

平成14年度

試験研究成果概要

秋田県総合食品研究所

目 次

(1) 県産農水産物の利用拡大に関する研究

新規いぶり漬用ダイコン等の加工適性	1
新規いぶり漬用ダイコン等の加工適性（完了）	3
機能性評価技術の開発と食品の開発（完了）	5
県産米等からの高血圧予防ペプチド等の検索	7
県産米等からの高血圧予防ペプチド等の検索（完了）	9
各種麺類の理化学的特性の解明と秋田産麺類の開発	11
各種麺類の理化学的特性の解明と秋田産麺類の開発（完了）	13
沿岸漁獲物の高付加価値加工技術の開発	15
沿岸漁獲物の高付加価値加工技術の開発（完了）	17

(2) 食品及び酒類の品質高度化に関する研究

高グリセロ - ル生産酵母による県産ワインの品質向上に関する研究	19
しょつつる風新調味料の開発	21
しょつつる風新調味料の開発（完了）	22
醸造食品の機能性香気成分増加技術の開発～味噌	24
県産農水産物の機能性成分を有効利用する加工法の開発	26
県産農水産物の機能性成分を有効利用する加工法の開発（完了）	28
穀類の高度加工法及びその利用に関する研究	30
穀類の高度加工法及びその利用に関する研究（完了）	32
県産米の水浸漬時における特性解明と利用加工法の改良	
- 流出タンパク質と米飯テクスチャー -	34
高品質な米麴の製造方法の検討	36
原材料の除菌・洗浄による園芸加工食品の品質向上	38
原材料の除菌・洗浄による園芸加工食品の品質向上（完了）	40
ジュ - ル加熱技術を応用した高精度殺菌システムの開発	42
ジュ - ル加熱技術を応用した高精度殺菌システムの開発（完了）	44
清酒のろ過技術に関する研究	46

(3) 微生物の利用技術に関する研究

乳酸菌を用いた機能性食品の開発	48
温度感受性酵母の特性解明	50
担子菌類のタンパク質分解酵素の特性解明とその応用	51

(4) 食品成分の分析と評価技術に関する研究

県産農水産物の新規分析評価技術の開発と応用	
- ポータブル近赤外分光装置による製粉穀類の品質評価 -	53
- 味覚センサによる市販塩の品質評価 -	55

(5) 生物機能の解明と利用技術に関する研究

糖代謝系制御によるストレス耐性酵母の育種	57
糖代謝系制御によるストレス耐性酵母の育種（完了）	59
糖質関連酵素遺伝子を用いた新規酵母の育種	61
糖質関連酵素遺伝子を用いた新規酵母の育種（完了）	63
県産米の品質向上に関する遺伝子工学的研究	
- 良質米特異的遺伝子の解析とその育種への応用 -	65
県産米の品質向上に関する遺伝子工学的研究（完了）	
- 良質米特異的遺伝子の解析とその育種への応用 -	67
発酵食品における着色因子の解析	
- 着色因子（麹菌チロシナーゼ等）の特性解明と低着色性麹菌の育種 -	69
発酵食品における着色因子の解析（完了）	
- 着色因子（麹菌チロシナーゼ等）の特性解明と低着色性麹菌の育種 -	71
食品関連酵素のプロテインエンジニアリング	
- <i>N</i> -アセチルグルコサミン 2 -エピメラーゼの機能解析 -	73
食品関連酵素のプロテインエンジニアリング（完了）	
- <i>N</i> -アセチルグルコサミン 2 -エピメラーゼの機能解析 -	75

(6) 食品の安全性と環境対策に関する研究

マンナン含有食品廃棄物からのマンノオリゴ糖生産技術の開発	77
植物性食品廃棄物からのゼロエミッションを目指した環境浄化技術の開発	79
食品製造過程における微生物の動態制御に関する研究（2）	
- 高品質、安全な食品製造 -	81
食材・包材等に含まれる内分泌攪乱物質分析手法の確立及び低減、除去技術の検討	84

(7) その他研究（共同研究）

山ぶどう交配種の醸造特性の検討	86
-----------------	----

研究課題名：新規いぶり漬用ダイコン等の加工適性

予算区分：県単

担当研究室：応用発酵部門素材開発担当

研究期間：継・中

担当者：菅原 久春

平14年度(平12~14年度)

協力・分担関係：農業試験場野菜・花き部

1. 目的

本県を代表する漬物として、いぶり漬は順調にその出荷を伸ばし、1,500ト前後の「いぶり漬」が製造販売されている。それに用いられる原料ダイコンは、製品歩留まり50%として、概ね3,000トと考えられ(製品歩留まり40%とすると3,750ト)、その出荷額は10億円に届こうとしている。

しかしながら原料ダイコンの品質の良否に出荷製品は制約を受けているのが現状で、高品質の加工用ダイコンが求められている。

昨年度までに、新規いぶり漬用ダイコンとして15品種から3品種さらに1品種まで絞り込み、その実用化を目指す。

2. 方法

スモークは改良中温処理法にて実施した。すなわち燻煙乾燥開始から一気に温度を上げ、室温で65(このときのダイコンの中心温度は概ね50になる)を3時間保つことにより、ダイコンの呼吸量を抑え、「ス」入りを防ぐことにつながる。以後の乾燥は従来どおりである。品種については2,4と改良秋田ダイコン、山形ダイコン、を用い比較検討をした。栽培場所は農試八竜町圃場(砂質)と協和町(黒ボク)の栽培地で行った。漬け込み条件は食塩3.5%,米糠4.5%,砂糖12%で行いその期間は60日~90日とした。

3. 成果の概要

熟成期間90日で製品歩留まりは、26~35%であった。改良秋田ダイコンと比較して2の系統(加工用ダイコン秋試交2号)が同等の硬さであり、「ス」入りも比較的少なかった。品種に秋田ダイコンが入ったものの方が加工用原料ダイコンとしては比較的肉質が緻密で、そうでないものよりも硬い傾向にあった(農試のコメント)。製品にしても同様の傾向であった。根肌が美しいこと、揃いが良いことと併せて秋試交2号を選択した。この品種は1987年に秋田市内より収集した在来種「秋田」の選抜固定系統(AK-1)と、1995年に導入した市販品種「山形」の選抜固定系統(YM-1)を、自家不和合性を利用して交配育成した正逆交配によるF1品種である。その特性は、草勢が安定し地上部、地下部の揃いが良いこと、根形はやや中ふくれ型で肌が美しく、曲がりやヒゲが少なく商品率が高い。肉質は緻密で堅く水分が少なく、たくあん漬けにした試作品も評価に充分耐え得るものであった。農試では2002年度中に品種登録の申請を予定している。

表1.有望品種の重量の推移(現地スモーク試験)

品種・系統名	本数 (本)	スモーク前		スモーク後		漬込後		製品
		一本根重 (g)	一本根重 (g)	歩留り (%)	一本根重 (g)	歩留り (%)	歩留り (%)	
秋試交2号	20	699	371	53.1	242	65.1	34.6	
山形	20	680	353	51.8	208	58.9	30.5	
改良秋田	20	612	272	44.4	171	63.0	27.9	

(2001年のデータ)

表2.有望品種の重量の推移(乾燥試験)

品種・系統名	本数 (本)	乾燥前		乾燥後		漬込後		製品
		一本根重 (g)	一本根重 (g)	歩留り (%)	一本根重 (g)	歩留り (%)	歩留り (%)	
秋試交2号	20	892	428	48.0	261	61.0	29.3	
秋試交2号	20	1059	513	48.4	297	57.9	28.0	
山形	20	884	418	47.3	232	55.5	26.2	
改良秋田	20	737	358	48.6	229	64.0	31.1	

表3.加工用ダイの特性

品種・系統名	根色	糖 度		硬 度			水 分 (%)
		(Brix)	(%)	上部	中部	下部	
秋試交2号	乳白	7.0	4.7	3.9	3.9	93.0	
山形	乳白	6.7	3.8	3.3	3.0	94.0	
改良秋田	乳白	6.9	4.7	4.0	4.1	92.4	

表4.漬込み条件等

食塩(%)	3.5
米糠(%)	4.5
砂糖(%)	12
漬込み期間	60日~90日
水分活性	0.92~0.93

4.今後の問題点と次年度以降の計画

5.結果の発表、活用等

各種講習会、研修会及び現場での技術指導、相談業務などで活用する。

研究課題名：新規いぶり漬用ダイコン等の加工適性

予算区分：県単

担当研究室：応用発酵部門素材開発担当

研究期間：平成12～14年

担当者：菅原 久春

協力・分担関係：農業試験場野菜・花き部

1. 目的

本県を代表する漬物として、いぶり漬は順調にその出荷を伸ばし、1,500ト前後の「いぶり漬」が製造販売されている。それに用いられる原料ダイコンは、製品歩留まり50%として、概ね3,000トと考えられ(製品歩留まり40%とすると3,750ト)、その出荷額は10億円に届こうとしている。

しかしながら原料ダイコンの品質の良否に出荷製品は制約を受けているのが現状で、高品質の加工用ダイコンが求められている。

昨年度までに、新規いぶり漬用ダイコンとして15品種から3品種さらに1品種まで絞り込み、その実用化を目指す。

2. 方法

スモークは改良中温処理法にて実施した。すなわち燻煙乾燥開始から一気に温度を上げ、室温で65(このときのダイコンの中心温度は概ね50になる)を3時間保つことにより、ダイコンの呼吸量を抑え、「ス」入りを防ぐことにつながる。以後の乾燥は従来どおりである品種については2,4と改良秋田ダイコン、山形ダイコン、を用い比較検討をした。栽培場所は農試八竜町圃場(砂質)と協和町(黒ボク)の栽培地で行った。漬け込み条件は食塩3～5%、米糠3～5%、砂糖12%で行いその期間は60～90日とした。

3. 成果の概要

熟成期間60～90日で製品歩留まりは、25～35%であった。改良秋田ダイコンと比較して2の系統(加工用ダイコン秋試交2号)が同等の硬さであり、「ス」入りも比較的少なかった。品種に秋田ダイコンが入ったものの方が加工用原料ダイコンとしては比較的肉質が緻密で、そうでないものよりも硬い傾向にあった(農試のコメント)。製品にしても同様の傾向であった。根肌が美しいこと、揃いが良いことと併せて秋試交2号を選択した。この品種は1987年に秋田市内より収集した在来種「秋田」の選抜固定系統(AK-1)と、1995年に導入した市販品種「山形」の選抜固定系統(YM-1)を、自家不和合性を利用して交配育成した正逆交配によるF1品種である。その特性は、草勢が安定し地上部、地下部の揃いが良いこと、根形はやや中ふくれ型で肌が美しく、曲がりやヒゲが少なく商品率が高い。肉質は緻密で堅く水分が少なく、たくあん漬けにした試作品も評価に充分耐えうるものであった。農試では2002年度中に品種登録の申請を予定している。

表1.有望品種の重量の推移(現地スモーク試験)

品種・系統名	本数 (本)	スモーク前	スモーク後		漬込後		製品
		一本根重 (g)	一本根重 (g)	歩留り (%)	一本根重 (g)	歩留り (%)	歩留り (%)
秋試交2号	20	699	371	53.1	242	65.1	34.6
山形	20	680	353	51.8	208	58.9	30.5
改良秋田	20	612	272	44.4	171	63.0	27.9

(2001年のデータ)

表2.有望品種の重量の推移(乾燥試験)

品種・系統名	本数 (本)	乾燥前	乾燥後		漬込後		製品
		一本根重 (g)	一本根重 (g)	歩留り (%)	一本根重 (g)	歩留り (%)	歩留り (%)
秋試交2号	20	892	428	48.0	261	61.0	29.3
秋試交2号	20	1059	513	48.4	297	57.9	28.0
山形	20	884	418	47.3	232	55.5	26.2
改良秋田	20	737	358	48.6	229	64.0	31.1

表3.加工用ダイの特性

品種・系統名	根色	糖 度		硬 度			水 分 (%)
		(Brix)	(%)	上部	中部	下部	
秋試交2号	乳白	7.0	4.7	3.9	3.9	93.0	
山形	乳白	6.7	3.8	3.3	3.0	94.0	
改良秋田	乳白	6.9	4.7	4.0	4.1	92.4	

表4.漬込み条件等

食塩(%)	3.5
米糠(%)	4.5
砂糖(%)	12
漬込み期間	60日~90日
水分活性	0.92~0.93

4.成果の活用面と留意点

1. 根部肥大の早晩は「山形」よりやや早く、晩播適応性が高い。播種期は県内平坦部で8月中~8月下旬である。
2. 収穫遅れは「ス」入りを招きやすいため、根重900~1000gを目安に、播種後70~80日の10月下~11月中旬に早めに収穫をする。

5.残された問題点とその対応

品種登録後定着普及するまでプレハーベストからポストハーベストまで農試と連携して実態を把握していく必要がある。

研究課題名：機能性評価技術の開発と食品の開発

予算区分：県単 **国庫** 委託

担当研究室：応用発酵部門 素材開発担当

研究期間：平14年度（平12～14年度）

担当者：戸松 誠、進藤 昌、柴本憲夫

協力・分担関係：

秋田今野商店(株)、(株)物産中仙、秋田県立大学
愛媛県工業技術センター、広島県立食品工業技術センター、香川県産業技術センター発酵食品研究所、高知県工業技術センター、沖縄県工業技術センター

1．目的

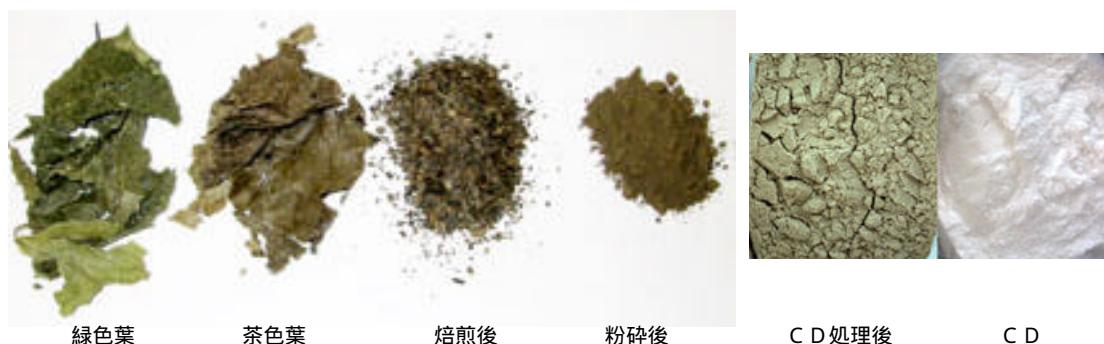
1998年の厚生省調査によると、糖尿病患者は、予備軍も含めると1,370万人を超えるとされ、糖尿病は生活習慣病の代表的疾患の一つとなっている。糖尿病において、もっとも恐ろしいのは、糖尿病性網膜症・糖尿病性腎症・神経障害等の合併症の発症であるといわれており、これら3大合併症の発症に深く関与していると考えられているのが、Aldose reductase (AR)である。そこで、AR阻害活性を県産農水産物から探索し、糖尿病合併症の予防に有効な食品・素材の開発を目的とする。

2．方法

ARとして、牛、兎、犬、ラット等の粗酵素画分を用いたAR阻害活性のスクリーニングの報告が多数あるが、本酵素は、種特異性があるとされ、ヒトのARを用いることが重要である。幸い、ヒト筋肉細胞由来のリコンビナントARが、市販されており、このものと筋肉および網膜の抽出精製ARとは、同等の機能を持つことが報告されているので、これを使用した。また、多数の試料をアッセイできるように、96穴マイクロプレートを使用し、反応系を100 μ Lにした。ARは、NADPHを補酵素に、グルコースからソルビトールを生成する酵素なので、340nmの吸光度変化を測定することで、AR活性を求めることができる。

3．成果の概要

- ・ AR阻害活性の迅速、簡便な評価系（ヒト・リコンビナント酵素法）を確立し、県産農水産物約70種から、本酵素の阻害活性を検索した結果、いくつかの産物に活性が認められ、なかでもトチュウ葉からは、活性成分を単離・同定できた。
- ・ この成分は、中性から酸性では、凍結あるいは加熱しても安定であることから、種々の加工工程でも活性を失わないことが期待された。
- ・ 官能的にクセが強いトチュウをマイルドにする方法として微生物処理が有効であり、この方法を用いた委託による試作品作りを行った。
- ・ ビールの凍結乾燥したものに、AR阻害活性が認められたため、ビール原料について活性測定したところ、ホップに活性があることがわかった。加熱により活性が強くなること等からイソ 酸が活性成分と推定された。
- ・ 上記成果については、それぞれ特許出願、学会、成果普及講習会およびマスコミ報道等にも成果普及できた。



4 . 成果の活用面と留意点

成果の受け渡し

研究成果の公表

- ・ 食品工業,44(10),88-89, 2001,「トチュウの糖尿病合併症予防活性成分」
- ・ 平成13年度 産学官地域技術交流会「トチュウの糖尿病合併症予防活性成分」(2001.9.20)
- ・ 平成14年度 産学官地域技術交流会「機能性成分評価技術の開発」(2002.9.19)
- ・ 平成12・13年度 中小企業技術開発産学官連携促進事業 成果普及講習会「機能性成分評価技術の開発と食品の開発」(2002.10.22)
- ・ 知の種苗交換会「高機能化食品素材等の開発とその利用技術」(2002.11.11)
- ・ 秋田応用微生物研究会 第2回講演会「トチュウおよびホップの糖尿病合併症予防活性成分」(2002.11.15)
- ・ 日刊工業新聞(2001.4.3)、秋田魁新報(2001.6.17)、秋田魁新報(2002.4.13)、佐賀新聞(2002.5.5)、愛媛新聞(2002.5.5)、中国新聞(2002.5.5)、四国新聞(2002.5.5)、福井新聞(2002.5.5)、東奥日報(2002.5.5)、河北新報(2002.5.30)、日本農業新聞(2002.7.2)、日本経済新聞(2002.11.7)、秋田魁新報(2002.11.12)、
- ・ A K T秋田テレビ「情報ステーションi450」(2001.8.7)、A B S秋田放送(2002.6.4)

特記事項(特許申請等)

- ・ 特開2002-220334「アルドースリダクターゼ阻害作用剤および活性酸素消去作用剤」
- ・ 特願2002-025013「アルドースリダクターゼ阻害作用剤」
- ・ 日本農芸化学会2001年度大会「トチュウの糖尿病合併症予防活性成分」
- ・ 日本農芸化学会2002年度大会「ビール中の糖尿病合併症予防活性成分について」
- ・ 「トチュウの糖尿病合併症予防活性成分」産業技術連携推進会議 東北・北海道地域部会研究論文集 第1号,145-146,(2002)
- ・ Inhibition of aldose reductase activity by extracts from hops. Journal of the Institute of Brewing, 108(3), 344-347, 2003.
- ・ 「トチュウおよびホップの糖尿病合併症予防活性成分」Bio Industry, 20(2), 19-26, 2003.

留意点

5 . 残された問題点とその対応

研究課題名：県産米等からの高血圧予防ペプチド等の検索	
予算区分：(県単) 国庫 委託	担当研究室：生物機能部門 生物機能第二担当
研究期間：(継)・中	担当者：畠恵司、堀一之、高橋砂織
平 14 年度 (平 12 ~ 14 年度) 協力・分担関係：	

1 . 目的

県産農水産物の利用拡大のため、農産物に含まれる生理機能を解明し、新たな生理活性物質の探索、これらに農水産物に含まれる既知の生理活性物質の新たな生理機能を解明することを目的とする。また、前テーマである"県産農水産資源の機能解明と健康志向性食品の開発"の研究過程 (H11-13)でタンポポより得られた lupane 型トリテルペン化合物のうちアポトーシス誘導能を持つ化合物群 [*J. Nat. Prod.* **65**, 645-648 (2002)]についてはアポトーシス誘導機構を解明する。

2 . 方法

1)米に含まれる生理活性物質の新たな生理機能解明

米に含まれる生理活性物質 (GABA、フィチン酸、フェルラ酸、サイアミン、 γ -オリザノール)のヒト大腸癌細胞 (Caco 2)生育阻害活性及び細胞周期に対する影響を Flow cytometer で調べた。

2)lupane トリテルペンの抗腫瘍作用

強い抗腫瘍作用を示した lup-28-al-20(29)-en-3-one (図 1、化合物 **8**)について、種々の腫瘍細胞に対する選択毒性、アポトーシス誘導能 (蛍光観察並びに DNA ラダー形成)、topoisomerase I 阻害活性を調べた。更に、多剤薬剤耐性腫瘍細胞に対する影響を検討した。

3 . 成果の概要

1) γ -オリザノールの大腸癌細胞増殖抑制活性

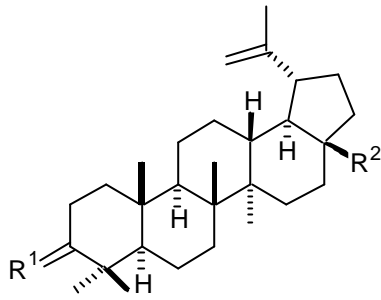
米由来の生理活性物質のうち γ -オリザノールが 1 μ g/ml 以上で Caco 2 の増殖を抑制した。特に 10 μ g/ml 以上では顕著な増殖抑制活性を示したが、細胞致死活性ではなく、増殖抑制活性であった。このため、10 μ g/ml の γ -オリザノール処理による Caco 2 細胞の細胞周期に対する影響を検討した結果、特定の細胞周期停止が観察された。

2)lupane トリテルペンの種々の腫瘍細胞に対する選択毒性

8 をヒト由来の腫瘍細胞 (14 組織由来 24 細胞)及び正常細胞 (WI38)に対する選択毒性を調べた結果、白血病並びに肺癌細胞に高い選択毒性並びにアポトーシス誘導能がみられた (図 2)。作用機構としては、topoisomerase I を阻害することにより (図 3)、以下のアポトーシス誘導系に情報が伝達されると推定される。また、種々の抗癌剤に耐性を獲得した多剤薬剤耐性株の出現は、今日の抗癌治療をより困難なものにしている。しかしながら、**8** はアドリアマイシンやビンクリスチンに耐性を示す腫瘍細胞に対して、親株と同濃度域でアポトーシス誘導能を示すことが確認され、多剤薬剤耐性を獲得した腫瘍細胞にも有効であると推察された。

4 . 今後の問題点と次年度以降の計画

本研究課題で得られた 活性物質の機能発現メカニズムは"食材に由来する高齢疾患予防因子の機能解析とその応用"で引き続き行う予定である。



Compound	R ¹	R ²
1	α-H, β-OH	CH ₃
2	=O	CH ₃
3	α-H, β-OAc	CH ₃
4	α-H, β-OH	CH ₂ OH
5	=O	CH ₂ OH
6	α-H, β-OAc	CH ₂ OCOCH ₃
7	α-H, β-OH	CHO
8	=O	CHO
9	α-H, β-OH	COOH
10	α-H, β-OH	COOCH ₃
11	=O	COOCH ₃

図 1 化合物 1-11 の化学構造

化合物 7-11 は腫瘍細胞アポトーシス誘導物質である。

8 HL60 U937 K562
 - + - + - +

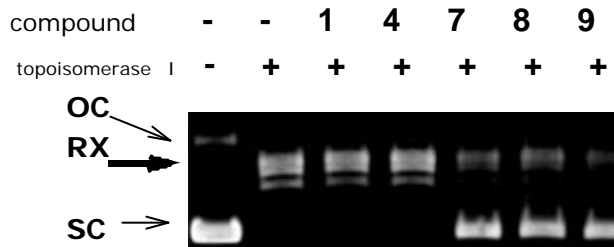
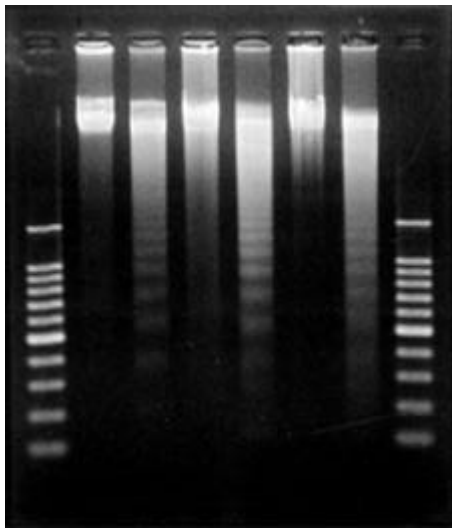


図 3. 化合物 7-9 はヒト topoisomerase I を阻害する

Topoisomerase I は supercoiled DNA (SC) を relaxed form (RX) に変換するが、化合物 7-9 (図 1 で の R² = カルボニル基を有する化合物群、5 μM) は topoisomerase I 活性を阻害する (topoisomerase I 阻害剤は腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することで、抗癌剤として用いられている)。

図 2. 8 の 3 種白血病細胞に対するアポトーシス誘導能
 8 の存在下、HL60 細胞 (2 μM)、U937 細胞 (5 μM)、K562 細胞 (5 μM) を 24 時間培養後、DNA ラダー形成を調べた。

5 . 結果の発表、活用等

1) Hata K., Hori K., Ogasawara H., Takahashi S., Antileukemia Activities of Lup-28-al-20(29)en-3-one. *Toxicol. Lett.* (2003), inpress.

2) 平成 15 年日本薬学会 (長崎) にて発表予定

研究課題名：県産米等からの高血圧予防ペプチド等の検索

予算区分：県単 国庫 委託

担当研究室：生物機能部門 生物機能第二担当

研究期間：平成 12 ~ 14 年

担当者：畠 恵司、堀 一之、高橋 砂織

協力・分担関係：なし

1. 目的

秋田県は高齢者の割合が高く、そのため高齢者特有の疾患が問題となっている。一方、本県は米を中心とした農業県であり、食材豊かな県でもある。そこで、米を始めとした農産物の生理機能性を解明する上で、高血圧等の高齢者疾患に照準を合わせ研究を開始した。

2. 方法

1) 高血圧予防関連

昇圧系に働くアンジオテンシン変換酵素 (ACE) に対する阻害活性及び高血圧マウスを用いた in vivo での評価を行った。

2) 抗癌活性

抗癌活性は増殖阻害活性、細胞周期停止作用を Flow Cytometer で、アポトーシス誘導能については蛍光観察並びに DNAラダー形成で測定した。

3. 成果の概要

米の機能性については以下の結果となった。抗 ACE 活性については米の脂溶性画分に顕著な阻害活性が見いだされたが、高血圧マウスに玄米を飼料として与えたところ、血圧低下は認められなかった。このため、米由来の生理活性物質について癌細胞の増殖抑制効果を検討した結果、 γ -オリザノールに大腸癌細胞の増殖抑制が認められた。この時、大腸癌細胞は 95 % 以上がシャーレに付着しており、 γ -オリザノールは細胞毒性と言うより細胞周期を特定の時期で停止させることで、増殖を抑制しているものと思われる。また、タンポポを起源とする lupane 型トリテルペンの腫瘍細胞に対する選択毒性を検討した結果、最も活性が強い lup-28-al-20(29)-en-3-one(図 1)は白血病及び肺癌細胞に選択的にアポトーシスを誘導する活性 (表 1)並びに多剤薬剤耐性株にも効果があるなど興味深い知見が得られた (図 2)。

表 1. Lup-28-al-20(29)-en-3-one の腫瘍細胞に対する選択毒性

組織	細胞名	IC ₅₀ (μM)
白血病	HL60	0.48
	U937	1.5
	K562	1.8
黒色腫	G361	9.4
	SK-MEL-28	9.3
神経芽腫	GOTO	5.2
	NB-1	5.8
骨肉腫	MG63	17.9
	Saos-2	13.5
肺癌	A549	2.3
	LU65	2.4
	LU99	0.81
胃癌	SH-10-TC	5.8
	MKN45	9.6
大腸癌	HCT-15	7.2
膵臓癌	MIA Paca 2	8.1
腎臓癌	ACHN	9.4
肝臓癌	HepG2	9.3
乳癌	MCF-7	14.7
子宮癌	HeLa	2.1
	Ca SKi	6.3
卵巣癌	OVK18	10.2
膀胱癌	EJ-1	16.2
	T24	12.5
正常細胞	WI38	17.3

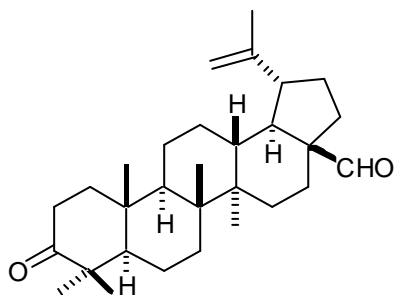
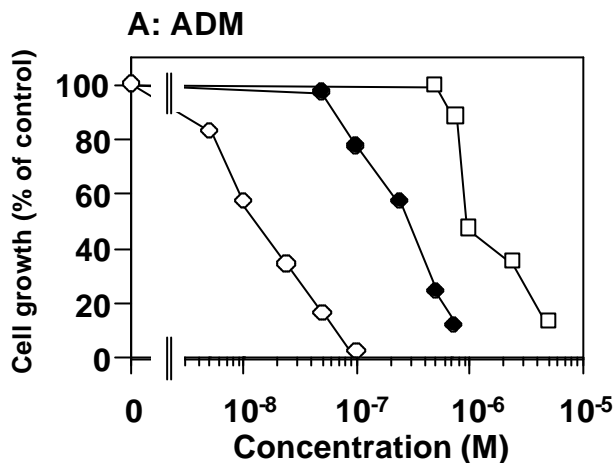
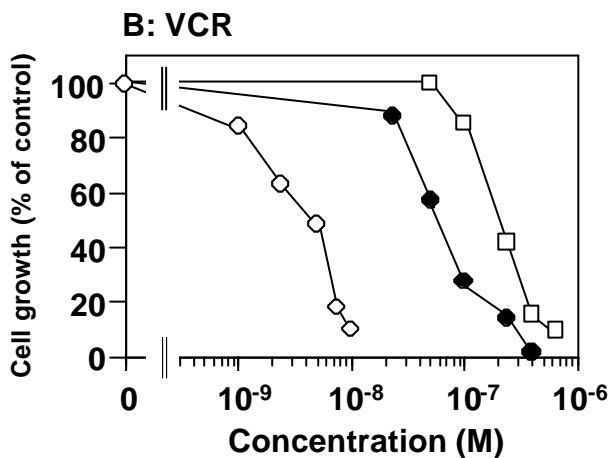


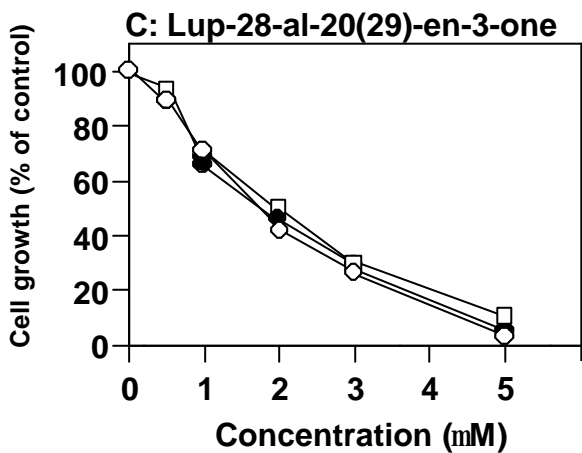
図 1. Lup-28-al-20(29)-en-3-one



A:
adriamycin(ADM)はヒト白血病細胞 K562 の増殖 (○)を強力に抑制する (IC₅₀=15 nM)。しかし、K562 由来で ADM に耐性を獲得した K562/ADM (□、IC₅₀=987.5 nM)や vincristine(VCR)耐性を獲得した K562/VCR (●、IC₅₀=305.4 nM)は ADM に抵抗性を示す・・・多剤薬剤耐性



B:
同じく、vincristine (VCR)はヒト白血病細胞 K562 の増殖 (○)を強力に抑制する (IC₅₀=4.7 nM)。しかし、K562 由来で ADM に耐性を獲得した K562/ADM (□、IC₅₀=217.3 nM)や VCR 耐性を獲得した K562/VCR (●、IC₅₀=35.4 nM)は VCR に抵抗性を示す・・・この多剤薬剤耐性株の出現が、今日の抗癌治療を更に困難なものにしている



C:
しかしながら、lup-28-al-20(29)-en-3-one はヒト白血病細胞 K562 (○、IC₅₀=1.8 μM)、K562/ADM (□、IC₅₀=1.7 μM)、K562/VCR (●、IC₅₀=2.0 μM)に対して同じ濃度域で細胞毒性を示す・・・多剤薬剤耐性の克服

図 2. Lup-28-al-20(29)-en-3-one の多剤薬剤耐性白血病細胞株に対する細胞毒性

4. 成果の活用面と留意点

1)Hata K., Hori K.,Ogasawara H., Takahashi S., *Toxicol. Lett.* (2003)in press

本研究はその一部において、(財)インテリジェント・コスモス学術振興財団「自然科学研究に対する助成事業」の助成をいただいた。

5. 残された問題点とその対応

本研究期間に得られた知見を基に、“食材に由来する高齢者疾患予防因子の機能解析とその応用”を展開する。

研究課題名： 各種麺類の理化学的特性の解明と秋田産麺類の開発	
予算区分： <u>県単</u> 国庫 委託	担当研究室：食品開発部門
研究期間： 継・中	担当者：大久 長範
平14年度(平12~14年)	協力・分担関係：稲庭うどん協同組合 中小企業団体中央会

1. 目的

中小企業団体中央会の仲介により、「秋田県稲庭うどん協同組合」が設立された。産地商品の確立を図り、更なる品質の向上を図るために、稲庭うどん協同組合22社の製品を調査し、「稲庭うどん自身を知る」こととした。得られた特性の最大公約数的なものを、稲庭うどんの定義や統一規格へ発展させることが、最終目標である。

