

# 秋田県総合食品研究所報告

第 10 号

平成20年 (2008年)

---

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

No.10, 2008

## 謝 辞

本報告書の再掲載論文「秋田産はたはたずしの化学成分と微生物相の地域特性」塚本研一、戸枝一喜、船木勉、大久長範、松永隆司：日本食品科学工学会誌 **54**(7), 313-319 (2007)及び”Gelatinization properties of aged rice texture by external layer removal. Toshihisa Ohno, Makoto Tomatsu, Kazuki Toeda, and Naganori Ohisa: *Food Sci. Technol. Res.*, **13**(4), 301-304 (2007)は、社団法人日本食品科学工学会より転載許可を頂きました。

本報告書の再掲載論文「秋田県沿岸海域で捕獲されたハタハタ *Arctoscopus japonicus* の肉および生殖巣中の脂質成分の季節変動」塚本研一、戸枝一喜、船木勉、和田芙美子、松本祥子、松永隆司：日本水産学会誌 **73**(5), 897-904 (2007)は、社団法人日本水産学会より転載許可を頂きました。

本報告書の再掲載論文”High-level expression of recombinant active human renin in Sf-9 cells: Rapid purification and characterization. Saori Takahashi, Keishi Hata, Ken-Ichi, Kikuchi, Takeshi Gotoh: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**(10), 2610-2613 (2007)”及び”Texture of cooked rice prepared from aged rice and its improvement by reducing agents. Toshihisa Ohno, Makoto Tomatsu, Kazuki Toeda, and Naganori Ohisa: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**(12), 2912-2920 (2007)は、社団法人日本農芸化学会より転載許可を頂きました。

本報告書の再掲載論文”Human renin inhibitory activity in legumes. Saori Takahashi, Kazuyuki Hori, Masanori Kumagai, and Saburou Wakabayashi: *J. Biol. Macromol.*, **7**(3), 49-54 (2007)は、著者と出版社のご好意により許可を得て転載いたしました

秋田県総合食品研究所報告第10号に転載許可を頂きました関係学会及び出版社に厚く御礼を申し上げます。

平成20年5月31日

編集委員長 秋田県農林水産技術センター所長

総合食品研究所長

佐藤喜盛

# 目次

## 1. 原著論文

- ①「色素培地を用いた交雑法による吟醸酒用酵母の育種」・・・・・・・・・・ 1  
渡辺誠衛、田口隆信、高橋 仁、大野 剛、杉本勇人
- ②「フキノトウ由来生理機能性成分の評価と発酵食品への応用」・・・・・・・・ 9  
渡辺隆幸、堀 一之
- ③「秋田の地下水・湧水の水質特性の解析」・・・・・・・・・・・・・・ 14  
熊谷昌則、大野 剛、高橋 仁、吉田知司
- ④「放線菌由来の耐熱性生澱粉分解酵素のクローニング」・・・・・・・・・・ 19  
“Molecular cloning of a thermostable raw starch digesting amylase gene from a  
*Streptomyces* sp.”  
金子隆宏

## 2. 総説

- ①「脳機能計測による新しい食品の評価法の開発」・・・・・・・・・・・・・・ 29  
熊谷昌則、高橋徹、佐藤文華、渡部雅実、堀一之、樋渡一之、戸枝一喜、  
秋山美展

## 3. 特許の概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

## 4. 学会発表要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

## 5. 外部発表論文再録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

## 6. その他の外部発表論文リスト・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 97

## 7. 第1号～第10号総目次・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 99

## 8. 第1号～第10号人名索引・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 107

## 1. 原著論文

- ①「色素培地を用いた交雑法による吟醸酒用酵母の育種」・・・・・・・・・・ 1  
渡辺誠衛、田口隆信、高橋 仁、大野 剛、杉本勇人
- ②「フキノトウ由来生理機能性成分の評価と発酵食品への応用」・・・・・・・・・・ 9  
渡辺隆幸、堀 一之
- ③「秋田の地下水・湧水の水質特性の解析」・・・・・・・・・・ 14  
熊谷昌則、大野 剛、高橋 仁、吉田知司
- ④「放線菌由来の耐熱性生澱粉分解酵素のクローニング」・・・・・・・・・・ 19  
“Molecular cloning of a thermostable raw starch digesting amylase gene from a  
*Streptomyces* sp.”  
金子隆宏

# 色素培地を用いた交雑法による吟醸酒用酵母の育種

渡辺誠衛・田口隆信・高橋 仁・大野 剛・杉本勇人  
(秋田県農林水産技術センター 総合食品研究所 酒類グループ)

Seiei WATANABE, Takanobu TAGUCHI,  
Hitoshi TAKAHASHI, Tsuyoshi OONO, Hayato SUGIMOTO

## 【要約】

清酒酵母は一般的に孢子形成能が極めて低く、交雑法による酵母育種の大きな障害となっている。前報<sup>1)</sup>では、ポンソーRとアニリンブルーを用いた色素培地により、一倍体株を高頻度で取得し、交雑法により新規吟醸酒用酵母「こまち酵母」を育種した。本報では、さらに改良を重ねた AKKM-140 酵母の育種と、その酒造適性について報告する。本酵母は「華こまち酵母」と命名され、平成 18 酒造年度から秋田県酒造協同組合より吟醸酒製造用酵母として配布し、実用化されている。

## 【諸言】

近年、清酒の多様化、差別化、そして、より一層の高品質化を目的として積極的な優良清酒酵母の分離・育種が広く行われており、その実用株の開発が進められ、芦田ら<sup>2)</sup>、柳内ら<sup>3)</sup>、秋田ら<sup>4)5)</sup>、市川ら<sup>6)</sup>、福田ら<sup>7)</sup>、吉田ら<sup>8)9)</sup>などの多くの報告がある。

一方、従来から二つの酵母の有用な性質のみを有する酵母の育種方法として、交雑法があるが、ヘテロタリック ( $a/\alpha$ ) で二倍体である清酒酵母の交雑を行う際、清酒酵母は極めて孢子形成能が低く、大きな障害となっている。

我々は前報<sup>1)</sup>で、ポンソーRとアニリンブルーの色素を用いた改良培地を用いて、協会酵母から一倍体を高頻度で取得し、交雑法により、発酵力を付与した高香气生成の新規吟醸酒用酵母「こまち酵母」を育種し、実用化に至っている。

本報では、「こまち酵母」と「秋田流・花酵母 (AK-1)」またはきょうかい 901 号酵母 (K-901) と交雑し、発酵力の強化と、ポラパック Q カラムを用いて従来のヘッドスペース法<sup>10)</sup>に比べてより詳細に香气成分を測定し、香味に膨らみを有する新規吟醸酒用酵母の育種を試みた。さらに、育種株の小仕込試験と現場醸造試験による酒造適性を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

## 【実験方法】

### 1. 使用菌株

(財)日本醸造協会のきょうかい 901 号 (K-901)、秋田流・花酵母 (AK-1)、こまち酵母を用いた。

## 2. ポラパック Q カラムを用いた酵母の香気成分パターン

前記、3 株 (K-901、AK-1、こまち酵母) と、当所保存株 3 株 (A 酵母、B 酵母、C 酵母) について、香気生成能を比較した。アルコール脱水麴を用いた培地<sup>11)</sup> (8g アルコール脱水麴、22ml 麴エキス Be'6) に培養酵母 1ml を植菌し、15°C、14 日発酵させ、遠心分離で得られたろ液を香気成分の分析に供した。試料調製は、Waters 社製の充填剤 Porapak Q を用いて、50ml の発酵液をカラムに吸着後、エーテル抽出し、硫酸ナトリウムで脱水後分析試料とした。分析は、HEWLETT PACKARD 社製 SERIES II のガスクロマトグラフィーを用いて、通常のヘッドスペース法<sup>10)</sup>と直接注入法の 2 通りで分析した。なお、内部標準は、回収率を考慮し、シクロヘキサノールと酢酸メチルの 2 成分を用いた。

## 3. 一倍体株の取得方法

K-901、AK-1、こまち酵母の 3 株を用いて、前報<sup>1)</sup>のとおり、ポンソー R とアニリンブルーを用いた色素培地で一倍体株を取得した。即ち、Sporation 培地で孢子形成を行った後、Zymolyase 処理、Heat shock を行い、流動パラフィンを追加し、境界線の流動パラフィン部位を取り、色素選択培地 (6.72g/l Y.N.B、10g/l Glucose、30g/l Sucrose、3g/l Methionine、3g/l Bact-yeast extract、20g/l Bact-agar、10ml/l Filtrated anilin blue (250mg/100ml)、10ml/l Filtrated ponsou-R (250mg/100ml)) にプレートした。30°C、3~5 日間培養後、赤色に染色したコロニーを釣菌した。

## 4. 一倍体株の諸性質

### (1) Haploid 株の確認と接合型の決定

色素培地で分離した Haploid 株と思われる株について、標準 Haploid 株 a Type と  $\alpha$  Type のそれぞれと凝集反応させ、凝集性の強い株を Haploid 株とし、標準 a Type と凝集する株を  $\alpha$  Type、標準  $\alpha$  Type と凝集する株を a Type とした。

### (2) Haploid 株の発酵試験

Y.P.D 液体培地 (1% Yeast extract、2% Poly peptone、2% Glucose) で、30°C、2 日間前培養を行った後、アルコール脱水麴を用いた培地<sup>11)</sup> で 15°C、14 日発酵させ、遠心分離で得られたろ液を供した。発酵力は振動式密度計 (アントンパール社製、DMA58) を用いて日本酒度として求めた。一般成分は、国税庁所定分析法<sup>12)</sup>により、香気生成能は、ガスクロマトグラフィーを用いて通常のヘッドスペース法<sup>10)</sup>と直接注入法の 2 通りで分析した。

## 5. 交雑方法と Diploid 株の取得

交雑に用いる Haploid 株を、Y.P.D 液体培地で、30°C、2 日間前培養を行った後、約  $1 \times 10^7$  cells/ml に調製した a Type と  $\alpha$  Type を 100  $\mu$ l ずつ混合し、30°C で 1 夜静置し接合させ、それらを Y.P.D 液体培地に 20  $\mu$ l 接種、30°C で 24 時間培養した。適当に希釈後、前記の色素選択培地に接種し、30°C、3~5 日間培養後、大きなコロニ

一でかつ、青色のコロニーを Diploid 株として釣菌した。

交雑した Diploid 株について、前記と同様にアルコール脱水麴<sup>11)</sup>を用いた培地で発酵試験を行い、発酵能、酸生成能、香気生成能を調べた。

## 6. 吟醸酒製造試験

### (1) 小仕込試験

原料米は、精米歩合 40%の秋田酒こまちを使用し、総米 1Kg で行った。酵母仕込で行い、一般的な吟醸酒の仕込配合で 3 段仕込みで行った。品温は、恒温器により制御し、最高温度は 10~11℃とした。

### (2) 中間規模醸造試験

原料米は、精米歩合 40%の秋田酒こまちを使用し、総米 180Kg で行った。酒母は速醸酒母、醪は一般的な吟醸酒の仕込配合で 3 段仕込みで行った。醪の最高温度は 10~11℃とした。

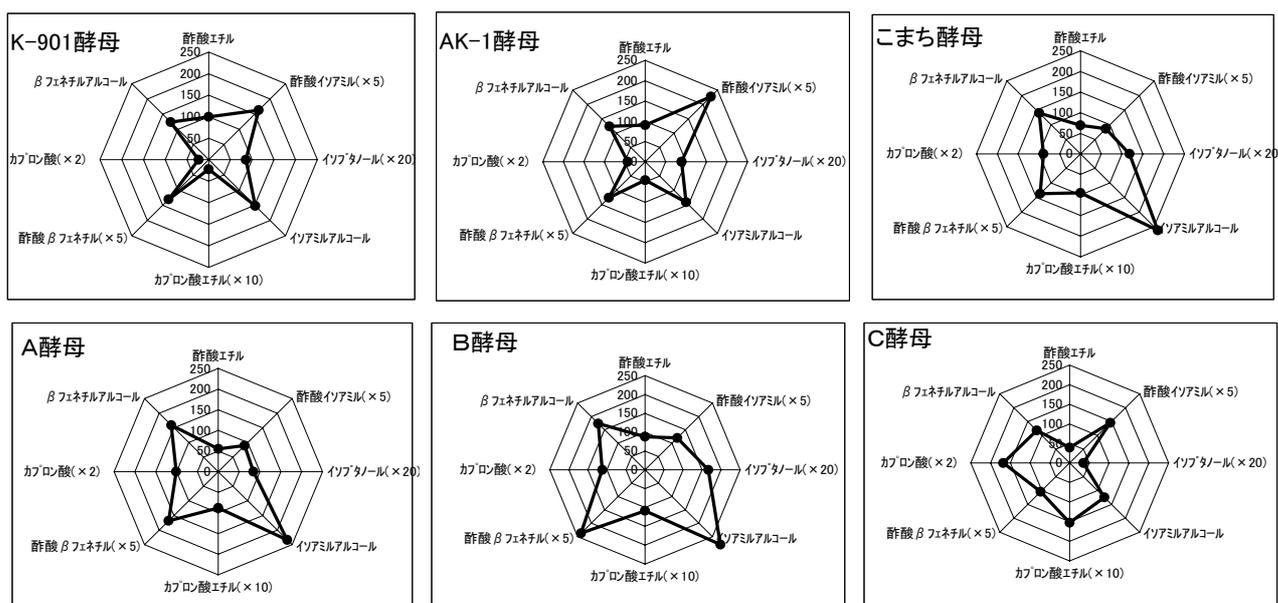
## 【実験結果及び考察】

### 1. ポラパック Q カラムを用いた酵母の香気成分パターン

主な吟醸酒用酵母の発酵液を、ガスクロマトグラフィーを用いて通常のヘッドスペース法<sup>10)</sup>と直接注入法の 2 通りで分析した。

結果を第 1 図に示した。便宜上、カプロン酸を 2 倍、酢酸イソアミルと酢酸βフェネチルを 5 倍、カプロン酸エチルを 10 倍、イソブタノールを 20 倍にしたレーダーチャートで表わした。

その結果、①K-901 と AK-1 タイプ、②こまち酵母と A 酵母、③B 酵母、④C 酵母 の 4 タイプにパターン化することができた。



第 1 図. 主な吟醸酵母の香気成分パターン

## 2. 一倍体株の取得と諸性質

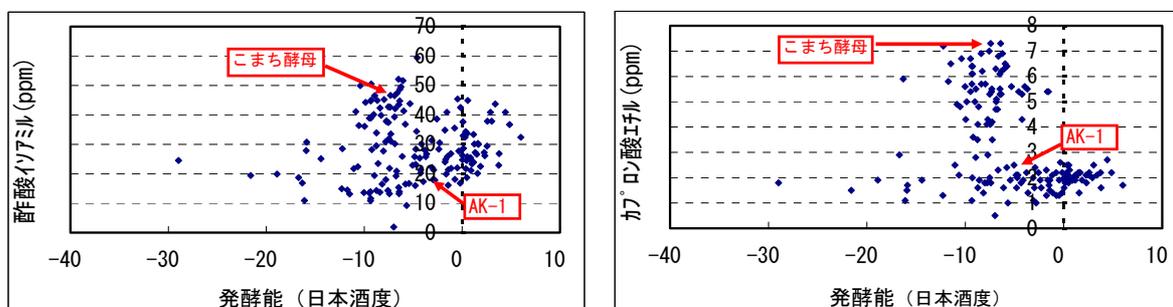
供試株の K-901、AK-1、こまち酵母から、前記の色素選択培地を用いて、赤色に染色された Haploid 株と思われるコロニーを釣菌し、標準 Haploid 株と凝集試験を行い、接合型を調べた結果、a Type が 30 株、 $\alpha$  Type が 42 株、凝集反応を示さないのが 7 株だった。

次に、交雑に用いる優良な Haploid 株の選抜を試みた。Haploid 株と確認された 72 株についてアルコール脱水麴を用いた培地<sup>11)</sup>で香気成分と官能試験を検討した結果から、高香気生成株としてこまち酵母から KM-24 ( $\alpha$  Type) を選抜した。一方、日本酒度を指標として選抜した高発酵力株として秋田流・花酵母 (AK-1) から AK-17 (a Type) を選抜した。

## 3. 交雑株の育種と発酵試験

KM-24 ( $\alpha$  Type) と AK-17 (a Type) の交雑により、交雑株 162 株を取得した。それら 162 株について、アルコール脱水麴を用いた培地<sup>11)</sup>で発酵試験を行い、日本酒度、酸度、香気成分を測定し、酒造適性を検討した。

第2図に酢酸イソamil生成量及びカプロン酸エチル生成量と発酵能の散布図を示した。交雑株の発酵能と香気生成量はバラエティーにとんでいた。最終的に一般成分、香気成分、官能試験の結果から総合的に判断して、AKKM-55、AKKM-56、AKKM-69、AKKM-78、AKKM-119、AKKM-121、AKKM-140、AKKM-166 の 8 株を選抜した。



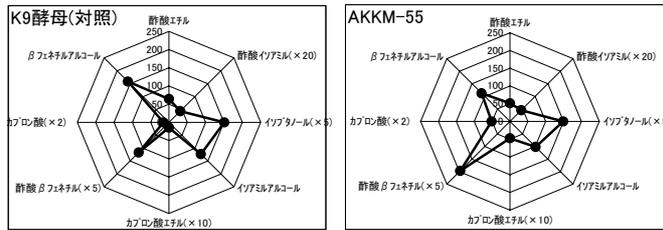
第2図. 交雑株の発酵能と香気生成能

## 4. 交雑株の小仕込試験

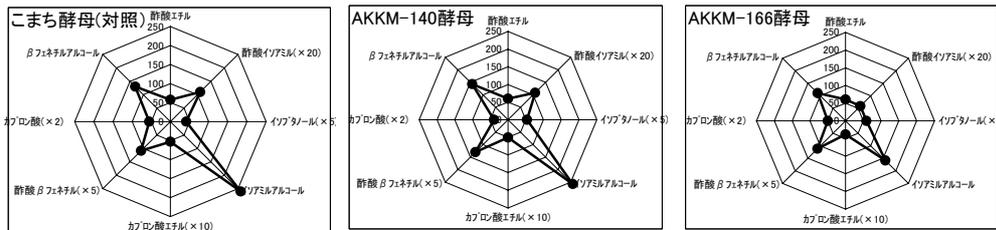
交雑株の酒造適性を把握する目的で、交雑株 8 株について総米 1Kg の吟醸酒製造試験を行った。上槽後の香気成分パターンを第3図に示した。

レーダーチャートから、Aタイプ：K-9、AKKM-55、Bタイプ：こまち酵母、AKKM-140、AKKM-166、Cタイプ：AK-1、AKKM-56、AKKM-69、AKKM-78、Dタイプ：AKK901-119、AKK901-121 の 4 パターンに分けることができた。香気成分パターンが類似していたが、一般成分、官能試験の結果を総合的に判断し、最終的に 1 株 (AKKM-140) を選抜した。

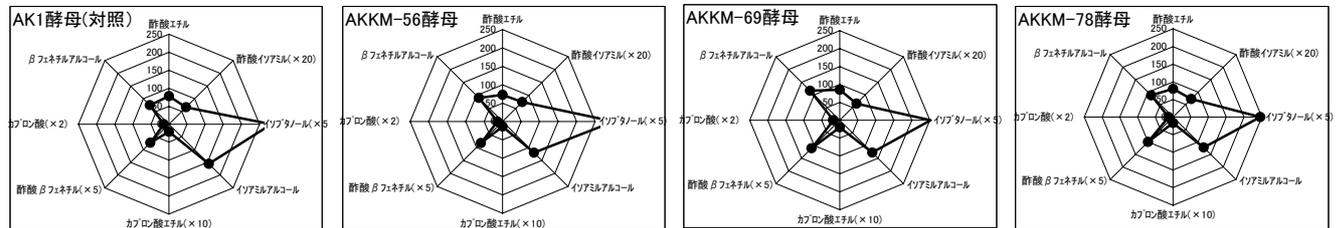
Aタイプ



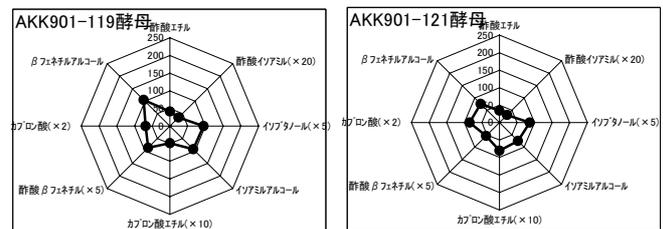
Bタイプ



Cタイプ



Dタイプ

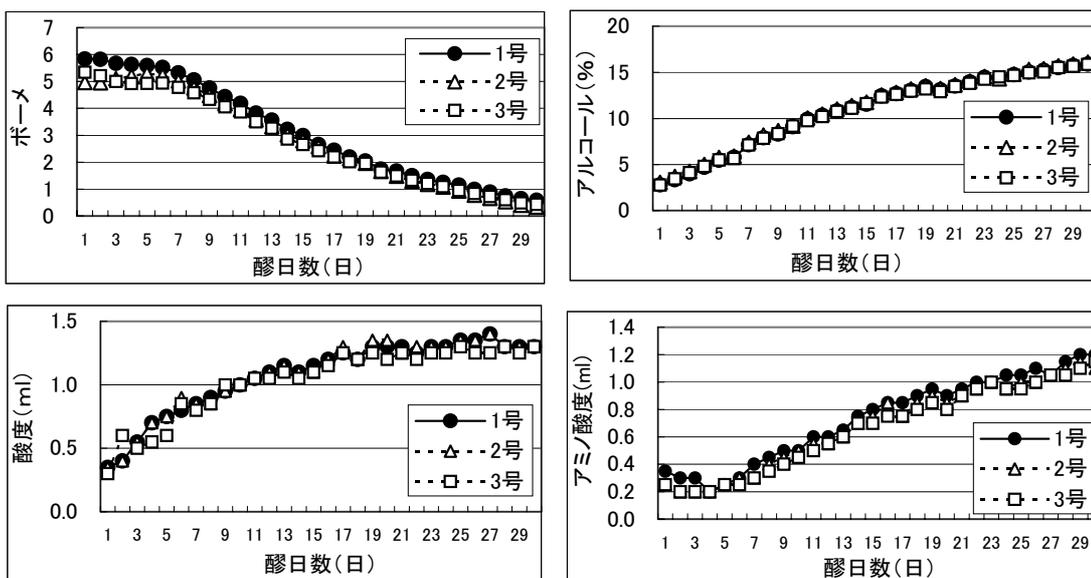


第3図. 小仕込酒の香気成分パターン

5. 中間規模醸造試験

精米歩合40%の秋田酒こまちを用いて、総米180Kgの吟醸酒製造試験を行った。対照はこまち酵母(1号仕込)、試験区はAKKM-140酵母を用いた(2号仕込と3号仕込)。第4図に醪の一般成分の経過を示した。第1表にはアルコール添加前の一般成分、第2表にはアルコール添加前の香気成分を示した。

醪では、1号仕込のこまち酵母に比べ、2号仕込と3号仕込のAKKM-140酵母で比較的発酵力が強く、ポーメの切れが良好だった。また、アミノ酸が少なく推移した。アルコール添加前の一般成分と香気成分はほぼこまち酵母と同様だった。



第4図. 醪の一般成分の動向

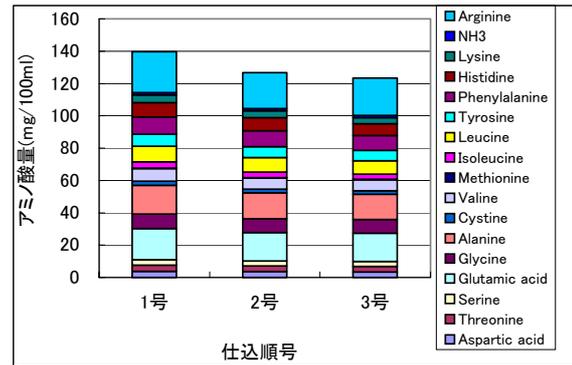
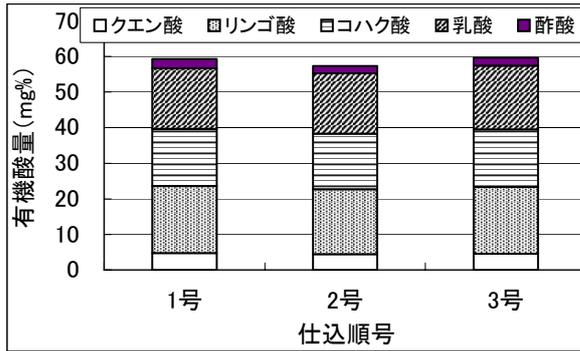
第1表. アルコール添加前一般成分

仕込順号	酵母	区分	日本酒度	アルコール (%)	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	グルコース (%)	ヒルビン酸 (ppm)	醪日数 (上槽まで)
1号	こまち酵母	対照	-3.96	16.3	1.4	1.3	1.8	3.3	35
2号	AKKM-140	試験	-3.32	16.1	1.3	1.2	1.8	34	33
3号	AKKM-140	試験	-3.48	16.0	1.3	1.1	1.5	41	34

第2表. アルコール添加前香気成分

仕込順号	酵母	区分	(ppm)					
			EtOAc	n-PrOH	i-BuOH	i-AmOAc	i-AmOH	EtOCap
1号	こまち酵母	対照	55.9	43.9	7.3	4.2	200.5	10.8
2号	AKKM-140	試験	58.6	43.5	7.7	4.0	210.3	11.4
3号	AKKM-140	試験	56.5	42.0	6.6	4.1	200.6	11.9

第5図と第6図にアルコール添加前の有機酸組成とアミノ酸組成を、第3表には製成酒の官能試験の結果を示した。選抜したAKKM-140酵母(2号仕込、3号仕込)は、アミノ酸が少なく、官能的にこまち酵母(1号仕込)に比べ評価が高く、ふくらみのある酒質となり、高い評価を得ることができた。



第5図. アルコール添加前有機酸組成

第6図. アルコール添加前アミノ酸組成

第3表. 製成酒官能試験

パネラー5名、5点法(1:良~5:悪)

仕込順号	香り	味	総合	短評
1号	2.2	2.4	2.4	香り華やか、味ふくらみ
2号	2.2	2.8	2.8	香り穏やか、やや渋味
3号	1.6	2.6	2.2	香りふくらみ、軽快

## 6. 現場醸造試験

AKKM-140 酵母を使用した吟醸酒は、「軽快な香りとふくらみのある香りを合わせ持ち、上品でキレのある味」を醸し出す特徴を有している。

平成 17 酒造年度に当研究所と県内 5 製造場で現場醸造試験を行い、良好な結果が確認されたため「華こまち酵母」と命名され、平成 18 酒造年度より秋田県酒造協同組合から県内清酒製造場へ配布されている。平成 18 酒造年は、県内 14 工場で使用され、7 社で商品化された。

使用した 14 社にアンケート調査を行い、回答のあった 9 社の結果を第 4 表に示した。香りの評価も高く、「使いやすい」、「どちらかというと使いやすい」と評価した製造場が 9 場中 6 場だったことから、実用性についてほぼ問題ないと思われた。

