

耐塩性きのこ株の食塩によってプロテアーゼ産生が促進される機構の解明

中村 和夫¹, 本間 裕人², 中西 戴慶²

¹山梨大学大学院医学工学総合研究部, ²東京農業大学短期大学部

概要 味噌・醤油などの高濃度食塩を含む醸造過程においてはきのこのプロテアーゼ活性は徐々に低下していくため、耐塩性プロテアーゼを有しかつ食塩存在下で生育できる耐塩性きのこを用いることができれば、発酵時間の短縮や雑菌汚染を防ぐことができ、きのこを用いた発酵生産が安定して効率的に進めることが考えられる。

我々は、食塩存在下で産生したスエヒロタケ NBRC4928 株のプロテアーゼの活性を食塩含有酵素反応系で測定したところ、食塩が含まれない条件下で産生したプロテアーゼの活性よりも高くなることが明らかとなった。この結果から、スエヒロタケ NBRC4928 株はこれまでに報告のない耐塩性きのこであり、菌株の生理的特徴に興味を持たれた。そこで本研究では、耐塩性きのこ株の食塩によってプロテアーゼ産生が促進される機構を解明することを目標として、スエヒロタケ NBRC4928 株を中心とする耐塩性きのこ株のプロテアーゼ活性の耐塩性および食塩存在下における酵素の保存安定性を調べ、醸造へのきのこ酵素の利用可能性を検討した。

スエヒロタケ 2 株、エノキタケ 3 株の耐塩性きのこ株の培養物から抽出した粗酵素のプロテアーゼ活性を、食塩濃度を 0%および 5%含む酵素反応系において測定した結果、最も高い酵素活性と耐塩性が示されたプロテアーゼを有するきのこ株はスエヒロタケ NBRC4928 株であった。

スエヒロタケを 3%の食塩濃度を含んだフスマ固体培地で培養し、培養物を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で抽出し、65°C で酵素反応することが本菌株のプロテアーゼの食塩の影響を検討するのに適した条件であることがわかった。食塩濃度を 0、5、10、15%含む酵素反応系におけるプロテアーゼ活性の耐塩性を検討したところ、食塩濃度 5 および 10%においては、酵素活性が食塩によって抑制されず、むしろ活性が促進されることがわかった。

25°C、食塩濃度 10%の環境下で酵素活性値は長時間一定の活性値を維持しており、高濃度食塩中において耐塩性きのこ株のプロテアーゼは安定性に優れていることがわかった。

以上より、食塩存在下でプロテアーゼ活性が食塩によって促進され耐塩性を維持することがわかり、醸造への応用が期待できた。

1. 研究目的

きのこは抗腫瘍活性や血圧降下作用などの生理活性機能をもつ親しみやすい微生物であるとともに、菌糸体は麹菌、酵母および乳酸菌が持つ酵素群 (アミラーゼ、プロテアーゼ、乳酸脱水素酵素など) を有し、その発酵能を用いて新規な発酵食品の製造が試みられている¹⁾。味噌・醤油などの高濃度食塩を含む醸造過程においてはきのこのプロテアーゼ活性は徐々に低下していくため、耐塩性プロテアーゼを有しかつ食塩存在下で生育できる耐塩性

きのこを用いることができれば、発酵時間の短縮や雑菌汚染を防ぐことができ、きのこを用いた発酵生産が安定して効率的に進めることが期待される。しかし、耐塩性をもったきのこ株の研究は殆ど見られない。

我々は高濃度食塩条件下で生育し、かつプロテアーゼ活性を維持するきのこ株を選抜することができた。耐塩性きのこ株の特性を検討した結果、食塩存在下で産生したスエヒロタケ NBRC4928 株のプロテアーゼの活性を食塩含有酵素反応系で測定したところ、食塩が含まれない条

件下で産生したプロテアーゼの活性よりも高くなることが明らかとなった。他の耐塩性きのこ株ではこのような結果は見いだされなかった。この結果から、スエヒロタケ NBRC4928 株はこれまでに報告のない耐塩性きのこであり、食塩によってプロテアーゼ活性が抑制されず、むしろ活性化されることがわかり、菌株の生理的特徴に興味を持たれるとともに応用面での展開が期待された。