2. 方法

試料：稲庭うどん協同組合(理事長、佐藤養助)傘下22社の製品を使用した。揖保の糸(兵庫)、白石素麺(宮城)、三輪素麺(奈良)、ナンバーワンうどん(日清製粉)は、秋田市内のデパート等で購入した。乾麺の巾と厚さは、30箇所をノギスで測定し平均を求めた。断面観察：乾麺を切断し、断面を実体顕微鏡(オリンパス)と電子顕微鏡(日本電子)で観察した。食塩の初期溶出：加熱沸騰中の蒸留水500 mlに、10cmに切断した乾麺25gを添加し、弱火で茹で、経時的に茹で液をサンプリングした。茹で液の食塩濃度を、電位差滴定装置(京都電子、AT-400)で測定した。タンパク質等の成分は(財)保健事業団に分析を依頼した(中央会が経費負担)。

3. 成果の概要

1) 前年までの要約： 稲庭うどん風中華乾麺を開発し、新聞等でレシピを発表した。稲庭うどんのグループ(7種類)の断面には、縦に伸びた気泡が観察された。しかし、他の市販乾麺にはそれが観察されなかった。食塩の初期溶出速度と、乾麺の表面積/体積の比(S/V)との関係を求めた。S/V比が大きくなるに従って、食塩溶出速度が速やかになる傾向が認められた。

2) 当該年度の結果

灰分(食塩)を多く含む稲庭うどんは、表面の明度が高いという傾向があった(図1)。生菌数と水分含量には正の相関が認められた(図2)。ある試料を室温で保存したところ、水分と生菌数が共に低減することを確認した。

成分、物性その他の諸性質(表1)から稲庭うどんの定義と規格を協同組合に提案した。
・提案した稲庭うどんの定義：a)小麦粉、食塩、取り粉以外のものを使用しない。b)生地を熟成する。c)巾と厚さの比率が約2:1。d)内部に気泡が存在する。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

今回提案した定義と規格、協同組合で実施したアンケート調査結果を総合し、稲庭うどん協同組合として統一規格を決める予定である。今後は技術相談で対応する。

5. 結果の発表、活用等

- 1) 食品科学工学会大会(H14/9月)。
- 2) 食品科学工学会誌、49、547-550(2002)
- 3) 稲庭うどん協同組合で講演(H14/8月、H15/1月)

表 1 稲庭うどん協同組合 2 2 社の主要な特性

	最小	最大	平均	標準偏差
生菌数 (対数)	2.50	7.00	4.43	0.37
水分 (%)	7.90	13.40	10.93	1.52
タンパク質 (%)	7.60	11.20	9.22	0.91
脂質 (%)	0.70	1.20	1.01	0.14
炭水化物 (%)	70.80	76.10	72.96	1.26
灰分 (%)	4.60	7.70	5.88	0.90
巾 (mm)	2.081	3.18	2.45	0.28
厚さ (mm)	0.75	1.21	0.97	0.11
長さ (mm)	239.0	359.0	276.4	38.6
重量 (g/100本)	42.80	98.90	65.30	12.84
食塩含量 (%)	4.54	7.69	5.74	0.95
食塩溶出 (%/min)	22.60	38.50	28.71	4.80
破断強度 (H2、N)	3.03	7.92	4.74	1.24
明度 (L)	76.40	90.03	84.03	4.13

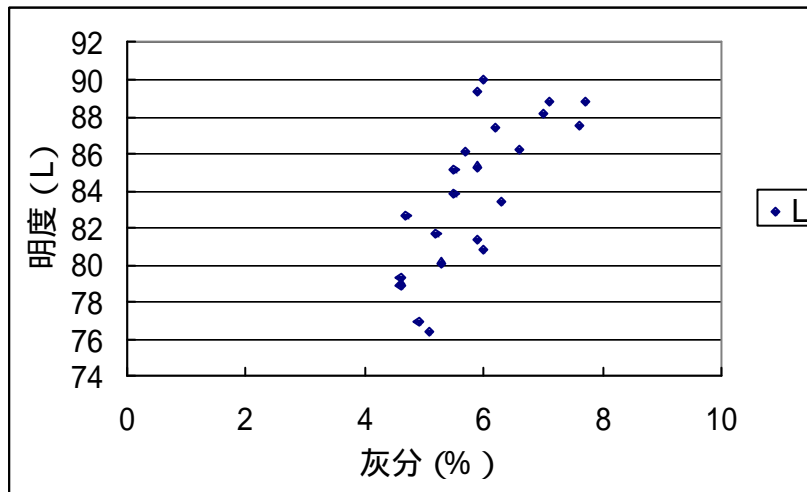


図 1 稲庭うどんの灰分と表面明度の関係

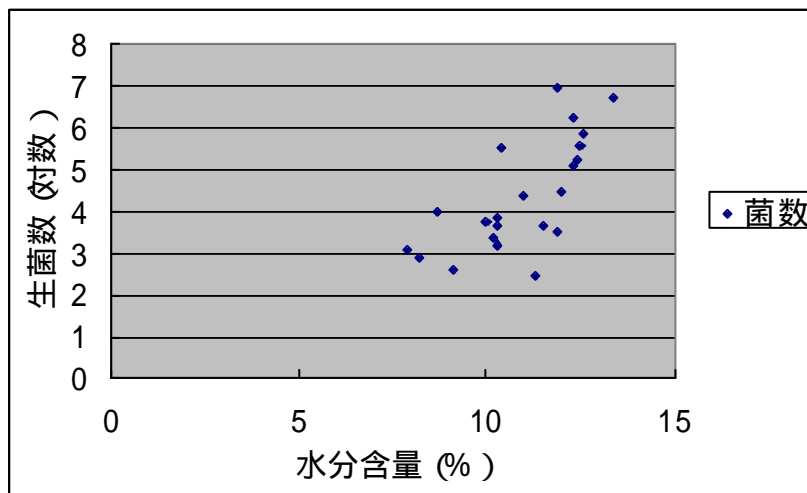


図 2 稲庭うどんの水分と生菌数

研究課題名	各種麺類の理化学的特性の解明と秋田産麺類の開発		
予算区分	県単	国庫	委託
研究期間	平成12～14年		
	担当研究室：食品開発部門		
	担当者：大久長範、高畠 聡		
	協力・分担関係：稲庭うどん協同組合		
	おぐら製粉、中小企業団体中央会、県南8町村		

1. 目的

水稻の転作作物としてそばの作付けが平成10年以降増加している。玄そばの収穫増に従い、地元で製粉し地元で加工・消費する活動も行われるようになった。そばを対象とした地産地消活動の情報交換を図り、製粉・製麺技術の向上を目指す必要がある。

一方、300年以上の歴史を誇り、昔ながらの手作り製法を受け継いでいる「稲庭うどん」がある。この乾麺は、茹で上がり早くのど越しがよい等から、高級な乾麺として定着している。しかし、偽物が多く出回り、また企業間によって味や形態にバラツキがあり、全体のイメージを下げている。地場産業を更に振興するためには、自浄作用を發揮しなければならない。

2. 方法

試験材料：稲庭うどん協同組合員22社の乾麺、揖保の系（兵庫）、白石温麺（宮城）、三輪素麺（奈良）、ナンバーワンうどん&素麺（日清製粉）を使用した。方法：そば粉の粒径は、日機装（株）MicrotracX-100で測定した。気泡の観察は、実体顕微鏡（オリンパス）、電子顕微鏡（SEM）、X線CT（島津製作所）で行った。

3. 成果の概要

1) 秋田県地そば研究会設立（平成12年）。「地産地消」をコンセプトに太田町、山内村、東由利町、鳥海町、増田町、皆瀬村、西木村、六郷町の県南8町村の団体、個人を会員とし当該研究会を設立した。

2) 県内で栽培され自家製粉されているそば粉と市販そば粉の粒度を調査した（表1）。市販そば粉の平均粒径が80 μ であったが、県内産自家製粉そば粉は265 μ と大きく、調理そばの結着性や食感やに悪影響を及ぼすと考えられた。

3) おぐら製粉に協力し平均粒度15 μ の低温気流粉碎そば粉を開発した（表1）。このそば粉を用いると、十割そばの製造が可能であった。

4) 稲庭うどん協同組合傘下22社の乾麺を調査し、稲庭うどんの特徴を明らかにした（表2）（中小企業団体中央会の組合組織化事業、平成13-14年）。これらの結果に基づき、稲庭うどんの定義を以下のように提案した。小麦粉、食塩、取り粉以外のものを使用しない、生地を熟成する、麺の巾と厚さの比が約2:1、内部に気泡がある。

5) 稲庭うどん（乾麺）の水分含量と生菌数には正の相関が認められ、水分含量は品質管理その他の重要な指標と考えられた。

4. 成果の活用面と留意点

成果の受け渡し：自家製粉したそば粉の問題点については、ARIFレターで告知し、技術相談を通じ普及している。稲庭うどん協同組合で講演（平14年1月&8月、平15年1月）

- 研究成果の公表：・低温気流粉碎したそば粉の性質、食科工誌，49，46-48（2002）.
 ・乾めんの形と内部気泡が食塩の溶出に及ぼす影響、食科工誌，49，547-550（2002）.
 ・稲庭うどんについて、調理科学会東北北海道支部会で基調講演（6/29，2002）.

5. 残された問題点とその対応

3年間に蓄積したものを基礎として秋田産麺類の開発につなげたい。

表 1 各種そば粉の粒径

サンプル	製造方法	平均粒径 (μ)
市販そば粉	ロール製粉	80
北海道幌加内産そば粉	石臼製粉	88
秋田県S村産そば粉	石臼製粉	265
おぐら製粉そば粉	低温気流粉碎	15

表 2 稲庭うどん協同組合 2 2 社の主要な特性

特 性	最小	最大	平均	標準偏差
生菌数 (対数)	2.50	7.00	4.43	0.37
水分 (%)	7.90	13.40	10.93	1.52
タンパク質 (%)	7.60	11.20	9.22	0.91
脂質 (%)	0.70	1.20	1.01	0.14
炭水化物 (%)	70.80	76.10	72.96	1.26
灰分 (%)	4.60	7.70	5.88	0.90
巾 (mm)	2.08	3.18	2.45	0.28
厚さ (mm)	0.75	1.21	0.97	0.11
長さ (mm)	239.0	359.0	276.4	38.6
重量 (g/100本)	42.80	98.90	65.30	12.80
食塩含量 (%)	4.54	7.69	5.74	0.95
食塩溶出 (%/min)	22.60	38.50	28.71	4.80
破断強度 (H2、N)	3.03	7.92	4.74	1.24
明度 (L)	76.40	90.03	84.03	4.13

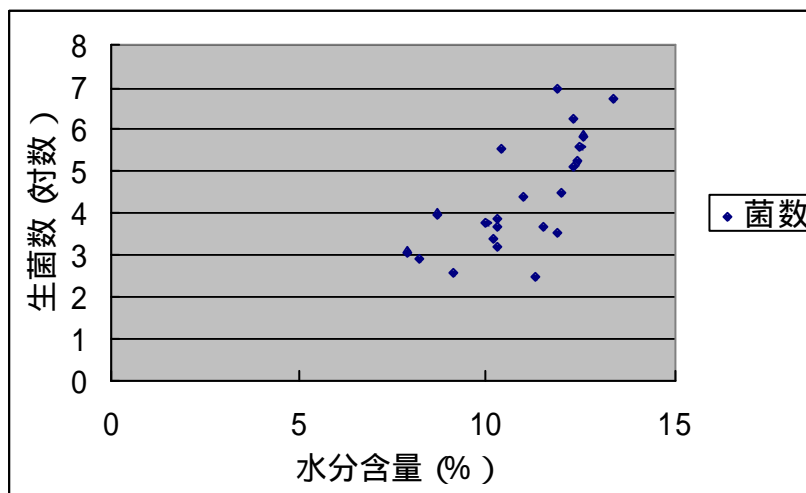


図 1 稲庭うどんの水分含量と生菌数

研究課題名 沿岸漁獲物の高付加価値加工技術の開発

予算区分：国庫

担当研究室：食品開発部門食品加工担当

研究期間：継

担当者：塚本研一、戸松誠、熊谷昌則

平14年度(平12～14年度)

戸枝一喜

協力・分担関係：水産振興センター

1. 目的

秋田県水産業の振興のためには、沿岸漁獲物の特徴である高鮮度を活かした水産加工と消費者ニーズに対応した新しい加工品の開発が課題となる。そのため加工原魚の鮮度保持技術、秋田県特産のしょつづるを利用した新しい塩干品加工技術、膨化加工機を用いた膨化加工実用化技術、加工品の品質保持技術等の技術開発を平成9年～11年の3年間で進めてきた。これらの成果をさらに充実させるため、平成12年度より秋田県の主要な水産加工品である水産物漬物、特にいずしについて高鮮度の沿岸漁獲物を利用した製造技術の確立を目的とした。また、これまでの経験的製造方法についても、科学的根拠を明らかにし、さらに微生物制御を主体とした高品質いずしの製造技術を開発し、沿岸漁獲物の高付加価値化を図るとともに、その技術普及を全体の目的とした。

また、特に今年度はいずしの熟成機構の解明による高品質いずしの製造技術の開発を目的とした。

2. 方法

1) いずし試作品の成分分析と官能評価

a. 成分分析

秋田県産のハタハタ、ホッケ、カワハギ(ウマズラハギ)、コダイを原料としていずしを試作し、3で20日間熟成を行い試料とした。分析は各いずしの魚肉部分を採取し、有機酸(HPLC有機酸分析システム島津LC10A)、単糖・オリゴ糖(HPLC糖分析システムDionexDX500)、遊離アミノ酸(アミノ酸分析計日本電子JLC500)、酵母(フィルム法)、乳酸菌(BCP培地)について行った。

b. 官能評価

水産業関係者および食品関係研究者で構成された22名のパネルにより、試作した4種類のいずしについて嗜好の順に順位を付ける順位法で行った。

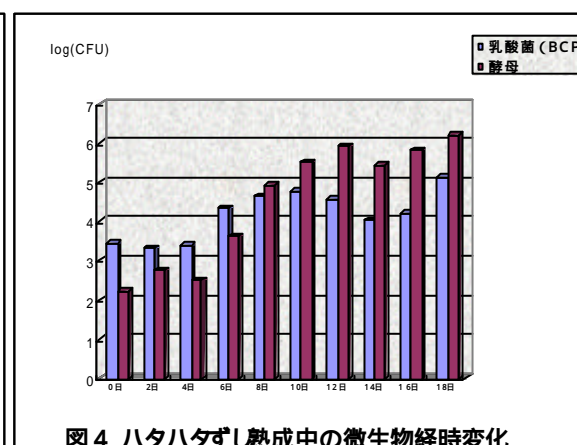
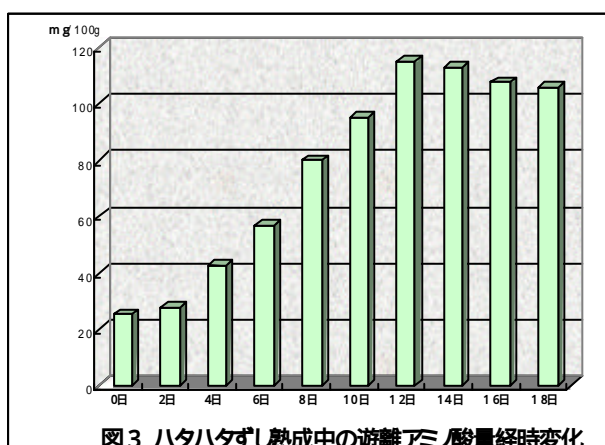
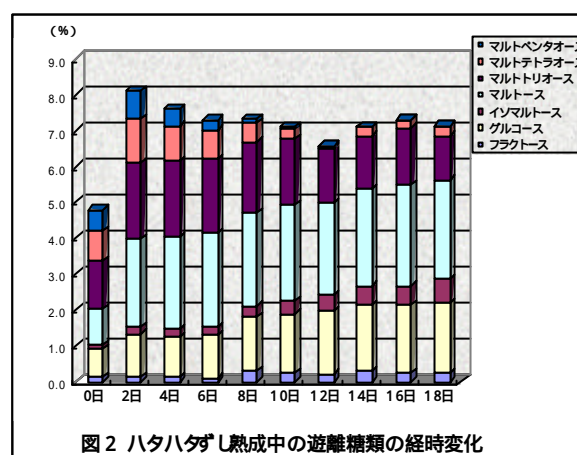
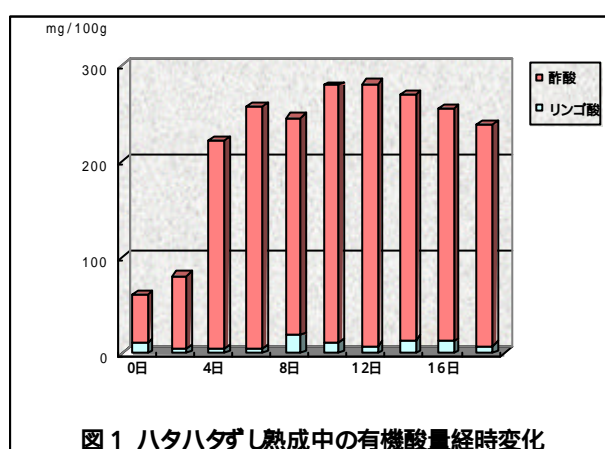
2) ハタハタずし熟成中の成分経時変化

秋田県内のハタハタずし製造業者の製造法に準じて試作を行った。3で18日間熟成を行い、米飯部分を2日間隔で採取し1)aの方法で分析を行った。

3. 成果の概要

- 前年度まで秋田県内の市販ハタハタずし製品はその成分等が3地域で異なっており、その地域の特色を明らかにした。また、市販ハタハタずしの総合的嗜好と関連する指標、分析値が明らかとなった。

- ・今年度はハタハタ、ホッケ、カワハギ、コダイのいずれの試作を行い順位法で官能評価を行った結果、ハタハタとホッケに有意な順位差が認められた（ハタハタ>ホッケ）。
- ・また、ハタハタずし熟成中の成分経時変化を分析したところ有機酸（図1）、遊離糖（図2）、遊離アミノ酸（図3）の結果からは10～12日以上以上の熟成が必要であることが判明した。微生物では乳酸菌と酵母が主要な微生物相（図4）であり、熟成に関与すると考えられた。
- ・熟成工程は魚肉部分と米飯・麹部分の間の成分移行や微生物による風味付与が主な機構であることが推定された。
- ・以上の結果から熟成はいずれの風味を完成させるため不可欠な工程であり、経験のみならず科学的数値による管理が必要と考えられた。



4．今後の問題点と次年度以降の計画

今後は実用化のため各地域の製造方法への適用について検討し、技術普及を行う必要がある。

5．結果の発表、活用等

地域水産加工高度化事業成果報告会で報告し、技術成果普及事業により公表・普及する。

研究課題名 沿岸漁獲物の高付加価値加工技術の開発

予算区分：国庫

担当研究室：食品開発部門食品加工担当

研究期間：平12～14年度

担当者：塚本研一、戸松誠、熊谷昌則

戸枝一喜

協力・分担関係：水産振興センター

1. 目的

秋田県水産業の振興のためには、沿岸漁獲物の特徴である高鮮度を活かした水産加工と消費者ニーズに対応した新しい加工品の開発が課題となる。そのため秋田県の主要な水産加工品である水産物漬物、特にいずしについて高鮮度の沿岸漁獲物を利用した製造技術の確立を目的とした。これまでの経験的製造方法についても科学的根拠を明らかにし、さらに微生物制御を主体とした高品質いずしの製造技術を開発するとともに、その技術普及を全体の目的とした。

2. 方法

1) 市販ハタハタずし製品の特徴

秋田県の沿岸北部(A)、中央部(B)、南部(C)の3地区で製造されたハタハタずし製品について各地区3種類の魚肉部分を試料とした。分析は水分、水分活性、塩分、全糖量、pH、揮発性塩基態窒素(VBN)、脂質含量、酸価(AV)、過酸化物価(POV)、カルボニル価、有機酸(HPLC有機酸分析システム島津LC10A)、単糖・オリゴ糖(HPLC糖分析システムDionexDX500)、遊離アミノ酸(アミノ酸分析計日本電子JLC500)、核酸関連成分(HPLC核酸関連成分分析システム島津LC10A)、一般生菌数、カビ・酵母、乳酸菌について行った。

2) 市販ハタハタずし製品の官能評価

水産業関係者および食品関係研究者で構成された11名のパネルにより、A、B、Cの各地区1製品ずつの官能評価を行った。魚肉部と米飯部に分けたものについて、におい、風味、味、食感の強度と嗜好の評価を製品全体では嗜好の総合評価のみを行った。なお、評価方法は尺度法により行った。

3) ハタハタずし熟成中の成分経時変化

秋田県内のハタハタずし製造業者の製造法に準じて試作を行った。3で18日間熟成を行い、米飯部分を2日間隔で採取し1)aの方法で分析を行った。

3. 成果の概要

- ・秋田県の市販ハタハタずし製品は製造地区の違いで3タイプに分類された。A地区は熟成期間の短い混ぜずしタイプ、B地区は乳酸発酵を行う混ぜずしタイプ、そしてC地区は熟成期間の長く、糖分の多い押しずしタイプであった(図1, 2)。
- ・市販ハタハタずしの官能評価結果から魚肉部では臭い、甘味、苦味が少なく、適当な塩分と硬さを有するもの、また米飯部では臭い、甘味、苦味、塩分が少いものが総合的に

好まれると考えられた。

- ・ハタハタずし熟成中の成分経時変化を分析したところ有機酸（図3）、遊離糖、遊離アミノ酸の結果からは10～12日以上熟成が必要であることが判明した。微生物では乳酸菌と酵母が主要な微生物相（図4）であり、熟成に関与すると考えられる。
- ・熟成工程は魚肉部分と米飯・麴部分の間の成分移行や微生物による風味付与が主な機構であることが推定された。
- ・以上の結果から熟成はいずしの風味を完成させるため不可欠な工程であり、経験のみならず科学的数値による管理が必要と考えられた。

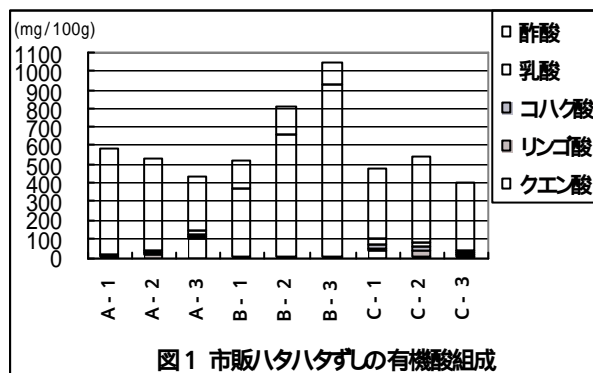


図1 市販ハタハタずしの有機酸組成

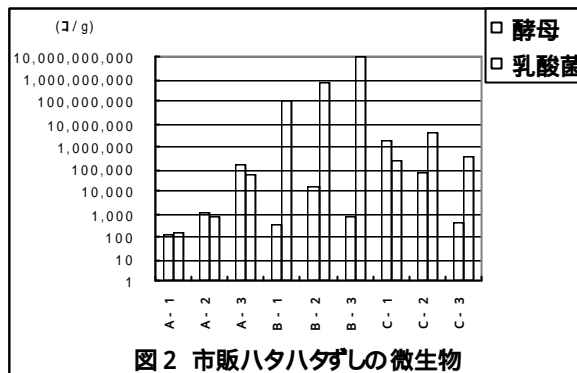


図2 市販ハタハタずしの微生物

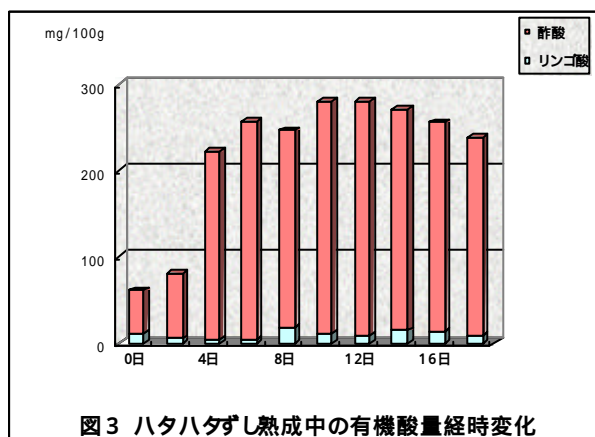


図3 ハタハタずし熟成中の有機酸量経時変化

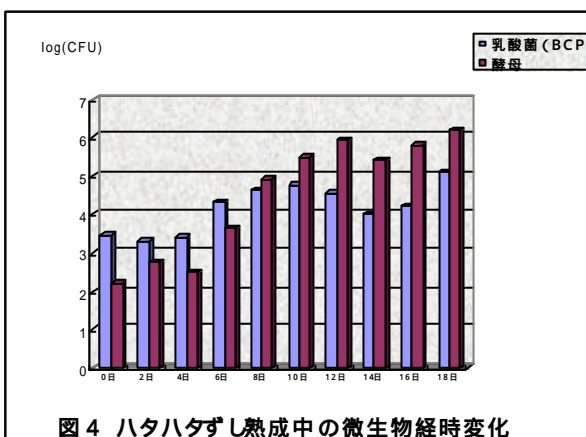


図4 ハタハタずし熟成中の微生物経時変化

4．成果の活用面と留意点

地域水産加工高度化事業成果報告会で報告し、技術成果普及事業により公表・普及する。

5．残された問題とその対応

高品質いずしの製造方法については、実用化のため各地域の製造方法への適用について検討し、技術普及を行う必要がある。

研究課題名：高グリセロール生産酵母による県産ワインの品質向上に関する研究	
予算区分：県単	担当研究室：酒類部門 酒類第2担当
研究期間：継	担当者：戸松さやか
平14年度(平13~15年度)	協力・分担関係：

1. 目的

ワインの原料となる醸造用ブドウはその土地の気候や風土に大きく影響され、同一品種でも栽培地によりその品質が異なる。これまでに県産ワイン製造への適性品種として白品種はシャルドネ、赤品種はカベルネフランを選抜した。一方、県産の原料をを利用したワインは酒質が淡泊になる傾向があるため、酒質にボディ感をつけるグリセロールを高生産する酵母の育種についても研究してきており、新規で有望な候補株を選抜した。

これまでの研究の成果を生かしながら芳香で濃醇なワインを製造し、県外品との差別化及び秋田ワインのブランド化を図る目的で、シャルドネを利用した高グリセロール生産酵母のワイン醸造について詳細な検討を行う。

今年度は昨年度までに取得した高グリセロール生産株が酢酸生成量が多い傾向にあるため、候補株の再スクリーニングにより、酢酸生成の少ない株を取得して、発酵試験等、ワイン醸造の最適発酵条件について検討することを目的に研究を行った。

2. 方法

(1) 供試菌株：Saccharomyces cerevisiae KW-3 (日本醸造協会ぶどう酒3号酵母)
高グリセロール生産酵母

(2) 小仕込み試験：酵母をYPD液体培地で25℃、2日間静置培養し、さらに果汁で拡大培養した後、糖度を24%に補糖したリースリングフォルテ(2002年)果汁2Lに 5×10^6 cells/mlになるように添加した。仕込み温度は25℃とし、発酵状態を見ながらろみ管理をした。

(3) 成分分析：一般成分は国税庁所定分析法、酸度は三菱化学工業自動測定装置GT-05、アミノ酸は日本電子JLC-300、有機酸は東京理化カルボン酸分析S-3000で測定した。また、グリセロールはF-キットグリセロール(J.K.I)、酢酸はF-キット酢酸(J.K.I)を用いて測定した。

3. 成果の概要

1) 高グリセロール生産株の取得：昨年度までにKW-3を親株として様々な変異処理、薬剤耐性処理等を行い、グリセロールを安定的に高生産する3株を得た。これらの株は酢酸の生成量が多く、オフフレーバーがあるため、さらに薬剤耐性処理により比較的酢酸生成量の少なく、かつ高グリセロールを生産する9株を取得した(Table.1)。

2) グリセロール高生産株の小仕込み試験：候補株は順調に発酵し、アルコール12%前後のワインができた。酢酸生成量は親株に比べやや多いものの、グリセロール生産量が約1.5から2倍で、オフフレーバーが感じられない株もあった。これらのワインの官能試験を行ったところ、酸味が強く感じられたものもあったが、中にはボディ感があり、味に幅があると高く評価された株があり、高く評価された株3株(71-71-77, 71-71-92, 71-59(2)-82)を選抜した(Table.1)。また、酢酸が親株に比べ多いものの、ワインの品質に影響を与えるほど多くないことが官能評価によりわかった。しかし、オフフレーバーは発酵条件の多少の変化により生成される傾向があることから、オフフレーバーの生成しない発酵条件を今後更に検討する必要がある。

Table.1 候補株のグリセロール生産量

	グリセロール(g/l)	生産比*
71-71-34	11.205	1.57
71-71-77	14.135	1.98
71-71-85	14.629	2.05
71-71-92	13.963	1.96
71-59(2)-82	12.986	1.82
71-59-75-33	13.790	1.94
71-71(2)-44	12.177	1.71
71-71(2)-46	16.373	2.30
71-71(2)-80	13.837	1.94
KW-3	7.124	1.00

* KW-3のグリセロール生産量を1.0とした時の生産比

Table.2 候補株を用いて醸造したワイン成分の比較

酵母	酸度 (g/100ml)	アルコール(%)	グリセロール(g/l)	酢酸(g/l)	短評
71-71-34	0.96	12.7	17.271	2.036	未熟臭がする。味重い。
71-71-77	0.97	13.1	16.943	1.542	酸味がある。味に幅ある
71-71-85	1.00	13.0	17.761	2.657	
71-71-92	1.08	12.2	16.088	2.838	酸味と甘味ある。口当たり良し
71-59(2)-82	0.88	13.0	13.888	1.312	酸味さわやか。味改良。
71-59-75-33	1.02	12.5	15.773	2.513	未熟臭、酸臭あり。甘味上品
71-71(2)-44	0.98	11.7	14.873	1.840	
71-71(2)-46	1.10	12.5	17.371	2.755	
71-71(2)-80	1.13	12.3	16.313	3.090	未熟臭、酸臭あり。甘味上品
KW-3 (コントロール)	0.86	13.3	10.345	0.665	

酸度 酒石酸換算

4 . 今後の問題点と次年度以降の計画

高グリセロール生産酵母は従来の酵母と異なる性質を持つことから、様々な発酵条件に敏感である。そのため、ワイン醸造に適切な温度やもろみ管理等を検討し、実用化に向けて県産原料からワイン醸造を行い、有効利用方法を探る。

また、さらなるワインの品質向上のため、高グリセロール生産機構の解明も必要であると考えている。

5 . 結果の発表、活用等

研究課題名	しょつつる風新調味料の開発		
予算区分	県単 国庫 委託	担当研究室	応用発酵部門発酵食品担当
研究期間	継・中	担当者	高橋光一
	平14年度(平7 ~ 14年度)	協力・分担関係	柴本・戸松・熊谷

1 . 目的

伝統的しょつつるの製造法の解明と品質について検討を行うとともに、微生物、酵素及び理化学的手法によるしょつつる新調味料の開発を行う。

病気による休職のため、本年度の研究成績はなし。

2 . 方法

前年度山本総合農林事務所・普及課、佐藤勝子副主幹から依頼され、高橋研究員が漁協北部総括支所(八森)婦人部にしょつつるの漬け込みを指導した。

今年度、加工の技術指導を依頼され、柴本、塚本が担当した。

3 . 成果の概要

高橋研究員不在のため、技術は諸井醸造所から指導を受け、その技術をもって、実施した。

来年度、商品化の予定。

4 . 今後の問題点と次年度以降の計画

なし

5 . 結果の発表、活用等

今後ともこれまでに蓄積された技術、ノウハウを個人、県内企業、漁協などの団体に普及していきたい。またしょつつるの新しい商品、しょつつるの利用拡大を図っていきたい。

研究課題名 しょつつる風新調味料の開発

予算区分：県単 国庫 委託

研究期間：平成 7～14年

担当研究室：応用発酵部門発酵食品担当

担当者：高橋 光一

協力・分担関係：柴本、戸松、熊谷

1. 目的

伝統的しょつつるの製造法の解明と品質について検討し、新しい手法を使った安価な原料への転換と製造期間の短縮、製造工程の改良などにより、新しいしょつつるの調味料を開発する。さらに確立された製造法の技術移転を行い、普及、需要の拡大をはかる。

背景

しょつつるの原料としてハタハタは有名であるが、一時20,000トンもあった漁獲量は平成3年には71トンと激減した。しょつつるの利用はハタハタの消長と機を一にして少なくなり、平成7年当時では製造業者は5社に過ぎず、その製法は文献には見られるものの実際の製法はノウハウを含めて明らかでなかった。このような中で県内のしょつつるの自家製造技術・利用法、県外の魚醤の製造法を調査し、新しいしょつつる風調味料を開発し、知名度の高いしょつつるの製造量、販売の回復が望まれた。

2. 方法

- | | |
|--------------------|-----------|
| 1) 市販、自家醸造品の品質調査 | |
| 2) しょつつる製造法の解明 | 平成 7年－ 8年 |
| 3) しょつつる新製造法の確立 | 平成 8年－ 9年 |
| 4) しょつつる製造工程の検討 | 平成 8年－12年 |
| 5) 技術移転としょつつる製品の開発 | 平成11年－14年 |

3. 成果の概要

方法1)により、品質の分析、製造方法、利用法を調査した。2)において各地の伝統的製造法を解明するとともに、その応用を検討した。3)では原料としてハタハタ以外の魚種(小型アジ、ブナザケ、コアミ、イワシ、コウナゴ)の試験醸造とともに、製造期間の短縮、官能検査、原料利用率向上などから酵素の利用を検討した。4)では火入れ、濾過技術の確立を行った。最終段階5)では技術の移転と製品製造、販売のため漁業者、しょつつる製造業者、食品加工業者の3者からなる研究会を作り、しょつつる干し、ラーメンスープの素、焼き肉のタレ、しょつつるキムチ、粉末しょつつるなどを開発、一部販売に至った。また魚醤としての特性を生かした料理レシピを作成し、利用拡大をはかった。

