

## 清酒麴の酵素活性に及ぼす原料米タンパク質組成の影響

岩野君夫, 中沢伸重, 伊藤俊彦, 高橋 仁\*, 上原泰樹\*\*, 松永隆司  
(秋田県立大学, \*秋田県総合食品研究所, \*\*中央農業総合研究センター・北陸地域基盤研究部)

平成 13 年 6 月 28 日受理

### The influence of protein components in raw material rice on various enzyme activities in sake-koji.

Kimio IWANO, Nobushige NAKAZAWA, Toshihiko ITO,  
Hitoshi TAKAHASHI, Yasuki UEHARA, Ryuji MATSUNAGA

(Akita Prefectural University, Nakano Shimo-Shinryo, Akita 010-0195, \*Akita Research  
Institute of Food & Brewing, Araya-machi, Akita 010-1623, National Agricultural  
Research Center, Dept. of Rice Research, Inada 1-2-1, Joetsu, 943 0193)

It was examined whether the protein components of raw material rice influence enzyme production by the Koji fungus. The ratio of the protein components varied greatly among the varieties of raw material rice. A negative high correlation was recognized between prolamin and glutelin, and a positive high correlation was recognized between prolamin and globulin. Furthermore, a negative high correlation was recognized between glutelin and globulin. High levels of activity for  $\alpha$ -amylase and glucoamylase were caused by raw material rice which contained low levels of prolamin and globulin and high levels of glutelin. Acid protease activity was intense in the raw material which had high levels of globulin and low levels of glutelin. Interestingly, acid carboxypeptidase was not at all influenced by the protein components of the raw material rice.

**Key words :** 製麴, 酵素生産, タンパク質組成

### 緒 言

原料米の醸造適性については酒米研究会による酒造用原料米分析法があり, 一般的に酒造好適米としては低タンパク質で吸水性が良い品種が優れているとされている。米のタンパク質は, 溶解度による分類から 60-90% エタノールに可溶性のタンパク質であるプロラミン, 水および中性塩溶液に不溶で希酸または希アルカリ可溶性のタンパク質であるグルテリン, 塩類と希酸および希アルカリ可溶性のグロブリン (26 kD) などがあり, SDS-PAGE 電気泳動で分離定量されている<sup>1,2)</sup>。

米の胚乳細胞中ではプロラミンはプロテインボディ

I, グルテリンとグロブリンはプロテインボディ II と呼ばれる顆粒に集積して含まれている<sup>3)</sup>。プロテインボディ I は難消化性タンパク質, プロテインボディ II は易消化性タンパク質と分類されており, その生合成と集積については遺伝子工学的な手法により解明が進んでいる<sup>3)</sup>。

酒造用白米のタンパク質組成については, すでに木崎らはプロテインボディの分離・定量法を設定し<sup>4)</sup>, さらに 120 点の酒造原料米を集めてプロテインボディ I, II の品種間差異を調べて報告している<sup>5)</sup>。

筆者等は, 原料米のタンパク質組成の違いは, 製麴工程において麴菌の発育に影響し, その結果として酵素活性の異なった麴ができるのではないかと推察し,

農林水産省北陸農業試験場が腎臓病患者の病態食向けとして開発した低グルテリン米<sup>6)</sup>の「春陽（旧系統名北陸183号）」と従来の酒造好適米3品種を用いて製麴試験を行ない、原料米のタンパク質組成の酵素生産に及ぼす影響を調べた。その結果、原料米のプロラミン、グルテリン、グロブリンの構成比が $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼの生産に大きく影響することを観察したので報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 原料米の品種

原料米は、平成12年産の山田錦（兵庫県産）、美山錦（秋田県産）、美郷錦（低タンパク質を特徴として秋田県で育種された新品種）および春陽（大潟村試験栽培）の4品種を用いた。白米の調製は、佐竹のテストミルを用いて70%まで精米した。

