

平成 21 年度

# 試験研究成果概要

秋田県総合食品研究センター



平成 21 年度

試験研究成果の概要

## 目 次

### 1. 平成21年度試験研究成果概要

#### (1) 食品の生理機能と物理化学特性解明及び利用技術に関する研究

#### (2) 食品及び酒類の安全性と高度加工技術に関する研究

##### 新たな市場展開を指向した秋田特産食品のための高度技術開発

新しい秋田特産ハタハタ加工品のための高度技術開発	4
新しい秋田特産麺類加工品のための高度技術開発	6
新しい秋田特産食品の品質管理技術開発	8

##### 県産米の新規用途開発によるさらなる高付加価値化に関する開発

米飯の物性解明と加工米飯の高品質化	10
米粉利用食品および利用システムの開発	12

##### 新たな消費市場に対応した新規酒類製造法の開発

新たな消費市場に対応した新規酒類製造法の開発	14
------------------------	----

#### (3) 微生物・酵素の利用技術の高度化と環境対策に関する研究

##### 白神微生物の産業利用に関する研究

既存開発特許技術を活用した製品開発	16
白神こだま酵母の多次元利用と保存株の特性解析及び実用化	18

##### 麹菌等の高度利用化技術の開発

多様な麹菌を活用した発酵食品の開発	20
放線菌や細菌類との協約的分解系の検討	22
麹菌等の高度利用化技術の開発(完了)	24

##### 米加工副産物の有効利用に関する研究

米加工副産物の有効利用に関する研究(完了)	26
-----------------------	----

##### 食品廃棄物・農林水産廃棄物のカスケード利用によるゼロエミッション技術の開発

食品廃棄物・農林水産廃棄物を効率的にバイオエタノールに変換する技術の開発	28
食品廃棄物・農林水産廃棄物変換プロセスから副生する物質の処理・再利用技術の開発	30
食品廃棄物から二次加工食品製造技術の開発	32

食品廃棄物・農林水産廃棄物のカスケード利用によるゼロエミッション技術の開発(完了)・・・ 34

(4) その他研究 ..... 36

---

研究課題：新たな市場展開を指向した秋田特産食品のための高度技術開発

（1）新しい秋田特産ハタハタ加工品のための高度技術

開発担当部署：食品開発グループ

担当者名：塚本研一

協力分担：

予算区分：県単

研究期間：継 2009年度（2008～2010年度）

---

## 1. 目的

秋田らしい食品、秋田独自の食品を残していくためには食習慣、食文化の継承が重要であり、現段階から秋田の食品について食習慣として定着させる必要がある。しかし、伝統食品や特産食品等は風味、食感などの嗜好性や品質管理方法など安全性の点で特に団塊ジュニアから下の世代には受け入れられないものが増えている。したがって品質管理を含めた高度加工技術を開発して次世代でも好まれる食品に進化させることが有効な方法となる。本研究課題では風味や物性を改良するための技術開発および品質管理のための簡易分析手法の開発を行い、最終的には開発した技術の普及を全体の目標とする。特にハタハタは独特の生臭みがあり敬遠される要因のひとつとなっているため、その物質解明、除去技術開発、除去した新しい食品の開発を行う。これらの研究成果により秋田特産食品の品質改善と新製品化が可能となり、新たな市場展開が期待される。今年度はハタハタについてその消費拡大のため、基礎的知見となる生臭み物質の解明と除去技術の開発を目的とする。

## 2. 方法

- ・ハタハタ生臭み除去方法について食塩処理、クエン酸処理の効果について検討した。
- ・生臭みを除去した食品試作試験を行った。
- ・ハタハタの生卵からブリコ井の素製造方法について検討した。

## 3. 結果の概要

- ・ハタハタ生臭み除去方法について食塩処理、クエン酸処理の併用が効果的であった。
- ・生臭みの除去には新に揚げ干し法も有効であることがわかった。
- ・生臭みを除去した食品の試作はハタハタ乾製品について行い、甘味系、塩味系の2種類の製造方法を確立した。
- ・製造方法は次の工程を基本とする。  
冷凍ハタハタ→解凍・水洗→2.5%食塩水（pH5クエン酸溶液）浸漬→50℃乾燥→  
植物油揚げ→仕上げ乾燥→ハタハタ乾製品  
→つや出しコーティング→仕上げ乾燥→ハタハタ乾製品
- ・ハタハタの生卵からブリコ井の素について70～90℃、5～10分の加熱後、冷凍保存で粘りが良好な状態で残ることが確認された。

## 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

生臭み物質の除去技術が確立したことから、除去技術を応用した食品開発を優先して進める。

## 5. 結果の発表、活用等

技術移転企業と連携して商品開発を進める予定である。



研究課題：新たな市場展開を指向した秋田特産食品のための高度技術開発

(2) 新しい秋田特産麺類加工品のための高度技術開発

①いなにわうどん等の伝統麺食品の新規用途調査および用途開発

担当部署：食品開発グループ

担当者名：高島 聡

協力分担：なし

予算区分：県単

研究期間：継 2008年度（2008～2010年度）

### 1. 目的

わが国の年齢構成は団塊の世代や団塊ジュニア世代など偏りが多いことが特徴であるが、本研究では団塊ジュニア世代以下（概ね35歳以下）をターゲットとして食品開発を行う。本課題では、いなにわうどん等の伝統麺食品の新規用途調査を行い、従来にないいなにわうどん等の用途開発を行い、マーケットに提案し、団塊ジュニア世代以下（概ね35歳以下）向けの市場の開拓を検討する。

### 2. 方法

本年度は新規用途調査の応用として、2008年度検討したスプーンによるいなにわうどんの喫食方法の検討に基づき、従来の稲庭うどん商品にあまりない長さ規格における商品案の開発を行った。また、これらの長さ規格の販売促進を想定したメニュー案について検討を行った。

### 3. 結果の概要

2008年度において、喫食者が「麺としての認識がもてる」＋「スプーンで食べたときの食べやすい」ための長さについて検討した。

「麺としての認識がもてる」＋「スプーンで食べたときの食べやすい」長さLは、スプーンの形状に依存し、麺の基準となる長さLの範囲は、以下のような範囲が考えられた。

$$\sqrt{a^2 + b^2} < L < \frac{3}{2} \sqrt{a^2 + b^2}$$

スプーンの長径：a、スプーンの短径：b

食事用の大きさのスプーンの長径：a、スプーンの短径：bを測定したところ、その平均値として、

a = 5.5 cm, b = 4.0 cmを得たので、これより長さLは、

$$6.8 \text{ cm} < L < 10.2 \text{ cm}$$

の範囲を得た。これに基づき、スープ用の麺として、「稲庭短冊饅饨」を商品案を開発した。

また、これとは別に、1/2の長さ（3.4 cm < L < 5.1 cm）のパスタサラダ用の稲庭うどんとして、「稲庭短冊饅饨（さらだ）」の商品案およびメニュー例を開発した。



<商品案とメニュー例>

麺	食べ方	メニュー例
稲庭短冊饅饨	温かい麺	吸い物の椀種
		卵スープ饅饨
		短冊饅饨のミネストローニエ
	冷たい麺	カップ稲庭饅饨
		わんこ稲庭饅饨
		冷製スープ稲庭饅饨
稲庭短冊饅饨 (さらだ)	その他	トマトとバジルの稲庭饅饨
		サラダジュリエンス
		カニ饅饨サラダ
		フルーツうどんサラダ

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

2009年度においての基礎的な調査をふまえ、2010年度は、団塊ジュニア世代以下（概ね35歳以下）向けの市場の開拓が可能と思われる用途開発について検討を行う。具体的な検討にあたっては稲庭饅饨メーカー、稲庭うどん協議会との連携も検討する。

5. 結果の発表、活用等

特になし

研究課題：新たな市場展開を指向した秋田特産食品のための高度技術開発

(4) 新しい秋田特産食品の品質管理技術開発

①近赤外領域分光技術による食品非破壊分析の品質管理適正の把握

担当部署：食品機能グループ

担当者名：熊谷昌則、高橋徹

協力分担：

予算区分：県単

研究期間：継 2009年度 (2008～2010年度)

1. 目的

次世代に向けた県産農林水産物と特産食品の高度加工技術に関する研究を目的として、品質管理のための簡易分析手法の開発を行うことを目標とする。今年度は、近赤外分光技術による米加工品(きりたんぼ)の水分分析の可能性について検討した。

2. 方法

市販のきりたんぼを40℃の恒温乾燥庫内で時間を変えて乾燥処理し、41.9%～46.3%の範囲に水分値を示す18本のモデル試料を調製した。これらを用いて、ニレコ社製NIRS6500により800nm～1100nmまでの近赤外領域の透過反射スペクトルを3回繰り返し測定し、計54本のスペクトルを得た。検量線はPLS回帰分析により作成し、妥当性の検証はLeave-one-out法で行った。

3. 結果の概要

図1に全試料の原スペクトルを示す。図2の水分との相関スペクトルから水に帰属される970nm近傍の吸光度の相関が高いことが分かる。二次微分スペクトルを用いてPLS回帰で求めた検量線による実測値と予測値の関係を図3に示す。このとき、予測値とのずれ最大値は2.31%、ずれ平均値は-0.08%であった。

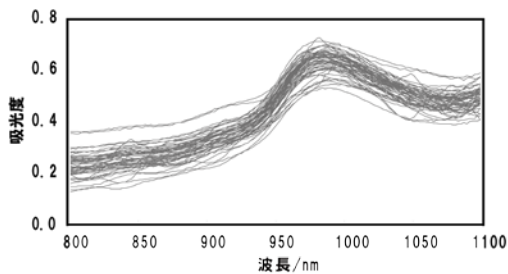


図1 原スペクトル

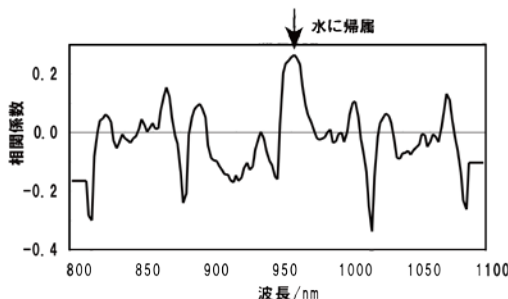


図2 相関スペクトル

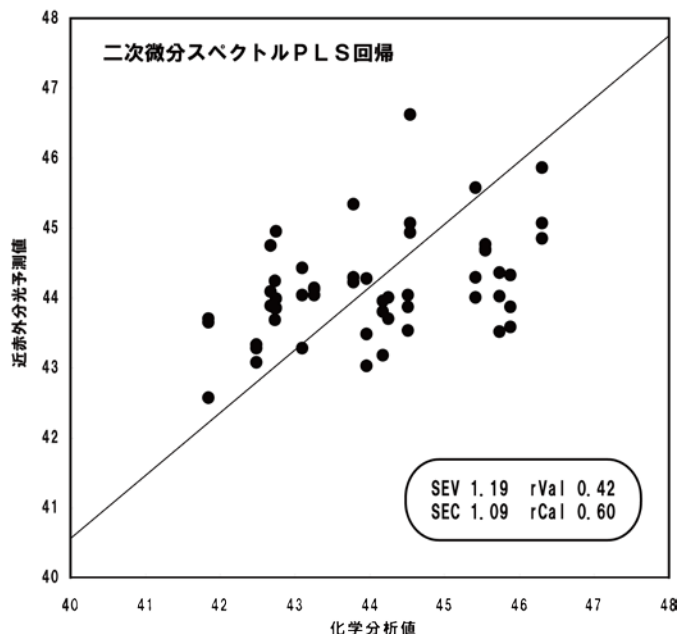


図3 実測値(化学分析値) vs 予測値

4. 今後の問題点と次年度以降の計画

きりたんぼの水分分析として、実用的精度は得られたものの、さらなる精度向上が必要である。

5. 結果の発表、活用等



研究課題：県産米の新規用途開発によるさらなる高付加価値化に関する研究

1. 米飯の物性解明と加工米飯等の高品質化

担当部署：食品開発グループ

担当者名：大能俊久

協力分担：

予算区分：県単

研究期間：継 2009年度（2008～2010年度）

## 1. 目的

これまでの研究により、数種のプロテアーゼによって米飯テクスチャーを改良できることが分かった。しかし、プロテアーゼと米飯テクスチャーの関係については分かっていない点が多い。そこで、プロテアーゼにより何が起こるかについて、一部検討を行った。

