



TITLE:

Biochemical characterizations and food applications of carbohydrate active enzymes secreted from microorganisms(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sakai, Kiyota

CITATION:

Sakai, Kiyota. Biochemical characterizations and food applications of carbohydrate active enzymes secreted from microorganisms. 京都大学, 2023, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2023-07-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13567>

RIGHT:

• Applied Microbiology and Biotechnology 101(8):3237-3245 (2017), <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8107-x> · Journal of Bioscience and Bioengineering 125(3):287-294 (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.009> · Scientific Reports 11(1):16631 (2021), <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96058-4> · Scientific Reports 12(1):1168 (2022), <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05091-4> · PLoS One 17(6):e0269278 (2022), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269278>

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	酒井 杏匠
論文題目	Biochemical characterizations and food applications of carbohydrate active enzymes secreted from microorganisms (微生物が分泌する糖質関連酵素の生化学的解析と産業利用)		
(論文内容の要旨)			
<p>産業利用されている微生物酵素の多くは細胞外に分泌されている。しかしながら、これら細胞外酵素の機能は完全には解明されていない。本論文は、微生物が分泌する、糖質関連化合物に作用する細胞外酵素の性質評価と、食品加工での有用性に焦点をあてたものである。すなわち、第一章では、GH134 family に属する麴菌・放線菌由来の β-マンナーゼの生化学的機能を解析し、第二章では、産業酵素による植物性代替肉の改変技術を開発した。本論文は、微生物が分泌する細胞外酵素の生化学的特性と、その新規な産業利用方法を示すものである。</p> <p>第一章では、Glycoside Hydrolase Family (GH) 134 に属する β-マンナーゼの機能を解析した。β-マンナーゼは、以前は GH5, GH26, GH113 に分類されていた。以降、これまでに新規な β-マンナーゼ Man134A が見いだされ (Shimizu <i>et al.</i> 2015 <i>J Biol Chem</i>)、一次配列の新規性から糖質関連酵素データベース CAZy にて GH134 family が新設された。しかし、GH134 に属する酵素の生化学的性質は詳細に解析されていなかった。本章では、麴菌ホモログ AoMan134A および放線菌ホモログ SsGH134 の性質評価を行なった。</p> <p>第一節では、麴菌ホモログ AoMan134A の酵素学的機能を解析した。種々の酵素学的性質を評価した結果、AoMan134A が β-マンナンを特異的に加水分解する β-マンナーゼであることを見いだした。興味深いことに、既知の β-マンナーゼの分解産物が主にマンノースであるのに対し、AoMan134A の分解産物はマンノビオース、マンノトリオース、マンノテトラオース、マンノペンタオースであることを明らかにした。これらマンノオリゴ糖は、整腸作用や脂肪吸収抑制などの機能性があり、その産業的重要性は近年高まっている。また、AoMan134A は耐熱性が高く、70°C 120 min 処理での残存活性率は 50% であり、既知の耐熱性 β-マンナーゼと同等以上であることを見いだした。以上より、AoMan134A は食品産業にて有望な性質を有していることがわかった。</p> <p>第二節では、放線菌ホモログである SsGH134 の酵素学的機能を解析した。SsGH134 は、N-末端に糖結合ドメイン Carbohydrate Binding Module Family 10 (CBM10) を、C-末端に GH134 ドメインを有することを見いだした。SsGH134 および CBM10 欠損変異体 (SsGH134-ΔCBM10) を大腸菌にて異種発現した結果、SsGH134 は β-マンナーゼであることが明らかとなった。一方、CBM10 ドメインは、セルロースや β-マンナンなどの多糖への結合能を示さないことを見いだした。興味深いことに、pH8.0-10.0 にて、SsGH134 の安定性は維持されるが、SsGH134-ΔCBM10 の安定性が低下していた。すなわち、CBM10 ドメインは、SsGH134 のアルカリ条件下での安定性に寄与していることを示している。<i>Streptomyces</i> 属の最適生育 pH が弱アルカリ条件であるため、CBM10 ドメインが β-マンナン分解を担う SsGH134 の安定性に寄与していることを示唆している。</p> <p>第二章では、近年注目を集めている植物性代替肉への産業酵素の利用について検討を加えている。世界保健機関 WHO の報告によれば、2050 年には世界人口が 97 億人に達する見込みである。この世界人口の急増により、蛋白源の需要供給バランスが崩壊する「蛋白危機」という問題に世界は直面している。このことは、食肉が持続的な食糧ではなくなることを意味する。この食糧難を解決するべく、植物成分を用いて</p>			

畜肉を模倣する「植物性代替肉」が注目を浴びている。本章では、植物性代替肉が有する諸課題に対して、産業酵素による解決法の構築に焦点をあてている。

第一節では、ラッカーゼによる蛋白質とペクチンの結着システムが検討された。畜肉ハンバーグの「つなぎ」には卵が使用されるが、植物性代替肉ではメチルセルロースが「つなぎ」の役割を担っている。メチルセルロースは、コストや結着性の観点で有望な結着剤であるが、化学法により製造されるため、欧米を中心にケミカルフリーの結着システムが求められていた。本論文では、酵素法による新たな蛋白質架橋システムの構築を目指し、蛋白質架橋酵素であるラッカーゼに着目した。まず、架橋反応を高めるメディエータをスクリーニングし、シュガービートペクチンを選抜した。ラッカーゼはフェノールどうしの架橋反応を触媒するため、蛋白質中のチロシン残基とペクチン中のフェルラ酸残基を重合したと推察している。次に、本結着システムの有用性を評価した結果、ペクチンおよびラッカーゼの併用により、代替肉の保形性・結着性が向上することがわかった。この新規な架橋システムは、メチルセルロース代替技術としてケミカルフリートレンドを満たすと考えられる。

