

〔生物工学会誌 第73巻 第3号 183-189, 1995〕

穀物糖化醪中のリゾレンチン量の制御因子†

鳥井 和之*・佐藤 賢次・大西 正巳

サントリー(株)研究センター
〒618 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1

(平成6年6月9日受付 平成7年2月2日受理)

Factors Controlling the Concentration of Lysophosphatidylcholine in Saccharified Mash Prepared from Grains

KAZUYUKI TORII,* KENJI SATO, and MASAMI ONISHI (*Research Center, Suntory Limited, 1-1-1 Wakayama-dai Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618*) Seibutsu-kogaku 73: 183-189, 1995.

Maize contained a small quantity of lysophosphatidylcholine (LPC) and saccharified mash made from maize similarly possessed a small amount. In contrast, although malted barley contained a large quantity of LPC, saccharified mash made from malted barley possessed only a small amount. It is suggested that LPC hydrolase in the barley malt hydrolyzed the LPC and decreased its concentration in the saccharified mash. LPC acylhydrolase hydrolyzes LPC into free fatty acids and glycerophosphoryl choline, so the concentration of free fatty acids in the saccharified mash made from barley malt increased, whereas that in the filtrate decreased because the LPC concentration in the saccharified mash, which dissolves fatty acids into the filtrate, was low.

[Key words: grain, saccharified mash, unsaturated fatty acids, lysophosphatidylcholine]

エステルは華やかな芳香を持ち、酒の香気成分としてきわめて重要なもののひとつである。大麦の酵素糖化ろ液を発酵させて得られた製成酒は、麦芽やトウモロコシの糖化ろ液を発酵させて得られた製成酒に比べエステル含有量が少なく、官能的にも華やかさに欠けるものとなるが、その原因のひとつは糖化ろ液に含まれる不飽和脂肪酸 (Unsaturated Fatty Acid=UFA) が酵母のエステル生成を抑制すること、さらにろ液中 UFA 量は大麦糖化醪が多量に含んでいるリゾレンチン (Lysophosphatidylcholine=LPC) によって増加することを前報で推察した。¹⁾ すなわちエステル類を多く含み、官能的にも華やかな製成酒を得るためには、大麦糖化ろ液中の UFA を減少させることはきわめて重要であると考えられるが、²⁾ そのひとつの手段として、糖化醪中の LPC 量を減少させることが考えられた。

本報では穀物糖化ろ液中の UFA を減少させるために大麦糖化ろ液中の LPC 量に影響を及ぼす因子について、原料成分を中心に検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

1) 大麦 精白歩合 (精白麦/原料麦重量比) 80% の国内産 2 条大麦を用いた。以下、単に「80%大麦」と表現する。

2) 麦芽 カナダ産の 6 条大麦麦芽を用いた。

3) トウモロコシ 米国産黄色馬歯種トウモロコシを用いた。

2. 糖化醪の調製

1) 酵素による 80% 大麦およびトウモロコシの糖化前報¹⁾と同様の方法で行った。すなわち、粉碎した 5.7 kg の原料に 25.7 l の水と粘度低下用 α アミラーゼ 23 U/g-grain を加え総量を 30 l とし、ジャーフェーマンターを用いて 120°C で 30 分間、醪を攪拌しながら煮沸した。放冷の後、煮沸・冷却中に失われた水分を

† 大麦糖化醪中の脂質制御に関する研究 (第 2 報)。

Studies on the control of lipids concentration in saccharified mash prepared from barley (II).

* 連絡先, Corresponding author.

