

黒麹菌のプロテアーゼが芋焼酎醸造に与える影響
(Effect of protease of black *koji* mold on sweet potato *shochu* brewing)

鹿児島大学大学院連合農学研究科
応用生命科学専攻

瀬戸口 翔

2019 年

目 次

第1章 序論 (General Introduction)	1
1.1 本格焼酎とその現状	1
1.2 麴 (麴菌) の機能性について	3
1.3 本論文の研究目的とその内容	4
第2章 黒麴菌 <i>Aspergillus luchuensis</i> の <i>pepA</i> 破壊および高発現が芋焼酎の香気に与える 影響	6
2.1 緒言	6
2.2 材料と方法	7
2.2.1 使用菌株および培地	7
2.2.2 <i>pepA</i> 破壊株および <i>pepA</i> 高発現株の構築	7
2.2.3 カゼインプレートアッセイによる酸性プロテアーゼ活性の比較	9
2.2.4 米麴の調製	10
2.2.5 米麴の分析	10
2.2.6 芋焼酎小仕込み試験	11
2.2.7 醪および芋焼酎の分析	11
2.3.1 <i>pepA</i> 破壊株および <i>pepA</i> 高発現株の取得	13
2.3.2 カゼインプレートアッセイによる酸性プロテアーゼ活性の比較	16
2.3.3 米麴の分析	16
2.3.4 芋焼酎の小仕込み試験	19
2.4 考察	23
3-1 緒論	25
3-2 材料と方法	25

3.2.1	菌株および培地.....	25
3.2.2	酸性プロテアーゼ高生産株の育種と選抜.....	26
3.2.3	製麴試験.....	26
3.2.4	麴の分析方法.....	27
3.2.5	芋焼酎の小仕込み試験.....	27
3.2.6	醪中の遊離アミノ酸分析.....	28
3.2.7	焼酎の香気成分分析.....	28
3.2.8	焼酎の官能試験.....	29
3.3	実験結果および考察.....	29
3.3.1	酸性プロテアーゼ高生産株の選抜.....	29
3.3.2	製麴試験.....	31
3.3.3	芋焼酎の小仕込み試験.....	34
3.4	謝辞.....	40
第4章	黄変黒麴の抗菌成分に関する研究.....	41
4.1	緒論.....	41
4.2	材料と方法.....	42
4.2.1	黄変黒麴が芋焼酎の醪発酵に与える影響.....	42
4.2.2	抗菌物質の精製.....	42
4.2.3	酵母に対する抗菌試験.....	43
4.2.4	酵母に対する殺菌効果試験.....	44
4.2.5	糸状菌に対する抗菌試験.....	44
4.2.6	Fraction 3 の定性試験.....	44
4.3	実験結果および考察.....	46
4.3.1	黄変黒麴が芋焼酎の醪発酵に与える影響.....	46
4.3.2	酵母に対する抗菌効果および殺菌効果.....	49
4.3.3	糸状菌に対する抗菌効果.....	50

4.3.4 Fraction 3 の定性	51
第 5 章 総括 (General Conclusion)	55
参考文献	58
本論文に関係のある報告	67
謝辞.....	70

List of Figures

Figure 1-1	Changes in production volume of simple distillation <i>shochu</i> .	1
Figure 1-2	Biosynthesis pathway of higher alcohols in yeast.	4
Figure 2-1	Confirmation of $\Delta pepA$ strain by colony PCR and Southern blotting.	14
Figure 2-2	Confirmation of OE $pepA$ strain by colony PCR and Southern blotting.	15
Figure 2-3	Comparison of transformants by plate assay.	16
Figure 2-4	Analysis of rice <i>koji</i> .	18
Figure 2-5	Microbiomass in rice <i>koji</i> .	19
Figure 2-6	Changes in total amino acid concentration during mash.	21
Figure 3-1	Comparison of mutants by plate assay.	30
Figure 3-2	Rice <i>koji</i> made using J7-2 and APH-1 strain.	31
Figure 3-3	Amino acid concentration of 1st mash and 2nd mash.	37
Figure 4-1	Isolation flowchart of antimicrobial substances contained in rice <i>koji</i> made by MEM-C.	43
Figure 4-2	Effect of yellowish black <i>koji</i> (MEM-C) on fermentation.	47
Figure 4-3	Antifungal activity of Fraction 3 for three fungi.	51
Figure 4-4	Confirmation of Fraction 3 by TLC.	52
Figure 4-5	Confirmation of Fraction 3 by HPLC	53
Figure 5-1	Aroma production pathway in 2nd mash of sweet potato <i>shochu</i>	56

List of Tables

Table 2-1	Nucleotide sequences of primers used in this study.	9
Table 2-2	Analysis result of secondary mash.	20
Table 2-3	Aroma component concentration in sweet potato <i>shochu</i> .	22
Table 3-1	GC/MS analysis conditions.	28
Table 3-2	Heavy ion beam intensity and survival Rate.	29
Table 3-3	Analysis of rice <i>koji</i> made on a flask scale.	31
Table 3-4	Analysis of rice <i>koji</i> .	33
Table 3-5	Analysis of 1st and 2nd fermented mash.	35
Table 3-6	Analysis of flavor components of sweet potato <i>shochu</i> .	39
Table 4-1	Acidity and enzyme activities of rice <i>koji</i> .	46
Table 4-2	Effect of yellowish black <i>koji</i> (MEM-C) on mash.	48
Table 4-3	Minimum inhibitory concentration of Fraction 3 for yeasts in <i>koji</i> extract media (pH 3.5).	49
Table 4-4	Sterilization effect of Fraction 3 on yeast.	50
Table 4-5	Antibacterial activity of Fraction 3's TLC, HPLC and ultrafiltration fraction on yeast.	54

第1章 序論 (General Introduction)

1.1 本格焼酎とその現状

日本の伝統的な蒸留酒とされる単式蒸留焼酎（焼酎乙類）の中でも、定められた原料と製法を用いて製造されたものを本格焼酎と呼び、主に九州・沖縄地方で生産されている。九州地方の中でも産地によって用いられる原料は様々であり、大分県や長崎県の壱岐では大麦を主原料とする麦焼酎が、熊本県（主に球磨）では米を主原料とする米焼酎、沖縄県では米麴を原料とする泡盛の生産が盛んであり、宮崎県や鹿児島県ではサツマイモを主原料とする芋焼酎の生産が盛んである。1970-2017年度における単式蒸留焼酎の製成数量推移を Fig. 1-1 に示したが、製成数量は3度の焼酎ブームを経て2006年度にピークを記録した後、減少傾向にある。要因として人口減少や若者のアルコール離れによる消費減少が考えられ、焼酎産業のみならず酒類産業全体にとっても深刻な問題となっている。

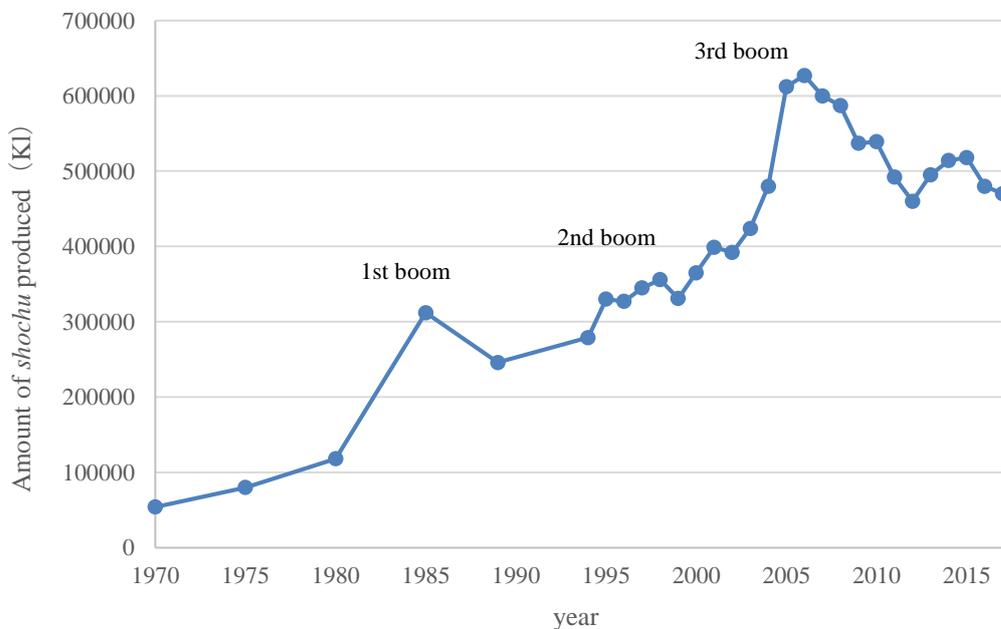


Fig. 1-1 Change in production volume of simple distillation *shochu*.

Production volume is based on the National Statistical Office Annual Statistical Report.

このような背景の中、芋焼酎メーカー各社はサツマイモの品種や原料処理方法、麹菌や酵母などの醸造微生物の組み合わせ、さらには蒸留方法を検討することで個性的な香味を有する商品の開発に力を注いでいる。近年では橙芋を使用したフルーティーなタイプの商品や減圧蒸留法を用いたすっきりとしたタイプの商品が開発され、若年層や女性から好評を得つつある。しかし、本格焼酎を含む単式蒸留焼酎全体の消費減少は続いており、海外市場も視野に入れた更なる品質向上や香味の多様化が望まれている。

芋焼酎醸造において香味を大きく左右する因子として、原料となるサツマイモの品種が挙げられる。様々なサツマイモ品種を用いた芋焼酎の特徴香については神渡らによって報告されており (1)、上述した橙芋や紫芋を使用すると大きく香味が変化するため、これらのサツマイモを使用した商品は多く市販されている。また、酵母の種類や蒸留方法、製造技術も大きな因子として挙げられる。酵母は、日本醸造協会や各県の酒造組合および公的研究機関から購入したものを使用することが一般的だが、メーカー独自に分離や育種された菌株が使用されることもある。酵母は芋焼酎の香気成分生成に深く関わっており、清酒酵母やワイン酵母などを使用した商品も開発されるなど、酒質の多様化に寄与している。蒸留方法については蒸留釜内に空気を送り込みながら蒸留するみがき蒸留 (2) などが開発されている。また、各社減圧蒸留機や材質、形状 (縦型・横型・ネック長など) の異なる蒸留機を使用することで多様な原酒を製造している。その他の製造技術については、芋麹や液体麹といった麹製造法 (3-5) や焦がし醪製法 (6) などが報告されている。

一方で、焼酎麹菌および麹が芋焼酎の香味に与える影響はこれまで報告が少なく、太田ら (7) が β -グルコシダーゼと芋焼酎の特徴香であるモノテルペンアルコールとの関連について報告してからは目立った報告はされていなかった。しかし、近年では自然界から分離した黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を用いて芋焼酎の醸造試験 (8) や、プロテアーゼ活性が高い麹菌を用いることで芋焼酎の香味が変化すること (9) が報告されていることから、芋焼酎の酒質を変えうる因子として麹菌にも注目が集まっている

ることが伺える。

さらに、焼酎麹菌（白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*・黒麹菌）のゲノム情報が公開された（10, 11）ことで焼酎麹菌に関する基礎研究が近年急速に進んでおり、黒麹菌ではバニリンの前駆体であるフェルラ酸の生成に関与する遺伝子も同定されている（12）。今後も研究が進むことで焼酎麹菌に着目した焼酎の商品開発や新たな焼酎製造技術の開発が期待される。

1.2 麹（麹菌）の機能性について

糸状菌の一種である麹菌は多種多様な二次代謝産物を生産するとされており、黒麹菌と白麹菌の近縁種である *Aspergillus niger* はカビ毒とされるオクラトキシンとフモニシンを生産することが報告されている。しかし、黒麹菌と白麹菌はこれらの生合成遺伝子クラスターが欠損しており、カビ毒を生産しないことが分かっている（13）。麹菌が生産する二次代謝産物については古くから報告があり、代表的なものに黄麹菌で生産が確認されているコウジ酸やアスペルギリン酸、アスピロクロリン（14-16）や、黒麹菌や白麹菌といった焼酎麹菌で生産が確認されているピラノニグリン（17）が挙げられる。中でもコウジ酸は 100 年以上前にその生産が確認されているが、美白効果を有する（18）ことなどから化粧品等に利用されている。

また、麹菌は様々な酵素を分泌することが知られており、例えば黄麹菌由来の酸性プロテアーゼは麹原料のタンパク質を分解することでアミノ酸やペプチドを生み出すだけでなく、直接摂取することでビフィズス菌が増加し、腸内環境を改善する効果が見出されている（19）。さらに、黄麹菌のアミラーゼ類は原料に含まれる澱粉などの糖質を分解することでマルトオリゴ糖やイソマルトオリゴ糖などの生成に関わっており、このオリゴ糖も腸内環境改善効果を有することが知られている（20）。

さらに、白麹菌で造られた麹にはグルコシルセラミドが含まれており、このセラミドは醸造過程において酵母に移行することでアルカリ耐性やエタノール耐性の付与ならびに酢酸エチルや酢酸イソアミル、1-プロパノールなどの香気成分の改変に寄与す

ることが報告されている (21)。

上述した二次代謝に関わる遺伝子クラスターや酵素生産に関わる遺伝子, さらにはそれらの制御因子に関して研究が進行しており, 今後機能性成分の収率向上や新規機能性成分の発見が期待される。

1.3 本論文の研究目的とその内容

1.1 で記述した通り, 麹菌は芋焼酎を含めた本格焼酎の醸造に必要不可欠な微生物であり, 麹菌の研究が進むことで芋焼酎の香味改善や酒質の多様化が期待できる。一方, 酵母はアミノ酸合成経路および/またはエールリッヒ経路 (22-24) を介して高級アルコールなどの様々な香気成分を生産することが知られている (Fig. 1-2)。

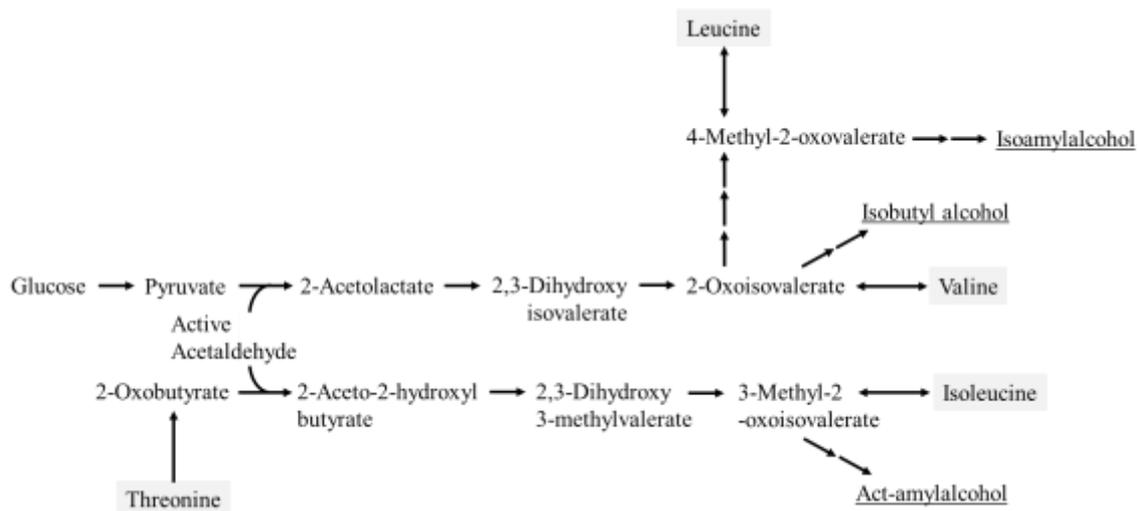


Fig. 1-2 Biosynthesis pathway of higher alcohols in yeast.

