

報 文

α -エチル-D-グルコシド高含有清酒の製造法の開発とその保湿効果

坊垣隆之^{*1,3}、相良純一²、尾関健二^{1,2}
(投稿日：2015.9.3、受理日：2015.11.11)

清酒黄麹菌に比べ焼酎黒麹菌の α -グルコシダーゼの方が清酒仕込で失活が少なく、清酒中の α -エチル-D-グルコシド(α -EG)が高生産となった。3% (wt/vol) 以上の α -EG高含有の清酒仕込は、麹歩合を10%にし、減らした分の α -アミラーゼ活性と α -グルコシダーゼ活性を酵素剤で補填し、焼酎酵母で発酵することにより醸造できることが分かった。2.5% α -EGを含有する清酒で、ヒト肌での120分後の水分保持量に有意差が認められたが、 α -EG単独では認められず、清酒中の発酵物との相乗効果によることが示唆された。

キーワード：エチル α -D-グルコシド、天然保湿成分、保湿機能、清酒、焼酎麹

1. 諸言

清酒は1990年代のバブル経済の破たんと共に毎年消費量が減少しており、「国酒」としての復権が望まれる。清酒はその製造工程で、酒母での乳酸菌発酵、麹菌での製麹、酵母のアルコール発酵の各種微生物の発酵産物が巧みに利用されている醸造酒である。伝承的に清酒の飲む量が多い、杜氏、蔵人、相撲取りは肌に弾力があり艶があると言われてきた。この起因となる物質が α -EGであることが、動物実験で紫外線による荒れ肌改善効果で証明されている[1]。また1% α -EGを含有する清酒を270 ml飲用すると、ヒトの肘角層水分量に有意差が認

められた[2]。

α -EGは動物実験で小腸からグルコーストランスポーターを介して吸収され、投与後1時間で血中濃度はピークとなり、半減期は約4時間で24時間後には約87%が尿中に排泄される[3]。また機能性として、動物実験でガラクトサミン誘発肝障害の抑制作用[4]、ヒトで入浴剤としての保湿効果[5]が報告されている。

市販清酒中に α -EGは0.2-0.7%含有し、速攻性の甘みと遅効性の苦みを持つ呈味成分であり、0.3%前後含有するグリセロールおよびその配糖体である α -D-グリコシドグリセロール(α -GG)と共に清酒の極味に関係している。清酒中の α -EGおよび α -GGは、もろみ中にデンプンの加水分解によって生成したマルトオリゴ糖やデキストリン成分およびグリセロールを基質として、麹菌が生産する α -グルコシダーゼの糖転移反応によってエタノールをアクセプターとして生産されることが分かっている[6]。清酒中に含まれる配糖体の代謝と機能性について解説がまとめられている[7]。本研究は、清酒醸造時のアミラーゼ系酵素のバラ

¹ 金沢工業大学院バイオ・化専攻
(921-8501 石川県野々市扇が丘 7-1)
² 金沢工業大学ゲノム生物学研究所
(924-0838 石川県八束穂白山 3-1)
³ 大関株式会社総合研究所
(663-8227 兵庫県西宮市今津出在家町
4-9)
*著者連絡先
E-mail: takayuki.bougaki@ozeki.co.jp

ンスが α -EG の生産効率に与える影響を調べまたその生産性が最大になる清酒醸造法を確立し、清酒の即効性の新規保湿機能について検証することを目的としている。

2. 実験

2.1. 焼酎麴または清酒麴を用いた小仕込み

小仕込み試験は、蒸米を 2 回 (添・仲と留) に分けて添加する 2 段仕込みで行った。掛米、麴米、汲水と 5.3×10^6 cells/ml の酵母を添加し、15, 20, 25, 30°C で 2 日間発酵した後、掛米と汲水を加え各温度でさらに 20 日間発酵した。麴は、焼酎麴 (黒麴菌; *Aspergillus awamori*: KBN2012*, カビ 4388**), 清酒麴 (黄麴菌; *Aspergillus oryzae*: RIB40***, 強力糖化菌 3**, * 株式会社ビオック分譲菌、** 株式会社樋口松之助商店分譲菌、*** 独立行政法人酒類総合研究所分譲菌) [8]、各々 2 種類の異なる麴菌を用いて製麴した。発酵終了後、清酒中の α -EG 濃度と α -グルコシダーゼ活性を定量した。仕込み配合を Table 1 に示す。なお、仕込みに用いる水は乳酸で pH 2.6-2.7 に調製した。

