

## 私立大学戦略的研究形成支援事業

「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：醸造食品分野での新規解析法の確立

プロジェクトでの役割：新規醸造微生物及び新規食品の開発

**研究タイトル：①「大分酵母」等、最適の新規微生物の開発：大分県にはまだない「大分酵母」等有用微生物の分離**

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 発酵食品製造学研究室

担当者職名：教授 岡本啓湖

### 1. 研究の目的

九州環内で大分県を除く全ての県が独自の清酒用酵母を保有している中、大分県酒造組合では大分県内で得られる生産物から協会酵母に匹敵するような高いエチルアルコール生成能を有し、且つ協会酵母と性質を異にする新酵母を模索していた。そこで大分県酒造組合との共同研究より、大分県酒造組合加盟酒造会社 18 社の酒粕、3 社の生酏より協会酵母との特性比較を基本姿勢として、新酵母の分離・同定・選抜を行い、更に得られた菌株を用いて各種製法により得られた試醸清酒の成分分析、官能検査により清酒用大分酵母の選抜を行った。

### 2. 研究内容

【第 1 スクリーニング方法及び結果】酒粕からの酵母の分離法として、協会酵母との相違が明確に見られる高リン酸培地 (TTC 下層培地) での酸性ホスファターゼ活性の有無による培養方法を用いた。判定にはジアゾカップリング法 (DC 染色法) により行い、DC 非染色性 70 菌株、DC 染色性 13 菌株を分離した。これら両菌株に対して、ダーラム管による発泡試験、顕微鏡による細胞形状観察、エチルアルコール生成量測定試験、マルチプレックス PCR による *S.cerevisiae* 株の簡易同定 (*SSU1*、*AWA1*、*BIO6*、*FLO1*) 遺伝子の存在確認) 等を行い、更に一段小仕込み醪モデル試験に供し、清酒大分酵母開発委員会の香りに基づく判定も加わえ、DC 非染色性 6 菌株 (KCT002、KDT043、KET001、KET002、KET011、KGT006)、DC 染色性 10 菌株 (ロ-1、ハ-1~4、チ-2~6) を選抜した。

【第 2 スクリーニング方法及び結果】 DC 非染色性及び染色性分離菌株を、独立法人酒類製造総合研究所作成製造法を用いて 15℃及び 10℃での小仕込み試験にて製造した清酒の成

分分析（エチルアルコール生成能、グルコース生成能、酸度・アミノ酸度、アミノ酸組成及びその濃度、低沸点香気成分解析）を行い、清酒協会酵母9号、7号に類似する菌株を推奨し、清酒酵母開発委員会により3菌株、即ちDC非染色性菌株であるKET002、DC染色性菌株であるハ-4、チ-2を選抜した。本研究で清酒用大分酵母獲得の最終段階である第3スクリーニングを下記方法により行った。

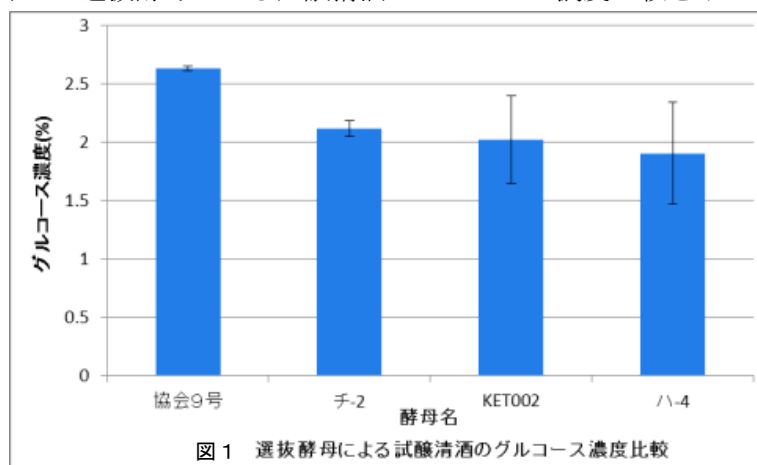
【第3スクリーニング方法】選抜された上記三種類の菌株及び日本醸造協会頒布、きょうかい酵母（清酒用）9号（以後協会9号と表記）を用いて、二回に亘り試醸（藤居酒造(株)）した各清酒の成分測定より、協会9号との最大相違性を有する菌株を大分酵母として推奨することを目的とした。藤居酒造(株)による各酵母菌株を用いた試醸清酒の製造では、70%精米五百万石（第1回）、70%精米ひのひかり（第2回）を原料とし、共に三段仕込み法を用いた。各試醸清酒の分析には、業界で通例の酸度・アミノ酸度及びpH測定、更に本研究室の詳細解析として常法としているグルコース定量、有機酸組成解析、アミノ酸組成解析、香気成分解析を行った。また市場化のためには官能検査を取り入れた。これらの結果を各項目で協会9号と最も相違する菌株1位を3点、2位を2点、3位を1点、類似（協会9号との数値差が0.1%以下の菌株）を0点とし、また、成分数値が同数値の菌株は同点として点数評価を行い、高得点を獲得した菌株を推奨大分酵母菌株とした。更に商品化に向けて、70%精米ひのひかりを原料とし、総米100kgの三段仕込み法により、推奨酵母及び醸造協会9号を用いて、試醸（株小松酒造場）した各清酒（第3回）の成分測定、官能検査により協会9号との相違性を検討した。

#### 【第3スクリーニング結果】

### 1) 第1回試醸清酒の全24項目の分析結果に於ける協会9号との相違性比較

#### 選抜酵母による試醸清酒のグルコースの定量分析結果

図1に選抜酵母による試醸清酒のグルコース濃度比較を示した。協会9号のグルコース濃度は



濃度は  $2.63 \pm 0.02\%$ 、チ-2 は  $2.12 \pm 0.07\%$ 、KET002 は  $2.02 \pm 0.38\%$ 、ハ-4 は  $1.90 \pm 0.46\%$ であった。協会9号のグルコース濃度との比較で、降順で80%のチ-2、77%のKET002、72%のハ-4となった。グルコース濃度において、全選抜酵母は協会9号より低く、且つ協会9号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会9号に近い菌株はチ-2であった。また、最も相違する菌株はハ-4であることが判明した。

協会9号より低く、且つ協会9号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会9号に近い菌株はチ-2であった。また、最も相違する菌株はハ-4であることが判明した。

## 選抜酵母による試醸清酒の酸度・pH 測定結果

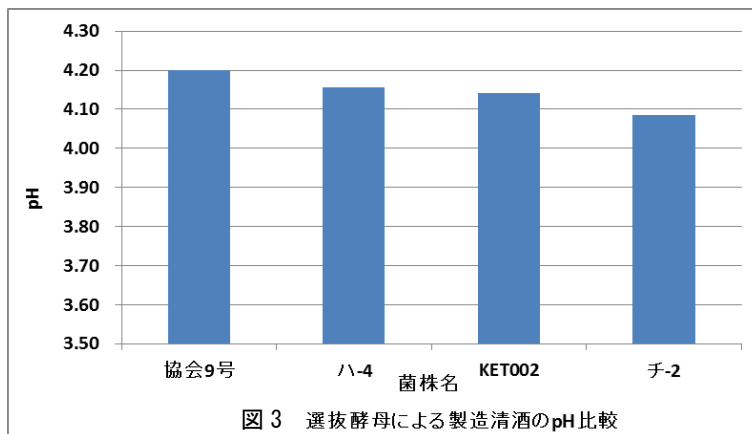
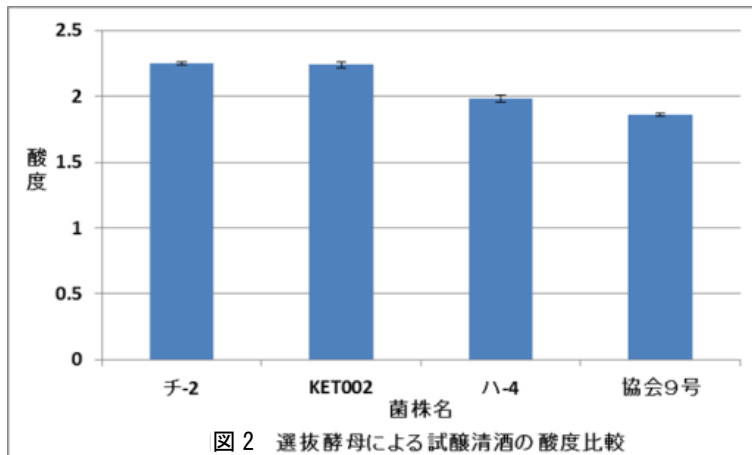
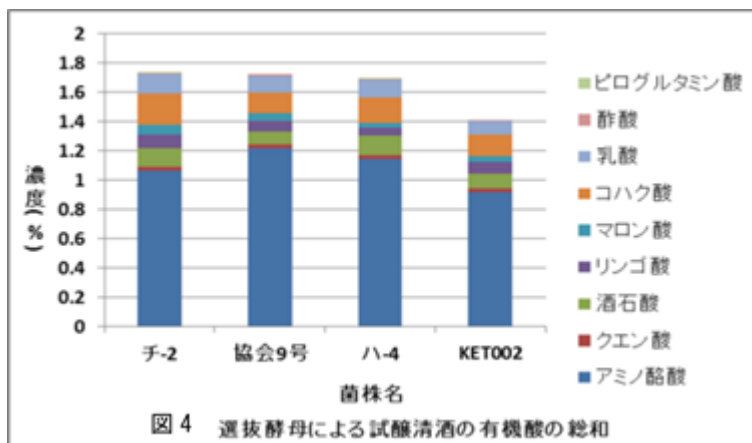


図 2 に選抜酵母による試醸清酒の酸度比較を示した。協会 9 号の酸度は  $1.86 \pm 0.01$ 、ハ-4 は  $1.98 \pm 0.03$ 、KET002 は  $2.24 \pm 0.02$ 、千-2 は  $2.25 \pm 0.01$  であった。協会 9 号の酸度との比較で、昇順で 1.06 倍のハ-4、1.20 倍の KET002、1.21 倍の千-2 となった。酸度に於いて、全選抜酵母は協会 9 号より高く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はハ-4 であった。また、最も相違する菌株は千-2 であることが判明した。図 3 に選抜酵母による試醸清酒の pH 比較を示した。協会 9 号の pH は 4.20、千-2 は  $2.25 \pm$

$0.01$ 、KET002 は  $2.24 \pm 0.02$ 、ハ-4 は  $1.98 \pm 0.03$  であった。協会 9 号の酸度との比較で、昇順でハ-4 は 99.0%、KET002 は 98.6%、千-2 は 97.1% となった。pH に於いて、全選抜酵母は協会 9 号より低い、協会 9 号に類似する菌株はハ-4 であった。また、協会 9 号に最も相違する菌株は千-2 であることが判明した。



## 選抜酵母による試醸清酒の有機酸の同定結果

図 4 に選抜酵母による試醸清酒の有機酸の総和を示した。最大有機酸総和を示したのは千-2 (1.73ppm)、降順で協会 9 号 (1.72ppm)、ハ-4 (1.69ppm)、KET002 (1.41ppm) であった。協会

9号との比較で、チ-2は1.006倍、ハ-4は98.26%、KET002は81.98%となった。有機酸の総和に於いて、協会9号に近似する菌株はチ-2であったが、他の2菌株は協会9号より少なく、最も少ない菌株はKET002であった。これらの結果から有機酸の総和が協会9号より最も少ないことで最大の相違を示したKET002が大分県酵母として推奨される。

#### 選抜酵母による試験清酒のアミノ酸度測定結果

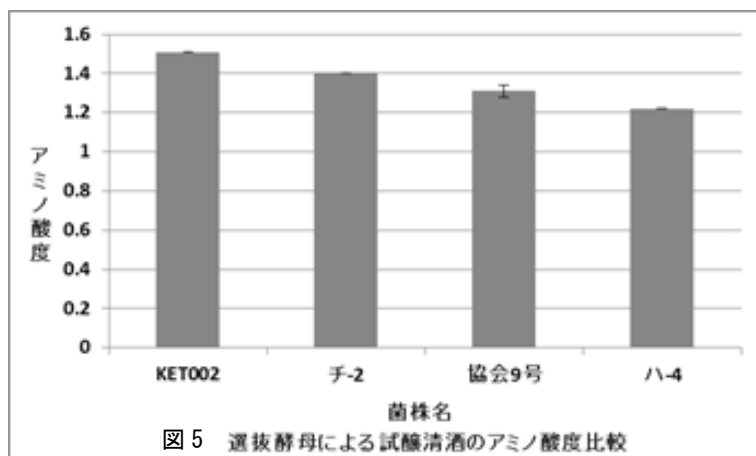


図5に選抜酵母による試験清酒のアミノ酸度比較を示した。協会9号のアミノ酸度は $1.31 \pm 0.029$ 、チ-2は $1.40 \pm 0.00$ 、ハ-4は $1.22 \pm 0.00$ 、KET002は $1.51 \pm 0.00$ であった。協会9号の酸度との比較で、昇順でKET002は1.15倍、チ-2は1.07倍、ハ-4は93%となった。アミノ酸度に於いて協会9号に

類似する菌株は存在しなかったが、最も協会9号に近い菌株はチ-2であり、最も協会9号に相違する菌株はKET002であることが判明した。

#### 選抜酵母による試験清酒のL-8900形高速アミノ酸分析計によるアミノ酸の種類と濃度分析結果

図6に選抜酵母による試験清酒のアミノ酸の総和を示した。アミノ酸の総和は協会9号と比較して、KET002は1.29倍、チ-2は1.18倍、ハ-4は1.04倍となった。アミノ酸の総和に於いて、全選抜酵母は協会9号より高く、且つ協会9号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会9号に近い菌株はハ-4であり、最も協会9号に相違する菌株はKET002であることが判明した。またこれらの結果(順位)は「表-36 TCA混合試料のニンヒドリン反応によるアミノ酸濃度概算比較」結果と一致したことから、アミノ酸総和量はTCA混合試料のニンヒドリン反応で代用可能となった。

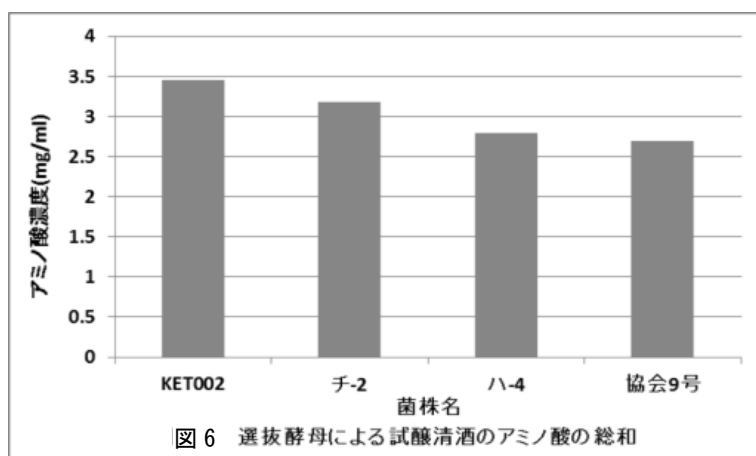
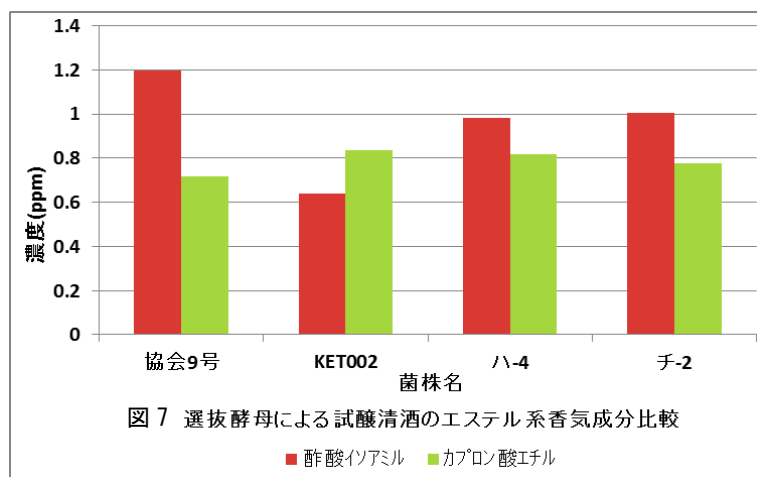


図6に選抜酵母による試験清酒のアミノ酸の総和を示した。アミノ酸の総和は協会9号と比較して、KET002は1.29倍、チ-2は1.18倍、ハ-4は1.04倍となった。アミノ酸の総和に於いて、全選抜酵母は協会9号より高く、且つ協会9号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会9号に近い菌株はハ-4であり、最も協会9号に相違する菌株はKET002であることが判明した。またこれらの結果(順位)は「表-36 TCA混合試料のニンヒドリン反応によるアミノ酸濃度概算比較」結果と一致したことから、アミノ酸総和量はTCA混合試料のニンヒドリン反応で代用可能となった。

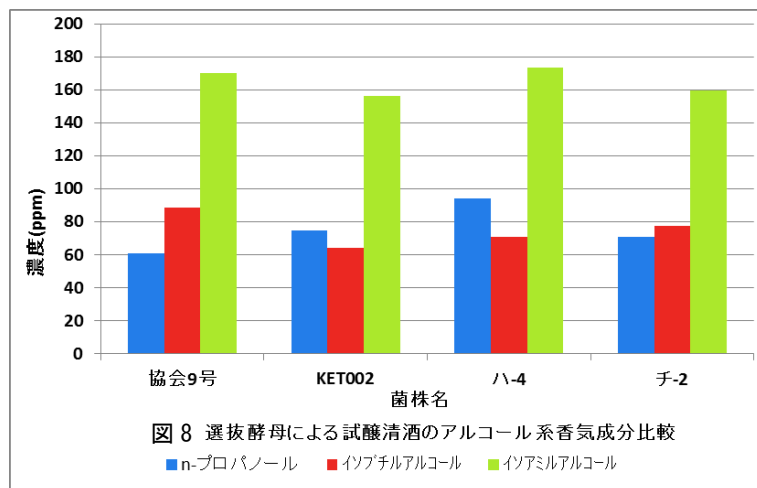
## 選抜酵母による試醸清酒の香り成分濃度測定結果

図 7 に選抜酵母による試醸清酒のエステル系香り成分比較を示した。酢酸イソアミル濃度は協会 9 号 ( $1.20 \pm 0.09 \text{ppm}$ ) と比較して KET002 ( $0.64 \pm 0.09 \text{ppm}$ ) は 53.6%、ハ-4 ( $0.98 \pm 0.06 \text{ppm}$ ) は 82.1%、チ-2



( $1.01 \pm 0.04 \text{ppm}$ ) は 84.1% だった。酢酸イソアミル濃度において、全選抜酵母は協会 9 号より低く、協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。

カプロン酸エチル濃度は協会 9 号 ( $0.72 \pm 0.18 \text{ppm}$ ) と比較して、KET002 ( $0.83 \pm 0.20 \text{ppm}$ ) は 1.16 倍、ハ-4 ( $0.82 \pm 0.15 \text{ppm}$ ) は 1.14 倍、チ-2 ( $0.77 \pm 0.14 \text{ppm}$ ) は 1.08 倍だった。カプロン酸エチル濃度において、全選抜酵母は協会 9 号より高く、協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。これらの結果から酢酸イソアミル、カプロン酸エチルの 2 種類のエステル系香り成分において協会 9 号と最も相違が見られるのは KET002 であり、更にこの KET002 のエステル系香り成分パターン (酢酸イソアミル濃度 < カプロン酸エチル濃度) は



協会 9 号と逆転することが明らかになった。

図 8 に選抜酵母による試醸清酒のアルコール系香り成分比較を示した。n-プロパノール濃度は協会 9 号 ( $60.98 \pm 0.50 \text{ppm}$ ) と比較して、KET002 ( $74.66 \pm 2.41 \text{ppm}$ ) は 1.22 倍、ハ-4 ( $94.07 \pm 4.83 \text{ppm}$ ) は 1.54 倍、チ-2 ( $70.87 \pm 1.01 \text{ppm}$ )

は 1.16 倍であった。n-プロパノールにおいて全選抜酵母は協会 9 号より高く、協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株はハ-4 であることが判明した。イソブチルアルコール濃度は協会 9 号 ( $88.45 \pm 4.19 \text{ppm}$ )

と比較して、KET002 ( $63.93 \pm 6.99\text{ppm}$ ) は 72.2%、ハ-4 ( $70.84 \pm 7.67\text{ppm}$ ) は 80.0%、チ-2 ( $77.64 \pm 5.55\text{ppm}$ ) は 87.8%であった。イソブチルアルコールにおいて全選抜酵母は協会 9 号より低く、協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。イソアミルアルコール濃度は協会 9 号 ( $169.97 \pm 1.09\text{ppm}$ ) と比較して、KET002 ( $156.26 \pm 2.65\text{ppm}$ ) は 91.9%、ハ-4 ( $173.24 \pm 7.43\text{ppm}$ ) は 1.02 倍、チ-2 ( $159.67 \pm 1.01\text{ppm}$ ) は 93.9%であった。イソアミルアルコールにおいて、最も協会 9 号に近い菌株はハ-4 であり、ハ-4 を除く 2 選抜酵母は協会 9 号より低く、最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。これらの結果から n-プロパノールを除くイソブチルアルコール、イソアミルアルコールの 2 種類アルコール系香気成分において、協会 9 号と最も相違が見られるのは KET002 であり、更にこの KET002 の n-プロパノール及びイソブチルアルコールパターン (n-プロパノール > イソブチルアルコール) が協会 9 号と逆転することが明らかになった。試作清酒の香気成分測定結果から、KET002 は、エステル系香気成分 (酢酸イソアミル、カプロン酸エチル)、アルコール系香気成分 (イソブチルアルコール、イソアミルアルコール) の 4 種の香気成分において協会 9 号と最も相違が見られた。KET002 は協会 9 号と同性質の DC 非染色性の *S.cereviziae* であるが、酢酸エチル及び n-プロパノールを除く他の香気成分で、協会 9 号に最も相違することから、協会酵母 7 号の可能性が考えられる。選抜酵母獲得に用いた酒粕は蔵元由来であるので、長い清酒製造期間には協会酵母 7 号を使用したこともあり得る。

### 試飲会による官能検査結果

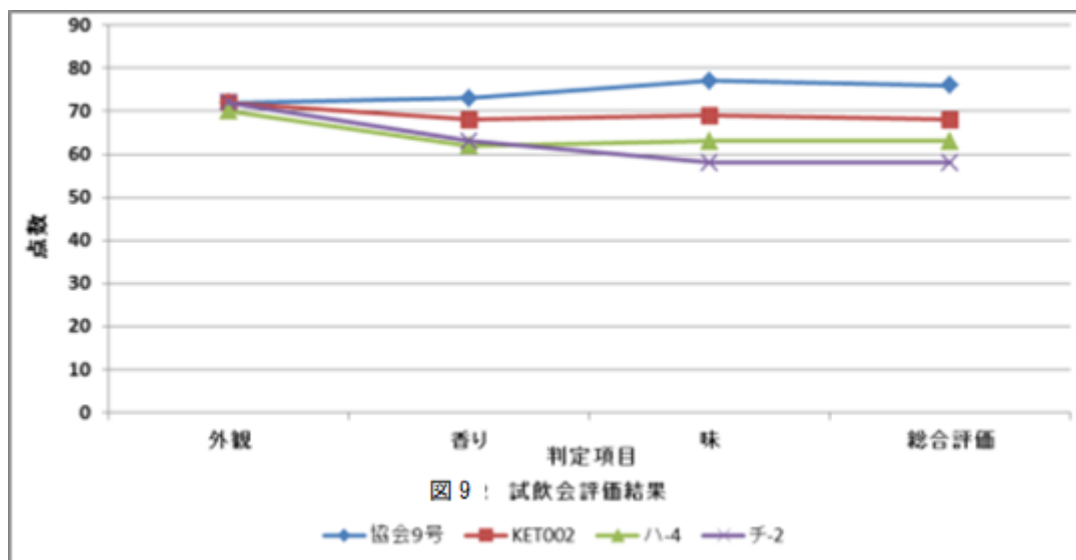


図 9 に選抜酵母による試醸清酒の試飲会評価結果を示した。アンケートは 5 点満点評価法とし、総合評価に点数が記載されていない場合は、製品の可能性の点数を採用した。更に総合評価を他の評価項目の合計としたパネリストは外した。外観の評価点はハ-4 (70 点) を除き、全て同値 (72 点) を示した。香り、味における最高評価点を獲得したのは協会 9 号