過去の研究では, 培地中のアミノ酸濃度を変化させると, 酵母由来の香気成分の量が変化することが報告されている (25, 26)。また, 醪にプロテアーゼやアミノ酸を添加することにより, 芋焼酎の香気形成に影響を与えることが報告されている (27, 28)。さらに, アルデヒド類は, 酵母のアミノ酸代謝経路やアミノ酸の Strecker 分解 (29) に

よっても産生される。このように、焼酎醪中のアミノ酸濃度は焼酎中に含まれる多くの香気成分生成に影響すると考えられる。そこで、1つ目の研究では芋焼酎の香味改善および香味多様化に繋げるため、醪中のアミノ酸濃度に影響し得る酸性プロテアーゼが焼酎麹菌の育種指標となるかを調査した。まず、アグロバクテリウム形質転換法（AMT）により、黒麹菌 *A. luchuensis* RIB 2604（NBRC 4314）を用いて *pepA* 欠失および高発現株を構築した。次に、*pepA* 破壊株（ $\Delta pepA$ ）と *pepA* 高発現株（OE*pepA*）を用いて米麴を作製し、米麴の性質を評価した。最後に芋焼酎の小仕込み試験を行い、各種香気成分の変化を調べた。これらの結果から酸性プロテアーゼは焼酎麹菌の育種指標として有望であると判断されたため、遺伝子組換えを用いない変異導入による育種法でプロテアーゼ高生産株を育種し、得られたプロテアーゼ高生産株についても芋焼酎の小仕込み試験を実施した。

さらに、1.2 で記述した通り、麴（麹菌）は多様な機能性を有しており、未知の機能性成分も含んでいる可能性が高い。霧島酒造（株）が保有する黒麹菌の中に黄色素を高生産する菌株があるが、この株を用いて製造された黄変黒麴は焼酎醸造過程において一次醪の発酵を阻害することが過去の試験で明らかとなっていた。そこで、2つ目の研究としてこの黄変黒麴が醪の発酵を阻害するメカニズムと原因物質の解明を目的に醪の発酵試験と原因物質の分離精製を行った。

第 2 章 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の *pepA* 破壊および高発現が芋焼酎の香気に与える影響

2.1 緒言

芋焼酎は、米麹、酵母およびサツマイモを原料とした日本の伝統的な蒸留酒である。焼酎醸造には麹菌と酵母の 2 種類の微生物が使用されており、酵母や麹菌の各種菌株が使用されている。黒麹菌 (30) と呼ばれる *A. luchuensis* は、米麹製造に使用される重要な微生物の 1 つである。その主な役割は、多量の糖化酵素を生産することにより、米とサツマイモのデンプンをグルコースとマルトースに分解することである。さらに、大量のクエン酸を生成し、焼酎醸造時の雑菌汚染を防止する。また、麹菌は芋焼酎の香りにも影響すると考えられている。例えば、麹菌で生産された β -グルコシダーゼは、サツマイモの焼酎中のモノテルペンアルコール生産に寄与していることが報告されている (7)。しかし、麹菌の酵素と焼酎の香り成分の関係については、あまり研究されていない。一方、多くの発酵食品に酵母関連の香り成分に関する報告があり、酵母はアミノ酸合成経路および/またはエールリッヒ経路 (22-24) を介して様々な香り成分を生産することが知られている。以前の研究では、培地中のアミノ酸濃度を変化させると、酵母由来の香り成分の量が変化することが報告されている (25,26)。また、醪にプロテアーゼやアミノ酸を添加することにより、芋焼酎の香り形成に影響を与えることが報告されている (27,28)。さらに、アルデヒド類は、酵母のアミノ酸代謝経路やアミノ酸の Strecker 分解 (29) によっても産生される。このように、焼酎醪中のアミノ酸濃度は焼酎中に含まれる多くの香り成分生成に影響すると考えられる。我々は、醪のアミノ酸濃度を制御する手段として、麹菌が産生する酸性プロテアーゼに注目した。本酵素は酸性条件下で活性を示すことから、焼酎醪中のアミノ酸濃度はこの酵素の影響を受けると考えられる。主要な細胞外プロテアーゼ *Aspergillopepsin A* をコードする遺伝子 *pepA* は *A. awamori* (31) でクローニングされており、*pepA* に類似した酸性プロテアーゼに関する研究が *A. oryzae* および *A. niger* (32-34) において報告されている。近

年, *A. luchuensis* のゲノム情報が開示されており (9), *A. luchuensis* の遺伝子機能解析が進んでいることもあり, 本研究では黒麹菌の酸性プロテアーゼが芋焼酎の香気成分の生産に関与しているかどうかを調べるために, *A. luchuensis* RIB 2604 株の $\Delta pepA$ および OE $pepA$ として *pepA* 相同遺伝子の欠失および高発現株をそれぞれ調製した。焼酎の香気成分生産に及ぼす *pepA* の役割を調べるために, WT, $\Delta pepA$, OE $pepA$ 株を用いて米麴, 醪, 焼酎をそれぞれ調製し, 醪中のアミノ酸含量と焼酎の香気成分含量を測定した。

2.2 材料と方法

2.2.1 使用菌株および培地

A. luchuensis RIB 2604 (NBRC 4314) 株および *A. luchuensis* RIB 2604 $\Delta ligD$ 株を形質転換用宿主として用いた (35)。 *Escherichia coli* DH5 α 株を種々のプラスミドの増幅に用いた。 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 株をアグロバクテリウム形質転換法

(AMT) による *A. luchuensis* RIB 2604 株および *A. luchuensis* RIB 2604 $\Delta ligD$ 株の形質転換に用いた。焼酎酵母鹿児島 5 号を, 芋焼酎の小スケール醸造試験に用いた。100 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシン B を添加した Czapek-Dox (CD) 培地 (0.3% NaNO_3 , 0.2% KCl , 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% glucose, 2% agar) (CD-hyg) を $\Delta pepA$ および OE $pepA$ の選択培地として使用した。カゼインプレートアッセイによる酸性プロテアーゼ活性の比較には, PDA 培地および乳酸で pH4.0 に調整した 1%カゼイン (乳由来) を含む CD-カゼイン (CD-cas) 培地を使用した。

2.2.2 *pepA* 破壊株および *pepA* 高発現株の構築

*pepA*破壊株は以下に示す方法で取得した。*pepA*の5'および3'領域を含む約700 bpおよび1.5 kbpの断片を, プライマー対P1-f / P1-rおよびP2-f / P2-rを用いたPCRにより

増幅した。*hphB*発現カセットはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (ALgpA) プロモーター, *hphB*遺伝子およびALgpAターミネーターを担持するプラスミドpB-AI-hph (O. Yamada, 未発表データ) から*KpnI*消化により取得した。これらの3つの断片をIn-Fusion HDクローニングキット (タカラバイオ) によりpRIE (35) の*Ec*oRI切断部位にクローニングしてpD*pepA*を形成した。

A. luchuensis RIB 2604Δ*ligD*株をAMT法 (35, 36) によりpD*pepA*で形質転換し, アグロバクテリウムを殺菌するために10 μg/ml セフトキシムおよび10 μg/ml スペクチノマイシンを加えたCD-hyg培地で形質転換体を選抜した。Δ*pepA*株は, プライマー対P4-f / P4-rおよびP5-f / P5-rを用いたコロニーPCRによって確認した。さらに, *pepA*破壊は, サザンブロット解析でも確認した。まず, *A. luchuensis* RIB 2604Δ*ligD*株およびΔ*pepA*株のゲノムDNAを*EcoRI*で消化し, 続いてアガロースゲル電気泳動を行った。ナイロンメンブレンに移した後, プライマー対P7-f / P7-rを用いたPCRによって増幅したDIG標識プローブ (PCR DIGプローブ合成キット, Roche Molecular Biochemicals) とハイブリダイズさせた。

次に, *pepA*高発現株は以下に示す方法で取得した。*A. luchuensis* RIB 2604のゲノムDNAを鋳型として, プライマー対P3-f / P3-rを用いて*pepA*コード領域をPCR増幅した。増幅した断片をIn-Fusion HD Cloning KitによりpRglaA142の*SalI*部位にクローニングし, *pepA*が*glaA*プロモーター (37, 38) の制御下に位置するpOE*pepA*を構築した。*A. luchuensis* RIB 2604株をAMT法によりpOE*pepA*で形質転換し, 10 μg/ml セフトキシムおよび10 μg/ml スペクチノマイシンを含むCD-hyg培地で形質転換体を選択した。OE*pepA*株は, プライマー対P6-f / P6-rを用いたコロニーPCRとサザンブロット解析によって確認した。サザンブロット解析は*A. luchuensis* RIB 2604株およびOE*pepA*株のゲノムDNAを*HindIII*および*SpeI*で消化し, 続いてアガロースゲル電気泳動を行った。ナイロンメンブレンに移した後, プライマー対P8-f / P8-rでPCR増幅したDIG標識プローブ (PCR DIGプローブ合成キット, Roche Molecular Biochemicals) とハイブリダイズさせた。本実験で使用したプライマーのヌクレオチド配列をTable 2-1

に示す。

TABLE 2-1 Nucleotide sequences of primers used in this study.

Primer	Nucleotide sequence (5'→3')
P1-f	CGTTTTTAATGAATTAAGACGCGATAGTCAAAGTCTGACTGTC
P1-r	TGGACCCCGAAGGCGCAAGCAAGAGAGTTCGGAGAAGAGATAG
P2-f	GAGCTCAATGGCCCGTCGTCGATGGGATACATCTGGACATATAG
P2-r	TAGTTTAAACTGAATTTAGGATGAGCATCAACTTGAGCTGATG
P3-f	GTCGAAGCAAGTCGAAAAATGGTCGTCTTCAGCAAACCGCTGCC
P3-r	CCGCAAGCTTGTCGACTAAGCTTGAGCAGCGAAGCCCAGCTTAGG
P4-f	TTACATCATCTCATCTCGTCCGGTTCCTCG
P4-r	CAACATTGGGAGATATGGGGACTGGACAAAC
P5-f	CTGTCTTGGAATTGCGAATATCCTCACGG
P5-r	CGCCCAACACGTTTCTACATGCAACCACTC
P6-f	CGCATCGTGGTTCATCGTCCCAGC
P6-r	GCTAATAGGATTCTGCCTTCCTGCTCAACG
P7-f	GGAAGGAATGAAGGTTGAGGGGAATGGGCG
P7-r	CAATGGTGCCATCGCAGCGAAACGGACATG
P8-f	CGCAAGGGCTTCACCATCAACCAGATTGCC
P8-r	GGAGGGGTGGTCGAGCAGGAGAAAACGTAG

2.2.3 カゼインプレートアッセイによる酸性プロテアーゼ活性の比較

カゼインプレートアッセイによって形質転換体および親株の酸性プロテアーゼ活性を比較した。1%カゼインを含む CD 培地(炭素源:2%マルトース, pH4.0)に $\Delta ligD\Delta pepA$ 株および OE $pepA$ 株, それぞれの親株の分生子懸濁液をスポットし, 30°C にて 48 時間

培養した後ハローの大きさを観察した。また、対照として PDA 培地でも増殖の確認を行った。

2.2.4 米麴の調製

フラスコ製麴試験は 500 ml 容三角フラスコに滅菌した α 米 60 g と滅菌水 30 ml, 1.5×10^7 個の胞子を添加し、良く攪拌した後、シリコキャップで蓋をし、恒温恒湿機で温度と湿度を管理しながら 48 時間培養した。

製麴条件は温度 38°C (0-19h) -36°C (19-27h) ~34°C (27-48h), 湿度 80% (0-27h) - 制御なし (27~48h) とした。

2.2.5 米麴の分析

麴の酸度および酸性プロテアーゼ活性は国税庁所定分析法注解 (39) に従って分析を行った。酸度は米麴 5 g に蒸留水 25 ml を加え、室温で 3 時間抽出後、ろ紙 (No.2, アドバンテック) でろ過し、指示薬を添加し、0.1 N NaOH で緑色になるまで滴定することで測定した。酸性プロテアーゼ活性測定試料は米麴 5 g に蒸留水 50 ml を加え、室温で 3 時間抽出後、ろ紙 (No.5C, アドバンテック) でろ過することで調製した。0.5% 乳酸を含む 2% カゼイン溶液 1.5 ml と McIlvaine buffer (pH3.5) 1 ml を混合した基質溶液に 0.5 ml の試料を加え、40°C・60 分間反応し、0.4 M トリクロロ酢酸 3 ml を加えることで反応を停止した。30 分間室温で放置後、反応液をろ過し、ろ液 1 ml と Na₂CO₃ 5 ml および 5 倍希釈したフェノール試薬(キシダ化学) 1 ml を混合して、40°C で 30 分間加温した後、660 nm の吸光度を測定した。チロシンの検量線を用いてチロシン生成量を算出した。酸性プロテアーゼは 40°C で 60 分間に 1 μ g のチロシン相当量の呈色を示す活性を 1 U とした。次に、5 g の米麴を 25 ml のタンパク質抽出緩衝液 (10mM 酢酸ナトリウム, 0.5% [wt/vol] NaCl, pH5.5) と混合し、室温で 3 時間インキュベートした後、これをろ紙 (No.5C) でろ過した。 α -アミラーゼ、糖化力、 α -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、酸カルボキシペプチダーゼの酵素活性は、 α -アミラーゼ測定キット

(キッコーマンバイオケミファ) および糖化力分別定量キット (キッコーマンバイオケミファ) および酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット (キッコーマンバイオケミファ) を用いて、製造者のプロトコルに従って分析した。また、米麴中の菌体量は HCl を用いて菌体を消化した後、Blix, 櫻井らの方法 (40, 41) によってグルコサミン量を定量することで算出した。乾燥米麴粉末 100 mg に 800 μ l の 4N HCl を加え、96°C で 16 時間反応させた。反応液に 800 μ l の滅菌蒸留水を加え、室温で 1 時間置いた後、15000 rpm で 20 分間遠心した。上清 40 μ l と蒸留水 160 μ l を混合し、400 μ l のアセチルアセトン試薬を加え、90°C で 1 時間反応させた。反応液を冷却後、4 ml の 100% エタノールと混合し、400 μ l のエールリッヒ試薬を加えた。室温で 1 時間後、530 nm の吸光度を測定した。最後にグルコサミンの検量線から米麴中のグルコサミン量を算出し、さらにあらかじめ作成しておいた菌株ごとの菌体あたりグルコサミン量の検量線を用いて菌体量を算出した。

2.2.6 芋焼酎小仕込み試験

各菌株から予め調製した米麴を用いた芋焼酎の醸造試験を以下のように行った。焼酎酵母鹿児島 5 号を 50 ml の YPD 液体培地で 30°C, 48 時間培養し、酵母前培養液を調製した。一次醪は、米麴 60 g にクエン酸溶液 (pH 4.0) 60 ml と酵母培養液 0.5 ml を加えて調製した。一次醪を 30°C で 5 日間発酵し、2 日目および 5 日目にそれぞれ 10 g を採取した。次いで、蒸して粉碎したサツマイモ 200 g と水 120 ml を一次醪に添加して二次醪を調製し、30°C で 8 日間発酵し、2 日目および 8 日目に 10 g と 50 g のサンプルを採取した。最後に、水蒸気蒸留装置 (宮本理研工業) を用いて 285 g の二次醪を常圧蒸留し、約 100 ml の芋焼酎を得た。

2.2.7 醪および芋焼酎の分析

採取した醪は 3000 rpm, 10 分間遠心し、上清を分析に用いた。エタノール濃度は簡易アルコール分析機 AL-3 (理研計器) で測定し、国税庁所定分析法注解 (39) に基づ

いて pH, 酸度, アミノ酸度を測定した。5 ml の上清に指示薬を添加し, 0.1 N NaOH で溶液が緑色になるまで滴定することで酸度を測定した。さらにアミノ酸度は以下の手順で調べた。酸度測定後のサンプルにフェノールフタレイン溶液を加え 0.1 N NaOH を溶液が赤紫に変わるまで加えた後, 中性ホルマリン溶液を 5 ml 加え, 再度 0.1 N NaOH で溶液が赤紫色を呈するまで滴定した。また, 醪中のアミノ酸を以下に示す方法で定量した。すなわち, 適宜希釈した醪上清に等量の 2% スルホサリチル酸を加えて攪拌後, 30 分間静置したものを 0.45 μm フィルターろ過して除タンパクを行った。除タンパクした試料を全自動アミノ酸分析装置 JLC-500/V (日本電子株式会社) に供し, 定量を行った。

次に, 得られた芋焼酎は原酒のエタノール濃度が 25% (v/v) になるようにイオン交換水で割り水し, 焼酎の香気成分は以下の条件で分析した。低沸点香気成分は, キャピラリーカラム DB-WAX (length : 30 m, I. D. : 0.32 mm, df : 0.25 μm) を装着した FID ガスクロマトグラフ (GC-2010, 島津製作所) を用いて内部標準法により測定した。分析試料は内部標準として 5000 mg/l ノルマルアミルアルコール 1.25 ml が入った 25 ml メスフラスコを焼酎でメスアップすることで調製した。オーブン温度は 40°C で 5 分間保持後, 40°C~120°C まで昇温速度 5°C /min, 120°C~230°C まで昇温速度 20°C /min とし, 230°C で 10 分間保持とした。注入口温度は 250°C, FID 温度は 250°C, スプリット比は 1/25 とした。中高沸点香気成分は, 焼酎をヘキサンで 1 回抽出した後, カラム DB-5 (length : 30 m, I. D. : 0.32 mm, df : 0.25 μm) を装着した FID ガスクロマトグラフ (GC-2025, Shimazu) を用いて絶対検量線法により測定した。すなわち, 25 ml 共栓試験管に焼酎 20 ml, ヘキサン 1 ml, 食塩 4 g を加え 50 秒間振盪し, 2 分間静置することで抽出後, スプリットレス法により測定した。オーブン温度は 40°C で 5 分間保持後, 40°C~100°C まで昇温速度 10°C /min, 100°C~280°C まで昇温速度 5°C /min, 280°C~300°C まで昇温速度 10°C /min, 300°C で 2 分間保持とした。注入口温度は 250°C, FID 温度は 310°C とした。

2.3 結果

2.3.1 *pepA* 破壊株および *pepA* 高発現株の取得

Uniprot Blast 検索サイト (<http://www.uniprot.org/blast/>) を用いて *A. luchuensis* ゲノムデータベース中から *A. niger* 酸性プロテアーゼ (AnPepA) のオルソログを検索したところ、394 個のアミノ酸からなり AnPepA と 97.0%の相同性を示す。

AA1_SCon_0040250 を見出した。本研究においてこの遺伝子を *pepA* 遺伝子としてターゲットに設定した。*A. luchuensis* の *pepA* 遺伝子が芋焼酎の香気成分生産に関与しているかどうかを調べるために、*pepA* 破壊株 ($\Delta pepA$) と *pepA* 高発現株

(OE*pepA*) を構築した。ハイグロマイシンを含む培地でスクリーニングした結果、 $\Delta pepA$ 株 4 株と OE*pepA* 株 5 株が得られた。得られた菌株をコロニーPCR およびサザンブロット分析により確認した。それぞれ $\Delta pepA$ の 4 株間および OE*pepA* の 5 株間で酸性プロテアーゼ活性の有意な差は確認されなかったため (データなし)、各株より 1 株を選抜し、サザンブロット解析を行った。また、 $\Delta pepA$ を確認するためにプライマーP4-f/P4-r および P5-f/P5-r を用いてコロニーPCR を行った (Fig. 2-1A)。

P4-f/P4-r プライマーを使用した場合、野生株 (WT) では増幅断片が見られなかったが、 $\Delta pepA$ では 4.0 kb の増幅断片が見られた (Fig. 2-1B)。P5-f/P5-r プライマーでは、WT の 2.1 kb 断片および $\Delta pepA$ の 3.2 kb 断片の増幅を確認することができた