そこで本研究では、耐塩性きのこ株の食塩によってプロテアーゼ産生が促進される機構を解明することを目標として、スエヒロタケ NBRC4928 株を中心とする耐塩性きのこ株のプロテアーゼ活性の耐塩性および食塩存在下における酵素の保存安定性を調べ、醸造へのきのこ酵素の利用可能性を検討したので、ここに報告する。

2. 研究方法

2.1 きのこと株の培養方法

2.1.1 使用菌株

食塩を 7.5%含有した寒天平板培地で生育しプロテアーゼ活性が認められた、エノキタケ (*Flammulina veutipes*) NBRC 4901、NBRC30875、NBRC30905、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) NBRC4928、NBRC4929 の 5 株を耐塩性きのこ株として実験に供した。

2.1.2 フスマ固体培養法

100 mL 容三角フラスコにフスマを 5 g 入れ、水を加えて培地水分含有量を 65%となるように加え混合した。培地をオートクレイブ殺菌 (20°C, 30min) した。寒天培地で生育した菌糸体を滅菌した 7 mm 径のコルクボーラーで 2 disks 繰りぬいて白金鉤を用いて培地に接種した。25°C で 2 週間静置培養した。

2.2 プロテアーゼ活性測定法²⁾

2.2.1 粗酵素液調製法

培養終了後、三角フラスコに 50 mL の抽出用緩衝液を加え、薬さじで菌糸体とフスマを充分にほぐし、一晚 4°C に保存した。これを茶こしと薬さじを用いて固液分離を行い、液体部分を遠心分離 (7°C, 8,000xg, 15min) した。上澄みを粗酵素溶液として回収した。

2.2.2 プロテアーゼ活性測定法

1.5 mL 容マイクロチューブに 1.5%ミルクカゼイン (Hammarsten casein, pH6.0) 100 μ L、蒸留水 100 μ L を加え、40°C に 10 分間放置した。酵素液 100 μ L を加えて酵

素反応を開始した。10 分間反応後、0.4M トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液を 300 μ L 加えて攪拌した。40°C に 10 分間放置した後、遠心分離 (25°C, 8,000xg, 15min) し、上澄みを回収した。

上澄み液 200 μ L に 0.4M 炭酸ナトリウム溶液 500 μ L、2 倍希釈した Folin Ciocalteu 液 100 μ L を加えて混合し 40°C に 20 分間放置した。反応終了後マイクロプレートリーダーで 660 nm における吸光度を測定した。

標準チロシン検量線に吸光度を当てはめて、生成するチロシン量を求めた。酵素の 1 単位 (U) を 1 分間に 1 μ mol のチロシンを生成する反応速度として定義した。酵素活性は酵素液 1 mL あたりの単位 (U/mL) として表した。

2.2.3 耐塩性評価法

プロテアーゼ活性測定混合物に食塩を加えて酵素反応した。NaCl を含まない測定系における活性 (100%) に対する、NaCl 存在下における活性の相対百分率 (%) を耐塩性として定義した。

3. 研究結果と考察

3.1 耐塩性きのこ株のプロテアーゼ産生と酵素活性

選抜した耐塩性きのこ 5 株を用いてフスマ固体培養によってプロテアーゼを産生した。フスマに食塩を 0% および 3% 含有した培地で各きのこ菌糸体を培養した。培養後、菌体外プロテアーゼを抽出し、粗酵素抽出液のプロテアーゼ活性を酵素反応混合物中の食塩濃度を 0% および 5% の条件下で測定した。その結果を Fig. 1 に示した。

食塩を含まない培地 (NaCl 0% 培地) で培養した場合、スエヒロタケ NBRC4928 株が最も高い酵素活性値を示した。しかし、食塩濃度 5% の反応系における活性値は、食塩濃度 0% の反応系における酵素活性値よりもいずれの菌株でも低くなり、耐塩性が低下した。

一方、食塩を 3% 含有したフスマ培地 (NaCl 3% 培地) で培養した場合、食塩を 0% 含有フスマ培地で培養した結果と同様にスエヒロタケ NBRC4928 株が最も高い酵素活性値を示し、他のきのこ株の 2 倍の値であった。さらにスエヒロタケ 2 株は食塩濃度 5% における反応系の酵素活性値が、食塩濃度 0% の反応系における酵素活性値と同等かそれ以上の値になることがわかった。エノキタケ 3 株は NaCl 0% 培地で産生した場合よりも酵素活性が著しく低下し、耐塩性も減少した。これに対してスエヒロタケは食塩存