## 2. 方法

### 1) 米飯テクスチャーの検討

0.25%のプロテアーゼ溶液で古米 10g を所定時間浸漬後、炊飯して米飯テクスチャーをテンシプレッサーで測定した。

### 2) 脱離粗タンパク質量の測定

0.25%のプロテアーゼ溶液で古米を所定時間浸漬後、浸漬液へ可溶化した粗タンパク質量を元素分析装置で測定した。

## 3. 結果の概要

短時間浸漬では米飯テクスチャーを改良しないプロテアーゼの中に、浸漬時間を長くすることで米飯を軟化させ、バランス度を上昇させる効果が認められるものが存在した。また、浸漬を長くすることで浸漬液へ可溶化して脱離する粗タンパク質量が大幅に増加した。

## 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

プロテアーゼや米タンパク質に着眼した米飯テクスチャー改良を念頭に、米飯類の改質技術や製造方法を確立する。

## 5. 結果の発表、活用等

研究成果の一部について、日本食品科学工学会等で発表を予定している。また、一部の技術については、今後県内企業への技術移転を検討する。



研究課題：県産米の新規用途開発によるさらなる高付加価値化に関する研究

米粉利用商品および利用システムの開発

担当部署：食品開発グループ

担当者名：高島 聡

協力分担：なし

予算区分：県単

研究期間：継 2008年度（2008～2010年度）、

## 1. 目的

米利用を粉体としての利用の視点から捉え、業務用食品加工原料としての米およびその副産物の利用について基礎研究から商品開発までを行う。

粉体としての米の利用として米粉を使用した新たな商品や市場形成に資する研究を行う。

2009年度は特に製麺分野における米粉利用商品および米粉の利用システムの開発に関する検討を行った。

## 2. 方法

米粉を可能と思われる製麺商品のマーケティング調査を行い、開発を目指す商品カテゴリーを検討した。検討したカテゴリーに基づき、具体的な商品群について、試作を行い、配合等の検討を行った。商品カテゴリーのマーケティング分析においては、コロンビア大学のバーンド・H・シュミットが開発したマーケティング分析手法である経験価値モジュールを用いて分析した。

検討した商品コンセプト、配合等に基づき、商品のプロトタイプを作成し、商品化の検討を行った。

## 3. 結果の概要

コロンビア大学のバーンド・H・シュミットは、マーケティング分析手法として、経験価値マーケティングを提唱し、商品を他の商品と差別化し、ブランド化する価値とした「経験価値」を「SENCE」、「FEEL」、「THINK」、「ACT」、「RELATE」の5つのモジュールに分類している。

「SENCE」は、顧客の五感（視覚・聴覚・触覚・味覚・嗅覚）に直接的に訴えかけることにより審美的な楽しみや刺激的な興奮を生み出す感覚的経験価値とし、「FEEL」は、顧客の内面にある感情や気分を訴えかけることにより情緒的に生み出される経験価値、「THINK」は、顧客の創造力を引き出す認知的・問題解決的な経験を通して顧客の知性に訴求する経験価値、「ACT」は、肉体的な経験価値、ライフスタイル、そして他人との相互作用に訴える経験価値と説明し、「RELATE」は、集団社会における個人の自己実現への欲求に訴求する経験価値としている。

表1 あきた純米めん（仮称）に付加する経験価値

分類	あきた純米めんに付加する経験価値
SENCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>・もちもちでしっとり感のある餅様の食感</li> <li>・ほんのり香るご飯の香り</li> <li>・味わい深い米（秋田県産米）の旨味</li> </ul>
FEEL	<p>「お米のいいとこどり！」感における満足感</p> <p>いつもの麺と違う「日本人のための日本の麺」という優越感</p> <p>「自然豊かな米どころ・あきた」への郷愁</p>
THINK	<p>米粉での製麺技術や職人技、うんちく</p> <p>「もちもち感」などの独特の食感等があり、小麦粉麺などの他の麺と異なる麺文化を創造できるかもしれないことに対する知的刺激</p>
ACT	国産原料使用、環境負荷も少ないことを選択するライフスタイルの差別化の自意識
RELATE	伝統的食品である米食を見直し、あたらしい食文化の創造することの喜び、満足感

表2 米粉・製麺商品案カテゴリー例

トータルブランド	カテゴリーブランド	商品案カテゴリー	商品案例
“あきた純米”	あきた純米めん	あきた純米うどん	純米うどん
			純米よもぎうどん・・・
		あきた純米中華めん	純米らーめん
			純米冷やし中華・・・
		あきた純米平めん	純米きしめん
			純米カレーうどん・・・
	あきた純米ぱすた	あきた純米すば	純米すばげてい
			純米生すばげてい・・・
		あきた純米まかろに	純米シェルまかろに
			純米エルゴまかろに・・・
あきた純米ふいとちーね	純米ふいとちーね		
	純米生ふいとちーね		

#### 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

2010年度は最終年度につき、米粉の利用拡大を目的とした一般消費者向けの米粉利用システムの開発を行い、研修会などにより、その有効性の検討の実証試験を行う。

#### 5. 結果の発表、活用等

2009年日本感性工学会年次大会（芝浦工業大学）

農商工等連携促進法に基づく農商工等連携事業計画 の実施（2008年度第2回認定）

研究課題：新たな消費市場に対応した新規酒類製造法の開発（全体）

担当部署：酒類グループ

担当者名：大野 剛、杉本勇人、高橋仁、田口隆信

協力分担：なし

予算区分：県単

研究期間：完 2009年度（2007～2009年度）

## 1. 目的

酒類製造業界は新酒税法が施行され、清酒副原料の使用量制限やリキュール製造免許の交付などの大変革があった。また酒類嗜好の多様化は更に進み、新酒税法下でそれに対応した商品開発が必要である。そこで我々は、酒類市場動向の調査結果をふまえて、副原料の効果的な使用法など、様々なニーズに対応した新規酒造技術を開発する。また、秋田らしい魅力ある地域ブランド商品をねらい、地域の特徴ある果実類を使用したリキュール、地域の米・酵母を用いたアルコール飲料の開発も行なう。

## 2. 方法

### 1) アルコール飲料市場動向調査

国税庁酒税課の調査研究報告を始めとする各種統計等を分析し、目的酒質の抽出を行った。

### 2) 糖添加清酒の製造・開発

糖添加により「フルーティ」「軽快さ」「後口良」などのキーワードをみたく「比較的安価」な清酒製造技術の開発を行った。

### 3) 特産果樹等を利用したリキュールの製造・開発

農畜産振興課、地域振興局、果樹試験場と連携し、県産リンゴ品種を用いたリキュール製造と技術移転を行った。

### 4) 新規格純米酒の検討

「秋田酒こまち」を活かした精米歩合 70%以上の純米酒製造法の検討とマニュアル化を行った。

## 3. 結果の概要

1) 低年齢層に消費意識があり、その階層の求める「フルーティ」「軽快さ」「後口良」などのキーワードを抽出し、それをみたく「比較的安価」な清酒製造技術の開発を行うこととした。

2) 前年度までに得られた知見を元に最適と思われる糖添加量と添加方法を検討した。

香気成分の生成は留時一括添加では一部増強され、分割添加では増強は見られなかった。

個別成分では酢酸イソアミル生成が増強される区分が多く見られた。（最大95%増）

生成酒は酸度が10～15%、最大24%増加、アミノ酸度30%程度、最大45%低下するなどの特徴を示し、低精白酒の難点である雑味成分の元となるアミノ酸度低減と吟醸様酒類の製造に重要な香気成分の生成に関しての知見が得られた。

これによりフルーティで酸味がありアミノ酸度の低い特徴的な清酒製造が可能と思われた。

これら技術は特に酸生成が低めな高香気生成系酵母に有効と思われた。



## 糖添加清酒の特徴

### 製成酒の成分

	略称	酵母	糖添加法	アルコール	酸度	アミノ酸度	グルコース	AmAc	EtCap	AmOH
1	3-N	No. 12	無添加	17.1	1.7	1.0	1.3	7.5	4.3	172.1
2	3-40	No. 12	40%一括	16.7	2.1	0.7	3.9	9.8	3.3	161.5
3	3-30	No. 12	30%一括	18.2	2.0	0.8	2.4	10.9	2.9	183.7
4	3-20	No. 12	20%分割	18.0	1.8	0.7	2.2	7.0	2.4	181.3
5	4-N	No. 15	無添加	17.8	1.7	1.0	1.0	3.1	7.1	128.9
6	4-40	No. 15	40%一括	17.7	1.8	0.6	2.7	5.7	4.9	131.6
7	4-30	No. 15	30%一括	18.0	1.8	0.6	2.3	6.0	6.0	134.9
8	4-20	No. 15	20%分割	19.0	1.8	0.7	1.5	3.2	5.3	144.0

### 無添加もろみを100%とした各成分比

	略称	酵母	糖添加法	アルコール	酸度	アミノ酸度	グルコース	AmAc	EtCap	AmOH
2	3-40	No. 12	40%一括	98%	124%	68%	302%	131%	77%	94%
3	3-30	No. 12	30%一括	106%	118%	84%	184%	145%	66%	107%
4	3-20	No. 12	20%分割	105%	106%	74%	167%	93%	57%	105%
6	4-40	No. 15	40%一括	99%	109%	55%	277%	185%	69%	102%
7	4-30	No. 15	30%一括	101%	109%	60%	234%	195%	84%	105%
8	4-20	No. 15	20%分割	107%	109%	70%	156%	104%	75%	112%

