

食品総合研究所研究報告

REPORT OF NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE

79

平成27年3月
March, 2015

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所

NARO Food Research Institute (NFRI)

National Agriculture and Food Research Organization (NARO)

Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

この印刷物は、環境物品等の調達に関する法律（グリーン購入法）に基づく基本方針の判断基準を満足する古紙配合率100%、白色度70%以下の非塗工印刷用紙を使用しています。
但し、表紙は除く（古紙は、新聞古紙等の市中回収古紙を100%原料として使用）。

食品総合研究所研究報告

第 79 号

平成 27 年 3 月

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所

食品総合研究所研究報告

第79号

所長	大谷敏郎				
編集委員会					
委員長	矢部希見子				
委員	矢野裕之	稲津康弘			
	八卷幸二	逸見林			
	中村敏英	小			
	伊藤康博				
事務局	濱野保文				

REPORT OF NATIONAL FOOD RESEARCH INSTITUTE

No. 79

President and Director General

OHTANI Toshio

Editorial Board

Chairman YABE Kimiko

Members YANO Hiroyuki

INATSU Yasuhiro

YAMAKI Kohji

HEMMI Hikaru

NAKAMURA Toshihide

KOBAYASHI Isao

ITO Yasuhiro

Secretary HAMANO Yasufumi

NARO Food Research Institute (NFRI)

National Agriculture and Food Research Organization (NARO)

Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

食品総合研究所研究報告（第79号）目次

報 文

Convenient preparation of template fungal genomic DNA for polymerase chain reaction and temporal temperature gradient gel electrophoresis analyses of fungal diversity in Japanese fermented soybean paste, <i>miso</i> 鈴木 聡, 柏木 豊, 楠本 憲一	1
Effect of sorghum flour on glutathione-rice bread 矢野 裕之, 福井 明子	9

研究ノート

茨城県つくば市の屋外でトラップに捕獲された貯穀害虫の記録 古井 聡, 今村 太郎, 宮ノ下 明大	19
ワークショップを通じた食品関連事業者等の自主衛生管理手法に関する知識の向上（第2報） 川崎 晋, 持田 麻里, 大畑 由紀子, 齋藤 美枝, 野澤 博美, 稲津 康弘	25
国産豆腐より分離された腸球菌の特性 細谷 幸恵, 大畑 由紀子, 川崎 晋, 稲津 康弘	31
Purification of Dehydrin Protein from Buckwheat Seed (<i>Fagopyrum esculentum</i> cv. <i>Kitawase</i>) 門間 美千子	35
巨大糖タンパク質プロテオグリカンの小角 X 線散乱測定による特性解析 渡邊 康	41

技術報告

ひじき粉末中の総ヒ素, カドミウム, 鉛及び必須無機元素の 2008 年度技能試験結果 内藤 成弘, 成川 知弘, 安井 明美	47
食品害虫サイト用に開発したアクセス解析プログラムとそのツール化 曲山 幸生, 七里 与子, 宮ノ下 明大, 今村 太郎, 古井 聡, 和田 有史, 増田 知尋	57
宿主株が異なる <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 組換え体におけるキシロース発酵能の比較 榊原 祥清, 王 曉輝, 徳安 健	67

国連大学生研究成果

Purification of Benzoic acid from Cranberry juice using Nanofiltration Technique Xin LU	77
ENCAPSULATION OF CLOVE OIL USING MICROCHANNEL EMULSIFICATION AND A HOMOGENIZATION METHOD Nanik Purwanti	78
The study on a bacterial adaptation by gene amplification Wannasiri Wannarat	79

Genetic improvement of secondary metabolite production of an industrial bacterial strain Le Thi Thu Hong	80
Effect of packaging material on shelf life, quality and gene expression of tomatoes Thiraviam Vanitha	81
抄 録	
《企画管理部》	
Effect of high-oxygen packaging on respiratory physiology and sensorial qualities of fresh shiitake mushrooms (<i>Lentinus edodes</i>) Yanjie Li, Yutaka Ishikawa, Takaaki Satake, Hiroaki Kitazawa, Xiaoli Qiu	82
エダマメの微細孔フィルムを用いた最適なMA包装条件 勝見 直行, 石川 豊, 北澤 裕明, 遠藤 昌幸, 鬼島 直子, 安達 あい	82
《放射性物質影響研究コーディネーター》	
うどん調理における放射性セシウムの動態解析 八戸 真弓, 内藤 成弘, 明石 肇, 等々力節子, 松倉 潮, 川本 伸一, 濱松 潮香	83
《食品機能研究領域》	
O-Methylated Theaflavins Suppress the Intracellular Accumulation of Triglycerides from Terminally Differentiated Human Visceral Adipocytes Yoshihisa Tanaka, Masanobu Kirita, Satoshi Miyata, Yuko Abe, Motoyuki Tagashira, Tomomasa Kanda, Mari Maeda-Yamamoto	83
Green tea extract containing a highly absorbent catechin prevents diet-induced lipid metabolism disorder Takashi Suzuki, Motofumi Kumazoe, Yoonhee Kim, Shuya Yamashita, Kanami Nakahara, Shuntaro Tsukamoto, Masako Sasaki, Takatoki Hagihara, Yukari Tsurudome, Yuhui Huang, Mari Maeda-Yamamoto, Yuki Shinoda, Wataru Yamaguchi, Koji Yamada, Hirofumi Tachibana	84
Effects of Bathing in Hot Springs on the Absorption of Green Tea Catechins: A Pilot Study Shinya Hayasaka, Yasuaki Goto, Mari Maeda-Yamamoto	84
ラットにおける「べにふうき」エキスの食後中性脂肪の上昇抑制作用 江頭祐嘉合, 蒲原 智子, 山口 航, 入江ひとみ, 豊田 唯, 花村 学, 平井 静, 篠田 有希, 山本(前田)万里	85
'Sunrouge', a new tea cultivar with high anthocyanin Atsushi Nesumi, Akiko Ogino, Katsuyuki Yoshida, Fumiya Taniguchi, Mari Maeda-Yamamoto, Junichi Tanaka, Akira Murakami	85
Low and medium but not high doses of green tea polyphenols ameliorated dextran sodium sulfate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity Hirofumi Inoue, Mari Maeda-Yamamoto, Atsushi Nesumi, Akira Murakami	86
Human Clinical Studies of Tea Polyphenols in Allergy or Life Style-related Diseases Mari Maeda-Yamamoto	86
Investigation of β -cryptoxanthin fatty acid ester compositions in citrus fruits cultivated in Japan Yusuke Wada, Atsuki Matsubara, Takato Uchikata, Yugo Iwasaki, Satochi Morimoto, Katsuta Kan, Tetsuya Ookura, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba	87

Distribution of Starch-degrading Enzymes in Rice Grains of different cultivars and Elution Behavior during Cooking Mika Tsuyukubo, Tetsuya Ookura, Midori Kasai	87
Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of Chinese fermented soypaste and estimation of inhibitory substances Fengjuan Li, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Yoko Takahashi, and Kohji Yamaki	88
Tea polyphenols as novel and potent inhibitory substances against renin activity Fengjuan Li, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Yoko Takahashi, and Kohji Yamaki	88
Inhibitory Effect of Catechin-Related Compounds on Renin Activity Fengjuan Li, Yoko Takahashi, and Kohji Yamaki	89
産地および収穫時期の違いがホウレンソウ・小松菜・トマト・キュウリの抗酸化能に及ぼす影響 若木 学, 渡辺 純, 石川(高野) 祐子	89
10-Hydroxy-2-decenoic acid, a unique medium-chain fatty acid, activates 5'-AMP-activated protein kinase in L6 myotubes and mice. Masathito Takikawa, Aya Kumagai, Harumi Hirata, Minoru Soga, Yoko Yamashita, Manabu Ueda, Hitoshi Ashida, Takanori Tsuda	89
北海道産タマネギ品種のケルセチン含有量と抗酸化能の差異 渡辺 純, 室 崇人, 柳田 大介, 山岸 喬, 石川(高野) 祐子	90
Improvement of the lipophilic-oxygen radical absorbance capacity (L-ORAC) method and single-laboratory validation Jun Watanabe, Tomoyuki Oki, Jun Takebayashi, Koji Yamasaki, Yuko Takano-Ishikawa, Akihiro Hino, Akemi Yasui	90
ブラッドオレンジ ‘タロッコ’ 果肉中のアントシアニンおよびフラボノイド含量が水溶性酸素ラジカル吸収能 (H-ORAC) に及ぼす影響 伊藤 史郎, 石々川英樹, 清水 篤, 菊池 毅洋, 毛利 幸喜, 森重 陽子, 石川(高野) 祐子	91
Total phenol content of different varieties of brinjal (<i>Solanum melongena</i> L.) and potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) growing in Bangladesh Nazma Shaheen, Ali Abbas Mohammad Kurshed, Kazi Muhammad Rezaul Karim, Md Mohiduzzaman, Cadi Parvin Banu, Momtaz Begum, Yuko Takano Ishikawa	91
牛乳アレルゲンタンパク質のステンレストレー上での加熱反応生成物 新本 洋士, 市川由佳里, 永田 紗織, 三浦 愛美, 長縄 康範, 石川(高野) 祐子	92
Possible role of S-equol on bone loss via amelioration of inflammatory indices in ovariectomized mice Yoriko Nishide, Miki Tadaishi, Masuko Kobori, Yuko Tousen, Michiko Kato, Masaki Inada, Chisato Miyaura, Yoshiko Ishimi	92
Corn oil and milk enhance the absorption of orally administered allyl isothiocyanate in rats Katsunari Ippoushi, Hiroshi Ueda, Atsuko Takeuchi	93
Differences in Cell-wall Polysaccharide Degradation during Softening Process in Two Cultivars of Japanese Apricot Fruits Yasuhisa Tsuchida, Hiroshi Yakushiji, Takaaki Oe, Keiichi Negoro, Nobuki Gato, Tatsuya Kotani, Yuriko Onishi, Takamichi Kobata, Motoi Tamura	93

Xylitol affects the intestinal microbiota and metabolism of daidzein in adult male mice Motoi Tamura, Chigusa Hoshi, Sachiko Hori	94
Clerk agent promotes consumers' ethical purchase intention in unmanned purchase environment Atsushi Kimura, Naoki Mukawa, Masahide Yuasa, Tomohiro Masuda, Mana Yamamoto, Takashi Oka, Yuji Wada.....	94
うま味を嗜好するマウスを用いたうま味修飾物質の力価測定 河合 崇行, 日下部裕子	95
Perception of elasticity in the kinetic illusory object with phase differences in inducer motion Tomohiro Masuda, Kazuki Sato, Takuma Murakoshi, Ken Utsumi, Atsushi Kimura, Nobu Shirai, So Kanazawa, Masami K. Yamaguchi, Yuji Wada	95
Memory color effect induced by familiarity of brand logos Atsushi Kimura, Yuji Wada, Tomohiro Masuda, Sho-ichi Goto, Daisuke Tsuzuki, Haruo Hibino, Dongsheng Cai, Ippeita Dan	96
Differential Functioning of Retrieval/Comparison Processing in Detection of the Presence and Absence of Change Takuma Murakoshi, Masako Hisa, Yuji Wada, Yoshihisa Osada	96
Infants' perception of curved illusory contour with motion Kazuki Sato, Tomohiro Masuda, Yuji Wada, Nobu Shirai, So Kanazawa, Masami K. Yamaguchi	97
Glossiness and Perishable Food Quality: Visual Freshness Judgment of Fish Eyes Based on Luminance Distribution Takuma Murakoshi, Tomohiro Masuda, Ken Utsumi, Kazuo Tsubota, Yuji Wada.....	97
A trial of human electromyography to evaluate texture of softened foodstuffs prepared with freeze-thaw impregnation of macerating enzymes Sayaka Nakatsu, Kaoru Kohyama, Yayoi Watanabe, Fumiyo Hayakawa, Kenya Shibata, Koji Sakamoto, Mitsuya Shimoda	98
Linear and non-linear rheology of mixed polysaccharide gels. Pt. II. Extrusion, compression, puncture and extension tests and correlation with sensory evaluation Tom Brenner, Fumiyo Hayakawa, Sayaka Ishihara, Yoshimi Tanaka, Makoto Nakauma, Kaoru Kohyama, Piyada Achayuthakan, Takahiro Funami, Katsuyoshi Nishinari	98
Effects of rice flour blends on bread texture and staling Tomoko Sasaki, Kaoru Kohyama, Kanae Miyashita, Tomoya Okunishi	99
Characterization of eating difficulty by sensory evaluation of hydrocolloid gels Fumiyo Hayakawa, Yukari Kazami, Sayaka Ishihara, Satomi Nakao, Makoto Nakauma, Takahiro Funami, Katsuyoshi Nishinari, Kaoru Kohyama	99
Parameters of texture profile analysis Katsuyoshi Nishinari, Kaoru Kohyama, Hitoshi Kumagai, Takahiro Funami, Malcolm C. Bourne	100
2バイトテクスチャー試験 (TPA) で得られるパラメータと超音波パルスドブロー法で求められる咽頭部流速と の関係 谷米(長谷川) 温子, 小倉 聖美, 秋間 彩香, 神山かおる, 熊谷日登美, 熊谷 仁	100

Ultrasound analysis of the effects of food bolus volume on tongue movement at the initiation of swallowing Zhihong Gao, Mitsuru Taniwaki, Hiromi Shimada, Sayaka Ishihara, Makoto Nakauma, Takahiro Funami, Kaoru Kohyama	101
《食品安全研究領域》	
Photochemical method to evaluate oxidation levels in heat-treated vegetable oil: comparison with peroxide-value and acid-value Hiromi Kameya, Mistuko Ukai	101
Effect of Gamma Irradiation on Soybean Allergen Levels. Tatsuya Moriyama, Erika Yano, Kazumi Kitta, Shin-ishi Kawamoto, Yukio Kawamura, Setsuko Todoriki	102
Arabidopsis thalianaにおけるガンマ線照射誘導過酸化水素蓄積と脂質過酸化の軽減にカタラーゼCAT2は関与しない Amena Sultana, 南 育子, 松島 大貴, Mohammad Issak, 中村 宜督, 等々力節子, 村田 芳之	102
Tribolium castaneumの幼虫と成虫へのガンマ線の影響 Amena Sultana, 南 育子, 市場 隆治, Mohammad Issak, 多田 幹朗, 中村 宜督, 宮竹 貴久, 等々力節子, 村田 芳之	103
振とう抽出法による放射線照射した食肉およびサーモンにおける2-アルキルシクロブタノン類の検知 堤 智昭, 足立 利華, 高附 巧, 根井 大介, 亀谷 宏美, 等々力節子, 松田りえ子, 手島 玲子	103
Comparison of scavenging capacities of vegetables by ORAC and EPR Hiromi Kameya, Jun Watanabe, Yuko Takano-Ishikawa, Setsuko Todoriki	104
キノコ熱水抽出物のE S Rスピントラップ法によるラジカル捕捉活性評価とORAC法 菅野 友美, 川村 翔栄, 原田栄津子, 亀谷 宏美, 鶴飼 光子, 大澤 俊彦	104
Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model Masaki Nagane, Hironobu Yasui, Tohru Yamamori, Songji Zhao, Yuji Kuge, Nagara Tamaki, Hiromi Kameya, Hide Nakamura, Hirotada Fujii, Osamu Inanami	105
ペンタフルオロフェニルカラムを用いたトリコテセン系カビ毒のLC-MS/MS高感度一斉分析法 田村 昌義, 中川 博之, 宇山 敦生, 望月 直樹	105
Detection of masked mycotoxins derived from type A trichothecenes in corn by high-resolution LC-Orbitrap mass spectrometer Hiroyuki Nakagawa, Shigeru Sakamoto, Yuki Sago, Masayo Kushiro, Hitoshi Nagashima	106
Detection of Type A Trichothecene Di-Glucosides Produced in Corn by High-Resolution Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry Hiroyuki Nakagawa, Shigeru Sakamoto, Yuki Sago, Hitoshi Nagashima	106
味噌に混入した糞便汚染指標菌の検出方法の検討 細谷 幸恵, 大畑由紀子, 川崎 晋, 稲津 康弘	107
Real-time PCRを用いた牛乳および生乳中のSalmonella増殖の特性評価と増殖挙動のモデル化 川崎 晋, 清水 茂雅, 小関 成樹, 稲津 康弘	107

ワークショップを通じた食品関連事業者等の自主衛生管理手法に関する知識の向上 川崎 晋, 持田 麻里, 大畑由紀子, 齋藤 美枝, 野澤 博美, 稲津 康弘	107
Evaluation of non-bacterial factors contributing to histamine accumulation in fish Daisuke Nei	108
Validation of hot water and chlorine treatments to inactivate pathogens inoculated on mung bean seeds: Influence of the seed production area DAISUKE NEI, Md. LATIFUL BARI, KATSUYOSHI ENOMOTO	108
穀物乾燥調製・貯蔵施設における玄米ベイトトラップによる貯穀害虫およびその天敵相の調査 今村 太郎, 宮ノ下明大, 古井 聡, 宮武 和史, 平井 佑佳, 田井 裕子, 中北 宏	108
粒状アーモンドチョコレート製品におけるノシメマダラメイガ <i>Plodia interpunctella</i> 幼虫の被害と発育 宮ノ下明大, 今村 太郎, 古井 聡, 西田 典由	109
マンション周辺における性フェロモントラップで捕獲されたノシメマダラメイガ <i>Plodia interpunctella</i> の個体数と分布 宮ノ下明大, 今村 太郎, 古井 聡	109
《食品分析研究領域》 Comparative analysis of flagellin glycans among pathovars of phytopathogenic <i>Pseudomonas syringae</i> Tadashi Ishii, Mitsuru Yoshida, Fumiko Taguchi, Yuki Ichinose, Hiroshi Ono	110
Hordatine A β -D-glucopyranoside from ungerminated barley grain Noriko Kohyama, Hiroshi Ono	110
Isolation and identification of phenolic compounds accumulated in brown rice grains ripened under high air temperature Hiroshi Nakano, Hiroshi Ono, Norio Iwasawa, Toshiyuki Takai, Yumiko Arai-Sanoh, Motohiko Kondo	111
Structure and biosynthesis of scabichelin, a novel tris-hydroxamate siderophore produced by the plant pathogen <i>Streptomyces scabies</i> 87.22 Shinya Kodani, Joanna Bicz, Lijiang Song, Robert J. Deeth, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Mitsuru Yoshida, Kozo Ochi, Gregory L. Challis	111
元素分析計-同位体比質量分析計 (EA-IRMS) によるうなぎ加工品試料の炭素・窒素・酸素安定同位体比分析の試験所間比較 鈴木彌生子, 一色 摩耶, 佐藤 里恵, 中下留美子	112
安定同位体比分析によるうなぎ加工品の原料原産地判別 一色 摩耶, 中村 哲, 高嶋 康晴, 寺田 昌市, 鈴木彌生子	112
安定同位体比分析および微量元素分析による湯通し塩蔵ワカメの産地判別 鈴木彌生子, 國分 敦子, 絵面 智宏, 中山 和美	113
塩尻市における牛舎周辺のツキノワグマ (<i>Ursus thibetanus</i>) 捕獲個体の家畜飼料依存 中下留美子, 岸元 良輔, 鈴木彌生子, 瀧井 暁子, 林秀 剛, 泉山 茂之	113
長野市街地ツキノワグマ出没個体は人里に依存していたか? 安定同位体比分析による食性解析 泉山 茂之, 中下留美子, 岸元 良輔, 鈴木彌生子, 林秀 剛, 瀧井 暁子	114

Responses of carbon and oxygen stable isotopes in rice grain (<i>Oryza sativa</i> L.) to an increase in air temperature during grain filling in the Japanese archipelago Fumikazu Akamatsu, Yaeko Suzuki, Rumiko Nakashita, Takashi Korenaga	114
Inversion of the stereochemistry around the sulfur atom of the axial methionine side chain through alteration of amino acid side chain packing in <i>Hydrogenobacter thermophilus</i> cytochrome c552 and its functional consequences Hulin Tai, Ken Tonegawa, Tomokazu Shibata, Hikaru Hemmi, Nagao Kobayashi, Yasuhiko Yamamoto	115
Objective evaluation of astringent and umami taste intensities of matcha using a taste sensor system Tomomi Ujihara, Nobuyuki Hayashi, Hidekazu Ikezaki	115
Recognition of caffeine by a water-soluble acyclic phane compound Nobuyuki Hayashi, Tomomi Ujihara, Shigeki Jin	116
Objective evaluation methods for the bitter and astringent taste intensities of black and oolong teas by a taste sensor Nobuyuki Hayashi, Tomomi Ujihara, Ronggang Chen, Kazue Irie, Hidekazu Ikezaki	116
Construction of Energy transfer Pathways Self-Assembled from DNA-Templated Stacks of Anthracene Rika Iwaura, Hiroharu Yui, Yuu Someya, Mayumi Ohnishi-Kameyama	117
調理条件が味噌汁のフラン量に及ぼす影響 箭田 浩士, 亀山真由美	117
Detection of eggs in the living white grub beetle <i>Dasylepida ishigakiensis</i> (Coleoptera: Scarabaeidae) by magnetic resonance imaging Yasuyo Sekiyama, Akemi K. Horigane, Nao Fujiwara-Tsujii, Hiroe Yasui, Hiroshi Ono	118
Observations of the migration of adult <i>Dasylepida ishigakiensis</i> (Coleoptera: Scarabaeidae) from belowground to the soil surface and their reproductive status by MRI Nao Fujiwara-Tsujii, Hiroe Yasui, Yasuyo Sekiyama, Akemi K. Horigane, Hiroshi Ono, Norio Arakaki	118
Pulse laser photolysis of aqueous ozone in the microsecond range studied by time-resolved far-ultraviolet absorption spectroscopy Takeyoshi Goto, Yusuke Morisawa, Noboru Higashi, Akifumi Ikehata, Yukihiro Ozaki	119
Oxide surface plasmon resonance for a new sensing platform in the near-infrared range Hiroaki Matsui, Wasanthamala Badalawa, Akifumi Ikehata, Hitoshi Tabata	119
生殖組織内における耐凍剤分布の計測法 都 甲洙, 佐藤 嘉兵, 斐 英煥, 池羽田晶文, 荒木 徹也, 上野 茂昭, 白 檉了	120
精米粉末中のカドミウム及び必須無機元素の2008年度技能試験結果 内藤 成弘, 門倉 雅史, 安井 明美	120
Identification of possible technical problems in determination of the major inorganic constituents of brown-rice flour by evaluating proficiency test results Shin-ichi Miyashita, Kazumi Inagaki, Shigehiro Naito, Kumiko Shindoh, Tomohiro Narukawa, Yanbei Zhu, Takayoshi Kuroiwa, Akiharu Hioki, Toshiyuki Fujimoto, Koichi Chiba	121

Inter-laboratory study of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of deoxynivalenol and its acetylated derivatives, 3-acetyl-deoxynivalenol and 15-acetyl-deoxynivalenol in wheat Tomoya Yoshinari, Toshitsugu Tanaka, Eiichi Ishikuro, Masakazu Horie, Toshihiro Nagayama, Masahiro Nakajima, Shigehiro Naito, Takahiro Ohnishi , Yoshiko Sugita-Konishi	121
Inter-Laboratory Study of an LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Fumonisin B1, B2 and B3 in Corn Tomoya YOSHINARI, Toshitsugu TANAKA, Eiichi ISHIKURO, Masakazu HORIE, Toshihiro NAGAYAMA, Masahiro NAKAJIMA, Shigehiro NAITO, Takahiro OHNISHI , Yoshiko SUGITA-KONISHI	122
Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of foods and agricultural products Junichi Mano, Shuko Hatano, Satoshi Futo, Yasutaka Minegishi, Kenji Ninomiya, Kosuke Nakamura, Kazunari Kondo, Reiko Teshima, Reona Takabatake, Kazumi Kitta	122
Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods Kosuke Nakamura, Yumi Minamitake, Kaori Nakamura, Tomoko Kobayashi, Akio Noguchi, Reona Takabatake, Kazumi Kitta, Hiroyuki Hashimoto, Hiroshi Kawakami, Kazunari Kondo, Reiko Teshima, Hiroshi Akiyama	123
Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand Kosuke Nakamura, Kazunari Kondo, Tomoko Kobayashi, Akio Noguchi, Kiyomi Ohmori, Reona Takabatake, Kazumi Kitta, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima, Tomoko Nishimaki-Mogami	123
Interlaboratory validation study of an event-specific real-time polymerase chain reaction detection method for genetically modified 55-1 papaya Akio Noguchi, Kosuke Nakamura, Kozue Sakata, Tomoko Kobayashi, Hiroshi Akiyama, Kazunari Kondo, Reiko Teshima, Kiyomi Ohmori, Masaki Kasahara, Rona Takabatake, Kazumi Kitta	124
Availability and utility of crop composition data Kazumi Kitta	124
Development and evaluation of a novel DNA extraction method suitable for processed foods Yasutaka Minegishi, Junichi Mano, Yasuo Kato, Kazumi Kitta, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima	125
Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns Reona Takabatake, Hiromichi Noritake, Akio Noguchi, Kosuke Nakamura, Kazunari Kondo, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima, Junichi Mano, Kazumi Kitta	125
Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct Kosuke Nakamura, Hiroshi Akiyama, Noriaki Kawano, Tomoko Kobayashi, Kayo Yoshimatsu, Junichi Mano, Kazumi Kitta, Kiyomi Ohmori, Akio Noguchi, Kazunari Kondo, Reiko Teshima	126
Interlaboratory study of qualitative PCR methods for genetically modified maize events MON810, Bt11, GA21, and CaMV P35S Reona Takabatake, Kaori Takashima, Takeyo Kurashima, Junichi Mano, Satoshi Furui, Kazumi Kitta, Tomohiro Koiwa, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima, Satoshi Futo, Yasutaka Minegishi	126
Simulation of collaborative studies for real-time PCR-based quantitation methods for genetically modified crops Satoshi Watanabe, Hiroshi Sawada, Shigehiro Naito, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima, Satoshi Furui, Kazumi Kitta, Akihiro Hino	127

《食品素材科学研究領域》

Application of Pressurized Fluid Extraction Method to Lipid Extraction for Determining trans-Fatty Acid Contents in Food Wakako Tsuzuki, Hideo Ohonishi and Ken Fujimoto	127
タンパク質含有率の低い硬質小麦品種におけるごはんパン適性について 細井 淳, 奥西 智哉	128
市販米粉の製パン性について 奥座 宏一, 松木 順子	128
Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. Masahiro Hayafune, Rita Berisio, Roberta Marchetti, Alba Silipo, Miyu Kayama, Yoshitake Desaki, Sakiko Arima, Flavia Squeglia, Alessia Ruggiero, Ken Tokuyasu, Antonio Molinaro, Hanae Kaku, Naoto Shibuya	129
Sorghum as whole-crop feedstock for integrated production of fermentable sugars Long Wu, Mitsuru Gau, Tomoyuki Takai, Shigemitsu Kasuga, Mun-Soo Yun, Ken Tokuyasu	129
Enzymatic hydrolysis of wood with alkaline treatment Dai Oka, Kayoko Kobayashi, Noriyuki Isobe, Yu Ogawa, Tomoya Yokoyama, Satoshi Kimura, Ung-Jin Kim, Ken Tokuyasu, Masahisa Wada	130
Integration of a step for phenolic-acid recovery from rice straw with CaCCO process for efficient fermentable-sugar recovery Rui Zhao, Min-Soo Yun, Riki Shiroma, Masakazu Ike, Di Guan, Ken Tokuyasu	130
High-solid loading pretreatment/saccharification tests with CaCCO (Calcium Capturing by Carbonation) process for rice straw and domestic energy crop, Erianthus arudinaceus Masakazu Ike, Rui Zhao, Min-Soo Yun, Riki Shiroma, Seiko Ito, Ying Zhang, Ying Zhang, Mitsuhiro Arakane, Muhammad Imran Al-Haq, Junko Matsuki, Jeung-Yil Park, Mitsuru Gau, Kenichi Yakushido, Minoru Nagashima, Ken Tokuyasu	131
Further studies on the protein chemistry and property of glutathione-added rice bread : evidence of glutathionylation of batter protein as well as crumb structure/sensory evaluation Hiroyuki Yano, Naoto Kaji, Motoyuki Tokuriki	131
Effects of fats and oils on the bioaccessibility of carotenoids and vitamin E in vegetables Akihiko Nagao, Eiichi Kotake-Nara, Megumi Hase	132
《食品工学研究領域》	
Decolorization of Japanese soy sauce (shoyu) using adsorption Atsushi Miyagi, Hiroshi Nabetani, Mitsutoshi Nakajima	132
Color control of Japanese soy sauce (shoyu) using membrane technology Atsushi Miyagi, Takayuki Suzuki, Hiroshi Nabetani, Mitsutoshi Nakajima	133
貯穀害虫の画像による自動判別 曲山 幸生, 七里 与子, 宮ノ下明大, 今村 太郎, 古井 聡, 和田 有史, 増田 知尋, 石山 墨	133
Direct Measurement of Helical Cell Motion of the Spirochete Leptospira Shuichi Nakamura, Alexander Leshansky, Yukio Magariyama, Keiichi Namba, Seishi Kudo	134

Distribution of Major Xanthones in the Pericarp, Aril, and Yellow Gum of Mangosteen (<i>Garcinia Mangostana</i> Linn.) Fruit and Their Contribution to Antioxidative Activity Udomlak SUKATTA, Makiko TAKENAKA, Hiroshi ONO, Hiroshi OKADOME, Itaru SOTOME, Kazuko NANAYAMA, Warunee THANAPASE, Seiichiro ISOBE	134
Effective extraction of curcuminoids by grinding turmeric (<i>Curcuma longa</i>) with medium-chain triacylglycerols Makiko Takenaka, Takeshi Ohkubo, Hiroshi Okadome, Itaru Sotome, Toshihiro Itoh, Seiichiro Isobe	135
微細水滴含有過熱水蒸気による食品加熱システムの開発と農産加工への応用 五月女 格	135
ORAC法による清酒製造工程の抗酸化性の変化 阿部 恭幸, 齋藤 高弘, 岡本 竹己, 佐々木隆浩, 星 佳宏, 杉江 正美, 萩原 昌司	136
Fluorescence fingerprint imaging of gluten and starch in wheat flour dough with consideration of total constituent ratio Mito Kokawa, Junichi Sugiyama, Mizuki Tsuta, Masatoshi Yoshimura, Kaori Fujita, Mario Shibata, Tetsuya Araki, Hiroshi Nabetani	136
Prediction of aerobic plate count on beef surface using fluorescence fingerprint Masatoshi Yoshimura, Junichi Sugiyama, Mizuki Tsuta, Kaori Fujita, Mario Shibata, Mito Kokawa, Seiichi Ohshita, Naomi Ohto	137
Supercontinuum laser based optical characterization of Intralipid® phantoms in the 500-2250 nm range Ben Aernouts, Eduardo Zamora-Rojas, Robbe Van Beers, Rodrigo Watté, Ling Wang, Mizuki Tsuta, Jeroen Lammertyn, Wouter Saeys	137
Use of multivariate analysis for the improvement in prediction accuracy of bacterial aerobic plate count by flow cytometry Mizuki Tsuta, Yasuhiko Sasaki, Ikuo Takeuchi, Hideki Nakamoto, Jun Ishikawa, Susumu Kawasaki, Junichi Sugiyama, Kaori Fujita, Masatoshi Yoshimura, Mario Shibata, Mito Kokawa	138
Detection of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nutmeg extract using fluorescence fingerprint Kaori Fujita, Junichi Sugiyama, Mizuki Tsuta, Mario Shibata, Mito Kokawa, Hiroyuki Onda, Takehito Sagawa	138
Image analysis of bread crumb structure in relation to mechanical properties Mario Shibata, Mizuki Tsuta, Junichi Sugiyama, Kaori Fujita, Mito Kokawa, Tetsuya Araki, Hiroshi Nabetani	139
Optimization of excitation–emission band-pass filter for visualization of viable bacteria distribution on the surface of pork meat Ken Nishino, Kazuaki Nakamura, Mizuki Tsuta, Masatoshi Yoshimura, Junichi Sugiyama, Shigeki Nakauchi,	139
蛍光指紋によるサトイモの産地判別法開発 中村結花子, 藤田かおり, 蔦 瑞樹, 杉山 純一, 粉川 美踏, 吉村 正俊, 柴田真理朗, 鍋谷 浩志, 荒木 徹也, 中村 哲	140
Preparation of Phi29 DNA polymerase free of amplifiable DNA using ethidium monoazide, an ultraviolet-free light-emitting diode lamp and trehalose Hirokazu Takahashi, Hiroyuki Yamazaki, Satoshi Akanuma, Hiroko Kanahara, Toshiyuki Saito, Tomoyuki Chimuro, Takayoshi Kobayashi, Toshio Ohtani, Kimiko Yamamoto, Shigeru Sugiyama, Toshiro Kobori	140
The genome folding mechanism in yeast Kimura Hajime, Yasutoshi shimooka, Jun-ichi Nishikawa, Osamu Miura, Shigeru Sugiyama, Shuji Yamada, Takashi Oyama,	141

Regions of unusually high flexibility occur frequently in human genomic DNA Kimura Hajime, Dai Kageyama, Mika Furuya, Shigeru Sugiyama, Noboru Murata, Takashi Oyama	141
Nano-structure of heat-moisture treated waxy and normal starches Wittawat Jiranuntakula, Shigeru Sugiyama, Kazumi Tukamoto, Chureerat Puttanlek, Vilai Rungsardthongd, Santhanee Pucha- arnon, Dudsadee Uttapap	142
Impact of hot air and vacuum drying on the quality attributes of kiwifruit slices Takahiro Orikasa, Shoji Koide, Shintaro Okamoto, Teppei Imaizumi, Yoshiki Muramatsu, Jun-ichi Takeda, Takeo Shiina, Akio Tagawa	142
積算温度を指標としたコマツナの遠赤外線乾燥における品質変化の評価 岡本慎太郎, 折笠 貴寛, 畑中 咲子, 菰田 俊一, 齋藤順一郎, 富樫 千之, 松村 良樹, 小出 章二, 椎名 武夫, 田川 彰男	143
Changes in gene expression of harvested cabbage in response to mechanical wound stress Manasikan Thammawong, Hiromi Umehara, Makoto Yoshida, Ayaka Soga, Tomoko Kaneta, Nobutaka Nakamura, Yasuhiro Ito, Kohei Nakano, Takeo Shiina	143
The response characteristics of Japanese radish (daikon) to mechanical wound stress Takeo Shiina, Hitomi Umehara, Tomoko Kaneta, Nobutaka Nakamura, Yasuhiro Ito, Manasikan Thammawong, Makoto Yoshida, Ayaka Soga, Kohei Nakano	144
加振周波数と包装資材が多段積載されたダイコンの加速度, 回転, 損傷特性に及ぼす影響 兼田 朋子, 中村 宣貴, タンマウオン マナスイカン, 北澤 裕明, 曾我 綾香, 吉田 誠, 福島 崇志, 中野 浩平, 椎名 武夫	144
Expression of physical wound stress-responsive genes in Arabidopsis thaliana and cabbage (Brassica oleracea var. capitata L.) Manasikan Thammawong, Tomoko Kaneta, Hitomi Umehara, Nobutaka Nakamura, Yasuhiro Ito, Takeo Shiina	145
青果物のバルクコンテナ物流技術の開発 -コスト・環境負荷の低減を目指して- 椎名 武夫, 中村 宣貴, 兼田 朋子, Manasikan THAMMAWONG	145
新規バルクコンテナ輸送に伴うダイコンの加速度および接触部位応力が損傷特性に及ぼす影響の解明 兼田 朋子, 中村 宣貴, タンマウオン マナスイカン, 曾我 綾香, 吉田 誠, 新實 誉也, 横山 幸一, 椎名 武夫	146
モモ果実の繰り返し衝撃に対する易損性の部位別評価 北澤 裕明, 清水 栄治, 長谷川奈緒子, 五十部誠一郎	146
Effects of post-harvest cooling delay on weight loss, soluble solid and ascorbic acid contents of strawberry fruit Hiroaki Kitazawa, Tatsuo Sato, Nobutaka Nakamura, Satoru Motoki	147
Effect of Difference in Acceleration and Velocity Change on Product Damage Due to Repetitive Shock Hiroaki Kitazawa, Katsuhiko Saito, Yutaka Ishikawa	147
Super-fine rice-flour production by enzymatic treatment with high hydrostatic pressure processing Miyuki Kido, Kaneto Kobayashi, Shuji Chino, Toshikazu Nishiwaki, Noriyuki Homma, Mayumi Hayashi, Kazutaka Yamamoto, Toru Shigematsu	148

Membrane damage and viability loss of <i>E. coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella</i> spp in apple juice treated with high hydrostatic pressure and thermal death time disks Dike O. Ukuku, Kazutaka Yamamoto, Md L. Bari, Sudarsan Mukhopadhaya, Vijay Juneja, Shinichi Kawamoto	148
短波帯加熱処理による包装済み味噌の酵素の失活 植村 邦彦, 高橋千栄子, 小林 功	149
Preparation, characterization, and in vitro gastrointestinal digestibility of oil-in-water emulsion-agar gels Zheng Wang, Marcos A. Neves, , Isao Kobayashi, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima	149
Formulation and storage stability of baicalein-loaded oil-in-water emulsions Witcha Treeswan, Sosaku Ichikawa, Zheng Wang, Marcos A. Neves, , Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima, , Isao Kobayashi	150
Preparation of monodisperse food-grade oleuropein-loaded W/O/W emulsions using microchannel emulsification and evaluation of their storage stability Safa Souilem, , Isao Kobayashi, Marcos A. Neves, , Sami Sayadi, Sosaku Ichikawa, Mitsutoshi Nakajima	150
Direct observation and characterization of the generation of organic solvent droplets with and without triglyceride oil by electrospraying Xian Zhang, , Isao Kobayashi, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima	151
Long-term continuous production of soybean oil-in-water emulsions by microchannel emulsification Yanru Zhang, Isao Kobayashi, Marcos A. Neves, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima	151
Preparation and characterization of water-in-oil-in-water emulsions containing a high concentration of L-ascorbic acid Nauman Khalid, Isao Kobayashi, Marcos A. Neves, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima	152
Inulin fructotransferase (DFA I-producing) from <i>Arthrobacter</i> sp. H10-2 Kazutomo Haraguchi	152
Effect of Potato Ethanol Residue on Rat Plasma Cholesterol Levels Naoto Hashimoto, Noriyuki Shinomiya, Katsuichi Saito, Takahiro Noda, Kyu-Ho Han, Michihiro Fukushima	153
Comparison of long-term up-regulated genes during induction of freezing tolerance by cold and ABA in bromegrass cell cultures revealed by microarray analyses Toshihide Nakamura, Junshi Yazaki, Naoki Kishimoto, Shoshi Kikuchi , Albert J. Robertson, Lawrence V. Gusta, Masaya Ishikawa	153
Structural Elucidation of the Cyclization Mechanism of α -1, 6-Glucan by <i>Bacillus circulans</i> T-3040 Cycloisomaltooligosaccharide Glucanotransferase Nobuhiro Suzuki, Zui Fujimoto, Young-Min Kim, Mitsuru Momma, Naomi Kishine, Ryuichiro Suzuki, Shiho Suzuki, Shinichi Kitamura, Mikihiko Kobayashi, Atsuo Kimura, Kazumi Funane	154
Evidence for cycloisomaltooligosaccharide production from starch by <i>Bacillus circulans</i> T-3040 Kazumi Funane, Hitomi Ichinose, Motomi Araki, Ryuichiro Suzuki, Keitarou Kimura, Zui Fujimoto, Mikihiko Kobayashi, Atsuo Kimura	154
菌体外分解酵素が増強された納豆菌 rpoB 変異株による黒大豆納豆の製造 久保 雄司, 齋藤 勝一, ダニエル ホルヴェック, 舟根 和美, 中川 力夫, 木村啓太郎	155

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from <i>Bacillus circulans</i> T-3040 Nobuhiro Suzuki, Young-Min Kim, Mitsuru Momma, Zui Fujimoto, Mikihiko Kobayashi, , Atsuo Kimura, Kazumi Funane	155
Conformation and physical properties of cycloisomaltooligosaccharides in aqueous solution Shiho Suzuki, Takashi Yukiya, Arata Ishikawa, Yoshiaki Yuguchi, Kazumi Funane, Shinichi Kitamura	156
Distribution of radioactive cesium (¹³⁴ Cs plus ¹³⁷ Cs) in a contaminated Japanese soybean cultivar during the preparation of tofu, natto, nimame (boiled soybean) Mayumi Hachinohe, Keitarou Kimura, Yuji Kubo, Katsuo Tanji, Shioka Hamamatsu, Shoji Hagiwara, Daisuke Nei, Hiromi Kameya, Rikio Nakagawa, Ushio Matsukura, Setsuko Todoriki, Shinichi Kawamoto	156
Reduction of the degradation activity of umami-enhancing purinic ribonucleotide supplement in miso by the targeted suppression of acid phosphatases in the <i>Aspergillus oryzae</i> starter culture Junichiro Marui, Sawaki Tada, Mari Fukuoka, Yutaka Wagu, Yohei Shiraiishi, Noriyuki Kitamoto, Tatsuya Sugimoto, Ryota Hattori, Satoshi Suzuki, Ken-Ichi Kusumoto	157
Characterization of a D-stereoselective aminopeptidase (DamA) exhibiting aminolytic activity and halophilicity from <i>Aspergillus oryzae</i> Mayumi Matsushita-Morita, Hiroyuki Nakagawa, Sawaki Tada, Junichiro Marui, Ryota Hattori, Satoshi Suzuki, Youhei Yamagata, Hitoshi Amano, Hiroki Ishida, Michio Takeuchi, Ken-Ichi Kusumoto.....	157
conF and conJ contribute to conidia germination and stress response in the filamentous fungus <i>Aspergillus nidulans</i> . Satoshi Suzuki, Özlem Sarikaya Bayram, Özgür Bayram, Gerhard H. Braus	158
Phytotoxicity Evaluation of Type B Trichothecenes Using a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Model System Tadahiro Suzuki, Yumiko Iwahashi	158
《食品バイオテクノロジー研究領域》 2-O- α -D-Glucosylglycerol phosphorylase from <i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10 possessing hydrolytic activity on β -D-glucose 1-phosphate Takanori Nihira, Yuka Saito, Ken' ichi Ohtsubo, Hiroyuki Nakai, Motomitsu Kitaoka.....	159
Facile preparation of highly-crystalline lamella of (1 \rightarrow 3)- β -glucan by using extract of <i>Euglena gracilis</i> Yu Ogawa, Kazuhiro Noda, Satoshi Kimura, Motomitsu Kitaoka, Masahisa Wada	159
Distinct substrate specificities of three glycoside hydrolase family 42 β -galactosidases from <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 Alexander H. Viborg, Takane Katayama, Maher Abou Hachem, Mathias C. F. Andersen, Mamoru Nishimoto, Mads H. Clausen, Tadasu Urashima, Birte Svensson, Motomitsu Kitaoka	160
Directed evolution to enhance thermostability of galacto-N-biose/lacto-N-biose I phosphorylase Yoshiyuki Koyama, Masafumi Hidaka, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka.....	160
Discovery of cellobionic acid phosphorylase in cellulolytic bacteria and fungi Takanori Nihira, Yuka Saito, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka, Kiyohiko Igarashi, Ken' ichi Ohtsubo, Hiroyuki Nakai	161
Potassium ion-dependent trehalose phosphorylase from halophilic <i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10 Takanori Nihira, Yuka Saito, Kazuhiro Chiku, Motomitsu Kitaoka, Ken-ichi Ohtsubo, Hiroyuki Nakai	161

Discovery of β -1, 4-D-mannosyl-N-acetyl-D-glucosamine phosphorylase involving in metabolism of N-glycans Takanori Nihira, Erika Suzuki, Motomitsu Kitaoka, Mamoru Nishimoto, Ken'ichi Ohtsubo, Hiroyuki Nakai	162
Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> shows a unique substrate specificity and requires a cognate chaperon for its active expression Haruko Sakurama, Masashi Kiyohara, Jun Wada, Yuji Honda, Masanori Yamaguchi, Satoru Fukiya, Atsushi Yokota, Hisashi Ashida, Hidehiko Kumagai, Motomitsu Kitaoka, Kenji Yamamoto, Takane Katayama	162
Structure of an uncharacterized glycoside hydrolase family 63 enzyme in complex with a glycosynthase product Takatsugu Miyazaki, Megumi Ichikawa, Gaku Yokoi, Motomitsu Kitaoka, Haruhide Mori, Yoshikazu Kitano, Atsushi Nishikawa, Takashi Tonozuka	163
Characterization of the cytosolic β -N-acetylglucosaminidase from <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> Yuji Honda, Mamoru Nishimoto, Takane Katayama, and Motomitsu Kitaoka	163
Colorimetric quantification of α -D-mannose 1-phosphate Takanori Nihira, Erika Suzuki, Motomitsu Kitaoka, Mamoru Nishimoto, Ken'ichi Ohtsubo, and Hiroyuki Nakai	164
Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is palmitoylated and internalizes ligands via caveolae/raft-dependent endocytosis M.K.Kuramochi, Q.Xie, S. Kajiwara, S. Komba, T.Minowa, S.Machida	164
Expression of neutral β -glucosidase from <i>Scytalidium thermophilum</i> in <i>Candida glabrata</i> for ethanol production from alkaline-pretreated rice straw Xiaohui Wang, Masakazu Ike, Riki Shiroma, Ken Tokuyasu, Yoshikiyo Sakakibara	165
クロラムフェニコール耐性遺伝子によるゲノム重複を活用した枯草菌育種法 稲岡 隆史, 草房 克江, 本山 志織	165
Biosynthetic conclusions from the functional dissection of oxygenases for biosynthesis of actinorhodin and related <i>Streptomyces</i> antibiotics Takaaki Taguchi, Masaki Yabe, Hitomi Odaki, Miki Shinozaki, Mikko Metsä-Ketelä, Takao Arai, Susumu Okamoto, Koji Ichinose	166
Transcriptional Regulation of Fruit Ripening by Tomato FRUITFULL Homologs and Associated MADS Box Proteins Masaki Fujisawa, Yoko Shima, Hiroyuki Nakagawa, Mamiko Kitagawa, Junji Kimbara, Toshitsugu Nakano, Takafumi Kasumi, Yasuhiro Ito	166
Characterization of a large glycoprotein proteoglycan by size-exclusion chromatography combined with light and X-ray scattering methods Yasushi Watanabe, Yoji Inoko	167
The regulatory mechanism of fruit ripening revealed by analyses of direct targets of the tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR Masaki Fujisawa, Yasuhiro Ito	167
Expression profiling of tomato pre-abscission pedicels provides insights into abscission zone properties including competence to respond to abscission signals Toshitsugu Nakano, Masaki Fujisawa, Yoko Shima, Yasuhiro Ito	168
Tomato FRUITFULL homologues act in fruit ripening via forming MADS-box transcription factor complexes with RIN Yoko Shima, Mamiko Kitagawa, Masaki Fujisawa, Toshitsugu Nakano, Hiroki Kato, Junji Kimbara, Takafumi Kasumi, Yasuhiro Ito	168

Crystal structure and characterization of the glycoside hydrolase family 62 α -L-arabinofuranosidase from <i>Streptomyces coelicolor</i> Tomoko Maehara, Zui Fujimoto, Hitomi Ichinose, Mari Michikawa, Koichi Harazono, Satoshi Kaneko	169
Characterization of mannose isomerase from a cellulolytic actinobacteria <i>Thermobifida fusca</i> MBL10003 Takafumi Kasumi, Sumiko Mori, Satoshi Kaneko, Hitoshi Matsumoto, Yousuke Kobayashi, Yoshiyuki Koyama	169
Expression of <i>Arabidopsis thaliana</i> xylose isomerase gene and the effect on ethanol production in <i>Flammulina velutipes</i> Tomoko Maehara, Koji Takabatake, Satoshi Kaneko	170
Phase diagram-guided method for growth of a large crystal of glycoside hydrolase family 45 inverting cellulase suitable for neutron structural analysis Akihiko Nakamura, Takuya Ishida, Shinya Fushinobu, Katsuhiko Kusaka, Ichiro Tanaka, Koji Inaka, Yoshiki Higuchi, Mika Masaki, Kazunori Ohta, Satoshi Kaneko, Nobuo Niimura, Kiyohiko Igarashi, Masahiro Samajima	170
A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in <i>Arabidopsis</i> Naomi Geshi, Jorunn N. Johansen, Adiphol Dilokpimol, Aurélie Rolland, Katia Belcram, Stéphane Verger, Toshihisa Kotake, Yoichi Tsumuraya, Satoshi Kaneko, Theodora Tryfona, Paul Dupree, Henrik V. Scheller, Herman Höfte, Gregory Mouille	171
The structure of a <i>Streptomyces avermitilis</i> α -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement Zui Fujimoto, Adam Jackson, Mari Michikawa, Tomoko Maehara, Mitsuru Momma, Bernard Henrissat, Harry J. Gilbert, Satoshi Kaneko	171
β -Galactosyl Yariv reagent binds to the β -1, 3-galactan of arabinogalactan proteins Kiminari Kitazawa, Theodora Tryfona, Yoshihisa Yoshimi, Yoshihiro Hayashi, Susumu Kawauchi, Liudmil Antonov, Hiroshi Tanaka, Takashi Takahashi, Satoshi Kaneko, Paul Dupree, Yoichi Tsumuraya, Toshihisa Kotake	172
付 録	
食品総合研究所研究報告投稿要領	173
「日本食品科学工学会誌」投稿論文記載要項	175

報 文

Convenient preparation of fungal genomic DNA templates for polymerase chain reaction and temporal temperature gradient gel electrophoresis analyses of fungal diversity in the Japanese fermented soybean paste *miso*

Satoshi Suzuki ¹, Yutaka Kashiwagi ², Ken-Ichi Kusumoto ^{1,*}

¹National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

²Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502, Japan

Abstract

We have developed a method to extract DNA from a traditional Japanese fermented soybean paste (*miso*) more easily and quickly than by conventional methods. The extracted *miso* DNA was used as a template for the polymerase chain reaction (PCR) to amplify the ITS2 region of ribosomal DNA. We found the PCR sensitivities with the templates extracted by this new method and by the conventional method to be comparable for the detection of fungal communities. We also investigated the fungal diversity in *miso* by using a culture-independent genetic fingerprinting technique known as temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE), and then compared the TTGE profiles of 18 *miso* samples. The TTGE profile of each *miso* type could be classified according to the fermentation procedure used during manufacture.

Key words: FTA® card, traditional Japanese fermented food *miso*, PCR-TTGE, fungal diversity

1. Introduction

Miso is a traditional Japanese fermented salty-tasting seasoning made from soybeans, rice or barley, and salt. Analysis of the microflora of *miso* is important for efficient quality control in the *miso*-producing industry. *Aspergillus oryzae* digests the grain starch to glucose; halotolerant yeast species such as *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida*

etchellsii, and *C. versatilis* produce the characteristic flavors and alcohols; and lactic acid bacteria produce the lactic acid. The fermentation room of every *miso*-manufacturing facility has its characteristic resident flora that impart the original flavor of the *miso* produced by each manufacturer. In addition to the flavor-producing favorable yeasts, the air can also contain undesirable contaminants such as *Bacillus* species.

*Corresponding author

E-mail address: kusumoto@affrc.go.jp

Telephone: +81-298-38-8077

Fax: +81-298-38-7996

Running title: TTGE analyses of Japanese fermented soybean paste

The conventional method for analyzing *miso* microflora is by the dilution and spread plate method, which requires several days for incubation and much effort. Previously, we reported a rapid and direct method for preparing PCR templates from *miso*¹⁾ by using the FTA® card. In that study, although we successfully amplified the fungal internal transcribed spacer (ITS) region from *miso* samples and observed the ITS DNA fragments by agarose gel electrophoresis, we could not identify the fungal species without cloning and sequencing each DNA fragment, because agarose gel electrophoresis cannot distinguish DNA fragments of different sequence but same length. Culture-independent approaches such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) or temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) have been developed for complex matrices such as food²⁾ and soil³⁾. The ability of DGGE or TTGE to separate DNA fragments of the same length depends on the difference of melting temperature applied during electrophoresis. Hosoi reported the analysis of bacterial communities in *miso* by PCR followed by DGGE⁴⁾, and Taiyouji, Ando, and Shima reported the analysis of lactic acid bacterial communities in soybean *koji*⁵⁾. The microflora of several Chinese and Korean soybean pastes were also analyzed by DGGE^{6,7)}. TTGE is a simpler technique than DGGE, in that it does not require a denaturing gradient gel. Instead, the gradually increasing gel temperature denatures the DNA fragment.

Here, we report on the amplification of the ITS2 region of fungal rDNA from 18 kinds of *miso* using the FTA® card and analysis by TTGE.

2. Materials and methods

2.1. Food samples and strains

Eighteen kinds of *miso* samples (A1, C1, C2, C3, C4, D1, D2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, F1, H1, and I1) obtained from Chuo *Miso* Kenkyujo (Central *Miso* Research Institute, Tokyo, Japan) were frozen at -20°C and stored. Each *miso* sample name consisted of an alphabet letter and a number. The alphabet letter shows the category of the *miso* (A: white-colored and sweet-tasting type rice *koji miso*; C: ocher-colored and salty-tasting type rice *koji miso*; D: red ocher-colored and salty-tasting type rice *koji miso*; E: brown-colored and salty-tasting type rice *koji miso*; F: soybean *koji miso*; H: barley *koji miso*; and I:

blend of rice and barley *koji miso*.) The number reflects the sample number of this study. Six reference strains of *miso* microorganisms (*A. oryzae* NFRI1599, *A. sojae* NFRI1147, *Z. rouxii* NFRI3471, *C. parapsilosis* NFRI4051, *C. versatilis* NFRI4052, and *C. etchellsii* NFRI4053) were obtained from the gene bank of the National Food Research Institute (Tsukuba, Japan). The fungal species were maintained on potato dextrose agar for 5 days at 25°C. The fungal species were inoculated into 10 mL of YPD medium (1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% D-glucose) in an Erlenmeyer flask and cultured at 30°C with 130 rpm rotary shaking for 1 day.

2.2. Preparation of template genomic *miso* DNA for PCR

2.2.1. Conventional DNA extraction

Miso samples (5 g each) were suspended in 20 mL of 10 mM phosphate buffer (pH 6.8) and homogenized for 1 min with a stomacher (MC-D400D; Gunze Sangyou, Tokyo, Japan). Two milliliters of the resulting suspension was centrifuged at 14,000 rpm for 3 min. The pellets were frozen in liquid nitrogen and crushed to a fine powder using an automatic grinding mill (TK-AM4; Tokken, Kashiwa, Japan) and approximately 100 mg of the frozen *miso* powder was suspended in the AP1 buffer of the DNeasy Plant Kit (Qiagen, Tokyo, Japan). DNA extraction from the frozen *miso* powder was carried out according to the manufacturer's protocol.

2.2.2. Template preparation by FTA® card

Template preparation by FTA® card was done according to a modified procedure of our previous report¹⁾. Approximately 50 mL of each *miso* sample was picked up using a disposable plastic inoculating loop and suspended in 300 mL of TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) and then subjected to filtration through an empty Micro Bio-Spin chromatography column (Bio-Rad, Tokyo, Japan) by centrifugation at 15,000 rpm. A large proportion of the source crop debris is retained on the column filter, while the buffer and cells of the microorganisms are eluted in the flow-through fractions. The cells were pelleted by column centrifugation. The pellets were resuspended in 25 mL of TE buffer and heated three times in a microwave oven for 30 s each time. In order not to evaporate the entire buffer, the lid of the tubes was kept firmly closed. Usually,

a small amount of vaporized water would be observed on the inner wall of the tube after heating. Five microliters of the preheated samples was applied onto the indicated FTA® classic cards (Whatman Plc, Brentford, Middlesex, UK) that were then dried for 10 min at room temperature. Disks of 3 mm diameter were punched out from the FTA® card with a paper punch and were washed according to the manufacturer's protocol.

2.2.3. DNA extraction from pure cultured fungi by the conventional method

The fungal culture in YPD medium was harvested by filtration or centrifugation. Approximately 100 mg of fungal cells was frozen by liquid nitrogen and crushed into a fine powder, as described above. Genomic DNA was extracted from approximately 100 mg of fungal cell powder using the DNeasy Plant Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

2.3. PCR amplification

The forward primer ITS3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3')⁸⁾ and the reverse primer ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')⁸⁾ were used. A GC clamp (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3')⁹⁾ was added to the 5' end of the ITS3 or ITS4 sequence (ITS3GC, ITS4GC). PCR was performed using the GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan) in a final reaction mixture volume of 50 μ L containing 10 μ L of 5 \times GC buffer, 25 μ L of Ampdirect (Shimadzu, Kyoto, Japan), 0.375 M concentrations of each primer, 0.375 U of Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Daiichikagaku, Tokyo, Japan), two FTA® card disks or 20 ng of DNA as template, and 7.5% dimethylsulfoxide. The following thermal cycling program was used: 94°C for 5 min (1 cycle), 98°C for 1 min, 48°C for 2 min, and 72°C for 3 min (10 cycles); the denaturing time was decreased by 3 s (i.e., from 1 min in the first cycle to 33 s in the tenth cycle); the annealing temperature was increased by 1°C (i.e., from 48°C in the first cycle to 57°C in the tenth cycle); and the extension time was increased 6 s after each cycle (i.e., from 3 min in the first cycle to 3 min 54 s in the tenth cycle); followed by 98°C for 30 s, 58°C for 2 min 30 s, and 72°C for 4 min (40 cycles). The size and quantity of the PCR products were confirmed by 2% agarose gel electrophoresis.

2.4. Temporal temperature gradient gel electrophoresis

TTGE was carried out using the Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). Polyacrylamide gels (8%) containing 7 M urea (16 cm \times 16 cm \times 1 mm) were prepared and run with 1.25 \times TAE buffer. Electrophoresis was performed at a constant voltage of 140 V for 6 h with an increasing temperature gradient of 2°C /h from an initial temperature of 48°C to a final temperature of 60°C. The gels were stained for 30 min with either SYBR Safe (Invitrogen Japan, Tokyo, Japan) and scanned by the Typhoon9400 scanner (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan), or with ethidium bromide and observed by an ultraviolet illuminator.

2.5. Sequencing

TTGE fragments of the *miso* samples were compared with the fragments of pure culture reference strains, and bands unique to the *miso* samples were selected for sequence analysis. Materials from the selected bands were excised using a razor blade, and the DNA fragments were eluted into 20 mL of sterile water at 4°C overnight. From the eluate, 5 mL was used as a template and re-amplified by PCR as described above. The PCR products were ligated into the pCR-Blunt vector (Invitrogen Japan) according to the manufacturer's instructions and subjected to the cycle sequencing reaction using the BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan). Sequence analysis was performed with the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. The sequencing results were compared with sequences in the NCBI nucleotide database.

3. Results

In this study, we first confirmed the validity of the FTA® DNA extraction method, and then investigated the fungal diversity of *miso* by the PCR-based method using the fungal genomic DNA template prepared by the FTA® DNA extraction method.

3.1. Comparison of the FTA® DNA extraction method with the conventional method

To confirm the validity of the FTA® DNA extraction method, we compared the TTGE profiles of the ITS2 region (from four *miso* samples) amplified from genomic DNA extracted by the FTA® method with those extracted

by the conventional method. The selected *miso* samples represented the typical types: white-colored and sweet-tasting type rice *koji miso*, brown-colored and salty-tasting type rice *koji miso*, soybean *koji miso*, and barley *koji miso*. To amplify the ITS2 region, the universal fungus-specific primers ITS3 and ITS4 were used. The GC clamp was added to the 5' end of these primer sequences. We compared the result of PCR amplification using ITS3GC and ITS4 with that of ITS3 and ITS4GC. ITS3GC and ITS4 amplified PCR products with better intensity than did ITS3 and ITS4GC (data not shown). We subsequently chose ITS3GC and ITS4 for further experiments. Fig.1 shows a TTGE gel image, in which Fig. 1A displays results with the reference strains (see next paragraph) and Fig.1B displays results of the conventional extraction. The *miso* genomic DNA prepared by the FTA® DNA extraction method was subjected to PCR amplification of the ITS2 region of rDNA

and separated by TTGE (Fig. 1C). Comparison with the results of conventional extraction (Fig. 1B) revealed nearly identical numbers and mobility of bands, indicative of similar sensitivities. It was noted that in the TTGE profiles of *miso* by the FTA® DNA extraction method, some bands were fainter and others were thicker, relative to the profile from conventional DNA extraction.

3.2. Fungal diversity of 18 kinds of *miso*

To determine the standard mobility of the reference strains of *miso* microorganisms, the ITS2 region of pure cultures of *miso* microorganisms was separated by TTGE. To investigate the fungal diversity of 18 kinds of *miso*, the ITS2 sequences amplified from the *miso* DNA templates prepared by the FTA® DNA extraction method were separated by TTGE. The results are shown in Fig. 2. The TTGE profiles of ITS2 PCR fragments amplified from

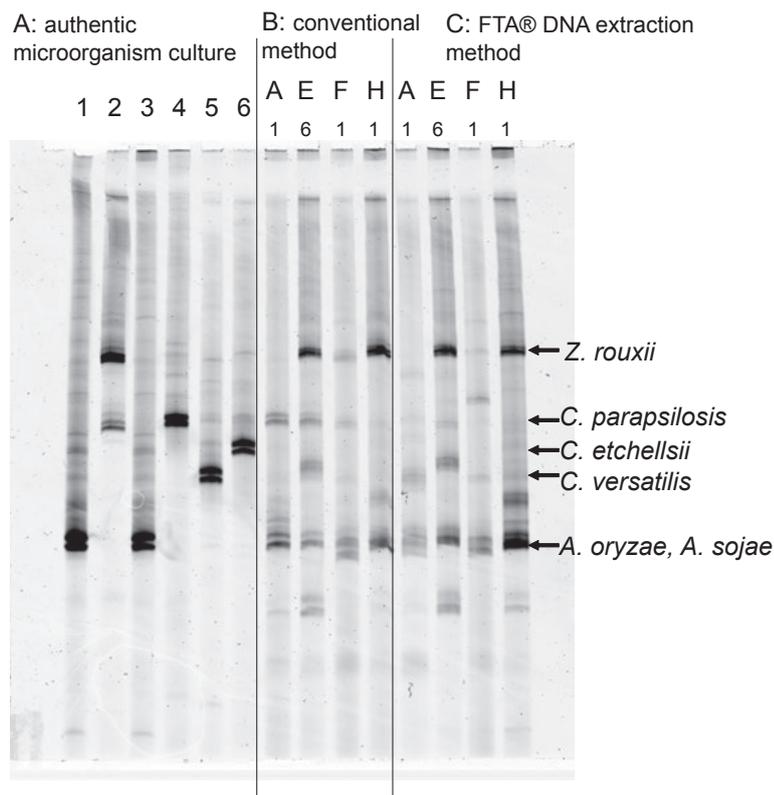


Fig. 1 Temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) profiles.

(A) TTGE profiles of the six *miso* fungal reference strains used in this study. ITS2 sequences were separated by TTGE. Lane 1: *Aspergillus oryzae*; lane 2: *Zygosaccharomyces rouxii*; lane 3: *Aspergillus sojae*; lane 4: *Candida parapsilosis*; lane 5: *Candida versatilis*; lane 6: *Candida etchellsii*. (B) TTGE profiles of the ITS2 region resulting from amplification of DNA extracted from four kinds of *miso* by the conventional method. Lane A1: white-colored and sweet-tasting type rice *koji miso*; lane E6: brown-colored and salty-tasting type rice *koji miso*; lane F1: soybean *koji miso*; lane H1: barley *koji miso*. (C) TTGE profiles of the ITS2 region resulting from amplification of DNA extracted from four kinds of *miso* by the FTA® DNA extraction method. Lane A1: white-colored and sweet-tasting type rice *koji miso*; lane E6: brown-colored and salty-tasting type rice *koji miso*; lane F1: soybean *koji miso*; lane H1: barley *koji miso*.

the reference strains of *miso* microorganisms are shown in Fig. 1A. The major bands of each *miso* sample showed mobility identical to that of the reference strains; bands 1, 4, 5, and 7 displayed mobility identical to that of *Z. rouxii*, *C. parapsilosis*, *C. versatilis*, and both *A. oryzae* and *A. sojae*, respectively.

To determine the species of the bands of *miso* that were not identical to any reference strain, we excised the material containing the particular DNA fragment from the gel and determined the sequence of the DNA fragment contained in the band. Only the DNA sequence of band 8 was determined, because the ethidium bromide staining of bands 2, 3, and 6 was too faint to distinguish flanking bands from each other. We therefore could not separately excise these bands upon ultraviolet illumination. The DNA fragments of the excised band 8 and the smear containing bands 2 or 6 were re-amplified by PCR and cloned into the pCR-Blunt vector. We failed to amplify the DNA fragment

in band 3. The sequences of the cloned DNA fragments were determined and compared with sequences in the NCBI DNA database. The sequence of band 8 was 100% identity to *Clavispora lusitaniae*. The DNA sequences from the faint smear containing bands 2 or 6 contained several clones of DNA fragments. Band 2 contained a DNA fragment that was 99% identical to *Z. pseudorouxii*. Band 6 contained several DNA fragments that showed low identity to uncultured mycorrhizal fungi. Band 6 was detected mainly in the *miso* of categories C and D. Band 8 was detected mainly in brown-colored *miso* (E category). The TTGE profiles of A-type and F-type *miso* displayed a few faint bands of yeast and *Aspergillus*, that of H-type *miso* displayed intense bands of *Z. rouxii* and *Aspergillus* and faint band 6, and that of I-type *miso* indicated that bands 4 and 5 were appropriately included in the profile of H-type *miso*.

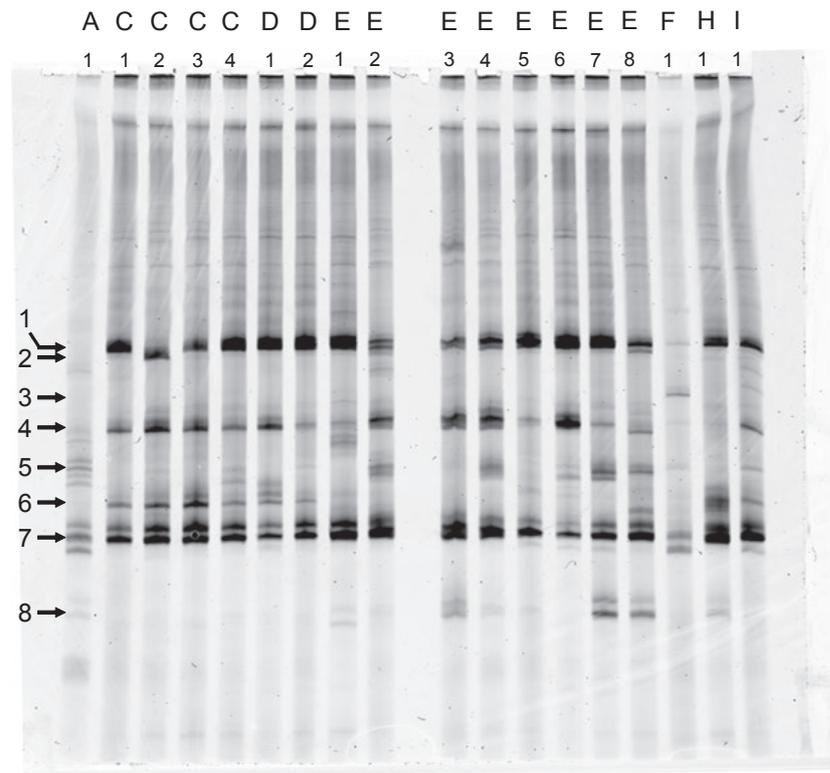


Fig. 2 Temporal temperature gradient electrophoresis (TTGE) profiles of the ITS2 region representing the fungal community present in 18 kinds of miso.

A: white-colored and sweet-tasting type rice *koji miso*; C: ocher-colored and salty-tasting type rice *koji miso*; D: red ocher-colored, salty-tasting type rice *koji miso*; E: brown-colored and salty-tasting type rice *koji miso*; F: soybean *koji miso*; H: barley *koji miso*; I: blend of rice and barley *koji miso*.

4. Discussion

Traditional Japanese fermented foods characteristically use *koji*, grain particles that are fermented by *koji* mold and used as an enzyme source. Fungi are the key microorganisms in traditional Japanese fermented foods and study of the fungal diversity in fermented Japanese foods is important.

We developed an easy and quick method to extract fungal DNA from *miso*. Generally, DNA extraction from food samples is laborious and time consuming. Our novel method does not require any organic solvent, protein denaturant, or specialized equipment. This facilitates quality control by DNA analysis in the food-producing industry. In this study, we compared the FTA® DNA extraction method with the conventional method and showed that both methods display almost equal sensitivity with respect to the number of DNA bands separated. Furthermore, we tried another two commercial DNA extraction kits that are widely used in the research of soil microorganism communities. One method is based on beads beading, and the other method uses benzyl chloride. The DNA extraction results from using these kits were low yielding and of poor quality (data not shown). Generally, in the TTGE or DGGE methods, biases resulting from the method of DNA extraction and PCR amplification cannot be completely ruled out. The simplicity and sensitivity of the method are inconsistent. In this study, we could detect DNA bands with mobility identical to that of the relevant reference strain, indicating that our method is valid as well as sufficient for the rapid analysis of multiple samples of *miso*. However, we must note that TTGE profiles of *miso* DNA extracted by the FTA® card method produced some bands that were fainter or thicker than the corresponding bands obtained by the conventional method. The significance of these dichotomies is not presently known.

The TTGE profile of each *miso* sample reasonably reflected the fermentation procedure used in its manufacture. Band 6 was detected mainly in the *miso* aged for only a short time (in most cases, the aging process lasts less than a few months) and in the C and D types. In contrast, band 8 was detected mainly in E-type *miso* that was older (typically aged for more than four months). The *miso* products of types C, D, and E are made from similar source materials

and using essentially the same procedure, except for the duration of aging. We have no explanation for the impact of differences in fungal diversity between C, D types of *miso* and E type *miso* in terms of their quality, taste, and flavor. The A type has a very short period of aging (less than two weeks). The aging of A-type *miso* is different from the other long-aged types of *miso*, being aged mainly by enzymes already secreted in *koji* by *koji* mold and not fermented by living microorganisms. To prevent fermentation, the aging of A-type *miso* is carried out at a high temperature (35–50°C). The TTGE profile of the lesser yeast bands, which displayed only a few faint bands of A type, is therefore reasonable. F-type *miso* is produced mainly by anaerobic fermentation by the lactic acid bacteria and fungi growing on the surface of the *miso*. As expected, the TTGE profile of F-type *miso* exhibited a few faint bands of yeast. The TTGE profile of H-type *miso* exhibited intense bands of *Z. rouxii* and *Aspergillus*, and faint band 6. Unlike the C and D types of rice *koji miso*, the H type is made using barley *koji*; however, the aging period is the same as the C and D types. The fungal band 6 is likely characteristic of the short-aged type of *miso*. The TTGE profile of I-type *miso* indicated a similar profile, with the exception of the existence of bands 4 and 5 in the profile of the H type. These latter bands were detected in rice *koji miso* of the C, D, and E types. This result is reasonable, given that the I type is manufactured using a blend of rice and barley *koji miso*. Generally, after aging, *miso* is mashed into smooth paste and then packed. Some consumers prefer intact type of *miso* that contains granules of source crops to mashed type *miso*. The C and E types used in this study contain mashed and intact types. There were no significant differences between mashed and intact types in the results shown in this study.

Conventional studies concerning *miso* microorganisms have demonstrated the presence of *Z. rouxii*, *C. versatilis*, and *C. etchellsii* in the final products, and the frequent contamination of low-quality *miso* products by *Pichia membranaefaciens* and *Hansenula anomala*.¹⁰⁾ RFLP analysis of *miso* revealed *Z. rouxii* to be the dominant species in the final product in the case in which a starter culture of *Z. rouxii* was added, whereas *P. guilliermondii*, *P. triangularis*, and *P. farinosa* were the dominant species in *miso* formed without a starter culture¹¹⁾. These authors mentioned that *miso* fermented without a *Z. rouxii* starter culture contained a lower level of 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-

5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone (generally known as HEMF) than those with the starter culture. The record of the manufacturers showed that all 18 kinds of *miso* investigated in this study included a starter culture of *Z. rouxii*. This explains why we could not detect the *Pichia* species. The fungi that were detected in this study have not been reported by conventional studies on *miso* using dilution spread plating. In E-type *miso*, *C. lusitanae* (band 8) was observed.

We expect our novel DNA extraction method to be a useful and efficient quality control tool in the food industry.

Acknowledgements

This work was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan (Bio Design Project), and from the Research and Development Program for New Bio-industry Initiative. We also appreciate to Ms. Momma (JIRCAS) for her great contribution in TTGE analysis.

References

- 1) Suzuki, S., Taketani, H., Kusumoto, K.I., Kashiwagi, Y. (2006). High-throughput genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 572-574.
- 2) Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods*, **56**, 297-314.
- 3) Felske, A., Engelen, B., Nübel, U., Backhaus, H. (1996). Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4162-4167.
- 4) Hosoi, T. (2007). Microorganism community analysis of fermented food by PCR-DGGE and determination of DNA sequence. *Miso Science and Technology*. **55**, 265-270. (in Japanese)
- 5) Taiyouji, M., Ando, A., Shima, J. (2006). Analysis of microbial community in soy-bean koji using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Report of National Food Research Institute* **70**, 23-28. (in Japanese)
- 6) Kim, T. W., Lee, J. H., Kim, S. E., Park, M. H., Chang, H. C., Kim, H. Y. (2009). Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food. Microbiol.* **131**, 265-271. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.001. Epub 2009 Mar 10.
- 7) Gao, X., Liu, H., Yi, X., Liu, Y., Wang, X., Xu, W., Tong, Q., Cui, Z. (2013). Microbial floral dynamics of Chinese traditional soybean paste (doujiang) and commercial soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1717-1725.
- 8) White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322.
- 9) Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233-3241.
- 10) Yamamoto, Y. (2004). Microorganisms in miso. *Miso Science and Technology* **52**, 422-437. (in Japanese)
- 11) Sujaya, I.N., Tamura, Y., Tanaka, T., Yamaki, T., Ikeda, T., Kikushima, N., Yata, H., Yokota, A., Asano, K., Tomita, F. (2003). Development of internal transcribed spacer regions amplification restriction fragment length polymorphism method and its application in monitoring the population of *Zygosaccharomyces rouxii* M2 in miso fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 438-447.

報 文

Effect of sorghum flour on glutathione-rice breadHiroyuki Yano*[§] and Akiko Fukui*

*National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
Kannondai 2-1-12, Tsukuba, Ibaraki 305-8642 Japan

Abstract

Owing to accumulating evidence of the high prevalence of celiac disease and wheat allergy, the development of high-quality gluten-free foods has become an urgent issue in the food industry. We previously reported that glutathione, a natural tripeptide, improves the gas-retaining capacity of gluten-free rice batter. In addition, sensory evaluation revealed that it is better to use “oxidized” glutathione in view of the bread smell. However, several problems remain to be solved before the practical application of glutathione in batter can be achieved. First, salt, a key flavor of bread, hinders the swelling of glutathione-supplemented batter. Second, although purified glutathione may be used as a food additive in the USA and some Asian countries, its use is not permitted in several other countries. In this paper, we sought to overcome these problems. Microstructure analysis revealed that sorghum flour in the batter resulted in thickened breadcrumb walls. Moreover, the swelling of the batter was not reduced by salt. Furthermore, a yeast extract containing a high content of glutathione worked effectively as a substitute for purified glutathione. Thus, the essential ingredients of the bread—rice/sorghum flour, water, yeast extract, dried yeast, and sugar—were all foodstuffs. In conclusion, a basic practical formulation for a glutathione-rice bread has been developed in this study.

Abbreviations: GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; HPMC, hydroxypropyl methylcellulose

Key words: Bread; Glutathione; Gluten-free; Rice bread; Sorghum

Introduction

The wide prevalence of celiac disease (Mooney and others 2014) and wheat allergy (Mansueto and others 2014) has increased the demand for gluten-free foods (Lamacchia and others 2014). Several approaches have been used to develop gluten-free rice-based breads, as rice flour is naturally gluten-free and has a simple and bland taste. The gluten-free rice breads use synthetic thickeners (Demirkesen

and others 2010), transglutaminase (Renzetti and others 2008), and proteases (Renzetti and Arendt 2009; Hamada and others 2013; Kawamura-Konishi and others 2013). In general, rice bread has a palatable chewy texture. However, the quality of these breads has been insufficient to satisfy customers' needs, and thus further research is needed to develop high-quality gluten-free breads.

Recently, we found that glutathione, a naturally occurring tripeptide, improved the gas-holding capacity of

[§] Corresponding author: Tel: +81-298388051; Fax: +81-298387996; E-mail: hyano@affrc.go.jp

gluten-free rice batter in the yeast leavening process (Yano 2010). The swelling rate was 2.4 times that of the control bread (without glutathione), and the specific volume was 3.0 cm³/g. In addition, the use of oxidized glutathione (GSSG) improved the smell of the bread (Yano 2012). However, from the viewpoint of practical applications, this bread prototype required improvement in several areas. First, salt reduced the ability of the batter to swell and rise during fermentation. As saltiness is one of the key flavors of breads (Noort and others 2010), this issue seemed a critical one to be solved. Second, whereas purified glutathione can be used as a food additive in the USA and several Asian countries, its use is not permitted in Europe or Japan. Therefore, the substitution of a yeast extract for the purified glutathione is a critical step before the bread can be used widely. However, although purified glutathione is effective in improving the specific volume of the bread, the use of a yeast extract with high glutathione content has not been successful, presumably as a result of the salt content of the yeast extract.

In this study, in order to enhance the practical utility of gluten-free breads, we sought to overcome these associated problems. In addition, although semisynthetic chemicals such as hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) (Barcenas and Rosell 2005) or guar gum (Ribotta and others 2004) are effective for allowing the gluten-free batter to rise during fermentation, some consumers prefer to avoid such non-natural materials in foods (Devcich and others 2007; Varela and Fiszman 2013). We therefore sought to develop a gluten-free bread made without using any non-natural additives.

The swelling mechanism of glutathione-rice bread appears to be different from that of wheat bread (Yano and others 2013). In the case of glutathione-rice bread, the batter is liquid and it becomes meringue-like in fermentation. Thus, the walls of the bubbles in the rising batter should be more fragile than those in wheat dough. It has been reported that a mixture of cereal flours improves the quality of gluten-free bread (Sciarini and others 2010). Moreover, among cereal flours, sorghum flour is frequently used for gluten-free foods such as bread (Schober and others 2007; Onyango and others 2011). Thus, in this study, we investigated the effects of sorghum flour on the properties of gluten-free bread, such as the rising of the batter during fermentation in the presence of salt and the fineness of the

breadcrumbs. The replacement of purified glutathione with yeast extract was also studied.

Materials and Methods

Materials

Rice flour (10.7% moisture, 0.3% ash, 6.2% protein, 0.9% lipid, and 81.9% starch) was obtained from Namisato, Co., Ltd. (Tochigi, Japan). Sorghum flour (12.4% moisture, 0.6% ash, 9.6% protein, 1.5% lipid, and 73.6% starch) was purchased from Nakano Sangyo, Co., Ltd. (Kagawa, Japan). Dried yeast (Nisshin Super Camellia) was obtained from Nisshin-foods Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Purified glutathione was a product of Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). The GSSG-containing (18%, w/w) yeast extract, YH-D18, was a gift from Kohjin Life Sciences Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Bread making

Breads were baked in a SPM-KP1 commercial bread maker (Sanyo Electric, Osaka, Japan) as described in a previous paper (Yano 2010) with some modifications. In summary, 160 g of a rice/sorghum flour mixture, 140 g of distilled water, and 0 to 5 g of glutathione were mixed by kneading paddles for 20 min in a bread bin of the bread maker. The batter was left overnight at room temperature. Then, 15 g of sugar and 2.5 g of baker's yeast (Nisshin Flour Milling Inc., Tokyo, Japan) were added and the batter was mixed for 20 min. Then, 200 g of the batter was transferred to a square pan case with an 800 mL capacity. Subsequent fermentation (40°C for 60 min) and baking (180°C for 24 min) were done using an EMO-C16C electric oven (Sanyo Electric, Osaka, Japan) by following the supplier's recommendations.

Specific volume

The loaves were measured 3 h or later after baking. The volume, weight, and specific volume were determined using a laser volume measurement unit (Selnac-WinVM2100A; ASTEX, Tokyo, Japan) according to the instruction manual.

Microstructure analysis of rice bread

Microscopic observation of the breadcrumbs was conducted as described previously (Yano 2010). Samples were taken from the center of the bread and placed on a cryo-specimen holder (JEOL, Tokyo, Japan). They were then cryo-fixed in slush nitrogen and transferred to the

cryo unit in a frozen state, where they were fractured and sublimed. The morphologies of the bread samples were observed with a scanning electron microscope (SEM; JSM-5310LV Low Vacuum SEM; JEOL) at 20 kV. The magnification used was $\times 100$.

Sensory evaluation

Sensory evaluation of the bread was conducted in a sensory panel room by an analytical panel consisting of 12 assessors. Bread that contained the yeast extract YH-D18 and bread that did not (control) were subjected to paired comparison tests. First, each panel member compared the breads in terms of the appearance of the crumb structure (coarse/fine), and scored the fineness of the YH-D18-containing bread relative to that of the control bread on a 7-point scale: +3, much finer; +2, finer; +1, slightly finer; 0, neither; -1, slightly coarser; -2, coarser; -3, much coarser. Then, the panel masticated the breads and evaluated the texture of the YH-D18-containing bread relative to that of

the control on a 7-point scale: +3, much better; +2, better; +1, slightly better; 0, neither; -1, slightly worse; -2, worse; -3, much worse.

Results and Discussion

Effect of sorghum flour on the glutathione bread

First, we investigated the effect of sorghum flour on the glutathione-rice batter in terms of the swelling of the bread. The total amount of the flour was 160 g with various rice/sorghum flour ratios. The amount of GSSG and distilled water was 0.5 g and 140 g, respectively. Figure 1 shows the specific volume and a cross-section of the breads. The specific volume was the highest ($3.79 \pm 0.11 \text{ cm}^3/\text{g}$) and the crumbs appeared finest when the rice/sorghum ratio was around 130/30. Raising the portion of sorghum flour further did not improve the specific volume or crumb appearance (data not shown).

