

ペプシンとパンクレアチンを用いた酵素分析法の キノコ食物繊維定量への応用

荒木 裕子

Application of Enzymatic Analysis with Pepsin and Pancreatin for the Determination of Dietary Fiber in Mushrooms

HIROKO ARAKI

A modified pepsin/pancreatin method was applied for the determination of dietary fibers in cultivated type mushroom.

The results of histochemical examinations indicate that the hypha, basidium and basidiospore cell walls of the sample mushroom contained chitin but no cellulose, lignin nor starch. A small amount of insoluble pectin was observed in the hymenium. These cell wall components showed no change after the pepsin/pancreatin treatment. On the other hand, protein reactions of protoplasm of various cells completely disappeared after the pepsin/pancreatin digestion, except a few sclerenchyma and basophilic hyphae.

The obtained data by this pepsin/pancreatin method were compared with those by AOAC method in an analytical test. The total dietary fiber (TDF) values obtained by the pepsin/pancreatin method were constantly higher than those by AOAC method.

近年食用キノコの栽培及び品種改良技術の進歩、普及に伴い四季を通じ、大量の栽培キノコが食品市場に流通するようになった。

しかし、その栄養価値、食材料としての特性などに関する知見は必ずしも広いとはいえない。本研究は栽培キノコ類を対象とした食物繊維定量法を検討した。

一般に食物繊維定量法は大別すると洗剤、酸、アルカリなどの抽出剤を用いる方法と、アミラーゼ、プロテアーゼなどの酵素剤を用いる方法とに大別され、前者を代表するものにVAN SOESTの酸性洗剤法(1963)¹⁾及び中性洗剤法²⁾があり、その変法も数多く提案されており、後者を代表とするものにAOAC公定法として採用されたProsky³⁾ら(1984)酵素

—重量法(以下AOAC法と呼ぶ)が知られている。

しかし、食品中の食物繊維成分の内容も多岐にわたっており、どの食品にも適用できる方法を見出すことは困難であり、少なくとも食品群毎に適用すべき分析法を選定すべきであると考えられる。簡便迅速法として広く採用されるようになった前述のAOAC法も残渣中の窒素をすべて非食物繊維成分として蛋白質に換算して一括控除する点に問題があることが指摘されており⁴⁾、著者らのグループも野菜類の食物繊維成分の分別定量にあたり、リグニンの多い材料ではペクチン質、リグニン、ヘミセルロース、セルロースなどの分画値を合計したTDF値よりAOAC法による

Key words: mushroom, dietary fiber

TDF値が低い値を示すことを報告している⁵⁾。

キノコ類の食物繊維の分析に関しては倉沢らの広汎な研究^{4), 6)}があり,キノコ類にAOAC法を適用するにあたって,キチン量を別に定量し,キチン由来の窒素量で残渣窒素量の補正をおこなう方法が報告されている。

ここでは,食品中の不消化残渣の定量を目的としたHELLENDOORNらの方法⁷⁾を部分的に改変した方法(以下,ペプシン-パンクレアチン消化法と呼ぶ)の市販栽培キノコの食物繊維定量への適用を試み,併せてAOAC法との分析値の比較と,組織化学的な検討を行った。

