

マイタケ由来タンパク質分解酵素の食品加工への利用

誌名	農業および園芸 = Agriculture and horticulture
ISSN	03695247
著者名	西脇, 俊和
発行元	[発行元不明]
巻/号	85巻6号
掲載ページ	p. 601-608
発行年月	2010年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



マイタケ由来タンパク質分解酵素の食品加工への利用

西脇 俊和*

〔キーワード〕：マイタケ，タンパク質分解酵素，食品加工，苦味低減，機能性食品

1. はじめに

キノコは細菌，糸状菌，酵母などと同様に菌類の一種（担子菌）であるが，糸状菌，酵母は既に何千年も前から醤油等発酵食品の製造に用いられている。一方，キノコは食材としては昔から大いに関心を持たれて利用されてきたが，糸状菌，酵母のように産生する酵素を利用されることはなかった。しかしながら，担子菌由来酵素の精製や性質の解明についての報告(Terashitaら 1985a, b, Nonakaら 1995, Dohmaeら 1995, Nonakaら 1997, Nonakaら 1998, Healyら 1999)は多く，近年になって，担子菌類(キノコ)は糸状菌，酵母にはない，ユニークな酵素を生産することが明らかとなってきている(山岸2002)。

マイタケ (*Grifola frondosa*) は，サルノコシカケ科に属する食用キノコで，ミズナラ，クリ，シイなどの根元に発生するいわゆる木材腐朽菌の一種である。マイタケは大手キノコ生産メーカー，惣菜メーカーで生産されるようになって以来，急速に出荷量が増加し，全国で約43,000t生産されているが(林野庁2008)，このうち約70%を新潟県が占めており，県特産品となっている。現在市場に出回っているマイタケは，殆どが人工栽培で，袋やビンの中に入れた木質基材と米糠などの栄養源を混ぜた人工の培地で栽培する，いわゆる菌床栽培法で商業生産され，年間を通じて流通している。しかしながら，生産されたマイタケはほとんどがトレーパック詰めで出荷されるため，包装時に全生産量の10%程度の切り屑が生じ，コストや環境面などから有効活用技術の開発が大きな課題となっている。また，マイタケの加工品は水煮や炊き込みご飯のもとなどの品目に限られており，新たな加工品開発も求められている。

マイタケは周年流通しているため，家庭では馴染

みの食材となっており，揚げ物，炒め物など様々な方法で調理されている。ところが，茶碗蒸しにマイタケを湯通しせずに入れて調理すると，卵が凝固しない現象が起こることが知られるようになった。湯通しした後に添加すると凝固することから(木元ら1994, 大野ら1995)，マイタケ中に高い活性をもつプロテアーゼの存在が示唆された。そこで，廃棄されてきたマイタケの切り屑等の活用とマイタケの食材以外の利用を目的に，プロテアーゼに着目し，マイタケの新たな利用性について筆者らが行った研究結果を中心に概要を紹介する。

2. マイタケアミノペプチダーゼの性質と苦味除去効果

(1) タンパク質分解物の苦味除去方法

タンパク質は，栄養的な機能の他に，増粘，乳化，気泡剤としても優れた効果を発揮することから，食品加工分野で広く利用されてきた。さらに，タンパク質を分解すると溶解性，熱安定性，消化吸収性も増加するため，経腸栄養食やスポーツ飲料への用途が築かれている(食品と開発編集部2008)。ところが，タンパク質を加水分解すると苦味ペプチドが生成し，不快な苦味を呈することがある。タンパク質は，疎水性領域を内部に包み込んだ状態で存在し，それ自体に苦味はないが，加水分解されると，アミノ酸の疎水性側鎖が露出し，これが舌の苦味受容体を刺激して苦味を呈する(井澤1999, 西村2003)。タンパク質加水分解物の苦味除去法は，1) 苦味ペプチドの疎水性を利用し，ブタノール抽出，疎水性または逆相系樹脂へ吸着させ苦味を除去する方法(選択分離法)，2) サイクロデキストリン，ポリリン酸塩，グルタミン酸，アスパラギン酸等による苦味のマスクング(マスクング法)，3) エクソ型プロテアーゼを作用させ疎水性ペプチドを分解する方法(酵素利用法)に大別される(井澤1999)。このうち，選択分離法は現実的には難しく，マスクング法は効果を得るために添加量を多くする必要

*新潟県農業総合研究所食品研究センター (Toshikazu Nishiwaki)

があるなど、それぞれ欠点を抱えている。一方、酵素利用法は遊離アミノ酸や低分子ペプチドに起因する呈味の変化が起きる可能性があるものの、苦味に選択的に作用する酵素が利用できれば有効な方法である。しかし、食品加工用プロテアーゼの大半は、ペプシン、トリプシン、パパイニンなどのエンド型プロテアーゼであり、苦味除去に利用できるエキソ型プロテアーゼは限られている。