- 3) 特産果樹等を利用したりキュールの製造・開発についてはリンゴりキュールの技術移転を実施した。
- 4) 「秋田酒こまち」と高酢酸イソアミル生成酵母A(秋田酵母No. 12)と高カプロン酸エチル生成酵母B(秋田酵母No. 15)の純米酒製造試験を行い、新麹菌株「吟味」と「N54G」、新酵母(N o. 12, No. 15)に製造し、1回以内の加熱処理で商品化された純米酒を新規格純米酒として推奨した。また「秋田酒こまち」の特徴を活かした精米歩合70%以上の純米酒の製造法の検討とマニュアル化を行った。これにより、従来よりアミノ酸が少ない安価で高品質な純米酒製造が期待できる。

### 「秋田酒こまち」新規格純米酒の製成酒成分

順号	原料米	酵母	種類	醸日数 (日)	一般成分				香気成分(ppm)			秋田酵母 No.12
					日本酒度	アルコール (%)	酸度 (ml)	アミ/酸度 (ml)	i-AmOAc	i-AmOH	EtOCap	
1号	秋田酒こまち55%	No.12	吟味	34	-0.9	16.9	1.9	1.0	13.6	187	3.8	秋田酵母 No.15 香りは、高カプロン酸エチル(メロン様)タイプ。 味は、華やかでふくらみのある酒質。
2号	秋田酒こまち55%	No.15	吟味	30	-0.6	17.1	1.8	1.1	4.7	139	6.2	
3号	秋田酒こまち55%	AK-1	吟味	35	-1.2	16.8	1.8	0.9	5.7	163	2.9	

## 4. 成果の活用面と留意点

各方面へ引き続き技術移転、商品化を図る。

糖添加酒、精米歩合70%以上の「秋田酒こまち」清酒製造とも、安価追求ではなく高品質化、品質維持も意識した商品開発を心掛ける。

## 5. 残された問題とその対応

研究課題：白神微生物の産業利用に関する研究

既存開発特許技術を活用した製品開発

担当部署：管理室

担当者名：高橋砂織

協力分担：小笠原博信（応用発酵・酵素・微生物G）、蕪澤悟（国際農林水産業研究センター）

予算区分：県単

研究期間：2009年度（2008～2010年度）

## 1. 目的

白神微生物関連の成果として、*Paenibacillus* sp. B38 株由来の新規 D-アスパラギン酸エンドペチダーゼである Paenidase（パエニダーゼ）生産菌を取得し、酵素ならびに生産菌の特許を申請した。本研究においては、この特許技術の有効活用を目指す。本年度は、パエニダーゼの機能解析の一端としてパエニダーゼ阻害剤生産菌の特性解析と阻害物質（仮称：Paenitin、パエニチン）の精製方法について検討した。

## 2. 方法

**パエニダーゼ遺伝子のクローニングと部位特異的変異体の作成：**パエニダーゼの部分アミノ酸配列を基に、各種フォワード及びリバースプライマーを合成し、ゲノム遺伝子を鋳型として PCR 法によりパエニダーゼ遺伝子をクローニングした。また、各種部位特異的変異体を作成し、大腸菌での発現系を用いて解析した。

***Streptomyces* sp. F70 株の培養：**保存菌株は、加糖ブイヨン培地（1% グルコース、1% ポリペプトン、0.5% 牛肉エキスもしくは酵母エキス、0.3% NaCl、pH 7.0）を用いて、30℃にて間振とう培養した。培養後、遠心分離にて培養上清を回収し、培地組成の違いによる酵素阻害活性を検討した。

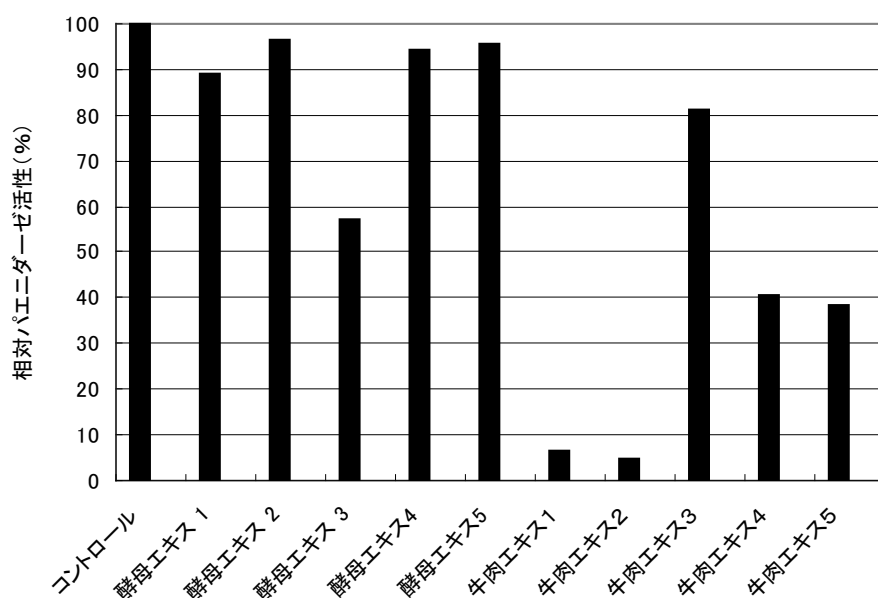
**パエニダーゼの活性：**新規合成基質 Suc-[D-Asp]-pNA を考案し、（株）ペプチド研究所にて依頼合成した。本基質及び市販の合成基質 Suc-[D-Asp]-MCA を用いてパエニダーゼ活性を測定した。

**パエニチンの精製：***Streptomyces* sp. F70 株の牛肉エキス培地培養液より種々のクロマトグラフィーによりパエニチンの精製を試みた。

## 3. 結果の概要

**1) 培地成分の違いによるパエニダーゼ阻害物質（パエニチン）の生産性：**最近、牛プリオン病の関係で、培地である牛肉エキスの入手が困難となっている。これまで、米国社製の牛肉エキスを用いて保存菌株を培養し、その培地を用いて酵素や阻害物質の探索を進めてきたが、培地の変更を考える必要がある。そこで、現在入手可能な酵母エキスと既存の牛肉エキスを用いてパエニダーゼ阻害物質の生産性を検討した。その結果、酵母エキスでは菌の増殖には問題は無いが、阻害物質の生産性が低い傾向が認められた（図1）。今後、各種培地を用いて阻害物質生産性の向上を検討する必要がある。また、各種クロマトグラフィーを用いて、パエニチンの精製条件を検討した。

**2) パエニダーゼ遺伝子のクローニングと部位変異体の解析：**パエニダーゼの全領域を含むクローンを PCR 法により取得した。大腸菌における発現においてパエニダーゼは前駆体として生合成されることが示唆された。触媒残基と想定されるアミノ酸残基の変位体は、Western Blotting で前駆体の発現は確認されたが、パエニダーゼ活性は認められなかった。



(図 1. *Streptomyces sp.* F70 株の培地の種類によるパエニダーゼ阻害物質の生産性)

#### 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

パエニダーゼの大腸菌での発現系が確立されたことから、大量発現と結晶化と高次構造解析を進める予定である。また、パエニチンの精製と構造解析も併せて行い、酵素の構造と機能相関を明らかとする必要がある。

#### 5. 結果の発表、活用等 (学会発表)

- 1<sup>st</sup>International Conference of D-amino acid research. “Primary structure and functional expression in *Escherichia coli* of novel D-aspartyl endopeptidase, paenidase, from prokaryote: Satoru Nirasawa and Saori Takahashi”  
(2009年7月1日発表、淡路夢舞台国際会議場、兵庫県淡路市)
- 第32回日本分子生物学会 “Site-directed mutagenesis of bacterial D-aspartyl endopeptidase (paenidase): Satoru Nirasawa and Saori Takahashi”  
(2009年12月9日発表、パシフィコ横浜、横浜市)
- 2010年度日本農芸化学会大会「原核微生物由来 D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ (Paenidase) の部位特異的変異法による特性解明: 葦澤 悟、高橋砂織」  
(2010年3月発表予定、東京大学、東京都)

研究課題：白神微生物の産業利用に関する研究

白神こだま酵母の多次元利用と保存株の特性解析及び実用化

担当部署：醸造試験場

担当者名：高橋慶太郎

協力分担：八峰町・八峰白神自然食品(株)・バイオファーム研究所・ADEKA・光風舎・能代市・  
(有)ポークランド・秋田十條化成(株)・(株)夢市場・(株)サラ秋田白神

予算区分：県単

研究期間：継・2009年度（2008～2010年度）

## 1. 目的

これまでの研究により、白神微生物は環境ストレスに対して高い抵抗性を持つ、増殖性が高い、同種の菌種より雑食性であるという共通する性質を有する。これらの特性は物質変換や物質生産・環境保全の分野で有効なものである。また食習慣のある菌も数多く取得されている。実用株としては、白神こだま酵母が製パン用として普及し、産業振興への寄与も大きい。実用株以外の大多数の白神微生物はその一部で特性解明が進展しているが、実用化には至っていない。これらの貴重な微生物遺伝子資源を活用した技術と製品開発を行い、産業振興に繋げることを目的とする。

21年度は白神こだま酵母の多次元利用を図り、製パン用以外の用途開発を行う。また、保存株の特性解析及び実用化を進める。さらに、循環型製造システムの構築のため1グループ以上の環境保全微生物群の選抜を行う。

## 2. 方法

- ・供試菌株；当研究所で白神山地の土壌より分離・保存している真菌類5236株及び市販白神こだま酵母。
- ・白神こだま酵母の多次元利用；どぶろく特区でのどぶろく製造及び藤里町でのそば菓子製造を検討した。
- ・特性解析；固体培地上での菌体増殖度を観察した。
- ・糖セレブロシド定性分析；定法により菌体より抽出・分画後、TLCでクロロホルム・メタノール・水（65:25:4）により展開し硫酸噴霧後加熱発色。
- ・環境保全微生物群の選抜；小麦ふすま等を混合したモデル培地に白神山地から採取した土を接種し、好氣的条件下で4℃及び30℃で培養し、黒色度で判定し選抜した。

## 3. 結果の概要

白神こだま酵母の多次元利用では、白神乳酸菌3138aCとの併用で八峰町のどぶろく特区での濁酒「白神の炎（あかり）」の製造が開始された。また、藤里町の企業で、そば粉を白神乳酸菌「作々楽」発酵液を混合し、発酵させたそば菓子「仙人の一休（いっぶく）」の製造・販売が始まった。さらに、昨年度共同開発した新規調味料「白神塩もろみ」を使用した種々の試作品が開発されるとともに、本資材を使用する八峰町農林水産物処理加工施設製造品利用組合が設立された。本資材は、豚肉加工品での活用も検討し、良好な熟成結果が得られた。