補い、全量を 30 l に合わせて蒸煮醪とした。

その蒸煮醪にグルコアミラーゼを 15 U/g-grain 加え 60°C で 2 時間、醪を攪拌しながら糖化し糖化醪とした。

2) 麦芽の糖化 前報¹⁾と同様の方法で行った。すなわち、粉碎した 5.7 kg の原料に 25.7 l の水を加え総量を 30 l とし、いっさいの酵素類を添加せずジャーフェーマンターを用いて 60°C で 3 時間、醪を攪拌しながら糖化し麦芽の糖化醪とした。

3) 麦芽抽出液を用いた 80% 大麦の糖化 まず、粉碎した麦芽 100 g に 450 ml の蒸留水を加え 40°C で 2 時間抽出後、遠心分離によって固形分を除去し、その上澄を麦芽抽出液とした。

次に前報¹⁾と同様の方法で得られた 80% 大麦の蒸煮醪 4 に対し麦芽抽出液を 1 の容量割合で添加、他の仕込と同様にグルコアミラーゼを 15 Units/g-grain 添加し、60°C で 2 時間、醪を攪拌しながら糖化して糖化醪を得た。

3. 糖化ろ液の調製 前項で得られた糖化醪をろ紙 (アドバンテック社製 No. 2 ろ紙) でろ過した。

4. 脂質の分析

1) 脂質の抽出 糖化醪、ろ液中の脂質の抽出は前報¹⁾と同様の方法で行った。

原料中の脂質の抽出は Bligh-Dyer の方法³⁾および Folch の方法⁴⁾に準拠した。すなわち、粉碎した原料 5 g をクロロホルム : メタノール混液 (2 : 1 v/v) 25 ml で 3 回、10 ml で 1 回攪拌抽出し、直接溶媒で抽出できる脂質を得た。その残渣から溶媒を除去した後、熱水を 20 ml 加え、100°C で 30 分加熱した。放冷の後、グルコアミラーゼを 75 U 添加し、60°C で 2 時間糖化した。この試料から上記と同様の方法によって、デンプンを分解後、はじめて抽出できる脂質を得た。これら原料から直接およびデンプン分解後に抽出された脂質はともに 0.88% KCl 溶液で洗浄後、減圧濃縮し、分析用試料とした。

なお、糖化に使用した糖化酵素には、レシチン (Phosphatidylcholine=PC), LPC およびグリセライド分解活性は含まれていないことを確認している。

2) 脂質の分離 前報¹⁾と同様 TLC 法によって脂質の分離を行った。

3) 遊離脂肪酸 (以下、単に脂肪酸) の定量 前報¹⁾と同様、GLC 分析法によって脂肪酸の定量を行った。なお、内部標準にはペンタデカン酸 (以下、C₁₅A と表現する) を用いた。

4) リン脂質の定量 前報¹⁾と同様、HPLC 分析法⁵⁾により、穀類中のリン脂質の大部分を占めるレシチン (PC) およびリゾレシチン (LPC) を定量した。

5) グリセライドの定量 前報¹⁾同様 Snyder らの方法⁶⁾に従い、エステル結合量を定量した。

5. リゾレシチン分解酵素 (LPCase) 活性の測定 1,250 ppm の卵黄 LPC (ミドリ十字社製) を基質に、pH 5.5 の 0.1 M リン酸緩衝液中、40°C で酵素液を反応させ、LPC 分解初速度を測定した。この条件下、1 分間に基質を 1 μM 分解する酵素量を 1 単位 (U) として表した。なお、使用した基質の脂肪酸分子種の 78% がパルミチン酸であったので、¹⁾モル数は基質の平均分子量を 519 として算出した。

実験結果および考察

1. 原料中の脂質量の比較 80% 大麦、麦芽、トウモロコシ中の脂質を定量した結果を Table 1 に示した。

グリセライドは、いずれの原料でもモノおよびジグリセライドに比べて、トリグリセライドの含有量が圧

Table 1. Amounts of lipids in the materials.

