

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	瀬戸口 翔
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 玉置 尚徳
	副査 琉球大学 教授 外山 博英
	副査 鹿児島大学 准教授 二神 泰基
	副査 佐賀大学 教授 後藤 正利
	副査 鹿児島大学 教授 高峯 和則
審査協力者	印
題目	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 <u>koji</u> mold on sweet potato <u>shochu</u> <u>brewing</u> .)
<p>麹菌は国菌と称され日本の伝統的な発酵産業において広く利用されている。清酒、味噌、醤油醸造に用いられる黄麹菌に関してはこれまでに様々な研究が行われてきたが、焼酎醸造に用いられる黒麹菌や白麹菌に関しては、研究が進んでいないのが現状である。黒麹菌及び白麹菌の焼酎醸造における主な役割は黄麹菌と同じ原料の糖化の他に、クエン酸の高生産による醪の雑菌汚染防止があげられる。このため焼酎醸造は、麹菌による糖化と酵母による発酵を室温に於いて同時に並行して行う事が出来る。近年、芋焼酎の香り成分の生成に関する研究も行われ、高級アルコールやエステル、硫黄化合物など芋焼酎の風味を左右する香気の生成に関しては酵母のアミノ酸代謝との関連が報告されているが、麹菌の役割に関しては明らかになっていない。</p> <p>本研究では焼酎醪中のアミノ酸濃度に影響を与えることが予想される黒麹菌の酸性プロテアーゼに着目し、本酵素の活性と芋焼酎の香り成分の関係について調べた。</p> <p>まず黒麹菌 <i>Aspergillus luchuensis</i> RIB 2604 (NBRC 4314) を用いて酸性プロテアーゼをコードする遺伝子 <i>pepA</i> の欠失株 ($\Delta pepA$ 株) 及び過剰発現株 (OE<i>pepA</i> 株) の構築を行った。</p>	

それぞれの株を用いて米麴を作製し、プロテアーゼ活性を測定したところ、親株と比較して 1/2 および 24 倍の活性を示した。また、この米麴を用いて芋焼酎の小仕込み試験を行い、醪のアミノ酸濃度を測定したところ、 $\Delta pepA$ 株の場合は親株より低く、 $OEpepA$ 株の場合は親株より高い値を示した。このことから、酸性プロテアーゼ活性は醪のアミノ酸濃度に影響することが示された。さらにこれらの醪を蒸留して得られた各焼酎の香気成分を測定した結果、高級アルコールやエステルに関して酸性プロテアーゼ活性との間に負の相関が認められた。すなわち香気成分は酸性プロテアーゼ活性が低い場合に多く、逆に活性が高い場合は少なかった。以上の結果より、麴菌の酸性プロテアーゼ活性は芋焼酎の香気に影響を与えることが明らかとなり、酸性プロテアーゼ活性を指標とした焼酎麴菌育種の可能性が示された。

次に、重イオンビーム照射による変異導入法を用いてプロテアーゼ高生産株を育種し、芋焼酎の小仕込み試験を行った。黒麴菌 *A. luchuensis* J7-2 株を用いて重イオンビーム照射による変異導入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高生産株のスクリーニングを行った。その結果、高い酸性プロテアーゼ活性を有する APH-1 株を取得した。APH-1 株を用いて米麴を作製し、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を測定したところ、J7-2 株を用いた米麴よりそれぞれ 4.5 倍および 2.3 倍高い値を示した。また、 β -グルコシダーゼ活性を測定したところ、APH-1 を用いた米麴は J7-2 株を用いた米麴の 1/4 と低い値を示した。APH-1 株を用いた場合、一次醪では低いエタノール濃度を示したが二次醪で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。これらの米麴を用いて製造した焼酎について香気成分を測定した結果、APH-1 株を用いた焼酎は J7-2 株を用いた焼酎よりも高級アルコールおよびエステル量の減少が認められ、上述した $OEpepA$ 株の場合と同様の結果となった。これらの結果より、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が明らかとなった。

本研究成果は、黒麴菌における酸性プロテアーゼ $PepA$ の活性が芋焼酎の香気に影響を与えることを明らかにしたことである。また、重イオンビーム照射による麴菌の育種の事例の一つとして、高プロテアーゼ活性を有する麴菌の育種を実証したものであり、新たな芋焼酎醸造に寄与するものである。

以上のことから、本論文は博士（農学）の論文として十分に価値のあるものと判定した。