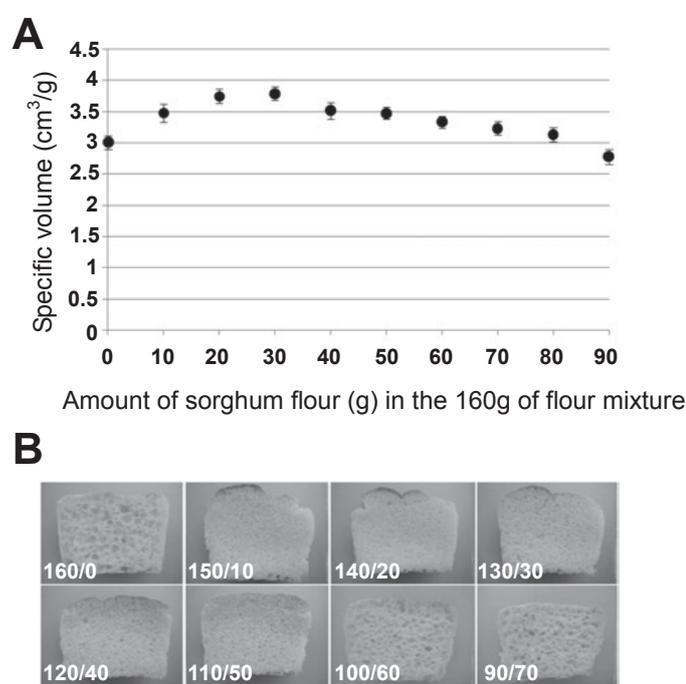


Fig. 1 Effect of adding sorghum flour to glutathione bread

A, The specific volume of breads plotted against the amount of sorghum flour. *B*, Cross-sections of some of the breads. The total amounts of sorghum/rice flour, distilled water, oxidized glutathione, dried yeast, and sugar were 160, 140, 0.5, 2.5, and 15 g, respectively. The standard fermentation and baking conditions were 40°C for 60 min and 180°C for 24 min, respectively. Each data point represents the mean \pm SD of three independent experiments.

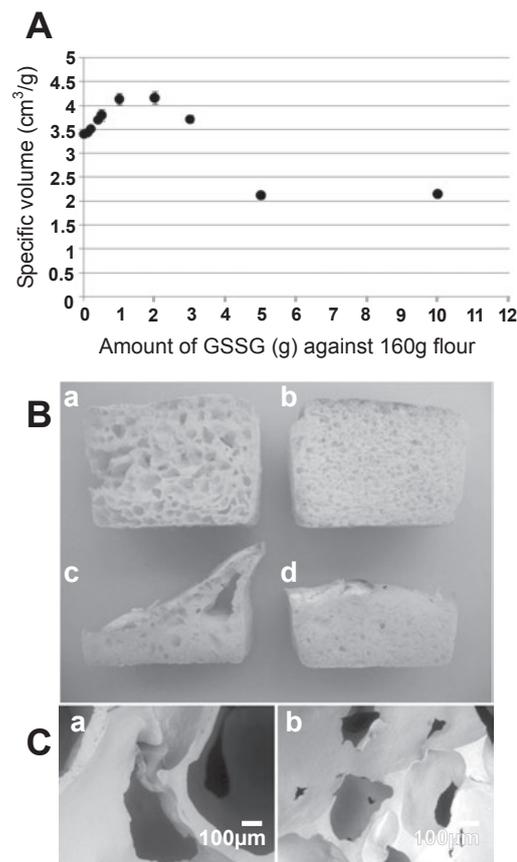


Fig. 2 Effect of oxidized glutathione on the sorghum/rice bread

A, The specific volume of breads plotted against the amount of oxidized glutathione (GSSG) added. Each data point represents the mean \pm SD of three independent experiments. *B*, Cross-sections of some of the breads. The amounts of GSSG were 0, 2, 5, and 10 g for *a*, *b*, *c*, and *d*, respectively. *C*, Low-vacuum scanning microscopic analysis of the control (*a*) and GSSG-added breads (*b*). The amounts of sorghum flour, rice flour, distilled water, dried yeast, and sugar were 30, 130, 140, 2.5, and 15 g, respectively. The standard fermentation and baking conditions were 40°C for 60 min and 180°C for 24 min, respectively.

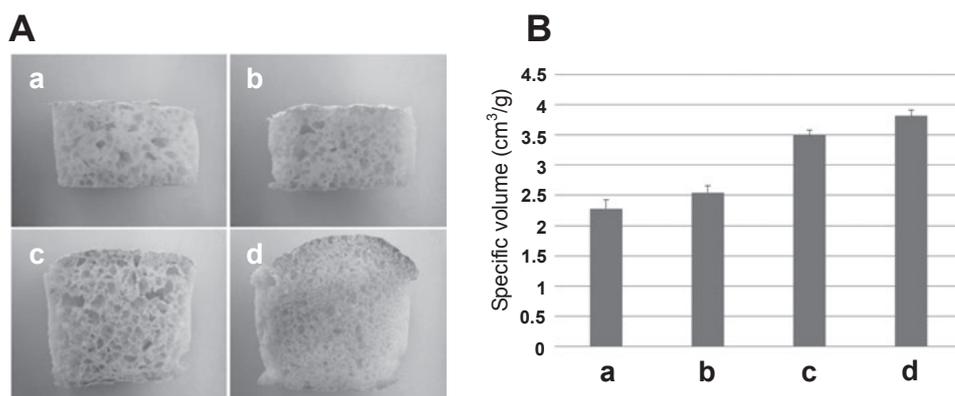


Fig. 3 Effect of sorghum flour on the salt tolerance of the rice bread containing glutathione

A, Cross-sections of the relevant rice breads. *a*, Rice bread; *b*, Oxidized glutathione (GSSG)-containing rice bread; *c*, Sorghum/rice bread; *d*, GSSG-containing sorghum/rice bread. *B*, The specific volume of each bread. Each data point represents the mean \pm SD of three independent experiments. The amount of GSSG for *b* and *d* was 1 g. The amount of rice flour was 160 g for *a* and *b*. The amounts of sorghum flour and rice flour were 30 and 130 g, respectively, for *c* and *d*. The amounts of salt, distilled water, dried yeast, and sugar were 2.4, 140, 2.5, and 7.5 g, respectively, for *a* to *d*. The standard fermentation and baking conditions were 40°C for 60 min and 180°C for 24 min, respectively.

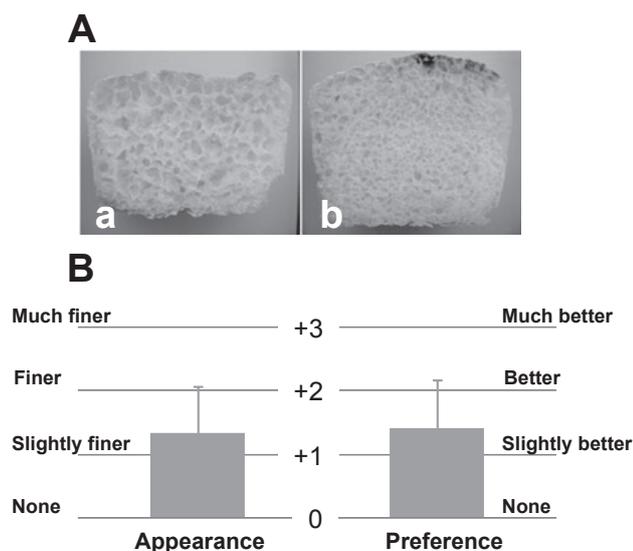


Fig. 4 Effects of a yeast extract with a high content of oxidized glutathione on the sorghum/rice bread

A, Cross-sections of the control (*a*) and yeast extract-containing (*b*) sorghum/rice breads. *B*, Sensory test of the breads with respect to crumb appearance (*left*) and preference (*right*). The results of the sensory tests (i.e., the difference in the crumb fineness and preference of the bread containing YH-D18 compared with the control bread) are shown. The ingredients of the breads were sorghum flour (30 g), rice flour (130 g), water (140 g), sugar (15 g), dried yeast (2.5 g), and butter (2 g). Two grams of the yeast extract YH-D18 had been added to the batter in panel *b* only. The standard fermentation and baking conditions were 40°C for 90 min and 180°C for 24 min, respectively.

Effect of oxidized glutathione on the sorghum/rice bread

Next, we investigated the effects of GSSG on the sorghum/rice batter in terms of the specific volume and crumb coarseness/fineness of the bread. The amount of rice/sorghum flour was 130 g/30 g, as this ratio provided the highest specific volume in the previous experiment (Fig. 1). Figure 2A shows the specific volume of breads plotted against the concentration of glutathione. Interestingly, the specific volume was relatively high ($3.40 \pm 0.04 \text{ cm}^3/\text{g}$) even in the absence of GSSG. The maximum specific volume, around $4.1 \text{ cm}^3/\text{g}$, was obtained with addition of 1 to 2 g of GSSG against 160 g of the flour mixture. When the amount of GSSG was 3 g or higher, the specific volume decreased. Figure 2B shows a cross-section of the rice/sorghum bread with and without GSSG. The crumbs appeared coarse in the absence of GSSG but became finer in its presence. The low-vacuum scanning microscopic analysis (Fig. 2C) of the control (*a*) and GSSG-added (*b*) breads suggested that the bubble wall was thicker in the absence of GSSG and thinner in its presence. Thus, it was speculated that the combined use of sorghum/rice flour strengthens the framework of the bubbles by thickening

their walls.

The enhancing effect of the use of mixed flours on the volume of gluten-free bread has already been reported (Sanchez and others 2002; Sciarini and others 2010). The mixture of sorghum/rice flour should have a similar effect. On the other hand, glutathione seems to enhance the fineness of the crumb structure. Although the swelling mechanism of the glutathione bread has not yet been elucidated, we hypothesize that glutathione affects the structure of the batter proteins by reducing the protein disulfide bonds (Yano and others 2013). Hamaker and Griffin (1993) have proposed that an endosperm matrix protein, or possibly a specific starch-granule-associated protein, exerts influence on the gelatinization behavior of rice starch granules. In short, the barrier theory postulates that disulfide-bound protein polymers in or surrounding the native starch granule affect the viscoelastic properties of the cooked grain and flour. When the protein disulfide bonds are disrupted, rice starch granules swell to a larger size, thereby increasing the paste viscosity. Therefore, as we discussed earlier, the addition of glutathione may cleave the disulfide bonds of the barrier protein, thereby increasing the batter viscosity as well as the gas-holding capacity in fermentation

(Yano 2010). Meanwhile, in their report on protease-treated rice batter, Hamada and others (2013) considered that a partially denatured protein, possibly glutelin, may work as a linker to join starch granules. These aggregates of starch granules, which have a lot of space within them, have a lower specific gravity and result in slower sedimentation. Hamada and others (2013) concluded that the aggregates may have caused a change in the batter rheology, particularly its viscosity and sedimentation behavior. Our own ongoing studies, as well as those of other researchers, will reveal the relations between the barrier protein and starch granule, as well as the swelling mechanism of the gluten-free bread.

Effect of sorghum on the salt tolerance of glutathione-rice bread

One of the major challenges in developing glutathione-rice bread is that salt reduces the swelling of the batter in fermentation (Yano 2010). This is an important problem to overcome, since the taste of salt is a key factor in the preference of bread (Miller and Hosney 2008). We therefore investigated whether the addition of sorghum flour to the glutathione-rice batter would enable the batter to rise during fermentation, even in the presence of salt. Figure 3A shows a cross-section of the relevant rice breads that contained 2.4 g of salt in 160 g of sorghum/rice flour. Figure 3B shows the specific volume of each type of bread. Without sorghum flour, the specific volumes of the rice bread were $2.28 \pm 0.15 \text{ cm}^3/\text{g}$ and $2.54 \pm 0.12 \text{ cm}^3/\text{g}$ in the absence (a) or presence (b) of GSSG, respectively. On the other hand, addition of sorghum flour improved the swelling of the batter during fermentation, increasing the specific volume of the breads to $3.49 \pm 0.09 \text{ cm}^3/\text{g}$ and $3.82 \pm 0.09 \text{ cm}^3/\text{g}$ in the absence (c) or presence (d) of GSSG, respectively. The crumbs appeared finer in the presence of GSSG (compare Fig. 3A c and d), even in the presence of salt. Conclusively, the addition of sorghum flour to the glutathione-rice batter was effective in making the bread swell and the crumb structure finer, even in the presence of salt.

Substitution of a yeast extract with high GSSG content for purified GSSG

Next, we investigated whether purified GSSG could be replaced with a yeast extract with a high concentration of GSSG. Although purified glutathione can be used as a food

additive in the USA and several Asian countries, it cannot be used as a food material in Europe and Japan. Glutathione is produced on an industrial scale by yeast fermentation (Li and others 2004). Although the commonly used yeast extracts contain only a negligible amount of reduced glutathione (GSH) or GSSG, specific yeast extracts with a high content of GSH or GSSG glutathione are commercially available. In many countries, it is permissible to use such yeast extracts as an ingredient in foods. In the following experiment, we used the yeast extract YH-D18, which contains approx. 18% (w/w) of GSSG.

Figure 4A shows cross-sections of sorghum/rice breads with a rice/sorghum ratio of 130/30. No GSSG had been added to the bread in panel *a* (control), whereas 2 g of yeast extract YH-D18 had been added to the bread in panel *b*. Rice batter with YH-D18 did not swell in the absence of sorghum flour (data not shown). The specific volume of the control and the YH-D18-containing bread was $3.34 \pm 0.08 \text{ cm}^3/\text{g}$ and $3.74 \pm 0.09 \text{ cm}^3/\text{g}$, respectively. The results were consistent with the observed effects of purified GSSG addition, which also increased the specific volume of sorghum/rice bread (Fig. 2A). It also appeared that the addition of the yeast extract made the breadcrumbs finer, as shown by the addition of purified GSSG (Fig. 2B).

Next, the breads were subjected to a comparative sensory test by a panel of 12 trained tasters employed at the Japan Food Research Laboratories (Tokyo, Japan), a foundation that offers analytical services on food products. Figure 4B shows the difference in the crumb fineness/coarseness between the bread containing YH-D18 and the control bread without YH-D18 as judged by the panel, with the results being scored on a 7-point scale (-3 to +3). The crumbs of the bread containing YH-D18 were recognized as being finer than those of the control bread. The difference was 1.33 ± 0.75 ($p < 0.01$) between “finer” and “slightly finer.” Moreover, when masticated, the bread containing YH-D18 was judged as being preferable (1.42 ± 0.76 ; $p < 0.01$) to the control bread; that is, between “better” and “slightly better.” The sensory tests thus conclusively demonstrated a clear effect of YH-D18 addition on the fineness of the breadcrumbs. It was speculated that this difference was attributable to the GSSG contained in the yeast extract YH-D18, since the results were consistent with those obtained using purified GSSG, as shown in Figures 2 and 3. Thus, a yeast extract with a high content of GSSG

or GSH may be useful for modifying the disulfide structure of food proteins. As disulfide bonds play critical roles in food chemistry (Yano 2014), this finding may expand the use of yeast extract in the food industry. Meanwhile, as the yeast extract contains other components, such as proteins, amino acids, lipids, and carbohydrates, some of these components might have exerted a secondary action on the swelling during fermentation or on the crumb fineness. Therefore, further studies will be needed to confirm a causal relationship between the GSSG in YH-D18 and the improvement of the bread quality.

Collectively, the studies performed in this and previous reports have completed the basic formulation for a glutathione-based gluten-free bread. This bread can be made using foodstuffs only; that is, rice flour, sorghum flour, yeast extract with a high content of glutathione, salt, dry yeast, sugar, and water. No specific apparatus is required other than a commercially available home bakery and electric oven. Semisynthetic chemicals such as HPMC or guar gum are not needed. Collaborative studies with bread makers to improve the quality of the bread and thus enhance its practical applicability as a food are ongoing in our laboratory. Hamaker and others (1987) reported that although cooked sorghum protein is less digestible than other cooked cereal proteins, cooking sorghum in the presence of reducing agents such as 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, sodium bisulfite, and l-cysteine increased the protein digestibility to a level comparable with other cereals. Thus, studies on the effect of glutathione on the nutritional value of the bread should also be conducted. Finally, it will be necessary to verify whether the bread has reduced malignancy in celiac and wheat allergy patients.

Conclusions

Addition of sorghum flour improves the swelling of glutathione-rice batter during fermentation. Bread making with the improved batter is possible even in the presence of salt. The basic ingredients are all foodstuffs, and no food additives or synthetic bread enhancers such as HPMC or guar gum are needed. The bread can be made with or without salt, so it can be a suitable food for renal patients or individuals with high blood pressure. Although the bread is at present just palatable, we are currently working with bread makers to improve the quality of the bread.

Additionally, the elucidation of the swelling mechanism, which is also ongoing in our laboratory, will help to expand the use of glutathione in the food industry.

Acknowledgments

We thank Professor Bob B. Buchanan, University of California, for his helpful discussions and encouragement. The low-vacuum SEM analyses and the sensory tests were carried out with the help of JEOL, Ltd. (Tokyo, Japan) and the Japan Food Research Laboratories (Tokyo, Japan), respectively. Yeast extract YH-D18 was gifted by Kohjin Life Sciences Co., Ltd. (Tokyo, Japan). This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (25450193 to H. Y.).

References

- Barcenas ME, Rosell CM. 2005. Effect of HPMC addition on the microstructure, quality and aging of wheat bread. *Food Hydrocolloids* 19:1037-43.
- Demirkesen I, Mert B, Sumnu G, Sahin S. 2010. Rheological properties of gluten-free bread formulations. *J Food Engineering* 96:295-303.
- Devcich DA, Pedersen IK, Petrie KJ. 2007. You eat what you are: modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite* 48:333-7.
- Hamada S, Suzuki K, Aoki N, Suzuki Y. 2013. Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*. *J Cereal Sci* 57:91-7.
- Hamaker BR, Griffin VK. 1993. Effect of disulfide bond-containing protein on rice starch gelatinization and pasting. *Cereal Chem* 70:377-80.
- Hamaker BR, Kirleis AW, Butler LG, Axtell JD, Mertz ET. 1987. Improving the *in vitro* protein digestibility of sorghum with reducing agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:626-8.
- Kawamura-Konishi Y, Shoda K, Koga H, Honda Y. 2013. Improvement in gluten-free rice bread quality by protease treatment. *J Cereal Sci* 58:45-50.
- Lamacchia C, Camarca A, Picascia S, Di Luccia A, Gianfrani C. 2014. Cereal-based gluten-free food: how to reconcile nutritional and technological properties of wheat proteins with safety for celiac disease patients.

- Nutrients 6:575-90.
- Li Y, Wei G, Chen J. 2004. Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* 66:233-42.
- Mansueto P, Seidita A, D'Alcamo A, Carroccio A. 2014. Non-celiac gluten sensitivity: literature review. *J American College Nutr* 33:39-54.
- Miller RA, Hoseney RC, 2008. Role of salt in baking. *Cereal Foods World* 53:4-6.
- Mooney PD, Hadjivassiliou M, Sanders DS. 2014. Coeliac disease. *British Medical J* in press. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.g1561>
- Noort MWJ, Bult JHF, Stieger M, Hamer RJ. 2010. Saltiness enhancement in bread by inhomogeneous spatial distribution of sodium chloride. *J Cereal Sci* 52:378-86.
- Onyango C, Mutungi C, Unbehend G, Lindhauer MG. 2011. Modification of gluten-free sorghum batter and bread using maize, potato, cassava or rice starch. *LWT - Food Sci Technol* 44:681-6.
- Renzetti S, Arendt EK. 2009. Effect of protease treatment on the baking quality of brawn rice bread: from textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. *J Cereal Sci* 50:22-8.
- Renzetti S, Dal Bello F, Arendt EK. 2008. Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *J Cereal Sci* 48:33-45.
- Ribotta PD, Perez GT, Leon AE, Anon MC. 2004. Effect of emulsifier and guar gum on micro structural, rheological and baking performance of frozen bread dough. *Food Hydrocolloids* 18:305-13.
- Sanchez HD, Osella CA, de la Torre MA. 2002. Optimization of gluten-free bread prepared from corn starch, rice flour and cassava starch. *J Food Sci* 67:416-9.
- Sciarini LS, Ribotta PD, León AE, Pérez GT. 2010. Influence of gluten-free flours and their mixtures on batter properties and bread quality. *Food Bioprocess Technol* 3:577-85.
- Schober TJ, Bean SR, Boyle DL. 2007. Gluten-free sorghum bread improved by sourdough fermentation: biochemical, rheological, and microstructural background. *J Agr Food Chem* 55:5137-46.
- Varela P, Fiszman SM. 2013. Exploring consumers' knowledge and perceptions of hydrocolloids used as food additives and ingredients. *Food Hydrocolloids* 30:477-84.
- Yano H. 2010. Improvements in the bread-making quality of gluten-free rice batter by glutathione. *J Agri Food Chem* 58:7949-54.
- Yano H. 2012. Comparison of oxidized and reduced glutathione in the breadmaking qualities of rice batter. *J Food Sci* 77:C182-8.
- Yano H, Kaji N, Tokuriki M. 2013. Further studies on the protein chemistry and property of glutathione-added rice bread: Evidence of glutathionylation of batter protein as well as crumb structure/sensory evaluation. *Japan Agricultural Research Quarterly* 47:417-21.
- Yano H. 2014. Ongoing applicative studies of plant thioredoxins. *Mol Plant* 7:4-13.

グルタチオン米粉パンに対するソルガム粉の効果

矢野 裕之*§, 福井明子*

*独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

要旨

セリアック病や小麦アレルギーの蔓延を示す報告が累積されつつあることから、高品質のグルテンフリー食品の開発は食品工業における緊急課題の一つである。著者らは天然トリペプチドであるグルタチオンがグルテンフリー米粉生地的气体保持能を高めることを既に報告した。また、パンの香りの点から、酸化型グルタチオンを使用することが望ましいことを官能評価により明らかにした。しかしながら、グルタチオンを利用した生地を実用化するためには解決すべきいくつかの課題が残されている。まず、パンの味に重要な食塩の添加が、グルタチオンを配合した生地の膨らみを抑制することである。次に、米国やアジアのいくつかの国々で食品添加物として認められている精製グルタチオンが、他国では認められない場合があるということである。本報では、これらの課題の克服を試みた。グルタチオンを添加した米粉生地にソルガム粉を添加するとクラム膜が厚くなることが微細構造解析により示された。また、この生地では食塩を添加しても膨らみが低下しなかった。さらに、高濃度のグルタチオンを含む酵母エキスがこの生地では精製グルタチオンの代用として効果的に作用した。そこで、このパンに必須な原料は米粉/ソルガム粉、水、酵母エキス、ドライイースト、砂糖であり、すべて食品でつくることができる。結論として、グルタチオンパンの実用的な基本処方が本研究で開発された。

キーワード：グルタチオン、グルテンフリー、米粉パン、ソルガム

研究ノート

茨城県つくば市の屋外でトラップに捕獲された貯穀害虫の記録

古井聡*, 今村太郎, 宮ノ下明大

独立行政法人 農業・食品産業総合研究機構 食品総合研究所

キーワード：貯穀害虫, トラップ, 捕獲, 屋外, つくば市

Note of stored-product insect pests captured by outdoor traps in Tsukuba

Satoshi Furui*, Taro Imamura, Akihiro Miyanoshita

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan, 305-8642

Key words: stored-product insect pest, trap, capture, outdoor, Tsukuba

Abstract

The number of stored-product insects captured by traps at the outdoors was examined from mid-April to the end of October 2014 in Tsukuba. The total numbers of *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera; Pyralidae), *Lasioderma sericornis* (Fabricius) (Coleoptera; Anobiidae) and *Anthrenus verbasci* (Linnaeus) (Coleoptera; Dermestidae) captured by four traps were 68, 37 and 94, respectively. Although, two traps were placed, no *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera; Tenebrionidae) was captured.

和訳

つくば市の屋外において捕獲される貯穀害虫の発生状況と消長を明らかにするため、2014年の4月中旬から10月末にかけてトラップ調査を行った。その結果、ノシメマダラメイガ、タバコシバンムシ、ヒメマルカツオブシムシは4個のトラップで、68個体、37個体、94個体がそれぞれ捕獲された。コクヌストモドキについては2個のトラップを設置したが、全く捕獲できなかった。

緒言

消費者の「食の安心・安全」に対する関心は、人間の生存本能に直結する事項であるため、我が国だけでなく、諸外国においても極めて高い。農産物を含む“食品”に混入する異物としては、虫、毛、金属片、小石など

が挙げられるが、食品への異物混入事例の中で消費者からのクレームが最も多いのは虫である。

代表的な貯穀害虫としてチョウ目のノシメマダラメイガ *Plodia interpunctella* (Hübner) (メイガ科) やコウチュウ目のタバコシバンムシ *Lasioderma sericornis* (Fabricius) (シバンムシ科)、ヒメマルカツオブシムシ *Anthrenus verbasci* (Linnaeus) (カツオブシムシ科) が知

* 連絡先, 〒 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12 satfurui@affrc.go.jp

られており、食品の保管状況により屋内でも比較的容易に見つけることが出来る身近な存在である(図1)。ところが、身近な昆虫であったとしても、その生態については明らかにされていないことが多く、貯穀害虫も例外では無い。

主に屋外から飛来し、屋内において穀物を食害する害虫が屋外においてどのように活動を維持しているのか、不明な点が多い。例えば、コウチュウ目のコクゾウムシ *Sitophilus zeamais* Motschulsky (オサゾウムシ科) については冬期には石の下¹⁾、同目のコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* (Herbst) (ゴミムシダマシ科) は樹皮下で越冬していた等²⁾の断片的な存在報告はあるが、屋外における生活史は明らかとなっていない。これらが明らかになると、屋外から屋内に侵入する貯穀害虫について屋外での発生自体を抑える知見が得られ、管理に有用である。しかしながら、比較的情報が多いノシメマダラメイガでは、製粉工場や食品加工工場において屋内外の個体数を調べた報告はあるが^{3,4)}、大量の穀物が常在していない一般の建物周辺については、多くの貯穀害虫で屋外における周年変化を調べたデータが少ない状況にある。

屋内において昆虫が発生した場合、その昆虫は元々屋内に生息していたか、あるいは屋外から家屋内に侵入したかのいずれかである。しかし、穀物の保管施設、精米・精麦施設、穀物の販売所など、常に昆虫の食餌となる試料が存在している場所であれば定着していると考えられるが、一般の住宅や職場等においては穀物が常時近辺に存在していないにもかかわらず害虫が侵入し、穀物において繁殖、あるいは混入する事例が発生する。以前に、我々はマンション周辺における性フェロモントラップで捕獲されたノシメマダラメイガの個体数と分布について報告している⁵⁾。本事例によると、

マンション建物での捕獲数はその周辺よりも多かったが、マンション敷地内に本種の発生源を発見することは出来なかったとしている。

一般に、繁殖条件が整えば、昆虫は一個体の雌成虫といえども産卵数は多数であるため、新たに発生した成虫が更に子をなしながら増えてゆく。また、多くの貯穀害虫は、発生の早期探知と発生源の特定が必要となる反面、個体が目立たず目視による発見が困難であるため、春季の第一世代の発生を確認し、対策することが防疫上重要である⁶⁾。この対策として、屋内については貯穀害虫捕獲用トラップによるモニタリングが行われており、昆虫発生の早期発見につながることから穀物の品質管理手法としてとても有用であるが、屋外環境についてはこれまで十分な情報が得られていない。

そこで、本研究ではつくば市の屋外における複数の貯穀害虫の発生状況とその消長を明らかにするため、調査場所を固定してノシメマダラメイガ、タバコシバンムシ等貯穀害虫の周年変化を経年的に調べ、周囲の環境などの要因から生活史を明らかにするための基礎データを得ることを目的として、トラップ試験を行った。

実験方法

貯穀害虫捕獲用トラップについては、既に様々な製品が数社から販売されている。試験に用いるトラップを大別すると、穀物等のえさ自体や食物由来の誘引物質(カイロモン)を誘引源としたもの(ベイトトラップ)、自然に侵入した昆虫を粘着物で捕らえるもの(粘着トラップ)、光に集まる性質を持つ昆虫を捕らえるもの(ライトトラップ)、捕獲対象とする昆虫に特有のフェロモンを誘引源として捕獲するもの(フェロモントラップ)等に分けられる。これらのうち、フェロ



図1. 代表的な貯穀害虫の例

写真は、左からノシメマダラメイガ、タバコシバンムシ、ヒメマルカツオブシムシである。ヒメマルカツオブシムシについては、左が幼虫(終齢)、右が成虫である。

モントラップについては性フェロモンと集合フェロモンによるものに細分されるが、一般には性フェロモンは種特異性が高く強力なトラップとして広く活用されている。

本研究では、捕獲用のトラップには、ノシメダラメイガ用にガチョンを、タバコシバンムシ用にはニューセリコ、コクヌストモドキ用にはトリオス、ヒメマルカツオブシムシ用にはハイレシス（いずれも富士フレーバー株式会社製）を用いた。ノシメダラメイガ用、ヒメアカカツオブシムシ用、ヒメマルカツオブシムシ用トラップの誘引剤は性フェロモン剤である。タバコシバンムシ用は性フェロモン剤とカイロモン剤を併用、コクヌストモドキ用は集合フェロモン剤を誘引剤としている。ノシメダラメイガ用、タバコシバンムシ用、ヒメマルカツオブシムシ用トラップはかまぼこ型で内側に誘引剤を有し、コクヌストモドキ用トラップは床置き型のプラスチックケース型トラップで、粘着シートの中央に誘引剤を有している。

調査対象および期間は、ヒメマルカツオブシムシに

ついては2014年4月15日から、ノシメダラメイガおよびタバコシバンムシについては2014年6月25日から、コクヌストモドキについては2014年7月28日から試験を開始し、2014年10月31日までの捕獲個体数を集計した。集計に当たっては、ヒメマルカツオブシムシ、ノシメダラメイガ、タバコシバンムシおよびコクヌストモドキについては、個体がほぼ完全な形で捕獲できているため、形態学的な特徴により同種であることを確認した。

調査地域は、茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所の変換利用実験棟（以下、変換利用実験棟とする。）である（図2）。ノシメダラメイガ用およびタバコシバンムシ用トラップについては、設置位置をA、B、C、D^aに、ヒメマルカツオブシムシ用トラップについては設置位置A、B、C、D^bとした。設置位置がD^a、D^bで異なる理由は、ノシメダラメイガ等他の害虫については、設置位置D^bの近辺に我々が恒常的に害虫を飼育するための部屋があり、試験結果への影響を考慮

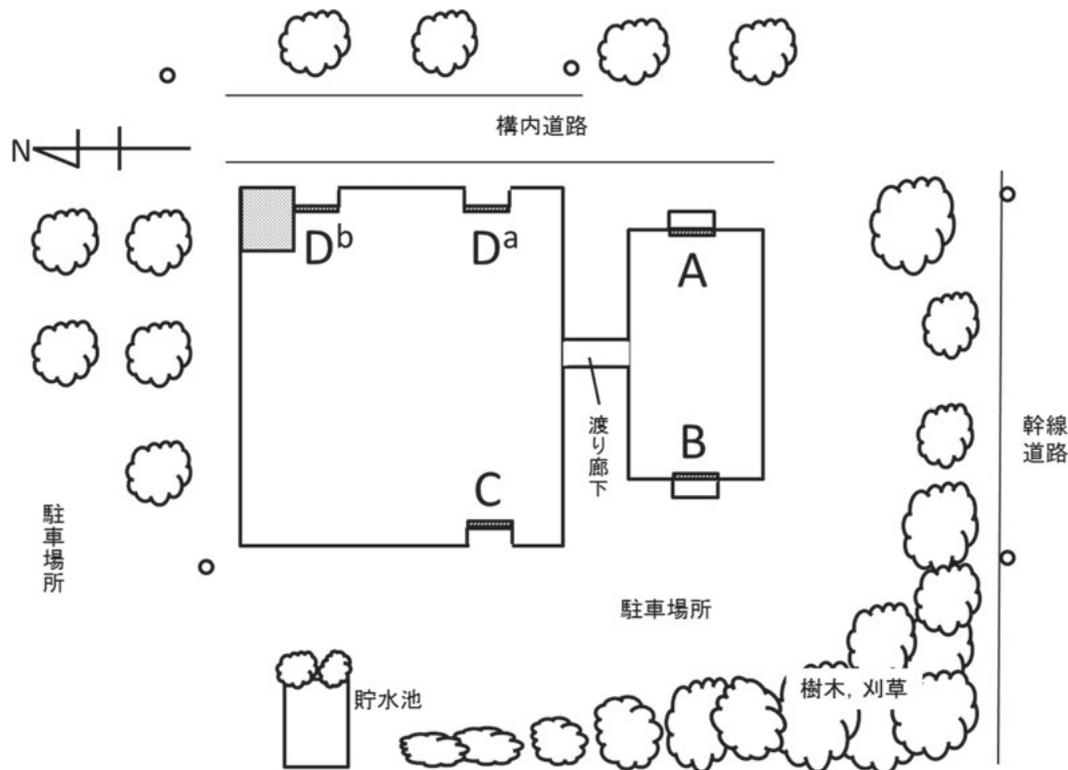


図2. 農研機構 食品総合研究所 変換利用実験棟におけるトラップの設置場所の模式図

設置場所 A、B のある建物は2階建て、設置場所 C、D^a、D^b のある建物は平屋建てである。

▨ : トラップの設置場所 (観音開きドア付近) ▨ : 貯穀害虫の継代飼育室 ○ : 街灯

してD^aとした。他方、ヒメマルカツオブシムシについては飼育方法上、混入リスクは少ないと考えられたため、設置位置Aよりも距離が離れた設置位置D^bを選択した。また、コクヌストモドキ用のトラップについては、他のトラップとの性フェロモンの干渉等を考慮し、A、Bの2カ所のみで予備試験的に実施した。

トラップは建屋の1階部分に設置した。具体的には、ノシメマダラメイガ用、タバコシバンムシ用、ヒメマルカツオブシムシ用トラップは屋外で雨が直接トラップに降り込まない場所を選び、床面から1.5m程度の高さに建物面を背にして荷造り用テープで固定した。コクヌストモドキ用トラップについては雨が直接トラップに降り込まない場所の建物面と床面の角に沿うように静置した。捕獲数の確認は、土曜日、日曜日、祝祭日を除く毎日午前中に行った。また、設置したトラップはトラップに添付されている説明書の有効期限に従って約1ヶ月を目処に交換した。

実験結果と考察

1. ノシメマダラメイガの発生状況とその消長

表1は各ノシメマダラメイガ用トラップの1週間あたりの捕獲数をまとめたものである。表1から、ノシメマダラメイガについては6月25日から10月31日までの間に屋外において総計68個体が捕獲された。各トラップにおける位置的な捕獲数の違いについてはA>B>D^a>Cの順で多かった。この理由については、温度、湿度、日長、時間、風向き等多くの要因に影響されることが考えられる。環境と生息状況との因果関係については、今後、基礎データを積み重ねて科学的に明らかにしたい。

図3については各位置のノシメマダラメイガの捕獲数を集計し、調査期間ごとにプロットしたものである。図3から変換利用実験棟周辺におけるノシメマダラメイガは7月12日から18日に捕獲のピークを迎え、8月30日から9月5日に向かって減少し、10月4日から10日にかけて第2の捕獲ピークが見られた。屋内におけるノシメマダラメイガ成虫の消長についてはいくつか報告があるが、我が国の環境条件ではおよそ初春から晩秋にかけて3～4回の捕獲ピークがあるとの報告がある⁷⁾。本試験では2回の捕獲ピークが見いだされたが、この差は、屋内での発生は食餌、温度等について昆虫の発育には有利と考えられるが、屋外ではこれらの環境が不均一なことによる可能性がある。

また、11月1日以降の屋外におけるノシメマダラ

表1. トラップに捕獲されたノシメマダラメイガの個体数

調査期間 (月/日)	ノシメマダラメイガの捕獲数				合計
	トラップの位置				
	A	B	C	D ^a	
6/25-6/27	0	0	0	0	0
6/28-7/4	1	0	0	2	3
7/5-7/11	1	0	0	0	1
7/12-7/18	9	2	1	0	12
7/19-7/25	3	0	0	1	4
7/26-8/1	3	4	0	2	9
8/2-8/8	0	0	1	4	5
8/9-8/15	3	1	3	0	7
8/16-8/22	3	1	0	0	4
8/23-8/29	2	1	0	3	6
8/30-9/5	0	1	0	0	1
9/6-9/12	2	0	0	0	2
9/13-9/19	1	0	0	0	1
9/20-9/26	3	0	0	0	3
9/27-10/3	0	0	0	1	1
10/4-10/10	3	0	0	1	4
10/11-10/17	0	0	0	0	0
10/15-10/24	1	0	0	0	1
10/25-10/31	2	1	1	0	4
合計	37	11	6	14	68

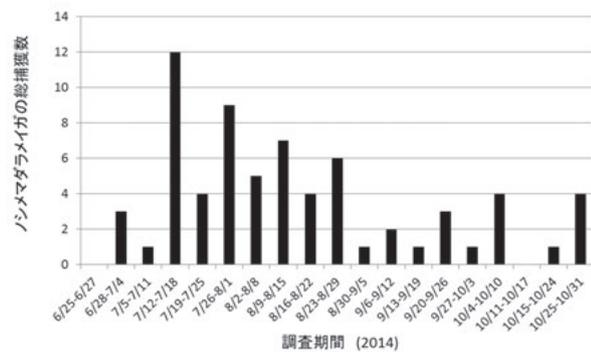


図3. トラップによる屋外のノシメマダラメイガの捕獲消長

4箇所性のフェロモントラップを用いて上記期間に捕獲した総計数を示す。

イガの捕獲状況については、今後もトラップを設置してデータの取得に努めるが、晩秋から早春にかけては終齢幼虫が越冬のため休眠するのでほぼ捕獲されることが予測される。

2. タバコシバンムシの発生状況とその消長

表2は各タバコシバンムシ用トラップの1週間あたりの捕獲数をまとめたものである。表2から、タバコシバンムシについては6月25日から10月31日の各トラップにおける位置的な捕獲数の違いについてはD^a>B>C>Aの順で多かった。

図4については各位置のタバコシバンムシの捕獲数

表2. トラップに捕獲されたタバコシバンムシの個体数

調査期間 (月/日)	タバコシバンムシの捕獲数				合計
	トラップの位置				
	A	B	C	D ^b	
6/25-6/27	0	0	0	0	0
6/28-7/4	1	1	0	1	3
7/5-7/11	1	0	1	0	2
7/12-7/18	0	0	0	0	0
7/19-7/25	1	0	1	0	2
7/26-8/1	1	1	1	0	3
8/2-8/8	0	3	2	4	9
8/9-8/15	2	0	0	1	3
8/16-8/22	0	0	0	4	4
8/23-8/29	0	1	0	3	4
8/30-9/5	0	2	0	1	3
9/6-9/12	0	0	2	2	4
9/13-9/19	0	0	0	0	0
9/20-9/26	0	0	0	0	0
9/27-10/3	0	0	0	0	0
10/4-10/10	0	0	0	0	0
10/11-10/17	0	0	0	0	0
10/15-10/24	0	0	0	0	0
10/25-10/31	0	0	0	0	0
合計	6	8	7	16	37

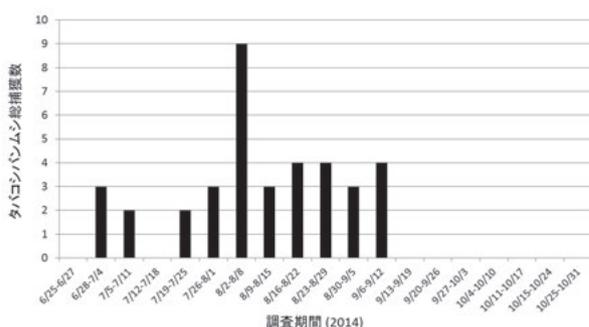


図4. トラップによる屋外のタバコシバンムシの捕獲消長

4箇所の性フェロモンおよびカイロモンを用いたトラップにより捕獲した総計数を示す。

を集計し、調査期間ごとにプロットしたものである。図4から変換利用実験棟周辺におけるタバコシバンムシは8月2日から8日に捕獲のピークを迎えた後、徐々に減少し、9月12日まで見られた。これらの結果は、高山らが関東に位置する無機化学物合成工場の屋内と屋外でタバコシバンムシの捕獲調査を実施した結果と概ね一致していた⁸⁾。

3. ヒメマルカツオブシムシの発生状況とその消長

表3は各ヒメマルカツオブシムシ用トラップの1週間あたりの捕獲数を纏めたものである。表3から、ヒメマルカツオブシムシについては4月15日から10月31

表3. トラップに捕獲されたヒメマルカツオブシムシの個体数

調査期間 (月/日)	ヒメマルカツオブシムシの捕獲数				合計
	トラップの位置				
	A	B	C	D ^a	
4/15-4/18	1	1	2	0	4
4/19-4/25	1	0	0	0	1
4/26-5/2	0	0	0	0	0
5/3-5/9	1	3	1	2	7
5/10-5/16	4	1	1	1	7
5/17-5/23	14	7	5	6	32
5/24-5/30	4	1	2	10	17
5/31-6/6	8	3	4	7	22
6/7-6/13	0	1	0	1	2
6/14-6/23	0	0	2	0	2
6/24-6/27	0	0	0	0	0
6/28-7/4	0	0	0	0	0
7/5-7/11	0	0	0	0	0
7/12-7/18	0	0	0	0	0
7/19-7/25	0	0	0	0	0
7/26-8/1	0	0	0	0	0
8/2-8/8	0	0	0	0	0
8/9-8/15	0	0	0	0	0
8/16-8/22	0	0	0	0	0
8/23-8/29	0	0	0	0	0
8/30-9/5	0	0	0	0	0
9/6-9/12	0	0	0	0	0
9/13-9/19	0	0	0	0	0
9/20-9/26	0	0	0	0	0
9/27-10/3	0	0	0	0	0
10/4-10/10	0	0	0	0	0
10/11-10/17	0	0	0	0	0
10/15-10/24	0	0	0	0	0
10/25-10/31	0	0	0	0	0
合計	33	17	17	27	94

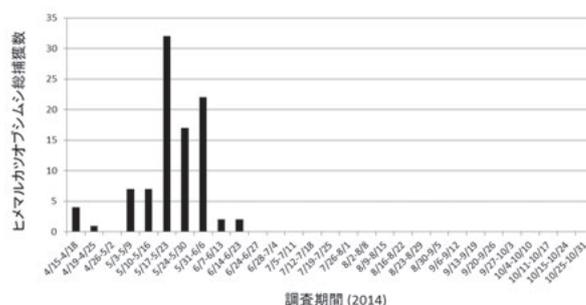


図5. トラップによる屋外のヒメマルカツオブシムシの捕獲消長

4箇所の性フェロモントラップを用いて捕獲した総計数を示す。

日までの間に屋外において総計94個体が捕獲された。各トラップにおける位置的な捕獲数の違いについては $A > D^b > B = C$ の順で多かった。

図5については各位置のヒメマルカツオブシムシの捕獲数を集計し、調査期間ごとにプロットしたものである。図5から変換利用実験棟周辺におけるヒメマルカツオブシムシは5月17日から23日に捕獲のピークを迎えなだらかに減少し、6月17日まで見られた。また、ヒメマルカツオブシムシは屋外において春先に開花す

るコデマリ、ハルジオン等の白い花への飛来が観察されている⁹⁾が、両花とも、変換利用実験棟近辺でも良く観察された。

4. コクヌストモドキの発生状況とその消長

一方、予備試験的に実施したコクヌストモドキ用トラップでの調査については、本試験では1個体も捕獲されなかった。試験期間が2014年7月28日から10月31日までと短く、捕獲できなかった可能性があるが、当害虫は穀物の貯蔵庫や精米所などでは頻繁に見かける種であり¹⁰⁾、年間を通じた調査を進めていく必要がある。

以上、貯穀害虫の屋外における発生状況と消長を明らかにするための基盤情報を得ることを目的とし、つくば市の屋外におけるノシメダラメイガ、タバコシバンムシ、ヒメマルカツオブシムシ、コクヌストモドキについて単年度調査した記録を報告した。今後、本調査を通年で行うことにより、貯穀害虫の周年変化に関する記録を蓄積し、周囲の環境などの要因から生活史を明らかにしたいと考えている。

参考文献

- 1) 高橋奨, 米穀の害虫と駆除予防, 明文堂, 東京, p202, (1931)
- 2) 富岡康浩, コクヌストモドキ(甲虫目:ゴミムシダマシ科)の野外越冬に関する知見, 家屋害虫, **20**, 82-85, (1998)
- 3) Doud, C. W. and T. W. Phillips, Activity of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera:Pyralidae) in and around flour mills. J. Econ. Entomol., **93**, 1842-1847, (2000)
- 4) Champbell, J. F. and M. A. Mullen, Distribution and dispersal behavior of *Trogoderma variabile* and *Plodia interpunctella* outside a food processing plant. J. Econ. Entomol., **97**, 1455-1464, (2004)
- 5) 宮ノ下明大, 今村太郎, 古井聡, マンション周辺における性フェロモントラップで捕獲されたノシメダラメイガ*Plodia interpunctella*の個体数と分布, 都市有害生物管理学会誌, **3**, 1-6, (2013)
- 6) ノシメダラメイガに対する性フェロモントラップの屋内及び屋外における誘引試験, 環動昆, **7**, 57-63, (1995)
- 7) 平尾素一, 性フェロモントラップにおけるノシメダラメイガ成虫発生 of 早期探知, 家屋害虫, **19**, 20-26, (1997)
- 8) 高山渉, 杉本可能, 高橋明也, フェロモントラップによる屋外におけるタバコシバンムシ捕獲調査, ベストロジー学会, **7**, 42-44, (1992)
- 9) 中元直吉, 衣類害虫の生態とその防除, 家屋害虫, (15,16), 52-70, (1983)
- 10) 今井利宏, 笠石義広, 尼崎謙一, 東広記, 塚本匡, 岩本栄二, 高温処理による製粉工場の害虫駆除, 家屋害虫, **29**, 39-47, (2007)

研究ノート

ワークショップを通じた食品関連事業者等の
自主衛生管理手法に関する知識の向上 (第2報)

川崎晋, 持田麻里, 大畑由紀子, 齋藤美枝,
野澤博美, 稲津康弘*

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所

**Improvement in the knowledge of self hygiene management for workers
relation with food by holding of the free-workshop (2)**

Susumu Kawasaki, Mari Mochida, Yukiko Ohata, Mie Saito,
Hiromi Nozawa, and Yasuhiro Inatsu*

National Food Research Institute, NARO
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

In our previous report, we described the holding free-workshop regarding the food-microbiological techniques for researchers of the public establishment organizations and staffs of small and medium-sized food companies that were beginners of food hygiene testing. From the analysis results of questionnaire survey in the last year, this free-workshop was modified to deepen the understanding of participants. We recognized that the improvement of workshop lecture contributes to a better understanding of self hygiene management.

Key words: food hygiene, workshop, self-inspection

* 連絡先 (Corresponding author), inatu@affrc.go.jp

緒言

食の安全性確保が、食品製造の根底にあることは多くの食品企業が理解している。しかしながら、実際に微生物検査を行うには、それに伴う設備が必要となるのはもちろんのこと、微生物検査自体を行える人材確保・育成が難しい点が大きなハードルとなっている。このため、仮に微生物検査室に必要な初期投資費用があったとしても、実際には必要機材の選定・取得、実験室の設計すらままならない状況にある。さらには自主衛生管理に必要とされる微生物検査結果の解釈までには到底到達できない環境に中小企業は直面している。この様な現状であるにも関わらず、微生物検査の基本的技術の習得ならびに結果の解釈について学べる機会は極めて少ないことは前報¹⁾にも述べた。

昨年度、食品安全研究領域食品衛生ユニットでは、これまで微生物の取扱い経験がほとんどない公設試験研究機関の職員および中小規模食品製造業者を対象に、食品工場などで自主衛生検査を実施する際の基本となる知識や技術の提供を目的に、食品技術講習会を2013年7月24～26日にかけて開催¹⁾(参加費無料)した。前報告では、その概要ならびに受講者からのアンケート結果をもとに講習の満足度・自主衛生管理に対する知識の理解度について解析し、今後の技術講習を行う際の重要項目について考察した。その結果、本講習により、微生物検査の理解については概ね達成され、満足度も十分なものであったと考察された。しかし、「細菌の簡易同定」の項目では公設試験研究機関職員と中小規模食品製造業者の2群間において講習の理解度に有意差が認められた。「細菌の簡易同定」法は、最終製品が微生物で汚染されていた場合の原因究明等に使用され、製造現場で要求される機会は比較的多い。一方、公設試験研究機関所属の受講者にとっては、実際の食品製造現場で自主衛生管理がどのように行われているかの経験する機会が少ないために、中小規模食品製造業者と比較して理解が進まなかったと推測された。これを解決するために衛生管理改善計画の実例紹介の補足や、事前テキスト送付などによる事前学習の機会を十分に与えることが、次回ワークショップ開催時の有効な改善点になると考えられた。

上記の改善点を踏まえ、再度食品技術講習会を開催(参加費無料)²⁾した。本報では、前回からの改善点の概要を述べるとともに、より理解度・満足度の高いワークショップを提供するために上記の改善策は有効

であったか、前年度とのアンケート結果の比較を行い、その効果について検証した。

具体的内容与方法

1. ワークショップ開催とその周知

本技術講習は農林水産技術会議事務局筑波事務所研究交流課が主催する第183回農林交流センターワークショップとして、2014年7月25～27日の3日間にかけて行った。その周知は、農林水産技術会議事務局筑波事務所のウェブサイト内で行った。昨年度と同様、対象者は「微生物の取扱い経験の少ない食品の自主衛生管理(の指導)に携わる(予定の)食品関連事業者および公的試験研究機関の研究者」とし、2014年5月23日～6月20日を募集期間として定員30名を募集、同時に応募者への事前アンケート(各項目5段階評価:表1, Q2～8)を実施した。最終的に35名の応募者が集まり、事前アンケートを参照しながら、公設試験研究機関職員および微生物の取扱い経験の少ない中小規模食品製造業者、併せて29名を選考した。

2. ワークショップの内容

ワークショップでの講義および実験は昨年度と同様に行い、自主衛生管理の全体像の把握と微生物検査の基本操作技術の習得を目的とした。ただし、昨年度からの改善点として、衛生管理改善計画の実例紹介の補足を講演者に事前に要望した。また、受講者に事前学習の機会を十分に与えることと実験計画を明確に把握させるため、テキストを2種類作成した。1つは、事前配布用テキストで、食品衛生検査指針²⁾に準じた微生物学実験についての基礎原理解説と実験計画を記載したものを作成した。本テキストは受講する1週間前に郵送で各受講者に送付、その際、少なくとも実験計画の記載部だけは確認するよう受講者に伝達した。また別途、実験テキストを作成(図1)した。これには実験計画と実験内容が記載され、特に昨年度では性状試験についての理解が十分でなかったことから、手法の原理と解説を重点的に記載した。性状試験項目は三瀬³⁾の腸内細菌科簡易同定法に基づいて実施した。実験テキストは当日受講者に配布し、実験中に受講者に活用させることとした。

3. ワークショップ後の評価および講習の効果についての統計学的解析

受講者が受講前後において理解度が変動したか考察



図1. 本ワークショップで作成,配布した講義・実験テキスト(左)と目次(右).講義テキストは事前配布(昨年では当日配布),実験用テキストは今年新たに作成された.

講義テキスト：微生物検査の意義と方法

1. はじめに
2. 検査の目的と意義、活用
3. 基礎知識編
4. 実験時の注意事項編
5. 検査室レイアウト編（必要機器）
6. 準備編（滅菌）
7. 操作編（無菌操作）
8. 生菌数測定操作編
9. 微生物分離操作編
10. システム化・自動化編
11. おわりに

実験用テキスト

1. 実験スケジュール
2. 一般生菌数・大腸菌群数の計測
3. 糞便系大腸菌群の検出
4. 生化学性状試験の基礎
5. 免疫凝集反応による黄色ブドウ球菌の同定

するため、ワークショップ終了時に、表1と同様のアンケートを再び実施した。また、各項目および講習全体の満足度についても質問した(表2, Q1~8)。

得られたアンケート結果から、受講前後の理解度の変動を項目別に求めた。本講習において理解度に有意な効果が認められるか、昨年の結果から改善が認められるか、ウィルコクソンの符号付順位和検定⁴⁾で検定した。

さらに、受講者を公設試験研究機関職員と中小規模食品製造業者の2群に分け、理解度および満足度について評価した。これも昨年の結果と比較した。受講者のグループでの理解度の比較はマン・ホイットニーのU検定⁴⁾により行い、両者に差が認められるか検定した。

結果と考察

表1に2013および2014年度ワークショップのアンケートから得られた受講者の理解度の推移を平均値で示した。受講前では、2013および2014年度どちらも平均2.1前後であり、両者についての差は認めなかった。前報で我々は、2013年度ではワークショップの結果、受講後の知識理解度は大幅に改善し、全ての理解度の質問項目で、有意水準0.05で効果があったことを報告したが、今回の2014年度においても全ての項目で、有意水準0.05で前年度と同様に効果を認めた。全ての設問において全体の理解度は平均4.0以上を得ており、昨年度よりも高い値を示した。このことから、本ワー

クショップが有意義かつ昨年度よりも改善されていることがうかがえた。前報にも述べたが、昨年度に本ワークショップを開催した際での問題点は、衛生管理改善計画の実例紹介の補足と、事前テキスト送付などによる事前学習の機会を十分に与えることと考えられた。本年度では、この改善点を重視し、講義テキストの事前配布と、綿密な実験テキストの作成を行った。昨年度では、Q4の簡易同定について、公設試験研究機関職員と中小規模食品製造業者の区分により理解度が有意に異なっていたため、実験テキストでは特にこの項目について内容を補足した。その結果、本年度では両区分での理解度の差は解消され、昨年度よりも理解度は有意に上昇した。アンケート所感によると、「事前に資料を送ってもらって助かった」「テキストがわかりやすく、デモで実際に手法を見られたので勉強になった」などの記載が見受けられ、事前学習と実験補助教材の作成は極めて有効な改善策と考えられた。

設問Q3, Q4, Q6, Q7の理解度は、前年度と比較して有意に高まった。中でも公設試験研究機関職員の区分ではQ4, Q7, Q8が、中小規模食品製造業者の区分ではQ6が有意に高まっていた。公設試験研究機関職員においては、検査法の原理の解釈に加えて、普段の研究結果の統計学的解析手法についても頻繁に行う機会が多いことから、中小規模食品製造業者に比べて理解が深まったものと推察された。特にQ7の「測定結果について」の両区分の差は、有意差として認めなかったものの理解度の平均値は4.5と3.6という開き

表1. 本ワークショップ受講前後での理解度の変化

番号	質問項目	理解度				
		2013年度		2014年度		
		受講前	受講後 ^{a)}	受講前	受講後 ^{a)}	
Q2	微生物検査の意義と方法について知識はお持ちですか/理解できましたか。	全体	2.8	4.1	2.5	4.3
	公設試験研究機関所属	2.7	4.1	2.6	4.6	
	食品製造業所属	2.9	4.1	2.4	4.1	
Q3	食品中の細菌の分離・計測を行ったことがありますか/理解できましたか。	全体	2.5	4.3	2.3	4.6 ^{c)}
	公設試験研究機関所属	2.5	4.2	2.4	4.8	
	食品製造業所属	2.6	4.1	2.3	4.5	
Q4	細菌の簡易同定を行ったことがありますか/理解できましたか。	全体	1.6	3.5	1.9	4.3 ^{c)}
	公設試験研究機関所属	1.7	3.0 ^{b)}	2.1	4.2 ^{c)}	
	食品製造業所属	1.7	3.8 ^{b)}	1.7	4.3	
Q5	自主衛生検査と外部認証制度の知識はお持ちですか/理解できましたか。	全体	1.7	4.0	1.7	4.0
	公設試験研究機関所属	1.6	4.1	1.9	4.1	
	食品製造業所属	1.8	3.9	1.5	3.9	
Q6	現場における衛生管理について知識はお持ちですか/理解できましたか。	全体	2.6	4.1	2.4	4.7 ^{c)}
	公設試験研究機関所属	2.3	4.3	2.4	4.6	
	食品製造業所属	2.6	3.9	2.4	4.8 ^{c)}	
Q7	測定結果の整理について知識はお持ちですか/理解できましたか。	全体	1.8	3.6	2.0	4.0 ^{c)}
	公設試験研究機関所属	1.8	3.3	2.1	4.5 ^{c)}	
	食品製造業所属	1.9	3.8	1.9	3.6	
Q8	平素から当該分野の研究者とのネットワークづくりに取り組んでいますか/は広がりましたか。	全体	1.6	4.0	2.0	4.3
	公設試験研究機関所属	1.8	3.9	2.5	4.6 ^{c)}	
	食品製造業所属	1.7	4.1	1.5	4.1	

a) 受講前後と比較して全ての設問・区分において優位に理解度は高まった (P<0.05)

b) 所属が公設試験研究機関と食品製造業との間で理解度の差を優位に認めた (P<0.05)

c) 2013と比較して優位に理解度が高まった (P<0.05)

表2. 本ワークショップ受講前後での満足度の変化

番号	質問項目	理解度		
		2013年度	2014年度	
		Q1	今回のワークショップを受講しての満足度を教えてください。	全体
Q2	微生物検査の意義と方法について、内容に満足しましたか。	公設試験研究機関所属	4.4	4.9
		食品製造業所属	4.3	4.9 ^{a)}
		全体	4.2	4.7 ^{a)}
Q3	食品中の細菌の分離・計測について、内容に満足しましたか。	公設試験研究機関所属	4.2	4.8 ^{a)}
		食品製造業所属	4.2	4.7
		全体	4.3	4.7 ^{a)}
Q4	細菌の簡易同定について、内容に満足しましたか。	公設試験研究機関所属	4.4	4.8
		食品製造業所属	4.3	4.7
		全体	4.0	4.5 ^{a)}
Q5	自主衛生検査と外部認証制度について、内容に満足しましたか。	公設試験研究機関所属	3.8	4.5 ^{a)}
		食品製造業所属	4.2	4.5
		全体	4.1	4.3
Q6	現場における衛生管理について、内容に満足しましたか。	公設試験研究機関所属	4.2	4.1
		食品製造業所属	4.1	4.5
		全体	4.1	4.7 ^{a)}
Q7	測定結果の整理について、内容に満足しましたか。	公設試験研究機関所属	4.3	4.6
		食品製造業所属	3.9	4.8 ^{a)}
		全体	3.8	4.4 ^{a)}
		公設試験研究機関所属	3.3	4.6 ^{a)}
		食品製造業所属	4.2	4.3

a) 2013と比較して優位に満足度が高まった (P<0.05)

があり、特に中小規模食品製造業者にとっては理解度の個人差が大きかった。逆にQ6の「製造現場における衛生管理の実際について」では、中小規模食品製造業者の理解度が進んでおり、普段の業務や製造現場の直接的な課題について共感できる内容であったためと推測した。

ワークショップにおける受講者の満足度についての結果を表2に示した。ワークショップ全体の満足度を問うQ1では、受講者29人中26人が5、残りが4としており、ほとんどが満足と回答した。また、昨年との結果と比較して有意に満足度は高まっていた。Q2～Q7では、各個別の内容の満足度について問う質問であったが、受講者全体ではQ5以外において昨年よりも有意に満足度は高まった。Q4、Q6、Q7では理解度の結果と同様、公設試験研究機関職員の区分ではQ4、Q7が、中小規模食品製造業者の区分ではQ6が有意に高まっており、理解度がそのまま満足度に反映した形となった。Q5では「外部認証制度」に関する講義についての満足度を問う設問であったが、外部認証制度についての講義では基本的に情報提供と多数配布資料の概略説明の内容になっており、受講者が実際に必要となる資料はそれぞれ立場によって異なる。アンケート所感には「内容はわかりやすかった」「配布資料を見直し復習する」「素晴らしい資料」など、講義と配布資料の内容には不満はないものの、本講義で得られた知識の具体的解釈と活用は各受講者に委ねられてしまうため、前年度からの大きな改善には至らなかったと推測された。いずれにせよ、本年度の受講後満足度はいずれの項目においても4.1以上、平均4.6であり、昨年度からの大幅な改善が確認できた。

以上、昨年度のワークショップによるアンケート結果を踏まえ、現場における衛生環境改善の実例紹介や、事前テキスト送付による事前学習の機会を与えるよう改善したことで、昨年度よりも理解度・満足度の

高いワークショップを提供することができ、本年度のアンケート結果との比較結果からもその効果が検証できた。

要約

昨年度、我々は微生物の取扱い経験が無い公設試験研究機関職員および中小規模食品製造業者を対象に、実習および講義を伴う微生物検査の基本的技術習得のためのワークショップを開催し、アンケート結果の解析を行った結果から改善点を模索した。この改善点をもとに、2014年7月25～27日に、再度食品技術講習会を開催したところ、昨年度に比べて理解度・満足度は有意に高まり、上記の改善策の有効性を検証できた。

参考文献

- 1) 川崎晋, 持田麻里, 大畑由紀子, 齋藤美枝, 野澤博美, 稲津康弘, ワークショップを通じた食品関連事業者等の自主衛生管理手法に関する知識の向上, 食総研報, **78**, 19-24 (2014).
- 2) 厚生労働省 (監修): 「食品衛生検査指針 微生物編」日本食品衛生協会 (2004)
- 3) 三瀬勝利・井上富士男 (編): 「食品中の微生物検査法解説書」第4章 微生物同定法, 講談社サイエンティフィク p126-138.
- 4) 柳井久江: 「4stepsエクセル統計」オーエムエス出版 p103-104, 227-230.

引用URL

- i) <http://sto.affrc.go.jp/event/workshop/173ws>
(引用日平成25年10月15日)
- ii) <http://sto.affrc.go.jp/event/workshop/183ws>
(引用日平成26年10月22日)

研究ノート

国産豆腐より分離された腸球菌の特性

細谷幸恵, 大畑由紀子, 川崎晋, 稲津康弘*

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所

Biochemical characteristics and antibacterial sensitivity of enterococci isolated from soybean curds purchased in Japan.

Yukie Hosotani, Yukiko Ohata, Susumu Kawasaki and Yasuhiro Inatsu *

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

Tofu (soybean curds) is one of the traditional processed food and commonly eaten in Japan. In this study, we isolated enterococci (indicator bacteria of fecal contamination) from *Tofu* purchased in Japan, and identified enterococcal species. In addition, we report the sensitivities to antibiotics of these bacteria.

Key words: enterococci, indicator bacteria of fecal contamination

緒言

豆腐は大豆を加水、磨砕した大豆汁を加熱することにより得られた豆乳に、にがり等の凝固剤を加えて凝固、成形することにより製造される生鮮食品である。日本での食習慣において、豆腐は生食で供される機会が多い食品である。一般に、市販豆腐は豆腐と共に水を充填する包装形態が取られるため、加熱工程後の操作も多い。それゆえ、二次汚染の起こる可能性が考え

られる。

豆腐を原因食品とした食中毒事例は、例えば、昭和63年、佐賀県・長崎県において病原性大腸菌による事例が報告されている(発症者:670名)¹⁾。

一般に、食品が衛生的に製造されているか否かを検討するための微生物指標として、一般生菌数や大腸菌群数といった定量的に汚染度を評価する手法が用いられ、また、糞便系大腸菌群 (E.coli) や腸球菌等の衛生指標菌の有無を定性的に検査する手法が用いられている。対象となる食品にもよるが、糞便系大腸菌を含む

* 連絡先 (Corresponding author), inatu@affrc.go.jp

大腸菌群の存在は糞便汚染の可能性を示唆し、製造過程での取扱いが不良であったと判断される。また、一部の腸球菌 (*Enterococcus faecalis* および *Enterococcus faecium*) はヒトや動物の腸管内に常在する微生物であり、乾燥に強く、外界での増殖率が低いこと、さらに土壌や水への分布が大腸菌群と比べて少ないことから、大腸菌群や糞便系大腸菌の代替となりうる糞便汚染指標菌として重視されつつある²⁾。

近年、複数の抗生物質に対して耐性を示すバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE: Vancomycin Resistant Enterococci) による日和見感染が医療現場において問題視されており、食品についてもVRE汚染の拡大が懸念されている³⁾。

本研究では、国内36都道府県において購入した市販豆腐について腸球菌の分離を試み、分離株についての生化学的性状試験により同定を行った。ならびに、分離株について薬剤感受性試験を行ったので、結果を併せて報告する。

実験材料および方法

1. 検体の種類

2009年9月から2011年10月の間に、国内で製造された市販豆腐 (もめん豆腐: 12検体, きぬごし豆腐: 4検体,

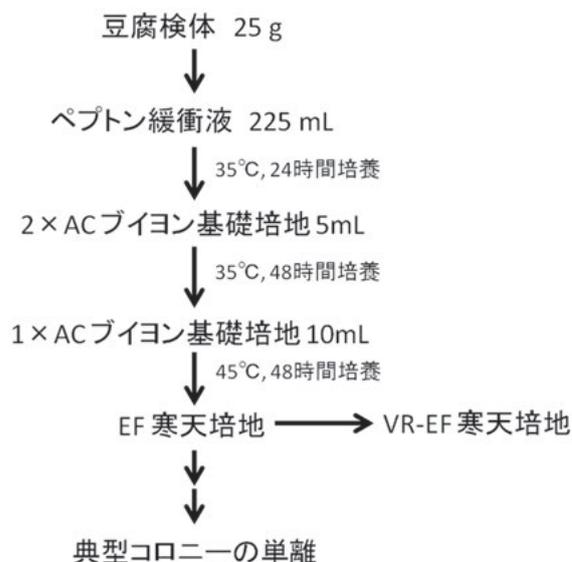
充填豆腐: 1検体, ソフト豆腐: 1検体) を検査対象とした。

2. 豆腐検体からの腸球菌の分離

腸球菌の検出方法は図1に示した方法で行った。豆腐検体は各25 g 採取し、9倍重量のペプトン緩衝液 (MERCK, Darmstadt, Germany) でストマッカー (MASTICATOR, IUL, Barcelona, Spain) 処理により乳剤化した。処理後の乳剤を、35°Cで、24時間培養し、その培養液5 mLを2倍濃度のACブイオン基礎培地 (日水製薬, 東京) 5 mLと混和し、35°Cで、48時間培養を行った。培養後、1白金耳量の菌液を通常濃度のACブイオン基礎培地10 mLに接種し、さらに45°C、48時間培養を行った。増菌により混濁の認められた培養液については、菌液をEF寒天培地 (日水製薬) に画線塗抹し、35°C、48時間培養した。培養後、腸球菌の典型性状コロニーを認めたものについて単離し、以下の生化学的性状試験に供した。

3. 生化学的性状試験と菌種同定法

EF寒天培地にて単離された菌株は普通寒天培地 (日水製薬) 上に画線塗抹後、35°C、48時間培養し、顕微鏡観察、カタラーゼ試験、およびアピStrep (SYSMEX bioMérieux, Lyon, France) による生化学的性状試験に供した。



(図中製品名: 培地名称)

- ・ ACブイオン基礎培地: Azide Citrate培地
- ・ EF寒天培地: *Enterococcus faecalis/faecium* (腸球菌) 選択分離培地
- ・ VR-EF寒天培地: バンコマイシン耐性腸球菌選択分離培地

図1. 豆腐検体からの腸球菌検出のための培養方法

4. 各種抗生物質に対する感受性試験

アピStrepにより、*Enterococcus faecalis*および*Enterococcus faecium*と同定された18株を、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)検査用培地であるVR-EF寒天培地(日水製薬)上に塗抹し、発育の可否について確認した。また、腸球菌の薬剤感受性試験はK-B(Kirby-Bauer)法⁴⁾に則り実施した。分離した18株について、普通寒天培地上で培養の後、単一の菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し、濃厚菌液を調製した。滅菌綿棒を用いて、ミュラーヒントン寒天培地に菌液を均等に塗布し、それぞれの抗生物質を含むBDセンシ・ディスク™(日本ベクトン・ディッキンソン、東京)を置いた。24時間培養の後に、発育阻止円径の測定を行った。得られた発育阻止円径の大きさから、判定表に従い、各種抗生物質に対する感受性の強さについて3段階(R:耐性, I:中間, S:感性)の判定を行った。

結果

国内で市販されている豆腐18検体より腸球菌の検出を行い、18株の腸球菌を分離した。顕微鏡観察および生化学性状試験に供した結果、*Enterococcus faecium*は計16株(もめん豆腐より7株、きぬ豆腐より2株、充填豆腐より1株、ソフト豆腐より1株)、*Enterococcus faecalis*は計2株(もめん豆腐より2株)と同定された(表1)。

分離した18株について、VR-EF寒天培地上に塗抹し、発育の可否について判定を行ったところ、2検体についてVR-EF寒天上での発育が認められた。また、ディスク拡散法により分離菌株について薬剤感受性試験を行ったところ、18株中2検体についてはバンコマイシン耐性(R)判定、1検体について中間(I)判定として得られた(表2)。

表1. 豆腐より分離した腸球菌の生化学的性状試験結果

分離源	同定名	catalase	Vp	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
きぬ豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
きぬ豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
充填豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
きぬ豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
きぬ豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
もめん豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
ソフト豆腐	<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-

(略号: 基質名) Vp: ビルビン酸ナトリウム, HIP: 馬尿酸ナトリウム, ESC: エスクリン, PYRA: ピロリドニル-2-ナフチルアミド, α GAL: 6-プロモ-2-ナフチル- α -D-ガラクトピラノシド, β GUR: ナフトール-AS-BI β -D-グルクロン酸, β GAL: 2-ナフチル- β -D-ガラクトピラノシド, PAL: 2-ナフチル-リン酸ナトリウム, LAP: L-ロイシン-2-ナフチルアミド, ADH: アルギニン, RIB: D-リボース, ARAL: アラビノース, MAN: D-マンニトール, SOR: D-ソルビトール, LAC: 乳糖, TRE: D-トレハロース, INU: イヌリン, RAF: D-ラフィノース, AMD: でんぷん, GLYG: グリコーゲン

表2. 豆腐検体より分離された腸球菌の薬剤感受性

	TC	EM	CP	VCM	TEIC	ABPC	SM	GM
R(耐性)	1	15	2	2	1	0	17	10
I(中間)	0	3	7	1	3	0	1	8
S(感性)	17	0	9	15	14	18	0	0

(検体数 / 18検体)

(表中略号: 薬剤名) TC: テトラサイクリン, EM: エリスロマイシン, CP: クロラムフェニコール, VCM: バンコマイシン, TEIC: テイコブラニン, ABPC: アンピシリン, SM: ストレプトマイシン, GM: ゲンタマイシン

考察

本研究では「きぬごし豆腐」、「もめん豆腐」、「ソフト豆腐」、「充填豆腐」の各種豆腐を、腸球菌の検出試験に供し、18株の腸球菌を分離した。この結果は、豆腐の製造環境中に何らかの形で腸球菌汚染の実態が存在することを示している。豆腐の製造環境は、水槽中での豆腐の固化や、切断、包装の際の水の充填など複数の製造段階があることから、水の飛散により汚染が拡大しやすく、特に加熱調理後の取り扱いには注意が必要である。

食品中から腸球菌が検出されたとしても、ただちに健康上の危害が発生するわけではなく、あくまで製造管理上の衛生管理指標に過ぎない。しかしながら、腸球菌のような衛生指標菌が検出されるということは、製造過程において何らかの汚染を受けた、あるいは殺菌が不十分であった可能性があり、有害細菌の混入・残存が示唆される。分離された腸球菌がヒトの健康に対し直接的な被害を与えることには直結しないが、少なくともヒト糞便由来の汚染指標菌が検出されたことから、今後、豆腐の製造環境における衛生状態をモニタリングする必要がある。

また、本試験ではK-B法により対象薬剤に対する耐性について判定を行い、2株がバンコマイシンへの耐性を示した。バンコマイシン耐性腸球菌の判定については、VR-EF寒天培地での発育や、K-B法による発育阻止円の形成を確認するのみでなく、バンコマイシン耐性遺伝子の検出による確定試験を行うことが望ましい⁵⁾。本試験において分離された腸球菌の中にも、2株についてVR-EF寒天培地で発育が見られたが、VRE確定試験は行われていないため、それらの追加検討が必要である。

要旨

豆腐は日本の伝統的な大豆加工食品であり、日常的に食されている。本研究は、日本国内で製造販売された豆腐に混入した衛生指標菌の分離を試み、18株の腸球菌を検出した。それらの分離株について生化学性状試験により *Enterococcus faecalis* 2株、および *Ent. faesium* 16株と同定した。また、それら分離株の特性を把握するため、薬剤感受性試験を実施し、2株についてバンコマイシン耐性の傾向を示すことが明らかとなった。

参考文献

- 1) 松浦 元幹, 福岡 逸朗, 山村 勝幸, 精進料理による病原大腸菌食中毒, 食品衛生学会誌, **30**, 463-465 (1989).
- 2) 厚生労働省監修, 「食品衛生検査指針 微生物編」, 社団法人日本食品衛生協会, (2004).
- 3) Klein G., Pack A., Reuter G., Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany., *Environ. Microbiol.*, **64**, 1825-1830, (1998).
- 4) Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M., Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, **45**, 493 - 496, (1966).
- 5) Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR, *J Clin Microbiol*, **33**, 24-27 (1995).

研究ノート

Purification of Dehydrin Protein from Buckwheat Seed (*Fagopyrum esculentum* cv. Kitawase)

Michiko Momma[§]

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642 Japan

Abstract

The presence of a dehydrin-like protein in buckwheat seeds had been revealed using an antibody against a Lys-rich conservative motif sequence for dehydrin. In this study, the dehydrin protein was purified from a Japanese variety of buckwheat seed (*Fagopyrum esculentum* cv. Kitawase) through four purification steps: heat treatment, addition of 10–45% saturated ammonium sulfate, ion-exchange chromatography on a HiTrap Q Fast Flow column, and gel filtration on a HiPrep Sephacryl S-200 column. Results of peptide mapping with trypsin indicated that the purified protein contained conservative motif sequences and Gly-rich sequences, which are characteristic to dehydrin proteins. The results of the pepsin digestion experiment showed that the purified dehydrin was promptly cleaved by simulated gastric fluid, and that a 16-kDa polypeptide that is highly resistant to pepsin digestion was produced.

Key dehydrin; group 2 LEA protein; buckwheat; 16-kDa pepsin-resistant protein

Abbreviations: LEA protein, late embryogenesis abundant protein; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SGF, simulated gastric fluid

Introduction

Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), a member of the Polygonaceae family, has a long history of cultivation in Japan as a substitute crop of rice, owing to its tolerance to low temperatures and adaptability to sterile soil. It has been widely used as a food material for noodles, dumplings, and confectionaries in East-Asian countries, and is also used in batter for cakes, pancakes, or crepes in Western countries. Although interest in buckwheat as a health food is growing, allergic reactions caused by its ingestion, including severe

symptoms called anaphylaxis, are a serious issue.

Dehydrin is a class of late embryogenesis abundant (LEA) proteins that are expressed in the late stage of seed maturation in response to water stress and/or formation of abscisic acid (Kleinwächter et al., 2014, Radwan et al., 2014). Based on the conserved motif of amino acid sequences across species, and the protein's extreme hydrophilicity, heat stability, and induction by dehydration, dehydrin is thought to be involved in the desiccation tolerance of plants (Close, 1997, Hanin et al., 2011). However, the function of dehydrin protein is not clear (Allagulova et al., 2003). We have studied the dehydrin

[§] Corresponding author: Phone: +81-29-838-8012; Fax: +81-29-838-7996
e-mail: michiko@affrc.go.jp

proteins in soybean and rice seeds (Momma, 2002, Momma et al., 1997, 2003) and extended the study to functional aspects, such as the protective activity against the freeze/thaw denaturation of enzyme proteins (Momma, 2003a, 2003b).

In a previous paper, the presence of dehydrin-like proteins in buckwheat and its products were shown for the first time, by immunoblotting assay using an antibody against a conservative motif sequence for dehydrin (Momma, 2009). The possibility that this dehydrin-like protein in buckwheat seeds might be associated with pepsin resistance and buckwheat allergy was also implied. In this current study, the 20-kDa dehydrin-like protein was purified and subjected to pepsin digestion analysis.

Materials and Methods

Purification of dehydrin protein

Whole grain flour of buckwheat (cv. Kitawase, from Japan) was supplied by Dr. Horigane at the National Food Research Institute. Thirty grams of the flour was mixed with 300 mL of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), containing 0.02% sodium azide and 1 mM polymethanesulfonyl fluoride. The suspension was homogenized in a Hiscotron apparatus (NS50; Nichi-On, Tokyo) at 10,000 rpm for 10 min and then centrifuged at 10,000 $\times g$ for 20 min. The supernatant was heated in boiling water for 10 min and centrifuged at the same condition in order to remove major seed proteins of buckwheat. After adding ammonium sulfate (10% saturation), the supernatant was stirred on ice for 10 min and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 20 min. Ammonium sulfate was added to the supernatant to a final concentration of 45% saturation and the mixture was stirred on ice for 10 min. The precipitate that developed was collected by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 20 min and dialyzed against 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). The dialyzate was centrifuged and filtrated through a 0.45-mm filter membrane.

Ion-exchange chromatography followed by gel filtration was carried out with a chromatography system, AKTa prime (GE Healthcare, Tokyo). The filtrate was put on a HiTrap Q Fast Flow ion-exchange column (5 mL) (GE Healthcare, Tokyo) equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). Materials were eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl. Fractions containing the 20-kDa

protein were concentrated with an ultrafiltration membrane filter (UltrafreeCL-UFC4, LGC25; Millipore, Bedford, MA, USA) and applied on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR gel filtration column equilibrated with the same buffer. The 20-kDa protein was concentrated with the same membrane filter and kept at -20°C or freeze-dried. SDS-PAGE was carried out by following the method of Laemmli (1970). Samples were mixed with an equal volume of SDS-PAGE sample buffer of 2 \times concentration, boiled for 5 min, and then loaded onto a 5–20% polyacrylamide gradient gel (PAGEL, NPG-520L; Atto, Tokyo). Electrophoresis was carried out at 20 mA for 90 min. The resultant gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Peptide mapping

Purified dehydrin fractions were separated by SDS-PAGE as described above. Bands of 20-kDa polypeptides on the SDS-PAGE gel were excised and digested by trypsin overnight at 35°C after washing twice in distilled water. The digested polypeptide was separated by HPLC with a Symmetry C18 column (Waters, Milford, MA, USA). The N-terminus amino acid sequences were analyzed with a Procise 494 HT protein sequencing system. In-gel digestion and subsequent analysis were carried out by Apro Science Co. Ltd., Tokyo.

Stability against pepsin digestion

The *in vitro* pepsin digestibility of the purified dehydrin protein was examined by the method of Astwood et al. (1996) using simulated gastric fluid (SGF) containing 0.32% pepsin (from porcine stomach, 3,300 units/mg; Wako, Tokyo) and 30 mM NaCl. Freeze-dried purified fractions were dissolved in 200 mL of distilled water and then 10 mL of the solution containing 6.8 mg of protein was mixed with 40 μL of SGF (128 mg as pepsin) and incubated at 37°C for 0, 0.25, 1, 2, 4, 8, 15, or 60 min. SDS-PAGE samples were loaded onto a 5–20% polyacrylamide precast gel (NPG-520; Atto, Tokyo) and subjected to electrophoresis at 20 mA for 90 min. The resultant gel was stained with Coomassie brilliant blue dye as described above.

Results and Discussion

Purification of dehydrin protein

In a previous paper, the presence of a dehydrin-like protein in buckwheat and its products were revealed for the first time, using an antibody against a Lys-rich conservative motif sequence for dehydrin (Momma, 2009). It was also implied that the dehydrin-like protein in buckwheat seeds might be associated with pepsin resistance and buckwheat allergy.

In this study, the dehydrin protein was purified from a Japanese variety of buckwheat seed (*Fagopyrum esculentum* cv. Kitawase) through four purification steps: heat treatment, 10–45% saturated ammonium sulfate, ion-exchange chromatography on a HiTrap Q Fast Flow column, and gel filtration on a HiPrep Sephacryl S-200 column.

As indicated previously, the molecular mass of the dehydrin-like protein (20 kDa) was close to that of legumin (22–23 kDa), the major seed protein of buckwheat (Momma, 2009). These proteins were difficult to distinguish in the SDS-PAGE profile of the extract. Since it is known that dehydrin proteins are highly heat soluble in general, heat treatment in boiling water was applied as the first step of purification. Then, the sample was concentrated and

subjected to ion-exchange column chromatography. The 20-kDa polypeptide co-eluted with a 35-kDa polypeptide and other minor components. These polypeptides were separated by gel filtration. Consequently, the 20-kDa polypeptide was purified to one band, as verified by SDS-PAGE analysis (Fig. 1, indicated by the arrow), although a trace amount of a 16-kDa band was often associated with it in the series of purification experiments.

Identification of dehydrin by peptide mapping

In order to confirm that the 20-kDa polypeptide is indeed the dehydrin protein, bands of the 20-kDa polypeptide were excised. The polypeptide was digested in-gel with trypsin, and then the N-terminus sequence of the fragment was analyzed. The generally accepted classification of dehydrins is based on their structural features as Y, S, and K segments (Allagulova et al., 2003). In particular, the lysine-rich motif structure, called the K segment and representing a highly conserved amino acid motif (EKKGIMDKIKEKLP), has been found in all dehydrins. Results of peptide mapping with trypsin digestion indicated that the 20-kDa protein contained two conservative motif sequences (KIKLPG, DEYGNP) and Gly-rich sequences that are characteristic to dehydrin proteins. From the result, it was suggested that the 20-kDa polypeptide found in buckwheat was one of the dehydrin group of proteins.

