

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05913

研究課題名（和文）酸化還元酵素による食品素材の機能改質と応用

研究課題名（英文）Modification and application of food protein functionalities by utilizing oxidoreductases

研究代表者

熊澤 義之（Kumazawa, Yoshiyuki）

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：90833054

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ラッカーゼ（Lac）及びチロシナーゼ（Ty）の特性評価と食品タンパク質の機能改質検討を試みた。好熱菌及び好冷菌Lacの組換え酵素、またイカ墨Tyの酵母による発現系を構築した。得られた酵素の特性評価を行い、好冷菌Lacやイカ墨Tyでは低温での相対活性が高いこと、いずれの酵素でも低分子フェノール（メデイエータ）存在下でタンパク質の架橋高分子化を起し、メデイエータ種によって架橋形成が異なること等が分かった。また、架橋構造物にチロシン二量体が含まれることが分かった。酵素処理により卵白の加熱ゲル物性、乳の酸性ゲルの保水性が増加した。また、ヨーグルトのかたさ低下やチーズカードの収率向上が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加工食品の原料としての食品タンパク質には、ゲル形成性、乳化性、保水性、起泡性等様々な機能特性があり、食品の製造工程や製品品質に大きな影響を与える要因となっている。多様化する現代社会においては、食に求めるニーズもまた多様化しており、それに応えるために様々な原料素材や技術が研究開発されている。機能改質の手段の一つとして、酵素的改質技術が知られているが、上述した特性改質を可能とする酵素として、トランスグルタミナーゼ（TG）が挙げられる。本研究は、TGに加え新たな機能改質技術の検討であり、多様化する食のニーズやおいしさの提供に資するものである。

研究成果の概要（英文）：Expression systems for laccases derived from psychrophile and thermophile in *E. coli*, and tyrosinase derived from squid ink in yeast, *Pichia pastoris*, were constructed. Enzyme properties and utilization for protein modification were evaluated. Enzymes from psychrophile and squid ink showed relatively higher activity in low temperature than enzyme from thermophile. Protein polymerizations were observed by all enzymes in the presence of low molecular phenol compounds worked as mediators. Different formation of crosslinking was observed by different mediators. Di-tyrosines were detected in some of crosslinking products indicating crosslinking in between tyrosine and tyrosine. Egg white and milk protein were treated by laccase and prepared heat gel, acid gel and cheese curd. Results suggested that hardness of egg white gel, water retention and curd yield of milk protein were increased, whereas hardness of acid gel as yogurt was decreased.

研究分野：食品科学

キーワード：酵素 ラッカーゼ チロシナーゼ 架橋高分子化 食品物性 食品タンパク質

酸化還元酵素による食品素材の機能改質と応用

1. 研究開始当初の背景

固体状食品の「食感」は、「おいしさ」に影響を与える重要な特性である。この特性は、食品素材の構造やその他の共存成分に由来すると考えられるが、その構造を変える技術として、酵素の利用が挙げられる。トランスグルタミナーゼ (EC2.3.2.13) は、タンパク質分子内/間を結合し、食品物性等の性質を変えることが可能な実用化されている唯一の架橋酵素である¹⁾。ラッカーゼ (EC1.10.3.2) 及びチロシナーゼ (EC1.14.18.1) は、ポリフェノールオキシダーゼと総称される酸化還元酵素であり、微生物、植物、動物など自然界に広く存在する。両酵素とも分子内に複数の銅イオンを有するマルチ銅タンパク質であり、モノ及びジフェノールを酸化し、キノンを生成する。生成したキノンは、反応性が高く、種々の高分子の酸化的重合を促進する。酵素の種類は多様で特異性は低い。食品分野においては、野菜や果実の酵素的褐変の要因として、古くから研究されているが、食品物性をはじめとして保水性、乳化性等各種機能性の変化に関する研究は十分になされていない。生体触媒である酵素を用いた食品素材の改質技術は、副反応が少なく、工程に極端な高温や圧力、酸、アルカリなどが不要で効率の高い、環境フレンドリーな技術であるといえる。多様化する現代社会の食のニーズに対応していくために、TG 以外にも酵素的な素材改質技術の拡充は意義あるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、酸化還元酵素 (ラッカーゼ及びチロシナーゼ) に着目し、食品タンパク質の酵素的改質手段としての可能性を検討することである。酵素起源として、好温菌由来、好冷菌由来、軟体動物由来酵素を用いてそれらの組換え酵素としての発現系構築や得られた酵素の諸性質評価、高温域や低温域での食品タンパク質との反応性、食品タンパク質の物性面への影響等の評価を試みる。これらの検討より、トランスグルタミナーゼに加えて、新たな食品素材の加工技術や新素材創出の実現に繋げていくことを目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 酵素の調製と活性測定

