

# 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

(Water Soluble Hydrolases from a Fruit Body of *Grifola frondosa* (Fr.) S.F. Gary)

大野 信子、仁平 佳奈、小平 了二

## 1. 緒 言

キノコ類は、古くより食用、薬用として広く利用されてきたが、近年、嗜好性と種々の生理的特性を備えた機能性食資源として、また新たに多くの関心を集めるようになり、人工栽培技術開発とあいまって数種のキノコ類に関しては著しく生産量が増大し、周年にわたって多量に利用されるようになってきている<sup>1)</sup>。

キノコ類の培養ろ液、菌床、菌糸体、子実体等からは、これまでに多数の生理活性物質<sup>2)</sup>や酵素類<sup>3)</sup>が単離され、現在もさらに多数の検索が試みられている<sup>1)</sup>。

われわれは、これらの中よりキノコ類の生産する加水分解酵素に着目して実験を進めており、すでにマンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) の生産するグルコアミラーゼについて、これを単離し、その性質を明らかにしている<sup>4,5)</sup>。比較的安価で、通年にわたって生の状態で手に入ることのできる、シイタケ、シメジ(ブナシメジ)、エノキタケ、ヒラタケ、マイタケ等は身近な料理によく利用されている。これらのキノコの中で、マイタケを鶏卵を用いた料理に加えると、卵の加熱による凝固を著しく妨げる事実を見いだした。この現象に関連して、本報告はマイタケ子実体から溶出してくる酵素について検討した結果を述べる。

## 2. 実験材料および方法

### 1) 供試キノコ類

シイタケ、シメジ(ブナシメジ)、エノキタケは、市販のものを使用した。マイタケは那須バイオファーム(栃木県)から分与されたものを使用した。これらのキノコは基本的には購入後ただちに用いたが、マイタケについては、 $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存しておいたものも実験に供した。

## 2) 酵素液の調製

各種キノコ子実体約50gを包丁で細かく刻み、これを蒸留水(20~50ml)に約1時間浸漬したのち、ろ過し、得られたろ液を酵素液として実験に用いた。

## 3) 酵素活性の測定

アミラーゼの活性は、前報<sup>6)</sup>に準じて、最終濃度が0.5%可溶性デンプンを基質とし、100  $\mu$ mol酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)を含む反応液中で30°Cにて測定した。酵素活性は、上記反応30分間に生成する還元糖量を3,6-ジニトロフタル酸法<sup>7)</sup>にて求め、グルコース相当量( $\mu$ g)として表示した。

キシラナーゼの活性は、前報<sup>6)</sup>に準じて、最終濃度が0.5%キシラン(Sigma社)を基質とし、100  $\mu$ mol酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)からなる組成の反応液4 mlをL一字試験管に入れ、30°Cにて振盪して測定した。酵素活性は、上記反応30分間に生成する還元糖量を3,6-ジニトロフタル酸法<sup>7)</sup>にて求め、キシロース相当量( $\mu$ g)として表示した。

セルラーゼの活性は、CMC-セルロース-Na(和光純薬製)溶液を9.0mlと酵素液1.0mlを含む反応液を40°Cにて30分間インキュベートした<sup>9)</sup>。酵素活性は、上記反応30分間に生成する還元糖量を3,6-ジニトロフタル酸法<sup>7)</sup>にて求め、グルコース相当量( $\mu$ g)として表示した。

プロテアーゼの活性は、pH 3.0(酸性プロテアーゼ)とpH 7.5(アルカリ性プロテアーゼ)において、ミルクカゼインを基質に用いチロシン法により測定した<sup>10)</sup>。酵素液0.5ml、pH 3.0あるいはpH 7.5の緩衝液0.25ml、基質0.5ml、pH 3.0あるいはpH 7.5の緩衝液0.25ml、基質0.5mlを含む反応液を37°Cにて30分間インキュベートしたのち、0.44Mトリクロル酢酸1.0mlを加え、さらに30分間放置してからろ過した。得られたろ液0.25mlに0.55M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2.0 mlと2倍希釈のFolin試薬0.25mlを加え20分間放置後、660nmにて吸光度を測定した。酵素活性は上記反応30分間に生成するチロシン量( $\mu$ g)をあらかじめ作成してある検量線より求めて表示した。pH 3.0における反応基質は、ミルクカゼイン0.6gを1/10N乳酸60mlに加えて煮沸溶解し、冷却後、1/10N水酸化ナトリウム溶液でpH 3.0に調整して、これに100mM乳酸緩衝液(pH 3.0) 20mlと水を加え、最終的に全体を100mlにして調製した。pH 7.5における反応基質は、ミルクカゼイン0.6gを1/10N水酸化ナトリウム溶液30mlに加えて煮沸溶解し、冷却後1/10リン酸溶液でpH 7.5に調整し、これに100mMリン酸緩衝液(pH 7.5) 20mlと水を加えて、最終的に全体を100mlにして調製した。

