# マイタケ由来タンパク質分解酵素の食品加工利用


| | |
|---|---|
| 誌名 | 日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan |
| ISSN | 09147314 |
| 著者名 | 西脇,俊和 |
| 発行元 | 日本醸造協会 |
| 巻/号 | 108巻8号 |
| 巻号補足 | |
| 掲載ページ | p. 575-582 |
| 発行年月 | 2013年8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利用

**従来，キノコは食材として捉えられることが主であったが，近年は新たに酵素のソースとしての側面に関心が寄せられているという。著者は，日常の食卓に上るようになって久しいおなじみのマイタケのタンパク質分解活性の高さに注目した取り組みを行っている。ここでは，マイタケアミノペプチダーゼの基質特異性を利用したタンパク質分解物の苦味除去や，血圧降下作用を有するペプチドの生成などについて述べていただいた。ご一読いただければ，マイタケひいてはキノコの酵素の食品加工への広範な応用の可能性の一端がうかがえるはずである。**

西脇俊和

## 1. はじめに

キノコはカビ，酵母などと同様に菌類の一種（担子菌）であるが，カビ，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関心をもたれて利用されてきたが，カビ，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，担子菌由来酵素の精製や性質の解明についての報告[1-7]は多く，近年になってキノコはカビ，酵母にはないユニークな酵素を生産することが明らかにされている[8]。

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43,000トン生産されているが[9]，このうち約60%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，様々な方法で揚げ物，炒め物などに調理されている。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[10,11]，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への利用を目的にタンパク質分解酵素に着目し，マイタケの新たな利用性について当センターが行った研究結果を中心に紹介する。

## 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いる。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

Food Processing Using Proteolytic Enzymes from the Edible Basidiomycete *Grifola frondosa*
Toshikazu NISHIWAKI (*Niigata Agricultural Research Institute Food Research Center*)

いる[12]。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[13,14]。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たブタノール抽出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キング（マスキング法），③エキ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[13]。このうち，選択分離法は現実的には難しく，マスキング法は効果を得るために添加量を多くする必要があるなど，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，選択的に苦味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) マイタケ子実体由来のアミノペプチダーゼ

そこで著者らは，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，マイタケ子実体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-*p*NA）を基質に用いて行った[15]。これは前述したように，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[13]，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。

はじめにマイタケの抽出液を硫安塩析し，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単離・精製して酵素を単離した。第1表に酵素の性質を示した。本酵素は分子量が約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，本酵素は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剤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[15]。