### 2. 原料白米のタンパク質の抽出と SDS-PAGE

白米のタンパク質の抽出は、農林水産省の方法<sup>6,7,8)</sup>で行った。すなわち白米1粒を硫酸紙でつつみ、ペンチで破碎して、1.5ml エッペンドルフチューブに移し、タンパク質抽出液700 $\mu$ lを加えてよく混ぜ、横にして翌日まで静置してタンパク質を抽出し、10,000 $\times$ gで遠心分離して上清をとり、この10 $\mu$ lをSDS-PAGEのゲルにチャージした。タンパク質抽出液はSDS 4g, 尿素 48g, グリセリン 20g, トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 1.51gを蒸留水で溶解し、塩酸でpH 6.8に調整し、メルカプトエタノール 5g（約4.5ml）を加え、100mlとしたものを用いた。SDS-PAGEは、12.5%濃度のゲルを作成し、1品種につき3粒のタンパク質組成を調べた。染色は、クーマシーブリリアントブルー R 250で行なった。タンパク質は、ルミノ・イメージアナライザー LAS-1000 plus（Fujifilm）で画像を取り込み、定量計算はImage Gauge（Fujifilm）ソフトで染色濃度を定量した。タンパク質組成は、76 kD以上前駆体、57 kD前駆体、37-39 kD グルテリン a、26 kD グロブリン、22-23 kD グルテリン b、16 kD プロラミン、13 kD プロラミンに区分して定量し、全体を100%としたそれぞれのパーセントで示した。

### 3. 製麴方法

製麴は恒温恒湿機（LH 20-11 P、㈱ナガノ科学機器製作所）を用いて温度、湿度をプログラムして行った。製麴容器は、ポリプロピレン製タッパー（W 120 $\times$ L 170 $\times$ D 55 mm）を用い、白米 200 g の製麴を行った。蒸米（白米 100 g）に種麴（秋田今野モヤシ、膠用）を散布した後、タッパーの半分まで寄せろ紙で表面を覆いタッパーの蓋をして20時間（温度 30 $^{\circ}$ C、湿度 95%）の床期間をとり、手入れ後、蒸米をタッパーの全面に広げ、ろ紙および蓋を取り除いてオープンとし、以後 34 $^{\circ}$ C（湿度 95%）で8時間、38 $^{\circ}$ C（湿度 90%）で5時間、40 $^{\circ}$ C（湿度 85%）で12時間、全製麴時間 45 時間の製麴を行った。2回目および3回目の製麴は、34 $^{\circ}$ Cと38 $^{\circ}$ Cの製麴時間を4時間と短縮し40 $^{\circ}$ Cでの製麴時間を長くしたプログラムで製麴を行った。

### 4. 酵素活性の測定

$\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼは国税庁所定分析法<sup>9)</sup>により、酸性ホスファターゼは既報<sup>10)</sup>に従い活性を測定した。

## 実 験 結 果

### 1. 原料米の品種特性

酒造用原料米全国統一分析法による玄米および70%白米の分析結果をTable-1に示した。4品種とも玄米の千粒重は27g前後で大粒米に属する。玄米の粗タンパク質と70%白米の粗タンパク質を比べてみると、美郷錦が低いが他の3品種はほぼ同じであった。

### 2. 原料白米の蛋白質組成

4品種の70%白米のタンパク質組成を調べた。SDS-PAGEの結果をFig. 1に、タンパク質組成を定量した結果を3粒の平均値としてTable-2に示した。易消化性タンパク質を比べてみると、春陽が48.1%と最も低く、次いで山田錦69.9%、美山錦74.4%、美郷錦76.9%の順番であった。難消化性タンパク質は逆に春陽が最も高く51.9%、次いで山田錦30.1%、美山錦25.6%、美郷錦が最も低く23.1%であった。易消化性タンパク質の構成比を比較すると春陽は他の3品種と比べてグロブリンが多くグルテリンが少ない。

