

ISSN 2185-6699

# 秋田県総合食品研究センター報告

第 16 号

平成 26 年 (2014 年)

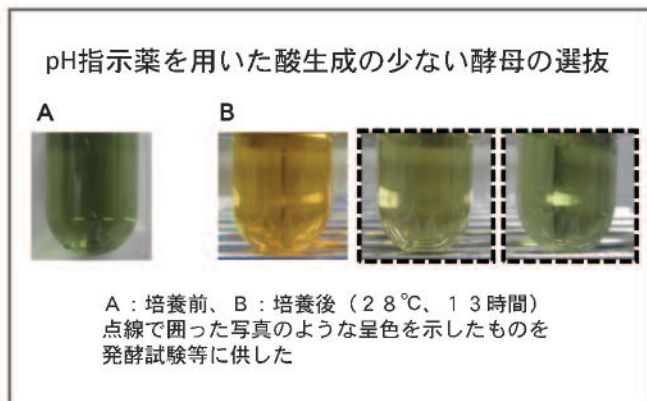
---

Bulletin of the Akita Research  
Institute of Food and Brewing  
(*ARIF*)

No. 16, 2014



秋田県産「てんこ小豆（黒ささげ）」の機能性探索に関する研究  
高橋砂織 他 No.16 1-16 (2014)



酸生成の少ない清酒酵母の簡易選抜法  
上原 (佐藤) 智美 他 No.16 17-23 (2014)



製麺性が低下したそば粉の品質  
大能俊久 No.16 25-27 (2014)



セルロース系バイオマスからのバイオエタノール  
進藤昌 No.16 29-42 (2014)

# 目 次

## 1. 原著論文（報文）

- 1) 秋田県産「てんこ小豆（黒ささげ）」の機能性探索に関する研究・・・ 1  
○高橋砂織、渡辺隆幸、畠 恵司
  
- 2) 酸生成の少ない清酒酵母の簡易選抜法  
○上原（佐藤）智美、渡邊誠衛、大野 剛、高橋 仁・・・・・・ 17

## 2. 原著論文（研究ノート）

- 1) 製麺性が低下したそば粉の品質・・・・・・ 25  
○大能俊久

## 3. 総説

- 1) セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産技術の開発・・・ 29  
○進藤 昌

## 4. 特許の概要（6件）・・・・・・ 43

## 5. 学会発表概要（20件）・・・・・・ 47

## 6. 外部発表論文概要（7件）・・・・・・ 63

## 7. 秋田県総合食品研究センター報告規程・・・・・・ 67

## 1. 原著論文（報文）（1件）

1) 秋田県産「てんこ小豆（黒ささげ）」の機能性探索に関する研究

○高橋砂織、渡辺隆幸、畠 恵司

2) 酸生成の少ない清酒酵母の簡易選抜法

○上原（佐藤）智美、渡邊誠衛、大野 剛、高橋 仁



## 秋田県産「てんこ小豆（黒ささげ）」の機能性探索に関する研究

高橋砂織、渡辺隆幸、畠 恵司  
(秋田県総合食品研究センター)

Saori TAKAHASHI, Takayuki WATANABE, and Keishi HATA

### 【緒言】

秋田県では大豆や小豆の栽培が盛んである。その中で秋田県の在来種である「てんこ小豆」は、秋田市雄和地区で古くから栽培され同地区や秋田県内で小豆の代わりに赤飯に多用されている。てんこ小豆は、黒ささげの秋田での名称であり、小粒で黒大豆様の形態をしている。てんこ小豆で作った赤飯は、小豆の赤飯に比べはるかに濃い赤褐色の着色があり、且つ風味が豊である（図1）。

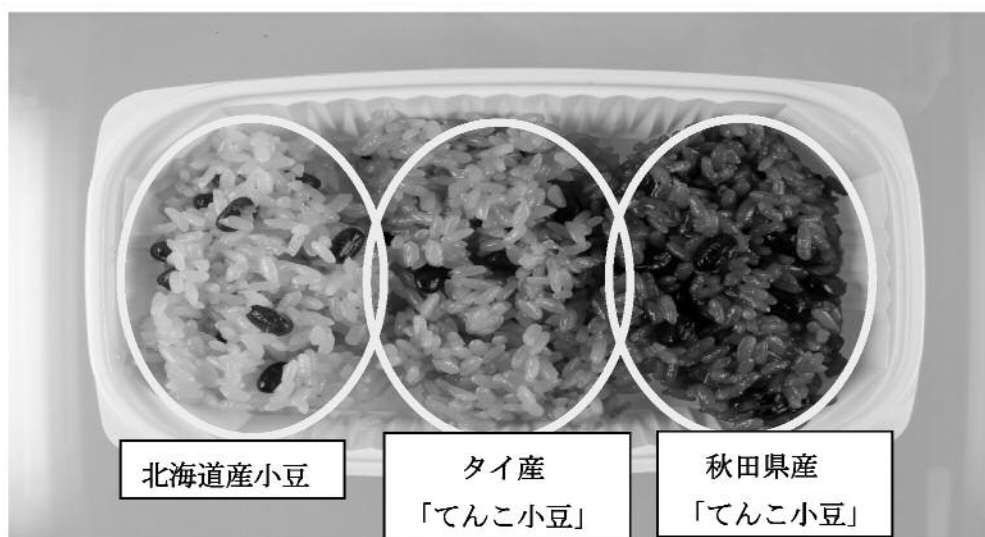


図1 小豆、タイ産てんこ小豆及び秋田県産てんこ小豆で試作した赤飯

てんこ小豆は生産量が少ないこと、単価が高いことなどからその消費は伸び悩んでいる。また、てんこ小豆の機能性に関する研究は皆無である。そこで本研究では、血圧調節系として最も解析が進んでいるレニン・アンギオテンシン系 (RAS) に注目して、RAS の重要な構成要素であるレニン、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) やキマーゼを標的酵素として、てんこ小豆抽出液の阻害活性について検討した。さらに、培養細胞系を駆使して脂質代謝改善効果作用も併せて検討することで、てんこ小豆の機能性素材としての可能性を探った。てんこ小豆の機能性が明らかになることで、秋田県内での作付け拡大と消費拡大が期待される。

### 【研究方法】

1) 市販てんこ小豆および小豆の入手

秋田産てんこ小豆(契約栽培品)及びタイ産てんこ小豆(同じく契約栽培品)は(有)鈴和商店(秋田市)より入手した。小豆は市販の北海道産小豆(JA十勝)を用いた。

## 2) てんこ小豆の生育状況調査

(有)鈴和商店が契約栽培している秋田市雄和地区の農家の許可を得て、通年でてんこ小豆の生育状況を観察した。

## 3) 秋田県内におけるてんこ小豆の栽培状況

平成25年4月から6月にかけて秋田県内にある30ヶ所全ての「道の駅」を訪問し、併設されている農産物直売所を調査した。また、JA系直売所や農業生産法人直売所などで販売・生産状況を調査した。

## 4) てんこ小豆の100粒重及び水抽出液の吸光度

てんこ小豆は、生産地や生産者により品質に大きな違いがあることが判明した。そこで、粒の大きさの指標として100粒重を測定した。また、赤飯などにした場合の色調の指標として、てんこ小豆水抽出液の可視部の吸光度を測定した。具体的には、1gのてんこ小豆に10mlの蒸留水を加え室温で1夜浸漬した。抽出液の可視域をスキャンして最大吸収波長を求めた。その結果、てんこ小豆色素は530nmに最大吸収を持つことが分かった。そこで、色強度の指標として水抽出液の530nmの吸光度を測定した。

## 5) レニン・アンギオテンシン系酵素類の活性測定方法

*In vitro* アッセイ系の標的酵素としては、高血圧に関連するレニン、ACE及びキマーゼを用いた。我々の研究グループでは、組換え型ヒトレニンのバキュロウイルス・昆虫細胞系発現系を構築しており、効率良く活性型ヒトレニンを発現することに成功している[1]。そこで、本組換え型ヒトレニンと新たに開発した蛍光消光基質、*N*-methylanthranlyl (Nma)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu\*Val-Ile-Thr-His-Lys-2, 4 dinitro phenyl (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub>(\*、レニンによる切断部位)を用いて阻害物質の探索を行った(図2)<sup>1, 2)</sup>。具体的には5μlの組換え型レニン溶液(5μg/ml)に5μlのてんこ小豆抽出液を加えて混合した後、40μlの基質溶液(DMSOに溶解した1mMの上記基質1μlに39μlの50mM Na-Phosphate buffer, pH 6.5, 0.1M NaCl, 0.02% Tween 20, 0.02% NaN<sub>3</sub>)を加え37°Cで30分間インキュベートした。反応を0.2mlの0.1N Na-Borate buffer, pH 10.5で停止し、励起波長340nm 蛍光波長440nmで蛍光強度を測定した。

ACE活性は、同じく我々が開発した簡便・高感度測定に対応した蛍光消光基質、*N*ma-Phe-His-Lys(Dnp)を用いて測定した<sup>3)</sup>。標的酵素としては、組換え型ヒトACE(R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いた。

キマーゼ活性は、上記ヒトレニン基質の有効性が示されており、同基質を用いてキマーゼの至適pHを決定し、至適pH条件で阻害活性を測定した<sup>4)</sup>。

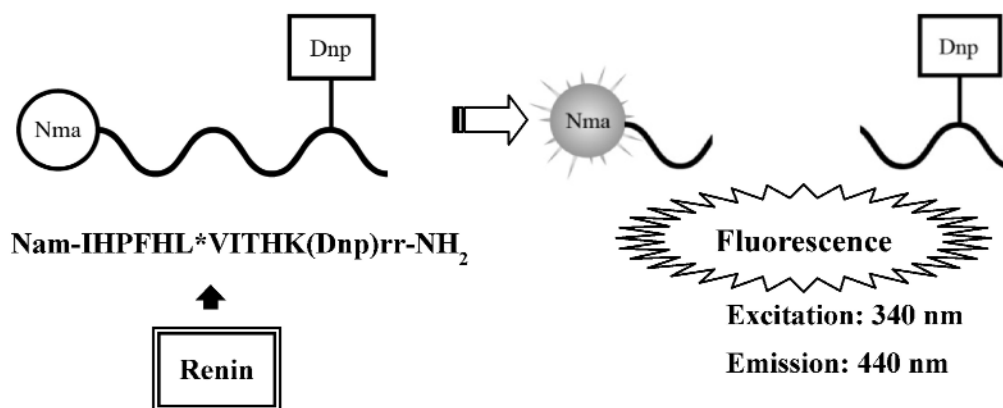


図2 蛍光消光基質を用いたレニン活性測定方法

#### 6) 脂肪細胞を用いた脂質代謝改善評価

培養細胞系での脂質代謝改善効果の検討にはマウス 3T3-L1 細胞を用いた。マウス 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化処理を行ない、作成した脂肪細胞を用いて脂質の蓄積抑制効果を検討した<sup>5)</sup>。

#### 7) 人工モデル臓器での評価

培養細胞から分化誘導した小腸、肝臓や脂肪組織の人工モデル臓器を用いた評価をおこなった<sup>6)</sup>。12 穴マイクロプレートにコラーゲン-1 コートしたセルインサート（孔径 8.0 mm）を挿入し  $2.5 \times 10^5$  個の Caco2 細胞を播種した。これを 10%牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地中で 2 日間培養後、5 mM 酪酸ナトリウム処理し、ヒト小腸上皮細胞に分化誘導した。

このヒト小腸上皮様細胞培養液の上層の培地を、0.75 mM オレイン酸ナトリウム及び 0.2 mg/ml リゾホスファチジルコリン、1.0%ウシ血清アルブミンならびに各濃度の被検体を含むダルベッコ変法イーグル培地（1 ml）に交換し（下層の培地は 1.0%ウシ血清アルブミンのみを含むダルベッコ変法イーグル培地 0.5 ml を用いた）、更に 4 日間培養した。上層の培地交換は毎日行った。4 日後生細胞数を計測する共に、下層の培地を遠心分離で回収し、LipoSEARCH®で Chylomicron、VLDL、LDL、HDL 中のトリグリセリドならびにコレステロールを定量した。

### 【研究結果】

#### 1) てんこ小豆の生育状況

定期的に（有）鈴和商店の契約栽培農家の圃場に於いて生育状況を調査した。播種は平成 25 年 5 月 23 日で、保温ビニールに約 30cm 間隔で穴を空け、これに数粒の豆を播種した。最初の調査日は、平成 25 年 6 月 2 日で播種後 11 日が経過しており、数枚の葉を形成していた。播種後約 1 ヶ月目の 6 月 21 日には、分枝が観察された。



播種後約3ヶ月で開花した。てんこ小豆の収穫時期は一定ではなく、成熟した房を逐次収穫しなければならず、作業が煩雑とのことであった。平成25年6月から9月までの生育状況を別添試料1に示した。

## 2) 県内のてんこ小豆栽培状況

県内30箇所全ての「道の駅」を訪問し、設置されている農産物販売所及びJAや各地区の農産物直売所などにおいて栽培状況を調査した。その結果、「道の駅」に併設されている全ての直売所でてんこ小豆を販売もしくは販売実績を持っていることが確認された。したがって、秋田県内では、内陸、沿岸を問わず県南から県北まで広く栽培されていることが分かった(表1)。

販売の名称に関しては、地域や栽培農家によって異なり、「天こう小豆」、「てんこ小豆」、「天甲小豆」、「天向小豆」、「赤飯用小豆」、「てんこう小豆」、「ならちゃ豆」など多くの呼称が見られた。栽培量に関するデータは得られていないが、1農家当たり50kg程度収穫しているとすると全県で、年間数十トンの生産量があると思われる。

別添資料2に収集したてんこ小豆40点及び(有)鈴和商店製の秋田産てんこ小豆及びタイ産てんこ小豆の写真、100粒重量及び抽出液の写真及び530nmの吸光度を示した。栽培者により豆の大きさ、皺の状態や抽出液の色調などが大きく異なることが分かった。100粒重の最小は、7.68g、最大が20.04gで平均が14.61gであった。また、抽出液の530nmの吸光度は、最小が0.225、最大が2.01で、平均が0.712であった(表1)。

表1 秋田県内のてんこ小豆栽培状況、呼称、100粒重量及び抽出液の吸光度

試料番号	販売場所	販売地域	販売名称	100粒重 (g)	吸光度 (530nm)
No. 1	由利本荘市	沿岸南部	天こう小豆	10.76	0.625
No. 2	にかほ市	沿岸南部	てんこ小豆	17.36	0.510
No. 3	にかほ市	沿岸南部	てんこ小豆	11.37	0.865
No. 4	由利本荘市	沿岸南部	天甲小豆	13.94	1.160
No. 5	由利本荘市	沿岸南部	天向小豆	9.50	0.625
No. 6	湯沢市	内陸南部	赤飯用小豆	13.46	0.505
No. 7	湯沢市	内陸南部	赤飯用小豆	16.99	0.780
No. 8	横手市	内陸南部	黒豆	15.53	0.665
No. 9	横手市	内陸南部	ならじゃ豆	15.90	0.610
No. 10	仙北郡	内陸中部	ナラチャ豆	11.69	0.285
No. 11	由利本荘市	沿岸南部	天甲小豆	14.38	0.470
No. 12	由利本荘市	沿岸南部	天甲小豆	17.14	0.685
No. 13	湯沢市	内陸南部	てんこ小豆	11.77	0.695

No. 14	湯沢市	内陸南部	てんこ小豆	16.59	0.625
No. 15	大仙市	内陸中部	てんこ小豆	15.23	0.720
No. 16	大仙市	内陸中部	天甲小豆	15.81	0.685
No. 17	大仙市	内陸中部	豆類	12.40	0.705
No. 18	北秋田郡	内陸北部	ならちゃ豆	12.69	0.370
No. 19	北秋田郡	内陸北部	テンコ小豆	17.20	0.590
No. 20	鹿角郡	内陸北部	豆 (てんこ小豆)	18.79	0.895
No. 21	鹿角市	内陸北部	天甲小豆	14.07	0.470
No. 22	大仙市	内陸中部	天甲小豆	12.44	1.530
No. 23	秋田市	沿岸中部	てんこ小豆	16.51	0.520
No. 24	山本郡	沿岸北部	テンコ小豆	12.59	0.225
No. 25	山本郡	沿岸北部	テンコ小豆	11.30	1.135
No. 26	能代市	沿岸北部	てんこ小豆	19.08	0.930
No. 27	能代市	沿岸北部	てんこ	7.68	0.840
No. 28	山本郡	沿岸北部	テンコ小豆	15.63	0.735
No. 29	山本郡	沿岸北部	テンコ小豆	15.71	0.635
No. 30	山本郡	沿岸北部	テンコ小豆	17.01	0.530
No. 31	能代市	沿岸北部	てんこう小豆	14.88	0.325
No. 32	能代市	沿岸北部	てんこう小豆	15.83	0.720
No. 33	能代市	沿岸北部	てんこう小豆	14.82	0.700
No. 34	大館市	内陸北部	てんこ小豆	12.62	0.630
No. 35	北秋田市	内陸北部	てんこ小豆	16.43	0.605
No. 36	北秋田市	内陸北部	ならちゃ豆	11.52	0.725
No. 37	南秋田郡	沿岸中部	てんこ小豆	14.18	0.660
No. 38	南秋田郡	沿岸中部	てんこ小豆	20.04	0.750
No. 39	南秋田郡	沿岸中部	てんこ小豆	16.26	0.815
No. 40	南秋田郡	沿岸中部	てんこ小豆	19.49	0.500
No. 41	鈴和商店製	秋田産	てんこ小豆	15.68	2.010
No. 42	鈴和商店製	タイ産	てんこ小豆	11.66	0.830
			平均	14.61 (±2.74)	0.712 (±0.307)

### 3) てんこ小豆抽出液の血圧関連酵素に及ぼす影響

小豆、タイ産てんこ小豆及び秋田産てんこ小豆の熱水抽出液およびエタノール抽出液を調整し、レニン、ACE 及びキマーゼの阻害活性を測定した。表 2 にそれぞれの酵素に対する 50%阻害値 (IC<sub>50</sub> 値) を示した。各豆類の酵素阻害活性はエタノール抽出液に比べ熱水抽出液で一桁程度強い値を示した。熱水抽出液においては、秋田産てん

こ小豆抽出液が北海道産小豆やタイ産てんこ小豆抽出液に比べていずれの酵素に対しても強い阻害活性を示した。

表2 豆抽出液のレニン、ACE 及びキマーゼ阻害活性 (IC<sub>50</sub> 値)

品 種	抽出方法	レニン阻害活性 ( $\mu\text{g/ml}$ )	ACE 阻害活性 ( $\mu\text{g/ml}$ )	キマーゼ阻害活性 ( $\mu\text{g/ml}$ )
秋田てんこ	EtOH	620	420	230
タイてんこ	EtOH	650	1000<	290
北海道小豆	EtOH	400	1000<	260
秋田てんこ	熱水	69.0	11.0	8.6
タイてんこ	熱水	97.0	18.0	14.0
北海道小豆	熱水	113.0	10.0	23.0

次に、秋田産てんこ小豆の阻害物質の特性を調べる一端として秋田産てんこ小豆熱水抽出液を C18 逆相カラムで分画した。それぞれの酵素の阻害活性の大部分は、C18 カラムを素通りした。次に、この通過液を Bio-Gel P-4 カラムを用いたクロマトグラフィーで分画した。レニン阻害活性とキマーゼ阻害活性は、高分子領域から低分子領域にわたり観察された。このことは、レニンとキマーゼの阻害物質が単一化合物によるものではなく、複数の化合物が存在していることを示唆している。一方、ACE の阻害活性を見て見ると阻害活性は低分子領域にシングルピークとして検出されたことから、てんこ小豆由来の ACE 阻害物質は単一化合物もしくは分子量が近接した複数の化合物である可能性が示唆された。今後、これら阻害物質の精製と構造解析を進める予定である。

#### 4) 豆類抽出液の脂肪蓄積抑制効果の検討

マウス由来 3T3-L1 細胞をホルモン処理により脂肪細胞に分化させた。本脂肪細胞に秋田産てんこ小豆及び比較としてのタイ産てんこ小豆、北海道産小豆、大豆及び黒豆の熱水抽出液及びエタノール抽出を添加し、細胞内脂肪蓄積を検討した (図 3)。

その結果いずれの抽出液においても顕著な蓄積抑制は観察されなかった。

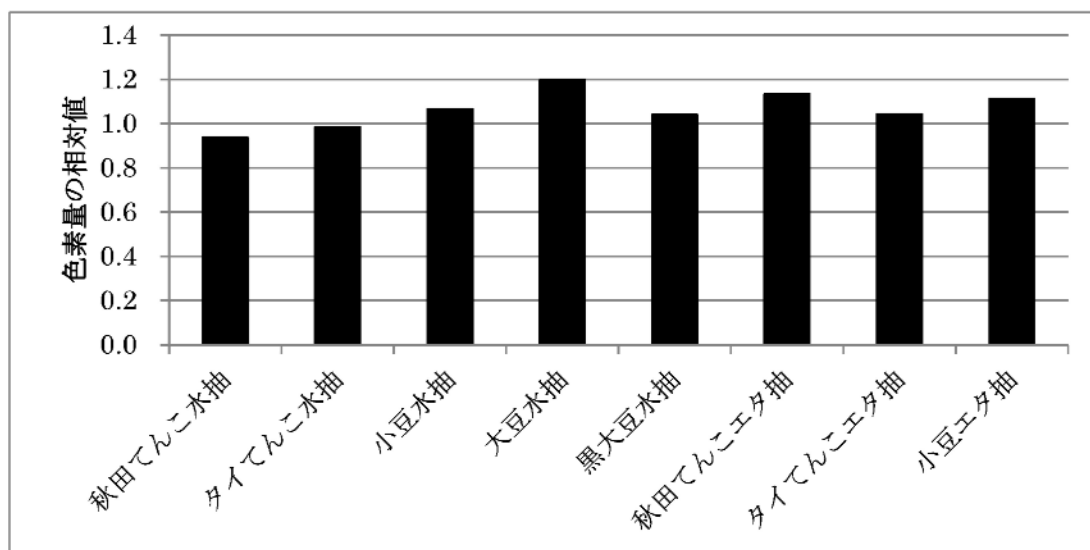


図3 豆抽出液の脂肪細胞に対する影響

脂肪細胞を各種抽出液で処理した後、Oil Red O 染色を行い、相対色素量を定量した。

#### 5) 豆類抽出液の人工モデル臓器での評価

培養細胞から分化誘導した人工モデル臓器を用いて各抽出液の影響を検討した。具体的には人工モデル臓器培養系に各種抽出液を加え、培養液中の LDL, HDL、コレステロール及びトリグリセリドの量を分析した。その結果、ポジティブコントロールとして用いた Pluronic L18 は、チャンバー下層へのトリグリセリドの吸収を阻害した。しかしながら、秋田産てんこ小豆熱水中抽出液やエタノール抽出液では吸収抑制活性は認められなかった (表3)。

表3 人工モデル臓器での評価

Conc.	—	Pluronic	てんこ	てんこ
		L-81	小豆熱水	小豆 EtOH
		1.0 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Cell number(x10 <sup>5</sup> )	2.7±0.3	2.5±0.4	2.8±0.1	2.7±0.2
Total triglycerides (µg/10 <sup>6</sup> cells)	19.3±0.9	8.2±1.6	20.6±0.8	23.9±4.2
Chyromicron	1.4±0.1	0.4	1.1±0.1	1.2±0.2
VLDL	13.5±0.8	4.7±0.9	13.5±0.7	16.5±3.4
LDL	3.4±0.2	2.4±0.5	4.3±0.1	4.9±0.7
HDL	1.1±0.1	0.8±0.1	2.7±0.2	1.2±0.1
Total cholesterol (µg/10 <sup>6</sup> cells)	3.0	2.7±0.2	1.5±0.2	3.4±0.3
Chyromicron	0.5±0.1	0.5±0.1	0.4	0.6±0.2
VLDL	1.4±0.1	1.1	1.1	1.6±0.1
LDL	0.6	0.6±0.1	0.6	0.7±0.1
HDL	0.4±0.1	0.4	0.5±0.1	0.5±0.1



表中の数値は means±SD (n=3)

### 【まとめ】

以上の結果より、秋田産てんこ小豆には高血圧関連酵素であるレニン、ACE やキマーゼ阻害物質が豊富に含まれていることが明らかとなった。これまでの研究で大豆由来レニン阻害物質としてソヤサポニン I を、また、米由来レニン阻害物質としてオレイン酸やリノール酸を同定している。今後、秋田産てんこ小豆の機能性を確立すべく RAS 系酵素類の阻害物質の精製と構造解析を進める予定である。

### 【参考論文】

1. Takahashi S., Hata K., Kikuchi K-I., and Gotoh T. (2007) High-level expression of recombinant active human renin in Sf-9 cells: Rapid purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613.
2. Takahashi S., Hori K., Shinbo M., Hiwatashi K., Gotoh T., and Yamada S. (2008) Isolation of human renin inhibitor from soybean: Soyasaponin I is the novel human renin inhibitor in soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236.
3. Takahashi S., Ono H., Gotoh T., Yoshizawa-Kumagae K., and Sugiyama T. (2011) Novel internally quenched fluorogenic substrates for angiotensin I-converting enzyme and carboxypeptidase Y. *Biomed. Res.*, **32**, 407-411.
4. 高橋砂織、佐々木康子、小笠原博信、渡辺隆幸 (2014) 血圧降下作用強化を目指した機能性味噌の開発 中央味噌研究所報告 35, 129-140.
5. Watanabe T., Hata K., Hiwatashi K., Hori K., Suzuki N., and Itoh H. (2010) Suppression of murine preadipocyte differentiation and reduction of visceral fat accumulation by a *Petasites japonicas* ethanol extract in mice fed a high-fat diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 499-503.
6. Takahashi J., Ogihara K., Naya Y., Kimura F., Itoh M., Iwama Y., Matsumoto Y., Toshima G., and Hata K. (2012) An in vitro assay system for antihyperlipidemic agents by evaluating profiles from intestinal epithelium-like cells. *3 Biotech*, **3**, 213-218.

