

微生物酵素を用いたバイオフィレグランスの研究

勝山陽子* 道畠俊英* 中村静夫* 南博道** 片山高嶺** 熊谷英彦**

香りを付加価値とする製品開発を目指して、アミンからアルデヒドを生成する酸化的脱アミノ化反応触媒酵素のアミノキシダーゼを用いて香料(バイオフィレグランス)を合成する研究開発を行った。様々な芳香族アミンを試験した結果、相当するアルデヒドに変換された際にフローラルな香りを放つ物質を選定した。このフローラルな香りについて、定量評価法を確立するとともに、反応の効率化を図った。その結果、生成する香りの濃度上昇に関して、反応溶液中の酸素濃度が重要な因子であることが示唆された。また、30℃、10分、400μLの反応系では12-39μM程度の香りが適当な強度であることを確認した。

キーワード: 微生物酵素, バイオフィレグランス, アミン, アルデヒド

Synthesis of Fragrance Formation Using Microbial Enzymes

Yoko KATSUYAMA, Toshihide MICHIHATA, Shizuo NAKAMURA,
Hiromichi MINAMI, Takane KATAYAMA and Hidehiko KUMAGAI

This research aimed at biofragrance formation using amine oxidases that catalyze the oxidative deamination of amines to produce aldehydes, in the anticipation of developing new fragrance-added products. Among various aromatic amines tested, we selected one that has the fragrance of flowers when converted to the corresponding aldehydes. We then established a method for quantifying the compound with a floral flavor and attempted to maximize its reaction efficiency. The results indicated that the content of dissolved oxygen in the solution is rate-limiting for increasing fragrance formation. The appropriate level for floral fragrance formation was about 12–39 μM when it was reacted under the following condition: 30°C, 10 min., 400 μL.

Keywords : microbial enzyme, biofragrance, amine, aldehyde

1. 緒言

近年、日本ではストレス社会化が進む中、癒しを求めて香りに関する様々な商品の購買意欲が高まっており、香り市場は2000億円を超える産業に成長してきた。香料物質として一般的に使用されるのは天然香料もしくは有機合成香料であり、微生物酵素を用いた香料開発例は、天然香料の改良の目的等に限られている^{1),2)}。しかしながら、過激な条件を要し副反応が課題となる有機合成と比較し、酵素反応は反応特異性が高く緩和な反応条件で行えるという利点を有していることから、微生物酵素を用いて簡便で安価な新規香料合成の可能性が期待できる。本研究では、図1に示すようにアミンから芳香性化合物のアルデヒドをつくる微生物由来アミン酸化酵素を使用して香料(バイオフィレ

レグランス)を効率良く合成することを目的とし、候補物質の選定を行った。また、選定した香料候補物質について定量評価法を検討した。さらに反応効率、生成物濃度、副産物濃度といった観点より、反応条件の検討を行った結果について報告する。

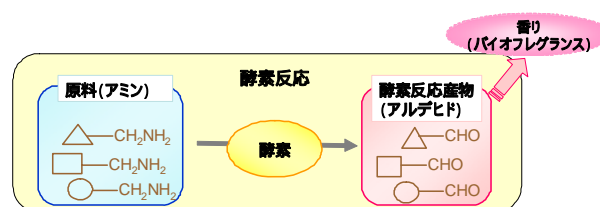


図1 バイオフィレグランスの生成イメージ

*化学食品部 **石川県立大学

2. 実験

2.1 材料及び実験方法

2.1.1 材料

検索に供試した酵素は、石川県立大学生物資源工学研究所応用微生物工学研究室にて精製したアミン酸化酵素 TYOM(*Micrococcus luteus* 由来 tyramine oxidase)の他、市販のアミノキシダーゼ活性を有する酵素である TYOA(旭化成(株)製, *Arthrobacter sp.*由来 tyramine oxidase), MAOA (sigma-aldrich 製, human, recombinant monoamine oxidase A)並びに MAOB(sigma-aldrich 製, human, recombinant monoamine oxidase B)である。

