

(論文内容の要旨)

日本酒や甘酒は、米を原料とする日本文化には欠かせない伝統的な発酵食品である。これら発酵食品の製造方法や風味・機能性における特徴を科学的に理解することは、発酵文化の発展のために重要である。本研究では、日本酒の伝統的な酵母スターターである山麴酒母における細菌叢の変遷について新たな知見を得るとともに、日本酒と甘酒の機能性・抗酸化能に寄与する主要な成分を明らかにした。

1. 山麴酒母製造時の細菌叢および化学成分の変化

酒蔵で製造された山麴酒母の細菌叢の16S リボソーム RNA 遺伝子メタゲノム解析と化学成分分析を初めて同時に実施し、仕込み年が異なるにもかかわらず乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* が最終的に優占種となる微生物叢のロバスト性を明らかにした。また、酒母製造工程中に *L. sakei* がアルギニンデイミナーゼ (ADI) 経路を酸耐性機構として利用していることを強く示唆される新たな知見を得た。一方、様々な酒蔵で製造された米麴を使用して本学研究室にて山麴酒母を仕込んだ結果、いずれも乳酸球菌 *Leuconostoc* 属が優勢化するという酒蔵仕込みの酒母と異なる結果を得た。統計解析を行ったところ、糖化度合い (グルコース濃度)、アミノ酸要求性、および ADI 経路による酸耐性機構が、また過去の報告により酒母中の亜硝酸の有無が、両乳酸菌種の優勢化に複合的に関与する可能性が示唆された。そこで、糖化度合い、アミノ酸濃度、および亜硝酸濃度が異なる米糖化物に、山麴由来の *Leuc. mesenteroides* と *L. sakei* の接種試験を行ったところ、*L. sakei* の存在は明らかに *Leuc. mesenteroides* の生育を阻害するが、糖化度合いやアミノ酸要求性よりも *L. sakei* の生酸による迅速な pH 低下が生育阻害に強く関与することが示唆された。*L. sakei* が発現する ADI 経路や酒母中における亜硝酸の存在が優占菌種に与える影響については明確化するには至らず、*L. sakei* の ADI 経路欠損株を作製するなどして今後追跡する必要があると考えている。本研究および他の研究でこれまでに得られている知見を総合し、山麴酒母製造中期に速やかかつ適切なタイミングで加温操作を実施することにより *L. sakei* の生育を迅速に誘導することが、両乳酸菌種の優勢化を左右し得る最も重要な要因であることが強く示唆された。

2. 日本酒および甘酒のラジカル吸収能と寄与成分

日本酒に含まれる抗酸化成分がラジカル吸収能に与える影響を理解するために、日本酒のラジカル吸収能と既知抗酸化成分量の測定を行い、各抗酸化成分の寄与率を評価した。その結果、4種の抗酸化を有するアミノ酸 (Cys, Met, Tyr, および Trp) の酸素ラジカル吸収能 (H-ORAC) に対する寄与率が、これまで主要な抗酸化成分と考えられてきたフェノール酸 (フェルラ酸および *p*-クマル酸) よりも顕著に高いと予測された。実際に、これら抗酸化アミノ酸を調合した溶液の H-ORAC を測定した結果、合計寄与率は26-52%となり、アミノ酸が日本酒における主要な抗酸化成分の一部を占めることが明確となった。また、メイラード反応の産物が日本酒の抗酸化能に寄与しないことも示した。さらに、日本酒製造の中間産物である甘酒類についても同様の結果が得られ、米と水のみを原料とする日本酒・甘酒では共通して、アミノ酸含有量を変数とした高い精度の H-ORAC 予測式が得られた。これらの事実は、ラジカル吸収能が米麴由来酵素によるタンパク質の分解度 (抗酸化アミノ酸・ペプチドの生成) に依存することを強く支持しており、米糖化物を基軸とした発酵製品の抗酸化能を高めるための手法の考案に繋がった。

(論文審査の結果の要旨)

学位授与申請者である辻篤史氏は、我が国で広く消費されている発酵飲料である日本酒（清酒）や甘酒など、米を原料とした発酵物の科学的詳細に迫る研究を本学大学院において遂行した。辻氏は、清酒の伝統発酵酒母である「生もと系酒母・山廃酒母」における主要優勢乳酸菌 *Lactobacillus sakei* 種に着目し、本菌種の米糖化物中における優勢化にとって重要な条件を新たに提示した。従来、生もと系酒母においては *Leuconostoc* 属乳酸菌の優勢化のみが見られるケースもあり、*L. sakei* との栄養要求性の差などから優勢化要因の検討がなされた研究例も存在していた。しかし、本研究において辻氏が取得した結果から、*L. sakei* の十分な生育と本菌種による生産を誘導するための発酵中期における迅速な加温操作がより重要であるという新たな可能性が提示された。また、生もと系酒母の発酵初期における硝酸還元菌の存在にロット間において可変性があること、同じ酒蔵由来の米麴を使用しても酒蔵仕込と研究室仕込の酒母では優勢化する乳酸菌種に相違がみられることなど、酒母中における細菌叢の多様性について以前の報告にみられない多数の事象を見出した。さらに、*L. sakei* のオルニチン生産性に着目して、低 pH 環境の酒母中での生存性に本代謝経路（アルギニン・デイミナーゼ経路）が関わる可能性を示唆するなど、生育特性だけでなく代謝レベルでの考察を加えたことも今後の清酒醸造の研究にとって有益であると考えられる。微生物叢の解析において、確度および網羅性の高い高速シーケンサーを採用したことも、研究成果の信頼性を向上させるうえで重要な点として挙げられる。

さらに、清酒や甘酒の抗酸化性についても辻氏は成分レベルにおける寄与率というユニークな観点で研究を展開し、これまで主要抗酸化物質として注目されてきたフェノール酸類よりも、米麴由来のプロテアーゼによる原料消化に伴って生成するアミノ酸・ペプチドにおいてラジカル吸収能への寄与率が有意に高いことを見出した。本結果は、これまでに存在する清酒抗酸化成分の研究においても未だ見出されていなかった新規知見であり、米発酵物を用いて抗酸化能を高めた発酵製品を今後開発する上でも、重要な成果であると考えられる。ラジカル吸収能の実測値とアミノ酸量の明確な相関や、それを示さない例外ケースの扱いなども適切に考察されている。

以上の辻氏の本学博士課程での研究において評価すべき点として、これまでに長い清酒研究の歴史が我が国に存在するにもかかわらず見過ごされてきた、多数の微生物学および化学成分的な未解明事項に焦点を当て、的確に解明に迫ったことが挙げられる。このような研究姿勢は、伝統発酵食品を対象とする研究者の資質に合致するものであり、本学博士号を有するに値すると考えられる。なお、上記の研究成果は学術雑誌原著論文 1 報として受理掲載されている。

よって、本論文は博士（生物資源環境学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、令和元年 7 月 24 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。