### 【謝辞】

本研究は、公益財団法人日本豆類協会平成 25 年度助成金により行われました。本論文の内容は、助成金報告書を基に作成したものであり、発表をご快諾頂きました公益財団法人日本豆類協会（理事長 佐藤俊彰氏）に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、てんこ小豆栽培農家を紹介頂くとともに県内の作付け情報などを提供頂きました有限会社鈴和商店（秋田市）鈴木昌幸氏、高橋智幸氏に御礼を申し上げます。また、実験の補助をして頂きました佐藤愛氏、てんこ小豆赤飯の試作並びに評価にご協力頂きました熊谷昌則博士、若狭愛未氏に感謝いたします。

別添資料1

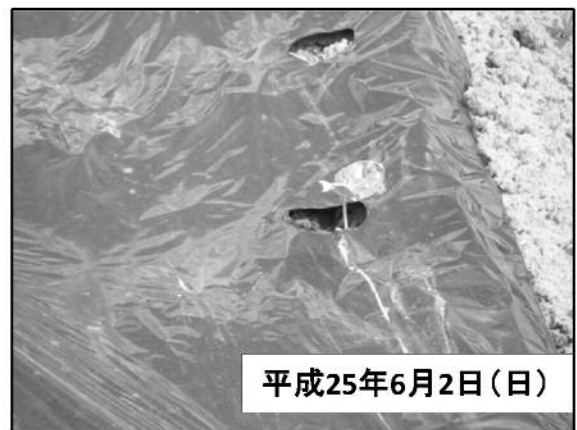
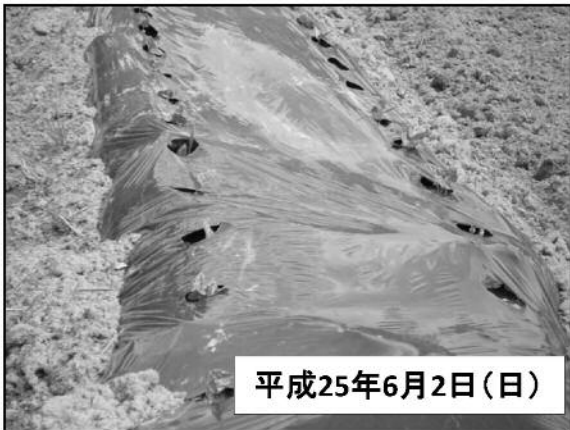
# てんこ小豆栽培調査

調査期間:

平成25年6月2日～9月14日

調査地: 秋田市河辺

播種: 平成25年5月23日







## 別添資料2

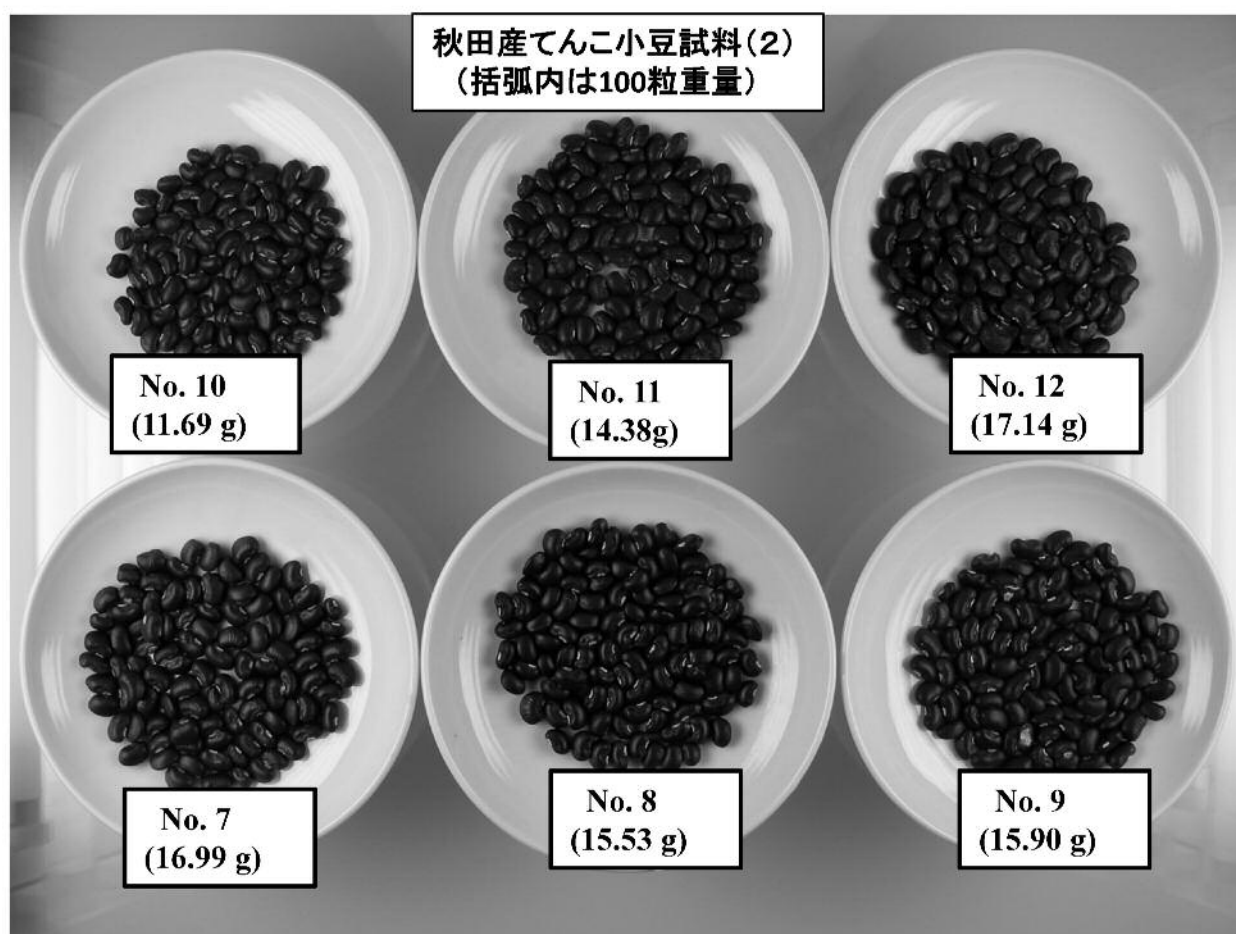
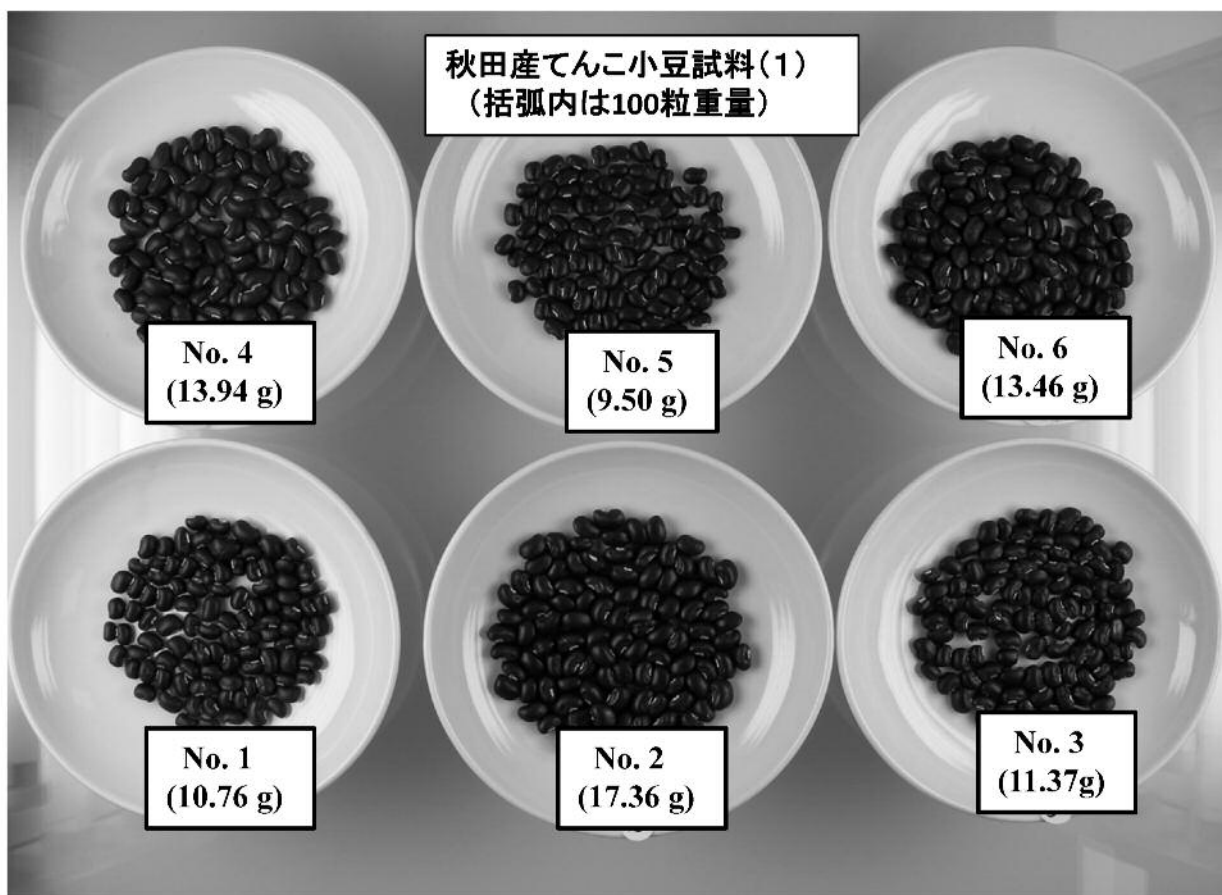
# 秋田県内におけるてんこ小豆の 栽培状況調査

### 秋田県内市販てんこ小豆（40点）

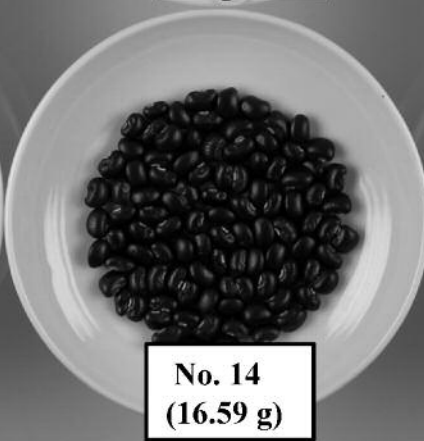
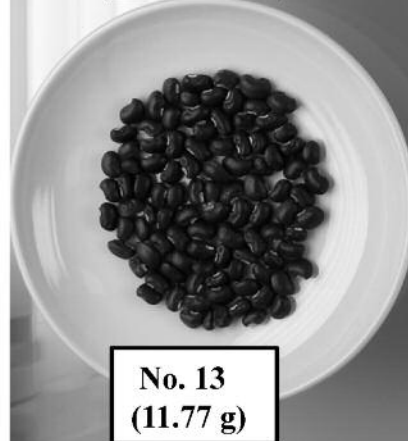


市販てんこ小豆40点。No. 41: 秋田産てんこ小豆(鈴和商店)、No.42: タイ産てんこ小豆を使用





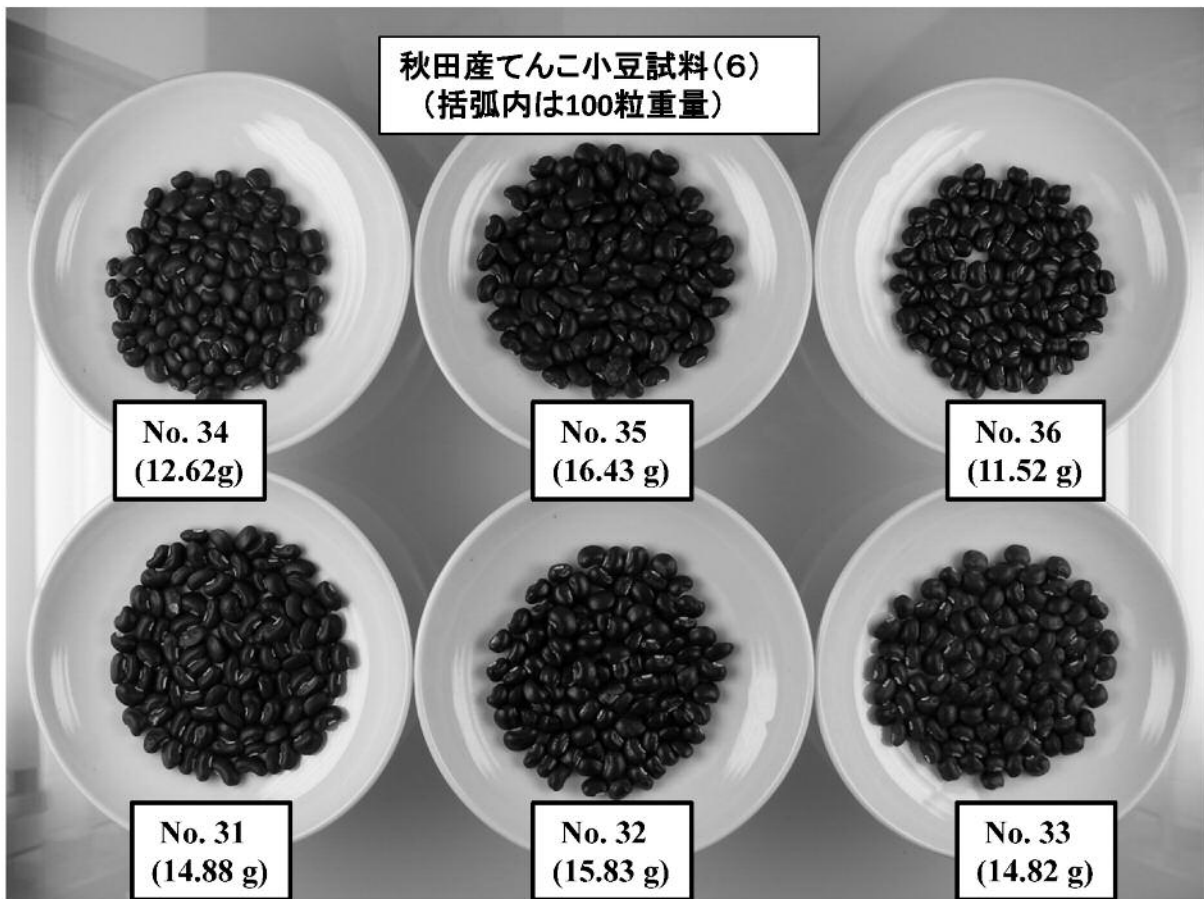
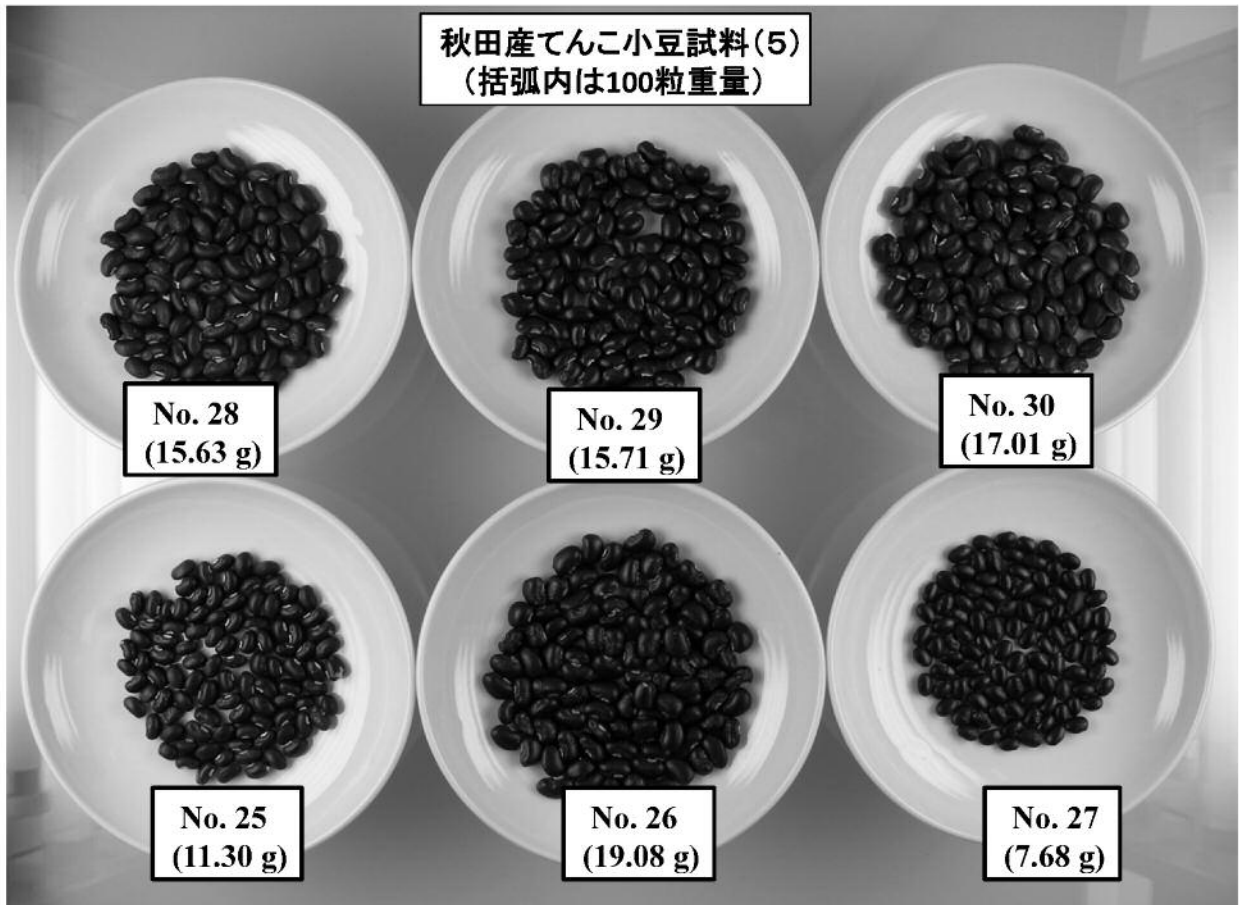
秋田産てんこ小豆試料(3)  
(括弧内は100粒重量)



秋田産てんこ小豆試料(4)  
(括弧内は100粒重量)

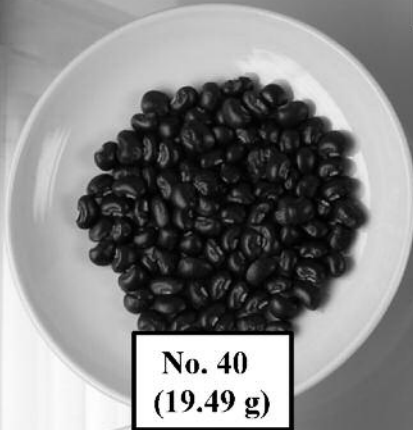




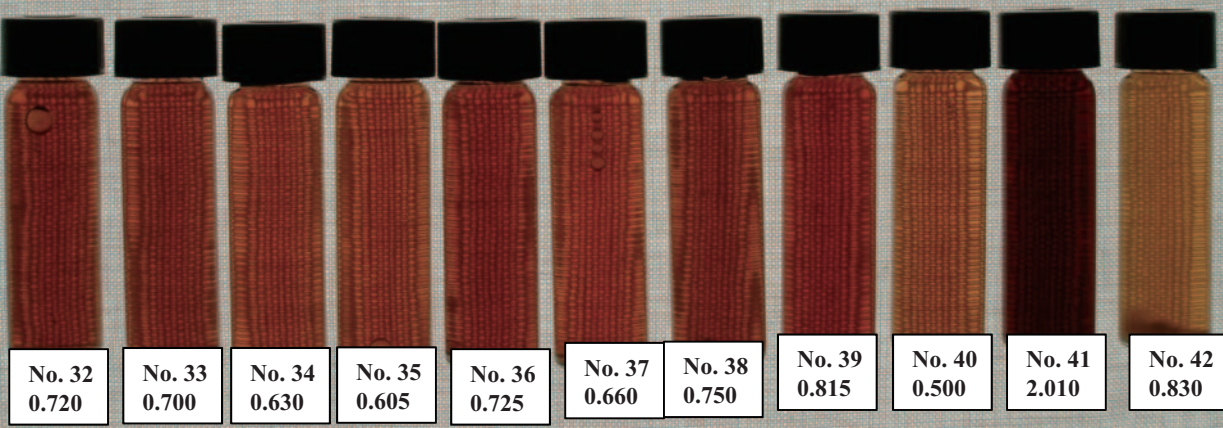
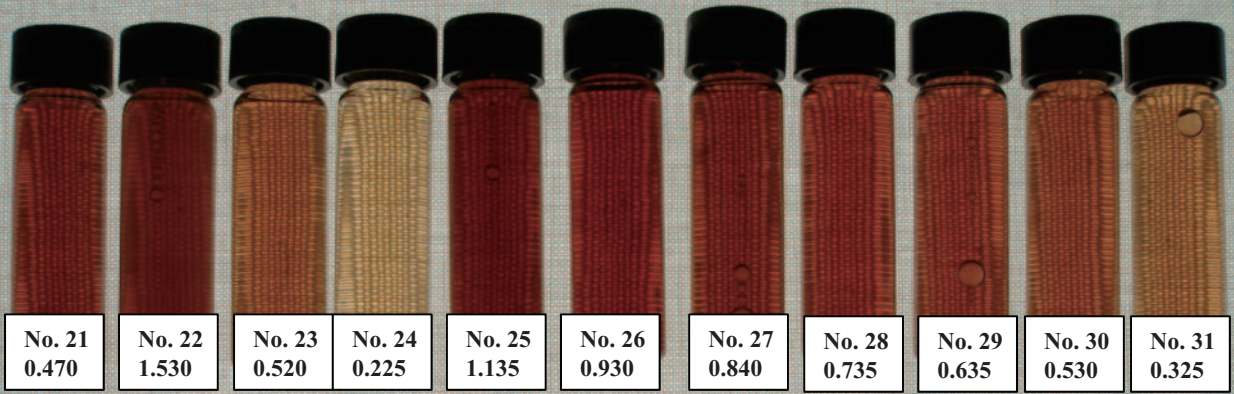
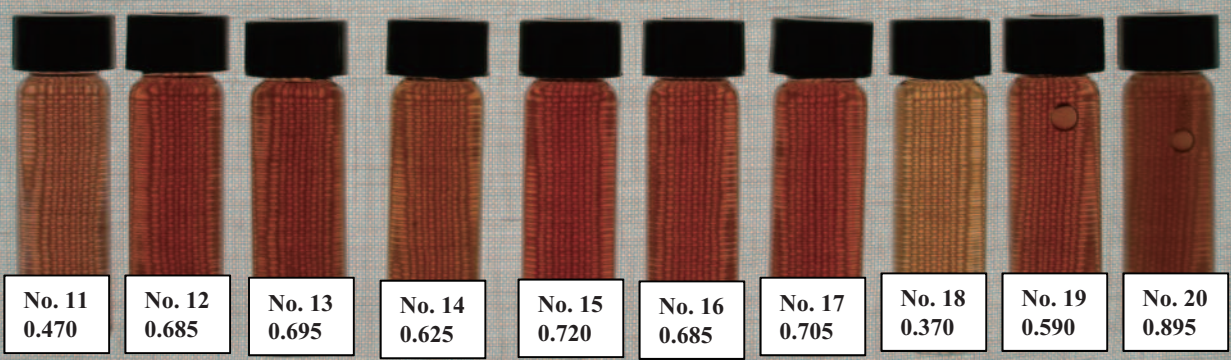




