様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：３２６５８
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０５４６０

研究課題名（和文）清酒醸造における低温長期の並行複発酵を可能とする、緩慢な糖生成のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of slow saccharification that enables long-term, low-temperature multiple-parallel fermentaion in sake brewing.

研究代表者

徳岡　昌文（Tokuoka, Masafumi）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：３０４４２５４４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：清酒醸造の特徴である並行複発酵における低温長期間のアルコール発酵の成立に必要な糖化のメカニズムについて、オリゴ糖の分解と生成の観点から検討を行った。清酒中オリゴ糖の構造解析と清酒醪中及びin vitroでのオリゴ糖の生成・分解メカニズムの解析から、清酒中のオリゴ糖には糖転移産物と澱粉分解物の両者が含まれること、これらの生成・分解には麹菌のα-グルコシダーゼAとBが関わることを明らかにした。また、阻害剤を用いた試験により、清酒醪中の分岐をもつオリゴ糖は緩やかに分解され、アルコール発酵のための糖供給に一定の寄与をしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究により、伝統的な清酒製造において、醪末期のアルコール発酵を支える糖の供給には分岐構造をもつオリゴ糖の緩慢な分解が一定の寄与をしていることが示された。この分岐構造を持つオリゴ糖の生成には、麹菌のα-グルコシダーゼAとBによる糖転移と分解が関わる。また、一部のオリゴ糖は澱粉分解により直接生成しており、澱粉の微細構造中に隣接した分岐が存在することを初めて明らかにした。その他に清酒中から新規のオリゴ糖や配糖体を発見した。以上の成果は伝統的な清酒醸造の科学的理解となるだけでなく、今後の清酒製造技術の発展の基盤となる有益な知見である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the details of saccharification necessary to establish the long-lasting, low-temperature fermentation that is a characteristic of traditional sake brewing. From the structural elucidation of oligosaccharides in sake and the analysis of the formation and degradation mechanisms of oligosaccharides in vitro and in fermentation mash, it was clarified that characteristic oligosaccharides in sake include both transglycosylation products and starch degradation products. Both alpha-glucosidase A and B of Aspergillus oryzae are involved in the formation and degradation of the oligosaccharide in sake. Inhibition tests revealed that branched oligosaccharides are slowly degraded in fermentation mash and make a certain contribution to the supply of sugar for alcohol fermentation.

研究分野：食品科学

キーワード：オリゴ糖　清酒　発酵　糖化　糖転移

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９，Ｆ－１９－１，Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

清酒造りは酵母によるアルコール発酵と麹菌酵素による糖化が並行して進む並行複発酵で行われる．中でも 10℃前後という低温下で 3 週間から 4 週間にわたって行われる清酒造りは，「吟醸造り」と呼ばれ，香味の優れた清酒を製造するための技術として広く普及している．一般的に清酒造りでは，醪の前半は原料米澱粉の溶解と酵母のアルコール発酵が旺盛であるが，後半ではアルコール濃度が高くなることによる酵母ストレスを緩和するために醪温度を下げる．これに伴い酵母のアルコール発酵は緩慢になるが，糖化によるグルコース供給も適度に抑制されることで，糖化とアルコール発酵のバランスのとれた発酵となる．実際に糖化の指標となる澱粉の「溶解率」は，もろみ前半に増加し，後半は穏やかになることが分かっている．すなわち，もろみの後期で糖の供給速度が緩慢になることは，長期間にわたる酵母によるアルコール発酵に必要であり，優れた品質の清酒を造る上で重要な要素であると言える．しかし，醪中の糖を詳細に解析する技術が無かったことから，この緩慢な糖化がなぜ可能であるのかを調べた研究は無かった．研究代表者らは清酒中のオリゴ糖の分析法を構築することで，清酒中のオリゴ糖は重合度が少なくとも 18 まであり，非還元末端側に分岐を有するβリミットデキストリンの構造を持つことを明らかにした(1)．さらにこれまでに報告のない新規構造の重合度 6，7，8 のオリゴ糖の存在を見出し，それらがグルコアミラーゼにより消化されにくいことを明らかにした(2)．一連の発見は，醪期間を経て清酒に残存するオリゴ糖が分岐を持つ，麹菌酵素による消化性の低い構造であり，もろみ後半においてはこれらオリゴ糖がゆっくりと分解されることで，糖が供給されていることを示唆するものであった．そこで，清酒醪において観察される糖化とアルコール発酵のバランスと清酒中のオリゴ糖の分解・生成との関連についての研究を行うこととした．