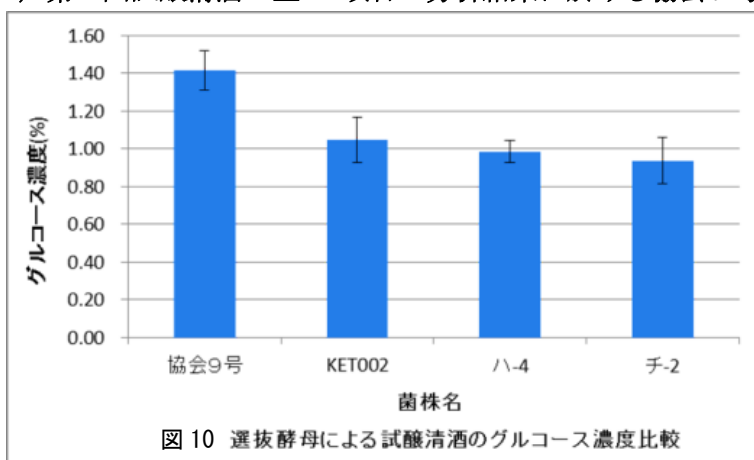
であったが、香気成分で協会 9 号と最大相違を示した KET002 は共に次点となった。ハ-4、チ-2 に関して、香り、味、共に KET002 より評価点は低い、両者間の相違として、香りでは近似値 (62、63 点)、味ではハ-4 が高い評価を得た。総合評価において、第 1 位は協会 9 号 (76 点) であったが、協会 9 号の 89.5% 評価点で KET002 (68 点) が次点となった。以降降順でハ-4 (63 点)、チ-2 の結果から選抜酵母の中で 大分酵母として推奨第 1 位は DC 非染色性の KET002 となった。DC 染色性であるハ-4、チ-2 は香り、味に於いて KET002 より低く、その結果総合評価点も KET002 に劣ることから KET002 程一般消費者向きではないと考えられる。また上記の結果から高い総合評価点の獲得には、香り、味に於いての高い評価点が重要と示唆された。

### 第 1 回試醸清酒の全分析結果に於ける協会 9 号との相違性比較

各成分で協会 9 号とは最も相違する菌株 1 位を 3 点、2 位を 2 点、3 位を 1 点、類似 (協会 9 号との数値差が 0.1% 以下の菌株) を 0 点とした。また、成分数値が同数値の菌株は同点として点数評価を行った結果、1 位が総合点数 52 点で KET002、2 位が 49 点でハ-4、3 位が 42 点でチ-2 となった。よって第 1 回試醸清酒の全分析結果に於ける協会 9 号との相違性が高い推奨大分酵母菌株 KET002 とした。

実験項目	KET002	ハ-4	チ-2
酸度	3	1	3
pH	2	0	3
アミノ酸度	3	1	1
アミノ酸度/酸度	1	3	2
グルコース濃度	2	3	1
アミノ酸組成と濃度	3	1	2
香気成分の総和	2	3	1
イソブチルアルコール	3	2	1
N-プロパノール	2	3	1
イソアミルアルコール	3	2	1
酢酸イソアミル	3	2	1
E/A比	3	2	1
酢酸エチル	1	3	2
カプロン酸エチル	3	2	1
有機酸の総和	3	2	0
アミノ酪酸	3	1	2
クエン酸	3	1	3
酒石酸	1	3	2
リンゴ酸	1	3	2
マロン酸	1	3	2
コハク酸	1	2	3
乳酸	3	1	2
酢酸	1	2	3
ピログルタミン酸	1	3	2
総合得点	52	49	42
ランク	1	2	3

### 2) 第 2 回試醸清酒の全 24 項目の分析結果に於ける協会 9 号との相違性比較



#### 選抜酵母による試醸清酒のグルコースの定量分析結果

図 10 に選抜酵母による試醸清酒のグルコース濃度比較を示した。グルコース濃度は協会 9 号 (1.41 ± 0.10%) と比較して、KET002 (1.05 ± 0.12%) は 74.2%、ハ-4 (0.98 ± 0.06%) は 69.7%、チ-2 (0.94 ± 0.12%) は 66.3%であった。

グルコース濃度において、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9 号に類似する菌株

は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株は KET002 であった。また、最も相違する菌株はチ-2 であることが判明した。更に第 1 回製造試醸清酒（五百万石使用）で得られた「全選抜酵母試醸清酒のグルコース濃度は協会 9 号より低い」結果は本実験により再現性が得られた。

### 選抜酵母による試醸清酒の酸度・pH 測定結果

図 11 に選抜酵母による試醸清酒の酸度比較を示した。協会 9 号 ( $2.52 \pm 0.03$ ) と比較して KET002 ( $3.48 \pm 0.04$ ) は 1.38 倍、チ-2 ( $3.07 \pm 0.02$ ) は 1.22 倍、ハ-4 ( $2.60 \pm 0.02$ ) は 1.03 倍であった。酸度に於いて全選抜酵母は協会 9 号より高く、且つ協会 9 号に類似する菌株は

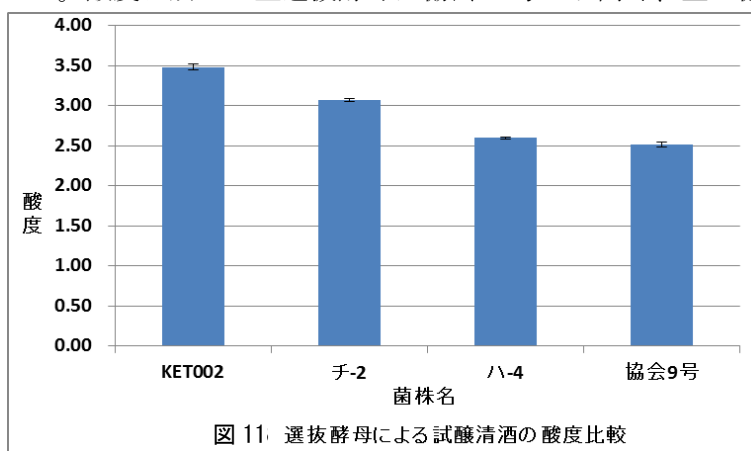


図 11 選抜酵母による試醸清酒の酸度比較

存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はハ-4 であった。また、最も相違する菌株は KET002 となった。更に第 1 回製造試醸清酒（五百万石使用）で得られた「全選抜酵母試醸清酒の酸度は協会 9 号より高い」及び「最も協会 9 号に近い菌株はハ-4」結果は本実験により再現性が得られた図 12 に選抜酵母による試醸清酒の pH 比較を示した。協会 9 号 (4.45) と比較してハ-4 (4.42) は 99.3%、チ-2 (4.38) は 98.4%、KET002 (4.17) は 93.7% であった。pH に於いて、全選抜酵母は協会 9 号

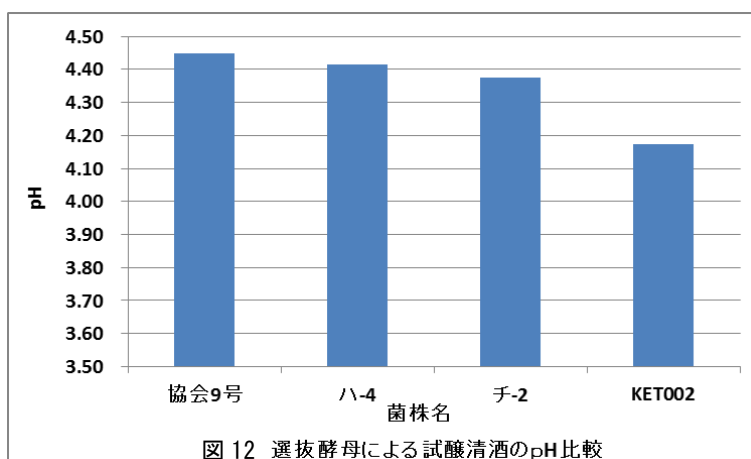


図 12 選抜酵母による試醸清酒のpH比較

より低い、協会 9 号に類似する菌株はハ-4 であった。また、協会 9 号に最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。更に第 1 回製造試醸清酒（五百万石使用）で得られた「全選抜酵母試醸清酒の酸度は協会 9 号より低い」及び「最も協会 9 号に近い菌株はハ-4」結果は本実験により再現性が得られた。

### 選抜酵母による試醸清酒の有機酸の同定結果



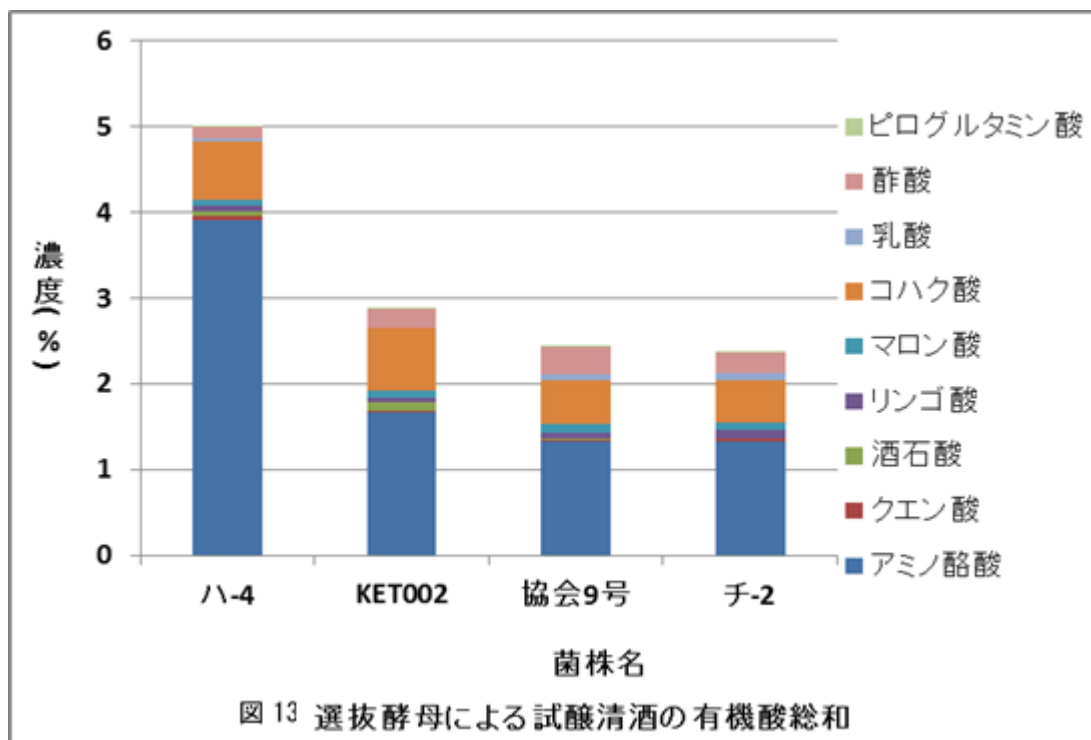
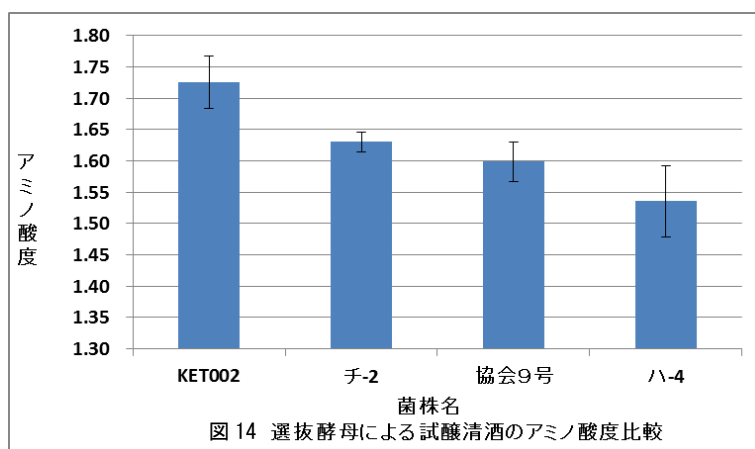


図 13 に選抜酵母による試醸清酒の有機酸総和を示した。有機酸の総和は協会 9 号 (2.43ppm) と比較してハ-4 (5.00ppm) は 1.44 倍、KET002 は 1.18 倍、チ-2 (2.37ppm) は 0.97 だった。有機酸の総和に於いて協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であった。また、協会 9 号に最も相違する菌株はハ-4 であることが判明した。更に第 1 回製造試醸清酒 (五百万石使用) で得られた「最も協会 9 号に近い菌株はチ-2」の結果は本実験により再現性が得られた。

#### 選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度測定結果

図 14 に選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度比較を示した。アミノ酸度は協会 9 号 (1.60



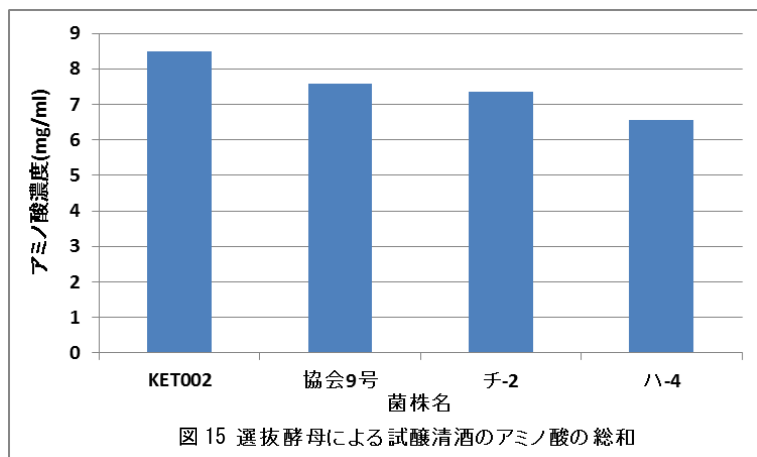
± 0.03) と比較して KET002 (1.73 ± 0.04) は 1.08 倍、チ-2 (1.63 ± 0.02) は 1.02 倍、ハ-4 (1.54 ± 0.06) は 96.0% だった。アミノ酸度に於いて協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であり、最も協会 9 号に相

違する菌株は KET002 であることが判明した。また第 1 回製造試醸清酒 (五百万石使用) で

得られた「最も協会9号に近い菌株はチ-2であり、最も協会9号に相違する菌株はKET002」結果は本実験により再現性が得られた。

### 選抜酵母による試醸清酒のL-8900形高速アミノ酸分析計によるアミノ酸の種類と濃度分析

図15に選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸の総和を示した。アミノ酸の総和は協会9号(7.59mg/ml)と比較してKET002(8.50mg/ml)は1.12倍、チ-2(7.37mg/ml)は97.1%、ハ-4(6.57mg/ml)は86.6%であった。アミノ酸の総和に於いて協会9号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会9号に近い菌株はチ-2であり、最も協会9号に相違する菌株はハ-4であることが判明した。

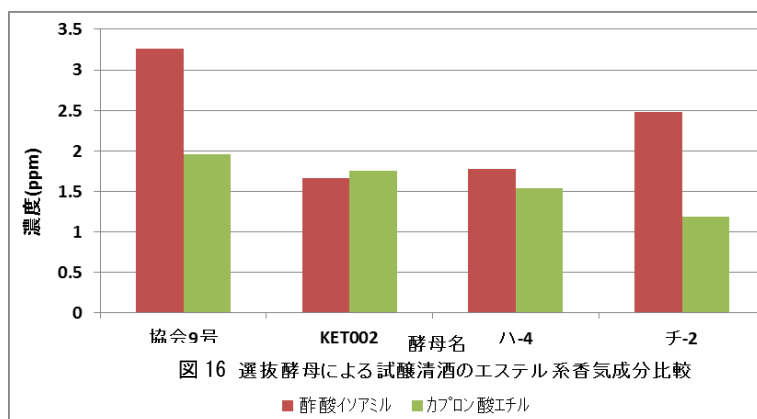


しなかったが、最も協会9号に近い菌株はチ-2であり、最も協会9号に相違する菌株はハ-4であることが判明した。

### 選抜酵母による試醸清酒の香り成分濃度測定結果

図16に選抜酵母による試醸清酒のエステル系

香り成分比較を示した。酢酸イソアミル濃度は協会9号(3.26±0.21ppm)と比較してKET002(1.66±0.10ppm)は50.9%、ハ-4(1.77±0.03ppm)は54.4%、チ-2(2.48±0.11ppm)は75.9%だった。酢酸イソアミル濃度において、全選抜酵母は協会9号より低く、且つ協会9号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会9号に近似する菌株はチ-2であり、最も相違する菌株はKET002であることが判明した。

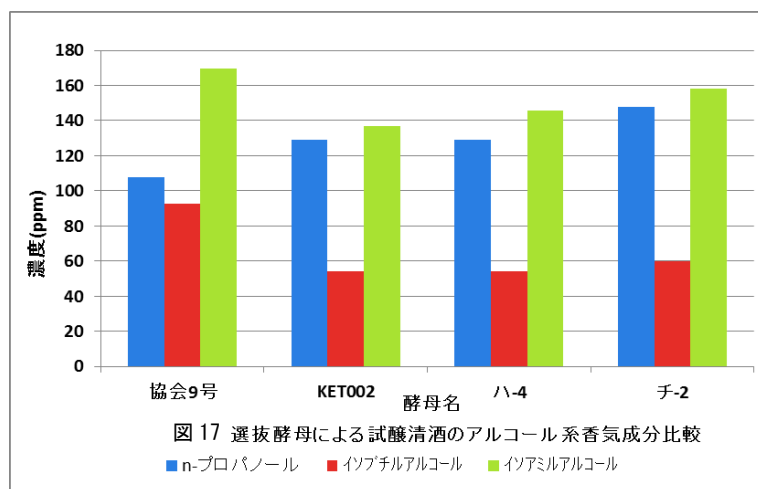


る菌株はKET002であることが判明した。カプロン酸エチル濃度は協会9号(1.96±0.07ppm)と比較して、KET002(1.75±0.11ppm)は89.6%、ハ-4(1.54±0.06ppm)は78.5%、チ-2(1.18±0.55ppm)は60.4%だった。

カプロン酸エチル濃度において、全選抜酵母は協会9号より低く、且つ協会9号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会9号に近似する菌株はKET002であり、最も相違する菌株はチ-2であることが判明した。

図17に選抜酵母による試醸清酒のアルコール系香り成分比較を示した。n-プロパノール濃度は協会9号(107.68±3.06ppm)と比較して、KET002(129.20±4.84ppm)は1.21倍、ハ-4(128.8±2.50ppm)は1.20倍、チ-2(147.79±4.42ppm)は1.37倍だった。n-プロパノール

ルにおいて、全選抜酵母は協会 9 号より高く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株はハ-4 であり、最も相違する菌株はチ-2 であることが判明した。



が判明した。イソブチルアルコール濃度は協会 9 号 (92.50 ± 2.49ppm) と比較して、KET002 (54.19 ± 1.81ppm) は 58.6%、ハ-4 (54.17 ± 1.45ppm) は 58.6%、チ-2 (59.76 ± 1.02ppm) は 64.6% だった。イソブチルアルコールにおいて、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9

号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株は KET002 とハ-4 であることが判明した。イソアミルアルコール濃度は協会 9 号 (169.89 ± 5.67ppm) と比較して、KET002 (136.86 ± 6.41ppm) は 80.1%、ハ-4 (145.94 ± 4.02ppm) は 85.9%、チ-2 (158.03 ± 6.75ppm) は 93.0% だった。イソアミルアルコールにおいて、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。

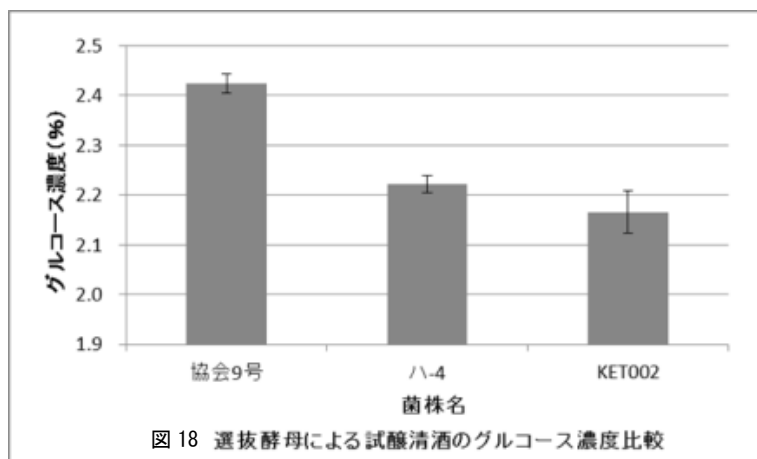
これら 6 酒類の全香気成分分析結果より、n-プロパノールを除くイソブチルアルコール、イソアミルアルコールの 2 種類のアルコール系香気成分において、またエステル系香気成分の酢酸イソアミルにおいても協会 9 号と最も相違が見られるのは KET002 となった。更に第 1 回製造試醸清酒 (五百万石使用) で得られた「イソブチルアルコール、イソアミルアルコールの 2 種類のアルコール系香気成分において、協会 9 号と最も相違が見られるのは KET002」結果は本実験により再現性が得られた。

### 試飲会による官能検査結果

第二回選抜酵母による試醸清酒の官能検査の結果、合計点数が KET002 は 41 点、チ-2 は 33 点、ハ-4 は 29.5 点、協会 9 号は 29 点となった。これらの結果から、最大評価 (最低点) を得たのは協会 9 号であった。最も協会 9 号に匹敵する菌株はハ-4、協会 9 号に最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。これらの結果から協会 9 号と同様に市場に迎合される選抜酵母はハ-4 となった。

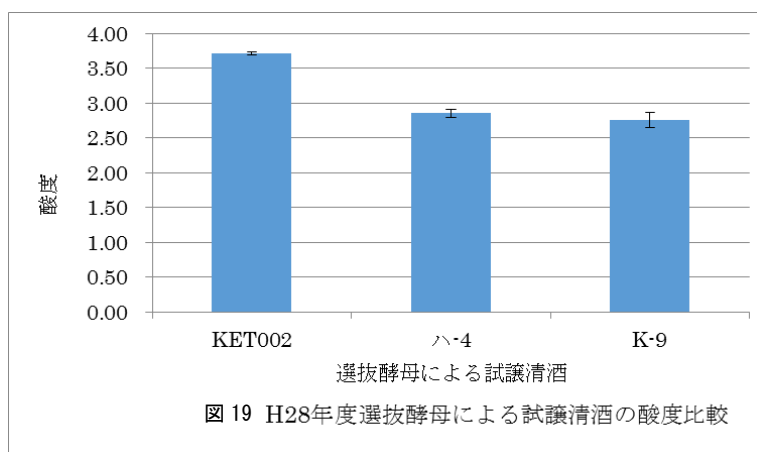
### 3) 第 3 回試醸清酒の全 24 項目の分析結果に於ける協会 9 号との相違性比較 選抜酵母による試醸清酒のグルコースの定量分析結果

図 18 に選抜酵母による試醸清酒のグルコース濃度比較を示した。グルコース濃度は協会 9 号 ( $2.42 \pm 0.02\%$ ) と比較して、KET002 ( $2.17 \pm 0.04\%$ ) は 89.3%、ハ-4 ( $2.22 \pm 0.02\%$ ) は 91.6%であった。グルコース濃度において、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株はハ-4 であった。また、最も相違する菌株は



KET002 であることが判明した。更にこれまでの実験結果で得られた「全選抜酵母試醸清酒のグルコース濃度は協会 9 号より低い」結果は本実験により再現性が得られた。また H27 年度第 2 回製造実験結果では、協会

9 号のグルコース濃度は  $14.13 \pm 1.04 \text{mg/ml}$  であったのに対し、本実験では  $24.24 \pm 0.196 \text{mg/ml}$  だった。ハ-4 は  $9.84 \pm 0.571 \text{mg/ml}$  から  $22.22 \pm 0.167 \text{mg/ml}$ 、KET002 は  $10.48 \pm 1.199 \text{mg/ml}$  から  $21.66 \pm 0.419 \text{mg/ml}$  となり、いずれも  $10 \text{mg/ml}$  以上グルコース濃度の増加がみられた。ハ-4 は H27 年度第 2 回製造実験結果では今回実験を行った 3 つの全選抜酵母の中で最も低いグルコース濃度であったが、今回の実験では協会 9 号の次に高いグルコース濃度となった。協会 9 号と比較したグルコース濃度は、H27 年度第 2 回製造実験結果では 69.7%であったのに対し本実験では 91.6%となった。また、KET002 の協会 9 号と比較したグルコース濃度は、H27 年度第 2 回製造実験結果では最も協会 9 号に近似する値を示した 74.2%であったが、本実験では最も相違していたにもかかわらず 89.3%であった。これらの結果から、本実験では H27 年度第 2 回製造実験結果と比較すると、酵母によるグルコース濃度の差が全体的に小さくなったと言える。



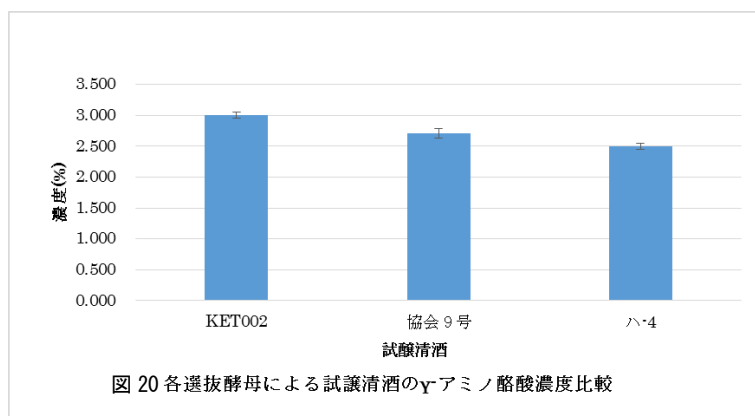
#### 選抜酵母による試醸清酒の酸度測定結果

図 19 に H28 年度選抜酵母による試醸清酒の酸度比較を示した。協会 9 号 (K-9) の酸度は  $2.76 \pm 0.11$ 、ハ-4 は  $2.86 \pm 0.06$ 、KET002 は  $3.72 \pm 0.02$  であった。協会 9 号の酸度との比較で、降順で 1.34

