

【技術分類】 2-1-13 素材／香料の加工技術／生化学的反応

【技術名称】 2-1-13-1 酵素反応

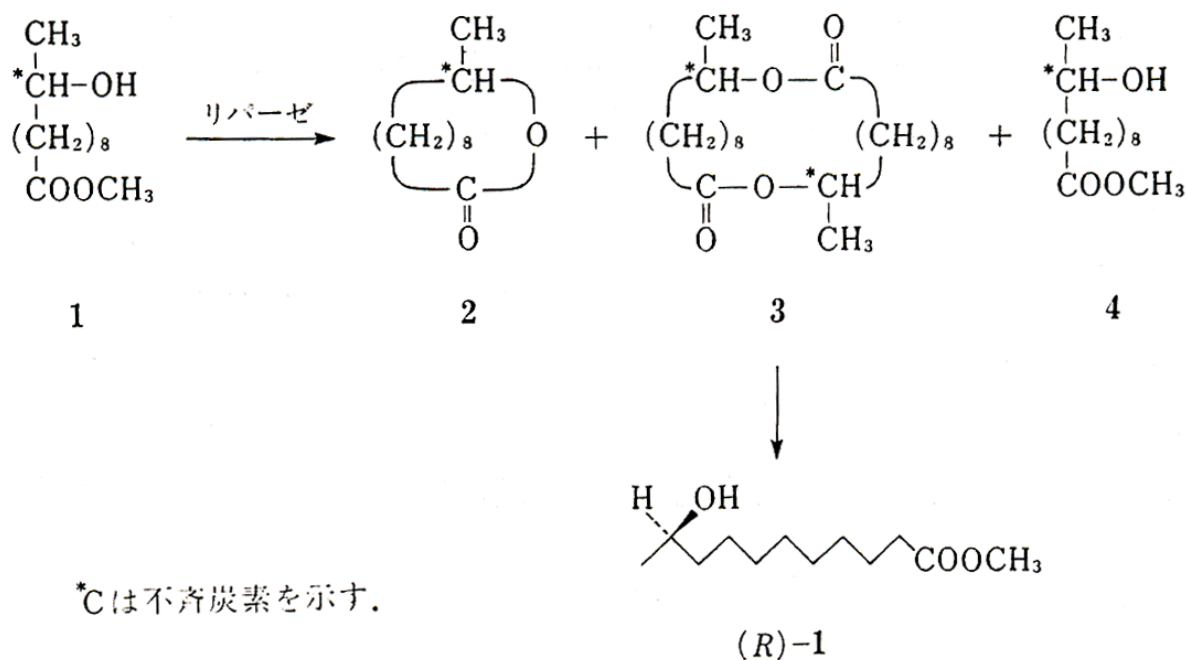
【技術内容】

香料の製造は化学的合成法が主であるが、酵素を触媒として用いることにより、酵素の持つ高度な選択性を利用し、副生成物を含まない高品質のフレーバーや天然香料を作る技術が発展している。特に光学活性体の製造に威力を発揮する。酵素としては加水分解酵素、異性化酵素、酸化還元酵素などで、多くの酵素は親水性であり、有機溶媒中では不安定であり適用範囲は限定されるが、固定化法の採用などにより有機溶媒中でも適用範囲が拡大している。ここに酵素を利用する香料合成の2つの例を挙げる。

1) リパーゼによる大環状ラクトンの合成

先ず、16種のリパーゼを用いてラクトン合成能の有無を調べたところ、3種のリパーゼにラクトン合成能が見出され、そのうち *pseudomonas* 由来のリパーゼが最も活性が高かった。そこでこのリパーゼを用いて光学活性大環状ラクトンの合成反応を検討した。反応式を図表1に示す。

【図表 1】



出典：「リパーゼによる大環状ラクトンの合成」、化学と生物 Vol. 25 No. 12 1987年、仁平卓也著、社団法人日本農芸化学会発行、819頁 図3 光学活性ラクトンのリパーゼによる合成

ラクトン合成における基質の鎖長の効果を図表2に示す。

【図表 2】

HO-(CH ₂) _n -COOCH ₃	生成物収率 (%) ^{b)}
<i>n</i> =12	38
<i>n</i> =13	64
<i>n</i> =14	78
<i>n</i> =15	80

a) リパーゼ P 3g と 1mm の各エステルを含む無水ベンゼン
300 ml 中で 40℃, 72 時間反応.

b) 単離したものの収率

出典：「リパーゼによる大環状ラク톤の合成」、化学と生物 Vol. 25 No. 12 1987 年、仁平卓也
著、社団法人日本農芸化学会発行、819 頁 表 4 ラク톤合成における基質の鎖長の効果

【図表 1、2 の説明】環状生成物は図表 1 でモノマーラクトン (2) とダイオリイド (3) である。

n=10、11 ではモノマーラク톤は殆ど生成せず、ダイオリイドの収率がそれぞれ 83%、66%であった
(表中への記載はない)。生成物は *n*=12 から *n*=15 と鎖長が長くなるにつれてモノマーラク톤の収率
が増加した。得られたラク톤は R-体であった。収率の点から pseudomonas のリパーゼを使う場合に
は *n*=14 以上の基質を選択する必要がある。

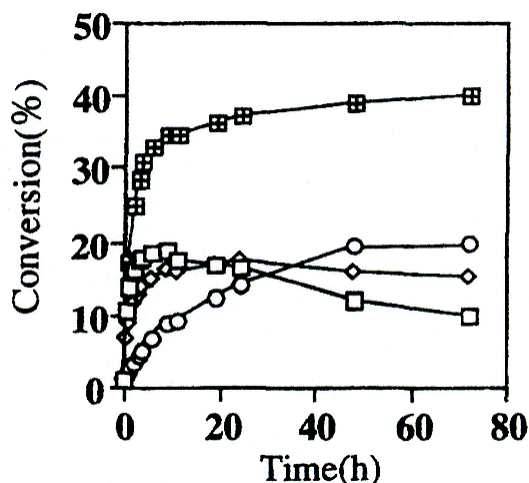
このように、安価なリパーゼを触媒とすることにより、適当な溶媒に基質を溶かしてかき混ぜるだ
けの簡単な方法で光学活性ラクトンが合成できる。

2) 酵素法によるフェネチルアルコール配糖体の大量合成

芳香族アルコールやモノテルペンアルコールの中には、植物体内で無香気性の配糖体として存在し、
開花や発酵時に酵素分解により香気を呈するアグリコンとして放出されるものが知られており、これ
ら配糖体は花や茶などの香気の前駆成分として注目されている。フェネチルアルコールはバラの香の
主要成分であり、フローラルローズ系香料では欠くことのできないものであり、その生産量は合成香
料中最大である。フェネチルアルコールは配糖体化することにより、無香性になることが予想され、
香料前駆体としての応用が期待される。その合成には酵素法が、安価な糖を使用でき、温和な条件で
位置・立体特異的に配糖化できる点で優れている。そこで最も安価な糖類の一つであるガラクトース
を用いて、β-ガラクトシダーゼによるフェネチルアルコール配糖体を kg スケールで合成した。

各種 β-ガラクトシダーゼによる糖転移反応を行った結果を図表 3 に示す。

【図表 3】



Reaction mixture (1.0ml, pH 7.0) containing 300mg lactose, 20mg phenethyl alcohol, and various β -galactosidases (50U) was incubated at 40°C.