検索に供試した原料アミンは、アミノキシダーゼの反応特異性を考慮して選択した芳香族アミン 25 種(東京化成工業(株)製, ナカライテスク(株)製, 和光純薬工業(株)製, Acros Organics 製)である(表 1)。

2.1.2 酵素反応原料検索

酵素反応条件は、反応温度 30℃, 反応時間 1 時間, 原料アミン濃度 250 μ M または 1000 μ M, 酵素は TYOM, TYOA, MAOA, MAOB のいずれかを 15mU/mL で使用した。緩衝液は 10mM KPB (リン酸カリウム緩衝液)(pH7)とした。なお、酵素反応容量は

表1 原料アミン

略号	物質名
P1	2-phenylethylamine
P2	2-(4-aminophenyl)ethylamine
P3	tyramine
P4	5-hydroxydopamine
P5	3-hydroxytyramine(dopamine)
P11	2-(p-methoxyphenylethylamine)
P12	3-o-methyl-dopamine
P13	4-methoxy-3-hydroxypnenylethylamine
P14	(4-methoxyphenyl)ethylamine
P15	2-(2-methoxyphenyl)ethylamine
P16	homoveratrylamine
P41	4-o-methyl-dopamine
B1	benzylamine
B2	3,4-dihydroxybenzylamine
B13	4-methoxybenzylamine
B15	4-hydroxy-3-methoxybenzylamine
B17	3,4-dimethoxybenzylamine
O2	2-amino-1-phenylethanol
O5	dl-norphenylephrine
O8	dl-octopamine
O9	3-phenylpropylamine
O15	tryptamine
O16	serotonin
O17	5-methoxytryptamine
O20	6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline

1mL とし、褐色バイアル内にて密封して行った。候補物質の選択は官能評価により行った。

2.1.3 酵素活性測定方法

酵素活性の測定は以下のように行った。ペルオキシダーゼ(東洋紡績(株)製)1mg を 0.01% 4-aminoantipirine 及び 0.2% phenol を含む 10mM KPB (pH7) 25mL に溶解した溶液(Sol.A)に 10mM tyramine を 1.25mL 添加したものを Sol.B とした。適宜 KPB(pH7)にて希釈した酵素溶液 25 μ L に KPB (pH7)を 275 μ L 添加した後、700 μ L の Sol.B を加えて 30℃ で反応後、吸光度 $A_{505} < 0.18$ となる適当な時間において A_{505} を分光光度計((株)日立製作所製, U-2810)にて測定した。酵素活性の値(U/mL)は、 $((A_{505}/\text{反応時間(分)}) - (\text{ブランクの } A_{505})/(\text{ブランクの反応時間(分)})) \times (\text{酵素希釈率})/6.25/0.025$ で算出した。

2.1.4 酵素反応生成物の定量評価法

酵素反応生成物の定量には、酵素反応溶液に対して 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)誘導体化をまず行った。19.81mg の DNPH(ナカライテスク(株)製)を 50mL の Sol.C(HCl:H₂O:CH₃CN=1:4:5)にて溶解し、20 mM DNPH stock solution(Sol.D)とした。Sol.D を Sol.C にて 10 倍希釈して用時調製した 2mM DNPH 誘導体化溶液(Sol.E)を酵素反応溶液に対して等量添加した後、30℃, 30 分の反応後、4℃ にて冷却し 0.2 μ m PTFE メンブランにより濾過したものを定量用試料とした。なお、Sol.E の添加をもって酵素反応終了とした。LC/MS((株)島津製作所製, 2010A)による分離定量条件は、カラム(信和化工(株)製, STR-ODSII 5 μ m(2.0 \times 150mm)), 移動相(A:H₂O, B:CH₃CN, 65%B), 流速(0.2mL/分), 検出(UV 360nm), カラム温度(40℃), イオン化(APCI-negative)とした。

