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

（S1513008L）

平成 27 年度～平成 29 年度

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

研究成果報告書

平成 30 年 4 月

学校法人名　別府大学
大学名　別府大学
研究組織名　別府大学食物栄養科学部
研究代表者　米元俊一
（別府大学食物栄養科学部）

はしがき

私ども、別府大学食物栄養科学部の研究グループは、文部科学省からの支援を受け、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」というプロジェクトを、平成 27 年度から平成 29 年度の３年間にわたって進めてまいりました。これは大分県の農水産物や香粧原料について、科学的視点からそれら生物資源の有効利用方法を検討し、素材特性を最大限に生かしながら加工・製品化まで食品や香粧品の幅広い新規開発に取り組み、さらには他の研究機関との各種共同研究を通じて、地域や産業の活性化に寄与する研究をめざそうというものです。大分県では、長年にわたり中枢となる生物系の大学研究機関が無かったため、発酵・醸造・加工食品業界での科学的分析情報が少ないのが現状でありました。この現状を打破するためにも、別府大学はリーダーシップを発揮できる環境を整備・充実させ、これらを基盤に県下の食品業界を科学的観点に基づく研究・開発に取り組めるよう導くことを任と考え本研究プロジェクトを組織いたしました。

これまで、このプロジェクトにおいて研究を進めていただいた皆さん、 また計画調書の作成から予算執行に関わる事務手続き等において懇切丁寧に教えていただき、ご協力いただきました大勢の皆さん方にも心から感謝申し上げます。この３年間のすべての研究成果をこの冊子にまとめてみましたが、論文（原著論文と総説あわせて）50 件、図書 11 件、学会発表は招待講演なども含めると 52 件に及んでおり、それらすべてをこの冊子に網羅できたかどうか少し不安ではあります。しかし、このような多くの研究成果を挙げられたのは、なによりも個々のプロジェクトメンバーの研究に対する意識の高さゆえであり、研究代表者にとっては嬉しい悲鳴ともいうべきものでございます。このような学術的な活動のみならず、一般社会に対するアピールも 1 件の特許および 21 件のプレスリリースを通して行われました。特に、酒造・醸造業界への貢献、大分県ハーブ六次産業化プロジェクトへの貢献、地元別府市への温泉への貢献等特筆すべきものがありました。このことは、このプロジェクトの研究成果が社会に対して大きく発信されたことを裏付けるものです。このようなプロジェクトの研究成果が、さらに次のステップの、より大きな別府大学のプロジェクトにつながることを心から祈念する次第です。

最後に、先生方、若手研究者、院生諸君、そしてこれらの研究に関わったすべての皆さん、今後のご活躍を心からお祈りいたします。御協力、どうもありがとうございました。

研究代表者
米元俊一

目　次

はしがき ----------2

目　次 ----------3

【香り関係】

【米元】 ----------5

① 麦焼酎の香気成分と光トポグラフィー装置（NIRS）による脳血流量への影響

② ガスクロマトグラフィー質量分析匂いかぎ法（GC-MS-O）によるカボスの熟成における香気成分の変化と光トポグラフィー装置（NIRS）による脳血流への影響

③ ガスクロマトグラフィー質量分析匂いかぎ法（GC-MS-O）による別府鉄輪温泉蒸し湯の石菖の香気成分分析と光トポグラフィー装置（NIRS）による脳血流への影響

④ 大分竹田の *Crocus sativus*（saffron）の GC-MS-O と官能評価による香気成分に関する研究

【吉井】 ----------29

① シチトウの香り成分の分析とその活用方法の検討

② ヒジキの香り成分の分析

【発酵関係】

【岡本】----------41

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

② 棚田の特産物として香り米を栽培し、その焼酎としての商品化の開発を開始

③ 本学科卒業生等をリサーチアシスタントへの採用と技術者及びシステム構築技師としての指導

【藤原】----------69

① 発酵・醸造食品の製造に最適の酵母等微生物の分離

② 高次発酵・醸造技術の確立（微生物汚染の研究も含む）

【林】----------81

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

【林・陶山】----------85

① 麹作成時において *Aspergillus kawachii* が産生するタンパク質の解析

【陶山】----------91

① 吟醸香の高い大分酵母の育種

【機能性関係】

【大坪】----------101
① ヒトの培養細胞でのアンチエイジング効果の評価法
② アンチエイジング効果を定量的に評価する系の確立
③ DNA 障害予防効果に関する研究
【木村】----------114
① マウス炎症性大腸炎における発酵大麦エキス投与の効果
② マウス炎症性大腸炎における甘酒投与の効果
【高松】----------127
① 柑橘類のアレルゲンに関する研究
② 食物アレルギーの自然歴に関する研究
③ ビールアレルゲンに関する検討
【仙波】----------140
① 発酵大麦エキスの新規機能性の探索
② 別府市特有の「湯の花」の機能解析と商品開発

私立大学戦略的研究形成支援事業
「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」
（平成 27 年度～平成 29 年度）
研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：新規農産物・発酵食品・香粧品の分析・開発
プロジェクトでの役割：新規農産物・発酵食品・香粧品の評価と提案

研究タイトル：①麦焼酎の香気成分と光トポグラフィー装置（NIRS）による脳血流量への影響

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　醸造香料学研究室
担当者職名：教授　米元俊一
研究協力者：梶原康博[1)]　高下秀春[1)]　小田誠[2)]　布施泰史[3)]
[1)]三和酒類 [2)]宮崎県総合政策部情報政策課 [3)]宮崎県工業技術センター

1．研究の目的

本格焼酎の香りに対する研究は、より多く販売することや、より美味しく飲むといったことに繋がる期待感がある。本格焼酎、ウイスキーなどの蒸留酒は、その評価の大部分が香りと言われ、その良否は酒質評価とともに売れ行きに大きな影響を与えている。本格焼酎の何の香りがヒトに好まれているか、またその香気成分を特定することができれば、本格焼酎に対する消費の拡大に繋がる。香りの嗜好のメカニズムの一端を知ることにより商品開発が容易になり精度を増すこと事ができる。

そこで、筆者は本格焼酎の香りについての嗜好性、さらには本格焼酎を摂取した際の満足度や癒し感などを客観的に判断しうる新しい酒類評価法の開発を目指して、NIRS（Near Infra-Red Spectroscopy）に着目し検討した。NIRS は神経活動にもとづく脳血流変化を反映する脳内ヘモグロビン（酸素化ヘモグロビン：oxy-Hb，脱酸素化ヘモグロビン：deoxy-Hb）の変化量をリアルタイムに記録できることが特徴である。測定は、完全に非侵襲であるばかりでなくパネルの身体的な自由度が高く、座位でも可能である。

本研究では、麦焼酎を中心に様々な本格焼酎を嗅覚刺激として与え、その時の前頭前野における局所脳血流量変化量からパネルの嗜好や感性表現を潜在的にあるいは非明示的に読み取れないか NIRS を用いて検討した。また嗅覚による酒質の評価をとることによって、より多角的にヒトの焼酎評価における嗜好性について検討した。

２．研究内容

食品の風味評価には、ヒトの感覚を用いた官能評価が主に用いられている。官能評価はヒ

トの嗜好を加味して食品を丸ごと評価できる優れた方法であるが、人材の確保と育成に課題がある。また、被験者の意図的な判断が含まれる可能性や、感情や体調に左右される可能性があり、これらが客観性に影響を及ぼすため、官能評価法を補完する方法が求められている。最近の近赤外光による脳機能イメージング法では、大脳皮質の活性部位を直接測定することはできないが、その神経活動によって間接的に変化する比較的頭皮に近い前頭葉や側頭葉の活性を調べることができる。食品の風味評価においては、脳科学は未知の分野であり、測定方法や解析手法が手探りの状態であること、上述の前頭前野腹側部は顎や目等の動きに関連する大きな筋肉が存在することから、得られた値に対する評価には充分な注意が必要となる。これまでの研究において、風味に関連する脳賦活部位が明らかになってきているが嗜好の判別や味の違いによる賦活変化の程度については未開拓の分野である。

１）実験試料

A：甲類焼酎、B：麦焼酎減圧、C：麦焼酎常圧、D：麦焼酎・市販酒、対照として E：芋焼酎：市販酒で、どの試料もアルコール度数 25%のものを使用した。B:麦焼酎減圧、C:麦焼酎常圧、D:麦焼酎・市販酒「麦焼酎減圧」は三和酒類㈱提供のものを、A:甲類焼酎は市販酒：宝酒造製、E:芋焼酎は市販酒：薩摩酒造製のものを使用した。

２）NIRS による実験

パネルは別府大学 3 人（パネル a:男性 22 才、パネル b:女性 22 才、パネル c:男性 64 才）で実験を行った。宮崎県工業技術センターにて同センターの光トポグラフィーETG-4000（日立メディコ）を使用し、NIRS にもとづく脳血流量変化をみた。また同センターの研究員の指導を受けた。

まず、パネルの頭部に図 1-A のような 3×5 モードの光ファイバープローブ（全 22 チャンネル）を配置した。チャンネルの位置は図 1-B に示すとおりである。実験試料を 10 秒間嗅いで脳血流量変化を測定し、10 秒間待機して次の試料を測定し、チャンネルごとの反応の差を得た。計測では、数センチ離れた頭の表面の 2 点に、発光プローブ、受光プローブをセットする。発光プローブから発せられた近赤外光は、脳組織内を散乱しながら進んでいく。大半の光は生体内に吸収されるか頭皮に戻って外部に逃げてしまうが、ごくわずかな光量が受光プローブに到達する。この光は微量であるが、脳の

図 1-A

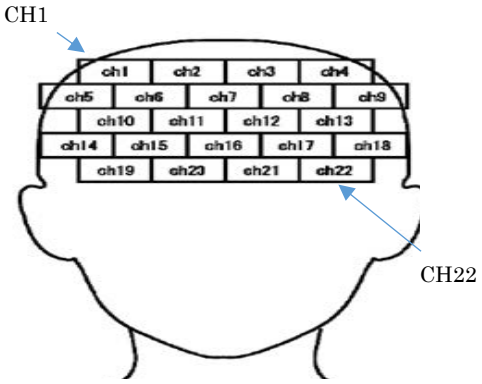


図 1-B

図 1　NIRS による実験状況と頭部の NIRS チャンネル部位

活動状態を伝える重要な情報を担っている。もし、光の進む光路の途中で脳の活動が盛んであれば脳組織の血流量が増加し、ヘモグロビン分子による光の吸収量が増加する。この結果、受光プローブで検出された光量変化を連続的に計測すれば、脳活動の変化がモニタリングできる。

３）NIRS の解析

ETG-7100 (Ver3.05) /ETG-4000 (Ver1.63) の Utility 機能に搭載した①②で処理した。

①Multiple Data Analysis（複数データ解析機能） 複数データの群平均波形を表示しデータ間の差分波形・差分 t 値波形を算出した。

②Wave Analysis（波形解析機能） 波形特徴量（最大値、最小値、平均値等）を算出 ROI 波形解析（部位単位での解析）した。宮崎県工業技術センターの研究員の指導にしたがった。NIRS の測定結果の解析方法を以下の図２（実験試料 A, B, C, D, E）を用いて説明する。折れ線グラフは寄与率を表し、1.0 に近い数値であるほど正確なデータが取れたことを示す。

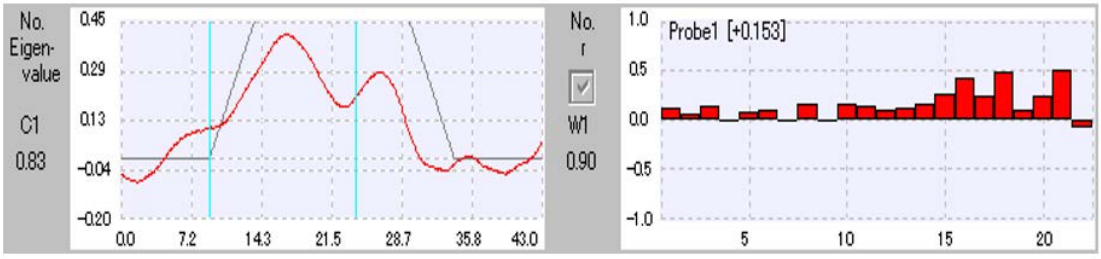


図 2. NIRS の解析パターン（パネル b 、サンプル A）

右の棒グラフは、各チャンネルの脳血流変化量を示す。同様にパネル b の例で示すとサンプル A では寄与率は 0.95 であるため、ほぼ正確なデータといえる。特に 21 番を先頭に 18 番、16 番の血流量が増加したことを表す。血流量の減少したものはなかったということがわかる。（図２参照） 同様に B では寄与率が 0.90 で、ほぼ正確なデータだといえる。血流量変化では、21,18,15 の順に増加していることがわかる。C では寄与率 0.83 で、ほぼ正確なデータといえる。血流量変化としては、21，18，16 の順に増加していて、22 だけは減少していることがわかる。D では、21，16，20 の順に血流量の増加がみられる。寄与率 0.96 で、ほぼ正確なデータといえる。E では、21，16，17 の順に血流量の増加していることがわかる。寄与率 0.90 で、このデータもほぼ正確である。これにより＋－になったものを表に示し、どの部位が増減したか判定した。ある香りをかいだ時にどの部位が反応したか、もし共通性があれば嗜好性あるいは好き嫌いの判定になる可能性がある。

4）嗅覚による酒質の評価のグラフ化

年齢や飲酒経験の多さの違いで、本格焼酎に対する香りの感じ方に差が生じるかを検討した。パネルは 29 人で（大学 3 年生 11 人、大学 4 年生 10 人、教員 8 人）で香りのみで評価した。試料をワイングラスに注ぎ、それぞれを順に嗅いでどんな印象を受けたかを評価した。印象評価は敢えて酒質評価用語は使用せず、香水等で使用される立川氏の 5 項目の対語で表現した。評価は、涼しい(1)～暖かい(9)、辛口(1)～甘口(9)、淡白(1)～濃厚(9)、単純

(1)～複雑(9)、女性的(1)～男性的(9)の 5 項目を 9 段階評価とした。次に、香りの好き嫌いで脳血流量の増減にどう影響が現れるかを見るために各試料を 5 段階評価した。評価は、好き(1)～嫌い(5)とした。これらの結果を平均化したもので示した。

5）NIRS の測定結果

NIRS での脳血流量の増減測定結果をパネルごとにまとめたものを表 1 に記載した。他のチャンネルよりも脳血流量の上昇幅が明らかに大きいものを上段に表記、脳血流量の減少幅が明らかに大きいもの下段に表記した。この表から、各個人の脳のどの場所が大きく反応を示しているのかを読み取ることができる。加えて、各試料の香りに対する各パネルの嗜好性を評価した。香りの好き嫌いで脳血流量の増減にどう影響が現れるかを見るために各試料を 5 段階評価した。評価は、好き(1)－嫌い(5)としたがパネル a は A:甲類焼酎が嫌い、パネル b は C:麦常圧、D:麦焼酎市販酒、E:芋焼酎市販酒が嫌いと答えた。パネル c は A:甲類焼酎、C:麦常圧が嫌いと答えた（表省略)。

パネル a の嗜好評価では、A： 甲類焼酎～E： 芋焼酎市販酒の順に好き嫌いが 5 段階評価（表省略）で 4, 3, 2, 2, 2 となっていて、評価が 2 の試料には反応部位の 11,12 番が反応していることが明らかになった。22 は左脳の方に、19 は右脳の方に位置していることから、パネル a は右脳で判断している可能性がみられた。視覚、聴覚、触覚の記銘に関する脳機能研究では、文字や音読された言葉などの言語情報の意図的記銘には、左側の前頭前野が関与することが知られている。一方、顔や幾何学模様、抽象音などの言語化しにくい情報の意図的記銘には、左右両側の前頭前野が関与することが知られている。このことから、パネル a は A： 甲類焼酎、B： 麦焼酎減圧、C： 麦焼酎常圧、D： 麦市販酒、E： 芋焼酎市販酒の香りに対して言語化しにくい情報として捉えている傾向がみられた。パネル b は比較的左脳

表 1. 脳血流量の増減

	パネルa	パネルb	パネルc
A: 甲類焼酎	増 19,5,20,15 減 17,13,18,21,22	増 21,18,16 減	増 22,21,14 減 2,11
B: 麦焼酎減圧	増 19,14,22,15,10 減	増 21,18,15 減	増 22,21,14 減 11
C: 麦焼酎常圧	増 16,12,11,19 減 14,18,15,21	増 21,18,16,15,17 減 22	増 22,14,19 減 11
D: 麦市販酒	増 19,11,20,10 減	増 21,16,20,18 減	増 22,14,5,10,9 減
E: 芋市販酒	増 19,15,10,11,13,12 減 18,17	増 21,16,17,18 減	増 22,14,18 減 11,12,7

で判断し、試料に対して言語情報として捉えている傾向がみられた。パネル c は左脳で判断し、また右脳でもやや判断する傾向が見られた。いずれにしても、ヒトは香りを嗅いだとき脳の前頭前野が反応することが明らかになった。また、香りを嗅ぐパネル、匂いサンプルにより、血流量が上昇する又は減少する場所が異なるが、共通して増加する部位も明らかになった。パネル a は 19、パネル b は 21，16、パネル c は 22,14 が増加している。減少を見る

と、パネル a は 18、パネル b は 22、パネル c は 11 が反応していた。よって、19〜22 の部分で強い反応がみられた場合、パネルは「飲みたい」と考えている可能性がみられた。しかしながら、パネル a は評価が 2 の試料に対して 11,12 が反応しており、19〜22 以外の部分も嗜好に対して反応している可能性も考えられた（表１）。

6）嗅覚による酒質の評価

A：甲類焼酎はすべての年代で評価が一致し、涼しい、辛口、淡白、単純、女性的という評価になった。B：麦焼酎減圧は涼しい、淡白、単純という評価が多数を占めた。C：麦焼酎常圧は濃厚、複雑、男性的という評価は、全ての年代で一致した。D：麦焼酎市販酒は、全体的に見ても評価が別れており、パネルによって評価が異なっていた。E：芋焼酎市販酒は、甘口、濃厚、男性的という評価が多く見られた。以上の結果から年代別で見ても香りに対する評価は概ね一致するということが明らかになった。

香りの強い常圧製品（麦焼酎常圧および芋市販酒）は、濃厚、男性的と評価の共通点が見られた。香りの弱い A：甲類焼酎に対する評価が一致したことについては、香りが弱く個性がないため、むしろ評価をしやすかったのではないかと推測された。A：甲類焼酎と C：麦焼酎常圧、E：芋焼酎市販酒の結果を比較して、香りの強い焼酎は濃厚、男性的、香りの弱い焼酎は淡白、女性的と全く反対になったことから、香りの弱い焼酎は淡白、女性的で、香りの強い焼酎は濃厚、男性的と評価される傾向にあるということが考えられた。9 段階での酒質評価の結果は、全ての年代を通して概ね評価が一致しており、年齢が違っていても感じとられる香りに大きな差はないことが明らかになった。嗅覚による酒質の嗜好評価では、全ての年代を通して共通点が多いことが明らかになった。

匂いによる好き嫌いの評価は A：甲類焼酎は、すべての年代において嫌いと評価された数が少ない結果となった。その反面、最も好きと評価された数も少なかった。若い大学 3〜4 年生だけに注目すると好きという評価が多く見られた。B：麦焼酎減圧は、最も好きと評価された数が多く、ほとんどの年代において嫌いという評価が少なかった。しかし、若い大学 3〜4 年生だけに注目すると嫌いという評価が一定数あった。C：麦焼酎常圧は、70 代を除いて全体的に嫌いという評価が多かった。D：麦焼酎市販酒はすべての年代において好き、嫌いが一定数あり評価が分かれた。E：芋焼酎市販酒は 70 代を除いた殆どの年代で嫌いという評価があった。中でも若い大学 3〜4 年生からの嫌いという評価が多かった。その反面、好きと評価された数も一定数あった。C：麦焼酎常圧、E：芋焼酎市販酒は嫌いと評価された数が多く、香りの強い常圧蒸留焼酎は一般的に好かれない傾向にあることが明らかになった。中でも若年層は C：麦焼酎常圧、E：芋焼酎市販酒のような香りの強い焼酎を嫌う評価が多いことと、香りの薄い A：甲類焼酎を好む評価が集まっていたことから、その傾向が強いことが明らかになった。

嗜好調査では香りの薄い焼酎に対する評価は、特に悪くもなく好きでもないという評価が多くみられた。逆に、香りの強い焼酎に対して嫌いと評価された数が多い反面、特に好きという評価も一定数得られた。結果として、香りが強すぎず、薄すぎない焼酎が好まれる傾

向があることが明らかになった。年齢の若い学生だけの結果を見た場合は、香りの強い焼酎を好きと評価された数が極端に少なくなり、香りの薄い焼酎を好む傾向があることがわかった。これは、他の年代に比べて飲酒経験が少ないことと、全体的に香りのするものを嫌う傾向があることが原因ではないかと推測された。

NIRS による香りの嗜好性は、個人ごとに脳血流量変化の大小、部位は異なるが匂いにより前頭前野の血流量の変化することが確認できた。また、香りを嗅ぐパネル、匂いサンプルにより、血流量が上昇する場所、減少する場所が異なるが、共通して増加する部位が明らかになった。

これは、前頭葉前野の中でも眼窩前頭皮質の部分が反応しているものと考えられる。この領域は情動、報酬価値、食べ物等に対する主観的な喜びの経験を仲介する役割を持っており、焼酎の香りがここに作用したのではないかと考えられる。ただ、嗜好性選択の違いが前頭前野の脳血流量に何らかの影響を及ぼしていることが示唆されたが、それは異なる被験者間で普遍的な応答とはいえなかった。香りの好き嫌いで脳血流量の増減にどう影響するかについて統一的見解は見いだせなかったが、各パネルでの脳血流量の増加部位、減少部位で特徴があることは観察できた。今後その特徴が嗜好性とどのように関係するか検討したい。また、焼酎の香りの好き嫌いの評価については、香りの薄い焼酎を好む傾向が影響しているのではないかと考えられた。

３．研究成果の副次的効果、今後の計画

本研究は、個人の感性・嗜好に関わる脳内情報を脳血流変化量にもとづく NIRS 信号で検出できないか検討したものである。パネルが本格焼酎の香りを嗅いだ時の脳血流変化と、官能評価及び好き嫌いの関係について調べた。NIRS による香りの嗜好度は、個人ごとに脳血流量変化の大小、部位は異なるものの、匂いにより前頭葉前野の血流量の変化することが確認できた。パネルによる嗜好の違いが NIRS 信号として反映され、パネルの嗜好の傾向を検出できる可能性が示された。

今後の商品開発をしていく上で、涼しい ⇔ 暖かい、辛口 ⇔ 甘口、淡泊 ⇔ 濃厚、単純 ⇔ 複雑、男性的 ⇔ 女性的などを商品のイメージに合わせて香りの質や強弱を変えていくことにより商品を理想の香りに近づけていける可能性がみられた。この研究は端緒を開いたばかりで、更なる精度向上、実験方法の改善、データ解析の方法の改善が求められる。今後、パネルの増員や別の試料も試していくことと、さらに嗜好評価のデータと脳血流量変化のパターンを見つけることで焼酎の嗜好性の傾向を明らかにしていきたい。

研究タイトル：②ガスクロマトグラフィー質量分析匂いかぎ法（GC-MS-O）によるカボスの熟成における香気成分の変化と光トポグラフィー装置（NIRS）による脳血流への影響

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　醸造香料学研究室

担当者職名：教授　米元俊一

1．研究の目的

カボスの香気成分の収穫時期(9～11 月)による差と、比較対象であるユズとの香気成分の違いを匂い嗅ぎガスクロマトグラフ質量分析計（以後 GC-MS-O と略記)を用いて行った。分析に使用した試料は、果皮と水蒸気蒸留法で抽出した精油を用いた。また、実際どのような匂いの感じ方をしたかを調べるため官能評価と同時に 11 月に収穫したカボスとユズの香りで NIRS を使用して嗅覚刺激として与え、脳血流量の変化から脳への影響を検討した。

２．研究内容

カボスは大分県の特産物で、ユズの近縁種である。そのカボスの生産量は、2013 年でおよそ全国の 96%を占める。カボスの旬の時期は 8～10 月末であり、カボスは緑色（青カボス）から熟成してくると黄色（黄カボス）になり、香味も変化すると言われる。主に料理の薬味に使われ、お菓子や清涼飲料水、お酒等に利用され、さらにカボスを飼料に混ぜて養殖させたカボスブリなどが売り出されている。カボスの匂いは柑橘系をメインに独特の青臭さなどが感じられる（写真１参照)。

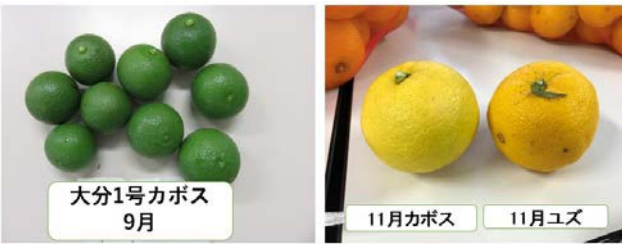


写真１．カボス（9 月）とカボス・ユズ（11 月）

１）実験試料

カボスは 9、10、11 月採取したもの、比較対照のユズは 11 月採取したものにした。試料の提供は大分県農林水産研究指導センター農業研究部・果樹グループ(国東)より同じ木から提供して頂いた。本研究で使用したカボスは通常品種の大分１号であり果実品質や栽培面で優れており、現在、県下のカボスの 85%が本品種である。

２）水蒸気蒸留による精油の抽出

カボス、ユズの果皮を包丁でそぎ落として、約 340～350ｇの果皮を用意した。蒸留器の底部に水を注ぎ、水が沸騰し始めたらそぎ落としたカボスの果皮を入れた。その後、1 時間蒸留を行い、留出した精油をビーカーに移し、冷蔵庫に保存した。

３）GC-MS-O による分析

実験方法として、各精油を 1μℓ、みじん切りにした果皮を 1ｇを分析した。どちらも 20ml バイアル瓶に入れてセプタムで密封して行った。これは圧搾法では精油サンプルが採取できなかったため、直接果皮をみじん切りにして香気成分分析を行った。分析に使用した匂いかぎ GC-MS-O は 7890B GC-5977AMSD （Agilent Technologies 社製）である。装置の上部には試料から香気成分をサンプリングする MultiPurpose Sampler （Grestel 社製)を付属している。匂いかぎ装置は Olfactory Detector Port ODP 3 を用いた。固相マイクロ抽出

(SPME)はファイバー:Carboxen/PDMS(中極性)を使用した。試料加温 (Incubation)条件温度:40℃,5分 、GC カラム:Agilent 1909IJ-433 HP-5,30m×250μm、カラム流量:1.9mL/min , キャリアガス:He、カラム昇温設定:40℃→100℃ (10℃/min),100℃→2 (8℃/ min)、イオン源温度: 230℃、EI 法、GC:O 流量比 1 対 1、Olfactometry Temp. :Transfer Temp: 250℃ 、Exit Temp: 150℃、メイクアップガス :N_2

匂い嗅ぎは、測定者がカラムの出口に鼻を近づけ、香りを感じたらボタンを押しつつ、感じた香りを記述した。また、測定者は成人女性 2 名である。香り分析ソフトのアロマオフィスにより定性を行った香気成分は、一致率が 80%以上のデータ以外は Un known と記し、GC-MS-O で測定した際、匂った香りについては全部を表に記した。また、2 名分のリテンションタイム（Rｔ）と香気成分が一致しているものは 1 つにまとめた。におい嗅ぎを行う評価者はパネル選定試験に合格する程度の嗅覚を有する者にした。分析後のデータのピーク面積を表示させ、カボスの成分に含まれている成分の割合をＲｔから照らし合わせ、その成分量を%で表し収穫時期による成分量の変化をまとめた。

４）官能評価によるカボスの評価

カボスの採取時期によって感じる香りの印象がどれだけ異なるか検討した。試料は 9、10、11 月のみじん切り果皮と水蒸気蒸留法で採取した精油を利用して採取した。カボスとユズとの比較では 11 月のカボスとユズの果皮と精油を使用した。パネルは、22 歳の女子大学生２名で行った。評価方法は、各試料に対して嗅いでどんな印象を受けたか 1～9 段階の評価で行った。評価は、涼しい(1)～暖かい(9)、辛口(1)～甘口(9)、淡白(1)～濃厚(9)、単純(1)～複雑(9)、女性的(1)～男性的(9)の 5 項目を 9 段階評価を全員の月ごとの平均で割り出した。官能評価開始前には室内の充分な換気を行い騒音のない適度な照明の下で行った。試料は 9 月カボス、10 月カボス、11 月カボス、11 月ユズの順にパネラーに試料を提示した。

５）NIRS 実験方法

本研究はヘルシンキ宣言の精神に則り，別府大学倫理委員会の承認を得て実施した。実験機器：NIRS は今回の事業で購入した株式会社日立国際八木ソリューソンズの WOT-100、16 チャンネルプローブモード(c)2×6 を使用した。計測チャンネル数は 16CH であった。

実験の流れは 30 秒間は安静にしたのち、30 秒間被験者に試料の香り提示を行い、30 秒間休憩を取り、再び同じ試料を 30 秒間提示して、最後に 30 秒間安静にして実験は終了した。NIRS の解析方法については計測された 2 名のパネルで行った。16 カ所のチャンネルにおいて oxy-Hb 濃度と deoxy-Hb 濃度の変化量のトポグラフィーのパターンの検討を行い、全体のタイムコースポトグラフィーより匂いによる脳内血流量の変化を観察した。その変化より oxy-Hb、deoxy-Hb の優位さについてパターンにより判断した。タイムコースでは匂いを嗅いでから 15 秒後の反応パターンを見た。また、NIRS の各チャネルの oxy-Hb 血流量のグラフから oxy-Hb 血流量の最も増加した場所 3 か所を選択しその上昇した長さをメジャーで計測し cm で表わした。その平均の結果を 1 回目は 30-60 秒、2 回目は 90-120 秒の結果ごとに出した。oxy-Hb 増加は血流量の増加と比例すると考えた。また oxy-Hb 減少はすべて

０とした。また同時にチャンネルの位置により脳内の部位による oxy-Hb、deoxy-Hb　変化の位置を推定した。実験結果と考察は以下の通りである。

①カボスの収穫時期による果皮と精油の香気成分の違い

表 1.　収穫時期による果皮の香気成分の違い

カボス　果皮	Rt	カボスの採取時期			匂い嗅ぎ官能評価
果皮の成分	(min)	９月(%)	１０月(%)	１１月(%)	(強さ)
β-pinene	6.9	0.23	0.29	0.34	青臭い　中
β-myrcene	7.2	5.27	10.41	10.50	柑橘　　大
d-limonene	8.6	34.43	27.96	22.53	柑橘　　大
cyclohexene.1-methyl-4-(1methylethylidene)-	9.7	2.69	1.36	1.19	フルーティ　中
nonanal	11.1	0.33	0.30	0.18	洗剤の泡　小
decanal	12.8	1.89	1.81	1.08	洗剤の泡　中
linalool	13.4	1.24	0.50	0.45	フルーティ　中

表１に示すように、カボス果皮の香気成分結果を見ると、主要成分である d-limonene が 9 月 34.4%、10 月 28.0%、11 月 22.5%と 9 月から 11 月にかけて成分が減少していた。他の成分の結果を見ても β- pinene、β- myrcene を除きすべての成分が 11 月にかけて減少していた。その他の香気成分も、カボスは 9 月から 10 月の旬を過ぎた 11 月にかけて成分が減少していく傾向にあった。そして鎮静効果のある linalool も同様であった。匂い嗅ぎの強度から匂いの主成分は d- limonene と γ- terpinene、β- myrcene であった。それに続く成分が linalool、β- pinene、decanal, cyclohexene.1-methyl-4-(1methylethylidene)-であった。実際に GC-MS-O で匂い嗅ぎを行った結果、嫌な匂いはあまりなくカボス特有の柑橘系の匂いや、青臭い、フルーティな良い匂いばかりであった。

表２に示すように、カボスの精油のデータでは、主要成分である d- limonene がどの月も 60%以上を占めていた。しかしカボス果皮の d-limonene の成分に比べ 9 月から 11 月にかけてあまり成分量が変化していなかった。その他の成分はカボス果皮同様に 9 月から 11 月にかけて減少傾向であった。β- myrcene に関しては、カボス果皮、精油同様に 9 月から 11 月にかけて増加傾向にあった。官能評価を行った際も 9 月から 11 月にかけて他の成分が減少している分、β- myrcene の香りである青臭さが目立っていたのでこのような結果になったのではないかと考えられる。各月ごとの果皮、または精油の GC-MS-O のパターンの香気成分変化をみると、9 月から 11 月になると香り成分の量や種類が減少してくることが分かった。

②　11 月カボスとユズの果皮と精油の香気成分の違い

表３に示すように、果皮みじん切りの香りは匂い嗅ぎ成分で 11 月のカボスとユズを比較

した結果、カボスは特にβ-myrcene が多く、β-pinene 、nonanal、decanal が多かった。ユズは d-limonene 、linalool が多く、cyclohexene.1-methyl-4-(1methylethylidene)-、3-hexene-1-ol,arodenderen がカボスに比べて明らかに成分量が多かった。カボスは蜜柑系の香りに松系の香、刺激香がメインで、ユズは蜜柑系の香がやや弱く linalool の芳香が強いことが分かった。また沢村の報告ではユズの香りはテルペン系炭化水素 2 個、アルコール 9 個、アルデヒドが 3 個、エステルが 1 個、硫黄化合物が 1 個、未同定物質 1 個となっている。この中で 6 - メチル - 5 - ヘプテン - 2 - オールとメチルトリスルフィドが鍵となる成分と報告している。

表２．　収穫時期による水蒸気蒸留の香気成分の違い

カボス水蒸気蒸留	Rt.	カボスの採取時期			匂い嗅ぎ官能評価
精油成分	(min)	9月(%)	10月(%)	11月(%)	(強さ)
β-myrcene	7.3	4.84	4.66	5.12	柑橘　大
d-limonene	8.2	61.60	62.95	64.15	柑橘　大
cyclohexene.1-methyl-4-(1methylethylidene)-	9.4	8.00	7.26	6.32	フルーティ　中
nonanal	11.2	1.63	1.16	0.64	洗剤の泡　小
decanal	12.5	0.46	0.26	0.07	洗剤の泡　中
linalool	13.5	2.49	2.33	0.96	フルーティ　中
dodecanal	16.7	1.60	1.50	0.67	洗剤の泡　中

表 3.　カボス 11 月と 11 月ユズの果皮　香気成分比較

果皮	RT	香気成分		匂い嗅ぎ官能評価
精油成分	(min)	カボス(%)	ユズ(%)	(強さ)
β-pinene	6.9	0.29	-	青臭い　中
β-myrcene	7.2	10.41	-	石油、柑橘　大
β-phellandren	7.6	-	0.80	青臭い　小
d- limonene	8.6	22.53	48.05	柑橘、フルーティ　大
cyclohexene.1-methyl-4-(1methylethylidene)-	9.7	1.19	2.35	フルーティ　中
nonanal	11.1	0.30	-	洗剤の泡　小
3-hexen-1-ol	11.0	-	0.19	青臭い　小
decanal	12.6	1.81	-	洗剤の泡　中
linalool	13.5	0.45	4.21	フルーティ　中
aromandendren	14.7	-	0.25	みかん　小

表４に示すように水蒸気蒸留精油の結果では逆になり、カボスは *d*-limonene、γ-terpinene, β- myrcene 、nonanal、decanal、dodecanal　が多く、ユズは linalool、1-methyl-4-(1methylethylidene)-、cyclohexene がカボスに比べて成分量が多く、さ

表 4.　カボス 11 月と 11 月ユズの精油成分比較結果　水蒸気蒸留

水蒸気蒸留	Rt.	香気成分		匂い嗅ぎ官能評価
精油成分	(min)	カボス(%)	ユズ(%)	(強さ)
β-pinene	6.4	-	0.29	青臭い　小
β-myrcene	7.3	5.12	1.07	柑橘　大
Bicyclo[3.1.0] hex-2-ene.4-methyl-1-(1-methylethyl)-	7.5	-	3.80	青臭い　中
d-limonene	8.2	64.2	46.1	石油、柑橘　大
γ- terpinene	8.9	5.88		柑橘　中
cyclohexene.1-methyl-4-(1methylethylidene)-	9.4	1.01	2.63	フルーティ　中
nonanal	11.2	0.64	-	洗剤の泡　小
decanal	12.5	0.07	-	洗剤の泡　中
linalool	13.5	0.96	6.54	フルーティ　中
caryophyllene	14.7	-	0.90	?
dodecanal	16.7	0.67	-	洗剤の泡　中

らに aromadenderene、3-hexen-1-ol、β- phellandrene が特徴である。また果皮に aromadendrene、3-hexen-1-ol、β- phellandrene、　精油にβ- pinene 等がみられた。反対にユズになくてカボスにある成分については、フルーティな香りや洗剤の泡みたいな匂いを感じるものが多かった。特に果皮にβ- pinene、β- myrcene　、nonanal、decanal、精油にγ-terpinene、β- myrcene、decanal、nonanal、dodecanal が見られた。

③　官能評価

カボス、ユズの果皮の官能評価結果及びカボス、ユズの精油の官能評価結果では、9 月、10 月、11 月のカボスの果皮と精油と 11 月ユズの果皮と精油を使用したが、特にカボス皮の匂いの感じ方がパネルによってばらつきがあった。平均したグラフを見てみるとそれほどの変化はないが、9 月から 11 月にかけて女性的で甘口な印象になっていくことがわかった。特にカボスでは女性的な印象が強かったのに対し、ユズでは男性的と 2 名とも感じていた。カボス、ユズ共に、どの収穫月を見ても涼しいという印象を得ていた。これは、カボス、ユズ特有の柑橘の香りがそのような印象を与えているのではないかと考えられる。一方で水蒸気蒸留で採取した精油ではユズの印象の差は果皮の時とほとんど差はなかったが、カボスは果皮と精油では印象が少し変わっていることがわかった。精油のほうが全体的に５

項目とも強い印象を与えていた。実際に官能評価をした際にも果皮と精油とでは匂いが少し異なっていた。

④　NIRS 測定結果

oxy-Hb 血流量の最も増加した場所 3 か所を選択しその上昇した長さをメジャーで計測した結果が表 5 である。1 回目は 30-60 秒、2 回目は 90-120 秒の結果である。

匂いを嗅がせて 15 秒後のパターンから判断すると、カボス果皮は血流量が増えて活性化しているのがわかる。1 回目では 4、7、13、16 番の場所周辺が活性化し、2 回目も同様であった。ただし 10 番あたりに鎮静化がみられた。カボス精油では果皮に比べ血流量が減少し、鎮静化がみられた。また精油のほうは 2 回目に嗅いだときのほうが血流量が減少していた。ただし 7 番、16 番は活性化がみられた。

表 5.　カボス・ユズ（11 月）の脳血流量への効果

回	果皮/精油	カボス		ユズ	
	Oxy-Hb 増加	果皮	精油	果皮	精油
1回目	Oxy-Hb 増加	0	1.73	0	0.54
	増加場所	-	4,7,13,16	-	4,7,13,16
2回目	Oxy-Hb 増加	1.5	1.58	0.52	0.54
	増加場所	5,7,10,12,13,16,19	6,13,19,12	19	6,13,12,18

※Oxy- Hb増加の単位はcm でパネルの平均値
増加場所は写真2参照

一方、ユズに関しては果皮、精油ともに左の 19 番周辺の血流量が増えたが全体的に見ると、血流量が増えず匂いを嗅いでいる間は落ち着いているという結果であった。特に果皮で 7 番、精油で 10 番の鎮静化がみられた（表５参照）。

果皮と精油では血流量の増加場所が明らかに異なっていたが、カボスとユズでは似ていた。カボスとユズの脳血流への増加傾向の差が認められた。GC-MS-O の結果で、ユズの香気成分において鎮静効果の高い linalool がカボスより多量に検出されたので NIRS でもその効果が出たのではないかと考えられた。すなわち全体として比較するとカボスの香気成分は、脳の血流量を増加させる効果があり、ユズの香り増加させない効果すなわち、鎮静効果があると考えられた。

考察するとカボスの精油の香気成分ではっきりと収穫時期の成分の移り変わりがわかったのが *d* -limonene、β- myrcene である。*d*-limonene と β- myrcene は 9、10、11 月カボス精油の 50%以上を占めており、11 月に至ってはこの二つの成分で 70%以上を占める結果となりこの二つが主要な香気成分であった。カボス香気成分は 11 月では成分量、種類とも

少なくなった。ユズとの比較でカボス及びユズの特徴香分があった。カボスはγ-terpinene、β－myrcene、ユズは linalool、β－pinene が特徴的であった。水蒸気蒸留精油では、カボスは d－limonene、γ－terpinene, β－myrcene 等が多く、ユズは linalool、1-methyl-4-(1methylethylidene)-、cyclohexene 等がカボスに比べて多かった。

また、官能評価を行った際にも、カボスよりもユズの香りのほうがやや柔らかく感じたのはこのためと考えられた。また果皮に aromadendrene、3-hexen-1-ol、β-phellandrene、精油にβ-pinene 等がみられた。通常の果皮を絞るという状態では、カボスの香り成分がやや弱いと感じられるのは d-limonene がやや弱く、β－myrcene、β－pinene の香が強い為で、反対にユズは d-limonene 、linalool が多く、特に香りの強い linalool はユズの方が 6.5%(カボスは 1.0%)と多いためであると推測できた。

最終的に纏めると大分県の特産物であるカボスの香気成分について、カボスの採取時期による成分とその量の変化、カボスまたはユズの特有のあるいは共通する成分などが判明した。また、官能評価ではカボスの香りは熟成により女性的から男性的、複雑から単純に変化したがユズは男性的という評価であった。NIRS 結果で 11 月のカボスとユズとで比較しカボスは脳血流量を上昇させる効果が高いことが分かった。

３．研究成果の副次的効果、今後の計画

カボスとユズの香気成分を比較すると、共通の成分や独自の成分がみられたが果皮と精油でも組成が非常に異なっていた。これより考えられることは、カボスは単に傷つけたぐらいでは香りが出にくいことを表している。品種改良等で果皮を柔らかくし、絞った時の果皮からの香りを立ちやすくする等の可能性が示された。

総じてカボスには蜜柑系の香り成分が多く、ユズは、linalool 系の香が特徴的であると考えられた。カボスの香りは女性的で複雑、甘口と評価された。ユズの香りは男性的で単純、辛口と評価された。今回は女性 2 名の評価であるので、男性や更にパネルを多くする必要がある。

NIRS 結果ではカボスの果皮及び精油の香気成分は、oxy-Hb 濃度すなわち、脳の血流量を増加させる効果があり、ユズの香りは血流量を増加させない効果すなわち、鎮静効果があると考えられた。これは沢村の報告でユズの香りは交感神経の活動を抑制しているとの報告があり今回も確認された。ユズと反対にカボス香気成分の脳活性化を利用した商品化の可能性がある。今回は掲載しなかったが、カボスブリの香気成分の研究でもカボスの香りが検出され、またそのブリ自体の香気へ影響を与えていた。

研究タイトル：③ガスクロマトグラフィー質量分析匂いかぎ法（GC-MS-O）による別府鉄輪温泉蒸し湯の石菖の香気成分分析と光トポグラフィー装置（NIRS）による脳血流への影響

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　醸造香料学研究室

担当者職名：教授　米元俊一

1．研究の目的

本研究ではセキショウの香気成分を季節ごとの変化を比較・定性することによって、セキショウの持つ香気成分特性を知ることができれば、蒸し湯以外へのセキショウの利用方法や蒸し湯文化の活性化への期待感が持てる。本実験ではGC-MS-O、官能評価、NIRSを使用しセキショウの新たな可能性を検討した。

写真１　セキショウ

２．研究内容

石菖（*Acorus gramineus*　以後セキショウと略する）は写真１の様にショウブ科の植物で根、茎は横にはって枝分かれして伸びる。生育場所は、渓流、湿地に群生している。石菖は精油の主成分として、アザロン（asarone）を含んでいる。漢方では石菖根として鎮痛、鎮静、健胃薬などに用いられている。 日本では、セキショウは石菖、ショウブ（*Acorus calamus*）は菖蒲として流通しているが、中国の生薬では、菖蒲とはセキショウのことなので混乱を生じやすい。一説によると、五月の菖蒲湯は、元々石菖を用いていたという説がある。写真２の鉄輪温泉の蒸し湯は、4人が入れるほどの狭い石室で、床には石菖（乾燥したセキショウ）が厚く敷いてあり、室中の香りは、麦茶と菖蒲の香りを足したような、芳ばしい香りである。

写真２　別府鉄輪温泉　蒸し湯　風景

１）実験試料

実験試料は、5月生セキショウ、5月乾燥セキショウ、10月生セキショウ、10月乾燥セキショウを使用した。全て、別府市役所から提供された物を使用した。

２）水蒸気蒸留法（steam distillation ）

本研究では㈱黄河製のアロマ蒸留器を使用した。生セキショウ130ｇ、乾燥セキショウ300ｇ使用し精油を採取した。蒸留時間は留出はじめから1時間にした。留出成分を遠心分離分離したのち精油をピペッターで取り出しサンプルとした。

３）匂いかぎガスクトマトグラフ質量分析計（GC-MS-O）

実験試料は、5月生セキショウ、5月乾燥セキショウ、10月生セキショウ、10月乾燥セキショウを使用した。セキショウについて香気成分の定性および匂いかぎ法による香りの評価を別府大学学生 3 人で行った。Agilent Technologies 7890B GC System に、Agilent

Technologies 5977A MSD, GERSTEL MPS2-xt Multi Purpose Sampler を使用した。匂い嗅ぎ装置は Olfactory Detector Port ODP 3 を用いた。SPME は MSU 071-00A Fiber 10mm Scale 36mm ID24 を使用した。カラムは Agilent Technologies DB-1 0.250 mm×30 m, 0.25μm、カラム温度は 40℃、注入口温度を 250℃、キャリアガスは He で流速は 1.9 ml/分にした。

生セキショウ、乾燥セキショウは 5ｇ、精油は 2μl をメスピペット及びピペットマンでガラスバイアルに入れて密栓し、40℃のアルミブロックバス内で 10 分間加熱保持した後、自動的に GC に注入した。10℃/分で 200℃まで加熱し、3℃/分で 250℃まで温度を上げて 2 分間加熱保持して 10℃/分で 320℃まで温度変化させて、成分分析と匂い嗅ぎを行った。匂い嗅ぎは、測定者が ODP の出口に鼻を近づけ、香りを感じたらボタンを押しつつ、その香りの質を記述した。定性を行った成分は、一致率が 90%以上のデータのみを記述した。RT は測定を開始してからの経過時間で、RT0.01 につき 0.6 秒である。