Conversion was expressed as the percentages of the peak areas of the transfer product against the peak areas of the total compounds, calculated from HPLC analyses. Symbols: $\square$, Penicillium sp.; $\diamond$, Aspergillus oryzae; $\circ$, Basillus sp.; $\blacksquare$, E. coli

出典：「酵素法によるフェネチルアルコール配糖体の大量合成とその応用」、Journal of Applied Glycoscience Vol. 47 No. 1 2000 年、木村隆、内田充恵、中島宏、鈍宝宗彦著、日本応用糖質科学会発行、57 頁 Fig.1 Time-course of glycosylation of phenethyl alcohol with various β -galactosidases.

【図表 3 の説明】 E. coli 由来の β -ガラクトシダーゼを用いた場合が最も成績が良く、転換率は 40% にも達した。この酵素を用いてフェネチルアルコール配糖体を大量 (2.8kg) 合成した。

【出典／参考資料】

「リパーゼによる大環状ラク톤の合成」、化学と生物 Vol. 25 No. 12 1987 年 仁平卓也著、社団法人日本農芸化学会発行、817-819 頁

「酵素法によるフェネチルアルコール配糖体の大量合成とその応用」、Journal of Applied Glycoscience Vol. 47 No. 1 2000 年、木村隆、内田充恵、中島宏、鈍宝宗彦著、日本応用糖質科学会発行、55-59 頁

【技術分類】 2-1-13 素材／香料の加工技術／生化学的反応

【技術名称】 2-1-13-2 微生物反応

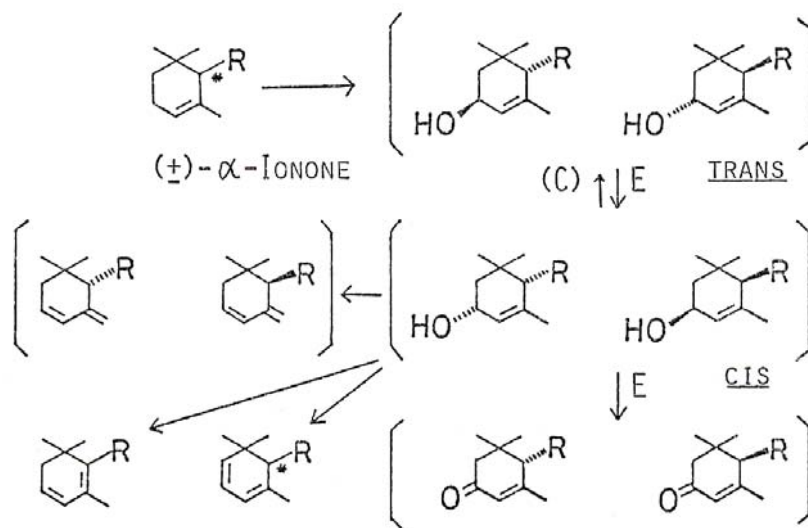
【技術内容】

微生物は醸造分野や発酵食品分野で従来から利用されてきた。そのプロセスは微生物の代謝および微生物の作り出す酵素により米や大豆などが味、形、香りを変えて食生活に利用されてきている。触媒としての酵素の存在が明らかになり、単離され始めたのは20世紀になってからである。その後生化学反応に応用され、前項に示すように、香料工業にも大いに利用されてきている。一方微生物による生化学反応については酵素反応ほど盛んではないが、取り組みはかなり行われている。

テルペンの微生物変換反応検討例を紹介する。

カロチノイドの代謝物あるいは分解物と考えられる、トリメチルシクロヘキセン環を持つC9～C15の化合物がタバコフレーバーとして重要であると考えられている。カロチノイドの生物分解における主要な中間体と考えられているイオノン類を基質として好氣的に変換を行わせた報告がある。

【図表 1】



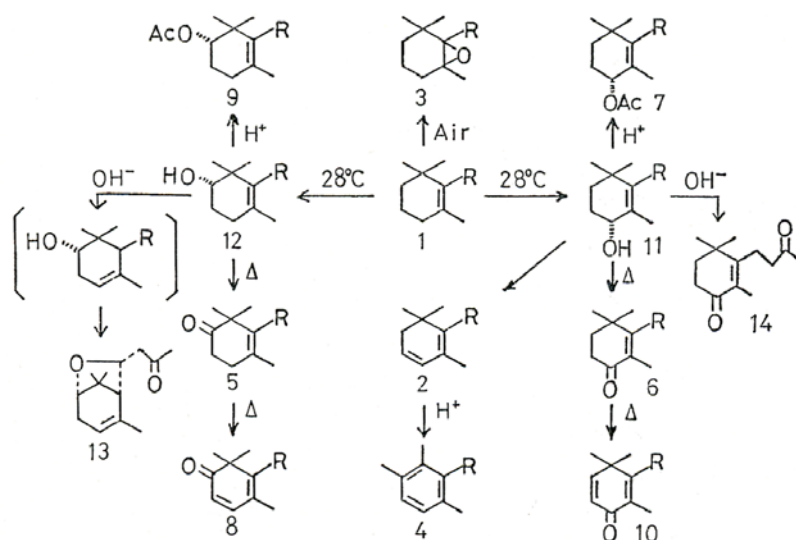
$\alpha\text{-IONONE}$; $R : -\text{CH}=\text{CO}-\text{CH}_3$

$\alpha\text{-METHYLIONONE}$; $R : -\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

$\alpha\text{-ISOMETHYLIONONE}$; $R : -\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CO}-\text{CH}_3$

出典:「第31回石油発酵講演会講演内容 微生物によるテルペンの変換とその利用」、発酵と工業 Vol. 42 NO. 5 1984年、三上洋一著、財団法人バイオインダストリー協会発行、374頁 図5 α -イオノン類の変換経路

【図表 2】



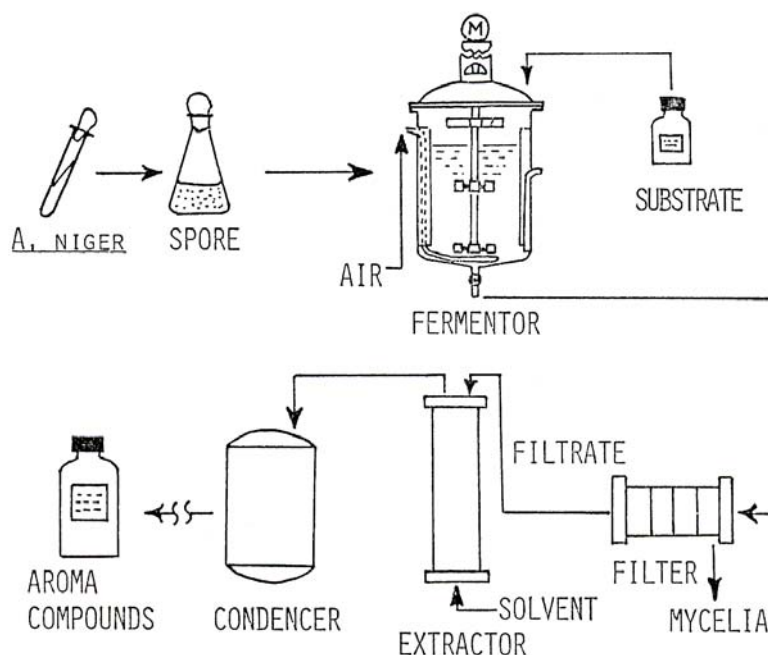
β -IONONE ; R : $-\text{CH}=\text{CO}-\text{CH}_3$
 β -METHYLIONONE ; R : $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

