

原油成分分解細菌の酵素を利用したアルドール縮合反応

工学部 バイオ応用化学科 鈴木敏弘、成田明子、滝澤 昇

keywords : アルドール反応、酵素、芳香族化合物、 α - β 不飽和ケトン

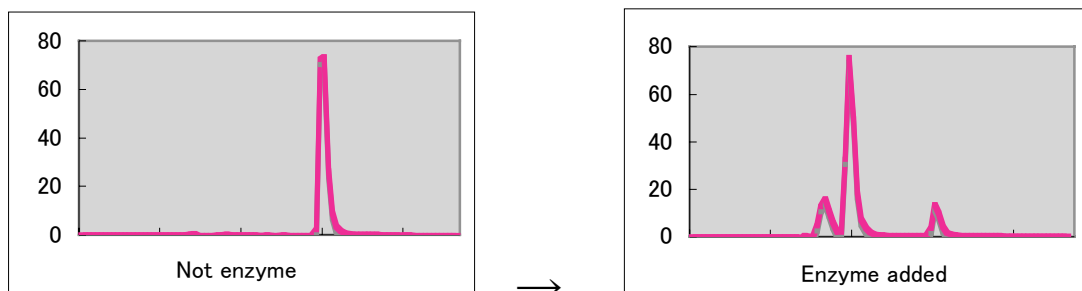
1. 目的

地球上に生息する様々な微生物の中にはダイオキシンや多環性芳香族化合物など、人間に有害な化学物質を分解する微生物がいる。本研究では、土壌微生物の一種である *Rhodococcus opacus* CIR2や、*Pseudomonas aeruginosa* PaK1 の持つナフタレン分解系酵素の一つであり、*trans*-*o*-Hydroxybenzylidenpyruvate (*o*-tHBPA)を *o*-Hydroxybenzaldehyde と pyruvate へ変換する『hydratase-aldolase』の逆反応を用い、 α - β 不飽和ケトンの合成を目的として研究を行ったので報告する。

2. 研究内容と結果

CIR2株、Pak1株から得た無細胞抽出液を用い、それぞれイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーにより、hydratase-aldolase をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) でバンドが単一になるまで精製した。CIR2株由来の酵素は、分子量32kDa の2量体構造、最適温度 ; 60°C、最適pH ; 8.0、 k_m 値 ; 20 μ M、 V_{max} ; 0.82であった。また、Pak1株由来の酵素では、分子量37kDaの4量体構造、最適温度 ; 60°C、最適pH ; 7.0、 k_m 値 ; 5 μ M、 V_{max} ; 15.9であった。さらに、hydratase-aldolase の逆反応について調べた結果、50°C、pH7.0 の中性条件下で反応を行ったところ *o*-Hydroxybenzaldehyde と pyruvate は縮合し、*o*-tHBPA を生成した。よって、本酵素は逆反応へも触媒として働くことが確認された。

次に、この hydratase-aldolase の基質特異性について調べた結果、CIR2株由来の酵素、Pak1株由来の酵素はともに *o*-tHBPA の構造異性体である *m*-tHBPA、*p*-tHBPA に対しても活性を示した。また、塩素、フッ素、カルボキシ基、アミノ基やアルデヒド基が置換した芳香族アルデヒドと、pyruvate の炭素鎖が伸びた2-oxobutyric acid, Laevulinic acid を用いてさまざまな組み合わせで縮合反応を行い、縮合生成物をHPLCによって分析、確認を行った。その結果、多くの縮合生成物を確認することができ、hydratase-aldolase の基質特異性は低く、さまざまな基質に対して活性を示すことが証明された。



o-Hydroxybenzaldehyde と pyruvate の縮合反応

3. 今後の展望

アルドール縮合反応は有機化学的には自発的に起こりにくいといわれるが、ナフタレン上流代謝経路に関与する酵素である *trans*-*o*-Hydroxybenzylidenpyruvate hydratase-aldolase は、中性条件下において触媒として働き、縮合反応は迅速に進行した。フッ素が置換した α - β 不飽和ケトンは、医薬品製造においての中間物質などに利用可能であることや、その他にも多種多様の縮合生成物が得られることが可能であるため、産業的応用が期待される。