(Fig. 2-1C)。サザンブロット解析では、それぞれ $\Delta pepA$ および WT で 2.9 および 4.8 kb の予想された位置にハイブリダイゼーションシグナルを示した (Fig. 2-1D)。これらの結果から、遺伝子置換が目的とする *pepA* 座で生じたことが示された。OE*pepA* の確認は、プライマーP6-f/P6-r を用いたコロニーPCR およびサザンブロット解析によって行った (Fig. 2-2A)。WT は増幅断片を示さなかったが、OE*pepA* 株の場合、1.7 kb の増幅断片が確認された (Fig. 2-2B)。OE*pepA* 株の *pepA* コピー数を確認するために、サザンブロット解析を行い、WT *pepA* locus に加えて *glaA* promoter を有する *pepA* の単一コピーの挿入が確認された (Fig. 2-2C)。

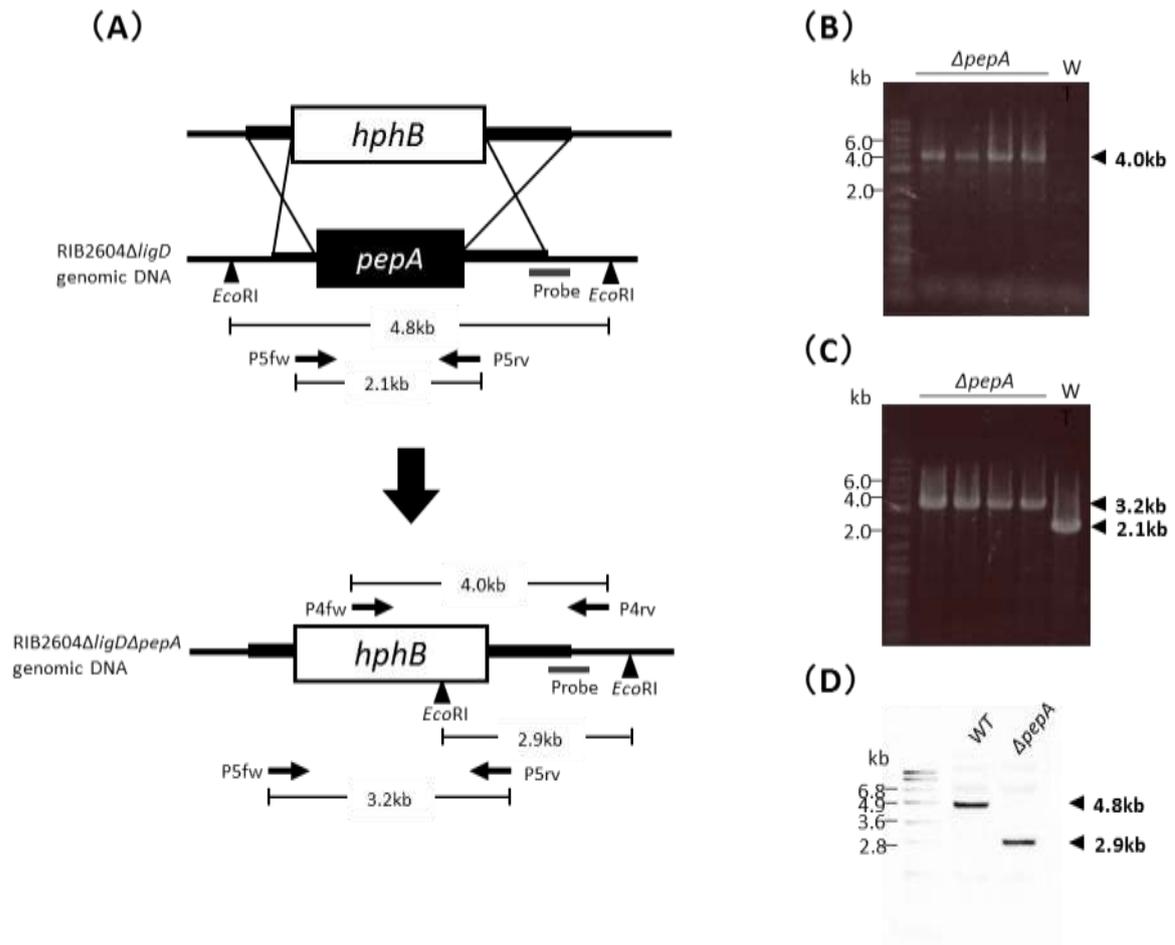


Fig. 2-1 Confirmation of $\Delta pepA$ strain by colony PCR and Southern blotting.

The outline of colony PCR and Southern blotting analysis is as shown in panel (A). Colony PCR was performed with primer pairs P4 (B) and P5 (C). As a control, RIB 2604 $\Delta ligD$ strain was used. In Southern blotting, the total DNA isolated from $\Delta pepA$ strain and RIB 2604 $\Delta ligD$ strain were digested with *EcoR* I and then hybridized with DIG-labeled probe (D).

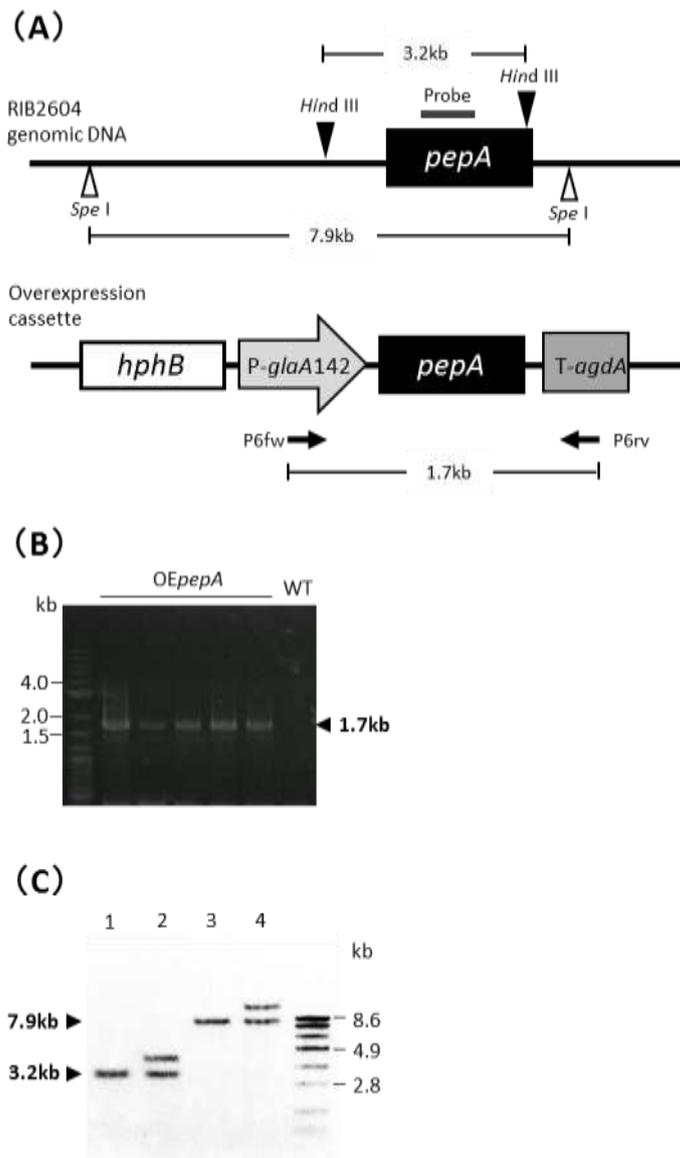


Fig. 2-2 Confirmation of OE*pepA* strain by colony PCR and Southern blotting.

The outline is as shown in panel (A). Colony PCR was performed with P6 primer pair (B) and the RIB 2604 strain was used as a control (WT). In Southern blotting, total DNA, isolated from OE*pepA* strain and RIB 2604 strain, was digested with *Hind*III or *Spe*I and then hybridized with DIG-labeled probe specific for *pepA* ORF (D). Lane 1, RIB 2604/*Hind*III; lane 2, RIB 2604OE*pepA*/*Hind*III; lane 3, RIB 2604/*Spe*I; lane 4, RIB 2604 OE*pepA*/*Spe*I.

2.3.2 カゼインプレートアッセイによる酸性プロテアーゼ活性の比較

$\Delta pepA$ 株, OE*pepA* 株および両親株をカゼインプレートで培養した結果, $\Delta pepA$ 株は増殖が親株よりも遅れ, ハローの大きさも親株より小さくなった。対照的に, OE*pepA* 株は増殖が親株より早くなり, ハローの大きさも大きくなった (Fig. 2-3A)。これらの結果から, 目視でも $\Delta pepA$ 株は親株より酸性プロテアーゼ活性が低く, OE*pepA* 株が親株よりも酸性プロテアーゼ活性が高いことが確認できた。また, 対照の PDA 培地ではすべての菌株で同等の増殖が確認されたことから (Fig. 2-3B), PepA がタンパク質を資化するために重要な酵素であると示唆された。

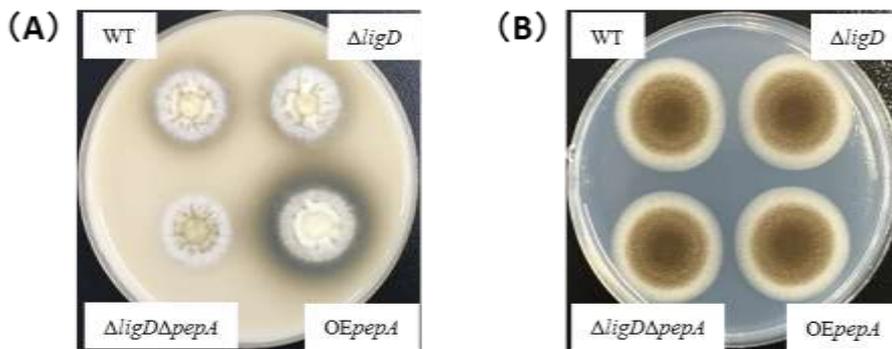


Fig. 2-3 Comparison of transformants by plate assay.

The transformants and respective parent strains were cultured in a CD-cas plate (A) and a PDA plate (B) at 30°C for 72 h.

2.3.3 米麴の分析

pepA 破壊および高発現が米麴の品質に及ぼす影響を調べるために, 米麴をプラスチックスケールで調製した。米麴を分析した結果, 酸性プロテアーゼ活性は $\Delta pepA$ で WT の 1/2 と低く, OE*pepA* は WT よりも 24 倍高かった (Fig. 2-4A)。 $\Delta pepA$ は, 他の株と比較して, 米麴中の菌体量が非常に低いため (Fig. 2-5), 米に含まれるタンパク質が完全に資化できないことで増殖が遅れたと考えられた。さらに, $\Delta pepA$ の酵素活

性は、菌体量が減少したことで全体的に低かったが、酸性カルボキシペプチダーゼの活性に有意差はなかった (Fig. 2-4C)。さらに、菌体量あたりに換算すると $\Delta pepA$ は、 α -アミラーゼ、酸性プロテアーゼを除いて、高い酵素活性と酸度を有したが、OE $pepA$ のそれらはやや低かった (Fig. 2-4B, D)。

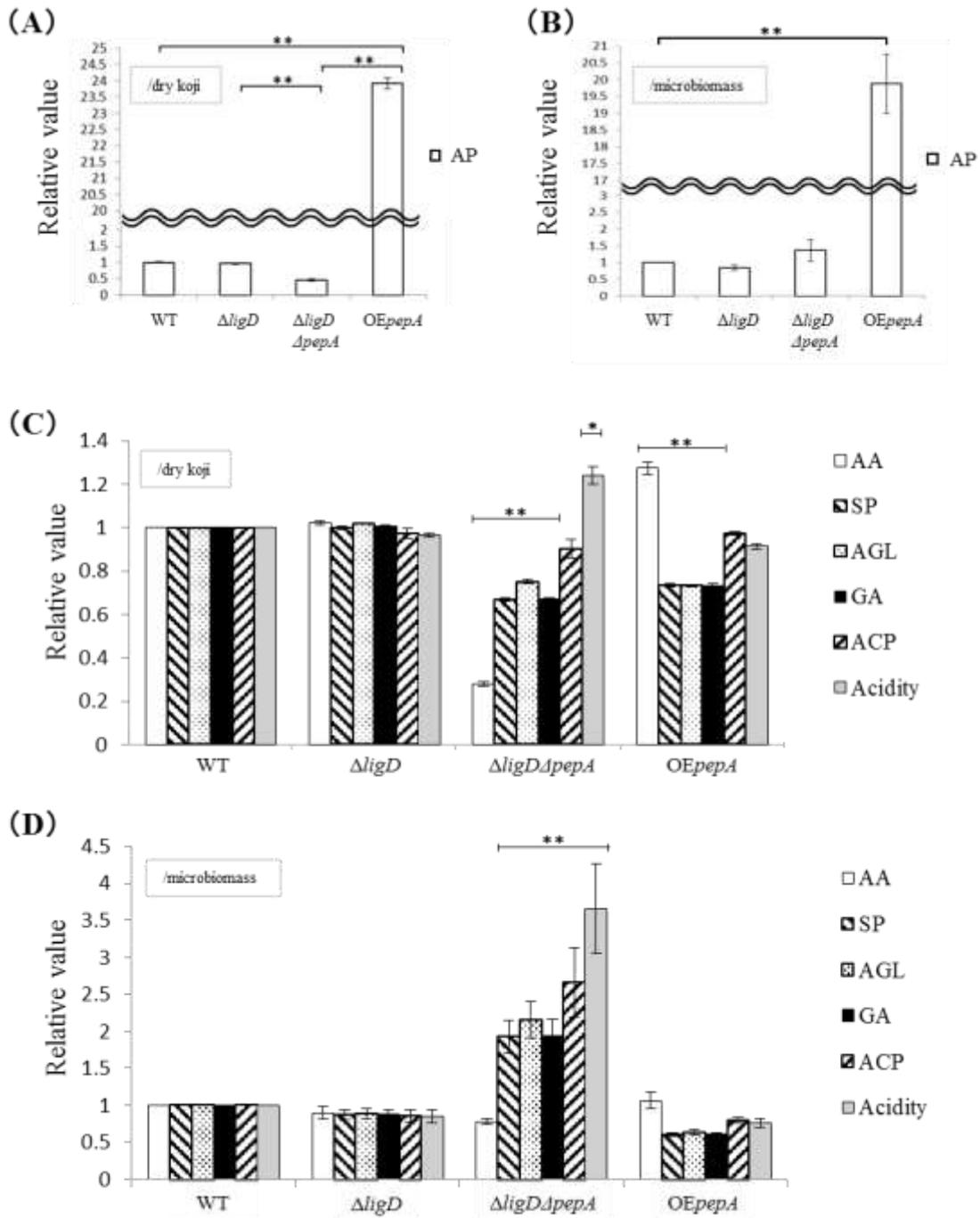


Fig. 2-4 Analysis of rice koji.

The acidic protease (AP) activity, per dried rice koji and per microbiosmass, were compared for their relative values using RIB 2604 (WT) as a control (A and B). The other enzyme activities and acidity were also compared in their relative values using RIB 2604 (WT) as a control (C and D). AA (white bars); α -amylase, SP (right hatched bars); saccharification power, AGL

(shaded bars); α -glucosidase, GA (black bars); glucoamylase, ACP (left hatched bars); acid carboxypeptidase, acidity (gray bars), respectively. The error bars indicate the standard errors of four independent experiments. The asterisks indicate significant differences ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, unpaired Student's *t*-test) between the WT and three transformants.

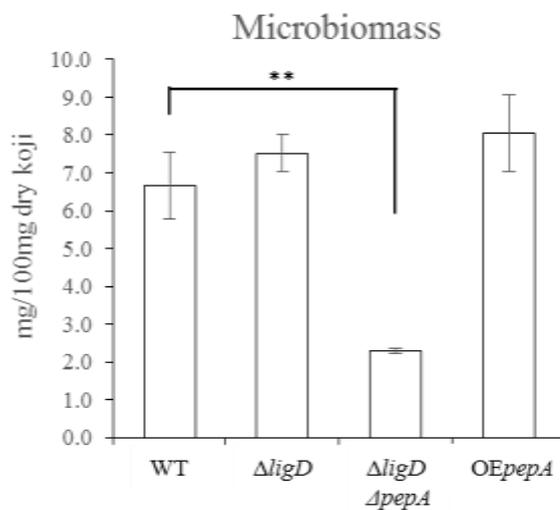


Fig. 2-5 Microbiomass in rice koji.

The error bars indicate the standard errors of four independent experiments. The asterisks indicate significant differences ($**p < 0.01$, unpaired Student's *t*-test) between the WT and three transformants.

2.3.4 芋焼酎の小仕込み試験

pepA 破壊および高発現が芋焼酎醸造に与える影響を調べるために $\Delta pepA$ 株および OEpepA 株を用いて調製した米麴を用いて芋焼酎の小仕込み試験を行った。蒸留直前の二次醪についてアルコール濃度, pH, 醪酸度, アミノ酸度を測定し, その結果を Table 2-2 に示した。アミノ酸度は $\Delta pepA$ で WT より低くなり, OEpepA で WT より高

くなった。この結果から *pepA* 破壊および高発現によって酸性プロテアーゼ活性を制御することで醪中のアミノ酸濃度も制御できることが示された。

Table 2-2 Analysis result of secondary mash.

		Strain			
		WT	$\Delta ligD$	$\Delta ligD\Delta pepA$	OE <i>pepA</i>
Alcohol conc	(%)	14.45	14.55	14.70	14.35
pH		4.43	4.42	4.36	4.42
Acidity		5.1	4.9	5.0	5.1
Amino acidity		2.64	2.68	1.64**	3.85**

Asterisks indicate significant differences (** $p < 0.01$, unpaired Student's *t*-test) compared to wild-type (WT) in four independent experiments.

