

機能性アミノ酸オルニチンを高含有する低アルコール清酒の開発

Development of Low Alcohol Sake Containing High Level Functional Amino Acid Ornithine

西尾 昭

Akira Nishio

電子・有機素材研究所 発酵生産科

機能性アミノ酸であるオルニチンを高含有する低アルコール清酒の開発を目的に製造条件を検討した。その結果、製麹条件、使用酵母によってオルニチン生成量が増加する可能性が示唆された。また、オルニチンの生成はアルギニンデイミナーゼ経路によるものと推測され、オルニチン生成に伴ってカルバミン酸エチルは増加しないことを確認した。

1. はじめに

前報¹⁾において、糖類ゼロでありながら旨味のある低アルコール清酒の開発を目指して、酸、アミノ酸に着目しその含有量を増加させる方法について検討したことを報告した。その結果からは、麹使用割合の増加、乳酸菌の添加が効果的であることが示唆された。その中で、乳酸菌添加区において、ほとんどのアミノ酸が増加する中、アルギニンのみ減少し、代わりにオルニチン(図1)が大きく増加していることを見出した。

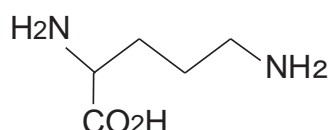


図1 オルニチン

オルニチンはシジミに多く含まれる、タンパク質を構成しない遊離アミノ酸であり、肝臓オルニチン回路でのアンモニアの解毒や成長ホルモンの分泌を促進し、疲労回復、ストレス改善、筋肉増強、肥満予防などの効果があるといわれている^{2)、3)}。

今回、オルニチンを高含有する低アルコール清酒の開発を目的に、オルニチン含有量を増加させる製造条件を検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

酵母は、清酒酵母協会701号、901号、1801号(以下、K701、901、1801)を使用した。乳酸菌は、平成17年山廃酛から分離した、*Lactobacillus sakei*と推定される株⁴⁾を使用した。

2.2 使用培地

酵母および乳酸菌の培養は、麹汁培地(pH5)を使用した。

2.3 原料米

平成26年島根県産五百万石(精米歩合68%)を使用した。

2.4 製造条件の検討

2.4.1 製麹条件

種麹は、ダイヤモンド印および、強力糖化菌(樋口松之助商店)の2種類を用い、米100kg当り100gを使用した。製麹時の温度経過は、低温経過(最高温度35℃付近)と高温経過(最高温度40℃付近)の2パターンとし、種麹と温度経過の組み合わせにより4試験区を設定した(表1)。

表1 製麹試験区

試験区	種麹	温度経過
1	ダイヤモンド印	低温
2	ダイヤモンド印	高温
3	強力糖化菌	低温
4	強力糖化菌	高温

2.4.2 酵母選抜試験

3種類の酵母を用い、図2の方法により発酵試験を行い、製成酒のオルニチン含量の多かった酵母を選抜した。

麴 500g/水 900ml
 ↓ 55°C, 5時間
 ↓ ←10%アルギニン
 (100 mg/100ml となるように)
 ↓ ←乳酸菌
 ↓ 10°C, 3日間
 ↓ ←酵母
 ↓ 15°C
 ↓ 上槽
 製成酒

図2 酵母選抜のための発酵試験方法

2.5 小仕込み試験

総米1 kgの小仕込み試験を表2の仕込配合および、図3の方法により実施した。対照として乳酸添加による試験を行った。

表2 小仕込み試験の仕込配合

	乳酸菌	乳酸(対照)
蒸米 (g)	500	500
麴 (g)	500	500
酵母 (ml)	10	10
乳酸菌 (ml)	10	—
乳酸 (ml)	—	2.5
水 (ml)	1,800 + α	1,800 + α

麴 500g/水 900ml
 ↓ 55°C, 5時間
 ↓ 冷却
 ↓ ←乳酸菌 10ml
 ↓ 10°C, 2日間
 ↓ ←酵母 10ml
 ↓ 15°C, 1晩
 ↓ ←水 900ml
 ↓ ←蒸米 500g
 ↓ 15°Cで発酵
 ↓ ←適宜水を添加 (アルコール度数調整)
 ↓ 上槽 (3,000rpm, 20分)
 製成酒

図3 小仕込み試験方法

アルコール度数の調整は、醪の分析値を見ながら適宜水を添加し、上槽前日にアルコール度数が10%以下になるように水を添加した。水添加後、5°Cで1日放置し、遠心分離により上槽した。

2.6 分析方法

麴酵素力価は、αアミラーゼ測定キット、糖化力測定キット、酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット (キッコーマン) を使用して測定した。

オルニチンおよび、アルギニン含量は、アミノ酸分析装置 (日本電子 JLC-500/V2) を用い、アルコール分および、日本酒度は、振動式密度計 (京都電子工業 DA-105) を用いて測定した。