Material Lipids	80%*6 barley	Malt	Maize
Glycerides (μmol-esters/g-grain)			
TG*1	32.1	26.8	61.9
DG & MG*2	8.8	9.1	11.0
Total	40.9	35.9	72.9
Phospholipids (μg/g-grain)			
LPC*3	3160	1800	820
PC*4	460	2200	320
Total	3620	4000	1140
Free fatty acids (μg/g-grain)			
C16 : 0*5	1338	1974	1195
C16 : 1	6	4	2
C18 : 0	16	27	71
C18 : 1	784	674	706
C18 : 2	3175	4178	2319
C18 : 3	179	537	42
Total	5498	7394	4335

*1 TG, Triglyceride; *2 DG & MG, di & monoglyceride; *3 LPC, lysophosphatidylcholine (lysolecithin); *4 PC, phosphatidylcholine (lecithin); *5 C16 : 0 (palmitic), C16 : 1 (palmitoleic), C18 : 0 (stearic), C18 : 1 (oleic), C18 : 2 (linoleic), C18 : 3 (linolenic); *6 80%, polishing ratio of barley.

倒的に多く、また、トウモロコシはエステル結合量で80%大麦や麦芽の約2倍量に当たる原料gあたり61.9 μmol のトリグリセライドを含有していた。続いて80%大麦が32.1、麦芽が26.8 μmol のトリグリセライドを含有していた。

次にリン脂質を比較すると、LPCは80%大麦中にもっとも多く、その含有量は3,160 ppmであった。麦芽中にも80%大麦の約60%の量に当たる1,800 ppmが含まれていた。一方、トウモロコシ中には麦芽のさらに半分である820 ppmしか含まれていなかった。大麦に含まれるLPCのほとんどはデンブンの構造中に取り込まれた形で存在しているものと考えられ、製麦中における結合型LPC量の変化についての、Baistedらの報告⁷⁾と同様に、原料からの直接抽出ではほとんど抽出されなかった。PCは麦芽中に多く含まれ2,200 ppmの含有量を示した。一方、80%大麦中およびトウモロコシ中の含有量は低く、それぞれ460、320 ppmであった。

脂肪酸の合計量を比較すると、麦芽中には7,394 ppmと、今回の試料中もっとも多量に含まれ、80%大麦およびトウモロコシの含有量はそれぞれ、5,498

ppmおよび4,335 ppmであった。脂肪酸の分子種は、いずれの原料もリノール酸が約50%、パルミチン酸が約20%を占めた。

2. 糖化中における脂質量の変化 前報¹⁾で報告した80%大麦、トウモロコシおよび麦芽の糖化醪に含まれる脂質量と、前項に示した、それら原料に含まれる脂質量を比較すると、両者は必ずしも一致せず、単純に原料中の脂質が全量そのまま糖化醪中に直接移行するのではないことが示唆された。たとえばLPCの場合、前報¹⁾で報告したように、麦芽の糖化醪には50 ppmと80%大麦の糖化醪に含まれる670 ppmに比べ、きわめて少量しか含まれていなかった。しかし、原料中にはもともと80%大麦の約60%に相当する量のLPCが含まれており、LPCが糖化中に変化していることが考えられた。そこで糖化中の脂質量の変化を検討するために、原料中の脂質量から計算して求めた糖化醪中の脂質量(原料5.7 kg中の脂質が、得られた糖化醪30 lに全量移行するとして計算した値)と、実際に糖化醪に含まれていた脂質量とを比較した(Table 2)。

表より明らかなように、80%大麦糖化醪に含まれる

Table 2. Amounts of lipids in mashes prepared from various materials.

Material Lipids	80% barley		Malt		Maize	
	Calc. * ¹	Quant. * ²	Calc.	Quant.	Calc.	Quant.
Glycerides ($\mu\text{mol-esters/ml-mash}$)						
TG	6.1	5.5	5.1	3.2	12.0	11.7
DG & MG	1.7	1.6	1.7	1.5	2.3	2.4
Total	7.8	7.1	6.8	4.7	14.3	14.1
Phospholipids ($\mu\text{g/ml-mash}$)						
LPC	600	670	340	50	160	190
PC	90	80	420	180	60	60
Total	690	750	760	230	220	250
Free fatty acids ($\mu\text{g/ml-mash}$)						
C16:0	254	214	375	622	227	193
C16:1	1	3	1	2	1	1
C18:0	3	8	5	32	13	10
C18:1	149	139	128	208	134	134
C18:2	603	489	794	1207	441	429
C18:3	34	31	102	144	8	20
Total	1045	884	1405	2215	824	787

*¹ Calc., Calculated values using the concentration in the material.