豆乳ヨーグルト（乳酸菌発酵豆乳食品）の開発

工学部 バイオ・応用化学科 岡本苑子、滝澤 昇
佐野食品（株） 佐野与昭

Keywords プロバイオティクス、ヨーグルト、豆乳、乳酸菌、機能性食品

【目的】 近年、食品による健康維持管理が大きく脚光を浴びてきている。その中に、乳酸菌による腸内環境の健全化が大変期待されている。当研究室では、ヨーグルトや漬物などの発酵食品や、その他の食品加工物に利用でき、かつ人の腸内環境改善に役立つような乳酸菌を植物や漬物から約40種類ほど単離し、そのうち11菌株を同定した。これらの乳酸菌を豆乳に接種するとによりヨーグルト状に固化することを一昨年の当会で報告した。本研究では同定済み乳酸菌と佐野食品（株）提供の豆乳を用いて豆乳ヨーグルトを作製し、商品化することを目的とした。

今回のOUSフォーラムでは、豆乳ヨーグルトを作製するにあたって、豆乳と牛乳の割合や発酵条件を変化させて作製したものを紹介する。

【結果】 豆乳ヨーグルトを作製するときの発酵条件の検討

菌の検討； *Lactococcus lactis* SLL4.16が香、味、形状ともに最もヨーグルトに近かった。

糖の検討； 主要な糖で検討した結果、香、味ともにグラニュー糖が適していた。

糖量の検討； ヨーグルト中の糖を1%、3%、5%に調整し検討した結果、1%はプレーンヨーグルト風、5%は酸味が甘味で消されて甘味が強かった。3%は酸味、甘味共に感じられて最も食べやすかった。

豆乳と牛乳の割合の検討； 様々な割合で検討した結果、豆乳：牛乳=3:1もしくは1:1のとき豆乳とヨーグルトどちらも風味があり、適していた。

培養時間の検討； 豆乳のみの場合、凝固が確認されたのは4時間以降だったが、ヨーグルトとしての堅さ、酸味、味ともに適していたのは6時間～8時間だった。豆乳と牛乳を混ぜた場合、16時間～20時間が適していた。

・ 試食結果

ヨーグルトの酸味を強調（プレーンヨーグルト）

豆乳：牛乳=1:1 糖量=1% 培養時間=20時間 豆乳を強調

豆乳：牛乳=3:1 糖量=3% 培養時間=20時間 一般的に美味しい

豆乳：牛乳=1:1 糖量=3% 培養時間=18時間

【今後の計画と応用の可能性】

- ・ 豆乳ヨーグルトの商品化
- ・ 豆乳と豆乳ヨーグルトの成分の違いを調査し、腸内環境清浄化にどのように役立つか調べる。

バイオ・機能性食品

乳酸菌とフィターゼを用いたおからの高付加価値化に関する研究

工学部 バイオ・応用化学科 滝澤 昇・酒匂慎一郎
佐野食品（株） 佐野与昭

Keywords : おから、バイオマス、廃棄物、畜産飼料、フィターゼ

【目的】おからは年間約100万トン生産され、1994年に産業廃棄物に指定された。おからは、水分保有率が75～80%と高く腐敗がはやいため、おからの処理は大きな問題となっている。本研究ではおからの有効的な利用の可能性として、乳酸菌による発酵処理とフィターゼを伴用し、飼料としての付加価値の向上について検討を行った。

【方法及び結果】乳酸添加もしくは乳酸菌培養液添加によってpH5.1に調整したおからに、フィターゼ生産菌である*Aspergillus. ficuum* K5株の孢子懸濁液またはフィターゼを振り掛け、30℃で10日間静置した。このおからの抽出液中に遊離されたアミノ酸、タンパク質、リン酸、糖の定量を行った。乳酸を添加したおからでは、*A. ficuum* K5株添加した場合は3～5日目から、フィターゼを添加した場合は1日目からリン酸と還元糖の遊離が確認された。一方乳酸菌を添加したおからでは、フィターゼ添加した場合、1日目からリン酸と還元糖の遊離が確認されたが、*A. ficuum* K5を添加した場合、リン酸と還元糖の遊離は確認されなかった。また乳酸添加の場合おからは5日目には悪臭を発したが、乳酸菌培養液添加したおからはほとんど悪臭を発することはなかった。

【考察】腐敗が早いおからに乳酸菌を添加し発酵させることで雑菌の生育が抑制され、数日間の常温保存が可能となり、常温輸送が容易となると期待される。またフィターゼを添加することでフィチンが分解され、リン酸が遊離され有効リン含量が増加し、同時にキレートされていたミネラルの有利も期待され、資料としての有効性が高まったものと考えられる。