

ISSN 2185-6699

秋田県総合食品研究センター報告

第 20 号

平成 30 年 (2018 年)

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

No. 20, 2018



発酵の国あきたを担う
未来産業型秋田オリジナル麴の
開発に係る基盤研究
上原健二、他 No. 20 1-11 (2018)



世界自然遺産「白神山地」より
分離された乳酸菌「白神サケイ株」
の日本酒への利用
木村貴一 No. 20 12-22 (2018)



畜産飼料用低温発酵性乳酸菌の
分離選抜と特性解明
木村貴一 No. 20 23-32 (2018)



酢酸の生成に及ぼす清酒もろみへの
追い水のタイミングの影響
佐藤友紀、他 No. 20 33-36 (2018)



いぶりがっこの品質調査と製造工程に
関する研究
佐々木康子、渡辺隆幸 No. 20 37-42 (2018)



地域特産ブランド構築のための
鱈しょっつるの経験価値分析
高島聡 No. 20 43-47 (2018)



あきたスマイルケア食研究会の
取り組みについて
松井ふゆみ、他 No. 20 49-55 (2018)

目次

1. 原著論文（報文）

- 1) 発酵の国あきたを担う未来産業型秋田オリジナル麴の開発に係る基盤研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
○上原健二、佐藤勉、瓜生撰、伊藤俊彦、小笠原博信
- 2) 世界自然遺産「白神山地」より分離された乳酸菌「白神サケイ株」の日本酒への利用・・・・・・・・・・ 12
○木村貴一
- 3) 畜産飼料用低温発酵性乳酸菌の分離選抜と特性解明・・・・・・・・・・ 23
○木村貴一

2. 原著論文（研究ノート）

- 1) 酢酸の生成に及ぼす清酒もろみへの追い水のタイミングの影響・・・・・・・・・・ 33
○佐藤友紀、上原智美、黒崎文華、大野剛、渡邊誠衛
- 2) いぶりがっこの品質調査と製造工程に関する研究・・・・・・・・・・ 37
○佐々木康子、渡辺隆幸
- 3) 地域特産ブランド構築のための鱈しょつつるの経験価値分析・・・・・・・・・・ 43
○高畠聡

3. 総説

- 1) あきたスマイルケア食研究会の取り組みについて・・・・・・・・・・ 49
○松井ふゆみ、畠恵司、佐々木玲、上原健二、熊谷昌則

4. 特許の概要（2件）・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 57

5. 学会発表概要（14件）・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

6. 外部発表論文概要（9件） 71

7. 秋田県総合食品研究センター報告規程 75

1. 原著論文（報文）（3件）

- 1) 発酵の国あきたを担う未来産業型秋田オリジナル麴の
開発に係る基盤研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
○上原健二、佐藤勉、瓜生撰、伊藤俊彦、小笠原博信

- 2) 世界自然遺産「白神山地」より分離された乳酸菌
「白神サケイ株」の日本酒への利用・・・・・・・・・・・・ 12
○木村貴一

- 3) 畜産飼料用低温発酵性乳酸菌の分離選抜と特性解明・・・・・・・・ 23
○木村貴一

発酵の国あきたを担う未来産業型秋田オリジナル麴 の開発に係る基盤研究

上原健二¹、佐藤勉²、瓜生摂²、伊藤俊彦³、小笠原博信¹

(¹秋田県総合食品研究センター、²株式会社秋田今野商店、³秋田県立大学 生物資源科学部 応用生物化学科食品醸造グループ)

Kenji UEHARA, Tsutomu SATO, Setsu URYU, Toshihiko ITO,
and Hironobu OGASAWARA

【要約】

秋田オリジナル麴「あめこうじ」は、「色が白く、味がすっきり、甘い」という従来の麴菌では得られなかった特徴を持ち、甘酒や発酵食品のほか、お菓子・化粧品等様々な用途に使用され、今後更なる利用拡大が期待される¹⁾。一方で、この「あめこうじ」をつくるための麴菌 CK33 株は生育がやや遅いため、麴製造時の難易度が高く、また、種麴のもととなる孢子着生が少ないことから、種麴製造時のコスト高になっている。今後の普及を考えた場合には、製造コストも抑える必要がある。

そこで我々は、「あめこうじ」の特性を継承しながら、作業時間短縮と種麴生産収率アップを実現する新しい麴菌株の育種を行い、製麴時の温度経過が早く、孢子着生が多い育種株を3株得た。うち1株を120kg規模種麴製造試験に供したところ、種麴収量が育種前に比べて116%となり、現場製造レベルでも育種株の特性が発揮されることを確認した。

【緒言】

麴菌は我国の醸造産業において千二百年以上も活用の歴史があり、日本の「国菌」と称されて研究開発も長年行われてきている。近年、秋田県の発酵食品の知名度も上がる中、我々は独自のトランスポゾン技術²⁻⁴⁾を応用し、秋田のさらなるPRの核となるべく秋田オリジナル麴「あめこうじ」を開発した。

総合食品研究センター（以下、総食研）において「あめこうじ製造ガイドライン」が策定され、現在「あめこうじ」は一定の品質と基準を満たす麴を製造できる県内企業にのみ製造が認められている。つまり、「あめこうじ」の普及は、製造現場（味噌・醤油製造も含む）での麴造りの技術力向上と、麴製品およびそれを利用した加工食品の高品質化に貢献しているといえる。さらに、「あめこうじプロモーション」などの県事業の効果は「発酵の国あきた」のイメージアップに加え、「甘い、すっきり、白い」という新タイプの麴ブランドの構築や「麴関連商品」の販売額拡大に繋がっている。

このように、「あめこうじ」は麴製品およびそれを利用した加工食品の高品質化を実現してきた。一方で、麴製造現場においては、①製造時間が長くかかる、②「麴の素」となる種麴生産収率が低い、という「甘い麴」を製造できる種麴菌株の多くが併せ持つ性質を克服することが課題として残されていた。

そこで我々は、麴製造時間の短縮に役立つ『①低温でも生育が早いこと』、および種麴生産収率の向上に効果のある『②孢子形成量が多いこと』、という麴菌株の2つの特性を指標に育種選抜を行い、「あめこうじ」の特徴である「甘い、すっきり、白い」という麴特性を継承した新しい麴「スーパーあめこうじ」を開発することにした。

【実験方法】

1. 製造時間短縮に最適化した麴生育の早い麴菌株の開発

1-1) トランスポゾン変異処理温度の検討

「あめこうじ」の元となる麴菌 CK33 株をポテトデキストロース寒天培地 (0.4% potato starch, 2% dextrose, 1.5% agar) (以下、PDA 培地) に植菌し、30℃で5~7日間培養した。形成された孢子を 0.1% Tween80 溶液で回収後、滅菌したミラクロス (メルク社) でろ過し、孢子懸濁液を得た。孢子懸濁液を遠心分離 (3500rpm、5分) し、上清を除去後、滅菌水で再懸濁し、50, 52, 54, 56, 60℃の温度帯で6時間処理した。処理後の孢子懸濁液を適宜希釈した後、PDA 培地に塗布し、生育してくるコロニー数から生存率 (処理前を 100%生存率とする) を算出した。

1-2) トランスポゾン変異処理時間の検討

CK33 株を PDA 培地に植菌し、30℃で5~7日間培養した。形成された孢子を 0.1% Tween80 溶液で回収後、滅菌したミラクロス (メルク社) でろ過し、孢子懸濁液を得た。孢子懸濁液を遠心分離 (3500rpm、5分) し、上清を除去後、滅菌水で再懸濁し、53℃の温度帯で2, 4, 6時間処理した。処理後の孢子懸濁液を適宜希釈した後、PDA 培地に塗布し、生育してくるコロニー数から生存率 (処理前を 100%生存率とする) を算出した。

1-3) トランスポゾン変異処理による生育性向上株の選抜 (LT シリーズ)

CK33 株に最適なトランスポゾン変異処理 (53℃、5時間処理) を行い、以下の2つの条件で生育性向上株の選抜を実施した。(方法1) 処理した孢子懸濁液を貧栄養培地である Czapek 最少培地 (3% saccharose, 0.2% sodium nitrate, 0.1% dipotassium phosphate, 0.05% magnesium sulfate, 0.05% potassium chloride, 0.001% ferrous sulfate, 1.5% agar) (以下、Cz 培地) に塗布後、30℃で2週間培養し、生育株を選抜株として収集した。(方法2) 富栄養培地である PDA 培地に塗布後、18℃で6日間培養し、生育株を選抜株として収集した。

2. 種麴生産性向上に必要な高い孢子形成能を持つ麴菌株の開発

2-1) 孢子形成が適度に起こる選抜培地の検討

PDA 培地と Cz 培地を 6 種類の割合 (100:0, 25:75, 20:80, 17:83, 13:87, 10:90) で配合し、さらに 0.25% となるよう Triton X-100 を添加した培地を調製した。同培地に 1 枚あたり 20~30 コロニーとなるように孢子懸濁液を塗布し、30°C で 8 日間培養した。培養後のコロニーを確認し、孢子形成が適度に起こる培地を目視にて決定した。

2-2) 自然突然変異による孢子形成能向上株の選抜 (SP シリーズ)

CK33 株を PDA 培地に植菌し、30°C で 5~7 日間培養した。0.1% Tween80 溶液で形成された孢子を回収後、滅菌したミラクロス (メルク社) でろ過し、孢子懸濁液を得た。選抜培地 (25%PDA、75%Cz、0.25% Triton X-100) に 1 枚あたり 20~30 コロニーとなるように孢子懸濁液を塗布し、20°C で 8~9 日間培養後、孢子着生が早い株を目視で選抜した (目視選抜株)。目視選抜株を PDA 培地に植え継ぎ、孢子を形成させた後 (30°C、5~7 日間)、0.1% Tween80 溶液 300 μ l を分注したマイクロチューブに爪楊枝にて孢子を適量懸濁した。ボルテックスでよく攪拌後、OD₆₆₀ を測定し、OD₆₆₀=0.1 となるように滅菌水で希釈した。親水性 PTFE メンブレンフィルター (直径 4.5cm、オートクレーブ済) を PDA 培地にのせ、中央に希釈液 5 μ l をスポットして乾燥後、30°C で 5~7 日間培養し、コロニー直径を計測した。コロニー直径を計測後、メンブレンフィルターを 50ml チューブに回収し、0.1% Tween80 溶液を加え、ボルテックスにてよく攪拌した (孢子懸濁液の調製)。孢子懸濁液の OD₆₆₀ を測定後、コロニー直径で補正し (OD₆₆₀/コロニー直径 cm)、親株 (CK33) の値または選抜 1 回あたりの候補株の平均値を 1 とし、親株比 (平均値比) が 1.2 以上の株を孢子形成能向上株として選抜した。

3. 種麴製造モデルによるスーパーあめこうじ用麴菌株の選抜

3-1) 種麴製造モデルでの選抜試験

選抜株を用いて、定法に従って種麴を作成した (20g スケール)。

4. 候補株の実用性評価方法

4-1) 種麴の相対孢子量測定

種麴 (玄米込み) を約 0.5 g 測り取り、0.01% Tween80 溶液 20 ml に懸濁した。転倒混和とボルテックスミキサーによる攪拌を 5 回行い、その後 15 分間超音波処理を行った。超音波処理後、40 μ m セルストレーナーを通し、孢子懸濁液を調製した。孢子懸濁液を少量とり、血球計算盤にて孢子濃度を計数した。結果は、CK33 株の親株である AOK3006 の種麴 1 g あたりの孢子数を 100% とした相対値で示した。

4-2) 製麴中の品温経過測定

原料米は精米歩合 60% の山田錦を α 化した物を用いた。プラスチックビーカーに α 米を 30g と、吸水率 40% になるよう調整した孢子懸濁液（孢子数を揃えた物）を 12 ml 入れ、スパーテルで米全体に懸濁液が浸透するようなじませた。麴サンプルの中央に温湿度データロガーハイグロクロン（KN ラボラトリーズ社）を埋め込み、恒温恒湿器（31°C, 90%）にて 48 時間培養し、製麴中の品温経過を測定した。この際、対照として CK33 及び AOK3006 を用いた。また、孢子を含まないものをブランクとして測定した。

5. 現場レベルの種麴製造試験および米麴での酵素活性評価

5-1) 種麴製造スケールアップ試験

選抜株を用いて、定法に従って種麴を作成した（200g スケール）。

5-2) 現場レベルの種麴製造試験

選抜株を用いて、定法に従って種麴を作成した（120kg スケール）。

5-3) 製麴

現場レベルの種麴製造試験で試作した SP-19 株の種麴を用い、シャーレ法にて米麴の製麴を行った。

5-4) 米麴の酵素活性測定

米麴の酵素力価について、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ、酸性プロテアーゼ（pH3.0）は国税庁所定分析法⁵⁾に準じて測定した（単位=U/g 麴）。チロシナーゼ活性は、小笠原らの方法⁶⁾を参考に測定した。すなわち、米麴 0.1g に 0.5% 食塩入りの 20mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）を 1ml 加え、バグクラッシャー GM-01（タイテック社）にて破碎した（[LA モードで 2 分処理→氷上 10 分]×3 セット）。破碎液を 4°C、15000rpm の条件で 15 分遠心分離後、上清を回収し、同条件で再度遠心分離を行った。遠心分離後の上清を回収し、チロシナーゼ活性測定用の粗酵素液とした。粗酵素液 100 μ l に 0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH3.0）を 50 μ l 加え、ボルテックスにて攪拌したのち、氷上で 30 分放置した（チロシナーゼの活性化）。次いで、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）を 600 μ l、10mM DOPA 溶液を 750 μ l 加え、ボルテックス攪拌したのち、40°C で 30 分間酵素反応させた。チロシナーゼによって L- β -(3,4-dihydroxyphenyl)alanine (DOPA) が酸化されて生じるオレンジ色の 5,6-Dioxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H-indole-2-carboxylic acid (DOPAchrome) を 475nm の波長により測定した（OD₄₇₅）。

【結果と考察】

1. トランスポゾン技術(ストレス処理有り)及び自然突然変異(ストレス処理無し)によるスーパーあめこうじ用候補麹菌株の選抜

1-1) 製造時間短縮に最適化した麴生育の早い麴菌株の開発

麴菌は強いストレス(高濃度の銅イオン処理、高温処理等)を受けると、トランスポゾンと呼ばれる可動性 DNA 因子がゲノム内を転移し、親株とわずかに異なる性質(遺伝子)を持つ株となる²⁻⁴⁾。この「トランスポゾン技術」を応用し、あめこうじの元である CK33 株から麴生育の早い株(=初期増殖が早い株)を選抜し、製造時間短縮に適した株を育種することにした。

トランスポゾンの転移(≡麴菌の変異)を誘発するには上述の通り強いストレスが必要であり、生存率が数%となるような条件でストレスをかける必要がある。ストレスに対する感受性は使用する菌株ごとに異なるため、まず CK33 の変異処理条件を検討した。結果を表 1 に示した。

表 1 変異処理温度の検討(6 時間処理)

温度(°C)	50	52	54	56	60
生存率(%)	86.5	2.9	0.5	0.0	0.0

表 1 のとおり、52~54°C の高温ストレス処理で生存率が数%程度となることが明らかとなった。したがって、変異処理温度は中間の 53°C で実施することに決定した。次に、53°C 処理した際に適切な生存率となるよう変異処理時間を検討した。結果を図 1 に示した。

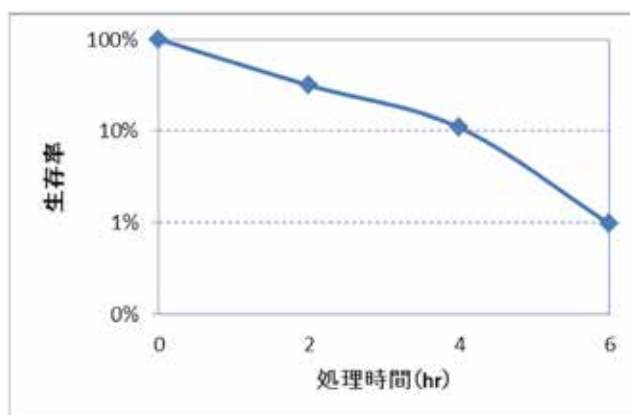


図 1 変異処理時間の検討(処理温度は 53°C)

図 1 のとおり、4~6 時間の処理時間で生存率が 1~10%程度になることから、「53°C、5 時間処理」を CK33 のトランスポゾン変異処理条件に決定した。尚、高温ストレス以外に高濃度の銅ストレス(100mM CuSO₄、30°C、6 時間処理)をかけた試験を実施したが、生存率が 60%程度と高く、変異処理条件としては不適であった(データ未掲載)。

CK33 に最適化したトランスポゾン変異処理条件 (53°C 高温ストレス、5 時間処理) にて選抜を行った結果、生育性が向上した可能性のある株を計 20 株 (選抜方法 1 から 1 株、選抜方法 2 から 19 株) の取得できた (LT シリーズ)。

1-2) 種麴生産性向上に必要な高い孢子形成能を持つ麴菌株の開発

孢子形成能が明確に高い株を CK33 株の自然突然変異株から選抜するため、以下のような孢子形成が適度に起こる選抜培地の検討を行った。まず栄養リッチな PDA 培地を用いて孢子形成能を評価しようと試みたが、孢子形成が早く、株間のわずかな違いを検出することは難しいと判断した。一方、貧栄養な Cz 培地では麴菌の生育や孢子形成速度が著しく遅く、選抜培地としては不適であると考えられた。そこで、これら培地を一定の割合で混合して培地を作成し、目視でも評価可能な培地組成の検討を行った。結果を図 2 に示した。

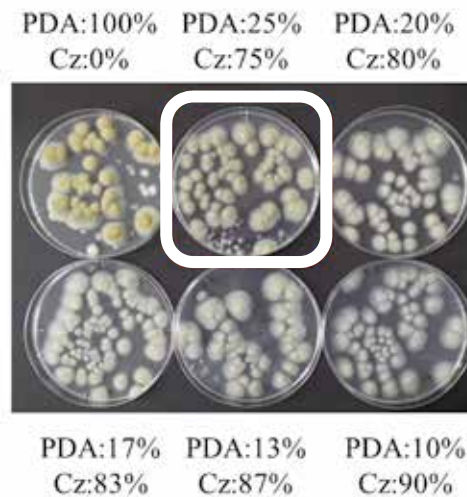


図 2 配合比率を変えた培地での孢子形成

培養期間および孢子形成の程度を総合的に判断し、「PDA 培地 : Cz 培地 = 25 : 75」を選抜培地として使用することにした。

次に、孢子形成が適度に起こる選抜培地を用い、孢子形成能が向上した株の選抜を行った。結果を図 3 に示した。

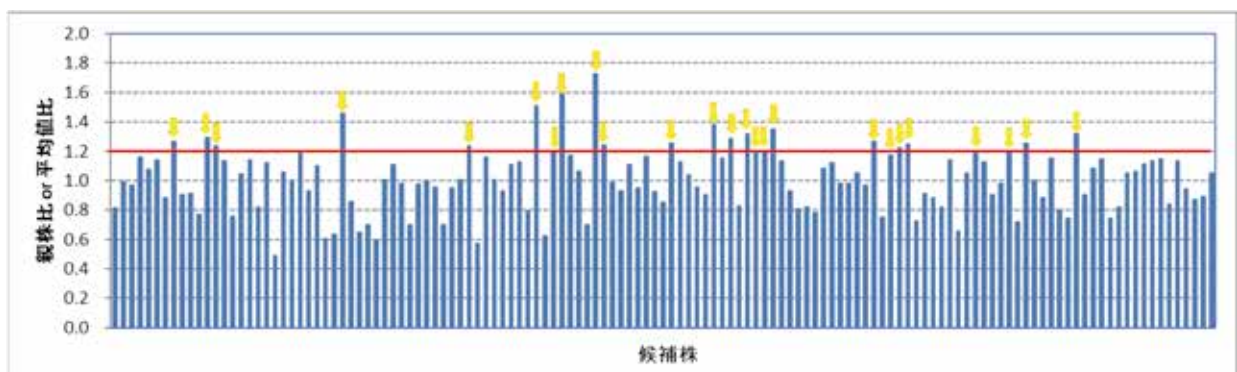


図 3 選抜した候補株の孢子形成能 (↓ : 孢子形成能が 1.2 倍以上であった候補株)

図3のとおり、目視選抜株139株から、孢子形成能が向上した可能性のある候補株を25株取得できた（SPシリーズ）。

2. 種麴製造モデルによるスーパーあめこうじ用麴菌株の選抜

1. で選抜された麴菌候補株を種麴製造モデル試験（米原料20g）に供し、孢子着生量（収量）と麴増殖速度を指標として二次選抜を行った（LTシリーズ：20株中8株を二次選抜へ移行、SPシリーズ：25株中24株を二次選抜へ移行）。結果を表2に示した。

表2 麴菌候補株の種麴製造モデル試験結果

候補株リスト	孢子着生 (目視)	増殖 (ハゼ)	候補株リスト	孢子着生 (目視)	増殖 (ハゼ)
SP-1		僅か早	SP-17		僅か早
SP-2	微増	僅か早	SP-18	微増	僅か早
SP-3	微増	僅か早	SP-19	微増	僅か早
SP-4		僅か早	SP-20		僅か早
SP-5		僅か早	SP-21		僅か早
SP-6	微増	僅か早	SP-22	微増	僅か早
SP-7		僅か早	SP-23		僅か早
SP-8	微増	僅か早	SP-24	微増	僅か早
SP-9		僅か早	LT-1	微増	僅か早
SP-10	微増	僅か早	LT-2		僅か早
SP-11		僅か早	LT-3		僅か早
SP-12	微増	僅か早	LT-4	微増	僅か早
SP-13		僅か早	LT-5		僅か早
SP-14		僅か早	LT-6		僅か早
SP-15	微増	僅か早	LT-7		僅か早
SP-16		僅か早	LT-8		僅か早

表2の通り、僅かではあるが親株より増殖がよく、且つ孢子着生の良い候補株が13株（SP-2, 3, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 19, 22, 24 & LT-1, 4）得られた（二次選抜株）。

3. 候補株の実用性評価方法の確立

3-1) 候補株の孢子形成能の評価

孢子形成能が向上した可能性のある株の実用性を客観的に評価するため、「2. 種麴製造モデルによるスーパーあめこうじ用麴菌株の選抜」で作成した種麴に含まれる孢子数を測定した。結果を表3に示した。

表3 候補株の種麩1gあたりの相対孢子量

候補株リスト	相対孢子量 (%)	候補株リスト	相対孢子量 (%)
SP-1	29.9	SP-17	50.7
SP-2	38.9	SP-18	90.7
SP-3	44.9	SP-19	69.8
SP-4	40.7	SP-20	59.6
SP-5	32.5	SP-21	43.0
SP-6	39.2	SP-22	54.7
SP-7	56.3	SP-23	67.0
SP-8	38.5	SP-24	59.8
SP-9	46.7	LT-1	54.4
SP-10	32.6	LT-2	39.0
SP-11	43.8	LT-3	48.1
SP-12	43.8	LT-4	46.9
SP-13	47.3	LT-5	51.3
SP-14	48.5	LT-6	61.1
SP-15	34.7	LT-7	56.6
SP-16	47.9	LT-8	47.1

CK33株の相対孢子量の最大値は47.2%（4ロット中）であったことから、候補株の相対孢子量が56%以上であれば孢子形成能が1.2倍向上した可能性があると考えられる。つまり、SP-7、SP-18、SP-19、SP-20、SP-23、SP-24、LT-6、LT-7の8株で孢子形成能が向上している可能性が考えられた。

3-2) 米麩での生育性評価方法の検討

米麩での麩菌の生育性を間接的に評価する手段として、製麩中の品温経過（麩菌の生育⇨発熱）測定を行い、評価方法としての利用可能性を検討した。製麩には孢子形成能が異なるLT-6、LT-7、およびLT-8の3種類を用いた。結果を図4に示した。

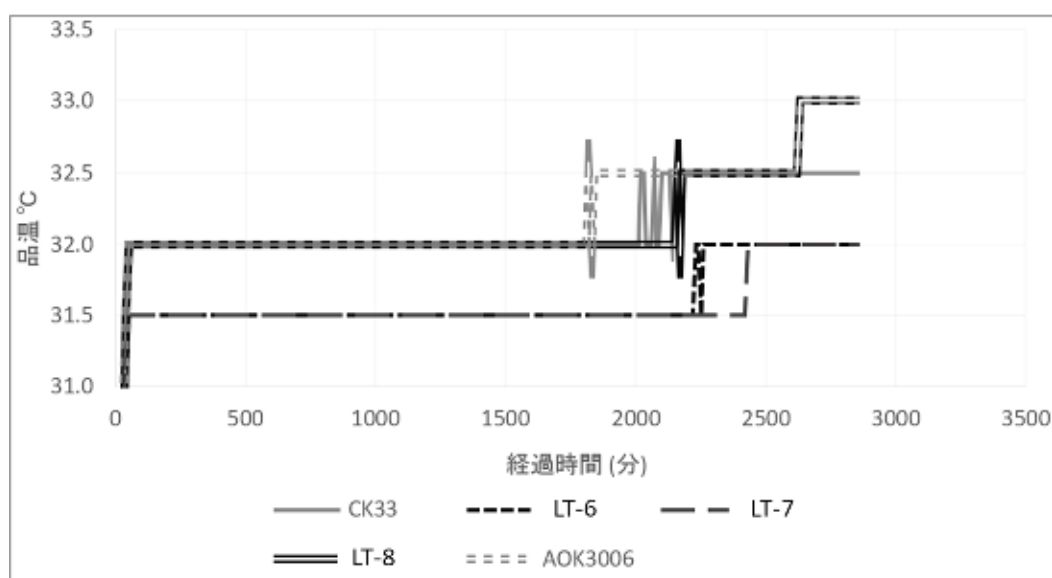


図4 製麩中の品温経過

予想通り品温上昇するタイミングが最も早かったのが AOK3006 株で、CK33 株はそれよりも遅れて品温の立ち上がりが見られた (図 4)。候補株に関しては、LT-6、LT-7 の 2 株は CK33 株よりも品温の立ち上がりが悪かったが、LT-8 株は AOK3006 株と同様に製麴終了間際の品温上昇が確認された。これらの結果は、温度データロガーを用いて製麴中の品温経過を測定することで、候補株ごとの品温上昇の差異、つまり米麴での生育性の良し悪しが評価可能であることを示していた。