(2) マイタケ子実由来のアミノペプチダーゼ

そこで筆者らは、苦味除去効果を有する食品加工酵素の探索を目的として、マイタケ子実からエキソ型プロテアーゼのスクリーニングを、ロイシンパラニトロアニリド (Leu-pNA) を基質に用いて行った (Nishiwaki and Hayashi 2001)。前述したように、タンパク質加水分解物にエキソ型プロテアーゼを作用させると、苦味を呈するペプチドから疎水性アミノ酸が遊離し、苦味が減少することから (井澤 1999)、疎水性アミノ酸遊離活性が高い酵素ほど苦味除去効果が高いと予測したためである。

はじめにマイタケ抽出液を硫酸塩析し、数種のカラムクロマトグラフィーにより、活性の高い画分を精製して酵素を単離した。表1に酵素の性質を示した。本酵素は、分子量約30kDaの単量体で、至適反応温度は65℃、至適pHは8.5であり、基質のN末端アミノ酸残基のロイシン、フェニルアラニンなど疎水性アミノ酸を優先的に遊離した。また、ベスタチンによって強く阻害され、EDTAやオルトフェナントロリンなどの金属キレートによって失活したことなどから、活性中心に亜鉛をもつ金属酵素と推定された (Nishiwaki and Hayashi 2001)。

(3) マイタケアミノペプチダーゼの苦味除去効果

ダイズタンパク質のペプシン分解物およびカゼインのトリプシン分解物から苦味溶液を調製し、マイタケアミノペプチダーゼを作用させて、苦味除去

能を検討した (Nishiwaki ら 2002)。

図1は、マイタケアミノペプチダーゼによる苦味溶液の官能評価と遊離アミノ酸量の経時変化を示したものである。ダイズタンパク質分解物については、反応時間の経過とともに、苦味が減少し、遊離アミノ酸量が増加した。反応22時間後では、苦味評価は1(閾値)以下となった。このことから、マイタケアミノペプチダーゼにより苦味ペプチドから疎水性アミノ酸を遊離することによって苦味が低減することが確認された。カゼイン分解物においても、苦味が反応開始7時間までは減少し苦味が低減した。しかし、反応7時間以降、遊離アミノ酸が増加し、酵素反応が進行したにもかかわらず、苦味は低減せずに残存した。

図2に、マイタケアミノペプチダーゼによって苦味溶液から遊離したアミノ酸組成の経時変化を示した。マイタケアミノペプチダーゼはダイズタンパク質分解物とカゼイン分解物のいずれについても、ロイシン、フェニルアラニン、バリンなど疎水性アミノ酸を優先的に遊離した。苦味溶液中の平均ペプチド鎖長は、ダイズタンパク質分解物ではマイタケアミノペプチダーゼ処理前の10.8から処理時間の経過とともに短縮し、22時間で5.8にまで短縮した

(図3)。カゼイン分解物では、11.1から22時間反応後に8.3となったが、ダイズタンパク質分解物の鎖長に比べ長かった(図3)。このようなダイズタンパク質分解物とカゼイン分解物に対するマイタケアミノペプチダーゼの分解性の差は、含有するペプチド構造の違いによるものと思われた。そこで、カゼインのアミノ酸組成を見ると、プロリン残基が多く存在し、そのためカゼイン分解物では内部にプロリン残基を含むペプチドを多く含有していることがわかった。すなわち、マイタケアミノペプチダーゼはプロリンを遊離できず分解が完全には進

まなかつたことが、苦味低減の制限された一因であると予想された。一方、ダイズタンパク質分解物に対しては、マイタケアミノペプチダーゼは構成アミノ酸の中で最も多いグルタミン酸およびアスパラギン酸をほとんど遊離しないため、味に大きな変化を与えることなく苦味を低減した。これは、マイタケアミノペプチダーゼの食品加工における優位性を示唆している。

表1 マイタケアミノペプチダーゼの性質

分子量	30000
至適温度	65℃
熱安定性	55℃以下
至適pH	8.5
pH安定性	6.5~10.0
基質特異性	Leu, Phe, Valなど疎水性アミノ酸
阻害剤	EDTA, オルトフェナントロリン, ベスタチン
EDTAで失活した酵素に有効な金属イオン	Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺

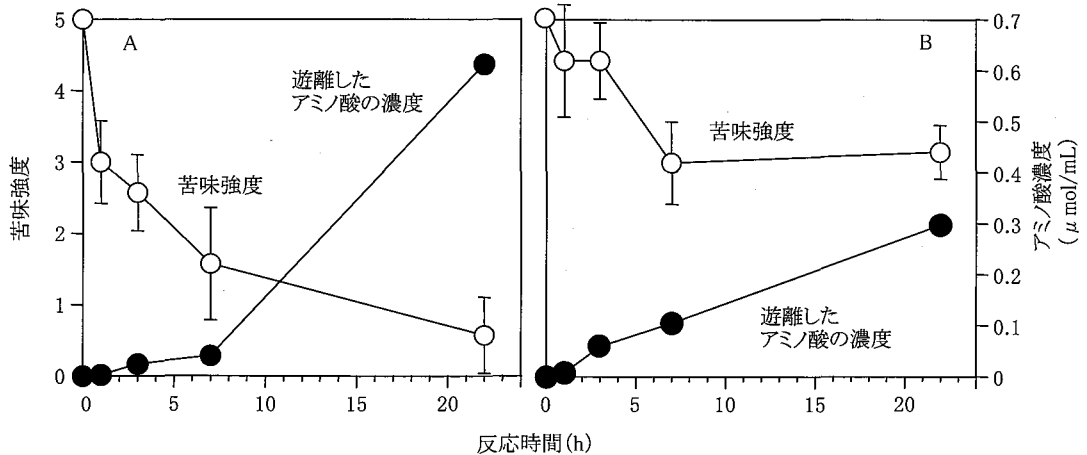


図1 マイタケアミノペプチダーゼによる苦味溶液の遊離アミノ酸と苦味の経時変化 (Nishiwakiら 2002)
 A: ダイズタンパク質分解苦味溶液, B: カゼイン分解苦味溶液
 酵素: 基質=1:2,500 (重量比)
 苦味評価点は5が2% (w/v) Gly-Phe相当の苦味, 1が閾値を表す. 官能評価は8名のパネルで行った.

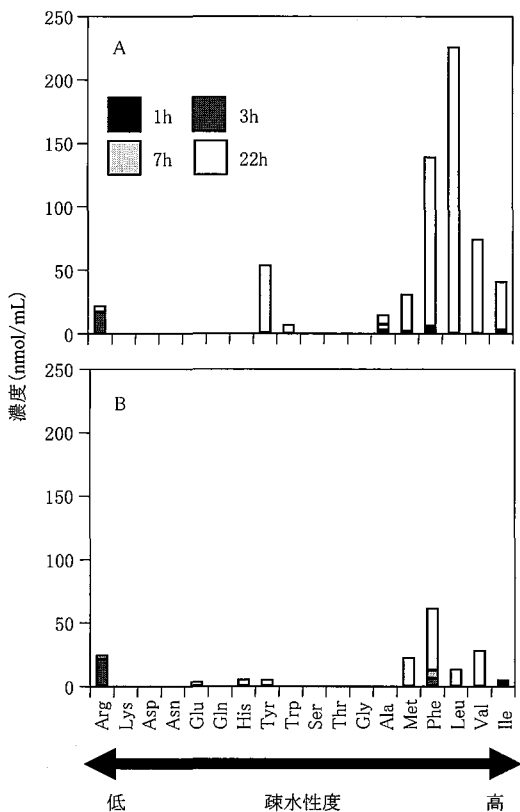


図2 マイタケアミノペプチダーゼによる苦味溶液中の遊離アミノ酸 (Nishiwakiら 2002)
 A: ダイズタンパク質分解苦味溶液
 B: カゼイン分解苦味溶液
 酵素: 基質=1:2500 (重量比)

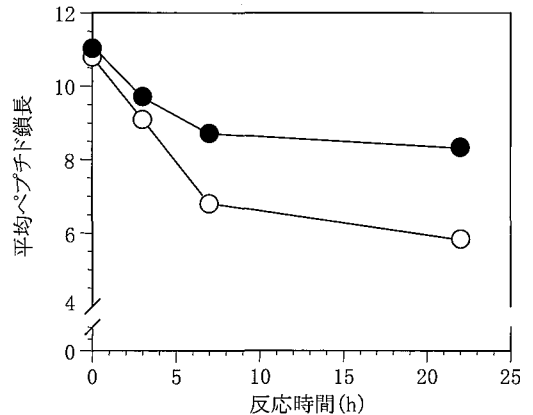


図3 マイタケアミノペプチダーゼによる苦味溶液中のペプチド鎖長の経時変化 (Nishiwakiら 2002)
 A: ダイズタンパク質分解苦味溶液
 B: カゼイン分解苦味溶液
 酵素: 基質=1:2,500 (重量比)

3. マイタケプロテアーゼの性質と利用

(1) マイタケプロテアーゼの性質

マイタケを水に懸濁するだけで、懸濁液は高いプロテアーゼ活性を示し、アミノペプチダーゼを単離・精製する過程でも活性の高い画分が確認された。このことは、マイタケを加熱処理せずに茶碗蒸しの具として入れると凝固が妨げられ、事前に熱処理を施すと凝固する事象からも容易に推測される(図4)。抽出操作、酵素の回収が容易なことは、実用上大きな利点となる。また、マイタケのプロテアーゼ活