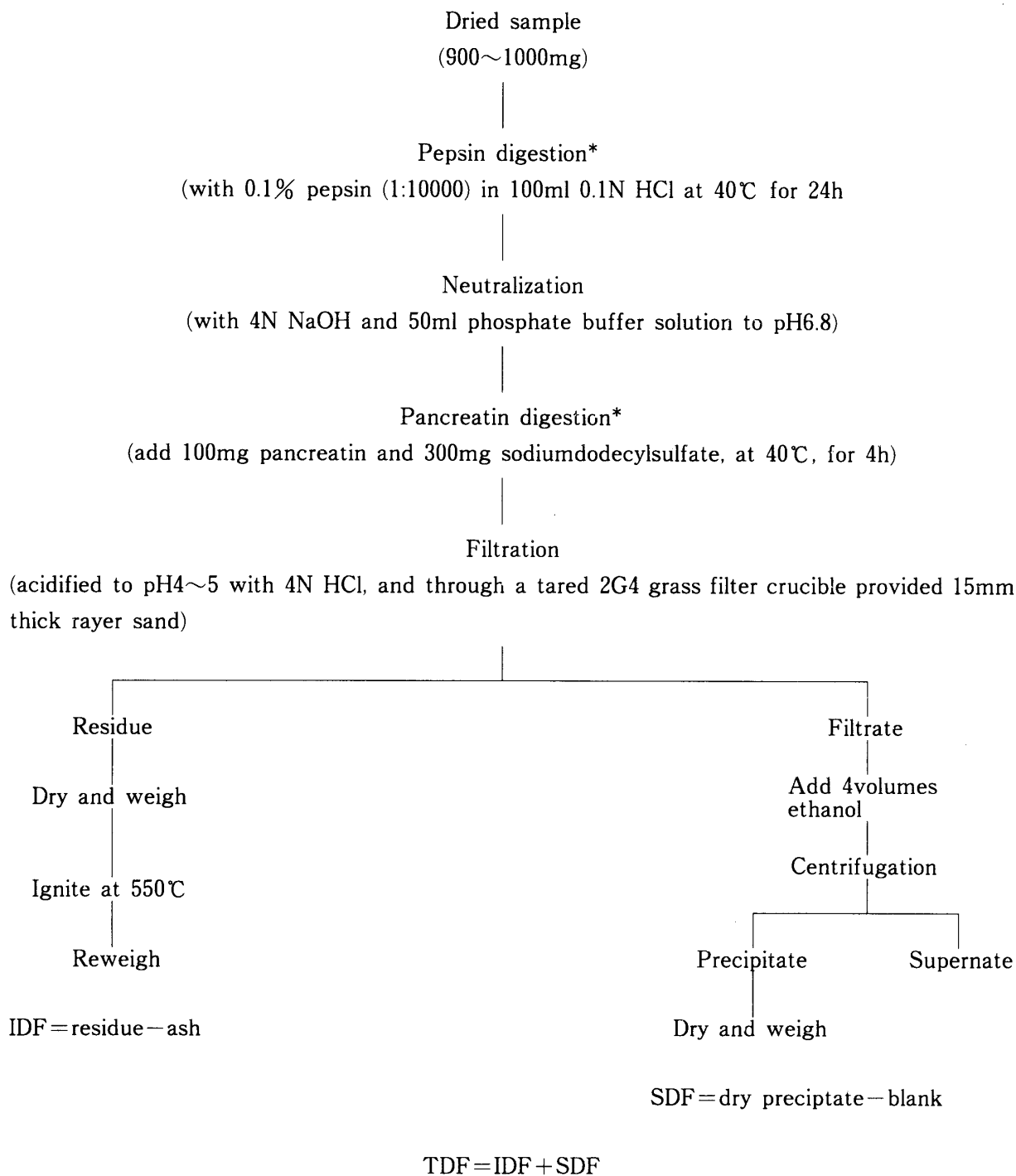


Fig. 1 Scheme of pepsin/pancreatin digestion procedure

* : Treatment was conducted by shaking extraction (100 stroke/min.)

材料と方法

1. 試料キノコ

シイタケ	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler
ホンシメジ	<i>Lyophyllum shimeji</i> (Kawam.) Hongo
ナメコ	<i>Pholiota nameko</i> (T. I- to.) S. Ito et Irnai
マッシュルーム	<i>Agaricus bisporus</i> (J. Lge.) Pila't
マイタケ	<i>Grifola frondosa</i> (Fr.) S. F. Gray

以上5種の市販栽培キノコを用いた。

2. 食物繊維の分析

(1) 試料の調製

市販生鮮試料は凍結乾燥して粉碎し、約1gを精秤して分析試料とした。水分含量はシイタケ90.29%、ホンシメジ92.29%、ナメコ94.13%、マッシュルーム93.29%、マイタケ91.01%であった。