検量線の作成には、phenylacetaldehyde (Aldrich 製, 90%)をアセトニトリルにて適宜希釈したものを、酵素反応溶液と同様に DNPH 化したものを使用した。

2.1.5 バイオフィレグラムの構造確認

パージ&トラップ装置(ジーエルサイエンス(株)製)に装着したナスフラスコ内にて酵素反応(30℃, P1:1mM, TYOA: 2.5mU/mL, 10mM tris(hydroxymethyl)amino-methane :Tris (pH7), 反応容量 400 μ L)を 30 分行った後、酵素反応を停止しないまま窒素パージ(30℃, 15 分)を

行って捕集後、TCT-GC/MS(TCT :ジールサイエンス(株)製、CP-4010、GC/MS : (株)島津製作所製、QP-505A)にて揮発成分を測定した。GC 条件はカラム(J&W Scientific 社製、DB-WAX , 60m×0.25mm)、GC プログラム(40 ;10 分, 40 230 ;5 /分, 230 ;14 分)、導入部温度(150), 検出部温度(230)である。マススペクトルは 70eV の化学イオン化によって得られるものとし、マススペクトルデータは、NIST データベース('98 edition)との比較により解析した。

2.2 香料合成のための酵素反応条件の検討

2.2.1 酵素, 原料アミン, 緩衝液の選択

2.1 で選定した原料アミンと酵素の検討においては、酵素反応時及び酵素活性測定時に使用する全ての緩衝液を KPB (pH7)から Tris(pH7)に置き変えて使用し活性値を比較した。緩衝液の検討においては、KPB (pH7) を 適 宜 , Tris(pH7), piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) :PIPES (pH7), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) :HEPES(pH7)に置き変えて使用した。なお、活性測定の方法は2.1.3に従い、酵素反応生成物の定量は2.1.4に従った。酵素反応条件は、反応温度 30 , 反応時間 30 分, 原料アミン濃度は 100 μ M もしくは 1000 μ M, 酵素量 1mU/mL, 反応容量は 400 μ L とし、褐色バイアル内にて密封して行った。

2.2.2 過酸化水素量の測定方法

反応温度 30 , 反応時間 10 分, 酵素量(TYOA) 10mU/mL, 緩衝液 10mM KPB (pH7), 反応容量 400 μ L とし、褐色バイアル内にて密封して酵素反応を行った。1 分間の煮沸によって酵素反応を停止後、Sol. A を 600 μ L 添加し、30 , 5 分の反応後の溶液の A₅₀₅を測定した。予め既知濃度の過酸化水素水で作成した検量線により、酵素反応溶液中の過酸化水素濃度を測定した。なお、同時に測定した酵素反応生成物定量は2.1.4に従ったが、酵素反応停止を1分間の煮沸によって行った後、2mM DNPH 溶液を添加した。酵素反応時の原料アミン(P1)濃度は適宜変更した。

2.2.3 カタラーゼ添加効果の検討

酵素反応条件は、反応温度 30 , 反応時間 10 分, 酵素量(TYOA) 10mU/mL, 緩衝液 10mM KPB (pH7), 反応容量 400 μ L とし、P1 濃度は適宜変更した。カタ

ラーゼ(sigma-aldrich 製, bovine liver 由来)添加群についてカタラーゼ(CAT)濃度が 10mU/mL となるように TYOA と同時に添加した。酵素反応生成物の定量は2.1.4に従った。

2.2.4 反応時間及び P1 濃度の検討

酵素反応条件は、反応温度 30 , 酵素量(TYOA) 10mU/mL, 緩衝液 10mM KPB (pH7), 反応容量 400 μ L とし、褐色バイアル内にて密封して行った。反応時間及び P1 濃度は適宜変更した。酵素反応生成物の定量は2.1.4に従った。