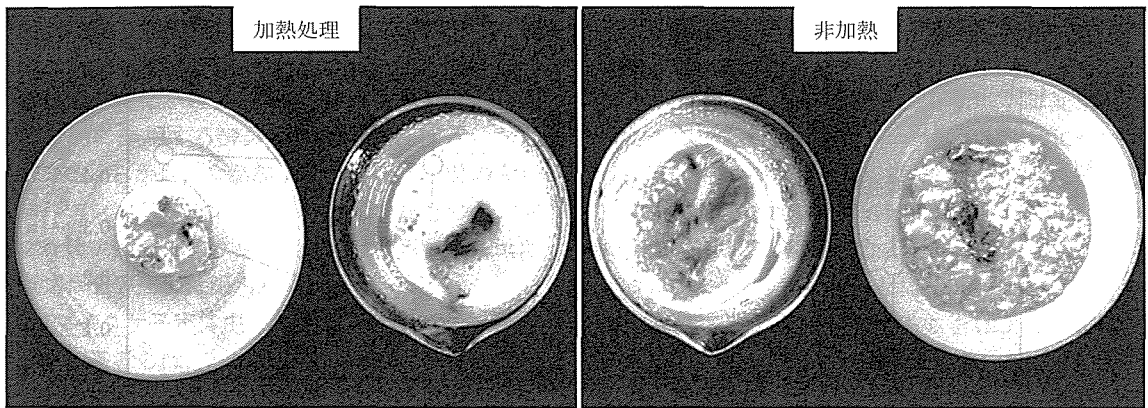


図4 マイタケが鶏卵タンパク質に及ぼす影響 (西脇 2009)
鶏卵溶液 100mLにマイタケ 10gを入れ, 15分間静置した後, 蒸し器で20分間加熱調理した. 加熱処理区は, 事前にマイタケを2分間電子レンジ (500W) で加熱した.

性は, 他の担子菌子実体と比較して非常に高く (図5), 食品加工用途の酵素剤として期待される. そこで, 食品加工利用における優位性を見出すことを目的に, マイタケの水抽出液をプロテアーゼ粗酵素液として, その性質について検討した (西脇 2009).

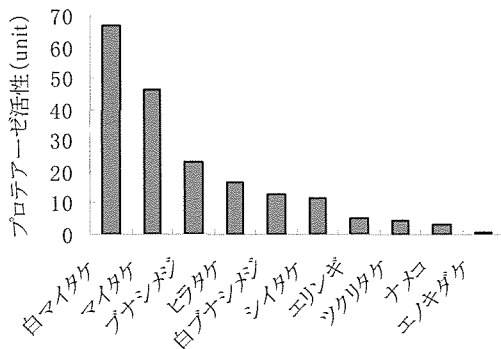


図5 食用担子菌子実体 (市販キノコ) のプロテアーゼ活性 (西脇 2009)

試料: 凍結乾燥粉末 1g/100mL水, 0.2mL
基質: 1%カゼイン水溶液 1mL (50mM MOPS緩衝液, pH 7.0)
反応温度: 60°C 反応時間: 30min
1分間に 1μgのチロシンを遊離する酵素量を 1unitとした.

マイタケ水抽出液 (以下マイタケ酵素液) のプロテアーゼ活性は pH 3.0 と pH 7.0 で高い値を示した (図6). これは, マイタケ酵素液に酸性プロテアーゼと中性プロテアーゼが存在することを示唆している. pH 安定性については, 30°Cで30分間, pH 4.5-8.5の範囲で70%以上の活性が保持された. プロテアーゼ活性に及ぼす温度の影響については, 55°Cで最大の活性を示し, 50-75°Cの範囲で80%以

上の活性を示した (図7). また, 活性は60°C以下で安定で, 60°C30分インキュベートした時, 74.4%の活性が残存した (図7). さらに pH 7.0の時, 60°C24時間インキュベートした後もなお61%の活性が残存した (データ省略). このように, マイタケプロテアーゼは熱に安定であり, 反応温度を高くすることで微生物のコンタミネーションによる腐敗の危険性を抑えられるため, 食品加工に利用する上で非常に有利である.

(2) 分解特異性

マイタケ酵素液が基質タンパク質のどの部位に作用するのかを明らかにするために, 一次構造が既知の30残基のアミノ酸からなるウシ酸化インシュリンB鎖を基質に用いて, 60°C, pH 7.0でマイタケ酵素液を作用させ, 得られたペプチドを分析することによって, 分解位置を特定した (Nishiwaki ら 2009).

Ala¹⁴-Leu¹⁵, Tyr¹⁶-Leu¹⁷, Phe²⁴-Phe²⁵, Pro²⁸-Lys²⁹の部位が, エンド型プロテアーゼによる分解部位であり, Phe¹-Val², Val²-Asn³, Leu¹⁵-Tyr¹⁶, Leu¹⁷-Val¹⁸, Val¹⁸-Cys¹⁹, Phe²⁵-Tyr²⁶の部位がアミノペプチダーゼによる分解部位であることが示された (図8). 既にマイタケ子実体からアシル-リジン結合部位 (-X-Lys-) を特異的に切断する金属エンドペプチダーゼが単離されており (Nonaka ら 1995), Pro²⁸-Lys²⁹部位の切断は, この酵素が関与しているものと推定された. 以上のように, エンド型プロテアーゼとアミノペプチダーゼの特異性が重複しており, エンド型プロテアーゼの作用で生じたペプチ