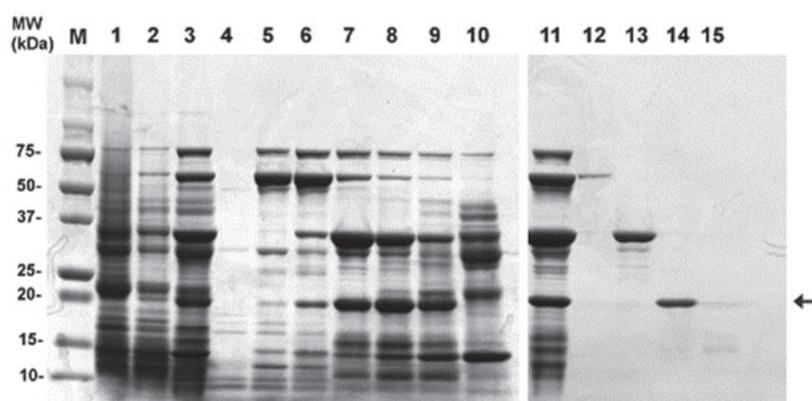


Fig. 1 SDS-PAGE patterns of fractions and purified dehydrin protein from the purification procedure.

M, molecular weight marker; lane 1, extract; lane 2, heated extract; lane 3, sample applied to ion-exchange chromatography; lanes 4–10, fractions 5, 7, 8, 10, 11, 12, and 14 from ion-exchange chromatography; lane 11, sample applied to gel filtration; lanes 12–15, fractions 17, 21, 25, and 28 from gel filtration chromatography.

Pepsin digestibility of purified dehydrin

The pepsin digestion experiment indicated that the purified dehydrin was promptly cleaved enzymatically. The 20-kDa band (marked as * in Fig. 3) almost disappeared within 1 min, producing several intermediate polypeptides of approx. 17 kDa. These polypeptides were also digested within 8 min in the course of the experiment, but the 16-kDa polypeptide (marked as ** in Fig. 3) was found to be highly resistant to pepsin digestion. Based on the

above results, it would seem that the trace band of 16 kDa detected in the purified dehydrin (lane 1) was a decomposed fragment of 20-kDa dehydrin.

In a previous paper, minor components of dehydrin-like protein were detected in buckwheat flour and its products by immunoblotting assay using an antibody against the lysine-rich motif structure of dehydrin (Momma, 2009). It is supposed that those minor components are also fragmentation products of the 20-kDa dehydrin.

In general, food allergens are considered to be

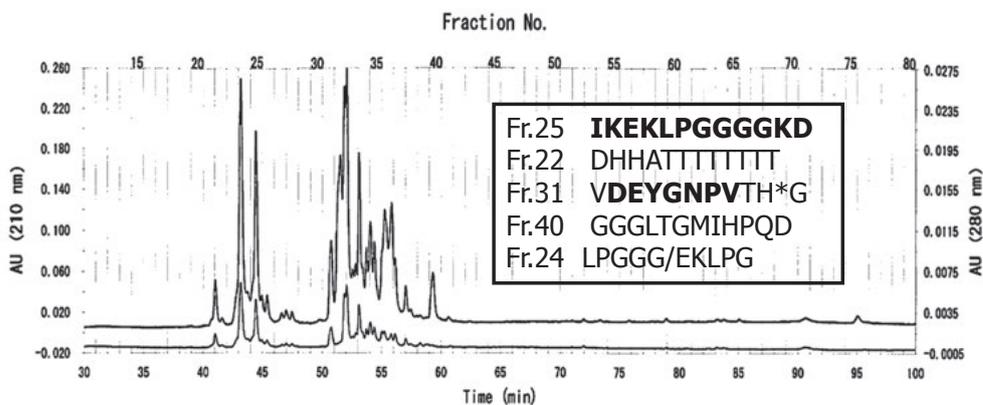


Fig. 2 N-Terminal peptide sequences of fragments from dehydrin proteins.

Profiles of reverse-phase chromatography and N-terminal peptide sequences of fractions 20, 22, 25, 31, and 40 are shown. Conserved motif sequences of dehydrin are shown in bold characters.

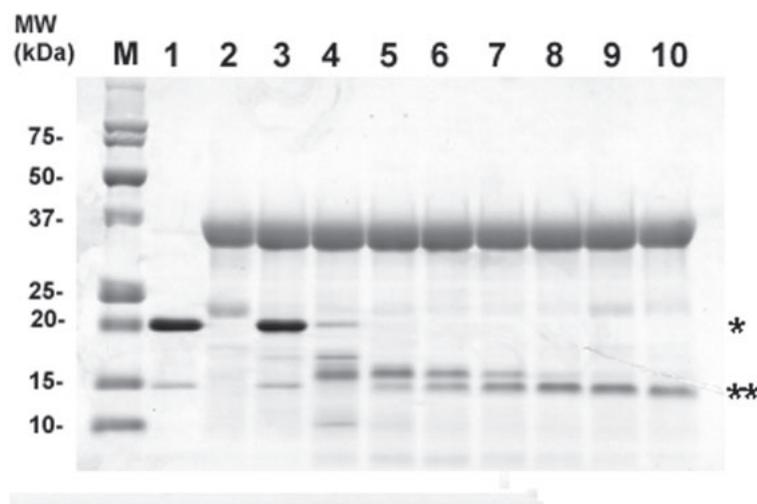


Fig. 3 Pepsin digestion assay of purified dehydrin protein.

M, Molecular weight marker; lane 1, purified dehydrin protein; lane 2, simulated gastric fluid (SGF); lanes 3–10, dehydrin protein incubated in SGF for 0, 0.25, 1, 2, 4, 8, 15, and 60 min, respectively. The asterisk marks on the right indicate the 20-kDa dehydrin and pepsin-resistant polypeptide.

stable against various digestive treatments. Lee et al. (2013) investigated the enzyme-resistant characteristic of buckwheat protein and its allergenic potential. They found a 16-kDa buckwheat protein remaining after 30 min of pepsin treatment on the SDS-PAGE gel, and implied the allergenicity of its hydrolysate. They also indicated the allergenic potentials of fragments produced from buckwheat proteins. In an earlier study, Tanaka et al. (2002) found a pepsin-resistant 16-kDa protein associated with an immediate hypersensitivity reaction to buckwheat allergens. They found that the N-terminal sequence of the 16-kDa protein (RDEGFDLGETQMSSK) had 80% homology with *Oriza sativa* dehydrin (GenBank Accession No. OSU60097). A few researchers have indicated that dehydrin proteins are involved in food allergy reactions. Chung et al. (2003) suggested that the accumulation of dehydrin in the peanut seed increases IgE binding and advances glycation end adducts.

It is of interest how the enzymatic fragmentation affects the protein structure, including its epitope exposure. It is also of importance to clarify the involvement of dehydrin in the allergenicity of crops. Since this protein is induced by maturation drying, there would be a way to control dehydrin levels in the course of harvesting and preservation.

In conclusion, a 20-kDa polypeptide in buckwheat seeds was purified and confirmed to be a dehydrin protein on the basis of its internal amino acid sequences. In an enzymatic digestion assay, a highly pepsin-resistant protein was found to be produced from the 20-kDa dehydrin.

Acknowledgments

I would like to thank Dr. Horigane at the National Food Research Institute, NARO for his kind cooperation and suggestion on the research of buckwheat.

要約

デハイドリンは、乾燥や低温によって誘導される植物ストレスタンパク質であり、種子にも広く分布することが知られている。前報において、デハイドリン固有のモチーフ配列に対する抗体を用いて、ソバ種子ならびに食品中にデハイドリン様タンパク質が存在することを示した。本研究では日本産ソバ種子（品種キタワセ）から、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロ

マトグラフィーおよびゲル濾過によって、20kDaデハイドリンを単離精製した。トリプシン消化物のアミノ酸配列分析の結果、デハイドリンのC末端側モチーフ配列と、デハイドリン固有のリジンモチーフ配列を有することが確認された。ペプシン消化性を検討した結果、16kDaペプシン消化耐性ポリペプチドの生成が見られた。

References

- Allagulova, Ch. R., Gimalov, Fr., Shakirove, F. M., and Vakhitov, V. A., *Biochemistry (mosc)*, **68**, 945-951 (2003).
- Astwood, J. D., Leach, J. N. and Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotech.*, **14**, 1269-1273.
- Chung, S.-Y., Butts, C. L., Maleki, S. J., and Champagne, E. T., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4273-4277 (2003).
- Close, T. J., *Physiologia Plantarum*, **100**, 291-296 (1997).
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., and Masmoudi, K., *Plant Signal Behav.*, **6**, 1503-1509 (2011).
- Kleinwächter, M., Radwan, A., Hara, M., and Selmar D., *Front. Plant Sci.*, **5**, 1-3 (2014)
- Laemmli, U. K., *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- Lee, S., Han, Y., Do, J.-R., and Oh, S., *Nutr. Res. Pract.*, **7**, 3-8 (2013).
- Momma, M., *Rep. Natl. Food Res. Inst.* (in Japanese), **66**, 21-28 (2002).
- Momma, M., *Rep. Natl. Food Res. Inst.* (in Japanese), **67**, 15-20 (2003a).
- Momma, M., *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, (in Japanese), **50**, 428-430 (2003b).
- Momma, M., *Rep. Natl. Food Res. Inst.*, **73**, 1-6 (2009).
- Momma, M., Haraguchi, K., Saito, M., Chikuni, K., and Harada, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1286-1291 (1997).
- Momma, M., Kaneko, S., Haraguchi, K., and Matsukura, U., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1832-1835 (2003).
- Radwan, A., Hara, M., Kleinwächter, M., and Selmar D., *Plant Biol (Stuttg)*, **16**, 853-855 (2014).
- Tanaka, K., Matsumoto, K., Akasawa, A., Nakajima, T., Nagasu, T., Iikura, Y., Saito, H., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **129**, 49-56 (2002).

研究ノート

巨大糖タンパク質プロテオグリカンの小角 X 線散乱測定による特性解析

渡邊 康[§]

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒350-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

**Characterization of a large glycoprotein proteoglycan
by small-angle X-ray scattering measurement**Yasushi Watanabe[§]

[§]National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

The chain conformation of intact salmon cartilage proteoglycan in solution was characterized by using small-angle X-ray scattering measurement. Fractal analysis of small-angle X-ray scattering data revealed that the intact proteoglycan molecule is a chain with excluded volume (fractal dimension is 1.7) and a rod-like region as a local structure (fractal dimension is 1). The Kratky plots of the small-angle X-ray scattering data showed that the chain conformation of the cartilage proteoglycan molecules is an unfolded structure in solution. Moreover, the persistence lengths of the salmon and shark cartilage proteoglycan molecules are estimated to be 9 nm and 15 nm, respectively.

Key words: food biopolymer, solution property, physicochemical characterization

タンパク質は重要な食品構成成分であるため、食品科学および食品産業におけるタンパク質の特性解析は基盤的で重要な課題の一つである。プロテオグリカンはタンパク質に複数のオリゴ糖が結合した複合生体高分子であり、主として体内のあらゆる組織の細胞外マトリックス中に存在する¹⁾。その機能に関しては、ポリアニオンとしてポリカチオンや陽イオンと結合しイオンの膜透過性を調整することや、軟骨の耐圧性に関

与するなど生理的および物理的に重要な役割をしている¹⁾。しかし、プロテオグリカンは、分子量の巨大さ、高密度 (60-90% (w/w)) に大量の糖鎖が結合している複雑さから取扱および解析が難しいこともあり¹⁾、構造特性の基礎的知見は十分に得られていない。

我々は、鮫軟骨の主要成分であるプロテオグリカンは食品成分であり、その溶液物性の知見を得ることはその機能や有効利用を考える上で重要であると考え、

[§] 連絡先 (Corresponding author), yasuw@affrc.go.jp

溶液散乱法による鮫軟骨プロテオグリカンの溶液物性解析を行ってきた^{2),3)}。その結果として、中性子溶液散乱法による分子の内部構造解析からタンパク質が分子コアに存在し、溶液中の分子は細長い構造体であることを明らかにした²⁾。さらに、生理的な条件では、わずかな量の分子量数百万以上の超高分子成分と分子量200万前後の主要成分からなることが光散乱測定による分子量評価によりわかった³⁾。また、水溶液中の鮫軟骨プロテオグリカン主要成分は、ほどけた構造で、高分子鎖の堅さの指標である持続長は13-16 nmであることも明らかにした³⁾。

本研究では、軟骨プロテオグリカンの物理的役割の理解のためにはその溶液構造特性の解明が不可欠と考え、まだ溶液構造特性の報告のない鮭軟骨プロテオグリカン^{4),5)}について、放射光小角X線散乱測定による溶液中の分子鎖構造解析を行った。また、本研究は溶液散乱法による複合タンパク質の構造解析を通して、広く食品関連生体高分子素材の溶液構造の解析に資する研究手法の提示も目的とした。その結果、溶液中の鮭軟骨プロテオグリカンは、排除体積をもつ高分子鎖と棒状の局所構造の特徴をそなえた柔軟な構造体であることがわかった。その鮭軟骨プロテオグリカンの持続長は、9 nmと評価された。また、標準的な静的（時分割測定でない）溶液X線散乱法により鮫軟骨プロテオグリカンの持続長は15 nmと評価され、先に報告した溶液X線散乱クロマトグラフィーによる結果³⁾と一致し、評価値の再現性が確認できた。これらの結果は、鮭軟骨プロテオグリカンは、鮫軟骨プロテオグリカンに比べて溶液中の分子鎖の柔軟性が高いことを示唆していて、今後その機能を考察する上で重要な知見となることが期待できる。

実験方法

鮭軟骨プロテオグリカンは、和光純薬（株）（東京）から購入し、鮫軟骨プロテオグリカンは鮫ひれ軟骨から精製した^{2),3)}。試料溶液は50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.8,を溶媒とし、濃度は乾燥重量法により決定した⁶⁾。

分子鎖構造は小角X線散乱測定により評価した。放射光溶液X線散乱測定は、鮭軟骨プロテオグリカンについては、高エネルギー加速器研究機構放射光施設ビームライン10Cに設置された小角X線散乱測定装置（酵素回折計）を使用した^{6)~9)}。検出器は一次元位置敏感比例係数装置（リガク（株）、東京）を用い、X線

の波長は0.1488 nm、試料検出器間距離は900 mmに設定した。試料セルはステンレス製で、厚み1 mm、縦3 mm、横15 mmの穴の両面に石英板（厚み20 μm 、縦6 mm、横20 mm）を窓材として貼ったものを使用し、測定時間は10分とした。一方、鮫軟骨プロテオグリカンについては、高輝度光科学研究センター SPring8のビームライン45X Uの小角X線散乱測定装置を利用した。検出器はイメージングプレート自動読み取り装置 R-Axis IV++（リガク（株））を用い、X線の波長は0.09 nm、試料検出器間距離は3500 mmに設定した。試料セルはステンレス製で、厚み3 mm、縦3 mm、横5 mmの穴の両面に厚み20 μm の石英板を窓材として貼ったものを使用し、試料濃度は3.7 mg/mLで測定時間は1分とした。

どちらも、試料セルホルダーを恒温水循環装置に接続し試料セル温度を24°Cに保持した。得られた散乱データは、試料直前のイオンチェンバーの出力により入射X線強度の補正を行った。溶質の散乱データは溶液の散乱強度から溶媒の散乱強度を差し引いた値とした。鶏の腱から取り出したコラーゲン繊維束を標準物質として、検出器のチャンネルを散乱ベクトル $q (=4\pi \cdot \lambda^{-1} \sin \theta)$ 、 λ はX線波長、 2θ は散乱角)に変換した。

実験結果と考察

本研究において、溶液構造特性について報告のない鮭軟骨プロテオグリカンを主な対象とし、生理的条件下で生のままの溶液中の分子鎖構造を調べるために放射光小角X線散乱測定を行った。小角X線散乱法は低分解能ではあるが溶液中のタンパク質の構造情報を得られる手法である^{6)~9)}。近年の放射光の発展により¹⁰⁾、比較的低濃度の試料での溶液散乱実験が可能となった^{6)~9)}。図1に鮭軟骨プロテオグリカンの1.8-15 mg/mLの濃度における濃度補正後の散乱パターン（散乱ベクトル q に対する散乱強度のプロット）を示す。この図から、この濃度範囲では低濃度であるほどデータのバラツキは大きいものの散乱パターンの差は見られないので、顕著な会合はなくこの溶媒条件で試料は測定時間内では十分に分散していることがわかる。鮭軟骨プロテオグリカンの分子量は200万程度と推定されていることから⁴⁾、この小角X線散乱装置の小角分解能では十分でないためサイズや分子量の評価には適さない。そこで、小角分解能を要求しない分子鎖構造の解析を行った。次の(1)式の様散乱強度 I が散乱ベクトル q のべき乗に比例する領域が散乱測定から得られる¹²⁾。

$$I \sim q^{-D} \quad (1)$$

ここで D はフラクタル次元である。すなわち、図2の様な散乱ベクトル q と散乱強度 I の両対数プロットで得られる直線の傾きから、溶質構造体のフラクタル次元が得られる。図2中の直線の傾きは、小角領域つまり散乱ベクトル q が小さい方から、1.7、1.0および1.4を表している。この散乱データから鯨軟骨プロテオグリカン分子のフラクタル次元が、散乱ベクトル q が 0.15 nm^{-1} から 0.25 nm^{-1} 付近の領域ではほぼ1.7に近似できる。フラクタル次元 1.67 ($\approx 5/3$) は、排除体積を持った高分子鎖構造を表している¹¹⁾。また、散乱ベクトル q

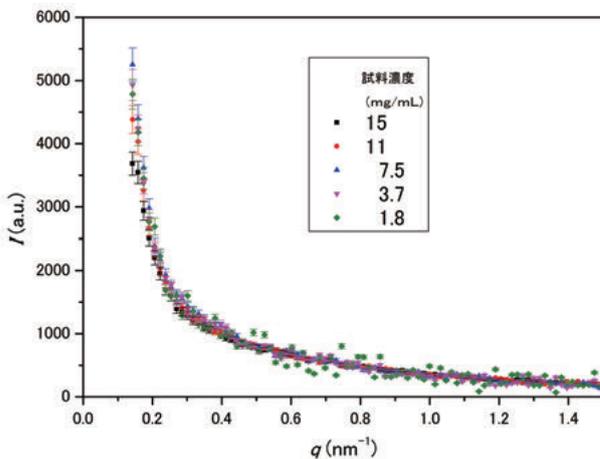


図1. 鯨軟骨プロテオグリカンの溶液X線散乱パターン
各データに対応する試料濃度は図中に示している。

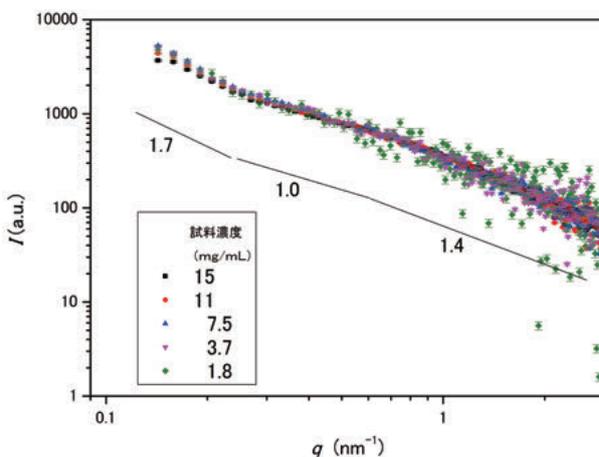


図2. 鯨軟骨プロテオグリカンの溶液X線散乱データの両対数プロット

測定条件は図1と同じである。図中の直線は散乱ベクトル q が小さい方から、傾きが1.7、1.0および1.4を表している。

が 0.25 nm^{-1} から 0.6 nm^{-1} の領域は傾きが1.0に近似でき、散乱ベクトル q の 0.6 nm^{-1} 以上の領域の傾きは1.4と近似できる。棒状分子のフラクタル次元は1.0で、ランダムコイル状態のフラクタル次元は2であるので¹²⁾、プロテオグリカン分子の局所構造特性はランダムコイル状態より棒状であることを示唆している。つまり、鯨軟骨プロテオグリカン分子の構造体のイメージは、分子全体としてはガウス鎖よりわずかに広がったフレキシブルな細長い分子鎖である。プロテオグリカンの高密度に結合した糖鎖はマイナス荷電をもつ。その糖鎖が密集する部分は互いに静電的に反発し合い、分子鎖が適度に広がった構造を持ち、微視的な構造単位としては棒状構造を持っていると考えられる。

さらに、図3に示す様に、散乱ベクトル q と $q^2 \cdot I$ の関係のクラツキープロット¹³⁾から、そのデータポイントは小角領域（散乱ベクトル q が 0.5 nm^{-1} 以下）では右上がりでありそれより小角領域に屈曲点 q^* が観察される。この屈曲点の値 q^* と高分子鎖の硬さの指標である持続長 L_p は式(2)の関係がある¹⁴⁾。

$$L_p = 2\pi \cdot (2.73 \cdot q^*)^{-1} \quad (2)$$

鯨軟骨プロテオグリカンについての屈曲点は 0.25 nm^{-1} なので、溶液中の分子鎖の持続長は 9 nm と計算できる。一方、鯨軟骨プロテオグリカンについては、先に溶液X線散乱クロマトグラフィーによりその持続長は $13\text{--}16 \text{ nm}$ と報告した³⁾。本研究ではその評価値の再現性の確認のため時分割測定でない小角X線散乱測定を

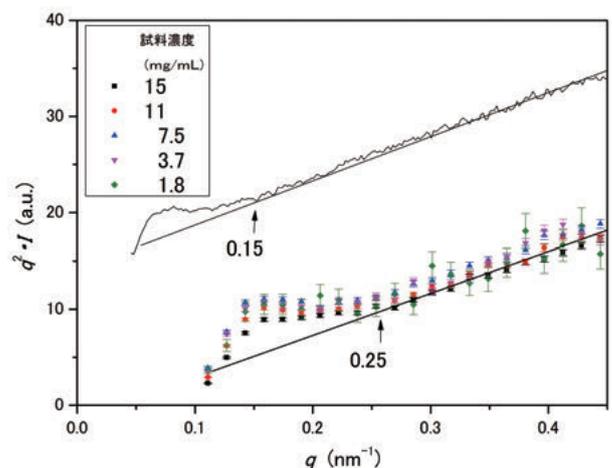


図3. 軟骨プロテオグリカンの溶液X線散乱データのクラツキープロット

鯨軟骨プロテオグリカンの測定条件は図1と同じである。鯨軟骨プロテオグリカンのデータは実線で示した。各軟骨プロテオグリカンのデータで観察される屈曲点 q^* を示した。

行った。図3にはその測定データのクラツキープロットを示しており、屈曲点 q^* が 0.15 nm^{-1} なので、持続長は (2) 式により 15 nm と計算できる。たとえば棒状ウイルスやヒアルロン酸の持続長は、それぞれ 880 nm ¹⁵⁾ と 4 nm ¹⁶⁾ と報告されている。この結果から、軟骨プロテオグリカンは棒状ウイルスほど剛直でないものの、ヒアルロン酸よりは柔軟性に欠ける。また、鮭軟骨プロテオグリカン分子鎖は鮫軟骨プロテオグリカンより溶液中の柔軟性が高いことがわかる。鮫軟骨プロテオグリカンの持続長の値は、先に報告した溶液X線散乱クロマトグラフィーによる結果³⁾と一致し、評価値の再現性が確認できた点は意義深い。この柔軟性は、これら分子の保水性と関連すると考えられるので、今後その物理的機能と構造の関係をさらに探求することは重要な課題である。

さらに、細長い構造体が示唆される場合は、円柱体構造を仮定した断面プロット (q^2 対 $\ln(I \cdot q)$) の中角領域の直線の傾きより次の (3) 式から円柱体の断面の回転半径 R_{gc} を評価し、構造について考察できる¹⁰⁾。

$$I \cdot q \sim \exp(-R_{gc}^2 \cdot q^2 \cdot 2^{-1}) \quad (3)$$

図4の直線の傾きより鮭軟骨プロテオグリカン分子の断面の回転半径は、実験で使用した濃度の範囲ではほぼ一定で、平均値は $0.50 \pm 0.04 \text{ nm}$ ($n=5$) で円柱の半径は 0.7 nm と計算できる。一方、鮫軟骨プロテオグリカンの断面の回転半径および円柱の半径は、試料濃

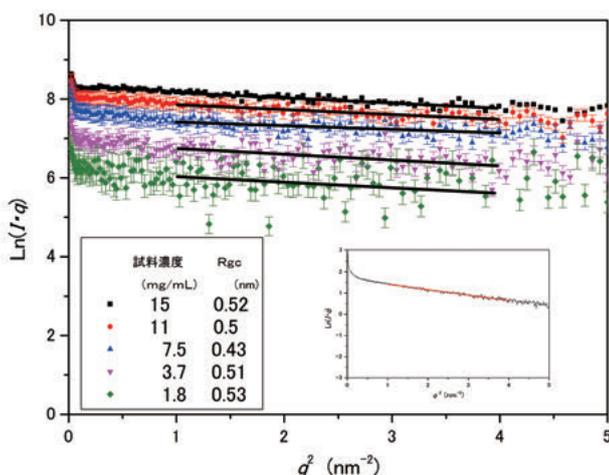


図4. 軟骨プロテオグリカンの断面プロット

鮭軟骨プロテオグリカンについて、各濃度データの違いを明確にするため散乱強度 I は試料濃度補正をしていない。その他の測定条件は図1と同じである。鮫軟骨プロテオグリカンの断面プロットを挿入図に示した。各図中の直線は計算に使用した領域を示す。

度が 3.7 mg/mL において 0.71 nm および 1 nm と評価される。鮭軟骨プロテオグリカンの回転半径は報告がないのでこれ以上の議論はできないが、鮫軟骨プロテオグリカンの回転半径は 25.3 nm である²⁾ ので、分子の長さは 88 nm と計算できる。この結果は電子顕微鏡によりプロテオグリカン分子の細長い構造体が観察されていることと矛盾しない¹⁾。

NMRはタンパク質の溶液構造を原子レベルで解析できる手法である¹⁷⁾。しかし、タンパク質の分子量が大きくても数万、通常は2万以下のものが主な対象となる。分子量数十万以上のタンパク質の溶液構造解析は、食品分野のタンパク質の有効利用のためには不可欠な課題である。溶液散乱の長所は、生理的な条件ばかりでなく種々の溶媒条件での測定が可能である点である^{6)~9)}。従って、溶液散乱法は、タンパク質の会合状態やゲル化初期過程あるいは分子間相互作用による超分子構造の解明に効果的に利用されることが期待される。さらに、タンパク質ばかりでなく多糖などの生体高分子についても本手法を適用することにより食品分野での生体高分子成分の特性解明への貢献が期待できる。今後、さらに適応例を増やすとともに、生体高分子の物性評価に適した手法の改良も重要な課題と考えられる。

謝辞

本研究の一部は、JSPS科研費24550111の助成を受けた。小角X線散乱測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光共同利用実験課題(2011G098および2013G099)として行った。また、高輝度光科学センターの小角X線散乱測定は、SPring-8量子ビーム施設震災優先枠課題番号2011A1927として行った。

要約

本研究では、食品関連糖タンパク質である軟骨プロテオグリカンについて、その機能の考察に重要な溶液構造特性を解明するために、放射光小角X線散乱測定による分子鎖構造解析を行った。その結果、溶液中の鮭軟骨プロテオグリカンは、棒状の局所構造特性を持つ細長いフレキシブルな構造体であることがわかった。さらに、分子鎖の溶液中の堅さの指標である持続長は、鮭軟骨および鮫軟骨のプロテオグリカンについて、それぞれ 9 nm と 15 nm と評価した。

文献

- 1) R.K.Murray and F.W.Keeley, The extracellular matrix. In "Harpers Illustrated Biochemistry", 29th ed., R.K.Murray, D.A.Bender, K.M.Botham, P.J.Kennelly, V.W.Rodwell, P.A.Weil, McGraw-Hill Medical, pp589-607 (2012) .
- 2) Y.Watanabe, I.Tanaka, Y.Sano and N.Niimura, Small-angle neutron scattering study on a proteoglycan in solution, *J.Phys.Soc.Japan*, **70**, 414-416 (2001) .
- 3) Y.Watanabe and Y.Inoko, Characterization of a large glycoprotein proteoglycan by size-exclusion chromatography combined with light and X-ray scattering methods, *J.Chromatogr.A*, **1303**, 100-104 (2013) .
- 4) I.Kakizaki, Y.Tatara, M.Majima, Y.Kato and M.Endo, Identification of proteoglycan from salmon nasal cartilage, *Arch.Biochem.Biophys.*, **506**, 58-65 (2011) .
- 5) Y.Tatara, I.Kakizaki, Y.Kuroda, S.Suto, H.Ishioka and M.Endo, Epiphygan from salmon nasal cartilage is a novel type of large leucine-rich proteoglycan, *Glycobiology*, **23**, 993-1003 (2013) .
- 6) Y.Watanabe and Y.Inoko, Small-angle light and X-ray scattering measurements of a protein-oligosaccharides complex mucin in solution, *J.Appl.Crystallogr.*, **40**, s209-s212 (2007) .
- 7) 渡邊 康, 猪子洋二, 小林克巳, タンパク質の放射光溶液X線散乱測定におけるX線透過率の同時評価, *食品総合研究所研究報告*, **69**, pp19-22 (2005) .
- 8) 渡邊 康, 猪子洋二, タンパク質のクロマトグラフィ検出手段としての溶液X線散乱測定, *食品総合研究所研究報告*, **70**, pp1-5 (2006) .
- 9) 渡邊 康, 猪子洋二, 両親媒性環境下の疎水性タンパク質の分子集合状態の特性評価, *食品総合研究所研究報告*, **71**, pp33-37 (2007) .
- 10) I.Pilz, Proteins.In "Small angle X-ray scattering", eds. O.Glatter and O.Kratky, Academic Press, pp239-293 (1982) .
- 11) 菊田惺志, 放射光光源, 「X線回折・散乱技術(上)」, 初版(東京大学出版会, 東京), pp176-200 (1997) .
- 12) T.G.Dewey, *Fractals in Molecular Biophysics*, Oxford Univ.Press (1997) .
- 13) O.Kratky, Natural high polymers in the dissolved and solid state.In "Small angle X-ray scattering", eds. O.Glatter and O.Kratky, Academic Press, pp361-386 (1982) .
- 14) L.E.Alexander, *X-ray diffraction methods in polymer science*, John Wiley & Sons (1969) .
- 15) M.Hagenbüchle, B.Weyerich, M.Deggelmann, C.Graf, R.Krause, E.E.Maier, S.F.Schultz, R. Klein, and R. Weber, Static light scattering by aqueous solutions of rodlike fd-virus particles, *Physica A* **169**, 29-41 (1990) .
- 16) R.L.Cleland, The persistence length of hyaluronic acid: An estimate from small-angle X-ray scattering and intrinsic viscosity, *Arch.Biochem.Biophys.*, **180**, 57-68 (1977) .
- 17) K.Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley & Sons (1986) .

技術報告

ひじき粉末中の総ヒ素, カドミウム, 鉛及び必須無機元素の2008年度技能試験結果

内藤成弘^{1§}, 成川知弘², 安井明美¹

¹ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

² 独立行政法人産業技術総合研究所計量標準総合センター

〒305-8563 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第3

Results of the proficiency testing program for determination of total arsenic, cadmium, lead and essential inorganic elements in hijiki seaweed powder in 2008

Shigehiro Naito^{1§}, Tomohiro Narukawa² and Akemi Yasui¹

¹ National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

² National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba Central 3, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8563, Japan

Abstract

National Food Research Institute, NARO provided a proficiency testing program for determination of total arsenic, cadmium, lead and nine essential inorganic elements in hijiki seaweed powder in 2008. A candidate reference material produced at National Metrology Institute of Japan was used as this test material. Reported values from 26 laboratories were analyzed according to the International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. Total arsenic, cadmium, lead and seven essential inorganic elements except for manganese and phosphorus, that is, iron, zinc, copper, sodium, potassium, magnesium and calcium had at least one reported value with $|z \text{ score}| > 3$. The largest number (eight) of reported values with $|z \text{ score}| > 3$ was found for total arsenic and these all values were negatively biased. Robust relative standard deviations (Huber H15) calculated from reported values of each element indicated that the reported values of cadmium and lead were more varied than those of other elements.

Keywords: proficiency testing, hijiki seaweed, total arsenic, cadmium, lead, essential inorganic elements

Key words: 技能試験, ひじき, 総ヒ素, カドミウム, 鉛, 必須無機元素

[§]連絡先 (Corresponding author), naito@affrc.go.jp

技能試験¹⁾²⁾への参加は、試験所認定³⁾⁴⁾や食品衛生法上の検査機関登録の必須条件⁵⁾であり、農林水産省の実態調査等で定量分析を受託する分析機関も技能試験への参加を要求されている¹⁾。これは、コーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission) が、食品の輸出入に係わる試験所への要求事項の一つとして、適切なプロフィシエンシテスティング (技能試験) への参加を挙げており⁶⁾、第三者が実施する技能試験に参加することが分析値の信頼性確保の一つの方法として国際的に認識されているためである。

欧州技能試験データベースEPTIS (European Proficiency Testing Information System)ⁱⁱ⁾によると、食品・飲料の分析化学の技能試験は、27カ国の海外プロバイダー 88機関から515プログラム (FAPASⁱⁱⁱ⁾ 提供のプログラムはEPTISでは1プログラムに集約)、食品・飲料の微生物検査の技能試験は、17カ国の海外プロバイダー 34機関から103プログラム (FEPASⁱⁱⁱ⁾ 提供のプログラムはEPTISでは1プログラムに集約) が提供されている。しかし、海外プロバイダーが提供する技能試験では、防疫上の理由から試料の日本への輸入が許可されず国内の試験室が参加できない場合や、国内で関心の高い試料・成分のプログラムが定期的に提供されていない場合がある。一方、国内で提供されている食品分析の技能試験^{iv)~ix)}は、対象食品・成分に限りがある。そこで、(独)農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所では、食品からの摂取量低減のための行政的施策が実施されているカドミウムについて、国内で関心の高い米をマトリックスに選択し、さらに食事摂取基準等に関連して分析機会の多い必須無機元素も対象成分に加えた技能試験を2006年度から2010年度まで年1回提供した^{7)~9)}。2011年度から2013年度では、(独)産業技術総合研究所計量標準総合センター (NMIJ) が生産した玄米粉末中の無機元素の候補標準物質を用いた技能試験を計量標準総合センター (NMIJ) と共催で年1回提供した¹⁰⁾。

技能試験では、実施者が均質な試料を参加試験室に配付し、各試験室は任意の方法で分析後、実施者に分析値を提出する。実施者は分析値の評価結果(かたより)を示した報告書を各参加試験室に送付するので、参加試験室はかたよりの大小によって各自の技能を確認し、他の試験室の分析方法などを参考にして、技能試験の結果を分析技能の向上に役立てることができる。技能試験の結果は参加者だけに報告されるのが原則のため、参加者以外が技能試験結果の情報を入手することは一般的には制限されている。しかし、測定値の分布

や使用された測定法に関する情報など、技能試験結果には参加者以外にとっても有益な情報が多く含まれる。また、技能試験への参加の必要性を啓発するためにも、技能試験結果を多くの人に知ってもらう必要がある。そこで、本報告では、計量標準総合センター (NMIJ) が微量元素分析用ひじき粉末標準物質に関する研究開発の中で生産した候補標準物質を用いたひじき粉末中の総ヒ素、カドミウム、鉛及び必須無機元素の技能試験を2008年度に実施した結果について報告する。

実験方法

1. 試料

ひじき粉末試料は、(独)産業技術総合研究所計量標準総合センター (NMIJ) が微量元素分析用ひじき粉末標準物質に関する研究開発の中で生産した候補標準物質である。候補標準物質は、ひじき粉末約20 gをガラス製褐色ビンに詰め、防カビ対策としてガンマ線照射を行い、その後にアルミコート袋に減圧シーリングしたものを、配付まで常温保管したものである。候補標準物質について計量標準総合センター (NMIJ) は標準物質の認証作業を進め、認証標準物質 NMIJ CRM 7405-a^{11), x)}として2010年4月より頒布中である^{xi)}。

候補標準物質の乾燥重量補正係数は、均質性確認時に試料約1.0 gを秤量ビンに分取し (n=4)、85℃のオープン内で一晚(約12~15時間)乾燥させた際の減少量から求めた。10本のビンに分注した試料について各4回測定した乾燥重量補正係数の総平均値は94.33% (質量分率)、各試料の平均値 (n=4) の標準偏差 (n=10) は0.28% (質量分率)、相対標準偏差は0.30%であった。

2. 均質性確認

均質性の確認は、計量標準総合センター (NMIJ) における候補標準物質の生産過程で行った。金属元素の均質性確認試験では、500本の候補標準物質に通し番号を振り、均等間隔に10本を抜き取り、抜き取った試料ビンについて4回サンプリングした。硫黄及び塩素の均質性確認試験では、500本の候補標準物質から均等間隔に6本を抜き取り、抜き取った試料ビンについて5回サンプリングした。

候補標準物質における金属元素の均質性確認試験では、前処理に硝酸-過塩素酸-ふっ酸を用いたマイクロ波湿式分解を用いて試料溶液を調製した。硫黄及び塩素の均質性確認試験では、前処理操作をせずに測定に用いた。

総ヒ素、鉄、亜鉛、銅、マンガン、ナトリウム、カ

リウム、マグネシウム、カルシウム及びリンの均質性確認試験では各JCSS標準液を検量線作成に用い、誘導結合プラズマ発光分光分析法（以下、ICP発光法と略記）で測定を行った。カドミウム及び鉛の均質性確認試験では各JCSS標準液を検量線作成に用い、誘導結合プラズマ質量分析法（以下、ICP質量法と略記）で測定を行った。硫黄及び塩素の均質性確認試験は、エネルギー分散型蛍光X線分析法で測定を行った。

均質性の判定は、IUPACの技能試験に関するハーモナイズドプロトコル¹⁾（以下、ハーモナイズドプロトコルと略記）の推奨7及び8の手順に従った。

3. 測定対象成分

測定対象成分は総ヒ素、カドミウム、鉛、鉄、亜鉛、銅、マンガン、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、リン、硫黄及び塩素について任意とした。また、元素測定に併行して、日本食品標準成分表が藻類の乾燥品で採用している試料量5 g、105℃、5時間の常圧通風加熱乾燥法¹²⁾の試料量を1 gに変更して水分測定を行うことを要求した。

4. 配付

試料は2008年10月14日に28試験室へ発送した。試料番号がラベルされた試料ビンとともに実施要領、試験結果報告用紙、分析方法報告用紙を参加者に送付した。報告の締め切りは2009年1月5日とした。

5. 統計解析

統計解析の手順は、ハーモナイズドプロトコル¹⁾に従った。ただし、外れ値検出には、ハーモナイズドプロトコル¹⁾に例として記載されている中央値±50%超の値を外れ値とする方法以外に、ナトリウム及びカルシウムについては箱ひげ図¹³⁾も用いた。箱ひげ図は、中央値±50%超の外れ値除去後に、付与値の不確かさに関するハーモナイズドプロトコル¹⁾の条件を満たさず、かつ箱ひげ図による外れ値（ナトリウムは新鮮重当たり1個、乾物重当たり1個、カルシウムは新鮮重当たり5個、乾物重当たり4個）が検出された場合に用いた。カルシウムは、付与値の不確かさに関するハーモナイズドプロトコル¹⁾の条件を満たすまで、全データの中央値からのかたよりが大きい順に外れ値を除去した。

zスコアを計算するときの標準偏差は、水分及び各元素の付与値又は参考値をHorwitzの式¹⁴⁾¹⁵⁾に代入して計算した。加熱乾燥法を用いる水分測定法は経験的分析法のため、得られた水分値はAOAC Internationalの

ガイドライン^{xii)}ではHorwitzの式の適用外である。しかし、Horwitzら¹⁶⁾は、水分の室間再現標準偏差のデータにもHorwitzの式が当てはまることを報告している。そこで、水分データの解析でもHorwitzの式を用い、その結果は参考とした。付与値を求めるための計算から除外した試験室についても、参考値としてzスコアを計算した。解析にはExcel2007及びフリーウェアのR2.8.1^{xiii)}を用いた。

技能試験の結果

試料重に水分含量を含む新鮮重（生重量）当たりの元素濃度はmg/kg fw又はg/kg fw、試料の水分含量を補正した乾物重（乾重量）当たりの元素濃度はmg/kg dw又はg/kg dwと示す。

1. 配付試料の均質性

ハーモナイズドプロトコル¹⁾に従って均質性確認試験を行った結果、14元素は均質であった（表1）。ハーモナイズドプロトコル¹⁾では、均質性確認試験に用いる分析法の併行標準偏差 s_p は、目的に適合した技能評価のための標準偏差 σ_p の1/2以下の値であることを推奨している。食品分析分野でHorwitzの式が適用可能な化学分析法については、 σ_p にHorwitzの式を用いて計算した室間再現標準偏差の予測値を用いる。この試験の均質性確認試験における併行標準偏差は、すべての元素で σ_p の1/2以下であった。

2. 報告数と参加機関

締め切り日までに20試験室、締め切り後に6試験室の合計26試験室から分析値が報告された。26試験室の所属先による分類を表2に示す。

3. 報告値の解析結果

回収率の測定は行っておらず、元素の報告値は回収率によって補正していない。報告数の少ない硫黄（4試験室）及び塩素（1試験室）の報告値はデータ解析から除外した。各試験室から報告された値、分析試料量、分析法、水分は以下の通りである。硫黄：①6.62 g/kg fw, 0.01 g, 炭素・硫黄分析装置（管状炉1450℃設定、非分散式赤外線検出器）、6.52%（質量分率）；②14.1 g/kg fw, 0.250 g, マイクロ波湿式分解（硝酸）、ICP発光法（182.6 nm）、8.10%（質量分率）；③14.7 g/kg fw, 0.2 g, マイクロ波湿式分解（硝酸）、ICP発光法（181.975 nm）、8.18%（質量分率）；④20.7 g/kg fw, 0.547 g, マイクロ

表1. 配付試料の均質性確認試験の結果

測定対象成分 ^{a)}	平均値	s_r ^{c)}	s_{bb} ^{d)}	u_{bb} ^{e)}	均質性由来の 標準不確かさ ^{f)}	合成標準 不確かさ ^{g)}	合成相対標準 不確かさ (%)
As (mg/kg dw) ^{b)}	34.9	0.5	0.5	0.1	0.5	0.7	2.0
Cd (mg/kg dw)	0.80	0.01	0	0.002	0.002	0.01	1.2
Pb (mg/kg dw)	0.44	0.01	0.005	0.003	0.005	0.01	2.5
Fe (mg/kg dw)	277	3	2	1	2	3	1.2
Zn (mg/kg dw)	12.7	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	2.1
Cu (mg/kg dw)	1.44	0.02	0.01	0.01	0.01	0.03	1.8
Mn (mg/kg dw)	12.5	0.1	0.1	0.03	0.1	0.2	1.4
Na (g/kg dw)	16.0	0.1	0.1	0.02	0.1	0.1	0.7
K (g/kg dw)	47.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.5
Mg (g/kg dw)	6.77	0.02	0.03	0.01	0.03	0.04	0.5
Ca (g/kg dw)	15.3	0.1	0.05	0.01	0.05	0.1	0.5
P (g/kg dw)	0.945	0.012	0.018	0.003	0.018	0.022	2.3
S (g/kg dw)	13.8	0.2	0	0.1	0.1	0.2	1.6
Cl (g/kg dw)	16.6	0.2	0	0.1	0.1	0.2	1.4

a) mg/kg dw 又は g/kg dw : 試料の水分含量を補正した乾物重 (乾重量) 当たりの元素濃度

b) 総ヒ素

c) 併行標準偏差

d) 試料ビン間の均質性標準偏差. s_{bb} が負の値になる Cd, S 及び Cl の場合は 0 とみなした.

e) JIS Q 0035:2008 に記載された併行精度の不十分さを考慮した試料ビン間の均質性標準偏差の最大推定値

f) JIS Q 0035:2008 に従い d) と e) の大きい方を採用

g) c) と f) を合成した標準不確かさ

表2. 参加者の所属先による分類

所属先	参加者数
独法研究・検査機関	4
都道府県の研究機関	3
依頼分析受託機関	11
民間会社	3
大学	5
計	26

波湿式分解 (硝酸), ICP発光法 (180.7 nm), 6.5% (質量分率). 塩素: 20.3 g/kg fw, 0.9024 g, 乾式灰化 (550 °C, 1時間), モール法, 6.52% (質量分率).

各参加試験室から報告された水分 (% (質量分率)) 及び各元素の新鮮重当たりの測定値の分布を図1に示す. ハーモナイズドプロトコル¹⁾に従って報告値から求めた付与値及び標準不確かさ, zスコアの分布を表3に示す. 表3には, 報告された水分で補正した乾物重当たりの測定値の解析結果も示す. 水分及びナトリウムの値は, 新鮮重当たり及び乾物重当たりの両方ともにばらつきが大きく, ハーモナイズドプロトコル¹⁾に従った付与値 (Huberのロバスト平均値, 又はデータ分布を正規分布カーネルで推定したカーネル密度の最頻値) を決定できなかった. そこで, 外れ値のなかった水分については全データの中央値を, 箱ひげ図¹³⁾で外れ値が1個認められたナトリウムについては, 外れ

値除去後のデータの中央値をそれぞれ参考値に採用した. 参考値については, その標準不確かさは計算しなかった. 鉛, 銅, カルシウム及びリンについては, ハーモナイズドプロトコル¹⁾に従って付与値 (Huberのロバスト平均値) を決定できたが, 有効データ数が15個未満¹⁾のため参考値とした.

表3の各元素の1回測定 of 相対標準不確かさは, 複数の試験室が任意の分析法を用いたときの不確かさを示しており, 複数の試験室が同じ分析法を用いる室間再現標準偏差よりも大きくなる変動要因を含んでいる. しかし, 室間再現相対標準偏差の大きさの評価指標である HorRat (R)¹⁷⁾ を表3の1回測定 of 相対標準不確かさについて計算すると 0.5 ~ 1.3 であり, Horwitz の式で予想される室間再現標準偏差と同程度 (0.5 ~ 1.3 倍) の大きさであった.

考察

1. 報告値の分布

水分, マンガン及びリン以外の10元素に, 技能評価で「疑わしい」と判定される $2 < |z\text{スコア}| \leq 3$ の報告値又は「不満足」と判定される $|z\text{スコア}| > 3$ の報告値が存在した (図1). 12元素中の10元素で, $|z\text{スコア}| > 3$ となるかたよりの大きい報告値が存在することは, 定量分

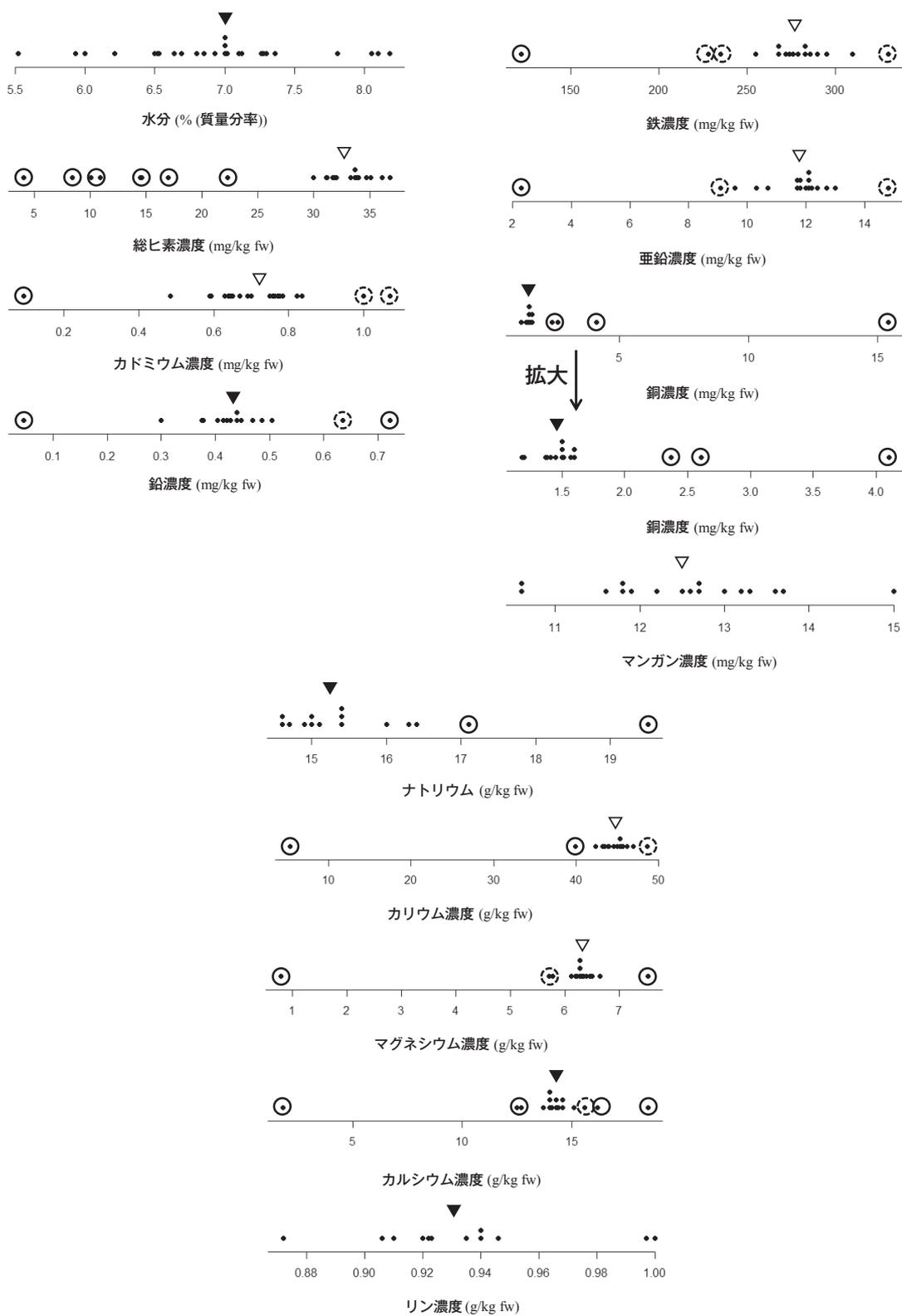


図1. 報告値のドットプロット

一つのドットは一つの報告値を示す。

- : $|z \text{ スコア}| > 3$ の報告値, ⊙ : $2 < |z \text{ スコア}| \leq 3$ の報告値
- 水分, 鉛, 銅, ナトリウム, カルシウム及びリンの z スコアは参考値
- ▽ : 付与値, ▼ : 参考値

表3. 技能試験結果

測定対象成分 ^{a)}	有効データ数 ^{e)}	付与値 ^{f)}	付与値の 標準不確かさ ^{g)}	1回測定の 標準不確かさ ^{h)}	1回測定の 相対標準不確かさ(%)	HorRat(R)	全スコア数	$ z$ スコア $ \leq 2$ の 試験室数	$ z$ スコア $ \leq 2$ の率(%)
水分 (% (質量分率)) ^{b,c)}	(26)	(7.00)	計算不可	計算不可	計算不可	計算不可	(26)	(26)	(100)
As (mg/kg fw) ^{d)}	18	32.7	0.6	2.5	7.6	0.8	24	16	67
Cd (mg/kg fw)	21	0.72	0.02	0.11	15.3	0.9	22	19	86
Pb (mg/kg fw) ^{e)}	(14)	(0.43)	(0.02)	(0.06)	(14.0)	(0.7)	(16)	(13)	(81)
Fe (mg/kg fw)	16	277	6	22	7.9	1.2	17	13	76
Zn (mg/kg fw)	17	11.8	0.3	1.1	9.3	0.8	18	15	83
Cu (mg/kg fw) ^{e)}	(13)	(1.46)	(0.04)	(0.13)	(8.9)	(0.6)	(17)	(13)	(76)
Mn (mg/kg fw)	17	12.5	0.3	1.1	8.8	0.8	17	17	100
Na (g/kg fw) ^{e)}	(14)	(15.3)	計算不可	計算不可	計算不可	計算不可	(15)	(13)	(87)
K (g/kg fw)	15	44.7	0.5	1.8	4.0	1.3	16	13	81
Mg (g/kg fw)	16	6.31	0.05	0.22	3.5	0.8	17	14	82
Ca (g/kg fw) ^{e)}	(13)	(14.3)	(0.2)	(0.6)	(4.2)	(1.1)	(17)	(11)	(65)
P (g/kg fw) ^{e)}	(12)	(0.932)	(0.009)	(0.032)	(3.4)	(0.6)	(12)	(12)	(100)
As (mg/kg dw) ^{d)}	18	35.2	0.6	2.7	7.7	0.8	24	16	67
Cd (mg/kg dw)	21	0.78	0.03	0.12	15.4	0.9	22	19	86
Pb (mg/kg dw) ^{e)}	(14)	(0.47)	(0.02)	(0.06)	(12.8)	(0.7)	(16)	(13)	(81)
Fe (mg/kg dw)	16	298	6	25	8.4	1.2	17	13	76
Zn (mg/kg dw)	17	12.7	0.3	1.2	9.4	0.9	18	15	83
Cu (mg/kg dw) ^{e)}	(13)	(1.57)	(0.04)	(0.13)	(8.3)	(0.6)	(17)	(13)	(76)
Mn (mg/kg dw)	17	13.4	0.3	1.2	9.0	0.8	17	17	100
Na (g/kg dw) ^{e)}	(14)	(16.4)	計算不可	計算不可	計算不可	計算不可	(15)	(13)	(87)
K (g/kg dw)	15	48.1	0.5	1.8	3.7	1.2	16	13	81
Mg (g/kg dw)	16	6.77	0.07	0.27	4.0	0.9	17	14	82
Ca (g/kg dw) ^{e)}	(13)	(15.4)	(0.2)	(0.6)	(3.9)	(1.0)	(17)	(11)	(65)
P (g/kg dw) ^{e)}	(12)	(1.00)	(0.01)	(0.03)	(3.0)	(0.5)	(12)	(12)	(100)

a) mg/kg fw 又は g/kg fw : 試料重に水分含量を含む新鮮重 (生重量) 当たりの元素濃度。

mg/kg dw 又は g/kg dw : 試料の水分含量を補正した乾物重 (乾重量) 当たりの元素濃度

b) zスコアの計算に Horwitz の式を用いたため、参考値として () で示した。

c) ハーモナイズドプロトコル¹⁾に従って付与値を決定できなかったため、解析結果はすべて参考値として () で示した。

Pb, Cu, Ca 及び P は有効データ数の条件 (15 個以上) を満たさず、Na は付与値の不確かさの条件及び有効データ数の条件を満たさなかった。

d) 総元素

e) 付与値を決定したデータ数

f) 水分及び Na(mg/kg fw, mg/kg dw) は有効データの中央値、他の元素は Huber のロバスト平均値 (H15) を付与値に採用

g) 水分及び Na(mg/kg fw, mg/kg dw) 以外の元素は Huber のロバスト標準偏差 (H15) / $\sqrt{\text{有効データ数}}$ を採用

h) 水分及び Na(mg/kg fw, mg/kg dw) 以外の元素は Huber のロバスト標準偏差 (H15) を採用

析を行うすべての試験室は分析値のかたよりを定期的に点検する必要性を示している。

報告値のばらつきを表3の1回測定の相対標準不確かさを指標にして評価すると、報告値のばらつきの大きい元素はカドミウム (1回測定の相対標準不確かさ15%) 及び鉛 (1回測定の相対標準不確かさ14%) であった。これら2元素の濃度は0.1 mg/kgのオーダーであり、他の元素よりも濃度が低い。しかし、3回実施した精米粉末中無機元素の技能試験^{7)~9)}では、3回ともナトリウム (1 mg/kgオーダー) 及び鉄 (1 mg/kgオーダー) の報告値のばらつき (1回測定の相対標準不確かさ: ナトリウム 76%, 56%, 29%; 鉄 20%, 16%, 22%) が大きく、0.1 mg/kgオーダーのカドミウムの報告値のばらつき (1回測定の相対標準不確かさ: 9%, 6%, 8%) は大きくなかった。そのため、濃度が低いことだけが、ひじき粉末中カドミウム及び鉛の報告値のばらつきが

大きい原因ではないといえるが、原因は不明である。

2. 付与値と認証値の比較

この技能試験で配付した候補標準物質は、計量標準総合センター (NMIJ) が標準物質の認証作業を進め、認証標準物質 NMIJ CRM 7405-a^(11), x)として2010年4月より頒布中である^{xi)}。そこで、技能試験で決定した乾物重当たりの付与値又は参考値と認証値を比較した (表4)。各元素の付与値又は参考値と認証値の差は、付与値又は参考値の拡張不確かさ (ナトリウムの参考値の拡張不確かさは0とみなした) と認証値の拡張不確かさを合成した拡張不確かさ¹⁸⁾以下になり、12元素すべてについて付与値又は参考値と認証値に有意差は認められなかった ($p>0.05$)。

zスコアの計算に付与値又は参考値を用いた場合と認証値を用いた場合を比較すると、技能評価に影響を

表4. 技能試験の付与値又は参考値とNMIJ CRM 7405-aの認証値との比較

元素 ^{a)}	zスコアに 用いた値 ^{d)}	拡張不確かさ ^{e)}	全スコア数 ^{f)}	スコア数 ^{g)}			技能評価に影響 するzスコアの変化 ^{h)}	
				$ zスコア \leq 2$	$2 < zスコア \leq 3$	$3 < zスコア $		
As (mg/kg dw) ^{b)}	付与値	35.2	1.3	24	16	0	8	
	認証値	35.8	0.9	24	16	0	8	
Cd (mg/kg dw)	付与値	0.78	0.05	22	19	2	1	-2.0 から -2.1
	認証値	0.79	0.02	22	18	3	1	
Pb (mg/kg dw) ^{c)}	参考値	(0.47)	(0.03)	(16)	(13)	(1)	(2)	(2.5) から 3.1
	認証値	0.43	0.03	16	13	0	3	
Fe (mg/kg dw)	付与値	298	12	17	13	3	1	-2.8 から -3.3
	認証値	311	11	17	13	2	2	
Zn (mg/kg dw)	付与値	12.7	0.6	18	15	2	1	2.3 から 1.7
	認証値	13.4	0.5	18	15	2	1	-1.7 から -2.1
Cu (mg/kg dw) ^{c)}	参考値	(1.57)	(0.07)	(17)	(13)	(0)	(4)	
	認証値	1.55	0.07	17	13	0	4	
Mn (mg/kg dw)	付与値	13.4	0.6	17	17	0	0	
	認証値	14.1	0.7	17	17	0	0	
Na (g/kg dw) ^{c)}	参考値	(16.4)	-	(15)	(13)	(0)	(2)	(2.0) から 2.3
	認証値	16.2	0.2	15	12	1	2	
K (g/kg dw)	付与値	48.1	0.9	16	13	1	2	-3.4 から -3.0
	認証値	47.5	0.7	16	13	2	1	
Mg (g/kg dw)	付与値	6.77	0.13	17	14	1	2	
	認証値	6.79	0.10	17	14	1	2	
Ca (g/kg dw) ^{c)}	参考値	(15.4)	(0.4)	(17)	(11)	(1)	(5)	(-3.3) から -3.0
	認証値	15.2	0.3	17	11	3	3	(-3.1) から -2.8
P (g/kg dw) ^{c)}	参考値	(1.00)	(0.02)	(12)	(12)	(0)	(0)	
	認証値	1.01	0.03	12	12	0	0	

a) mg/kg dw 又は g/kg dw : 試料の水分含量を補正した乾物重(乾重量)当たりの元素濃度

b) 総ヒ素

c) 付与値及び各スコア数は参考値のため () で示す。

d) 各元素の上段は表3の技能試験結果、下段はNMIJ CRM 7405-aの認証値

e) 各元素の上段は技能試験の付与値又は参考値の拡張不確かさ(包含係数は2)、

下段はNMIJ 7405-aの認証値の拡張不確かさ(包含係数は2)

f) 各元素の上段、下段ともに技能試験の報告数

g) 各元素の上段、下段ともに技能試験の各報告値について計算したzスコアの頻度分布

h) zスコアの計算に用いる値を付与値又は参考値から認証値に変更することによるzスコアの変化

与えるzスコアの変化は9個認められた(表4)。これら9個は、カドミウム、鉛、鉄、亜鉛、ナトリウム、カリウム及びカルシウムの7元素で認められた。技能評価が「満足」($|zスコア| \leq 2$)から「疑わしい」($2 < |zスコア| \leq 3$)に変化が3個、「疑わしい」から「不満足」($|zスコア| > 3$)に変化が2個、「不満足」から「疑わしい」に変化が3個、「疑わしい」から「満足」に変化が1個であった。技能評価が「満足」から「不満足」、又は「不満足」から「満足」に変化することはなかった。付与値又は参考値を用いて計算したzスコアは、技能評価のためのzスコア境界値(± 2 又は ± 3)の ± 0.1 以内で3個、zスコア境界値 ± 0.2 で1個、zスコア境界値 ± 0.3 で3個、zスコア境界値 ± 0.4 で1個、zスコア境界値 ± 0.5 で1個あり、9個中5個がzスコアの境界値から ± 0.3 以上離れたzスコアであった。

zスコアの計算に付与値又は参考値を用いた場合と

認証値を用いた場合に、技能評価に影響を与えるzスコアの変化がない元素は、総ヒ素、銅、マンガン、マグネシウム及びリンであった。マンガン以外の4元素は、付与値又は参考値と認証値は有効数字の3桁目で違い、その違いは小さい。しかし、付与値又は参考値と認証値が有効数字の3桁目で違うナトリウム及びカルシウムは、技能評価に影響を与えるzスコアの変化が認められる一方、付与値又は参考値と認証値が有効数字の2桁目で違うマンガンでは技能評価に影響を与えるzスコアの変化が認められない。したがって、付与値又は参考値と認証値との差違の程度だけではなく、各報告値のこれらの値からのかたよりの大きさも技能評価に影響を与えるzスコア変化の有無に関係する。

付与値又は参考値はハーモナイズドプロトコル¹⁾に従ってロバスト法(HuberのH15)で決定したが、水分及び12元素の有効データ数は12~26個と少ない。参

加者数が限定された技能試験に関するIUPAC/CITACガイド¹⁹⁾には、統計的な不確かさの観点から検討した結果、30試験室未満の技能試験の付与値を報告値から決定するのは好ましくなく、参加者には非明示で認証標準物質(CRM)を利用することが好ましいと記載されている。このガイド¹⁹⁾には、20個未満のデータにロバスト法は通常推奨されないと記載されている。この技能試験では、付与値又は参考値と認証値に有意差は認められなかった($p>0.05$)が、報告数が限られることが想定される技能試験を提供する場合は、付与値の決定方法について事前に注意深く検討する必要がある。

3. |zスコア|>3の報告値に関する検討

|zスコア|>3の報告値を与えた元素分析における試料量、前処理法、測定法を表5に示す。マンガン、リン以外の10元素で|zスコア|>3の報告値が存在した。|zスコア|>3の報告数は、総ヒ素が一番多く8試験室で、次に銅及びカルシウムが多く4試験室であった。総ヒ素

は8試験室すべてで低めに外れていたが、この原因は不明である。

12元素で合計208個の報告値が提出され、そのうち|zスコア|>3の報告値は27個(11試験室)存在した。この27個のうち8個は1試験室(マイクロ波湿式分解(硝酸-過酸化水素)、ICP質量法)の報告値であり、8個のzスコア(-27.5~-4.9)はすべてマイナスであった。この1試験室の報告値をすべて除外すると、|zスコア|>3の報告値は19個になり、そのうちプラスのかたよりが10個、マイナスのかたよりが9個で、どちらかへのかたよりの多い傾向は認められなかった。|zスコア|>3の報告値を与えた元素分析における前処理法及び測定法について調べたところ、27個中の16個に同一又は類似条件の前処理法及び測定法で|zスコア|≤2の報告値があり、特定の方法に問題は認められなかった。|zスコア|>3の報告値を提出した11試験室の報告値のzスコアを表6に示す。11試験室中7試験室が|zスコア|>3の報告値を2個以上提出していた。|zスコア|>3の報告値を提出する試験室は|zスコア|>3の報告値を2個以上提出す

表5. |zスコア|>3の報告値の分析条件

測定対象成分 ^{a)}	付与値 (内は参考値)	試験室 No.	報告値	zスコア	試料量 (g)	前処理法	測定法
As (mg/kg fw)	32.7	6	17	-5.1	1	湿式分解(硝酸-硝酸-過塩素酸)	水素化物発生原子吸光法(193.7 nm)
		7	8.42	-7.9	1.0	マイクロ波湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP質量法(91, Zr, リアクションガスとして酸素を使用)
		8	10.9	-7.1	0.25	湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP発光法(予備還元後水素化物とし、193.696 nmで測定)
		11	22.3	-3.4	1	乾式灰化(硝酸マグネシウム添加, 500℃, 12時間)	水素化物発生原子吸光法(193.7 nm)
		16	14.5	-5.9	約0.1	湿式分解(硝酸-過酸化水素)	還元気化-コールドトラップ-石英セルフレイム加熱原子吸光法(193.7 nm)
		17	10.09	-7.3	0.5	湿式分解(硝酸-硫酸)	水素化物発生原子吸光法(193.7 nm)
		20	14.6	-5.9	0.532	マイクロ波湿式分解(硝酸)	ICP発光法(189.0 nm)
Cd (mg/kg fw)	0.72	24	4.03	-9.3	2	湿式分解(硝酸-過塩素酸)	水素化物発生原子吸光法(193.7 nm)
		7	0.0925	-5.2	1.0	マイクロ波湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP質量法(114)
Pb (mg/kg fw) ^{b)}	(0.43)	7	0.0452	(-4.9)	1.0	マイクロ波湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP質量法(208)
		20	0.722	(3.7)	0.547	マイクロ波湿式分解(硝酸)	ICP発光法(220.3 nm)
Fe (mg/kg fw)	277	7	122	-8.2	1.0	マイクロ波湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP質量法(56, コリジョンガスとしてメタンを使用)
Zn (mg/kg fw)	11.8	7	2.29	-7.3	1.0	マイクロ波湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP質量法(64, Ce)
		11	2.37	(4.1)	5	乾式分解(550℃, 12時間)	フレイム原子吸光法(324.8 nm)
		15	2.61	(5.2)	0.8289	湿式分解(硝酸-過塩素酸)	ICP発光法(224.7 nm, キレート樹脂抽出濃縮法)
		16	4.1	(11.9)	約0.1	湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP発光法(324.8 nm)
Na (g/kg fw) ^{b)}	(15.3)	24	15.4	(63.1)	2	湿式分解(硝酸-過塩素酸)	電気加熱原子吸光法, 324.7 nm
		6	17.1	(3.1)	1	乾式灰化(500℃, 8時間)	フレイム原子吸光法(589.0 nm)
K (g/kg fw)	44.7	20	19.5	(7.3)	0.547	マイクロ波湿式分解(硝酸)	フレイム原子吸光法(589.0 nm)
		5	39.9	-3.4	1	希酸抽出(1%-塩酸)	フレイム原子吸光法(766.5 nm)
Mg (g/kg fw)	6.31	7	5.35	-27.5	1.0	マイクロ波湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP質量法(39)
		7	0.791	-20.4	1.0	マイクロ波湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP質量法(24)
Ca (g/kg fw) ^{b)}	(14.3)	16	7.52	4.5	約0.1	湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP発光法(279.6 nm)
		4	12.5	(-3.3)	1	乾式灰化(500℃, 6時間)途中硝酸添加	ICP発光法(396.847 nm, 0.2 mol/L 硝酸溶液)
		7	1.78	(-23.1)	1.0	マイクロ波湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP質量法(44)
		15	16.2	(3.5)	0.9940	乾式灰化(530℃, 5時間)	ICP発光法(393.3 nm)
		16	18.5	(7.7)	約0.1	湿式分解(硝酸-過酸化水素)	ICP発光法(393.4 nm)

a) mg/kg fw 又は g/kg fw: 試料重に水分含量を含む新鮮重(生重量)当たりの元素濃度
b) 付与値及びzスコアは参考値のため()で示す。

表6. |zスコア|>3の報告値を提出した試験室の報告傾向

試験室 No.	分析した元素数	分析した元素の z スコア		
		zスコア ≤2 の率	2< zスコア ≤3	3< zスコア
4	11 (Pb<1 mg/kg fw)	10/11		(Ca:-3.3)
5	6	5/6		K:-3.4
6	12	10/12		As:-5.1, (Na:3.1)
7	8	0/8		As:-7.9, Cd:-5.2, (Pb:-4.9), Fe:-8.2, Zn:-7.3, K:-27.5, Mg:-20.4, (Ca:-23.1)
8	2	1/2		As:-7.1
11	12	8/12	Zn:2.3, (Ca:2.4)	As:-3.4, (Cu:4.1)
15	11 (Pb ≤ LOQ=1.0 mg/kg fw)	9/11		(Cu:5.2), (Ca:3.5)
16	8	2/8	Cd:2.3, Fe:2.8	As:-5.9, (Cu:11.9), Mg:4.5, (Ca:7.7)
17	11	8/11	(Pb:2.6), Zn:-2.1	As:-7.3
20	12	6/12	K:2.7, Mg:-2.2, (Ca:-3.0)	As:-5.9, (Pb:3.7), (Na:7.3)
24	4	1/3	Cd:2.9	As:-9.3, (Cu:63.1)

注1) mg/kg fw : 試料重に水分含量を含む新鮮重 (生重量) 当たりの元素濃度

注2) Pb, Cu, Na 及び Ca の z スコアは参考値のため () で示す.

る傾向は、精米試料を用いた技能試験⁸⁾⁹⁾でも認められた。

分析値がかたよる原因としては、コンタミネーション、計算ミス、希釈倍率の間違い、検量線作成の問題、前処理条件の問題、測定条件の問題等が考えられる。例えば、試験室No.7のカドミウムの報告値0.0925 mg/kg fw及び鉛の報告値0.0452 mg/kg fw (表5) は、どちらも10倍すると|zスコア|≤2になり、転記ミス又は計算ミスの可能性が考えられた。|zスコア|>3の報告値を提出した試験室の内部質管理 (IQC:Internal Quality Control) の実施状況は未確認であるが、2011年度に実施した玄米粉末中無機元素の技能試験¹⁰⁾では、CRMを利用している試験室の報告値の方がCRMを利用していない試験室の報告値よりも付与値に近い傾向が認められている。内部質管理を適切に実施すれば分析値のかたよりは点検できるため、技能試験に参加するとともに内部質管理を行うことの重要性を再認識する技能試験結果であった。

要約

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所は、ひじき粉末中の総ヒ素、カドミウム、鉛及び必須無機元素の技能試験を2008年度に提供した。配付試料には(独) 産業技術総合研究所計量標準総合センター (NMIJ) が生産した候補標準物質を用いた。26参加試験室からの報告値は、IUPACの技能試験に関するハーモナイズドプロトコルに従って解析した。総ヒ素、

カドミウム、鉛及び必須無機元素の9元素中7元素(鉄、亜鉛、銅、ナトリウム、カリウム、マグネシウム及びカルシウム) には|zスコア|>3の報告値が存在した。総ヒ素には|zスコア|>3の報告値が最も多い8個存在し、それらの報告値はすべてマイナス側にかたよっていた。各元素の報告値のロバスト相対標準偏差 (HuberのH15) を計算したところ、カドミウムと鉛の報告値のばらつきが他の元素の報告値のばらつきよりも大きいことが明らかになった。

文献

- 1) Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R., The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report), Pure & Appl. Chem., **78**(1), 145-196 (2006).
- 2) JIS Q 17043, 適合性評価---技能試験に対する一般要求事項 (2011).
- 3) ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (2005).
- 4) JIS Q 17025, 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項 (2005).
- 5) 厚生労働省, 食品衛生検査施設における検査等の業務の管理の実施について (平成9年4月1日衛食第117号)
- 6) Codex CAC/GL 27, Guidelines for the assessment of

- the competence of testing laboratories involved in the import and export control of food (1997).
- 7) 進藤久美子, 塚越芳樹, 内藤成弘, 稲垣和三, 鎗田孝, 成川知弘, 千葉光一, 安井明美, 精米粉末中カドミウム及び主要無機質の技能試験, 分析化学, **57**(6), 427-437 (2008).
 - 8) 内藤成弘, 進藤久美子, 安井明美, 精米粉末中カドミウム及び必須無機元素の2007年度技能試験結果, 食総研報, **77**, 69-77(2013).
 - 9) 内藤成弘, 門倉雅史, 安井明美, 精米粉末中のカドミウム及び必須無機元素の2008年度技能試験結果, 食総研報, **78**, 47-55 (2014).
 - 10) Miyashita, S., Inagaki, K., Naito, S., Shindoh, K., Narukawa, T., Zhu, Y., Kuroiwa, T., Hioki, A., Fujimoto, T. and Chiba, K., Identification of possible technical problems in determination of the major inorganic constituents of brown-rice flour by evaluating proficiency test results, Anal. Bioanal. Chem., **405**(25), 8347-8362 (2013).
 - 11) Narukawa, T., Inagaki, K., Zhu, Y., Kuroiwa, T., Narushima, I., Chiba, K. and Hioki, A., Preparation and certification of Hijiki reference material, NMIJ CRM 7405-a, from the edible marine algae hijiki (*Hizikia fusiforme*), Anal. Bioanal. Chem., **402** (4), 1713-1722 (2012).
 - 12) 科学技術庁資源調査会食品成分部会編, 五訂日本食品標準成分表分析マニュアル(資源協会, 東京), p. 12 (1997).
 - 13) 渡部洋, 鈴木規夫, 山田文康, 大塚雄作, 箱型図, 探索的データ解析入門(朝倉書店, 東京), pp. 33-37 (1985).
 - 14) Horwitz, W., Kamps, L.R. and Boyer, K.W., Quality assurance in the analysis foods for trace constituents, J. AOAC, **63** (6), 1344-1354 (1980).
 - 15) 内藤成弘, Horwitzの式, 最新版食品分析法の妥当性確認ハンドブック, 第1版, 安井明美, 五十君静信, 後藤哲久, 丹野憲二, 湯川剛一郎編(サイエンスフォーラム, 東京), pp. 76-78 (2010).
 - 16) Horwitz W., Albert R. and Deutsch, M., Precision parameters of methods of analysis required for nutrition labeling. Part I. major nutrients, J. AOAC, **73** (5), 661-680 (1990).
 - 17) Codex, CAC/GL 72-2009, Guidelines on analytical terminology (2009).
 - 18) JIS Q 0035, 標準物質-認証のための一般的及び統計的な原則, 8.4.2 不確かさの評価(2008).
 - 19) Kuselman, I. and Fajgelj, A., IUPAC/CITAC Guide: Selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants—chemical analytical laboratories (IUPAC Technical Report), Pure & Appl. Chem., **82** (5), 1099-1135 (2010).

引用 URL

- i) http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/guide_zenbun_1.pdf (2014. 10. 1)
- ii) <http://www.eptis.bam.de/> (2014. 9. 3)
- iii) http://sid.gsi.co.jp/fera/document/Round_list_2014.zip (2014. 10. 1)
- iv) <http://www.jsac.or.jp/ginousiken/> (2014. 10. 1)
- v) <http://www.fdsc.or.jp/hatanoken/gaibuseidokanri.html> (2014. 10. 1)
- vi) http://www.jfrl.or.jp/seminar/pt_guide2014_rev1.pdf (2014. 10. 1)
- vii) <http://www.jffic.or.jp/proficiencytest> (2014. 10. 1)
- viii) <https://cosmokai.com/survey> (2014. 9. 3)
- ix) <https://www.nmij.jp/public/event/2014/proficiencytest/main.html> (2014. 10. 1)
- x) https://www.nmij.jp/service/C/crm/61/7405a_J.pdf (2014. 10. 1)
- xi) <https://www.nmij.jp/service/C/> (2014. 10. 1)
- xii) http://www.eoma.aoac.org/app_d.pdf (2014. 10. 1)
- xiii) <http://www.r-project.org/> (2014. 10. 1)

技術報告

食品害虫サイト用に開発したアクセス解析プログラムとそのツール化

曲山幸生*, 七里与子, 宮ノ下明大, 今村太郎, 古井聡, 和田有史, 増田知尋

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

キーワード：アクセス解析, 食品害虫サイト, 放射線影響サイト, アクセス行動, ウェブサイト運営

**An Access Analysis Tool Based on an Access Analysis Program Originally
Developed for Food-Insect Site**

Yukio Magariyama*, Kumiko Shichiri, Akihiro Miyanoshita, Taro Imamura, Satoshi Furui,
Yuji Wada, and Tomohiro Masuda

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-862, Japan

Abstract

We had originally developed a computer program to analyze Food-Insect Site more than 4 years ago, and have been using and improving the program ever since. By separating the part specified for Food-Insect Site from the computer program to form a configuration file, we made an access analysis tool that could be used to analyze the other websites more easily. The tool has the advantage of giving information about a visitor's movement among webpages in addition to the number of views of a webpage. To show the value of the tool, we did an access analysis of Radiation-Influence Site. The results showed that the proportion of visitors who read several pages during one visit of Food-Insect Site was larger than that of Radiation-Influence Site. The documents about the design of the tool are already available.