4. 現場レベルの種麴製造試験および米麴での酵素活性評価

4-1) 種麴製造試験に供する候補株の選抜

「2. 種麴製造モデルによるスーパーあめこうじ用麴菌株の選抜」において選抜された二次選抜株 8 株を、スケールアップした種麴製造試験 (米原料 200g) に供し、孢子着生および増殖性が良好な候補株を 3 株選抜した (SP-6、SP-12、SP-19 の 3 株; 原株作成用の候補株として三次選抜)。3 株の三次選抜株のうち、SP-19 株は「3. 候補株の実用性評価方法の確立」において、相対孢子量が AOK3006 株に対して約 70%と高い値を示したことから、SP-19 株を現場レベルの種麴製造試験に供する菌株として選抜した。

4-2) 選抜株の種麴製造試験

実製造レベルに近い 120kg 規模での種麴製造試験を、SP-19 株を用いて実施した。結果を表 4 に示した。

表 4 選抜株 (SP-19) の種麴生産収量

種麴製造試験株	孢子収量 (g / 120 kg)	生育速度 (ハゼまわり)
CK33 (対照)	2040	—
SP-19	2360	ほぼ同等

表 4 の通り、生育速度は対照である CK33 株とほぼ同程度であったが、孢子生産収量は CK33 株に比べて約 1.2 倍と、選抜結果と非常に近い値となった。このことから、本報告で実施した選抜方法が、孢子形成量の多い菌株の育種に有効であることが明らかとなった。

4-3) 選抜株の米麴製造試験

「4-2) 選抜株の種麴製造試験」において、SP-19 株を使用することにより種麴生産収量が向上することが明らかとなったが、米麴にした際に親株である CK33 株の特徴を維持しているか否かは未確認であった。そこで、SP-19 株の種麴を用いて製麴を行い、米麴の酵素活性評価を実施した。結果を表 5 に示した。

表 5 選抜株 (SP-19) の酵素活性

試験株	グルコ アミラーゼ	α -アミラーゼ	酸性プロテアーゼ (pH3.0)	チロシナーゼ
CK33 (対照)	1336	3118	11750	0.08
SP-19	1333	3198	10538	0.21

表 5 の通り、親株である CK33 株と選抜株 SP-19 とで酵素活性に大きな違いは見られなかった。チロシナーゼ活性が選抜株の方で若干高くなっているが、米麴の褐変性に影響するほどの値ではないと考えられる。

以上の結果を踏まえると、選抜株である SP-19 株は、CK33 株の特徴はそのままに、孢子生産収量のみが増加した優良株であることが明らかとなった。

5. 今後

- 最終選抜された SP-19 株の使用に加え、製造装置や条件設定の更なる検討を重ね、種麴生産収量の向上（種麴製造コストの削減）を図る。
- 本報告では麴菌の生育速度を目視のみで判断しており（ハゼこみの良し悪し）、生育の良い候補株を見落としている可能性も考えられる。今後は、本報告で確立した「米麴での生育性評価方法」を用いて候補株を再評価し、製造時間短縮に最適化した麴生育の早い麴菌株の開発を継続して行う。

【謝辞】

本研究の一部は、あきた産学官連携未来創造研究事業平成 29 年度あきた創生シーズ展開事業（秋田県）の助成を受けて行われました。

【引用文献】

- 1) 秋田県総合食品研究センター編（2018）あめこうじ, ARIF Letter, Vol.23, 秋田県総合食品研究センター
- 2) Ogasawara H., Obata H., Hata Y., Takahashi S., and Gomi K. (2009) *Crawler*, a novel *Tc1/mariner*-type transposable element in *Aspergillus oryzae* transposes under stress conditions. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 441-449.
- 3) 小笠原博信（2010）麴菌におけるトランスポゾン (*Crawler*) 活性の発見と醸造産業への応用展望, 日本醸造協会誌 **105**, 334-342.
- 4) 小笠原博信、佐々木康子、渡辺隆幸、佐藤勉、瓜生摂、今野宏、高橋砂織（2013）トランスポゾン転移技術を利用した白色麴菌株の育種と発酵食品への応用, 秋田

県総合食品研究センター報告 **15**, 19-28.

- 5) 注釈編集委員会編（1993） 固体こうじ：第4回改訂国税庁所定分析法注解 p211-226, 財団法人日本醸造協会, 東京
- 6) 小笠原博信、高橋仁、今野宏、佐藤勉, 新規麹菌, 特許第 5803009 号, 2015-11-04

世界自然遺産「白神山地」より分離された乳酸菌

「白神サケイ株」の日本酒への利用

木村貴一

(秋田県総合食品研究センター)

Kiichi KIMURA

【要約】

世界自然遺産「白神山地」より、低温増殖性および低温発酵性に優れた日本酒製造に有用な清酒用乳酸菌の分離選抜を試み、ラクトバシラス サケイ KLB 3138aC 株を取得した。KLB 3138aC 株の諸性質の決定と酒造適性を検討し、「白神サケイ株」として技術移転を行い、清酒の商品化に至ったので報告する。

秋田県山本郡八森町の世界自然遺産「白神山地」緩衝地域より所管官庁の許可を得て採取した温帯落葉広葉樹林帯の腐葉土から乳酸菌を分離した。新規に得られた乳酸菌ラクトバシラス サケイ KLB 3138aC 株は、従来の生酏酒母より分離された同種の NBRC 3541 株に比べて低温で良好な生育を示し、低温にて乳酸を高生産した。また、5%以下のアルコール濃度環境下で良好な生育を示し、マルトース資化性及びメリビオース資化性を失った特殊な糖質資化性を示した。

KLB 3138aC 株に最適な清酒製造法を検討したところ、伝統的な生酏／山麩酒母の温度経過ならびに高温糖化酏における清酒製造法に適性を見いだした。生酏／山麩酒母の野生乳酸菌にかわり KLB 3138aC 株を利用することで、乳酸発酵期間を 0～7 日まで短縮し、酒母期間を 7～15 日とする大幅な短縮を実現した。これにより、高品質で一定した品質の乳酸発酵酒母を計画的に製造出来るようになり、設備利用効率や作業効率の向上および省力化が実現できた。

【緒言】

品質の良い日本酒を安全に醸造する上で、乳酸の存在意義は大きい¹⁾。乳酸は雑菌の生育を抑制し、酵母が健全なアルコール発酵を行うための環境を整えている。自然界に存在する野生乳酸菌による乳酸発酵で生成した乳酸を利用する酒母の製造法として、生酏酒母や山麩酒母が代表的かつ伝統的な酒母製造法として知られている。伝統的な生酏／山麩酒母の製造法は、2℃の冷水中に蒸米や米麴を浸漬して 1 日あたり 0.5℃昇温し、3～4 週間の酒母期間を経て、11～12%のアルコールを含む酒母が完成する。伝統的製法はとても優れた製法であるが、酒母期間が約 1 ヶ月と非常に長いことや、野生乳酸菌に依存するため安定した乳酸発酵が難しくなり、乳酸発酵期間が明確

にならず、製造計画が立てにくい。また、酒質の安定が難しいことや、細やかな温度管理が必要で作業が頻雑になり省力化しにくい、近年の暖冬化傾向のため、低温維持にコストがかかるなど、改善できる要素が多く見受けられた。

我々は、酒母製造に優れた適性を有する乳酸菌を酒母に添加することで、高品質な乳酸発酵酒母を安定的、かつ、効率よく製造出来ると考えた。低温環境に強い微生物の分離源として、厳寒期にはマイナス 5℃以下になり、5m 近い積雪となる世界自然遺産「白神山地」の腐葉土を選んだ。選抜した乳酸菌を添加した乳酸発酵酒母によって、酒母期間の短縮と作業の省力化、設備の効率的利用、および、技術移転による商品開発を検討したので報告する。

【実験方法】

1. 乳酸菌の分離源と分離

乳酸菌の分離源として、秋田県山本郡八森町の世界自然遺産「白神山地」緩衝地域より所管官庁の許可を得て腐葉土を採取した。腐葉土 0.1g を 0.9%の塩化ナトリウムを含む滅菌生理食塩水 5ml に懸濁した後、この懸濁液 1ml を、炭酸カルシウム 0.8%と寒天 1%を加えた Lactobacilli MRS 培地 (Difco 社製) 20ml の組成からなる MRS 寒天培地で混釈培養を行い、30℃で 3 日間培養し純粋に分離した。各菌体は MRS 液体培地にて 30℃で 18 時間培養し、終濃度 10%グリセロールとなるように滅菌したグリセロールを混合して、マイナス 80℃にて凍結保存した。

2. 乳酸生成能および低温増殖性に優れた乳酸菌の選抜

分離した乳酸菌から、炭酸カルシウムを含む MRS 寒天培地に対するクリアゾーンの大きさを指標として、高い乳酸産生能を有する乳酸菌を選抜した。

乳酸生成能の高い菌株を MRS 液体培地に各菌体の前培養液を 1/1000 量接種し、4℃で 7 日間培養し、増殖が認められた菌株を低温増殖性があるとして選抜した。

3. 乳酸菌の同定法と菌学的性質の決定

乳酸菌の同定は、16S リボソーム DNA (rDNA) の塩基配列の相同性の解析²⁾、および、API50 CH/CHL(日本ビオメリユー社製)による糖質資化性試験、および、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法³⁾の 3 つの試験にて、微生物の同定と菌学的性質の決定を行った。比較対照として、市販乳酸菌の標準株(Type Strain、末尾に^Tと表記)であるラクトバシラス サケイ JCM 1157^T株およびラクトバシラス カルバタス JCM 1096^T株、ラクトバシラス カゼイ JCM 1134^T株を用いた。標準株ではないが、生酏酒母より分離された市販乳酸菌ラクトバシラス サケイ NBRC 3541 株も用いた

以下、ラクトバシラス サケイを *Lactobacillus sakei*、または *L. sakei* と表記することがある。同様に、ラクトバシラス カルバタスを *Lactobacillus curvatus*、または *L. curvatus*、ラクトバシラス カゼイを *Lactobacillus casei*、または *L. casei* と表記することがある。

4. 清酒製造適性の検討

供試菌株：選抜株の清酒製造適性を検討するにあたり、生酏清酒の酒母を分離源とする市販乳酸菌ラクトバシラス サケイ JCM 1157^T 株およびラクトバシラス サケイ NBRC 3541 株を用いた。乳酸菌株は、いずれも MRS 液体培地にて得られた菌体を遠心分離機にて集菌し、ペレットを滅菌水で3回洗浄したものを使用した。

(1)低温増殖性比較試験：低温増殖性では、MRS 液体培地に各菌体の前培養液を1/1000 量添加し、5℃、10℃、15℃のそれぞれの各温度帯で培養し、経時的にサンプリングを行い、ABS600nm の値を測定して増殖性を調べた。

(2)食塩およびアルコール存在下における増殖性：食塩耐性は 0～8%(w/v)になるように 1%刻みで塩化ナトリウムを加えた Lactobacilli MRS 培地を用いた。アルコール存在下における増殖性は、0～17.5%(w/v)になるように 2.5%刻みで 99.5%エタノールを加えた Lactobacilli MRS 液体培地を用いた。これらの MRS 培地に選抜株の前培養液を 1/1000 量接種し、30℃で 36 時間培養を行い、経時的にサンプリングを行い、ABS600nm の値を測定して増殖性を調べた。

5. 酒母製造試験

モデル水麴及びモデル高温糖化酏の調整：清酒用に製麴した米麴を普通麴とし、これを 95%エタノールに浸漬後乾燥させたアルコール脱水麴の 2 種類の米麴を用いた。麴：蒸米：水=1:1:2 または 1:1:3 または 4:2:5 の割合で混合したモデル水麴を作製した。このモデル水麴を 53℃で 4 時間糖化後、80℃で 2 時間保温して殺菌後、冷却した物をモデル高温糖化酏とした。

モデル水麴またはモデル高温糖化酏には、MRS 液体培地で培養した後、滅菌水で3回洗浄した乳酸菌菌体を添加し、任意の温度で保温して乳酸発酵を行った。また、酸度が 2.5 となった時点で、酒造用酵母「こまち酵母」を終濃度 10^5 cells / ml となるように添加してアルコール発酵を行い、アルコールが 11～12%程度となった時点で発酵を終了し、乳酸発酵酒母とした。

(1)8℃における水麴の酸度変化：モデル水麴に KLB 3138aC 株あるいは NBRC 3541 株を、終濃度 10^6 cells / ml となるように植菌し、実際の酒母に近い温度である 8℃で所定時間静置培養し、低温における乳酸産生の指標として酸度を経時的に測定した。また、できあがった乳酸発酵酒母の官能試験を行った。

(2)乳酸菌菌体添加量と酸度：蒸米と米麴と水を 2:4:5 の割合で混合してモデル水麴とした。モデル水麴に乳酸菌を、終濃度 10^6 cells / ml または、 10^8 cells / ml または、終濃度 10^{10} cells / ml となるように植菌し、実際の酒母に近い温度である 8℃で所定時間静置培養し、低温における乳酸産生の指標として酸度を経時的に測定した。また、できあがった乳酸発酵酒母の官能試験を行った。酵母添加時期を計る酸度として、酸度 1.8～2.5 の範囲を目標とした。

(3)8℃における乳酸発酵酒母製造試験：普通麴またはアルコール脱水麴を水麴として使用した。乳酸菌を終濃度 10^6 cells / ml となるように添加し、8℃にて乳酸発酵を行

った。酸度 2.5 に到達後、酵母を添加し、15℃でアルコール濃度 11～12%まで発酵を行い、乳酸発酵酒母とした。乳酸菌非添加区には醸造用乳酸を加え、酸度 2.5 とした。

乳酸発酵酒母の有機酸を有機酸アナライザーで分析した。また、酸度、アミノ酸度、グルコース、日本酒度などの諸成分を測定した。

6. 清酒製造場への技術移転および商品化

得られた情報を元に技術移転を行った。各清酒製造場毎に最適な乳酸発酵酒母製造法の検討を行い、商品化を行った。

【結果と考察】

1. 乳酸菌の分離源と分離

白神山地由来の乳酸菌を含む酸生産菌として、3,400 株を取得した。我々は過去に世界自然遺産「白神山地」より、パン用酵母「白神こだま酵母」⁴⁾や漬物用乳酸菌「作々楽」⁵⁾を分離選抜し、実用化してきた。白神山地由来の微生物は、生存競争に打ち勝つなにかしらの特徴的な性質を有している事が経験的にわかっていた。具体的には、他の環境由来の同種の微生物と比較して、増殖速度が早く、低温増殖性に優れている傾向がある。

2. 乳酸生成能および低温増殖性に優れた乳酸菌の選抜

高い乳酸産生能を有する乳酸菌として 8 株を選抜した。この 8 株を 4℃で 7 日間培養した結果、KLB 3138aC 株に増殖が認められた。この 1 株を低温増殖性があるとして選抜した。

3. 乳酸菌の同定と菌学的性質

選抜株 KLB 3138aC 株の同定を行った。16S rDNA の塩基配列相同性解析の結果を表 1 に示した。その結果、ラクトバシラス サケイ(*Lactobacillus sakei*、または *L. sakei*) の標準株である JCM 1157^T 株と 98.7%の相同性を示した。また、サケイ株の NBRC 3541 株とは 99.7%の高い相同性を示した。標準株と 95%以上の相同性を示したことから、KLB 3138aC 株は、ラクトバシラス サケイに属すると推定された。

糖質資化性試験の結果を表 2 に示した。KLB 3138aC 株はマンニトール及びメリビオースの両方を資化しなかった。糖質資化性は乳酸菌の同定に重要な意義を持つ。特にラクトバシラス サケイとラクトバシラス カルバタス及びラクトバシラス カゼイの分類にはマンニトール及びメリビオース発酵性が重要視される。表 3 に示したとおり、ラクトバシラス サケイはメリビオース発酵性を有し、マンニトールは発酵しない。ラクトバシラス カゼイはマンニトール発酵性を有し、メリビオースは発酵しない。ラクトバシラス カルバタスはメリビオースとマンニトールの両方を発酵しない。

KLB 3138aC 株はマンニトール及びメリビオースの両方を発酵しないため、ラクト

バシラス カルバタスに属する乳酸菌の可能性が示唆された。しかしながら、糖質発酵性試験の結果をラクトバシラス サケイ NBRC 3541 株と比べるとマルトース及びメリビオースの発酵性を失っている点を除いて一致したが、ラクトバシラス カルバタスやラクトバシラス カゼイとはほとんど一致しなかった。故に本乳酸菌 KLB 3138aC 株はメリビオース発酵性を失ったラクトバシラス サケイに属する菌株であると推定された。KLB 3138aC 株は NBRC3541 株とほぼ同等の糖質発酵性を示したことから、標準株 JCM 1157 株に比べて NBRC 3541 株と近縁である可能性が考えられた。

また、清酒製造において、マルトース資化性は重要な要素となる。ラクトバシラス サケイに属する一般的な菌株はマルトースを資化できるが、KLB 3138aC 株はマルトースを資化できない。そこで、マルトオリゴ糖を用いて発酵性を確認したところ、表 4 に示したように KLB 3138aC 株はマルトース以上のオリゴ糖を資化できないことがわかった。マルトースはふくらみのある甘みを呈し、マルトオリゴ糖類は食品にテリやコクを与える。KLB 3138aC 株はマルトース発酵性を持たないことから、従来のラクトバシラス サケイを利用した発酵食品に比べ特徴的な甘みを有するマルトースをより多く含んだ食品になる可能性が示唆された。

乳酸菌を同定するにあたり、16S rDNA 塩基配列相同性比較試験や糖質資化性試験は、菌種の「推定」である。そこで、KLB 3138aC 株を同定するために、DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験を行った。その結果、表 5 に示したとおり、ラクトバシラス サケイの標準株である JCM 1157^T 株と 70%以上のハイブリッドを形成したが、ラクトバシラス カルバタスを含む他の乳酸菌株とは 50%以下のハイブリッド形成率であった。

以上の結果より、ラクトバシラス サケイ JCM 1157^T 株と 70%以上のハイブリッドを形成したこと、16S rDNA の塩基配列相同性解析の結果、JCM 1157^T 株と 98.7%の相同性を示したこと、糖質の発酵性がラクトバシラス サケイ NBRC 3541 株と比べてマルトース及びメリビオースの発酵性を失っている点を除いて一致したこと等の性質から、本乳酸菌はラクトバシラス サケイに属する菌株であると同定した。

しかしながら、16S rDNA において 100%の相同性を示さず、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法においても 100%のハイブリッドを形成しないことや、糖質発酵性においてラクトバシラス サケイの決定要因であるメリビオース発酵性を有しないことから、公知菌とは明らかに異なる新規な菌株と認め、本菌をラクトバシラス サケイ KLB 3138aC 株と命名し、特許微生物許諾申請を行い、特許出願を行った。

表1 16S rDNA塩基配列相同性比較

	16S rDNA
<i>L. sakei</i> JCM 1157	98.7% (1439bp)
<i>L. sakei</i> NBRC 3541	99.7% (1434bp)

表2 糖質資化性試験

	KLB 3138aC	NBRC 3541	JCM 1157 ^T	JCM 1096 ^T	JCM 1134 ^T		KLB 3138aC	NBRC 3541	JCM 1157 ^T	JCM 1096 ^T	JCM 1134 ^T
Glycerol	-	-	-	-	-	Esculine	+	+	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-	-	Salicine	+	±	-	-	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	Cellulose	+	+	-	+	+
L-Arabinose	+	+	+	-	-	Maltose	-	+	+	+	-
Ribose	+	+	+	+	-	Lactose	±	+	±	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	-	Melibiose	-	+	+	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	Saccharose	±	+	+	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	Trehalose	+	+	+	-	+
β-Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	Inuline	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	Melezitose	-	-	-	-	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	D-Raffinose	-	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	Amidon	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	Glycogene	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	Xylitol	-	-	-	-	-
Rhamnose	±	+	±	-	-	β-Gentiobiose	+	+	+	-	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	D-Turanose	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	+	D-Tagatose	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	D-Fucose	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	-	-	-	-	L-Rucose	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-	-	-
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	L-Arabitol	-	-	-	-	-
Amygdaline	-	-	-	-	+	Gluconate	±	±	±	-	±
Arbutine	-	-	-	-	+	2 ceto-gluconate	-	-	-	-	-
						5 ceto-gluconate	-	-	-	-	-

表3 糖質資化性の比較

	Mannitol	Melibiose
<i>L. sakei</i> JCM 1157	-	+
<i>L. casei</i> JCM 1134	+	-
<i>L. curvatus</i> JCM 1096	-	-
KLB 3138aC	-	-

表4 マルトース資化性試験

	Glucose	Maltose	Malto-triose	Malto-tetraose	Isomalto oligo-saccharides
KLB 3138aC	+	-	-	-	-
<i>L. sakei</i> JCM 1157	+	+	-	-	±
<i>L. sakei</i> NBRC 3541	+	+	-	-	-

表5 DNA-DNAハイブリダイゼーション

	ハイブリッド形成率
<i>L. sakei</i> JCM 1157	87.6%
<i>L. casei</i> JCM 1134	8.15%
<i>L. curvatus</i> JCM 1096	27.5%

4. 清酒製造適性の検討

(1)低温増殖性比較試験：低温増殖性試験結果を図1~3に示した。いずれの温度帯においてもKLB 3138aC株は生酏清酒より分離されたNBRC 3541株よりも優れた低温増殖性を示した。また、標準株であるJCM 1157^T株は、低温増殖性が劣ることがわかった。

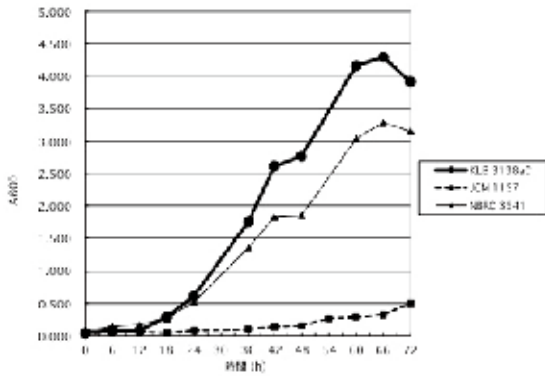


図1 5°Cにおける増殖曲線

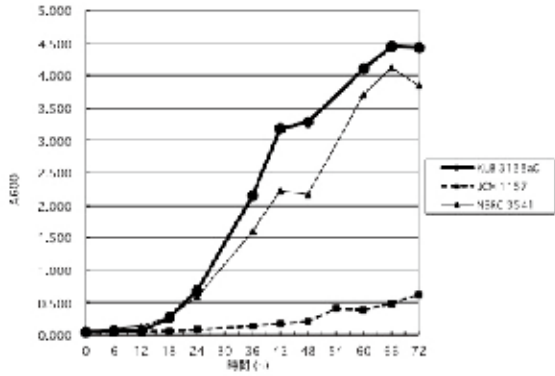


図2 10°Cにおける増殖曲線

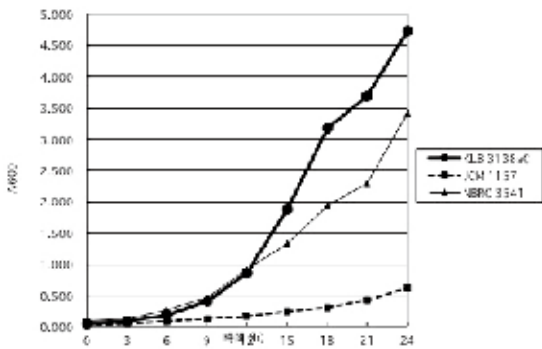


図3 15°Cにおける増殖曲線

(2)食塩およびアルコール存在下における増殖性：食塩存在下における増殖性を図4に、アルコール存在下における増殖性を図5に示した。その結果、KLB 3138aC株は食塩濃度5%、アルコール濃度5%まで良好に生育することがわかった。また、図には示されていないが、培養開始後96時間以降では、食塩濃度8%及びアルコール濃度7.5%において生育をわずかに確認した。この結果より、本乳酸菌を利用した高含塩発酵食品への利用が可能だと認められた。また、アルコール濃度7.5%における生育は非常に悪いことから、腐造性乳酸菌の可能性は少なく、酒母における腐造の可能性を否定できた。