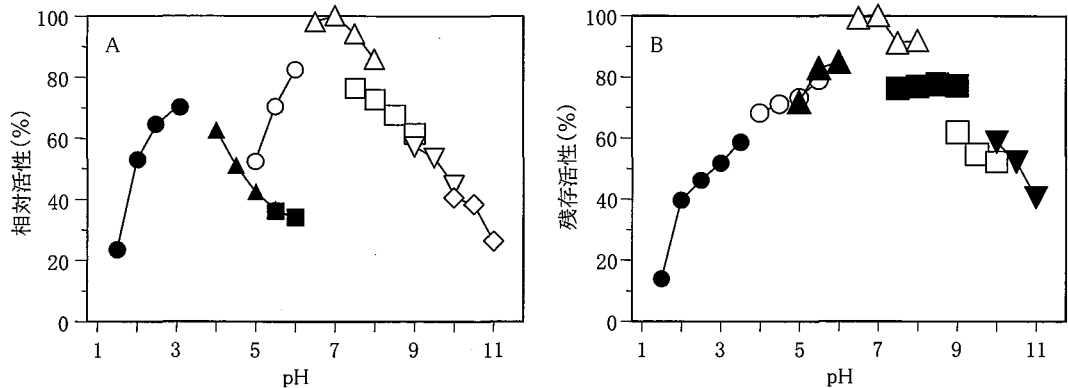


図6 マイタケ水抽出液のプロテアーゼ活性に及ぼすpHの影響 (Nishiwakiら 2009)

A: 至適pH, 30°C 30分反応, 使用した基質; ウシヘモグロビン (pH 1.5~6.0), カゼイン (pH 5.0~11.0), 使用した緩衝液; ●グリシン, ▲酢酸, ■MES, ○MOPS, △Tris-HCl, ▽CHES, ◇CAPS.

B: pH安定性, 酵素液を各pHの緩衝液に30°C・30分曝した後, MOPS緩衝液 (pH 7.0) で30°C・30分反応.

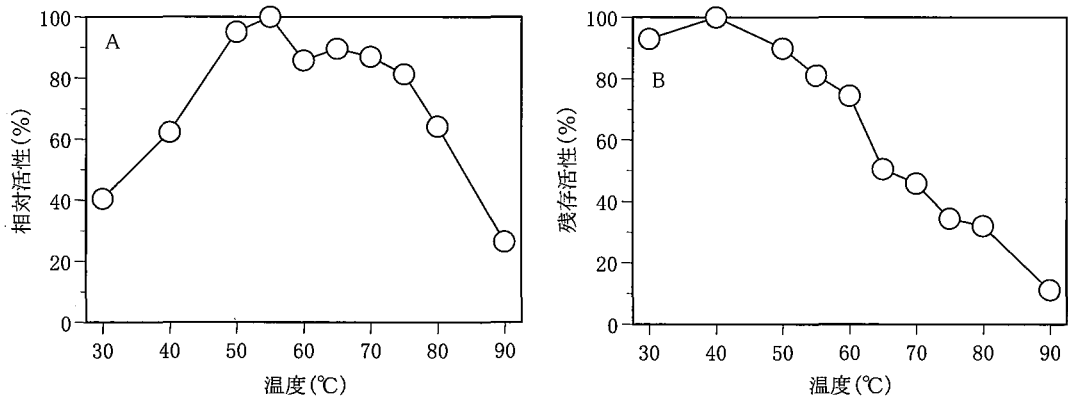


図7 マイタケ水抽出液のプロテアーゼ活性に及ぼす温度の影響 (Nishiwakiら 2009)

A: 至適温度, 基質; カゼイン, MOPS緩衝液 (pH 7.0) で30°C・30分反応.

B: 温度安定性, 基質; カゼイン, 酵素液を各温度で30分曝した後, MOPS緩衝液 (pH 7.0) で30°C 30分反応.

ドのN末端アミノ酸残基をアミノペプチダーゼが切り取り, 共同的に働いていると考えられる. これは, 他の担子菌類のプロテアーゼについても多く見られている (水野ら 1992).

次に, ダイズタンパク質を用いてマイタケ酵素液を反応させ, 遊離するアミノ酸を測定した (Nishiwakiら 2009). マイタケ酵素液によりダイズタンパク質からフェニルアラニン, ロイシン, バリン, イソロイシンなどの疎水性アミノ酸が優先的に遊離したが, ダイズタンパク質の構成アミノ酸の中で最も多いグルタミン酸はほとんど遊離しなかった (図9). この特性は, 前項で示したアミノペプチダーゼの性質によるものと思われ, 水抽出による粗酵素においてもその性質が大きく反映された. また, 反応後のダイズタンパク質分解液は苦味

が感じられず, 呈味に大きな変化を与えることなくタンパク質を分解できることも示された. このことから, マイタケ酵素液は発酵食品の熟成促進や調味液の調製等への適応が期待される.