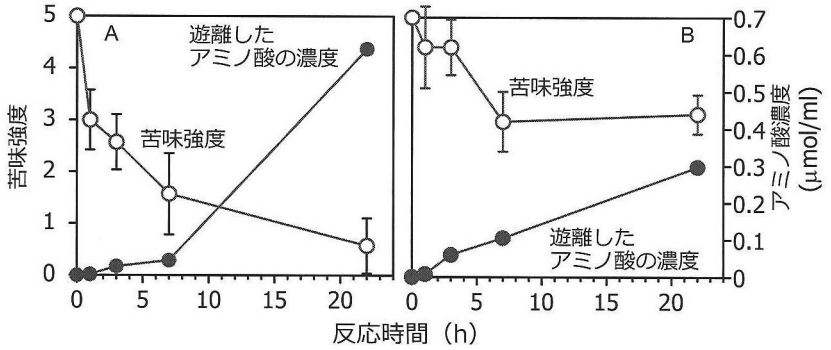
### (3) マイタケアミノペプチダーゼの苦味除去効果

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[16]。

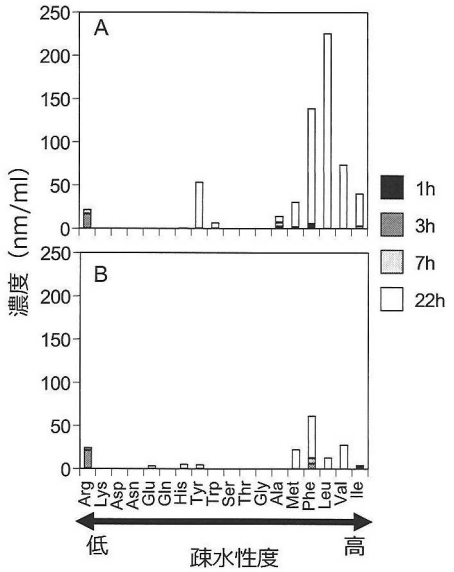
第1図にマイタケアミノペプチダーゼによる苦味溶液の官能評価と遊離アミノ酸量の経時変化を示した。ダイズタンパク質分解物については，反応時間の経過とともに苦味が減少し遊離アミノ酸量が増加した。反応22時間後では苦味評価は1（閾値）以下となった。このことから，マイタケアミノペプチダーゼにより苦味ペプチドから疎水性アミノ酸を遊離することによって苦味が低減することが確認された。カゼイン分解物においても苦味が反応開始7時間までは減少し苦味が低減した。しかし，反応7時間以降，遊離アミノ酸が増加し酵素反応が進行したにもかかわらず，苦味は低減せずに残存した。第2図にマイタケアミノペプチダーゼによって苦味溶液から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

**第1表** マイタケアミノペプチダーゼの性質

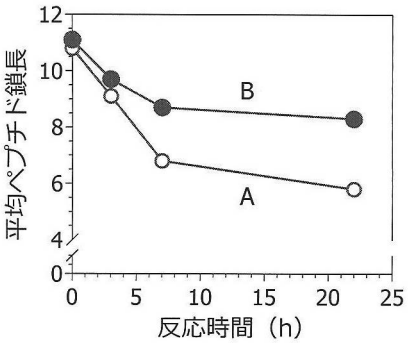
| | | | |
|---|---|---|---|
| 分子量 | 30,000 | 基質特異性 | Leu，Phe，Valなど疎水性アミノ酸 |
| 至適温度 | 65℃ | 阻害剤 | EDTA，オルトフェナントロリン，ベスタチン |
| 熱安定性 | 55℃以下 | EDTAで失活した酵素に有効な金属イオン | Mn，Zn，Cu，Co |
| 至適pH | 8.5 | | |
| pH安定性 | 6.5～10.0 | | |




**第1図**　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
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。




**第2図**　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
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)




**第3図**　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
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)

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（第3図）。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（第3図）。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っ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殆ど遊離しないため，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への利用性を示唆している。

## 3. マイタケ水抽出液の性質と利用

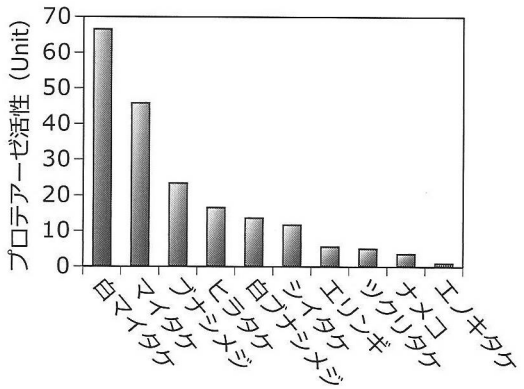
### (1) マイタケ水抽出液の性質

マイタケを水に懸濁するだけでその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，あらかじめ熱処理を施すと凝固する事象からも容易に推測される（第4図）。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性は他の担子菌子実体と比較して非常に高く（第5図），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[17]。

マイタケ水抽出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（第6図A）。これはマイタケ水抽出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℃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（第6図B）。プロテアーゼ活性に及ぼす温度の影響については，55℃で最大の活性を示し，50－75℃の範囲で80%以上の活性を示した（第7図A）。また，活性は60℃以下で安定で，60℃ 30分インキュベートした時，74.4%の活性が残存した（第7図B）。さらにpH 7.0の時，60℃ 24時間インキュベートした後でもなお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。

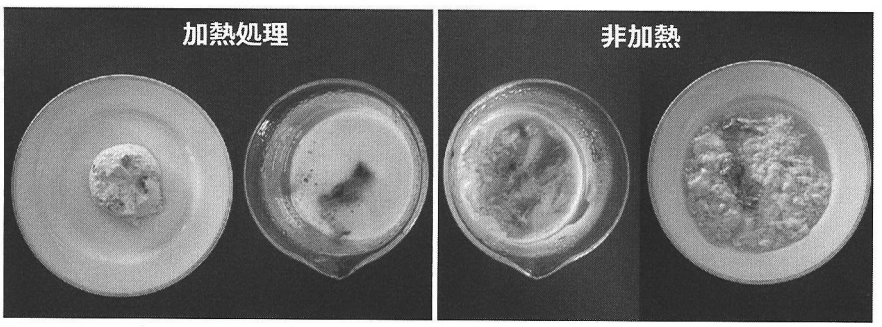
### (2) 分解特異性

マイタケ水抽出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℃，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