また、醪中のアミノ酸について詳しく分析した結果、醪中ではほぼすべてのアミノ酸が同じ濃度の挙動を示し (date not shown)、二次仕込み 48 時間後の醪は総アミノ酸濃度が非常に低いことが分かった (Fig. 2-6)。これは二次仕込みで投入される主原料のサツマイモは米と比較してタンパク質含量が少ないこと (42) に加え、旺盛な酵母の増殖のために一次醪由来のアミノ酸が利用されたことが要因と考えられる。 $\Delta pepA$ 株を用いたときは、この時期のアミノ酸濃度が非常に低くなり、メチオニンやトリプトファンなど検出できないアミノ酸もいくつかあった。逆に、OE*pepA* 株を用いたときは全体的にアミノ酸濃度が増加し、枯渇するようなアミノ酸はみられなかった。

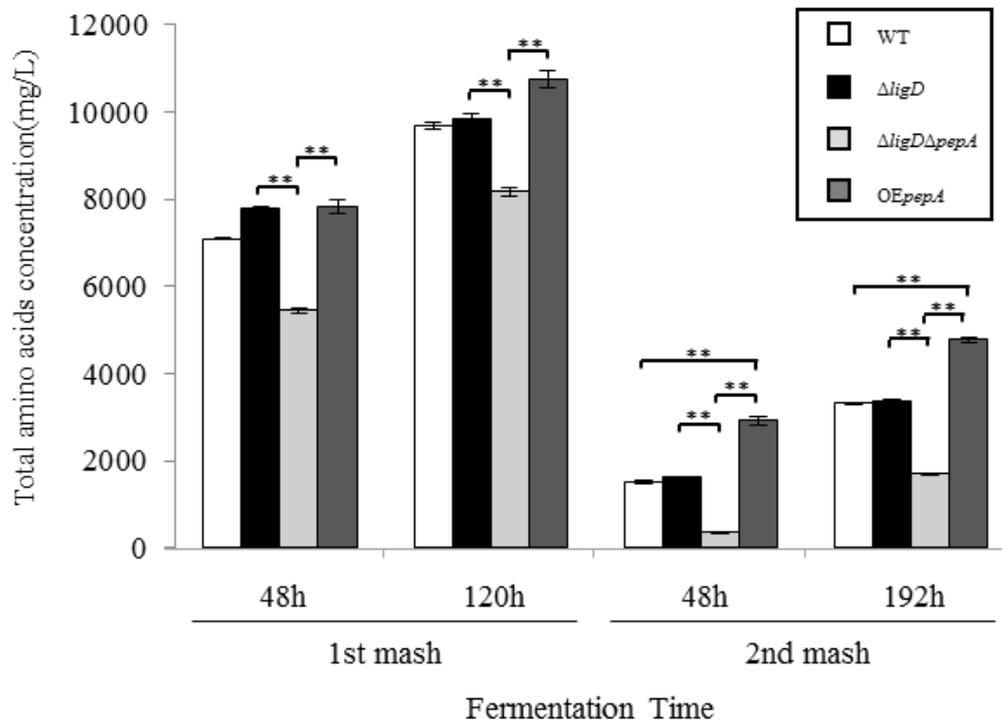


Fig. 2-6 Changes in total amino acid concentration during mash.

White bars ; WT, black bars ; $\Delta ligD$, gray bars ; $\Delta ligD\Delta pepA$, dark gray bars ; $OE pepA$ respectively. Error bars indicate the standard errors of four independent experiments. Double asterisk indicates significant differences (** $p < 0.01$, unpaired Student's t -test).

次に、焼酎の香気成分について GC を用いて定量を行った。 $\Delta pepA$ 株を用いたときはノルマルプロピルアルコールやイソブチルアルコール、イソアミルアルコールなどの高級アルコール類と酢酸イソアミルや酢酸 β -フェニルエチルなどのエステル類が高くなった (Table 2-3)。対照的に、 $OE pepA$ 株を用いた時は高級アルコール類やエステル類の濃度が低くなった。これらの結果から、アミノ酸濃度は芋焼酎の香気成分に影響を与えることが明らかとなった。

Table 2-3 Aroma component concentration in sweet potato *shochu*.

Volatile compounds (mg/l)	Strain			
	WT	$\Delta ligD$	$\Delta ligD\Delta pepA$	OE $pepA$
Acetaldehyde	34.9	31.9**	26.5**	28.7**
Ethyl acetate	66.4	66.2	66.8	60.1*
Methanol	359.5	354.0	322.5**	322.4**
n-Propyl alcohol	91.2	84.2	119.7**	65.3**
Isobutyl alcohol	179.6	170.9	202.2**	163.4*
n-Butyl alcohol	2.2	1.8	2.4**	1.7*
Isoamyl alcohol	295.1	284.9	363.5**	267.9**
Isoamyl acetate	1.5	1.6	2.9**	1.4
Ethyl caproate	0.10	0.10	0.10	0.09
β -phenylethyl alcohol	1.7	1.7	2.0*	1.4*
Ethyl caprylate	0.12	0.13	0.10	0.10
β -phenylethyl acetate	1.0	0.9	1.4*	0.8*
Ethyl caprate	0.11	0.11	0.09	0.10

The asterisk shows significantly increased or decreased values (* p <0.05, ** p <0.01, unpaired Student's t -test) compared to WT in four independent experiments.

2.4 考察

本研究では、麴菌酸性プロテアーゼをコードする遺伝子 *pepA* の破壊または高発現が麴菌の生育および麴の酵素活性および芋焼酎醸造に及ぼす影響を調べた。カゼインプレートアッセイと米麴製造試験の結果、 $\Delta pepA$ 株では、pH 4 に調整したカゼインプレート (Fig. 2-3A) と麴製造中の蒸し米 (Fig. 2-5) の両方で増殖遅延が観察された。また、 $\Delta pepA$ 株ではカゼインプレート上にカゼイン分解によるハローは観察されなかった (Fig. 2-3A)。これらの結果から、黒麴菌において *PepA* は酸性条件下では主要な分泌型酸性プロテアーゼであり、この酸性プロテアーゼが $\Delta pepA$ 株では分泌されないため、培地に含まれるタンパク質の分解によって得られるアミノ酸が供給されず、増殖が遅れた可能性が示唆された。

一方、 $\Delta pepA$ 株は、菌体量あたりに換算すると α -アミラーゼ以外の α -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼなどの酵素活性と麴酸度が高かった (Fig. 2-4D)。OE*pepA* 株は逆に菌体量あたりに換算すると低い酵素活性および麴酸度を示したため、*PepA* はタンパク質および有機酸の生産または分泌に関与している可能性が示唆された。真菌による異種タンパク質の生産において、生産されたタンパク質は時に宿主のプロテアーゼによって分解されることから、プロテアーゼを生産しない真菌宿主の育種についても報告がある (43-45)。 $\Delta pepA$ 株は菌体量あたりの酵素活性が増加を示したことから、異種タンパク質生産のための宿主としても有用な可能性がある。

芋焼酎の醸造試験において、*pepA* 破壊株および高発現株を用いると、酸性プロテアーゼである *PepA* の活性が芋焼酎の香気成分に影響を与えることが明らかとなった。米麴の酸性プロテアーゼ活性を制御することによって醪のアミノ酸度を制御することができ (Table 2-2)、その結果、焼酎に含まれるアミノ酸由来の高級アルコールおよびエステルの含有量も影響を受けた (Table 2-3)。高級アルコール濃度は、酸性プロテアーゼ活性が低いときに増加し、逆に酸性プロテアーゼ活性が高いときに減少

した (Table 2-3)。これらの結果は、芋焼酎醸造中にプロテアーゼ製剤を添加することによってノルマルプロピルアルコール、イソブチルアルコール、イソアミルアルコールなどの高級アルコールが減少するという報告 (27) と一致した。また、 β -フェニルエチルアルコール、酢酸 β -フェニルエチルなどのエステルも同様の傾向を示した。これらの香気成分は酵母のアミノ酸代謝によって生成されるため (22-24, 46, 47)、醪中のアミノ酸濃度の影響で生成量が変化したと考えられた。醪中のアミノ酸を定量した結果、二次醪のアミノ酸は発酵の 48 時間後に大きく減少した (Fig. 2-6)。この現象は、タンパク質含量が低いサツマイモから焼酎を製造する芋焼酎特有の現象であると推察された。 $\Delta pepA$ 株を使用した二次醪の発酵 48 時間後においてアミノ酸がほとんど検出されなかったことから、プロテアーゼ活性が低かったことが芋焼酎の香気成分に大きく影響した可能性がある。また、OE $pepA$ 株では、 α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼの活性が低いため、醪の糖濃度が芋焼酎の風味に影響を与えた可能性もある。

結論として、*A.luchuensis* の酸性プロテアーゼ PepA の活性を制御することで醪中のアミノ酸濃度を制御できる可能性があり、これにより芋焼酎の香気成分にも影響を与えることが示された。PepA を含む酸性プロテアーゼの活性は、焼酎麹菌の育種指標として有用であり、バラエティ豊かな香味を持つ焼酎の開発に利用し得ることが明らかになった。

第3章 酸性プロテアーゼを高生産する黒麹菌の育種と芋焼酎醸造試験

3-1 緒論

芋焼酎醸造において黒麹菌 *A. luchuensis* は、米麹製造に使われる重要な微生物の 1 つである。その主な役割は第 2 章 2-1 緒論で記述した通りである。さらに、黒麹菌の酸性プロテアーゼをコードする遺伝子 *pepA* を破壊または高発現することで芋焼酎の香気成分含量が変化することを明らかにした上での酸性プロテアーゼが焼酎麹菌育種の指標として利用できる可能性を第 2 章で論じた。また、白石らによって醪へのプロテアーゼ剤添加が芋焼酎の香気形成に影響を与えることや、酸性プロテアーゼ活性を指標にした黒麹菌の選抜と本格焼酎の酒質多様化について報告されている (9,28)。このように酸性プロテアーゼと焼酎の酒質については近年になって興味深い知見が得られているが、焼酎用黒麹菌の酸性プロテアーゼを指標とした変異育種についてはこれまでに報告が無い。そこで、我々は実用的な酸性プロテアーゼ高生産黒麹菌の取得を目的として、重イオンビームを用いた変異育種と育種した黒麹菌株を用いた芋焼酎の小仕込み試験を行った。

3-2 材料と方法

3.2.1 菌株および培地

霧島酒造 (株) 保有の黒麹菌 *A. luchuensis* J7-2 (以下 J7-2) を供試菌株とした。重イオンビーム照射時の培地は TYMG 寒天培地 (0.1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% malt extract, 0.1% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 1% glucose, 1.5% agar, pH 7.0) (48), カゼインプレートアッセイによるスクリーニングおよびの酸性プロテアーゼ活性の比較には、カゼイン (乳由来) を含み、グルコースを炭素源とする Czapeck-Dox 寒天培地 (1% casein, 0.3% NaNO₃, 0.2% KCl, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.002%

FeSO₄ · 7H₂O, 2% glucose, 2% agar, pH 4.0) を使用した。また、菌株の形態比較に PDA 培地 (日水製薬 (株)) を用いた。芋焼酎の小仕込み試験には鹿児島 5 号酵母を使用し、酵母の前培養には YPD 液体培地 (2% peptone, 1% yeast extract, 2% glucose) を使用した。

3.2.2 酸性プロテアーゼ高生産株の育種と選抜

酸性プロテアーゼ高生産株の育種には半谷らの方法 (49) を一部改変した方法を用いた。はじめに、Kojo らの方法 (48) を参考に独立行政法人日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の TIARA にて黒麹菌 J7-2 を生育させたプレートに 25 Gy から 100 Gy の強度で重イオンビームを照射し、変異を導入した。次に、変異導入後のプレートから分生子懸濁液を調製し、これを適宜希釈してカゼインを含む選択培地に塗抹した。30°C で培養し、ハローやコロニーの大きさを指標に 1 次スクリーニングを行った。さらに同培地に植え継いで 2 次スクリーニング後、得られた候補株を用いて 20 g の α 米を原料としてフラスコスケールでの製麹試験を行った。酵素活性分析の結果、米麹の酸性プロテアーゼ活性が最も高く、麹酸度や糖化酵素などに問題が無い株を選抜した。

3.2.3 製麹試験

選抜した株で作製した米麹の特性を調べるため、選抜株および比較対照として親株である J7-2 株を用いて下記の方法で米 2 kg スケールの製麹試験 (n=3) を行った。まず、国産米 2 kg を洗米後、30 分水中に浸漬し、水切りを 1 時間行った。次に、水切りした米を蒸し器で 30 分蒸煮し、適当に冷ましたところに選抜株の種麹を 2 g 加えよく攪拌した (種付け)。これを河内式自動製麹装置に入れて 38°C で培養を開始し、培養 16 時間後と 24 時間後に攪拌 (手入れ) した。また、攪拌と同時に設定温度を変更した (1 回目 38°C→36°C 2 回目 36°C→34°C)。42 時間で出麹後、30 分ほど室温で広げて冷却 (枯らし) した米麹を各種分析および芋焼酎の小仕込み試験に供した。また、参考として株式会社ビオックから市販されている泡盛黒麹菌 (以下、Bioc) を種麹として米

麴を作製した (n=1)。

3.2.4 麴の分析方法

製麴試験で得られた米麴の各種分析を下記の方法で行った。麴水分および麴酸度、酸性プロテアーゼ活性は国税庁所定分析法注解 (39) に基づいて行なった。酸性カルボキシペプチダーゼ, α -アミラーゼ, グルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性は各種測定キット (キッコーマン社製) を使用して測定した。 β -グルコシダーゼ活性は太田ら (7) の方法に従って測定した。また, 米麴中の菌体量は HCl を用いて菌体を消化した後, Blix ら (40, 41) の方法によってグルコサミン量を定量することで算出した。

3.2.5 芋焼酎の小仕込み試験

米 400 g 相当の米麴 (J7-2, 選抜株) とサツマイモ (コガネセンガン) を用いて一次汲み水歩合 120%, 総汲み水歩合 67% で芋焼酎の小仕込み試験 (n=3) を行なった。酵母は滅菌済 YPD 液体培地 50 ml に一白金耳植菌し, 28°C, 107 rpm の条件で 48 時間振盪培養し (BIO-SHAKER BR-40LF, TAITEC), これを前培養液とした。一次仕込みは, 前培養液を 4 ml, 米麴, 汲水 480 ml を 3 l 酒母容器に加えて混合することで行なった。その後, 容器の上部をラップで覆い, 28°C で 5 日間静置発酵した。二次仕込みは, 5 l セパラブルフラスコに発酵終了後の一次醪全量と蒸し芋 2,000 g および汲水 1,128 ml を加え, よく混合した後, フラスコ上部をラップで覆い, 30°C で発酵した。仕込み中の攪拌は一次および二次それぞれ 2 日目に行なった。9 日目で仕込み終了とし, 原酒のエタノール濃度が 40% となるようにガラス蒸留機を用いて常圧蒸留した。醪の分析は, 国税庁所定分析法注解 (39) に基づき行なった。原酒を 0.1 μ m シリンジフィルター SY25GF (ADVANCED MICRODEVICES PVT. LTD.) を用いて 4°C で冷却ろ過後, アルコール度数 25% になるようにイオン交換水で割水したものを香気成分分析試料とした。

3.2.6 醪中の遊離アミノ酸分析

一次 6 日目および二次 3, 6, 9 日目の醪を 5 ml 採取し, 3000 rpm で 5 分間遠心した。上清を高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた NexeraX2 プレカラム誘導体化アミノ酸分析システム ((株) 島津製作所) に供し, 20 種類のアミノ酸 (Asp, Glu, Asn, Ser, Gln, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr, Val, Met, Cys, Phe, Ile, Leu, Lys, Pro, GABA) について定量を行った。

3.2.7 焼酎の香気成分分析

焼酎の一般香気成分 (低沸点成分, 中高沸点成分) 分析は宮川らの (50) 方法に従って行った。また, 焼酎のモノテルペンアルコール (MTA) の分析は (株) 島津製作所の GC-MS (SHIMADZU GCMS TQ-8040) を用いて 5 回繰り返し分析した。サンプル 10 ml を 60°C で 1 分間プレインキュベートした後, SPME ファイバーを用いて 60°C で 20 分間ヘッドスペース抽出し, GC-MS にインジェクションした。GC-MS 分析条件を Table 3-1 に示した。

Table 3-1 GC/MS analysis conditions

Analysis equipment	SHIMADZU GCMS TQ-8040
Injection volume	10ml
Column	DB-5 59 m×0.25 mm I.D, 1.0µm film
Carrier	Helium
Oven	40°C (2 min) to 150°C at 6.0°C /min to 250°C at 4.0°C /min to 310°C at 7°C /min to 70°C
Injection	1min, splitless, 240°C
Ion source temperature	200°C
Detection	Total ion monitor
Scan range	m/z 39-350

3.2.8 焼酎の官能試験

官能試験は霧島酒造（株）の研究員およびブレンダーの計 17 名のパネルにより実施した。評価は 3 点法（1, 良 ; 2, 普通 ; 3, 難あり）とし, コメントは各項目についてのチェック方式とした。

3.3 実験結果および考察

3.3.1 酸性プロテアーゼ高生産株の選抜

重イオンビーム強度と生存率の関係を Table 3-2 に示した。カゼインプレートを用いたハローアッセイによりハローが大きい株（APH-1）と比較的コロニーが大きい株（APH-2, APH-3）を選抜した。選抜した 3 株についてカゼインプレートおよび PDA プレートでの増殖を確認したところ（Fig. 3-1）, APH-1 は選抜時同様にハロー形成能が高い一方で, 分生子形成能が低い形質を示した。APH-2 および APH-3 は選抜時ほどカゼインプレートにおけるコロニーは大きくなり, 分生子形成能がやや低い形質を示した。なお, 全照射条件において菌株の選抜を行ったが, ハロー形成能が高かった APH-1 は 75Gy の強度で重イオンビームを照射した株の中から選抜された。

Table 3-2 Heavy ion beam intensity and survival Rate

	Heavy ion beam intensity			
	25 Gy	50 Gy	75 Gy	100 Gy
Survival rate (%)	59	38	43	15

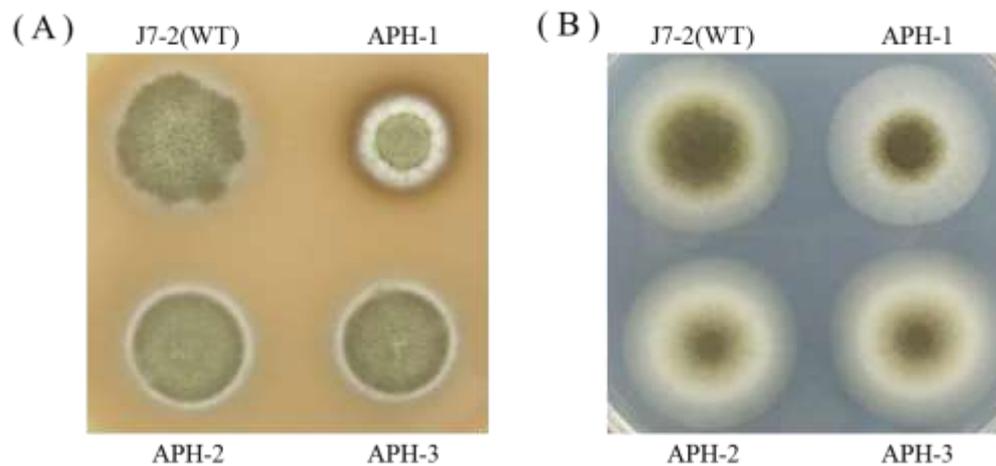


Fig. 3-1 Comparison of mutants by plate assay.