Key words: Access Analysis, Food-Insect Site, Radiation-Influence Site, Access Behavior, Website Operation

ウェブは現在ほとんどの組織が利用する重要なメディアであると同時に、新聞、テレビ、ラジオ等に比べると手軽に情報発信できるために、情報の内容や見やすさ、使いやすさ等の質に関して玉石混淆である。しかし、ウェブサーバに記録された閲覧記録を解析する（アクセス解析）ことによって、運営しているウェブサイトを客観的に評価して改善することができる。

著者ら（食品害虫サイト運営グループ）は、2007年より食品害虫サイト^{a,1)}を運営しているが、早期にアクセス解析を導入しサイトの改善等に利用してきた。2010年から独自にアクセス解析ツールを開発し、これまでに食品害虫サイトの運営に必要な機能を追加するなどの改良を重ねた。この独自開発アクセス解析プログラムは他のサイトの運営においても利用できるのではないかと考え、プログラムの中からウェブサイト固有の情報を独立させて簡単に設定変更できるようにした。これにより食品害虫サイト以外にも適用できるアクセス解析ツールが完成した。

本技術報告では、食品害虫サイトにおけるアクセス解析が果たした役割を紹介した後、今回作成したアクセス解析ツールの利用方法について、放射線影響サイト^{1,10)}への適用例を交えて、述べる。

アクセス解析ツールの利用準備

1. アクセスログに含まれる情報

ここで報告するアクセス解析ツールで採用している方法は「サーバログ型」である³⁾。他に、「パケットキャプチャ型」や「ウェブビーコン型」等があり、それぞれに特徴がある⁴⁾。サーバログ型を採用した最大の理由は、導入時に大きな作業や費用が発生しないこと（パケットキャプチャ型ではウェブサーバに出入りする情報を入手するためのハードウェアを追加する、ウェブビーコン型ではすべてのウェブページのソースコードにデータ収集サーバに情報を送信するタグを埋め込むことが必要である）と、過去にさかのぼって解析できることの2点である。これらは試験的にアクセス解析ツールを導入する場合に重要な要件である。

食品害虫サイトと放射線影響サイトのウェブサーバはウェブサーバソフトウェアとしてApacheを使用して

いる。そのアクセスログの書式はCombined Log Formatで、サーバの1作業ごとに次の情報セットが記録されている¹¹⁾。

①%h	ユーザのIPアドレス
②%l	(使用しない)
③%u	ユーザID
④%t	処理時刻
⑤¥"%r¥"	リクエスト
⑥%>s	HTTPステータスコード
⑦%b	転送容量(バイト)
⑧¥"%{Referer}i¥"	参照元情報
⑨¥"%{User-Agent}i¥"	ユーザエージェント

すべての解析結果はこの情報から導いたものになるので、ブラウザの戻るボタンの操作などサーバが関知しない情報を直接得ることはできない。

2. アクセスログの入手

食品害虫サイトは食品総合研究所ウェブサイト（農研機構ウェブサイトの一部）に含まれているので、農研機構本部広報部門を通じ農研機構ウェブサーバアクセスログを入手した。2014年8月時点で放射線影響サイトは食品総合研究所ウェブサイトと農林水産研究情報総合センターのバーチャルラボシステムに分かれて配置されている。著者(曲山)は放射線影響サイト(バーチャルラボシステム部分)のサーバ管理者の一人でもあるので、バーチャルラボシステムのウェブサーバアクセスログは直接サーバから読み出した。

農研機構ウェブサーバログファイルは毎月1回gzip¹²⁾で圧縮して授受することにしており、解凍には圧縮解凍ソフト7-zip¹³⁾を用いた。

3. 解析プログラム

巨大容量ファイルを取り扱うことができるエディタEmEditor¹⁴⁾を用いて、アクセスログファイルの月の境界の微調整と解析プログラムに入力できる形式への変換を行った。解析プログラムはExcel Macro (VBA)を用いて作成し、結果もExcelシートに出力するようにした。

a 食品害虫サイト：貯穀害虫・天敵図鑑を中心に、害虫の防除情報やニュース・コラム等、多様な情報を提供するウェブサイト
b 放射線影響サイト：放射性物質の食品への影響に関する情報を提供するために、東日本大震災に伴う原子力発電所事故後に食品総合研究所が開設したウェブサイト¹⁾。関係する情報へのリンク集と関連論文集²⁾にもまとめられている）から構成される。

食品害虫サイトで利用されたアクセス解析

2007年開設の食品害虫サイト¹⁾は、現在では食品総合研究所ウェブサイトの中で閲覧数の多いページを多く含み、多様な情報を提供する人気コンテンツの一つになっている。この発展に貢献した要因はいくつかあるが、アクセス解析もその一つである。以下に食品害虫サイトの取組みの歴史の中で、アクセス解析が果たした役割を追ってみたい(図1)。

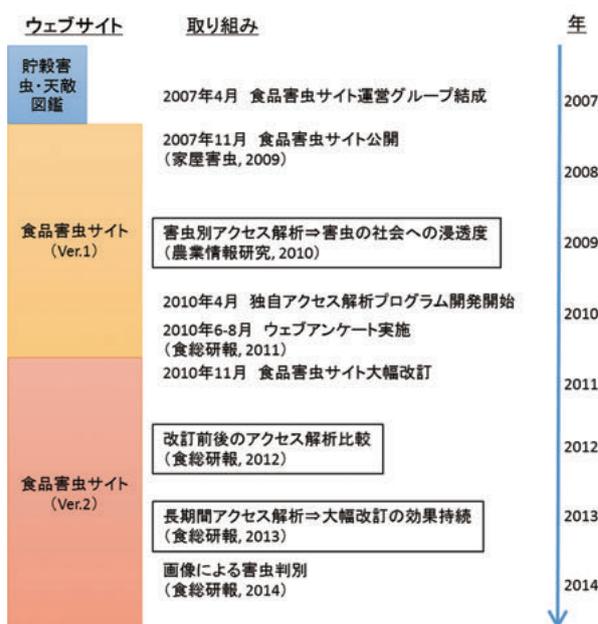


図1. 食品害虫サイトの取組みの歴史

1. アクセス解析で示された害虫の社会への浸透度

食品害虫サイトは2007年11月にインターネット図鑑「貯穀害虫・天敵図鑑」を拡張する形で開設された⁵⁾。開設の初期に図鑑の各ページのアクセス解析結果を比較することによって、下記の新たな発見があった。貯穀害虫・天敵図鑑に掲載されている食品害虫の各ページについて、閲覧数(対数)と検索サイト経由の比率のグラフにプロットすると、右肩上がりの直線の周辺に分布した。ただし、コクゾウムシとノシメマダラメイガは検索サイト経由の比率が低く、この分布から大きくはずれていた⁶⁾。つまり、この2種はすでに多くの人に知られていて、貯穀害虫・天敵図鑑にリンクを張っているウェブページが多く存在しているなど、社会に十分浸透していると推測された。ある食品害虫に注目した場合、図鑑ページの閲覧数はその時点における社会の注目度を反映していると考えられるが、それ以外に社会への浸透度(一過性の注目か長い年月にわたって

の注目か)までアクセス解析でわかることが示された。

2. 長期間アクセス行動に影響するウェブサイトの設計

食品害虫サイトの目的は、貯穀害虫・天敵図鑑を利用しやすくすることに加えて、食品害虫に関する食品総合研究所における研究成果とその周辺情報を提供することである。食品害虫サイトの訪問者を対象に2010年6月から8月に実施したウェブアンケートによれば、これらの目的は概ね達成していたが、貯穀害虫・天敵図鑑とその他のコンテンツの間の関連性を強くすることで、図鑑の訪問者を他のコンテンツに誘導する確率をさらに高くできると考えられた⁷⁾。そこで、図鑑と他のコンテンツの間の関連性の強化を目指し、2010年11月に食品害虫サイトの大幅改訂を実施した。改訂の効果をアクセス解析により解析したところ、図鑑から他のコンテンツへの移動、その逆の他のコンテンツから図鑑への移動がともに増加し、大幅改訂が食品害虫サイト訪問者のアクセス行動に変化をもたらしたことが明らかになった⁸⁾。この変化したアクセス行動は大幅改訂後1年以上経過しても継続していることが、アクセス解析結果によって示されている³⁾。これらの結果は、ウェブサイトのコンテンツ設計の変更により訪問者のアクセス行動が影響を受けることと、その影響が長期間継続することを示している。

3. 食品害虫サイトにおけるアクセス解析の役割

上述した食品害虫サイトの歴史の中で、アクセス解析はコンテンツの定期的な更新(ほぼ毎月)とともに重要な役割を果たした。作成した食品害虫サイトがユーザにどのように受け取られているのか、客観的なデータを獲得するために利用できる技術は少ない。例えば、ウェブアンケートの場合、ある程度詳細にユーザの意識を調査することができるが、アンケート回答者はモチベーションの高い訪問者に限られていること等、サンプルに偏りがあると考えられ、調査結果が食品害虫サイト訪問者全体の傾向を反映しているとは言えない。一方、アクセス解析の場合、獲得できる情報の種類は限られているものの、食品害虫サイト訪問者全員のアクセス行動情報を入手できるというメリットがある。食品害虫サイトにおいては、アクセス解析による閲覧パターン解析から、サイトの問題点を抽出し改善の方向を決定してきた。

食品害虫サイトでは独自に開発したアクセス解析プログラムを利用している。当初は農研機構が提供していたアクセス解析ツールを利用していた。しかし、訪

問者のサイト内の移動経路等の情報が得られなかったことや、ツール自体が変更されたことがあった。そこで、必要な情報を安定して得るために2010年より独自開発アクセス解析プログラムを利用し、開発後もプログラムに改良を加えてきた。2011年から食品害虫サイトのコンテンツとしてアクセス解析結果（人気害虫、人気ページランキング等）も掲載している^{viii)}。

食品害虫サイト用に独自に開発したプログラムのツール化

食品害虫サイトの客観的評価のために2010年より独自に開発してきたアクセス解析プログラムは現在まで日常的に利用しており、この2年ほどは大きなトラブルもなく動作している状況である。今回、このプログラム中のソースコードから食品害虫サイト専用に記述された部分を外部設定シートとして分離し、プログラムを汎用的に利用できるように修正した。ここでは作成したアクセス解析ツールの機能と具体的な使用方法について説明する。

1. アクセス解析ツールの解析項目

アクセス解析プログラムは次の流れ（図2）に沿って解析を進めていく。

- ① 読み込み：アクセスログファイルから食品害虫サイトに関する行だけを読み込み、情報の項目別に分解して、解析結果ファイルのシートlogに書き込む。この工程で、ユーザのIPアドレスとユーザエージェントの情報から各ユーザを区別し、固有の名前を付けてホストとした。データは時刻順に並んでいる。
- ② 並べ替え：シートlogの同一日内のデータをもとにホストをキーにして昇順に並べ替え、結果をシートsortに書き込む。
- ③ 訪問解析：同一ホストの30分以内のアクセスを1訪問と解釈し、結果をシートpath0に書き込む。次に、直前の閲覧ページと参照元が異なる場合はユーザがアクセスログに記録されないブラウザ操作を行ったと仮定して、その間を矛盾なく連結する仮想アクセスを追加する。この結果はシートpathに書き込む。
- ④ 参照元解析：シートpathのデータを使って、参照元情報から1訪問ごとの参照元分類（農研機構サイト、検索サイト、その他の外部サイト、不明）、参照元

- URL、検索サイトの場合キーワードの3つのデータを抽出し、結果をシートrefererに書き込む。
- ⑤ トレンド解析：サイト内のすべてのページについて1日の閲覧数をカウントし、結果をシートtrendに書き込む。
- ⑥ ページ間結合解析：シートpathのデータを使って、ページ間移動（参照元ページ→閲覧ページ）の回数をカウントし、結果をシートconnectionに書き込む。
- ⑦ 順位解析：次の項目について回数の多いものから順位付けし、結果をシートrankに書き込む。解析する項目：参照元ページ、閲覧ページ、ページ間移動、訪問の参照元ドメイン、入口ページ、出口ページ。
- ⑧ 報告書作成：人気ページ、参照元情報、1訪問閲覧ページ数、入口ページと出口ページのランキングをグラフ化したものを、A4サイズ1ページで表示できるようにまとめたものをシートReportに書き込む。

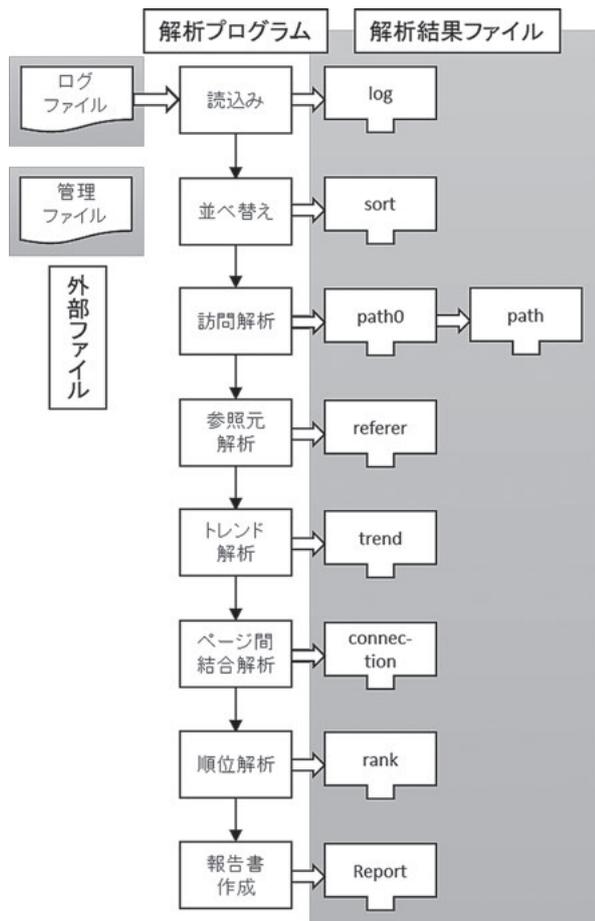


図2. 解析プログラムの動作の流れ

2. アクセス解析手順

食品害虫サイトのアクセス解析手順（図3）で関係するファイルは下記のとおりである。

- ① Lists.xlsm: サイト管理情報等を格納した管理ファイル。
- ② access_combined_log.yyyyymm.gz: ウェブサーバから出力されたままのyyyy年mm月のアクセスログファイル（圧縮版）。
- ③ access_combined_log_yyyyymm_naro.log: アクセス解析プログラムの解析対象となる修正済みアクセスログファイル。
- ④ macro_Foodinsect.xlsm: アクセス解析プログラム（本体）。
- ⑤ Analysis_Food_yyyyymm.xlsx: yyyy年mm月の解析結果ファイル。

次に、具体的な解析手順を簡単に説明する。

(ア) 管理ファイルLists.xlsmの更新

最初に、サイト管理情報等が格納された管理ファイルLists.xlsmを最新情報に更新する。初めてアクセス解析するウェブサイトはもちろん、毎月解析をしているウェブサイトでも、新しいページが追加された場合等にはこの作業が必要になる。

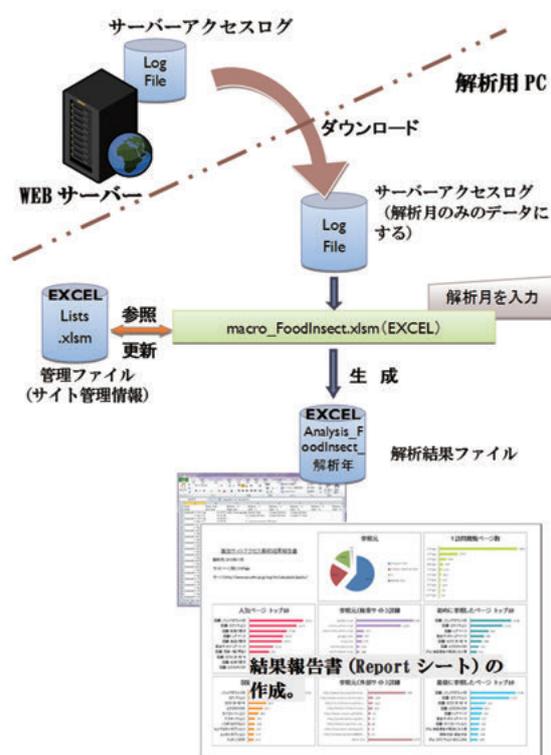


図3. 食品害虫サイトのアクセス解析手順の概略

このファイルには次の種類の情報が格納されている。

- ① Server: サーバ情報
サイト格納サーバ、サイト格納フォルダ、開始日、終了日、有効、サイト説明、備考。
- ② Pages: サイトのすべてのページ一覧
HTMLファイル名、ページ名称、開始日、終了日、有効、HTMLファイル名（パス付）、備考。
- ③ Insects: 貯穀害虫・天敵図鑑の害虫ページ一覧
害虫名、（未使用）、開始日、終了日、有効、害虫名、HTMLファイル名、図鑑番号。
- ④ Robots: ロボット（クローラ）一覧
識別用文字列、（未使用）、ロボット名。
- ⑤ SearchSites: 検索サイト一覧
識別用文字列、キーワードのタグ、（未使用）、検索サイト名。
- ⑥ Queries: 漢字変換一覧
ヒット件数、文字コード、エンコードされた文字列、デコードされた文字列（漢字）、区分 {15文字一致/新規/新規(二重)}、備考。
- ⑦ Replace: サイト内置換えページ一覧
置換え前ページ、(→)、置換え後ページ。
- ⑧ Classification: サイト区分一覧
区分ID、種別、サイトドメイン、（未使用）、注意事項1、備考1。
- ⑨ TEMP: Classificationの説明

(イ) アクセスログファイルの準備

利用するアクセスログはウェブサーバソフトウェアApacheのCombined Log Formatで出力されたものを前提としている。したがって、この書式のアクセスログなら、農研機構ウェブサーバやバーチャルラボシステムウェブサーバに限らず、特別な変更もなく以下に説明する作業を実行してアクセス解析することができる。

アクセス解析ツールはWindows上で動作するExcel macro（VBA）で作成されているので、アクセスログファイルもWindows用に変換する必要がある。すなわち、文字コードをEUCからShift-JISへ、改行コードをLFからCR+LFへ変更する。また、Apacheが出力したアクセスログの範囲が厳密に月初めから月末ではなく、数行ずれていることが多いので、それも修正して入力用アクセスログファイルを作成する。ファイル名に関する特別な決まりはないが、食品害虫サイトでは慣例でaccess_combined_log_yyyyymm_naro.log（yyyyymmの部分は201406等）としている。

(ウ) アクセス解析ツールmacro_FoodInsect.xlsmの実行次の手順に従って解析を実行する。なお、この手順はmacro_FoodInsect.xlsmのシート「解析手順詳細」に記載されている。すべての操作終了後は、数値結果を記載したシートだけでなく、グラフ中心のまとめのシートも作成される(図4)。

- ① 解析月を指定する。(解析したい月が2013年9月の場合、2013/09/01と入力。)
- ② 解析結果ファイル名指定 (Analysis_FoodInsect_yyyymm.xlsx) して「保存(S)」を押す。
- ③ アクセスログファイルを指定 (【対象R抽出】の出力F: access_combined_log_yyyymm_naro.log) して「開く(O)」を押す。
- ④ "クローラ?"のコメントに答える。
ロボットらしき物には「はい」、そうでなさそうな物には「キャンセル」。
USER_AGENT: 情報にゴミが入っている時や何も

ない (none) の時にも「はい」を選択する。 ※"はい"にすると解析対象外レコードとなる。

- ⑤ 検索サイト判別のための文字列。
表示されたアドレスが検索サイトなら「はい」、そうでないなら「キャンセル」。
※検索サイトURLとキーワードの識別コードを設定する。
- ⑥ "日本語変換"のコメントに答える。
変換正常なものが出たら「はい(Y)」で、別変換が必要な時「いいえ(N)」で、変換しないとき「キャンセル」。

(エ) 管理ファイルList.xlsmの保守

シートRobots, SearchSites, Queriesに新たにデータが追加されているので、それらをチェックし、問題があれば修正して保存する。

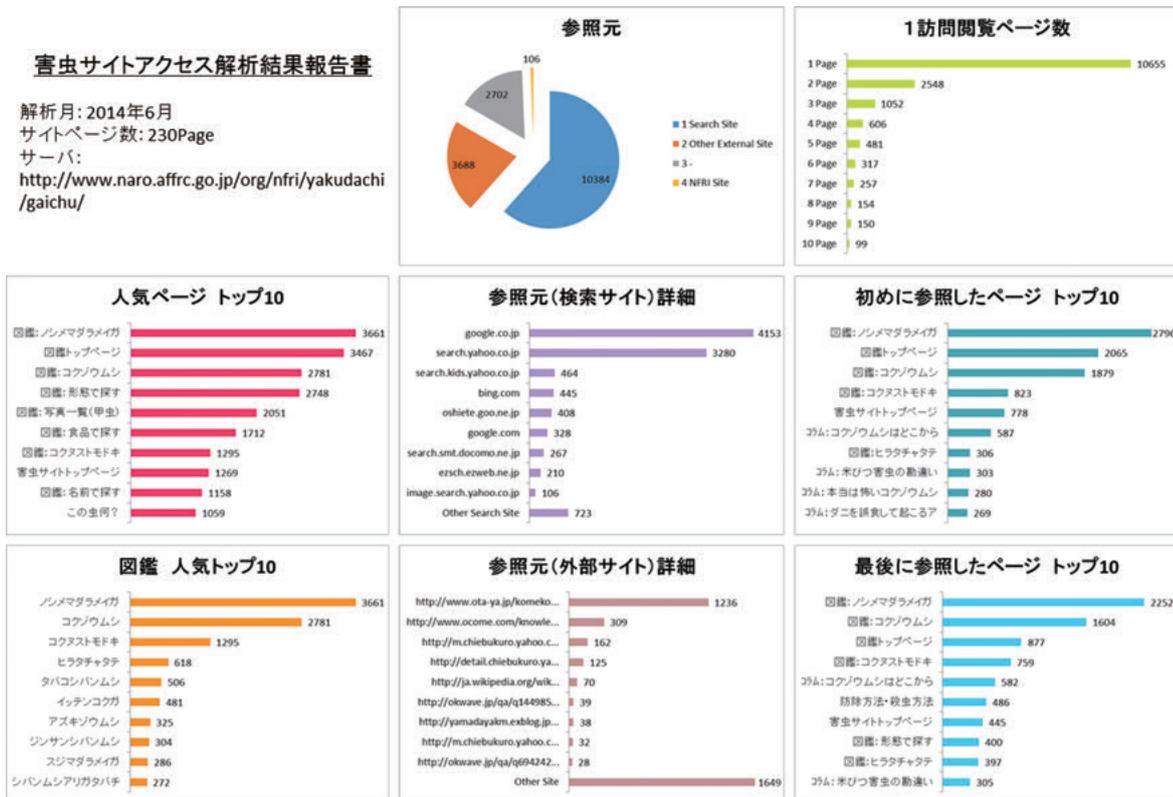


図4. アクセス解析結果のまとめ (食品害虫サイト)

c ロボット (クローラ) : 検索エンジンロボット. 検索サイトがウェブページの情報を収集するために動作させているプログラム. ウェブサーバの視点からは, 人間がブラウザを利用してウェブページを閲覧するのも, ロボットがウェブページにアクセスするのも違いはない.

アクセス解析ツールの放射線影響サイトへの適用

実際に他のウェブサイトにもアクセス解析ツールが使えることを示すために、以下に本アクセス解析ツールを用いて、放射線影響サイトの解析をおこなった例を示す。

1. アクセス解析手順

アクセス解析は次の手順で実施した。

(ア) Lists.xlsm: Serverの設定

放射線影響サイトは農研機構ウェブサーバとバーチャルラボシステムウェブサーバに分かれて配置されているので、シートServerには表1のようにその二つの情報を入力した。

(イ) Lists.xlsm: Pagesの設定

2014年5月時点の放射線影響サイトは、PDFファイルを含めて、17ページで構成されていた。表2のように、これをすべてシートPagesに登録した。

(ウ) Lists.xlsm: Replacesの設定

放射線影響サイトの改訂により、同じ内容のページが別の名称になったり、配置が変わったりしたものが4つあった。表3のように、これをシートReplaceに登録した。

(エ) アクセスログファイルの準備

(ア)で述べたように、放射線影響サイトは農研機構ウェブサーバとバーチャルラボシステムウェブサーバに分かれて存在するため、それぞれからアクセスログファイルを入手し、アクセス解析用入力ファイルとして、yyyymm_naro.logとyyyymm_rc0311.logを作成した。

(オ) アクセス解析ツールmacro_FoodInsect.xlsmの実行

この過程は、食品害虫サイトであろうが他のウェブサイトであろうが、大きな違いはない。2(ウ)のうち、入力ファイル名、出力ファイル名を適切なものに変更するだけでよい。放射線影響サイトの解析結果のまとめは図5のようになった。

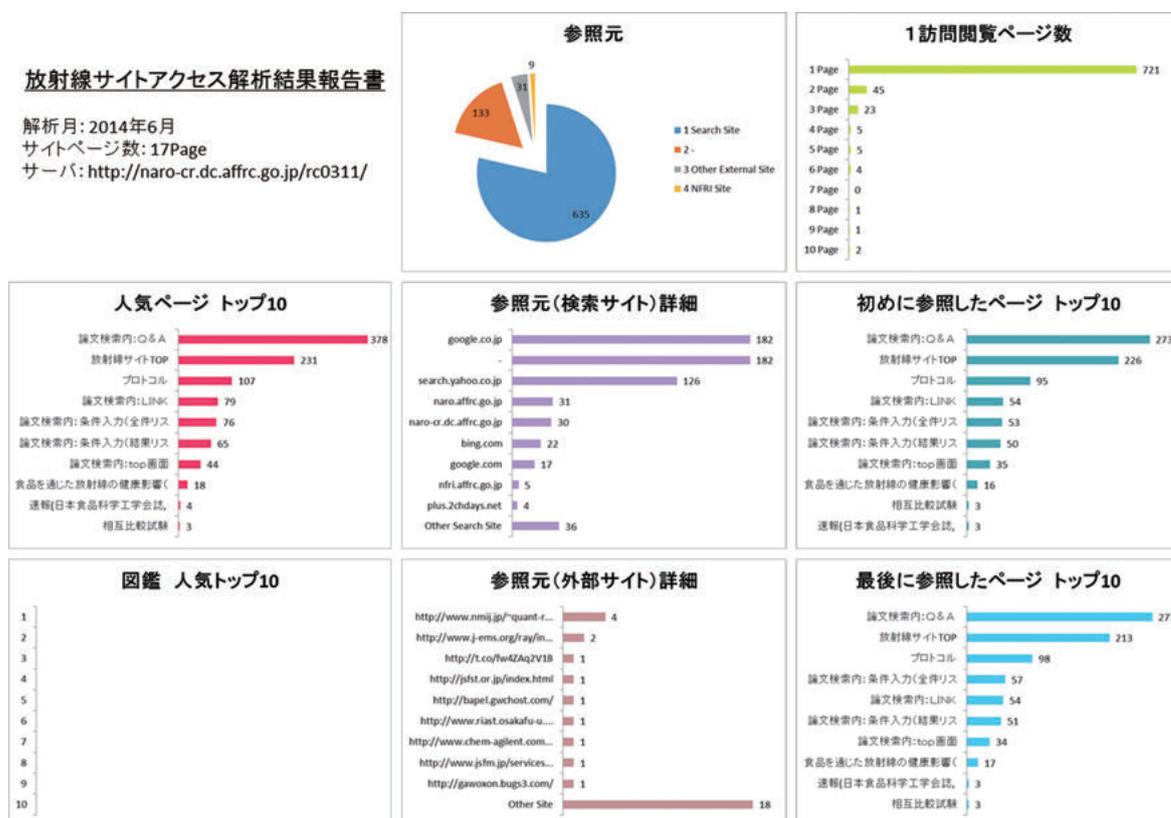


図5. アクセス解析結果のまとめ(放射線影響サイト)

表1. 放射線影響サイト用の設定 (シートServer)

サーバ	メインの階層	開始日	終了日	有効	サイト名称	備考
農研機構	http://www.naro.affrc.go.jp /org/nfri/topics/	2011/3/11		Yes	放射線サイト (メイン)	
バーチャルラボ	http://www.naro.affrc.go.jp /rc0311/	2011/3/11		Yes	放射線サイト (論文検索)	

表2. 放射線影響サイト用の設定 (シートPages)

ファイル名	ページ名称	開始日	終了日	有効	サイトID	備考
/R_C.html	放射線サイト TOP	2011/3/11		Yes	/R_C.html	
/protocol_kakunin25.pdf	プロトコル	2011/3/11		Yes	/protocol_kakunin25.pdf	
/kakunin_FAQ.pdf	よくある問い合わせ	2011/3/11		Yes	/kakunin_FAQ.pdf	
/kakunin_131023.pdf	相互比較試験	2011/3/11		Yes	/kakunin_131023.pdf	
/GE-2011-06-20.pdf	ゲルマニウム半導体検出装置	2011/3/11		Yes	/pdf/GE-2011-06-20.pdf	
/20110921-NaI.pdf	速報 (日本食品科学工学会誌, 58(9), 464-469(2011)) として掲載	2011/3/11		Yes	/pdf/20110921-NaI.pdf	
/CRinfo-end.pdf	放射性物質の食品影響と今後の対応	2011/3/11		Yes	/pdf/CRinfo-end.pdf	
/sympo1.pdf	放射性物質の基礎を学ぶ (小林泰彦先生)	2011/3/11		Yes	/pdf/sympo1.pdf	
/sympo2.pdf	食品を通じた放射線の健康影響 (滝澤行雄先生)	2011/3/11		Yes	/pdf/sympo2.pdf	
/Questionnaire.pdf	緊急シンポジウム アンケート集計結果	2011/3/11		Yes	/pdf/Questionnaire.pdf	
/ronbun_index.html	論文検索内: top 画面	2011/3/11		Yes	/rc0311/ronbun_index.html	
/link.html	論文検索内: LINK	2011/3/11		Yes	/rc0311/link.html	
/sympsiun.html	論文検索内: 緊急シンポジウム	2011/3/11		Yes	/rc0311/sympsiun.html	
/faq_01.jsp	論文検索内: Q & A	2011/3/11		Yes	/rc0311/faq_01.jsp	
/ronbun_01.jsp	論文検索内: 条件入力 (全件リスト付き)	2011/3/11		Yes	/rc0311/ronbun_01.jsp	
/ronbun_02.jsp	論文検索内: 条件入力 (結果リスト付き)	2011/3/11		Yes	/rc0311/ronbun_02.jsp	
/ronbun_03.jsp	論文検索内: 用語対訳リスト	2011/3/11		Yes	/rc0311/ronbun_03.jsp	

表3. 放射線影響サイト用の設定 (シートReplace)

置換え前	置換え後
rc0311/index.html	rc0311/ronbun_index.html
rc0311/symposium_files/sympo1.pdf	pdf/sympo1.pdf
rc0311/symposium_files/sympo2.pdf	pdf/sympo2.pdf
rc0311/symposium_files/Questionnaire.pdf	pdf/Questionnaire.pdf

(カ) 管理ファイルLists.xlsmの保守

この過程も食品害虫サイトの場合と同じである。

2. 放射線影響サイトと食品害虫サイトの比較

放射線影響サイトと食品害虫サイトのアクセス解析結果の比較を以下に記す(図4と図5)。

2014年6月時点で放射線影響サイトは17ページ、食品害虫サイトは230ページから構成されていた。

人気ページトップ10のグラフから、人気ページの1カ月の閲覧数を知ることができる。食品害虫サイトの

ページ閲覧数は放射線影響サイトのおよそ10倍であることから、放射線影響サイトの訪問者は専門家の割合が多く、食品害虫サイトは専門家以外の人も含まれていると思われた。

参照元の円グラフから、放射線影響サイトでは80%ほどが検索サイトからの訪問者であるのに対して、食品害虫サイトは他の外部サイトや「-」の割合が多くなっていった。「-」には、①訪問者のブラウザが参照元情報を返さない場合、②お気に入り(ブックマーク)から直接そのページを閲覧する場合が含まれている。

検索サイトを介さずに食品害虫サイトを訪問する割合が多いことから、すでに食品害虫サイトを認知しているユーザの割合が、放射線影響サイトよりも多いと言える。参照元（外部サイト）詳細のグラフからわかるように、食品害虫サイトのほうが外部サイト経由の訪問者が桁違いに多かったことも、これを裏付けている。

1訪問閲覧ページ数は、訪問者が1回の訪問で何ページ閲覧したかというデータである。放射線影響サイトでは1回の訪問で1ページ、つまり他のページを閲覧せずにそのまま出て行ってしまう場合がほとんどである。それに対して、食品害虫サイトでは複数ページを閲覧する割合が多くなっていた。この違いの原因は、サイトに含まれるページ数の違いもあるが、食品害虫サイトでは他のページに訪問者を誘導する工夫を施したページ作りをしている⁵⁾こともあるだろう。

始めに参照したページトップ10と最後に参照したページトップ10のデータから、食品害虫サイトで特徴的な傾向が見られた。防除方法・殺虫方法というページはほとんど1訪問の最初の閲覧ページ（入口）にはならないが、最後の閲覧ページ（出口）としては多かった。家庭で発生した害虫を調べるために図鑑ページにたどり着いた訪問者が、最後に防除方法を調べて満足したと考えられる。これは食品害虫サイトのページ作りの意図と合致している。一方、放射線影響サイトではこのようなことは見られなかった。

以上、開発したアクセス解析ツールが出力する結果のまとめを分析することで知ることができる訪問者のアクセス行動を簡単に紹介した。アクセス解析をしなければこのようなこともわからないため、ウェブサイトの評価も主観的になってしまうだろう。現在では食品害虫サイトの運営にアクセス解析は不可欠になっている。

本アクセス解析ツールの利用について

1. 本アクセス解析ツールを利用したい方へ

市販されているアクセス解析ツールは、本アクセス解析ツールよりも高速・高機能である。日常の解析項目が確定しており、見栄えのよい報告書を素早く作成したいという用途には、市販ツールの利用をおすすめする。

一方、ウェブサーバApacheからCombined Log Formatで出力されたアクセスログファイル、Windows PC、巨大ファイルを扱えるエディタ、Excelを用意すれば、ここで紹介したアクセス解析ツールを利用することが

できる。本報告のほかに、次節で述べる文書も用意しており、アクセス解析ツールそのものをさらにカスタマイズすることも可能である。食品害虫サイトの運営に利用してきた経験から、これからアクセス解析を導入するかどうか検討してみたい人や、小さなウェブサイトの運営に利用したい人にとって、本アクセス解析ツールは適していると考えている。本アクセス解析ツールを利用したい方は、食品総合研究所にお問い合わせいただきたい。

2. 関連文書

本アクセス解析ツールを他のウェブサイトに適用するときの参考にするために、下記の文書を整備している。

(ア) 解析ツール概要書.docx

解析内容など、概略を説明している。

(イ) 解析ツール設計書（全体仕様）.docx

アクセス解析ツールの仕様について全体像を示している。環境、処理の流れ、サーバアクセスログ形式、管理ファイルLists.xlsxmのシートの説明、解析結果ファイルAnalysis_FoodInsect_YYMM.xlsxのシートの説明に関して記述している。

(ウ) 解析ツール詳細設計書（Procedure）.docx

アクセス解析ツールの下記のプロシージャを解説している。

- ① Mod_main(): 全体の制御
- ② Sub1_Input(): 関係行だけを抽出
- ③ Sub2_Sort(): 並べ替え
- ④ Sub3_Path0(): 訪問経路解析
- ⑤ Sub4_Path1(): 訪問経路修正
- ⑥ Sub5_Connection(): ページ間結合解析
- ⑦ Sub6_Ranking(): ランキング
- ⑧ Sub8_Report(): 報告書作成

(エ) 解析ツール詳細設計書（Function）.docx

アクセス解析ツールで使われる下記のオリジナル関数を解説している。

- ① isCheckExtract(): 出力対象チェック
- ② strRevisedHost(): Host編集
- ③ strRevisedReferer(): Referer編集処理
- ④ strRevisedRequest(): Request編集処理
- ⑤ iPageID(): Connectionシート編集ライン算出処理
- ⑥ isCheckSearchSite(): サーチサイトチェック処理

- ⑦ strKeyword(): キーワード編集処理
- ⑧ strKeyword0(引数1): キーワード編集処理

(オ) 添付資料ファイル設計書 (Lists).xlsm

アクセス解析ツールで使われる変更の可能性があるパラメータをまとめたファイルLists.xlsmを説明している。内容は2.(1)で記したとおりである。

要約

著者らは4年以上前に食品害虫サイト用にアクセス解析プログラムを独自に開発し、これまで改良しながら使い続けてきている。今回、食品害虫サイト専用に記述された部分をプログラム本体から外部設定シートに分離することにより、簡単な作業で食品害虫サイト以外にも適用できるアクセス解析ツールを作成した。このアクセス解析ツールは、サイト内の各ページの閲覧数だけでなく、ページ間の移動に関する情報を解析できることに特徴がある。有用性を示すために、このアクセス解析ツールを放射線影響サイトに適用した。その解析結果を食品害虫サイトと比較したところ、食品害虫サイトのほうが1訪問中に複数ページを閲覧する割合が多いことがわかった。このアクセス解析ツールの利用希望者のために、設計資料等の文書も準備できている。

農研機構ウェブサーバのアクセスログの入手において新田宜史氏と大川清弘氏にお世話になった。また、ウェブサイトの開設と運営について石井馨氏にアドバイスを受けた。

文献

- 1) 濱松潮香, 放射性物質の食品への影響研究について, 食糧, **52**, 5-26 (2014).
 - 2) 食品総合研究所, 「食糧, 第50号」(食品総合研究所), (2011).
 - 3) 曲山幸生, 七里与子, 宮ノ下明大, 今村太郎, 古井聡, 和田有史, 増田知尋, 食品害虫サイトの長期間アクセス解析, 食品総合研究所研究報告, **77**, 51-61 (2013).
 - 4) 衣袋宏美, 「PROFESSIONAL アクセス解析」(技術評論社, 東京), (2011).
 - 5) 曲山幸生, 七里与子, 宮ノ下明大, 今村太郎, 食品害虫サイトの開設とそのアクセス解析, 家屋害虫, **31**, 93-99 (2009).
 - 6) 曲山幸生, 七里与子, 宮ノ下明大, 今村太郎, アクセス解析から推定した食品害虫の注目度と浸透度, 農業情報研究, **19**, 1-9 (2010).
 - 7) 曲山幸生, 七里与子, 宮ノ下明大, 今村太郎, 和田有史, 増田知尋, 木村敦, ウェブアンケートによる食品害虫サイト利用状況調査, 食品総合研究所研究報告, **75**, 55-61 (2011).
 - 8) 曲山幸生, 七里与子, 宮ノ下明大, 今村太郎, 古井聡, 和田有史, 増田知尋, 食品害虫サイトの大幅改訂による訪問者のアクセス行動の変化, 食品総合研究所研究報告, **76**, 59-66 (2012).
- (引用URL)
- i) <http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/index.html> (2014. 10. 23)
 - ii) http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/topics/R_C.html (2014. 10. 23)
 - iii) <http://httpd.apache.org/> (2014. 10. 23)
 - iv) <http://www.gzip.org/> (2014. 10. 23)
 - v) <http://sevensip.sourceforge.jp/> (2014. 10. 23)
 - vi) <https://jp.emeditor.com/> (2014. 10. 23)
 - vii) http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/ranking_00.html (2014. 10. 23)
- 1) 濱松潮香, 放射性物質の食品への影響研究について, 食糧, **52**, 5-26 (2014).

技術報告

宿主株が異なる *Saccharomyces cerevisiae* 組換え体におけるキシロース発酵能の比較

榊原祥清*, 王晓輝, 徳安健

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

Comparative evaluation of ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* derived from different host strains

Yoshikiyo Sakakibara*, Xiaohui Wang, and Ken Tokuyasu

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 305-8642

Abstract

In order to produce ethanol from xylose, which was the second most abundant sugar in cellulosic biomass, the xylose reductase, xylitol dehydrogenase, and xylulokinase genes were overexpressed in three different *Saccharomyces cerevisiae* strains, ATCC 24860, InvSc1, and NBRC 0224. The recombinant strain derived from *S. cerevisiae* ATCC 24860 was expected to possess the high xylose-fermenting ability owing to its high ability of ethanol production from xylulose, which was an intermediate of the xylose metabolism. In contrast to the expectation, the recombinant strain of ATCC 24860 did not show higher xylose fermentation compared to the other recombinant strains. This result suggests that the conversion efficiency from xylose to xylulose is more critical for conferring the xylose-fermenting ability on *S. cerevisiae* by introducing the exogenous pathway consisting of xylose reductase and xylitol dehydrogenase, rather than the xylulose-fermenting ability of the host cells.

Key words: バイオエタノール (Bioethanol)、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、キシロース発酵 (Xylose fermentation)、キシルロース発酵 (Xylulose fermentation)

緒言

近年、石油資源に替わり、再生可能なバイオマスを有用物質に変換してエネルギー源や工業原料として用いる技術開発が世界各国で進められている。バイオ

マスを原料として微生物の発酵により生産されるエタノール、いわゆるバイオエタノールは、石油資源の消費を抑え、大気中の二酸化炭素の増加を抑制するという観点から代替燃料として期待を集めている。とりわけ食料と競合しない燃料として、セルロースを主体とする草本類や木本類等の非可食部を利用したバイオエ

* 連絡先 (Corresponding author), sakaki@affrc.go.jp

タノールが望まれている。

すでにアメリカやブラジルで普及している澱粉或いは蔗糖を原料としたエタノール、すなわち第一世代のバイオエタノールとは異なり、第二世代のバイオエタノールとも称されるセルロース系エタノールは、糖類を取り出すプロセス（前処理、糖化）の困難さやコストの問題が解決されておらず、量産化への道程はまだ遠い。また、取り出された糖類も、澱粉系・蔗糖系バイオマスが、酵母等の微生物にとって利用が容易なグルコースが主体であるのに対して、植物の茎葉部に由来するセルロース系バイオマスには、グルコースの他にキシロースやL-アラビノース、マンノースといった多様な糖類が含まれている。草本植物には特にキシロースが多量（茎葉部に含まれる糖類全体の3～4割）に含まれており¹⁾、キシロースを効率的にエタノールに変換することが、セルロース系エタノール生産に

とって重要な課題となっている。

エタノール製造に最も利用されている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、グルコースを基質とした際には優れたエタノール生産能を示すものの、キシロースを発酵することは殆どできない。一方、自然界から単離されてきた酵母の中には、*Scheffersomyces stipitis* や *Scheffersomyces shehatae* といったキシロース発酵能を有するものも見出されている²⁾。ただし、これらの酵母はキシロース代謝に酸素を必要とし、酸素存在下においてエタノールも炭素源として消費してしまうことから、これを防ぐために通気条件等の煩雑な制御が必要になる。また、キシロース資化性の細菌 (*Escherichia coli* 等) のエタノール生産能を高めたり³⁾、エタノール生産能の高い細菌 (*Zymomonas mobilis* 等) にキシロース利用能を付与する⁴⁾ ことにより、キシロース発酵用細菌の作出も行われている。しかしな

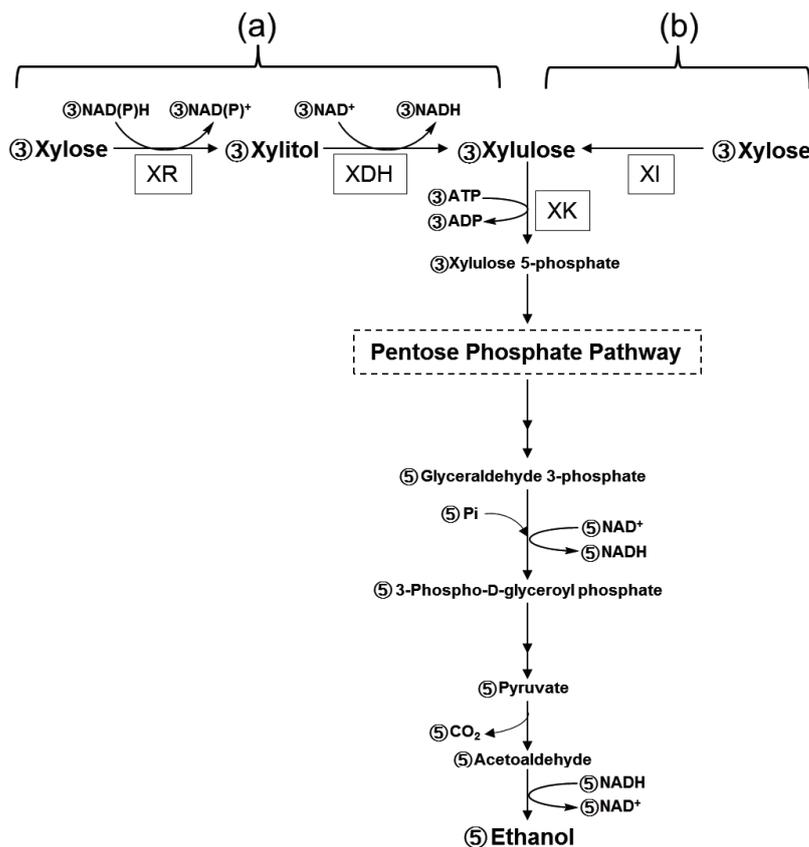


図1. キシロース発酵経路

XR-XDH 経路(a)或いは XI 経路(b)を介したキシロースからエタノールへの代謝経路を示す。XR:キシロースレダクターゼ, XDH:キシリトールデヒドロゲナーゼ, XI:キシロースイソメラーゼ, XK:キシロキナーゼ。丸数字は代謝過程におけるモル比を表す。理論的には、3分子のキシロースから5分子のエタノールが生成するため、エタノールの理論収率は0.510 g/g xyloseとなる。

表 1. プライマーの塩基配列

Primer	Sequence (5' to 3')
PGKp-SmaI	gctctagaccgggagatattataacatctgcataatag
PGKp-XbaI-as	gccgccgtctagatgtttatattgtgtaaaaagtag
XR-XbaI	gggtctagaatgccttctattaaagttgaactctgg
XR-KpnI	ggggtaccttagacgaagataggaatcttctgc
XDH-XbaI	ggctctagaatgactgtaaaccttctctggtg
XDH-XhoI	ccgctcgagtactcaggccgtcaatgag
XK-XbaI	ggctctagaatgttgtgttcagtaattcagagacag
XK-XhoI	ccgctcgagttagatgagagcttttccag
PGKp-SphI	gaccgcagccacagatattataacatctgcataatag
CYCt-SbfI	agccctcgaggaagcttgcataataagccttcg
PGKp-SbfI	gcccctcgagagatattataacatctgcataatag
CYCt-SalI	agccctcgacaagcttgcataataagccttcg
CYCt-SacI	ggcgagctcaagcttgcataataagccttcg

がら、細菌はエタノール耐性や生育阻害物質耐性、菌の頑強性等が酵母より劣っており、エタノール生産用微生物の主流とはなっていない。

これまでに、*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する試みが数多く行われており、その最も一般的な方法は、遺伝子組換えにより酵母細胞に異種生物のキシロース代謝系の一部を導入にするものである⁵⁻⁷⁾。微生物のキシロース代謝経路には、キシロース資化性真菌に存在するキシロースレダクターゼ (XR) 及びキシリトールデヒドロゲナーゼ (XDH) による経路 (XR-XDH 経路) と、主に原核生物のキシロース代謝経路であるキシロースイソメラーゼ (XI) による経路 (XI 経路) がよく知られている (図1)。1993年に世界で初めて開発されたキシロースを効率的に発酵する*S. cerevisiae*株は、*Sch. stipitis*由来のXR遺伝子 (XR) とXDH遺伝子 (XDH) から成るXR-XDH経路を導入したものであった⁸⁾。同時に、自身のキシロキナーゼ遺伝子 (XK) の高発現も遺伝子組換えにより行われており、これは野性型株の*S. cerevisiae*におけるキシロキナーゼ (XK) 活性が低いことを補うためであった⁸⁾。このHoらの方法は、*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する手法として、現在でも多くの研究で利用されている。

図1に示したように、XR-XDH経路とXI経路とは、キシロースからキシロースに至る過程は異なるものの、キシロースから下流の代謝系は共通である。野性型の*S. cerevisiae*は、キシロースは殆ど資化及び発酵できないものの、キシロースは発酵できることが知

られている。そこで、*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与するときに、キシロース発酵能の高い株を宿主として利用する試みが行われている^{9,10)}。微生物株保存機関より入手可能な高キシロース発酵性の*S. cerevisiae*株としてATCC 24860があり、この株は一般的な出芽酵母よりも2倍以上高いキシロース発酵能を有することが報告されている¹⁰⁾。

本研究では、遺伝子組換えによって*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する際に、宿主のキシロース発酵能が、作出される組換え株のキシロース発酵に与える影響を調べるために、キシロース発酵能の高いATCC 24860に加え、実験室株であるInvScl1, エタノール生産の実用株であるNBRC 0224¹¹⁾に対してXR-XDH経路の導入を行い、各遺伝子組換え株のキシロース発酵能について比較検討した。

方法

1. 酵母発現用ベクターの構築

*S. cerevisiae*の恒常発現型プロモーターであるホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター (*PGK1p*) を単離するために、PGKp-SmaIプライマー及びPGKp-XbaI-asプライマー (表1) を用いて、*S. cerevisiae* InvScl1のゲノムDNAを鋳型にしてPCRを行った。得られた*PGK1p*断片 (0.75 kb) を*XbaI*及び*SmaI*で消化した。次に、pYPGE15ベクター¹²⁾を*BstXI*で消化、T4 DNAポリメラーゼで平滑化後さらに*XbaI*で消化し、元々存在していた0.27 kbの*PGK1p*領域を除去した後、上述の0.75 kb長の*PGK1p*を連結し、pYPGE15Lを構築した (図2a)。

なお、本研究における酵母ゲノムDNAの調製は、Genとるくん酵母用 (タカラバイオ) を用いて、メーカーのプロトコールに従って行った。また、本研究におけるPCRには、ハイ・フィデリティ型のDNAポリメラーゼであるPfuUltra II fusion HS DNA Polymerase (Agilent) を用いた。

2. XR, XDH, XK 遺伝子のクローニング

Sch. stipitis NBRC 10063のゲノムDNAを鋳型にして、XR-XbaIプライマー及びXR-KpnIプライマー (表1) を用いて、XR (0.96 kb) をPCRにより増幅した。得られたDNA断片を*XbaI*及び*KpnI*で消化した後、同じ制限酵素で消化したpYPGE15Lに連結し、*PGK1p*とシトクロームcアイソフォームI転写ターミネーター (*CYC1t*) との間にXRが挿入されたpYPGE15L-XRを構築した (図2a)。次に、*Sch. stipitis* NBRC 10063のゲノムDNA

を鋳型にして, XDH-XbaIプライマー及びXDH-XhoIプライマー (表1) を用いてXDH (1.1 kb) をPCRにより増幅した. 得られたDNA断片をXbaI及びXhoIで消化し, 同じ制限酵素で消化したpYPGE15Lと連結し, PGK1pとCYC1tとの間にXDHが挿入されたpYPGE15L-XDHを構築した (図2a). さらに, *S. cerevisiae* InvSc1のゲノムDNAを鋳型にして, XK-XbaIプライマー及びXK-XhoIプライマー (表1) を用いてXK (1.8 kb) をPCRにより増幅した. 得られたDNA断片をXbaI及びXhoIで消化し, 同じ制限酵素で消化したpYPGE15Lと連結し, PGK1pとCYC1tとの間にXKが挿入されたpYPGE15L-XKを構築した (図2a).

3. XR, XDH, XK 遺伝子共発現用プラスミドの構築

まず, pYPGE15L-XKを鋳型にして, PGKp-SphIプ

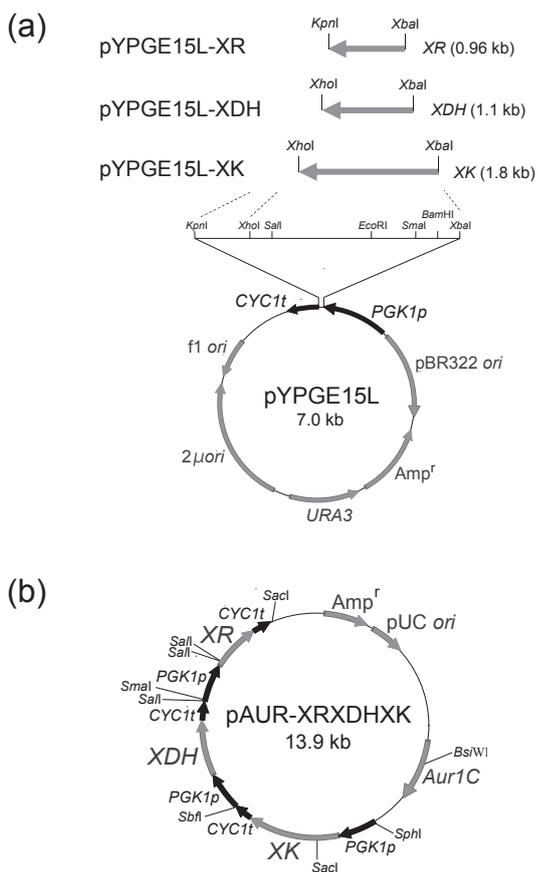


図2. プラスミドの模式図

(a) pYPGE15L ベクターの PGK1p と CYC1t の間に, *Sch. stipitis* 由来の XR 及び XDH, *S. cerevisiae* 由来の XK をそれぞれクローニングし, pYPGE15L-XR, pYPGE15L-XDH, pYPGE15L-XK とした. (b) 真菌用の薬剤耐性マーカーである *Aur1C* を含有する pAUR101 ベクターに, PGK1p-XK-CYC1t, PGK1p-XDH-CYC1t, PGK1p-XR-CYC1t 発現カセットを挿入した pAUR-XRDXHXK を構築した.

ライマー及びCYCt-SbfIプライマー (表1) を用いてPCRにより増幅した, PGK1p-XK-CYC1t融合遺伝子 (2.9 kb) をSphI及びSbfIで消化し, 同じ制限酵素で消化したpAUR101ベクター (タカラバイオ) に連結し, pAUR-XKを構築した. 次に, pYPGE15L-XDHを鋳型にして, PGKp-SbfIプライマー及びCYCt-SalIプライマー (表1) を用いてPCRにより増幅した, PGK1p-XDH-CYC1t融合遺伝子 (2.2 kb) をSbfI及びSalIで消化し, 同じ制限酵素で消化したpAUR-XKと連結し, pAUR-XDHXKを構築した. さらに, pYPGE15L-XRを鋳型にして, PGKp-SmaIプライマー及びCYCt-SacIプライマー (表1) を用いてPCRにより増幅した, PGK1p-XR-CYC1t融合遺伝子 (2.1 kb) をSmaI及びSacIで消化した. pAUR-XDHXKをSmaIで消化後, SacIで部分消化し, 11.8 kbのDNA断片を調製し, これとPGK1p-XR-CYC1t融合遺伝子とを連結し, XR, XDH及びXK共発現用ベクターであるpAUR-XRDXHXKを構築した (図2b).

4. XR 遺伝子, XDH 遺伝子及び XK 遺伝子の酵母への導入

酵母の形質転換はElbleによる酢酸リチウム法¹³⁾によって行った. *S. cerevisiae* ATCC 24860, InvSc1, NBRC 0224をそれぞれYPD培地 (10 g/L イーストエキストラクト (Difco), 20 g/L ポリペプトン (日本製薬), 20 g/L グルコース) で1晩培養後, 1 mlの培養液から遠心分離 (5,000 ×g, 1分) により集菌し, 1 mlの滅菌水で洗浄後, 再度, 遠心分離により集菌した. *BsiWI*消化により直鎖状にしたpAUR-XRDXHXK (1 μg) を10 μlの滅菌水に溶解し, 10 μlのニシン精子DNA (10 mg/ml) と混合した. これに500 μlのPLATE溶液 (40% (w/v) ポリエチレングリコール #4000 (ナカライテスク), 0.1 M 酢酸リチウム, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) を加え混合した. この溶液で上記の酵母菌体を懸濁し, 室温で1日静置後, 遠心分離により集菌し, 200 μlの滅菌水で菌体を懸濁した. この菌体懸濁液を100 μlずつ, 2枚のYPD-AbA寒天培地 (10 g/L イーストエキストラクト, 20 g/L ポリペプトン, 20 g/L グルコース, 0.5 μg/mL オーレオバシジンA (タカラバイオ), 20 g/L バクトアガー (Difco)) に塗布した. 30 °Cで3日間静置培養し, オーレオバシジンA耐性を示したコロニーを単離することにより, ATCC 24860, InvSc1, NBRC 0224の各染色体上にPGK1p-XR-CYC1t, PGK1p-XDH-CYC1t及びPGK1p-XK-CYC1tが挿入された組換え株を取得し, それぞれATCC 24860-X, InvSc1-X, NBRC 0224-Xと命名した.

5. 酵素活性の測定

XR活性の測定は、反応によって消費されるNADPHについて、分光光度計（日立ハイテクサイエンス、UV-3010）を用いて、340 nmの吸光度を30 °Cで経時的に計測し、単位時間当たりの減少量を求めることにより行った。反応液（100 mM キシロース、0.2 mM NADPH、100 mM Tris-HCl (pH 7.0)）中において、1分間に1 μ molのNADPHを消費することができる酵素量を1ユニット (U) と定義した。

XDH活性の測定は、反応によって生成するNADHについて、分光光度計を用いて340nmの吸光度を30 °Cで経時的に計測し、単位時間当たりの増加量を求めることにより行った。反応液（100 mM キシリトール、2 mM NAD、100 mM Tris-HCl (pH 9.0)）中において、1分間に1 μ molのNADHを生成することができる酵素量を1 Uと定義した。

XK活性の測定は、キシロースからキシロース5-リン酸にリン酸化されるときに生じるADPをピルビン酸キナーゼと乳酸脱水素酵素との共役反応に利用することにより生成されるNADHについて、分光光度計を用いて340nmの吸光度を30 °Cで経時的に計測し、単位時間当たりの増加量を求めることにより行った。反応液（10 mM キシリロース、2 mM MgCl₂、5 mM NaF、2 mM ATP、0.2 mM NADH、0.2 mM ホスホエノールピルビン酸、3 mM グルタチオン、10 U 乳酸脱水素酵素、10 U ピルビン酸キナーゼ、100 mM Tris HCl (pH 7.5)）中において、1分間に1 μ molのNADHを生成することができる酵素量を1 Uと定義した。

S. cerevisiae ATCC 24860-X, InvSc1-X, NBRC 0224-X, ATCC 24860, InvSc1, NBRC 0224の各株を、YPD培地を用いて、30 °Cで24時間振とう培養した。培養液から遠心分離により集菌後、プロテアーゼ阻害剤（Roche, cOmplete ULTRA Tablet mini, EDTA-free）及び100 mM ジチオトレイトールを加えた適量の酵母タンパク質抽出試薬（Pierce, Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent）に酵母細胞を懸濁した。細胞懸濁液を室温で20分間攪拌した後、遠心分離し、その上清を無細胞抽出液として上述の酵素活性測定に用いた。無細胞抽出液中の総タンパク質濃度は、BCA Protein Assay kit – Reducing Agent Compatible (Pierce) を用いて求めた。

6. エタノール発酵能の評価

S. cerevisiae ATCC 24860-X, InvSc1-X, NBRC 0224-Xを、YPD培地を用いて30 °Cで好氣的に一晩前培養した後、600 nmにおける吸光度 (OD₆₀₀) を測定し、

前培養液の菌体濃度を求めた。前培養液を遠心分離により集菌し、菌体を滅菌水で洗浄した後、容量10 mlのガラスバイアル（日電理化硝子, SVG-10）に入った2 % (w/v) キシロース、或いは5 % (w/v) グルコース及び2 % (w/v) キシロースを含有する5 mlのYP培地（10 g/L イーストエキストラクト、20 g/L ポリペプトン）に、初発菌体濃度OD₆₀₀ = 1となるように添加した。バイアルをゴム栓及び穴あきキャップにて密封した後、30 °Cで振とう培養（200 rpm）を行った。注射針（テルモ, 20G×70）を用いて経時的にサンプリングを行い、採取した発酵液から遠心分離によって酵母菌体を除いた後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって、発酵液に含まれるエタノール及び糖類の定量分析を行った。HPLC装置（島津製作所, Prominence）に配位子交換クロマトグラフィー用カラム（Shodex SP0810, 内径8.0 mm×長さ300 mm）を接続し、移動相に超純水を用いて、流速0.6 mL/min, カラム温度80 °Cで分析を行った。示差屈折率検出器により得られたクロマトグラムから、サンプルと標準品の保持時間及びピーク面積を比較することにより、発酵液中のエタノールや糖類の同定及び定量分析を行った。

結果及び考察

1. キシロース発酵株の作成

恒常発現型のプロモーターである*PGK1p*を融合させたXR, XDH, XKの3種類の遺伝子を染色体上に組み込んだ遺伝子組換え*S. cerevisiae*株である、ATCC 24860-X, InvSc1-X, NBRC 0224-Xについて、組み込んだ遺伝子が発現していることを確認するために、それぞれの酵素活性の測定を行った。その結果、3種類の遺伝子組換え株とも、元株では検出されなかったXR及びXDH活性が検出され、活性はこれらの3株で同等であった（表2）。また、XK活性についても、3つの遺伝子組換え株でほぼ同等であり、元株に比べ約3～4倍活性が上昇していた（表2）。これらの結果から、組み込んだ各遺伝子は、酵母細胞内において目的通り発現しているものと考えられた。*PGK1p*は、培地中のグルコースが無くなると、グルコースが存在する場合に比べ、発現活性がおおよそ半分に低下することが知られているが¹⁴⁾、各遺伝子組換え株は、グルコースが枯渇していると考えられる培養24時間においても、元株よりも高い活性を有していた。

ATCC 24860株はキシロース発酵能の高い株として報告されているが¹⁰⁾、XK活性はInvSc1やNBRC

0224のそれと大きく変わらなかった。このことは、ATCC 24860株のキシロース発酵能の高さは、XK活性の違いによるものではなく、より下流の代謝経路の活性が高いことによるものと考えられる。

2. キシロース発酵能の比較

まず、キシロースのみを基質とした場合のエタノール発酵能を検討するため、作成した遺伝子組換え株を、2% (w/v) キシロースを含むYP培地を用いて嫌氣的に培養を行った。野性型株であるInvSc1, ATCC 24860, NBRC 0224はいずれもキシロースを利用することができなかった(データ省略)。一方、遺伝子組換え株はいずれもキシロースからエタノールを生産し、NBRC 0224-X (図3c), InvSc1-X (図3b), ATCC 24860-X (図3a)の順にエタノール生産能が高かった。このときのエタノール収率(理論収率である0.51 g/g substrateに対する割合)は、それぞれ、49%, 43%, 32%であった。

ATCC 24860はキシロース発酵能が高いことが報告されており¹⁰⁾、キシロースからキシロースへの代謝系であるXR-XDH経路の導入により作出される遺伝子組換え株は、高いキシロース発酵能を有することが期待された。実際に、2% (w/v) キシロースを用いてATCC 24860のキシロース発酵能を確認したところ、発酵72時間においてNBRC 0224よりも2.4倍高いエタノール収率を示した(データ省略)。しかし、ATCC 24860-Xのキシロース発酵能は、NBRC 0224-XやInvSc1-Xよりも低かった。ATCC 24860-Xでは、最初の間産物であるキシリトールの蓄積も少なかったことから(図3a)、細胞内へのキシロースの取り込みや補酵素の供給量が少ない等の理由により、キシロースの利用能が低いものと考えられた。

3. グルコース・キシロース共発酵能の比較

次に、稲わらの糖組成比を模した糖液、すなわち5% (w/v) グルコース及び2% (w/v) キシロースの混合物を基質にしてエタノール発酵を行った。ATCC 24860-X (図4a) 及びNBRC 0224-X (図4c) は発酵12時間以内に、InvSc1-X (図4b) は発酵24時間以内に添加したグルコースの全量を消費した。さらに、キシロースのみを基質とした場合に比べ、グルコースとの共発酵では、いずれの株においてもキシロースの利用能が向上していた。すなわち、ATCC 24860-X及びNBRC 0224-Xでは、キシロース単独基質の場合、発酵72時間時の基質消費率がそれぞれ58%, 84%だったものが(図3a, c), グルコースの添加により72時間以内にすべてのキシロースが消費された(図4a, c)。InvSc1-Xにおいても、キシロース単独の場合発酵72時間における基質消費率が73%だったものが(図3b), グルコースの添加によりキシロース消費率が89%まで向上した(図4b)。

発酵72時間におけるエタノール収率(対理論収率)は、ATCC 24860-Xは82%, InvSc1-Xは81%, NBRC 0224-Xは84%であった。グルコースの共存により、特に、ATCC 24860-Xにおいてキシロース消費能及びエタノール生産能に顕著な向上が見られた。元株であるATCC 24860では、グルコースとキシロースの共発酵を行っても、キシロース単独基質の場合と比べて、キシロース消費量やエタノール収率の増加は起こらなかったことが報告されている¹⁰⁾。このことから、グルコースの添加によって、ATCC 24860-Xのキシロースからキシロースへの代謝が主に促進されたことが示唆される。この原因として、細胞がグルコースを利用することにより、細胞内の酸化還元環境やエネルギー

表2. 組換え酵母株及び元株における酵素活性

Strain	Activity (U/ mg protein)		
	XR ^{a)}	XDH ^{b)}	XK ^{c)}
ATCC 24860-X	0.28 ± 0.01	1.43 ± 0.17	0.78 ± 0.03
InvSc1-X	0.30 ± 0.03	1.62 ± 0.12	0.79 ± 0.07
NBRC 0224-X	0.35 ± 0.02	1.87 ± 0.11	0.65 ± 0.05
ATCC 24860	N.D.	N.D.	0.23 ± 0.05
InvSc1	N.D.	N.D.	0.21 ± 0.01
NBRC 0224	N.D.	N.D.	0.18 ± 0.02

測定は3連で行い、データはその平均値±標準偏差で表す。N.D.: 不検出。

^{a)} 反応中において、1分間に1 μmolのNADPHを消費することができる酵素量を1Uとした。

^{b)} 反応中において、1分間に1 μmolのNADHを生成することができる酵素量を1Uとした。

^{c)} 反応中において、ピルビン酸キナーゼ及び乳酸脱水素酵素との共役反応により、1分間に1 μmolのNADHを生成することができる酵素量を1Uとした。

ギー環境が改善し、補酵素の供給量や代謝酵素の発現量が増加したことが考えられる。

当初、*S. cerevisiae* ATCC 24860はキシロース発酵能が優れることから、この株にキシロースからキシロースへの代謝経路を導入することにより、高いキシロース発酵能を持つ酵母株が得られるものと期待された。しかし、実際にXR-XDH経路を導入した株(ATCC 24860-X)の発酵能を調べたところ、キシロース単独発酵の場合は他株よりもエタノール収率が低く、グルコースとの共発酵の場合でも他株との顕著な差異は見られなかった。このことは、XR-XDH経路を利用したキシロース発酵では、宿主のキシロース発酵能の優劣よりも、キシロースからキシロースへの代謝に、

より留意する必要があることを示している。

グルコースとの共発酵により、ATCC 24860-Xではエタノール収率が増加したものの、キシリトールの蓄積量(72時間時、2.5% (w/v))も増加していた(図4 a)。キシリトールの蓄積はNBRC 0224-Xにおいても見られ、発酵72時間で3.5% (w/v)のキシリトールが発酵液中に蓄積していた(図4 c)。酵母へのXR-XDH系の導入では、XRとXDHとの補酵素特異性(図1)の違いに起因した、細胞内の補酵素のアンバランスがしばしば問題となる。すなわち、XRは補酵素として主にNADPHを、XDHはNAD⁺を利用することから、お互いの中で補酵素の再生が完結できず、キシロース発酵が進むに連れて補酵素のアンバランスが大きくなると

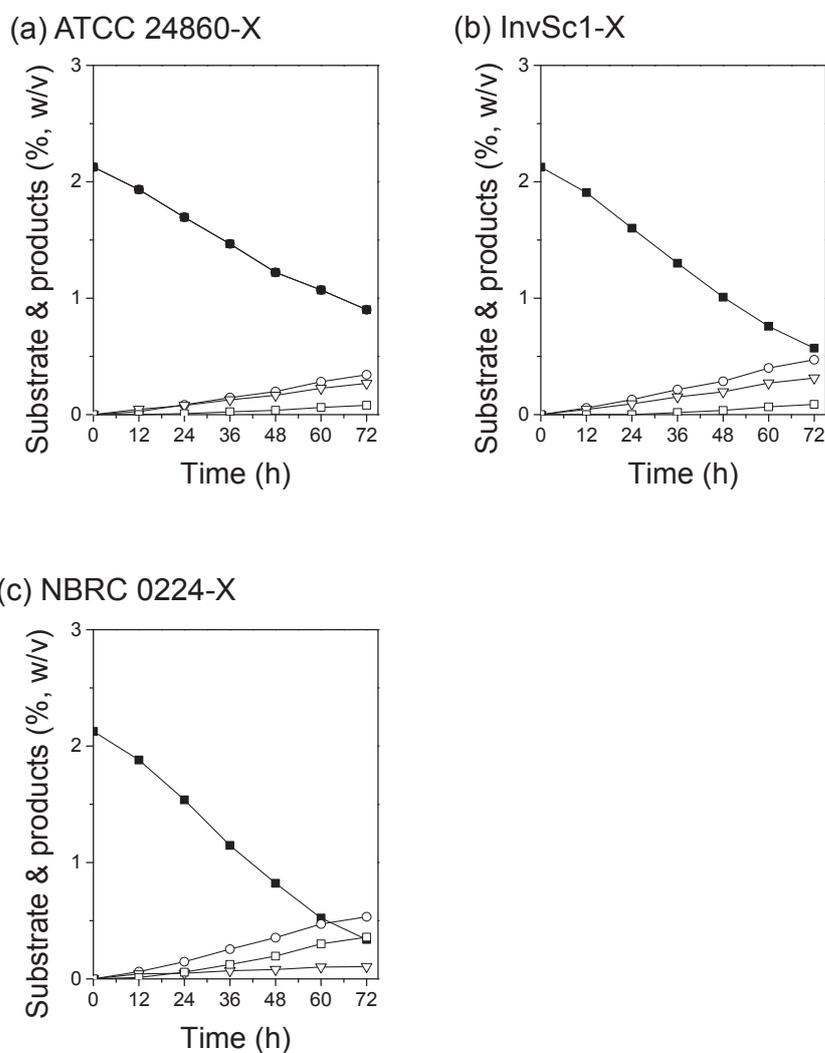


図3. 遺伝子組換え酵母株によるキシロース発酵

S. cerevisiae ATCC 24860-X (a), InvSc1-X (b) 及び NBRC 0224-X (c) を 2% (w/v) キシロースを含む YP 培地を用いて嫌氣的に培養し、培養液に含まれる糖類やエタノールを HPLC によって解析した。実験は 3 連で行い、データはその平均値を示す。■：キシロース、○：エタノール、□：キシリトール、▽：グリセロール。

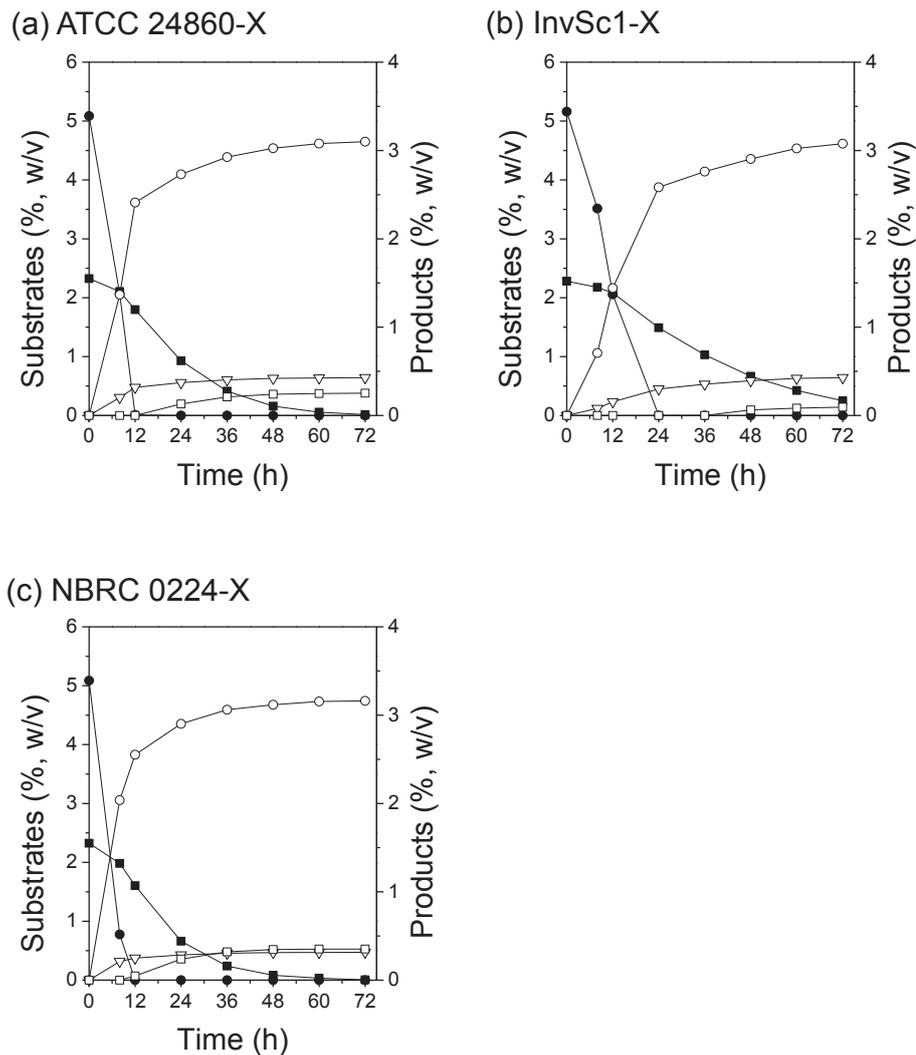


図4. 遺伝子組換え酵母株によるグルコース・キシロース共発酵

S. cerevisiae ATCC 24860-X (a), InvSc1-X (b) 及び NBRC 0224-X (c) を 5% (w/v) グルコース及び 2% (w/v) キシロースを含む YP 培地を用いて嫌気的に培養し、培養液中に含まれる糖類やエタノールを HPLC によって解析した。実験は 3 連で行い、データはその平均値を示す。●：グルコース，■：キシロース，○：エタノール，□：キシリトール，▽：グリセロール。

考えられている。特に、嫌気条件下では NAD^+ の再生効率が低く、 NAD^+ 不足によりキシリトールからキシロースへの変換が滞り、エタノール収率の低下を引き起こすことが XR-XDH 系の大きな問題点となっている。この問題を解消するために、代謝工学的な観点から様々なアプローチが試みられ¹⁵⁻¹⁹⁾、キシロース代謝の改善やエタノール収率の向上がなされているものの、キシリトール蓄積を完全に抑制するには至っていない。

一方、InvSc1-X には、キシロース消費速度は遅いものの、キシリトールの蓄積が少ないという特徴が見

出された (図 4 b)。消費したキシロース量に対するキシリトール生成量の割合は、ATCC 24860-X が 11.0%、NBRC 0224-X が 15.2% だったのに対して、InvSc1-X では 4.2% にとどまっていた。InvSc1-X においてキシリトール蓄積量が少ない原因については明らかではないが、InvSc1-X におけるキシロースの代謝プロファイルを解析することによって、キシリトール蓄積の抑制に役立つ知見が得られる可能性がある。

S. cerevisiae という単一の種においても株によって様々な代謝の特徴を有しており、実際にキシロース代謝系を組み込むことにより、キシロース発酵に関して

個々の株に特徴的な形質を見出すことができた。これらの形質を決定している因子をメタボロームやトランスクリプトーム等の網羅的解析手法を用いて特定することにより、酵母のキシロース発酵能の向上に資する種々の改良点が明らかになるものと期待される。

要約

セルロース系バイオマスに多く含まれるキシロースを効率的にエタノールに変換するために、キシロースレダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼ、キシロキナーゼ遺伝子を、3つの異なる*Saccharomyces cerevisiae*株において高発現させた。このうち、キシロースの代謝中間産物であるキシロースの発酵能が高いATCC 24860株に由来する組換え株は、高いキシロース発酵能を示すことが期待されたが、実際には、他の2つの株由来のものに対する優位性は見出されなかった。キシロースレダクターゼ及びキシリトールデヒドロゲナーゼの導入によって*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する際には、キシロース以降の代謝よりも、キシロースからキシロースへの代謝により留意する必要がある。

参考文献

- 1) Thalagala, T. A. T. P., Kodama, S., Mishima, T., Isono, N., Furujo, A., Kawasaki, Y., and Hisamatsu, M., Study on ethanol fermentation using D-glucose rich fractions obtained from lignocelluloses by a two-step extraction with sulfuric acid and *Issatchenkia orientalis* MF 121, *J. Appl. Glycosci.*, **56**, 7-11 (2009).
- 2) Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J. P., and Scheffers, W. A., Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1221-1223 (1984).
- 3) Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O., Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 893-900 (1991).
- 4) Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkstein, M., and Picataggio, S., Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*, *Science*, **267**, 240-243 (1995).
- 5) Chu, B. C. H. and Lee, H., Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation, *Biotechnology Advances*, **25**, 425-441 (2007).
- 6) Jeffries, T. W., Engineering yeasts for xylose metabolism, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**, 320-326 (2006).
- 7) Jeffries, T. W. and Jin, Y. S., Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 495-509 (2004).
- 8) Ho, N. W. Y., Chen, Z., and Brainard, A. P., Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1852-1859 (1998).
- 9) Eliasson, A., Boles, E., Johansson, B., Österberg, M., Thevelein, J. M., Spencer-Martins, I., Juhnke, H., and Hahn-Hägerdal, B., Xylulose fermentation by mutant and wild-type strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 376-382 (2000).
- 10) Yu, S., Jeppsson, H., and Hahn-Hägerdal, B., Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 314-320 (1995).
- 11) 中澤亮治, 霜三雄, 二つの新しい酵母菌, 日本農芸化学会誌, **12**, 356-365 (1935).
- 12) Brunelli, J. P. and Pall, M. L., A series of yeast/*Escherichia coli* λ expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and *cre/lox*-mediated plasmid excision, *Yeast*, **9**, 1309-1318 (1993).
- 13) Elble, R., A simple and efficient procedure for transformation of yeasts, *BioTechniques*, **13**, 18-20 (1992).
- 14) Partow, S., Siewers, V., Bjorn, S., Nielsen, J., and Maury, J., Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **27**, 955-964 (2010).
- 15) Jeppsson, M., Bengtsson, O., Franke, K., Lee, H., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F., The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K_m for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, **93**, 665-673 (2006).
- 16) Jin, Y. S. and Jeffries, T. W., Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant

- Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **105-108**, 277-286 (2003) .
- 17) Matsushika, A. and Sawayama, S., Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity, *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 306-309 (2008) .
- 18) Verho, R., Londesborough, J., Penttilä, M., and Richard, P., Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5892-5897 (2003) .
- 19) Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T., and Makino, K., Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, *J. Biotechnol.*, **130**, 316-319 (2007) .

Purification of Benzoic acid from Cranberry juice using Nanofiltration Technique

Xin LU

UNU-Kirin Fellow from China
Reaction and Separation Engineering Lab., Food Engineering Division
National Food Research Institute, NARO

Benzoic acid (C_6H_5-COOH) has been used widely in food industry and cosmetic industry as a preservative because of its antibacterial efficiency. Cranberry is rich in Benzoic acid, and the content of Benzoic acid is about 100ppm in the cranberry juice (10%Brix). The concentration implies that cranberry juice contains excess amount of Benzoic acid which can be utilized as natural preservative. Membrane separation technologies such as microfiltration, ultrafiltration and reverse osmosis have many advantages over other separation technologies because they require less energy and no heat treatment. Their application in food industries has been widely developed. If the excess Benzoic acid in cranberry juice can be separated with low cost by use of membrane separation technologies, it will be a promising material for natural preservative.

In previous research of reaction and separation engineering laboratory, NFRI, Benzoic acid rich solution could separate from Cranberry juice by using nanofiltration. However, puerility of Benzoic acid was still low and it's required more purification for use a preservative of food and cosmetics. And NFT-50 membrane which was most suitable nanofiltration membrane for separate Benzoic acid became the abolition from manufacture.

In this study, the efficient conditions of nanofiltration for purification of Benzoic acid from cranberry juice were investigated. At first, rapid analysis method using HPLC with UV detector for organic acids and RI detector for monosaccharide (sugar) was conducted. And eleven commercial nanofiltration membranes were tested with test cell (C60F, Nittodenko, Japan) for checking Benzoic acid separation ability under the high pressure (more than 3 MPa) from the model solution and straight cranberry juice. The effect of pretreatment by ultrafiltration (UF) also tested in separation test using straight cranberry juice. Furthermore, these results were checked with a pilot scale membrane separation system (DDS Lab Module Type 20 plate and frame system).

According to results of model solution separation test, DL, DK, "NF" and UTC-60 considered suitable for purified by second NF treatment. In NF treatment of cranberry juice, GR40PP which is a UF membrane showed good performance for pretreatment of NF because of keeping Benzoic acid (permeability of Benzoic acid) and high permeate flux on next NF test. Benzoic acid was purified by twice nanofiltration. The optimum conditions were using DK membrane at 5 MPa and pH 4.5 on 1st nanofiltration, and at 3MPa and pH 2.5 on 2nd nanofiltration. The concentration of each components after twice NF treatment were as follows; Benzoic acid 2.46 (3.34* ,*before NF)mM Malic acid 1.78 (37.9*) mM, Citric acid 0.14 (65.2*) mM, Fructose 0.13 (43.1*) mM, Glucose 0.44 (188.1*) mM. The purity of Benzoic acid benzoic acid was increased from 0.86 %(mol/mol) to 49.7 % (mol/mol) by twice NF at these conditions. The pilot scale test with Lab Module Type 20 was conducted with no pH adjustment on 1st NF for concentrated cranberry juice to use as other food materials such as juice, jam and etc. Under this condition, purity of Benzoic acid after twice nanofiltration became 32.5 % (mol/mol)

This study was investigated Benzoic acid was separated and purified from cranberry juice by twice nanofiltration. Moreover, no pH adjustment on 1st NF might be suitable for recover excess Benzoic acid and produce cranberry foods.

ENCAPSULATION OF CLOVE OIL USING MICROCHANNEL EMULSIFICATION AND A HOMOGENIZATION METHOD

Nanik Purwanti
UNU-Kirin Fellow from Indonesia

Advanced Food Technology Lab, Food Engineering Division
National Food Research Institute, NARO

Clove oil is an essential oil extracted from clove, and it has been widely applied in pharmaceutical, fragrance, and flavor industry. The oil has several functionalities such as antioxidant agent, free-radicals scavenger, anti-microbial agent, etc. Clove oil is generally recognized as safe (GRAS) to be applied in foods with a considered safety limit (< 1500 ppm). Encapsulating clove oil in the form of oil-in-water (O/W) emulsion is a possibility to preserve the functionalities. The release of clove oil from the emulsion could also be controlled via its formulation to ensure its safety during application. Microchannel (MC) emulsification and homogenization method were used in this research to prepare clove oil-in-water emulsion. MC emulsification is a novel emulsification that requires low energy input and produces monodisperse emulsion droplets. Homogenization method involves high intensive energy to prepare the emulsion and usually results in polydisperse emulsion droplets. Clove oil emulsion droplets produced by MC emulsification were initially monodisperse with coefficient of variance of below 10%. However, the droplets shrunk immediately when surrounded by the continuous phase. This phenomenon took place because the nature of the clove oil that is slightly hydrophilic. Clove oil droplets tend to diffuse to the continuous phase regardless the surfactant applied, resulting in instable emulsion system over time. Instability was also observed when the emulsion was prepared by homogenization method. However, different instability phenomena involved, such as coalescence, Ostwald ripening, and sedimentation. Shrinkage of oil droplets was difficult to be determined with this method. In addition, the instability was contributed by the nature of clove oil that changes in color over time. Stable emulsion until 31 days was obtained when a high concentration (10% w/w) of whey protein isolate (WPI) as the surfactant was applied. However, high concentration of surfactant is hardly applied in food formulation. Instability of clove oil emulsion droplets with a low WPI concentration (2.5% w/w) prepared by homogenization method might be enhanced by increasing viscosity of the continuous phase. A mixture of sodium alginate and WPI with a ratio of at least 1:2 enhanced the stability of the emulsion for at least 10 days.

The study on a bacterial adaptation by gene amplification

Dr. Wannasiri Wannarat
UNU-Kirin Fellow from Thailand

Microbial Function Laboratory, Food Biotechnology Division
National Food Research Institute, NARO

The reiteration of a chromosomal DNA segment, called gene amplification, occurs spontaneously during replication in all organisms. Gene amplification plays an important role in bacterial adaptation to antibiotics. The aim of this work is to understand the gene amplification-mediated adaptive mechanism under antibiotic stress condition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, which are well-characterized bacteria as the model organisms.

Approximately 4% of ampicillin resistant *E. coli* was found to have duplicated copy of the genomic region including a multidrug resistance gene *acrA*. These *acrA*-amplified strains exhibited resistance to many antimicrobial agents including chloramphenicol, tetracycline, erythromycin, kanamycin, novobiocin, cefotaxime and rifampicin.

B. subtilis also can acquire a higher tolerance to tetracycline by increasing the gene dosage of its resistance gene *tetB*. Here we showed that approximately one-third of total tetracycline-resistant cells had multiple copies of *tetB* gene ranging 2 to 230. Four direct repeats flanking *tetB* gene apparently contributed to the *tetB* amplification. Furthermore, the disruption of *recA* gene resulted in a 30-fold decrease in the frequency of *tetB* amplification. Our results indicate that the direct repeats and RecA have an important role for Tc-tolerance development in *B. subtilis*.

Genetic improvement of secondary metabolite production of an industrial bacterial strain

Dr. Le Thi Thu Hong
UNU-Kirin fellow from Vietnam

Applied Bacteriology Laboratory, Applied Microbiology Division
National Food Research Institute, NARO

Bacillus subtilis (natto) is an industrial fermentation strain that significantly increases the nutritional value of soybeans and develops a unique flavor and texture. *B. subtilis* (natto) produces extracellular poly- γ -glutamate (γ -PGA), a very viscous polymer of DL-glutamic acid linked by gamma peptide bonds. In *B. subtilis* (natto), γ -PGA is synthesized by *pgsBCA* operon. The expression of the *pgs* operon is regulated by quorum-sensing components, ComPA, DegQ, DegS, DegU and cell motility related SwrA. Disruption of *degQ* gene causes loss of ability of γ -PGA production, which is restored by mutations in *degS* as well as other unknown target genes. By whole genome sequencing analysis for the unknown targets revealed several candidate genes responsible to the mucoid colony phenotype, including a single point mutation occurred in *yxyZ* gene leading to alternation of an amino acid in the protein. We obtained evidence that single amino acid alteration of wild-type *yxyZ* plays an important role in restoring γ -PGA production that was abolished by disruption of *degQ*. In addition, it is noted that disruption of *yxyZ* gene not only effects on colony morphology relative to bacteria swarming mobility on solid surface but also reduces in *pgs* operon expression and exoprotease production. Furthermore, recombinant wild-type and the mutant YxyZ protein produced in *E. coli* cells behaved quite differently; wild-type YxyZ was stably expressed and effectively purified due to its good solubility whereas the mutant was very sensitive with changes of fermentation condition.