4 . 成果の活用面と留意点

上に記したように、技術移転を行い、しょつつるの普及を図った。
それには県のフードビジネス支援事業（技術移転型）に参加し、上記の漁協、醸造会社、食品会社からなるしょつつる研究会を立ち上げ、これを中心にしょつつるの製品化、利
用法、しょつつる利用新製品開発を行った。各地でしょつつる製造・販売の機運が
出てきたと同時にハタハタ資源も回復しつつあり、利用拡大が望める状態になった。

研究としても研究所報告に下記の6報投稿した。

- | | | | |
|-----|-----------------------------------|---------------------|------|
| 1) | しょつつる風新調味料の開発（第一報） | | |
| | 市販・自家醸造品の品質について | 研究所報告 | 1999 |
| 2) | ”（第二報） コウナゴによる試験醸造 | 研究所報告 | 2000 |
| 3) | ”（第三報） コアミによる試験醸造 | ” | |
| 4) | ”（第四報） 小アジを用いたしょつつるの
試験醸造 | 研究所報告 | 2001 |
| 5) | ”（第五報） グルコン酸を用いたしょつつる
の試験醸造 | ” | |
| 6) | ”（第六報） ハタハタ・イワシを用いた
しょつつるの試験醸造 | 研究所報告 | 2002 |
| 7) | しょつつるを用いた特産品の開発 | 試験研究成果概要
（平成13年） | |

5 . 残された問題点とその対応

担当者が退職の時期にあり、技術、情報の移転が課題である。

研究課題名	醸造食品の機能性香り成分増加技術の開発～味噌		
予算区分	県単	国庫	委託
研究期間	継・中		担当研究室：応用発酵部門 発酵食品担当
	平14年度（平13～15年度）		担当者：尾張 かおる
	協力・分担関係：		

1. 目的

消費者の健康志向が高まり、多くの機能性食品が開発される中、醸造食品においては香味の向上に加え強い抗酸化性や抗腫瘍性が認められている HEMF が注目を集めている。しかし米麹の割合が多い高級秋田みその現在の製法では充分量を作ることができないので、新たな製造方法を確立し普及することを目的とする。

昨年度は小仕込試験において、仕込から 30 日後までに充分量の酵母が増殖することにより HEMF が順調に生成することが明らかになった。今年度は小仕込試験および現場の中間規模での試験醸造において、酵母大量添加法が HEMF を 15 μ g/g 以上生成させることの確認とともに、次年度に計画している普及活動のための準備を目的とする。

2. 方法

基本配合：麹歩合20、食塩11.5%、水分11.5%、添加酵母 A M2、
仕込総量10kg(小仕込)・70kg(中間規模)

研究所：酵母添加量を 10^4 , 10^5 , 10^6 と変えて3区分、25 温醸

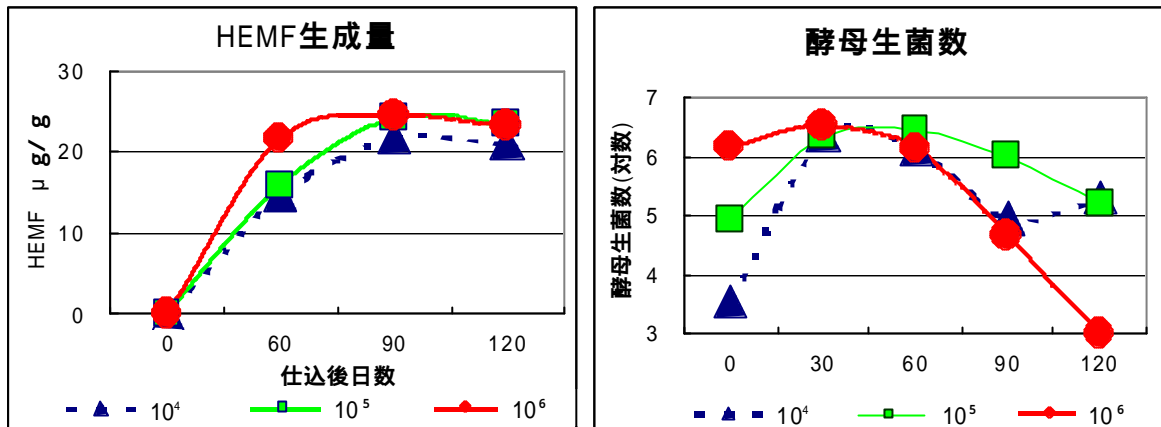
A工場：乳酸菌を 10^6 添加し、酵母添加量を 10^5 , 10^6 と変えて2区分、温醸

B工場：酵母添加量を 10^5 , 10^6 と変えて2区分、温醸

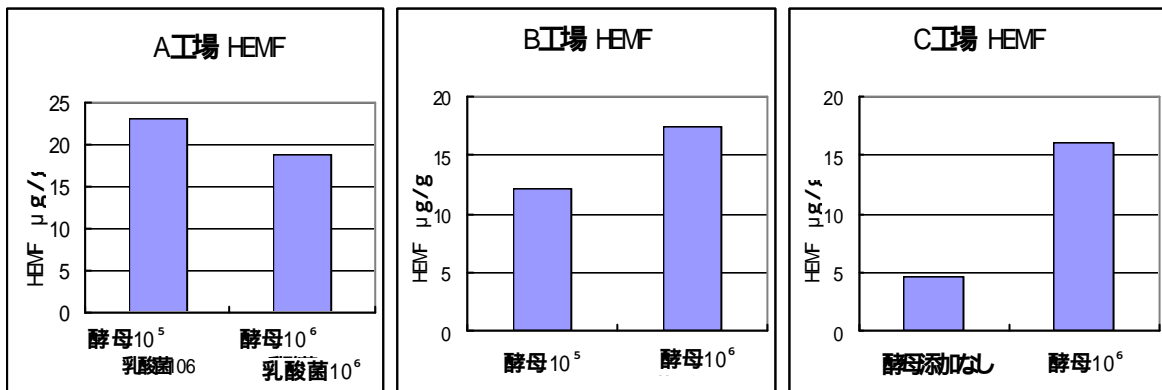
C工場：酵母添加の有無の2区分、天然醸造

3. 結果の概要

- ・研究所で行った小仕込試験では、酵母添加量に関わらずすべての仕込で HEMF が 20 μ g/g 生成した。仕込時の酵母添加量が多いほど HEMF が早く生成し、生成量も多かった。
- ・現場における中間規模仕込では、3工場とも当初の目的である HEMF 15 μ g/g 以上の生成が達成された。
- ・A工場では乳酸菌添加の影響から生成抑制が懸念されたが、充分量の HEMF 生成が可能であった。
- ・C工場では、添加酵母以外の酵母(産膜等)の増殖がみられることから、仕込み工程の改善が必要である。
- ・品評会審査員 3 名による官能評価において、HEMF の香り生成が確認できた。



第1図 酵母添加量とHEMF生成量(小仕込試験)



第2図 現場での中間規模仕込結果

第1表 C工場7か月目の酵母数

	酵母添加なし	酵母添加
酵母生菌数	8.5×10^5	1.5×10^6
産膜酵母生菌数	1.5×10^6	2.0×10^5

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

県南部の、麹歩合が多い味噌を製造している工場を中心に普及活動をする予定である。

5. 結果の発表、活用等

研究所報告

味噌醤油組合を通じたの報告会等

研究課題名 県産農水産物の機能性成分を有効利用する加工法の開発
 予算区分：県単 担当研究室：食品開発部門 食品工学担当
 研究期間：継・中 担当者：秋山美展
 平14年度(平12~14年度) 協力・分担関係：
 大阪市立大大学院医学研究科
 皮膚病態学研究室

1. 目的

食品加工の技術はこれまで主として、微生物制御、品質保持、加工工程の合理化、商品性の付与などを目的として開発が進められてきたが、食の安全性と健康に対する社会の要求は年々高まってきており、これらの社会要請に対応する研究が必要である。本科題の目的は、食品及びその原料に含まれる活性酸素消去成分を明らかにし、それらを有効に活用するための新たな加工技術の開発をすることである。これまでに穀類を中心とした食品中の活性酸素消去成分の探索を行い、その過程で大豆と米が共存すると活性酸素消去能が相乗的に高められることを見いだした。

今年度の目的は、相乗効果を最大限に生かす加工技術の開発と製品開発を行い、さらに活性酸素消去における相乗効果を動物実験によって確かめることである。

2. 方法

- 1) X Y Z系活性酸素消去発光法による新たな相乗効果の検索
- 2) 加熱工程における活性酸素消去活性の動態分析
- 3) ラットを用いた活性酸素消去相乗効果の確認

3. 成果の概要

【平成12年度】

米に含まれる活性酸素消去成分として新たに -オリザノール4種、サイアミン誘導体を同定した。米と大豆は共存することによりその活性酸素消去活性が飛躍的に高められる相乗効果のあることを初めて見いだした。

【平成13年度】

米は緑茶との間にも強い活性酸素消去相乗効果を示すことを見いだした。緑茶は更に雑穀類(ヒエ、アワ、キビ、ソバ)との間でも強い相乗効果を示すことを見いだした。相乗効果発現メカニズムを調べ、活性酸素消去成分が水素供与の際にホモカップリングするよりもヘテロカップリングする方が活性化エネルギーが低くなる場合に相乗効果が発現するものと考えられた。

【平成14年度】

- 1) 相乗効果検索

相乗効果を発現する食品と消去能が相殺される食品の組み合わせを表1に示す。

表1 食品の組み合わせによる活性酸素消去活性の変化

食品の組み合わせ	相乗効果比	食品の組み合わせ	相乗効果比
米 + ショウガ	4.4	緑茶 + ショウガ	0.2
米 + ザクロ	4.2	緑茶 + ザクロ	1.2
米 + イチジク	5.6	緑茶 + イチジク	0.7
米 + レッドキャベツ	4.5	緑茶 + レッドキャベツ	0.6

活性酸素消去における相乗効果には正と負の組み合わせのあることが明らかになった。ショウガ、ザクロ、イチジク、レッドキャベツ等は米に対しては正の相乗効果を示すが緑茶に対しては負の相乗効果（減衰効果）をもたらした。これらの結果は、活性酸素消去活性を訴求する商品の設計を行う際に原材料選択の重要な情報となりうるものと考えられる。

2) 加熱工程における活性酸素消去活性の動態分析

食品加工において加熱工程は必須である。相乗効果発現に対する加熱の影響を調べた結果、2成分を混合した後加熱する方が消去能が増加する場合と、加熱後混合した方がよい場合に分かれた。

3) 動物実験

S D系雄ラットにパラコートを投与し、強制的に肝および肺に活性酸素障害を誘導し、米と大豆によってもたらされる活性酸素消去相乗効果による障害抑制効果を調べた。活性酸素による障害の程度は尿中に排泄される8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OHdG）をモノクローナル抗体を用いたELISA法によって測定した。図1に8-OHdGの測定結果を示す。図2にパラコートによって誘導された典型的な活性酸素障害の剖検写真を示す。

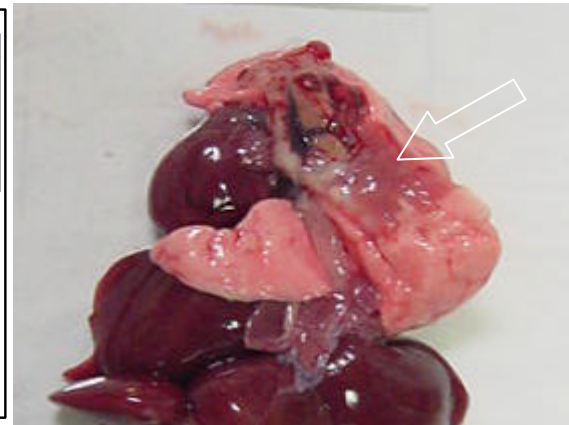
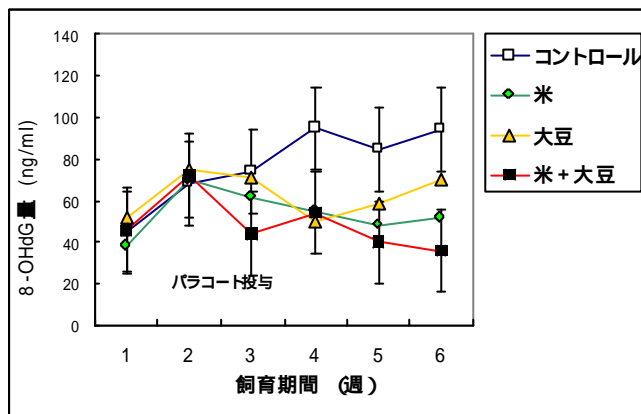


図1 DNA酸化障害に対する米と大豆の相乗効果

図2 パラコート誘導肺障害
矢印がびまん性肺胞障害

尿中8-OHdG量はコントロール群に比べて明らかに低下しており、米と大豆の相乗効果が確認できた。剖検時の臓器観察によっても、コントロール群では肺に明らかな障害が認められたが、（米+大豆）食群では異常を認めなかった。

4) 活性酸素消去活性の高い製品の開発

米と大豆の相乗効果を活かした新商品として『米と大豆のプリン』、『玄米豆腐』を開発し、技術普及を行った。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

負の相乗効果発現のメカニズムを明らかにするとともに、組み合わせに関するデータの蓄積を行う。動物実験の結果を踏まえて、ヒトへの有効性を検証する必要がある。さらに、相乗効果を活用した新製品開発と普及を行う必要がある。これらは15年度よりの新規課題『県産米及び穀類の新規需要を開拓するための加工技術開発』の中で実施する。

5. 結果の発表、活用等

- 1) 論文投稿：XYZ系活性酸素消去発光研究会誌、No.1 (2002)
- 2) 学会発表：日本食品科学工学会(2002)、第二回XYZ系活性酸素消去発光研究会、日本作物学会39回講演会(2002)
- 3) 講演：8回豆類利用研究会(2002)、シンポジウム『高齢社会の食を考える』(2003)
- 4) TV出演：秋田朝日放送開局特別番組(2002.10.12)

研究課題名 県産農水産物の機能性成分を有効利用する加工法の開発	
予算区分：県単	担当研究室：食品開発部門 食品工学担当
研究期間：平成12 ~ 14年	担当者：秋山美展
	協力・分担関係： 東北大学院生命科学研究科 大阪市立大学院医学研究科

1. 目的

食品加工の技術はこれまで主として、微生物制御、品質保持、加工工程の合理化、商品性の付与などを目的として開発が進められてきたが、食の安全性と健康に対する社会の要求は年々高まってきており、これらの社会要請に対応する研究が必要である。本科題の目的は、食品及びその原料に含まれる活性酸素消去成分を明らかにし、それらを有効に活用するための新たな加工技術の開発をすることである。これまでに穀類を中心とした食品中の活性酸素消去成分の探索を行い、その過程で大豆と米が共存すると活性酸素消去能が相乗的に高められることを見いだした。活性酸素消去における相乗効果を最大限に生かす加工技術の開発と製品開発を行い、さらに活性酸素消去における相乗効果が実際に生体に対して有効であるかどうかを動物実験によって確認する。

2. 方法

活性酸素消去活性の測定：XYZ系微弱発光法、電子スピン共鳴法（ESR）、
と成分同定 微弱発光検出高速液体クロマトグラフィ

相乗効果発現機構の解明：酸化還元電位測定、活性化エネルギー測定、発光波長解析

動物実験：ラットによるパラコート活性酸素障害抑制効果試験

3. 成果の概要

1) 活性酸素消去成分の検索

米、大豆、雑穀、野菜、果実、山菜、動物組織、市販加工食品など、約530試料の活性酸素消去活性を測定した。米や大豆は品種により消去活性が異なるが、同一品種でも栽培条件によって大きく変動することがわかった。一般に植物の果皮、内皮に活性酸素消去成分が同在することを明らかにした。

2) 同定と活性部位

米に含まれる活性酸素消去成分として -オリザノール4種を見だしその化学構造を明らかにした。消去活性部位はフェルラ酸ユニットの4位水酸基であることを明らかにした。

3) 相乗効果

米は大豆、茶およびいくつかの野菜や果実との間で、活性酸素消去活性を相乗的に高める作用（相乗作用）を発現することを見いだした。相乗効果発現に関与する成分として、米のサイアミン誘導体、大豆のイソフラボン、茶のカテキン類、雑穀のイノシトール6リン酸を同定した。

4) 発現機構解明

活性酸素消去反応において、消去物質（電子供与体）から活性酸素種への電子受け渡し

に伴って消去物質が酸化重合する際に、ホモカップリング化エネルギーよりもヘテロカップリング化エネルギーが小となるような組み合わせの時に活性酸素消去相乗効果が現れるものと考えられる。

5) 動物実験

X Y Z系微弱発光法、E S R法によって得られたin vitro データの生体への有効性を検証するためラットを用いた動物実験を行った。パラコートによって活性酸素障害を誘導させ、大豆および米糠の水抽出液を投与し、障害の抑制効果を観察した。DNAの酸化障害マーカーである8-ヒドロキシデヒドログアノシン(8-OHdG)の尿中への排泄量を測定したところ、米と大豆を同時に与えた群では明らかに酸化障害が抑制されていた。剖検による臓器の障害観察でも同様の結果を得た。これよりin vitro 実験において観察された相乗効果は同様に生体内でも作用することが確かめられた。活性酸素由来のDNA酸化障害が軽減されればがんの発生抑制に大きな効果が期待できる。

6) 加工法開発

食品およびその原料に含まれる活性酸素消去成分はその共通機能として、活性酸素種を還元する。この還元力は温度、pH、共存物質等、多くの因子によって左右されるが、加工工程中の酸化還元電位およびX Y Z系微弱発光撮影によって迅速かつ簡便に活性酸素消去活性をモニターすることが可能となったため、活性酸素消去活性を最大限に発揮させるための原料選択、工程設計、製品保存法の設定が極めて容易になった。

7) 新商品開発と成果普及

米と大豆の活性酸素消去相乗効果を活かした下記二点の新商品を開発した。

a 米プリン

玄米粉と豆乳を原料として製造。活性酸素消去活性は市販品の約3倍以上。
県内食品メーカーより製造発売予定。

b 玄米豆腐

豆腐の食感を壊さないために加熱糊化玄米を配合。活性酸素消去活性は市販品の3-4倍。県内食品メーカーにより製造販売されている。

4 . 成果の活用面と留意点

食品の生理機能性の表示および訴求法については関連法規に抵触しないよう配慮が必要である。活性酸素消去相乗効果を活用した商品の開発と普及は本課題終了後も引き続き行ってゆく。

5 . 結果の発表、活用等

- 1) 論文投稿 : Luminescence, 16, 237-241(2001), The Third International Soybean processing and Utilization Conference Proceedings(2000), X Y Z系活性酸素消去発光研究会誌, No.1 (2002), その他に連名で5報。
- 2) 学会発表 : 第三回国際大豆会議 (ISPAC)、EUROFOODCHEM、日本農芸化学会、日本食品科学工学会、日本作物学会など主発表7題、連名8題。
- 3) 講演・セミナー : 第三回国際大豆会議併設セミナー(2000)、第6, 7, 8回豆類利用研究会(2000, 2001, 2002)、シンポジウム『高齢社会の食を考える』(2003)。
- 4) 専門誌執筆 : ジャパンフードサイエンス誌等へ主著3編、共著18編。
- 5) 新聞掲載 : 魁新報2回、中日新聞1回。
- 6) T V出演 : 秋田朝日放送開局特別番組 (2002.10.12)

研究課題名：穀類の高度加工法およびその利用に関する研究	
予算区分：県単	担当研究室：食品開発部門食品工学担当
研究期間：完了	担当者：高橋 徹
平14年度（平12～14年度）	協力・分担関係：岩手大学農学部農業生命科学科

1. 目的

糊化時の米粉は粘度変化が大きいことなどから食品加工用途としての利用範囲が限られてきた。そこで、物理的処理による米粉の糊化特性を改質し、その調理・加工適性の向上に資することを目的としてきた。今年度は湿熱処理、乾熱処理米粉を用いた食品の試作からその調理・加工適性を解明することを目的とした。

2. 方法

(1) 試料

ウルチ精白米(あきたこまち)を加熱処理(乾熱処理160℃, 湿熱処理120℃でそれぞれ60分間)後、粉碎して無処理米粉, 乾熱処理米粉および湿熱処理米粉とした。

(2) 加熱処理米粉の耐酸性の評価

各米粉懸濁液のpHを6.3, 4.5および2.8に調整して糊化特性および糊液の粘性率を測定した。また、糊液の還元糖量についても測定した。

(3) ライスプディングの官能評価

各米粉, グラニュー糖, 粉末寒天を用いてライスプディングを試作し, SD法による官能評価から加熱処理米粉の調理・加工適性を評価した。

3. 成果の概要

【前年度までの成果】

95 加熱時における無処理米粉の糊液の粘性率は、加熱処理米粉の約4～8倍高い粘稠な物性を示したが、レトルト処理(120℃, 20分)によって低下し、デンプンの低分子化が原因と考えられた。一方、95 加熱時の加熱処理米粉の粘性率は無処理米粉と比較してかなり低く、レトルト処理によって増加し、特に湿熱処理米粉は顕著であった。このことから、加熱処理米粉の加熱耐性の向上が示唆された。

【今年度の成果】

(1) 加熱処理による米粉の耐酸性の付与

米粉懸濁液のpHを6.3, 4.5および2.8に調整し, RVAによる糊化特性を測定した。各試料の粘度上昇温度(GT)はpHの低下にしたがい低下したが、無処理米粉の加熱時最高粘度(PV), 最低粘度(MV)ならびに最終粘度(FV)はUTが減少した。一方、乾熱処理米粉, 湿熱処理米粉のPV, MV, FVの変化はUTと比較して小さかった。また、流動特性値や見かけの粘性率に及ぼすpHの影響も無処理米粉が乾熱処理米粉および湿熱処理米粉よりも大きかった(図1)。さらに、pHを変化させた場合に生成された還元糖量、すなわち、酸分解によるデンプン鎖の分解の程度は無処理米粉が最も多く、加熱処理米粉は減少したが、中でも湿熱処理米粉が最も少ないと考えられた(図2)。したがって、乾熱処理ならびに湿熱処理は米粉に耐酸性を付与する加熱処理であると判断された。

(2) 加熱処理米粉を用いたライスプディングの試作

乾熱処理米粉配合系および湿熱処理米粉配合系は無処理米粉配合系と比較して黄色みを帯び

ていたが、表面は滑らかであった。無処理米粉配合系は粘りが強く、調理または加工時における作業性に問題があると考えられた。一方、湿熱処理米粉配合系は無処理米粉配合系よりも流動性が非常に高く、容器への分注が容易で調理器具への付着も少ないため、製品の歩留りの向上が期待された。ライスプディングの官能評価から、無処理米粉配合系と乾熱処理米粉配合系および湿熱処理米粉配合系との間に明確な差異が見られた。特に、無処理米粉配合系は乾熱処理米粉および湿熱処理米粉配合系と比較して滑らかで軟らかく、糊のようなべたつきを示すために容器や歯への付着が多いと判断された。乾熱処理米粉配合系および湿熱処理米粉配合系は無処理配合系と比較して餡と似た食品テクスチャーを持つと識別されたが、湿熱処理米粉配合系が無処理米粉配合系よりもざらつくこと、乾熱処理米粉配合系が無処理米粉配合系よりも硬い特長を有しているためであると推察した。

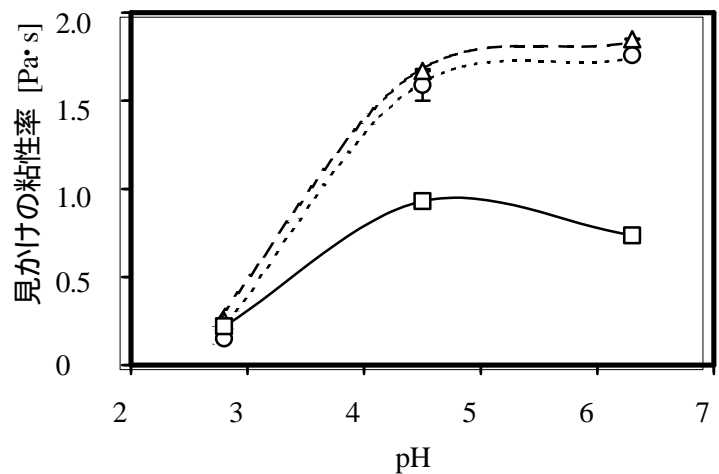


図1 米粉の糊液の粘性率に与えるpHの影響

○- 無処理米粉, -△- 乾熱処理米粉,
□- 湿熱処理米粉

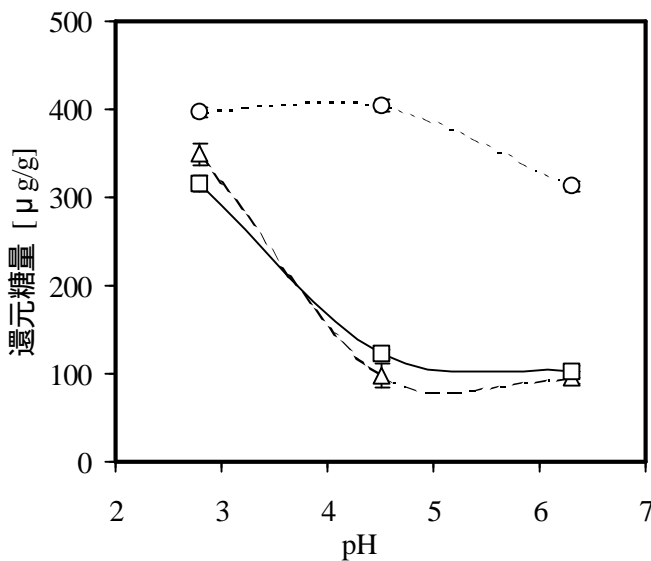


図2 米粉の糊液の還元糖量に与えるpHの影響

○- 無処理米粉, -△- 乾熱処理米粉,
□- 湿熱処理米粉

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

5. 結果の発表, 活用等

1) 投稿論文

日本食品科学工学会誌, 49, 757-764 (2002)

日本食品科学工学会誌, (投稿中)

2) 学会発表

日本食品科学工学会第49回大会 (名古屋市)

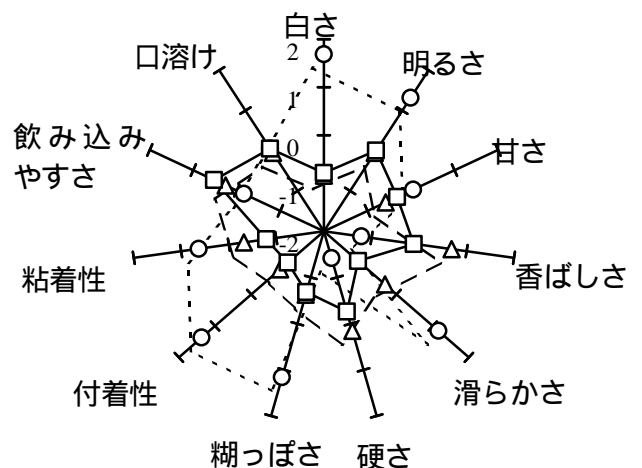


図3 ライスプディングの官能評価

○- 無処理米粉配合, -△- 乾熱処理米粉配合,
□- 湿熱処理米粉配合

研究課題名：穀類の高度加工法およびその利用に関する研究	
予算区分：県単	担当研究室：食品開発部門食品工学担当
研究期間：平成12～14年	担当者：高橋 徹
協力・分担関係：岩手大学農学部農業生命科学科	

1. 目的

穀物自給率の改善に向けた米の消費拡大が叫ばれており、米を用いたパンや麺などの製造技術の開発の重要性が以前にも増している。ところが、米粉の加熱糊化時の物性の制御は難しく、調理・加工適性が小麦粉などと比較して劣るとされている。また、米粉を用いた食品は糊のような重い食品テクスチャーを有するなど、食品加工原料としての利用範囲が限定されてきた。

糊化特性の改善には、高圧処理、温水処理、マイクロ波加熱処理、加熱・せん断処理などの物理的処理が有効とされており、米粉を対象とした研究も多い。ところが、物理的処理を行った米粉の物理化学的特性や調理・加工適性の解明は不十分である。本研究の目的は、物理的処理（乾熱処理および湿熱処理）による米粉の糊化特性を主にした改質ならびにその調理・加工適性の解明である。

2. 方法

精白米を加熱処理（乾熱処理140～160℃、湿熱処理100～120℃）して粉碎した米粉を試料に用いた。米粉の物理学特性については、糊化特性、DSC測定、X線回折測定から評価し、糊液の耐酸性ならびに耐熱性を糊液のレオロジー特性、還元糖量から評価した。さらに、加熱処理米粉の調理・加工適性を製パン、膨化食品やライスプディングの試作から評価した。

3. 成果の概要

・加熱処理が米粉の物理化学的特性に及ぼす影響

米粉懸濁液のレオロジー測定やDSC測定から、乾熱処理米粉（HDT）および湿熱処理米粉（HMT）の加熱糊化 - 攪拌時における米粉およびデンプン粒の膨潤や崩壊の抑制が明らかとなった。また、各米粉のX線回折図から、HMTの結晶性は処理温度の上昇にしたがい低下しており、デンプンの糊化に起因する非晶質の増加を示した。また、DSC測定と同様にアミロース-脂質複合体の形成を示す回折ピークも確認された。加熱処理による糊化特性の変化、特にHMTのように非晶質が増加したのにもかかわらず、膨潤・糊化が抑制されたことは、非晶質ではあっても粒構造が強固になったことを示唆する。これは、デンプン粒がアニーリング（固相における再組織化、不完全結晶の融解と再結晶化）を受けたためと考えられた。

・加熱処理が米粉の糊液およびゲルの物理化学的特性に及ぼす影響

系のpHを調整した糊液の粘性率の変化は、HMT120が最も小さかった。また、HDT160およびHMT120の還元糖量の変化は小さく、加熱処理によって酸性下におけるデンプン鎖の分解が抑制されることを示唆した。したがって、加熱処理は米粉に耐酸性を付与する加熱処理であることが明らかとなった。また、レトルト処理によって、UTの粘性率が減少したのに対して、HDT160はほとんど変化せず、HMT120では増加した。レトルト加熱前のHDT160ならびにHMT120の還元糖量はUTよりも極めて少なかった。レトルト処理を繰り返すことで各試料の還元糖量は増加したが、HDT160ならびにHMT120の還元糖量UTよりも少なかった。UTはレトルト処理によって粘性率が低下するが、HDT160やHMT120の粘性率は変化しないか増加し、さらにレトルト処理を繰り返してもその粘性率はUTよりも高いことから、レトルト処理に対する安定性、いわゆる加熱耐性を有する米粉であるといえる。加熱処理による米粉への耐酸性や加熱耐性の付与は、加熱処理中に生じたアニーリングによるデンプンの規則構造の変化や粒構造の強化に起因すると推察され、これらの調理・加工適性の向上が期待された。

・加熱処理米粉を原料に用いた食品の調製ならびに調理・加工適性の解明

各米粉を30%配合した場合の製パンから、各米粉配合系の色特性は、対照系との間に大きな差は見られなかった。米粉配合系の比容積の減少、内相の硬さの増加や気孔構造の変化は、グルテン量の減少による網目構造骨格の脆弱化に起因すると考えられた。米粉配合系の中でも、HDT配合系およびHMT配合系の比容積がUT配合系よりも減少し、内相の硬さは増加した。したがって、米粉を用いた製パンには、UTがHDTやHMTよりも適していると判断した。各米粉を50%配合してエクストルージョンクッキングで調製した膨化物の膨化率は、HMT配合系およびHDT配合系がUT配合系よりも大きかった。また、各米粉配合系の食品テクスチャーから、加熱処理米粉配合系、中でもHDT配合系は高いクリスピーネス（サクサク感）を示すことが明確となった。したがって、米粉を用いた膨化物の調製には、特に食品テクスチャーの点からHDTが最も適していると判断した。各米粉を10%配合して調製したライスブディングのレオロジー特性から、HMT配合系の流動性が高く、作業性の向上が期待された。また、官能評価からはHMT配合系およびHDT配合系のべたつきや付着性が弱く、餡と似た食品テクスチャーを示すことが明らかとなった。したがって、ライスブディングの調製にはHMTが最も適していると判断した。

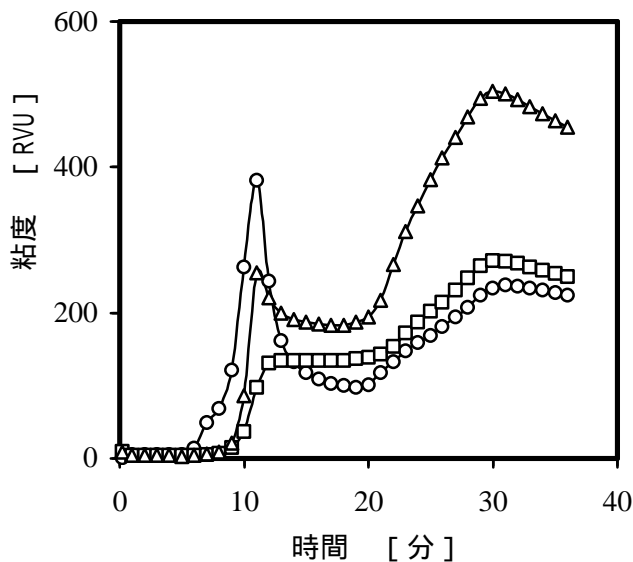


図1 各米粉の糊化特性曲線

○, 無処理米粉; □, 乾熱処理米粉(160℃, 60分);

△, 湿熱処理米粉(120℃, 60分)

