

リンゴ搾り粕からのフレーバー
アルコール生産に関する研究

2007

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻

(弘前大学)

村 中 文 人

第1章 緒論	1
第2章 カビ由来の酵素液を用いたリンゴ搾り粕からのエタノール生産性の向上	5
第1節 序論	5
第2節 リンゴ搾り粕の成分組成	7
第3節 液体麹製造用カビ菌株の選抜	13
第4節 <i>B. cinerea</i> 30915 株培養液から調製した液体麹によるリンゴ搾り粕の糖化	18
第5節 リンゴ搾り粕の液体麹による糖化とアルコール発酵	28
第6節 要約	35
第3章 カプロン酸エチル高生産酵母 3703-7 株の菌学的特徴	37
第1節 序論	37
第2節 3703-7 株の細胞形態学的特徴	39
第3節 3703-7 株の糖・アルコール耐性と薬剤耐性	43
第4節 DNAマイクロアレイ解析による変異株の性質	51
第5節 要約	70
第4章 カプロン酸エチル高生産株による香気物質の生産性の向上	71
第1節 序論	71
第2節 香気物質の生産条件の検討	73
第3節 リンゴ搾り粕抽出液を基質としたフレーバーアルコールの生産	83
第4節 要約	90
第5章 総括	91
第6章 要約	96
引用文献	99
謝辞	106

第1章 緒論

青森県のリンゴ果実生産量は全国生産の約半分を占め、年間約 35 万トンから 40 万トンの間で推移している。果汁に加工されるリンゴ果実は約 10 万トンで、副産物として年間に 2 万 5 千トン前後のリンゴ搾り粕が排出されている。リンゴ加工場から排出されるリンゴ搾り粕は、一部は家畜の飼料のほか、肥料、土壌改良材としての利用が行われているが、リンゴ繊維、ペクチン等食物繊維のような付加価値の高い食品素材として利用されているのは、全排出量の一割に満たない^{1,2)}。リンゴ搾り粕の主な成分は水溶性糖類と水不溶性の多糖類であり³⁾、これらをバイオマスとして有効に活用することは、産業的には廃棄物の減少とバイオリファイナリーの見地から、社会および環境的には石油資源の節約と温室効果ガスの低減という見地から重要と考えられる。そのため青森県においても、長年にわたりリンゴ搾り粕の利用法について多くの研究がなされてきた⁴⁻¹⁶⁾。しかしながら、依然としてリンゴ搾り粕は飼料や土壌改良材として使われ、多くは未利用のまま費用をかけて処分されている状況には変わりがなく、より付加価値の高い利用技術の開発が望まれているところである。

本研究は、このリンゴ搾り粕をアルコール発酵することにより、食品や飲料に添加できるフレーバーアルコールを作り出すことを目的に行うものである。フレーバーアルコール製造を目的とした理由は、次の2点である。(1) 日本は世界2位の香料消費国であり¹⁷⁾、リラックス効果など香りのプラス効果への期待も高く、新規性のあるフレーバーアルコールは市場性があると考えられる。(2) 飲料アルコールについても、しょうちゅう、スピリッツ類、リキュール類の消費が過去5年間でそれぞれ 130%、179%、105%の伸びを示しており、新規参入のしやすい市場である¹⁸⁾。これらの理由に加えて、リンゴを原料とすることは青森県の地域性とマッチしており、消費者に理解されやすいという点も有利であると考えられる。

リンゴ搾り粕糖液からフレーバーアルコールを生産する技術開発は発酵と膜技術を利用した鶴見ら¹⁶⁾のリンゴ芳香物質生産の研究がある。彼らは膜透析したリンゴ搾り粕糖液に *n*-ヘキサノール、*trans*-2-ヘキシナールや 2-メチル酪酸エチルなどのリンゴフレーバーを生成する酵母を培養し、フレーバーアルコールを生産する技術開発を行った。しかし、リンゴ搾り粕の水不溶性物質の利用や吟醸香芳香物質を生産する酵母の開発の研究は行わなかった。本研究は食品製造に準拠した方法で、リンゴ搾り粕の水不溶性の多糖類を効率的に分解して発酵性糖類を生成し、吟醸香芳香物質を生産する酵母によるフレーバーアルコールの発酵生産技術を開発することを目的とした。

原料にカビを培養し、生成する酵素を精製せずにそのまま用いて水不溶性物質を分解する麹利用技術は、酒造^{19,20)}および発酵食品業界^{21,22)}においては古くから用いられてきた技術であり、酵素の抽出・精製といった操作を必要としない効率的な方法である。現在みそ・醤油・清酒・しょうちゅうの原料となる米・麦・豆などの麹に利用されている麹菌はほとんどが *Aspergillus* 属の麹菌²³⁻²⁵⁾である。また、東南アジアの大豆発酵食品であるテンペにはテンペ菌(*Rhizopus oligosporus*)が、オンチヨムなどにはアカパンカビの一種であるオンチヨム菌(*Neurospora intermedia*)が使われている²⁶⁻²⁸⁾。これらの菌は様々な酵素を生産し、原料穀物のデンプンやタンパク質を分解して酵母の栄養源となるブドウ糖やアミノ酸を供給するとともに、カビの生産するビタミンなどの栄養素により酵母の増殖・発酵を促進し、さらには目的とする発酵食品の香味にも影響を与える。このように、麹菌に代表されるカビの利用は伝統的な発酵食品を製造する上で最も目的に叶った菌種を選抜・選択してきた結果であり、その努力は現在も続けられている^{29,30)}。そこで、リンゴ搾り粕を原料としてカビを培養し、生産された酵素(液体麹)により、リンゴ搾り粕を糖化する技術について検討した。

リンゴを発酵させ、蒸留して得られる飲料としては、主にヨーロッパで造られるアップルブランデーおよびカルバドス³¹⁾がある。カルバドスはノルマンディ地方カルバドス県で

作られるアップルブランデーの名称である。これらはすでに商品として流通しており、こうした既存商品より優れた嗜好性を有するフレーバーを安価に製造し、既存のアップルブランデーにはない特徴を付ける必要がある。アルコール飲料の発酵生産において、製品の香りを特徴づけるのは、原料由来の香りと発酵過程で酵母が生産する香気成分であり、発酵過程で酵母が生産するカプロン酸エチルなどの香気成分は、清酒やしょうちゅうでは製品の品質向上の要因として重要視されている。一方、果実酒の分野では、原料由来の果実香が重視され、酵母の生成するエステルは不必要なものとして扱われている。従って、果実由来の香りに加えて清酒酵母の生産するカプロン酸エチルなどの芳香を有するフレーバーアルコールに関する研究は行われていない。このような現状を鑑み、本研究では清酒用に変異株から選抜されたカプロン酸エチル高生産酵母 3703-7 株を使用してリンゴ搾り粕から既存商品にはない嗜好性の優れたフレーバーアルコールの製造の可能性について検討した。

3703-7 株は、青森県工業試験場（現青森県工業総合研究センター弘前地域技術研究所）保有の清酒酵母を泡なし化した変異株 3703 株を親株とし、財団法人日本醸造協会に委託して育種した変異株であり、いずれも実用株としての使用実績がある。しかし、3703-7 株は、変異株であることの確認、セルレニン耐性を持つこと、清酒もろみ中でカプロン酸エチルを多く生産すること以外に親株との生理的特性の違いについてはほとんど検討されていない。よって、本変異株の特性についても検討した。

この研究は以下の3つの部分から構成される。

第一に、リンゴ搾り粕の水不溶性成分を可溶化し、酵母の利用できる糖類を効率的に生成するカビを選抜し、液体麹によりリンゴ搾り粕の糖化を検討すると共に酵母の選抜を行いエタノール発酵、芳香物質の生産について検討した。

第二に、カプロン酸エチル高生産酵母 3703-7 株の細胞形態学的生理学的特徴と、変異株の遺伝子の特徴をマイクロアレイ解析により検討した。

第三に、カプロン酸エチル高生産変異株 3703-7 株によりリンゴ搾り粕糖液を発酵させ、リンゴの香りとカプロン酸エチルの芳香を有するフレーバーアルコールの発酵条件を検討した。

第2章 カビ由来の酵素液を用いたリンゴ搾り粕からのエタノール生産性の向上

第1節 序論

リンゴジュース製造は、10月下旬から始まって5月初めごろまで続くが、その間生成されるリンゴ搾り残渣は2万5千トンにも及ぶ。これだけの量が短期間に生成されるリンゴ粕をバイオマスとして商業的に利用する場合の課題として、1. 排出される時期が限定され、設備の稼働率が悪い、2. 自己消化により軟化・泥状化するため、貯蔵や運搬等の取り扱いが難しい、3. 水分・糖分が多く腐敗しやすい、4. 含まれる糖分が保水性を持つため、乾燥・粉末化に費やす経費が高い、などの要因が挙げられる。これらの課題を克服するためには、簡単な設備で、比較的短時間のうちにリンゴ搾り粕の多糖類を分解し、生成した糖類を利用するシステムを構築する必要がある。本研究はこうした課題を解決するという見地から、発酵食品製造における麴を応用し、リンゴ搾り粕でカビを培養した培養液を「液体麴」として利用することにより、効率的にリンゴ搾り粕の不溶性糖類を糖化する技術開発を行った。

バイオマス等、糖質原料に含まれる多糖類を加水分解して単糖類を得る方法は、化学的分解^{32,33)}または酵素³⁴⁾およびこれらの技術の組み合わせ³⁵⁻³⁷⁾を用いるのが一般的である。しかしながら化学的分解法は、高温高圧、強酸や高アルカリ等の激しい条件を必要とするばかりでなく、前後の処理（中和等）が煩雑であり、反応条件によっては生成した単糖類が副反応を起こすため収率が悪くなるなどの問題がある。一方、酵素剤を用いる方法は、穏和な条件下で安全に分解反応を進めることが可能であるが、一般的に酵素剤が高価であり、高分子多糖類を分解する酵素は固定化などの方法により連用することが難しく使い切りになってしまうため、コストの面での問題を抱えている。これに対し、原料でカビを培養し生成する酵素を精製せずにそのまま用いて原料を分解する麴利用技術は、糖質原料と酵素を生産する菌のみを利用し、その他の原料や酵素剤などを必要としない安価で効率的な方法である。

液体麴製造に利用するカビについては、基質を良く分解して発酵性糖類を生産することと、食品としての安全性という観点から、*Botrytis cinerea* について検討することとした。不完

全菌の一種である *Botrytis cinerea* は、灰色カビ病菌として知られる多犯性の植物病原菌³⁸⁻⁴¹⁾であり、宿主に感染する際に多くの酵素を分泌することが報告されている⁴²⁻⁴⁴⁾。当研究室の佐々木らは、*Botrytis cinerea* の β -グルコシダーゼとリンゴに対する病原性との関連性について研究し、 β -グルコシダーゼの活性とリンゴに対する感染性の間に正の相関があること、精製した β -グルコシダーゼが単独でリンゴ組織を分解すること、および、 β -グルコシダーゼがリンゴの粗繊維画分またはセルロースにより誘導される事を明らかにしている⁴⁵⁻⁴⁸⁾。こうした知見は、リンゴ搾り粕を培地として液体麴を生産する目的に *Botrytis cinerea* が利用できる可能性を示唆している。

また、*Botrytis cinerea* はブドウに感染した場合、ブドウ果実表面のワックス層を分解して水分蒸発を促進することにより、エキス分の濃縮した果実「貴腐ブドウ」を作り出すことが知られている⁴⁹⁻⁵¹⁾。この貴腐ブドウは高級ワインである「貴腐ワイン」を醸出するために利用されていることから、*Botrytis cinerea* はすでに食品に利用されている安全なカビと位置づけることが出来る。このことは、生産した糖類およびそれを原料とした発酵生産物が、そのまま食品として利用出来ることを示しており、付加価値の高いフレーバーアルコールを生産するという本研究の目的に最適の菌種であるといえる。

本章では、リンゴ搾り粕を培地として *Botrytis cinerea* を培養することにより液体麴を調製し、リンゴ搾り粕から資化性糖を効率的に得る条件を明らかにするとともに、リンゴ搾り粕から生成された糖液から酵母によるアルコール発酵を行うことについて検討した。

第2節 リンゴ搾り粕の成分組成

1. 目的

リンゴ搾り粕の主成分は多糖類および可溶性糖類であることがすでに知られている³⁾。多糖類はペクチン、セルロース、ヘミセルロースが主体であり、可溶性糖類はグルコース、フルクトース、シュクロースなどが含まれると言われている。加藤らは細胞壁を構成する多糖に違いはみられないが、ペクチン含量に品種間差がみられることを報告しており⁵²⁾、また、真壁は果実の栽培条件、成熟の度合いによってペクチン含量が0.5~1.6% (新鮮物当たり)程度変動することを報告している⁵³⁾。これらの知見から、本研究に使用するリンゴ搾り粕の全量を一回にまとめて採集し、不溶性糖類および可溶性糖類の組成を測定した。

2. 実験材料及び方法

2-1 リンゴ搾り粕試料

平成18年1月に、青森県果工(株)でふじを主体とするリンゴ果実を破碎搾汁し、果汁を製造した残りのリンゴ搾り粕を用いた。リンゴ搾り粕は30kgを分譲していただき、全体をよく混ぜた後、500gずつビニール袋に分取し、-30℃ストッカーに保存した。

2-2 リンゴ搾り粕の水分の定量

アルミニウム製秤量器(蓋付)に試料を分取し、105℃常圧または65℃減圧下で恒量となるまで乾燥し、乾燥前後の秤量値から固型分および水分を算出した。

2-3 リンゴ搾り粕の分画

加藤らの方法⁵⁴⁾に準じた。リンゴ搾り粕30gに90ml蒸留水を添加し、ミキサー処理後、8,000rpm、30分遠心分離により上清と沈殿に分画した。沈殿画分に、90ml蒸留水を添加し、同様に遠心処理を2回繰り返し、得られた上清および沈殿を、上清画分、沈殿画分

(P1 画分) とした。

P1 画分 2.5 g

↓ +100ml 0.25% シュウ酸アンモニウム

↓ 95℃ 3 時間攪拌抽出

吸引ろ過

沈殿画分を P2 画分とした

P2 画分 2 g

↓ +200ml 24% KOH

↓ 40℃ 2 時間抽出

吸引ろ過

沈殿画分を P3 画分とした

2-4 リンゴ搾り粕不溶性糖類の定量

2-3 で分画した P1、P2、P3 画分を 105℃ で恒量となるまで乾燥して重量を測定し、計算により以下のとおり不溶性糖類の量を求めた

重量 (P1 - P2) : ペクチン画分

重量 (P2 - P3) : ヘミセルロース画分

重量 (P3) : セルロース画分

2-5 リンゴ搾り粕可溶性糖類の定量

2-4 で得られた上清画分を溶離液で希釈後、0.45μm メンブランでろ過し、液体クロマトグラフ (HPLC) に供した。

HPLC 条件

カラム: NH2P-50 4E (4.6mmID×250mm) (Shodex, Japan)

機器構成: コントローラー;W600E (Waters, USA)
ポンプ;solvent delivery system model6000A (Waters, USA)
オートサンプラー;L7200 (HITACHI, Japan)
検出器;Model 5040 (ESA, USA)
記録装置;CR8A (SHIMADZU, Japan)
溶媒: アセトニトリル/水=(75:25)
流速: 0.7ml/分
分離温度: 40 °C
検出器: ECD
注入量: 5 µl
内部標準物質: ラクトース

3. 結果と考察

試料に使用したリンゴ搾り粕の成分組成を水不溶性成分と水可溶性成分に分け測定した。その結果を Fig2-1 に示す。リンゴ搾り粕は 80.0%が水分であり、水不溶性成分は 8.5%、水可溶性成分は 11.5%であった。水不溶性成分ではペクチンが 4.9%と最も多く、ヘミセルロースは 1.0%、セルロースは 2.6%であった。分析結果からリンゴ搾り粕の水不溶性成分の主要な成分は多糖類であった。リンゴ搾り粕の多糖類について市田ら³⁾、Hang⁵⁴⁾、Noroら⁵⁵⁾が Table 2-1 に示すように分析しているが、いずれの報告においても構成多糖類はペクチン、ヘミセルロース、セルロースであり、含量としてはペクチンが最も多く、ついでセルロースが多いことを示している。これらの結果は、微生物の生産する酵素を利用してリンゴ搾り粕のペクチンやセルロースなどの多糖類は発酵性糖類に転換出来ることを示唆している。

リンゴ搾り粕に含まれる水可溶性成分はほとんどが糖類であり、その組成はフルクトース 7.3%、グルコース 3.4%、シュクロース 0.6%と、全体の 68%をフルクトースが占めていた。Noroら⁵⁵⁾は、リンゴ搾り粕の水可溶性画分に含まれる糖類の構成比は、フルクトース：グルコース：シュクロース、56.6:9.7:31.1 としている。これらの値は、リンゴ果汁の糖組成比（フルクトース 5-6%、グルコース 2-4%、シュクロース 2-3%）と同様⁵⁶⁾で、フルクトースが全体の半分以上を占め、ついでグルコース、シュクロースの順に多く含まれていた。

以上の結果から、リンゴ搾り粕の水不溶性多糖類はペクチン・ヘミセルロース・セルロー

スであり、ペクチン>セルロース>ヘミセルロースの順に多く含まれること、これらの多糖類は微生物の生産する酵素によりグルコース、ガラクトースやフルクトースなどの発酵性糖類に分解されること、可溶性糖類はリンゴ果汁と同様フルクトース・グルコース・シュクロースであり、フルクトースが全体の半分以上を占めることが明らかになった。これらの結果はリンゴ搾り粕は発酵性糖類を多く含み、アルコール生産に適した原料であることを示唆している。

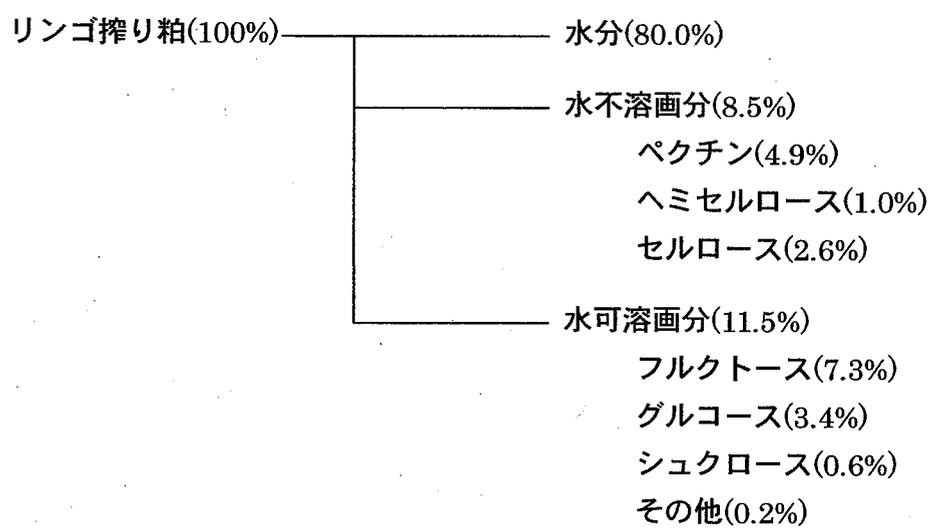


Fig.2-1 リンゴ搾り粕の成分組成

Table 2-1 リンゴ搾り粕の繊維分

	粗繊維	ペクチン	リグニン	ヘミ セルロース	セルロース	文献
リンゴ搾り粕	8.5%	4.9%	N.D	1.0%	2.6%	市田ら ³⁾
リンゴ搾り粕乾物	15.3-20.6%	15.0-18.0%				Hang ⁵⁴⁾
リンゴ搾り粕	6.24%	2.84%		1.99%	1.41%	Noro ら ⁵⁵⁾

第3節 液体麹製造用カビ菌株の選抜

1. 目的

前節では、リンゴ搾り粕の水不溶性多糖類は、ペクチン、セルロースとヘミセルロースが主要な成分であることを確認した。リンゴ搾り粕に含まれるペクチンは最も多い多糖類であるが、リンゴペクチンを微生物や酵素により分解することによりグルコース、ガラクトースなどの発酵性糖類が生成される⁵⁷⁾。植物細胞の細胞壁は微生物や酵素により分解が困難なセルロース、ペクチンとヘミセルロース複合体から構成されているが、細胞壁組織のペクチンとヘミセルロース複合体を分解することによりセルロースが分解され、細胞壁が崩壊することが明らかにされている⁵⁸⁾。これらの研究からリンゴ搾り粕に含まれるペクチンの分解が発酵性糖類を得るうえに重要な作用であると考えられる。

そこで、ペクチンまたはセルロースのみを炭素源とする培地を用いて、これらの培地上で生育の良いカビ菌株を選抜することを検討した。

2. 実験材料及び方法

2-1 菌株

研究室保有菌株のうち、*Botrytis cinerea* 5株 (30915株、7181株、7186株、5365株、9397株)、*Aspergillus oryzae* 1株、*Aspergillus niger* 1株を用いた。

2-2 培地

・ペクチン培地	
ペクチン (リンゴ製)	0.5%
NaNO ₃	0.2%
K ₂ HPO ₄	0.1%
KCl	0.05%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001%

・ CMセルロース培地

CM セルロース	0.5%
NaNO ₃	0.2%
K ₂ HPO ₄	0.1%
KCl	0.05%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001%

蒸留水に培地を加えて pH4.5 に調整後、アガロース 2%を加えてオートクレーブ（120℃、20分）滅菌し、斜面培地に調製した。

2-3 培養と生育の判定

各培地に各菌株を穿刺により植菌し、*B. cinerea* は 15℃、*A. oryzae* および *A. niger* は 30℃で1 2日間培養し、菌糸の生育を－（生育せず）～++++（生育良好）の6段階で判定した。

2-4 *B. cinerea* の顕微鏡観察

斜面培地から採取した菌体のプレパラートを作製し、光学顕微鏡 BX50（OLYMPUS, Japan）を用いて 400 倍で検鏡した。写真撮影は全自動写真撮影装置 P M 30（OLYMPUS, Japan）を用いた。

3. 結果と考察

ペクチン培地とCMセルロース培地に *Botrytis cinerea* 各菌株、*A. oryzae* と *A. niger* を培養し、経時的に生育を観察した。その結果を Table 2-2 に示す。ペクチン培地では、*B. cinerea* 30915 株が最も生育良好であり、他の菌株では培養4～8日目以降は菌糸の伸長が停滞したのに対し、培養8日目以降も菌糸の伸長が見られた。*B. cinerea* 30915 株はCMセルロース培地においても、培養1 2日目まで菌糸の伸長を維持したのに対し、他の菌株で

は培養4日以降は菌糸の伸長が鈍化した。また、*B. cinerea* 7186 株、*A. oryzae* および *A. niger* はCMセルロース培地では生育が悪かった。これらの生育観察の結果からペクチン培地とCMセルロース培地の両培地に最も良い生育を示したのは30915株であった。佐々木らは *B. cinerea* のペクチナーゼはリンゴ果実やリンゴの繊維成分を加えた培地で培養した時生産されるが、繊維成分以外にグルコース、アビセルやセロビオースを加えた培地でも生成されることを報告^{45,48)}している。彼らは、またリンゴ細胞組織の崩壊能の強い菌株ほどβ-グルコシダーゼ活性が高いこと、*B. cinerea* のβ-グルコシダーゼは、ヘミセルロース分解活性を有すること⁴⁶⁾を明らかにした。*B. cinerea* 30915株はペクチン、CMセルロース培地に最も良く生育した菌株であったが、佐々木らの研究結果に示されたリンゴ細胞組織の崩壊能の強い菌群に本菌株も含まれている。*B. cinerea* 30915の光学顕微鏡写真をFig.2-2に示す。

以上の結果から、*B. cinerea* 30915株はリンゴ搾り粕からの発酵性糖類およびリンゴ搾り粕固形分の低減に有用な菌株であることが明らかになった。

Table 2-2 ペクチンおよびセルロース培地での各菌株の生育

菌株	ペクチン培地				セルロース培地			
	2日	4日	8日	12日	2日	4日	8日	12日
<i>B. cinerea</i> 30915	+	++	++++	+++++	+	++	+++	++++
<i>B. cinerea</i> 7181	+	+++	+++	+++	+	++	+++	+++
<i>B. cinerea</i> 7186	+	++	+++	+++	-	+	+	+
<i>B. cinerea</i> 5365	-	+	++	+++	+	++	++	+++
<i>B. cinerea</i> 9397	+	++	+++	+++	+	++	++	+++
<i>Asp. oryzae</i>	+	++	++	++	-	+	+	+
<i>Asp. niger</i>	+	++	++	++	-	+	+	+

ペクチンおよびセルロース0.5%を炭素源とする斜面培地に各菌株を植菌し、*B. cinerea*は15°C、*Asp. oryzae*および*Asp. niger*は30°Cで培養し、生育を-(生育せず)~+++++(生育良好)の6段階で判定した。