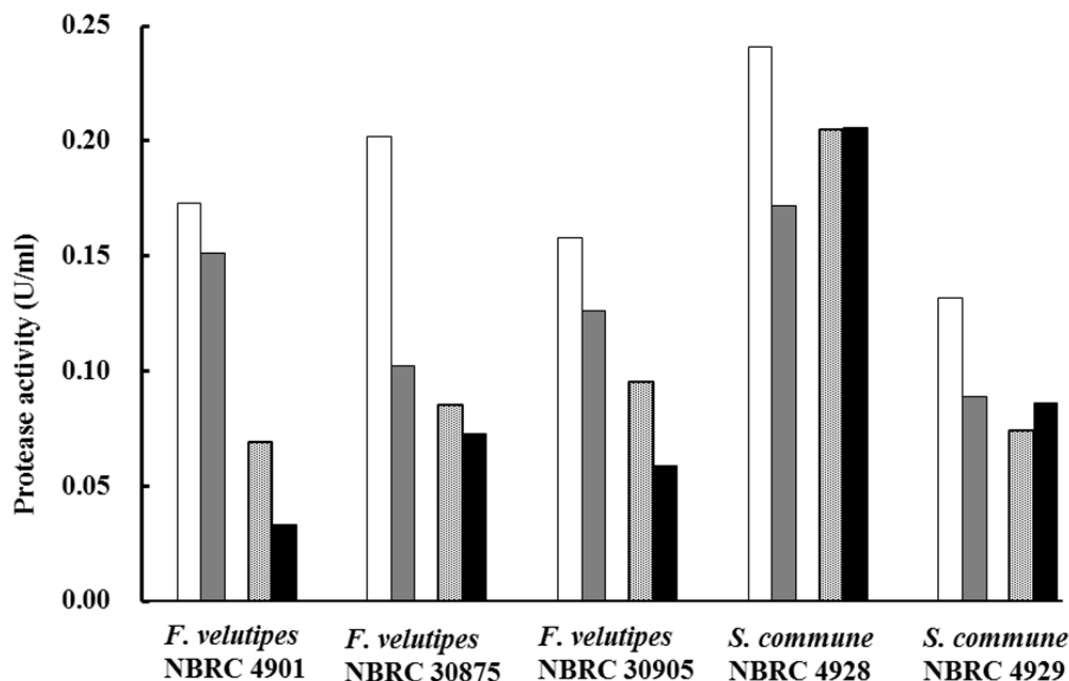


Fig. 1. The activities of proteases from salt-tolerant mushrooms grown on the solid-state medium containing 0 % NaCl or 3 % NaCl. The proteases produced on 0 % NaCl medium were assayed at 0 % NaCl (□) and 5 % NaCl (■). The proteases produced on 3 % NaCl medium were assayed at 0 % NaCl (▨) and 5 % NaCl (■).

在下で生育し生産されたプロテアーゼは、食塩存在系においてプロテアーゼ活性が食塩によって促進され、酵素活性の耐塩性が100%を超えることがわかった。

以上の結果から、生育とプロテアーゼ産生が優れ、高いプロテアーゼの耐塩性をもったきのこ株として、スエヒロタケ NBRC4928 株を選抜した。よって、このきのこ株が生成する非常にユニークなプロテアーゼの酵素化学的性質を明らかにするために、食塩濃度が酵素活性におよぼす反応機構を研究することとした。

3・2 スエヒロタケのプロテアーゼ産生におよぼす培地食塩濃度の検討

3% NaCl を含んだフスマ培地で産生されたスエヒロタケ NBRC4928 株のプロテアーゼ活性は食塩によって抑制されなかったため、本菌株のプロテアーゼ生成および耐塩性に及ぼすフスマ固体培地中の食塩濃度の影響を検討した。食塩を0から8%含有した培地で産生された酵素液の、酵素反応系内食塩濃度が0%および5%における酵素活性値を Fig. 2 に示した。