第4表. 現場醸造試験アンケート結果

製造場	発酵力は?	香りは?	味は?	使いやすい酵母か?
A社1	良い	高い	良い	使いやすい
A社2	やや良い	やや高い	良い	使いやすい
B社	やや悪い	やや高い	普通	どちらかというと使いにくい
C社	やや悪い	普通	やや悪い	普通
D社	やや良い	やや高い	良い	使いやすい
E社	良い	やや低い	普通	使いやすい
F社	やや良い	普通	普通	どちらかというと使いやすい
G社	悪い	やや高い	やや良い	どちらかというと使いやすい
H社	やや悪い	やや高い	やや良い	どちらかというと使いにくい
I社	良い	高い	良い	使いやすい

終わりに臨み、現場醸造試験にご協力頂いた秋田県酒造協同組合と、快く現場醸造試験を引き受けて下さいました県内酒造メーカーの方々に厚く感謝いたします。

### 〔引用文献〕

- 1) 渡辺誠衛, 新野葉子, 田口隆信, 高橋 仁, 大野 剛, 中田健美, 立花忠則 : 秋田県総合食品研究所報告(7), 38-45(2005)
- 2) S. ASHIDA, E. ICHIKAWA, K. SUGINAMI & S. IMAYASU : *Agric. Biol. Chem.*, 51(8), 2061-2065(1987)
- 3) 柳内敏靖, 清川良文, 若井芳則 : 醗酵工学, 67(1), 159-165(1989)
- 4) 秋田 修, 蓮尾徹夫, 原 昌道, 吉沢 淑 : 醗酵工学, 67(1), 7-14(1989)
- 5) 秋田 修, 井田哲郎, 小幡孝之, 原 昌道 : 醸協, 85(7), 501-505(1990)
- 6) 市川英治 : 醸協, 88(2), 101-105(1993)
- 7) K. FUKUDA, M. WATANABE, K. ASANO, H. UEDA & S. OHTA : *Agric. Biol. Chem.*, 54(1), 269-271(1990)
- 8) 吉田 潔, 稲橋正明, 野呂二三, 中村欽一, 野白喜久雄 : 醸協, 88(7), 565-569(1993)
- 9) 吉田 潔, 稲橋正明, 中村欽一, 秋山裕一, 野白喜久雄 : 醸協, 89(8), 647-651(1994)
- 10) 吉沢 淑 : 醸協, 68(1), 59-61(1973)
- 11) 斉藤久一, 渡辺誠衛, 田口隆信, 高橋 仁 : 醸協, 87(12), 915-921(1992)
- 12) 注解編集委員会編 : 第四回改定国税庁所定分析法注解, p7-p33, 日本醸造協会(1973)

## フキノトウ由来生理機能成分の評価と発酵食品への応用

渡辺隆幸、堀 一之

(秋田県農林水産技術センター総合食品研究所、応用発酵・酵素・微生物グループ)

Takayuki WATANABE and Kazuyuki HORI

### 【要約】

発酵食品との複合的活用を図るために県産農産物 24 点のラジカル捕捉活性、抗変異原性を調べた。その結果フキノトウに高い活性を有することを認め、そのラジカル捕捉活性成分の分画により、カフェ酸メチルエステル等の 5 成分を同定した。食習慣のあるフキノトウを用いて調合味噌を試作した結果、味噌よりも高いラジカル捕捉活性を保持した調合味噌の製造が可能であり、60 日間の保存試験の結果、その活性は安定であることが明らかになった。

### 【緒言】

味噌は主に味噌汁として農水産物と組み合わせられて食されるが、その複合的な生理機能性を調べた例は少ない。本研究では味噌と農産物を組み合わせた場合の抗変異原活性および DPPH ラジカル捕捉活性の評価を行い、味噌の需要の喚起および新規食品開発のシードづくりに役立てることを目的とした。日本各地に群生するフキノトウ (*Petasites japonicus*) は春の到来を告げる山菜として調合味噌としての食習慣があり、秋田県の県花に指定されるなど当県の象徴的な植物でもある。フキノトウに含まれるラジカル捕捉活性成分の分画同定に加え、フキノトウを材料とする調合味噌(味噌)の試作を行い、ラジカル捕捉成分の定量方法の検討を行った。

### 【実験方法】

#### 1. 発酵食品および農産物の複合的評価

秋田味噌の市販品および 24 種類の農産物すなわちフキノトウ、ハツカダイコン、アザミ、カタクリ、コメノコ、クサソテツ、ワラビ、シドケ、ヤマウド、アイコ、アサツキ、サントウナ、ボンナ、ソラマメ、イシガキ、ズッキーニ、ミニトマト、キュウリ、ニンジン、モロヘイヤ、オオバ、シソ、ミズ、ハヤトウリ(すべて県内での呼称による)を県内の量販店、野菜直売所にて購入した。各サンプルを 5 倍もしくは 10 倍量の 80%メタノールにより抽出した後、活性測定に供した。DPPH ラジカル捕捉活性は常法<sup>1)</sup>に従い、没食子酸を標準物質として検量線を作成し、各試料の活性を相当量として求めた。

抗変異原活性は *Salmonella typhimurium* TA98 を用い、Trp-P-2 を変異原として、コファクター-S9 を加えたプレインキュベーション法<sup>2)</sup>により測定した。

ラジカル捕捉活性、抗変異原活性とも 2 連の試験を 3 回実施しその平均値と

標準偏差を求めた。

## 2. フキノトウ由来のラジカル捕捉活性成分の同定

2005年4月秋田市雄和地区にて採集した食用として適した時期のフキノトウ5.0 kgを実験に供した。

抽出・分離：生鮮フキノトウを半分あるいは4分の1程度、縦方向に分割し真空凍結乾燥した後、ミルサー（イワタニ社製）で細砕の後、熱時メタノールで抽出した。得られたメタノールエキスを濃縮することなく、活性炭カラムに通じ、その後メタノール、メタノール-クロロホルム(7:3)、クロロホルムで順次溶出させた。この内、DPPHラジカル捕捉活性が強く認められたメタノール-クロロホルム(7:3)画分について、シリカゲル、セファデックス LH-20、ポリアミド C-200などの各種クロマトに付した。ラジカル捕捉活性が得られた活性を有する化合物の化学構造は、質量分析(MS)・核磁気共鳴(NMR)・赤外吸収(FT-IR)の各スペクトルの詳細な解析および紫外線吸収(UV)のシフト試薬添加スペクトル群の解析を実施した。

## 3. ふきのとう味噌

1. の実験に供したフキノトウの一部をを沸騰0.1%食塩水中にて1分間、ブラッシングした後、オスタライザー（オスター社）を用いてペースト状にした。このフキノトウペースト80 gと味噌80 g、食塩16 gを混合することにより、フキノトウ味噌を試作し、5℃下60日間保存した。経時的に1の実験と同様にラジカル捕捉活性を測定し、味噌、ふきのとう味噌、フキノトウペーストの活性を比較した。

### 【結果と考察】

#### 1. 発酵食品および農産物の複合的評価

図1、図2に示したようにDPPHラジカル捕捉活性はボンナ、アザミ、シソ、クサソテツ、ミズ、フキノトウ、シドケ、オオバが高い活性を示し、抗変異原活性はアザミ、オオバ、シソ、カタクリ、フキノトウ、山ウド、クサソテツ、ボンナが高い活性を示した。

味噌と農水産物の抽出液の混合比率を変化させて行った結果、アザミ、オオバ、シソ、フキノトウについてDPPHラジカル捕捉活性、抗変異原活性とも相乗効果は認められなかった。

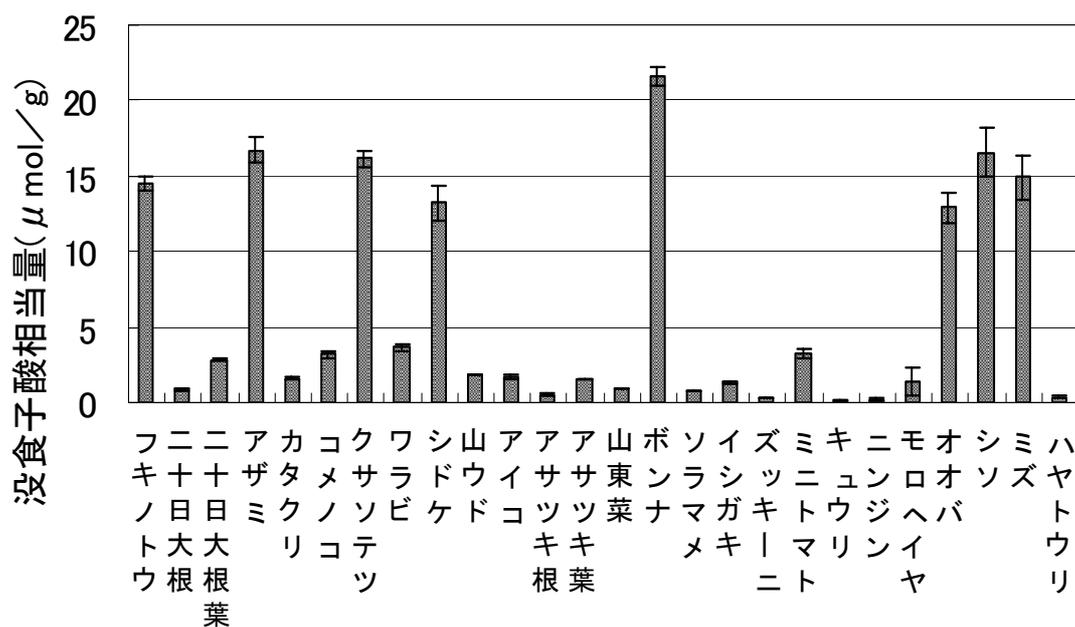


図1 県産農産物のDPPHラジカル捕捉活性  
2連3回の測定の平均値と標準偏差を示す。

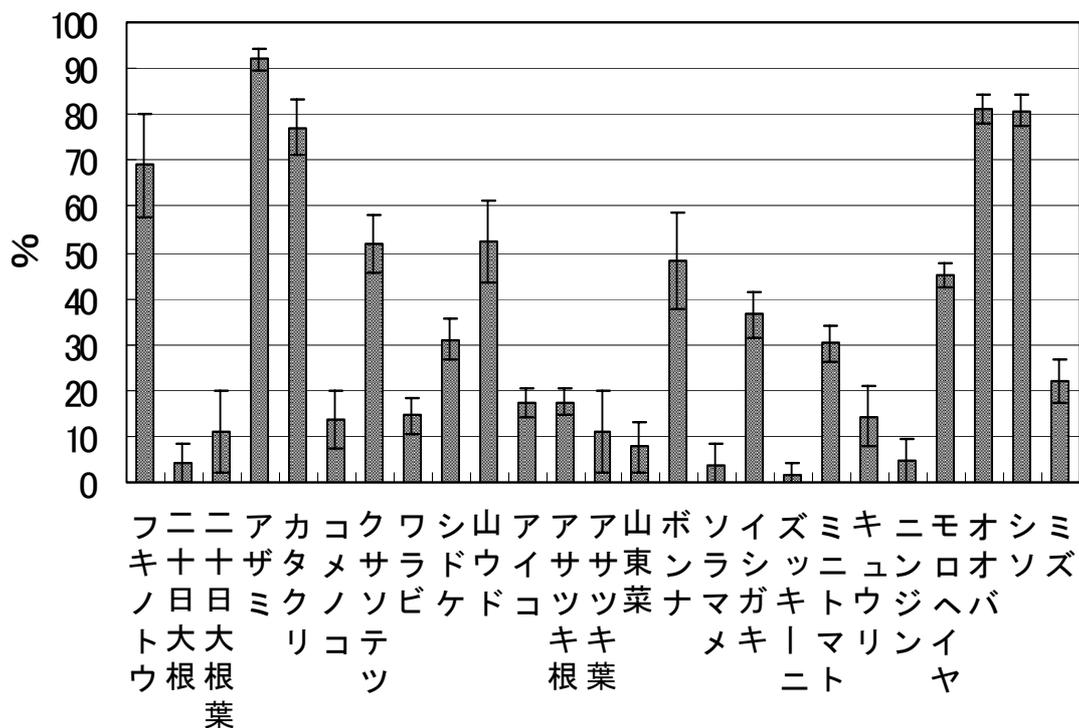


図2 県産農産物の抗変異原活性  
2連3回の測定の平均値と標準偏差を示す。ハヤトウリは未測定。

## 2. フキノトウ由来のラジカル捕捉活性成分の同定

分画した成分について MS、NMR、FT-IR の解析結果を総合し、フラボノール配糖体 4 種 (1~4) とフェニルプロパノイド 1 種 (5) であることを決定した。(図 3)

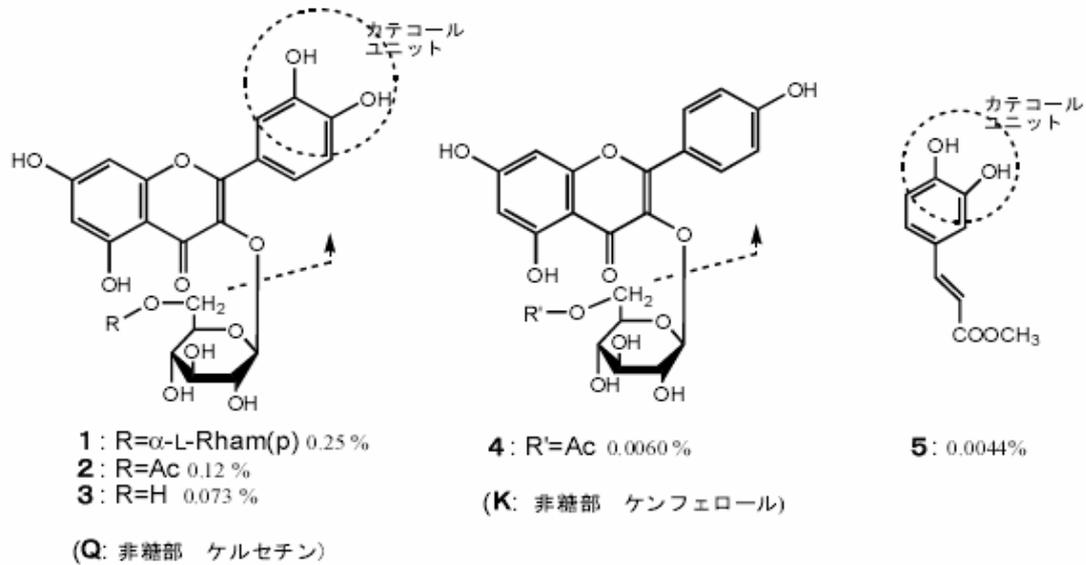


図 3 フキノトウ由来のラジカル捕捉活性成分の構造

図 4 に示したフキノトウ由来成分の DPPH ラジカル捕捉活性の大きさは、フラボノール配糖体類は没食子酸とほぼ同等 (1.08~1.23 mmol/g) であったが、比較対象として同時に測定した非糖部化合物であるケルセチンではおよそ 3 倍の強さを示し、さらにカフェ酸メチルエステルにおいても同等である 3 倍の強さを示したことから、活性は糖部ではなくフェノール性水酸基部分 (特にカテコールユニット) に関連していることが示唆された。

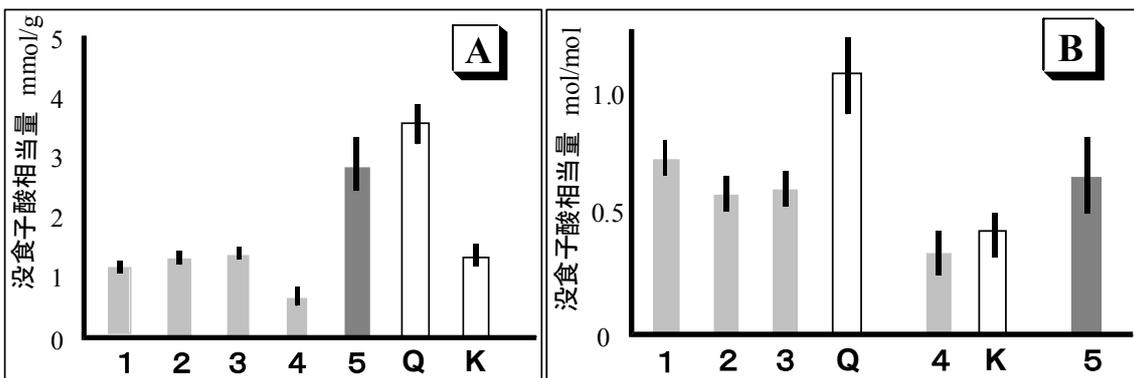


図 4 フキノトウ由来ラジカル捕捉活性成分の活性比  
 (A は重量活性比、B はモル活性比)

### 3. ふきのとう味噌

図5に示した結果より強いラジカル捕捉活性を有しているフキノトウを味噌と組み合わせることによりラジカル捕捉活性の強い調合味噌が製造できることが明らかになった。また試作したふきのとう味噌は60日間の保存試験の結果、ラジカル捕捉活性に変化は認められなかった。

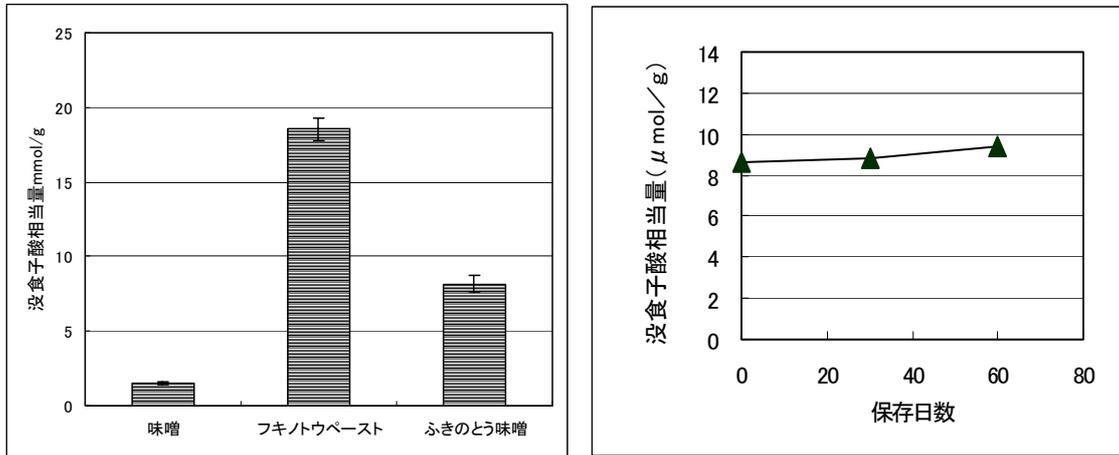


図5 ふきのとう味噌のラジカル捕捉活性とその安定性

本研究の一部は日本薬学会第126年会（2006年 仙台市）にて発表した。

#### 【引用文献】

- 1) Tomoko Yamaguchi *et al*, *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **62**(6),1201-1204 (1998)
- 2) 早津彦哉、微生物を用いた検出法「変異原物質試験法」（廣川書店）、15-35 (1990)

## 秋田の地下水・湧水の水質特性の解析

熊谷昌則\*, 大野 剛\*, 高橋 仁\*, 吉田知司\*\*

(\*秋田県農林水産技術センター総合食品研究所, \*\*徳島文理大学工学部)

Masanori KUMAGAI, Tsuyoshi OHNO, Hitoshi TAKAHASHI, and Tomoji YOSHIDA

### 【要 約】

食品製造において原料用水は製品の品質に多大な影響を与えることから、県内の原料用水ならびに水資源に関する水質特性の評価が業界から求められている。本研究では、食品製造への有効活用を目的として、原料用水としての水質特性を分析し、解析評価した。トリリニアダイアグラムによる水質特性の解析の結果、秋田の水はアルカリ土類炭酸塩型、アルカリ非炭酸塩型、そしてこれらの中間型に分類されることが示された。味覚センサ応答パターンによる評価においては、従来から報告されていた硬度との相関に加えて、今回はトリリニアダイアグラムによる分類との関連が示唆される新たな知見が得られた。化学的酸素消費量(COD)ならびに O index 基準から、秋田の水はきれいでおいしい水の多いことも示された。今後は、これらの水質特性にもとづいて食品製造における原料用水としての適性について、最終製品に与える影響を考慮しながら対象となる食品や飲料毎に個別に判断していく予定である。

### 【緒 言】

世界遺産の白神山地、名山連なる奥羽山脈、秀麗無比なる鳥海山を主な水源とする秋田の水資源は、おいしいお米や日本酒、そして秋田美人を育ててきた。秋田は水資源そのものがブランド化できる可能性を秘めているといっても過言ではない。県内の食品産業においても、秋田の水にこだわった商品開発の動きが加速している。しかしながら、食品の製造において用いられる原料用水は製品の最終品質に多大な影響を与えるにもかかわらず、県内の水資源に関しては原料用水としての水質特性を把握するための系統的な調査、研究はこれまで皆無であった。

そこで本研究では、業界からの要望にも応えるため、前報<sup>1)</sup>に引き続いて、県内各地より地下水・湧水を採水し、その原料用水としての水質特性を分析し、解析評価するとともに、それらをデータベース化することによって食品製造に活用させることを目的とした。

### 【方 法】

図 1 に、平成 17 年 2 月、5 月、8 月、11 月にそれぞれ採水された地下水・湧水の採水地点 16 ヶ所を示す。採水試料の主要な陽/陰イオンについては電気伝導度



図1 地下水・湧水の採水地点

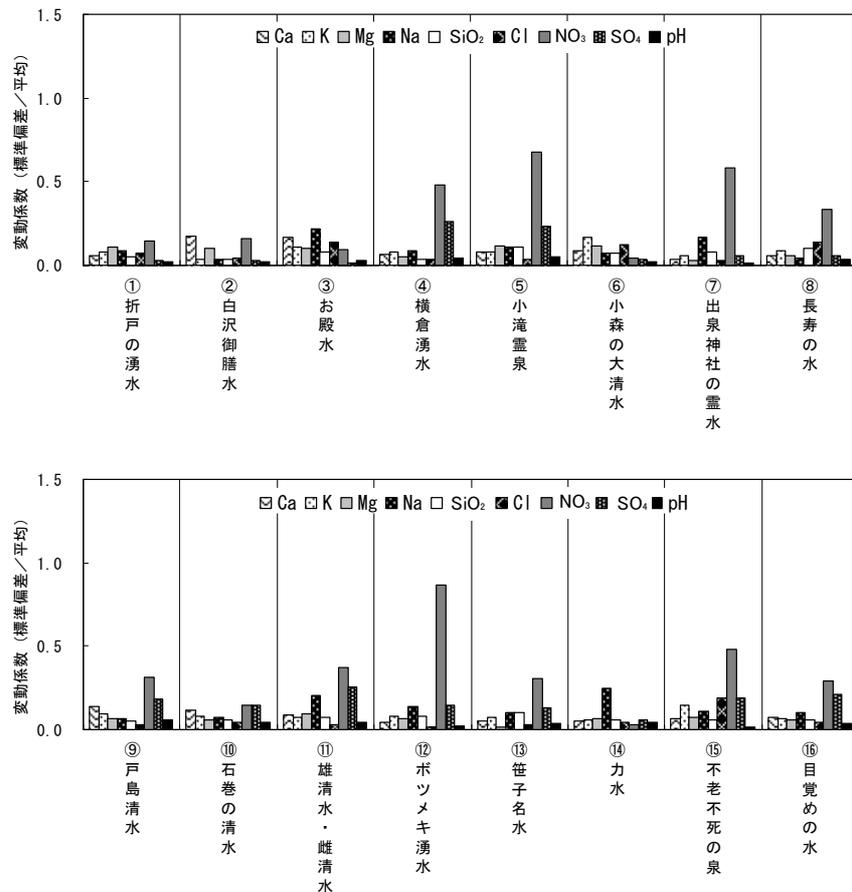


図2 16地点の水質成分の季節間変動

検出型イオンクロマトグラフ DX-100(DIONEX)を用い、また、主要な元素については誘導結合プラズマ発光分析装置 IRIS-AP(日本ジャーレル・アッシュ)を用いて、それぞれ定量した。化学的酸素消費量(COD)については過マンガン酸カリウム酸性法により求めた。また、おいしい水を識別するための指標として大阪大学の橋本らによって提案<sup>2)</sup>された「 $O\ index = (Ca+K+SiO_2) / (Mg+SO_4) \geq 2.0$ 」にもとづく評価を行った。一方、味覚センサによる識別は味認識装置 SA-402 (インテリジェントセンサーテクノロジー)を用いた<sup>1)</sup>。

### 【結果と考察】

図 2 に、地下水・湧水の水質成分の季節間変動を見るために、Ca イオン、K イオン、Mg イオン、SiO<sub>2</sub> イオン、Cl イオン、NO<sub>3</sub> イオン、SO<sub>4</sub> イオンならびに pH について、16 地点で年 4 回測定したときの変動係数を示した。これにより、これら 16 地点では、降雨・降雪などの影響を受けることなく、年間を通じて水質成分の変化の非常に少ない、安定した水質の地下水・湧水が多いことが分かった。

図 3 には各地点の硬度を示した。衛生試験法<sup>3)</sup>では、硬度が 50mg/L 未満を軟水、50～100mg/L を中程度の軟水、100～150mg/L を軽度の硬水、150～250mg/L を中程度の硬水、250～350mg/L を硬水、350mg/L より大を非常に硬度の硬水とする Taylor の分類を載せている。したがって、この基準では③、⑦、⑩地点の 3 試料は中程度の軟水に分類され、それ以外の 13 地点は軟水に分類されることになる。

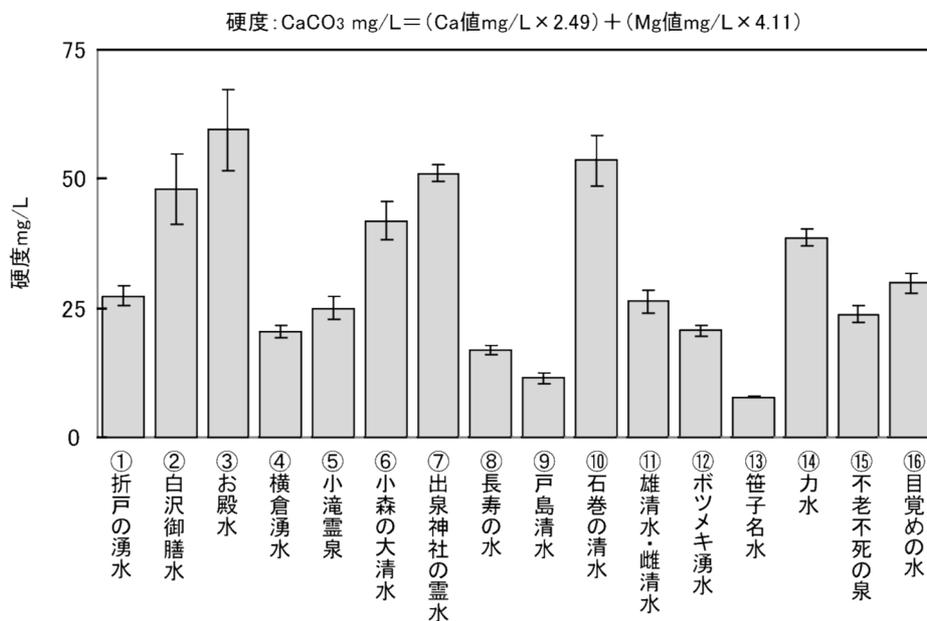


図 3 16 地点の水の硬度

次に図4には、トリリニアダイアグラム<sup>4)</sup>による秋田の水の水質解析結果を示した。トリリニアダイアグラムでは、溶存成分の濃度ではなく、溶存比の特徴が表示されている。トリリニアダイアグラム中の領域Ⅰはアルカリ土類非炭酸塩型、領域Ⅲはアルカリ炭酸塩型に分類されるが、今回採水された水でこれらに分類される地点はなかった。領域Ⅱのアルカリ土類炭酸塩型には7地点が、領域Ⅳのアルカリ非炭酸塩型には5地点が、そして領域Ⅴの中間型には4地点の水がそれぞれ分類された。原料用水としてCaイオンやMgイオンを比較的多く含む領域Ⅱ、Ⅴに分類されるやや硬度の高い水を用いた場合、逆に溶存イオンの比較的小さい領域Ⅳの水を用いた場合、それぞれが最終製品に与える影響は異なることが予想される。これらの水質特性を把握しておくことは、原料用水としての適性を知るための重要な判断基準となる。