保存株の特性解析及び実用化では糖セレブロシド蓄積株の実用化に関して、昨年度までにガラクトシルセレブロシド分解活性の高さより選抜した2株（No. 3679, No. 4431）は、培養前期に糖セレブロシドを蓄積することから、より高い蓄積株取得のため培養後期蓄積株の選抜を行ったところ、1株（No. 2684）が取得された。本株は、*Candida pelliculosa*と簡易同定された。

環境保全微生物群の選抜では、4・20・37℃でそれぞれ高増殖性の微生物を含む微生物群2群を選抜し、能代市産のゼオライトに固定化した乾燥体を用いて、能代市コンポスト見なおし隊で実証試験を行ったところ良好なコンポスト製造が確認された。

#### 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

次年度、白神こだま酵母の多次元利用では、糖セレブロシド蓄積株の実用化を進める。また、循環型製造システムの構築では、選抜した環境保全微生物群の製品化を検討する。

#### 5. 結果の発表、活用等

- ・「白神山地からのトレハロース高蓄積酵母の分離とその活用」  
(日本応用糖質化学会 21 年度大会講演、21 年 9 月、弘前大学)
- ・「白神微生物と環境保全」  
(平成 21 年度日本学術会議東北地区会議公開学術講演会講演、21 年 12 月、弘前市)

研究課題：麴菌等の高度利用化技術の開発

多様な麴菌を活用した発酵食品の開発

担当部署：応用発酵・酵素・微生物グループ

担当者名：渡辺隆幸、小笠原博信

協力分担：秋田今野商店、酒類総研

予算区分：県単

研究期間：継 2009年度（2007～2009年度）

## 1. 目的

秋田今野商店と共同開発した味噌用麴菌 AOK139 は、リパーゼ等の酵素力価が高い特長の反面、チロシナーゼ活性が高いため麴褐変性を有し、また製麴特性が晩生であることが、その普及を妨げる要因となっている。AOK139 の育種改良により長所を保持しつつ、短所の改善を行うことにより発酵食品の品質高度化に大きな寄与が見込まれる。本実施課題では AOK139 由来の改良株および多様な麴菌株の活用による発酵食品の品質向上を目的とする。

平成 21 年度は AOK139 変異株を用いた試験製造を実施する。

## 2. 方法

製造試験（シャーレ麴）を実施し、酵素力測定（国税庁所定分析法、キット法）を行った。

## 3. 結果の概要

前年度まで多様な麴菌として酒類総研の保有株 RIB 株、8 株および秋田今野商店市販種麴 5 種について米麴、味噌の製造試験を実施した。RIB 株に関しては味噌製造に適性のある株が数株あることを認めた。また  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性に着目した市販麴菌株の比較では AOK139 が最も高い  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を有していることを明らかにしている。本年度において AOK139 の変異株の麴の酵素力価を測定した結果、変異株 WS61、W72、W72S とともに十分な製麴特性を有することが認められた。

表 AOK139 変異株試作麴の結果

	製麴速度	糖化力	$\alpha$ グルコシダーゼ	$\alpha$ アミラーゼ	ACP
AOK139	+++	858	0.653	790	14843
WS61	++	530	0.390	443	12158
W72	++	528	0.499	480	11399
W72S	+	308	0.310	96	8072

## 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

菌により生育速度に違いが認められ、変異株に適した製麴方法を検討する必要がある。

次年度以降、新規課題「トランスポゾン技術を応用した多様な優良麴菌遺伝子バンクの構築」において菌の特長を活用した新規発酵食品の製造技術開発を実施する。

## 5. 成果の発表、活用等

なし



研究課題：麹菌等の高度利用化技術の開発

放線菌や細菌類との協約的分解系の検討

担当部署：応用発酵・酵素・微生物グループ、管理室

担当者名：金子隆宏、小笠原博信、高橋砂織

協力分担：

予算区分：県単

研究期間：継 2009年度（2007～2009年度）

## 1. 目的

生澱粉分解酵素(RSA)による生澱粉の糖化は、澱粉の $\alpha$ 化が不要でありコストメリットが高い。また、生澱粉糖化によって生じた有孔化澱粉は、原料澱粉とは異なった物性や、包接能を示すことなどが期待される。これまでに金子らは放線菌(E-2248株)、*Aeromonas*属(50-2株)、*B. cereus*株(C-株)に由来するRSAを見出しており、E-2248株由来RSAの蛋白レベル、遺伝子レベルでの解析も終了している。本年度は50-2株由来RSA酵素の特性解析、遺伝子のクローニング、及びC-株由来RSA遺伝子のクローニングを試みた。

## 2. 方法

菌株はすべて県内某製粉工場排水汚泥から得られたものである。菌株の培養上清からButyl-Toyopearl及びToyopearl-HW55(S)などで酵素の精製を試みた。酵素活性は主にSomogyi-Nelson法で測定した。生成糖の組成はHPAEC(DIONEX社)で分析した。遺伝子のクローニングは二段階PCR法を試みた。プライマーはシグマ社製、DNAポリメラーゼはTaKaRaのEx-Taqを使用した。サザンハイブリダイゼーションはNBT/BCIPでの発色により検出した。

## 3. 結果の概要

サザンハイブリダイゼーションを併用した二段階PCR法により50-2株由来のRSA遺伝子をクローニングした。本遺伝子は2349bp上にコードされており、783アミノ酸(AA)残基(図1)、分子量83.7kDaに相当した。そのN-末端側約500AAはE-2248RSAと類似しており、C-末端側250AAは特異なドメイン(おそらく生澱粉吸着ドメイン)であった(図2)。大腸菌による粗酵素液ではpH6.0、40°Cで最大の力価を示したが、35°Cでも最大の90%程度、30°Cで70%程度の力価を示した。またHPAEC分析による生成糖の組成より、本RSAは $\alpha$ -amylaseタイプと思われた。なお、C-株由来RSAも同様に二段階PCRによりクローニング中である。

## 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

得られたRSA3者はそれぞれ異なる形状を残しながら生澱粉粒を穿孔していく。そのため、得られた有孔化澱粉もそれぞれ異なった物性変化を示すことが予想され、様々な用途への使い分けが期待される。これらの利用研究は新規課題や外部予算などで引き続き取り組んでいきたい。

## 5. 結果の発表、活用等

- ・結果の文献発表：秋田県総合食品研究所報告 第11号(2009年) 9-16ページ
- ・研究会への報告：なし
- ・マスコミ等への発表：なし
- ・知的所有権の取得：なし



	10	20	30	40	50	60
MHSTLLRTAL	LTAALGSFSH	AATAEGVMVH	LFQWKFNDA	NECETVLGPK	GFGGVQITPP	
	70	80	90	100	110	120
AEHKQGSQVW	WTVYQPVSFK	NFNSFGGSEA	ELRSMIARCN	AAGVKVYADA	VFNQLASGSG	
	130	140	150	160	170	180
TATGGGSYNA	GQYQYPQFGY	NDFHHSGDIT	NYGDSNNVWN	GALYGMXDLN	TGSPYVQDQI	
	190	200	210	220	230	240
ATYMKTLIGW	GVAGFRIDAA	KHMAPSDVKA	ILDKAGSPKA	YLEVIGAGGE	SPDIQPGRYT	
	250	260	270	280	290	300
YIDTVTDFKY	GTDLAANFNG	QIKNLKTLGE	SWGLLPSAKA	FVFFVNHGRE	RGHGGGGMLT	
	310	320	330	340	350	360
FMSGARYDLA	XTFMMAWPYG	WKQVMGSRF	ENMSTYETDK	GAPGSTPCTD	SQWNCEQRRP	
	370	380	390	400	410	420
TIMMALFHN	RTEGQPVNNW	WDNGNNQIAF	GRGDKGFVAI	NNESGSLVAS	LQTGLPAGEY	
	430	440	450	460	470	480
CNLXXGNDYC	SGGYVTVDGS	GKASLNVPGM	KAAAIAGCT	KASPCGGSAL	PGTKFSSMNL	
	490	500	510	520	530	540
RGTHNAWGNT	PMTVDANRVW	SATLTLTGNG	DATGAQRFKF	DVFGNWAENY	GDNEGDGIAD	
	550	560	570	580	590	600
KGSSKDILVS	GTGSHRITLN	ESDLRYTVTP	LTSNQAPVAA	LSPKTLVKA	GESVVLDAASA	
	610	620	630	640	650	660
SRDDGGVVS	SWSSGGTAAT	ETVRFDTXGT	HTVTVTVTDA	EGLTASASAT	VTVTDDNGTY	
	670	680	690	700	710	720
ASVLPPTLNR	GTPNAWGLA	MTLVADNQWE	ALVTFDQGAN	QRFRFDVKGD	WSKNYGDITNK	
	730	740	750	760	770	780
DGVAELAGSD	ILTSVTGQYR	VRFNDQTLQY	SLTPVSVGLR	EELRQPEHSR	HHQQLGGHPPH	
	790	800	810	820	830	840

VAG\*

図1. 50-2株由来RSAの推定されるアミノ酸配列(暫定)

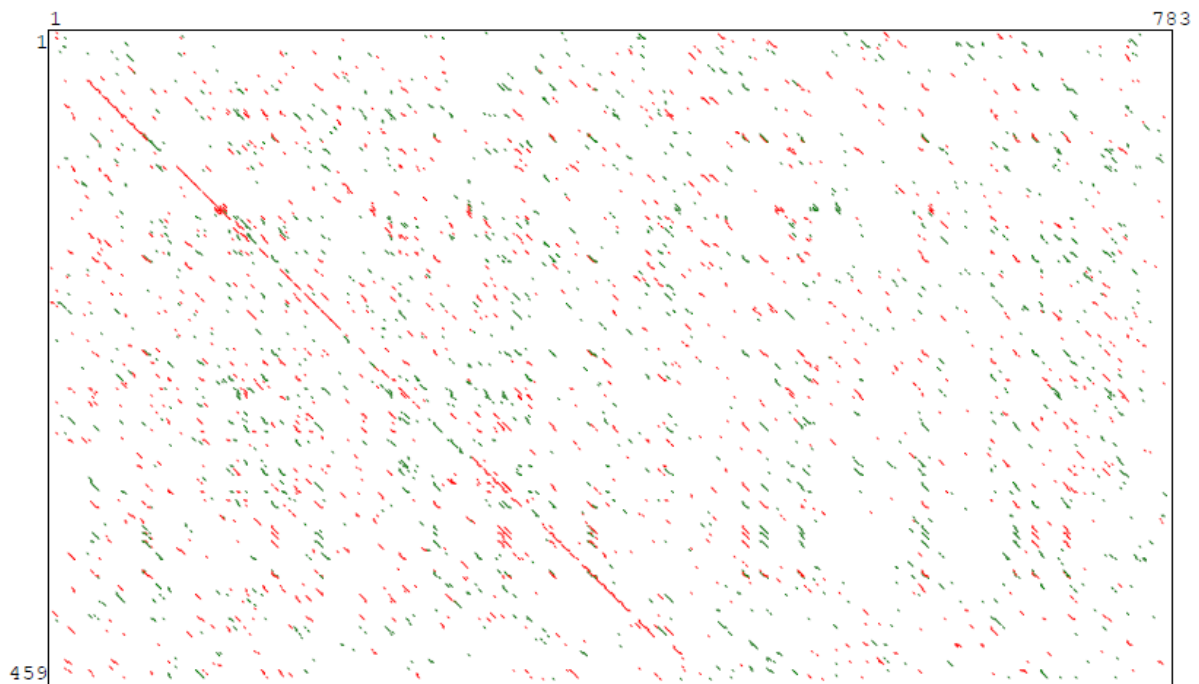


図2. 50-2株由来RSA(横方向)とE-2248株(縦方向)とのHarrPlot

研究課題：麴菌等の高度利用化技術の開発（全体）  
—新規分子育種法の醸造食品及び新規発酵産業への応用—  
担当部署：応用発酵・酵素・微生物グループ／管理室  
担当者名：小笠原博信、渡辺隆幸、金子隆宏／高橋砂織  
協力分担：株式会社秋田今野商店、東北大学大学院農学研究科  
予算区分：県単  
研究期間：完 2009年度（2007～2009年度）