(3) 機能性食品素材の開発

プロテアーゼによって引き起こされるタンパク質の主な機能性の変化として, 溶解性, 粘性, 保水性, 界面活性, 呈味性などがあるが, 近年は特定保健用食品に代表されるように, 食品の三次機能としての働きが注目されており, スポーツ飲料, 栄養補助食品などでも利用が進んでいる. 特に高血圧は典型的な生活習慣病であるため, 食品の摂取による予防が期待されている. 近年, 食品タンパク質から派生するアミノ酸やペプチドが, 生体内の血圧上昇に関与するアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) を阻

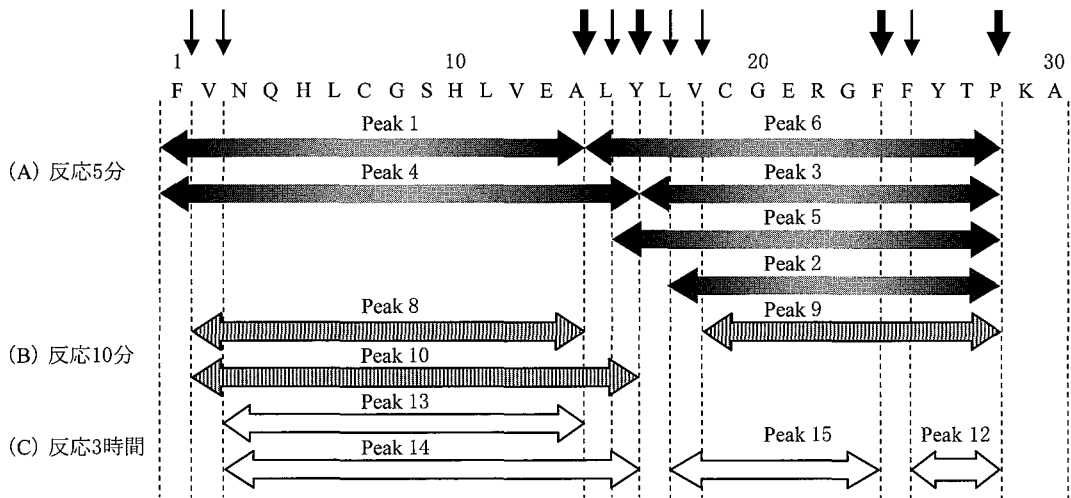


図8 マイタケプロテアーゼによるウシ酸化インシュリンB鎖の分解部位 (Nishiwakiら 2009)
ウシ酸化インシュリンB鎖溶液にマイタケ酵素液を添加し、60°Cでインキュベートした。
5分、10分、3時間後に反応液を10分間沸騰水中に置き反応を停止させた。
ピーク成分(生成ペプチド)をHPLCで分離・分取し、プロテインシーケンサーを用いて同定した。
縦細矢印はアミノペプチダーゼによる分解部位、縦太矢印はエンド型プロテアーゼによる分解部位。
アミノ酸残基は一文字表記とした。

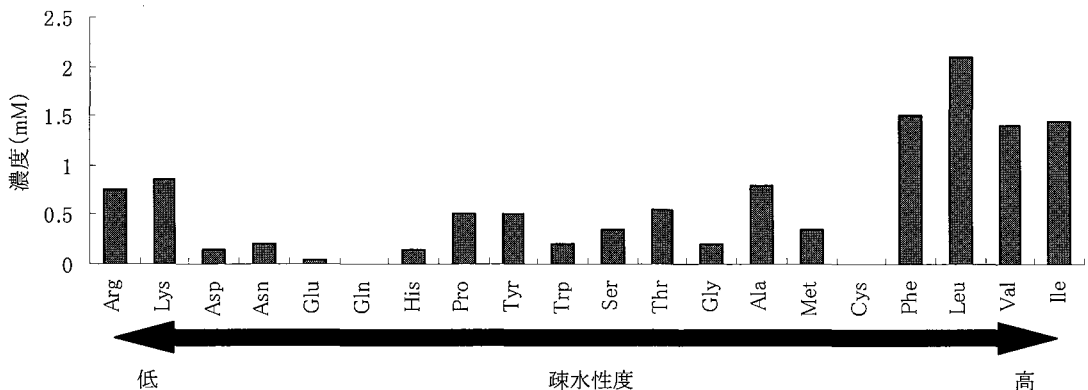


図9 マイタケプロテアーゼによるダイズタンパク質分解液のアミノ酸組成 (Nishiwakiら 2009)
5% (w/v) ダイズタンパク質水溶液にマイタケ酵素液を添加し、60°C24時間反応。

害し、血圧降下作用を示すことも判明してきた(吉川ら 2004)。また、「血圧が高めの方へ」と表記される特定保健用食品の有効成分のほとんどが、2~3残基のアミノ酸で構成されるペプチドである。そこで、高血圧予防食品素材の開発を目的に、マイタケ凍結乾燥粉末を酵素剤に、マイタケプロテアーゼを作用させたときに苦味が少なく呈味性がよいダイズタンパク質を基質に用いて、生成するACE阻害ペプチドの単離・同定を試みた(西脇ら 2008)。