第二節では、ラッカーゼとペクチンによる褐変化システムが検討された。畜肉製品は、焼成工程によって鮮やかな赤色から香ばしさを感じさせる褐色へ色調変化する。しかし植物蛋白質は黄褐色を呈するため、この色調変化を代替肉で再現することも課題の1つであった。代替肉用途の赤色色素としては、ビート色素が広く製品に採用されているが、ビート色素を含む代替肉は、焼成工程による色調変化が不十分であった。本論文では、酸化酵素による褐変化システムの開発が試みられた。まず、種々酸化酵素をスクリーニングした結果、ラッカーゼおよびメディエータとしてのシュガービートペクチンの併用により、焼成工程の加温に伴い、ビート色素を含む代替肉を赤色から褐色へ色調変化させうることを見いだした。次に、本色調変化システムを用いた代替肉と畜肉の色調変化を比較した結果、焼成工程前後の反射率（色調）の波形変化が類似していることが観察された。以上により、ラッカーゼ、ペクチンおよびビート色素によって、畜肉の褐色化を代替肉で再現しうると考えられる。

第三節では、サイクロデキストリン (CD) 生成アミラーゼによる大豆臭低減システムが検討されている。大豆臭の原因物質として、ヘキサナール、1-オクテン-3-オール、ベンズアルデヒドなどの疎水性揮発物質が知られている。大豆臭はわずかでも官能的に検知されるため、特に欧米では植物性代替肉製品の消費者への受け入れを困難にしている。本論文では、酵素による大豆臭低減システムの開発が検討された。まず大豆臭を低減する物質をスクリーニングした結果、CDのうち、 α -CD および β -CD が選抜された。CDは疎水性物質を抱合する性質を有する。そこで、 α -CD および β -CD を産生するアミラーゼ (*Paenibacillus macerans* 由来) および澱粉を代替肉パテ中で反応させた結果、パテ重量当たり 1.7% の CD が産生されることが示された。酵素処理により、ヘキサナール、1-オクテン-3-オール、ベンズアルデヒドの揮発量は、それぞれ 52%、55%、67% にまで低減している。以上より、アミラーゼによって産生した CD が、疎水性揮発物質を抱合することで、大豆臭の揮発量を抑制しうると示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

食品産業で利用される酵素の多くは、微生物が分泌する細胞外酵素であるが、その機能や有用性は完全には解明されていない。そのため、社会課題や時代ニーズに合致した新規酵素のスクリーニングや既存酵素の新規用途開発が、今なお盛んに行われている。本論文では、GH134 family に属する麴菌・放線菌由来の新規 β -マンナナーゼの生化学的機能を解析し、さらに産業酵素であるラッカーゼとアミラーゼによる植物性代替肉の改変技術が開発されている。評価すべき点として、以下の 5 点が挙げられる。

1. 新規 GH134 family に属する麴菌 β -マンナナーゼ AoMan134A は、機能性が知られるマンノオリゴ糖を特異的に生産する性質を有し、さらに非常に高い熱安定性を示すことを明らかにした。以上より、AoMan134A が様々な食品産業において有望な性質を有することを見いだした。
2. 新規 GH134 family に属する放線菌 β -マンナナーゼ SsGH134 は、アルカリ条件下や界面活性剤存在下にて高い安定性を示したが、糖質結合ドメインである CBM10 を欠失すると安定性が低下することを見いだした。以上より、CBM10 ドメインが β -マンナン分解を担う SsGH134 の安定性に寄与していることを示した。
3. ラッカーゼおよびシュガービートペクチンの併用により、代替肉における新規な結着システムを構築した。本結着システムは、ラッカーゼによるペクチンと蛋白質の架橋によるものであり、テクスチャーやジューシーさを向上しうるものであった。
4. ラッカーゼおよびシュガービートペクチンの併用により、代替肉においてビート色素の色調を制御するシステムを構築した。本システムにより、焼成工程の加温に伴う、畜肉の色調変化を代替肉で再現できることを示した。
5. サイクロデキストリン生成アミラーゼおよび澱粉の併用により、代替肉における新規な大豆臭低減システムを構築した。本システムにより、大豆臭の代表的な化合物であるヘキサナールやベンズアルデヒドの揮発量を半減させ、ヒト官能特性レベルにおいても大豆臭低減を達成できることを示した。

以上のように、本論文は、麴菌および放線菌由来の新規 β -マンナナーゼの酵素学的性質を明らかにするとともに、産業酵素であるラッカーゼとアミラーゼによる植物性代替肉の高機能化を達成した。これらの成果は、微生物が分泌する細胞外酵素の産業的有用性を示したものであり、発酵生理学、応用微生物学、応用酵素学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和 5 年 5 月 18 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）