## 1. 目的

麴菌の新規 DNA トランスポゾン の転移活性を利用した「非組換え」型分子育種法と伝統的選抜育種法を駆使し、様々な実用麴菌株を開発する。有用菌株による褐変しにくい米麴の製造や機能性成分の高い発酵食品の開発等を目指す。また、米麴造り等で培われてきた個体培養という伝統技術を応用し、新規醸造食品の開発や、糖質関連酵素の解析を行うことで放線菌や細菌類を活用した食品加工未利用資源および廃棄物の効率的な分解技術を開発する。

実用株からの遺伝子改変優良株の取得を目的に、DNA トランスポゾン *Crawler* の実用株（AOK139 など）における種々のストレス応答の解析と遺伝子改変技術の確立を目指した。さらに DNA トランスポゾン *Crawler* の転移した実用株（AOK139 など）を多数取得し、味噌醸造への適性を目的に優良株のスクリーニングを行った。また、ゲノム特性既知の味噌用 RIB 株や AOK139 株変異株による米麴特性の検討を行った。さらに糖質関連酵素の解析として生澱粉分解酵素（RSA）生産菌からの RSA 酵素の精製、遺伝子のクローニングを行った。

## 2. 方法

- 1) 麴菌トランスポゾン *Crawler* の優良株育種への応用：実用株（AOK139 など）における転移特性解析と Cu および熱ストレスによる優良株のスクリーニング
- 2) RIB 株による味噌仕込み試験および AOK139 株変異株による米麴特性製造試験（シャーレ麴）を実施、酵素力価の測定（国税庁所定分析法、キット法）
- 3) 糖質関連酵素の解析：生澱粉分解酵素（RSA）生産菌からの RSA 酵素精製と遺伝子機能解析

## 3. 結果の概要

### 【麴菌トランスポゾン *Crawler* の優良株育種への応用】

- 1) 定量 RT-PCR による *Crawler* mRNA 分子種の組成比較から、AOK139 株などの *Crawler* 遺伝子を多コピーで保有する実用麴菌株においても Cu ストレスや熱ストレスにより転移活性の上昇と共に、erroneous splicing の阻害および ORF 内での poly(A)付加抑制が認められた。
- 2) 温度ストレス精査により AOK139 株の白色分生子変異株が独立して 2 株得られ、1 株においては wA(polyketide synthase)遺伝子に *Crawler* が逆区方向に挿入（+3150,TA の位置）されていた。
- 3) AOK139 株は 52℃のストレス処理および、Cu20mM により高効率で転移株が得られ、両処理区から分生子色、気中菌糸長、分生子形成数等の異なる表現型変異株が多数得られた。
- 4) AKO139WS61 株は米麴—シャーレ培養において 10 世代以上安定であった。
- 5) 復帰株のスクリーニングにより、幾つかの低褐変性候補株およびトランスポゾン変異株バンク（約 1300 株）が得られている。

### 【味噌仕込み試験および AOK139 株変異株による米麴特性】

- 6) 味噌用 RIB 株の小仕込み試験の結果から、味噌の製造に十分と思われる酵素力価を有し、特に色調において良好な株を認めた。
- 7) AOK139 株の遺伝子解析より、高リパーゼ活性とキシラナーゼ遺伝子群が多いことが高機能性に寄与しているものと推定された。
- 8) 市販 5 菌株の比較 AOK139 が最も高い  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を示した。

9)AOK139 の利用によりオリゴ糖含量が高くなることが認められた。

10)AOK139 の *Crawler* 変異株の麴の酵素力価を測定した結果、AOK139 変異株 : WS61、W72、W72S ともに十分な製麴特性を有することが認められた。

#### 【糖質関連酵素の解析】

11) 県内製粉工場より見出した高度生澱粉資化生菌 3 株を、その16s塩基配列よりそれぞれ *Streptomyces*属 (E-2248株)、*Aeromonas*属 (50-2株)、*B. cereus*株 (C-株) と同定した。

12) E-2248株由来のRSAの精製と遺伝子機能解析を行うとともに、本遺伝子を *S. cerevisiae* で発現させ、酵素の安定生産を可能とした。

14) 50-2株由来RSAの遺伝子レベルでの解析も行い、本酵素が2349bp (783AA、83.7kDa) にコードされ、そのN-末端側約500bpはE-2248株と相同性が高く、C-末端側約250bpは特異なドメイン(おそらく生澱粉吸着部位)であることを確認した。

15) 大腸菌による粗酵素液による酵素特性の解析から、pH6.0、40°Cで最大の力価を示したが、35°Cでも最大の90%程度、30°Cで70%程度の力価を示し、生成糖組成から本酵素は $\alpha$ -amylaseタイプと推定された。

#### 4. 成果の活用面と留意点

1) 日本生物工学会 平成 19 年度大会 (広島、2007 年 9 月)

2) 第 7 回糸状菌分子生物学コンファレンス (東京、2007 年 11 月)

3) 第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス (金沢、2008 年 11 月)

4) 6<sup>th</sup> International Aspergillus Meeting and 25<sup>th</sup> Fungal Genetic Conference (Asilomar, CA, 2009 年 3 月)

5) 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡、2009 年 3 月)

6) Ogasawara, H., et al. *Fungal Gen. Biol.* **46**, 441-449 (2009)

7) 第 61 回日本生物工学会 (名古屋、2009 年 9 月)

8) 秋田県総合食品研究所報告 第 10 号、第 11 号

9) 7<sup>th</sup> International Aspergillus Meeting (Noordwijkerhout, Netherlands, 2010 年 3 月)

10) 10<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics (Noordwijkerhout, Netherlands, 2010 年 3 月)

#### 5. 残された問題とその対応

実用化前の秋田みそ用麴菌の開発は次年度新規課題においても下記の研究を継続する。

- ・ 白色分生子変異株の米麴特性および小仕込味噌の機能性の比較
- ・ チロシナーゼ欠損等の白色系有用変異株のスクリーニング

---

研究課題：米加工副産物の有効利用に関する研究

担当部署：食品開発グループ

担当者名：戸松 誠、保莉美佳、戸枝一喜

協力分担：2005-2006（東北農研センター、県畜試、秋田銘醸（株））

予算区分：委託 2005-2006（東北農研センター：バイオリサイクル研究事業）

県単 2007-2009

研究期間：2005～2009年度

---

## 1. 目的

秋田県の主力農産物である米は玄米で出荷されるほか、白米でも相当量出荷されているが、精米の際に糠が多量に発生する。また、日本酒製造においても精米に伴い、赤糠、白糠が多量に発生する。県内で発生する米糠（白糠を含む）としては21,000トンと推定されているが、その殆どが県外に低価格で出荷されている。このような背景から、糠を原料として高付加価値化した食品の開発が望まれている。

米糠には糖質、蛋白質、繊維等が多く含まれているため乳酸菌の発酵原料として有望であり、乳酸菌の発酵生産により期待できる有用物質としてはγ-アミノ酪酸（GABA）・乳酸があるが、新たな機能性因子が含まれている可能性もある。そこで、米糠から乳酸発酵によりGABA・乳酸の効率的生産技術開発を行うと共に、神経疾患を引き起こす神経細胞死を抑制する活性（NGF様活性）についても検討することを目的とする。

## 2. 方法

- (1)-1. 乳酸生産条件の検討
- (1)-2. GABAの効率的生産法の検討
- (1)-3. GABA含有食品の開発
- (2) 乳酸菌の生産するNGF様活性因子の探索等

## 3. 結果の概要

- (1)-1. 乳酸生産条件の検討
  - ・高生産株を選抜した。
  - ・糠の液化・糖化处理液からのジャー培養により、高い乳酸生産性を示した（5%グルコースを15時間で90%以上の高収率で乳酸に変換した）。
- (1)-2. GABA生産試験
  - ・発酵のスケールアップを検討し、無洗米粕400kgを用いたパイロットスケールでのGABA生産試験を行った。その結果、GABAを1%以上含む培養液を大量に生産することに成功した。（図1）。
  - ・GABA生産における最適固液比を検討し、従来に比べ約6倍の高生産条件を見いだした。
- (1)-3. GABA含有食品の開発
  - ・納豆、清涼飲料が商品化された。また、試作品開発も行った。
- (2) 乳酸菌の生産するNGF様活性因子の探索等
  - ・上記乳酸生産株の中に、同因子を生産するものを見いだし（図2）、おおよその性質を調べた。
  - ・本乳酸菌を用いて試作したヨーグルトに同活性の存在を確認した。