倍の KET002、次いで 1.03 倍のハ-4 となった。酸度に於いて、最も相違する菌株は KET002 で、協会 9 号に類似する菌株はハ-4 であった。また、本年度の酸度は、平成 27 年度第 2 回目の同酵母の 10kg 試醸清酒の酸度と比較して、協会 9 号は 1.48 倍、ハ-4 は 1.44 倍、KET002 は 1.66 倍と全ての菌株で増大することが明らかになった。しかし、酸度の順位は本結果と一致した。これらの結果から仕込み量を増やすことで、酸度も増大するが、酸度の順位は変化しないことが判明した。

### 選抜酵母による試験醸造清酒の HPLC による有機酸の同定結果

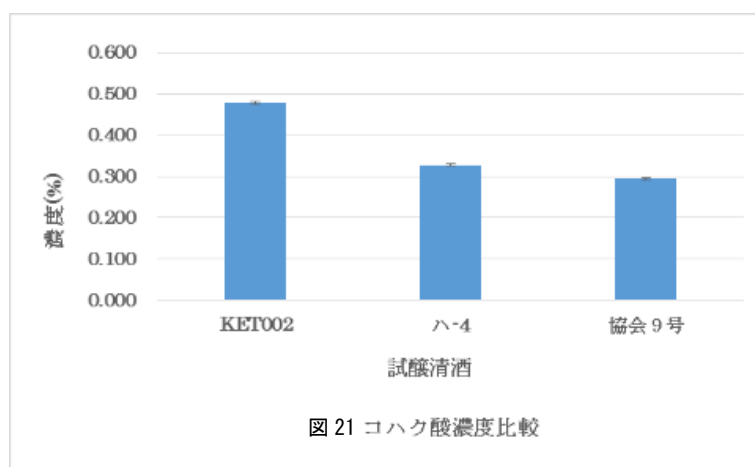
図 20 に選抜酵母による試験醸造清酒のアミノ酪酸濃度比較を示した。アミノ酪酸 ( $\gamma$ -アミノ-n-酪酸) 濃度は協会 9 号と比較してハ-4 は 92.2%、KET002 は 1.11 倍であった。アミノ酪酸濃度に於いて、KET002 は協会 9 号より高く、ハ-4 は協会 9 号より低いことが明らかになった。 $\gamma$ -アミノ酪酸は頭文字をとった略称 GABA として知られている。GABA には気持ちを落ち着かせる「抗ストレス作用」がある。脳に存在する抑制系の神経伝達物質として、ストレスを和らげ、興奮した神経を落ち着かせる働きをしている。ドーパミンなど興奮系の神経伝達物質の過剰分泌を抑えて、リラックス状態



持ちを落ち着かせる「抗ストレス作用」がある。脳に存在する抑制系の神経伝達物質として、ストレスを和らげ、興奮した神経を落ち着かせる働きをしている。ドーパミンなど興奮系の神経伝達物質の過剰分泌を抑えて、リラックス状態

態をもたらすと言われている。KET002 による試験醸造清酒は協会 9 号よりも GABA の抗ストレス作用によるリラックス効果が高くなると考えられる。

図 21 に選抜酵母による試験醸造清酒のコハク酸濃度比較を示した。コハク酸濃度は協会 9 号と比較してハ-4 は 1.11 倍、KET002 は 1.62 倍であった。コハク酸濃度に於いて、両菌株とも協会 9 号より高く、最高コハク酸濃度を呈するのは KET002 となった。



とも協会 9 号より高く、最高コハク酸濃度を呈するのは KET002 となった。コハク酸は、貝類のうま味成分の酸としてよく知られている有機酸で、独特な酸味とうま味があり、清酒や合成酒、味噌・醤油などの味(酸味・うま味)の調整に使われている。

また、腸内のコハク酸濃度が 20 ミリモルになると、大腸がん細胞の増殖が 50% 近くまで減

り、胃がん細胞でも抑制効果があることが確認され、コハク酸に疾病予防作用が見つけられた。これらの情報から旨味及び疾病予防作用が高いのは KET002、次いでハ-4、協会 9 号と推定される。

### 選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度測定結果

H28 年度選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度を比較した。協会 9 号のアミノ酸度は  $2.38 \pm 0.04$ 、KET002 は  $2.29 \pm 0.08$ 、ハ-4 は  $2.22 \pm 0.03$  であった。協会 9 号のアミノ酸度との比較で、降順で KET002 は 96.2%、ハ-4 は 93.3% といずれも協会 9 号を下回ることが明らかになった。本年度のアミノ酸度は平成 27 年度第 2 回目の同酵母の 10kg 試醸清酒のアミノ酸度と比較して、協会 9 号は 1.82 倍、ハ-4 は 1.82 倍、KET002 は 1.52 倍と全ての菌株で増大し、アミノ酸度の順位も変化した。これらの結果から仕込み量を増やすことで、アミノ酸度も増大するが、アミノ酸度の順位も変化することが判明した。

### 選抜酵母による小仕込み試醸清酒の香気成分濃度測定結果

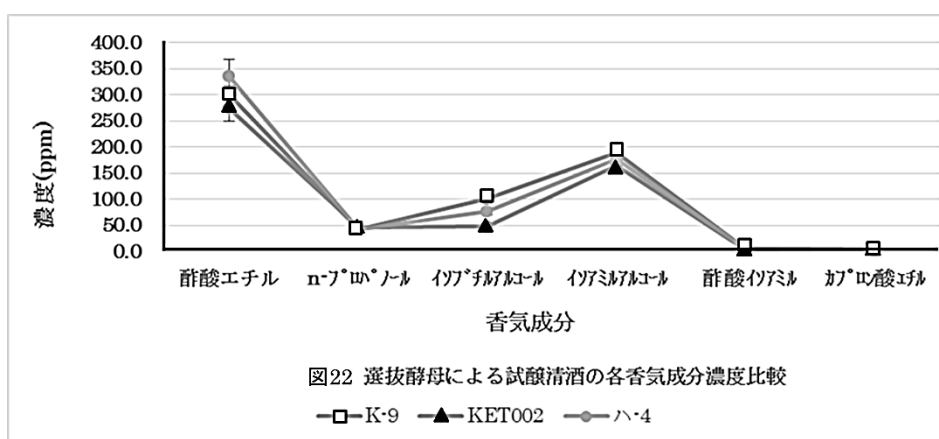


図 22 に選抜酵母による試醸清酒の香気成分濃度比較測定結果を示した。全菌株で最高濃度を有する香気成分は酢酸エチル、次点はイソアミルアルコール、第 3 位はイソブチルアルコール、第 4 位は n-プロパノールであった。第 5 位は協会 9 号 (K-9) 及びハ-4 の酢酸イソアミルと KET002 のカプロン酸エチルに分かれ、第 6 位は第 5 位と連動し K-9 及びハ-4 のカプロン酸エチルと KET002 の酢酸イソアミルに分かれた。これらの結果から、全菌株でアルコール系香気成分は酢酸エチルを除くエステル系香気成分より濃度が高く、共通して第 1 位がイソアミルアルコール、エステル系では第 1 位が酢酸エチルであることが明らかになった。平成 27 年度第 2 回目の同酵母の 10kg 試醸清酒の香気成分濃度比較において、第 3 位、第 4 位であった酢酸エチルが本年度の 100kg 試醸清酒では最高濃度となり、前年度では最高濃度を示したイソアミルアルコールは今年度において次点となった。仕込み量を増加することで、酢酸エチル生成がイソアミルアルコール生成を上回ることが明らかになった。

## 試飲会による官能検査結果

試醸清酒の官能検査結果を示した。合計点数が協会9号は606点、ハ-4は575点、KET002

種類	判定項目 評点(点)	外見 人数	各評価点合計		香り 人数	各評価点合計		味 人数	各評価点合計		商品化の可能性 人数	各評価点合計		総合評価 人数	各評価点合計	外見・香り・味・総合の総点数
			各評価点合計	人数		各評価点合計	人数		各評価点合計	人数		各評価点合計	人数			
K-9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	606	
	2	5	10	0	0	3	6	2	4	1	2	33	11	2		
	3	16	48	11	33	12	36	10	30	11	68	17	68			
	4	8	32	17	68	13	52	11	44	17	68	5	25			
	5	5	25	6	30	6	30	6	30	5	25					
各小計	6	34	115	34	131	34	124	29	108	34	128					
ハ-4	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	575		
	8	4	8	2	4	4	8	2	4	2	4	42	14		42	
	9	17	51	21	63	13	39	13	39	14	60	15	60			
	10	9	36	7	28	11	44	10	40	15	60	3	15			
	11	4	20	4	20	6	30	4	20	3	15					
各小計	12	34	115	34	115	34	121	29	103	34	121					
KET002	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	573		
	14	4	8	3	6	5	10	3	6	3	6	64	16		64	
	15	17	51	17	51	11	33	10	30	13	39	2	10			
	16	9	36	11	44	13	52	13	52	16	64					
	17	4	20	3	15	5	25	3	15	2	10					
各小計	18	34	115	34	116	34	120	29	103	34	119					

は573点となった。これらの結果から、最大評価（最高点）を得たのは協会9号であった。最も協会9号に匹敵する菌株はハ-4、協会9号に最も相違する菌株はKET002であることが判明した。これらの結果から協会9号と同様に市場に迎合される選抜酵母はハ-4となった。

### 3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

第1回、第2回、第3回試醸清酒の分析結果に於ける協会9号との相違性が最も高い菌株はKET002、第2位がハ-4、第3位がチ-2となった。これらの結果を基に大分県清酒用酵母開発研究委員会により、特性が清酒協会酵母9号に近いハ-4が清酒用大分酵母No.1、清酒協会酵母9号と相違するKET002が清酒用大分酵母No.2と決定した。またNo.2を用いて試験販売（1.8L×300本）した結果完売した（H28年）。

選抜酵母試醸清酒の酸度、アミノ酸度、グルコース濃度、有機酸濃度、香气成分濃度におけるK-9との比較した結果を下記に示した（K-9との差が0～10%未満差を±1点、10%以上～20%未満差は±2点とした）。

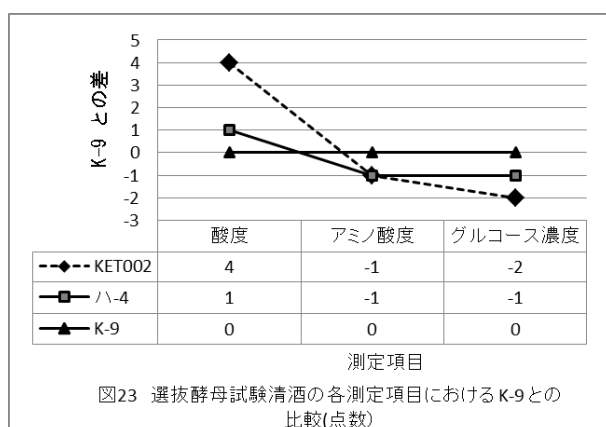


図23 選抜酵母試醸清酒の各測定項目におけるK-9との比較(点数)

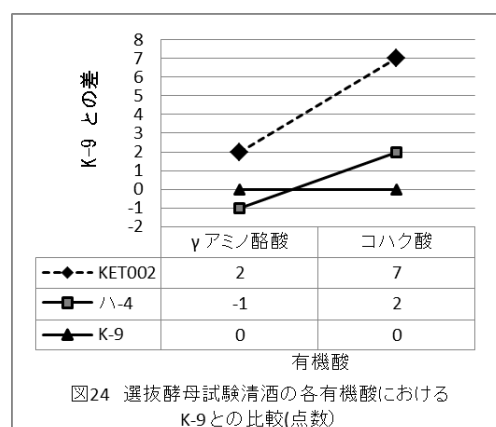
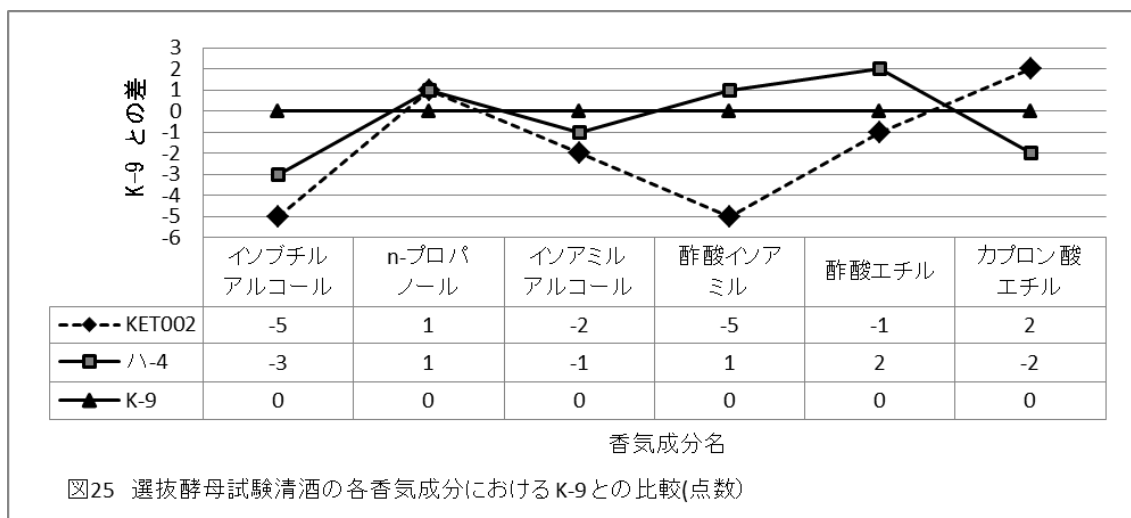


図24 選抜酵母試醸清酒の各有機酸におけるK-9との比較(点数)

上記の結果から、ハ-4は旨味、甘味が僅かに低く、酸味が僅かに高いK-9系、KET002は切れのあるスッキリとした味（酸味が強く、旨味が少なく、甘味は更に少ない）が示唆され、更にハ-4は燃料臭が少なく、洋梨を含むフルーティーな香りを有し、KET002は燃料臭が大幅に少なく、パイナップル様の香りが高いことが明らかになった。これらの結果から、現在

これら清酒用大分酵の特性を活かした清酒製造方法の開発や特性改革（カプロン酸エチル生成能向上）に既に取り組んでいる。



## 研究タイトル：②棚田の特産物として香り米を栽培し、その焼酎としての商品化の開発を開始

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 発酵食品製造学研究室

担当者職名：教授 岡本啓湖

### 1. 研究の目的

別府大学には大分県、大分農業文化公園と協定締結した「大分農業文化公園棚田プロジェクト」があり、学生主体の夢米（ゆめ）棚田チームが大分農業文化公園内の棚田で作物の栽培を中心に年間を通じた活動を行っている。大分農業文化公園は標高が高く昼夜の気温差の大きい環境のため、学生達は栽培可能な珍しい水稻品種を探し、辿り着いたのが香り米（Aromatic Rice）であった。香り米は不良田であっても育成できるような吸肥力の強さに特徴があり、更に昼夜の気温差の大きい田で栽培すると香りが強くなるので、棚田チームにとって最適な品種であった。そこで香り米の新たな利用法として、焼酎麹（*Aspergillus kawachii*）と焼酎酵母（焼酎協会酵母 S-2）を用い、掛米に香り米及びヒノヒカリ米（対照）を加える三段仕込みの焼酎製法による本格焼酎の研究が始められた。その結果、香り米焼酎の低沸点アルコール系香気成分の最大濃度を示したのは対照のヒノヒカリ米焼酎と同様、強烈で特有な香りを有するイソアミルアルコールであったが、低沸点エステル系香気成分の最大濃度はフルーティーな香りを有する酢酸エチルで、ヒノヒカリ米焼酎の 1.32 倍と高くなった。また 17 名のパネラーによる官能検査の総合評価では、第 1 位に白岳しろ（市販品）、次いで対照のヒノヒカリ米焼酎、最下位が香り米焼酎となった。本研究では上記香り米添加焼酎の商品化を目指し、掛米としての香り米の最適条件を見出すために、エステル系香気成分を主とする清酒醪用（*Aspergillus oryzae*）及び清酒用協会酵母 901 を用い、更に添加率を減少さ



せることで市場に受け入れられる香り米添加本格米焼酎の製造方法を検索した。

## 2. 研究内容

### 【方法】

#### 1) 81.82% (総仕込水／総米) 醪の製造方法

ヒノヒカリ米醪、10%香り米醪、1%香り米醪の製造には種麴に清酒醪用 (*Aspergillus oryzae*) ((株) 樋口松之介商店)、酵母に清酒用協会酵母 901 号 ((公) 日本醸造協会) を用い、三段仕込み法とした。一次仕込みには共にヒノヒカリ米を使用し、二次仕込み、三次仕込みに対照にはヒノヒカリ米、試験区には 1%、10%になるように香り米を添加した。ヒノヒカリ米 (100g) を 1 時間浸漬した後、1 時間蒸煮、冷却後に種麴 (0.1g) を接種し、48 時間製麴後、滅菌水 (120ml) 及び清酒用協会酵母 901 号 (2.5ml) を加え (1 次仕込み)、15℃で 7 日間発酵後、ヒノヒカリ米焼酎醪にはヒノヒカリ米 (225g) を、1%香り米焼酎醪には香り米 (2.25g) 及びヒノヒカリ米 (222.75g) を、10%香り米焼酎醪には香り米 (22.5g) 及びヒノヒカリ米 (202.5g) を添加し、各醪に滅菌水 (165ml) を添加した (2 次仕込み)。更に翌日、二次仕込みと同様ヒノヒカリ米、香り米、滅菌水量、及びグルク SG (天野エンザイム (株) グルコアミラーゼ 50.0% : 二次仕込み発酵物に対して 0.025% 含量) を加えた (三次仕込み) 後 16~19 日間発酵した。

#### 2) 160% (総仕込水／総米) 醪の製造工程

ヒノヒカリ米醪、1%香り米醪、2%香り米醪、5%香り米醪の製造には 81.82% (総仕込水／総米) 醪の二次仕込みの滅菌水を 400ml に、三次仕込みを 300ml に増量し、三次仕込み後ヒノヒカリ米醪、1%香り米醪は 16~19 日間、1%香り米醪、2%香り米醪、5%香り米醪は 19~28 日間発酵し、その他は全て同一工程とした。

#### 3) 蒸留方法

##### 常圧蒸留法

得られた 81.82% (総仕込水／総米) ヒノヒカリ米醪、10%香り米醪、1%香り米醪はマントルヒーター (大科電器株式会社製) を用いて常圧蒸留に供し、初留を排除した後、蒸留水を加え酒精計 ((株) 横田計機器製作所) でアルコール 25% に調整した。

##### 常圧蒸気蒸留方法

得られた 160% (総仕込水／総米) ヒノヒカリ米醪、1%香り米醪、2%香り米醪及び 5%香り米醪はマントルヒーター (大科電器株式会社製) を用いて常圧水蒸気蒸留し、初留を排除した後、蒸留水を加え酒精計 ((株) 横田計機器製作所) でアルコール 25% に調整した。

##### 減圧蒸留方法

得られた 160% (総仕込水／総米) 1%香り米醪を減圧蒸留 (江藤製作所) 用タンクに移し、減圧 (-0.092MPa) 状態で内部温度を 55℃ に加熱蒸留し、蒸留水を加え酒精計 ((株) 横田計

機器製作所) でアルコール 25%に調整した。

#### 4) 醪の清酒協会酵母 901 の生菌数測定

醪 0.1ml を採取して、0.9%生理食塩水 0.9ml に懸濁し 101~1010 まで段階希釈し、各々段階希釈した溶液 200  $\mu$ l を YM 寒天培地 (酵母エキス 0.3g、ペプトン 0.5g、グルコース 1.0g、寒天 2.0g 蒸留水 100ml) に添加し、菌液を均一に広げた後、30℃で 3 日間培養後に菌数を測定した。

#### 5) 生成エチルアルコール濃度算出

発酵初日より重量計により醪の重量を測定し、重量減少量から生成エチルアルコール濃度を算出した。

#### 6) 焼酎の GC による低沸点香气成分測定方法

(独) 酒類総合研究所作成方法の改良法より測定した。

#### 7) 各焼酎の官能検査方法

各焼酎をパネリストに提供し、外見、香り、味、総合評価の 4 項目に関して官能検査を行った。各項目に付き、最高点を 5 点とし、最低点を 1 点とした 5 点満点法での評価を依頼した。

### 【結果及び考察】

#### 81.82% (総仕込水/総米) 醪の清酒協会酵母 901 号の生菌数比較

81.82% (総仕込水/総米) 醪の発酵日数に伴う清酒協会酵母 901 の生菌数動態に於いて、全醪共に発酵 3 日で最大値 ( $2.77 \pm 0.77 \times 10^8$ cfu/ml) を近似値\*で示し、二次仕込み、三次仕込みにより一旦減少し、発酵 10 日で最小値 ( $4.61 \pm 0.65 \times 10^5$ cfu/ml) を示した。しかし

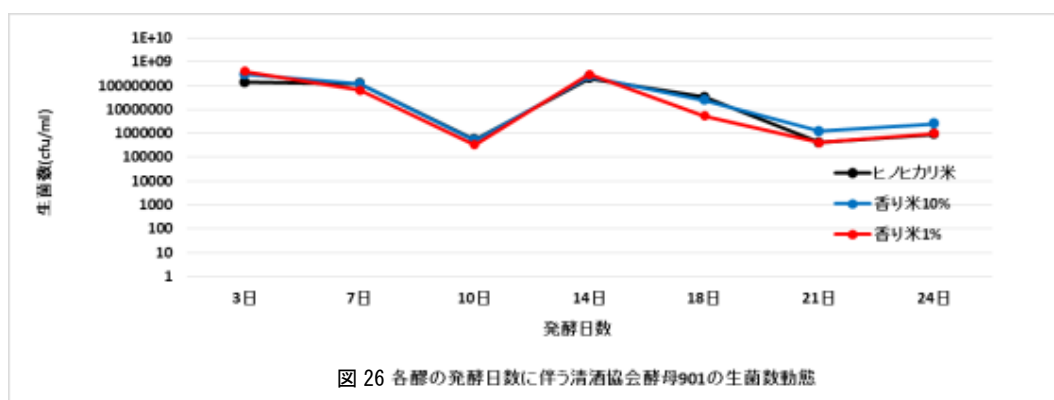


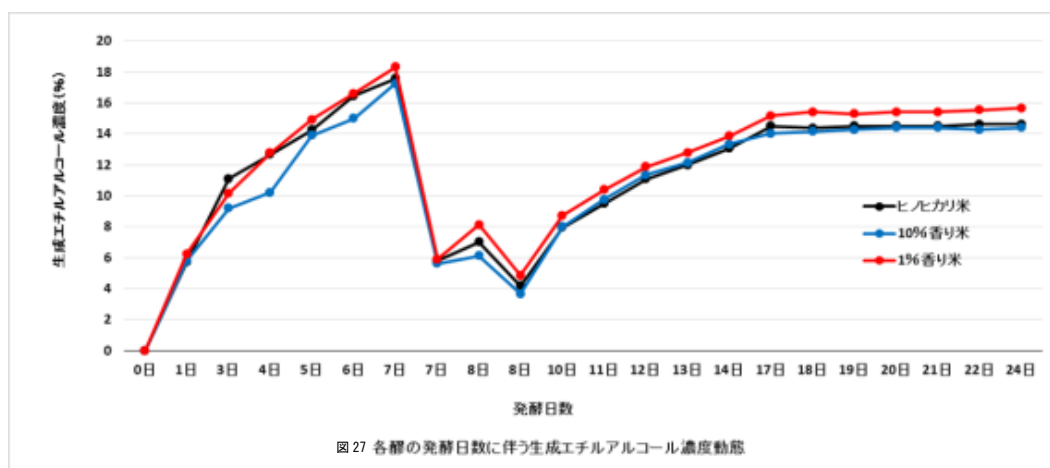
図 26 各醪の発酵日数に伴う清酒協会酵母901の生菌数動態

発酵 14 日 ( $2.43 \pm 0.26 \times 10^8$ cfu/ml) には発酵 3 日の 87.7%まで回復し、その後は発酵日数に伴い再度減少し、発酵 21 日 ( $0.68 \pm 0.28 \times 10^6$ cfu/ml)、発酵 24 日 ( $1.46 \pm 0.50 \times 10^6$ cfu/ml)