２．研究の目的

本研究は伝統的な清酒醸造における，低温長期のアルコール発酵を支えるオリゴ糖の分解と生成メカニズムを明らかにすることである．具体的には，未同定の清酒中のオリゴ糖の構造を明らかにしたうえで，その生成と分解メカニズムを明らかにし，実際の醪におけるグルコースの消費とオリゴ糖の分解による生成のバランスを解析する．これまでの知見を活かし，麹菌 *Aspergillus oryzae* のα-グルコシダーゼによる糖転移の可能性も考慮し，遺伝子破壊株や組換え酵素を用いた検討を行う．また，清酒中で見出されているオリゴ糖の醪中での分解について，LC-TOF/MS を用いた個別の詳細な分析から明らかにする．さらに阻害剤を活用することで，発酵で消費されるグルコース量とオリゴ糖分解で生成するグルコース量を推定する．特に醪後期における分岐オリゴ糖から生成するグルコースが全体に占める割合を明らかにすることで，オリゴ糖の分解と緩慢なアルコール発酵との関連を調べる．

３．研究の方法

(1)清酒中オリゴ糖の構造解析

清酒をエバポレーターで濃縮し，アルコールを除去した後，オリゴ糖を活性炭に吸着させ，Milli-Q 水及び 5%(v/v)エタノールでグルコース及び DP2 のオリゴ糖を溶出した後，10%エタノールでオリゴ糖を溶出させて分画した．得られたフラクションを濃縮後，分析カラム（SUGAR SZ5532，6.0ｘ150 ㎜，Shodex）を用いて分画を繰り返すことで精製品を得た．

(2)オリゴ糖の生成メカニズムの解析

①遺伝子破壊麹菌株の作製

*agdA* 遺伝子破壊株は既に取得しているものを用いた(3)．*agdB* 遺伝子破壊株は NS4Δ*ligD* 株(4)を親株として，麹菌のゲノム情報から+441～+2490 の領域を *A. nidulans* の *sC* 遺伝子に置換することで遺伝子破壊株を得た．また，Δ*agdA*Δ*agdB* 二重遺伝子破壊株(5)は東北大の五味教授より分譲頂いた．

②清酒の仕込みは酒母省略の 3 段仕込みを行い，原料米は山田錦（精米歩合 65%）を用いた．酵母は協会 901 号酵母を用い，総米 200g で 15℃一定で清酒を仕込んだ．サンプリングは適宜実施し，分析試料は 50%アセトニトリル溶液として LC-TOF/MS により分析した．

③*Pichia pastoris* による AgdA と AgdB の発現

市販されている *P. pastoris* X-33 株を用いた発現系（Invitrogen）を利用し，発現ベクターには ORF に *A. oryzae* のシグナル配列を除いた *agdA* と *agdB* をそれぞれ導入したプラスミドを作製し，エレクトロポレーションにより *P. pastoris* X-33 株へ形質転換した．取得した株は PCR により遺伝子導入を確認し，メタノールによる誘導により AgdA と AgdB を生産させた．取得したタンパク質は限外ろ過により濃縮し実験に用いた．In vitro 試験においては，$^{13}$C マルトースを糖転移のドナーとして用いた．

④隣接型分岐オリゴ糖 DP6-1 の由来の解析

山田錦を粉砕し 0.5g を 20 ml の酢酸緩衝液(20 mM，pH 5.0)に溶解し，これをオートクレーブで糊化した後，55℃まで温度が下がったところで 1,000 U のブタ膵臓α-アミラーゼを加えて 24 時間消化した．さらに 40 U のリゾプス由来グルコアミラーゼで 40℃で 24 時間消化し，生成物を確認した．重合度 6 のオリゴ糖の精製にはスケールアップした反応液を用い，分取カラム（Shodex HILICpak VN-50 10E，10㎜x250㎜）を用いてアイソクラティック溶出（70%アセトニ

トリル水）で溶出したオリゴ糖を集めることで精製した．NMR は既報(3)と同様に実施した．

(3) 清酒醪におけるオリゴ糖分解

総米 5 kg（山田錦 65%精米），K-901 酵母を用いて酒母省略 3 段仕込みを行った．温度は添と踊りを 15℃，仲 12℃，留 10℃とし，留後 1 日 1℃ずつ温度を上げ，13℃に達したところで温度上昇を止め，以降上槽まで 13℃一定で管理した．醪は留後 20 日目に遠心分離によって上槽した．