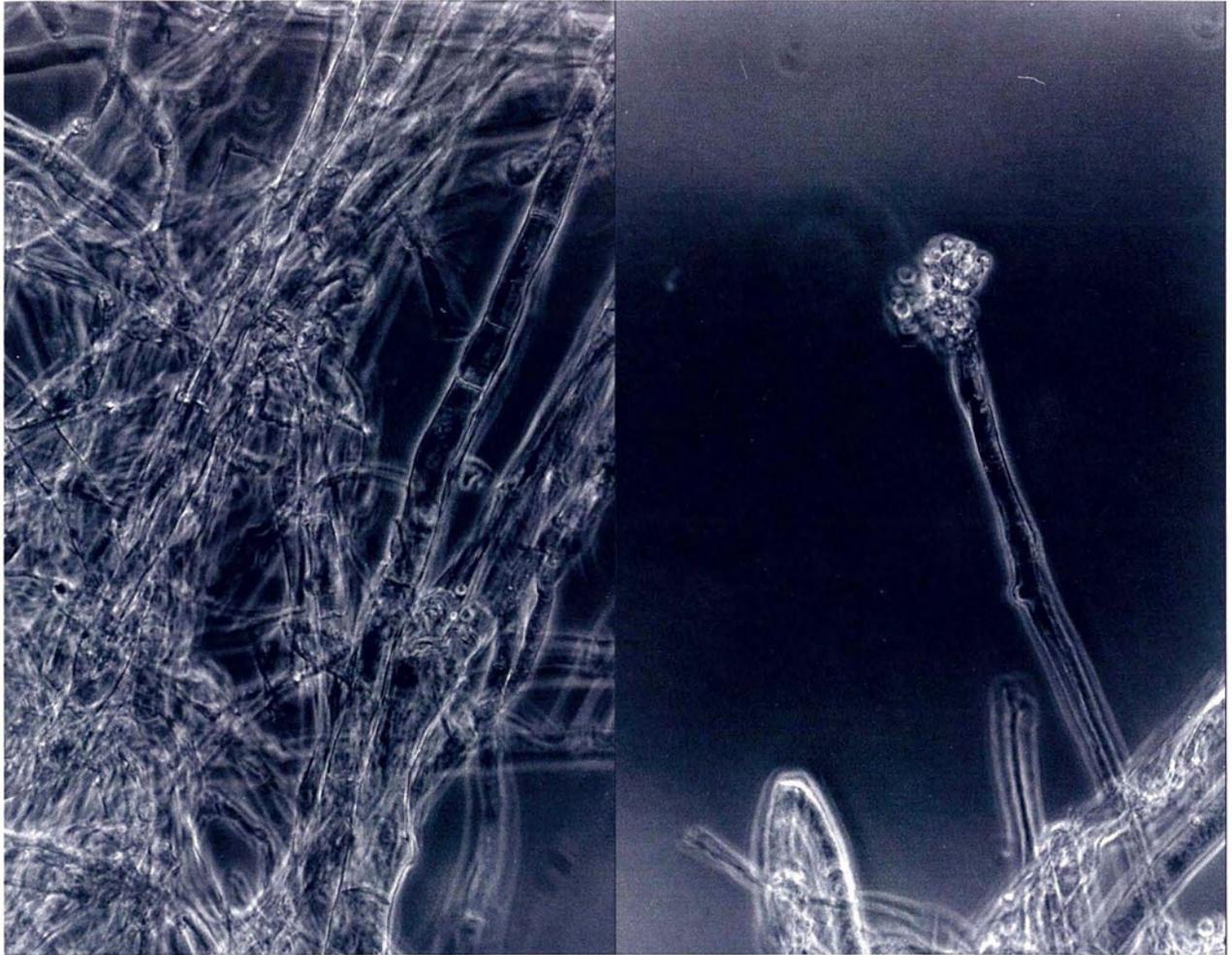


Fig. 2-2 *B. cinerea* 30915 株の光学顕微鏡写真

左は菌糸、細胞と細胞の間に隔壁が見られる。菌糸の幅は $5\sim 7\mu\text{m}$ である。右は分生子柄

第4節 *B. cinerea* 30915 株培養液から調製した液体麹によるリンゴ搾り粕の糖化

1. 目的

リンゴ搾り粕の多糖類成分であるペクチン、セルロース培地に良い生育を示す菌種は、*Asp. oryzae*, *Asp. niger* よりも *B. cinerea* であることを3節で明らかにした。

本節ではリンゴ搾り粕を基質とする培地で *B. cinerea* 30915 株を培養し、ペクチン、ヘミセルロース、セルロース等の分解活性の高い液体麹を製造し、効率的にリンゴ搾り粕から還元糖を生成する方法を検討した。

2. 実験材料及び方法

2-1 培地および培養方法

リンゴ搾り粕は、水分 80.40%を含む搾り粕試料を用いた。リンゴ搾り粕除糖残渣は、リンゴ搾り粕に2倍量の蒸留水を加えガーゼで搾り、これを3回繰り返した後の残渣(水分 91.5%)をリンゴ搾り粕除糖残渣試料として用いた。

1) リンゴ搾り粕培地およびリンゴ搾り粕除糖残渣培地

リンゴ搾り粕 またはリンゴ搾り粕除糖残渣 20%

NaNO ₃	0.2%
K ₂ HPO ₄	0.1%
KCl	0.05%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001%

培地 200ml を三角フラスコに入れ、シリコ栓をしてオートクレーブ(121℃、20分)で滅菌後、孢子懸濁液 2ml を加え、15℃、好気条件下(振盪;150rpm)で培養を行った。

2) 孢子懸濁液の調製

ペクチン培地(第2章第3節参照)を斜面培地に調製し、*B. cinerea* 30915 株を一白金耳量植菌し15℃で2週間培養後、滅菌水 10ml を加え、ボルテックスで攪拌し、孢子懸濁液とした。

2-2 液体麹の調製

リンゴ搾り粕培地およびリンゴ搾り粕除糖残渣培地で培養した *B. cinerea* 30915 株の培養

液を 8,000rpm, 20 分 遠心分離し、上清液を液体麴とした。

2-3 ペクチナーゼ活性

0.1%ペクチン（リンゴ製）を含む 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)2ml を 40℃20 分プレインキュベート後、液体麴 0.5ml を加えて 40℃振盪条件で 60~120 分反応後、生成したガラクトン酸を Milner-Avigod 法⁵⁹⁾により測定した。液体麴 1ml が 1 時間に 1 mg のガラクトン酸を生成する力価を 1 U とした。

2-4 還元糖生成活性

1.5 倍量の蒸留水を加えミキサー処理したリンゴ搾り粕除糖残渣 25 g に液体麴 20ml を加え、30℃振盪条件で 10~48 時間反応後、生成した還元糖を Somogyi Nelson 法⁶⁰⁾で測定した。

2-5 リンゴ搾り粕可溶性糖類の定量

第 2 章第 2 節に準じ、HPLC を用いて定量した。

2-6 培養液のガラクトン酸、タンパク質およびリンゴ搾り粕残渣の測定

1) ガラクトン酸

ガラクトン酸は Milner-Avigod 法⁵⁹⁾により測定した。

2) タンパク質

B.cinerea 30915 株をリンゴ搾り粕培地およびリンゴ搾り粕除糖残渣培地で培養した培養液のタンパク質は Bradford 法⁶⁰⁾により、bovine serum albumin を標準タンパク質として測定した。

3) リンゴ搾り粕残渣

B. cinerea 30915 株をリンゴ搾り粕培地およびリンゴ搾り粕除糖残渣培地で培養した培養液をろ過 (TOYO:No.5C) し、残渣を数回蒸留水で洗浄後、105℃で恒量となるまで乾燥し、重量を測定して残渣とした。

3. 結果と考察

1) リンゴ搾り粕から還元糖の生成

B. cinerea 30915 株をリンゴ搾り粕培地に培養し、生育に伴って変化するペクチナーゼ活性、ガラクトuron酸およびタンパク質を経時的に測定した。その結果を Fig.2-2 に示す。ペクチナーゼ活性は培養6日目から増大し、培養11日に最大活性を示した。それ以降、ペクチナーゼ活性は急速に減少した。ガラクトuron酸生成量はペクチナーゼ活性の増加とともに増大し、ペクチナーゼ活性が減少する12日以降は 1.6mg/ml 培養液とほぼ一定となった。

B. cinerea 30915 株の生育を示すタンパク質は培養5日目から増加し、培養10日目で最大 0.38μg/ml 培養液になった。これらの結果は、ペクチナーゼ活性は菌の生育と共に増加し、ペクチンの分解によってガラクトuron酸が生成されたことを示唆している。

ガラクトuron酸は還元性を持つ酸性糖であるが、リンゴペクチンはグルコースやガラクトース等の中性糖が含まれる多糖である。またリンゴ搾り粕の多糖類にはセルロース、ヘミセルロースが含まれるのでこれらの分解によりグルコースとキシロース等が生成される。これらの糖類はすべて還元性を持つことから、リンゴ搾り粕の水不溶性成分の分解を生成される還元糖を指標にして実験を行った。

リンゴ搾り粕培地に10日間培養した *B. cinerea* 30915 株の液体麴を用いてリンゴ搾り粕除糖残渣の分解によって生成される還元糖を経時的に測定した結果を、Fig.2-3 に示す。還元糖生成は反応24時間までほぼ直線的に増加し、48時間でほぼ終了した。48時間で生成した還元糖は、グルコースにして 5.67mg/ml 反応液であった。なお、反応時間を170時間まで延ばしても、生成する還元糖量はほとんど増加しなかった。リンゴペクチンにはガラ

クツロン酸以外に中性糖類が含まれていることが Quemener ら⁶²⁾、川端ら⁶³⁾、Noro ら⁵⁵⁾により明らかにされている。リンゴペクチンを構成する糖類を Table 2-3 に示す。いずれの報告においてもラムノース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトースとグルコースから構成され、それらの含量はトータルで 9.6%~16.7%に達する。中でも 6 炭糖ではガラクトースとグルコースが多く、5 炭糖ではアラビノースが多く含まれている。リンゴペクチンのこれらの中性糖類は 5 炭糖のキシロースおよびアラビノースを除きアルコール発酵に利用できる発酵性糖類である⁶⁴⁾。これらの報告は Fig.2-3 に示すリンゴ搾り粕の水不溶性成分から還元糖が生成されることを支持するものであり、*B. cinerea* 30915 株の液体麹を使用してペクチン、セルロースやヘミセルロースなどのリンゴ繊維成分を分解し、酵母の利用できる発酵性糖類を生産できることが示唆される。

2) リンゴ搾り粕の水不溶性成分の分解

B. cinerea 30915 株の液体麹によるリンゴ搾り粕の水不溶性物質からの還元糖生成についてペクチナーゼ活性を指標として示すことができたが、3 節で明らかにしたように本菌株によってセルロースとヘミセルロースも分解され、還元糖としてグルコースやキシロースも生成している。リンゴ搾り粕の水溶性糖類を除いた水不溶性成分の分解を明らかにするために生成する還元糖を指標にして実験を行った。

リンゴ搾り粕培地およびリンゴ搾り粕除糖残渣培地で *B. cinerea* 30915 株を 1 2 日間培養した液体麹の還元糖生成活性を測定した。その結果を Fig.2-4 に示す。リンゴ搾り粕培地から調製した液体麹では、還元糖の生成はペクチナーゼ活性とほぼ同様の傾向を示し、培養 6 日目から増大し、培養 8~10 日目で最大となり、その還元糖生成量は 7.94~8.33mg/ml であった。一方リンゴ搾り粕除糖残渣培地から調製した液体麹は、培養 4 日目まではほとんど糖化活性が無かったが、6 日目で急激に増加し、還元糖生成量はリンゴ粕培地の場合の 3.8 倍に当たる 10.74mg/ml に達した。その後、還元糖生成活性は徐々に減少したが、リン

ゴ搾り粕培地での還元糖生成活性に対し 1.2~1.3 倍という高い値を維持した。リンゴ搾り粕除糖残渣培地 6 日間培養の液体麹を作用させた後、基質として用いたリンゴ搾り粕除糖残渣の全固形分は、0.861 g から 0.276 g に減少し、生成した還元糖はトータルで 0.473g、分解した固形分 1g あたり 808.6mg であった。分解されないで残ったリンゴ搾り粕除糖残渣は 32%であった。

このときの還元糖組成を Table 2-4 に示す。定量された主要な還元糖は分解された固形分 1g あたり 549.4mg であった。生成した還元糖の中でグルコースは最も多く、分解されたリンゴ搾り粕除糖残渣 1g 当たり 312.0mg で、その比率は 56.8%であった。ついでフルクトースは 104.7mg で、19.0%であった。その次に多かったのはウロン酸で 12.5%であった。シュクロースは検出されなかった。残りの 11.7%はその他の中性糖であった。岩間ら⁵⁹⁾は、リンゴ搾り粕を市販のペクチナーゼで糖化することにより、残渣が 17.3%まで減少するとともにグルコース、酸性糖、フルクトース、その他の還元糖が生成したと報告している。これらの結果から、*B. cinerea* 30915 株の液体麹によってリンゴ搾り粕の水不溶性成分をおよそ 68%分解できることが明らかになった。

リンゴ細胞組織の分解にペクチン・ヘミセルロース複合体の分解が重要であることに関して、Pilnik⁵⁸⁾はリンゴ細胞壁のセルロースを分解するためにはセルロースを囲むペクチンとヘミセルロースの分解が必要であることを報告している。Rha ら⁴⁰⁾は炭素源としてミカンペクチン含有培地で培養した *B. cinerea* から分泌するエンド型ポリガラクトナーゼのポリクローナル抗体を調製し、キュウリ葉の組織浸解にペクチン分解が重要な役割を果たすことを明らかにしている。Have⁴³⁾はエンド型ポリガラクトナーゼ(*Bcpg1*)遺伝子欠損株は病原性が微弱であること、また Wubben ら⁶⁵⁾は、*B. cinerea* の発現する 6 つのエンド型ポリガラクトナーゼ遺伝子の一つはグルコースなどの、より利用されやすい炭素源で抑制されることを報告している。本研究で可溶性糖類を除いたリンゴ搾り粕を用いて調製した液体麹の方がより早く、より高い還元糖生成能を発現したことは、利用されやすい炭素源を除くことによりリンゴ繊維成分を分解す

る酵素が抑制を受けなかったことによると考えられる。

以上の結果から、リンゴ搾り粕除糖残渣を加えた培地に *B. cinerea* 30915 株を培養することにより、リンゴ搾り粕から発酵性糖類を生産する液体麹が得られることが明らかになった。

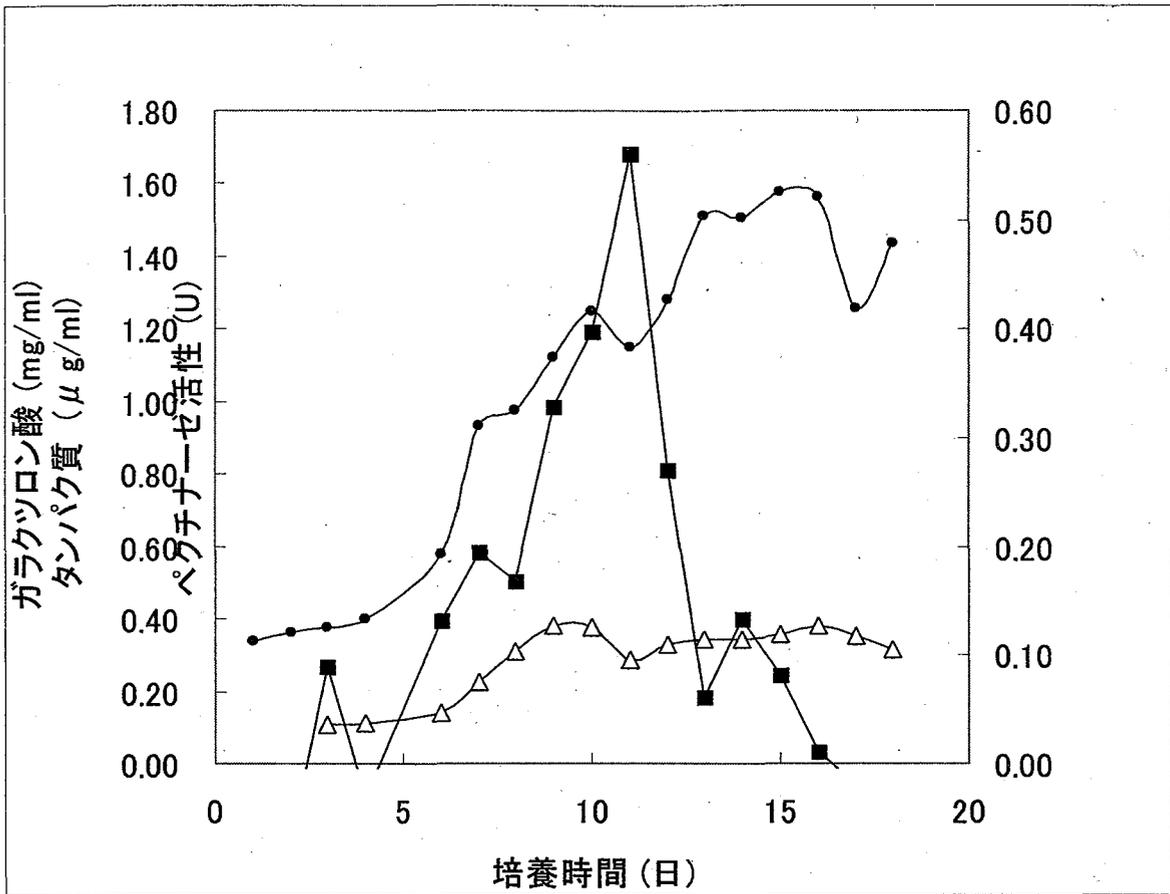


Fig.2-2 *B. cinerea* 培養によるリンゴ搾り粕培地のガラクトツロン酸、タンパク質およびペクチナーゼ活性の経時変化。

●; ガラクトツロン酸 (mg/ml), △;タンパク質 (μg/ml), ■; ペクチナーゼ活性 (U)

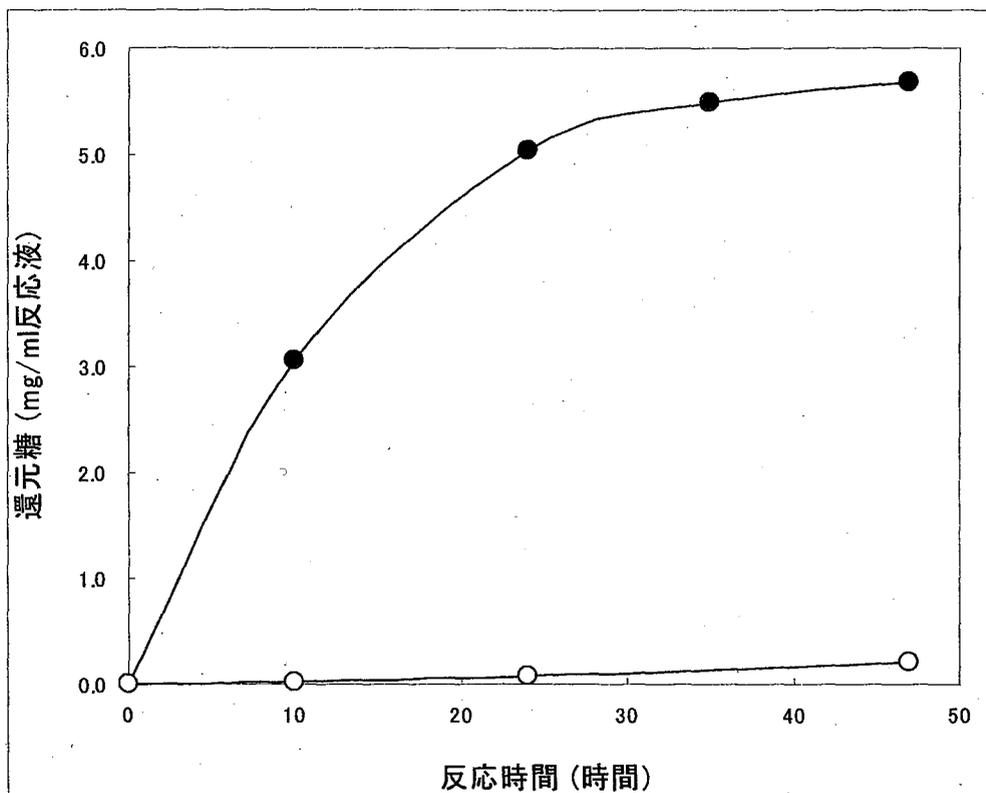


Fig.2-3 液体麹によるリンゴ搾り粕からの還元糖の生成

●; リンゴ搾り粕+液体麹, ○;リンゴ搾り粕+水

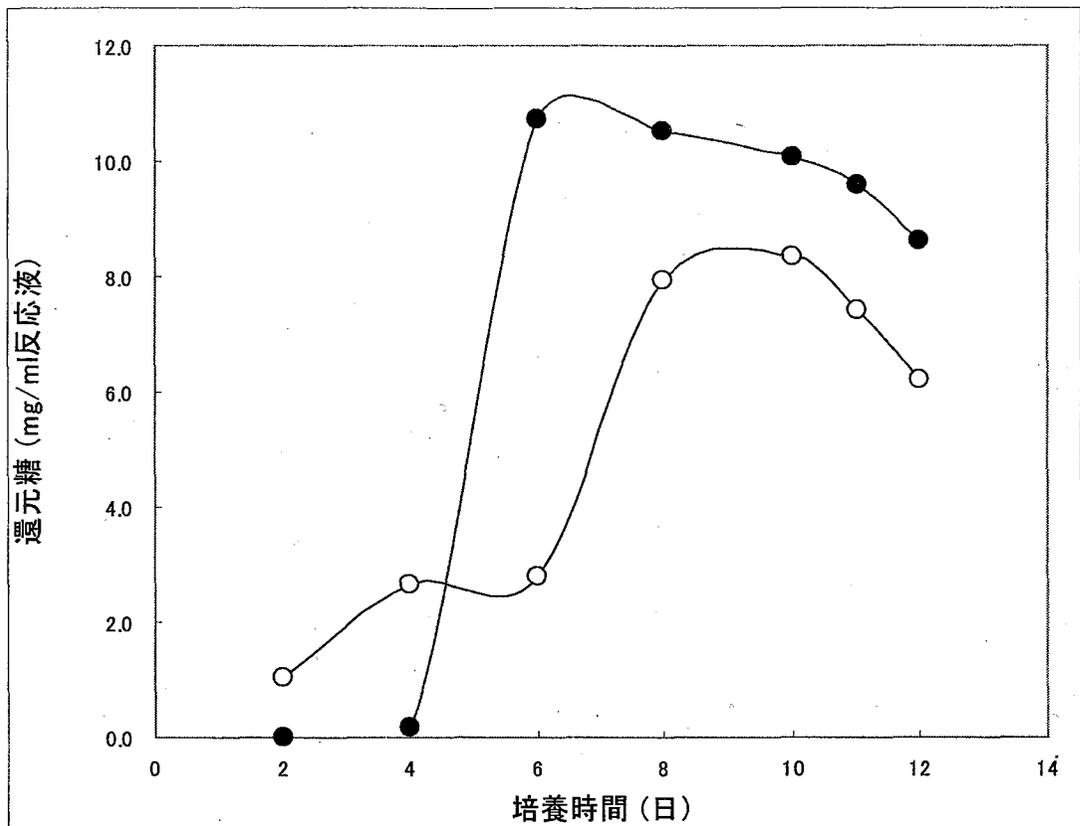


Fig.2-4 *B. cinerea* 培養によるリンゴ搾り粕培地およびリンゴ搾り粕除糖残渣培地の還元糖生成活性の経時変化。

○; リンゴ搾り粕培地, ●; リンゴ搾り粕除糖残渣培地

Table 2-3 リンゴペクチンの構成中性糖組成(%)

ラムノース	アラビノース	キシロース	マンノース	ガラクトース	グルコース	文献
2.1	1.0	1.2	0.1	2.5	3.5	Quemener et al ⁶²⁾
0.2	6.8	0.5	-	6.8	2.4	川端ら ⁶³⁾
0.8	6.2	0.0	0.1	2.0	0.5	Noro et al ⁵⁵⁾

Table 2-4 リンゴ搾り粕除糖残渣から生成した還元糖の組成

全還元糖	ウロン酸	グルコース	フルクトース	シュクロース	その他
54.94	6.86	31.20	10.47	0.00	6.42

リンゴ搾り粕除糖残渣の乾物重100gから生成した量(g)で示した。

第5節 リンゴ搾り粕の液体麹による糖化とアルコール発酵

1. 目的

前節でリンゴ搾り粕の水可溶性画分および水不溶性画分から、発酵性糖類が得られることを明らかにしたので、リンゴ搾り粕に液体麹および研究室保有の酵母を添加し、リンゴ搾り粕の糖化と発酵を並行的におこなう方式でのアルコール生産を検討した。

また、吟醸酒芳香の主要な成分であるカプロン酸エチル高生産性酵母をリンゴ搾り粕の液体麹による糖化液で培養し、カプロン酸エチルに加えて酢酸イソアミル、酢酸エチル等の吟醸香を多く含むフレーバーアルコールの生産について検討した。

2. 実験材料及び方法

2-1 菌株

研究室保有の *Saccharomyces cerevisiae* (kw4 株、3703 株および 3703-7 株) を用いた。リンゴ搾り粕糖化液のアルコール発酵には、市販されているワイン醸造用の実用株である kw4 株を試験に供した。また、リンゴ搾り粕抽出液からのフレーバーアルコール生産には、カプロン酸エチル高生産変異株 3703-7 株と、対照としてその親株である 3703 株を供した。

2-2 培地及び発酵

リンゴ搾り粕 10g(湿重、水分 80.0%)と蒸留水 15ml を三角フラスコに入れ、pH4.0 に調整後オートクレーブ滅菌した。室温に冷却後、液体麹(リンゴ粕除糖培地で *B.cinerea* 30915 株を8日間培養)50ml を添加し、リンゴ搾り粕糖化液培地とした。

リンゴ搾り粕糖化液培地に *S. cerevisiae* kw4 株を 1×10^6 cell/ml となるよう添加し、シリコ栓を施して 30℃、4 日間振盪培養(125rpm)を行った。対照としては、蒸留水のみを加えた培養、蒸留水と酵母を添加した培養、および液体麹のみを添加した培養を行った。

2) リンゴ搾り粕糖化液のアルコール発酵

リンゴ搾り粕 10g(湿重、水分 80.0%)と蒸留水 15ml を、pH4.0 に調整後オートクレーブ滅菌した。オートクレーブ滅菌後、液体麹(リンゴ搾り粕除糖培地で *B. cinerea* 30915 株を8日間培養) 50ml を添加し、30℃4 日間振盪(125rpm)下で糖化反応を行った。反応終了後、8,000rpm、20 分 遠心分離し、上清を回収しリンゴ搾り粕糖化液とした。このときのリンゴ搾り粕糖化液の還元糖濃度はグルコース相当で 3.81%であった。リンゴ搾り粕糖化液をバイアル瓶(125ml 容)に分注してオートクレーブ滅菌し、*S. cerevisiae*3703 株および 3703-7 株を 10^6 cell/ml となるよう植菌した後、香气成分の揮散を防ぐためブチルゴム栓とアルミシールで密栓を施して 15℃、7日間静置培養を行った。

2-3 生成アルコールの定量

蒸留とガスクロマトグラフへの直接注入法の組み合わせにより、微量アルコールの定量を行った。

サンプル 100 μ l に 20ml 蒸留水を加え、国税庁所定分析法⁶⁵⁾に準拠した蒸留器で、留液 15ml 以上回収し、20ml に fill up した。留液 900 μ l に内部標準液(1000ppm n-アミルアルコール) 100 μ l 添加し、試料とした。試料 10 μ l をガスクロマトグラフに直接注入し、下記条件で分離定量を行った。なお、標準には 5%エタノール水溶液を、上記方法で蒸留調製したものをを用いた。

ガスクロマトグラフ条件

本体：HP 7694 型 (HEWLETT PACKARD, USA)
カラム：HP INNOWAX(Polyethylene Glycol) 30m
検出器：FID
条件：オープン初期温度 50℃
昇温 10.0 ℃/分
終温 230℃ (5 分間保持)