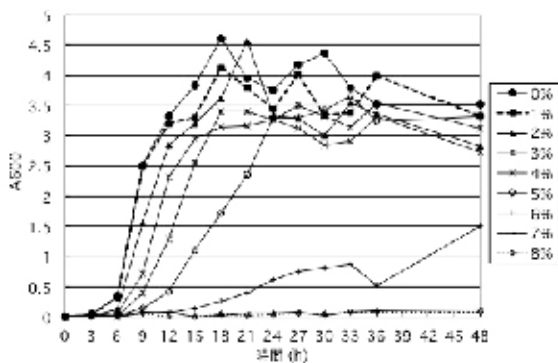


図4 KLB 3138aC株の増殖に及ぼす食塩濃度の影響

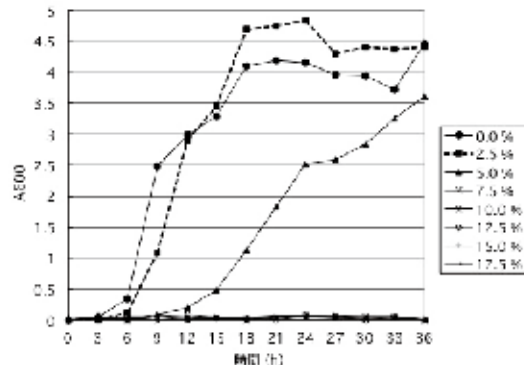


図5 KLB 3138aC株の増殖に及ぼすアルコール濃度の影響

5. 酒母製造試験

(1) 8°Cにおける水麴の酸度変化: 結果を図6に示した。モデル水麴を用いて8°Cで低温培養した場合、KLB 3138aC株はNBRC 3541株に比べて良好な乳酸産生能を示した。一般に清酒酵母が選択的に増殖を始める酸度である酸度2.5を目標とした場合、KLB 3138aC株はNBRC 3541株に比べて4日早い7日で到達した。故に、酒母製造時に本乳酸菌を添加することで従来菌を添加した場合よりも酒母期間の大幅な短縮が可能となる。さらに、本乳酸菌を用いた乳酸発酵酒母からジアセチルの発生は官能的に認められず、乳酸菌の菌臭などもなく、マルトースに由来するふくらみある甘みを有する非常に高品質な乳酸発酵酒母ができた。

(2) 乳酸菌菌体添加量と酸度: 結果を図7に示した。本乳酸菌を終濃度 10^{10} cells/ml添加した場合、培養2日目で酸度3を超えたことから、培養1日目の酸度は1.8~2.3と予想された。この結果より、本乳酸菌添加後培養1日目に酵母添加が適当であるとわかった。さらに、乳酸菌と酵母の同時添加が可能であると思われた。同様に、本乳酸菌を終濃度 10^8 cells/ml添加した場合の酵母添加時期は、乳酸菌培養開始後4~5日目、終濃度 10^6 cells/ml添加した場合の酵母添加時期は、乳酸菌培養開始後6~7日目に酵母添加すればよいことがわかった。これらの結果から、従来の生酏/山麴酒母に必要であった7~14日間の乳酸発酵期間を、酒母期間短縮を目的とした従来技術のように仕込み温度を高温にするといった特別な操作を行わずとも、通常のスラッシュ酒母と同程度の品温経過で生酏酒母又は山麴酒母の乳酸発酵期間を1~7日で育成することができた。さらに、酵母と同時添加することで乳酸発酵期間を0日とすることが可能と考えられた。

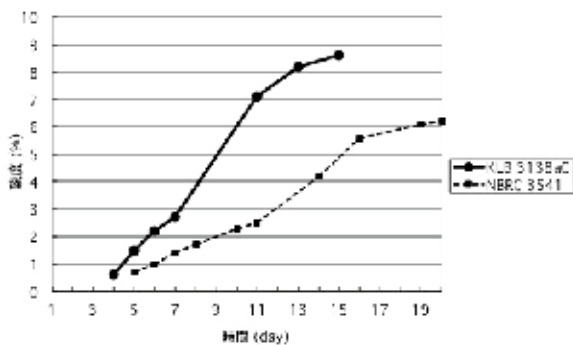


図6 8°Cにおける水麴酸度の経時変化

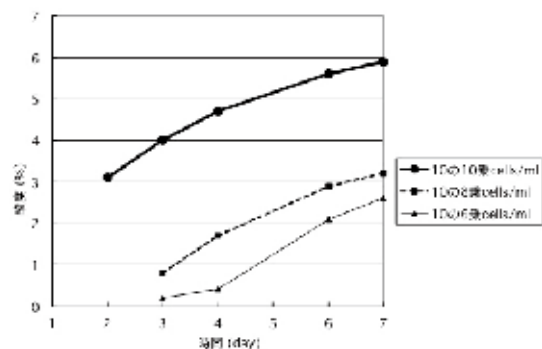


図7 乳酸菌菌体添加量と酸度の経時変化

(3) 8°Cにおける乳酸発酵酒母製造試験: 乳酸発酵酒母の酸度変化を図8に示した。8°Cにおいて、KLB 3138aC株は高い酸生産性を示し、NBRC 3541株に比べて、乳酸発酵期間を4日短縮し、アルコール発酵を含めた酒母日数として、5日短縮できた。この結果から、KLB 3138aC株の添加および乳酸発酵は、酵母のアルコール発酵に悪い影響を与えないことがわかった。

得られた乳酸発酵酒母の有機酸組成を図 9 に、諸成分組成を表 6 に示した。KLB 3138aC 株による酒母の有機酸組成は、乳酸が有意に多く、酒母使用時には、NBRC 3541 株による乳酸発酵酒母に比べて乳酸が約 1.5 倍多い事がわかった。乳酸以外の有機酸については特に差が認められなかった。

酒母の諸成分としては酸度と酒母期間の他は有意差を認められないが、日本酒度が比較的高くなった。これは、マルトース資化性と関連しており、酒母中にマルトース以上のオリゴ糖が多く残っているためと考えられた。

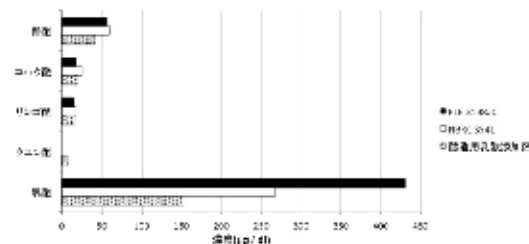
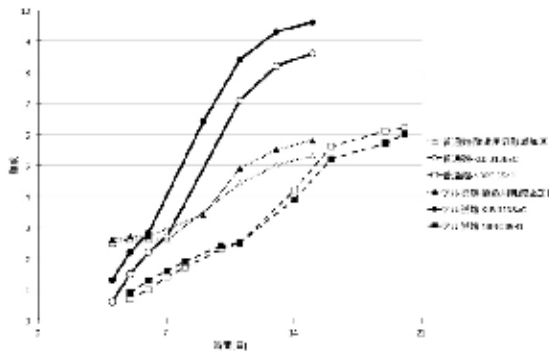


図 8 乳酸発酵酒母の酸度の経時変化

図 9 酒母使用時の有機酸組成

表6 乳酸発酵酒母の諸成分組成

麹	酵母添加日	酒母日数 (日)	日本酒度	アルコール (%)	アミノ酸度	酸度	グルコース (%)	
KLB 3138aC	普通	7日目	15	-16	11.05	2.6	8.6	3.1
NBRC 3541	普通	11日目	20	-9.3	12.15	2.6	6.2	2.5
醸造用乳酸添加区	普通	7日目	15	-20.8	11.1	1.5	5.3	3.4
KLB 3138aC	アル脱	6日目	15	-41.8	13.4	2.4	9.6	3.4
NBRC 3541	アル脱	11日目	20	-25.3	13.25	2.6	6	4.6
醸造用乳酸添加区	アル脱	6日目	15	-30.8	12.45	1.4	5.8	5.1

アル脱糖：アルコール脱水糖

6. 清酒製造場への技術移転および商品化

乳酸菌を添加する乳酸発酵酒母は、伝統的な生酏／山廃酒母の製造法と比較すると、非常に合理的な製造法と言える。伝統的製法に見られる野生乳酸菌による乳酸発酵酒母に比べて安全かつ確実に乳酸発酵を行える。また、8℃一定の簡便な温度管理でよく、厳格な温度管理から解放され、省力化が見込める。さらに、伝統的製法では亜硝酸菌の生育期間なども必要であり、21 日以上を要していた乳酸発酵期間を大幅に短縮でき、亜硝酸菌などの発酵期間を必要としないため、設備使用の効率化が見込め、製造計画が立てやすくなる。

さらに、KLB 3138aC 株を用いた乳酸発酵酒母は、既知の酒母由来乳酸菌 NBRC 3541 株による乳酸発酵酒母に比べて乳酸発酵期間および酒母期間の短縮が実現され、有機酸組成は乳酸のみが特異的に増加すること、アルコール発酵に影響を与えないことがわかった。風味に与える効果としては、より多量の乳酸による酸味と、マルトース以

上のマルトオリゴ糖類がより多く残存することから、既存製品にない特徴的な酒質となり、製品の差別化が可能である。

これらの特徴から技術移転を行った。各清酒製造場毎に最適な乳酸発酵酒母製造法の検討を行った結果、平成 28 年から岐阜県の蔵元、株式会社林本店より「百十郎 白炎」として商品化(写真 1)された。



写真 1 百十郎「白炎」

【謝辞】

本研究にあたり、土壌採取にご協力頂いた高橋慶太郎氏(現秋田総合科学研究センター)、生酏清酒製造技術をアドバイスして頂いた当センター醸造試験場酒類グループ大野剛主任研究員、乳酸発酵酒母の成分分析にご協力頂いた木村葉子氏(旧姓新野、元当センター臨時職員、現宮城県保健環境センター)、官能評価にご協力頂いた酒類グループの皆様へ感謝いたします。また、商品化にご尽力頂いた(株)林本店の佐藤俊二製造本部長、林里榮子社長に感謝いたします。

【引用文献】

- 1) 木村貴一、高橋慶太郎、大野剛、新野葉子、乳酸菌ラクトバシラス・サケイ株、飲料製造方法、食品製造方法、漬け床製造方法、製パン改質原料製造方法 特許 504476 号
- 2) Mori K., Yamazaki K., Ishiyama T., Katsumata M., Kobayashi K., Kawai Y., Inoue N., and Shinano H. (1997) Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 54-57
- 3) Ezaki T., Hashimoto Y., Takeuchi N., Yamamoto H., Liu S-L., Miura H., Matsui K., and Yabuuchi E. (1988) Simple genetic method to identify Viridans group Streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1708-1713

- 4) 小玉健吉、高橋慶太郎、酵母、冷凍パン生地、乾燥パン酵母、発酵食品、含塩発酵食品及び発酵食品製造方法 特許第 99518 号
- 5) 木村貴一、低温で良好な生育を示し、ナイシンを高生産する糖質資化性に優れ γ -アミノ酪酸を生産する新規乳酸菌および γ -アミノ酪酸高生産法と酒類の火落ち防止技術等への利用 特許 4041850 号

畜産飼料用低温発酵性乳酸菌の分離選抜と特性解明

木村貴一

(秋田県総合食品研究センター)

Kiichi KIMURA

【要約】

冬期間の安価かつ安全な乳牛用発酵飼料の提供を目的として、秋田県畜産試験場および秋田十條化成株式会社と共同研究を実施し、低温環境下で発酵飼料製造に適した乳酸菌の分離選抜から発酵飼料の製造、乳牛の嗜好性調査、乳酸菌製剤の開発までを一貫して検討した。当センターは低温環境下で飼料の発酵に優れた適性を有する乳酸菌の分離選抜および特性解明を担当した。

目的を達成するにあたり、選抜する乳酸菌の特性として、a. 低温環境下における発酵性と増殖性に優れた乳酸菌であり、かつ、b. 秋田県産農産未利用資源を利用した発酵 TMR 飼料(Total Mixed Rations:混合飼料)を製造でき、かつ、c. 飼料用イネの発酵性に優れている、といった、3つの特性が求められた。

そこで、畜産試験場内圃場の牧草や飼料作物およびロールバールサイレージを乳酸菌の分離源とし、選抜試験を行った結果、上記3つの特性を兼ね備えたラクトバシラス・カルバタス C5127Di 株(以下、C5127Di 株)を得た。

外気温の平均気温が氷点下となる厳寒期の屋外での、C5127Di 株を使用した実規模発酵 TMR 製造試験では pH 4.58 の発酵飼料となり、良好な発酵飼料の指標とされる pH4.5 以下をわずかに上回ったものの、厳寒期の屋外においても発酵 TMR 飼料製造を実現できることが明らかとなった。さらに、乳酸菌添加量は一般的な使用量の 1/10 量で良く、低コスト化が期待された。C5127Di 株により、北海道と本州の一部を除いたほぼ全国で、良質な発酵飼料の通年製造を実現できると期待される。

【緒言】

秋田県では、畜産飼料用作物の最後の収穫は 11 月下旬頃となる。秋田県畜産試験場のある大仙市では、11 月上旬に平均気温が 10℃以下となり、12 月上旬には平均気温は 0℃を下回る。このような低温環境下で、良好な発酵飼料を短期間に製造出来る、低温発酵性に優れた乳酸菌が求められてきた。

良質な発酵飼料とは、乳酸菌による発酵が進み、乳酸含量が高く、pH 4.0~4.5 の範囲にあるものとされており、酪酸型や酢酸型の発酵をした飼料は劣質とされる¹⁾。カビの発生や劣質な発酵により、飼料を廃棄することも少なくない。特に低温環境下においては乳酸菌が発酵できず、劣質な飼料になるリスクが高い。

牧草・飼料作物などの粗飼料を発酵した畜産飼料をサイレージと呼び、一般的には、

牧草・飼料作物に付着した野生細菌による自然発酵にて調製される。そのため発酵が安定せず、特に低温環境下においては野生乳酸菌が発酵できず、劣質な飼料になりやすい。飼料イネサイレージは、イネの茎が中空構造で空気量が多くなり、嫌気的条件下の保持が難しく、好気性微生物や糸状菌などが良く繁殖する。その結果、乳酸発酵が円滑に進まず酢酸型やアンモニア態窒素が多い劣質な飼料になりやすい。このように、牧草や飼料作物、飼料米や飼料イネなどを安定的に乳酸発酵できる乳酸菌が求められていた。

畜産飼料として広く利用されている混合飼料 TMR は、TMR 素材の輸入依存度が高く、世界的な需要の増加や天候不順により価格が高騰している。そのため、最終製品である乳製品や畜肉の価格高騰に直結している。

一方で、資源循環型社会の構築および環境負荷の低減などの観点から、廃棄される食品や食品製造工程で排出される食品残渣を乳酸発酵した高品質な混合飼料「発酵 TMR 飼料」の利用が検討されている。

このような低・未利用飼料資源には多様な素材や糖質が含まれており、これらを良好に乳酸発酵できる乳酸菌が求められている。

良質な発酵飼料を製造するために、サイレージ発酵スターター乳酸菌製剤が開発され、これまで使用されてきた。しかしながら、寒冷地や高地などの低温環境下での良好な発酵性に着目した乳酸菌製剤はない。

本報では、低温発酵性および低温増殖性に優れた乳酸菌を取得し、低温環境下におけるサイレージや発酵 TMR 飼料の品質改善に効果を認めたので報告する。

【実験方法】

1. 乳酸菌の分離源および分離

乳酸菌を含む酸生産菌の分離源として、秋田県畜産試験場内圃場にて栽培された牧草・飼料作物（牧草としてリードカナリーグラスまたはオーチャードグラス、飼料作物としてトウモロコシを含む）及び、ロールバールサイレージ内の発酵飼料の断片を許可を得て採取し、試料とした。

酸生産菌の分離は、試料の採取後、速やかに行った。試料 1g を滅菌生理食塩水 10ml に懸濁し、この懸濁液 1ml を炭酸カルシウム 0.8% と寒天 1.5% を加えた Lactobacilli MRS 培地に混釈し、30℃で 4 日間培養をした。炭酸カルシウムを溶解してクリアゾーンを形成したコロニーを分離した。

2. 低温増殖性および低温発酵性に優れた乳酸菌の選抜

(1) 低温環境下における増殖性の評価は次の方法で行った。96well 丸底マイクロプレート(岩城硝子社製)に 1well あたり 200 μ l の MRS 液体培地を分注し、1well あたり 5 μ l の前培養液を植菌して行った。

① 1 次スクリーニング：10℃にて 4 日間静置培養し、濁りを生じた well を目視で確認し、低温増殖性有りとして選抜した。

- ② 2次スクリーニング:1次選抜株を6°Cにて7日間静置培養し、濁りを生じた well を目視で確認し、より低温増殖性が良い菌株として選抜した。
- ③ 3次スクリーニング:2次選抜株の8°CにおけるABS=600nmの吸光度の変化を経時的に測定する事で、3次スクリーニングを行った。バイオマイクロプレートリーダーHiTS(品番:HiTS-S, 株式会社サイニクス社製)を用いて8°Cにて7日間振盪培養を行い、経時的にABS=600nmの吸光度を測定した。吸光度変化を増殖性の指標とし、低温増殖性に優れた酸生産菌を選抜した。

(2) 低温環境下における発酵性の評価は、次の方法で行った。低温増殖性に優れた3次選抜株の前培養液を、0.017%のBCP(ブロモクレゾールパープル、pH指示薬)を含むMRS液体培地5mlに1/100量接種して8°Cで3日間培養し、色相の変化を指標にpH低下を確認した。また、色相に変化が認められたものは、pHメーター(堀場製作所社製)にて培養液のpHを計測した。

3. 糖質資化性による分類

糖質資化性は、API50 CH / CHL(日本ビオメリユー社製)を用いて常法に従い検討した。

4. 選抜された乳酸菌の同定

16S リボソームDNA(rDNA)の塩基配列の相同性の解析²⁾、および、API50 CH / CHL(日本ビオメリユー社製)による糖質資化能による分類にて同定した。

5. 乳酸菌の培養法および調整法

筆者は、世界自然遺産白神山地より有用微生物を分離選抜し、食品への利用を検討してきた。生酏清酒製造に最適な乳酸菌として、低温増殖性に優れた乳酸菌ラクトバシラス・サケイ KLB 3138aC 株(以下、KLB 3138aC 株)を分離選抜し、白神サケイ株として実用化している。KLB 3138aC 株は、16種類の糖を乳酸発酵できることがわかっている。

C5127Di 株の低温増殖性を検討するにあたり、KLB 3138aC 株を、比較対照として選んだ。また、競合する先行技術の比較対照として、市販されている飼料イネサイレージ調製用乳酸菌製剤を市販株(以下、市販株)として比較に用いた。

Lactobacilli MRS 培地にて30°Cで18時間静置培養したC5127Di 株及びKLB 3138aC 株を遠心分離機にて集菌し、ペレットを回収した。

市販株については、培地容積の1/1000重量の乳酸菌製剤をLactobacilli MRS 培地に添加し、30°Cで18時間培養後、遠心分離機にて集菌し、ペレットを回収した。

これらのペレットを滅菌生理食塩水で2回洗浄後、 1×10^8 cells / ml となるように滅菌生理食塩水にて懸濁した乳酸菌株を、以降の試験に用いた。

6. 飼料米／飼料用イネを発酵基質とした低温発酵性試験

飼料米／飼料用イネ 100g をビニール袋に計りとり、 1×10^8 cells / ml の各乳酸菌懸濁液を終濃度 1×10^5 cells / g となるように添加し、密閉した。乳酸菌を添加した飼料米／飼料用イネを 4℃ または 6℃ または 8℃ にて 21 日間培養し、pH を測定する事で低温発酵性を測定した。

試験区としては、乳酸菌無添加区、C5127Di 株添加区、KLB 3138aC 株添加区、市販株添加区を用意した。

7. 飼料米／飼料用イネを発酵基質とした 4℃ における発酵期間の決定

飼料米／飼料用イネ 100g をビニール袋に計りとり、 1×10^8 cells / ml の各乳酸菌懸濁液を終濃度 1×10^5 cells / g となるように添加し、密閉した。乳酸菌を添加した飼料米／飼料用イネを 4℃ に保存し、14 日目、21 日目、28 日目の pH を測定する事で低温発酵性を測定した。

試験区としては、乳酸菌無添加区、C5127Di 株添加区、KLB 3138aC 株添加区、市販株添加区を用意した。

8. 飼料米／飼料用イネを発酵基質とした 4℃ における最適添加菌数の決定

飼料米／飼料用イネ 100g をビニール袋に計りとり、 1×10^8 cells / ml の各乳酸菌懸濁液を、終濃度 1×10^4 cells / g、 1×10^5 cells / g、または 1×10^6 cells / g となるようにそれぞれ添加し、密閉した。乳酸菌を添加した飼料米／飼料用イネを 4℃ に保存し 21 日目の pH を測定する事で最適添加菌数を検討した。

9. TMR 原料を基質とした、小規模サイレージにおける低温発酵試験

TMR 素材として、重量で乾草 32.1%、おから 47.8%、糖蜜 2.0%、水分 60% となるように混合した TMR 原料を調製した。この TMR 原料 100g をビニール袋に計りとり、 1×10^8 cells / ml の各乳酸菌懸濁液を、終濃度 1×10^5 cells / g となるように添加し、密閉した。乳酸菌を添加した TMR 原料を 4℃ に保存し 21 日目の pH を測定する事で発酵 TMR 適性を検討した。この試験は 3 連で行い、その平均値を結果とした。

10. TMR 原料を基質とした、晩秋から初冬における実規模サイレージ低温発酵試験

実規模での乳酸発酵 TMR の製造試験を行った。通常の TMR は輸入飼料である配合飼料とビートパルプにデントコーンサイレージやロールバールサイレージを混ぜて調製される。本試験では、食品残渣の利用に関して、配合飼料及びビートパルプの使用量を減らし、国産食品残渣への置き換えを検討した。

TMR 配合成分と配分を、表 1 に示した。要求される栄養成分のうち、配合飼料とビートパルプの栄養素を生おからと酒粕に置き換えた。

表 1 の通りの重量配分にある TMR 原料 1000kg に対して 1×10^9 個 cell / ml を含

む乳酸菌培養液を 1 リットル添加し、常法に従いロールベールサイレージとして 2014 年 10 月 1 日（以下、秋期と表記）と 2014 年 11 月 28 日（以下、厳寒期と表記）に調製し、屋外にて保管および発酵した。また、C5127Di 株と KLB 3138aC 株の培養液を混合して添加した混合培養物も用意した。30 日目のロールベールサイレージを開封し、pH を測定する事で実規模発酵 TMR 適性を検討した。

また、通常の Lactobacilli MRS 培地は動物由来成分を含んでいるため、飼料に添加することが出来ない。そのため、動物由来成分を排除した培地にて、培養液を作成し、本試験に使用した。

表 1 TMR 配合成分と配分

トウモロコシ サイレージ (DM 28%)	牧草ロール サイレージ	構成比率 (DM %)				飼料成分			
		配合飼料 (TDN 75, CP 18) パルキー	ビートパルプ	生おから	酒粕	TDN (%)	CP (%)	NDF (%)	水分 (%)
24.6	18.5	32.3	11.8	9.2	3.6	72.0	16.1	37.6	52.9

※DM:乾物量、TDN:可消化養分総量、CP:粗タンパク質、NDF:中性デタージェント繊維

11. 実規模製造試験で得た発酵 TMR の官能評価および乳牛の嗜好性調査

実規模製造試験で得た発酵 TMR の官能評価を香りを中心に行った。また、実際に乳牛に与え、食いつきや臨床症状の確認を行った。

【結果と考察】

1. 乳酸菌の分離源および分離

牧草・飼料作物などの試料採取を 6 度行った。集めた試料 172 点から、酸生産菌として 1,562 株を得た。多くの酸生産菌を分離できたことから、牧草や飼料作物は乳酸菌の優秀な分離源と考えられた。また、これらの乳酸菌は、牧草や飼料作物に対して、高い発酵能を持つことが期待された。

2. 低温増殖性および低温発酵性に優れた乳酸菌の選抜

(1) 低温環境下における増殖性の検討

- ① 1 次スクリーニング：酸生産菌 1,562 株から、10℃における増殖性を有する酸生産菌の選抜を行った結果、1 次選抜株として 300 株を得た。
- ② 2 次スクリーニング：1 次選抜株 300 株から、6℃における増殖性を有する酸生産菌の選抜を行った結果、2 次選抜株として 14 株を得た。
- ③ 3 次スクリーニング：2 次選抜株 14 株の 8℃における増殖性を有する酸生産菌の選抜を行った。8℃における吸光度の変化を増殖曲線として図 1 に示した。低温増殖性に優れた酸生産菌として、ABS=600nm の値が 1.1 未満の 5 株（点線で記した）を除外し、ABS=600nm の値が 1.1 以上の 9 株（実線で記した）を得た。この 9 株を 3 次選抜株とした。