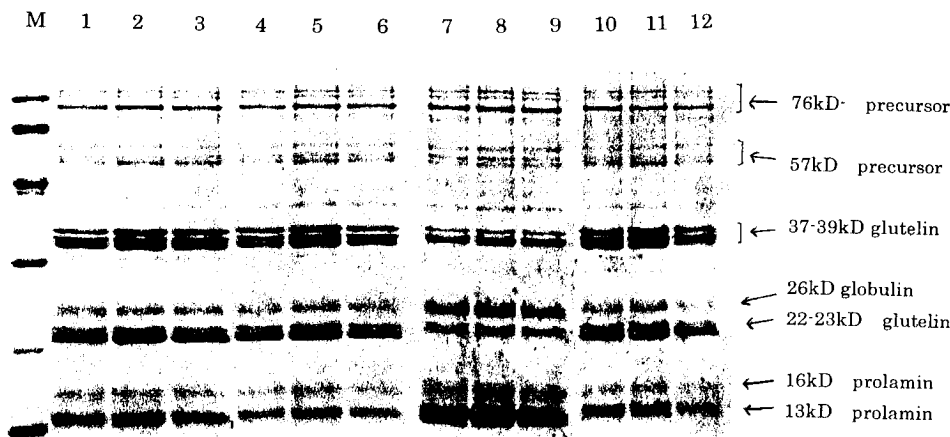
**Table 1** Properties of various rice strains.

	<i>Yamadanishiki</i>	<i>Misatonishiki</i>	<i>Shunyou</i>	<i>Miyamanishiki</i>	
Raw rice	1,000 g weight(g)	27.2	26.3	27.2	27.0
	Normal grain ratio(%)	93.8	93.1	90.6	93.9
	Water content(%)	16.0	16.9	13.5	15.7
	Protein content(%)	7.7	6.8	7.8	7.9
70 % polished rice	Water content(%)	13.6	13.4	13.2	13.3
	Protein content(%)	4.8	4.0	4.9	4.5
	Potassium(ppm)	358.0	436.0	338.0	389.0
	Amylose(%)	19.8	18.6	21.4	18.8
	20 min water absorption rate(%)	30.5	29.5	25.0	29.2
	120 min water absorption rate(%)	31.5	31.2	32.3	30.9
	Steamed rice water absorption rate(%)	36.3	36.1	37.6	34.8
	Brix sugar(%)	9.3	9.6	7.8	9.8
	Amino acid(ml)	0.3	0.4	0.3	0.5
	Glucose(%)	4.4	5.1	4.9	4.8
	Amount of saccharification liquid(ml)	43.7	42.5	40.5	42.3

難消化性タンパク質の構成比を比較すると 16 kD プロラミンは品種間の違いは小さく、13 kD プロラミンの品種間の違いが大きい。タンパク質組成間の相関関係を調べてみると Table-3 に示したように 13 kD プロラミンは 22-23 kD グルテリン、37-39 kD グルテリンとの間に極めて高い負の相関関係が認められ、16 kD プロラミン及び 26 kD グロブリンとは正の相関関係が認められた。22-23 kD グルテリンと 37-39 kD グ

ルテリンの間には極めて高い正の相関関係がみられたが、両グルテリンと 26 kD グロブリンとの間には高い負の相関関係があった。これらの結果は易消化性タンパク質であるプロテインボディ II を構成するグルテリンとグロブリンの構成比は原料米品種によって異なることを示すものである。

**3. 麴の各種酵素生産に及ぼす原料米タンパク質組成**



**Fig. 1** SDS-PAGE of the protein composition of the raw material rice.

M ; Molecular weight maker proteins (phosphorylase, 97 kD ; bovine serum albumin, 66 kD ; ovalbumin, 45 kD ; carbonic anhydrase, 30 kD ; trypsin inhibitor, 20.1 kD ;  $\alpha$ -lactalbumin, 14.4 kD).  
 Lane 1,2,3 ; Yamadanishiki. Lane 4,5,6 ; Misatonishiki. Lane 7,8,9 ; Shunyou. Lane 10,11,12 ; Miyamanishiki.