出典:「第 31 回石油発酵講演会講演内容 微生物によるテルペンの変換とその利用」、発酵と工業 Vol. 42 NO. 5 1984 年、三上洋一著、財団法人バイオインダストリー協会発行、375 頁 図 6 β -イオノン類の変換経路

【図表 1、2 の説明】スクリーニングの結果、*Aspergillus niger* JTS 191 がたばこ香料の製造に最も適しており、この菌はトリメチルシクロヘキサン環を持つ殆どすべての化合物を変換できた。この菌を用いて基質 (α -、 β -イオノン； α -、 β -、 γ -メチルイオノン；イソホロン、オキシイソホロンなど) を選択することにより、異なる香調の香料が得られた。例として、 α -イオノン類の変換経路を図表 1 に、 β -イオノンの変換経路を図表 2 に示す。変換生成物はタバコカロチノイド由来の主要香氣成分に類似し、光学活性なヒドロキシ化合物を生成することは香料製造における微生物変換プロセスの活用が有意義であることを示している。

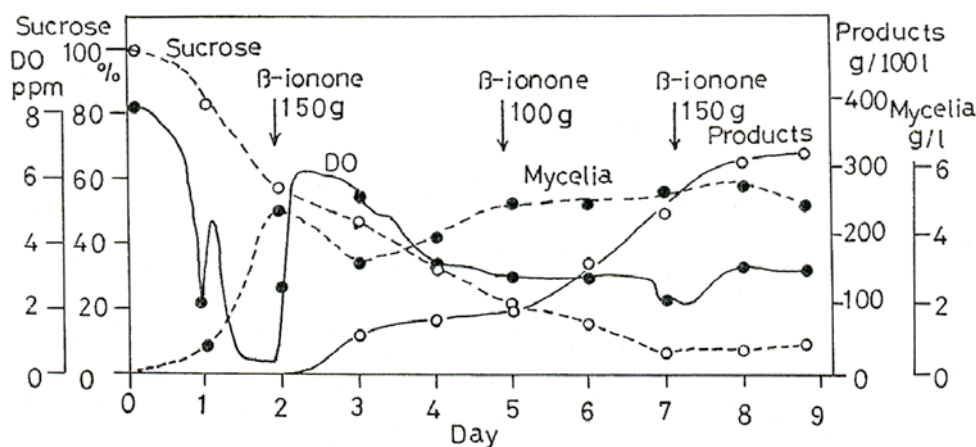
発酵槽による香料生産における培養・変換工程の概略を図表 3 に示す。

【図表 3】



出典:「第 31 回石油発酵講演会講演内容 微生物によるテルペンの変換とその利用」、発酵と工業 Vol. 42 NO. 5 1984 年、三上洋一著、財団法人バイオインダストリー協会発行、377 頁 図 10 発酵槽による生産工程

【図表 4】



出典:「第 31 回石油発酵講演会講演内容 微生物によるテルペンの変換とその利用」、発酵と工業 Vol. 42 NO. 5 1984 年、三上洋一著、財団法人バイオインダストリー協会発行、378 頁 図 13 間欠添加による β -イオノンの変換

【図表 4 の説明】テルペン類の多くがそうであるように、ノルテルペンであるイオノン類も強い抗微生物作用があり、培地 11 当り 1.5g 以上は実際上添加できなかった。しかし、間欠的に添加する場合には最大 6g/l まで変換が行われた。100l 張込の通気攪拌型発酵槽により β -イオノンを 4g/l まで添加した例を図表 4 に示す。

1 回目の添加では β -イオノンの抗微生物性により、呼吸活性が低下し、静菌状態となって DO の上昇が見られ、また菌体重も減少も観察される。しかし 2 回目以降の添加ではこの減少は認められず、菌糸ペレットは β -イオノンに対する何らかの防衛体制を獲得したものと思われる。

【出典／参考資料】

「第 31 回石油発酵講演会講演内容 微生物によるテルペンの変換とその利用」、発酵と工業 Vol. 42
NO. 5 1984 年、三上洋一著、財団法人バイオインダストリー協会発行、372－380 頁

【技術分類】 2-1-13 素材／香料の加工技術／生化学的反応

【技術名称】 2-1-13-3 微生物によるフレーバー

【技術内容】

微生物を利用したフレーバーの生産は酵素利用と同様にかなり進展し、実用化も進んでいる。健康志向の高まりとともに、香料の分野でも合成品よりも天然品の要望が増加しているが、バイオテクノロジーの進歩により工業的規模でのフレーバー生産が可能になり、多くのフレーバーが取引されるようになってきている。

フラノン化合物 4-Hydroxy-2, 5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMP) 及び 4-Hydroxy-2 (or 5) -ethyl-5(or 2)-methyl-3-(2H)-furanone (HEMP) は醤油、味噌、チーズ、ビールなどの重要な香気成分であり、抗腫瘍性や抗酸化性などの機能性を持つとされる。これらの香気成分の生成について記す。

糖・アミノ酸液を添加した YPD 培地を耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* MH-1 により発酵させたところ、顕著なフラノン化合物の生成が見られた。結果を図表 1、図表 2 に示す。

【図表 1】

Amino acid	HDMF concentration					
	mg/					
	No sugar No yeast	No sugar + Yeast	Ribose No yeast	Ribose + Yeast	Galactose No Yeast	Galactose + Yeast
Ala	0.62	1.85	0.53	1.82	0.72	2.28
Glu	0.55	1.73	0.93	1.97	0.92	3.76
Gly	0.59	1.47	0.52	1.73	0.69	2.22
His	0.57	1.72	0.50	1.33	0.42	2.00
Lys	0.50	1.65	0.63	1.58	0.65	1.95
Orn	0.43	1.60	0.48	0.87	0.42	1.53
Pro	0.48	1.73	0.51	1.94	0.62	2.02
Ser	0.49	1.75	0.57	1.74	0.65	2.37
Thr	0.43	1.59	0.66	2.01	0.54	2.13
Val	0.42	1.91	0.52	1.65	0.62	2.70
None	0.55	1.80	0.60	1.69	0.57	1.64

出典：「加熱した糖・アミノ酸液を添加した YPD 培地の酵母発酵によるフラノン化合物 HDMF 及び HEMF の生成」、日本醤油研究所雑誌 Vol. 25 No. 5 1999 年、林田安生、西村賢了、栗山博、SLAUGHTER J C 著、財団法人日本醤油技術センター発行、239 頁 表 1 加熱した糖・アミノ酸液を加えた YPD 培地での HDMF の生成