留後 5 日目，10 日目，15 日目においてサンプリングし，アカルボース及びカスタノスペルミンを終濃度 1000 ppm となるように添加した．この際，醪とは別に，遠心上清をフィルターろ過(0.22 μm)した試料も作り，1 日おきに LC-TOF/MS による糖分析を行った．

## ４．研究成果

### (1)清酒中オリゴ糖の構造解析

清酒中オリゴ糖の分解や生成を考える上で，構造は基本的な情報であることから，主要なオリゴ糖の構造解析に取組んだ．清酒中のオリゴ糖を LC-TOF/MS を用いて詳細に分析すると，強度が比較的強いにもかかわらず，清酒に含まれることが明らかになっているオリゴ糖標品と溶出時間が一致しないシグナルが複数検出された．これらは清酒で存在が確認できていないオリゴ糖と考えられたたことから，市販標品との溶出時間の比較を行ったところ，イソマルトシルマルトース，イソマルトトリオシル（iG3）マルトース，iG3 マルトトリオース，iG3 マルトテトラオース及び DP5 までのイソマルトオリゴ糖が見いだされた．さらに清酒からの精製と NMR 解析により，ニゲロシルグルコース，セントース，イソマルトトリオシル(iG3)グルコース（図 1）の存在も確認された．

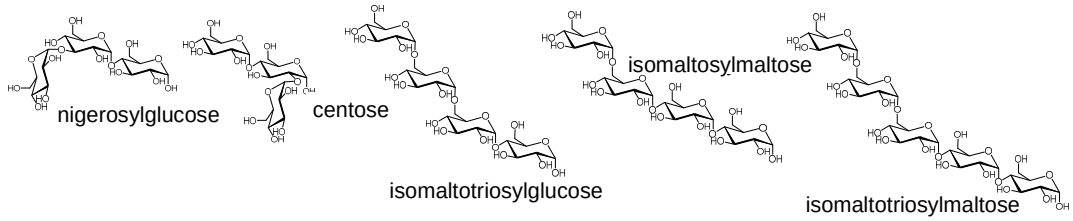


図 1. 本研究で新たに明らかになった清酒中のオリゴ糖（一部）

### (2) オリゴ糖の生成メカニズムの解析

#### ① 遺伝子破壊麹菌株を用いた検討

清酒中のオリゴ糖の構造は，原料の米澱粉の微細構造には含まれていない結合が含まれていることから，麹菌のα-グルコシダーゼによる糖転移で生成すると推定された．そこで，麹菌 *A. oryzae* の主要なグルコシダーゼであるα-グルコシダーゼ A 遺伝子 *agdA* とα-グルコシダーゼ B 遺伝子 *agdB* の各遺伝子破壊株，及び*Δagd*A*Δagd*B 二重遺伝子破壊株を用いて清酒を製造し，製成酒のオリゴ糖を分析した．その結果，イソマルトトリオシル基を持つオリゴ糖は AgdA の糖転移により，α-1,2 結合又はα-1,3 結合をもつオリゴ糖は AgdB の糖転移により，清酒製造過程で生成することが示唆された．

#### ②清酒醪におけるオリゴ糖の消長

清酒オリゴ糖の生成と分解を理解する上で，各オリゴ糖の清酒醪中での消長を詳細に調べた．単一ピークとして判別できる 21 種のオリゴ糖についてピーク強度から個別に消長を確認したところ，マルトオリゴ糖が醪の留後 4～6 日目までに急激に減少するのに対して，イソマルトオリゴ糖は 5-12 日目までの間，イソマルトトリオシル基を持つオリゴ糖は 7-9 日目まで増加後に減少する消長となった．また隣接型分岐を持つオリゴ糖については，DP6-1 は醪期間を通じて減少，DP7-1 は醪期間を通じて漸減と，特徴的な消長をすることが明らかとなった．全体の傾向としては，分岐を持つオリゴ糖は醪後半では糖転移による合成は抑制され，分解が進行すると予想された．