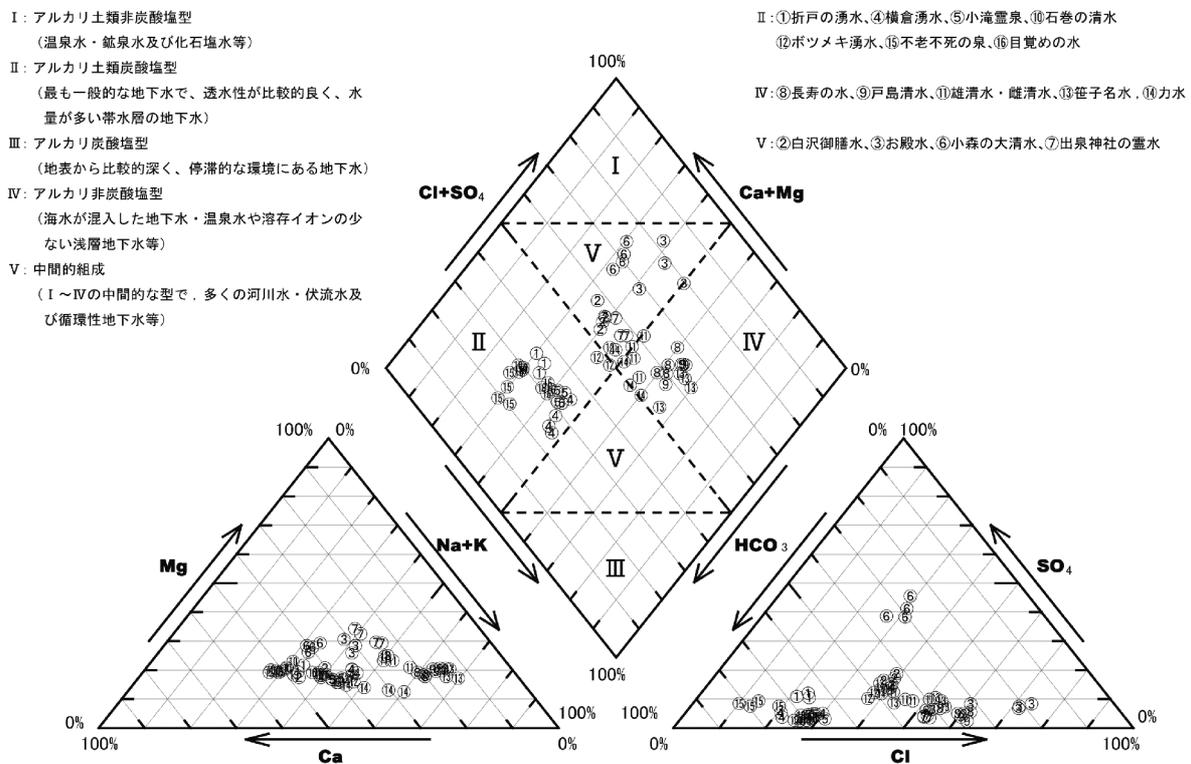


図4 トリリニアダイアグラムによる分類

有機汚濁の代表的な指標となる化学的酸素消費量(COD)については、平均値が0.20mg/Lであり、総じて有機汚濁は少ないと判断された。したがって、水道法第4条にもとづく水質基準における10mg/Lを越える地点はなく、さらに昭和60年に旧厚生省が発表した「おいしい水の条件」<sup>5)</sup>である3mg/Lを越える地点もなかった。一方、おいしい水を識別するための指標として橋本らによって提案されたO index<sup>2)</sup>にもとづいて評価したところ、16地点中14地点がおいしい水の基準を満



# Molecular Cloning of a Thermostable Raw Starch Digesting Amylase Gene from a *Streptomyces* sp.

Takahiro KANEKO

*Institute for Food and Brewing (ARIF), Akita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, 4-26 Sanuki, Arayamachi, Akita 010-1623, Japan*

Raw starch digesting amylase (RSA) from *Streptomyces* sp. E-2248 is a thermostable enzyme with a large potential for starch liquefaction and saccharification. The gene encoding this unique enzyme was cloned by a simple two-step PCR method, and expressed in *Escherichia coli*. A single open reading frame consisting of 1374 base pairs (67.47 mol% of G+C content) that encoded a polypeptide composed of 458 amino acid residues (*Mr* 49,386) was found. The *E. coli* transformant carrying the gene overproduced the recombinant RSA and the enzyme was successfully expressed under the transcriptional control of the *tac*-promoter. The purified recombinant enzyme was indistinguishable from that of the authentic enzyme, in terms of molecular weight and products, temperature, and pH profiles. The relationships between the structure and properties of the enzymes are also discussed.

**Keywords:** *Streptomyces*; amylase; raw starch; cloning; gene

## 1. Introduction

Starch is the major storage carbohydrate of many plants, and enzymes digesting starch are widely distributed in nature [1]. The substrate is completely hydrolyzed to glucose through the combined actions of enzymes including  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase, and debranching enzymes such as pullulanase. These amylolytic enzymes have been isolated and their biochemical properties have been studied for many years. Numerous amylolytic enzymes have been cloned, with some produced in heterologous expression systems [2-4], and the three-dimensional structures of several of them have been solved [5, 6].

The major application of amylases in the food industry is the saccharification of starch in the manufacture of diverse starch-derived products. Gelatinization and liquefaction of starch slurry, a required pretreatment, are catalyzed by  $\alpha$ -amylase at 70°C and 95°C,

respectively [7]. Therefore, amylases capable of digesting raw starch (e.g., raw starch digesting amylases (RSA)) have drawn the attention of researchers as a possible replacement for this energy-consuming and economically costly step [8]. Certain fungi and bacteria are known to produce RSA, and some of these amylases have been purified and characterized [9-11].

I have previously isolated a raw starch-utilizing microbe from mud in a milling factory [12]. The 16S ribosomal DNA sequencing and morphological properties of the strain indicated that it belongs to the genus *Streptomyces*, and the strain was named *Streptomyces* sp. E-2248. A potent raw starch digesting amylase (RSA) was purified from the culture supernatant of the strain and characterized [12].

To further investigate this enzyme, I have now cloned and sequenced the RSA gene of the *Streptomyces* sp. E-2248, and expressed, purified, and characterized it in *Escherichia coli*.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial strains and plasmids

*Streptomyces* sp. E-2248 was isolated in my laboratory and used for the enzyme preparation and as a donor strain of its chromosomal DNA. *E. coli* HB101 was used as a host strain for plasmid harboring and expression of the cloned

---

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number of the nucleotide sequence reported is **AB253790**.

*E-mail address:* kaneko@arif.pref.akita.jp

*Abbreviations:* RSA, Raw starch digesting amylase; PCR, polymerase chain reaction; ORF, open reading frame; LEP, Lysyl Endopeptidase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis

gene. Plasmid pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) was used for cloning and sequencing of DNA fragments. Plasmid pUK 223-3, which was constructed by Oda *et al.* [13], was used for expression of the gene. This 2.9 kbp plasmid derived from a 1.4 kbp *Sph*I (blunt-ended)-*Pvu*I fragment containing a *tac*-promoter, a *rrnB*-terminator, and a multi-cloning site of pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, UK) and a 1.5 kbp *Pvu*II-*Pvu*I fragment containing a replication origin of pUC18.

## 2.2. Culture conditions and media for the enzyme preparations

The strain E-2248 was cultivated aerobically at 30 °C for five days in a liquid medium containing 1% corn starch (sterilized separately by dry heating), 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.02% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O in tap water. The culture supernatant was prepared by centrifugation (10,000 x g, 10 min, 4 °C) of the broth.

*E. coli* harboring the recombinant plasmid was grown in LB medium [14] containing 50 µg/ml of ampicillin at 37 °C on a rotary shaker. After 16 h, IPTG was added to the medium to make 100 µM and the medium was further incubated at 37 °C for 8 h on a rotary shaker. The culture broth was sonicated and centrifuged.

## 2.3. Purification of the enzyme

The raw starch digesting amylase was prepared as previously described [12]. About 3 % (W/V) of corn starch was added to the supernatant described above, and the suspension was gently stirred at 4 °C for 30 min. Crude enzyme that adsorbed the starch was harvested by centrifugation and eluted by washing the precipitate with 10 mM acetate buffer (pH 5.0) containing 1 % of β-CD. After dialysis of the eluent against tap water, the raw starch digesting amylase was purified by chromatography on a DEAE-Toyopearl 650S (Tosoh Co., Tokyo, Japan) column (26.4 x 450 mm) with a continuous linear gradient of NaCl (0 to 0.5 M) at a flow rate of 1.5 ml/min, and a Toyopearl HW-55S gel filtration column (15 x 1000 mm) at a flow rate of 0.15 ml/min with 10 mM acetate buffer (pH 5.0). The purified enzyme preparation had a single protein band on SDS-PAGE [15] stained with Coomassie brilliant blue.

## 2.4. Enzyme and protein assays

Enzyme and protein assays were followed as described before [12]. For simplicity, enzyme activity was measured by the reducing sugar formed, as follows. In the standard condition, a reaction mixture was composed of 0.5 ml of 1% raw corn starch suspension containing 10 mM of acetate buffer (pH 5.0) and 5 mM of CaCl<sub>2</sub>, and 0.05 ml of enzyme solution in a 15 x 105 mm test tube. Incubation was carried out at 37 °C for 30 min with shaking. Adding 0.5 ml of Somogyi reagent stopped the reaction, and the amount of reducing sugar formed was determined by the Somogyi-Nelson method [16]. One µmole of glucosidic bond cleavage per min was expressed as one unit of enzyme activity. The enzyme activity was also measured using a substrate mixture containing 1% soluble or gelatinized starch, as above.

The protein contents of the enzyme preparations were measured by the method of Bradford [17] using Bio-Rad Protein Reagent (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). A280 was used to monitor the protein in the column effluents.

## 2.5. Analysis of N-terminal and internal amino acid sequence

Approximately 25 µg of the purified enzyme from *Streptomyces* sp. E-2248 was electrophoresed by SDS-PAGE and blotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, and the N-terminal amino acid sequence was determined with a Shimadzu protein sequencer, model PPSQ-10 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan).

For the internal amino acid sequence analysis, about 25 µg of the purified protein in 10 µl of 5 mM Tris-HCl (pH 9.0) containing 0.1% SDS was boiled for 3 min. 10 ng of lysyl endopeptidase (LEP, Wako Pure Chemical Industries, LTD., Osaka, Japan) was added to the solution and kept at 37 °C for 16 h. The preparation was electrophoresed (15% polyacrylamide gel) and blotted, and N-terminal amino acid sequences of peptide fragments on the PVDF membrane were analyzed as described above.

## 2.6. PCR cloning

DNA amplifications for cloning of RSA gene were done by polymerase chain reaction (PCR) as follows. Each 20 µl reaction mixture containing chromosomal DNA (1 µg) as a

template and sense and anti-sense primers (20 pmole each), was prepared by the protocol supplied with *Taq* polymerase (*Ex-Taq*, Takara Biomedicals, Kyoto, Japan). The sequences of the sense and anti-sense primers for the first inner PCR step were based on the N-terminal and internal amino acid sequence determined in this study as follows: sense primer (1-F), 5'-ACC AAG GAC GTC ACC GCS GAC CTC TTC GAG-3'; and anti-sense primer (1-R), 5'-GGC CAG CAT GAA GAC GTT CGC SAG GGT GTA-3' ('S' means 'G or C', see Fig. 2 and 4). The sense and anti-sense primers for the second inverse PCR step were designated based on the sequence of the amplified fragment at the first inner PCR step, as follows: sense primer (2-F), 5'-AGC GCA ACG GCA GCA CGC TGA ACT ACA AGA-3'; and anti-sense primer (2-R), 5'-GCA CTC CTT GGC CAC CGA GGC GTA GTT CCA-3' (see Fig. 2 and 4). The temperature program for each cycle was 94 °C for 1 min, 37 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min (or, in the case of the second inverse PCR step, 5 min). After 5 min at 94 °C for DNA denaturing, 25 cycles were run.

### 2.7. DNA sequencing

The cloned fragments were sequenced in both orientations by the dideoxy chain termination method [18] using a dye terminator cyclic sequencing kit (Perkin-Elmer Co., Foster City, CA, USA) and an automated DNA sequencer (Model 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Computer analyses of the sequence were done with GENETYX ver. 7 software (Genetyx Co, Tokyo, Japan).

### 2.8. Construction of RSA expression plasmid

For expression of the RSA gene in *E. coli*, two primers containing *EcoRI* or *HindIII* sites were designed as follows: sense primer, 5'-GGA AGA ATT CAT GGC ACG CAG AAC CCT CCC-3'; anti-sense primer, 5'-AGA CAA GCT TTC AGC AGC TCG ACT TGC CGG-3' and PCR was done with chromosomal DNA from the strain E-2248 as a template. The temperature program for each cycle was 94 °C for 1 min, 61 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min. After 5 min at 94 °C for DNA denaturing, 25 cycles were run. The amplified 1.4 kbp fragment was digested with *EcoRI* and *HindIII* and subcloned into the site of plasmid pUK223-3. The resulting RSA-positive plasmid was designated pRSAE-2248, and this pRSAE-2248 was introduced into *E. coli* HB101.

### 2.9. Product profile from raw corn starch

One percent of raw corn starch suspension containing 10 mM acetate (pH 5.0) and 5 mM CaCl<sub>2</sub> was incubated with the enzyme (7 U/g starch) at 50 °C. Aliquots were withdrawn, centrifuged, and diluted to 100 times. 100 µl of the dilutions were analyzed using the HPAEC system with a Carbobac PA-1 column (4 x 250 mm, Dionex, Osaka, Japan) and a pulsed amperometric detector (model ED-40, Dionex). The temperature of the column was ambient. The mobile phase of the column was a gradient of 0.5 M sodium acetate in 0.1 M NaOH at a flow rate of 1.0 ml/min.

### 2.10. Chemicals and others

Synthesized oligonucleotides for PCR primer were purchased from Promega Japan (Tokyo). High-amylose corn starch was provided by Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd. (Tokyo). The series of maltooligosaccharides used as external standards in the HPAEC analysis were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). All other chemicals used were of guaranteed grade. All other DNA manipulations were as described by Maniatis *et al.* [19] and all other analyses for characterization of the enzyme were done as described previously [12], unless otherwise stated.

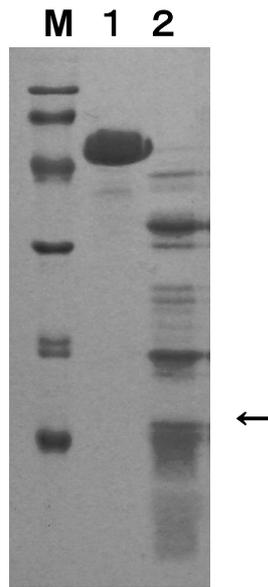
## 3. Results

### 3.1. N-terminal and internal amino acid sequences

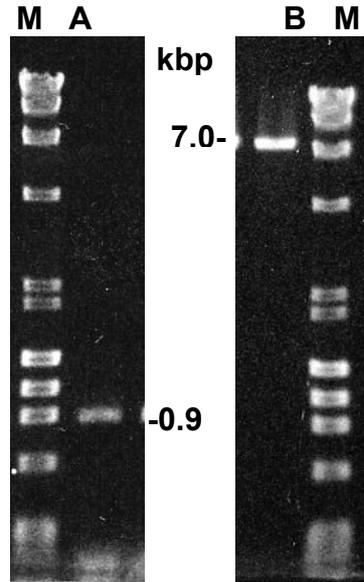
The N-terminal amino acid sequence of the intact enzyme from *Streptomyces* sp. E-2248 was analyzed as described in Materials and Methods, and determined as Ser-Pro-Pro-Gly-Thr-Lys-Asp-Val-Thr-Ala-Asp-Leu-Phe-Glu-Trp-. The internal amino acid sequence was determined as Ser-Gly-Ala-Asp-Tyr-Thr-Leu-Ala-Asn-Val-Phe-Met-Leu-Ala-, according to the N-terminal analysis of the 16 kDa peptide formed by the LEP treatment with the enzyme as described in Materials and Methods (Fig. 1).

### 3.2. Cloning and sequencing of the RSA gene by two-step PCR method

The two-step PCR method [20] used to clone the RSA gene is summarized in Fig. 2. The first inner PCR step was done to amplify a part of the RSA gene with chromosomal DNA from the strain E-2248 as a template, and the sense and anti-sense primers as described in

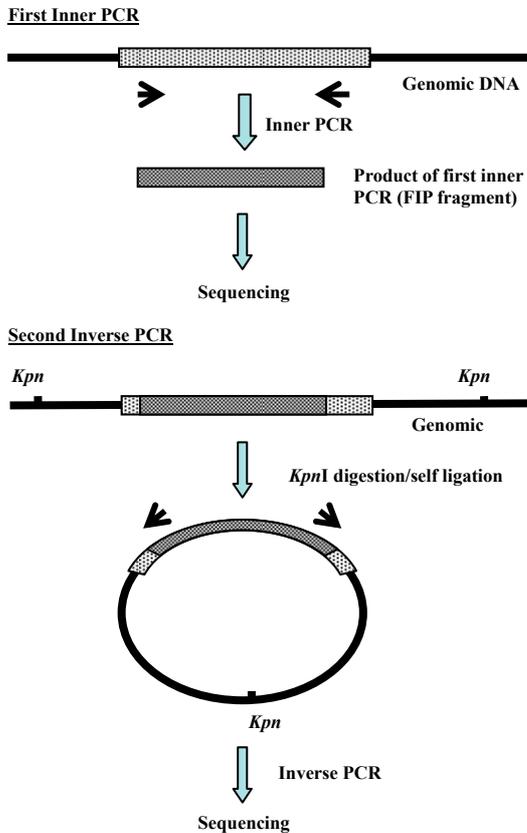


**Fig.1.** SDS-PAGE of intact and LEP treated RSA. LEP treatment, electrophoresis and blotting were done as described in “Materials and Methods”. Lane M, molecular mass standards, phosphorylase *b* (97,400), bovine serum albumin (66,700), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), lysozyme (14,400). Lane 1, intact RSA purified from the E-2248 strain. Lane 2, LEP-treated RSA. Arrowed fragment was sequenced.



**Fig.3.** Agarose gel electrophoresis of cloned fragments by the two PCR steps.

The reaction mixture of the first inner PCR step (A) and second inverse PCR step (B) were electrophoresed on 2 % of agarose. Lane M: molecular weight marker,  $\lambda$ -HindIII (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125bp) and  $\phi$ x174-HaeIII (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72bp).



**Fig.2.** The strategy for cloning of the RSA gene by PCR. The first inner PCR and the second inverse PCR were

Materials and Methods. In the resulting reaction mixture, a single 0.9 kbp band was found by agarose gel electrophoresis (Fig. 3). This amplified DNA fragment was subcloned into the plasmid pGEM-T and sequenced. By the DNA sequence, the fragment was comprised of 879 bp and showed a strong similarity to DNA sequences from other *Streptomyces* amylases [21-27]. This PCR product was designated as the FIP (first inner PCR) fragment. To ascertain the DNA sequence, I sequenced five independent FIP fragments.

In the DNA sequence analyzed above, there were no recognition sites for *KpnI* in this FIP fragment, so chromosomal DNA from the strain E-2248 was digested with *KpnI* and self-ligated. The second inverse PCR step was then done to clone the entire sequence of the RSA gene with the cyclic DNA mixture as the template (Fig. 2). An amplified single DNA fragment was found in the PCR reaction mixture, and was estimated to be 7.0 kbp long by agarose gel electrophoresis, as shown in Fig. 3. The results of subcloning and sequencing of the 7.0 kbp

done as described in “Materials and Methods”. A single open reading fragment was found from the nucleotide sequences of these two PCR fragments.

```

1  GGGCGCAAGACCGGGCCCGGGCTTCCACGCTGAAGCTTGTACCGGGCCGCGCTGCGCGCGCGCCGGGCCACCCGGACCTCGGGG
91  CGGGGGAGGCGGTGGAGTGGCTGCGGGGCGCCGAGGGCGCTCTGGCCCTCCGGGCGGGTGAACCTCGTGTGCGTGCAGAACACCACGGGGG
181 AGTCGGTGACGACCCCGTGTACGGCCCGCTGCTCACCAGCGGTGAGGTGACCGAGGCGGACGGCGAGACCAAGGTGCCCGCGACA
271 CCACGGTCTGGTGGACGACGCGACTGACCGCCGAGGGGGGGCCGGTCTGAGGCCCGGTCTGAAAATTCTGCATCAAGTTCACACC
361 GGCCCGCTGCGCTTCGGCCAGCGGGCCCTTAACATCTGCGTACCGCAAAGCTTGTGAAATATTTACGCAAGCCTTCAGCGGTCCCGTCG
451 CCTTCAACGTGAAGGAACCCACATGGCAGCAGAACCTCCCCACGGCGGTGCGCCTCACAGCCGCGCTGTGGTTGGCATGACCCCG
      M A R R T L P T A V A L T A A A L V G M T P
      1-F                               2-R
541 ACGGCCCGGAGGCCTCCCGCCCGGCACCAAGGACGTACCGCCGACCTCTTCGAGTGGAACTACGCCTCGGTGGCCAAGGAGTGCACC
      T A A E A S P P G T K D V T A D L F E W N Y A S V A K E C T
631 ACCGCCTCGGCCCGCCGCTACGGATACGTCCAGGTCTCCCGCCCGGAGCACATACAGGGGGCGCAGTGGTGGAGTCGTACCAG
      T A L C T G P A G Y G Y V Q V S P P A E H I Q G A Q W T S Y Q
721 CCCGTGTCTACAAGATCGCGGGCCGCTCGGCGACCGCACCGCCTTCGGAACATGGTGAACACCTGTACAGCGCCGGTGTGAAGTTC
      P V S Y K I A G R L G D R T A F R N M V N T C H A A G V K V
811 GTCGTGGACACCGTGTCAACACATGTGCGGGGACGGCCACCGCCACCGCCGCTCGTGTACACGAAGTACGACTACCCGGCCCTG
      V V D T V I N H M S A G S G T G T G G S S Y T K Y D Y P G L
901 TACTCGGTCTACGACTTCGACGACTGCACCTCCAGGTGTGCAACTACTCCGACCGCTGGAACGTGACGACTGCGAACTCGTCCGGCTC
      Y S V Y D F D D C T S Q V S N Y S D R W N V G H C E L V G L
991 GCCGACTCGACACCGCGAGGAGTACGTCCGCAAGACCATCGCCGGTACATGAACGACCTCCTCACCCCTCGCGTTCGACGGCTCCGCG
      A D L D T G E E Y V R K T I A G Y M N D L L T L G V D G F R
1081 ATCGACGCGGCAAGCACATCCCGCCCGGTGACCTGGCAACATCAAGAGCCGCTGACCAATCCGTCGCGCTACTGGAAGCAGGAGGTC
      I D A A K H I P A G D L A N I K S R L T N P S A Y W K Q E V
1171 ATCTAGCGCGGGAGAGGCCGTCCAGCCCTCCGAGTACACCGGCAACGGAGACGTCCAGGAGTTCGTTACGCCTACGACCTCAAGCCG
      I Y G A G E A V Q P S E Y T G N G D V Q E F R Y A Y D L K R
1261 GTCTTACACAGCGAGAAGCTCGCTACCTACCAACTACGGCGAGGGCTGGGGCTATCTGAACAGCTCGGTCCGCGGGCGTCTTCGTGAC
      V F T S E K L A Y L T N Y G E G W G Y L N S S V A G V F V D
      2-F                               1-R
1351 AACCACGACACCGAGCGCAACGGCAGCAGCTGAACTACAAGAGCGGCGCCGACTACACCCTGGCGAACGCTTTCATGCTGGCCTGGCCC
      N H D T E R N G S T L N Y K S G A D Y T L A N V F M L A W P
1441 TACGGCGCCCCGACGCTCAACTCCGGCTACGAGTGGTCCGACGCGGACGCGCGCCGCCAACGGCGGCCAGTGAACGCTGCTGGCAG
      Y G A P D V N S G Y E W S D A D A G P P N G G Q V N A C W Q
1531 GACGGCTGGAAGTGCACGACGCTGGCCGGAGATCAAGTCCATGGTCCGCTTCGCAACGCGACCCGCGGACAGGCGGTCCGCAACTGG
      D G W K C Q H A W P E I K S M V A F R N A T R G Q A V A N W
1621 TGGACAACCGCAACACCGCATCGCGTTCGGCCGGGGCACCAAGGGCTACGTGGCGATCAATACGAGTCCCTCGTCCCTGACCCGACCC
      W D N G N N A I A F G R G T K G Y V A I N H E S S S L T R T
1711 TACCAGACGCTCCCTCCCGCCGGGACGTAAGTCAACGTCGCAACACACCCCGGTGACGGTGAATCCAGCGGGCAGTCCACCCGCCACC
      Y Q T S L P A G T Y C N V Q N N T P V T V N S S G Q S T A T
1801 CTGGGCTCGAACACCGCCCTCGCGCTCTACGCCGGCAAGTCGAGTGTGTAGCCACGCTGTGACGGAGCGTGAAACCTCTTGGGGAGGT
      L G S N T A L A L Y A G K S S C *
1891 TTCACGCCCTTGCCGCAAAACCCAGCAACTCCCGAAGGAGTCTCACCTGTGATACCGAGATGGCCGGCGCCGCGAGGCGCCGTAC
1981 CCCGCACCGTGCAGCGGCGCGGCCGTACCCGCCGCCCTCGCCGCGCGCTGCTCCAGCCGCTGGCCGCCACGCGGCCGGCCCGC
2071 CCGCGCCCGCTCGGACGCAAGCTCGCCGCCGTACCCGCCGGCACGACGCCACCCGCGAGCAGTTCTACTTCTGCTCGCCGACCGCT
2161 TCGCCAACGGGACCCCTCCAACGACAGGGGGGTCTGACCGGCTCCCGCTGTCCACGGGTACGACCCACCGACAAGGGCTTCTACC
2251 AGGGCGGCGACCTCAAGGCTGACGAAGCGGCTGACTACATCAAGGGCTCGGCACCACGGCCATCTGGCTGGCGCGATCTTCAAGA
2341 ACCGCCCGTGCAGGGCACCGGACGCAACGCTCGCCGGCTACACGGCTACTGGATCACCGACTTACCCAGGTGCACCCGACTTCGG

```

**Fig.4.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of the RSA gene.

The deduced amino acid sequence of the RSA gene is described below the nucleotide sequence by a one-letter notation. The primers for the first inner PCR step (1-F and 1-R) and the second inverse PCR step (2-F and 2-R) are shown underlined.

