

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00780

研究課題名(和文) ヤマブシタケの凝乳酵素を用いた日本独自のナチュラルチーズの新規な特性の解明

研究課題名(英文) Investigation of the properties of a new natural cheese unique to Japan using the milk-clotting enzyme from *Hericium erinaceum*

研究代表者

中村 和夫 (NAKAMURA, Kazuo)

山梨大学・大学院総合研究部・研究員

研究者番号：80111780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヤマブシタケが生産する凝乳酵素を用いて新規なチーズを開発する研究を行った。ヤマブシタケの酵素は低温殺菌乳のみならず超高温殺菌乳も凝固した。ヤマブシタケ酵素を用いて作製したカードの粘弾性は、レンネット由来カードの粘弾性よりも低かった。ホエイ成分分析の結果、ヤマブシタケの酵素はカッパ-カゼインの切断に関与しないことが示唆された。国内で分離した8株のヤマブシタケの凝乳酵素には凝乳活性がみられ、超高温殺菌乳の凝固が5株の酵素に認められた。8株の凝乳酵素由来のチーズは黒コウジカビに対して抗菌性を示した。よってヤマブシタケが生産する凝乳酵素は新規なチーズ生産に有用であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We developed a new type of cheese unique to Japan using the crude enzyme from *Hericium erinaceum*. The crude enzyme from *H. erinaceum* could clot not only the low heat milk but also the ultra-high temperature milk. The viscoelastic moduli of the curd on the milk coagulation process with the crude enzyme from *H. erinaceum* was lower than that with chymosin. The whey analysis revealed that the milk-clotting process by the action of the crude enzyme from *H. erinaceum* might not be dependent on the cleavage of k-casein. The crude enzymes from the 8 strains of *H. erinaceum* isolated in Japan had the milk-clotting activity. The crude enzymes from the 5 strains coagulated the ultra-high temperature milk. The cheese samples using the crude enzymes from the 8 strains showed growth inhibitory activity toward *Aspergillus niger*. Thus, the crude enzyme from *H. erinaceum* may be useful for the production of a new type of cheese.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ヤマブシタケ 凝乳酵素 チーズ 凝乳活性 抗菌性

1. 研究開始当初の背景

チーズ生産において一般的に用いられる凝乳酵素はカーフレンネットである。しかし、この酵素を得るための動物愛護問題および BSE 発症による価格の上昇が問題となっている。そこで解決策として *Rhizomucor miehei* などのカビから生産される微生物レンネット、および微生物にレンネット遺伝子を組み込んで生産させる遺伝子組み換えレンネットが存在する。しかし、*Rhizomucor miehei* は食用に適する微生物ではないため、毒性試験が必要である。また、微生物レンネットはカード収量が低く、遺伝子組み換えレンネットは安全面で消費者に受け入れられにくい。

一方、酪農・乳業界では酪農家の減少、生乳生産量の減少、バターや脱脂粉乳など乳製品の需給変動、TPP など自由化の流れなどの中で、「持続可能な農と食」の維持は我が国の喫緊な課題である。このような状況において現在、ナチュラルチーズは消費期限の限られた外国製品に依存しており、保存安定性に欠けるのが現状である。このため、国際競争力のある日本独自の製品化技術と用法が切望されている。

食用きのこ由来凝乳酵素は消費者イメージ、食の安全性および健康面における優位性が期待できることから、研究代表者は本格的な研究に着手した。その結果、高い凝乳活性を有する酵素を生産する食用きのこ株のヤマブシタケ NBRC100328 株を初めて見出した(日本食品科学工学会誌、61、444-447 (2014))。

さらに本酵素は低温殺菌乳からのカードの生成能が充分に存在することに加えて、超高温殺菌乳も凝固できる新規な酵素の特徴を示した。また、本酵素を用いたチーズは乳酸菌を添加していないにもかかわらず、滑らかで、かつ保存中においても雑菌繁殖が認められないことがわかった。

2. 研究の目的

これまでに食用きのこのヤマブシタケの 1

株に凝乳酵素生産能が存在し、きのこの酵素を用いたチーズには抗菌性がありかつ滑らかな食感であることがわかったので、新規な日本独自の製法によるチーズの創製を目標にして、以下の点を明らかにする。

1) ヤマブシタケ株の凝乳酵素生産方法の最適化、2) きこの酵素の凝乳過程の解明、3) きこのチーズの食品物性の解明、4) チーズ抗菌性の解明

3. 研究の方法

(1) 凝乳酵素生産の最適化とチーズ作製

ヤマブシタケの分譲株および国内で分離した *Hericium* 株の菌糸体を、フスマ固体培地に接種し、25℃、14日間培養した。培養物から酵素を抽出した。スキムミルクを基質としてカード粒子が形成されるまでの時間を測定して凝乳酵素活性を測定した。

