



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Penicillium multicolor 由来

$\beta$ -ジグリコシダーゼによる有用配糖体の合成と分解  
に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鶴喰, 寿孝 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/3108">http://hdl.handle.net/20.500.12099/3108</a>

氏名(本国籍)	鶴 喰 寿 孝 (愛知県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第411号
学位授与年月日	平成18年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	<i>Penicillium multicolor</i> 由来β-ジグリコシダーゼによる有用配糖体の合成と分解に関する研究
審査委員会	主査 静岡大学 教授 碓 氷 泰 市 副査 静岡大学 助教授 村 田 健 臣 副査 岐阜大学 教授 加 藤 宏 治 副査 信州大学 教授 北 畑 寿 美 雄

### 論文の内容の要旨

植物香気前駆体であるβ-プリメベロシド二糖配糖体は、茶や花などに存在し、β-プリメベロシダーゼによる糖部とアグリコン部に水解されることにより、そのアグリコン部として香気を発する。従って、植物に微量にしか存在しないこの種の酵素を微生物に求め、大量生産することができれば、有用酵素の開発ということで応用展開が見込める。本研究は、微生物起原からβ-プリメベロシダーゼ様酵素を見出すとともに、その量産化に基づいて植物香気前駆体β-プリメベロシドの合成法の開発、本酵素の諸性質の解明、そして、大豆イソフラボン配糖体のアグリコンへの変換による食品の機能性の向上に関する研究と、3部に要約される。

#### 1. 植物香気前駆体β-プリメベロシド (Psd) の酵素合成

微生物起原をスクリーニングした結果、*Penicillium multicolor* IAM 7153 の培養液から *p*-ニトロフェニル (*p*NP) β-Psd を基質として、強力に水解・転移活性を有する本酵素を見出した。本転移活性を触媒素子として、供与体基質を *p*NP β-Psd、受容体基質を各種アルコール性香気あるいはフェノール性香気として、高基質濃度下で糖転移反応(プリメベロシル化)を行うと、直接ワンポットでプリメベロシド配糖体であるベンジル、2-フェニルエチル、(2*S*)-3-ヘキセニル、ゲラニル、及びオイゲニルβ-Psd が高い効率で生成されることを見出した。中でもベンジル、2-フェニルエチル、(2*S*)-3-ヘキセニルβ-Psd の収率は50-71%と高い効率であった。

## 2. $\beta$ -プリメベロシダーゼ様酵素 ( $\beta$ -ジグリコシダーゼ) の精製と酵素学的諸性質

*P. multicolor* IAM7153 の培養液を硫酸分画後、順次、疎水クロマト、イオンクロマト、アフィニティークロマトを行うことにより、SDS-PAGE 及びゲルろ過クロマト的に均一な酵素標品を得た。本酵素の基質特異性を解析したところ、 $\beta$ -プリメベロシダーゼの本来の基質である植物香気前駆体 $\beta$ -Psd 二糖配糖体を良好な基質とせず、人工基質である *p*NP  $\beta$ -Psd を最もよい基質とする特異な活性を有していた。このことから、本酵素は、植物起原 $\beta$ -プリメベロシダーゼというよりはむしろ、 $\beta$ -ジグリコシダーゼの一種であると結論付けた。

## 3. イソフラボン配糖体の特異的水解と大豆食品への応用

一連のイソフラボン配糖体に $\beta$ -ジグリコシダーゼを作用させたところ、イソフラボン $\beta$ -グルコシドのみならず、これらの誘導体である 6''-*O*-マロニル $\beta$ -グルコシドにも作用し、糖部とアグリコン部とに遊離する活性を有することを見出した。この水解特性を豆乳に適用したところ、イソフラボン $\beta$ -グルコシド及びこれらの 6''-*O*-マロニルグルコシド誘導体を極めて効率的に水解することが明らかになった。処理条件として、幅広い温度・pH 範囲を有し、高い効率でアグリコンへと変換できることを示した。さらに本酵素は、凍り豆腐のイソフラボン配糖体のアグリコンへの変換にも適用できることを明らかにした。

以上、植物香気前駆体を加水分解する酵素である $\beta$ -プリメベロシダーゼ様の酵素を微生物に求め、その量産技術の開発を手始めに、本酵素をツールとした植物香気前駆体である一連の有用二糖配糖体の合成法を確立し、更に本酵素を利用した豆乳中のイソフラボン配糖体の特異的分解による大豆食品の機能性を向上させる方法を開発した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

茶や花などで生産される $\beta$ -プリメベロシド (6-*O*-D- $\beta$ -xylopyranosyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, Psd) 香気前駆体は、 $\beta$ -プリメベロシダーゼによって加水分解され、香気を発生する。本論文では、この種の $\beta$ -プリメベロシダーゼ活性をもつ酵素を微生物起原に求め、大量生産法を考案するとともに、本酵素を用いた有用配糖体の合成法の確立、酵素の精製ならびに諸特性の解明、さらには本酵素の大豆食品への応用研究を行った。その内容は以下のように要約される。