は近似値を示した。全醪とも生菌数動態で近似値を示したことから、1%及び10%香り米添加による清酒協会酵母901号への増殖抑制は見られないと判断した。

### 81.82% (総仕込水/総米) 醪のエチルアルコール生成能比較

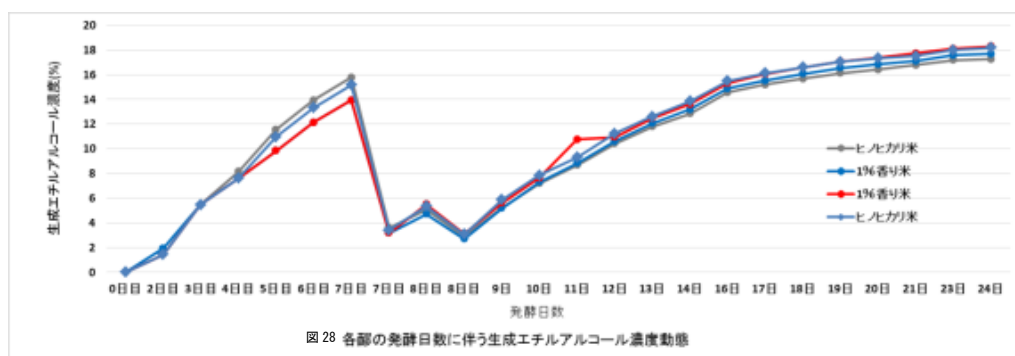
81.82% (総仕込水/総米) 醪の生成エチルアルコール濃度動態に於いて、全醪共に発酵0日から生成エチルアルコール濃度は増加し、発酵7日で最大値を示した。この時点での各醪の最大生成エチルアルコール濃度は  $17.8 \pm 0.3\%$  と近似値\*\*を示した。二次仕込み、三次仕込みにより一旦減少するが、三次仕込み以降回復し、発酵最終日(24日)での生成エチ



ルアルコール濃度も  $14.9 \pm 0.4\%$  と近似値を示した。三次仕込み法の特徴として、発酵終了時の生成エチルアルコール濃度が三次仕込み直前(発酵7日)の濃度まで回復するのが望ましいが、各醪とも発酵7日の  $84.2 \pm 0.8\%$  に留まった。全醪とも生成エチルアルコール動態での濃度が近似値を示したことから、1%及び10%香り米添加による清酒協会酵母901号の生成エチルアルコール能への抑制は見られないと判断した。

\*\*近似値：標準誤差/平均 < 0.05

### 160% (総仕込水/総米) 醪のエチルアルコール生成能比較

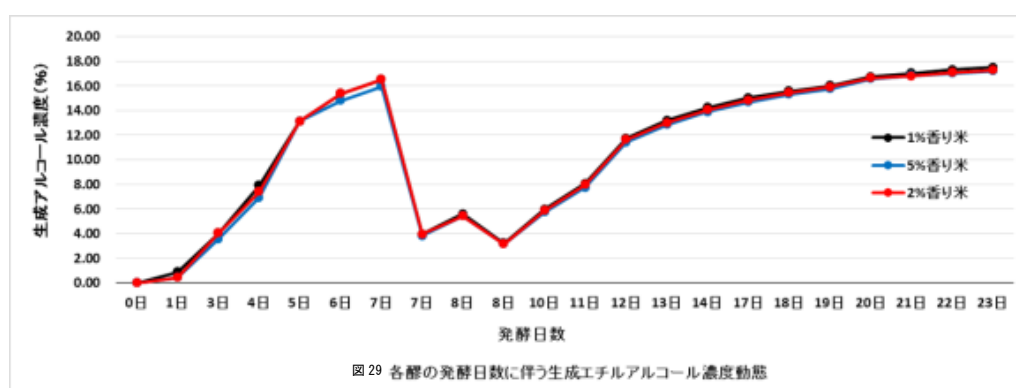


三次仕込み後発酵期間16日~19日での、160% (総仕込水/総米) 醪の生成エチルアルコール濃度動態に於いて、全醪共に発酵0日から生成エチルアルコール濃度は増加し、発酵7

日で  $14.7 \pm 0.8\%$  を呈し、近似値を示した。二次仕込み、三次仕込みにより一旦減少するが、三次仕込み以降回復し、発酵最終日 (24 日) で最大生成エチルアルコール濃度 ( $17.9 \pm 0.4\%$ ) を醸し出し、この濃度は全醪で近似値を示した。また発酵最終日濃度は各醪とも発酵 7 日の  $121.5 \pm 8.3\%$  に増加し、これらの結果から 160 % (総仕込水/総米) 醪法により全醪の高濃度でのエチルアルコール生成が得られることが判明した。

### 160 % (総仕込水/総米) 醪のエチルアルコール生成能比較

三次仕込み後発酵期間 26 日~28 日法での 160 % (総仕込水/総米) 醪の生成エチルアルコール濃度動態に於いて、全醪共に発酵 0 日から生成エチルアルコール濃度は増加し、発酵 7 日で  $16.3 \pm 0.2\%$  を呈し、近似値を示した。二次仕込み、三次仕込みにより一旦減少するが、三次仕込み以降回復し、発酵最終日 (23 日) で最大生成エチルアルコール濃度 ( $17.3 \pm 0.1\%$ ) を醸し出し、この濃度は全醪で近似値を示した。また発酵最終日濃度は各醪とも発酵 7 日の  $106.1 \pm 0.0\%$  に増加し、これらの結果から 160 % (総仕込水/総米) 醪法により全醪の高濃度でのエチルアルコール生成が得られることが再検証された。



### 81.82% (総仕込水/総米) 醪より常圧蒸留で得られた各焼酎の特性比較

#### 官能検査比較

パネリストとして成人男女の計 18 名で、評価点合計は各評価点×人数とし、各小計は各項目の合計点とし、総点数は各焼酎での各小計の合計とした。「外見」は蒸留水で割水するため、全ての焼酎に於いて僅かに白濁を帯びるため、評価点は  $67.3 \pm 0.3$  で、近似値を示した。また「香り」評価点 ( $69.0 \pm 1.0$ )、「味」評価点 ( $68.0 \pm 1.01$ )、「総合評価」点 ( $63.0 \pm 1.0$ )、総点数 ( $267.3 \pm 2.3$ ) の全ての項目に於いても近似値を示した。官能検査評価での 1%、10% 香り米焼酎は対照であるヒノヒカリ米と同値となった。

焼酎名	判定項目		外見		香り		味		総合評価		外見・香り・味・総合の総点数
	評点(点)	人数	各評価点合計	人数	各評価点合計	人数	各評価点合計	人数	各評価点合計		
ヒノヒカリ米焼酎	5	2	10	1	5	3	15	2	10	263	
	4	10	40	11	44	7	28	8	32		
	3	6	18	6	18	7	21	6	18		
	2	0	0	0	0	1	2	1	2		
	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
各小計		18	68	18	67	18	66	17	62		
1%香り米焼酎	5	2	10	4	20	5	25	4	20	271	
	4	9	36	9	36	7	28	7	28		
	3	7	21	4	12	5	15	5	15		
	2	0	0	1	2	0	0	1	2		
	1	0	0	0	0	1	1	0	0		
各小計		18	67	18	70	18	69	17	65		
10%香り米焼酎	5	2	10	5	25	5	25	3	15	268	
	4	9	36	8	32	9	36	8	32		
	3	7	21	3	9	2	6	4	12		
	2	0	0	2	4	0	0	1	2		
	1	0	0	0	0	2	2	1	1		
各小計		18	67	18	70	18	69	17	62		

### 低沸点香气成分濃度パターン比較

蒸留酒である焼酎には醸造酒の清酒で測定される酸度（有機酸含有量）やアミノ酸度（アミノ酸含有量）が検出されない（データ表示無し）ため、香り、味を支配する成分として低沸点香气成分が重要と考えられる（図 30）。全焼酎のアルコール系香气成分の中で最大濃度を有するのはイソアミルアルコール、エステル系香气成分で最大濃度を有するのは酢酸エチルであった。イソアミルアルコール濃度が酢酸エチル濃度より高いパターンをイソアミルアルコール型、酢酸エチルより低いパターンを酢酸エチル型と定義した。81.82%（総仕込水／総米）醪の常圧蒸留法で得られる焼酎は全てイソアミルアルコール型を呈することが明らかになった。全焼酎のイソアミルアルコール濃度は  $545.0 \pm 17.6\text{ppm}$  で近似値を示したが、酢酸エチル濃度では差が見られ、10%香り米焼酎（278.7ppm）、次いで 1%香り米焼酎（224.9ppm）、第3位はヒノヒカリ米焼酎（215.0ppm）となった。また酢酸エチル（EA）のイソアミルアルコール（IAA）に対する比率（EA/IAA）は、10%香り米焼酎 0.53、ヒノヒカリ米焼酎 0.41、1%香り米焼酎 0.39 であった。イソアミルアルコールは近似値のため、EA/IAAが高いのは酢酸エチル濃度が高いと推論される。しかし本研究で得られた相違は官能検査

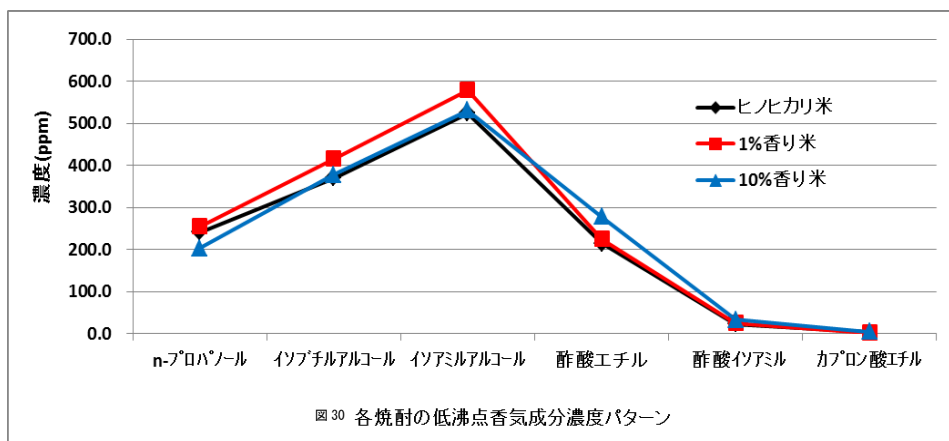


図 30 各焼酎の低沸点香气成分濃度パターン

には反映されないことが明らかになった。

## 160 % (総仕込水／総米) 醪の常圧水蒸気蒸留法及び減圧蒸留法により得られた各焼酎の特性比較

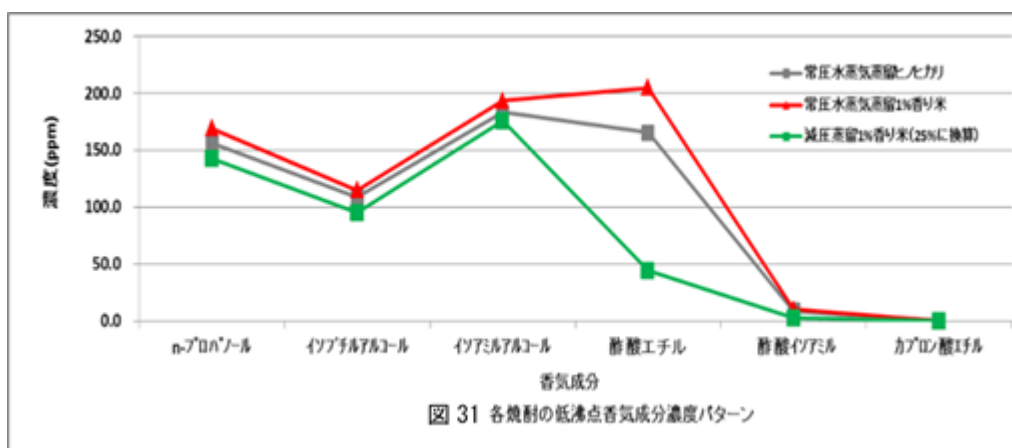
### 官能検査比較

パネリストとして成人男女の計 11 名で行なった。「外見」の評価点 (35.3±1.7) のみ近似値を示したが、他の項目には差が見られ。最も差が大きい項目は「香り」、次いで「総合評価」、「味」及び「総点」であった。この要因として減圧蒸留 1% 香り米焼酎が他の二焼酎に比べ極端に点数が低いことにある。160 % (総仕込水／総米) 醪の 1% 香り米は減圧蒸留法ではパネリストに受け入れられないことが明らかとなった。常圧水蒸気蒸留法で得られた 1% 香り米焼酎の対照ヒノヒカリ米焼酎との比較に於いて、「外見」及び「味」の評価点が高く、その結果総点数が高くなった。常圧水蒸気蒸留法で得られた 1% 香り米焼酎は対照ヒノヒカリ米焼酎よりもパネリストに受け入れられることが明らかとなった。

種類	判定項目		外見		香り		味		総合評価		外見・香り・味・総合の総点数
	評点(点)	人数	各評価点合計	人数	各評価点合計	人数	各評価点合計	人数	各評価点合計		
常圧水蒸気蒸留 ヒノヒカリ焼酎	5	0	0	1	5	0	0	0	0	147	
	4	1	4	6	24	5	20	6	24		
	3	8	24	4	12	3	9	5	15		
	2	2	4	0	0	3	6	0	0		
	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
各小計		11	32	11	41	11	35	11	39		
常圧水蒸気蒸留 1%香り米焼酎	5	1	5	1	5	0	0	0	0	154	
	4	2	8	6	24	5	20	6	24		
	3	8	24	4	12	5	15	5	15		
	2	0	0	0	0	1	2	0	0		
	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
各小計		11	37	11	41	11	37	11	39		
減圧1%香り米焼酎	5	1	5	0	0	1	5	1	5	125	
	4	2	8	1	4	0	0	0	0		
	3	8	24	5	15	5	15	4	12		
	2	0	0	5	10	5	10	6	12		
	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
各小計		11	37	11	29	11	30	11	29		

### 低沸点香氣成分濃度パターン比較

三次仕込み後発酵期間 16 日～19 日法の 160.0% (総仕込水／総米) 醪の常圧水蒸留法及び減圧蒸留法で得られる焼酎は酢酸エチル型を呈した常圧水蒸留 1% 香り米を除き、他はイソアミルアルコール型を呈した。全焼酎のイソアミルアルコール濃度は 184.2±5.1ppm で近似値を示したが、酢酸エチル濃度では差が見られ、最大値は常圧水蒸気蒸留 1% 香り米焼酎 (204.8ppm)、次いでヒノヒカリ米焼酎 (165.7ppm)、減圧蒸留 1% 香り米焼酎 (44.5ppm) となった。ヒノヒカリ米に 1% 香り米を添加することで、酢酸エチルが 1.2 倍に増加し、その結果イソアミルアルコール型ヒノヒカリ米焼酎が、酢酸エチル型に変化すると考えられる。また酢酸エチルのイソアミルアルコールに対する比率 (EA/IAA) は、常圧水蒸気蒸留 1% 香



り米焼酎で 1.06、常圧水蒸気蒸留ヒノヒカリ米焼酎で 0.90、減圧蒸留 1% 香り米焼酎で 0.25 となった。イソアミルアルコールは近似値のため、EA/IAA が高いのは酢酸エチル濃度が高いと再検証された。また対照のヒノヒカリ米焼酎は仕込み水量増加 (1.96 倍) 及び水蒸気蒸留により EA/IAA の上昇に繋がると考えられる。1% 香り米醪の蒸留法を変えることで低沸点香気成分濃度が変化した。減圧蒸留法ではアルコール系成分が常圧水蒸気蒸留法の 85.9 ± 2.6% に減少し、エステル系成分に於いてはアルコール系成分より減少率が大きく、酢酸エチルでは 21.7%、酢酸イソアミルでは 26.3% まで減少することが明らかになった。本研究で得られた相違は官能検査にも反映され、官能検査の順位 (常圧水蒸気蒸留 1% 香り米焼酎、次いでヒノヒカリ米焼酎、最下位減圧蒸留 1% 香り米焼酎) は EA/IAA の順位と一致した。パネリストの評価に関係する成分として酢酸エチルが示唆された。また本研究により減圧蒸留 1% 香り米焼酎の評価点が少ない理由も明らかになった。

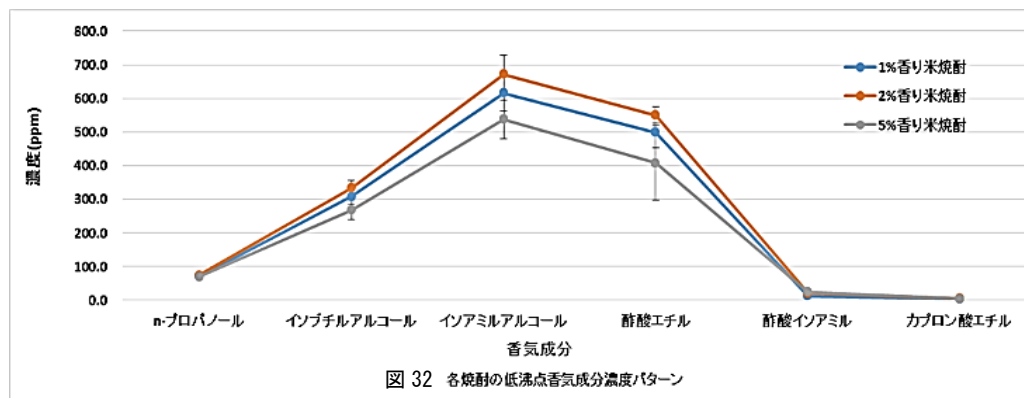
### 160 % (総仕込水/総米) 醪の常圧水蒸気蒸留法により得られた各焼酎の特性比較 官能検査比較

種類	判定項目		外見		香り		味		総合評価		外見・香り・味・総合の総点数
	評点(点)	人数	各評価点合計	人数	各評価点合計	人数	各評価点合計	人数	各評価点合計		
1% 香り米焼酎	5	8	40	1	5	0	0	0	0	433	
	4	15	60	5	20	4	16	7	28		
	3	11	33	24	72	18	54	24	72		
	2	0	0	4	8	7	14	3	6		
	1	0	0	0	0	5	5	0	0		
各小計		34	133	34	105	34	89	34	106		
2% 香り米焼酎	5	6	30	0	0	0	0	0	0	458	
	4	10	40	18	72	11	44	18	72		
	3	18	54	12	36	14	42	13	39		
	2	0	0	3	6	8	16	2	4		
	1	0	0	1	1	1	1	1	1		
各小計		34	124	34	115	34	103	34	116		
5% 香り米焼酎	5	3	15	1	5	3	15	1	5	449	
	4	13	52	11	44	12	48	12	48		
	3	17	51	18	54	9	27	17	51		
	2	1	2	3	6	7	14	4	8		
	1	0	0	1	1	3	3	0	0		
各小計		34	120	34	110	34	107	34	112		

パネリストは20~21歳の男性15名、女性19名の計34名で行なった。各評価点では「外見」(125.7±3.8)、「香り」(100.9±2.9)、「総合評価」(111.3±2.9)、「総点」(446.7±7.3)に於いて近似値を示した。「味」のみに差が見られ、5%香り米焼酎、次いで2%香り米焼酎、第3位が1%香り米焼酎となった。

### 低沸点香気成分濃度パターン比較

三次仕込み後発酵期間26日~28日法の160.0%（総仕込水/総米）醪の常圧水蒸留法で得られる焼酎は全てイソアミルアルコール型を呈し、全焼酎で近似値を示したのはn-プロパノール(71.7±1.3ppm)のみであった(図32)。他の成分には差が見られることから、各焼酎の1%香り米焼酎の各低沸点香気成分濃度比率（n-プロパノールを除く）を調べた。その結果、2%香り米焼酎のアルコール系成分は1%香り米焼酎と近似値を示したが、エステル系成分は1.39±0.18倍に増加した。これらエステル系香気成分は清酒酵母により生成される<sup>14)</sup>ことから、2%では添加香り米の増加が清酒酵母のエステル系成分、特にカプロン酸エチル（リンゴ様の香り）、酢酸イソアミル（バナナ様の香り）の生合成を促進に繋がること考えられる。しかし5%香り米焼酎では酢酸イソアミルを除く他の成分は88.5±6.0%に減少に転じた。各醪での生菌数動態は近似値を示したことから、5%では酢酸イソアミル以外は酵母による生合成経路に阻害が生じたと考えられる。酢酸エチルのイソアミルアルコールに対する比率(EA/IAA)は、全焼酎で0.80±0.021と近似値を示した。EA/IAAは1、2、5%



の香り米の添加率には影響されないと考えられる。更に本研究での三次仕込み後発酵期間26日~28日法の1%香り米焼酎はEA/IAAが0.81のイソアミルアルコール型を呈したが、同16日~19日法の1%香り米焼酎はEA/IAAが1.06の酢酸エチル型を示した。これら両者の製造上の相違は三次仕込み後の発酵日数の相違(10日間)のみである。このことから三次仕込み後から蒸留までの発酵日数の長短により、酢酸エチル濃度の変更すると考えられる。この現象は蒸留後の保存中にも見られるとのことである。既に商品化された本格焼酎夢香米は蒸留から販売まで5ヶ月程熟成させた後に瓶詰めする。開封直後の夢香米のEA/IAAも0.81であった。本研究で得られた相違は官能検査に於いて男性パネリストに反映され、官能検査の順位(5%香り米焼酎、次いで、2%香り米焼酎、1%香り米焼酎)は「味」の評価順位と一致した。



### 3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

上記研究の結果より、長稈、短稈香り米が栽培され、これらを用いた香り米焼酎の研究に発展した。醗製造にはヒノヒカリ米に *Aspergillus oryzae* を接種し製麴した麴に清酒協会酵母 901 を添加し、15℃で7日間発酵後、掛米を発酵7、8日に添加する三段仕込みを用い、常圧水蒸気蒸留法により蒸留後、割水し25度に調整した。掛け米は単独で用いヒノヒカリ米、長稈香り米、短稈香り米とした。割水後のヒノヒカリ米（焼酎）（対照）に長稈（香り米焼酎）又は短稈（香り米焼酎）を混合し、各香り米焼酎1%、2%、5%を作製した。各焼酎の香気成分分析は（独）酒類総合研究所法により行った。アルコール系（低沸点）香気成分で最大値を呈するイソアミルアルコール（IA）、次点のイソブチルアルコール（IB）濃度は対照比較で、長稈、短稈共に高く、エステル系香気成分の酢酸エチル（EA）、カプロン酸エチル（EC）濃度は低濃度を示した。更に長稈、短稈1%、2%、5%では対照との比較でアルコール系成分濃度は近似値を示した（5%短稈香り米焼酎のイソアミルアルコールを除く）が、エステル系成分では多様な結果となった。即ち、酢酸エチルでは増加：2%長稈、減少：5%長稈、1%短稈、5%短稈、酢酸イソアミルでは増加：2%長稈>1%短稈≒1%長稈>5%長稈（>は増加率の順位）、カプロン酸エチルでは減少：5%長稈、5%短稈のみであった。これらの結果は、2019年に向けての新たな本格焼酎「夢香米」の誕生に繋がった。また本研究により本格焼酎「夢香米」製造に於ける HACCP 取得の実績をもたらした。

### 研究タイトル：③③ 本学科卒業生等をリサーチアシスタントへの採用と技術者及びシステム構築技師としての指導

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 発酵食品製造学研究室

担当者職名：教授 岡本啓湖

研究協力者：陶山明子

実験補助：佐藤茉莉香

#### 1. 研究の目的

本担当の最終目標は、大分県下醸造業界及び食品業界に高度な解析・開発方法を推進させることである。本研究では GC による低沸点香気成分測定のために CTC-2014 (SHIMAZU) 及び HS-20 HEADSPACE SAMPLER を用いた GC 操作を、酸度、アミノ酸度及びグルコースの詳細な解析のために HPLC 操作を修得させるために、学生にマニュアル作成をさせ、更に作成したマニュアルで他の学生に対しての指導者としての体験を積ませた。

#### 2. 研究の内容

大分県下醸造業界及び食品業界に高度な解析・開発方法を推進させるという課題達成の為には、各企業の食品を本研究で確立した高次解析システムを用いて共同研究や、研修の受け入れ、あるいは委託分析として受け入れる必要がある。この高次解析システムは清酒用大

分酵母の獲得及び本格焼酎「夢香米」の製品化を達成させた。高次解析システムの一つに GC による低沸点香気成分測定方法がある。これは(独)酒類総合研究所方法に準じているが、この解析に新たな知見(低沸点好気性成分濃度パターン)を導入した。このため学生に、CTC-2014 (SHIMAZU) 及び HS-20 HEADSPACE SAMPLER を用いた GC 操作を修得させるために、マニュアル作成をさせ、更に作成したマニュアルで他の学生に対しての指導者としての体験を積むことで、GC 操作初心者でも数ヶ月で GC 分析・解析オペレータとしての育成(GC 分析・解析オペレータ育成システム)が達成された。この実績育成から、今後の低沸点香気成分に於いての委託分析業務の可能性が確認された。また酸度、アミノ酸度及びグルコースの詳細な解析には HPLC による分析法が必須である。このため GC 分析・解析オペレータ育成システムに従い、HPLC 分析・解析オペレータ育成システムを開始し、学生によりマニュアルを作成した。HPLC 操作初心者でも数ヶ月で HPLC 分析・解析オペレータとしての育成(HPLC 分析・解析オペレータ育成システム)を推進した。

### 3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

#### 【今後の計画】

完成した GC および HPLC 操作マニュアルを用い、操作初心者の卒論研究学生を数ヶ月で GC および HPLC 分析・解析オペレータとして育成する。さらに低沸点香気成分、酸度、アミノ酸度及びグルコースにおいて委託分析業務を推進したい。

### 4. 研究成果

#### a) 原著論文

1. 岡本 啓湖、高橋 義樹、都甲 花織、棚田特産香り米を使用した新焼酎開発に於けるヒノヒカリ米との特性比較、2017、別府大学大学院紀要 第 19 号 79-91
2. 岡本啓湖、平井龍一、日野美香、浅田貴美子、藤原秀彦、カボス (*Citrus sphaerocarpa*) 花から高確率で *Saccharomyces cerevisiae* を獲得するための最適分離初期条件、2016、別府大学大学院紀要 第 18 号 47-55
3. Hidehiko Fujihara, Mika Hino, Kimiko Asada, Hideharu Takashita, Yasuhiro Kajiwara, Toshimasa Nakamura, Keiko Okamoto and Kensuke Furukawa. 2014, Efficient Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains from Environmental Isolates that are suitable for brewing. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **78**:1086-1089.