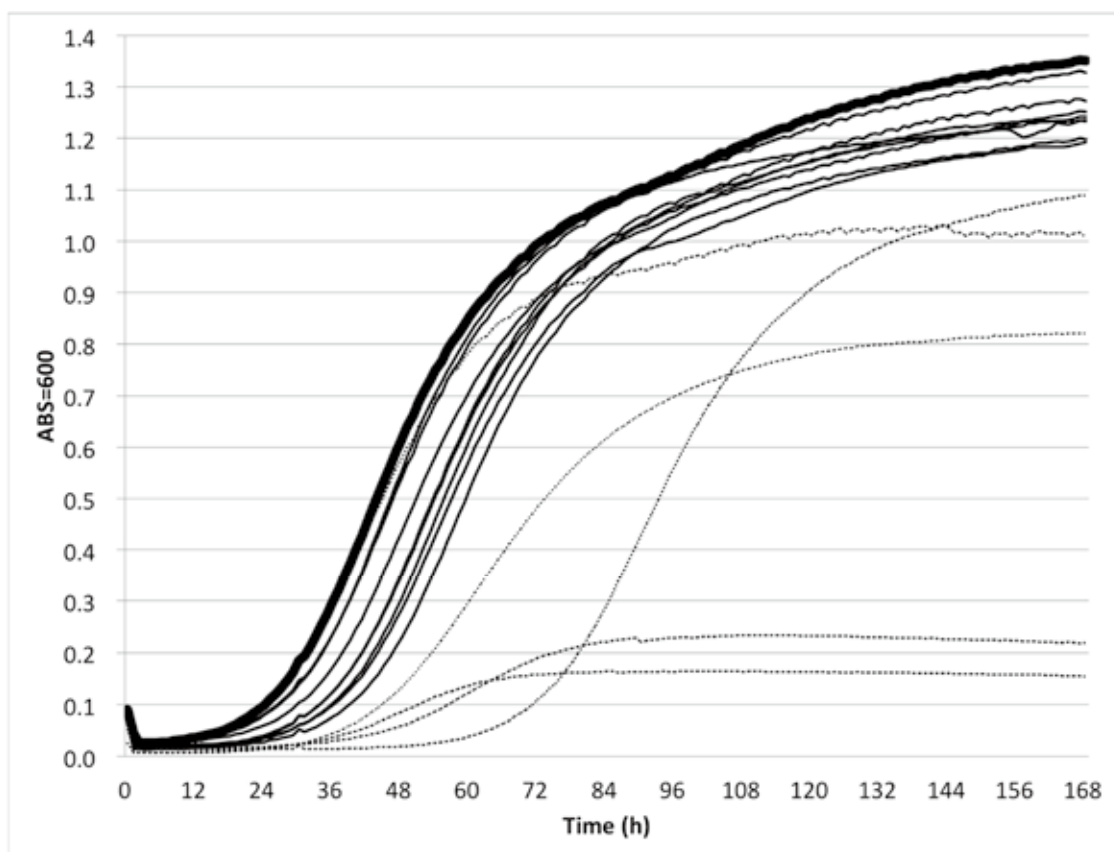


図1 2次選抜株の8°Cにおける増殖曲線

選抜株である C5127Di 株の増殖曲線を、太い実線で記した。

(2) 低温環境下における発酵性の検討

低温増殖性に優れた3次選抜株9株は、すべての菌株で8°Cで3日以内に色相が変化した。これにより、9株は何れも優れた低温発酵性を有する事がわかった。8°CにおけるMRS液体培地のpHを測定したところ、1株のみpH 4.27であったが、その他8株についてはpH 3.94~4.03の範囲であった。

3. 糖質資化性に優れた乳酸菌の選抜

3次選抜株9株の糖質資化性を、API50 CH / CHL(日本ビオメリュー社製)を用いて検討したところ、最も多様な20種類の糖質を資化する酸生産菌が2株存在した。そのうち、低温発酵性に優れた1株を選抜した。その他7菌株の糖質資化性は、19~14種類の範囲で認められた。

4. 選抜された乳酸菌の同定

選抜された1株の16S rDNAの塩基配列の相同性を解析した結果、乳酸菌に属する細菌の一種であるラクトバシラス・カルバタスまたはラクトバシラス・サケイと99.9%の相同性を示した。さらに、糖質資化能による分類の結果を表2に示した。糖質資化能による分類の結果、ラクトバシラス・カルバタスの標準株であ

る JCM 1096 株とは異なる糖質資化性を示すこと、且つ、マンニトール及びメリビオースの資化性を有しない特徴から、本菌はラクトバシラス・カルバタスに属する新規な菌株と同定し、菌株番号を C5127Di とした。以下、C5127Di 株と表記する。C5127Di 株の分離源は、オーチャードグラスであった。C5127Di 株の 8℃における増殖曲線を図 1 に太い実線で示した。C5127Di 株は選抜株の中でも 8℃において特に良好な生育を示していた。また、8℃における MRS 液体培地は pH 3.94 であり、低温発酵性に優れていることもわかった。

表 2 C5127Di 株と標準株 JCM 1096 株の糖質資化性比較

	JCM 1096T	C5127Di		JCM 1096T	C5127Di
グリセロール	-	-	サリシン	-	+
エリスリトール	-	-	セロビオース	+	+
D-アラビノース	-	-	マルトース	+	+
L-アラビノース	-	+	ラクトース	+	+
リボース	+	+	メリビオース	-	-
D-キシロース	-	+	サッカロース	-	-
L-キシロース	-	-	トレハロース	-	+
アドニトール	-	-	イヌリン	-	-
β-メチル-キシロシド	-	-	メレジトース	-	+
ガラクトース	+	+	D-ラフィノース	-	-
D-グルコース	+	+	アミドン	-	-
D-フルクトース	+	+	グリコゲン	-	-
D-マンノース	+	+	キシリトール	-	-
L-ソルボース	-	-	β-ゲンチオピオース	-	+
ラムノース	-	-	D-ツラノース	-	-
ズルシトール	-	-	D-リグゾース	-	-
イノシトール	-	-	D-タガトース	-	+
マンニトール	-	-	D-フコース	-	-
ソルビトール	-	-	L-ルコース	-	-
α-メチル-D-マンノシド	-	-	D-アラビトール	-	-
α-メチル-D-グルコシド	-	-	L-アラビトール	-	-
N-アセチルグルコサミン	+	+	グルコネート	-	+
アミグダリン	-	+	2ケトグルコネート	-	-
アルブチン	-	+	5ケトグルコネート	-	-
エスクリン	+	+			

5. 飼料米／飼料用イネを発酵基質とした低温発酵性試験

試験開始時の飼料米／飼料用イネの pH は 6.8 であった。各温度にて 21 日間培養した pH の測定値を、図 2 に示した。4℃および 6℃といった低温環境下では、C5127Di 株は飼料米／飼料用イネの発酵において特に優れた能力を持つことがわかった。

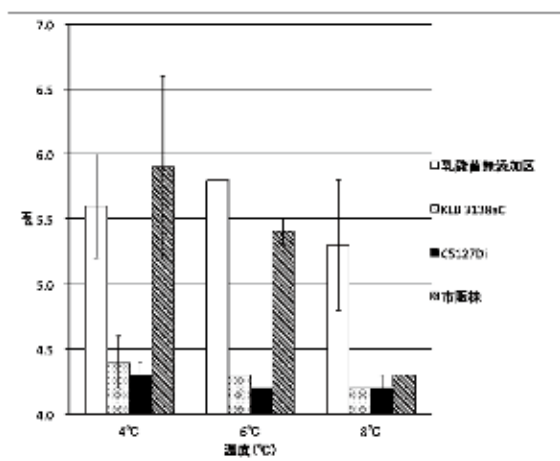


図2 飼料米／飼料用イネにおける pH

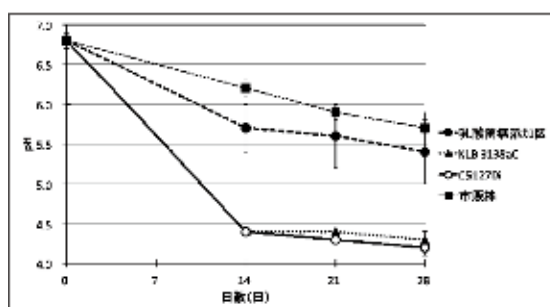


図3 4°Cにおける pH の変化

6. 飼料米／飼料用イネを発酵基質とした 4°Cにおける発酵期間の決定

試験開始時の飼料米／飼料用イネの pH は 6.8 であった。4°Cにて保存した 14 日目、21 日目、28 日目の pH の測定値を、図 3 に示した。C5127Di 株および KLB 3138aC 株は 4°C で 14 日間保存した場合、飼料米／飼料用イネを pH 4.4 まで低下することができ、さらに、28 日間で pH 4.2 まで低下することが出来た。この結果より、C5127Di 株および KLB 3138aC 株は、4°C の低温環境下で発酵飼料を製造出来ることがわかった。

7. 飼料米／飼料用イネを発酵基質とした 4°Cにおける最適添加菌数の決定

試験開始時の飼料米／飼料用イネの pH は 6.8 であった。添加乳酸菌数を変化させ、4°Cにて保存した 21 日目の pH を表 3 に示す。

乳酸菌添加量が終濃度 1×10^4 cells / g 添加区において、C5127Di 株および KLB 3138aC 株は pH 4.2 と pH 4.3 であり、必要且つ十分な乳酸発酵を 4°C において行えることがわかった。発酵飼料製造において一般的な乳酸菌添加量は 1×10^5 cells / g 以上であることから、乳酸菌製剤使用量を 1/10 に減らすことができ、低コスト化の実現が示唆された。

表 3 添加乳酸菌数を変化させ、飼料米／飼料用イネを 4°Cにて保存した 21 日目の pH 測定値と標準偏差

	乳酸菌無添加区	1×10^4 cells / g	1×10^5 cells / g	1×10^6 cells / g
乳酸菌無添加区	pH 5.6 ± 0.4			
KLB 3138aC		pH 4.4 ± 0.0	pH 4.4 ± 0.2	pH 4.3 ± 0.0
C5127Di		pH 4.3 ± 0.0	pH 4.3 ± 0.1	pH 4.2 ± 0.0
市販株		pH 6.3 ± 0.0	pH 5.9 ± 0.7	pH 5.4 ± 0.1

8. TMR 原料を基質とした、小規模サイレージにおける低温発酵試験

試験開始時の TMR 原料の pH は 7.13 であった。4°C で 21 日間保存した後の TMR 原料の pH 変化を図 4 に示した。C5127Di 株は pH 4.47、KLB 3138aC 株は pH 4.52 と、十分に pH が低下していた。この結果から、C5127Di 株は 4°C の低温環境下において発酵 TMR 飼料の製造を実現できる事が示唆された。

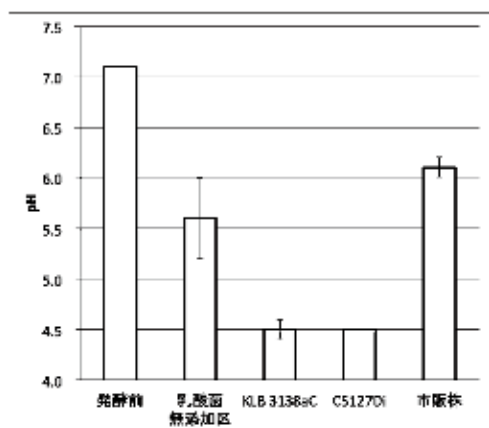


図 4 4°C 保存 21 日目の TMR 原料の pH

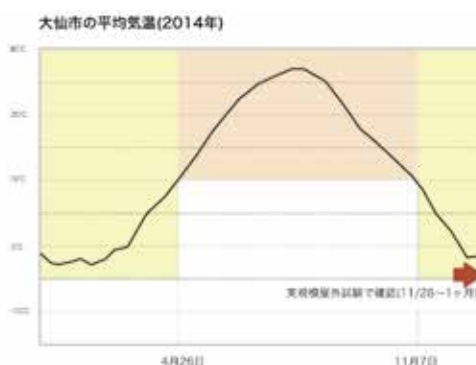


図 5 大仙市の年間平均気温

9. TMR 原料を基質とした、晩秋から初冬における実規模サイレージ低温発酵試験

試験開始時の TMR 原料の pH は 7.13 であった。結果を表 4 に示した。また、試験地域である大仙市の当該年の平均気温を図 5 に示した。秋期に 30 日間保存した後の pH 変化は、KLB 3138aC 株は pH 4.09、C5127Di 株は pH 4.13 と、十分に pH が低下していた。厳寒期に 30 日間保存した後の pH 変化は、KLB 3138aC 株は pH 4.56、C5127Di 株は pH 4.58 であった。さらに、C5127Di 株と KLB3138aC 株の培養液を混合して調製した発酵 TMR は、秋期は pH 4.05、厳寒期は pH 4.58 であった。

発酵 TMR は pH 4.5 以下を目標に製造される。厳寒期の結果は若干 pH が高いが許容範囲内であり、厳寒期における発酵 TMR 試料の製造が可能と考えられた。

表 4 実規模サイレージ低温発酵試験

添加乳酸菌株	調整時期	pH ± 標準偏差
KLB 3138aC	秋期	pH 4.09 ± 0.04
	厳寒期	pH 4.56 ± 0.02
C5127Di	秋期	pH 4.13 ± 0.04
	厳寒期	pH 4.58 ± 0.02
KLB 3138aCと C5127Di混合	秋期	pH 4.05 ± 0.03
	厳寒期	pH 4.58 ± 0.01

10. 実規模製造試験で得た発酵 TMR の官能評価および乳牛の嗜好性調査

実規模製造試験で調製した発酵 TMR のすべての試験区において、香りが良く

良好な発酵を認めた。実際に乳牛に与えたところ、嗜好性が非常に良く、下痢などの臨床症状も認められなかった。以上より、厳寒期における発酵 TMR 製造は、C5127Di 株を用いることで実現できた。

【謝辞】

本研究は、秋田県畜産試験場および秋田十條化成株式会社の共同研究により実施された。研究推進にご協力頂いた高橋慶太郎氏、秋田県畜産試験場加藤真姫子氏、渡邊潤氏、佐藤寛子氏、秋田十條化成株式会社把田雅彦氏、加藤正樹氏に感謝いたします。また、本研究は、秋田県学術国際部が主催した補助事業フイージビリティスタディー事業（平成25年度）、シーズ育成事業（平成26～27年度）の3期にわたる補助により実施された。補助事業提供者の皆様に感謝いたします。

【引用文献】

- 1) 木村貴一、高橋慶太郎、加藤真姫子、渡邊潤、佐藤寛子、肥田雅彦、加藤正樹、低温発酵性乳酸菌および低温発酵性乳酸菌を用いた発酵飼料の製造方法
特開 2017-12052（公開日：平成29年1月19日）
- 2) Mori K., Yamazaki K., Ishiyama T., Katsumata M., Kobayashi K., Kawai Y., Inoue N., and Shinano H. (1997) Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 54-57

2. 原著論文（研究ノート）（3件）

- 1) 酢酸の生成に及ぼす清酒もろみへの追い水のタイミングの影響・・・・・・・・・・33
○佐藤友紀、上原智美、黒崎文華、大野剛、渡邊誠衛
- 2) いぶりがっこの品質調査と製造工程に関する研究・・・・・・・・・・37
○佐々木康子、渡辺隆幸
- 3) 地域特産ブランド構築のための鱈しょっつるの経験価値分析・・・・・・・・・・43
○高畠聡

酢酸の生成に及ぼす清酒もろみへの追い水のタイミング の影響

佐藤友紀¹、上原智美¹、黒崎文華¹、齋藤雅昭²、大野剛¹、児玉雅¹、渡邊誠衛¹
(1：秋田県総合食品研究センター醸造試験場、
2：株式会社飛良泉本舗)

Tomonori SATO, Tomomi UEHARA, Fumika KUROSAKI, Msaaki SAITO,
Tsuyoshi OHNO, Masa KODAMA, and Seiei WATANABE

【緒言】

我が国では、独立行政法人酒類総合研究所と日本酒造組合中央会の共催で、全国新酒鑑評会が例年開催されている。出品酒の多くはアルコール添加によって酒質を調整している（いわゆるアル添酒）が、アルコール添加を行わない「純米酒」も少数ながら出品されている。平成 28 酒造年度の実績において、秋田県を除く東北 5 県では 138 場中純米酒での出品は 27 場であるが（純米酒率 19.6%）、秋田県では、全 31 場中 11 場（純米酒率 35.5%）が純米酒を出品しており、さらに増加傾向にある¹⁾。純米酒の場合、水の添加（追い水）によってもろみの管理を行い、酒質やもろみ経過を制御する。追い水によって、もろみ中成分の濃度変化、酵母の活動域の変化などの影響が生じるが、有機酸組成に及ぼす影響は知られていない。特に、清酒の特徴、あるいはオフフレーバーの原因にもなる酢酸の濃度に追い水が及ぼす影響は興味深く、追い水による影響があれば製造場の技術力向上に寄与する。

そこで本研究では、清酒もろみへの追い水のタイミングによる酒質、特に酢酸濃度への影響を検討することを目的とし、実験を行った。

【方法】

原料米として掛け米及び麴米に精米歩合 40%の秋田酒こまち（2014 年秋田県産）を使用し、種麴菌はグルコ S（天野エンザイム製）を用いた。酵母は AKITA 雪国酵母 UT-2 を使用し、仕込み方法は総米 500 g の 3 段仕込みとした。群分けは、汲み水歩合 140%で追い水を行わない 140C、汲み水歩合 150%で追い水を行わない 150C、もろみ日数 8 日目（最大ボーメ時）に 50ml の追い水を行う B、もろみ 11 日目（最高温度時）に 50ml の追い水を行う T、もろみ 20 日目（もろみ後半時期）に 50ml の追い水を行う A の計 5 群（いずれも n=3）とした。140C, B, T, A の仕込み配合を表 1 に、150C の仕込み配合を表 2 にそれぞれ示す。

表 1. 140C, B, T, A の仕込み配合

140C, B, T, A	酒母及び添	仲	留	計
白米 (g)	80.0	132.5	202.5	415.0
麴用白米 (g)	34.0	21.0	30.0	85.0
総白米 (g)	114.0	153.7	232.3	500.0
蒸米 (g)	108.0	181.5	278.0	567.5
麴米 (g)	43.0	26.6	38.0	107.6
汲み水 (mL)	180.0	210.0	310.0	700.0

表 2. 150C の仕込み配合

150C	酒母及び添	仲	留	計
白米 (g)	80.0	132.5	202.5	415.0
麴用白米 (g)	34.0	21.0	30.0	85.0
総白米 (g)	114.0	153.7	232.3	500.0
蒸米 (g)	108.0	181.5	278.0	567.5
麴米 (g)	43.0	26.6	38.0	107.6
汲み水 (mL)	190.0	230.0	330.0	750.0

品温は添仕込み 13℃、踊り 12℃、仲仕込み 9℃、留仕込み 6℃とし、最高温度である 12℃に達するまで、1 日あたり 0.6℃ずつ品温を上昇させた。最高温度は 4 日間継続し、以降は 1 日あたり 0.6℃ずつ品温を低下させた。もろみ日数 29 日目に、0℃、3,000 rpm、50 分間の条件でもろみを遠心分離して上槽した。上槽後の製成酒をサンプルとし、アルコール濃度、酸度、アミノ酸度、日本酒度を国税庁所定分析法に基づき、分析した²⁾。さらに、製成酒中の酢酸濃度を、HPLC（株式会社島津製作所、カラム：Shodex RSpakKC811 及び KCG、移動相：3mM 過塩素酸水溶液、反応液：0.2mM ブロモフェノールブルー・15mM リン酸水素ナトリウム水溶液）を用いて分析した。

【結果と考察】

製成酒のアルコール濃度、酸度、アミノ酸度、日本酒度を図 1 に示す。いずれも群間で目立った差はなかったが、酸度については 140C が 2.23 ± 0.07 に対し、150C が 2.03 ± 0.09 とやや低く、T が 2.57 ± 0.07 とやや高い挙動が見られた（図 1-B）。次に、製成酒の酢酸濃度を図 2 に示した。

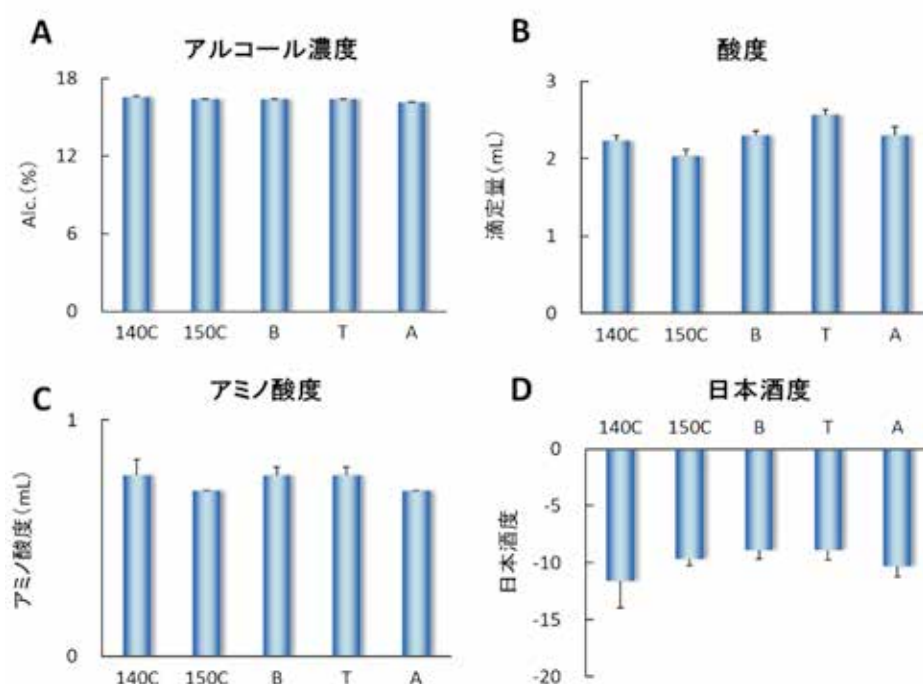


図 1. 製成酒の一般成分

A : アルコール濃度、B : 酸度、C : アミノ酸度、D : 日本酒度
 値は平均値±標準誤差 (SE) として示した (n=3)。

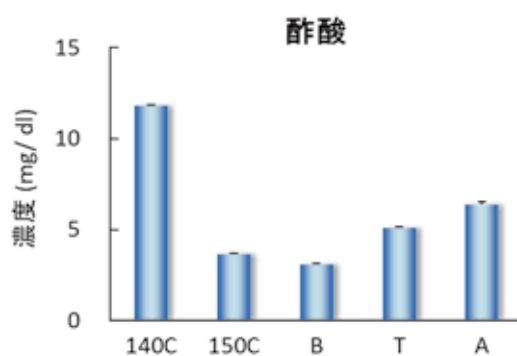


図 2. 製成酒の酢酸濃度

値は平均値±標準誤差 (SE) として示した (n=3)。

清酒もろみ中で酢酸が産生されるメカニズムは完全には解明されていないが、酵母の細胞質においてピルビン酸をアセチル CoA に変換する経路 (ピルビン酸デヒドロゲナーゼバイパス) の中間代謝物として酢酸が産生され、菌体外に放出される機構が有力視されている³⁾。ピルビン酸デヒドロゲナーゼバイパスでは、ピルビン酸からアセトアルデヒドが生成され、さらにアセトアルデヒドがアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALD) の作用によって酢酸に代謝される。ALD は ALD2~6 の 5 つの遺

伝子にコードされており、このうち ALD2, 3, 6 が細胞質の ALD をコードする。清酒もろみ初期では ALD2 及び 3 が蓄積すること、高浸透圧条件で ALD2 が誘導されること、濃糖条件では酢酸生成が促進されることがそれぞれ報告されている³⁾。したがって、汲み水歩合の低い 140C ではもろみ初期に濃糖状態となり、ALD の発現が誘導され、結果酢酸が製成酒に蓄積したと考えられた。酢酸は製成酒中で過剰になると「酸臭」というオフフレーバーとして指摘され、特に出品酒では欠点となる⁴⁾。一方、より早期に追い水を行った群では酢酸濃度が低くなることが確認された(図 2)。これは、追い水によってもろみ中の糖が希釈され、濃糖条件が緩和されたことで ALD の誘導が抑えられたためと推察される。また、150C においては汲み水歩合が他の群より 10% 高く、もろみ中の糖濃度が比較的低い状態に保たれたことが製成酒中における酢酸濃度が低値であった理由と推察される。したがって、酸臭などのオフフレーバーが問題になりやすい製造場であれば、汲み水歩合を高めを設定することで濃糖による酸臭を低減できると考えられる。

一方、酸度(総酸)は酢酸とは異なる挙動を示した(図 1-B)が、本研究において酢酸以外の有機酸濃度は群間で差はなく(data not shown)、酢酸のみの変動が総酸量に及ぼす影響が少なかったためと推察される。最高温度時に追い水をすると総酸がわずかに増加する可能性については今後の検討が必要である。

本研究より、より早期の追い水が製成酒の酢酸濃度低減に寄与する可能性を示した。

【引用文献】

- 1) 独立行政法人酒類総合研究所、日本酒造組合中央会(2017) 第 105 回平成 28 酒造年度全国新酒鑑評会 製造技術研究会 出品目録
- 2) 財団法人日本醸造協会(1993) 第四回改正国税庁所定分析法注解
- 3) 後藤奈美、Dang Hong Anh(2006) 酵母の酢酸代謝酵素遺伝子の破壊及び高発現がアルコール発酵中の酢酸生成に及ぼす影響 日本醸造協会誌 **101**: 949-956
- 4) 独立行政法人酒類総合研究所(2011) 清酒のにおいとその由来について <https://www.nrib.go.jp/data/pdf/seikoumisan.pdf>

いぶりがっこの品質調査と製造工程に関する研究

佐々木康子、渡辺隆幸

(秋田県総合食品研究センター)

Koko SASAKI and Takayuki WATANABE

【要約】

本研究では、市販のいぶりがっこの成分分析を行うことにより成分の特性を明らかにした。また、製造工程における「燻り」の工程の解明のため、熱風乾燥モデル試験を行い、ダイコン重量の変化と乾燥時間について検討した。その結果、同一温度におけるダイコン重量の減少割合は一定であり、乾燥温度が下がるほど乾燥効率が下がることが分かった。

【緒言】

「いぶりがっこ」は、「いぶり大根漬」「いぶりたくあん漬」「いぶり漬」等とも呼ばれ、古くから秋田県内で食されている漬物である。原料ダイコンを薪で燻煙して乾燥と香りの付与を行った後、米糠等を用いて漬け込むことにより製造されている。燻煙工程（燻り工程）を有する漬物は世界的にも珍しいものであり、現在、いぶりがっこは秋田県を代表する発酵食品のひとつとなっている。また、市販品は各製造業者独自の燻り工程と漬込工程により製造されていることから、品質や成分には様々な違いがあると予想される。菅原らにより 1980 年から 1990 年にかけて市販のいぶりがっこに関する調査研究が行われた¹⁻³⁾が、その後は調査研究はほとんど行われていなかった。そこで、今回改めていぶりがっこの品質調査を行い、成分面からいぶりがっこの特徴を明らかにすることを目標にした。