第1章では、本来植物で生産される $\beta$ -プリメベロシダーゼ様酵素の探索を微生物起原からスクリーニングしたところ、*Penicillium multicolor* IAM7153 株の培養液から、*p*-ニトロフェニル(*p*NP)  $\beta$ -Psd を糖部 (プリメベロース) とアグリコン部 (*p*NP) とに分解する強力な水解活性を見出した。そこで、この培養液から調製した部分精製酵素標品を触媒素子とし、*p*NP  $\beta$ -Psd を供与体基質、各種アルコール性香気 (ベンジルアルコール、2-フェニルエチルアルコール、 $\alpha$ -3-ヘキセニルアルコール、ゲラニオール) 及びフェノール性香気 (オイゲノール) を受容体基質として、有機-水層の二層系での糖転移反応を行った。この反応により、一連の $\beta$ -Psd 香気二糖配糖体が効率よく生成することを

見出した。特に、ベンジル、2-フェニルエチル、(2)-3-ヘキセニル  $\beta$ -Psd の収率は高く、50-71%であった。

第2章では、*P. multicolor* IAM7153 株の培養液から  $\beta$ -Psd 糖転移活性を有する  $\beta$ -プリメベロシダーゼ様酵素の精製を行った。培養液を硫酸分画後、順次、疎水クロマト、MonoQ クロマト、 $\beta$ -ガラクトシルアミジンアフィニティークロマトを行うことにより、SDS-PAGE 及びゲルろ過クロマト的に均一な分子量 50000 でサブユニット構造を持たない精製酵素を得た。次に、本酵素の基質特異性を解析したところ、二糖配糖体である *p*NP  $\beta$ -Psd を最も良好な基質とすることを示した。しかし、上記合成した一連のアルコール性香気前駆体である第1章で合成した4種類の  $\beta$ -Psd (ベンジル、2-フェニルエチル、(2)-3-ヘキセニル、ゲラニル  $\beta$ -Psd) に対する相対水解活性は、*p*NP  $\beta$ -Psd の 1/1000 であることを示し、水解基質として評価できないほどの値であることを明らかにした。この事実は、第1章での一連の  $\beta$ -Psd の合成において、なぜ本酵素が高い収率で  $\beta$ -Psd を合成できるのかのヒントを与えるものであった。また、 $\beta$ -Psd 配糖体の動力学的解析の結果、本酵素は、*p*NP  $\beta$ -Psd を最も良い基質とする特異性の狭い酵素であり、茶由来の  $\beta$ -プリメベロシダーゼとは基質特性の異なる  $\beta$ -ジグリコシダーゼの一種であることを明らかにしている。

第3章では、第2章において諸性質を明らかにした  $\beta$ -ジグリコシダーゼを用い、イソフラボン配糖体のアグリコンへの効率的変換を目的とした大豆食品への応用研究を行った。本酵素は、イソフラボン  $\beta$ -グルコシドである、ダイジン、ゲニスチン、及びグリシチンだけでなく、これらの 6''-*O*-アセチル、6''-*O*-マロニルグルコシド誘導体にも直接作用し、糖部 6''-*O*-アセチルまたは 6''-*O*-マロニルグルコースとアグリコン部とに遊離することを見出している。本特性は、*Aspergillus niger* 由来の  $\beta$ -グルコシダーゼでは見られない特異な基質特異性である。そこで、イソフラボン 6''-*O*-アセチル及び 6''-*O*-マロニルグルコシドなどのグルコシド誘導体を多く含む豆乳に本酵素を適用し、イソフラボン配糖体のアグリコンへの変換効率の向上を目的とした研究を行っている。豆乳を本酵素で処理すると、イソフラボン配糖体のアグリコンへの変換効率は著しく向上することを明らかにするとともに、その条件として、幅広い反応温度・pH 範囲を有し、少量の酵素添加量で効率よく反応が進行することも示している。さらに本酵素処理によって、凍り豆腐中のイソフラボン配糖体のアグリコンへの変換にも適用でき、より一層の効果を確認した。

本論文は、植物が生成する  $\beta$ -Psd 香気前駆体を水解する酵素、 $\beta$ -プリメベロシダーゼを微生物起原から探索し、この酵素と似た  $\beta$ -プリメベロシダーゼ様酵素を *P. multicolor* から大量生産し、本酵素の強力な糖転移作用を活用し、一連の植物香気前駆体である  $\beta$ -Psd 配糖体の効率の高い合成法を開発している。同時に本酵素を精製し、諸性質を明らかにする中で、植物由来の  $\beta$ -プリメベロシダーゼと共通の活性を有するものの、基質特異性の異なる  $\beta$ -ジグリコシダーゼであることを明らかにしてきている。この特異な特性を豆乳中のイソフラボン配糖体のアグリコンへの効率的な変換に応用し、実際的大豆食品への利用へと展開した。このように、有用酵素の生産を手始めに、本酵素を有用配糖体の合成のツールとして、さらに食品の機能性向上への利用研究までを行っており、その内容は高く評価できる。

以上について、審査委員会全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

[基礎となる学術論文]

1. K. Tsuruhami, S. Mori, K. Sakata, S. Amarume, S. Saruwatari, T. Murata, and T. Usui: Efficient synthesis of  $\beta$ -primeverosides as aroma precursors by transglycosylation of  $\beta$ -diglycosidase from *Penicillium multicolor*.  
*J. Carbohydr. Chem.*, 24, 849-863 (2005)
2. K. Tsuruhami, S. Mori, S. Amarume, S. Saruwatari, T. Murata, J. Hiratake, K. Sakata, and T. Usui: Isolation and characterization of a  $\beta$ -primeverosidase-like enzyme from *Penicillium multicolor*.  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(3), (2006) in press