カラム流速 4.22ml/分
インジェクター温度 250℃
検出器温度 300℃

2-4 香気成分の定量

ガスクロマトグラフ（ヘッドスペース法）で行った。ガスクロマトグラフ条件は 2-3 と同じである。サンプル 3ml を 10ml 容バイアルビンに入れ、NaCl 1g および 200 μ l 内部標準物（50ppm カプロン酸メチル、100ppm n-アミルアルコール）を添加、プチルゴム栓を付け、アルミシールで密封後、オートサンプラー-HP7694 (HEWLETT PACKARD, USA) にセットした。サンプルは 80℃、20 分プレインキュベート後、ヘッドスペース 10 μ l がガスクロマトグラフに導入された。

3. 結果と考察

1) リンゴ搾り粕からのエタノール発酵に対する液体麴による糖化効果

リンゴ搾り粕に液体麴と *S. cerevisiae* kw4 株を添加し、30℃でリンゴ搾り粕の水不溶性成分（ペクチン、セルロース、ヘミセルロース等）の糖化とエタノール発酵を行った。その結果を Fig.2-5 に示す。アルコールは酵母を添加した場合のみ生成され、蒸留水のみを添加した培養液と液体麴のみを添加した培養液では検出されなかった。アルコール発酵 1 日目は液体麴無添加、添加培養液で 0.35% とほぼ同量のエタノールを生成したが、2 日目では液体麴無添加の 0.57% に対し、液体麴添加では 0.82% と 1.44 倍のエタノールが生成した。4 日まで培養時間を延ばしても、生成エタノールの増加は見られなかった。2 日間培養で生成したエタノールはリンゴ搾り粕(乾重)100g 当たりで、液体麴無添加で 16.89g、液体麴添加では 24.30g であった。これらの結果は、液体麴と酵母の添加によりリンゴ搾り粕からの還元糖生成とエタノール発酵が並行的に行われ、液体麴により生成した糖類を酵母が資化することにより、エタノールが生成したことを示唆している。*B. cinerea* は、リンゴ搾り粕の糖化およびアルコール発酵を行う30℃

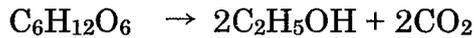
では生育は著しく不良であり^{67,68)}、また、リンゴ搾り粕の糖化の過程で生成するガラクトン酸により培養液の pH が 3.3~3.5 まで低下するので、培養液中の糖類が *B. cinerea* や汚染菌により消費されることなくエタノール発酵に利用される液体麹菌として有利な点を持つ糸状菌であることを示唆している。

リンゴ搾り粕からのエタノール生成について Hang⁵⁴⁾は、リンゴ搾り粕を基質とした野生酵母による発酵では 30°C、96 時間の発酵でも少量のエタノールしか生成せず、アルコール発酵を促進するためには市販のワイン酵母を添加する必要があることを明らかにし、市販のワイン酵母を用いて 30°C、24 時間固体発酵を行うことにより、リンゴ搾り粕 kg(湿重、水分 66.4~78.2%) 当たり 29~40g のエタノールを取得したと報告している。Hang の報告した値と比較すると、液体麹無添加のリンゴ搾り粕から取得したエタノール量はほぼ同等の範囲にあり、液体麹添加によって Hang の報告の最大の値より 1.3 倍のエタノールを取得したことは、液体麹によるリンゴ搾り粕固形分の分解により発酵性糖類が増大したことに起因すると考察される。

2) リンゴ搾り粕の糖化液からのフレーバーアルコール生産

リンゴ搾り粕を液体麹で糖化した糖化液にカプロン酸エチル高生産性変異株、3703-7 株と親株、3703 株を培養し、エタノールと香気物質の生成を測定した。その発酵試験の結果を Table 2-5 に示す。15°C、7 日間の培養で生成されたエタノールは親株で 1.83%(v/v) 生成されたが、変異株は親株と比べて 1.56%(v/v) とわずかに少なかった。香気成分では、カプロン酸エチルは親株 0.24ppm に対し変異株では 0.71ppm とほぼ 3 倍量生産された。酢酸イソアミルおよび酢酸エチルの生成量は、親株でそれぞれ 0.17ppm、2.31ppm であり、変異株は 0.13ppm、1.85ppm であった。吟醸香の主成分であるカプロン酸エチルがリンゴ搾り粕から生成されることが明らかになった。

グルコースが完全にアルコールに変換された場合、グルコースの 51% 重量のエタノールが生成することが、計算から求められる。



本試験では、初発の還元糖濃度は 3.81%(w/v)であり、これがすべてグルコースで完全にエタノールに変換したと仮定すると生成するエタノール濃度は 1.94%(w/v)であるが、実際の生成したエタノールは、3703 株が理論値の 92.8%、3703-7 株が 82.5%であった。両酵母はほとんどのリンゴ搾り粕の糖化液に含まれる還元糖をエタノールに転換したと考えられるが、3703-7 株の方がエタノールの生成比率は低かった。

香気成分について宇都宮ら⁶⁹⁾は、清酒に添加したカプロン酸エチルの検知閾値は 0.12ppm、認知閾値は 0.27ppm であると報告している。本研究の発酵液でも、カプロン酸エチル濃度の高かった 3703-7 株の発酵液は 3703 株の発酵液に比較し、吟醸酒の芳香が感じられた。3703-7 株の発酵液を蒸留し、エタノール 40%まで濃縮した場合、香気成分の回収率がエタノールと同等であれば、カプロン酸エチル 17.75ppm を含むフレーバーアルコールが得られることになる。このフレーバーアルコールを清酒に 10%添加したとして、カプロン酸エチルの終濃度は 1.78ppm となる。この濃度は、清酒に吟醸酒の香りを付与するのに十分である。

これらの結果は、カプロン酸エチル高生産酵母を用いることによってフルクトース、グルコースとショ糖を多く含有するリンゴ搾り粕から吟醸酒の芳香を有するフレーバーアルコールが生産できることを示唆している。

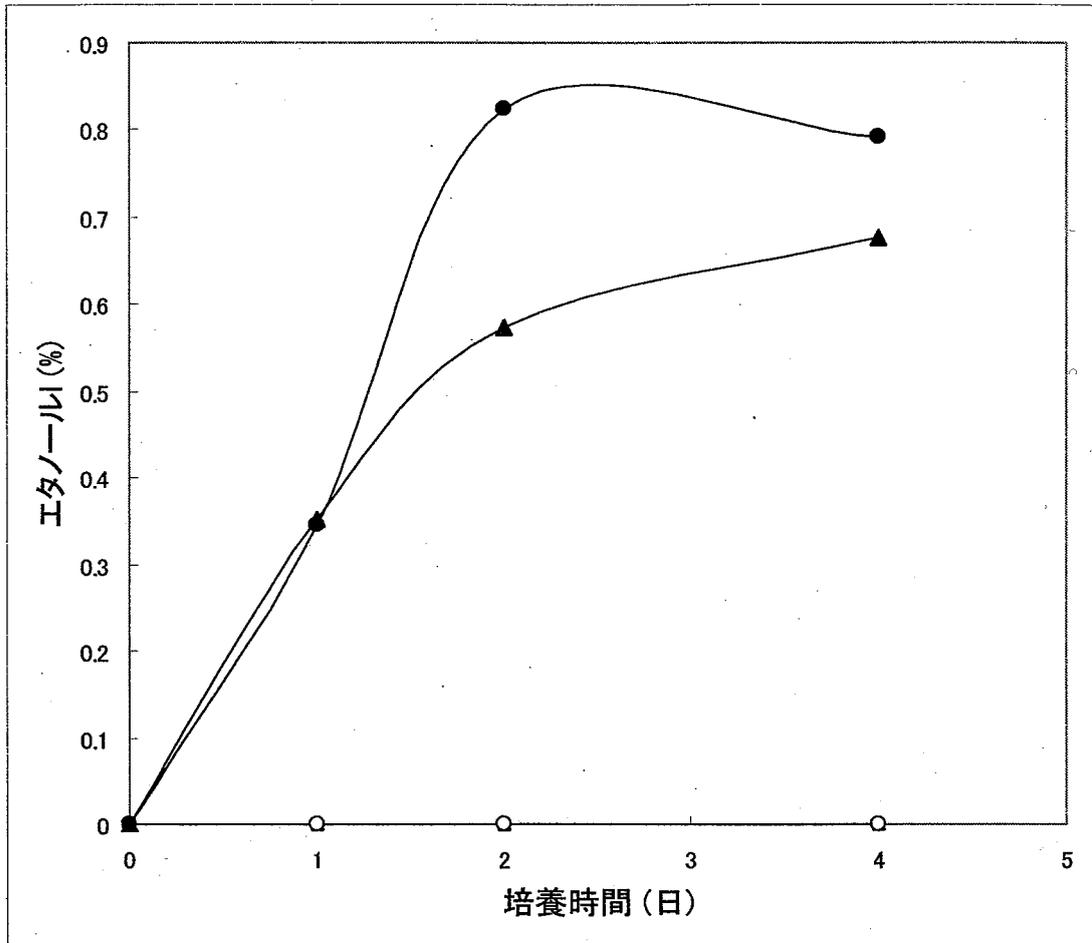


Fig.2-5 リンゴ搾り粕からのエタノール生産に対する酵母および液体麴の添加効果。

●;酵母+液体麴 ▲;酵母+蒸留水, ○; 液体麴のみ, △; 蒸留水のみ

Table 2-5 リンゴ搾り粕発酵液中のエタノールおよび香気成分。

成分		菌株	3703株	3703-7株
エタノール(%)			1.83	1.56
香気成分 (ppm)	カブロン酸エチル		0.24	0.71
	酢酸エチル		2.31	1.85
	酢酸イソアミル		0.17	0.13

リンゴ搾り粕糖化液に 3703 株および 3703-7 株を添加し、15℃7 日間静置培養を行った。

第6節 要約

リンゴ搾り粕に含まれる糖質の組成について分析した結果、リンゴ搾り粕の水不溶性多糖類はペクチン・ヘミセルロース・セルロースであり、ペクチン>セルロース>ヘミセルロースの順に多く含まれること、可溶性糖類はリンゴ果汁と同様フルクトース・グルコース・シュクロースであり、フルクトースが全体の半分以上を占めていた。ペクチン・ヘミセルロース・セルロースは微生物の生産する酵素により分解されること、およびペクチン・セルロースからはウロン酸や5炭糖などの非発酵性糖類とともに、グルコース、ガラクトースやフルクトースなどの発酵性糖類が生成することから、リンゴ搾り粕は発酵性糖類の供給源として、アルコール生産に適した原料であることを明らかにした。

リンゴ搾り粕の主要な水不溶性多糖類であるペクチンおよびグルコースを主成分とする難分解性多糖類であるセルロースを炭素源とした培地を用いて、菌糸の生育を指標として液体麹製造用の糸状菌菌株の選抜を行い、*B. cinerea* 30915 株を選抜した。この菌株をリンゴ搾り粕またはリンゴ搾り粕除糖残渣を炭素源として含む培地で培養した結果、リンゴ搾り粕除糖残渣から還元糖を生成する液体麹を作ることができた。

この液体麹とリンゴ搾り粕を用いてエタノール発酵を試みたところ、リンゴ搾り粕に液体麹と酵母を添加した場合も、液体麹により還元糖量が増加したリンゴ搾り粕糖化液に酵母添加を行った場合も、発酵によるエタノール生成が認められた。

3種類の酵母菌株を用いて、リンゴ搾り粕培地及びリンゴ搾り粕糖化液培地でエタノール発酵を行ったが、ほぼ同等のエタノールが生産され、発酵後のリンゴ搾り粕残渣は約32%まで減少した。またカプロン酸エチル高生産変異株 3703-7 株を用いた発酵では、親株と比較して多くのカプロン酸エチルが生成されることを明らかにした。

以上の結果から、リンゴ搾り粕に含まれる水可溶性糖類、および液体麹を作用させて糖化した糖化液はともにエタノール生産に利用できること、リンゴ搾り粕を糖化することにより固形分残渣が大幅に減少すること、カプロン酸エチル高生産酵母によりリンゴ搾り粕糖化液

を発酵させることにより、吟醸酒の芳香を有するフレーバーアルコールが生産できることを明らかにした。

第3章 カプロン酸エチル高生産酵母 3703-7 株の菌学的特徴

第1節 序論

カプロン酸エチル高生産株 3703-7 株は、青森県工業試験場（現青森県工業総合研究センター弘前地域技術研究所）保有の清酒酵母を泡なし化した変異株 3703 株を親株とし、財団法人日本醸造協会に委託して育種した変異株であり、いずれも実用株としての使用実績があることから本研究に供した。変異株の育種法は Ashida ら⁷⁰⁾および Ichikawa ら⁷¹⁾の方法を一部改変した方法で、親株をエチルメタンサルフォネートで変異処理後、セルレニンを含む培地に培養し、生育したコロニーを釣菌する方法である⁷²⁾。3703-7 株については、セルレニン耐性を持つことと、清酒もろみ中でカプロン酸エチルを多く生産すること以外、アルコール感受性などの生理的特性についてはほとんど検討されていない。こうした生理機能には多くの遺伝子が関与しており、それらの発現や抑制を個別に検討するには遺伝子欠損株の作成など、膨大な時間と、手間が必要とされるからである。

現在までに、セルレニン耐性により分離・育種された株は、清酒もろみ末期にエタノールの作用により発酵が緩慢になることにより清酒に余剰の糖分が残ったり、酵母の死滅により清酒中のアミノ酸が増えて味を悪くするということが報告されている⁷²⁻⁷⁵⁾。また、一般にエタノールは、酵母の細胞膜や膜に存在する酵素に影響を及ぼし、膜の構造や透過性を変化させること、カプロン酸エチルを合成する酵素は細胞質中に存在するアルコールアシルトランスフェラーゼおよび細胞膜に局在するエステラーゼ等複数の酵素が関わっていることが明らかにされている⁷⁷⁻⁷⁹⁾。芳醇な吟醸香を持つ清酒醸造用に作出された 3703-7 株は変異したことで糖耐性、エタノール耐性がどのように親株と違うのか、また 3703-7 株のセルレニンやシクロヘキシミドなどの抗生物質耐性と吟醸香芳香物質の生産について明らかにする。

近年、実験室酵母 *S. cerevisiae* S288C ゲノムの全塩基配列が決定したことにより、実験室酵母のすべての ORF に対応した DNA を固定化したマイクロアレイが作成されるようになり、酵母のゲノム構造や遺伝子発現を包括的に解析することが可能となった⁸⁰⁻⁸²⁾。本章で

は清酒酵母から取得した高香気生成変異株 3703-7 株と親株 3703 株を比較し、変異株の細胞形態学的特徴、生育特性、抗生物質耐性および DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現の特徴について検討を行った。

第2節 3703-7株の細胞形態学的特徴

1. 目的

カプロン酸エチルを高生産する変異株 3703-7 株と親株について、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて細胞形態学的観察を行った。

2. 実験材料及び方法

2-1 使用菌株

3703-7 株および対照として親株の 3703 株を用いた。

2-2 培地および培養方法

15%グルコースを含む YMP 培地 (1%酵母エキス 1%麦芽エキス、2%ポリペプトン) を、試験管に 10ml 分注後シリコン栓を施し、オートクレーブ滅菌した。この培地に酵母菌株一白金耳量を植菌し、30℃で2日間静置培養を行った。

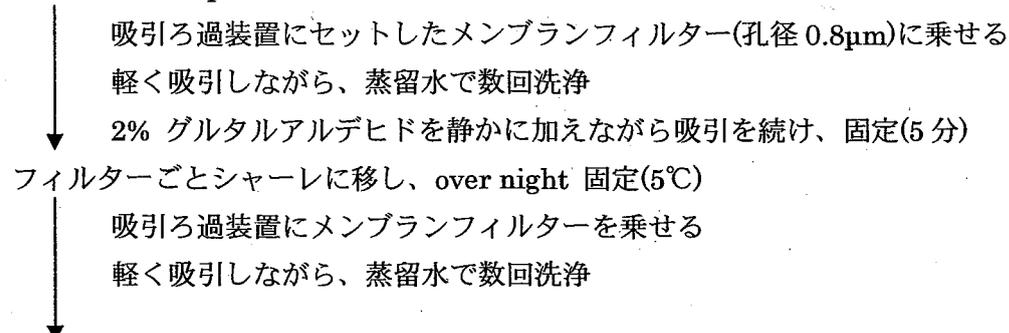
2-3 試料の調製

文献⁸³⁾に準じて試料の固定、脱水、有機溶媒置換を行った。

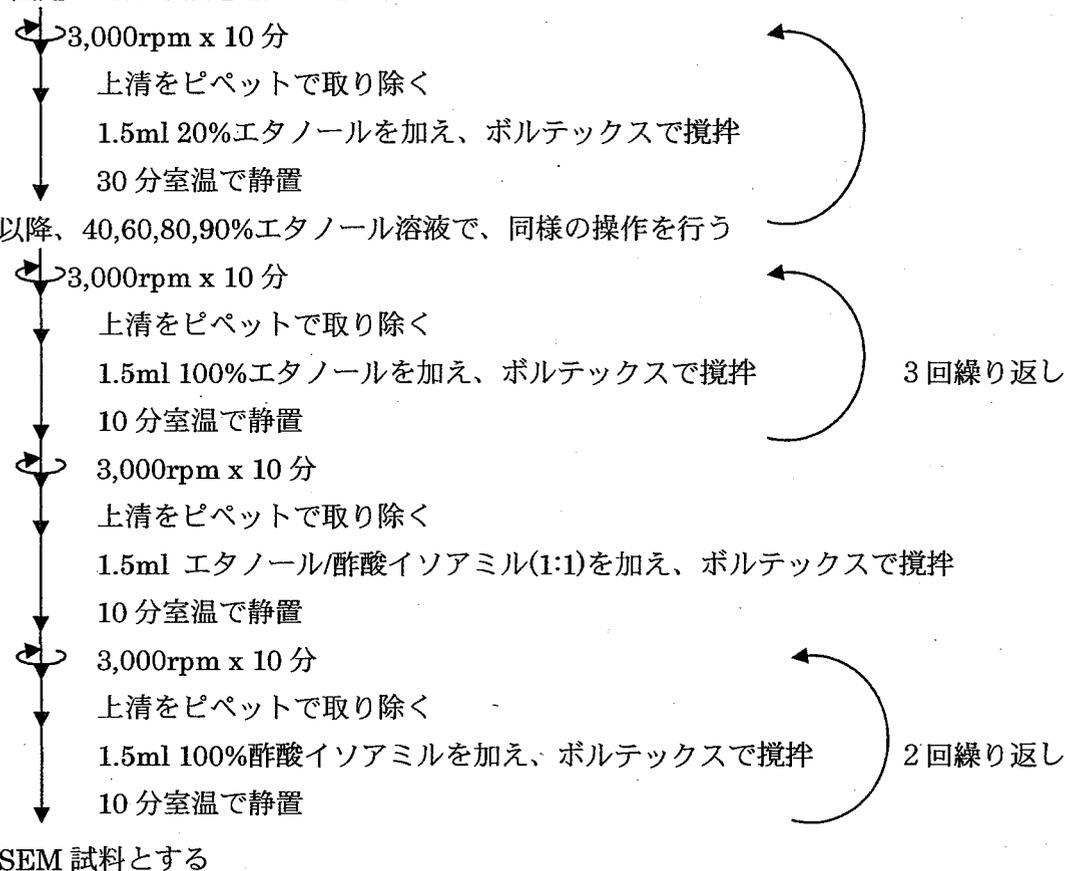
以下の操作に使う蒸留水、エタノール (99.5%) および酢酸イソアミルはすべてメンブランフィルター(酢酸セルロース、孔径 0.8 μ m)を通したものをを用いた。

1) 試料の固定、脱水、有機溶媒置換

酵母培養液 300 μ l



吸引を止め、蒸留水 500 μ l に細胞を分散させエッペンドルフチューブに移す(3回)
固定した酵母細胞を入れたエッペンドルフチューブ



2) 超臨界点乾燥および金属膜蒸着

操作はラテックス手袋を装着して行った。超臨界点乾燥は、JCPD-5(JOEL, Japan)を用いた。試料用かご(ϕ 20mm)に試料を移し、JCPD-5 の乾燥室にセット後、排気を開けた状態で炭酸ガスを注入し、排気から酢酸イソアミルの匂いがしないことを確認後排気弁を閉め、液化炭酸ガスを乾燥室に満たし1時間試料となじませた後、32 $^{\circ}$ C 5分間超臨界点乾燥を行った。

金属膜蒸着は、オートファインコーターJFC-1600 (JOEL, Japan) を用いた。

試料固定用カーボンシールまたはアルミ両面テープを貼付した試料ステージ(ϕ 12mm)に試料を乗せ、JFC-1600 にセットして、30mA、90秒白金蒸着膜を形成した(約 50nm)。

3) 走査型電子顕微鏡観察

フィールドエミッション型走査型電子顕微鏡 JSM 7000F(JOEL, Japan)を使い、5.0kVで3,000-10,000倍まで拡大して観察を行った。

3. 結果と考察

3703株と3703-7株は基質としてグルコースを利用して生育し、エタノールを生成した。これら両菌株はグルコース以外にフラクトース、ガラクトース、マンノース、マルトース、シヨ糖を基質として利用した。グルコースを基質にした YMP 培地に 3703-7 株と 3703 株を 30℃で 2 日間培養し、これら両菌株の細胞を走査型電子顕微鏡で観察した。その写真を Fig.3-1 に示す。両株とも細胞の形態は *S. cerevisiae* の特徴である球形～楕円形であり、3703 株は長径 4～7μm、短径 2.5～4 μm、3703-7 株は長径 4～8μm、短径 2.5～4 μm であり、3703-7 株の方にやや細胞の大きさのばらつきが見られた(Fig.3-1(B))。

出芽様式は、細胞表面に複数の出芽痕（矢印）が認められることから多極出芽であった (Fig. 3-1(C),(D))。

以上の結果はカプロン酸エチル高生産変異株 3703-7 株の細胞形態、増殖様式は清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞形態、増殖と同じく、卵状細胞で出芽により増殖する酵母であった。

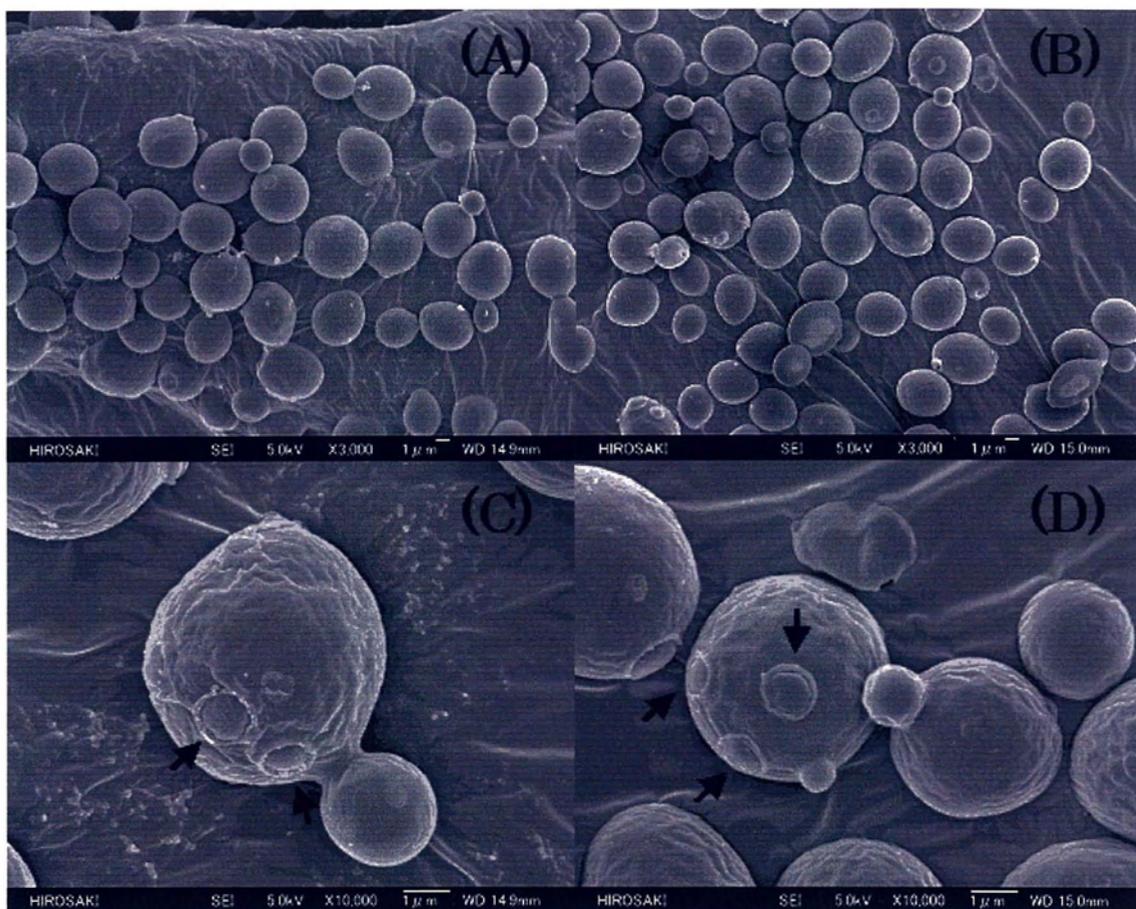


Fig.3-1 3703株および3703-7株の走査型電子顕微鏡写真。
 (A),(C), 3703株; (B),(D), 3703-7株 矢印は出芽痕を示す。

第3節 3703-7株の糖・アルコール耐性と薬剤耐性

1. 目的

3703-7株はカプロン酸エチルを高生産することを指標として選抜されたセルレニン耐性の変異株である。カプロン酸エチルを高生産する変異株については、親株より増殖が遅いこと、アルコール耐性が低いこと、濃糖圧迫（浸透圧ストレス）に弱いことが報告されている。また抗生物質耐性を持つ酵母が芳醇な吟醸香の清酒を醸造するという研究も多くある。

本節は、3703-7株の生育に及ぼすグルコース、エタノールの影響とセルレニン、シクロヘキシミドおよびクロトリマゾールを添加した培地で3703-7株を培養し、これらの抗生物質耐性について検討した。

2. 実験材料及び方法

2-1 使用菌株

研究室保有の *Saccharomyces cerevisiae* 3703-7株および3703株を用いた。グルコース耐性とエタノール耐性試験には清酒酵母の標準株として醸造協会 K701株を用いた。

2-2 グルコースおよびエタノール耐性試験

1) 培地組成および培養

YMPx2培地（2%酵母エキス 2%麦芽エキス、4%ポリペプトン）を、オートクレーブ滅菌し、用いた。培養には96穴マイクロウェルプレート（flat bottom、透明蓋付、滅菌済み）を用いた。ウェルにYMPx2培地100 μ l、グルコース溶液または蒸留水で希釈したエタノールおよび菌体濃度を調整（終濃度 10^4 cell/ml）した酵母懸濁液を分注し、総量200 μ lとした。