## 4) 茶わん蒸しの調理法

茶わん蒸し1個に対し鶏卵約30g、出し汁90ml(水100mlに対して、だしの素1g)、食塩0.9g、しょう油1.2mlを用いた。この出し汁を60°Cに冷ましたのち、卵を加え静かに混ぜ、さら

に裏ごしきでこし、これにキノコ (約10~30g) を加えて、直ちに蒸し器で85~90°Cを保つように弱火で15~20分間加熱して調理した。

### 3. 結果および考察

#### 1) マイタケ子実体が鶏卵の熱凝固に及ぼす影響

卵のタンパク質が熱によって凝固する性質を利用した料理は数多く見られる。これの料理に種々のキノコが具として用いられることも多く、茶わん蒸しはその一つである。安価で手に入りやすいキノコとして、シイタケ、シメジ、マイタケ、エノキタケを適当に刻み材料の一つとして用いて茶わん蒸しを作ってみた。

出し汁と合わせた卵液にこれらのキノコを加えて直ちに蒸し器で85~90°Cを保つように弱火で15~20分間加熱した結果、シイタケ、シメジ、エノキタケを用いたものでは、キノコを用いなかったものと同様に卵液の表面が滑らかに凝固した状態になったが、マイタケを用いた場合には卵液は凝固することなく液状のままであった。また、卵液は黒みを帯びてきた。このような状態は、キノコが適当に入っている量 (約10g) で観察された (図1)。一方、シイタケ、シメジ、エノキタケについては、これらの量をさらに約30gになるまで加えてみても (かなりキノコの多い状態)、卵の凝固性はほとんど影響を受けなかった (データ省略)。