2.3 官能評価

不特定に選抜した 24 人のパネラーによる、P1-TYOA 反応溶液の官能評価を行った。評価は 4 点法(0: 香りを感じない, 1:弱すぎる, 2:丁度良い, 3:強過ぎる)で行った。酵素反応条件は、反応温度 30 , 反応時間 10 分, 反応容量 400 μ L とし、開放試験管にて行い、P1 濃度及び TYOA 濃度は適宜変更した。また、酵素反応生成物の定量は2.1.4に従った。

3. 結果及び考察

3.1 原料の検索と定量評価法の検討

4 種のアミンオキシダーゼ及び 25 種の原料アミンの組み合わせについて検討したところ、2 種の原料アミン(P1 及び P12)が TYOM 及び TYOA に対する香料原料候補となることを確認した。これら P1 酵素反応生成物及び P12 酵素反応生成物が、アミンを原料としたアミン酸化酵素により生成されたアルデヒドであることを確認するため、酵素反応生成物の定量法を検討した。検討した定量法はアルデヒドの定量において一般的に使用される、DNPH 化反応を利用した LC による分離定量法である。DNPH 溶液の調製方法として、HCl/EtOH を使用する方法³⁾や HCOOH/ CH₃CN を使用する手法⁴⁾が報告されている。本研究では、HCl/ CH₃CN/H₂O での手法により酵素反応停止を兼ねることが可能であることから、HCl/CH₃CN/H₂O での手法を採用した。その結果、P1 を原料した場合、酵素反応に伴い出現する単一ピーク(DNPH 化 P1-CHO:r.t. 9.2 分)を分離することが可能であった。また、DNPH 化 benzaldehyde の LC/MS 分析方法⁵⁾を参考に、DNPH 化した P1 酵素反応生成物(P1-CHO)のピークを解析したところ、9.2 分のピークは予想されるアルデヒド

(phenylacetaldehyde:P1-CHO)の DNPH 体が示す質量値 (m/z:299)であった(図 2)。これより、市販試薬 P1-CHO を利用した検量線の作成により、P1 酵素反応生成物の分離定量法を確立することができた。なお、P12 酵素反応生成物については、同様の LC/MS 分析を行ったが酵素反応に伴い出現するピークが複数出現した。いずれのピークについてもマスペクトルによる構造解析を行ったが、構造確認に至らなかった。

酵素反応溶液中に生成が確認された P1-CHO が、気体中に揮発して鼻で感じるフローラルな香り物質、すなわちバイオフィグランスの本体となっているかを確認するため、P1 酵素反応溶液の揮発成分分析を TCT-GC/MS 法により解析した。その結果、揮発成分として P1-CHO が検出された(図 3)。さらに LC/MS 及び GC/MS による分析結果から、P1 を原料とする酵素反