秋田産てんこ小豆試料(7)  
(括弧内は100粒重量)



てんこ小豆抽出液  
 試料番号下の数値は、530 nmの吸光度





## 酸生成の少ない清酒酵母の簡易選抜法

上原（佐藤）智美、渡邊誠衛、大野 剛、高橋 仁  
（秋田県総合食品研究センター 酒類グループ）

Tomomi UEHARA-SATO, Seiei WATANABE, Tsuyoshi OHNO, and Hitoshi TAKAHASHI

### 【緒言】

多様化の時代と言われて久しいが、清酒の品質にも多様化が求められ、様々な特徴を有する清酒酵母の育種が各地で活発に行われている<sup>1)</sup>。なかでも有機酸は、酒質に影響を及ぼす要因の一つであり、これまで数多くの研究がなされている。清酒中には、約 40 種類の有機酸が含まれているが、全有機酸のおよそ 7~8 割を乳酸、コハク酸、リンゴ酸が占めている<sup>2)</sup>。有機酸に着目した酵母の育種については、これまでに様々な方法でリンゴ酸高生産性酵母<sup>3, 4)</sup>や少酸性酵母<sup>5, 6)</sup>が報告されている。しかし、酵母の育種を行うには高い技術力と高額な設備が必要であることが多く、地方の公設試や大手の清酒製造場による実用例は多数あるが、小規模の製造場ではほとんどないのが実状である。そこで我々は、比較的規模の小さい製造場でも酸生成の少ない清酒酵母の取得ができるよう簡便な選抜法の確立について検討を行った。

### 【実験方法】

#### 1. pH 指示薬を用いた酸生成の少ない酵母の選抜

pH 指示薬にはブロムチモール・ブルーとニュートラル・レッドを混合した混合指示薬を用いた。親株として酢酸イソアミル高生産株である秋田酵母 No. 12<sup>7)</sup>を、また基準株として同酵母から派生して得られたイソアミルアルコール低生産性株の 2 株 (LAc1、LAc2) を使用した。上記の 2 つの基準株を 2 ml の麴エキスに植菌して 30°C で 2 日間静置培養した。3 回の継代培養を行い、YPD 寒天培地 (1% yeast extract、2% poly peptone、2% glucose、2% agar) に適量を塗布して 30°C で 2 日間培養した。それぞれの寒天培地に生育したコロニーをランダムにピックアップし、再び麴エキスによる培養後に以下の操作に供した。すなわち適量 (スポイトで 1、2 滴) の混合指示薬および 500  $\mu$ l の 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液を添加した 2.5 ml の麴エキスを調製し、前述の培養液を 30  $\mu$ l 加えて 28°C、13~16 時間静置培養した。指示薬の色から判断して酸の生成が少ないと思われるものを選抜し、以下の試験に用いた。

## 2. 発酵試験

アルコール脱水麴を添加した培地による発酵試験は、斎藤らの方法<sup>8)</sup>に準じて行った。すなわち、前述のような方法で選抜した酵母を麴エキス培地に植菌した後、30°Cで3日間静置培養した。次に8gのアルコール脱水麴、20mlの麴エキスに上記の培養液をそれぞれ1mlずつ添加し、13°Cで14日間静置した。発酵終了後、遠心分離(0°C、5000rpm、10分間)を行い、得られた上清の一般成分(日本酒度、アルコール、酸度、アミノ酸度)および香気成分の分析を行った。

## 3. 仕込試験および官能評価

原料米は掛米に精米歩合70%の秋田107号(「ぎんさん」として品種登録申請を行い、H26. 2. 5に出願公表済)、麴米に精米歩合55%の秋田酒こまち、麴菌はN54Gを使用して、3段仕込みにて総米500gの仕込試験を行った(表1)。親株は秋田酵母No. 12を用いた。仕込配合を表1に示す。品温は、添仕込13°C、仲仕込9°C、留仕込6°Cとして、最高温度(11°C)に達するまで1日あたり0.7~0.8°Cずつ上昇させた。もろみの管理は主としてBMD値<sup>9)</sup>(留め後日数×ポーメ度)にて行い、定期的にサンプリングを実施した。最終的に遠心分離(0°C、3000rpm、50分間)により上槽した。得られた製成酒の一般成分および香気成分を分析し、きき酒による官能評価を行った。官能評価は4人の醸造試験場職員が5点法により実施した(親株を3とした相対評価)。

表1 仕込配合

	酒母+添	仲	留	計
総米 (g)	118	153	230	500
白米 (g)	78	128	195	400
蒸米 (g)	101	166	253	-
麴 (g)	46	29	40	-
汲水 (ml)	190	230	330	750

## 【結果と考察】

### 1. pH 指示薬を用いた酸生成の少ない酵母の選抜

本選抜法を確立するにあたり、液体培地に pH 指示薬を加えただけでは色調がほとんど変化しないが、水酸化ナトリウムを加えることにより、アルカリ側に傾き、色調が青味を帯びるため、本試験では同試薬を液体培地に添加して選抜することとした。また培養温度と時間および水酸化ナトリウムの添加量について予備検討を行った。その結果、温度については 30℃では増殖が早すぎて作業性に難があることから 28℃が適当であることを確認した。また時間については温度 28℃で 13~16 時間培養することが最適であると判断した。これらの条件が決まった後に、水酸化ナトリウムの添加量を変えて、増殖に影響を与える濃度について検討したところ、終濃度 0.01 N~0.02 Nの間であれば酵母の増殖にほとんど影響がないことが分かった（データ未提示）。

pH 指示薬を添加した液体培地を用いて、ランダムにピックアップした 100 株（各基準株 50 株ずつ）から酸生成の少ない酵母の選抜を行った結果、培養後に明らかに青味を帯びたものが 21 株（LAc1 : 14 株、LAc2 : 7 株）得られた（図 1）。

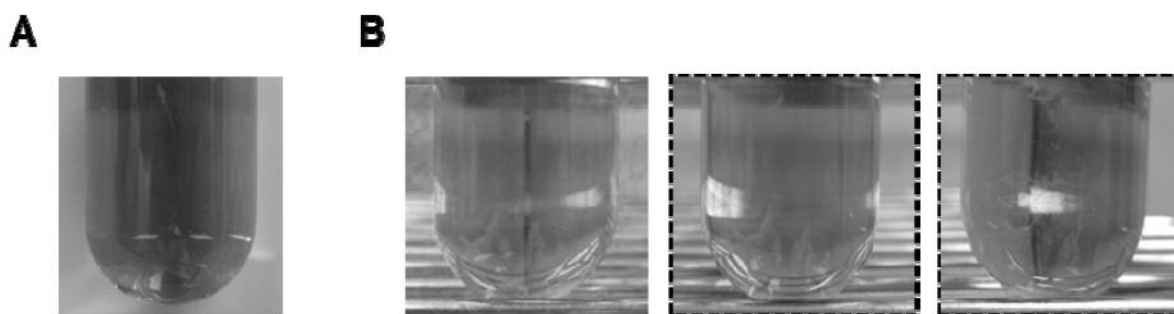


図 1 pH 指示薬を用いた酸生成の少ない酵母の選抜

A : 培養前、B : 培養後（28℃、13 時間）

点線で囲った写真のような呈色を示したものを次試験に供した。

### 2. 発酵試験

混合指示薬により選抜した 21 株を用いて発酵試験を行い、上清を分析（酸度、日本酒度、アルコール、香り成分）した結果、発酵力および香り成分は基準株と同等で、酸度が 0.05~0.10 ほど低減していた 6 株を得た（データ未提示）。この 6 株のうちで酸生成の少ない 2 株（LAc2-1 と LAc2-30）を選び、これらの株を基準株として前述の操作を繰り返し、再び 100 株から選抜および発酵試験を行った。その結果、発酵力

は変わらず、酸度が基準株と同等もしくは低かったものが合計 17 株得られた(表 2)。そのうち 11 株を総米 500 g の仕込試験に供することにした。

表 2 2 回目の発酵試験結果

株名	酸度	日本酒度	アルコール [%]	株名	酸度	日本酒度	アルコール [%]
LAc2-1-1	2.15	2.82	15.45	LAc2-30-1	2.10	3.95	16.20
LAc2-1-2	2.15	7.46	15.75	LAc2-30-2*	2.05	2.54	16.20
LAc2-1-3	2.25	10.04	14.85	LAc2-30-3*	2.05	5.26	16.25
LAc2-1-4	2.20	4.94	15.70	LAc2-30-4*	2.00	6.51	15.55
LAc2-1-10	2.10	3.88	16.00	LAc2-30-5	2.10	1.91	16.15
LAc2-1-15	2.30	5.98	16.30	LAc2-30-8	2.25	-0.79	15.80
LAc2-1-16	2.15	7.35	15.90	LAc2-30-10	2.20	3.18	15.95
LAc2-1-17	2.10	6.86	15.75	LAc2-30-11	2.15	5.75	16.20
LAc2-1-19	2.15	4.78	16.00	LAc2-30-12	2.15	5.61	16.70
LAc2-1-23	2.15	4.59	16.35	LAc2-30-26*	2.05	2.54	16.15
LAc2-1-24	2.10	3.36	16.20	LAc2-30-28	2.15	3.27	16.10
LAc2-1-25	2.15	3.44	15.90	LAc2-30-31*	2.05	4.81	16.25
LAc2-1-27	2.15	4.47	16.15	LAc2-30-33	2.20	11.59	14.65
LAc2-1-28	2.10	3.92	16.20	LAc2-30-34*	2.00	6.58	16.25
LAc2-1-29	2.10	2.31	15.95	LAc2-30-35	2.10	5.59	16.35
LAc2-1-30	2.15	6.25	16.45	LAc2-30-36	2.15	3.98	16.45
LAc2-1-34*	2.05	2.70	16.35	LAc2-30-37*	2.00	7.15	15.75
LAc2-1-35	2.15	5.14	16.55	LAc2-30-38	2.10	1.47	16.10
LAc2-1-36*	2.05	2.70	16.30	LAc2-30-39	2.15	3.79	16.05
LAc2-1-37*	2.05	3.52	16.35	LAc2-30-41*	2.00	8.00	15.60
LAc2-1-43	2.25	3.10	15.65	LAc2-30-44	2.15	4.84	16.70
LAc2-1-48	2.10	3.01	16.10	LAc2-30-45	2.10	4.15	16.30
LAc2-1	2.05	2.99	16.45	LAc2-30-46	2.15	3.46	16.40
				LAc2-30-47	2.15	3.14	16.45
				LAc2-30-48	2.15	3.12	16.60
				LAc2-30-50	2.10	3.82	16.30
				LAc2-30	2.10	5.50	15.95

アスタリスク (\*) は次試験に供した株を、太字は酸度が基準株と同等もしくは低かったものを示す。

### 3. 仕込試験および官能評価

発酵試験から選抜した 11 株を用いて総米 500 g の仕込試験を行い、官能評価で評



点が2.5以下の6株（データ未提示）を再び仕込試験に供した。2回目の試験で得られた製成酒の成分分析および官能評価の結果を表3に示す。親株に比べて全ての選抜株で酸度が低減していた。アミノ酸度については親株と同等、グルコース濃度、日本酒度、アルコール濃度、もろみ日数についてはややバラツキが見られたものの、親株とほぼ同程度と判断し、発酵力に大きな差はないと思われた。香気成分については、酢酸エチル、酢酸イソアミル、イソアミルアルコールが親株に比べて減少していた。これに関してはイソアミルアルコール低生産株を基準株として用いたため、同成分およびそれを基質として生成される酢酸イソアミルが減少した可能性が考えられた。また、全ての株で酸度の低減は認められたものの、製成酒の有機酸組成についても調べる必要がある。二糖（主にマルトース）の資化性を指標にして有機酸生産性が変化した清酒酵母の取得<sup>10)</sup>も既に試みられていることから、これらの株のマルトース資化性についても興味深い知見が得られるかもしれない。

#### 【まとめ】

本研究では、酸生成の少ない清酒酵母の選抜法の確立について検討を行った。これまでに報告されている方法では、最初に有機酸分析を行っているものが多かったが、同分析を多検体に対して行うのは時間がかかるというデメリットがあった。今回の方法では、簡単に酸生成の少ない酵母を選ぶことができる。また逆に培養時間を早くすることにより、多酸性の酵母の選抜法としても使えらると思えられる。しかし、選抜法の再現性および有用性については他の酵母を用いた詳細な検討が必要である。



表3 2区目の仕込試験結果

株名	酸度	アミノ酸度	グルコース [%]	日本酒度	アルコール [%]	もろみ日数	香氣成分 [ppm]							E/A* (平均)
							酢酸エチル	n-ブタノール	i-ブタノール	酢酸nアミル	nアミルアルコール	カロン酸エチル		
親株	1.70	0.60	1.1	+2.10	15.40	28日	82.19	45.66	59.38	4.65	150.69	2.69	3.1	-
2-1-37	1.65	0.60	1.3	+1.72	15.15	25日	62.88	45.11	56.11	3.10	137.84	4.60	2.2	3.0
2-30-3	1.50	0.60	1.0	+5.71	15.20	25日	64.36	43.23	54.07	3.19	134.64	4.23	2.4	2.0
2-30-26	1.55	0.60	0.7	+6.10	15.80	27日	66.01	50.42	57.63	3.28	138.99	4.10	2.4	2.0
2-30-31	1.60	0.50	1.1	+3.75	15.00	25日	60.91	45.26	54.94	3.18	136.32	4.41	2.3	3.0
2-30-34	1.60	0.60	0.9	+3.57	15.45	28日	59.25	46.28	61.26	3.33	146.66	4.74	2.3	3.0
2-30-41	1.50	0.70	1.0	+2.14	15.70	28日	64.19	49.31	61.90	3.54	147.18	4.60	2.4	2.3

\*は酢酸イソアミル (E) とイソアミルアルコール (A) の生成比を示す。

#### 【引用文献】

- 1) 清酒酵母研究会編（1980）：清酒酵母の研究－80年代の研究－ p110-126
- 2) 日本醸造協会編（1999）：新版醸造成分一覧 p37-50
- 3) 吉田 清、稲橋正明、中村欽一、秋山裕一、野白喜久雄（1994）コハク酸生産性の低いリンゴ酸高生産性清酒酵母の育種 日本醸造協会誌 89, 647-651.
- 4) 大場孝宏、末永 光、一松時生、波田野雄大、満生慎二、鈴木正柯（2008）清酒醪からの多酸性清酒酵母の分離とその特性 日本醸造協会誌 103, 949-953.
- 5) 吉田 清、稲橋正明、野呂二三、中村欽一、野白喜久雄（1993）有機酸生成の少ないエステル高生産性清酒酵母の育種 日本醸造協会誌 88, 565-569.
- 6) 福田 央、家藤治幸、木崎康造、高橋康次郎（2000）少酸性酒類製造用酵母の育種 特許第 3136332 号
- 7) 渡邊誠衛、田口隆信、高橋 仁、大野 剛（2010）秋田酵母 No. 12 と秋田酵母 No. 15 の開発 秋田県総合食品研究所報告 12, 14-23.
- 8) 斎藤久一、渡邊誠衛、田口隆信、高橋 仁、中田健美、岩野君夫、石川雄章（1992）アルコール脱水麴を用いる培地による優良酵母の分離とその性状 日本醸造協会誌 87, 915-921.
- 9) 日本醸造協会編（2009）：増補改訂 清酒製造技術 p251-253
- 10) 浅野忠男（2007）清酒酵母の有機酸生成に関する研究 生物工学会誌 85, 63-68.

## 2. 原著論文（研究ノート）

- 1) 製麺性が低下したそば粉の品質  
○大能俊久

# 製麺性が低下したそば粉の品質

大能俊久

(秋田県総合食品研究センター 食品開発グループ)

Toshihisa OHNO

## 【緒言】

通常玄そばは収穫後貯蔵され、使用する際に製粉されてそば粉となる。その後、小麦粉や水と一緒に捏ねられて生地となり、圧延、裁断されて麺の「蕎麦」となり食される。玄そばは翌年の玄そばが収穫されるまで、1年程度貯蔵された後に使用される場合がある。今回、約1年冷蔵貯蔵した玄そばから調製したそば粉について製麺性と品質を調べ、若干の知見を得たので以下に報告する。

## 【実験方法】

### 1. 試料

2012年秋に秋田県内の同一地域で収穫した玄そばを使用した。2つを別の紙袋に入れ、13℃の同一の冷蔵庫中に2012年10月に入れた。10ヶ月貯蔵後に冷蔵庫から取り出してロールミルで製粉した物をそば粉Aとし、11ヶ月貯蔵後に冷蔵庫から取り出してロールミルで製粉した物をそば粉Bとした。

### 2. 製麺性試験

そば粉80gに小麦粉20g、水50gを加えて捏ねて生地を作った。その生地を(株)丸和製作所の製麺機出雲を使用してロールがけ(圧延)を行って薄く延ばし、その後出雲のカッターを使用して麺線にした。この麺線が短く切れているかどうかや麺線を持ち上げた時麺線が切れるかどうかを基に、製麺性を普通、やや悪い、悪いの3段階で評価した。

### 3. 水分、水分活性、カビ数の測定

水分は105℃5時間加熱乾燥法で測定した。水分活性はデカゴン社のポータブル水分活性計Pawkitで測定した。カビ数の測定はそば粉懸濁液をポテトデキストロース寒天培地にのせて25℃で培養し、培養5日後にコロニーの形状からカビかどうかを判断し、カビの数を計測することで行った。水分と水分活性は測定回数3回で行い、結果を平均値±標準偏差で示し、有意差検定をスチューデントのt検定(両側検定)で行った(有意水準5%)。カビ数の測定は測定回数2回で行い、結果を平均値で示した。

## 【結果と考察】

### 1. 製麺性試験

表1に示したように、そば粉Aを原料にした場合は、麺線にカットした後短い麺線ができず、また麺線を持ち上げても麺線が切れなかったため製麺性を普通と判断した。一方、そば粉Bを原料とした場合は、麺線にカットした時点で短い麺線が発生し、また麺線を持ち上げると途中で切れるものが多かった。以上から、そば粉Bは製麺性が

悪いと判断した。

表1 そば粉の製麺性

	製麺性	備考
そば粉A	普通(3)	カット後に短い麺線はできない 持ち上げても麺線が切れない
そば粉B	悪い(1)	カット後に短い麺線ができる 持ち上げると麺線が切れる

製麺性は、普通(3)、やや悪い(2)、悪い(1)の3段階で評価した。

表2 そば粉の品質

	水分 (%)	水分活性	カビ数 (個/g)
そば粉A	15.69±0.11 <sup>a</sup>	0.79±0.01 <sup>a</sup>	0
そば粉B	16.04±0.05 <sup>b</sup>	0.80±0.01 <sup>a</sup>	30000

水分、水分活性の違うアルファベットはt検定で有意差があることを示し、同じアルファベットは有意差がないことを示す( $p < 0.05$ )。

## 2. そば粉の品質

そば粉の水分、水分活性、カビ数の結果を表2に示す。そば粉Bはそば粉Aに比べて水分が有意に高くなっており、水分活性は有意差は認められなかったものの0.01高くなっていた。また、カビは、1g当たり3万個が認められた。一方、そば粉Aにはカビは認められなかった。

そば粉Bはそば粉Aより水分が高かったが、冷蔵貯蔵中に冷蔵庫の扉の開け閉めにより外気が冷蔵庫内に入り、冷やされて結露を起こしたことなどが原因で水分が高くなった可能性がある。そば粉Bは玄そばでの冷蔵貯蔵期間がそば粉Aより1ヶ月長く、結露が起こる可能性もそば粉Aより高いからである。そして、水分が増えたためカビが増殖したと推測される。通常のカビは水分活性0.80以上で増殖が可能とされ<sup>1)</sup>、今回の測定結果はちょうど境界の0.80だが、冷蔵貯蔵中に結露などが発生して水分が増えたとすると、吸水した部分は局所的には水分活性0.80を超える値になっているはずで、カビは充分増殖可能であろう。

そばの穂発芽により $\alpha$ -アミラーゼ活性が増加して製麺性が低下することがこれまでに報告されている<sup>2)</sup>。また、カビが $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼなどのデンプンに作用する酵素を生産していることは麹菌等で広く知られている<sup>3,4)</sup>。今回、製麺性の低下したそば粉Bでカビが繁殖していたことから、カビが繁殖することそのものが製麺性の低下に関与する可能性や、カビが繁殖して $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼ等のデンプン分解酵素を生産し、それらがそば粉や小麦粉のデンプンに作用することが製麺性の低下に関与する可能性が示唆された。

【引用文献】

- 1) 食品産業戦略研究所編(1996)食品の腐敗変敗防止対策ハンドブック p38-42,株式会社サイエンスフォーラム、東京.
- 2) 杉本雅俊 (2003) 発芽そば由来の $\alpha$ -アミラーゼによるそば麵の物性低下 *食品と技術* **381**, 10-12.
- 3) 伊藤清 (2005) 焼酎麴菌の酵素生産の特徴 *日本醸造協会誌* **100**, 838-848.
- 4) 小路博志、杉本利和、細井健二、柴田和憲、田邊正行、川面克行 (2007) 麴菌で酵素を生産 *日本醸造協会誌* **102**, 109-114.