４）NIRS による測定方法と解析方法については前報告と同様である。

５）嗅覚による匂いの評価

セキショウの状態や採取時期によって感じる香りの印象がどれだけ異なるか検討した。試料は水蒸気蒸留法を利用して採取した精油を保存してある褐色瓶から直接、順番に嗅いでどんな印象を受けたかを 1～9 段階で評価をした。評価方法は研究タイトル②と同様である。嗅覚による匂いの評価は 4 年男子 3 人、4 年女子 1 人、男性教員 1 人の計 5 人で行った。

結果は以下のようになった。

① GC-MS-O の測定結果

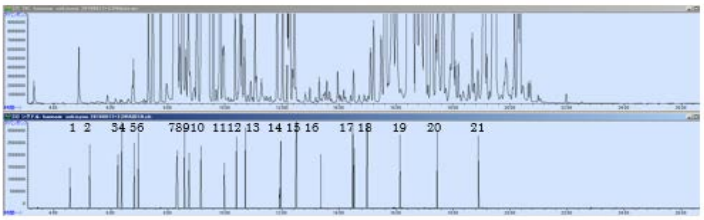
表 1 に示すようにまた匂い嗅ぎ成分組成は大きく変化していた。全体の生セキショウの匂い嗅ぎの結果では 5 月の生セキショウが 10 月より香気成分数、量とも多かった。生セキショウの匂い嗅ぎの結果では、5 月の生セキショウは匂い嗅ぎ成分が 21 個、10 月では 16 個であった。生セキショウ精油の匂い嗅ぎの結果では、5 月の生セキショウ精油は匂い嗅ぎ成分が 38 個と大きく増加したが 10 月の精油では匂い嗅ぎ成分は 32 個とやや少ないもののそれほどは減少していなかった。乾燥セキショウの匂い嗅ぎの結果では生セキショウと比較し成分数は大きく減少した。乾燥セキショウでは 5 月は 18 個、10 月セキショウは 12 個であった。5 月乾燥　セキショウ精油の匂い嗅ぎの結果では匂い嗅ぎ成分は 39 個と大きく増加したが 10 月精油では 17 個と少なくなった。また、結果には示さなかったが、精油抽出でヘキサンによって抽出されたものは、香気成分が殆ど検出されておらず、匂い嗅ぎ法でもあまり香

表１　GC-MS-O による匂い嗅ぎの香気成分数

	5月セキショウ	10月セキショウ
生セキショウ	21	16
生セキショウ精油	38	32
乾燥セキショウ	18	12
乾燥セキショウ精油	39	17

りを感じることができなかった。しかし、水蒸気蒸留での精油抽出では十分に精油が採取できたため、水蒸気蒸留法で行った。

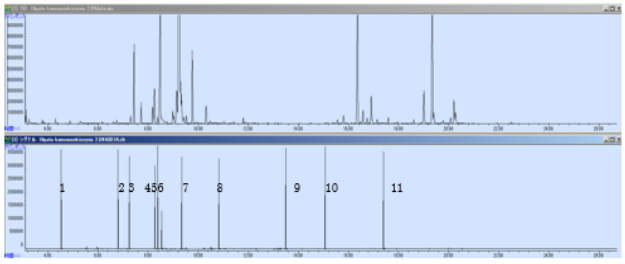
鉄輪温泉の蒸し湯では乾燥セキショウが使用されているので図１に５月乾燥セキショウ、図２に 10 月乾燥セキショウの GC-MS-O パターンを比較すると明らかに５月の乾燥セキショウが 10 月より香気成分数、量とも多かった。官能評価では生セキショウは青っぽい香り、乾燥セキショウは干し草の香りがし、５月の方が 10 月より香りが強かった。



No	Rt	成分名	香り
1	4.522	Toluene	特臭臭
2	4.878	Hexanol	青臭い
3	5.182	1-Hexanol	青臭
4	5.537	1-Butanol,3-metyl-,acetate	花
5	6.787	Heptanal	青臭
6	6.965	unknown	
7	8.317	β-Pinene	松
8	8.530	β-Myrcene	安神
9	8.782	Octanal	キノコ
10	9.028	4-Carene	甘い香り
11	9.851	γ-Terpinene	松
12	10.357	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	安神
13	10.677	1-Octen-3-yl-acetate	マツタケ
14	11.863	Endo-Borneol	樟脳
15	12.303	unknown	
16	13.309	Linalyl acetate	安神
17	14.424	2-Methoxy-4-vinylphenol	スパイス
18	14.981	unknown	
19	16.025	1,4-Methano-1H-inden,octahydro-4-metyl-8-metylene-7-(metyletyl)-(is	
20	18.871	γ-Asarone	セキショウ
21	19.713	Aromadanderene	

図１　５月乾燥セキショウの GC-MS-O クロマトグラムと匂い嗅ぎ成分　（21 個）

これから言えることは、生セキショウ、乾燥セキショウとも５月は若い葉で香気成分の量、数とも多いが 10 月セキショウではでは十分に香り成分が出にくいことが考えられた。５月の水蒸気抽出精油の香り成分の匂い嗅ぎでの検出された香気成分数は同様なので、葉の構造が固くなり香気成分が出にくいことを示唆した。総じて乾燥セキショウと生セキショウの分析結果では、RT16.369～20.247 までの間にセキショウの特徴香である、 caryophyllene、humulene、isoeugenol、asarone が確認され、香辛料のような香りや甘い香りが確認された。また、乾燥させることにより、これらの香気成分が揮散するかあるいは新たな香りが生成し、全体的な香りが変化していた。乾燥セキショウでは、caryophyllene、humulene、asarone が検出されているが、セキショウの緑の香りから乾燥することにより枯草のような、あるいはハーブ様の



No	Rt	成分名	香り
1	4.510	unknown	
2	4.955	Stylene	ヒヤシンス
3	7.297	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	
4	8.257	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	
5	8.245	β-Pinene	針葉樹
6	8.483	β-Myrcene	蜜柑
7	9.253	d-Limonene	蜜柑
8	10.711	Phenyletyl Alcohol	花
9	13.499	unknown	
10	15.076	α-Cubebene	漢方薬
11	17.234	γ-murolene	漢方薬

図２　10 月乾燥セキショウの GC-MS-O クロマトグラムと匂い嗅ぎ成分　（11 個）

の香りに変化していることが分かった。蒸し湯で使用される時の乾燥セキショウの5月、10月で共通して残留する香気成分はpinene 、eucalyptol 、ocimeneなどの針葉樹系、ハーブ系の香り成分が共通していた。またセキショウではasaroneが有名であるが5月の生とその精油ではみられたが、乾燥とその精油では見られなかった。10月の生、乾燥、精油においても見られなかった。匂い嗅ぎの結果よりAsaroneの香りでの貢献度は弱いとみられた。

② NIRSの測定結果

NIRS による測定では5月乾燥セキショウ精油において脳血流量の減少がみられ、特に強い鎮静効果があることが確認された。試料を嗅いだ後は、急激に脳血流量が低下し、脳が鎮静化していることが分かった。また前頭葉中心部の7、13、16の部位で、特に前頭葉左部16の部位に強力に反応することが分かった。ただし一部、前頭葉右5番の部位も活性化していた。全体的に鎮静化しているが、これはセキショウの香気成分に鎮静効果を持つものが多く含まれているためだと推測した(図3)。

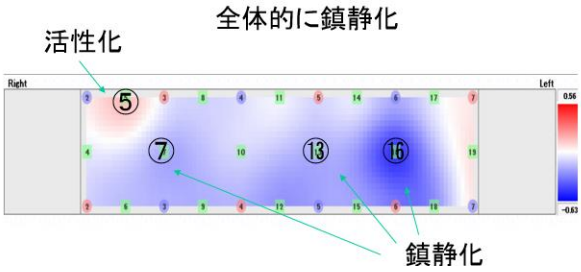


図3　5月乾燥セキショウ精油
NIRS　匂い15秒後とその部位

③ 香りの評価

5月生セキショウは、暖かく、濃厚複雑で若干、甘い香りで男性的、5月乾燥セキショウは暖かく、濃厚、複雑で男性的という評価になった。 また5月生セキショウが10月のものと比較し、濃厚という評価であった。しかし、乾燥セキショウ精油では10月の方が逆に濃厚という評価となった。この理由については不明である。また、5月に収穫されたセキショウは全ての試料に暖かいと言う評価がなされているが、10 月セキショウは比較的、涼しいと評価している人が多かった。これは、セキショウに含まれている香気成分の種類が5月セキショウと比較すると減少しているためだと推測された。すなわち乾燥過程と水蒸気蒸留精油抽出の過程で香気成分が大きく変化するものと考えられるので注意する必要がある。

収穫時期の差では明らかに5月の乾燥セキショウが10月より香気成分数、量とも多く、匂い嗅ぎ成分も同様の傾向であった。5月は若い葉で香気成分の量質とも多いが10月では乾燥セキショウでは十分に香り成分が出にくいことが考えられた。5月生セキショウ精油での香り成分数や量は変わっていないので、存在はしているが、葉の構造が固くなり出にくいことを表していた。この結果より、できるなら5月の春物のセキショウを用いると香りがより楽しめると考えられた。

④まとめ

別府鉄輪温泉の蒸し湯で使用されているセキショウの時期、乾燥、精油による香気成分の変化についてGC-MS-O、NIRSによる脳内情報、官能評価を使用して香りの可能性を探った。

セキショウの特徴成分では、香気成分は5月セキショウが香り成分、量とも多いが、乾燥すると成分数が少なくなり、結果的に、生、乾燥物、精油の香気成分が非常に異なっていた。

乾燥工程の差では、乾燥セキショウは生セキショウと比較し香気成分数は大きく減少していたが、5月より10月乾燥セキショウの香気成分の減少量が大きかった。さらに精油でも同様な結果であった。生を乾燥させることにより、セキショウの共通の香りは、香気成分が揮発し、あるいは新たな香りが生成し、総じて香りが弱まっていると考えられた。乾燥セキショウでは、caryophyllene、humulene、asaroneが検出されているが、緑の香りとハーブの香りから乾燥により枯草のような甘い香りに変化していることが分かった。すなわち、蒸し湯で使用されるときの乾燥セキショウで共通する香気成分はβ-pinene 、eucalyptol 、ocimeneなどの針葉樹系、ハーブ系の香り成分が共通していた。Asaronは5月の生、精油ではみられたが、乾燥とその精油では見られなかった。脳血流量への影響はNIRSによる結果（5月乾燥セキショウ精油）からセキショウの香りを嗅いだ後、脳血流量を低下させ、沈静効果を持っていることが推測できた。

香りには強い鎮静効果があり、それを利用したアロマ商品開発が考えられた。また実験におけるパネルの増員と更なる生理的なセキショウの香り効果を検討していきたい。

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

セキショウ生と乾燥、精油では香気成分が大きく異なっていることが分かった。現在、蒸し湯で乾燥セキショウだけを使用しているが、生のセキショウの香り(青臭い、濃厚なグリーンな香り)の一部併用も検討に値すると考えられた。鉄輪温泉の蒸し湯でも鎮静効果が期待できると考えられる。以上のことによりセキショウの香りを就寝前に使用するアロマオイルやアロマキャンドル、入浴剤として利用できると考えられた。またセキショウ精油も大分・別府のアロマ香りの素材として十分可能性がある。今後は、この結果を発展させ様々な有効利用の可能性を探っていきたい。

研究タイトル：④大分竹田の *Crocus sativus* (saffron)のGC-MS-Oと官能評価による香気成分に関する研究

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　醸造香料学研究室

担当者職名：教授　米元俊一

研究協力者：渡邊淳二（大分農業文化公園）、吉田千秋（大分香りの博物館）

１．研究の目的

サフラン(saffron)の学名は *Crocus sativus* で、秋咲きの球根植物で淡い紫色の6弁の花を咲かせる。花びらを中心に黄色い雄しべと強い芳香を放つ細長い赤い雌しべを1本ずつ持ち、さらに雌しべと雄しべの先は3本に分かれている。雌しべの柱頭の赤色の部分だけを集めて乾燥させたものが一般に「サフラン」と呼ばれ、香辛料や薬、染料として使用

されている。生理機能性は記憶の改善、抗皮膚がん作用などが報告されている。

原産地は南ヨーロッパ・西アジア一帯である。雌しべの部分は 300g からわずか 1g ほどしか収穫できないため世界一高価なスパイスとして知られているが、出荷には大量の花を必要とする。しかしながら、花や雄しべの部分は活用する手段がなく、大量に廃棄されているという現状がある。花本来が持つ香りをなにか活かすことが出来れば産業的、経済的に活性化できる。本研究ではサフランの各部位における香気成分を GC-MS-O による分析及び香りによる官能評価を比較検討した。

２．研究内容

サフランの栽培は古く紀元前 2 千年頃のクレタ文明で既に栽培が盛んであった。ヨーロッパへはアラビア人により伝えられ、日本へは江戸時代の天保年間に渡来したとされる。明治後期から全国に広まり大きな産地も形成されたが、現在では大きな産地と呼ばれる地域は竹田市のみとなっている。サフランの開花方法はヨーロッパでは畑に球根を植えて開花させるが、大分県竹田市では室内で球根を置いて花を咲かせる世界的に珍しい方法となっている（写真 1 参照）。

写真 1 竹田市でのサフラン屋内栽培

１）試料

試料は大分農業文化公園から提供されたサフラン約 1kg を用いた。また、香気成分を溶剤抽出にはエタノール（99%特級エタノール、和光純薬製）、ヘキサン（特級、和光純薬製）を使用した。乾燥花弁と雄しべは竹田市の大塚氏より提供して頂いた。

２）抽出方法

採取したサフランを花弁、雌しべ、雄しべの 3 つにピンセットなどで丁寧に分け、それぞれビーカーに移してアルコール、ヘキサンを各 200ml ずつ加えて浸した。ビーカーは完全に密閉した状態にして約 3 日間冷蔵庫内で保存し、ある程度香気成分がアルコール、ヘキサンに溶け出ているのを確認した後ドラフト内でろ紙を用いてろ過を行った。そしてろ液を移したビーカーを 70～80℃前後のお湯に浸し、アルコール、ヘキサンを蒸発させて、ビーカー内に残った内容物に 99%エタノールを加えてもう一度溶かし冷蔵庫内で保存した。

３）GC-MS-O による定性条件は研究タイトル②と同様である。

４）官能評価は醸造・香料研究室の学生 4 名と教員 1 名で行った。方法は研究タイトル②と同様である。

５）NIRS による脳血流量への効果の分析及び解析方法は研究タイトル②と同様である。

６）商品開発

乾燥物を使用して教員と学生で話し合いインセンス(線香)、バスボム、飲物、酒、食品について商品開発を提案し試作を行った。

結果及び考察は以下の通りである。

①生サフランを写真２に示した。左写真に全体花弁、花弁、雄しべ、雌しべ)、右写真に GC-花弁、雄しべの乾燥物を示した。

写真２　サフラン(生)の各部分と花弁・雄しべ（乾燥）

② GC-MS-O 結果及び考察

GC-MS-O による定性結果から物質同定を行い、アロマオフィスで一致率 90%以上のもの記載した。表１に GC-MS-O による香気成分の定性分析を纏めて示した。各部位と抽出法それぞれに対して定性出来た香気成分には○をつけた。その結果、主な香気成分はリナロール、酢酸エチル、1 - ブタノール、3-メチル - アセテートは雄しべ､雌しべ共に検出されたが生の花弁ではあまり検出されずフェネチルアルコール（バラの香り）が主成分であった。ツヨン(メントール様)はアルコール抽出で 3 つとも検出された。フムレンはホップに見られる成分であるが､花弁のヘキサン抽出のみで検出された。これらの香りは香料植物に見られる代表的な香気成分であり、その他、微量の香気成分が数多く見られた。花弁と雄しべにアルコール抽出法でのみ 2,6,6-トリメチル-1,3-シクロヘキサジエン-1-カルボキシアルデヒド（サフラナール）が見られた。サフラナールはサフランの独特な香りの主成分として知られている香気成分であるが､今回はサフラナールの香気匂い嗅ぎで指摘した人は少

表１　サフランの各部位及び抽出物の香気成分（GC-MS-O）のまとめ

	香気成分	花弁			雌しべ			雄しべ			香り
		生	アルコール	ヘキサン	生	アルコール	ヘキサン	生	アルコール	ヘキサン	
1	**リナロール**		○	○	○	○	○	○	○	○	バラの香り
2	フェノール, 2-メトキシー							○			
3	**フェネチルアルコール**	○		○	○			○	○		バラの香り
4	2(5H)-フラノン		○					○			
5	オキシムー, メトキシーフェニル-								○		
6	1-ブタノール, 3-メチル-1-ブタノール			○		○			○		
7	**ツヨン**		○			○			○		メントール様
8	**ベンゼンアセトアルデヒド**		○						○		杏の香り
9	**酢酸エチル**		○	○		○	○		○	○	セメダイン
10	1-ブタノール, 3-メチル-, アセテート		○	○		○	○		○	○	不快
12	Dカーボーン			○						○	?
13	**シクロヘプタノロキサン, ヘキサメチル-**			○		○		○			
14	5-メチルキノキサリン								○	○	
15	β-シシネ										
16	シクロヘキセン, 1-メチル-4-(1-メチルエテリデン)-								○		
17	ユーカリプトール						○	○		○	
18	**ベンゼン, 1-メチル-4-(1-メチルエテニル)-**						○	○			
19	1,4-シクロヘサンジオン, 2,2,6-トリメチル-							○			
20	テルピネン-4-オール		○			○					
21	**トランス-β-イオノン**	○						○			スミレ
22	ヘプタナール								○		
23	ビシクロ(3.1.0)ヘキス-2-エン, 4-メチル-1-(1-メチルエチル)-								○		
24	(1S)-2,6,6-トリメチルビシクロ(3.1.1)ヘプト-2-エン								○		
25	2,6,6-トリメチル-1,3-シクロヘキサジエン-1-カルボキシアルデヒド		○						○		
26	エイコサン								○		
27	シクロヘキサナール, 5-メチル-2-1(1-メチルエチル)-シス-						○				
28	3-ブテン-2-オン, 4-(2,6,6-トリメチル-1-1シクロヘキセン-1-イル)-							○			
29	ブタン酸, 2-メチル-, エチルエステル		○								
30	2-ブタノン,4-(2,6,6-トリメチル-1-シクロヘキセン-1-イル)-				○						
31	D-リモネン				○						柑橘
32	ノナナール				○						不快
33	4-ヒドロキシ-3,5,5-トリメチルシクロヘキセ-2-エノン					○					
34	ジメチルスホキシド			○							
35	β-ミルセン						○				柑橘
36	2,4ジ-テート-ブチルフェノール										
37	ベンゼン, 1,3-ジクロロ-	○									
38	**α-テルピネン**		○	○							森林
39	4-ヒドロキシ-3,5,5-トリメチルシクロヘキセ-2-エノン		○								
40	ベンジルアルコール			○							弱い芳香
41	シクロヘキサン, 2-メチル-5-(1-メチルエテニル)-トランス			○							
42	フムレン			○							ホップ

なかった。

面積比で計算すると、花弁を１とすると、雌しべは 54 倍、雄しべは 71 倍と圧倒的に雌しべと雄しべに多かった。

またヘキサン抽出法で行った場合雌しべ、雄しべで全てユーカリプトール等が確認出来た。これらは香料などに用いられている香気成分である。結果的から抽出を変えると違いは出たが、部位ごとでは共通の成分、独自の成分があった。香気成分の GC-MS-O パターンを見ると雌しべは全範囲にわたっているが雄しべは前半の偏っており、花弁は全体的に少ない。しかし花弁は溶剤抽出では全体的に香気成分が抽出されていた。このように雄しべ、雌しべ、花弁の生の香りには差があるが。溶剤の種類によっても異なっていた。

表２　乾燥サフランの部位の香気成分まとめ

香気成分 ＼ サフランの状態	乾燥サフラン	
	花弁 ＋ 雄しべ	雌しべ
4-Octenoic acid		
Ethyl ether		
Benzene acetaldehyde		
Phenyl ethyl alcohol		
Cyclotetrasiloxane octamethyl-		
Butyl acetone		
2-Hydroxy-3.5.5-trimethyl-cyclohex-2-enone		○
2-Hydroxy-3.5.5-trimetyhlcyclohex		
1-cyclohexene-1-propanol		
Ethanol,2-phenoxy		
4-Hydroxy-2.6.6-trimethylcyclohex-1-enecarbal		
Butanoic acid		
1.4.7.10.13.16-Hexaoxacyclooctadecane		
Prenol		
Linalool		
5-Hydroxy-4.6.6-trimethyl-7-oxabicyclo heptan		
1.3-cyclohexadiene-1-carboxaldehyde2.6.6.-trimethyl		◎
2.6.6-Trimethyl-2-cyclohexene-1.4-dione（サフラナール）		
2-Hydroxy-4.6.6¯trimethyl-cyclohexa-2.5-dienone		
Furfural	○	
2(5)-Furanone	○	
Acetic acid		○
2-Propanol.1.1'-oxybis-		○
4-Hydroxy-2.6.6-trimethyl-3-oxocyclohex-1.4-dienecarbaldehyde		△
2-Hydroxy-3.5.5-trimethylcyclohex-2-ene-1.4-dione		○
Hexanal		△
Mesitylene		○

また表２に示すように乾燥した花弁＋雄しべではフルフラールとフラノン、雌しべの結果では多くの香気成分が見られたがサフラナールは検出されなかった。香りの面で乾燥花弁と雄しべは使用が難しいことが分かった。

このことから雄しべや花弁部分にも廃棄するのではなく香料として用いる事が出来る可能性が十分考えられた。

②香りによる官能評価

香りによる官能評価は、醸造・香料研究室の学生４名と教員１名で行ったところ、個人による差は多少見られたがほとんどが平均的に中間に集まる結果となった（表省略）。官能評価の結果をまとめると各部位や抽出法ごとに僅かながらの差は感じられた。生の花弁はエステルの香り、雌しべは酸臭の独特の香り、雄しべは重いかおりであった。

乾燥雌しべは生の状態に比べると香りが強くなり、女性的、暖かいという評価であった。乾燥雄しべ＋乾燥花弁は匂いが少なくなっていた（表３）。また、抽出の差では、アルコール抽出したものはヘキサン抽出したものと比べると暖かい印象が強く、香りを複雑だと感じる人が多く見られたのに対して、ヘキサン抽出したものは女性的でかなり単純な香りであると感じるという結果が見られた。部位ごとでも甘口で女性的な印象が強いのが花弁で、暖かい単純な香りの印象が強いのは意外にも雄しべであった。抽出溶剤の差では、アルコール抽出したものに比べてヘキサン抽出したものの方が香りに女性的な印象を持つパネルが多かった（表省略）。総合的に見るとバランスの良い印象である雌しべが一番良い評価であった。

表３　サフランの各部位の生、乾燥の官能評価

サフランの状態	生				乾燥	
サフランの部位	全体	花弁	めしべ	おしべ	めしべ	花弁＋おしべ
官能評価	甘ったるい(1) エステル系(1) やや冷たい(1)	フローラル(1) やや単純(1) 香水の香り(1) 香りが小さい(2)	酸っぱい(3) 独特(1) フローラルではない(1)	男性的(1) 複雑(1) 重い(1) フローラルではない(1)	酸っぱい(3) 独特(1) 薬方薬みたい(2) 酸の臭い(2) 古い(1)	酸っぱい(3) 男性的(1) 重い(1) やや不潔(1) 香りが強い(1)

表４　サフランの各部位の香り NIRS　匂い 15 秒後

状態	生				乾燥	
部位	全体	花弁	めしべ	おしべ	めしべ	おしべ＋花弁
1回目	2.05	1.50	1.9	1.15	2.20	1.56
2回目	0.99	1.53	1.7	1.28	1.93	2.10
1回目と2回目の平均	1.52	1.52	1.8	1.22	2.07	1.83

脳血流量の増加

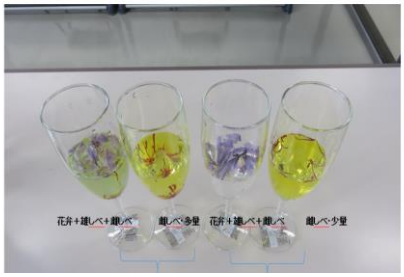
③　NIRS による脳血流量への効果

サフランの雌しべに脳血流の増加をもたらす香りがあることが示唆された（表４）。生では雌しべが最も高く、花弁、雄しべの順になった。乾燥物でも雌しべが最も高かった。乾燥花弁と雄しべはも雌しべより弱いが血流量増加の高い値を示した。

④　サフラン香りを利用した商品開発

雌しべまたは花弁＋雄しべの乾燥物を使用して商品開発を行った。飲物（酒、サイダー）では雌しべの黄金色が着色し、いろいろな使用が可能と考えられた。また乾燥物の雄しべ＋花弁は水に戻し使用すると、サフランの花が咲いたようになり見た目は綺麗であった。またこの時の色はやや青みがかった色になった。麦焼酎でも同様で雌しべの黄金色は使用できると考えられた。食品ではアイスクリームに混ぜて使用したが、雌しべの黄金色の色が付き、食べると口の中でサフランの香りが広がり、とても印象的で美味しく使用可能と考えられた。インセンス（線香）　は雌しべの線香でサフランらしい香りが認められたが、花弁＋雄しべではコゲ臭が主であった。

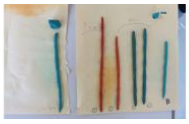
バスボムでは花弁＋雄しべ乾燥物で試作したがサフランらしさはなかった。今後ともアイデアを出せば様々な用途が考えられた。（写真 3）



麦焼酎とサイダー

バスボム

アイスクリーム



線香

写真３　サフランを利用した商品開発

３．研究成果の副次的効果、今後の計画

サフランを花弁、雌しべ、雄しべに分け、直接あるいは複数の抽出法を用いた濃縮物を GC-MS-O 及び香りの官能評価を行い比較検討した。その結果、生では、部位における共通の香気成分はリナロールと酪酸エチルであり、さらに独特の香気成分があった。廃棄処分されている雄しべや花弁を香気成分的に、あるいは官能評価により独特の香り成分から香料や香水などへの可能性を示した。サフランの部位ごとでは共通の成分、独自の成分があり、雄しべや花弁部分も香料として用いる事が出来る可能性が十分考えられた。ただ乾燥物になると花弁＋雄しべは匂い成分が少なくなり匂い原料としては不適であった。香気成分の GC-MS-O パターンで見ると生において雌しべは全範囲にわたっているが雄しべは前半に偏っており、花弁は全体的に少ない。雄しべ、雌しべ、花弁の生の香りには差があるが、溶剤の種類によっても香りは異なった。脳血流量増加への効果では乾燥物の雌しべが高かったが、乾燥物の花弁と雄しべの混合物も高い効果を示した。今後もサフランの重要な生理機能性として考えられる。食品に使用する場合は安全性を考えて、ヘキサン抽出よりアルコール抽出が良いと考えられるが、今後も食品香料や香粧原料等や生理機能性、安全性についても考慮に入れて研究したい。今回、大分県ハーブ六次産業化プロジェクトの一環として行い商品化も提案の研究も行ったが、乾燥物を利用して、線香、酒、飲料、食品で行い特に、酒と飲料、食品で商品化に値する評価が得られた。

４．研究成果

a)原著論文

１．＊仙波和代、米元俊一、発酵大麦エキスの新規機能性探索，別府大学大学院紀要，18, 89-93，2016

２．＊藤原秀彦、米元俊一、発芽玄米浸漬水中から分離された乳酸菌を用いた豆乳ヨーグルトの作成，別府大学紀要，58，159-162，2017.

３．米元俊一、世界の蒸留器と本格焼酎蒸留器の伝播について，別府大学紀要，58，119-135，2017.

４．米元俊一、本格焼酎の酒質に及ぼす紙容器内面材の収着の影響について，別府大学大学

院紀要，19，93-106，2017.

５．＊米元俊一、小屋徳次郎、小田原綾子、梶原康博、高下秀春、小田誠、布施泰史：麦焼酎の香気成分とNIRSによる脳血流量への影響，別府大学大学院紀要，20，2018.　印刷中

６．＊米元俊一、永松未有、河野尚子、佐藤豪昭、乾雄大　：ガスクロマトグラフィー質量分析計匂いかぎ法によるカボスの熟成における香気成分の変化と光トポグラフィー装置（NIRS）による脳血流への影響　別府大学紀要，59，2018. 印刷中

７．＊米元俊一、倉橋和也：ガスクロマトグラフィー質量分析計匂いかぎ法による別府鉄輪温泉蒸し湯の石菖の香気成分分析と光トポグラフィー装置（NIRS）による脳血流への影響　別府大学紀要，59，2018. 印刷中

８．＊米元俊一、渡辺元樹、木元沙耶加、大野優美香：大分竹田の *Crocus sativus*（saffron）のＧＣ-MS 匂い嗅ぎ法と官能評価による香気成分に関する研究，別府大学大学院紀要，20，2018 ．印刷中

b)総説

１．＊米元俊一：大分県ハーブ六次産業化プロジェクトについて、aromatopia,2016, 139 ,22-24.

２．米元俊一：本格焼酎の香味成分と美味しさ、日本醸造協会誌、2017,112(2)96－107.

３．＊米元俊一：別府大、醸造香料研究室、におい・かおり環境学会誌、2017、48(4),335.

４．米元俊一：焼酎講義、高峯和則編.分筆、㈱ディーエスネット、2017,58-66.

ｃ)招待講演、シンポジウム

１．＊米元俊一：「焼酎の香りについて」、第７回九州学生本格焼酎プログラム
平成27年７月（別府大学）別府市

２．＊米元俊一：大分県農林水産研究指導センターと「におい」に関する研修会、「”におい“研究の今とこれから」平成28年３月（別府大学）　別府市

３．米元俊一：　別府大学・食品香料コースの取り組み　、ＪＣＣ／佐賀県　第14回セッションと大学先端技術交流会、平成28年３月　唐津市

４．米元俊一：『本格焼酎』、　日本酒造組合中央会、単式蒸留焼酎業伝統技術継承発展勉強会、平成28年９月　那覇市

５．米元俊一：大航海時代と焼酎の伝来、別府大学鹿児島後援会、平成28年10月　鹿児島市

６．米元俊一：沖縄県泡盛講習会、平成29年２月　うるま市

７．＊米元俊一：鉄輪温泉の蒸し湯と石菖の香り、別府大学温泉学講座、平成 29 年 11 月 別府市

g)その他(学会賞、報道など)

１．＊大分アロマ六次産業化プロジェクト　大分県農業振興公社、別府大学協定締結式
平成28年７月８日　大分県庁にて

２．＊大分合同新聞：2017年７月28日「竹田サフラン抽出商品開発」

私立大学戦略的研究形成支援事業
「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」
（平成 27 年度～平成 29 年度）
研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：新規農産物・発酵食品・香粧品の分析・開発
プロジェクトでの役割：フレーバー成分の解析による新たな利用法の確立

研究タイトル：①シチトウの香り成分の分析とその活用方法の検討

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　匂いの化学研究室
担当者職名：教授　吉井文子

１．　研究の目的

シチトウ（シチトウイ、七島藺、リュウキュウイ、*Cyperus malaccensis Lam.*）は、多年草、単子葉類、カヤツリグサ科（カヤツリ草科は日本では 26 属 500 種が認められている）の植物である。約 330 年前に九州南西諸島から畳表の原料として豊後（大分県）に持ち込まれ栽培が広まったとされており、青畳等とも呼ばれその光沢・強靭さ・火に強い等の特性のため活用されてきたが、現在では大分県が全国唯一の生産地帯となっている。また、『シチトウイ』として、世界農業遺産「クヌギ林とため池がつなぐ国東半島・宇佐の農林水産循環」での重要特用作物として位置づけられており、大分の特産品として、新規用途や新規商品の開発が望まれている作物である。

本研究の目的は、シチトウの香りがどのような化学的成分から成り立っているのか、香りに寄与する成分を分析し、その香りの特徴を調べること、そして、香気成分を利用して香粧品等、畳表以外の製品の開発に繋げることである。

助成により導入することができた機器、匂い嗅ぎ付きガスクロマトグラフー質量分析計（以下、GC-MS-O と示す）を利用することにより、試料香気の加熱による変化を抑えること、植物に含有される成分の量ではなくヒトが特徴的であると感じる香気成分に着目した分析を行うことが可能となった。今後のシチトウの新規利用法や開発について役立つ基礎的データが得られ、新たな活用方法についても検討したので、その概要を示す。

２．研究内容

1)乾燥シチトウの香り成分の分析とその特徴解析

シチトウは茎部、花部、根部の 3 部位から構成されており、地上部位は 1.5m 程度に達する。収穫後に天日乾燥を経て、茎部が畳表や工芸品の材料として利用される。乾燥シチトウ茎部（**図 1**）をそのまま用いて、GC-5977A MSD 本体（Agilent Technologies 社製）、サンプ

ラーMultiPurpose Sampler（Gerstel 社製）で構成される GC-MS-O で香気成分をした。においの質と強度の評価は、嗅覚パネル選定試験（第一薬品産業社製基準臭使用）に合格した被験者 3 名で行った。

図１　乾燥シチトウ茎部および根部

実験条件を下記に示す。

試料：シチトウ茎部 1.8g（ガラスバイアルに入れ分析）

固相マイクロ抽出(SPME)ファイバー：Carboxen/PDMS

試料加温（Incubation）条件温度：40℃、5 分

GC カラム: Agilent 19091J-433 HP-5, 30m×250 μm×0.25 μm

カラム昇温設定：40℃→100℃（10℃/min)、100℃→250℃（8℃/min）

分析結果を図 2 に示す。上段が MS のクロマトグラムで、下段が被験者による評価である。

推定された香気成分図中の a、b はそれぞれ α-ピネン、リモネンであり、ある程度の含量であったが香りへの寄与は少なかった。

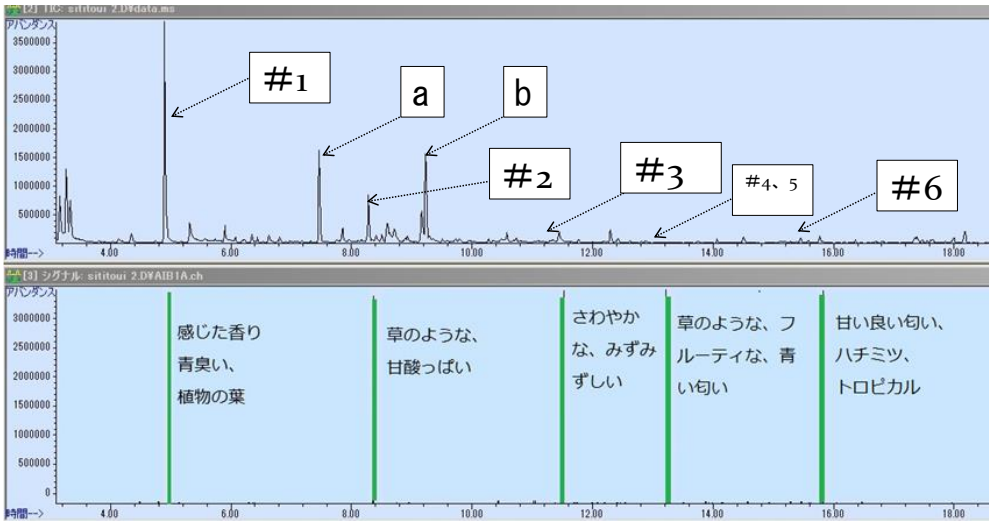
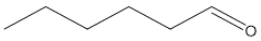
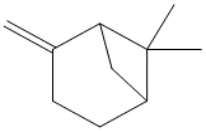
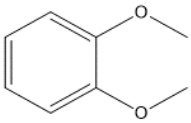
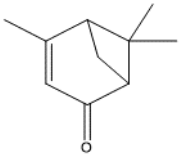
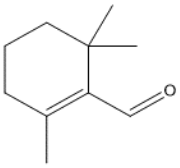
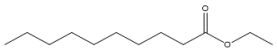


図２　乾燥シチトウ茎部の GC-MS-O 分析

図 2 中の＃1～＃6 の成分については表 1 に示す。表 1 中の芳香成分より、シチトウの香りは、＃1 のヘキサナールの青臭さに加え、みずみずしさに起因する＃3 のベラトール

と甘さを与える#6のデカン酸エチルの存在により、やや穏やかな香りとなっていると考えることができた。既に報告されているシチトウの水蒸気蒸留精油の分析結果と比較すると、今回のGC-MS-O分析では、α-ピネン、β-ピネン、 リモネン、ベルベノンのみが共通成分であった。

表１　乾燥シチトウの特徴的香気成分

No.	保持時間	成分名	分子式	CAS 登録番号	分子構造
#1	4.95	hexanal	$C_6H_{12}O$	66-25-1	
#2	8.30	β-pinene	$C_{10}H_{16}$	127-91-3	
#3	11.35	benzene, 1,2-dimethoxy-〔別名 veratrole〕	$C_8H_{10}O_2$	91-16-7	
#4	12.62	bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-, (1S)-〔別名 verbenone〕	$C_{10}H_{14}O$	1196-01-6	
#5	12.81	1-cyclohexene-1-carboxaldehyde, 2,6,6-trimethyl-〔別名β-cycrocitral〕	$C_{10}H_{16}O$	432-25-7	
#6	15.75	decanoic acid, ethyl ester	$C_{12}H_{24}O_2$	110-38-3	

比較のため、シチトウよりも畳表として広範に利用されているイグサの乾燥品も同様の条件で分析した。イグサについての結果を図3に示す。乾燥イグサのGC-MS-O分析でも、特徴的香気成分として図3、No.1のヘキサナールが検出された。ヘキサナールの青臭さに加えて、さらに、No.5のユーカリプトールとNo.6のα-カンファーのショウノウ様香気の他、含硫化合物の存在も示唆された。

被験者を用いて乾燥シチトウと乾燥イグサの香りの官能評価を行った。ヘルシンキ宣言に準じ、特別の訓練を受けていない学生ボランティアに、試料についての情報を与えずに、

シチトウとイグサの判別試験と快・不快度評価を実施した。その結果、15 名中、半数を超える８名がシチトウとイグサの香りの差異を明確には判別できない、ということがわかった。シチトウとイグサの香りの差異を明確に判別できた７名のうち、シチトウの香りをより好む者が３名、イグサの香りをより好む者が２名、シチトウとイグサを同程度に好む（あるいは同程度に嫌いである）者は２名、であった。

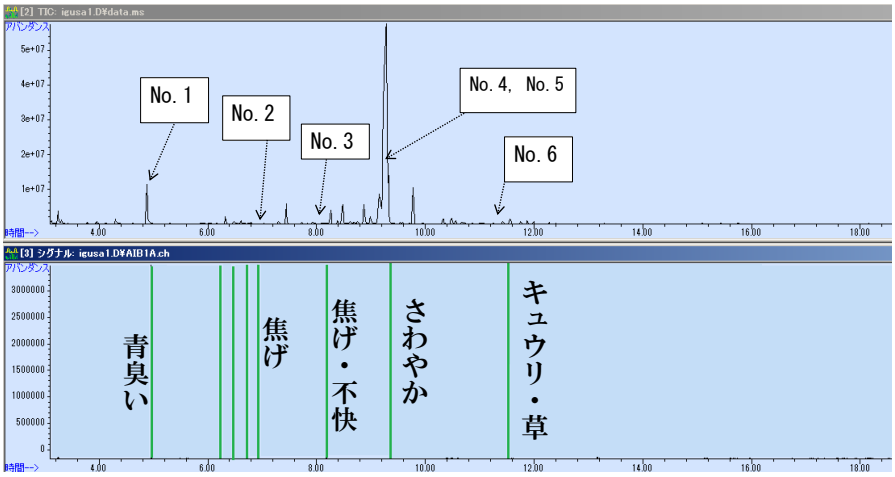


図３　乾燥イグサ茎部の GC-MS-O 分析

以上から、乾燥シチトウと乾燥イグサはこれまでの主な利用法は畳表と共通しており、含有される香気成分は、青臭さにはヘキサナールが寄与するという共通点があったが、他の香気成分には違いがあるということが明らかになった。また、被験者による判別試験や嗜好性試験の結果から、シチトウとイグサの間では、ヒトへの香気の影響や機能性に差があることが予想できた。

乾燥シチトウの香気成分の疎水性や電荷分布を解析することにより、その成分特性を今後の開発に利用する基盤をつくることができると考え、パーソナルコンピュータ（OS: Windows 7 および 10）で構築した主要６成分の分子構造について、特性データの検索や電荷等を Chem3D ultra（16.0.0.82）、Conflex（ver. 5.2）、Gaussian 16W による計算と解析を行った。分子の化学的特徴の一部を分子量とともに表２に示した。分子の疎水性の指標である log P 値は 1.3～3.9 の間にあり、溶解度の指標である log S 値は-1.5～-3.6 の間にあり、ヘキサナールとベラトロールが水と親和性が高く、デカン酸エチルが最も水に溶けにくいことがわかった。分子構造の柔軟性の指標と今後の解析のために、分子力学法（MMFF94s 力場）を利用して水和状態での配座異性体数（存在確率 1%以上）も求めた。

表２　乾燥シチトウの主要香気成分の化学的特徴

成分分子	分子量	log P	log S	配座異性体数
hexanal	100	1.33	-1.64	5
β-pinene	136	2.95	-2.90	1
veratrole	138	1.78	-1.52	5
verbenone	150	1.71	-1.94	1
cycrocitral	152	2.14	-2.38	4
ethyl decanoate	200	3.87	-3.60	5

2)　乾燥シチトウから香り成分の抽出と抽出物の特性解析

上記 1)においては、乾燥後のシチトウから私たちが感じるのに近い香りを分析するために、乾燥したシチトウをそのまま用いて分析した。生のシチトウは保存性が高くないため、ここでは、乾燥後のシチトウから、ハーブオイルメーカー（図 4）を利用して植物精油等の抽出に広く用いられている水蒸気蒸留法で抽出を行った。精油と芳香蒸留水（ハーブウォーター）が得られたが、シチトウの精油量は微量であり、少量の精油を含む蒸留物（抽出物の上層部）は焦げた不快臭を示した。一方、水溶性成分が多いと考えられるハーブウォーターにはやや良い香りがあったが、乾燥条件により乾燥シチトウ自体の香りが変動するため、得られるハーブウォーターの香りにも差がでることがわかった。さらに、精油を含むハーブウォーターは 6 か月程室温保存をすると香質が変化し、不快臭が減少し芳香性が増加することを認め、GC-MS-O を用いて分析した。その結果、精油を含むハーブウォーターの香気には、乾燥状態で特徴的な青臭さの成分であるヘキサナールは認められず、乾燥シチトウでは認められなかった芳香成分が含まれていることがわかり、さらに詳細を検討中である。

図４　ハーブオイルメーカー

水蒸気蒸留の結果から、シチトウの水溶性成分の芳香性の利用が期待できたため、乾燥したシチトウ茎部に熱湯を加えて短時間（15 分）抽出を行った。得られた熱水抽出物は美しい黄金色（図５）であった。シチトウの熱水抽出物は、強くはないがマイルドでやや芳香性があり、イグサの熱水抽出物はゆで汁や乾燥イグサを想起させる香りであった。

図５　熱水抽出物
（左：シチトウ、右：イグサ）

シチトウの色素について調べるため、ブレンダーを用いて粉末状にして、疎水性が異なる溶媒（エタノール、アセトン、ジエチルエーテル、ヘキサン）に加えて、シチトウの色素の溶出しやすさを確認した。緑茶の色素と比較すると、シチトウの色素は、親水性が高いエタノールに抽出されやすく、フラボノイド系色素などの親水性の色素、すなわち、ポリフェノール系のものを多く含む可能性が示唆された。粉末状としたシチトウは、粉末状の緑茶や粉末状のイグサと比較すると、保存時の退色速度が最も速く、酸素あるいは光により変化しやすい色素を含むのではないかと考えられた。

上記より、乾燥シチトウの熱水抽出物に抗酸化性物質が含まれる可能性が示唆されたため、乾燥シチトウの粉末試料を熱湯で 2 分間抽出後、2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル（DPPH）ラジカルの消去活性を 517nm の吸光度変化により測定した。その結果、シチトウの抽出物は、ビタミン C の 200 μg/mL 溶液よりもやや高い DPPH ラジカル消去活性を示し、シチトウの抽出物を 1/10 に希釈しても活性の低下は 20%以下であった。シチトウ熱水抽出物は、緑茶やイグサと同程度のラジカルの消去活性があることがわかり、シチトウが抗酸化作用を持つ可能性を認めた。（図６）。

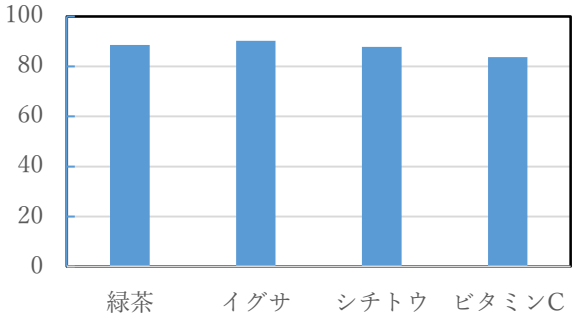


図６　　DPPH ラジカル消去活性（%）
（ビタミン C は 200 μg/mL 水溶液、その他は 10 mg 乾燥物/mL）

ここまでの各種の結果より、乾燥シチトウをハーブティー、その他の食用、あるいは熱水抽出物を香粧品に利用する可能性を考えて、シチトウの熱水抽出物の安全性について検討した。外部委託（日本食品分析センター）によるマウス（4～5 週齢の ICR 系雌（♀）マウスを試験群 5 匹、対照群 5 匹使用）を用いた 14 日間反復投与毒性試験を行った。一般状態観察、体重測定(週 1 回)を行い、試験期間中に異常および死亡例は認められず、剖検においても抽出物の影響と思われる変化は認められなかった。試験群には抽出液（10g/400mL、熱湯により 5 分間抽出したもの)、対照群には水道水を給与したところ、マウスの 1 日摂水量は、1 群 5 匹当たり試験群で 44 g、対照群で 35 g であった。マウスの 1 日摂水量は、通常の実験での飲水量（1 匹 4.0～7.0mL/日程度）と差は無く、シチトウの熱水抽出物と水道水で大きな差はなかったため、マウスにとってシチトウの熱水抽出物の嗜好性は水と大きな

差はなく、シチトウの熱水抽出物をマウスが飲用として利用できるものであることが確認できた。ただし、各種試験法の検討や依頼をした結果、過去にヒトが飲用・食用・薬用として用いられた歴史が無い植物が食品として認可されるには、試験項目が非常に多く難しいことが明らかになった。