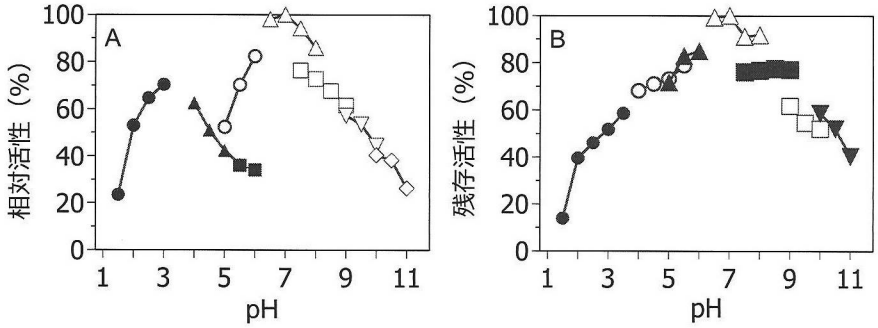

**第5図** 食用担子菌子実体(市販キノコ)のプロテアーゼ活性

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℃，反応時間：30 min，1分間に1 μgのチロシンを遊離する酵素量を1 unitとした。



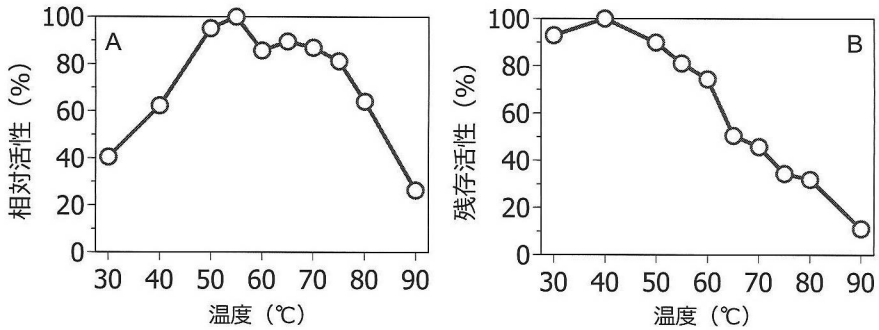

**第4図** マイタケが鶏卵タンパク質に及ぼす影響

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，あらかじめマイタケを2分間電子レンジ(500W)で加熱した。




**第6図**　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

A：至適 pH，30℃ 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，○ MES，△ MOPS，□ Tris-HCl，▽ CHES，◇ CAPS
B：pH 安定性，酵素液を各 pH の緩衝液に 30℃ 30 分曝した後，MOPS 緩衝液（pH 7.0）で 30℃ 30 分反応。

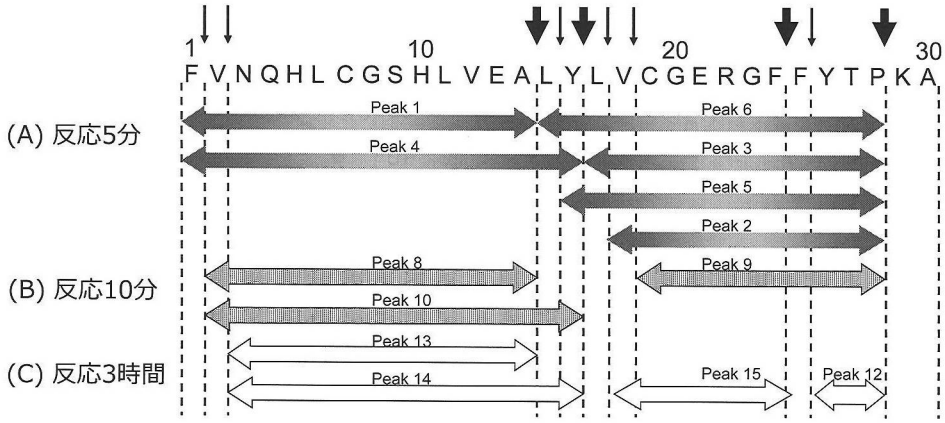



**第7図**　マイタケ水抽出液のプロテアーゼ活性に及ぼす温度の影響

A：至適温度，基質；カゼイン，MOPS 緩衝液（pH 7.0）で 30℃ 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℃ 30 分反応。