Table 1 麴仕込み配合

	添・仲	留	合計
総米 (g)	12.0	13.0	25.0
掛米 (g)	7.5	13.0	20.5
麴米 (g)	4.5	0	4.5
汲水 (ml)	19.5	18.5	38.0

2.2. 酵素剤の配合を変化させた小仕込み試験

焼酎麴を麴歩合 10%でもろみに添加し Table 2 の仕込み配合で小仕込み試験を行った。酵素剤の添加を考慮して、麴歩合を通常の半量にした。酵素剤は、 α -amylase (AA) 剤 (スミチーム L) 100, 250, 500, 750, 1000 U 及び α -glucosidase (AG) 剤 (トランスグルコシダーゼ「アマノ」) 900, 1500, 2100 U を組み合わせ併用した。焼酎酵母

5.3×10^6 cells/ml をもろみに加え、15°C で 20 日間発酵させた。

Table 2 酵素剤仕込み配合

	添・仲	留	合計
総米 (g)	9.75	13.0	22.8
掛米 (g)	7.5	13.0	20.5
麴米 (g)	2.25	0	2.25
汲水 (ml)	19.5	18.5	38.0

2.3. α -EG の定量

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析装置には、Alliance HPLC system 及び 2414 RI (waters, US) 検出器を用いた。用いた分析条件は以下のとおりである。カラム: shodex SPO 810 (昭和電工, 東京), 移動相: H₂O, 流速: 400 μ l/min, カラム温度: 65°C, 注入量: 1 μ l

2.4. 酵素活性測定

α -グルコシダーゼ活性及びグルコアミラーゼ活性の測定は、「糖化力分別定量キット」、 α -アミラーゼ活性の測定は、 α -アミラーゼ測定キット (何れもキッコーマンバイオケミファ, 東京) を用いて、キットに添付の手順に従って行った。その他の定量は国税庁所定分析法[9]に従った。

2.5. ヒト肌試験

20 代前半の被験者の上腕内側を洗浄し水分をふき取り測定室の環境 (22-24°C) に 20 分間馴化させた後、100 μ l のサンプルを含ませたパッチシートを貼り 2 分間放置した後、シートをはがし、皮膚表面の主に角層に含まれる水分を皮膚水分量測定計 Corneometer CM 825 (インテグラル、東京) を用いて 120 分後に測定した。なお、サンプル塗布前の肌の水分量も測定しこれを対象とした。