(2) ペプシン-パンクレアチン消化法の操作はHELLENDOORNらの原法は体内消化の実態に近い*in vitro*の消化試験、即ち不消化残渣の定量に力点があり、HELLENDOORNらはそれらをそのまま総食物繊維量(TDF)値としているが、理論的にやや難点があるので酵素消化後の濾液中の可溶性繊維(SDF)をFURDA(1979)⁸⁾及びSCHWEIZERら(1979)⁹⁾の方法に準じ、80%エタノール沈でん物として捕捉し、他方、不溶性食物繊維(IDF)は残渣-残渣灰分=IDFとして算定し、TDF=SDF+IDFとした。なお、エタノール沈でん物中の灰分量は、900~1000mg程度の試料採取量では無視できる水準であった。

ここで用いたペプシン-パンクレアチン消化法は可消化蛋白質及び糖質の完全抽出を前提とするため、酵素処理時間を原法より延長するとともに、振とう抽出(100ストローク/分)した。パンクレアチン消化(pH 6.8)の際は変敗防止のためチモールを添加した。処理操作のスキームはFig 1の如くである。

(3) AOAC法

PROSKYらの原法通り実施した。

3. 組織化学的手法

(1) 固定、切片の作成

生鮮試料の傘、柄小片を採取し、10%中性ホルマリン固定(72h)後25 μ m氷結切片を作成した。

(2) 染色

1) 蛋白質: アミノ基を検出するジニトロフロロベンゼン法(DNFB法)¹⁰⁾

2) セルロース: ヨウ素液(ルゴール液)処理後飽和塩化亜鉛水溶液又は2/3硫酸で処理するchlor-Zinc-Iodine method¹¹⁾

3) キチン: RUNHAM(1961)¹²⁾のキチン同定法に準じ過ヨウ素酸-シッフ反応(PAS反応)¹³⁾を主とし、アルシアンブルー、トルイジンブルー、ブロムフェノールブルー染色などを併用した。さらに、50%KOH処理後のヨード性亜鉛処理法も試みた。

4) デンプン: ヨウ素反応

5) リグニン: フロログルシン-HCl反応¹⁴⁾

6) 酸性粘液多糖類: トルイジンブルー及びチオニンによるメタクロマジー反応¹⁵⁾

7) ペクチン質: ルテニウムレッド染色¹⁶⁾とペクチナーゼ消化の併用し、対照切片としてダイコン凍結切片を使用した。

結果と考察

1. 組織化学的所見

未処理切片による主要成分の固定とペプシン-パンクレアチン消化法の効果の観察結果は概要次の如くである。(Table 1)

(1) 蛋白質の分布と酵素処理後の影響

菌糸、担子器、担子孢子などの原形質はDNFB反応で中等度の陽性反応を示し、ペプシン-パンクレアチン消化法で陰性化した(Fig. 2~Fig. 3)。ただし、ナメコ、マッシュルームの菌糸組織に少数分布し蛋白反応強陽性で好塩基性(チオニン、トルイジンブルー好染性)の原形質をもつ厚膜菌糸は処理後も弱い蛋白反応が残存していた。(Fig. 4)

(2) キチンとセルロースの同定と酵素処理の

Table 1 Histochemical test for efficiency of the proposed method
(pepsin-pancreatin digestion procedure)

Sample and treatment of section	Histochemical staining									
	DNFB method for protein		Chlor-zinc-iodine method for cellulose		PAS reaction for chitin		Ruthenium red staining for pectin		Phloroglucin-HCl reaction for lignin	
	W	P	W	P	W	P	W	P	W	P
<i>L. edodes</i>										
mushroom US	—	+	—	—	##	—	+	—	—	—
TS	—	—	—	—	##	—	+	—	—	—
<i>L. simeji</i>										
mushroom US	—	+	—	—	##	—	+	—	—	—
TS	—	—	—	—	##	—	+	—	—	—
<i>P. nameco</i>										
mushroom US	—	##~###*	—	—	##	—	+	—	—	—
TS	—	—~+*	—	—	##	—	+	—	—	—
<i>A. bisporus</i>										
mushroom US	—	##~##	—	—	##	—	+	—	—	—
TS	—	—~+	—	—	##	—	+	—	—	—
<i>G. frondosa</i>										
mushroom US	—	+	—	—	##	—	+	—	—	—
TS	—	—	—	—	##	—	+	—	—	—

—~##: density of staining

US: untreated section

TS: treated (enzyme digestion) section

W: cellwalls (hyphase, basidia, basidiospores)

P: protoplasm

*: a basophilic and sclerenchyma hyphae.