### 3. 総説

#### 1) セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産技術の開発

○進藤 昌



# セルロース系バイオマスからのバイオエタノール 生産技術の開発

進藤 昌

(秋田県総合食品研究センター バイオリファイナリーグループ)

Sho SHINDO

## 【要約】

バイオマス（生物系資源）を利用したエネルギーは、再生可能かつクリーンであるため、地球温暖化対策として積極的に開発を推進することが求められている。また、有機性廃棄物のリサイクル推進の観点からも重視されている。特に、バイオマスを微生物・酵素を利用してエタノールへ変換し、エネルギー源として利用する利用法はきわめて魅力的であり、その実用化が強く期待されている。本総説においては、セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産技術において、微生物による発酵生産を中心に最近の知見を紹介する。

## 1. 緒言

バイオエタノールは、植物由来であるため過剰な炭酸ガスの排出が無く、地球温暖化防止の切り札として注目されている。日本では、バイオエタノールの原料として食糧と競合しない、雑草や稲ワラなどのような草本系バイオマスと間伐材や廃木材などのような木質系バイオマスを利用するのが望ましいと考えられている。しかし、これらバイオマスからバイオエタノールを生産することは、トウモロコシなどの澱粉系穀物に比較して技術的に難しい点が多い。間伐材や林地残材の場合、国内での発生量は年間760万トンを超えており、稲わらでは年間900万トンを超える。これらをバイオエタノールに変換することは資源の乏しい日本にとって有用なことである。

セルロース系バイオマスの多くは、ヘキソースとペントースで構成されているセルロース、ヘミセルロースなどの植物繊維が大部分を占めている。ところが現状では、ヘキソースからの酵母によるエタノール生産技術は開発されているが、ペントースからのエタノール生産は困難であり、遺伝子組換え菌などによる研究報告が有るが生産能が低く、制御も困難であり未だ実用化の例はない。したがって、セルロース系バイオマスの糖化処理物から効率よくエタノールを生産するには、ペントースからのエタノール生産を効率化することが必要である。ペントースからのエタノール生産菌の生産効率が悪い要因として、基質溶液中のヘキソースのカタボライトレプレッションによりペントースからの生産が抑制されることが考えられる。

本総説では、セルロース系バイオマスからの微生物による発酵を中心として、単行複発酵、並行複発酵およびコンソリデーティッドバイオプロセス（CBP）によるバイ

オエタノール生産技術を中心に最近の知見を解説する（図 1）。

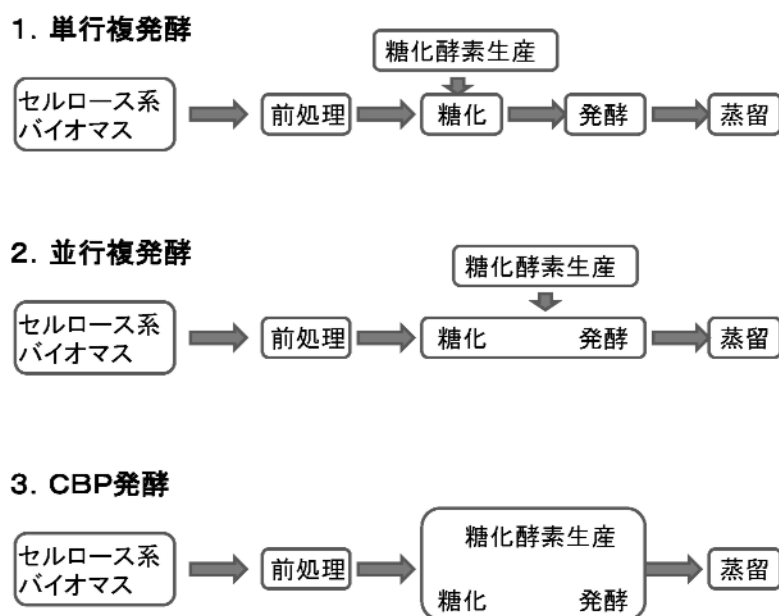


図 1. セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産システム

## 2. セルロース系バイオマスからの単行複発酵によるバイオエタノール生産

セルロース系バイオマスの糖化は、水熱処理や硫酸処理など多くの方法が検討され実証段階に入っている。その前処理方法により、フルフラール等の発酵阻害成分が生成される場合があるが、現在は、何れの方法においても高収率でヘキソースとペントースが得られるようになった。単行複発酵では、セルロース系バイオマスの糖化と発酵が別々に行われることより、発酵では、ヘキソースとペントースを如何に効率よくバイオエタノールに変換できるかが大きな課題となる。ヘキソースからのバイオエタノール生産は、醸造用酵母として一般に利用されている *Saccharomyces cerevisiae* で容易に行うことができる。ブラジルでは、サトウキビから得られる糖蜜からのバイオエタノール生産を凝集性の *S.cerevisiae* で大規模に行っている。しかし、*S.cerevisiae* は、キシロース、アラビノースなどペントースからのバイオエタノール生産能を有していないため、未だセルロース系糖化液からの大規模な工業化に成功していない。1993年に Kotter らが *S.cerevisiae* に *Pichia stipitis* のキシロース代謝遺伝子を導入してキシロースからのバイオエタノール生産に成功した<sup>1)</sup>。*S.cerevisiae* はキシロースを代謝するために酸素を必要とするため、キシロース代謝遺伝子を導入した *S.cerevisiae* においてもキシロースからバイオエタノールを生産の際に酸素を必要とすることを明らかにした。Walfridsson らは、*Thermus thermophilus* のキシロースイソメラーゼをコードしている *Xyl1A* 遺伝子を *S.cerevisiae* に導入し、キシロースからキシリトールを介さずにバイオエタノールを生産することに成功した<sup>2)</sup>。

Katahira らは、*S.cerevisiae* に *P. stipitis* 由来のキシロースリダクターゼ (XR) とキシリトールデヒドロゲナーゼ (XDH) を発現させ、さらに *S.cerevisiae* 由来のキシロールキナーゼ (XK) を高発現させて、キシロースから高収率でバイオエタノールを生産させることに成功した<sup>3)</sup>。また、グラム陰性嫌気性桿菌である *Zymomonas mobilis* も利用されている。本菌は、バイオエタノール変換率が高く、生産速度も酵母よりも 3~5 倍高い。さらに、バイオエタノール耐性も *S.cerevisiae* と同等である。また Ingram らは、ヘキソース及びペントースの代謝能を有する *Escherichia coli* に *Z.mobilis* のエタノール生産遺伝子を導入してバイオエタノール生産を行わせることに成功した<sup>4)</sup>。その後、Ingram らが開発した KO11 は、日本でも廃建材からのバイオエタノール生産の実証試験に使用された。*E. coli* は、発酵温度が 35°C と酵母などに比較して高いため、温度制御にエネルギーがかからないため有利である。しかし、エタノール耐性が 5% と低いため、高濃度のバイオエタノールを得るためにはヘキソースとペントースをそれぞれ別工程でバイオエタノール変換を行わせる必要がある。また彼らは、1992 年に、*Klebsiella oxytoca* に *Z.mobilis* のエタノール生産遺伝子を導入してバイオエタノール生産を行わせることにも成功した<sup>5)</sup>。その後、Zhnag らは、*Z.mobilis* に *E. coli* のキシロース代謝遺伝子であるキシロースイソメラーゼ (*xyIA*)、キシロキナーゼ (*xyIB*)、トランスケトラーゼ (*tktA*)、トランスアルドラーゼ (*talB*) を導入し、キシロースから高収率でバイオエタノールの生産に成功した<sup>6)</sup>。Inui らは、*Corynebacterium glutamicum* に *Z.mobilis* のエタノール生産遺伝子を導入してバイオエタノール生産を行わせた。さらにフルフラールや酢酸、レブリン酸などの化合物による増殖阻害を回避した新規な発酵システムを開発した<sup>7)</sup>。*C. glutamicum* は、前記阻害物質に対して嫌気条件下では分裂生育は停止するものの主要代謝系の活性が維持される特徴を有している。本菌株の特徴を利用した RITE プロセスでは、菌の増殖は起こらずに阻害されることなく高収率でバイオエタノールを生産することができる。

### 3. セルロース系バイオマスからの並行複発酵によるバイオエタノール生産

並行複発酵は、単行複発酵と違い、セルロース系バイオマスの糖化と発酵が同時に行われる発酵システムである。米を原料とした日本酒の発酵システムが、まさに並行複発酵であり、糖による影響を抑えながらバイオエタノール生産を行えるため、単行複発酵に比較して高濃度のバイオエタノールを得ることができる。穀物デンプンからの並行複発酵システムによるバイオエタノール生産は、酵素剤の開発も含めてすでに確立されているが、セルロース系バイオマスからは、未だ工業化されていない。セルロースの糖化に使用されるセルラーゼやキシラナーゼは、生産物である糖によりフィードバック阻害を受ける。しかし、並行複発酵では、生産された糖が菌によってバイオエタノールに変換されるため、阻害を低減することができる。一方、セルロースの糖化速度は、デンプンの糖化速度に比較して遅いため、菌によるバイオエタノール生産とのバランスを取ることが困難である。また、セルラーゼや  $\beta$ -グルコシダーゼ等



の最適糖化温度がバイオエタノールを生産する菌の最適発酵温度に比較して高いため、条件を揃えることが難しい。Hackらは、45°Cでバイオエタノールの生産可能な *Kluyveromyces marxianus* IMB3 によるセルロースからのバイオエタノール生産について報告した<sup>8)</sup>。しかし、高温での菌の増殖が安定しないなどの問題があり、実用化に至っていない。また、Olssonらは、麦わらを原料にした並行複発酵について検討を行い、糖化を効率よく進めながら同時に発酵を行うシステムを報告した<sup>9)</sup>。彼らは、糖化条件の最適温度である 50°Cで2時間の予備的な糖化を行い、その後、キシロース発酵能を付与した *S.cerevisiae* の最適温度である 30°Cに下げて並行複発酵を行った。バイオエタノール生産速度は、初めは単行複発酵の方が速かったが、後半になると並行複発酵の方が速くなり、バイオエタノール収率も高くなった。

筆者らは、杉を原料にした並行複発酵システムを開発した。杉のチップを粉砕機で 20 μm まで微粉砕したのち、セルラーゼと酵母による並行複発酵を行った<sup>10)</sup>。杉はセルロース系バイオマス中では、ヘキソース含有率が高くグルコースとマンノースが構成糖の 85%以上を占める。従って、筆者らは、ヘキソースのみをターゲットにしてバイオエタノールの生産を行った。杉から酵素を用いて効率よくヘキソースを生産させるために、酵素剤の検討を行いセルラーゼとヘミセルラーゼの組み合わせによりグルコースとマンノースを効率よく生産できることを明らかにした。杉からの並行複発酵によるバイオエタノール生産は、2種類の酵素剤とヘキソース発酵能を有する *S.cerevisiae* を 20 μm まで粉砕された杉の入った懸濁液に添加して 30°Cで行った。その結果、図2に示したように 60(g/L)濃度のバイオエタノールを生産することができた。これにより、1 tの乾燥杉から230 Lのバイオエタノールを生産できる。微粉砕された杉から並行複発酵システムを用いることによりバイオエタノールを生産することが可能であることが判明したが、粉砕エネルギーの問題や酵素剤のコストなどクリアしなければならない課題が残っている。

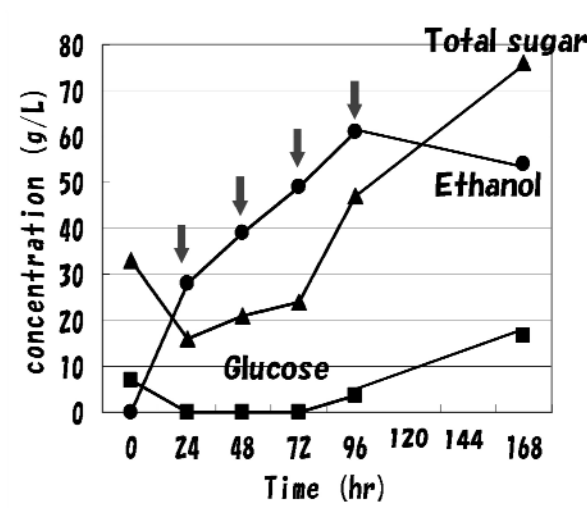


図2.微粉砕された杉からのバイオエタノール生産

#### 4. セルロース系バイオマスからのコンソリデーティッドバイオプロセス (CBP) によるバイオエタノール生産

現在、セルロース系バイオマスから低コストでバイオエタノールを生産するシステムとして期待されているのがコンソリデーティッドバイオプロセス (CBP) である。これは、一つの発酵槽内で酵素の生産と酵素によるセルロースの糖化、さらに糖からのエタノール生産を同時に行わせるシステムである。並行複発酵では、酵素の生産が別工程で行われるのに対して CBP では一工程で済むため非常に効率的である。Lynd らは、並行複発酵と CBP のコスト計算を行い、その優位性を報告した<sup>11)</sup>。すなわち、並行複発酵では、酵素生産に 9.85(\$/gal EtOH)、発酵に 8.98(\$/gal EtOH)を要し、トータルで 18.9(\$/gal EtOH)のコストが掛かるのに対し、CBP では、わずか 1/4 の 4.23(\$/gal EtOH)のコストで済む。従って、CBP のコストにおける優位性は非常に高い。CBP システムに応用する微生物の開発には、2つのアプローチが考えられる。1つは、*Thermophiles* に代表される構成的にセルラーゼを生産し、加水分解された糖を取り込むことのできる菌を代謝工学を利用して生産能力を改善しようとする方法 (Native strategy)。もう一つは、酵母に代表される生産性や収率の高い菌に、セルラーゼ遺伝子を組換えして発現させようとする方法 (Recombinant strategy) である。Native strategy による CBP の開発では、2000 年に Jennert らが、セルロース分解能を持つ嫌気性菌 *Clostridium cellulolyticum* に Electrotransformation (ET) 法により遺伝子を導入しエタノール生産を行った<sup>12)</sup>。さらに、ET 法による *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*<sup>13)</sup> や *T. saccharolyticum*<sup>14)</sup> の遺伝子組換え菌によるバイオエタノール生産も報告されている。Native strategy における CBP 開発において、菌の生産物阻害が問題になる。Lynd らは、エタノール耐性菌の検索を行い、60(g/L)のエタノール耐性を有する *C.thermocellum* を取得した<sup>15)</sup>。一方、Recombinant strategy による CBP の開発では、Zhou らが、エタノール生産用に育種された *K. oxytoca* へのセルラーゼ遺伝子の導入を行い、微結晶性セルロース (Avicel, FMC, Philadelphia) の加水分解を行うことに成功した<sup>16)</sup>。しかし、本菌は、セルラーゼを初期に添加しないと増殖しなかった。また、Fujita らが、酵母の細胞表層にエンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼおよびエキソセロビオヒドロラーゼをディスプレイして集積することで、アモルファスセルロースから直接バイオエタノールを生産することに成功した<sup>17,18)</sup>。さらに、*S.cerevisiae* の表層にキシラン分解酵素である *Trichoderma reesei* 由来のキシラナーゼおよび *Aspergillus oryzae* 由来の  $\beta$ -キシロシダーゼを表示させ、キシランからの CBP によるバイオエタノール生産に成功した<sup>3)</sup>。

筆者らは、木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のセルラーゼならびに  $\beta$ -グルコシダーゼの生産可能な組換え *P. pastoris* (KM71H) を用いた糖化関連酵素の生産からエタノール生産までの一貫プロセス化技術を開発した。セロビオヒドロラーゼ発現酵母と ベーターグルコシダーゼ発現酵母を混合した CBP による 5%  $\beta$ -グルカンからのエタノール生産を行い、18 時間でエタノール収率 86%を達成した (図 3)。

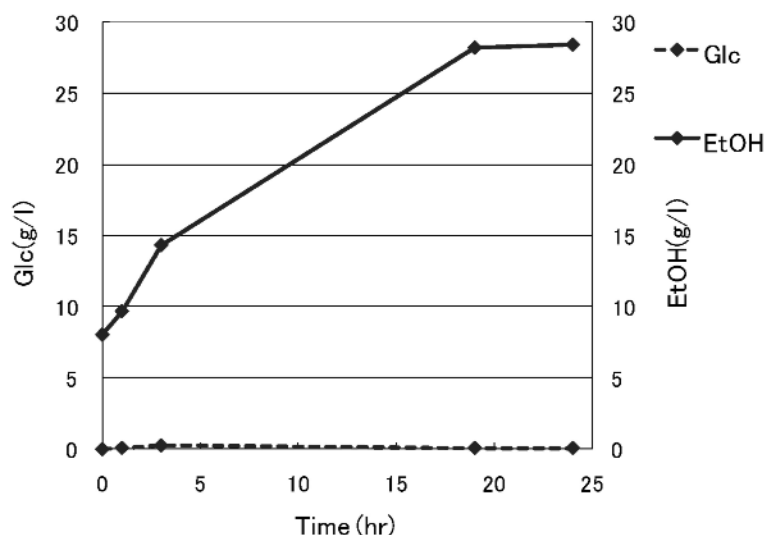


図 3. Cel15A 発現酵母+BGL1Bcat 発現酵母+種母培養液添加による  $\beta$ -グルカンからのエタノール生産

CBP はセルロースからのバイオエタノール生産だけではなく、他の物質生産においても低コストで生産できるという大きなポテンシャルを持っている。今後、前処理されたセルロース系バイオマスから高い収率でセルラーゼを生産し、高効率で加水分解と物質生産を行える菌の開発が期待される。

### 5. 非遺伝子組換え菌によるセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産

日本では、遺伝子組換え菌によるバイオエタノール生産は、自然界に存在しない菌を用いるため、外部に菌が漏れないように発酵タンクの設備を厳重にする必要性などからコストが高くなる。また、稲わらなどの農産廃棄物を原料にする場合には、工場が田園地帯に隣接して建設されることが想定されるため、現状では、遺伝子組換え菌の使用は困難である。これまでに、遺伝子組換え菌を用いた並行複発酵システムやCBPシステムが研究開発されているが、非遺伝子組換え菌によるセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産の研究も数多く報告されている。しかし、非遺伝子組換え菌によるセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産の実用化例は無い。それは、キシロースからのバイオエタノール生産能が弱く、またエタノール耐性が低いなどの問題を抱えているからである。酵母によるキシロースからのエタノール生産は、1959年に Karczewska らが *Candida tropicalis* を用いたのが最初である<sup>19)</sup>。その後、自然界にもヘキソースやペントースからバイオエタノールを生産する菌が数多く報告されており、これまでに、22 種類の酵母やカビが見つまっている。その中でも特にバイオエタノール生産能がすぐれているのが、*Brettanomyces naardensis*, *C. shehatae*, *C. tenuis*, *Pachysolen tannophilus*, *P. stipitis* の 6 種類で、特に *C. shehatae*, *P. tannophilus*, *P. stipitis* が有能な酵母として精力的に研究が行われた。*P. stipitis* の報告は多く、この酵母は、キシロースリダクターゼ(XR)とキシロ



ースデヒドロゲナーゼ(XDH) を持っており、キシリトールを介してキシロースからバイオエタノールを生産することができる。しかし、2つの酵素の補酵素であるNADHとNADPHがこの経路で相補できないため、キシリトールの蓄積が問題となる。さらに、エタノール耐性も *S. cerevisiae* に比較して低いため実用化が困難である。1980年代には、ペントース発酵酵母として注目され、発酵プロセスの改善によりキシリトールの蓄積を抑えた発酵システムが確立された。近年は、*S. cerevisiae* で *P. stipitis* のXRやXDHの遺伝子を発現させるための研究が多く行われている。同時に非遺伝子組換え菌である *P. stipitis* を用いたセルロース系バイオマスからのエタノール生産についても多くの報告がある。Meyrialは、*P. stipitis* がグルコースを取り込む時とキシロースを取り込む時に糖の違いによりエタノール耐性に差があることを見出した<sup>20)</sup>。これは、プラズマメンブランのH<sup>+</sup>-ATPase活性がグルコースを取り込む時に高くなることに起因するものである。Ligthelmは、*P. stipitis* によるグルコースおよびキシロースからのバイオエタノール生産において、溶存酸素の影響について検討を行った<sup>21)</sup>。キシロースからのバイオエタノール生産は、酸素制限下の時に最もバイオエタノール収率が高く生産速度も速くなり、また、好気条件下ではバイオエタノール収率が酸素制限下に比べて38%まで低下することを報告している。

筆者らは、非遺伝子組換え菌によるセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産を目指して、自然界よりキシロースからエタノールを生産できる菌の検索を行った。腐朽した倒木や枯れ葉の堆積している個所、またキノコや花などを集め、それらサンプルからキシロースからのバイオエタノール生産能を有する菌のスクリーニングを行い、2株の酵母(SS1-2、SS2-1)を得た。これら2株は、何れも26S rDNA-D1/D2塩基配列解析、形態観察および生理性状試験の結果より *P. stipitis* Pignal に近縁な新種な *Pichia* 属の一種であると同定され、2株の中ではSS1-2がバイオエタノール生産能が高かった。SS1-2は、グルコースおよびキシロースから高い収率でバイオエタノールを生産することができる。しかし *S. cerevisiae* に比較してエタノール耐性が低く、グルコースからのバイオエタノール変換速度も遅い。従って、SS1-2を単独で使用してもヘキソースとペントースが混在するセルロース系バイオマス糖化液からバイオエタノール生産を行っても5%(w/v)が限界である。また、本酵母は、グルコースによるカタボライトリプレッションを受けるため、グルコースから変換したエタノールが5%(w/v)を超えた場合、グルコースが消費されてキシロースの取り込みが開始されても溶存しているエタノールにより阻害され、キシロースからのエタノール生産が起こらない。バイオエタノールを低コストで生産させるためには、発酵工程で高濃度のバイオエタノールを生産させて蒸留工程のエネルギー負荷を低減させることが重要である。そこで、筆者らは、本酵母のエタノール阻害を除くためにヘキソース発酵酵母とSS1-2を2段階に用いてバイオエタノール生産を行うシステムを開発した。すなわち、バイオマス糖化液中のヘキソースをヘキソース発酵酵母でバイオエタノール生産を行わせた後、一度、ガスストリッピング法によりバイオエタノールを回収し、さらに低濃度のエタノールとペントースが残った糖化液をSS1-2

でペントースからバイオエタノール生産を行わせるものである。

以下に 2 種類の酵母によるバイオマス糖化液からの 2 段階発酵システムについて解説する。筆者らは、2 種類の酵母の特性を把握するために、初めに同時混合発酵によるグルコース・キシロースからのバイオエタノール生産を行い検証を行った。グルコース 40 (g/L)、キシロース 16 (g/L) を含む混合培地及びグルコース 70 (g/L)、キシロース 35 (g/L) を含む混合培地における SS1-2 とヘキソース発酵酵母として *S.cerevisiae* の同時混合発酵法によるバイオエタノール生産について検討を行った。グルコース 40 (g/L)、キシロース (16g/L) を含む混合発酵では、発酵速度は、*S.cerevisiae* 単独発酵と同じであるが、バイオエタノール生産量は、混合発酵のほうが多くなった (図 4)。これは、*S.cerevisiae* によるグルコースからのバイオエタノール生産の後に SS1-2 によるキシロースからのバイオエタノール生産が行われたことによるものと考えられる。また、SS1-2 単独での発酵では、発酵速度が混合発酵よりも遅く、発酵時間も長くなった。従って、グルコース 40 (g/L)、キシロース 16 (g/L) の糖濃度では、混合発酵法を用いた方が発酵速度とバイオエタノール収率を高くすることができるため低コスト生産に有利であることが分かる。

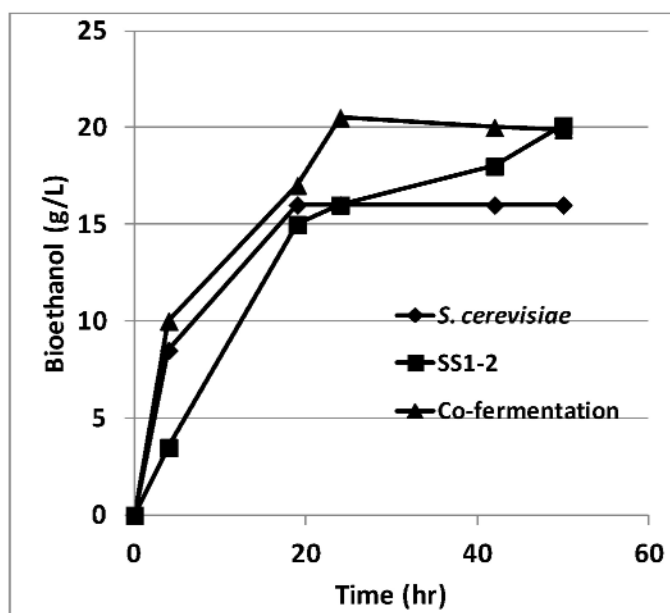


図 4. SS1-2 と *S.cerevisiae* の同時混合発酵

グルコース 40(g/L)、キシロース 16(g/L)を含む混合培地におけるバイオエタノール生産

次に、グルコース 70 (g/L)、キシロース 35 (g/L) を含む混合発酵では、*S.cerevisiae* 単独発酵と同じであったが、最終バイオエタノール生産量は、どちらも同じであった。さらに、この時の濃度は SS1-2 単独による発酵の時と同じであった (図 5)。これは、混合発酵では、SS1-2 によるキシロースからのバイオエタノール生産が行われなかったことに起因するものである。