2) グルコース耐性試験

グルコースは、以下の終濃度となるよう培地に添加した。

0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0%

マイクロプレートに蓋を施した後、マイクロプレートシェーカーで酵母菌体を均一に分散させた後、30℃で18時間静置培養を行った。

3) エタノール耐性試験

エタノールは、以下の終濃度となるよう培地に添加した。

0、2.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0%

エタノールの揮散を防ぐためプレートシールでウェルを密封後に蓋をし、マイクロプレートシェーカーで酵母菌体を均一に分散させた後、30℃で30時間静置培養を行った。

4) 酵母菌体数の測定

培養後のマイクロプレートは、マイクロプレートシェーカーで酵母菌体を均一に分散させ、マイクロプレートリーダー Multiskan(Thermo LabSystems, Japan)でO.D.₆₃₀を測定した。

630nmでの吸光度と菌体数の関係については、同じ試料の細胞数をトーマの血球計測板で計測したもので検量線を作成し、これをもとに算出した。

2-2 3703-7株の抗生物質耐性試験

1) 培地組成および培養

第3章第3節に準じ、ウェルにYMPx2培地100 μ l、グルコース(終濃度2%)、抗生物質溶液および菌体濃度を調整(終濃度 10^4 cell/ml)した酵母懸濁液を分注し、総量200 μ lとした。培養時間は30時間とした。

1)セルレニン耐性試験

セルレニンは、以下の終濃度となるよう培地に添加した。

0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、5.0、8.0ppm

2) シクロヘキシミド耐性試験

シクロヘキシミドは、以下の終濃度となるよう培地に添加した。

0、0.01、0.03、0.05、0.07、0.10、0.15、0.20、0.30、0.50、1.00ppm

3) クロトリマゾール耐性試験

クロトリマゾールは、以下の終濃度となるよう培地に添加した。

0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、15.00、20.00、25.00ppm

4) 細胞数の測定

第3章第3節に準じて測定し、抗生物質無添加の細胞数を100%として示した

3. 結果と考察

1) 3703-7株のグルコース耐性とエタノール耐性

親株と醸造協会 K701 株を対照にして 3703-7 株の生育に及ぼすグルコース濃度の影響について調べた。グルコースは菌の生育と共に消費され、濃度は減少する、また生育と共にエタノールが生成するのでエタノールの影響も生じる。この実験は、できるだけ生育初期の3菌株の細胞数を計数することによってグルコース濃度と生育の関係を調べた。各菌株の培養 18 時間後の細胞数とグルコース濃度の関係を Fig.3-2 に示す。3703-7 株は、0.6%以上のグルコース濃度で菌数は増加せず、8%の濃度までほぼ同じ菌数 (2×10^7 個/ml) であった。他方対照の菌株、3703 株と K701 株はグルコース 2%まで菌数が増加した。それ以上の濃度ではほぼ一定になり、菌数は前者が 8.0×10^7 、後者は 8.8×10^7 個/ml であった。3703 株と比べて 3703-7 株のグルコース耐性は低かったが、8%グルコース培地で 80 時間培養後の 3703-7 株の最大菌数は 1.6×10^8

個/ml で、3703 株の 1.9×10^8 個/ml とほぼ同じ菌数まで生育した。またグルコース 15% 培地で培養した菌数は Fig.3-5 に示したが、3703-7 株の最大菌数は 1.8×10^8 個/ml で、3703 株は 2.6×10^8 個であった。変異株 3703-7 株は親株 3703 株と比べて糖感受性が高く、生育速度は遅くなるが、最大菌数は親株とほとんど変わらない菌数まで生育することを示唆している。

各菌株の培養 30 時間後の細胞数と培地中のアルコール濃度の関係を Fig.3-3 に示す。3703-7 株は、2% 濃度のエタノールでも増殖が抑制され、5% 以上のエタノール濃度では増殖しなかった。3703 株と K701 株は、エタノール 6% まではほとんど増殖阻害は見られず、エタノール 8% 以上で増殖しなかった。

これらの結果から、3703-7 株は親株および清酒酵母 K701 株と比較してグルコースおよびエタノールに対する耐性が低い菌株であることが明らかになった。エタノールは酵母の細胞膜や各種オルガネラ膜、膜に存在する疎水性タンパク質などの細胞構造に影響を及ぼし、特に細胞膜の構造や透過性を変化させることにより細胞機能にダメージを与えることが報告されている⁸⁴⁾。セルレニン耐性により取得される変異株は、脂肪酸合成酵素複合体の 2 つのサブユニットの内、 α サブユニットに突然変異が起こることにより、脂肪酸合成経路の縮合活性を選択的に阻害するセルレニンに対し耐性を獲得する⁸⁵⁾ 一方、脂肪酸の炭素鎖伸長反応が完全に進まず炭素数 8 のカプロン酸が多く生産されることが明らかにされている^{85,86)}。カプロン酸エチル高生産株 3703-7 株は脂肪酸の合成系が損傷を受けたことから、細胞膜の主要な構成要素である高級脂肪酸合成が親株 3703 株のように正常に機能しないためにエタノール耐性が低くなったと考えられる。

2) 3703-7 株の抗生物質耐性

セルレニン、シクロヘキシミドとクロトリマゾールに対する 3703-7 株の耐性試験を行った。抗生物質耐性の比較対照に親株 3703 株を用い、30 時間培養後の菌濃度を測定した。その結果を Fig 3-4 に示す。セルレニンに対しては (fig.3-3 (A))、3703-7 株は 2ppm までは

ほとんど増殖を阻害されず、5ppm の添加でも無添加時の 45%の増殖が見られた。一方 3703 株ではわずか 0.2ppm の添加でも増殖が 84%阻害され、0.6ppm の添加でほぼ完全に増殖が阻害された。シクロヘキシミド(Fig.3-3 (B))に対しては、3703-7 株の増殖は 3703 株と比べてはきわめて低い 0.07ppm の濃度で、著しく阻害され、10%以下の菌濃度であった。3703 株は 0.2ppm のシクロヘキシミドで 10%以下のまで増殖が阻害された。シクロヘキシミドはタンパク質合成系を阻害する抗生物質であるが、3703-7 株と 3703 株の両菌株に対して低濃度で生育を阻害した。クロトリマゾール(Fig.3-3 (C))に対しては、3703-7 株、3703 株とも 2ppm の添加で増殖が無添加の 50%以下まで阻害された。しかしながら 4ppm 以上クロトリマゾールを添加しても、3703-7 株は無添加の 25%程度、3707 株では無添加の 50%程度の増殖力は維持していた。クロトリマゾールはエルゴステロール合成を阻害するアゾール系抗真菌剤であるが、両菌株はクロトリマゾールに対しては耐性があった。曲淵ら⁷⁴⁾は脂肪酸合成阻害剤セルレニン 0.5ppm と 0.2ppm のシクロヘキシミドに耐性を持つ菌株を分離し、カプロン酸エチル高生産株を取得している。また溝口ら⁸⁸⁾は 20ppm クロトリマゾール耐性により分離したすべての変異株が、2ppm セルレニンおよび 0.1ppm シクロヘキシミドに対しても耐性を持つと報告している。

セルレニン、シクロヘキシミドとクロトリマゾールに対する耐性でセルレニンに対して変異株 3703-7 株は親株 3703 株と異なり、耐性菌であった。セルレニン耐性の獲得について、Funabashi ら⁸⁵⁾は、 α 、 β のふたつのサブユニットからなる脂肪酸合成複酵素合体(FAS)の、 α サブユニットの縮合部位の変異によることを明らかにしている。また、市川⁸⁶⁾は、 α サブユニットの変異の結果として、長鎖脂肪酸の合成が中断することにより、カプロイル CoA およびカプロン酸が酵母の細胞内に蓄積することにより、カプロン酸エチルが高生産されると報告している。これらの結果を考察するとカプロン酸エチル高生産株である 3703-7 株のセルレニン耐性は、脂肪酸合成酵素複合体に変異が生じ、吟醸香高生産株に変異したことを示唆している。

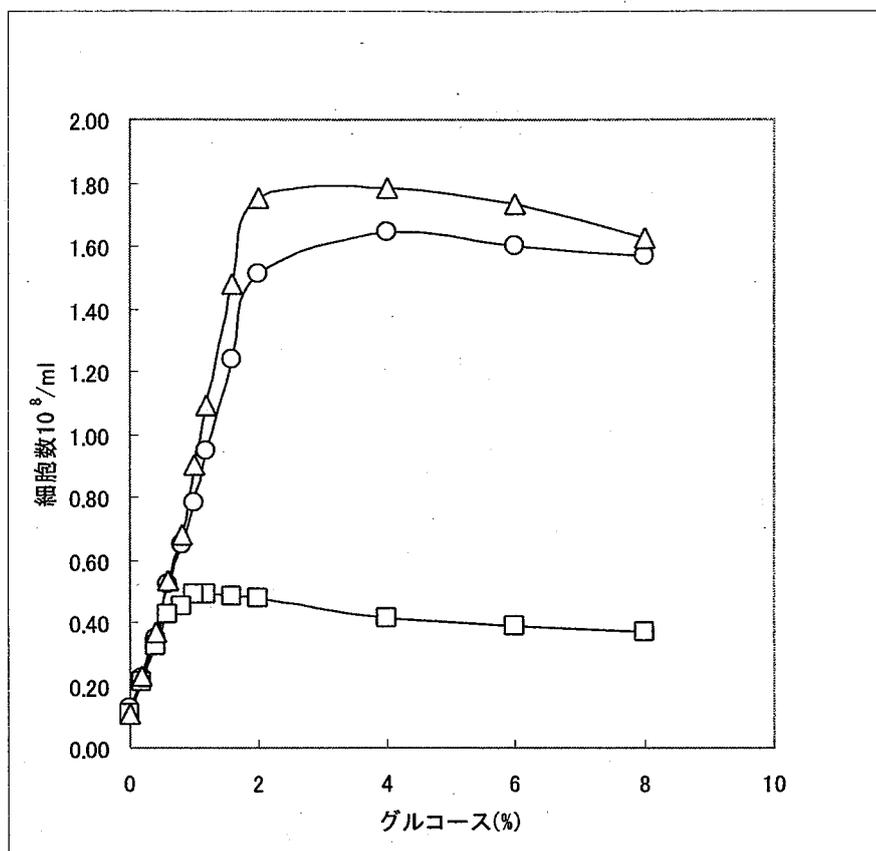


Fig.3-2 酵母菌株の生育に及ぼすグルコース濃度の影響

培養 18 時間後の細胞数を計数した。○ 3703 株, □ 3703-7 株,
△ K701 株

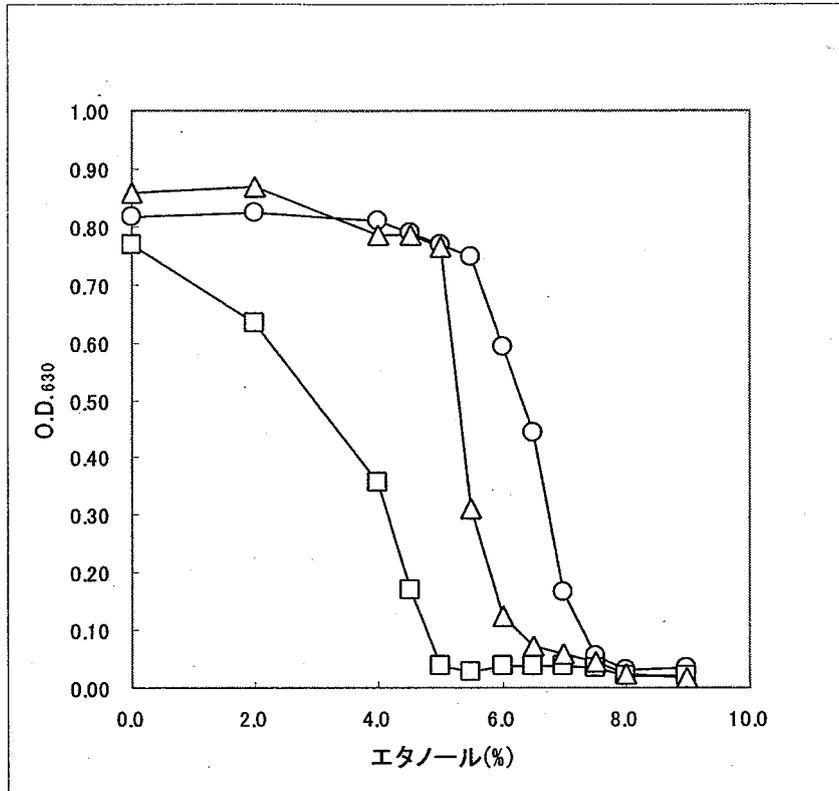


Fig.3-3酵母菌株の生育に及ぼすエタノール濃度の影響

培養30時間後のODを測定した。○ 3703株, □ 3703-7株, △ K701株

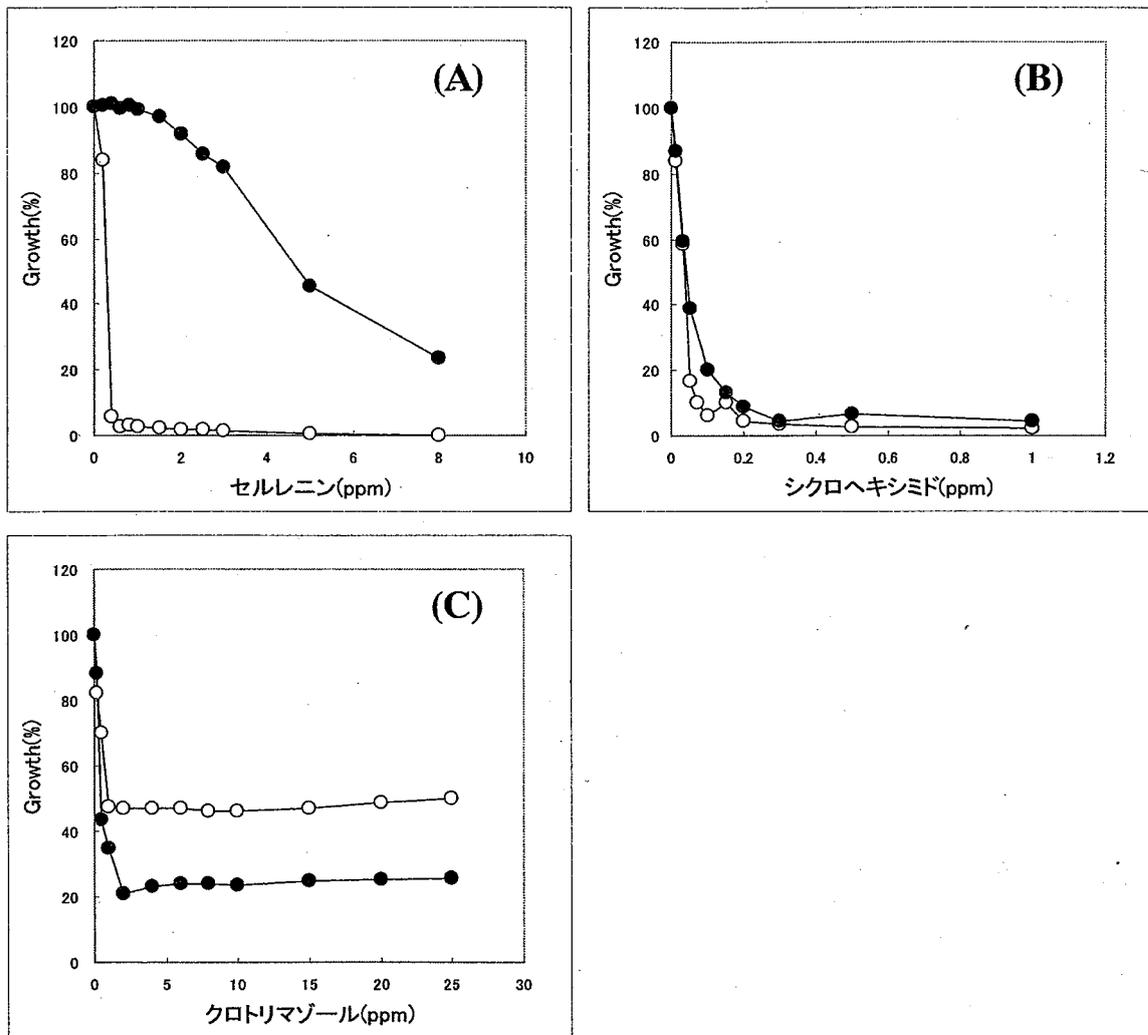


Fig. 3-4 酵母菌株の生育に及ぼす抗生物質の影響

セルレニン (A)、シクロヘキシミド (B)、クロトリマゾール (C) を添加した培地で酵母菌株を 30℃, 30 時間静置培養し、無添加の場合の生育を 100%として表示した。○ 3703 株, ● 3703-7 株,

第4節 DNAマイクロアレイ解析による変異株の性質

1. 目的

3703-7 株は親株と違ってセルレニン耐性株であることを3節で示したが、脂肪酸合成系が損傷を受け、カプロン酸エチル高生産株に変異したと考えられる。脂肪酸合成系から合成される長鎖脂肪酸は細胞の膜系の構成要素であり、この供給が阻害されていることは、細胞の形態維持、膜局在タンパク質の安定性や活性、膜輸送系など広範な細胞活動に影響を与えることが考えられる。そこで、遺伝子発現を網羅的に捉えることの出来るDNAマイクロアレイを用いて、セルレニン耐性変異が細胞生理全体に与える影響を調べた。

2. 材料及び方法

2-1 使用菌株

3703-7 株および対照として親株の 3703 株を用いた。

2-2 培地組成と培養

15%グルコースを含む YNB 培地を用いた。培地はねじ口付き試験管に 10ml を分注し、オートクレーブ滅菌後、 10^4 cell/ml となるよう酵母細胞を植菌し、ブチルゴム中栓とスクリューキャップで密栓後、25℃で静置培養した。

DNAマイクロアレイに供する細胞の培養は、同培地 100ml を 200ml 容アイボトル(PFねじ口、テフロンライナーパッキン付き、オートクレーブ可能ボトル)に分注し、オートクレーブ後、酵母を菌体濃度 10^4 cell/ml となるよう添加して密栓し、25℃ 4日間および6日間 25℃ 静置培養した。

2-3 香気物質の定量

第2章第5節に準じ、ガスクロマトグラフ (HP 7694 型 ヘッドスペース法) で行った。

2-4 エタノールの定量

第2章第5節に準じ、蒸留法とガスクロマトグラフ直接導入法の組み合わせで行った。

2-5 マイクロアレイ試料の調製

1) 集菌

O.D.₆₀₀ = 1.0 となるよう蒸留水で希釈した培養後の酵母細胞各 100ml を遠心分離 (3,000rpm 3分)により集菌し、30ml 蒸留・滅菌水で2回洗浄後、ファルコンチューブに集め、ドライアイスで急速凍結(-80℃)した。

2) total-RNA の抽出

ホットフェノール法で行った。試薬は以下のように調製した。

・酢酸 Na buffer

50mM 酢酸-酢酸 Na,で pH 5.0 に調製し、10mM EDTA を加えた

・フェノール buffer

フェノールと上記酢酸 Na buffer を混合し、下層のフェノールを使用した

・DEPC 水 (RNase free water)

蒸留水に 0.1%ジエチルピロカルボネートを加え、一晚放置反応後、オートクレーブ滅菌し、使用した。

凍結細胞 (-80℃保存)

↓
+ 10ml 酢酸 Na buffer
+ 1ml 10% SDS
↓ + 10ml フェノール buffer

5分激しく攪拌ながら 65℃インキュベート

↓

氷水中で 5-10 分冷却

↻ 3500rpm(2500g) x 10 分 (室温)

上層 (水層部分) を新しいファルコンチューブに移した

↓ + 5ml 酢酸 Na buffer

5 分攪拌しながら 65°C インキュベート

↓

氷水中で 5-10 分冷却

↻ 3500rpm(2500g) x 10 分 (室温)

上層を新しいファルコンチューブに移す

↓ + 15ml フェノール/クロロホルム(1:1)

2 分 激しく攪拌

↻ 3500rpm(2500g) x 10 分 (室温)

上層を新しいファルコンチューブに移す

↓ + 10ml クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)

2 分 激しく攪拌

↻ 3500rpm(2500g) x 10 分 (室温)

上層を新しいファルコンチューブに移す

↓ + 1.5ml 3M 酢酸 Na

↓ + 15ml イソプロパノール

-20°C で 1 時間 ~ 一晩放置し、沈殿(total-RNA)を確認

↻ 3500rpm(2500g) x 40 分 (4°C)

液層を捨てパラフィルムで封じ、パラフィルムにピンホールを開ける

遠心乾燥機で 40~60 分乾燥

DEPC 水 300 μ l を加え、軽く攪拌し、沈殿を溶解する

O.D.₂₆₀ および O.D.₂₈₀ を測定し、濃度・純度を測定

Total-RNA 1500 μ g/150 μ l となるよう DEPC 水で希釈

3) mRNA の精製

Oligotex TM-dT30(Takara Corp, Japan)を使用して行った。

エッペンドルフチューブに 300 μ g total-RNA/150 μ l を入れた

↓ + 150 μ l 2x buffer

↓ + 15 μ l oligo dT

70°C 5 分攪拌

室温で10分放冷

↻ 15000rpm x 5分 (室温)

液層を捨てる

↓ + 350μl wash buffer

フィルター付きエッペンドルフチューブに移す

↻ 15000rpm x 30秒 (室温)

フィルターを外し新しいエッペンドルフチューブに移す

↓ + 350μl wash buffer

↻ 15000rpm x 30秒 (室温)

フィルターを外し新しいエッペンドルフチューブに移す

↓ + 50μl 70°C RNase free water

指で軽くはじいて混ぜる

↻ 15000rpm x 30sec (室温)

3回繰り返す

total 150μl 回収 O.D.₂₆₀ および O.D.₂₈₀ を測定し、濃度・純度を測定

↓ + 15μl 3M 酢酸 Na

↓ + 450μl エタノール

-20°C 一晩保存

↻ 15000rpm x 20分 (4°C)

液層を捨てる

↓ + 1ml 70%エタノール

↻ 15000rpm x 20分 (4°C)

液層を捨てパラフィルムで封じ、パラフィルムにピンホールを開ける

遠心乾燥機で20~30分(完全に乾くまで)乾燥

↓ + 12μl DEPC水をゆっくり加え溶かす

精製 mRNA

4) 蛍光標識 cDNA の作成

cDNA の作成には Cyscribe First strand cDNA labeling kit (Amersham Bioscienc Corp, USA) を用い蛍光ラベルには Cy3-dUTP および Cy5-dUTP (Perkin Elmer, USA) を使用した。

2-4 μ g mRNA in 9 μ l in 1.5ml tube

↓ + 1 μ l オリゴ dT プライマー

↓ + 1 μ l ランダムプライマー

↻ フラッシュ

70°C 5分インキュベート

室温で10分放冷 (以降の操作は遮光下で行う)

↓ + 4 μ l 5x Cyscribe buffer

↓ + 2 μ l 0.1M DTT

↓ + 1 μ l dUTP nuclease mix

↓ + 1 μ l Cyscribe receraset (Cy5: サンプル, Cy3: 対照)

混合

↻ フラッシュ

42°C 1.5時間インキュベート

↻ フラッシュ

↓ + 2 μ l 2.5M 水酸化 Na

37°C 15分

↻ フラッシュ

↓ + 10 μ l 2M HEPES free acid

↓ チューブにセットした AutoSeq™ G-50 カラムに移す

↻ 5,000 rpm x 1分(室温)

↓ カラムを取り去る

Cy3 サンプルと Cy5 サンプルを混合

チューブをパラフィルムで封じ、パラフィルムにピンホールを開ける

遠心乾燥機で完全に乾くまで 乾燥

2-6 ハイブリダイゼーション

マイクロアレイチップ(DNA Chip Research, Japan)を使った。

試薬は以下のように調製した。

・ 20x SSC

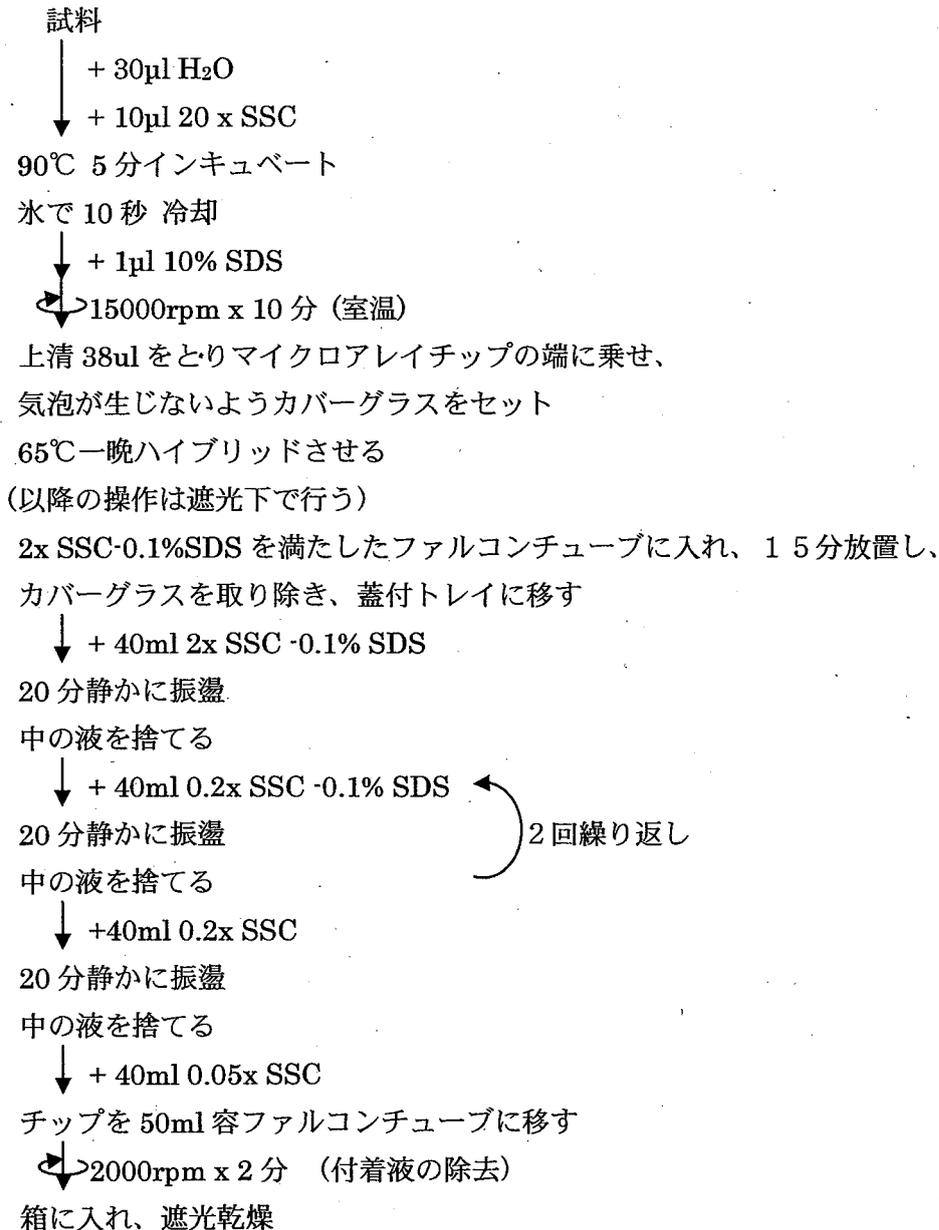
NaCl 75.32g およびクエン酸 Na 88.23g を蒸留水 1l に溶解し、pH7.0 に調製したもの