影響

各試料未処理切片のすべての細胞壁はPAS強陽性でトルイジンブルー、アルシャンブルー、ブロムフェノールブルー等には陰性であった。(Fig. 5)

古典的なキチン検出法であるアルカリ(酸)処理後のヨード性亜鉛処理及びその変法の何れにも対照試料の甲殻類キチンは陽性であったがキノコ細胞壁ではすべて陰性であった。

セルロースのための沃素処理後の飽和亜鉛(または2/3 H₂SO₄)処理のいわゆるChlor-Zinc-Iodine反応は対照試料のパルプ粉末、グリーンアスパラガス切片などでは強陽性であるがキノコ切片ではすべて陰性であった。

以上から供試キノコ各組織の細胞壁は甲殻

類などのキチンとは性状を異にし、PAS反応にのみ強陽性なキチンを含み、高等植物では細胞壁主成分として分布する α セルロースは本研究のキノコ細胞壁には含まれないものと判定された。

PAS反応陽性な細胞壁キチンはペプシン-パンクレアチン処理の影響は全く認められなかった。

(3) ペクチン質の同定と分布

ルテニウムレッドは蛋白質にも陽性反応を示すのでペクチナーゼ消化後の対照切片との比較から子実層組織に少量の不溶性ペクチン質の存在が同定されたが(Fig 6-a~Fig 6-b)菌糸組織は弱陽性反応を示したが慢性の分布であり、高等植物の細胞壁のように明瞭な局在性は観察できなかった。



Fig.2. Transection of *L.edodes* mushroom hat, shows protein distribution.

(Dinitrofluorobenzen method.)

Protein reaction was detected in hypha protoplasm.

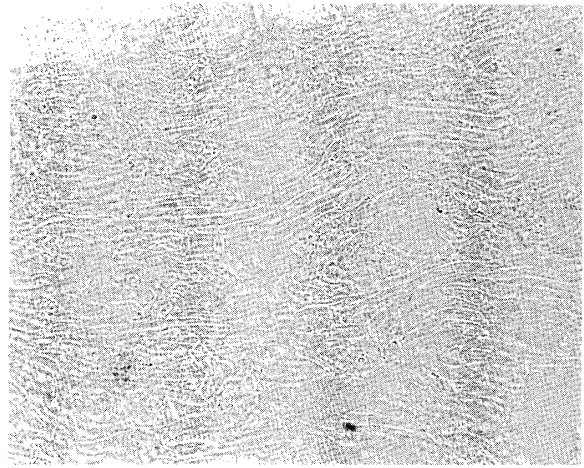


Fig.3. Serial section of Fig.2, following pepsin /pancreatin digestion (procedure similar to that in Fig.1) shows the protein reaction of phae completely disappeared.

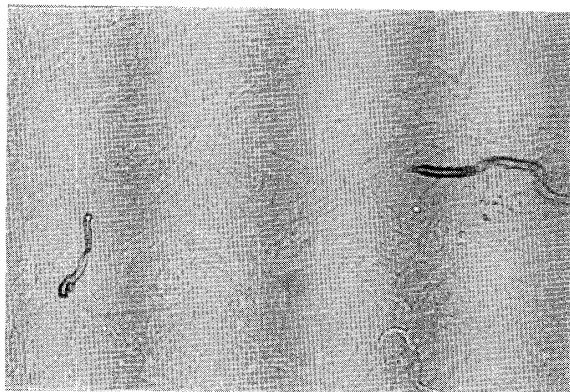


Fig.4. Transection of *A.bisporus* mushroom hat, following pepsin/pancreatin, shows remaining protein reaction a few basophilic and sclenchyma hyphae.

(Dinitrofluorobenzene method.)