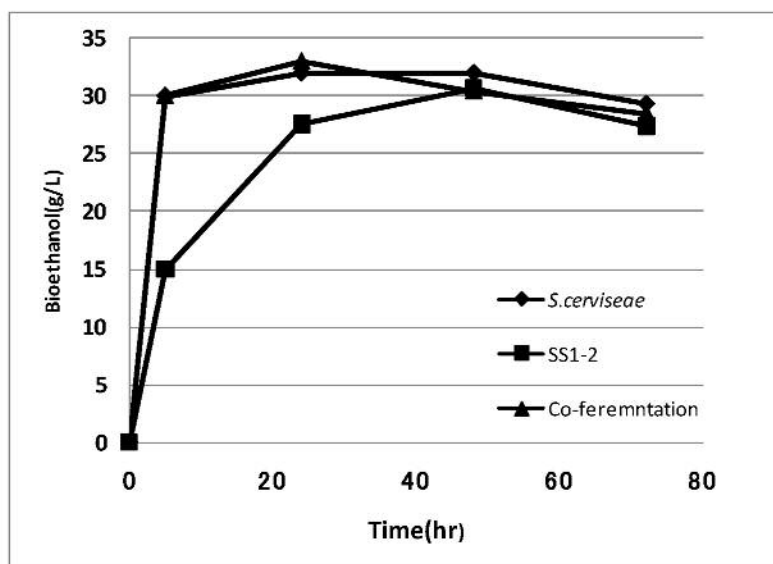


図5. SS1-2 と *S.cerevisiae* の同時混合発酵

グルコース 70(g/L)、キシロース 35(g/L)を含む混合培地におけるバイオエタノール生産

以上のことより、SS1-2 はアルコール濃度 3%(w/v) 以上の発酵液で発酵阻害を起こすことが推察され、高濃度バイオエタノール生産を2種類の酵母を用いて行うためには、エタノール耐性酵母を育種するか、もしくは、新規な発酵システムを構築する必要があると考えられた。そこで、我々は、2段階による発酵システムを開発するために、合成培地を用いた SS1-2 のバイオエタノール生産に及ぼす初発エタノール濃度の影響について検討を行った。方法は、発酵用培地にエタノールを添加し SS1-2 を植菌しバイオエタノールの生産量を測定した。その結果、合成培地にバイオエタノールを添加した場合には、SS1-2 の発酵速度はかなり低下するものの 4%(w/v) までは、バイオエタノールを生産することができたが、6%(w/v) の初発エタノール濃度では、バイオエタノールを生産できないことが判明した (図6)。

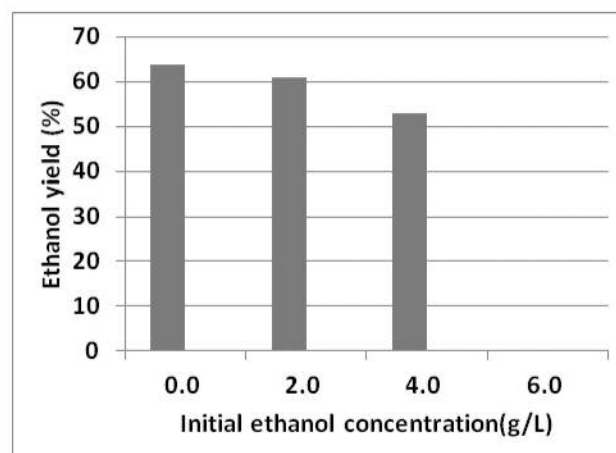


図6. SS1-2 のバイオエタノール生産に及ぼす初発エタノール濃度の影響

合成培地にエタノールを添加して SS1-2 で発酵を行った。



さらに、SS1-2のエタノール以外の阻害要因を探るため、*S.cerevisiae*を用いてグルコース、キシロース混合培地で発酵させた発酵液にSS1-2を植菌した時のバイオエタノール生産に及ぼすエタノール濃度の影響を検討した。発酵液中に産生したバイオエタノールが含有された発酵液では、SS1-2は、初発エタノール濃度3.6%(w/v)では、バイオエタノール収率が理論値の18%となり発酵が阻害された。合成培地での試験より阻害率が高いことより、バイオエタノール以外の発酵代謝産物による相乗効果が推察された。一方、*S.cerevisiae*発酵液からバイオエタノールを除去したのち、SS1-2で発酵を行わせたところ、発酵阻害を受けることなくバイオエタノールを生産することができた(図7)。この結果より、2種類の酵母を用いてグルコース、キシロースの混合した培地から高濃度のバイオエタノールを生産させるには、最初に*S.cerevisiae*を用いてグルコースから高濃度のバイオエタノール生産を行わせ、得られた発酵液からバイオエタノールを回収し、引き続き、SS1-2を用いてキシロースからバイオエタノールを生産されることにより効率よくバイオエタノールを得ることができると推察された。

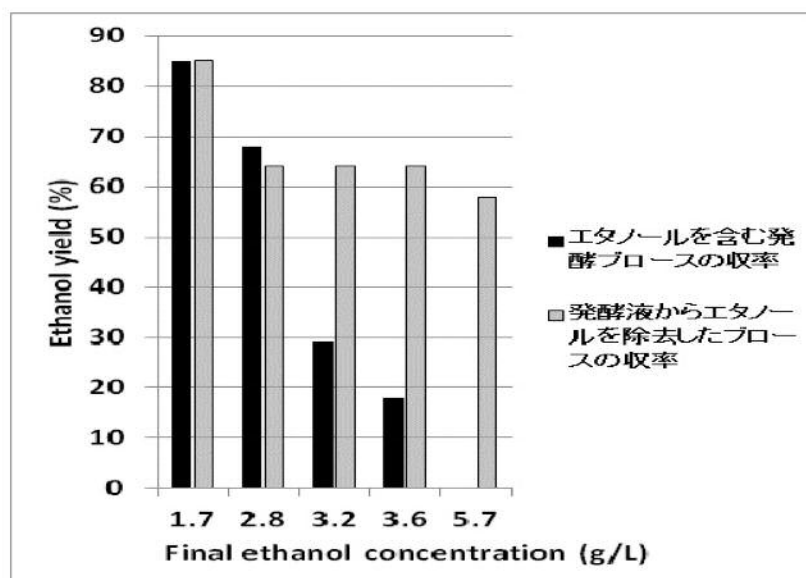


図7. グルコース、キシロース混合培地での *S. cerevisiae* 発酵プロセスに SS1-2 を植菌した時のエタノール生産に及ぼす初発エタノール濃度の影響

以上の結果を踏まえて、SS1-2と*S.cerevisiae*を用いて2段階発酵法によるバイオエタノール生産を検討した。グルコースとキシロースの混合された発酵用培地に初めに*S.cerevisiae*を植菌してグルコースからのバイオエタノール生産を行わせた。次に無菌的に酵母を回収した後、発酵液に無菌の窒素ガスをバブリングすることにより含有しているエタノールを除去した(ガスストリッピング法)。さらにエタノールを除いた発酵液にSS1-2を植菌して、キシロースからのバイオエタノール生産を行わせた(図8)。

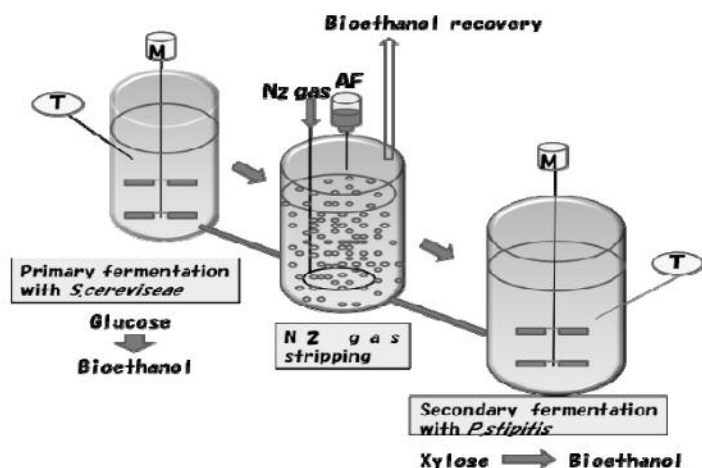


図 8. 2 段階発酵方法によるセルロース系バイオマス糖化液からのバイオエタノール生産システム

表 1 にそれぞれの糖濃度でのバイオエタノール生産について結果を示した。試験区 1 のグルコース濃度が 40 (g/L) の場合は、1 段階目の発酵終了時にバイオエタノールを除去しなくてもキシロースからバイオエタノールが産生された。しかし、試験区 2 以下では、グルコース濃度が高くなるにつれて、1 段階目の発酵終了時にバイオエタノールを除去した方が、SS1-2 による 2 段階目のキシロースからのバイオエタノール生産がおこなわれることが判明した。試験区 5 では、2 段階発酵を行うことにより 83.5 (g/L) のバイオエタノールを得ることができた (図 9)。この時のバイオエタノール収率は 78.0% だった。

表 1. 2 段階発酵によるエタノール生産

試験区	グルコース (g/L)	キシロース (g/L)	1段階発酵後の エタノール除去	産生エタノール (g/L)	エタノール収率 (%)
1	39.5	23.5	有	26.0	81.0
	41.5	19.0	無	23.7	77.0
2	70.2	39.0	有	40.2	72.1
	67.0	33.9	無	34.3	66.7
3	81.2	52.9	有	50.4	73.6
	82.9	44.2	無	40.1	61.8
4	127.9	76.1	有	73.9	71.0
	124.4	72.1	無	57.8	57.7
5	141.8	69.5	有	83.5	78.0
	140.9	68.9	無	58.5	54.7

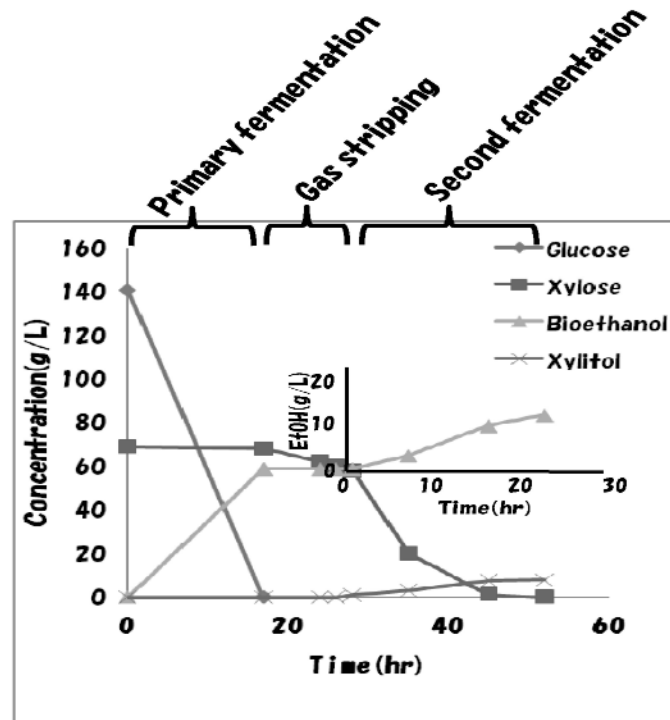


図9. 2段階発酵法によるグルコース・キシロース混合液からのバイオエタノール生産

#### おわりに

バイオエタノールは地球温暖化防止の新エネルギーであるため、環境面においても重要であると認識されている。そのため、世界中でバイオマスからバイオエタノールを生産するための技術開発が行われている。このバイオエタノールを広く世界に普及させるためには、食糧とは競合しないセルロース系バイオマスから低コストでバイオエタノールを生産することが必須である。近年は、バイオリファイナリーという概念のもとバイオマスからバイオエタノールだけでなく化学製品や医薬品、機能性食品、食糧、飼料などの付加価値の高い製品を加工・生産するバイオコンビナートが、低コストでのバイオエタノール生産に直結するであろうということが認識されてきた。バイオエタノールの原料となるバイオマスは、現時点ではサトウキビやトウモロコシ、ビート、小麦などが主流となっているが、バイオエタノールの需要が高まれば、どうしてもセルロース系バイオマスからバイオエタノールを生産しなければならないため、低コスト生産技術の開発が急がれる。セルロース系バイオマスからのエタノール生産技術の開発は、原料生産から前処理、糖化、発酵、蒸留、脱水と一連のプロセスを検討することにより、初めて低コスト化の製造プロセスが確立される。発酵における最適プロセスの検討を行い、発酵におけるデーターを前処理・糖化工程にフィードバックすることにより、さらに効率的なシステムが構築されるのである。日本では、この理念のもとセルロース系バイオマスの栽培からバイオエタノールの生産までの一貫製造技術開発のプロジェクトが動きだした。近い将来、低コストでバイオエタノ



ールを生産するバイオコンビナートが日本にもつくられるものと確信している<sup>22)</sup>。

#### 文献

- 1) Kotter.,P. *et al.* (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**,776-783
- 2) Walfridsson, M. *et al.* (1996) Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4648-4651
- 3) Katahira, S. *et al.* (2004) Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5407-5414
- 4) Ingram, L. O. *et al.* (1987) Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2420-2425
- 5) Ingram, L. O. *et al.* (1992) Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1128-1133
- 6) Zang, M. *et al.* (1995) Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, **267**, 240-243
- 7) Inui, M. *et al.* (2004) Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 182-196
- 8) Hack, C. J. *et al.* (1998) Ethanol adaptation in a thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 227-231
- 9) Olsson, L. *et al.* (2006) Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **129-132**,117-129
- 10) Shindo, S. *et al.* (2007) Simultaneous saccharification and bioethanol production from powder of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *J. Biotechnol.* **131** S23-24
- 11) Lynd, L. R. *et al.* (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, 577-583
- 12) Jennert,K.C.B. *et al.* (2000) Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Microbiol.* **146**, 3071-3080
- 13) Krapatch,T.R. *et al.* (1996) Electrotransformation of *Clostridium thermosaccharolyticum*. *J. Ind. Microbiol.* **16**,342-347
- 14) Mai, V. *et al.* (2000) Advances in development of a genetic system for *Thermoanaerobacterium* spp.: Expression of genes encoding hydrolytic

- enzymes, development of a second shuttle vector, and integration of genes into the chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4817-4821
- 15) Lynd, L. R. *et al.* (1996) Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. *Annu. Rev. Energy. Environ.* **21**, 403-465
  - 16) Zhou, S.F. *et al.* (2001) Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CelY (*celY*) and CelZ (*celZ*) in ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 6-14
  - 17) Fujita, Y. *et al.* (2002) Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5136-5141
  - 18) Fujita, Y. *et al.* (2004) Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1207-1212
  - 19) Karczewska, H. *et al.* (1959) Production of ethanol by yeast using xylulose. *Compt. Rend. Lab. Carlsberg*, **31**, 251-258
  - 20) Meyrial, V. *et al.* (1997) Relationship between effect of ethanol on proton flux across plasma membrane and ethanol tolerance, in *Pichia stipitis*. *Anaerobe* **3**, 423-429
  - 21) Ligthem, M. E. *et al.* (1998) The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of xylose and glucose to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 63-68
  - 22) 進藤 昌 (2010) 「次世代バイオエタノール生産の技術革新と事業展開」 153-163 フロンティア出版、東京

#### 4. 特許の概要（6件）

- 1) 発明の名称：抗癌剤として有用なトリテルペン化合物及び該トリテルペン化合物を用いた抗癌用組成物
- 2) 発明の名称：脂質代謝改善剤、機能性食品、食品添加物、抗酸化剤、医薬、動脈硬化予防・改善剤、化粧品、及び脂質代謝改善剤の製造方法
- 3) 発明の名称：ルペオール含有医薬組成物、食品及び飼料
- 4) 発明の名称：アンギオテンシン変換酵素阻害ペプチド、該ペプチドを含有するアンギオテンシン変換酵素阻害剤、組成物及び食品、並びに、該ペプチドの製造方法
- 5) 発明の名称：糖液の製造方法、糖液及びエタノールの製造方法
- 6) 発明の名称：新規酵母およびそれを用いたエタノールの製造方法

1) 発明の名称：抗癌剤として有用なトリテルペン化合物及び該トリテルペン化合物を用いた抗癌用組成物

発明者：畠 恵司、堀一之（秋田県総合食品研究センター）

藤本康雄、飯田隆（日本大学文理学部）

特許番号：特許第 5320530 号

登録日：2013 年 7 月 26 日

【要約】

[課題]新規ルパン型トリテルペンの構造と活性相関については不明な点が多く、薬剤開発において、前述課題を解決することが急務であった。

[解決手段]新規ルパン型トリテルペンを合成し、幾つかの化合物に、白血病ならびに肺がんを始めとする腫瘍に対して有効であることを確認した。

2) 発明の名称：脂質代謝改善剤、機能性食品、食品添加物、抗酸化剤、医薬、動脈硬化予防・改善剤、化粧品、及び脂質代謝改善剤の製造方法

発明者：畠 恵司（秋田県総合食品研究センター）

浜田健太郎、木内高信（(株)Harvestech）

特許番号：特許第 5344494 号

登録日：2013 年 11 月 20 日

【要約】

[課題]効果の高い脂質代謝改善剤を提供する。

[解決手段]ジュンサイ (*Brasenia schreberi*) を加工して脂質代謝改善剤を製造する。この脂質代謝改善剤は、血中中性脂肪値を低下させる。また、特に全 LDL に占める small dense LDL (sdLDL) の割合を低下させる。実際に、この脂質代謝改善剤は、in vitro 実験にて、脂肪酸合成系及びコレステロール合成系の脂質代謝関連遺伝子の発現を低下させる。また、ヒトにおいても、LDL コレステロールの分子量の減少を抑え、sdLDL を少なくすることができる。

3) 発明の名称：ルペオール含有医薬組成物、食品及び飼料

発明者：畠 恵司（秋田県総合食品研究センター）

佐々木裕樹、河原崎哲、菅原美貴子（(株)スカイライト・バイオテック）

駒井三千夫、白川仁、アルディアンシャー（東北大農学研究科）

特許番号：特許第 5428000 号

登録日：2013 年 12 月 13 日

【要約】

[課題]ルペオールの生理機能に関しては、抗炎症作用や抗腫瘍作用など幾つか報告されているが、ヒトを始めとする哺乳類の脂質代謝改善作用に関する報告はない。

[解決手段]ルペオール又はその誘導体が、内臓脂肪増加作用、抗肥満作用、超低比重リポタンパク質中性脂肪増加作用、若しくは血圧降下作用を有することを検証した。



本発明は、上記脂質代謝改善作用を有するルペオール又はその誘導体を含有する食品、及びルペオールを含有する飼料、特に家畜用飼料または愛玩動物用飼料の発明に寄与するものである。

**4) 発明の名称：アンギオテンシン変換酵素阻害ペプチド、該ペプチドを含有するアンギオテンシン変換酵素阻害剤、組成物及び食品、並びに、該ペプチドの製造方法**

発明者：戸松 誠、高橋砂織（秋田県総合食品研究センター）

嶋影逸、山田清繁（株式会社 ヤマダフーズ）

公開番号：特開 2013-159577

公開日：2013年8月19日

**【要約】**

[課題] 少量の摂取でACEを有効に阻害し、かつ副作用の心配が無く、高血圧者が日常生の中で容易に経口摂取出来る新規のACE阻害ペプチド、及びこれらのペプチドを含むアンギオテンシン変換酵素阻害剤、組成物及び食品、並びにその製造法を提供すること。

[解決手段] 下記(1)～(8)のいずれかで表されるアミノ酸配列からなり、アンギオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチド及びその塩。

(1) Phe-Phe-Tyr-Tyr、(2) Trp-His-Pro、(3) Phe-Val-Pro、(4) Leu-His-Pro-Gly-Asp-Ala-Glu-Arg、(5) Ile-Ala-Val、(6) Val-Asn-Pro、(7) Leu-Glu-Pro-Pro、(8) Trp-Asn-Pro-Arg。

**5) 発明の名称：糖液の製造方法、糖液及びエタノールの製造方法**

発明者：進藤 昌<sup>1</sup>、西田 孝伸<sup>1</sup>、丹羽 雅裕<sup>2</sup>、岸本 淳平<sup>3</sup>、南野 淳<sup>3</sup>、

栗原 宏征<sup>3</sup>、山田 勝成<sup>3</sup>（<sup>1</sup>秋田県総合食品研究センター、<sup>2</sup>JX日鉱日石エネルギー株式会社、<sup>3</sup>東レ株式会社）

公開番号：特開 2013-162777

公開日：2013年8月22日

**【要約】**

[課題] アンモニアを含む処理剤で処理したセルロース系バイオマスから製造した糖液の発酵効率を向上させることができる糖液の製造方法、糖液及びエタノールの製造方法を提供する。

[解決手段] 本発明の糖液の製造方法は、セルロース系バイオマスにアンモニアを含む処理剤で処理し、アンモニア処理物を得る前処理工程と、アンモニア処理物を酵素糖化し、アンモニア処理糖液を得るアンモニア処理糖液の作製工程と、アンモニア処理糖液に含まれるクマルアミドおよび/またはフェルラアミドを精製除去し、クマルアミドおよび/またはフェルラアミドの濃度が10～1100ppmの精製糖液を得る精製糖液の作製工程を含むことを特徴とする。

6) 発明の名称：新規酵母およびそれを用いたエタノールの製造方法

発明者：進藤 昌（秋田県総合食品研究センター）

公開番号：2013-188156

公開日：2013年9月26日

【要約】

[課題] 本発明では、高温でのグルコースからのエタノール発酵性に優れ、且つ、優れた凝集性を有する新規酵母を提供することを目的とする。また、バイオマス原料からのエタノール製造に適した二段階発酵法において、一次発酵（6炭糖類からのエタノール発酵）に適した酵母を提供することを目的とする。

[解決手段] 高温及び低pHでのグルコースからのエタノール発酵性に優れ、且つ、優れた凝集性を有する、*Schizosaccharomyces japonicus* に属する新規酵母、；特には *Schizosaccharomyces japonicus* SS4-5 株（受託番号 NITE P-1197）である酵母、また、高温低 pH 発酵性を有し且つ凝集性を有する前記 SS4-5 株の変異体である酵母、また、前記酵母を用いることを特徴とする、エタノールの製造方法を提供する。

## 5. 学会発表要旨 (20 件)

### 1) 発表学会：第 22 回 秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2013 年 5 月 31 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：麴菌(*Aspergillus oryzae*)分生子におけるストレス処理による  
トランスポゾン遺伝子転写産物の動的変動

発表者：○小笠原博信（秋田県総食研セ）、高橋砂織（秋田県総食研セ）、  
五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

### 2) 発表学会：第 22 回秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2013 年 5 月 31 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：中国およびタイにおける機能性食品研究

発表者：○葦澤悟（国際農研セ）、中原和彦（国際農研セ）、後藤猛（秋田大）、  
高橋砂織（秋田県総食研セ）

### 3) 発表学会：日本調理科学会

発表日と場所：2013 年 8 月 24 日、奈良女子大学（奈良市）

演題名：異なるゲル化剤を用いた豆腐カステラソフト食の物性と食味の比較

発表者：○大野 智子<sup>1</sup>、鎌田 好美<sup>2</sup>、佐々木 玲<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>聖霊女子短大、<sup>2</sup>由利組合総合病院、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

### 4) 発表学会：日本食品科学工学会第 60 回大会

発表日と場所：2013 年 8 月 30 日、実践女子大学（東京都）

演題名：加熱処理によって  $\gamma$ -アミノ酪酸を増加させた米の品質

発表者：○大能俊久、塚本研一

### 5) 学会発表：日本土壌肥料科学 2013 年度大会

発表日と場所：2013 年 9 月 11 日、名古屋大学（名古屋市）

演題名：カドミウム含長香穀バイオマスの有効利用（第 3 報）カドミウム除去バイオ  
マスからのバイオエタノール生産

発表者：○頼 春樹<sup>1</sup>、横山 咲<sup>1</sup>、伊藤正志<sup>2</sup>、進藤 昌<sup>3</sup>、服部浩之<sup>1</sup>

（<sup>1</sup>秋田県立大学、<sup>2</sup>秋田県農試、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

### 6) 発表学会：第 83 回日本生化学会大会

発表日と場所：2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜（横浜市）

演題名：Characterization and structure-activity relationship of novel D-aspartyl  
endopeptidase, paenidase, from prokaryote

発表者：Satoru Nirasawa<sup>1</sup> and Saori Takahashi<sup>2</sup> （<sup>1</sup> Japan International Research Center

for Agricultural Sciences, <sup>2</sup> Akita Research Institute of Food and Brewing)

7) 発表学会：第 40 回食品の物性に関するシンポジウム

発表日と場所：2013 年 9 月 21 日、ルポール讃岐（高松市）

演題名：変異体米澱粉の構造がその物理化学特性に与える影響

発表者：○高橋徹<sup>1</sup>、藤田直子<sup>2</sup> (<sup>1</sup>秋田県総食研セ、<sup>2</sup>秋田県立大)

8) 発表学会：平成 25 年度 化学系協会東北大会

発表日と場所：2013 年 9 月 28 日（仙台市）

演題名：Efficient production of human angiotensin-converting enzyme 2 by Sf9 insect cells

発表者：○Mai Miyawaki<sup>1</sup>、Kenta Tsuchida<sup>2</sup>、Saki Yokota<sup>1</sup>、Saori Takahashi<sup>3</sup>、  
Satoru Nirasawa<sup>4</sup>、Takeshi Gotoh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Engineering Resource Science, Akita University

<sup>2</sup> Faculty of Engineering and Resource Science, Akita University

<sup>3</sup> Akita Research Institute of Food and Brewing

<sup>4</sup> Japan International Research Center for Agricultural Sciences

9) 発表学会：第 10 回アジア・太平洋キッチン&キトサンシンポジウム、  
第 27 回キッチン・キトサンシンポジウム（併催）

発表日と場所：2013 年 10 月 4 日、米子コンベンションセンター（米子市）

演題名：Characterization of the cellobiose 2-epimerase from the D-aspartic acid specific  
endopeptidase-producing bacteria, *Paenibacillus* sp. B38

発表者：○Satoru Nirasawa<sup>1\*</sup> and Saori Takahashi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ibaraki, Japan.