4. 成果の活用面と留意点

投稿論文：日本食品科学工学会誌，49，757-764（2002），日本食品科学工学会誌，（投稿中），学会発表：日本食品工学会第1回年次大会（東京），日本食品科学工学会第48回大会（高松），日本食品科学工学会第49回大会（名古屋）

5. 残された問題点とその対応

- ・加熱処理米粉の調理・加工食品用途としての利用範囲の拡大
- ・穀類の高付加価値化による県産農産物の利用拡大

表1 パンの比容積および内相の硬さ

	比容積 [$\times 10^{-3} \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$]	硬さ [N]
対照	4.9 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2
UT配合	3.9 \pm 0.1	2.1 \pm 0.4
HDT160配合	3.7 \pm 0.2	2.3 \pm 0.6
HMT120配合	3.5 \pm 0.1	2.6 \pm 0.6

表2 ライスブディングの破断力，付着力

	破断力 [N]	付着力 [N]
UT配合	2.1 \pm 0.2	1.0 \pm 0.1
HDT160配合	3.5 \pm 0.1	1.1 \pm 0.0
HMT120配合	2.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.0

研究課題名：県産米の水浸漬時における特性解明と利用加工法の改良

(流出タンパク質と米飯テクスチャー)

予算区分：県単 国庫 委託

担当研究室：食品開発部門資源利用担当

研究期間：継・中

担当者：大能俊久

平14年度(平14～17年度) 協力・分担関係：

1. 目的

炊飯米の水分の内約90%は炊飯時に米粒の外から供給される。従って炊飯に使用する水の性状は、炊飯米の食味に影響する重要な要因と考えられるにもかかわらず、水が炊飯米の物性や嗜好性の変化にどのように寄与しているかは十分に研究されていない。そこで、炊飯水が米飯の性状に与える影響を解明し、キリタンポをはじめとする種々の加工米飯に適した炊飯方法の確立を行い、県産米の消費拡大を図ることを目的とする。

炊飯に使用する水の主成分は一般的に米から溶出してきた成分であり、その中でもタンパク質は食味に関わる重要な要因である。そこで、水浸漬時における米からのタンパク質の流出に着目して、その挙動の把握と米飯テクスチャーへの影響について検討した。

2. 方法

1) 普通精米の流出タンパク質量

秋田県産あきたこまち普通精米をそのまま、あるいは2.5倍量の蒸留水を加えて薬さじで10回攪拌して水を捨てる操作を5回行った後、1.6倍量の蒸留水に1～24時間浸漬し浸漬液中の粗タンパク質量(CP量)をケルダール法で求めた。浸漬液を3000rpm10分遠心し、上澄と沈殿についてタンパク質量を求めた。

2) 各種精米の流出CP量

無洗米、普通精米を使用して、そのまま1時間蒸留水に浸漬後、1)と同様に浸漬液全体のCP量を求めた。

3) 浸漬時の流出物等と米飯テクスチャー

普通精米、または古米をそのまま蒸留水で1hr浸漬した後浸漬液を3000rpm10分遠心し上澄を炊飯溶液とした。精米にこれらを加えて炊飯し、米飯テクスチャーをテンスプレッサーで測定した。また、BG無洗米調整時にでる肌糠を加えた場合の米飯テクスチャーも測定した。

4) 精米外層粉のタンパク質量

千代田エンジニアリングの精米機で精米外層粉(外層から3%)を調整し、元素分析装置でタンパク質量を測定した。

3. 成果の概要

普通精米からの流出は1～24時間でほとんど変わらなかった。普通精米を水洗しない場合は0.14g(上澄で約0.08g、沈殿で約0.06g)であった。水洗した場合は水洗による流出が0.18gで、浸漬液は0.04g(上澄で0.03g、沈殿で0.01g)であった。(表1)一方、無洗米の流出量はこれら2つの間であり0.06～0.08gであった。(表2)

前年度までの研究で、肌糠を除いた無洗米で普通精米に比べてバランズ度が改良されることが示された。そこで、普通精米浸漬時に流出する物がバランズ度に影響していると考えて、流出物を加えた場合の米飯テクスチャーを測定した。普通精米の流出物や肌糠を加えても

バランス度はほとんど変化しなかった。(表3)これらのことから、普通精米の肌糠は精米外層に付着しているとバランス度を低下させるが、外層から取りさえすれば存在してもバランス度を低下させない、と推察された。

精米の外層粉を調製して調べたところ、CP量は約16%であった。無洗米は聞き取り調査で普通精米から1.3~1.5%外層を削っている。これらを考慮すると普通精米を水洗しない場合全流出CP量は0.14g、普通精米を水洗した場合は0.22g、無洗米は0.29gとなる。(表4)これまで測定した米飯のバランス度は、普通精米水洗なし<普通精米水洗あり<無洗米、の順であり、これら流出CP量が米飯のテクスチャーに関与していると現在推察している。

表1 普通精米の流出CP量

	浸漬液中の流出CP量 (g/100g精米)	
	上澄	沈殿
水洗なし水浸漬1hr	0.08	0.06
" 2hr	0.09	0.05
" 4hr	0.07	0.04
" 24hr	0.08	0.06
水洗による流出	合わせて0.18	
水洗あり水浸漬1hr	0.03	0.01
" 2hr	0.03	0.01
" 4hr	0.03	0.01
" 24hr	0.03	0.01

表2 各種精米の流出CP量

浸漬液中の流出CP量 (g/100g精米)	
普通精米 A	0.11
普通精米 B	0.14
B G 無洗米	0.06
T W R "	0.08
S J " A	0.07
S J " B	0.06

表3 米飯のテクスチャー

精米	炊飯溶液	硬さ	粘り	バランス度
B G 無洗米 A	蒸留水	31.4	9.4	0.302
"	普通精米上澄	31.5	9.5	0.305
普通精米	蒸留水	32.0	10.1	0.318
"	古米上澄	32.3	10.2	0.322
B G 無洗米 B	蒸留水	31.8	10.2	0.326
" + B G 糠	蒸留水	32.2	10.3	0.325

表4 流出CP量 g/100g精米

	研削、水洗	流出CP量	合計
普通精米(水洗なし)		0.14	0.14
普通精米(水洗あり)	0.18	0.04	0.22
無洗米	0.22	0.07	0.29

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

米飯のテクスチャーについてより詳しく理解するため、引き続き「県産米及び穀類の新規需要を開拓するための加工技術開発」で研究を行う予定である。

5. 結果の発表、活用等

食品科学工学会での発表を予定している。

研究課題名：高品質な米麴の製造方法の検討

予算区分：県単 国庫 委託

担当研究室：応用発酵部門

研究期間：継・中

担当者：佐々木康子、渡辺隆幸、柴本憲夫

平14年度(平13～15年度) 協力・分担関係：

1. 目的

昔から、米の収穫量の多かった秋田では、米麴がよく作られてきた。米麴は、漬物、味噌、水産加工品(例えば、はたはたずし)などの食品の原料となっているが、県内では、米麴を多く使用するものが特に好まれ、秋田県の食品において、必要不可欠なものとなっている。

米麴を利用した食品においては、米麴そのものの品質が最終製品に大きな影響を与えており、特に非加熱食品においては、米麴の微生物汚染の影響をそのまま受けしてしまうことがある。しかしながら、これまでに行った市販米麴の微生物検査によって、県内業者により製造された米麴のなかには、衛生的問題が存在するものがあることがわかった。その結果を県内の米麴製造業者で構成されている任意団体である、製麴研究会で発表したところ、品質向上に意欲を示した製造業者が数社あった。また、はたはたずしに大腸菌群が検出され、これが原料の米麴由来であることがわかり、米麴を大腸菌群陰性にするにはどうしたらよいかという技術相談もあった。これらの要望を受け、昨年度までは、工場の衛生管理技術のレベルアップによる米麴の品質向上を目的として研究を行ってきた。今年度は、製麴時に乳酸菌を添加して混合培養することにより、米麴の微生物汚染を防止する方法について検討する。

2. 方法

2-1) 乳酸菌の選択

乳酸菌は、微生物汚染のなかった県内 A社の米麴から釣菌した 46菌株、ぬか床由来の 21菌株(同定済)、および赤ずし由来の47菌株(同定済)を用いた。E.coli は、秋田県衛生研究所より譲渡された 1菌株を用いた。乳酸菌の前培養は、GYP液体培地で 30、24時間行った。この培養液を遠心(3000rpm, 5分間)後、菌体を 5mlの滅菌水で 2回洗浄し、5mlの滅菌水に懸濁させ、希釈して濁度(OD 550nm)0.50に合わせた(菌数は 6.0×10^8 /ml)。E.coli の前培養は、普通寒天培地(日水製薬社製)に塗抹し、37 で 24時間行い、5mlの滅菌水に懸濁させ、希釈して濁度(OD 550nm)0.50に合わせ(菌数は 6.0×10^8 /ml)、数段階希釈した。滅菌した麴エキス培地(Bx11.5) 10mlに、 6.0×10^8 /mlの乳酸菌および 6.0×10^4 /mlの E.coli を各々 0.1ml加え、30 で 24時間培養した。培養液を 1ml採取し、デゾキシコレート培地(日水製薬社製)を 15ml加えて混釈し、37 で 24時間培養してコロニー数をカウントした。

2-2) 乳酸菌の同定

E.coli に対して増殖抑制効果のあった米麴由来の乳酸菌 8株の同定をアピ 50CHL(日本ビオメリュー社製)を用いて行った。

3. 成果の概要

- 1) E.coli 増殖抑制効果があったのは、米麴由来の乳酸菌 8株、赤ずし由来の乳酸菌 24株であった。
- 2) E.coli 増殖抑制効果があった米麴由来の乳酸菌を同定した結果、*Leuconostoc citreum* および *Lactobacillus plantarum* であった。
- 3) E.coli 増殖抑制効果があった乳酸菌は、*Leuconostoc citreum*、*Lactobacillus plantarum*、*Leuconostoc mesenteroides mesenteroides/dextranicum* 1、*Leuconostoc mesenteroides mesenteroides/dextranicum* 2であった。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

今後は、乳酸菌および E.coli を添加した米麴製造試験を行う必要がある。また、漬物、味噌など製品別に適合する米麴の開発も行う。

表 1 米麹由来の乳酸菌を添加した場合のE.coli数

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
E.coli数	*	*	5	*	*	*	*	46	*	*	122	*	*	*	*	12
No.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
E.coli数	*	*	*	4	*	*	*	*	*	0	*	*	*	0	*	*
No.	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46		
E.coli数	*	*	2	0	327	*	*	*	*	*	*	6	*	*		

注) 単位は、CFU/ml

* は、 10^3 (CFU/ml)以上を示す。

表 2 めか床由来の乳酸菌を添加した場合のE.coli数

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
E.coli数	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
No.	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
E.coli数	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

注) * は、 10^3 (CFU/ml)以上を示す。

表 3 赤ずし由来の乳酸菌を添加した場合のE.coli数

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
E.coli数	63	0	0	34	54	60	0	0	6	147	*	*	251	0	0	0
No.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
E.coli数	38	*	0	261	0	*	0	*	60	10	*	0	0	16	*	*
No.	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	
E.coli数	0	138	*	*	*	0	123	0	1	0	5	2	0	20	0	

注) 単位は、CFU/ml

* は、 10^3 (CFU/ml)以上を示す。

表 4 乳酸菌の同定結果

サンプル	同定結果
米麹由来 No.3,20,35,44 赤ずし由来 No.2,3,7,8,14,15,16,29,38,41,43,45,46,47	Leuconostoc citreum
米麹由来 No.16,26,30,36	Lactobacillus plantarum
赤ずし由来 No.9,17,21,23,26,28,33,40,42,44	Leuconostoc mesenteroides mesenteroides/dextranicum 1
赤ずし由来 No.19	Leuconostoc mesenteroides mesenteroides/dextranicum 2

5. 結果の発表、活用等

研究課題名：原材料の除菌・洗浄による園芸加工食品の品質向上	
予算区分：県単（国庫）	担当研究室：応用発酵部門素材開発担当
研究期間：継・中	担当者：菅原 久春
平14年度（平12～14年度）	協力・分担関係：なし

1. 目的

家庭生活への加工食品の普及、食品の量産化、PL法施行、HACCP、日付表示の賞味期限への移行といった背景から、食品企業の製品に対する品質管理がますます重要なこととされている。

一方において、消費者の食品に対する安全・健康志向が定着し伝統的な地域特有な食品と言えどもその範疇の中で品質の向上を図ることが命題とされている。すなわち、低食塩・低甘味の食品が消費者・市場での要請であり、結果的に微生物制御の技術面でのハードルは従来にも増して高くなっている。

従って、伝統的な食品の日持ちを延長するために、その原料から付着微生物等の除去を行い、品質の向上を図ることが急務とされている。

2. 方法

キトサン、ビタミンB₁・ラウリル硫酸塩、ナイシン、グリシン等の微生物抑制の効果等について、主に漬物由来の酵母を主体に大腸菌等を用いて増殖度係数(増殖抑制係数)を個別に測定・分析をした。

本年度は製剤化を図るために抗菌物質の組み合わせによる最適な条件を見出すため、一部組み合わせ試験を実施し、微生物抑制の効力について数値化することを検討した。

各微生物を、L型培養管(培地10ml)に初発菌数が10⁵/mlになるように調整し、アドバンテック東洋製TN-112D温度勾配バイオフォトレコーダを使用して(0.D.660nm)30で培養中の微生物の生育曲線(微生物の抑制曲線)を描かせ、抗菌効果について数値化し、判断をした。

3. 成果の概要

$$B(t)=B(M)*EXP(b*t)$$

b:増殖度係数、t:時間

B(M):対数増殖期生菌数初期値

B(t):生菌数

$$b=LN(B(t)/B(M))*1/t, t=LN(B(t)/B(M))*1/b$$

$$=LN(2)*1/b$$

:2倍に増殖するまでの世代時間

上記の式で増殖速度係数 b を求めた。

また、増殖始動までを休眠期と位置づけ抗菌効果の一つの指標とした。

このことで、抗菌性の効果を数値化することによつて的確に判断することが可能となった。これをもとに、乳酸菌以外の酵母や大腸菌等にあてはめてみた。

食塩3% ビタミンB1・ラリル硫酸塩 10mg% で供試した酵母(9種)の増殖が阻止された。

Debaryomyces hansenii (NFRI 3836), Saccharomyces servazzii(JCM5200), 秋田白神003, 秋田みそAM2, 秋田白神197, Zygosaccharomyces rouxii E-16, Pichia anomala(AOK624), Pichia subpelliculosa E20-1, Pichia farinosa (IF00193)。

食塩3% ビタミンB1・ラリル硫酸塩7.5mg% で供試した酵母(9種)のうち7種の増殖が阻止された。

Debaryomyces hansenii (NFRI 3836) --b=0.2589, 総合抑制指数0.27

秋田白神197

---b=0.1861, 総合抑制指数0.06

食塩3% ビタミンB1・ラリル硫酸塩5.0mg% で供試した酵母(9種)のうち3種の増殖が阻止された。

	b(増殖速度係数)	総合抑制指数
Debaryomyces hansenii (NFRI 3836)	0.2783	0.53
Saccharomyces servazzii (JCM5200)	0.0551	0.42
秋田白神003	0.0992	0.18
秋田みそAM2	0	
秋田白神197	0.1527	0.17
Zygosaccharomyces rouxii E-16	0	
Pichia anomala (AOK624)	0.2290	0.07
Pichia subpelliculosa E20-1	0	
Pichia farinosa	0.1191	0.04

食塩3% ユッカフォーム抽出物0.05~0.1%で秋田白神197を除いて酵母の増殖が阻止された。

ユッカフォーム抽出物0.05% ---b=0.2112, 総合抑制指数0.28

ユッカフォーム抽出物0.1% ---b=0.2836, 総合抑制指数0.57

食塩3% ナイシン0.05%で酵母の増殖は阻止できなかった。

食塩3% キトサン0.1%で酵母の増殖は阻止できなかった。

食塩3% グリシン1%で大腸菌やBacillus の増殖を抑制することが可能。

表 抗菌剤の相違(グリソ併用)による増殖度(食塩濃度3%, 初発菌数100,000/ml)

	Bacillus cereus				Escherichia coli				Bacillus subtilis			
	b	時間	日	日	b	時間	日	日	b	時間	日	日
対照	0.3879	1.7869	7.33	0.31	0.2751	2.5196	16.17	0.67	0.2513	2.7583	16.17	0.67
グリソ1%	0.2455	2.8234	8.72	0.36	0.0582	11.9098	61.52	2.56	-	-	-	-
キトサン0.1%	0.2042	3.3945	16.30	0.68	0.2395	2.8942	32.59	1.36	-	-	-	-
グリソ1%, キトサン0.05%	0.2895	2.3943	9.35	0.39	-	-	52.67	2.19	-	-	-	-
V-B1 0.025%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グルコ酸亜鉛0.3%	0.1338	5.1805	40.80	1.70	0.2189	3.1665	35.12	1.46	-	-	-	-

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

5. 結果の発表、活用等 各種講習会、研修会、技術指導、相談業務などで活用する。

研究課題名：原材料の除菌・洗浄による園芸加工食品の品質向上

予算区分：県単（国庫）

担当研究室：応用発酵部門素材開発担当

研究期間：平成12～14年

担当者：菅原 久春

協力・分担関係：なし

1. 目的

家庭生活への加工食品の普及、食品の量産化、PL法施行、HACCP、日付表示の賞味期限への移行といった背景から、食品企業の製品に対する品質管理がますます重要なこととされている。

一方において、消費者の食品に対する安全・健康志向が定着し伝統的な地域特有な食品と言えどもその範疇の中で品質の向上を図ることが命題とされている。すなわち、低食塩・低甘味の食品が消費者・市場での要請であり、結果的に微生物制御の技術面でのハードルは従来にも増して高くなっている。

従って、伝統的な食品の日持ちを延長するために、その原料から付着微生物等の除去を行い、品質の向上を図ることが急務とされている。

2. 方法

電解次亜水(弱アルカリ次亜塩素酸ナトリウム水、pH8.3,有効塩素濃度50～100ppm)を主に焼成カルシウム(アルカリ領域)や醸造酢、酢酸(酸性領域)等で漬物原料やきりたんぼ鍋の食材となる野菜等の初発菌数の低減を試みシェルフライフ延長を可能にする。

一方キトサン、ビタミンB₁・ラウリル硫酸塩、ナイシン、グリシン等の微生物抑制の効果等について、主に漬物由来の乳酸菌や酵母を主体に大腸菌等を用いて増殖度係数(増殖抑制係数)を個別に測定・分析をした。

製剤化を図るために抗菌物質の組み合わせによる最適な条件を見出すため、組み合わせ試験を実施し、微生物抑制の効力について数値化することを検討した。

各微生物を、L型培養管(培地10ml)に初発菌数が10⁵/mlになるように調整し、アドバンテック東洋製TN-112D温度勾配バイオフォトレコーダを使用して(0.D.660nm)30で培養中の微生物の生育曲線(微生物の抑制曲線)を描かせ、抗菌効果について数値化し、判断をした。

3. 成果の概要

$$B(t)=B(M)*EXP(b*t)$$

b:増殖度係数、t:時間

B(M):対数増殖期生菌数初期値

B(t):生菌数

$$b=LN(B(t)/B(M))*1/t, t=LN(B(t)/B(M))*1/b$$

$$=LN(2)*1/b$$

:2倍に増殖するまでの世代時間

上記の式で増殖速度係数 b を求めた。

また、増殖始動までを休眠期と位置づけ抗菌効果の一つの指標とした。

このことで、抗菌性の効果を数値化することによつて的確に判断することが可能となった。これをもとに、乳酸菌、酵母や大腸菌等にあてはめてみた。

以上のことで日持ち向上剤の比較試験が可能になり、製剤化する上での基礎知見を得ることができた。

食塩3% ビタミンB1・ラウリル硫酸塩 10 mg% で供試した酵母(9種)の増殖が阻止された。

Debaryomyces hansenii (NFRI 3836), Saccharomyces servazzii (JCM5200), 秋田白神003, 秋田みそAM2, 秋田白神197, Zygosaccharomyces rouxii E-16, Pichia anomala (AOK624), Pichia subpelliculosa E20-1, Pichia farinosa (IF00193)。

食塩3% ビタミンB1・ラウリル硫酸塩 7.5 mg% で供試した酵母(9種)のうち7種の増殖が阻止された。

Debaryomyces hansenii (NFRI 3836) --b=0.2589, 総合抑制指数0.27

秋田白神197 ---b=0.1861, 総合抑制指数0.06

食塩3% ビタミンB1・ラウリル硫酸塩 5.0 mg% で供試した酵母(9種)のうち3種の増殖が阻止された。

	b (増殖速度係数)	総合抑制指数
Debaryomyces hansenii (NFRI 3836)	0.2783	0.53
Saccharomyces servazzii (JCM5200)	0.0551	0.42
秋田白神003	0.0992	0.18
秋田みそAM2	0	
秋田白神197	0.1527	0.17
Zygosaccharomyces rouxii E-16	0	
Pichia anomala (AOK624)	0.2290	0.07
Pichia subpelliculosa E20-1	0	
Pichia farinosa	0.1191	0.04

食塩3% ユッカフォーム抽出物 0.05 ~ 0.1% で秋田白神197を除いて酵母の増殖が阻止された。

ユッカフォーム抽出物 0.05% ---b=0.2112, 総合抑制指数0.28

ユッカフォーム抽出物 0.1% ---b=0.2836, 総合抑制指数0.57

食塩3% ナイシン 0.05% で酵母の増殖は阻止できなかった。

食塩3% キトサン 0.1% で酵母の増殖は阻止できなかった。

食塩3% グリシン 1% で大腸菌や Bacillus の増殖を抑制することが可能。

表 抗菌剤の相違(グリシン併用)による増殖度(食塩濃度3%, 初発菌数100,000/ml)

	Bacillus cereus				Escherichia coli				Bacillus subtilis			
	b	時間	日	日	b	時間	日	日	b	時間	日	日
対照	0.3879	1.7869	7.33	0.31	0.2751	2.5196	16.17	0.67	0.2513	2.7583	16.17	0.67
グリシン1%	0.2455	2.8234	8.72	0.36	0.0582	11.9098	61.52	2.56	-	-	-	-
キトサン0.1%	0.2042	3.3945	16.30	0.68	0.2395	2.8942	32.59	1.36	-	-	-	-
グリシン1%, キトサン0.05%	0.2895	2.3943	9.35	0.39	-	-	52.67	2.19	-	-	-	-
V-B1 0.025%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グルコン酸亜鉛0.3%	0.1338	5.1805	40.80	1.70	0.2189	3.1665	35.12	1.46	-	-	-	-

4. 成果の活用面と留意点

各種講習会、研修会、技術指導、相談業務等で積極的に活用を諮るため酵母の抑制なのか、乳酸菌なのか、両方なのか個別対応する際に総合的に判断をする必要がある。

5. 残された問題点とその対応

15年度からの新規課題「特産野菜高付加価値加工技術の開発」で対応を検討する。

研究課題名 ジュール加熱技術を応用した高精度殺菌システムの開発	
予算区分：県単	担当研究室：食品開発部門 食品工学担当
研究期間：継・中	担当者：秋山美展
平14年度(平12~14年度)	協力・分担関係： 秋田大学工学資源学部機械工学科 秋田県工業技術センター

1. 目的

食品をはじめ液体の加熱には熱交換機や加熱釜が用いられているが、これらはいずれも熱媒体からの伝熱によって加温するものである。そのため、伝熱面におけるコゲや加熱凝集物の被膜が形成され、伝熱効率低下と製品への異物混入の原因となる。また伝熱式は加熱ムラが大きく殺菌不良や過加熱といった内在的欠点を有している。その結果、被処理物の加熱履歴(温度×時間)は大きく変動し、製品品質の低下につながる。

ジュール加熱法は加熱に伴う各種の加熱障害を最小限にとどめることが可能である他に、任意の温度で昇温を停止し一定時間その温度に保持した後、再び昇温するといったプログラム昇温が極めて容易かつ正確に行える長所がある。従来の加熱法は全体の平均昇温速度の制御は行っても、時系列的に昇温速度を制御するという概念はなく、従ってそのような装置も普及していない。

今年度は、プログラム加熱試験装置を作製し各種加熱工程への適用を試みる。最終目標はプログラム昇温機能を活かした新しい加熱装置と加工法の開発である。

2. 方法

- 1) 食品材料の正味の熱履歴を表しうるモデル式の精密化
メイラード反応による吸光度と加熱積算値(Cv値)の比較
- 2) プログラム加熱法の各種加熱工程への適用とその効果の評価
玄米炊飯、発芽玄米の製造、発酵工程への応用
- 3) プログラム加熱装置の設計製作

3. 成果の概要

【平成12年度】

中小企業総合事業団の研究助成を受け、ジュール加熱技術を応用した実機レベルの試験用液体連続殺菌システムを製作した。吟醸酒の高品位殺菌を目的として装置の改良を行い、最適な殺菌法を確立した。

【平成13年度】

吟醸酒殺菌システムの実用機を設計・製作し酒造メーカーに導入した。酒造メーカーにおいて現場試験を行いシステムの完成度を高めた。プログラム加熱の概念を導入した多段階温度保持システムを開発した。

【平成14年度】

1) 前年度に作成した加熱積算値モデルの精密化を行った。メイラード反応をモデル系として様々な温度-時間履歴を与え、そのCv値(計算値)と実際の加熱履歴量(測定吸光度)を比較した結果、図1に示す高い相関を得た。

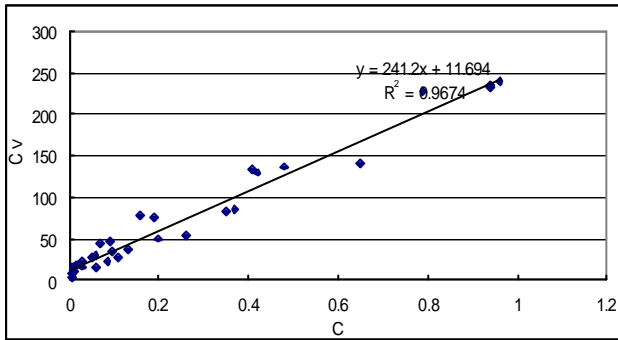


図1 Cv値（計算値）と実加熱履歴量

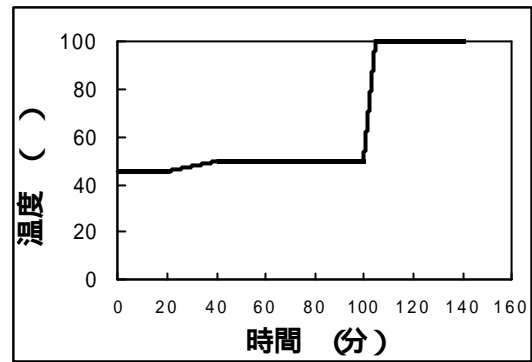


図2 玄米炊飯プログラム

2) プログラム加熱法による玄米炊飯

玄米の一般的な炊飯方法では炊飯に先立って、玄米を約10-12時間浸漬する必要がある。これは玄米の吸水速度が遅いためであるが、浸漬温度を高めることで浸漬時間を短縮することが可能である。図2に示す温度-時間プログラムにより炊飯した結果、約2時間で炊飯を完了し、官能品質も従来法で炊飯したものと同等であった。プログラム加熱により炊飯時間を大幅に短縮することが可能である。

3) 発芽玄米の催芽と品質向上

発芽玄米の製造では催芽のために約30℃で18-24時間保持する。従来法で製造した発芽玄米はこの工程で雑菌の繁殖による微生物汚染を受けるため、最終製品の品質を低下させてしまうという欠点を有していた。プログラム加熱法を用いて、催芽工程後ただちに60℃前後で中間殺菌を行うことにより最終製品の微生物品質を大きく改善できる可能性が確認された。プログラムジュール法によれば、小ロット（10-100kg/ロット）での生産も容易であり、設備コストも低く抑えることが可能であるため、発芽玄米製造への新規参入や生産拡大のための最適な生産方法になりうるものと考えられる。

4) プログラム加熱装置の設計製作

任意温度、任意時間、任意ステップ数で加熱制御のできるプログラム加熱装置を製作した（図3）。



図3 プログラムジュール試験機

性能諸元	
電源	100 V
出力	600 VA
温度制御	30-200 ± 0.5
設定ステップ数	20以上

4 . 今後の問題点と次年度以降の計画

実機及び応用技術の開発と普及は15年度新課題『小規模食品工場向けの光度加工技術の開発』において引き続き継続する。

5 . 結果の発表、活用等

- 1) 学会発表：日本食品工学会14年大会(2002)
- 2) 専門誌執筆：ジャパンフードサイエンス, 41, 6(2002)
 ジャパンフードサイエンス, 41, 8(2002)、 同41,9(2002)

研究課題名	ジュール加熱技術を応用した高精度殺菌システムの開発		
予算区分	： 県単	担当研究室	： 食品開発部門 食品工学担当
研究期間	： 平成12 ~ 14年	担当者	： 秋山美展
		協力・分担関係	：
			日本精機(株)、両関酒造(株)、 秋田大学工学資源学部機械工学科、 秋田県工業技術センター、 酒類部門

1. 目的

食品をはじめ液体の加熱には熱交換機や加熱釜が用いられているが、これらはいずれも熱媒体からの伝熱によって加温するものである。そのため、伝熱面におけるコゲや加熱凝集物の被膜が形成され、伝熱効率低下と製品への異物混入の原因となる。また伝熱式は加熱ムラが大きく殺菌不良や過加熱といった内在的欠点を有している。その結果、被処理物の加熱履歴(温度×時間)は大きく変動し、製品品質の低下につながる。これに対し、ジュール加熱法はコゲや過加熱障害を最低限に抑えることができ、加熱温度の制御精度も高いという利点を有している。このため熱に対して不安定な成分や加熱凝集性を示す物質の殺菌に対して従来法に比較し高い洗剤能力を有すると考えられる。

本研究では、乳、卵白などの蛋白系食品、香気成分の散逸しやすい酒類、生理活性成分などの殺菌、発酵や培養などの温度保持、さらには精密かつ高い衛生性が要求される医療用輸液などの加熱処理を可能にするシステムを開発することを目標とする。

2. 方法

- 1) 試験用ジュール加熱装置の設計と製作
- 2) 実機レベルの高精度殺菌システムの開発と普及
- 3) ジュール加熱法の各種加熱工程への適用と評価
- 4) 多段階保持加熱法(プログラム加熱法)の導入と基礎解析および実用化試験

3. 成果の概要

1) 試験用ジュール加熱装置の設計と製作

中小企業創造基盤技術研究事業(中小企業総合事業団)による研究助成を受け、試験用ジュール加熱装置を開発した。温度制御精度、応答性は従来のプレート式熱交換システムを凌ぐ性能であった(図1)。

2) 実機レベルの高精度殺菌システムの開発と普及

清酒の高品位殺菌を目的とした殺菌システムを開発した(図2)。温度制御精度は目標温度±0.5 の高精度で200L/hrの処理能力を有している。本システムは連続殺菌システムの利点を有しながらも、小ロット(20L)でも極めて低い損耗率で殺菌処理が可能である。装置価格は従来型の熱交換機システムの約二分の一から三分の一の低価格を達成している。ジュール加熱法による清酒の殺菌法を特許出願した。

3) ジュール加熱法の各種加熱工程への適用と評価

表1にジュール加熱法の適用例と従来法(伝熱加熱法)に対する特徴、利点を示す。

4) 新しい加熱法の導入と基礎解析および実用化試験

ジュール加熱法の発展技術としてプログラム加熱法を開発した。これは昇温工程中に一定温度で保持した後、さらに昇温する加熱法で、食品の加熱工程中に起こる様々な化学反

応、酵素反応、物理変化に対して最適の温度と作用時間を与えることにより、対象とする反応（変化）を任意制御しようとするものである。プログラム加熱試験装置を作製し、実際の食品加工への適用試験を行った（表1）。



図1 試験用ジュール加熱装置



図2 高品位清酒殺菌システム

表1 ジュール加熱法の適用例と従来法との比較

工程、製品	従来法に対する特徴、利点	開発、普及状況	技術要素
にがり豆腐製造	品質向上、安定。熟練技術不要	商品化例多数	
多層構造豆腐	工程簡略、商品価値向上	試作品完成	個別凝固
味噌の殺菌	着色抑制、香気保持	実用化	
清酒の殺菌	香気保持、品質安定、省力化	実用化	温度制御精度
果汁の殺菌	品質向上、	試験終了	負荷変動対処
発酵乳製造	装置簡易化、製品多様化	試験終了	
卵加工品製造	新食感、歩留向上	試験終了	
ジャム製造	香気、色調改善	試験終了	
スープ製造	品質安定、省力化	試験段階	無攪拌均一加熱
餡製造	品質安定、工程簡略化	試験段階	
発芽玄米製造	微生物品質向上	試験段階	プログラム加熱
玄米早炊き	炊飯時間短縮、省力化	試験段階	プログラム加熱
甘酒製造	品質向上、装置簡易化	試験段階	プログラム加熱
ナタ漬け製造	工程簡略、装置簡易化	試験段階	プログラム加熱
畜肉表面殺菌	品質向上、工程簡略化	試験段階	通電周波数制御

4．成果の活用面と留意点

実用段階に入ったジュール加熱装置および技術の普及と、試験段階にある技術の開発は15年度新規課題『小規模食品工場向けの高度加工技術の開発』において推進する。

5．結果の発表、活用等

- 1)論文、著書：食品加工総覧第1巻（農文協）、わが国における食用マメ類の研究（農研センター）、中小企業創造基盤技術研究事業11年度報告書（2000）、同12年度（2001）
- 2)学会発表：日本食品工学会2000年大会（2000）、同2001年大会（2001）、同2002年大会
- 3)講演・セミナー：第三回国際大豆会議併設セミナー（2000）、第6回豆類利用研究会（2000）、全国食品関係試験研究所長会・生命工学部会（2002）、
- 4)専門誌執筆：ジャパンフードサイエンス、41,6(2002)、同41,8(2002)、同41,9(2002) 食品機械装置、38,12(2001)、デイリーフード13年1月号、食品と技術 No.366(2001)、現代農業13年4月号
- 5)新聞掲載：魁新報12.10.16版、日刊工業新聞12.11.1版、