PCR fragment showed that the DNA sequences of both termini of this inverse PCR product overlapped with those of the FIP fragment.

Putative regions of the ribosome-binding site GAAGGAA [24], initiation ATG codon, and termination TGA codon were also found in this PCR fragment. To ascertain this DNA sequence, I sequenced five independent isolates of inverse PCR.

From the sequencing data of these two

fragments, a single open reading frame (ORF) of 1374 bp that could encode a polypeptide of 458 amino acids was found. The G+C content of this structural gene was 67.47 mol%. Fig. 4 shows the entire nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the RSA gene. The nucleotide sequence analyzed here was submitted to the DDBJ/GenBank/EMBL DNA databases and given the accession number AB253790.

### 3.3. Expression, purification and characterization of RSA

The transformant harboring the plasmid pRSAE-2248 was cultured in one liter of LB medium as described in Materials and Methods, and the RSA was extracted by sonication. The crude extract had a strong activity, 0.16 U per ml of culture broth, and this was 2.3-fold that of the enzyme productivity from *Streptomyces* sp. E-2248. The RSA was purified from the extract by chromatographic procedures as described in Materials and Methods. The final preparation showed 67.7% activity recovery. The purified enzyme preparation had single protein band on SDS-PAGE and a relative molecular mass of 49 kDa was estimated from the migration distances in relation to reference proteins (Fig. 5).

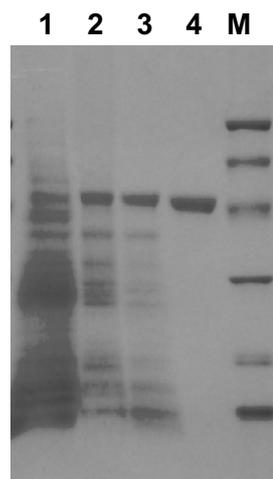
To determine the effects of temperature and pH on enzyme activity, the reaction mixture described in Materials and Methods was incubated at various temperatures (at pH 5.0) or at various pH (at 37 °C) for 30 min and the reducing power formed was measured. The maximum activity of the RSA from *E. coli* was observed around 50 to 60 °C and pH 6, respectively.

The effect of temperature on the stability of the enzyme was then measured. After incubation of the enzyme solution (pH 5.0) at various temperatures for 30 min, the remaining activity was measured. There was no loss of enzyme activity below 50 °C in the presence of 5 mM CaCl<sub>2</sub> and even after heating at 60 °C, about 50% of the activity remained.

To determine the effect of pH on the enzyme stability, the enzyme solution was incubated at various pH at 50 °C for one hour in the presence of 5 mM CaCl<sub>2</sub>, and the remaining activity was measured. There was no loss of enzyme activity at pH 6.0 and about 18% loss at pH 5.0. Even after incubation at pH 7.0, about 60% of the activity remained.

The products profile from raw corn starch by the enzyme digestion was investigated. The dominant product was maltose and other maltooligosaccharides were also found. After 48 h incubation, the percentages of glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, and maltopentaose to the total carbohydrates, were 19.6, 56.3, 9.3, 2.8, and 5.6, respectively.

These results were the same as the properties of the authentic enzyme from *Streptomyces* sp. E-2248 described previously [12].



**Fig.5.** SDS-PAGE of RSA expressed in *E. coli*.

Purification procedures were described in “Materials and Methods”. Whole cell extract (lane 1), and the effluents from starch adsorption (lane 2), DEAE-(lane 3), and Toyopearl HW55s (lane 4) column are shown. Approximately 10µg of proteins were put on each lane. Lane M: Molecular mass standards are: phosphorylase *b* (97,400), bovine serum albumin (66,700), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), lysozyme (14,400).

## 4. Discussion

Previously, I isolated a RSA-producing streptomycete from mud in a milling factory [12]. The enzyme is an endo-type, strongly starch-adsorbable amylase with a molecular weight of 47,000. In the present study, I cloned the RSA gene from *Streptomyces* sp. E-2248 using a two-step PCR method.

For internal amino acid sequence analysis, the purified RSA was pretreated with SDS and boiled, and partially digested by LEP. I tried several pretreatments in this partial digestion, and found suitable conditions as described in Materials and Methods. Four fragments were found after electrophoresis of the partially digested preparation. The N-terminal amino acid sequences of the four fragments were as follows: Ser-Gly-Ala-Asp-Tyr-Thr-Leu-Ala-Asn-Val-Phe-Met-Leu-Ala- (the 16 kDa fragment in Fig. 1), Glu-Cys-Thr-Thr-Ala-Leu-Gly-Pro-Ala-Gly-Tyr-Gly-Tyr-Val-Gln-Val- (21 kDa), Tyr-Asp-Tyr-Pro-Gly-Leu-Tyr-Ser-Val-Tyr-Asp-Phe-Asp-Asp- (25 kDa), and Ile-Ala-Gly-Arg-Leu-Gly-Asp-Arg-Thr-Ala-Phe-Arg-Asn-Met-Val- (34 kDa). I designed four anti-sense primers based on those internal amino acid sequences and the second and third letters of the triplets were substituted for G or C,

```

RSA: 1 -----SPPGTKDVTADLFEWNYASVAKECTTALGPA 31
TAA: 1 ATPADWRSQSIYFLLTDRFARTDGS'TTATCNTADRKYCGGTWQGIIDKLDYIQGMGFTAI 60

RSA: 32 GYGYVQVSPFAEHIQGAQWWTSYQPVSYKIAGRIGDRTAFRNMVNTCHAAGVKVVVDITVI 91
TAA: 61 WITPVTALPQOTTAYGDAYHGYWQDIIYSLNENYGTADDLKALSSALHERGMYLMVDVVA 120

RSA: 92 NHMS-AGSGTGTGGSSYTKYDYPGLYSVYDFDDCTSQVSNYSDRWNVQHCELVGLADLDT 150
TAA: 121 NHMGYDGAAGSSVDYSVFKPFSSQDYFHPFCLIQNYEDQTQVEDCWLGDN--TVSLPDLDT 178

RSA: 151 GEEYVRKTIAGYMNLLT-LGVDFRIDAAKHIPAGDLANIKSRLTNPSAYWKQEVIIYGA 209
TAA: 179 TKDVFVKNNEWYDVGSLVSNYSIDGLRIDTVKHVQKDFWPGYN---KAAGVYICIGEVLDGD 235

RSA: 210 GEAVQPSSEYTGNGDVQEFRYAYDLKRVF--TSEKLA--YLTNYGEGWGYLNSVAGVFD 265
TAA: 236 PAYTCTPYQNVMDG-VLNYPYYPILLNAFKSTSGSMDLLYNMINTVKSDCPDSTLLGTFVE 294

RSA: 266 NHDTERNGSTLNYKSGADYTLANVFMALWPYGAFDVNSGYEWSADADAGPPNGGQVNAQWQ 325
TAA: 295 NHDNPRFAS--YTNDIALAKNVAAFIILNDGIEIYAGQE--QHYAGGNDPANREAITWL 349

RSA: 326 DGWKCQ-HAWPEIKSMVAFRN-----ATRGOAVANWWD-NGNNAIAFGRGTKG--YVAIN 376
TAA: 350 SCYPTDSELYKLIASANAIRNYAISKDTGFVTVYKNWPIYKDDTTIAMRKGTDGSIQIVTIL 409

RSA: 377 HESSSLTRTYQTSIPAGTYCNVQN-----NIEVTVNSSGQSTATLGSNTALALYAGKSS 430
TAA: 410 SNKGASGDSYTLISLGGAGYTAGOQLTEVIGCTIVTVGSDGNVPPVMAGGLPRVLYPTEKL 469

RSA: 431 C----- 431
TAA: 470 AGSKICSSS 478

```

Fig.6. Comparison of the amino acid sequence of the RSA with those of the  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae*.

RSA: raw starch digesting amylase from the strain E-2248(this study); TAA:  $\alpha$ -amylase from *Asp. oryzae* (Taka-amylase). The signal peptide regions are replaced. Identical amino acid residues are boxed.

where possible. The first inner PCRs were performed with a sense primer designed from the N-terminal amino acid sequence of the intact RSA and an anti-sense primer designed above, and 0.9 kbp, none, 350 bp, less than 300 bp, of DNA fragments were formed in each PCR. The largest 0.9 kbp fragment was sequenced, followed by the second inverse PCR was done as described in Materials and Methods.

By this two-step PCR method, I have cloned and sequenced the RSA gene from the strain E-2248. The sequence of the N-terminal 15 amino acids of the extracellular RSA from the *Streptomyces* was determined with a peptide sequencer. This amino acid sequence was identical to that deduced from the DNA sequence (see Fig. 4). This result suggests that the first 27 amino acid residues, from the initiator Met to the Ala, represent a signal peptide that was removed during secretion of the RSA. Thus, according to the nucleotide sequence, mature RSA is comprised of 431 amino acids and has a Mr of 46748.51. Toda *et al* [28] showed that the  $\alpha$ -amylase from *Asp.*

*oryzae* (Taka-amylase, which is one of the smallest  $\alpha$ -amylase) comprises 478 amino acids. The RSA is comprised of 431 amino acids, and so is smaller than Taka-amylase.

Fig. 6 shows the alignment between these two sequences. Computer analysis showed 67.9% similarity and 22.4% identity. Four regions of consensus sequence inferred to be the active and/or substrate-binding site of  $\alpha$ -amylase were also found (DTVINH from 88th amino acid residue in RSA, GFRIDAACH from 173th, EVIY from 204th, and FVDNHD from 263th). I have no information about X-ray diffraction studies of the enzyme, but I presume that RSA is folded in three domains, a  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel catalytic domain, a small domain protruding out from the barrel in the place of the loop 3, and a C-terminal eight-stranded anti-parallel  $\beta$ -sandwich domain, similar to Taka-amylase and a number of  $\alpha$ -amylases. The enzyme has no extra domains that bind to raw starch, on either its C- or N-terminus. Raw starch binding ability of the enzyme would depend on a few amino acid substitution of the active and/or substrate-binding site.

## Acknowledgement

Analysis of DNA sequencing was conducted with the Life Research Support Center in Akita Prefectural University.

## References

- [1] Hayashida S, Teramoto Y, Inoue T, and Mitsui S. Occurrence of an affinity site apart from the active site on the raw-starch-digesting but non-raw-starch-adsorbable *Bacillus subtilis* 65  $\alpha$ -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2584-2586 (1990).
- [2] Konishi H, Sato T, Yamagata H, and Udaka S. Efficient production of human  $\alpha$ -amylase by a *Bacillus brevis* mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34 297-302 (1990).
- [3] Sogaard M, Anderson J. S, Roepstorff P, and Svensson B. Electrospray mass spectrometry characterization of post-translational modification of barley  $\alpha$ -amylase 1 produced in yeast. *Bio/Technology* 11, 1162-1165 (1993).
- [4] Svensson B, and Sogaard M. Protein engineering of amylases. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 34-42 (1992).
- [5] Matsuura Y, Kusunoki H, Harada W, and Kakuda M. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase. *J. Biochem. (Tokyo)* 95, 695-702 (1984).
- [6] Mikami B, Hegre ED, Sata M, Katsube Y, Hirose M, Morita Y, and Sacchettini J C. The 2.0 Å resolution structure of soybean  $\beta$ -amylase complex with  $\alpha$ -cyclodextrin. *Biochemistry* 32, 6836-6845 (1993).
- [7] Bigelis R. Carbohydrates: In T. Nagodawithana and G. Reed ed. *Enzymes in food processing* 3rd ed. Academic press, Inc., San Diego, Calif., p.124-125 (1993).
- [8] Mikuni K, Monma M, and Kainuma K. Alcohol fermentation of corn starch digesting by *Chalara paradoxa* amylase without cooking. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 729-732 (1987).
- [9] Hamilton LM, Kelly CT, and Fogarty WM. Purification and properties of the raw starch degrading  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Proc. Biotechnol.* 35, 27-33 (1999).
- [10] Hamilton LM, Kelly CT, and Fogarty WM. Purification and properties of the raw starch degrading  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Biotechnol. Lett.* 21, 111-115 (1999).
- [11] Mamo G, and Gessesse A. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable  $\alpha$ -amylases from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 433-438 (1999).
- [12] Kaneko T, Ohno T, and Ohisa N. Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1073-1081 (2005).
- [13] Oda K, Ito M, Uchida K, Shibano Y, Fukuhara K, and Takahashi S. Cloning and expression of an isovaleryl pepstatin-insensitive carboxyl proteinase gene from *Xanthomonas* sp. T-22. *J. Biochem.* 120, 564-572 (1996)
- [14] Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* 1st edn. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, N. Y. (1982)
- [15] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- [16] Fukui S. "Measurement Methods of Reducing Sugar. *Experimental Methods of Biochemistry Series No.1*," Gakkai Shuppan Center, Tokyo, pp. 10-12 (1978).
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
- [18] Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977)
- [19] Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* 1st edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1982)
- [20] Kaneko T, Saito K, Kawamura Y, and Takahashi S. Molecular Cloning of Acid-Stable Glucose Isomerase Gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by a Simple Two-Step PCR Methods, and Its Expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 1054-1062 (2001)
- [21] Mellouli L, Ghorbel R, Virolle MJ, and Bejar S. Alpha-amylase gene of thermophilic *Streptomyces* sp. TO1: nucleotide sequence transcriptional and amino acid sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 17-23 (1998).
- [22] Bahri SM, and Ward JM. Sequence of the *Streptomyces thermoviolaceus* CUB74  $\alpha$ -

- amylase-encoding gene and its transcription analysis in *Streptomyces lividans*. *Gene* 127, 133-137 (1993).
- [23] Vigal T, Gil JA, Daza A, Garcia-Gonzalez MD, and Martin JF. Cloning characterization and expression of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU3570. *Mol. Gen. Genet* 225, 278-288 (1991).
- [24] Long CM, Virolle MJ, Chang SY, Chang S, and Bibb MJ. Alpha-amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence expression motifs and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate  $\alpha$ -amylases. *J. Bacteriol.* 169, 5745-5754 (1987).
- [25] Yin XH, Gagnat J, Gerbaud C, Guerineau M, and Virolle MJ. Cloning and characterization of a new  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces lividans* TK24. *Gene* 197, 37-45 (1997).
- [26] Virolle MJ, Long CM, Chang S, and Bibb MJ. Cloning, characterization and regulation of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces venezuelae*. *Gene* 74, 321-334 (1988).
- [27] Hoshiko S, Malabe O, Nojiri C, Katsumata K, Satoh E, and Nagaoka K. Molecular cloning and characterization of the *Streptomyces hygrosopicus*  $\alpha$ -amylase gene. *J. Bacteriol* 169, 1029-1036 (1987).
- [28] Toda H, Kondo K, and Narita K. The Complete Amino Acid Sequence of Takamylase A. *Proc. Japan Acad* 58, 208-212 (1982).

*Streptomyces* sp. E-2248 株の生産する生澱粉分解酵素は中程度の耐熱性を示し、澱粉の液化及び糖化工程において有用なものである。本酵素遺伝子を二段階 PCR 法を用いて簡便にクローニングした。得られた構造遺伝子は 1374 塩基上にコードされ (GC 含量 67.47mol%)、アミノ酸 458 残基 (分子量 49,386) に相当した。本遺伝子は大腸菌で効率よく発現され、その分子量、生成物組成、温度や pH に対する挙動などは親株由来の酵素と全く同一の性質を示した。現在最も良く研究されている  $\alpha$  アミラーゼの一つである麹菌由来のアミラーゼ(タカアミラーゼ)と本酵素とを比較し、その構造と機能についての考察も行った。



## 2. 総説

- ①「脳機能計測による新しい食品の評価法の開発」・・・・・・・・・・ 29  
熊谷昌則、高橋徹、佐藤文華、渡部雅実、堀一之、樋渡一之、戸枝一喜、  
秋山美展

# 脳機能計測による新しい食品の評価法の開発

熊谷昌則\*, 高橋徹\*, 佐藤文華\*, 渡部雅実\*, 堀一之\*, 樋渡一之\*, 戸枝一喜\*, 秋山美展\*\*  
(\*秋田県農林水産技術センター総合食品研究所, \*\*秋田県立大学生物資源科学部)

Masanori KUMAGAI, Toru TAKAHASHI, Fumika SATO, Masami WATANABE,  
Kazuyuki HORI, Kazuyuki HIWATASHI, Kazuki TOEDA and Yosinobu AKIYAMA

## 要約

秋田県農林水産技術センター総合食品研究所では、平成 19 年度から秋田県央エリア産学官連携促進事業「中・高齢者の心身両面の健康を支える米等を活用した食品の開発と食品産業クラスターの形成」(文部科学省都市エリア事業)に係わる研究を開始した。ここでは、研究テーマのひとつとして、脳波等のリアルタイム計測による新規食品評価法の開発と咀嚼行動による脳機能活性化に関する研究に取り組んでいる。そこで本稿では、脳機能に対する生理学的効果の評価法について概観するとともに、食と脳機能の関連についての研究事例の中から、咀嚼と脳活動の関係を中心に述べる。我々はこの研究により、食品の受容性や嗜好性、さらには食品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食品評価法の開発を目指している。また、脳機能賦活効果評価システムの構築により、ある特定の食品成分や食行動(調理行動、咀嚼などを含む食事行動、食事環境など)による脳機能の活性化に関する研究を行い、加齢抑制や認知症予防に効果が期待できる食品の開発につなげたいと考えている。

## 1. はじめに

秋田県は、人口構成に占める高齢者の割合が高く、がんや高血圧などの生活習慣によって引き起こされる疾病での死亡率も高いことが知られている。そこで、県民が安心して生活できる健康長寿社会の実現にむけた取り組みが求められている。

秋田県農林水産技術センター総合食品研究所では、平成 19 年度から文部科学省の都市エリア事業<sup>1)</sup>の採択により、秋田県央エリア産学官連携促進事業として「中・高齢者の心身両面の健康を支える米等を活用した食品の開発と食品産業クラスターの形成」に係わる研究を開始したところである。

この事業では、醸造食品、発酵食品などの食品製造に関し、長い伝統と技術蓄

積を有する本県「県央エリア」の食品産業の振興・活性化を図り、食品産業クラスターの形成を目指して、中・高齢者の心身両面の健康を支えることのできる米等を活用した長寿社会対応型食品を開発し、全国に向けて発信することを目標としている。研究テーマとしては、①脳波等のリアルタイム計測による新規食品評価法の開発と咀嚼行動による脳機能活性化に関する研究、②中・高齢者の心身両面の健康維持に効果の期待できる食品・酒類の開発、③穀類等をベースとした特定保健用食品の開発を、それぞれ本事業の中核課題として位置づけている。

本稿では、食品産業において技術的、科学的な面ではどちらかというとなだなじみの少ない、食と脳機能の係わりを扱うことになる研究テーマ①についての技術動向と将来展望について概観することにした。

## 2. 脳機能に対する生理学的効果の評価法

食品は、ヒトが食べ物として口に入れて飲んだり食べたりしたときに、初めてその普遍的意味が全うされる。したがって、食品を評価するということは、食品そのものの物質としての特性評価のみならず、食品を摂取する側のヒトそのものを評価するという重要性も重要となってくる。特に後者については、栄養学的見地（一次機能）、嗜好的見地（二次機能）、体調節機能的見地（三次機能）からのアプローチによる研究がそれぞれ活発に行われてきたが、さらに食の脳機能に対する生理学的効果の評価に関する研究が注目を集めるようになってきた。

近年の医療診断、分析技術のめざましい進歩により、脳の働きを頭蓋骨の外から非侵襲的に計測することが可能になっている<sup>2)</sup>。これまでは医師を中心とした医療従事者のための手法であったものが、今では学際的に様々な分野で脳機能計測が行われるようになってきた。その理由のひとつには、測定機器の汎用性が向上したことがあげられる。

脳の働きを非侵襲的に計測する方法としては、脳活動に伴う微弱な電磁界変化を計測する方法と、局所的な脳血流変化量を計測する方法がある。ここでは我々の研究グループが用いている脳波測定法と近赤外分光法を用いた脳血流変化の測定法を中心に、脳機能に対する生理学的効果の評価方法について述べる。

### 2-1) 脳波と事象関連電位

生体が活動するときには何らかの電気現象が起こっている。脳内で起こる神経活動は、頭皮上から記録される電位の変化によって直接とらえることができるが、1920年代にドイツのベルガー博士によって初めてヒトの脳で記録された<sup>2)</sup>。脳電図または一般に脳波(electroencephalogram : EEG)は、皮下組織の電解質成分に近い組成のクリームを使って頭皮と皿電極を固定した後、2組の電極間の電位差をアンプで増幅することによって記録される。

脳波は、一定の周期を持った波が反復出現して基礎律動を形成している場合が多い。国際脳波学会では、周期の逆数である周波数の帯域によって、 $\delta$ 波(4Hz未満)、 $\theta$ 波(4~8Hz)、 $\alpha$ 波(8~13Hz)、 $\beta$ 波(13Hz以上)に分類している<sup>3)</sup>。これらの脳波は、その個体が生きている限り絶え間なく自発的に出現する。

一方、外界から一定の刺激を与えた場合に大脳に誘発される一過性の電位があり、これを誘発電位という<sup>2)</sup>。誘発電位には、大別すると視覚刺激や聴覚刺激、手足の感覚刺激などによって誘発される刺激関連電位(stimulus-related potential : SRP)と、その刺激が何であったのか、刺激の意味や注意といった心理的变化のような高次の認知機能を反映すると考えられている事象関連電位(event-related potential : ERP)と呼ばれるものがある。ERPは情報処理能力やその速度に与える影響を検討する目的で用いられる。刺激を与えてからその電位が出現するまでの時間を「潜時」といい、その大きさは「振幅」で表される。ERPの測度のうち、潜時約300ミリ秒に出現する陽性の電位は、頭頂部正中線上から最もよく記録され、陽性のP(positive)とその

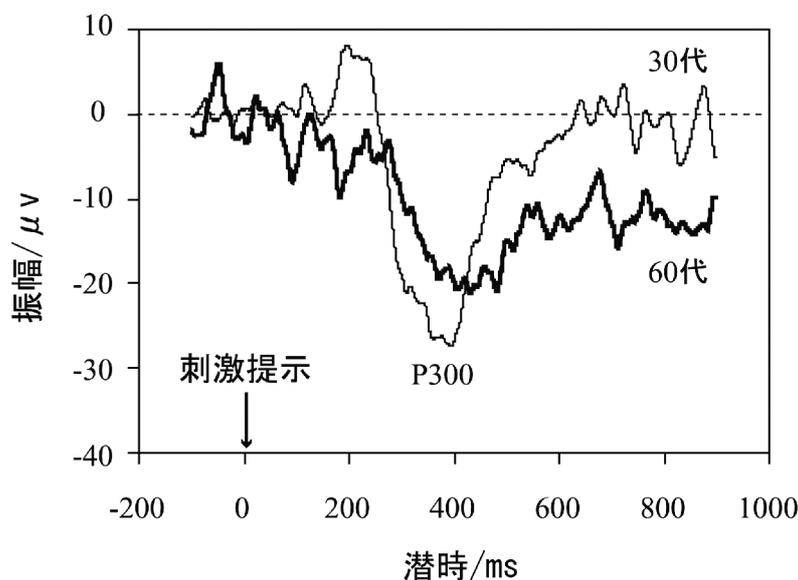


図1 事象関連電位(ERP)波形の例<sup>4)</sup>

平均潜時から、特に P300 成分と呼ばれている。図1に ERP 波形の例<sup>4)</sup>を示す。P300は健常人でも加齢によって潜時は長くなり、振幅が小さくなること、また、アルツハイマー病などの認知症による知能低下によっても潜時が延長することが知られている<sup>2)</sup>。杏林大学医学部精神神経科の古賀教授らは、アラキドン酸 240mg 含有油脂を健康な 60 歳前後の高年齢者に 1 ヶ月間、継続摂取させたところ、P300 の平均潜時の短縮と平均振幅の増加を認めたと報告した<sup>5)</sup>。したがって、P300 潜時の短縮と振幅の増加は、脳機能活性化による加齢抑制の指標として有望と考えられている。

また、好き嫌いなどの嗜好の差異を ERP で検出しようとする試みもあり、振幅の変化が関係しているのではないかとの推測もある<sup>6)</sup>。

## 2-2) 脳血流変化

脳血流の変化を近赤外(NIR : near infrared)領域の光で非侵襲的に測定する手法があり、NIRS(near infrared spectroscopy)、あるいは機能的という意味の functional の f をつけて fNIRS、あるいはまた光トポグラフィーなどと呼ばれている。

NIR 領域とは、800-2500nm の波長域を指し、非常に透過性の良いのが特長である。紫外、可視、赤外領域の光では得られない透過吸収スペクトルを測定することができる<sup>7)</sup>。頭皮上から光ファイバで照射された NIR 光は、成人頭部で数十 mm 程度の深部にまで到達し、白質や灰白質で散乱して再び頭皮外にもどるので、この散乱光を照射位置から 30mm 程度離れた位置で検出することができる<sup>8)</sup>。

一般に、神経細胞が活動すると酸素消費量が増加する。酸素は血液中のヘモグロビンに結合して供給されるが、このとき酸素化ヘモグロビン(oxy-Hb)が脱酸素化ヘモグロビン(deoxy-Hb)に変化する。血液中の oxy-Hb と deoxy-Hb は両者とも NIR 領域に異なった吸収スペクトルを持ち、さらに 800nm 近傍には等吸収点が存在するた



図2 NIRS による脳血流測定の様子

(秋田県農林水産技術センター総合食品研究所)

め、これにより両者の濃度変化が求められる。このようにして、NIRS では脳内の神経活動が起こっている領域のヘモグロビンの濃度変化を外部から非侵襲的に計測することができる。NIRS の光源に用いられる 1~10mW クラスの近赤外半導体レーザーは、人体に直接照射しても十分に安全であることが確認されていて、新生児や乳幼児にも安全に適用可能である<sup>8)</sup>。また、光ファイバを頭皮に触れさせるだけで計測できるので、被験者は狭い空間に閉じ込められることもなく、ある程度動くことも可能である。また装置が後述の fMRI に比べて安価であり、しかもコンパクトで可搬性があるなどの利点がある(図 2)。独立行政法人食品総合研究所の檀らは、NIRS を用いて味覚の記憶生成過程のモニタリングに初めて成功した<sup>9-11)</sup>。また標準脳座