また、いぶりがっこの製造工程において最も特徴的な工程である燻り工程は、燻り温度と燻り時間の工程管理が経験に基づいて行われており、温度とダイコンの水分変化や成分の関係については調査されていなかった。燻り工程は温度コントロールが難しいため、乾燥機を用いたモデル乾燥試験を実施することにより、乾燥温度の違いがダイコンの水分変化や成分に与える影響について検討した。

【実験方法】

1) 市販品の成分分析

いぶりがっこのサンプルとして、加熱殺菌済のもの 20 点 (No. 1~20、漬物企業製造)、殺菌前のもの 18 点 (No. 21~38; 農家による自家製造) を用いた。

サンプルの成分分析 (分析項目: Brix・pH・塩分・水分・アミノ酸・有機酸)

は、常法に従って行った。Brixはポケット糖度計 APAL-1 (ATAGO)、pHは pH METER M-13 (HORIBA)、塩分は自動滴定装置 umeCOM (HIRANUMA)、水分は常圧乾燥法 (105℃、5時間)、アミノ酸は全自動アミノ酸分析機 JLC-500/V (日本電子データム)、有機酸は有機酸分析システム (日本分光) で測定した。

2) 燻り工程の熱風乾燥モデル試験

各乾燥温度 (45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80℃) においてダイコン重量が 50%になるまで乾燥を行い、ダイコン重量を経時的に測定した。それぞれの乾燥温度において、ダイコンは 2 本ずつ用いた。なお、試験に使用したダイコンは、45, 50, 55℃乾燥試験が同一ロット、60, 65, 70, 75, 80℃乾燥試験が同一ロットである。

【結果と考察】

1) 市販品の成分分析結果を表 1 と表 2 に示した。

表 1 市販品(加熱殺菌済)の成分

No.	形態	成分分析結果			
		Brix (%)	pH	塩分 (%)	水分 (%)
1	一本漬	19.8	5.12	3.8	78.5
2	一本漬	21.3	5.20	3.9	75.7
3	一本漬	24.3	5.05	3.7	72.4
4	一本漬	21.6	5.61	3.7	73.8
5	一本漬	15.9	4.76	3.1	81.8
6	一本漬	27.3	4.74	4.5	68.5
7	一本漬	19.2	5.80	4.4	77.4
8	一本漬	28.2	5.58	5.2	67.9
9	一本漬	19.8	5.48	4.3	66.4
10	一本漬	25.2	5.84	4.4	77.8
11	一本漬	26.4	5.88	4.0	69.7
12	スライス	20.4	5.17	3.2	76.0
13	スライス	25.8	5.08	4.0	70.9
14	スライス	29.1	5.25	4.8	60.5
15	スライス	26.4	5.27	4.6	68.1
16	スライス	25.8	4.84	4.4	71.3
17	ピロー包装	22.8	5.30	4.5	74.1
18	ピロー包装	27.3	4.69	4.0	67.5
19	ピロー包装	21.9	4.38	3.7	73.6
20	ピロー包装	17.4	4.61	3.8	78.5
平均		23.3	5.18	4.1	72.5

表 2 市販品(殺菌前)の成分

No.	形態	成分分析結果			
		Brix (%)	pH	塩分 (%)	水分 (%)
21	一本漬	22.5	5.84	2.5	77.4
22	一本漬	27.6	4.89	3.5	71.7
23	一本漬	24.0	4.86	2.9	72.8
24	一本漬	25.2	5.86	3.8	71.6
25	一本漬	25.5	5.86	3.1	71.4
26	一本漬	19.5	4.27	3.0	78.2
27	一本漬	23.4	5.55	3.7	74.6
28	一本漬	22.2	5.94	4.3	74.7
29	一本漬	20.7	6.06	3.1	76.6
30	一本漬	22.5	5.91	3.7	75.8
31	一本漬	24.9	4.64	3.4	72.6
32	一本漬	21.0	5.22	4.0	77.6
33	一本漬	23.7	5.37	2.8	74.5
34	一本漬	26.1	5.99	3.8	71.3
35	一本漬	23.1	5.66	3.5	75.8
36	一本漬	22.5	4.48	2.8	77.1
37	一本漬	24.0	6.05	3.8	74.6
38	一本漬	17.7	5.15	3.1	80.0
平均		23.1	5.42	3.4	74.9

Brix は、殺菌済サンプルが平均 23.3 (15.9~29.1)、殺菌前サンプルが平均 23.1 (17.7~27.6) であった。pH は、殺菌済サンプルが平均 5.18 (4.38~5.88)、殺菌前サンプルが平均 5.42 (4.27~6.06) であった。塩分は、殺菌済サンプルが平均 4.1 (3.1~5.2)、殺菌前サンプルが平均 3.4 (2.5~4.3) であった。水分は、殺菌済サンプルが平均 72.5 (60.5~81.8)、殺菌前サンプルが平均 74.9 (71.3~80.0) であった。以上の結果から、Brix、pH、塩分、水分においては、製品による差が大きいことが分かった。塩分は、殺菌済サンプルよりも殺菌前サンプルの方が全体的に低めであった。菅原らの調査によると、市販品の塩分の平均値は、5.64 (1979年調査¹⁾)、5.47 (1984年調査²⁾) であったことから、市販品の低塩化が進んでいると推測された。Brix と pH の平均値は、菅原らの調査結果¹⁻²⁾ と差がなかった。

アミノ酸分析の結果、グルタミン酸 (Glu)、γ-アミノ酪酸 (GABA)、アラニン (Ala) 量において、製品ごとに差があった (表 3、表 4)。GABA については、殺菌前サンプルの方が殺菌済サンプルよりも多い傾向が認められた。

表 3 市販品(加熱殺菌済)のアミノ酸量

	Glu	GABA	Ala
1	24.2	70.2	44.6
2	166.3	106.4	41.4
3	66.8	62.6	48.3
4	7.8	81.6	45.2
5	60.5	45.6	43.0
6	18.9	46.9	32.3
7	28.5	83.8	52.9
8	8.3	112.5	83.1
9	60.2	52.9	46.1
10	389.1	53.3	26.6
11	22.3	86.4	71.4
12	59.9	93.4	58.7
13	116.7	109.5	50.6
14	8.9	49.0	47.5
15	29.4	58.6	29.3
16	13.5	52.9	30.2
17	52.7	77.1	59.9
18	14.9	40.8	33.9
19	62.4	55.1	39.3
20	80.4	106.8	37.1
平均	64.6	72.3	46.1

(mg/100g)

表 4 市販品(殺菌前)のアミノ酸量

	Glu	GABA	Ala
21	9.7	394.0	79.5
22	16.4	109.8	70.2
23	5.3	183.9	124.5
24	22.5	109.0	52.0
25	18.3	118.4	72.4
26	39.0	82.6	57.7
27	2.1	108.6	60.7
28	13.9	90.5	58.1
29	2.0	127.2	97.0
30	N.D.	135.1	92.1
31	43.8	62.0	60.7
32	17.8	62.6	56.1
33	N.D.	95.2	66.8
34	19.1	111.8	81.5
35	22.5	82.9	68.1
36	32.5	94.0	90.2
37	18.1	271.7	75.8
38	3.3	166.6	67.2
平均	15.9	133.7	73.9

(mg/100g)

N.D.(検出限界以下)

有機酸分析の結果、酸の組成や含有量は製品により大きな差があることが分かった（表5、表6）。クエン酸、リンゴ酸、乳酸、酢酸量の合計は、殺菌前サンプルの方が殺菌済サンプルよりも多い傾向があった。

2) 熱風乾燥モデル試験

一定の温度下でダイコン重量が50%になるまで乾燥を行い、経時的に重量を測定した（試験に用いたダイコンは各温度2本ずつである）。各乾燥温度におけるダイコン重量と乾燥時間の関係を図1~9に示した。その結果、乾燥開始時のダイコン重量に差があっても乾燥時間にはあまり差がなく、同一温度におけるダイコン重量の減少割合はほぼ一定であることが分かった。図10、図11に、ダイコン重量が50%になるまでの乾燥時間と乾燥温度の関係を示した。乾燥温度が下がるほど乾燥効率が下がり、特に40℃以下になると極端に乾燥効率が下がることが分かった。この結果から、燻り工程においては、温度が40℃以下にならないようにしながら、なるべく高い温度を保つようにすれば、より短時間での燻りが可能になると推測される。

表5 市販品(加熱殺菌済)の有機酸量

	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	酢酸	合計
1	372.7	N.D.	545.0	236.9	1154.6
2	217.1	192.0	43.7	172.0	624.8
3	255.1	94.6	24.0	221.5	595.2
4	263.1	109.7	60.0	137.7	570.5
5	231.2	75.3	N.D.	81.1	387.6
6	291.8	98.6	N.D.	204.2	594.6
7	267.1	82.7	100.7	85.3	535.8
8	327.3	124.7	57.0	298.1	807.1
9	197.8	183.8	34.3	193.0	608.9
10	338.0	331.9	N.D.	151.0	820.9
11	301.3	199.8	N.D.	93.3	594.4
12	365.7	69.3	95.6	169.2	699.8
13	228.8	84.0	N.D.	194.4	507.2
14	255.7	65.4	N.D.	808.3	1129.4
15	153.0	57.7	N.D.	615.7	826.4
16	192.0	90.5	25.5	436.8	744.8
17	671.9	164.2	86.0	167.8	1089.9
18	394.8	206.9	N.D.	139.3	741.0
19	276.5	90.4	N.D.	N.D.	366.9
20	312.3	120.3	16.6	133.2	582.4
平均	295.7	122.1	54.4	226.9	699.1

(mg/100g)

表6 市販品(殺菌前)の有機酸量

	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	酢酸	合計
21	551.6	246.8	388.6	204.1	1391.1
22	603.9	51.9	277.5	398.6	1331.9
23	589.8	56.3	674.9	202.9	1523.9
24	531.4	56.7	68.4	64.3	720.8
25	568.6	421.5	568.6	421.5	1980.2
26	486.9	N.D.	539.0	448.5	1474.4
27	537.1	N.D.	279.7	187.6	1004.4
28	381.3	104.4	93.2	105.4	684.3
29	345.7	187.3	N.D.	95.8	628.8
30	372.6	159.1	72.6	166.5	770.8
31	510.6	N.D.	484.1	168.1	1162.8
32	683.8	N.D.	398.4	156.1	1238.3
33	167.6	76.9	N.D.	144.2	388.7
34	829.2	132.3	N.D.	128.5	1090.0
35	387.6	137.7	N.D.	226.3	751.6
36	522.0	N.D.	658.4	272.4	1452.8
37	457.1	127.1	84.1	73.9	742.2
38	292.2	N.D.	155.5	249.7	697.4
平均	489.9	97.7	263.5	206.4	1057.5

(mg/100g)

N.D.(検出限界以下)

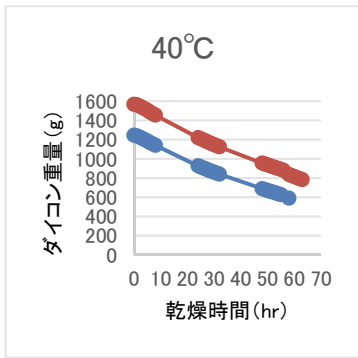


図 1 40°Cでの重量変化

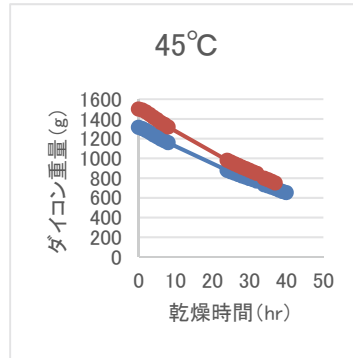


図 2 45°Cでの重量変化

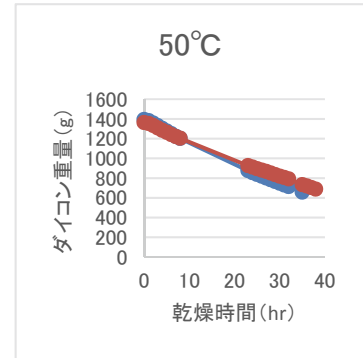


図 3 50°Cでの重量変化

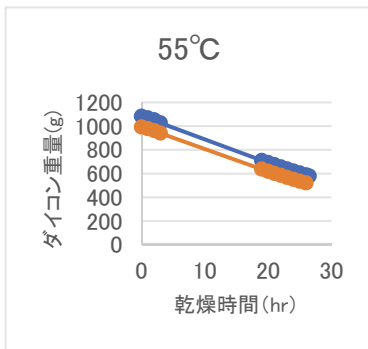


図 4 55°Cでの重量変化

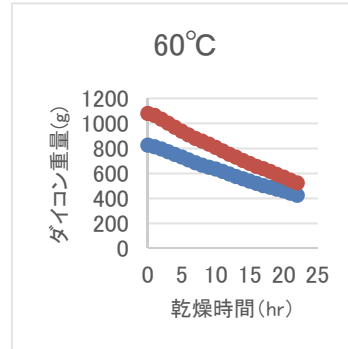


図 5 60°Cでの重量変化

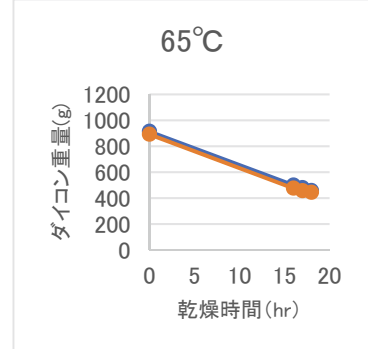


図 6 65°Cでの重量変化

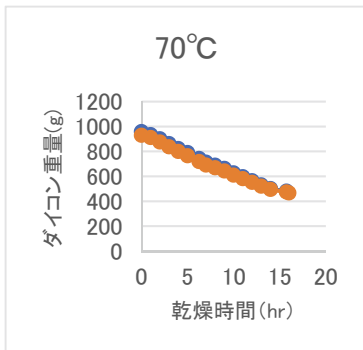


図 7 70°Cでの重量変化

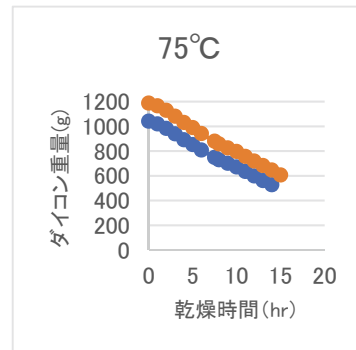


図 8 75°Cでの重量変化

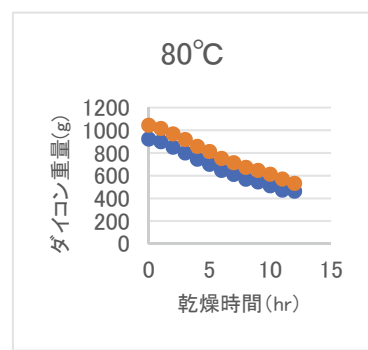


図 9 80°Cでの重量変化

乾燥温度とアミノ酸量の結果を図 12 と図 13 に示した。乾燥温度とアミノ酸量には相関が認められなかったが、アミノ酸量はサンプルによるバラツキが大きかったため、乾燥温度の影響よりもダイコンの個体差の影響の方が大きいと推測された。各乾燥温度（40～80°C）で乾燥した全てのダイコンにおいて、GABA は 30mg/100g 以上、Ala は 20mg/100g 以上含まれていた。

日干しや塩押し等の脱水処理により GABA 量が増加することは既に報告されている⁵⁻⁶⁾ことから、いぶりがっこの GABA 量や Ala 量に与える乾燥温度の影響については、今後詳細に検討する予定である。

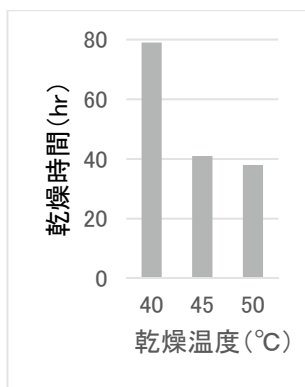


図 10 乾燥温度と乾燥時間

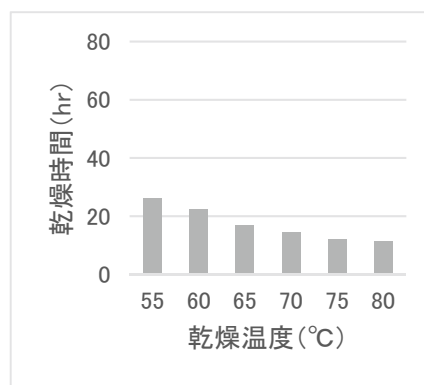


図 11 乾燥温度と乾燥時間

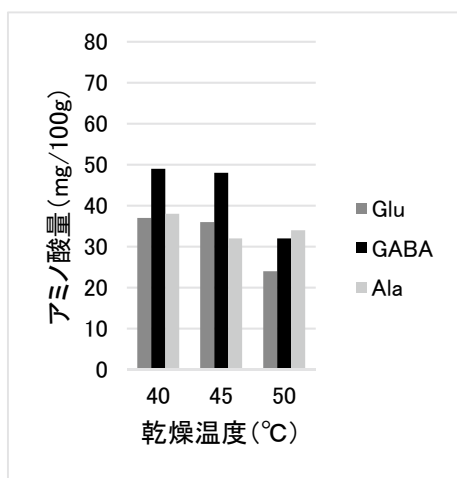


図 12 乾燥温度とアミノ酸量

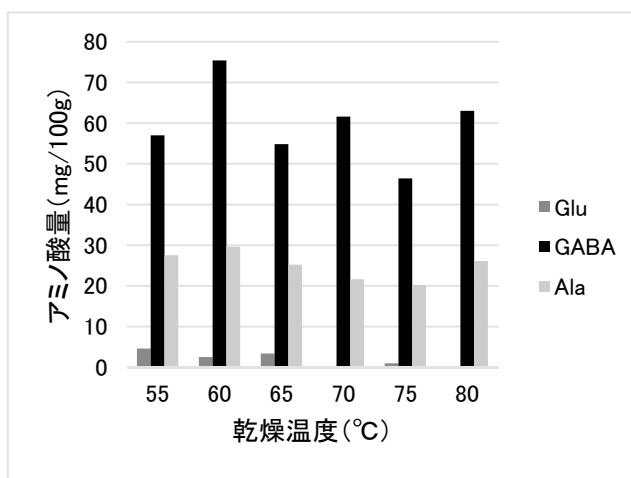


図 13 乾燥温度とアミノ酸量

【引用文献】

- 1) 菅原久春、吉田明美、高橋均、小笠原泰 (1980) いぶりたくあん漬に関する研究 (第 2 報) 秋田県醸造試験場報告 **12**, 37-48.
- 2) 菅原久春 (1984) いぶりたくあん漬に関する研究 (第 5 報) 秋田県醸造試験場報告 **16**, 52-55.
- 3) 菅原久春、小笠原博信 (1989) いぶりたくあん漬に関する研究 (第 10 報) 秋田県醸造試験場報告 **21**, 52-55.
- 4) 守谷磐村 (1972) 秋田の漬物 調理科学 **2**, 98-101.
- 5) 加藤亮、林里美、小林泰斗、高橋仁恵、木村紀久 (2015) たくあん漬け製造時における γ -アミノ酪酸とグルタミン酸脱炭酸酵素活性の解析 日本食品科学工学会誌 **62**, 492-500.
- 6) 長友絵美、福山明子、柚木崎千鶴子 (2009) ダイコンの乾燥工程中における成分変化 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告 **54**, 75-77.

地域特産ブランド構築のための

鱈しよっつるの経験価値分析

高島 聡

(秋田県総合食品研究センター)

Satoshi TAKABATAKE

【要約】

経験価値分析により鱈しよっつるのスペックや価格といった定量的な価値ではなく、消費者が商品やサービスを通じて得られる感動や満足感といった感覚的、心理的価値のような定性的な価値を明らかにすることにより、鱈しよっつるの地域特産ブランドの構築を試みた。経験価値を鱈しよっつるの商品説明等に付加することにより、他の魚醤油との差別化を可能にし、さらに、大豆醤油、食塩の代替利用法(変換公式)をユーザーに提示することにより、鱈しよっつるの利用拡大を図り、より商品価値、利用価値の高い地域特産食品としてのブランド化が可能になると考えられた。

【緒言】

地域には、特産品として広く人々に賞味され、土産品として販売されている地域特産食品と呼ばれる商品分野が存在する。米、野菜、果物、畜肉、鮮魚等の農産物や菓子、麺類、漬け物等の加工食品、日本酒、焼酎などの酒類等、その分野は幅広い。

米や牛肉、鶏肉等の畜肉、マグロ等の魚介類などは、産地や品種、育て方等により他の商品と差別化し、いわゆる食品としての地域特産品ブランドを形成している。

食品の場合、通常、地域の在来種や伝統食品をその基礎としているが、銘柄米のようにその地域の気候や作物特性を検討し、育種を重ねて商品ブランドを構築する、広い意味での地域特産ブランドも存在している。

地域特産ブランドは、同種の食品との差別化を容易にし、より多くの利益をもたらすことを可能にする。また、地域特産ブランドを活用し、地域特産品を販売していくことは、地域経済へ与えるメリットも大きい。

そこで、地域特産調味料である鱈しよっつるを経験価値モジュールにより分析し、地域特産ブランドとして、その価値特性を明確にし、鱈しよっつるのブランド化の可能性について検討したので、これについて報告する。

【実験方法】

1. 経験価値および経験価値分析とは

経験価値とは、商品のスペックや価格といった定量的な価値ではなく、消費者が商品やサービスを通じて得られる感動や満足感といった感覚的、心理的価値のような定性的な価値であり、米国 コロンビア大学 バーン・H・シュミット教授により提唱された。シュミット教授は、その著書「経験価値マーケティング」のなかで、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¹⁾。

長沢らによれば、「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には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²⁾。これらの5つのモジュールについて定性的な分析を行い、経験価値分析とした。

【結果と考察】

1. 鱈しょっつるの経験価値分析

一般にしょっつるとは、秋田県の伝統の魚醤油であり、原料となる魚介類(ハタハタ・タラ・イワシなど)に食塩を加えて、腐敗するのを抑制しながら1年以上の時間をかけて熟成し製造された魚醤油である。その主な成分は魚介類のタンパク質が分解されたアミノ酸やペプチドで、旨味と特有の風味が特徴の調味料である³⁾。石川県のいしり、香川県のいかなご醤油とならび、日本三大魚醤油のひとつとされている。鱈を原料とした、鱈しょっつるにおいて、経験価値分析により、その商品特性を明確化するために、感動や満足感といった感覚的、心理的価値のような定性的な価値である鱈しょっつるの経験価値を明らかにし、差別化、高付加価値化を図り、地域特産ブランドとしての構築を検討した。表1は、鱈しょっつるの経験価値分析である。

表1 鱈しよつつの経験価値分析

分類	鱈しよつつの経験価値
SENCE	<ul style="list-style-type: none"> ・鱈由来の天然アミノ酸の旨味 ・大豆醤油にはない、琥珀色の色調 ・魚醬特有のクセの少ない、やさしい香り
FEEL	<ul style="list-style-type: none"> ・地域特産の調味料である鱈しよつつへの興味、関心 ・他の魚醬とは違う鱈しよつつの特別感 ・「自然豊かな・あきた」への郷愁
THINK	<ul style="list-style-type: none"> ・長期熟成製造等の製造方法や職人技に関する蘊蓄（うんちく） ・他の魚醬油に比べ魚醬特有のクセが少なくやさしい香りであることへの知的刺激、好奇心
ACT	<ul style="list-style-type: none"> ・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	<ul style="list-style-type: none"> ・地域特産調味料である鱈しよつつを使用することでの、地域との一体感、食文化の創造することの喜び、満足感

2. 鱈しよつつの地域特産ブランド化のための利用法の検討

鱈しよつつの経験価値を分析し、差別化、高付加価値化を図ることにより、地域特産ブランド化の端緒は得られるが、地域特産ブランド化には、それだけでは不十分であり、実際に鱈しよつつを多くのユーザーに利用してもらい、ブランド化の構築を図らなければならない。そこで、鱈しよつつをより多くのユーザーに利用してもらうための鱈しよつつの新しい利用法について検討する必要がある。

しよつつ全般に言えることであるが、総じて食塩分量が高く（鱈しよつつ 食塩分量 約25%）、大豆醤油（市販濃口醤油 食塩分量 約15%）と同様には使用できない。

しかし、鱈しよつつの製造、保存には、現状では25%程度の食塩分量は、必要不可欠であり、減塩化した15%食塩分量程度、鱈しよつつの製造、保存が難しい。

また、鱈しよつつは従来魚醬油に比べ魚醬油特有のクセが少なく、やさしい香りが特徴であるが、一般に魚醬油特有の風味は、ユーザーにより嗜好が分かれ、特有の風味を好まないユーザーのしよつつの利用を抑制する傾向がある。

例えば、鱈しよつつを大豆醤油の様に一般的な調味料として利用してもらうには、食塩分量の低減と魚醬油特有の風味の低減が必要となる。

以上のことを考慮し、実際に鱈しよつつユーザーが利用可能な方法について検討した。

その1「酒しょつつる」による鰯しょつつるの利用

あらかじめ、鰯しょつつると日本酒（秋田県産清酒）を重量比で1：1に混合し、「酒しょつつる」を自家調製し、大豆醤油と同様に煮物、焼き物、炒め物等の加熱調理に使用する。（日本酒と混合しているため、非加熱調理には適さない。）鰯しょつつる：日本酒（秋田県産清酒）＝1：1（重量比）の混合で食塩分量は、約12.5%となり、市販減塩醤油程度の食塩分量となる。また、日本酒（秋田県産清酒）と混合されているため、魚醤特有の風味も低減されている。大豆醤油に比べて色もうすいので素材の色調を邪魔しない。少量（100g程度）ずつを自家調製し、冷蔵庫（5℃）で保存して、使用する。