Effect of packaging material on shelf life, quality and gene expression of tomatoes

Thiraviam Vanitha

UNU-Kirin Fellow from India

Distribution Food Engineering Laboratory, Food Engineering Division

National Food Research Institute, NARO

The effect of packaging material and storage temperatures on the shelf life and quality changes of tomato 'KEK-I' (called as super tomato fruit containing 9° Brix) during storage. Tomatoes with three packaging conditions, Modified Atmospheric Packaging (MAP), MAP+ hinokitiol (MH), and perforated film package as control were compared for their quality change. Packaging material used were Low Density Polyethylene (LDPE) film (40µm) and fresh sheets of hinokitiol. Hinokitiol is a volatile oil and reported to have a strong chelating agent, inhibits microbial spoilage, antifungal, inhibits enzymatic browning and was approved as food additive by Japanese Government.

Tomato is a climateric fruit which shows a dramatic increase in respiration rate and ethylene production rate at the onset of ripening on vine or postharvest. Ripening process is characterized by softening of fruit, degradation of chlorophyll, and synthesis of acids, sugar and lycopene associated with increased expression of ACC Synthase (ACS) gene,. Packaged 'KEK-I' tomatoes stored at 15 °C or 25 °C were analyzed for the ripening related parameters and quality control factors during the intervals of storage. Gas composition was maintained at the recommended level of 3 to 5 % O₂ upto 9th day of storage at 15 °C or 25 °C. Control tomato has significant difference of color, texture, and pigments in both the temperatures whereas those under MAP and MH showed little change. A linear relation was found between a* and lycopene and between b* and β carotene of all samples throughout the storage period.

Expression levels of genes related to the ethylene production, textural and fermentative changes of tomato were evaluated through quantitative Real Time PCR (qRT-PCR). qRT-PCR results for *LeACS?*, *LeADH*, *LePDC* and *LeTBG4* showed the drastic change of *LeACS?* in the control sample but not in the other samples and genes.

Green of the tomatoes was maintained after 20th and 15th day of storage under MAP and MH at 15°C and 25°C respectively. Packaging condition and storage temperatures used in this research study are effective for MAP and MH in terms of shelf life extension of 'KEK-I' tomatoes when compared to control. This study would provide valuable information of shelf life extension of 'KEK-I' tomato by using MAP treatment and would be useful for future research on the quality control of fresh tomatoes.

Key words: Modified Atmosphere Packaging, Hinokitiol, 'KEK-I', ACS, ADH, PDC and TBG4

抄 録

Journal of Food Research, 2(6), 89-96(2013)

Effect of high-oxygen packaging on respiratory physiology and sensorial qualities of fresh shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*)

Yanjie Li^{*1,*3}, Yutaka Ishikawa^{*2}, Takaaki Satake^{*1}, Hiroaki Kitazawa^{*2}, Xiaoli Qiu^{*1,*4}

^{*1} University of Tsukuba

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Jinan Fruit Research Institute, All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, China

^{*4} Northwest A&F University, China

シイタケをプラスチックフィルムで密封包装した。包装条件は初期酸素濃度80%および100%とし、10℃、90%RH条件下で9日間貯蔵した。貯蔵中の呼吸速度、TSS、色調、官能評価値の測定を行った。初期濃度を高酸素条件にすることで貯蔵中に包装内が嫌気状態になることを遅らせることができ、色調、においの保持に効果が見られた。特に初期100%とした場合には、80%のものに比べて色調保持に有意な効果が見られた。

シイタケ(*Lentinus edodes*)の呼吸生理と官能評価に及ぼす高酸素包装の影響

李 艶傑^{*1,*3}、石川 豊^{*2}、佐竹 隆顕^{*1}、北澤 裕明^{*2}、Xiaoli Qiu^{*1,*4}

^{*1} 筑波大学

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*3} Jinan Fruit Research Institute, All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, China

^{*4} 西北農林科技大学, 中国

日本食品科学工学会誌, 60(6), 295-300, (2013)

エダマメの微細孔フィルムを用いた最適なMA包装条件

勝見 直行^{*1}、石川 豊^{*2}、北澤 裕明^{*2}、遠藤 昌幸^{*1}、鬼島 直子^{*1}、安達 あい^{*1}

^{*1} 山形県農業総合研究センター

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

市販されているエダマメのMA包装の現状調査および微細孔フィルムを用いた最適な包装条件について検討した。

- (1) 市販されている5種のエダマメについて調査した結果、4種については十分なMA効果が期待されるレベルにあるとはいえなかった。
- (2) 3種の市販品の袋の酸素透過度とエダマメの酸素消費速度から袋内の酸素濃度についてシミュレーションを行ったところ、5℃における平衡酸素濃度は14.0～17.2%であり、また20℃では平衡酸素濃度は10.7%付近に低下することが示された。
- (3) 袋当たりの微細孔の数を0～4個に調製したところ、袋内のガス濃度は、微細孔なし(0個)の場合には極端な低酸素濃度となり異臭が発生したが、微細孔1～2個程度で鮮度保持に十分な低酸素、高二酸化炭素濃度となった。
- (4) 生およびゆでエダマメの子実の色調・硬度を測定した結果、色調については微細孔の数が少ないほどより緑色の保持につながった。

Optimum Design for Commercial Packaging of Green Soybeans using Micro-perforated Pouches

Naoyuki Katsumi^{*1}, Yutaka Ishikawa^{*2}, Hiroaki Kitazawa^{*2}, Masayuki Endo^{*1}, Naoko Kijima^{*1}, Ai Adachi^{*1}

^{*1} Yamagata Integrated Agricultural Research Center

^{*2} National Food Research Institute, NARO

日本食品工学会誌, 61(1), 34-38(2014)

うどん調理における放射性セシウムの動態解析

八戸 真弓*¹, 内藤 成弘*¹, 明石 肇*², 等々力節子*¹, 松倉 潮*³, 川本 伸一*¹, 濱松 潮香*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 株式会社日清製粉グループ本社

*³ 一般財団法人日本穀物検定協会東京分析センター

太さの異なる2種類のうどん生麺, 太麺 (2.5 mm × 3 mm) と細麺 (1.5 mm × 1.5 mm) をそれぞれゆで時間を変えて調理し, 麺の太さとゆで時間による放射性セシウムの動態への影響を評価した. ゆで時間により加工係数は, 太麺で20分間まで, 細麺で4.5分間までは有意に低下したが, それ以降はゆで時間の延長による有意な低下は認められなかった. 残存割合は太麺では10分間で, 細麺では3分間までは有意な低下がみられたが, それ以降は有意な低下は認められなかった. これらのことから, 喫食に適する茹で時間 (太麺では20分間, 細麺では3-4.5分間) での調理で, ゆで麺とゆで湯間の放射性セシウムの濃度勾配が小さくなっており, それ以上の時間ではゆで麺の放射性セシウム濃度の有意な低下は起こらず, 茹で調理により80%以上の放射性セシウムが除去されることが明らかとなった.

Effect of Noodle Size and Boiling Time on Dynamics of Radioactive Cesium During Cooking of Japanese Udon Noodles

Mayumi Hachinohe*¹, Shigehiro Naito*¹, Hajime Akashi*², Setsuko Todoriki*¹, Ushio Matsukura*³, Shinichi Kawamoto*¹, Shioka Hamamatsu*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Nisshin Seifun Group Inc.

*³ Tokyo Research Laboratory, Japan Grain Inspection Association

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(51), 12634-12639 (2013)

O-Methylated Theaflavins Suppress the Intracellular Accumulation of Triglycerides from Terminally Differentiated Human Visceral Adipocytes

Yoshihisa Tanaka*¹, Masanobu Kirita*¹, Satoshi Miyata*¹, Yuko Abe*¹, Motoyuki Tagashira*¹, Tomomasa Kanda*¹, Mari Maeda-Yamamoto*²

*¹ Research Laboratories for Fundamental Technology of Food, Asahi Group Holdings, Limited

*² National Food Research Institute, NARO

知られているメチル化テアフラビンは, テアフラビン-3-O-メチルガラート (3MeTF3G) とテアフラビン-3-O-(3, 5-ジメチル)ガラート (3, 5diMeTF3G) でありテアフラビンガラート (TF3G) のO-メチル化により生合成される. 3MeTF3Gと3, 5diMeTF3GはpH7.5での安定性がTF3Gよりも高く, その安定性は, 3, 5diMeTF3G > 3MeTF3G > の順であった. これらの物質の分化ヒト脂肪細胞への中性脂肪の細胞内集積に対する阻害効果を検討したところ, 3, 5diMeTF3G (3 μ M, 10 μ M) では, TF3Gに比べて有意に強く阻害した.

メチル化テアフラビンはヒト分化内臓脂肪細胞の中性脂肪の細胞内集積を抑制する

田中 善久*¹, 切田 雅信*¹, 宮田 聡*¹, 阿部 祐子*¹, 田頭 素行*¹, 神田 智正*¹, 山本 (前田) 万里*²

*¹ アサヒビールホールディングス

*² (独) 農研機構食品総合研究所

Scientific reports, 3:2749 (2013)

Green tea extract containing a highly absorbent catechin prevents diet-induced lipid metabolism disorder

Takashi Suzuki^{*1}, Motofumi Kumazoe^{*1}, Yoonhee Kim^{*1}, Shuya Yamashita^{*1}, Kanami Nakahara^{*1}, Shuntaro Tsukamoto^{*1},
Masako Sasaki^{*1}, Takatoki Hagihara^{*1}, Yukari Tsurudome^{*1}, Yuhui Huang^{*1}, Mari Maeda-Yamamoto^{*2},
Yuki Shinoda^{*3}, Wataru Yamaguchi^{*3}, Koji Yamada^{*1}, Hirofumi Tachibana^{*1}

^{*1} Division of Applied Biological Chemistry, Kyushu University

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Product Research & Development Laboratory, Asahi Soft Drinks

メチル化カテキンを多く含む茶品種である「べにふうき」エキス及びメチル化カテキンを含まない品種「やぶきた」エキス (0.2%あるいは1%添加) の高脂肪/高蔗糖食負荷マウスに対する効果を評価した。6週間後、べにふうき0.2%投与群では、顕著に血清中性脂肪 (TG)、遊離脂肪酸はやぶきた0.2%投与群に比べて低下した。べにふうき1%投与群では、脂肪組織重量、肝臓TG、肝臓中脂質合成遺伝子発現が減少した。メチル化カテキンが強い脂質低下効果を持つことが示された。

メチル化カテキンを含有するべにふうき緑茶はスギ花粉症の症状を軽減する (RCT試験)

鈴木 隆^{*1}, 熊添 基文^{*1}, Yoonhee Kim^{*1}, 山下 修矢^{*1}, 中原加奈美^{*1}, 塚本俊太郎^{*1},
佐々木雅子^{*1}, 萩原 立春^{*1}, 鶴留ゆかり^{*1}, Yuhui Huang^{*1}, 山本(前田)万里^{*2},
篠田 有希^{*3}, 山口 航^{*3}, 山田 耕路^{*1}, 立花 宏文^{*1}

^{*1} 九州大学農学研究院

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*3} アサヒ飲料(株) 商品開発研究所

Complementary Therapies in Clinical Practice, 19(4), 243-5 (2013)

Effects of Bathing in Hot Springs on the Absorption of Green Tea Catechins: A Pilot Study

Shinya Hayasaka^{*1}, Yasuaki Goto^{*2}, Mari Maeda-Yamamoto^{*3}

^{*1} Daito Bunka University

^{*2} Japan Health and Research Institute

^{*3} National Food Research Institute, NARO

緑茶はカテキンにより有益な効果をもつことが知られている。また、日本では健康維持に重要なこととして温泉に入浴することが知られている。このパイロットスタディでは、緑茶飲用と温泉入浴を組み合わせることが緑茶カテキンの吸収を改善するかどうかを評価した。緑茶飲用のみの血中カテキン濃度と緑茶飲用後温泉入浴したときの血中カテキン濃度を比較したところ、温泉に入浴した方が有意にカテキン (特にEGCG) の吸収率が上昇した。

緑茶カテキンの吸収に及ぼす温泉入浴の影響：パイロットスタディ

早坂 信哉^{*1}, 後藤 康彰^{*2}, 山本(前田)万里^{*3}

^{*1} 大東文化大学

^{*2} (財) 日本健康開発財団

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

日本食品科学工学会誌, 60(8), 407-411 (2013)

ラットにおける「べにふうき」エキスの食後中性脂肪の上昇抑制作用

江頭祐嘉合*1, 蒲原 智子*1, 山口 航*2, 入江ひとみ*1, 豊田 唯*2,
花村 学*1, 平井 静*1, 篠田 有希*2, 山本(前田)万里*3

*1 千葉大学園芸学研究科
*2 (独) 農研機構食品総合研究所
*3 アサヒ飲料(株) 商品開発研究所

「べにふうき」熱水抽出エキスのラットへの経口脂肪負荷試験 (OGTT) を行い, 食後の血中中性脂肪 (TG) の上昇へ及ぼす効果について検討した. コーン油投与後, 対照群では, 血中TGが5時間後に最大値に達し, 徐々に低下して10時間後に初期の値に戻った. 「べにふうき」エキス50mg投与群は, 対照群に比べ有意差はなかったものの2~6時間後で低い値を示した. 「べにふうき」100mg投与群では, 3~6時間後で対照群に比べ有意に低い値を示し, AUCに関しても対照群と比較して有意に低下した.

Suppression of postprandial hypertriglyceridemia in rats by Benifuuki tea extract

Yukari Egashira*1, Tomoko Kamohara*1, Wataru Yamaguchi*2, Hitomi Irie*1, Yui Toyoda*2,
Manabu Hanamura*1, Shizuka Hirai*1, Yuki Shinoda*2, Mari Maeda-Yamamoto*3

*1 Graduate School of Horticulture, Chiba University
*2 Product Research & Development Laboratory, Asahi Soft Drinks
*3 National Food Research Institute, NARO

JARQ, 46(4), 321-328 (2012)

‘Sunrouge’, a new tea cultivar with high anthocyanin

Atsushi Nesumi*1, Akiko Ogino*1, Katsuyuki Yoshida*1, Fumiya Taniguchi*1,
Mari Maeda-Yamamoto*1, Junichi Tanaka*1, Akira Murakami*2

*1 NARO Institute of Vegetable and Tea Science,
*2 Nippon Paper Group, Inc.

「サンルージュ」は「茶中間母本農6号」を育種素材とし, その実生集団の中から選抜したアントシアニン含有量の豊富な茶品種である. 「サンルージュ」のアントシアニン含量は茶中間母本農6号より多い. 「サンルージュ」は「やぶきた」と同様, やや早生品種である. また, 炭疽病や輪斑病に比較的強い抵抗性を示し, 芽数が多く, 仕立てやすいなど栽培特性に優れている. また, 光独立栄養培養法で発根させた後, セル育苗した苗木を定植した場合, 圃場での活着, 定植後の生育が優れる特徴がある.

アントシアニンを多く含む新しい茶品種「サンルージュ」

根角 厚司*1, 荻野 暁子*1, 吉田 克志*1, 谷口 郁也*1,
山本(前田)万里*1, 田中 淳一*1, 村上 明*2

*1 (独) 農研機構野菜茶業研究所
*2 日本製紙グループ

Biosci. Biotechnol. Biochem, 77(6), 1223-1228 (2013)

Low and medium but not high doses of green tea polyphenols ameliorated dextran sodium sulfate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity

Hirofumi Inoue*¹, Mari Maeda-Yamamoto*², Atsushi Nesumi*³, Akira Murakami*¹

*¹ Kyoto University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ NARO Institute of Vegetable and Tea Science

今までの研究では、緑茶ポリフェノール (GTP) を高濃度 (1%) で含む食事で飼育したマウスは、熱ショックタンパク質 (HSP) や酸化酵素の減少により肝臓や腎臓の機能が損なわれることがわかっている。ここでは、それより低い濃度 (0.01%, 0.1%) の GTP を添加したデキストラン硫酸 (DSS) で暴露したマウスの肝臓や腎臓に対する効果について検討した。0.01%, 0.1% GTP 投与群では、血清 AST, ALT レベルが対照群に比べて有意に低下した。反対に、1% 投与群では、腎臓重、血清クレアチニン値、腎臓や肝臓での TBARS が増加した。また、0.01%, 0.1% 添加群では顕著に HO-1 や HSP70 の mRNA 発現が上昇した。この結果から低濃度の GTP は自己の防御酵素を増強することにより DSS 誘導肝毒性に有効な影響を与えることがわかった。

高濃度ではない低・中濃度緑茶ポリフェノールはデキストラン硫酸誘導肝毒性を改善する

井上 博文*¹, 山本(前田)万里*², 根角 厚司*³, 村上 明*¹

*¹ 京都大学(院) 農学研究科

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ (独) 農研機構野菜茶業研究所

Current Pharmaceutical Design, 19(34), 6148-6155 (2013)

Human Clinical Studies of Tea Polyphenols in Allergy or Life Style-related Diseases

Mari Maeda-Yamamoto

National Food Research Institute, NARO

緑茶カテキンの過去の疫学研究についてレビューを行った。緑茶の飲用と動脈硬化や2型糖尿病発症リスクとは負の関係にあることが数多くの論文に示されている。またヒト介入試験(RCT)においても緑茶の連続飲用が血中のLDLコレステロール値を有意に低下させること、体重維持に効果的であることが示された。空腹時血糖の低下には効果を示すが、HbA1cの低下には寄与しないという報告もある。また、抗アレルギー効果では、メチル化カテキン(エピガロカテキン-3-O-(メチル)ガレート)を多く含む茶品種であるべにふうき緑茶を長期飲用することにより、メチル化カテキンを含まないやぶきた緑茶飲用と比較して有意に鼻症状や目症状の悪化が改善されることが報告されている。

アレルギー、生活習慣病に関する茶ポリフェノールの人介入試験

山本(前田)万里

(独) 農研機構食品総合研究所

Food Nutrition Sciences, 4, 98-104 (2013)

Investigation of β -cryptoxanthin fatty acid ester compositions in citrus fruits cultivated in Japan

Yusuke Wada^{*1}, Atsuki Matsubara^{*1}, Takato Uchikata^{*1}, Yugo Iwasaki^{*2}, Satochi Morimoto^{*3},
Katsuta Kan^{*4}, Tetsuya Ookura^{*5}, Eiichiro Fukusaki^{*1}, Takeshi Bamba^{*1}

^{*1} Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University

^{*2} Graduate School of Agricultural Sciences, Nagoya University

^{*3} Food Research Center, Ehime Institute of Industrial Technology

^{*4} Omishima Fruits Processing

^{*5} National Food Research Institute, NARO

本稿では、日本産柑橘9品種と海外産柑橘1品種について超臨界クロマトグラフィ-トリプル四重極マススペクトロメトリ-(SFC/QqQMS)を用いて、果皮及び果実に含まれる β クリプトキサンチン及びその脂肪酸エステル体の組成を明らかにした。各品種とも、 β クリプトキサンチン、ラウリン酸エステル、ミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル及びオレイン酸エステルが主に含まれていたが、品種ごとに果皮と果実に含まれる脂肪酸エステルの組成は異なることが明らかとなった。このことからSFC/QqQMSの有用性が示された。

日本産柑橘品種における β クリプトキサンチン脂肪酸エステル組成の分析

和田 雄介^{*1}, 松原 惇起^{*1}, 内方 崇人^{*1}, 岩崎 雄吾^{*2}, 森本 聡^{*3},
菅 剋太^{*4}, 大倉 哲也^{*5}, 福崎英一郎^{*1}, 馬場 健史^{*1}

^{*1} 大阪大学 工学部

^{*2} 名古屋大学 工学部

^{*3} 愛媛県産業技術研究所 食品産業技術センター

^{*4} (株)大三島果汁

^{*5} (独)農研機構食品総合研究所

Food Science and Technology Research, 19(2-3), 303-311(2013)

Distribution of Starch-degrading Enzymes in Rice Grains of different cultivars and Elution Behavior during Cooking

Mika Tsuyukubo^{*1}, Tetsuya Ookura^{*2}, Midori Kasai^{*1}

^{*1} Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University

^{*2} National Food Research Institute, NARO

イネ種子はデンプン分解酵素(α グルコシダーゼ, α アミラーゼ, β アミラーゼ, プルナーゼ, イソアミラーゼ)を含んでいる。我々は、各酵素の生米における分布及び炊飯過程における溶出挙動を各酵素に対する抗体を用いて日本晴と羽二重糯とで解析を行った。その結果、特定の酵素は品種間で生米中の分布が異なり、また溶出挙動にも差が認められた。以上のことから、異なる品種の米を炊飯する際には、これらデンプン分解酵素の分布と酵素によるデンプンの分解の違いを考慮に入れるべきであると考えられた。

異なる品種におけるデンプン分解酵素の分布と炊飯過程での溶出挙動解析

露久保美夏^{*1}, 大倉 哲也^{*2}, 香西みどり^{*1}

^{*1} お茶の水女子大学 人間文化創成科学

^{*2} (独)農研機構食品総合研究所

Journal of Functional Foods, 5(4), 1991-1995(2013)

Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of Chinese fermented soy paste and estimation of inhibitory substances

Fengjuan Li^{*1,*2}, Mayumi Ohnishi-Kameyama^{*1}, Yoko Takahashi^{*1}, and Kohji Yamaki^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Tianjin University, China

中国市販味噌の水溶性抽出物のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 抑制活性が測定された。北部中国の6つの製品がIC50値で40 µg/mlより小さい値で抑制効果を示した。最も強い活性の試料から活性成分が、限外濾過、固相抽出カラム、高速液体クロマトグラフィー法で精製が行われた。詳細な機器分析よりこの活性成分は分子量328.1で組成式C₁₅H₂₁NO₇と決定された。それはフェニルアラニンとグルコースのメイラード反応の産物であると推定された。これらの結果より、このACE抑制活性は、様々な活性物質の総合的な抑制であり、中国味噌はその機能を有する素材として有望であると判断された。

中国味噌のアンジオテンシンI変換酵素抑制活性と抑制物質の推定

李風 娟^{*1,*2}, 亀山真由美^{*1}, 高橋 陽子^{*1}, 八巻 幸二^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 天津大学

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(40), 9697-9704(2013)

Tea polyphenols as novel and potent inhibitory substances against renin activity

Fengjuan Li^{*1,*2}, Mayumi Ohnishi-Kameyama^{*1}, Yoko Takahashi^{*1}, and Kohji Yamaki^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Tianjin University, China

3つの茶製品のレニン抑制活性が調べられた。ウーロン茶と紅茶の水溶性抽出物は強いレニン抑制活性を示した。限外濾過法、高速液体クロマトグラフィー、吸収スペクトルの手法で紅茶の4つの成分が同定され、それらはtheasinensin B, theasinensin C, strictinin, そして、ガロ基の結合した硫酸基結合6炭糖であった。それらは19.33, 40.21, 311.09, 50.16 µMのIC50値を示した。最も強い活性のtheasinensin Bは紅茶にのみ存在し、カテキンの単体はレニンの抑制に関与しなかった。これらの結果から、茶由来の新しい抑制物質が明らかになり、血圧調節におけるお茶飲用効果の可能性が指摘された。

レニン活性に対する新しい有効な抑制物質としての茶ポリフェノール

李風 娟^{*1,*2}, 亀山真由美^{*1}, 高橋 陽子^{*1}, 八巻 幸二^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 天津大学

Biomedical Research, 34(3), 167-171(2013)

Inhibitory Effect of Catechin-Related Compounds on Renin Activity

Fengjuan Li^{*1,*2}, Yoko Takahashi^{*1}, and Kohji Yamaki^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Tianjin University, China

レニンとはレニンアンジオテンシン系の重要な酵素で、その活性の抑制は血圧調節に有効な手段と考えられている。この報告でカテキン関連物質の抑制効果を検討した。エビガロカテキンガレートは、IC50値で44.53 μ Mと最も高値で、不競拮抗阻害であった。ガロ基の結合したカテキンは結合しない物と比較しより強い活性を示した。没食子酸はエビカテキンガレートの活性と同等であった。この結果から、ガロイル基とオルト位水酸基フェノール構造がこれら化合物のレニン抑制活性に重要であることが明らかになった。

カテキン関連物質のレニン活性抑制効果

李風 娟^{*1,*2}, 高橋 陽子^{*1}, 八巻 幸二^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 天津大学

食品総合研究所研究報告, 78, 65-71(2014)

産地および収穫時期の違いがホウレンソウ・小松菜・トマト・キュウリの抗酸化能に及ぼす影響

若木 学, 渡辺 純, 石川(高野) 祐子

(独) 農研機構食品総合研究所

酸化ストレスが様々な疾病に寄与していることが明らかにされており、食品由来の抗酸化物質の摂取が重要視されてきている。本研究では、ラジカル捕捉能を測定するORAC法を用いて、産地および収穫時期によるホウレンソウ、小松菜、トマト、およびキュウリの抗酸化能の変動に関して基礎的な知見を得ることを目的とした。その結果、産地および収穫時期は野菜の親水性抗酸化物質に影響を及ぼすことを明らかにした。

Effects of producing area and harvest season on antioxidant activities of spinach, komatsuna, tomato, and cucumber

Manabu Wakagi, Jun Watanabe, Yuko Takano-Ishikawa

National Food Research Institute, NARO

Molecular Nutrition & Food Research, 57(10), 1794-1802(2013)

10-Hydroxy-2-decenoic acid, a unique medium-chain fatty acid, activates 5'-AMP-activated protein kinase in L6 myotubes and mice.

Masathito Takikawa^{*1}, Aya Kumagai^{*1}, Harumi Hirata^{*1}, Minoru Soga^{*1}, Yoko Yamashita^{*2}, Manabu Ueda^{*2}, Hitoshi Ashida^{*2}, Takanori Tsuda^{*1}

^{*1} College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

^{*2} Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

10-ヒドロキシ-2-デセン酸 (10H2DA) はローヤルゼリー中に含まれる特異な中鎖脂肪酸のひとつである。10H2DAが骨格筋のモデル細胞においてエネルギー代謝の鍵分子であるAMPキナーゼを活性化し、その結果グルコーストランスポーター4の細胞膜移行上昇と、これに伴うグルコース取り込みを上昇させることを見出した。さらにこの作用機序を解明したところ、Ca²⁺-dependent Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase β (CaMKK β)を介してAMPキナーゼを活性化することがわかった。10H2DAによるAMPキナーゼの活性化とグルコーストランスポーター4の細胞膜移行上昇はマウス骨格筋においても同様に認められた。

10-ヒドロキシ-2-デセン酸は骨格筋においてAMPキナーゼの活性化を促進する

滝川 雅仁^{*1}, 熊谷 綾^{*1}, 平田 晴実^{*1}, 曾我 実^{*1}, 山下 陽子^{*2}, 上田 学^{*2}, 芦田 均^{*2}, 津田 孝範^{*1}

^{*1} 中部大学応用生物学部

^{*2} 神戸大学農学部

日本食品工学会誌, 60(10), 563-566(2013)

北海道産タマネギ品種のケルセチン含有量と抗酸化能の差異

渡辺 純^{*1}, 室 崇人^{*2}, 柳田 大介^{*3}, 山岸 喬^{*4}, 石川 (高野) 祐子^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} (独) 農研機構北海道農業研究センター

^{*3} (地独) 北海道総合研究機構農業研究本部北見農業試験場

^{*4} 北見工業大学

北海道産タマネギ9品種のケルセチン配糖体, ORAC法による抗酸化能測定値および総ポリフェノール含有量を比較した。その結果, ケルセチン配糖体含有量は 31.24 ± 2.15 から 133.7 ± 8.88 $\mu\text{mol}/100\text{g FW}$ の範囲, ORAC値は 878.1 ± 44.7 から $2,075.6 \pm 168.6$ $\mu\text{mol TE}/100\text{g FW}$ の範囲, 総ポリフェノール含有量は 22.65 ± 1.41 から 48.44 ± 1.35 $\text{mg GAE}/100\text{g FW}$ の範囲であり, いずれも「月交24号」が最も高値を示した。また, タマネギ中の主要な抗酸化物質はケルセチン配糖体であり, 「月交24号」はケルセチン配糖体を高含有する品種であるため, 高い抗酸化能を示したと考えられた。

Varietal Differences in Quercetin Contents and Antioxidant Capacities of Onions

Jun Watanabe^{*1}, Takato Muro^{*2}, Daisuke Yanagida^{*3}, Takashi Yamagishi^{*4}, Yuko Takano-Ishikawa^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Hokkaido Agricultural Research Center, NARO

^{*3} Kitami Agricultural Experiment Station, Hokkaido Research Organization

^{*4} Kitami Institute of Technology

Bioscience Biotechnology and Biochemistry 77(4), 857-859(2013)

Improvement of the lipophilic-oxygen radical absorbance capacity (L-ORAC) method and single-laboratory validation

Jun Watanabe^{*1}, Tomoyuki Oki^{*2}, Jun Takebayashi^{*3}, Koji Yamasaki^{*4},
Yuko Takano-Ishikawa^{*1}, Akihiro Hino^{*1}, Akemi Yasui^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO

^{*3} National Institute of Health and Nutrition

^{*4} Taiyo Kagaku Co.

親油性酸素ラジカル吸収能測定法 (L-ORAC法) を改良した測定プレート上部にプレートシールを測定中に貼付し, 試料の取り扱いにはガラスバイアルとカラスキャピラリーをつけたマイクロディベンサーを用いることが精度の向上に重要であった。抗酸化物質溶液を用いて抗酸化能測定の併行精度, 中間精度を改良法と従来法の間で比較した。従来法の併行精度および中間精度は相対標準偏差として10.0-24.5%, および9.3-32.5%であったが, 改良法ではそれぞれ1.3-8.0%および5.0-9.5%と顕著な精度の向上が認められた。食品抽出液の抗酸化能も改良法を用いると, 抗酸化物質溶液と同程度の精度で測定可能であった。

親油性酸素ラジカル吸収能測定法 (L-ORAC法) の改良と単一試験室での再現性試験

渡辺 純^{*1}, 沖 智之^{*2}, 竹林 純^{*3}, 山崎 光司^{*4},
石川 (高野) 祐子^{*1}, 日野 明寛^{*1}, 安井 明美^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} (独) 農研機構九州・沖縄農業研究センター

^{*3} (独) 国立健康・栄養研究所

^{*4} (独) 太陽化学株式会社

近畿中国四国農業研究, 22, 43-49 (2013)

ブラッドオレンジ 'タロッコ' 果肉中のアントシアニンおよびフラボノイド含量が水溶性酸素ラジカル吸収能 (H-ORAC) に及ぼす影響

伊藤 史郎*¹, 石々川英樹*¹, 清水 篤*¹, 菊池 毅洋*²,
毛利 幸喜*^{2,3}, 森重 陽子*^{2,3}, 石川 (高野) 祐子*⁴

*¹ 愛媛県農林水産研究所

*² 愛媛県農林水産研究所果樹研究センターみかん研究所

*³ 愛媛県中予地方局産業振興課

*⁴ (独) 農研機構食品総合研究所

ブラッドオレンジ 'タロッコ' の果肉に含有されるアントシアニンおよびフラボノイドの含量について、流通時期別に調査し、さらに水溶性酸素ラジカル吸収能に及ぼす影響を明らかにした。

Effect of anthocyanin and flavonoid content on oxygen radical absorbance capacity in flesh blood orange 'Tarocco'

Fumiaki ITO*¹, Hideki ISHIISHIKAWA*¹, Atsushi SHIMIZU*¹, Takehiro KIKUCHI*²,
Kouki MOURI*^{1,3}, Yoko MORISHIGE*^{1,3}, Yuko TAKANO-ISHIKAWA*⁴

*¹ Ehime Research Institute of Agriculture, Forestry and Fisheries

*² Ehime Research Institute for Citrus Fruits

*³ Xhyo Regional Office Ehime Prefecture

*⁴ National Food Research Institute, NARO

Bangladesh Journal of Botany, 42(1), 175-177 (2013)

Total phenol content of different varieties of brinjal (*Solanum melongena* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.) growing in Bangladesh

Nazma Shaheen*¹, Ali Abbas Mohammad Kurshed*¹, Kazi Muhammad Rezaul Karim*¹,
Md Mohiduzzaman*¹, Cadi Parvin Banu*¹, Momtaz Begum*¹, Yuko Takano Ishikawa*²

*¹Dakka University

*²National Food Research Institute, NARO

バングラデシュ産ナス、ジャガイモの総ポリフェノールの品種間差異を見たところ、ナスは $3.16 \pm 0.04 - 7.86 \pm 0.33$ mg GAE(没食子酸等量) /gFW(生鮮重)であった。同様にジャガイモの品種間差では、皮付きの方が皮なしよりも高い総ポリフェノールを示した。BARI Begun-8という多収量品種はポリフェノールの摂取源として適しており、食物由来の抗酸化物質の摂取源と考えることができる。

バングラデシュ産ナス、ジャガイモの総ポリフェノールの品種間差異

ナズマ シャヒーン*¹, アリ アッバス モハメド クルシェド*¹, カジム ハマドラザル カリム*¹,
モハメド モヒデ ザマン*¹, カディ パルヴィン バヌ*¹, モタズ ベグム*¹, 石川 (高野) 祐子*²

*¹ダッカ大学

*²(独)農研機構食品総合研究所

日本食品科学工学会誌, 60(5), 233-236(2013)

牛乳アレルギータンパク質のステンレストレー上での加熱反応生成物

新本 洋士*1, 市川 由佳里*1, 永田 紗織*2, 三浦 愛美*1, 長縄 康範*1, 石川 (高野) 祐子*3

*1玉川大学農学部
*2茨城大学大学院農学研究科
*3(独)農研機構食品総合研究所

加熱による牛乳アレルギーの分子量変化を検討するために、市販牛乳、およびβ-ラクトグロブリンとラクトースの混合物をステンレストレー上で120°C、60分間加熱した。SDS-PAGE解析の結果、加熱した牛乳においては牛乳タンパク質の分子量が高分子側にシフトした。β-ラクトグロブリンにおいては、加熱によって2量体、あるいは3量体が生じた。またラクトースとの加熱によってβ-ラクトグロブリンの分子量は高分子側にシフトし、PAS染色によって糖鎖修飾されたことが判明した。さらに抗β-ラクトグロブリン抗体を用いたウェスタンブロット解析によって、単量体、2量体、3量体に加え、ブロードな多量体が検出されたことから、加熱されたβ-ラクトグロブリンが抗原性を保持していることが示唆された。

PAGE-Analysis of Milk Allergens after Heating on Stainless Steel Tray

Hiroshi Shinmoto*1, Yukari Ichikawa*1, Saori Nagata*2, Megumi Miura*1, Yasunori Naganawa*1, Yuko Takano-Ishikawa*3

*1Tamagawa University
*2Graduate School of Agriculture, Ibaraki University
*3 National Food Research Institute, NARO

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 53, 41-48 (2013)

Possible role of S-equol on bone loss via amelioration of inflammatory indices in ovariectomized mice

Yoriko Nishide*1,*2, Miki Tadaishi*1, Masuko Kobori*3, Yuko Tousei*1, Michiko Kato*1,
Masaki Inada*1, Chisato Miyaura*2, Yoshiko Ishimi*1

*1 Department of Food Function and Labeling, National Institute of Health and Nutrition
*2 Cooperative Major in Advanced Health Science, Tokyo University of Agriculture and Technology
*3 National Food Research Institute, NARO

S-エクオールは大豆イソフラボンであるダイゼインの腸内細菌による代謝産物である。S-エクオールは他の大豆イソフラボンに比べて高いエストロゲン活性を示し、閉経後女性の骨量減少を予防する。エストロゲンは骨髄において、互いに密接に関連する骨のリモデリングと血液生成を制御する。そこで、S-エクオールが閉経後骨粗鬆症モデル動物の骨量と骨髄細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。12週齢の雌のddyマウスに卵巣摘出あるいは偽手術を行い、それぞれを2群に分けて、コントロール又は0.06% (w/w) S-エクオール添加食摂取群とした。その結果、骨粗鬆症モデルマウスにおいては2週間後に大腿骨幹端の骨量は顕著に減少したが、その減少はエクオールの摂取により緩和された。また、炎症、破骨細胞形成及び脂肪合成に関わる遺伝子発現は骨粗鬆症モデルで増加したが、これらの発現増加はS-エクオールにより抑制された。本研究により、エクオールはエストロゲン欠乏により引き起こされる骨量の減少を、骨髄における血液生成と炎症性サイトカイン産生の制御を介して軽減することが明らかになった。

S-エクオールが卵巣切除マウスの炎症指数の改善を介して骨量減少に果たし得る役割

西出 依子*1,*2, 只石 幹*1, 小堀真珠子*3, 東泉 裕子*1, 加藤美智子*1,
稲田 全規*1, 宮浦 千里*2, 石見 佳子*1

*1 (独) 国立健康・栄養研究所 保健機能研究部
*2 東京農工大学生命工学科
*3 (独) 農研機構食品総合研究所

Food Chemistry, 141(2), 1192-1195(2013)

Corn oil and milk enhance the absorption of orally administered allyl isothiocyanate in rats

Katsunari Ippoushi*1, Hiroshi Ueda*2, Atsuko Takeuchi*2

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 NARO Institute of Vegetable and Tea Science

芥子油の主要成分アリルイソチオシアネート (AITC) は、腫瘍培養細胞および動物モデルに於いて、抗腫瘍作用を示す。水、緑茶、牛乳、10%エタノールまたはコーン油にAITCを溶解したものを経口投与したラット尿中のAITC-N-アセチルシステイン抱合体 (AITC-NAC, AITCの最終代謝物) 量を測定した。コーン油または牛乳にAITC (2, 4 μ mol) を溶解したものを経口投与した尿中のAITC-NAC量は、 1.4 ± 0.22 , $2.7 \pm 0.34 \mu\text{mol}$ または 1.2 ± 0.32 , $2.5 \pm 0.36 \mu\text{mol}$ で、水に溶解した場合 (0.78 ± 0.10 , $1.7 \pm 0.17 \mu\text{mol}$) と比較して、1.6, 1.8倍または1.5倍と多くなった。この結果は、コーン油および牛乳がラットのAITC吸収を高めることを示している。

コーン油および牛乳はラットに於いて経口投与したアリルイソチオシアネートの吸収を高める

一法師 克成*1, 上田 浩史*2, 竹内 敦子*2

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 (独) 農研機構野菜茶業研究所

Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 83(1), 81-89(2014)

Differences in Cell-wall Polysaccharide Degradation during Softening Process in Two Cultivars of Japanese Apricot Fruits

Yasuhisa Tsuchida*1, Hiroshi Yakushiji*2, Takaaki Oe*1, Keiichi Negoro*1, Nobuki Gato*3, Tatsuya Kotani*3, Yuriko Onishi*3, Takamichi Kobata*4, Motoi Tamura*5

*1 Japanese Apricot Laboratory, Wakayama Fruit Tree Experiment Station

*2 NARO Institute of Fruit Tree Science

*3 Food Science Research Laboratory, Nakano BC Co. Ltd.,

*4 R & D Department, Kobata Research Institute Limited.,

*5 National Food Research Institute, NARO

和歌山県のウメ主要品種 '南高'果実と '古城'果実の2品種の和歌山県のウメ主要品種 '南高'果実は '古城'に比べて柔らかい肉質を持っている。そのため、これらの品種の加工適性には違いがある。そこで筆者らは、果肉硬度に影響を与える細胞壁多糖類の分解特性を、これら2品種の果実軟化過程において調査したところ、ウメ果肉の細胞壁中ペクチンとヘミセルロースの崩壊がウメ果実の軟化の原因と考えられた。'南高'の軟化過程におけるペクチン中の中性糖および酸性糖、ヘミセルロース中の中性糖の減少量は、'古城'に比べて多かった。さらに'南高'ではセルロース含量が減少した。以上の結果から、'南高'は軟化過程で細胞壁のペクチン、ヘミセルロースおよびセルロース量が著しく減少することによって、'古城'に比べて柔らかい果肉になると考えられた。

ウメ2品種の果実軟化過程における細胞壁多糖類の分解特性

土田 靖久*1, 薬師寺 博*2, 大江 孝明*1, 根来 圭一*1, 我藤 伸樹*3,
小谷 竜也*3, 大西由里子*3, 小畑 貴路*4, 田村 基*5

*1和歌山県果樹試験場うめ研究所

*2 (独) 農業研究機構果樹研究所

*3 (株) 中野 BC 食品科学研究所

*4 (有) コバタ総合研究所

*5 (独) 農研機構食品総合研究所

International Journal of Molecular Sciences, 14(12), 23993-4007 (2013)

Xylitol affects the intestinal microbiota and metabolism of daidzein in adult male mice

Motoi Tamura, Chigusa Hoshi, Sachiko Hori

National Food Research Institute, NARO

ダイゼイン代謝に及ぼすキシリトールの影響を動物試験によって検討した。

ICR系雄マウスに5%キシリトールと0.05%ダイゼインを添加した食餌(キシリトール食)もしくは0.05%ダイゼインを添加した食餌を給餌(対照食)したところ、尿へのエコール排泄量は、キシリトール食群は、対照食群に比べて有意に高値を示した。盲腸内菌叢の構成は、キシリトール食群と対照食群とで異なっていた。キシリトールは、腸内菌叢のダイゼインからエコールへの産生を高める可能性が示唆された。

キシリトールは成熟雄マウスの腸内菌叢とダイゼイン代謝に影響をおよぼす。

田村 基, 星 千草, 堀 幸子

(独) 農研機構食品総合研究所

Computers in Human Behavior, 33, 1-7 (2014)

Clerk agent promotes consumers' ethical purchase intention in unmanned purchase environment

Atsushi Kimura*1, Naoki Mukawa*1, Masahide Yuasa*2, Tomohiro Masuda*3, Mana Yamamoto*4, Takashi Oka*5, Yuji Wada*3

*1 Department of Information Environment, Tokyo Denki University

*2 Department of Applied Computer Sciences, ShonanInstitute of Technology

*3 National Food Research Institute, NARO

*4 Graduate School of Literature and Social Science, Nihon University

*5 Department of Psychology, Nihon University

日本人消費者におけるフェアトレード商品の購買意図に購入環境における人工的な人物の存在が与える影響について検討した。実験では女性の店員を模したCGエージェントが課題を説明する条件と、テキストボックスで課題を説明する条件を設けた。その結果、エージェント条件の実験参加者はテキストボックスで説明される条件の参加者よりもフェアトレード商品を高く評価することがわかった。

店員エージェントが購買環境における倫理的購入意図を促進する

木村 敦*1, 武川 直樹*1, 湯浅 将英*2, 増田 知尋*3, 山本 真菜*4, 岡 隆*5, 和田 有史*3

*1 東京電機大学環境情報学部

*2 湘南工科大学コンピュータ応用学科

*3 (独) 農研機構食品総合研究所

*4 日本大学大学院文学研究科

*5 日本大学心理学科

日本味と匂学会誌, 20(3), 291-294(2013)

うま味を嗜好するマウスを用いたうま味修飾物質の力価測定

河合 崇行, 日下部裕子

(独) 農研機構食品総合研究所

学習・飼育条件の検討し, グルタミン酸ナトリウム溶液に対して濃度依存的に嗜好性を示すマウスを作成した. そのマウスを用いて, MSG, IMP-Na, GMP-Na, コハク酸Na, あるいはそれらの混合溶液に対する10秒間リック試験を行った. その結果, 本実験条件下では, MSG溶液0.1 ~ 1.6モルの範囲でS字状のリック曲線が得られた. 30 mMのNaClを加えると, 0.17倍程度の嗜好性上昇が認められた. 8 mMのIMP-Naを加えた場合は約26倍, 8 mMのGMP-Naを加えた場合は約23倍, 100 mMのコハク酸Naを加えた場合は約2.7倍の嗜好性上昇が認められた.

Evaluation of umami-modifying substances using umami preferring mice

Kawai Takayuki, Kusakabe Yuko

National Food Research Institute, NARO

PLoS ONE, 8(10), e786214(2013)

Perception of elasticity in the kinetic illusory object with phase differences in inducer motion

Tomohiro Masuda*¹, Kazuki Sato*², Takuma Murakoshi*³, Ken Utsumi*¹, Atsushi Kimura*^{1, *4},
Nobu Shirai*⁵, So Kanazawa*⁶, Masami K. Yamaguchi*², Yuji Wada*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Department of Psychology, Chuo University

*³ Behavioral and Cognitive Neuroscience Unit, RIKEN BSI-TOYOTA Collaboration Center

*⁴ Department of Information Environment, Tokyo Denki University

*⁵ Department of Psychology, Niigata University

*⁶ Department of Psychology, Japan Women's University

主観的輪郭は図形が運動していても知覚されていることは知られているが, 主観的輪郭によって生じた面の変形や剛体性の変化を含んでいるかは知られていなかった. そこで, 正方形の主観的輪郭を生じさせる誘導図形の垂直線分を, 正方形の頂点を始点として振り子運動させ, 上下の振り子運動間の時間的なずれ(位相差)を生じさせた視覚刺激を被験者に観察させ, 主観的な面の素材が異なって知覚されるかどうかを検討した. また, 多次元尺度構成法を用いて, 上記の刺激に観察される主観的輪郭が曲線, 直線のいずれに近いのかを検討した.

その結果, 位相差の程度に従い, 体系的に錯覚によって生じる面の硬さの印象が入れ替わることが明らかになった. また, 本研究で用いた誘導図形の運動に伴う主観的輪郭は曲線に近いことが示された. これらの結果は, 観察対象に含まれる運動の位相差が物性の知覚を左右する要因である事を示した.

誘導図形の位相差を伴う動的な主観的輪郭における弾性知覚

増田 知尋*¹, 佐藤 夏月*², 村越 琢磨*³, 内海 建*¹, 木村 敦*^{1, *4},
白井 述*⁵, 金沢 創*⁶, 山口 真美*², 和田 有史*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 中央大学心理学科

*³ (独) 理化学研究所BSI-トヨタ連携センター

*⁴ 東京電機大学環境情報学部

*⁵ 新潟大学心理学科

*⁶ 日本女子大学心理学科

Memory color effect induced by familiarity of brand logos

Atsushi Kimura*¹, Yuji Wada*², Tomohiro Masuda*², Sho-ichi Goto*²,
Daisuke Tsuzuki*³, Haruo Hibino*⁴, Dongsheng Cai*⁵, Ippeita Dan*³

*¹ Department of Information Environment, Tokyo Denki University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Faculty of Science and Engineering, Chuo University

*⁴ Graduate School of Engineering, Chiba University,

*⁵ Graduate School of System and Information Engineering, University of Tsukuba

果物などのよく知られている物の色を画面上で主観的に無色に見えるように調整させると実際の無色よりも記憶している色の反対側の色に調整される。これを記憶色効果という。一方でこれが物への馴染みの影響によって生じるのかどうかは明らかになっていない。そこで本研究では食品関連会社のブランドロゴを用いて、馴染みの程度と記憶色効果の大きさについて検討した。実験1では、馴染みが高いロゴ、中程度のロゴ、低いロゴを用いて、ブランドロゴを灰色に調整させる実験を行った。その結果、馴染みが高いブランドロゴのみで記憶色効果が生じた。さらにブランドの店舗数と記憶色効果の間に相関が見られた。実験2では、ブランドのロゴと製品の結びつきを意味プライミング課題で検討した。その結果、馴染みが高いブランドロゴで正しい色の場合にのみ、馴染みが低いブランドよりも強い意味的な連合が見られた。その一方、無色や反対色の場合ではそのような効果が見られなかった。

ブランドロゴの親近性に誘発される記憶色効果

木村 敦*¹, 和田 有史*², 増田 知尋*², 後藤 祥一*²,
續木 大介*³, 日比野治雄*⁴, 蔡 東生*⁵, 檀一 平太*³

*¹ 東京電機大学環境情報学部

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 中央大学理工学部

*⁴ 千葉大学工学部

*⁵ 筑波大学大学院システム情報工学研究科

Differential Functioning of Retrieval/Comparison Processing in Detection of the Presence and Absence of Change

Takuma Murakoshi*¹, Masako Hisa*², Yuji Wada*¹, Yoshihisa Osada*²

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Department of Psychology, Rikkyo University

変化の見落とし現象には変化の検出と無変化の検出の二種類が考えられる。無変化の検出は変化の検出に比べて困難と考えられているが、両者に対する検索・比較処理の違いは明らかでなく、本研究はこの機能の違いについて検討した。20人の実験参加者に対して、複数の無変化アイテムの中から一つの変化アイテムを検出する変化検出課題と、複数の変化アイテムの中から一つの無変化アイテムを検出する無変化検出課題の二種類の変化検出課題を課した。正答率およびA'に対する分散分析の結果、(1) 変化の検出は無変化の検出に比べて容易で、(2) 変化を棄却することは変化を受容することよりも容易なのに対し、(3) 無変化を棄却することは無変化を受容することと同様に困難であることが示された。これらの結果は変化の検出と無変化の検出に対する検索・比較処理は異なり、検索・比較処理がアイテムが変化したことに特化して検出を行うのに対し、アイテムが同じであることは検出しないため生じたと考えられる。このことは、視覚場面の変化の検索・比較処理とは別に、各アイテムが直前に観察されたアイテムと同じのものであると想定する処理が存在することを示唆する。

変化の検出と無変化の検出における検索・比較処理の異なる機能

村越 琢磨*¹, 久 雅子*², 和田 有史*¹, 長田 佳久*²

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 立教大学心理学科

Infant Behavior & Development, 36, 557- 563 (2013)

Infants' perception of curved illusory contour with motion

Kazuki Sato*¹, Tomohiro Masuda*², Yuji Wada*², Nobu Shirai*³, So Kanazawa*⁴, Masami K. Yamaguchi*¹

*¹ Department of Psychology, Chuo University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Department of Psychology, Niigata University

*⁴ Department of Psychology, Japan Women's University

ネオンカラー拡散を伴う正方形の主観的輪郭を生じさせる誘導図形の垂直線分を、正方形の頂点を始点として振り子運動させ、上下の振り子運動間の時間的なずれ（位相差）を生じさせた視覚刺激を成人の実験参加者に観察させると、主観的な面の素材が非剛体に知覚され、位相差がない場合は剛体が観察される。本研究では、選好注視法により3-8ヶ月児が運動する主観的輪郭図形が生じる図形と生じない図形を区別するかどうかを検討した。その結果、7-8ヶ月児は位相差を伴う主観的輪郭図形に対する選好を示したが、3-6ヶ月児には選好はなかった。実験2では、本研究で用いた視覚刺激の妥当性を検証するために、乳児が今回のネオンカラー拡散を伴う図形に主観的輪郭が検出できることを検証した。これらの実験の結果、非剛体運動を伴う主観的輪郭が7-8ヶ月児は知覚していることを示唆した。

乳児における運動を伴う曲線的な主観的輪郭の知覚

佐藤 夏月*¹, 増田 知尋*², 和田 有史*², 白井 述*³, 金沢 創*⁴, 山口 真美*¹

*¹ 中央大学心理学科

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 新潟大学心理学科

*⁴ 日本女子大学心理学科

PLoS ONE, 8(3), e58994(2013)

Glossiness and Perishable Food Quality: Visual Freshness Judgment of Fish Eyes Based on Luminance Distribution

Takuma Murakoshi*¹, Tomohiro Masuda*¹, Ken Utsumi*¹, Kazuo Tsubota*², Yuji Wada*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² School of Medicine, Keio University

視覚による生鮮食品の鮮度知覚は画像の輝度分布に影響されるが、食品の個体差によっても輝度分布は異なる。本研究では経過時間だけではなく、個体差を含む刺激セットを用いた場合でも輝度分布が鮮度知覚を説明できるかどうかを検討した。魚眼を3.29時間放置して撮影し、3個体の3時点での写真を刺激として用いた。実験には11名が参加した。2つの刺激を対提示され、一対比較法で鮮度の評定を行った。ブラッドリーモデルによって、知覚された鮮度の得点を算出し、結果を分析したところ、経過時間によって鮮度得点が下がるだけではなく、鮮度が高い場合には個体差が大きいことが示された。重回帰分析の結果、輝度分布の標準偏差と歪度が含まれた回帰式が最も説明力が高かった。

つやと生鮮食品の品質：輝度分布に基づいた魚眼の視覚による鮮度評価

村越 琢磨*¹, 増田 知尋*¹, 内海 建*¹, 坪田 一男*², 和田 有史*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 慶應義塾大学医学部

Innovative Food Science and Emerging Technologies, 21, 188-194(2014)

A trial of human electromyography to evaluate texture of softened foodstuffs prepared with freeze-thaw impregnation of macerating enzymes

Sayaka Nakatsu*¹, Kaoru Kohyama*², Yayoi Watanabe*¹, Fumiyo Hayakawa*², Kenya Shibata*¹, Koji Sakamoto*¹, Mitsuya Shimoda*³

*¹ Food Technology Research Center, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University

筋電位測定 (EMG) による摂食挙動の観察により、酵素凍結含浸法で調製した軟らかい食材のテクスチャー変化を研究した。6名の被験者で、咬筋および舌骨上筋群の筋電位を測定した。5種類の食材 (タケノコ, ゴボウ, レンコン, タラ, シイタケ) はスプーンで潰れるほど、すなわち歯で噛まなくても容易に潰せる硬さ加工された。咬筋筋電位から求めた、咀嚼時間、総筋活動量、総筋活動時間、咀嚼周期は食品間で大きく異なった。とくに第一嚥下後の挙動が試料間で異なり、タケノコとシイタケは他の食材よりも咀嚼に必要な仕事が少なかった。摂食時間は、乾燥繊維質残渣量および付着性と相関することから、この乾燥繊維質残渣量は食塊の形成しやすさのよい指標になると考えられた。

酵素凍結含浸法により調製した軟らかい食材のテクスチャー評価のためのヒト筋電位測定の試み

中津沙弥香*¹, 神山かおる*², 渡邊 弥生*¹, 早川 文代*², 柴田 賢哉*¹, 坂本 宏司*¹, 下田 満哉*³

*¹ 広島県立総合技術研究所食品工業技術センター

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 九州大学農学研究院生命機能科学部門

Journal of Texture Studies, 45(1), 30-46(2014)

Linear and non-linear rheology of mixed polysaccharide gels. Pt. II. Extrusion, compression, puncture and extension tests and correlation with sensory evaluation

Tom Brenner*¹, Fumiyo Hayakawa*², Sayaka Ishihara*³, Yoshimi Tanaka*⁴, Makoto Nakauma*³,

Kaoru Kohyama*², Piyada Achayuthakan*⁵, Takahiro Funami*³, Katsuyoshi Nishinari*¹

*¹ Graduate School of Human Life Science, Osaka City University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ San-Ei Gen F. F. I., Inc.,

*⁴ Faculty of Environmental and Information Science, Yokohama National University

*⁵ Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University

官能評価と押し出し試験との相関を報告する。多糖類ゲルのテクスチャーアナライザーに注射器を組み込んだ押し出し試験では、押し出し力は流量にそれほど依存せず、弾性的な寄与が高いことが示唆された。この押し出し力は官能評価による「歯切れ」と高い相関を示し、弾性率に対する押し出し力の比は「のび」と良く相関した。ヤング率と押し出し力は官能評価での「硬さ」と相関した。注射筒径と押し出し口の直径の比が大きい時の押し出し力は、定法であるテクスチャー解析のパラメータよりも官能評価とより高い相関が得られた。経験的及び基礎的な大変形試験の結果とテクスチャーとの相関を検討したところ、押し出し試験とのより高い相関は、咀嚼における混合した変形用式に関係していると考えられた。

多糖類混合ゲルの線形および非線形レオロジー II. 押し出し, 圧縮, 貫入, 伸び試験と官能評価との相関

Tom Brenner*¹, 早川 文代*², 石原 清香*³, 田中 良巳*⁴, 中馬 誠*³,

神山かおる*², Piyada Achayuthakan*⁵, 船見 孝博*³, 西成 勝好*¹

*¹ 大阪市立大学大学院生活科学研究科

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

*⁴ 横浜国立大学環境情報学部

*⁵ タイ・Suan Sunandha Rajabhat大学科学技術部

Cereal Chemistry 91(2), 146-151(2014)

Effects of rice flour blends on bread texture and staling

Tomoko Sasaki, Kaoru Kohyama, Kanae Miyashita, Tomoya Okunishi

National Food Research Institute, NARO

アミロース含量の異なる3品種の米粉を30%の比率で小麦粉に配合したパンを調製し、パンの老化におけるテクスチャーの変化を解析した。圧縮試験を繰り返して測定した回復率は米粉を配合したパンでは小麦粉100%のパンより顕著に低く、アミロース含量の違いも反映されていた。さらに、米粉パンでは老化にともない回復率が増加する傾向が認められた。また、貫通試験および引張り試験によって得られた結果から、米粉パンのクラムは小麦粉100%のパンと比べて伸展性が高いことが示された。また、アミロース含量の低い米粉を配合したパンほど伸展性が高かった。パンの老化にともなうアミロペクチンの再結晶化の進行は、小麦粉100%のパンと米粉パンで明らかに異なる挙動を示した。

米粉の配合がパンのテクスチャーおよび老化に及ぼす影響

佐々木朋子, 神山かおる, 宮下かなえ, 奥西 智哉

(独) 農研機構食品総合研究所

Food Hydrocolloids, 38, 95-103(2014)

Characterization of eating difficulty by sensory evaluation of hydrocolloid gels

Fumiyo Hayakawa*¹, Yukari Kazami*¹, Sayaka Ishihara*², Satomi Nakao*², Makoto Nakauma*²,
Takahiro Funami*², Katsuyoshi Nishinari*³, Kaoru Kohyama*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² San-Ei Gen F.F.I., Inc.

*³ Graduate School of Human Life Science, Osaka City University

ハイドロコロイドゲルをモデル食品とし、官能評価によって食べにくさの特徴づけた。広範囲のテクスチャーを有する20種のゲルを調製し、試料とした。12人のパネリストが、線尺度上で各試料の食べにくさを評価した。さらに、パネリストは、試料のテクスチャー特性6項目(かたさ、歯切れ、弾力、のび、付着感、口どけ)についても評価した。試料ゲルのテクスチャー特性を把握するために主成分分析を行ったところ、試料ゲルは、「壊れにくさ」と「ねっとり感」の2軸から成る平面上に布置された。ここに、食べにくさの値の等高線を重ねた結果、「壊れにくさ」と「ねっとり感」は、食べにくさを構成する主要な要素であることが示された。

ハイドロコロイドゲルの官能評価による食べにくさの特徴づけ

早川 文代*¹, 風見由香利*¹, 石原 清香*², 中尾 理美*²,
中馬 誠*², 船見 孝博*², 西成 勝好*³, 神山かおる*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 三栄源エフ・エフ・アイ(株)

*³ 大阪市立大学生生活科学部

Parameters of texture profile analysis

Katsuyoshi Nishinari*¹, Kaoru Kohyama*², Hitoshi Kumagai*³, Takahiro Funami*⁴, Malcolm C. Bourne*⁵*¹ Graduate School of Human Life Science, Osaka City University*² National Food Research Institute, NARO*³ Faculty of Home Economics, Kyoritsu Women's University*⁴ San-Ei Gen F. F. I., Inc.*⁵ New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University

テクスチャープロファイル法 (TPA) は、本来固形状食品に向けて開発されたものであり、多くの固形状食品のテクスチャー解析には有効だが、これを液状食品に間違えて適用することを警告する。液状食品に対してTPAパラメータを間違えて用いるリスクについて述べる。消費者庁の「えん下困難者用食品」の物性基準では、自立しない軟らかい食品試料、あるいは流れてしまう液状食品を、容器に入れて2回圧縮するTPA法を適用している。この方法では、粘度が低く流れやすい試料ほど、見かけの「凝集性」値が高くなる。水のような試料は嚥下時にまとまりにくく誤嚥しやすいが、「凝集性」値が1になる。これは、誤嚥しやすい試料の性質として、たいへん誤解されやすいものである。

テクスチャープロファイル法のパラメータについて

西成 勝好*¹, 神山かおる*², 熊谷 仁*³, 船見 孝博*⁴, M. C. Bourne*⁵*¹ 大阪市立大学大学院生活科学研究科*² (独) 農研機構食品総合研究所*³ 共立女子大学家政学部*⁴ 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社*⁵ 米国コーネル大学ニューヨーク州農業研究所

2バイトテクスチャー試験 (TPA) で得られるパラメータと超音波パルスドプラー法で求められる咽頭部流速との関係

谷米 (長谷川) 温子*¹, 小倉 聖美*², 秋間 彩香*², 神山かおる*³, 熊谷日登美*¹, 熊谷 仁*²*¹ 日本大学生物資源科学部*² 共立女子大学家政学部*³ (独) 農研機構食品総合研究所

2-バイトテクスチャー試験 (TPA) から求められるパラメータと、咽頭部通過時の食物の流速との関係を検討した。TPA試験は厚生労働省の「えん下困難者用食品」の基準法に準拠して行った。得られたTPA曲線から、「硬さ」、「付着性」、「凝集性」を求めた。咽頭部の流速は、超音波パルスドプラー法で測定した。3つのパラメータの中では、「硬さ」が、誤嚥の危険性の尺度によいと報告のある咽頭部最大流速 (Vmax) との相関が最も高く、嚥下困難者用介護食の指標として、適していると考えられた。一方、「凝集性」は試料の性状によって変化し、咽頭部流速との相関がみられなかった。3つのパラメータに対するVmaxのプロットの形は、プランジャー速度が10 mm/sでも1 mm/sでもあまり変わらなかったことから、TPA試験におけるプランジャー速度は、装置依存性の小さい1mm/sが国の基準で採用されている10 mm/sより適していると示唆された。

Relationship between the parameters obtained by 2-bite texture profile analysis (TPA) and the velocity through the pharynx measured by the ultrasonic pulse Doppler method

Atsuko Hasegawa-Tanigome*¹, Kiyomi Ogura*², Ayaka Akima*², Kaoru Kohyama*³, Hitomi Kumagai*¹, Hitoshi Kumagai*²*¹ College of Bioresource Sciences, Nihon University*² Faculty of Home Economics, Kyoritsu Women's University*³ National Food Research Institute, NARO

Journal of Texture Studies, 44 (5), 387-396 (2013)

Ultrasound analysis of the effects of food bolus volume on tongue movement at the initiation of swallowing

Zhihong Gao*¹, Mitsuru Taniwaki*¹, Hiromi Shimada*¹, Sayaka Ishihara*²,
Makoto Nakauma*², Takahiro Funami*², Kaoru Kohyama*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² San-Ei Gen F. F. I., Inc.

超音波測定により、嚥下開始時の舌運動に食塊の量が及ぼす影響を研究した。一口量3 mLまたは6 mLの異なる物性の食品、すなわち硬いゲル、軟らかいゲル、ゾル、水を、スプーンで4名の健常女性被験者に与え、普通に摂食させ一回で飲み込ませた。超音波プローブを被験者の顎下に配置し、Bモードで舌の前額断イメージを得た。左右中央部の舌背の上下運動を超音波Mモードで観察した。嚥下直前の舌には陥凹運動が観察されるが、凹みの深さ(約10 mm)や陥凹の生じる時間(約0.4 秒)は、6 mLのゲルが3 mLより高値であったが、ゾルと水では有意差が認められなかった。陥凹運動速度は、同じ食品であれば量によって有意には異ならなかった。いずれの場合でも、陥凹が形成される速度よりも消失する速度の方が速かった。

嚥下開始時における舌運動に対する食品量の影響の超音波分析

高智 紅*¹, 谷脇 満*¹, 島田 宏美*¹, 石原 清香*²,
中馬 誠*², 船見 孝博*², 神山かおる*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

Journal of Food Science and Engineering, 3, 299-308(2013)

Photochemical method to evaluate oxidation levels in heat-treated vegetable oil: comparison with peroxide-value and acid-value

Hiromi Kameya*¹, Mistuko Ukai*²

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Hokkaido University of Education

PBNを用いたEPRスピントラップ法により、加熱植物油のラジカルをアルキルペルオキシラジカル(PBN- \cdot OOR)とアルキルオキシラジカル(PBN- \cdot OR)と同定した。PBNアダクト信号の強度は加熱処理により増加し、植物油中の抗酸化物質トコフェロール含有量が少ないほど信号強度が大きくなる傾向にあった。過酸化価(PV)、酸価(AV)で検出できない酸化ラジカルをEPRスピントラップ法で評価できる可能性が示された。

熱処理した植物油の光科学的手法による酸化評価法:過酸化価および酸価との比較

亀谷 宏美*¹, 鶴飼 光子*²

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 北海道教育大学

Biosc. Biotech. Biochem, 77(12), 2371-2377 (2013)

Effect of Gamma Irradiation on Soybean Allergen Levels.

Tatsuya Moriyama*¹, Erika Yano*¹, Kazumi Kitta*³, Shin-ishi Kawamoto*³, Yukio Kawamura*², Setsuko Todoriki*³

*¹ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Kinki University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Department of Food Science and Biochemistry, Kyoto Women's University

ガンマ照射された大豆 (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 20と30kGy) 中の食物アレルギーの濃度を, 特異抗体とアレルギー患者血清を用いたイムノブロットおよびELISAにより調査した. 照射3ヶ月後の大豆の総タンパク質のCBB染色による電気泳動パターンは照射によりほとんど変化せず, 高線量の照射で多少のタンパク質分解が示された.

特異抗体によるイムノブロットの結果, 主要な大豆アレルギーのバンドパターンは, 照射によりほとんど変化しなかった. 特異抗体を用いた競合ELISAによる解析では, 大豆トリプシンインヒビターの減少をのぞき, 照射による主要アレルギーの含量変化は認められなかった. 患者血清IgEのイムノブロットのパターンは30kGyまで照射によって変化せず, 患者血清IgEを用いたELISAの結果では, 照射された大豆抽出へのIgE反応性は(非照射の)コントロールのレベルから増加することはない, むしろ, 数人の患者血清IgEでは, 照射により有意な反応性の減少していることが認められた.

大豆アレルギーに対するガンマ線照射の影響

森山 達哉*¹, 矢野えりか*¹, 橘田 和美*², 川本 伸一*², 河村 幸雄*³, 等々力節子*²

*¹ 近畿大学農学部

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 京都女子大学家政学部

食品照射, 48(1), 38-41(2013)

Arabidopsis thalianaにおけるガンマ線照射誘導過酸化水素蓄積と脂質過酸化の軽減にカタラーゼCAT2は関与しない

Amena Sultana*¹, 南 育子*¹, 松島 大貴*¹, Mohammad Issak*¹,
中村 宜督*¹, 等々力節子*², 村田 芳之*¹

*¹ 岡山大学大学院自然科学研究科

*² (独) 農研機構食品総合研究所

シロイヌナズナにおけるカタラーゼの機能を明らかにする目的で, cat2変異体へのガンマ線照射による影響を検討した. シロイヌナズナ野生株 (Col-0) 及びcat2変異体への10 kGyのガンマ線照射は, H₂O₂蓄積及び脂質過酸化生成を誘起したが, 0.1 kGyと1 kGyのガンマ線照射は, 誘起しなかった. また, 野生株と変異体との間で, H₂O₂蓄積及び脂質過酸化に有意な差はなかった. 以上の結果より, カタラーゼCAT2は, ガンマ線によって誘起される損傷を軽減するための重要な酵素ではないことが示唆された.

Catalase, CAT2, is not Involved in Mitigation of Gamma Irradiation-induced H₂O₂ Accumulation or Lipid Peroxidation in Arabidopsis thaliana

Amena Sultana*¹, Ikuko Minami*¹, Daiki Matsushima*¹, Mohammad Issak*¹,
Yoshimasa Nakamura*¹, Setsuko Todoriki*², Yoshiyuki Murata*¹

*¹ Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

*² National Food Research Institute, NARO

食品照射, 48(1), 19-23(2013)

*Tribolium castaneum*の幼虫と成虫へのガンマ線の影響

Amena Sultana*¹, 南 育子*¹, 市場 隆治*¹, Mohammad Issak*¹, 多田 幹朗*¹,
中村 宜督*¹, 宮竹 貴久*², 等々力節子*³, 村田 芳之*¹

*¹ 岡山大学大学院自然科学研究科

*² 岡山大学大学院環境学研究科

*³ (独) 農研機構食品総合研究所

ガンマ線を用いた食品照射は、穀物やスパイスの害虫の侵入を抑制する手段の一つである。我々は、*Tribolium castaneum*の幼虫と成虫へのガンマ線照射の影響を調べた。羽化は、500Gyの照射で完全に阻害された。成虫の生存率は、500Gy以上の照射で著しく減少した。中性条件でのコメントアッセイの結果より、500Gyまたは1000Gy照射によるDNA損傷は、不可逆的に増加したが、100Gy照射によるDNA損傷は一過的に増加した。100Gy照射ではDNAの修復が行われていることが示唆された。以上の結果より500Gy以上のガンマ線照射は、*T. castaneum*の幼虫と成虫の駆除に十分であることが示された。

Effects of γ -Irradiation on Larval and Adult Stages of *Tribolium castaneum* (Red Flour Beetle)

Amena Sultana*¹, Ikuko Minami*¹, Ryuji Ichiba*¹, Mohammad Issak*¹, Mikiro Tada*¹,
Yoshimasa Nakamura*¹, Takahisa Miyatake*², Setsuko Todoriki*³, Yoshiyuki Murata*¹

*¹ Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

*² Graduate School of Environmental Science, Okayama University

*³ National Food Research Institute, NARO

食品照射, 48(1), 31-37(2013)

振とう抽出法による放射線照射した食肉およびサーモンにおける2-アルキルシクロブタン類の検知

堤 智昭*¹, 足立 利華*¹, 高附 巧*¹, 根井 大介*²,
亀谷 宏美*², 等々力節子*², 松田りえ子*¹, 手島 玲子*¹

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所

*² (独) 農研機構食品総合研究所

DCBおよびTCBの抽出法として、ソックスレー抽出法が広く用いられているが、長時間を要する欠点がある。本研究では、分析法の迅速化を目的として振とう抽出法を評価した。振とう抽出法により抽出されたソックスレー抽出と比較すると、DCB量は、牛肉で86～104%、豚肉で77～99%、鶏肉で108～121%、およびサーモンで82～96%、TCB量はソックスレー抽出法と比較すると、牛肉で85～108%、豚肉で90～120%、鶏肉で101～107%、およびサーモンで93～101%であった。両抽出法で得られたSIMクロマトグラムに顕著な違いは認められなかった。さらに、肉類およびサーモンの未照射と照射試料に対して、振とう抽出法を適用した際の照射の判定精度を検討し、全ての試料について振とう抽出法でも未照射および照射の判定が正しく行え、各判定項目の内容についてもソックスレー抽出と同様に判定に支障は無いことを確認した。

Detection of 2-alkylcyclobutanones in Irradiated Meats and Salmon by Shaking Extraction

Tomoaki Tsutsumi*¹, Rika Adachi*¹, Satoshi Takatsuki*¹, Daisuke Nei*²,
Hiromi Kameya*², Setsuko Todoriki*², Rieko Matsuda*¹, Reiko Teshima*¹

*¹ National Institute of Health Sciences

*² National Food Research Institute, NARO

Food Chemistry, 145, 866-872(2013)

Comparison of scavenging capacities of vegetables by ORAC and EPR

Hiromi Kameya, Jun Watanabe, Yuko Takano-Ishikawa, Setsuko Todoriki

National Food Research Institute, NARO

本研究では、光照射システムを利用したEPRスピントラップ法を開発した。この手法は、ラジカル発生試薬を変更すると、同一機器・手順のまま異なる活性酸素種に対する抗酸化能を評価できる。食品への適応が可能か否かを検討するため、野菜抽出液の抗酸化能を評価した。また、各活性酸素種への抗酸化能をORAC値の比較検討した。ORAC値はスーパーオキシドラジカルおよびアルコキシルラジカルへの抗酸化能と高い相関が認められた。しかし、ヒドロキシルラジカルはORAC値との相関は見られなかった。

ORACとEPRスピントラップ法による野菜の抗酸化能力評価の比較

亀谷 宏美, 渡辺 純, 石川(高野) 祐子, 等々力節子

(独) 農研機構食品総合研究所

日本食品工学会誌, 60(4), 173-178(2013)

キノコ熱水抽出物のESRスピントラップ法によるラジカル捕捉活性評価とORAC法

菅野 友美*1, 川村 翔栄*2, 原田栄津子*3, 亀谷 宏美*4, 鶴飼 光子*2, 大澤 俊彦*5

*1 北海道教育大学旭川校

*2 北海道教育大学函館校

*3 株式会社岩出菌学研究所

*4 (独) 農研機構食品総合研究所

*5 愛知学院大学心身科学部

13種のキノコ熱水抽出物についてORAC法とCYPMPOを用いたESRスピントラップ法による種々のラジカル捕捉能を評価した。その結果、ORAC法ではCoprinus comatusの値が最も高かった。ラジカル捕捉能はそれぞれ、ヒドロキシルラジカル捕捉活性能は、Agrocybe cylindraceaが、スーパーオキシドラジカル捕捉能は、Leucopaxillus giganteusが、アルコキシルラジカル捕捉能は、Pleurotus ostreatusが、一重項酸素捕捉能は、Agrocybe cylindraceaが最も高い値であった。ORAC値と各ラジカル捕捉能との間には相関性が認められなかった。しかし、CYPMPOを用いたESRスピントラップ法が新規評価法の一つとして期待されるものと考えられた。

Radical Scavenging Ability by ESR Spin Trapping and Oxygen Radical Absorbance Capacity of Hot Water Extracts from Mushrooms

Tomomi Kanno*1, Shouei Kawamura*2, Etsuko Harada*3, Hiromi Kameya*4, Mitsuko Ukai*2, Toshihiko Osawa*5

*1 Hokkaido University of Education Asahikawa Campus

*2 Hokkaido University of Education Hakodate Campus

*3 Iwade Research Institute of Mycology

*4 National Food Research Institute, NARO

*5 Aichi Gakuin University

Biochemical and Biophysical Research Communications, 437(3), 420-425(2013)

Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model

Masaki Nagane*¹, Hironobu Yasui*¹, Tohru Yamamori*¹, Songji Zhao*², Yuji Kuge*³,
Nagara Tamaki*⁴, Hiromi Kameya*⁵, Hide Nakamura*⁶, Hirotsada Fujii*⁷, Osamu Inanami*¹

*¹ Department of Environmental Veterinary Sciences, Hokkaido University

*² Department of Tracer Kinetics and Bioanalysis, Hokkaido University

*³ Central Institute of Isotope Science, Hokkaido University

*⁴ Department of Nuclear Medicine, Hokkaido University

*⁵ National Food Research Institute, NARO

*⁶ Department of Chemistry, Hokkaido University of Education

*⁷ Center for Medical Education, Sapporo Medical University

腫瘍酸欠は放射線療法の成功のためによく挑戦されている。近年の研究報告では、IR(ionizing radiation)は酸化窒素(NO)生成量を増加させ、IR誘導されたNOは腫瘍内の循環を増加させる可能性があること提示されている。しかしながら、NO生成メカニズムなどについては不明瞭なままとなっている。本研究では、腫瘍内でIRがNOを生成するメカニズムと、腫瘍のIR感受性に誘発されたNOが与える効果を解明することを目的とした。結果、IR誘導NOは腫瘍の放射線感受性を増加させた。

照射誘導酸化窒素によるSCCVII腫瘍モデルネズミの腫瘍酸欠と放射性抵抗性の緩和

長根 正樹*¹, 安井 久晃*¹, 山盛 徹*¹, 趙 松吉*², 久下 裕司*³,
玉木 長良*⁴, 亀谷 宏美*⁵, 中村 秀夫*⁶, 藤井 博匡*⁷, 稲浪 修*¹

*¹北海道大学 獣医学研究科毒性学教室

*²北海道大学 医学研究科トレーサー情報分析学分野

*³北海道大学 アイソトープ総合センター

*⁴北海道大学 核医学分野

*⁵(独)農研機構 食品総合研究所

*⁶北海道教育大学

*⁷札幌医科大学

食品衛生学会誌, 55(1), 19-24(2014)

ペンタフルオロフェニルカラムを用いたトリコテセン系カビ毒のLC-MS/MS高感度一斉分析法

田村 昌義*¹, 中川 博之*², 宇山 敦生*¹, 望月 直樹*¹

*¹アサヒグループホールディングス株式会社

*²(独)農研機構食品総合研究所

トリコテセン系カビ毒を9種(ニバレノール, デオキシニバレノール, フザレノン-X, ネオソラニオール, 3-アセチルデオキシニバレノール, 15-アセチルデオキシニバレノール, ジアセトキシシルベノール, HT-2トキシン, T-2トキシン)の一斉分析法を検討した。その結果、試料中のカビ毒をアセトニトリル-水(1:1)を用いて抽出し、QuEChERSキットおよび多機能カートリッジによる精製後、内部標準法を用いたLC-MS/MSにより定量する方法を確立した。LC分離にはペンタフルオロフェニルカラムとメタノールを含む移動相を用い、各カビ毒の完全分離と高感度定量を実現した。粉末コーンスープを用いた分析妥当性試験では、直線性0.99以上、真度95~111%、日内再現性0.9~6.6%、日間再現性0.6~11.6%、検出限界0.01~0.75 µg/kg、定量下限0.04~275 µg/kgという良好な結果を得た。本法を用いて市販粉末コーンスープ15試料を分析したところ、2試料よりデオキシニバレノール(20.7, 22.5 µg/kg)を検出し、そのうち1試料は3-アセチルデオキシニバレノール(13.5 µg/kg)との共汚染であった。

Simultaneous Trichothecenes Analysis by LC-MS/MS with a Pentafluorophenyl Column

Masayoshi Tamura*¹, Hiroyuki Nakagawa*², Atsuo Uyama*², and Naoki Mochizuki*²

*¹ Industrial Asahi Group Holdings, Ltd.

*² National Food Research Institute, NARO

Food Additives and Contaminants: Part A, 30, 1407-1414 (2013)

Detection of masked mycotoxins derived from type A trichothecenes in corn by high-resolution LC-Orbitrap mass spectrometer

Hiroyuki Nakagawa*¹, Shigeru Sakamoto*², Yuki Sago*¹, Masayo Kushiro*¹, Hitoshi Nagashima*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² ThermoFisher Scientific

市販の精度管理用トウモロコシ粉末試料において、タイプAトリコセテン系カビ毒由来のマスクドマイコトキシン（カビ毒配糖体）を検出した。これら新規配糖体は高分解能液体クロマトグラフィー・オービトラップ質量分析（LC-Orbitrap MS）により精密質量を指標として検出され、特徴的なイオンとそのフラグメントパターンに基づいてネオソラニオール-グルコシド（NESGlc）およびジアセトキシシルペノール-グルコシド（DASGlc）と同定された。立体構造は決定されなかったが、ネオソラニオールとジアセトキシシルペノールの分子構造とこれらのカビ毒配糖体のフラグメントパターンを考慮すると3位のOH基におけるグルコース付加の可能性が高いと考えられた。最も有名なタイプBトリコセテン系カビ毒であるデオキシニバレノール由来の配糖体、デオキシニバレノール-3-グルコシドが同一の試料において検出されたことも、この可能性を支持するものである。

高分解LC-Orbitrap質量分析装置によるトウモロコシに含まれるタイプAトリコセテン系カビ毒由来マスクドマイコトキシンの検出

中川 博之*¹, 坂本 茂*², 佐合 由紀*¹, 久城 真代*¹, 長嶋 等*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² サーモフィッシャーサイエンティフィック

Toxins, 5, 590-604 (2013)

Detection of Type A Trichothecene Di-Glucosides Produced in Corn by High-Resolution Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry

Hiroyuki Nakagawa*¹, Shigeru Sakamoto*², Yuki Sago*¹, Hitoshi Nagashima*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² ThermoFisher Scientific

植物（トウモロコシ粉末）試料中に含まれるカビ毒T-2トキシン由来のジ-グルコシド誘導体を初めて検出し、同時にHT-2トキシン由来のジ-グルコシド誘導体も検出した。これらのマスクドマイコトキシン（カビ毒配糖体）は、高分解能液体クロマトグラフィー・オービトラップ質量分析（LC-Orbitrap MS）により精密質量を指標として検出され、特徴的なイオンとそのフラグメントパターンに基づいてT-2トキシン-ジ-グルコシド（T2GlcGlc）およびHT-2トキシン-ジ-グルコシド（HT2GlcGlc）と同定された。T2GlcGlcの立体構造は決定されなかったが、T-2トキシンの分子構造を考慮すると2分子のグルコースが直鎖状で連続して3位のOH基に縮合していると考えられた。一方、HT2GlcGlcの場合、HT-2トキシン分子の2箇所（3位のOH基と4位のOH基）にグルコース付加の可能性があるため、分子構造の推定はより複雑に思われた。これらに加えて15-モノアセトキシシルペノール-グルコシド（MASGlc）も同じ試料中に検出された。

高分解能液体クロマトグラフィー・オービトラップ質量分析法によるトウモロコシに含まれるタイプAトリコセテン系カビ毒由来ジ-グルコシドの検出

中川 博之*¹, 坂本 茂*², 佐合 由紀*¹, 長嶋 等*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² サーモフィッシャーサイエンティフィック

食品総合研究所報告, 78, 25-29, (2014)

味噌に混入した糞便汚染指標菌の検出方法の検討

細谷 幸恵, 大畑由紀子, 川崎 晋, 稲津 康弘

(独) 農研機構食品総合研究所

味噌は日本の伝統的な発酵食品である。高い塩分濃度と弱酸性状態によって、味噌中の有害細菌の増殖が抑制されることから、安全性の高い食品であると考えられるが、最近では低塩味噌やその他の加工製品も販売されるようになってきている。本研究では、味噌に混入した少量の腸球菌をより正確に検出するため、サンプリング数、培養期間、および使用培地の検討を行った。本研究で得られた結果は自主衛生検査を実施する際に有用であると考えられた。

Consideration of the detection procedure of indicator bacteria of fecal pollution in miso (salt-fermented soybean).