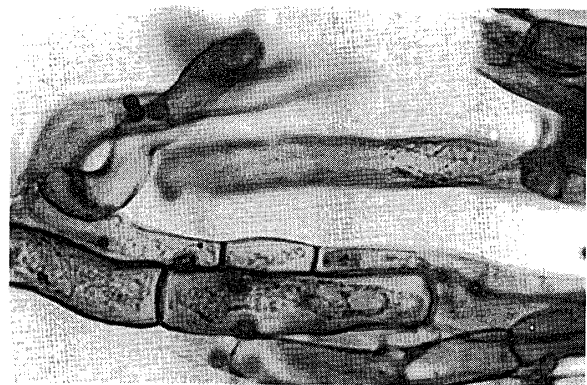
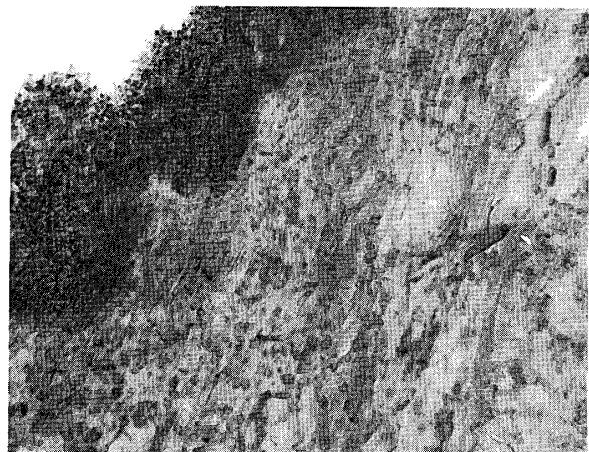


Fig.5. Transection of *G.frondosa* mushroom, shows localization of chitin.

Intence reaction is evident in the cell wall of hyphae and basidiospores (PA Srection).



a: After pectinase digestion



b: Untreated cntrol

Fig.6. Transection of *L.edodes* mushroom hat, stined with ruthenum red, showing distribution of pectic material in hymenum tissues.

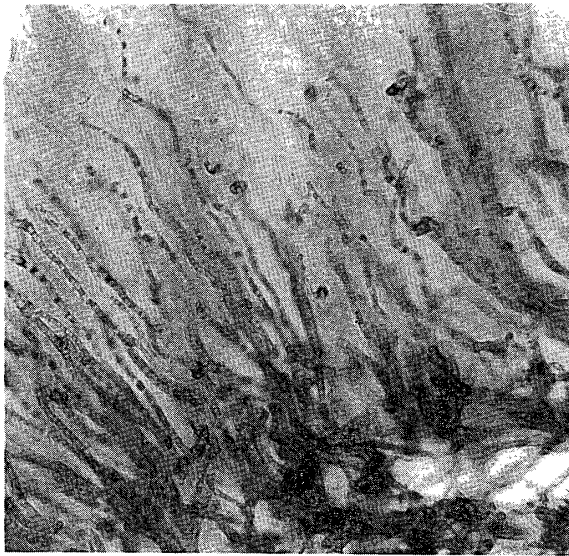


Fig.7 Mucous materials of *L.nameko* mushroom (ruthenium red staining).

(4) デンプンの分布：

高等植物の組織にみられるようなデンプン粒の存在（いわゆる赤デンプンも含めて）は何れの材料からも検出されなかった。ただしグリコーゲン型多糖類の存在がシイタケなどで認められているが¹⁰本研究の手法では検出できなかった。

(5) リグニンの同定

フロログルシン-HCl反応はすべて陰性であり高等植物細胞壁にみられる形態のリグニンは存在しないと考えられる。類縁物質とし

てのポリフェノール類は食物繊維の対象外なので特に検索は行なわなかった。

(6) 酸性ムコ多糖類

チオニン及びトルイジンブルーによるメタクロマジー反応はマッシュルームの傘の表の粘質物に認められたがナメコ粘質物は陰性であった。

なお、ナメコ粘質物はPAS及びルテニウムレッドにも陽性な樹枝状骨格¹⁰の間を、PASやルテニウムレッドなどに反応しない無定形粘質物で埋められていた。(Fig.7)

以上キノコ類は真菌植物に属する担子菌類（一部は子のう菌類）の子実体であり、菌糸、酵母、孢子などの細胞壁成分も高等植物とは著しく異なり、真菌類に共通する成分はキチンであり、高等植物細胞壁の主成分のセルロースの存在は一部のグループに限られ、キノコ類の細胞壁の原繊維（hibrillar）成分はセルロースではなくキチンであり、さらにマトリクス成分はマンナンなどの多様なグルカンで構成され、それらに包摂（inclusive）された不溶、不消化性の蛋白質の存在も知られている¹⁰。