を、20x SSC とした。

・ 10% SDS

SDS (ドデシルスルホン酸 Na) 1g を蒸留水 10ml に溶解し、10%SDS とした。

2x SSC -0.1% SDS, 0.2x SSC および 0.05x SSC は、20x SSC,10% SDS および蒸留水を適宜混合し、調製した。



2-7 蛍光光度の読み取りと遺伝子の発現比の算出

ScanArray 4000(GSI Lunomics, USA) を使い、3703 株の mRNA 発現量を表す Cy3

の蛍光(532nm)強度および 3703-7 株の mRNA 発現量を表す Cy5 の蛍光(635nm)強度を測定し、Cy5/ Cy3 の値として発現比を算出した。

2-8 データ解析

マイクロアレイ専用解析ソフト GeneSpring ver.7 (Silicon Genetics, USA)を用いた。また、遺伝子機能の詳細および遺伝子のカテゴリー分けについては MIPS(Munich information center of protein sequences) (<http://mips.gsf.de/>) および SGD (the Saccharomyces Genome Database) (<http://www.yeastgenome.org/>)に基づいて行った。

3. 結果と考察

1) 3703 株と 3703-7 株のカプロン酸エチルとエタノール生成の経時的変化

3703 株および 3703-7 株を培養し、細胞数、カプロン酸エチル、グルコースとエタノールの経時的変化を測定した。その結果を Fig.3-5 と Fig.3-6 に示す。3703 株および 3703-7 株の細胞数はどちらも培養 4 日目まで増加し、6 日目以降は定常となった。3703-7 株のカプロン酸エチル生成は培養 2 日目から 6 日目まで増殖と共に増加し、6 日目に最大になり、2.24ppm であった。3703 株は培養 2 日目から生成が見られたが、4 日目で最大 0.37ppm であった。

エタノールは、3703-7 株では 4 日目までほぼ直線的に増加し、3.3%生成されたが、4 日目以降は増加しなかった。他方 3703 株では 6 日目までエタノールが増加し、5.5%になった。グルコースは培養の全期間を通じて減少し、培養 15 日では 3703 株では 1.6%まで、3703-7 株では 2.4%まで減少した。カプロン酸エチルの生成は 3703-7 株の方が 3703 株と比べて著しく多く、エタノールは 3703 株の方が多く生成された。

これらの結果から対数増殖期末期の 4 日目とカプロン酸エチル生成とエタノール生成に最

も大きな差の見られる培養6日目の細胞をマイクロアレイ試験に用いた。

2) 高発現および低発現遺伝子数

水上ら⁸⁾の方法に従い、mRNA発現量が親株に比べて2倍以上の遺伝子を高発現遺伝子、0.5倍以下の遺伝子を低発現遺伝子とし3703株とカプロン酸エチル高生産変異株3703-7株の遺伝子発現の特徴を調べた。DNAマイクロアレイの蛍光画像をFig. 3-7に示す。培養4日目および6日目の3703株と3703-7株の遺伝子発現量の散布図を、それぞれFig.3-8とFig.3-9に示す。プロットの横軸は3703株の遺伝子発現量、縦軸が3703-7株の遺伝子発現量を示し、中央の線は両菌株の遺伝子発現量が等しい位置を示し、上の線（発現量が2倍）、下の線（発現量が0.5倍）の範囲をはずれたスポットが、変異株で高発現、または低発現の遺伝子を示している。変異株で特徴的な高発現遺伝子数は、培養4日目で363、6日目で317であった。一方、低発現遺伝子は、4日目、6日目で、それぞれ341、389であった。

この結果から、変異株と親株において全遺伝子数（約6000遺伝子）の約10%が異なる発現量を示すことが推察される。

3) 機能分類から見た高発現遺伝子の代謝経路の解析

酵母のゲノムデータベース(MIPS)を用いて酵母の遺伝子を機能別に25のカテゴリーに分類し、変異株の遺伝子発現の特徴を検討した。その結果をTable 3-1に示す。変異株で親株に比べて特徴的な高発現遺伝子は、4日培養の細胞では、エネルギー生産、タンパク質合成、細胞救助、防御および解毒、及び窒素・硫黄代謝に関わる遺伝子であった。また、炭素化合物・炭水化物の代謝、ビタミン・補酵素の代謝、輸送系、タンパク質の活性制御、結合因子やコファクターを必要とするタンパク質（構造タンパクまたは酵素）の遺伝子も親株より高発現していた。6日培養の細胞では、窒素および硫黄代謝、エネルギー生産、細胞救助、防御および解毒、炭素化合物および炭水化物代謝に関わる遺伝子が誘導されていた。3703株

と 3703-7 株の脂肪酸合成酵素の α サブユニットの遺伝子 FAS2 の発現はどちらも同じ発現で差はなかった。

培養 4 日目、6 日目を通じて、エネルギー生産、細胞救助、防御および解毒、窒素・硫黄代謝および炭素化合物・炭水化物の代謝に関わる遺伝子が高発現していることは、変異株の細胞が、親株と比較して培養条件に対し何らかのストレスを受け、エネルギー生産および物質代謝が活発になっていると考えられる。

4) 高発現遺伝子が関与する代謝経路の解析

DNA マイクロアレイデータ解析専用ソフト、GeneSpring を用いて、高発現している遺伝子の多い代謝経路のリストを作成した。培養 4 日目および 6 日目の細胞のデータを Table 3-2 に示す。培養 4 日目のデータは、リボソーム、エネルギー生産、核酸合成関係の遺伝子が高発現しており、6 日目はリボソーム、エネルギー生産に加えてブタン酸代謝とグリセロリン脂質代謝に関わる遺伝子が高発現していた。MIPS でカテゴリー分けをしたデータと同様、3703-7 株は浸透圧ストレスによる細胞膜の損傷を補うため、タンパク質の分解に関わるプロテオソームと壊されたタンパク質の合成に関わるリボソーム、ATP 合成、酸化的リン酸化の代謝系の遺伝子が特徴的に誘導されたと考えられる。

5) ストレス応答

3703 株に対して高発現している 3703-7 株のストレス応答遺伝子数は培養 4 日目で 17、培養 6 日目で 14 であった。そのリストを Table 3-3 に示す。培養 4 日目で顕著に高発現していたのは 9 遺伝子で、浸透圧ストレスで誘導される *SIP18*, *HSP12*, *HOR7*, *HSP26*, *DDR2*, *GRE1*, *PRX1*, *SPI1*, *PAI3* であり、これらの多くは培養 6 日目においても高発現していた。熱ショックで誘導される *HSP10*, *UBC5* も培養 4 日目・6 日目で共通して高発現していた。機能別に見ると、培養 4 日目ではミトコンドリアに関係する *PRX1*, *HSP10*,

HMF1、細胞骨格・細胞膜に関連する *PFY1*、*RVS161*、*SPI1*、DNA ダメージ抵抗に関連する *DDR2*、*DDR48* などが高発現していた。培養6日目では、酸化ストレスに関連する *AAD4*、*AAD6*、*GAD1*、*GRE3* が高発現しており、これらの遺伝子は γ -アミノ酪酸 (GABA)生成などブタン酸代謝経路 (Table 3-2) を構成する遺伝子であった。

これらの結果からカプロン酸エチルを高生産するように変異された 3703-7 株は、長鎖脂肪酸の合成阻害による細胞膜系の欠陥に対して、細胞膜、ER、ミトコンドリア膜、核膜などの膜系の保護、および損傷DNAの修復、異常タンパクの選択的分解などの酸化ストレスへの対応ため、浸透圧ストレス応答遺伝子を中心とした多くのストレス応答遺伝子が誘導されていると考えられる。

培養4日目と6日目で共通して最も高く発現している *SIP18* について、Saccharomyces Genome Database には機能不明と記載されているが、Scheglmann ら⁸⁹⁾は、酵母タンパク質の Sip18p と高い配列の類似性を示すペプチドが、リン脂質との結合に必須の C 末端 Lys を有することから、タンパク質の空間構造の安定化や細胞への局在化に寄与していると推察している。

酸化ストレスに関して Sean ら⁹⁰⁾は *GAD1* のコードする Glutamate Decarboxylase によるグルタミン酸の脱炭酸と GABA の生成が、酸化ストレス抵抗に必須であると報告している。このプロセスでは、最終的にコハク酸と NADPH が生成する。培養6日目で高発現している *GRE3* は NADPH 依存性のカルボニル化合物の還元酵素をコードしている。また、*AAD4* と *AAD6* はアルコール類を酸化して NAD から NADH と H⁺を生成するプロセスに関与していることが明らかにされている。3703-7 株の培養6日目の細胞が酸化・還元に関係する遺伝子を高発現していることは、酸化ストレスから生じるカルボニル化合物の代謝に対応していることが示唆される。

セルレニン耐性の獲得について、Funabashi ら⁸⁵⁾は、 α 、 β のふたつのサブユニットからなる脂肪酸合成複合体(FAS)の、 α サブユニットの縮合部位の変異によることを明らかに

した。また、市川ら⁸⁶⁾は、 α サブユニットの変異の結果、親株がステアリン酸とパルミチン酸のみを生成するのに対して変異株はステアリン酸が減少し、パルミチン酸が増加するだけでなく、ミリスチン酸が生成されるなど脂肪酸合成が低級脂肪酸へ変化することを明らかにした。 α サブユニットの遺伝子は *FAS2* であるが、3703-7 株の *FAS2* の発現は親株と変わらなかった。これらの結果からカプロン酸エチルを高生産するように変異された 3703-7 株は、長鎖脂肪酸の組成の変化による細胞膜系の欠陥に対して、細胞膜、ER、ミトコンドリア膜、核膜などの膜系の保護、および損傷DNAの修復、異常タンパク質の選択的分解などの酸化ストレスへの対応ため、浸透圧ストレス応答遺伝子を中心とした多くのストレス応答遺伝子が高発現されると考察される。

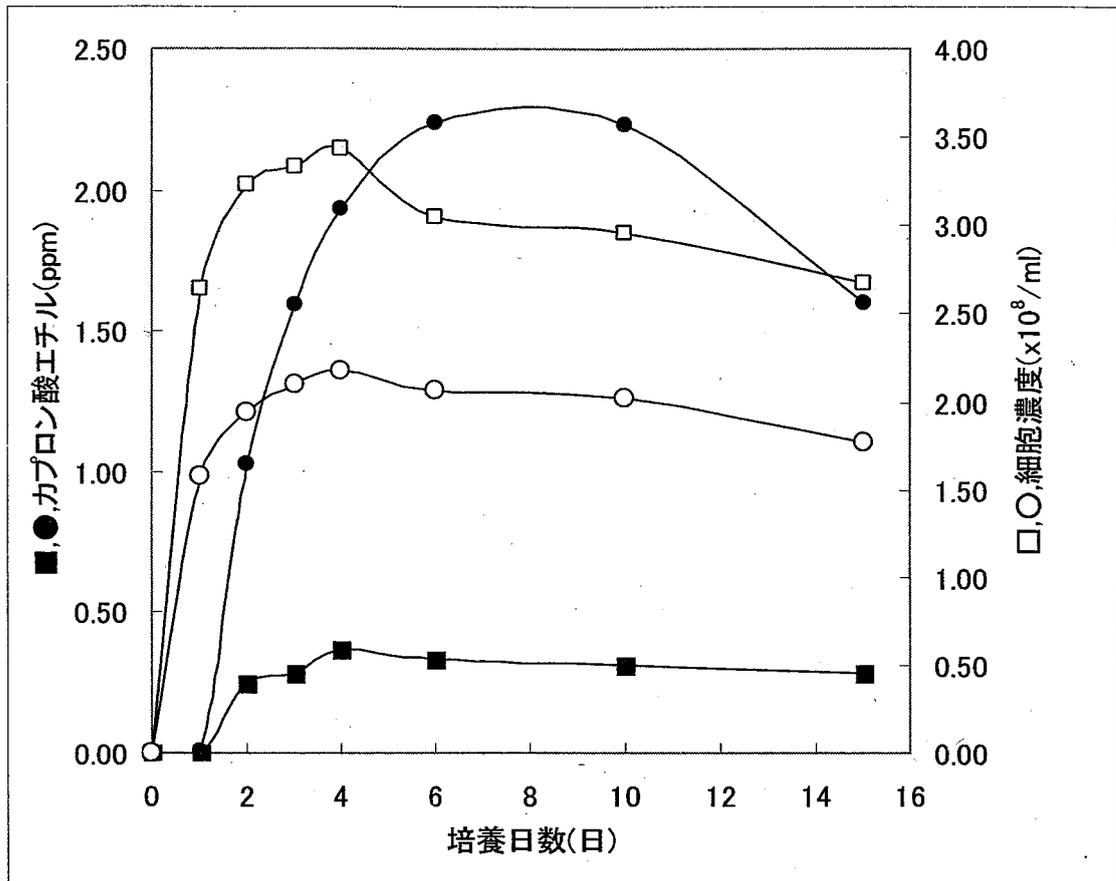


Fig. 3-5 3703株および3703-7株の培養による培地中のカプロン酸エチルおよび細胞濃度の経時変化

15%グルコースを含むYNB培地で25℃1~15日間密閉静置条件で培養を行った。
 ■, □, 3703株 ●, ○, 3703-7株 ; ■, ●, カプロン酸エチル □, ○, 細胞濃度

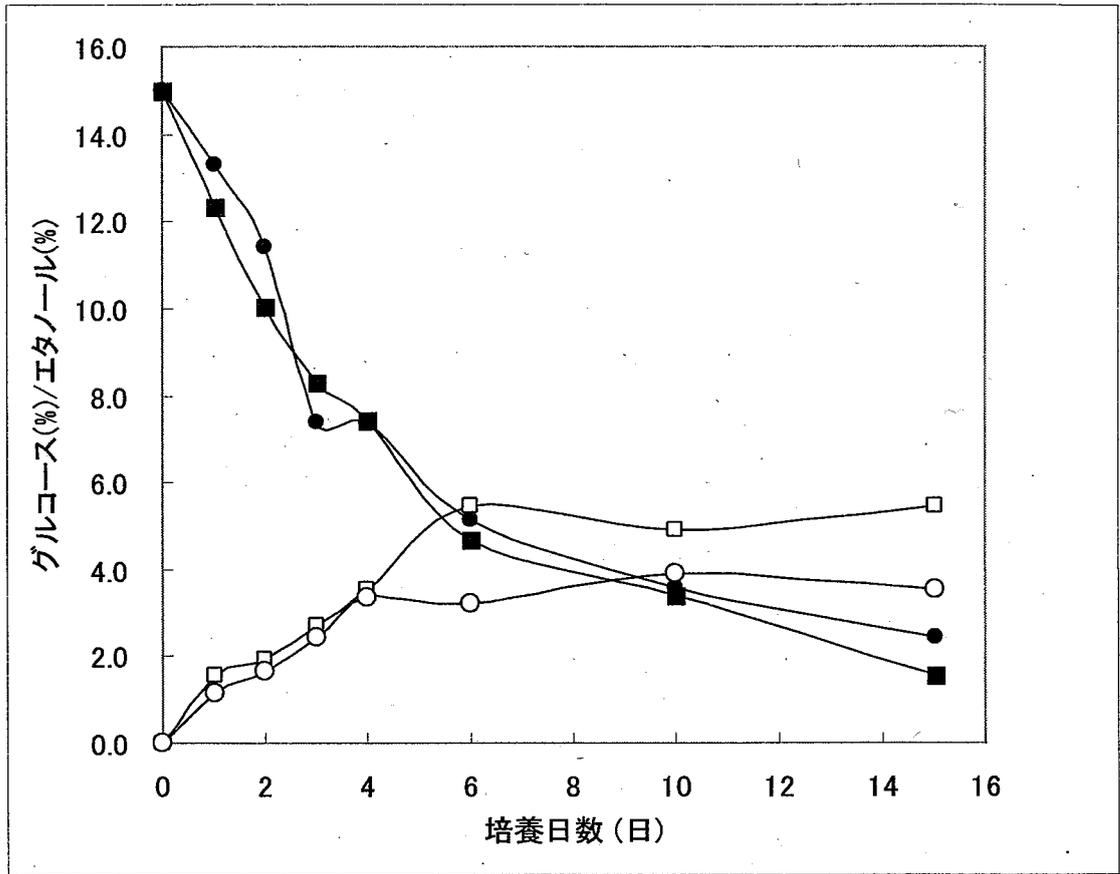


Fig. 3-6 3703株および3703-7株の培養による培地中のグルコースおよびエタノールの経時変化

15%グルコースを含むYNB培地で25℃1~15日間密閉静置条件で培養を行った。
 ■, □, 3703株 ●, ○, 3703-7株 ; ■, ●, グルコース □, ○, エタノール

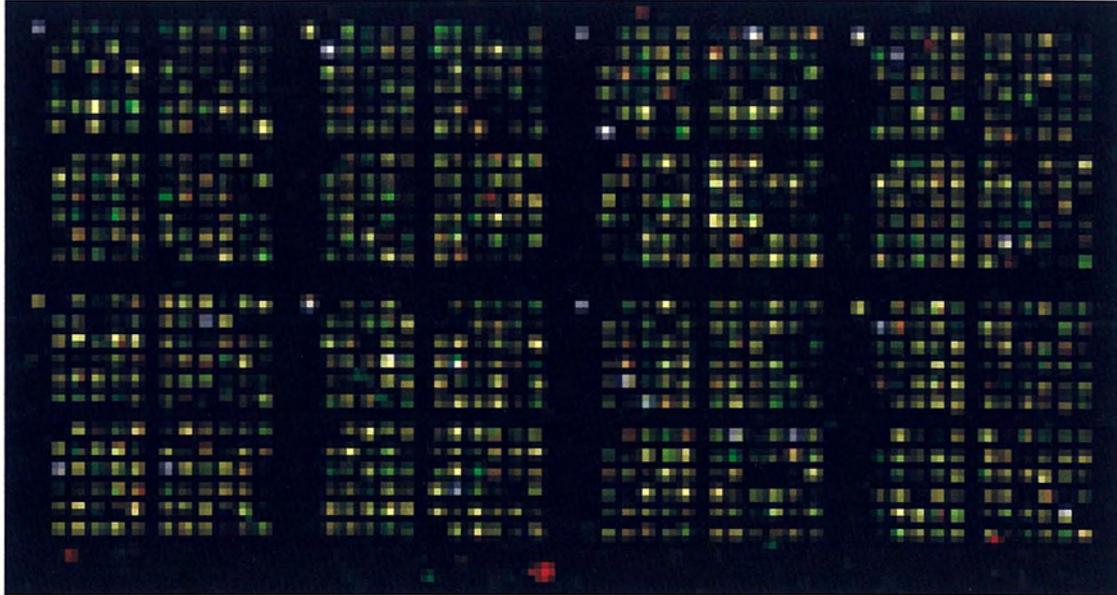
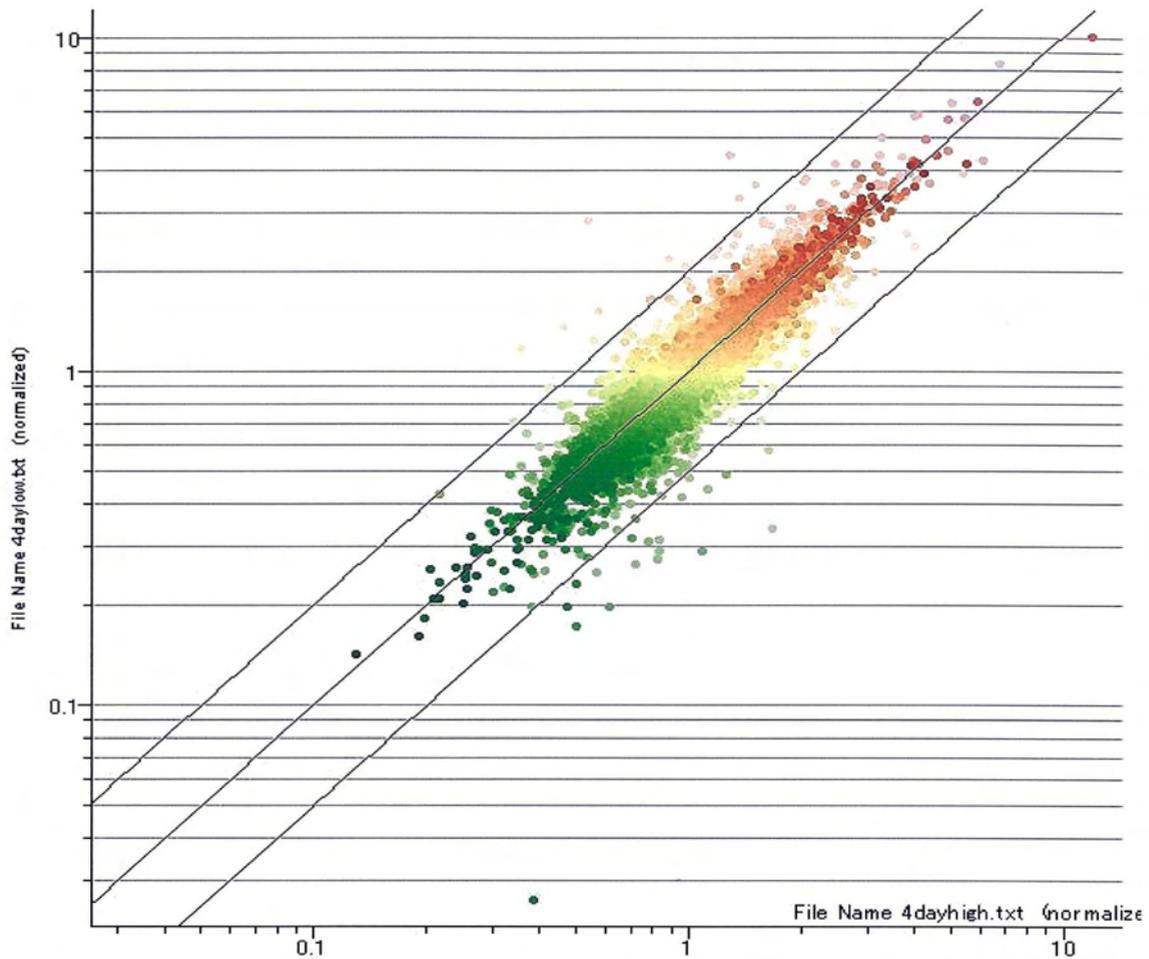


Fig. 3-7 DNA マイクロアレイチップの蛍光画像

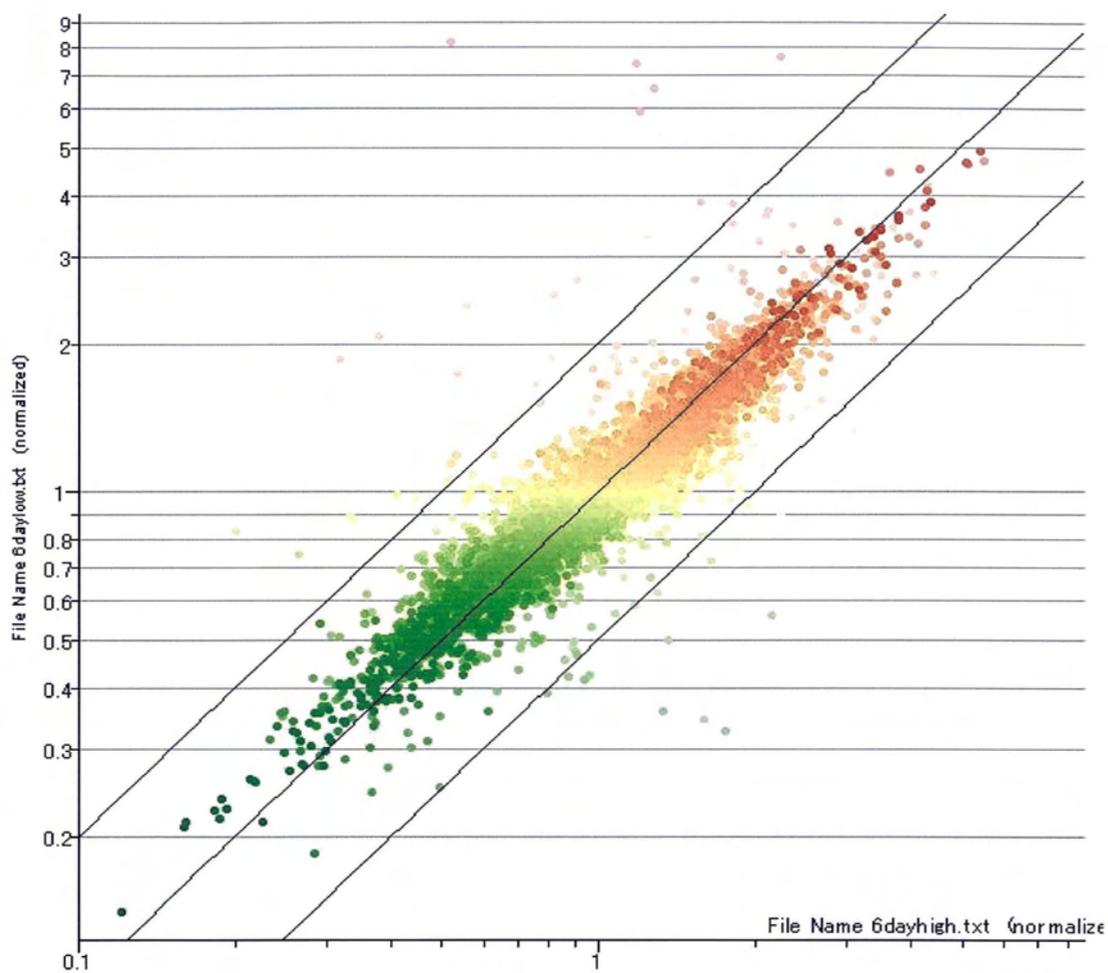
スポットの蛍光強度は、青、緑、黄色、赤、白の順に強くなっている



X-axis: 4day (Default Interpretation) : File Name 4day\Gene List: all genes (6703)
 Y-axis: 4day (Default Interpretation) : File Name 4day\Gene List: all genes (6703)