3) シチトウの香気成分の利用法の検討

①シチトウのインセンスへの利用

乾燥シチトウ、線香の原料として広く利用されているタブ粉（タブノキ、*Machilus thunbergii*、クスノキ科、香仙堂より提供）および市販ペパーミント（*Mentha piperita*、株式会社生活の木）を材料とした。シチトウは木部が多く硬い部分があるため、また、ペパーミントは乾燥した葉を利用するため、ブレンダーを使って粉砕し粉状として、混合・加水を行い、コーン型を利用して高さ約 2 ㎝のインセンスを作成した（図７：左、中央)。材料粉体粒子の細かさに依存し、粒子の粗いシチトウのみで作成したものはタブ粉を含むものに比べて、1 個当たりのインセンスの質量は小さかった。室温で 3 日～10 日程度放置してから、インセンスの香気評価を茶香炉（図７：右）による加熱法と先端部位に着火する燃焼法で行った。作成したインセンスの色、加熱法と燃焼試験の結果を表３に示す。

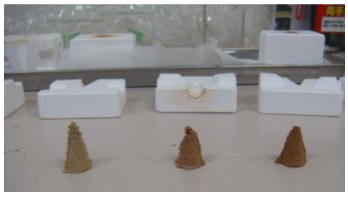


図７　インセンスの作成と評価（左：コーン型、中央：作成したインセンス、右：茶香炉）

表３　シチトウおよびシチトウ含有インセンスの特徴と匂い

配合比率 ＼ 比較項目	シチトウ 100%	シチトウ 40% タブ粉 60%	シチトウ 20% ペパーミント 20% タブ粉 60%
乾燥後の特徴	やや緑色、もろい、やや緑の植物の匂い	やや茶色、シチトウのみよりは硬い、匂いはほとんどない	濃い茶色、シチトウのみよりは硬い、匂いはほとんどない
匂い（加熱法）	笹の葉を蒸したような弱い匂い		
匂い（燃焼法）	一番刺激臭が強い、ややきつい匂い	タブ粉の燃焼した匂い	タブ粉の燃焼した匂い、ミント臭なし

加熱法では、植物の葉を蒸したような弱い香りがしたが、はっきりとした香りは感じられなかった。使用したティーライトキャンドルの炎の大きさも香りの強さに影響すると考えられ、加熱温度を制御できる実験がより有効であると考えられた。燃焼法では、インセンスの燃焼はスムーズに進行したが、タブ粉を混合した場合は燃焼臭と思われるもののみが感じられ煙に芳香性は認められなかった。ペパーミントを加えた場合も同様で、煙に特別な芳香性は認められなかった。一方、シチトウのみを用いた場合は、最も強い刺激臭を示した。害虫忌避への利用や畳表に利用できない端材の利用法として、さらに検討の余地があると考えられた。

②シチトウの香気成分の再構成と香粧品への利用の検討

GC-MS-O 分析の結果から乾燥シチトウの香気成分のうち香りへの寄与が高いと考えられた 6 成分を利用して、シチトウの香気の再構成、およびオーデコロンなどの香粧品用のブレンドを検討した。再構成での成分比率は、GC-MS-O で得られたトータルイオンクロマトグラム（TIC）ピークの高さを参考に、香粧品用のブレンド比率は、文献（Fenaroli's handbook of flavor ingredients (sixth edition)）からフレーバーとして食品へ添加されている量（表４）を検索し参考とした。

表４　各香気成分の香りと香料としての実際の使用量

香気成分	香りの特徴	香料としての使用量〔ppm〕
ヘキサナール	青臭い	１～2
β－ピネン	樹脂、草	10～20
ベラトロール	さわやか	0.2
ベルベノン	ミント様	1～5
シクロシトラール	樟脳様	0.002～0.01
デカン酸エチル	甘い香り	0.02～10

香りの再構成においては、ヘキサナールの匂いが非常に強く感じられこのまま利用することはできないことがわかった。また、香粧品用のブレンドでは、ヘキサナールをある程度減少させてもその匂いが強く感じられるため、さらにこれを減少させ混合の比率を変化させること、ベースノートとなるような重く持続性のある香りの成分を新たに添加すること、香粧品において安全性の観点からアルデヒド類の代替を行う傾向があることを考慮し別の成分への代替も検討することなど、今後の課題が明らかになった。

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

途中から参加したこともあり、期限内に終了できない部分が多く残っているが、大分県農水産物であるシチトウの香気成分を明確にするという点にある程度貢献できた。収益の観

点からみて企業などではすぐには実施できない GC-MS-O を用いた特徴香の香りの分析ができた。研究成果を農林水産研究指導センター職員に対して発表を行うことで、職員に香りの分析法についての知見を深めることにも協力できた。大分香りの博物館企画展「国東半島宇佐地域　世界農業遺産と香り」において香りの分析結果を公開することにより、博物館に貢献し来場者に地域農産物を知ってもらう一助となった。

この研究の成果を知った企業からのコンタクトがあり、今後香りを利用した商品開発に協力して取り組む可能性がでてきた。別府大学夢米棚田プロジェクトのリーダー学生が、自分達が栽培に協力しているシチトウについて興味を持ち、教育面にも貢献できたと考える。県内の野草や薬草についての知識や利用法の普及に関わる NPO 法人の方も研究結果に興味を示してくれた。今回の研究を通して、さらなる研究や商品開発に、学生、地域の人材、企業を巻き込んでいけそうな手ごたえが感じられた。

今後、シチトウの研究面では、下記のようなことが考えられる。

１）植物部位・生育時期による香気の差異、生と乾燥品の香気の差異、乾燥条件を制御しての香気の差異、をさらに明らかにする。

２）シチトウの水蒸気蒸留物の経時変化を、温度を制御して調べ明らかにする。

３）ハーブティーとしての利用は断念したが、シチトウ熱水抽出物の抗酸化性について、物質面からさらに明確にする。

４）近赤外分光法（NIRS）を利用してシチトウの香りの脳活動の影響、生理的影響、心理的影響を明らかにする。

今後、シチトウの応用面では、下記のようなことが考えられる。

１）本研究で明らかになった乾燥シチトウの香気成分を利用した香粧品開発、乾燥シチトウの水蒸気蒸留物の香気成分に着目した香粧品開発を推進する。特に、調香師と相談し、ベースノートとなるような成分を添加し、オーデコロンなどの開発を検討する。

２）シチトウに他の特産品を混合させたインセンスおよび蚊取り線香の試作と評価を継続する。上記のシチトウの応用、商品開発については、地域企業や別府大学学生と一緒にアイディアを出して進めていく方向が考えられる。

研究タイトル：②ヒジキの香り成分の分析

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　匂いの化学研究室

担当者職名：教授　吉井文子

1. 研究の目的

ヒジキ（*Sargassum fusiforme*、褐藻類ホンダワラ科）漁業は大分県内の国東半島周辺、別府湾、豊後水道の各地で行われており、大分県は全国第 3 位のヒジキの生産県である。県内のヒジキの水揚げ量は、10 年前の約 3 倍程度に達している。しかし、韓国や中国からの輸入ものが多く、日本で流通する国内産ヒジキは、全体の一割程度である。ヒジキについて、

香気成分の解明を行い、今後の大分県産ヒジキの有効利用に貢献することを目的とする。

助成により導入することができた機器、GC-MS-O を利用することにより、試料香気の加熱による変化を抑えること、含有成分量ではなくヒトが特徴的であると感じる香気成分に着目した分析を行うことが可能となった。解析を開始したばかりであるが、今後のヒジキの新規利用法や開発について役立つ基礎的データが得られたので、その概要を示す。

２．研究内容　　方法と結果を含む

一般的なヒジキ（*Sargassum fusiforme*）は採取したものを鉄鍋で３～４時間ゆでて干したものである。長ひじき（ヒジキの茎の部分）と芽ひじき（ヒジキの茎の部分ではなく枝分かれした芽の部分、米ヒジキと呼ぶこともある）が市販されている。製法については会社により異なる。ここでは、大分県産の製品（株式会社山忠提供、製造法は特許取得のノンドリップ蒸煮法、芽ヒジキ）を用いて（図 1)、GC-MS-O 分析により特徴香気を明らかにした。乾燥ヒジキそのものの香りは、甘じょっぱく、やや海藻を想起させ食欲をそそる香りである。

図１　　乾燥ヒジキ

GC-MS-O　分析条件
試料：乾燥ヒジキ 1.8 g（ガラスバイアルに入れ分析）
マイクロ抽出(SPME)ファイバー：Carboxen/PDMS
試料加温（Incubation）条件温度：40℃、５分
Agilent DB-WAX、30m×250 μm×0.25 μm、
カラム昇温設定：
40℃(2 min)→100℃(10℃/min)、100℃→230℃(8℃/min)

特徴的香気成分を GC-MS-O で分析した結果を図２に示す。その結果、ヘキサナールやヘキセナールの青臭い香りの成分に加え、2,6-ノナジエナールのさわやかな香り、酢酸の酸臭、エステルの甘い香りが含まれていることがわかった。特に、ヒジキの乾燥品そのものからは酸っぱい匂いはないのに、酢酸の含量が多いことは特徴的であった。また、フラン環やピロール環を有した焦げ臭を示す成分が生成しており、これらはヒジキの加熱加工により生成したものではないかと推測された。ヒジキのフレーバーによりタバコの香りを改善しようとする試みはあるが、乾燥ヒジキはもちろん生のヒジキの香気成分そのものについては、これまでほとんど調査・報告がされていない。他の生の海藻、ワカメ、アサクサノリ、ヤハズ等の香気成分については分析報告があり、今回の乾燥ヒジキの香気成分と比較すると、全く異なる成分を含んでいることがわかった。

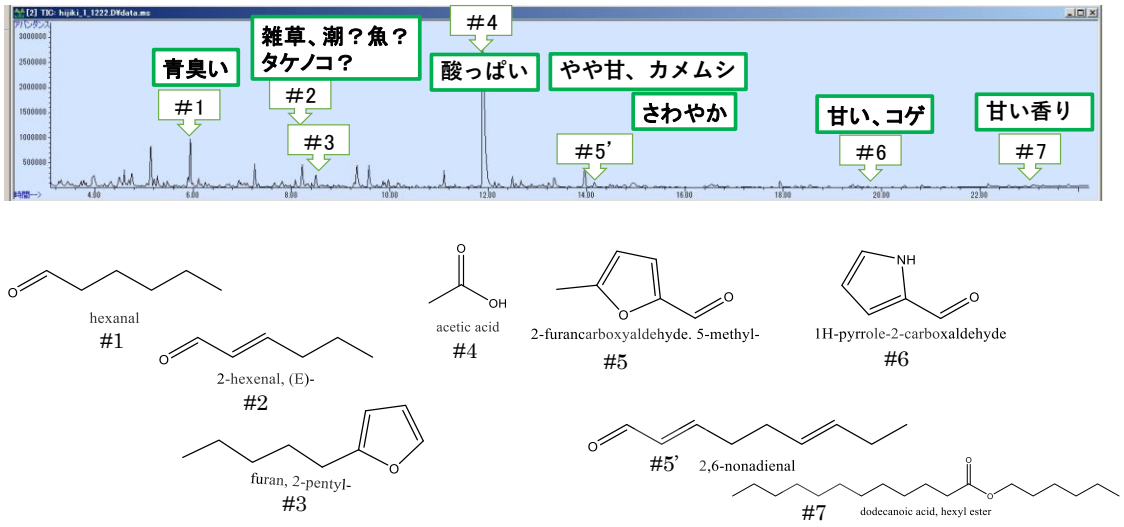


図２　　乾燥ヒジキの GC-MS-O 分析結果と香気成分

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

途中から参加したこともあり、期限内に終了できない部分が多く残っているが、大分県産水産物であるヒジキ香気成分について GC-MS-O を用いて明確にするという点にある程度貢献できた。

今後、ヒジキの研究面では、下記のようなことが考えられる。

１）大分県産品ヒジキについて香りの分析を行ったので、産地（中国産、韓国産）や製法の異なるヒジキのフレーバー成分を分析して比較する。

２）近赤外分光法（NIRS）を利用してヒジキの香りの脳活動の影響、生理的影響、心理的影響を明らかにする。

今後、ヒジキの応用面では、下記のようなことが考えられる。

１）海外産との香気成分の差異が明確になれば、それに着目した商品開発に繋げる。

２）海藻香気の抽出を行いフレーバーとしての利用を検討する。

４．研究成果

a)原著論文

1.　＊吉井文子、におい嗅ぎ GC-MS を用いたシチトウイの香気分析、別府大学紀要、2017、58、137-146.

b)総説、図書

１．斉藤幸子、井濃内順、綾部早穂、吉井文子、中野詩織：嗅覚概論（第 2 版）におい評価の基礎：公益社団法人　におい・かおり環境協会、2017　：1 章におい物質、9 章においの計測

c)招待講演、シンポジウム、他

１．吉井文子：シチトウイの香りの分析（展示）：平成 28 年度大分香りの博物館企画展「国東半島宇佐地域　世界農業遺産と香り」　2016 年 10 月 1 日～1 月 31 日（大分香りの博物館）別府市

２．吉井文子：シチトウイ（七島藺）の香りについて　におい嗅ぎ GC-MS の利用事例：はやしセミナー　2017 年 3 月 23 日（別府大学）別府市

d）国際学会（一般公演のみ）

１．なし

e）国内学会（一般公演のみ）

１．　2017 年　日本味と匂学会発表　1 件

f）特許

１．なし

g）その他（学会賞、報道など）

１．なし

私立大学戦略的研究形成支援事業
「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」
（平成 27 年度～平成 29 年度）
研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：醸造食品分野での新規解析法の確立
プロジェクトでの役割：新規醸造微生物及び新規食品の開発

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

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　発酵食品製造学研究室
担当者職名：教授　岡本啓湖

1．研究の目的

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

２．研究内容

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

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

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

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

【第３スクリーニング結果】

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

選抜酵母による試醸清酒のグルコースの定量分析結果

図 1 に選抜酵母による試譲清酒のグルコース濃度比較を示した。協会 9 号のグルコース濃度は 2.63±0.02%、チ-2 は 2.12 ± 0.07% 、KET002 は 2.02±0.38%、ハ-4 は 1.90±0.46%であった。協会 9 号のグルコース濃度との比較で、降順で 80%のチ-2、77% の KET002、72%のハ-4 となった。グルコース濃度において、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であった。また、最も相違する菌株はハ-4 であることが判明した。

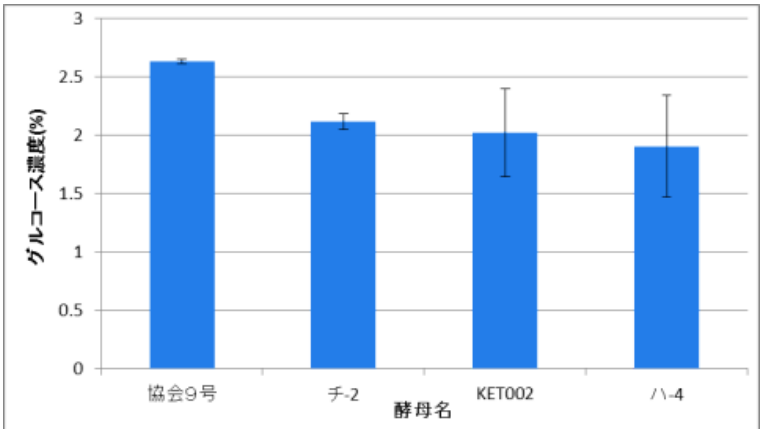


図１　選抜酵母による試醸清酒のグルコース濃度比較

選抜酵母による試醸清酒の酸度・pH 測定結果

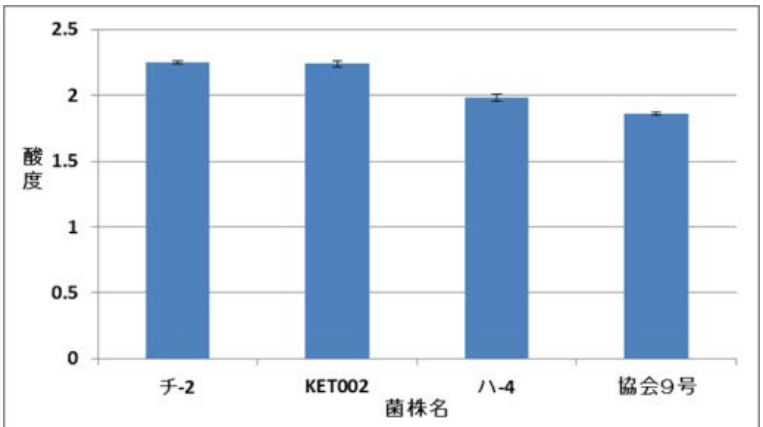


図 2　選抜酵母による試醸清酒の酸度比較

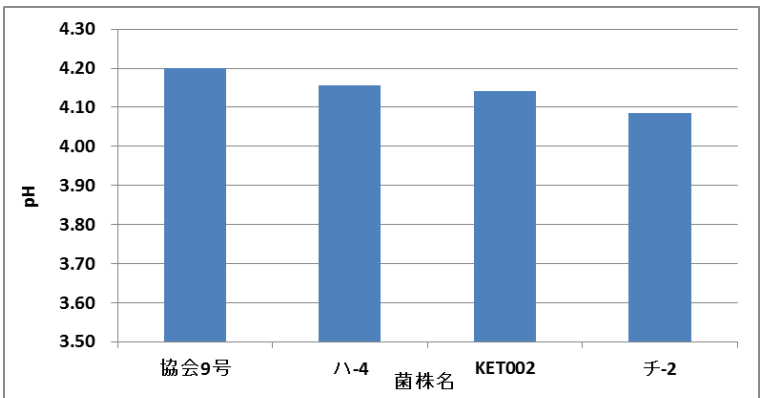


図 3　選抜酵母による製造清酒のpH比較

図 2 に選抜酵母による試譲清酒の酸度比較を示した。協会 9 号の酸度は 1.86±0.01、ハ-4 は 1.98±0.03、KET002 は 2.24±0.02、チ-2 は 2.25±0.01 であった。協会 9 号の酸度との比較で、昇順で 1.06 倍のハ-4、1.20 倍の KET002、1.21 倍のチ-2 となった。酸度に於いて、全選抜酵母は協会 9 号より高く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はハ-4 であった。また、最も相違する菌株はチ-2 であることが判明した。図 3 に選抜酵母による試譲清酒の pH 比較を示した。協会 9 号の pH は 4.20、チ-2 は 2.25±0.01、KET002 は 2.24±0.02、ハ-4 は 1.98±0.03 であった。協会 9 号の酸度との比較で、昇順でハ-4 は 99.0%、KET002 は 98.6%、チ-2 は 97.1%となった。pH に於いて、全選抜酵母は協会 9 号より低いが、協会 9 号に類似する菌株はハ-4 であった。また、協会 9 号に最も相違する菌株はチ-2 であることが判明した。

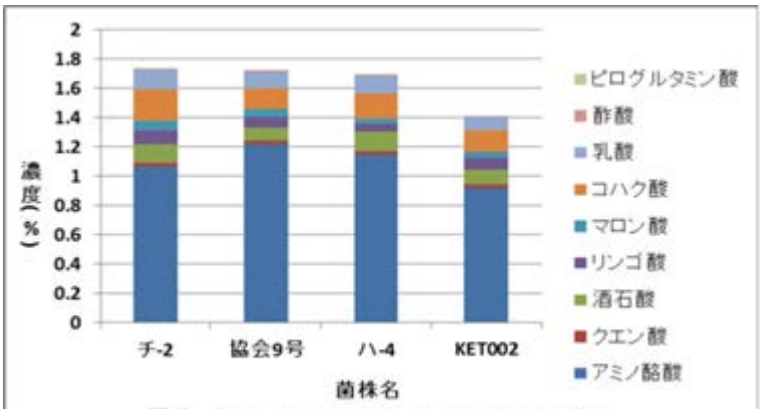


図 4　選抜酵母による試醸清酒の有機酸の総和

選抜酵母による試醸清酒の有機酸の同定結果

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

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

選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度測定結果

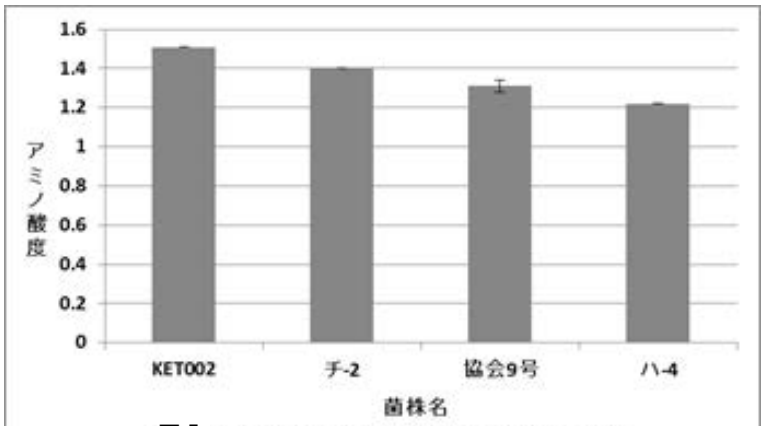


図 5　選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度比較

図 5 に選抜酵母による試譲清酒のアミノ酸度比較を示した。協会 9 号のアミノ酸度は 1.31±0.029、チ-2 は 1.40±0.00、ハ-4 は 1.22±0.00、KET002 は 1.51±0.00、であった。協会 9 号の酸度との比較で、昇順で KET002 は 1.15 倍、チ-2 は 1.07 倍、ハ-4 は 93%となった。アミノ酸度に於いて協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であり、最も協会 9 号に相違する菌株は KET002 であることが判明した。

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

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

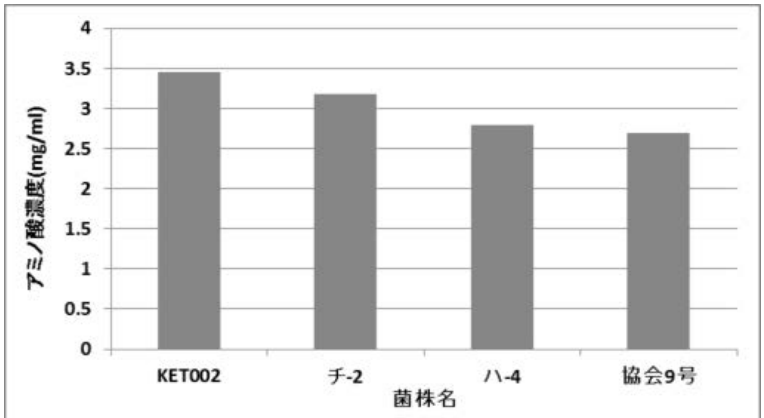


図 6　選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸の総和

選抜酵母による試醸清酒の香気成分濃度測定結果

図 7 に選抜酵母による試醸清酒のエステル系香気成分比較を示した。酢酸イソアミル濃度は協会 9 号（1.20±0.09ppm）と比較して KET002（0.64±0.09ppm）は 53.6%、ハ-4（0.98±0.06ppm）は 82.1%、チ-2（1.01±0.04ppm）は 84.1%だった。酢酸イソアミル濃度において、全選抜酵母は協会 9 号より低く、協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。

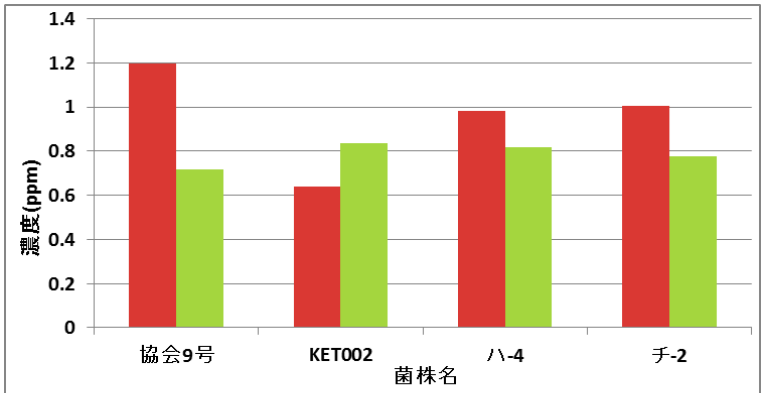


図 7 選抜酵母による試醸清酒のエステル系香気成分比較

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

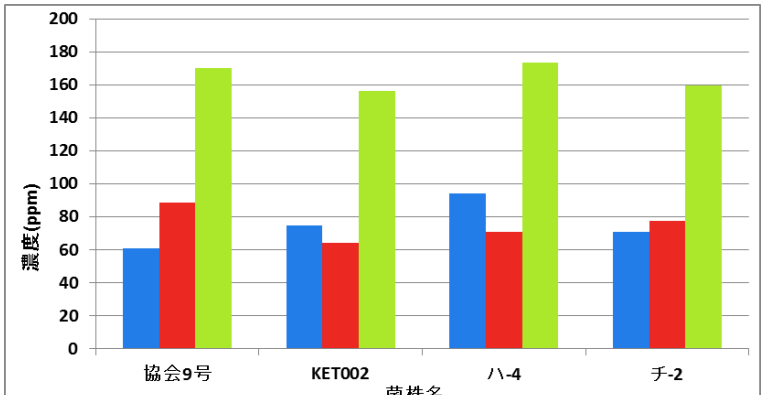


図 8 選抜酵母による試醸清酒のアルコール系香気成分比較

図 8 に選抜酵母による試醸清酒のアルコール系香気成分比較を示した。n-プロパノール濃度は協会 9 号（60.98±0.50ppm）と比較して、KET002（74.66±2.41ppm）は 1.22 倍、ハ-4（94.07±4.83ppm）は 1.54 倍、チ-2（70.87±1.01ppm）は 1.16 倍であった。n-プロパノールにおいて全選抜酵母は協会 9 号より高く、協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株はハ-4 であることが判明した。イソブチルアルコール濃度は協会 9 号（88.45±4.19ppm）

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

試飲会による官能検査結果

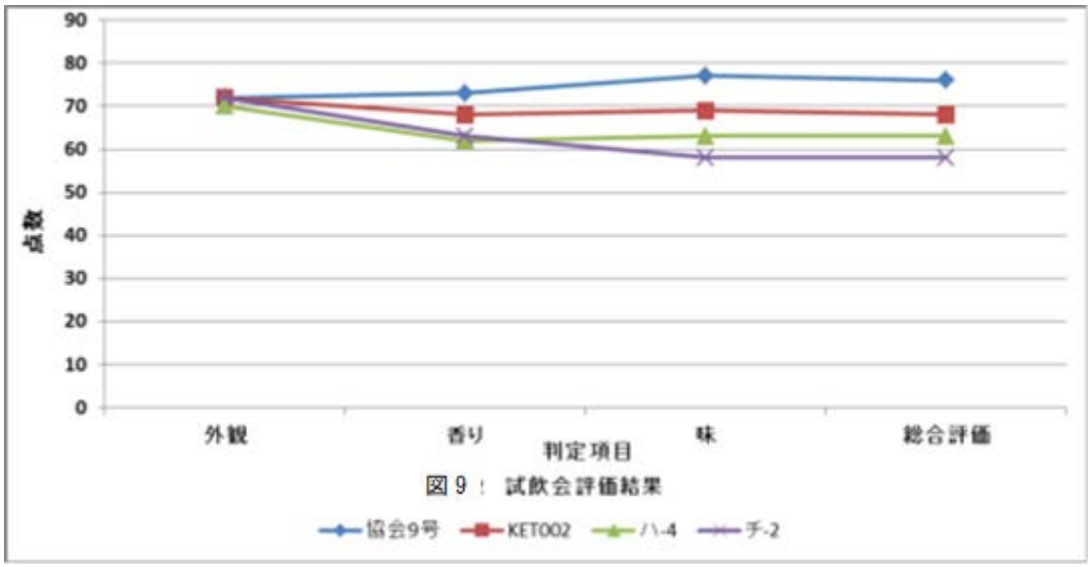


図 9 に選抜酵母による試醸清酒の試飲会評価結果を示した。アンケートは 5 点満点評価法とし、総合評価に点数が記載されていない場合は、製品の可能性の点数を採用した。更に総合評価を他の評価項目の合計としたパネリストは外した。外観の評価点はハ-4（70 点）を除き、全て同値（72 点）を示した。香り、味における最高評価点を獲得したのは協会 9 号

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

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

第 1 回試醸清酒の全分析結果に於ける協会 9 号との相違性比較

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

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

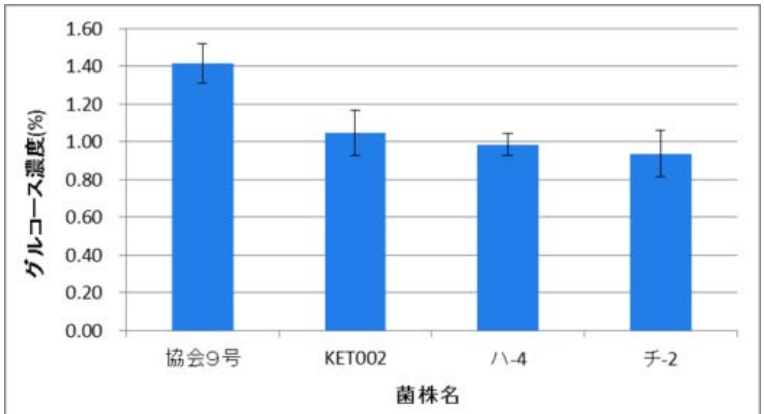


図 10 選抜酵母による試醸清酒のグルコース濃度比較

選抜酵母による試醸清酒のグルコースの定量分析結果

図 10 に選抜酵母による試醸清酒のグルコース濃度比較を示した。グルコース濃度は協会 9 号（1.41±0.10%）と比較して、KET002（1.05±0.12%）は 74.2%、ハ-4（0.98±0.06%）は 69.7%、チ-2（0.94±0.12%）は 66.3%であった。グルコース濃度において、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9 号に類似する菌株

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

選抜酵母による試醸清酒の酸度・pH 測定結果

図 11 に選抜酵母による試醸清酒の酸度比較を示した。協会 9 号（2.52±0.03）と比較して KET002（3.48±0.04）は 1.38 倍、チ-2（3.07±0.02）は 1.22 倍、ハ-4（2.60±0.02）は 1.03 倍であった。酸度に於いて全選抜酵母は協会 9 号より高く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はハ-4 であった。また、最も相違する菌株は KET002 となった。更に第 1 回製造試醸清酒（五百万石使用）で得られた「全選抜酵母試醸清酒の酸度は協会 9 号より高い」及び「最も協会 9 号に近い菌株はハ-4」結果は本実験により再現性が得られた図 12 に選抜酵母による試醸清酒の pH 比較を示した。協会 9 号（4.45）と比較してハ-4（4.42）は 99.3%、チ-2（4.38）は 98.4%、KET002（4.17）は 93.7% であった。pH に於いて、全選抜酵母は協会 9 号より低いが、協会 9 号に類似する菌株はハ-4 であった。また、協会 9 号に最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。更に第 1 回製造試醸清酒（五百万石使用）で得られた「全選抜酵母試醸清酒の酸度は協会 9 号より低い」及び「最も協会 9 号に近い菌株はハ-4」結果は本実験により再現性が得られた。

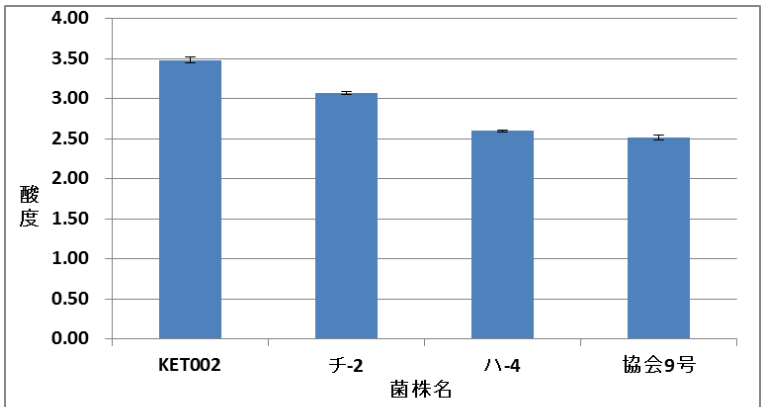


図 11 選抜酵母による試醸清酒の酸度比較

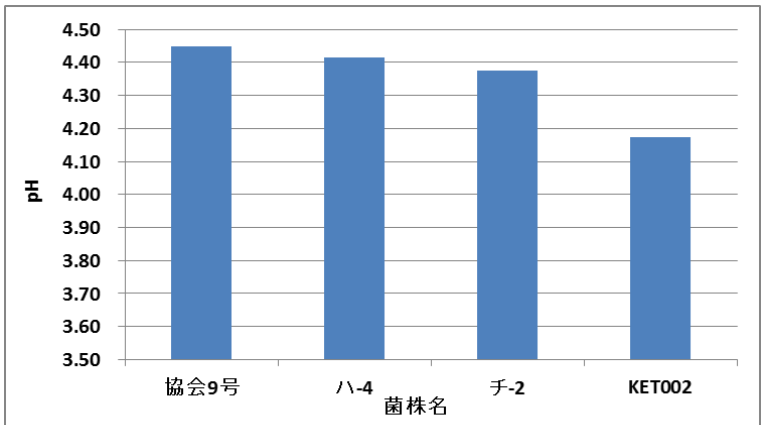


図 12 選抜酵母による試醸清酒のpH比較

選抜酵母による試醸清酒の有機酸の同定結果

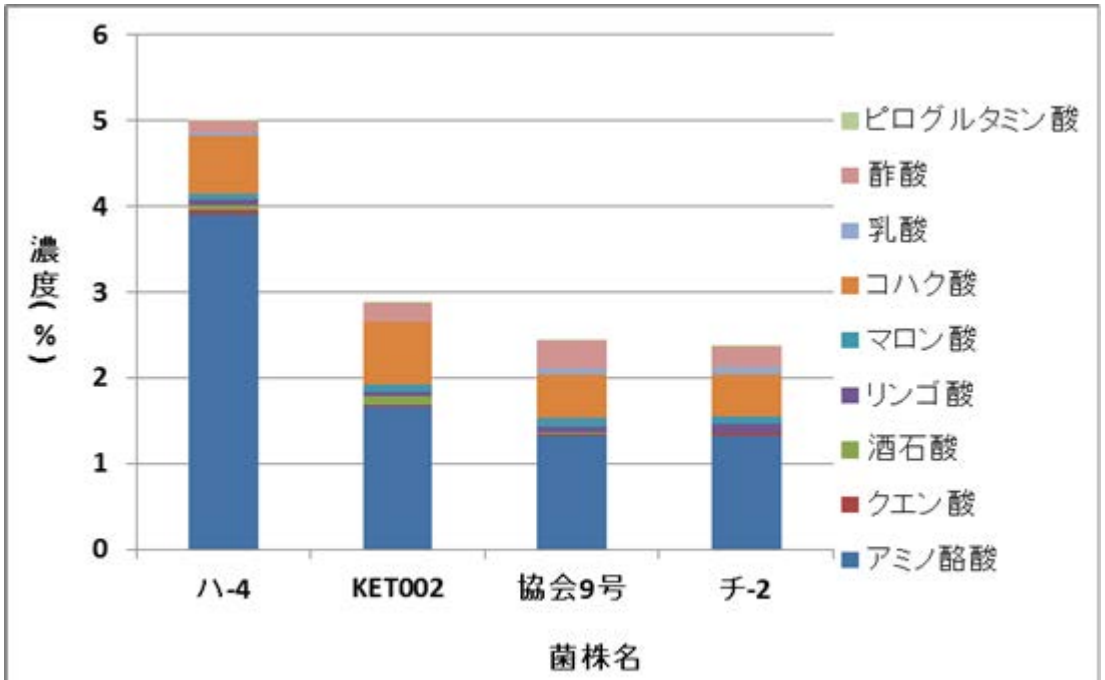


図 13 選抜酵母による試醸清酒の有機酸総和

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

選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度測定結果

図 14 に選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度比較を示した。アミノ酸度は協会 9 号（1.60 ± 0.03）と比較して KET002（1.73±0.04）は 1.08 倍、チ-2（1.63±0.02）は 1.02 倍、ハ-4（1.54±0.06）は 96.0%だった。アミノ酸度に於いて協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近い菌株はチ-2 であり、最も協会 9 号に相違する菌株は KET002 であることが判明した。また第 1 回製造試醸清酒（五百万石使用）で

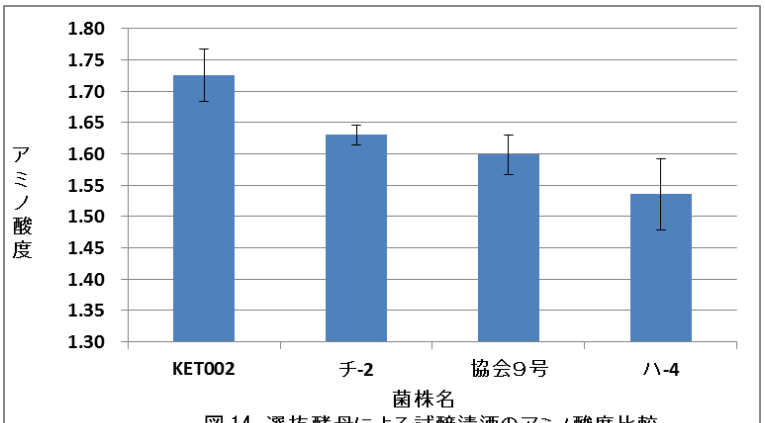


図 14 選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度比較

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

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

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

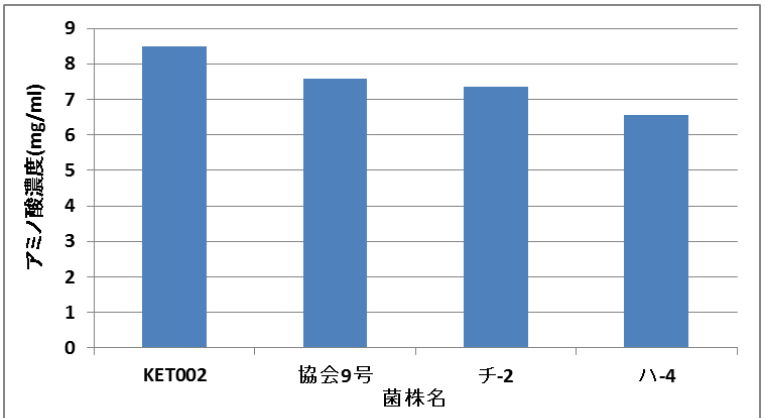


図 15 選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸の総和

選抜酵母による試醸清酒の香気成分濃度測定結果

図 16 に選抜酵母による試醸清酒のエステル系香気成分比較を示した。酢酸イソアミル濃度は協会 9 号（3.26±0.21ppm）と比較して KET002（1.66±0.10ppm）は 50.9%、ハ-4（1.77±0.03ppm）は 54.4%、チ-2（2.48±0.11ppm）は 75.9%だった。酢酸イソアミル濃度において、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。カプロン酸エチル濃度は協会 9 号（1.96±0.07ppm）と比較して、KET002（1.75±0.11ppm）は 89.6%、ハ-4（1.54 ± 0.06ppm）は 78.5%、チ-2（1.18 ± 0.55ppm）は 60.4%だった。

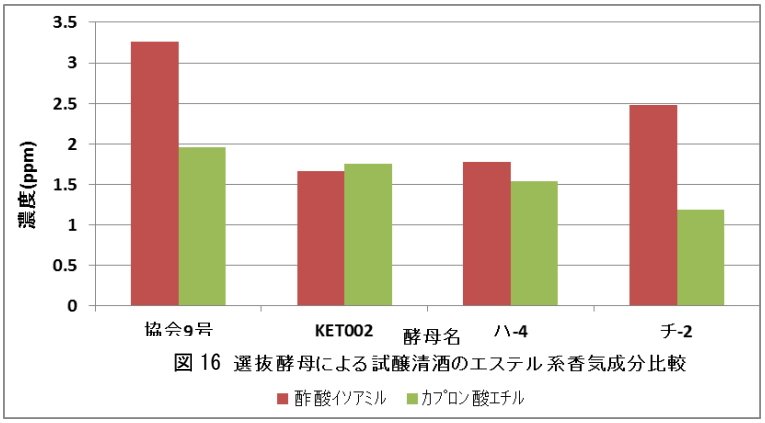


図 16 選抜酵母による試醸清酒のエステル系香気成分比較

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

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

ルにおいて、全選抜酵母は協会 9 号より高く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株はハ-4 であり、最も相違する菌株はチ-2 であることが判明した。イソブチルアルコール濃度は協会 9 号（92.50±2.49ppm）と比較して、KET002（54.19±1.81ppm）は 58.6%、ハ-4（54.17 ± 1.45ppm）は 58.6%、チ-2（59.76 ± 1.02ppm）は 64.6%だった。イソブチルアルコールにおいて、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株は KET002 とハ-4 であることが判明した。イソアミルアルコール濃度は協会 9 号（169.89±5.67ppm）と比較して、KET002（136.86±6.41ppm）は 80.1%、ハ-4（145.94±4.02ppm）は 85.9%、チ-2（158.03±6.75ppm）は 93.0%だった。イソアミルアルコールにおいて、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株はチ-2 であり、最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。

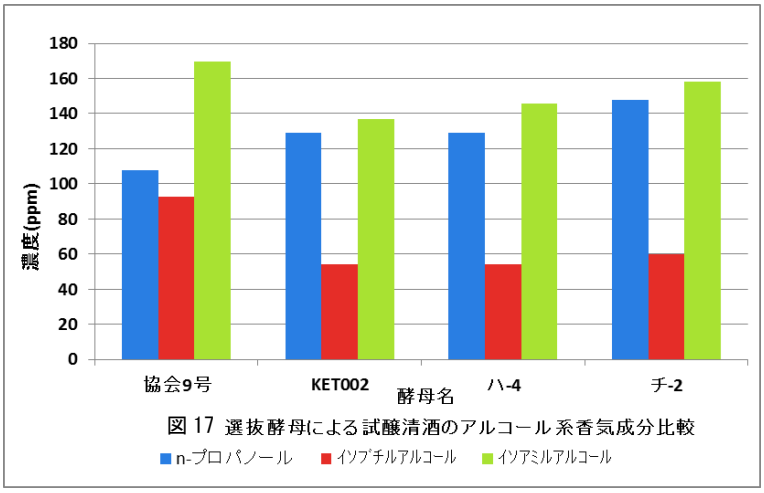


図 17 選抜酵母による試醸清酒のアルコール系香気成分比較

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

試飲会による官能検査結果

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

3）第 3 回試醸清酒の全 24 項目の分析結果に於ける協会 9 号との相違性比較

選抜酵母による試醸清酒のグルコースの定量分析結果

図 18 に選抜酵母による試醸清酒のグルコース濃度比較を示した。グルコース濃度は協会 9 号（2.42±0.02%）と比較して、KET002（2.17±0.04%）は 89.3%、ハ-4（2.22±0.02%）は 91.6%であった。グルコース濃度において、全選抜酵母は協会 9 号より低く、且つ協会 9 号に類似する菌株は存在しなかったが、最も協会 9 号に近似する菌株はハ-4 であった。また、最も相違する菌株は KET002 であることが判明した。更にこれまでの実験結果で得られた「全選抜酵母試醸清酒のグルコース濃度は協会 9 号より低い」結果は本実験により再現性が得られた。また H27 年度第 2 回製造実験結果では、協会 9 号のグルコース濃度は 14.13±1.04mg/ml であったのに対し、本実験では 24.24±0.196mg/ml だった。ハ-4 は 9.84±0.571mg/ml から 22.22±0.167mg/ml、KET002 は 10.48±1.199mg/ml から 21.66±0.419mg/ml となり、いずれも 10mg/ml 以上グルコース濃度の増加がみられた。ハ-4 は H27 年度第 2 回製造実験結果では今回実験を行った 3 つの全選抜酵母の中で最も低いグルコース濃度であったが、今回の実験では協会 9 号の次に高いグルコース濃度となった。協会 9 号と比較したグルコース濃度は、H27 年度第 2 回製造実験結果では 69.7%であったのに対し本実験では 91.6%となった。また、KET002 の協会 9 号と比較したグルコース濃度は、H27 年度第 2 回製造実験結果では最も協会 9 号に近似する値を示した 74.2%であったが、本実験では最も相違していたにもかかわらず 89.3%であった。これらの結果から、本実験では H27 年度第 2 回製造実験結果と比較すると、酵母によるグルコース濃度の差が全体的に小さくなったと言える。

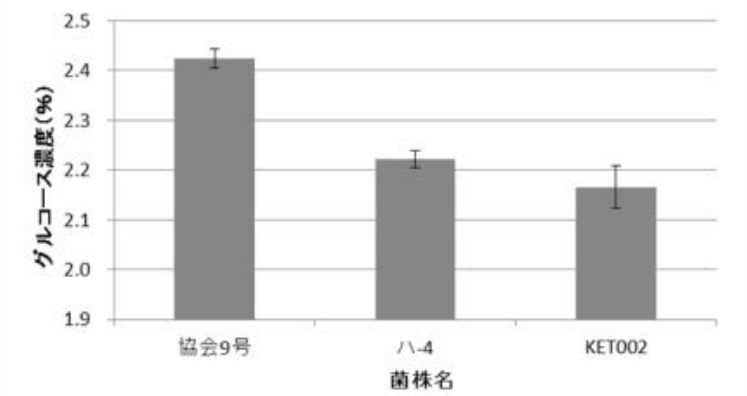


図 18 選抜酵母による試醸清酒のグルコース濃度比較

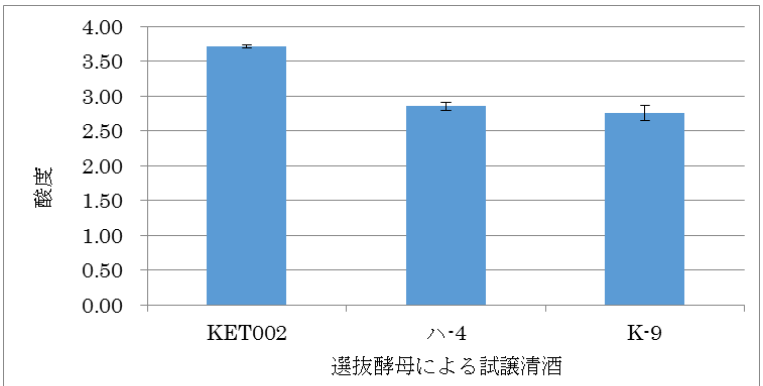


図 19 H28年度選抜酵母による試醸清酒の酸度比較

選抜酵母による試醸清酒の酸度測定結果

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

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

選抜酵母による試醸清酒の HPLC による有機酸の同定結果

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

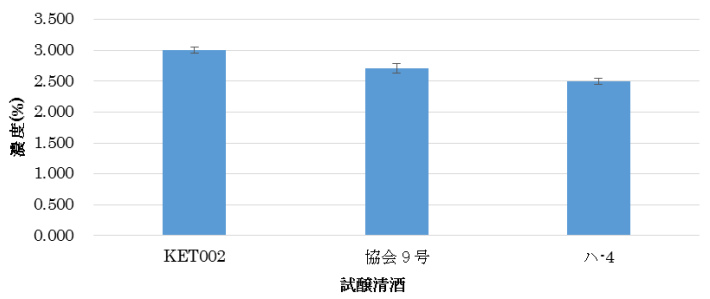


図 20 各選抜酵母による試譲清酒のγ-アミノ酪酸濃度比較

図 21 に選抜酵母による試験醸造清酒のコハク酸濃度比較を示した。コハク酸濃度は協会 9 号と比較してハ-4 は 1.11 倍、KET002 は 1.62 倍であった。コハク酸濃度に於いて、両菌株とも協会 9 号より高く、最高コハク酸濃度を呈するのは KET002 となった。コハク酸は、貝類のうま味成分の酸としてよく知られている有機酸で、独特な酸味とうま味があり、清酒や合成酒、味噌・醤油などの味（酸味・うま味）の調整に使われている 。また、腸内のコハク酸濃度が 20 ミリモルになると、大腸がん細胞の増殖が 50%近くまで減

