

論文の内容の要旨

論文題目 酵素を用いた呈味成分の改質と微生物を用いた香気物質の生産に関する研究

氏名 駒井 強

本論文は微生物・酵素を用いた食品素材の呈味成分の改質と香気物質の生産に関する研究であり、第1章「酵素を用いた呈味成分の改質」として第1節「スルメイカ肝臓由来カテプシンDの精製とその遺伝子的解析」、第2節「スルメイカ肝臓由来カルボキシペプチダーゼの精製とその利用」、第2章「微生物を用いた香気物質の生産」として第1節「微生物を用いたメチルケトン類の生産」、第2節「微生物によるキラルビルディングブロックの生産と応用」からなっている。

食品には栄養、嗜好、機能が保持されねばならない。加工食品の開発時に、最も重要視されるのは「おいしさ」であり、主要素である呈味と香気をコントロールすることが、開発食品をヒットに導く。一方、20世紀の科学技術の発展によって、人類は豊かな生活を手に入れた。しかし、その代償として地球環境は、破綻の危機を迎えている。地球環境に優しい化学として、グリーンケミストリーが推進されている。環境に負担となる廃棄物を出さず、エネルギー節約、リサイクルを考慮し、化学物質を生産する試みである。

著者は、このような背景から廃棄物から得られる酵素を用いた食品に不可欠な呈味成分の改質とグリーンケミストリー触媒である微生物を用いた香気物質の生産を研究した。

第1章「酵素を用いた呈味成分の改質」の第1節「スルメイカ肝臓由来カテプシンDの精製とその遺伝子的解析」では、イカ肝臓由来カテプシンDの精製とその遺伝子的解析について述べた。スルメイカは日本でもっとも多い漁獲高を誇る水産物であるが、肝臓を含む臓器はほとんど廃棄される。この廃棄物である肝臓の有効利用を目指し、酵素の検索を行った。結果、アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンDの存在を明らかにし、単離精製を経て、諸性質を解析するとともに、スルメイカ肝臓よりカテプシ

ン D の cDNA を得た。Pre-Pro 域を含む全アミノ酸配列は 392 アミノ酸残基からなり成熟酵素は 334 アミノ酸残基からなることを解明した。さらに、他種生物のカテプシン D との相同性を対比し、無根系統樹を作成して本カテプシン D は節足動物のそれに近いことを示した。スルメイカ肝臓のカテプシン D を Todarepsin と命名し、塩基配列を DDBJ に ACCESSION No. AB106552 で登録した。

第 2 節では、「スルメイカ肝臓由来カルボキシペプチダーゼの精製とその利用」について述べた。第 1 節同様に、食品工業に利用できる酵素を目指し、スルメイカ肝臓中を探索し、カルボキシペプチダーゼを発見するとともに、分離精製した。本酵素はセリンカルボキシペプチダーゼであり CPase Tpa と命名した。食品工業では、機能性食品の取り扱いが活発であるが、おいしく、栄養機能に優れた食品を作ることは使命である。生物にとってタンパク質は重要な栄養源であるが、消化酵素による分解が必要であり、その吸収は容易ではない。一方、このタンパク質を酵素であらかじめ加水分解することによって、その利用を容易にする方法が行われている。しかし、この手法によって生成するペプチドは栄養価こそ高いが、時として、苦味を伴う場合があり、食用に適さない。CPase Tpa はこの易吸収性ペプチドの苦味を除去する可能性があるとして、その基質特異性から考え、利用を検討した。大豆タンパク質、カゼイン、コーングルテンをエンド型プロテアーゼで加水分解して苦味ペプチドを得た。これに、CPase Tpa を作用させて、その苦味を除去または低減することができた。このように動物の臓器からセリンカルボキシペプチダーゼを得て食品工業に応用した例は他にはないと考えている。

第 2 章ではグリーンケミストリーである「微生物を用いた香気物質の生産」について述べた。食品の香気は食品そのものを認識させ、特徴づけるもので、必要不可欠である。この香気を付与するものが香料である。香料は天然物から抽出して得られる天然香料と有機合成によって得られる合成香料とがある。これらを調合して、香気を調整したものが調合香料である。天然香料の範囲には、有機合成を用いず自然界で起こる生化学的あるいは物理的プロセスに基づく、すなわち、酵素・微生物反応や加熱調理などによって天然原料から化学物質を生成させる「ナチュラル」と呼称される製法による香料がある。このような「ナチュラル」製法によって生産された香料は欧米では ナチュラルモレキュールズと呼ばれ、“Natural” 香料として表示できる。