#### c) 招待講演、シンポジウム

##### 1. 大分県酒造組合での講演

- (1) 池見俊介、岡本啓湖「大分県酒造組合選抜酵母による小仕込み製造清酒の品質及び酵母菌の特性比較」2015 年 10 月 20 日
- (2) 小野浩輝、難波桃子、岡本啓湖「大分県酒造組合選抜酵母 (ハ-4、KET002) の小仕込

み製造清酒の清酒酵母会 9 号との品質及び特性比較」 2016 年 10 月 27 日

2. 藤居酒造（株）での講演

堀田瑞稀、岡本啓湖「HACCP 取得に向けての取り組み」2017 年 2 月 28 日

3. 平成 29 年度おおいた食品産業企業会 ミニ展示会での講演

堀田瑞稀<sup>1)</sup>、石垣祐介<sup>1)</sup>、高橋義樹<sup>1)</sup>、小野浩輝<sup>1)</sup>、山海志穂里<sup>1)</sup>、藤居崇<sup>2)</sup>、藤居徹<sup>2)</sup>、  
今城敏<sup>3)</sup>、岡本啓湖<sup>1)</sup>

1) 別大・食栄・発酵食品 2) 藤居酒造（株） 3) ロイドレジスタージャパン（株）  
食品安全ハザードの防除を実現する本格焼酎「夢香米」製造における HACCP 導入

4. 2017 年度 後期「国際文化論」（公開講座）にて講演

「別府大学六次産業により生まれた本格焼酎「夢香米」の誕生と今後の展望」  
（平成 29 年 11 月 28 日）

5. 天瀬まちづくり大学」受講生の別府大学訪問での講演

「別府大学六次産業により生まれた本格焼酎「夢香米」の誕生と今後の展望」  
（平成 29 年 12 月 4 日）

e) 国内学会

1. 2018 年 日本農芸化学会 2018 年度大会 1 件
2. 2017 年 第 24 回 日本生物工学会九州支部沖縄大会 1 件
3. 2017 年 第 113 回 日本食品衛生学会学術講演会 1 件
4. 2016 年 第 23 回 日本生物工学会九州支部飯塚大会 1 件
5. 2015 年 第 22 回 日本生物工学会九州支部宮崎大会 1 件

g) その他（学会賞、報道など）

- 1) 学生の卒業研究成果に基づく別府大学六次産業による本格焼酎夢香米（ゆめ）の商品化  
平成 28 年 4 月 2016 年バージョン本格焼酎夢香米の大分香りの博物館での販売  
平成 29 年 9 月 大分県・別府大学・藤居酒造（株）の官学民からなる夢米棚田プロジェクト六次産業推進組織の設立  
平成 30 年 2 月 2017 年バージョン本格焼酎夢香米の大分香りの博物館及び別府市内の酒販店での販売

2) 報道関連

- (1) 平成 28 年 2 月 17 日 農業共済新聞《地域農業に役立つ研究 別府大学「夢米棚田プロジェクト」～香り米で焼酎 念願の商品化～ 高橋義樹さん・食物栄養科学部発酵食品学科 4 年》に掲載
- (2) 平成 28 年 2 月 21 日 （朝刊）朝日新聞「先輩の研究継ぎ別大生が焼酎」「香り米栽培、ブレンド」「5 月販売へ熟成中」掲載
- (3) 平成 28 年 4 月 12 日 TOS テレビ大分（4:50～7:00 TOS ゆ～わくワイド）出演

- ゆ〜ナビ別府大学（特集 180 秒）サブタイトル【別府大学ブランド焼酎「夢香米」】
- (4) 平成 28 年 4 月 13 日（朝刊）読売新聞「別府大学生が焼酎を開発」「香り米ブレンド先輩から研究受け継ぐ」掲載
- (5) 平成 28 年 4 月 22 日（夕刊）今日新聞「大分香りの博物館で別府大学ブランド焼酎販売 2 年の試行錯誤で完成 引き継がれた想いが「夢香米」に」に掲載
- (6) 平成 28 年 5 月 18 日 TOS テレビ大分（4:50~7:00 TOS ゆ〜わくワイド）6 時代ニュースに出演 別府大学ブランド焼酎「夢香米」
- (7) 平成 28 年 5 月 20 日 ケーブルテレビ（6:00 わくわくトンボテレビ）出演  
【別府大学ブランド焼酎「夢香米」】
- (8) 平成 28 年 5 月 24 日 シティー情報おおいた 2016 年 6 月号 編集部の最近コレ気にナッテマス に「大学生もスゴイぞっ！ 別府大学 分析と研究の集大成」掲載
- (9) 平成 28 年 7 月 14 日（朝刊）合同新聞「香り米焼酎完成 爽やかな甘さに 別大生らが報告」に掲載
- (10) 平成 28 年 7 月 5 日（夕刊）今日新聞「市長に夢香米完成を報告 4 月から別府大学オリジナル焼酎販売」に掲載
- (11) 平成 28 年 10 月 6 日（夕刊）今日新聞「衛生管理法の実践者を育成 品質保証のポイント学ぶ 別府大学で第 1 回目の講習会」に掲載
- (12) 平成 28 年 10 月 19 日（夕刊）今日新聞「香り米焼酎の試飲会 先輩らの意志継ぎ学生 2 人が醸造」で掲載
- (13) タイトル「宇佐市特産黒大豆を用いた「クロダマルパン」商品化に着手（第一回報告）」で別府大学 HP トピックスに掲載 2017.10.18
- (14) タイトル「別府大学六次産業で生まれた本格焼酎「夢香米」に HACCP 導入」で別府大学 HP トピックスに掲載 2017.10.24
- (15) タイトル「本格焼酎「夢香米」製造における HACCP 導入 で発表しました。」で別府大学 HP トピックスに掲載 2017 年 11 月 22 日
- (16) タイトル「引き立つ“夢”の香り 学生が代々続ける米焼酎製造 別府」で合同新聞（朝刊）11 ページに掲載 平成 30 年 2 月 7 日  
<http://www.oita-press.co.jp/1010000000/2018/02/07/JD0056595371>
- (17) タイトル「香り強い米使用 焼酎に第 2 弾 別府大」で日本経済新聞に掲載 九州・沖縄 2018/2/5 21:43  
<https://www.nikkei.com/article/DGXMZO26549150V00C18A2LX0000/>
- (18) タイトル「先輩引き継ぎ焼酎第 2 弾」別府大青、地震乗り越え開発」で読売新聞に掲載九州・沖縄 2018/2/21
- (19) タイトル「食品衛生国際基準「HACCP」普及担い手育成加速へ」で合同新聞（朝刊）11 ページに掲載 平成 30 年 3 月 7 日

## 私立大学戦略的研究形成支援事業

「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：発酵食品製造における汚染微生物検出法の確立

プロジェクトでの役割：微生物汚染の早期発見と防除

研究タイトル：①発酵・醸造食品の製造に最適の酵母等微生物の分離

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 環境微生物学研究室

担当者職名：准教授 藤原秀彦

### 1. 研究の目的

大分県は、日本有数の発酵・醸造産業が盛んな土地柄である。しかしながら、微生物を分離する研究機関がほとんどないため（企業は除く）、大分県は県独自の特徴のある微生物を保有しておらず、その分離が望まれる。本研究では、醸造・発酵分野で最も多く利用される微生物である、酵母および乳酸菌の分離を目的とした。

### 2. 研究内容

#### 【酵母の簡易 2 次スクリーニング法の確立】

別府大学では、これまでの研究活動により 1000 種を超える酵母をスクリーニングしている。これら酵母の中には、発酵・醸造に最もよく用いられる *Saccharomyces cerevisiae* だけでなく、*Candida* 属や *Pichia* 属、*Kluyveromyces* 属、*Rhodotorula* 属等、多くの属が存在する。これらの中には、*Candida albicans* のような病原性を示すものもあるため、野生酵母を用いる際には十分な注意が必要である。また、発酵・醸造産業が盛んな大分県ではあるが、大分県産酵母（大分酵母）を保有していない。したがって、本プロジェクトで大分酵母をスクリーニングし、特色のある発酵食品を創出することは産業的意義が大きい。そこで本研究では、*S. cerevisiae* 標準株と、各属標準株、また本学保存株について、PCR 法やドットプロット法を行い、*S. cerevisiae* を効率的にかつ正確に検出する方法の確立し、大分酵母を取得するためのツールの開発を目指した。

<方法> 本学所有の *S. cerevisiae* のほか各属酵母および環境分離株の計 97 株を試験した。また、醸造用酵母 *S. cerevisiae* に多く見られる遺伝子として、高泡形成に関与する *AWAI*、ビオチン合成に関与する *BIO6*、亜硫酸耐性に関与する *SSU1*、沈降に関与する *FLO1* の 4 つの遺伝子に着目した。各遺伝子群のプライマーを作成し、① PCR による確認、② ドットプロット法による確認を行なった。また、同じ反応系に複数のプライマーペアを用い

ることができる③ MultiPlex-PCR 法による検討も行なった。

<結果> ①、② の両法ともに *S. cerevisiae* を効率よく検出することができた。① は ② と比較すると正確性は低い、比較的容易な検出法であり、② は正確性が非常に高い、操作が煩雑な検出法であるという特徴を持っていた。そこで、操作が容易で、また正確性も高い手法の開発を試みるべく、③ の MultiPlex-PCR 法を検討した。また、この際、プライマーの配列に改良を加えた。その結果、下図のように①、② 法と比較して、高精度で *S. cerevisiae* を検出できた。また、本法によると、DNA バンドパターンによって醸造用 *S. cerevisiae* か否かを判定することができた。実際に、*S. cerevisiae* K7 株と明らかにバンドパターンが異なる株の 18S rRNA 遺伝子の配列を解析したところ、*Candida* 属や *Pichia* 属であった。これらの結果から、今回用いた 4 種類のプライマーを用いた MultiPlex-PCR 法を用いれば、簡便で時間も短縮され、かつ高精度で醸造用 *S. cerevisiae* を検出できる系を構築できたことが明らかとなった。

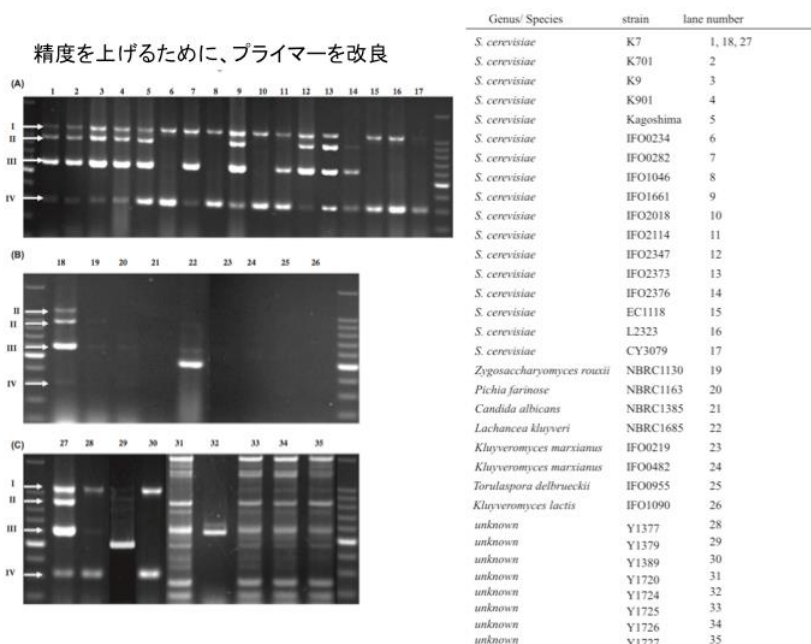
#### 【乳酸菌の分離】

乳酸菌は、酵母と同様に発酵食品製造には欠かすことのできない微生物であり、ヨーグルトや漬物、乳酸菌飲料等様々な用途に用いられている。本研究で

は、某スーパーで市販されている豆乳ヨーグルトの種液から、豆乳ヨーグルトを作成するのに最適な乳酸菌を分離し、より風味の良い豆乳ヨーグルトを市販することを目的とした。

#### <方法と結果>

某スーパーの豆乳ヨーグルト種液は、福岡県宗像市の玄米浸漬液を用いたものであった。まず本研究では、本玄米浸漬液から乳酸菌を分離することを試みた。MRS 寒天培地 (0.1% CaCO<sub>3</sub> 含有) に、適宜希釈した玄米浸漬液を塗布し、37℃ でアネロパック嫌気を用いて嫌気状態で静置培養した。数日培養し、コロニーの周りにクリアゾーンを形成したものを乳酸菌として、コロニーの大きさや表面の様子等で 3 株を分離し、M1、M2、M3 株とした。これら 3 株のゲノム DNA を定法に則り抽出し、ユニバーサルプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を PCR にて増幅した。その結果、M1 株と M2 株では DNA が増幅されたが、M3 株では増幅されなかった。これは、数種類の DNA ポリメラーゼを PCR に用いても同様であったため、M3 株は真性細菌ではない可能性が強く示唆された。よって、この後



の実験には M1 株と M2 株のみを用いた。M1 株と M2 株の 16S rRNA 遺伝子を北海道システム・サイエンス株式会社にシーケンス解析を依頼したところ、これらはそれぞれ *Lactobacillus casei* もしくは *Lb. paracasei* と 99 %、*Lb. plantrum* と 99 % の相同性を有した。これら菌株はこれまでに毒性の報告がないため、豆乳ヨーグルトの作成に適しているものと考え、現在福岡市の某スーパーで豆乳ヨーグルトとして市販されている。なお、本研究結果をまとめた論文（別府大学紀要）を以下に転載する。

発芽玄米浸漬水中から分離された乳酸菌を用いた豆乳ヨーグルトの作成

藤原秀彦<sup>1)</sup>、牧井忠<sup>2)</sup>、米元俊一<sup>1)</sup>

(1) 別府大学食物栄養科学部発酵食品学科 (2) (有)マキイ

Production of Yogurt from Soy Milk using by Lactic Acid Bacteria isolated from Immersing Water of Sprouted Brown Rice

Hidehiko Fujihara, Tadashi Makii and Toshikazu Yonemoto

要旨

豆乳ヨーグルトは乳酸菌の乳酸発酵により生じた乳酸が豆乳中のタンパク質を変性させ固化したものである。本研究では福岡県宗像市の発芽玄米浸漬水中から乳酸菌を分離し安全性を評価し、より風味のよい豆乳ヨーグルトを作成し、市販することを目的とした。発芽玄米浸漬水中から 3 株の乳酸菌様微生物を分離し、同定を行なった結果、病原性・毒性がない微生物であることが示唆された。これら 2 菌株を用い豆乳ヨーグルトを作成した。

キーワード

豆乳ヨーグルト、乳酸菌、DNA シーケンス

【はじめに】

乳酸菌とは、一般的に酸素分圧の低い条件下でグルコースのような単糖をホモ乳酸発酵で乳酸を、ヘテロ乳酸発酵により乳酸およびアルコール、二酸化炭素を生成しエネルギーを獲得する微生物群の総称である。本菌はグラム陽性細菌で細胞形態が球状の *Lactococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Pediococcus* 属細菌などが存在し、一方で細胞形態が桿状の *Lactococcus* 属、*Bifidobacterium* 属細菌などが存在する。また、生息域によって植物性乳酸菌と動物性乳酸菌に分類される。植物性乳酸菌は植物の表面などに生息し、主に日本のぬか漬けや韓国のキムチ、中国のザーサイ、ドイツのザワークラウトなどの植物を原料とした発酵食品製造に用いられる。一方、動物性乳酸菌は動物の腸管内等に分離し、ヨーグル

トなどの動物性の乳等を原料とした発酵食品製造に用いられる。これら乳酸菌群は、前述のように発酵食品製造に用いられ、プロバイオティクスへの関心の高まりから一般に好まれる微生物群であるが、*Streptococcus* 属細菌の中には *S. pyogenes* や、*S. pneumoniae* はヒトに対し病原性を示すものも存在するので注意が必要である。

ヨーグルトとは、動物の(主に牛)の乳を、動物性乳酸菌を用いて発酵させたものである。乳酸菌は乳中の乳糖を分解しグルコースへと変換する。グルコースは解糖もしくはペントースリン酸経路によりピルビン酸へと酸化される。さらにピルビン酸は還元され、乳酸を生成する。この乳酸により乳中のタンパク質が変性し、凝固したものがヨーグルトである。

一方、豆乳中には大豆タンパク質が豊富に含まれる。この大豆タンパク質をにがりに含まれる  $Mg^{2+}$  を用いて凝固させたものが豆腐である。この大豆タンパク質は pH を酸性にすると凝固する性質を持っている。この性質を利用し、乳酸を用いて豆乳を凝固させたものが豆乳ヨーグルトである。

本研究では福岡県福岡市にて販売されている豆乳ヨーグルト中から植物性乳酸菌を分離し、その同定を行なった。同定を行なった乳酸菌を用い、より風味のよい豆乳ヨーグルトの作成を行なった。

## 【材料と方法】

### 1. 豆乳ヨーグルト

豆乳ヨーグルトは福岡県福岡市のスーパーマーケットマキイで市販されている物を用いた。本豆乳ヨーグルトは、福岡県宗像市の自然農タッキーベジガーデンにて、平成 25 年に 1 ヶ月間天日干ししたヒノヒカリ玄米を浸漬した水を乳酸菌種とし、福岡県糸島市のフクユタカの豆乳に添加し室温で一晩培養したものである。

### 2. 菌株の分離

1 の乳酸菌種を適宜希釈し、MRS + 0.1 %  $CaCO_3$  寒天培地に塗布した。MRS + 0.1 %  $CaCO_3$  寒天培地組成は表 1 に示す。塗布した寒天培地は、アネロパック嫌気を用いて 37 °C で 2 日間嫌気培養した。出現したコロニーのうち、 $CaCO_3$  を溶解させたクリアゾーンを形成したものを酸生成菌とし、コロニーの色、形が異なるものを選択した。

表 1 MRS 寒天培地組成 (g/L, pH6.2)

Peptone	10	Yeast Extract	4	Glucose	20	Tween80	1 mL
$K_2HPO_4$	2	Sodium Acetate	5	$(NH_4)_3$ -citrate	2	$MgSO_4$	0.2
$MnSO_4$	0.5	Meat Extract	10	$CaCO_3$	1		

### 3. DNA 抽出

DNA 抽出は Sambrook の手法を参考にした。MRS 寒天培地で一晩培養した菌体を滅菌水とコンラージ棒を用いて集菌し、0.1 M Tris-HCl (pH7.0) で菌体を洗浄した。Protainase K (20 mg/mL) にて一晩反応後、フェノール/クロロフォルム抽出で菌体破碎およびタンパク質



の除去を行なった。さらに、RNase 処理後、再度フェノール/クロロフォルム抽出を行ない、RNase の除去を行なった。0.6 倍量のイソプロパノールを加え、-80 °C で 2 時間インキュベート後、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し DNA を沈殿させた。上澄みを除去し、70 % エタノールで沈殿を洗浄し、真空乾燥を行なった。沈殿に適量の TE バッファーを加え、4 °C で十分に時間をかけて DNA を溶解させた。溶解した DNA は電気泳動で存在を確認し、NanoDrop で DNA 濃度を 1 µg/mL に調整した。

#### 4. PCR とクローニング、DNA シーケンス

菌株の同定を行うために、16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅した。用いたプライマーの配列を表 2 に示す。PCR 反応は Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) を用いて製造者の推奨する方法で行なった。

PCR 反応後電気泳動にて増幅を確認し、MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (TOYOBO) を用いて DNA を精製した。生成した

表 2 用いたプライマー

名前	配列	Tm値 (°C)
27F	5'-AGAGTTTGATCACTGGCTCAG-3'	
907R	5'-CCGTCGAATTCMTTTRAGTTT-3'	

DNA 断片を北海道システム・サイエンス株式会社 (<http://www.hssnet.co.jp>) に依頼し塩基配列を決定した。

#### 5. BLAST 検索

決定された塩基配列は、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて相同性検索を行った。この際相同性検索を行なった塩基配列は、フォワードとリバースプライマーで解析された配列のうち、保存された領域を用いた。

##### 【結果と考察】

##### 1. 乳酸菌の分離と DNA 増幅

乳酸菌種から 3 株の乳酸菌を分離し M1 株、M2 株、M3 株とした。これら 3 株の DNA を抽出し、PCR 法で 16S rRNA 遺伝子を増幅したところ、M3 株の増幅が認められなかった (図 1)。M3 株において真性細菌に保存されている 16S rRNA 遺伝子が増幅しなかったことから、本菌株が真性細菌ではないことが示唆された。本研究では豆乳ヨーグルトの作成を目的としているため、真性細菌以外の可能性がある M3 株を今後の研究に用いないこととした。

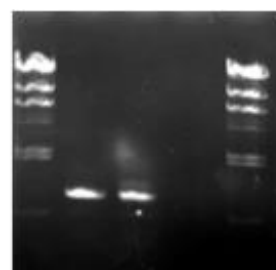


図1 16S rRNA 遺伝子の増幅 Lane1, 5: λHindIII マーカー、Lane2: M1 株、Lane3: M2 株、Lane4: M3 株のゲノム DNA を増幅したもの

##### 2. 乳酸菌の同定

M1 株、M2 株の 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行った。得られた塩基配列を

BLAST を用いて相同性検索した。その結果 M1 株が *Lactobacillus casei* と、M2 株が *Lb. plantarum* とそれぞれ 99% の相同性を示したことから、M1 株は *Lb. casei*、M2 株は *Lb. plantarum* であることが明らかとなった。なお、両種ともにこれまでに毒性・病原性の報告がないため M1 株、M2 株も同様に毒性・病原性がないものと判断した。

### 3. 豆乳ヨーグルト作成

スーパーマーケットマキイでは豆乳ヨーグルトを乳酸菌種から製造していたが、本研究で分離した M1 株、M2 株を用いて改めて豆乳ヨーグルトの作成を行なった。クリーンベンチ中で滅菌した 100 mL 容広口瓶に豆乳を適量入れ、MRS 寒天培地に生育させた M1 株、M2 株を、コンラージ棒を用いて掻き取り、それぞれ別の豆乳に植菌した。37°C で一晩静置培養した。固化した豆乳ヨーグルトをスターターとして、滅菌した 1.5 L 容広口瓶に M1 株、M2 株で作成した豆乳ヨーグルトものをそれぞれ、5 mL、2.5 mL 添加し、37°C で一晩静置培養した。その結果、M1 株、M2 株のみから作成した豆乳ヨーグルトと比較して、酸味が抑えられたまろやかな豆乳ヨーグルトが得られたため、これを市販品として販売することとした。

豆乳ヨーグルトのスターターとして牛乳およびスキムミルクを用いたが凝固しなかった。

#### 【終わりに】

今回、発芽玄米浸漬水中から 3 株の乳酸菌を分離し、2 株の同定に成功した。その結果この 2 菌株は *Lb. casei*、*Lb. plantarum* であることが明らかとなり、ともにこれまでに毒性・病原性が報告されておらず、本 2 菌株が食品製造に適した菌であることが示唆された。この 2 菌株を用いた豆乳ヨーグルトを作成したところ、M1 株、M2 株の種ヨーグルトを 2:1 の割合で混合すると酸味が抑えられたまろやかな豆乳ヨーグルトを作成することができた。現在図 2 に示すように、福岡市中央区のスーパーマーケットマキイにて市販されている。今後、より有用な乳酸菌を分離し、本豆乳ヨーグルト製造に用いることで機能性のある食品の開発が望まれる。



図2 市販されている豆乳ヨーグルト

### 3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

#### 【酵母の簡易 2 次スクリーニング法の確立】

環境中から醸造に適した酵母 *S. cerevisiae* を検出する 4 種類のプライマーペアのデザインに成功し、MultiPlex-PCR 法にて簡便にかつ実験者の熟練を必要としない手法を開発することができた。本プライマーペアと MultiPlex-PCR キットを用いることで、Ready-to-Go のキットを開発できるものとする。今後は、各有用（もしくは有害）微生物に独自の遺伝子

群を見出し、それを検出できるプライマーをデザインし、本法を適用すれば容易に目的とする微生物の検出が可能になることが期待される。

#### 【乳酸菌の分離】

乳酸菌の分離を行い、市販化した。本乳酸菌は、玄米浸漬液という植物由来乳酸菌であり、牛乳を固化する能力は著しく低かった。植物由来乳酸菌は、牛乳中の乳糖を乳酸へ変換する能力が低いと考えられる。豆乳ヨーグルトは、豆乳を乳酸を用いて固化させたもので、乳酸菌の機能性を付与した製品は少ない。今後、豆乳ヨーグルトを機能性を有する乳酸菌で製造し、機能性食品として販売することが期待される。