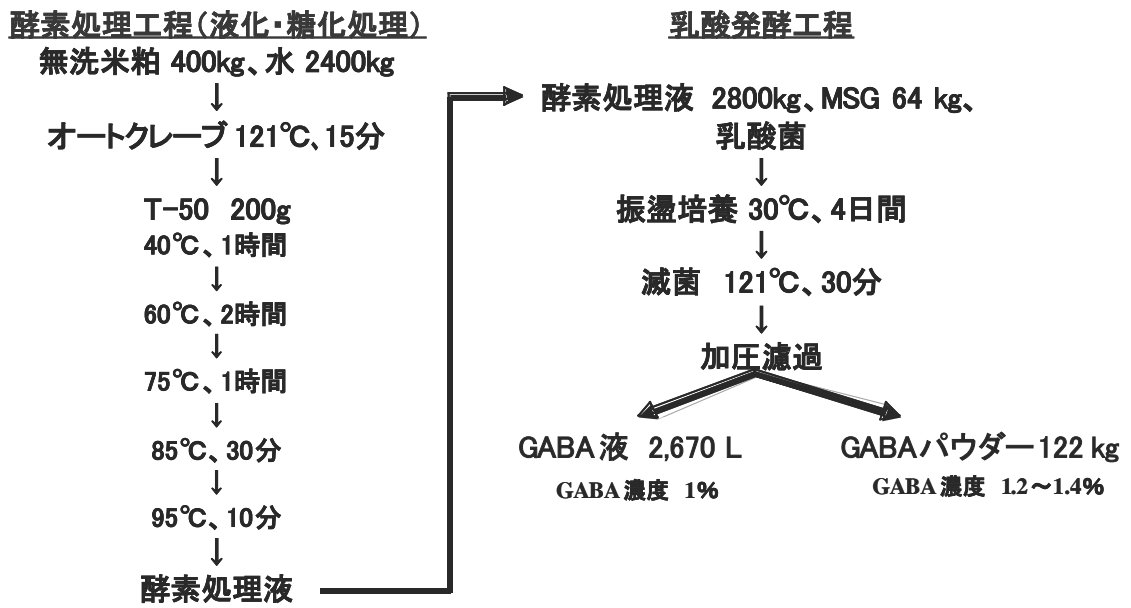
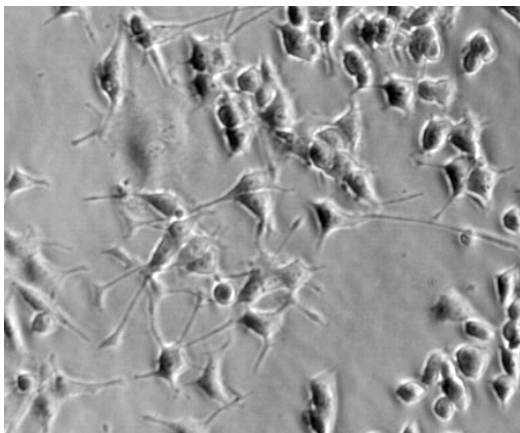
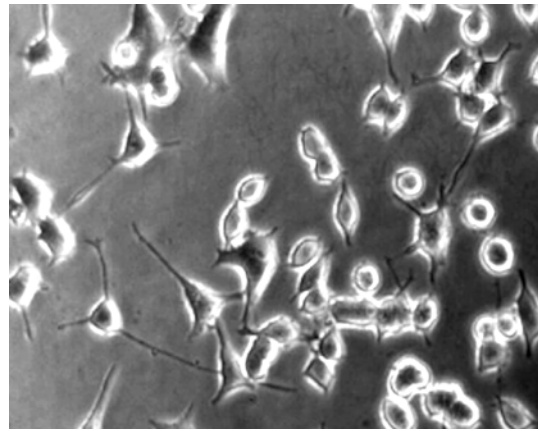


図1 パイロットスケールでの GABA 生産試験



乳酸菌培養液の SepPak C18 溶出画分



ポジティブコントロール : NGF 32ng/ml

図2 PC-12 細胞に対する神経突起伸長活性 (NGF 様活性)

4. 成果の活用面と留意点

商品発売 2、特許出願 1、学会発表 1、論文掲載 1

5. 残された問題とその対応

特になし

研究課題：食品廃棄物・農林水産廃棄物のカスケード利用によるゼロエミッション技術の開発  
食品廃棄物・農林水産廃棄物を効率的にバイオエタノールに変換する技術の開発

担当部署：秋田総食研・環境・食品安全グループ

担当者名：進藤 昌、竹本 浩、西田孝伸

協力分担：東京大学大学院、秋田県立大学、（独）食品産業技術総合研究機構、バイオエタノール革新技術研究組合

予算区分：県単・委託（農林水産省、NEDO）

研究期間：継 2007～2009 年度

## 1. 目的

食品業界および農林水産業界から大量に排出される廃棄物バイオマスからバイオ製品や高付加価値物質を生産する資源循環型社会を目指す。また、バイオ製品を普及させることにより炭酸ガスの排出を抑制し地球温暖化を防止する。具体的には、食品工場から排出される生ごみ、さらに農林水産廃棄物である木質系廃棄物、野菜くず、稲わら、重金属を含むファイトレメディエーションバイオマス並びに産業米を原料にして機能性物質、新規2次加工食品の製造技術の開発を行なう。また最終残渣からバイオエタノールへ変換する技術の開発を目指す。

平成21年度は、稲わら、資源作物からのバイオエタノール生産技術の開発を行なった。

## 2. 方法

各種バイオマスの前処理は、ボールミルによる粉碎を行い平均粒径20-100 $\mu$ mの粉碎物を得た。粉碎バイオマスの糖化は、硫酸処理またはアンモニア処理後のバイオマスを各種セルラーゼ、ヘミセルラーゼで処理を行い糖化液を得た。発酵は *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia stipitis* 及び *Pichia pastoris* を用いた。各種糖の定量は、酵素法およびDIONE Xを用いて行った。エタノールおよびキシリトールの定量は、酵素法により行った。

## 3. 結果の概要

### 3.1. カドミウム含有稲わらからのバイオエタノール生産技術の開発

カドミウム（Cd）吸収能の高い長香穀の稲わらを用いたバイオエタノール生産について検討を行った。2%硫酸で高温高圧処理後、糖化酵素処理を行うことによりカドミウムの分離と糖化効率が高くなることが判明した。また、*P. stipitis* は、糖化液中のCdに影響を受けることなくグルコース・キシロースをエタノールに変換することができた。

### 3.2. 稲わら等の未利用部分を効率的にバイオエタノールに変換する技術の開発

稲わらの酵素糖化液から効率よくバイオエタノールを生産する技術の開発を行った。非組換え酵母である *Pichia stipitis* SS39-1（秋田県総合食品研究所保存株）をガラスビーズに固定化してモデル糖化液（グルコース5%・キシロース3%）から24時間サイクルで一カ月にわたり安定的にエタノールを生産することができた。この時の平均エタノール収率は、81.6%であった。

### 3.3. バイオエタノール一貫生産システムに関する研究開発

資源作物であるエリアンサス糖化液からのバイオエタノール生産技術の開発を行った。アンモニア処理および水熱処理を行った糖化液の発酵特性を検討したところ前処理法の違いにより発酵挙動に違いがあることが判明した。また、各種ストレス耐性酵母の育種を行い、エタノール耐性酵母やメラノイジン耐性酵母を取得した。

### 3.4. セルロース系バイオマス酵素糖化の高効率化をめざした新規セルラーゼの取得と大量生産技術の開発

セルラーゼ生産能を有する遺伝子組換え菌 *P. pastoris* によるセルラーゼ生産とセルロースの酵素糖化さらに糖からのバイオエタノール生産を同時に行うコンソリデेटィッドバイオプロセス（CBP）の検討を行った。本年度は、10%のセロビオースを基質として並行複発酵を行い、47時間で理論収率の77%にあたる42g/Lのエタノールを生産することに成功した。

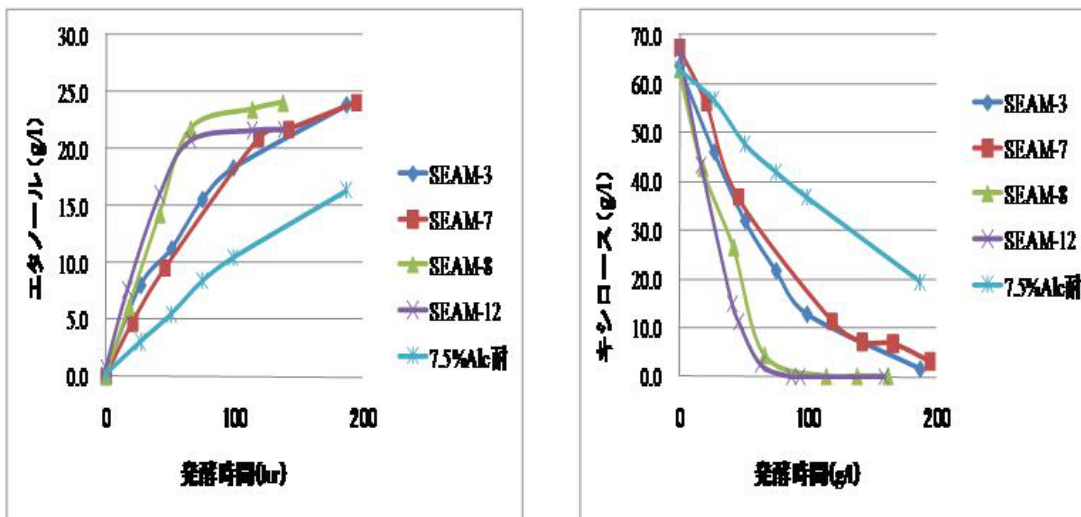


図1. エタノール耐性株の取得

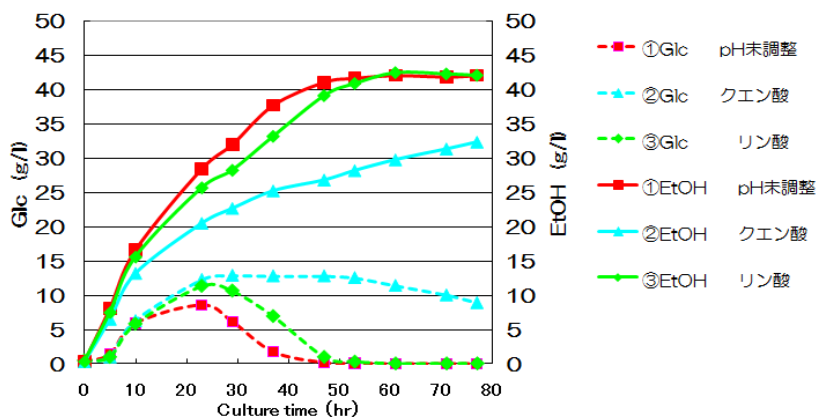


図2. BGL3A遺伝子導入KM71H(GAP3Acat)によるセロビオースからのCBPによるエタノール生産

#### 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

今年度で本課題は終了。次年度は、バイオリファイナリー技術の開発において引き続きバイオエタノール生産技術の開発を行う。

#### 5. 結果の発表、活用等

特許出願：特願 2009-241693 「エタノール製造方法」

学会発表：1. 14<sup>th</sup> European congress of biotechnology.