標系を用いた確率的空間解析法を開発したことで知られ<sup>12)</sup>、それまで NIRS データは MRI の解剖学的構造情報なしには測定位置の特定ができなかったが、MRI 情報なしでもそれを可能にしたことで、臨床分野においても高い評価を得ている。

### 2-3) その他の脳機能計測法

脳の神経細胞が電流を発生するとそれにともなって磁場も発生する。EEG が、脳内のニューロン網に発生する電気現象を電位変動としてとらえるものであるのに対し、脳磁図(magneto encephalography : MEG)は、この電気現象を磁界変動としてとらえるものである<sup>2)</sup>。磁界を検出するので、EEG のように電極を貼る必要がなく、基準電極も必要ない。EEG に比べ空間分解能に優れているため、脳内の各部位の活動をより限局的にとらえることができるという特長がある。また、EEG では頭蓋骨を介するため、信号が 1/5~1/10 に減衰するが、脳磁図では頭蓋骨による信号の減衰はないといわれている。短所としては EEG に比べて装置が高額であること、非常に微弱な磁気を計測するためにシールドルームが必要であることなどがあげられる。

一方、脳血流変化を測定する手法としては、機能的磁気共鳴画像(functional magnetic resonance imaging : fMRI)が知られており、臨床的には NIRS よりも一般的に用いられている。通常の MRI や CT は、主に組織の形態を観察するための検査法であるのに対し、fMRI は生体の機能を観察するための検査法であるという違いがある。

脳の神経活動が亢進すると局所的に酸素消費量が増加する。これにより神経細胞の周囲では一時的な酸素濃度の低下が起るため、脳血流量を増やして対応しようとする。このとき、脳血流量は急激に 20-40%増大するが、神経細胞の酸素消費量は実際には 5%程度しか増加しないといわれている。したがって、脳血流量の急激な増加によって供給された酸素量は、消費量を大きく上回ることから、oxy-Hb 濃度が急激に増大することになり、相対的に deoxy-Hb が減少する。このような現象を BOLD(blood oxygenation level dependency)効果と呼び、1989 年に小川誠二博士により発見された<sup>13)</sup>。deoxy-Hb は常磁性体であるため、これが減少すると磁気共鳴測定における横緩和時間  $T_2^*$  の延長が生じ、MR 信号が増強される<sup>14)</sup>。賦活部位の特定は、賦活刺激前後の差分によって表される。fMRI と先述の NIRS は、どちらも同様にヘモグロビンの濃度変化を非侵襲的に計測することができるが、fMRI の長所は脳の活動分布と脳の形態構造が同時に得られること、また空間分解能が高いことがあげられる。短所は、被験者が狭いスキャナー内に仰臥位のまま入らなくてはならないこと、装置が高額であることなどである。

脳内の様々な物質の動きを画像化するにはポジトロン断層法(positron emission tomography : PET)という手法もある。その原理は<sup>2)</sup>、測定したい化学物質、たとえばグルコースやアミノ酸などに放射性同位元素で標識したトレーサが体内で  $\beta$  崩壊するとき放出される陽電子(ポジトロン)が電子と結合する際に、ふたつの光子が正反対の方向に飛び散る。それを円形に並べた  $\gamma$  線カウンターで検出することによ

り、そのトレーサの位置と量を特定することができる。したがって、fMRI や NIRS では血流の経時的変化量しか計測できなかったのに対して、PET は唯一、絶対量が計測可能であるという優位性がある。なお、使用される放射性トレーサは半減期が短いため、生体への影響は少ないといわれている。

このような原理に基づく PET 研究において、秋田県立脳血管研究センターはその開発から応用まで常に世界の最先端をリードしてきた。これについては、立花隆著「脳を究める—脳研究最前線—」<sup>15)</sup>に詳しい。

### 3. 食と脳機能の関連についての研究事例 ～咀嚼と脳活動の関係～

これまで、脳機能計測法について概観してきたので、ここからは、食と脳機能の関連についての研究事例の中から、咀嚼と脳活動の関係を中心に述べる。

咀嚼とは食物を咬み砕き、唾液を混ぜ合わせ、嚥下しやすく、そして消化しやすい状態をつくる行動ではあるが、単に消化吸収を助けるための補助的機能のみならず、脳の働きと咀嚼行動は密接な関係のあることが明らかになってきた<sup>16)</sup>。咀嚼能力の低下は高齢者においてはアルツハイマー病の発症危険因子となり、小児では知的能力の発達に関与しているという調査報告がある<sup>16)</sup>。これらは動物実験からも実証されてきており、固形飼料を与えたマウスのほうが粉末飼料を与えたマウスよりも脳の老化を遅延させる効果が認められているという<sup>16)</sup>。また、歯牙喪失老齡モデルラットの上下前臼歯喪失群では、作業記憶と参照記憶が傷害されている可能性が示唆され、さらに自然老化の対照群と比較して臼歯喪失群では情動性がさらに亢進し、より高度な認知症を発症している可能性が示唆されている<sup>17)</sup>。

一方、先述の脳機能計測法を用いた研究事例も多数報告されるようになってきた。EEG を用いて咀嚼と脳機能の関係を調べた報告として、秋田県立リハビリテーション・精神医療センターの横山、中澤、ならびに秋田県立脳血管研究センターの長田ら<sup>18)</sup>は、咀嚼運動が脳機能に及ぼす影響を明らかにする目的で、脳器質性疾患を有する患者の咀嚼後の背景 EEG の定量的変化について検討した。その結果、咀嚼後には  $\delta$ ,  $\theta$  波が減少し、 $\alpha$ ,  $\beta$  波が増加したことから、覚醒レベルの改善などを反映して電気生理学的な活動性が高まる可能性があるとして指摘している。このとき、咀嚼障害がある場合は、障害のない患者よりも咀嚼による背景 EEG への影響が少なかったとも述べている。

同様に、朝日大学歯学部 of 山村ら<sup>19)</sup>は、ガム咀嚼前後の EEG を測定し、咀嚼により  $\alpha$  波は減少し、 $\beta$  波は増加する傾向があると報告している。この結果から、咀嚼は食欲と密接な関係にあり、また脳の発達や老化防止に深い関係があることと無関係ではないと推測している。また、歯科医の佐橋<sup>20)</sup>は、ガム咀嚼が ERP に及ぼす影響を調べ、ガム咀嚼により一般的注意および覚醒水準の上昇という認知機能を亢進させることを示した。これにより、咀嚼は認知機能の反応精度を高め、反応時間を短縮させるという精神生理学的メカニズムが明らかになったとしている。その他

にも、鎮静作用を有するテアニンと嗜好性の高い香料を含んだガム咀嚼のリラックス効果を調べたところ、大脳における $\alpha$ 波の出現量を増加させる効果が認められたと、ロッテ中央研究所の研究グループが発表している<sup>21)</sup>。

次に、NIRS を使って咀嚼と脳血流動態を調べた事例として、東京医科歯科大学の佐々木<sup>22)</sup>は、ガム咀嚼時に前額部の総ヘモグロビン量、酸素化ヘモグロビン量が増加することを示した。このとき、咀嚼運動による血流変化は、顎運動によって生じるものではなかったという。同様に、日本歯科大学の志賀ら<sup>23)</sup>によって、ガム咀嚼時の両側の脳内血流を計測した結果から、咀嚼により脳が活性化されること、またそれは主咀嚼側咀嚼時のほうが、非主咀嚼側咀嚼時よりも強い可能性が明らかにされた。さらに志賀ら<sup>24)</sup>は、NIRS を使ってグミゼリー咀嚼により脳内血流が有意に増加することも認めている。このとき、苦味の程度の異なるグミゼリーを咀嚼させたところ、苦味の少ないグミゼリーのほうが脳内血流が多かったことから、食品の味の違いが脳内血流の変化の大小に影響を及ぼすことを示唆した。ただし、咀嚼筋活動には影響を及ぼさなかったとしている。

これらの報告以外にも、例えば、fMRI を使った田村ら<sup>25)</sup>の研究や、PET を用いた百瀬ら<sup>26)</sup>の研究では、咀嚼による一次感覚運動野の賦活が報告されている。

このように、咀嚼に伴って、ヒトの脳の様々な領域で血流量が増加し、脳の神経活動が上昇することが脳機能計測により明らかになってきている。また、咀嚼と海馬領域の血流量の増加には密接な相関関係があることも報告されており、咀嚼が記憶に影響を及ぼすことも示唆されている<sup>27)</sup>。

#### 4. 食に対する脳機能研究が目指す目標

我々の研究グループでは、中・高齢者むけ食品の食感や味などをヒトの側に立って評価するために、実際に食品を摂取した時の脳波や脳血流を計測し、食品の受容性や嗜好性、さらには食品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食品評価法の開発を目指している。また、脳機能賦活効果評価システムの構築により、ある特定の食品成分や食行動（調理行動、咀嚼などを含む食事行動、食事環境など）による脳機能の活性化に関する研究を行い、加齢抑制や認知症予防に効果が期待できる食品の開発につなげたいと考えている。

しかしながら、「現状では、食品を食べている際のヒトの脳活動から食品の印象を調べて、食品開発に応用するといった観脳評価の実現は、まだ見込み薄である」との意見もある<sup>9)</sup>。なぜならば、A という刺激に対して脳の B という領域の活動が高まることを検出したからといって、逆に、脳の B という領域の活動が高まれば A という刺激があった、とはいえないからである。

我々の研究グループが目指すのは、食による脳機能の解明ではない。むしろ、これまでに解明されつつある脳機能の活性化を食によって実現するためにはどうしたらよいか、その道具として脳機能計測を利用したいと考えているのである。

脳は加齢とともに、その機能が低下するのは事実である。生活習慣の改善によって脳機能の低下を抑制するためにも食は重要なファクターである。脳機能計測によって明らかになった事実、これから明らかになる事実に着目し、それを食品技術者の視点から掘り下げ、それを食品開発に応用することによって、食による健康長寿社会の実現にむけた取り組みを実践していきたいと考えている。

## 参考文献

- 1) 文部科学省 HP [http://www.mext.go.jp/a\\_menu/kagaku/chiiki/city\\_area/index.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/kagaku/chiiki/city_area/index.htm)
- 2) 芝崎浩・米倉義春著：脳のイメージング—脳のはたらきはどこまで画像化できるか—，共立出版 (1994)。
- 3) 末永和栄・岡田保紀著：最新脳波標準テキスト(改訂2版)，メディカルシステム研修所 (2004)。
- 4) 高橋徹 (秋田県農林水産技術センター総合食品研究所) 未発表データ
- 5) 古賀，第57回日本栄養・食糧学会総会講演要旨集，p.25 (2003)。
- 6) 船田ら，人間工学，**37**，526 (2001)。
- 7) 尾崎幸洋・河田聡編著：近赤外分光法，学会出版センター (1996)。
- 8) 小泉ら，電子情報通信学会誌，**87**，207 (2004)。
- 9) 檀，岡本，月刊フードケミカル (12)，38 (2006)。
- 10) 檀，ぶんせき (6)，276 (2007)。
- 11) 檀，*BIONICS*，(4)，66 (2006)。
- 12) M. Okamoto *et. al.*，*Neuroimage*，**21**，99 (2004)。
- 13) 月本ら著：脳機能画像解析入門，医歯薬出版 (2007)。
- 14) 灰田，*MEDIX*，**36**，17 (2003)。
- 15) 立花隆著：脳を究める，朝日新聞社 (1996)。
- 16) 上田実著：咀嚼健康法，中公新書 (1998)。
- 17) 重富，日本歯科医師会雑誌，**50**，1165 (1998)。
- 18) 横山ら，日本薬物脳波学会誌，**3**，11 (2001)。
- 19) 山村ら，岐歯学誌，**31**，1 (2004)。
- 20) 佐橋，*J. Oral Biosci.*，**46**，116 (2004)。
- 21) 大塚ら，日本咀嚼学会誌，**7**，11 (1997)。
- 22) 佐々木，口病誌，**68**，72 (2001)。
- 23) 志賀ら，日本咀嚼学会誌，**14**，68 (2004)。
- 24) 志賀ら，日本顎口腔機能学会誌，**13**，54 (2006)。
- 25) 田村ら，補綴誌，**44**・103 回特別号，87 (2000)。
- 26) Momose, T. *et. al.*，*Archs. Oral Biol.*，**42**，57 (1997)。
- 27) 西成勝好ら：食感創造ハンドブック，p.103，サイエンスフォーラム (2005)。

### 3. 特許の概要

- ① 発明の名称：発酵食品用種麴及び該種麴を用いる発酵食品の製造法・・・37  
発明者：渡辺隆幸、尾張かおる、堀 一之  
今野 宏、佐藤 勉（秋田今野商店）  
公開番号（公開日） 特開 2006-345712（2006年12月28日）  
特許番号（登録日） 第 4049220 号（2007年12月7日）
- ② 発明の名称：新規遺伝子、それを用いた形質転換体及びその利用・・・37  
発明者：金子隆宏、大能俊久、大久長範  
公開番号：特開 2007-20489  
公開日：2007年2月1日
- ③ 発明の名称：米飯類の製造方法および米粉加工品類の製造方法・・・38  
発明者：大能俊久、金子隆宏、大久長範、樋渡一之、高橋砂織  
公開番号（公開日）：特開 2007-43932（2007年2月22日）
- ④ 発明の名称：米の調整方法及び包装米・・・38  
発明者：大能俊久、金子隆宏、大久長範  
公開番号（公開日）：特開 2007-236304（2007年9月20日）
- ⑤ 発明の名称： $\gamma$ -アミノ酪酸含有組成物を含む飼料とその製造方法・・・39  
発明者：押部明德、戸枝一喜、大友理宣  
公開番号（公開日）：特開 2007-319126（2007年12月13日）
- ⑥ 発明の名称：新規酵母およびそれを用いたアルコール飲料の製造方法・・・39  
発明者：戸松さやか、進藤昌  
公開番号：特開 2008-000042  
公開日：2008年1月10日

**発明の名称：発酵食品用種麴及び該種麴を用いる発酵食品の製造法**

発明者：渡辺隆幸、尾張かおる、堀 一之

今野 宏、佐藤 勉（秋田今野商店）

公開番号（公開日） 特開 2006-345712（平成18年12月28日）

特許番号（登録日） 第4049220号（平成19年12月 7日）

**【要約】**

**[課題]**

味噌製造時に用いる麴菌アスペルギルス・オリゼは、遊離脂肪酸、脂肪酸エチルエステルなどの物質を生産する酵素であるリパーゼの力価が一般に微弱である。

また該酵素力価の高いアスペルギルス・オリゼの選抜を行ったという報告は未だない。

**[解決手段]**

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、食品産業用の麴菌株の中からリパーゼ及びセルラーゼの力価が高いアスペルギルス・オリゼ AOK138 株及びアスペルギルス・オリゼ AOK139 株を選抜することに成功した。さらに、これら麴菌を種麴として用いて味噌、醤油などの発酵食品を製造する方法を開発した。

**発明の名称：新規遺伝子、それを用いた形質転換体及びその利用**

発明者：金子隆宏、大能俊久、大久長範

公開番号：特開2007-20487

公開日：平成19年2月1日

**【要約】**

**[課題]**

ストレプトマイセス E-2248 株の生産する酵素は生澱粉分解能を有し、かつ工業的にも十分な耐熱性を示す、産業上きわめて有益な酵素であるが、本菌株による酵素の生産はきわめて不安定であり、供給量、供給費用などの点で問題が多い。

**[解決手段]**

本発明は、上記問題を解決するために、該酵素をコードする遺伝子 DNA の塩基配列を決定し、該遺伝子を酵母高発現プロモーターとともに宿主酵母に導入した形質転換体を構築し、さらに該形質転換体を培養することによって生澱粉分解酵素を効率的かつ安定的に製造する方法を完成したものである。

**発明の名称：米飯類の製造方法および米粉加工品類の製造方法**

発明者：大能俊久、金子隆宏、大久長範、樋渡一之、高橋砂織

公開番号（公開日）：特開 2007-43932（平成 19 年 2 月 22 日）

**【要約】**

〔課題〕

米飯及び米粉加工品の製造において、その性状を安価で安心な食品素材を使用して改良する方法を提供すること。

〔解決手段〕

通常の炊飯又は、米粉加工品の製造を行うにあたり、マイタケ、またはマイタケ粉末、またはマイタケ抽出液を使用して、水浸漬を行うことにより米飯類と米粉加工品類の性状改良を行う製造方法。

**発明の名称：米の調整方法及び包装米**

発明者：大能俊久、金子隆宏、大久長範

公開番号（公開日）：特開 2007-236304（平成 19 年 9 月 20 日）

**【要約】**

〔課題〕

洗米浸漬なしで炊飯しても食味が良好になる米を特殊な機械設備を用いることなく製造する調整方法と、調製した米を提供することを目的としたものである。

〔解決手段〕

米を水に短時間浸漬した後水を切り、米粒をエタノールまたは含水エタノールに浸漬する、またはエタノールまたは含水エタノールを噴霧する。そして米粒の水をエタノールまたは含水エタノールに置換する。その後エタノールを除去して乾燥を行い、水分 16%以下の米粒を得る方法と、この方法で調整した米に、米粉や米澱粉、他の米などを混入した米により目的を達成した。

**発明の名称： $\gamma$ -アミノ酪酸含有組成物を含む飼料とその製造方法**

発明者：押部明德、戸枝一喜、大友理宣

公開番号（公開日）：特開 2007-319126 （2007 年 12 月 13 日）

**【要約】**

[課題] 従来存在しなかった、 $\gamma$ -アミノ酪酸含有組成物を含む飼料を提供すること、即ち、家畜における嗜好性および飼料特性に優れた、 $\gamma$ -アミノ酪酸含有組成物を含む飼料を提供することを目的とする。

[解決方法] 発芽玄米糠、米糠、米、脱脂米糠、ふすま、大豆種皮、小豆種皮及び竹小豆種皮よりなる群から選ばれた少なくとも 1 種のものと同グルタミン酸もしくはその塩を含む培地での乳酸菌の培養物を有する  $\gamma$ -アミノ酪酸含有組成物と糖或いはデンプン含量の高い、液体又は固体原料と、から実質的になる  $\gamma$ -アミノ酪酸含有組成物を含む飼料；並びに前記  $\gamma$ -アミノ酪酸含有組成物と、糖或いはデンプン含量の高い、液体又は固体原料とを、攪拌混合することを特徴とする、 $\gamma$ -アミノ酪酸含有組成物を含む飼料の製造方法を提供する。

**発明の名称：新規酵母およびそれを用いたアルコール飲料の製造方法**

発明者：戸松さやか、進藤昌

公開番号：特開 2008-000042

公開日：平成 20 年 1 月 10 日

**【要約】**

[課題] グリセロールを高生産し、発酵能が維持された酵母の選抜・育種を行うこと、および当該酵母を使用して品質の改善されたアルコール飲料を製造する方法を提供すること。

[解決手段] グリセロール生産量が顕著に高いサッカロミセス・セレビシエ HGP-C-2 (FERM P-20913) 並びに当該酵母を用いることを特徴とするアルコール飲料の製造方法を提供する。



4. 学会発表要旨 (26 件) . . . . . 41

1) 発表学会：2007 年度日本農芸化学会大会

発表日と場所：2007 年 3 月 25 日、東京農業大学（東京都）

演題名：微粉碎木質系バイオマスからの並行複発酵によるバイオエタノール生産

発表者：進藤 昌、佐藤洋子、伊藤 新<sup>1</sup>、日置 進<sup>1</sup>（秋田総食研、秋田県立大<sup>1</sup>）

2) 発表学会：2007 年度日本農芸化学会大会

発表日と場所：2007 年 3 月 25 日、東京農業大学（東京都）

演題名：味噌及び大豆由来レニン阻害物質について

発表者：高橋砂織、小笠原博信、渡辺隆幸、熊谷昌則、尾張かおる、堀 一之（秋田農林水産技セ・総食研）

3) 発表学会：第 68 回分析化学討論会

発表日と場所：2007 年 5 月 19 日、宇都宮大学（宇都宮市）

演題名：秋田県における名水の水質解析評価

発表者：（徳島文理大工）○吉田知司・谷川浩司・池田早苗（秋田総食研）  
大野剛・高橋仁・熊谷昌則

4) 発表学会：日本素材物性学会平成 19 年度年会

発表日と場所：2007 年 6 月 19 日、秋田ビューホテル（秋田市）

演題名：秋田の地下水・湧水の水質特性の解析

発表者：○熊谷昌則\*、大野 剛\*、高橋 仁\*、吉田知司\*\*（\*秋田総食研、\*\*徳島文理大工）

5) 発表学会：第21回キチン・キトサン・シンポジウム

発表日・場所：2007 年 7 月 28 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

演題名：N-アシルヘキソサミン酸化酵素とペルオキシダーゼとの共役系を用いた  
GlcNAc 2-エピメラーゼ（レニン結合タンパク質）の活性測定法に  
ついて

発表者：高橋砂織、堀 一之（秋田県農林水産技セ・総食研）

6) 発表学会：2007 年度日本感性工学会年次大会

発表日と場所：2007 年 8 月 1 日、工学院大学（東京都新宿区）

演題名：地域産業と経験価値創造（Building of customer experiences in local industries）

発表者：高畠 聡（秋田県農林水産技術センター 総合食品研究所）

7) 発表学会：日本食品工学会第 8 回大会

発表日と場所：2007 年 8 月 3 日 関西大学（大阪府吹田市）

演題名：種々の固形状食品の咀嚼パラメータとレオロジー特性値との対応

発表者：高橋 徹、早川文代\*、熊谷昌則、秋山美展、神山かおる\*

（秋田農技セ総食研、農研機構食総研\*）

- 8) **発表学会：2007年度日本食品科学工学会**  
発表日と場所：2007年9月7日、中村学園大学（福岡県福岡市）  
演題名：古米の変化と米飯テクスチャーの改良  
発表者：大能俊久、戸松誠、塚本研一、戸枝一喜（秋田県農林水産技セ・総食研）
- 9) **発表学会：食品科学工学会第54回大会**  
発表日・場所：2007年9月8日、中村学園大学（福岡県福岡市）  
演題名：食物由来レニン阻害物質について  
発表者：高橋砂織、渡辺隆幸、小笠原博信、熊谷昌則、畠 恵司、堀 一之、菅原真理（秋田県農林水産技セ・総食研）
- 10) **発表学会：日本食品科学工学会2007年次大会**  
発表日と場所：2007年9月8日 中村学園大学（福岡県福岡市）  
演題名：多糖類および魚卵由来粘質物の添加がでん粉糊液のレオロジー特性に与える影響  
発表者：高橋徹、戸枝一喜、塚本研一、熊谷昌則、秋山美展（秋田農水技セ総食研）
- 11) **発表学会：食品酵素化学研究会第7回学術講演会**  
発表日・場所：2007年9月9日、京都大学（京都府京都市）  
演題名：組換え型ヒトレニンを用いた阻害物質スクリーニング系の構築  
発表者：高橋砂織、渡辺隆幸、小笠原博信、熊谷昌則、堀 一之、菅原真理（秋田県農林水産技セ・総食研）
- 12) **発表学会：第3回 D-アミノ酸研究会**  
発表日・場所：2007年9月14日、徳島大学（徳島県徳島市）  
演題名：原核微生物由来D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼのクローニング  
発表者：葺澤悟、北岡本光、小林秀行（農研機構・食総研）高橋砂織（秋田県農林水産技セ・総食研）
- 13) **発表学会：13<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology**  
発表日と場所：2007年9月17日、Barcelona, Spain  
演題名： Simultaneous saccharification and bioethanol production from powder of Japanese cedar(*Cryptomeria japonica*)  
発表者： Sho Shindo, Yoko Sato, Arata Ito, Susumu Hioki
- 14) **発表学会：第59回 日本生物工学会大会**  
発表日と場所：2007年9月26日、広島大学（広島県東広島市）  
演題名：ストレス処理による麹菌(*Aspergillus oryzae*)トランスボゾン *Crawler* の転移促進とmRNA分子種の変動  
発表者： 小笠原 博信<sup>1</sup>、小畑 浩<sup>2</sup>、秦 洋二<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>1</sup>、五味 勝也<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>秋田県農技セ総食研・酵素微生物、<sup>2</sup>月桂冠・総研、<sup>3</sup>東北大院農・生物産業創成)

- 15) 発表学会 : 5th General Meeting of the International Proteolysis Society  
発表日・場所 : 2007年10月23日、University of Patras (Patras, Greece)  
演題名 : Cloning of novel D-aspartyl endopeptidase, paenidase, from prokaryote.  
発表者 : Satoru Nirasawa, Hotomitsu Kitaoka, Hideyuki Kibayashi, and Saori Takahashi  
(<sup>1</sup>National Food Res. Inst., <sup>2</sup>Inst. Food & Brewing, <sup>2</sup>Akita Pref. Agric. Forest. & Fisher. Res. Cent.)
- 16) 発表学会 : 第55回レオロジー討論会  
発表日と場所 : 2007年11月1日 金沢大学 (石川県金沢市)  
演題名 : 固形状食品の咀嚼特性値とレオロジー特性値との関係  
発表者 : 高橋 徹, 早川文代\*, 熊谷昌則, 秋山美展, 神山かおる\*  
(秋田農技セ総食研, \*農研機構食総研)
- 17) 発表学会 : 第7回糸状菌分子生物学コンファレンス  
発表日と場所 : 2007年11月16日、東京大学 (東京都文京区)  
演題名 : 麹菌(*Aspergillus oryzae*)DNA トランスポゾン *Crawler* の転移活性と mRNA  
分子種変動に及ぼすストレス処理の影響  
発表者 : 小笠原 博信<sup>1</sup>、小畑 浩<sup>2</sup>、秦 洋二<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>1</sup>、五味 勝也<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>秋田県農技セ総食研・酵素微生物、<sup>2</sup>月桂冠・総研、<sup>3</sup>東北大院農・生物産業創成)
- 18) 発表学会 : ICOFF 2007, International Conference on Food Factors for Health Promotion.  
発表日・場所 : 2007年11月30日、京都国際会議場 (京都府京都市)  
演題名 : Renin Inhibitor in Legumes.  
発表者 : Saori Takahashi, Kazuyuki Hori, Masanori Kumagai, and Saburou Wakabayashi  
(Akita Pref. Agric. Forest. & Fisher. Res. Cent.)
- 19) 発表学会 : ICoFF 2007  
発表日と場所 : 2007年11月30日、京都国際会館 (京都市)  
演題名 : Effects of lupeol on visceral fat weights and serum lipoprotein profiles in  
high-fat diet fed mice  
発表者 : ○Hiroki Sasaki<sup>1</sup>, Satoru Kawarasaki<sup>1</sup>, Mikiko Sugawara<sup>1</sup>, Keishi Hata<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Skylight Biotech Inc., <sup>2</sup>Akita Research Institute for Food & Brewing)
- 20) 発表学会 : 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会  
発表日・場所 : 2007年12月13日・パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)  
演題名 : Primary structure of novel D-aspartyl endopeptidase, paenidase,  
from prokaryote.  
発表者 : Satoru Nirasawa<sup>1</sup>, Hotomitsu Kitaoka<sup>1</sup>, Hideyuki Kobayashi<sup>1</sup>, Saori Takahashi<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>National Food Res. Inst., <sup>2</sup>Inst. Food & Brewing, Akita Pref. Agric. Forest. & Fisher. Res. Cent.)