て，分解位置を特定した[18]。Ala[14]-Leu[15]，Tyr[16]-Leu[17]，Phe[24]-Phe[25]，Pro[28]-Lys[29] の部位が，エンド型プロテアーゼによる分解部位であり，Phe[1]-Val[2]，Val[2]-Asn[3]，Leu[15]-Tyr[16]，Leu[17]-Val[18]，Val[18]-Cys[19]，Phe[25]-Tyr[26] 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（第 8 図）。既にマイタケ子実体からアシルーリジン結合部位（-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[5]，Pro[28]-Lys[29] 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[19]。

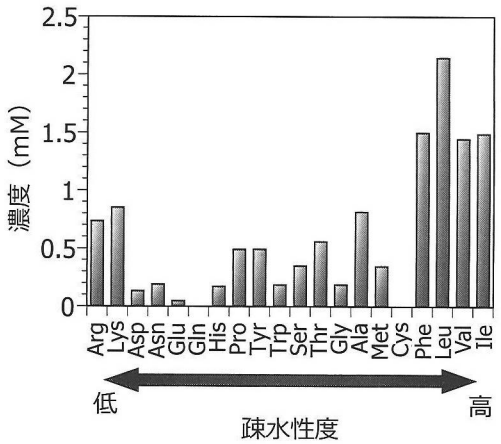
次にダイズタンパク質にマイタケ水抽出液を反応させ，遊離するアミノ酸を測定した[18]。マイタケ水抽出液によりダイズタンパク質からフェニルアラニン，ロイシン，バリン，イソロイシンなどの疎水性アミノ酸を優先的に遊離したが，ダイズタンパク質の構成アミノ酸の中で最も多いグルタミン酸は殆ど遊離しなかった（第 9 図）。この特性は，前項で示したアミノペプチダーゼの性質によるものと考えられ，水抽出による粗酵素においてもその性質が大きく反映された。また，反応後のダイズタンパク質分解液は苦味が感じられず，呈味に大きな変化を与えることなくタンパク質を分解できることも示された。このことから，マイタケ水抽出液は発酵食品の熟成促進や調味液の調製等への適応が期待される。




**第8図**　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

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℃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。

細矢印はアミノペプチダーゼによる分解部位，太矢印はエンド型プロテアーゼによる分解部位。




**第9図**　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

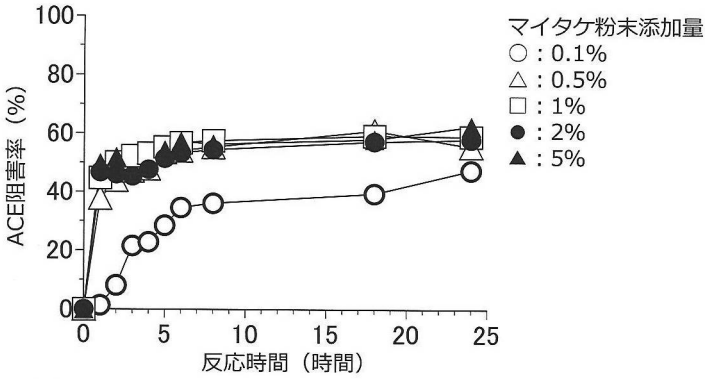
5%(w/v)ダイズタンパク質水溶液にマイタケ水抽出液を添加し60 ℃ 24時間反応。