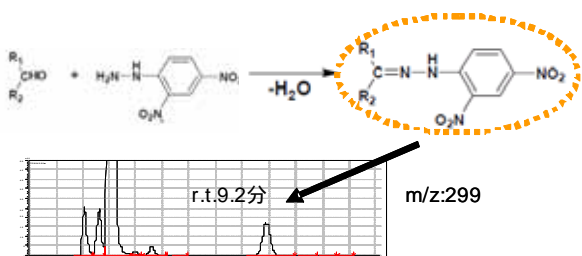


図2 P1酵素反応生成物のDNPH化による分離検出

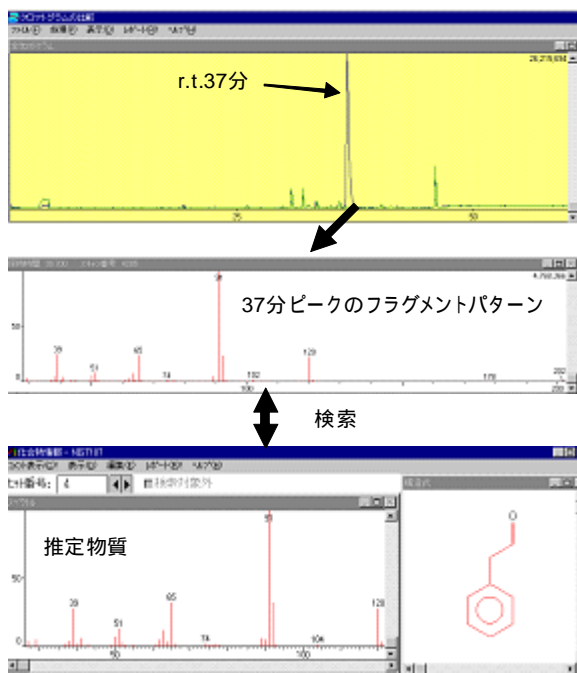


図3 バイオフィグランス(P1-CHO)の検出と構造確認

応により目的とする香料物質が生成しているものと判断された。

3.2 酵素反応条件の検討

TYOM 及び TYOA に対する原料候補物質(P1, P12)に対する反応効率について検討するために、基準物質 (tyramine)に対する酵素活性値を 100 とし、各組み合わせ反応における活性値を比較した。その結果、TYOA は、P1 に対する反応効率が TYOM の約 30 倍であり、候補物質 P12 に対しても TYOM の約 3 倍であった。これより、原料 P1 及び酵素 TYOA の組み合わせ

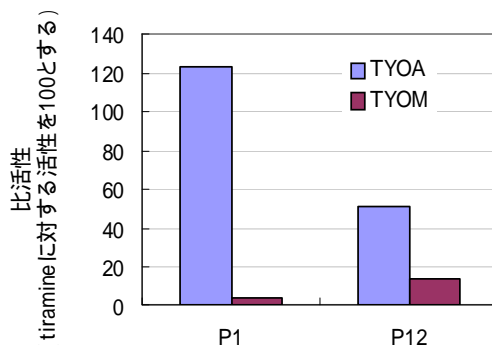


図4 酵素及び原料アミンの組み合わせによる反応効率の比較

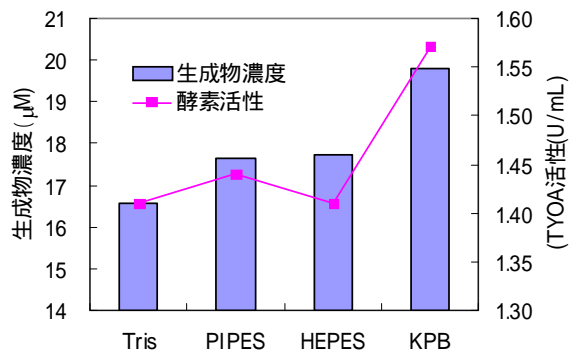


図5 各緩衝液(pH 7)における生成物濃度及び酵素活性の比較

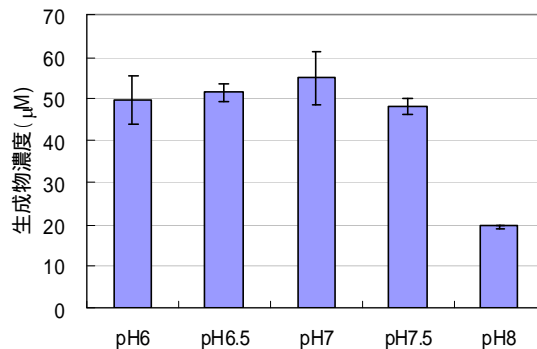


図6 緩衝液KPBにおける各pHでの生成物濃度の比較

せが有効であることが明らかとなった(図 4)。反応原料 P1 及び酵素 TYOA の反応緩衝液として、中性付近で緩衝能のある、Tris、PIPES、HEPES、KPB の 4 種類を選択し、酵素活性及び生成物濃度の両点から検討