5% (w/v) ダイズタンパク質水溶液にマイタケ凍結乾燥粉末を0.1~5% (w/v) 添加して60°Cで反応

させ、反応液のACE阻害活性の経時変化とマイタケ粉末の添加量の影響を図10に示した。反応時間が6時間まで阻害活性が急激に上昇し、最大となり、それ以降24時間まで阻害活性の上昇はほとんどなかった。マイタケ粉末添加量を2または5%としても1%添加した場合とほとんど変わらなかった。

一方、ペプチド濃度は反応後24時間まで経時的に増加した(図11)。これらのことから、反応後速やかにACE阻害成分が生成し、タンパク質の低分子化が進行しても生成したACE阻害成分はほとんど影響を受けないことが確認された。

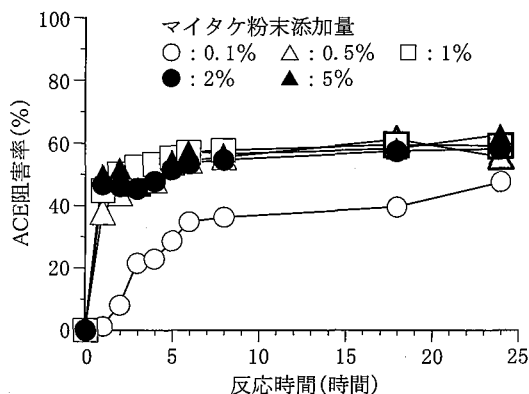


図 10 マイタケ粉末添加量と反応時間が及ぼす ACE 阻害率の経時変化 (西脇 2009)
試料 (基質): 5% (w/v) ダイズタンパク質反応液中の高分子成分をトリクロ酢酸で沈殿除去し、最終的に 10 倍に希釈して測定。

次に、分解物からゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等により得た画分の ACE 阻害活性を測定し、ACE 阻害活性の高いピーク成分を精製した。その結果、Leu-Gln, Ala-Val-Glu, Thr-Ala, Val-Thr-Ala の 4 種のペプチドと既に ACE 阻害能が高いことが知られているニコチアナミンを含む画分を得た (西脇 2009)。ところが、同定した 4 種のペプチドは、いずれも ACE 阻害活性がこれまでに報告されている ACE 阻害ペプチドと比較して高くはなかった。これは、既知の ACE 阻害ペプチドが、疎水性アミノ酸で構成されているものが多く、マイタケプロテアーゼを用いると疎水性アミノ酸を遊離しやすいため、ACE 阻害能の高いペプチドが得られにくいものと思われた。このことから、マイタケプロテアーゼによるダイズタンパク質分解物の ACE 活性阻害能は、複数のペプチドとニコチアナミンなどの成分が共同することで発揮されると推定した。

4. 今後の展開

以上、マイタケのタンパク質分解酵素の特性と食品加工における応用、利点について示した。これまでに、上市されている酵素剤は、糸状菌、細菌、放線菌、植物由来であり、担子菌 (キノコ) 由来の酵素は現在に至るまでない。また、今まで食品加工でキノコを酵素剤として利用した例は、姫マツタケ (*Agaricus blazei*)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) を用いたワイン

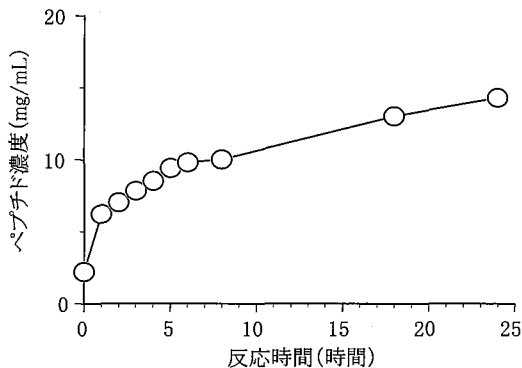


図 11. マイタケプロテアーゼによるダイズタンパク質分解液中のペプチド濃度の経時変化 (西脇 2009)
1%マイタケ粉末添加時の経時変化。
ペプチド濃度は Gly-Phe 換算で算出。

の試醸 (Okamura ら 2001) と、マイタケを用いた魚醤油の速醸 (樋渡ら 2006) があるが、商業的な利用には至っていない。そのため、オリジナリティーの高い加工食品の開発が期待できる。一方、マイタケの食品加工における酵素的な利点が明らかになったが、生産、流通面でも利点が多い。例えば、マイタケは、大手キノコ生産メーカーや惣菜メーカーで工業的に生産されており、原料供給が安定で、かつ、衛生的な管理が可能である。さらに、残留農薬の問題もないなどの利点も兼ね揃えている。農産物の安心・安全の高まりから、近年、植物工場が脚光を浴びているが、現在ではまだ、生産性、需要、コストとの関係で一部の葉菜類にしか適用できていない。マイタケの生産工場は、安全な食材の安定的な供給という点で、先進的な農 (林) 産物生産システムであり、食の安心・安全が大前提である現在において、マイタケは最も合理的に生産できる素材のひとつであると考えられる。マイタケ工場が、食糧供給の面だけでなく、食品加工用酵素剤の供給源となり、新たな産業が形成され、さらなる高付加価値化に繋がることを期待している。

