

氏 名 (本 国 籍)	PHROMRAKSA PANTHITRA (タイ王国)
主 指 導 教 員 名	岐阜大学 教授 金 丸 義 敬
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第537号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月15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	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Characterization of Proteolytic Properties of <i>Bacillus subtilis</i> Isolated from Fermented Foods: An Approach to Development of Healthier Foods (発酵食品から分離した <i>Bacillus subtilis</i> のタンパク質分解力の特徴：健康食品開発へのアプローチ)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 鈴 木 徹 副査 岐阜大学 教授 金 丸 義 敬 副査 岐阜大学 准教授 矢 部 富 雄 副査 信州大学 教授 大 谷 元 副査 静岡大学 教授 田 原 康 孝

論 文 の 内 容 の 要 旨

人々は、古く微生物の存在を明らかにする前から、微生物を食品製造に利用してきた。タイをはじめ東南アジア諸国で広く食されている発酵米麺カノンチーンは、製造中に *Bacillus* 属、乳酸菌、酵母等の微生物が存在している。それらの産生する酵素により、米タンパク質を分解し、グルタミン酸等が増加後、乳酸菌によりグルタミン酸から GABA 量も増加している。そのため、1. タイの発酵食品からタンパク質分解能の高い微生物を分離同定すること、2. 牛乳 (β -ラクトグロブリン) や穀物製品のアレルゲンを低減化すること、3. タンパク質分解能のある微生物をモデル的に作用させ、分岐鎖アミノ酸や GABA に関与したグルタミン酸を増加させる事を目的として研究を進めた。

1) タンパク質分解能微生物の分離と同定

(大豆 (ツアナオ)、大豆ペースト (ツアナオ)、蒸しパンの生地 (サアパオ)、米麺の浸漬米 (カノンチーン)) の4試料から、不溶性コラーゲンを含んだ選択培地より、タンパク質分解能の高い微生物を分離した。さらに、塩耐性およびゼラチンタンパク質分解能試験を行い、9種類の微生物を以下の実験に用いた。分離微生物は全てグラム陽性桿菌であり、API 50 CH システムと 16S rDNA により、7株は *B. subtilis* と同定された。分離した *B. subtilis* 7株を 16S rDNA 配列に基づき、系統図を作製した結果、タイプトカルチャー *B.*

subtilis DSM10 と同じグループであった。

2) 分離した *B. subtilis* のタンパク質分解能の特徴

B. subtilis 7 株をゼラチン含有培地で培養し、菌体外酵素を硫酸沈殿させた粗酵素を 3 種類の合成基質を用いて、アミノ酸の分解部位の検討を行った。Suc-AAPF-pNA (サブチリシンとキモトリプシン試験用合成基質) に対しては *B. subtilis* SB4 以外の微生物は高い酵素活性を示した。Bz-FVR-pNA (トリプシン試験用合成基質) に対しては、*B. subtilis* 菌株間で異なったが、FALGPA (コラゲナーゼ試験用合成基質) に対しては、*B. subtilis* SB5 と DB 株は高い酵素活性を示した。これらのことは、特有のアミノ酸配列をもつ合成基質に対して各酵素の作用部位が異なることが明らかになった。特に *B. subtilis* DB は、3 種類の合成基質に対し高い酵素活性を示したことから、発酵米麺の開発を行うために、米から分離した *B. subtilis* SR とともに以下の実験に用いた。

3) 分解微生物のタンパク質分解試験

B. subtilis 産生酵素を用いて、アレルギータンパク質である β -ラクトグロブリン (β -LG) と米タンパク質アレルギー低減を検討した。*B. subtilis* DB の産生粗酵素は、牛乳タンパク質の中でも最もアレルギー性のある β -LG のアレルギーのエピトープ部分を Gln³⁵-Ser³⁶ 位置で分解することが明らかになった。

B. subtilis DB と *B. subtilis* SR 産生酵素は、米タンパク質 14~50 kDa、米アレルギーである 16 kDa タンパク質分解し、モノクローナル抗体試験により米アレルギーを低減化していることを明らかにした。さらに *B. subtilis* SR は、米タンパク質を分解し、分岐鎖アミノ酸 (Leu, Ile, Val) や GABA に関与するグルタミン酸を増加させた。タイの伝統的な発酵食品から分離した *B. subtilis* DB と *B. subtilis* SR は、乳や米の低アレルギー化や機能性をもつ食品製造への利用の可能性を示した。