酸度、アミノ酸度は国税庁所定分析法⁵⁾に従い、還元糖はフェーリング法により分析した。

尿素および、アンモニア含量は、F-キット-尿素/アンモニア (ロシュ・ダイアグノスティックス) を使用して定量した。

カルバミン酸エチル含量は、橋口らの方法⁶⁾に従って定量した。すなわち、製成酒をエキストレレート NT3 カラムを用いて図4の手順で前処理後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) により定量した。

製成酒 3ml

↓ ←10ppm カルバミン酸ブチル(I.S.)30μ l
 ↓ Mix
 ↓ エキストレレート NT3 カラムに保持 10min
 ↓ ヘキサン: 酢エチ=1:1 18m で溶出
 ↓ エバポレータで 1ml まで濃縮
 ↓ 硫酸ナトリウムで脱水

GCMS 分析

図4 カルバミン酸エチル分析方法

(GCMS 分析条件)
 ・装置: GCMS QP2010 Plus (島津)
 ・カラム: DB-WAX 60m×0.25mm, 0.25μ m
 ・カラム温度: 100°C (1min)→10°C/min→230°C
 ・注入口温度: 190°C
 ・注入量: 1μ l (スプリットレス)
 ・カラム流量: 1ml/min (He)
 ・測定イオン: 62 (SIM モード)

3. 結果と考察

3.1 オルニチンを高生産する製造条件の検討

3.1.1 製麹条件

オルニチンはアルギニンから生成すると考えられ、アルギニンを添加して発酵試験を行ったところ、オルニチンが増加することを確認した（データ非掲載）。すなわち、オルニチン含量を高めるためには、醪中のアルギニン含量を高める必要があることが分かった。そこで、米タンパク質からアルギニンを高生成させるため、タンパク分解力の強い種麴の選抜とタンパク分解力を高める製麹方法を検討した。

2種類の種麴を使用し、温度経過を変えて製麹試験を行った結果、試験区1（ダイヤモンド印、低温経過）の時、最もタンパク分解力（酸性カルボキシペプチダーゼ活性）が強くなることがわかり、この条件を採用することとした（表3）。

表3 種麴および温度経過の違いによる麴の酵素活性

試験区	種麴	温度経過	α-アミラーゼ (U/g・dry)	糖化力 (U/g・dry)	酸性カルボキシ ペプチダーゼ (U/g・dry)
1	ダイヤモンド印	低温	1,024	260	5,270
2	〃	高温	1,102	270	5,166
3	強力糖化菌	低温	1,218	362	3,717
4	〃	高温	1,458	361	3,652

3.1.2 使用酵母

3種類の酵母（K701、901、1801）を使用して発酵試験を行った結果、K1801を使用したときに最もオルニチン含量が高いことが分かった（図5）。このことから酵母の種類を変えることによりオルニチン生成量増加の可能性が示唆された。

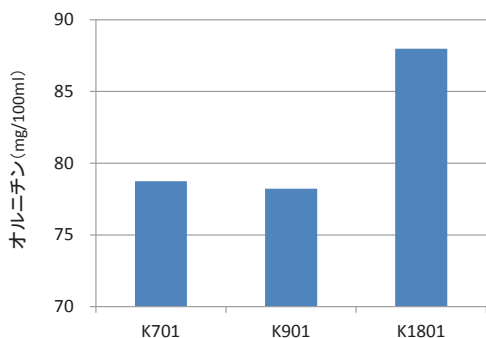


図5 使用酵母の違いによるオルニチン生成量

3.2 小仕込み試験

総米1kgの小仕込み試験を行った。原料米は、五百万石（精米歩合68%）、種麴はダイヤモンド印、製麹の温度経過は低温経過とし、酵母はK1801を用いた。製成酒の成分値を表4に示す。前報¹⁾と同様に、乳酸菌を添加した試験区は、乳酸（対照）より酸度、アミノ酸度が高く、濃醇な酒質となった。

表4 小仕込み試験製成酒の成分分析結果

	アルコール分 (%)	日本酒度	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	還元糖 (%)
乳酸菌	9.2	4.6	4.40	3.00	0.77
乳酸 (対照)	9.6	8.1	2.40	1.75	0.57

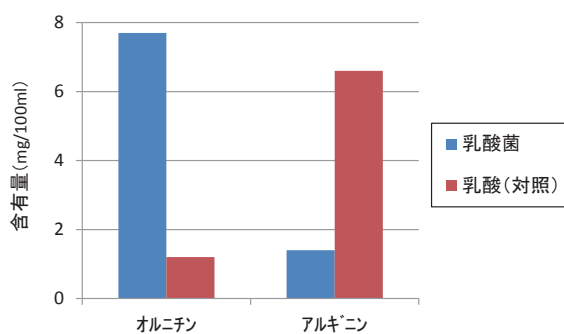


図6 小仕込み試験製成酒のオルニチンおよびアルギニン含量

オルニチン含量は、対照に比べ6倍程度と高かったが、予想していた含有量よりも少なかった。そもそも対照のアルギニン含量が6.6mg/100mlと少なく、原料米からのアルギニンの供給が少なかったことが原因と考えられる（図6）。