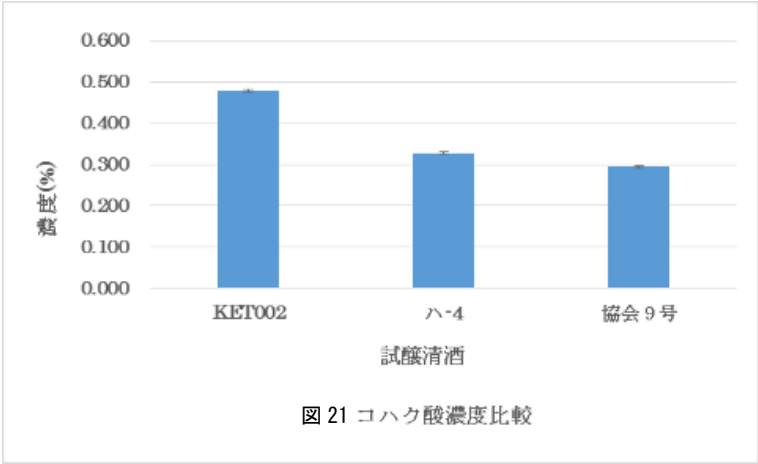


図 21 コハク酸濃度比較

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

選抜酵母による試醸清酒のアミノ酸度測定結果

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

選抜酵母による小仕込み試醸清酒の香気成分濃度測定結果

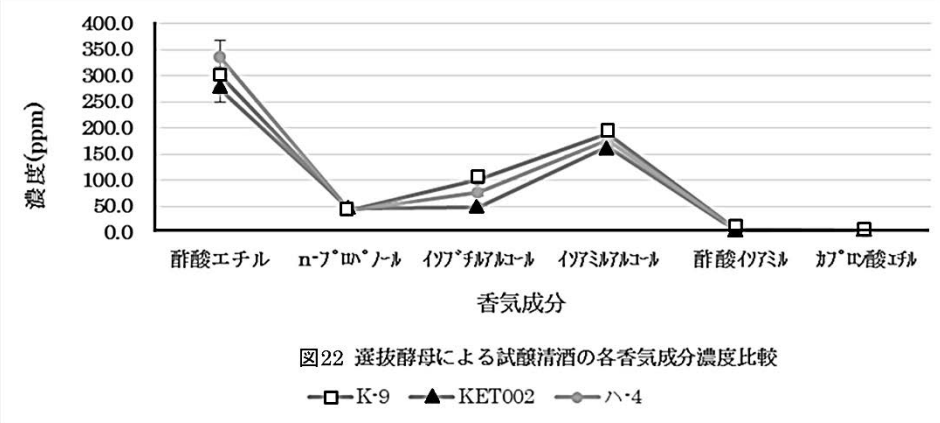


図22 選抜酵母による試醸清酒の各香気成分濃度比較

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

試飲会による官能検査結果

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

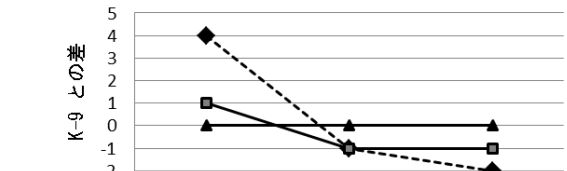
種類	判定項目	外見	各評価点合計	香り	各評価点合計	味	各評価点合計	商品化の可能性	各評価点合計	総合評価	各評価点合計	外見・香り・味・総合の総点数
	評点(点)	人数		人数		人数		人数		人数		
K-9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	606
	2	5	10	0	0	3	6	2	4	1	2	
	3	16	48	11	33	12	36	10	30	11	33	
	4	8	32	17	68	13	52	11	44	17	68	
	5	5	25	6	30	6	30	6	30	5	25	
各小計	6	34	115	34	131	34	124	29	108	34	128	
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

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

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

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

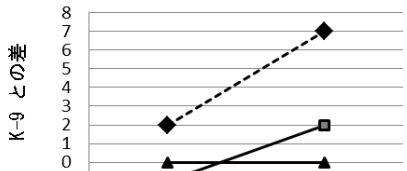
選抜酵母試醸清酒の酸度、アミノ酸度、グルコース濃度、有機酸濃度、香気成分濃度における K-9 との比較した結果を下記に示した（K-9 との差が 0～10%未満差を±1 点、10%以上～20%未満差は±2 点とした）。



	酸度	アミノ酸度	グルコース濃度
KET002	4	-1	-2
ハ-4	1	-1	-1
K-9	0	0	0

測定項目

図23 選抜酵母試験清酒の各測定項目における K-9との比較(点数)



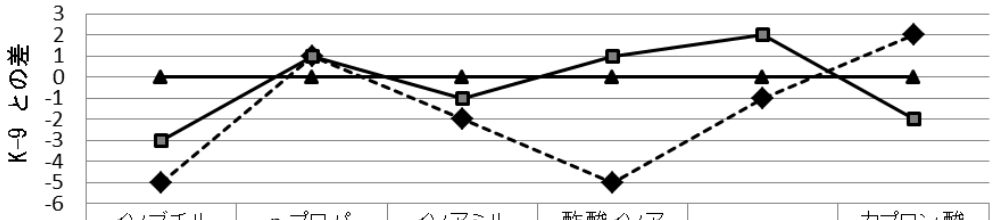
	γアミノ酪酸	コハク酸
KET002	2	7
ハ-4	-1	2
K-9	0	0

有機酸

図24 選抜酵母試験清酒の各有機酸における K-9との比較(点数)

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

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



	イソブチルアルコール	n-プロパノール	イソアミルアルコール	酢酸イソアミル	酢酸エチル	カプロン酸エチル
KET002	-5	1	-2	-5	-1	2
ハ-4	-3	1	-1	1	2	-2
K-9	0	0	0	0	0	0

香気成分名

図25　選抜酵母試験清酒の各香気成分におけるK-9との比較(点数)

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

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　発酵食品製造学研究室
担当者職名：教授　岡本啓湖

1．研究の目的

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

せることで市場に受け入れられる香り米添加本格米焼酎の製造方法を検索した。

２．研究内容

【方法】

1）81.82%（総仕込水／総米）醪の製造方法

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

2）160%（総仕込水／総米）醪の製造工程

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

3）蒸留方法

常圧蒸留法

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

常圧蒸気蒸留方法

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

減圧蒸留方法

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

機器製作所）でアルコール 25%に調整した。

4）醪の清酒協会酵母 901 の生菌数測定

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

5）生成エチルアルコール濃度算出

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

6）焼酎の GC による低沸点香気成分測定方法

（独）酒類総合研究所作成方法の改良法より測定した。

7）各焼酎の官能検査方法

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

【結果及び考察】

81.82%（総仕込水／総米）醪の清酒協会酵母 901 号の生菌数比較

81.82%（総仕込水／総米）醪の発酵日数に伴う清酒協会酵母 901 の生菌数動態に於いて、全醪共に発酵 3 日で最大値（2.77±0.77×108cfu/ml）を近似値＊で示し、二次仕込み、三次仕込みにより一旦減少し、発酵 10 日で最小値 （4.61±0.65×105cfu/ml）を示した。しかし

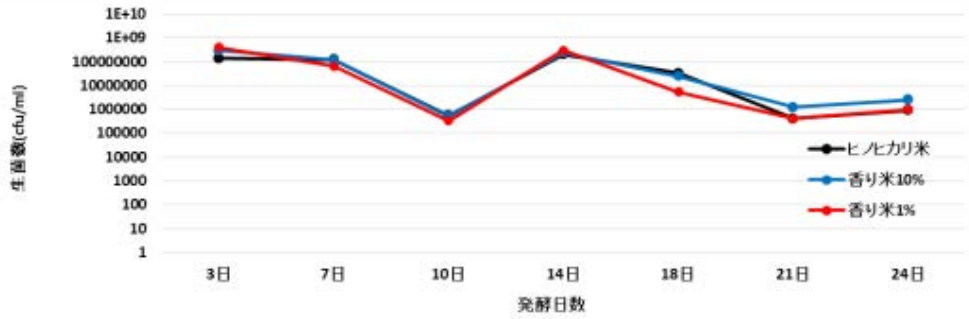


図 26 各醪の発酵日数に伴う清酒協会酵母901の生菌数動態

発酵 14 日 （2.43±0.26×108cfu/ml） には発酵 3 日の 87.7%まで回復し、その後は発酵日数に伴い再度減少し、発酵 21 日（0.68±0.28×106cfu/ml）、発酵 24 日（1.46±0.50×106cfu/ml）

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

81.82%（総仕込水／総米）醪のエチルアルコール生成能比較

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

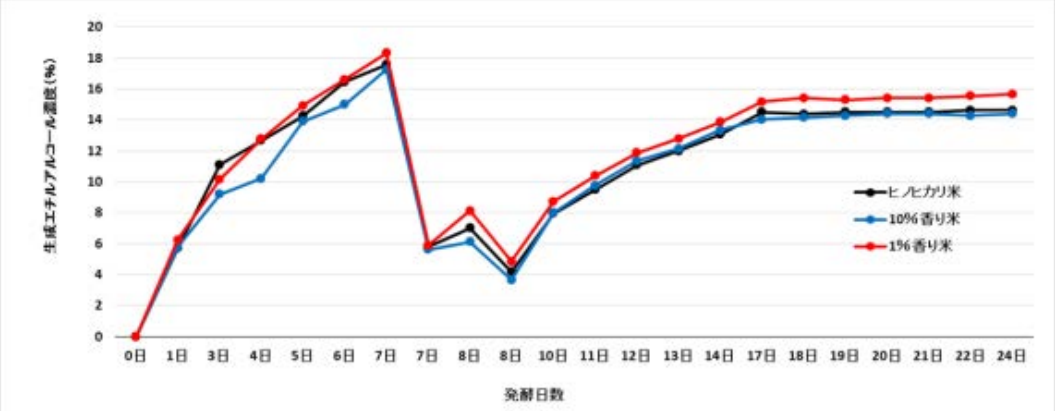


図 27 各醪の発酵日数に伴う生成エチルアルコール濃度動態

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

＊＊近似値：標準誤差／平均 ＜0.05

160 %（総仕込水／総米）醪のエチルアルコール生成能比較

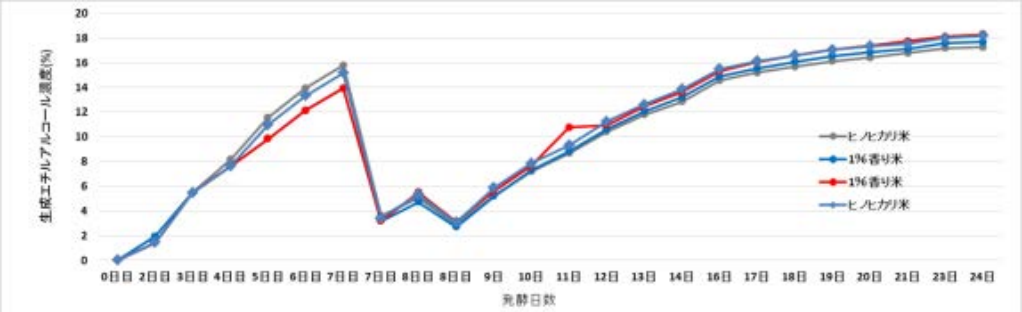


図 28 各醪の発酵日数に伴う生成エチルアルコール濃度動態

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

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

160 %（総仕込水／総米）醪のエチルアルコール生成能比較

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

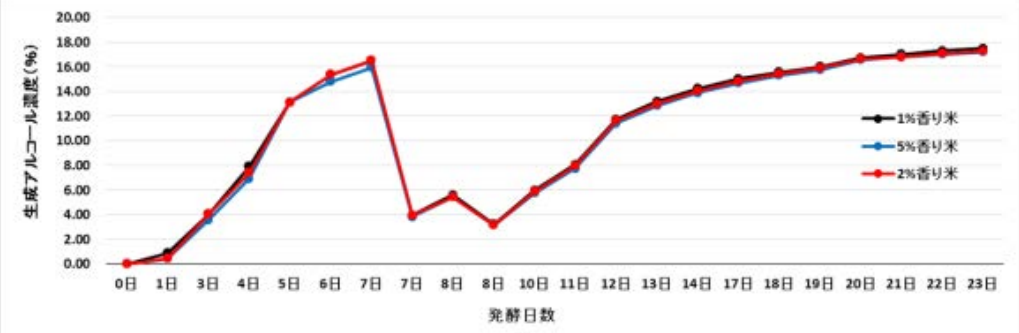


図 29 各醪の発酵日数に伴う生成エチルアルコール濃度動態

81.82%（総仕込水／総米）醪より常圧蒸留で得られた各焼酎の特性比較

官能検査比較

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

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

低沸点香気成分濃度パターン比較

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

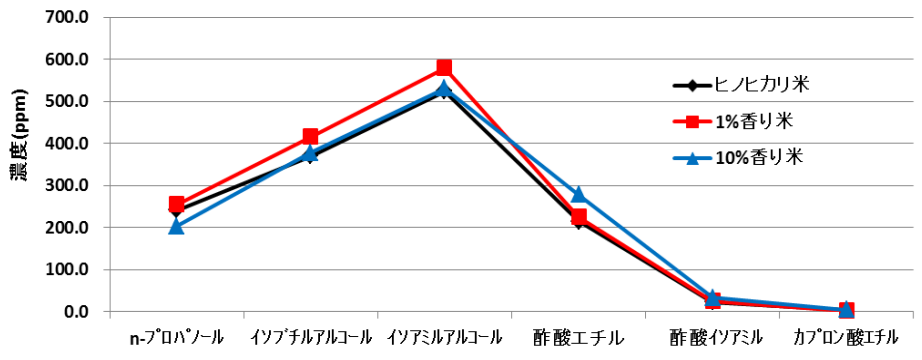


図 30 各焼酎の低沸点香気成分濃度パターン

には反映されないことが明らかになった。

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

官能検査比較

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

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

低沸点香気成分濃度パターン比較

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

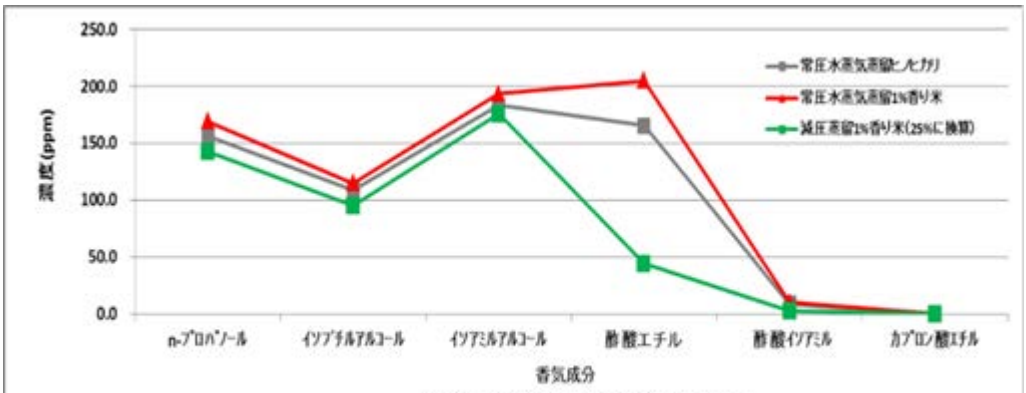


図 31 各焼酎の低沸点香気成分濃度パターン

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

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

官能検査比較

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

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

低沸点香気成分濃度パターン比較

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

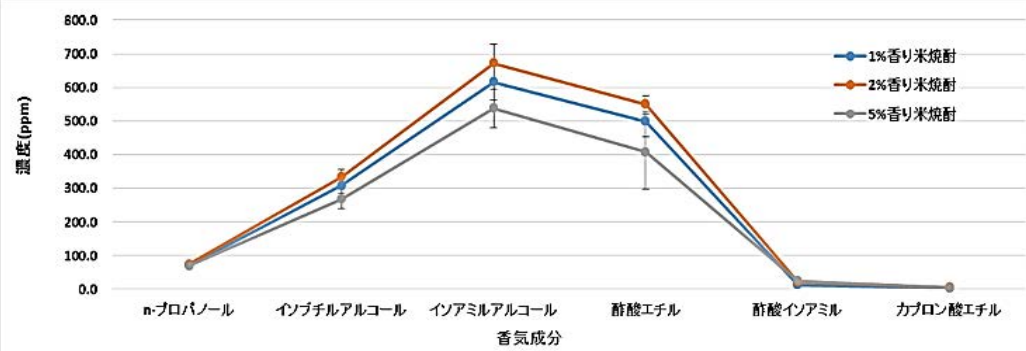


図 32 各焼酎の低沸点香気成分濃度パターン

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

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

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

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

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　発酵食品製造学研究室
担当者職名：教授　岡本啓湖
研究協力者：陶山明子
実験補助：佐藤茉莉香

１．研究の目的

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

２．研究の内容

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

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

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

【今後の計画】

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

４．研究成果

a）原著論文

１．岡本 啓湖、高橋 義樹、都甲 花織、棚田特産香り米を使用した新焼酎開発に於けるヒノヒカリ米との特性比較、2017、別府大学大学院紀要　第 19 号 79-91

２．岡本啓湖、平井龍一、日野美香、浅田貴美子、藤原秀彦、カボス（*Citrus sphaerocarpa*）花から高確率で *Saccharomyces cerevisiae* を獲得するための最適分離初期条件、2016、別府大学大学院紀要 第 18 号 47-55

３．Hidehiko Fujihara, Mika Hino, Kimiko Asada, Hideharu Takashita, Yasuhiro Kajiwara, Toshimasa Nakamura, Keiko Okamoto and Kensuke Furukawa. 2014, Efficient Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains from Environmental Isolates that are suitable for brewing. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **78**:1086-1089.

ｃ）招待講演、シンポジウム

１．大分県酒造組合での講演

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

（2）小野浩輝、難波桃子、岡本啓湖「大分県酒造組合選抜酵母（ハ-4、KET002）の小仕込

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

２．藤居酒造（株）での講演

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

３．平成 29 年度おおいた食品産業企業会　ミニ展示会での講演

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

1）別大・食栄・発酵食品　2）藤居酒造（株）　3）ロイドレジスタージャパン（株）

食品安全ハザードの防除を実現する本格焼酎「夢香米」製造における HACCP 導入

４．2017 年度　後期「国際文化論」（公開講座）にて講演

「別府大学六次産業により生まれた本格焼酎「夢香米」の誕生と今後の展望」

（平成 29 年 11 月 28 日）

５．天瀬まちづくり大学」受講生の別府大学訪問での講演

「別府大学六次産業により生まれた本格焼酎「夢香米」の誕生と今後の展望」

（平成 29 年 12 月 4 日）

e）国内学会

１．2018 年　日本農芸化学会 2018 年度大会　１件

２．2017 年　第 24 回　日本生物工学会九州支部沖縄大会　１件

３．2017 年　第 113 回　日本食品衛生学会学術講演会　１件

４．2016 年　第 23 回　日本生物工学会九州支部飯塚大会　１件

５．2015 年　第 22 回　日本生物工学会九州支部宮崎大会　１件

g）その他（学会賞、報道など）

１）学生の卒業研究成果に基づく別府大学六次産業による本格焼夢香米（ゆめ）の商品化

平成 28 年 4 月　2016 年バージョン本格焼酎夢香米の大分香りの博物館での販売

平成 29 年 9 月　大分県・別府大学・藤居酒造（株）の官学民からなる夢米棚田プロジェクト六次産業推進組織の設立

平成 30 年 2 月　2017 年バージョン本格焼酎夢香米の大分香りの博物館及び別府市内の酒販店での販売

２）報道関連

(1) 平成 28 年 2 月 17 日　農業共済新聞《地域農業に役立つ研究　別府大学「夢米棚田プロジェクト」　~香り米で焼酎　念願の商品化~　高橋義樹さん・食物栄養科学部発酵食品学科４年》に掲載

(2) 平成 28 年 2 月 21 日　（朝刊）朝日新聞「先輩の研究継ぎ別大生が焼酎」「香り米栽培、ブレンド」「５月販売へ熟成中」掲載

(3) 平成 28 年 4 月 12 日　TOS テレビ大分（4:50～7:00 TOS ゆ～わくワイド）出演

ゆ～ナビ別府大学（特集 180 秒）サブタイトル【別府大学ブランド焼酎「夢香米」】

(4) 平成 28 年 4 月 13 日　（朝刊）読売新聞「別府大学生が焼酎を開発」「香り米ブレンド 先輩から研究受け継ぐ」掲載

(5) 平成 28 年 4 月 22 日　（夕刊）今日新聞「大分香りの博物館で別府大学ブランド焼酎 販売　２年の試行錯誤で完成　引き継がれた想いが「夢香米」に」に掲載

(6) 平成 28 年 5 月 18 日　TOS テレビ大分（4:50～7:00 TOS ゆ～わくワイド）6 時代ニュースに出演　別府大学ブランド焼酎「夢香米」

(7) 平成 28 年 5 月 20 日　ケーブルテレビ（6:00 わくわくトンボテレビ）出演 【別府大学ブランド焼酎「夢香米」】

(8) 平成 28 年 5 月 24 日　シティー情報おおいた　2016 年 6 月号　編集部の最近コレ気にナッテマス　に「大学生もスゴイぞっ！　別府大学　分析と研究の集大成」掲載

(9) 平成 28 年 7 月 14 日　（朝刊）合同新聞「香り米焼酎完成　爽やかな甘さに　別大生らが報告」に掲載

(10) 平成 28 年 7 月 5 日　（夕刊）今日新聞「市長に夢香米完成を報告　4 月から別府大学オリジナル焼酎販売」に掲載

(11) 平成 28 年 10 月 6 日　（夕刊）今日新聞「衛生管理法の実践者を育成　品質保証のポイント学ぶ　別府大学で第 1 回目の講習会」に掲載

(12) 平成 28 年 10 月 19 日　（夕刊）今日新聞「香り米焼酎の試飲会　先輩らの意志継ぎ学生２人が醸造」で掲載

(13) タイトル「宇佐市特産黒大豆を用いた「クロダマルパン」商品化に着手（第一回報告）」で別府大学 HP トピックスに掲載　2017.10.18

(14) タイトル「別府大学六次産業で生まれた本格焼酎「夢香米」に HACCP 導入」で別府大学 HP トピックスに掲載　2017.10.24

(15) タイトル 「本格焼酎「夢香米」製造における HACCP 導入 で発表しました。」で別府大学 HP トピックスに掲載　2017 年 11 月 22 日

(16) タイトル「引き立つ“夢”の香り　学生が代々続ける米焼酎製造　別府」で合同新聞（朝刊）11 ページに掲載　平成 30 年 2 月 7 日
http://www.oita-press.co.jp/1010000000/2018/02/07/JD0056595371

(17) タイトル「香り強い米使用　焼酎に第２弾　別府大 」で日本経済新聞に掲載
九州・沖縄 2018/2/5 21:43
https://www.nikkei.com/article/DGXMZO26549150V00C18A2LX0000/

(18) タイトル「先輩引き継ぎ焼酎第２弾」別府大青、地震乗り越え開発」で読売新聞に掲載九州・沖縄 2018/2/21

(19) タイトル「食品衛生国際基準「HACCP」普及担い手育成加速へ」で合同新聞（朝刊）11 ページに掲載　平成 30 年 3 月 7 日

私立大学戦略的研究形成支援事業
「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」
（平成 27 年度～平成 29 年度）
研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：発酵食品製造における汚染微生物検出法の確立
プロジェクトでの役割：微生物汚染の早期発見と防除

研究タイトル：①発酵・醸造食品の製造に最適の酵母等微生物の分離
研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　環境微生物学研究室
担当者職名：准教授　藤原秀彦

1．研究の目的

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

２．研究内容

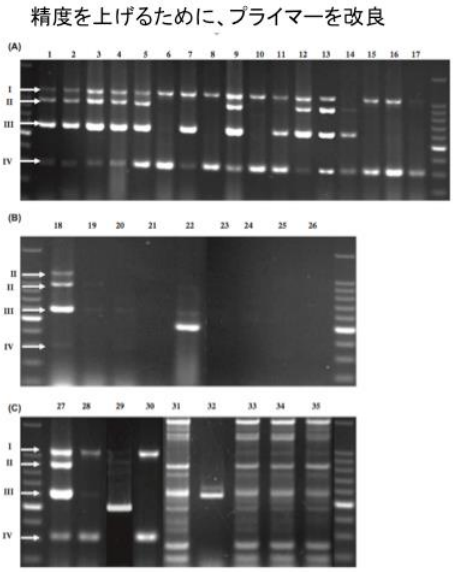
【酵母の簡易 2 次スクリーニング法の確立】

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

＜方法＞ 本学所有の *S. cerevisiae* のほか各属酵母および環境分離株の計 97 株を試験した。また、醸造用酵母 *S. cerevisiae* に多く見られる遺伝子として、高泡形成に関与する *AWA1*、ビオチン生合成に関与する *BIO6*、亜硫酸耐性に関与する *SSU1*、沈降に関与する *FLO1* の 4 つの遺伝子に着目した。各遺伝子群のプライマーを作成し、① PCR による確認、②ドットブロット法による確認を行なった。また、同じ反応系に複数のプライマーペアを用い

ることができる③ MultiPlex-PCR 法による検討も行なった。

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



Genus/ Species	strain	lane number
S. cerevisiae	K7	1, 18, 27
S. cerevisiae	K701	2
S. cerevisiae	K9	3
S. cerevisiae	K901	4
S. cerevisiae	Kagoshima	5
S. cerevisiae	IFO0234	6
S. cerevisiae	IFO0282	7
S. cerevisiae	IFO1046	8
S. cerevisiae	IFO1661	9
S. cerevisiae	IFO2018	10
S. cerevisiae	IFO2114	11
S. cerevisiae	IFO2347	12
S. cerevisiae	IFO2373	13
S. cerevisiae	IFO2376	14
S. cerevisiae	EC1118	15
S. cerevisiae	L2323	16
S. cerevisiae	CY3079	17
Zygosaccharyomyces rouxii	NBRC1130	19
Pichia farinose	NBRC1163	20
Candida albicans	NBRC1385	21
Lachancea kluyveri	NBRC1685	22
Kluyveromyces marxianus	IFO0219	23
Kluyveromyces marxianus	IFO0482	24
Torulaspora delbrueckii	IFO0955	25
Kluyveromyces lactis	IFO1090	26
unknown	Y1377	28
unknown	Y1379	29
unknown	Y1389	30
unknown	Y1720	31
unknown	Y1724	32
unknown	Y1725	33
unknown	Y1726	34
unknown	Y1727	35

【乳酸菌の分離】

乳酸菌は、酵母と同様に発酵食品製造には欠かすことのできない微生物であり、ヨーグルトや漬物、乳酸菌飲料等様々な用途に用いられている。本研究では、某スーパーで市販されている豆乳ヨーグルトの種液から、豆乳ヨーグルトを作成するのに最適な乳酸菌を分離し、より風味の良い豆乳ヨーグルトを市販することを目的とした。

＜方法と結果＞

某スーパーの豆乳ヨーグルト種液は、福岡県宗像市の玄米浸漬液を用いたものであった。まず本研究では、本玄米浸漬液から乳酸菌を分離することを試みた。MRS 寒天培地 (0.1％ $CaCO_3$ 含有) に、適宜希釈した玄米浸漬液を塗布し、37 ℃ でアネロパック嫌気を用いて嫌気状態で静置培養した。数日培養し、コロニーの周りにクリアゾーンを形成したものを乳酸菌として、コロニーの大きさや表面の様子等で 3 株を分離し、M1、M2、M3 株とした。これら 3 株のゲノム DNA を定法に則り抽出し、ユニバーサルプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を PCR にて増幅した。その結果、M1 株と M2 株では DNA が増幅されたが、M3 株では増幅されなかった。これは、数種類の DNA ポリメラーゼを PCR に用いても同様であったため、M3 株は真性細菌ではない可能性が強く示唆された。よって、この後

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

発芽玄米浸漬水中から分離された乳酸菌を用いた豆乳ヨーグルトの作成

藤原秀彦 [1)]、牧井忠 [2)]、米元俊一 [1)]

(1) 別府大学食物栄養科学部発酵食品学科　(2) ㈲マキイ

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

Hidehiko Fujihara, Tadashi Makii and Toshikazu Yonemoto

要旨

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

キーワード

豆乳ヨーグルト、乳酸菌、DNA シーケンス

【はじめに】

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

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

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

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

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

【材料と方法】

1．豆乳ヨーグルト

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

2．菌株の分離

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

表 1 MRS 寒天培地組成 (g/L, pH6.2))

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

3．DNA 抽出

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

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

4. PCR とクローニング、DNA シーケンス

菌株の同定を行うために、16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅した。用いたプライマーの配列を表 2 に示す。PCR 反応は Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) を用いて製造者の推奨する方法で行なった。PCR 反応後電気泳動にて増幅を確認し、MagExtractor ™ -PCR & Gel Clean up- (TOYOBO) を用いて DNA を精製した。生成した DNA 断片を北海道システム・サイエンス株式会社 (http://www.hssnet.co.jp) に依頼し塩基配列を決定した。

表 2 用いたプライマー

名前	配列	Tm値 (℃)
27F	5'-AGAGTTTGATCACTGGCTCAG-3'	
907R	5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'	

5. BLAST 検索

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

【結果と考察】

1. 乳酸菌の分離と DNA 増幅

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

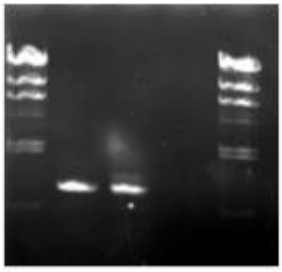


図1 16S rRNA 遺伝子の増幅 Lane1, 5: λ/*Hin*dIII マーカー、Lane2: M1 株、Lane3: M2 株、Lane4: M3 株のゲノム DNA を増幅したもの

2. 乳酸菌の同定

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

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

3. 豆乳ヨーグルト作成

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

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

【終わりに】

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

図2 市販されている豆乳ヨーグルト

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

【酵母の簡易 2 次スクリーニング法の確立】

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

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

【乳酸菌の分離】

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

研究タイトル：②高次発酵・醸造技術の確立（微生物汚染の研究も含む）

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　環境微生物学研究室

担当者職名：准教授　藤原秀彦

1．研究の目的

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

２．研究内容

【PCR-DGGE 法による菌叢解析】

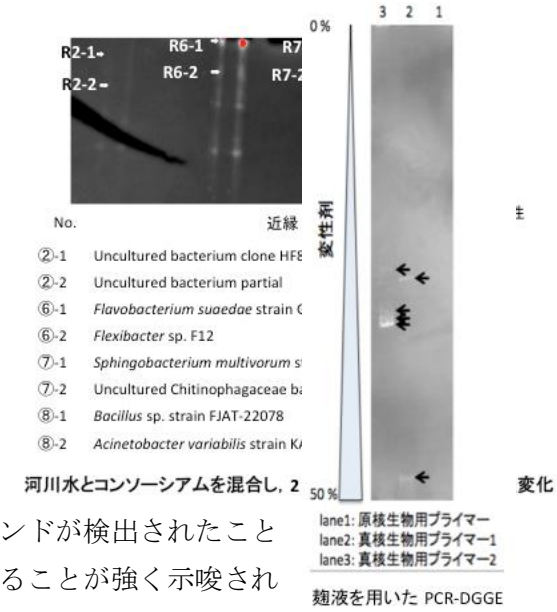
DGGE 法とは、変性剤濃度勾配ゲル (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) のことで、変性剤（尿素やホルムアミド）の濃度勾配をつけたゲルを用いた電気泳動法である。このゲルに、GC クランプと呼ばれる GC に富んだ配列を付与したプライマーを用いて PCR した DNA 断片を供し電気泳動すると、GC クランプ領域以外の DNA が変性すると泳動が止まる。すなわち、PCR 産物の GC 含量の差異によって泳動度が変化することを利用した手法が PCR-DGGE 法である。この PCR のターゲットに 16S rRNA 遺伝子を用いると、系中のバクテリア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

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

＜方法と結果＞

【PCR-DGGE】

Aspergillus oryzae と市販のヒノヒカリを用いて、米麹を定法に則り作成した。作成した米麹と水を 1:1 で混合し、蓋をし、室温で 5 日間放置した。その後に、キットを用いて全 DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子増幅用ユニバーサルプライマーと、真核生物用プライマーを用いて PCR 反応を行なった。反応産物を DGGE に供したところ、右図のように原核生物ではバンドが検出されず、真核生物用プライマーでのみバンドが検出された。この麹液中には *A. oryzae* しか存在しないはずであるが、複数種の DNA バンドが検出されたことから、この麹液中に未知の真核生物が混入していることが強く示唆された。今回は同定にまでは至らなかったが、添加した微生物が明らかな系においては本法によって微生物混入をある程度検出できることが明らかとなった。しかしながら、ゲル板の作成やサンプル調製には一定の熟練度が必要である。そこで、大学 4 年生でも簡単に実験が行えるように、作業をマニュアル化した。今回用いたサンプルは、別府市内の河川水と、本学科が所有している海棲生物由来微生物コンソーシアム （以下、コンソーシアム）である。なお、本コンソーシアムには *Bacillus* 属細菌を優先とする 66 種類の微生物が存在することがすでに明らかとなっている。河川水とコンソーシアムを混合し、37 ℃で 8 日培養し定期的に DNA を回収し、PCR-DGGE 法に供した。その結果、右図に示すようにスメアではあるものの、DNA バンドが検出された。これらのうち 8 つのバンドについて DNA を回収し、シーケンス解析を行い、BLAST による相同性検索を行ったところ図に示すような菌株と相同性を示した。前述のように、本コンソーシアムは *Bacillus* を優占種とするが実際に *Bacillus* は 1 種のみしか検出されなかった。また、相同性も 87 %～96 %と低く、未知の菌株が多く検出された。これは、本コンソーシアム添加により、河川水中に存在する未知の微生物が活性化したものと考えらえる。このように、今回作成したマニュアルを用いれば、ほとんど作業経験がない学生でも容易に PCR-DGGE 法を用い菌叢解析ができることが明らかとなった。今後、さらに改良を重ねて、学生でも扱いやすいマニュアルの策定を行なっていく予定である。



【PFGE-RFLP】

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

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

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

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

４．研究成果

a)**原著論文**

１．Kimura N, Yamazoe A, Hosoyama A, Hirose J, Watanabe T, Suenaga H, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of *Pseudomonas abietaniphila* KF717 (NBRC 110669), Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil in Japan., Genome Announc. 2015 Mar 19;3(2). pii: e00059-15. doi: 10.1128/genomeA.00059-15.

２．Suenaga H, Yamazoe A, Hosoyama A, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of the Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium *Pseudomonas putida* KF703 (NBRC 110666) Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., Genome Announc. 2015 Mar 19;3(2). pii: e00142-15. doi: 10.1128/genomeA.00142-15.

３．Suenaga H, Yamazoe A, Hosoyama A, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Fujihara H, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of the Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium *Cupriavidus basilensis* KF708 (NBRC 110671) Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., Genome Announc. 2015 Mar 19;3(2). pii: e00143-15. doi: 10.1128/genomeA.00143-15.

４．Watanabe T, Yamazoe A, Hosoyama A, Fujihara H, Suenaga H, Hirose J, Futagami T, Goto M, Kimura N, Furukawa K., Draft Genome Sequence of *Cupriavidus pauculus* strain KF709, a Biphenyl-Utilizing Bacterium Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., Genome Announc. 2015 Mar 26;3(2). pii: e00222-15. doi: 10.1128/genomeA.00222-15.

５．Watanabe T, Yamazoe A, Hosoyama A, Fujihara H, Suenaga H, Hirose J, Futagami T, Goto M, Kimura N, Furukawa K., Draft Genome Sequence of *Pseudomonas toyotomiensis* KF710, a Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., Genome Announc. 2015 Apr 2;3(2). pii: e00223-15. doi: 10.1128/genomeA.00223-15.

６．Fujihara H, Yamazoe A, Hosoyama A, Suenaga H, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Futagami T, Goto M, Furukawa K., Draft Genome Sequence of *Pseudomonas abietaniphila* KF701 (NBRC110664), a Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil., Genome Announc. 2015 May 14;3(3). pii: e00473-15. doi: 10.1128/genomeA.00473-15.

７．Fujihara H, Yamazoe A, Hosoyama A, Suenaga H, Kimura N, Hirose J, Watanabe T, Futagami T,

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

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

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

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

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

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

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

b) 総説

なし

c) 招待講演、シンポジウム

なし

d) 国際学会

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

e) 国内学会

１．渡邊崇人、藤原秀彦、廣瀬遵、末永光、木村信忠、木質バイオマスからの有用物質生産に向けた環境汚染物質分解菌が持つ芳香族化合物分解代謝系の利用、第 275 回生存圏シンポジウム 生存圏ミッションシンポジウム、2015、京都

２．廣瀬 遵、平井 晋哉、横井 春比古、木村 信忠、末永 光、渡邊 崇人、山副 敦司、藤原 秀彦、古川 謙介、*Pseudomonas stutzeri* KF716 のビフェニル・サリチル酸 分解系をコードする可動性遺伝因子の解析、日本農芸化学会大会、2015、岡山

３．藤原 秀彦、小石 早希、安部 周斗、山副 敦司、細山 哲、下平 潤、木村 信忠、末永 光、廣瀬 遵、渡邊 崇人、二神 泰基、後藤 正利、古川 謙介、ビフェニル分解菌の分解遺伝子群の欠失と再編成、日本生物工学会大会、2015

４. 廣瀬 遵、藤元 勇樹、原田 幸音、菅本 和寛、横井 春比古、松本 朋子、末永 光、藤原 秀彦、古川 謙介、キメラ型ビフェニルジオキシゲナーゼによるフラボンの変換、日本生物工学会大会、2015

５．廣瀬 遵、米村 凌、横井春比古、山副敦司、細山 哲、末永 光、木村信忠、渡邊崇人、二神泰基、後藤正利、藤原秀彦、古川謙介、*Pseudomonas putida* KF703 のビフェニル、サリチル酸および安息香酸分解経路をコードするゲノミックアイランドの解析、環境バイオテクノロジー学会大会、2015、東京

６．木村信忠、山副敦司、細山 哲、廣瀬 遵、渡邊崇人、末永 光、藤原秀彦、二神泰基、後藤正利、古川謙介、ビフェニル／PCB 分解菌 *Pseudomonas balearica* KF707 株の完全長ゲノムシーケンス解析、環境バイオテクノロジー学会大会、2015、東京

７. ビフェニル分解菌の分解遺伝子群の欠失と再編成現象、藤原秀彦、小石早希、安部周斗、山副敦司、細山 哲、下平 潤、木村信忠、末永 光、廣瀬 遵、渡邊崇人、二神泰基、後藤正利、古川謙介、日本生物工学会大会、2015、鹿児島

８．末永 光、藤原秀彦、山副敦司、細山 哲、下平 潤、木村信忠、廣瀬 遵、渡邊崇人、二神泰基、後藤正利、古川謙介、ビフェニル/PCB 分解能力を高頻度に転移・欠失する *Pseudomonas putida* KF715 株のゲノム再編成現象、日本農芸化学会大会、2016、北海道

９. 廣瀬 遵、寺野貴洋、横井春比古、末永 光、木村信忠、渡邊崇人、二神泰基、後藤正利、藤原秀彦、古川 謙介、*Pseudomonas aeruginosa* KF702 のビフェニル・サリチル酸・安息香酸分解経路をコードするゲノミックアイランドの再編成、日本農芸化学会大会、2016、北海道

１０．渡邊崇人、藤原秀彦、廣瀬 遵、末永 光、木村信忠、リグニン由来化合物の生産のための環境汚染物質分解菌の利用、第 307 回生存圏シンポジウム「生存圏ミッションシンポジウム」、2016、京都

１１．渡邊崇人、藤原秀彦、末永光、木村信忠、廣瀬 遵、二神泰基、後藤正利、古川謙介、ビフェニル/PCB 分解細菌のリグニン由来芳香族化合物代謝酵素の探索と同定、日本生物工

学会大会、2016、富山

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

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

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

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

f) 特許

なし

g) その他（学会賞、報道など）

なし

私立大学戦略的研究形成支援事業
「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」
（平成 27 年度～平成 29 年度）
研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：機能性タンパク質の同定および機能解析
プロジェクトでの役割：食品中の機能性タンパク質の解析

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

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　生化学研究室
担当者職名：准教授　林　毅（平成 27～28 年度）

1．研究の目的

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

２．研究内容

【材料および方法】

１）使用菌株

Zymomonas mobilis ZM6

２）*Zm. mobilis* が産生する菌体内タンパク質の抽出

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

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

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

３）2 次元電気泳動

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

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

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

４）PVDF 膜へのタンパク質の転写

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

５）プロテインシーケンサーによるアミノ酸配列の解析

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

【実験結果】

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

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

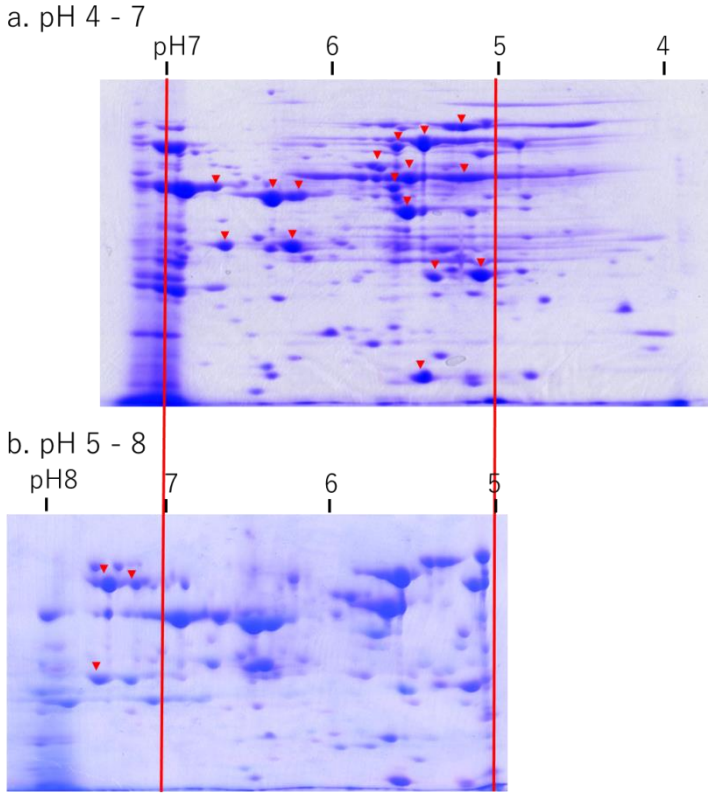


図1　*Zm. mobilis* 菌体内タンパク質の2次元電気泳動
a.　1次元電気泳動条件：pH4-7
b.　1次元電気泳動条件：pH5-8
矢印は高発現タンパク質を示す

２）プロテインシーケンサーによるタンパク質の同定

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

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

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

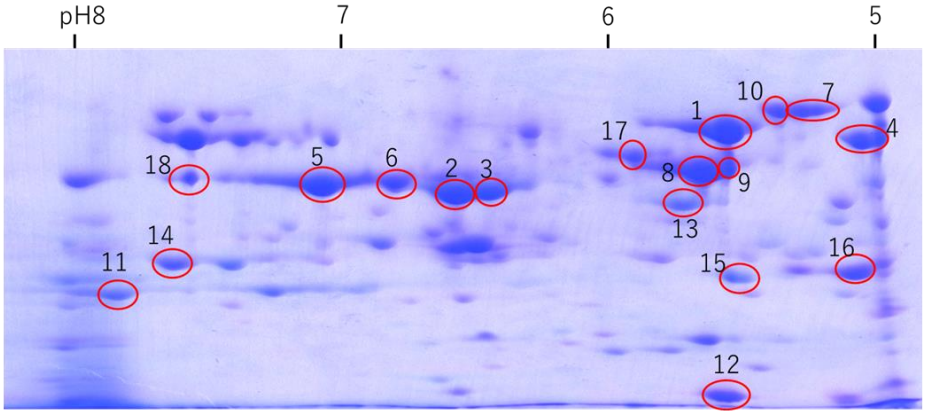


図2 *Zm. mobilis* 菌体内タンパク質の2次元電気泳動結果
赤丸はプロテインシーケンサーで分析したスポット。

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

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

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

３．研究成果の副次的効果

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

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

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　生化学研究室
担当者職名：准教授　林　毅（平成 27～28 年度）、准教授　陶山　明子（平成 29 年度）
研究協力者：准教授　藤原　秀彦

1．研究の目的

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

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

２．研究内容

【材料および方法】

１）麦麹

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

２）SDS-PAGE による麦麹中のタンパク質の解析

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

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

サンプルの前処理として 5 通りの方法を試した。

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

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

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

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

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

３）米麹

酒造用米麹（黄麹菌使用）と米麹（W-20：白麹菌仕様）を使用した。

４）味噌

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

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

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

５）味噌からの水溶性タンパク質抽出

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

６）2 次元電気泳動

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

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

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

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

【結果および考察】

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

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

２）2 次元電気泳動による麦麹中のタンパク質の解析

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

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

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

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

３）米麹の２次元電気泳動

前処理法（4）　１次元目の等電点電気泳動に供することのできる最大サンプル量は 125 µl である。粉砕した麹 250 mg に対して膨潤/サンプルバッファーを 125 µl 添加したところ、溶液の粘性が高くなりゲル状となったため 1 次元目の等電点電気泳動に供することができなかった。そこで粉砕した麹 250 mg に対して膨潤/サンプルバッファーを 1 ml 添加して溶解させ 2 次元電気泳動を行った。しかし、スメア状の濃いスポットと、5 つ前後の薄いスポットしか検出できなかった。スメア状の濃いスポットは高含量のタンパク質の存在を示しており、米の主要な貯蔵タンパク質であるグルテリン（オリザニン）ではないかと推測した。それ以外のタンパク質量は少なかったため 5 つ前後の薄いスポットしか検出できなかったと考察した。