研究課題名：清酒のろ過技術に関する研究

予算区分：(県単) 国庫 委託

担当研究室：酒類部門 担当

研究期間：(継)・中

担当者：中田健美

平14年度(平13～15年度) 協力・分担関係：

1. 目的

現在の清酒のろ過工程は、植物繊維・セライト・活性炭等をろ過助剤としたろ過器で、ろ過の目的も脱色を主体にした技術体系で、香味の調整を加味したろ過技術は未解明の部分が残っている。本県のように原料米を吟味し、丁寧な醗酵管理を行ない製造した清酒でも出荷時のろ過操作により香味が損なわれている場合が多い。また、香味の損失を防ぐために、貯蔵前のろ過清澄を行なわない場合や、生で貯蔵し出荷する場合もあるが、これらの場合、吟醸酒などの高級酒は、貯蔵により製品に生老香など香気の劣化やオリ等の沈殿を招く場合が多く商品のイメージダウンが懸念されている。普通酒の販売不振の中で、吟醸酒や吟醸純米酒などの高級酒が順調な伸長している業界の現状にあって、県産高級酒の品質向上のために香味の損失や劣化を防止する新しいろ過方法の開発が必要である。

本年度は、生酒中の種々の酵素が貯蔵中の劣化することから、酵素蛋白除去を目的に生酒の蛋白質吸着能の優れたろ過助剤を選定する。

2. 方法

(1) 吸着剤 セライト(白)、セライト(赤)、チタン酸カリ(商標テスモ)、キトサン、 γ -カラギーナン、イギス(Ceramium kondoi Yendoの凍結乾燥粉末)および活性炭を試験に供した。

(2) 方法 生酒100mlに各吸着剤50mgを2時間接触させてから、(10%コポロック1ml+1%ゼラチン0.5ml)系でオリ下げを行ない、GC50の濾紙でろ過し分析に用いた。

(3) 蛋白質はBio-RadのProtein Assayにより測定した。アミノ酸は、JLCアミノ酸アナライザー、香気成分は、ガスクロマトグラフィーにより常法に従った。

3. 成果の概要

前年度は、生酒5種類について、活性炭素による吸着試験で着色度およびアミラーゼは清酒のそれぞれの濃度が高いほど吸着が大きく、吸着量は濃度と正の相関関係があると推定された。また、生酒の加水分解前後の含量の差から蛋白質の吸着を推定した。

本年度は、生酒中の蛋白質を吸着による除去の可能性を検討した。

用いた吸着剤の中では γ -カラギーナンが一番蛋白質を吸着した。また γ -カラギーナンは香気成分の吸着も少ないが着色度の著しい増大があった。いずれの吸着剤も、蛋白質、香気成分の吸着が見られるがアミノ酸は吸着されない。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

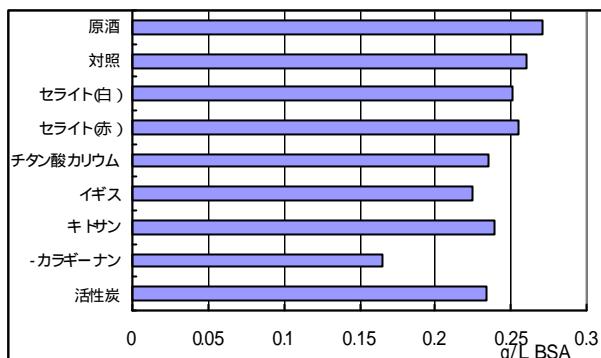
用いた吸着剤は、それぞれ異なる蛋白質を吸着している可能性があり、生酒の劣化させる酵素蛋白質を除去する吸着剤を選定する必要がある。また、 γ -カラギーナンの蛋白吸着能を利用するために、着色の原因を解明する必要がある。

5. 結果の発表、活用等

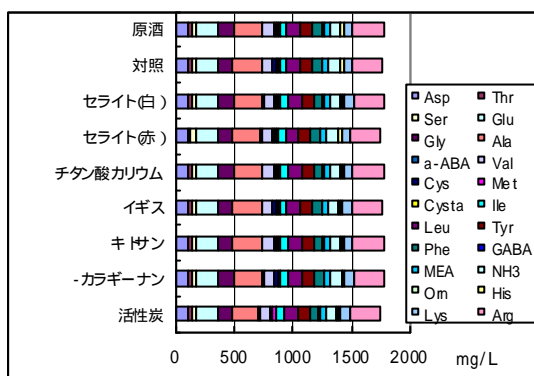
所内発表、講習会での技術普及

第1表 吸着剤による処理酒

	透明性	沈殿層(ml)	OD430nm	OD660nm
原酒	+	-	0.0290	0.0015
対照	+	2	0.0261	0.0011
セライト(白)	+	2	0.0219	0.0002
セライト(赤)	+	2	0.0216	0.0002
チタン酸カリウム	+	3	0.0212	0.0006
イギス	+	2	0.0275	0.0029
キトサン	+	3	0.0250	0.0026
-カラギーナン	+	3	0.0379	0.0071
活性炭	+	2	0.0005	0.0005



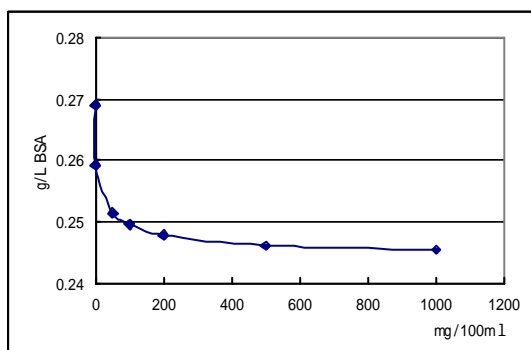
第1図 処理酒の蛋白含量



第2図 処理酒のアミノ酸組成

第2表 処理酒の香り成分

	(ppm)					
	EtOAc	n-PrOH	i-BuOH	i-AmOAc	i-AmOH	EtOCap
原酒	50.7	66.0	19.3	1.7	232.9	5.6
対照	50.0	51.4	19.1	1.7	220.0	5.2
セライト(白)	45.5	53.1	18.5	1.6	212.9	4.5
セライト(赤)	49.6	51.7	18.1	1.7	227.9	4.9
チタン酸カリウム	48.1	59.0	18.0	1.6	225.0	4.5
イギス	47.2	50.9	17.6	1.6	225.1	4.3
キトサン	45.0	58.7	18.4	1.4	221.1	3.8
-カラギーナン	47.8	62.8	17.5	1.7	226.1	4.7
活性炭	47.9	50.7	18.2	1.4	228.6	3.0



第3図 セライト(白)使用量と蛋白含量

研究課題名：乳酸菌を用いた機能性食品の開発	
予算区分： 県単 国庫 委託	担当研究室：生物機能部門生物機能第一担当
研究期間： 継	担当者：木村貴一、高橋慶太郎、高橋砂織
平 14年度（平 14～ 16年度）	協力・分担関係：なし

1. 目的

乳酸菌は、麹菌、酵母と同じく重要な発酵微生物であり、さらに乳酸菌の持つ健康的意義に強い関心が寄せられている。本研究では、乳酸菌由来の機能性に密接な関係がある糖質関連酵素や蛋白質分解酵素に注目し、それら酵素類に特徴のある乳酸菌の分離を行う。

本年度は、乳酸菌所有株の充実を目的に白神土壌をはじめとする自然界や市販食品から乳酸菌の分離方法を検討した。また特に抗菌活性を有する乳酸菌の単離に重点を置き、機能性評価法の確立を目的とした。

2. 方法

培地：Lactobacilli MRS Broth (DIFCO社製)を基本培地として使用し、必要に応じてトマトジュース濾過上清、寒天、炭酸カルシウム、スキムミルクを添加した。

乳酸菌の分離にはサンプリング後1週間以内の白神土壌や市販食品を試料とした。寒天と炭酸カルシウムを加えた基本培地に試料を添加し、30℃、1? 3日間培養を行った。寒天中にクリアゾーンを形成した菌体を単離した後、カタラーゼ活性を測定し、グラム染色とそれに続く顕微鏡観察により選抜した。

抗菌物質生産菌のスクリーニングは分離した乳酸菌の培養上清を試料とし、ペーパーディスク法、アガーウェル法で行った。表1にあげた複数の検定菌を上層寒天に混釈し、平板培地上で固化した。

プロテアーゼ生産菌は分離した乳酸菌を、寒天とスキムミルクを加えた基本培地にて穿刺培養し、生成したクリアゾーンから判別した。

3. 成果の概要

初年度につき、乳酸菌所有株の増加が第一の目的であった。そこで春、夏に白神山地より採取した土壌2071点や市販食品から乳酸菌の分離を試みた。

その結果、白神土壌より116株(表2)、市販食品30点より110株の乳酸菌と思われる酸生産菌を得た。しかし、土壌2071点より得られた酸生産菌数が116株と少なかった。その理由として、分離方法が不適切であった、土壌に乳酸菌が少なかった、等が考えられた。しかしながら、同様の方法にて行った市販食品からの分離は分離数に問題がなかったことから、白神土壌中に乳酸菌が少なかったためと考えられた。

得られた酸生産菌について抗菌物質生産菌のスクリーニングを試みた。その結果、白神土壌より球菌1株(No. 1527株、図1)、また市販食品から3株の抗菌物質生産菌を取得した。

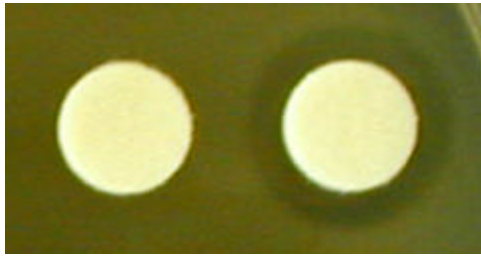


図1 No. 1527株培養上清により生じた
阻止円(右)
検定菌はLb. sake IF03541

表1 抗菌活性検出に用いた検定菌

Lactobacillus sake	IF03541
Lb. brevis	IF012005
Leuconostoc mesenteroides	IF01066
Leu. mesenteroides	IF01068

表2 白神土壌由来乳酸菌

土壌No.	採取時期	酸生産菌分離数	グラム染色	カタラーゼ	芽胞
1~630	2001年 秋(冷蔵保存したもの)	9株	全て(+)	全て(-)	無し
631~1410	2002年 春	34株	全て(+)	全て(-)	2株
1411~2071	2002年 初夏	73株	全て(+)	全て(-)	無し

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

白神土壌から分離した乳酸菌が少数であることから、分離源とする土壌に幅を持たせる
必要があり、次年度も引き続き乳酸菌の分離を行う。

その他の機能性評価法を確立するとともに、すでに確立したスクリーニング方法を基に
選抜試験を行う。

今年度取得した抗菌物質生産菌の抗菌物質について検討を行う。

5. 結果の発表、活用等

特許出願：1件

[発明の名称]低温感受性酵母と抗菌物質産生乳酸菌を併用した発酵食品及びその製造方法
[概要] 米と米麹を使用した食品、おから、キムチ、ぬか床などの賞味期限延長技術と製造
方法など。

学会発表：1件

日本農芸化学会2003年度大会「Enterococcus faecalis NFRI 7400株の生産する抗菌物質」
(発表予定)

(備考) 本年度10 - 12月の3ヶ月間、食総研・酵母研究室・川本伸一先生の下へ依頼研究員
として派遣された。「豆乳ヨーグルトに適したバクテリオシン生産菌のスクリーニング」
を研究テーマとし、乳酸菌の作るバクテリオシンの精製方法、検出方法、食品への利用方
法などを習得した。

研究課題名 温度感受性酵母の特性解明

予算区分：**県単** 国庫 委託

担当研究室：生物機能部門

生物機能第一担当

研究期間：**継**・中

平14年度(平14～15年度)

担当者：高橋慶太郎

協力・分担関係：

食品開発部門食品工学担当 秋山美展

応用発酵部門発酵食品担当 渡辺隆幸

(共同研究)小玉醸造株式会社

1. 目的

味噌製造においては発酵終了後も醸造用酵母が生存しているため、そのまま製品化すると酵母による炭酸ガス発生があり商品価値を著しく低下させる。そのため加熱による殺菌処理・エチルアルコール等の薬剤による静菌処理が行われている。前者は加熱により品質の劣化が激しく秋田味噌のような味噌では使用できない。また、後者では添加薬剤による風味の変化や消費者より要望の高い無添加味噌では利用できないなど問題が多い。近年、産業利用されている微生物においては環境・エネルギー対策として各種のストレスに対し感受性の高い、あるいは低い(耐性の高い)微生物の育種が盛んとなっている。そこで、既に取得した温度感受性自己消化味噌醸造用酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* を対象とし、この温度感受性機構を分子生物学的に解明する。それをもとに、常温流通可能な無添加味噌の商品化を計り、さらに製品の高度利用を目的とした。

今年度は、処理味噌と市販味噌との差別化のための検討を行った。

2. 方法

国内各地で製造された無添加表示等の味噌12点を供試試料とし、酵母生菌数並びに30 保存試験及び保存後の生菌数・糖の変化を測定した。

3. 成果の概要

供試試料は、静菌・殺菌処理をしていない生味噌表示のものでも生菌数は 10^2 /g未満と少なかった。また、エチルアルコールによる静菌処理をした味噌も生菌数は同様であった。これは、供試味噌が製造日より日数が経過しているためと考えられた。さらに、30・14日間保存後の生菌数の増加及びガス発生は12点とも観察されなかった。また、グルコースは保存中に5～40%減少した。

これらのことは、製品中に生存していた酵母は強いストレス負荷の状態であり、供試試料の製造メーカーは比較的大規模の企業であることから発酵熟成が十分であったためと予想された。

温度感受性酵母とジュール加熱を組み合わせた、今回の開発技術は同様のストレス負荷を微生物と環境の両面から積極的かつ計画的に行うもので、その有効性が確認された。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

既存の生味噌製品との差別化のため今後、消費者嗜好の動向を同時に調査する必要がある。

5. 結果の発表、活用等

特開2000-245381 「温度感受性酵母を用いた味噌及びその製造方法」

研究課題名：担子菌類のタンパク質分解酵素の特性解明とその応用	
予算区分：県単	担当研究室：生物機能部門 生物機能第二担当
研究期間：継 平14年度(平14~16年度)	担当者：樋渡一之、堀一之、高橋砂織 協力・分担関係：なし

1. 目的

これまで食品加工に用いられてきたプロテアーゼは様々なものが知られているが、それらは微生物由来のものが中心である。しかし、同じ微生物でありながら担子菌類(キノコ類)由来のプロテアーゼが食品産業で用いられた例は少ない。そこで本研究課題では、秋田県内で生育・栽培される食習慣のある担子菌類から食品加工等に有用なプロテアーゼを単離し、その特性を解明することを目的とする。また、その応用として、単離した新規酵素類を用いて機能性食品等の開発を目指すものである。

今年度は、秋田県内で生育・栽培されている食習慣のある担子菌類のプロテアーゼについて基礎的なデータを得ることを目的として、担子菌の子実体を持つ各種のプロテアーゼ活性を測定した。その結果および強いプロテアーゼ活性を持つことが知られていることなどからマイタケ(*Grifola frondosa*)に注目し、マイタケが持つアミノペプチダーゼを精製してその酵素の諸性質について検討を行った。

2. 方法

1) プロテアーゼ活性による担子菌のスクリーニング

秋田県内で生育・栽培されている食習慣のある担子菌類38種(栽培9種、天然24種)の子実体をホモジナイズし、その遠心上清を酵素溶液として各種プロテアーゼ活性を測定した。

2) マイタケ由来アミノペプチダーゼ(GfPAP)の精製と諸性質

マイタケ子実体をホモジナイズして硫酸濃縮した後、DEAE-Sepharose CL₂B、Butyl-Toyopearl 650M、Sephacryl S-100 HR、Mono-Qの4段階のカラムクロマトで精製した(図1a)。精製した酵素標品を用いて酵素の特性を検討した。

3. 成果の概要

1)スクリーニング結果を表1に示した。中性プロテアーゼではハタケシメジやシモコシ、酸性プロテアーゼではヤマブシタケやスギヒラタケ、プロリルアミノペプチダーゼではアマタケ、ホンシメジやマイタケが高い活性を示した。ハタケシメジとスギヒラタケが強い凝乳活性を持っていた。

2)電気泳動的に単一の酵素標品を得た(図1b)。本酵素は、中性領域に比較的幅広い至適pHを持ち(図2)、Pro-pNAに対して高い特異性を示した(表2)。各種酵素阻害剤の影響を検討した結果、本酵素がPCMBやヨード酢酸によって阻害されたことからチオールプロテアーゼであることが示唆された(表3)。分子量はSDS-PAGEで33 kDa、ゲル濾過で58 kDaと求められたことから、本酵素は二量体と推定された。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

- ・プロテアーゼ活性による担子菌のスクリーニングの継続
- ・GfPAPの特性解明と構造解析
- ・担子菌プロテアーゼの食品加工への応用に関する基礎検討
- ・新たな食品加工関連酵素の精製と特性解明

表 1 各種担子菌抽出液のプロテアーゼ活性

単位は全て Unit/ mg protein

種名	学名	中性 プロテアーゼ	酸性 プロテアーゼ	プロリル アミノペプチダーゼ	グルタミン アミノペプチダーゼ	凝乳活性
<栽培>						
ヒラタケ	Pleurotus ostreatus	+	+	++	+	-
エリンギ	Pleurotus eryngii	+	+	++	+	-
シイタケ	Lentinula edodes	+	+	++	+	-
ブナシメジ	Hypsizygus marmoreus	++	+	++	+	+
エノキタケ	Flammulina velutipes	+	+	+	+	-
ナメシ	Pholiota nameko	++	+	++	+	+
ヤマブシタケ	Hericium erinaceum	+	++	++	+	+++
マイタケ	Grifola frondosa	++	+	++	+	+
マンネンタケ	Ganoderma lucidum	+	+	+	-	+++
<天然>						
ヒラタケ	Pleurotus ostreatus	++	+	++	-	-
キノメリガサ	Hygrophorus lucorum	+	+	+	+	-
フユヤマタケ	Hygrophorus hypothecus F. pinetorum	+	+	+	+	-
ハタケシメジ	Lyophyllum decastes	+++	+	+	+	++++
ホンシメジ	Lyophyllum shimeji	+	+	+++	+	+
ムラサキシメジ	Lepista nuda	++	+	+	+	++
シロシメジ	Tricholoma japonicum	+	+	++	+	-
シモコシ	Tricholoma auratum	++	+	+	+	-
シモフリシメジ	Tricholoma portentosum	++	+	+	+	-
ハマシメジ	Tricholoma myomyces	+	+	++	+	-
ナラタケ	Armillariella mellea	+	+	+	+	-
スギヒラタケ	Pleurocybella porrigens	+	++	+++	-	++++
ムキタケ	Panellus serotinus	+	+	++	+	-
エノキタケ	Flammulina velutipes	+	+	++	+	-
コガネタケ	Phaeolepiota aurea	+	+	++	+	-
クリタケ	Naematoloma sublateralitium	+	+	+	+	-
ナメシ	Pholiota nameko	++	+	++	+	++
ヌメリササタケ	Cortinarius pseudosalor	+	+	+	-	-
アマタケ	Suillus bovinus	+	+	+++	-	+
アカハツ	Lactarius akahatsu	+	+	++	+	-
ハツタケ	Lactarius hatsudake	++	+	++	+	+++
ヤマブシタケ	Hericium erinaceum	+	+	+	-	+++
ブナハリタケ	Mycoleptodonoides aitchisonii	++	+	++	+	+++
マイタケ	Grifola frondosa	++	+	+++	+	+

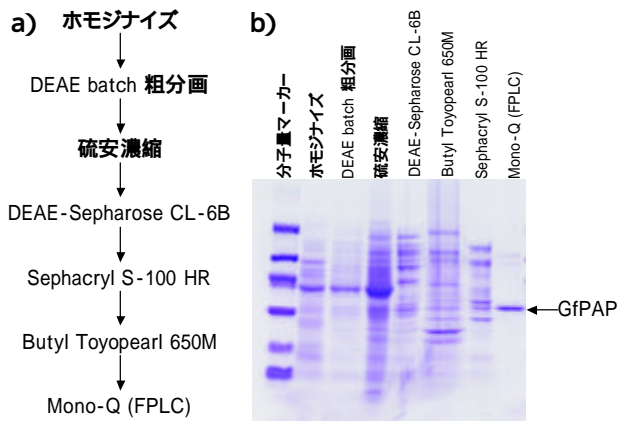


図 1 GfPAPの精製とSDS - PAGE

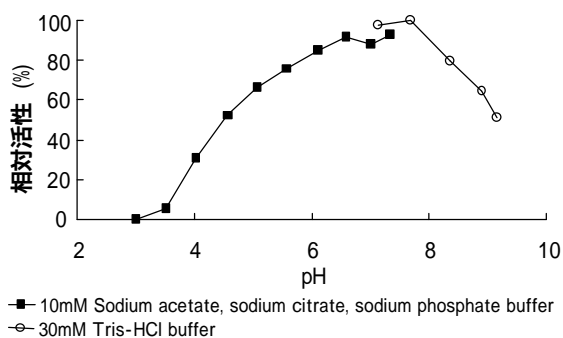


図 2 GfPAP活性に及ぼす pHの影響

表 2 GfPAPの基質特異性

基質	相対活性(%)
Pro-pNA	100
Ala-pNA	36.2
Leu-pNA	4.4
Glu-pNA	3.4
Val-pNA	2.4
Lys-pNA	1.8

表 3 GfPAP活性に及ぼす酵素阻害剤の影響

阻害剤	終濃度	残存活性 (%)
なし		100
EDTA	5 mM	103
1, 10-Phenanthroline	5 mM	87
PMSF	5 mM	42
	1 mM	81
	0.1 mM	96
DFP	5 mM	94
PCMB	1 mM	3
	0.1 mM	52
NEM	5 mM	70
	1 mM	89
	0.1 mM	97
IAA	5 mM	18
	1 mM	31
	0.1 mM	90
Pepstatin A	10 ug/ ml	96
Amastatin	10 ug/ ml	93
Arphamenine A	10 ug/ ml	24
	1 ug/ ml	66
	0.1 ug/ ml	85
Antipain	10 ug/ ml	91

5. 結果の発表、活用等

- 1) マイタケ子実体形成に伴うプロテアーゼの動態について
樋渡一之、加賀屋明良、井上俊三、高橋慶太郎、高橋砂織
日本農芸化学会2002年度大会(仙台市)
- 2) マイタケ由来プロリルアミノペプチダーゼの精製と諸性質
樋渡一之、加賀屋明良、井上俊三、高橋慶太郎、高橋砂織
日本農芸化学会2003年度大会(神奈川県藤沢市)発表予定

**研究課題名 県産農水産物の新規分析評価技術の開発と応用(その1)
ポータブル近赤外分光装置による製粉穀類の品質評価**予算区分：県単 国庫 委託

担当研究室：食品開発部門食品加工担当

研究期間：継・中

担当者：熊谷昌則、大久長範

平14年度(平13~15年度)

協力・分担関係：秋田大学工学資源学部
小川信明**1. 目的**

食品の品質向上や新規食品の開発を行うためには、その品質を正しく評価することが求められる。そこで本研究では、県産農水産物の新規分析評価技術の開発と応用を行う。昨年度は、近赤外分光法をそば粉の品質評価に適用できることを示したが、今年度は製粉穀類の近赤外スペクトルから、試料構成成分に係わる化学情報を抽出するためのスペクトル処理法について検討し、数学的・統計学的見地のみならず、分析化学の見地から近赤外分光法を定性、定量分析法として確立するための基礎検討を行った。ここでは、これらの成果のうち、産業界に応用が可能なものを中心に紹介する。

2. 方法

近赤外スペクトルは、昨年度と同様にポータブル型近赤外分光装置の PlaScan-SH (オプト技研製) を用いて測定した。製粉穀類の検体は、秋田県産を含むそば粉4種類と、麵用小麦粉5種類で、さらにこれらを所定の割合で混合して調製した混合モデル試料を加えた計89種類を測定サンプルとした。加工品の検体は、稲庭うどん22種類の乾麺であり、麺のままのもの(麺状)と、比較のため麺を粉碎したもの(粉状)を測定サンプルとした。

3. 成果の概要

そば粉には、割粉としてのつなぎ用小麦粉が混合されているものがある。昨年度は、そば粉と小麦粉の近赤外スペクトルは非常によく似ているが、両者を判別することができることを示した。今年度は、近赤外スペクトルにより両者の混合物からそば粉配合量を推定できる(図1)ということがわかった。スペクトルを詳細に検討した結果、この推定にはでんぷんやたんぱく質の化学構造に帰属される波長が寄与していることがわかった。このように近赤外スペクトルはそば粉や小麦粉の判別に用いることが可能で、製粉、製麺業者などの原料管理に役立てることができる。

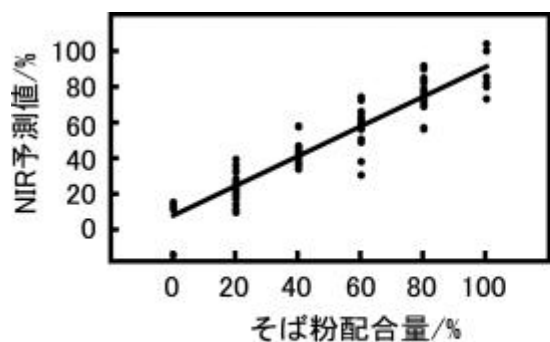
稲庭うどんに関しては、図2および表1に示すように、近赤外スペクトルから一般化学成分(水分、たんぱく質、炭水化物、脂質、灰分)が、しかも麺状のまま、わずか数秒の測定で定量できることがわかった。さらに製品中の水分と一般生菌数が比例する(図3)こともわかり、とりわけ水分がそのまま定量できるということは、乾燥工程をモニタリングすることができるため、稲庭うどんの品質安定化に大いに役立つものと期待される。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

近赤外分光法による非破壊・迅速測定の適用の場を他の農水産物にも拡大するための検討を継続して行う。

5. 結果の発表、活用等

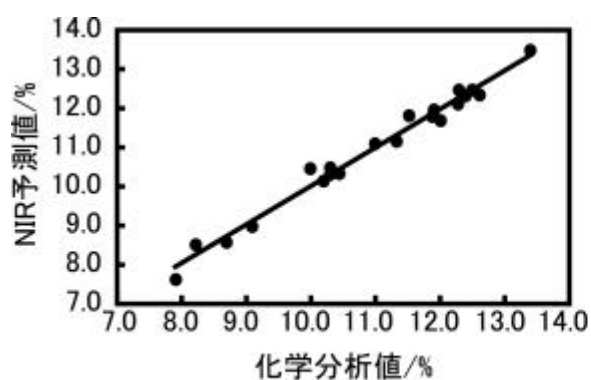
- [1] 熊谷, 軽部, 松浦, 佐藤, 大久, 天野, 菊地, 小川, 日本分析化学会第51年会講演要旨集, p24(2002).
- [2] M. Kumagai, K. Karube, T. Sato, N. Ohisa, T. Amano, R. Kikuchi, and N. Ogawa, *Anal. Sci.*, 18, 1145(2002).
- [3] 熊谷, 松浦, 李, 佐藤, 菊地, 大久, 小川, 秋田大学サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー研究成果発表会(2003.2.14)



波長/nm	帰属
λ 1 1864	OH str. + 2×CO str. (starch)
λ 2 2137	NH str. + CO str. (amino acid)
λ 3 1383	2×CH str. + CH def. (CH ₂)
λ 4 1984	NH asym.str. + amide II (protein)

$$\text{そば粉配合量(NIR予測値/\%)} = -631 + 1226 \times (A_{\lambda 1}) - 547 \times (A_{\lambda 2}) - 1263 \times (A_{\lambda 3}) - 971 \times (A_{\lambda 4})$$

図 1 そば粉・小麦粉混合物中のそば粉配合量の定量と波長の帰属



波長/nm	帰属
λ 1 1991	2×OH def. + CO def. (H ₂ O)
λ 2 2042	NH sym.str. + amide II (CONH)
λ 3 1408	2×CH str. + CH def. (CH ₂)
λ 4 2214	CH str. + CO str. (CHO)

$$\text{水分(NIR予測値/\%)} = 20.13 + 8.81 \times (A_{\lambda 1}) - 4.82 \times (A_{\lambda 2}) - 7.99 \times (A_{\lambda 3}) - 7.41 \times (A_{\lambda 4})$$

図 2 稲庭うどんの水分の定量と波長の帰属

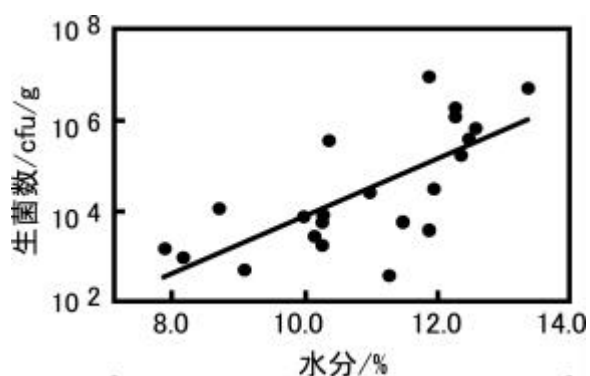


図 3 稲庭うどんの水分と生菌数の関係

表 1 稲庭うどん化学成分の予測精度

化学成分	R ²
水分	0.98
たんぱく質	0.71
炭水化物	0.69
脂質	0.79
灰分	0.82

研究課題名 県産農水産物の新規分析評価技術の開発と応用(その2)**味覚センサによる市販塩の品質評価**予算区分：県単 国庫 委託

担当研究室：食品開発部門食品加工担当

研究期間：継・中

担当者：熊谷昌則

平14年度(平13~15年度) 協力・分担関係：秋田県立大学生物資源科学部
石川匡子、松永隆司**1. 目的**

平成9年に塩の専売制が緩和されて以来、国内各地で地先の海水を原料とする食塩の製造販売が行われるようになった。これらは「自然塩」や「天然塩」として食品素材の地域性や健康面での優位性をアピールしているものが多い。現在、秋田県内においても同様の塩が製造されている。本研究では、市販塩の品質を評価するために味覚センサを用いて、その化学組成ならびに官能評価との関係を調べることを目的とした。

2. 方法

市販塩30種を用いて、味認識装置SA402(アンリツ(株);現在は(株)インテリジェントセンサテクノロジーが製造販売)により8種類の味覚センサ応答パターンを測定した。化学組成については、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 Fe^{2+} をキャピラリー電気泳動法で測定した。官能評価はNaCl濃度が1.2%の希釈溶液を調製し、パネル15名が塩味、苦味、渋味、くどさ、まろやかさの強弱を5点法で採点した。なお、化学組成の分析ならびに官能評価は県立大学によって実施された。

3. 成果の概要

図1に試料の味覚センサ応答パターンを示す。これに、化学組成ならびに官能評価値を加えたデータに主成分分析を行い、図2に示すような主成分スコアプロットを得た。図中には因子負荷量の大きさと方向を矢印で同時に示した。主成分1は正側でSensor1~4ならびに Ca^{2+} 、 Mg^{2+} と関係があり、これらは苦味や渋味に影響していることがわかる。逆に負側では Na^+ 、 Cl^- と関係があり、これらは塩味やまろやかさに影響していることがわかる。主成分2については、Sensor5,6,8と関係があるが、これらは本実験で求めた化学組成や官能評価値だけではわからない味の違いを味覚センサがとらえているものと考えられる。特に、試料No.3、30、27、24の群と試料No.14、20の群は、他の試料群と味覚センサ応答パターンが異なっており、これらに着目した検討が必要である。このように、味覚センサ応答パターンは、新たな観点から市販塩の品質を細分化して評価できる可能性がある。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

これらの結果はデータベース化し、秋田県内で製造販売されている市販塩との比較を行う予定。また、Sensor5,6,8については、どのような化学成分が影響し、さらにそれが官能特性にどのようにあらわれているか引き続いて検討する。

5. 結果の発表、活用等

- [1] 石川,張,陳,松永,熊谷,日本海水学会講演要旨集, p33 & 57 (2002).
- [2] 石川,熊谷,陳,張,松永,日本海水学会誌, 56, 440 (2002).