ラッカーゼは、好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 由来 (TthLac) 及び類縁菌 (*Thermus thermophilus* SG0.5JP17-16、以下 TtSG0.5) 由来とのキメラ酵素 (LacTT)、好冷放線菌 *Cryobacterium* sp. 由来酵素 (CRLac) を大腸菌での発現系による生産を試みた。また、*Myceliophthora thermophila* 由来²⁾ (MtLac) 酵素 (試薬) を用いた。チロシナーゼは、*Sepia esculenta* (コウイカ) 墨からの部分精製 (SeTy)、また酵母 (*Pichia pastoris*) での発現系を試みた (PpTy)。また、*Agaricus bisporus* (マッシュルーム) 由来酵素 (AbTy) (試薬) を用いた。ラッカーゼ活性は ABTS (2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) を基質として生成する酸化型 ABTS を 420nm で測定、チロシナーゼ活性は、L-Dopa を基質として生成する Dopa キノンを 475nm で測定することにより求めた。各種酵素の反応至適温度を評価した。

(2) 食品タンパク質との反応性検討

タンパク質基質として、乳 (カゼイン、スキムミルク)、卵白 (乾燥卵白)、抽出分離大豆タンパク質、魚肉 (イトヨリアクトミオシン) を用いた。基質タンパク質溶液 (中性、~1%) に対して、メディエーター (フェルラ酸、コーヒー酸) 存在 (~10mM)、非存在下で、各種酵素を添加、種々の温度 (~70)、時間 (~2 時間) にて反応させた。反応後のサンプルを還元あるいは非還元条件にて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)、Native 電気泳動に供し、タンパク質の成分組成の変化を観察した。また、ANS (8-アリニノ-1-ナフタリンスルホン酸アンモニウム) 標識による表面疎水性、TNBS (2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 Na) による遊離アミノ基、DTNB (5,5'-ジチオ-ビス (2-ニトロ安息香酸 Na) による SH 基の定量を行った。また、反応生成物中の架橋構造物を考察するためにジチロシン抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。

(3) 改質タンパク質の機能評価

MtLac を用いた改質タンパク質の機能変化を評価した。卵白 (10% 溶液) をメディエーター存在下で酵素処理 (25、16 時間) を行った後、沸騰水中で 10 分間加熱を行い、ゲル化させ、得られたゲルの物性値をクリープメーターにより測定した。また、乳 (カゼイン) 溶液 (4%) を酵素処理 (60、2 時間) し、沸騰水中、5 分保持し加熱失活させた後、グルコノデルタラクト

ン (GDL) を添加 (1.5%) し、酸性ゲルを調製した。得られたゲルの物性 (かたさ、もろさ、凝集性、付着性) をクリープメーターにより測定した。また、酸性ゲルを 1,000 xg、15 分の遠心分離を行い、得られた沈殿重量より、保水性を評価した。

(4) 食品モデル系での評価

乳 (スキムミルク) に MtLac を添加し、酵素処理乳を調製した。得られた酵素処理乳を用いて、食品モデル系としてセットタイプヨーグルト及びチーズカードを調製した。セットタイプヨーグルトは、乳酸菌接種後、43 °C にて保持し、pH4.6 まで発酵させた。得られたヨーグルトサンプルについて、クリープメーターによる物性測定、静置状態での離水量の測定を行った。チーズカードは、キモシンにより凝乳を行い、カッティング後、遠心分離によりホエーを排出させ、回収したカードの重量からカード収率への影響を評価した。また、カードの水分含量を測定した。