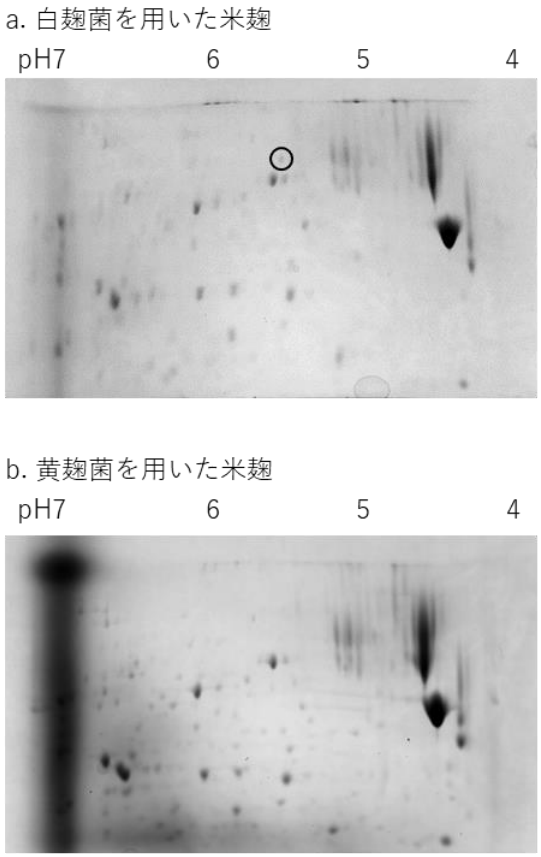


図1　米麹の水溶性タンパク質の2次元電気泳動解析

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

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

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

４）味噌の 2 次元電気泳動

味噌の製造には黄麹菌（*A. oryzae*）を用いた黄米麹と黄麦麹が用いられる。焼酎製造に用いられる麹菌はクエン酸を高生産することが特徴であり、産生した多量のクエン酸により 焼酎麹の pH は低く（pH 約 3）なっている。また焼酎麹菌は黄麹菌よりも多量に植物細胞壁溶解酵素を産生する特徴がある。今回、黄米麹、黄麦麹をそれぞれ白米麹、白麦麹に置き換えてどのような違いが現れるかを、水溶性タンパク質の 2 次元電気泳動により検討した。

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

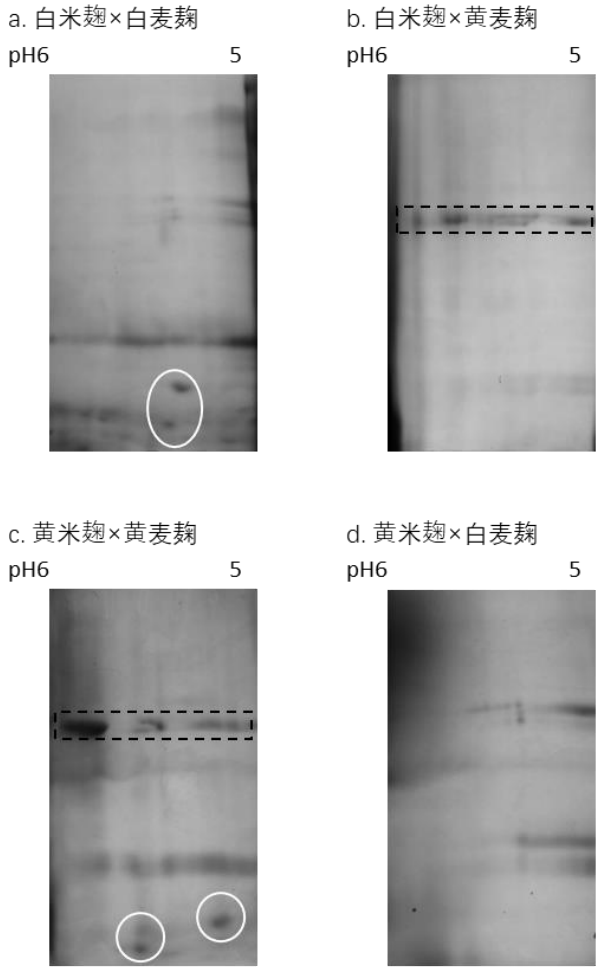


図２　味噌の水溶性タンパク質の2次元電気泳動解析

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

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

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

【終わりに】

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

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

【研究成果の副次的効果】

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

【今後の展望】

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

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

研究タイトル：①吟醸香の高い大分酵母の育種

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　生化学研究室
担当者職名：准教授　陶山　明子
研究協力者：教授　米元　俊一、教授　岡本　啓胡

1．研究の目的

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

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

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

２．研究内容

【実験方法】

１）供試菌株

大分県産酵母 KET002 株およびハ-4 株を使用した。

２）培地

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

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

３）セルレニン耐性酵母の取得

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

４）一段仕込み

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

５）ガスクロマトグラフィー

エタノール濃度の分析条件を以下に示す。

装置：GC-2014（株式会社島津製作所）、検出器：FDA 検出器、分離管：Φ3.0 mm ×2 m、固定相：Porapak Q50/80、検出器温度：250℃、試料導入部温度：210℃、分離管温度：155℃、キャリアーガス：窒素、99.999%、流速：40 ml/min、分析試料量：2 μl

香気成分の分析条件を以下に示す。

[ガスクロマトグラフィー]

装置 : GC-2014（株式会社島津製作所）、カラム : DB-WAX（Φ0.32 mm×30 m、膜圧 0.25 μm）、カラム温度 : 75℃、FID 温度 : 250℃、キャリアーガス : N_2、キャリアーガス流速 : 1.0ml/min、スプリット比 : 10、ヘッドスペースガス量 : 1 ml、平衡時間 : 3 min、注入モード : スプリット、サンプリング時間 : 1.00 min、制御モード : 圧力、圧力 : 38.2 kPa、全流量 : 1.0 ml/min、カラム流量 : 1.00 ml/min、線速度 : 20.2 cm/sec、パージ流量 : 0.0 ml/min

[ヘッドスペースサンプラー]

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

６）GC-MS-O

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

分析条件を以下に示す。

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

Olfactometry Temp : Transfer Temp : 250℃、Exit Temp : 150℃

【実験結果および考察】

１）セルレニン耐性酵母の取得

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

２）セルレニン耐性酵母の 1 段仕込み試験

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

表1　セルレニン耐性株のエタノール濃度

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

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

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

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

表2　セルレニン耐性株を用いた一段仕込み試験で生成した酒の香気成分濃度

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

次にハ-4 株由来のセルレニン耐性株について述べる。酢酸エチル濃度について

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

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

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

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

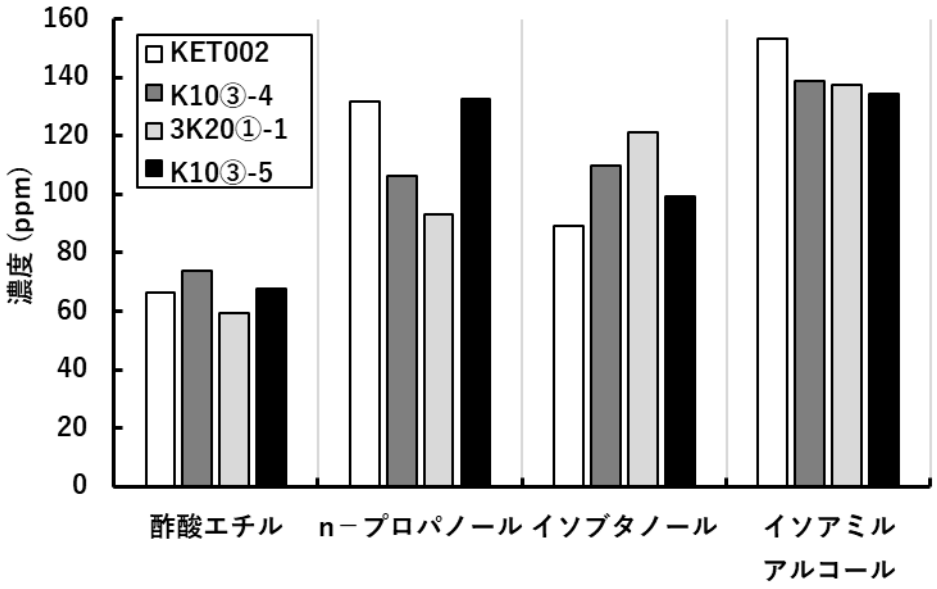


図1　セルレニン耐性株を使用した一段仕込みの低沸点香気成分分析

３）GC-MS-O による香気成分の分析

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

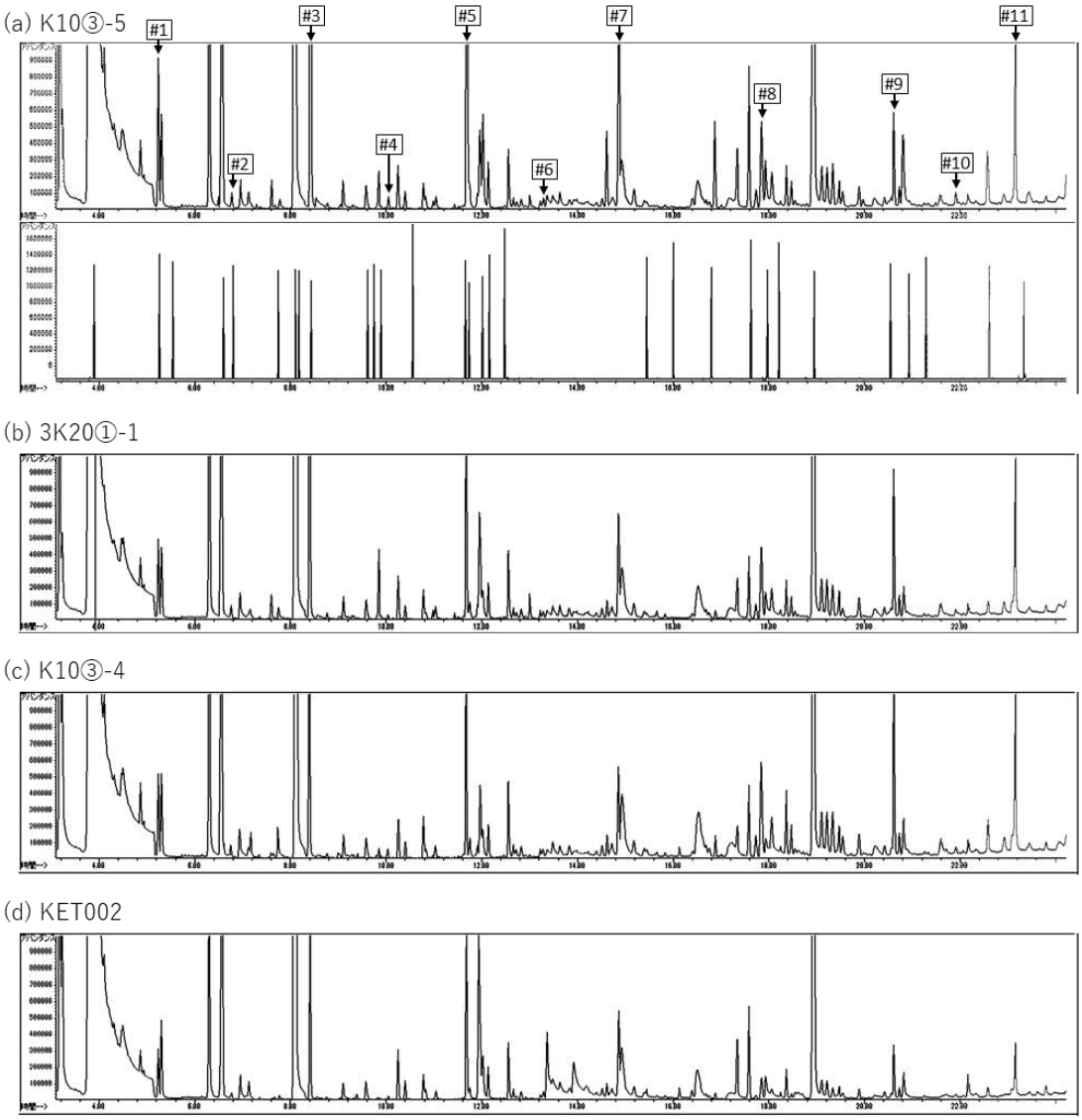


図2　GC-MS-O による香気成分分析
(a) 上段：GC スペクトル。脂肪酸エチルエステルを示すピークにナンバリングした。下段：評価者が香りを感じたピーク

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

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

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

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

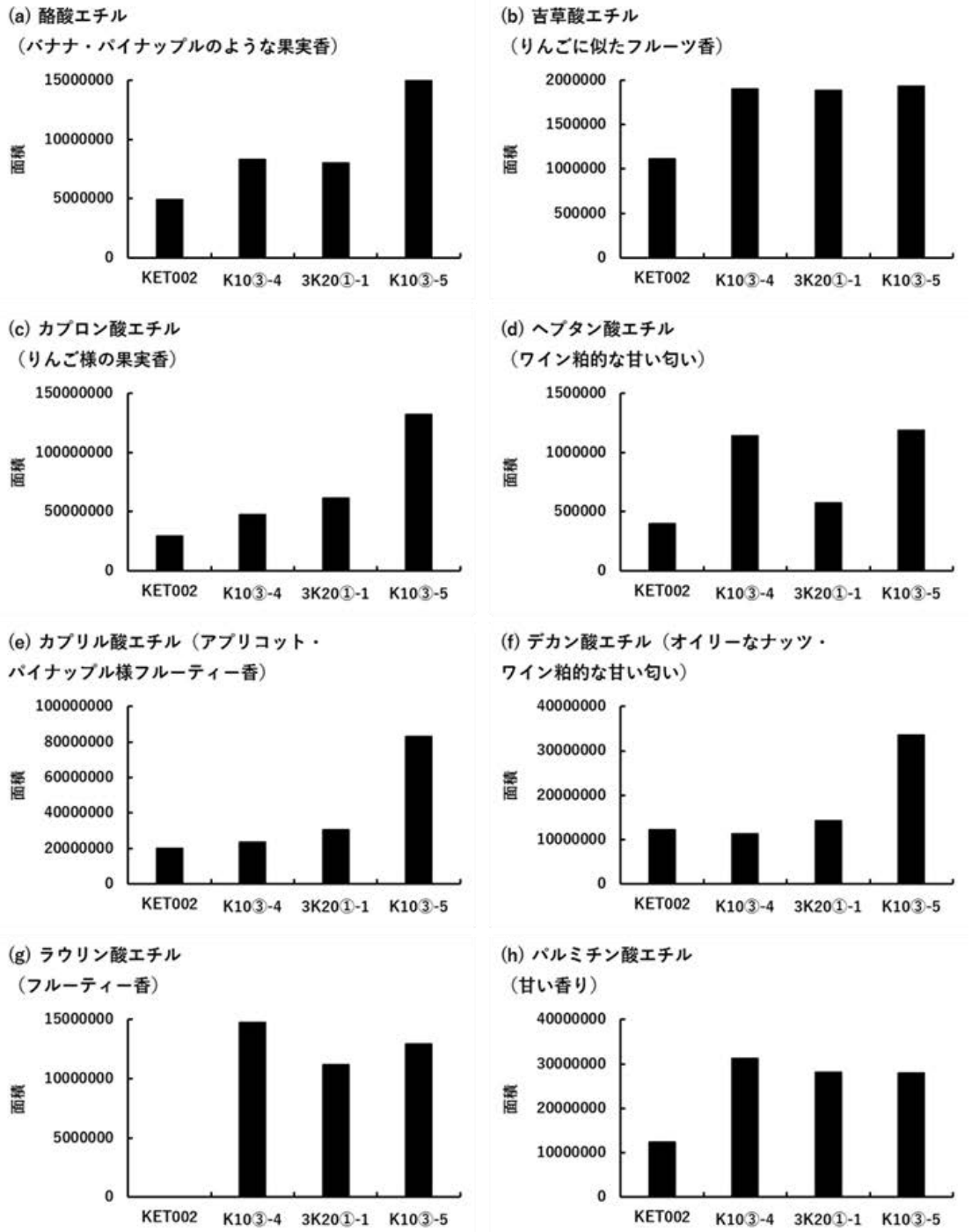


図 3　KET002 株とセルレニン耐性株を使用した一段仕込みの脂肪酸エチルエステルの比較
匂いかぎGC-MS-O分析で得られたピーク面積で比較した

カプロン酸エチル以外にもさまざまな鎖長の脂肪酸エチルエステル類が検出さ

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

これらの結果から、K10③-5 株が最も吟醸香が高いと評価した。

【まとめ】

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

３．研究成果の副次的効果、今後の計画など

【今後の計画】

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

４．研究成果

a）原著論文

１．陶山明子、岡　瑞貴、毎田裕美子、米元俊一、岡本啓湖、大分県酒造協同組合、吟醸香の高い清酒用大分酵母の育種、別府大学大学院紀要 No.20 （2018） 印刷中

２．陶山明子、衞藤美加、藤原秀彦、麹に含まれるタンパク質の網羅的解析-麹作成に用い

た麹菌間での比較-、別府大学紀要 No.59 （2018） 印刷中

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

b）総説

なし

ｃ）招待講演、シンポジウム

なし

ｄ）国際学会

なし

e）国内学会

１．2017 年　平成 29 年度第 2 回合同研究成果発表会 1 件

１．2016 年　日本農芸化学会 2016 年度大会　1 件

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

３．2015 年　第 67 回日本生物工学会（鹿児島）　1 件

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

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

f）特許

なし

g）その他（学会賞、報道など）

１．日本農芸化学会西日本支部奨励賞（2016 年）林　毅

私立大学戦略的研究形成支援事業
「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」
（平成 27 年度～平成 29 年度）
研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：新規加工・発酵醸造食品の機能性評価
プロジェクトでの役割：アンチエイジング効果、免疫力向上などの健康増進効果の評価

研究タイトル：①ヒトの培養細胞でのアンチエイジング効果の評価法

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　細胞生物学研究室
担当者職名：教授　大坪素秋

1．研究の目的

我が国において近年大きな社会問題となっている糖尿病やがんをはじめとする生活習慣病の増加には食生活の欧米化に伴う質的変化が大きくかかわっていることが以前から指摘されている。近い将来、超高齢化社会の到来により生活習慣病のさらなる増加が予想され、少子高齢化とそれに伴う医療費の負担増により国の財政赤字の悪化を加速させることが持続可能な社会にとっての大きな課題となっている。

一方で 2013 年 12 月に和食がユネスコの無形文化遺産に登録され、長寿国日本の伝統的食習慣である和食の健康面での有効性が見直されており、世界的に注目を集めている。その中でも和食に欠かせない、酵母、麹菌や乳酸菌などの発酵微生物を利用して製造される発酵醸造食品の健康機能性が特に注目され、海外での日本食・日本酒ブームにつながっている。しかしながら、これら発酵醸造食品についての有効性の科学的評価については十分な解析が行われておらず、ヒトの健康面への影響については不明な点が残されている。

本研究課題において、大分県産の農林水産物やそれらを原料とした発酵醸造食品の健康機能性評価のためにヒト培養細胞を用いた実験を行い、それら食品に含まれる健康機能性成分のうちアンチエイジング効果や免疫力向上などの健康増進効果の科学的評価法の確立を行う。本評価システムの確立により、発酵醸造食品とそれに含まれる成分の健康機能性における有効性についての科学的判定が容易になり、より付加価値の高い製品開発が可能となることで地域貢献につながることが期待される。

２．研究内容

発酵食品中にアンチエイジング効果を有する機能性成分が含まれているか評価するために、ヒトの培養細胞の系を用いて、アンチエイジングにおいて重要な細胞小器官であるミト

コンドリアの健康度が標的マーカーとして利用できるのではないかと考え、ヒトの培養細胞内において蛍光試薬により生きた状態で可視化して蛍光顕微鏡で観察することでアンチエイジング効果を評価する方法を本研究課題で模索した。細胞のミトコンドリアは外的ストレス因子により障害を受けやすく、さらにそれらの障害が直接細胞に老化促進などの重大な影響を及ぼすと考えられる。生きた細胞のミトコンドリアの可視化についてはすでに様々なミトコンドリア特異的な蛍光試薬が市販されており、それらを利用してミトコンドリアのバイオイメージングが行われているので、そのうちのマイトトラッカーレッド（Thermo Fisher Scientific Inc.）と GFP-Mito 発現ベクター (pAcGFP1-Mito、 Clontech 社)を購入してヒトの培養細胞の HeLa 細胞内のミトコンドリアの可視化を試みた。

1）GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞株の樹立：

まず、ヒトの株化細胞として広く用いられている HeLa 細胞を利用して、生きた細胞のミトコンドリアの可視化を試みた。緑色蛍光タンパク質（GFP）をミトコンドリアに局在させるシグナルを利用することによりミトコンドリアに GFP を限局させる GFP-Mito 発現プラスミドを HeLa 細胞に遺伝子導入し、GFP-Mito を高発現する HeLa 細胞を薬剤耐性マーカー（G418 耐性）遺伝子と共発現させて選抜した。遺伝子導入法は、比較的安価な試薬である非脂質性ポリカチオンのポリエチレンイミン（Polyethyleneimine “Max”(MW 40,000)、Polysciences, Inc.）による方法を用いて遺伝子導入に成功し、GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞株の樹立に成功した（図 1)。

次に樹立した GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞において GFP-Mito（緑色蛍光）の局在が実際にミトコンドリアを反映しているか、ミトコンドリア特異的な蛍光試薬であるマイトトラッカーレッドで染色して（赤色蛍光)、赤と緑の蛍光画像を重ね合わせて GFP-Mito の局在と一致するか調べることによりミトコンドリア特異的局在を確認できた（図 2)。

以上の観察は本研究機関に既設の倒立型位相差蛍光顕微鏡(Axiovert 135, Carl Zeiss)と CCD デジタルカメラ（DP70, Olympus）を利用して行った。

位相差　　GFP-Mito（緑色蛍光、B 励起光）　　重ね合わせ画像

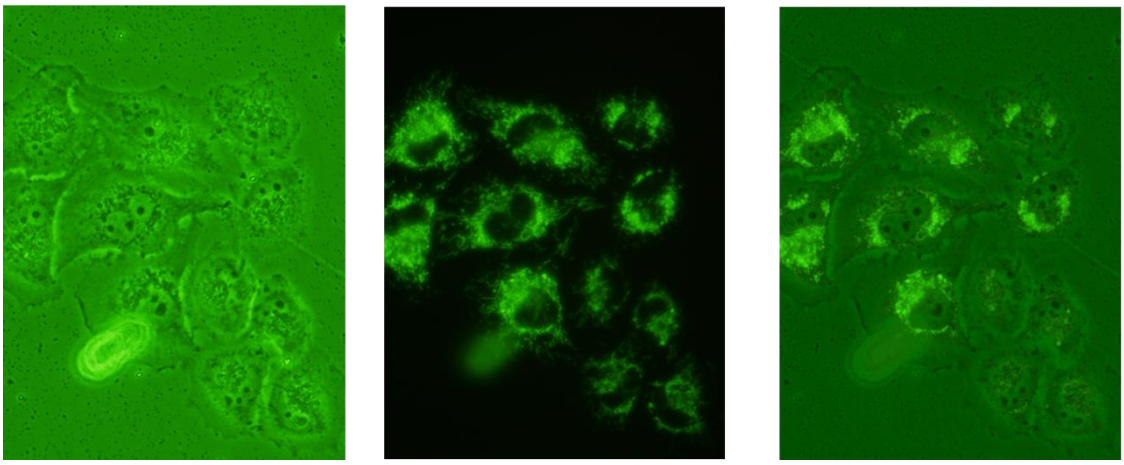


図 1．GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞株

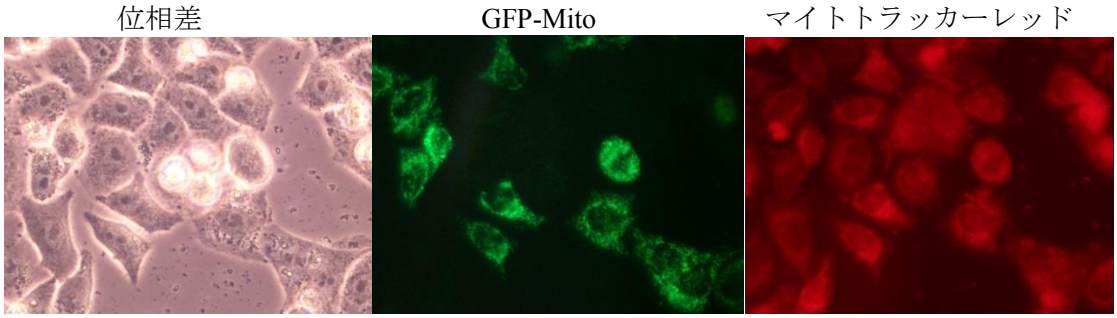


図 2．マイトトラッカーレッドで染色した GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞株

2）生きた細胞のミトコンドリアの動態解析法の確立：

次に GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞におけるミトコンドリアの動態変化を経時的に観察する目的で、CCD デジタルカメラ（DP70, Olympus）を利用したタイムラプスビデオ撮影によるライブイメージング技術の確立を目指した。

CO_2 インキュベータ外で長時間にわたる顕微鏡による観察を実施するため、倒立型位相差蛍光顕微鏡(Axiovert 135)にサーモステージ(Tokai Hit)を組み合わせることにより、細胞培養皿の温度を CO_2 インキュベータ外においても 37℃に保温できるようになり、生理的条件下での長時間にわたる細胞の観察が可能になった（図 3）。このようにサーモステージの導入により CCD デジタルカメラによるミトコンドリアの動態の長時間にわたるタイムラプスビデオ撮影が可能となった。

さらに x63 対物レンズに x2 の光学レンズを組み合わせることで約 1,300 倍の拡大画像で、微細なミトコンドリアが分裂や融合する様子の動態観察も可能となり、生きた細胞内のミトコンドリアのダイナミックな変化がリアルタイムで追跡可能となった。

生きた細胞でのミトコンドリアの動態解析法の確立により、機能性成分を培養中の細胞に与えることによるミトコンドリアの動態変化を添加前と添加後でタイムラプスビデオのデータとして記録し、比較することが可能となった。

以上のように、GFP-Mito 高発現 HeLa 細胞と蛍光顕微鏡を駆使して、ミトコンドリアを蛍光試薬で標識して可視化することで、ミトコンドリアの数や形態変化などをもとにしたアンチエイジング効果を生きた細胞で評価するライブイメージングの実験系を樹立できた。また、本研究の過程で、ミトコンドリア機能維持に関する遺伝子が関与する小児疾患のスクリーニング法の研究についての学術論文を共同研究として報告した（*Mol. Genet. Metab.* 2016)。

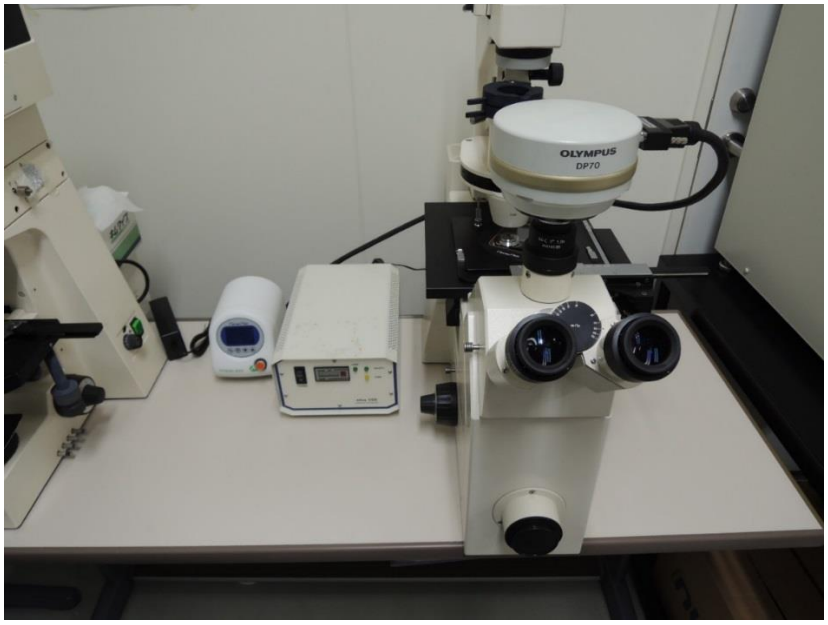


図 3．倒立型位相差蛍光顕微鏡(Axiovert 135)とサーモステージ(Tokai Hit)の組み合わせ

研究タイトル：②アンチエイジング効果を定量的に評価する系の確立

研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　細胞生物学研究室

担当者職名：教授　大坪素秋

1．研究の目的

アンチエイジング効果を有する化合物としては、細胞にとって有害な活性酸素種（ROS）を中和できるポリフェノールなどの抗酸化物質（アンチオキシダント）が一般に知られている。特に植物由来ポリフェノールのレスベラトロールのアンチエイジング効果による健康機能性については、最初酵母やモデル動物での基礎研究によって重要性が明らかになり、その後マスコミ等を宣伝媒体として大きく取り上げられ一般にも知られるようになってきた。一方でアンチエイジング効果を有する化合物の人体への有効性に関しては、十分な研究がヒトを対象として実施されておらず、科学的な確証が得られていない状況である。大分県特産の柑橘類をはじめとする様々な農林水産物にはポリフェノールなどの抗酸化作用を有する化合物が多く含まれており、レスベラトロール類似のアンチエイジング効果が期待できるので、それらの抗酸化作用についてヒトの培養細胞を利用した科学的評価法の確立をめざした。

２．研究内容

1）ミトコンドリア内の ROS の発生や膜電位のフローサイトメーターによる測定：

その目的で、本研究課題で 28 年度購入したフローサイトメーターの、3 レーザー細胞解析機（MACSQuant Analyser 、ミニサンプラ付き、Miltenyi Bitotec 社）の活用を計画した（図 4）。フローサイトメーターは様々な蛍光試薬と組み合わせることで細胞のミトコンドリア

内の ROS の発生や膜電位を測定することが可能で、ミトコンドリアの健康度を定量的に調べることが可能である。また、蛍光顕微鏡での測定と比較して定量性に優れている。そのため食品や食品に含まれる化合物のアンチエイジング効果の指標となる抗酸化活性の強さについて培養細胞を用いた実験により定量的に比較することが可能となる。
細胞内のミトコンドリア内の ROS を検出する蛍光試薬として MitoSOX™ Red（Thermo Fisher Scientific Inc.）を利用した。MitoSOX™ Red は還元状態では非蛍光であるが、ROS によって酸化されると蛍光強度が増大する。培養している HEK293 細胞に MitoSOX™ Red を最終濃度 5μM となるように加えて 37℃、30 分間 CO_2 インキュベータで培養し、その後 H_2O_2 を 1mM 加えてさらに 10 分間培養することで ROS の産生を促して、H_2O_2 を加えていないコントロールとフローサイトメーター（検出波長 585nm、細胞数 10,000）で比較したところ、有意な ROS の産生の増加が H_2O_2 添加後に認められた（図 5）。

2）ミトコンドリアの容積と膜電位のフローサイトメーターによる測定：

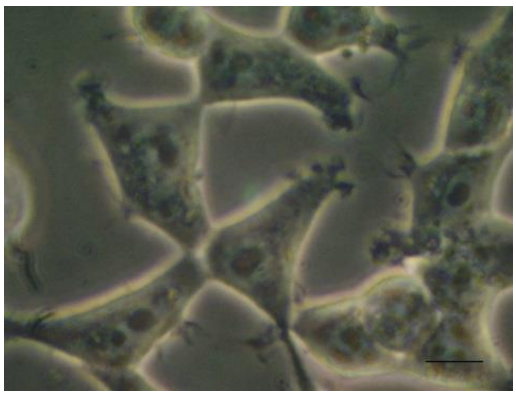
ミトコンドリアの容積や形態をもとにミトコンドリアの健康度を蛍光顕微鏡により評価する方法は定量性に欠けるため、ミトコンドリアの健康度の指標となるミトコンドリア内の ROS や膜電位をフローサイトメーターで測定することによりアンチエイジング効果を定量的に評価する系の検討を行った。

その目的のためフローサイトメーターとミトコンドリア特異的な蛍光試薬を組み合わせて HEK293 細胞で定量的な測定方法を検討した。蛍光試薬としては、ミトコンドリアの容積の測定のためマイトトラッカーレッド、ミトコンドリアの膜電位には JC-1 iodide (5,5′,6,6′-Tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine, iodide)、TMRM（tetramethylrhodamine ethyl ester）、ROS の測定に MitoSOX™ Red をそれぞれ用いた。これら蛍光試薬とフローサイトメーターの組み合わせによりミトコンドリア内の ROS や膜電位を定量できる実験系が確立できたので（図 5）、抗酸化活性などの食品に含まれる成分の細胞への影響を定量的に評価することが可能となった。H_2O_2 添加後の ROS の産生を、大分県特産の柑橘類をはじめとする様々な農林水産物に含まれる抗酸化作用を有する化合物が実際に抑制する効果があるか今後調べていく。

図 4　3 レーザー細胞解析機（MACSQuant Analyser、ミニサンプラ付き、Miltenyi Bitotec 社）

無処理

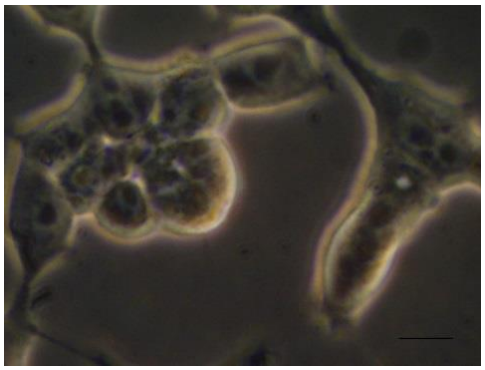
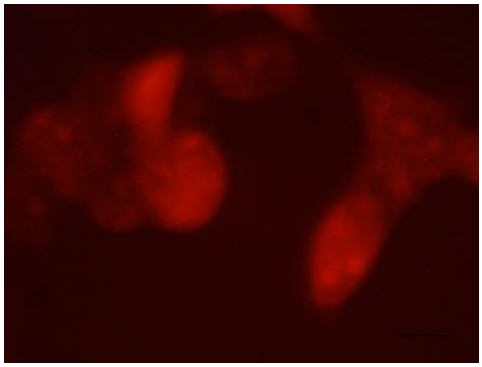
明視野（位相差）　　落射蛍光（赤色蛍光、G 励起光）



スケールバー：50μm

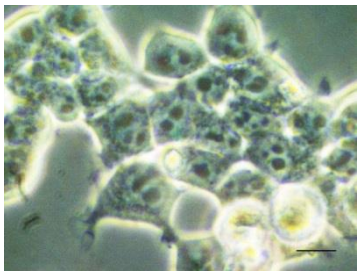
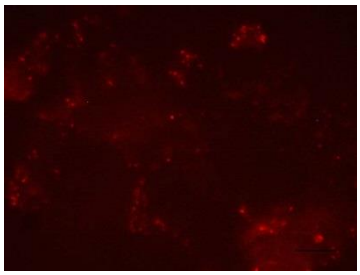
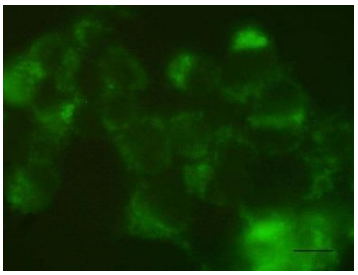
MitoSOX™ Red

明視野（位相差）　　落射蛍光（赤色蛍光、G 励起光）

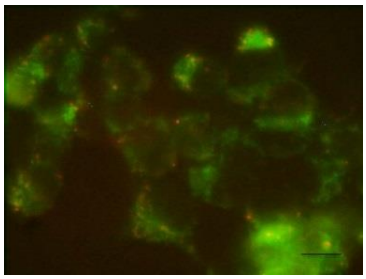



JC-1 iodide

明視野(位相差)　落射蛍光（赤色蛍光、G 励起光）　落射蛍光（緑色蛍光、B 励起光）

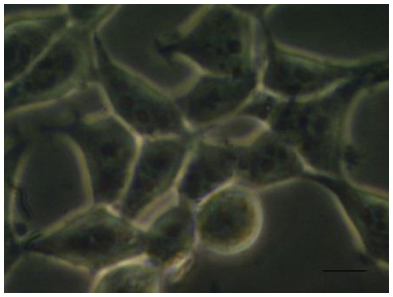
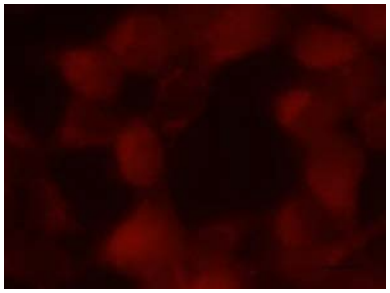




重ね合わせ画像（赤色蛍光、G 励起光、緑色蛍光、B 励起光）

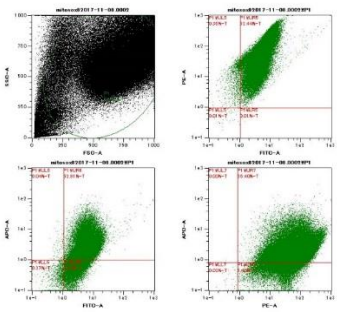


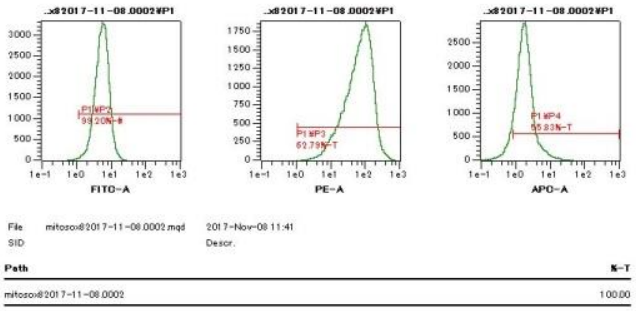
TMRM

明視野(位相差)　落射蛍光（赤色蛍光、G 励起光）

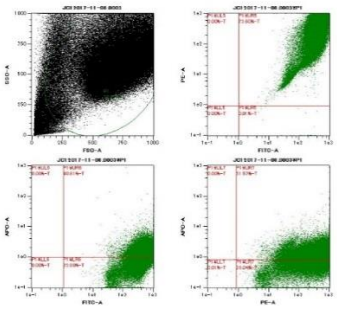



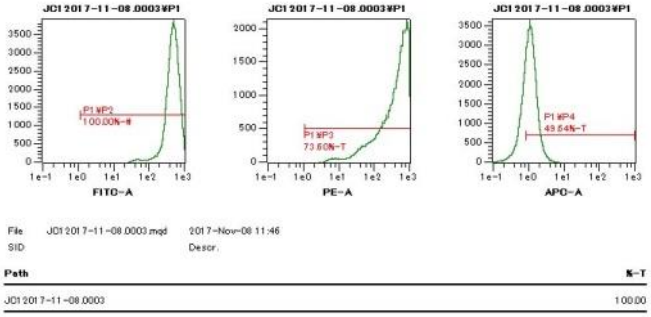
MitoSOX™ Red　8μl (5μM)　525nm(FITC)　585nm(PE)　655-730nm(APC)



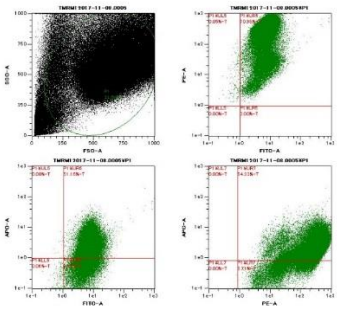


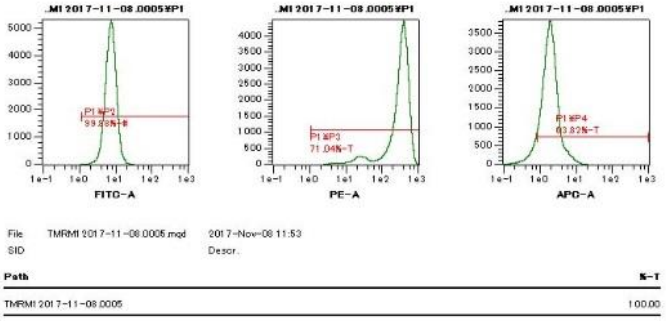
JC-1 iodide 1µl (0.5µg/ml) 525nm(FITC) 585nm(PE) 655-730nm(APC)





TMRM 1µl (1µM) 525nm(FITC) 585nm(PE) 655-730nm(APC)





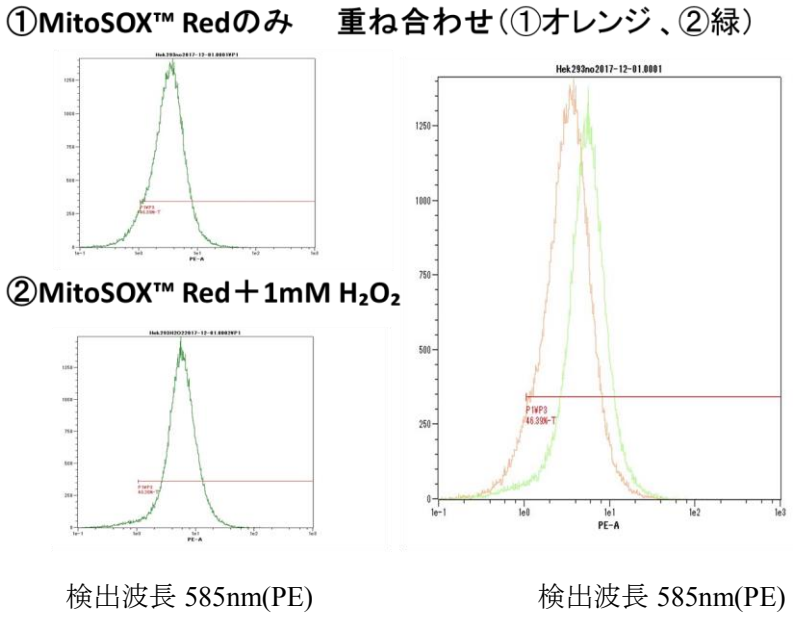


図５　MitoSOX™ Red による HEK293 細胞のミトコンドリア内の ROS の測定

研究タイトル：③DNA 障害予防効果に関する研究
研究機関：食物栄養科学部　発酵食品学科　細胞生物学研究室
担当者職名：教授　大坪素秋

１．研究の目的

テロメア DNA などのヘテロクロマチン領域は様々な外的ストレス因子により障害を受けやすく、さらにそれらによる障害が直接細胞老化促進などの重大な影響を及ぼすと考えられる。ヘテロクロマチン領域がアンチエイジングの標的マーカーとして利用できないか検討を行った。そのために、ヘテロクロマチン領域に対する各種蛍光試薬と蛍光顕微鏡を利用したバイオイメージング法による定性的な評価方法と、フローサイトメーターを活用した定量的な評価方法の両方について確立を目指した。

２．研究内容

1）テロメア DNA などのヘテロクロマチン領域の可視化【目的④】

その目的で、赤色単量体蛍光タンパク質 mCherry (pmCherry-C1、Clontech 社)にヒト由来のヘテロクロマチンタンパク質の HP1α を融合させた融合遺伝子発現ベクターpmCherry-HP1 発現プラスミドを作成した。HP1α はテロメアなどのヘテロクロマチン領域特異的に局在するヘテロクロマチンタンパク質として知られている。

比較的安価な試薬である非脂質性ポリカチオンのポリエチレンイミンによる方法を用いて、ヘテロクロマチンの観察が容易な NIH3T3 細胞に遺伝子導入を試みた。

その結果、pmCherry-HP1 発現プラスミドを導入した NIH3T3 細胞で赤色単量体蛍光タン

パク質 mCherry の発現を細胞核内に認めた。次に mCherry の発現がヘテロクロマチンと対応しているかをヘテロクロマチン特異的な蛍光試薬であるヘキスト 33342（青色蛍光）で二重染色することにより確認することができた（図 6）。

mCherry-HP1（赤色蛍光、G 励起光）　ヘキスト 33342(DNA)（青色蛍光、UV 励起光）

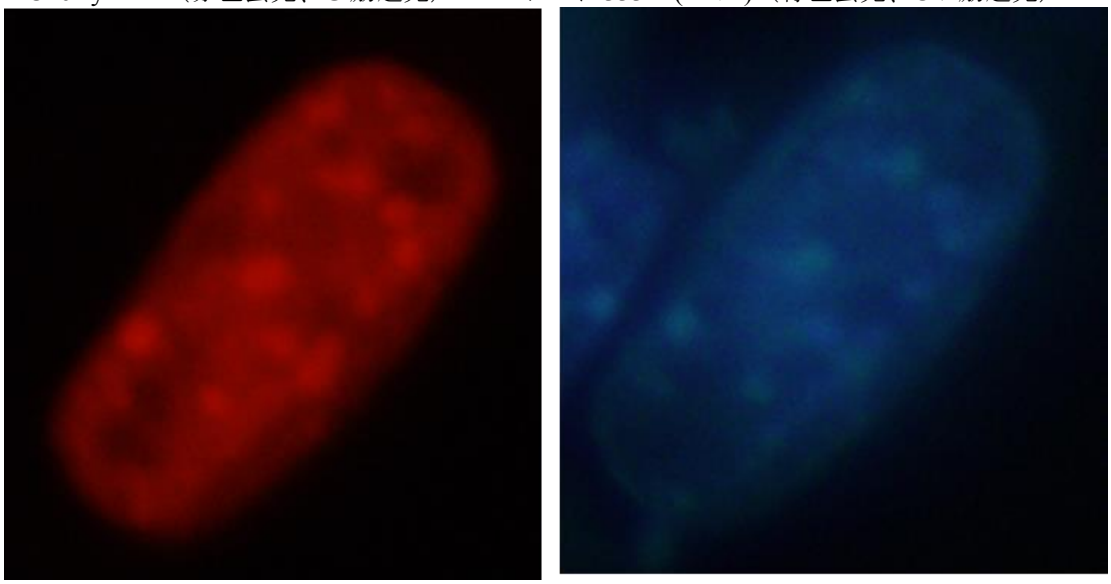


図 6　NIH3T3 細胞核のヘテロクロマチン領域の蛍光顕微鏡による観察。
mCherry-HP1（左）ヘキスト 33342(DNA)（右）2,000 倍

2）フローサイトメーターを利用した DNA 障害の検出【目的④】:

増殖中の細胞の DNA になんらかの原因で障害が発生すると、細胞は増殖を停止する。この現象は DNA 障害チェックポイントと呼ばれ、DNA 障害チェックポイントが発動することにより細胞の増殖が中断して DNA の修復が誘導される。DNA 障害の修復が無事に完了すると細胞は再び増殖を開始する。DNA 障害の最大の原因は ROS に代表される酸化ストレスであるので、DNA 障害チェックポイントの誘導をフローサイトメーターにより検出する実験系の確立を目指した。

NIH3T3 細胞に DNA 障害を与えて DNA 障害チェックポイントを誘導させたのち細胞を回収し、DNA 特異的な蛍光試薬のヨウ化プロピジウム（PI）により細胞の DNA を蛍光染色してフローサイトメーターで調べたところ（検出波長 585nm、細胞数 10,000）、DNA 障害チェックポイントが発動した条件下では細胞周期の G_2 期停止（G_2 block））がみとめられたことから（図 7）、DNA 障害の検出のための実験系が確立できたと判断した。

以上のごとく、ヒトの培養細胞を用いて DNA 障害予防効果を評価する方法の確立を目指し、1）蛍光タンパク質を用いて、DNA 障害の指標となる染色体末端のテロメアのヘテロクロマチンの状態を生細胞でモニターできる系と、2）フローサイトメーターを利用した DNA 障害を検出する系を確立することができた。以上の方法を用いて DNA 障害予防効果の有無について、DNA 障害を誘導する各種実験系で実際に調べていくことを今後計画している。

また、DNA 障害予防効果に関する研究の過程で、DNA 複製制御に関する遺伝子のコードするタンパク質のリン酸化とユビキチン化修飾による安定性制御についての研究を共同研究により学術論文に報告することができた（*Mol. Genet. Metab.* 2016)。

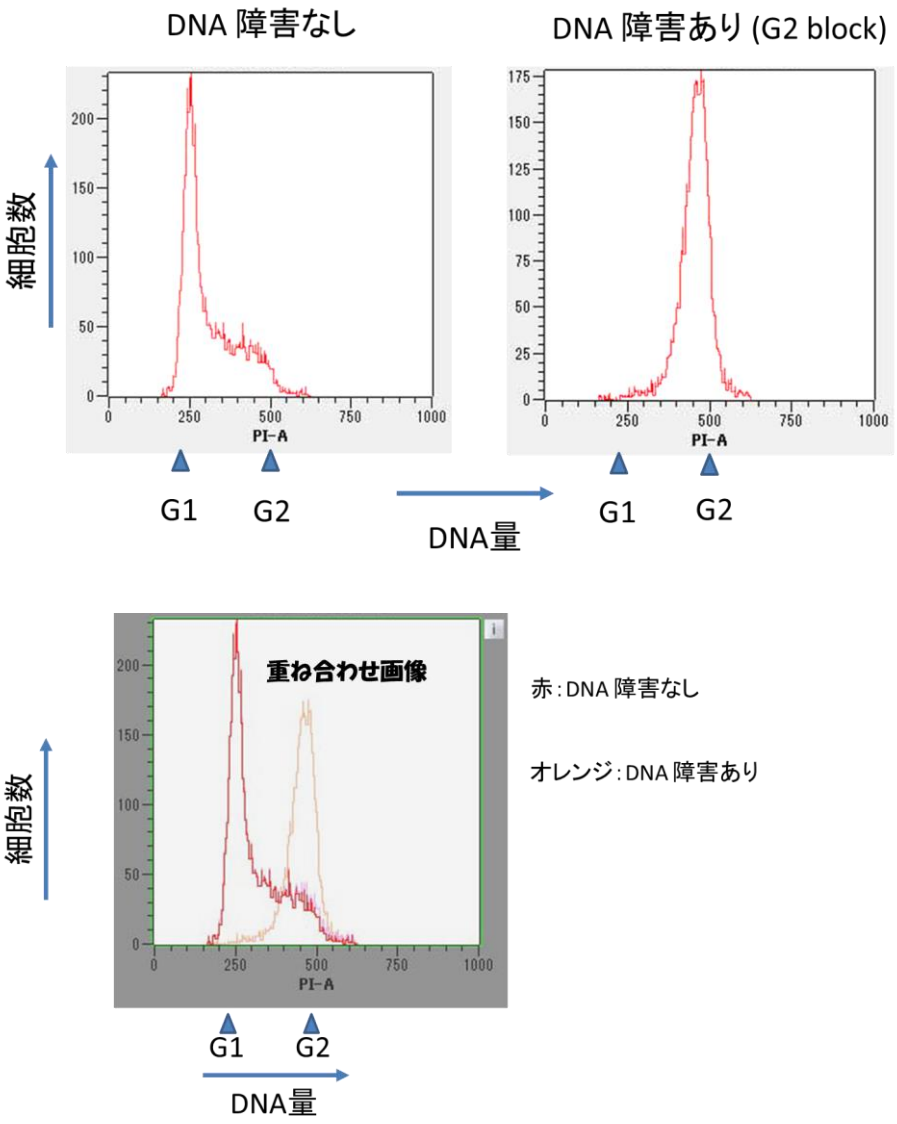


図７．DNA 障害チェックポイントが誘導された NIH3T3 細胞の PI 染色による細胞周期解析 (MACSQuant® Analyzer)

３．研究成果の副次的効果

副次的効果としては、大学内、大学間そして大分県内の企業と連携の共同研究についても本研究成果がきっかけとなって進めることができたので、今後も継続して推し進めていき発展させていきたい。何よりも大きかった副次的効果は、本学の学生と大学院生の教育面での影響であり、本研究課題に関与することで分子生物学と細胞生物学に関しての知識と科

学的思考が養われて、卒業論文と修論のレベルアップにつながった。

今後の計画など

今後は、本研究で確立したミトコンドリアの健康度や DNA 障害予防に関するマーカーを指標にしたアンチエイジング効果を細胞で評価する実験系を活用することで、大分県産の農林水産物やそれらを原料にして本プロジェクトにおいて分離した発酵微生物により製造した発酵醸造食品中にアンチエイジング効果を有する機能性成分が含まれているかを科学的に検証していく。本支援事業に参加している、実験動物やヒトでの研究を実施している他の研究者と密に連絡を取りながら、得られた結果については総合的に評価を行っていきたいと考えている。また、期間内で達成することができなかった免疫力向上を評価する実験系の開発については、今後 HEK293 細胞を用いた培養細胞での炎症性サイトカインのアッセイ系について研究していき開発を目指していきたい。免疫力に関しては、免疫のバランスの重要性が最近明らかになってきているので最新の知識をもとに評価方法について検討していきたい。本研究課題で得られた結果をまとめることにより査読付きの国際雑誌への論文投稿を中心に今後成果の発信を行っていく予定である。

４．研究成果

a)原著論文

１．＊Hara K, Tajima G, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Shirao K, Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Hata I, Sakura N, Shigematsu Y, Takihara Y, Kobayashi M.　Significance of ACADM mutations identified through newborn screening of MCAD deficiency in Japan. *Mol. Genet. Metab.* 118(1): 9-14 (2016).

２．Ohno Y, Suzuki-Takedachi K., Yasunaga S, Kurogi T, Santo M, Masuhiro Y, Hanazawa S, Ohtsubo M, Naka K., Takihara Y. Manipulation of Cell Cycle and Chromatin Configuration by Means of Cell-Penetrating Geminin. *PLoS One*. 11(5):e0155558. doi: 10.1371/journal.pone.0155558. eCollection (2016).

３．Yasunaga S, Ohno Y, Shirasu N, Zhang B, Suzuki-Takedachi K, Ohtsubo M, Takihara Y. Role of Geminin in cell fate determination of hematopoietic stem cells (HSCs). Int. *J. Hematol. 103(3)*: 324-329 (2016).

４．＊Nukina K, Hayashi A, Shiomi Y, Sugasawa K, Ohtsubo M, Nishitani N. . Mutations at multiple CDK-phosphorylation consensus sites on Cdt2 increase the affinity of $CRL4^{Cdt2}$ for PCNA and its ubiquitination activity in S phase. *Genes to cells* Feb 9. doi: 10.1111/gtc.12563. [Epub ahead of print] (2018).

b)総説

１．なし

c)招待講演、シンポジウム

１．なし

d)国際学会

１．なし

e）国内学会

１．Suzuki-Takedachi K, Ohno Y, Kurogi T, Santo M, Yasunaga S, Ohtsubo M, Naka K, Takihara Y. Analysis of molecular role for Geminin in self-renewal and differentiation of HSCs. The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2015 年 10 月 18 日（金沢）

２．Ohno Y, Suzuki-Takedachi K, Kurogi T, Santo M, Yasunaga S, Ohtsubo M, Naka K, Takihara Y. A new strategy for manipulating expression and activety of Geminin, a cell-fate determinant for HSCs. The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2015 年 10 月 18 日（金沢）

３．竹立（鈴木）恭子、大野芳典、黒木利知、安永晋一郎、山藤幹茂子、舛廣善和、花澤重正、大坪素秋、仲一仁、瀧原義宏　DNA 複製とクロマチンリモデリングを制御する Cell-penetrating(CP-) Geminin の開発　日本分子生物学会年会　2015 年 12 月 2 日(神戸ポートアイランド)

４．大野芳典、竹立（鈴木）恭子、山藤幹茂子、郭芸、菅野雅元、白須直人、安永晋一郎, 大坪素秋, 仲一仁, 瀧原義宏, 低線量率被ばくに対する造血幹細胞の分子応答,　第 59 回放射線影響学会総会 2016 年 10 月 26 日（広島）

５．大野芳典、竹立（鈴木）恭子、山藤幹茂子、郭芸、菅野雅元、白須直人、大坪素秋、仲一仁、安永晋一郎、瀧原義宏　造血幹細胞の低線量率放射線被ばくに対する分子応答の解析　日本分子生物学会年会　2016 年 12 月 2 日(パシフィコ横浜)

６．大野芳典、竹立（鈴木）恭子、山藤幹茂子、郭芸、菅野雅元、白須直人、安永晋一郎、大坪素秋、瀧原義宏　低線量率放射線が造血に与える影響　日本分子生物学会年会　2017 年 12 月 7 日(神戸ポートアイランド)

７．竹立（鈴木）恭子、大野芳典、山藤幹茂子、白須直人、大坪素秋、安永晋一郎、瀧原義宏　造血幹細胞の細胞周期と分化の制御における Geminin の分子機能　日本分子生物学会年会　2017 年 12 月 7 日(神戸ポートアイランド)

f)特許

１．なし

g)その他(学会賞、報道など)

１．なし

私立大学戦略的研究形成支援事業
「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」
（平成 27 年度～平成 29 年度）
研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：発酵微生物が産生する抗炎症性機能成分の探索
プロジェクトでの役割：免疫調節作用を有する機能性発酵醸造食品の開発

研究タイトル：①マウス炎症性大腸炎における発酵大麦エキス投与の効果

研究機関：食物栄養科学部　食物栄養学科　食品機能学研究室
担当者職名：教授　木村靖浩

1．研究の目的

炎症性大腸炎（Inflammatory Bowel Disease, IBD）は、潰瘍性大腸炎や Crohn 病に代表される腸に炎症をきたす疾患の総称である。潰瘍性大腸炎は大腸粘膜を侵し、びらんや潰瘍を形成する原因不明のびまん性炎症性疾患であり、病変は直腸から始まり、連続性に広がると言われている。Crohn 病は若年者に多く見られ、口腔から肛門までの消化管のあらゆるところで炎症が起こるという特徴を示し、小腸及び大腸が好発部位である。潰瘍性大腸炎や Crohn 病に代表される IBD は経過中に寛解と再燃を繰り返し、腸管合併症や腸管外合併症を伴うことがある。また、長期に広範に大腸を侵す場合は、大腸がんの発症リスクが高まる。IBD の典型的な症状は下痢、粘血便、腹痛、発熱などを呈するが、病変範囲と重症度によって左右される。我が国の有病率は欧米と比べて少ないが、近年、増加傾向にあり、難治病情報センターによる平成 26 年度特定疾患医療受給者証所持者数統計では我が国の潰瘍性大腸炎患者数は 166,085 人、Crohn 病患者数は 41,279 人と報告されている。

IBD の病因は未だ完全に解明されていないが、腸管バリア機能の低下、腸内細菌叢の変化により誘発された免疫異常による大腸組織への炎症性免疫細胞の過剰な浸潤が見られる。特に局所における Th1 及び Th17 ヘルパーT 細胞の免疫応答亢進による INF-γ や IL-17A などの炎症性サイトカインの過剰な産生が IBD の粘膜組織傷害への中心的な役割を担うと考えられている。根治療法は依然確立しておらず、治療は炎症を抑える薬物療法と消化管に負担をかけない食事療法で再燃を抑え寛解状態を維持するという対症療法が中心となる。

発酵大麦エキス（Fermented Barley Extract（FBE）、アルコケア®、三和酒類（株））の摂取は、腸内環境を改善して腸管免疫機能を調節すること、Lipopolysaccharide 誘導性肝障害の酸化ストレスを軽減し、炎症性サイトカイン産生を抑制して肝機能を保護することなどが動物実験により示されている。FBE は大麦焼酎を製造する過程で副産物として産生される焼酎粕をベースに製造される（図 1）。すなわち、三和酒類（株）の独自製法によって大麦焼酎粕を分離・精製・濃縮・乾燥させたものであり、その中には麹菌や焼酎酵母が生成したペプチド・タンパク質を最も多く含み、その他には多糖類・遊離糖類、クエン酸、ポリフェノール類なども含まれる（図 2）。

図１．発酵大麦エキスの生産工程（出典：三和種類(株)、2016年健康博覧会資料）

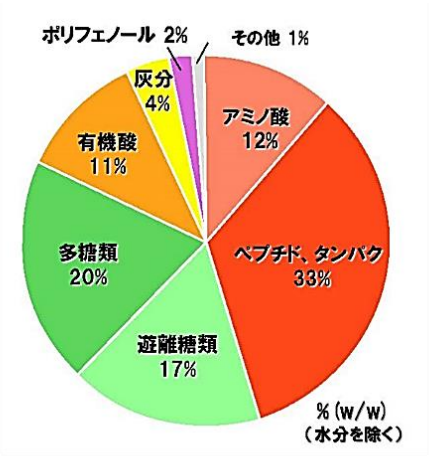


図２．発酵大麦エキスの組成（出典：三和種類(株)、2016年健康博覧会資料）

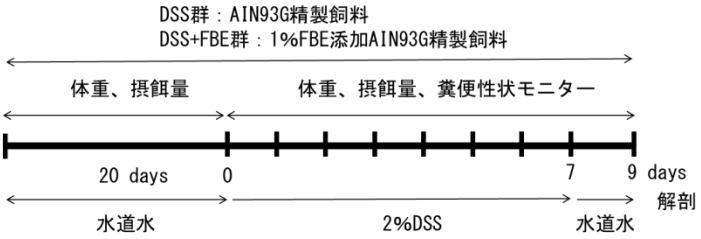
そこで、本研究では FBE の含有成分による抗炎症作用に着目し、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導急性大腸炎（IBD）マウスにおいて FBE 投与により急性大腸炎緩和作用が認められるかを調べた。

２．研究内容

1）実験方法（動物飼育、糞便性状評価、試料分析）

実験動物は 4 週齢 C57BL/6 雌マウスを使用した。マウスは日本チャールス・リバー株式会社より購入した。マウスは室温 22±2℃、湿度 50±10%及び 12 時間の明暗サイクル（明期 7 時～19 時）の飼育環境下にプラスチックケージにて 5 匹ずつの群飼とした。1 週間の環境への順化後、マウスを 2 群に分け個別飼いとし、一方には FBE を 1%含む AIN93G 精製粉末飼料をまず 20 日間与えた（DSS+FBE 群）。もう一方のマウスには AIN93G 精製粉末飼料を与えた（DSS 群）。その間、飲料水は水道水を自由摂取させた。次

いで各群のマウスには飲料水を水道水から 2%DSS 溶液に切り替え、7 日間与えて急性大腸炎を惹起した。その後、2 日間水道水を与えて IBD マウスを安楽死させた（実験 29 日目）（図 3)。また、大腸の長さ及び大腸組織サイトカイン濃度の参考値を得るため大腸炎を起こさせない無処置対照群（Control 群）も設けた。DSS 投与開始から体重、摂餌量及び糞便性状（下痢・血便の状態）を毎日モニターし、体重減少率及び糞便性状を数値化した。体重減少率スコアは、減少なしあるいは増加が０、1～5%の減少が１、5～10%の減少が２、11～15%の減少が３、15%以上の減少が４とした。下痢のスコアは正常が０、軟便が１、下痢が２、水様性下痢が３とした。血便のスコアは正常が０、部分的血便が１、全体的血便が２、肛門から出血が３とした。さらに体重減少率と糞便性状スコアを平均し、疾患活動指標（Disease Activity Index, DAI）を求めた。実験 29 日目にマウスをイソフルラン吸入麻酔下に開腹し、下大静脈より採血して脱血死させたのち、直ちに大腸を摘出した。摘出した大腸は、氷冷生理食塩水（大塚製薬（株））にて内容物を洗い出した後、重量と長さを測定し、大腸組織を液体窒素にて迅速凍結し、分析に供するまで−80℃で凍結保存した。



・動物：5週齢C57BL/6雌マウス
・評価項目：
体重、摂餌量、糞便性状（下痢・血便）
大腸長さ、大腸組織サイトカイン濃度（TNF- α・INF- γ・IL-17A）

図３．実験デザイン

凍結保存した大腸組織を約 30 mg を 1.5 ml マイクロ遠心チューブに秤量した。そこに Cell lysis buffer（Santa Cruz Technology, USA）1 ml に Phenylmethylsulfonylfluoride（Santa Cruz Technology）を 25 µl 及び蒸留水 4 ml を添加した細胞溶解緩衝液を大腸組織の 10 倍容となるよう加えた。眼科用小型ハサミで大腸組織を細かく刻んだのち、Homogenizer（S-203, As One）を使って氷水冷下に最低速度で約 10 秒間、4～5 ストロークホモジネートした。そのホモジネートは 4℃、10,000×*g* で 5 分間遠心分離し、その遠心分離上清を Bradford 法による総タンパク質濃度及び ELISA 法による炎症性サイトカイン（Tumor necrosis factor-alpha（TNF-α)、Interferon-gamma（INF-γ)、Interleukin-17A（IL-17A)）濃度の測定に供した。総タンパク質及び炎症性サイトカイン濃度は、それぞれ Quick Start™（Bio-rad laboratories, USA）及び ELISA キット（eBioscience, Affymetrix 社, USA）を用いて測定した。

2）結果及び考察

IBD マウスの終体重は DSS 群が 17.6±0.5 g（Mean±SEM)、DSS+FBE 群が 17.5±0.4 g、実験期間中の累積摂餌量は DSS 群が 82.3±8.4 g、DSS+FBE 群が 79.5±7.4 g で、それぞれに FBE 投与による影響は認められなかった。

下痢スコア、血便スコア及び DAI の経日変化の結果を、それぞれ図 4、図 5 及び図 6 に

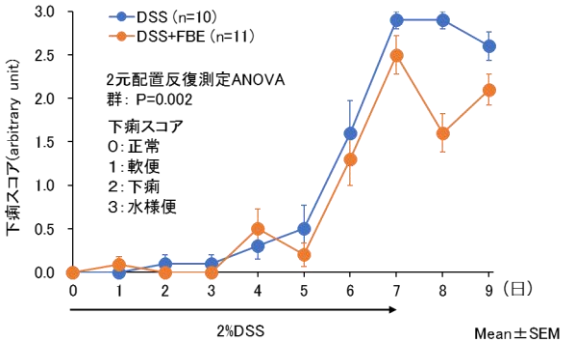


図4. FBEを投与したIBDマウスの下痢スコアの経日変化

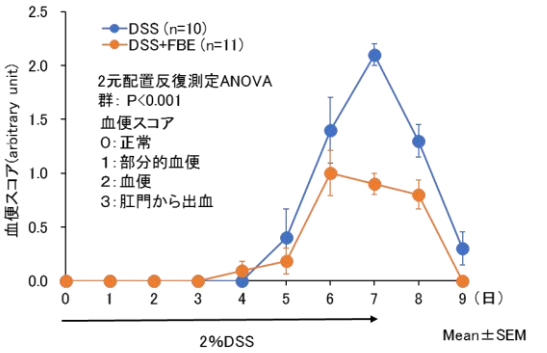


図5. FBEを投与したIBDマウスの血便スコアの経日変化

示した。DSS＋FBE 群の下痢スコアは、DSS 群に比べ低値で推移し、FBE 投与により有意に IBD マウスの下痢症状が改善された（p=0.002）（図 4）。血便スコアの経日変化も下痢スコアの経日変化同様に、DSS＋FBE 群が DSS 群に比べ低値で推移し、FBE 投与により有意に IBD マウスの血便症状が改善された（p<0.001）（図 5）。さらに体重減少率、下痢及び血便スコアから算出した DAI の経日変化は、DSS＋FBE 群が DSS 群に比べ低値で推移し、FBE の投与により DAI にも有意な改善が認められた（p<0.001）（図 6）。

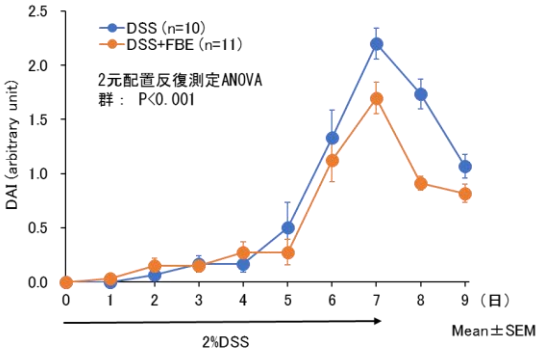


図6. FBEを投与したIBDマウスのDAIの経日変化

IBD マウスの大腸の長さは、FBE を投与したマウス（DSS+FBE 群）の大腸の長さが 6.2±0.1 cm で DSS 群マウスの 5.5±0.12 cm に比べ有意に長かった（p<0.05）。しかし、正常マウス（Control 群）の大腸の長さ 6.8±0.4 cm と比べて差はなかった。

IBD マウスの大腸組織炎症性サイトカイン濃度の結果を、それぞれ図 7、図 8 及び図 9 に示した。DSS 群マウスの大腸組織 TNF-α 濃度は、Control 群マウスに比べ約 6 倍高くなった（p<0.05）。しかし、FBE 投与によりその上昇が約 3.7 倍までに抑制された（図 7）。大腸組織 INF-γ 濃度は、Control 群に比べ、DSS 群及び DSS+FBE 群共に、有意に高値を示し（p<0.05）、FBE 投与による影響は認められなかった（図 8）。INF-γ 濃度の結果と同様、IL-17A 濃度も Control 群に比べ、DSS 群及び DSS＋FBE 群共に有意に高値を示し（p<0.05）、FBE 投与による影響は認められなかった（図 9）。

以上のように FBE 投与により IBD マウスの主要臨床症状（下痢・血便の程度）が軽減されること、FBE の投与は、通常、DSS で誘導した IBD マウスで短縮する大腸の長さを維持し、さらに FBE は大腸組織 TNF-α レベルを低下させることがわかった。大腸組織 INF-γ 及び IL-17A 濃度には FBE 投与の影響が見られなかったが、TNF-α 濃度を低下させたことより、FBE は大腸組織へ浸潤した Th1 ヘルパーT 細胞よりもマクロファージの活性化を抑制して、大腸炎を緩和する可能性が示唆された。

FBE は、原料、麹菌、焼酎酵母に由来するアミノ酸、ペプチド、タンパク質、オリゴ糖、難消化性多糖類、有機酸、ビタミン、ミネラルなど数々の有用な成分を含む。特に FBE に含まれるオリゴ糖及び β-グルカンなどの難消化性糖類は腸内の乳酸菌及びビフィズス菌の増殖を促し、酢酸、酪酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸の産生を増すことで腸内環境を改善して腸管免疫機能を調節すること、また、マウス腹腔内マクロファージを活性化することがわかっている。本研究においても FBE に含有されるそれら難消化性オリゴ糖及び多糖類よる腸内環境の変化を介して大腸炎の症状が軽減されたと推測される。

筆者は、FBE が前述のように難消化性オリゴ糖・多糖類及び抗酸化性ポリフェノール類を比較的多く含むことから、それらの成分が腸内環境の改善や腸管バリア機能を保持すること、さらに大腸に浸潤した免疫細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制して大腸炎の症状軽減に寄与しているのではないかと推測している。

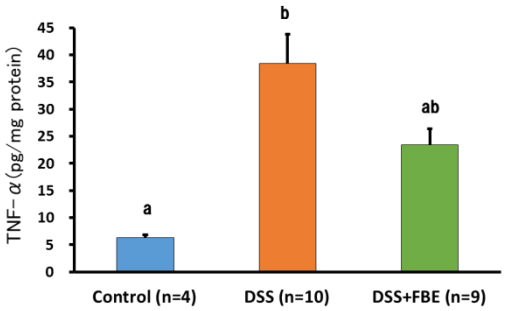


図7. FBEを投与したIBDマウスの大腸組織TNF−α濃度
数値はMean±SEMで示した。異なるアルファベットの平均値はクラスカル・ウォリスの一元配置分散分析によりp<0.05で有意差あり。

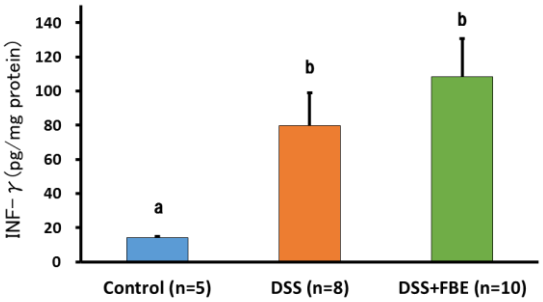


図8. FBEを投与したIBDマウスの大腸組織INF−γ濃度
数値はMean±SEMで示した。異なるアルファベットの平均値はクラスカル・ウォリスの一元配置分散分析によりp<0.05で有意差あり。

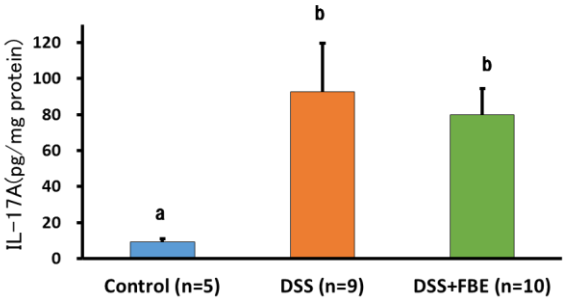


図9. FBEを投与したIBDマウスの大腸組織IL−17A濃度
数値はMean±SEMで示した。異なるアルファベットの平均値はクラスカル・ウォリスの一元配置分散分析によりp<0.05で有意差あり。

３．研究成果の副次的効果、今後の計画

1）副次的効果

本研究により見出された発酵大麦エキスに大腸炎軽減作用があるという知見は、作用メカニズムが明らかになるという前提ではあるが、他の炎症に起因する炎症性疾患、例えば非アルコール性肝障害、軽度炎症が全身的に広がっていると言われている肥満、糸球体腎炎を主徴とする慢性腎臓病（CKD）などに応用が可能かと思われる。機会があればそれら疾患モデル動物で発酵大麦エキスの有用性を検討したいと考えている。

2）今後の計画

将来的には IBD を緩和・予防する機能性発酵食品の開発を目指しているが、現段階ではマウスの急性大腸炎モデルにおいて下痢及び血便の程度など臨床症状の緩和に発酵大麦エキス投与が有効である可能性が示唆された知見を得たのみでそれらの作用機序を明らかにできていない。ヒトへ応用するためにはまだまだ道のりは遠く、安全性の確認、有効投与量の設定やさらに作用メカニズムに関するデータの蓄積が必要となる。麹菌及び酵母などにより調製した発酵食品に抗炎症作用があることを解明し、ヒト IBD 患者に応用できれば、炎症の寛解と再燃を繰り返す IBD 患者の寛解期の延長、増悪化の防止・軽減など、患者の QOL 改善につなげることができると考えられる。次のステップとして発酵大麦エキスの抗炎症作用を確認するため本研究で使った急性期ではなく炎症の程度がよりマイルドな慢性期の大腸炎マウスで発酵大麦エキスの効果を評価したい。その上で抗炎症作用の機序を探索するため大腸組織に浸潤した免疫細胞を分取してそれら免疫細胞のマーカーサイトカインの mRNA を検出する実験系を確立して抗炎症作用の作用メカニズムを検討したい。

研究タイトル：②マウス炎症性大腸炎における甘酒投与の効果

研究機関：食物栄養科学部　食物栄養学科　食品機能学研究室

担当者職名：教授　木村靖浩

１．研究の目的

炎症性腸疾患（IBD）の病因は未だ解明されていないが、遺伝子的な素因によって通常の腸内細菌に対して異常な免疫応答を示すことが病態の発症に関与していると推測されている。腸内細菌叢の変化により誘発された免疫異常による大腸組織への炎症性免疫細胞の過剰な浸潤が見られ、特に出血性の壊死を生じさせる TNF-α、免疫細胞の産生を促進させる IL-1β、炎症部位へ免疫細胞の遊走を促す IL-17A の過剰な産生と免疫抑制作用のある IL-10 の産生低下が粘膜組織傷害の主な原因と考えられている。

従来、当研究室では食品に含まれる抗炎症作用を有する機能性成分（生理活性物質）の探索をしており、現在は IBD に焦点を当て、その発症予防や症状を軽減する食品及び食品機能性成分の探索を行っている。

清酒、みそ、醤油などの製造に使われる麹菌（*Aspelgillus oryze*）のような発酵微生物は、有機酸、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、難消化性オリゴ糖・多糖類及び核酸関連物質など生体調節に関与する様々な機能性成分を産生することが知られており、発酵微生物が産生する生理活性物質の機能性食品素材としての応用が期待されている。実際に米麹により調製した甘酒には、麹菌が産生する炎症時に減少すると言われているビタミン B 群、グルコース、難消化性オリゴ糖及び多糖類、アミノ酸、ペプチド及びタンパク質、有機酸類を豊富に含んでいることが知られている。麹菌発酵穀物胚芽の投与は潰瘍性大腸炎ラットの腸内細菌叢を改善して腸管免疫機能を調節し大腸炎症状を緩和すること、また、

DSS 誘導性潰瘍性大腸炎マウスにおいても麹菌発酵穀物胚芽の投与が大腸炎の症状を緩和し、大腸組織の炎症性サイトカイン産生を抑制することが報告されている。

そこで、本研究では米麹により調製した甘酒投与により期待される腸内環境改善作用及び抗炎症作用に着目し、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導急性大腸炎（IBD）マウスにおいて甘酒投与による大腸炎緩和作用が認められるかを調べた。

２．研究内容

1）実験方法（被検物調製、動物飼育、糞便性状評価、試料分析、大腸病理組織学検査）

甘酒には清酒の製造過程でできる酒粕を使った酒粕甘酒と米麹を使った麹甘酒があるが、今回は自作した麹甘酒を使用した。その調製工程を図 1 に示した。もち米 1.5 合に水 420 ml を加えて炊飯した。炊き上がったもち米を保温調理鍋に移して 200 ml の熱湯を加え、よく撹拌して 70℃まで冷却した。そこに乾燥米麹（㈱ますやみそ、広島県呉市）250 g を加え、よく混合し 6 時間保温した（40℃程度になる）。鍋を弱火にかけ内容物の温度が 60～62℃になるよう加温し、60℃でさらに 5 時間保温した。

図１．甘酒の調製方法

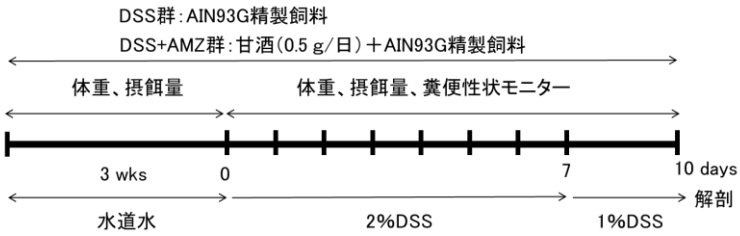
甘酒の一般成分分析には以下の方法を用いた。水分は常圧加熱乾燥法、たんぱく質は改良ケルダール法、脂質はソックスレー脂質抽出法、灰分は直接灰化法により測定した。炭水化物は差し引き法により算出した。

実験動物は 4 週齢 C57BL/6 雌マウスを使用した。マウスは日本エスエルシー株式会社より購入した。マウスは室温 22℃±2℃、湿度 50%±10%及び 12 時間の明暗サイクル（明期 7 時～19 時）の飼育環境下でプラスチックケージにて５匹の群飼とした。1 週間環境に順化させた後、マウスを 2 群に分け個別飼いとし、一方のマウス（DSS 群）には AIN93G 精製固形飼料のみを、他方のマウス（DSS+AMZ 群）には AIN93G 精製固形飼料に加えマウスの腸内環境を整えるため甘酒を 1 日当たり 0.5 g、21 日間与えた。その間、飲料水は水道水を自由摂取させた。次いで各群のマウスの飲料水を水道水から 2%DSS 溶液に切り替え、7 日間与えて急性大腸炎を惹起した。さらにその後 3 日間、大腸の炎症状態を維持するため 1 % DSS 溶液を継続投与した（図 2）。また、大腸の形態（長さ及び重量）及び大腸組織炎症関連サイトカイン濃度の参考値を得るため大腸炎を起こさせない無処置対照群（Control 群）も設けた。DSS 投与開始後からの体重、糞便性状（下痢・血便の状態）のモニター及びそれらを基にした DAI のスコア化は①の研究と同様に行った。

実験 31 日目に各群のマウスをイソフルラン吸入麻酔下に開腹し、下大静脈より採血して脱血死させ、直ちに大腸を摘出した。摘出した大腸は氷冷生理食塩水（大塚製薬（株））にて内容物を洗い出した後、長さと重量を測定し、残りの大腸組織を液体窒素にて迅速凍結し、分析に供するまで－80℃で凍結保存した。また、凍結保存とは別に病理組織学的検査を行うために DSS 群、DSS+AMZ 群及び Control 群のマウス、それぞれ 4 匹、4 匹及び 2 匹の大腸組織を 4%パラホルムアルデヒドりん酸緩衝液にて浸漬固定し、検査に提供した。

凍結した大腸組織は①の研究で示した方法と同様に処理をして、総タンパク質濃度を Bradford 法により、炎症関連サイトカイン濃度（TNF-α、IL-17A、IL-1β 及び IL-10）を ELISA 法により測定した。

マウス大腸組織切片の作製及び一般病理組織学的検査は、株式会社バイオ病理研究所（大分県国東市）に依頼した。DSS 群、DSS+AMZ 群及び Control 群のマウス、それぞれ 4 匹、4 匹及び 2 匹の浸漬固定した大腸組織を横断面にて輪切りした。輪切した組織をパラフィン包埋したのち、3 μm の厚さで薄切を行った。薄切切片はヘマトキシリン・エオシン染色（HE 染色）を施した。なお、病理組織学的検査はサンプルの詳細を知らされていない上記研究所の研究員により行われた。



・動物：5週齢C57BL/6雌マウス
・評価項目：
体重、摂餌量、糞便性状（下痢・血便）
大腸長さ、大腸組織サイトカイン濃度（TNF-α・IL-1β・IL-17A・IL-10）
大腸病理組織学的検査

図2. 実験デザイン

2）結果及び考察

甘酒の一般成分分析結果を図 3 に示した。本研究で使用した甘酒の一般成分の分析結果は、水分が 51%、たんぱく質が 3%、脂質が 0.03%、炭水化物が 45%及び灰分が 1%であった。

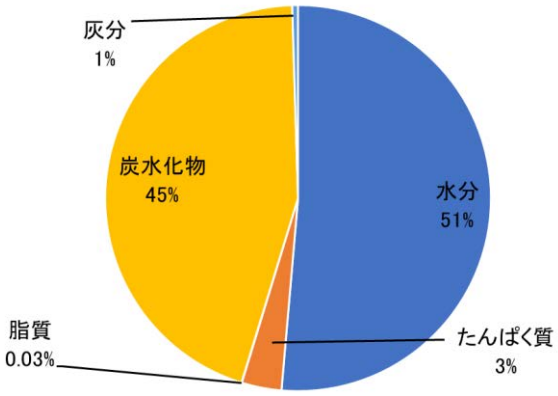


図3. 甘酒の一般成分

実験期間中の累積摂餌量は DSS 群が 70.7±1.4 g、DSS＋AMZ 群が 66.7±1.7 g で、累積熱量摂取量は DSS 群が

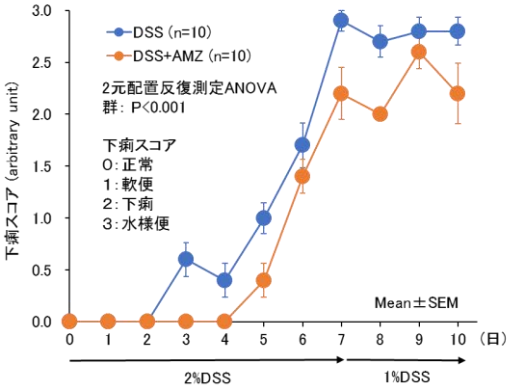


図4. 甘酒を投与したIBDマウスの下痢スコアの経日変化

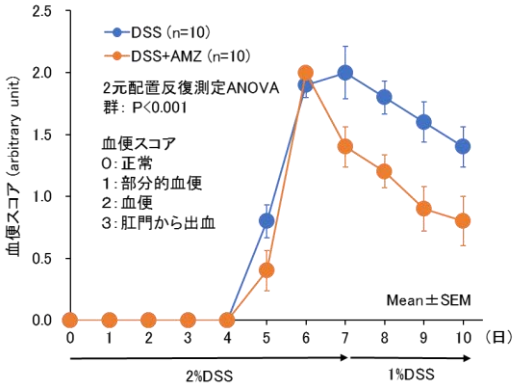


図5. 甘酒を投与したIBDマウスの血便スコアの経日変化

283.0±5.6 kcal、DSS+AMZ 群が 297±6.9 kcal で、それぞれ群間に差は見られなかった。甘酒の熱量は、一般成分分析（図3）で求めたたんぱく質、脂質、炭水化物量を基に各々のアトウォーター係数を乗じて算出した（0.96 kcal/甘酒 0.5 g）。IBD マウスの終体重は DSS 群が 17.6±0.4 g、DSS＋AMZ 群が 19.1±0.3 g であり、終体重は甘酒投与により有意に重かった（p<0.05）。

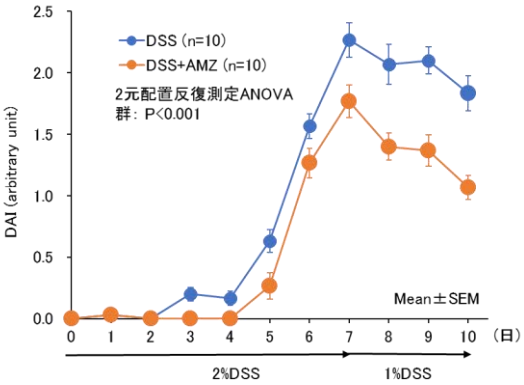


図6. 甘酒を投与したIBDマウスのDAIの経日変化

IBD マウスの下痢スコア、血便スコア及び DAI の経日変化を、それぞれ図 4、図 5 及び図 6 に示した。IBD マウスの下痢スコアは、DSS＋AMZ 群が DSS 群に比べ低値で推移し、甘酒投与により有意に下痢の症状が改善された（p<0.001）（図 4）。血便スコアの経日変化も下痢スコアの結果と同様に、DSS 群に比べ DSS＋AMZ 群において低値で推移し、甘酒投与により有意に血便の症状が改善された（p<0.001）（図 5）。また、DAI も DSS＋AMZ 群が DSS 群に比べ低値で推移し、甘酒投与により DAI の有意な改善が認められた（p<0.001）（図 6）。

IBD マウスの大腸重量に甘酒投与の影響は認められなかった。一方、IBD の発症によりマウスの大腸の短縮が認められた（Control 群 vs. DSS 群、p<0.05）。しかしながら、DSS+AMZ 群マウスの大腸の長さは DSS 群に比べ有意に長かった（DSS 群：4.75±0.17 cm vs. DSS+AMZ 群：5.90±0.23 cm、p<0.05）が、Control 群（7.14±0.17 cm）との間には有意差は認められなかった（図 7）。

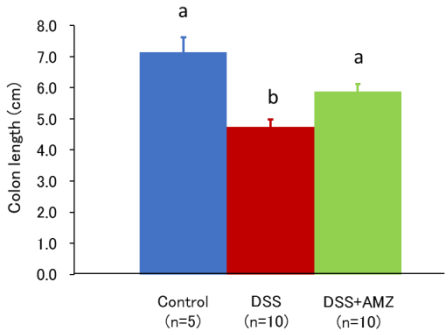


図7. 甘酒を投与したIBDマウスの大腸の長さ
数値はMean±SEMで示した。異なるアルファベットの平均値は
クラスカル・ウォリスの一元配置分散分析によりp<0.05で有意差あり。

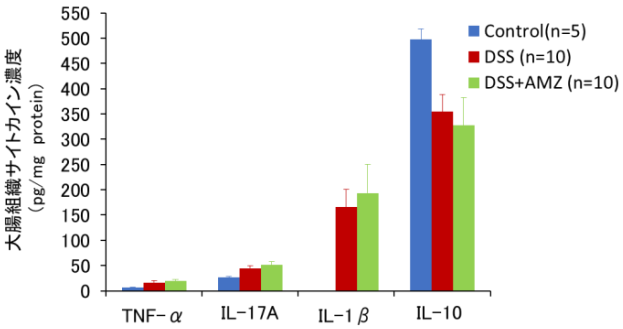


図8. 甘酒を投与したIBDマウスの大腸組織サイトカイン濃度
数値はMean±SEMで示した。

ELISA 法により測定した大腸組織炎症関連サイトカイン濃度の結果を図 8 に示した。IBD マウスの大腸組織 TNF-α 濃度及び IL-17A 濃度は、Control 群と比較して、それぞれ約 3 倍及び約 2 倍高くなった。しかし、DSS 群と DSS＋AMZ 群の TNF-α 濃度及び IL-17 A 濃度を比較すると両群間に差は見られず、甘酒投与による影響は認められなかった。また、Control 群マウスの大腸組織 IL-1β 濃度は検出限界以下であったが、 DSS 群と DSS＋AMZ 群の IL-1β 濃度を比較すると両群間に差は見られず、甘酒投与による影響は認められなかった。一方、抗炎症性のサイトカイン IL-10 濃度は、IBD マウスにおいて Control 群に比べて約 2/3 程度に低下した。しかし、DSS 群及び DSS＋AMZ 群では両群間に差は見られず、甘酒投与による影響は見られなかった。

次に IBD マウスの大腸病理組織学的検査の代表的な結果を図 9 に示した。大腸病理組織学的検査において IBD 発症により粘膜細胞の脱落の程度は DSS 群及び DSS+AMZ 群の両群間に大きな違いは認められなかった。しかし、DSS 群マウスでは炎症性細胞の浸潤が筋層にまで及び、内輪筋の断裂（←）が 3/4 例で認められたのに対し、DSS+AMZ 群マウスでは 0/4 例であった。さらに甘酒を投与したマウスにおいて腸上皮再生の亢進（→）が 3/4 例で認められたのに対し、DSS 群マウスでは 1/4 例であった。

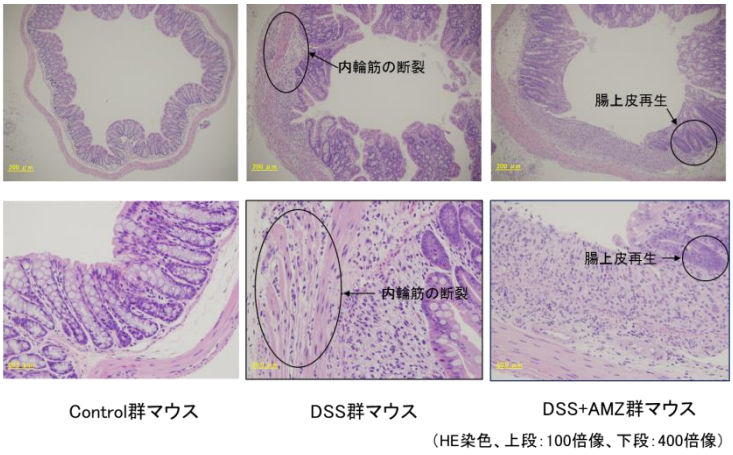


図9. 甘酒を投与したIBDマウスの大腸病理組織像

本研究の目的は、甘酒の投与により DSS 誘導性 IBD マウスの大腸炎緩和作用が認められるかを調べることであった。

通常、DSS により惹起した IBD マウスで短縮する大腸の長さは甘酒の投与によってその程度が抑制された。さらに IBD の主な臨床症状である下痢及び血便の程度が軽減され、

DAI も改善された。また、IBD マウスの大腸病理組織像では、甘酒投与マウスでは筋層への炎症性細胞の浸潤が DSS 群マウスに比べて軽度で、内輪筋の断裂が認められなかった。しかしながら、大腸組織の炎症関連サイトカイン濃度には甘酒投与の影響は認められなかった。

甘酒には、炊飯米に米麹と酒粕を混合して作製する酒粕甘酒と炊飯米に米麹のみを使って作製する麹甘酒がある。元来、甘酒と言えば麹甘酒を指していたようであるが、近年では酒粕甘酒が一般的に普及しているようである。それに並行して酒粕甘酒の機能性の評価が行われるようになってきた。マウスを使った動物実験で酒粕甘酒の肥満抑制効果や血圧上昇抑制効果が示されている。抗肥満作用については、高脂肪食負荷マウスにおいて甘酒に含まれる酒粕由来の食物繊維が便中への胆汁酸、コレステロール及び脂質の排泄量を増加させ、そのため、体重、血清中性脂肪及び総コレステロール濃度、脂肪組織の増加が抑制されることにより、抗肥満効果がもたらされたと考えられている。また、血圧上昇抑制の要因としては酒粕由来の ACE 阻害ペプチドの関与が示唆されている。その他にも甘酒に含まれるコウジ酸にはメラニン色素生成を抑制する効果や、エルゴチオネインには強い抗酸化作用によるフリーラジカル消去活性も確認されている。一方、米麹を原料とする甘酒にも麹菌が産生する様々な機能性成分が含まれている。麹甘酒の作製には麹菌を蒸米に接種して調製した米麹を使用する。蒸米に麹菌を作用させると麹菌が有する酵素（プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼなど）の作用によってそれまで蒸米にはなかった成分が約 400 種も蓄積されると言われている。それらには必須アミノ酸、複合タンパク質、グルコース、オリゴ糖、難消化性多糖類、有機酸類、ビタミン類など生理活性をもった物質が含まれている。このように甘酒はヒトに必要な栄養素を数多く含んでいることから「飲む点滴」とも言われ、疲労回復や夏バテ予防などに古来より重宝されている。さらに近年では女性の健康や美容への関心も高く、甘酒消費が拡大していると言われている。麹甘酒の代表的な機能性成分にオリゴ糖や難消化性多糖類が挙げられ、それらには腸内のビフィズス菌や乳酸菌を増やす働きがあることから腸内細菌叢の改善を介した整腸作用が期待される。