*² Quant., Quantitative values.

Other symbols are the same as in Table 1.

グリセライドのエステル結合量は、原料からの計算では 1 ml あたり 7.8 μmol であるのに対して、実測では 7.1 μmol であった。リン脂質は同様に 690 ppm と 750 ppm, 脂肪酸はそれぞれ 1,045 ppm と 884 ppm であった。また、トウモロコシ糖化醪に含まれるグリセライドのエステル結合量は原料からの計算では 1 ml あたり 14.3 μmol であるのに対して、実測では 14.1 μmol であった。同様にリン脂質は 220 ppm と 250 ppm, 脂肪酸は 824 ppm と 787 ppm であった。つまり、80%大麦およびトウモロコシについては糖化醪に実際に含まれる脂質量と原料の分析値から計算した脂質量には大きな差はなく、これら原料中に含まれるグリセライド、リン脂質、脂肪酸はほとんど変化せず、糖化醪に移行することが確認された。一方、麦芽糖化醪中に含まれるグリセライドのエステル結合量は計算では 1 ml あたり 6.8 μmol であったが、実際には 4.7 μmol であった。また、リン脂質は 760 ppm に対し 230 ppm と、ともに大きく減少していた。逆に脂肪酸は計算値の 1,405 ppm に対して実測値は 2,215 ppm と増加しており、麦芽を原料に用いた場合、糖化中にグリセライドおよびリン脂質が減少し、脂肪酸が増加することが示唆された。

つまり、前報¹⁾で報告したところの麦芽およびトウ

モロコシを糖化した醪中には LPC が少なく、80%大麦を糖化した醪中にのみ LPC が多く含まれる理由は、トウモロコシはもともと原料中に LPC が少なかったためであり、麦芽は原料中には LPC を多く含んでいるが、糖化中に減少するためであることがわかった。

次に、麦芽の何が糖化醪に含まれる LPC を減少させるのかを明らかにするために以下の実験を行った。

3. 麦芽中の LPC 量制御因子

1) 麦芽抽出液による糖化醪中 LPC 量低減効果

80%大麦の蒸煮醪を、麦芽の温水抽出物とグルコアミラーゼ剤によって糖化した時の醪中に含まれるリン脂質と遊離脂肪酸量を Table 3 に示した。なお、糖化醪中に含まれる脂質量の計算値は、2. の場合と同様、80%大麦原料中および麦芽抽出液中に含まれる脂質分析値から算出した。

結果は、麦芽の糖化醪と同様の傾向を示し、糖化した醪に含まれるリン脂質は原料由来の 550 ppm から 260 ppm に減少し、遊離脂肪酸は 858 ppm から 1,031 ppm に増加した。

つまり、80%大麦の糖化醪中に含まれる LPC を減少させる因子は麦芽から温水で抽出できる成分であることが示唆された。

糖化醪中のリン脂質の減少にともない、ろ液中に含まれるリン脂質は 0 ppm となり遊離脂肪酸は合計量

Table 3. Amounts of lipids in the mash and filtrate prepared from 80% barley and malt extract with glucoamylase.

Material	80% barley & malt ex.		
	Sacchaifying mash		Filtrate
Lipids	Calc.	Quant.	Quant.
Phospholipids ($\mu\text{g/ml-mash}$)			
LPC	480	200	ND* ¹
PC	70	60	ND
Total	550	260	0
Free fatty acids ($\mu\text{g/ml-mash}$)			
C16 : 0	204	293	1
C16 : 1	1	1	ND
C18 : 0	2	8	ND
C18 : 1	142	126	1
C18 : 2	482	567	1
C18 : 3	27	36	ND
Total	858	1031	3

*¹ ND, Not detected.