【図表 2】

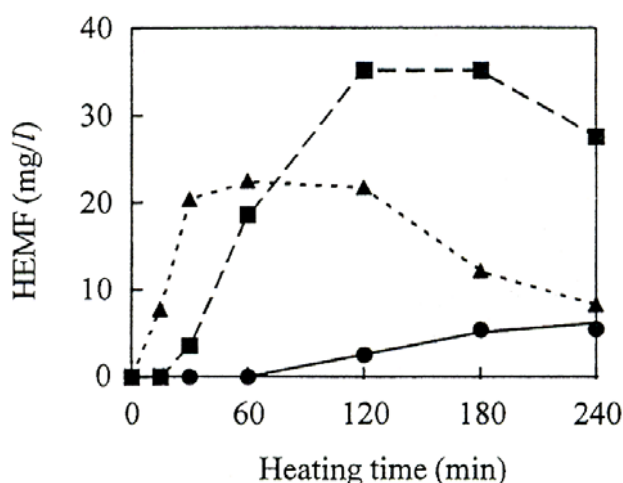
Amino acid	HEMF Concentration mg/l
	Ribose + Yeast
Ala	5.40
Glu	20.81
Gly	4.77
His	3.16
Lys	6.84
Orn	2.06
Pro	2.44
Ser	3.29
Thr	2.70
Val	6.19
None	ND

出典：「加熱した糖・アミノ酸液を添加した YPD 培地の酵母発酵によるフラノン化合物 HDMF 及び HEMF の生成」、日本醤油研究所雑誌 Vol. 25 No. 5 1999 年、林田安生、西村賢了、栗山博、SLAUGHTER J C 著、財団法人日本醤油技術センター発行、239 頁 表 2 加熱した糖・アミノ酸液を加えた YPD 培地での HEMF の生成

【図表 1、2 の説明】ヘキソース・アミノ酸、ペントース・アミノ酸の加熱により、メイラード反応を生じた試料からは HDMF、HEMF がそれぞれ顕著に生成していたが、メイラード反応を生じなかった試料からは、いずれの化合物も顕著には生成しなかった。この知見はメイラード反応中間体が酵母によって HDMF 及び HEMF に変換される生成機構を支持する。

次に、単純培地に加える糖・アミノ酸液の加熱温度及び時間が酵母発酵後の HEMF 生成に与える影響を検討した報告がある。

【図表 3】



加熱温度:80°C (●)、100°C (■)、120°C (▲)

出典：「糖・アミノ酸液の加熱温度及び時間の単純培地での酵母発酵による HEMF 生成への影響」、日本醤油研究所雑誌 Vol. 26 No. 2 2000 年、原田直美スエリ、林田安生、西村賢了、栗山博、SLAUGHTER J C 著、財団法人日本醤油技術センター発行、85 頁 図 3 酵母発酵による HEMF 生成へのリボース・

グルタミン酸ナトリウム液の加熱温度及び時間の影響

【図表 3 の説明】加熱したリボース・グルタミン酸ナトリウム溶液から調製した単純培地を酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* MH-1 で発酵させると、HEMF が生成するが、この単純培地の酵母発酵による HEMF の生成は、図表 3 に示すように糖・アミノ酸液の加熱温度及び時間に大きく影響される。100℃ および 120℃ で加熱した試験区では加熱時間が長くなるにつれ発酵後に生成する HEMF 量は増加し、その後減少している。これはメイラード反応によって生成する HEMF 前駆体の濃度変化によると考えられている。

【出典／参考資料】

「加熱した糖・アミノ酸液を添加した YPD 培地の酵母発酵によるフラノン化合物 HDMF 及び HEMF の生成」、日本醤油研究所雑誌 Vol. 25 No. 5 1999 年、林田安生、西村賢了、栗山博、SLAUGHTER J C 著、財団法人日本醤油技術センター発行、237-242 頁

「糖・アミノ酸液の加熱温度及び時間の単純培地での酵母発酵による HEMF 生成への影響」、日本醤油研究所雑誌 Vol. 26 No. 2 2000 年、原田直美スエリ、林田安生、西村賢了、栗山博、SLAUGHTER J C 著、財団法人日本醤油技術センター発行、83-87 頁

微生物と香り ミクロ世界のアロマの力 2002 年 8 月 1 日、井上重治著、有限会社フレグランスジャーナル社発行、43-168 頁

【技術分類】 2－1－1 3 素材／香料の抽出・精製・合成技術／生化学的反応

【技術名称】 2－1－1 3－4 醸造用酵母

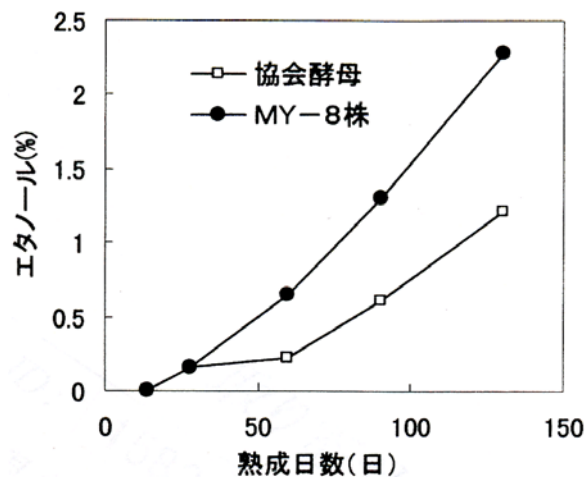
【技術内容】

醸造用酵母の利用は古来実施されてきているが、より良い香りを求めてさまざまな角度からの検討がなされている。

福井県内の味噌から分離した約 200 種の酵母をもとに、アルコール生産性、味噌ペースト培地での香气生成などを指標とした選抜により、MY-8 株が取得された。MY-8 株の醸造特性として、味噌の熟成過程におけるエタノールとHEMF (4-hydroxy-2(or-5)-ethyl-(5(R 2)-methyl-3(2H)-furanone) 生成量の関係を検討した。酵母は味噌 1g 当たり 1.1×10^6 個添加した。対照としては協会酵母（日本醸造協会）を用いた。

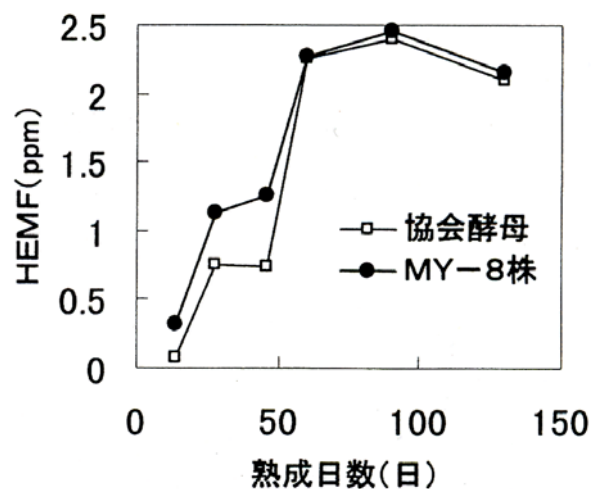
熟成後 90 日の味噌の一般成分は MY-8 株と協会酵母で pH、色調に差は認められなかった。MY-8 株は協会酵母と比較し、蛋白溶解率、蛋白分解率は若干高かった。糖分解率は MY-8 株の方が低かった。糖分解率は熟成度の指標のひとつといわれ、熟成途中まで増加し、それ以後は減少する。このことから MY-8 株は発酵が旺盛で、熟成が早く進むことがわかった。