このような背景から、第 1 節では、グリーンケミストリーかつナチュラル製法である「微生物を用いたメチルケトン類の生産」について述べた。メチルケトン類は、ブルーチーズや乳製品に欠くことのできない香気物質である。ブルーチーズでは *Penicillium roqueforti* が乳成分である乳脂肪の脂肪酸を酸化代謝して、炭素数の一つ少ないメチルケトンに変換する。このような微生物の発酵能を利用してメチルケトン類を製造を研究した。基質となる脂肪酸の供給源としてヤシ油を選択し、これをリパーゼで加水分解して脂肪酸を生成させ、さらに酸化によってメチルケトン類を生産する微生物をスクリーニングした。その結果、*Aspergillus* sp. KM-1 株を C7 メチルケトン(2-heptanone)生産優良株として選択した。

この株を用い、ヤシ油の含有量、培養基、培養方法の検討・設定を行い、ヤシ油を基礎培地に対し 30%含有する培地で、C7 メチルケトンをヤシ油中のカプリル酸から 86%の変換率で生産することができた。これを踏まえ、実製造が可能となり、分離精製して C7、C9、C11 メチルケトンをそれぞれ香料として上市することができた。さらに、1 バッチでの収量向上を目指し、ヤシ油含有量を上げ、基礎培地に対し、ヤシ油 200%まで増量し、生産性を向上させることが可能となった。

第 2 節では、グリーンケミストリーである「微生物によるキラルビルディングブロックの生産と応用」について述べた。光学活性物質は自然界に存在し、生命体の構成成分であるとともに種々な機能を持つ。光学活性な医薬品、フェロモン、そして光学活性香料などを目的とした有機合成においては、一つの方法として、純粋な光学活性出発物質としてキラルビルディングブロックが必要である。ここでは、2-メチル酪酸 **1** をキラルビルディングブロックとして取り上げ、微生物不斉資化法による生産を検討するとともに、調製した (*R*)-**1** を応用した種々の光学活性香料物質の合成とその香気評価について述べた。微生物は種々の化学物質を資化代謝できる性質を持っているとともに、光学活性認識能もある。この性質を利用してラセミ体 **1** を原料にキラルビルディングブロックとなり得る光学活性な **1** の生産を検討した。(±)-2-メチル酪酸を資化する微生物を土壌から 113 株分離した。さらに (±)-2-メチル酪酸資化培養後の残存 2-メチル酪酸の鏡像体純度を測定したところ、(*R*)-体を 100% e.e. で残存させている菌株 2 株を得た。収率が良好である菌株を同定し、*Pseudomonas* sp. TH-252-1 株とした。この菌株を(±)-2-メチル酪酸を基質に培養し、5.8g/L の収量で、鏡像体純度 100% e.e.、収率 29% (基質がラセミ体であることを考慮すると 58%) で (*R*)-**1** が得られた。すでに、種々の果実類の香気成分として見出されている (*S*)-**1** は市販されていて、重要な香料素材でもある。(*R*)-**1** が得られたことによりその両鏡像体の香気の差異が明らかとなった。次に、(*R*)-**1** と市販 (*S*)-**1** をキラルビルディングブロックとして香気物質の両鏡像体を合成し、香気について研究した。ホウノ木の花の香気成分である 2-メチルブタノール **2** と 2-メチルブチルベンゾエート **3** 立体配置を決定する目的で、**2** および **3** のそれぞれの (*R*)-体、(*S*)-体を合成した。天然物と合成品のキラルガスクロマトグラフィー比較から、ホウノ木の花の **2** および **3** はともに (*S*)-体過剰であることが判明した。また、両鏡像体の香気を比較し、差異があることを確認した。果実に存在するエチル 2-メチルブチレート **4** の (*R*)-体を合成し、市販 (*S*)-**4** と香気を比較し、差異を明らかにした。Filbertone((2*E*)-5-methyl-2-hepten-4-one) **5** は、ヘーゼルナッツの主要香気成分であり、ヘーゼルナッツの産地やロースト法によって **5** の鏡像体の存在割合は異なる。これの (*R*),(*S*)両鏡像体を合成し、香気を比較し香気と検出閾値に差異があることを明らかにした。このように (*R*)-**1** を生産することによって種々の光学活性香料物質の合成ができ、鏡像体間の香気の差異について比較研究することが可能となった。

以上のように食品に関与する呈味と香気の研究を生化学的な手法を取り入れて遂行してきた。一つには、環境問題を意識して、新しい酵素の供給源として、廃棄物から酵素を分

離精製し、呈味改善に利用することができた。一方、グリーンケミストリーとして、新しい微生物反応を開発した。微生物の発酵生産能を用いて、香料を実製造するプロセスを開発できた。さらに、微生物の光学活性認識能を利用した不斉資化法による光学活性物質の合成に重要なキラルビルディングブロックの生産を可能にし、有機合成に用いることによって、光学活性な香気物質の香気特性を明らかにした。今後も微生物・酵素と化学の関わりを深め、新たな開発と応用を推進したい。