4. 研究成果

(1) 酵素の調製と反応至適温度

(1) - 1 ラッカーゼ: TthLac、LacTT 及び CRLac の各種ラッカーゼを大腸菌での発現系を構築し、精製酵素として取得した。これらのラッカーゼ及び MtLac の反応至適温度を調べた (表 1.)。結果、TthLac では 70 °C で最大活性を示し、80 °C でもその 90% の活性を示した。既報³⁾では約 92 °C 付近に最大活性があることが報告されており、今回得られた TthLac にはフォールディングに問題がある可能性が考えられた。TtSG0.5 のラッカーゼは、TthLac に対して 75% のホモロジーを有し、類似した立体構造であるが、活性中心のループ構造が異なっている。TthLac のループ構造を TtSG0.5 のラッカーゼのループ構造に置換したキメラ酵素 (LacTT) では、至適温度が 30 °C と TthLac より 40 °C と大幅に低下した。また、20 °C 及び 10 °C においても最大活性の 92% 及び 55% と高い活性を保持しており、本ループ構造は温度に対する活性発現に大きな影響を与える構造であることが示唆された。CRLac では、70 °C に最大活性が得られたが、20 °C あるいは 10 °C でも最大活性に対して 50% 弱の活性が得られた。好熱性真菌である *Myceliophthora thermophila* 由来ラッカーゼ (MtLac) では、至適温度は 55 °C であったが、70 °C でも約 80% の活性を発揮した。これらのことから、かなりの高温域での酵素利用に加えて、好冷菌由来酵素や構造改変酵素により、低温での加工オペレーションの食品 (畜肉加工、水産練り製品等) への適応可能性が示唆された。

表 1. 各種ラッカーゼの反応至適温度と各温度帯における相対活性

	Optimam temp. (°C)	Relative activity (%)		
		80°C	20°C	10°C
TthLac	70	90	-	-
LacTT	30	17	92	55
CRLac	70	25	48	45
MtLac	55	80*	-	-

-, Not determined. *, 70°Cでのデータ

(1) - 2 チロシナーゼ: ラッカーゼ同様ポリフェノールオキシダーゼに含まれるチロシナーゼについて検討を行った。コウイカ墨中にはチロシナーゼ活性が認められた。各種クロマトグラフィーにより部分精製を行ったが、量的に十分量の酵素を得ることが出来ず、組換え酵素としての取得を試みた。大腸菌での発現系での生産においては、活性を有する形での酵素が得られなかったため、酵母での生産を試み、*Pichia pastoris* による分泌発現にて活性を有する酵素 (PpTy) を得ることに成功した。SeTy 及び PpTy の反応至適温度は、それぞれ 30 °C 及び 45 °C 付近で、10 °C での相対活性は、それぞれ 41% 及び 25% であった。また、高温域では活性は低く、70 °C では両酵素とも 20% 以下であった。イカ墨チロシナーゼは、比較的低温での加工オペレーションに有利な酵素であることが考えられる。尚 AbTy では、これらに比べて至適温度は高温側に認められた。SeTy と PpTy の違いについては明らかではなく、今後検討が必要である。イカ墨チロシナーゼはトリプシン消化による部分分解で活性上昇が起こることが知られている⁴⁾が、SeTy 及び PpTy でも活性上昇が確認された。また、トリプシン消化と硫酸沈殿を組み合わせることで、簡便にイカ墨からチロシナーゼを回収できる可能性があり、現在検討を続けている。

(2) 食品タンパク質との反応性検討

(1) で得られたラッカーゼと各種食品タンパク質との反応性を検討した。図 1 (a) には MtLac と乳 (カゼイン) との反応後の SDS-PAGE を示した。反応時間の経過に伴いカゼインの減少と高分子域にスミアな染色域が観察されるようになり、酵素処理による高分子化が認められた。この際に還元条件下での泳動では、ゲル上端部に染色域が認められるが、還元条件ではそれらが認められなくなること、また -カゼインのバンドが認められるようになることから、架橋形成には -カゼインの関与するジスルフィド結合が関与していることが示唆された。図 1 (b) には