2. 食物繊維の分析結果について

ペプシン-パンクレアチン消化法で5種の試料の食物繊維の分析結果はTable 2の通り

Table 2 Results of determination of total dietary fiber by the Pepsin-pancreatin digestion procedure and AOAC method

Sample	Pepsin-pancreatin digestion procedure (Proposed method)					AOAC method (Prosky et al. 1984)		
	Residue (%)	SDF (%)	IDF (%)	TDF (%)	Residue-N %/total-N	Residue (%)	TDF (%)	Residue-N %/total-N
<i>L. edodes</i> mushroom	43.39	4.90	43.23	48.13±0.28*	14.54	58.18	44.85±0.22*	45.23
<i>L. shimeji</i> mushroom	20.73	9.64	20.47	30.11±1.37	8.27	42.68	28.19±0.77	38.85
<i>P. nameco</i> mushroom	37.42	9.40	37.00	46.40±0.02	17.54	56.56	41.18±0.88	51.98
<i>A. bisporus</i> mushroom	21.79	9.47	21.41	30.88±0.37	17.16	48.46	29.00±1.29	45.80
<i>G. frondosa</i> mushroom	31.85	6.28	31.47	37.75±0.09	10.34	51.02	35.58±1.42	37.42

SDF: Soluble dietary fiber ※: SD
 IDF: Insoluble dietary fiber
 TDF: Total dietary fiber

である。

(1) 分析法と残渣窒素

Table 2には両分析法による処理後の残渣中の残留窒素を試料中総窒素に対する百分比で示してあるがペプシンーパンクレアチン法では8.27% (ホンシメジ) ~17.55% (ナメコ) に対しAOAC法では38.91% (ホンシメジ) ~52.02% (ナメコ) と大きな差を示している。これはAOAC法が迅速性を重視し、蛋白質の消化抽出が不十分でも残渣窒素を一括控除(蛋白質に換算して)することで補正するのに対してペプシンーパンクレアチン法は可消化蛋白質、可溶性窒素化合物の完全抽出を前提にし、消化抽出に時間をかけ、振とう抽出をおこなうためと考えられる。さらに、ペプシンーパンクレアチン消化法でもナメコとマッシュルームが共に17%前後の高い水準の比率を示すのは組織化学的な所見で示した厚膜好塩基性菌糸の残留不消化蛋白質が影響していることも推定された。

(2) TDF分析値について

ペプシンーパンクレアチン消化法では $TDF = IDF + SDF$ であり、濾液の80%エタノール沈でん物は可溶性で不消化な高分子有機物であり、本研究の材料では酵素を含まないブランクでも3.30% (マイタケ) ~6.67% (ナメコ) に達しておりSDFとして食物繊維成分に算入する点はAOAC法と同じであり、TDFに占める比率が高いことを知った。

Table 2にみられるように両法によるTDF値はシイタケが最も高く、ナメコ、マイタケ、マッシュルーム、ホンシメジの順に低くなっている点は完全に一致しているがAOAC法によるTDF値は5試料を通じ一貫して低い値を示した。

これはAOAC法では $TDF = \text{残渣重} - [\text{残渣蛋白重} (\text{残留可消化蛋白重} + \text{不消化不溶性窒素化合物}) + \text{残渣灰分}]$ であり、両分析法の違いは残渣中の不消化、不溶性の窒素化合物の扱いであり、細胞壁成分にリグニン、キチンなどを無視できない量を含む場合はAOAC法では真のTDF値より低い値をとることは

既に述べたとおりである。

ここでの定量値の差はキチン、不消化な細胞壁マトリクス蛋白質、ナメコ、マッシュルームなどの好塩基厚膜菌糸の不消化蛋白質の扱いに基くものと推定できる。

食物繊維の定義、範囲に関して印南、桐山(1982)²⁰の解説があるが、高等植物のセルロースを主成分とした細胞壁とはその組成や性状を異にするキノコ類の食物繊維を消化性を基準にして不消化グルカンとキチンなどの不消化含窒素高分子化合物を包括したものと定義づければペプシンーパンクレアチン消化法はSDFの捕捉を慎重にすればキノコ類のTDF分析法として充分適用できる方法であると考えられた。