- 21) 発表学会：第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会  
発表日・場所：2007 年 12 月 13 日・パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）  
演題名：Expression of recombinant active human renin in Sf-9 cells.  
発表者：Saori Takahashi<sup>1</sup>, Keishi Hata<sup>1</sup>, Kazuyuki Hori<sup>1</sup>, Toshihiro Sugiyama<sup>2</sup>,  
Ken-Ichi Kikuchi<sup>3</sup>, and Takeshi Gotoh<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Inst. Food & Brewing, Akita  
Pref. Agric. Forest. & Fisher. Res. Cent., <sup>2</sup>Dept. Biochem. Akita Univ.  
School of Med., <sup>3</sup>Dept. Material Process Eng. & Appl. Chem. Environ.)
- 22) 発表学会：第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会  
発表日・場所：2007 年 12 月 14 日・パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）  
演題名：COX-2 及び核内受容体 PPAR への影響を指標にした植物油の機能性評価  
発表者：堀田真理子<sup>1</sup>、田中理恵子<sup>1</sup>、堀一之<sup>2</sup>、高橋砂織<sup>2</sup>、井上裕康<sup>1</sup>（<sup>1</sup>奈良  
女子大・環境栄養、<sup>2</sup>秋田県農林水産技セ・総食研）
- 23) 発表学会：日本化学工学会第 73 年会  
発表日と場所：2008 年 3 月 17 日、静岡大学工学部（静岡県浜松市）  
演題名：バキュロウイルス感染昆虫細胞によるプロレニン発現および  
レニン生成の挙動  
発表者：安和広乃、後藤 猛、菊地賢一（秋田大・工学資源）、  
高橋砂織（秋田県農林水産技セ・総食研）
- 24) 学会発表：第 89 回日本養豚学会大会  
発表日と場所：2008 年 3 月 18 日、東京農大（東京都）  
演題名：子豚における GABA 製造残渣の飼料価値の評価  
発表者：○佐々木浩一・戸枝一喜<sup>1</sup>・大友理宣<sup>2</sup>・押部明德<sup>3</sup>（秋田農技セ畜試、<sup>1</sup>  
秋田農技セ総食研、<sup>2</sup>秋田銘醸(株)、<sup>3</sup>東北農研）
- 25) 発表学会：2008 年度日本農芸化学会大会  
発表日と場所：2008 年 3 月 28 日、名城大学（愛知県名古屋市）  
演題名：原核微生物由来 D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ(Paenidase)の  
一次構造  
発表者：葦澤悟、北岡本光、小林秀行（農研機構・食総研）高橋砂織（秋田県  
農林水産技セ・総食研）
- 26) 発表学会：2008 年度日本農芸化学会大会  
発表日と場所：2008 年 3 月 28 日、名城大学（愛知県名古屋市）  
演題名：雑豆類由来レニン阻害物質について  
発表者：高橋砂織、堀一之、熊谷昌則、若林三郎（秋田県農林水産技セ・総食研）

#### 発表学会：2007年度日本農芸化学会大会

発表日と場所：2007年3月25日、東京農業大学（東京都）

演題名：微粉碎木質系バイオマスからの並行複発酵によるバイオエタノール生産

発表者：進藤 昌、佐藤洋子、伊藤 新<sup>1</sup>、日置 進<sup>1</sup>（秋田総食研、秋田県立大<sup>1</sup>）

【目的】間伐材などの木質系バイオマスは、バイオエタノールの原料として注目されている。糖化方法として硫酸による加水分解法があるが設備の腐食や中和工程が必要となるためコスト高が問題となる。そこで、我々は微粉碎木質を原料として酵素と酵母による並行複発酵によるバイオエタノール生産について検討を行ったので報告する。

【方法】木質系バイオマスとして秋田杉の間伐材を用いた。粉碎は、高衝撃力負荷型の新規歯車型ロッド粉碎媒体利用振動ミルを用いて行い粒径 20  $\mu\text{m}$  の粉碎物を得た。エタノール発酵は酵素と酵母を用いた並行複発酵により行なった。

【結果】微粉碎木質バイオマスの糖化条件を検討し、メイセラゼとヘミセルラーゼを同時に作用させることによりマンノースとガラクトースの生産量が上昇することが判明した。糖化条件は pH 5.5 が最適であった。秋田杉の糖化液は、グルコースとマンノースで全糖の 80% を占めており、これらの糖のエタノール変換を目的として *S. cerevisiae* を用いて並行複発酵を行い 5.9% (v/v) のエタノールを得た。これにより 1 t の乾燥秋田杉から 230 L のバイオエタノールを生産できる。

#### 発表学会：2007年度日本農芸化学会大会

発表日と場所：2007年3月25日、東京農業大学（東京都）

演題名：味噌及び大豆由来レニン阻害物質について

発表者：高橋砂織、小笠原博信、渡辺隆幸、熊谷昌則、尾張かおる、堀 一之

（秋田農林水産技セ・総食研）

【目的】レニンは、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系(RAS)による血圧調節機構において律速酵素として重要な役割を担っている。これまで、RAS系制御に関しては、活性測定の簡便さからアンギオテンシン変換酵素を標的にその阻害物質の検討が行われてきた。しかしながら、レニン阻害物質の探索は酵素の問題や活性測定が煩雑であることなどから殆ど行われていない。今回、大腸菌で発現したヒトプロレニンの巻き戻しとその活性化条件を検討するとともに、組換え型ヒトレニンを用いた阻害物質のスクリーニング系を構築した。

【方法と結果】ヒトプロレニン・チオレドキシン融合タンパク質は、大腸菌で封入体として過剰発現した。得られた封入体を高濃度の塩酸グアニジンで可溶化し、アルギニンと界面活性剤を併用して巻き戻し条件を決定した。得られたプロレニンをトリプシンで活性化し、スクリーニング用酵素として用いた。レニン活性は、アンギオテンシン I 生成能を指標に評価した。本スクリーニング系を用いて食物由来のレニン阻害物質を探索した結果、味噌にその阻害活性を見出した。また、味噌の阻害物質は大豆由来であることが示唆された。

### 発表学会：第 68 回分析化学討論会

発表日と場所：2007 年 5 月 19 日、宇都宮大学（宇都宮市）

演題名：秋田県における名水の水質解析評価

発表者：（徳島文理大工）○吉田知司・谷川浩司・池田早苗（秋田総食研）大野剛・高橋仁・熊谷昌則

【緒言】秋田県に存在する湧水の水質を明らかにするために、秋田県内各地の名水を複数回採取して分析し、水質解析評価を総合的に実施した結果について報告する。

【実験】2005 年に秋田県内湧水について全国名水百選（力水）を含む 16 地点（秋田市より北に 8 地点、南に 8 地点）を 2,5,8,11 月の 4 回に分けて 60 試料採取し、溶存イオン種濃度はイオンクロマトグラフィーで、COD は過マンガン酸塩法で測定した。ステップダイアグラム法とトリリニアダイアグラム法を用いて水質解析評価を行った。なお、水質評価を容易にするためのシステムは、本研究室で開発したものである。

【結果】トリリニアダイアグラム法による水質解析結果から、水の起源別の分布はアルカリ土類炭酸塩型の典型的な地下水タイプが 37.5%，次いで、アルカリ土類非炭酸塩型の熱水・化石水タイプが 31.3%，アルカリ非炭酸型の海水タイプが 31.3%であった。調査試料中には、アルカリ炭酸塩型の停滞地下水タイプの湧水は認められなかった。一般的な日本の地下水と比較して典型的な地下水タイプの割合が少なかった。内陸部分に海水タイプ湧水が存在し、また、熱水・化石水タイプ湧水の大部分は秋田県北部に存在していた。COD 値の分布は 0.1ppm 以下が 65.0%，0.1～0.2ppm が 21.7%となり大部分(86.7%)がきれいな水であったが、1.0ppm 以上を示す湧水が 1 箇所存在した。全サンプル中にアンモニウムイオンは検出されなかった。全体的に、水質が良好な中性（pH:6.1～7.2）の軟水（硬度：7.6～68.0ppm）であった。ステップダイアグラム法によると、同一地点の水質はほとんど変化せず安定しており、トリリニアダイアグラムの形状はほぼ同一であった。マグネシウムイオンとカリウムイオンの含有量は相対的に少なく変動も小さかったが、塩素イオンと硝酸イオンの含有量は変動が大きかった。秋田県の湧水は、四国の湧水と比較して、COD 値と硬度はほぼ同様であったが、典型的な地下水タイプの水が少なく、熱水・化石水タイプや海水タイプが多いのが特徴であることが分かった。

### 発表学会：日本素材物性学会平成 19 年度年会

発表日と場所：2007 年 6 月 19 日、秋田ビューホテル（秋田市）

演題名：秋田の地下水・湧水の水質特性の解析

発表者：○熊谷 昌則\*、大野 剛\*、高橋 仁\*、吉田知司\*\*（\*秋田総食研、\*\*徳島文理大工）

【目的】食品の製造において用いられる原料用水は製品の最終品質に多大な影響を与えるにもかかわらず、県内の水資源に関しては原料用水としての水質特性を把握するための系統的な調査、研究はこれまで皆無であった。そこで本研究では、県内各地の地下水・湧水の原料用水としての水質特性を分析し、解析評価するとともに、それらをデータベース化することによって食品製造に活用させることを目的とした。

【方法】平成 17 年 2 月、5 月、8 月、11 月に秋田県内 16 ヶ所から地下水・湧水を採取し、主要な陽／陰イオン、元素、ならびに化学的酸素消費量(COD)を測定した。また、おいしい水を識別するための指標「 $O\ index = (Ca+K+SiO_2) / (Mg+SO_4) \geq 2.0$ 」にもとづく評価を行った。一方、味覚センサ応答パターンによる識別は味認識装置 SA-402（インテリジェントセンサーテクノロジー）を用いた。

【結果】トリリニアダイアグラムによる水質特性の解析の結果、秋田の水はアルカリ土類炭酸塩型、アルカリ非炭酸塩型、そしてこれらの中間型に分類されることが示された。味覚センサ応答パターンによる評価においては、従来から報告されていた硬度との相関に加えて、今回はトリリニアダイアグラムによる分類との関連が示唆される新たな知見が得られた。COD ならびに O index から、秋田の水はきれいでおいしい水の多いことも示された。

**発表学会：第21回キチン・キトサン・シンポジウム**

発表日・場所：2007年7月28日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

演題名：*N*-アシルヘキソサミン酸化酵素とペルオキシダーゼとの共役系を用いた  
GlcNAc 2-エピメラーゼ（レニン結合タンパク質）の活性測定法について

発表者：高橋砂織、堀 一之（秋田県農林水産技セ・総食研）

【目的】レニン結合タンパク質は、昇圧酵素レニンの内在性阻害タンパク質である。最近本タンパク質が、GlcNAc と ManNAc との相互変換を触媒する GlcNAc 2-エピメラーゼ活性を持つことが示されている。これまで、本酵素の活性測定には反応産物の誘導體化と HPLC による分離定量もしくは、DIONEX 社の糖分析装置などが用いられてきた。しかし、前処理の煩雑さや分析に長時間を要することから、簡便な活性測定法の開発が望まれていた。本研究では、*N*-アシルヘキソサミン酸化酵素（*N*-acyl hexosamine oxidase, AHOX）の基質特異性を踏まえ、AHOX とペルオキシダーゼとの共役系を用いた簡便かつ迅速な GlcNAc 2-エピメラーゼ活性測定法を開発したので報告する。

【方法と結果】AHOX は、Horiuchi<sup>1)</sup>が土壌微生物からスクリーニングで取得したもので、Sigma 社製から購入した。各種糖類を用いて AHOX の基質特異性を検討したところ、AHOX は GlcNAc、GalNAc、*D*-Glucosamine、*N*, *N*-Diacetylchitobiose などには反応するものの ManNAc や *D*-Mannosamine には全く反応しないことが判明した。そこで、ManNAc を基質として用いて、GlcNAc 2-エピメラーゼとの反応で生じた GlcNAc を AHOX とペルオキシダーゼとの共役系を用いて測定する方法を開発した。本活性測定法の開発により約2時間で数十検体の活性測定が可能となった。

1) Horiuchi, T., *Agric. Biol. Chem.* **53**, 361-368 (1989)

**発表学会：2007年度日本感性工学会年次大会**

発表日と場所：2007年8月1日、工学院大学（東京都新宿区）

演題名：地域産業と経験価値創造 (Building of customer experiences in local industries)

発表者：高畠 聡（秋田県農林水産技術センター 総合食品研究所）

【目的】

地域産業に経験価値創造を導入することにより、「少量生産・クチコミ・高付加価値・限定販売」し、地域産業をニッチ化し、国内大手メーカーや流通業界、外国製品との差別化し、売り上げ高は少なくとも、収益力のある地域産業の創造につながる事例について、経験価値創造という観点から検討した。

【方法】

地域産業における経験価値創造の導入例

～酒造業における限定酒のオークション販売モデル～

純米大吟醸の雫酒（しずくざけ）を斗瓶（18L）ごとに買い付け者が試飲し、これをオークションする。オークションでは、築数百年の酒蔵の中で行われ、参加者は酒蔵の半被を着てもらい、蔵人たちのまかない飯が振る舞われる

「日本酒販売」＋「オークション」＋「半被、まかない飯」

＝「造り酒屋の“旦那（女将）”体験」＝「経験価値創造」

【結果】

経験価値創造を導入するシステムを付加することにより、他の企業との差別化を図ることが可能であり、地域産業の振興につながると考えられる。

## 発表学会：日本食品工学会第 8 回大会

発表日と場所：2007 年 8 月 3 日 関西大学（大阪府吹田市）

演題名：種々の固形状食品の咀嚼パラメータとレオロジー特性値との対応

発表者：高橋 徹、早川文代\*、熊谷昌則、秋山美展、神山かおる\*

（秋田農技セ総食研，農研機構食総研\*）

【目的】咀嚼時の固形状食品のテクスチャー特性の解明が生体計測により試みられている。本研究の目的は、固形状食品の咀嚼時のヒト臼歯における生体計測値と機器計測値との関連性を明らかにすることである。

【方法】物理特性値とテクスチャーを表現する用語との関係が明らかな食感の異なる 11 種類の固形状食品（あわび、クッキー、ごま豆腐、ゼリー、たくあん、食パン、マシュマロ、鶏の唐揚げ、焼き芋、大根、豚の角煮）を直方体に成形した。ヒト臼歯（男性 3 名、女性 2 名）で噛んだ際の応力は、シート状センサを介した応力分布測定システムで計測・解析した。また、万能試験機を用いた各食品の貫入試験と圧縮試験から応力を測定した。

【結果】あわび、たくあんは複数の咀嚼応力が大きなピークを持ち、クッキーは咀嚼の早い時期に鋸歯状の波形が観察された。マシュマロやごま豆腐は応力値が小さく、初期の傾きが緩やかな曲線を示した。食パンの圧縮応力は小さいが、咀嚼応力は大根や豚の角煮と同程度で、軟らかくても強く噛む傾向が見られた。たくあん、クッキー、あわびのような硬い食品の咀嚼時間は長かったが、軟らかい食品群の中にはマシュマロのように咀嚼時間が長くなるものもあった。各食品の圧縮応力と咀嚼応力は 1 次式での近似が可能だったが、食パン、焼き芋、たくあんのように近似直線から離れる食品もあった。

## 発表学会：2007 年度日本食品科学工学会

発表日と場所：2007 年 9 月 7 日、中村学園大学（福岡県福岡市）

演題名：古米の変化と米飯テクスチャーの改良

発表者：大能俊久、戸松誠、塚本研一、戸枝一喜（秋田県農林水産技セ・総食研）

【目的】古米米飯は硬くて粘りが少ないため敬遠される。これまで演者らは古米に関する研究を行い、古米を還元剤である亜硫酸ナトリウム溶液で炊飯した場合に米飯テクスチャーが改良されること、古米は浸漬時に溶出するタンパク質が減少すること、等を明らかにしてきた 1)。今年度は、古米化の詳細と、種々の溶液を使用して炊飯を行い、古米の米飯テクスチャーがどのように変わるのかを調べ、米飯テクスチャーの形成機構について検討を行った。

【方法】試料は、精米貯蔵した古米を用いた。まず、10mM の種々の溶液に古米を浸漬し、その後浸漬液を回収して SDS-PAGE を行い、各種溶液浸漬時のタンパク質の溶出について調べた。米飯テクスチャーの測定は、種々の溶液を米に対して 1.6 倍量加えて炊飯し、テンシプレッサーで行った。加熱時脱離固形分は、米に各種溶液を加えて 1 時間浸漬後、80℃で 5 分加熱して溶液中の固形分を乾燥して求めた。また、米タンパク質の抽出液と各種溶液を反応させた後、SDS-PAGE を行い各種溶液と米タンパク質がどのように反応するかを調べた。

【結果】亜硫酸ナトリウムとリン酸水素 2 ナトリウム（DSHP）溶液は、浸漬時のタンパク質の溶出が多かった。そこで、亜硫酸ナトリウム、DSHP などの各種溶液で炊飯を行った。亜硫酸ナトリウム等、タンパク質の SS 結合を開裂する溶液は米飯のバランス度を上昇させ、アスコルビン酸や DSHP 溶液はバランス度の変化が小さかった。また、亜硫酸ナトリウム等、タンパク質の SS 結合を開裂する溶液は、加熱時脱離固形分も増加させた。これらのことから、SS 結合を開裂することが加熱時に米粒から脱離する固形分を増加させ、その結果おねば層が厚くなり、米飯が軟らかくなる、と推測した。

1) Ohno, T. and Ohisa, N. Food Sci. Technol. Res. 11, 385-389 (2005).

#### 発表学会：食品科学工学会第 54 回大会

発表日・場所：2007 年 9 月 8 日、中村学園大学（福岡県福岡市）

演題名：食物由来レニン阻害物質について

発表者：高橋砂織、渡辺隆幸、小笠原博信、熊谷昌則、畠 恵司、堀 一之、菅原真理  
（秋田県農林水産技セ・総食研）

【目的】レニンは、非常に特異性の高いアスパルティックプロテアーゼで、腎臓の傍糸球体細胞で生合成され細胞内のレニン顆粒内に貯留されている。顆粒内レニンは、各種刺激により血流に放出され、アンギオテンシノーゲンからアンギオテンシン I (AI) を生成する。生じた AI は、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) によりアンギオテンシン II (AII) となり生理機能を発揮する。AII は直接血管壁に作用して血管を収縮させて、血圧上昇を引き起こす他、副腎に作用してアルドステロンの分泌を促進し、体内のナトリウム貯留を介して体液量が増加することでも血圧上昇を引き起こす。これまで、活性測定が容易なことから ACE をターゲットとした食物由来の阻害物質探索が数多く行われて来た。しかしながら、レニンをターゲットとした研究は殆ど行われていない。そこで、本研究では、レニン阻害物質のスクリーニング系を構築した。

【方法と結果】ブタ腎臓レニンは、Takahashi らの方法により精製した<sup>1)</sup>。組換え型ヒトレニンは、大腸菌で高発現したチオレドキシン・プロレニン封入体を高濃度のアルギニンと界面活性剤を用いて巻き戻し、トリプシンで活性化した標品を用いた。レニン活性は、アンギオテンシノーゲンを基質として、生じた AI をラジオイムノアッセイにて定量した。各種食材のメタノールエキスや味噌の脱塩抽出物を用いてレニン活性阻害能を評価した。その結果、味噌中に大豆由来のレニン活性阻害物質の存在が確認された。

#### 発表学会：日本食品科学工学会 2007 年次大会

発表日と場所：2007 年 9 月 8 日 中村学園大学（福岡県福岡市）

演 題 名：多糖類および魚卵由来粘質物の添加がでん粉糊液のレオロジー特性に与える影響

発 表 者：高橋徹、戸枝一喜、塚本研一、熊谷昌則、秋山美展（秋田農水技セ総食研）

【目的】でん粉の糊化・老化特性に与える魚卵由来粘質物の影響を明らかにすることを目的とし、魚卵由来粘質物の添加によるでん粉糊液およびゲルのレオロジー特性について検討した。

【方法】試料としてトウモロコシでん粉、グアーガム、ハタハタ卵巣からゼリー状物質を分離した凍結乾燥物を魚卵由来粘質物として用いた。RVA より調製した多糖類あるいは魚卵由来粘質物混合糊液をガラス製型に注入して、3°C で保存した。でん粉ゲルの力学特性を引張圧縮型レオメーターにて測定した。また、糊化後に多糖類および粘質物を添加した場合についても検討した。

【結果】0.3%グアーガム溶液に分散させたでん粉の粘度上昇温度は、対照と比較して約 3°C 低下し、加熱時ピーク粘度は増加した。1%魚卵由来粘質物を添加したゲルの破断応力はグアーガム添加したものよりもさらに低い値であった。

**発表学会：食品酵素化学研究会第7回学術講演会**

発表日・場所：2007年9月9日、京都大学（京都府京都市）

演題名：組換え型ヒトレニンを用いた阻害物質スクリーニング系の構築

発表者：高橋砂織、渡辺隆幸、小笠原博信、熊谷昌則、堀 一之、菅原真理  
（秋田県農林水産技セ・総食研）

【目的】 レニンは、非常に特性の高いアスパルテックプロテアーゼで、主に腎臓の傍糸球体細胞で生合成されており、様々な刺激で血中に放出される。血中のレニンは基質であるアンギオテンシノーゲン(ATNG)の C 末端からデカペプチドのアンギオテンシン I (AI)を遊離する。生じた AI は、アンギオテンシン変換酵素(ACE)により C 末端2残基が切除され、アンギオテンシン II となり、血圧上昇を引き起こす。これまで、ACE を標的酵素として、各種食品からその阻害物質の探索が行われており、その機能を付与した食品等の開発が行われている。レニンは、レニン・アンギオテンシン系血圧調節では律速酵素として重要な役割を担っているにも関わらず、酵素の入手の問題や活性測定の煩雑さなどから、食品由来阻害物質の探索は行われていない。そこで、本研究では、ヒトプロレニンの大腸菌での発現系を構築するとともに、その巻き戻し条件を検討した。また、取得したヒトレニンを用いて各種食材の抽出液を用いて阻害物質の探索を行った。

【方法】 ヒトレニン cDNA<sup>1)</sup> と pET32a ベクター (Novagen) をもとにして、プロレニンの N-末端にチオレドキシシン遺伝子を導入した、チオレドキシシン・プロレニン融合タンパク質発現ベクター pETHRN1 を構築した。pETHRN1 を大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、IPTG により融合タンパク質を過剰発現した。発現タンパク質は封入体を形成した。封入体を 4 M 塩酸グアニジンで可溶化後、高濃度のアルギニンと界面活性剤に対して透析し、さらに、透析により暫時、アルギニン濃度と界面活性剤の濃度を低減させ、融合タンパク質の巻き戻しを行った。得られた融合タンパク質をトリプシンで活性化し、阻害活性検定に用いた。レニン活性は、ブタ血漿から部分精製した ATNG を基質として生じた AI をラジオイムノアッセイにて定量した。<sup>2)</sup>

【結果】 封入体として発現した融合タンパク質の一部は上記の処理で巻き戻しが起こり、トリプシンによりレニン活性を発現した。発現したレニン活性は抗ヒトレニン抗体で完全にその活性が阻害された。一方、海藻、きのこや各種食材由来の抽出液を用いてレニン活性阻害能を検定した結果、味噌抽出液にレニン活性阻害が認められた。さらに、味噌の原材料を検討したところ、大豆にレニン活性阻害能があることを見出した。

【考察】 大腸菌で発現したヒトプロレニンは、トリプシンでの活性化後に複数のバンドが検出されたことから、活性化の最適化条件を検討する必要がある。今後、大豆由来レニン阻害物質の精製を行い、構造機能相関を明らかとする予定である。

【参考文献】 1. Inoue, H., et al. *J. Biochem.*, **111**, 407-412 (1990), 2. Murakami, K., et al. *Biomed. Res.*, **1**, 392-399 (1980), 3. Takahashi, S., et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2913-2918 (2006).