### 研究タイトル：②高次発酵・醸造技術の確立（微生物汚染の研究も含む）

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 環境微生物学研究室

担当者職名：准教授 藤原秀彦

#### 1. 研究の目的

発酵・醸造の製造には微生物が用いられる。これら微生物は、目に見えないため発酵過程で混入し（コンタミネーション）、場合によっては製品の汚染につながり、中小企業が多い発酵・醸造メーカーにとっては死活問題に発展する可能性がある。そこで、本研究では、このような微生物汚染の早期発見法の開発を目的とした。

#### 2. 研究内容

##### 【PCR-DGGE 法による菌叢解析】

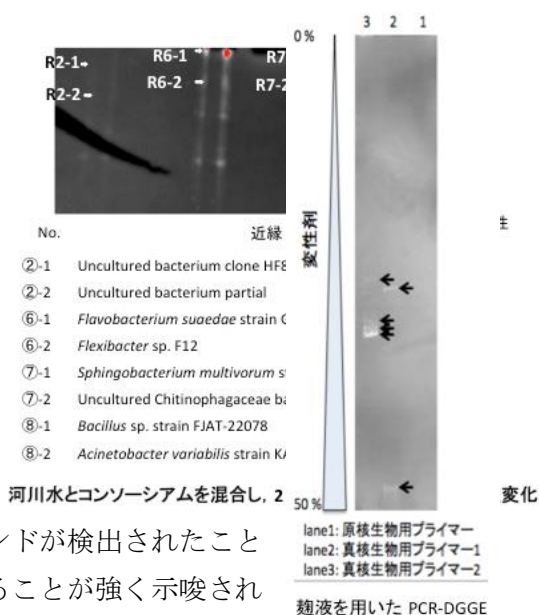
DGGE 法とは、変性剤濃度勾配ゲル (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) のことで、変性剤（尿素やホルムアミド）の濃度勾配をつけたゲルを用いた電気泳動法である。このゲルに、GC クランプと呼ばれる GC に富んだ配列を付与したプライマーを用いて PCR した DNA 断片を供し電気泳動すると、GC クランプ領域以外の DNA が変性すると泳動が止まる。すなわち、PCR 産物の GC 含量の差異によって泳動度が変化することを利用した手法が PCR-DGGE 法である。この PCR のターゲットに 16S rRNA 遺伝子を用いると、系中のバクテリアの菌叢解析が可能となる。そこでまず本研究では、本法を用い、麹液中の菌叢解析を行った。また、菌叢解析を大学 4 年生の学生にも扱えるようなトレーニングを行なうために、ある微生物コンソーシアムを環境水と混合し、数日培養したのちの菌叢解析を行ない、マニュアルを作成した。

PCR-DGGE 法は、菌叢解析はできるがその操作は煩雑である。また、検出された微生物が汚染微生物かどうかを判定するためには 16S rRNA 遺伝子の配列を読む必要がある。そこでもっと簡便な手法として、PFGE-RFLP 解析（パルスフィールドゲル電気泳動-制限酵素長多型分析）を検討した。

<方法と結果>

【PCR-DGGE】

*Aspergillus oryzae* と市販のヒノヒカリを用いて、米麴を定法に則り作成した。作成した米麴と水を 1:1 で混合し、蓋をし、室温で 5 日間放置した。その後に、キットを用いて全 DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子増幅用ユニバーサルプライマーと、真核生物用プライマーを用いて PCR 反応を行なった。反応産物を DGGE に供したところ、右図のように原核生物ではバンドが検出されず、真核生物用プライマーでのみバンドが検出された。この麴液中には *A. oryzae*



しか存在しないはずであるが、複数種の DNA バンドが検出されたことから、この麴液中に未知の真核生物が混入していることが強く示唆された。今回は同定にまでは至らなかったが、添加した微生物が明らかな系

においては本法によって微生物混入をある程度検出できることが明らかとなった。しかしながら、ゲル板の作成やサンプル調製には一定の熟練度が必要である。そこで、大学 4 年生でも簡単に実験が行えるように、作業をマニュアル化した。今回用いたサンプルは、別府市内の河川水と、本学科が所有している海棲生物由来微生物コンソーシアム（以下、コンソーシアム）である。なお、本コンソーシアムには *Bacillus* 属細菌を優先とする 66 種類の微生物が存在することがすでに明らかとなっている。河川水とコンソーシアムを混合し、37 °C で 8 日培養し定期的に DNA を回収し、PCR-DGGE 法に供した。その結果、右図に示すようにスメアではあるものの、DNA バンドが検出された。これらのうち 8 つのバンドについて DNA を回収し、シーケンス解析を行い、BLAST による相同性検索を行ったところ図に示すような菌株と相同性を示した。前述のように、本コンソーシアムは *Bacillus* を優占種とするが実際に *Bacillus* は 1 種のみしか検出されなかった。また、相同性も 87 % ~ 96 % と低く、未知の菌株が多く検出された。これは、本コンソーシアム添加により、河川水中に存在する未知の微生物が活性化したものと考えられる。このように、今回作成したマニュアルを用いれば、ほとんど作業経験がない学生でも容易に PCR-DGGE 法を用い菌叢解析ができることが明らかとなった。今後、さらに改良を重ねて、学生でも扱いやすいマニュアルの策定を行なっていく予定である。

【PFGE-RFLP】

本法は、巨大 DNA を電気泳動できる PFGE 法と、制限酵素長多型分析 (RFLP) を組み合わせた手法である。すなわち、発酵過程のサンプルを直接ゲルに封入し、そのゲルを適切な制限酵素で処理し、その泳動パターンにより発酵産物中の異種 DNA を判別するという手法である。現在、条件検討を行なっている状況である。

### 3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

PCR-DGGE 法は学生でも容易に扱うことができるマニュアルを作成できた。今後は、より簡易で、実験精度をあげるようなマニュアルを作成したい。

PFGE-RFLP 法は現在条件検討を行なっている。今後、どのような制限酵素を組み合わせればより良い結果が出るのか、またより低予算で行えるような制限酵素はないのか検討を行なっていく予定である。

### 4. 研究成果

#### a)原著論文

1. Kimura N, Yamazoe A, Hosoyama A, Hirose J, Watanabe T, Suenaga H, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of *Pseudomonas abietaniphila* KF717 (NBRC 110669), Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil in Japan., *Genome Announc.* 2015 Mar 19;3(2). pii: e00059-15. doi: 10.1128/genomeA.00059-15.
2. Suenaga H, Yamazoe A, Hosoyama A, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of the Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium *Pseudomonas putida* KF703 (NBRC 110666) Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., *Genome Announc.* 2015 Mar 19;3(2). pii: e00142-15. doi: 10.1128/genomeA.00142-15.
3. Suenaga H, Yamazoe A, Hosoyama A, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of the Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium *Cupriavidus basilensis* KF708 (NBRC 110671) Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., *Genome Announc.* 2015 Mar 19;3(2). pii: e00143-15. doi: 10.1128/genomeA.00143-15.
4. Watanabe T, Yamazoe A, Hosoyama A, Fujihara H, Suenaga H, Hirose J, Futagami T, Goto M, Kimura N, Furukawa K., Draft Genome Sequence of *Cupriavidus pauculus* strain KF709, a Biphenyl-Utilizing Bacterium Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., *Genome Announc.* 2015 Mar 26;3(2). pii: e00222-15. doi: 10.1128/genomeA.00222-15.
5. Watanabe T, Yamazoe A, Hosoyama A, Fujihara H, Suenaga H, Hirose J, Futagami T, Goto M, Kimura N, Furukawa K., Draft Genome Sequence of *Pseudomonas toyotomiensis* KF710, a Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., *Genome Announc.* 2015 Apr 2;3(2). pii: e00223-15. doi: 10.1128/genomeA.00223-15.
6. Fujihara H, Yamazoe A, Hosoyama A, Suenaga H, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of *Pseudomonas abietaniphila* KF701 (NBRC110664), a Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., *Genome Announc.* 2015 May 14;3(3). pii: e00473-15. doi: 10.1128/genomeA.00473-15.
7. Fujihara H, Yamazoe A, Hosoyama A, Suenaga H, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Futagami T,

Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* KF702 (NBRC 110665), a Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., Genome Announc. 2015 May 21;3(3). pii: e00517-15. doi: 10.1128/genomeA.00517-15.

8. Hirose J, Yamazoe A, Hosoyama A, Kimura N, Suenaga H, Watanabe T, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of the Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium *Comamonas testosteroni* KF712 (NBRC 110673)., Genome Announc. 2015 Oct 15;3(5). pii: e01214-15. doi: 10.1128/genomeA.01214-15.

9. Hirose J, Yamazoe A, Hosoyama A, Kimura N, Suenaga H, Watanabe T, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of the Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium *Pseudomonas stutzeri* KF716 (NBRC 110668)., Genome Announc. 2015 Oct 22;3(5). pii: e01215-15. doi: 10.1128/genomeA.01215-15.

10. 岡本 啓湖、平井 龍一、浅田 貴美子、日野 美香、藤原 秀彦、カボス (*Citrus sphaerocarpa*) 花から高確率で *Saccharomyces cerevisiae* を獲得するための最適分離初期条件、別府大学大学院紀要、2016、No.18、p.47- 55

11. Suenaga H, Yamazoe A, Hosoyama A, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Complete Genome Sequence of the Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium *Pseudomonas putida* KF715 (NBRC 110667) Isolated from Biphenyl- Contaminated Soil., Genome Announc. 2017 Feb 16;5 (7). pii: e01624-16. doi: 10.1128/genomeA.01624-16.

12. Suenaga H, Fujihara H, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Futagami T, Goto M, Shimodaira J, Furukawa K., Insights into the genomic plasticity of *Pseudomonas putida* KF715, a strain with unique biphenyl-utilizing activity and genome instability properties., beEnviron Microbiol Rep. 2017 Oct;9 (5):589-598. doi: 10.1111/1758-2229.12561. Epub 2017 Jul 13.

13. 藤原 秀彦、牧井 忠、米元 俊一、発芽玄米浸漬水中から分離された乳酸菌を用いた豆乳ヨーグルトの作成、別府大学紀要、2017、No.58、 p.159- 162

#### b) 総説

なし

#### c) 招待講演、シンポジウム

なし

#### d) 国際学会

1. H. Suenaga, H. Fujihara, N. Kimura, J. Hirose, T. Watanabe, T. Futagami, M. Goto and K. Furukawa. Insight into genomic plasticity of *Pseudomonas putida* KF715 which has unique properties in biphenyl-utilizing activity and genomic instability, 7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, 2017, Spain

e) 国内学会

1. 渡邊崇人、藤原秀彦、廣瀬遵、末永光、木村信忠、木質バイオマスからの有用物質生産に向けた環境汚染物質分解菌が持つ芳香族化合物分解代謝系の利用、第 275 回生存圏シンポジウム 生存圏ミッションシンポジウム、2015、京都
2. 廣瀬 遵、平井 晋哉、横井 春比古、木村 信忠、末永 光、渡邊 崇人、山副 敦司、藤原 秀彦、古川 謙介、*Pseudomonas stutzeri* KF716 のビフェニル・サリチル酸 分解系をコードする可動性遺伝因子の解析、日本農芸化学会大会、2015、岡山
3. 藤原 秀彦、小石 早希、安部 周斗、山副 敦司、細山 哲、下平 潤、木村 信忠、末永 光、廣瀬 遵、渡邊 崇人、二神 泰基、後藤 正利、古川 謙介、ビフェニル分解菌の分解遺伝子群の欠失と再編成、日本生物工学会大会、2015
4. 廣瀬 遵、藤元 勇樹、原田 幸音、菅本 和寛、横井 春比古、松本 朋子、末永 光、藤原 秀彦、古川 謙介、キメラ型ビフェニルジオキシゲナーゼによるフラボンの変換、日本生物工学会大会、2015
5. 廣瀬 遵、米村 凌、横井春比古、山副敦司、細山 哲、末永 光、木村信忠、渡邊崇人、二神泰基、後藤正利、藤原秀彦、古川謙介、*Pseudomonas putida* KF703 のビフェニル、サリチル酸および安息香酸分解経路をコードするゲノミックアイランドの解析、環境バイオテクノロジー学会大会、2015、東京
6. 木村信忠、山副敦司、細山 哲、廣瀬 遵、渡邊崇人、末永 光、藤原秀彦、二神泰基、後藤正利、古川謙介、ビフェニル/PCB 分解菌 *Pseudomonas balearica* KF707 株の完全長ゲノムシーケンス解析、環境バイオテクノロジー学会大会、2015、東京
7. ビフェニル分解菌の分解遺伝子群の欠失と再編成現象、藤原秀彦、小石早希、安部周斗、山副敦司、細山 哲、下平 潤、木村信忠、末永 光、廣瀬 遵、渡邊崇人、二神泰基、後藤正利、古川謙介、日本生物工学会大会、2015、鹿児島
8. 末永 光、藤原秀彦、山副敦司、細山 哲、下平 潤、木村信忠、廣瀬 遵、渡邊崇人、二神泰基、後藤正利、古川謙介、ビフェニル/PCB 分解能力を高頻度に転移・欠失する *Pseudomonas putida* KF715 株のゲノム再編成現象、日本農芸化学会大会、2016、北海道
9. 廣瀬 遵、寺野貴洋、横井春比古、末永 光、木村信忠、渡邊崇人、二神泰基、後藤正利、藤原秀彦、古川 謙介、*Pseudomonas aeruginosa* KF702 のビフェニル・サリチル酸・安息香酸分解経路をコードするゲノミックアイランドの再編成、日本農芸化学会大会、2016、北海道
10. 渡邊崇人、藤原秀彦、廣瀬 遵、末永 光、木村信忠、リグニン由来化合物の生産のための環境汚染物質分解菌の利用、第 307 回生存圏シンポジウム「生存圏ミッションシンポジウム」、2016、京都
11. 渡邊崇人、藤原秀彦、末永光、木村信忠、廣瀬 遵、二神泰基、後藤正利、古川謙介、ビフェニル/PCB 分解細菌のリグニン由来芳香族化合物代謝酵素の探索と同定、日本生物工

学会大会、2016、富山

1 2. 廣瀬 遵、寺野貴洋、横井晴比古、末永 光、木村信忠、渡邊崇人、二神泰基、後藤正利、藤原秀彦、古川謙介、同一サイトで分離された PCB 分解性細菌 (KF 株) 10 菌株のビフェニル分解系 *bph* 遺伝子の多様性、環境微生物系学会合同大会 2017、2017、宮城

1 3. 藤原秀彦、中尾 桜、東 沙紀、末永 光、木村信忠、渡邊崇人、廣瀬 遵、二神泰基、後藤正利、古川謙介、ビフェニル分解特性を高頻度に転移・欠失する *P. putida* KF715 株のゲノム再編成能に寄与する遺伝因子、環境微生物系学会合同大会 2017、2017、宮城

1 4. 岡本啓湖、小野浩輝、池見俊亮、掛橋凌、木村奨、張 愚皓、仁平拓哉、永松一馬、中村俊雅、日野美香、藤原秀彦、二階堂雅士、大分県酒造協同組合蔵元酒粕からの清酒用大分酵母の獲得、日本農芸化学会大会、2018、愛知

1 5. 廣瀬 遵、米村 凌、末永 光、木村信忠、渡邊崇人、宮武宗利、横井春比古、二神泰基、後藤正利、藤原秀彦、古川謙介、PCB/ビフェニル分解性シェードモナス細菌の安息香酸分解系トランスポゾン欠失株の諸性質、日本農芸化学会大会、2018、愛知

f) 特許

なし

g) その他 (学会賞、報道など)

なし



私立大学戦略的研究形成支援事業

「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」

(平成 27 年度～平成 29 年度)

研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：機能性タンパク質の同定および機能解析

プロジェクトでの役割：食品中の機能性タンパク質の解析

研究タイトル：① *Zymomonas mobilis* アルコール高生産株が産生するタンパク質の解析

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 生化学研究室

担当者職名：准教授 林 毅 (平成 27～28 年度)

1. 研究の目的

本プロジェクトで得られた発酵・醸造食品の有用性をタンパク質レベルで解析するため、まずモデル食品微生物としてタンパク質の解析が容易であるエタノール発酵細菌 (*Zymomonas mobilis*、テキーラの醸造菌) を用いて、2次元電気泳動およびプロテインシーケンサーを用いた未知タンパク質分析系の確立を目指した。すなわち先ず特異的に発現している未知タンパク質の同定が出来るように、2次元電気泳動でタンパク質を分離・精製を行う。次に分離・精製したタンパク質スポットを、プロテインシーケンサーで N 末端側からのアミノ酸配列を解読する。最後に遺伝子データベース中でそのアミノ酸配列の相同物を検索し、未知タンパク質を同定するという、以上の一連の実験系の確立を試みた。

2. 研究内容

【材料および方法】

1) 使用菌株

*Zymomonas mobilis* ZM6

2) *Zm. mobilis* が産生する菌体内タンパク質の抽出

*Zm. mobilis* のシングルコロニーを 3 ml の *Zm. mobilis* 用液体培地 (2 % マルトース、1 % 酵母エキス、0.2 % リン酸二水素カリウム、0.5 % 塩化ナトリウム) に植菌し、30℃で一晩培養した後 100 ml の *Zm. mobilis* 用液体培地に全量を接種し、さらに一晩培養した。集菌 (15,000 rpm、5 分、4℃) ・洗浄した菌体に、膨潤バッファーを 500 μl 加え、穏やかに 3 分間ピペッティングを行った。15,000 rpm、5 分、4℃で遠心し、再びピペッティングした後、凍結 (-80℃で 15 分間) 融解させ、遠心 (15,000 rpm、5 分、4℃) した上清を回

取し、さらに超遠心した (50,000 rpm、30 分、4°C)。超遠心後の上清をサンプルとした。

サンプル中のタンパク質濃度はブラッドフォード法により測定した。スタンダードは BSA を使用した。

### 3) 2次元電気泳動

サンプル中のタンパク質量が 100 µg/125 µl になるように膨潤バッファーで希釈した。2次元電気泳動に使用する試薬および装置はすべてバイオラッド社のものを使用し、バイオラッド社の 2次元電気泳動ガイドに従って操作した。

1次元目の等電点電気泳動は IPG ストリップ (pH レンジ 4-7、7 cm) を使用し、等電点電気泳動の電気条件は、膨潤: 12 時間、Step1: 250 V Rapid 15 min、Step2: 4000 V linear 1 h、Step3: 4000 V Rapid 10000 Vhour である。等電点電気泳動装置はプロテアン IEF セルを使用した。電気泳動の終了後、IEF ストリップは ReadyPrep™ 2次元スターターキット付属の平衡化バッファーI およびバッファーII で平衡化した。

2次元目の SDS-PAGE は 10% ミニプロテアン TGX™ プレキャストゲルを用い、200 V、35 分で電気泳動した。

### 4) PVDF 膜へのタンパク質の転写

PVDF 膜をメタノールに 1 分間浸した。次に PVDF 膜とポリアクリルアミドゲルを転写バッファー中で 20 分間振とうした。メンブレンブロッティング装置の陽極側からスポンジ、転写バッファーで湿らせた濾紙 2 枚、ポリアクリルアミドゲル、PVDF 膜、転写バッファーで湿らせた濾紙 2 枚、スポンジの順で重ね、メンブレンブロッティング装置にセットし、180 mA で 120 分間アクリルアミド中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。次に純水で PVDF 膜を洗浄し、ボンソーS で 20 秒間染色した。45%メタノールで数回脱色を行った後、PVDF 膜を乾燥させ、プロテインシーケンスのサンプルとした。

### 5) プロテインシーケンサーによるアミノ酸配列の解析

PVDF 膜上のタンパク質スポットを切り出し、プロテインシーケンサーに供した。各サンプルは N 末端側から 8 残基のアミノ酸まで解析した。タンパク質を同定するために、*Zm. mobilis* ATCC29191 (Gene ID: T02187) および *Zm. mobilis* ZM4 (Gene ID: T00221) ゲノム配列より FASTA (<http://www.genome.jp/tools/blast/>) を用いてホモロジー検索した。

## 【実験結果】

### 1) *Zm. mobilis* が産生する菌体内タンパク質の 2次元電気泳動

2次元電気泳動の結果、150 個程度のスポットを検出した (図 1)。そのうち高発現タンパク質は 30 個程度であった。

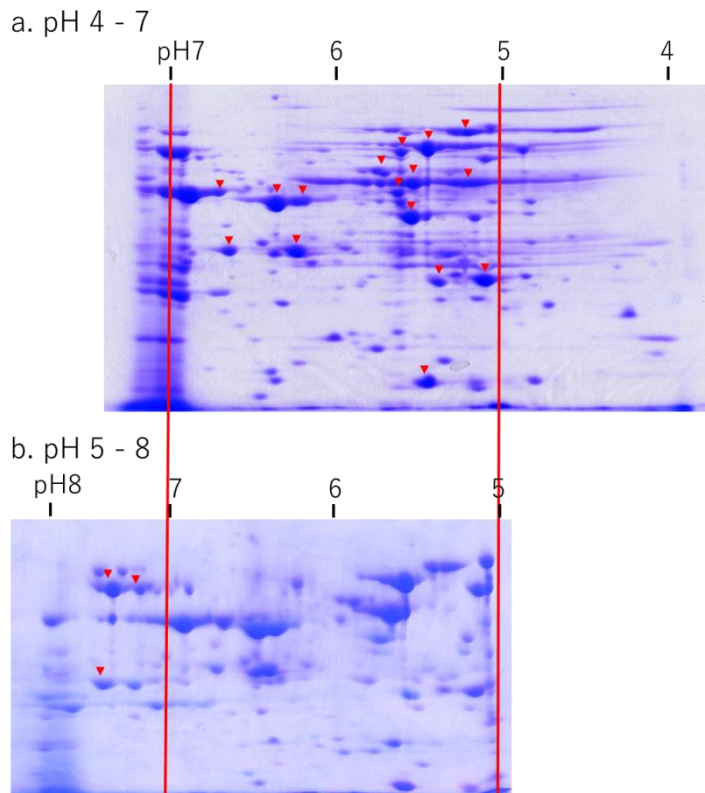


図1 *Zm. mobilis* 菌体内タンパク質の2次元電気泳動  
 a. 1次元電気泳動条件:pH4-7  
 b. 1次元電気泳動条件:pH5-8  
 矢印は高発現タンパク質を示す

## 2) プロテインシーケンサーによるタンパク質の同定

高発現タンパク質 18 サンプルについてプロテインシーケンサーで分析した結果、それぞれ 8~24 アミノ酸の配列を決定できた (図 2、表 1)。データベースによる解析で 15 サンプルについてタンパク質が同定できた。そのうち 7 種類のタンパク質はグルコース代謝を担っているエントナー・ドウドロフ (ED) 経路と解糖系を構成している酵素であった。*Zm. mobilis* は解糖系の酵素を大量に発現させ経路を高回転させることでエネルギーを得ていると考えられる。

次に低発現タンパク質について同様に解析したところ少ないタンパク質量 (~1 pmol) でも 10 残基程度は問題なくアミノ酸配列を読み取ることが出来ることが分かった。また少なくとも 8 残基を正確に読むことが出来れば、遺伝子データベースにて相同タンパク質が特定され、未知タンパク質を同定できることが明らかとなった。

さらに *Zm. mobilis* の呼吸鎖の複合体 V (ATP 合成酵素) のうち、最も重要な  $\beta$  サブユニットが大量に発現していることが明らかになった。エネルギーの生産効率から考えると、この大量の  $\beta$  サブユニットが実際に解糖系で作った ATP を加水分解しているとは考えにくい。更なる解析が必要である。

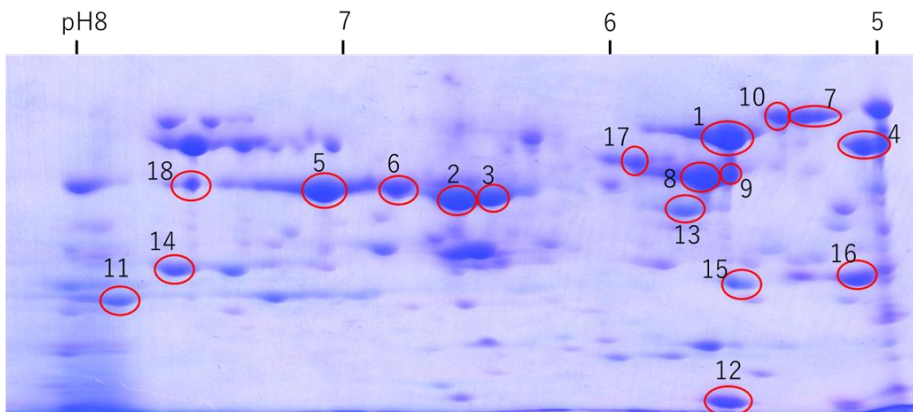


図2 *Zm. mobilis* 菌体内タンパク質の2次元電気泳動結果  
赤丸はプロテインシーケンサーで分析したスポット。

表1 2次元電気泳動で分離した *Zm. mobilis* 菌体内タンパク質の同定結果

N末端配列において、下線が引かれたアミノ酸はデータベースと配列が異なる。アミノ酸残基数、等電点、分子量は ATCC29191 の配列を参照した。また等電点と分子量は Compute pI/Mw ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) を用いて算出した。