Yukie Hosotani, Yukiko Ohata, Susumu Kawasaki, Yasuhiro Inatsu

National Food Research Institute, NARO

日本食品微生物学会雑誌, 31(1), 1-8(2014)

Real-time PCRを用いた牛乳および生乳中のSalmonella増殖の特性評価と増殖挙動のモデル化

川崎 晋*1, 清水 茂雅*2, 小関 成樹*1, 稲津 康弘*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 地方独立行政法人 北海道立総合研究機構 網走水産試験場

Real-time PCRを用いて、牛乳および生乳中のSalmonellaの特異的増殖曲線を取得し、その増殖曲線から増殖モデル化が可能か検討した。Real-time PCRで求めたSalmonella菌数から増殖曲線を作成し、平方根モデルを用いて μ_{max} と保存温度との関係式を導いた。牛乳と生乳の両者を比較した結果、生乳では牛乳と比べてSalmonellaの菌数が少なく観察される傾向にあったが、 μ_{max} は若干低くなる程度であった。このようにreal-time PCRによる特異的微生物定量法と微生物増殖モデル式による解析手法の活用により、微生物叢と食材の影響を含んだ増殖特性を迅速提供できる可能性を示唆した。

Characterization and modeling of Salmonella growth in pasteurized and non-pasteurized milk using real-time PCR

Susumu Kawasaki*1, Shigemasa Shimizu*2, Shigenobu Koseki*1, Yasuhiro Inatsu*1

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Abashiri Fisheries Research Institute

食品総合研究所研究報告, 78, 19-24(2014)

ワークショップを通じた食品関連事業者等の自主衛生管理手法に関する知識の向上

川崎 晋, 持田 麻里, 大畑由紀子, 齋藤 美枝, 野澤 博美, 稲津 康弘

(独) 農研機構食品総合研究所

食品製造現場において、自主衛生検査による食の安全性確保は重要であるが、初心者が微生物検査の基本的技術を習得できる機会は極めて少ない。我々は微生物の取扱経験が無い公設試験研究機関職員および中小規模食品製造業者を対象として、実習および講義を伴う微生物検査基本的技術習得についての講習会を開催した。このワークショップのアンケート結果について解析したところ、本講習会により受講者の微生物学的知識が深まったことを示した。また、公設試験研究機関職員向けには衛生管理改善計画の実例を示すことが有効であると考えられた。

Improvement in the knowledge of self hygiene management for workers relation with food by holding of the free-workshop

Susumu Kawasaki, Mari Mochida, Yukiko Ohata, Mie Saito, Hiromi Nozawa, Yasuhiro Inatsu

National Food Research Institute, NARO

Food Control, 35, 142-145 (2013)

Evaluation of non-bacterial factors contributing to histamine accumulation in fish

Daisuke Nei

National Food Research Institute, NARO

ヒスタミンは細菌が有するヒスチジン脱炭酸酵素の作用により食品中に蓄積すると考えられている。本研究ではヒスタミンの蓄積について、非細菌性の要素が関与しているか否かを明らかにするために、放射線照射により無菌化したマグロ魚肉およびブリ魚肉におけるヒスタミンの蓄積挙動を調査した。無菌の魚肉を5, 15, 25℃で7日間保存し、その後ヒスタミン濃度を分析した結果、全てのサンプルでヒスタミンは検出限界以下であった (< 10 mg/kg)。一方で、ヒスタミン生産菌である *Morganella morganii* を接種した魚肉中ではヒスタミンの顕著な蓄積が認められた。したがって、非細菌性の要素はヒスタミンの蓄積にはほとんど関与しておらず、細菌を適切に制御することがヒスタミンの蓄積を抑制する上で必要かつ十分な条件であると結論付けられた。

根井 大介

(独) 農研機構食品総合研究所

Food Control, 32, 186-189 (2013)

Validation of hot water and chlorine treatments to inactivate pathogens inoculated on mung bean seeds: Influence of the seed production area

DAISUKE NEI*¹, Md. LATIFUL BARI*², KATSUYOSHI ENOMOTO*³*¹ National Food Research Institute, NARO*² University of Dhaka*³ Daisey Machinery Co. Ltd.

熱水と次亜塩素酸処理を利用した緑豆種子の殺菌方法について、その汎用性を評価するために種々の産地で収穫された緑豆を使用して殺菌効果を評価した。緑豆種子に大腸菌O157:H7およびサルモネラを接種し、85℃の熱水処理と2,000 ppmの次亜塩素酸処理を加えた。産地に関わらず、大腸菌O157:H7およびサルモネラの生菌数は5 log CFU/g以上低下し、高い殺菌効果を得ることができた。また、これらの殺菌処理にともなう顕著な発芽率の低下は認められなかった。

根井 大介*¹, Md. Latiful Bari*², 榎本 克義*³*¹ (独) 農研機構食品総合研究所*² ダッカ大学*³ (株) 大生機械

食品総合研究所研究報告, 78, 1-9(2014)

穀物乾燥調製・貯蔵施設における玄米ベイトトラップによる貯穀害虫およびその天敵相の調査

今村 太郎*¹, 宮ノ下明大*¹, 古井 聡*¹, 宮武 和史*², 平井 佑佳*², 田井 裕子*², 中北 宏*³*¹ (独) 農研機構食品総合研究所*² 国際衛生株式会社技術研究所*³ つくば防虫協議会

茨城県南西部の米穀生産地帯に立地する5箇所の穀類乾燥調製施設と2箇所の穀物貯蔵低温倉庫に玄米をベイトとしたトラップを設置し、貯穀害虫とその天敵相を調査した。設置した期間は2012年7月4日～8月9日と2012年8月9日～9月6日であった。ベイトトラップにより、コウチュウ目10種、チョウ目3種の貯穀害虫が採集された。コクゾウムシの幼虫の寄生蜂であるゾウムシコガネコバチ、コクゾウコバチが数多く採集され、全ての調査地点で少なくともどちらかの寄生蜂が採集できた。ノシメマダラメイガの成虫はこういった施設において目視で観察されるにも関わらず、ベイトトラップではあまり採集できず、その寄生蜂も採集できなかった。

Investigation of stored-product insect pests and their natural enemies by traps baited with brown rice in grain drying and conditioning facilities and grain warehouses

Taro Imamura*¹, Akihiro Miyanoshita*¹, Satoshi Furui*¹, Kazushi Miyatake*², Yuka Hirai*², Yuko Tai*², Hiroshi Nakakita*³*¹ National Food Research Institute, NARO*² Technical Research Laboratory, Kokusaieisei Co., Ltd.,*³ Tsukuba Association Of Insect Pest Control

ペストロジー, 28(2), 117-121(2013)

粒状アーモンドチョコレート製品におけるノシメダラメイガ *Plodia interpunctella* 幼虫の被害と発育

宮ノ下明大*1, 今村 太郎*1, 古井 聡*1, 西田 典由*2

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 愛媛県産業技術研究所 紙産業技術センター

ノシメダラメイガの1齢幼虫を粒状アーモンドチョコレート製品で飼育した時の発育を、28℃、70% RH、16L 8Dの条件で調べた。供試した製品は、ロースト・ホール・アーモンドに3種類の異なるチョコレート(ミルクチョコレート・ホワイトチョコレート・粗く砕いた柿の種入りチョコレート)を掛けて包んだ形状である。各製品での個別飼育の結果、成虫羽化率は5~20%と低く、発育日数は、ミルクチョコレートで149日、ホワイトチョコレートでは101~149日、柿の種入りチョコレートでは80~101日であった。ノシメダラメイガ幼虫の発育にとって粒状チョコレート製品は、不安定な食物であると考えられた。

Damage by and larval development of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae), on chocolate-covered almonds

Akihiro Miyanoshita*1, Taro Imamura*1, Satoshi Furui*1, Noriyoshi Nishida*2

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Ehime institute of Industrial Technology Paper Technology Center

都市有害生物管理, 3(1), 1-6(2013)

マンション周辺における性フェロモントラップで捕獲されたノシメダラメイガ *Plodia interpunctella* の個体数と分布

宮ノ下明大, 今村 太郎, 古井 聡

(独) 農研機構食品総合研究所

2011年8月中旬から9月中旬にかけて、茨城県つくば市のマンション3階のベランダやその周辺にノシメダラメイガの性フェロモントラップを設置し、雄成虫の捕獲数や分布を調査した。8月中旬の8日間では日平均捕獲数はベランダ2箇所で8.5個体、10.5個体、玄関先で6.1個体であった。トラップでの捕獲は日没後の18:30から見られ、20:30頃にピークとなり夜間継続した。マンション敷地内での捕獲はその周囲よりも多かったが、マンション敷地内に本種の発生源を発見することはできなかった。

Number and distribution of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) captured by sex pheromone traps at or near a condominium

Akihiro Miyanoshita, Taro Imamura, Satoshi Furui

National Food Research Institute, NARO

Comparative analysis of flagellin glycans among pathovars of phytopathogenic *Pseudomonas syringae*Tadashi Ishii*¹, Mitsuru Yoshida*¹, Fumiko Taguchi*², Yuki Ichinose*², Hiroshi Ono*¹*¹ National Food Research Institute, NARO*² Okayama university

フラジェリンはべん毛の基本的な成分である。これまで我々は*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 (Pta6605)のフラジェリンが2ないし3つのL-ラムノシル残基と末端の4, 6-ジデオキシ-4-(3-ヒドロキシブタンアミド)-2-O-メチルグルコピラノシル残基からなるオリゴ糖でグリコシル化されていることを報告した。本研究で我々は*P. syringae* pathovars *glycinea* race 4 (Pgl4), *phaseolicola* 1448A (Pph1448A), *tomato* DC3000 (PtoDC3000), および *syringae* B728a (PsyB728a)のフラジェリン糖鎖の化学構造の特徴を明らかにした。フラジェリン糖鎖はヒドラジン分解で分離後、還元末端を2-アミノピリジン (PA) で標識され、PA標識オリゴ糖として高圧液体クロマトグラフィーで単離された。精製PA標識多糖は質量分析とNMRで分析したその結果、Pgl4, PtoDC3000, およびPph1448Aの糖鎖は以前同定されたPta6605のものと同一であった。PsyB728aのフラジェリンは新規な3糖によりO-グリコシル化されており、2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→2)-3-O-メチル-α-L-ラムノピラノシル-(1→2)-L-ラムノースと同定された。我々のデータは*P. syringae*の病原型のフラジェリンのグリコシル化は普遍性があり多様性は少ないことを示している。

植物病原細菌*Pseudomonas syringae*の病原型間のフラジェリン糖鎖の比較解析知久 和寛*¹, 山本 雅信*¹, 亀山真由美*¹, 石井 忠*¹, 吉田 充*¹, 田口富美子*², 一瀬 勇規*², 小野 裕嗣*¹*¹ (独) 農研機構食品総合研究所*² 岡山大学

Hordatine A β-D-glucopyranoside from ungerminated barley grain

Noriko Kohyama*¹, Hiroshi Ono*²*¹ NARO Institute of Crop Science*² National Food Research Institute, NARO

オオムギの未発芽種子からホルダチンA β-D-グルコピラノシド (図1) が初めて単離され、MSとNMRから同定された。この化合物は、開花後20日から35日にかけて蓄積する。オオムギ種子を段階的に搗精すると、ホルダチンA β-D-グルコピラノシドは85%から70%の歩留まりで大部分が除去され、アリュエロン層に分布していることを示唆している。10品種の完熟種子におけるホルダチンA β-D-グルコピラノシド含量は、103 ~ 254 nmol/g dwであり、全ての品種で検出される。ホルダチン類はオオムギ特有の抗菌成分であることが知られているため、登熟の後期から登熟種子における抗菌成分として働いている。

未発芽大麦種子のホルダチンA β-D-グルコピラノシド

神山 紀子*¹, 小野 裕嗣*²*¹ (独) 農研機構作物研究所*² (独) 農研機構食品総合研究所

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(49), 11921-11928(2013)

Isolation and identification of phenolic compounds accumulated in brown rice grains ripened under high air temperature

Hiroshi Nakano^{*1}, Hiroshi Ono^{*2}, Norio Iwasawa^{*1}, Toshiyuki Takai^{*1}, Yumiko Arai-Sanoh^{*1}, Motohiko Kondo^{*1}

^{*1} NARO Institute of Crop Science

^{*2} National Food Research Institute, NARO

本研究の目的は高温耐性が強い「ふさおとめ」、弱い「初星」と中程度である「コシヒカリ」を用いて、高温登熟した玄米中に濃度が増加あるいは減少する成分を調べることである。6-O-フェルロイルスクロース(1)、3',6-ジ-O-シナポイルスクロース(2)、3'-O-シナポイル-6-O-フェルロイルスクロース(3)、3',6-ジ-O-フェルロイルスクロース(4)、フェルラ酸シクロアルテニル(5)とフェルラ酸24-メチレンシクロアルテニル(6)が玄米抽出物から単離された。単離化合物(1-6)の構造は機器分析により解明した。高温登熟した種子中の化合物2,3,6の平均濃度は通常温度で登熟したものよりも著しく高かった。一方、高温登熟した種子中の化合物5の平均濃度は通常温度で登熟したものよりも著しく低かった。従って、化合物2,3,5,6は用いた品種の高温ストレスのバイオマーカーとなる可能性がある。「ふさおとめ」の種子中の化合物4の平均濃度はすべての品種の中でもっとも高かった。一方、「ふさおとめ」の種子中の化合物5の平均濃度はもっとも低かった。

中野 洋^{*1}, 小野 裕嗣^{*2}, 岩澤 紀生^{*1}, 高井 俊之^{*1}, 荒井裕見子^{*1}, 近藤 始彦^{*1}

^{*1} (独) 農研機構作物研究所

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

Organic & Biomolecular Chemistry, 11(28), 4686-4694 (2013)

Structure and biosynthesis of scabichelin, a novel tris-hydroxamate siderophore produced by the plant pathogen *Streptomyces scabies* 87.22

Shinya Kodani^{*1}, Joanna Bicz^{*2}, Lijiang Song^{*2}, Robert J. Deeth^{*2},
Mayumi Ohnishi-Kameyama^{*3}, Mitsuru Yoshida^{*3}, Kozo Ochi^{*4}, Gregory L. Challis^{*2}

^{*1} Department of Agriculture, Shizuoka University

^{*2} Department of Chemistry, University of Warwick

^{*3} National Food Research Institute, NARO

^{*4} Department of Life Science, Hiroshima Institute of Technology

新規ヒドロキサム酸型シデロフォアであるscabichelinとturgichelinを、*Streptomyces antibioticus* NBRC 13838と*S. scabies* JCM 7914、*S. turgidiscabies* JCM 10429から単離し、それぞれガリウム(III)複合体としてその構造をMSとNMRにより決定した。*S. scabies* 87.22のゲノム配列解析の結果、非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)をコードする遺伝子を含む遺伝子クラスターの存在が確認された。このNRPSはscabichelinやturgichelinと類似の構造を有するペンタペプチドの産生に関与すると考えられる。野生型*S. scabies* 87.22とNRPS遺伝子欠損変異株の培地上清のLC-MS/MSにより、変異株ではscabichelinが認められなかったことから、*S. scabies* 87.22ではNRPSがscabichelinの産生に関与することが示唆された。

ジャガイモそうか病菌*Streptomyces scabies* 87.22が産生する新規ヒドロキサム酸型シデロフォアであるscabichelinの構造と生合成

小谷 真也^{*1}, Joanna Bicz^{*2}, Lijiang Song^{*2}, Robert J. Deeth^{*2},
亀山眞由美^{*3}, 吉田 充^{*3}, 越智 幸三^{*4}, Gregory L. Challis^{*2}

^{*1} 静岡大学農学部

^{*2} ウォーリック大学化学科

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*4} 広島工業大学生命学部

元素分析計-同位体比質量分析計 (EA-IRMS) によるうなぎ加工品試料の炭素・窒素・酸素安定同位体比分析の試験所間比較

鈴木彌生子*1, 一色 摩耶*2, 佐藤 里恵*3, 中下留美子*4

- *1 (独) 農研機構食品総合研究所
*2 (独) 農林水産消費安全技術センター
*3 SIサイエンス(株)
*4 (独) 森林総合研究所

安定同位体比分析による産地判別の可能性が報告されているうなぎ加工品を試料として、炭素・窒素・酸素安定同位体比の室間試験を実施した。炭素・窒素同位体比の室間差は、1.2%と1.6%であり、室間差は比較的小さい結果となった。酸素同位体比については最大で7.6%の室間差があることが分かった。うなぎ加工品には窒素が含まれるため、COガスとN₂ガスの分離が真度へ大きな影響を及ぼしていると考えられる。そこで、COガスとN₂ガスの分離が酸素同位体比に及ぼす影響について検証した結果、分離カラムを長くしたり、熱脱着カラムを用いたりするなど、分離カラムを工夫してN₂ピークとCOピークの分離を改善した研究室については、室間差が2.6%となり、酸素同位体比の結果が改善されることが分かった。

Interlaboratory Comparison of Processed Eel Samples for Carbon, Nitrogen, and Oxygen Isotope Ratios Using EA-IRMS System

Yaeko Suzuki*1, Maya Isshiki*2, Rie Sato*3, Rumiko Nakashita*4

- *1 National Food Research Institute, NARO
*2 Food Agricultural Materials Inspection Center
*3 SI Science CO., LTD.
*4 Forestry and Forest Products Research Institute

安定同位体比分析によるうなぎ加工品の原料原産地判別

一色 摩耶*1, 中村 哲*1, 高嶋 康晴*1, 寺田 昌市*1, 鈴木彌生子*2

- *1 (独) 農林水産消費安全技術センター
*2 (独) 農研機構食品総合研究所

炭素、窒素、および酸素安定同位体比分析によるうなぎ加工品の原料原産地判別を検討した。酸素安定同位体比分析については、分離カラム1.2mを用いて測定し、かつ本研究で提案した補正計算を行うことで窒素の影響を軽減できることが分かった。また、うなぎ加工品の前処理である調味料洗浄過程における酸素安定同位体交換のリスクを評価し、本研究で用いた水洗浄は試料の値に影響しないことを確認した。最適化した分析方法を用いて、うなぎ加工品244件（日本産139件および中国産105件）を試料として分析した結果、全ての安定同位体比に有意差が認められた。分析結果に基づいて線形判別分析により判別関数を構築したところ、その予測率は日本産で97.8%、中国産で83.8%となった。高い予測率で判別可能であったことから、炭素、窒素および酸素の安定同位体比分析はうなぎ加工品の原料原産地表示の真正性を確認するための有効な分析法であることが示唆された。

Determination of the Geographic Origin of Eel Products by Stable Isotope Ratio Analysis

Maya Isshiki*1, Satoru Nakamura*1, Yasuharu Takashima*1, Shouichi Terada*1, Yaeko Suzuki*2

- *1 Food Agricultural Materials Inspection Center
*2 National Food Research Institute, NARO

日本食品科学工学会誌, 61(3), 134-138(2014)

安定同位体比分析および微量元素分析による湯通し塩蔵ワカメの産地判別

鈴木彌生子*1, 國分 敦子*2, 絵面 智宏*2, 中山 和美*2

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 理研ビタミン(株)

鳴門・三陸および中国で収穫された素性の確かな湯通し塩蔵ワカメ(210試料)について、既報の炭素・窒素同位体比分析の結果と9元素組成(Mg・P・Ca・V・Mn・Zn・Rb・Sr・Ba)を組み合わせるにより、産地判別の正確さの向上を検証した。9元素の組成を比較した結果、中国産については他の地域よりもとくにMg・Ba・Mn・V・Znの濃度が高く、特徴的な傾向が得られた。特徴の得られた5元素濃度(Mg・Ba・Mn・V・Zn)と炭素・窒素同位体比の結果を用いて、鳴門・三陸・中国・韓国の4群について正準判別分析を行った。判別率は、鳴門産は100%(64点中)、中国産は94.4%となった。しかし、三陸産と韓国産の特徴は類似し、判別率は80%前後となった。以上より、安定同位体比と微量元素組成を組み合わせることで、湯通し塩蔵ワカメの産地判別の正確さが向上した。

Tracing the Geographical Origin of Boiled and Salted Wakame (*Undaria pinnatifida*) Using Trace Element and Stable Isotope Analyses

Yaeko Suzuki*1, Atsuko Kokubun*2, Tomohiro Edura*2, Kazumi Nakayama*2

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Riken Vitamin Co., Ltd.

長野県環境保全研究所研究報告, 9, 17-22(2013)

塩尻市における牛舎周辺のツキノワグマ (*Ursus thibetanus*) 捕獲個体の家畜飼料依存

中下留美子*1,*5, 岸元 良輔*2,*5, 鈴木彌生子*3,*5,
瀧井 暁子*4,*5, 林秀 剛*5, 泉山 茂之*4,*5

*1 (独) 森林総合研究所

*2 長野県環境保全研究所

*3 (独) 農研機構食品総合研究所

*4 信州大学農学部

*5 NPO信州ツキノワグマ研究会

長野県塩尻市内の2か所の牛舎でツキノワグマ (*Ursus thibetanus*) の出没が問題となっている。2010-11年の2年間に牛舎周辺および近隣地区において捕獲された9個体について、炭素・窒素安定同位体比解析を行い、食性履歴の推定を行った。その結果、9個体中5個体が牛舎の家畜飼料に依存していた可能性があることが明らかとなった。牛舎周辺には民家もあることから、早急な対策が求められる。

Dependence on cattle feed of Asiatic black bears captured near beef cattle barns in Shiojiri, Nagano

Rumiko NAKASHITA*1,*5, Ryosuke KISHIMOTO*2,*5, Yaeko SUZUKI*3,*5,
Akiko TAKII*4,*5, Hidetake HAYASHI*5, Shigeyuki IZUMIYAMA*4,*5

*1 Forestry and Forest Products Research Institute

*2 Nagano Environmental Conservation Research Institute

*3 National Food Research Institute, NARO

*4 Faculty of Agriculture, Shinshu University

*5 Shinshu Black Bear Research Group, NPO

信州大学農学部AFC報告, 11, 25-28(2013)

長野市街地ツキノワグマ出没個体は人里に依存していたか? 安定同位体比分析による食性解析

泉山 茂之*1,*5, 中下留美子*2,*5, 岸元 良輔*3,*5, 鈴木彌生子*4,*5, 林秀 剛*5, 瀧井 暁子*1,*5

*1 信州大学農学部
*2 (独) 森林総合研究所
*3 長野県環境保全研究所
*4 (独) 農研機構食品総合研究所
*5 NPO信州ツキノワグマ研究会

2012年10月5日に長野市市街地に出没して裾花川沿いで射殺されたツキノワグマ (*Ursus thibetanus*) 個体について、年齢査定と胃内容物分析を行うとともに、体毛の炭素・窒素安定同位体比解析による食性履歴の推定を行い、出没原因として人に由来する食物に依存していたかを検討した。その結果、当該個体は3歳の性成熟前後のオスグマで、胃内容物分析から河川沿いでヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) を集中的に食べていたと考えられるが、モモ (*Amygdalus persica*) の種子が1個だけ検出された。安定同位体比解析では、炭素同位体比がやや高い時期が見られて、トウモロコシ等のC4植物を摂取していた可能性も否定できなかったが、依存していたほどの値ではなかった。従って、モモなどの果樹に誘引されて人里に下りてきた可能性も否定はできないが、過度の依存は認められず、河川敷を餌場として利用するうちに偶発的に市街地に入り込んだと推測される。

Feeding habit analysis of an Asiatic black bear that intruded into an urban area in Nagano City by measuring carbon and nitrogen stable isotope ratios

Shigeyuki Izumiya*1,*5, Rumiko Nakashita*2,*5, Ryosuke Kishimoto*3,*5, Yaeko Suzuki*4,*5, Hidetake Hayashi*5, Akiko Takii*1,*5

*1 Faculty of Agriculture, Shinshu University
*2 Forestry and Forest Products Research Institute
*3 Nagano Environmental Conservation Research Institute
*4 National Food Research Institute, NARO
*5 Shinshu Black Bear Research Group, NPO

Ecological Research, 29(1), 45-53(2014)

Responses of carbon and oxygen stable isotopes in rice grain (*Oryza sativa* L.) to an increase in air temperature during grain filling in the Japanese archipelago

Fumikazu Akamatsu*1,*2, Yaeko Suzuki*1,*3, Rumiko Nakashita*1,*4, Takashi Korenaga*1

*1 Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University
*2 Center for Ecological Research, Kyoto University
*3 National Food Research Institute, NARO
*4 Forestry and Forest Products Research Institute

植物の炭素・酸素同位体比は生育状況を反映するため、気候変化に伴う気温上昇といった環境要因を読み解く指標となり得る。日本においては、気候変化に伴い、日中よりも夜間における気温上昇の方が大きく変動すると予測される。本研究では、コシヒカリの炭素・酸素同位体比が登熟期間の気温変動やコメの品質・生産量と相関関係があるかどうかを検証した。炭素同位体比は平均最高気温または平均最低気温と相関関係は見られなかった。酸素同位体比は平均最低気温と正の相関関係が見られ、コメの酸素同位体比は夜間の気温の変動を反映すると推察される。さらに、コメの登熟期間における平均最低気温の上昇はコメの収量や品質に負の影響を及ぼすことが分かった。よって、コメの酸素同位体比は登熟期間の最低気温の変化を示す指標となることが分かった。

日本列島におけるコメの登熟期間の気温上昇に対するコメの炭素・酸素安定同位体比の変動

赤松 史一*1,*2, 鈴木彌生子*1,*3, 中下留美子*1,*4, 伊永 隆史*1

*1 首都大学東京理学部
*2 京都大学生態学研究センター
*3 (独) 農研機構食品総合研究所
*4 (独) 森林総合研究所

Biochemistry, 52(28), 4800-4809 (2013)

Inversion of the stereochemistry around the sulfur atom of the axial methionine side chain through alteration of amino acid side chain packing in Hydrogenobacter thermophilus cytochrome c552 and its functional consequences

Hulin Tai*¹, Ken Tonegawa*¹, Tomokazu Shibata*¹, Hikaru Hemmi*², Nagao Kobayashi*³, Yasuhiko Yamamoto*¹

*¹ Department of Chemistry, University of Tsukuba

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University

好熱性水素細菌(Hydrogenobacter thermophiles) (HT) のシトクロムc552において、ヘム鉄に軸配位子としてMetが結合を形成する場合、硫黄原子(S δ)の2組の非共有電子対のうちいずれかがヘム鉄に供与されるためS δは不斉原子となることから、軸配位子Met側鎖は、RまたはS配向のいずれかのコンフォメーションとして存在する。今回、我々は、R配向である軸配位子Met59の側鎖のコンフォメーションが、α-helix間の接触界面に存在するAla73をValに置換することにより、S配向に変わることを明らかにした。さらに、A73V変異体の酸化還元電位(Em)は265 mVであり、HTよりも20 mV高いこと、そしてEmの上昇はΔSの寄与に依り生じることも分かった。

遠隔アミノ酸残基置換による好熱性水素細菌シトクロムC552の軸配位子メチオニン側鎖硫黄原子の不斉反転と機能への影響

太 虎林*¹, 利根川 健*¹, 柴田 友和*¹, 逸見 光*², 小林 長夫*³, 山本 泰彦*¹

*¹ 筑波大学数理物質科学研究科化学専攻

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 東北大学理学部化学科

Food Science and Technology Research, 19(6), 1099-1105(2013)

Objective evaluation of astringent and umami taste intensities of matcha using a taste sensor system

Tomomi Ujihara*¹, Nobuyuki Hayashi*², Hidekazu Ikezaki*³

*¹ National Institute of Vegetable and Tea Science, NARO

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Intelligent Sensor Technology, Inc.

日本緑茶の一種である抹茶は、伝統的な茶道に用いられるが、近年では食品材料としても利用されるようになってきている。また、茶道や抹茶を使った食品は、これまで抹茶に親しみのなかった外国にも浸透しつつある。このような事情から、抹茶の品質に関する情報を提供することは、生産者、販売者、消費者のいずれにも、目的に合った製品の生産や商品の選択を可能とするために重要である。我々は、抹茶の味を客観的に評価するための、標準化された方法を開発した。この方法は、渋味強度とうま味強度の標準物質として、没食子酸エビガロカテキンとグルタミン酸ナトリウムをそれぞれ使用する。この評価法の再現性は高く、実用に耐えうると考えられた。また、市販の抹茶試料の分析を試みた結果、本法は、茶道用、食品材料用といった用途の異なる抹茶の味の違いを、詳細に評価可能であることが明らかになった。

味覚センサー装置を用いた抹茶の渋味およびうま味強度測定法

氏原ともみ*¹, 林 宣之*², 池崎 秀和*³

*¹ (独) 農研機構野菜茶業研究所

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ (株) インテリジェントセンサーテクノロジー

Recognition of caffeine by a water-soluble acyclic phane compound

Nobuyuki Hayashi*1, Tomomi Ujihara*2, Shigeki Jin*3

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 National Institute of Vegetable and Tea Science, NARO

*3 Faculty of Health Science, Hokkaido University

カフェインは我々の日常生活に関連した化学物質である。水中でカフェインを認識するために、人工レセプターとして3個の芳香環から構成される6種類の水溶性非環状ファン化合物が検討された。1H NMR滴定実験によって、6,6'-[1,3-phenylenebis(carbonylimino)]bis-1,3-naphthalenedisulfonateがカフェインに対して最も高い結合能力(結合定数 $K_b=127 \pm 5 \text{ M}^{-1}$)を有することが明らかになった。このファン化合物はテオフィリンとも複合体を形成したが(その結合定数は、カフェインとの値のおよそ半分の $K_b=64 \pm 4 \text{ M}^{-1}$)、アデノシン、グアノシン、イノシン、およびそれらの5'-リン酸塩に対しては弱く結合するか、もしくは、ほとんど結合を示さなかった。

水溶性非環状ファン化合物によるカフェインの認識

林 宣之*1, 氏原ともみ*2, 神 繁樹*3

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 (独) 農研機構野菜茶業研究所

*3 北海道大学大学院保健科学研究所

Objective evaluation methods for the bitter and astringent taste intensities of black and oolong teas by a taste sensor

Nobuyuki Hayashi*1, Tomomi Ujihara*2, Ronggang Chen*3, Kazue Irie*3, Hidekazu Ikezaki*3

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 National Institute of Vegetable and Tea Science, NARO

*3 Intelligent Sensor Technology, Inc.

一定不変の基準点から紅茶と烏龍茶の苦味強度を客観的に示すために、味覚センサーを利用する方法が開発された。センサー出力値は化学薬品のみから調製された標準液によって較正された。標準物質として、没食子酸エチル(EG)が使用された。センサー出力値は濃度の異なる2つのEG水溶液を用いて苦味強度を表す値に換算された。これらの茶の渋味強度も同様の方法によって評価された。渋味の場合には、(-)-没食子酸エピガロカテキンが標準物質として使用された。味覚センサーによるこれらの評価結果は官能評価の結果と類似した傾向を示した。味覚センサーに基づく味強度値の相対標準偏差は、これらの評価法が十分な実用的精度を持っていることを裏付けた。苦味強度と渋味強度に関する2次元マッピング解析によって、本研究における試料調製条件下では、インド産とスリランカ産の紅茶が、中国産の烏龍茶よりも総じて強い味強度をもつ傾向にあることが示された。

味覚センサーを用いた紅茶・烏龍茶の苦味・渋味強度の客観的評価法

林 宣之*1, 氏原ともみ*2, 陳 榮剛*3, 入江 和江*3, 池崎 秀和*3

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 (独) 農研機構野菜茶業研究所

*3 (株) インテリジェントセンサーテクノロジー

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 130, 199-204 (2014)

Construction of Energy transfer Pathways Self-Assembled from DNA-Templated Stacks of Anthracene

Rika Iwaura*¹, Hiroharu Yui*², Yuu Someya*², Mayumi Ohnishi-Kameyama*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science

オリゴアデニル酸とチミジル酸-アントラセン複合体 (TACA) の二成分系自己集合体は、水中でアントラセン部位がスタックした一次元集積体を形成することを見いだした。この一次元集積体の時間分解蛍光スペクトル測定では、アントラセンの蛍光寿命の著しい単寿命化が観察された。さらに、HEX色素を修飾したオリゴアデニル酸とTACTの二成分系自己集合体の蛍光スペクトルは、アントラセンの励起波長を用いた場合でもアントラセンの蛍光は観察されず、HEX色素の蛍光のみが観察された。以上の結果から、オリゴアデニル酸とTACTの二成分系自己集合体中では、一次元集積したアントラセン上を効率よくエネルギー移動が起こっているものと考察した。

DNAを鋳型としたアントラセン集積体から自己集合したエネルギー移動経路の構築

岩浦 里愛*¹, 由井 宏治*², 染谷 悠*², 亀山真由美*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 東京理科大学理学部化学科

日本食品科学工学会誌, 60(9), 521-524(2013)

調理条件が味噌汁のフラン量に及ぼす影響

箭田 浩士, 亀山真由美

(独) 農研機構食品総合研究所

調味料として加熱調理に用いられることの多い味噌について、家庭で使われる調理器具を用いて味噌汁を調理した後に、静置(保温)と温め直しを繰り返す条件でフランの挙動を調べた。通常の鍋で加熱調理後に静置と温め直しを繰り返した場合にはフラン量の変化が小さかったが、より気密性と保温性が高い保温調理器具を用いて保温と温め直しを繰り返すと味噌汁中のフラン量が直線的に増加した。今回、家庭での調理と類似した条件において味噌汁中のフラン量が増加して、未加熱食材に含まれるフラン量の二倍を越える場合があることを確認した。

Effects of Cooking Conditions on Furan Levels in Miso Soup

Hiroshi Yada, Mayumi Ohnishi-Kameyama

National Food Research Institute, NARO

Applied Entomology and Zoology, 48(4), 423-429(2013)

Detection of eggs in the living white grub beetle *Dasylepida ishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae) by magnetic resonance imaging

Yasuyo Sekiyama*¹, Akemi K. Horigane*¹, Nao Fujiwara-Tsujii*², Hiroe Yasui*², Hiroshi Ono*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² National Institute of Agrobiological Sciences

ケブカアカチャコガネ (*Dasylepida ishigakiensis*) はサトウキビの重要害虫であり、幼虫によるサトウキビ根茎部の食害は、沖縄県宮古島などで甚大な被害をもたらしている。成虫(雌)の性フェロモンを利用して交尾行動を阻害し、繁殖を抑える「交信かく乱法」が開発されているが、効果的な防除法を開発するためにはメスの性成熟の程度とフェロモン放出のタイミングを明らかにする必要がある。

そこで本研究では、磁気共鳴画像法(MRI)により生きた雌個体の卵巣発達を経時的にモニタリングするための計測条件を検討した。生体を13℃で固定することで動きによるアーチファクト生成を抑え、T1強調画像の測定パラメータを最適化することで、短時間での成熟卵の検出を可能にした。

MRIによるケブカアカチャコガネの卵の検出

関山 恭代*¹, 堀金 明美*¹, 辻井 直*², 安居 拓恵*², 小野 裕嗣*¹

*¹(独) 農研機構食品総合研究所

*²(独) 農業生物資源研究所

Applied Entomology and Zoology, 48(3), 233-239(2013)

Observations of the migration of adult *Dasylepida ishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae) from belowground to the soil surface and their reproductive status by MRI

Nao Fujiwara-Tsujii*¹, Hiroe Yasui*¹, Yasuyo Sekiyama*², Akemi K. Horigane*², Hiroshi Ono*¹, Norio Arakaki*³

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² National Institute of Agrobiological Sciences

*³ Okinawa Prefectural Agricultural Research Center

ケブカアカチャコガネ (*Dasylepida ishigakiensis*) はサトウキビの重要害虫であり、幼虫によるサトウキビ根茎部の食害は、沖縄県宮古島などで甚大な被害をもたらしている。成虫(雌)の性フェロモンを利用して交尾行動を阻害し、繁殖を抑える「交信かく乱法」が開発されているが、効果的な防除法を開発するためには、雌雄それぞれが地上に出現するタイミングや、雌の性成熟の程度とフェロモン放出のタイミングなどを明らかにする必要がある。

そこで本研究では、雌が地下で羽化した後移動しながら性成熟し、地上部に出現するまでの卵巣発達の程度を経時的にモニタリングし、雌の地下部での移動度と卵巣発達の関係を明らかにした。

ケブカアカチャコガネ *Dasylepida ishigakiensis* (コウチュウ目: コガネムシ科) 成虫の土中から地上への移動及びMRIによる卵巣発達度の観察

辻井 直*¹, 安居 拓恵*², 関山 恭代*¹, 堀金 明美*¹, 小野 裕嗣*¹, 新垣 則雄*³

*¹(独) 農研機構食品総合研究所

*²(独) 農業生物資源研究所

*³ 沖縄県農業研究センター

Analytical Chemistry, 85(9), 4500-4506 (2013)

Pulse laser photolysis of aqueous ozone in the microsecond range studied by time-resolved far-ultraviolet absorption spectroscopy

Takeyoshi Goto^{*1}, Yusuke Morisawa^{*2}, Noboru Higashi^{*3}, Akifumi Ikehata^{*4}, Yukihiro Ozaki^{*1}

^{*1} School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University

^{*2} School of Science and Engineering, Kinki University

^{*3} Kurabo Industries Ltd.,

^{*4} National Food Research Institute, NARO

オゾンのパルス光分解反応ダイナミクスについて、ポンププローブ過渡遠紫外 (FUV) 吸収分光法で調べた。オゾン水 (濃度:78-480 μ M, pH:2.5-11.3) を266 nmのナノ秒パルスレーザーでポンプし、190 nmから225 nmまでの波長領域で-50 ~ 50マイクロ秒の時間範囲で過渡スペクトルを得た。測定された過渡吸収スペクトルをmultivariate curve resolution法でモル吸光係数および構成される化学成分の濃度-時間プロファイルに分解した。オゾンの初期濃度に対する20マイクロ秒の時間平均濃度の依存性から、オゾンの分解過渡スペクトルには過酸化水素 (H₂O₂)、およびヒドロキシルラジカル (OH)、またはペルヒドロキシルラジカル (HO₂) に割り当てられる第三成分の存在が示唆された。さらに、第3の成分の時間平均濃度のpH依存性により、第三成分としてはOHが存在する可能性が高いことが示された。

時間分解遠紫外分光法によるオゾン水のマイクロ秒パルスレーザー光分解

後藤 剛喜^{*1}, 森澤 勇介^{*2}, 東 昇^{*3}, 池羽田晶文^{*4}, 尾崎 幸洋^{*1}

^{*1} 関西学院大学理工学部

^{*2} 近畿大学理工学部

^{*3} 倉敷紡績株式会社

^{*4} (独) 農研機構食品総合研究所

Advanced Optical Materials, 1(5), 397-403 (2013)

Oxide surface plasmon resonance for a new sensing platform in the near-infrared range

Hiroaki Matsui^{*1, *2}, Wasanthamala Badalawa^{*2}, Akifumi Ikehata^{*3}, Hitoshi Tabata^{*1, *2}

^{*1} Department of Bioengineering, The University of Tokyo

^{*2} Department of Electronics Engineering and Information systems, The University of Tokyo

^{*3} National Food Research Institute, NARO

ドーパされた酸化物半導体In₂O₃:Sn層により、近赤外 (NIR) 領域での表面プラズモン共鳴を実現する新しいセンサープラットフォーム (酸化物系SPR) を開発した。酸化物系SPRの検出感度の増強は、表面プラズモンと分子振動の励起との間でカップリングが達成された場合にのみ発生する。このことはNIR範囲における分子振動モードに起因する吸収帯の増強によって実証された。これらの結果は、膜表面上の電場の理論解析によって支持される。グルコース水溶液のSPR測定により、酸化物系SPRの検出感度 (S) は7576 nm RIU-1であることが明らかとなった。この値は理論的による推定値 (S = 7447 nm RIU-1と一致する)。屈折率の実験的及び理論的に得られる分解能は10-5程度である。結果として、酸化物系SPRの検出感度は、可視域で普及している金基板のSPRに近いことが明らかとなった。

時間分解遠紫外分光法によるオゾン水のマイクロ秒パルスレーザー光分解

松井 裕章^{*1, *2}, バダラワ ワサンタマーラー ^{*2}, 池羽田晶文^{*3}, 田畑 仁^{*1, *2}

^{*1} 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻

^{*2} 東京大学大学院工学系研究科電気系工学専攻

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

生殖組織内における耐凍剤分布の計測法

都 甲洙*1, 佐藤 嘉兵*1, 斐 英煥*2, 池羽田晶文*3, 荒木 徹也*4, 上野 茂昭*5, 白 樗了*6

*1 日本大学生物資源科学部

*2 順天大学校

*3 (独) 農研機構食品総合研究所

*4 東京大学大学院農学生命科学研究科

*5 東北大学農学研究

*6 東京大学生産技術研究所

凍結プロセスにおける生殖組織の最適凍結保存法を解明するために、水の吸収波長で得られた分光画像の画素を吸光度に変換することで、卵巣組織におけるEGの浸透挙動の計測および濃度分布の定量化を試みた。近赤外分光法によりエチレングリコール(EG)水溶液の吸収スペクトルを計測した結果、EG100 wt%の吸収ピークは1586nmであり、水の吸収ピークは1460nmであることが確認された。これらを利用し、EG水溶液濃度別の吸光度と分光画像の吸光度変換における吸光度を求めた。近赤外分光イメージングにより卵巣組織内のEG浸透挙動の計測が可能になり、EG浸透圧における分光画像の吸光度により、卵巣組織内のEG濃度分布を算出できた。

A measuring method for the concentration of cryoprotectant within reproductive tissue

Gabsoo Do*1, Kahei Sato*1, Yeonghwan Bae*2, Akifumi Ikehata*3, Tetsuya Araki*4, Shigeaki Ueno*5, Ryo Shlrakashi*6

*1 College of Bioresource Sciences, Nihon University

*2 Suncheon National University

*3 National Food Research Institute, NARO

*4 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

*5 Graduate School of Agricultural Sciences, Tohoku University

*6 Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

精米粉中のカドミウム及び必須無機元素の2008年度技能試験結果

内藤 成弘*1, 門倉 雅史*2, 安井 明美*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 (独) 農林水産消費安全技術センター

(独) 農研機構食品総合研究所が実施した精米粉中のカドミウム及び必須無機元素の2008年度技能試験の36参加試験室からの報告値を技能試験の国際ハーモナイズドプロトコルに従って解析した。水分、カドミウム及び9必須無機元素のすべての測定対象成分について |zスコア| > 2の報告値が存在し、カドミウム以外の測定対象成分には |zスコア| > 3の報告値も存在した。ナトリウム、カルシウム及び鉄は、報告値のばらつきが大きく、ハーモナイズドプロトコルに従っての付与値の決定はできず、これら3成分については、外れ値除去後の中央値を参考値に採用した。

Results of the proficiency testing program for determination of cadmium and essential inorganic elements in milled rice flour in 2008

Shigehiro Naito*1, Masashi Kadokura*2, Akemi Yasui*1

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Food and Agricultural Materials Inspection Center

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405(25), 8347-8362 (2013)

Identification of possible technical problems in determination of the major inorganic constituents of brown-rice flour by evaluating proficiency test results

Shin-ichi Miyashita*¹, Kazumi Inagaki*¹, Shigehiro Naito*², Kumiko Shindoh*², Tomohiro Narukawa*¹,
Yanbei Zhu*¹, Takayoshi Kuroiwa*¹, Akiharu Hioki*¹, Toshiyuki Fujimoto*¹, Koichi Chiba*¹

*¹ National Metrology Institute of Japan (NMIJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

*² National Food Research Institute, NARO

食品中の無機元素分析の技能向上を支援する目的で、計量標準総合センター及び食品総合研究所は玄米粉末中のマンガン、鉄、銅、亜鉛、総ヒ素及びカドミウム定量分析の技能試験を技能試験の国際規格 (ISO/IEC 17043:2010) に基づいて提供した。133機関の報告をISO/IEC 17043及び技能試験の国際ハーモナイズドプロトコルに従って解析し、評価した。各機関から報告された分析値及び分析方法の詳細レポートを精査し、技能試験結果が疑わしい又は不満足に判定された参加機関の技術的な原因について考察した。

技能試験結果の評価による玄米粉末中の主要無機成分の定量分析における技術的問題点

宮下 振一*¹, 稲垣 和三*¹, 内藤 成弘*², 進藤久美子*², 成川 知弘*¹,
朱 彦北*¹, 黒岩 貴芳*¹, 日置 昭治*¹, 藤本 俊幸*¹, 千葉 光一*¹

*¹ (独) 産業技術総合研究所計量標準総合センター

*² (独) 農研機構食品総合研究所

食品衛生学雑誌, 54(1), 75-82 (2013)

Inter-laboratory study of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of deoxynivalenol and its acetylated derivatives, 3-acetyl-deoxynivalenol and 15-acetyl-deoxynivalenol in wheat

Tomoya Yoshinari*¹, Toshitsugu Tanaka*², Eiichi Ishikuro*³, Masakazu Horie*⁴, Toshihiro Nagayama*⁵,
Masahiro Nakajima*⁶, Shigehiro Naito*⁷, Takahiro Ohnishi*¹, Yoshiko Sugita-Konishi*¹

*¹ National Institute of Health Sciences

*² Kobe Institute of Health

*³ Japan Scientific Feeds Association

*⁴ Otsuma Women's University

*⁵ Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

*⁶ Nagoya City Public Health Research Institute

*⁷ National Food Research Institute, NARO

小麦中のデオキシニバレノール (DON), 並びにその誘導体である3-アセチルデオキシニバレノール (3ADON) 及び15-アセチルデオキシニバレノール (15ADON) の多機能カラム及びLC-MS/MSを用いた同時定量法の妥当性確認のために、9試験室にブランク試料1個、添加試料3個及び自然汚染試料1個を配付して室間共同試験を行った。回収率、併行精度、室間再現精度及びHorRatを評価した結果、これら3成分の同時定量法の妥当性を確認できた。

小麦中のデオキシニバレノール (DON), 並びにその誘導体である3-アセチルデオキシニバレノール (3ADON) 及び15-アセチルデオキシニバレノール (15ADON) の同時定量のためのLC-MS/MS法の室間共同試験

吉成 知也*¹, 田中 敏嗣*², 石黒 瑛一*³, 堀江 正一*⁴, 永山 敏廣*⁵,
中島 正博*⁶, 内藤 成弘*⁷, 大西 貴弘*¹, 小西 (杉田) 良子*¹

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所

*² 神戸市環境保健研究所

*³ 日本科学飼料協会

*⁴ 大妻女子大学

*⁵ 東京都健康安全研究センター

*⁶ 名古屋市衛生研究所

*⁷ (独) 農研機構食品総合研究所

食品衛生学雑誌, 54(4), 266-276 (2013)

Inter-Laboratory Study of an LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Fumonisin B1, B2 and B3 in Corn

Tomoya YOSHINARI*1, Toshitsugu TANAKA*2, Eiichi ISHIKURO*3, Masakazu HORIE*4, Toshihiro NAGAYAMA*5,
Masahiro NAKAJIMA*6, Shigehiro NAITO*7, Takahiro OHNISHI*1, Yoshiko SUGITA-KONISHI*1

*1 National Institute of Health Sciences

*2 Kobe Institute of Health

*3 Japan Scientific Feeds Association

*4 Otsuma Women's University

*5 Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

*6 Nagoya City Public Health Research Institute

*7 National Food Research Institute, NARO

コーン中のフモニシンB1, B2及びB3の強陰イオン交換カートリッジ及びLC-MS/MSを用いた同時定量法の妥当性を確認するために、9試験室にフモニシン陰性試料1個、添加試料3個及び自然汚染試料2個を9試験室に配付して室間共同試験を行った。回収率、併行精度、室間再現精度及びHorRatを評価した結果、これら3成分の同時定量法の妥当性を確認できた。本分析法を用いてコーングリッツ中のフモニシンのサーベイランスを実施した結果、すべての試料でフモニシンが定量された。

コーン中のフモニシンB1, B2及びB3の同時定量のためのLC-MS/MS法の室間共同試験

吉成 知也*1, 田中 敏嗣*2, 石黒 瑛一*3, 堀江 正一*4, 永山 敏廣*5,
中島 正博*6, 内藤 成弘*7, 大西 貴弘*1, 小西(杉田) 良子*1

*1 国立医薬品食品衛生研究所

*2 神戸市環境保健研究所

*3 日本科学飼料協会

*4 大妻女子大学

*5 東京都健康安全研究センター

*6 名古屋市衛生研究所

*7 (独) 農研機構食品総合研究所

Food Hygiene and Safety Science, 55(1), 25-33 (2014)

Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of foods and agricultural products

Junichi Mano*1, Shuko Hatano*2, Satoshi Futo*2, Yasutaka Minegishi*3, Kenji Ninomiya*4,
Kosuke Nakamura*5, Kazunari Kondo*5, Reiko Teshima*5, Reona Takabatake*1, Kazumi Kitta*1

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Fasmac Co., Ltd.

*3 Nippon Gene Co., Ltd.

*4 Shimadzu Corporation

*5 National Institute of Health Sciences

食品及び農産物のDNA分析をより簡易なものとするため、分析試料の粗抽出液からDNAを直接PCRで増幅し、それをリアルタイムPCR装置でモニタリングするダイレクトリアルタイムPCRについて検討を行った。既定の組織溶解液による前処理と開発したマスターミックスによるリアルタイムPCRを組み合わせてダイレクトリアルタイムPCRシステムとした。開発した手法が多様な試料に適用可能であること、ダイレクトリアルタイムPCRにおけるプライマーの選択性は、精製DNAを用いる通常のPCRと同等であることが確認された。最後に、遺伝子組換え農産物を一定の濃度で含む試料を用いてダイレクトリアルタイムPCRの検出感度及び定量性について評価を行った。分析の結果から、ダイレクトリアルタイムPCRによって標的の高感度な検出と高精度な定量が可能であることが明らかとなった。

多様な食品及び農産物に適用可能なダイレクトリアルタイムPCRシステムの開発

真野 潤一*1, 波田野修子*2, 布藤 聡*2, 峯岸 恭孝*3, 宮健 二*4,
中村 公亮*5, 近藤 一成*5, 手島 玲子*5, 高島令王奈*1, 橘田 和美*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 (株) ファスマック

*3 (株) ニッポンジーン

*4 (株) 島津製作所

*5 国立医薬品食品衛生研究所

Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, 20(3), 161-169 (2013)

Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods

Kosuke Nakamura^{*1}, Yumi Minamitake^{*1, *2}, Kaori Nakamura^{*1, *2}, Tomoko Kobayashi^{*1}, Akio Noguchi^{*1}, Reona Takabatake^{*3}, Kazumi Kitta^{*3}, Hiroyuki Hashimoto^{*4}, Hiroshi Kawakami^{*2}, Kazunari Kondo^{*1}, Reiko Teshima^{*1}, Hiroshi Akiyama^{*1}

^{*1} National Institute of Health Sciences

^{*2} Kyoritsu Women's University

^{*3} National Food Research Institute, NARO

^{*4} Chiba Prefectural Institute of Public Health

ジャガイモ加工食品中のDNAの断片化の程度を、増幅断片長が異なる種々のPCRプライマー対を設計し、定性PCRにて解析した。ジャガイモスナック菓子、冷凍ジャガイモ、乾燥ジャガイモ、ポテトサラダ等調理済みジャガイモでは301bp断片長まで増幅した。一方、ジャガイモデンプンや、さらにその加工品である春雨からは51-101bp断片長までを増幅した。リアルタイムPCRでは全てのジャガイモ加工品から63bpの増幅産物が検出された。以上の結果より、PCRを使用してジャガイモ加工食品中の遺伝子組換えジャガイモを検出するためには、標的増幅産物が51-101bp以下となるようにPCRプライマー対を設計する必要があることが示唆された。

加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来DNAを高感度に検出するためのPCRプライマー設計について

中村 公亮^{*1}, 南竹 優美^{*1, *2}, 中村 香織^{*1, *2}, 小林 友子^{*1}, 野口 秋雄^{*1}, 高島令王奈^{*3}, 橋田 和美^{*3}, 橋本 博之^{*4}, 川上 浩^{*2}, 近藤 一成^{*1}, 手島 玲子^{*1}, 穂山 浩^{*1}

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所

^{*2} 共立女子大学

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*4} 千葉県衛生研究所

Biological and Pharmaceutical Bulletin, 37(1), 1-5 (2014)

Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand

Kosuke Nakamura^{*1}, Kazunari Kondo^{*1}, Tomoko Kobayashi^{*1}, Akio Noguchi^{*1}, Kiyomi Ohmori^{*2}, Reona Takabatake^{*3}, Kazumi Kitta^{*3}, Hiroshi Akiyama^{*1}, Reiko Teshima^{*1}, Tomoko Nishimaki-Mogami^{*1}

^{*1} National Institute of Health Sciences

^{*2} Chemistry Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

^{*3} National Food Research Institute, NARO

パパイヤリングスポットウイルス (PRSV) の種々の株からの感染に抵抗性を持たせるために、数多くの系統の遺伝子組換え (GM) パパイヤ (*Carica papaya* LINNAEUS) が世界中で開発されている。われわれは輸入パパイヤ加工食品中に未確認・未承認のGMパパイヤが混入していることを発見した。タイ国で分離されたPRSV株に対して抵抗性を有する遺伝子組換え配列を検知した。そして、タイ国由来PRSV抵抗性GMパパイヤを定性的に検知する特異的なリアルタイムPCR法を開発した。

タイにおけるパパイヤリングスポットウイルス抵抗性遺伝子組換えパパイヤの同定・検出

中村 公亮^{*1}, 近藤 一成^{*1}, 小林 友子^{*1}, 野口 秋雄^{*1}, 大森 清美^{*2}, 高島令王奈^{*3}, 橋田 和美^{*3}, 穂山 浩^{*1}, 手島 玲子^{*1}, 最上(西巻)知子^{*1}

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所

^{*2} 神奈川県衛生研究所理化学部

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

Interlaboratory validation study of an event-specific real-time polymerase chain reaction detection method for genetically modified 55-1 papaya

Akio Noguchi*¹, Kosuke Nakamura*¹, Kozue Sakata*¹, Tomoko Kobayashi*¹, Hiroshi Akiyama*¹, Kazunari Kondo*¹,
Reiko Teshima*¹, Kiyomi Ohmori*², Masaki Kasahara*³, Rona Takabatake*⁴, Kazumi Kitta*⁴

*¹ National Institute of Health Sciences

*² Chemistry Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

*³ Food and Agricultural Materials Inspection Center

*⁴ National Food Research Institute, NARO

遺伝子組換えパパイヤ55-1(55-1)は、パパイヤリングスポットウイルスに対して抵抗性が付与されており、様々な国で商業利用されている。55-1の表示制度担保のため、リアルタイムPCRを用いた系統特異的検知法が開発された。また、開発された定性検知法の妥当性確認を目的として、12機関による試験室間共同試験(コラボ試験)が実施された。コラボ試験では、イオン交換カラムを用いたDNAの抽出および抽出DNAを用いたリアルタイムPCRによる分析までを各参画機関で行った。その結果、本分析法は、高い繰り返し性(0.6-0.8%)および高い再現性(2.2-3.6%)を有していることが示された。

遺伝子組換えパパイヤ55-1系統特異的リアルタイムPCR検出法の妥当性確認試験

野口 秋雄*¹, 中村 公亮*¹, 坂田こずえ*¹, 小林 友子*¹, 穂山 浩*¹, 近藤 一成*¹,
手島 玲子*¹, 大森 清美*², 笠原 正輝*³, 高畠令王奈*⁴, 橘田 和美*⁴

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所

*² 神奈川県衛生研究所理化学部

*³ (独) 農林水産消費安全技術センター

*⁴ (独) 農研機構食品総合研究所

Availability and utility of crop composition data

Kazumi Kitta

National Food Research Institute, NARO

多くの国で遺伝子組換え(GM)作物の安全性評価が義務づけられている。この安全性評価に際しては、意図的に導入された遺伝子に起因する形質による影響とともに、非意図的な影響についても、評価されなければならない。しかし、食品は幅広い変動幅を有する構成成分からなる複合体であり、その成分は、品種、栽培環境等様々な要因によって影響を受けうる。GM食品の個々の全成分に関して、科学的な安全性評価をすることは困難である。従って、既存の食品との比較において異なる点に焦点をあて、評価を行うことが合理的であるとされ、この考え方は各国の行政機関において共有されている。効率的なGM作物の安全性評価のためには、研究者、行政関係者が利用しやすい、農作物の幅広い成分データの蓄積が求められる。そこで、われわれは、コメ、ダイズ等の主要作物について、主要栄養素、抗栄養成分、毒性物質、機能性成分等のデータを収載した、インターネットで利用可能なデータベースを構築した。

農作物の成分データの公開とその有用性

橘田 和美

(独) 農研機構食品総合研究所

Japanese Journal of Food Chemistry and Safety, 20(2), 96-104 (2013)

Development and evaluation of a novel DNA extraction method suitable for processed foods

Yasutaka Minegishi^{*1, *2}, Junichi Mano^{*3}, Yasuo Kato^{*2}, Kazumi Kitta^{*3}, Hiroshi Akiyama^{*4}, Reiko Teshima^{*4}

^{*1} NIPPON GENE, Co., Ltd.

^{*2} Department of Biotechnology, Toyama Prefectural University

^{*3} National Food Research Institute, NARO

^{*4} National Institute of Health Sciences

加工食品から簡便迅速にDNAを抽出することを目的としてシリカ膜を用いた新規DNA抽出法を開発した。本法は穀物を対象とするDNA抽出キットGM quicker 2を基盤とし、加工食品からのDNA抽出に最適化を図ったものである。6種類の加工食品（きな粉、豆乳、味噌、トウモロコシ缶詰、スナック菓子、粉末コーンスープ）を用い、既存の4種類のDNA抽出法と新たに開発した方法の比較を行った。その結果、DNAの収量、純度及び操作性の各指標において、新たに開発した方法は従来法と同等かそれ以上の性能を有することが確認された。本研究で開発したDNA抽出法は、遺伝子組換え農産物や、アレルゲン、食中毒菌などを対象とする加工食品の遺伝子検査に広く活用されることが期待される。

加工食品に適した新規DNA抽出法の開発と評価

峯岸 恭孝^{*1, *2}, 真野 潤一^{*3}, 加藤 康夫^{*2}, 橘田 和美^{*3}, 穂山 浩^{*4}, 手島 玲子^{*4}

^{*1} (株)ニッポンジーン

^{*2} 富山県立大学大学院生物学専攻

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*4} 国立医薬品食品衛生研究所

Food Hygiene and Safety Science, 54(4), 309-315 (2013)

Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns

Reona Takabatake^{*1}, Hiromichi Noritake^{*2}, Akio Noguchi^{*3}, Kosuke Nakamura^{*3}, Kazunari Kondo^{*3}, Hiroshi Akiyama^{*3}, Reiko Teshima^{*3}, Junichi Mano^{*1}, Kazumi Kitta^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center

^{*3} National Institute of Health Sciences

スイートコーン種子およびその加工試料（冷凍、缶詰、ドライパック、ベビーコーン）を対象に、4種類のDNA抽出法（CTAB法、DNeasy Plant Maxi kit, GM Quicker 3, Genomic tip-20/G）を試みた。未加工種子及びベビーコーンでは、全ての抽出法でDNAが抽出され、それ以外の加工品では、CTAB法を除き全て抽出可能であったが、Genomic tip-20/Gを用いた場合に最も収量が多かった。電気泳動パターン、リアルタイムPCR解析等から、抽出DNAは、未加工種子で最も分解度合いが低く、以下、冷凍品、缶詰、ドライパック、ベビーコーンの順に分解が進んでいることが示された。各抽出法によって得られたDNAを様々な手法で比較したところ、加工品からの抽出に関しては、GM Quicker 3が最も適していることが示唆された。

加工品を含む複数のスイートコーン試料からのDNA抽出法の検討

高畠令王奈^{*1}, 則武 寛通^{*2}, 野口 秋雄^{*3}, 中村 公亮^{*3}, 近藤 一成^{*3}, 穂山 浩^{*3}, 手島 玲子^{*3}, 真野 潤一^{*1}, 橘田 和美^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター

^{*3} 国立医薬品食品衛生研究所

Food Chemistry, 141(3), 2618-2624 (2013)

Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct

Kosuke Nakamura^{*1}, Hiroshi Akiyama^{*1}, Noriaki Kawano^{*2}, Tomoko Kobayashi^{*1}, Kayo Yoshimatsu^{*2}, Junichi Mano^{*3}, Kazumi Kitta^{*3}, Kiyomi Ohmori^{*4}, Akio Noguchi^{*1}, Kazunari Kondo^{*1}, Reiko Teshima^{*1}

^{*1} National Institute of Health Sciences

^{*2} Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation

^{*3} National Food Research Institute, NARO

^{*4} Chemistry Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

KefengやKemingdaoといった未承認遺伝子組換えイネ系統は、多くの国々において加工食品中に混入が見出されており、遺伝子組換えコメの定性検知法が必要とされている。ササゲ由来トリプシンインヒビターを発現する組換え遺伝子のコンストラクトがKemingdaoを含む輸入加工コメ製品中から検出された。この3'末端配列は小胞体保持シグナルをコードする配列とノパリン合成酵素ターミネーターを含んでおり、Kefengのもの一致した。この組換え遺伝子コンストラクトの境界を検知する新規の構造特異的リアルタイムPCR検知法を開発し、この検知法を5つの系統特異的検知法と検出率を比較したところ、構造特異的検知法は、より高い効率で組換えコメを検出した。このことから、この構造特異的検知法は、組換えコメのスクリーニングのためにより有用なツールであるといえる。

CpTI-KDEL-T-nosコンストラクト導入遺伝子組換えコメを検出するリアルタイムPCR検知法の評価

中村 公亮^{*1}, 穂山 浩^{*1}, 河野 徳昭^{*2}, 小林 友子^{*1}, 吉松 嘉代^{*2}, 真野 潤一^{*3}, 橘田 和美^{*3}, 大森 清美^{*4}, 野口 秋雄^{*1}, 近藤 一成^{*1}, 手島 玲子^{*1}

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所

^{*2} (独) 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*4} 神奈川県衛生研究所理化学部

《食品素材科学研究領域》

Journal of AOAC International, 96(2), 346-352 (2013)

Interlaboratory study of qualitative PCR methods for genetically modified maize events MON810, Bt11, GA21, and CaMV P35S

Reona Takabatake^{*1}, Kaori Takashima^{*1}, Takeyo Kurashima^{*1}, Junichi Mano^{*1}, Satoshi Furui^{*1}, Kazumi Kitta^{*1}, Tomohiro Koiwa^{*2}, Hiroshi Akiyama^{*3}, Reiko Teshima^{*3}, Satoshi Futo^{*4}, Yasutaka Minegishi^{*5}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center

^{*3} National Institute of Health Sciences

^{*4} FASMAC Co., Ltd.

^{*5} NIPPON GENE Co., Ltd.

遺伝子組換えトウモロコシMON810, Bt11, GA21およびカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター(P35S)を標的とした定性PCR検知法の室間室間共同試験(コラボ試験)による性能評価を行った。P35Sは様々なGMトウモロコシに導入されているが、本研究では、MON810中のP35S領域を性能評価に用いた。本コラボ試験には、国内の15の機関が参加した。それぞれの定性分析法を、均一性が確認された三種類の濃度の擬似混入試料を用いて検証した結果、MON810, Bt11, GA21およびP35Sの検出限界は、それぞれ0.2, 0.2, 0.1および0.2%であることが示された。

遺伝子組換えトウモロコシMON810, Bt11, GA21およびCaMV P35Sの定性PCR検知法による室間室間共同試験

高島 令王奈^{*1}, 高島 かつり^{*1}, 倉嶋 たけ代^{*1}, 真野 潤一^{*1}, 古井 聡^{*1}, 橘田 和美^{*1}, 小岩 智宏^{*2}, 穂山 浩^{*3}, 手島 玲子^{*3}, 布藤 聡^{*4}, 峯岸 恭孝^{*5}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター

^{*3} 国立医薬品食品衛生研究所

^{*4} (株) ファスマック

^{*5} (株) ニッポンジーン

Journal of AOAC International, 96(2), 357-368 (2013)

Simulation of collaborative studies for real-time PCR-based quantitation methods for genetically modified crops

Satoshi Watanabe*¹, Hiroshi Sawada*¹, Shigehiro Naito*², Hiroshi Akiyama*³,
Reiko Teshima*³, Satoshi Furui*², Kazumi Kitta*², Akihiro Hino*²

*¹ SOMATECH Center, House Foods Corporation

*² National Food Research Institute, NARO

*³ National Institute of Health Sciences

遺伝子組換え (GM) 作物の定量検査法の試験室間共同 (コラボ) 試験における様々な変量効果やパラメーターの影響を検討するため、種特異的内在性配列を内部標準とする検量線ベースのリアルタイムPCR法のCt値のための変量効果モデルを開発した。既に公表されているコラボ試験のデータを、様々な条件下におけるコラボ試験のシミュレーションのために用いた。その結果、1 DNA試料液あたり3ウェルから2ウェル並行に、また、標準試料を5から3濃度レベルに減らしても、許容可能なRSDrおよびRSDRを保持したまま、1プレートあたりの濃度未知の試料数を倍にすることが可能であることが明らかとなった。また、RSDrおよびRSDRは試料の不均一性の影響を最も受けやすいが、DNA抽出からの影響は無視しうるものであった。本研究によって得られたモデルは、GM作物の検量線ベースの定量法およびそのコラボ試験に役立つことが期待される。

遺伝子組換え作物のリアルタイムPCRによる定量法の模擬的試験室間共同試験

渡辺 聡*¹, 澤田 博*¹, 内藤 成弘*², 穂山 浩*³,
手島 玲子*³, 古井 聡*², 橋田 和美*², 日野 明寛*²

*¹ ハウス食品(株)ソマテックセンター

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 国立医薬品食品衛生研究所

Chemistry Letters, 42(9), 1026-1028(2013)

Application of Pressurized Fluid Extraction Method to Lipid Extraction for Determining trans-Fatty Acid Contents in Food

Wakako Tsuzuki*¹, Hideo Ohonishi*² and Ken Fujimoto*²

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Nihon BUCHI K.K.

高速高圧抽出法で抽出した食品油脂のトランス脂肪酸含量を測定し、従来の脂質抽出法であるフォルヒ法、酸分解法、ソックスレー法の結果と比較した。市販のクッキーや玄米からの油脂の抽出効率は、高速高圧抽出法と従来法とで差異はなかった。さらに、高速高圧抽出法による脂質抽出中の脂質劣化やトランス異性化は検出されなかった。これらの結果から、食品のトランス脂肪酸分析に、高速高圧抽出法による脂質抽出が有効であることが示唆された。

食品に含まれるトランス脂肪酸分析を目的とした高速高圧法の油脂抽出への応用

都築和香子*¹, 大西 秀男*², 藤本 健*²

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 日本ビュッヒ株式会社

北陸作物学会報, 48, 28-30(2013)

タンパク質含有率の低い硬質小麦品種におけるごはんパン適性について

細井 淳*1, 奥西 智哉*2

*1 長野県農業試験場

*2 (独) 農研機構食品総合研究所

米粉（グルテンを含む）における吸水動態を、ファリノグラフを用いて製粉方法ごとに比較した。サンプルに少量の色素粉末を混合し、所定の加水量にてミキシングし観察したところ、容易かつ明瞭に米粉の特徴を把握できた。气流湿式では滑らかな質感となり、呈色が均一で早かった。ピンミル式およびロールミル式では、ざらついた質感となり、極度に色の濃い部分が斑点状に呈色した。气流乾式では、粉状の質感となり、呈色した部分が他と比べて極端に少なく遅かった。これらの特徴は、ミキシング開始15～20秒程度で最も顕著にあらわれた。

Comparison Water-absorbing Property of Rice Flours Prepared by Different Milling Methods with Farinograph

Jun HOSOI*1, Tomoya OKUNISHI*2

*1 Nagano Agricultural Experiment Station

*2 National Food Research Institute, NARO

食品総合研究所研究報告, 78, 43-46(2013)

市販米粉の製パン性について

奥座 宏一, 松木 順子

(独) 農研機構食品総合研究所

市販の15種類の米粉を用いて製パン試験を行った。新規用途米粉6種類は平均粒径も100 μm以下と小さく、損傷澱粉含量も低く、製パン時の比容積は比較的高い傾向がみられた。和菓子用の米粉については損傷澱粉含量が高い米粉では比容積が低下した。牛皮粉、上用粉など損傷澱粉含量が低い粉では比較的高い比容積を示した。

Rice breads made from commercial rice flour

Koichi Yoza, Junko Matsuki

National Food Research Institute, NARO

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(3), E404-413 (2014)

Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization.

Masahiro Hayafune*¹, Rita Berisio*², Roberta Marchetti*³, Alba Silipo*³, Miyu Kayama*¹, Yoshitake Desaki*¹, Sakiko Arima*¹,
Flavia Squeglia*², Alessia Ruggiero*², Ken Tokuyasu*⁴, Antonio Molinaro*³, Hanae Kaku*¹, Naoto Shibuya*¹

*¹ Meiji University

*² National Research Council, Italy

*³ Università di Napoli Federico II, Italy

*⁴ National Food Research Institute, NARO

植物では、微生物関連分子パターン(MAMPs)の認識レセプターを介した感知が様々な防御応答を誘導し、この誘導免疫機構は、多くの病原菌に対する植物防御において重要な役割を果たす。キチンオリゴ糖に対して特異性の高い稲由来のキチンエリシター結合蛋白質(CEBiP)の認識に係る分子機構、そしてレセプター複合体の形成機構を解明するため、生化学的試験、NMR解析、計算科学的研究を行った。CEBiPの外部ドメイン内中央部のリジンモチーフがキチンオリゴ糖の結合に不可欠であることを、欠失試験やドメイン交換試験で確認し、NMRによるエピトープマッピングの結果、キチンオリゴ糖7-8量体のような比較的長いキチンオリゴ糖鎖がCEBiPへの結合に適しており、糖鎖のN-アセチル基が重要な役割を果たすことが明らかとなった。分子モデリング/ドッキング研究により、中央リジンモチーフのIle122残基がリガンドの結合の際に重要であることを解明し、本知見は、部位特異的突然変異導入試験により支持された。これらの結果から、二つのCEBiP分子が同時に一分子のキチンオリゴ糖に対して反対側から結合し、二量体化を起こすことが示唆された。このモデルは、インビトロでキチンオリゴ糖8量体の添加によりCEBiPの外部ドメインの二量体化が起こり、この二量体化とキチンオリゴ糖8量体による活性酸素発生は、二量体化の際に片側にだけN-アセチル基をもつ、(GlcNβ1, 4GlcNAc)₄の構造のユニークなオリゴ糖の添加により阻害された。これらの結果から、CEBiPと稲キチンエリシターレセプターキナーゼ-1の両方が関与するレセプター複合体のリガンド誘導型活性化に関する仮説モデルを提案した。

稲レセプター CEBiPによるキチン誘導性の免疫シグナリング活性化は、ユニークなサンドイッチ型の二量体化により起こる

Masahiro Hayafune*¹, Rita Berisio*², Roberta Marchetti*³, Alba Silipo*³, Miyu Kayama*¹, Yoshitake Desaki*¹, Sakiko Arima*¹,
Flavia Squeglia*², Alessia Ruggiero*², 徳安 健*⁴, Antonio Molinaro*³, 賀来 華江*¹, 渋谷 直人*¹

*¹ 明治大学

*² National Research Council, Italy

*³ Università di Napoli Federico II, Italy

*⁴ (独) 農研機構食品総合研究所

Industrial Crops and Products, 49, 645-647(2013)

Sorghum as whole-crop feedstock for integrated production of fermentable sugars

Long Wu*¹, Mitsuru Gau*², Tomoyuki Takai*², Shigemitsu Kasuga*³, Mun-Soon Yun*¹, Ken Tokuyasu*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² National Agricultural Center for Kyushu Okinawa Region, NARO

*³ Shinshu University

3系統のソルガムについてホールクロップからの発酵性糖質の生産性を調べた。可溶性糖質を搾汁するのみならず、実には澱粉、茎にはセルロースが見出されており、これらはアミラーゼやセルラーゼによる酵素的加水分解を受けてグルコースになる。低温アルカリ前処理法ヘリグノセルロース残渣を供すると繊維質バイオマスの酵素糖化性が向上した。澱粉とセルロースの酵素加水分解によるグルコース回収率はそれぞれ95%および90%に達し、糖濃度はそれぞれ23%および11%(w/v)となった。実験データとバイオマス収量試験のデータから発酵性糖質とエタノール製造ポテンシャルを比較評価した結果、今回の変換プラットホームを適用した場合のそれぞれの系統からの最大エタノール収量は、それぞれ42.9, 75.4および76.9 L/aとなるものと考えられた。

発酵性糖質の総合的生産のためのホールクロップ原料としてのソルガム

武 龍*¹, 我有 満*², 高井 智之*², 春日 重光*³, 尹 旻洙*¹, 徳安 健*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² (独) 農研機構九州沖縄農業研究センター

*³ 信州大学

Enzymatic hydrolysis of wood with alkaline treatment

Dai Oka^{*1}, Kayoko Kobayashi^{*1}, Noriyuki Isobe^{*1}, Yu Ogawa^{*1}, Tomoya Yokoyama^{*1}, Satoshi Kimura^{*1, *2},
Ung-Jin Kim^{*1, *2}, Ken Tokuyasu^{*3}, Masahisa Wada^{*1, *2}

^{*1} The University of Tokyo

^{*2} Kyung Hee University, Republic of Korea

^{*3} National Food Research Institute, NARO

スギおよびユーカリ由来の微粉碎木粉試料を25–125℃で5N水酸化ナトリウム処理した結果、処理温度上昇によりヘミセルロースとリグニンの含有率は低下した一方で、グルコース残基の回収率は90%近くを維持した。X線散乱解析の結果、試料中のセルロースI構造の残存率は処理温度上昇によって低下し、150℃で処理した場合には、マーセル化によりセルロースIIにほぼ変換することが明らかとなった。アルカリ処理した試料を37℃でセルラーゼとβ-グルコシダーゼを用いた酵素処理に供した結果、高温でのアルカリ処理試料になる程良好な酵素糖化性を示した。水酸化ナトリウム濃度を1Nに低下させて150℃で処理した試料では、ヘミセルロースとリグニンがある程度除かれた一方で、マーセル化は誘導されなかった。この試料では、酵素糖化性は、同じ温度条件で5N水酸化ナトリウム処理した試料と比較して大きく低下した。このように、高温での高濃度アルカリ処理では、ヘミセルロースとリグニンの除去のみならずセルロース構造が改変し、木質の酵素糖化効率を向上させる。

アルカリ処理木材の酵素糖化

Dai Oka^{*1}, Kayoko Kobayashi^{*1}, Noriyuki Isobe^{*1}, Yu Ogawa^{*1}, Tomoya Yokoyama^{*1}, 木村 聡^{*1, *2},
Ung-Jin Kim^{*1, *2}, 徳安 健^{*3}, 和田 昌久^{*1, *2}

^{*1} 東京大学

^{*2} 慶熙大学校

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

Integration of a step for phenolic-acid recovery from rice straw with CaCCO process for efficient fermentable-sugar recovery

Rui Zhao, Min-Soo Yun, Riki Shiroma, Masakazu Ike, Di Guan, Ken Tokuyasu

National Food Research Institute, NARO

CaCCO法にフェノール酸(PA)の回収工程を導入することで、リグノセルロース系原料からの糖生産技術について、新たなバイオプロセスを構築した。95℃、2時間のCaCCO前処理条件で、PAが原料稲わらから効果的に遊離し、前処理物を数回水洗することで、PAを可溶性液中に回収できることを示した。また、PA回収工程を加えることで、稲わら固形分の酵素糖化効率が有意に増加した(65.9%→70.3~72.7%)。SRB-CaCCOと名付けた新しいバイオプロセスは、原料からの発酵性糖質と有価物の効率的な同時生産を可能にし、経済的・環境的に優位性があるものと考えられる。

効率的な発酵性糖質回収を目的としたCaCCO法による稲わらからのフェノール酸回収工程の統合

趙 鋭, 尹 旻洙, 城間 力, 池 正和, 関 笛, 徳安 健

(独) 農研機構食品総合研究所

Journal of Applied Glycoscience, 60(4), 177-185(2013)

High-solid loading pretreatment/saccharification tests with CaCCO (Calcium Capturing by Carbonation) process for rice straw and domestic energy crop, *Erianthus arudinaceus*

Masakazu Ike^{*1}, Rui Zhao^{*1}, Min-Soo Yun^{*1}, Riki Shiroma^{*1}, Seiko Ito^{*1}, Ying Zhang^{*1}, Ying Zhang^{*1}, Mitsuhiro Arakane^{*1}, Muhammad Imran Al-Haq^{*1}, Junko Matsuki^{*1}, Jeung-Yil Park^{*1}, Mitsuru Gau^{*2}, Kenichi Yakushido^{*3}, Minoru Nagashima^{*1}, Ken Tokuyasu^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO

^{*3} NARO Headquarters

草本系繊維質資源からの糖製造プロセスであるCaCCO法について、稲わら(RS)及び資源作物エリアンサス(ER)からの発酵性糖質回収量向上を目的としたプロセス改良を行った。原料粉碎、前処理条件等について検討を行い、湿式粉碎方式を採用することで、湿潤原料に対応可能かつ粉碎・薬液混合工程を統合すると共に、従来プロセスと比較して低い温度でのアルカリ熱処理条件を見出した。前処理原料10 kg程度を用い、CO₂加圧糖化が可能なリアクター内にて、酵素糖化性を評価した。およそ28%(w/w)のスラリー濃度、40℃、CO₂分圧0.9 MPaの条件下で72時間の糖化反応を行ったところ、RSでは80.6%、ERでは68.1%の糖可溶化率であった。また、糖化スラリーの遠心分離により、RSでは16.9% (w/v)、ERでは15.5% (w/v)の高濃度糖液を回収した。CaCCOプロセス改良により、乾燥原料・湿潤原料からの効率的な高濃度糖液製造が可能になったことで、繊維質由来糖液を利用した新産業創出など、地域農業活性化に繋がると期待される。

稲わら及び国内資源作物 *Erianthus arudinaceus* を原料とした高固形分条件下でのCaCCO法前処理・糖化試験

池 正和^{*1}, 趙 鋭^{*1}, 尹 旻洙^{*1}, 城間 力^{*1}, 伊藤 聖子^{*1}, 張 エイ^{*1}, 張 穎^{*1}, 荒金 光弘^{*1}, ムハンマド イムラン アルハック^{*1}, 松木 順子^{*1}, 朴 正一^{*1}, 我有 満^{*2}, 薬師堂謙一^{*3}, 長島 實^{*1}, 徳安 健^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} (独) 農研機構九州沖縄農業研究センター

^{*3} (独) 農研機構本部

JARQ (Japan Agricultural Research Quarterly), 47(4), 417-421 (2013)

Further studies on the protein chemistry and property of glutathione-added rice bread : evidence of glutathionylation of batter protein as well as crumb structure/sensory evaluation

Hiroyuki Yano^{*1}, Naoto Kaji^{*2}, Motoyuki Tokuriki^{*2}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Research Laboratory, Kohjin Life Sciences Co., Ltd

コメを主原料とした加工食品の開発は発展途上国の経済促進に有効であろう。我々は最近、天然ペプチドであるグルタチオンの添加により米粉生地が発酵時に炭酸ガスを保持し、グルテンがなくてもパンが膨らむことを報告した。著者らは、分子間ジスルフィド結合で高分子化した蛋白質が澱粉粒の吸水を阻害するという「バリア説」がこのメカニズムを説明すると考えている。グルタチオンはこのジスルフィド結合を切断したり、その形成を阻害することで澱粉の水和を促進し、米粉生地の粘度や連続性を高める可能性がある。本稿では、グルタチオンがバリア蛋白質のSH基を修飾(グルタチオニル化)し、その可溶性を高めるなど、バリアを綻ばせる実験の根拠を得た。さらに、パンのきめの細かさ/粗さを調節できること、また、グルタチオンがパンの香りを損なわないことを官能評価により確認した。研究成果はグルタチオンパンの実用化を促進されるであろう。

グルタチオン添加米粉パンの蛋白質化学および品質に関する研究の続報：生地蛋白質がグルタチオニル化される実験の根拠とクラム構造および官能評価について

矢野 裕之^{*1}, 梶 直人^{*2}, 徳力 基之^{*2}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 興人ライフサイエンス株式会社研究部

Effects of fats and oils on the bioaccessibility of carotenoids and vitamin E in vegetables

Akihiko Nagao, Eiichi Kotake-Nara, Megumi Hase

National Food Research Institute, NARO

脂溶性微量栄養成分の生体利用性が低い原因は、主に、水系のミセルへの可溶化が限定されることにある。バイオアクセシビリティは、摂取量に対する可溶化量に割合を示す。本研究では、模擬消化試験により、野菜に含まれるカロテノイドとビタミンEのバイオアクセシビリティに対する油脂の影響を調べた。様々な油脂及び長鎖のトリアシルグリセロールはホウレン草β-カロテンのバイオアクセシビリティを高めたが、ルテインやα-トコフェロールには影響しなかった。遊離脂肪酸、モノアシルグリセロール及びジアシルグリセロールも、ホウレン草β-カロテンのバイオアクセシビリティを高めた。長鎖のトリアシルグリセロールに加えて、消化中に生成するトリアシルグリセロールの加水分解物がβ-カロテンの分散と混合ミセルへの可溶化を促進するものと考えられた。

野菜に含まれるカロテノイドとビタミンEのバイオアクセシビリティに対する油脂の影響

長尾 昭彦, 小竹 英一, 長谷 恵

(独) 農研機構食品総合研究所

Decolorization of Japanese soy sauce (shoyu) using adsorption

Atsushi Miyagi*1, Hiroshi Nabetani*2, Mitsutoshi Nakajima*3

*1 Chiba Industrial Technology Research Institute

*2 National Food Research Institute, NARO

*3 Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

醤油の風味に影響を及ぼすことなく、脱色を行う方法を、活性炭 (AC)、活性白度 (ACL)、珪藻土 (DE)、酸化マグネシウム (MGO) およびシリカゲル (SG) を吸着剤として用い、系統立てて検討した。AC, ACL および SG による処理は、脱色効果を示したが、DE および MGO は脱色効果を示さなかった。AC の脱色効果は、ACL のその 30 倍であり、ACL の脱色効果は、SG の 3 倍であった。AC, ACL および SG で処理した醤油の色の特性は、同様の特性曲線を描いて変化した。同様の脱色程度の場合、AC 処理では、主要な品質指標 (全窒素, 食塩以外の可溶性成分, エタノールおよび pH) を維持することができたが、ACL 処理では変化した (特に、エタノール)。また、SG では、エタノール以外の指標は維持することができた。AC 処理と SG 処理では、アミノ酸や有機酸 (乳酸および酢酸) の低下はなく、風味は維持された。