<sup>2</sup> Akita Research Institute of Food and Brewing, Akita, Japan.

\*E-mail: stnirasa@affrc.go.jp

10) 発表学会：平成 25 年度日本醸造学会大会

発表日と場所：2013 年 10 月 16 日、北とぴあ（東京都）

演題名：多収穫水稻系統「秋田 107 号」の酒造特性について

発表者：○大野 剛（秋田県総食研セ）、進藤真人（秋田銘醸（株））、  
佐藤智美、渡邊誠衛、田口隆信、高橋 仁（秋田県総食研セ）

11) 発表学会：2013 年度日本生物高分子学会

発表日と場所：2013 年 10 月 19 日、大阪工業大学（大阪市）

演題名：レニン・アンギオテンシン系酵素群用蛍光消光基質の開発とその応用

発表者：○高橋砂織（秋田県総食研セ）、後藤猛（秋田大学・院）、中原和彦、葺澤悟  
(JIRCAS)



**12) 学会発表：International Conference on Fermentation Technology, Bioprocess and Cell Culture**

発表日と場所：2013年10月28日、(カンザスシティー)

演題名：Production of bioethanol with novel two-step fermentation system using high temperature tolerance *Schizosaccharomyces japonicus* and *Pichia stipitis* from saccharifeid *Pennisetum purpureum*.

発表者：○Sho Shindo, Takanori Nishida (Akita Research Institute of Food and Brewing)

**13) 発表学会：第22回秋田応用生命科学研究会学術講演会**

発表日と場所：2013年11月29日、秋田県総合食品研究センター(秋田市)

演題名：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 (パエニダーゼ) ホモロジーのクローニング及び大腸菌における発現

発表者：○葦澤悟(国際農研セ)、高橋砂織(秋田県総食研セ)

**14) 学会発表：日本エネルギー学会 第9回バイオマス科学会議**

発表日と場所：2014年1月15日、高知県立県民文化ホール(高知市)

演題名：高効率アルコール発酵のためのキシロース資化性酵母 *Pichia stipitis* の改良

発表者：○西田孝伸<sup>1</sup>、進藤昌<sup>1</sup>、佐々木美希子<sup>1</sup>、柏谷香織<sup>1</sup>、三橋秀一<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>秋田県総食研セ、<sup>2</sup>バイオエタノール革新技术組合)

**15) 発表学会：第13回産総研・産技連ライフサイエンス・バイオテクノロジー合同研究発表会**

発表日と場所：2014年2月18日、産業技術総合研究所(つくば市)

演題名：レニン・アンギオテンシン系酵素類の制御を目指した機能性味噌に関する研究

発表者：○高橋砂織、佐々木康子、小笠原博信、渡辺隆幸

**16) 発表学会：平成25年度 秋田化学技術協会講演会**

発表日と場所：2014年3月4日、秋田大学(秋田市)

演題名：昆虫細胞-バキュロウイルス発現系によるアンギオテンシン変換酵素2の生産

発表者：○宮脇 舞(秋田大院・工学資源)、横田早希(秋田大院・工学資源)、葦澤悟(国際農研セ)、高橋砂織(秋田県総食研セ)、後藤猛(秋田大院・工学資源)

**17) 発表学会：2014年日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2014年3月28日、明治大学生田キャンパス(川崎市)

演題名： $\beta$ -キチンナノファイバーを用いた簡便なキチナーゼ活性測定法の開発

発表者：○西平知世<sup>1</sup>、宮野有紗実<sup>2</sup>、大沼貴之<sup>1</sup>、成廣和枝<sup>3</sup>、山下和彦<sup>3</sup>、後藤猛<sup>4</sup>、

高橋砂織<sup>5</sup>（<sup>1</sup>近畿大院・農・バイオ、<sup>2</sup>近畿大・農・バイオ、<sup>3</sup>ヤエガキ醗酵  
技研（株）、<sup>4</sup>秋田大院・工学資源、<sup>5</sup>秋田県総食研セ）

**18) 発表学会：2014年日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2014年3月29日、明治大学生田キャンパス（川崎市）

演題名：味噌中のレニン・アンギオテンシン関連酵素類の阻害活性について

発表者：○高橋砂織、佐々木康子、佐藤 愛、小笠原博信、渡辺隆幸

**19) 発表学会：2014年度日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2014年3月29日、明治大学生田キャンパス（川崎市）

演題名：食用地衣のレニン及びキマーゼ阻害活性

発表者：○葦澤 悟、程 永強<sup>1</sup>、山本 好和<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>3</sup>（国際農研、<sup>1</sup>中国農大・食  
品科学、<sup>2</sup>秋田県大・生物資源、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

**20) 発表学会：2014年日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2014年3月30日、明治大学生田キャンパス（川崎市）

演題名：ジュンサイ成分による HIV-1 逆転写酵素活性の阻害

発表者：○久好哲郎<sup>1</sup>、篠村まゆ<sup>1</sup>、小西篤<sup>1</sup>、田中潤司<sup>2</sup>、下田博司<sup>2</sup>、畠恵司<sup>3</sup>、  
高橋砂織<sup>3</sup>、保川清<sup>1</sup>

（<sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>オリザ油化（株）、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

## 1) 発表学会：第 22 回 秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2013 年 5 月 31 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：麴菌(*Aspergillus oryzae*)分生子におけるストレス処理による

トランスポゾン遺伝子転写産物の動的変動

発表者：○小笠原博信（秋田県総食研セ）、高橋砂織（秋田県総食研セ）、

五味勝也（東北大院農・生物産業創成）

【目的】高濃度の  $\text{Cu}^{2+}$  や高温などのストレスを受けると麴菌の活性型 DNA トランスポゾン *Crawler* は mRNA の cryptic splicing や ORF 内 poly(A) 付加が減少し、全長 mRNA 比率が増加することで転移活性（機能化）を示す。ストレス処理下の分子中の mRNA シーケンシングにより作成したストレス応答 cDNA ブラウザーによる探索から機能化が推定される新たなトランスポゾン配列も見出されてきている。本研究ではそれら新規および既にアノテーションされているトランスポゾン遺伝子を対象にストレス条件下での mRNA 分子種変動について解析を行った。

【方法】 $\text{Cu}^{2+}$  処理および高温処理を行った分生子より全 RNA を抽出し、RT-PCR や 3'-RACE および転写産物の cDNA 配列決定により、splicing の変化と poly(A) 付加位置の変動について解析を行った。

【結果】未アノテーション領域より見出されていた幾つかの transposase やレトロトランスポゾンの gag 様配列、および既知の *implala* 様配列（AO090023000251）ではストレスにより splicing 阻害が認められた。一方、新規 DNA トランスポゾン *AoTan1* では cryptic splicing は検出されなかったが、ORF 内の poly(A) 付加が減少する一方で 3'-UTR 領域への正常な poly(A) 付加が認められるようになった。 $\text{Cu}^{2+}$  ストレスによる RNA 分子種の変動はストレス解除後も回復が十分でなかったのに対し、高温ストレスにおいてはストレス解除後、速やかに機能発現を抑制する方向に回復することが認められた。以上のことから、麴菌内のトランスポゾン様遺伝子は *Crawler* と同様に RNA レベルでの制御により、通常培養条件下では不活性化および転移抑制がなされていることが示唆された。

【謝辞】本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（基盤研究（C）22580096）の助成を受けて行われた。

## 2) 発表学会：第 22 回秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2013 年 5 月 31 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：中国およびタイにおける機能性食品研究

発表者：○葺澤悟（国際農研セ）、中原和彦（国際農研セ）、後藤猛（秋田大）、

高橋砂織（秋田県総食研セ）

東・東南アジア地域では、在来農林水産物や伝統醗酵食品など多様な地域食料資源があり、機能性食品やその他新たな加工食品の原材料として利用出来るものが数多くある。一方、各地域独特の特殊な原料・製造方法・醗酵微生物などにより生産された食品については、「これまでに知られていない有用な生理機能性成分などが見つかる

可能性が高く、それらの物質を機能性食品などの原料として利用することが出来れば、地域食料資源に対して大きな付加価値を付けることが可能となる。また、同地域では、経済発展に伴う農村から都市への大規模な人工移動と都市部を中心とした中間所得層の増加の結果、農産物の多様化・高品質化が求められるようになってきている。従来、農村部を中心に生産・食品されてきた在来農産物や伝統食品も、新たな中間所得層や農村地域から都市に移住した人々の間で需要が高まっている。今回我々は、中国及びタイにおける食品機能性の関する最近の研究について報告する。

中国食材では、まず大豆醗酵食品における  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性について検討を行った。その結果、豆鼓及びおから醗酵食品に活性物質が含まれること、おから醗酵食品に含まれる活性物質は 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) であることが明らかとなった。また、おから醗酵食品から DNJ 生産菌である *Bacillus subtilis* B2 を単離したが、本菌はゲノム解析の結果、*Bacillus amyloliquenfaciens* と相同性のあることが明らかとなった。さらに、*B. amyloliquenfaciens* の DNJ 生産能を検討したところ、複数の株において DNJ を生産した。次に、レニン及び ACE 阻害活性を有する食品について検討を行った。レニン及び ACE 活性測定は高橋らの方法 (Takahashi S., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610 (2007), Takahashi S., *et al.*, *ibid* **72**, 3232 (2008), Takahashi S., *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407 (2011)) で行った。その結果、種々の豆鼓、豆醬に活性物質の存在することが明らかとなった。また、エンドウ豆粉、甜酒薬 (薬草を加えた餅麴) にレニン阻害活性の存在することが明らかとなった。

タイ食材では、まず種々のタイ野菜における抗変異原活性、抗酸化性について検討を行った。その結果、インドセンダン及びコブミカン抽出液に複素環アミンに対する抗変異原性 (エームス試験) を示す活性物質の存在すること、インドセンダンの活性物質はフラバノン誘導体、コブミカンの活性物質はフラノクマリン誘導体であることが明らかとなった。また、バジル類の抗酸化活性および総ポリフェノール含量が調理により変化することが明らかになった。次に魚醗酵食品中におけるレニン阻害活性について検討を行った。その結果、プラ-ラーに活性物質の存在すること、活性物質がドコサヘキサエン酸、リノール酸であることが明らかとなった。

### 3) 発表学会：日本調理科学会

発表日と場所：2013 年 8 月 24 日、奈良女子大学 (奈良市)

演題名：異なるゲル化剤を用いた豆腐カステラソフト食の物性と食味の比較

発表者：○大野 智子<sup>1</sup>、鎌田 好美<sup>2</sup>、佐々木 玲<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>聖霊女子短大、<sup>2</sup>由利組合総合病院、<sup>3</sup>秋田県総食研セ)

【目的】これまでに、ゼラチン、寒天、米粉をゲル化剤に用いて、秋田県の郷土料理のひとつである「豆腐カステラ」の高齢者用ソフト食の開発を試みてきた。本研究では、高齢者施設等で利用されている 3 種のゲル化剤を使用し、物性および食味を比較検討することを目的とした。



【方法】材料は、絹ごし豆腐、上白糖、鶏卵とし、ゲル化剤には介護食用寒天、ゼラチン寒天、ソフティア2を用いて3試料を調製した。物性の測定は、消費者庁が定める特別用途食品「えん下困難者用食品許可基準」の試験方法に準拠した。試料を直径40mm、高さ20mmの容器に15mm充填し、直線運動により物質の圧縮応力を測定することが可能な万能試験機(5544社製: INSTRON)を用いて、直径20mm、高さ40mmの樹脂製のプランジャーにより、圧縮応力10mm/sec、クリアランス5mmで2回圧縮測定した。得られた記録曲線から硬さ、付着性、凝集性を算出した。さらに、20代女子学生をパネルとし、評点法を用いて食味に関する官能評価を行った。評価項目は、外観、色、硬さ、べたつき、飲み込みやすさ、口中でのぼらつき、口中での残留感、おいしさ、総合的評価の9項目とした。

【結果】物性測定の結果、硬さ、付着性、凝集性のいずれも介護食用寒天とソフティア2を使用した試料がえん下困難者用食品許可基準Ⅱに該当した。ゼラチン寒天を使用した試料は他の試料に比べて有意に硬く、基準に該当しない結果となった。官能評価では、外観、硬さ、べたつき、飲み込みやすさ、口中での残留感、おいしさの6項目に関して有意差が認められ、ソフティア2、介護食用寒天、ゼラチン寒天の順によりと評価された。

#### 4) 発表学会：日本食品科学工学会第60回大会

発表日と場所：2013年8月30日、実践女子大学（東京都）

演題名：加熱処理によって $\gamma$ -アミノ酪酸を増加させた米の品質

発表者：○大能俊久、塚本研一

【目的】発芽玄米は玄米を水に浸漬するため、腐敗や臭いの発生などが問題とされる。これらの問題を解決するため、水に浸漬せず加熱処理することで $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)を増加させる方法を考案し<sup>1)</sup>、玄米の水分量が17.5%以下でのGABAの増加量について報告を行った<sup>2)</sup>。今回は、水分量19.2%以下の玄米について加熱時のGABA量の変化を調べ、併せて加熱処理玄米を精米したものについてその特徴を検討した。

【方法】秋田県産あきたこまち玄米から、水分の異なる3つの玄米を調製した(15.7%、17.5%、19.2%)。それぞれについて、非加熱、70°C15時間加熱、80°C8時間加熱の3つの処理を行った。加熱処理は、玄米をアルミパウチ中に密封した後パウチごと恒温乾燥機に入れて行った。GABAを含む遊離アミノ酸は、日本電子製全自動アミノ酸分析機JLC-500/Vで測定した。精米の実験は以下の方法で行った。秋田県産あきたこまち玄米を70°Cで15時間加熱処理した後、山本製作所製ライスパルVP-31Tで精米した。精米中の砕粒の割合を測定し、精米の色彩測定(ミノルタ製色彩色差計CR-200、L\*a\*b\*表色系)を行った。この精米を炊飯した米飯のテクスチャーをテンシプレッサー(タケトモ電機製TTP-50BXII)で測定した。対照は未処理玄米から調製した精米とした。

【結果】水分を19.2%まで増加させて加熱したもののGABA量は、水分17.5%のも

のと大きな差はなかった。また、加熱処理した玄米から調製した精米は、砕粒が増加しており、色彩測定で  $b^*$  値が増加していた。米飯テクスチャーは対照に比べて、硬さが増加し、粘りが減少していた。

<sup>1)</sup>第 58 回日本食品科学工学会大会講演要旨集, p.62

<sup>2)</sup>第 59 回日本食品科学工学会大会講演要旨集, p.86

## 5) 学会発表：日本土壌肥料科学 2013 年度大会

発表日と場所：2013 年 9 月 11 日、名古屋大学（名古屋市）

演題名：カドミウム含長香穀バイオマスの有効利用（第 3 報）カドミウム除去バイオマスからのバイオエタノール生産

発表者：○頼 春樹<sup>1</sup>、横山 咲<sup>1</sup>、伊藤正志<sup>2</sup>、進藤 昌<sup>3</sup>、服部浩之<sup>1</sup>

（<sup>1</sup>秋田県立大学、<sup>2</sup>秋田県農試、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

カドミウム (Cd) 含有のセルロース系バイオマスとして Cd 高吸収性水稻の長香穀を原料にしてバイオエタノールを製造した場合の Cd をはじめとした重金属イオンの動態について検討した。バイオエタノール製造法として希硫酸一酵素糖化法を用い、糖化液は酵母によるエタノール醗酵、その後蒸留によりエタノールを精製した。Cd 除去法としてバイオエタノール製造過程の希硫酸糖化後に吸引ろ過および洗浄により糖化液を分離し、この糖化液に対し pH 調整と各種キレート樹脂もしくはキレート剤の添加により Cd を沈殿させ、Cd フリーの糖化液を作成する方法を開発した。処理後の糖化液中の Cd 濃度は 10ppb 以下となり、極めて高い回収率（10ppm 以上の Cd 含有バイオマスで 99.5% 以上）を達成できた。4 段階（38.9、26.5、18.1、10.1ppm）の Cd 濃度の長香穀を原料に Cd 除去法を組み込んだ場合と組み込まなかったバイオエタノール製造法でバイオエタノールを製造した場合、中間過程の糖化液、最終的に廃棄物として生じる糖化残液、エタノール蒸留後の蒸留残液、回収した酵母のそれぞれについて Cd をはじめとする重金属濃度を測定し、その動態を明らかにした。その結果 Cd 除去をしなかった場合には稲わらに含まれる Cd はそのほとんどが酵素糖化残液に沈殿として混入していた。酸と酵素による糖化处理によりセルロースがほぼ糖化された結果、約 35% 程度に減量化されており、Cd の濃度も 91.7、83.8、56.5、34.6ppm と濃縮されていた。また酵母や蒸留残液にも Cd は分配されてしまっており、原料とする植物バイオマスの Cd 濃度によってはバイオエタノールの製造過程で生じる廃棄物の Cd 濃度が高くなるため Cd 除去工程を組み込む必要が生じることが示された。

## 6) 発表学会：第 83 回日本生化学会大会

発表日と場所：2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜（横浜市）

演題名：Characterization and structure-activity relationship of novel D-aspartyl endopeptidase, paenidase, from prokaryote

発表者：Satoru Nirasawa<sup>1</sup> and Saori Takahashi<sup>2</sup> (<sup>1</sup> Japan International Research Center

for Agricultural Sciences, <sup>2</sup> Akita Research Institute of Food and Brewing)

Paenidase is the first microorganism-derived D-aspartyl endopeptidase that specifically recognizes an internal D-Asp residue to cleave [D-Asp]-X peptide bonds (S. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **139**,197-202, 2006). In this study, we have characterized recombinant paenidase and investigated its structure-activity relationship. Nucleotide sequencing of paenidase gene revealed that its precursor was consisted of 322 amino acid residues of the mature region and 197 amino acid residues of the N-terminal extension peptide. Amino acid sequence similarity was confirmed between the mature region of paenidase and several penicillin binding proteins (PBP), with matches of 35-50% seen on a BLAST database search. In addition, paenidase was classified into peptidase family S12 based on a MEROPS database search. Family S12 contains serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidases that have three active site residues (Ser, Lys and Tyr) in the motifs Ser-Xaa-Thr-Lys and Tyr-Xaa-Asn. These motifs were conserved in the primary structure of paenidase. *E. coli* transformed by plasmid coding the mature paenidase produced the protein as soluble form and the suc-[D-Asp]-MCA-hydrolysis activity was detected. In addition, obtained enzymes also hydrolyzed suc-[D-Asp]-pNA but not suc-[D-Ala]-pNA, suc-[D-Leu]-pNA and suc-[D-Glu]-pNA. Next, several mutants for the putative active site residues of paenidase were constructed and expressed in *E. coli* cells, whereas they showed no peptidase activity. CD and fluorescence spectra of the mutants were identical with those of the wild type. These results indicate that these residues of the paenidase are essential for the enzyme activity.

#### 7) 発表学会：第40回食品の物性に関するシンポジウム

発表日と場所：2013年9月21日、ルポール讃岐（高松市）

演題名：変異体米澱粉の構造がその物理化学特性に与える影響

発表者：○高橋徹<sup>1</sup>、藤田直子<sup>2</sup>（<sup>1</sup>秋田県総食研セ、<sup>2</sup>秋田県立大）

【目的】我々は、遺伝的背景が明確で、特定の澱粉生合成関連酵素が欠失した突然変異体米およびこれらを交配した二重変異体が生産する澱粉に着目し、特定の酵素の欠損が物理化学特性や鎖長構造に与える影響について詳細な検討を続けている。本発表では、澱粉直鎖伸長酵素（SS）変異体の一つである *ss3a* 変異体（ $\Delta SSIIIa$ ）と、澱粉枝作り酵素（BE）変異体の一つである *be2b* 変異体（ $\Delta BEIIb$ ）とを交配して創出した二重変異体（ $\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$ ）米澱粉の際立った特徴（特願 2010-160660）について紹介する。X線回折測定から、 $\Delta SSIIIa$  の結晶形は A 型、 $\Delta BEIIb$  および  $\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$  はそれぞれ B 型を示し、これらの相対澱粉結晶化度（RSC）は対照（日本晴）よりも低下したが、アミロース量の増加に伴うアミロペクチン量の相対的な減少に起因するためと考えられる。また、示差走査熱量測定（DSC）の結果から、 $\Delta BEIIb$  および  $\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$  の糊化温度は  $\Delta SSIIIa$  および日本晴よりも有意に上昇した。アミロペクチン量で基準化した糊化エンタルピー（ $\Delta H$ ）は日本晴と  $\Delta SSIIIa$  間、 $\Delta BEIIb$  と



$\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$  間ではほぼ同値となり、後者が前者よりも大きいことから、アミロペクチンの二重らせん形成に寄与する鎖のうち、DP15~24 の鎖の顕著な増加が  $\Delta H$  の増加にも影響を与えることが分かった。澱粉懸濁液の動的粘弾性測定から、貯蔵弾性率 ( $G'$ ) の立ち上がり温度およびピーク値は、DSC の結果を支持した。また、冷却時の  $G'$  は  $\Delta SSIIIa/\Delta BEIIb$  が顕著に大きく、 $\Delta SSIIIa$  および  $\Delta BEIIb$  の結果を加味すると、老化の初期段階において、アミロースの存在はもとより、長鎖のアミロペクチンの効果が色濃く、アイソザイム BEIIb は澱粉の糊化・老化に大きな影響を与える因子であると推察された。一方、アイソザイム SSIIIa の欠損は、アミロペクチン長鎖を減少させるため、粒内のクラスター構造も小さくなり、アミロペクチン鎖の広がり (粒の膨潤) を小さくすると考えている。澱粉糊液やゲルの物性が、アミロペクチン構造に多大な影響を受けることを明らかにしつつあり、変異体米の選抜・育種や産業利用時の指標となることが期待される。

#### 8) 発表学会：平成 25 年度 化学系協会東北大会

発表日と場所：2013 年 9 月 28 日 (仙台市)

演題名：Efficient production of human angiotensin-converting enzyme 2 by Sf9 insect cells

発表者：Mai Miyawaki<sup>1</sup>, Kenta Tsuchida<sup>2</sup>, Saki Yokota<sup>1</sup>, Saori Takahashi<sup>3</sup>, Satoru Nirasawa<sup>4</sup>, Takeshi Gotoh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Engineering Resource Science, Akita University

<sup>2</sup> Faculty of Engineering and Resource Science, Akita University

<sup>3</sup> Akita Research Institute of Food and Brewing

<sup>4</sup> Japan International Research Center for Agricultural Sciences

The renin angiotensin system plays the most important role to regulate blood pressure in mammalian animals. In this system, angiotensin II, which is generated from angiotensin I by angiotensin-converting enzyme (ACE), causes a rise in blood pressure. In late years, it has been reported that an ACE homolog (ACE2) exists in a heart blood vessel endothelium, and ACE2 inhibitors could be expected as a therapeutic drug of the cardiac function disorder. In the present study, for functional analysis of ACE2 and screening for ACE2 inhibitors, we aimed for mass production of human ACE2 by the insect cell expression system. The Bac-to-Bac expression system was used to generate a recombinant baculovirus (vACE2), which carried a cDNA of human ACE2 with His-tag sequence at N-terminus in the polyhydriin locus. *Spodoptera frugiperda* (Sf9) seeded in Sf900-II serum-free medium at  $1 \times 10^6$  cells/ml were infected with vACE2 at a MOI of 0.1 pfu/cell and cultured at on an orbital shaker 28°C for 5d. Culture samples were withdrawn at regular intervals and subjected to western blotting analysis using a His-tag antibody and to ACE2 assay using self-quenching fluorescent substrate. As a result, we found that human ACE2 was expressed and accumulated in the vACE2-infected Sf9 cells.



9) 発表学会：第 10 回アジア・太平洋キチン&キトサンシンポジウム、  
第 27 回キチン・キトサンシンポジウム（併催）

発表日と場所：2013 年 10 月 4 日、米子コンベンションセンター（米子市）

演題名：Characterization of the cellobiose 2-epimerase from the D-aspartic acid specific  
endopeptidase-producing bacteria, *Paenibacillus* sp. B38

発表者：Satoru Nirasawa<sup>1\*</sup> and Saori Takahashi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ibaraki, Japan.