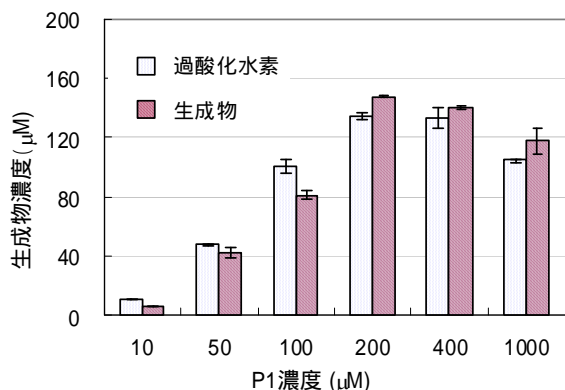


図7 過酸化水素濃度と生成物濃度の比較

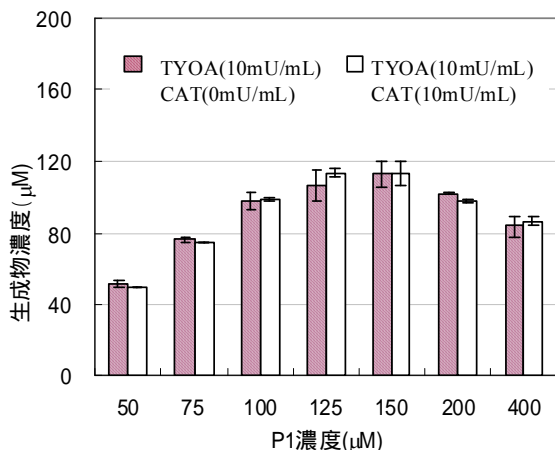


図8 生成物濃度のカタラーゼ添加による影響

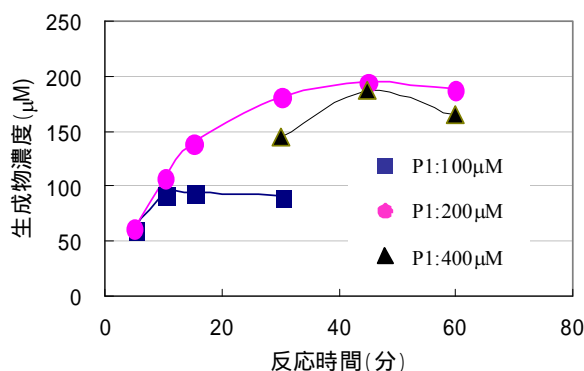


図9 反応時間とP1濃度の変化による生成物濃度への影響

した。その結果、酵素活性及び生成物濃度のいずれにおいても KPB (pH7)が適していることを確認した(図 5)。さらに、生成物濃度の点から、KPB の pH 条件を検討したところ、pH7 が最適であることが確認できた(図 6)。したがって、緩衝液は KPB(pH7)の条件で行うこととした。

次に、短時間で効率的な酵素反応を行うため、TYOA を 10mU/mL、反応時間を 10 分に固定し、P1 濃度について検討した結果を図 7 に示す。P1 が 200μM 以上になると、生成物濃度が下がることが明らかとなった。本酵素反応は $R-CH_2-NH_2 + H_2O + O_2 \rightarrow R-CHO + H_2O_2 + NH_3$ であることから、上記の現象の原因として、

生成アルデヒドが原料アミンと反応してイミンを形成し、生成した全てのアルデヒドが DNPH と反応していないこと、副生成物である過酸化水素が酵素反応を阻害していること、酵素濃度が足りないことが考えられた。そこで、過酸化水素濃度を測定したところ、P1-CHO と同様に高濃度原料において、過酸化水素生成濃度が下がる傾向があり、その生成量は P1-CHO とほぼ同等であった(図 7)。

これより、の可能性よりも もしくはの可能性が高いと考えられるため、過酸化水素を酵素に分解するカタラーゼ(CAT)を共反応させることにより、およびの課題を合わせて克服できるかを検討した。しかし CAT の添加効果は認められず、生成物濃度の向上は図れなかった(図 8)。そこで酵素濃度が律速であることを確認するため、緩衝液に酵素を吹き込むことで溶存酵素濃度を上昇させた後に酵素反応を開始したところ、P1 濃度の上昇に伴って生成物濃度の増加を図ることが可能であった。