吸着法を用いた醤油の脱色

宮城 淳*1, 鍋谷 浩志*2, 中嶋 光敏*3

*1 千葉県工業技術研究所

*2 (独) 農研機構食品総合研究所

*3 筑波大学大学院生命環境科学研究科

Food and Bioproduct Processing, 91(4), 507-514(2013)

Color control of Japanese soy sauce (shoyu) using membrane technology

Atsushi Miyagi*¹, Takayuki Suzuki*², Hiroshi Nabetani*³, Mitsutoshi Nakajima*⁴

*¹ Chiba Industrial Technology Research Institute

*² Commerce, Industry and Labor Department, Chiba Prefecture

*³ National Food Research Institute, NARO

*⁴ Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

膜分離プロセスを用いて醤油の脱色を行い、分離の機構を解析した。限外ろ過膜 (UF, NTU-2120) の脱色効果はわずかであった。スルホン化ポリスルホン製のナノ濾過膜 (NF, NTR-7400シリーズ) は、ポリビニルアルコール/バリアミド製ナノろ過膜 (NTR-7250) よりも高い脱色性能を示した。NF膜処理により、全窒素が17-24%、食塩以外の可溶性成分が24-32%、還元糖が25-43%、アミノ酸が10-25%、それぞれ阻止された。NTR-7400膜により、乳酸が6-9%、ピログルタミン酸が11-21%阻止される一方、他の品質指標は維持された。NF膜処理においては、中性アミノ酸や塩基性アミノ酸に比較して、酸性アミノ酸がより阻止される傾向を示した。分離性能は、篩効果だけでなく、電気的な効果によっても支配された。原料醤油をNF膜処理した醤油と混合することにより、醤油の色を調整することができる。

膜技術を用いた醤油の色の調整

宮城 淳*¹, 鈴木 隆幸*², 鍋谷 浩志*³, 中嶋 光敏*⁴

*¹ 千葉県工業技術研究所

*² 千葉県商工労働部

*³ (独) 農研機構食品総合研究所

*⁴ 筑波大学大学院生命環境科学研究科

食品総合研究所研究報告, 78, 57-64(2014)

貯穀害虫の画像による自動判別

曲山 幸生*¹, 七里 与子*¹, 宮ノ下明大*¹, 今村 太郎*¹,
古井 聡*¹, 和田 有史*¹, 増田 知尋*¹, 石山 墨*²

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 日本電気(株)情報・メディアプロセッシング研究所

我々は画像認識技術を応用した写真による昆虫判別技術の開発に取り組んでいる。今回、判別する対象として、コクゾウムシ、ノシメダラメイガ、コクヌストモドキ、タバコシバンムシの4種の貯穀害虫について、輪郭情報を基に判別するプログラムを開発した。この判別システムの改良を図るために、食品害虫サイトに試験運用ページを公開し、現技術の問題点の抽出を行っている。

Automatic Discrimination of Stored Grain Insects by Image Analysis

Yukio Magariyama*¹, Kumiko Shichiri*¹, Akihiro Miyanoshita*¹, Taro Imamura*¹,
Satoshi Furui*¹, Yuji Wada*¹, Tomohiro Masuda*¹, Rui Ishiyama*²

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Information and Media Processing Research Laboratories, NEC Corporation

Direct Measurement of Helical Cell Motion of the Spirochete *Leptospira*Shuichi Nakamura*¹, Alexander Leshansky*², Yukio Magariyama*³, Keiichi Namba*⁴, Seishi Kudo*¹*¹ Graduate School of Engineering, Tohoku University*² Department of Chemical Engineering, Technion*³ National Food Research Institute, NARO*⁴ Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University,

スピロヘータの一種であるレプトスピラは、短ピッチの細胞コイル (PC) とその前方部分 (S-end), 後方部分 (H-end) の3つの部分を回転させて遊泳する。この研究では、遊泳速度と同時に、各部分の回転速度も測定した。この結果、推進に重要なのはPCとS-endであり、それぞれ同程度の寄与があった。発生トルクの大きさは4000 pN nm以上で、大腸菌の2倍ほどであった。また、S-endのトルクはPCよりも大きく揺らいでおり、H-endのトルク変化と関係していると示唆された。

レプトスピラのらせん細胞運動の直接測定

中村 修一*¹, Alexander Leshansky*², 曲山 幸生*³, 難波 啓一*⁴, 工藤 成史*¹*¹ 東北大学大学院工学研究科*² イスラエル工科大学化学工学部*³ (独) 農研機構食品総合研究所*⁴ 大阪大学大学院生命機能研究科Distribution of Major Xanthones in the Pericarp, Aril, and Yellow Gum of Mangosteen (*Garcinia Mangostana* Linn.) Fruit and Their Contribution to Antioxidative ActivityUdomlak SUKATTA*^{1, 2}, Makiko TAKENAKA*¹, Hiroshi ONO*¹, Hiroshi OKADOME*¹, Itaru SOTOME*¹, Kazuko NANAYAMA*¹, Warunee THANAPASE*², Seiichiro ISOBE*¹*¹ National Food Research Institute, NARO*² Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Kasetsart University

マンゴスチン果実におけるキサントン類 (α -マンゴスチンおよび γ -マンゴスチン) は、抗酸化活性や抗炎症活性などの様々な生理活性を有することが報告されている。本研究の目的は、農産物の有効利用の観点からマンゴスチン果実の各部位におけるキサントン類を定量的および定性的に評価することである。マンゴスチンの一部に生理障害の結果発生するイエローガムには極めて高濃度のキサントン類が含まれており (α -マンゴスチン382.2 mg/g, γ -マンゴスチン144.9 mg/g), 果皮, 果肉の順に多くキサントン類が含まれていた。イエローガムが発生したマンゴスチン果実においてはキサントン類はイエローガムから果肉表面に一部移行したと考えられた。イエローガムが発生した果実と発生していない果実においては、果実全体でみるとキサントン類の含有量はほぼ同じであった。マンゴスチン果実の果皮およびイエローガムは果肉よりもはるかに高いラジカル消去活性と鉄還元能を示した。

マンゴスチンの果皮, 果肉およびイエローガムにおける主要なキサントン類の分布とそれらの抗酸化活性への寄与

ウドムラク スカッタ*^{1, 2}, 竹中真紀子*¹, 小野 裕嗣*¹, 岡留 博司*¹, 五月女 格*¹, 七山 和子*¹, ワルニー タナパセ*², 五十部誠一郎*¹*¹ (独) 農研機構食品総合研究所*² カセサート大学 農業および農産物開発研究所

Food Science and Technology Research, 19(4), 655-659 (2013)

Effective extraction of curcuminoids by grinding turmeric (*Curcuma longa*) with medium-chain triacylglycerols

Makiko Takenaka*¹, Takeshi Ohkubo*², Hiroshi Okadome*¹, Itaru Sotome*¹, Toshihiro Itoh*³, Seiichiro Isobe*^{1, *3}

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Functional Foods Research Laboratory, NOF Corporation

*³ Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

ウコンはその根茎に脂溶性の生理活性物質であるクルクミン類を豊富に含む。本研究は、化学溶媒を使わずに食用の油脂を用いてクルクミン類を抽出することを目的として、ウコンを天然の中鎖脂肪酸トリアシルグリセロール (MCT) と共に磨砕処理する新しい抽出方法を確立した。ウコンをMCTと共に磨砕した後、圧搾・濾過により液状部と固形部に分離した。次いで液状部を遠心分離および加温し、清澄のMCT画分を得た。ウコンからMCT画分へのクルクミン類の回収率は10%程度であったが、このMCT画分はクルクミン類でほとんど飽和していると推察された。クルクミン類を含むMCT画分は、黄色色素やクルクミン類の持つ機能性ととも、MCTの持つ物理的および生物学的特性を付与するために、様々な食品に直接利用することができる。

ウコンの中鎖脂肪酸トリアシルグリセロール (MCT) 中の磨砕処理によるクルクミン類の効率的な抽出

竹中真紀子*¹, 大久保 剛*², 岡留 博司*¹, 五月女 格*¹, 伊東 利博*³, 五十部誠一郎*^{1, *3}

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 日油株式会社食品研究所

*³ 筑波大学大学院生命環境科学研究科

冷凍, 88(1031), 624-627(2013)

微細水滴含有過熱水蒸気による食品加熱システムの開発と農産加工への応用

五月女 格

(独) 農研機構食品総合研究所

過熱水蒸気(SHS)と微細な熱水滴(WMD)を用いた食品加熱システム(SHS+WMD)を開発して農産物の一次加工と調理に利用した。このシステムでは加圧されて120～140℃で沸騰している熱湯と水蒸気をノズルから等エンタルピ的に噴出させ、115～120℃の過熱水蒸気を発生させ、その中に微細な熱水滴を分散させる。SHS+WMDシステムではジャガイモやその他の農産物のテクスチャーや色彩等の品質変化および乾燥や成分溶出などによる歩留まり低下を同時に抑制したブランチングが可能であった。またSHS+WMDシステムではSHSと比較して食品に対する熱伝達効率が高かった。この効果によりキュウリ等の野菜の表面加熱殺菌に要する加熱時間が短縮され、野菜の加熱による品質変化を抑制した殺菌が可能であった。

Development of a heating system using superheated steam with microdroplets of hot water and its application for processing of agricultural product

Itaru Sotome

National Food Research Institute, NARO

ORAC法による清酒製造工程の抗酸化性の変化

阿部 恭幸*1, 齋藤 高弘*1, 岡本 竹己*2, 佐々木隆浩*2, 星 佳宏*2, 杉江 正美*3, 萩原 昌司*4

*1 宇都宮大学農学部
 *2 栃木県産業技術センター
 *3 浜松ホトニクス株式会社
 *4 (独) 農研機構食品総合研究所

清酒製造工程についてORAC法を基に抗酸化能評価を行った。酒米は精米を30%行う事で、元の玄米の抗酸化性の2割に減少した。製麹工程で、酒米は元の9.3倍までORAC値が増加した。酒母造りで生もと、速醸もと造りともに原料に比べ大きく抗酸化性が高まった。生もとは速醸もとに比べ1.7倍のORAC値を示した。醗製造中においてORAC値は徐々に増加し、酒母の造りの違いによる差は見られなかった。清酒は活性炭を0.5g/L処理する事で、元の清酒の75%のORAC値となった。清酒製造において、酒母では原料に含まれる総ORAC値の32倍、醗製造では5.3倍に増加した。製造される清酒の総ORAC値は、酒母原料の67倍、醗原料の1.3倍となった。生もと造りにおける抗酸化成分の生成速度は酒母製造中で0.05、醗製造中では $0.55 \times 10E4$ マイクロmolTE/dであった。清酒製造において、製麹過程、酒母、醗製造過程において抗酸化性が増加。よって、麹、酒母の持つ抗酸化性を高める事、麹や酒母の割合を高くする事、活性炭の使用量を減少させる事が高いORAC値を有する清酒の製造に繋がると考えられた。

Investigation of changes in antioxidant activity during sake brewing by ORAC method

yasuyuki Abe*1, Tkakahiro Saito*1, Takemi Okamoto*2, Yoshihiro Hoshi*2, Masami Sugie*3, Shoji Hagiwara*4, Tohru Shiga*1

*1 Faculty of Agriculture, Utsunomiya University
 *2 Industrial Technology Center of Tochigi Prefecture
 *3 Hamamatsu Photonics K.K.
 *4 National Food Research Institute, NARO

Fluorescence fingerprint imaging of gluten and starch in wheat flour dough with consideration of total constituent ratio

Mito Kokawa*1,*2, Junichi Sugiyama*3, Mizuki Tsuta*3, Masatoshi Yoshimura*3, Kaori Fujita*3, Mario Shibata*3, Tetsuya Araki*2, Hiroshi Nabetani*2,*3

*1 Research Fellow of Japan Society for the Promotin of Science
 *2 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
 *3 National Food Research Institute, NARO

本研究では、パン生地中のグルテンとデンプンの分布を染色せずに、また、両者の存在比を考慮して可視化することを目的とし、蛍光指紋イメージング手法を開発した。ミキシング不足、適正ミキシング、ミキシング過剰の3段階のパン生地、及び、適正ミキシング段階のパン生地から抽出した純粋なグルテンとデンプンを試料とし、63の励起・蛍光波長の組み合わせで試料断面の蛍光画像を撮像した。パン生地の各画素の蛍光指紋と純粋なグルテン及びデンプンの蛍光指紋とのコサイン類似度を計算した。パン生地中のグルテンとデンプンの割合を考慮し、類似度に基づいて各画素の成分（グルテン、もしくはデンプン）を判断し、画像化したところ、ミキシング不足、適正、ミキシング過剰の3段階の生地の画像には大きな違いが見られた。

成分比を考慮したカラーマッピング法によるパン生地の蛍光指紋イメージング

粉川 美踏*1,*2, 杉山純一*3, 蔦 瑞樹*3, 吉村 正俊*3, 藤田かおり*3, 柴田真理朗*3, 荒木 徹也*2, 鍋谷 浩志*2,*3

*1 日本学術振興会
 *2 東京大学大学院農学生命科学研究科
 *3 (独) 農研機構食品総合研究所

Food and Bioprocess Technology, (2014)7:1496-1504

Prediction of aerobic plate count on beef surface using fluorescence fingerprint

Masatoshi Yoshimura^{*1}, Junichi Sugiyama^{*1}, Mizuki Tsuta^{*1}, Kaori Fujita^{*1}, Mario Shibata^{*1},
Mito Kokawa^{*2}, Seiichi Ohshita^{*2}, Naomi Ohto^{*2}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

牛肉表面における一般生菌数の非破壊推定手法の開発のために、蛍光指紋分光法の可能性について調べた。試料には60枚の牛赤身肉（国内産および豪州産）を使用し、好氣的に15℃で48時間まで静置し、12時間毎に蛍光指紋と一般生菌数の計測を行った。蛍光指紋は励起・蛍光波長ともに200～900 nmの波長範囲で測定を行った。PLS回帰分析を行った結果、0.752 log cfu/cm²の推定誤差で、蛍光指紋による一般生菌数の推定モデルを構築することができた。PLSモデルの回帰係数より、一般生菌数の推定には5種類の自家蛍光（トリプトファン・NAD(P)H・ビタミンA・ポルフィリン・フラビン）の情報が使われていることが推測された。蛍光指紋分光法と多変量解析の組合せは、牛赤身肉の表面の一般生菌数の非破壊推定に適用できると考えられる。

蛍光指紋による牛肉表面の一般生菌数の推定

吉村 正俊^{*1}, 杉山純一^{*1}, 葛 瑞樹^{*1}, 藤田かおり^{*1}, 柴田真理朗^{*1},
粉川 美踏^{*2}, 大下 誠一^{*2}, 大戸 尚美^{*2}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 東京大学大学院農学生命科学研究科

Optics Express, 21(26), 32450-32467(2013)

Supercontinuum laser based optical characterization of Intralipid® phantoms in the 500-2250 nm range

Ben Aernouts^{*1}, Eduardo Zamora-Rojas^{*2}, Robbe Van Beers^{*1}, Rodrigo Watté^{*1},
Ling Wang^{*3}, Mizuki Tsuta^{*4}, Jeroen Lammertyn^{*1}, Wouter Saeys^{*1}

^{*1} Department of Biosystems-MeBioS, KU Leuven

^{*2} Department of Animal Production, University of Córdoba

^{*3} Department of Physics and Astronomy, KU Leuven

^{*4} National Food Research Institute, NARO

スーパーコンティニュームレーザーと二重積分球を組み合わせ、非散乱透過率測定を行うセットアップを構築し、500から2250 nmの波長範囲で不透明試料の光学特性を求めた。広い範囲の吸収及び散乱特性をカバーする57点の液体光学ファントムを調製し、2種類の厚さで測定した。推定された光学特性は、吸収と散乱との間のクロストークなしに、両方の厚さに対して、理論値とよく一致した。濃度20%のイントラリピッドについて、500から2250 nmの範囲で散乱特性パラメータである $\mu(s)$ 、 $\mu(s)'$ 及び g を推定する式を算出した。

スーパーコンティニュームレーザーによるイントラリピッドの500-2250 nmにおける光学特性把握

Ben Aernouts^{*1}, Eduardo Zamora-Rojas^{*2}, Robbe Van Beers^{*1}, Rodrigo Watté^{*1},
Ling Wang^{*3}, 葛 瑞樹^{*4}, Jeroen Lammertyn^{*1}, Wouter Saeys^{*1}

^{*1} Department of Biosystems-MeBioS, KU Leuven

^{*2} Department of Animal Production, University of Córdoba

^{*3} Department of Physics and Astronomy, KU Leuven

^{*4} (独) 農研機構食品総合研究所

LWT-Food Science and Technology, 21(26), 32450-32467(2013)

Use of multivariate analysis for the improvement in prediction accuracy of bacterial aerobic plate count by flow cytometry

Mizuki Tsuta^{*1}, Yasuhiko Sasaki^{*2}, Ikuo Takeuchi^{*2}, Hideki Nakamoto^{*2}, Jun Ishikawa^{*2}, Susumu Kawasaki^{*1},
Junichi Sugiyama^{*1}, Kaori Fujita^{*1}, Masatoshi Yoshimura^{*1}, Mario Shibata^{*1}, Mito Kokawa^{*3}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Hitachi Power Solutions Co., Ltd

^{*3} Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

フローサイトメトリーで得られた電圧値をヒストグラムに変換し、これを説明変数としてPLS回帰分析を行って一般生菌数を推定する手法を提案した。緑茶飲料に大腸菌を添加した試料に本手法を適用したところ、電圧値に閾値を設定し、それを超えるイベント数をカウントする従来法に比べ、著しく大腸菌数の推定精度が向上した。これは、個々の菌が発する蛍光の強弱、すなわち電圧の高低ではなく、一連の計測で得られた電圧値のヒストグラムを一種の「スペクトル」とみなし、その全体のパターンに着目することにより、擬陽性及び偽陰性を低減できたためと考えられる。本手法には特殊な装置や試薬が不要のため、現在市販されているフローサイトメーターで得たデータの解析にも適用可能である。

多変量解析を利用したフローサイトメトリーによる生菌数推定精度の向上

葛 瑞樹^{*1}, 佐々木康彦^{*2}, 竹内 郁雄^{*2}, 中本 英樹^{*2}, 石川 淳^{*2}, 川崎 晋^{*1},
杉山 純一^{*1}, 藤田かおり^{*1}, 吉村 正俊^{*1}, 柴田真理朗^{*1}, 粉川 美踏^{*3}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 日立パワーソリューション(株)

^{*3} 東京大学大学院農学生命科学研究科

Food Science and Technology Research, 19(4), 539-545(2013)

Detection of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nutmeg extract using fluorescence fingerprint

Kaori Fujita^{*1}, Junichi Sugiyama^{*1}, Mizuki Tsuta^{*1}, Mario Shibata^{*1},
Mito Kokawa^{*2}, Hiroyuki Onda^{*3}, Takehito Sagawa^{*3}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

^{*3} S&B Food Inc.

蛍光指紋計測 (FF) と PLS 回帰分析を用いたナツメグ抽出液中の総アフラトキシン (B1, B2, G1, G2) 量の簡易推定を実施した。FF は励起蛍光マトリクスとして知られており、励起光を波長移動しつつ蛍光スペクトルを取得する手法である。材料には人工的にアフラトキシン溶液を添加し作製したナツメグ抽出溶液を用い FF を計測した。得られた FF データから 5041 波長条件から 1428 波長条件の蛍光情報を抽出し PLS 回帰分析に供試した。供試した 21 サンプル中 11 サンプルをキャリブレーション用、10 サンプルをバリデーションに用い、3 つの潜在変数を用いた PLS 回帰モデルを構築した。キャリブレーションでの推定は $R^2=0.993$, $SEC=0.2\mu\text{g/L}$ であり、バリデーションでは $R^2=0.774$, $SEC=1.0\mu\text{g/L}$ となった。PLS の回帰係数からアフラトキシンの蛍光情報から PLS モデルが構築されたことが示唆された。

蛍光指紋を用いたナツメグ抽出液中におけるアフラトキシン B1, B2, G1, G2 の検出

藤田かおり^{*1}, 杉山純一^{*1}, 葛 瑞樹^{*1}, 柴田真理朗^{*1},
粉川 美踏^{*2}, 恩田 浩幸^{*3}, 佐川 岳人^{*3}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 東京大学大学院農学生命科学研究科

^{*3} S&B 食品株式会社

International Journal of Food Engineering, 9(1), 115-120 (2013)

Image analysis of bread crumb structure in relation to mechanical properties

Mario Shibata*¹, Mizuki Tsuta*¹, Junichi Sugiyama*¹, Kaori Fujita*¹, Mito Kokawa*², Tetsuya Araki*², Hiroshi Nabetani*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

パンのクラム構造と力学的特性を関連づけるために、クラム試料の気泡構造を測定するイメージスキャナやデジタル画像処理を使用した単純かつ客観的な方法を開発した。4つの直交する方向でスキャンした試料の4つの画像を位置合わせした上、画素毎に4つの画像の画素毎に最小の階調レベルを選択することにより、気泡部分が強調された強調画像を得た。次に、正確に気泡部分を定量化するため、小領域毎にOtsuの方法を適用した。その結果、パンの4種類の気泡パラメータ（平均気泡領域、周囲長、気泡の数、及び気泡面積割合）を求めた。さらに、クリープ試験によって測定された粘弾性は、気泡面積割合 ($r > 0.59$, $p < 0.05$) と有意に相関することが分かった。このことは気泡面積が増加するほど、クラムの硬さが増加することを示している。

力学的特性に関連したパンクラム構造の画像解析

柴田真理朗*¹, 葛 瑞樹*¹, 杉山 純一*¹, 藤田かおり*¹, 粉川 美踏*², 荒木 徹也*², 鍋谷 浩志*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 東京大学 大学院農学生命科学研究科

Optics Express, 21(10), 12579-12591 (2013)

Optimization of excitation-emission band-pass filter for visualization of viable bacteria distribution on the surface of pork meat

Ken Nishino*¹, Kazuaki Nakamura*¹, Mizuki Tsuta*², Masatoshi Yoshimura*², Junichi Sugiyama*², Shigeki Nakauchi*¹,

*¹ Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology

*² National Food Research Institute, NARO

豚肉表面の生菌数の可視化を目的として、蛍光指紋における励起波長と蛍光波長の帯域幅の最適化により、次元数を減らす新しい試みを提案した。理論的に設計された判別フィルタは、豚肉表面の蛍光指紋データを使って、100, 316, 1000のS/N比のノイズでもって設計した。これらのフィルタの効果を別の蛍光指紋データにより評価した。S/N比にて設計したフィルタが最も精度よく生菌数の可視化を実現できた。提案した手法は、蛍光指紋イメージングの新しい分野を拓くものと期待される。

豚肉表面の生菌数可視化のための励起蛍光フィルタの最適化

西野 顕*¹, 中村 円亮*¹, 葛 瑞樹*², 吉村 正俊*², 杉山 純一*², 中内 茂樹*¹

*¹ 豊橋技術科学大学

*² (独) 農研機構食品総合研究所

蛍光指紋によるサトイモの産地判別法開発

中村結花子*1, 藤田かおり*2, 蔦 瑞樹*2, 杉山 純一*2, 粉川 美踏*2,
吉村 正俊*2, 柴田真理朗*2, 鍋谷 浩志*2, 荒木 徹也*2, 中村 哲*3

*1 東京大学大学院農学生命科学研究科

*2 (独) 農研機構食品総合研究所

*3 (独) 農林水産消費安全技術センター本部

2008年産の日本産サトイモ117個, 2008年産の中国産サトイモ23個を粉碎, 均一化したのち, それらの蛍光指紋を励起, 蛍光波長範囲200-900 nmにおいて, 10 nmおきに計測した. 得られたデータはキャリブレーションとバリデーションセットに二分した. 前者に正準判別分析を適用し, サトイモの産地を判別するモデルを構築した. 得られたモデルをバリデーションセットに適用したところ, 誤判別率は9.4%となった. Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線の下での面積であるArea Under the Curve (AUC)を蛍光指紋法について求めたところ, 微量元素濃度のみ, 及び微量元素濃度とSr安定同位体比の組み合わせによる既往の産地判別法と同等の値を示した. これらの結果から, 蛍光指紋による迅速かつ高精度なサトイモの産地判別の可能性が示された.

Development of a Method for Determination of the Geographic Origin of Taros Using Fluorescence Fingerprint

Yukako Nakamura*1, Kori Fujita*2, Mizuki Tuta*2, Junichi Sugiyama*2, Mito Kokawa*2,
Masatoshi Yoshimura*2, Mario Shibata*2, Hiroshi Nabetani*2, Tetsuya Araki*2, Satoru Nakamura*3

*1 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

*2 National Food Research Institute, NARO

*3 Headquarters, Food and Agricultural Materials Inspection Center

Preparation of Phi29 DNA polymerase free of amplifiable DNA using ethidium monoazide, an ultraviolet-free light-emitting diode lamp and trehalose

Hirokazu Takahashi*1, Hiroyuki Yamazaki*2, Satoshi Akanuma*3, Hiroko Kanahara*1, Toshiyuki Saito*4, Tomoyuki Chimuro*2,
Takayoshi Kobayashi*5, Toshio Ohtani*1, Kimiko Yamamoto*6, Shigeru Sugiyama*1, Toshiro Kobori*1

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Isehara Research Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Ltd.

*3 Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

*4 National Institute of Radiological Sciences

*5 Kanto Chemical Co., Ltd.

*6 National Institute of Agrobiological Sciences

Here we describe a procedure for preparing Phi29 DNA polymerase which is essentially free of amplifiable DNA. This procedure is realized by a combination of host DNA removal using appropriate salt concentrations, inactivation of amplifiable DNA using ethidium monoazide, and irradiation with visible light from a light-emitting diode lamp.

本論文では, 基本的に増幅可能なDNAを含まない, 遺伝子組換えPhi29 DNAポリメラーゼの精製方法について述べる. 本方法は, 適切な塩濃度によるホストDNAの除去, エチジウムモノアジドと紫外線を含まないLEDからの可視光照射によるDNAの不活化の方法の組み合わせで実現できる. さらに, Phi29 DNAポリメラーゼ自身がとらえたオリゴヌクレオチドは, ポリメラーゼの凝集を押しやる効果のあるトレハロース存在下で, ポリメラーゼ自身が持つ3'-5'エクソヌクレアーゼ活性によって分解した. 本方法で精製されたPhi29 DNAポリメラーゼは, 増幅可能なDNAをほとんど持っていないため, 少なくとも10コピーのプラスミドDNAを再現良く増幅可能であり, 副産物の生成もなく, 反応液量を減少させる必要がない.

エチジウムモノアジド, 紫外線不含LEDランプおよびトレハロースを利用した,
増幅可能なDNAを含まないPhi29 DNAポリメラーゼの精製

高橋 宏和*1, 山崎 博之*2, 赤沼 聡*3, 金原 浩子*1, 斎藤 敏幸*4, 地室 智之*2,
小林 孝義*5, 大谷 敏郎*1, 山本 公子*6, 杉山 滋*1, 小堀 俊郎*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 関東化学株式会社伊勢原研究所

*3 東京薬科大学

*4 (独) 放射線医学総合研究所

*5 関東化学株式会社

*6 (独) 農業生物資源研究所

The Journal of Biochemistry, 154(2), 137-147(2013)

The genome folding mechanism in yeast

Kimura Hajime*¹, Yasutoshi Shimooka*¹, Jun-ichi Nishikawa*², Osamu Miura*¹, Shigeru Sugiyama*³, Shuji Yamada*⁴, Takashi Oyama*^{1, *2}

*¹ Graduate School of Science and Engineering, Waseda University

*² Faculty of Education and Integrated Arts and Sciences, Waseda University

*³ National Food Research Institute, NARO

*⁴ Department of Mathematics, Faculty of Science, Kyoto Sangyo University

We clarified the flexibilities and persistence lengths of all linker DNAs of the organism, deduced their spatial expanses and simulated the architectures of all 16 interphase chromosomes in the nucleus, at a resolution of beads-on-a-string chromatin fibre. For the average spatial distance between two given loci in a chromosome, the model predictions agreed well with all experimental data reported to date.

ここでは、ヌクレオソーム配置のパスとクロマチンのアーキテクチャ自体が、ゲノムDNAや酵母での核の大きさの物理的特性によって主に決定されることを実証している。私たちは、生物のすべてのリンカーDNAの柔軟性と持続長を明らかにし、その空間的な配置を推定し、ビーズ・オン・ア・ストリングクロマチンファイバーの解像度で、核内の全16回期の染色体のアーキテクチャをシミュレートした。染色体中の与えられた二つの遺伝子座の間の平均空間距離は、モデル予測では、現在までに報告されたすべての実験データとよく一致した。これらの知見は、間期染色体における真核生物ゲノムのフォールディングの基礎となる一般的なメカニズムを示唆している。

酵母におけるゲノムのフォールディングメカニズム

木村 元*¹, 下岡 保俊*¹, 西川 純一*², 三浦 理*¹, 杉山 滋*³, 山田 修司*⁴, 大山 隆*^{1, *2}

*¹ 早稲田大学大学院 理工学研究科

*² 早稲田大学 教育・総合科学学術院 理学科

*³ (独) 農研機構食品総合研究所

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77(3), 612-617 (2013)

Regions of unusually high flexibility occur frequently in human genomic DNA

Kimura Hajime*¹, Dai Kageyama*¹, Mika Furuya*¹, Shigeru Sugiyama*², Noboru Murata*¹, Takashi Oyama*^{1, *3}

*¹ Graduate School of Science and Engineering, Waseda University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Faculty of Education and Integrated Arts and Sciences, Waseda University

We have created DNA flexibility maps of the human, mouse, fruit fly, and nematode chromosomes. The maps revealed that all of these chromosomes have markedly flexible DNA regions (We named them SPIKES). SPIKES occur more frequently in the human chromosomes than in the mouse, fruit fly, and nematode chromosomes.

本研究では、ヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫染色体のDNA柔軟性地図を作成した。地図はこれらの染色体のすべてが著しく柔軟なDNA領域を持っていることを明らかにした (SPIKEと命名)。SPIKEは、マウス、ショウジョウバエ、および線虫染色体に比べてヒト染色体で高頻度に発生する。極めて硬いDNA領域 (rSPIKE) もこれらの染色体に存在する。SPIKEやrSPIKEの総数に対するSPIKEの数の比率は、生物間の進化的位置づけと正の相関を示した。軟質および硬質の性質を有する反復DNA配列は、それぞれ、SPIKEとrSPIKEの形成に寄与する。しかし、非反復軟質および硬質配列は、それぞれSPIKEとrSPIKE形成において主要な役割を果たすように思われる。これらは真核生物のゲノムフォールディング機序に関与している可能性がある。

ヒトゲノムDNAにおいて異常に高い柔軟性領域が頻発する

木村 元*¹, 景山 大*¹, 古屋 美香*¹, 杉山 滋*², 村田 昇*¹, 大山 隆*^{1, *3}

*¹ 早稲田大学大学院 理工学研究科

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 早稲田大学 教育・総合科学学術院 理学科

Nano-structure of heat-moisture treated waxy and normal starches

Wittawat Jiranuntakula^{*1}, Shigeru Sugiyama^{*2}, Kazumi Tukamoto^{*2}, Chureerat Puttanleke^{*3},
 Vilai Rungsardthong^{*4}, Santhanee Pancha- arnon^{*1}, Dudsadee Uttapap^{*1}

^{*1} King Mongkut's University of Technology Thonburi,

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Silpakorn University

^{*4} King Mongkut's Institute of Technology North Bangkok

未処理および湿熱処理 (HMT) したノーマルライス (うるち性米), ワキシールライス (もち性米), ノーマルコーン, ワキシールコーン, ノーマルポテト, 及びワキシールポテトデンプン粒の表面領域を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した. AFM画像では, 約15 ~ 90 nm の直径の未処理のデンプン粒と突起の表面粗さが見られた. 処理の後, デンプン粒に滑らかな表面領域は, 特にノーマルライス, ワキシールライス, ノーマルコーンデンプンに観察された. HMT処理ポテトデンプン粒の表面上の突起の大きさの有意な減少もまた検出された. 新たに形成された構造は, 障壁として作用し, デンプン顆粒への水の浸透を遅らせることと考えられる. デンプン粒アーキテクチャのブロックレットモデルも, AFM画像によって確認された.

湿熱処理を施したワキシールデンプンとノーマルデンプンのナノ構造

ヴィタワット ジラスンタクラ^{*1}, 杉山 滋^{*2}, 塚本 和己^{*2}, チュリーラット パッタンレク^{*3},
 ヴィライ ランサーソント^{*4}, サンサニー プンチャ-アルノン^{*1}, ダドサディ ウタパップ^{*1}

^{*1} モンクット王工科大学トンブリ校

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*3} シラパコーン大学

^{*4} モンクット王工科大学北バンコク校

Impact of hot air and vacuum drying on the quality attributes of kiwifruit slices

Takahiro Orikasa^{*1}, Shoji Koide^{*1}, Shintaro Okamoto^{*2}, Teppei Imaizumi^{*3}, Yoshiki Muramatsu^{*4}, Jun-ichi Takeda^{*1}, Takeo Shiina^{*5},
 Akio Tagawa^{*6}

^{*1} Faculty of Agriculture, Iwate University

^{*2} Graduate School of Food, Agriculture and Environmental Science, Miyagi University

^{*3} Graduate School of Bioresource and Environmental Science, Kyushu University

^{*4} Faculty of Bio-industry, Tokyo University of Agriculture

^{*5} National Food Research Institute, NARO

^{*6} Graduate School of Horticulture, Chiba University

熱風乾燥および減圧乾燥がキウイフルーツスライスの含水率, 硬度, L-アスコルビン酸, 抗酸化活性, 表面色に及ぼす影響について検討した. 乾燥温度は50, 60および70°C, 減圧乾燥の圧力は3.00kPaとした. L-アスコルビン酸残存率および抗酸化活性は, それぞれ, 0.75-0.99および4.3-5.5であった. 熱風乾燥におけるL-アスコルビン酸変化は, 一次反応式に従った. 硬度および抗酸化活性の変化は, 0次反応式に従った. いずれの条件でも表面色の変化 ΔE は, 12以上であった. 減圧乾燥における ΔE は, 熱風乾燥のそれと比べて有意に小さかった ($p < 0.01$).

熱風乾燥および減圧乾燥がキウイフルーツスライスの乾燥品質特性に及ぼす影響

折笠 貴寛^{*1}, 小出 章二^{*1}, 岡本慎太郎^{*2}, 今泉 哲平^{*3}, 松村 良樹^{*4}, 椎名 武夫^{*5}, 田川 彰男^{*6}

^{*1} 岩手大学農学部

^{*2} 宮城大学大学院食産業学研究科

^{*3} 九州大学大学院生物資源環境科学府 大学院農学研究院

^{*4} 東京農業大学生物産業学部

^{*5} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*6} 千葉大学大学院園芸学研究科

日本食品保蔵科学会誌, 39(6), 311-318(2013)

積算温度を指標としたコマツナの遠赤外線乾燥における品質変化の評価

岡本慎太郎*1, 折笠 貴寛*2, 畑中 咲子*3, 菰田 俊一*3, 齋藤順一郎*4,
富樫 千之*1, 松村 良樹*5, 小出 章二*2, 椎名 武夫*6, 田川 彰男*7

*1 宮城大学大学院食産業学研究科

*2 岩手大学農学部

*3 宮城大学食産業学部

*4 東洋興産(株)

*5 東京農業大学生物産学学部

*6 (独) 農研機構食品総合研究所

*7 千葉大学大学院園芸学研究科

コマツナを試料として、遠赤外線乾燥および熱風乾燥を行い、乾燥速度および品質変化の温度依存性について検討した。含水率変化は、指数モデルで示され、乾燥速度定数にArrhenius型の温度依存性が見られた。L-アスコルビン酸の残存率は、積算温度依存性を示し、 $4.1 \times 10^2 \cdot h$ 以上で分解が抑制された。色彩変化は、積算温度が小さいほど変化量が小さいこと、その主要因がクロロフィルa, bの減少であることが示唆された。温度と時間の2つのパラメータを指標とすることで、乾燥条件の最適化が可能になると考えられた。

Evaluation of quality change in the far-infrared drying of Komatsuna leaves using cumulative temperature as an indicator

Shintaro Okamoto*1, Takahiro Orikasa*2, Sakiko Hatanaka*3, Toshikazu Komoda*3, Junichiro Saito*4,
Chiyuki Togashi*1, Yoshiki Muramatsu*5, Shoji Koide*2, Takeo Shiina*6, Akio Tagawa*7

*1 Graduate School of Food, Agriculture and Environmental Science, Miyagi University

*2 Faculty of Agriculture, Iwate University

*3 School of Food, Agriculture and Environmental Science, Miyagi University

*4 Toyo Kosan, Co. Ltd.

*5 Faculty of Bio-industry, Tokyo University of Agriculture

*6 National Food Research Institute, NARO

*7 Graduate School of Horticulture, Chiba University

Acta Horticulturae, 1005, 117-123(2013)

Changes in gene expression of harvested cabbage in response to mechanical wound stress

Manasikan Thammawong*1, Hiromi Umehara*1, Makoto Yoshida*2, Ayaka Soga*2,
Tomoko Kaneta*1, Nobutaka Nakamura*1, Yasuhiro Ito*1, Kohei Nakano*3, Takeo Shiina*1

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Kanagawa Agricultural Technology Center

*3 Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

機械的ストレスは、収穫後の農産物に対して様々な影響を及ぼす。本研究では、キャベツを対象に、外傷および落下損傷がストレスシグナルの応答に関する遺伝子活性および細胞の応答に及ぼす影響について調査を行った。その結果、コルクボラーを用いてパンチングしたサンプルについては、1時間以内にカルモジュリンをエンコードする遺伝子であるBoCam1およびBoCam2およびホスホリパーゼDをエンコードするBoPLD1, PoPLD2が有意に一時的な増加を示した。このことから、これらの遺伝子は、植物細胞内のストレスシグナルカスケードに関与していると推察された。また、40cmの高さから落とす落下損傷についても、BoCam1, BoCam2, BoPLD1, BoPLD2が増加したが、外傷を受けた試験区と比較すると短時間で遺伝子発現が低下した。今後の更なる研究により、キャベツの細胞ストレス応答のシグナルカスケードに、カルモジュリンおよびホスホリパーゼエンコード遺伝子が関与することが明らかになるとと思われる。

機械的損傷に対する収穫後キャベツの遺伝子発現の変動

タンマウォン マナスイカン*1, 梅原 仁美*1, 曾我 綾香*2, 吉田 誠*2,
兼田 朋子*1, 中村 宣貴*1, 伊藤 康博*1, 中野 浩平*3, 椎名 武夫*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 神奈川県農業技術センター

*3 岐阜大学応用生物科学

Acta Horticulturae, 1005, 247-252 (2013)

The response characteristics of Japanese radish (daikon) to mechanical wound stress

Takeo Shiina^{*1}, Hitomi Umehara^{*1}, Tomoko Kaneta^{*1}, Nobutaka Nakamura^{*1}, Yasuhiro Ito^{*1},
Manasikan Thammawong^{*1}, Makoto Yoshida^{*2}, Ayaka Soga^{*2}, Kohei Nakano^{*3}^{*1} National Food Research Institute, NARO^{*2} Kanagawa Agricultural Technology Center^{*3} Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

ダイコンを対象として、物理的ストレスが遺伝子 (RsCHI, RsPAL, ReSOD) の発現に及ぼす影響について検討を行った。RsCHIおよびRsPALについては、損傷して4～6時間経過後に、明確に増加した。一方、ReSODは、4～6時間経過時点でも低レベルであり、10～12時間経過後に増加した。本研究の結果より、例えばバルクコンテナ輸送などの状況下でのダイコンに加わる物理的ストレスが、細胞の代謝変動および品質変動にも影響を及ぼすことが遺伝子レベルで確認された。

物理的損傷に対するダイコンの応答特性

椎名 武夫^{*1}, 梅原 仁美^{*1}, 兼田 朋子^{*1}, 中村 宣貴^{*1}, 伊藤 康博^{*1},
マナシカン タンマウオン^{*1}, 吉田 誠^{*2}, 曾我 彩香^{*2}, 中野 浩平^{*3}^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所^{*2} 神奈川県農業技術センター^{*3} 岐阜大学応用生物科学

日本食品保蔵科学会誌, 39(5), 255-261(2013)

加振周波数と包装資材が多段積載されたダイコンの加速度、回転、損傷特性に及ぼす影響

兼田 朋子^{*1}, 中村 宣貴^{*1}, タンマウオン マナスイカン^{*1}, 北澤 裕明^{*1},
曾我 綾香^{*2}, 吉田 誠^{*2}, 福島 崇志^{*3}, 中野 浩平^{*4}, 椎名 武夫^{*1}^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所^{*2} 神奈川県農業技術センター^{*3} 三重大学大学院生物資源研究科^{*4} 岐阜大学応用生物科学

新規開発されたバルクコンテナ内に多段積載 (5段) されたダイコンを対象として、加振時の振動特性、損傷特性について検討を行った。2, 10, 15, 20, 30Hz, 0.6Gの定常波で加振処理を行った結果、10-20Hzにおいて共振が観察され、相対的な位置移動を伴う広範囲の損傷が観察された。また、損傷は、振動特性である加速度伝達率および回転角と正の相関を示した(それぞれ $r^2=0.92, 0.66$)。また、内袋を利用した加速度伝達率の低減、底板の種類を変えることによる共振周波数の制御により、新規バルクコンテナで輸送中のダイコンの損傷を低減することが可能であることが示唆された。

Effects of Vibration Frequency and Inner Packaging Material on the Acceleration, Rotation, and Damage of Japanese Radishes Stacked in the Newly Developed Bulk Container under Sinusoidal Vibration

Tomoko Kaneta^{*1}, Nobutaka Nakamura^{*1}, Manasikan Thammawong^{*1}, Hiroaki Kitazawa^{*1},
Ayaka Soga^{*2}, Makoto Yoshida^{*2}, Takashi Fukusima^{*3}, Kohei Nakano^{*4}, Takeo Shiina^{*1}^{*1} National Food Research Institute, NARO^{*2} Kanagawa Agricultural Technology Center^{*3} Graduate School of Bioresources, Mie University^{*4} Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

Acta Horticulturae, 989, 73-78(2013)

Expression of physical wound stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)

Manasikan Thammawong, Tomoko Kaneta, Hitomi Umehara, Nobutaka Nakamura, Yasuhiro Ito, Takeo Shiina

National Food Research Institute, NARO

細胞壁の機械的な損傷は、植物細胞内のストレスシグナル、細胞応答、そして生理代謝変動を引き起こす。しかし、生鮮青果物の物理ストレスと分子機構の関連は明確でない。そこで、機械的損傷がシロイヌナズナおよびキャベツのストレス応答に及ぼす影響について調査した。シロイヌナズナでは、損傷後、5分後にAtERF#018, 15分後にCML38, ACS6が増加したが、PAL1の増加は認められなかった。キャベツでは、30-60分後にBoCam1, 120-240分後にBoCam2の増加が認められた。以上より、物理的損傷はストレス応答遺伝子に明確に影響し、それはストレスを受けて一定時間経過後に現れることが明らかとなった。

シロイヌナズナおよびキャベツの物理的ストレス応答遺伝子の発現

マナシカン タンマウォン, 兼田 朋子, 梅原 仁美, 中村 宣貴, 伊藤 康博, 椎名 武夫

(独) 農研機構食品総合研究所

農産物流通技術研究会会報, 294, 18-20(2013)

青果物のバルクコンテナ物流技術の開発 - コスト・環境負荷の低減を目指して -

椎名 武夫, 中村 宣貴, 兼田 朋子, Manasikan THAMMAWONG

(独) 農研機構食品総合研究所

コマツナを試料として、遠赤外線乾燥および熱風乾燥を行い、乾燥速度および品質変化の温度依存性について検討した。含水率変化は、指数モデルで示され、乾燥速度定数にArrheius型の温度依存性が見られた。L-アスコルビン酸の残存率は、積算温度依存性を示し、 $4.1 \times 10^2 \cdot h$ 以上で分解が抑制された。色彩変化は、積算温度が小さいほど変化量が小さいこと、その主要因がクロロフィルa, bの減少であることが示唆された。温度と時間の2つのパラメータを指標とすることで、乾燥条件の最適化が可能になると考えられた。

Development of Bulk container transportation of fresh produce

Takeo Shiina, Nobutaka Nakamura, Tomoko Kaneta, Manasikan Thammawong

National Food Research Institute, NARO

新規バルクコンテナ輸送に伴うダイコンの加速度および接触部位応力が損傷特性に及ぼす影響の解明

兼田 朋子*1, 中村 宣貴*1, タンマウォン マナスイカン*1, 曾我 綾香*2,
吉田 誠*2, 新實 誉也*3, 横山 幸一*4, 椎名 武夫*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所
*2 神奈川県農業技術センター
*3 キョーラク株式会社
*4 王子インターパック株式会社

5段積載したダイコンに加振処理を施し, 多段積載時の損傷特性と損傷発生メカニズムの解析を行った。ダイコンに発生する損傷の種類やその程度は, 積載位置段位や加振時間によって大きく異なり, 「押し傷」は下段で, 「擦り傷」および「剥皮傷」は上段で多かった。

加速度伝達率, 最大応力指数について解析を行った結果, 上段では相対運動により「擦り傷」や「剥皮傷」が発生し, 下段は荷重が大きいことで「押し傷」が発生すると考えられた。一方, ダイコンのバルク輸送時の損傷を防ぐための対策として, 上段の動きの抑制が有効であると考えられ, そのための包装, 輸送技術の開発が今後の課題として示された。

Effects of the Acceleration and the Contact Point Stress on the Damage Characteristics of Stacked Japanese Radishes under the Vibration Assuming the Distribution by Newly Developed Bulk Container

KANETA Tomoko*1, NAKAMURA Nobutaka*1, THAMMAWONG Manasikan*1, SOGA Ayaka*2,
YOSHIDA Makoto*2, NIIMI Takaya*3, YOKOYAMA Koichi*4, SHIINA Takeo*1

*1 National Food Research Institute, NARO
*2 Kanagawa Agricultural Technology Center
*3 Kyoraku Co., Ltd.
*4 Oji Interpack Co., Ltd.

モモ果実の繰り返し衝撃に対する易損性の部位別評価

北澤 裕明*1, 清水 栄治*2, 長谷川奈緒子*1, 五十部誠一郎*2

*1 (独) 農研機構食品総合研究所
*2 日本大学生産工学部マネジメント工学科

モモ果実の繰り返し衝撃に対する易損性を, ていあ部, 赤道部および果頂部に区分して検討した。ていあ部における果肉硬度は他2部位よりも低く, このことにもない繰り返し衝撃に対する易損性は, 他2部位よりも大きいことが明らかとなった。通常, モモ果実は, ていあ部が下, 果頂部が上となるように立てた状態で包装されて流通しているが, 本結果は, 輸送中の繰り返し衝撃による損傷回避の観点からは, このような包装方法が必ずしも最善とは限らない可能性を示唆するものであった。

Evaluation of fragility due to repetitive shock in different parts of peach fruit

Hiroaki Kitazawa*1, Eiji Shimizu*2, Naoko Hasegawa*1, Seiichiro Isobe*2

*1 National Food Research Institute, NARO
*2 Department of Industrial Engineering and Management, College of Industrial Technology, Nihon University,

Journal of Food, Agriculture & Environment, 11(3-4), 372-376 (2013)

Effects of post-harvest cooling delay on weight loss, soluble solid and ascorbic acid contents of strawberry fruit

Hiroaki Kitazawa*¹, Tatsuo Sato*², Nobutaka Nakamura*¹, Satoru Motoki*³

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Faculty of Agriculture, Ibaraki University

*³ School of Agriculture, Meiji University

イチゴ果実を用いて収穫してから冷却するまでの時間の違いが、果実の重量、可溶性固形物およびアスコルビン酸含量の変化に及ぼす影響を3日間の保存試験を通して検証した。果実の重量減少は、冷却の開始が遅れるほど大きい傾向にあったが、冷却開始後においては、変化はみられなかった。可溶性固形物含量の変化は、冷却開始までの時間に影響を受けなかったが、アスコルビン酸含量は冷却が16時間以上遅れた場合、有意に減少した。呼吸モデルを用いたシミュレーションにより、その理由は積算呼吸量がある閾値を超えたことによるものと推定された。

収穫後の予冷の遅れがイチゴ果実の重量減少、可溶性固形物およびアスコルビン酸含量に及ぼす影響

北澤 裕明*¹, 佐藤 達雄*², 中村 宣貴*¹, 元木 悟*³

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² 茨城大学農学部

*³ 明治大学農学部

Packaging Technology & Science, 27(3), 221-230 (2014)

Effect of Difference in Acceleration and Velocity Change on Product Damage Due to Repetitive Shock

Hiroaki Kitazawa*^{1, 2}, Katsuhiko Saito*³, Yutaka Ishikawa*²

*¹ Graduate School of Maritime Sciences, Kobe University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Transport Packaging Laboratory, Kobe University

繰り返し衝撃により損傷する物品の緩衝包装設計のためには、種々の包装条件に起因するピーク加速度および速度変化の組み合わせに対応する、衝撃1回あたりの損傷度を明確にする必要がある。本研究では、イチゴ果実を対象としてピーク加速度および速度変化の違いが衝撃1回あたりの損傷度に及ぼす影響を調査した。物性が異なる緩衝材および数段階の落下高さを組み合わせた落下試験により、任意のピーク加速度および速度変化の組み合わせ条件を作成し、果実の損傷評価を行ったところ、範囲は限定的であったものの、ピーク加速度および速度変化の組み合わせに対応する衝撃1回あたりの損傷度を損傷限界曲線として提示することができた。

加速度と速度変化の違いが繰り返し衝撃による物品の損傷に及ぼす影響

北澤 裕明*^{1, 2}, 斎藤 勝彦*³, 石川 豊*²

*¹ 神戸大学大学院海事科学研究科

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 神戸大学輸送包装研究室

Super-fine rice-flour production by enzymatic treatment with high hydrostatic pressure processing

Miyuki Kido*¹, Kaneto Kobayashi*^{1,2}, Shuji Chino*^{1,3}, Toshikazu Nishiwaki*^{1,3},
Noriyuki Homma*^{1,3}, Mayumi Hayashi*⁴, Kazutaka Yamamoto*⁵, Toru Shigematsu*⁴

*¹ Niigata Industrial Creation Organization

*² Niigata seifun Co. Ltd.,

*³ Food Research Center, Niigata Agricultural Research Institute

*⁴ Faculty of Applied Life Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

*⁵ National Food Research Institute, NARO

近年、米粉の需要増大を受けて、酵素処理粉砕法に高静水圧 (HP) 処理を適用することによる新規米粉製造プロセスを確立した。HP 処理により、酵素処理粉砕法で用いられるペクチナーゼ活性が増大し、米粒の吸水力が向上した。これらにより、米粒の組織構造損傷が改善されることが示唆された。一方、HP 処理によりグルコース増加が抑制されたことから、澱粉損傷度が低下した可能性があった。200 MPa (40°C) で1時間処理し、11,000 rpmで湿式粉砕するのが、本製造工程の最適条件であった。本製造工程により、酵素液もしくは蒸留水に浸漬した米粒から、平均粒径20 μm以下、澱粉損傷度5%未満の超微細米粉が得られた。この超微細米粉はパン、パスタ、麺類、洋菓子に適している。

高静水圧加工を伴う酵素処理による超微細米粉の生産

木戸みゆ紀*¹, 小林 兼人*^{1,2}, 知野 秀次*^{1,3}, 西脇 俊和*^{1,3},
本間 紀之*^{1,3}, 林 真由美*⁴, 山本 和貴*⁵, 重松 亨*⁴

*¹ にいがた産業創造機構

*² 新潟製粉

*³ 新潟県農業総合研究所食品研究センター

*⁴ 新潟薬科大学応用生命科学部

*⁵ (独) 農研機構食品総合研究所

Membrane damage and viability loss of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp in apple juice treated with high hydrostatic pressure and thermal death time disks

Dike O. Ukuku*¹, Kazutaka Yamamoto*³, Md L. Bari*², Sudarsan Mukhopadhyaya*¹, Vijay Juneja*¹, Shinichi Kawamoto*³

*¹ Eastern Regional Research Center, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture

*² Center for Advance Research in Science, University of Dhaka

*³ National Food Research Institute, NARO

熱死滅時間 (TDT) ディスク処理及び高静水圧で処理したリンゴ果汁中のサルモネラ属菌及び大腸菌O157:H7について、細胞内紫外線吸収物質の溶出を含む膜損傷の差異、生残性の差異を検討した。これら細菌を最終的に7.8 log₁₀ CFU/mlとなるようリンゴ果汁に接種し、TDTディスクで25, 35, 45, 50, 55, 60°Cにおいて4分間熱処理し、或いは、350, 400, 450 MPa, 25, 35, 45, 50, 55, 60°Cで20分間処理した。各試料0.1mlを、非選択培地Trypticase Soy Agar (TSA)、サルモネラ属菌検出用選択培地Xylose Lysine Sodium Tetracyclisulfate (XLT4)に、大腸菌検出用選択培地Cefixime Potassium Tellurite Sorbitol-MacConkey (CT-SMACK)寒天培地に塗布し、36°Cで48時間培養し、亜致死的な損傷、紫外線吸収物質溶出、生残性低下を膜損傷の指標として調べた。55°C以上でのTDTディスク処理、25°C以上での高圧処理において、両細菌の亜致死的な損傷が見られた。細胞内の紫外線吸収物質の溶出及びTDT処理での損傷細胞のATP量は、高圧処理した試料よりも低かった。同様に、TDT処理で損傷した細胞の回復は、高圧処理し22°Cで保存した細胞よりも早かった。これらの結果から、350 MPa, 35°Cで20分間の高圧処理または55°Cまたは60°Cでの熱処理の後に5°Cで保存することにより、回復が阻害され、それによるリンゴ果汁中の損傷菌の完全不活性化によって、処理果汁の微生物的安全性が促進される。

リンゴ果汁中で高静水圧処理され、熱死滅時間ディスクで処理した大腸菌O157:H7及びサルモネラ属菌の膜損傷及び生残性減少

Dike O. Ukuku*¹, 山本 和貴*³, Md L. Bari*², Sudarsan Mukhopadhyaya*¹, Vijay Juneja*¹, 川本 伸一*³

*¹ Eastern Regional Research Center, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture

*² Center for Advance Research in Science, University of Dhaka

*³ (独) 農研機構食品総合研究所

日本食品科学工学会誌, 61(2), 95-99(2014)

短波帯加熱処理による包装済み味噌の酵素の失活

植村 邦彦, 高橋千栄子, 小林 功

(独) 農研機構食品総合研究所

2000W の短波帯の交流を包装済みの味噌600 g に適用することにより, 約10 分間の処理で味噌の中心温度を70℃に昇温可能なことが分かった。短波帯処理によるプロテアーゼ活性は, 従来加熱よりも40 ~ 12℃低い温度で活性が低下し, フォスファターゼは従来加熱よりも20 ~ 12℃低い温度で活性が低下し, いずれの酵素も72℃で完全に失活した。従来加熱処理で40 g の味噌中の酵素を完全に失活させる85℃まで昇温するのに30 分間要したことを考慮すると, 短波帯処理は処理時間を1/3以下に短縮し, 処理温度を12℃低下することが可能になったといえる。本研究結果より, 短波帯処理を用いることにより, 既存の出し入り味噌よりも生味噌に近い品質を維持した出し入り味噌を製造できるようになることが期待される。

Inactivation of Enzymes in Packed Miso Paste by Radio-Frequency Heating

Kunihiko Uemura, Chieko Takahashi, Isao Kobayashi

National Food Research Institute, NARO

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77(3), 467-474 (2013)

Preparation, characterization, and in vitro gastrointestinal digestibility of oil-in-water emulsion-agar gels

Zheng Wang^{*1,*2}, Marcos A. Neves^{*2,*3,*4}, Isao Kobayashi^{*2,*4}, Kunihiko Uemura^{*2,*4}, Mitsutoshi Nakajima^{*2,*3,*4}

^{*1} Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

^{*4} The Alliance for Research on North Africa, University of Tsukuba

本研究では, ゲル化剤と寒天を利用した大豆油中水滴 (O/W) 型エマルジョンゲルの作製, 特性評価, およびin vitro胃腸消化モデルを用いた消化性評価を目的とした。エマルジョンゾルは, 60℃に加温されたO/Wエマルジョンと寒天水溶液の混合物を5℃で1時間冷却して調製された。ゲル強度は, 使用した乳化剤であるポリグリセリン脂肪酸エステル重合度およびサブミクロン領域でのサイズの影響を受けることが示された。エマルジョンゲルから放出された微小油滴の凝集や合一は, 乳化剤の種類の影響を受けた。In vitro胃腸消化終了時において, 放出された遊離脂肪酸の合計量は, エマルジョンをゲル化させることにより半分程度に抑制可能であることが示された。

O/Wエマルジョン-寒天ゲルの調製, 特性評価, およびin vitro胃腸消化性

王 政^{*1,*2}, Marcos A. Neves^{*2,*3,*4}, 小林 功^{*2,*4}, 植村 邦彦^{*2,*4}, 中嶋 光敏^{*2,*3,*4}

^{*1} 筑波大学大学院生命環境科学研究科

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*3} 筑波大学生命環境系

^{*4} 筑波大学北アフリカ研究センター

Formulation and storage stability of baicalein-loaded oil-in-water emulsions

Witcha Treeswan^{*1,*2}, Sosaku Ichikawa^{*3}, Zheng Wang^{*1,*4}, Marcos A. Neves^{*1,*3,*4},
Kunihiko Uemura^{*1}, Mitsutoshi Nakajima^{*1,*3,*4}, Isao Kobayashi^{*1,*4}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University

^{*3} Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

^{*4} The Alliance for Research on North Africa, University of Tsukuba

本研究では、親油性の機能性食品素材であるバイカレインを内包した水中油滴 (O/W) エマルションの作製および安定性評価を目的とした。バイカレインを内包したO/Wエマルションは高圧乳化法を用いて作製された。ザウター平均直径 (d_{3,2}) は高圧乳化時の圧力 (20 ~ 150 MPa) の増加に伴って減少し、最小で300 nm程度のバイカレイン内包O/Wエマルションを作製可能であることが示された。エマルションの物理的安定性の指標であるd_{3,2}の変化は、30日の保存期間中にほとんど認められなかった。O/Wエマルションに内包されたバイカレインの化学的安定性に関しては、保存前後のエマルションサンプル中のバイカレイン含量を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) の利用により定量した。30日経過後のO/Wエマルション中におけるバイカレインの保持率は36 ~ 49%であった。

バイカレインを内包したO/Wエマルションの作製および安定性評価

Witcha Treeswan^{*1,*2}, 市川 創作^{*3}, 王 政^{*1,*4}, Marcos A. Neves^{*1,*3,*4},
植村 邦彦^{*1}, 中嶋 光敏^{*1,*3,*4}, 小林 功^{*1,*4}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} カセサート大学食品研究製品開発研究所

^{*3} 筑波大学大学院生命環境科学研究科

^{*4} 筑波大学北アフリカ研究センター

Preparation of monodisperse food-grade oleuropein-loaded W/O/W emulsions using microchannel emulsification and evaluation of their storage stability

Safa Souilem^{*1,*2,*3,*4}, Isao Kobayashi^{*2,*3}, Marcos A. Neves^{*1,*2,*3},
Sami Sayadi^{*4}, Sosaku Ichikawa^{*1}, Mitsutoshi Nakajima^{*1,*2,*3}

^{*1} Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} The Alliance for Research on North Africa, University of Tsukuba

^{*4} Center for Biotechnology of Sfax

本研究の目的は、親水性生理活性物質であるオレウロペインを内包した食品用単分散W/O/Wエマルションの作製である。W/O/Wエマルションは、高圧乳化装置を用いた一次乳化とマイクロチャネル (MC) 乳化を用いた二次乳化を経て作製された。高圧乳化により作製されたオレウロペイン内包W/Oエマルションの液滴径は最小で0.15 μmであった。この時作製されたW/Oエマルションを分散相として用いたMC乳化により、W/O液滴の平均直径と変動係数がそれぞれ27 μmと5%未満の単分散W/O/Wエマルションが作製された。本研究で得られた単分散W/O/Wエマルションの保存安定性は、油相中の乳化剤濃度および内水相中のオレウロペイン濃度の影響を受けることが示された。

マイクロチャネル乳化を用いたオレウロペインを内包した単分散食品用W/O/Wエマルションの作製およびその保存安定性評価

Safa Souilem^{*1,*2,*3,*4}, 小林 功^{*2,*3}, Marcos A. Neves^{*1,*2,*3},
Sami Sayadi^{*4}, 市川 創作^{*1}, 中嶋 光敏^{*1,*2,*3}

^{*1} 筑波大学大学院生命環境科学研究科

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*3} 筑波大学北アフリカ研究センター

^{*4} スファックス・バイオテクノロジーセンター

Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects, 436, 937-943 (2013)

Direct observation and characterization of the generation of organic solvent droplets with and without triglyceride oil by electrospraying

Xian Zhang^{*1,*2,*3}, Isao Kobayashi^{*1}, Kunihiko Uemura^{*1}, Mitsutoshi Nakajima^{*1,*2}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

^{*3} School of Agricultural and Food Science, Zhejiang A & F University

本研究では、ノズルデバイスを利用した静電噴霧による有機溶媒液滴およびトリグリセリド油を含有した有機溶媒液滴の作製特性について主に検討した。有機溶媒として、10～99.5%エタノール、酢酸エチル、ヘキサン、およびヘプタンを用いた。また、トリグリセリド油を添加した99.5%エタノール溶液も使用した。安定的な静電噴霧は、高濃度のエタノール（66.7%）および酢酸エチルを用いた時に観察されたとともに、ノズル先端から噴射されたジェット径は10～20 μm程度であった。ジェットの分裂による微小液滴の作製速度は、最大で毎秒50万個であった。微小液滴の作製速度は、ノズルの本数を増やしたデバイスの開発により10倍程度向上した。また、トリグリセリド油を含むエタノール溶液を用いた場合でも、安定的な静電噴霧が起きた。静電噴霧されたエタノール溶液を回収したところ、直径が2 μm程度の微小油滴が得られた。

静電噴霧による有機溶媒液滴およびトリグリセリド油を含有した有機溶媒液滴の作製の直接観察および特性評価

張 晏如^{*1,*2}, 小林 功^{*1}, Marcos A. Neves^{*1,*2}, 植村 邦彦^{*1}, 中嶋 光敏^{*1,*2}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 筑波大学大学院生命環境科学研究科

^{*3} 浙江農林大学農業与食品科学学院

Food Science and Technology Research, 19(6), 995-1001 (2013)

Long-term continuous production of soybean oil-in-water emulsions by microchannel emulsification

Yanru Zhang^{*1,*2}, Isao Kobayashi^{*1}, Marcos A. Neves^{*1,*2}, Kunihiko Uemura^{*1}, Mitsutoshi Nakajima^{*1,*2}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

本研究では、運転時間と乳化剤の種類が長時間連続でマイクロチャネル(MC)乳化を行った際の水中大豆油滴(O/W)エマルションの製造に与える影響について検討することを目的とした。連続相には、乳化剤(Tween 20またはSDS)濃度が1 wt%の水溶液を用いた。乳化1日目では、いずれの乳化剤の場合でも単分散O/Wエマルション(平均直径約22～23 μm, 変動係数3%未満)が安定的に製造された。SDS系の場合では、7日目においても微小油滴の平均直径、変動係数、および液滴作製挙動に変化が見られなかった。一方、Tween 20系の場合では、3日目以降に作製されたエマルションの平均液滴径の微増、変動係数の漸増、ならび液滴作製挙動の不安定化が認められた。

マイクロチャネル乳化による水中大豆油適エマルションの長時間連続運転

張 晏如^{*1,*2}, 小林 功^{*1}, Marcos A. Neves^{*1,*2}, 植村 邦彦^{*1}, 中嶋 光敏^{*1,*2}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 筑波大学大学院生命環境科学研究科

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77(6), 1171-1178 (2013)

Preparation and characterization of water-in-oil-in-water emulsions containing a high concentration of L-ascorbic acid

Nauman Khalid^{*1,*2}, Isao Kobayashi^{*1}, Marcos A. Neves^{*1,*3}, Kunihiko Uemura^{*1}, Mitsutoshi Nakajima^{*1,*3}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tsukuba

^{*3} Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

本研究では、L-アスコルビン酸が内水相中に高濃度で内包されたW/O/Wエマルションの作製を主目的とした。油相として大豆油を用いた乳化によって、平均液滴径が2～3 μmのW/Oエマルションが作製された。W/Oエマルション液滴中のL-アスコルビン酸の濃度は30% (w/v)であった。このW/Oエマルションと外水相中に分散させることによって、W/O液滴の体積分率が30% (v/v)のW/O/Wエマルションが作製された。作製されたW/O液滴の平均液滴径と変動係数はそれぞれ14～18 μmと18～25%であった。内水相にゼラチンと硫酸マグネシウム、内水相と外水相にグルコースを適量添加することによって、安定なL-アスコルビン酸高含有W/O/Wエマルションの作製可能であることが示された。W/O/Wエマルションに内包されたL-アスコルビン酸の保持率は徐々に低下し、30日間保存後は40%程度であった。

L-アスコルビン酸高含有のW/O/Wエマルションの作製および特性評価

Nauman Khalid^{*1,*2}, 小林 功^{*1}, Marcos A. Neves^{*1,*3}, 植村 邦彦^{*1}, 中嶋 光敏^{*1,*3}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 筑波大学大学院生命環境科学研究科

^{*3} 東京大学大学院農学生命科学研究科

食品総合研究所報告, 78, 11-17, (2014)

Inulin fructotransferase (DFA I-producing) from *Arthrobacter* sp. H10-2

Kazutomo Haraguchi

National Food Research Institute, NARO

Arthrobacter sp. H10-2が生産するDFA Iオリゴ糖合成酵素を精製し、性質を検討した。本酵素は菌株の培養上清から17.3%の収率で精製された。本酵素の反応至適pHは5.5、反応至適温度40℃であった。耐熱性について検討すると75℃、30minまで安定であった。本酵素の分子量についてはSDS-電気泳動から45 kDa、ゲル濾過から46 kDaという値が得られ、単量体と推察された。

Arthrobacter sp. H10-2のイヌリンフルクトトランスフェラーゼ

原口 和朋

(独) 農研機構食品総合研究所

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77(4), 850-852(2013)

Effect of Potato Ethanol Residue on Rat Plasma Cholesterol Levels

Naoto Hashimoto^{*1, *2}, Noriyuki Shinomiya^{*3}, Katsuichi Saito^{*2, *4},
Takahiro Noda^{*2}, Kyu-Ho Han^{*5}, Michihiro Fukushima^{*5}

^{*1} Koshi Research Station, NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center
^{*2} Memuro Upland Farming Research Station, NARO Hokkaido Agricultural Research Center
^{*3} Hokkaido Tokachi Area Regional Food Processing Technology Center
^{*4} National Food Research Institute, NARO
^{*5} Department of Animal Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

馬鈴薯エタノール発酵残渣(PER)の摂食によるコレステロール低減作用について検討を行った。6週間PER添加食を摂食したラットにおいて、対照群と比べ糞中のコレステロールが高くなる一方で、血漿中の非HDL-コレステロールレベルの低下が確認できた。以上の結果より、PERが糞中へのコレステロールの排出を促進し、血漿中の一部コレステロールのレベルを低下させるものと考えられた。

馬鈴薯エタノール発酵残渣摂食が及ぼすラット血漿コレステロールレベルへの影響

橋本 直人^{*1, *2}, 四宮 紀之^{*3}, 齋藤 勝一^{*2, *4},
野田 高弘^{*2}, 韓 圭鎬^{*5}, 福島 道広^{*5}

^{*1}(独) 農研機構九州沖縄農業研究センター, 合志研究拠点
^{*2}(独) 農研機構北海道農業研究センター, 芽室研究拠点
^{*3}(財) 十勝圏振興機構・十勝圏地域食品加工技術センター
^{*4}(独) 農研機構食品総合研究所
^{*5} 帯広畜産大学畜産学部

Plant Growth Regulation, 71(2), 113-136(2013)

Comparison of long-term up-regulated genes during induction of freezing tolerance by cold and ABA in bromegrass cell cultures revealed by microarray analyses

Toshihide Nakamura^{*1}, Junshi Yazaki^{*2}, Naoki Kishimoto^{*2}, Shoshi Kikuchi^{*2},
Albert J. Robertson^{*3}, Lawrence V. Gusta^{*3}, Masaya Ishikawa^{*2}

^{*1} National Food Research Institute, NARO
^{*2} National Institute of Agrobiological Sciences
^{*3} University of Saskatchewan

ブロムグラス懸濁培養細胞は低温やアブシジン酸(ABA)処理により耐凍性を獲得する。低温で獲得する耐凍性と、ABA処理で獲得する耐凍性の共通点および相違点を明らかにするため、耐凍性獲得時における遺伝子発現の違いをマイクロアレイ法で解析した。その結果、低温処理では300、ABA処理では479遺伝子の発現が上昇し、149遺伝子が両方の処理で発現が上昇していることが明らかとなった。両方の処理で発現上昇が確認できた遺伝子から8遺伝子を選択し、ノーザンブロット解析で発現を再確認した。低温処理では低温ストレス関連遺伝子の他にタンパク質分解やRNA関連遺伝子が発現上昇していた。ABA処理では種子形成や環境ストレス耐性に関連する遺伝子の発現上昇が多く見られた。

ブロムグラス培養細胞の低温とABAによる耐凍性獲得時における長期発現上昇遺伝子のマイクロアレイ法による比較

中村 敏英^{*1}, 矢崎 潤史^{*2}, 岸本 直己^{*2}, 菊池 尚志^{*2},
Albert J. ROBERTSON^{*3}, Lawrence V. GUSTA^{*3}, 石川 雅也^{*2}

^{*1}(独) 農研機構食品総合研究所
^{*2}(独) 農業生物資源研究所
^{*3} サスカトーン大学

Structural Elucidation of the Cyclization Mechanism of α -1, 6-Glucan by *Bacillus circulans* T-3040 Cycloisomaltooligosaccharide GlucanotransferaseNobuhiro Suzuki*¹, Zui Fujimoto*¹, Young-Min Kim*², Mitsuru Momma*¹, Naomi Kishine*¹, Ryuichiro Suzuki*³, Shiho Suzuki*⁴, Shinichi Kitamura*⁴, Mikihiko Kobayashi*⁵, Atsuo Kimura*², Kazumi Funane*³*¹ Biomolecular Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences*² Division of Applied Bioscience, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University*³ Applied Microbiology Division, National Food Research Institute, NARO*⁴ College of Life, Environment, and Advanced Sciences, Osaka Prefecture University*⁵ Department of Food and Health Science, Jissen Women's University

バチルス・サーキュランズ T-3040株の環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ (BcCITase) は、グリコシドヒドロラーゼファミリー 66に属し、デキストランから環状イソマルトオリゴ糖を生産する。N末端のシグナル配列とC末端の非保存領域を削除したBcCITaseのSer39～Met738の結晶構造を明らかにした。(β/α)8バレル構造の触媒ドメインA、グリークキー構造のドメインC、糖結合領域35(CBM35)、ジュリーロール構造のドメインBから成る。イソマルトオリゴ糖および環状イソマルトオクタオースとBcCITaseの共結晶構造も解析した結果、CBM35にサブサイト-8として働く糖結合部位が見出され、触媒クレフトのMet310が環状化に関与することが明らかになった。CBM35の働きによって本酵素が環状イソマルトオクタオースを優先的に生産することが示唆された。

バチルス・サーキュランズ T-3040株由来環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼにおける環状化メカニズムの構造学的解析

鈴木 喜大*¹, 藤本 瑞*¹, キム・ヨンミン*², 門間 充*¹, 岸根 尚美*¹, 鈴木龍一郎*³, 鈴木 志保*⁴, 北村 進一*⁴, 小林 幹彦*⁵, 木村 淳夫*², 舟根 和美*³*¹ (独) 農業生物資源研究所*² 北海道大学*³ (独) 農研機構食品総合研究所*⁴ 大阪府立大学*⁵ 実践女子大学Evidence for cycloisomaltooligosaccharide production from starch by *Bacillus circulans* T-3040Kazumi Funane*¹, Hitomi Ichinose*¹, Motomi Araki*², Ryuichiro Suzuki*¹, Keitarou Kimura*¹, Zui Fujimoto*³, Mikihiko Kobayashi*², Atsuo Kimura*⁴*¹ National Food Research Institute, NARO*² Department of Food and Health Science, Jissen Women's University*³ Biomolecular Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences*⁴ Division of Applied Bioscience, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University

バチルス・サーキュランズ T-3040株はデキストランを含む培地で培養する際に環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ (CITase) および環状イソマルトオリゴ糖 (CI) を生産する。炭素源によるCITase生産への影響を調べるために、グルコース、ショ糖、イソマルトース、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、デキストリン、デキストラン40および可溶性澱粉で培養した。CIはデキストランおよび可溶性澱粉で培養した際に生産したが、CITaseはデキストラン、澱粉、イソマルトオリゴ糖で生産誘導された。デキストランおよびイソマルトオリゴ糖培地にグルコースを加えてもCITaseの生産に顕著な影響を与えなかったが、澱粉培地にグルコースを加えるとCITase生産は消失した。澱粉からCIを生産するためにはCITaseのほかに135 kDa蛋白が必要であることが示唆された。

バチルス・サーキュランズ T-3040株における澱粉から環状イソマルトオリゴ糖生産能の実証

舟根 和美*¹, 一ノ瀬仁美*¹, 荒木 紀美*², 鈴木龍一郎*¹, 木村啓太郎*¹, 藤本 瑞*³, 小林 幹彦*², 木村 淳夫*⁴*¹ (独) 農研機構食品総合研究所*² 実践女子大学*³ (独) 農業生物資源研究所*⁴ 北海道大学

日本食品工学会誌, 60(10), 577-581(2013)

菌体外分解酵素が増強された納豆菌rpoB変異株による黒大豆納豆の製造

久保 雄司*1, 齋藤 勝一*2, ダニエル ホルヴェック*2,*3, 舟根 和美*2, 中川 力夫*1, 木村啓太郎*2

*1 茨城県工業技術センター
*2 (独) 農研機構食品総合研究所
*3 ベルリン工科大学

新規に取得した納豆菌Miyagi-4株を親株とする分解酵素高生産を示すrpoB遺伝子変異株Miyagi-4100株を用いて、硬い種皮を持つ黒大豆を原料として納豆を製造した。Miyagi-4100株の黒大豆発酵適性を粘り物質であるポリ- γ -グルタミン酸とレバンの含量及び納豆の硬さを指標として評価した。比較対照株として、商用スターター株であるMiyagino株とMiyagi-4株を用いた。試験の結果、Miyagi-4100株で作った黒大豆納豆は、より多くのレバンを含み、柔らかく仕上がった。このことから、Miyagi-4100株は黒大豆を納豆に発酵する適性が高いことが示唆された。

Black Soybeans Fermentation by the rpoB Mutant Strain of *Bacillus subtilis* (natto)

Yuji Kubo*1, Katsuichi Saito*2, Daniel Hohlweck*2,*3, Kazumi Funane*2, Rikio Nakagawa*1, Keitarou Kimura*2

*1 Industrial Technology Institute of Ibaraki Prefecture
*2 National Food Research Institute, NARO
*3 Technical University Berlin

Acta Crystallographica Section F, 69(Pt 8), 946-949 (2013)

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from *Bacillus circulans* T-3040

Nobuhiro Suzuki*1, Young-Min Kim*2, Mitsuru Momma*1, Zui Fujimoto*1,
Mikihiko Kobayashi*1,*3,*4, Atsuo Kimura*2, Kazumi Funane*3

*1 Biomolecular Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences
*2 Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University
*3 Applied Microbiology Division, National Food Research Institute, NARO
*4 Department of Food and Health Science, Jissen Women's University

バチルス・サーキュランズ T-3040株の環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ (BcCITase) は、分子内転移反応によりデキストランから環状イソマルトオリゴ糖を生産する。BcCITaseを大腸菌で過剰発現し、N末His6タグ付きとC末His6タグ付きの酵素をそれぞれシッティングドロップ方式で結晶化した。

バチルス・サーキュランズ T-3040株由来環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼのX線結晶構造学的解析

鈴木 喜大*1, キム・ヨンミン*2, 門間 充*1, 藤本 瑞*1,
小林 幹彦*1,*3,*4, 木村 淳夫*2, 舟根 和美*3

*1 (独) 農業生物資源研究所
*2 北海道大学
*3 (独) 農研機構食品総合研究所
*4 実践女子大学

Carbohydrate Polymers, 99(2), 432- 437 (2014)

Conformation and physical properties of cyclodextrin oligosaccharides in aqueous solution

Shiho Suzuki^{*1}, Takashi Yukiya^{*1}, Arata Ishikawa^{*1}, Yoshiaki Yuguchi^{*2}, Kazumi Funane^{*3}, Shinichi Kitamura^{*1}

^{*1} Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

^{*2} Faculty of Engineering, Osaka Electro-Communication University

^{*3} Applied Microbiology Division, ³National Food Research Institute, NARO

環状および直鎖のイソマルトオリゴ糖の構造と物理的性質を、水溶液中で固有粘度を測定することにより調べた。環状イソマルトオリゴ糖は重合度7～10のもの(CI-7～CI-10)、直鎖イソマルトオリゴ糖は重合度7～11のもの(LI-7～LI-11)を用いた。CIとLIのマーク - フォント - 桜田の式による α 値はそれぞれ0.50および0.78であった。CI-7, CI-8, CI-9, CI-10の回転半径をX線小角散乱法によって測定した結果は、それぞれ6.7, 6.9, 7.5および8.3 $^{\circ}$ Aであった。CI-9の散乱曲線より、CIはLIよりも柔軟性が低く、小型の環状構造であることが示唆された。

環状イソマルトオリゴ糖の水溶液中での構造と物理的性質

鈴木 志保^{*1}, 雪山 聖^{*1}, 石川 新^{*1}, 湯口 宜明^{*2}, 舟根 和美^{*3}, 北村 進一^{*1}

^{*1} 大阪府立大学

^{*2} 大阪電気通信大学

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

Journal of Food Protection, 76(6), 1021-1026 (2013)

Distribution of radioactive cesium (134Cs plus 137Cs) in a contaminated Japanese soybean cultivar during the preparation of tofu, natto, nimame (boiled soybean)

Mayumi Hachinohe^{*1}, Keitarou Kimura^{*1}, Yuji Kubo^{*2}, Katsuo Tanji^{*3}, Shioka Hamamatsu^{*1}, Shoji Hagiwara^{*1}, Daisuke Nei^{*1}, Hiromi Kameya^{*1}, Rikio Nakagawa^{*2}, Ushio Matsukura^{*1}, Setsuko Todoriki^{*1}, Shinichi Kawamoto^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Industrial Technology Institute of Ibaraki Prefecture

^{*3} Fukushima Agricultural Technology Centre

2011年に収穫され、放射性セシウム(134Cs, 137Cs)を含む大豆(240～340 Bq/kg, 乾重量)を用いて豆腐や納豆、煮豆を作り、放射性セシウムの加工・調理品や副産物中への放射性セシウムの移行を調べた。加工係数(加工後の放射性セシウム濃度÷加工前の放射性セシウム濃度(新鮮重))は、豆腐や納豆、煮豆とオカラでは、それぞれ、0.12, 0.40, 0.20, 0.18となった。この結果から、原料大豆において放射性セシウムの基準値に従うことで、安全な範囲で利用できることが示唆された。また、大豆粒の中で子葉や胚軸、表皮に含まれる放射性セシウムの濃度比は、1:1:0.4であった。

大豆に含まれる放射性セシウム(セシウム134とセシウム137)の豆腐、納豆、煮豆製造時の分配

八戸 真弓^{*1}, 木村啓太郎^{*1}, 久保 雄司^{*2}, 丹治 克男^{*3}, 濱松 潮香^{*1}, 萩原 昌司^{*1}, 根井 大介^{*1}, 亀谷 宏美^{*1}, 中川 力夫^{*2}, 松倉 潮^{*1}, 等々力節子^{*1}, 川本 伸一^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 茨城県工業技術センター

^{*3} 福島県農業総合センター

International Journal of Food Microbiology, 166 (2), 238-243 (2013)

Reduction of the degradation activity of umami-enhancing purinic ribonucleotide supplement in miso by the targeted suppression of acid phosphatases in the *Aspergillus oryzae* starter culture

Junichiro Marui*¹, Sawaki Tada*¹, Mari Fukuoka*¹, Yutaka Wagu*², Yohei Shiraishi*²,
Noriyuki Kitamoto*³, Tatsuya Sugimoto*⁴, Ryota Hattori*¹, Satoshi Suzuki*¹, Ken-Ichi Kusumoto*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Bio'c, Co., Ltd.

*³ Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute

*⁴ Nakamo, Co., Ltd.

出し入り味噌に添加されるイノシン酸等の核酸系調味料は、味噌中の酸性ホスファターゼにより分解を受けるため、添加前に味噌を加熱する必要がある。そこで、加熱処理を回避するため麹段階における酸性ホスファターゼの低減化が必要となる。A. *oryzae* KBN8048の米麹培養において、13種類の酸性ホスファターゼ遺伝子のうち、8遺伝子が麹に添加したリン酸の濃度に依存して転写量が減少する一方、aphC遺伝子の転写は同条件で増加していた。KBN8048株の米麹におけるイノシン酸の脱リン酸活性とaphC破壊株の同活性は、麹にリン酸を添加した場合にそれぞれ30%と70%に低下した。また、KBN8048株とaphC破壊株を用いて醸造した味噌サンプルでは、イノシン酸脱リン酸活性はそれぞれ80%と90%の減少率であり、アミラーゼとプロテアーゼ活性に影響はなかった。これらのことから、aphC遺伝子は味噌製品における核酸系調味料分解活性を低減化するための、A. *oryzae*育種の有効な標的遺伝子であると言える。

*Aspergillus oryzae*培養中の酸性ホスファターゼ群における特定遺伝子の抑制による味噌中核酸系調味料の分解活性低減化

丸井淳一郎*¹, 多田 功生*¹, 福岡 真里*¹, 和久 豊*², 白石 洋平*²,
北本 則行*³, 杉本 達哉*⁴, 服部 領太*¹, 鈴木 聡*¹, 楠本 憲一*¹

*¹(独) 農研機構食品総合研究所

*² 株式会社ビオック

*³ 愛知県産業技術研究所 食品工業技術センター

*⁴ ナカモ株式会社

Applied Biochemistry and Biotechnology, 171 (1), 145-164 (2013)

Characterization of a D-stereoselective aminopeptidase (DamA) exhibiting aminolytic activity and halophilicity from *Aspergillus oryzae*

Mayumi Matsushita-Morita*¹, Hiroyuki Nakagawa*¹, Sawaki Tada*¹, Junichiro Marui*¹, Ryota Hattori*¹, Satoshi Suzuki*¹,
Youhei Yamagata*², Hitoshi Amano*³, Hiroki Ishida*⁴, Michio Takeuchi*², Ken-Ichi Kusumoto*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Department of Applied Molecular Biology and Biochemistry, Tokyo University of Agriculture and Technology

*³ Amano Enzyme Inc.