**Table 2** The protein composition ratio of the raw material rice (%)

Varieties of rice	polishing rate(%)	Digest well protein					Digest poorly protein			
		76 kD- precursor	57 kD precursor	37-39 kD glutelin a	26 kD globulin	22-23 kD glutelin b	Total	16 kD prolamin	13 kD prolamin	Total
<i>Yamadanishiki</i>	69.8	5.2	5.4	27.6	8.4	23.3	69.9	10.6	19.5	30.1
<i>Misatonishiki</i>	68.3	7.4	5.3	29.8	10.0	24.3	76.9	10.3	12.7	23.1
<i>Shunyou</i>	70.0	6.2	3.7	12.7	15.2	10.4	48.1	12.7	39.2	51.9
<i>Miyamanishiki</i>	70.0	9.8	6.1	29.9	5.4	23.3	74.4	8.2	17.4	25.6

**Table 3** Correlations for the protein composition of the raw material rice

	13 kD	16 kD	22-23 kD	26 kD	37-39 kD	57 kD	76 kD-
13 kD prolamin	1	0.5816*	-0.9659**	0.6585*	-0.9147**	-0.5928*	-0.3773
16 kD prolamin		1	-0.5986*	0.3721	-0.5681	-0.6698*	-0.5050
22-23 kD glutelin b			1	-0.7036*	0.9109**	0.5072	0.2887
26 kD globulin				1	-0.8483**	-0.3044	-0.3390
37-39 kD glutelin a					1	0.4397	0.2662
57 kD precursor						1	0.5466
76 kD- precursor							1

相関係数の有意性の検定は  $|r| > r(n-2, \alpha)$  の式で行った。

ここで、n は試料数、 $\alpha$  は危険率を示す。

\*\* ; 危険率 1% で有意 ( $r(10, 0.01) = 0.7079$ )

\* ; 危険率 5% で有意 ( $r(10, 0.05) = 0.5760$ )

4 品種の原料白米を用いて製麴条件をかえて 3 回製麴を行った。酵素活性を Table-4 に、原料米のタンパク質組成と麴の酵素活性との相関関係を調べた結果を Table-5 に示した。 $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性において、春陽は他の品種に比べて低い傾向が認められた。酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼ活性において、春陽は他の 3 品種に比べて高い傾向がみられた。原料米のタンパク質組成と酵素活性との相関は Table-5 から明らかのように、 $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼはほぼ同じ傾向が認められ、22-23 kD グルテリンおよび 37-39 kD グルテリンとの間に高い正の相関関係があり、13 kD プロラミン、16 kD プロラミンおよび 26 kD グロブリンとの間に高い負の相関関係が認められた。酸性プロテアーゼは 26 kD グロブリンとの間に正の高い相関関係があり、22-23 kD グルテリンと 37-39 kD グルテリンとの間に高い負の相関関係が認められた。酸性プロテアーゼと 13 kD プロラミンと 16 kD プロラミンとの間にも正の相関関係が認められたが、グロブリンやグルテリンよりも低かった。酸性カルボキシペプチ

ダーゼはタンパク質組成との間には相関関係が認められなかった。以上の相関分析の結果から、麴米との適性評価を酵素生産の観点から眺めると、プロテインボディ I とプロテインボディ II の比よりもプロラミン、グルテリン、グロブリンの構成比がより重要であることが明らかとなった。春陽の  $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼ活性が低かったのは 13 kD プロラミンが極端に多く、22-23 kD グルテリンと 37-39 kD グルテリンが低い結果であり、酸性プロテアーゼ活性が高かったのは 26 kD グロブリンが多かったためと推論される。山田錦と美山錦は酸性プロテアーゼ活性が低いが 26 kD グロブリンが少ないためと推察される。

清酒醸造でアミノ酸の生成に深く関わる酸性カルボキシペプチダーゼは原料米のタンパク質組成とはほとんど無関係であったことは、原料米の品種選択よりも麴造りの技術が重要であることを示唆するもので興味深い。