2. 2009MRS Fall meeting (Materials and Research Society)

3. 平成 22 年度日本農芸化学大会 セルロース系バイオマスからの新規発酵システムによるバイオエタノール生産

4. 平成 22 年度日本農芸化学大会  $\beta$  グルコシダーゼ発現 *Pichia pastoris* によるセロビオースからのエタノール生産

5. 平成 22 年度日本農芸化学大会 突然変異誘導処理による *Pichia stipitis* 高エタノール産生株の育種及び導入された変異の検証

6. 東京大学大学院農学生命科学研究科公開シンポジウム 「次世代バイオエタノール生産に向けた技術革新とシステム構築」

書籍：次世代バイオエタノール燃料製造の最新技術と事業化」(株)フロンティア出版

研究課題：食品廃棄物・農林水産廃棄物のカスケード利用によるゼロエミッション技術の開発  
食品廃棄物・農林水産廃棄物変換プロセスから副生する物質の処理・再利用技術の開発  
担当部署：環境・食品安全グループ  
担当者名：戸松 さやか  
協力分担：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所  
予算区分：県単・委託（委託先名：農林水産省）  
研究期間：継 2009年度（2007～2009年度）

## 1. 目的

食品業界および農林水産業界から大量に排出される廃棄物バイオマスからバイオ製品や高付加価値物質を生産する資源循環型社会の構築を目指す。また、バイオ製品を普及させることにより炭酸ガス排出を抑制し地球温暖化を防止する。具体的には食品工場から排出されるおから、稲庭そうめんの切れ端、醤油残渣、焼酎残渣などの生ゴミ、さらに農林水産廃棄物である木質系廃棄物、アスパラガスなどの野菜くず、米、稲わら、重金属を含むファイトレメデーションバイオマスを原料にして、機能性物質、新規2次加工食品の製造技術の開発を行う。また、最終残渣からバイオエタノールへ変換する技術の開発を目指す。

今年度はさらに3種のバイオマス原料を酵素系の評価方法で機能性を検索し、さらに、昨年度までに活性が認められたものの機能性物質の抽出方法を検討し、同定を試みた。

## 2. 方法

- 1) 試料抽出液の調整：乾燥試料 1g につき 30ml の水または熱水、メタノール、酢酸エチルで抽出した。この抽出液を濾過し、エバポレーターで濃縮後、適宜希釈して試料抽出液とした。
- 2) アルドースレダクターゼ (AR) 阻害活性の測定：ヒト筋肉細胞起源の組み換え体 AR を用い、グリセルアルデヒドとの反応により消費される NADPH の吸光度変化を測定し、コントロールとの比較から阻害率を算出した。
- 3) コラゲナーゼ阻害活性の測定：蛍光標識ゼラチン (*pig skin*) を基質としてコラゲナーゼタイプ IV (*Clostridium histolyticum*) を用いて反応を行い、蛍光光度計を用いて励起波長 485nm、蛍光波長 515nm で蛍光強度を測定し、活性を調べた。
- 4) チロシナーゼ阻害活性の測定：マッシュルーム由来のチロシナーゼを用い、L-DOPA から生じる DOPA quinone の生成度を 492nm における吸光度を測定することにより調べた。
- 5) ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定：ヒアルロン酸からヒアルロニダーゼの作用により遊離する N-アセチルグルコサミンに p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを作用させ、585nm における吸光度を測定し、コントロールとの比較から阻害率を算出した。
- 6) 抗酸化性の測定：有色安定ラジカルである DPPH のラジカル消去による退色を 530nm における吸光度を測定し、抗酸化性を調べた。
- 7) 抗菌性の測定：標準培地に抽出物を 1mg/ml 添加し、大腸菌、黄色ブドウ球菌に対する生育の影響を調べた。
- 8) 機能性物質の分画・精製：乾燥試料約 1kg から抽出を行いダイヤイオン HP20 やシリカゲル、Sephadex LH-20 などの各種カラムクロマトに供し、分離、精製した。

## 3. 結果の概要

### 前年度までの結果

抗酸化およびアルドースレダクターゼ阻害、コラゲナーゼ阻害、チロシナーゼ阻害、ヒアルロ



ニダーゼ阻害を指標とした酵素系の評価方法で様々な農林水産廃棄物について、機能性を調べた。秋田スギ、広葉樹等の木材に強い活性があり、他にもブドウ発酵残渣や野菜等に活性があるものがあった。また、秋田スギや広葉樹、稲わら等はバイオエタノール製造後の残渣についても阻害活性があることが分かり、残渣から機能性物質の抽出が可能であると推察された。

### 今年度の結果

#### 1) エリアンサス・バガス・エゾノキヌヤナギ抽出物の検討

エリアンサス、バガス、エゾノキヌヤナギ各乾燥粉碎物を抽出し検討したところ、バガスのメタノール抽出物とエゾノキヌヤナギの酢酸エチル抽出物にはAR阻害活性、エリアンサスの熱水抽出物とバガスのメタノール抽出物、エゾノキヌヤナギの熱水抽出物にチロシナーゼ阻害活性が認められた。また3種とも酢酸エチル抽出物およびバガスのメタノール抽出物には抗菌活性も認められた(表1)。このことからエリアンサス、バガス、エゾノキヌヤナギはバイオマス原料として有効に活用できると推察された。

#### 2) 稲わらの機能性物質の検討

稲わら糖化残渣を熱水抽出したのものにはチロシナーゼ阻害活性が認められたことから、糖化残渣乾燥物約1kgから抽出を行い、各種カラムを用いて分離・精製を行ったところ、0.1μg/mlで阻害活性が75%ある物質を分離することが出来た。今後、この物質の同定を行う予定である。

表1. 抽出物の機能性

	AR 阻害	コラゲナーゼ <sup>*</sup> 阻害	チロシナーゼ <sup>*</sup> 阻害	ヒアルロニダーゼ <sup>*</sup> 阻害	抗酸化活性	抗菌
エリアンサス	+	—	+	—	—	+
バガス	++	—	+	—	—	+
エゾノキヌヤナギ	++	—	+	—	—	+

—: 試料濃度 100 μg/ml で阻害活性 50%以下

+: 試料濃度 100 μg/ml で阻害活性 50%以上

++: 試料濃度 10 μg/ml で阻害活性 50%以上

—: Trolox 0.5mM 未満

### 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

試験研究上の残された問題点：稲わら糖化残渣の機能性物質の同定

### 5. 成果の発表、活用等

日本農芸化学会 2010年度大会発表予定

「セルロース系バイオエタノール製造残渣の有効利用」

研究課題：食品廃棄物・農林水産廃棄物のカスケード利用によるゼロエミッション技術の開発  
食品廃棄物から二次加工食品製造技術の開発

担当部署：環境・食品安全グループ

担当者名：杉本勇人

協力分担：渡辺隆幸、高橋 仁

予算区分：県単

研究期間：継 2009年度 (2007～2009年度)

## 1. 目的

食品業界および農林水産業界から大量に排出される廃棄物バイオマスからバイオ製品や高付加価値物質を生産する資源循環型社会を目指す。また、バイオ製品を普及させることにより炭酸ガスの排出を抑制し地球温暖化を防止する。具体的には、食品工場から排出される生ごみ、さらに農林水産廃棄物である木質系廃棄物、野菜くず、稲わら、重金属を含むファイトレメディエーションバイオマス並びに産業米を原料にして機能性物質、新規2次加工食品の製造技術の開発を行なう。また最終残渣からバイオエタノールへ変換する技術の開発を目指す。今年度は、豆腐工場から排出されるおからや醤油工場から排出される醤油の搾り粕を利用した、新規2次加工食品の製造技術の開発を行なった。

## 2. 方法

### (1) おから麴

市販の真空包装おから（平川食品）を60℃で乾燥させ、白麴菌1号0.5%量を混合し、水分45%に調整した。この白麴菌を混合したおからを薄底の容器に均等に敷き詰め、32℃で生育させた。24時間後、30℃の恒温室に移し、2時間置きに手入れ作業を行った。さらに24時間育成させ、おから麴を得た。麴の酸性カルボキシペプチダーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ アミラーゼの測定は、キッコーマン醸造分析キットを用いて行った。

### (2) しょつつる

しょつつる製造時の酵素剤として、市販の米麴、おから麴、醤油の搾り粕を用いた。ハタハタのオス（秋田県漁協）の16%分を麴または粕で置き換え、塩分23wt%になるよう食塩を加えて漬け込んだ。漬け込んだハタハタを37℃の恒温室（コントロールの一部は室温）で熟成させた。

表1 しょつつるの配合

	原料配合		ハタハタ	食塩	麴	粕
①	ハタハタ	食塩 23wt%	3.0kg	0.9kg		
②	ハタハタ	食塩 23wt% (室温)	3.0kg	0.9kg		
③	ハタハタ	食塩 23wt% + 米麴	2.5kg	0.9kg	0.5kg	
④	ハタハタ	食塩 23wt% + おから麴	2.5kg	0.9kg	0.5kg	
⑤	ハタハタ	食塩 23wt% + 醤油粕	2.5kg	0.9kg		0.5kg

## 3. 結果の概要

### (1) おから麴

五訂日本食品標準成分表によるとおからの炭水化物は13.8%と、米などに比べてかなり少ないため、麴菌がおからで生育するか心配されたが、水分量を調整することでおから麴をつくることに成功した。水分量35%のおからでは麴の生育が遅く、水分量40%、45%では順調に製麴できた。

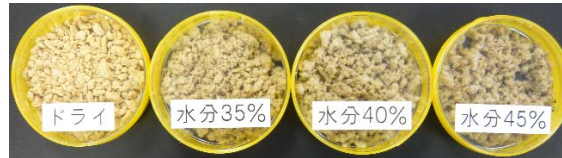


図1 おから麴

おから麴と比較対照として市販の米麴、醤油の搾り粕の、酸性カルボキシペプチダーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ アミラーゼを測定した。その結果おから麴は米麴に比べそれぞれの活性は落ちるものの、国税庁所定法に換算して比較するとしょうちゅう麦麴とほぼ同等の活性を示していた。

表2 おから麴の各種酵素活性

	酸性カルボキシペプチダーゼ (U/dryg)	グルコアミラーゼ <sup>*</sup> (U/dryg)	$\alpha$ アミラーゼ <sup>*</sup> (U/dryg)	G/ $\alpha$ 比
① 米麴(太子)	0.664	149	1,221	0.12
② 米麴(田精)	0.839	246	1,610	0.15
③ おから麴	0.429	230	2,571	0.09
④ 醤油粕	0.303	98	54	1.80

## (2) しょつつる

表1に示した配合で、37℃（一部のコントロールは室温）下で熟成させた。米麴（表1③）、おから麴（表1④）、醤油粕（表1⑤）を用いたものは、約1週間で魚体が崩れてスラリー状になった。以上の結果から、おから麴や醤油粕はしょつつる製造時の酵素剤として用いることが可能である。



図2 しょつつる熟成  
1週間後

## 4. 今後の問題点と次年度以降の計画

おから麴を作る際の麴菌の検討や製麴条件の検討を行っていないため、最適条件が見つからない。おから麴を実用化するためには、今後このような検討が必要である。

## 5. 成果の発表、活用等

特になし

研究課題：食品廃棄物・農林水産廃棄物のカスケード利用によるゼロエミッション技術の開発

担当部署：環境・食品安全グループ

担当者名：進藤 昌、戸松さやか、杉本勇人、竹本 浩、西田孝伸

協力分担：東京大学大学院農学生命科学研究科、秋田県立大学システム科学技術学部、

（独）食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所、新日本石油(株)、長瀬産業(株)、

予算区分：国庫・委託（農林水産省、NEDO、環境省、秋田県水田総合利用課、秋田県環境枠）

研究期間：新・継・中・断 2008年度（2007～2009年度）

**1. 目的：** 食品業界および農林水産業界から大量に排出される廃棄物バイオマスからバイオ製品や高付加価値物質を生産する資源循環型社会を目指す。また、バイオ製品を普及させることにより炭酸ガスの排出を抑制し地球温暖化を防止する。具体的には、食品工場から排出される生ごみ、さらに農林水産廃棄物である木質系廃棄物、野菜くず、稲わら、重金属を含むファイトレメディエーションバイオマス並びに産業米を原料にして機能性物質、新規2次加工食品の製造技術の開発を行なう。また最終残渣からバイオエタノールへ変換する技術の開発を目指す。