#### ② 組換え AgdA と AgdB によるオリゴ糖の生成及び分解試験

遺伝子破壊麹菌株での清酒の解析から，AgdA と Agd の各オリゴ糖の生成と分解への影響が明らかになった．そこで，さらにそれぞれの酵素を *P. pastoris* による異種発現系を構築することで組換え酵素として調製し，これを用いて清酒醪の留後 7 日目のろ液をアクセプター基質溶液とした糖転移試験を試みた．$^{13}$C マルトースをドナー基質として用いることで，糖転移産物はグルコース 1 分子の炭素原子分に相当する+6 の特徴的なシグナルとして，マススペクトル上で検出されるようにした．通常の醪よりもマルトース濃度と各酵素の活性ともに高い条件であることから，醪での反応をそのまま反映しているとは考えにくいものの，サケビオースとニゲロシル

グルコースは AgdB が特異的に，イソマルトトリオースは AgdA 特異的に合成されることが確認された（図 2）。DP7-1 は AgdA，AgdB とも該当するシグナルが検出されなかったことから，DP7-1 は清酒製造工程における糖転移では生成しない可能性が示された（図 2）．また，研究当初より謎であったグルコアミラーゼで分解されにくい隣接型分岐を持つオリゴ糖については，DP6-1 は AgdB により分解されることが分かったことから，醪後期での DP6-1 漸減は AgdB の作用によることが強く示唆された．

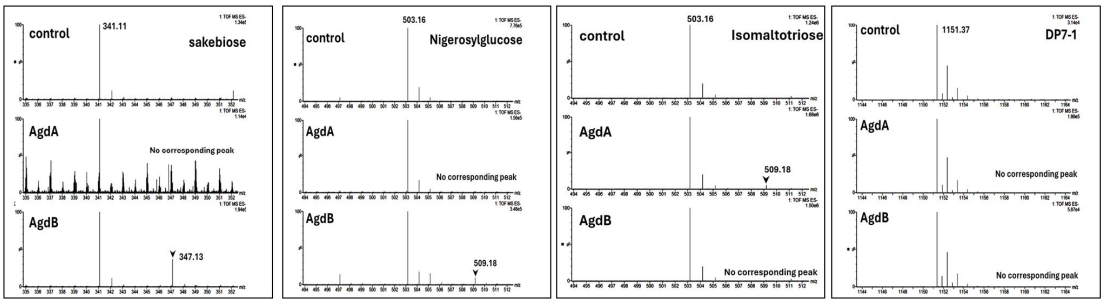


図 2 組換え AgdA と AgdB、$^{13}C$ ラベル化マルトース、醪留後 7 日目ろ液を用いた糖転移試験（抜粋）

矢じりは糖転移により生成したオリゴ糖のシグナル。

④隣接型分岐オリゴ糖 DP6-1 の由来の解析

清酒から見いだされたオリゴ糖 DP6-1 は隣接した分岐(α-1,6 結合)を非還元末端側にもつ特徴的な構造のオリゴ糖である．澱粉構造中にはこのような分岐は存在しないと予想されていたことから，糖転移での生成が推定された．しかし，①の実験において，*agdA* と *agdB* の遺伝子破壊の影響をほとんど受けなかったことから，DP6-1 は清酒製造工程においては糖転移で生成しないと予想された．そこで，澱粉の分解物である可能性について検証した．米粉をα化し，糖転移活性が無いことが知られる豚膵臓α-アミラーゼとグルコアミラーゼで十分に分解し，生成した重合度 6 のオリゴ糖の構造を NMR で調べたところ，DP6-1 と一致した（図 3）．この結果より澱粉の微細構造に隣接型分岐が存在することが初めて明らかとなった．また，隣接型分岐は澱粉構造中の分岐の 1/100 程度と推定された．また DP7-1 も澱粉の分解物から得られたことから，両オリゴ糖は糖転移ではなく，澱粉分解残渣として生成することが示唆された．