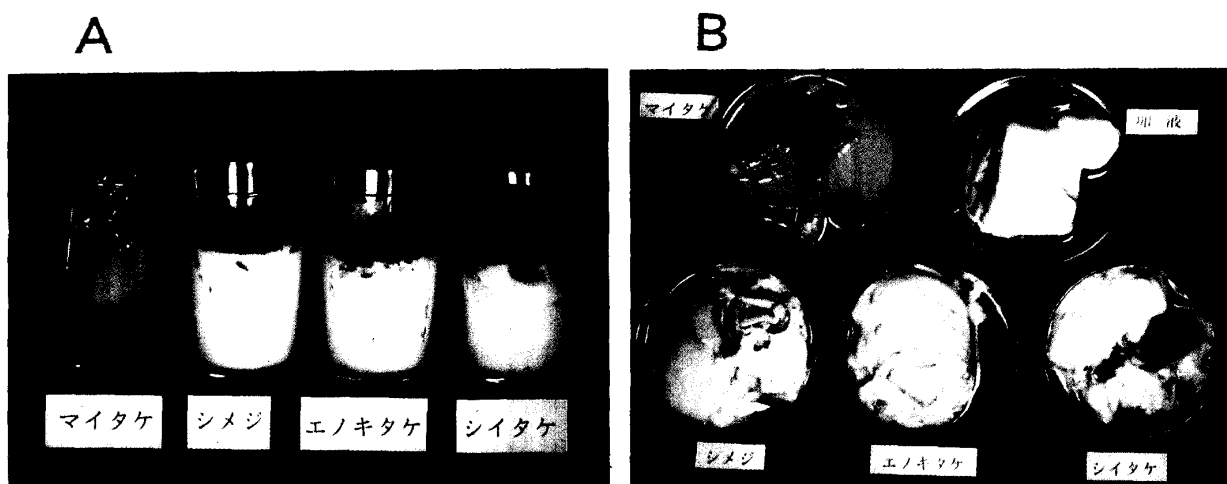


図1 各種のキノコが卵液の熱凝固に及ぼす影響

各種のキノコの子実体約10g (生重量) を卵液 (鶏卵30gと出し汁) 100mlに入れ約15~20分間蒸した。

A: 熱処理後容器を横に傾けた状態 B: 熱処理後容器から取り出した状態

そこで、さらにマイタケを3分間電子レンジ処理、あるいは10分間の加熱処理（煮沸）をしたものを用いて、上記と同様な実験を行ってみた。これらの前処理をしたマイタケを用いた場合には、キノコを用いなかった場合と同様卵液は滑らかに凝固した（図2）。

さらに、約10gのマイタケを約20mlの蒸留水に室温で1時間浸漬したのち、浸漬ろ液を取り、これをキノコの代わりに卵液に加えて上記と同様な実験を行ったところ、やはり卵液の凝固は観察されなかった（図3）。

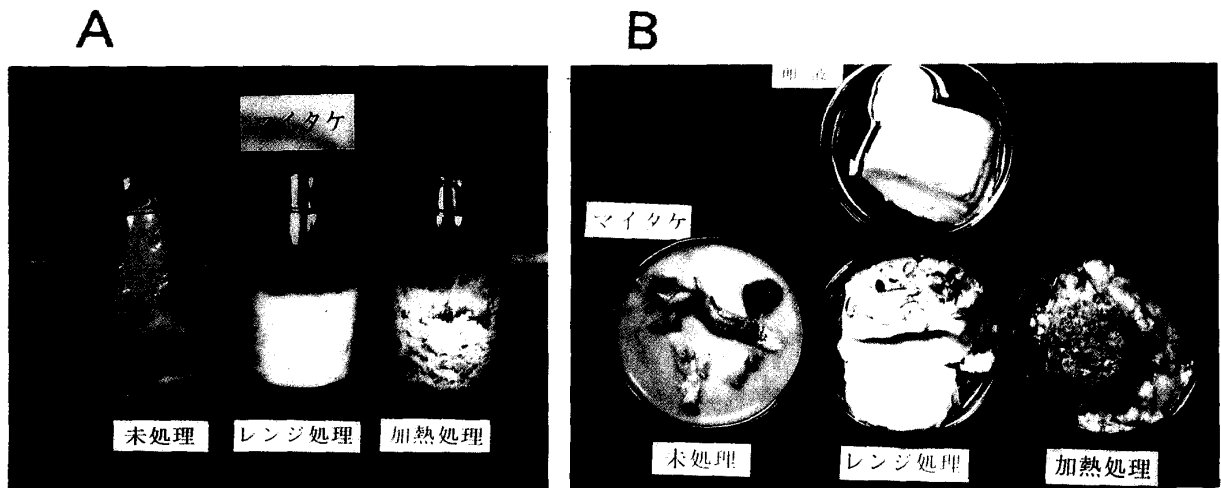


図2 前処理したマイタケ子実体が卵液の熱凝固に及ぼす影響

マイタケ子実体約10g（生重量）を、そのまま、電子レンジ処理（3分間）、加熱処理（10分間煮沸）した状態で、それぞれ卵液（鶏卵30gと出し汁）100mlに入れ約15～20分間蒸した。