### (3) 機能性食品素材の開発

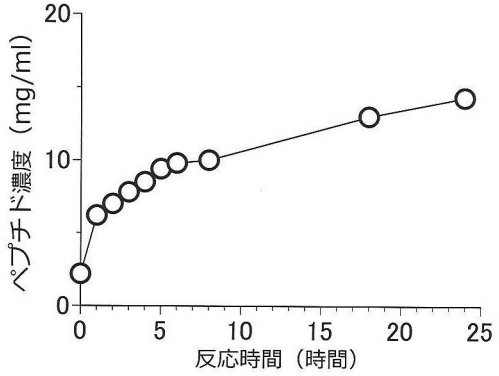
プロテアーゼによって引き起こされるタンパク質の主な機能性の変化として，溶解性，粘性，保水性，界面活性，呈味性などを挙げられるが，近年は特定保健用食品に代表されるように食品の三次機能としての働きが注目されており，スポーツ飲料，栄養補助食品などでも利用が進んでいる。特に高血圧は典型的な生活習慣病であるため，食品の摂取による予防が期待されている。近年，食品タンパク質から派生するアミノ酸やペプチドが生体内の血圧上昇に関与するアンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）を阻害し，血圧降下作用を示すことも明らかにされてきた[20]。また，「血圧が高めの方へ」と表記される特定保健用食品の有効成分のほとんどが2～3残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。

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℃で反応させ，その反応液のACE阻害活性の経時変化とマイタケ粉末の添加量の関係を第10図に示した。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(第11図)。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。

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




**第10図**　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
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ロ酢酸で沈殿除去し，最終的に10倍に希釈して測定。




**第11図**　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
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。

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-Aal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。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協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，利点について記した。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*）を用いたワインの試醸[21]とマイタケを用いた魚醤油の速醸[22]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。農産物の安全・安心の高まりから近年，植物工場が注目されているが，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，食の安全・安心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って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。

〈新潟県農業総合研究所食品研究センター〉

## 参考文献


1) Terashita, T., Oda, K., Kono, M. and Murao, S.: *Transactions of the Mycological Society of Japan*, **26**, 397-409 (1985)
2) Terashita, T., Oda, K. and Murao, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2293-2300 (1985)
3) Nonaka, T., Ishikawa, H., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y., Dohmae, N. and Takio, K.: *Journal of Biochemistry*, **118**, 1014-1020 (1985)
4) Dohmae, N., Hayashi, K., Miki, K., Tsumuraya Y. and Hashimoto Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59** (11), 2074-2080 (1995)
5) Nonaka, T., Dohmae, N., Hashimoto, Y. and Takio, K.: *J. Biol. Chem.*, **272** (48), 30032-30039 (1997)
6) Nonaka, T., Hashimoto, Y. and Takio K.: *J. Biochem.*, **124**, 157-162 (1998)
7) Healy, V., O'Connell, J., McCarthy, T. V. and Doonan, S.: *Biochem. Biophys. Res.*, **262**, 60-63 (1999)
8) 山岸賢治：食の科学，**296**, 21-27 (2002)
9) 林野庁：平成23年特用林産物の生産量 (2013), http://www.rinya.maff.go.jp/j/press/tokuyou/121003.html.
10) 木元幸一，林あつみ，草間正夫，菅原龍幸，青柳康夫：日栄・食糧会誌，**47** (1)，43-48 (1994)
11) 大野信子，仁平佳奈，小平了二：和洋女子大学紀要　第**35**集（家政系編），11-19 (1995)
12) 食品と開発 編集部：食品と開発，**43** (7)，33-44 (2008)
13) 井澤　登：食科工誌，**46** (8)，501-507 (1999)
14) 西村敏英：日本調理科学会誌，**36** (1)，55-62 (2003)
15) Nishiwaki, T. and Hayashi, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (2), 424-427 (2001)
16) Nishiwaki, T., Yoshimizu, S., Furuta, M. and Hayashi, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93** (1), 60-63 (2002)
17) 西脇俊和，浅野　聡，大山卓爾：日本農芸化学会2008年度大会講演要旨集，300 (2008)
18) Nishiwaki, T., Asano, S. and Ohyama, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **107** (6), 605-609 (2009)
19) 水野　卓，川合正允 編著：キノコの化学・生化学．学会出版センター，202-203 (1992)
20) 吉川正明，Marczak, Ewa D.，藤田裕之：*Food Style* 21, **8** (7)，45-50 (2004)
21) Okamura, T., Ogata, T., Minamimoto, N., Takeno, T., Noda, H., Fukuda, S. and Ohsugi, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (7), 1596-1600 (2001)
22) 樋渡一之，高橋砂織：16年度　実用化できる試験研究成果 (2006), http://www.pref.akita.lg.jp/www/contents/1131329992182/index.html