【図表 1】



出典：「味噌製造技術の改善並びに有用酵母の開発 味噌用酵母 MY-8 株の醸造特性（第 2 報）」、食品加工に関する試験成績 Vol. 1999 2000 年、田中ゆかり 著、福井県農業試験場食品加工研究所発行、11 頁 図 1 熟成日数とエタノールの生成

【図表 2】



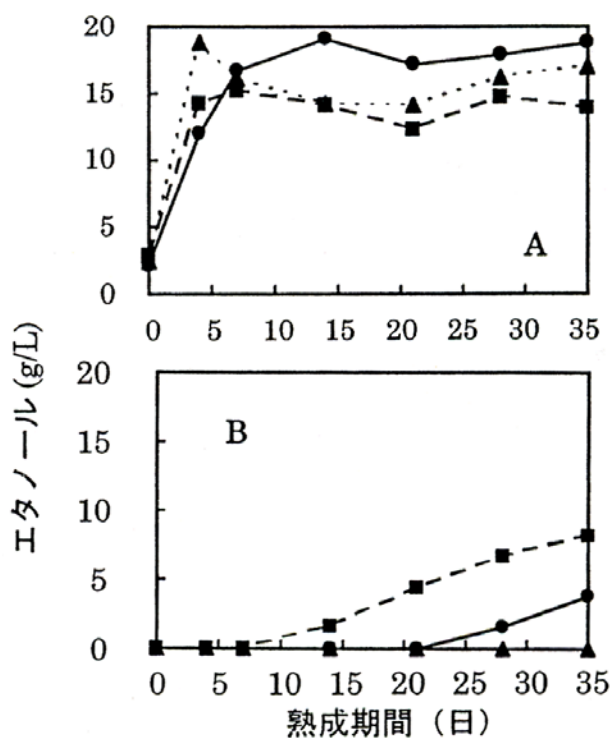
出典：「味噌製造技術の改善並びに有用酵母の開発 味噌用酵母 MY-8 株の醸造特性（第 2 報）」、食品加工に関する試験成績 Vol. 1999 2000 年、田中ゆかり著、福井県農業試験場食品加工研究所発行、11 頁 図 2 熟成日数と HEMF の生成

【図表 1、2 の説明】熟成による、香り成分エタノール、HEMF の生成の変化を図表 1、図表 2 に示した。どちらの成分も、MY-8 株は、対照として用いた協会酵母と比較して、早い時期から生成し、生成量が多かった。

HEMF の濃度を食品中でコントロールすることは、香りの改良に重要である。醤油の製造においてもそれに関する報告がある。

醤油もろみを熟成し、濾過、除菌した清澄液に耐塩基性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* MH-1 を接種し、30℃で 14 日間発酵させた。エタノール、及び HEMF の生成を図表 3 及び図表 4 に示す。

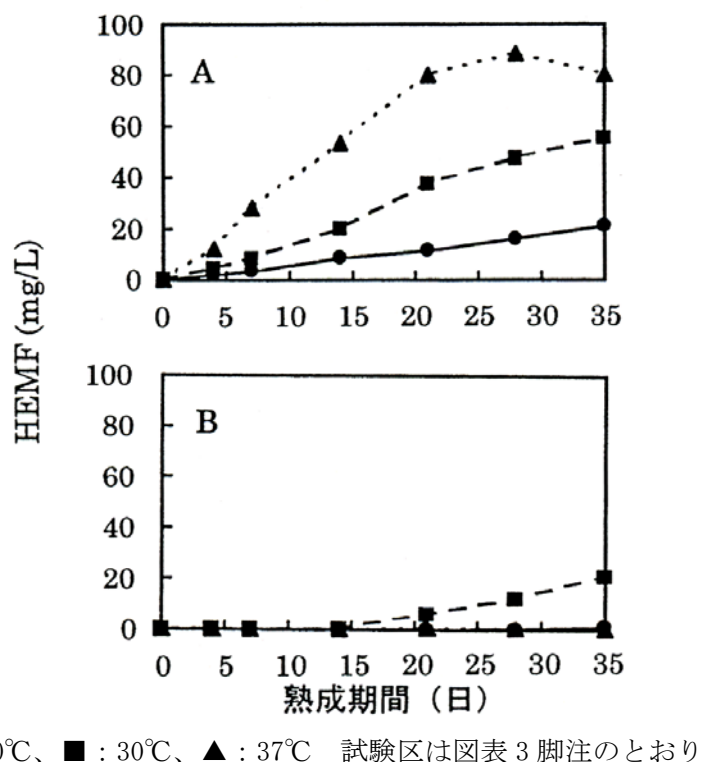
【図表 3】



20 (●)、30 (■)、そして、37℃ (▲) で熟成させた醤油もろみから調製した清澄液に酵母を加え、30℃で 14 日間放置した (A)。対照として、酵母を添加しない試験区も調製し同様の試験を行った (B)。

出典：「酵母による発酵食品の香気及び機能性の強化に関する研究」、熊本県工業技術センター研究報告 No. 39 2001 年、林田安生、西村賢了著、熊本県工業技術センター発行、4 頁 図 3 熟成した醤油もろみ清澄液の酵母発酵によるエタノールの生成

【図表 4】



出典：「酵母による発酵食品の香気及び機能性の強化に関する研究」、熊本県工業技術センター研究報告 No. 39 2001 年、林田安生、西村賢了著、熊本県工業技術センター発行、5 頁 図 4 熟成した醤油もろみ清澄液の酵母発酵による HEMF の生成

【図表 3、4 の説明】

エタノールは 4 日以上熟成させた試験区を発酵すると、10~20g/L の範囲でほぼ一定の値をとった。HEMF は熟成温度が高く、その期間が長くなるほど高い濃度で検出された。

本研究によってメイラード反応中間体である前駆体が酵母によって変換されるフランノン化合物の生合成経路を明らかにし、熟成による前駆体の蓄積と酵母の活性化によって HEMF を増強・コントロールすることが可能であることを示した。

【出典／参考資料】

「味噌製造技術の改善並びに有用酵母の開発 味噌用酵母 MY-8 株の醸造特性（第 2 報）」食品加工に関する試験成績 Vol. 1999 2000 年 田中ゆかり著、福井県農業試験場食品加工研究所発行、10-11 頁

「酵母による発酵食品の香気及び機能性の強化に関する研究」、熊本県工業技術センター研究報告 No. 39 2001 年、林田安生、西村賢了著、熊本県工業技術センター発行、1-7 頁

【技術分類】 2-1-13 素材／香料の加工技術／生化学的反応

【技術名称】 2-1-13-5 遺伝子組み換え

【技術内容】

近年、遺伝子組み換え技術を利用して、微生物の改良を行う研究が盛んに行われている。特に食品製造に広く利用されている酵母は遺伝子組み換えを行う微生物として良いターゲットになっており、中でも香気成分に関する清酒酵母の育種研究が活発である。その一端を紹介する。