A：熱処理後容器を横に傾けた状態 B：熱処理後容器から取り出した状態

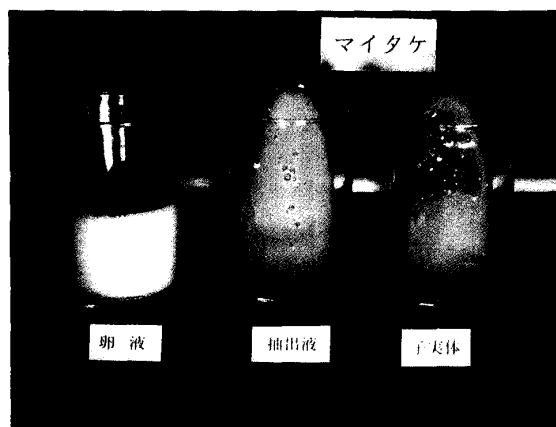


図3 マイタケ子実体からの浸漬液が卵液の熱凝固に及ぼす影響

マイタケ子実体約10g（生重量）を浸漬して得られた液を卵液（鶏卵30gと出し汁）100mlに合わせて約15～20分間蒸した。

表1 マイタケ子実体から溶出する各種加水分解酵素

溶 出 酵 素	酵 素 活 性 (反応生成物 $\mu\text{g}/\text{浸漬 ml}$ )
ア ミ ラ ー ゼ	ND*
キ シ ラ ナ ー ゼ	0.175
セ ル ラ ー ゼ	0.128
プ ロ テ ア ー ゼ	
pH3.0	300
pH7.5	500

子実体50gを蒸留水20mlに室温にて1時間浸漬した。

\*：活性不検出。

これらの結果からマイタケ子実体には、容易に溶出してくる卵タンパク質に強く作用する酵素の存在が示唆された。

## 2) マイタケ子実体から溶出する各種の酵素

マイタケの子実体を細かく刻み、これを蒸留水に浸漬して、室温(約20°C)にて1時間放置したのちろ過し、得られた浸漬ろ液中の酵素活性を調べた(表1)。ろ液中にはアミラーゼ、キシラナーゼ、およびセルラーゼの活性はほとんど検出されないが、わずかに検出されたにすぎなかった。これに対して、プロテアーゼについては、pH 3.0とpH 7.5においてかなり強い活性が検出された。これらの結果より、マイタケの子実体には容易に溶出してくるプロテアーゼが多量に存在することが示された。なお、pH 3.0とpH 7.5における活性の比はおよそ0.66であった。

キノコ類の菌糸によって培養液中へ生産されるプロテアーゼのpH 3とpH 6の活性比に関しては、ヒダナシタケ目では大半が1以上、ハラタケ目では0.7以下で、ヒダナシ目の生産するプロテアーゼは至適pH 2~3の酸性プロテアーゼが主体であり、ハラタケ目ではそれより高いプロテアーゼが生産されるといわれている<sup>3)</sup>。マイタケ(ヒダナシ目)の子実体に関しては、すでにpH 10~11に至適活性をもつアルカリプロテアーゼが精製され、その諸性質が明らかにされている<sup>11)</sup>。しかしながら、子実体に酸性プロテアーゼが存在するかどうかについては触れられていない。そこでさらに、子実体から溶出してくる酵素についてpH 3と7.5における活性の比較を中心に以下に調べた。

## 3) マイタケ子実体からのプロテアーゼの溶出に及ぼす温度の影響

上記のマイタケからのプロテアーゼの溶出は、子実体を刻んで、これを蒸留水に浸漬して室温(約25°C)に1時間放置して行うものであるため、次に、浸漬時の温度の影響を調べて

表2 マイタケ子実体からのプロテアーゼの溶出に及ぼす浸漬温度の影響

浸漬温度	酵素活性 (反応生成物 $\mu\text{g}/\text{浸漬液 ml}$ )		活性比 (pH3.0/pH7.5)
	pH3.0	pH7.5	
室温 (約25°C)	330	500	0.660
30°C	490	835	0.587
37°C	295	790	0.373

子実体50gを蒸留水20mlに各温度にて1時間浸漬した。

表3 マイタケ子実体からのプロテアーゼの溶出に及ぼす食塩の影響

食塩濃度 (%)	酵素活性 (反応生成物 $\mu\text{g}/\text{浸漬液 ml}$ )		活性比 (pH3.0/pH7.5)
	pH3.0	pH7.5	
0	136	169	0.804
1.0	121	163	0.742
5.0	108	125	0.864
10.0	216	160	1.35

子実体50gを蒸留水50mlに30°Cにて1時間浸漬した。

みた(表2)。pH 3.0における活性もpH 7.5における活性も、ともに刻んだ子実体を30°Cにおいて浸漬した場合に最大に達した。しかしながら、それぞれの温度で溶出されてくる酵素の活性のpH 3.0とpH 7.5における比は、0.66から0.37とかなりの差が見られた。これらの結果は、マイタケの子実体には少なくとも酸性領域で働く活性と中性からアルカリ性領域で働く活性を持つ複数の酵素が存在することを強く示すものと思う。