3.3 オルニチン生成経路

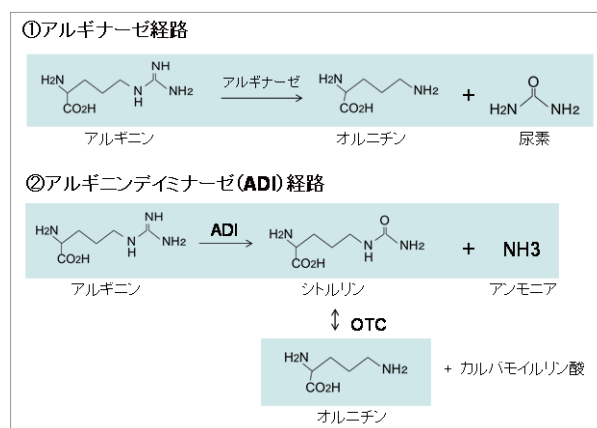


図7 オルニチン生成経路

オルニチンの生成経路として、アルギナーゼ経路とアルギニンデイミナーゼ経路の2つが考えられる(図7)。

製成酒の尿素および、アンモニア分析を行った結果、乳酸菌添加により尿素は減少し、アンモニアは増加していることが分かった(図8)。これによりオルニチンの生成は、アルギナーゼ経路ではなく、アルギニンデイミナーゼ経路によるものと推測された。

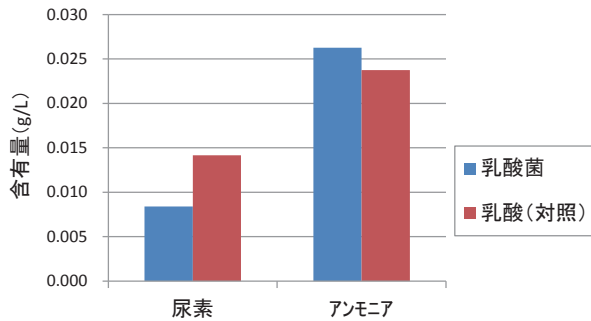


図8 製成酒の尿素およびアンモニア含量

3.4 カルバミン酸エチル含量

カルバミン酸エチルは、エタノールと尿素の反応で生成し、発がん性が危惧される物質である⁶⁾。オルニチン生成に伴い、尿素生成の可能性も考えられたため、カルバミン酸エチル含量の分析を行った。

その結果、乳酸菌を使用した製成酒は、使用しなかったものよりカルバミン酸エチル含量が少なく、乳酸菌使用によるカルバミン酸エチルの増加はないことが確認された(図9)。

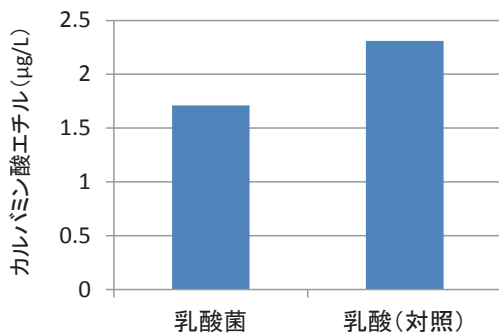


図9 製成酒のカルバミン酸エチル含量

4. おわりに

機能性アミノ酸であるオルニチンを高含有する低アルコール清酒の製造条件を検討した結果、以下の知見が得られた。

- (1) 種麹および製麹時の温度経過を変えることにより、タンパク分解力の強い麹の製成が可能である。
- (2) 酵母の種類によりオルニチン生成量増加の可能性が示唆された。
- (3) 小仕込み試験の実施により、従来法に比べオルニチン含量の高い低アルコール清酒の製造が可能であることが確認された。
- (4) オルニチンの生成経路は、アルギニンデイミナーゼ経路と推測され、乳酸菌使用によるカルバミン酸エチルの増加はないことが確認された。

文献

- 1) 西尾昭；糖類ゼロ低アルコール清酒の製造技術に関する研究，鳥取県産業技術センター研究報告，17，p.21-25（2014）
- 2) Gebhardt R., Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 283, p.1-6（1997）
- 3) Evain-Brion D., Clinical Endocrinology, 17, p.119-122（1982）
- 4) 西尾昭，茂一孝；乳酸菌と硝酸還元菌の添加による生醗系酒母製造の安定化，鳥取県産業技術センター研究報告，11，p.54-57（2008）
- 5) 第4回改正国税庁所定分析法注解（1993）
- 6) 橋口知一，伊木由香里，後藤邦康；酒類中のカルバミン酸エチルの簡易定量法，醸協，101，p.519-525（2006）