参考文献

- Dohmae, N., Hayashi, K., Miki, K., Tsumuraya Y., and Hashimoto Y. 1995. Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* Fruiting bodies. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59 (11): 2074-2080.
- Healy, V., O'Connell, J., McCarthy, T. V., and Doonan, S. 1999 The lysine-specific proteinase from *Armillaria mellea* is a member of a novel class of

- metalloendopeptidases located in Basidiomycetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262: 60-63.
- 樋渡一之・高橋砂織ら 2006. 担子菌類のタンパク質分解酵素の特性解明とその応用—マイタケを用いた魚醤油速醸法の開発—. 平成16年度 実用化できる試験研究成果. 秋田県ホームページ.
- 井澤 登 1999. 蛋白質加水分解物の苦味とその除去. *食品科学工学会誌* 46 (8) : 501-507.
- 木元幸一・林あつみ・草間正夫・菅原龍幸・青柳康夫 1994. 卵白の加熱凝固に対するマイタケ中のプロテアーゼの影響. *栄養食糧学会誌* 47 (1) : 43-48.
- 水野 卓・川合正允編著 1992. キノコの化学・生化学. pp. 202-203. 学会出版センター.
- 西村敏英 2003. 食品の呈味形成におけるペプチドの働き—呈味性ペプチドとペプチドの味覚調節作用—. *日本調理科学会誌* 36 (1) : 55-62.
- Nishiwaki, T., and Hayashi, K. 2001. Purification and characterization of an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (2): 424-427.
- Nishiwaki, T., Yoshimizu, S., Furuta, M., and Hayashi, K. 2002. Debittering of enzymatic hydrolysates using an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93 (1): 60-63.
- 西脇俊和・浅野 聡・大山卓爾 2008. マイタケ由来プロテアーゼを用いた大豆タンパク質分解によるACE阻害ペプチドの生成. 日本農芸化学会 2008年度大会講演要旨集. pp. 300.
- Nishiwaki, T., Asano, S., and Ohyama, T. 2009. Properties and substrate specificities of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 (6): 605-609.
- 西脇俊和 2009. マイタケ子実体のタンパク質分解酵素を利用した食品加工に関する研究. 新潟大学大学院自然科学研究科博士学位論文.
- Nonaka, T., Ishikawa, H., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y., Dohmae, N., and Takio, K. 1995. Characterization of a thermostable lysine-specific metalloendopeptidase from the fruiting bodies of a basidiomycete, *Grifola frondosa*. *Journal of Biochemistry* 118: 1014-1020.
- Nonaka, T., Dohmae, N., Hashimoto, Y., and Takio, K. 1997. Amino acid sequences of metalloendopeptidases specific for acyl-lysine bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Journal of Biological Chemistry* 272 (48): 30032-30039.
- Nonaka, T., Hashimoto, Y., and Takio, K. 1998. Characterization of a thermostable lysine-specific metalloendopeptidases from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Journal of Biochemistry* 124: 157-162.
- Okamura, T., Ogata, T., Minamimoto, N., Takeno, T., Noda, H., Fukuda, S., and Ohnogi, M. 2001. Characteristics of wine produced by mushroom fermentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (7): 1596-1600.
- 大野信子・仁平佳奈・小平了二 1995. マイタケ (*Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray) 子実体から溶出する加水分解酵素. 和洋女子大学紀要 第35集 (家政系編) : 11-19.
- 林野庁 2008. 平成19年の主要な特用林産物の生産動向. 林野庁ホームページ.
- 食品と開発 編集部 2008. たん白・ペプチド素材の市場動向. *食品と開発* 43 (7) : 33-44.
- Suda, H., Aoyagi, T., Takeuchi, T., and Umezawa, H. 1976. Inhibition of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase by bestatin and its stereoisomer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 177: 196-200.
- Terashita, T., Oda, K., Kono, M., and Murao, S. 1985. Proteinase systems in *Flammulina velutipes* and *Pleurotus ostreatus*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 26: 397-409.
- Terashita, T., Oda, K., and Murao, S. 1985. Purification and some properties of metal proteinases from *Lentinus edodes*. *Agricultural Biology and Chemistry* 49: 2293-2300.
- Umezawa, H., Ishizuka, M., Aoyagi, T., and Takeuchi, T. 1976. Enhancement of delayed-type hypersensitivity by bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase. *Journal of Antibiotics* 29: 857-859.
- 吉川正明・Marczak, Ewa D.・藤田裕之 2004. 血圧調節におけるペプチドの役割. *Food Style* 21. 8 (7) : 45-50.
- 山岸賢治 2002. 遺伝子導入キノコの作出と展望. *食の科学* 296 : 21-27.