なお、「酒しょつつる」を加熱して煮きり、日本酒のアルコール分を飛ばすと、保存性が極めて低くなり、すぐに腐敗してしまうので、注意が必要である。

使用例（変換式）

大豆醤油 大さじ1 = 「酒しょつつる」大さじ1（同量）

配合例 おでん出汁

水 1300ml		水 1300ml
かつおだし顆粒 小さじ4	レシピ変換	かつおだし顆粒 小さじ4
みりん 大さじ2	→	みりん 大さじ2
酒 大さじ1、薄口醤油 大さじ2		酒しょつつる（1：1）大さじ4
塩 小さじ1		

食塩の代わりに原液の鰯しょつつるを利用する。鰯しょつつるは液体なので、食材とのなじみも良く、食塩にはない、アミノ酸等の旨味も付加されるので、料理がよりいっそう美味しくなる。

使用例（変換式）

食塩 小さじ1 / 3 = 「鰯しょつつるうま味液塩」小さじ1（3倍量）

配合例 ピクルス液

水 100ml		水 100ml
酢 200ml	レシピ変換	酢 200ml
砂糖 大さじ2	→	砂糖 大さじ2
塩 小さじ1		しょつつる（原液） 小さじ3
鷹の爪2本+ローリエ2枚		鷹の爪2本+ローリエ2枚

経験価値に従い分析した5つのモジュールの特性を、鱈しょっつるの商品説明等に付加することにより、他の魚醤油との差別化を可能にし、さらに、大豆醤油、食塩の代替利用法（変換式）をユーザーに提示することにより、鱈しょっつるの利用拡大を図り、より商品価値、利用価値の高い地域特産食品としてのブランド化が可能になると考えられた。

【引用文献】

- 1) Bernd H.Schmitt, 嶋村和恵、広瀬盛一訳(2000)「経験価値マーケティング (EXPERIENTIAL MARKETING)」、ダイヤモンド社
- 2) 長沢伸也、染谷高士(2007)「老舗ブランド「虎屋」の伝統と革新」晃洋書房
- 3) 国立研究開発法人水産研究・教育機構 中央水産研究所 ホームページ (<http://nrifs.fra.affrc.go.jp/kakou/souran/syottsuru/>)

3. 総説 (1 件)

1) あきたスマイルケア食研究会の取り組みについて・・・・・・・・・・・・・・・・49

○松井ふゆみ、畠恵司、佐々木玲、上原健二、熊谷昌則

あきたスマイルケア食研究会の取り組みについて

松井ふゆみ、畠恵司、佐々木玲、上原健二、熊谷昌則

秋田県総合食品研究センター

Fuyumi MATSUI, Keishi HATA, Akira SASAKI, Kenji UEHARA,
and Masanori KUMAGAI

【要約】

高齢化が進む秋田県では、企業版ふるさと納税の支援を受けて、新しい介護食の枠組みであるスマイルケア食の開発と普及推進を行った。産学官の連携を目的として設立した「あきたスマイルケア食研究会」は様々な業種から 95 名が会員登録されている。また、スマイルケア食青マークの取得推進を進めた結果、団体数、商品数とも全国最多となった。こういった取組みが注目され、新聞やテレビに取り上げられる機会も増え、スマイルケア食の利用者である一般県民への啓蒙普及も進んでいる。

【緒言】

秋田県は平成 24 年度から高齢化率全国 1 位となっており、平成 30 年度は全国の高齢化率が 27.7%であるのに対し、秋田県は 35.6%であり、高齢化先進県といえる¹⁾。秋田県総合食品研究センター（以下、総食研）では、高齢化社会を見据えて、10 年ほど前から企業と共同で介護食の開発に取り組んできたが²⁾、平成 28 年度に農林水産省が新しい介護食の枠組みとして「スマイルケア食」を制定したため、この制度に則った介護食の開発を進めることとした。

スマイルケア食は、介護食品の市場拡大を通じて、食品産業、ひいては農林水産業の活性化を図るとともに、国民の健康寿命延伸に資するべく、これまで介護食品と呼ばれてきた食品の範囲を整理し、新しい枠組みとして整備されたものである³⁾。従来の噛むこと、飲み込むことに問題がある方向けの食品だけでなく、噛むこと、飲み込むことに問題はないものの、健康維持上栄養補給を必要とする方向けの食品が加わった。これまでの介護食品は民間規格であるユニバーサルデザインフード（UDF）や、日本摂食嚥下リハビリテーション学会嚥下調整食分類 2013 など数種類の分類があり、これらの規格の統一化もスマイルケア食制定の目的の一つである。また、すでに介護が必要な状態の方向けだけでなく、低栄養状態の予防・改善により介護予防を目的とした食品の基準を新たに設けているのが特徴である。飲み込むことに問題がある方向けの食品は赤マーク、噛むことに問題がある方向けの食品は黄マーク、栄養補給を目的とした食品には青マークが付けられる。赤マークは、特別用途食品（えん下困難者用食品）規格基準を満たすものであること、黄マークは日本農林規格等に関する法律（JAS 法）に基づいて、そしゃく配慮食品の JAS 規格の格付け対象商品であることが条件である。青マークはエネルギーおよびたんぱく質の基準が設けられており、

エネルギーが 100kcal 以上（100g または 100ml 当たり）および 100g（100ml）当たりのたんぱく質量が 8.1g（4.1g）以上、または、100kcal 当たりのたんぱく質含有量が 4.1g 以上であることが条件となっている。この条件を満たす商品を「自己適合宣言」としてホームページで公表し、農林水産省に対してマークの利用許諾申請を行う。

【これまでの取組み】

1) あきたスマイルケア食研究会の設立

平成 29 年 7 月、総食研を事務局として、県産農林水産物を活用したスマイルケア食の開発や利用普及と啓発を通じて元気で長生きできる健康づくりと産学官の連携を目的に、「あきたスマイルケア食研究会」を設立した。研究会設立時のキックオフミーティングには 108 名の参加があり、医療法人新都市医療研究会「君津」会 南大和病院の管理栄養士である工藤美香氏（現 駒沢女子大学准教授）と、聖霊女子短期大学講師の伊藤雅子氏からご講演いただいた。会員数は平成 30 年 9 月末現在の 95 名で、食品製造業者をはじめ、農林漁業者、医療・福祉関連事業者、流通・販売業者、大学・研究機関、金融機関、行政機関等と幅広い業種が参加している。現在は事務局がスマイルケア食に関する情報収集と情報発信を行っているが、今後、会員同士が自由に連携することで、スマイルケア食の商品開発が進むことを期待している。

研究会の活動として、食品事業者への既存商品、新商品でのマーク利用許諾申請を呼びかけ、積極的な申請支援とマーク取得後の販路拡大のためのプロモーションを行った。また、スマイルケア食を利用する立場である一般県民に対しては、県の広報番組をはじめ、あきた県庁出前講座やイベントを活用して多方面からの情報発信を行っている。

平成 30 年 8 月には第 2 回総会を開催し、約 80 名の参加があった。秋田県栄養士会理事で BF ホールディングス株式会社の管理栄養士である谷口典子氏にご講演いただいた。

2) スマイルケア食マーク取得の支援

黄マークや赤マークの取得は条件が厳しく、すぐに対応できる事業環境が整っていないため、まずは低栄養状態の予防・改善を目的とした青マークの取得に取り組んだ。既存商品や新商品で青マークの基準を満たしている場合は農林水産省への青マーク利用申請手続きの説明を、基準に達していない商品についてはエネルギーやたんぱく質を強化したレシピを提案する等の支援を行った。その結果、同省より平成 29 年度までに 7 団体 24 商品が青マークの利用許諾を得るに至った。その後、平成 30 年 10 月末現在、計 10 団体 32 商品が登録され、企業数、商品数ともに全国最多となっている（表 1）。登録された商品の中には、秋田県の郷土料理である「あさづけ」を基にしたフルーツかゆや、能代の食文化である豚の軟骨を柔らかく食べやすく加工したキーマカレー等、県内の食文化を生かした商品もあり、高齢者にも馴染みのある味で手軽に栄養を摂取できることが特徴となっている。さらに、男鹿海洋高等学校が生徒の実習で製造・販売を行っているさばの缶詰 3 種とかまぼこ 2 種も青マークを取得してお

り、高校生が製造した全国初のスマイルケア食として注目されている。

多くの事業者は、これまでの道の駅やスーパーだけでなく、スマイルケア食の認証を受けることで薬局やドラッグストア等への販路拡大も狙いとしているが、男鹿海洋高等学校の場合は、生徒たちが介護食の分野に興味を持つきっかけとして、教育的な面を有している。これにより、若い世代へもスマイルケア食への理解が進むことが期待される。

表1. スマイルケア食青マーク取得企業・商品一覧（平成30年10月末現在）

企業・団体名	商品名	認証年月日
あぐりこまち 株式会社	あぐりこまち あずきがゆ	平成28年11月24日
	レトルトおかゆ	
	粒入りあずきがゆ(ぜんざい風味)	平成30年2月16日
	玄米粉フルーツかゆ(プレーン)	平成30年2月16日
	玄米粉フルーツかゆ(りんご果肉入)	平成30年2月16日
	玄米粉フルーツかゆ(みかん果肉入)	平成30年2月16日
	玄米粉フルーツかゆ(黄桃果肉入)	平成30年2月16日
	玄米粉フルーツかゆ(ナシ果肉入)	平成30年2月16日
株式会社 幸栄丸	きりたんぼ風味かゆ	平成30年2月16日
	いものこ汁	平成30年8月6日
	豚の角煮 大根入り	平成29年6月12日
	八幡平ポーク	平成29年7月19日
	杜仲豚	平成29年7月19日
株式会社 田沼屋慶吉	笑子豚	平成29年7月19日
	シルクポーク	平成29年7月19日
株式会社 田沼屋慶吉	比内地鶏の煮たまご	平成29年6月12日
有限会社 鈴和商店	らくらく蒸し豆 大豆	平成30年1月18日
	らくらく蒸し豆 ひよこ豆	平成30年4月24日
株式会社 白神屋	豚極	平成30年2月13日
	豚なんこつきーマカレー	平成30年2月13日
	豚なんこつハンバーグ	平成30年2月13日
秋田県立男鹿海洋高等学校	さば水煮缶詰	平成30年2月13日
	さば味噌煮缶詰	平成30年2月13日
	さば油漬缶詰	平成30年2月13日
	揚げかまぼこ	平成30年2月13日
	蒸しかまぼこ	平成30年2月13日
秋田いなふく米菓 株式会社	あられんこ(しよつふる味)巾着タイプ	平成30年3月6日
	あられんこ(しよつふる味)スタンドパックタイプ	平成30年3月6日
株式会社 グランドパレス川端	山の手ホテル 義平福ビーフカレー	平成30年4月10日
	山の手ホテル 羽後和牛ビーフカレー	平成30年4月10日
	山の手ホテル 秋田県産ポークカレー	平成30年4月10日
有限会社 みちのくアトリウムプラン	「、(てん)平」君	平成30年8月31日
有限会社 佐藤建工	秋田どじょう甘露煮	平成30年10月10日
	秋田どじょうつくだ煮	平成30年10月10日

3) 成果発信、啓蒙普及、販路開拓及び報道

栄養士・管理栄養士が多く所属する日本栄養改善学会において、これまでの秋田でのスマイルケア食への取組みについて事例発表し、成果の発信を行った⁴⁻⁶⁾。本学会では、2年続けて発表したが、いずれの年も他の研究者からスマイルケア食に関する発表はなかった。参加者の多くはスマイルケア食は知っているが、商品数が少なく、購入できる場所がわからないなどの理由からUDFの方が認知度、利用率も高いよう

であった。確かに、スマイルケア食は青マーク商品は増えているものの、黄、赤マークはそれぞれ1社しか取得していない。平成30年度の発表時には、「秋田県が県を挙げてスマイルケア食に取り組んでいることを初めて知った」、「大手企業とは異なる地域色のある商品が多く興味深い」、「インターネット販売をしてもらえると、全国で購入しやすいのではないか」、といった声が聞かれた。また、スマイルケア食の名称は知っていたが、その詳細は知らなかったといったコメントもあった。秋田県の高齢者は、インターネットショッピングを活用できる方は少なく、近所のスーパーやドラッグストアでの購入が求められる。しかし、離れた土地に暮らす子ども世代がインターネットショッピングで購入し、親世代の家に送るといった利用もできるため、近所のお店からインターネットまで、幅広い購買層に応えられる販路の開拓が必要であると考えられる。

県内のスマイルケア食の利用者である医療・介護事業者から一般市民向けには、県の広報番組である「あきたびじょん NEXT」と県内3つの放送局による企画番組や、その他研修会や講習会、県庁出前講座を活用して啓蒙活動を行った（表2）。

平成29年に秋田で開催された「ねんりんピック秋田2017」でも研究会のブースを構えてPR活動を行ったが、ねんりんピックに参加する高齢者の多くは健康な方が多く、反響は少なかった。しかし、青マーク商品はエネルギーとたんぱく質が多いため、スポーツをする高齢者の体力維持にも役立てられるのではないかと考えている。

商談を目的とした食品・飲料のバイヤー向けの専門展示会としてアジア最大級のFOODEX JAPAN 2018（国際食料・飲料展、平成30年3月）（図1）におけるブース出展では、中国をはじめとする海外の方の関心も高く、特にあずきかゆの試食は好評であった。平成30年7月の県産食材マッチング商談会では、店舗にコーナーを設けてスマイルケア食を扱いたい、という販売業者もいた。コンビニエンスストアでは、冷蔵・冷凍コーナーのスペースが小さく限られるため、常温の棚に置ける商品は扱いやすいとのことであった。このような商談会で県内の全商品を掲載したパンフレットを配布したことにより、各事業者に個別に商談があったとのことで、販路拡大に一定の効果があったと思われる。このパンフレットは、青マーク取得企業が自社の商談の際にスマイルケア食をPRし、普及促進を図る際にも活用されている。



図1. FOODEX JAPAN 2018の様子

以上のような取組みの結果、新聞やテレビ報道でも取り上げられることが増えており（表2）、スマイルケア食の認知度向上に寄与している。秋田県の取組みはNHKのおはよう秋田で初めて県外に紹介され、その後、全国農業新聞では秋田県が全国に先駆けてスマイルケア食の開発と普及に取り組んでいることが1面で大きく取り上げられた。今後さらに、県民だけでなく全国への啓蒙普及が進むことを期待している。

表2. 新聞・テレビ報道

新聞掲載	
平成28年12月17日	秋田魁新報 「介護食「青マーク」取得 あぐりこまち(秋田市)」
平成29年2月6日	秋田魁新報 「研究機関から 県産品使い介護予防」
平成29年5月9日	日本経済新聞 「東北技あり企業 あぐりこまち 産学官連携で付加価値」
平成29年5月13日	秋田魁新報 「県産農産物使い介護食 県、補正予算に開発費」
平成29年7月28日	秋田魁新報 「介護食開発へ産学官連携 「先進県」目指し研究会」
平成29年8月6日	河北新報 「秋田 介護食品の開発加速 官民連携 加工品出荷増へ」
平成30年2月22日	秋田魁新報 「栄養価の高さ お墨付き 介護食「青マーク」取得 高校の製品で全国初」
平成30年2月22日	北羽新報 「介護食品「スマイルケア食」に 豚なんこつ3商品 販路開拓の視野拡大」
平成30年3月23日	日本経済新聞 「新介護食 秋田で熱 都道府県でも最多」
平成30年6月22日	全国農業新聞 「高齢社会で市場拡大 秋田が全国に先駆け研究」
平成30年8月31日	秋田魁新報 「スマイルケア食研究会 普及に向け活動報告」
平成30年9月18日	河北新報 「変わる介護食 高齢県・秋田 地元企業参入の好機」
テレビ放映	
平成29年9月18、21日	秋田県広報番組 あきたびじょんNEXT (AAB、ABS、AKT)
平成30年4月5日	ABS秋田放送 news every.
平成30年4月16日	NHK ニュースこまち
平成30年5月15日	NHK おはよう秋田(東北6県に放映)
平成30年6月12日	AAB秋田朝日放送 トレタテ!
平成30年8月28日	AKT秋田テレビ PRIME news AKITA
平成30年8月28日	ABS秋田放送 news every.

【課題】

スマイルケア食の取組みにおける第1の課題は認知度の低さである。出前講座等で質問してみると、スマイルケア食はもちろん、UDF も知らない方が意外に多い。スマイルケア食は全国的にも商品数が少なく、スーパーや薬局で目にする機会が少ないことや、特に老老介護では市販の介護食品を利用することに抵抗を感じる人が多く、実生活における必要性を感じないことから興味を持たないことなどが理由と考えられる。介護者がスマイルケア食の利用によって調理の負担を少しでも減らすことが可能となるなど、介護者の意識を変えられるようなスマイルケア食の活用法などの啓蒙活動が必要かもしれない。また、全国的にスマイルケア食が盛り上がらないのは、早くから介護食分野に取り組む大手企業のほとんどがUDFを提唱する日本介護食品協議会の役員企業となっていることも大きいと考えている。最近ではUDFには無い区分である青マークへの参入がみられるようになったが、UDFからスマイルケア食の黄や赤マークへの転向にはかなりの時間を要すると考えられている。大手企業が参入する前に、秋田県から黄や赤マーク商品を出すことが望ましいが、スマイルケア食自体が盛り上がっていない現状では、企業の意欲も高まってはいない。

第2の課題は、スマイルケア食品の販路拡大である。啓蒙活動の際にはできるだけ

試食も行い、実際にスマイルケア食がどのようなものであるかを体験してもらっている。ここでも良く聞かれることが、「どこで購入できるか」、であり、現在は各事業者がそれぞれの販路で販売していることから、全商品をまとめて置いてある場が無いいため、消費者が購入しづらいことが課題であると考えている。スーパーや薬局などで、簡単にスマイルケア食が購入できる環境の整備が求められている。秋田のスマイルケア食商品を県外でPRする機会がほとんどないため、販路の拡大は難しいものとなっている。スマイルケア食のマークを取得することで既存商品の販路拡大を狙っているが、現状ではスマイルケア食であることに関心を持った商談は少なかったものと推測される。

秋田県には、特産品のハタハタをはじめとする魚介類や大豆など、たんぱく源となる様々な食材がある。しかしながら現状では魚を使用した商品が少ないため、今後、強化する必要があると思われる。

【今後の展望】

あきたスマイルケア食研究会の取り組みとしては、会員同士が自由に連携し、商品開発や販路拡大につながることを期待している。また、医療・福祉関連事業者との連携を強化し、介護の現場の声を商品開発に活かしたり、開発段階で利用者に試食してもらうなど、現場のニーズに合った商品開発を行っていききたい。

「スマイルケア食」は「新しい介護食の枠組み」とされているが、低栄養予防・改善を目的とした青マーク商品は、育ち盛りの子どもにも適していると考えられる。さらに、レトルトおかゆは、離乳食にも応用できる商品であるため、今後、高齢者向けの介護食に加え、乳幼児・児童向けの商品としての展開も考えている。

【謝辞】

本事業は、内閣府地方創生推進事業の地方創生応援税制（企業版ふるさと納税）の対象事業として、株式会社京急ショッピングセンターと、あいおいニッセイ同和損害保険株式会社より御支援いただいた。

【引用文献】

- 1) 内閣府（2018）平成30年版高齢社会白書
- 2) 熊谷昌則、上原健二、渡邊健、渡邊和子、大野智子（2017）
低栄養の予防と改善を目指したスマイルケア食「青」マーク利用許諾商品の開発
秋田県総合食品研究センター報告 19号 1-9.
- 3) 農林水産省食料産業局食品製造課（2016）スマイルケア食識別マーク利用許諾要領
- 4) 渡邊健、渡邊和子、大野智子、上原健二、熊谷昌則（2017）
低栄養の改善と予防を目指した利便性の高い「レトルトおかゆ」の開発
日本栄養改善学会 東北支部学術総会（秋田市）

- 5) 熊谷昌則、大野智子 (2017) 第 64 回日本栄養改善学会学術総会 (徳島市)
- 6) 松井ふゆみ、熊谷昌則 (2018) 第 65 回日本栄養改善学会学術総会 (新潟市)

4. 特許の概要 (2 件)

1) 発明の名称：レニン阻害剤、キマーゼ阻害剤、並びにレニン阻害活性及び／またはキマーゼ阻害活性を有する食品

発明者：葦澤悟、程永強、高橋砂織

2) 発明の名称：アンギオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、前期ポリペプチドをコードする遺伝子、前期遺伝子を含有する発現プラスミド、前期発現プラスミドで形質転換された形質転換体及び前期酵素の製造法

発明者：葦澤悟、高橋砂織

1) 発明の名称：レニン阻害剤、キマーゼ阻害剤、並びにレニン阻害活性及び／またはキマーゼ阻害活性を有する食品

発明者：葦澤悟、程永強、高橋砂織

特許番号：特許第 6284257 号

登録日：平成 30 年 2 月 9 日

【要約】

【特許の概要】これまでのレニン・アンギオテンシン系の標的酵素は、アンギオテンシン I から II への変換を触媒するアンギオテンシン変換酵素に限定されており、レニン及びキマーゼ阻害に関する食物由来の化合物に関する研究は殆ど見られない。本発明は、地衣類であるスルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ由来のレニン阻害活性及びキマーゼ阻害活性を提供することにある。

【解決手段】スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ、スルカリア・スルカタ抽出物又はロバリア・クロカワエ抽出物又はスルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ抽出物を含有するレニン阻害活性、キマーゼ活性測定及び降圧剤を提供することにある。

2) 発明の名称：アンギオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチド、前期ポリペプチドをコードする遺伝子、前期遺伝子を含有する発現プラスミド、前期発現プラスミドで形質転換された形質転換体及び前期酵素の製造法

発明者：葦澤悟、高橋砂織

出願番号：特願 2017-039917（特開：2018-14314）

出願日：平成 29 年 3 月 2 日（公開日：平成 30 年 9 月 2 日）

【要約】

【特許の概要】アンギオテンシン変換酵素 2 は、ヒトを含む哺乳類の血圧調節に重要な酵素である。本酵素は、レニン・アンギオテンシン系を負に調節して血圧降下作用を示す。アンギオテンシン変換酵素 2 は多様な糖鎖を持つ糖タンパク質であり、疎水性細胞膜貫通領域を持つ膜タンパク質であることから、大量発現は困難で、遺伝子組換え技術を用いて大量に生産出来るものが求められていた。本発明の目的は、糖鎖のない可溶性アンギオテンシン変換酵素 2 活性を有する酵素を提供することにある。

【解決手段】本発明は、*Paenibacillus* sp. B38 株由来の可溶性アンギオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチドを提供するものである。本発明は、前期ポリペプチドをコードする遺伝子又は、当該遺伝子の塩基配列の相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするアンギオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を提供する。また、本発明は、前期アンギオテンシン変換酵素 2 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含有する発現プラスミド及び前期発現プラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

5. 学会発表概要 (14 件)

1) 発表学会：第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2017 年 5 月 19 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 (パエニダーゼ) の各種組換え体の活性及び国際宇宙ステーションを利用した結晶化

発表者：○葦澤悟¹、中原和彦¹、木平清人²、高橋砂織³

(¹国際農研、²宇宙航空研究開発機構、³秋田県総食研)

2) 発表学会：秋田応用生命科学研究会 第 29 回講演会

発表日と場所：2017 年 5 月 19 日、秋田県総合食品研究センター (秋田市)

演題名：トランスポゾン解析を利用した秋田オリジナル麴菌「あめこうじ」の開発

発表者：小笠原博信 (秋田県総食研)

3) 発表学会：第 71 回日本栄養・食糧学会大会

発表日と場所：2017 年 5 月 20 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

演題名：Ubiquinol-10 が老化促進モデルマウスの骨格筋タンパク質代謝に及ぼす影響

発表者：○佐藤友紀^{1*}、伊藤芳明¹、長澤孝志¹

(¹岩手大院連合農・生物資源科学、*現秋田県総食研)

4) 発表学会：第 71 回日本栄養・食糧学会大会

発表日と場所：2017 年 5 月 20 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

演題名：L-リジンの経口摂取が老化促進モデルマウスの脂質代謝に及ぼす影響

発表者：○村松菜緒¹、佐藤友紀^{2*}、伊藤芳明¹、長澤孝志¹

(¹岩手大院農・応用生物化学、²岩手大院連合農・生物資源科学、*現秋田県総食研)

5) 発表学会：第 3 回日本栄養改善学会東北支部学術総会

発表日と場所：2017 年 6 月 4 日、カレッジプラザ (秋田市)

演題名：低栄養の改善と予防を目指した利便性の高い「レトルトおかゆ」の開発

発表者：渡邊健¹、渡邊和子²、大野智子^{3,4}、上原健二⁵、○熊谷昌則⁵

(¹あぐりこまち (株)、² (有) 宅配こまち、³ 元聖霊女子短大、⁴ 青森県立保健大、⁵ 秋田県総食研)

6) 発表学会：第 12 回日本調理科学会 東北・北海道支部学術総会

発表日と場所：2017 年 6 月 17 日、カレッジプラザ (秋田市)

演題名：酒粕の減塩味噌への添加効果を味覚センサで評価する

発表者：○熊谷昌則¹、大友理宣²、畠恵司¹、渡辺隆幸¹

(¹秋田県総食研、²秋田銘醸株式会社)

7) 発表学会：日本調理科学会平成 29 年度大会

発表日と場所：2017 年 8 月 31 日、お茶の水女子大学 (東京都)