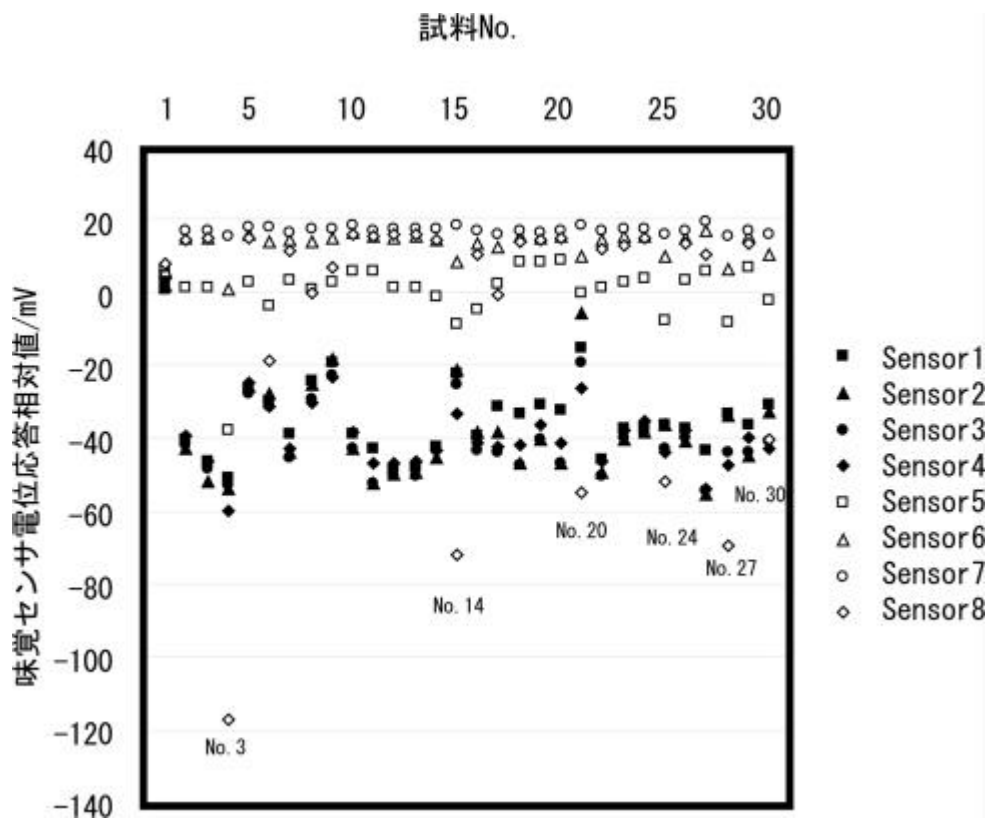


図 1 市販食塩30種の味覚センサ応答パターン

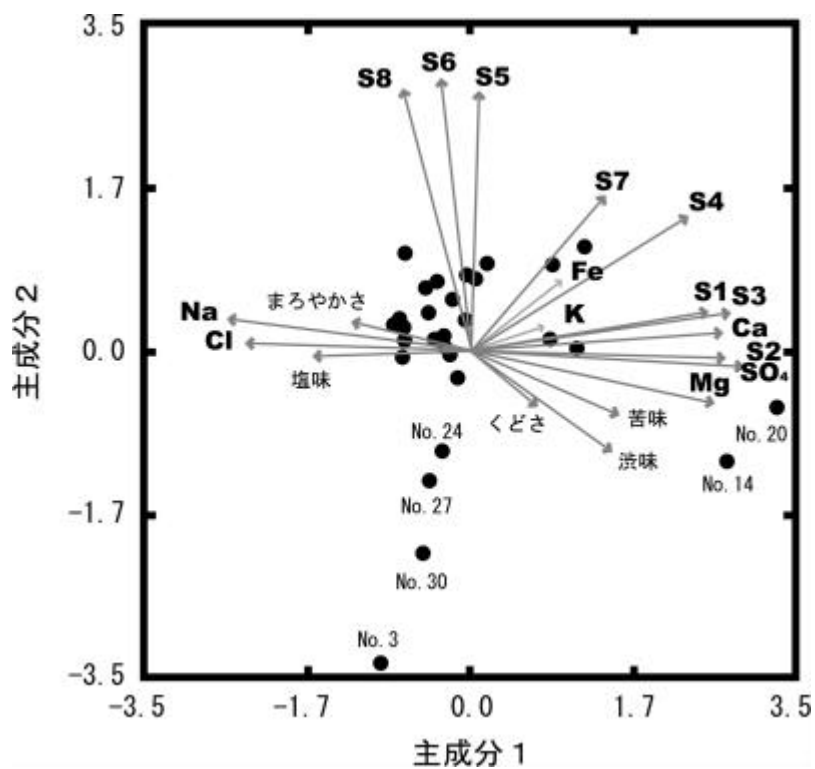


図 2 味覚センサ応答パターンと成分組成および官能評価の関係
主成分スコアプロット(●)と因子負荷量(矢印)

研究課題名 糖代謝系制御によるストレス耐性酵母の育種

予算区分：**県単** 国庫 委託

担当研究室：生物機能部門生物機能第一担当

研究期間：継・中

担当者：高橋慶太郎

平14年度(平12～14年度) 協力・分担関係：

1. 目的

現在、清酒酵母に要求されている特性の一つに各種ストレスに対する耐性の向上がある。Saccharomyces cerevisiae の実験室株(ハプロイド)において、貯蔵性糖質の一つであるトレハロースの代謝系を改変することにより冷凍耐性・耐久性の向上が認められている。また、この代謝系を制御することによりアルコール耐性が増大することも知られている。本研究では、清酒用酵母の交配用として、既にそのハプロイド株の選抜を終了している自然界より分離した高トレハロース蓄積・高冷凍耐性酵母(KD-003株)を使用して清酒醸造用酵母としての最適なトレハロース代謝系の検討とその代謝系を有する酵母の作出を目的とした。

14年度は、急速に増加している県内産小麦の生産に対応する新規な需要開拓が早急に求められていることから、KD-003株の低タンパク質小麦での良好な製パン適性と高冷凍耐性を利用した、県内産小麦を原料とする冷凍生地製パン法の開発を目的とした。

2. 方法

KD-003株の最適な冷凍前発酵条件を液体モデル培地で検討した。さらに、実際のパン生地を使用した各種冷凍生地製パン法の検討を行った。分析には、アミログラフ・ドウグラフ・ファーモグラフ等の機器を使用した。

3. 成果の概要

通常冷凍生地製パン法においては、冷凍前の発酵時間が長くなるに従い酵母菌体内のトレハロース含量が低下するため、酵母の冷凍耐性が低くなることが知られている。そのため、現在の冷凍生地でのパン作りは直捏製パン法による成型後冷凍が主流となっている。また、通常のスクラッチ製パン法では、製パン企業においては作業性・品質より中種法による製パンが行われている。

KD-003株を液体モデル培地で発酵させ、その後冷凍・解凍後の生存率及びトレハロース含量を観察したところ図1に示したように、KD-003株では冷凍前の発酵時間及び状態に係わらず生存率は100%であり、通常の冷凍生地用酵母とは大きく異なることが観察された。また、菌体内のトレハロース含量は発酵開始と同時に消費されるが、3%まで低下した後再び蓄積が開始され、中種製パン法の発酵時間である8時間後には10%以上まで回復することが判明した。この結果より、KD-003株を使用した冷凍生地製パン法では、高品質な製パン法でありながら、これまで用いることができなかった中種法による冷凍生地製パン法が利用可能であることが明らかとなった。

小麦粉への加糖量を0～20%とした実際のパン生地を使用した冷凍生地試験では、加糖量が多いほど冷凍による発酵阻害は抑制された。解凍後に糖をさらに5%添加した系での検討により、この現象は糖による凍結からの保護効果ではなく、解凍後の酵母の糖取り込み易さが影響していると考えられた(図2)。

これらの結果及び県内産小麦の成分・物性分析結果より、1%加糖中種法で製パンを行い、成型前後に冷凍する冷凍生地製パン法を組み立て、ライン試験を行ったところ2ヶ月間安定な冷凍生地が製造可能なことが確認された。

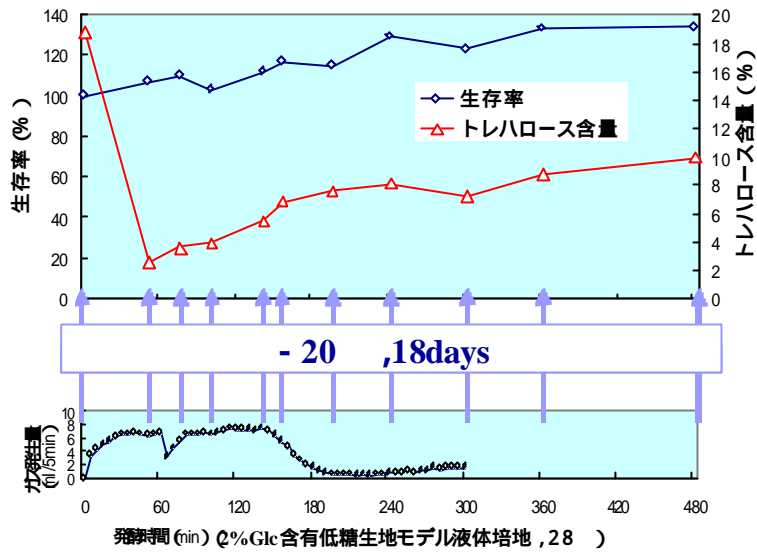


図1 冷凍前発酵時間と酵母生存率

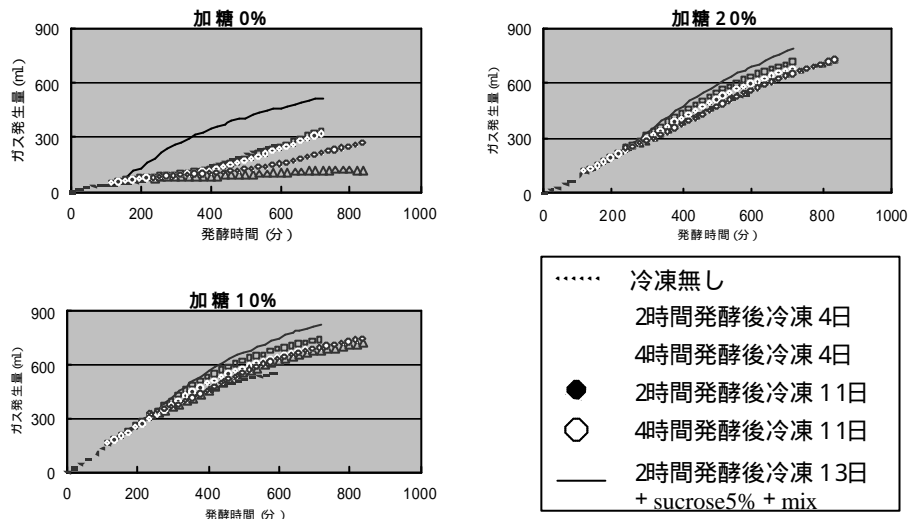


図2 冷凍パン生地の前発酵時間と糖濃度の影響 (30 でのガス発生量変化)

4. 今後の問題点

- 試験研究推進上の残された問題点
 - 小麦粉品質変動に対する対処方法
 - 必要な協力関係
 - 農政部関連部所

5. 成果の発表、活用等

- 日本放線菌学会 2002 年度大会
 - 「世界遺産白神山地から分離した酵母の特性解明とその利用」
- 日本農芸化学会 2003 年度大会
 - 「デンプン粒子が製パン性に及ぼす影響」(発表予定)

尚、本研究の一部は総合食料対策事業(平成14年度農林水産省委託研究)として行われた。

研究課題名 糖代謝系制御によるストレス耐性酵母の育種

予算区分：**県単** 国庫 委託

研究期間：平成12～14年度

担当研究室：生物機能部門生物機能第一担当

担当者：高橋慶太郎

協力・分担関係：

1. 目的

現在、清酒酵母に要求されている特性の一つに各種ストレスに対する耐性の向上がある。Saccharomyces cerevisiae の実験室株（ハプロイド）において、貯蔵性糖質の一つであるトレハロースの代謝系を改変することにより冷凍耐性・耐久性の向上が認められている。また、この代謝系を制御することによりアルコール耐性が増大することも知られている。本研究では、清酒用酵母の交配用として、既にそのハプロイド株の選抜を終了している自然界より分離した高トレハロース蓄積・高冷凍耐性酵母（KD-003株；白神こだま酵母）を使用して清酒醸造用酵母としての最適なトレハロース代謝系の検討とその代謝系を有する酵母の作出を目的とした。また、急速に増加している県内産小麦の生産に対応する新規な需要開拓が早急に求められていることから、KD-003株の低タンパク質小麦での良好な製パン適性と高冷凍耐性を利用した、県内産小麦を原料とするスクラッチ製パン法（生地非冷凍製パン法）及び冷凍生地製パン法の開発を併せて行った。さらに、本株の有する高乾燥耐性を利用した乾燥品の開発も検討した。

2. 方法

- 80 ~ + 30 でKD-003株を一年間保存し、プレート計測法により生存率を求めた。また、乾燥した同酵母を4 一年間保存した際の残存発酵力及び生存率を測定し乾燥耐性を観察した。本株の湿菌体及び乾燥菌体を使用して、スクラッチ製パン法及び冷凍生地製パン法における最適な発酵条件を液体モデル培地で検討した。さらに、実際のパン生地を使用した両製パン法の条件検討を行った。分析には、アミログラフ・ドウグラフ・ファームグラフ等の機器を使用した。

3. 成果の概要

KD-003株を - 80 ~ + 30 で一年間保存した結果、- 30 以下の冷凍では一年後も生存率は100%を示し、冷凍ストレスに対し耐性が非常に高いことが確認された。しかしながら、- 20 の冷凍では一年後の生存率は86%であることよりこの凍結状態では何らかの生命活動が行われていることが示唆された。また未凍結の- 2 以上の保存では温度が高くなるに従い急速に死滅していくことが観察された。乾燥耐性は非常に高いことが確認された。冷凍耐性試験における- 20 での一部菌体の死滅及び乾燥耐性試験における生存率より残存発酵力が高いことは、本株は菌体自体が高いストレス耐性を有するとともに、その菌体内の各種酵素もそれ以上のストレス耐性を有すると考えられた。

直捏製パン法においてKD-003株を使用し、秋田県の認定小麦品種であるハルイブキを配合することにより蛋白質含量8.5%以上の混合粉であれば熟練を要せずに製パンが可能であることが示された。また中種製パン法においてもKD-003株とハルイブキの使用により8.1%以上の蛋白質含量に混合した小麦粉であれば、グルテン増強剤等の添加無しで良好な機械耐性を示しラインを使用した製パンができることが確認された。この結果は、蛋白質含量が低い小麦粉でもKD-003株を使用し、さらにハルイブキをブレンドすることにより製パン原料として使用可能なことを示しており、これまで低蛋白質含量のため製パンへの利用が低かった製麺用小麦品種ネバリゴシ・ナンブコムギ等の製パン原料化が可能となった。図1に確立した製パン方法の概略を示した。

この研究過程での小麦分析により、国内産小麦の製パン適性はそのタンパク質含量との相関が低いことが観察された（図2）。

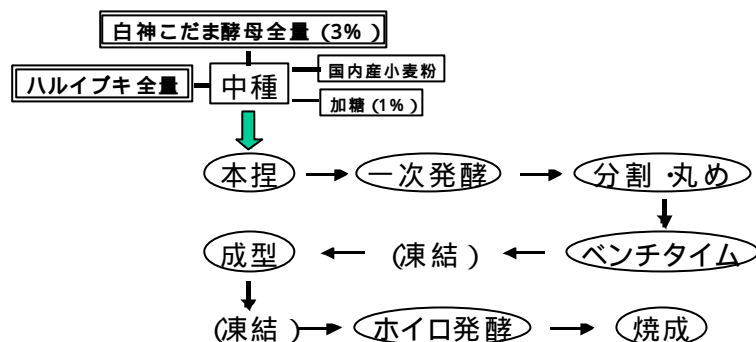


図1 県産小麦・白神こだま酵母を原料とする(冷凍生地)製パン法

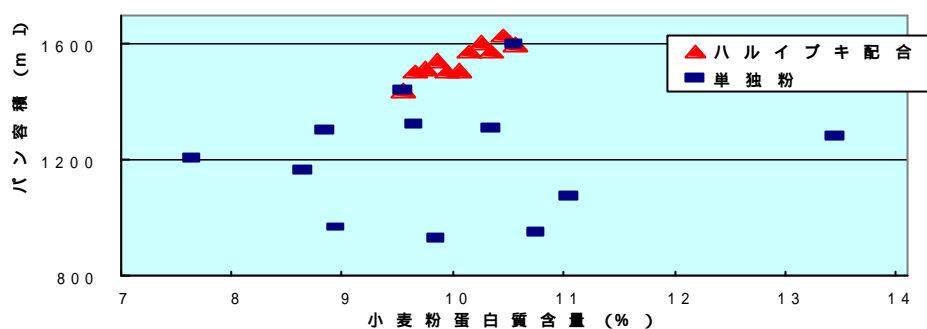


図2 パン容積と小麦タンパク質含量との相関

4. 成果の活用面と留意点

成果の受け渡し

- ・白神こだま酵母の秋田県内外の製パンへの普及（白神こだま酵母友の会）
- ・白神こだま酵母の秋田県内学校給食への導入（秋田県学校給食会）
- ・秋田県産小麦の製パン原料化（製パン企業・秋田県学校給食会）
- ・白神こだま酵母ドライの開発（秋田十條化成・秋田サラ白神）

研究成果の公表

- ・平成12年度国内産麦技術情報交換会
「国内産小麦の高ストレス耐性野生酵母利用による製パン技術の開発」
- ・平成13年度国内産麦技術情報交換会
「国内産小麦の高ストレス耐性野生酵母利用による製パン技術の開発」
- ・日本農芸化学会2002年度大会
「高ストレス耐性野生酵母とその利用」
- ・日本放線菌学会2002年度大会
「世界遺産白神山地から分離した酵母の特性解明とその利用」
- ・日本農芸化学会2003年度大会
「デンプン粒子が製パン性に及ぼす影響」

その他、秋田県内外における製パン及び小麦に関する講演会等

5. 残された問題点とその対応

白神こだま酵母の製パン以外への利用促進のため、新たな製品開発を進める必要がある。また、本酵母の特性をさらに引き出すことが求められており、このことは酵母のトレハロース代謝系の生物学的解明に繋がると期待される。

尚、本研究の一部は国内産麦新技術等研究開発事業（平成12・13年度食糧庁委託研究）、総合食料対策事業（平成14年度農林水産省委託研究）として行われた。

研究課題名：糖質関連酵素遺伝子を用いた新規酵母の育種	
予算区分： 国庫 委託	担当研究室：食品開発部門資源利用担当
研究期間：継・中	担当者：金子隆宏
平14年度(平12~14年度)	協力・分担関係：

1. 目的

- 「研究期間を通じての目的」 -

清酒酵母等のホストベクター系を用いて、場合によっては染色体DNAへのインテグレーションを行い、**実用株での蛋白発現及び生産の系を確立する**。必要に応じて、菌体外への分泌も試みる。

具体的には、Glucose Isomerase(GI)遺伝子を清酒酵母に導入し、もろみ発酵中に発現させることで、清酒中に残存するグルコースをフラクトースへと異性化し、清酒の甘味の質を改善することを試みる。

- 「本年度に実施した研究目的」 -

本年度は本酵素遺伝子の清酒酵母への導入を行った。その際、酵母菌体外への分泌を期待し、構造遺伝子上流にシグナルシーケンスを接合させたものも使用した。染色体DNAへの本酵素遺伝子のインテグレーションも試みた。実用酵母でのホストベクター系の確立のため、麹のGlucosyltransferase(Glc), Taka-amylase(TAA), B. maceransのCGTase(BMA)等も清酒酵母に導入した。

2. 方法

各amylase構造遺伝子(Glc, BMA, TAA)はPCR法でクローニングした。PCR-primerは依頼合成した。ポリメラーゼはKOD(東洋紡)を使用した。competent cellは大腸菌JM109またはHB101を用い自作した。制限酵素、その他試薬はおもに宝酒造社のものを使用した。GI活性はシステイン-カルバゾール-硫酸法で測定した。清酒酵母は協会901号他を用いた。培地はYPD(Blue-starch 0,2%)を使用した。酵母用発現ベクターはpAUR123(選択マーカー:AUR1-C、宝酒造)を一部改良して使用した。すなわち、本プラスミドのうち、酵母内での自律複製に關与するARS1及びCEN4部位を切除し、染色体組込型ベクターとして使用した。またS. pombeにはpAUR224を使用した。酵母へのDNA導入はGene Pulser(Bio-Rad)装置を用いてelectroporation法で行った。すなわち、酵母菌体を酢酸リチウム処理の後、gapが0.2cmのcuvetteを用いてpulse条件を1.5kV、25µF、200で形質転換をした。

3. 成果の概要

- 「昨年度までの成果の概要」 -

昨年度までに、秋田県内の土壌及び研究所保存菌株より**スクリーニング**を行い、放線菌*Streptomyces olivaceoviridis* E-86がGIを強力に生産することを見出した。本GIを**精製**し、その特性解析も行った。また本酵素が極めて高い耐酸性を示すことに着目し、異性化糖(ブドウ糖果糖液糖)の**新規製造方法を開発**した。さらには二段階PCR法にて本酵素の**遺伝子をクローニング**し、その**全塩基配列を決定**した。本遺伝子を**大腸菌で発現**し、**酵素の精製及び性質の検討**も行った。本遺伝子を*S. griseofuscus* S-41由来のGIと比較することにより、本酵素の特性に関して**分子レベルでの知見**を得た。得られたGI遺伝子からPCR-conjugation法を用い、それぞれ由来の異なるシグナルを接合した5種の**構造遺伝子を構築**した。これらDNAをelectroporation法で**酵母へ導入**したところ、aureobasidin耐性株が数株得られた。自律複製型プラスミドで $10^5/\mu\text{g}$ 、染色体組込型

プラスミドで $10^4/\mu\text{g}$ 程度の形質転換率であった。染色体組込型のうち、1/10株程度が二倍体双方に導入遺伝子を保持していた。

- 「本年度における成果の概要」 -

得られた形質転換酵母は何れもGI活性を示さなかった。またウエスタンブロッティングにおいても、GI酵素蛋白は免疫学的に検出されなかった。GI geneが脱落していないことはPCRで確認した。以上のことはK-701、*S.bayanus*、及び*S.pombe*でも同様であった。一方、BMA、Glc、TAAの各遺伝子は、K901(pAUR123)で発現したことから、ホスト-ベクター系は正常に機能していた。GC含量を比較すると、酵母染色体で40~47%mol、GI geneで71%molと、大きくことなっていることから、GI遺伝子が発現しないのは酵母とのCodon usageの差に起因すると推測された。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

Glc, BMA, TAA等の遺伝子での実用酵母の組換えは達成できた。ポイントミューテーションなど行えばGI遺伝子の酵母での発現も可能であろう。機会があれば検討してみたい。本研究では「3. 成果の概要」「5. 結果の発表、活用等」の通り、多くの成果を得た。当初の予定通り、本研究は本年度で終了とする。

5. 結果の発表、活用等

- ・平成13年度日本農芸化学会大会(京都立命館大学)口頭発表
「二段階PCR法による耐酸性グルコースイソメラーゼ遺伝子のクローニング及び大腸菌での発現」
- ・平成13年度日本食品科学工学会東北支部大会(秋田県庁第二庁舎)口頭発表
「放線菌由来耐酸性グルコースイソメラーゼを用いた異性化糖の新規製法の開発」
- ・平成13年度生命工学部会バイオテクノロジー研究会(産総研つくばセンター)
口頭発表
「二段階PCR法による耐酸性グルコースイソメラーゼ遺伝子のクローニング及び大腸菌での発現」
- ・平成13年度ライフサイエンス分野融合会議(産総研つくばセンター)ポスター発表
「二段階PCR法による耐酸性グルコースイソメラーゼ遺伝子のクローニング及び大腸菌での発現」
- ・"Characterization of Acid-stable Glucose Isomerase from *Streptomyces* sp., and Development of Single-step Processes for High-Fructose Corn Sweetener (HFCS) Production"
Biosci.Biotechnol.Biochem., 64(5),940-947,2000
- ・"Molecular Cloning of Acid-Stable Glucose Isomerase Gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by a Simple Two-Step PCR Method, and Its Expression in *Escherichia coli*"
Biosci.Biotechnol.Biochem., 65(5),1054-1062,2001

研究課題名：糖質関連酵素遺伝子を用いた新規酵母の育種	
予算区分： 県 国庫 委託	担当研究室：食品開発部門資源利用担当
研究期間：平成12～14年	担当者：金子隆宏
	協力・分担関係：

1. 目的

グルコースイソメラーゼ(GI)遺伝子を清酒酵母に導入し、もろみ発酵中に発現させることで、清酒中に残存するグルコースをフラクトースへと異性化し、清酒の甘味の質を改善する。

本課題を通して、清酒酵母など実用株でのホストベクター系を確立し、実際の食品製造での蛋白の発現及び生産に対応できる**技術**を確立する。

2. 方法

各構造遺伝子(GI、Glc、BMA、TAA)はPCR法でクローニングした。PCR-primerは依頼合成した。ポリメラーゼはKOD(東洋紡)を使用した。competent cellは大腸菌JM109またはHB101を用い自作した。制限酵素、その他試薬はおもに宝酒造社のものを使用した。GI活性はシステイン-カルバゾール-硫酸法で測定した。清酒酵母は協会901号他を用いた。培地はYPD(Blue-starch 0,2%)を使用した。酵母用発現ベクターはpAUR123(選択マーカー:AUR1-C、宝酒造)を一部改良して使用した。すなわち、本プラスミドのうち、酵母内での自律複製に関与するARS1及びCEN4部位を切除し、染色体組込型ベクターとして使用した。また*S.pombe*にはpAUR224を使用した。酵母へのDNA導入はGene Pulser(Bio-Rad)装置を用いてelectroporation法で行った。すなわち、酵母菌体を酢酸リチウム処理の後、gapが0.2cmのcuvetteを用いてpulse条件を1.5kV、25μF、200で形質転換をした。

3. 成果の概要

秋田県内の土壌及び研究所保存菌株よりスクリーニングを行い、放線菌*Streptomyces olivaceoviridis* E-86がGIを強力に生産することを見出した。本GIを精製し、その特性解析も行った。また本酵素が極めて高い耐酸性を示すことに着目し、異性化糖(ブドウ糖果糖液糖)の**新規製造方法を開発**した。さらには二段階PCR法にて本酵素の**遺伝子をクローニング**し、その**全塩基配列を決定**した。本遺伝子を**大腸菌で発現**し、**酵素の精製**及び性質の検討も行った。本遺伝子を*S. griseofuscus* S-41由来のGIと比較することにより、本酵素の特性に関して**分子レベルでの知見**を得た。得られたGI遺伝子からPCR-conjugation法を用い、それぞれ由来の異なるシグナルを接合した5種の**構造遺伝子を構築**した。これらDNAをelectroporation法で**酵母へ導入**したところ、aureobasidin耐性株が数株得られた。自律複製型プラスミドで $10^5/\mu\text{g}$ 、染色体組込型プラスミドで $10^4/\mu\text{g}$ 程度の形質転換率であった。染色体組込型のうち、1/10株程度が二倍体双方に導入遺伝子を保持していた。しかしながら得られた形質転換酵母は何れもGI活性を示さなかった。またウエスタンブロッティングにおいても、GI酵素蛋白は免疫学的に検出されなかった。GI geneが脱落していないことはPCRで確認した。以上のことはK-701、*S.bayanus*、及び*S.pombe*でも同様であった。一方、BMA、Glc、TAAの各遺伝子は、K901(pAUR123)で発現したことから、ホスト-ベクター系は正常に機能していた。GC含量を比較すると、酵母染色体で40～47%mol、GI geneで71%molと、大きくことなっていることから、GI遺伝子が発現しないのは酵母とのCodon usageの差に起因すると推測された。

4. 成果の活用面と留意点

< 研究成果の公表 >

- ・ 特許出願(特開平11-243954 出願日1998年3月3日)
「キシロースイソメラーゼ遺伝子を含む組換えDNA及びその組換えDNA断片を含む形質転換微生物」
- ・ 平成10年度日本農芸化学会大会(名古屋名城大学)口頭発表
「*Streptomyces olivaceoviridis* E-86由来のグルコースイソメラーゼの精製と性質」
- ・ 平成12年度日本農芸化学会大会(東京ビッグサイト)ポスター発表
「放線菌由来の耐酸性 glucose isomerase の性質及び異性化糖の新規製法の開発」
- ・ 平成13年度日本農芸化学会大会(京都立命館大学)口頭発表
「二段階PCR法による耐酸性グルコースイソメラーゼ遺伝子のクローニング及び大腸菌での発現」
- ・ 平成13年度日本食品科学工学会東北支部大会(秋田県庁第二庁舎)口頭発表
「放線菌由来耐酸性グルコースイソメラーゼを用いた異性化糖の新規製法の開発」
- ・ 平成13年度生命工学部会バイオテクノロジー研究会(産総研つくばセンター)
口頭発表
「二段階PCR法による耐酸性グルコースイソメラーゼ遺伝子のクローニング及び大腸菌での発現」
- ・ 平成13年度ライフサイエンス分野融合会議(産総研つくばセンター)ポスター発表
「二段階PCR法による耐酸性グルコースイソメラーゼ遺伝子のクローニング及び大腸菌での発現」
- ・ "Characterization of Acid-stable Glucose Isomerase from *Streptomyces* sp., and Development of Single-step Processes for High-Fructose Corn Sweetener (HFCS) Production"
Biosci.Biotechnol.Biochem., 64(5),940-947,2000
- ・ "Molecular Cloning of Acid-Stable Glucose Isomerase Gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by a Simple Two-Step PCR Method, and Its Expression in *Escherichia coli*"
Biosci.Biotechnol.Biochem., 65(5),1054-1062,2001

5. 残された問題点とその対応

Glc,BMA,TAA等の遺伝子での実用酵母の組換えは達成できた。ポイントミューテーションなど行えばGI遺伝子の酵母での発現も可能であろう。機会があれば検討してみたい。本研究では「3. 成果の概要」「4. 成果の活用面と留意点<研究成果の公表>」の通り、多くの成果を得た。当初の予定通り、本研究は本年度で終了とする。

研究課題名：県産米の品質向上に関する遺伝子工学的研究 - - - 良質米特異的遺伝子の解析とその育種への応用 - - -	
予算区分：県単	担当研究室：生物機能部門 生物機能第一担当
研究期間：継 平14年度(平10~14年度)	担当者：小笠原博信 協力・分担関係：なし

1. 目的

国内の米流通の多様化が進み、品質や食味が一層重視される中、「めんこいな」が秋田県の新奨励品種として登録され平成12年度産米から出荷され始めた。「めんこいな」は「ひとめぼれ」と「秋田39」から秋田県農業試験場が育種開発した新食感タイプの米で、流通、加工業界からも大きな関心が寄せられている。そこで、本研究では既に開発されているSTS(Sequence Tagged-Site)-PCR法による「あきたこまち」1粒品判別技術を応用して、「めんこいな」についても品種判別技術の開発と判別法の高精度化を行い、実用化への検討を行った。また、新規STSマーカー開発や判別マーカーに連動する機能遺伝子の検索等を目的として、昨年に充実してきたイネゲノム・データベースをもとに判別マーカーの相同性検索を再度行った。

2. 方法

- 1) 「めんこいな」判別用ARIF3マーカーについて、現場での実用化試験を行った。
 - ・ARIF3aマーカー(1220bp) : 「あきたこまち」グループ
 - ・ARIF3b1マーカー(1050bp) : 「めんこいな」グループ
 - ・ARIF3b2マーカー(740bp) : 「めんこいな」グループ
 遺伝子増幅装置：PCRサーマルサイクラーTP3000(タカラ)
 場所：秋田米特性分析センター
- 2) 国立遺伝学研究所のデータベースを用いてARIFマーカーの相同性解析を行った。

3. 成果の概要

- 1) ARIF3マーカーの分別STS-PCRについても、従来マーカーと同様に明確に増幅され、実用化が可能となった。(図1)
- 2) PCR感度が高く、増幅バンド強度の強い点から、ARIF3b1マーカー(1050bp)を「めんこいな」判別マーカーとして適用することとした。(図1,表1)
- 3) 相同性検索の結果、ARIF1はオオムギ(*Hordeum vulgare*) cDNAクローン、ARIF2とARIF4は「日本晴」の第1染色体DNA、およびARIF3は「日本晴」の第10染色体DNAの一部と相同性が高かった。また、ARIF5は未知のDNA配列であった。(表2)

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

「あきたこまち」等の良食味米特異的遺伝子は、「日本晴」の遺伝子を基本とするイネゲノム・データベース中には無い場合があるため、今後は判別マーカー周辺領域の遺伝子解析が必要と考えられる。

5. 結果の発表、活用等

- 1) JA全農あきたへの技術移転を行った。
- 2) 「秋田県奨励米DNA鑑定キット」と改名され、タカラバイオより供給されることとなり、今後の新奨励品種のDNA鑑定にも継続して使用可能である。(図2)
- 3) 平成14年6月より「めんこいな」DNA鑑定事業も開始され、鑑定マークの付いたパッケージで流通・販売されている。(図2)
- 4) ミニレビュー：小笠原：生物工学会誌，バイオメディア，80(8),342(2002)。

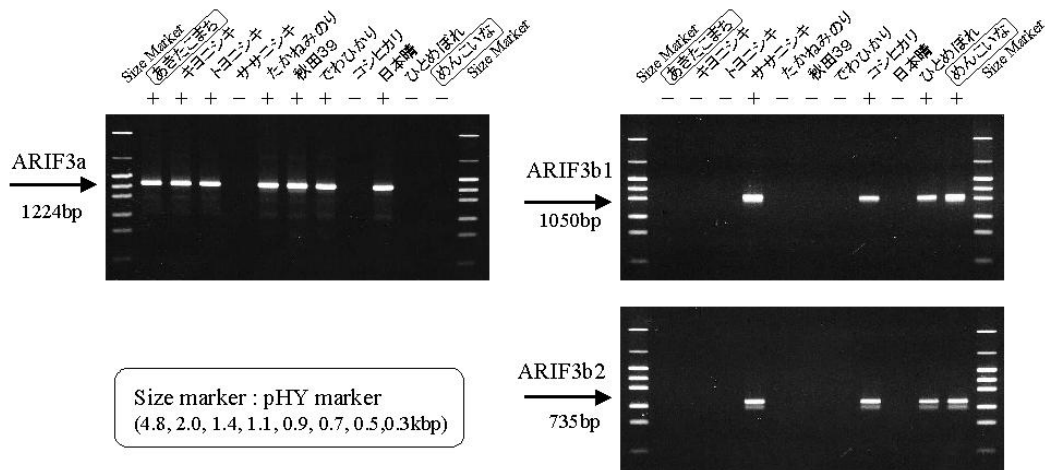


図1 A R I F 3 マーカーの分別 S T S - P C R

表1 めんこいな判別表

ARIF1	-
ARIF2	-
ARIF3a	-
ARIF3b	+
ARIF4	+
ARIF5	-



図2 「秋田県奨励米鑑定キット」と「めんこいな」DNA鑑定パッケージ

表2 A R I F 判別マーカーの相同性検索の結果

STS Markers	Homologous Sequence
ARIF1 (1662bp)	214bp(92%) : <i>Hordeum vulgare</i> cDNA clone
ARIF2 (1832bp)	1215bp(95%):putative rust resistant protein[Chr.1 genomic DNA] 804bp(83%):NBS-LRR like protein mRNA
ARIF3 (a:1503bp)	1503bp(99%):[Chr.10 genomic DNA] 337bp(94%):MITE element? promoter : Starch Branching Enzyme(RSBE1) Gene : β -1,3-Glucanase Precursor(Gns9)Gene
ARIF4 (1121bp)	1121bp(99%) :[Chr.1 genomic DNA] hypothetical protein similar to <i>A. thaliana</i> chr.5
ARIF5 (590bp)	None Unknown Sequence

研究課題名：県産米の品質向上に関する遺伝子工学的研究 - - - 良質米特異的遺伝子の解析とその育種への応用 - - -	
予算区分：県単	担当研究室：生物機能部門 生物機能第一担当
研究期間：平成10～14年	担当者：小笠原博信 協力・分担関係：なし

1. 目的

新食糧法施行等の規制緩和にともない米流通の多様化が進む中、品質と食味が一層重視されるようになった。米の品質保持の観点から、秋田県においても県産米の品種判別は重要な課題である。先に、RAPD法を用いたDNA鑑別法を応用し、「あきたこまち」をはじめとする県奨励7品種について品種判定技術を開発した。本研究では、DNA配列決定等、県産米の遺伝子解析を行うことにより、判定をより簡便、迅速かつ高精度に行える「あきたこまち」等の特異的判定技術を開発することを目的とした。さらに、「あきたこまち」等良食味米の品種特異的遺伝子の検索と解析を行うことは、高品質に寄与する要因を解明することにつながり、育種に及ぼす効果は大きいと考えられる。

2. 方法

- 1) RAPDマーカーの塩基配列決定と相同性検索：> 5種類のRAPDマーカーARIF1～5の判別フラグメントを精製(GeneClean:フナコシ社)後、pGEM-Tベクター(プロメガ社)に挿入し、逐次塩基配列を決定した。さらに国立遺伝学研究所データベースにより相同性検索を行った。
- 2) 判別用試料米とSTS(Sequence Tagged-sites)-PCR：> 判別用試料米は秋田県農試より提供を受けた「あきたこまち」や平成12年度新奨励品種「めんこいな」をはじめとする秋田県奨励品米9品種と、参考品種として「コシヒカリ」、「日本晴」の2品種、計11品種を用いた。得られた配列情報をもとにマーカー・フラグメントの上流端、下流端を含む14merないし20merのPCRプライマーを設計し、目的のRAPDマーカーが単一のバンドとして増幅されるSTS-PCR条件を設定した。
- 3) 「めんこいな」および「ひとめぼれ」判別用STSプライマーの作成：> ARIF3マーカーの欠損および結合部分に20merのプライマーを作成し、判別マーカーの最適化について検討を行った。

3. 成果の概要

- 1) STS化により判別マーカーが単一バンドとなり、「あきたこまち」と他の奨励品種との判別をより簡便かつ高精度に行うことが可能となった。(図1,表:平成10年度)
- 2) STS化により判別時間(PCRサイクル時間等)を短縮できた。(平成10年度)
- 3) ARIF3マーカーは「めんこいな」において3箇所欠損が認められ(約100塩基対)、プライマー改良による3aマーカー、3bマーカーにより「めんこいな」や「ひとめぼれ」についても明確な判別が可能となった。(図1,表:平成12,13年度)
- 4) 相同性検索の結果、いくつかの機能遺伝子との関連性が示唆された。(平成14年度)

4. 成果の活用面と留意点

- 1) JA全農あきた(当時秋田県経済連)に技術移転を行い、「あきたこまち」(平成10年度～)と「めんこいな」(平成14年度～)の一部に「DNA鑑定マーク」付のパッケージで流通・販売されている。(図2,3)
- 2) 学会発表等：小笠原・高橋：日本農芸化学会1999年度大会(1999)
小笠原・高橋：日本食品科学工学会第46回大会(1999)
小笠原・高橋：日本食品科学工学会第47回大会(2000)
- 3) 論文等：小笠原：ジャパンフードサイエンス,37(8),27-32(1998).
小笠原・高橋：日本食品科学工学会誌,47,632-637(2000).