### 発表学会：第3回 D-アミノ酸研究会

発表日・場所：2007年9月14日、徳島大学（徳島県徳島市）

演題名：原核微生物由来 D-アスパラギン酸特異的エンドペプチダーゼのクローニング

発表者：菑澤悟、北岡本光、小林秀行（農研機構・食総研）高橋砂織（秋田県農林水産  
技セ・総食研）

【目的】これまで、一部の細菌の細胞膜に D 型アミノ酸の存在することが知られていた。近年の分析手法の進歩により、哺乳類の生体内にも遊離の D 型アミノ酸や D 型アミノ酸を含有するタンパク質の存在することが見出されている。さらに、これらの D 型アミノ酸が様々な病態と関連することが示唆されている。特に、D-アスパラギン酸が注目されており、アミロイドβタンパク質ではアスパラギン酸残基の D 型変異がアミロイドタンパク質の凝集を引き起こすことが示唆されている。

高橋らは、新規合成基質 Suc-[D-Asp]-pNA を用いて D 型アミノ酸を特異的に認識するペプチダーゼのスクリーニングを行い、D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ生産菌 (*Paenibacillus* sp. B38 株) を分離することに成功した (S. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **139**,197-202, 2006)。また、生産する酵素を paenidase と命名し、その性質を明らかにした。今回我々は、paenidase 遺伝子のクローニングを行うことによって paenidase の全アミノ酸配列を解明するとともに、paenidase 関連酵素タンパク質の検索を行った。

【方法】*Paenibacillus* sp. B38 株より単離した天然 paenidase I の N 末端アミノ酸配列分析を行い、その結果をもとに Mix プライマーを合成した。これを用いて、*Paenibacillus* sp. B38 ゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、得られた DNA 断片の塩基配列を決定した。つづいて、決定した塩基配列をもとに thermal asymmetric interlaced (TAIL)-PCR 法により、上流および下流の未知配列を決定した。また、アミノ酸配列の相同性解析は BLAST を、ペプチダーゼファミリーの分類は MEROPS データベース用いて行った。

【結果および考察】まず、天然 paenidase I の配列分析を行い、68 番目までのアミノ酸配列を決定した。つぎに、各種 PCR により得られた DNA 断片の塩基配列を決定し、これより paenidase I の全アミノ酸配列を推定した。その結果、成熟 paenidase I は 322 アミノ酸残基からなること、成熟領域の N 末端側にプロ配列が存在することが明らかになった。また、成熟領域のアミノ酸配列は上述の天然 paenidase I の配列分析結果と一致した。配列をもとに成熟 paenidase I の分子量を計算すると 34,980 となり、天然 paenidase I の MALDI-TOF/MS の結果 (34,748) と近い値を示した (Takahashi *et al.* 2006)。

つぎに、アミノ酸配列の相同性を解析したところ、種々の β-lactamase、penicillin-binding protein、D-Ala-D-Ala carboxypeptidase と 35-39% の相同性があることが明らかになった。さらに、ペプチダーゼファミリー S12 に分類されることが推定された。ペプチダーゼファミリー S12 は、活性部位に Ser、Lys、Tyr 残基をもつセリンプロテアーゼの一群であり、Ser-Xaa-Thr-Lys および Tyr-Xaa-Asn のモチーフを持つ。これらのモチーフは paenidase I においても保存されていた。また、S12 には *Streptomyces* R61 D-Ala-D-Ala carboxypeptidase、D-Stereospecific aminopeptidase DmpB、alkaline D-peptidase などの D 型アミノ酸を認識するペプチダーゼが属しており、paenidase の構造機能相関を解明する上で大変興味深い。

**発表学会：13<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology**

発表日と場所：2007年9月17日、Barcelona, Spain

演題名： Simultaneous saccharification and bioethanol production from powder of Japanese cedar(*Cryptomeria japonica*)

発表者： Sho Shindo, Yoko Sato, Arata Ito, Susumu Hioki

Bioethanol is an ideal fuel for transportation use since it is easily transported, charged to vehicles, and carried on board. The conversion of biomass into energy and useful chemicals has gained considerable attention in recent years, due in part to the depletion of fossil fuel resources. We used the Japanese cedar as a material for bioethanol production in this investigation. The Japanese cedar were treated as follows; firstly, Japanese cedar were crushed until 20 micron of particle size using Cogwheel Mill in order to degrade the lignin. Secondly, the powder of Japanese cedar were saccharified by various saccharification enzymes. To confirm the sugar production ability from Japanese cedar powder by enzyme treatment, various commercial cellulases were tested. When 1g of dry powder of Japanese cedar was treated with Meicellase (Meiji Seika Co., Ltd) and Hemicellulase A (Amano Enzyme Inc.), 0.36g of glucose, 0.19g of mannose, 0.049g of galactose, 0.016g of arabinose, and 0.09g of xylose were produced under the optimum pH condition (pH5.5). The quantity of hexose that was included glucose, mannose, and galactose were 0.566g. The rate of total hexose was 86% in total sugars that was obtained from Japanese cedar. So, it was considered that the bioethanol conversion is easily occurred by *Saccharomyces cerevisiae*. When bioethanol production from 120g/L of Japanese cedar suspension was carried out by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using *S. cerevisiae* and commercial cellulase, a bioethanol concentration of 26 g/L was produced after 1 day. The yield ( $Y_{e/s}$  ethanol yield[g of ethanol per g of Japanese cedar]) was 0.22. Next, bioethanol production from Japanese cedar was carried out by the fed batch fermentation method. Firstly, 120g/L of Japanese cedar suspension was used for bioethanol production by SSF, a bioethanol concentration of 23 g/L was produced after 1 day and then 60g of Japanese cedar powder added to same reactor after 1 day. More 16g/L of bioethanol was produced and a bioethanol concentration was 39g/L after 2 days. Furthermore, 60g of Japanese cedar powder added to same reactor after 2 days. More 5g/L of bioethanol was produced and final concentration reaching 44g/L after 3 days. However, after 4 days the bioethanol production rate was decreased and hydrolyzed sugars were remained in the reactor. The yield was 0.18 in this fed batch bioethanol production method. This yield was lower than that produced by batch fermentation method. It was considered that the Japanese cedar contained any inhibitor for bioethanol production activity of yeast cells.

In conclusion, it was found that the 270L of bioethanol was produced from 1.0 ton of Japanese cedar by SSF using *S. cerevisiae* and commercial cellulase.

発表学会：第 59 回 日本生物工学会大会

発表日と場所：2007 年 9 月 26 日、広島大学（広島県東広島市）

演 題：ストレス処理による麹菌(*Aspergillus oryzae*)トランスポゾン *Crawler* の転移促進と

mRNA 分子種の変動

発表者：○小笠原 博信<sup>1</sup>、小畑 浩<sup>2</sup>、秦 洋二<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>1</sup>、五味 勝也<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>秋田県農技セ総食研・酵素微生物、<sup>2</sup>月桂冠・総研、<sup>3</sup>東北大院農・生物産業創成)

【目的】*A. oryzae* OSI1013 株より見いだされた活性型 DNA トランスポゾン *Crawler* は、転移が認められない通常培養条件下では transposase ORF 内部での splicing や poly(A) 付加が起きており、*Crawler* 遺伝子からは複数の mRNA 分子種が生成していることが明らかとなった<sup>1)</sup>。そこで、麹菌における transposon 転移活性に対する制御機構の解明を目的に種々の活性化条件における *Crawler* 転写産物の解析を行った。

【方法と結果】転移促進を引き起こす Cu や高温ストレス処理後の分生子より total RNA を抽出し、定量 RT-PCR により *Crawler*-mRNA 分子種の組成を測定した。その結果、転移活性が認められる 50°C 以上の高温処理区に分生子では、splicing された mRNA はほとんど検出されなかった。Cu 処理区においてもストレス強度の上昇に伴い splicing や poly(A) 付加による不完全な mRNA 分子種は減少し、インタクトな全長 mRNA の分子種比率が高くなっていることが認められた。OSI1013 株と同じく活性型 *Crawler* を有する RIB128 株および AOK139 株においても同様の現象が認められ、ストレス処理による mRNA 分子種の変動が *Crawler* の転移促進につながるものと推定された。

1)小笠原・他，農化大会要旨，p190(2007)

**発表学会 : 5th General Meeting of the International Proteolysis Society**

発表日・場所 : 2007年10月23日、University of Patras (Patras, Greece)

演題名 : Cloning of novel D-aspartyl endopeptidase, paenidase, from prokaryote.

発表者 : Satoru Nirasawa, Hotomitsu Kitaoka, Hideyuki Kibayashi, and Saori Takahashi

(<sup>1</sup>National Food Res. Inst., <sup>2</sup>Inst. Food & Brewing, <sup>2</sup>Akita Pref. Agric. Forest. & Fisher. Res. Cent.)

Paenidase is the first D-aspartyl endopeptidase from a microorganism that specifically recognizes an internal D-Asp residue to cleave [D-Asp]-X peptide bonds (S. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **139**,197-202, 2006). Two forms of paenidases (I and II) are isolated from the culture filtrate of *Penibacillus* sp. B38. Paenidase II is a mutant deleted 5 amino acid residues from the N-terminal of paenidase I. These enzymes specifically hydrolyze succinyl-D-aspartic acid  $\alpha$ -(*p*-nitroanilide) and succinyl-D-aspartic acid  $\alpha$ -(4-methylcoumaryl-7-amide) to generate *p*-nitroaniline and 7-amino-4-methylcoumarin, and internally cleaved a synthetic peptide (D-A-E-F-R-H-[D-Asp]-G-S-Y) of the [D-Asp]<sup>7</sup> amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) protein between [D-Asp]<sup>7</sup>-G<sup>8</sup>. In this study, cloning and nucleotide sequence of paenidase are reported. And, it makes known the primary structure and related proteins of paenidase.

N-terminal amino acid sequence up to the 68th residue of native paenidase I was determined by Edman degradation. In order to clone the DNA encoding a partial sequence of paenidase I, two degenerate primers were prepared on the basis of the amino acid sequence of the enzyme. The PCR was conducted using genomic DNA isolated from *Penibacillus* sp. B38, and the amplified fragment was subjected to nucleotide sequencing. To obtain the unknown sequences of 5'- and 3'-ends of paenidase gene, thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) was conducted using several specific primers prepared on the basis of the partial nucleotide sequence of paenidase gene and arbitrary degenerate primers. As results of nucleotide sequencing of the amplified fragments, it was revealed that mature paenidase consisted of 322 amino acid residues and that a propeptide was bound to the N-terminus of mature region. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence of paenidase gene was identified with that of native enzyme determined by Edman degradation described above. The molecular mass calculated on the basis of amino acid residues of the mature region (34,980) was very close to that of the native paenidase I (34,748) measured by MALDI-TOF/MS as reported previously (Takahashi *et al.* 2006). Amino acid sequence similarity was found between paenidase and several -lactamases, penicillin-binding proteins with 35-39% match by retrieving BLAST database. In addition, it was estimated that paenidase was classified peptidase family S12 by retrieving MEROPS database. The family S12 contains serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidases which have three active site residues, Ser, Lys and Tyr, in the motifs Ser-Xaa-Thr-Lys and Tyr-Xaa-Asn. These motifs were conserved in the amino acid sequence of paenidase.

#### 発表学会：第55回レオロジー討論会

発表日と場所：2007年11月1日 金沢大学（石川県金沢市）

演題名：固形状食品の咀嚼特性値とレオロジー特性値との関係

発表者：高橋 徹，早川文代\*，熊谷昌則，秋山美展，神山かおる\*  
（秋田農技セ総食研，\*農研機構食総研）

【目的】咀嚼時の固形状食品のテクスチャー特性の解明が生体計測により試みられている。本研究の目的は、固形状食品の咀嚼時のヒト臼歯における生体計測値と機器計測値との関連性を明らかにすることである。

【方法】食感の異なる11種類の固形状食品（あわび，クッキー，ごま豆腐，ゼリー，たくあん，食パン，マシュマロ，鶏の唐揚げ，焼き芋，大根，豚の角煮）を直方体に成形し，ヒト臼歯（女性2名，男性3名）における咀嚼圧力を多点シートセンサを装着した応力分布測定システムで実施した。万能試験機による力学特性値と咀嚼計測から求めた咀嚼パラメータとの関連について調べた。

【結果】各食品は得られた曲線の形状や応力値から，4区分に分類が可能と考えられた。本研究での臼歯における種々の固形状食品の咀嚼応力は，圧縮時最大応力との間に線形性が見られたものの，食パン，たくあん，焼き芋のように回帰直線から離れるものもあり，単純な機器測定で広範囲な食品のテクスチャーを表現するのは難しいことを示唆した。

#### 発表学会：第7回糸状菌分子生物学コンファレンス

発表日と場所：2007年11月16日、東京大学（東京都文京区）

演題：麴菌(*Aspergillus oryzae*)DNAトランスポゾン *Crawler*の転移活性とmRNA分子種変動に及ぼすストレス処理の影響

発表者：○小笠原 博信<sup>1</sup>、小畑 浩<sup>2</sup>、秦 洋二<sup>2</sup>、高橋 砂織<sup>1</sup>、五味 勝也<sup>3</sup>

（<sup>1</sup>秋田県農技セ総食研・酵素微生物、<sup>2</sup>月桂冠・総研、<sup>3</sup>東北大院農・生物産業創成）

【目的】*A. oryzae* OSI1013株より見いだされた活性型DNAトランスポゾン *Crawler*は、転移が認められない通常培養条件下ではtransposase ORF内部でのsplicingやpoly(A)付加が起きており、*Crawler*遺伝子からは複数のmRNA分子種が生成していることが明らかとなった<sup>1)</sup>。そこで、麴菌におけるtransposon転移活性に対する制御機構の解明を目的に種々のストレス条件下における転移活性と*Crawler*mRNA分子種比率の変化について解析を行った。

【方法と結果】転移促進を引き起こすCuや高温ストレス処理後の分生子よりtotal RNAを抽出し、定量RT-PCRにより*Crawler*mRNA分子種の組成を測定した。その結果、転移活性が認められるCu処理区や高温処理区に分生子では、ストレス強度の上昇に伴いsplicingやpoly(A)付加による不完全なmRNA分子種は減少し、インタクトな全長mRNAの分子種比率が高くなっていることが認められた。また、致命的に近い条件にもかかわらず転移活性化が僅かしか認められない酸、高浸透圧、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、およびUVによるストレスではインタクトな全長mRNAの分子種比率の増加は認められなかった。さらに、OSI1013株と同じく活性型*Crawler*を多コピーで有するRIB128株およびAOK139株においてもCuおよび高温ストレス条件下では同様の現象が認められ、ストレス処理によるmRNA分子種の変動が*Crawler*の転移促進につながるものと推定された。

1)小笠原・他，農化大会要旨，p190(2007)

**発表学会 : ICOFF 2007, International Conference on Food Factors for Health Promotion.**

発表日・場所 : 2007年11月30日、京都国際会議場 (京都府京都市)

演題名 : Renin Inhibitor in Legumes.

発表者 : Saori Takahashi, Kazuyuki Hori, Masanori Kumagai, and Saburo Wakabayashi  
(Akita Pref. Agric. Forest. & Fisher. Res. Cent.)

The RAS plays an essential role in blood pressure control in animals. ACE has been used as a target enzyme in RAS for screening inhibitors because of its simple assay method; however, renin is a rate-limiting enzyme in RAS, so it was not used because the measurement is very complicated. Recently, we expressed recombinant (rh) human renin in *Escherichia coli* cells, refolded and activated by trypsin. Using rh-renin as a target enzyme, we screened the renin inhibitory activity in fermented soybean paste (miso) and found that soybean, the major ingredient of miso, had renin inhibitory activity. In the present study, the effects of minor legume extracts on human renin activity were investigated. All minor legume extracts showed renin inhibitory activity in this study. Minor legumes can be divided into two groups, high renin inhibitory (Group 1) and low renin inhibitory (Group 2) groups. Group 1 minor legumes include *Vigna angularis*, *V. anguiculata* subsp. *sesquipedalis*, and *Phaseolus vulgaris*. Group 2 minor legumes include *P. coccineus* var. *albus*, *P. coccineus*, *Lathyrus purpureus*, *Canavalia gladiata*, *Vicia faba*, and *Pisum sativum*. This is the first demonstration of renin inhibitory activity in minor legumes.

**発表学会 : ICoFF 2007**

発表日と場所 : 2007年11月30日、京都国際会館 (京都市)

演題名 : Effects of lupeol on visceral fat weights and serum lipoprotein profiles in high-fat diet fed mice

発表者 : ○Hiroki Sasaki<sup>1</sup>, Satoru Kawarasaki<sup>1</sup>, Mikiko Sugawara<sup>1</sup>, Keishi Hata<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Skylight Biotech Inc., <sup>2</sup>Akita Research Institute for Food & Brewing)

Lupeol is widely distributed in plant kingdom, and the biological activities of lupeol have attracted a great deal of attention. In the present study, we investigated the effects of lupeol on lipid metabolisms in high-fat diet (HFD) fed mice.

The control and lupeol group was orally administered with saline and lupeol (30mg/kg/day), respectively. No significant differences in the weights of body, liver and epididymal adipose tissue in the mice of both groups were detected. However, the mesenteric adipose tissue weights in lupeol group were significantly decreased when compared with the control group. Serum triglyceride levels of total, VLDL, LDL and cholesterol level in VLDL in lupeol group were markedly decreased when compared with the control group. These results suggested that lupeol seems to be an effective agent against metabolic syndrome by suppressing the increases in visceral adipose tissue and serum VLDL level induced by HFD.

発表学会：第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会

発表日・場所：2007 年 12 月 13 日・パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

演題名：Primary structure of novel D-aspartyl endopeptidase, paenidase, from prokaryote.

発表者：Satoru Nirasawa<sup>1</sup>, Hotomitsu Kitaoka<sup>1</sup>, Hideyuki Kobayashi<sup>1</sup>, Saori Takahashi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>National Food Res. Inst., <sup>2</sup>Inst. Food & Brewing, Akita Pref. Agric. Forest. & Fisher. Res. Cent.)

これまで、一部の細菌の細胞膜に D 型アミノ酸の存在することが知られていたが、近年、哺乳類の生体内にも遊離の D 型アミノ酸や D 型アミノ酸を含有するタンパク質の存在が見出されている。高橋らは、新規合成基質 Suc-[D-Asp]-pNA を用いて D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ生産菌 (*Paenibacillus* sp. B38 株) を分離するとともに、生産する酵素を paenidase と命名し、その性質を明らかにした<sup>1)</sup>。今回我々は、paenidase の一次構造を解明した。まず、天然 paenidase I の配列分析を行い、68 番目までのアミノ酸配列を決定した。つぎに、各種 PCR により得られた DNA 断片の塩基配列を決定し、paenidase I の全アミノ酸配列を推定した。その結果、成熟 paenidase I は 322 アミノ酸残基からなること、成熟領域の N 末端側にプロ配列が存在することが明らかになった。つぎに、ホモロジーサーチをしたところ、種々の  $\beta$ -lactamase、penicillin-binding protein と 35-39% の相同性があること、ペプチダーゼファミリー S12 (MEROPS) に分類されることが明らかになった。また、活性部位のモチーフ (Ser-Xaa-Thr-Lys および Tyr-Xaa-Asn) は保存されていた。ファミリー S12 には D 型アミノ酸を認識するペプチダーゼが属しており、paenidase の構造機能相関を解明する上で大変興味深い。

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

発表学会：第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会

発表日・場所：2007 年 12 月 13 日・パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

演題名：Expression of recombinant active human renin in Sf-9 cells.

発表者：Saori Takahashi<sup>1</sup>, Keishi Hata<sup>1</sup>, Kazuyuki Hori<sup>1</sup>, Toshihiro Sugiyama<sup>2</sup>, Ken-Ichi Kikuchi<sup>3</sup>, and Takeshi Gotoh<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Inst. Food & Brewing, Akita Pref. Agric. Forest. & Fisher. Res. Cent., <sup>2</sup>Dept. Biochem. Akita Univ. School of Med., <sup>3</sup>Dept. Material Process Eng. & Appl. Chem. Environ.)

Renin [EC 3. 4. 23. 15] is a highly specific aspartic proteinase mainly synthesized in juxtaglomerular cells in the kidney. The enzyme catalyzes the release of angiotensin I from angiotensinogen. This conversion is the rate-limiting step in the renin-angiotensin- aldosterone cascade. Angiotensin I is an inactive peptide activated by angiotensin converting enzyme. The produced angiotensin II directly acts on arterial smooth muscle cells to maintain blood pressure and stimulate the synthesis and release of aldosterone. The expression of rh-prorenin was first demonstrated in *Escherichia coli* cells. The expressed rh-prorenin makes inclusion bodies and is hard to refold. Recently, we expressed rh-prorenin in *E. coli* cells as a fusion protein with thioredoxin. The expressed rh-prorenin was refolded by systematic dialysis and activated by trypsin. On the other hand, the expression of rh-prorenin or -renin in mammalian and insect cells has also been reported. In these cases, major secreted protein was inactive prorenin, and trypsin treatment was essential for the activation of prorenin. In the present study, we expressed rh-renin in Sf9 cells and found that mature active renin was accumulated in the late stage of cultivation. The rh-renin was purified after 5-day culture by two steps of column chromatography. Approximately 0.61 mg of pure rh-renin was obtained from 200 ml of culture medium with a yield of 35.3%. The concentration of mature renin in the medium was thus estimated to be 8.7 mg/l. The  $k_{cat}$  and  $K_m$  values of rh-renin for the synthetic substrate [*N*-methylanthranil-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu\*Val-Ile-Thr-His-Lys-2,4 dinitrophenyl-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub> (\*, scissile peptide bond)] at pH 6.5 and at 37 °C were 833 s<sup>-1</sup> and 35.7  $\mu$ M<sup>-1</sup>, respectively. The  $k_{cat}$  and calculated  $k_{cat}/K_m$  values, 23.3 s<sup>-1</sup>  $\mu$ M<sup>-1</sup>, were similar to those of CHO- expressed rh-renin (1550 s<sup>-1</sup>, 35.8 s<sup>-1</sup>  $\mu$ M<sup>-1</sup>). Our paper demonstrates the potential for producing large quantities of mature rh-renin in Sf-9 insect cells.

**発表学会：第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会**

発表日・場所：2007 年 12 月 14 日・パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

演題名：COX-2 及び核内受容体 PPAR への影響を指標にした植物油の機能性評価

発表者：堀田真理子<sup>1</sup>、田中理恵子<sup>1</sup>、堀一之<sup>2</sup>、高橋砂織<sup>2</sup>、井上裕康<sup>1</sup>（<sup>1</sup>奈良女子大・環境栄養、<sup>2</sup>秋田県農林水産技セ・総食研）

誘導型シクロオキシゲナーゼ(COX-2)はプロスタグランジン生産の律速酵素で、非ステロイド性抗炎症薬の標的として知られている。最近では、COX-2 は炎症だけではなく、発癌や生活習慣病にも関与することがわかってきた。われわれは、COX-2 に関する研究を進め、核内受容体 PPAR $\gamma$  が COX-2 の細胞特異的発現調節に関与することを報告した。また、赤ワインに含まれるレスベラトロールが、1) COX-2 の発現を抑制すること、2) PPAR $\alpha$ 、 $\gamma$  のデュアルアゴニストになること、3) PPAR $\alpha$  活性化を介して脳保護効果を持つことを報告した。一方、種々の植物ポリフェノールの成分であるフムロンのように、1) の性質を持つ分子も報告されてきた。したがって、1) COX-2 発現制御と 2) PPAR 活性化を指標にすることで、食品成分の新しい評価が出来ると考えた。そこで、種々の植物油に対して、この 2つを指標にして検討を行ったので報告する。1) の評価として、牛血管内皮細胞に COX-2 レポーターベクター、PPAR $\gamma$  発現ベクターを共導入後、植物油を添加し、LPS 刺激による COX-2 発現誘導に対する抑制効果を検討した。2) の評価として、PPAR レポーターベクターと PPAR $\alpha$  あるいは $\gamma$  発現ベクターを共導入し、植物油を添加して測定した。そして、21 種類の植物油について検討した結果、ベルガモット油、チョウジ油、ウイキョウ油、ユーカリ油、オリガナム油、バラ油に 1) の効果が認められた。また、このうちオリガナム油では 2) の効果も認められた。現在、これらの活性を有するオリガナム油成分の同定を行っており、あわせて報告する予定である。

**発表学会：日本化学工学会第 73 年会**

発表日と場所：2008 年 3 月 17 日、静岡大学工学部（静岡県浜松市）

演題名：バキュロウイルス感染昆虫細胞によるプロレニン発現およびレニン生成の挙動

発表者：安和広乃、後藤 猛、菊地賢一（秋田大・工学資源）、  
高橋砂織（秋田県農林水産技セ・総食研）

【緒言】レニンはアンギオテンシノーゲンからアンギオテンシン I を生成するアスパラギン酸プロテアーゼであり、血圧や体液、電解質の恒常性維持において重要な役割を担っている。活性型組換えヒトレニンは、大腸菌で発現したプロレニンをトリプシン処理することにより得られるが、封入体生成とリフォールディングの問題がある。著者らは、ヒトプレプロレニンcDNA 導入バキュロウイルスを昆虫細胞に感染させると、不活性型のプロレニンが発現した後、活性型レニンが生成することを報告した。本研究では、この昆虫細胞・バキュロウイルス発現系によるプロレニンおよびレニン生成の挙動をさらに詳細に調べることを目的とする。

【実験方法】（ウイルス感染培養）指数増殖期にある *Spodoptera flugiperda* (Sf-9) 細胞を昆虫細胞無血清培地に懸濁させて細胞密度  $3 \times 10^6$  cells/ml とし、ヒトプレプロレニン遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスを任意の感染多重度 (MOI) で接種した。1 時間振盪した後、新鮮培地をさらに加えて  $1 \times 10^6$  cells/ml とし、28°C で振盪培養した。

（分析）プロレニンおよびレニン発現は SDS-PAGE とウエスタンブロットにより分析した。レニン活性測定には蛍光消光基質 *N*-methylanthranlyl (Nma)-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu\* Val-Ile-Thr-His-Lys-2, 4dinitrophenyl (Dnp)-D-Arg-D-Arg-NH<sub>2</sub> を用い (\* ; ペプチド結合切断部位), 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5), 0.1 M NaCl, 0.02% Tween 20, 0.02% Na<sub>3</sub> から成る酵素反応溶液を 37°C で 30 分間インキュベートした後、励起波長 340 nm, 測定波長 440 nm で蛍光強度を測定した。

【結果と考察】最初に、MOI =1, 10 pfu/cell で組換えバキュロウイルスを感染させたときの細胞密度および生存率の挙動を検討した。MOI =1 pfu/cell の場合、培養 2 日目まで細胞密度が増加してほぼ一定になり、3 日目から生存率が低下しはじめた。MOI =10 pfu/cell においては、到達細胞密度は低いですが、生存率はウイルス添加直後から低下し始め、5 日目に 25%以下となった。次ぎに、ウエスタンブロットによるプロレニンおよびレニンの生成挙動を検討した。どちらの MOI においても培養 2 日目からプロレニンの蓄積が見られ、生存率が 30%以下となる培養 5 日目にはプロレニンが完全に消失してレニンが生成した。培地中のレニン活性については、どちらの感染培養においても生存率が低下し始める頃からレニン活性が上昇する傾向が見られるが、MOI =1 pfu/cell における培養 5 日目のレニン活性は MOI =10pfu/cell に比べて非常に大きくなった。これは、到達細胞密度の違いによるものと考えられる。現在、レニン生成に関与する酵素 (PPE) の作用メカニズムについて検討中である。

## 学会発表：第 89 回日本養豚学会大会

発表日と場所：2008 年 3 月 18 日、東京農大（東京都）

演 題：子豚における GABA 製造残渣の飼料価値の評価

発表者：○佐々木浩一・戸枝一喜<sup>1</sup>・大友理宣<sup>2</sup>・押部明德<sup>3</sup>（秋田農技セ畜試，<sup>1</sup>秋田農技セ総食研，<sup>2</sup>秋田銘醸(株)，<sup>3</sup>東北農研）

### 要旨

【目的】 無洗米粕の有効利用法の一つとして乳酸菌を用いたγ-アミノ酪酸(GABA)の生産技術が開発されつつあり、その生産過程で生じる製造残渣の有効利用方法も求められている。人では GABA の精神安定作用などが報告されており、数パーセントの GABA が残存する GABA 製造残渣は、補助飼料としてその機能性を活用できる可能性もある。よって、本試験では、無洗米粕を原料とする GABA 製造残渣を子豚へ短期的及び長期的に給与し、その飼料価値を評価することとした。

【方法】 本試験にて用いた GABA 製造残渣の一般成分は、水分 2.2%，粗蛋白質 24.4%，粗脂肪 31.2%，粗繊維 4.3%，粗灰分 8.1%及び NFE29.8%であり、GABA 含有量は 14mg/g(1.4%)であった。試験 I (短期給与)：供試豚として、4 週離乳した三元交雑豚(LWD)去勢 8 頭を用いた。試験区は、市販の子豚用配合飼料を給与した対照区(4 頭)及び GABA 製造残渣を市販配合飼料に対して重量比で約 15%(13.6~16.2%)代替給与した 15%区(4 頭)の 2 区とした。試験期間は、2 週間(29.5 から 43.5 日齢)とした。供試豚は、試験期間中離乳豚房にて単飼した。試験 II (長期給与)：試験区は、市販の子豚用配合飼料を給与した対照区、GABA 製造残渣 15%及び 30%代替給与区(15%区、30%区)の 3 区とした。各区 4 頭とし、去勢 1 頭と雌 1 頭を 1 組として 2 頭/房で飼養した。試験期間は、6 週間(50.1 から 92.1 日齢)とした。試験 I 及び II において、体重、一日増体量(DG)、飼料摂取量、飼料要求率、血中 GABA 濃度を調査した。