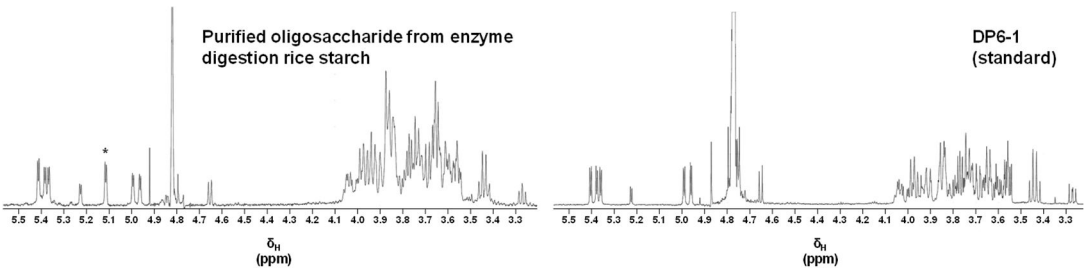


図 3．澱粉分解残渣中 DP6 オリゴ糖と DP6-1 の H NMR チャートの比較

*は夾雑糖に由来

(3)清酒醪におけるオリゴ糖分解

ここまでの研究により，清酒中の分岐オリゴ糖は糖転移産物と澱粉分解残渣の両者で構成されることが明らかとなった．分岐を含むオリゴ糖のグルコース生成への寄与を確認するために，α-グルコシダーゼとグルコアミラーゼの阻害剤を用いた試験を実施した．留後 15 日目における 24 時間でのアルコール生成量とグルコース濃度変化から換算されるグルコース生成量は 1.02%であった．一方，阻害剤添加試験から，24 時間でマルトースとマルトトリオースの分解で生成したグルコースは 0.39%と推定された．したがって，その差分である 0.63%が分岐オリゴ糖の分解で生成したグルコースと推定された．この結果より，醪の 15 日目において，醪で生成するグルコースの約 2/3 は分岐オリゴ糖に由来していると予想された．これら分岐オリゴ糖(2)-②の実験から，オリゴ糖の多くはもろみ後半には漸減することからも，醪におけるグルコース供給にはこれらオリゴ糖のゆっくりとした分解がグルコース供給に寄与していることが示唆された．しかし，LC-TOF/MS によるオリゴ糖の精密な定量については標品が必要であり，標品が入手できるマルトースとマルトトリオースのみを定量し，それを全体から差し引くという計算を行ってい

る点に課題を残しており，各分岐オリゴ糖の定量技術の構築がより正確な寄与の推定には必要である．

（4）その他の成果

清酒中のオリゴ糖の分析の過程において，清酒中の糖と糖アルコールの配糖体を発見した．エリスリトール，アラビトール，マンニトール，ソルビトールとグルコースの配糖体と予想されるシグナルを LC-TOF/MS で検出した．組換え AgdA を用いて in vitro でエリスリトールとマルトースを基質とした糖転移試験を実施したところ，清酒と一致する MS/MS フラグメントを持つ化合物が得られた．NMR 解析より，この化合物が 2 種類の構造異性体からなるグルコシルエリスリトールであることが分かった．


1. **Tokuoka, M., Honda, C., Totsuka, A., Shindo, H., and Hosaka, M.:** Analysis of the oligosaccharides in Japanese rice wine, sake, by hydrophilic interaction liquid chromatography-time-of-flight/mass spectrometry, J Biosci Bioeng, **124**, 171-177 (2017).
2. **Honda, C., Katsuta, R., Yamada, M., Kojima, Y., Mamiya, A., Okada, N., Kawamura, T., Totsuka, A., Shindo, H., Hosaka, M., Nukada, T., and Tokuoka, M.:** Novel glucoamylase-resistant gluco-oligosaccharides with adjacent α-1, 6 branches at the non-reducing end discovered in Japanese rice wine, sake, Carbohydrate polymers, **251**, 116993 (2021).
3. **Kojima, Y., Honda, C., Kobayashi, I., Katsuta, R., Matsumura, S., Wagatsuma, I., Takehisa, M., Shindo, H., Hosaka, M., Nukada, T., and Tokuoka, M.:** Transglycosylation Forms Novel Glycoside Ethyl alpha-Maltoside and Ethyl alpha-Isomaltoside in Sake during the Brewing Process by alpha-Glucosidase A of Aspergillus oryzae, J Agric Food Chem, **68**, 1419-1426 (2020).
4. **Mizutani, O., Kudo, Y., Saito, A., Matsuura, T., Inoue, H., Abe, K., and Gomi, K.:** A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in Aspergillus oryzae, Fungal Genet Biol, **45**, 878-889 (2008).
5. **Ichikawa, T., Tanaka, M., Watanabe, T., Zhan, S., Watanabe, A., Shintani, T., and Gomi, K.:** Crucial role of the intracellular α-glucosidase MalT in the activation of the transcription factor AmyR essential for amylolytic gene expression in Aspergillus oryzae, Biosci Biotechnol Biochem, **85**, 2076-2083 (2021).