Fig.3-8 培養4日目の3703株と3703-7株の各遺伝子の発現量の散布図

各ドットが個々の遺伝子を示し、横軸が3703株の遺伝子発現量、縦軸が3703-7株の遺伝子発現量を表す。中央の線は両菌株の遺伝子発現量が等しい位置を示し、上の線は発現量が2倍、下の線は発現量が0.5の範囲を示している。



X-axis: 6day (Default Interpretation) : File Name 6day.txt Colored by: 6day, Default Interpretation (File Name 6d
 Y-axis: 6day (Default Interpretation) : File Name 6day.txt Gene List: all genes (6703)

Fig.3-9 培養 6 日目の 3703 株 と 3703-7 株の各遺伝子の発現量の散布図

各ドットが個々の遺伝子を示し、横軸が 3703 株の遺伝子発現量、縦軸が 3703-7 株の遺伝子発現量を表す。中央の線は両菌株の遺伝子発現量が等しい位置を示し、上の線は発現量が 2 倍、下の線は発現量が 0.5 の範囲を示している。

Table3-1 変異株における高発現遺伝子の機能分類

機能カテゴリー	サンプル	各カテゴリーに 属する遺伝子の 数	4日目	6日目	4日目	6日目
			発現促進遺伝子数		発現促進率(%)	
エネルギー生産		365	28	16	7.7	4.4
タンパク合成		476	22	11	4.6	2.3
細胞救助、防御および解毒		548	24	19	4.4	3.5
窒素および硫黄代謝		96	4	6	4.2	6.3
細胞内輸送、輸送機構および輸送経路		1031	37	23	3.6	2.2
炭素化合物および炭水化物代謝		504	18	17	3.6	3.4
タンパク活性制御		238	8	4	3.4	1.7
結合機能または補因子を必要とするタンパク (構造タンパクまたは酵素)		1034	32	19	3.1	1.8
ビタミン、共因子および補綴的グループの代謝		163	5	4	3.1	2.5
細胞分化		449	13	6	2.9	1.3
細胞環境との相互作用		458	13	7	2.8	1.5
核酸代謝		227	6	1	2.6	0.4
二次代謝		77	2	2	2.6	2.6
細胞物質の生合成		854	22	23	2.6	2.7
アミノ酸代謝		243	6	8	2.5	3.3
タンパク修飾 (折り畳み, 修飾, 輸送)		1137	26	22	2.3	1.9
リン酸代謝		414	8	2	1.9	0.5
脂質、脂肪酸およびイソプレノイド代謝		272	5	7	1.8	2.6
転写		1063	18	18	1.7	1.7
細胞周期とDNAプロセッシング		1001	15	18	1.5	1.8
細胞応答/信号伝達機構		234	3	1	1.3	0.4
環境との相互作用 (構成的)		5	0	0	0.0	0.0
トランスポゾン、ウィルスおよびプラスミドタンパク		124	0	0	0.0	0.0
発達 (構成的)		70	0	0	0.0	0.0
未分類タンパク		2038	59	70	2.9	3.4

発現が親株の2倍以上となっている遺伝子が各カテゴリーに含まれている量をパーセントで示す。

Table3-2 Gene springを用いた、各代謝経路において高発現していた遺伝子数および遺伝子名

	代謝経路	信頼値 (p値)	発現が促進している 遺伝子数	遺伝子名
4日目	リボゾーム	8.64E-10	33	RPL13A,RPS23A,RPS29B,RPS13,RPS31,RPS25A,RPS25B,RPS26B,RPS26A,RPS28A,RPL3,RPL11B,RPL9B,RPL12B,RPL16B,RPL1B,RPL2A,RPL23A,RPL23B,RPL17A,RPL26B,RPL26A,RPL42B,RPL31A,RPL32,RPL37A,RPL6B,RPL20A,RPL38,RPP2B,MRPL28,MRPL33,RPS3
	酸化的リン酸化	1.59E-07	18	COX17,ACP1,COX9,YMR118C,QCR9,QCR8,COX13,COX5B,ATP3,ATP16,ATP17,VMA7,ATP14,ATP18,ATP19,ATP15,VMA13,IPP1
	ATP合成	4.88E-05	9	ATP18,ATP3,ATP16,ATP15,ATP17,ATP14,ATP19,VMA7,VMA13
	プロテオソーム	0.000214	9	RPN10,RPN12,PUP2,PRE5,PUP3,PRE1,PRE2,PRE7,PRE4
	解糖・糖新生	0.00131	10	ALD4,ALD6,PDC1,ADH1,ENO1,ENO2,TDH1,TPI1,FBP1,HXK1
	炭素固定	0.00609	5	PCK1,MDH2,RPE1,FBP1,TPI1
	RNAポリメラーゼ	0.0454	5	RPB9,RPB10,RPB11,RPC10,RPA14
	ピルビン酸代謝	0.0726	5	PCK1,MAE1,MDH2,ALD4,ALD6
	プリン代謝	0.0886	10	RPA14,RPB9,RPC10,RPB11,RPB10,YNK1,GUK1,DAL2,MET14,YSA1
	ピリミジン代謝	0.106	8	CPA2,RPA14,RPB9,RPC10,RPB11,RPB10,YNK1,FCY1
	酸化的リン酸化	0.00268	9	YDL085W,ACP1,COX9,QCR8,COX13,ATP17,ATP18,ATP15,IPP1
	ブタン酸代謝	0.00629	5	GAD1,AAD4,AAD6,GRE3,ILV6
	リボゾーム	0.0090	14	RPS23A,RPS29B,RPS25A,RPS26B,RPS26A,RPS28B,RPS28A,RPL16B,RPL23A,RPL23B,RPL41A,RPL32,MRPL33,RPS16B
	グリセロリン脂質代謝	0.0221	5	AAD4,AAD6,GRE3,GPD2,CRD1

親株に対し5遺伝子以上が高発現していた代謝経路を示す
信頼値は、代謝経路でランダムに高発現した場合との比較で示す

Table 3-3 3703-7株で高発現しているストレス応答関連遺伝子

遺伝子名	発現量(倍)		Saccharomyces Genome Databaseによる遺伝子機能の説明		
	4day	6day	誘導因子	所在	機能
<i>SIP18</i>	11.0	4.9	浸透圧	細胞質	不明
<i>HSP12</i>	7.5	2.3	熱、酸化、浸透圧	細胞質、核、細胞膜	膜崩壊の保護
<i>HOR7</i>	5.6	3.5	高浸透圧	細胞壁、ER、膜面分	不明
<i>HSP26</i>	5.3	0.7	熱	細胞質、核、細胞膜	シャペロン
<i>DDR2</i>	4.6	4.9	マルチストレス(他生物の生産物、環境的生理的ストレス)	細胞質、液胞	不明
<i>GRE1</i>	4.1	4.3	浸透圧、イオン、酸化、熱、重金属	細胞質	不明
<i>PRX1</i>	3.6	-	酸化	ミトコンドリア	過酸化水素還元
<i>SPI1</i>	3.2	4.1	マルチストレス	細胞壁	不明
<i>PAI3</i>	3.1	2.4	浸透圧	細胞質	プロテアーゼA阻害
<i>GPX2</i>	2.5	1.4	グルコース飢餓	細胞質、核	グルタチオン酸化(過酸化水素還元)、過酸化リン脂質からの保護
<i>HMF1</i>	2.4	1.6	熱	細胞質、核	不明
<i>DDR48</i>	2.3	1.5	熱、DNA損傷	細胞質	DNA修復
<i>GRE2</i>	2.3	1.8	浸透圧、イオン、酸化、熱、重金属	細胞質、核	NADPH依存還元酵素
<i>HSP10</i>	2.2	2.5	熱	ミトコンドリア膜	シャペロン(ミトコンドリアタンパクの折りたたみ、整列)
<i>PFY1</i>	2.1	-	熱	アクチンキャップ、出芽部位	細胞骨格形成、出芽、細胞内輸送
<i>RVS161</i>	2.0	1.7	浸透圧、細胞飢餓	細胞膜	アクチン膜形成、脂質輸送
<i>UBC5</i>	2.0	2.0	マルチストレス、熱	プロテオソーム	ストレス応答の中心的構成要素。異常タンパクの選択的分解
<i>GRE3</i>	1.8	2.1	浸透圧、イオン、酸化、熱、重金属	細胞質、核	還元酵素
<i>GAD1</i>	1.7	2.3	酸化	細胞質	還元酵素
<i>SSE2</i>	1.5	2.0	熱	細胞質	タンパク質の折りたたみ
<i>AAD6</i>	1.4	2.5	酸化	不明	アリアルアルコール酸化
<i>AAD4</i>	1.4	2.1	酸化	不明	アリアルアルコール酸化

ストレス対応に関係する遺伝子で、4日目または6日目で発現が促進している遺伝子を表にした。数値は親株に対して、何倍の発現であったかを示す(-は欠損データ)。

第5節 要約

カプロン酸エチル高生産株 3703-7 株と親株 3703 株の細胞形態、増殖は清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞形態、増殖様式と同じく、卵状細胞で出芽により増殖する酵母であった。3703-7 株は親株および清酒酵母 K701 株と比較してグルコースおよびエタノールに対する耐性が低い菌株であった。3703-7 株はグルコース濃度が増大しても親株と比べて増殖速度は遅くなるが、最大細胞数はほとんど変わらずに生育した。3703 株と 3703-7 株のセルレニン、シクロヘキシミドとクロトリマゾールに対する耐性は、脂肪酸合成酵素阻害剤であるセルレニンに対してだけ異なり、3703 株はセルレニンに対して耐性がなかったが、3703-7 株は耐性株であった。また 3703-7 株はシクロヘキシミドに対しては極めて低い濃度で生育は阻害された。

3703-7 株の遺伝子発現の特徴を明らかにするために DNA マイクロアレイにより解析を行った。3703 株と 3703-7 株の 4 日目（対数増殖期）およびカプロン酸エチル生成とエタノール生成に最も大きな差の見られる培養 6 日目（定常期）の細胞の高発現遺伝子は、培養 4 日目 363、6 日目 317 であった。低発現遺伝子は、4 日目、6 日目で、それぞれ 341、389 であった。この結果は、変異株において全遺伝子（約 6,000 遺伝子）の約 10% が親株と異なった発現を示している。3703-7 株の脂肪酸合成酵素遺伝子 *FAS2* の発現は親株と変わらなかった。高発現遺伝子はエネルギー生産、構造タンパク質および酵素、浸透圧ストレス・熱ショックで誘導される遺伝子であった。これらの結果からカプロン酸エチルを高生産するように変異された 3703-7 株は、長鎖脂肪酸の組成の変化による細胞膜系の欠陥に対して、細胞膜、ER、ミトコンドリア膜、核膜などの膜系の保護、および損傷 DNA の修復、異常タンパク質の選択的分解などの酸化的ストレスへの対応のため、浸透圧ストレス応答遺伝子を中心とした多くのストレス応答遺伝子が高発現されると考察される。

第4章 カプロン酸エチル高生産株による香気物質の生産性の向上

第1節 序論

本研究の第2章では、リンゴ搾り粕糖液を基質としてカプロン酸エチル高生産酵母3703-7株を培養することにより、カプロン酸エチルを多く含むフレーバーアルコールの生産が可能であることを明らかにした。カプロン酸エチルはリンゴなどの果実様の甘い香りを有し、吟醸酒を特徴づける吟醸香の主要な構成成分であることから⁹⁰⁾、清酒やしょうちゅうではカプロン酸エチルの香りを高めることにより品質を向上させる研究が行われている^{71,77-79,92-95)}。リンゴ搾り粕を原料とするエタノール生産についても、カプロン酸エチルの香りを付加することにより、飲料の嗜好性や商品価値を高めるだけでなく、天然のフレーバーとして様々な用途に利用が可能であると考えられる。

フレーバー産業は化粧品、石けん、トイレタリーや環境芳香剤等に使われるフレグランス産業とともに近年注目される産業分野である。「フレーバー」は、香料業界では飲食料品に使われる香料を表す用語である。日本はアメリカに次ぐ世界第2位の香料消費国であり、金額ベースで世界の香料の約12%を消費している(日本香料工業会1990)¹⁷⁾。2002年のデータ⁹⁶⁾では、日本の香料市場の規模は2,800~3,000億円、その内75%がフレーバーで、25%がフレグランスである。

フレーバーは、動植物香料原料を圧搾抽出、水蒸気蒸留、溶剤抽出、吸収、アルコール浸出(チンキ)などの方法で香気成分を抽出することにより製造される。抽出後に溶剤を除去する場合は、溶剤除去過程で低沸点の香気成分の一部が失われることが知られている。

フレーバーアルコールには厳密な定義は無いが、芳香物質とアルコールを含む飲用可能なフレーバーとすることができる。たとえば、ブランデーをブランデーと呼ぶのは酒税法上の区分であり、ブランデーケーキの香味付けに使われる場合は、フレーバーアルコールとして使用されていることになる。カクテルや料理に使用されるリキュール、エッセンス

類にも同様のことが言える。

フレーバーアルコールは上記のようにそのまま利用される場合と、食品の加工に利用されることから、蒸留、浸漬などにより作られたものをそのまま利用するほか、風味付けのためシロップ、色素、香辛料、香料などが添加される場合もある。利用法は飲用のほか、飲料や菓子などへの風味付けが主要な用途である。香料市場全体を見渡すと、自然志向による天然香料への要求や、香りによる癒しやリラクゼーション、いわゆるアロマセラピー効果への期待が高く⁹⁷⁾、新規性のある天然フレーバーアルコールは、市場性があると考えられる。

本章では、合成培地を用いて 3703-7 株がカプロン酸エチルを高生産する条件を検討するとともに、リンゴ搾り粕から糖液を調製し、これを基質としてアルコール発酵を行い、蒸留することによりカプロン酸エチルを多く含むフレーバーアルコールを製造する条件について検討した。

第2節 香気物質の生産条件の検討

1. 目的

カプロン酸エチルは吟醸酒の芳香の主要な成分であり、清酒もろみでは低温長期発酵で、かつ 1%以上のグルコースの存在下で生成するとされる。しかしながらリンゴ搾り粕糖液を基質とした発酵は、糖の組成や濃度、pH、ミネラル、窒素源など清酒もろみとは異なる原料の栄養組成と培養条件であるので、細胞増殖、エタノール生成やカプロン酸エチル等の芳香物質の生産は清酒もろみとは異なる。本節では、合成培地を用いて 3703-7 株がカプロン酸エチルを高生産する培養条件について検討を行った。

2. 実験材料及び方法

2-1 使用菌株

菌株は、清酒用酵母 3703 株（親株）とカプロン酸エチル高生産変異株, 3703-7 株を用いた。

2-2 培地組成および培養

第3章第4節に準じ、YNB 培地(0.67% Yeast nitrogen base (Difco))に糖類を添加した培地をスクリューキャップ付き試験管に 10ml を分注後、オートクレーブ滅菌し、プチルゴム中栓とスクリューキャップで密栓を施した。培養は、酵母細胞 5×10^6 cell/ml となるように植菌し、嫌気、静置条件で行った。

2-3 酵母菌体数の測定

培養後の培養液を 20~40 倍希釈し、吸光光度計で O.D.₆₀₀ を測定した。600nm での吸光度と菌体数の関係については、同じ試料の菌体数をトーマの血球計測板で計測して検量線を作成し、これをもとに算出した。

2-4 休止細胞による香気物質の生成

休止細胞の実験は栗山⁷⁸⁾らの方法に準じて行った。3703 株と 3703-7 株をグルコース 2% の YMP 培地に 5×10^5 cell/ml となるよう植菌し、25℃、1 日間静置培養した酵母を休止細胞の実験に用いた。15%グルコースを含む 0.1M クエン酸緩衝液 (pH 4.2) を 10ml ずつ試験管に分注し、オートクレーブ滅菌後、 5×10^7 cell/ml となるように酵母細胞を添加し、ブチルゴム栓およびアルミシールで密閉した。反応は 25℃、20 時間静置下で行った。

2-4 培養液の化学分析

1) 香気物質の分析

第 2 章第 5 節に準じ、ガスクロマトグラフ (HP 7694 型 ヘッドスペース法) により行った。

2) エタノールの定量

第 2 章第 5 節に準じ、培養液を蒸留し、ガスクロマトグラフ (HP 7694 型) に直接注入して行った。

3) 還元糖の定量

Somogyi-Nelson 法を用いて定量した。

3. 結果と考察

1) グルコース濃度の効果

グルコース 2% および 15% に調製した YNB 培地に 3703 株および 3703-7 株を植菌し、15℃ で静置培養してカプロン酸エチルの生成を経時的に測定した。その結果を Fig.4-1 に

示す。カプロン酸エチルはグルコース 15%で 3703-7 株を培養した時最も多く生成された。3703-7 株によるカプロン酸エチルは培養 7 日間でグルコース 2%の時と比べてグルコース 15%では 3.4 倍多く生成された。グルコース濃度を 2%から 20%まで段階的に変えて 15℃, 7 日間培養し、生成されたカプロン酸エチルを測定した。Fig.4-2 に示すようにグルコース濃度全般に亘って 3703-7 株と比べて 3703 株の生育はよかったが、カプロン酸エチル高生産株 3703-7 株のカプロン酸エチル生成はグルコース濃度の増加とともに著しく増加した。3703-7 株はグルコース濃度 15%以上ではカプロン酸エチル生成は増加しなかった。親株の 3703 株はカプロン酸エチル生成に対するグルコース濃度の効果はほとんどなかった。

2) 培養温度の影響

3703 株と 3703-7 株を 15%グルコースの YNB 培地で、培養温度 15℃、25℃と 30℃で 3 日間嫌氣的に静置培養を行い、生成するエタノールおよび香気物質を測定した。その結果を Table4-1 に示す。エタノール、カプロン酸エチル、酢酸エチルと酢酸イソアミルの生成は 15℃培養と比較して 25℃培養の方がより多く、カプロン酸エチルは、3703 株は 4.7 倍、3703-7 株は 8.2 倍であった。15℃と 25℃のいずれの培養温度でも 3703-7 株より 3703 株の方がエタノールを多く生成した。3703-7 株を 30℃で培養した場合は、25℃と比較してエタノール生成は増加したが、香気物質は減少した。小室ら⁹⁷⁾は花から分離した ND-4 株は低温でカプロン酸エチルを最も多く生産し、13℃、25 日間培養で 2.18ppm であったと報告している。一方、穂坂ら⁹⁸⁾は花から分離したカプロン酸エチル高生産酵母、ND 株は 17℃から 30℃の培養温度では低い温度程カプロン酸エチルを多く生成するが、25℃の発酵温度でもカプロン酸エチルを生成したと報告している。小室ら、穂坂らは開放系で実験を行った結果であり、我々が用いた密封容器での香気物質の生産の結果と同じく比較はできないが、3703-7 株は生育の速い温度でフレーバーアルコールを効率よく生産する、有用な酵母であると推察される。

3) 糖基質の効果

3703-7 株を、グルコース、フルクトースとシュクロースをそれぞれ 15%含む YNB 培地に接種し、25℃で 3 日間培養し、生成した香気成分を測定した。その結果を Table.4-2 に示す。香気物質の生成はシュクロース>フルクトース>グルコースの順に多く、糖質の効果を最も受けたカプロン酸エチルは、フルクトースでグルコースの場合の 1.4 倍、シュクロースでは 1.8 倍に達した。リンゴ搾り粕抽出液に含まれる資化性糖の約 75%はフルクトースとシュクロースで占められており、これらの糖が香気物質の生成を増加させる効果があることは、リンゴ搾り粕がフレーバーアルコール生産に適した原料であることを示唆している。

4) 休止細胞によるカプロン酸エチルの生成

グルコースおよびエタノールを含む反応液に加え、3703 株と 3703-7 株の休止細胞によって生成されるカプロン酸エチルと酢酸エチルを測定した。3703-7 株のカプロン酸エチルと酢酸エチルは、Fig. 4-3 に示すようにエタノールの添加により生成量は増加した。3703 株の酢酸エチルの生成はエタノール添加で増加したが、カプロン酸エチルはエタノールを加えた反応でも生産されなかった。3703-7 株によって生成されたカプロン酸エチルはエタノール 5%添加で最も多く、2.3ppm であった。この生成量はエタノール無添加時の 0.6ppm に対して約 4 倍であった。吟醸香の主成分であるカプロン酸エチルは 3703-7 株の休止細胞だけが生成した。酢酸イソアミルは、エタノール無添加区で 3703 株では 2.2ppm、3703-7 株では 1.7ppm 生成されたが、エタノール 5%以上では生成されなかった。これらの結果は 3703-7 株の休止細胞を使って、糖とエタノールからカプロン酸エチル、酢酸エチルや酢酸イソアミルなどの吟醸香芳香物質を生産できることを示唆している。

表には示さなかったが、3703-7 株でグルコース無添加の反応液にエタノール 5%の添加

によりカプロン酸エチルが 0.22ppm 生成された。この生成量はグルコース添加の反応液にエタノールを加えない時の約 1/3 であった。これらの結果からカプロン酸エチルはグルコースがカプロン酸エチルの前駆体に代謝され、この前駆体とエタノールにより生成されることが示唆される。栗山ら⁷⁸⁾は協会酵母 7 号の休止細胞を用いてグルコースとカプロン酸を含む反応液にエタノールを加え、カプロン酸エチル生成に対するエタノールの添加効果について検討し、カプロン酸エチル生成はエタノール濃度の増加に従って増加し、エタノール 20%で最大の 10ppm まで増加したと報告している。反応液にカプロン酸を加えた彼らの実験ではカプロン酸エチル生成量は 3703-7 株での実験結果よりかなり多く生成されたが、カプロン酸とエタノールからカプロン酸エチルが生成されることを示唆している。清酒酵母によるカプロン酸エチルは Fig. 4-6 の代謝経路により生成される⁸⁶⁾。栗山ら^{78,99)}は、協会 7 号酵母の休止細胞による実験を行い、カプロン酸エチルはエステラーゼ経路ではなく、アルコールアシルトランスフェラーゼ経路により合成されることを明らかにした。エタノール生成量が 3703 株と比べて 3703-7 株の方が少ないのはカプロン酸エチルや酢酸エチル等のエステル生成に使われることによると考えられる。

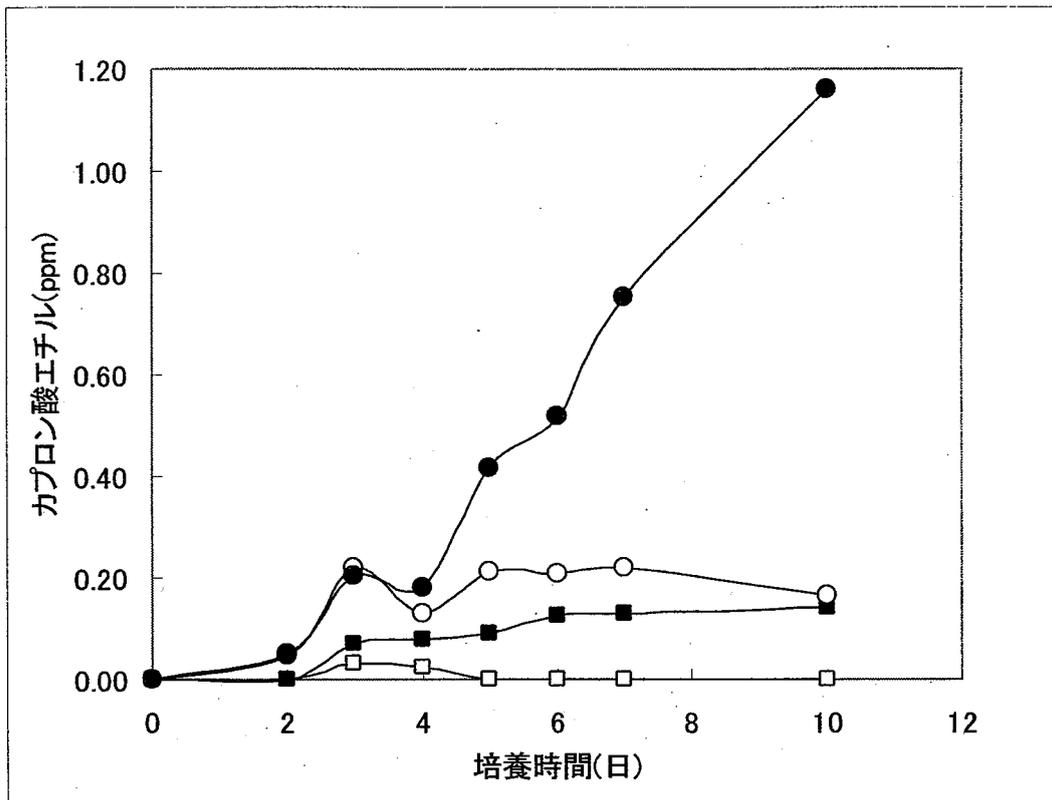


Fig.4-1 3703 株および 3703-7 株の培養による培地中のカプロン酸エチル濃度の

経時変化

2%および 15%グルコースを含むY.N.B培地で 15℃2~10 日間密閉静置条件で培養を行った。

■,□,3703 株 ●,○,3703-7 株; □,○, 2%グルコース ■,●, 15%グルコース

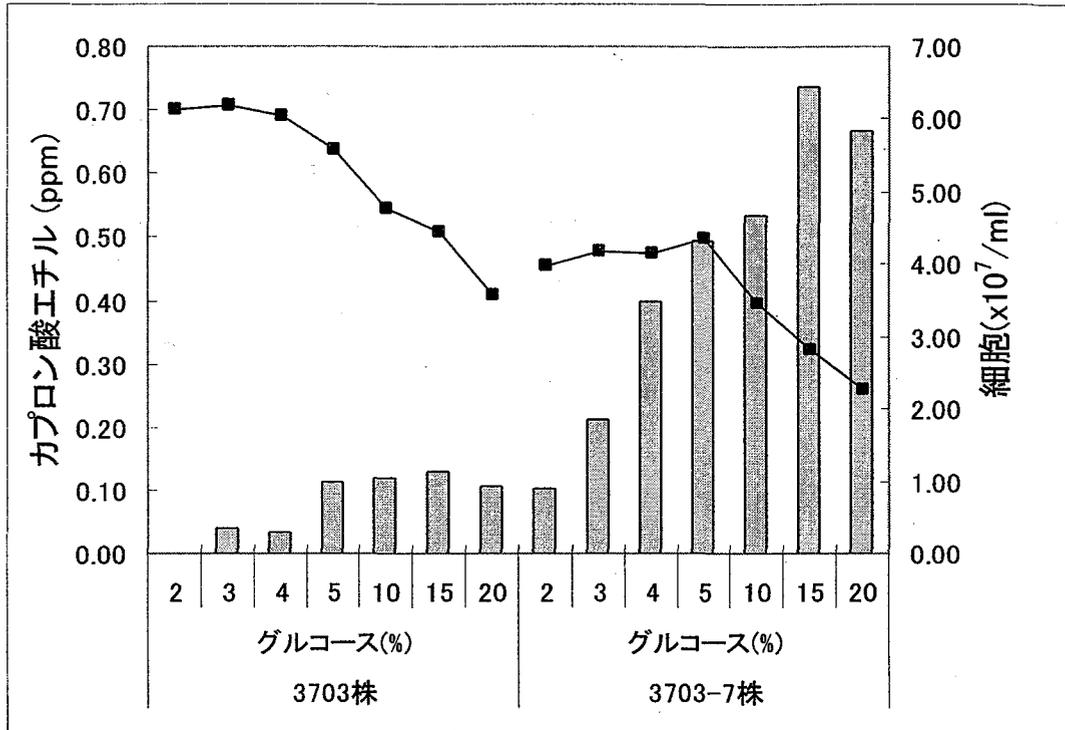


Fig.4-2 3703 株および 3703-7 株のカプロン酸エチルおよび細胞濃度に及ぼすグルコース濃度の影響

2%~20%グルコースを含むYNB培地で15°C7日間密閉静置条件で培養を行った。

■, 細胞数; 灰色のバー,カプロン酸エチル濃度

Table4-1エタノールおよび香気成分生成に対する培養温度の影響

成分		菌株		3703-7		
		3703		15°C	25°C	30°C
エタノール (%)		15°C	25°C	15°C	25°C	30°C
香気成分 (ppm)	カブロン酸エチル	1.72	2.72	0.89	2.44	3.58
	酢酸エチル	0.06	0.28	0.24	1.97	1.02
	酢酸イソアミル	1.30	7.56	0.73	3.23	3.16
		0.10	0.33	0.07	0.26	0.15