演題名：秋田県の家料理：おやつの特徴および調理特性

発表者：○高山裕子¹、熊谷昌則²、大野智子³、山田節子¹、三森一司¹、高橋徹²、逸見洋子⁴、駒場千佳子⁵、長沼誠子⁶

(¹ 聖霊短大、² 秋田県総食研、³ 青森県立保健大、⁴ 秋田大、⁵ 女子栄養大、⁶ 元秋田大)

8) 発表学会：第 64 回日本栄養改善学会学術総会

発表日と場所：2017 年 9 月 14 日、アスティとくしま（徳島市）

演題名：スマイルケア食「青」マーク許諾食品の開発

発表者：○熊谷昌則¹、大野智子^{2,3}（¹ 秋田県総食研、² 元聖霊女子短大、³ 青森県立保健大）

9) 発表学会：第 11 回食香粧シンポジウム

発表日と場所：2017 年 11 月 10 日、東京農業大学世田谷キャンパス（東京都）

演題名：ヤムイモの機能性に関する研究

発表者：○関珠翠¹、菊野日出彦²、戸松誠³、妙田貴生¹、堀容嗣¹、戸枝一喜¹
（¹ 東京農大院・食香、² 東京農大宮古亜熱帯農場、³ 秋田県総食研）

10) 発表学会：第 30 回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2017 年 11 月 24 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：*Paenibacillus* sp. B38 由来カルボキシペプチダーゼのクローニングおよび大腸菌における発現

発表者：○葺澤悟¹、吉矢拓²、熊谷久美子²、高橋砂織³
（¹ 国際農研、² ペプチド研究所、³ 秋田県総食研）

11) 発表学会：第 30 回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2017 年 11 月 24 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：高血圧制御を目指した食物由来レニン・アンギオテンシン系酵素類阻害物質の網羅的解析

発表者：高橋砂織（秋田県総食研）

12) 発表学会：2017 年度生命科学系学会合同年次大会

（第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会）

発表日と場所：2017 年 12 月 8 日、神戸国際会議場（神戸市）

演題名：D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ生産菌 *Paenibacillus* sp. B38 由来メタロカルボキシペプチダーゼの性質

発表者：○葺澤悟¹、吉矢拓²、熊谷久美子²、高橋砂織³
（¹ 国際農研、² ペプチド研究所、³ 秋田県総食研）

13) 発表学会：日本食品科学工学会 2018 年北海道支部大会

発表日と場所：2018 年 3 月 9 日、オホーツク・文化交流センター（網走市）

演題名：ヤムイモ葉の乾燥工程におけるアミノ酸の生成とその利用

発表者：○関珠翠¹、菊野日出彦²、戸松誠³、妙田貴生¹、堀容嗣¹、戸枝一喜¹
（¹ 東京農大院・食香、² 東京農大宮古亜熱帯農場、³ 秋田県総食研）

14) 発表学会：日本農芸化学会 2018 年度大会

発表日と場所：2018 年 3 月 16 日、名城大学（名古屋市）

演題名：異質 2 倍体 *Zygosaccharomyces rouxii* は異質 1 倍体配偶子を作ることができる

のか？

発表者：○渡部潤¹、茂木亮介¹、上原健二²、月岡祐一郎¹

(¹ヤマサ醤油株式会社、²秋田県総食研)

1) 発表学会：第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2017 年 5 月 19 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（パエニダーゼ）の各種組換え体の活性及び国際宇宙ステーションを利用した結晶化

発表者：○葦澤悟¹、中原和彦¹、木平清人²、高橋砂織³

（¹国際農研、²宇宙航空研究開発機構、³秋田県総食研）

要旨：生体を構成する重要な物質であるアミノ酸には、2 種類の光学異性体（L 型および D 型）が存在する。地球上の生物は、これらのうち L 型アミノ酸によって構成されており、D 型アミノ酸は一部の細菌の細胞壁に存在するのみと考えられてきた。しかしながら、最近の分析手法の進歩により、哺乳類の生体内にも D 型アミノ酸の存在が見いだされている。さらに、これら D 型アミノ酸の中でも、特に D-アスパラギン酸が、タンパク質の異常な折り畳みが原因で生じるヒトの疾病（アルツハイマー病、白内障）の病変組織や皮膚の老化した組織などに存在することが報告されている。高橋らは、D-アスパラギン酸特異的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 (PAE) と命名し、その性質を解析した。¹⁾ これまでに、我々は PAE 遺伝子を同定し、大量発現系を構築した。また、前田らは、PAE により分解したペプチドの分析方法を、小笠原らは慢性閉塞性肺疾患の病変組織に PAE 感受性ペプチドが含まれることを報告した。^{2), 3)} 今回我々は、PAE 各種組換え体の活性を解析するとともに、国際宇宙ステーションを利用した PAE の結晶化を試みた。

PAE のアミノ酸配列から推定される活性部位に特異的変異を導入した各種組換え体 (S65A, S65C, K69A, K69I, Y149F, H276A) について、各種合成基質、合成ペプチドを用いて基質特異性を解析した。その結果、H276A は Wild-Type と同様に Suc-[D- α -Asp]-pNA, Suc-[D- α -Asp]-MCA, DAEFRH-[D- α -Asp]-SYG を加水分解したが、他のアミノ酸残基や [L- α -Asp], [L- β -Asp], [D- β -Asp] 残基を含む基質は加水分解しなかった。一方、S65A, S65C, K69A, K69I, Y149F は分析した全ての基質を加水分解しなかった。また、H276A の熱安定性を Wild-Type と比較したところ、同様なプロファイルを示した。以上の結果から、S65, K69 Y149 は PAE の触媒活性に重要な役割を担っているが、H276 は PAE の触媒活性、基質認識、安定性には寄与していないことが明らかとなった。次に、PAE の基質認識部位の立体構造を明らかにするために、PAE 及び S65A の結晶化を行った。これまでの結晶化実験では、結晶構造解析に十分な分解能が得られなかったことから、今回は国際宇宙ステーションを利用した結晶化を試みた。その結果、宇宙実験で得られた結晶は地上結晶と比較して、大きく、質が良い外形の異なる結晶が得られ、また分解能も向上していた。今後、立体構造を決定するとともに、基質アナログ等との複合体の構造解析を行う予定である。

(1) S. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.*, **139**, 197-202 (2006). (2) H. Maeda *et al.*, *Anal. Chem.*, **82**, 561-568 (2015). (3) M. Ogasawara *et al.*, *Exp. Lung. Res.*, **42**, 245-262 (2016).

2) 発表学会：秋田応用生命科学研究会 第29回講演会

発表日と場所：2017年5月19日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：トランスポゾン解析を利用した秋田オリジナル麴菌「あめこうじ」の開発

発表者：小笠原博信（秋田県総食研）

【目的】秋田県は麴文化県と言って良いほど麴を利用した多数の伝統的発酵食品がある。麴利用食品の人気の高まる昨今、さらに差別化してPRできる秋田県オリジナル麴の開発を目指した。すなわち、近年開発した新規育種手法を用い幅広い世代や全国に秋田の麴文化を広めることができるような新たな特徴を持つ麴菌株の開発に取り組んだ。

【方法と結果】①麴菌の内在性DNAトランスポゾンCrawlerの転移活性を利用した実用麴菌株育種：実用株のゲノムを広く調べることで麴菌が本来持っているDNAトランスポゾンCrawlerが転移活性を有することを初めて発見し、高温や高濃度Cu²⁺イオンなど強力なストレスにより転移することを見出した。内在性のトランスポゾンであることから、麴菌の環境適応能力を利用した「非組換え」遺伝子改変であり食品加工現場でもすぐに利用可能な実用麴株を多数得ることが可能となった。（味噌用白色麴菌WS61株）②吟醸酒用麴菌の育種と実用性評価：吟醸酒用に精米した酒米を用いた少量製麴により、GA活性が維持され酒粕の褐変性要因であるチロシナーゼ活性が30%以下に低下し、アミノ酸度が低い株（CK33株）を得ることができた。CK33株を用いた小仕込み試験では香りが高く、「すっきり」タイプの吟醸酒が生成され、酒粕の褐変性は低かった。以上、CK33株が新しい吟醸酒用麴菌として利用出来ることを明らかにした。③食品加工用麴への応用：90%精米あきたこまちでのCK33株による麴試作を行ったところ、吟醸酒用麴と同様に外観の白色性が保たれ、糖化活性も高くなることが判明した。甘酒の試作においても、甘味は強いがすっきりとした味わいの甘酒が得られた。以上、CK33株による麴は甘くすっきりした新しいタイプであり、漬物など麴が従来使用されている加工品に止まらず、甘酒による甘味素材として菓子などへ応用できる優れた麴であることが判明した。④産業上の効果：秋田県では近年、発酵食品や伝統食品のイメージをPRしながら、地域加工食品の販売促進を推進している。平成26年、秋田オリジナル麴CK33株に「あめこうじ」という愛称およびロゴマークを冠し、当該麴を利用した商品造成の推進と秋田の麴文化を核とした売り込みを推進している。現在まで新しいタイプの甘酒や水産加工品、およびパンやお菓子などでも新商品の販売がなされている。今後、さらに活用を広げて秋田県の発酵食品のPRに大きく寄与するものと期待される。

3) 発表学会：第71回日本栄養・食糧学会大会

発表日と場所：2017年5月20日、沖縄コンベンションセンター（沖縄県）

演題名：Ubiquinol-10が老化促進モデルマウスの骨格筋タンパク質代謝に及ぼす影響

発表者：○佐藤友紀^{1*}、伊藤芳明¹、長澤孝志¹

¹岩手大院連合農・生物資源科学、*現秋田県総食研

【背景】加齢に伴う筋肉量及び筋力の衰え、すなわちサルコペニアの発症には、酸化ストレスや低栄養の関与が指摘されている。コエンザイム Q10 (CoQ10) には、酸化型の ubiquinone-10 (QO) と還元型の ubiquinol-10 (QH) があり、QH には抗酸化性が報告されている。一方、QH が骨格筋タンパク質代謝に及ぼす効果や、骨格筋細胞内における QH の抗酸化能は明らかではない。そこで本研究では、QH が骨格筋タンパク質代謝に及ぼす影響を、マウス横紋筋由来 C2C12 細胞と、加齢依存的な筋肉量の減少を示す老化促進モデルマウス SAMP8 で評価した。

【方法】C2C12 筋芽細胞を 2%ウマ血清含有 DMEM で 4 日間培養して筋管細胞へ分化させた。分化誘導 3~4 日目の間、QH 又は QO を 10~20 μ M となるように培地に加えた。分化誘導 4 日目に培地を無血清の DMEM に交換し、250 μ M の過酸化水素に曝露した。細胞内の活性酸素種 (ROS) を DCF-DA を用いて、オートファジー活性を western blotting による LC3-II の検出により評価した。24 週齢の SAMP8 に 0.3%QH (P30 として 1%) 又は 0.3%QO (原末) 添加食を与え、42 週齢まで飼育した。筋原線維タンパク質分解速度を単離筋肉切片からの 3-methylhistidine 放出量から、タンパク質分解システムの活性を LC3-II やユビキチン化タンパク質量から評価した。

【結果及び考察】C2C12 筋管細胞において、過酸化水素処理で ROS とオートファジーが誘導された。QO は ROS の消去に寄与しなかったが、QH は ROS の消去とオートファジーの抑制に働いた。QH を摂取した SAMP8 では、通常食を摂取した SAMP8 と比較して筋重量が重い傾向が認められたが、SAMP8 で亢進した筋原線維タンパク質分解速度やタンパク質分解システムの活性に影響はなかった。SAMP8 では加齢依存的に摂食量が減少したが、QH の摂取により、摂食量の減少が顕著に抑えられた。以上より、QH は食欲の減退を防ぎ、エネルギーの生産効率を改善することで筋肉量の減少を緩和すると考えられた。

4) 発表学会：第 71 回日本栄養・食糧学会大会

発表日と場所：2017 年 5 月 20 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

演題名：L-リジンの経口摂取が老化促進モデルマウスの脂質代謝に及ぼす影響

発表者：○村松菜緒¹、佐藤友紀^{2*}、伊藤芳明¹、長澤孝志¹

(¹岩手大院農・応用生物化学、²岩手大院連合農・生物資源科学、*現秋田県総食研)

【背景】近年、加齢に伴う筋肉量の減少 (サルコペニア) や非アルコール性脂肪肝に対する予防や治療法が注目されている。必須アミノ酸である L-リジン (Lys) はサルコペニア抑制作用があることを私たちは示してきたが、脂質代謝との関連もまた報告されている。本研究では Lys の食事性肥満モデル及び老化促進モデルマウス (SAMP8) の脂質代謝に対する影響を検討した。

【方法】実験 1：7 週齢雄の C57BL/6J マウスを 3 群に分け、AIN93G に準拠したコントロール食 (C)、高脂肪食 (HF)、1.5%Lys 添加高脂肪食 (K) を 4 ヶ月間与えた。最終日に 4 時間絶食後に屠殺・解剖し、血漿及び肝臓中の脂質濃度と肝臓におけ

る脂質代謝関連酵素のタンパク質発現量を測定した。

実験 2： 24 週齢雄の SAMP8 を 2 群に分け、AIN93M に準拠した 14%カゼイン食 (P) と 1.5%Lys 添加 14%カゼイン食 (K) を 4 ヶ月間与えた。また 14%カゼイン食を与える SAMR1 (R) を対照群として設けた。最終日の食餌摂取 3 時間後に屠殺・解剖を行い、実験 1 の測定項目に加えて肝臓中の脂質代謝関連酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により評価した。

【結果と考察】 実験 1： 肝臓重量に差はなかったが、K 群では HF 群に比べて肝臓中トリグリセリド (TG) や総コレステロール (TC) 量が低値を示した。

実験 2： P 群では R 群に比べて体重が減少した一方で、肝臓中 TG や TC 蓄積量が増加していたが、Lys 摂取はそれらを抑制することが示された。また、Lys 摂取による脂肪酸合成に関わる ACC や FAS のタンパク質発現量への影響は見られなかった一方で、 β 酸化において重要な Cpt1a の遺伝子発現量が増加した。よって Lys は β 酸化を亢進させることで肝臓中の TG 蓄積量を抑えた可能性がある。

以上より、L-リジンの摂取は食事性肥満だけではなく、加齢により生じる脂肪肝の抑制に寄与することが示された。今後はその抑制メカニズムの解明を進める予定である。

5) 発表学会：第 3 回日本栄養改善学会東北支部学術総会

発表日と場所：2017 年 6 月 4 日、カレッジプラザ (秋田市)

演題名：低栄養の改善と予防を目指した利便性の高い「レトルトおかゆ」の開発

発表者：渡邊健¹、渡邊和子²、大野智子^{3,4}、上原健二⁵、○熊谷昌則⁵

(¹ あぐりこまち (株)、² (有) 宅配こまち、³ 元聖霊女子短大、⁴ 青森県立保健大、⁵ 秋田県総食研)

【目的】おかゆは、消化不良あるいは飲み込みが困難なときの食事提供手段として有効であるが、水が主成分のため栄養量としては不足がちになる。そこで、エネルギー、たんぱく質を強化することによって低栄養の改善と予防効果が期待でき、利便性・簡便性が高く、保存性にも優れたレトルトおかゆを新たに開発することを目的とした。

【方法】嚥下・咀嚼機能などに問題はないが、健康維持上、栄養補給が必要な人向けの食品として農林水産省が普及に取り組むスマイルケア食「青」マーク表示基準を満たすおかゆについて組成化検討を行った。試作品の風味や食感については、管理栄養士、介護員らを対象とした試食モニター試験を実施して評価した。

【結果】白米のおかゆに、あずきと砂糖などを添加することによって、エネルギー、たんぱく質が強化された、常温保存が可能な『しるこ風味のおかゆ』を開発した。このとき、たんぱく質補強ならびに褥瘡予防、改善などの目的でコラーゲンペプチドを配合した。また、整腸効果などが期待される食物繊維について、「含む旨」の強調表示が可能な基準 100g 当たり 3g 以上 (消費者庁) を満たすように配合した。本品は、農林水産省が取り組むスマイルケア食「青」マーク利用基準を満たしていることが (一財) 日本食品分析センターの栄養分析により実証されたことから、同省より「青」マ

ーク利用許諾証が、全国6社目、東北では初めて交付された。

6) 発表学会：第12回日本調理科学会 東北・北海道支部学術総会

発表日と場所：2017年6月17日、カレッジプラザ（秋田市）

演題名：酒粕の減塩味噌への添加効果を味覚センサで評価する

発表者：○熊谷昌則¹、大友理宣²、畠恵司¹、渡辺隆幸¹

(¹秋田県総食研、²秋田銘醸株式会社)

【目的】酒粕には、醸造過程で発生する豊富な糖分、たんぱく質、有機酸、アミノ酸、酵母などが含まれている。そのため、調味に用いると甘味やうま味、コクなどの付与や、肉や魚などの生臭みのマスキングの効果があるとされる。我々は、酒粕の各種食品に対する添加効果について、味覚センサを用いて評価しているが、今回は、減塩味噌に対する呈味効果について得られた知見を報告する。

【方法】酒粕は、秋田銘醸株式会社製の「爛漫酒粕粉末」を用いた。減塩味噌は、秋田県内のメーカーが製造販売しているヤマキウあま塩秋田味噌（小玉醸造）、福寿おいしい減塩生みそ（浅利佐助商店）、石孫の金の蔵（石孫本店）と、比較のためにレギュラー品としてヤマキウ秋田味噌（小玉醸造）の計4点を測定に供した。味覚センサは、味認識装置 SA402B（(株) インテリジェントセンサーテクノロジー社）を用いて、感受性の異なる5種類の脂質膜センサの応答による味覚強度の測定を行った。

【結果】0.05%から1%まで、それぞれ段階的に濃度を変化させた食塩の希釈溶液の測定結果から、味覚センサの塩味応答値は、感覚に関する精神物理学の基本法則のひとつである、感覚強度が刺激の対数に比例して変化するという Weber-Fechner の法則に合致することが示された。本実験で用いた味覚センサでは、5種類の脂質膜センサ応答値を用いることによって、塩味、うま味など8種類の味推定値が得られる。そこで、この味推定値を変数として相関係数行列から出発する主成分分析を適用して次元を圧縮し、得られた主成分得点散布図からなる2次元の味覚マップを作成した。これには、主成分1と2の寄与率の合計から、全データ情報量の約83%が反映されていた。この味覚マップでは、それぞれの味噌の味の違いに基づく位置関係が見える化されている。このとき、因子負荷量ベクトルの方向により、味の違いや特徴を読み解くことができる。これにより、酒粕を減塩味噌に添加することによってうま味コク、塩味が増強され、苦味、渋味が低減される効果のあることが味覚センサ応答値により示唆された。今後は、官能評価実施して、本結果と合わせて比較評価する予定である。

7) 発表学会：日本調理科学会平成29年度大会

発表日と場所：2017年8月31日、お茶の水女子大学（東京都）

演題名：秋田県の家庭料理：おやつの特徴および調理特性

発表者：○高山裕子¹、熊谷昌則²、大野智子³、山田節子¹、三森一司¹、高橋徹²、逸見洋子⁴、駒場千佳子⁵、長沼誠子⁶

(¹聖霊短大、²秋田県総食研、³青森県立保健大、⁴秋田大、⁵女子栄養大、⁶元

秋田大)

(目的) 日本調理科学会特別研究平成 24~25 年度『次世代に伝え継ぐ 日本の家庭料理』の聞き書き調査を通して、秋田県における次世代に伝えるべき家庭料理を抽出し、前回平成 28 年度大会の特別企画において主食の特徴について報告した。今回は得られた料理の「おやつ」に着目し、その特徴と調理特性について明らかにすることを目的とした。

(方法) 秋田県内 8 調査地域 (鹿角・北秋田・山本・秋田・由利・仙北・平鹿・雄勝) において、昭和 35~45 年頃に調理を担当していた対象者 19 名 (女性、74.2±7.8 歳) に聞き書き調査を実施した。調査から得られた 110 の料理について、主食・主菜・副菜・汁物・おやつに分類した。そのうち、おやつに該当する料理を抽出し、その特徴および調理特性について調査した。

(結果) おやつに該当した 23 の料理は、多くは日常、食されているものであるが、祭り・行事にて食されるものも 5 つ挙げられた。調理操作では、「蒸す」が全地域で多かったが、「揚げる」「焼く」も見られた。主材料では、米・米粉を使用するものが多く、県内全域において、おやき、干し餅・あられが、各地域で、ゆみそ、ごま巻き餅、バター餅、ままづけ、厚焼き、あさづけ、なんばこ、松皮もち、ゆべしが挙げられた。また、米・米粉以外に、県央部の沿岸地域においては、魚を使った磯部揚げ、県南部の内陸地域において、豆腐を主材料にした、豆腐カステラ、豆腐巻きなどが、地域固有のおやつとして継承されていた。

8) 発表学会：第 64 回日本栄養改善学会学術総会

発表日と場所：2017 年 9 月 14 日、アスティとくしま (徳島市)

演題名：スマイルケア食「青」マーク許諾食品の開発

発表者：○熊谷昌則¹、大野智子^{2,3} (¹秋田県総食研、²元聖霊女子短大、³青森県立保健大)

【目的】嚥下・咀嚼などの食機能に問題はないものの、健康維持上、栄養補給が必要な人向けの食品として農林水産省が普及に取り組むスマイルケア食「青」マーク表示基準を満たす食品を新規に開発することを目的とした。

【方法】1) 事前検討として、介護員らを対象とした市販介護食品のニーズ調査を実施した。2) 「青」マーク表示基準を満たす食品として、エネルギー、たんぱく質を強化したおかゆの組成化を検討した。3) 栄養成分分析により、当該製品の基準適合の可否判定を行った。4) 管理栄養士、介護員らを対象とした当該製品の試食モニター試験を実施した。

【結果】1) 市販介護食品には、食べやすさ、飲み込みやすさ、おいしさの次に栄養強化が求められていた。2) 白米のおかゆに、あずきと砂糖などを添加した、利便性・簡便性にも優れて常温保存が可能なレトルトの『しるこ風味のおかゆ』を開発した。このとき、たんぱく質補強ならびに褥瘡予防、改善などの目的でコラーゲンペプチドを配合した。コラーゲンペプチドは、日本褥瘡学会「褥瘡予防管理ガイドライン (第 4

版)」において、褥瘡患者に有効な栄養素として、従来の「亜鉛」、「アスコルビン酸」などに加えて新たに追加された成分でもある。また、整腸効果などが期待される食物繊維について、「含む旨」の強調表示が可能な基準 100g 当たり 3g 以上（消費者庁）を満たすように配合した。3) 日本食品分析センターの分析により、当該製品は基準を満たしていることが実証され、農林水産省よりスマイルケア食「青」マーク利用許諾証が交付された。4) 試食モニター試験の結果は全体として評価は良好であったが、見た目や1食あたりの量がやや多いなどの改良余地があることが分かった。

【考察】小売店などでも入手しやすいスマイルケア食の開発と普及には、既存の介護食関連事業者に加えて、食品製造事業者らの新規参入を促す必要がある。

9) 発表学会：第 11 回食香粧シンポジウム

発表日と場所：2017 年 11 月 10 日、東京農業大学世田谷キャンパス（東京都）

演題名：ヤムイモの機能性に関する研究

発表者：○関珠翠¹、菊野日出彦²、戸松誠³、妙田貴生¹、堀容嗣¹、戸枝一喜¹

(¹東京農大院・食香、²東京農大宮古亜熱帯農場、³秋田県総食研)

先行研究よりナガイモの乾燥葉には γ -アミノ酪酸 (GABA) が含まれ、乾燥中に増加することが認められた。本実験は、ナガイモと同属のヤムイモ 24 品種について乾燥工程における GABA 含有量の変化を測定した。生葉での GABA 含有量は検出限界以下であったが、GABA 前駆体であるグルタミン酸 (Glu) は高含有であった。乾燥により GABA と Glu が経時的に増加したことから、葉中のタンパク質より新たに Glu が供給され、GABA に変換されていることが推測された。

10) 発表学会：第 30 回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2017 年 11 月 24 日、秋田県総合食品研究センター（秋田市）

演題名：*Paenibacillus* sp. B38 由来カルボキシペプチダーゼのクローニングおよび大腸菌における発現

発表者：○葺澤悟¹、吉矢拓²、熊谷久美子²、高橋砂織³

(¹国際農研、²ペプチド研究所、³秋田県総食研)

【目的】ヒトの血圧調節を担うレニン-アンジオテンシン系において、レニン、アンジオテンシン変換酵素 (ACE)、ACE2、キマーゼなどのタンパク質加水分解酵素が重要な役割を担っている。高橋らは、消光性蛍光基質を用いてレニン[1]、ACE[2]、ACE2[3]、キマーゼ[4]の活性測定方法を確立し、各種食材よりそれらの阻害物質を同定した。これらのうちヒト ACE2 は、膜結合ドメインを有する糖タンパク質であり、遺伝子組換え技術等による酵素の大量生産が比較的難しい。そこで今回我々は、ヒト ACE2 の代替となりうる微生物由来 ACE2 の取得を目的とした。

【方法】高橋らにより単離された D 型アスパラギン酸残特異的エンドペプチダーゼ (Paenidase) 産生菌 *Paenibacillus* sp. B38 株[5]のゲノム塩基配列は、次世代シーケンサーにより解析した。アミノ酸配列の相同性検索には BLAST を用いた。タンパ

ク質立体構造の相同性検索には MOE(CCG 社、カナダ)を用いた。酵素遺伝子は PCR 法により取得し、pET-28a にクローニングした。得られたプラスミドで大腸菌を形質転換し、酵素の大量発現を行った。