Mutants and respective parent strains were cultured in a casein plate (A) and a PDA plate (B) at 30°C. for 72 hours.

さらに、この3株を用いてフラスコ製麴試験を行った結果、APH-1は3株の中で最も酸性プロテアーゼ活性が高く、APH-2およびAPH-3はやや高い程度であった

(Table 3-3)。APH-3は酸度や糖化酵素など、全体的にJ7-2よりやや高い数値であることから変異により増殖がJ7-2よりもやや早くなった可能性が示唆された。以上の結果から、酸性プロテアーゼ活性が最も高く、酸度やその他の酵素活性も実用的に問題が無いAPH-1を以降の実験に供することにした。

Table 3-3 Analysis of rice *koji* made on a flask scale

Strains	Acidity	Enzyme activities (U/g dry <i>koji</i>)					
		AA	GA	AGL	BGL	AP	ACP
J7-2	5.6	42.5	942	0.170	9.1	14630	13622
APH-1	3.9	58.7	1219	0.211	1.7	31569	17670
APH-2	7.7	-	-	-	-	15280	-
APH-3	6.6	48.2	1126	0.182	13.8	16210	14267

AA: α -Amylase, GA: Glucoamylase, AGL: α -Glucosidase, BGL: β -glucosidase, AP: Acid Protease, ACP: Acid Carboxypeptidase.

3.3.2 製麴試験

米 2 kg スケールで製麴した J7-2 と APH-1 の出麴写真を Fig. 3-2 に示した。APH-1 は出麴時に黒い分生子がほとんど確認されなかったことから分生子形成能が低下している可能性が示唆された。

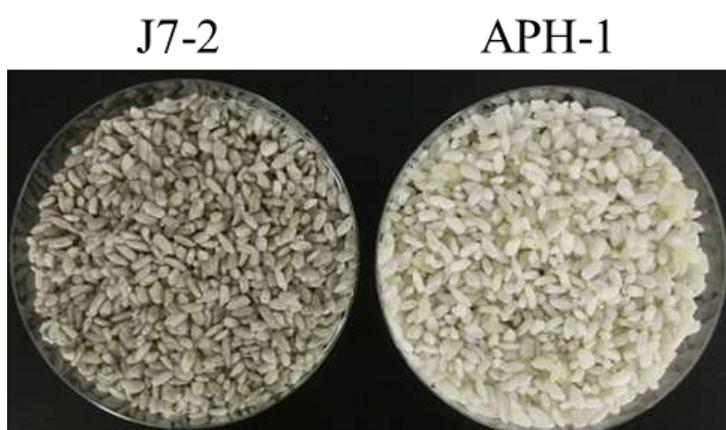


Fig. 3-2 Rice *koji* made using strains J7-2 and APH-1.

次に、米麴の各種分析結果を Table 3-4 に示した。APH-1 は乾燥米麴あたりの酸性プロテアーゼ活性が J7-2 の 4.5 倍、酸性カルボキシペプチダーゼ活性が 2.3 倍と高く、プロテアーゼ類の活性上昇が確認された。さらに、 α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、 α -グルコシダーゼ活性も J7-2 より高かった。しかし、APH-1 は米麴中の菌体量も J7-2 より高かったことから、3.3.1 で上述したように、これら糖化酵素類の活性上昇は菌体量の増加によるものと考えられた。一方、 β -グルコシダーゼ活性は親株の 1/4 と低く、麴酸度は乾燥米麴あたりでは J7-2 と同等であったが、菌体あたりに換算すると J7-2 の 1/2 程度となった。

Table 3-4 Analysis of rice *koji*

Strains	Acidity	Microbiomass (mg/g dry <i>koji</i>)	Enzyme activities (U/g dry <i>koji</i>)					
			AA	GA	AGL	BGL	AP	ACP
J7-2	4.0 ± 0.0	39.2 ± 3.9	55.1 ± 0.9	1710 ± 60	0.241 ± 0.009	35.3 ± 6.4	9290 ± 570	11740 ± 330
APH-1	3.7 ± 0.1**	81.4 ± 7.4**	86.8 ± 6.2**	1950 ± 190	0.294 ± 0.037	7.2 ± 1.4**	42540 ± 2370**	26440 ± 2340**
Bioc	4.8	43.1	55.4	1240	0.190	51.7	14760	13580

AA: α -Amylase, GA: Glucoamylase, AGL: α -Glucosidase, BGL: β -glucosidase, AP: Acid Protease, ACP: Acid Carboxypeptidase.

Mean ± SD obtained from three independent experiments.

The asterisks indicate significant differences between J7-2 and APH-1 (** $p < 0.01$).

3.3.3 芋焼酎の小仕込み試験

製麹試験で得られた J7-2 と APH-1 の米麹を用いて芋焼酎の小仕込み試験を行った。以下に各種分析結果を記述する。

(1) 醪分析結果

Table 3-5 に発酵終了後の一次醪および二次醪の分析結果を示した。一次醪のアルコール濃度は J7-2 よりも APH-1 で 3%程度低かったが、二次醪では逆転して APH-1 が J7-2 よりも 0.3%程度高かった。醪の炭酸ガス発生量の推移にも差が表れており (data not shown), APH-1 の麹を用いると一次醪の発酵が緩やかに進み、二次醪の発酵が速やかに進むことが分かった。また、一次醪、二次醪ともに APH-1 のアミノ酸度は J7-2 の 1.5 倍程度となり、米麹の酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼの活性が醪のアミノ酸濃度にも影響することが示された。

Table 3-5 Analysis of 1st and 2nd fermented mash

	Alcohol (%)	pH	Acidity	Volatile acidity	Amino Acidity	The number of yeasts		
						Total ($\times 10^8$ cells/ml)	Viable ($\times 10^8$ cells/ml)	Rate (%)
(1st mash)								
J7-2	14.2 \pm 0.2	3.5 \pm 0.0	18.1 \pm 0.4	-	4.3 \pm 0.1	1.9 \pm 0.3	1.4 \pm 0.4	82.5 \pm 4.8
APH-1	11.4 \pm 1.0*	3.5 \pm 0.0	17.2 \pm 0.2	-	6.4 \pm 0.1**	1.4 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	77.7 \pm 6.4

(2nd mash)								
J7-2	15.2 \pm 0.2	4.2 \pm 0.0	6.1 \pm 0.2	1.7 \pm 0.0	1.5 \pm 0.1	2.6 \pm 0.3	1.0 \pm 0.1	39.3 \pm 5.4
APH-1	15.5 \pm 0.1	4.3 \pm 0.0	6.1 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2	2.2 \pm 0.3*	2.8 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	29.1 \pm 0.7

Mean \pm SD obtained from three independent experiments.

The asterisks indicate significant differences between J7-2 and APH-1 (* p < 0.05, ** p < 0.01).

(2) 蒸留歩合およびアルコール収得量

蒸留歩合は J7-2 が 94.7 (±0.6) %, APH-1 が 94.6 (±0.9) % となり大きな差はなかった。アルコール収得量は J7-2 が 214.2 (±4.5) l/ton, APH-1 が 220.3 (±4.4) l/ton となり, APH-1 が 6.1 l/ton (2.8%) 高くなった。清酒において酸性プロテアーゼは蒸米のタンパク質を減少させることで α -アミラーゼの作用を亢進し, 蒸米の溶解を促進することが報告されている (51)。また, 芋焼酎醪にプロテアーゼ剤を添加することで醪の粘度が低下し, アルコール収得量が増加することを報告されている

(27)。本研究においても酸性プロテアーゼ活性が高い APH-1 を用いることで同様の現象が起きていると推察される。また, 遊離したアミノ酸の直接的な影響も排除できない。

(3) 醪中のアミノ酸分析

発酵 6 日目の一次醪および発酵 3 日目, 6 日目, 9 日目の二次醪中に含まれる遊離アミノ酸を HPLC によって分析した結果, 定量した 20 種類のアミノ酸のうち, GABA を除いたすべてのアミノ酸で同様の濃度推移を示したため, 総アミノ酸濃度の推移を Fig. 3-3 に示した。一次醪中にはアミノ酸が豊富に含まれるが, 発酵 3 日目の二次醪では急激に濃度が減少し, 特に Met は検出できないほど減少していた。一次醪の主原料は米麴であり, 米 (精白米) には 100 g 中に 6.1 g のタンパク質が含まれているのに対し, 二次仕込みで米の 5 倍量加えられるサツマイモ (蒸し芋) は 100 g 中にわずか 0.9 g とタンパク質含量が少ないこと (42), さらに, 発酵 2 日目から 3 日目の二次醪は酵母の増殖が旺盛であり, 酵母がアミノ酸を利用したことで二次醪中のアミノ酸が減少したと推察され, これはタンパク質含量が少ないサツマイモを主原料とする芋焼酎醪特有の現象であると考えられる。また, どの段階の醪においても APH-1 が J7-2 よりもアミノ酸濃度が高く, (1) で上述したアミノ酸度同様, 酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼの活性の高さが醪のアミノ酸濃度にも表れていた。

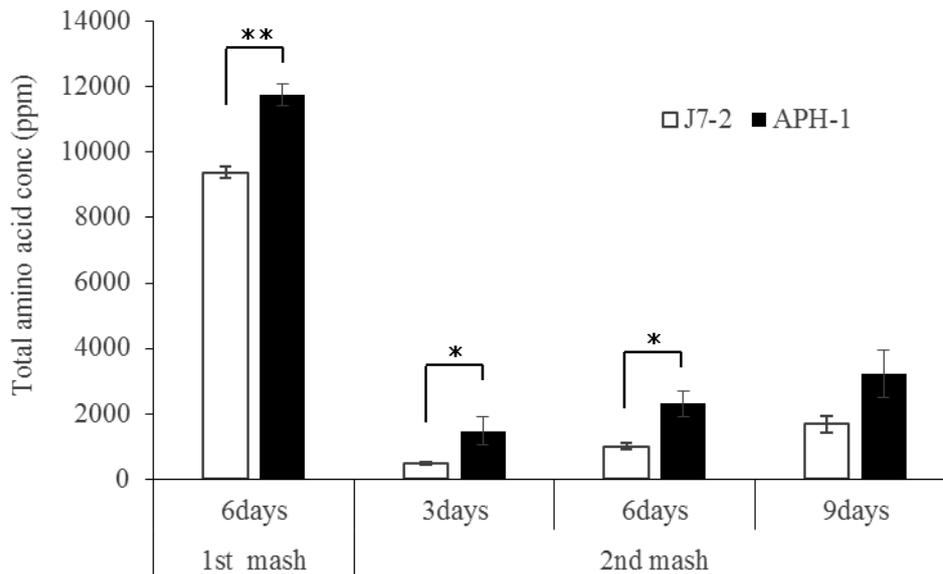


Fig. 3-3 Amino acid concentration of 1st mash and 2nd mash.

The amino acid concentration of the 1st mash supernatant on the sixth day of culture and the 2nd mash supernatant on the 3rd, 6th and 9th day of culture were measured. The error bars indicate the standard deviations of three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between J7-2 and APH-1 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

(4) 香気成分分析

原酒を 4°C で冷却ろ過後，アルコール分 25 度に割水した焼酎の香気成分について GC を用いて分析し，その結果を Table 3-6 に示した。n-プロピルアルコールやイソアミルアルコールなどの高級アルコール類や酢酸イソアミルの濃度は APH-1 よりも J7-2 の方が高かった。この結果は *pepA* 遺伝子組換え体を用いた仕込み試験で *pepA* 破壊により高級アルコールや酢酸イソアミルの生成量が増加し，*pepA* 高発現により減少したという結果（第 2 章参照）や醪中のアミノ酸が増加すると高級アルコール生成量が減少したという報告（27）と一致しており，米麴の酸性プロテアーゼ活性が低い方

が高級アルコール類や酢酸イソアミルが高生成されることが明らかとなった。しかし、APH-1 と J7-2 では酸性プロテアーゼ以外の酵素活性や麴酸度も異なることから、これらの差が香気成分生成に影響した可能性もある。また、メタノール濃度には有意差が確認され、APH-1 で高かった。メタノールはサツマイモに含まれるペクチンを基質として焼酎麴菌が産生するペクチンメチルエステラーゼ (Pme) の関与によって生成すると報告 (51) されていることから、APH-1 の Pme 活性が上昇している可能性が示唆された。一方、MTA 濃度には大差はなく、太田ら (7) が報告しているような β -グルコシダーゼ活性と MTA 濃度の相関は確認されなかった。

Table 3-6 Analysis of flavor components of sweet potato *shochu*

Low-boiling point (mg/l)			Middle and high-boiling point (mg/l)		
	J7-2	APH-1		J7-2	APH-1
Acetaldehyde	13.2 ± 0.8	13.2 ± 0.4	Furfural	3.73 ± 0.25	4.89 ± 0.59
Ethyl acetate	74.7 ± 2.3	79.8 ± 5.6	Isoamyl acetate	5.15 ± 0.34	4.32 ± 0.34**
Methanol	276.9 ± 0.5	336.2 ± 2.6**	Caproic acid	1.24 ± 0.05	1.22 ± 0.00
n-Propyl alcohol	130.8 ± 0.6	105.3 ± 0.5**	Ethyl capronate	0.36 ± 0.03	0.30 ± 0.02
IsoButyl alcohol	223.6 ± 0.6	203.3 ± 1.4**	β - PhenylEthyl alcohol	86.0 ± 5.8	77.2 ± 5.8
n-Butyl alcohol	4.03 ± 0.09	4.02 ± 0.10	Caprylic acid	1.57 ± 0.07	1.56 ± 0.03
Isoamyl alcohol	435.1 ± 1.6	357.0 ± 2.0**	Ethyl caprylate	1.99 ± 0.27	1.69 ± 0.18
A/P	3.33 ± 0.01	3.39 ± 0.02**	PhenylEthyl acetate	0.023 ± 0.002	0.024 ± 0.003
B/P	1.70 ± 0.01	1.93 ± 0.01**	Capric acid	1.20 ± 0.08	1.22 ± 0.04
A/B	1.95 ± 0.00	1.76 ± 0.01**	β - PhenylEthyl acetate	2.76 ± 0.22	2.76 ± 0.19
Monoterpene (μ g/l)			Ethyl caprate	1.49 ± 0.42	1.35 ± 0.33
Linalool	51.0 ± 3.2	46.0 ± 0.2	Ethyl laurate	0.220 ± 0.106	0.240 ± 0.106
α -Terpineol	40.9 ± 2.0	45.9 ± 2.0	Ethyl myristate	0.024 ± 0.009	0.056 ± 0.030
β -Citronellol	32.2 ± 4.2	29.0 ± 5.1			
Nerol	26.5 ± 0.5	24.3 ± 3.2			

A/P= Isoamyl alcohol/ n-Propyl alcohol, B/P= IsoButyl alcohol/n-Propyl alcohol, A/B= Isoamyl alcohol/ IsoButyl alcohol.

Mean \pm SD obtained from three independent experiments.

The asterisks indicate significant differences between J7-2 and APH-1 (** $p < 0.01$).