清酒中の主要な香気成分である酢酸イソアミルを高生産する酵母がトリフルオロロイシン耐性株 (TFL 耐性株) より育種されている。これはロイシン生合成系の最終産物であるロイシンによるフィードバック阻害が解除され、イソアミルアルコールや酢酸イソアミルの生成が高められたものである。酢酸イソアミル生成能の高い TFL 耐性株より、 α -イソプロピルリンゴ酸合成酵素をコードする LEU4 遺伝子を抽出し、変異点を解析し、グリシン 516 がアスパラギン酸に変化した点変異であることを明らかにした。この変異型 LEU4 遺伝子を野生型清酒酵母に導入することにより、酢酸イソアミルの生成量を親株の 6 倍にまで高めることができた (pAUR101-LEU4-13 (KA1) 株)。その結果を図表 1 に示す。

【図表 1】

Strains	Sakemeter (%)	Alcohol	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	OD260	OD280	Isoamyl alcohol (ppm)	Ethyl acetate (ppm)	Isoamyl acetate (ppm)	Ethyl caproate (ppm)
[Parents]										
KA1	+5.7	17.3	2.55	1.52	424	353	118.4	70.9	3.65	1.11
A-14	+7.7	17.2	2.62	1.37	437	356	140.8	81.4	6.46	1.12
[Mutant]										
TFL-10	+3.8	16.9	2.53	1.51	446	354	238.1	108.7	14.86	1.36
[Transformants]										
pAUR101-LEU4										
-3 (KA1)	+4.7	17.2	2.65	1.46	388	320	250.1	61.2	9.53	1.42
-4 (KA1)	-9.3	16.1	2.25	1.62	451	358	212.9	67.9	10.84	1.94
-10 (KA1)	+3.7	17.4	2.60	1.44	458	362	284.4	100.1	17.50	1.65
-13 (KA1)	+5.7	17.2	2.71	1.55	474	368	326.2	90.5	21.67	1.72
pAUR123-LEU4										
-4 (KA1)	+5.7	17.3	3.10	1.19	354	304	298.0	83.3	14.76	1.74
-6 (KA1)	+1.0	16.6	2.82	1.44	482	373	293.8	70.9	15.90	1.55

The parents of the transformants are indicated in parentheses.

The rice used was Yamadanisiki (40% polishing ratio) and the fermentation temperature was below 10°C.

Diluted samples (20 fold) were used to measure the OD260 and OD280.

出典：「変異型 α -イソプロピルリンゴ酸合成酵素遺伝子およびロイシン脱水素酵素遺伝子を導入した高香気性清酒酵母の育種」、日本醸造協会誌 Vol. 96 No. 2 2001 年、上東治彦、加藤麗奈、河本織江、関美緒、中川悦子、小島有理、永田信治、味園春雄著、財団法人日本醸造協会発行、134 頁 Table 1. Composition and flavour content of sake produced by parents, mutants and transformants in 150g-scale fermentations.

【図表 1 の説明】 形質転換株、特に pAUR101-LEU4-10 (KA1), pAUR101-LEU4-13 (KA1) 株は発酵力は親株と同等で、酢酸イソアミルの生成量は各々親株の約 4.8 倍、約 6 倍に当たる 17.5ppm, 21.67ppm と著量生成した。

清酒の香気成分としては、イソアミルアルコール、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル等が重要である。日本醸造協会 7 号酵母 (K7) を親株として、紫外線照射によってその変異株を作製し、酢酸イソアミル高生産株を取得した。図表 2 に変異株の香気生産能を示す。E/A 比とは酢酸イソアミルの濃度をイソアミルアルコールの濃度で割り 100 を掛けた値で、この数値が高いほど、吟醸香として好ましいとされている。

【図表 2】

酵 母	イソアミルアルコール (ppm)	酢酸イソアミル (ppm)	E/A 比
K7	182.47	4.74	2.60
K9	159.98	4.42	2.76
K901	166.88	4.97	2.98
45-5	725.71	37.95	5.23
45-16	688.75	46.18	6.71
45-31	693.08	34.71	5.01
45-34	697.92	34.81	4.99
45-55	730.68	39.92	5.46
55-2	411.77	13.75	3.34
55-7	459.08	15.29	3.33
55-9	417.72	11.88	2.84
55-56	435.37	22.83	5.24
55-63	427.93	11.03	2.58
60-8	394.30	16.37	4.15
60-14	394.93	13.96	3.54
60-15	422.59	15.05	3.56
60-26	443.59	12.18	2.74
60-43	394.87	12.45	3.15

出典：「遺伝子組換えによる微生物の改良と活用研究(第 1 報) 高香気を生産する変異酵母の取得」、愛媛県工業技術センター研究報告 Vol. 1994 No. 33 1995 年、亀岡啓、新谷智吉、別所康守、宮岡俊輔著、愛媛県工業技術センター発行、29 頁 表 1 変異株の香気生産能

【図表 2 の説明】日本醸造協会酵母 K7 が生産するイソアミルアルコールは 180ppm 程度であるのに対し、変異株では最高値で約 4 倍の 725ppm である。紫外線照射時間 45 秒の酵母が生産性が高い。

花の香気成分の生合成遺伝子の研究も盛んである。遺伝子が単離された花の香気成分の生合成酵素を図表 3 に、生合成経路を図表 4 に示す。図表 4 では酵素及び遺伝子を生合成経路上に示してある。