【結果と考察】 ヒト ACE2 の立体構造相同性検索により *Bacillus subtilis* M32 株由来カルボキシペプチダーゼ (M32CP) を見出した。M32CP と相同なアミノ酸配列を B38 株ゲノム塩基配列から検索したところ、1 種類の配列を取得した。ゲノム配列で欠損していた部分を TAIL-PCR 法により取得し、全長塩基配列を解析したところ、本酵素のアミノ酸残基数は 504、分子量は 57,597 であることが明らかとなった。本酵素を大腸菌により発現させたところ、菌体可溶性画分に大量の組換え酵素が得られた。精製酵素の Nma-His-Pro-Lys(Dnp)に対する動力学定数 (K_m 22 μ M, k_{cat} 188 s⁻¹) は ACE2 と近似な値 (K_m 23 μ M, k_{cat} 167 s⁻¹) [3]を示した。

【参考文献】

- [1] Takahashi S. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3232-3236 (2007)
- [2] Takahashi S. *et al.*, *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011)
- [3] Takahashi S. *et al.*, *Biomed. Res.*, **36**, 219-224 (2015)
- [4] Takahashi S. *et al.*, *J. Biol. Macromol.*, **17**, 3-13 (2017)
- [5] Takahashi S. *et al.*, *J. Biochem.* **139**, 197-202 (2006)

11) 発表学会：第 30 回秋田応用生命科学研究会講演会

発表日と場所：2017 年 11 月 24 日、秋田県総合食品研究センター (秋田市)

演題名：高血圧制御を目指した食物由来レニン・アンジオテンシン系酵素類阻害物質の網羅的解析

発表者：高橋砂織 (秋田県総食研)

【目的】レニン-アンジオテンシン系 (RAS) は哺乳類で最も重要な血圧調節系である。演者らは、これまで RAS を構成する酵素類 (レニン、ACE、ACE2 やキマーゼ) の高感度・迅速測定方法を開発している [1-6]。また、これらの測定法を駆使して、各種県産食材よりレニン、ACE、ACE2 やキマーゼ阻害物質を同定した [2-4, 6]。本発表では、RAS 系各種酵素類の新規活性測定方法の開発とそれを用いた RAS 酵素阻害物質の同定について解説する。

【方法】RAS を構成する各酵素の基質特異性を加味して最適な蛍光消光基質を開発した。本研究で用いた基質類は全て我々の研究グループが開発したものであり、現在、(株) ペプチド研究所 (大阪府箕面市) から入手可能である。具体的には、レニン活性測定用基質として、2-Methylamino benzoyl (Nma)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu*Val-Ile-His-Thr-[N^ε-(2,4-dinitrophenyl)-Lys(Lys(Dnp))]-D-Arg-D-Arg-NH₂ を ACE 活性測定用基質として、Nma-Phe*His-Lys(Dnp)-COOH をさらに、ACE2 活性測定用として、Nma-His-Pro*Lys(Dnp)-COOH を開発した。また、キマーゼ活性測定用基質として、レニンとの切断部位が異なるもののレニン基質 Nma-Ile-His-Pro-Phe*His-Leu-Val-Ile-His-Thr-Lys(Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH₂ がキマーゼ活性測定にも応用出来ることが示さ

れている。(各基質の*印は、基質切断部位を示す。) これらの蛍光消光基質は、蛍光物質が Nma で同一であることから、基質と酵素を適宜組み合わせることで、異なる酵素阻害活性を同一マイクロプレートで測定出来る大きなメリットがある

【結果と考察】最初に各種食材よりレニン阻害物質の探索を行った。その結果、味噌にレニン阻害活性を見いだした [7]。味噌の原材料を検討した結果、大豆がレニン阻害物質を含むことが判明し、大豆胚軸をより食物由来で最初のレニン阻害物質としてソヤサポニン I を同定した [2]。また、山菜のウドや米にもレニン阻害物質を見いだし、化合物の同定にも成功している [5]。その他、酵素処理豆乳からは新規 ACE 阻害ペプチド類 [8]を、また、食物由来最初の ACE2 阻害として大豆よりニコチアミンを同定した [4]。さらに、ジュンサイにキマーゼ阻害活性を見いだし、ジュンサイポリフェノール類が阻害活性を持つことなどを明らかとしている [6]。今後これらの食材を活用した機能性食品の開発が期待される。

【参考文献】 [1] *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2610-2613 (2007), [2] *ibid.*, **72**, 3232-3236 (2008), [3] *Biomed. Res.*, **32**, 407-411 (2011), [4] *ibid.*, **36**, 219-224 (2015), [5] *J. Biol. Macromol.*, **14**, 71-84 (2014), [6] *ibid.*, **17**, 3-13 (2017), [7] *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2913-2918 (2006), [8] *Food Chem.*, **136**, 612-616 (2013).

12) 発表学会：2017 年度生命科学系学会合同年次大会

(第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会)

発表日と場所：2017 年 12 月 8 日、神戸国際会議場 (神戸市)

演題名：D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼ生産菌 *Paenibacillus* sp. B38 由来メタロカルボキシペプチダーゼの性質

発表者：○葦澤悟¹、吉矢拓²、熊谷久美子²、高橋砂織³

(¹国際農研、²ペプチド研究所、³秋田県総食研)

要旨：D 型のアスパラギン酸残基を特異的に認識するエンドペプチダーゼは、現在までにマウス及び原核微生物由来の 2 種類のみが知られている。この大変ユニークな酵素を産生する原核微生物 *Paenibacillus* sp. B38 は、高橋らにより単離された¹⁾。一方、ヒトの血圧調節を担うレニン-アンジオテンシン系の酵素であるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 及び ACE2 はメタロカルボキシペプチダーゼであり、ペプチダーゼファミリー M2 に属する。今回我々は、次世代シーケンサーにより解析した *Paenibacillus* sp. B38 ゲノム塩基配列から、メタロカルボキシペプチダーゼと相同性のある酵素を *in silico* スクリーニングし、これをクローニングするとともに大腸菌で発現させ、得られた組換え酵素の性質を解析した。BLAST 検索法を用いて、*Paenibacillus* sp. B38 ゲノム塩基配列より、メタロカルボキシペプチダーゼと相同なアミノ酸配列を検索したところ、1 種類の ORF を得た。この ORF より推定されるアミノ酸配列は、ファミリー M32 に属する細菌由来メタロカルボキシペプチダーゼ群と相同性があった。また、ファミリー M2 及び M32 に属するメタロカルボキシペプチダーゼの活性部位モチーフ (His-Glu-Xaa-Xaa-His) は、本酵素にも保存されていた。つぎに、

Paenibacillus sp. B38 より精製したゲノム DNA を鋳型として PCR 法により本酵素遺伝子の取得し、pET28a を用いて大腸菌により本酵素を生産した。得られた組換え酵素の基質特異性を調べたところ、蛍光消光基質 *N*-methylanthranil (*Nma*)-His-Pro-Lys[2,4-dinitrophenyl (*Dnp*)]²⁾ 及び *Nma*-Phe-His-Lys(*Dnp*)³⁾ を切断した。また、*Nma*-Xaa-Pro-Lys(*Dnp*) (Xaa はシステイン以外の 19 種類のアミノ酸) を用いて解析したところ、切断部位は Pro-Lys(*Dnp*) 間であること、Xaa が疎水性アミノ酸 (脂肪族 > 芳香族) の場合によく切断されること、酸性アミノ酸及びグリシンの場合には切断されにくいことが明らかとなった。さらに、本酵素は、ACE2 の酵素反応と同様に、アンジオテンシン I をアンジオテンシン (1-9) に変換するとともに、ACE2 インヒビターである Nicotianamine によって阻害された。以上の結果は、ヒト ACE2 及び細菌メタロカルボキシペプチダーゼの構造機能相関を考察する上で、有力な知見になると考えられる。 1) Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **139**, 197-202, 2006. 2) Takahashi *et al.*, *Biomed. Res.* **36**, 219-224, 2015. 3) Takahashi *et al.*, *Biomed. Res.* **32**, 407-411, 2011.

13) 発表学会：日本食品科学工学会 2018 年北海道支部大会

発表日と場所：2018 年 3 月 9 日、オホーツク・文化交流センター (網走市)

演題名：ヤムイモ葉の乾燥工程におけるアミノ酸の生成とその利用

発表者：○関珠翠¹、菊野日出彦²、戸松誠³、妙田貴生¹、堀容嗣¹、戸枝一喜¹

(¹東京農大院・食香、²東京農大宮古亜熱帯農場、³秋田県総食研)

【はじめに】ヤムイモはヤマノイモ科ヤマノイモ属(*Dioscoreaceae Dioscorea*)に属し、塊茎を食用とする種の総称である。主に熱帯・亜熱帯地域で栽培され、96%をアフリカが占めている。日本で栽培されているヤムイモは、主にヤマイモ、ナガイモ、ダイジョであり、ナガイモは寒冷地での栽培も可能なことから、北海道でも生産が盛んに行われている。その一方で、収穫後に残る葉は大量に廃棄されている。本研究では、ヤムイモ未利用部位の有効活用法を見出すため、イモ収穫後に廃棄される葉の機能性と活用法を探索することを目的とした。

【方法】実験には 2017 年 8,9,11 月に採取した網走産マクベツ系統のナガイモ(*D. polystachya*)の葉と、同年 7,11,12 月に採取した宮古島産のダイジョ(*D. alata*)、トゲイモ(*D. esculenta*)の葉、合計 25 品種を使用した。これらを凍結乾燥、自然乾燥、恒温乾燥、嫌気乾燥させたものを試料とし、遊離アミノ酸含量の乾燥条件による変動、および生育段階による推移を測定した。イモ収穫後の葉の活用法としてお茶の利用を例に、乾燥条件・抽出温度による遊離アミノ酸含量と味の違いを評価した。

14) 発表学会：日本農芸化学会 2018 年度大会

発表日と場所：2018 年 3 月 16 日、名城大学 (名古屋市)

演題名：異質 2 倍体 *Zygosaccharomyces rouxii* は異質 1 倍体配偶子を作ることができるのか？

発表者：○渡部潤¹、茂木亮介¹、上原健二²、月岡祐一郎¹

(¹ヤマサ醤油株式会社、²秋田県総食研)

【目的】醤油の主発酵酵母である *Zygosaccharomyces rouxii* は近縁の 2 種間の交雑により生じた異質 2 倍体である。異質 2 倍体は同祖染色体の非相同性により正常な減数分裂ができないため不稔となるが、異質 2 倍体 *Z. rouxii* は染色体転座による Mating-Type 遺伝子座のヘテロ接合性の消失により、接合能を回復している。そのため、異質 2 倍体間での接合が可能であり、異質 4 倍体となることで染色体数を倍加させ、稔性を回復することに成功している 1)。近年、野生の出芽酵母 *Saccharomyces paradoxus* における homoploid hybrid speciation (染色体数の変化を伴わない種分化) が報告された 2)。これは自然界において異質 2 倍体由来の異質 1 倍体が発生し得ることを示唆している。今回、我々は、*Candida versatilis* と誤同定されていた t-1 株が異質 2 倍体 *Z. rouxii* に由来する異質 1 倍体であることを明らかにしたので報告する。

【方法】ゲノムデータは NCBI のホームページからダウンロードした。オルソログ遺伝子の検出は TBLASTN を用いてマニュアルで実施した。シンテニーを確認するため、Yeast Genome Annotation Pipeline で注釈付けを行った後、Yeast Gene Order Browser で解析した。

【結果】t-1 株と *C. versatilis* JCM5958 株のゲノムを比較したところ、両者の GC 含量に顕著な差があることを見出した。JCM5958 株の 26S rDNA D1/D2 領域は *C. versatilis* CBS1752T 株のそれと 99% の相同性を示したが、t-1 株の D1/D2 領域は *Z. rouxii* CBS732T 株のそれと 100% の相同性を示した。この結果は、t-1 株は *C. versatilis* よりも *Zygosaccharomyces* 属に近縁であり、t-1 株の同定が誤りである可能性を示していた。この可能性を検証するため、ゲノムワイドなシンテニーと相同性について確認を行ったところ、t-1 株が *Z. rouxii* に類似した 1 倍体であることが示唆された。t-1 株の起源及び系統的な位置を確認するため、14 個のオルソログ遺伝子にコードされたタンパク質の分子進化系統解析及びゲノム間の相同性の比較を実施した。その結果、t-1 株のゲノムは異質 2 倍体 *Z. rouxii* の両祖先に由来すると考えられる配列から構成されることが明らかとなり、t-1 株は異質 2 倍体 *Z. rouxii* の減数分裂又は染色体欠損により生じた異質 1 倍体であることが示唆された 3)。

1) Watanabe et al., Appl. Environ. Microbiol. 83:21 (2017)

2) Leducq et al., Nat. Microbiol. 1: 15003 (2015)

3) Watanabe et al., Appl. Environ. Microbiol. In press (2018)

6. 外部発表論文概要 (9 件)

1) 論文題名 : **Inhibition of renin-angiotensin system related enzymes (renin, angiotensin converting enzyme, chymase, and angiotensin converting enzyme 2) by water shield extracts.**

著者名 : Saori Takahashi, Ai Sato, Hiroshi Shimoda, and Keishi Hata

雑誌名 : *Journal of Biological Macromolecules* **17**(1), 3-13 (2017)

発行日 : 2017 年 6 月 1 日

2) 論文題名 : **Citrus jabara Extracts Suppress MUC5AC Mucin Production in Human Lung Epithelial Cells.**

著者名 : Jun Iwashita, Naoki Iguchi, Akiko Takashima, Daisuke Watanabe, Kimihiko Sano, Masahiko Ishikuro, Keishi Hata, and Jun Murata

雑誌名 : *Advances in Biological Chemistry* **7**, 139-150 (2017)

発行日 : 2017 年 6 月 29 日

3) 論文題名 : 味噌由来高血圧予防因子について

著者名 : 高橋砂織

雑誌名 : 温古知新 **54**、 19-28 (2017)

発行日 : 2017 年 7 月 31 日

4) 論文題名 : 「あめこうじ」を秋田の麴の宝に！～秋田オリジナル麴「あめこうじ」の開発と利用～

著者名 : 尾張かおる

雑誌名 : 温古知新 **54**、 44-49 (2017)

発行日 : 2017 年 7 月 31 日

5) 論文題名 : 秋田県産未利用農水産物資源を活用した機能性素材の開発

著者名 : 畠恵司

雑誌名 : 食品と開発 **52** (1)、72-74 (2017)

発行日 : 2017 年 8 月 1 日

6) 論文題名 : ジュンサイエキスと酒粕粉末から調製したサプリメント摂取による成人健康女性に対する便通改善作用

著者名 : 高嶋亜希子、佐野公彦、村上正代、上原健二、佐々木玲、樋渡一之、熊谷昌則、畠恵司

雑誌名 : 生薬学雑誌 **71** (2)、94-97 (2017)

発行日 : 2017 年 8 月 1 日

7) 論文題名 : 「ジュンサイ+酒粕」サプリメント摂取による肌の毛穴引き締め効果

著者名 : 畠恵司、村上正代、高嶋亜希子、佐野公彦

雑誌名 : 食品と開発 **52** (9)、72-74 (2017)

発行日 : 2017 年 9 月 11 日

8) 論文題名 : **Mechanism for Restoration of Fertility in Hybrid *Zygosaccharomyces rouxii* Generated by Interspecies Hybridization.**

著者名 : Jun Watanabe, Kenji Uehara, and Yuichiro Tsukioka

雑誌名 : *Applied and Environmental Microbiology* , 78(21), e01187-17 (2017)

発行日 : 2017 年 10 月 17 日

9) 論文題名 : Can interspecies hybrid *Zygosaccharomyces rouxii* produce allohaploid gamete?

著者名 : Jun Watanabe, Ryosuke Mogi, Kenji Uehara, and Yuichiro Tsukioka

雑誌名 : *Applied and Environmental Microbiology* , AEM.01845-17 (2017)

発行日 : 2017 年 10 月 27 日

1) 論文題名 : Inhibition of renin-angiotensin system related enzymes (renin, angiotensin converting enzyme, chymase, and angiotensin converting enzyme 2) by water shield extracts.

著者名 : Saori Takahashi, Ai Sato, Hiroshi Shimoda, and Keishi Hata

雑誌名 : *Journal of Biological Macromolecules* **17**(1), 3-13 (2017)

発行日 : 2017 年 6 月 1 日

要約 : We screened for the inhibitory activities of 19 wild vegetable and fruit extracts for renin-angiotensin system (RAS)-related enzymes, including renin, angiotensin converting enzyme (ACE), chymase, and angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). Among them, a hot water extract of *Brasenia schreberi* (Water shield, Junsai) strongly inhibited renin and chymase activities and significantly inhibited ACE and ACE2 activities. We also tested RAS-related enzyme inhibitory activities of 13 polyphenols isolated from *Brasenia schreberi*. The polyphenols mostly had little effect on ACE and ACE2 activities. Among them, hypolaetin 7-O-glucoside showed the strongest chymase inhibitory activity with an IC₅₀ value of 3.8 μM. Some other polyphenols also inhibited renin and chymase activities.

2) 論文題名 : Citrus jabara Extracts Suppress MUC5AC Mucin Production in Human Lung Epithelial Cells.

著者名 : Jun Iwashita, Naoki Iguchi, Akiko Takashima, Daisuke Watanabe, Kimihiko Sano, Masahiko Ishikuro, Keishi Hata, and Jun Murata

雑誌名 : *Advances in Biological Chemistry* **7**, 139-150 (2017)

発行日 : 2017 年 6 月 29 日

要約 : In the human airway, the overproduction of MUC5AC mucin is a key feature of allergic asthma, and it induces airway narrowing and obstruction. The production of MUC5AC is regulated by several signals, but the mechanism is not completely understood. We investigated the effect of jabara, a citrus containing abundant flavonoids, on the regulation of MUC5AC production. When NCI-H292 human airway epithelial cells were cultured with jabara extracts, we found that the expression of Periodic acid-schiff stained mucin was suppressed with downregulated MUC5AC production. In human primary airway cells derived from asthmatic patients, MUC5AC production was also suppressed by jabara extracts. The treatment of cells with jabara extracts decreased ERK activation in NCI-H292 and in primary cells. These results show that jabara extracts contain some factors that suppress MUC5AC production and ERK activity and suggest that it will be useful for relieving asthma.

3) 論文題名 : 味噌由来高血圧予防因子について

著者名 : 高橋砂織

雑誌名 : 温古知新 **54**, 19-28 (2017)

発行日 : 2017 年 7 月 31 日

4) 論文題名：「あめこうじ」を秋田の麴の宝に！～秋田オリジナル麴「あめこうじ」の開発と利用～

著者名：尾張かおる

雑誌名：温古知新 **54**、 44-49 (2017)

発行日：2017年7月31日

5) 論文題名：秋田県産未利用農水産物資源を活用した機能性素材の開発

著者名：畠恵司

雑誌名：食品と開発 **52** (1)、72-74 (2017)

発行日：2017年8月1日

要約：機能性食品開発において、食材の規格外など未利用資源の利活用は重要な課題だ。しかしながら、食品産業の大半を中小企業が占める秋田県では、未利用資源から機能性食品開発を自社単独でできる企業は少ない。そのため、機能性食品の事業化には、これら機能性原料を加工できる県外企業との連携が不可欠であるが、訴求する機能性の目新しさ、その素材自体のストーリー性、十分な供給量の確保など幾つかの越えなければならないハードルが存在する。本稿では、ジュンサイの機能性素材事業を例に解説した。後半では、現在取り組んでいる園芸メガ団地から、比較的大量に得られる未利用資源の機能性素材化について紹介した。

6) 論文題名：ジュンサイエキスと酒粕粉末から調製したサプリメント摂取による成人健康女性に対する便通改善作用

著者名：高嶋亜希子、佐野公彦、村上正代、上原健二、佐々木玲、樋渡一之、熊谷昌則、畠恵司

雑誌名：生薬学雑誌 **71** (2)、94-97 (2017)

発行日：2017年8月1日

要約：Dietary supplements prepared with water shield (*Brasenia schreberi*) extract and sake cake dry powder at 150 mg/day and 950 mg/day, respectively, were administered for 2 weeks to 26 healthy adult females. The supplements markedly increased the number of days with defecation and defecation frequency, when compared to a placebo group. Furthermore, the dietary supplement intakes seemed to improve fecal strength, shape and odor, and sense of incomplete evacuation of subjects.

7) 論文題名：「ジュンサイ+酒粕」サプリメント摂取による肌の毛穴引き締め効果

著者名：畠恵司、村上正代、高嶋亜希子、佐野公彦

雑誌名：食品と開発 **52** (9)、72-74 (2017)

発行日：2017年9月11日

要約：秋田県産の機能性素材であるジュンサイエキスと酒粕粉末を含有するサプリメントの開発のために、これら素材の機能性解明を行っている。両素材からなる試験食

摂取により健常な成人女性の便痛が改善されるという先の報告に続き、本稿では、同時に実施した肌状態のアンケート調査結果について報告した。結果、サプリメント摂取により「毛穴が気になる」と回答した参加者が約 4 割を超えた。毛穴の広がり、『過剰に分泌される皮脂が毛穴に貯留すること』と『毛穴周囲の真皮コラーゲンの減少が皮膚表面にたるみを生じさせ、毛穴が大きくなったり、変形したりすること』が原因とされる。試験食摂取による毛穴引き締め効果を実感した参加者のうち、皮脂と関係深い「顔が脂っぽい」の項目に対する改善の回答は少なく、「ハリ・つやがない」に対して改善したと回答した数が多かったため、コラーゲンネットワークに作用していることが推定された。

8) 論文題名 : **Mechanism for Restoration of Fertility in Hybrid *Zygosaccharomyces rouxii* Generated by Interspecies Hybridization.**

著者名 : Jun Watanabe, Kenji Uehara, and Yuichiro Tsukioka

雑誌名 : *Applied and Environmental Microbiology* , **78**(21), e01187-17 (2017)

発行日 : 2017 年 10 月 17 日

要約 : The mechanism of whole-genome duplication (WGD) in yeast has been intensively studied because it has a large impact on yeast evolution. WGD has shaped the genomic architecture of modern *Saccharomyces cerevisiae*; however, the mechanism for restoring fertility after interspecies hybridization, which would be involved in the process of WGD, has not been thoroughly elucidated. In this study, we obtained a draft genome sequence of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC110957 and revealed that it is a hybrid lineage of *Z. rouxii* (allodiploid) with two subgenomes equivalent to NBRC1876. Because this allodiploid yeast can mate with other allodiploid strains and form spores, it can be a good model of restoring fertility after interspecies hybridization. We observed that NBRC110957 and NBRC1876 contain six mating-type-like (MTL) loci. There are no large deletions or deleterious mutations in MTL loci, except for several-base-pair deletions in the X region in certain MTL loci. We also assigned only one mating-type (MAT) locus that exclusively determines mating types from six MTL loci. These results suggest that it is possible to recover mating competence regardless of whether cells lose one MAT locus through random gene loss by mitotically dividing after interspecies hybridization. Moreover, we propose that perturbation of gene expression and substantial breakdown of MAT heterozygosity caused by chromosomal rearrangement at MTL loci play roles in restoring the mating competence of allodiploids. This scenario can provide a mechanism for restoring fertility after interspecies hybridization that is compatible with random gene loss models and suggests genomic plasticity during WGD in yeast.

9) 論文題名 : **Can interspecies hybrid *Zygosaccharomyces rouxii* produce allohaploid gamete?**

著者名 : Jun Watanabe, Ryosuke Mogi, Kenji Uehara, and Yuichiro Tsukioka

雑誌名 : *Applied and Environmental Microbiology* , AEM.01845-17 (2017)

発行日 : 2017 年 10 月 27 日

要約 : In soy sauce manufacturing, *Candida versatilis* plays a role in the production of volatile flavor compounds, such as volatile phenols, but limited accessible information on its genome has prevented further investigation regarding aroma production and breeding. Although the draft genome sequence data of two strains of *C. versatilis* have recently been reported, these strains are not similar to each other. Here, we reassess the draft genome sequence data for strain t-1, which was originally reported to be *C. versatilis*, and conclude that strain t-1 is most probably not *C. versatilis* but a gamete of hybrid *Zygosaccharomyces rouxii*. Phylogenetic analysis of the D1/D2 region of the 26S rDNA sequence indicated that strain t-1 is more similar to the genus *Zygosaccharomyces* than *C. versatilis*. Moreover, we found that the genome of strain t-1 is composed of haploid genome content and divided into two regions that show approximately 100% identity with the T- or P-subgenome derived from the natural hybrid *Zygosaccharomyces rouxii*, such as NBRC110957 and NBRC1876. We also found a chromosome crossing-over signature in the scaffolds of strain t-1. These results suggest that strain t-1 is a gamete of the hybrid *Z. rouxii*, generated by either meiosis or chromosome loss following reciprocal translocation between the T- and P-subgenomes. Although it is unclear why strain t-1 was misidentified as *C. versatilis*, the genome of strain t-1 has broad implications for considering the evolutionary fate of an allodiploid. Importance In yeast, crossing between different species sometimes leads to interspecies hybrids. The hybrid generally cannot produce viable spores because dissimilarity of parental genomes prevents normal chromosome segregation during meiotic division, leading to a dead end. Thus, only a handful of natural cases of homoploid hybrid speciation, which requires mating between 1n gametes of hybrids, have been described. However, a recent study provided strong evidence that homoploid hybrid speciation initiates in natural populations of the budding yeast, suggesting the potential presence of viable 1n gametes of hybrids. The significance of our study is finding that the strain t-1, which had been misidentified as *Candida versatilis*, is a viable 1n gamete derived from hybrid *Zygosaccharomyces rouxii*.

6. 秋田県総合食品研究センター報告規程

【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¹⁾、や総食研²⁻⁴⁾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 名以上の場合には、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20号

発行日 平成30年12月1日

発行者 秋田県総合食品研究センター報告 編集委員会

〒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】