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Honda Chihiro、Kaneko Ayaka、Katsuta Ryo、Tokuoka Masafumi | ４．巻<br>519 |
| ２．論文標題<br>Adjacent double branches exist in the branching structure of starch | ５．発行年<br>2022年 |
| ３．雑誌名<br>Carbohydrate Research | ６．最初と最後の頁<br>108628～108628 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.carres.2022.108628 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>本田千尋、徳岡昌文 | ４．巻<br>108 |
| ２．論文標題<br>清酒中オリゴ糖の網羅的分析とユニークな新規オリゴ糖の発見 | ５．発行年<br>2021年 |
| ３．雑誌名<br>日本醸造協会誌 | ６．最初と最後の頁<br>819-825 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし | 査読の有無<br>無 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>徳岡昌文 | ４．巻<br>102 |
| ２．論文標題<br>清酒中の未知オリゴ糖に関する研究 | ５．発行年<br>2024年 |
| ３．雑誌名<br>生物工学会誌 | ６．最初と最後の頁<br>96-102 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし | 査読の有無<br>無 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

〔学会発表〕　計10件（うち招待講演　3件／うち国際学会　0件）

| |
|---|
| １．発表者名<br>本田千尋、勝田亮、進藤斉、穂坂賢、徳岡昌文 |
| ２．発表標題<br>澱粉の酵素消化により得られた重合度8以上のオリゴ糖の構造解析 |
| ３．学会等名<br>日本農芸化学会2023年度大会 |
| ４．発表年<br>2023年 |

１．発表者名
山田明日香、金本湧太、吉澤耕、小林泉美、本田千尋、竹久まや、進藤斉、穂坂賢、徳岡昌文

２．発表標題
組換え酵素を用いた清酒オリゴ糖生成メカニズムの解析

３．学会等名
日本農芸化学会2023年度大会

４．発表年
2023年

１．発表者名
吉澤 耕、勝田 亮、山田 明日香、小林 泉美、本田 千尋、進藤 斉、穂坂 賢、徳岡 昌文

２．発表標題
清酒中の未同定糖アルコール配糖体に関する研究

３．学会等名
日本農芸化学会2023年度大会

４．発表年
2023年

１．発表者名
竹久まや

２．発表標題
清酒から新たに見出されたオリゴ糖の構造解析

３．学会等名
日本農芸化学会2022年度大会

４．発表年
2022年

１．発表者名
徳岡昌文

２．発表標題
清酒から見つかった新規オリゴ糖

３．学会等名
日本応用糖質科学会　中部支部名古屋講演会（招待講演）

４．発表年
2021年

１．発表者名
徳岡昌文

２．発表標題
清酒中のオリゴ糖について

３．学会等名
第61回　澱粉研究懇談会（招待講演）

４．発表年
2022年

１．発表者名
徳岡昌文

２．発表標題
清酒中の未知オリゴ糖に関する研究

３．学会等名
第75回　日本生物工学会大会（招待講演）

４．発表年
2023年

１．発表者名
吉澤耕、山田明日香、勝田亮、小林泉美、本田千尋、進藤斉、穂坂賢、徳岡昌文

２．発表標題
清酒中に含まれる糖アルコール配糖体の探索

３．学会等名
第75回　日本生物工学会大会

４．発表年
2023年

１．発表者名
秋山唯、本田千尋、吉澤耕、山田明日香、小林泉美、徳岡昌文、熊澤茂則

２．発表標題
清酒中から発見された配糖体の構造解析

３．学会等名
日本農芸化学会2024年度大会

４．発表年
2024年

| |
|---|
| １．発表者名<br>六倉春樹、本田千尋、中山俊一、岡田奈々子、馬宮綾音、進藤斉、穂坂賢、徳岡昌文 |
| ２．発表標題<br>清酒中オリゴ糖による香気成分の揮発抑制効果 |
| ３．学会等名<br>日本農芸化学会2024年度大会 |
| ４．発表年<br>2024年 |

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

| 産業財産権の名称 | 発明者 | 権利者 |
|---|---|---|
| 難消化性オリゴ糖の製造方法 | 徳岡昌文 | 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 | 出願年 | 国内・外国の別 |
| 特許、特願2021-143307 | 2021年 | 国内 |

〔取得〕　計0件

〔その他〕

―

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---|---|