酒粕甘酒は麹菌の作用に加えて清酒酵母の作用による様々な機能性成分が相加的に含まれることから麹甘酒に比べ有用性は高いかもしれない。しかし、酒粕を使用しているため程度の大小はあると思われるが、アルコール成分の混入は避けがたいと思われる。我々は消化管粘膜に炎症が起こる IBD に焦点を当て、その症状を軽減する食品及び食品機能性成分を探索する研究をしているため被験物へのアルコール成分の混入は極力避けたいと考え、本研究では麹甘酒を使用した。マウス及びラット急性大腸炎モデルにおいて麹菌発酵穀物胚芽の有用性が報告されているものの、前述のように甘酒には様々な炎症に有効な機能性成分が含まれていることが示唆されているにも関わらず、甘酒を炎症性腸疾患に応用した報告は未だ見当たらない。今回の研究結果は、下痢、血便などの IBD マウスの主要な臨床症状が麹甘酒投与によって有意に軽減されることがわかったが、大腸組織の炎症関連

サイトカイン濃度には甘酒投与による明らかな影響が認められなかった。その理由としては、①薬剤に比べて食品や食品成分による介入ではその効果が緩やかでこのような炎症が激しい急性期大腸炎モデルではその効果をうまく検出できなかった、②さらに炎症関連サイトカイン濃度はマウスによって個体差が大きかった点、③また、炎症関連サイトカイン濃度の測定に試料として使った大腸の部位が統一できなかった点が結果に影響しているものと考えている。一方、IBD マウスの大腸病理組織像においては、無処置の IBD マウスでは、大腸粘膜下組織への炎症性細胞の浸潤が著しく、内輪筋の断裂が認められた。しかし、甘酒を投与したマウスでは、粘膜細胞の脱落範囲が大きい個体があったものの、総じて粘膜下組織及び筋層への炎症性細胞の浸潤が無処置 IBD マウスに比べて少なく、内輪筋の断裂は検査したマウスで 1 例も認められなかった。さらに甘酒投与により腸上皮再生の亢進が認められたことから、甘酒は粘膜傷害を防御する作用を有する可能性が示唆された。

３．研究成果の副次的効果、今後の計画

1）副次的効果

①の研究と同様、本研究により見出された甘酒に大腸炎軽減作用があるという知見は、作用メカニズムが明らかになった上での前提ではあるが、他の炎症に起因する炎症性疾患、例えば非アルコール性肝障害、軽度炎症が全身的に広がっていると言われている肥満症、糸球体腎炎を主徴とする慢性腎臓病（CKD）などに応用が可能かと思われる。機会があればそれら疾患モデル動物で甘酒の有用性を検討したいと考えている。

2）今後の計画

本研究において古来より日本において飲用されてきた甘酒に炎症性大腸炎を抑える可能性が示唆されたことはたいへん興味深い。これまで日常的に飲用されており、経験的に安全性も確立されている食品が、寛解と再燃を繰り返す炎症性腸疾患患者の QOL（寛解期の延長、増悪化の軽減・増悪期の短縮など）の改善の一助として臨床応用ができれば、その意義は大きいと思われる。

本研究において甘酒が急性大腸炎マウスの主要臨床症状（下痢、血便、体重減少の程度）を軽減すること、大腸炎マウスで起こる大腸の短縮を抑制することが認められた。さらに大腸病理組織学的検査結果でも甘酒を投与したマウスにおいて粘膜障害を軽減する所見が得られた。しかしながら、これらの結果と大腸組織炎症関連サイトカイン濃度の結果に一致が認められなかった。

今後は、今回の結果を踏まえて炎症症状が激しい急性大腸炎モデルではなく炎症症状が緩徐な慢性大腸炎モデルに変更し甘酒の効果を検討したい。また、大腸の炎症を抑える最適な甘酒投与量を検討する必要もある。さらに摂餌量及び摂取熱量への影響も考え無処置 IBD マウスには被検物に代わる粥など甘酒に類似する対照物を与えるなど実験系を改善し、炎症性大腸炎における甘酒の抗炎症作用を調べたいと考えている。さらに①の研究と同様に

大腸組織に浸潤したヘルパーT リンパ球やマクロファージなど免疫細胞を分離し、それら免疫細胞特有の炎症に関連するサイトカイン mRNA の発現を測定する実験系を確立して粘膜傷害の程度との関連やタイトジャンクション関連タンパク質を検出して腸管バリア機能も評価し、甘酒による大腸炎軽減作用の作用メカニズムを探索していきたいと考えている。

４．研究成果

a)原著論文

なし

b)総説

なし

ｃ)招待講演、シンポジウム

なし

ｄ)国際学会

なし

e）国内学会

１．2015 年　日本栄養改善学会九州・沖縄支部学術総会 1 件

２．2015 年　九州栄養学研究会 1 件

f)特許

なし

g)その他(学会賞、報道など)

なし

私立大学戦略的研究形成支援事業
「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」
（平成 27 年度～平成 29 年度）
研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：大分県産発酵食品製造過程における低アレルゲン化に関する基礎的研究
プロジェクトでの役割：食品中のアレルゲンタンパク質の解析

研究タイトル：①柑橘類のアレルゲンに関する研究

研究機関：食物栄養科学部　食物栄養学科　食品加工学研究室
担当者職名：教授　高松伸枝
研究協力者：近藤康人、松田幹、柘植郁哉、林毅、宇理須厚雄、田中裕、栗原和幸

１．研究の目的

柑橘類はバナナについで国内外で広く生産、消費される果物であり、大分県は温州みかんやかぼすなどのこれら柑橘類の特産地である。一方、近年食物アレルギーは増加傾向にあり、社会問題化されている。柑橘類の一種であるオレンジは、食品表示法のアレルギー推奨表示品目のひとつとなっているものの、そのアレルゲンタンパク質の研究は本邦で十分になされていない。そこで、柑橘類のアレルギーの臨床像及びアレルゲンタンパク質の解析とともに柑橘類や柑橘類加工品のアレルゲン性、安全提供のための低アレルゲン化について検討し、将来的な発酵利用による低アレルゲン化のための基礎データ蓄積を目的とした。

表１ オレンジの分類

温州みかんはミカン属（柑橘属）ミカン類に属しており、オレンジ類などと多くの交配種が生産されその種類は多い（表 1)。

一方、果物アレルギーの先行研究で明らかになっている。アレルギーのタイプは、果物そのものによって感作（経皮・経腸管）されて発症するタイプ（即時型症状)、特殊型として

果物を摂取後の運動によりアナフィラキシーを誘発するタイプ（FDEIA:食物依存性運動誘発アナフィラキシー）、また花粉による経気道感作ののちに、花粉アレルゲンとの交差反応によって発症し、症状は口腔内に限局されるタイプ（OAS、PFAS：口腔アレルギー症候群、花粉果物アレルギー候群）にわかれている。これらの症状をひきおこす既知の柑橘類（オレンジ）のアレルゲンは、下記の 3 つのタンパクが知られているが、そのほとんどが海外での症例に限られている（表 2）。

オレンジ（*Citrus sinensis*)のアレルゲン

Cit s 1　GLP　（Germin-like proteins　23~24kDa）
耐熱性　諸外国ではメインアレルゲン
Cit s 2　Profilin　(Actin-Binding Proteins　13~14kDa)
容易に変性　花粉と交差反応を指摘
Cit s 3　LTP　(Lipid Transfer Proteins　9 kDa)
耐熱性　諸外国ではAn原因タンパク

表 2 既知のオレンジアレルゲン

本研究は、日本の柑橘類アレルギーの臨床像、重症柑橘類アレルギーの症例を明らかにするとともに、柑橘類間及び花粉との共通抗原性、及びアレルゲンの特定後、加工食品を低アレルゲン化することが可能であるかについて検討を行った。患者血清の集積にあたっては、一般的に食物アレルギーの発症は乳幼児期がピークであるため、大分大学医学部、藤田保健衛生大学及び神奈川こども小児医療センター、あいち保健医療総合センター等の協力を得た。患者対象は、医療機関を受診して柑橘類摂取による明らかな既往があり、オレンジに対する特異的 IgE 抗体価が陽性の患者 12 名とした。施行可能な患者には、皮膚試験、食物経口負荷試験、舌下試験、運動誘発試験を行った。本研究の protocol は藤田保健衛生大学疫学・臨床研究倫理審査委員会の審査を経て、全患者に書面による informed consent を得た。

患者の柑橘類の特異的IgE抗体価及び皮膚試験結果

No.	Group	Age	Sex	ImmunoCAP® (UA/ml) Orange	ImmunoCAP® (UA/ml) Grapefruit	SPT Valencia orange (*Citrus sinensis*)	SPT Mikan (*Citrus unshiu*)	SPT Grapefruit (*Citrus×paradisi*)
1	OAS	6	M	3.22	4.65	2+	1+	2+
2		11	F	3.74	10.6	2+	NT	NT
3		12	F	7.3	24.5	2+	3+	2+
4		14	F	1.21	8.86	2+	2+	–
5		16	F	0.83	1.86	–	–	–
6		9	F	0.7	1.53	2+	2+	2+
7		11	F	2.59	9.72	2+	2+	2+
8		11	F	2.79	3.59	2+	2+	2+
9	FDEIA	10	F	0.85	<0.35	2+	3+	3+
10		11	M	1.07	0.92	NT	NT	NT
11		22	F	3.25	1.11	NT	NT	NT
12		15	F	2.51	2.09	2+	2+	2+

柑橘２種の抗体価間で相関（r=0.83)がみられた。
皮膚試験においても、柑橘３種間で同様の結果がみられた.

表 3　柑橘類アレルギー患者　検査結果

小児科での患者集積を中心に行った結果、発症年齢は 10 歳前後で、花粉症の発症とともに症状を誘発するケースが主にみられた。症例は、患者問診では、オレンジ類（バレンシア・ネーブル）の摂取による症状誘発エピソードが最も多かったが、ほとんどの患者は、温州みかんを含む柑橘類全般に対して症状を訴えていた（表 3）。

症状は口腔周囲（OAS 群）、あるいは食物依存性運動誘発アナフィラキシー（FDEIA 群）に分かれ、オレンジ特

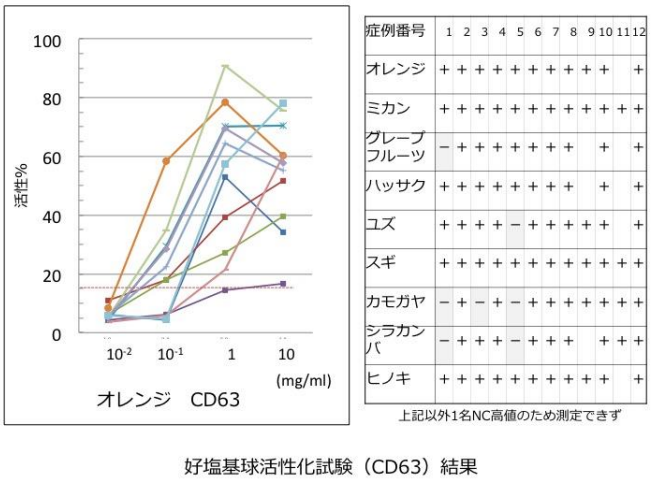


図 1 柑橘類アレルギー患者血液による好塩基球活性化試験

異的 IgE 抗体価は 0.7～3.74、皮膚試験（スキンプリックテスト）では、検査を行なった全員が 2+の陽性であった。さらに生体内での反応を検討するために、好塩基球活性化試験 (CD63/CRTH2- FITC フローサイトメトリーによる測定)を検討した（図 1）。1 名が陰性コントロール高値のために測定ができなかったが、11 名は活性化率 40～90%に及び、かつ複数の柑橘類での反応が生じていた。一般的に口腔症状は、外見から判断がしにくいことがある。主観的な症状との区別ができない場合があり、診断に苦慮することがあるが、今回の結果から、FDEIA 群、OAS 群いずれも生体内で IgE-mediated な反応が生じていることが確認でき、本試験によって柑橘類アレルギーの確定診断に役立つものと思われた。

次に症状分類 2 タイプの患者の花粉感作状況について検討した（図 2）。柑橘類アレルギー患者のほぼ全員の患者がスギ花粉に感作、もしくは自覚症状があった。タイプ別にみると、FDEIA 群は、OAS 群に比較して有意にスギ特異的 IgE 抗体価が高かった（マンホイットニーU 検定）。しかし、カモガヤ・シラカンバ花粉の感作状況をみると、FDEIA 群はほぼ感作されていなかったが、OAS 群は、カモガヤ花粉、シラカンバ花粉への感作が有意に高い傾向にあり（t 検定）、これら 2 タイプは異なった感作状況にあることが明らかとなった。この結果によって、柑橘類アレルギーの予後において、これら花粉特異的 IgE 抗体価を測定することによって、重症度の判定ができる可能性が示唆された。

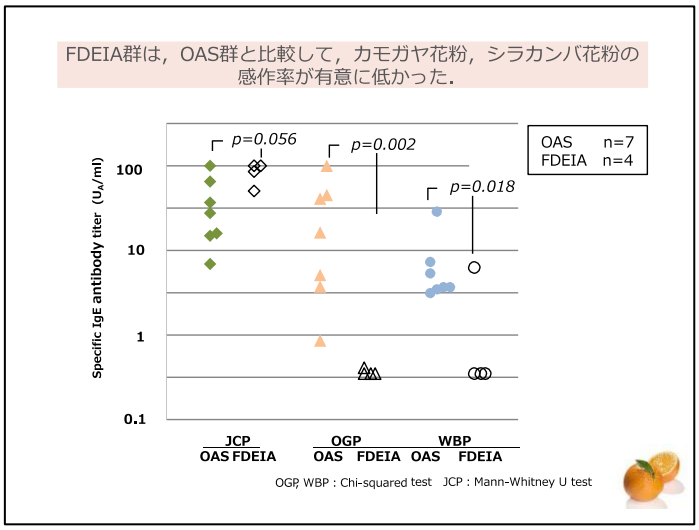


図 2　柑橘類アレルギー患者の花粉（スギ：JCP、カモガヤ：OGP、シラカンバ：WBP）特異的 IgE 抗体価の症状分類における比較

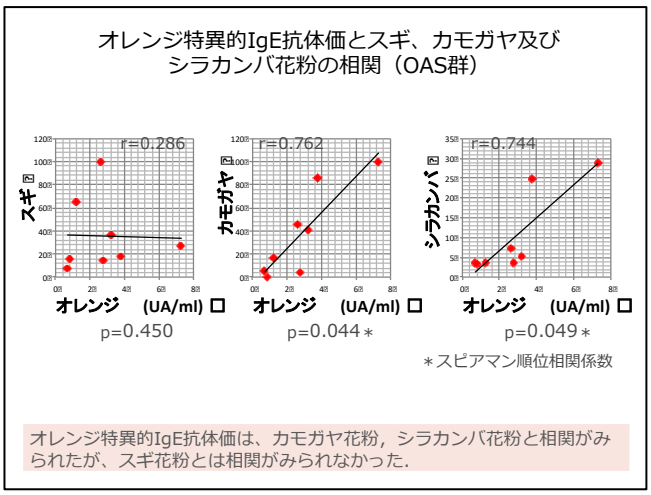


図 3 オレンジ特異的 IgE 抗体価と花粉（スギ、

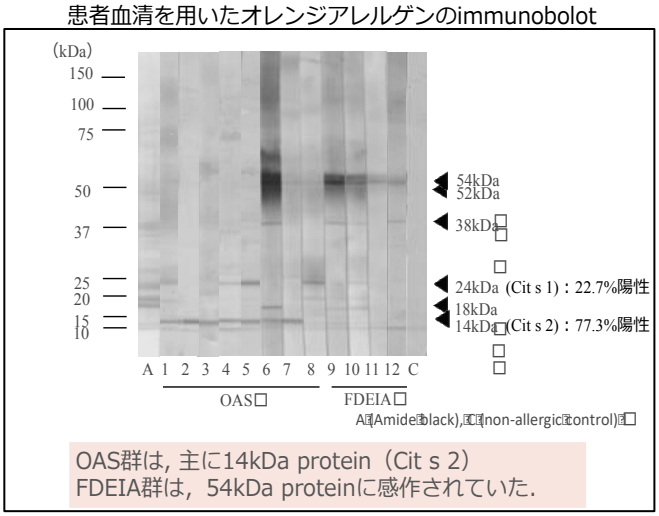


図 4 柑橘類アレルギー患者のオレンジ特異的 IgE 結合能

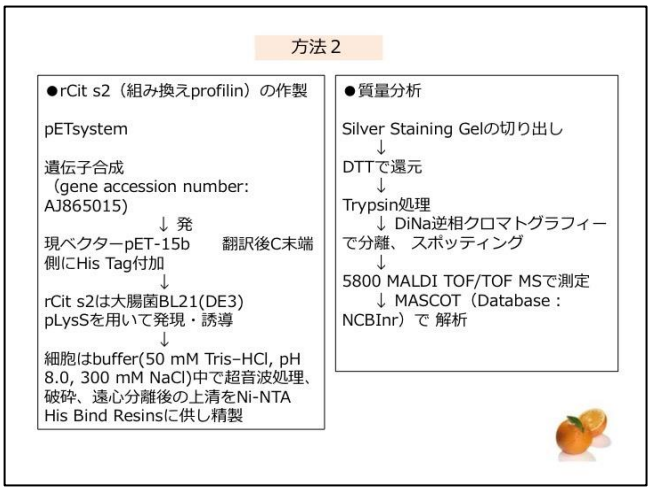


表 4 アレルゲン解析方法

OAS 群については、花粉感作との関連性が示唆されたことから、さらに、柑橘類でコマーシャルベースにおける特異的 IgE 抗体価の測定が可能であるオレンジ特異的 IgE 抗体価と、花粉特異的 IgE 抗体価の関連について検討した（図 3）。その結果、オレンジは、スギ花粉との関連はみられなかったが、カモガヤ花粉(スピアマン順位相関係数 : p=0.044)およびシラカンバ花粉(p=0.049)との関連がみられていた。したがって、カモガヤ、シラカンバ花粉とオレンジとの IgE 抗体価に何らかの関連、交差反応が生じている可能性があると考えられた。そこで、柑橘類アレルゲンの検出及び特定を行うとともに、関連性のある花粉と柑橘類アレルゲンとの関連性について検討した。まず患者血清を用いた immunoblot を行い、特異的 IgE 結合能について検討した（図 4）。症状分類 2 タイプで、結合タンパクが分かれる結果となった。OAS 群では主に 14、18、24kDa 付近で、全員が 14kDa に感作されていた。一方、FDEIA 群では、38、52、54kDa 付近に特異的な IgE 結合がみられ、特に 54kDa に共通に反応がみられた。14、24kDa は、既知のアレルゲン である Cit s1、Cit s2 と予想されたが、他のタンパク、特に FDEIA 群の 54kDa は未知と考えられたため、さらに解析を進めた。

未知のタンパクを同定することを目的として、リコンビナントタンパク（Cit s2 及び Cit s1）を作成すると

Band3 (majorなband)

1 gi|568856679 PREDICTED: enolase-like [Citrus sinensis]

Mass: 48043 **Score:** 2411 **Matches:** 26(21) **Protein sequence coverage: 65%**

1	MAITITAVKA	RQIFDSRGNP	TVEVDVTTSD	GHVARAAVPS	GASTGIYEAL
51	ELRDGGSDYL	GKGVSKAVSN	VNAIIGPALA	GKDPTEQTAI	DNYMVQQLDG
101	TVNEWGWCKQ	KLGANAILAV	SLAVCKAGAH	VKKIPLYKHI	AELSGNKNLV
151	LPVPAFNVIN	GGSHAGNKLA	MQEFMILPVG	ASSFKEAMKM	GVEVYHHLKA
201	VIKKKYGQDA	TNVGDEGGFA	PNIQENKEGL	ELLNTAIAKA	GYTGKVVIGM
251	DVAASEFYGS	DKTYDLNFKE	ENNDGSQKIS	GDALKDLYKS	FISDYPIVSI
301	EDPFDQDDWE	HYAKLTSEVG	EKVQIVGDDL	LVTNPKRVEK	AIKEKTCNAL
351	LLKVNQIGSV	TESIEAVRMS	KQAGWGVMAS	HRSGETEDTF	IADLSVGLAT
401	GQIKTGAPCR	SERLAKYNQL	LRIEEELGAE	AVYAGAKFRA	PVEPY

8 gi|568858184 PREDICTED: uncharacterized protein At5g39570-like [Citrus sinensis]

Mass: 46786 **Score:** 959 **Matches:** 9(7) **Protein sequence coverage: 34%**

1	MPYYADNDDD	VTDFDDYDPT	PYDGGYDITL	TYGRPLPPSD	ETCYPSSSAS
51	DGDFDYARPK	FSSHSEPSAY	ADEALNNEYS	SYARPKPRPG	FVPGSGGGSG
101	YGGRPQPQPA	YGIQPGMGRP	EPYGSGRSES	EYGSGYAKRP	DSQEYGSGYG
151	KRPESEEYGS	GYGRKPDSEV	YGSGYGRRPE	SGESGFGGRT	ESEYGGSAYG
201	RKPEYESGYG	QKPEYESGFG	GKPGYESGYG	SKPEFESGYG	RKPEYESGYG
251	SKPEFESGYG	RKPEYESGYG	SKHDDRSGYG	SKPHESGYGR	KPDYESGYGS
301	KPEYESGYGR	KPEYESGYGS	KPEYESGYGR	KPESEYEGGY	GGGSEYGKFE
351	RKSSHGRSDD	EEGYKKPSSY	GYERRGDDDE	YSGGSHEYGY	GRKKKDDDSD
401	DDNEKKHSRH	KHQHHHRHYD	DE		

図 5 MALDI TOF/TOF/ MS、MASCOT による アレルゲン候補タンパク

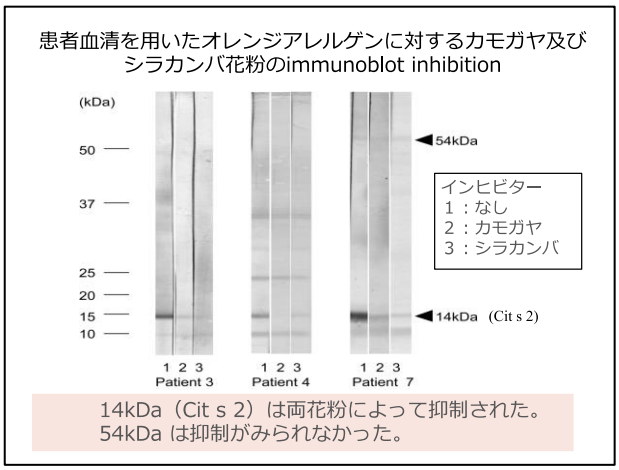


図 6 オレンジとカモガヤ、シラカンバ花粉との交差反応性

皮膚試験結果

■柑橘生果実類の全体の陽性率は48～74%
柑橘複数で陽性が多い．

■加工品の陽性率は低かった．
OAS群は無症状が多い．

■加工品は摂取しても、軽微な症状が多い．

↓

加熱によるCit s 2の変性
OAS群に対する低アレルゲン化

SPT	実施数	陽性率 (%)
オレンジ	15	74
ミカン	15	67
ハッサク	13	69
ユズ	14	57
グレープフルーツ	17	48
ミカン缶	13	23
マーマレード	13	15
オレンジジュース	13	15

表 5 柑橘類の調理・加工によるアレルゲン化

ともに、質量分析を行なった(表 4)。14、24kDa は諸外国で報告をされている既知のアレルゲン（profilin 及び germin-like proteins）であることが明らかになった。また、FDEIA 群に共通にみられた 54kDa については、質量分析の結果、enolase と推定された（図 5）。

加えて花粉症との関連性を明らかにするために、患者血清による immunoblot inhibition 法を行った（図 6）。オレンジと花粉の交差反応に関与する主要アレルゲンは profilin 等と推定され、花粉はカモガヤ、シラカンバで共通抗原性が認められた。enolase においては、交差反応はみられなかった。これまでの先行研究では、OAS を有する患者で、果物アレルゲンと交差する花粉タンパクにはシラカンバ花粉が報告されてきているが、原因となる食物（果物）はバラ科果物が挙げられていた。しかし今回の結果から、柑橘類においても交差反応が認められたことが明らかとなった。さらに、国内に広く自生するカモガヤ花粉においても、柑橘類アレルギーを有する患者の一部においては、交差反応が生じることが明らかとなった。

原因アレルゲン の Cit s2 (オレンジ profilin)および Cit r2 （ミカン profilin）は、熱により容易に変性することが知られている。そこで調理・加工による低アレルゲン化の可能性を考え、まず、柑橘類加工品を用いた患者皮膚試験（スキンプリックテスト）を行った。柑橘生果実類の全体の陽性率は 48～74%であり、患者個人で複数の柑橘類（オレンジ、ミカン、ハッサク、ユズ、グレープフルーツ）にわたり陽性となったが、加工品（ミカ

ン缶詰、マーマレード、オレンジジュース）の陽性率は生と比較して低かった。また食物経口負荷試験においても、9 割は摂取可能な患者で、症状があってもごく軽微な症状におさまっていた。したがって、profilin 感作の患者においては、加熱処理によって、ある程度は柑橘類を摂取できることが明らかとなった（表 5）。

最後に上記患者群とは別に、温州みかんで FDEIA を発症した 1 例を報告した。症例は 12 歳女児。家族歴は父・母：特記すべき事項なし。兄はアレルギー性鼻炎，気管支喘息。既往歴：アレルギー性鼻炎。現病歴：海鮮ピザを摂取した後、走って帰宅中に足に膨疹が出現した。膨疹は全身に拡大し、咳嗽・呼吸苦も出現したため以前に処方されていた抗ヒスタミン薬を内服して近医を受診した。受診時、全身の膨疹・呼吸苦に加え，78／46mmHg と血圧低下を認めたため、アナフィラキシーショックと判断し、アドレナリン筋注とステロイドの全身投与の処置を行って症状は軽快した。経過から食物依存性運動誘発アナフィラキシーが疑われたため、症状誘発時に摂取していた卵，乳，小麦の除去が開始され、また症状誘発時に備えエピペンが処方された。その後、原因食物の精査を目的に病院へ紹介となった。以前にも給食摂取後の食物摂取後の運動負荷によるアナフィラキシー症状を繰り返したため、FDEIA を疑い原因食物の精査を行った。症状誘発時に摂取頻度の高かった卵・乳・大豆と、原因食物として頻度の高い小麦について、それぞれの食物摂取後の運動負荷試験を施行したが全て陰性であった。運動負荷試験前に温州みかん摂取単独では症状が誘発されないことを確認した。ASA（サリチル酸）を併用した運動負荷試験で膨疹、喘鳴、血圧低下などのアナフィラキシー症状が誘発され、温州みかんによる FDEIA と診断された。症状誘発時に温州みかんを摂取していないエピソードが 2 回あったが、症状誘発時に食事を摂取した店に確認したところシーフードサラダに使用していたドレッシングにレモンが含まれていることが判明した。またもう 1 回のエピソードでは給食の献立からポンカンを摂取していることがわかった。

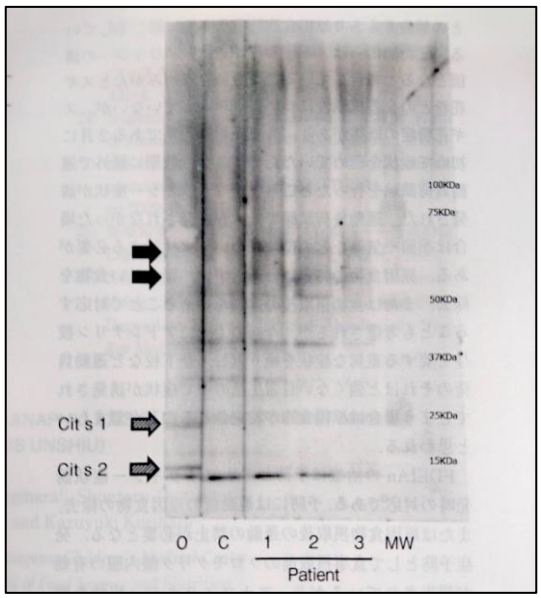


図 7 温州みかん FDEIA 患者の IgE 結合能

多数の柑橘類で SPT 陽性を示したため、柑橘類の完全除去を指示したところ、それ以後アナフィラキシー症状は認めていない。本症例の immunoblot（ImageQuant による ECL 検出）においても、50–60kDa 付近に特異的な IgE 結合が認められた（図 7）。

３．研究成果の副次的効果と今後の計画

食品表示法では、オレンジは特定原材料に準ずる食品であり表示を推奨されている。しか

し対象となる食品は、バレンシアオレンジ、ネーブルオレンジなどのオレンジ類に限られている。温州みかんやグレープフルーツ、レモンなどの他の柑橘類は対象外であるため、アレルギーがあっても、加工食品中の柑橘類を完全に回避することは難しい。このように profilin 感作の患者の場合には、交差反応によって広く植物性食品に症状をきたす可能性があることに留意すべきである。profilin を有する植物性食品のアレルゲン性については、柑橘類と同様の傾向を示すと予想され、他食品の研究への応用（副次的効果）が期待される。

今後の計画は、柑橘類の加熱による低アレルゲン化の可能性がみいだされたことから、水煮、蒸し、加熱殺菌、電子レンジ加熱、あるいは調理済み食品、ジャムやソース、缶詰製品などのアレルゲンを定量し、アレルギー対応食品の継続検討を行うとともに、患者血清及び経口負荷試験による反応評価を行ないたい。また、最近は花粉症の交差反応による果物アレルギー（花粉果物アレルギー症候群）の増加が指摘されており、これらの関連性と花粉免疫療法による果物アレルギーの改善例みられることから、これらのメカニズムにおいても、抗原特異的 IgE、IgG4、好塩基球活性化試験によって明らかにする予定である。

研究タイトル：②食物アレルギーの自然歴に関する研究

研究機関：食物栄養科学部　食物栄養学科　食品加工学研究室
担当者職名：教授　高松伸枝
研究協力者：久保田優、藤森安里、樋園和仁

１．研究の目的

日本では食物アレルギー（FA）の罹患が増加傾向にある。東京都 3 歳児全都調査によれば、平成 11 年度は 7.1%であったものが、平成 26 年には 16.7%と増加している。食物アレルギー患者実態については、厚生労働科学研究班による医療機関に受診した患者の全国調査で、乳児約 10%、3 歳児 5%、学童以降が 1.3~2.6%とされている。しかし、これまでの全国調査は専門医の常駐する医療機関に受診者のみを対象としたもので、一般人を対象とした調査はみあたらない。そこで今回は、一般大学生を対象として食物アレルギー及びその関連疾患の自然歴を検討し、今後アレルギー対応の商品開発のための資料とすることを目的とした。

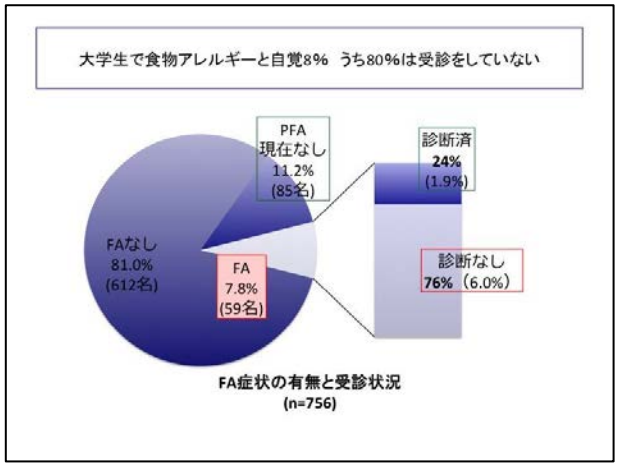


図１ 調査対象の背景

２．研究内容

奈良県及び大分県在住の大学生 768 名を対象に、自記式の集団調査法を行った。回収率は 98.0%、年齢は 20.19±1.35 歳であった。質問は、アレルギー疾患の有無、アレルギーの種類（花粉症の有無）、症状、既往歴、原因食物、軽快もしくは寛解時期などとした。結果は、エクセル統計にて集計し、χ^2 検定を行なった。

アレルギー疾患の既往のある者は全体の 52.4%であり、花粉症が 29.6%を占めていた。

アレルギー疾患のうち食物アレルギーをみると、現在食物アレルギーと思われる症状をもつものが 7.8%、以前は食物アレルギーであったが、現在は症状がないものが 11.2%いた。現在食物アレルギーがあるもののうち、医師からの診断があったものが 24%（全体の 1.9%）で、そのほかは医療機関を受診せずに、自己判断で自覚症状があると答えていた（図 1）。次に、過去に FA 症状があり寛解したと答えた者を PFA 群、現在 FA 症状があると答えた者を FA 群として比較検討を行った（表 1）。FA 群の中で診断を受けていた者は 23.7%であった。PFA 群の原因食物は鶏卵 39.4%、甲殻類 1.9%、魚類・乳類 11.7%で、症状は、口腔周囲のかゆみを訴えるものが最も多く、次に皮膚症状を呈していた。中には全身症状を経験したものも 3%程度存在した（図 2）。

PFA 群の初発頻度は 0 から 12 歳まで漸増するも、寛解する者も 2～3 歳頃から徐々に増え、15 歳までに 62.7%に達した。一方 FA 群の原因食物は甲殻類 30.5%、果物類（キウイ 23.7%、メロン 13。6%）などで口腔周囲の症

大学生アレルギーの原因は、甲殻類、果物（キウイ、メロン）が多い

原因食物		(複数回答)	
PFA n=94		FA n=59	(%)
鶏卵	39.4	甲殻類	30.5
甲殻類	14.9	キウイフルーツ	23.7
乳・乳製品	11.7	メロン	13.6
魚類	11.7	鶏卵	11.9
キウイフルーツ	5.3	乳・乳製品	10.1
そば	4.3	魚類	10.1
小麦	4.3	すいか	6.8
メロン	4.3	柑橘類	6.8
その他	38.3	その他	61.0

表 1 食物アレルギー発症時期別の原因食物の頻度

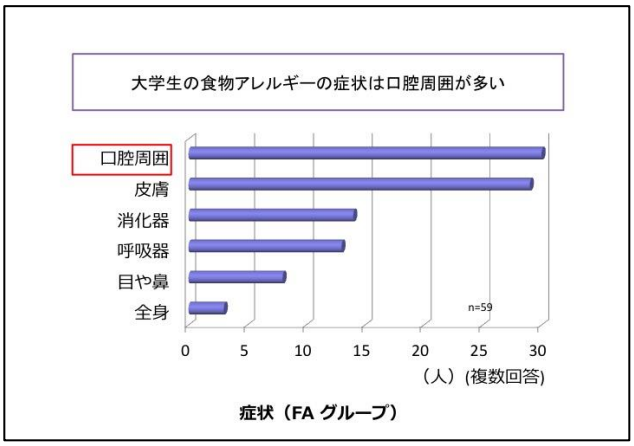


図 2 食物アレルギーの症状別頻度

現在の食物アレルギーは学童期以降に発症する者が多い

発症と寛解時期 (%)

years old	発症(PFA) n=94	寛解(PFA) n=94	発症(FA) n=59
0	6.4	-	3.4
1	10.6	-	0
2-3	18.1	8.5	10.2
4-6	16.0	19.1	11.9
7-11	27.7	19.1	25.4
12-14	5.3	16.0	25.4
15<	16.0	37.2	23.7

表 2 食物アレルギーの発症と寛解時期

状が多かった。柑橘類は 6.8%であった。FA 群の発症時期は 6 歳以降が 74.5%を占めており、幼児期にはこれら原因食物が摂取可能であったが、小学校入学以降に、症状を訴えてきた様子がうかがえた（表 2)。

３．研究成果の副次的効果、今後の計画

今回の調査では、全国調査と比較して PFA、FA 群ともに小麦の頻度が低く（＜5%)、花粉症のある者は有意に果物の発症頻度が高かった(χ^2検定 $p<0.0001$)。FA の自覚症状があっても未受診の者が受診者の約 4 倍存在し、これまでの調査に反映されない潜在的な患者が存在することが示唆された。今後花粉症の増加にともなって、花粉果物アレルギー症候群（PFAS）の罹患率も増加すると懸念されるため、これら患者をターゲットとした新規食品開発への副次的な方向性も考えられた。

最近ではべにふうき茶など花粉症の緩和を目的としたハーブティーの商品販売が行われている。また基礎分野ではアレルギー疾患と腸内細菌叢の関連性の検討もなされている。今後はヨーグルト製品等発酵食品の機能性、商品開発についても検討する計画である。

研究タイトル：③ビールアレルゲンに関する検討

研究機関：食物栄養科学部　食物栄養学科　食品加工学研究室
担当者職名：教授　高松伸枝
研究協力者：近藤康人、柘植郁哉、有田孝司

１．研究の目的

一般に味噌、醤油などの発酵食品は、発酵・熟成によるタンパクの分解、アミノ酸の生成とともに、原料のアレルゲンが減少、消失が知られているが、発酵飲料であるビールにおいては、アレルギーの症例報告が諸外国でなされている。本邦ではあまりなされていず、今回ビールによるアナフィラキシー症状を来した症例について検討した。

２．研究内容

症例は、2011 年 5 月お好み焼きとビールを摂取後、両上腕部に小発疹が出現。2012 年 3 月、夕食 18 時頃、つけ麺摂取とワイン、ビールを摂取中に体の痒みと発疹を自覚。19 時頃ピザとスパゲティ、ワインを摂取し、痒みと発疹が継続。会計に行く途中に耳鳴りと酸素が少ないと感じた後、意識消失、救急受診した。これまでにアレルギー疾患の既往はなかった（表 1)。

症　例

症例：51歳女性

●エピソード

2011年5月　お好み焼きとビールを摂取し，両上腕部に小発疹が出現。

2012年3月　18時頃つけ麺とワイン、ビールを摂取中に体の痒みと発疹を自覚。19時頃、ピザとスパゲティ、ワインを摂取。痒みと発疹が継続。会計に行く途中に耳鳴りと息のしにくさを感じ、意識消失。（1～2分）

2012年4月　18時頃トンカツとビールを摂取。ビールを2口飲んだ後、口周囲の腫れるような感じを自覚し、抗ヒスタミン剤を服用したが、顔・首・指まで発疹が出現。少し息苦しさがあったが、翌日は発疹消失。負荷試験入院。

表 1 ビールアレルギー患者のエピソード

写真 1 ビール摂取後の患者写真
口唇の腫脹と口腔周囲の発赤

検査項目として測定可能な特異的 IgE 抗体価の大麦、麦芽、ビール酵母等で陰性、スキンプリックテスト陰性。食物経口負荷試験では、ビール A を 160ml 負荷で、頸部、上背部、上腕、下腹部に蕁麻疹が出現した（写真 1, 表 2）。血圧は蕁麻疹出現時 172/95 で d－クロルフェニラミンマレイン酸塩 0.5A 静注。同時摂取したお好み焼きとビール B の同時摂取、およびビール B、C の各 160ml 単回摂取、赤ワイン 100ml 単回摂取を行ったが症状誘発なく、ビール A に含まれる何らかの成分によるアナフィラキシーと診断され、ビール A の摂取を中止したのちは症状の誘発はみられていない。

原因となる抗原タンパク質の同定を目的として、SDS-PAGE、immunoblot、及びアミノ酸配列分析を行なった。ビール抽出物と患者血清のイムノブロット結果では、45kDa 付近に患者血清との特異的な IgE 結合がみられた（図 1）。また本 band のアミノ酸配列（島津製 PPSQ-30）は DENQSTHGAYRCMVPWFKIL と決定されたが、タンパク質の特定には至っていない。

検　査（2012年3月14日）

・特異的IgE抗体価
（Immuno CAP）

ω5グリアジン　豚肉
ヤケヒョウダニ　ビール酵母
ハウスダスト1　グルテン
カンジダ　カカオ
小麦
アーモンド
エビ
すべて　0.34UA/mL以下

・食物経口負荷試験

1日目
Aビールのみ摂取
10mlから160mlあで30分毎負荷。
5分後に口周囲、頭、肩の痒み。
160mlで全身蕁麻疹出現。

Bビールのみ及びBビールとお好み焼き負荷で誘発症状なし。

2日目
Bビール、ワイン、Cビール160ml負荷で症状なし。
Aビール160ml負荷で全身蕁麻疹。

表 2 ビールアレルギー患者の検査結果

これまでビールのアレルギーに関する文献の多くは、欧州で報告されており、大麦抽出物による反応が原因とされている。Figueredo らは麦芽、大麦抽出物に 31-56kDa 間で数種、かつビール抽出物で 38kDa、Fernandez-Anaya らは、ビールおよび大麦において 44kDa に特異的 IgE 結合タンパク質を検出した。García らは、大麦特異的 IgE 抗体価が陽性の患者で、ビール中 9kDa の脂質輸送タンパク質 1（LTP1）と 45kDa の Z4 大麦タンパク質（セルピン）の両方を同定している。日本の症例報告では、主抗原は 20～25kDa のタンパク質であった。

日本におけるビールの原料は、酒税法にて麦芽、ホップ、コメ、トウモロコシ、デンプン、

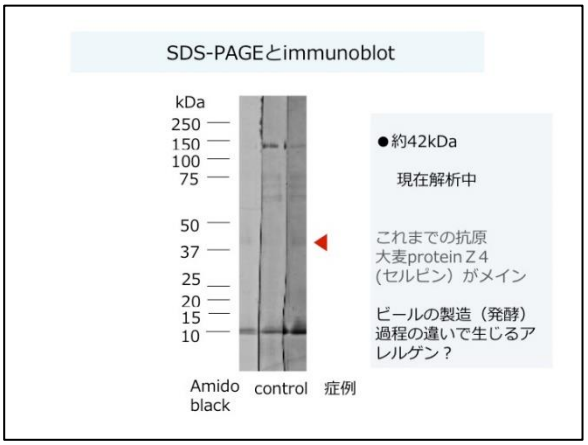


図１ ビールアレルギー患者の IgE 結合能

糖類の使用が認められている。原料の大麦やホップの多くは輸入品であり、ビール製造各社によって、用いる原料品種や配合割合も異なっている。製法は、発芽大麦を焙燥後に糖化、さらにホップを加えて煮沸し、各社独自のビール酵母を加えて発酵、熟成後製品化する。主原料の大麦や麦芽には、アレルゲンであるプロテインＺ型が最も豊富に含まれ、LTP と同様、加工処理に安定なタンパク質であるため加工品においても反応性が高いとされている。今回の症例の原因タンパク質は、イムノブロットにおける IgE 結合タンパク質の分子量から推定してプロテインＺ型セルピンが示唆されたが､先行研究の症例とは異なる病態もあることから、原料や酵母の違いや発酵過程による特定の分解産物の可能性、あるいはアミノ酸配列が特定できない一因として異なる耐熱性タンパク質の重複も考えられた。

３．研究成果の副次的効果、今後の計画

代表的なアルコール発酵飲料であるビールアレルギーに関する研究は、本邦ではこれまでほとんどなされていない。アレルゲンの解析結果は、患者への指導資料として副次的に活用可能である。

今後は、ビールアレルゲンの解析を継続して行う。大麦・ホップ由来、あるいは発酵・熟成中に生じる成分等を明らかにし、ビール特異的なアレルゲンを含まない製品管理のための資料提供が可能である。ひきつづき N 末端アミノ酸配列解析を進めるとともに、2D-Western blotting による分析、検討を続けたい。

４．研究成果

a)原著論文

１．小野倫太郎、本村知華子、高松 伸枝、近藤 康人、赤峰 裕子、松崎 寛司、村上 洋子、網本 裕子、田場 直彦、本荘. 哲、柴田瑠美子、小田嶋 博：オレンジによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーの１例、アレルギー、2015, 64(2)149-154.

２．高松伸枝、近藤康人、是松聖悟：患児と家族の食の QOL を考慮した食物除去と解除の支援、日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌, 2015, 13(3)249-253.

３．＊Fujimori A, Yamashita T, Kubota T, Saito H, Takamatsu N, Nambu M.：Comparison of the prevalence and characteristics of food hypersensitivity among adolescent and older women. APJCN，2016, 25(4)858-862.

４．＊高松伸枝、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄：オレンジアレルギー患者血清を用いた

柑橘類の交差抗原性の検討、藤田学園医学会誌、2016, 39(1)51-53.

５．＊Takamatsu N, Kondo Y, Tsuge, I, Nakajima Y, Naruse, N, Tanaka K, Inuo, C, Hayashi T, Matsuda T, Yoshikawa T, Urisu A.：Study of Cross-Reactivity Between Citrus Fruit and Pollen Allergens in Oral Allergy Syndrome and Food-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis in Japan. The Fujita Medial Journal, 2016, 2(1)6-11.

６．Narabayashi N, Okafuji I, Tanaka Y, Tsuruta S, Takamatsu N.：Anaphylaxis caused by casein used in artificially marbled beef: A case report. Allergology International, 2016, 65, 341-342.

７．＊田中裕、松原麻理恵、津曲俊太郎、高松伸枝、栗原和幸：温州みかんによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーの 1 例、アレルギー、2017, 66 (8)1011-1015.

８．＊高松伸枝、有田孝司、近藤康人：ビール摂取によるアナフィラキシーと診断された一例、別府大学大学院紀要、印刷中.

９．近藤由理、高松伸枝：食物アレルギー対策事業のニーズに関するアンケート調査、別府大学紀要、印刷中.

b）総説

１．高松伸枝：集団給食における食物アレルギー児への対応の現状、チャイルドヘルス、2015, 17(10)9-12.

２．高松伸枝：日本の伝統食品うるか、食品と容器、2015, 56, 482-485.

３．西間三馨他：アレルギーの子どもの学校生活、慶應義塾大学出版会、2015, 158-176.

４．長浜幸子他：実践臨床栄養学実習、第一出版（株）、 2016, 58-72.

５．宇理須厚雄他：加工食品のアレルゲン含有量早見表 2016、平成 27 年度消費者庁政策調査費、2016.