反応系内食塩濃度が0%における酵素活性値は培地食塩濃度が増加するとともに減少する傾向が見られた。一

方、反応系内食塩濃度が5%における酵素活性値は培地食塩濃度が0%および1%の場合は酵素活性が低かったが、培地食塩濃度が2%以上では、培地食塩濃度8%を除いて反応系内食塩濃度が0%における酵素活性値と同程度かそれ以上の酵素活性値を示し、食塩によって酵素活性が抑制されないことがわかった。特に培地食塩濃度2%および3%の培養から得られたプロテアーゼは酵素活性値が高く、且つ生産された酵素は食塩によって全く阻害されず、耐塩性に優れていることがわかった。

以上の結果から、今後醸造に本菌株のプロテアーゼを利用することを考えて、培地食塩濃度が3%のフスマ固体培地を培養最適食塩濃度と決定し、この食塩濃度で得られた酵素液のユニークな性質の解明を行うこととした。

3・3 酵素を抽出するための緩衝液の検討

スエヒロタケ NBRC4928 株の耐塩性プロテアーゼの性質を検討するために培養物から抽出する溶媒の検討を行った。3%のフスマ固体培地で培養して得られた培養物から0.1M酢酸緩衝液(pH4.5)と0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて抽出し、酵素活性を40°Cで測定した。その結果を Table 1 に示した。

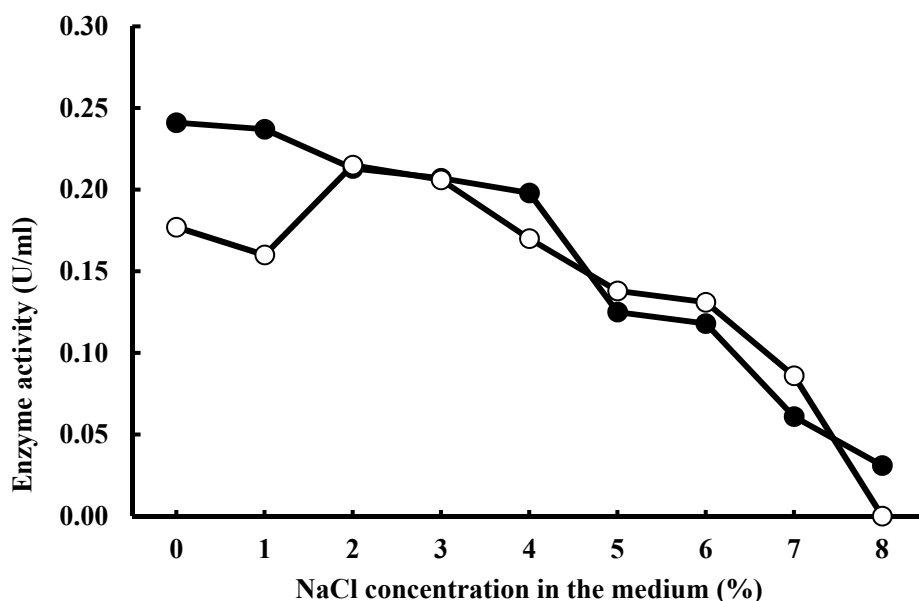


Fig. 2. Effect of NaCl concentration in the medium on protease activity

Table 1. Effect of buffer used for enzyme extraction on protease activity and salt-tolerance

Enzyme activity (U/ml)	0.1 M Acetate buffer (pH 4.5)	0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0)
Activity at 0 % NaCl	0.160	0.319
Activity at 10 % NaCl	0.132	0.139
Salt-tolerance (%)	82.5	43.6

0.1Mリン酸 Buffer で抽出した酵素液の食塩濃度 0%の反応系における酵素活性値は高かったが、食塩濃度 10%の反応系における酵素活性値は低下し耐塩性は 43%となった。一方、0.1M酢酸 Buffer で抽出した酵素液は、リン酸 Buffer で抽出した酵素液よりも食塩濃度 0%の反応系における酵素活性値は低かったが、食塩濃度 10%の反応系における酵素活性値の低下は少なく耐塩性は 83%と高い活性を維持していた。

本研究はきのこプロテアーゼの食塩に対する特徴的な酵素活性を解明するため、以後の実験は、耐塩性が高い酵素液が得られる、0.1M 酢酸 Buffer で抽出することとした。