要 約

ペプシンーパンクレアチン消化法(HELLENDOORN et al. 1975の変法)を栽培型キノコの食物繊維の定量に適用した。

組織化学的所見から、試料キノコ組織の菌糸、担子器、担子孢子などの細胞壁はキチンを含み、セルロース、リグニン、澱粉を含まず、不溶性ペクチン質は子実層に少量分布していた。これらの細胞壁成分はペプシンーパンクレアチン処理後も変化はなかった。他方、各種細胞の原形質の蛋白質反応は少数の好塩基性厚膜細胞を除き、ペプシンーパンクレアチン消化で完全に消化した。

分析試験では、AOAC法(PROSKY et al. 1984)との比較をおこない、ペプシンーパンクレアチン消化法(提案法)で得られたTDF定量値は、各試料ともAOAC法のそれより一貫して高い値を示した。これはAOAC法では、キノコ類の重要な細胞壁成分であるmatrix蛋白質やキチンの窒素まで控除することによるものである。したがってキノコ類に対してはペプシンーパンクレアチン消化法の方がAOAC法より簡易かつ合理的と考えられる。

終わりに臨みご懇切なご指導をいただき種

種ご便宜を図って下さった本学助教授 筒井知己博士と女子栄養短期大学助教授 青柳康夫博士に感謝いたします。また組織化学的テクニックの御指導と原稿のご校閲をいただいた本学名誉教授 箕口重義博士にお礼申し上げます。

文 献

- 1) VAN SOEST, P.J. : J. Assoc. Off. Anal. Chem, 46, 825 (1963).
- 2) VAN SOEST, P.J. : J. Assoc. Off. Anal. Chem, 50, 50 (1967).
- 3) PROSKY, L., ASP, N.G., FRUDA, I., DEVIES, J.W., SCHWEIZER, T.F., and HARLAND, B.F. : J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 1044 (1984).
- 4) 倉沢新一, 菅原龍幸, 林淳三 : 日本食品工業学会第32回大会講演集P.64 (1989).
- 5) 箕口重義, 荒木裕子, 山本直子 : 食工誌, 35, 405 (1988).
- 6) 倉沢新一, 菅原龍幸, 林淳三 : 食工誌, 29, 400 (1982).
- 7) HELLENDORRN, E.W., NOORDHOFF, M.G., and SLAGMAN, J. : J. Sci. Food Agric., 26, 1461 (1975).
- 8) FURDA, I., GENGLER, S.C., JOHNSON, R.R., MAGNUSON, J.S., and SMITH, D.E. : AOAC Annul Meeting (1979). (J. Assoc. of Anal. Chem., 64, 6 (1981)より).
- 9) SCHWEIZER, T.F., and WURSCH, P. : J. Sci, Food Agric., 30, 613 (1979).
- 10) BURSTONE, M.S. : J. Histochem. Cytochem., 3, 32 (1955).
- 11) LISON, L. 今泉正訳 組織化学及び細胞化学, 2版p.291 白水社(東京), (1961).
- 12) RUNHAM, N.W. : Histochem. Cytochem., 9, 87 (1961).
- 13) MCMANUS, J.F.A. : Stain Technol., 23, 99 (1948).
- 14) KNEEBONE, W.R. : CROP Sci., 2, 268 (1962).
- 15) PEARSE, A.G.E. : Histochemistry, Theoretical and Applied, 2, Ed., Churchill (London), (1961).
- 16) 鈴木直治 : 農技研報告 C4, No 8, 69 (1957).
- 17) 志田万里子, 間瀬民子, 笹川祐子, 松田和雄 : 農化 45, 454, (1971).
- 18) 槇光章 : 家政学誌, 18, 307 (1967).
- 19) DEACON, J.W. 著 山口英世, 河合康雄訳 : 現代真菌学入門, 初版 p.29 培風館(東京), (1982).
- 20) 印南敏, 桐山修八 : 食物繊維, 第1刷, 第一出版(東京), (1982).