Other symbols are the same as in Tables 1 and 2.

Table 4. Amounts of lipids in the mash and filtrate prepared from 80% barley and heated malt extract with glucoamylase.

Material	80% barley & heated malt ex.		
	Sacchaifying mash		Filtrate
Lipids	Calc.	Quant.	Quant.
Phospholipids ($\mu\text{g/ml-mash}$)			
LPC	480	450	70
PC	70	50	10
Total	550	500	80
Free fatty acids ($\mu\text{g/ml-mash}$)			
C16 : 0	204	184	24
C16 : 1	1	2	ND
C18 : 0	2	2	ND
C18 : 1	142	172	13
C18 : 2	482	471	35
C18 : 3	27	30	ND
Total	858	861	72

Symbols are the same as in Tables 1 and 2.

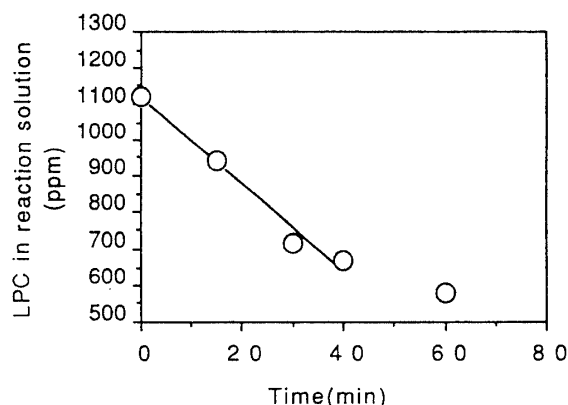


Fig. 1. Hydrolysis of LPC with LPCase in malt extract.

として 3 ppm に減少した。

2) 加熱した麦芽抽出液の糖化醪中 LPC 量低減効果
次に 100°C で 15 分加熱した温水抽出液とグルコアミラーゼ剤によって糖化した時の醪中リン脂質と遊離脂肪酸量を Table 4 に示した。糖化醪中の脂質成分量には大きな変化は見られず、糖化醪中のリン脂質は原料由来の 550 ppm に対し 500 ppm、遊離脂肪酸は 858 ppm に対し 861 ppm と原料からほぼそのままの量に変化せずに移行した。一方、ろ液中のリン脂質は 80 ppm となり、合計量で 72 ppm の脂肪酸が糖化醪からろ液中に移行した。

つまり、麦芽中に含まれている LPC 制御因子は温水で抽出することが可能で、加熱によってその効果を失うもの、すなわち酵素である可能性が示唆された。

4. 麦芽中の LPC 分解酵素 (LPCase) 活性 麦芽糖化醪に含まれ、LPC を低減させる因子は麦芽中の酵素活性である可能性が示唆されたので、麦芽の温水抽出物を粗酵素抽出液として、その LPC 分解活性を測定した。麦芽粗酵素液の卵黄 LPC の分解経時変化を Fig. 1 に示した。図より明らかなように、LPC 濃度が 700 ppm あたりまでは LPC は直線的に分解された。その分解反応が直線を示す部分から LPC 分解酵素活性を算出した結果、温水抽出される麦芽中の LPC 分解活性は麦芽 1 g あたり 6 Units/g であった。

製麦中における LPCase の変化は Baisted らによって報告されているが、⁷⁾ 発芽 7 日で可溶性 LPCase の活性はアリュールン層、胚乳部でそれぞれ 8 U/g、4 U/g であったと報告されている。これは我々の測定値、麦芽全粒で 6 U/g という測定値とほぼ一致した。