3. 結果および考察

麴菌の種類と仕込温度の影響を調べた結果を Fig. 1 に示した。焼酎麴を用いた場合

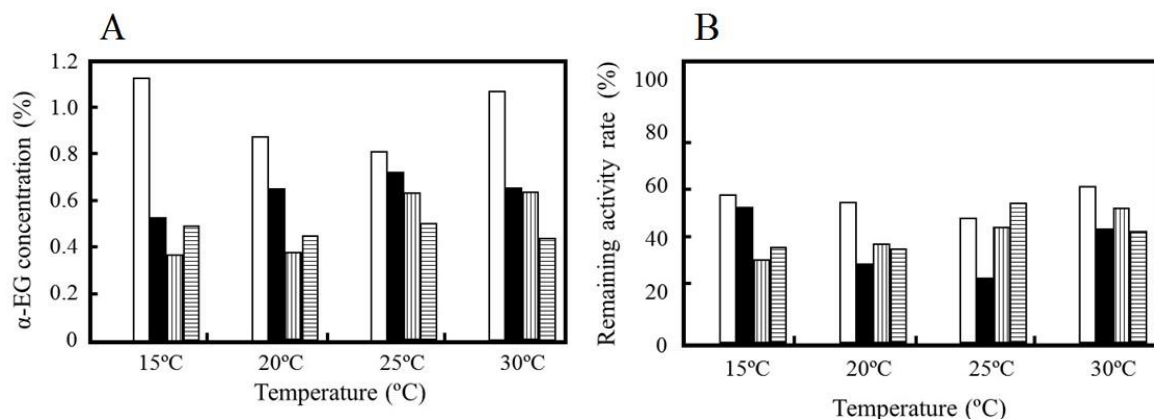


Fig. 1 Effect of koji types and fermentation temperature. A: The concentration of α -EG of fermented sake at each temperature using the four different koji. B: Remaining α -glucosidase activity after fermentation. The relative value of the remaining activity of α -glucosidase in sake is shown. Alpha-glucosidase activity which was added to mash was set at 100%. Open box; KBN2012, Filled box; Mold 4388, Vertical stripes; RIB 40, Horizontal stripes; Strong saccharifying mold 3. Plotted values represent mean ($n = 3$).

にすべての仕込み温度で α -EG が高生産であり特に KBN2012 が高生産であった。仕込み温度と α -EG の濃度の関係についてははっきりとした傾向は見られなかった (Fig. 1A)。KBN2012 がすべての仕込み温度で残存 α -グルコシダーゼ活性が高かった (Fig. 1B)。この結果から α -EG が高生産になるためにはもろみ期間の初期から後期まで α -グルコシダーゼ活性が高いことが重要であ

ると考えられた。麴量を通常の半量の 10%にして、 α -アミラーゼ剤 (AA) と α -グルコシダーゼ剤 (AG) を組み合わせて補填して仕込んだ α -EG 高含有仕込みの結果を Fig. 2 に示した。エタノール濃度は 13-16%でアルコール発酵は十分であり、AA 1000 U と AG 900 又は 1500 U の組み合わせで α -EG 濃度が 3%を超えた。AG は今回の試験区分では活性が

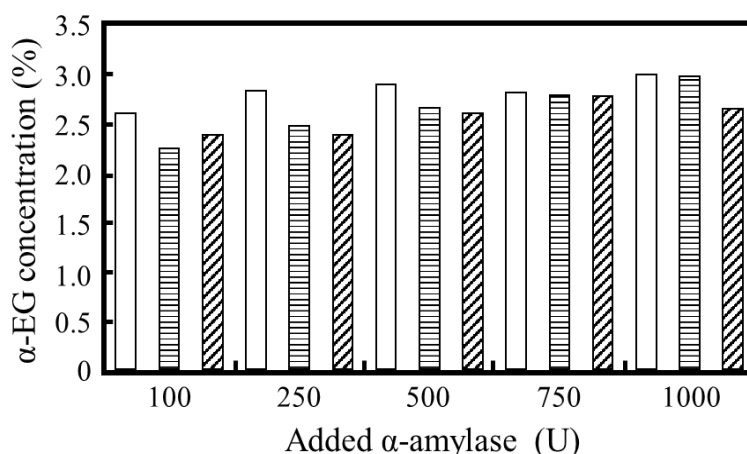


Fig. 2 Effect of adding enzymes to the sake mash for α -EG production.

Open box; AG 900 U, horizontal stripes; AG 1500 U, oblique stripes; AG 2100 U.

Plotted values represent mean ($n = 3$).

低い方が α -EG 高濃度であった、この原因は AG の酵素剤中に共存するグルコアミラーゼ活性によるものと推察できる。AA については 1000 U が一番高濃度あり、試験区分では最も添加量が多い時に α -EG 高生産であった。酵素剤を用いない仕込みと比較して 2.5 倍以上の α -EG を生産出来た事と酵素の配合量によって生産性に差があることから酵素バランスが重要である事が確認された。Table 3 に α -EG 濃度が 3% を超えた時の各酵素活性を示す。

また、対象はエタノールを含まない RO 水である為水分蒸散が少なく、エタノールを含む供試サンプルと差が出にくい実験条件であるが、 α -EG 高含有清酒は対象に対して有意差があった。 α -EG 試薬では塗布前より水分量は増加したが、 α -EG 高含有清酒及び清酒よりも水分量は少なく、0.9% α -EG では対象よりも有意に水分量が少なかった。米焼酎蒸留残渣から調製した 2.5% α -EG 抽出液と 2.5% α -EG 試薬には、肌試験で保湿効果が認められたが、この場合試料には

Table 3 酒中の α -EG 濃度が 3% を超えた仕込みの酵素活性.