選抜株を用いたフスマ静置培養における最適酵素生産条件を決定した。低温殺菌牛乳または超高温殺菌牛乳に酵素液を添加し凝固させた。凝固物をカッティングしたのち、ホエイを排出してカードを作製した。カードを加塩してから 13℃ で一か月間熟成してチーズを作製した。

(2) カード生成過程における力学的特性の測定

牛乳にヤマブシタケの酵素を加えて凝乳反応を開始し、カード生成においてカゼインミセル集合体が形成される凝乳過程を、温調システムを装備したレオメータを用いて動的粘弾性を測定することにより評価した。さら温度変化に伴う貯蔵弾性率 (G') および損失弾性率 (G'') を測定して、きのこ酵素で作製したチーズの滑らかさを解析した。

(3) ホエイ成分の分析

カード生成時に生ずるホエイを、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いて分析し、ホエイ中にグリコマクロペプチド (GMP) を検出した。

(4) チーズの抗菌性測定法

Aspergillus niger の分生子を含んだ寒天平板培地上の穴にチーズ試料を埋め込み培養後、阻止円サイズを測定し、抗カビ性を評価した。

4. 研究成果

(1) 凝乳酵素生産方法の検討

分譲株 7 株について酵素活性を測定したところ、ヤマブシタケ MAFF435060 株が最も酵素生産性に優れていたため、本菌株を用いて研究を進めることにした。

酵素生産条件を検討した結果、培養温度 25、培地水分含量 60%、培養時間 14 日が最適であった。

(2) カード生成過程における動的粘弾性

低温殺菌乳にヤマブシタケの凝乳粗酵素を添加した。乳の粘弾性の時間経過を測定した結果、急激な粘弾性の上昇が起こり、キモシン（レンネット）における凝乳と同様に凝乳過程を数値化できた。一方、ヤマブシタケの凝乳粗酵素の特異的な凝乳は超高温殺菌乳の凝固において認められた。この結果から従来のレンネットとは異なる新規な凝乳酵素であることがわかった。

(3) カードの粘弾性に及ぼす温度の影響

図 1 にヤマブシタケ酵素とレンネットを用いて作製したカードにおける粘弾性の温度依存性を示した。弾性率曲線の変化が 15 付近においてすべての試料にみられた。これは試料中の乳脂肪球の固体化に起因する現象であった。弾性率の大きさは、キモシン由来のカードよりもきのこ酵素由来カードは小さく、酵素によって大きく異なることが明らかとなった。

図 2 にきのこ酵素由来カードとキモシン由来カードの $\tan \delta (=G''/G')$ への温度依存性を示した。どの温度においてもキモシンの試料はきのこ酵素の試料よりも $\tan \delta$ が小さく、2 つの試料における $\tan \delta$ の違いが明らかであった。この結果から、きのこ酵

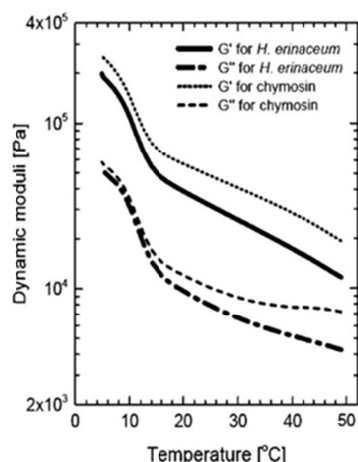


図 1 ヤマブシタケ酵素由来のカードまたはキモシン由来のカードの粘弾性に及ぼす温度の影響
G' : 貯蔵弾性率、G'' : 損失弾性率

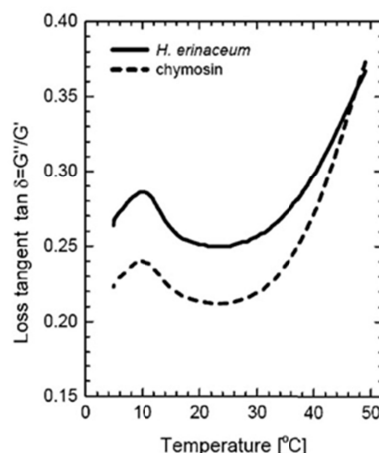


図 2 カードの loss tangent ($\tan \delta = G''/G'$) に及ぼす温度の影響

素は室温以下でキモシンよりも粘着性に優れたチーズカードを形成することがわかった。

(4) ホエイ成分の RP-HPLC 分析による解析

図 3 に低温殺菌乳からヤマブシタケ酵素由来およびキモシン由来のチーズ製造過程から得られたホエイの RP-HPLC クロマトグラムを示した。図 3 c に α -カゼインをキモシンで処理した溶液のクロマトグラムを示し、GMP がピーク 1 (12.9min) とピーク 2 (13.9min) に検出された。キモシンにおける凝乳反応ではホエイ中に GMP は当然のごとく検出された(図 3 b)が、ヤマブシタケ酵素による反応では検出されなかった(図 3 a)。