## 考 察

製麴工程における麴菌の酵素生産に及ぼす要因につ

**Table 4** The enzyme activities of the koji produced with various raw material rice strains.

		<i>Yamadanishiki</i>	<i>Misatonishiki</i>	<i>Shunyou</i>	<i>Miyamanishiki</i>
$\alpha$ -amylase	Koji-1	568	752	485	679
	koji-2	701	634	459	842
	koji-3	574	682	418	720
Glucoamylase	koji-1	154	171	120	163
	koji-2	136	153	81	142
	koji-3	141	163	114	161
Acid protease	koji-1	1,781	2,254	2,775	2,024
	koji-2	1,442	1,902	2,169	1,818
	koji-3	1,995	2,069	2,656	1,848
Acid carboxypeptidase	koji-1	3,723	4,554	5,481	3,874
	koji-2	2,249	2,967	3,289	2,759
	koji-3	3,531	4,308	5,010	3,829

Activity : units/g-koji

**Table 5** Correlations of the raw material rice protein composition and enzyme production (Correlation coefficient)

	Raw material rice protein composition						
	13 kD prolamin precursor	16 kD prolamin	22 23 kD glutelin b	26 kD globulin	37-39 kD glutelin	57 kD	76 kD-
$\alpha$ Amylase	-0.8216**	-0.8584**	0.8119**	0.8207**	0.8505**	0.8581**	0.6338*
Glucoamylase	-0.8876**	-0.7345**	0.8659**	-0.7263**	0.8770**	0.8009**	0.4416
Acid protease	0.6664*	0.6101*	-0.7438**	0.7392**	-0.7255**	-0.7451**	-0.1153
Acid carboxypeptidase	0.3183	0.3287	-0.3728	0.4087	-0.3638	-0.3982	-0.0529

相関係数の有意性の検定は $|r| > r(n-2, \alpha)$ の式で行った。

ここで、nは試料数、 $\alpha$ は危険率を示す。

\*\* : 危険率1%で有意 (r(10, 0.01) = 0.7079)

\* : 危険率5%で有意 (r(10, 0.05) = 0.5760)

いて、製麴温度の影響、蒸米水分の影響、種麴接種量の影響、精米歩合の影響、菌体増殖量と酵素生産との関係など多くの研究が行われ清酒製造技術（(財)日本醸造協会）にこれまでの研究成果が詳しく記述されている<sup>9)</sup>。今回、筆者等は原料米のタンパク質組成が酵素生産に及ぼす影響について検討したが、その結果予想以上に原料米のタンパク質組成 プロラミン、グルテリンおよびグロブリンの構成比が酸性プロテアーゼの生産のみならず $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼの生産にまで大きく影響するという新しい知見が得られた。麴菌が蒸米上で生育する過程で胚乳細胞のタンパク質組成の違いが麴菌の増殖に何らかの影響を及ぼしていることが容易に推論される。今回の知見は、酒造好適米のタンパク質組成が麴米としての適性評価

の1つの指標となり得ることを示すものと考えられる。清酒麴の様々な酵素の活性量や活性バランスが清酒麴の並行複発酵や製成酒の品質へ及ぼす影響についての筆者等の知見<sup>10-22)</sup>から、麴中での蒸米の溶解には $\alpha$ -アミラーゼと酸性プロテアーゼ活性が高いことが重要であり、糖化と発酵にはグルコアミラーゼ活性が高いことが重要であることが分かっている。今回の結果から $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼを高めるには難消化性タンパク質で構成されるプロテインボディIが少なくプロテインボディIIの多い原料米で、酸性プロテアーゼを高めるにはプロテインボディIIを構成するグルテリンとグロブリンの比率が適正なバランスの原料米が麴米としての評価されるのではないかと考える。