表 STS - PCR法による秋田県奨励米の品種判別

プライマー セット	秋 田 県 奨 励 品 種									参考品種	
	あきたこまち	メロニシキ	トヨニシキ	サザニシキ	たかねみのり	秋田39	でわひかり	ひとめぼれ	めんこいな	コシヒカリ	日本晴
ARIF1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
ARIF2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARIF3a	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
ARIF3b	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
ARIF4	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
ARIF5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Type	A	B	C	D	E	F	G	H	I	I	C

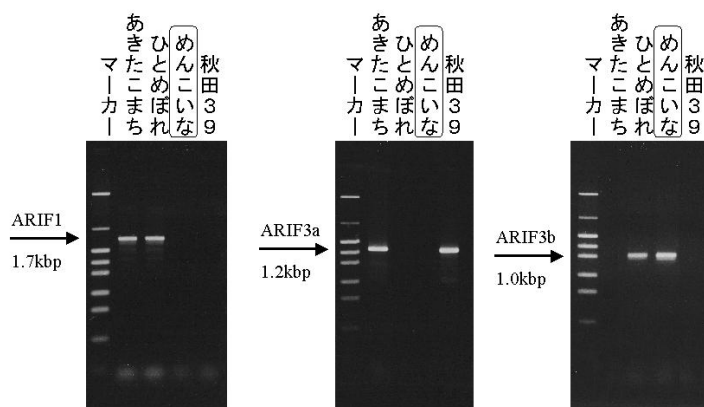


図1 「めんこいな」のSTS - PCR判別



図2 秋田県奨励米鑑定キット



図3 「あきたこまち」と「めんこいな」のDNA鑑定マーク付きパッケージ

5. 残された問題点とその対応
特になし

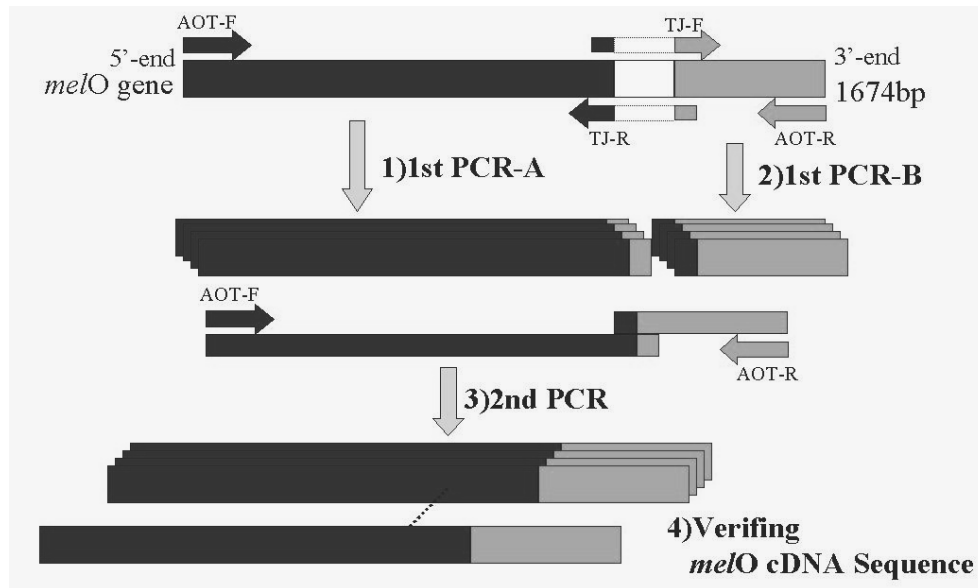


図1 リコンビナントPCRによる *meI*O cDNA の作成

MeI0	1	MASVEPIKTFEIRQKGPVETKAERKSI	RDLN	NEEELDKLIEAWRWIQDPARTGED	SFFYL	AGLHGEPFRGAGYNN	SHWGGYCHHGNILFP	90
AOK-1	1	MASVEPIKTFEIRQKGPVETKAERKSI	RDLN	NEEELDKLIEAWRWIQDPARTGED	SFFYL	AGLHGEPFRGAGYNN	SHWGGYCHHGNILFP	90
AOK-64	1	MASVEPIKTFEIRQKGPVETKAERKSI	RDLN	NEEELDKLIEAWRWIQDPARTGED	SFFYL	AGLHGEPFRGAGYNN	SHWGGYCHHGNILFP	90
W6	1	MASVEPIKTFEIRQKGPVETKAERKSI	RDLN	NEEELDKLIEAWRWIQDPARTGED	SFFYL	AGLHGEPFRGAGYNN	SHWGGYCHHGNILFP	90
MeI0	91	TWHRAYLMAVEKALRKACPDVSLPYWDES	DD	EAKKGIPLIFTQKEYK	GKPNPLYSYTF	SERIVDRLAKFPDADYSK	PQGYKTCRYPYSG	180
AOK-1	91	TWHRAYLMAVEKALRKACPDVSLPYWDES	DD	EAKKGIPLIFTQKEYK	GKPNPLYSYTF	SERIVDRLAKFPDADYSK	PQGYKTCRYPYSG	180
AOK-64	91	TWHRAYLMAVEKALRKACPDVSLPYWDES	DD	EAKKGIPLIFTQKEYK	GKPNPLYSYTF	SERIVDRLAKFPDADYSK	PQGYKTCRYPYSG	180
W6	91	TWHRAYLMAVEKALRKACPDVSLPYWDES	DD	EAKKGIPLIFTQKEYK	GKPNPLYSYTF	SERIVDRLAKFPDADYSK	PQGYKTCRYPYSG	180
MeI0	181	LCGQDDIAIAQQHNNFLDANFNQEQITGLL	NSNVT	SWLNLGQFTDIEGKQVKADTRWK	IRQCLL	TEEYTVFSNTTSAQRW	NDEQFHPL	270
AOK-1	181	LCGQDDIAIAQQHNNFLDANFNQEQITGLL	NSNVT	SWLNLGQFTDIEGKQVKADTRWK	IRQCLL	TEEYTVFSNTTSAQRW	NDEQFHPL	270
AOK-64	181	LCGQDDIAIAQQHNNFLDANFNQEQITGLL	NSNVT	SWLNLGQFTDIEGKQVKADTRWK	IRQCLL	TEEYTVFSNTTSAQRW	NDEQFHPL	270
W6	181	LCGQDDIAIAQQHNNFLDANFNQEQITGLL	NSNVT	SWLNLGQFTDIEGKQVKADTRWK	IRQCLL	TEEYTVFSNTTSAQRW	NDEQFHPL	270
MeI0	271	GGKETEAKATSLAVPLESPHNDMHLAIGGVQ	IPGF	NVDQYAGANGDMGENDTASFDP	IFYFHCF	IDYLFWTWQTMHKK	TDAQITILPE	360
AOK-1	271	GGKETEAKATSLAVPLESPHNDMHLAIGGVQ	IPGF	NVDQYAGANGDMGENDTASFDP	IFYFHCF	IDYLFWTWQTMHKK	TDAQITILPE	360
AOK-64	271	GGKETEAKATSLAVPLESPHNDMHLAIGGVQ	IPGF	NVDQYAGANGDMGENDTASFDP	IFYFHCF	IDYLFWTWQTMHKK	TDAQITILPE	360
W6	271	GGKETEAKATSLAVPLESPHNDMHLAIGGVQ	IPGF	NVDQYAGANGDMGENDTASFDP	IFYFHCF	IDYLFWTWQTMHKK	TDAQITILPE	360
MeI0	361	YPGTNSVDSQGP	TPGISGNT	WLTLDTP	LPFR	ENGDKVTSNKLLTLK	DLPTYKAPTSGTGSVFNDVPRLNYPLSPPILRVSGINRASIA	450
AOK-1	361	YPGTNSVDSQGP	TPGISGNT	WLTLDTP	LPFR	ENGDKVTSNKLLTLK	DLPTYKAPTSGTGSVFNDVPRLNYPLSPPILRVSGINRASIA	450
AOK-64	361	YPGTNSVDSQGP	TPGISGNT	WLTLDTP	LPFR	ENGDKVTSNKLLTLK	DLPTYKAPTSGTGSVFNDVPRLNYPLSPPILRVSGINRASIA	450
W6	361	YPGTNSVDSQGP	TPGISGNT	WLTLDTP	LPFR	ENGDKVTSNKLLTLK	DLPTYKAPTSGTGSVFNDVPRLNYPLSPPILRVSGINRASIA	450
MeI0	451	GSFALAI	SQTDHTGKAQVKGIESVLSRWHVQGC	CANCQTHLSTTAFVPLFELNEDDAK	KRKHANNELAVHLHTRGNP	GGQRVRNVT	VGTM*	540
AOK-1	451	GSFALAI	SQTDHTGKAQVKGIESVLSRWHVQGC	CANCQTHLSTTAFVPLFELNEDDAK	KRKHANNELAVHLHTRGNP	GGQRVRNVT	VGTM*	540
AOK-64	451	GSFALAI	SQTDHTGKAQVKGIESVLSRWHVQGC	CANCQTHLSTTAFVPLFELNEDDAK	KRKHANNELAVHLHTRGNP	GGQRVRNVT	VGTM*	540
W6	451	GSFALAI	SQTDHTGKAQVKGIESVLSRWHVQGC	CANCQTHLSTTAFVPLFELNEDDAK	KRKHANNELAVHLHTRGNP	GGQRVRNVT	VGTM*	540

図2 *MeI*Oアミノ酸配列の比較

* : Cu A配位アミノ酸残基, # : Cu B配位アミノ酸残基
太字 : 異なるアミノ酸残基

研究課題名：発酵食品における着色因子の解析 ----着色因子（麹菌チロシナーゼ等）の特性解明と低着色性麹菌の育種----	
予算区分：県単	担当研究室：生物機能部門 生物機能第1担当
研究期間：平成12～14年	担当者：小笠原博信 協力・分担関係：なし

1. 目的

秋田県には酒、味噌・醤油のほか米麹を使用した漬物や惣菜など多様な発酵食品がある。その商品価値は外観の「白さ」に依存するところが大きい。従来米麹では容易に褐変化し商品価値の低下につながっている。したがって、食品加工業界においては低褐変性の麹菌の育種、および着色を抑制できる製麹方法の開発が望まれている。

そこで、麹菌の着色因子の作用機構を遺伝子工学的手法等を用いて解明することにより、米麹使用食品の加工工程での褐変化を抑制し、付加価値の高い発酵食品の製造法を開発することを目的とした。褐変性およびチロシナーゼ活性の異なる実用株の米麹におけるチロシナーゼ活性と*melO*遺伝子配列との菌株間比較について検討した。

2. 方法

1) 使用麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 株

- ・ AOK - 1 (強褐変性) ・ AOK - 64 (非褐変性) : 秋田今野商店より譲渡
- ・ W6 (白色系コロニー) : 市販清酒用種麹より分離

2) *melO*遺伝子のPCRクローニング

*melO*遺伝子配列より作成したプライマーを用いて3菌株のプロモータ領域、および構造遺伝子をPCR増幅し、pGEM-Tベクターに挿入後、逐次、遺伝子配列を決定した。

2) リコンビナントPCRによるcDNAの作成

1箇所のイントロン部分を削除するためのプライマーを設計し、多段階PCRを行った。

3) 発現ベクターと発現条件の検討：ベクター（ホスト）

- ・ pUK223-3 (*E. coli* JM109) ・ pET32 (*E. coli* BL21)

4) チロシナーゼ活性測定

米麹の20mMリン酸緩衝液(pH6.0)磨砕抽出液を酵素溶液とし、DOPAを基質として反応させ、475nmの吸光度を測定した。発現用大腸菌の超音波破碎上清液のチロシナーゼ活性についても同様に行った。

3. 成果の概要

- 1) プロモータ領域の塩基配列比較の結果、CAAT, TATA配列の菌株による位置的な差は認められなかった。(平成12年度)
- 2) 米麹の褐変性はAOK-1株で高く、W6株では低く、AOK-64株ではほとんど褐変化が認められなかった。(図1：平成13年度)
- 3) チロシナーゼ活性はAOK-1株で高く、相対活性でW6株が1/10, AOK-64株は1/100となり、米麹の褐変性と相関していた。(図2：平成13年度)
- 4) リコンビナントPCRによりアミノ酸配列の異なる3菌株の*melO*cDNAを得た。(図3：平成14年度)
- 5) *melO*チロシナーゼ活性の菌株間比較を目的に、高発現ベクター2種を用い、誘導時間、温度、Cu添加濃度等について検討したが、いずれの条件においてもチロシナーゼ活性は認められなかった。(平成14年度)

4. 成果の活用面と留意点

- ・ 学会発表等：小笠原・今野・高橋：日本食品科学工学会第48回大会(2001)

5. 残された問題点とその対応

- ・ *melO*の大腸菌および酵母での発現条件の検討と褐変性に関与する*mel*関連遺伝子の検索

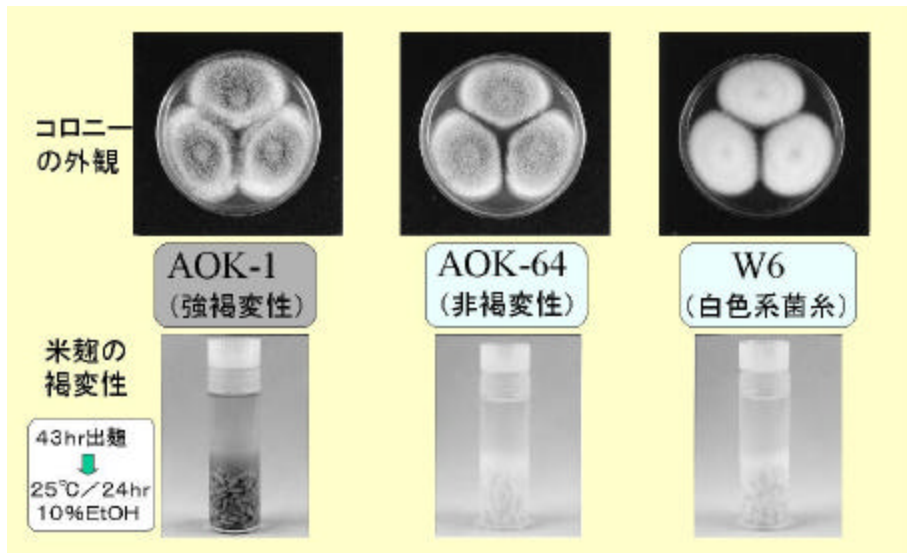


図1 麹菌株と米麹の褐変性

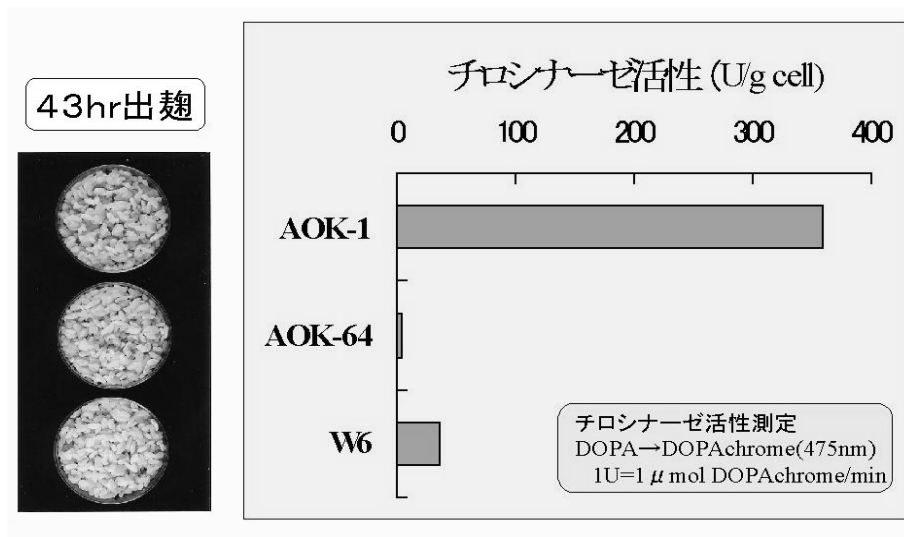


図2 米麹のチロシナーゼ活性

Strain	Residue	Sequence	Position	
Me10	1	MASVEPIKTFEIRQKGPVETKAERKSI	90	
	AOK-1	1	MASVEPIKTFEIRQKGPVETKAERKSI	90
	W6	1	MASVEPIKTFEIRQKGPVETKAERKSI	90
Me10	91	TWHRAYLMAVEKALRKACPDVSLPYWDES	180	
	AOK-1	91	TWHRAYLMAVEKALRKACPDVSLPYWDES	180
	W6	91	TWHRAYLMAVEKALRKACPDVSLPYWDES	180
Me10	181	LCGQDDIAIAQ0HNNFLDANFNQEQITGLL	270	
	AOK-1	181	LCGQDDIAIAQ0HNNFLDANFNQEQITGLL	270
	W6	181	LCGQDDIAIAQ0HNNFLDANFNQEQITGLL	270
Me10	271	GGKETEAKATSLAVPLESPHNDMHLAIGGVQI	360	
	AOK-1	271	GGKETEAKATSLAVPLESPHNDMHLAIGGVQI	360
	W6	271	GGKETEAKATSLAVPLESPHNDMHLAIGGVQI	360
Me10	361	YPGTNSVDSQGPFPGISGNTWLTLDTPLD	450	
	AOK-1	361	YPGTNSVDSQGPFPGISGNTWLTLDTPLD	450
	W6	361	YPGTNSVDSQGPFPGISGNTWLTLDTPLD	450
Me10	451	GSFALASQTDHTGKAQVKGIESVLSRWHV	540	
	AOK-1	451	GSFALASQTDHTGKAQVKGIESVLSRWHV	540
	W6	451	GSFALASQTDHTGKAQVKGIESVLSRWHV	540

図3 Me10アミノ酸配列の比較

* : CuA配位アミノ酸残基, # : CuB配位アミノ酸残基, 太字 : 異なるアミノ酸残基

研究課題名：食品関連酵素のプロテインエンジニアリング

「N? アセチルグルコサミン2? エピメラーゼの機能解析」

予算区分：県単

担当研究室：生物機能部門

研究期間：継

担当者：高橋砂織

平14年度(平10~14年度) 協力・分担関係：

1. 目的

食品関連酵素は、入手が容易な微生物由来のものが多く用いられている。動物や植物由来の酵素類は多くの優れた特性を持ちながら、コストや生産性などの理由でその使用は、限られている。そこで、動物由来酵素類を有効活用する目的で、糖質関連酵素であるN? アセチルグルコサミン(GlcNAc)2? エピメラーゼに注目し、大腸菌での大量発現系を構築するとともに、各種部位変異体を作成し、安定化酵素の作出を試みてきた。今回、酵素の活性発現に影響を及ぼすヌクレオチド結合領域について検討した。

2. 方法

(1) GlcNAc 2-エピメラーゼ活性の測定は、我々が開発した方法を用いた[Takahashi, S., et al. J. Biochem.128, 951-956 (2000)]。すなわち、N? アセチルマンノサミンを基質とし、生じたGlcNAcをN? アシル酸化酵素とペルオキシダーゼとの共役系で測定した。

(2) ヒト型酵素とラット型酵素との各種キメラ酵素の大腸菌発現ベクターは、それぞれのcDNAに共通する制限酵素切断部位を利用して作成した。

(3) 作成した6種類のキメラ酵素とヒト型およびラット型酵素類は大腸菌JM109細胞で発現し、既報の手段で精製した[Takahashi, S., et al. J. Biochem.125, 348-353 (1999)]。

(4) レニン活性は新規蛍光合成基質を用いて測定した[Takahashi, S., et al. J. Biochem.128, 951-956 (2000)]。

3. 成果の概要

これまで、ヒト、ブタやラット由来GlcNAc2? エピメラーゼの大腸菌での発現ベクターを構築し、組換え型酵素類の諸性質を明らかとしてきた。今回、図1に示す6種類のキメラ酵素を作成した。これらのキメラ酵素を大腸菌で発現し、6-12mgの精製組換え酵素を取得した(表1)。作成した全てのキメラ酵素は、レニン活性を阻害することが示された。精製酵素は、ヒト型酵素とほぼ同一の比活性を持つ高比活性型酵素[HHR, RHH, RHRキメラ]と低比活性型酵素[HRR, RRH, HRHキメラ]の2種類に大別された。また、ヌクレオチドに対する親和性も同様に2種類に大別された(表2)。ATPに対する親和性を、図2に示す。HRR, RRH, HRHキメラ酵素類は親和性が高く、HHR, RHH, RHRキメラ類は親和性が低いことから、親和性を規定している領域は本酵素分子の中央部分であることが判明した。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

今年度の研究により、GlcNAc2? エピメラーゼのヌクレオチド結合領域が確定された。今後、新規稀少糖類の生産に本酵素が利用されることを期待したい。

5. 成果の発表・活用等

【原著論文】Identification of a Domain Conferring Nucleotide Binding to the N-Acetyl-D-Glucosamine 2-Epimerase (Renin Binding Protein). (2002) Takahashi, S., et al. J. Biochem. 131, 605-610.

【学会発表】1、2002年度日本生化学会大会(京都市)2、2002年度キチン・キトサン・シンポジウム(長野県上田市)3、5th International Conference of the European Chitin Society (Norway, EUCHIS '02), 4、食品酵素化学研究会第2回学術講演会(京都市)などで発表

【国際学会紀要】in Advances in Chitin Science pp129-pp132 (2002) NTUT, Norway.



図1 ヒト型とラット型酵素とのキメラ体の構築
H: ヒト型酵素領域 R: ラット型酵素領域

表1 キメラ酵素の比活性と収量

キメラ酵素	比活性 (U/mg)	収量 (mg/l)
1. HRR RnBP	14.0	12.1
2. HHR RnBP	28.3	12.1
3. RHH RnBP	30.5	8.0
4. HRH RnBP	15.4	5.1
5. RHR RnBP	26.7	9.4
6. RRH RnBP	14.0	5.8

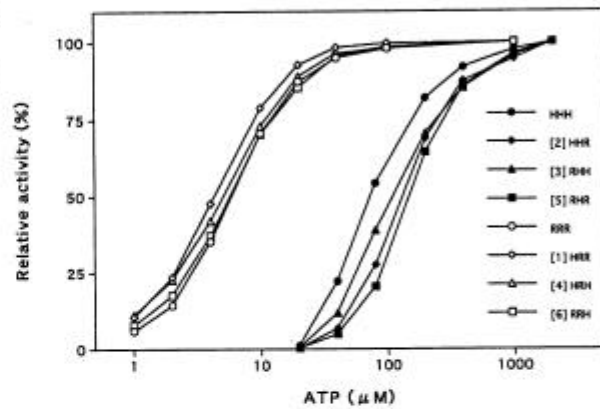


図2 キメラ酵素に対するATPの影響

表2 キメラ酵素に及ぼす各種ヌクレオチドの影響

Nucleotides* ¹	HHH	RRR	HRR	HHR	RHH	HRH	RHR	RRH
ATP	100	100	100	100	100	100	100	100
dATP	115	146	132	95.3	120	147	103	142
ddATP	118	183	164	92.8	126	180	94.2	178
ADP	20.7	122	109	10.4	17.1	123	6.7	122
AMP	nd	31.2	41.8	nd	nd	60.5	nd	53.8
GTP	11.0	60.5	55.1	6.0	10.8	64.7	5.4	68.9
CTP	nd	18.3	18.1	nd	nd	23.7	nd	29.0
TTP	nd	38.9	34.1	nd	nd	47.8	nd	54.1
UTP	nd	41.9	39.1	nd	nd	50.3	nd	55.2
dGTP	nd	23.3	23.3	nd	nd	32.2	nd	35.3
dCTP	nd	17.3	17.2	nd	nd	23.1	nd	26.2
dTTP	nd	39.2	34.5	nd	nd	47.4	nd	51.3
none	nd	nd	nd	nd	nd	6.0	nd	nd

*¹, Final concentrations of 2 mM.
nd, not detected, less than 5% activity.

研究課題名：食品関連酵素のプロテインエンジニアリング 「N? アセチルグルコサミン2? エピメラーゼの機能解析」	
予算区分：県単	担当研究室：生物機能部門
研究期間：平成10～14年度	担当者：高橋砂織
協力・分担関係：	

1. 目的

現在、糖質関連酵素やタンパク分解酵素などの様々な酵素類が食品加工や原材料の加工などに用いられている。その多くは微生物由来であり、生産性やコストの面で動物や植物由来酵素が使われる割合は限られている。本研究においては、動物由来酵素類の大腸菌での発現系を構築し、低価格で付加価値の高い酵素類の生産系を開発することを目的とした。さらに、各種部位変異体を作成し、安定性を向上させた酵素の生産を目指した。

2. 方法

(1) 既にクローニングが完了している各種動物由来糖質関連酵素(ヒト、ブタやラット由来N? アセチルグルコサミン(GlcNAc)2—エピメラーゼ)の大腸菌での発現ベクターは、高発現ベクターpUK223-3をもとに構築した。

(2) 各種組換え型酵素類は、Western Blottingによりその発現を確認した。

(3) 各種部位変異体は、変異プライマーを用いたPCR法により構築した。

3. 成果の概要

(1) ヒト型GlcNAc 2-エピメラーゼの大腸菌での高発現系を構築した(図1)。(2) 部位特異的変異体の解析から、ヒト型酵素の380番目のシステイン残基が活性発現に必須であることが判明した(図2)。(3) 蛍光クエンチ法を用いた新規レニン活性測定法を開発した(図3)。(4) GlcNAc 2-エピメラーゼの新規測定法を開発した(図4)。(5) ヒト、ブタやラット型酵素の比較生化学的研究から、ラット型酵素がヌクレオチドに対して最も親和性の高いことを明らかとした(図5)。(6) キメラ体の解析により酵素の中央領域がヌクレオチド結合部位であることを明らかとした(図6)。

4. 成果の活用面と留意点

本研究により動物由来酵素類の大腸菌での発現系が確立されるとともに、酵素分子の安定化に寄与する残基の同定も可能となった。国内外で成果を発表する機会を与えられたことから、日本キチン・キトサン学会での幹事を仰せつかり、平成15年度の全国大会を秋田で開催することとなった。また、以下のかたちで外部に成果を発表した。【原著論文】

1) S. Takahashi, et al. (1999) J. Biochem. 125, 348-353. 2) *ibid.* (1999) 126, 639-642. 3) *ibid.* (2000) 128, 951-956. 4) *ibid.* (2001) 129, 529-535. 5) *ibid.* 130, 815-821. 6) *ibid.* (2002) 131, 605-610. など

【国際学会紀要】1) *Advances in Chitin Science* Vol. 3, pp178-185. 2) *Advances in Chitin Science* Vol. 4, pp631-636. 3) *Chitin and Chitosan.-Chitin and Chitosan in Life Science-*, pp194-197. 4) *Chitin Enzymology* 2001, pp565-571. 5) *Advances in Chitin Science* Vol. 6, pp129-132. など

【関連論文】1) *J. Biol. Chem.* 275, 15357-15362 (2000). 2) *J. Biol. Chem.* (2003) in press. 3) *J. Cardiac Failure*, (2003) in press. など

【学会発表等】国内学会発表13件、国際学会発表5件(計18件)など

5. 残された問題とその対応

本酵素が新規稀少糖類の生産系に使用されることを期待したい。

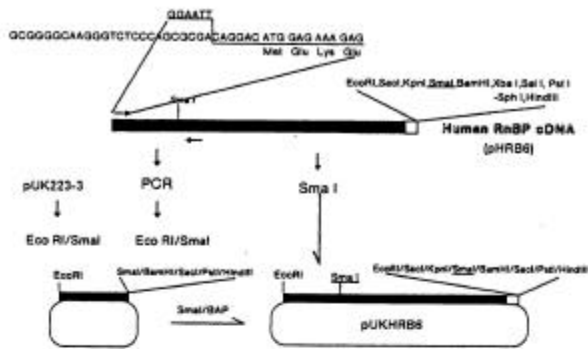


図1 ヒト型酵素の大腸菌での発現ベクターの構築

(GlcNAc 2-Epimerase)
 $\text{ManNAc} \rightarrow \text{GlcNAc}$

(N-Acylhexosamine Oxidase)
 $\text{GlcNAc} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{N-Acetylglucosamic Acid} + \text{H}_2\text{O}_2$

(Peroxidase)
 $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-Aminoantipyrine} + \text{HTIB}^* \rightarrow \text{Quinoneimine Dye} + 2\text{H}_2\text{O}$
 (Absorbance at 515 nm)

図4 GlcNAc 2-エピメラーゼの新規活性測定法
 *HTIB, 3-Hydroxy 2,4,6 Triiodobenzoic Acid

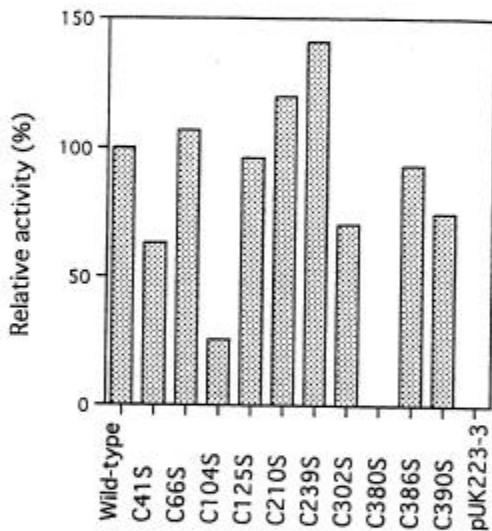


図2 部位特異的変異体の酵素活性

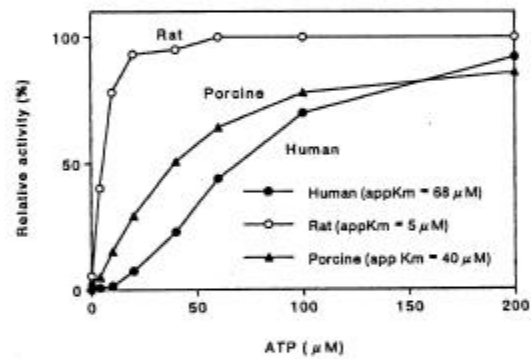


図5 酵素活性に及ぼすATPの影響

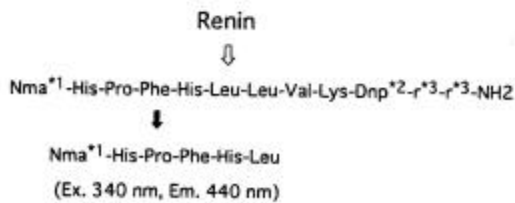


図3 新規レニン活性測定法

*1 Nma, N-Metylanthranyl; *2 Dnp, 2,4-dinitrophenyl; *3 r, D-Arg.