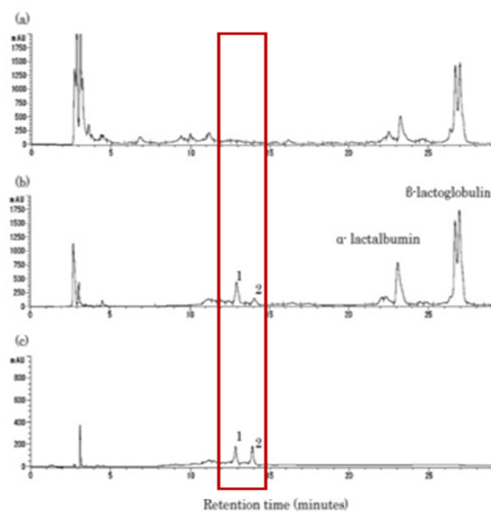


図3 ヤマブシタケ酵素由来ホエイ (a), キモシン由来ホエイ (b) および キモシン処理したκ-カゼイン (c) のRP-HPLCクロマトグラム

この結果から、GMP 画分はヤマブシタケ酵素の作用によって生成せず、カゼイン内に残っていると考えられた。よって、きのこ酵素は -カゼインを分解せずに凝乳することが明らかとなった。

以上のことから、新しい凝乳過程の推定および超高温殺菌乳を用いた新しいチーズの生産への応用が期待できた。

(5) 分離株の同定

国内で採取分離した 11 株の ITS-5.8SrDNA 領域の分析結果を表 1 に示した。全て *Hericium* 属であった。WH01, 02, 03, 04, 06, 07, 08, 13 の 8 株は *H.erinaceus* (旧名 *H.erinaceum*) と 99.8%以上の相同性を示し、ヤマブシタケと確認した。WH20, 21 の 2 株は *H.abietis* と同定された。WH10 株は *Hericium* sp.であった。

(6) 粗酵素の凝乳活性と超高温殺菌乳凝固能

分離 11 株由来粗酵素の凝乳活性を表 2 に示した。WH20 と WH21 株以外の 9 株には活性が存在し、活性値に違いが認められた。超高温殺菌乳に対する凝固能は、WH02, 03, 04, 07, 08 株には存在したが、WH01, 06, 10, 13 株には存在しなかった。よって超高温殺菌乳の凝固能は凝乳活性の大きさとは相関しない

表 1 国内の子実体から分離した *Hericium* 属菌糸体の ITS-5.8S rDNA シークエンスに基づく BLAST 検索

| Mycelial strain | BLAST match sequence | |
|-----------------|---------------------------------|----------------|
| | Reference strain No. | Similarity (%) |
| WH01 | <i>H.erinaceus</i> KUMC1008 | 100 |
| WH02 | <i>H.erinaceus</i> KUMC1008 | 100 |
| WH03 | <i>H.erinaceus</i> KUMC1008 | 100 |
| WH04 | <i>H.erinaceus</i> KUMC1008 | 100 |
| WH06 | <i>H.erinaceus</i> KUMC1008 | 100 |
| WH07 | <i>H.erinaceus</i> KUMC1008 | 100 |
| WH08 | <i>H.erinaceus</i> KUMC1008 | 100 |
| WH10 | <i>H.coralloides</i> ATCC524584 | 95.9 |
| WH13 | <i>H.erinaceus</i> KUMC1008 | 99.8 |
| WH20 | <i>H.abietis</i> CBS125851 | 99.5 |
| WH21 | <i>H.abietis</i> CBS125851 | 99.5 |

表 2 分離株由来粗酵素の凝乳活性と超高温殺菌乳凝固能

| Mycelial strain | Milk clotting activity (U/mL) | UHT-milk coagulation ability |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|
| WH01 | 333.8±103.0 | Absent |
| WH02 | 310.6±48.3 | Present |
| WH03 | 260.2±49.8 | Present |
| WH04 | 251.6±49.7 | Present |
| WH06 | 218.2±20.2 | Absent |
| WH07 | 174.9±9.2 | Present |
| WH08 | 169.0±36.5 | Present |
| WH10 | 70.6±39.4 | Absent |
| WH13 | 85.8±25.2 | Absent |
| WH20 | ND | NT |
| WH21 | ND | NT |

Values are the mean ± standard deviation (n=4). Mean of the enzyme activity in four independent cultures extracts. Absent, milk without coagulation; Present, milk with strong coagulation. ND, not detected; NT, not tested.