審 査 結 果 の 要 旨

伝統的な発酵法は、古くから微生物を食品製造に利用してきた。現代では、伝統的な発酵食品は、日常的になっており、その原料は、世界中では穀物、豆類、乳類、魚、野菜など多くの地域農産品を用いている。多くの *Bacillus* 属は、伝統的発酵食品に関与しており、それらの発酵過程における主な働きは、産生酵素による原料タンパク質分解である。*B. subtilis* は、特にこれらの発酵食品中の優勢な微生物である。*B. subtilis* の酵素生産や食物発酵等への応用には長い歴史があり、一般的に安全な (GRAS, generally recognized as safe) 微生物であると評価されている。

今日、穀物 (小麦、そば、米)、牛乳、卵などの食物アレルギーは大きな社会問題である。このため、アレルギーの低減化に酵素を用いる研究が注目されている。そのためタイの発酵食品からタンパク質分解能の高い微生物を分離同定し、牛乳 (β -ラクトグロブリン) や穀物製品のアレルゲンを低減化することを本研究の第一の目的としている。また、発酵米麺カノンチーンは、タイをはじめ東南アジア諸国で広く食されている。カノンチーンの製造中に *Bacillus* 属、酵母等の微生物は米タンパク質を分解し、グルタミン酸等が増加後、乳酸菌によりグルタミン酸から GABA 量も増加する。そのため本研究の第二の目的は、たんぱく質分解能のある微生物を作用させ、分岐鎖

アミノ酸や GABA に関与したグルタミン酸を増加させることを目指した。

大豆（ツアナオ）、大豆ペースト（ツアナオ）、蒸しパンの生地（サアパオ）、米麴の浸漬米（カノンチーン）の 4 試料から、不溶性コラーゲンを含んだ選択培地より、タンパク質分解能の高い微生物を分離した。をさらに、塩耐性およびゼラチンタンパク質分解能試験を行い、9 種類の微生物を以下の実験に用いた。分離微生物は全てグラム陽性桿菌であり、API 50 CH システムと 16S rDNA により、7 株は *B. subtilis* と同定された。

分離した *B. subtilis* 7 株をゼラチン含有培地で培養し、菌体外酵素を硫酸沈殿させた粗酵素を 3 種類の合成基質（Suc-AAPF-pNA、Bz-FVR-pNA、FALGPA）を用いて、アミノ酸の分解部位の検討を行った。*B. subtilis* の産生する酵素は Suc-AAPF-pNA 合成基質に対しては *B. subtilis* SB4 以外のほとんどの微生物は高い酵素活性を示した。Bz-FVR-pNA 合成基質に対しては、*B. subtilis* 菌株間で異なった結果を示した。FALGPA 合成基質に対しては、*B. subtilis* SB5 と DB 株は高い酵素活性を示した。これらのことは、特有のアミノ酸配列をもつ合成基質に対して各酵素の作用部位（分解アミノ酸）が異なることが明らかになった。特に *B. subtilis* DB は、3 種類の合成基質に対し高い酵素活性を示したことから、発酵米麴の開発を行うために米から分離した *B. subtilis* SR とともに以下の実験に用いることとした。

B. subtilis DB の産生粗酵素は、牛乳タンパク質の中でも最もアレルゲン性のある β -LG のアレルギーのエピトープ部分を Gln³⁵-Ser³⁶ 位置で分解することが明らかになった。*B. subtilis* DB と *B. subtilis* SR 産生酵素は、米タンパク質 14~50 kDa を分解し、さらに米アレルゲンである 16 kDa タンパク質分解し、米アレルギーを低減化していることが明らかとなった。さらに *B. subtilis* SR は、米タンパク質を分解し、分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）や GABA に関与するグルタミン酸が増加した。このように *B. subtilis* DB と *B. subtilis* SR は、乳や米の栄養、機能性をもつ食品製造への可能性を示した。

これらの結果は 2 編の論文にまとめられている。

以上について、審査委員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。

1. Phromraksa P, Nagano H, Kanamaru Y, Izumi H, Yamada C, Khamboonruang C. 2009. Characterization of *Bacillus subtilis* Isolated from Asian Fermented foods. *Food Science and Technology Research*. Vol 15, No 6, pp. 659-666.
2. Phromraksa P, Nagano H, Boonmars T, Kamboonruang C. 2008. Identification of Proteolytic Bacteria from Thai Traditional Fermented Foods and Their Allergenic Reducing Potentials. *Journal of Food Science*. Vol 73, No 4, pp. M189-M195.