【結果】 試験 I での 15%区は、体重、DG、飼料摂取量及び飼料要求率はいずれも対照区と同等であり、良好な発育を示した。また、試験 II の 15%区は、試験 I と同様に、良好な発育を示した。しかし、30%区は、対照区に比べて DG が有意に低下し(P<0.05)、試験終了時では体重が少ない傾向にあった。飼料要求率は、区間で差は見られなかったが、30%区の飼料摂取量は、対照区及び 15%区に比べて少ない傾向にあった。血中 GABA 濃度は、代替率が 15%及び 30%と増加するに従って上昇する傾向が見られ、30%区の血中 GABA 濃度は、対照区または 15%区に比べて、有意に高くなった(P<0.05)。以上より、GABA 製造残渣による代替率が高い場合、飼料摂取量減少に伴う子豚の発育低下を招く可能性があるが、GABA 製造残渣の粗蛋白質含量は高く、15%代替給与では良好な発育であったことから、GABA 製造残渣の養豚用飼料素材としての有効性が示唆された。今後は、含有する GABA の生理的機能性の検討も行い、養豚用飼料における GABA 製造残渣の利用方法を確立する。

**発表学会：2008年度日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2008年3月28日、名城大学（愛知県名古屋市）

演題名：原核微生物由来 D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ(Paenidase)の一次構造

発表者：菝澤悟、北岡本光、小林秀行（農研機構・食総研）高橋砂織（秋田県農林水産技セ・総食研）

【目的】近年、哺乳類の生体内に遊離の D 型アミノ酸や D 型アミノ酸を含有するタンパク質の存在することが見出されている。高橋らは、新規合成基質 Suc-[D-Asp]-pNA を用いて D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ生産菌 (*Paenibacillus* sp. B38 株) を分離するとともに、生産する酵素を paenidase と命名し、その性質を明らかにした (Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **139**(2), 197-202, 2006)。今回我々は、paenidase の一次構造を解明した。

【方法および結果】各種 PCR により得られた DNA 断片の塩基配列を決定し、paenidase I の全アミノ酸配列を推定した。その結果、成熟 paenidase I は 322 アミノ酸残基からなること、成熟領域の N 末端側にプロ配列が存在することが明らかになった。つぎに、ホモロジーサーチをしたところ、種々の  $\beta$ -lactamase と 35~39% の相同性があること、ペプチダーゼファミリー S12 (MEROPS) に分類されることが明らかになった。ファミリー S12 には D 型アミノ酸を認識するペプチダーゼが属しており、paenidase の構造機能相関を解明する上で大変興味深い。

**発表学会：2008年度日本農芸化学会大会**

発表日と場所：2008年3月28日、名城大学（愛知県名古屋市）

演題名：雑豆類由来レニン阻害物質について

発表者：高橋砂織、堀一之、熊谷昌則、若林三郎（秋田県農林水産技セ・総食研）

【目的】レニンは、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系(RAS)における血圧調節上、律速酵素として要の役割を担っている。これまで、RAS の調節を目指して活性測定の容易なアンギオテンシン変換酵素をターゲットとした食品由来調節物質の探索が行われてきた。しかしながら、食物由来レニン阻害物質の探索に関しては、我々の大豆や味噌由来レニン阻害物質の研究以外、殆ど報告は無い。そこで、本研究では大豆や落花生を除く小豆やエンドウなど雑豆類由来のレニン阻害物質について検討した。

【方法と結果】スクリーニング用のヒトレニンは、大腸菌で発現し巻き戻した後、トリプシンにより活性化した組換え酵素を用いた。レニン活性は、Nma-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-Thr-His-Lys-(Dnp)-NH<sub>2</sub> を基質とした蛍光消光法により測定した。雑豆類は、水に一夜膨潤した後、オートクレーブ処理した。それをミキサーで破碎・抽出し、遠心上清を回収した。上清を ODS カラムに吸着し、メタノール溶出画分を阻害検定に用いた。今回 15 種類の雑豆抽出液を用いてヒトレニン活性の阻害を検討した。その結果、用いた雑豆類抽出液の全てに阻害を認めた。また、阻害強度から雑豆類は 2 群に大別されることが示された。

「秋田県総合食品研究所報告」第1号～第10号総目次  
(報文、研究ノート、総説)

第1号(1999年)

【原著論文】

- 「酒造好適米『吟の精』の選抜と酒造適性について」・・・1-1  
○高橋 仁、田口隆信、渡辺誠衛、石川京子、田中健美、斎藤久一、佐無田隆、  
岩野君夫、石川雄章
- 「紫黒米を用いた赤色を有する清酒の製造について」・・・1-8  
○高橋 仁、渡辺誠衛、佐渡高智
- 「秋田県産ブドウによる醸造適性試験」・・・1-14  
○立花忠則
- 「DNA分析による秋田県奨励米1粒からの品種判別技術の開発」・・・1-28  
○小笠原博信
- 「青大豆の豆腐加工適性について」・・・1-35  
○秋山美展、高橋 徹、熊谷昌則、薛 文通
- 「中国における大豆関連商品に市場と加工技術の動向」・・・1-48  
○秋山美展
- 「コアミ塩辛に関する研究 一塩・アルコール併用による品質の向上一」・・・1-62  
○戸松 誠、石川匡子、塚本研一、高橋光一、柴本憲夫
- 「しょつつる風味調味料の開発 一市販・自家醸品の品質について一」・・・1-69  
○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則

【研究ノート】

- 「糖質関連酵素等を利用した大豆加工廃棄物からのオリゴ等類の生産について」・1-79  
○高橋砂織、戸枝一喜
- 「ジュール加熱による液体連続加熱装置の開発」・・・1-82  
○秋山美展
- 「玄米の発芽に伴うγ-アミノ酪酸の生成」・・・1-85  
○大久長範、阿部雪子

第2号(2000年)

【原著論文】

- 「市販きりたんぼ鍋セットの品質特性  
一食品産業の視点からみたきりたんぼの伝承性と現代化の様相一」・・・2-1  
○熊谷昌則、高橋 徹、畠 康子、大久長範

- 「しよつふる風味調味料の開発（第2報） —コウナゴによる試験醸造—」・・・2-9  
 ○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「しよつふる風味調味料の開発（第3報） —コアミによる試験醸造—」・・・2-17  
 ○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「ホッケの高付加価値加工技術の開発Ⅰ —成分と鮮度—」・・・・・・・・・・2-25  
 ○塚本研一、戸松 誠、石川匡子、柴本憲夫、山田潤一
- 「ホッケの高付加価値加工技術の開発Ⅱ —塩干品とスナック風食品—」・・・2-29  
 ○塚本研一、戸松 誠、折戸めぐみ、柴本憲夫、山田潤一
- 「ソフト清酒用酵母とそれを用いたソフト清酒の開発」・・・・・・・・・・2-36  
 ○渡辺誠衛、高橋 仁、田口隆信、中田健美、立花忠則、斎藤久一
- 「秋田味噌用乳酸菌AL-1の開発」・・・・・・・・・・2-45  
 ○渡辺隆幸、尾張かおる、高橋光一、伊藤信義

**【研究ノート】**

- 「ワラビ保存性の改善に及ぼす温度処理の効果」・・・・・・・・・・2-57  
 ○菅原久春、大久長範、小林昭一
- 「新しいタイプの市販清酒の調査」・・・・・・・・・・2-61  
 ○田中健美

**第3号（2001年）**

**【原著論文】**

- 「水稻新品種めんこいなの食味に関わる理化学的性質」・・・・・・・・・・3-1  
 ○大能俊久、高橋 徹、熊谷昌則、大久長範
- 「比内地鶏ガラ加工適性」・・・・・・・・・・3-6  
 ○熊谷昌則、高橋光一
- 「しよつふる風味調味料の開発（第4報）  
 —小アジを用いたしよつふるの試験醸造—」・・・・・・・・・・3-12  
 ○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「しよつふる風味調味料の開発（第5報）  
 —グルコン酸を用いたしよつふるの試験醸造—」・・・・・・・・・・3-19  
 ○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「秋田県産ハタハタずし製品の品質」・・・・・・・・・・3-25  
 ○塚本研一、戸松 誠、菅原真理、戸枝一喜、柴本憲夫、山田潤一
- 「籾殻の爆砕・蒸煮処理残渣及びその灰化物の諸性質」・・・・・・・・・・3-32  
 ○戸枝一喜、吉田 徹

- 「長期保存が可能な酒粕及び白色乾燥粕の開発  
—醸造副産物の有効利用に関する研究—」・・・ 3-35  
○木村貴一
- 「膜電位計測型味覚センサによる清酒の評価」・・・ 3-44  
○熊谷昌則、進藤 昌、渡辺誠衛
- 「秋田県産ブドウからのMLF乳酸菌の分離」・・・ 3-49  
○大野 剛、立花忠則
- 「白神こだま酵母の学校給食用パンへの利用」・・・ 3-57  
○熊谷昌則、高橋慶太郎、高橋砂織

【研究ノート】

- 「デジタルピペットの定量性と操作因子」・・・ 3-65  
○秋山美展
- 「起泡特性を利用した簡便な大豆加工品サポニンの検知法について」・・・ 3-68  
○堀 一之、辰巳英三、殷 麗君、張 曉峰、李 里特

第4号（2002年）

【原著論文】

- 「きりたんぼ製造における製品の冷却特性」・・・ 4-1  
○高橋 徹、熊谷昌則、佐々木康子、大久長範
- 「秋田県の伝統的食品『赤ずし』に関する微生物的考察」・・・ 4-6  
○佐々木康子、菅原真理、柴本憲夫
- 「しよつる風味調味料の開発（第6報）  
—ハタハタ・イワシを用いたしよつるの試験醸造—」・・・ 4-11  
○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「味噌のHEMF生成における仕込条件の影響」・・・ 4-19  
○尾張かおる、高橋光一、渡辺隆幸
- 「γ-アミノ酪酸高含有米糠の製造法」・・・ 4-25  
○戸枝一喜、青木淳子、熊谷 亮、伊藤 汎
- 「酒粕及び麹菌からの糖質関連有用物質の生産について」・・・ 4-30  
○木村貴一、高橋慶太郎、立花忠則、高橋砂織
- 「遠心分離方式によする清酒の上槽工程自動化技術の開発」・・・ 4-42  
○田口隆信、中田健美、立花忠則、斎藤久一
- 「栽培地区別醸造用ブドウの特徴およびワインの品質」・・・ 4-50  
○戸松さやか、大野 剛、立花忠則

【研究ノート】

- 「焼成カルシウム存在下でボイル処理したエダマメ」・・・・・・・・・・ 4－59  
○大久長範、大能俊久、龐 中存
- 「学校給食用白神パンの品質に関する研究」・・・・・・・・・・ 4－62  
○熊谷昌則、高橋慶太郎、高橋砂織

第5号（2003年）

【原著論文】

- 「米麴および市販米味噌の抗変異原性」・・・・・・・・・・ 5－1  
○渡辺隆幸、尾張かおる、高橋光一、柴本憲夫
- 「安全、高品質な食品の製造に関する研究 ー米麴の製造法についての検討ー」・・ 5－7  
○柴本憲夫、渡辺隆幸、佐々木康子、菅原真理
- 「安全、高品質な食品の製造に関する研究 ーいぶり大根漬についてー」・・・・ 5－14  
○佐々木康子、菅原真理、柴本憲夫
- 「攪拌式造粒 ー真空乾燥法によるぬか床用乳酸菌スターターの粉末化ー」・・・・ 5－21  
○佐々木康子、菅原久春、鈴木聡美、柴本憲夫
- 「食品包装容器等のプラスチック素材のポータブル近赤外分光装置による判別」・ 5－27  
○熊谷昌則、天野敏男、小川信明
- 「秋田県産ハタハタずし製品の成分と官能評価」・・・・・・・・・・ 5－33  
○塚本研一、戸松 誠、熊谷昌則、保苺美佳、戸枝一喜、船木 勉
- 「大豆および米遺伝資源試料の活性酸素消去活性とその相乗効果」・・・・・・・・ 5－40  
○秋山美展、大久長範、高田吉丈、島田信二、山口誠之
- 「DNA鑑定による新奨励米『めんこいな』の品種判別技術の開発」・・・・・・・・ 5－48  
○小笠原博信、高橋砂織

【研究ノート】

- 「無洗米の米飯テクスチャーと貯蔵による変化」・・・・・・・・・・ 5－55  
○大能俊久、堀 一之、大久長範
- 「乾めんの電子顕微鏡による断面観察」・・・・・・・・・・ 5－58  
○大久長範、大能俊久

【総説】

- 「秋田県産農水産物の生理機能性の解明とその応用・・・・・・・・・・ 5－61  
ー食材から化粧品素材へー」  
○堀 一之、畠 恵司、高橋砂織

## 第6号(2004年)

### 【原著論文】

- 「安全、高品質な食品の製造に関する研究  
—比内地鶏製品についての検討—」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6-1  
○菅原真理、柴本憲夫
- 「安全、高品質な食品の製造に関する研究 —広域流通を目的とした賞味期限の  
長いきりたんぼの製造について—」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6-8  
○佐々木康子、菅原真理、高橋 徹、熊谷昌則、柴本憲夫
- 「大豆種皮からの酵素処理によるマンノース、マンノオリゴ糖の製造法」・・・・・・・・ 6-13  
○戸枝一喜、保刈美佳
- 「稲庭うどん製造工程への携帯方近赤外分光装置の適用」・・・・・・・・・・ 6-18  
○熊谷昌則、大久長範、小川信明
- 「温度感受性味噌酵母とその利用」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6-25  
○高橋慶太郎、渡辺隆幸、秋山美展
- 「新しい吟醸酒用自動製麹機の開発と吟醸酒の醸造試験」・・・・・・・・・・ 6-32  
○田口隆信、高橋 仁、渡辺誠衛、新野葉子、中田健美、立花忠則、斎藤久一

### 【研究ノート】

- 「加熱処理が米粉の糊化特性に与える影響」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6-41  
○高橋 徹、三浦 靖、小林昭一

### 【総説】

- 「新しい活性酸素種およびその消去成分の検出・定量」・・・・・・・・・・・・・・・・ 6-45  
○秋山美展、大久保一良
- 「秋田味噌醤油品評会出品物分析結果のまとめ」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6-50  
○尾張かおる、渡辺隆幸、高橋光一

## 第7号(2005年)

### 【原著論文】

- 「近赤外スペクトルによるビールのパターン認識分類」・・・・・・・・・・・・・・・・ 7-1  
○熊谷昌則、高橋 豊、進藤 昌、小川信明
- 「味覚センサによる市販食用塩の味質評価」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7-6  
○熊谷昌則、三浦幸子、杉本真帆、石川匡子、松永隆司
- 「マンナナーゼ生産菌の分離と培養条件の検討」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7-12  
○戸枝一喜、保刈美佳
- 「食品の加熱工程における加熱履歴表現モデルの構築」・・・・・・・・・・ 7-17

- 秋山美展、高橋 徹、大久長範、長縄明大
- 「高品質味噌を目的とする県産大豆の蒸煮条件の検討」・・・ 7-23
- 尾張かおる、渡辺隆幸
- 「秋田県産酒造原料米における酒造適性の経年変動」・・・ 7-31
- 高橋 仁、渡辺誠衛、大野 剛、田口隆信、中田健美、立花忠則、田口トモ子
- 「色素培地を用いた優良酵母の育種とその酒造適性」・・・ 7-38
- 渡辺誠衛、新野葉子、田口隆信、高橋 仁、大野 剛、中田健美、立花忠則

**【研究ノート】**

- 「秋田酒こまちと蕎麦におけるγ-アミノ酪酸の分布」・・・ 7-47
- 大久長範、大能俊久、高橋 仁
- 「食品工場におけるカビの発生事例」・・・ 7-49
- 佐々木康子、菅原真理
- 「県産味噌のイソフラボン量と配糖体、アグリコンの比率」・・・ 7-53
- 渡辺隆幸、尾張かおる、高橋慶太郎
- 「食用担子菌類が持つ各種酵素活性」・・・ 7-57
- 樋渡一之、小笠原博信、堀 一之、高橋砂織

**【総説】**

- 「安全、高品質な食品製造に関する研究 ―秋田県内中小企業食品製造工場におけるHACCP簡易構築の取り組み―」・・・ 7-61
- 菅原真理、佐々木康子

**第8号（2006年）**

**【原著論文】**

- 「加熱処理による米粉の改質ならびにその調理・加工適性の解明」・・・ 8-1
- 高橋 徹、三浦 靖、小林昭一
- 「米味噌の脂肪酸エチルエステル生成に与える種麴、酵母と酵素剤の影響」・・・ 8-7
- 渡辺隆幸、尾張かおる、堀 一之
- 「ジュンサイの品質向上技術の開発 ―黒変解明と黒変除去―」・・・ 8-15
- 杉本勇人、塚本研一、山田幸樹

**【研究ノート】**

- 「カバノアナタケ抽出液の保存方法」・・・ 8-23
- 大久長範、今野祐子

【総説】

- 「秋田県産農水産物に含まれる生理活性物質  
—癌転移抑制物質の探索研究—」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8-27  
○畠 恵司、堀 一之、高橋砂織

第9号（2007年）

【原著論文】

- 「大豆リュウホウを用いた高品質味噌製造の検討  
—多麹および新規麹菌の利用—」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9-1  
○尾張かおる、渡辺隆幸  
「秋田の水のミネラルバランスと味覚センサ応答パターン」・・・・・・・・・・ 9-5  
○熊谷昌則、大野 剛、高橋 仁、中田健美  
「北東北産雑穀類の利用（第1報） —雑穀麴パンの製造試験—」・・・・・・・・ 9-10  
○畑山 誠、秋山美展、高橋慶太郎  
「北東北産雑穀類の利用（第2報） —雑穀麴みその製造試験と抗変異原性—」・ 9-15  
○畑山 誠、渡辺隆幸、尾張かおる、高橋慶太郎  
「アルコール感受性酵母を用いた新しいタイプの清酒の開発」・・・・・・・・・・ 9-20  
○渡辺誠衛、大野 剛、田口隆信

【総説】

- 「清酒業界における密度測定について  
—浮ひょうと振動式密度計との測定値の比較—」・・・・・・・・・・・・・・・・ 9-27  
○若林三郎

【解説】

- 「特許制度と各種支援制度について」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9-35  
○佐々木康子

第10号（2008年）

【原著論文】

- 「色素培地を用いた交雑法による吟醸酒用酵母の育種」・・・・・・・・・・ 10-1  
渡辺誠衛、田口隆信、高橋 仁、大野 剛  
○「フキノトウ由来生理機能性成分の評価と発酵食品への応用」・・・・・・・・ 10-9  
渡辺隆幸、堀 一之  
○「秋田の地下水・湧水の水質特性の解析」・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10-14  
熊谷昌則、大野 剛、高橋 仁、吉田知司

- 「放線菌由来の耐熱性生澱粉分解酵素のクローニング」・・・・・・・・・・ 10-19

“Molecular cloning of a thermostable raw starch digesting amylase gene from a  
*Streptomyces* sp.”

金子隆宏

【総説】

- 「脳機能計測による新しい食品の評価法の開発」・・・・・・・・・・ 10-29

熊谷昌則、高橋徹、佐藤文華、渡部雅実、堀一之、樋渡一之、戸枝一喜、

秋山美展

「秋田県総合食品研究所報告」第1号～第9号人名索引  
(報文、研究ノート、総説)

[号—ページ、太字下線は筆頭著者を示す。]

【あ】

- 青木淳子 [4-25]  
秋山美展 [1-35, 1-48, 1-82, 3-65, 5-40, 6-25, 6-45, 7-17, 9-10, 10-29]  
阿部雪子 [1-85]  
天野敏雄 [5-27]  
石川京子 [1-1]  
石川匡子 [1-62, 2-25, 7-6]  
石川雄章 [1-1]  
伊藤信義 [2-45]  
伊藤 汎 [4-25]  
岩野君夫 [1-1]  
大久保良一 [6-45]  
大能俊久 [3-1, 4-59, 5-55, 5-58, 7-47]  
大野 剛 [3-49, 4-50, 7-31, 7-38, 9-5, 9-15, 10-1, 10-14]  
大久長範 [1-85, 2-1, 2-57, 3-1, 4-1, 4-59, 5-40, 5-55, 5-58, 6-18, 7-17, 7-47,  
8-23]  
小笠原博信 [1-28, 5-48, 7-57]  
小川信明 [5-27, 6-18, 7-1]  
折戸めぐみ [2-29]  
尾張かおる [2-45, 4-19, 5-1, 6-50, 7-23, 7-53, 8-7, 9-1, 9-15]

【か】

- 金子隆宏 [10-19]  
木村貴一 [3-35, 4-30]  
熊谷昌則 [1-35, 1-69, 2-1, 2-9, 2-17, 3-1, 3-6, 3-12, 3-19, 3-44, 3-57, 4-1, 4-11,  
4-62, 5-29, 5-33, 6-8, 6-18, 7-1, 7-6, 9-5, 10-14, 10-29]  
熊谷 亮 [4-25]  
小林昭一 [2-57, 6-41, 8-1]  
今野祐子 [8-23]

【さ】

- 斎藤久一 [1-1, 2-36, 4-42, 6-32]

佐々木(畠)康子 [2-1, 4-1, 4-6, 5-7, 5-14, 5-21, 6-8, 7-49, 7-61, 9-35]  
佐渡高智 [1-8]  
佐藤文華 [10-29]  
佐無田隆 [1-1]  
柴本憲夫 [1-62, 1-69, 2-9, 2-17, 2-25, 2-29, 3-12, 3-19, 3-25, 4-6, 4-11, 5-1, 5-7, 5-21, 6-1, 6-8]  
島田信二 [5-40]  
進藤 昌 [3-44, 7-1]  
菅原真理 [3-25, 4-6, 5-7, 5-14, 6-1, 6-8, 7-49, 7-61]  
菅原久春 [2-57, 5-21]  
杉本真帆 [7-6]  
杉本勇人 [8-15]  
鈴木聡美 [5-21]

#### 【た】

高田吉丈 [5-40]  
高橋慶太郎 [3-57, 4-30, 4-62, 6-25, 7-53, 9-10, 9-20]  
高橋光一 [1-62, 1-69, 2-9, 2-17, 2-45, 3-6, 3-12, 3-19, 4-11, 4-19, 5-1, 5-14, 6-50]  
高橋砂織 [1-79, 3-57, 4-30, 4-62, 5-48, 5-61, 7-57, 8-27]  
高橋 徹 [1-35, 2-1, 3-1, 4-1, 6-8, 6-41, 7-17, 8-1, 10-29]  
高橋 仁 [1-1, 1-8, 2-36, 6-32, 7-31, 7-38, 7-47, 9-5, 10-1, 10-14]  
高橋 豊 [7-1]  
田口隆信 [1-1, 2-36, 4-42, 6-32, 7-31, 7-38, 9-20, 10-1]  
田口トモ子 [7-31]  
立花忠則 [1-14, 2-36, 3-49, 4-30, 4-42, 4-50, 6-32, 7-31, 7-38]  
辰巳英三 [3-68]  
塚本研一 [1-62, 2-25, 2-29, 3-25, 5-33, 8-15]  
戸枝一喜 [1-79, 3-25, 3-32, 4-25, 5-33, 6-13, 7-12, 10-29]  
戸松さやか [4-50]  
戸松 誠 [1-62, 1-69, 2-9, 2-17, 2-25, 2-29, 3-12, 3-19, 3-25, 4-11, 5-33]

#### 【な】

中田健美 [1-1, 2-36, 2-61, 4-42, 6-32, 7-31, 7-38, 9-5]  
長縄明夫 [7-17]  
新野葉子 [6-32, 7-38]

【は】

- 畠 恵司 [5-61, 8-27]  
畑山 誠 [9-10, 9-15]  
樋渡一之 [7-57, 10-29]  
船木 勉 [5-33]  
保苺美佳 [5-33, 6-13, 7-12]  
堀 一之 [3-68, 5-55, 5-61, 7-57, 8-7, 8-27, 10-9, 10-29]

【ま】

- 松永隆司 [7-6]  
三浦幸子 [7-6]  
三浦 靖 [6-41, 8-1]

【や】

- 山口誠之 [5-40]  
山田幸樹 [8-15]  
山田潤一 [2-25, 2-29, 3-25]  
吉田 徹 [3-32]  
吉田知司 [10-14]

【わ】

- 若林三郎 [9-27]  
渡辺誠衛 [1-1, 1-8, 2-36, 3-44, 6-32, 7-31, 7-38, 9-20, 10-1]  
渡辺隆幸 [2-45, 4-19, 5-1, 5-7, 6-25, 6-50, 7-23, 7-53, 8-7, 9-1, 9-15, 10-9]  
渡部雅実 [10-29]

【他】

- 薛 文通 [1-35]  
殷 麗君 [3-68]  
張 曉峰 [3-68]  
李 里特 [3-68]  
龐 中存 [4-59]

## 秋田県総合食品研究所報告規定

### 【総則】

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

### 【掲載論文の種類】

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

### 【掲載論文等のページ数と注意事項】

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

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

（特許の要約と学会発表要旨）どちらの項目も1/2ページにまとめること。

（外部発表論文再掲載）原則として、秋田県総合食品研究所の職員が主体となり作成した論文に限り再掲載することが出来る。外部発表論文を再掲載する際には、執筆者が論文発表元の了解を得るとともに、編集委員に了解を得た旨を連絡すること。

（その他の外部発表論文リスト）論文題名、著者名、雑誌もしくは著書名、巻、最初と最後のページ及び発表年を記載する。

### 【審査】

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

### 【原稿の書き方】

1. 一般的注意事項：論文の記述は正確を期し、全編にわたり簡潔明瞭であること。
2. 原稿は、ワープロソフト（「Word」もしくは「一太郎」）を用いて作成し、A4版縦長に印刷して提出すること。
3. 原稿の書体は、原則として明朝体を用い、表題は18ポイント、本文は12ポイントとし、読みやすいように明瞭に印字すること。
4. 原稿は、オフセット印刷となるので、上下、左右には2.5cmの余白を設ける。

### 【論文の形式】

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

### 【引用文献】

1. 引用文献には、本文中での引用順に番号を付けて記載する。
2. 引用文献は、著者名、雑誌名もしくは著書名、巻、号、最初と最後のページ、発行年の順に記載する。
3. 著者名は、姓名とも記し、全著者名を記載する。
4. 欧文雑誌は、イタリック、巻はボールドとする。
5. 和文誌名は、科学技術文献速報、また、欧文誌名は、*Chemical Abstract* や *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 投稿規定等を参照のこと。

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

【学名】学名にはイタリックを用いる。

秋田県農林水産技術センター  
総合食品研究所報告 第10号

委員長 佐藤 喜盛  
幹事 本間 猛  
副委員長 高橋 砂織

委員 塚本 研一  
同 熊谷 昌則  
同 進藤 昌  
同 高橋 慶太郎  
同 堀 一之  
同 松橋 哲也

発行 平成20年7月7日  
発行者 秋田県農林水産技術センター  
総合食品研究所  
〒010-1623  
秋田市新屋町字砂奴寄 4-26  
電話：018-888-2000（代）  
FAX：018-888-2008  
<http://www.arif.pref.akita.jp/>

【無断複製を禁ず】