<sup>2</sup> Akita Research Institute of Food and Brewing, Akita, Japan.

\*E-mail: stnirasa@affrc.go.jp

### Abstract

In this study, the cellobiose 2-epimerase from the D-aspartic acid specific endopeptidase-producing bacterium, *Paenibacillus* sp. B38 (Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **139**, 197-202, 2006), was *in silico* screened, cloned and expressed in *Escherichia coli*. We screened an open reading frame (ORF) similar to the amino acid sequence of human renin binding protein (N-acetylglucosamine 2-epimerase, Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **125**, 348-353, 1999, Inoue, H. *et al.*, *J. Biochem.* **110**, 493-500, 1991) from the genome sequence database of *Paenibacillus* sp. B38 by a BLAST search. As a result, the ORF with match of about 20% was obtained. Deduced amino acid sequence similarity was found between the ORF and several bacterial genome sequences. The ORF was cloned into plasmid, pET-28a, and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The expressed protein was purified and characterized. The obtained protein epimerized lactose and cellobiose but not N-acetylglucosamine. These results were suggested that this enzyme (cbeP) was a cellobiose 2-epimerase but not an N-acetylglucosamine 2-epimerase. Amino acid sequence similarity was confirmed between cbeP and other bacterial cellobiose 2-epimerases from *Rhodothermus marinus*, *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 and *Ruminococcus albus* with matches of 49, 44 and 37%, respectively. The molecular mass of the purified recombinant cbeP (46,000) measured by SDS-PAGE analysis was very similar to that calculated from amino acid residues of cbeP (46,706). The analysis of gel filtration chromatography showed that the active cbeP formed the dimer in the presence of 2-mercaptethanol while the inactive cbeP formed the monomer in the absence of 2-mercaptethanol. Moreover, since cbeP was inhibited with thiol modifiers such as N-ethylmaleimide and iodoacetamide, it was considered that the free thiol group in cbeP was essential for the epimerase activity. This result is the same as that of N-acetylglucosamine 2-epimerase from mammals. The Cys-380, the conservative amino acid residue in the mammalian epimerases, is essential for the epimerase activity, since the mutant of Cys-380 to Ser is the inactive (Takahashi, S. *et al.*, *J. Biochem.* **126**, 639-642, 1999). The Cys-380 of cbeP is also conserved, which is very interesting when considering the structure-function relationship of cbeP.

## 10) 発表学会：平成 25 年度日本醸造学会大会

発表日と場所：2013 年 10 月 16 日、北とぴあ（東京都）

演題名：多収穫水稻系統「秋田 107 号」の酒造特性について

発表者：○大野 剛（秋田県総食研セ）、進藤真人（秋田銘醸（株））、  
佐藤智美、渡邊誠衛、田口隆信、高橋 仁（秋田県総食研セ）

【目的】コストパフォーマンスに優れた純米酒を目的に多収穫水稻系統「秋田 107 号」の酒造適性を評価した。

【方法】秋田県農業試験場にて育成した多収穫米 13 系統を比較試料として玄米及び精米歩合 70%白米の千粒重、心白型比率、粗タンパク質、乳酸可溶性タンパク質を分析した。純米酒製造試験は精米歩合 70%で実施、総米 5kg では「あきたこまち」・「美山錦」を対照に、総米 95kg では「あきたこまち」を対照に各酒造工程の操作性と製成酒の官能評価により酒造適性を評価した。

【結果】平成 23・24 年産「秋田 107 号」は収量が 70 kg/a 前後であり「あきたこまち」の約 2 割増であった。原料米の分析結果では、千粒重が 24g 台の中粒、心白は無白粒が 9 割以上を占め一般粳米の外観を有していた。また、粗タンパク質は低い傾向であったが、特に乳酸可溶性タンパク質は「美山錦」よりも低く、他の多収穫系統の中では最も低い値であった。

総米 5kg の仕込みでは、もろみの発酵は進む傾向であったが酸度、アミノ酸度は「あきたこまち」「美山錦」よりも低く推移し製成酒においても低い値となった。製成酒の官能評価では、なめらか、後味の切れが良く、苦味・雑味が少ない特性が指摘された。

総米 95kg の仕込みでは、精米は、「あきたこまち」よりも整粒歩合が高く、無効精米歩合が低かった。原料処理、製麹では割れが少なく操作性は良好であった。麹のグルコアミラーゼ活性は「あきたこまち」と同程度、 $\alpha$ -アミラーゼ活性は低めであったため G/a 比が高くなる傾向があった。もろみ、製成酒ではアミノ酸度が低く、製成酒の官能評価では味の良さ、後味のキレイさが特徴であり「あきたこまち」よりも高い評価となった。以上の結果から、「秋田 107 号」が「あきたこまち」に対して優位な酒造特性を備えており、コストパフォーマンスに優れた純米酒製造が可能と考えられた。

## 11) 発表学会：2013 年度日本生物高分子学会

発表日と場所：2013 年 10 月 19 日、大阪工業大学（大阪市）

演題名：レニン・アンジオテンシン系酵素群用蛍光消光基質の開発とその応用

発表者：○高橋砂織（秋田県総食研セ）、後藤猛（秋田大学・院）、中原和彦、菑澤悟（JIRCAS）

【目的】血圧はホルモンや神経系などでコントロールされている。その中で最も研究が進んでいる血圧調節系の一つがレニン・アンジオテンシン系 (RAS) である。RAS ではレニンで生成されたアンジオテンシン I が、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) により活性型ホルモンであるアンジオテンシン II に変換され血圧の上昇を引き起こす。

ACE 以外にも肥満細胞に存在するキマーゼも AI から AII を生成する活性を有している。そこでこれら 3 種類の酵素を標的として国内外の各種食材より RSA 系酵素阻害物質を網羅的に探索した。

【方法】組換え型ヒトレニン既報により調整した [1]。レニン活性及び組換え型ヒト ACE の活性は、新規蛍光消光基質類を用いて測定した [1-3]。キマーゼ活性は、ヒトレニン活性測定用の蛍光消光基質を用いて測定した。阻害活性測定用の食材としては、国産及び中国やタイ産の発酵食品や地域農産物等を用いた。

【結果】各種食材を用いて検討した結果、味噌にレニン阻害活性の存在することを初めて見出した。味噌のレニン阻害活性は、大豆由来でその構造をソヤサポニン I と同定した。また、米や雑穀類にもレニン阻害活性を見出し、活性物質の構造をオレイン酸およびリノール酸と同定した。さらに、山菜類を探索した結果、ウドに強いレニン阻害活性を見だし、活性物質としてカウレン酸及びジアミノピメリン酸を同定した。中国やタイ産の食材からもレニン阻害活性が見出されており、種々の豆鼓や豆醬に活性物質の存在することが示された。一方、タイ特産の魚発酵調味料であるプラーラーにもレニン阻害活性が見出され、阻害活性物質としてドコサヘキサエン酸 (DHA) とリノール酸を同定した。

【参考論文】 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007). 2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236 (2008). 3. *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011).

## 12) 学会発表 : International Conference on Fermentation Technology, Bioprocess and Cell Culture

発表日と場所 : 2013 年 10 月 28 日、(カンザスシティ)

演題名 : Production of bioethanol with novel two-step fermentation system using high temperature tolerance *Schizosaccharomyces japonicus* and *Pichia stipitis* from saccharified *Pennisetum purpureum*.

発表者 : Sho Shindo, Takanori Nishida (Akita Research Institute of Food and Brewing)

Lignocellulosic biomass sources have the potential to act feedstock for the sustainable production of organic liquid fuels. Although the discovery of xylose-fermenting yeasts has enhanced interest in the microbial conversion of renewable lignocellulosic resources to bioethanol, various problems occurred in the development of an efficient fermentation: the main problem is that these yeast strains exhibit low ethanol-tolerance and low ethanol productivities from xylose, compared to those obtained from D-glucose with other microorganism. We reported the novel two-step fermentation system using *Schizosaccharomyces japonicus* and *Pichia stipitis* from a mixture of glucose and xylose. First step, mixture of glucose and xylose was fermented by *S. japonicus* at 42°C. In this step, bioethanol production from glucose and volatilization of bioethanol were occurred simultaneously. Second step, the treated broth was fermented by *P. stipitis* and xylose was converted to bioethanol. In this study, the production of bioethanol using novel two-step fermentation system from *Pennisetum purpureum* was investigated. Saccharified-liquid was obtained by ammonia-pretreatment and cellulase treatment method and this



Saccharified-liquid contained 6.0% of glucose and 4.0% of xylose. When ethanol production was done using novel two step fermentation system from this liquid, 90% of ethanol yield was achieved.

### Reference

S. Shindo, Production of bioethanol with novel fermentation system using high temperature tolerance *Schizosaccharomyces japonicus* and *Pichia stipitis* from cellulosic biomass. 15th European Congress of Biotechnology (2012)

### 13) 発表学会：第 22 回秋田応用生命科学研究会学術講演会

発表日と場所：2013 年 11 月 29 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：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（パエニダーゼ）ホモロジーのクローニング及び大腸菌における発現

発表者：○葦澤悟（国際農研セ）、高橋砂織（秋田県総食研セ）

【目的】これまで、一部の細菌の細胞膜に D 型アミノ酸の存在することが知られていたが、近年、哺乳類の生体内にも遊離の D 型アミノ酸や D 型アミノ酸を含有するタンパク質の存在することが見出されている。高橋らは D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ生産菌 (*Paenibacillus* sp B38 株)を分離するとともに、生産する酵素を Paenidase（パエニダーゼ）と命名し、その性質を明らかにした [1]。今回我々は、Paenidase のアミノ酸配列と相同性を持つ各種ホモロジーをクローニングし、大腸菌における発現を行うとともに、それらの酵素活性を調べた。

【方法】アミノ酸配列の相同性解析には BLAST 及び MEROPS データベースを用いた。大腸菌における各種遺伝子の発現には、pET-28a 及び *Escherichia coli* BL21 (DE3) 株を用いた。酵素活性測定は、高橋らの方法で行った [1]。ホモロジーモデリングは MOE2012.10 (Molecular Operating Environment, CCG 社、カナダ)を用いて行った。

#### 【結果と考察】

Paenidase のアミノ酸配列の相同性を解析したところ、種々の  $\beta$ -lactamase、penicillin binding protein、D-Ala-D-Ala- carboxypaptidase と 35~50%の相同性があることが明らかになった。これらのうち、全長カバー率及びアミノ酸残基一致率の高い 3 種類のホモロジー (D14、DF、JDR)を選択し、遺伝子合成を行った。次に、大腸菌においてこれらのホモロジーを発現させたところ、全てにおいて可溶性組換え酵素を得ることに成功した。つづいて、得られた組換え酵素について Suc-[D-Asp]-MCA 分解活性を検討した結果、D14 は活性を示したが、DF 及び JDR は活性を示さなかった。さらに、Paenidase、D14、DF、JDR のホモロジーモデリングを行い、活性部位近傍 5 Å に位置するアミノ酸残基について解析した。その結果、Paenidase 及び D14 においてアミノ酸残基が一致し、且つ DF 及び JDR においてアミノ酸残基が異なるものは、6 ヶ所存在することが明らかとなった。また、DF 及び JDR には Paenidase 及び D14 には無い構造が 1 ヶ所存在することが明らかとなった。以上の結果は、Paenidase の基質認識機構を考察する上で、有力な手掛かりになると考えられる。



## 【参考文献】

1. S. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.*, **139**, 197-202 (2006)

### 14) 学会発表：日本エネルギー学会 第9回バイオマス科学会議

発表日と場所：2014年1月15日、高知県立県民文化ホール（高知市）

演題名：高効率アルコール発酵のためのキシロース資化性酵母 *Pichia stipitis* の改良

発表者：○西田孝伸<sup>1</sup>、進藤昌<sup>1</sup>、佐々木美希子<sup>1</sup>、柏谷香織<sup>1</sup>、三橋秀一<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>秋田県総食研セ、<sup>2</sup>バイオエタノール革新技术組合)

キシロースをエタノールに変換することのできる *Pichia stipitis* などの酵母はエタノール生成能が低く、バイオマス糖化液に含まれている様々な発酵阻害物質により強く阻害されることが知られている。キシロースからの効率的なエタノール生産を実現するために、我々は *P. stipitis* の高エタノール生産株および発酵阻害物質耐性株の取得を試みた。突然変異誘導処理および馴化処理の結果、エタノール耐性とクロトリマゾール (CTZ) 耐性が強化された酵母変異株 CTZ-X2 株の取得に成功した。坑真菌薬の一種である CTZ に対する耐性を付与することで酒酵母のエタノール生産性と多種の薬剤に対する耐性が向上することが報告されている<sup>1)</sup>。 *P. stipitis* の CTZ 耐性株でも高いエタノール産生能の向上と発酵阻害物質耐性能の強化が見られた。CTZ-X2 株はグルコースとキシロースの混在下において約 50 時間で約 82% のエタノール収率を達成した。また、CTZ-X2 株はバイオマス糖化液でも発酵阻害物質の除去なしで高いエタノール生成能を維持していることが分かった。

<sup>1)</sup> 溝口弘子ら：生物工学会誌, 76(5), 194-199 (1998).

### 15) 発表学会：第13回産総研・産技連ライフサイエンス・バイオテクノロジー 合同研究発表会

発表日と場所：2014年2月18日、産業技術総合研究所（つくば市）

演題名：レニン・アンギオテンシン系酵素類の制御を目指した機能性味噌に関する研究

発表者：○高橋砂織、佐々木康子、小笠原博信、渡辺隆幸

レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系 (RAS) は血圧調節において重要な役割を担っている。RAS における血圧調節機構では、律速酵素となっている腎臓由来のレニン、アンギオテンシン I (AI) からアンギオテンシン II (AII) を生成する血管内皮細胞由来のアンギオテンシン変換酵素 (ACE) や肥満細胞由来で ACE と同様に AI から AII を生成する作用を持つキマーゼなど複数の酵素が関与して血圧を制御している。我々は、味噌に食物由来としては初めてレニン阻害活性を見出した。味噌の原材料を検討した結果、レニン阻害物質は大豆由来であることを明らかとしている [1-3]。今回、全国市販味噌や秋田県産味噌中のレニン、ACE やキマーゼ阻害活性を検討するとともに、大豆や麹菌の種類異なる味噌を試験醸造し、それら酵素類の阻害活性を比較検討した。その結果、味噌には普遍的にレニン、ACE やキマーゼ阻害活性の存在

すること、大豆や麹菌の違いにより RAS 系酵素の阻害活性強化味噌醸造の可能性が示された。

[1] Takahashi S., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2913-2918 (2006).

[2] Takahashi S., *et al.*, *ibid.*, **72**, 3232-3236 (2008).

[3] Takahashi S., *et al.*, *Biomed. Res.*, **31**, 155-159 (2010).

本研究は、一般社団法人中央味噌研究所助成金により行われました。

## 16) 発表学会：平成 25 年度 秋田化学技術協会講演会

発表日と場所：2014 年 3 月 4 日、秋田大学（秋田市）

演題名：昆虫細胞-バキュロウイルス発現系によるアンギオテンシン変換酵素 2 の生産

発表者：○宮脇 舞（秋田大院・工学資源）、横田早希（秋田大院・工学資源）、  
菑澤悟（国際農研セ）、高橋砂織（秋田県総食研セ）、後藤猛（秋田大院・工学資源）

【目的】レニン・アンギオテンシン系はヒトを含む哺乳類の血圧調節系として重要な役割を担っている。本系ではレニンやアンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) が律速酵素として機能している。最近、心臓の血管内皮細胞から ACE のホモログとしてアンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) が見出された。ACE2 は、8 残基のペプチドからなるアンギオテンシン II の C 末端 1 残基を切除しアンギオテンシン 1-7 を生成し、血管を拡張させる作用を持っている。本研究では高血圧治療の新たなターゲットとして期待される ACE2 の機能解析を目指して、昆虫細胞発現系により組換え型ヒト ACE2 を生産することを目的とした。

【目的】3'側に His-Tag を付加した ACE2cDNA を PCR により増幅した。得られた産物を制限酵素で切断し、pFastBacI のポリヒドロリンプロモーターの下流に挿入してトランスファーベクター pFastBacI-ACE2-His6 を構築した。その後、Bac-to-Bac システムを用いた部位特異的トランスポジションにより組換えバックミドベクターを作製し、これを昆虫細胞 (Sf9) にトランスフェクションし、組換えバキュロウイルス vACE2 を作製した。指数増殖期にある Sf9 細胞を Sf900-II 培地に懸濁させ細胞密度  $1 \times 10^6$  cells/ml とし、vACE2 を感染多重度 (MOI) 0.1 pfu/cell で接種して 28°C, 100 rpm で 5 日間旋回振とう培養した。抗 His タグ抗体を用いた Western Blotting により ACE2 の発現を解析した。また、ACE2 の活性測定には蛍光消光基質 (Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH) を用いた。

【結果と考察】作製したトランスファーベクター pFastBacI-ACE2-His6 のシーケンシングにより挿入遺伝子が正しく挿入されていることが確認された。本トランスファーベクターから構築されたバックミドベクターを Sf9 細胞にトランスフェクションしたところ培養液上清に細胞感染性が認められたことから、vACE2 の増幅培養を行い  $6.27 \times 10^7$  pfu/ml のウイルスストック溶液を取得した。本ウイルス溶液を感染培養に用いた。感染培養 3 日目以降の細胞画分に 93.8 kDa の目的タンパク質バンドが確認された。

一方、培地画分に抗体と特異的反應するバンドは認められなかった。細胞画分及び培地画分の活性測定を行った結果、ACE2 活性は培養初期では細胞画分のみに活性が認められた。培養中期から後期にかけて培地にも徐々に活性が認められた。このことは、細胞で発現した ACE2 が細胞の死滅に伴って培地に漏出したものと考えられた。

## 17) 発表学会：2014年日本農芸化学会大会

発表日と場所：2014年3月28日、明治大学生田キャンパス（川崎市）

演題名： $\beta$ -キチンナノファイバーを用いた簡便なキチナーゼ活性測定法の開発

発表者：○西平知世<sup>1</sup>、宮野有紗実<sup>2</sup>、大沼貴之<sup>1</sup>、成廣和枝<sup>3</sup>、山下和彦<sup>3</sup>、後藤猛<sup>4</sup>、高橋砂織<sup>5</sup>（<sup>1</sup>近畿大院・農・バイオ、<sup>2</sup>近畿大・農・バイオ、<sup>3</sup>ヤエガキ醗酵技研（株）、<sup>4</sup>秋田大院・工学資源、<sup>5</sup>秋田県総食研セ）

【目的】キチナーゼはキチンの  $\beta$ -1,4 グリコジド結合を加水分解する酵素である。これまでグリコールキチンやオリゴ糖の誘導体などを用いて、キチナーゼ活性の測定が行われてきたが、生成した還元糖を定量する際の煩雑さ、またはオリゴ糖の誘導化の伴うアーティファクトなどが問題として挙げられていた。一方、 $\beta$ -キチンナノファイバーは、イカの軟骨に含まれる  $\beta$ -キチンをナノレベルまでサイズダウンさせ、繊維状に加工した物質であり、水溶液に分散しやすいという特徴を示す。このような特性を持つ  $\beta$ -キチンナノファイバーを用いることによって、より簡便なキチナーゼ活性測定法の開発が可能になると考えられる。本研究では、*Serratia marcescens* 由来、バキュロウイルス由来および植物由来キチナーゼを用いて、 $\beta$ -キチンナノファイバーの加水分解を行い、新規活性測定法の確立を試みた。

【方法】基質である  $\beta$ -キチンナノファイバー懸濁液を用いて、540 nm の波長で濁度を測定し、0.9~1.0 の値になるように 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で濃度を調整した。この基質懸濁液 1 ml に対して、酵素終濃度が 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0  $\mu$ M となるように酵素を加え、37°C で反応させた。その後、反応進行に伴う濁度の減少を 540 nm で追跡した。

【結果】植物由来キチナーゼと  $\beta$ -キチンナノファイバーを混合したところ、濁度の減少は確認出来なかった。しかし、*Serratia marcescens* 由来キチナーゼ B (SmChi-B) およびバキュロウイルス由来キチナーゼ (AcMNPV-Chi) を用いると、濁度は酵素濃度異存的に減少し、簡便に加水分解反応を追跡出来ることが分かった。また、SmChi-B は AcMNPV-Chi に比べると高い活性を示した。今回用いた SmChi-B と AcMNPV-Chi は、結晶性キチンに対して高い分解活性を有するプロセッシブ酵素であり、その他の酵素は非プロセッシブ酵素である。このことから、 $\beta$ -キチンナノファイバーを用いて酵素の分解活性を評価することは、プロセッシブ酵素か非プロセッシブ酵素かを判断する上で有用な手段のひとつになり得るものと考えられた。現在、キチン結合ドメインを持つ酵素と持たない酵素における  $\beta$ -キチンナノファイバーに対する分解活性を評価



している。

### 18) 発表学会：2014年日本農芸化学会大会

発表日と場所：2014年3月29日、明治大学生田キャンパス（川崎市）

演題名：味噌中のレニン・アンジオテンシン関連酵素類の阻害活性について

発表者：○高橋砂織、佐々木康子、佐藤 愛、小笠原博信、渡辺隆幸

【目的】レニン・アンジオテンシン系(RAS)は哺乳類で最も解析が進んでいる昇圧系である。これまで RAS 制御を目的として様々な食材よりアンジオテンシン変換酵素(ACE)の阻害物質探索が行われてきた。その結果、多くの阻害ペプチドが同定されている。我々は、RAS に関連する酵素群としてレニン、ACE 及びキマーゼに注目して味噌由来これら酵素群の阻害活性を探索した。

【方法】①RAS 酵素活性測定用基質の開発：レニンおよびキマーゼ活性測定用蛍光消光基質としては Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Thr-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub> を[1, 2]また、ACE 活性測定用蛍光消光基質としては Nma-Phe-His-Lys(Dnp)を用いた[3]。②阻害活性測定用酵素の調製：組換え型ヒトレニンは、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて発現しアフィニティークロマトグラフィーで精製した標品を用いた[1]。組換え型ヒト ACE 及びキマーゼは、Sigma-Aldrich 社製及び R&D Systems 社製を使用した。③味噌抽出液の調製：市販味噌及び試験醸造味噌の抽出液は、既報により調製した[4]。

【結果】平成 22 年度全国市販味噌及び秋田県産味噌の各種酵素阻害活性を検討した結果、調べた全ての味噌抽出液にレニン、ACE 及びキマーゼ阻害活性が認められ、味噌には普遍的に RAS 系酵素阻害活性の存在することが示された。一方、大豆や麹菌の違う味噌を試験醸造した結果、大豆の種類や用いる麹菌の種類によりレニン、ACE やキマーゼ阻害活性に相違が見られた。

#### 【参考論文】

1. Takahashi S., *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007).
2. Takahashi S., *et al.*, *ibid.*, **72**, 3232-3236 (2008).
3. Takahashi S., *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011).
4. 高橋砂織他、*中央味噌研究所報告* **33**, 165-170 (2012).