#### 4) マイタケ子実体からのプロテアーゼの溶出に及ぼす食塩の影響

プロテアーゼの溶出に及ぼす食塩の影響について、子実体の浸漬温度を30°Cにして調べた(表3)。子実体からのプロテアーゼの溶出に関して、調べた範囲の濃度の食塩(0~10%)は、pH 7.5における活性にはほとんど影響しないようであった。しかし、子実体を10%食塩水溶液で浸漬した場合に、浸漬液中にはpH 3.0における活性がかなり増加し、その値はpH 7.5の活性を越えるまでになった。この結果より、子実体にはアルカリプロテアーゼの他にもかなりの量の酸性プロテアーゼが存在するものと推定される。

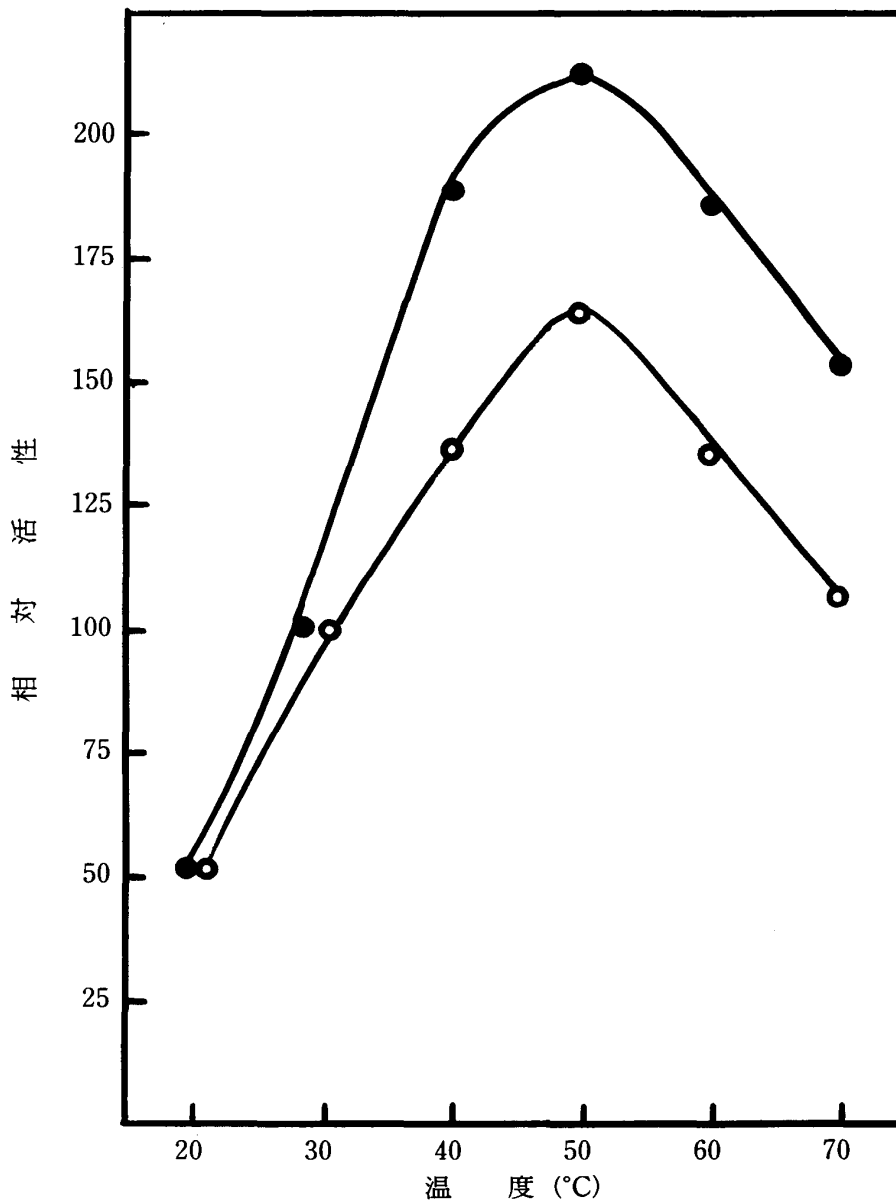


図4 マイタケ子実体の浸漬液中のプロテアーゼ活性に及ぼす温度の影響  
 プロテアーゼ活性は本文中に示した条件でpH3.0 (○) とpH7.5 (●) においてそれぞれの温度で測定した。なお、それぞれの活性は30°Cにおける活性を100として表示した。