3703株および3703-7株を各培養温度で3日間密閉静置条件で培養を行った。

Table4-2香気成分生成に対する基質糖類の影響

成分		菌株		
		グルコース	フルクトース	シュクロース
香気成分 (ppm)	カブロン酸エチル	2.51	3.61	4.53
	酢酸エチル	3.01	3.60	4.29
	酢酸イソアミル	0.31	0.34	0.42

15%各糖基質を含む培地で3703-7株を25°C3日間密閉静置条件で培養を行った。

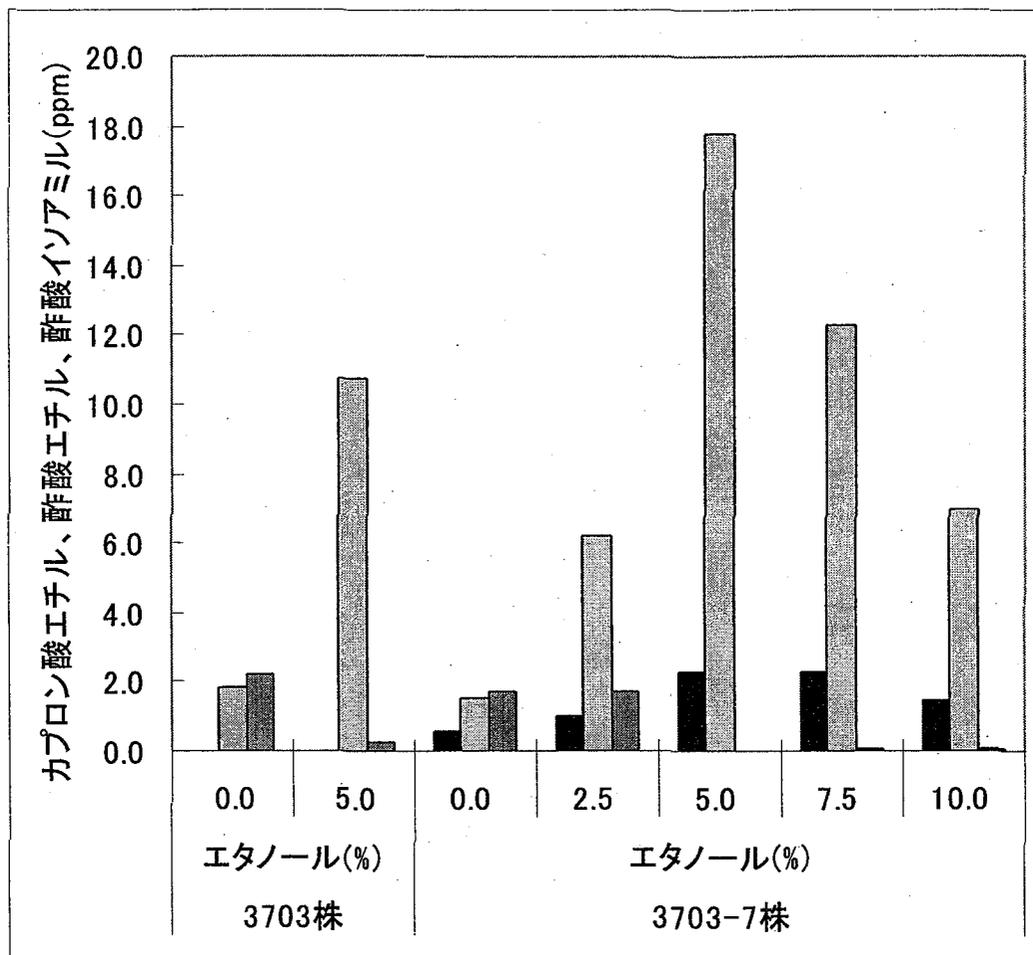


Fig.4-3 3703 株と 3703-7 株の休止細胞による香気成分生成に対するエタノールの添加効果

■, カプロン酸エチル □, 酢酸エチル ▨, 酢酸イソアミル

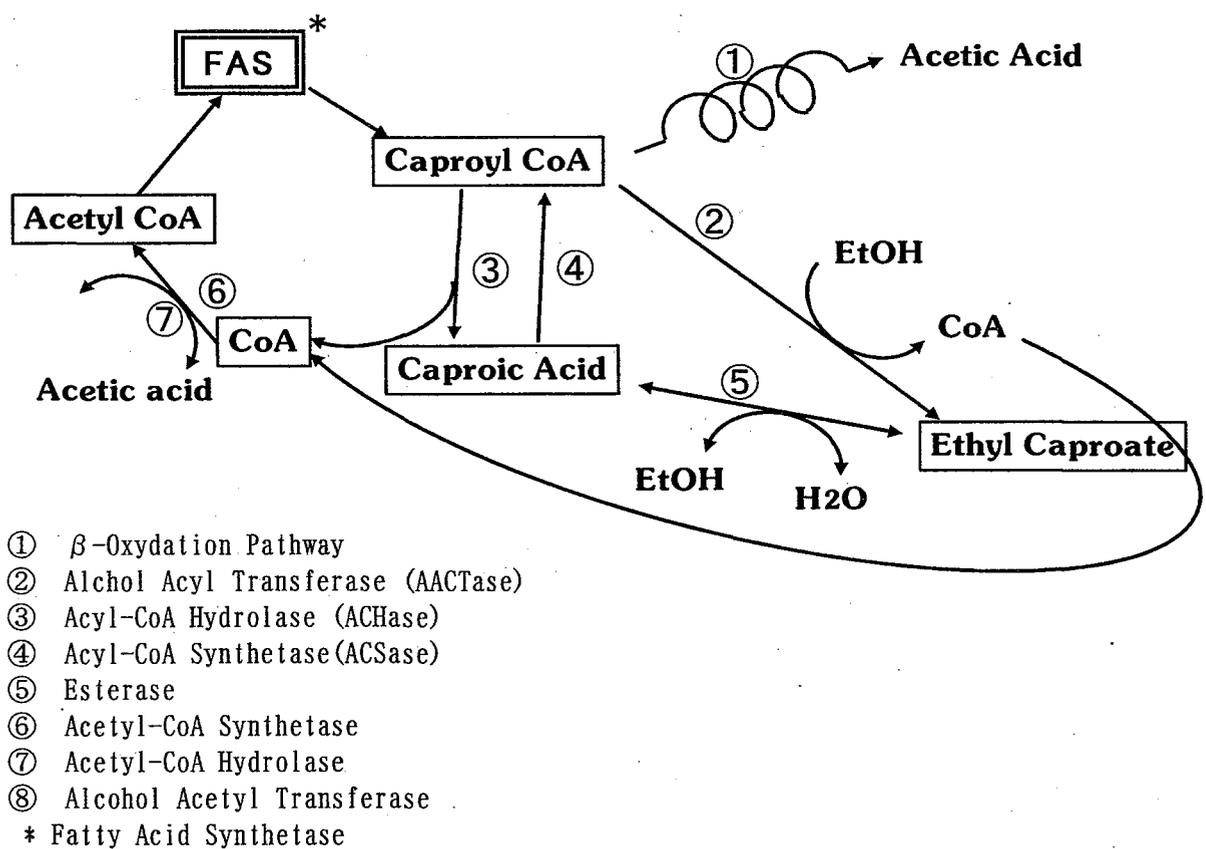


Fig.4-4 カプロン酸エチル生成機構の模式図 86)

第3節 リンゴ搾り粕抽出液を基質としたフレーバーアルコールの生産

1. 目的

リンゴ搾り粕を発酵させることにより独特のフレーバーを持つアルコールが生産できれば、嗜好性の高いアルコール飲料が製造できるだけでなく、天然香料としても様々な用途が開かれる。前節で 3703-7 株によるカプロン酸エチルの生産条件を検討した結果、カプロン酸エチルは糖濃度の高い方が、培養温度は低温発酵よりは生育に適した高い温度での発酵がより多く生産され、糖基質はシュクロース>フルクトース>グルコースの順にカプロン酸エチルは多く生産されることを明らかにした。

本章では、リンゴ搾り粕から糖濃度の異なる2種類の糖液を調製し、これを基質としてアルコール発酵を行い、カプロン酸エチル、酢酸エチルや酢酸イソアミルの生産条件を検討するとともに発酵液を蒸留することにより、良好な香りを持つフレーバーアルコールの製造を検討した。

2. 実験材料及び方法

2-1 使用菌株

菌株は、清酒用酵母 3703 株（親株）とカプロン酸エチル高生産 3703-7 株（変異株）を用いた。

2-2 リンゴ搾り粕抽出液の調製

平成18年1月に、青森県果工でリンゴ果実を破碎搾汁し、果汁を製造した残りのリンゴ搾り粕を用いた。リンゴ果実の品種は主にふじである。このリンゴ搾り粕から2種類の抽出液を調製した。リンゴ搾り粕 500g に 500ml または 100ml の蒸留水を加え、40℃、1時間、時々攪拌しながら抽出を行い、ガーゼろ過後、8,000rpm x 10min 遠心上清液を採取し、それぞれを×5抽出液、×1抽出液とした。抽出液の還元糖を測定した。リンゴ搾り粕抽出液は 50ml をバイアルビン(125ml)に分注し、オートクレーブ滅菌後ブチルゴム中

栓とアルミニウムキャップで密栓した。

2-3 培養液の化学分析

1) 香気物質の分析

第2章第5節に準じ、ガスクロマトグラフ (HP 7694 型 ヘッドスペース法) により、行った。

2) エタノールの定量

第2章第5節に準じ、培養液を蒸留し、ガスクロマトグラフ (HP 7694 型) に直接注入して行った。

3) 還元糖の定量

Somogyi-Nelson 法、および、F キット (Saccharose/D-Glucose/D-Fructose) (Biopharm, Germany) を用いて定量した。

2-3 リンゴ搾り粕抽出液のアルコール発酵

×1抽出液 および×5抽出液 50ml に 3703-7 株を 5×10^6 cell/ml になるように植菌し、嫌気条件で 15℃ および 25℃ で 1-12 日間静置発酵を行った。

2-5 フレーバーアルコールの蒸留

×1抽出液 50ml をスクリュウキャップ付きバイアルビンに入れ、オートクレーブ滅菌後、酵母 5×10^6 cell/ml となるように植菌し、嫌気条件で 25℃、8 日間静置培養を行った。培養液 100ml を国税庁所定分析法注解にあるアルコール分定量用の蒸留装置を用いて常温常圧蒸留を行い、留液 15ml をフレーバーアルコールとして回収した。

3. 結果と考察

リンゴ搾り粕から糖濃度の異なる2種類の糖液を調製し、これを培地として 3703-7 株を培養し、カプロン酸エチル、酢酸エチルや酢酸イソアミルの生産条件を検討した。リンゴ搾り粕×5抽出液および×1抽出液中の糖成分を Table4-3 に示す。フルクトースとグルコースが主要糖分でシュクロースはそれらの 1/10 量含まれていた。×5抽出液の全糖分は 6.4%であった。×1抽出液では全糖分は 10.4%であった。×5抽出液および×1抽出液 50ml に 3703-7 株を 5×10^6 cell/ml になるように植菌し、嫌気条件で 15℃および 25℃で静置培養を行い、還元糖の消費、エタノールと香気成分生成を測定した。その結果を Fig.4-4 に示す。×1抽出液を培養温度 25℃で本菌株を発酵させた時カプロン酸エチル生成は最大であった。この値は 15℃の培養と比較して3倍であった。×5抽出液の場合、カプロン酸エチル生成は低く、25℃でも 1.2ppm であった。エタノールは×1抽出液を培養温度 25℃で発酵させた時に最も良く生成された。エタノール発酵は 8 日目ではほぼ終了し、その時のエタノール、カプロン酸エチルはそれぞれ 5.02%と 3.1ppm であり、酢酸エチルと酢酸イソアミルは 6.0ppm と 0.5ppm であった。また、還元糖は発酵に伴い減少し、×1抽出液 15℃発酵の場合を除いて発酵 10 日目にはほとんどが消費された。リンゴ搾り粕抽出液でも糖濃度が高い方が、また発酵温度は生育に適した温度の方がエタノールおよびカプロン酸エチル生成は多かった。

再度リンゴ搾り粕から調製した×1抽出液 50ml (還元糖 10.8%, Table 4-4) に 3703-7 株および 3703 株を 5×10^6 cell/ml になるように植菌し、培養温度 25℃、嫌気条件で静置培養した。培養 8 日後の発酵液および発酵液を蒸留し、回収したフレーバーアルコールの成分を測定した。その結果を Table4-5 に示す。3703-7 株のエタノール生成量は 3703 株より少なかったが、カプロン酸エチルは前者の 0.10ppm に対して後者は 3.12ppm と著しく多く生産された。酢酸イソアミルと酢酸エチルはカプロン酸エチルとは違い、3703 株の方が多く生成された。カプロン酸エチル、酢酸イソアミルと酢酸エチルの発酵生産の傾向は

グルコースまたはフルクトースを加えた YNB 培地で両菌株を発酵させた時と同じであった。

蒸留回収された 3703-7 株のエタノールは発酵液に対して 6.2 倍に濃縮されたが、カプロン酸エチルもほぼ同じ 6 倍に濃縮された。カプロン酸エチルは 3703 株の 0.46ppm に対して 3703-7 株は 40.5 倍の 18.64ppm の濃度であった。官能試験では 3703 株によって生成されたフレーバーアルコールは爽やかなリンゴ果実様の風味であるのに対し、3703-7 株によって生成されたフレーバーアルコールはリンゴの香りに加えてカプロン酸エチルに由来する華やかな甘い香りを有し、ブレンド用はもとよりそのままアップルブランデーとして飲用することも可能であると考えられる。

Table 4-3 リンゴ搾り粕抽出液に含まれる可溶性糖類の組成

糖	試料	×5抽出液	×1抽出液
		組成(%)	組成(%)
フルクトース		4.33	6.88
グルコース		2.02	2.75
シュクロース		0.49	0.81
トータル		6.41	10.44

リンゴ搾り粕湿物 500g に蒸留水 500ml (×5抽出液) または 100ml (×1抽出液) を加え、40℃, 1時間、時々攪拌しながら抽出を行い、ガーゼろ過後、8,000rpm x 10min 遠心上清液を採取した。

Table 4-4 リンゴ搾り粕×1抽出液に含まれる可溶性糖類の組成

糖	試料	×1抽出液
		組成(%)
フルクトース		7.0
グルコース		2.9
シュクロース		0.8
トータル		10.8

リンゴ搾り粕湿物 500g に蒸留水 100ml を加え、40℃, 1時間、時々攪拌しながら抽出を行い、ガーゼろ過後、8,000rpm x 10min 遠心上清液を採取した。

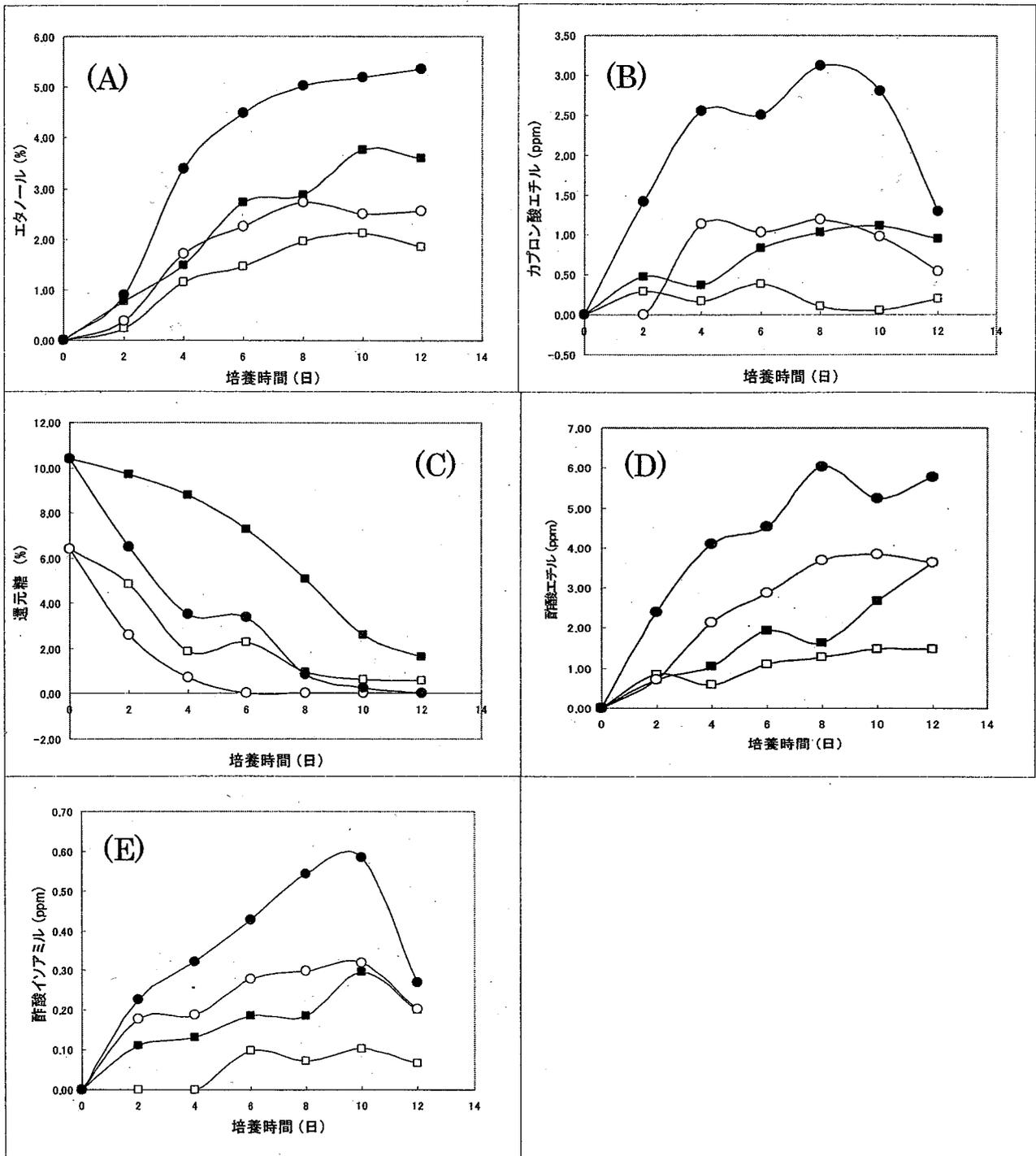


Fig.4-5 リンゴ搾り粕抽出液培地の糖濃度および発酵温度が、3703-7 株での発酵におけるエタノール生成、カプロン酸エチル生成および還元糖消費に与える影響。

(A),エタノール生成 (B),カプロン酸エチル生成 (C),還元糖濃度 (D),酢酸エチル生成 (E),酢酸イソアミル生成

□, ■, 15°Cで発酵 ○, ●, 25°Cで発酵; ●, ■, ×1抽出液培地(還元糖 10.4%) ○, □, ×5抽出液培地(還元糖 6.4%)

Table 4-5 リンゴ搾り粕抽出液の発酵液およびそれを蒸留したフレーバーアルコールに含まれるエタノールおよび香気成分

	成分	菌株		
		3703株	3703-7株	
発酵液	エタノール(%)	5.43	5.23	
	香気成分 (ppm)	カプロン酸エチル	0.10	3.12
		酢酸イソアミル	11.35	7.13
		酢酸エチル	0.58	0.45
フレーバー アルコール	エタノール(%)	32.49	32.27	
	香気成分 (ppm)	カプロン酸エチル	0.46	18.64
		酢酸イソアミル	55.55	37.78
		酢酸エチル	3.23	2.49

リンゴ搾り粕×1抽出液(還元糖 10.8%を含む)を 3703 株および 3703-7 株で 25°C8 日間発酵した後、発酵液を常温常圧で蒸留し、フレーバーアルコールを回収した。

第4節 要約

カプロン酸エチル高生産酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 3703-7 株はグルコース濃度 15%, 培養温度 25°C で培養した時カプロン酸エチル生成が最大であった。グルコース濃度は低い濃度よりは高い濃度の方がカプロン酸エチル生成は良く、糖類ではグルコースよりはシュクロース、フルクトース基質の方がカプロン酸エチルを多く生成した。吟醸酒醸造は低温仕込みで行われるが、3703-7 株による吟醸香芳香物質の生産は増殖の速い培養温度、25°C で最も良かった。親株の 3703 株はカプロン酸エチル生成に対するグルコース濃度、培養温度の効果はほとんどなく、その生成量は 3703-7 株と比較して 1/7~1/10 であり、低かった。これらの結果からフルクトース、グルコースとシュクロースを糖組成とするリンゴ搾り粕を原料として 3703-7 株をエタノール発酵することによりカプロン酸エチルや酢酸エチルの香気物質を生成することが示唆される。

3703-7 株の休止細胞にグルコースおよびエタノールを作用させることにより、カプロン酸エチル、酢酸エチルおよび酢酸イソアミルが生成された。親株の 3703 株ではエタノールの添加によってカプロン酸エチルは生成しなかった。これらの結果は 3703-7 株の休止細胞を使ってリンゴ搾り粕糖液とエタノールから吟醸香芳香物質成分のカプロン酸エチル、酢酸エチルやイソアミルを生成できることを示唆している。

リンゴ搾り粕から糖濃度の異なる 2 種類の抽出液、×5 抽出液 (糖分 6.4% を含む) および ×1 抽出液 (糖分 10.4% を含む) を調製し、3703-7 株を植菌し、15°C および 25°C で培養した。カプロン酸エチルは ×1 抽出液の方が多く生産された。糖分 10.8% を含む ×1 抽出液で 3703-7 株を 25°C、8 日間培養した後、エタノールは 5.23% 生成され、カプロン酸エチル、酢酸イソアミルと酢酸エチルはそれぞれ 3.12ppm, 7.13ppm, 0.45ppm であった。この発酵液の蒸留液はカプロン酸エチル、酢酸イソアミルと酢酸エチルはそれぞれ 18.64ppm, 37.78ppm, 2.49ppm 含まれ、リンゴの香りに加えて甘い香りを有するエタノール 32.27% のフレーバーアルコールであった。

第5章 総括

青森県のリンゴ生産量は40万トンで、全国生産量の約50%を占めている。その主要な産業作物であるリンゴ果実は約10万トンがリンゴジュースに加工され、その過程で排出されるリンゴ搾り粕は2万5千トンにも及ぶ。本研究はリンゴ搾り粕を原料として液体麴と酵母を利用し、フレーバーアルコールを製造する技術開発を目的に研究を行った。

リンゴ搾り粕に含まれる水不溶性多糖類はペクチン・ヘミセルロース・セルロースであり、これらの成分はリンゴの種類、収穫時期などに違いがあるが、いずれの果実でもペクチンが最も多く、次いでセルロース、ヘミセルロースの順に多く含まれていた。可溶性糖類の組成はリンゴ果汁と同様フルクトース・グルコース・シュクロースであり、フルクトースが全体の半分以上を占めた。酵母は可溶性糖類を利用し、エタノール発酵をすることが出来るが、水不溶性の多糖類は利用できないので加水分解して可溶性糖類にしなければならない。リンゴ搾り粕の水不溶性多糖類の分解には、コウジカビ *Aspergillus oryzae* や *Aspergillus niger* より、*Botrytis cinerea* が適していることを明らかにした。

リンゴ搾り粕の主要な水不溶性多糖類であるペクチンおよびセルロースを炭素源とした培地を用いて、菌糸の生育を指標として液体麴製造用の糸状菌菌株の選抜を行った。*A. oryzae* と *A. niger* は *B. cinerea* 30915 株と比べてペクチン、セルロース培地に生育は悪く、特に両菌株はセルロース培地に生育は顕著に劣った。この結果から *B. cinerea* 30915 株を液体麴製造用菌株に選抜した。リンゴ細胞組織の分解はペクチン・ヘミセルロース複合体の分解が重要であるが、*B. cinerea* 30915 はペクチナーゼ、セルラーゼ活性が強く、リンゴ搾り粕のペクチンやセルロースを分解した。リンゴペクチンの分解によりガラクトuron酸に加えてグルコースやフルクトースなどの酵母が利用できる糖類が更に生成した。液体麴を加えたリンゴ搾り粕に *Saccharomyces cerevisiae* kw4 株を接種し、培養した培養液だけが、還元糖は消費され、エタノールが生成された。しかし酵母を加えなかった培養液ではエタノールは生成されなかった。発酵後のリンゴ搾り粕残渣は約32%まで減少した。*B. cinerea*