(5) 官能試験

暗番にて利き酒による官能試験を実施した結果, 3点評価, コメント等に大きな差は確認できなかった。

3点評価平均は J7-2 が 1.79, APH-1 が 1.61 とやや APH-1 が高い評価となったが, 香気成分分析で有意差が確認された成分に関するコメントは得られなかった。芋焼酎には多くの香気成分が含まれており, 複合的な香味で評価されるため, 香気成分分析値の差が官能試験結果に反映されなかったと考えられた。

3.4 謝辞

本研究は原子力機構施設利用共同研究制度の支援を受けて行われたものである。

第4章 黄変黒麹の抗菌成分に関する研究

4.1 緒論

第2章および第3章でも記述したように、芋焼酎製造において麹菌は酵母同様に重要な役割を担っている。また、近年では Ferdouse らによって麹菌が生産するスフィンゴ脂質が酵母の醸造特性に影響を与えることが報告されるなど (52)、醸造における麹菌の新たな機能が注目されつつある。このように、麹菌が持つ醸造に有利な機能については数多く報告されているが、麹菌が醸造に及ぼす悪影響についての報告は少ない。また、クエン酸やコウジ酸などの有機酸を除いて麹菌が生産する抗菌物質については黄麹菌 *A. oryzae* が生産する yeastcidin (53-55) やアスペラチン (56) が報告されており、また、白麹菌 *A. luchuensis* mut. *kawachii* で製麹された米麹中に抗菌物質が含まれることが山元らによって報告されている (57)。しかし、これらの抗菌物質について精製は行われているが、含まれる物質の構造決定には至っておらず、清酒や焼酎醸造に与える影響については未だ分かっていない。

我々はメタンスルホン酸エチル (EMS) を用いた変異導入による黒麹菌の育種を行う過程で得られた変異株の中に寒天培地上で黄色色素を高生産する黒麹菌 *A. luchuensis* MEM-C 株を発見した。MEM-C は黄変した米麹 (黄変黒麹) を形成するのみならず、芋焼酎の一次醪において強い酵母の増殖抑制と発酵阻害を引き起こした。これらの結果から *A. luchuensis* MEM-C は米麹中に抗菌物質を高生産していると考えられた。これまでに黒麹菌が生産する黄色色素に関する報告はいくつかあるが (58-61)、これらの色素と抗菌効果との関連について報告は無く、これまで麹由来の成分が通常清酒や焼酎の醸造現場において発酵阻害を引き起こしたという報告も無い。本研究では黄変黒麹に含まれる抗菌物質の精製を行い、黄色色素と抗菌効果の関連および各種真菌に対する抗菌効果について検証した。

4.2 材料と方法

4.2.1 黄変黒麹が芋焼酎の醪発酵に与える影響

黒麹菌 *A. luchuensis* MEM-C を用いて製造した黄変黒麹および市販されている河内 NK 種麹（(株) 河内源一郎商店）を用いて製造した米麹を用いて芋焼酎醪の発酵試験を行った。まず、2 種類の米麹を黄変黒麹の割合が 0%, 50%, 75%, 100% となるように混合した。この混合米麹 120.0 g に YPD 液体培地で 2 日間前培養した自社酵母を 1 ml および水 120 ml を 1 l 容三角フラスコに加えて一次醪を調製した。30°C で 6 日間発酵した後、437.5 g の蒸したサツマイモ（黄金千貫）と水 247 ml を加えてよく攪拌し、二次醪を調製した。これを 30°C で 7 日間発酵させた。24 時間毎に醪重量を計量し、発酵終了後の一次醪と二次醪についてアルコール濃度は簡易アルコール分析機 AL-3（理研計器（株））、Brix は糖度計 PAL-1（(株) アタゴ）によりそれぞれ測定し、国税庁所定分析法注解（39）に基づいて醪酸度を測定した。

4.2.2 抗菌物質の精製

黄変黒麹 1.0 kg（乾燥重）に 80% エタノールを 5000 ml 加え、室温で 30 分間攪拌しながら抽出した。抽出後、No.101 ろ紙、No.5C ろ紙（アドバンテック）の順でろ過した。得られたろ液はロータリーエバポレーターを用いて約 700 ml 程度まで濃縮後、分液ロートに等量のヘキサンと共に加えて良く攪拌し、一晚静置した。下層を濃縮し、合成吸収樹脂 Diaion HP20（三菱化学（株））カラムにかけた。非吸着画分および吸着成分を 60, 80, 100% エタノールで溶出した画分をそれぞれ Fraction 1~4 として回収した。これらの画分をロータリーエバポレーターにて 40°C で減圧濃縮した後、凍結乾燥したものを供試試料とした（Fig. 4-1）。なお、プレテストの結果、全画分中で Fraction 3 の抗菌活性が最も高いことが確認されたため、以降の試験は Fraction 3 に絞って検討した。

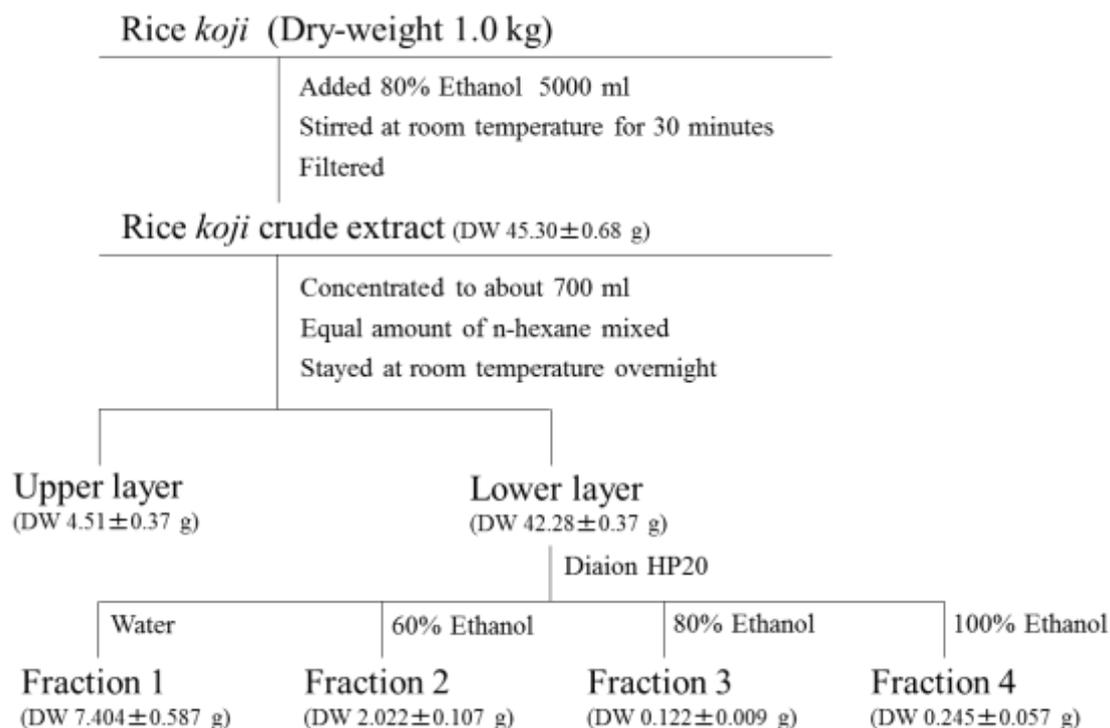


Fig. 4-1 Isolation flowchart of antimicrobial substances contained in rice *koji* made by MEM-C.

The yield of each fraction showed an average value (\pm SE, n=5).

4.2.3 酵母に対する抗菌試験

抗菌活性試験には実験室酵母 W303-1 (1 倍体) や焼酎酵母 (鹿児島 2 号酵母, 鹿児島 5 号酵母, 平成宮崎酵母, 泡盛 101 号酵母, 霧島酒造酵母 No.1, 霧島酒造酵母 No.2), 清酒酵母 (協会 7 号酵母, 協会 9 号酵母), その他の醸造酵母 (ウイスキー酵母 NBRC 0234, 協会ワイン酵母 KW-1 および KW-2), パン酵母 (NBRC 0555, NBRC 110416) そして, *S.cerevisiae* 以外の酵母 (*Kluyveromyces marxianus* NBRC 1735, *Pichia farinose* NBRC 1163, *Candida kefyr* NBRC 0541) など計 17 株を使用した。滅菌した麴汁培地

(Brix 10.0, pH 3.5) に 100%ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した Fraction 3 を終濃度 10~1000 mg/l となるように添加し (DMSO の終濃度 5%), 滅菌済み 96 ウェルプレートに 200 μ l ずつ分注した。培地に前培養した各酵母を 2×10^3 cells/200 μ l となるように接種し, 30°C で 72 時間静置培養した後, 目視にて増殖の有無を確認した。酵母の増殖が全く確認されない濃度を最少生育阻止濃度 (MIC) とした。

4.2.4 酵母に対する殺菌効果試験

酵母に対する Fraction 3 の殺菌効果を調べるために, 以下の試験を行った。すなわち, 濃度を変えて Fraction 3 を添加した麴汁培地 (Brix 10.0, pH 3.5) 1 ml に YPD 液体培地で 2 日間前培養した鹿児島 2 号酵母を 1×10^5 個接種して室温で 1 時間曝露後, 適宜希釈して YPD プレートにまき, 30°C で 24 時間培養した。対照は Fraction 3 を含まない麴汁培地に同数の酵母を接種して室温で 1 時間静置したサンプルとし, 生育が確認されたコロニー数から各濃度における酵母の死滅率を算出した。

4.2.5 糸状菌に対する抗菌試験

糸状菌に対する抗菌活性は hyphal-extension inhibition assay (62, 63) により評価した。すなわち, 麴汁寒天培地 (Brix 10.0, pH 3.5) のプレートを準備し, プレート中心から 15 mm の位置で寒天に直径 6 mm の穴を空けた。穴の中に滅菌水に溶かした Fraction 3 溶液 (100, 500, 1000 mg/l) 20 μ l を添加した後, プレート中央に *Trichoderma reesei* NBRC31326, *Rhizopus oryzae* NBRC100014 および *A.luchuensis* MEM-C の分生子懸濁液を接種し, 30°C で各々のコロニーが穴に達するまで培養した。抗菌活性については培養後に目視によって行った。

4.2.6 Fraction 3 の定性試験

Fraction 3 の同定を目的に TLC と HPLC による分析と限外ろ過フィルターを用いた分子量の確認を行った。

(1) TLC による確認

薄層プレート Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) の下から 10 mm の位置に 80% エタノールに溶かした Fraction 3 をスポットし、室温で 2-プロパノール：酢酸：水=4：1：1 を展開溶媒として展開を行なった。風乾後、UV 照射および各種検出試薬を用いてスポットの検出を行った。さらに、検出されたスポットを分取用の薄層プレート Merck PLC Silica gel 60 F₂₅₄ 濃縮ゾーン付 (Merck) を用いて分取し、濃縮および凍結乾燥後、鹿児島 2 号酵母に対する抗菌活性を調べた。

(2) HPLC による確認

Fraction 3 を水に溶解後、0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過したものをサンプルとして高速液体クロマトグラフ (HPLC) ((株) 島津製作所) を用いて分析した。カラムは Cadenza CD-C18 (75 \times 4.6mm, (インタクト (株))), 移動相は 0.2% ギ酸 (A) と 0.2% ギ酸含有アセトニトリル (B) を使用し、0~3 min (B 20% \rightarrow 30%), 3~23min (B 30% \rightarrow 50%), 23~30min (B 50% \rightarrow 100%), 30~35min (B 100%) のグラジエント溶出、オーブン温度は 40 $^{\circ}$ C、流速は 0.8 ml/min で測定を行った。検出器は吸光度検出器 SPD-20A ((株) 島津製作所) を用い検出波長は 280 nm と 450 nm で分析した。さらに、HPLC を用いて主要なピークを分取し、得られた画分を濃縮および凍結乾燥した後、鹿児島 2 号酵母に対する抗菌活性を調べた。

(3) 限外ろ過による分子量の確認

Fraction 3 を水に溶かした後、遠心分離により不溶物を除去したものを限外ろ過フィルター Merck Amicon Ultra-15 (Merck) に供し、分子量 0~3 kDa, 3~10 kDa, 10~30 kDa, 30~50 kDa, 50~100 kDa, 100 kDa 以上の 6 つの画分に分けた。これらの画分を濃縮および凍結乾燥した後、鹿児島 2 号酵母に対する抗菌活性を調べた。

4.3 実験結果および考察

4.3.1 黄変黒麹が芋焼酎の醪発酵に与える影響

MEM-C 株を種麹とした黄変黒麹と購入した河内 NK 米麹を併用し、これらの配合を段階的に変えることで、黄変黒麹が醪の発酵に与える影響を調べた。実験に用いた各米麹の酸度や酵素活性について発酵に影響するような大きな差は確認されなかった (Table 4-1)。

Table 4-1 Acidity and enzyme activities of rice *koji*

	Acidity	Enzyme activities (U / g dry <i>koji</i>)					
		AA	SP	AGL	GA	ACP	BGL
NK	6.2	58.0	20.4	0.390	2800	14300	58.0
MEM-C	5.7	57.4	13.6	0.260	1870	11500	165.2

AA: α -amylase, SP: saccharification power, AGL: α -glucosidase, GA: glucoamylase, ACP: acid carboxypeptidase, BGL: β -glucosidase

発酵試験の結果、一次醪の炭酸ガス発生量は黄変黒麹の割合と負の相関がみられた (Fig. 4-2A)。二次仕込み直前の一次醪を分析したところ、アルコール濃度は黄変黒麹の割合が高いほど低くなったが、Brix は逆に高くなったことから糖化には問題は無く、酸度にもサンプル間の大きな差は無いことから、黄変黒麹由来の成分が発酵を阻害している可能性が示唆された (Table 4-2)。一方、二次仕込み直後の発酵速度は黄変黒麹の割合が高いほうが速かった (Fig. 4-2B)。一次醪末期の酵母生菌数は黄変黒麹の割合が高いほど多く、これが二次醪初期で速やかに発酵が進んだ要因と考えられた。また、全ての二次醪で発酵阻害が緩和されており、一次醪で発酵を阻害していた成分が二次原料のサツマイモや水を加えたことによって希釈され、その効力が弱ま

ったと考えられた。次に、一次醪における発酵阻害の原因を調べるため一次醪初期の酵母生菌数を調べたところ、黄変黒麹の割合が増えるにつれて生菌数が減少した。以上の結果から、黄変黒麹は酵母に対する抗菌活性を有しており、これが一次醪で確認された発酵阻害の原因であると推察された。

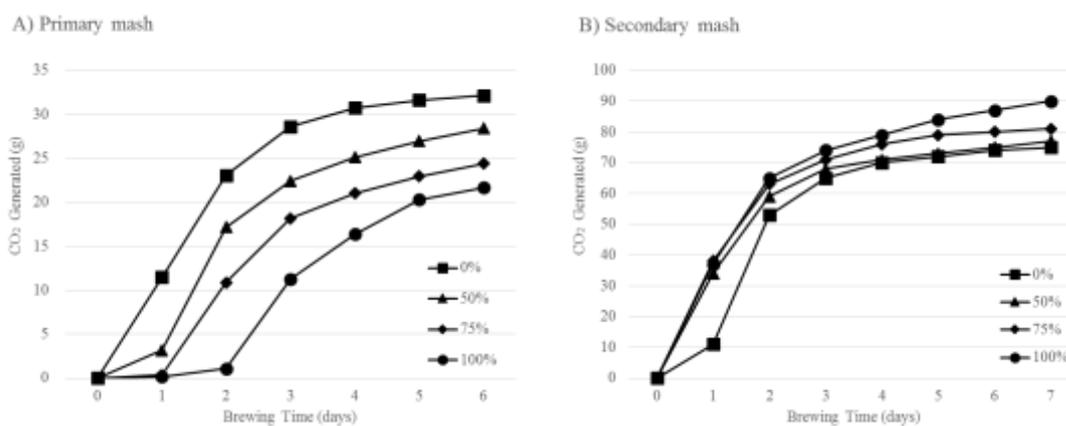


Fig. 4-2 Effect of yellowish black *koji* (MEM-C) on fermentation.

CO₂ generated of primary mash. B) CO₂ generated of secondary mash.

Symbols show the proportion of MEM-C, ■ : 0%, ▲ : 50%, ◆ : 75%, ● : 100%, respectively.

Table 4-2 Effect of yellowish black *koji* (MEM-C) on mash.

			Alcohol	Brix	Sake	Acidity	Live yeast count
			(%)		meter		($\times 10^8$ cells/ml)
Primary mash	MEM-C	0%	18.30	19.5	-	25.6	0.56
	MEM-C	50%	16.45	22.7	-	25.0	0.51
	MEM-C	75%	13.60	24.6	-	25.0	0.85
	MEM-C	100%	11.00	25.8	-	25.6	1.12
Secondary mash	MEM-C	0%	14.98	-	6.74	7.2	-
	MEM-C	50%	15.59	-	6.48	7.8	-
	MEM-C	75%	15.67	-	5.17	7.8	-
	MEM-C	100%	15.27	-	2.36	8.2	-

4.3.2 酵母に対する抗菌効果および殺菌効果

黄変黒麹から抽出，精製によって得られた Fraction 3 を培地に添加して各種酵母に対する MIC を調べた。その結果，Fraction 3 は供試したすべての酵母に対して抗菌活性を示し，MIC は 10～50 $\mu\text{g/ml}$ と菌株によって感受性に差が見られた (Table 4-3)。

Table 4-3 Minimum inhibitory concentration of Fraction 3 for yeasts in *koji* extract media (pH 3.5)

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<u>Laboratory yeast</u>		<u>Wine yeasts</u>	
W303-1(Haploid)	10	KW-1	50
		KW-3	20
<u>Shochu yeasts</u>		<u>Baker's yeasts</u>	
Kagoshima No.2	50	NBRC 0555	20 - 50
Kagoshima No.5	50	NBRC 110416	50
Heisei Miyazaki	50		
Awamori No.101	20 - 50	<u>Other yeasts</u>	
Kirishima No.1	50	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	10 - 20
Kirishima No.2	20 - 50	NBRC 1735	
<u>Whisky yeast</u>			
NBRC 0234	10 - 20	<i>Pichia farinose</i> NBRC 1163	50
<u>Sake yeasts</u>		<i>Candida kefyr</i> NBRC 0541	20
Kyokai No.7	20 - 50		
Kyokai No.9	50		

Fraction 3 は酵母に対して強い抗菌活性を有することが分かったが、抗菌には静菌効果によるものと殺菌効果によるものがあることから鹿児島 2 号酵母を対象に Fraction 3 の殺菌効果について検証した。その結果、高い濃度の Fraction 3 に曝露するほど鹿児島 2 号酵母の死滅率は増加し、50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では 99.8% の死滅率となった (Table 4-4)。また、メチレンブルー染色によって青く染まった死菌を実態顕微鏡 (1000 倍) で観察したが、細胞の形に生菌との差は確認できなかった。以上の結果より Fraction 3 は酵母に対して高い殺菌効果を有することが示された。

Table 4-4 Sterilization effect of Fraction 3 on yeast

	Control	Exposure concentration of Fraction 3 ($\mu\text{g/ml}$)			
		10	50	100	200
CFU / ml	8.28×10^4	3.28×10^4	2.00×10^2	ND	ND
Death rate (%)	-	60.4	99.8	100	100

Death rate (%) = each CFU / control's CFU \times 100.

ND: not detected.