６．宇理須厚雄他：食物アレルギーの子どものためのレシピ集、(独)環境再生保全機構、2016.

７．宇理須厚雄他：食物アレルギーひやりはっと事例集 2015、平成 27 年度消費者庁支出委任費、2016.

８．大分県医師会：学校・幼稚園における食物アレルギー対応の手びき大分県版、2016.

９．宇理須厚雄他：加工食品のアレルゲン含有量早見表 2017、平成 27 年度消費者庁政策調査費、2017.

１０．宇理須厚雄他：食物アレルギーひやりはっと事例集 2017、平成 28 年度消費者庁支出委任費、2017.

１１．＊高松伸枝、近藤康人：花粉症と関連する食物アレルギー、栄養、2017, 24, 224-228.

１２．日本小児難治喘息アレルギー疾患学会：食物アレルギーレシピ集、2018.

１３．海老澤元宏他：食物アレルギーの栄養食事指導の手引き 2017、厚生労働科学研究費、2018.

１４．＊高松伸枝：食物アレルギーの栄養食事指導、日本栄養士会雑誌、2018, 61, 6-9.

１５．高松伸枝他：食物アレルギーお弁当 ABC、第一出版（株）（印刷中）

１６．＊海老澤元宏他：食物アレルギーの栄養指導、医歯薬出版（株）（印刷中）

c)招待講演、シンポジウム

１．＊高松伸枝：臨床現場からみる食物依存性運動誘発アナフィラキシー（FDEIA）、日本体力医学会シンポジウム 11、2017 年 9 月 17 日（松山大学）松山市

２．高松伸枝：食物アレルギーに関連した栄養士・管理栄養士認定制度における PAE の関わり、日本小児アレルギー学会 エデュケーター企画　2017 年 11 月 18 日（ホテル東日本）宇都宮市

３．高松伸枝 : PAE 過疎地域でのちいさな活動、日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会ワークショップ、2017 年 7 月 23 日（ピアザ淡海）大津市

d)国際学会

１．＊Takamatsu N, Fujimori A, Nagai A, Kubota T, Tezono K. ：Past and Present Symptoms of Food Allergy in University Students , The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism(ESPEN), 2015.

２．Narabayashi N, Okafuji I, Tanaka Y, Tsuruta S, Takamatsu N. ：Individuals Allergic to Cow'sMilk Should be Vigilant When Consuming Beef Because It May be Injected Beef. XXIV World Allergy Congress (WAC 2015), 2015.

e)国内学会

１．2017 年　日本小児臨床アレルギー学会 3 件、日本アレルギー学会 2 件、日本小児アレルギー学会 2 件、日本栄養改善学会 1 件、西日本小児アレルギー研究会 1 件

２．2016 年　日本小児アレルギー学会 1 件、日本栄養食糧学会 1 件、日本栄養改善学会 1 件、日本小児科学会 1 件

３．2015 年　日本アレルギー学会 2 件、日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会 1 件、日本栄養改善学会学術総会 1 件、日本小児アレルギー学会 2 件

f)特許

なし

g)その他（学会賞、報道など）

なし

私立大学戦略的研究形成支援事業
「発酵王国大分が育む地域農水産物を活用した新規加工・発酵醸造食品の高次開発・分析技術基盤の構築」
（平成 27 年度～平成 29 年度）
研究成果最終報告書

プロジェクトでの研究課題：発酵食品の生体への影響
プロジェクトでの役割：発酵食品の予防医学への寄与

研究タイトル：①発酵大麦エキスの新規機能性の探索

研究機関：食物栄養科学部　食物栄養学科　感染・代謝免疫学研究室
担当者職名：教授　仙波和代
研究協力者：新名宏二（株式会社ゆふ・は）、岩瀬伸子（明礬温泉　岡本屋）
丸岡生行、外薗英樹（三和酒類株式会社　三和研究所）、米元俊一（別府大学）

１．研究の目的

焼酎の製造に伴って、蒸留工程後に焼酎蒸留粕が排出される。この焼酎蒸留粕には高濃度の有機物が含まれているため、長年処理は困難とされ海洋投入が行われてきた。しかし 1997 年、ロンドン条約を背景とする改正海洋汚染防止法の制定により、焼酎粕の海洋投棄が全面禁止となった結果、海洋投入から焼却やメタン発酵といった陸上処理へと移行してきた。一方、焼酎蒸留粕には豊富な糖類、ミネラル、タンパク質などが含まれているため、その有効利用を目的とした研究開発が盛んに行われている現況がある。これまでも別府大学は「発酵大麦エキス・アルコケアのマウス腸管免疫活性化作用」の報告などを行ってきている。本研究では発酵大麦エキスのメタボローム解析を行い、現在までに報告されている発酵大麦エキスの機能をふまえながら考察を行った。

２．研究内容

【実験方法】

株化樹状細胞(JAWS II 細胞：ATCC より購入)を 5 x 10^5 個 / well にて 6 ウェルプレートに播種し、24 時間後にアルコケアを 5%濃度になるように添加した。48 時間後に細胞培養上清を回収し、メタボローム解析を行った（HMT ; Humna Metabolome Technologies 山形県　に委託）。メタボローム解析とは「代謝物質の種類と濃度を網羅的に分析・解析する手法」のことであが、疾病や環境要因の変化に伴い、どの代謝系が動き変化をするのか分析する手法のことである。

【結果・考察】

今回のメタボローム解析の結果、2 つの産物において差が認められた（図 1)。アルコケア添加培地ではグルコース-6-リン酸(G6P)量が多くなっていた。これはアルコケア中にグルコース量が多く存在していたからであるが、アルコケア由来の G6P の多くがペントースリン酸系に利用されていることが、リブロース 5 リン酸(Ru5P)の増加より推定できる。ペントースリン酸経路は最終的には核酸や脂肪酸の合成と関わっているが、1 分子の G6P から 1 分子の CO_2 と 2 分子の NADPH が生成される。生成された NADPH の機能は多くの報告が既に教科書にも記載されており、脂肪酸合成、過酸化物の無害化（抗酸化作用)、過酸化水素生成と処理（殺菌)、p450 酵素による解毒、NHDPH オキシダーゼでスーパーオキシドをつくり細菌を破壊する、NO 産生などがあげられる。アルコケア添加ではこれら全ての作用が亢進していると推定できる。本稿では、本研究結果について、NADPH の抗酸化作用、NO 産生機能、そしてこれまでの研究報告を交えながら考察を加える。

現在までに報告されているアルコケアの肝障害抑制メカニズムは、①アルコール摂取によって亢進した細胞内 NF-κB を抑制することで、炎症性サイトカインの産生を低下させる、②アルコール摂取により発生した活性酸素を消去する、の 2 つであるが（図 2 参考)、どのようなメカニズムで活性酸素を除去しているのか詳細が不明のままであった。今回のメタボローム解析の結果、アルコケアはペントースリン酸経路を活性化させることにより、NADPH を産生させ、活性酸素を消去することが解明された。NADPH は酸化グルタチオンを還元型に変換するが（図 3 参考)、この還元型グルタチオンは、自らが酸化型グルタチオンになることにより、強力に活性酸素種を還元し消去する。

また本研究チームでは、アルコケアをマウス脾臓細胞に添加すると IL-6 が低下することを既に報告している。IL-6 は Th2 細胞から産生されるサイトカインの 1 つである。免疫系には古典的なヘルパーT 細胞(Th)の概念として Th1/Th2 バランスが存在しているが、Th1 は IL-12 によって誘導され細胞性免疫を活性化し、Th2 は IL-4 によって誘導され液性免疫を活性化させる。このバランスは免疫系の制御に深く関与している（図 4 参考)。アルコケアは IL-6 を低下させることから Th2 応答を低下させ Th1 応答優位の免疫状態にしている。

本研究に使用した細胞は免疫系の中枢である樹状細胞であるが、アルコケア添加によりペントースリン酸経路が活性化し、NADPH が産生され、Th1 系物質である NO も産生が亢進したと考えられる。NO はアルギニンに NADPH が作用することにより生じるガス性セカンドメッセンジャーであり、微生物の感染において強力な防御物質として機能している。これまでも発酵系食品には Th2 を抑制しアレルギー症状を改善するという報告があったが、本研究結果からも同様の Th1 応答優位（Th2 応答低下）を示唆する結果を得ることができた。

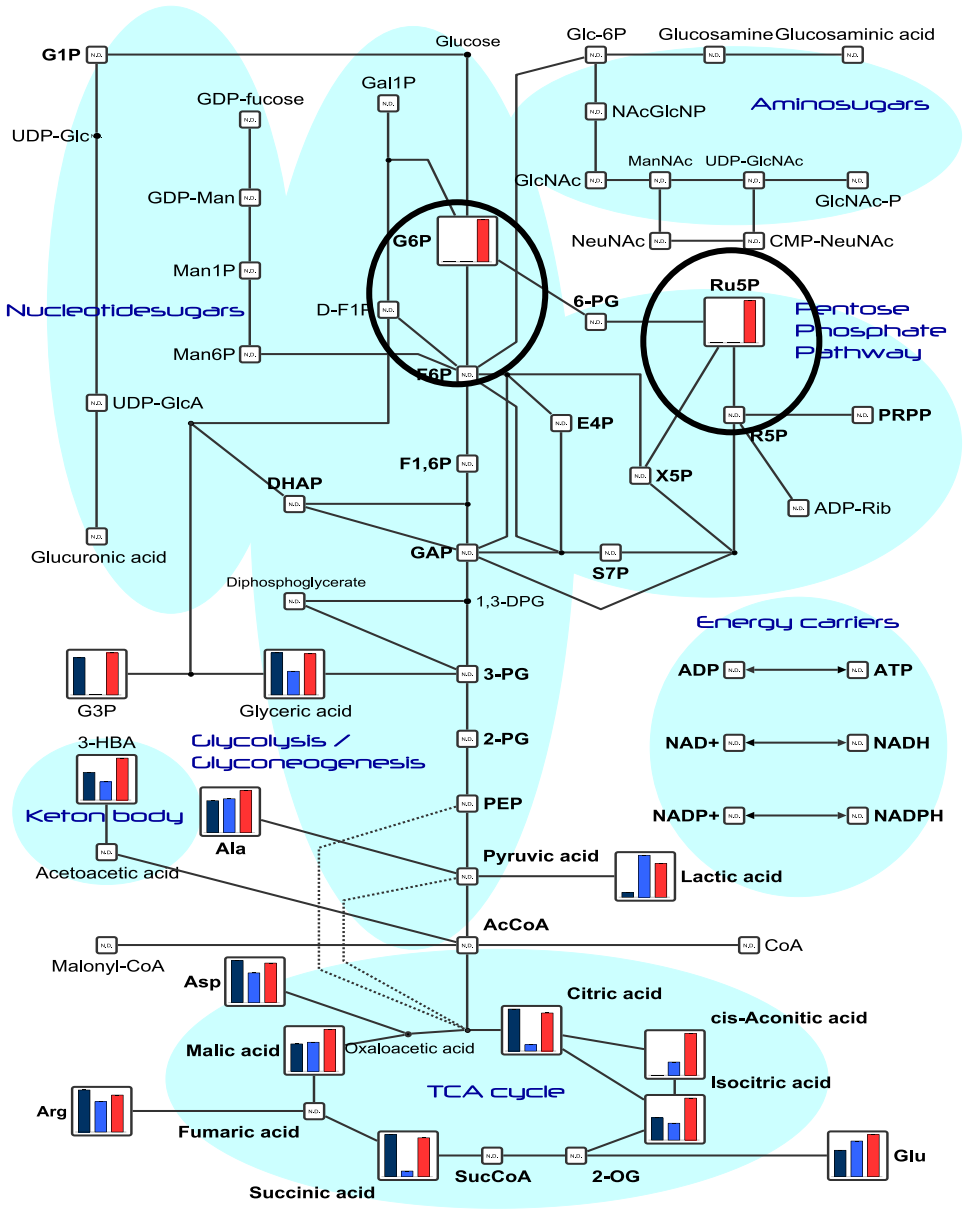


図 1：メタボローム解析の結果、差が認められたグラフ（○）とその代謝経路
棒グラフ左；アルコケア添加培養液
棒グラフ中央；細胞培養液
棒グラフ右；アルコケア添加細胞培養液

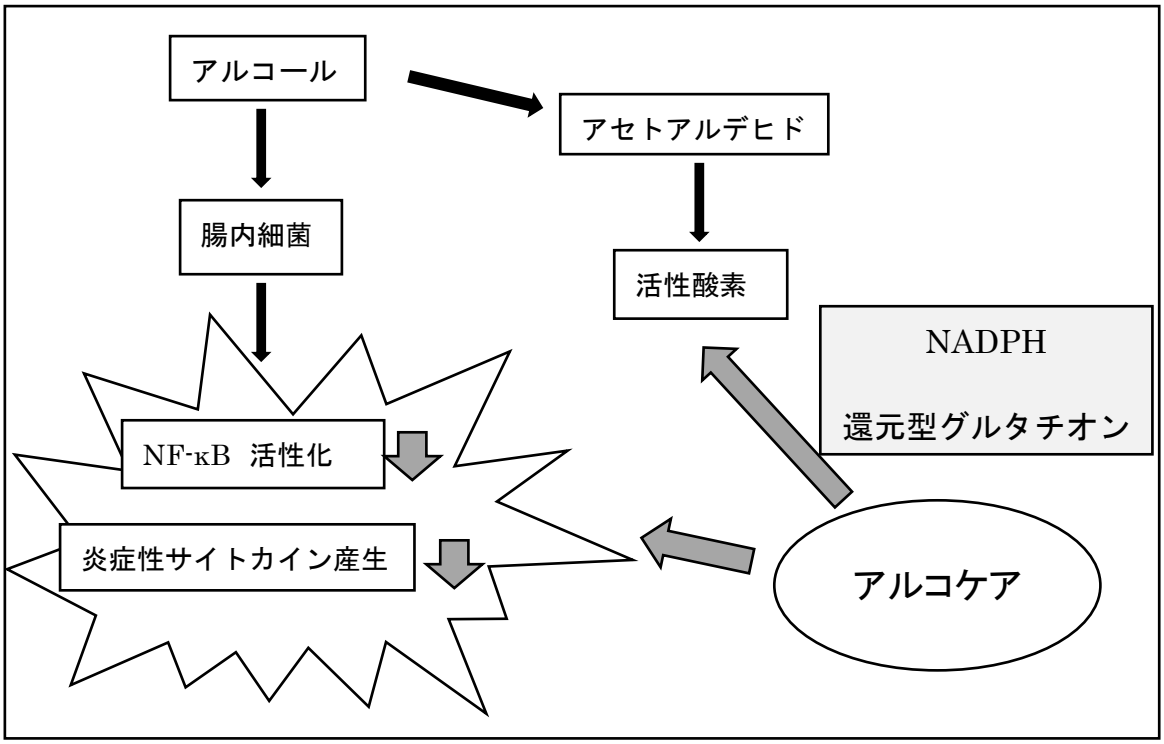


図２．アルコケアの肝障害抑制作用（三和酒類株式会社　提供）

アルコール摂取により、腸内細菌はマクロファージの TLR4 を介し NF-κB を活性化し、炎症性サイトカインの産生を促す。アルコケアはマクロファージ内の NF-κB 活性化を抑制することにより、炎症性サイトカインの産生を制御している。またアルコールは活性酸素を作り肝細胞にダメージを与えるが、アルコケアは NADPH 産生により、産生された活性酸素を消去する。

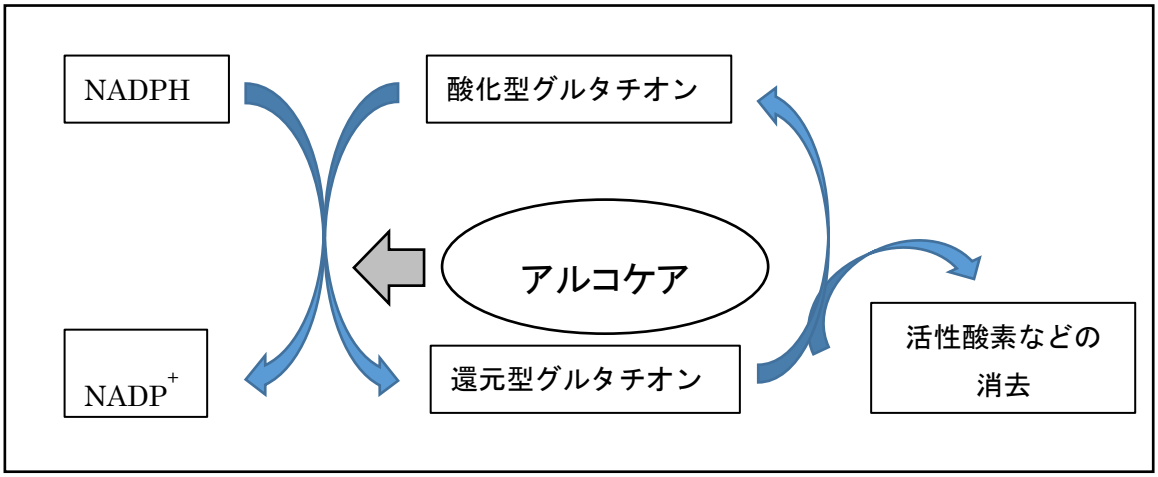


図３．グルタチオンと NADPH の関係（参考：レーニンジャーの新生化学）

アルコケアによって産生される NADPH は酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンに還元する。

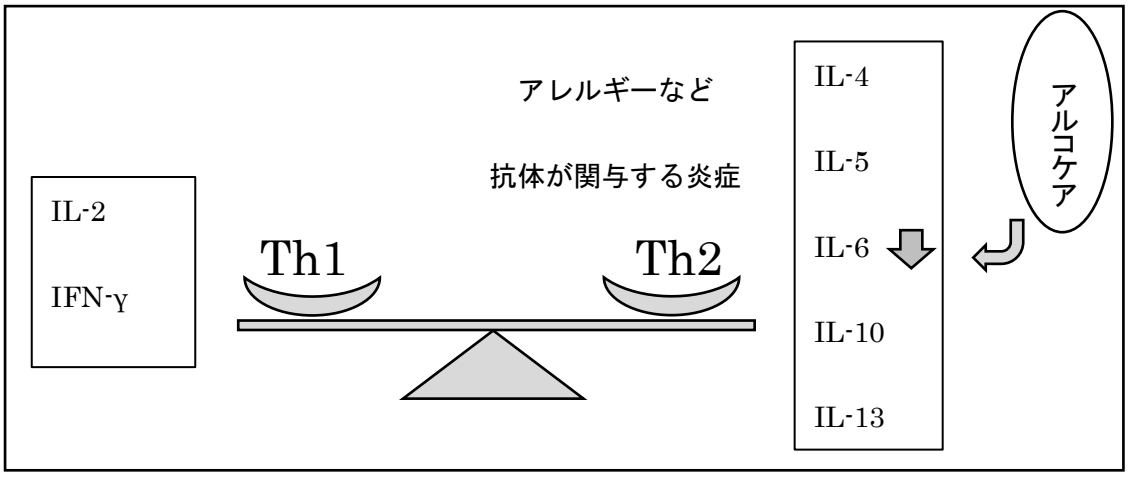


図４．Th1 Th2 バランス（第 66 回日本栄養・食糧学会にて発表）
アルコケアは Th2 応答を低下させ、その結果 Th1 応答を高める。

３．研究成果の副次的効果

発酵大麦エキスには活性酸素除去効果があることが報告されているが、本研究結果よりそのメカニズムは NADPH の産生である可能性が示された。NADPH の産生に影響を与える食物やサプリメントは少なく、既存の抗加齢効果とは異なるメカニズムによる抗加齢効果を有するサプリメントの開発が期待できる。これは健康寿命の延長にもつながり、医療費の削減につながるかもしれない。

今後の計画など

実際に継続して発酵大麦エキスを摂取した場合、寿命延長効果があるのか、さらに寿命延長効果まではいかなくとも、抗老化作用があるのか、細胞ではなく動物を使って実験を行う予定である。

研究タイトル：②別府市特有の「湯の花」の機能解析と商品開発

研究機関：食物栄養科学部　食物栄養学科　感染・代謝免疫学研究室
担当者職名：教授　仙波和代

１．研究の目的と学術的背景

【目的】

大分県別府市は温泉地として有名な町である。別府温泉が他の温泉と異なる特徴は、単なる楽しみとして温泉につかるだけでなく、歴史的に「疾病や怪我の治療・療養」として発展してきた点にある（表１）。これら歴史的な背景のお蔭で、別府市は現在でも日本有数の

湯治客を誇っており、湯治客用の設備も整っている。これまで別府温泉に関してはいくつかの科学的研究が報告されており、温泉泉質の効能、飲泉・鉱泥の効果（別府市資料）、また「地獄蒸し」に関する味や調理方法の研究もある。

一方、別府には重要無形民俗文化財として「湯の花製法」がある。この製法で栽培された「湯の花」は温泉の成分ではないが、入浴剤として販売されており、その効能の表示を見ると「あせも・いんきん・うちみ・肩こり・くじき・神経痛・しっしん・しもやけ・痔・ただれ・たむし・冷え性・水虫・腰痛・リウマチ・かいせん」と記載されている。しかしながら、「湯の花」の効能を科学的に検証した研究論文はほとんど無く、「別府の「湯の花」は硫黄噴気を利用して栽培される、よって硫黄の効能と同じである」という論法で記載されていることが分かった。温泉入浴や入浴剤に関する事項は、薬事法ではなく「温泉法」「温泉法施行令」「温泉法施行規則」で定められているため、効能表示に、必ずしも科学的証明が必要ないためであった。

別府の「湯の花」は小屋内で栽培される。温泉ガスが均等に小屋内で噴出できるよう栗石で石畳みを作り、その上にモンモリロナイト（青粘土）を敷き詰め、硫黄噴気と青粘土が化学反応を起こしてできた結晶を成長させ、採取、精製して作り上げる（図５）。つまり「湯の花」は、温泉と同一の噴気は利用するが、温泉の泉質とは全く異なる天然化学反応生成物であり、この製法は世界中で別府にしか無く、1 日に 1mm ずつ結晶を成長させて、丁寧に作り上げられた別府の特産物であると言える。

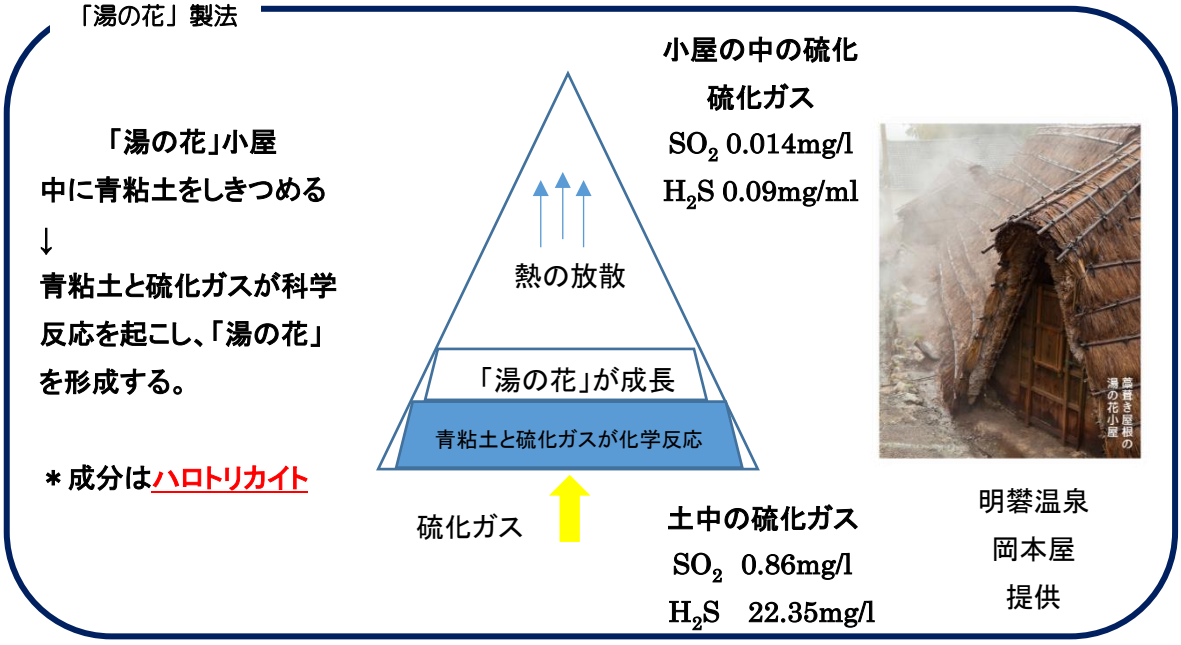


図５．湯の花製法と硫化ガス

以上のことから別府特有の「湯の花」が、皮膚を介して、本当に私達の健康に影響を与えているのか科学的に研究することを試みた。

時期	記述内容
８世紀初め	神代の昔、少彦名の命が病を得て卒倒した時、嘆き悲しんだ大国主の命が、別府の温泉を道後へ運び、病気が回復した（神話）。
鎌倉時代	大友頼泰が元寇の役で傷を負った武士を癒すため、別府、鉄輪、浜脇などに療養所をつくった。
明治時代 大正時代	陸軍病院開設 海軍病院開設　　現）国立病院機構別府医療センター
昭和６年	九州大学温泉治療学研究所開設　現）九州大学別府病院
昭和３５年	原子爆弾被爆者別府温泉利用研究所開設

（表１）別府温泉の歴史

【学術的背景】

別府「湯の花」の健康に関する**先行研究は無く**、私達が初めての着手となる。研究の方向性を考える際に参考とした学術的背景を記載する。

（１）ミョウバンの機能について

別府「湯の花」の主成分はハロトリカイトやアルノーゲンなどの天然アルミニウム硫酸塩（ミョウバン）である。ミョウバンは 1 世紀近くアジュバントとしてワクチンに使用されており、長年そのアジュバントメカニズムは不明であった。しかし近年、ミョウバンの免疫活性機能メカニズムはインフラマソームの活性化によるものであることが報告された。「湯の花」の主成分はミョウバンであるが、*in vitro* にて生成している訳ではなく、天然資源を用いて反応させていることから、純粋なミョウバンとは考えにくく、恐らく様々な反応物が混合していると考えられる。よってミョウバンに類似した免疫活性機能は推測されるものの、全く同じかどうかは分からない。以上のことから本研究では「湯の花」の免疫機能を探索することとした。

（２）アトピー性皮膚炎について

アトピー性皮膚炎は小児に発症することの多い皮膚疾患で、他のアレルギー疾患と合併し得ることから、アレルギー性炎症であると考えられてきた。しかしながら生体が何に反応しているのかは不明で、原因となるアレルゲンは長らく特定されていなかった。ところが、2015 年 immunity にて、アトピー性皮膚炎は皮膚の異常細菌叢が原因であり、黄色ブドウ球菌とコリネバクテリウムを正常化することが治療で大切であることが示された。また論文には、臨床では抗生剤を長期塗布する治療法は現実的ではなく、抗生物質に頼らない正常な細菌叢を誘導する方法の検討が大切であると述べられている。

（３）アルミニウム液の抗菌活性：ブロー氏液について

ブロー氏液は、19 世紀後半にドイツの医師 Karl August von Burow により収斂・消毒剤と

して考案された pH 約 3 の 13%酢酸アルミニウム溶液である。タンパク質に接すると「タンパク－金属複合体」を形成し、殺菌、肉芽形成促進などの作用を発現させる。欧米では現在も医療に使用されているが、日本では 1920 年発行の薬局方にまでは収載されていたが、抗生物質の普及とともに使用頻度が減少し、1971 年に削除された。しかしながら 2000 年に発表された Thorp らの論文によると、慢性可能性中耳炎患者に非常に有効であるということから、日本でも耳鼻科領域において抗菌性の高さと耐性菌の問題から、再び脚光をあび始めている[8)]。ブロー氏液は、ミョウバンと同様にアルミニウムの溶液であり、細菌、真菌の種類を選ばず MRSA や緑膿菌にも有効であるというスペクトルの広い抗菌作用を有し、さらに現存する抗生物質とは作用機序も異なっており、副作用の報告もほとんど無い。よって本研究では、上述の（２）の内容と絡めて、「湯の花」が黄色ブドウ球菌に対して抗菌作用を発することで、アトピー症状を改善するのではないかと推測し、その可能性を探ることを目指した。

２．研究内容

【研究方法】

（１）「湯の花」使用者のモニタリング調査

ミョウバンは民間療法として以前よりアトピー性皮膚炎などの皮膚炎症性疾患の症状緩和に利用されている。そこで申請者らは、2016 年 4 月～8 月まで、別府岡本屋旅館において、皮膚トラブルに対する民間療法として「湯の花」を購入しに来た 8 名の方々に対し、「湯の花」使用前後の症状の経過観察を行った。内訳はアトピー性皮膚炎と診断されている方が 4 名、痤瘡の方が 2 名、酒さ様皮膚炎と診断された方が 1 名、基底細胞癌（90 歳のため手術はせず経過観察中）と診断された方が 1 名であった。

（２）「湯の花」の黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用

「湯の花」がアトピー性皮膚炎の症状緩和に有効であったのは、「湯の花」が黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示したためと私達は考えた。そこで「湯の花」が黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示すのか、*in vitro* で検討を行った。「湯の花」を濃度依存的に添加した黄色ブドウ球菌液(10^6)を作製し、作製直後と 25℃1 時間保持後の菌液を、卵黄加マンニット食塩寒天培地で 37℃、48±2 時間培養し、それぞれの菌数を計測した（図６）。

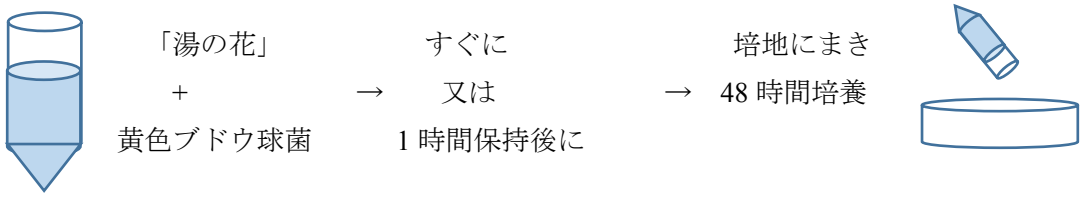


図６．黄色ブドウ球菌に対する「湯の花」の抗菌活性試験

（３）「湯の花」の免疫活性機能の探索

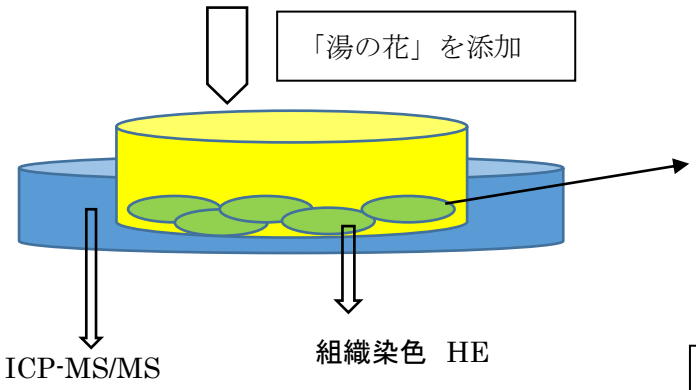
免疫を司るヘルパーT 細胞には、体液性免疫を導くサイトカインを産生する Th2 細胞と、細胞性免疫を導くサイトカインを産生する Th1 細胞とがある。Th1 と Th2 はシーソーのような関係で、生体内で片方が上昇すれば片方が下降するという関係にある。アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギーは Th2 が優位になっている状態で、炎症を抑える為には、アレルゲン除去だけでなく Th1/Th2 バランスを整えることも重要であると考えられる。そこで私達は、「湯の花」の刺激が Th1/Th2 バランスに影響を与えているのか調べるために、樹状細胞を用いて、「湯の花」の免疫活性機能の探索を行った。

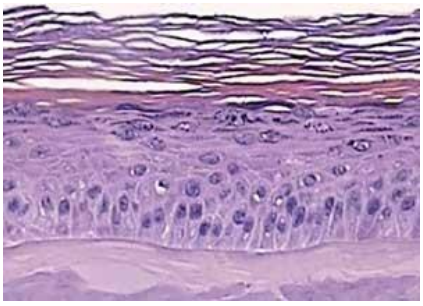
骨髄系樹状細胞を $6x10^6$/5ml/well の濃度で 6well プレートに播種し、GM-CSF 加 RPMI 培地を用いて 24 時間培養を行った。24 時間後に「湯の花」DMSO 溶解液を、最終濃度 50μg/well となるように添加して、さらに 48 時間培養を行った。48 時間後に樹状細胞を回収し、RNA 抽出を行い、変動する遺伝子の網羅的解析を行った。

（４）「湯の花」の皮膚細胞への影響と皮膚浸透性

上記（１）～（３）の結果より、「湯の花」には①黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性能、②Irak4 を介した黄色ブドウ球菌に対する抵抗性の向上、③Th1 系の活性化による Th2 系の抑制、という効果がある可能性を見出した。そこで「湯の花」の溶解した温泉に入ることで、本当に皮膚を介して 3 つの効果を引き出せるのかどうかを調べるために、「湯の花」の皮膚細胞への影響と皮膚透過性の実験を *in vitro* にて行った。

ニコダームリサーチ社の三次元組織ヒト表皮モデルを用いて実験を行った。ヒトケラチノサイトを 12 穴プレートに添加し、3 次元培養表皮モデル EpiSkin-LM (EpiSkin) を設置した。角化過程を経て、角層機能を持つ再生表皮を形成させた。その後、「湯の花」の DMSO 溶解液を 25μg/well となるように添加し、48 時間培養を行った。48 時間後に、細胞は組織染色を行って状態を観察し、培地は ICP-MS/MS 解析することにより、「湯の花」成分が皮膚細胞と基底層を通過して溶液中に出ているのか検討を行った（図７）。





Al, S, Fe について解析を行った。

図７．「湯の花」の皮膚への効果

（上）はニコダームリサーチ社から頂いたイメージ写真

組織染色方法

EpiSkin の表面を PBS(-)にて洗浄し、4%パラホルムアルデヒドに一晩浸漬し固定を行った。次に、パラフィンブロックを作成後、ミクロトームにて 5 μm の厚さで薄切して切片をスライドガラスに貼り付けた (組織切片の作成)。染色後の組織切片をマリノール封入し、顕微鏡画像を撮影した。以下、染色手順について記す。スライドガラスに張り付けた組織切片をマイヤーのヘマトキシリン溶液に 10 分間処理し、精製水にて洗浄した。次いで、0.5%エオシン Y を含有した PBS(-)にて 5 分間処理し、精製水にて洗浄した (HE 染色)。

【 結果・考察】

（1）「湯の花」使用者のモニタリング調査（以下は全て特許で既に公開されています）

「湯の花」使用者 8 名に対してモニタリング調査を行った。その結果 8 名とも皮膚症状の改善傾向を認めた。基底細胞癌と診断されていた女性は、「湯の花」継続使用 2 週間後、一部が痂皮化、落屑し、正常組織に戻るといった経緯も認めた。3 名の写真を以下に示す。

【写真 1】は 2 歳 10 ケ月の男の子でアトピー性皮膚炎と診断されていた。「湯の花」継続使用 35 日で、ほぼアトピーの症状は消失した。

「湯の花」使用前

「湯の花」使用 35 日目 【写真 1】

【写真 2】は幼少期から重篤なアトピー症状が続いている 30 歳男性の肘写真である。
様々な処方薬を使用してきたが、結局コントロールできずに現在に至った経緯がある。「湯の花」を継続使用することで改善傾向を認めた。

「湯の花」使用前

「湯の花」使用 9 日目

「湯の花」使用 33 日目【写真２】

【写真３】は 17 歳の女性の写真で、小学生の時にアトピー性皮膚炎を発症した例である。掻痒感が激しく、「湯の花」使用後に掻痒感が消失するとともに、発疹にも改善傾向が認められた。

「湯の花」使用前　　「湯の花」使用 8 日目　　「湯の花」使用 47 日目

【写真３】

これらのモニタリング調査により、別府「湯の花」にはアトピー性皮膚炎に対して何らかの有効成分が含まれているのではないかという事が推測できた。今回は医療機関で臨床治験として調査を行った訳ではないので、1 人 1 人の詳細な経緯やコントールデーターなどは調査できていないが、私達は 8 名の方の「湯の花」使用前後の症状を調べることにより、研究の方向性を決めることができたと考えている。

（２）「湯の花」の黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用

コントロールでは 1 時間の保持に関わらず、測定 48 時間後の黄色ブドウ球菌数には変化が認められなかった。また「湯の花」と混合させてすぐに培地に移した群にはあまり菌数の変化が認められなかったのに対し、「湯の花」と混合させて 1 時間保持した後に培地に移した菌群では、「湯の花」の濃度依存的に、測定菌数の減少を認めた（表２）。

	すぐに培地にまいた場合（CFU/ml）	25℃1 時間保持後に培地にまいた場合（CFU/ml）
滅菌精製水（コントロール）	$2.8x10^4$	$2.4x10^4$
「湯の花」　2.0g/100ml	$1.4x10^4$	0
「湯の花」　1.0g/100ml	$1.3x10^4$	7.6x10
「湯の花」　0.5g/100ml	$1.6x10^4$	$8.4x10^2$
「湯の花」　0.1g/100ml	$2.2x10^4$	$1.0x10^3$

表２．「湯の花」の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性試験結果

以上の結果より、①「湯の花」は黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を有する、②その抗菌

作用は「湯の花」と長時間混合させることにより発現することから、研究背景で記述したブロー氏液と同様に「金属―タンパク複合体形成」によるものではないかと推測できた。

（３）「湯の花」の免疫活性機能の探索

In vitro において、「湯の花」を樹状細胞に添加し、樹状細胞の遺伝子を網羅的に解析することで、「湯の花」が、どのような免疫機能に影響を与えているのか検討した。

表３は 15 倍以上の差を認めた遺伝子を示している。特に Irak-4 遺伝子の発現は 142 倍と群を抜いて高かった。IRAK-4 は Interleukin-1 receptor associated kinase 4 であり、2002 年に同定された分子である。IRAK-4 が欠損すると、Il-1R、 IL-18R 刺激、TLR2,3,4,9 刺激に対する反応が欠損し、ブドウ球菌に対する感染抵抗性が著しく低下することが既に報告されている。TLR2,3,4,9 刺激は基本的に Th1 を優位に導く経路であるため、「湯の花」は Th2 に傾いているアレルギー症状を Th1 へ傾けている可能性が示唆された。つまり「湯の花」には、①アトピー性皮膚炎の主要原因である黄色ブドウ球菌に対する生体側の抵抗性を向上させる、②Th2 に傾いている免疫バランスを Th1 に傾ける、という効果があると考えられる。

GeneName	FoldChange
Irak4	142.5574415
Gdap1	27.41435832
Defb42	26.35255063
Slit2	23.70448591
AK131781	20.12829826
5730457N03Rik	19.69499301
Saxo1os	19.62609305
chr1:93755492-93755943_R	19.08248299
Nr2e3	16.47537274
Cpxm2	16.26775203
Myh3	16.17723344
C230037E05Rik	15.71060464
Mpp6	15.39805261
Wdhd1	15.33276521
Krt36	15.31954772

表３．「湯の花」の樹状細胞に対する遺伝子発現

（４）「湯の花」の皮膚細胞への影響と皮膚浸透性

DMSO 適用後の皮膚モデルと比較して、「湯の花」（サンプル HU）の角層および表皮層の厚みは薄かった。また DMSO 適用後と比較して、角層では下部が膨潤し、表皮層の厚みが薄くなった（図８）。

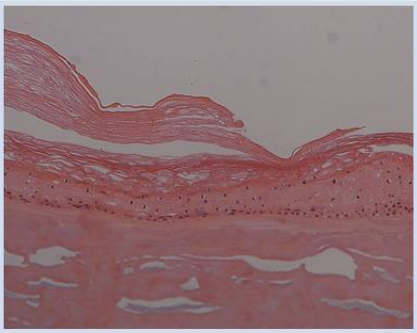
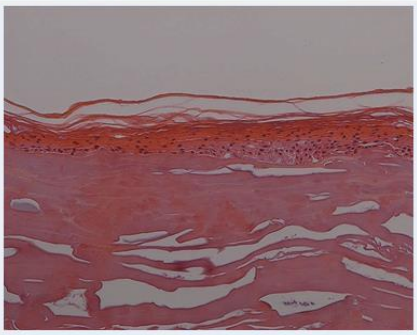
試料	切片画像
DMSO	
サンプルHU	

図８．「湯の花」の皮膚に対する効果；HE 染色

ICP-MS/MS 解析では、溶液中のアルミニウム、硫黄、鉄について調べた。アルミニウムと鉄において、皮膚基底層を通過して真皮層まで浸透している可能性が示唆された（図９）。

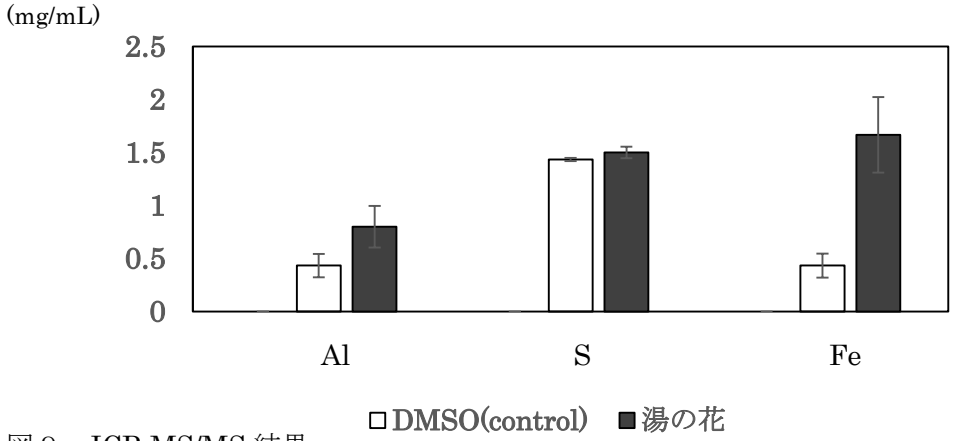


図９．ICP-MS/MS 結果

３．研究成果の副次的効果

（1）皮膚疾患に対する治療選択肢を増やすことができる

H26 の厚労省の報告によれば、アトピー性皮膚炎の患者数は約 46 万人存在し、その数は年々増加している。現在、皮膚の炎症には「ステロイド薬」「プロトピック」などが使用されており、また開発中のものとして「IL-4Ra 抗体」「IL-31R 抗体」がある。いずれも掻痒感や炎症に対して効果があるが、菌交代現象や日和見感染症などの副作用が生じるケースも多く、自己判断で治療を辞めてしまう人も多い。アトピー性皮膚炎の主原因が黄色ブドウ球菌であると報告されたことから、ターゲットを細菌にした新しい治療薬の開発は急務である。特に長期抗生物質の使用が現実的でないことから、漢方薬やハーブなどを利用した黄色ブドウ球菌コントロール薬が求められる。ミョウバンは決して新しい物質ではないが、モニタリング調査、耳鼻科領域での温故知新、インフラマソーム活性化、IRAK-4 分子発現などから考慮すると、抗菌作用を併せ持つ免疫誘導物質であると推測できる。よってミョウバンの作用や作用発現メカニズムを解明することは、皮膚疾患に対する治療選択肢を広げることにつながると考えている。

（2）「湯の花」を使った感染防御に有効な石鹸や含嗽剤などの開発

昨今、医療現場では「抗生物質耐性菌による院内感染」の問題が深刻になりつつある。1961 年に MRSA が出現して以来、現在では、MDR、VRE、VRSA もあり、欧米では年間 2 万人の患者がこれら耐性菌で亡くなっている。院内感染は医療従事者の手指や飛沫を介して微生物が患者に移行するケースが多い。よって医療従事者の手指消毒・嗽による確実な感染防御体制の確立は急務である。もし「湯の花」が MRSA や多剤耐性緑膿菌に対して有効であるならば、それは新規な知見であり、石鹸液や手洗い液として使用することで、院内感染を劇的に制御できるかもしれない。またインフルエンザなどのウイルスに有効であれば、含嗽剤やスプレー剤として使用し、市中での大流行を弱めることができるとも考えられる。そしてその作用メカニズムは既存の抗生物質や抗ウイルス薬とは異なることが想定できるので、併用することも可能であろうと考えている。

（3）IRAK-4 発現増減の意義

2006 年に理研より IRAK-4 分子が自然免疫と獲得免疫の両者に共通した分子であることが発表された。しかしながら、IRAK-4 分子の定常発現量の差が、感染防御や免疫疾患にどのように関与しているのか報告は少ない。よって本研究を発展させることで、感染防御や免疫疾患に関する IRAK-4 分子の新規知見を得ることができる。

今後の計画など

今後は、これまでの研究の再現性をとりつつ、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、「湯の花」が黄色ブドウ球菌をコントロールできるのか検討を行う。さらに、他の細菌やウ

イルスを用いて、「湯の花」に抗微生物活性があるのか検討を行い、そのメカニズムが「タンパクー金属複合体形成」によるものであることを証明する。

また高齢マウスなどを用いて、正常ではあるけれど免疫力が低下している場合、「湯の花」を用いて IRAK-4 分子を発現させることで、日和見的な感染症を予防できるのかどうか検討を行う。「湯の花」入浴剤を使用すると、免疫力が向上し、健康寿命が延長できれば、学術面だけでなく地域の活性化にも繋がる。

４．研究成果

a) 原著論文

１．Effects of Fermented Barlry Extract on Antioxidant Status in JAWS II cells.
SENBA. K, WU Xianglin, MARUOKA. N, HOKAZONO. H, IKEBE. Emi, YONEMOTO.T.
Bulletin of Beppu University Graduate School No.18 p89-93 2016 （査読有）

b) 総説

なし

C) 招待講演、シンポジウムなど

１．2015 年 9 月 1 日 産学官交流大会講演
「別府地獄蒸し料理は加齢マウスの記憶力を増加させる」

d) 国際学会

なし

e) 国内学会

１．サイエンス・インカレ 2018
「別府湯の花の皮膚に対する効果」（研究室の学生が発表）

f) 特許

１．湯の花が溶解された溶液、それを用いた感染症予防液（出願番号:特願 2017-24738）
出願日 2017 年 2 月 27 日
出願人：学校法人別府大学
発明者：仙波和代

g) その他(学会賞、報道など)

１．2017 年 7 月 13 日 OBS ラジオ
湯の花の効能について

２．2018 年サイエンス・インカレ　ファーウェー賞受賞
湯の花の皮膚に対する効果
３．2018 年 3 月 22 日　今日新聞
別府大学の湯の花の研究について
４．2018 年 3 月 24 日　大分合同新聞
別府大学の湯の花の研究について