30915 株の液体麴を添加し、リンゴ搾り粕の糖化と酵母のエタノール発酵を並行的に行った場合と液体麴無添加でリンゴ搾り粕に酵母を加え、アルコール発酵を行った場合とでエタノール生成量を比較したが、リンゴ搾り粕(乾重)200g 当たり液体麴無添加では 33.77g、液体麴添加では 48.59g であった。この結果は、液体麴により生成した糖類を酵母が資化することにより、エタノールが生成されたことを示唆している。この実験に *S. cerevisiae* kw4 株に加えて、カプロン酸エチル高生産変異株 3703-7 株を選び、リンゴ搾り粕培地に培養し、カプロン酸エチルが生成されるか調べた。3703-7 株は、エタノールの生成と共にカプロン酸エチル、酢酸エチルと酢酸イソアミルを生成し、吟醸香の主成分であるカプロン酸エチルは 3703 株と比べて 3 倍も多く生成された。3703-7 株の培養液はリンゴの芳香に加えて芳醇な香りのする培養液であった。

リンゴ搾り粕を原料にして芳醇な香りのエタノールを製造できることが分かったので 3703-7 株の細胞形態、基質利用性、糖・エタノール・抗生物質耐性などの生理学的特徴と芳香物質の生産条件を明らかにした。カプロン酸エチル高生産変異株 3703-7 株は親株 3703 株と同様、*S. cerevisiae* の細胞形態、増殖様式は同じく、卵状細胞で多極出芽により増殖する酵母であった。3703-7 株と 3703 株が違った点は、前者がグルコースおよびエタノールに対する耐性が弱いこと、セルレニンに対して 3703-7 株は 3703 株と異なり、耐性菌であることであった。

カプロン酸エチル高生産変異株 3703-7 株のセルレニン耐性変異が細胞生理全体に与える影響を明らかにするために DNA マイクロアレイにより解析を行った。3703 株と 3703-7 株の間でカプロン酸エチル生成に最も大きな差の見られる培養 4 日目(対数増殖期末期)およびエタノール生成で差の見られる 6 日目(定常期)の細胞を実験に使用した。高発現遺伝子は、培養 4 日目 363、6 日目 317 であった。低発現遺伝子は、4 日目、6 日目で、それぞれ 341、389 であった。この結果により、変異株において DNA マイクロアレイチップ上に配置された約 6,000 遺伝子の約 10%が親株と異なった発現を示すことを明ら

かにした。

MIPS のデータベースおよび GeneSpring を用いて高発現遺伝子の代謝経路の解析を行ったところ、培養4日目の変異株は親株に対しエネルギー生産および蛋白質合成に関わる遺伝子が親株より高発現しており、また、炭素化合物の代謝、ビタミン・補酵素の代謝、輸送系、タンパク質の活性制御、結合因子やコファクターを必要とするタンパク質（構造タンパク質または酵素）の遺伝子が高発現し、変異株の方が親株より活発に代謝を行っていることを明らかにした。親株に対して変異株で高発現しているストレス応答遺伝子は、培養4日目は、浸透圧ストレスで誘導される *SIP18*, *HSP12*, *HOR7*, *HSP26*, *DDR2*, *GRE1*, *PRX1*, *SPI1*, *PAI3* であり、これらの多くは培養6日目においても高発現していた。熱ショックで誘導される *HSP10*, *UBC5* も培養4日目・6日目で共通して高発現していた。機能別に見ると、培養4日目ではミトコンドリア、細胞骨格・細胞膜、DNA ダメージ抵抗に関連する遺伝子が高発現していた。培養6日目では、酸化的ストレスに関連する *AAD4*, *AAD6*, *GAD1*, *GRE3* が高発現しており、これらの遺伝子は γ -アミノ酪酸 (GABA)生成などブタン酸代謝経路を構成する遺伝子であった。

これらの結果からカプロン酸エチルを高生産するように変異された 3703-7 株は、長鎖脂肪酸の組成の変化による細胞膜系の欠陥に対して、細胞膜、ER、ミトコンドリア膜、核膜などの膜系の保護、および損傷DNAの修復、異常タンパクの選択的分解などの酸化的ストレスへの対応のため、浸透圧ストレス応答遺伝子を中心とした多くのストレス応答遺伝子が誘導されていると考察される。

3703-7 株をリンゴ搾り粕培地で培養し、吟醸香の主要成分であるカプロン酸エチル、酢酸エチルや酢酸イソアミルが生成されたので、リンゴ搾り粕からフレーバーアルコールを生産するためにリンゴ搾り粕に含まれる糖類からのカプロン酸エチルや酢酸エチルなどの吟醸香芳香物質の生産条件を検討した。3703-7 株はグルコース濃度 15%, 培養温度 25°C で培養した時カプロン酸エチル生成が最大であった。グルコース濃度は低い濃度よりは高い

濃度の方がカプロン酸エチル生成は良く、糖類ではグルコースよりはフルクトース、ショ糖の基質の方がカプロン酸エチルを多く生成した。吟醸酒醸造は低温仕込みで行われるが、3703-7株による吟醸香芳香物質の生産は増殖の速い培養温度、25℃で最も良かった。親株の3703株はカプロン酸エチル生成に対するグルコース濃度、培養温度の効果はほとんどなく、その生成量は3703-7株と比較して1/7~1/10であり、低かった。これらの結果は、フルクトース、グルコースとシュクロースを糖組成とするリンゴ搾り粕を原料として生育の適温25℃で、3703-7株をエタノール発酵することによりカプロン酸エチルや酢酸エチルの吟醸香芳香物質を含むフレーバーアルコールを生産できることを示唆している。また3703-7株の休止細胞にグルコースおよびエタノールを作用させることにより、カプロン酸エチル、酢酸エチルおよび酢酸イソアミルが生成された。親株の3703株ではエタノールの添加によってカプロン酸エチルは生成されなかった。これらの結果は3703-7株の休止細胞を使ってもリンゴ搾り粕糖液とエタノールから吟醸香芳香物質成分のカプロン酸エチルや酢酸エチルを生成できることを示唆している。

これまでの研究で3703-7株はフルクトース、グルコースとショ糖を含むリンゴ搾り粕糖液から吟醸香芳香物質であるカプロン酸エチル、酢酸エチルや酢酸イソアミルを生成することを明らかにした。糖類ではリンゴ搾り粕に最も多く含まれるフルクトースから吟醸香の主要な香気成分であるカプロン酸エチルがグルコースより多く生産されること、糖濃度は高い方が多く生産されること、また3703-7株の生育適温である25℃でカプロン酸エチルが多く生産されことを合成培地で明らかにした。これらの結果に基づいて実際のリンゴ搾り粕糖液を培地に使い、フレーバーアルコールの製造を行った。リンゴ搾り粕から糖濃度の異なる2種類の抽出液、×5抽出液（糖分6.4%を含む）および×1抽出液（糖分10.4%を含む）を調製し、3703-7株を植菌し、15℃および25℃で培養した。カプロン酸エチルは培養温度25℃、×1抽出液の方が多く生産された。×1抽出液で25℃、8日間培養後、糖類はほとんど消費され、エタノール、カプロン酸エチル、酢酸イソアミルと

酢酸エチルはそれぞれ 5.23%, 3.12ppm, 7.13ppm, 0.45ppm 生成された。発酵液の蒸留液はエタノール、カプロン酸エチル、酢酸エチルと酢酸イソアミルはそれぞれ 32.27%, 18.64ppm, 37.78ppm, 2.49ppm であった。3703-7 株のカプロン酸エチルは 3703-7 株と比べて 40.5 倍も多かった。3703-7 株の蒸留液はリンゴの香りに加えてカプロン酸エチルの甘い香りを有するフレーバーアルコールであった。

これらの一連の研究により、リンゴ搾り粕からカプロン酸エチルの華やかな香りを特徴とするフレーバーアルコールの製造技術を開発できたことから、芳香物質を生成する酵母を使うことによりリンゴ搾り粕を原料とした多様な香気発酵が可能になり、リンゴ搾り粕の工業原料としての有効利用に道を開くことができた。

第6章 要約

本論文はリンゴ果実をジュースに加工する過程で排出されるリンゴ搾り粕を液体麴により糖化し、リンゴ搾り粕糖液からカプロン酸エチル高生産酵母によるフレーバーアルコール製造の技術開発を扱ったものである。研究の成果は以下のようにまとめられている。

1. カビ由来の酵素液を用いたリンゴ搾り粕からのエタノール生産性の向上

リンゴ搾り粕に含まれる可溶性糖類の組成はりんご果汁と同様フルクトース・グルコース・シュクロースであった。水不溶性多糖類はペクチン、セルロース、ヘミセルロースの順に多く含まれていた。これらの多糖類を加水分解して可溶性糖類を生産するカビとしては、麴カビ *Aspergillus oryzae*, *A. niger* よりは *Botrytis cinerea* が適していることを明らかにし、*B. cinerea* 30915 株を液体麴製造用菌株に選抜した。リンゴ搾り粕で *B. cinerea* 30915 を培養することにより調製した液体麴と *Saccharomyces cerevisiae* kw4 株をリンゴ搾り粕に添加し、リンゴ搾り粕の糖化と発酵を並行的に行うことにより、エタノール生成量は液体麴無添加での場合の 1.44 倍まで増加し、発酵後のリンゴ搾り粕残渣は約 32%まで減少した。また、カプロン酸エチル高生産変異株 3703-7 株を同様の方法で培養することにより、エタノールの生成と共にカプロン酸エチル、酢酸エチルと酢酸イソアミルが生成された。

これらの結果から、液体麴を使うことによりリンゴ搾り粕の水不溶性物質が分解され、酵母の利用できる還元糖が生成されると共にエタノールおよび吟醸香芳香物質が得られることが明らかになった。

2. カプロン酸エチル高生産株 3703-7 株の菌学的特徴

セルレニン耐性で育種されたカプロン酸エチル高生産株 3703-7 株は親株 3703 株と同様、卵状細胞で多極出芽により増殖するが、前者は後者に比べてグルコースおよびエタノール

に対する耐性が弱いことを明らかにした。そして、両者の相違を詳しく調べるため、DNA マイクロアレイを用いて 3703-7 株の遺伝子発現解析を行った結果、変異株において解析された約 6,000 遺伝子の約 10%が親株と異なった発現を示した。高発現遺伝子が関与する代謝経路の解析により、3703-7 株は親株と比較して培養条件に対し何らかのストレスを受け、エネルギー生産および物質代謝が活発になっていることが示唆された。また、高発現しているストレス応答遺伝子の分類により、膜系の保護および浸透圧ストレス応答に関わる多くのストレス応答遺伝子が誘導されていることが示唆された。

以上の結果から、細胞膜の主要な構成要素である高級脂肪酸合成が親株 3703 株のように正常に機能しないために、培地中の糖やエタノールなどからストレスを受けていることが示唆された。

3. カプロン酸エチル高生産株による香気物質の生産性の向上

3703-7 株による吟醸香芳香物質の生産条件を検討し、温度は生育適温の 25℃、グルコース濃度は 15%が最適であること、糖類ではグルコースよりはフルクトース、シュクロースの方がカプロン酸エチルを多く生成することを明らかにした。また、3703-7 株の休止細胞にグルコースおよびエタノールを作用させることにより、休止細胞を使っても吟醸香芳香物質成分のカプロン酸エチルや酢酸エチルを生成できることを明らかにした。

リンゴ搾り粕から糖濃度 (6.4%、10.4%) の異なる 2 種類の抽出液を調製し、3703-7 株による芳香物質の生産を調べたところ、糖濃度 10.4%を含む抽出液で培養した方がカプロン酸エチルは多く生産され、25℃、8 日間の培養後、エタノール、カプロン酸エチル、酢酸エチル、酢酸イソアミルがそれぞれ 5.23%、3.12ppm、6.03ppm、0.54ppm に達することが明らかとなった。この発酵液を蒸留することにより、リンゴの香りに加えてカプロン酸エチルの甘い香りを有するエタノール 32.27%のフレーバーアルコールを回収することができた。

以上の結果、リンゴ搾り粕に含まれる糖類を発酵させることにより、吟醸香芳香物質を含むフレーバーアルコールを製造出来ることが、初めて明らかとなった。

これらの一連の研究により、リンゴ搾り粕からカプロン酸エチルの華やかな香りを持つフレーバーアルコールの製造技術が開発できたことから、芳香物質を生成する酵母を使うことによりリンゴ搾り粕を原料とした多様な香気発酵が可能になり、リンゴ搾り粕の工業原料としての有効利用に道を開くことができた。

引用文献

- 1) 酒井重男:食品工業, 1.30, 3-84 (2005)
- 2) 泉谷真実:弘前大学農学生命科学部学術報告, No.5, 68-74 (2003)
- 3) 市田淳治ら:青森県産業技術開発センター第1期キープロジェクト研究報告書, 3-8 (1992).
- 4) 豊川好司:日本草地学会誌, Vol.51 No.2, 220-225 (2005)
- 5) 花松憲光:ブレインテクノニュース, No.93, 26-30 (2002)
- 6) 宮木博:青森県工業試験場報告, Vol.2000, 77-80 (2001)
- 7) 山口信哉, 櫛引正剛, 花松憲光, 松江一:未来を拓くグローバルテクノロジー, 164-167 (2001)
- 8) 村山成治, 豊川好司:農学生命研究からみた青森県農業の優位性 青森県「飛躍の芽」発掘事業弘前大学農学生命科学部報告書, 155-158 (1999)
- 9) 豊川好司:農学生命研究からみた青森県農業の優位性 青森県「飛躍の芽」発掘事業弘前大学農学生命科学部報告書, 82-84 (1999)
- 10) 武田潔:農学生命研究からみた青森県農業の優位性 青森県「飛躍の芽」発掘事業弘前大学農学生命科学部報告書, 64-65 (1999)
- 11) 宮入一夫, 奥野智旦:農学生命研究からみた青森県農業の優位性 青森県「飛躍の芽」発掘事業弘前大学農学生命科学部報告書, 53-63 (1999)
- 12) 奥野秀樹, 高橋潤一, 河村勝雄, 貝森一夫, 相馬敏夫, 工藤吉隆:青森県畜産試験場試験調査設計書, Vol.1995, 133-136 (1995)
- 13) 貝森一夫, 高橋潤一:青森県畜産試験場試験調査設計書, Vol.1994, 107-109 (1994)
- 14) 奥野秀樹, 高橋潤一, 河村勝雄, 貝森一夫, 相馬敏夫, 工藤吉隆:青森県畜産試験場試験調査設計書, Vol.1995, 133-136 (1995)

- 15) 逢坂憲政, 上原子俊之, 佐藤義人, 橋本俊明: 青森県畜産試験場試験調査設計書, Vol.1995, 121-124 (1995)
- 16) 鶴見里香, 白石末一, 安藤善和, 柳田誠, 武田潔: 日本食品科学高学会誌, 48 巻, 564-569 (2001)
- 17) 日本香料工業会編: 食品香料ハンドブック, 2-8 (1990)
- 18) 国税庁: 酒のしおり (平成17年2月), 2 (2005)
- 19) 財団法人日本醸造協会: 清酒製造技術, 財団法人日本醸造協会, 91 (1983)
- 20) 財団法人日本醸造協会: 本格焼酎製造技術, 財団法人日本醸造協会, 88 (2004)
- 21) 柏木豊: 食品と技術, No.421, 1-10 (2006)
- 22) Tanaka K., Goto T., Manabe M., Matsuura S.: JARQ, Vol.36 No.1, 45-50 (2002)
- 23) 伊藤清: 醸協, Vol.100 No.12, 838-848 (2005)
- 24) 鶴田猛彦, 若槻修, 村岡勇紀: 日本食品科学工学会大会講演集, Vol.52nd, 66 (2005)
- 25) 加藤拓, 下飯仁, 伊藤清: 醸協, Vol.100 No.7, 513-519 (2005)
- 26) 小野晴寛: 食品と開発, Vol.35 No.7, 52-53 (2000)
- 27) 松尾真砂子: 醸協, Vol.99 No.11, 773-783 (2004)
- 28) Matsuo M.: J Nutr Sci Vitaminol, Vol.52 No.3, 216-222 (2006)
- 29) 斎藤知明, 岩間直子, 石田一則, 高橋匡, 村中文人: 青森県工業総合研究センター事業報告書(CD-ROM), Vol.2005, B104 (2006)
- 30) 渡辺隆幸: 温古知新, No.42, 90-96 (2005)
- 31) ワイン学編集委員会: ワイン学, 産業調査会, 363-364 (1991)
- 32) 科学技術振興機構: 科学技術振興機構報, No.38, 5 (2004)
- 33) Shibamura K., Osaki S., Takamine K., Maseda S., Abe J., Hizukuri S.: *J. Appl. Glycosci.*, Vol.46 No.3, 249-256 (1999)
- 34) Luenser S.: *Brew Dig.*, Vol.62 No.5, 36-39 (1987)

- 35) Cristobal C., Encarnacion R., Eulogio C., Ignacio B., Maria J. N.: *Process Biochem.*, Vol.41 No.2, 423-429 (2006)
- 36) Shengdong Z., Yuanxin W., Cunwen W., Faquan Y., Shiwei J., Ziniu Y., Xuan Z. : *Process Biochem.*, Vol.41 No.4, 869-873 (2006)
- 37) Sun Y., Cheng J.: *Pap Am Soc Agric Eng*, 10 (2002)
- 38) Goto S.: *Ecology of Microorganisms 9(Fungi) 2nd Ed.*, Gakkai Shuppan Center, Tokyo, 118-135 (1981)
- 39) Fabian M., Bernadette D., Marc F.: *Phytopathology*, Vol.95 No.6, 692-700 (2005)
- 40) Kora C., Mcdonald M. R., Boland G. J.: *Plant Pathol.*, Vol.54 No.5, 665-670 (2005)
- 41) 向島博行:北陸病害虫研究会報, No.54, 49-53 (2005)
- 42) Gioti A., Simon A., Pecheur P. L., Giraud C., Pradier J.m., Viaud M., Levis C.: *J Mol. Biol.*, Vol.358 No.2, 372-386 (2006)
- 43) Have A. T., Mulder W., Visser J., Kan J. V.: *Mol. Plant-Microbe Interact*, Vol.11 No.10, 1009-1016 (1998)
- 44) Rha E., Park H. J., Kim M. O., Chung Y. R., Lee C-W., Ki J. Wm: *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol.201 No.1, 105-109 (2001)
- 45) Sasaki I., Nagayama H. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.58 No.4, 616-620 (1994)
- 46) Sasaki I., Nagayama H. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.59 No.1, 100-101 (1995)
- 47) Sasaki I., Nagayama H. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.60 No.1, 54-56 (1996)
- 48) Sasaki I., Nagayama H. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol.61 No.7, 1039-1076 (1997)
- 49) 上野雄やす, 里吉弘行, 戸川英夫, 井理正彦 : 醸協, Vol.74 No.4, 264-268 (1979)

- 50) Watanabe M., Shimazu Y. : *J. Ferment. Technol.*, Vol.56 No.2, 114-120 (1978)
- 51) Barbe J-C., DE Revel G., Joyeux A., Bertrand A., Lonvaud-funel A.: *J. Appl. Microbiol.*, Vol.90 No.1, 34-42 (2001)
- 52) 加藤陽治 , 斎藤幸子 , 佐藤あつ子 , 荒川修, 元村佳恵 :弘前大学教育学部紀要, No.85, 115-120 (2001)
- 53) 真部孝明,パクチン-その科学と食品のテクスチャー, 幸書房, 6-7 (2001)
- 54) HANG Y.D. : *Food Technol.*, Vol.41 No.3, 115-117 (1987)
- 55) Noro S., Takahashi T., Ichita J., Muranaka Y., Kato Y.: *MRS Japan*,31(4) , 973-976 (2006)
- 56) 朝倉邦造;果汁・果実飲料事典, 35 (1997)
- 57) Miyairi, K., Nishida, K., Takarae, M., Shikanai, Y., and Okuno, T. : *J. Appl. Glycosci.*, 49(2),99-106 (2002)
- 58) Pilnik W.: *EUR. Rep. Comm. Eur. Commun.*, 220-229 (1981)
- 59) 岩間直子、斎藤知明、石田一則、村中文人:「知」の結集プロジェクト研究促進推進事業成果報告書, 2-11 (2003)
- 60) Somogyi M.:*J. Biol. Chem.*, 195, 19-23 (1952)
- 61) 上野川修一、駒野徹、志村憲助、中村研三、山崎信行編;タンパク質の定量法 (第3版) ,学会出版センター,158-162 (2000)
- 62) Quemener B., Thibault J-F.: *Carbohydr. Res.*, 206, 277 (1990)
- 63) 川端晶子, 澤山茂, 栄養と食糧, 28, 395 (1975)
- 64) 清酒酵母研究会:改訂清酒酵母の研究,清酒酵母研究会,28 (1980)
- 65) Wubben J. P., TEN Have A., VAN KAN J. A. L., VISSER J.: *Curr. Genet.*, Vol.37 No.2, 152-157 (2000)
- 66) 注解編集委員会:国税庁所定分析法注解, 財団法人日本醸造協会, 15 (1995)

- 67) 岡田清嗣, 草刈真一: 今月の農業 農薬・資材・技術, Vol.46 No.1, 101-103,9 (2002)
- 68) O'Neill T. M., Shtienberg D., Elad Y.: *Plant Dis.*, Vol.81 No.1, 36-40 (1997)
- 69) 宇都宮仁, 磯谷敦子, 岩田博: 日本醸造学会大会講演要旨集, Vol.2003,12 (2003)
- 70) Ashida S., Ichikawa E., Suginami K., Imayasu S.: *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2061-2065 (1987)
- 71) Ichikawa E., Hosokawa N., Hata Y., Abe Y., Suginami K., Imayasu S.: *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2153-2154 (1991)
- 72) 後藤 (山本) 奈美、劉 宏芳、石川 雄章、岡崎 直人: 醸協, 95 (7), 533 (2000)
- 73) Eiji Ichikawa, Naomi Hosokawa, Yoji Hata, Yasuhisa Abe, Koji Suginami, Satoshi Imayasu: *Agric. Biol. Chem.*, 55(8), 2153-2154 (1991)
- 74) 曲渕哲朗、森川貴子、岩瀬利徳、福田秀雄、佐々木清祐: 醸協, Vol.92 No.2, 143-150 (1997)
- 75) 稲橋正明: 醸協, Vol.96 No.10, 679-687 (2001)
- 76) 宮尾俊輔: 醸協, Vol.99 No.10, 694-700 (2004)
- 77) 石川 雄章、百瀬 洋夫、吉沢 淑: 醸協, 79 (1), 62 (1984)
- 78) 栗山 一秀、芦田 晋三、斉藤 義幸、秦 洋二、杉並 孝二、今安 聡: 醱酵工学, 64 (3), 175-183 (1986)
- 79) P. Malcorps, J. M. Cheval, S. Jamil, J. P. Dufour: *ASBC Journal*, Vol.49 No.2, p50-53 (1991)
- 80) Ogawa N., DeRisi J., Brown P. O.: *Mol. Biol. Cell*, 11, 4309 (2000)
- 81) 水上里美、岩橋均: 環境浄化技術, Vol.4 No.2. 21-26 (2005)
- 82) Mizukami S., Suzuki Y., Kitagawa E., Iwahashi H.: *Chem-Bio. Infomatics J.*, Vol.4, No.2, 38-55 (2004)
- 83) 天児和暢、小池聖淳: 医学・生物学のための「電子顕微鏡実験法」3、微生物学にお

- ける電子顕微鏡技術 (上), 学会出版センター, 3-10 (1982)
- 84) 秋田修、渡辺隆幸、蓮尾徹夫、小幡孝之、原昌道: 醱酵工学, 68, 95-100 (1990)
- 85) H. Funabashi, A. Kawaguchi, H. Tomoda, S. Omura, S. Okuda, S. Iwasaki: *J. Biochem.*, 105, 751 (1989)
- 86) 市川 英治: 醸協, 88 (2), 101-105 (1993)
- 87) K. Aritomi, I. Hirosawa, H. Hoshida, M. Shiigi, Y. Nishizawa, S. Kashiwagi, R. Akada: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (1), 206-214 (2004)
- 88) 溝口弘子、渡辺陸、西村顕、近藤恭一: 生物工学会誌, Vol.76 No.5, p194-199 (1998)
- 89) Scheglmann D., Werner K., Eiselt G., Klinger R.: *Protein Eng. (Oxf)*, Vol.15 No.6, 521-527 (2002)
- 90) Sean T., Tung K. F., Sherry A. R., Frank J. T., Scott W. Moye-Rowley: *J. Biol. Chem.*, Vol.276 No.1, 244-250 (2001)
- 91) 宇都宮仁、山田修、橋口知一: 醸協, 95, Vol.3, 214-218 (2000)
- 92) 吉沢 淑、鈴木 大介、新藤 斉、角田 潔和、小泉 武夫; 醸協, 92 (3), 217-223 (1997)
- 93) 上東 治彦、中川悦子、森山 洋憲、永田 信治、味園 春雄: 醸協, 94 (1), 63-71 (1999)
- 94) 境田 博至、渡司 奈穂子、中原 徳昭、甲斐 孝憲、榊原 陽一、西山 和夫、水光 正仁: 日食工誌, 52 (1), 19-26 (2005)
- 95) 小室 友香理、穂坂 賢、中田 久保: 醸協, 99 (10), 743-749 (2004)
- 96) 吉擬英紀: 香料入門, フレグランスジャーナル社, 第2刷, 3-5 (2003)
- 97) Shamel R., Udis-Kessler A.: *Chem. Ind.*, No.1, 27-28 (2000)
- 98) 穂坂 賢、小室 友香理、中田 久保: 醸協, 99 (5), 381-387 (2004)
- 99) 栗山 一秀、芦田 晋三、斉藤 義幸、秦 洋二、杉並 孝二、今安 聡: 醱酵工

学,64 (4), 253-259 (1986)

謝辞

本研究の遂行にあたり、主指導教官として終始ご指導ご鞭撻を賜りました弘前大学農学生命科学部 武田潔教授、弘前大学農学生命科学部遺伝子実験施設 赤田辰治助教授に謹んでお礼申し上げます。本論文のご指導、ご校閲を賜りました、岩手大学農学部応用生物学科 磯部公安教授、山形大学農学部生物生産学科 河東田茂義教授、弘前大学農学生命科学部 殿内暁夫助教授、山形大学農学部生物資源学科 小関卓也助教授に謹んでお礼申し上げます。

また、リンゴ搾り粕試料を提供いただきました青森県果工株式会社、3703-7 株の育種にご協力いただきました財団法人日本醸造協会、電子顕微鏡技術のご指導をいただきました弘前大学農学生命科学部 藤田隆先生、DNA マイクロアレイ解析にご協力いただきました独立行政法人産業技術総合研究所ヒューマンストレスシグナル研究センター 岩橋均氏、村田（水上）里美氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究にあたり、数々のご協力を頂きました青森県工業総合研究センター弘前地域技術研究所生命科学部の皆様に、心よりお礼申し上げます。