5) マイタケ子実体のプロテアーゼ活性に及ぼす温度の影響

浸漬液中に溶出してきたプロテアーゼの活性に及ぼす温度の影響を調べた(図4)。pH 3.0における活性もpH 7.5の活性も50°Cにおいて最大に達し、ともに70°Cにおいてもキノコの生育条件(15~20°C)での活性と比較してかなりの強さを維持した。また、pH 7.5における活性の方がpH 3.0における活性より若干ではあるが高温側に至適の条件がシフトしているようであった。

以上のようにマイタケ子実体のプロテアーゼは、細かく刻んだだけで容易に水に多量に溶出し、熱に対してかなり安定な性質を持っているので、茶わん蒸し調理中においても十分卵タンパク質に作用することができ、結果的に熱による凝固を妨げたものと考えられる。すでに、マイタケ子実体にはアルカリプロテアーゼが存在しその諸性質が明らかにされているが<sup>11)</sup>、本実験より酸性プロテアーゼもそれに匹敵する量存在する可能性が示されたので、ヒダナシ目キノコの培養中に生産されるプロテアーゼとしては、むしろ一般的な酸性プロテアーゼが子実体にも多量に存在するのかどうかは、今後さらに検討する必要があるものと思う。

#### 4. 要 約

市販のシイタケ、シメジ(ブナシメジ)、マイタケ、エノキタケを適当に刻み、これらを材料の一つとして用いて茶わん蒸しを調理した場合、マイタケを用いたものは卵液が凝固することがなかった。マイタケ子実体からは、これを細かく刻み、蒸留水に浸漬するだけで多量のプロテアーゼが溶出してきた。これに対して、浸漬液中のアミラーゼ、キシラナーゼ、セルラーゼの活性はほとんど検出されないか極めて微弱であった。浸漬条件の若干の検討結果等から子実体には、酸性領域で働く酵素と、中性からアルカリ性領域で働くプロテアーゼの存在が示唆された。両酵素とも活性の至適温度は50°Cにあったが、70°Cにおいても30°Cにおけると同程度のかなりの活性を維持した。

本研究を遂行するにあたり、実験に協力下さった和洋女子大学根本真里栄さん、吉野真由美さん、実験協力やご助言を頂いた千葉大学藤井貴明教授、篠山浩文助教授、また試料の提供やご助言下さった合同酒精株式会社、小林文男氏に感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) 水野卓、川合正允：キノコの化学と生学、学会出版センター、(1992)
- 2) 竹内富雄、飯沼寛信：醸酵と工業、34、843 (1976)
- 3) 川合正允、醸酵と工業：34、834 (1976)
- 4) 大野信子、黒田智枝、御園光信：和洋女大紀要、第30集(家政系編)、1 (1990)
- 5) 大野信子、藤井貴明：家政学会、42、515 (1991)
- 6) Ohno, N., Ijuin, T., Song, S., Uchiyama, S., Shinoyama, H., Ando, A. and Fujii, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 465 (1992)
- 7) 百瀬 勉、向井良子、河辺節子、鈴木順子、山本恭子：分化、11、956 (1962)
- 8) 大野信子、藤原佳奈、篠山浩文、藤井貴明：生物工程、72、13、(1994)



- 9) 若林和正、西沢一俊：醸工、42、347 (1964)
- 10) 荻原文二：酵素研究法、第2巻、赤堀編237 (1962)
- 11) 橋本洋一：蛋白質、核酸、酵素、28、1200 (1983)

大野 信子(本学教授)

仁平 佳奈(本学助手補)

小平 了二(本学教授)