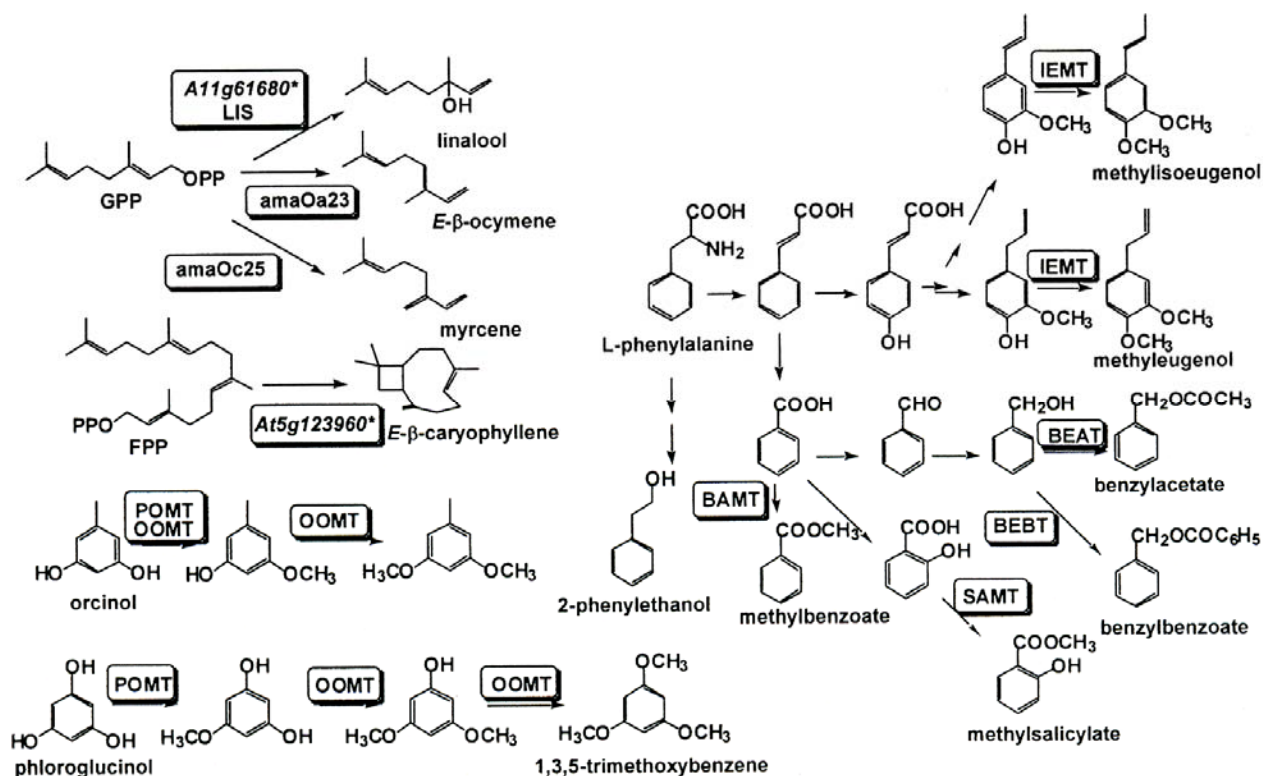
【図表 3】

酵素 (和名)	酵素 (英名)	略 号	起源 (花の種類)	文 献
リナロール生成酵素	Linalool synthase	LIS	<i>Clarkia breweri</i> の柱頭, <i>C. concinna</i>	Pichersky et al. 1995, Dudareva et al. 1996, Pichersky et al. 1994, Cseke et al. 1998,
オシメン生成酵素	<i>E</i> - β -Ocymene synthase	amaOa23	<i>Antirrhinum majus</i> 花卉	Dudareva et al. 2003
ミルセン生成酵素	Myrcene synthase	amaOc15	<i>Antirrhinum majus</i> 花卉	Dudareva et al. 2003
ベンジルアルコールベ ンゾイルトランスフェ ラーゼ	Benzoyl-CoA : benzyl alcohol benzoyl transferase	BEBT	<i>Clarkia breweri</i> 柱頭	D'Auria et al. 2002
ベンジルアルコールア セチルトランスフェ ラーゼ	Acetyl-CoA : benzylalcohol acetyltransferase	BEAT	<i>Clarkia breweri</i>	Dudareva et al. 1998, Dudareva and Pichersky 2000
サリチル酸メチルト ランスフェラーゼ	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionine : salicylic acid carboxyl methyl- transferase	SAMT	<i>Clarkia breweri</i> 花卉, <i>Stephanotis floribunda</i> 花卉	Dudareva et al. 1998, Ross et al. 1999, Pott et al. 2002
安息香酸メチルト ランスフェラーゼ	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionine : benzoic acid carboxyl methyltrans- ferase	BAMT	<i>Antirrhinum majus</i> 花卉, <i>Petunia</i> cv Mitcell	Murfitt et al. 2000, Dudareva et al. 2000, Dudareva and Pichersky 2000, Nerge et al. 2003
オイゲノール <i>O</i> -メチ ルトランスフェラーゼ	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionine : (iso) eugenol <i>O</i> -methyltrans- ferase I	EMT	<i>Clarkia breweri</i> , <i>Rosa chinensis</i> var. <i>spontanea</i>	Wang et al. 1997, Wang and Pichersky 1998, 1999, Wu et al. 2003
オルシノール <i>O</i> -メチ ルトランスフェラーゼ	Orcinol <i>O</i> -methyltransferase	OOMT	<i>Rosa hybrida</i> L.	Lavid et al. 2002, Scalliet et al. 2002
フロログルシノール <i>O</i> -メチルトランス フェラーゼ	Phloroglucinol <i>O</i> -methyltransfer- ase	POMT	<i>Rosa chinensis</i> var. <i>spontanea</i>	Wu, in press

出典：「花の香気成分分子機構に関する最近の知見」、植物の生長調節 Vol. 39 No. 1 2004 年、大久保直美、渡辺修治著、植物化学調節学会発行、87 頁 表 1 遺伝子が花から単離された香気成分生合成酵素

【図表 3 の説明】 遺伝子が花から単離され、機能が解析されている香気成分生合成酵素を示す。

【図表 4】



出典：「花の香り成分分子機構に関する最近の知見」、植物の生長調節 Vol. 39 No. 1 2004 年、大久保直美、渡辺修治著、植物化学調節学会発行、88 頁 図 2 花の香り成分生合成経路と酵素

【図表 4 の説明】図表 3 に示した酵素および遺伝子を生合成経路上に示している。四角内の酵素の遺伝子は花から単離されている（図表 3 参照）。また * 印で示したものはシロイヌナズナから新たに明らかにされた遺伝子である。

(+)-S-リナロールの生合成遺伝子 LIS は花の香り成分生合成に関わる遺伝子として最初に明らかにされた。発現部位としては、アカバナサンジソウでは LISmRNA はリナロールの発現に最も都合の良い花弁表層細胞で、強く発現している。IEMTmRNA の発現部位も LISmRNA と同様に花特異的であり、且つ花弁表層細胞で発現している。

【出典／参考資料】

「変異型 α-イソプロピルリンゴ酸合成酵素遺伝子およびロイシン脱水素酵素遺伝子を導入した高香気性清酒酵母の育種」、日本醸造協会誌 Vol. 96 No. 2 2001 年 上東治彦、加藤麗奈、河本織江、関美緒、中川悦子、小島有理、永田信治、味園春雄著、財団法人日本醸造協会発行、129－136 頁

「花の香り成分分子機構に関する最近の知見」、植物の生長調節 Vol. 39 No. 1 2004 年、大久保直美、渡辺修治著、植物化学調節学会発行、85－96 頁

「遺伝子組換えによる微生物の改良と活用研究(第 1 報) 高香気を生産する変異酵母の取得」、愛媛県工業技術センター研究報告 Vol. 1994 No. 33 1995 年、亀岡啓、新谷智吉、別所康守、宮岡俊輔著、愛媛県工業技術センター発行、27－32 頁