ことがわかった。

WH02, 03, 04, 07, 08 株は超高温殺菌乳を原料とするチーズ生産に使用できる可能性が期待された。

(7) ヤマブシタケ分離株の酵素を用いたチーズの抗菌性

すでにヤマブシタケ MAFF435060 株を用いて作製したチーズには抗菌性が存在することを見出している。図 4 にそのチーズの熟成中における *A.niger* の生育抑制をレンネットチーズと比較して示した。レンネットチーズにはカビの抑制はなかった (図 4 A)。一方

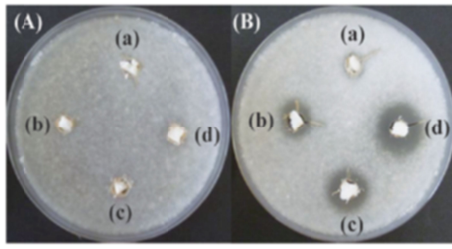


図4 レンネットを用いたチーズ(A)とヤマブシタケ粗酵素を用いたチーズ(B)の *A. niger* 増殖阻害
 チーズは13°Cで熟成0日(a), 15日(b), 30日(c)および45日(d)した試料を用いた

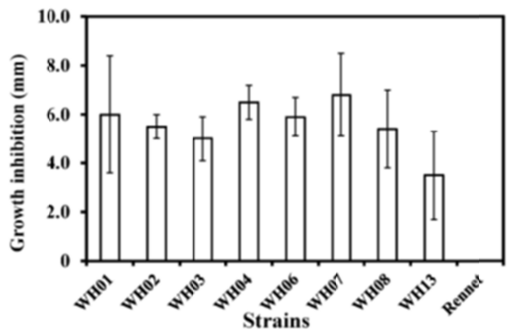


図5 8株の *H. erinaceus* とレンネット由来チーズの *A. niger* 増殖阻害

ヤマブシタケ酵素のチーズでは熟成時間の経過に伴って徐々に阻止円の大きさが増加していきことが分かった(図4B)。

8株の分離 *H. erinaceus* 株由来チーズの *A. niger* に対する抗菌度を図5に示した。レンネットチーズには増殖阻害はなかったが、ヤマブシタケのチーズには生育抑制が認められた。

従来のレンネットで作ったチーズ、特にフレッシュチーズにはしばしば雑菌汚染がみられたが、ヤマブシタケの酵素を用いたチーズではチーズの賞味期限の改良が期待される。よって抗菌活性のメカニズムの解明研究が今後必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

M. Kishimoto, K. Nakamura, K. Kanemaru, T. Tasaki, T. Nakamura, M.

Tanimoto; Food Science and Technology Research, 査読有、24, 139-143 (2018)

DOI: 10.3136/fstr.24.139

K. Sato, H. Shima, K. Nakamura, N.

Kobayashi, M. Endo, M. Tanimoto;

Rheological properties of milk

coagulation by crude enzyme from

Hericium erinaceum, Milk Science, 査

読有、65, 161-169 (2016)

DOI: 10.11465/milk.65.161

〔学会発表〕(計 3件)

田崎拓杜、中村和夫、岸本宗和、谷本守

正、畑井佑菜；ヤマブシタケが生産する

凝乳酵素を用いたチーズが生成する抗菌

物質の探索、日本酪農科学会(2016)

金丸京弥、中村和夫、谷本守正、遠藤

基；ヤマブシタケの凝乳酵素の生産条件

の検討、日本酪農科学会(2016)

中村和夫、谷本守正、佐藤 薫、島 弘

幸、小林奈保子、金丸京弥、畑井佑菜；

食用きのこのヤマブシタケが生産する凝

乳酵素の性質とチーズの特徴、日本酪農

科学会(2015)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 和夫 (NAKAMURA, Kazuo)

山梨大学・大学院総合研究部・研究員

研究者番号：80111780

(2)研究分担者

谷本 守正 (TANIMOTO, Morimasa)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60621323

(3)研究協力者

岸本 宗和 (KISHIMOTO, Munekazu)

佐藤 薫 (SATO, Kaoru)