5. LPC 分解酵素が糖化ろ液中脂肪酸量に及ぼす影響 麦芽による穀物糖化醪中の LPC 低減効果は、

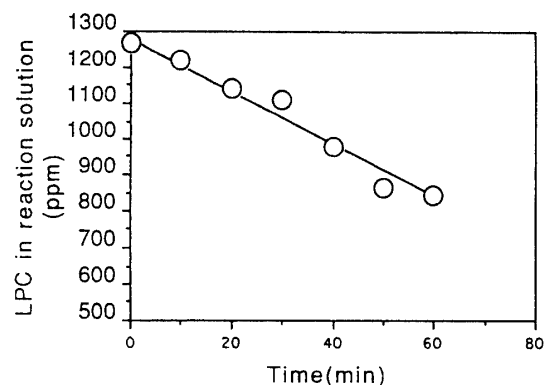


Fig. 2. Hydrolysis of LPC with LPCase for reagent use.

麦芽に含まれる LPCase によるものであることをさらに明確にするために、穀物の糖化醪への LPCase 添加実験を行った。

LPCase はシグマ社製 Phospholipase B を用いた。当酵素の卵黄 LPC の分解経時変化を Fig. 2 に示した。分解反応が直線を示す部分から算出した、当酵素の LPC 分解活性は 3.2 Units/mg であった。

80% 大麦の蒸煮醪にグルコアミラーゼを添加すると同時に上記の LPCase 0.016 U/ml を添加し、60°C で 2 時間糖化、ろ過した。(なお、前出 3.-1) に示した麦芽温水抽出物添加実験の場合の LPCase 添加活性は

Table 5. Amounts of lipids in the mash and filtrate prepared from 80% barley with glucoamylase and LPCase. *1

Material	80% barley & LPCase.		
	Sacchaifying mash		Filtrate
Lipids	Calc.	Quant.	Quant.
Phospholipids (μg/ml-mash)			
LPC	600	120	ND
PC	90	110	10
Total	690	230	10
Free fatty acids (μg/ml-mash)			
C16:0	254	371	2
C16:1	1	1	ND
C18:0	3	3	ND
C18:1	149	158	1
C18:2	603	715	3
C18:3	34	36	ND
Total	1045	1284	6

*1 LPCase, LPC hydrazase.

Other symbols are the same as in Tables 1 and 2.

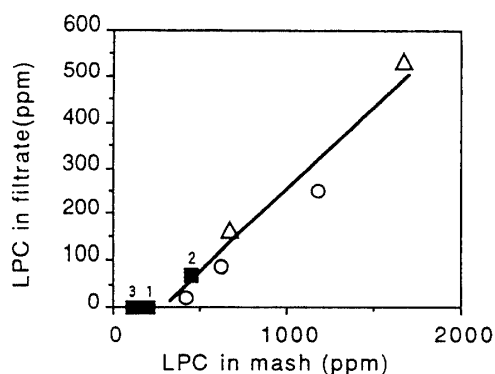


Fig. 3. Relationship between LPC concentration in the mash and filtrate. Symbols: ○, maize; △, barley; ■¹, barley (with malt extract); ■², barley (with heated malt extract); ■³, barley (with LPCase).

0.33 U/mlであった。)この糖化醪およびろ液に含まれる脂質の分析結果を Table 5 に示した。

表より明らかなように、麦芽抽出液を糖化に用いた時と同様の傾向を示し、糖化醪中に含まれるリン脂質の量が原料由来の 690 ppm から 230 ppm に減少したのに対し、遊離脂肪酸は 1,045 ppm から 1,284 ppm に増加した。また、ろ液中に含まれるリン脂質の量は 10 ppm となり遊離脂肪酸は合計量で 6 ppm となった。

つまり、麦芽中に存在する、穀物糖化醪中のリン脂質を低減する因子の一つは LPCase であることが確認された。

以上、糖化醪中に含まれる LPC 量は原料中の LPC 量と LPCase 活性量に影響されることが推察された。

6. 糖化醪中の LPC 量と糖化ろ液中の LPC 量との関係 前報¹⁾で糖化醪中に含まれる LPC 量と、糖化ろ液中に含まれる LPC 量との関係をグラフで示したが、それに今回のデータ、すなわち