【技術分類】 2－1－1 3 素材／香料の加工技術／生化学的反応

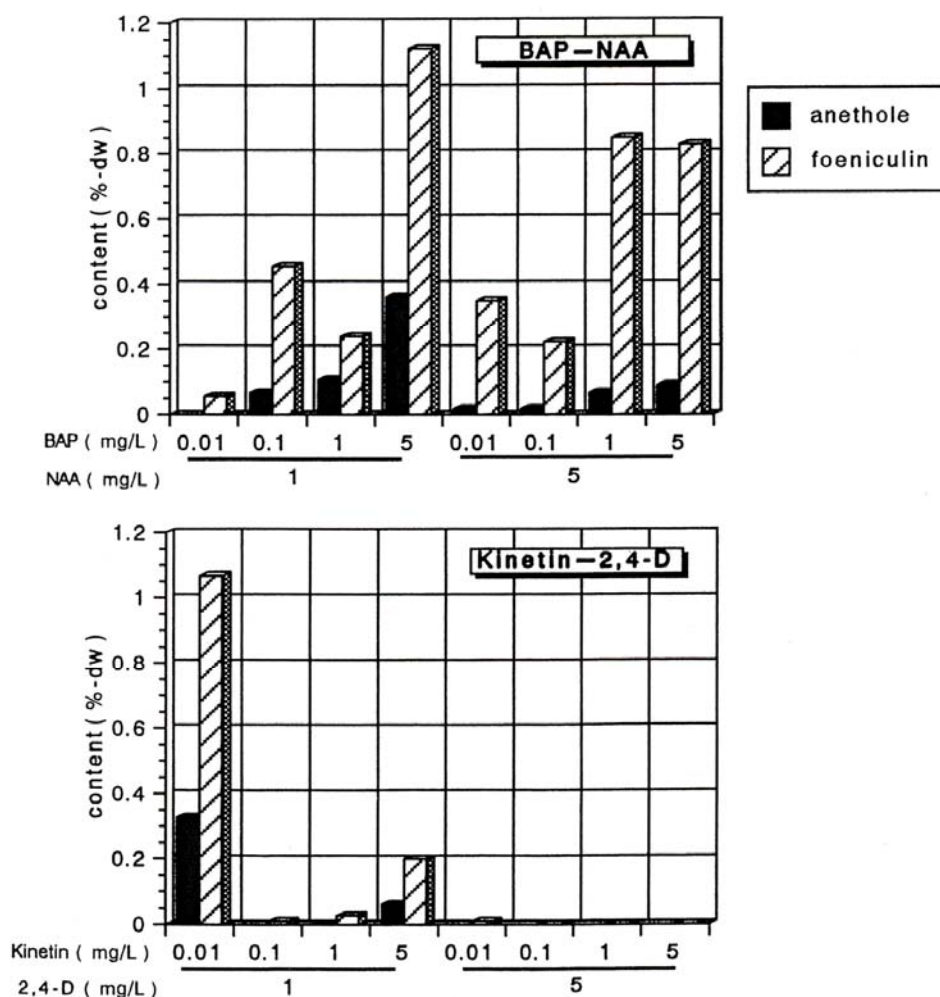
【技術名称】 2－1－1 3－6 組織培養・細胞培養

【技術内容】

香木は草花に比べて成長に長い期間を必要とし、そのため生産される製品は高価で、また再生が遅いため資源の枯渇が憂慮される。このような問題を解決する方法の一つに植物組織培養がある。そこで、香木香気成分の培養による生産の例を示す。

ダイウイキョウの葉片を外植片として切断面が接するように培地表面に置床し、基本培地に植物成長調節物質として6-benzylaminopurine (BAP) と α -naphthaleneacetic acid (NAA)、あるいは6-furfurylaminopurine (Kinetin) と 2,4-dichlorophenoxyacetic acid を組み合わせて添加して培養を行い、形成されたカルスを移植材料としてさらに培養を行った。培養 40 週間後、どの試験区においても新しいカルスの産生が認められた。各試験区における精油成分 anethole 並びに foeniculin 生産量を図表 1 に示す。

【図表 1】



出典：「煙にまかれぬように... 香木香気成分の培養による生産」、日本植物園協会誌 No. 32 1998 年、神田博史著、社団法人日本植物園協会発行、62 頁 Fig.3 Effect of cytokinin and auxin concentrations on anethole and foreniculin contents in dried callus

【図表 1 の説明】 BAP と NAA の系では anethole, foeniculin とともに生産され、Kinetin と 2,4-D の系では含有量は一部の系以外では含有量は低かった。*Ilicium verum* を材料として主精油成分

anetole および foeniculin の生産に成功した初めての事例である。

その他、ビャクダン、ジンコウ、ギンバイカの培養に関する研究も行われている。

観賞用植物ローズゼラニウムの組織培養による精油生産の研究もある。ローズゼラニウムから抽出されるゼラニウムオイルはローズ油の原料となり、主成分として Geraniol と Citronellol を含んでいるため、世界各国で商業生産が行われているが、精油成分の生産は栽培環境の影響を受け易く、また収油率が 0.1~0.3%と低いので、安定した生産手段の確立が望まれている。

ローズゼラニウム葉柄切片を外植体に用い、基本培地に NAA (α ナフタレン酢酸)、BA (ベンジルアデニン) を添加してカルスを形成させた。NAA と BA を組み合わせた培地に形成されたカルスの細胞内部には油滴の存在が確認され、また精油成分の中にゲラニオールを含んでいることがわかり、カルスの増殖による精油生産の可能性が見出された。

醤油醸造におけるプロトプラスト融合の研究がある。プロトプラスト融合により香気成分生成能に優れた酵母に酢酸耐性を付与し、旺盛な乳酸発酵にも耐え得る、諸味への添加効果の高い酵母の育種が目的である。香気性酵母 K1 のアミノ酸要求性ミュータント Km11(Arg-) と酢酸耐性酵母 B1 の核酸要求性ミュータント Bm10(Ade-) を用いてプロトプラスト融合を行った。その菌体処理の流れを図表 2 に示す。

【図表 2】



出典：「細胞融合による高香気性醸造用酵母の研究開発（第2報）栄養要求性ミュータントの発酵特性とプロトプラスト融合」、宮崎県工業試験場・宮崎県食品加工研究開発センター研究報告 No.

40(1995) 1996 年、富山幸子、工藤哲三、日高照利、柏田雅徳著、宮崎県工業技術センター発行、159 頁 図 2 プロトプラスト融合のための菌体処理

【図表 2 の説明】図表 2 に示す処理を行いプロトプラスト融合を行って以下の結果が得られた。

- 1) 発酵能、香気成分生成能ともに親株と同等以上の栄養要求性ミュータントを取得した。
- 2) 栄養要求性ミュータントの酢酸耐性については、親株と同等以上の値を示した株が得られた。
- 3) 香気性酵母 Km11(Arg-) と酢酸耐性酵母 Bm10(Ade-) とのプロトプラスト融合を行い、融合株と考えられるコロニーの生育を認めた。

【出典／参考資料】

「煙にまかれぬように... 香木香気成分の培養による生産」、日本植物園協会誌 No. 32 1998 年、神田博史著、社団法人日本植物園協会発行、59-66 頁

「ローズゼラニウムの組織培養による精油生産」、名城大学農学部学術報告 No. 38 2002 年、中村真弓、夏目美菜子、岸江優子、八木則行、平井潤著、名城大学農学部発行、15-22 頁

「細胞融合による高香気性醸造用酵母の研究開発（第 2 報）栄養要求性ミュータントの発酵特性とプロトプラスト融合」、宮崎県工業試験場・宮崎県食品加工研究開発センター研究報告 No. 40(1995) 1996 年、富山幸子、工藤哲三、日高照利、柏田雅徳著、宮崎県工業技術センター発行、157-165 頁