AA 剤 (U/g 米)	AG 剤 (U/g 米)	α -グルコシダーゼ (U/g 米)	グルコアミラーゼ (U/g 米)	α -アミラーゼ (U/g 米)
1000	900	0.322	5.63	455
1000	1500	0.204	7.46	455

α -EG、エタノール及びグルコースを含む清酒または α -EG 溶液と RO 水 (Table 4) を用いて人肌試験を行った結果を Fig. 3 に示す。本実験は、肌の保湿機能が健全な若いボランティアの学生 (男性 3 名、女性 3 名、平均年齢 22 歳) を被験者としている。

エタノールが含まれていなかった[10]。今回の α -EG 試薬溶液は 15% のエタノールを含んでいるために、水分の蒸散が多かったと考えられる。今回 α -EG 高含有清酒だけで有意差が出た原因として、 α -EG と醸造によって生じた天然保湿成分である有機酸などの相乗効果が考えられた。

Table 4 保湿試験に用いたサンプルの組成.

	α -EG (%)	エタノール (%)	グルコース (%)
RO 水	0	0	0
α -EG 高含有清酒*	2.5	16.1	1.6
清酒**	0.9	16.3	1.6
α -EG 試薬 1	2.5	15.0	1.6
α -EG 試薬 2	0.9	15.0	1.6

*; 本研究で醸造した清酒、**; 清酒酵母と清酒用麴を用いて醸造した清酒

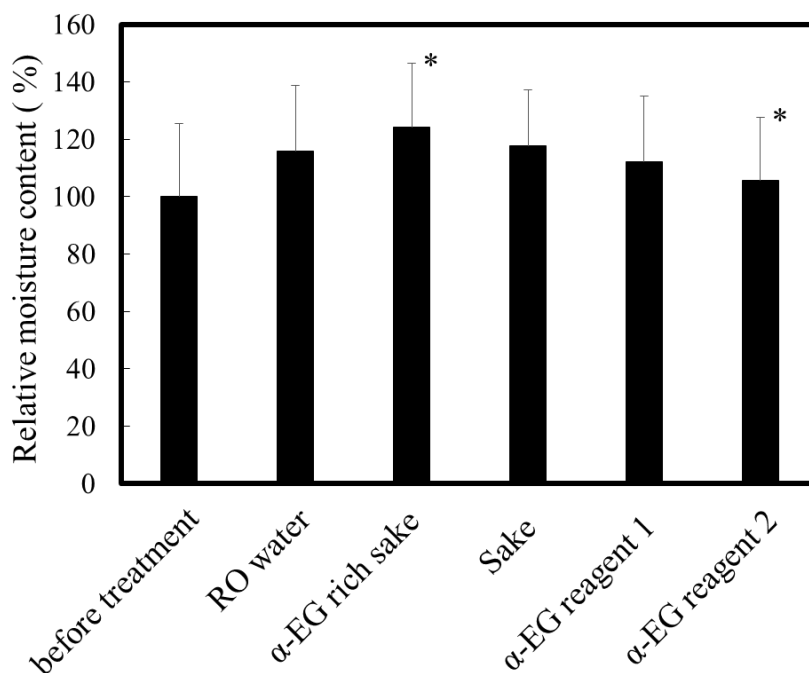


Fig. 3 Relative moisture content of stratum corneum, 120 min after application of samples containing α -EG. α -EG-rich-sake; Sake brewed in this study, Sake; Sake brewed using sake yeast and sake koji mold. * $p < 0.05$ vs RO Water (t-test). This experiment was repeated five times using six subjects. Plotted values represent mean \pm SD (n = 30).