次に、反応温度を 30℃、TYOA を 10mU/mL に固定した際の最適な反応時間及び P1 濃度条件を検討した。その結果、P1 濃度 200-400μM、45 分程度の反応条件において最高濃度の生成物を得られることが示された(図 9)。これは大気下 30℃における溶存酵素飽和濃度が 235μM であることに合致しており、溶存酵素濃度が本反応の律速であると考えられる。

3.3 官能評価

香りは、その濃度によっては不快な香りとして受け取られることがある。そこで、P1-CHO によるフローラルな香りが、どの程度の濃度で適度な強度であるかを検討した。表 2 に示す条件で酵素反応を行った 5 パ

ターンの(試験区 A-E)についてパネラーテストを行った。その結果, 30 , 10分, 400 μ L の反応系では, 12-39 μ M 程度の香りが適当な強度であることを確認した(図 10)。なお, 気体中の適当な香り濃度の測定法を検討するために, 気体中のアルデヒド測定法として一般的に使用される Sep-Pak DNPH シリカカートリッジによる手法⁶⁾を検討したが検出不可能であった。気体中のバイオフレグランスの評価法が今後の課題である。

表2 パネラーテストの条件

	A	B	C	D	E
P1濃度 (μ M)	10	200	10	80	200
TYOA(mU/mL)	0.125	0.125	0.5	0.5	2
P1-CHO濃度(μ M)	2.4	3.8	6.9	12.3	38.8

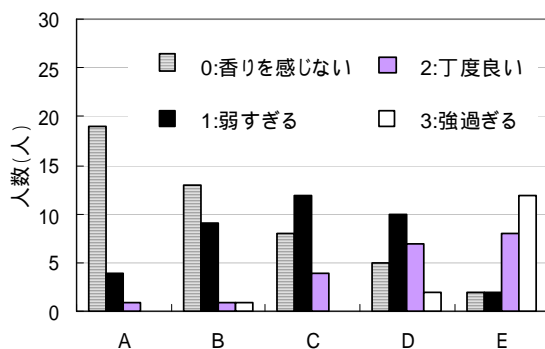


図10 パネラーテストの結果

4. 結 言

微生物酵素を用いた香料の生成に関する研究開発を行い, 以下の成果を得た。

- (1)微生物酵素 TYOA を用いたバイオフレグランスの候補としてフローラルな香りを見出した。
- (2)フローラルな香りについて, 定量評価方法及び最適酵素反応条件, 適当な香り強度を示す濃度(12-39 μ M; 30 , 10分, 400 μ L 反応系)を見出した。

参考文献

- 1) (株)白元. 微生物の代謝を利用した芳香剤及び芳香の発生方法. 特開 1995-187980. 1995-07-25.
- 2) 天野エンザイム(株). 植物体の香気増強法及びこれに用いる香気増強剤. 特開 2005-87084. 2005-04-07.
- 3) 久延善弘, 中野和子, 樋口香織, 末松伸一. HPLC による米飯中のカルボニル化合物の定量. 東洋食品研究所研究報告書. 2000, vol. 23, p. 83-90.
- 4) Andreoli R., Manini P., Corradi M., Mutti A., Niessen WM. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2003, vol. 17, p. 637-645.
- 5) (株)島津製作所. "Analysis of DNPH-aldehydes using LC-MS". LC-MS Application Data Sheet. No. 031.
- 6) 今村清, 江口正治, 大平修平, 白國忠志, 竹中規訓, 田代恭久, 立花茂雄, 平井恭三, 藤方豊, 矢坂裕太. 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体化法による大気中におけるアルデヒド類の高速液体クロマトグラフ定量法の評価. 分析化学. 2003, vol. 52, p. 73-79.