3. 4 酵素反応系内食塩濃度のプロテアーゼ活性におよぼす影響

3. 4. 1 酵素活性と耐塩性におよぼす酵素反応温度の影響

最適な活性測定条件でプロテアーゼの性質を明らかに

するために、耐塩性プロテアーゼの最適反応温度を検討した。カゼインを基質として酵素反応系の食塩濃度を 0%と 10%として 40~80℃の温度範囲で酵素活性を測定した。測定結果を Fig. 3 に示した。

40℃における活性値よりも高い温度における酵素活性値が高く、食塩濃度 0%の反応系において最適反応温度は 60℃であった。一方、食塩濃度 10%の反応系における最適反応温度は 65℃であった。反応系食塩濃度の違いによって最適反応温度が異なった。この原因はわからなかった。65℃において食塩濃度 10%の反応系の活性値が食塩濃度 0%の反応系の活性値よりも高いという興味深いスエヒロタケの特徴が得られたため、65℃を耐塩性プロテアーゼの最適反応温度として以後の実験を行った。

3. 4. 2 酵素反応系内食塩濃度のプロテアーゼ活性におよぼす影響

スエヒロタケのプロテアーゼの耐塩性の特徴をさらに解明することにした。スエヒロタケの培地食塩濃度 3%のフス

マ固体培地由来の粗酵素液と、エノキタケNBRC30905株の培地食塩濃度 0%の培地由来の粗酵素液について、酵素反応系における各食塩濃度 (0, 5, 10, 15% NaCl) のプロテアーゼ活性に及ぼす影響を比較検討した。

Fig. 4 に示すように、培地食塩濃度 3%で生育したスエヒロタケ由来の酵素では、反応系食塩濃度 0%における活性を 100%とした場合、食塩反応系 5%と 10%における耐塩性はそれぞれ 162%、127%となり反応系 0%の活性値を

大幅に超えた。食塩反応系 15%においても 34%の活性が保持されていた。また図には示さなかったが、培地食塩濃度 0%で生育した培養物からの酵素においては、3%含有培地由来の酵素活性よりは劣るが、反応系 5%のみで 100%の活性を維持する耐塩性が認められた。一方、エノキタケにおいては反応液中の食塩濃度の増加に伴って酵素活性が減少し、食塩反応系 15%では酵素活性が認められなかった。

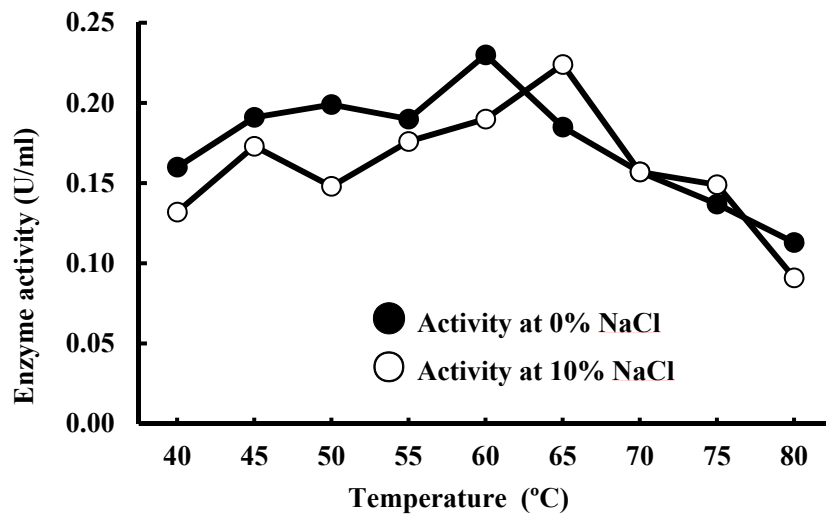


Fig. 3. Effect of temperature on the protease activity at 0 or 10 % NaCl in enzyme assay mixture