## 2. 方法

**バイオエタノール生産方法：** 各種バイオマスの前処理は、ボールミルによる粉砕を行い平均粒径20-100 $\mu$ mの粉砕物を得た。粉砕バイオマスの糖化は、各種セルラーゼ、ヘミセルラーゼによる酵素糖化を行った。発酵は *Saccharomyces cerevisiae* および *Pichia stipitis* を用いた

**機能性の活性測定法：** アルドースレダクターゼ (AR) 阻害活性の測定は、ヒト筋肉細胞起源の組み換え体 AR を用いて測定した。コラゲナーゼ阻害活性の測定は、蛍光標識ゼラチンを基質としてコラゲナーゼタイプIVを用いて測定した。チロシナーゼ阻害活性の測定は、マッシュルーム由来のチロシナーゼを用いた。ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定は、ヒアルロン酸からヒアルロニダーゼの作用により遊離する N-アセチルグルコサミンに p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを作用させた。抗酸化性の測定は、有色安定ラジカルである DPPH のラジカル消去により調べた。

**おから麴としょうつるの製造：** おからを60℃で乾燥させ、白麴菌1号を混合し、水分45%に調整した。この白麴菌を混合したおからを薄底の容器に均等に敷き詰め、32℃で生育させた。24時間後、30℃の恒温室に移し、2時間置きに手入れ作業を行った。さらに24時間育成させ、おから麴を得た。しょうつる製造には市販の米麴、おから麴、醤油の搾り粕を用いた。ハタハタのオスの16%分を麴または粕で置き換え、塩分23wt%になるよう食塩を加えて漬け込み37℃で熟成させた。

## 3. 結果の概要

**3.1. カドミウム (Cd) 含有米および稲わらからのバイオエタノール生産技術の開発：** 米に含有するCdの影響を受けずに酵母でバイオエタノールを生産できることが判明した。さらに、Cd吸収能の高い長香穀の稲わらを用いたバイオエタノール生産について検討を行った。前処理は2%硫酸で高温高压処理後、糖化酵素処理を行うことによりカドミウムの分離と糖化効率が高くなることが判明した。また、得られた糖化液からエタノールに変換することができた。

**3.2. 稲わら等の未利用部分を効率的にバイオエタノールに変換する技術の開発：** 稲わらの酵素糖化液から効率よくバイオエタノールを生産する技術の開発を行った。非組換え酵母である *Pichia stipitis* SS39-1 をガラスビーズに固定化してモデル糖化液（グルコース5%・キシロース3%）から2-4時間サイクルで一カ月にわたり安定的にエタノールを生産することができた。この時の平均エタノール収率は、81.6%であった。

**3.3. バイオエタノール一貫生産システムに関する研究開発：** 資源作物であるエリアンサス糖化液からのバイオエタノール生産技術の開発を行った。グルコース・キシロースから効率よくバイオエタノールを生産できる酵母を自然界から取得し、さらに2段階発酵法による新規なバイオリアクターシステムを構築した。また、各種ストレス耐性酵母の育種をおこない、エタノール耐性酵母やメラノイジン耐性酵母を取得した。

3.4. セルロース系バイオマス酵素糖化の高効率化をめざした新規セルラーゼの取得と大量生産技術の開発：セルラーゼ生産能を有する遺伝子組換え菌 *Pichia pastoris* によるセルラーゼ生産とセルロースの酵素糖化さらに糖からのバイオエタノール生産を同時に行うコンソリデーテッドバイオプロセスの検討を行い、10%のセロビオースから 42g/L のエタノールを生産した。

3.5. 秋田杉からのバイオエタノール生産技術の開発：秋田杉粉碎物の糖化条件を検討し、メイセラゼとヘミセルラーゼを同時に作用させることによりマンノースとガラクトースの生産量が上昇することが判明した *S. cerevisiae* を用いて並行複発酵を行い 59(g/L) のエタノールを得た。

3.6. 担子菌による whole crop の直接バイオエタノール生産技術の開発：担子菌の中からエタノール生産能の高い菌を検索し *Flammulina velutipes* FV2 を得た。

3.7. 機能性成分の探索：抗酸化、抗菌性およびアルドースレダクターゼ阻害、コラゲナーゼ阻害、チロシナーゼ阻害、ヒアルロニダーゼ阻害を指標として機能性を調べ、秋田スギ、ブナ、ナラ、ニセアカシア等に強い活性があり、他にもエリアンサス、バガス、エゾノキヌヤナギやブドウ発酵残渣や野菜等に活性があるものがあつた。また、秋田スギや広葉樹、稲わら等はバイオエタノール製造後の残渣についても阻害活性があることが分つた。稲わら糖化残渣にはチロシナーゼ阻害活性が認められ、0.1  $\mu$ g/ml で阻害活性が 75%ある物質を分離することが出来た

3.8. おから麴としょうつつの製造試験：水分量 35%のおからでは麴の生育が遅く、水分量 40%、45%では順調に製麴できた。おから麴と比較対照として市販の米麴、醤油の搾り粕の、酸性カルボキシペプチダーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ アミラーゼを測定した結果、おから麴は麦麴とほぼ同等の活性を示していた。しょうつつのは、米麴、おから麴、醤油粕を用いたものは、約 1 週間で魚体が崩れてスラリー状になった。

#### 4. 成果の活用と留意点

特許出願：特願 2007-185456 「エタノール製造方法」

特願 2008-157787 「エタノール製造方法」

特願 2008-194235 「新規酵母およびそれを用いたエタノール製造方法」

特願 2009-241693 「エタノール製造方法」

学会発表：1. 13<sup>th</sup> European congress of Biotechnology (Barcelona) 「Simultaneously saccharification and bioethanol production from powder of Japanese cedar」

2. 日本農芸化学会「秋田杉からの並行複発行によるバイオエタノール生産技術の開発」

3. The Pacific Rim Summit on Industrial Biotechnology and Bioenergy.

4. 日本農業農村工学会

5. 14<sup>th</sup> European congress of biotechnology.

6. 2009MRS Fall meeting (Materials and Research Society)

7. 平成 22 年度日本農芸化学大会 セルロース系バイオマスからの新規発酵システムによるバイオエタノール生産

8. 平成 22 年度日本農芸化学大会  $\beta$  グルコシダーゼ発現 *Pichia pastoris* によるセロビオースからのエタノール生産

9. 平成 22 年度日本農芸化学大会 突然変異誘導処理による *Pichia stipitis* 高エタノール産生株の育種及び導入された変異の検証

10. 東京大学大学院農学生命科学研究科公開シンポジウム 「次世代バイオエタノール生産に向けた技術革新とシステム構築」

書籍：次世代バイオエタノール燃料製造の最新技術と事業化」(株)フロンティア出版

マスコミ等への発表：秋田魁新報他各種全国新聞 NHKおはよう日本、NHKクローズアップ東北、NHKジャーナル 他多数

区 分：共同研究  
研 究 名：新規清酒酵母の開発  
担 当 部 署：酒類グループ  
担 当 者 名：渡辺誠衛、田口隆信、高橋仁、大野剛  
研 究 期 間：2009 年度（2009～継続）  
協力・分担関係：秋田県酒造組合、秋田県清酒分析研究会、秋田市内 4 酒販店

**【目的】**

1. 酒販店等の意見を参考にして、消費者の求める清酒を提供する。
2. 県内若手技術者を対象にして、酵母の研修を兼ねながら醸造試験場保存株の中から目標とする酵母を選抜する。
3. 技術移転を促進し、商品化により秋田県産酒の需要開発を図る

**【方法】**

1. 酵母の選抜・育種。
2. 選抜株の酒造適性（発酵試験、中間規模醸造試験）。
3. 現場醸造試験。
4. 商品化

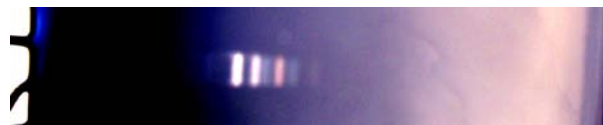
**【成果】**

1. 全国の売れ筋商品 13 点について成分分析や官能試験。2 タイプの清酒を目標とした。
2. 醸造試験場保存株 887 株の 200 株について発酵試験を行い、11 株を選抜した。
3. 最終的に、目標とする性質に合致する酵母として秋田酵母No.12 と秋田酵母No.15 酵母を選抜し、さらに、秋田酵母No.15 酵母から泡無株の分離に成功した。
4. 中間規模純米酒製造試験と現場醸造試験により実用化を推進した。
5. 秋田県酒造協同組合から酵母を配布。両酵母併せて県内約 20 社で使用された。

区	分：新規課題予備的実験
研	究 名： <i>Paenibacillus</i> YN-1205由来の糖質関連酵素
担	当 部 署：応用発酵・酵素・微生物グループ
担	当 者 名：金子隆宏
研	究 期 間：2009年度(2006年度～ )
協	力・分担関係：

**【概要】**

新規機能性糖質(多糖、オリゴ糖)の生成を目的として、主に糖転移酵素に着目しスクリーニングしたところ、製粉工場由来のサンプルより、平板培地上に水溶性粘性多糖を生成する一菌株を見出した。この多糖はグルコースより構成されており、その生成に澱粉が必須であった。また16s 塩基配列より本菌株を *Paenibacillus* と同定し、YN-1205 株と命名した。本菌株の培養上清を PAGE 後、ヨード澱粉反応で活性染色したところ、単純加水分解と思われる白色バンド以外に、転移活性と思われる赤紫、及び伸長反応と思われる青紫のバンドなど多数見出された。この培養上清をグルコース、マルトース、可溶性澱粉、 $\beta$ -CD 等に作用させ HPAEC 分析したところ、可溶性澱粉からは種々オリゴ糖が、マルトースからはグルコース及び転移生成物と思われるブロードなピークが検出された。現在本菌株の至適培養条件、酵素活性測定法、酵素液調製法など検討中である。



YN-1205 培養上清を PAGE 後、ヨード澱粉反応で活性染色

**平成 21 年度 試験研究成果概要**

発行 平成 21 年 8 月

発行者 秋田県総合食品研究センター

〒010-1623

秋田市新屋町字砂奴寄 4 - 2 6

TEL 018-888-2000(代) FAX 018-888-2008

<http://www.arif.pref.akita.jp/>