要 約

1. 麹菌の酵素生産に及ぼす原料米のタンパク質組成の影響について検討した。原料米のタンパク質組成の構成比は品種によって大きく異なり、プロラミンはグロブリンと正の高い相関関係、グルテリンと負の高い相関関係が認められた。さらに、易消化性タンパク質を構成するグルテリンとグロブリンとの間には負の高い相関関係が認められた。
2. デンプン分解酵素の $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼは、グルテリンが多くプロラミンとグロブリンが少ない原料米において酵素生産が多かった。
3. 酸性プロテアーゼは、グロブリンが多くグルテリンが少ない原料米において酵素生産が多かった。
4. 酸性カルボキシペプチダーゼは、原料米のタンパク質組成とは全く有意な相関関係が認められなかった。  
終わりに春陽を提供していただいた増永寛氏（ジーンバンク事業による実証圃担当農家）に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Masahiro Ogawa, Toshihiro Kumamaru, Hikaru Satoh, Nobuo Iwata, Takeshi Omura, Zenzaburo Kasai and Kunisuke Tanaka; *Plant Cell Physiol.* 28(8), 1517-1527 (1987)
- 2) 増村威宏, 田中国介; *醸協誌*, 88(6), 414-420 (1993)
- 3) Kunisuke Tanaka, Toshio Sugimoto, Masahiro Ogawa and Zenzaburo Kasai; *Agric. Biol. Chem.*, 44(7), 1633-1639 (1980)
- 4) 木崎康造, 井上康裕, 岡崎直人, 小林信也; *醸協誌*, 86(4), 293-298 (1991)
- 5) 木崎康造, 小原 昭, 逸見彰則, 荒巻 巧, 小林信也, 岡崎直人; *醸協誌*, 88(4), 326-331 (1993)

- 6) 北陸農業試験場 新品種決定に関する参考成績書 平成13年3月
- 7) 西尾 剛; 農業研究センター研究資料(第30号), 50-53, イネ育種マニュアル, 平成7年10月31日
- 8) 山本隆一・堀末登・池田良一共編 イネ育種マニュアル 養賢堂(1996年2月)
- 9) (財)日本醸造協会編, 第四回改正国税庁所定分析法注解, 平成5年
- 10) (財)日本醸造協会編, 増補改訂清酒製造技術, 1998
- 11) 布川弥太郎, 岩野君夫, 風間敬夫; *醸協誌*, 71(8), 650-653 (1976)
- 12) 岩野君夫, 布川弥太郎; *醸協誌*, 71(12), 943-947 (1976)
- 13) 岩野君夫, 布川弥太郎; *醸協誌*, 72(1), 78-81 (1977)
- 14) 岩野君夫, 布川弥太郎; *醸協誌*, 73(7), 555-557 (1978)
- 15) 岩野君夫, 柴田和宏, 布川弥太郎; *醸協誌*, 72(7), 521-525 (1977)
- 16) 布川弥太郎, 飯塚尚彦, 岩野君夫, 斎藤和夫; *醸協誌*, 76(4), 267-271 (1981)
- 17) 岩野君夫, 飯塚尚彦, 斎藤和夫, 布川弥太郎; *醸協誌*, 76(4), 272-275 (1981)
- 18) 布川弥太郎, 椎木 敏, 岩野君夫, 斎藤和夫; *醸協誌*, 76(5), 350-353 (1981)
- 19) 岡部正人, 桜田博克, 清水弘人, 中谷俊多美, 三上重明, 岩野君夫; *醸協誌*, 91(3), 203-208 (1996)
- 20) 清水弘人, 中谷俊多美, 岡部正人, 三上重明, 岩野君夫; *醸協誌*, 91(5), 362-366 (1996)
- 21) 岩野君夫, 三上重明, 尾崎博己, 天野 仁; *醸協誌*, 95(8), 607-612 (2000)
- 22) 岩野君夫, 三上重明, 磯谷敦子, 天野 仁, 佐藤深雪; *醸協誌*, 95(9), 672-678 (2000)