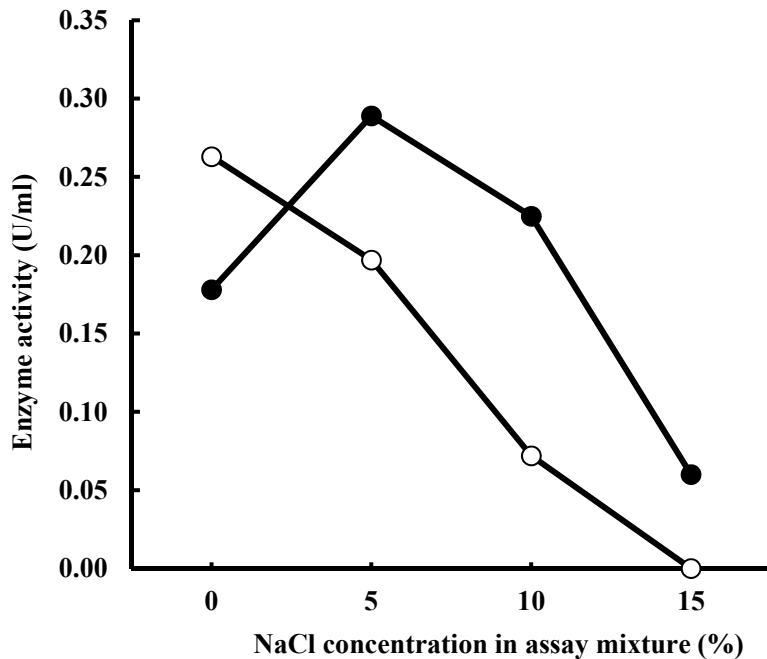


Fig. 4. Effect of NaCl concentration in assay mixture on the protease activity of *S. commune* and *F. velutipes*

以上の結果から、スエヒロタケは食塩を含まない培地で生育させた場合の酵素にも耐塩性があることがわかったが、食塩を 3% 含んだ培地で生育させた場合の酵素液は高い耐塩性をもつだけでなく、食塩を 5~10% ほど存在させることによって酵素活性が食塩によって促進されることが明らかとなった。この結果は今までには報告がなく、スエヒロタケのプロテアーゼの酵素生産および酵素活性発現が食塩によって促進されていることがわかった。

3.5 食塩存在下における酵素の保存安定性

麹菌由来の耐塩性プロテアーゼは、食塩 18% 存在下で酵素を保存した場合、優れた耐塩性を示しても数時間後には酵素活性が半分以下に低下すると報告されている³⁾。しかし、きのこ由来の耐塩性プロテアーゼの保存安定性についての報告はない。よってスエヒロタケ NBRC4928 株のプロテアーゼの保存安定性に及ぼす食塩濃度の影響を検討した。また、比較として耐塩性きのこ株のエノキタケ NBRC30905 株についても検討を行った。スエヒロタケの 3% 食塩濃度培地由来の粗酵素と、エノキタケの 0% 食塩濃度培地由来の粗酵素について検討した。両きのこ株の酵素を、10% の食塩溶液中に 25°C の保存温度条件下で保存し、酵素活性の変化を測定した。実験結果を Fig. 5A に示した。

食塩が高濃度で存在する室温条件下で 6 時間保存し

ても、両きのこのプロテアーゼの活性に変化が見られなかった。尚、図には示していないが 24 時間保存した酵素液は、保存開始時の活性に対して、スエヒロタケでは 71%、エノキタケでも 103% の活性を維持していることがわかり、耐塩性きのこ株の酵素は食塩に対して非常に安定な酵素であることがわかった。

この結果は粗酵素液を用いたため、酵素液中には多くの蛋白質が含まれている。味噌抽出液由来の酵素液の実験報告⁴⁾によると、共存する蛋白質がプロテアーゼの保護剤として機能したために、酵素が食塩によって失活するのを防いでいる可能性が考えられている。そこで、両菌株の粗酵素液をイオン交換クロマトグラフィーで部分精製したプロテアーゼ活性画分の保存安定性を粗酵素と同様の条件で試験した。実験結果は Fig. 5B に示すように、粗酵素液中の蛋白質を部分的に除去したにもかかわらず、両きのこ株の酵素は 6 時間後でも十分に酵素活性を維持していた。すなわち酵素自身が食塩に対して高い安定性を持っているため、食塩存在下でも失活しないことが考えられた。