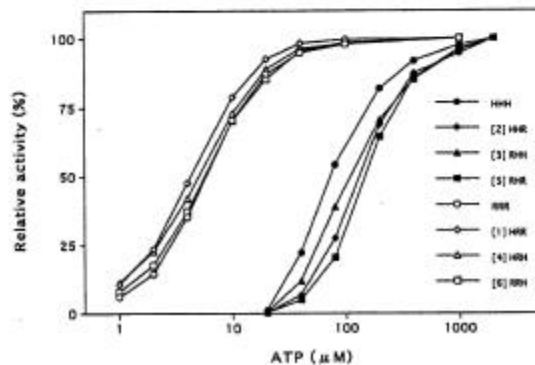


図6 キメラ酵素に及ぼすATPの影響

研究課題名	マンナン含有食品廃棄物からのマンノオリゴ糖生産技術の開発		
予算区分	県単	国庫	委託
	担当研究室：食品開発部門 食品加工担当 生物機能部門		
研究期間	継・中 平14年度(平14~16年度)		
	担当者：戸枝一喜、保苅美佳、畠恵司		

1. 目的

マンナンを含有する食品廃棄物として大豆種皮、山芋残渣を取り上げ、酵素等によりマンノオリゴ糖生産法の開発を行う。また、その機能性について探索を行う。

今年度は1)大豆種皮、山芋残渣からの酵素糖化条件の検討、2)生成したマンノオリゴ糖の構造を解析、3)機能性試験の構築を行う。

2. 方法

1) 大豆種皮マンナンの酵素糖化

新規マンナーゼKT551 (KT551) および市販マンナーゼを用いて大豆種皮マンナンの糖化を検討した。

2) マンノオリゴ糖スタンダードの調製

ガラクトマンナンであるスピノガムおよびグルコマンナンであるコンニャクマンナンをKT551により糖化を行った。糖化液中のオリゴ糖を活性炭クロマトグラフィーとトヨパールHW40によるGPCにより精製した。

3) 機能性試験の構築

大腸細胞を用いてサルモネラ菌の付着抑制試験法の構築を行った。

3. 成果の概要

1)大豆種皮マンナンの酵素糖化

大豆種皮を各種のマンナーゼにより酵素糖化を行った結果、マンノース生産にはGM5が良好であった。マンノオリゴ糖生産にはKT551等が良好であった。

2) マンノオリゴ糖スタンダードの調製

- ・ スピノガムからKT551によるガラクトマンノオリゴ糖を含むオリゴ糖の調製を行いマンノビオース(M2)の他に、2種の未同定ガラクトマンノオリゴ糖を単離した。MLDI-TOFMS分析(弘前大学)によりUK1が4糖、UK2が5糖と判明した(図1)。
- ・ コンニャクマンナンからピガラーゼによりグルコマンノオリゴ糖を含むオリゴ糖の調製を行いM2、マンノトリオースの他に、1種の未同定グルコマンノオリゴ糖を単離した。MLDI-TOFMS分析により3糖と判明した。

3) 機能性試験の構築

マンノースの投与により鶏体内のサルモネラ菌が排出されることが知られている。そこで、in vitroでのアッセイ系の構築を試みた。大腸癌細胞に対するサルモネラ菌の付着を調べた結果、マンノースには付着阻害が認められなかった(図3)。この結果を踏まえ、本アッセイ系の適用の可否について検討を要することが示唆された。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

- 1) ガラクトマンノオリゴ糖UK1、UK2を含む未同定オリゴ糖の構造決定
- 2) 大腸癌細胞を用いたアッセイ系の詳細検討および精製マンノオリゴ糖の評価
- 3) ビフィズス菌増殖試験を含む機能性試験の構築および精製マンノオリゴ糖の評価

5. 結果の発表、活用等

オリゴ糖の機能が判明次第、特許および学会発表の予定

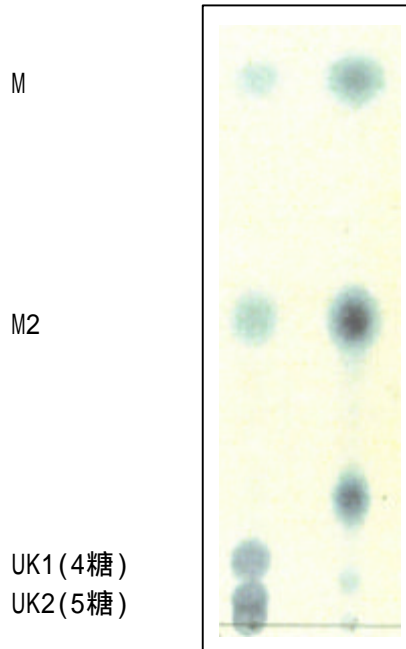


図1 スピノガムのKT551による糖化

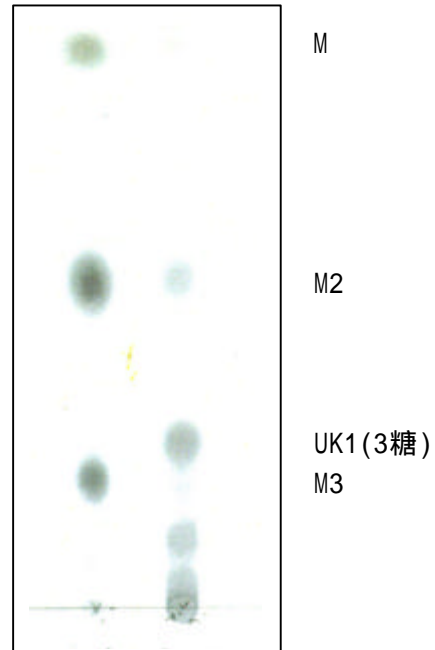


図2 グルコマンナンのヒガラーゼによる糖化

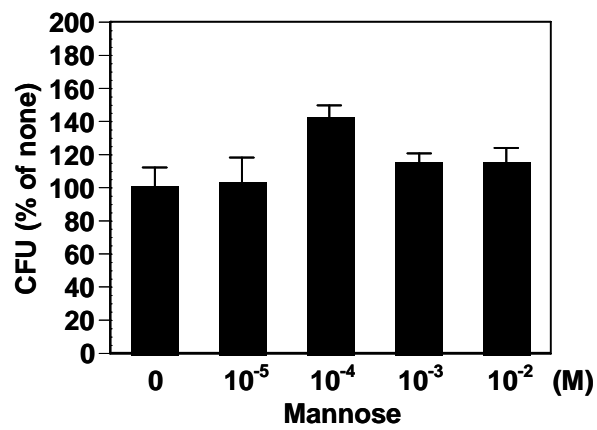


図3 サルモネラ菌の大腸癌細胞付着へのマンノースの効果

研究課題名	植物性食品廃棄物からのゼロエミッションを目指した環境浄化技術の開発
予算区分	県単 国庫 委託
研究期間	継・中 平14年度(平14~16年度)
担当研究室	酒類部門 酒類第2担当
担当者	進藤 昌
協力・分担関係	秋田県立大学 (独)産業技術総合研究所 (株)秋田今野商店

1. 目的

秋田県では、米や麦、そば、大豆など多くの農産物を生産しており、その加工において穀物の殻やおから等多くの植物性食品廃棄物が排出されている。これらの多くは、焼却又は埋め立て廃棄されており、環境に対する負荷がかなり大きい。一方、環境保全のための生分解性プラスチックが開発されているが、原料である乳酸の価格が高いため広く使用されていない。秋田県においては農業用のビニールフィルムが大量に使用されているが、近年のダイオキシン問題で焼却処分が出来ないため、その処理が大きな問題となっている。従って、この方面への生分解性プラスチックの応用が急がれているところである。また、炭酸ガスの排出が規制され始めている現在、化石燃料に変わるエネルギー源が期待されている。そこで、本研究では県内食品企業より排出される植物性廃棄物から効率よく乳酸またはエタノールを生産するシステムの開発を行うことを目的とする。

平成14年度は、食品廃棄物の最適爆砕処理条件を確立し、可溶化液のセルロース、ヘミセルロース等の酵素分解に関する条件を確立することを目的とした。

2. 方法

モデル植物性食品廃棄物としてモルトフィードを用いた。廃棄物の爆砕処理は、耐圧40kg/cm²、容量2Lの爆砕装置を用いて行った。また爆砕可溶化液の糖化は、市販の糖化酵素剤または固定化糸状菌 (*Aspergillus oryzae* SS1026) の抽出酵素を用いて行った。全糖量はフェノール硫酸法、単糖の分析はDIONEX、D/L乳酸は酵素法を用いて定量を行った。

3. 成果の概要

モルトフィードの爆砕処理条件の検討を行ったところ、30kg/cm²で1分間処理した時が最も液化効率が高かった(表1)。さらに得られた液化液中の単糖(グルコース、キシロース、アラビノース)の生成は、グルコアミラーゼとセルラーゼで処理した時が最も生成量が多かった(表2)。さらに、固定化糸状菌の抽出酵素を用いて爆砕可溶化液を処理したところ、市販酵素剤処理に匹敵する単糖が得られることが判明した。また、糸状菌の最適固体化担体の検索を行い、ポリオレフィン製の担体が最適であることが判明した。

次にモルトフィード可溶化液からの乳酸発酵について検討を行い、*Lactobacillus rhamnosus* NBRC14710とセルラーゼ、ヘミセルラーゼを併用して作用させることにより全糖濃度4.2%の爆砕可溶化液から14.5(g/l)のL-乳酸を得ることができた。また、本研究で用いた乳酸菌はメラノイジン分解能を有しており爆砕可溶化液を脱色することができた。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

残された問題点：爆砕可溶化液からのエタノール生産菌の検索

協力関係：秋田県立大学、秋田今野商店(株)

次年度の計画：植物性食品廃棄物の爆砕可溶化液の生物学的変換に関する研究

- ・爆砕可溶化液からの最適乳酸生産条件の確立
- ・爆砕可溶化液からの最適エタノール生産条件の確立

5. 結果の発表と活用

結果の発表：平成14年度農芸化学学会大会にて発表予定

研究会への報告：産学官連携推進委員会にて報告（平成14年12月5日）

知的所有権の取得：

表1 モルト粕の可溶化に及ぼす爆砕条件の影響

試験区	処理圧力 (kg/cm ²)	処理時間 (min)	回収量 (l)	糖濃度 (%)	全糖量 (g)
1	10	10	4.5	1.4	56.4
2	20	10	8.7	0.7	57.2
3	30	10	9.0	0.6	49.1
4	30	1	3.0	2.2	60
5	30	5	8.0	0.8	55.1

表2 モルト粕爆砕可溶化液の糖組成に及ぼす酵素処理の影響

試験区	グルコース(%)	キシロース(%)	アラビノース(%)
セルラーゼ	0.69	0.43	0.30
ヘミセルラーゼ	0.48	0.23	0.27
グルコアミラーゼ	1.20	0.23	0.27
α-アミラーゼ	0.13	0.22	0.27
セルラーゼ+	0.86	0.44	0.30
ヘミセルラーゼ			
グルコアミラーゼ+	1.15	0.23	0.26
α-アミラーゼ			
4酵素混合			
無処理	1.26	0.50	0.30
	0.2	0.1	0.20

研究課題名：食品製造過程における微生物の動態制御に関する研究(2)

- 高品質、安全な食品製造 -

予算区分：国庫 委託

担当研究室：応用発酵部門

研究期間：中

担当者：柴本憲夫、佐々木康子

平14年度(平14～16年度)

協力・分担関係：食品開発部門

高橋 徹、熊谷昌則

1. 目的

県内食品企業がHACCP対応するため、その橋渡しをめざす。当面は安全な食品製造を行うため、一般衛生管理確立にいたる2業種(キリタンポ製造業、大型小売り店舗のバックヤードでの食品製造)のマニュアルを作成する。同時にこれらの食品業の製品の安全面からの高付加価値化をはかる。

2. 方法

製品製造工場のより高度な自主衛生管理

1) 現状の把握

聞き取り調査(製造工程、衛生管理、現在のクレーム状況、工場視察)

微生物検査(落下細菌、工場汚染検査、製品検査、記録簿の作成)

2) サンプル分析と衛生管理ポイント提案

汚染菌同定と対策

人、製品の動線の検討

製造工程の5S

ゾーニング、清潔区の保持技術

3) 従業員への教育訓練

3. 成果の概要

1) 県特産品であるキリタンポの製造工程の衛生管理をおこなった。

旧工場の時にカビ対策を依頼され、改築する計画があるとのことで、取り入れてもらいたい条件を提案した。その後、改築、高橋(徹)らの尽力で自動化され、工場を衛生的に管理することが必要となった。HACCP手法を取り入れ、試行錯誤の結果十分賞味期限を保てる製品を出すことができるようになった。

2) 大型小売り店舗のバックヤードの衛生管理

目的が特産品からは離れたが、現在、食品の安全性にもっとも力を注いでいる業界であるとともに、このような業界が独自の点検マニュアルで製造委託会社の選択を行っている。県内にもこのような体制ができれば、技術の普及が容易になるため共同研究を行った。モデルケースとして一支店の管理を受け持った。ゾーニング、動線を考慮し、改造の結果、目的はかなり達成できた。

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

この両企業は施設の改善、安全への取り組みに非常に積極的であった。

今後、本県食品企業で一番の問題は従業員への教育訓練であることを痛感した。

企業の要請に基づいて、教育訓練の場をつくる努力をしたい。

5. 結果の発表、活用等

研修などに結果データを活用する。またマニュアルを作成する

大型小売り店舗(バックヤード)における落下細菌測定結果

測定場所	4月		5月		6月		7月		8月		9月		10月		11月		12月		1月		
	細菌	カビ	細菌	カビ	細菌	カビ	細菌	カビ	細菌	カビ	細菌	カビ	細菌	カビ	細菌	カビ	細菌	カビ	細菌	カビ	
1 下拵え	16	0	4	0	0	0	3	0	4	0	4	0	3	0	4	0	1	1	19	0	
2 冷蔵庫	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	
3 流し魚下拵え	5	0	6	1	1	0	1	0	0	0	1	0	3	0	3	0	5	0	7	0	
4 魚シラー	7	1	3	0	0	0	0	0	5	0	8	0	9	0	22	0	1	2	2	0	
5 魚バック	3	0	6	0	1	0	2	0	3	0	4	0	5	1	2	0	1	2	1	0	
6 刺身	7	0	1	0	4	0	3	0	4	0	2	0	2	0	5	0	7	0	0	0	
7 刺身シラー	1	0	0	0	1	0	3	0	0	0	2	0	3	0	12	0	3	3	0	0	
8 刺身流し	2	0	4	0	2	0	0	0	0	0	2	0	27	0	1	0	7	2	0	0	
9 肉シラー	6	0	3	0	2	0	2	0	10	0	2	0	2	0	5	0	5	0	1	0	
10 肉バック台	4	0	5	1	0	0	4	0	5	0	1	0	8	0	2	0	0	1	1	0	
11 肉スライサー	5	0	5	0	2	0	0	0	20	0	5	0	5	0	1	0	4	0	0	0	
12 肉流し	8	0	52	0	56	0	1	0	2	0	94	1	4	0	28	0	73	0	18	0	
13 惣菜冷蔵庫	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	2	0	
14 惣菜流し	3	0	38	0	15	0	0	0	2	0	7	0	5	0	23	0	12	0	5	0	
15 惣菜シラー	1	0	3	0	2	0	4	0	2	0	3	0	3	0	1	0	2	2	1	0	
16 惣菜フライヤー	6	0	4	0	1	0	0	1	4	0	54	0	10	0	65	0	3	4	2	0	
17 惣菜値付け	2	1	1	1	0	0	1	0	3	0	0	0	3	0	2	0	0	3	1	0	
18 寿司作業台	22	0	1	0	2	0	2	0	0	0	4	0	1	0	4	0	1	1	0	0	
19 寿司盛台	3	2	4	0	1	0	5	0	4	1	2	0	1	0	0	0	7	0	2	0	
20 寿司シラー															1	0	2	0	0	0	
21 青物シラー(1)	61	0	9	0	1	0	7	8	32	13	4	0	4	12	28	2	50	1	51	8	
22 青物カット台	23	1	40	0	0	0	5	11	39	62	7	0	14	49	5	16	72	2	50	3	
23 青物シラー(2)	多	0	4	1	15	0	4	13	8	26	3	0	39	60	11	14	50	5	26	1	
24 青物蘇生室	32	0	2	0	0	0	2	1	2	13	1	2	1	1	6	6	5	7	0	0	
25 青果作業台															5	8	6	9	30	24	
26 ハーガー作業台(1)	10	1	7	0	24	0	13	1	4	2	6	1	5	0	22	0	2	1	1	0	
27 ハーガーミキサー	4	0	24	0	13	0	17	0	4	0	0	0	7	1	10	0	11	1	16	0	
28 ベーカリー棚	3	0	9	0	2	0	2	0	1	1	4	0	1	0	0	1	6	1	5	0	
29 ハーガー作業台(2)	16	0	56	0	5	0	0	0	7	0	2	1	6	1	9	0	6	3	0	0	
30 果物作業台																					
31 惣菜弁当作業台																			多	9	0

(数字は、標準寒天培地を使用し、37℃・24時間培養後の細菌及びカビの計数)

大型小売り店舗(バックヤード)における定期ふきとり検査

大腸菌群

ふき取り場所	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月
1 魚冷蔵庫中床	210	10	110	330	70	20	0	30	0	0
2 魚冷蔵庫中把手	30	0	10	0	0	20	0	10	0	0
3 魚冷蔵庫中台車	0	0	40	90	10	1260	160	0	0	0
4 魚冷蔵庫把手	50	0	30	多	20	0	0	0	0	0
5 魚冷蔵庫壁	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
6 魚下加工床	950	10	30	0	多	多	多	480	60	40
7 魚下加工作业台	580	0	0	290	10	160	150	0	0	0
8 魚下加工作业台	0	10	0	340	480	220	60	0	0	50
9 魚下加工カート	0	0	0	20	40	0	0	0	0	0
10 魚下加工シーラー	1360	0	0	0	0	10	20	70	0	0
11 刺身加工床	0	10	10	970	1100	多	50	0	30	0
12 刺身入り口扉	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
13 刺身冷蔵庫	30	0	0	0	0	80	210	0	0	0
14 刺身加工壁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 刺身カート台	10	10	0	0	0	0	260	20	0	0
16 肉加工床	0	0	0	0	多	30	20	0	0	0
17 肉加工壁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18 肉作業台まな板	1070	0	10	0	多	10	210	0	多	0
19 肉スライサー	多	0	0	0	0	0	40	0	0	0
20 肉カート	0	0	60	0	0	90	0	0	20	0
21 自動パック台	0	0	0	0	10	0	100	0	0	0
22 寿司床	100	970	70	10	多	80	30	60	0	0
23 惣菜寿司壁	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
24 寿司作業台	多	0	0	90	0	0	120	0	10	0
25 寿司ゴミ箱	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
26 惣菜床	0	40	1130	30	230	200	20	20	550	1460
27 惣菜壁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28 惣菜作業台	30	0	0	0	0	0	20	0	0	10
29 惣菜棚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 惣菜シーラー	0	0	0	0	0	0	40	20	0	20
31 惣菜冷蔵庫床	400	310	230	100	180	820	310	0	60	0
32 惣菜冷蔵庫(2)棚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33 惣菜カート	1110	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34 ベーカリー床	0	0	0	300	0	100	130	0	40	0
35 ベーカリー作業台	0	0	0	10	10	10	10	0	0	0
36 ベーカリー冷蔵庫把手	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37 ベーカリー陳列台	30	0	0	0	0	0	50	60	0	50
38 野菜床	0	0	80	1020	2420	90	160	0	50	0
39 野菜作業台	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40 野菜扉	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
41 野菜壁	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
42 野菜シーラー	0	150	0	80	0	60	0	0	0	10
43 野菜カート	0	130	0	0	0	0	0	0	0	0
44 野菜蘇生庫床	0	0	0	0	20	120	130	320	160	0
45 野菜まな板		0	110	180	0	20	10	160	20	0
46 野菜包丁		420	0	30	0	80	0	10	0	0
47 トイレノブ			0	0	0	0	0	0	0	0
48 トイレ前床			0	0	0	50	130	20	0	30
49 値付けシーラー							0	0	20	0
50 値付け床							190	20	0	0

(数字の単位は、CFU/g)

培地及び培養条件: デソキシコレート培地 37°C・24時間

研究課題名	食材・包材等に含まれる内分泌攪乱物質分析手法の確立 及び低減、除去技術の検討		
予算区分	県単	国庫	委託
担当研究室	生物機能部門生物機能第二担当		
研究期間	継	中	
担当者	堀 一之		
協力・分担関係	平14年度(平13~15年度)		

1. 目的

内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)のうち、食品分野ではプラスチック系包材の可塑剤成分であるフタル酸エステル類の汚染実態の把握とともに、それらの低減あるいは除去技術を検討することが求められている。本研究では、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(以下DEHP)を主たる研究対象とし、容易かつコンタミネーションの少ない極微量分析手法について所有するGC/MSで対応可能な方法を開発し、さらに一般的かつ比較的含量の多い場合に利用可能なFID-GCを用いる分析条件への移行・確立を行う。さらに、各種包装材料や食品類でのフタル酸エステル類の存在量の実態を把握し、それらの低減・除去の可能性を検討する。14年度は、GC/MSによるフタル酸エステル類極微量分析法の検討及びFID-GCへの分析条件移行について検討した。さらに包材および食材のフタル酸エステル含有量について実際の定量分析に着手した。

2. 方法

実験に供した装置、試薬類は平成13年度成績書に記載した通りである。今年度はGC/MS極微量分析の条件検討として、 C_{10} -物質(DEHP- d_4)による回収実験を行った。既に確立したGC/MS分析法をFID-GC法に条件移行させ、その検出範囲について検討した。一般入手可能な包材そのものについてフタル酸エステル類の定量分析を行った。DEHP含有量の大きい包材での加熱殺菌モデルを設定し、封入水移行があるかを測定した。葉物野菜の数点についてDEHPの含有量を測定した。

3. 成果の概要

先に確立したGC/MS分析方法でDEHPおよびDEHP- d_4 標準物質それぞれを単独、混合で分析し、いずれも同じ保持時間を有し、 m/z がそれぞれ149・167・279, 153・171・283に現れたことから C_{10} -トとしての条件を満たしていることが判明した。さらに後述のGとJの包材を使った加熱殺菌モデル実験(SPME塩析法)での回収実験において回収率、標準偏差とも良好な結果を得た。

GC/MSによる極微量とは逆に、1 ppmの桁より大きい高濃度の分析方法としてFID-GC法への条件移行を行い、100:1 μ リット/100 ppm μ - μ リットル/100 ppb μ - μ の濃度範囲で精度良く定量分析が可能であることを確認した。

11種の食品包材(A~K)について、包材そのものを一定の大きさの小片に切断し、 C_{10} - μ リットル(1:1)を抽出溶媒として、35 $^\circ$ で30分超音波抽出したものについてFID-GC分析を行い、6種のフタル酸エステル類について定量分析を行った。結果はいずれもDEHPが含まれるほか、一部に代用可塑剤としてのジ μ ル μ ル μ ル μ ル(DnBP)とジ μ ル μ ル μ ル μ ル(DnOP)フタル酸エステル類の含有が確認された。また、食品用ラップ(L,M)では、植物油系可塑剤が使われているが少量のDEHPの存在が確認された。(表1)

DEHPを含む包材Gを用いて封入水を加熱し、SPME塩析サンプリングによるGC/MS定量分析を行った。その結果、加熱時間と温度によって封入水のDEHP含有量が大きくなることが確認された。(表2)

由来が明確で入手可能なある種の山菜数点について、 に準じたサンプリング・分析法でDEHPの定量分析を行い、ハウス栽培ではかなりのDEHPの存在が認められ、自生（天然）でもある程度含有されている実態が明らかとなった。（表3）

化合物	DMP	DEP	DrBP	BBnP	octanol	DEHP	DnOP	抽出条件
保持時間(分)	12	13.45	18.1	23.94	25.33	26.6	29.2	n-hexane-EtOH (1:1) 10 ml 包材1gを0.1×0.5cm各に切断後 50ml共栓フラスコに入れ35 で 30分超音波発生機中で抽出
A	nd	nd	nd	nd	1	1.62	nd	検出条件 FID-GCスプリットス 1 μl 検量線はEPA606標準mixを使用 (各成分20 mg/ml およびoctanol 1 ml/ml) A~Kは食品用包材 L,Mは食品用ラップフィルム 2回サンプリング × 5回測定 n=10の平均 nd 全検出されず trace 痕跡あり * 脂肪酸化合物と重複 単位 μg/ml (=ppm)
B	nd	nd	nd	nd	1	18.43	nd	
C	nd	nd	nd	nd	1	15.32	nd	
D	nd	nd	nd	nd	1	12.22	nd	
E	nd	nd	nd	nd	1	8.44	nd	
F	nd	nd	nd	nd	1	9.02	nd	
G	nd	nd	54.44	nd	1	780.32	10.22	
H	nd	nd	12.22	nd	1	560.53	35.43	
I	nd	nd	trace	nd	1	150.23	1.23	
J	nd	nd	nd	nd	1	23.32	nd	
K	nd	nd	nd	nd	1	18.42	nd	
L	*	*	*	nd	1	140.55	nd	
M	*	*	*	nd	1	43.65	13.32	
塩ビ	nd	23.33	130.42	40.22	1	飽和	2235.2	
塩ビx1000	nd	trace	0.35	trace	1	4.32	2.1	
ブレンク	nd	nd	0.33	nd	1	1.22	nd	

表1 包材に含まれるフタル酸エステル類

温度	40	55	70	沸騰水	使用包材はG
浸せき時間					封入水にはシリカゲル処理した 蒸留水(blank 12.2)を用いた
5分	43.5	129.5	611.2		3回サンプリング各 5回
15分	61.1	255.8	1024.2		n=15の平均値
30分	72.2	303.1	1154.7	1030	単位 ppm
60分	70.5	295.5	1100.8		

表2 封入水の加熱 時間によるDEHP移行の推移

	#1	#2	#3	#4	サンプル 5g 正確にはかり シリカゲル処理蒸留水5ml とともに 攪拌した液でサンプリングを行った 2回サンプリング各 5回 n=10の平均値
サンプル					単位 ppm
α(市場品)	129.2	138.5			
β(自生採集品)	108.5	88.1	71.1		
γ(自生採集品)	65.8	78.5	92.2		
δ(温室栽培品)	622.5	587.3	483.5	505.6	
ε(温室栽培品)	870.2	598.3			

表3 ある種の山菜におけるDEHPの含有状況

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

次年度はまず、フタル酸エステル類含有状況の実態把握として包材と食材を組み合わせた場合すなわち山菜水煮の様な系でどうなるかを検討する。さらにフタル酸エステル類は蒸気圧が比較的低く水蒸気と共沸することが知られているので、開放系プランチングの条件（温度、時間、溶質の種類・有無など）で低減あるいは除去が可能かどうかなどを検討し、加工・調理における安全性についての知見を得たいと考えている。

5. 結果の発表、活用等

最終的には本研究が安全な食生活の為の有為な情報発信に繋がることを期待している。

研究課題名：山ぶどう交配種の醸造特性の検討（共同研究）

予算区分：県単

担当研究室：酒類部門、酒類第2担当

研究期間：

担当者：戸松さやか、進藤 昌

平14年度

協力・分担関係：小坂町葡萄愛好会

1. 目的

小坂町では平成元年より山ぶどう交配種の栽培を普及し、ワインなどの加工を行ってきた。平成13年度より国庫事業により、新品種の導入を検討しており、数種類の比較を行っている。そこで、新品種のブドウの品質およびワインへの醸造特性を検討した。

2. 方法

(1) 原料：小公子、国豊3号、岩木ヤマブドウ、ワイングランド（対照）

(2) 仕込み：酵母は*Saccharomyces cerevisiae*(LALVIN EC1118)を用い、糖度24%まで補糖し、仕込み温度は24℃とし、もろみの発酵状態を見ながら温度管理を行った。主発酵終了後、乳酸菌*Viniflora oenos* DSM7008によるマロラクテック発酵を行い、減酸処理をした。

(3) 成分分析：一般成分は国税庁所定分析法、酸度は三菱化学工業自動測定装置GT-05、アミノ酸は日本電子JLC-300、有機酸は東京理化カルボン酸分析S-3000で測定した。

3. 成果の概要

1) 果実の形態

果房重、果粒重ともに国豊3号が大きく、特に果房重量は他の3株の2倍以上であった。また、小公子が小さい傾向にあった(Table.1)。

2) 果汁成分

ヤマブドウ交配種であるため、酸度は非常に高く、特に小公子や岩木ヤマブドウは一般的な醸造用ブドウに比べて2倍ほど高くなっていた。糖度は小公子が23.3%と高く、他は17%前後であった(Table.2)。

3) ワイン醸造

すべての品種で順調に発酵し、10日～12日で主発酵が終了し、アルコール11～12%生成した。乳酸菌によるマロラクテック発酵は、品種により発酵期間が異なり、20～54日で終了した(Fig.1)。

4) ワイン成分

アルコール11～12%でエキスは3(g/100ml)前後のワインが生成された。これまでにワイン醸造に用いているワイングランドに比べて、小公子や岩木ヤマブドウは酸度が高く、色が濃く、ポリフェノールが1.5～2倍という特徴があり、逆に国豊3号は酸度が低く、色が薄くポリフェノールも少なかった(Table.3)。

5) 官能評価

小公子は品種香があり、酸味が強いが、味に幅のあるワインであった。国豊3号は特徴的な香りとフラットな味がするワインで評価が低かった。岩木ヤマブドウは酸味が強いが、華やかな香りがする濃い色のワインであった。小公子と岩木ヤマブドウはワイングランドに比べ、評価が高く、今後ワインとして期待できる品種と考えられた(Table.4)。

Table.1 果実の形態比較

ブドウ品種	果房重(g)		果粒重(g)	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
ワイングランド	94.41	54.322	3.15	0.853
小公子	74.35	28.125	1.08	0.304
国豊3号	189.83	89.876	3.52	1.049
岩木ヤマブドウ	79.63	28.639	2.27	0.528

Table.2 果汁成分の比較

ブドウ品種	pH	Bx(%)	酸度(ml)	比重
ワイングランド	3.07	17.2	13.600	1.0778
小公子	2.95	23.3	17.898	1.1062
国豊3号	3.21	17.9	11.410	1.0805
岩木ヤマブドウ	2.81	16.6	18.884	1.0758

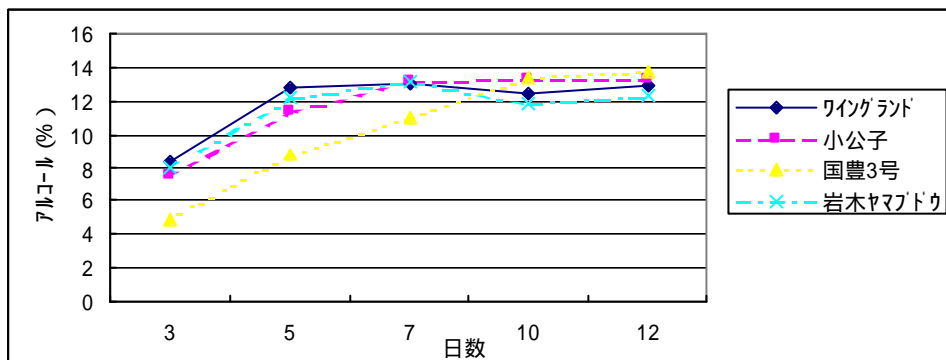


Fig.1 発酵経過

Table.3 ワイン成分の比較

ブドウ品種	pH	酸度(ml)	色 (O.D530)	比重	エキス (g/100ml)	アルコール(%)	ポリフェノール (ppm)
ワイングランド	3.55	10.359	1.267	0.9937	2.6	11.0	1163
小公子	3.24	13.120	4.432	0.9954	3.0	12.2	2187
国豊3号	3.61	9.469	0.350	0.9926	3.4	11.3	906
岩木ヤマブドウ	3.00	17.033	3.687	0.9965	3.3	12.1	1677

色 :5倍希釈

Table.4 官能評価

ブドウ品種	短評
ワイングランド	香特徴的であるが、酸味ハナレル。
小公子	品種香があり、味に幅がある
国豊3号	香にクセがあり、味が薄い。
岩木ヤマブドウ	個性的な香があり、酸味が強い。

平成14年度 試験研究成果概要

発行 平成15年6月
発行者 秋田県総合食品研究所
〒010-1623
秋田市新屋町字砂奴寄4-26
tel 018-888-2000(代)
fax 018-823-7215