- ①麦芽抽出物を用いた80%大麦蒸煮醪の糖化
- ②加熱した麦芽抽出物を用いた80%大麦蒸煮醪の糖化
- ③LPCase を用いた80%大麦蒸煮醪の糖化

を同じグラフ上に重ねてプロットしたものが Fig. 3 である。すでにプロットされていた点とはほぼ同様の直線上にプロットされ、前報¹⁾同様、糖化醪中に含まれる LPC 量が多ければ、原料の種類に関係なく糖化ろ液中の LPC 量は増加することが示された。

つまり、トウモロコシを原料とした糖化ろ液に含まれる LPC 量が少ないのは、もともと原料中 LPC 量が少ないからであり、麦芽の糖化ろ液に含まれる LPC 量が少ないのは麦芽中に存在する LPCase によって、LPC が糖化工程中に分解されたからであると

考えられた。一方、80%大麦には LPC が多く含まれ、糖化中に分解されることもないため、糖化醪にも LPC が多く含まれ、そのまま糖化ろ液中に移行するものと考えられた。

LPCase は LPC を分解し、UFA を遊離する酵素であるので、糖化ろ液中の脂肪酸を減少させることは直接的には考えにくい。しかし、実際には麦芽や LPCase を糖化時に使用することによって、糖化醪に含まれる UFA は増加することを確認したが、糖化ろ液中の UFA は逆に減少した。この理由については、前報¹⁾で報告したように、糖化醪中 UFA のろ液中への移行を助長する LPC の量が減少したためと考えている。すなわち、糖化醪に含まれる UFA が増加しても、LPC 量を減らすことができれば、ろ液に含まれる UFA の量を減少できるものと考えられた。

このことは LPCase を用い、糖化ろ液中の遊離不飽和脂肪酸を減少させたろ液を発酵することによって、製成酒中エステル量を増加させることができる可能性を示唆している。現在 LPCase を酒類の製造に用いることを検討中である。

要 約

大麦（精白歩合80%）、麦芽、トウモロコシを原料に用いて、糖化ろ液中不飽和脂肪酸量に大きな影響を与える因子について検討し、以下の知見を得た。

- 1) 大麦、トウモロコシは原料中の LPC がそのまま酵素糖化醪中に移行した。一方、麦芽は糖化中に LPC 量が減少した。これらのことから、原料中に LPC を多量に含むものが必ずしも糖化醪中の LPC 量も多いとは限らないことがわかった。
- 2) 麦芽に存在する、糖化醪中の LPC 低減因子はリゾレシチン分解酵素 (LPCase) であると推察された。
- 3) LPCase を糖化時に添加することによって糖化醪中に含まれる LPC 量は減少し、ろ液中の LPC 量および脂肪酸量を共に減少させることができた。
- 4) 糖化醪に含まれる LPC の量は原料に含まれる LPC 量と LPCase 活性によって影響を受ける。

文 献

- 1) 鳥井和之, 佐藤賢次, 大西正巳: 醸酵工学, 70, 177-183 (1992).
- 2) 坂口正明: バイオサイエンスとバイオインダストリー, 10, 32-36 (1989).
- 3) Bligh, E. G., Dyer, W. J.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917 (1959).

-
- | | |
|--|--|
| 4) Folch, J., Lee, M., Sloane-Stanley, G. H.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 226 , 497-509 (1957). | 6) Snyder, F., Stephens, N.: <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , 34 , 244-245 (1954). |
| 5) 鳥井和之, 佐藤賢次, 大西正巳: 醸協, 87 , 470-472 (1992). | 7) Baisted, D. J., Stroud, F.: <i>Phytochemistry</i> , 21 , 29-31 (1982). |