耐塩性きのこ株のプロテアーゼの特性として、酵素活性の耐塩性にはきのこ株によって違いが生じたが、保存安定性においては食塩の存在は影響せず異なることがわかった。

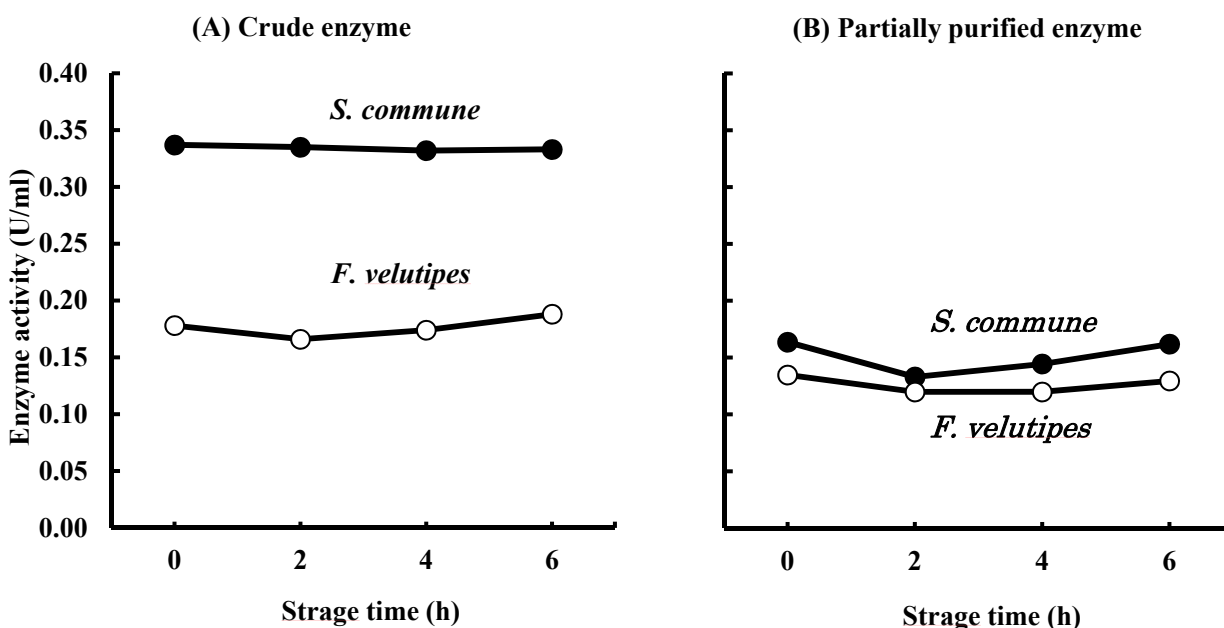


Fig. 5. Storage stabilities of the proteases from *S. commune* and *F. velutipes* in 10 % NaCl at 25 °C.

文 献

- 1) 松井徳光、田畑麻理子、きのこの発酵能を利用した機能性食品の開発、きのこ研だより、33, 31-38 (2010)
- 2) 柳田藤治、醸造・食品学実験書、pp.71-73 (1984), 食品研究社
- 3) N-W Su and M-H Lee, Screening and characterization of koji molds producing saline-tolerant protease, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 26, 230-234 (2001)
- 4) 和久 豊、味噌熟成中の酵素活性について、醸協、88、433-438 (1993)

The Mechanism of Activation by Sodium Chloride on the Protease Production Using Salt-Tolerant Mushroom

Kazuo Nakamura¹, Hiroto Homma², Kotoyoshi Nakanishi²

¹University of Yamanashi, ²Tokyo University of Agriculture

Summary

Five salt-tolerant mushrooms grown on agar plate containing 7.5% NaCl were cultivated in the solid-state medium with wheat bran containing 3% NaCl. The protease activities at 0% and 5% NaCl in the assay mixture were measured. The protease from *Schizophyllum commune* NBRC 4928 showed the highest values of enzyme activity and salt-tolerance among the 5 salt-tolerant mushrooms tested. The kind of buffer to extract the protease and the optimum temperature of enzyme activity were investigated with *S. commune* NBRC 4928. As a result, the optimal buffer to extract for salt-tolerant protease was 0.1M acetate buffer (pH 4.5). The optimal temperature of the protease was 65°C at 10% NaCl in the enzyme assay mixture. Influence of NaCl concentration in enzyme assay mixture was studied about the salt-tolerance of the protease. The protease activities at 5 and 10% NaCl concentration in enzyme assay mixture were accelerated and activated by NaCl. In the storage of protease in 10% NaCl solution at 25°C, the protease from *S. commune* NBRC 4928 maintained the initial enzyme activity for 24 hr. The stability of a protease produced by a salt-tolerant mushroom was excellent on the condition of high concentration of NaCl.