4.3.3 糸状菌に対する抗菌効果

Fraction 3 の糸状菌に対する抗菌活性を hyphal-extension inhibition assay で調べた結果、*T. reesei* NBRC31326 は添加濃度 500 mg/l 以上で強い菌糸成長阻害が確認された (Fig. 4-3A)。一方、*R. oryzae* NBRC100014 に対しては弱い菌糸成長阻害は確認できたものの、*T. reesei* NBRC31326 と比較するとその効果は小さかった (Fig. 4-3B)。本抗菌物質を生産する *A. luchuensis* MEM-C に対する抗菌活性は今回の添加濃度においては確認できなかった (Fig. 4-3C)。以上の結果から、Fraction 3 は糸状菌に対しても抗菌効果を有するが、その感受性は菌種によって異なることが示唆された。

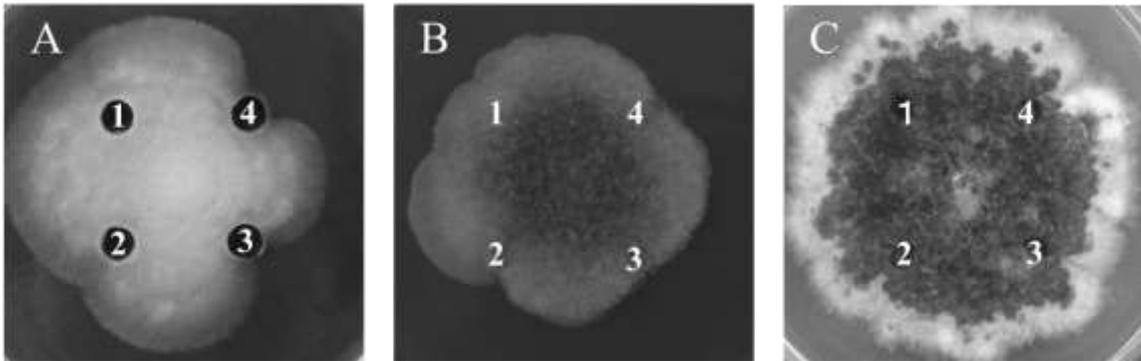


Fig. 4-3 Antifungal activity of Fraction 3 for three fungi.

A: *T. reesei* NBRC31326, B: *R. oryzae* NBRC100014, C: *A. luchuensis* MEM-C

The wells contained 20 μ l of Fraction 3 solutions: 1; blank (sterile water), 2; 100 mg/l, 3; 500 mg/l, 4; 1000 mg/l.

4.3.4 Fraction 3 の定性

(1) TLC による確認

Fraction 3 を TLC で確認したところ、大きく 3 つのスポットが検出された (Fig. 4-4)。Spot A (R_f 0.81) は分離されなかった多数の成分を含むスポットであり、ニンヒドリンおよび硫酸の噴霧により発色が確認されたことから糖およびアミノ酸を含むと考えられた。Spot B (R_f 0.38) および Spot C (R_f 0.15) は硫酸の噴霧により発色が確認されたことから糖を含む成分であると示唆された。次に、これらのスポットをプレートから切り出して水で溶出し、凍結乾燥した後、各スポットの酵母に対する抗菌活性を調べたところ Spot C を含む画分に強い抗菌活性が確認された (Table 4-5)。

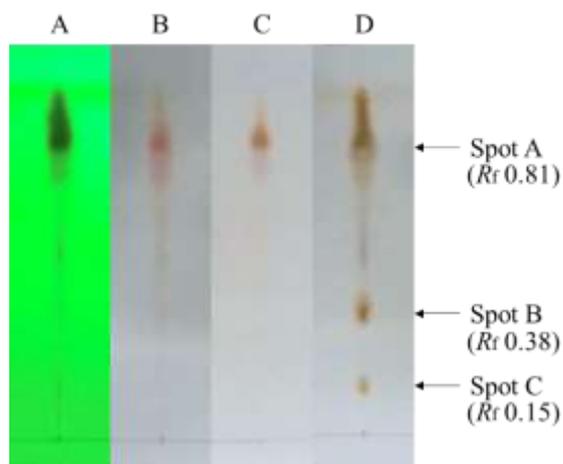


Fig. 4-4 Confirmation of Fraction 3 by TLC.

Solvent system; 2-propanol/Acetate/water(4:1:1), detection; A: UV254 nm, B: spraying 1% FeCl₃, C: spraying ninhydrin solution then heating at 105°C, D: spraying 10% sulfuric acid then heating at 105°C, respectively.

(2) HPLC による確認

Fraction 3 を HPLC にて分析した結果、複数のピークが検出されたことから Fraction 3 は複数の成分を含むことが示された (Fig. 4-5)。さらに Fig. 4-5 に示した通りに 5 つの画分を分取し、酵母に対する抗菌活性を調べたところ、Fraction 3-II (RT 15 – 25 min)、Fraction 3-III (RT 25 – 30 min)、Fraction 3-IV (RT 30 -35 min) に Fraction 3 と同等以上の強い抗菌活性が確認された (Table 4-5)。この結果より、Fraction 3 は構造が異なる複数の抗菌成分を含んでいる可能性が示唆され、いずれも C18 逆相カラムに長く保持されたことから比較的極性が低い成分であると推察された。一方、450nm で検出される黄色色素は Fraction 3-III に多く含まれていた。

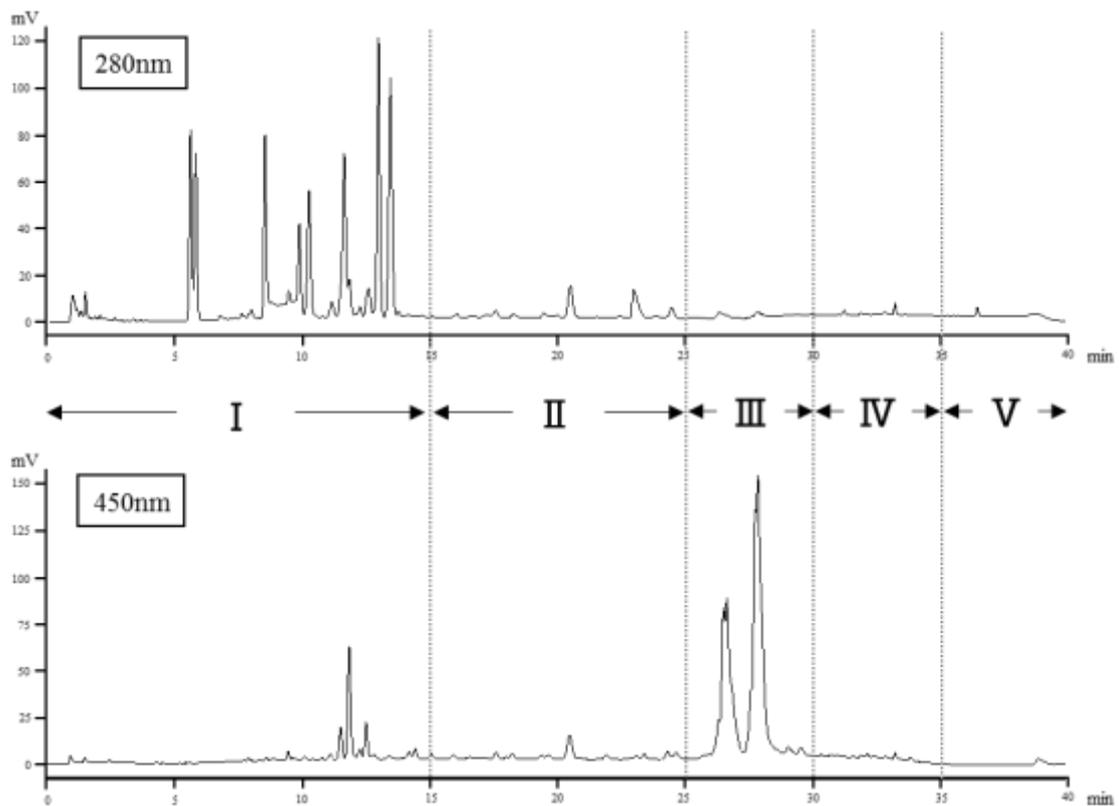


Fig. 4-5 Confirmation of Fraction 3 by HPLC.

The components were separated at the dotted line positions and subjected to the antimicrobial experiments.

(3) 限外ろ過による分子量の確認

Fraction 3 を限外ろ過フィルターにより分子量の異なる 6 つの画分に分けた。黄色色素は主に 50~100 kDa と 100 kDa 以上の画分に含まれていた。収量は 50~100 kDa 画分が最も多く、抗菌活性も 50~100 kDa 画分が最も強かった。100 kDa 以上の画分にも弱い抗菌活性が確認されたが (Table 4-5), これは限外ろ過時に 50~100 kDa 画分の一部が残存した可能性が示唆された。

Table 4-5 Antibacterial activity of Fraction 3's TLC, HPLC and ultrafiltration fraction on yeast

		Antibacterial activity					
TLC		A	B	C			
fraction		-	-	○			
HPLC		I	II	III	IV	V	
fraction		-	○	○	○	-	
Ultrafiltration		0-3 kDa	3-10 kDa	10-30 kDa	30-50 kDa	50-100 kDa	100 kDa<
fraction		-	-	-	-	○	△

The antibacterial activity against yeast (Kagoshima No.2) of each fraction was compared with Fraction 3.

○: Activity equal to or higher than that of Fraction 3, △: Weaker activity than Fraction 3, Hyphen (-): No activity, respectively.

以上の結果より、Fraction 3 は複数の成分を含むことが明らかとなり、Fraction 3 に含まれる抗菌物質は分子量が 50~100 kDa と大きな分子であること、極性が低いこと、糖を含むことが示唆された。しかし、黄色色素と抗菌効果の直接的な関係について本研究では結論付けられなかった。

第5章 総括 (General Conclusion)

芋焼酎は南九州の特産品として多数の製造元から多種多様な銘柄が販売されており、現在では日本を代表する蒸留酒のひとつとなった。芋焼酎を含め、アルコール飲料は嗜好品であり、近年では人口減少に加え、消費者の健康志向や若者のアルコール離れが理由で国内での消費が落ち込んでいる。このような市場の状況を受け、芋焼酎においてはサツマイモの品種や酵母、麹菌の種類、原料の処理方法や製造方法を変えることでさらなる香味の多様化と嗜好性の向上が図られている。本研究では焼酎醸造に欠かせない麹菌に着目し、黒麹菌が生産するタンパク質分解酵素の酸性プロテアーゼが芋焼酎醸造に与える影響を調査した。また、麹菌は様々な代謝物を生成するが、霧島酒造保有の黒麹菌 *A. luchuensis* MEM-C 株で製造された米麹（黄変黒麹）から焼酎醸造において一次醪の発酵を阻害する抗菌物質が見出されたため、これについても解析を行った。

まず、黒麹菌が有する酸性プロテアーゼ PepA の焼酎醸造における役割について検討した。アグロバクテリウム形質転換法により、黒麹菌 *A. luchuensis* RIB 2604 (NBRC 4314) および、その *ligD* 破壊株を用いて、*pepA* 破壊株および高発現株を構築した。*pepA* 破壊株 ($\Delta pepA$) と *pepA* 高発現株 (OE*pepA*) を用いて作製した米麹は、それぞれ親株と比較して 1/2, 24 倍のプロテアーゼ活性を示した。また、芋焼酎の小仕込み試験を行った結果、 $\Delta pepA$ の醪は親株の醪より低いアミノ酸濃度を示したが、OE*pepA* の醪は親株の醪と比較して高いアミノ酸濃度を示した。したがって、醪のアミノ酸濃度は、酸性プロテアーゼ活性に比例することが示された。さらに、これらの醪を蒸留した後、焼酎の香気成分を分析した結果、高級アルコールやエステル等で酸性プロテアーゼ活性と負の相関が確認され、これらは酸性プロテアーゼ活性が高いときほど濃度が低くなった。アミノ酸含量の少ない芋焼酎の二次醪中においては主に酵母のアミノ酸生合成経路を介して高級アルコールが生成されており (Fig.5-1), $\Delta pepA$ 株を用いるとさらにアミノ酸が減少することで本経路が活性化され、結果的に高級アルコールや

その代謝物であるエステル類が増加したと考えられる。

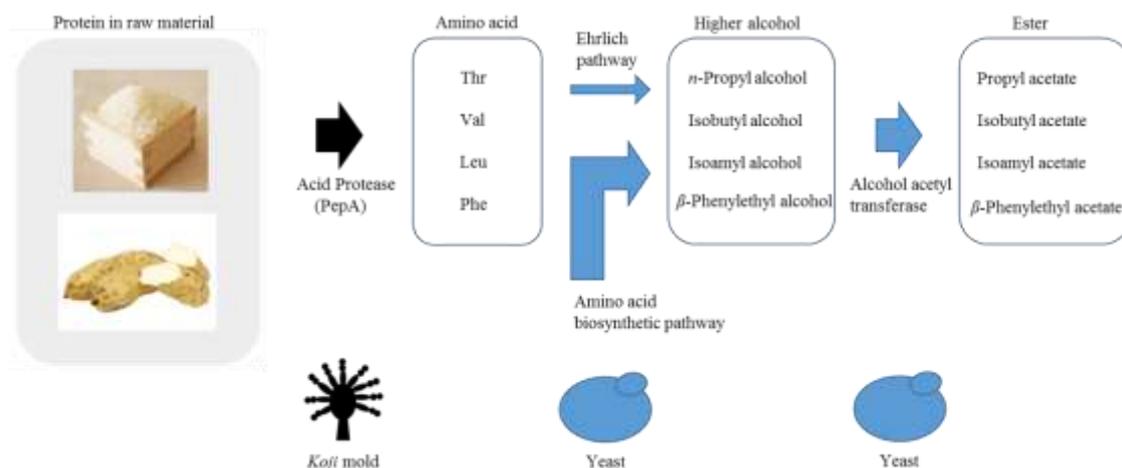


Fig. 5-1 Aroma production pathway in 2nd mash of sweet potato *shochu*.

以上の結果より、麹菌の酸性プロテアーゼは芋焼酎の香気に影響を与えることが明らかとなり、酸性プロテアーゼを指標とした焼酎麹菌育種の可能性が示された。

上述した通り、酸性プロテアーゼを指標とする焼酎麹菌の育種は焼酎の香味多様化に繋がる可能性が示されたが、遺伝子組換えによって育種した麹菌を商品製造に用いるには高い障壁がある。そこで、次の研究では遺伝子組換えを伴わない方法として、重イオンビーム変異導入法およびカゼイン寒天プレートを用いたハローアッセイにより酸性プロテアーゼ活性に着目した *A. luchuensis* J7-2 の育種を行った。その結果、高い酸性プロテアーゼ活性を有する *A. luchuensis* APH-1 を取得した。APH-1 株を用いた米麴の酸性プロテアーゼ活性および酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、J7-2 株を用いた米麴のよりそれぞれ 4.5 倍および 2.3 倍高かった。一方で、APH-1 を用いた米麴の方が J7-2 を用いた米麴よりも β -グルコシダーゼ活性が 1/4 と低かった。また、焼酎の香気成分を分析した結果、APH-1 を使用した焼酎は J7-2 を使用した焼酎よりも高級アルコールおよびエステルが減少していた。さらに、APH-1 株を使用することによって、

一次醪は低いエタノール濃度を示したが、二次醪はやや高いエタノール濃度を示し、結果的に原料当たりのエタノール収量は 6.1 l/t (2.8%) 増加した。一次醪でエタノール濃度が低かったことで酵母に対するストレスが軽減され、健全な酵母がより多く二次醪に持ち込まれたことが最終的なエタノール収量が増加した要因と考えられるが、一次醪でエタノール濃度が低くなった要因については分かっていない。これらの結果は、酸性プロテアーゼ活性が芋焼酎の風味形成およびエタノール生産に非常に重要な役割を果たしていることを示している。

最後に、黒麹菌が生産する抗菌物質に関する解析を行った。MEM-C 株を用いて作製した米麹（黄変黒麹）を用いて、芋焼酎醸造試験を行ったところ、黄変黒麹を使用すると一次醪の発酵が遅延し、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の増殖が有意に抑制されたことより、MEM-C 株が抗菌物質を分泌する可能性が示された。そこで、黄変黒麹より抗菌物質の同定を目的として抽出・分画および抗菌活性試験を行った。その結果、黄変黒麹抽出画分 3(以下、Fraction 3)は、焼酎酵母、清酒酵母、ウイスキー酵母、パン酵母および実験室酵母などの *S. cerevisiae* 株の他に、*Pichia farinose*, *Candida kefyr*, *Kluyveromyces marxianus*, *Trichoderma reesei* そして *Rhizopus oryzae* を含む様々な真菌に対して抗菌活性を示したが、*A. luchuensis* 自体には示さなかった。さらに、Fraction 3 の同定を試みた結果、抗菌物質は糖類を含み、極性が低く、分子量 50~100kDa の高分子であることが示唆された。抗菌物質の中には抗酸化作用や抗炎症作用を有しているものも多く、本物質の全容を明らかにすることで麹菌（麹）の新たな価値を提示できると考えている。

以上の結果は、黒麹菌の醸造特性および機能性に関する新たな知見を含み、芋焼酎の酒質多様化や麹菌の新たな価値創造に資するものである。

参考文献

1. 神渡巧, 瀬戸口眞治, 上田次郎, 瀬戸口智子, 緒方新一郎: 芋焼酎の酒質に及ぼすサツマイモ品種の影響と特徴香成分の検索, 醸協, 101(6), 437-445 (2006).
2. 本坊酒造株式会社: 日本特許, 公開特許広報, 特開 2010-207126(2010年9月24日).
3. 寶酒造株式会社: 日本特許, 公開特許広報, 特開 2001-95523(2001年4月10日).
4. 霧島酒造株式会社: 日本特許, 公開特許広報, 特開 2008-228620 (2008年10月2日).
5. 小路博志, 杉本利和, 舛田晋, 上野貴生: 新規液体麴の開発と発酵飲食品への展開, 生物工学会誌, 91(2), 73-79(2003).
6. 滝沢ら: 「焦がしもろみ製法」による芋焼酎の製造, 平成 29 年度日本醸造学会大会講演要旨集, 13 項(2017).
7. 太田剛雄, 下條寛和, 橋本憲治, 近藤洋大, 佐無田隆, 大場俊輝: 白麴の β -グルコシダーゼ活性と甘藷焼酎香氣への寄与, 醸協, 86(7), 536-539 (1991).
8. 瀬戸口翔, 尾崎圭晃, 河野邦晃, 岩井謙一, 高瀬良和: 土壌から分離した黒麴菌による芋焼酎の製造, 平成 26 年度日本醸造学会大会講演要旨集, 14 項(2014).
9. 白石洋平, 原口愛美, 村田梨恵, 久遼馬, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉

- 置尚徳, 和久豊, 高峯和則: 異なる黒麹菌を用いた本格焼酎の酒質の多様化, 醸協, 113(12), 757-765(2018).
10. Futagami, T., Mori, K., Yamashita, A., Wada, S., Kajiwara, Y., Takashita, H., Omori, T., Takegawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S and Goto, M.: Genome sequence of the white *koji* mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, used for brewing the Japanese distilled spirit *shochu*, Eukaryot Cell, **10**(11), 1586–1587(2011).
11. Yamada, O., Machida M., Hosoyama A, Goto, M., Takahashi, T., Futagami, T., Yamagata, Y., Takeuchi, M., Kobayashi, T., Koike, H., and other 17 authors: Genome sequence of *Aspergillus luchuensis* NBRC 4314, DNA Research, 23, 507–515 (2016).
12. Maeda, M., Tokashiki, M., Tokashiki, M., Uechi, K., Ito, S., Taira, T.: Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*., J Biosci Bioeng, 126(2), 162-168 (2018).
13. 橋本レイコ, 浅野勝佳, 渡嘉敷唯章, 陰地義樹, 廣瀬 (安元) 美奈, 高良亮, 豊里哲也, 吉野敦, 池端真美, 劉瑩, 久米田裕子, 横山耕治, 高橋治男: *Aspergillus niger* とその近縁種黒麹菌のマイコトキシン産生性, Mycotoxins, 63 (2), 179-186 (2013).
14. 藪田貞次郎: 麹菌により生産せらるる 1 新有機酸(麴酸)に就て, 東化, 37, 1185-1223(1916)
15. 株式会社テンヨ武田: 日本特許, 公開特許広報, 特開 2003-81715 (2003 年 3 月 19 日) .