スポット No.	N末端配列	一致したタンパク質		遺伝子名	アミノ 酸 残基数	等電点	分子量 (Average)
		<i>Zm. mobilis</i> ATCC29191	<i>Zm. mobilis</i> ZM4				
1	AAKDVKFSRD	ZZ6_1221	ZMO1929	chaperonin GroEL, 60 kDa chaperonin	549	5.06	58322.78
2	ASSTFYIPFVNEMGEGSLE	ZZ6_1515	ZMO1596	iron-containing alcohol dehydrogenase	383	5.66	40177.28
3	ASSTFYIP	ZZ6_1515	ZMO1596	iron-containing alcohol dehydrogenase	383	5.66	40177.28
4	ATASSKKN	ZZ6_0975	ZMO0241	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit beta	484	4.85	52189.15
5	AFRTLIAI	ZZ6_1033	ZMO0178	phosphoglycerate kinase	397	6.03	41422.73
6	MAKKVITLGH	なし	なし	なし			
7	GKVIIGILL	ZZ6_0619	ZMO0660	chaperone protein DnaK	635	4.81	68536.22
8	MVNAKNGG	なし	なし	なし			
9	MNNALNGG	なし	なし	なし			
10	TEGLFPRGR	ZZ6_1055	ZMO0152	pyruvate Kinase	475	6.26	51489.29
11	MRDIDSVM	ZZ6_0313	ZMO0997	2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase	208	6.59	21475.34
12	MNFRPLHD	ZZ6_1222	ZMO1928	chaperonin GroES, 10 kDa chaperonin	95	5.12	10263.72
13	AEITAAAV	ZZ6_0173	ZMO1155	elongation factor Ts	307	5.11	32111.61
14	PTLVLSRH	ZZ6_0092	ZMO1240	phosphoglycerate mutase	228	6.34	25894.36
15	MEQKKYE	ZZ6_1173	ZMO0016	molecular chaperone GrpE	190	5.03	21295.03
16	MDVILLER	ZZ6_0108	ZMO1227	50S ribosomal protein L9	209	4.78	22801.51
17	TAIVSIHG	ZZ6_1504	ZMO1608	enolase	429	5.15	45732.71
18	AVKVAIAG	ZZ6_1034	ZMO0177	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	337	6.25	36102.11

### 3. 研究成果の副次的効果

*Zm. mobilis* が産生するタンパク質を解析した結果 *Zm. mobilis* の塩耐性には解糖系酵素が重要であることが明らかになり、成果として論文および学会にて発表することができた。

## 研究タイトル:①麴作成時において *Aspergillus kawachii* が産生するタンパク質の解析

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 生化学研究室

担当者職名：准教授 林 毅（平成 27～28 年度）、准教授 陶山 明子（平成 29 年度）

研究協力者：准教授 藤原 秀彦

### 1. 研究の目的

発酵・醸造食品は原料を微生物により発酵させることで原料にない物質を作り出し機能性を高めることができる。例えば酒類全般では抗酸化活性、免疫賦活作用、抗がん作用などがあり、独自の作用としては清酒の美肌効果、健忘症抑制効果、ビールの骨粗鬆症改善効果、ワインの心臓病改善効果などがある。味噌では血圧上昇抑制効果、抗変異原性、がん細胞増殖抑制効果がある。これらの発酵・醸造食品の製造には酵母・麹菌・乳酸菌などの醸造微生物が関わっており、使用する醸造微生物の違いで発酵食品の味や色、香り、機能性物質の種類・量などが異なってくる。これらの違いは微生物の産生する酵素の量や働きの違いによるものが大きい。

近年、タンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析が多く報告されている。プロテオーム解析は生体中の全タンパク質を分離してそれらのタンパク質のアミノ酸や分子量を測定した結果を、遺伝子配列の情報のデータベースと照合して同定する手法である。我々は、発酵食品の機能性に関わるタンパク質（酵素）の特定や食品の品質管理への応用をめざして、醸造微生物のプロテオーム解析を試みている。プロテオーム解析の成功の鍵は、高収率に全タンパク質を抽出し、高い分離能で分離することである。本研究では、まず麦麹作成時において焼酎白麹菌 *Aspergillus kawachii* が産生するタンパク質について 2 次元電気泳動（1 次元目：等電点電気泳動、2 次元目：SDS-PAGE）およびプロテインシーケンサーを用いた未知タンパク質分析系を確立し、次に発酵食品の例として麹と味噌からタンパク質を抽出し 2 次元電気泳動によるタンパク質の分離を行った結果を報告する。

### 2. 研究内容

#### 【材料および方法】

#### 1) 麦麹

オートクレーブ（105℃、50 分）を用いて蒸麦を作製し、これに *A. kawachii* の孢子懸濁液を作製、植菌し、35℃のインキュベーター中で培養を行った。

#### 2) SDS-PAGE による麦麹中のタンパク質の解析

2 次元電気泳動の前段階として、培養時間の異なる麦麹を SDS-PAGE を用いてタンパク質解析し、2 次元電気泳動のサンプルとして用いるものを選定した。3、20、24、48、72、

96時間培養ごとに麦麴をサンプリングし、緩衝液を添加して10秒間ボルテックス後、100°Cで1分間処理した後、遠心分離（15,000 rpm、5分）した上清をサンプルとした。

サンプルの前処理として5通りの方法を試した。

(1) 凍結乾燥した麦麴3粒をガラスビーズで破碎し、緩衝液に懸濁後、遠心分離した上清をサンプルとした。

(2) 凍結乾燥した麦麴3粒をガラスビーズで破碎し、ふるいにかけて麦を除去し菌糸を回収し、緩衝液に懸濁後、遠心分離した上清をサンプルとした。

(3) 凍結乾燥した麦麴3粒をガラスビーズで破碎し、ふるいにかけて菌糸を回収した後、酵素処理（ヤタラーゼとセルラーゼを使用）して遠心分離した沈殿を回収し、緩衝液に懸濁後、遠心分離した上清をサンプルとした。

(4) 麴は液体窒素で凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて粉碎した。粉碎した麴250 mgに対して膨潤/サンプルバッファー（ReadyPrep™ 2次元スターターキット（バイオラッド製））を125 µlまたは1 ml添加して麴を溶解した液を2次元電気泳動のサンプルとして使用した。このサンプルには水に可溶性タンパク質と水に不溶性タンパク質が可溶化したものが含まれている。膨潤/サンプルバッファーの組成は、8 M 尿素、50 mM ジチオスレイトール、2% CHAPS、0.2% キャリアアンフォライト（pHレンジ3-10）、0.001% BPBである。

(5) 麴は液体窒素で凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて粉碎した。粉碎した麴250 mgに対して滅菌水を1 ml添加して懸濁し室温で2時間振とうした後、10,000 rpm、5分、4°Cで遠心し、上清を回収した。上清170 µlに対して10倍量の10% TCAを含むアセトン溶液を加え-20°Cで3時間静置した。15,000 rpm、10分、4°Cで遠心し、沈殿を回収して冷アセトンで2回洗浄した。沈殿を乾燥してアセトンを完全に除去し、膨潤/サンプルバッファー125 µlに溶解し2次元電気泳動のサンプルとして使用した。このサンプルには水に可溶性タンパク質のみが含まれる。

### 3) 米麴

酒造用米麴（黄麴菌使用）と米麴（W-20：白麴菌仕様）を使用した。

### 4) 味噌

*A. kawachii* と *A. oryzae* を用いて作成した白米麴、白麦麴、黄米麴、黄麦麴を用いて、a. 白米麴×白麦麴、b. 白米麴×黄麦麴、c. 黄米麴×黄麦麴、d. 黄米麴×白麦麴の組み合わせで味噌を作成した。

味噌の作成は、麴屋本店の味噌の作成方法に従った。以下に詳細を示す。味噌は、原料の比率を米麴：麦麴：大豆：食塩＝約1：4：3：1として作成した。大豆は市販の国産大豆を使用した。まず圧力鍋で大豆を40分間蒸煮した後、ざるに上げて常温まで放熱し、チャック付きの袋に入れて冷凍しておいた。冷凍大豆は100°Cで10分湯煎して解凍し使用した。次に米麴22 gと麦麴126 g、大豆106 g、食塩30 gを十分に混ぜ合わせ、保存袋に詰め

た。発酵の過程で二酸化炭素が発生するため随時空気抜きと天地返しを行い、常温で 2 ヶ月静置して作成を終了した。

#### 5) 味噌からの水溶性タンパク質抽出

味噌 400 mg に滅菌水 1 ml を添加して懸濁し室温で 1 時間振とうした後、ろ過した。ろ液に 100 % (w/v) TCA を 2 ml 添加し-20°C で一夜静置した。9000 rpm、15 分、4°C で遠心し、沈殿を回収して冷アセトンで 2 回洗浄した。沈殿を乾燥してアセトンを完全に除去し、膨潤/サンプルバッファー 125 µl に溶解し 2 次元電気泳動のサンプルとして使用した。このサンプルには水に可溶なタンパク質のみが含まれる。

#### 6) 2 次元電気泳動

2 次元電気泳動に使用する試薬および装置はすべてバイオラッド社のものを使用し、バイオラッド社の 2 次元電気泳動ガイドに従って操作した。

1 次元目の等電点電気泳動は IPG ストリップ (pH レンジ 4-7、7 cm) を使用し、等電点電気泳動の電気条件は、膨潤: 12 時間、Step1: 250 V Rapid 15 min、Step2: 4000 V linear 1 h、Step3: 4000 V Rapid 10000 Vhour である。等電点電気泳動装置はプロティアン IEF セルを使用した。電気泳動の終了後、IEF ストリップは ReadyPrep™ 2 次元スターターキット付属の平衡化バッファー I およびバッファー II で平衡化した。

2 次元目の SDS-PAGE は 10% ミニプロティアン TGX™ プレキャストゲルを用い、200 V、35 分で電気泳動した。

タンパク質は EzStain Aqua (アトー社) による染色で検出した。2 次元電気泳動では、タンパク質はスポット状に検出される。

#### 【結果および考察】

##### 1) SDS-PAGE による麦麴中の *A. kawachii* が産生するタンパク質の解析

培養 20 時間で新たなタンパク質のバンドを検出した。また、培養 48 時間で蒸麦だけのサンプルで見られていたタンパク質のバンドが消失した。時間経過に伴い、発現するタンパク質が異なると予想されるので、20 時間以降で経時的にサンプリングして 2 次元電気泳動を行う必要がある。

##### 2) 2 次元電気泳動による麦麴中のタンパク質の解析

前処理法 (1): 凍結乾燥した焼酎麴をビーズクラッシャーで破碎し、その後 *Zm. mobilis* と同様の方法で抽出したたんぱく質を 2 次元電気泳動したところ、明らかにタンパク質と思われるスポットが多く確認できたが、電気泳動自体が乱れていた。麦中に含まれる多糖類などが 2 次元電気泳動を阻害していると考えた。麦タンパク質の回収量を減らすことが必要である。

前処理法 (2) : 前処理法 (1) に加え、ふるいにかけて麦を除去することで2次元電気泳動の乱れは見られなくなり、タンパク質の分離に成功した。しかしタンパク質のスポットは少なかつた。膨潤バッファーに懸濁するのみでは固い麴菌の細胞壁が破壊できていないと考察した。

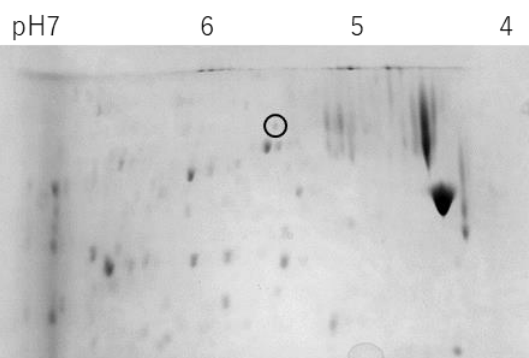
前処理法 (3) : 酵素処理を行った結果、(2) よりもスポットが減少した。ヤタラーゼ中には多くのプロテアーゼが含まれていると予想される。これらのプロテアーゼが、菌糸中のタンパク質を分解した可能性が考えられたため、酵素処理法は適さないと判断した。

酵素処理以外の方法で麴菌の細胞壁を破壊する必要があることが明らかになった。前処理法として凍結乾燥して破砕するより液体窒素で凍結して破砕した方がタンパク質を多く回収できるとの情報を得た。

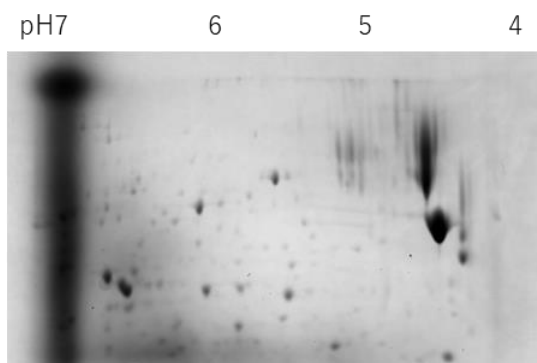
### 3) 米麴の2次元電気泳動

前処理法 (4) 1次元目の等電点電気泳動に供することのできる最大サンプル量は 125  $\mu$ l である。粉砕した麴 250 mg に対して膨潤/サンプルバッファーを 125  $\mu$ l 添加したところ、

a. 白麴菌を用いた米麴



b. 黄麴菌を用いた米麴



溶液の粘性が高くなりゲル状となったため1次元目の等電点電気泳動に供することができなかつた。そこで粉砕した麴 250 mg に対して膨潤/サンプルバッファーを 1 ml 添加して溶解させ2次元電気泳動を行った。しかし、スミア状の濃いスポットと、5つ前後の薄いスポットしか検出できなかつた。スミア状の濃いスポットは高含量のタンパク質の存在を示しており、米の主要な貯蔵タンパク質であるグルテリン (オリザニン) ではないかと推測した。それ以外のタンパク質量は少なかつたため5つ前後の薄いスポットしか検出できなかつたと考察した。

前処理法 (5) プロテオーム解析を行うためには、なるべく多くのタンパク質を2次元電気泳動で分離することが必要である。そのためには、高含量のタンパク質を除去し、低含量のタンパク質を濃縮する必要がある。グルテリンは水に不溶のため、麴を水で抽出すると不溶性タ

図1 米麴の水溶性タンパク質の2次元電気泳動解析

a. 白麴菌を用いた米麴、b. 黄麴菌を用いた米麴。  
電気泳動写真の上の数字は等電点電気泳動におけるpHを示す。黒丸は特異的なタンパク質を示す。



ンパク質として除去できる。そこで、水に可溶性タンパク質と不溶性タンパク質に分けて2次元電気泳動を行うこととし、今回は可溶性タンパク質の2次元電気泳動を行った。粉碎した麴 250 mg の水溶性タンパク質を TCA/アセトン沈殿した全量を膨潤/サンプルバッファを 125  $\mu$ l で溶解し2次元電気泳動に供した。図 1a に白麴菌を用いた米麴の、図 1b に黄麴菌を用いた米麴の2次元電気泳動結果を示す。両者とも 50 個以上の良く分離されたスポットが検出できた。それぞれのスポット位置はほぼ同一であったが、白麴菌を用いた米麴に特異的なタンパク質のスポットが1つ検出できた(図 1a)。

#### 4) 味噌の2次元電気泳動

味噌の製造には黄麴菌 (*A. oryzae*) を用いた黄米麴と黄麦麴が用いられる。焼酎製造に用いられる麴菌はクエン酸を高生産することが特徴であり、産生した多量のクエン酸により

焼酎麴の pH は低く (pH 約 3) になっている。また焼酎麴菌は黄麴菌よりも多量に植物細胞壁溶解酵素を産生する特徴がある。今回、黄米麴、黄麦麴をそれぞれ白米麴、白麦麴に置き換えてどのような違いが現れるかを、水溶性タンパク質の2次元電気泳動により検討した。

味噌は a.白米麴×白麦麴、b.白米麴×黄麦麴、c.黄米麴×黄麦麴、d.黄米麴×白麦麴の組み合わせで作成した。味噌 400 mg の水溶性タンパク質を TCA/アセトン沈殿した全量を膨潤/サンプルバッファを 125  $\mu$ l で溶解し2次元電気泳動に供した。図 2 には、特異的なタンパク質のスポットが検出された pH 5 から 6 までの範囲の2次元電気泳動結果を示す。a.白米麴×白麦麴と c.黄米麴×黄麦麴の組み合わせ

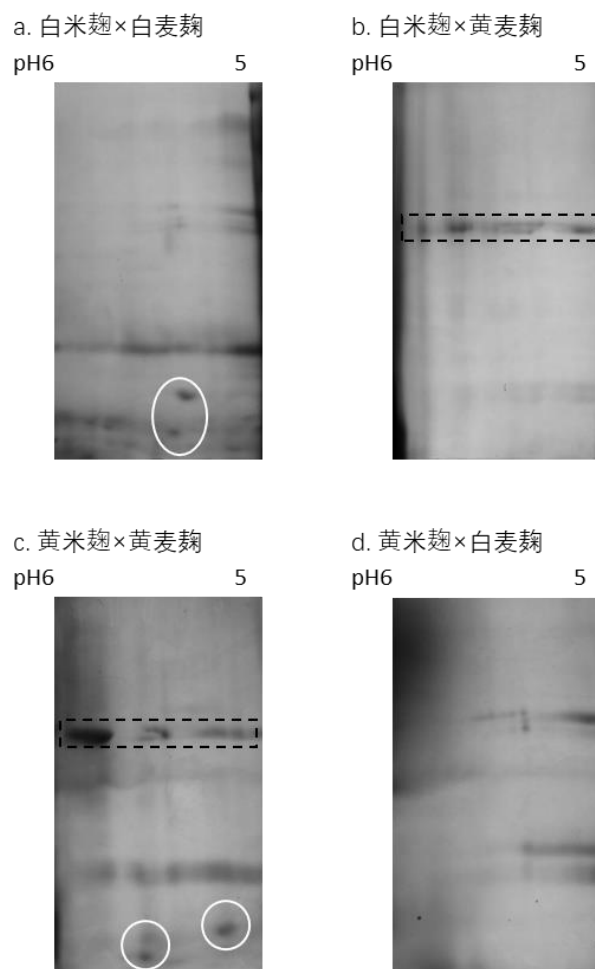


図 2 味噌の水溶性タンパク質の2次元電気泳動解析

a. 白米麴と白麦麴を用いた味噌、b. 白米麴と黄麦麴を用いた味噌、c. 黄米麴と黄麦麴を用いた味噌、d. 黄米麴と白麦麴を用いた味噌。電気泳動写真の上の数字は等電点電気泳動における pH を示す。白丸はその味噌に特異的なタンパク質を示す。黒い点線で囲んだ部分は共通と思われるタンパク質を示す。

では、低分子量（20 kDa 以下）の特異的なタンパク質スポットが検出された。したがって白麹菌のみを用いた味噌と黄麹菌のみを用いた味噌の違いを 2 次元電気泳動で検出することができた。一方、b.白米麹×黄麦麹および d.黄米麹×白麦麹のように白麹菌と黄麹菌を用いた組み合わせでは、良く分離されたタンパク質スポットは検出できなかったが、黒い点線で囲んだ中～高分子量のタンパク質が共に検出された。このタンパク質は a.白米麹×白麦麹と d.黄米麹×白麦麹では検出されなかったため、黄麦麹由来であると考えられる。また、味噌の 2 次元電気泳動結果（図 2）では麹の結果（図 1）と比べると高分子量のタンパク質スポットは少なかった。味噌作成にかかった 2 ヶ月間で、高分子量のタンパク質が分解されて低分子量のタンパク質やペプチドになったためであると考えられる。低分子量のタンパク質検出に適したゲルを使用することでそれらのスポットの検出が期待できる。

今回の結果ではタンパク質スポットの数は非常に少なかったが、白麹菌のみを用いた味噌、黄麹菌のみを用いた味噌、黄麦麹を用いた味噌のそれぞれに特異的なタンパク質スポットを検出することができた。今後、サンプル調製および 2 次元電気泳動の条件を最適化することでより多くの特徴的なタンパク質スポットを得て、発酵食品の機能性に関わるタンパク質（酵素）の特定を行っていききたい。

#### 【終わりに】

2 次元電気泳動で麹と味噌を分析した結果、使用した麹菌に特異的なタンパク質が検出できた。サンプル調製および 2 次元電気泳動の条件を最適化し、発酵食品の機能性に関わるタンパク質（酵素）の特定を行っていききたい。また、食品分析への応用も以下のように行っていききたい。まず製造過程ごとに食品サンプルの 2 次元電気泳動を行い、正常に製造できているときの泳動パターンを作成しておく。次に腐敗・色の変化など品質が低下した食品サンプルの 2 次元電気泳動を行って正常時の泳動パターンと比較することで、品質低下の原因となったタンパク質を特定する。そのタンパク質をプロテインシーケンサーで同定することで、品質低下の原因（微生物汚染、製造過程の不備など）が特定でき、製造過程の改善に役立てられることが期待される。

### 3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

#### 【研究成果の副次的効果】

2 次元電気泳動装置とプロテインシーケンサーによるタンパク質の分析について研究発表した結果、自治体や企業、大学研究者から問い合わせがあり、次年度から依頼分析を行う予定がある。

#### 【今後の展望】

発酵食品の醸造過程で寄与するタンパク質を特定に関しては食品微生物の株の違いや製法の違い、各条件において特異的なタンパク質を同定することで、発酵・醸造食品の有用性

や機能性への寄与をタンパク質のレベルで解析する。特に発酵食品の醸造過程におけるそのタンパク質の寄与に関して解析する。本研究プロジェクトで導入した 2 次元電気泳動やプロテインシーケンサーなどの機器について産学官連携で地場企業に広く活用を推進することで、本学のみならず大分県の食品産業における食品分析・研究レベルの底上げが期待できる。

## 研究タイトル：①吟醸香の高い大分酵母の育種

研究機関：食物栄養科学部 発酵食品学科 生化学研究室

担当者職名：准教授 陶山 明子

研究協力者：教授 米元 俊一、教授 岡本 啓胡

### 1. 研究の目的

大分県産酵母 KET002 株およびハ-4 株は、大分県酒造組合と別府大学との共同研究により大分県内の酒造会社の酒粕から分離した酵母である。大分県産酵母を使用した酒は協会酵母を使用した酒と比較すると、KET002 株は酸味が強く、旨味が少なく、甘みは更に少ない。ハ-4 株は旨味、甘みがかすかに低く、酸味が僅かに高く、協会酵母 9 号に近い味であった。男女を対象にした官能検査の結果では、点数の高い順に協会酵母 9 号、ハ-4 株、KET002 株という結果であった。

そこで、大分県産酵母を用いた酒の品質向上を目的として、吟醸香を高めることを目指した。吟醸香の主要成分は、酢酸イソアミル（バナナ様の香）とカプロン酸エチル（リンゴ様の香）であり、近年、吟醸酒の製造ではカプロン酸エチル高生産酵母が用いられることが多い。カプロン酸エチルを増加させるには、基質であるカプロン酸を増加させることが必要である。カプロン酸は、脂肪酸合成酵素によって作られるが、通常はカプロン酸のような短鎖脂肪酸は大量に生成しない。しかし脂肪酸合成酵素の働きを弱めることにより、短い脂肪酸を蓄積することが出来る。そこで脂肪酸合成酵素を特異的に阻害する薬剤のセルレニンに耐性がある酵母を取得することで、カプロン酸エチル高生産株が育種した報告が多数ある。

本研究では、カプロン酸エチルを高生産する KET002 株およびハ-4 株の育種を試みた。得られた酵母を使用し、一段仕込みした後、ガスクロマトグラフィーや GC-MS-O で香気成分の分析を行い、カプロン酸エチルを高生産する酵母を選抜した結果を報告する。

### 2. 研究内容

#### 【実験方法】

#### 1) 供試菌株

大分県産酵母 KET002 株およびハ-4 株を使用した。

## 2) 培地

KET002 株は YPD 培地 (2% D-グルコース、2% Polypeptone、1% Yeast Extract) または YPD 寒天培地 (YPD 培地、3% 寒天) で培養した。

セルレニン耐性株の選抜には、25  $\mu$ M セルレニンを含む YPD 寒天培地を使用した。

## 3) セルレニン耐性酵母の取得

セルレニン耐性酵母の取得は、市川らの方法に準じて行った。100 ml 容量の三角フラスコに YPD 液体培地を 10 ml 入れ、KET002 株を 1 白金耳接種し、23°C で一夜培養した。培養液は遠心 (5000 rpm、5 分、4°C) して菌体回収後、滅菌水で 2 回洗浄した。遠心 (5000 rpm、5 分、4°C) して回収した菌体を、5% エチルメタンサルホン酸 (EMS) を含むリン酸バッファー 600  $\mu$ l で懸濁した後 30°C で 20 分インキュベートして突然変異処理を行った。中和のため 6% チオ硫酸ナトリウム溶液を等量入れ、遠心 (5000 rpm、2 分、4°C) し、上清を除いた。菌体は、滅菌水で 2 回洗浄した。遠心 (5000 rpm、2 分、4°C) して回収した菌体を YPD 液体培地 100  $\mu$ l で懸濁し、セルレニン含有 YPD 寒天培地に塗布し 15°C で 2 週間培養した。出現したコロニーを新しいセルレニン含有 YPD 寒天培地に釣菌し、単離した。