まとめ

清酒麹よりも焼酎麹の生産する α -グルコシダーゼの失活が少なく、その結果焼酎麹の方が α -EGの生産量が多かった。麹量を半量にして、 α -アミラーゼ剤と α -グルコシダーゼ剤を添加した酵素仕込みの方が、麹仕込みよりも α -EGの生産性が高く、3%という高い α -EG濃度の清酒が醸造できた。 α -EGを高濃度とするためには、 α -アミラーゼ活性と α -グルコシダーゼ活性のバランスが重要であると考えられる。学生ボランティアによる肌試験では、醸造した α -EG高含有清酒が試験区の中で最も保水能が高かった。試薬の α -EGと比較して、清酒の保水能が高かったのは α -EGと醸造過程で生産された有機酸などの発酵産物の相乗効

果であると考えられる。今後は α -EG高含有酒の官能試験を行うと共に、どこまで希釈しても保湿機能が認められるか、 α -EG試薬とともに検討していきたい。

文献

1. Hirotsune, M, Haratake, A., Komiya, A., Sugita, J., Tachihara, T., Komai, T., Hizume, K., Ozeki, K. and Ikemoto, T.: Effect of ingested concentrate and components of Sake on epidermal permeability barrier disruption by UVB irradiation, *J. Agric. Food chem.*, **53**, 948-952 (2005).
2. Hirotsune, M., New function of ethyl α -D-glucoside in Sake, *J. Brew. Soc. Japan.* **99**, 836-841 (2004).

3. Mishima, T., Harino, S., Sugita, J., Nakahara, M., Suzuki, T., and Hayaka, T., Plasma kinetics and urine profile of Ethyl Glucosides after oral administration in the rat, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 393-397 (2008).
4. Izu, H., Hizume, K., Goto, K., and Hirotsune, M., Hepatoprotective effects of concentrate and components of Sake against galactosamine (GalN)-induced liver injury in mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 951-957 (2007).
5. Maeda, M., Sugita, J., Saito, M., Hagihara, M., and Ikemoto, T., Effects of Bath Product Named as Sake Concentrate Preparation, *J. Japanese Soc. Balneol. Climatol. Phys. Med.* **69**, 179-186 (2006)
6. Takenaka, F., Uchiyama, H., and Imamura, T., Identification of α -D-glucosylglycerol in sake, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 378-385 (2000).
7. Mishima, T. and Ozeki, K., Physiological function and metabolism of glucosides in Sake, *Food & Food Ingredients J. Japan.*, **219**, 275-280 (2014) (in Japanese).
8. Ozeki, K., Kirifuji, K., Tsutsui, K., Wakaizumi, M., and Ozeki, K., Production of antioxidant by the rice Koji, saccharification of the rice koji and fermentation of saccharified the rice koji, *Food Clin. Nutr.* **4**, 19-26 (2008).
9. National Tax Agency analysis method; Available from : <http://www.nta.go.jp/shiraberu/zeiho-kaishaku/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/01.htm>
10. Bogaki, T., and Ozeki, K., High-yield production of ethyl α -D-glucoside in shochu brewing and evaluation of its functionality, *J. Biol. Macromol.* **15**, 41-50 (2015)

High-yield production of ethyl α -D-glucoside in sake brewing and evaluation of its moisturizing effect

Takayuki Bogaki^{1,3,*}, Junichi Sagara², Kenji Ozeki^{1,2}

¹College of Bioscience and Chemistry, Department of Applied Bioscience, Kanazawa Institute of Technology, 7-1 Ohgigaoka, Nonoichi, Ishikawa 921-8501, Japan

²Genome Biotechnology laboratory, Kanazawa Institute of Technology, 3-1 Yatsukaho, Hakusan, Ishikawa 924-0838, Japan

³General Research Laboratory, Ozeki Corporation, 4-9 Imazu, Dezaike, Nishinomiya, Hyogo 663-8227, Japan

Received September 3, 2015; Accepted November 11, 2015

Alpha- glucosidase of shochu koji mold, compared to sake koji mold, is less deactivated in sake mash. When brewed using shochu koji, a high level of ethyl α -D-glucoside (α -EG) concentration was detected in the sake. We found α -EG rich sake containing more than 3% (wt/vol) of α -EG can be brewed by 1% of koji, enzyme preparations to supplement for the reduced α -amylase and glucoamylase activity, and shochu yeast for fermentation. In sake containing 2.5% α -EG, a significant difference was observed in the moisture content of skin 120 minutes after application compared to water. However, effect of α -EG alone was not observed, suggesting that the moisturizing effect mentioned above was due to a synergistic effect of the fermented product in sake.

Keywords: ethyl α -D-glucoside, Natural moisturizing factor, Moisturizing function, Sake, shochu koji

(責任編集委員：植野 洋志)