*⁴ Gekkeikan Sake Co., Ltd.

ベータアミノペプチダーゼは加水分解活性およびアミノリシス活性（ペプチド結合形成）の両方を示す酵素であり、これまでに細菌で報告されているだけであった。著者らは糸状菌*Aspergillus oryzae*のゲノムデータベースから同酵素の相同遺伝子を見出した。同遺伝子をA. *oryzae*で過剰発現した組み換え株より同酵素を精製した。細菌酵素と異なり、精製酵素はD-Leu-パラニトロアニリド(pNA)およびD-Phe-pNAを好んで基質とした。そこで、当該遺伝子をD-アミノ酸選択的アミノペプチダーゼA (damA)と命名した。精製した組み換えDamAは4量体を形成し、構成サブユニットは29.5および11.5 kDaの分子量であった。同酵素は中温域、微アルカリ性において良好な活性を示した。

*Aspergillus oryzae*のD-アミノ酸選択的アミノペプチダーゼ (DamA) の特性解析およびそのアミノリシス活性と好塩性

松下(森田)真由美*¹, 中川 博之*¹, 多田 功生*¹, 丸井淳一郎*¹, 服部 領太*¹, 鈴木 聡*¹,
山形 洋平*², 天野 仁*³, 石田 博樹*⁴, 竹内 道雄*², 楠本 憲一*¹

*¹(独) 農研機構食品総合研究所

*² 東京農工大学

*³ 天野エンザイム株式会社

*⁴ 月桂冠株式会社

conF and conJ contribute to conidia germination and stress response in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.

Satoshi Suzuki*¹, Özlem Sarikaya Bayram*², Özgür Bayram*², Gerhard H. Braus*²

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Institute of Microbiology and Genetics, Georg-August-Universität Göttingen

真菌類に広く保存された分生子関連遺伝子conは光により誘導される。我々はアカパンカビcon-6及びcon-10の*A. nidulans*における相同遺伝子conF及びconJを解析した。5分間の光照射により両遺伝子の発現は誘導された。また、アカパンカビでの研究同様にこれらの遺伝子の一重破壊株においては、顕著な表現形は観察されなかった。ところが、これらの遺伝子の二重欠損は分生子内グリセロール及びエリスリトール濃度を上昇させ、また、分生子発芽の遅延を引き起こすことを示した。

糸状菌*Aspergillus nidulans*においてconFとconJは分生子発芽とストレス応答に関与する

鈴木 聡*¹, オズレム サリカヤバイラム*², オズギュア バイラム*², ゲルハルト H ブラウス*²

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² ゲッチングゲン大学微生物遺伝学研究所

Phytotoxicity Evaluation of Type B Trichothecenes Using a *Chlamydomonas reinhardtii* Model System

Tadahiro Suzuki, Yumiko Iwahashi

National Food Research Institute, NARO

光合成や光応答反応のモデル細胞として利用される*Chlamydomonas reinhardtii*に対してタイプBトリコテセンであるデオキシニバレノール(DON), ニバレノール(NIV)及びその中間生成物であるアセチル化体の曝露による生育試験をじっしした結果, *C. reinhardtii*は光の有無によらず, 各マイコトキシンに対して同様の感受性傾向を示した。また, 光合成の効率を高める単波長LEDを用いて複数の波長条件における生育を実施したが, この中でもマイコトキシンの感受性傾向に大きな変化は見られなかった。しかし, 光合成光量子密度を変化(Photosynthesis Photon Flux Density)させた場合, 光条件においてNIVのアセチル化体であるフザレノンXの感受性が高まり, 弱光条件においては感受性が抑えられることを示唆した。

*Chlamydomonas reinhardtii*のモデルシステムを用いたタイプBトリコテセンマイコトキシンの植物毒性の評価

鈴木 忠宏, 岩橋由美子

(独) 農研機構食品総合研究所

PLoS ONE, 9 (1), e86548 (2014)

2-O- α -D-Glucosylglycerol phosphorylase from *Bacillus selenitireducens* MLS10 possessing hydrolytic activity on β -D-glucose 1-phosphate

Takanori Nihira^{*1}, Yuka Saito^{*1}, Ken'ichi Ohtsubo^{*1}, Hiroyuki Nakai^{*1}, Motomitsu Kitaoka^{*2}

^{*1} Faculty of Agriculture, Niigata University

^{*2} National Food Research Institute, NARO

糖加水分解酵素ファミリー (GH)65は α -グルコシドに作用する反転型加リン酸分解酵素のファミリーである。 *Bacillus selenitireducens* MLS10由来GH65酵素(Bsel_2816)にリン酸依存性のコージビオース加水分解活性 (速度 0.43 s^{-1}) を見いだした。 本酵素は β -D-グルコース1-リン酸(β Glc1P)を加水分解した (速度 2.8 s^{-1})。 H2180中での加水分解では180はグルコース側に取り込まれることからこの加水分解はホスファターゼではなくギル腰ターゼ型の反応であることが示された。 本酵素のアクセプターを調べたところグリセロールを良いアクセプターとして2-O- α -D-グルコシルグリセロール(GG)を生成した (速度 180 s^{-1})。 GGの加リン酸分解速度は 95 s^{-1} であった。 本酵素の系統名2-O- α -D-glucopyranosylglycerol: phosphate β -D-glucosyltransferaseおよび慣用名2-O- α -D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼを提案する。

β -D-グルコース1-リン酸加水分解活性を持つ*Bacillus selenitireducens* MLS10由来2-O- α -D-グルコシルグリセロールホスホリラーゼ

仁平 高則^{*1}, 斉藤 由華^{*1}, 大坪 研一^{*1}, 中井 博之^{*1}, 北岡 本光^{*2}

^{*1} 新潟大学農学部

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

International Journal of Biological Macromolecules, 64, 415-419 (2014)

Facile preparation of highly-crystalline lamella of (1 \rightarrow 3)- β -glucan by using extract of *Euglena gracilis*

Yu Ogawa^{*1}, Kazuhiro Noda^{*1}, Satoshi Kimura^{*1}, Motomitsu Kitaoka^{*2}, Masahisa Wada^{*1}

^{*1} Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

^{*2} National Food Research Institute, NARO

ラミナリビオースホスホリラーゼを含む*Euglena gracilis*抽出液およびスクロースホスホリラーゼを用いて(1 \rightarrow 3)- β -グルカンをin vitro合成した。 合成産物は平均分子量30程度の分子量分布の狭い直鎖(1 \rightarrow 3)- β -グルカンであった。 X線反射及び電子顕微鏡観察の結果グルカン分子は結晶性の高い六角形ラメラを構成していた。 生成物は一次構造から高次構造まで均一性が高く、(1 \rightarrow 3)- β -グルカンの機能研究に有用であると考えられた。

*Euglena gracilis*抽出液を用いた高結晶性ラメラ構造の(1 \rightarrow 3)- β -グルカンの簡便な調製法

小川 悠^{*1}, 野田 和宏^{*1}, 木村 聡^{*1}, 北岡 本光^{*2}, 和田 昌久^{*1}

^{*1} 東京大学大学院農学生命科学研究科

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

Glycobiology, 24 (2), 208-216 (2014)

Distinct substrate specificities of three glycoside hydrolase family 42 β -galactosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697

Alexander H. Viborg^{*1}, Takane Katayama^{*2}, Maher Abou Hachem^{*1}, Mathias C. F. Andersen^{*1},
Mamoru Nishimoto^{*3}, Mads H. Clausen^{*1}, Tadasu Urashima^{*4}, Birte Svensson^{*1}, Motomitsu Kitaoka^{*2}

^{*1} Technical University of Denmark

^{*2} Ishikawa Prefectural University

^{*3} National Food Research Institute, NARO

^{*4} Graduate School of Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

糖加水分解酵素ファミリー 42(GH42)は β ガラクトシダーゼからなるファミリーである。健康に良いよされるプロバイオティクス菌であるビフィズス菌は種々のGH42 β ガラクトシダーゼを生産している。しかしながらそれぞれのGH42酵素の詳細な特異性についての報告例は少ない。我々は*B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697の産生する三種のGH42酵素Bga42A, Bga42B, Bga42Cの基質特異性を詳細に決定した。Bga42Aは β 1, 3結合を好むのに対し, Bga42BはGal β 1-4Gal結合を良く分解した。Bga42Cはアラビノガラクトン関連オリゴ糖の分解酵素と考えられた。

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* ATCC 1569由来糖加水分解酵素ファミリー 42に属する三種の酵素の基質特異性

Alexander H. Viborg^{*1}, 片山 高嶺^{*2}, Maher Abou Hachem^{*1}, Mathias C. F. Andersen^{*1},
西本 完^{*3}, Mads H. Clausen^{*1}, 浦島 匡^{*4}, Birte Svensson^{*1}, 北岡 本光^{*2}

^{*1} デンマーク工科大学

^{*2} 石川県立大学

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*4} 帯広畜産大学大学院食品衛生学専攻

Protein Engineering Design & Selection, 26 (11), 755-761 (2013)

Directed evolution to enhance thermostability of galacto-N-biose/lacto-N-biose I phosphorylase

Yoshiyuki Koyama^{*1}, Masafumi Hidaka^{*2}, Mamoru Nishimoto^{*1}, Motomitsu Kitaoka^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

ガラクト-N-ビオース/ラクト-N-ビオースIホスホリラーゼ(GLNBP)は酵素法によるラクト-N-ビオースI製造の鍵酵素である。本酵素の工業的利用を考慮してエラープロンPCR-選抜法による分子進化的手法によりGLNBPの耐熱性向上を試みた。その結果耐熱性の向上した5種のアミノ酸置換を選抜した。その中でもC236Y及びD576V変異酵素に大きな耐熱性向上が見られた。C236Yの構造解析の結果、Tyr236の水酸基がE319と水素結合していることを確認した。二重変異酵素C236Y/D576Vでは20°C以上の耐熱性の向上が見られた。

分子進化によるガラクト-N-ビオース/ラクト-N-ビオースIホスホリラーゼの耐熱性向上

小山 善幸^{*1}, 日高 將文^{*2}, 西本 完^{*1}, 北岡 本光^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 東北大学大学院農学研究科

FEBS Letters, 587 (21), 3556-3561 (2013)

Discovery of cellobionic acid phosphorylase in cellulolytic bacteria and fungi

Takanori Nihira^{*1}, Yuka Saito^{*1}, Mamoru Nishimoto^{*2}, Motomitsu Kitaoka^{*2}, Kiyohiko Igarashi^{*3}, Ken'ichi Ohtsubo^{*1}, Hiroyuki Nakai^{*1}

^{*1} Faculty of Agriculture, Niigata University

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

セルロース分解性細菌 *Xanthomonas campestris* 及びカビ *Neurospora crassa*. 由来糖加水分解酵素ファミリー 94 に属するホスホリラーゼの諸性質を決定し、両者がセロビオン酸を加リン酸分解する酵素であることを見いだした。本酵素の系統名を 4-O-β-D-glucopyranosyl-D-gluconic acid: phosphate α-D-glucosyltransferase. 短縮名をセロビオン酸ホスホリラーゼと呼ぶことを提案する。Ascomycota 門に属する数種のカビゲノム中からホモログ酵素をコードする遺伝子が見つかった。本酵素はセルロースの酸化分解系で生じるセロビオン酸の代謝に関わると推定した。

セルロース分解性バクテリア及びカビからのセロビオン酸ホスホリラーゼの発見

仁平 高則^{*1}, 斉藤 由華^{*1}, 西本 完^{*2}, 北岡 本光^{*2}, 五十嵐圭日子^{*3}, 大坪 研一^{*1}, 中井 博之^{*1}

^{*1} 新潟大学農学部

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*3} 東京大学大学院農学生命科学研究科

FEBS Letters, 587 (21), 3382-3386 (2013)

Potassium ion-dependent trehalose phosphorylase from halophilic *Bacillus selenitireducens* MLS10

Takanori Nihira^{*1}, Yuka Saito^{*1}, Kazuhiro Chiku^{*1}, Motomitsu Kitaoka^{*2}, Ken-ichi Ohtsubo^{*1}, Hiroyuki Nakai^{*1}

^{*1} Faculty of Agriculture, Niigata University

^{*2} National Food Research Institute, NARO

我々は好塩性細菌 *Bacillus selenitireducens* MLS10 由来糖加水分解酵素ファミリー 65 に属する酵素 (Bsel_1207) がカリウムイオン要求性トレハロースホスホリラーゼであることを見いだした。大腸菌により発現させた Bsel_1207 は高カリウムイオン濃度で活性型二量体を保ち、トレハロースをシークエンシャル機構に沿ってグルコースと β-グルコース 1 リン酸に加リン酸分解した。カリウムイオンの低下により、非活性型のモノマーを生じるとともに安定性の低下が観察された。

好塩性細菌 *Bacillus selenitireducens* MLS10 由来カリウムイオン要求性トレハロースホスホリラーゼ

仁平 高則^{*1}, 斉藤 由華^{*1}, 知久 和寛^{*1}, 北岡 本光^{*2}, 大坪 研一^{*1}, 中井 博之^{*1}

^{*1} 新潟大学農学部

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

The Journal of Biological Chemistry, 288 (38), 27366-27374 (2013)

Discovery of β -1, 4-D-mannosyl-N-acetyl-D-glucosamine phosphorylase involving in metabolism of N-glycans

Takanori Nihira^{*1}, Erika Suzuki^{*1}, Motomitsu Kitaoka^{*2}, Mamoru Nishimoto^{*2}, Ken'ichi Ohtsubo^{*1}, Hiroyuki Nakai^{*1}

^{*1} Faculty of Agriculture, Niigata University

^{*2} National Food Research Institute, NARO

Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482ゲノムから、N-結合型グリカンの代謝に関わる遺伝子クラスターを見いだした。本遺伝子クラスターはトランスポーター関連タンパク、4種の加水分解酵素及び機能未知のホスホリラーゼ(BT1033)より形成されていた。BT1033タンパクは β -1, 4-D-マンノシル-N-アセチル-D-グルコサミンをシーケンシャル機構で加リン酸分解した。本酵素のホモログはBacteroides fragilis, Bacteroides helcogenes, Bacteroides salanitronis, Bacteroides vulgatus, Prevotella denticola, Prevotella dentalis, Prevotella melaninogenica, Parabacteroides distasonis, Alistipes finegoldiiに見られた。本酵素を β -1, 4-D-マンノシル-N-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼと命名することを提案する。

N-結合型グリカン代謝に関わる β -1, 4-D-マンノシル-N-アセチル-D-グルコサミンホスホリラーゼの発見

仁平 高則^{*1}, 鈴木絵里香^{*1}, 北岡 本光^{*2}, 西本 完^{*2}, 大坪 研一^{*1}, 中井 博之^{*1}

^{*1} 新潟大学農学部

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

The Journal of Biological Chemistry, 288 (35), 25194-25206 (2013)

Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of Bifidobacterium longum subsp. longum shows a unique substrate specificity and requires a cognate chaperon for its active expression

Haruko Sakurama^{*1}, Masashi Kiyohara^{*1}, Jun Wada^{*1}, Yuji Honda^{*1}, Masanori Yamaguchi^{*2}, Satoru Fukiya^{*3}, Atsushi Yokota^{*3}, Hisashi Ashida^{*4}, Hidehiko Kumagai^{*1}, Motomitsu Kitaoka^{*5}, Kenji Yamamoto^{*1}, Takane Katayama^{*1}

^{*1} Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University

^{*2} Department of Organic Chemistry, Wakayama University

^{*3} Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University

^{*4} Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University

^{*5} National Food Research Institute, NARO

乳児型ビフィズス菌は種特異的にヒトミルクオリゴ糖分解酵素を保持している。ラクト-N-ピオシダーゼ(LNBase)は、主成分であるラクト-N-テトラオースを分解する鍵酵素である。我々は以前Bifidobacterium bifidumおよび一部のBifidobacterium longum subsp. longum (B. longum)からLNBase活性を検出した。その後、B. bifidumから糖加水分解酵素ファミリー 20 (GH20)に属するLNBaseを単離したが、LNBase+のB. longumゲノムにはGH20 LNBaseホモログが存在しなかった。我々は、B. longum JCM1217 由来BLLJ_1505およびBLLJ_1506タンパク (LnbXおよびLnbY) がLNBaseを形成することを見いだした。LnbX, LnbYともに機能既知のタンパクとは有意な相同性を示さなかった。LnbXのみで構成される精製酵素は、ラクト-N-テトラオースを分解するとともに、遅いながらもラクト-N-フコペンタオースIおよびシアロラクト-N-テトラオースを分解した。発色基質として、Gal β 1-3GlcNAc β -pNP以外GalNAc β 1-3GlcNAc β -pNPも分解した。GalNAc β 1-3GlcNAc β 結合は α -ジストログリカンのO-マンノシル糖鎖に見られる構造であり、本酵素は糖鎖解析ツールとして有用である。LnbYはLnbXのフォールディングに重要であり、リフォールディング試験では金属イオンを要求した。LnbXとLnbYのホモログは一部のB. bifidum, B. longumおよびごく少数の腸内細菌のゲノムにしか見られなかった。

Bifidobacterium longum subsp. longum由来新規ラクト-N-ピオシダーゼの基質特異性及び分子シャペロン要求性

櫻間 晴子^{*1}, 清原 正志^{*1}, 和田 潤^{*1}, 本多 裕司^{*1}, 山口 真範^{*2}, 吹谷 悟^{*3}, 横田 篤^{*3}, 芦田 久^{*4}, 熊谷 英彦^{*1}, 北岡 本光^{*5}, 山本 憲二^{*1}, 片山 高嶺^{*1}

^{*1} 石川県立大学生物資源工学研究所

^{*2} 山口大学教育学部

^{*3} 北海道大学大学院農学院

^{*4} 近畿大学生物理工学部

^{*5} (独) 農研機構食品総合研究所

FEBS Journal, 280 (18), 4560-4571 (2013)

Structure of an uncharacterized glycoside hydrolase family 63 enzyme in complex with a glycosynthase product

Takatsugu Miyazaki^{*1}, Megumi Ichikawa^{*1}, Gaku Yokoi^{*1}, Motomitsu Kitaoka^{*2},
Haruhide Mori^{*3}, Yoshikazu Kitano^{*1}, Atsushi Nishikawa^{*1}, Takashi Tonozuka^{*1}

^{*1} Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Agriculture and Technology

^{*2} National Food Research Institute, NARO

^{*3} Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University

糖加水分解酵素ファミリー (GH)63に属するタンパク質は細菌、始原菌および真核生物から見つかっている。真核生物由来GH63タンパクはプロセッシング α -グルコシダーゼIと同定されているが、細菌および始原菌由来GH63タンパクの機能は不明である。我々はGH63タンパクである大腸菌YgjKをグライコシターゼ化してその特異性を探った。2種のYgjK変異体(E727A, D324N)を作製したところ両者ともグライコシターゼ活性を示した。E727Aの反応では、 β -グルコシルフルオリドをドナーとしガラクトースをアクセプターとしたときに最大の二糖蓄積を観測した。生成物とE727A複合体の構造から生成物を2-O- α -グルコシルガラクトース(Glc12Gal)と同定した。2種の複合体の構造比較からYgjKがopen構造およびclosed構造を取ることが示唆された。これらの結果から、本酵素の真の基質はGlc12Gal構造を含むことが推察される。

糖加水分解酵素ファミリー 63酵素のグライコシターゼ生成物との複合体構造

宮崎 剛亜^{*1}, 市川めぐみ^{*1}, 横井 岳^{*1}, 北岡 本光^{*2},
森 春英^{*3}, 北野 克和^{*1}, 西河 淳^{*1}, 殿塚 隆史^{*1}

^{*1} 東京農工大学農学部

^{*2} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*3} 北海道大学大学院農学院

Journal of Applied Glycoscience, 60 (3), 141-146 (2013)

Characterization of the cytosolic β -N-acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*

Yuji Honda^{*1, *2}, Mamoru Nishimoto^{*1}, Takane Katayama^{*2}, and Motomitsu Kitaoka^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Ishikawa Prefectural University

Bifidobacterium longum subsp. *longum* JCM1217由来BLLJ 1391タンパクは、ラクト-N-トリオースII (LNTri)およびキチンオリゴ糖を分解する糖加水分解酵素ファミリー (GH)20に属する菌体内 β -N-アセチルグルコサミニダーゼであった。本酵素の反応は他のGH20酵素と同様に基質補助機構によるアノマー保持型反応であった。本酵素のホモログは乳児型ビフィズス菌である*B. longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, and *Bifidobacterium breve*, のゲノム中に存在していた。この分布は1, 3- β -ガラクトシル-N-アセチルヘキソサミンホスホリラーゼの分布と類似している。本酵素は菌体内でラクト-N-テトラオースが特異的 β -ガラクトシダーゼで分解されて生じるLNTriの代謝に関わると推察した。

Bifidobacterium longum subsp. *longum* 由来菌体内 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ

本多 裕司^{*1, *2}, 西本 完^{*1}, 片山 高嶺^{*2}, 北岡 本光^{*1}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} 石川県立大学

Colorimetric quantification of α -D-mannose 1-phosphateTakanori Nihira*¹, Erika Suzuki*¹, Motomitsu Kitaoka*², Mamoru Nishimoto*², Ken'ichi Ohtsubo*¹, and Hiroyuki Nakai*¹*¹ Faculty of Agriculture, Niigata University*² National Food Research Institute, NARO

グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ法によるグルコース6-リン酸定量法に、ホスホマンノムターゼ、ホスホマンノースイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼを追加することによる α -マンノース1-リン酸の定量法を開発した。この方法では、 α -マンノース1-リン酸は、マンノース6-リン酸、フラクトース6-リン酸、グルコース6-リン酸と変換された後、自身がグルコン酸6-リン酸に酸化される時にチオNAD⁺を還元しチオNADHを生じる。生成したチオNADHを波長400 nmの吸光により定量する。この方法は、マンノース、マンノサミン、N-アセチルマンノサミン、マンノオリゴ糖などの存在により妨害されないため、 α -マンノース1-リン酸を生成物とする糖加水分解酵素ファミリー 130に属するホスホリラーゼの反応解析に有用である。

 α -マンノース1-リン酸の比色定量法仁平 高則*¹, 鈴木絵里香*¹, 北岡 本光*², 西本 完*², 大坪 研一*¹, 中井 博之*¹*¹ 新潟大学農学部*² (独) 農研機構食品総合研究所

Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is palmitoylated and internalizes ligands via caveolae/raft-dependent endocytosis

M.K.Kuramochi*¹, Q.Xie*¹, S. Kajiwara*², S. Komba*¹, T.Minowa*², S.Machida*¹*¹ National Food Research Institute, NARO*² National Institute for Materials Science

レクチン様酸化LDL受容体 (LOX-1) は、酸化LDLの取り込みに重要な役割を担う血管内皮上の受容体であり、動脈硬化発症に深く関係している。LOX-1は、オリゴマーを形成して機能するが、LOX-1のオリゴマー形成機構に関する知見は限られており、LOX-1に認識されたリガンドの輸送過程も不明な点が多い。本研究は、LOX-1に認識されたリガンドが、カベオラ/ラフト依存的エンドサイトーシスにより取り込まれることを明らかにした。さらに、LOX-1の36番目、および、46番目のシステインがパルミトイル化を受けており、パルミトイル化がLOX-1の細胞膜上の微小領域への高密度な集積とそれに続くリガンド認識に必須なことを示した。

レクチン様酸化LDL受容体(LOX-1)はパルミトイル化されており、リガンドをカベオラ/ラフト依存的エンドサイトーシス経路により取り込む

倉持(熊野)みゆき*¹, 謝 秋宏*¹, 梶原 祥子*¹, 今場 司朗*¹, 箕輪 貴司*², 町田 幸子*¹*¹ (独) 農研機構食品総合研究所*² (独) 物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合センター

Journal of Bioscience and Bioengineering, 116(3), 362-365 (2013)

Expression of neutral β -glucosidase from *Scytalidium thermophilum* in *Candida glabrata* for ethanol production from alkaline-pretreated rice straw

Xiaohui Wang, Masakazu Ike, Riki Shiroma, Ken Tokuyasu, Yoshikiyo Sakakibara

National Food Research Institute, NARO

我々は、*Scytalidium thermophilum*由来の中性に至適pHがある β -グルコシダーゼ (BGL4) を、耐熱性酵母である*Candida glabrata*において発現させることに成功した。このBGL4発現酵母株は、至適pHが酸性にある*Aspergillus*由来の β -グルコシダーゼ (BGL1) を発現させた酵母株よりも、40°C、pH 4の条件下で高いセロピオース発酵能を示し、アルカリ前処理稲わらを原料とした際により多くのエタノールを生産した。

アルカリ前処理稲わらからのエタノール生産のための*Candida glabrata*における*Scytalidium thermophilum*由来中性 β -グルコシダーゼの発現

王 暁輝, 池 正和, 城間 力, 徳安 健, 榊原 祥清

(独) 農研機構食品総合研究所

食品総合研究所研究報告, 78, 37-41(2014)

クロラムフェニコール耐性遺伝子によるゲノム重複を活用した枯草菌育種法

稲岡 隆史, 草房 克江, 本山 志織

(独) 農研機構食品総合研究所

遺伝子重複は染色体DNAの一部が反復する現象であり、全ての生物において複製過程に起こる。本研究では、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (cat) を選択マーカーとして用いて枯草菌の遺伝子重複を調査した。ゲノム中に1コピーのcat遺伝子と β -ラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) を有する枯草菌TI74株を最小発育阻止濃度より高い濃度のクロラムフェニコール培地で選択した時、全ての耐性株のcat遺伝子が多コピー化していた。さらに、cat重複株ではlacZ遺伝子の多コピー化も観察され、 β -ガラクトシダーゼ活性も上昇した。これらの結果は、クロラムフェニコール耐性の増大により、cat遺伝子重複株を効率的に選択できることを示している。このように、cat遺伝子は枯草菌における遺伝子重複株の選択マーカーとして有用である。

Investigation of *Bacillus subtilis* gene amplification by utilizing chloramphenicol-resistance gene

Takashi Inaoka, Katsue Kusafusa, Shiori Motoyama

National Food Research Institute, NARO

Biosynthetic conclusions from the functional dissection of oxygenases for biosynthesis of actinorhodin and related Streptomyces antibiotics

Takaaki Taguchi*¹, Masaki Yabe*^{2,3}, Hitomi Odaki*¹, Miki Shinozaki*¹,
Mikko Metsä-Ketelä*⁴, Takao Arai*³, Susumu Okamoto*², Koji Ichinose*¹

*¹ Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University

*² National Food Research Institute, NARO

*³ Department of Biological Science, Tokyo University of Science

*⁴ Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Turku

アクチノロジン(ACT)は、*Streptomyces coelicolor* A3(2)によって生産されるベンゾイソクロマキノン(BIQ)系の抗生物質である。ActVA-ORF5はフラビン依存型モノオキシゲナーゼ(FMO)であり、フラビン還元酵素であるActVBと二成分酵素系を構成している。actVA-ORF5遺伝子と高い相同性を示す遺伝子は、他のBIQ系化合物であるグラナティシン(GRA)とメダマイシン(MED)の生合成遺伝子クラスターにも存在する。また、BIQ化合物に類似した抗生物質アルヌマイシン(ALN)の生合成遺伝子クラスターにも相同遺伝子が見られる。本論文では、これらのFMO (ActVA-ORF5, Gra-ORF21, Med-ORF7, AlnT) の機能解析を行い、ActVA-ORF5とGra-ORF21が、6位および8位の酸化を触媒する二機能性のFMOであることを明らかにした。

アクチノロジンおよび類似の構造を有する放線菌由来抗生物質の生合成に関与するモノオキシゲナーゼの機能解析から導き出された生合成的帰結

田口 貴章*¹, 矢部 正樹*^{2,3}, 小瀧 仁美*¹, 篠崎 美樹*¹,
Mikko Metsä-Ketelä*⁴, 新井 孝夫*³, 岡本 晋*², 市瀬 浩志*¹

*¹ 武蔵野大学薬学研究所

*² (独) 農研機構食品総合研究所

*³ 東京理科大学応用生物科学

*⁴ トゥルク大学生化学・食品化学科

Transcriptional Regulation of Fruit Ripening by Tomato FRUITFULL Homologs and Associated MADS Box Proteins

Masaki Fujisawa*¹, Yoko Shima*¹, Hiroyuki Nakagawa*¹, Mamiko Kitagawa*²,
Junji Kimbara*², Toshitsugu Nakano*¹, Takafumi Kasumi*³, Yasuhiro Ito*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² Research Institute, Kagome Co.

*³ Department of Chemistry and Lifescience, Nihon University

トマトのMADS box型転写因子FRUITFULLホモログ (FUL1, FUL2) は、同じくMADS box因子のRINと相互作用し、またFUL1/FUL2抑制株は果実の成熟が阻害されることから、成熟制御因子であることが最近明らかになった。そこでFUL1, FUL2の成熟における役割および成熟制御様式を解明するために、トマト全遺伝子プロモーター解析用のマイクロアレイを用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP-chip) およびFUL1/FUL2抑制株のRNA-Seq解析によりFUL1, FUL2それぞれの標的遺伝子群を大規模に同定した。その機能分類およびRIN標的遺伝子群との比較、さらに生化学的解析によって、FUL1/FUL2がRINおよびMADS box因子で成熟制御に関わるTAGL1と複合体を形成し、これが成熟制御の中心的役割を担う一方で、RINとは独立に関与する代謝経路も存在することを明らかにした。

トマトFRUITFULLホモログおよび関連MADS box型転写因子が司る果実成熟の転写制御機構

藤澤 雅樹*¹, 嶋 羊子*¹, 中川 博之*¹, 北川 麻美子*²,
金原 淳司*², 中野 年継*¹, 春見 隆文*³, 伊藤 康博*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² カゴメ(株) 総合研究所

*³ 日本大学 生物資源科学部

Journal of Chromatography A, 1303, 100-104(2013)

Characterization of a large glycoprotein proteoglycan by size-exclusion chromatography combined with light and X-ray scattering methods

Yasushi Watanabe*1, Yoji Inoko*2

*1 National Food Research Institute, NARO

*2 Graduate School of Engineering Science, Osaka University

溶液中の鯨軟骨プロテオグリカンの分子量と分子鎖構造について、レーザー光散乱法および小角X線散乱法をゲルクロマトグラフィーに組み込んだ測定システムでそれぞれ解析した。生理的な条件では、わずかな量の分子量数百万以上の超高分子成分と分子量200万前後の主要成分からなることが光散乱測定による分子量評価によりわかった。また、溶液X線クロマトグラフィー法により、水溶液中のプロテオグリカン主要成分はほどけた構造で、高分子鎖の堅さの指標である持続長は13-16 nmであることを明らかにした。

光およびX線散乱法と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィーによる巨大糖タンパク質の特性解析

渡邊 康*1, 猪子 洋二*2

*1 (独) 農研機構食品総合研究所

*2 大阪大学大学院基礎工学研究科

Plant Signaling and Behavior Journal, 8:5, e2435726 (2013)

The regulatory mechanism of fruit ripening revealed by analyses of direct targets of the tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR

Masaki Fujisawa, Yasuhiro Ito

National Food Research Institute, NARO

成熟は多肉果の特徴的な過程であり果実の品質を決定する重要なステップである。トマトではMADSボックス転写因子RINが成熟のもっとも初期に機能する転写因子であることが明らかにされており、エチレン依存的、非依存的な制御の両方に対して広く機能していることが知られている。しかしながらRINが直接制御している遺伝子については全体像が知られていなかった。そこで我々は前報でChIP-chip法によりRINの標的遺伝子を大規模に解析し、241遺伝子を同定した。これらの遺伝子の機能解析の結果、RINはエチレン合成やリコペン合成等の典型的な成熟反応を含む多様な生物機能の制御に関わっていることが明らかになった。加えてエチレンの作用がRINおよびRINの制御下にある転写因子の発現を完全に誘導するのに必要であることが明らかになった。ここではRINが関与する成熟過程の制御、またRINとエチレンの相互作用について議論する。

トマトMADS box型転写因子RIPENING INHIBITORの直接標的遺伝子の解析による果実成熟制御のメカニズム

藤澤 雅樹, 伊藤 康博

(独) 農研機構食品総合研究所

Expression profiling of tomato pre-abscission pedicels provides insights into abscission zone properties including competence to respond to abscission signals

Toshitsugu Nakano, Masaki Fujisawa, Yoko Shima, Yasuhiro Ito

National Food Research Institute, NARO

トマトの花脱離メカニズムを明らかにするために、脱離直前の花柄の遺伝子発現解析を網羅的に行った。花柄のうち、離層領域(AZ)、離層より花側の花柄(Dis)、離層より植物本体側(Prox)の花柄に分けて遺伝子発現解析を行ったところ、離層のみで発現が高い89遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中には、生長点で特異的に発現が認められていた転写因子が、複数含まれていた。また、オーキシン活性に関わる遺伝子が花柄先端から基部にかけて発現の勾配が見られ、オーキシンの局在が示唆された。また、AZ、Dis、Proxに部位特異的に異なるMADSボックス転写因子が発現しており、似たような構造であるDisとProxは異なる性質を持つ組織であることが示唆された。またAZに特異的に発現している転写因子遺伝子BI、GOB、LS、LeWUSのうち、脱離処理に伴いBIは発現が向上し、その他は発現が低下したことから、それぞれ脱離の促進、あるいは抑制制御に関わっている可能性が示唆された。

トマト脱離前花柄の遺伝子発現解析により推察される脱離開始シグナルに反応する能力を含む離層組織の特異的な性質

中野 年継, 藤澤 雅樹, 嶋 羊子, 伊藤 康博

(独) 農研機構食品総合研究所

Tomato FRUITFULL homologues act in fruit ripening via forming MADS-box transcription factor complexes with RIN

Yoko Shima^{*1}, Mamiko Kitagawa^{*2}, Masaki Fujisawa^{*1}, Toshitsugu Nakano^{*1},
Hiroki Kato^{*1, *3}, Junji Kimbara^{*2}, Takafumi Kasumi^{*4}, Yasuhiro Ito^{*1}

^{*1} National Food Research Institute, NARO

^{*2} Research Institute, Kagome Co., Ltd.

^{*3} Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science

^{*4} Department of Chemistry and Lifescience, Nihon University

トマトの果実成熟制御因子であるMADSボックス転写因子RINと結合するタンパク質を探索するために、酵母ツーハイブリット法を行い、シロイヌナズナの果実肥大に関与するMADSボックス転写因子FRUITFULLのホモログ、FUL1及びFUL2を見出した。FUL1及びFUL2は非常に高い相同性を示したが、その発現は異なるパターンを示した。ゲルシフトアッセイにより、FUL1及びFUL2はCドメインを介してRINとヘテロダイマーを形成し、既知のMADSボックス転写因子結合配列に結合することが判明した。ChIP解析では、FUL1及びFUL2がRIN標的である成熟関連遺伝子プロモーターへ結合していることを明らかにし、生細胞内でFUL1及びFUL2がRINと複合体を形成することが示唆された。これらの結果は、FUL1及びFUL2がRINと複合体を形成し、成熟関連遺伝子発現の制御を行っていることを示している。

トマトFRUITFULLホモログはRINとMADSボックス転写因子複合体を形成して果実成熟を制御する

嶋 羊子^{*1}, 北川麻美子^{*2}, 藤澤 雅樹^{*1}, 中野 年継^{*1},
加藤 大^{*1, *3}, 金原 淳司^{*2}, 春見 隆文^{*4}, 伊藤 康博^{*2}

^{*1} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*2} カゴメ(株) 研究開発本部

^{*3} 東京理科大学理工学部

^{*4} 日本大学生物資源科学部

The Journal of Biological Chemistry, 289(11), 7962-7972, (2014)

Crystal structure and characterization of the glycoside hydrolase family 62 α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces coelicolor*

Tomoko Maehara*¹, Zui Fujimoto*², Hitomi Ichinose*¹, Mari Michikawa*¹, Koichi Harazono*³, Satoshi Kaneko*¹

*¹ National Food Research Institute, NARO

*² National Institute of Agrobiological Sciences

*³ Nagase ChemteX Corp.

糖加水分解酵素ファミリー 62(GH62)に分類されるアラビノフラノシダーゼはアラビノキシランには作用するが、アラビナンやアラビノガラクトンには作用しない。その理由を解明するために、ストレプトマイセス スエリカラー由来GH62アラビノフラノシダーゼの結晶構造を解明し、基質特異性のメカニズムを詳細に解析した。L-アラビノース、キシロトリオース、キシロヘキサオースとの結合構造から本酵素はキシラン主鎖と結合する5個のサブサイトと側鎖L-アラビノースが結合するポケットを活性部位に有していた。Trp270, Tyr461, 及び Asn462は酵素が基質を識別するうえで重要な役割を果たしており、特にサブサイト+ 2におけるAsn462とキシロースの結合は分岐しているアラビノース側鎖の結合に対して高い活性を示すうえで非常に重要であることが明らかとなった。

ストレプトマイセス スエリカラー由来糖加水分解酵素ファミリー 62アラビノフラノシダーゼの結晶構造と特性

前原 智子*¹, 藤本 瑞*², 一ノ瀬仁美*¹, 路川 真理*¹, 原園 幸一*³, 金子 哲*¹

*¹ (独) 農研機構食品総合研究所

*² (独) 農業生物資源研究所

*³ ナガセケムテックス (株)

Journal of Applied Glycoscience, 61(1), 21-25(2014)

Characterization of mannose isomerase from a cellulolytic actinobacteria *Thermobifida fusca* MBL10003

Takafumi Kasumi*¹, Sumiko Mori*², Satoshi Kaneko*², Hitoshi Matsumoto*¹, Yousuke Kobayashi*¹, Yoshiyuki Koyama*¹

*¹ Nihon University

*² National Food Research Institute, NARO

新たに単離された放線菌サーモビフィダフスカMBL10003株よりD-マンノースイソメラーゼ遺伝子をクローニングし、組換え酵素の特性解析を行った。本酵素遺伝子は407アミノ酸からなり、推定分子量43900のポリペプチドである。アミノ酸配列の相同性は高くない(サルモネラ菌由来45.7%, アグロバクテリウム・ラジオブクター由来38.5%)が、活性中心はホモログ配列で保存されていた。本酵素は2量体であり、活性の至適温度およびpHは、それぞれ60°C, 8.0であった。本酵素は約60°C以下, pH4 ~ 11の間で安定であった。本酵素は、D-マンノースとD-リキソースに活性を示したが、N-アセチルD-グルコサミンには、作用せず、配列が似ているN-アシルD-グルコサミン2-エピメラーゼとは異なることが明らかとなった。D-マンノースに対するKm値は115 mMと他のマンノースイソメラーゼに比べ大きかったが、kcat及びkcat/Kmがたと比べ著しく大きく、はるかに高い数値を示した。また本酵素の活性は、Cu²⁺, CD²⁺またはCa²⁺のような二価の金属イオンにより著しく阻害された。

セルロース資化性放線菌サーモビフィダ フスカ由来マンノースイソメラーゼの特性解析

春見 隆文*¹, 森 澄子*², 金子 哲*², 松本 和*¹, 小林 洋介*¹, 小山 善幸*²

*¹ 日本大学

*² (独) 農研機構食品総合研究所

Expression of Arabidopsis thaliana xylose isomerase gene and the effect on ethanol production in Flammulina velutipes

Tomoko Maehara*¹, Koji Takabatake*², Satoshi Kaneko*¹*¹ National Food Research Institute, NARO*² Forest Institute, Toyama Prefectural Agricultural, Forestry and Fisheries Research Center

エノキタケのペントースを原料としたエタノール生産性向上のため、シロイヌナズナ由来のキシロースイソメラーゼ様遺伝子をクローニングし、エノキタケに形質転換した。導入遺伝子の発現はmRNAの発現とキシロースイソメラーゼ活性を測定することで確認し、導入した遺伝子が確かにキシロースイソメラーゼをコードしていること、またシロイヌナズナ由来の遺伝子がエノキタケ中ではうまく発現していることが明らかとなった。得られた形質転換体ではキシロースを原料とした際のエタノール生産性が向上しており、植物由来の遺伝子が、エノキタケの形質の改変に利用できる可能性が初めて示された。

エノキタケにおけるシロイヌナズナ由来キシロースイソメラーゼ遺伝子の発現とエタノール生産性への影響

前原 智子*¹, 高島 幸司*², 金子 哲*¹*¹ (独) 農研機構食品総合研究所*² 富山県農林水産総合技術センター森林研究所

Phase diagram-guided method for growth of a large crystal of glycoside hydrolase family 45 inverting cellulase suitable for neutron structural analysis

Akihiko Nakamura*¹, Takuya Ishida*¹, Shinya Fushinobu*¹, Katsuhiko Kusaka*², Ichiro Tanaka*², Koji Inaka*³, Yoshiki Higuchi*⁴, Mika Masaki*⁵, Kazunori Ohta*⁵, Satoshi Kaneko*⁶, Nobuo Niimura*², Kiyohiko Igarashi*¹, Masahiro Samajima*¹*¹ The University of Tokyo*² Ibaraki University*³ Maruwa Foods and Biosciences, Inc.*⁴ University of Hyogo and Himeji Institute of Technology*⁵ Japan Aerospace Exploration Agency, Tsukuba Space Center*⁶ National Food Research Institute, NARO

中性子タンパク質結晶解析 (NPC) はタンパク質中の水素の位置や水の向きを決定するための強力なツールであるがX線結晶構造解析より大きな結晶が必要であり、結晶の準備がボトルネックとなっている。大きなタンパク質結晶を得るためには、標的タンパク質の結晶化溶液中の特性を知る必要がある。本研究ではカビ由来のセルラーゼ (PcCel45A) に位相ダイアグラム誘導法を試した。最終的に6立方ミリメートル (3ミリメートル×2ミリメートル×1ミリメートル) の結晶を得ることに成功した。得られた結晶は中性子回折に適していた。

中性子構造解析に適した糖加水分解酵素ファミリー 45-セルラーゼ巨大結晶の位相ダイアグラム誘導法

中村 彰彦*¹, 石田 卓也*¹, 伏信 進矢*¹, 日下 勝弘*², 田中伊知朗*², 伊中 浩治*³, 樋口 芳樹*⁴, 正木 美佳*⁵, 太田 和敬*⁵, 金子 哲*⁶, 新村 信雄*², 五十嵐圭日子*¹, 鮫島 正浩*¹*¹ 東京大学*² 茨城大学*³ 丸和食品*⁴ 兵庫県立大学*⁵ つくば宇宙センター*⁶ (独) 農研機構食品総合研究所

The Plant Journal, 76(1), 128-137(2013)

A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in Arabidopsis

Naomi Geshi^{*1}, Jorunn N. Johansen^{*2, *3}, Adiphol Dilokpimol^{*1}, Aurélie Rolland^{*2, *3}, Katia Belcram^{*2, *3}, Stéphane Verger^{*2, *3}, Toshihisa Kotake^{*4}, Yoichi Tsumuraya^{*4}, Satoshi Kaneko^{*5}, Theodora Tryfona^{*6}, Paul Dupree^{*6}, Henrik V. Scheller^{*1, *7}, Herman Höfte^{*2, *3}, Gregory Mouille^{*2, *3}

^{*1} University of Copenhagen

^{*2} Institut Jean-Pierre Bourgin, Saclay Plant Sciences

^{*3} AgroParisTech

^{*4} Saitama University

^{*5} National Food Research Institute, NARO

^{*6} Cambridge University

^{*7} Joint BioEnergy Institute

アラビノガラクトタン-プロテインは複雑な構造をした細胞表面プロテオグリカンであり、植物の生長に関与していると考えられている。AGPのコアタンパク質が多岐に渡るため、遺伝的なアプローチによるAGPの機能解析の成功例は少ない。そこで、本研究ではAGP糖鎖の構造を改変するアプローチを行った。AGP糖鎖に作用する糖転移酵素ファミリー 31に分類されるガラクトース転移酵素遺伝子を破壊すると胚の生長を阻害することを見出した。

アラビノガラクトタン-プロテインの糖鎖に作用するガラクトース転移酵素はシロイソナズナの胚の発育に必須である

下司 直美^{*1}, Jorunn N. Johansen^{*2, *3}, Adiphol Dilokpimol^{*1}, Aurélie Rolland^{*2, *3}, Katia Belcram^{*2, *3}, Stéphane Verger^{*2, *3}, 小竹 敬久^{*4}, 円谷 陽一^{*4}, 金子 哲^{*5}, Theodora Tryfona^{*6}, Paul Dupree^{*6}, Henrik V. Scheller^{*1, *7}, Herman Höfte^{*2, *3}, Gregory Mouille^{*2, *3}

^{*1} コペンハーゲン大学

^{*2} ヤン-ピエールボウジン研究所

^{*3} アグロパリステック

^{*4} 埼玉大学

^{*5} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*6} ケンブリッジ大学

^{*7} ジョイントバイオエナジー研究所

The Journal of Biological Chemistry, 288(17), 12376-12385(2013)

The structure of a Streptomyces avermitilis α -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement

Zui Fujimoto^{*1}, Adam Jackson^{*2}, Mari Michikawa^{*3}, Tomoko Maehara^{*3}, Mitsuru Momma^{*1}, Bernard Henrissat^{*4}, Harry J. Gilbert^{*2}, Satoshi Kaneko^{*3}

^{*1} National Institute of Agrobiological Sciences

^{*2} Newcastle University

^{*3} National Food Research Institute, NARO

^{*4} Aix-Marseille University

α -L-ラムノシダーゼは多糖やオリゴ糖中の α -L-ラムノシド結合を加水分解する酵素である。我々はストレプトマイセス エバミティリス由来の糖加水分解酵素ファミリー 78に分類される α -L-ラムノシダーゼ (SaRha78) のL-ラムノースが結合した立体構造を明らかにした。本酵素はN, D, E, F, A及びCの6ドメインから形成されていた。触媒部位と推定される部位にL-ラムノースの結合が観察され、SaRha78はインパーティングな機構により加水分解反応を触媒し、Glu636がプロトンドナー、Glu895が水を求核基として活性化する塩基触媒であることが判明した。これらの残基を他のアミノ酸に置換した場合には著しい活性の低下が見られた。L-ラムノースはドメインDにもカルシウム依存的に結合していた。L-ラムノースとドメインDの親和力は $K_d=135\mu\text{M}$ であり、本ドメインは新規な糖結合モジュールであることが明らかになった。

ストレプトマイセス エバミティリス由来ラムノシダーゼの立体構造は6ドメイン構造中に新規な糖結合ドメインであるCBM67を見出した

藤本 瑞^{*1}, Adam Jackson^{*2}, 路川 真理^{*3}, 前原 智子^{*3}, 門岡 充^{*1}, Bernard Henrissat^{*4}, Harry J. Gilbert^{*1}, 金子 哲^{*3}

^{*1} (独) 農業生物資源研究所

^{*2} ニューカッスル大学

^{*3} (独) 農研機構食品総合研究所

^{*4} マルセイユ大学

β -Galactosyl Yariv reagent binds to the β -1, 3-galactan of arabinogalactan proteins

Kiminari Kitazawa*¹, Theodora Tryfona*², Yoshihisa Yoshimi*¹, Yoshihiro Hayashi*³, Susumu Kawauchi*³, Liudmil Antonov*⁴, Hiroshi Tanaka*³, Takashi Takahashi*³, Satoshi Kaneko*⁵, Paul Dupree*², Yoichi Tsumuraya*¹, Toshihisa Kotake*¹

*¹ Saitama University

*² University of Cambridge

*³ Tokyo Institute of Technology

*⁴ Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences,

*⁵ National Food Research Institute, NARO

β -ガラクトシルヤリフ試薬はアラビノガラクトタン-プロテイン (AGP) に特異的に結合するため、AGPの検出、定量、精製、組織染色等に使用されるが、本試薬がAGPのどの構造と結合するかは全く不明である。そこで、AGPの糖鎖を各種酵素で段階的にトリミングし、ヤリフ試薬の標的となる構造を明らかにした。アラビノース残基、グルクロン酸残基、 β -1, 6-ガラクトタン側鎖を除いても、ヤリフ試薬との反応性は低下しなかったが、 β -1, 3-ガラクトタン主鎖を分解すると反応性が消失した。そこで、結合の異なるオリゴ糖を用いて、反応性を確認したところ、 β -1, 6-結合のガラクトオリゴ糖には全く反応しなかったが、重合度5以上の β -1, 3-結合のガラクトオリゴ糖に反応を示した。以上の結果から β -ガラクトシルヤリフ試薬は重合度5以上の β -1, 3-結合のガラクトタンを認識し、重合度7以上で結合の強さが飽和すると判断した。

β -ガラクトシルヤリフ試薬はアラビノガラクトタン-プロテインの β -1, 3-ガラクトタンに結合する

北澤 仁成*¹, Theodora Tryfona*², 吉見 圭永*¹, 林 慶浩*³, 川内 進*³, Liudmil Antonov*⁴, 田中 浩士*³, 高橋 孝志*³, 金子 哲*⁵, Paul Dupree*², 円谷 陽一*¹, 小竹 敬久*¹

*¹ 埼玉大学

*² ケンブリッジ大学

*³ 東京工業大学

*⁴ ブルガリア科学アカデミー植物化学センター有機化学研究所

*⁵ (独) 農研機構食品総合研究所

食品総合研究所研究報告投稿要領

- 1 食品総合研究所研究報告への投稿に関し、必要な事項を定めることを目的とする。
- 2 投稿者は、次のとおりである。
 - (1) 投稿者は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所職員（契約職員を除く。以下「職員」という。）及び元職員とする。

ただし、機構特別研究員、食研特別研究員、流動研究員、依頼研究員、日本学術振興会特別研究員、日本学術振興会外国人特別研究員、連携大学院生、国連大学生、インターン等は、当該研究員の受け入れ職員（元職員を含む。）を責任著者（コレスポンディングオーサー等）とすることにより、投稿できるものとする。
 - (2) 投稿者は、責任著者とする。ただし、筆頭著者が責任著者と異なる際には、職員（元職員を含む。）である責任著者の了承の下、筆頭著者が投稿できるものとする。
 - (3) 投稿する内容は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所において得られた研究成果とし、そのうち学術的または技術的に価値のある原著論文とする。
 - (4) (1) から (3) の内容に関して、特段の問題が生じた際には、編集委員会において、調整できるものとする。
- 3 投稿できる論文の内容は、次のとおりである。
 - (1) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所研究報告（以下「研究報告」という。）には、原著（「報文」、「研究ノート」、及び「技術報告」）、「国連大学生研究成果」、及び学会誌発表研究論文の「抄録」を登載する。
 - (2) 原著は食品分野の研究及び産業等に寄与するもので、他誌に未発表のものに限る。「報文」は独創的な研究に基づいて得られた新しい事実と価値ある結論を有するもの、「研究ノート」は報文にまとめ得ないが学術的に公表する価値のある事実または結論を含むもの、「技術報告」は報文にまとめ得ないが有用なデータを含むものとする。
 - (3) 「国連大学生研究成果」として、当所の国連大学生が実施した研究成果の抄録を登載する。
 - (4) 前年度に当所の職員が学会誌に発表したすべての研究論文について、「抄録」を登載する。
- 4 食品総合研究所研究報告の著作権は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構刊行物著作権取扱規程（14規程第56号）によるものとする。
- 5 原稿の執筆に当たっては、別に定める食品総合研究所刊行物執筆要領に基づくものとする。使用する言語は日本語または英語とする。編集委員会で扱うその他の刊行物については、この執筆要領を準用する。
- 6 原稿の提出
 - (1) 原著論文の投稿に際しては、事前に所属領域長の承認及び内容の確認を得て行う。

- (2) 原著原稿は、正 1 部を提出し、電子ファイルを併せて提出する。なお、図及び写真で電子化できないものは、正原稿とは別に原図 1 部を提出する。
- (3) 「国連大学生研究成果」抄録原稿は、原稿 1 部を提出する。
- (4) 抄録原稿は、原稿 1 部を提出する。
- (5) 印刷用の最終原稿として電子化ファイルを提出する。ただし、図表等が電子化されていない場合は、この限りではない。
- (6) 原著については、原稿、原稿の電子ファイルともに、著者、事務局双方でバックアップを保管する。

7 原著論文については、編集委員会が選定した査読者が査読を行う。

8 食品総合研究所研究報告の発行回数は原則として年 1 回とするが、所長の判断により追加できるものとする。

9 食品総合研究所研究報告の別刷は原則として作成しない。ただし、執筆者等の希望がある場合は、研究ユニット等の経費負担により作成できるものとする。

10 その他、ここに定められていない事項は、編集委員会で決定する。

附則 この要領は、平成 26 年 6 月 17 日から実施する。

「食品総合研究所研究報告」の編集については、廃止する。

1 はじめに

この記載要領は投稿規程により、論文投稿に当たって原稿を執筆するさいの指針として作成したものである。執筆に当たっては投稿規程とともによく読んで、体裁の整った理解しやすい論文を作成するように努めていただきたい。

2 投稿論文

2.1 用紙は A4 判とし、縦長に置き、上下左右に各 3 cm 程度の余白を設け、11 ポイント程度の字の大きさを 26 字×27 行 (=702 字) を横書きする。

2.2 投稿論文の構成と提出部数

投稿論文の構成は、(1)表紙、(2)英文要旨およびその和訳、(3)本文、(4)表、(5)図(写真を含む)、(6)図(写真を含む)の説明原稿とする。

著者は投稿原稿の完全な控えを手元に保存する。なお審査の過程で変更があった場合は、それらの控えもすべて保存する。

3 投稿方法

論文の投稿はオンライン投稿システムの指示に従い行う。(URL : <http://www.editorialmanager.com/nskkk/>)

4 表紙

4.1 表紙には 4.5 の例のように、和文で欄外見出し、題名、著者名、所属、キーワード(日本語)、脚注の順に書く。

4.2 欄外見出しは著者名(姓のみ、2 名の場合は併記し、3 名以上の場合は「筆頭著者の姓・他」とする)に続いて、題名を 15 字以内にまとめて書く。なお、欄外見出しは会誌の表紙題名としても使用される。

4.3 共著者の所属が筆頭著者のそれと異なる場合は、共著者の氏名の右肩に「¹」「²」「³」を付け、所属(著者の正式な所属機関名)と対応させる。内容に関する質疑、別刷り請求等のための連絡先代表者を指定する場合は、当該氏名に「*」を付け、脚注と対応させる。

4.4 脚注には著者の所属機関の郵便番号と住所を書く。なお、連絡先代表者を指定した場合、「連絡先 (Corresponding author)」としメールアドレスを記載する。

4.5 表紙記載例

〔欄外見出し〕

食品・他：麹菌および鶏卵の量と魚醤油の品質

醤油麹量と鶏卵添加量がイカおよびイワシ魚醤油の品質に及ぼす影響[†]

食品花子¹、深海潜太²、水産勝尾^{2*}、
畜産育雄³、農業営子³

¹独立行政法人機能食材研究所

²太平洋大学農林水産学系

³全国県農業畜産試験場

キーワード：5 語以内

.....〔脚注〕.....

¹〒929-0808 能登県いしる市薄口台 4-5-67

²〒288-9999 西南県南総市黒潮岬 3-2-1

³〒123-4567 全国県風見鶏市大豆が丘 5432-10

*連絡先 (Corresponding author), abcd@efg.hijk

5 英文要旨およびその和訳

5.1 英文要旨は報文および技術論文では、200 語程度とし、研究ノートおよび速報では 100 語程度とする。

5.2 下記 5.4 の例のように、題名、次いで 3 行あけて著者名(名、姓の順とし、先頭文字のみ大文字とする)、所属機関名および住所、所在地、次に 1 行あけて要旨本文を書く。

5.3 英文要旨には研究の目的、方法、結果および結論を述べる。キーワードを 5 語以内で付ける。

5.4 英文要旨記載例

Effects of Concentrations of “Shoyu Koji” and Egg on Quality of Fish Sauces of Squid and Sardine

Hanako Shokuhin¹, Senta Fukami², Katsuo Suisan^{2*}, Ikuo Chikusan³ and Eiko Nogyo³

¹National Functional Food Stuff Institute, 4-5-67 Usukuchidai, Ishiru, Noto 929-0808

²Institution of Agriculture, Forestry and Fisheries, Taiheiyu University, 3-2-1 Kuroshiomisaki, Nansou, Seinan 288-9999

³Zenkoku Prefectural Agricultural and Livestock Experiment Station, 5432-10 daizugaoka, kazamidori, Zenkoku 123-4567

Fish sauces were prepared, using Japanese squid and sardine caught in the sea near Oni-ga-shima island. The quality of fish sauces was studied by changing Shoyu Koji and Ukokkei-egg concentrations during fermentation.……

Keywords :

6 本文

6.1 本文の構成

6.1.1 報文および技術論文

構成区分は原則として緒言（記述に当たっては「緒言」という見出し字句は用いない）、実験方法、実験結果、考察（「実験結果および考察」としてもよい）、要約、謝辞（必要な場合、記述に当たっては「謝辞」という字句は用いない）、文献とする。記述に当たっては、構成区分の見出し字句の前後は1行ずつあけ、見出し字句は行の中央に書く。

構成区分中の大見出し、中見出しおよび小見出しは、それぞれ1, 2, 3, ……; (1), (2), (3), ……; i), ii), iii), ……のように順次区別する。

中見出しまでは見出し字句をつけ、改行して文章を書き出す。小見出しは見出し字句をつけ、改行して文章を書くことを原則とするが、見出し字句のあとに「:」をつけて改行しないで文章を続けてもよい。見出し字句の最後にピリオドはつけない。

6.1.2 研究ノートおよび速報

構成区分見出しを必要とせず、緒言（記述に当たっては「緒言」という見出し字句は用いない）、大見出し以下の区別で記述する。大見出しの見出し字句は原則として、直接必要な事項の字句を見出しとする。要約は大見出しにより、文献のみは構成区分見出しとする。

6.2 原稿の書き方

6.2.1 文章および文字

文章は平易かつ簡潔な「である」調とする。英字、数字は原則として半角とする。

6.2.2 専門用語は原則として文部科学省学術用語審議会編「学術用語集」による。略語又は記号を用いるときは、最初に用いる箇所で正式名称を書き、かっこ内に略語や記号を示す。

6.2.3 化合物名は原則としてIUPAC（国際純正応用化学連合）命名法に従い日本語で書く。

本文中では化学式を用いず、名称を用いて書く。長い化合物名の場合は、6.2.2に準じて略語を用いてもよい。また、化合物の名称として、一般に使用されるものを用いてもよい。

6.2.4 外国の人名、会社名などはアルファベット表記とする。ただし、例のように、周知の術語となっている人名はカタカナ書きでもよい。人名には敬称をつけない。

〔例〕 ケルダール分解法、ソモギー法、モール法、フェーリング液など

6.2.5 本文中に図、表を引用する場合、図、表が英文で書かれている場合は Fig. 1, Table 1 とし、和文で書かれている場合は図1, 表1とする。挿入位置を原稿用紙の右余白に Fig. 1, Table 1, 図1, 表1 のように指示する。

6.2.6 物理量の記号および使用上の規約は、なるべくIUPACの勧告に従う。付記1および「物理化学で用いられる量・単位・記号」（社）日本化学会標準化専門委員会監修、朽津耕三訳、（講談社サイエンティフィック、東京）（1991）、要約版は、化学と工業、42（3）、498-506（1989）。以下「IUPAC手引き」と略称）を参照する。

6.2.7 単位は付記2に準拠する。

6.2.8 動植物名は「文部科学省学術用語審議会編：学術用語集-動物編、植物編-大日本図書」「園芸学会編：園芸作物名編-養賢堂」などを参照し、カタカナ書きとする。学名は例1のように属（第1字目を大文字とする）、種、変種、亜変種の部分にイタリック書体とする。

〔例1〕 リンゴ→*Malus domestica* Borkh.

ウンシュウミカン→*Citrus unshiu* Marc.

動植物体の加工品は〔例2〕のように原則としてひらがなまたは漢字を用いる。

〔例2〕 コムギ→こむぎ粉、小麦粉

サケ→塩さけ

6.2.9 微生物の名称および用語については「日本細菌学会用語委員会編：最新版英和英微生物学用語集（菜根出版、東京都千代田区平河町1-8-13 和田ビル）」などによる。また微生物の学名は、例のようにイタリック書体とする。

〔例〕 微生物の属名のみを記載する場合

Aspergillus sp.

属・種名を記載する場合

Aspergillus oryzae

亜種・変種などを記載する場合

Bacillus cereus var. *mycoides*

特定の菌株などを記載する場合

Escherichia coli K-12

6.2.10 酵素の分離精製，諸性質の解明および応用に関する論文では，対象酵素の酵素番号および系統名を必要箇所に記述する。酵素番号および系統名は国際生化学連合 (I.U.B.) 酵素委員会報告 “Enzyme Nomenclature Recommendations (1984) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Academic Press (1984)” に準拠する。

〔例 1〕 グルコースイソメラーゼ (E.C. 5.3.1.5, D-Xylose ketol-isomerase)

論文で用いている酵素名が系統名と異なることから，酵素番号と系統名を記述する。

〔例 2〕 トリプシン (E.C. 3.4.21.4)

論文で用いている酵素名が系統名と同一のため，酵素番号だけを記述する。

6.2.11 数および数式については，付記 3 および 6.2.6 の「IUPAC 手引き」を参照する。

6.2.12 引用文献番号は引用順に通し番号とし，本文中の該当箇所に「¹⁾²⁾」，「^{1)~3)}」，「^{1)3)~5)7)}」のように上付きで指示する。本文の最後に「文献」としてまとめて書く。文献の書き方は付記 4 に従う。引用する文献は直接参照したものに限る。

6.2.13 本文中の脚注は原則として用いないが，やむを得ない場合には本文中の項目の右肩に*，**を用い，例のように書く。

〔例〕

(本文) ○○○○○○*，○○○	
脚 { *○○○○○○○○○	}
注 { ○○○○○○	
注 { ○○○○	
(本文) ○○○○○○	

6.2.14 本文原稿は欄外にページ番号をつける。

6.2.15 各ページには行番号をつける。

7 図，写真および表

7.1 図と表は最小限にとどめ，同一内容のものはいずれか一方とする。

7.2 図・写真と表は，A4 サイズに原則ひとつずつとする。英文で図と表を作成する場合は，本文と独立して内容が理解できるような説明文を簡潔に書く。

7.3 図および写真

7.3.1 全ての図は，同一縮尺となるように調整し文字も印刷されたときを考慮し，大きさに気を付ける。印刷された文字の縦長が 1.5 mm 以下とならないようにする。グラフの縦軸の説明文字や物理量 / 単位は下方から上方へ向かって，横軸のそれは左から右へ横書きとする（ただし，

目盛の数字はこの限りでない）。

カラーの図の印刷料金は，付表 1 による。

7.3.2 図・写真と表はコンピュータ画面上でも審査可能な鮮明なものとする。

また，これらは印刷時により解像度の高いものと差し替えることが可能である。カラー印刷も可能であるが，印刷費用は著者が負担する。カラー印刷料金については付表 1 による。

7.4 表

7.4.1 表は原則として A4 判を用いる。

7.4.2 表の題名は，表 1 又は Table 1 として表の上部に，説明などの注記は下部に書く。英文の場合，表題および表中の語句は最初の文字を大文字とし，以下は小文字とする。

8 掲載料

掲載料は付表 2 による

9 別刷

別刷の注文は「別刷注文書」によって行う。

別刷料金は付表 3 による。

10 その他

刷り上がり 1 頁は，本文の場合，702 字詰め用の紙 3 枚，図表原稿の場合，4 枚に相当する。

著者校正は一度だけ行う。英文要旨および英文で書かれた図表については，英文校閲をすませているので，これに従う。

〔付記 1〕 物理量とその記号

1.1 物理量の記号は，論文ごとに定義を明示してから用いる。記号はラテン文字又はギリシャ文字の 1 字（ただし pH は例外）とし，必要な場合に添字（ラテン文字，ギリシャ文字，アラビア数字，ローマ数字から選ぶ），その他の記号をつけることができる。

1.2 物理量の記号は，イタリック体（斜体）で印刷するが，添字についてはそれ自体が物理量を表わすときはイタリック体とし，そうでない場合はローマン体（立体）とする。

1.3 物理量の値は，数値と単位の積である。物理量およびそれを表す記号は，特定の単位の採用を意味するものであってはいけな。例：“長さを l とする” は正しいが，“cm で測った長さを l とする” は誤りである）

1.4 物理量の記号は 6.2.6 の「IUPAC 手引き」の 2 章に記載されているものについては，できるだけこれに準拠する。記載されていない物理量の記号は，1.2 の原則に従ってなるべく慣用されているものを用いる。

「IUPAC 手引き」の 2 章から抜粋した記号を以下に示す。

(1) 空間と時間		
長さ	length	l
高さ	height	h
半径	radius	r
直径	diameter	d
面積	area	A, A_s, S
体積	volume	V
時間	time	t
速度	velocity	v, u, w, c
(2) 力学		
質量	mass	m
密度	(mass) density	ρ
相対密度	relative density	d
力	force	F
圧力	pressure	p, P
重量	weight	G, W
運動エネルギー	kinetic energy	E_k, T, K
弾性率	modulus of elasticity	E
粘性率・粘度	viscosity	η, μ
(3) 一般化学		
要素粒子の数	number of entities	N
物質質量	amount of substance	n
モル質量	molar mass	M
相対分子質量	relative molar mass,	M_r
(分子量)	(molecular weight)	
相対原子質量	relative atomic mass,	A_r
(原子量)	(atomic weight)	
(溶質) B のモル濃度	amount (of substance)	
	concentration of B,	$c_B, [B]$
(略して B の濃度)	(concentration of B)	
解離度	degree of dissociation	α
(4) 熱力学		
熱	heat	q, Q
仕事	work	w, W
熱力学温度	thermodynamic temperature	T
熱容量	heat capacity	C_p, C_v
浸透圧	osmotic pressure	Π
(相対) 活量	(relative) activity	a
平衡定数	equilibrium constant	K
(5) 電気と磁気		
電荷	electric charge	Q
電流	electric current	I
電位	electric potential	V
電気容量	capacitance	C
誘電率	permittivity	ϵ
抵抗	resistance	R
抵抗率	resistivity	ρ
(6) 電磁放射		

波長	wavelength	λ
放射エネルギー	radiant energy	Q
透過率	transmittance, transmission factor	τ
吸光率	absorptance, absorption factor	α, R
吸光度 (常用対数) (decadic)	absorbance	A
吸光係数, 吸収係数	absorption coefficient	ϵ
モル吸光係数 (常用対数)	molar (decadic)	
	absorption coefficient	

【付記2】 単位および単位記号の書き方

2.1 現在, 単位は国際的に SI [国際単位系を表す記号 (symbol)] であって, 略号ではないので, どの国語でも SI と書く] 単位に統一されつつあるが (参考文献 1) を参照), ここでは SI および慣用されている単位の主なものを記載した. 論文の作成に当たっては, ここに記載した単位を選んで使用する. なお, ここに記載していない特定の量を表す単位については, 著者が論文中に定義を明確に示してから用いる.

2.2 単位記号はローマン体 (立体) で印刷し, 複数を意味する場合でも形を変えてはいけない. 又, 文末にくるとき以外はピリオドをつけない.

[例] 5 cm とし, 5 cms, 5 cm., 5 cms. とはしない.

2.3 接頭語と単位記号の間にはスペースをおかない.

2.4 2つの単位の積を示すときはセンターピリオドをおく.

[例] N・m とし Nm としない.

2.5 2つの単位の商はスラッシュ (/) 又は割算の横線 (—), あるいは⁻¹で示す. / は決して 2 回以上使用しない.

[例] m/s, $\frac{m}{s}$, m·s⁻¹

J/(K·mol) または J·K⁻¹·mol⁻¹ とし, J/K/mol としない.

2.6 SI 接頭語

大きさ	接頭語	記号	大きさ	接頭語	記号
10 ⁻¹	デシ	d	10	デカ	da
10 ⁻²	センチ	c	10 ²	ヘクト	h
10 ⁻³	ミリ	m	10 ³	キロ	k
10 ⁻⁶	マイクロ	μ	10 ⁶	メガ	M
10 ⁻⁹	ナノ	n	10 ⁹	ギガ	G
10 ⁻¹²	ピコ	p	10 ¹²	テラ	T
10 ⁻¹⁵	フェムト	f	10 ¹⁵	ペタ	P
10 ⁻¹⁸	アット	a	10 ¹⁸	エクサ	E

2.7 単位と単位記号の表

表中の * 印は SI 基本単位を示し, ** は SI 組立単位で固有の名称と記号をもつものを示した.

(参考文献)

1) 国際単位系 (SI) - グローバル化社会の共通ルール - 日本語版国際文書第 7 版, 日本規格協会発行 (1998)

単位と単位記号の表

量	単位の名称 (SI 単位の定義)	単位記号		
長	さ			
	メートル (meter)*	m		
	マイクロメートル (micro meter)	μm		
面	積			
	ナノメートル (nano meter)	nm		
	平方メートル (square meter)	m^2		
	アール (are) ヘクタール (hectare) } (土地面積に限定)	a ha		
体	積			
	立方メートル (cubic meter)	m^3		
	リットル (liter), (dm^3)	l, L		
	キロリットル (kiloliter), (m^3)	kl, kL		
	ミリリットル (milliliter), (cm^3)	ml, mL		
平	面	角	マイクロリットル (microliter), (mm^3)	μl , μL
			ラジアン (radian)**	rad
			度 (degree)	°
			分 (minute)	'
立	体	角	秒 (second)	"
			ステラジアン (steradian)**	sr
			秒 (second)*	s
			分 (minute), (60s)	min
時	間	時 (hour), (3600s)	h	
		日 (day), (86400s)	d	
		ヘルツ (hertz)**, (s^{-1})	Hz	
		メガヘルツ (megahertz)	MHz	
周	波	数	回毎分 (revolutions per minute)	rpm
			質量	
回	質	量	キログラム (kilogram)*	kg
			グラム (gram)	g
			ミリグラム (milligram)	mg
			マイクログラム (microgram)	μg
			トン (ton), (Mg)	t
			モル (mole)*	mol
濃	度	(g 分子, g 原子, g イオン, 「当量」などの語は SI 単位では廃止された)		
		・モル濃度 (molar concentration または molarity……1 L の溶液の中に含まれる溶質のモル数)	mol/l, mol/L	
		(規定濃度 N は用いない)		
		・パーセント (percent) … (溶液中の 2 つの量の比)×100, を意味する. パーセントを使う時は, 次のように, 重量と重量の比か, 容量と容量の比かを明確にして用いる.	%	
		・重量パーセント	% (w/w)	
		・容量パーセント	% (v/v)	
		・(重量 / 容量) パーセント	% (w/v)	
		・(容量 / 重量) パーセント	% (v/w)	
		・溶液 100 g 当たりの溶質のミリグラム	mg/100 g	
		・溶液 100 mL 当たりの溶質のミリグラム (mg% は用いない)	mg/100ml, mg/100mL	
・parts per million } (何の比率か明示する)	ppm			
・parts per billion }	ppb			
・parts per trillion }	ppt			

量	単位の名称 (SI 単位の定義)	単位記号
力	ニュートン (newton)**, ($\text{kg} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-2}$)	N
圧力・応力	パスカル (pascal)**, ($\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$)	Pa
粘度	パスカル秒	Pa·s
エネルギー・熱量	ジュール (joule)**, ($\text{kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$)	J
温度	カロリー (calorie), (4.184 J) (栄養・代謝に限定)	cal
	ケルビン (Kelvin)*	K
	摂氏 (Celsius), ($0^\circ\text{C} = 273.15\text{K}$)	$^\circ\text{C}$
電流	アンペア (ampere)*	A
電荷・電気量	クーロン (coulomb), ($\text{s} \cdot \text{A}$)**	C
電位差, 起電力	ボルト (volt), ($\text{J} \cdot \text{A}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)**	V
静電容量	ファラド (farad), ($\text{A} \cdot \text{s} \cdot \text{V}^{-1}$)**	F
電気抵抗	オーム (ohm), ($\text{V} \cdot \text{A}^{-1}$)**	Ω
工率, 放射束	ワット (watt)**	W
インダクタンス	ヘンリー (henry), ($\text{V} \cdot \text{A}^{-1} \cdot \text{s}$)**	H
コンダクタンス	ジーメンズ (siemens), ($\text{A} \cdot \text{V}^{-1} = \Omega^{-1}$)**	S
光度	カンデラ (candela)*	cd
光束	ルーメン (lumen), ($\text{cd} \cdot \text{sr}$)**	lm
照度	ルクス (lux), ($\text{m}^{-2} \cdot \text{cd} \cdot \text{sr}$)**	lx
光の波長	マイクロメートル (micrometer)	μm
	ナノメートル (nanometer)	nm
放射能, 放射線	ベクレル (becquerel, 放射性核種の放射能)**, (s^{-1})	Bq
	グレイ (gray, 吸収線量)**, ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2} (= \text{J} \cdot \text{kg}^{-1})$)	Gy
	カウント毎分 (counts per minute)	cpm
	シーベルト (sievert; 線量当量)**	Sv

【付記 3】 数と数式

- 3.1** 小数点は 0.101 とし, .101 とはしない。
- 3.2** けた数の区切りは 5 530 000 とし, 5,530,000 としない。
- 3.3** 積は 101.325×10^8 とし $101.325 \cdot 10^8$ としない。
- 3.4** 範囲を示す場合は $(1.0 \sim 1.5) \times 10^8$ 又は $(25 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ と書く。
- 3.5** 数学的演算子 (d, Δ など) および数学的定数 (e, π , i など) は, ローマン体で印刷する。
- 3.6** 商を表わす斜線 (/) を用いるとき, 混同を避けるためかっこを必要とする。
 $\cdot a+b/c+d (=a+bc^{-1}+d$ と混同する) とせず $(a+b)/(c+d)$ とする。
 $\cdot (a/b)/c$ は $a/b/c$ としてはならない。
- 3.7** 二重の添字になる書き方はできる限り避ける。

【付記 4】 引用文献の記載法

4.1 著者名

和文著者名は, 姓名共に書き, 英文著者名は姓を先にし, ついで first および middle name のイニシャルを書く。著者が複数の場合は, 各著者名の間に「,」を入れる。ただし,

英文の場合, 最後の名前の前は and のみを入れる。

4.2 論文題名

引用論文の題名を書く。

4.3 雑誌名

和文雑誌名は原則として略さない。欧文雑誌の略名は原則として最近の国際規格の ISO 4, およびそれに準拠して ISSN 国際センターが作成する目録マニュアル「ISSN Manual. Cataloguing Part」と略語表「List of Title Word Abbreviations」(<http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>) に従う。略記形が不明の場合は, 略記せずに完全誌名を記述する。

同じ雑誌が連続して引用される場合も“同上”, “ibid.”は用いないで繰返して書く。

4.4 巻数, 頁数, 発行年

巻数はボールド体で書く。巻数を表記しない雑誌では, 巻数の位置に発行年を西暦で書く。頁数は引用論文の最初と最後の頁数を - で結んで書き, 次いで発行年を () で書く。

4.5 単行本の場合

著者名, 章のタイトル, 書名, 版数, 巻数, 編集者名, 出版社, 発行地, 頁数 (最初と最後), 発行年の順に書く。

4.6 特許の場合

特許権者または出願者名，題名，特許番号または公告番号，年月日の順に書く。

4.7 学会講演要旨集等の場合

学会要旨等は原則として引用しない。やむを得ず引用する場合は，講演者名，題名，学会大会資料名，頁数（複数頁の場合は最初と最後の頁数を - で結ぶ），開催地，開催年の順に書く。

4.8 文献記載例

- 1) ミネ子，薩摩橙大，温州みかんのカロチノイドに関する研究（第2報）近赤外線照射による温州ミカン果皮カロチノイドの変質，日本食品科学工学会誌，**48**，123-456（2001）。
- 2) Yoshida, K., Kirimura, O. and Danna, G., Change in the amount of SDS-insoluble membrane components by oxidants during breadmaking. *J. Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 99-999（2001）。
- 3) 佐藤昌康，味の知覚，「味覚の生理学」，第1版（朝倉書店，東京），pp. 1-22（1991）。
- 4) Mendel, D.S., Gene and chromosome. In "Introduction to quantitative genetics," 1st ed. (Ronald. Press. Co.), pp. 9-99（1999）。
- 5) 三井清司，色素分析一般，「植物色素-実験・研究への手引き」，第2版，林 孝三編，（養賢堂，東京），pp. 93-150（1988）。
- 6) Yokota, T., Brassinosteroids. In "Comprehensive natural products chemistry," Vol. 8, eds. Barton, D.H. R., Nakanishi, K. and Meth-Cohn, O. (Vol. ed., Mori, K.), Pergamon, pp. 99-107（1999）。
- 7) 藤山京司，早乙女成弘，上島輝光，小谷悠久，浸透圧の測定方法及び装置，特許第2802344号（2001.1.11）。
- 8) 深海潜太，食品花子，水産勝尾，畜産育雄，東京湾雑魚の魚種および異なる醤油麹が魚醤油の品質と成分に及ぼす影響，日本食品科学工学会第48回大会講演要旨集，p. 47，香川（2001）。

4.9 雑誌略名例

ボールド部分のみ残し，イタリックの部分は略す。単語の途中で略した場合はピリオドを打つ。

Agricultural and Biological Chemistry

Analytical Biochemistry

Analytical Chemistry

Applied and Environmental Microbiology

Archives of Biochemistry and Biophysics

Bakers Digest

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry

Biochemical and Biophysical Research Communications

The Biochemical Journal

Biochemistry

Biochimica et Biophysica Acta

Biotechnology and Bioengineering

Carbohydrate Research

Cereal Chemistry

European Journal of Biochemistry

FEBS Letters

Federation Proceedings

Food Science and Technology International, Tokyo

Food Science and Technology Research

Food Technology

Food Technology in Australia

HortScience

International Journal of Food Science and Technology

Journal of Agricultural and Food Chemistry

The Journal of Applied Bacteriology

Journal of Bacteriology

The Journal of Biochemistry

The Journal of Biological Chemistry

The Journal of Cell Biology

Journal of Chromatographic Science

Journal of Chromatography

Journal of Dairy Science

Journal of Fermentation and Bioengineering

Journal of Food Science

Journal of Food Technology

Journal of General Microbiology

Journal of Lipid Research

Journal of Molecular Biology

Journal of Nutrition

Journal of Stored Products Research

Journal of Texture Studies

Journal of the American Chemical Society

Journal of the American Oil Chemists Society

Journal of the American Society for Horticultural Science

Journal of the Association of Official Analytical Chemists

Journal of the Science of Food and Agriculture

Lipids

Nature

Phytochemistry

Plant and Cell Physiology

Plant Physiology

The Rice Journal

Science

Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung

4.10 引用 URL

データベースやホームページなどは更新・削除され，参照できなくなる恐れがあるので，引用はできるだけ避ける。

引用する際には、引用 URL 番号は引用順に通し番号とし、本文中の該当箇所に、「ⁱ⁾」, 「^{i)~iii)}」, 「^{i)iv)~vi)}」のように上付きで指示する。「文献」の次に「引用 URL」と書き、URL をまとめて書く。なお、該当する情報を入手した年月日を括弧内に記入する。

記載例

引用 URL

- i) <http://www.jsfst.or.jp/journal/index.html> (2008. 9. 3)

【付記 5】 印刷上の活字の指示

特別な理由のない限り、立体のギリシャ文字は次のものに限る。

$\Gamma, \Delta, \alpha, \beta, \gamma, \delta, \mu, \Pi, \pi, \Sigma, \Omega$

上付き又は下付き記号としては、原則として次のものを用いることができる。

マル	・	′	″	∞	*	
+	-	†	‡	Φ		
			ダガー	ダブルダガー	プリムソル	

付 表

付表1 カラー（原色版）印刷料金（円）

カラー印刷 1頁 60 000 円	・2頁以上で表裏印刷とならない場合、 追加1頁当たり 30 000 円 ・表裏印刷となる場合は、1枚2頁で 2×60 000 円
2色カラー印刷 1頁 40 000 円	・2頁以上で表裏印刷とならない場合、 追加1頁当たり 20 000 円 ・表裏印刷となる場合は、1枚×2頁で 2×40 000 円

付表2 掲 載 料 (円)

頁 数	報文、技術論文	研究ノート、速報
2 以下	5 000	5 000
3	5 000	17 000
4	5 000	29 000
5	5 000	41 000
6	17 000	*
7	29 000	*

*以後1頁加えるごとに12 000円を加算する

付表3 別刷価格表（抜粋）

(円)

	50部（表紙なし）	100部（〃）	150部（〃）	200部（〃）
2頁	2 800	3 800	5 300	6 800
4頁	3 800	5 300	7 300	8 800
6頁	4 800	6 800	9 300	10 800
8頁	5 800	8 300	11 300	12 800
表紙付き加算	3 000	3 800	4 700	5 600

(注) 一件につき手数料 800 円含む

フルカラー頁を含む別刷りの場合は、1部につき 40 円を加算する

2色カラー頁を含む別刷りの場合は、1部につき 30 円を加算する

付表4 英文校閲料（円）

1編	2 650
----	-------

食品総合研究所研究報告

第79号

平成27年3月 印刷 平成27年3月 発行
(非売品)

編集者 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

発行者 食品総合研究所

所長 大谷敏郎

(〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12)

印刷所 茨城県筑西市中館185-6

朝日印刷株式会社

本誌より転載・複製をする場合は食品総合研究所の許可を得て下さい。