## 4) 一段仕込み

YPD 液体培地を 4 ml 入れた試験管に、単離したセルレニン耐性酵母を 1 白金耳接種し、23°C で一夜、振とう培養 (120 rpm) し、前培養液とした。総米 2 g、乾燥麴 4 g および滅菌水 15 ml を 50 ml 容コニカルチューブに入れ、前培養液を 30  $\mu$ l 接種し、15°C で発酵させた。発酵経過の指標とするため 24 時間ごとにもろみの重量を測定した。15 日間発酵させた後、もろみをろ過し、得られたろ液のエタノール濃度をガスクロマトグラフィーで、香気成分をガスクロマトグラフィーと匂いかぎ GC-MS-O で分析した。コントロールとして KET002 株およびハ-4 株も同様に試験した。

## 5) ガスクロマトグラフィー

エタノール濃度の分析条件を以下に示す。

装置：GC-2014 (株式会社島津製作所)、検出器：FDA 検出器、分離管： $\Phi$ 3.0 mm  $\times$  2 m、固定相：Porapak Q50/80、検出器温度：250°C、試料導入部温度：210°C、分離管温度：155°C、キャリアーガス：窒素、99.999%、流速：40 ml/min、分析試料量：2  $\mu$ l

香気成分の分析条件を以下に示す。

[ガスクロマトグラフィー]

装置：GC-2014 (株式会社島津製作所)、カラム：DB-WAX (Φ0.32 mm×30 m、膜厚 0.25 μm)、カラム温度：75℃、FID 温度：250℃、キャリアーガス：N<sub>2</sub>、キャリアーガス流速：1.0ml/min、スプリット比：10、ヘッドスペースガス量：1 ml、平衡時間：3 min、注入モード：スプリット、サンプリング時間：1.00 min、制御モード：圧力、圧力：38.2 kPa、全流量：1.0 ml/min、カラム流量：1.00 ml/min、線速度：20.2 cm/sec、ページ流量：0.0 ml/min

[ヘッドスペースサンプラー]

装置：HS-20、オープン温度：50℃、サンプルライン温度：150℃、トランスファーライン：150℃、バイアル攪拌：OFF、バイアル加圧用ガス圧力：50 kPa、バイアル保温時間：30 min、バイアル加圧時間：2 min、加圧平衡化時間：0.1 min、ロード時間：0.5 min、ロード平衡化時間：0.1 min、注入時間：1 min、ニードルフラッシュ時間：5 min、GC サイクルタイム：30min

## 6) GC-MS-O

装置：7890B GC-5977AMSD (Agilent Technologies 社)、装置の上部に試料から香気成分をサンプリングする MultiPurpose Sampler (Grestel 社) を付属している。匂いかぎ装置は Olfactory Detector Port ODP3 を用いた。

分析条件を以下に示す。

固定相マイクロ抽出 (SPME) ファイバー：Carboxen/PDMS (中極性)、試料加温条件温度：40℃、5 分、GC カラム：Agilent 122-7032DB-WAX (30 m×250 μm)、カラム流量：1.9 ml/min、カラム昇温設定：40℃→100℃ (10℃/min)、100℃→250℃ (8℃/min)、イオン源温度：230℃、EI 法、GC-0 流量比 1 対 1  
Olfactometry Temp：Transfer Temp：250℃、Exit Temp：150℃

### 【実験結果および考察】

#### 1) セルレニン耐性酵母の取得

カブロン酸高生産酵母を育種するために、KET002 株およびハ-4 株に対して EMS による突然変異処理を行い、脂肪酸合成酵素を特異的に阻害する薬剤であるセルレニンに耐性がある酵母を取得した。セルレニン含有 YPD 寒天培地に出現したコロニーからランダムに 39 株選抜した。このうち KET002 株由来は 24 株、ハ-4 株由来は 15 株であった。

#### 2) セルレニン耐性酵母の 1 段仕込み試験

選抜した 39 株および KET002 株、ハ-4 株について 1 段仕込み（総米 2 g の小仕込試験）を行った。15 °C、15 日間発酵させた後ろ過し、得られたろ液のエタノール濃度と香気成分を測定した。

表1 セルレニン耐性株のエタノール濃度

菌株	エタノール濃度 (%)
親株	
KET002	15.6
ハ-4	16.0
KET002 株由来セルレニン耐性株	
K①-1	17.1
K①-2	16.7
K①-3	19.3
K②-2	16.4
K②-3	16.7
K②-4	16.6
K10①-3	16.4
K10①-5	17.8
K10①-8	16.0
K10②-4	15.8
K10②-6	15.2
K10②-8	15.2
K10③-4	14.3
K10③-5	17.4
K10③-6	17.3
3K20①-1	15.7
3K20②-2	15.6
ハ-4 株由来セルレニン耐性株	
ハ①-3	18.2
ハ①-4	18.2
ハ①-9	17.5
ハ②-1	18.1
ハ②-2	16.3
ハ②-3	16.9
ハ10①-2	18.2
ハ10①-4	17.3
ハ10①-5	16.4
ハ10②-2	14.6
ハ10②-6	17.8
ハ10②-8	16.0
ハ10③-4	17.4
ハ10③-8	16.4
ハ10③-9	18.5

表 1 にエタノール濃度の測定結果の一部を示す。KET002 株のエタノール濃度は 15.6%、ハ-4 株は 16.0%であった。セルレニン耐性株でエタノールが最も高かった株は K①-3 株（19.3%）、最も低かった株は K10③-4 株（14.3%）であった。

ガスクロマトグラフィーで測定した香気成分は、酢酸エチル、n-プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコールである。酢酸エチルはパイナップルに似た果実香、n-プロパノールは特異臭、イソブタノールは独特な香り・発酵した香り、イソアミルアルコールは特有のアルコール様の香りといわれている。測定結果を表 2 に示す。

KET002 株由来のセルレニン耐性株についての結果についてまず述べる。酢酸エチル濃度については、K10③-4 株は KET002 株の 1.1 倍であり K10③-5 株は KET002 株と同程度であったが、それ以外のセルレニン耐性株は KET002 株の値より減少した。n-プロパノール濃度については、K10③-5 株は KET002 株と同程度であったが、それ以外のセルレニン耐性株は KET002 株の値より減少した。イソブタノール濃度については KET002 株の濃度より増加したのは 22 株であった。イソアミルアルコール濃度については、9 株が増加したが、K10③-5 株は減少していた。

表2 セルレニン耐性株を用いた一段仕込み試験で生成した酒の香気成分濃度

菌株	酢酸エチル (ppm)	n-プロパノール (ppm)	イソブタノール (ppm)	イソアミルアルコール (ppm)
親株				
KET002	66.3	131.7	89.1	153.1
ハ-4	52.4	85.5	76.8	132.7
KET002 株由来セルレニン耐性株				
K①-1	32.8	90.9	84.0	117.2
K①-2	29.6	110.9	72.9	115.1
K①-3	32.7	81.3	129.2	149.1
K②-2	21.1	66.2	148.0	141.2
K②-3	29.1	64.3	109.5	124.0
K②-4	25.4	60.2	183.2	167.0
K10①-3	28.7	56.7	123.3	131.5
K10①-5	53.4	79.2	132.5	171.3
K10①-8	34.6	87.3	127.9	178.7
K10②-4	27.6	84.9	105.6	151.7
K10②-6	39.4	116.0	136.0	158.6
K10②-8	25.3	108.2	119.3	133.5
K10③-4	74.0	106.3	109.6	138.8
K10③-5	67.5	132.6	99.1	134.3
K10③-6	12.0	73.5	108.8	136.6
K30①	18.4	79.4	130.9	155.5
K30②	21.1	53.6	186.1	128.5
3K0①	16.2	57.6	106.4	157.3
3K0②	17.0	60.5	99.6	158.8
3K0③	20.4	62.5	103.5	159.4
3K20①	9.6	63.4	130.6	156.7
3K20①-1	59.2	93.1	121.1	137.3
3K20②	9.8	44.6	107.9	127.7
3K20②-2	46.5	73.4	120.1	146.7
ハ-4 株由来セルレニン耐性株				
ハ①-3	31.2	81.2	108.5	142.1
ハ①-4	11.6	61.2	129.4	134.4
ハ①-9	14.6	76.7	67.4	123.2
ハ②-1	18.2	71.7	73.1	130.3
ハ②-2	15.8	75.1	108.3	146.4
ハ②-3	27.4	78.1	105.3	137.3
ハ10①-2	32.4	85.0	79.1	132.3
ハ10①-4	13.3	68.7	97.0	127.5
ハ10①-5	13.5	62.1	97.1	136.2
ハ10②-2	16.6	61.9	81.0	163.7
ハ10②-6	39.5	92.1	86.9	145.6
ハ10②-8	11.6	59.6	90.5	121.2
ハ10③-4	18.1	64.6	78.1	149.7
ハ10③-8	10.6	61.9	96.1	134.9
ハ10③-9	36.6	85.5	88.4	136.2

次にハ-4 株由来のセルレニン耐性株について述べる。酢酸エチル濃度について

は全てのセルレニン耐性株がハ-4株の値より減少した。n-プロパノール濃度については、2株が増加した。イソブタノール濃度については13株が増加した。イソアミルアルコール濃度については、10株が増加した。

イソアミルアルコールを多く含む清酒は、溶媒様臭やイソアミルアルコールの酸化により生じるイソバレルアルデヒドによるオフフレーバーが問題となる<sup>4)</sup>。K10③-5株のように酢酸エチル濃度は親株であるKET002株と同程度かつイソアミルアルコール濃度は減少している株の方が良いと考えられる。

さらに、一段仕込みのろ液の香りを測定者3名でかぎ、全員一致で吟醸香が高いと判定した3株(3K20①-1株、K10③-4株、K10③-5株)を選抜した。特にK10③-5株は高い吟醸香が感じられた。これらの3株はすべてKET002株由来であった。ガスクロマトグラフィーで測定した4つの香気成分について、これら3株とKET002株を比較した結果を図1に示す。

なお、カプロン酸エチル濃度については今回の分析条件ではほとんど検出できなかったため、これら3株(3K20①-1株、K10③-4株、K10③-5株)についてGC-MS-Oで分析した。

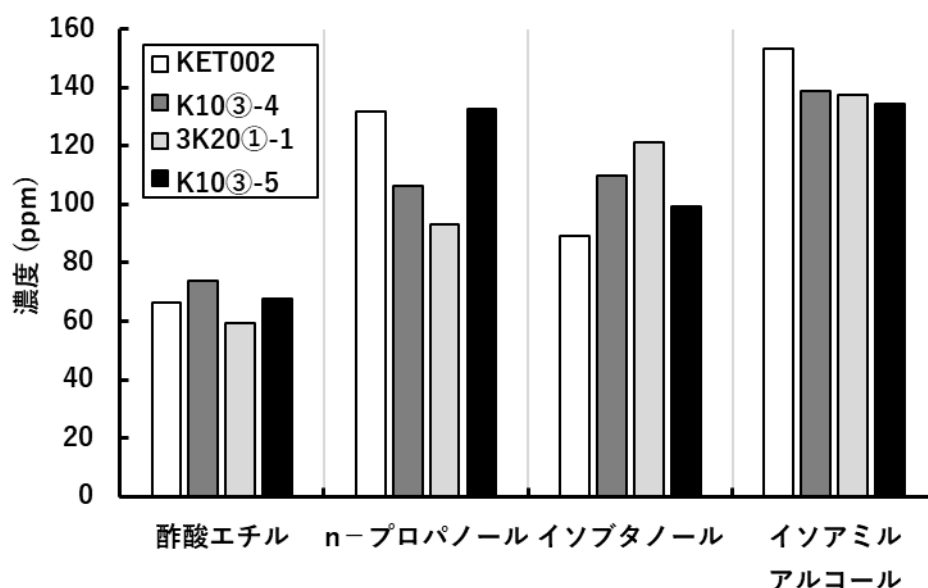


図1 セルレニン耐性株を使用した一段仕込みの低沸点香気成分分析

### 3) GC-MS-Oによる香気成分の分析

3K20①-1株、K10③-4株、K10③-5株およびKET002株についてGC-MS-Oによる香気成分の分析を行った。匂いかぎは、測定者がカラムの出口に鼻を近づけ、香りを感じたらボタンを押しつつ、感じた香りを記述した。測定者は成人女性1名である。



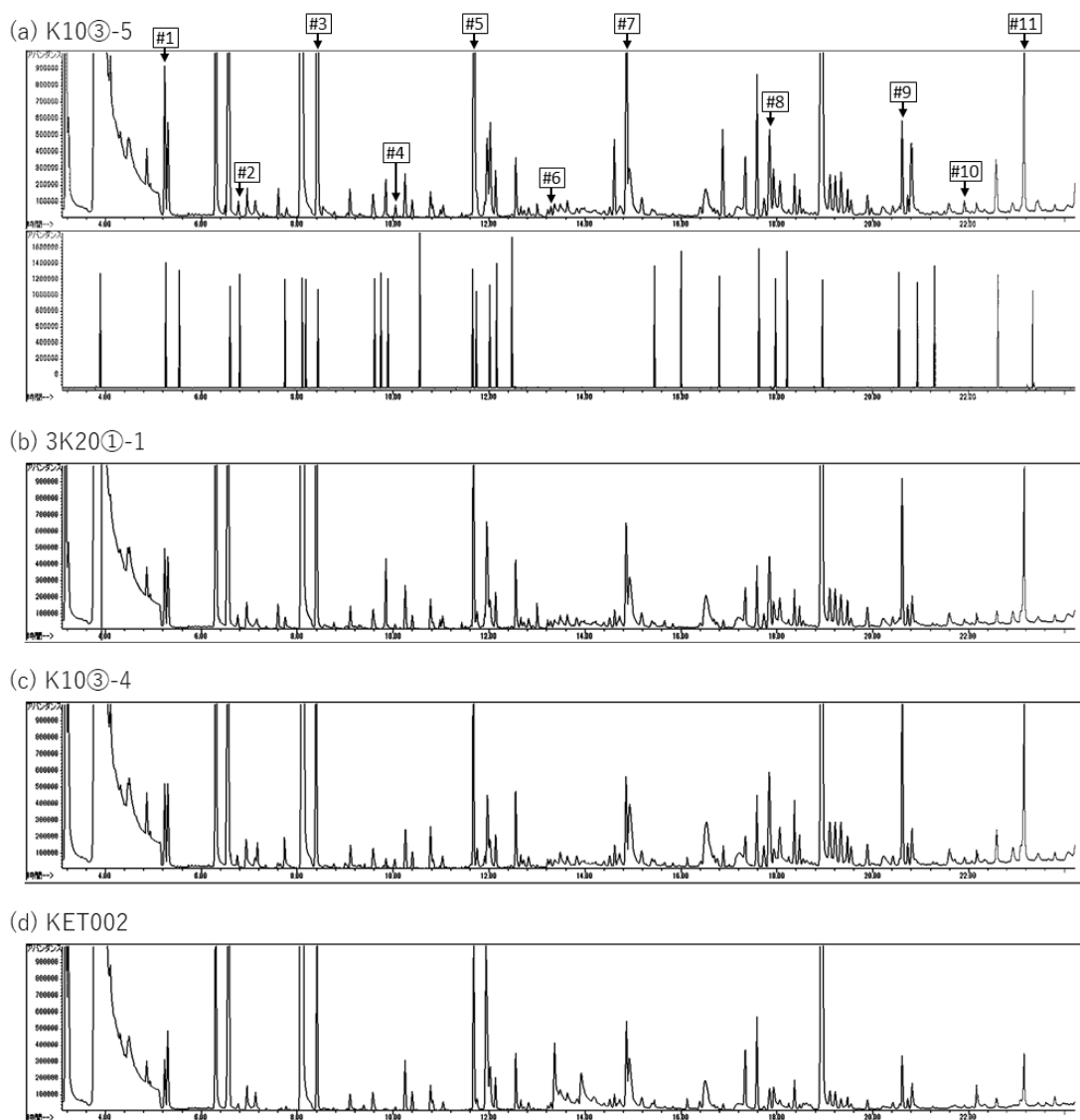


図2 GC-MS-Oによる香気成分分析

(a) 上段：GCスペクトル。脂肪酸エチルエステルを示すピークにナンバリングした。下段：評価者が香りを感じたピーク

表3 セルレニン耐性株 K10③-5 を使用した一段仕込みのGC-MS-Oによる脂肪酸エチルエステル分析

No.：図2(a)で脂肪酸エチルエステルを示すピークに付けた番号、RT：保持時間 (min)

No.	RT	評価者の印象(香りの強さ)	香気成分の種類 (一致率)	概要
#1	5.24	サイダー (小)	酪酸エチル(94)	バナナ・パイナップルのような果実香
#2	6.78	フルーツ系 (小)	吉草酸エチル(94)	リンゴに似たフルーツ香
#3	8.42	サイダー (中)	カプロン酸エチル(98)	リンゴ様の果実香
#4	10.05		ヘプタン酸エチル(98)	ワイン粕的な甘い匂い
#5	11.69	フルーツ系 (小)	カプリル酸エチル(98)	アプリコット・パイナップル様フルーティー香
#6	13.29		ノナン酸エチル(97)	
#7	14.86		デカン酸エチル(99)	オイリーなナッツ・ワイン粕的な甘い匂い
#8	17.85	柑橘系 (小)	ラウリン酸エチル (99)	フルーティー香
#9	20.62	焼き菓子 (中)	ミリスチン酸エチル(99)	
#10	21.91		ペンタデカン酸エチル(98)	
#11	23.16		パルミチン酸エチル(99)	甘い香り

香り分析ソフトのアロマオフィスにより定性を行った香気成分は、一致率が90%以上のデータを記載した。また香気成分の濃度の比較には、得られたクロマトグラムのピーク面積を用いた。試験した4株のクロマトグラムを図2に示す。また、その解析結果を代表してK10③-5株の結果を表3に示す。

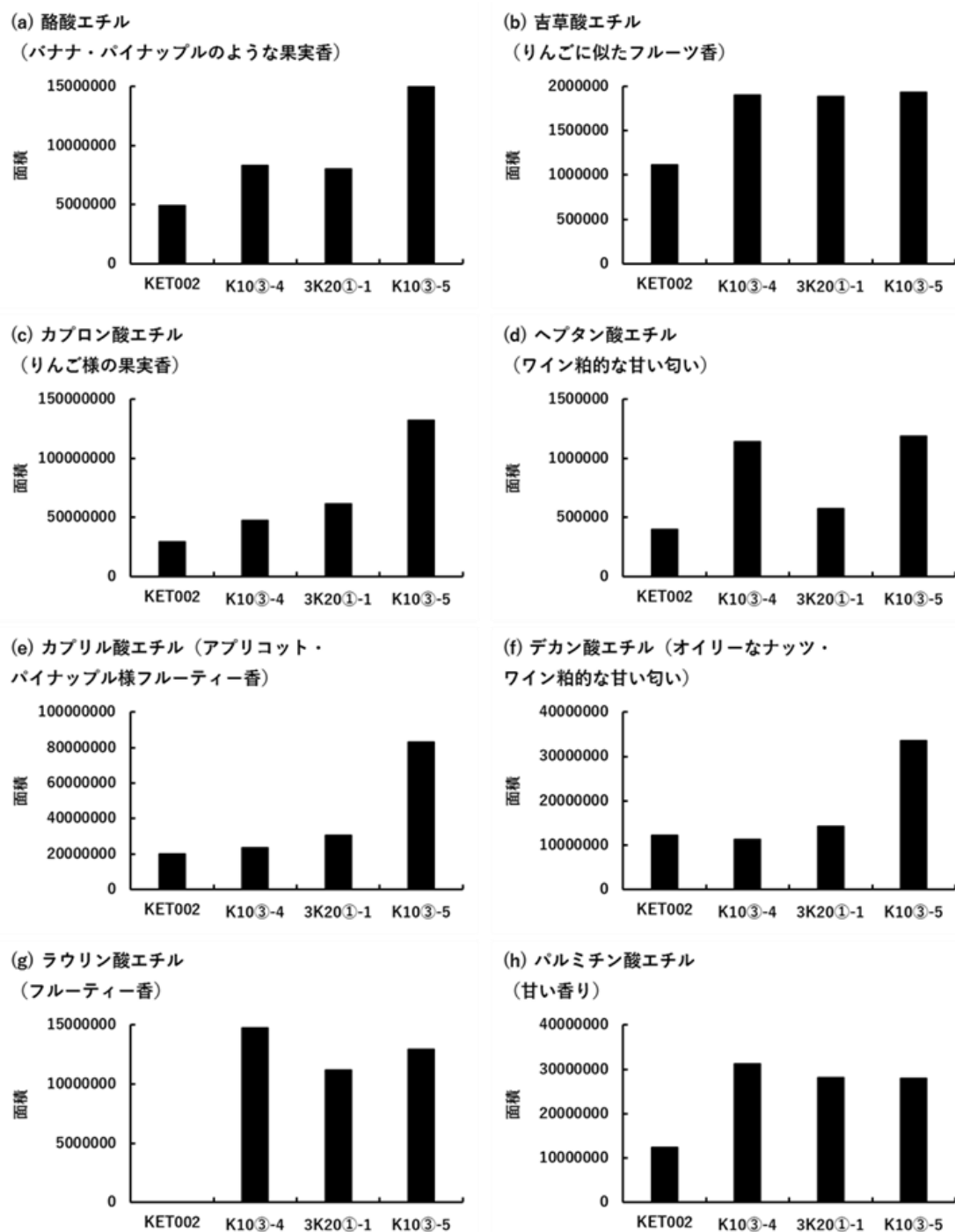


図3 KET002株とセルレニン耐性株を使用した一段仕込みの脂肪酸エチルエステルと比較匂いかぎGC-MS-O分析で得られたピーク面積で比較した

カプロン酸エチル以外にもさまざまな鎖長の脂肪酸エチルエステル類が検出さ

れた。試験した4株におけるこれらの脂肪酸エチルエステル類の濃度の比較を図3に示す。すべてのセルレニン耐性株の値がKET002株の値よりも増加した脂肪酸エチルエステルは、酪酸エチル、吉草酸エチル、カプロン酸エチル、ヘプタン酸エチル、カプリル酸エチル、パルミチン酸エチルであった。特にK10③-5株はそれらの脂肪酸エチルエステル生産量が最も高かった。代表的な吟醸香であるカプロン酸エチルについては、K10③-5株は親株であるKET002株の4.5倍生産した。またフルーティー香が特徴のラウリン酸エチルはKET002株では検出されなかったが、すべてのセルレニン耐性株で検出された。K10③-4株はミリスチン酸エチル生産量とワイン粕的な甘い匂いが特徴のヘプタン酸エチル生産量が高かったが、ノナン酸エチルは検出できなかった。

これらの結果から、K10③-5株が最も吟醸香が高いと評価した。

#### 【まとめ】

大分県産酵母KET002株およびハ-4株の吟醸香を高めるため、突然変異によるセルレニン耐性株の取得を試みた。得られた耐性株の1段仕込み試験を行い、エタノール濃度および低沸点香气成分分析に加え、匂いをかいで吟醸香の高いものを評価し、3株選抜した。これらの株の中高沸点香气成分をGC-MS-Oで分析すると、吟醸香の主要成分であるカプロン酸エチルおよび果実香や甘い香りの短鎖脂肪酸エチルエステルをKET002株より多く生産していた。特にK10③-5株はカプロン酸エチルを親株の4.5倍生産しており吟醸香を高めた酵母を育種することができた。

### 3. 研究成果の副次的効果、今後の計画など

#### 【今後の計画】

- ・アミノ酸度および酸度、日本酒度を調べ、これらの酵母の更なる評価を行う。
- ・高い吟醸香を生産する形質が遺伝的に安定かどうかを検証する。
- ・K10③-5株、KET002株、協会酵母7号および9号を用いて三段仕込みを行い、得られた清酒の評価を行う。
- ・大分県産酵母については酸度やアミノ酸度についても改良を行い、より良い酵母を育種したい。

### 4. 研究成果

#### a) 原著論文

1. 陶山明子、岡 瑞貴、毎田裕美子、米元俊一、岡本啓湖、大分県酒造協同組合、吟醸香の高い清酒用大分酵母の育種、別府大学大学院紀要 No.20 (2018) 印刷中
2. 陶山明子、衛藤美加、藤原秀彦、麴に含まれるタンパク質の網羅的解析-麴作成に用い

た麹菌間での比較-、別府大学紀要 No.59 (2018) 印刷中

3. Hayashi T, Kato T, Watakabe S, Song W, Aikawa S, Furukawa K. Respiratory chain provides salt stress tolerance by maintaining a low NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in *Zymomonas mobilis*. *Microbiology*, 2015, 12 : 2384-2394.

b) 総説

なし

c) 招待講演、シンポジウム

なし

d) 国際学会

なし

e) 国内学会

1. 2017年 平成29年度第2回合同研究成果発表会 1件

1. 2016年 日本農芸化学会2016年度大会 1件

2. 2015年 微生物学の新たな発展、ゲノムから機能・実用に関する九州シンポジウム 1件

3. 2015年 第67回日本生物工学会(鹿児島) 1件

4. 2015年 九州における蛋白質の構造と機能に関する九州シンポジウム(大分) 1件

5. (第22回 日本生物工学会九州支部宮崎大会講演要旨集 24 2015 )

f) 特許

なし

g) その他(学会賞、報道など)

1. 日本農芸化学会西日本支部奨励賞(2016年) 林 毅