16. Montif, F., Ripamonti, F., Hawser, P, S and Islam, K.: Aspirochlorine: A Highly Selective and Potent Inhibitor of Fungal Protein Synthesis, *The Journal of Antibiotics*, 52(3), 311-318(1999)
17. 祝園秀樹, 藤田依里, 高山清子, 山本英樹, 水谷政美: 焼酎麹菌による抗酸化物質 pyranonigrin-A の生産特性, *醸協*, 112(11), 751-757 (2017)
18. Yang, Y., Iwamoto, A., Kumrungsee, T., Okazaki, Y., Kuroda, M., Yamaguchi, S., Kato, N.: Consumption of an acid protease derived from *Aspergillus oryzae* causes bifidogenic effect in rats. *Nutr Res.*, 44, 60-66 (2017)
19. 三嶋豊, 芝田孝一, 瀬戸英伸, 大山康明, 波多江慎吉: コウジ酸のメラニン生成抑制作用と各種色素沈着症に対する治療効果, *皮膚*, 36(2), 134-150(1994)
20. 光岡知足: プレバイオティクスと腸内フローラ, *腸内細菌学雑誌*, 16(1), 1-10(2002).
21. Sawada, K., Sato, T., Hamajima, H., Lahiru Niroshan Jayakody, N.L., Hirata, M., Yamashiro, M., Tajima, M., Mitsutake, S., Nagao, K., Tsuge, K., Abe, F., Hanada, K., Kitagaki, H.: Glucosylceramide Contained in Koji Mold-Cultured Cereal Confers Membrane and Flavor Modification and Stress Tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* during Coculture Fermentation, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 81(11), 3688-3698(2015).
22. Hazelwood, A. L., Daran, M. J., Maris, J. A. A., Pronk, T. J., and Dickinson, J. R.: The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 2259–2266 (2008).

23. Ouchi, K., Yamamoto, Y., Takagishi, M., and Akiyama, H.: Effect of nitrogen source on higher alcohol formation by *Saccharomyces cerevisiae*, J. Ferment. Technol., 59(1), 9–16 (1981).
24. Ayrapaa, T.: The formation of phenethyl alcohol from 14C-labelled phenylalanine, J. Inst. Brew., 71, 341–347 (1965).
25. Ayrapaa, T.: Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium, J. Inst. Brew., 77, 266–276 (1971).
26. Akita, O., Hasuo, T., Oba, T., and Miyano, N.: Effect of amino acid composition on higher alcohols and isoamyl acetate formation by a yeast, J. Ferment. Technol., 65, 19–26 (1987).
27. 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則: 芋焼酎醪へのプロテアーゼ剤添加による揮発成分と官能評価への影響, 醸協, 112(7), 517–523 (2017).
28. 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則: 芋焼酎の香味形成に及ぼすアミノ酸の影響, 醸協, 112(8), 563-568(2017).
29. 奥村 丞司: メイラ-ド反応とフレーバーの生成, 醸協, 88(3), 178-187 (1993).
30. Hong, S., Lee, M., Kim, D., Varga, J., Frisvad, C. J., Perrone, G., Gomi, K., Yamada, O., Machida, M., Houbraken J., and Samson, A. R.: *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *aspergillus* in east asia, PLoS ONE, 8, e63769 (2013).

31. Berka, M. R., Ward, M., Wilson, J. L., Hayenga, J. K., Kodama, H. K., Carlomagne, P. L., and Thompson, A. S.: Molecular cloning of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*, *Gene*, 86, 153–162 (1990).
32. Berka, M. R., Carmona, L. C., Hayenga, J. K., Thompson, A. S., and Ward, M.: Isolation and characterization of the *Aspergillus oryzae* gene encoding aspergillopepsin O, *Gene*, 125, 195–198 (1993).
33. Gomi, K., Arikawa, k., Kamiya, N., Kitamoto, K., and Kumagai, C.: Cloning and Nucleotide Sequence of the Acid Protease-encoding Gene (*pepA*) from *Aspergillus oryzae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1095–1100 (1993).
34. Van Den Hombergh, J. P. T. W., Sollewijn Gelpke M. D., Van De Vondervoort, P. J. I., Buxton. F. P., and Visser, J.: Disruption of Three Acid Proteases in *Aspergillus niger* Effects on Protease Spectrum, Intracellular Proteolysis, and Degradation of Target Proteins, *Eur. J. Biochem.*, 247, 605–613 (1997).
35. Takahashi, T., Mizutani, O., Shiraishi, Y., and Yamada, O.: Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the nonhomologous end joining system, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 529–534 (2011).
36. Michielse, C. B., Hooykass, P. J., van den Hondel, C. A., and Ram, A. F.: Agrobacterium-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*, *Nat. Protoc.*, 3, 1671–1678 (2008).

37. Minetoki, T.: The expression system of heterologous genes in aspergilli (in Japanese), *Kagaku To Seibutsu.*, 38, 831–838 (2000).
38. Hata, Y., K. Kitamoto., K. Gomi., C. Kumagai., and G. Tamura.: Functional elements of the promoter region of the *Aspergillus oryzae glaA* gene encoding glucoamylase, *Curr. Genet.*, 22, 85–91 (1992).
39. 注解編集委員改編，第四回改訂国税庁所定分析法注解（財団法人日本醸造協会，東京）（1993）
40. Blix, G.: The Determination of Hexosamines According to Elson and Morgan, *Acta Chern. Scand.*, 2, 467–473 (1948).
41. Sakurai, Y., Lee, H. T., and Shiota H.: On the convenient method for glucosamine estimation in koji, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 619–624 (1977).
42. 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会：日本食品標準成分表 2015 年版（七訂）
43. Tsuchiya, K., Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Jigami, Y and Tamura, G.: High level expression of the synthetic human lysozyme gene in *Aspergillus oryzae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 109–114 (1992).
44. Archer, D. B., MacKenzie, D. A., Jeenes, D. J. and Roberts, I. N.: Proteolytic degradation of heterologous proteins expressed *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Lett.*, 14, 357–362(1992).

45. Ward, M.: Production of calf chymosin by *Aspergillus awamori*, Genet. Mol. Bio. Industr Microorg., Am. Soc. Microbiol., Washington., 288–294 (1989).
46. Koganemaru, K., Sumi, T., Kanda, K., Kato, F., Tasiro, K and Kuhara, S.: β -phenyletyl alcohol production by a mutant of sake yeast and its highly productive mechanism, J. Brew. Soc. Jpn., 98, 201–209 (2003).
47. Akita, O., Hasuo, T., Miyano, N and Yoshizawa K.: Formation of aroma components in fermented liquor made by the fermentation following after saccharification.: Studies on the Brewing of Alcoholic Beverage by the System of Fermentation Following after Saccharification (Part 7), J. Brew. Soc. Jpn., 82, 369–374 (1987).
48. T. Kojo, C. Kadooka, M. Komohara, S. Onitsuka, M. Tanimura, Y. Muroi, S. Kurazono, Y. Shiraishi, K. Oda, K. Iwashita, M. Onoue, K. Okutsu, Y. Yoshizaki, K. Takamine, T. Futagami, K. Mori, H. Tamaki : Characterization of amylolytic enzyme overproducing mutant of *Aspergillus luchuensis* obtained by ion beam mutagenesis, J Gen Appl Microbiol, 63(6), 339-346(2018).
49. キッコーマン株式会社, 独立行政法人 日本原子力研究開発機構 : 日本特許, 公開特許広報, 特開 2009-95280 (2009 年 5 月 7 日)
50. 宮川博士, 鈴木恵利香, 小境敏揮, 河野邦晃, 岩井謙一, 高瀬良和 : 芋焼酎醪に生息している乳酸菌の単離と酒質に与える影響, 醸協, 111(6), 405-411(2016)

51. 水谷政美, 山本英樹, 工藤哲三: 焼酎の酒質向上に関する研究, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, 52, 85-88 (2007)
52. 椎木敏: 清酒もろみにおける蒸米溶解の機作に関する研究, 醗酵工学, 70(4), 293-301(1992)
53. Ferdouse J., Yamamoto Y., Taguchi S., Yoshizaki Y., Takamine K., Kitagaki H. :
Glycosylceramide modifies the flavor and metabolic characteristics of sake yeast, PeerJ Vol:
6 Issue: e4768 <https://doi.org/10.7717/peerj.4768>(2018)
54. 中田久保, 坂井 劭, 竹田正久, 塚原寅次: こうじ菌の生産する抗菌性物質に関する研究, 醸協, 75(9), 761-764(1980)
55. 中田久保, 折茂北子, 立原悦子, 坂井 劭: こうじ菌の生産する抗菌性物質
Yeastcidin の *Saccharomyces cerevisiae* に対する抗菌作用, 農学集報 (東京農業大学), 26(1), 9-14(1981).
56. 穂坂 賢, 新宅信彦, 矢作直子, 中田久保, 坂井 劭: 麹菌(*Aspergillus oryzae*)の
生産する抗菌性物質(Yeastcidin)の精製と性質, 発酵工学, 65(3), 191-197(1987)
57. 公立大学法人秋田県立大学, 株式会社秋田今野商店: 日本特許, 公開特許広報,
特開平 7-177897 (平成 7 年 7 月 18 日)
58. 山元正博, 安藤昭一, 藤井貴明, 矢吹 稔, 小倉長雄: 焼酎もろみに含まれる生育阻止物質について, 千葉大園学報, 41, 51-55(1988).

59. H. Tanaka, P. Wang and O. Yamada : Yellow Pigments of *Aspergillus niger* and *Asp. awamori* Part I *Agr. Biol. Chem.*, 30(2), 107-113(1966)
60. P. Wang and H. Tanaka : Yellow Pigments of *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori* Part II. Chemical Structure of Aurasperone A, *Agr. Biol. Chem.*, 30(7), 683-687(1966)
61. 有馬 啓, 柳 洲鉦, 田村学造 : *Aspergillus awamori* および *Aspergillus niger* の生産する新黄色色素 asperyellone について(第 1 報):新黄色色素 asperyellone の生産条件とその分離精製, 日本農芸化学会誌, 41(11), 571-577(1967)
62. J. Yu, G. Tamura, N. Takahashi and K. Arima : Asperyellone, a New Yellow Pigment of *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger* Part II. The Chemical Structure of Asperyellone *Agr. Biol. Chem.*, 31(7), 831-836(1967)
63. Roberts, W. K and Selitrennikoff, C.P : Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley, *Biochim. Biophys. Acta*, 880, 161-170(1986)
64. T. Taira, T. Ohnuma, T. Yamagami and Y. Aso : Antifungal Activity of Rye (*Secale cereale*) Seed Chitinases: the Different Binding Manner of Class I and Class II Chitinases to the Fungal Cell Walls, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 66(5), 970-977(2002)

本論文に関係のある報告

【論文】

1. Sho Setoguchi, Osamu Mizutani, Osamu Yamada, Taiki Futagami, Kenichi Iwai, Yoshikazu Takase, Hisanori Tamaki: Effect of *pepA* deletion and overexpression in *Aspergillus luchuensis* on sweet potato *shochu* brewing, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (2019.3.28 Accept)
2. 瀬戸口翔, 益留綾菜, 大岩達郎, 二神泰基, 河野邦晃, 岩井謙一, 玉置尚徳: 酸性プロテアーゼを高生産する黒麹菌の育種と芋焼酎醸造試験, *日本醸造協会誌*, (投稿中) .
3. 瀬戸口翔, 章超, 飯島遼平, 二神泰基, 河野邦晃, 岩井謙一, 玉置尚徳: 焼酎醸造において発酵遅延を引き起こす黄変黒麹から見出された抗菌物質の抗菌効果, *日本醸造協会誌*, (投稿中) .

【講演】

1. 瀬戸口翔, 章超, 宮成亮太, 山田修, 水谷治, 岩井謙一, 高瀬良和: 黄変黒麹が焼酎醸造に与える影響とその要因, 平成 28 年度日本醸造学会大会, 平成 28 年 10 月 20 日.
2. 瀬戸口翔, 水谷治, 高橋徹, 山田修, 二神泰基, 玉置尚徳, 岩井謙一, 高瀬良和: 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の酸性プロテアーゼ遺伝子破壊株および高発現株の解析, 第 16 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 平成 28 年 11 月 18 日.
3. 瀬戸口翔, 章超, 宮成亮太, 水谷治, 山田修, 二神泰基, 玉置尚徳, 岩井謙一, 高

瀬良和：黄変黒麹に関する研究，第 9 回日中醸造技術および食品シンポジウム・第 13 回鹿児島大学焼酎学シンポジウム合同大会，平成 28 年 12 月 14 日。

4. 瀬戸口翔，水谷治，高橋徹，山田修，岩井謙一，高瀬良和，外山博英，二神泰基，玉置尚徳：黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の酸性プロテアーゼ遺伝子 *pepA* 破壊および高発現が芋焼酎醸造に与える影響，第 69 回日本生物工学会大会，平成 29 年 9 月 14 日
5. 瀬戸口翔，水谷治，高橋徹，山田修，益留綾菜，岩井謙一，高瀬良和，外山博英，二神泰基，玉置尚徳：黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の *pepA* 破壊および高発現が芋焼酎の香気に与える影響，第 24 回日本生物工学会九州支部沖縄大会，平成 29 年 12 月 9 日
6. 瀬戸口翔，水谷治，高橋徹，山田修，益留綾菜，岩井謙一，高瀬良和，外山博英，二神泰基，玉置尚徳：黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の *pepA* 破壊および高発現が芋焼酎の香気に与える影響，第 14 回鹿児島大学焼酎学シンポジウム，平成 29 年 12 月 13 日
7. 瀬戸口翔，益留綾菜，一谷勝之，橋本文雄，吉田理一郎，岡本繁久，内海俊樹，尾上昌平，岩井謙一，高瀬良和，二神泰基，玉置尚徳：プロテアーゼを高生産する黒麹菌の育種と芋焼酎醸造試験による評価，第 70 回日本生物工学会大会，平成 30 年 9 月 7 日
8. 瀬戸口翔，水谷治，山田修，二神泰基，岩井謙一，高瀬良和，玉置尚徳：麹菌の酸性プロテアーゼが芋焼酎の香気に与える影響，第 10 回国際酒文化・科学技術研討会，平成 30 年 10 月 23 日

9. 瀬戸口翔, 益留綾菜, 岩井謙一, 高瀬良和, 二神泰基, 玉置尚徳: プロテアーゼを高生産する黒麹菌の育種と芋焼酎醸造試験による評価, 第 25 回日本生物工学会九州支部鹿児島大会, 平成 30 年 12 月 1 日

10. 瀬戸口翔, 益留綾菜, 岩井謙一, 高瀬良和, 二神泰基, 玉置尚徳: プロテアーゼを高生産する黒麹菌の育種と芋焼酎醸造試験による評価, 第 15 回鹿児島大学焼酎学シンポジウム, 平成 30 年 12 月 13 日

謝辞

本研究を遂行するにあたり，御指導，御鞭撻を賜りました鹿児島大学大学院連合農学研究科の玉置尚徳教授と二神泰基准教授，琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科の外山博英教授と水谷治准教授，酒類総合研究所醸造微生物研究部門の山田修部門長に深甚なる感謝の意を表します。

また，本研究の一部は酒類総合研究所にて実施させていただきました。その際に御助言，御支援いただきました醸造技術研究部門の向井伸彦部門長，林梨咲様に深く感謝申し上げます。

最後に，本論文を完成させるにあたり，御理解と御支援，御協力をいただきました霧島酒造株式会社取締役専務の江夏拓三氏，酒質開発本部の高瀬良和氏，岩井謙一氏，河野邦晃氏，章超氏，宮川博士氏，益留綾菜氏，飯島遼平氏，大岩達郎氏および研究開発部の皆様に対しましても，心から御礼を申し上げます。