謝辞：本研究は、平成 24 年度一般社団法人中央味噌研究所助成により行われた。

### 19) 発表学会：2014 年度日本農芸化学会大会

発表日と場所：2014 年 3 月 29 日、明治大学生田キャンパス（川崎市）

演題名：食用地衣のレニン及びキマーゼ阻害活性

発表者：○荻澤 悟、程 永強<sup>1</sup>、山本 好和<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>3</sup>（国際農研、<sup>1</sup>中国農大・食品科学、<sup>2</sup>秋田県大・生物資源、<sup>3</sup>秋田県総食研セ）

【目的】レニンは、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系における血圧調節上、律速酵素として重要な役割を担っている。これまで、活性測定が容易なアンジオ



テンシン I 変換酵素 (ACE) を標的として各種食材よりその阻害物質の探索が多数行われてきた。しかしながら、レニンを経験的酵素とした食物由来阻害物質の探索は殆ど行われていなかった。高橋らは、ヒト型組換えレニンと消光性蛍光基質を組み合わせたレニン阻害活性の測定方法を確立し[1]、これまでに大豆からソヤサポニン I [2]をまた米から遊離脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸を同定した[3]。今回、各種食材よりレニン阻害物質を探索することを目的とした。また、ACE と同様にアンジオテンシン I に作用し、アンジオテンシン II を生成する酵素キマーゼについても同様に検索した。

【方法】レニン[1, 2]、キマーゼ[4]及び ACE[5]活性測定は高橋らの方法で行った。活性の測定には消光性蛍光基質 (レニン及びキマーゼ: Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile- His-Thr-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg、ACE: Nma-Phe-His-Lys(Dnp))を用いた。各種食材のメタノール抽出液、熱水抽出液を調製し、阻害活性検定用に用いた。また、*in vivo* における作用の検証は、各種抽出液を生後 12 週齢の雄性の高血圧自然発症ラット (SHR) に単回経口投与し、経時的に血圧を測定した。

【結果】各種食材抽出液のレニン阻害活性を測定したところ、食用地衣 (*Sulcaria sulcata*, *Lobaria kurokawae*) に強い活性があることが明らかになった。*Sulcaria sulcata* は日本でバンダイキノリ、中国で樹花菜として、*Lobaria kurokawae* は中国で樹胡蝶として食されている。一方、これらの ACE 阻害活性を測定したところ、比較的低かった。また、キマーゼについて、これらの抽出液の阻害活性を測定したところ、高い阻害活性を示した。つぎに、これらの抽出液の SHR における作用を検討したところ、抽出液投与後、4~6 時間において、コントロール群に比べ有意な血圧上昇抑制効果が確認された。

#### 【参考文献】

- [1] Takahashi S. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007)
- [2] Takahashi S. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236 (2008)
- [3] Takahashi S. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1713-1715 (2010)
- [4] 高橋他 中央味噌研究所報告 35, 印刷中 (2014)
- [5] Takahashi S. *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011)

## 20) 発表学会：2014年日本農芸化学会大会

発表日と場所：2014年3月30日、明治大学生田キャンパス (川崎市)

演題名：ジュンサイ成分による HIV-1 逆転写酵素活性の阻害

発表者：○久好哲郎<sup>1</sup>、篠村まゆ<sup>1</sup>、小西篤<sup>1</sup>、田中潤司<sup>2</sup>、下田博司<sup>2</sup>、畠恵司<sup>3</sup>、  
高橋砂織<sup>3</sup>、保川清<sup>1</sup>

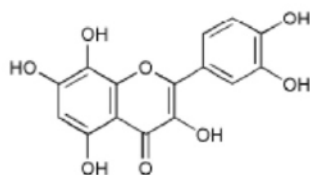
(<sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>オリザ油化 (株)、<sup>3</sup>秋田県総食研セ)

【目的】1 型ヒト免疫不全ウイルス逆転写酵素 (HIV-1 RT) は HIV-1 の増殖に不可欠であり、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 治療薬の標的となっている。また、阻害剤耐性 RT を持つ変異型 HIV-1 株の出現を抑えるため、新たな阻害機構を有する阻害剤

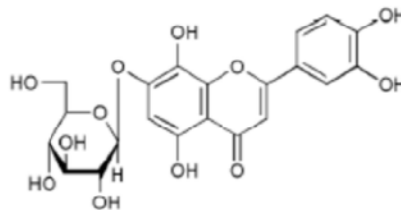
の開発が求められている。そこで本研究では、様々な食品に含まれる HIV-1 RT 阻害物質を探索することを目的とした。

【方法】①組換え HIV-1 RT の調製：HIV-1 RT は分子量 51,000 の p51 と分子量 66,000 の p66 からなるヘテロダイマーである。p51 を発現させた大腸菌 BL21(DE3)の菌体と p66 を発現させた菌体を混合し、超音波破碎の後、可溶性画分から HIV-1 RT を精製した。②poly-(rA)-p(dT)<sub>15</sub> (T/P) への dTTP の取り込み反応：食品抽出液と HIV-1 RT 溶液を混合し、常温で 3 分間インキュベートした。その後、25  $\mu$ M T/P (濃度は p(dT)<sub>15</sub> のモル換算)、0.2 mM [<sup>3</sup>H]dTTP 存在下、37°C で反応を行い、継時的に反応液を採取して酸不溶性画分への放射能の取り込みから初速度を求めた。

【結果】25 種類の食品抽出液のうち、ジュンサイのエタノール抽出液と水抽出液が HIV-1 RT の逆転写活性を阻害した。さらに 15 種類のジュンサイ成分を調べたところ、Gossypetin と Hypolaetin 7-O-glucoside が HIV-1 RT を阻害した。



Gossypetin



Hypolaetin 7-O-glucoside

## 6. 外部発表論文概要 (7件)

### 1) 論文題名 : **Taste of Milk from Inflamed Breasts of Breastfeeding Mothers with Mastitis Evaluated Using a Taste Sensor**

著者名 : Yoshida Michiko, Shinohara Hitomi, Sugiyama Toshihiro, Kumagai Masanori, Muto Hajime, and Kodama Hideya.

雑誌名 : *Breastfeeding Medicine*, 9, 92 - 97 (2014)

発行日 : 2014年2月24日

### 2) 論文題名 : **An in vitro assay system for antihyperlipidemic agents by evaluating lipoprotein profiles from human intestinal epithelium-like cells**

著者名 : Junichiro Takahashi, Kikumi Ogihara, Yuko Naya, Fumiko Kimura, Mizuho Itoh, Yuka Iwama, Yukie Matsumoto, Gen Toshima, Keishi Hata

雑誌名 : *3 Biotech*, 3, 213–218 (2013)

発行日 : 2013年6月1日

### 3) 論文題名 : **Systemic and local injections of lupeol inhibit tumor growth in a melanoma-bearing mouse model**

著者名 : Makiko Nitta, Kazuo Azuma, Keishi Hata, Saori Takahashi, Kikumi Ogiwara, Takeshi Tsuka, Tomohiro Imagawa, Inoru Yokoe, Tomohiro Osaki, Saburo Minami, Yoshiharu Okamoto

雑誌名 : *Biomedical Reports*, 1, 641-645 (2013)

発行日 : 2013年7月1日

### 4) 論文題名 : 塩味を強調する梅塩の開発

著者名 : 石川匡子、高橋美子、遠藤由香、佐藤史奈、小笠原美穂、奥山慧一、熊谷昌則、秋山美展、松永隆司

雑誌名 : 日本海水学会誌, 67, 219 – 223 (2013).

発行日 : 2013年8月1日

### 5) 論文題名 : **Advantages of assessing lipoprotein profiles in hepatic cell differentiation**

著者名 : Junichiro Takahashi, Fumiko Kimura, Mizuho Miura, Yuka Iwama, Gen Toshima, Keishi Hata

雑誌名 : *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 49, 554-556 (2013)

発行日 : 2013年8月1日

6) 論文題名 : **LipoSEARCH; Analytical GP-HPLC method for lipoprotein profiling and its applications**

著者名 : Gen Toshima, Yuka Iwama, Fumiko Kimura, Yukie Matsumoto, Mizuho Miura, Junichiro Takahashi, Hidemi Yasuda, Nobuaki Arai, Hisashi Mizutani, Keishi Hata, Shinichi Usui, and Mitsuyo Okazaki

雑誌名 : *J. Biol. Macromol.*, **13**, 21-32 (2013)

発行日 : 2013 年 10 月 1 日

7) 論文題名 : 血圧降下作用を目指した機能性味噌の開発

著者名 : 高橋砂織、佐々木康子、小笠原博信、渡辺隆幸

雑誌名 : 中央味噌研究所報告 35, 46-57(2014)

発行日 : 2014 年 3 月 24 日



1) 論文題名: **Taste of Milk from Inflamed Breasts of Breastfeeding Mothers with Mastitis Evaluated Using a Taste Sensor**

著者名: Yoshida Michiko, Shinohara Hitomi, Sugiyama Toshihiro, Kumagai Masanori, Muto Hajime, and Kodama Hideya.

雑誌名: *Breastfeeding Medicine*, **9**, 92 - 97 (2014)

発行日: 2014年2月24日

要約: Background: The refusal of infants to suckle from a breast that is inflamed with mastitis suggests that the taste of the milk has changed. However, the taste of milk from a breast with mastitis has never been empirically determined. The present study compares the taste of milk from breastfeeding mothers with or without mastitis and identifies specific changes in the taste of milk from mothers with mastitis.

Subjects and Methods: The intensity of four basic tastes (sourness, saltiness, bitterness, and umami) of breastmilk from 24 healthy mothers at 3–5 days and at 2–3, 4–5, and 8–10 weeks postpartum and from 14 mothers with mastitis was determined objectively using a taste sensor. The intensity of each basic taste and the concentrations of main taste substances in milk were compared between the inflamed breasts and the normal breasts of control mothers or the contralateral asymptomatic breast of mothers with unilateral mastitis.

Results: The transition from colostrum to mature milk was accompanied by changes in the taste of the milk, such as decreased saltiness and umami and increased bitterness and sourness. Umami and saltiness increased in milk from inflamed breasts. Contents of sodium, glutamate, and guanosine monophosphate increased in milk from inflamed breasts.

Conclusions: Tastes that were specifically associated with inflamed breasts appeared to include an increase in umami and saltiness, which might have resulted from an increased content in factors associated with umami and sodium.

2) 論文題名: **An in vitro assay system for antihyperlipidemic agents by evaluating lipoprotein profiles from human intestinal epithelium-like cells**

著者名: Junichiro Takahashi, Kikumi Ogihara, Yuko Naya, Fumiko Kimura, Mizuho Itoh, Yuka Iwama, Yukie Matsumoto, Gen Toshima, Keishi Hata

雑誌名: *3 Biotech*, **3** (3), 213–218 (2013)

発行日: 2013年6月1日

要約: We developed an in vitro screening system for antihyperlipidemic activity by measuring lipoprotein profiles secreted from human intestinal epithelium-like cells from the colon cancer cell line, Caco-2. Sodium (Na) butyrate at 5 mM differentiated Caco-2 cells into intestinal epithelium-like cells and numerous microvilli on the apical side of cells were observed under transmission electron microscopy. Real-time RT-PCR analysis revealed that Na butyrate stimulated expression levels of intestinal differentiation markers in Caco-2 cells in a dose-dependent manner and 5 mM Na butyrate up-regulated intestinal alkaline phosphatase,

sucrase–isomaltase complex, and microsomal triglyceride transfer protein by 8.1-, 1.9-, and 2.1-fold that of non-treated cells, respectively. Lipoprotein secretions from differentiated Caco-2 cells were promoted by lysophosphatidyl choline and Na oleate, which are a stimulator of lipoprotein secretion and a substrate of triglycerides, respectively. We examined the effects of Pluronic L-81, a lipoprotein secretion inhibitor, on lipoprotein profiles of differentiated Caco-2 cells. Pluronic L-81 at 1.0 lg/ml inhibited TG contents in lipoprotein fractions from cells by 25.6 % and secretion was completely suppressed by the agent at 10 lg/ml.

### 3) 論文題名: **Systemic and local injections of lupeol inhibit tumor growth in a melanoma-bearing mouse model**

著者名: Makiko Nitta, Kazuo Azuma, Keishi Hata, Saori Takahashi, Kikumi Ogiwara, Takeshi Tsuka, Tomohiro Imagawa, Inoru Yokoe, Tomohiro Osaki, Saburo Minami, Yoshiharu Okamoto

雑誌名: *Biomedical Reports*, **1** (4), 641-645 (2013)

発行日: 2013年7月1日

要約: Melanoma is the most aggressive type of skin cancer and it is procured from activated or genetically altered epidermal melanocytes. In the present study, the tumor-suppressive effects of systemic and local injections of lupeol, a triterpene extracted from Indian lettuce (*Lactuca indica*), in a melanoma-bearing mouse model were evaluated. Mice were injected once with lupeol or olive oil (solvent control) subcutaneously into the skin of the back or into the tumor tissue. seven days after the injection, the tumor growth rates were calculated and the tumor tissues were collected. Immunohistochemical staining for Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were performed. the tumor growth rates in the lupeol-injected group were significantly decreased compared to those observed in the non-treated (NT) and solvent control groups. Lupeol also significantly decreased the areas positively stained for Ki-67 and PCNA in the tumor tissues compared to those in the NT and solvent control groups. The results of the present study demonstrated that systemic and local injections of lupeol suppress tumor growth and induce cell cycle arrest in a melanoma-bearing mouse model. These data suggest that lupeol may be effective as a novel therapeutic option for melanoma patients.

### 4) 論文題名: **塩味を強調する梅塩の開発**

著者名: 石川匡子、高橋美子、遠藤由香、佐藤史奈、小笠原美穂、奥山慧一、熊谷昌則、秋山美展、松永隆司

雑誌名: 日本海水学会誌, **67**, 219 - 223 (2013).

発行日: 2013年8月1日

要約: 塩味と酸味物質による相互作用を利用した塩味増強について、クエン酸ならびに梅を

用いて、水溶液および固体の両面から検討を行った。水溶液においては、クエン酸添加により塩味が強く感じられ、その作用は食塩水およびクエン酸の濃度により異なっていた。自作した梅干しおよび梅酢を用い、梅パウダー添加塩、梅酢添加塩を調製した。2種類の塩をそれぞれ直接口に含み、食塩と塩味の強さを比較した結果、梅パウダー添加塩、梅酢添加塩は、塩味増強が確認された。

**5) 論文題名 : Advantages of assessing lipoprotein profiles in hepatic cell differentiation**

著者名 : Junichiro Takahashi, Fumiko Kimura, Mizuho Miura, Yuka Iwama, Gen Toshima, Keishi Hata

雑誌名 : *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, **49**, 554-556 (2013)

発行日 : 2013 年 8 月 1 日

要約 : We examined changes in lipoprotein profiles in hepatic cell differentiation. Sodium (Na) butyrate at a concentration over 1 mM increased the gene expression levels of hepatic markers in HepG2 human hepatoma cells. Lipoprotein components such as apolipoprotein (Apo) A-1, ApoB-100, and lipogenic and cholesterogenic enzymes were up-regulated at the mRNA level depending on HepG2 cell differentiation by Na butyrate. Furthermore, we investigated the effect of Na butyrate on the lipoprotein profiles of HepG2 cells. Differentiated HepG2 cells produced higher levels of triglycerides and cholesterol in very low density lipoproteins (VLDL) and LDL than those of non-induced cells. These results suggest that the lipoprotein profile may be a useful index for hepatic cell differentiation.

**6) 論文題名 : LipoSEARCH; Analytical GP-HPLC method for lipoprotein profiling and its applications**

著者名 : Gen Toshima, Yuka Iwama, Fumiko Kimura, Yukie Matsumoto, Mizuho Miura, Junichiro Takahashi, Hidemi Yasuda, Nobuaki Arai, Hisashi Mizutani, Keishi Hata, Shinichi Usui, and Mitsuyo Okazaki

雑誌名 : *J. Biol. Macromol.*, **13**, 21-32 (2013)

発行日 : 2013 年 10 月 1 日

要約 : We developed a novel evaluation system to conveniently classify and quantify lipoproteins with high sensitivity using gel-permeation high-performance liquid chromatography (GP-HPLC, LipoSEARCH®), which is an alternative method to ultracentrifugation. In LipoSEARCH®, cholesterol and triglycerides (TG) levels of the major classes and subclasses of lipoproteins were determined by their component peak analyses on the basis of lipoprotein particle sizes with the Gaussian curve fitting technique, and the particle sizes of each lipoprotein were calculated by their retention times on a chromatogram. LipoSEARCH® exhibited good reproducibility and linearity on determinations of cholesterol and TG in lipoproteins, and strong relationships with other analytical methods such as ultracentrifugation. We recently used LipoSEARCH® to analyze lipoprotein profiles from



companion animal serum (LipoTEST®) and cell culture media (LipoCULTURE). Furthermore, we developed a unique service to assess the progress risk of metabolic syndrome and/or atherosclerosis by determining LDL particle size and small dense LDL-cholesterol (MetaboCHART®).

#### 7) 論文題名：血圧降下作用を目指した機能性味噌の開発

著者名：高橋砂織、佐々木康子、小笠原博信、渡辺隆幸

雑誌名：中央味噌研究所報告 35, 46-57 (2014)

発行日：2014年3月24日

要約：レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は哺乳類において最も重要な血圧調節機構である。我々は、味噌に初めてレニン阻害活性を見出し、原材料の大豆からレニン阻害物質としてソヤサポニン I を同定した。今回、RAS を構成するレニン以外の律速酵素としてキマーゼやアンジオテンシン変換酵素 (ACE) にも注目してこれら酵素の新規測定法の開発を行うとともに各種味噌抽出液のレニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性を検討した。さらに、丸大豆と脱皮大豆について性質の異なる麹菌を用いて味噌の仕込みを行い、RAS 系酵素類を阻害する活性を評価した。その結果、味噌抽出物はいずれもレニン、キマーゼや ACE 活性を阻害することが示され、味噌には普遍的に RSA 酵素群を阻害する物質が含まれていることが明らかとなった。これらの味噌試料における各種酵素活性阻害の相関を解析したところ、レニン阻害活性とキマーゼ阻害活性に高い相関が認められた。しかしながら、ACE 阻害活性とレニン阻害活性や ACE 阻害活性とキマーゼ阻害活性には相関関係が認められなかった。

丸大豆及と脱皮大豆とを原料として3種類の麹菌を用いて試験醸造した味噌の各種酵素阻害活性を検討した。その結果、レニン阻害活性に関しては、丸大豆を用いた場合味噌用麹と WS61 株で、醸造期間が長くなるにつれて阻害が減少する傾向が見られた。AOK139 株では、一過性に阻害が上昇する傾向があった。一方、脱皮大豆を用いた場合に味噌用麹と AOK139 株の場合醸造期間中に阻害活性に大きな変化は認められなかった。しかしながら、WS61 株の場合、レニン阻害活性は1ヶ月目で減少傾向があり、2ヶ月目では増加が観察された。また、キマーゼ阻害活性に関しては、丸大豆と脱皮大豆を用い異なる麹菌を用いた場合、全体的に醸造期間にしたがって阻害が減少する傾向が見られた。しかしながら、WS61 株を用いた場合には1ヶ月目には減少傾向が見られたが、レニン阻害活性の場合と同様に2ヶ月目で阻害の増加が観察された。ACE 阻害活性に関しては、丸大豆及び脱皮大豆を用いた場合のいずれの場合においても麹菌の種類に関わらず熟成が進むにつれて阻害が強くなることが示された。

以上より、脱皮大豆を用いまた種麹菌として WS 61 株を用いることで、レニン、キマーゼ及び ACE 阻害活性の強化した味噌の開発が可能と考えられた。



## 7. 秋田県総合食品研究センター報告規定

### 【総則】

1. 秋田県総合食品研究センター報告は、食品研究に関する幅広い分野の原著論文（報文及び研究ノート）、総説、特許の要約、学会発表要旨及び外部発表論文要約等を掲載する。原著論文（報文及び研究ノート）は独創的なものであり、価値ある新事実や結論を含むものでなければならない。
2. 投稿者は、原則として秋田県総合食品研究センターの職員とする。
3. 論文の用語は、原則として日本語とする。

### 【掲載論文の種類】

原著論文（報文及び研究ノート）と総説の2種類とする。原著論文は、論文として未発表のものに限る。ただし、講演要旨、会議議事録などに発表した内容を投稿することは妨げない。

### 【掲載論文等のページ数と注意事項】

（報文及び総説）論文自身が独立しており、完結した内容でなければならない。論文の長さは特に限定しないが、10ページ程度であることが望ましい。

（研究ノート）限られた部分の発見や、新しい実験方法など、報文としてはまとまらないものであっても、報告する価値のあるもの。論文は、4ページ以内にまとめること。

（特許の要約）1/2ページにまとめること。

（学会発表要旨）1ページ以内にまとめること。

（外部発表論文要約）外部発表論文や著書等について、論文題名、著者名、雑誌もしくは著書名、巻、最初と最後のページ及び発表年を記載するとともに、要約を1ページ以内に記載する。

### 【審査】

1. 原著（報文及び研究ノート）及び総説に関しては、複数の編集委員によりその論文の価値判断がなされ、掲載の可否が決定される。
2. 編集委員は、論文の内容、文章などについて著者に改正を助言し、あるいは疑義の解明を求めることが出来る。
3. 編集委員の質問や意見に対して明確な回答がなされた場合には、速やかに修正原稿を提出しなければならない。

### 【原稿の書き方】

1. 一般的注意事項：文章は平易且つ簡潔な「である」調とする。数字や英字は原則として半角とする。論文の記述は正確を期し、全編にわたり簡潔明瞭であること。
2. 原稿は、「Word」を用いて作成し、A4版縦長様式とする。

3. 原稿の書体は、原則としてMS明朝体を用い、表題は18ポイント、本文は12ポイントとする。文章中（全角）では句点「。」及び句読点「、」を用いる。半角の場合には、終止符「.」及びカンマ「,」を用いる。
4. 原稿の上下、左右には2.5 cmの余白を設ける。

#### 【論文の形式】

1. 報文は、次の形式をとる。  
【要約】、【緒言】、【実験方法】、【結果】、【考察】、【引用文献】の順とする。  
【謝辞】は、【引用文献】の前に入れる。
2. 研究ノートは、次の形式をとる。  
【緒言】、【実験方法】、【結果と考察】、【引用文献】とする。
3. 総説は、特に形式にこだわらないが、最初に要約を付ける。
4. 図表は、本文中では図1あるいは表1などと表記する。
5. 引用文献は、本文中の該当人名や事項の後に上付き小文字で、秋田県<sup>1)</sup>、や総食研<sup>2-4)</sup>などのように番号を付し、そのリストを一括して引用文献の項に記載する。
6. 投稿中の論文、私信、未発表結果は、引用文献に入れず本文中に括弧で示し引用する。
7. 本文中に他の論文の著者名を引用する場合には、混乱の起こらない限り姓のみとする。著者が2名の論文は、両者の姓を併記し、3名以上の場合は、筆頭著者以外を「他」もしくは「ら」と略記する。
8. 定義を必要とする略号や記号の使用は最小限にとどめる。使用するときには、初出の箇所に正式名を書き、続けて括弧内に略号をいれる。用いた略号は文末（引用文献のあと）に一括して表示する。また、表題には略号を用いない。

#### 【引用文献記載方法】

1. 雑誌は、著者名、(年号)、論文表題、雑誌名、巻、ページ（最初と最後）、の順に記載する。
2. 単行本は、著者名、(年号)、論文表題、書名、(編者)、ページ（最初と最後）、出版社、出版都市とする。
3. 著者名は、姓名とも記し、全著者名を記載する。
4. 欧文雑誌の略記は、Index Medicusによる。誌名はイタリックとし、巻はボールドとする。
5. 和文誌名は略記しない。

#### (引用文献載例)

- 1) Tomatsu M, Shimakage A, Shinbo M, Yamada S, Takahashi S (2013) Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from soya milk. *Food Chem*, **135**, 612-616.

- 2) Inagami T (1998) Angiotensin receptors: molecular biology and signaling. In: Renin-Angiotensin. (Ulfendahl HR, Aurell M, eds), p25-35, Portland Press Ltd, London.
- 3) 小笠原博信、高橋砂織 (2000) STS-PCR 法によるあきたこまち等の 1 粒品種判別 日本食品科学工学会誌 47, 632-637.
- 4) 作田庄平 (2004) アロサミジンとキチナーゼ: キチン・キトサンの開発と応用 (平野茂博監修) p153-164, 株式会社シーエムシー出版、東京.

#### 【単位と物質の名称】

種々の物質単位及びその用語や記号は、国際単位系・SI(metric system)を基本とする。常用的に用いられている物質名のうち、極めて使用頻度が高く、使い方が国際的に統一されている物質名は、定義なしで使用できる。

#### 【学名】

学名はイタリックを用いる。

本規定は平成 11 年 4 月 1 日より施行する。

平成 21 年 4 月 1 日、一部改正。

平成 23 年 4 月 1 日、一部改正。

平成 25 年 4 月 1 日、一部改正。

秋田県総合食品研究センター報告  
第 16 号

委員長 田口 博  
副委員長 高橋 砂織

委 員 塚本 研一  
同 熊谷 昌則  
同 進藤 昌  
同 渡邊 誠衛  
同 小笠原 博信  
同 杉本 勇人

発 行 平成 26 年 12 月 1 日  
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 4-26  
電話：018-888-2000 (代)  
FAX：018-888-2008  
<http://www.arif.pref.akita.jp/>

【無断複製を禁ず】