Native 電気泳動の結果を示した。反応によって 700~1,200kDa に染色域 (矢印領域) が観察され、数十以上のカゼインモノマーが高分子化に関与していることが示唆された。

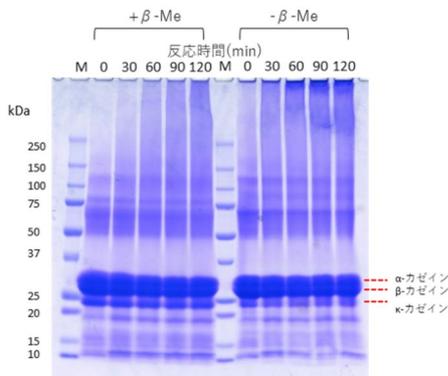


図 1(a) MtLacによるカゼインの架橋重合 (SDS-PAGE)
M, 分子量マーカー; β-Me, β-メルカプトエタノール, 反応温度 60°C

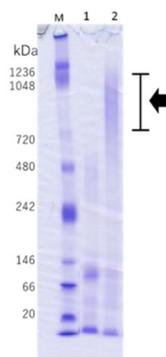


図 1(b) MtLacによるカゼインの架橋重合 (Native-PAGE)
M, 分子量マーカー; Lane1, MtLac未処理; 2, MtLac処理 反応温度 60°C

表 2. にその他のラッカーゼと各種食品タンパク質との反応をまとめて示した。基本的に反応によって起こるタンパク質の架橋重合は、いずれの場合もメディエーター(フェルラ酸、コーヒー酸)の存在下(数 mM 程度)で起こることを確認した。タンパク質によって反応しやすいもの(例えば卵白オボトランスフェリン、ミオシン重鎖、大豆)と反応しにくいもの(卵白オボアルブミンが存在することが確認された。タンパク質架橋酵素である TG は、アクチンなど反応しにくいことが知られているが、ラッカーゼでは条件によっては架橋を形成することが分かった。

ウエスタンブロッティングにより架橋構造物中のジチロシンの形成を観察したところ、MtLac と魚肉あるいは卵白との反応物では、フェルラ酸存在下での反応物中にはジチロシンが検出されたが、コーヒー酸存在下のもでは検出されなかった。また、フェルラ酸存在下で架橋の見られなかったオボアルブミンでもモノマーの位置にジチロシンが検出された。これらのことより、ラッカーゼによる架橋構造物中にはジチロシンが形成される場合があるが、その形成はメディエーターの種類によって異なること、タンパク質によっては分子内架橋を形成する場合もあることが考えられた。また、アクトミオシンやカゼインでは、ラッカーゼ処理により表面疎水性が低下すること、大豆タンパク質では遊離アミノ基や SH 基の減少が確認され、表面構造の変化や反応へのアミノ酸残基の関与を確認した。

表 2. 各種ラッカーゼと食品タンパク質との反応

ラッカーゼ	大豆		乳(カゼイン)			卵白		魚肉(アクトミオシン)	
	β-Co	GL	α	β	κ	OVT	OVA	MHC	Ac
TthLac	+	+	ND	ND	ND	+	-	ND	ND
LacTT	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
CRLac	+	+	ND	ND	ND	+	-	+	-
MtLac	ND	ND	+	+	+	+	-	+	+

+, 架橋形成あり; -, 架橋形成なし

β-Co, β-コングリニン; GL, グリニン; OVT, オボトランスフェリン; OVA, オボアルブミン; MHC, ミオシン重鎖; Ac, アクチン ND, Not determined.

(3) 改質タンパク質の機能評価

図 2. に MtLac で処理を行った卵白の加熱ゲルの物性変化を示した。ラッカーゼ処理により破断に至るまでの荷重と凹みの増加が起ることが示された。この際、コーヒー酸ではフェルラ酸よりも物性値の増加は大きく、メディエーターの種類によって、物性改質の効果が異なることが分かった。

MtLac 処理を行った乳(カゼイン)の GDL による酸性化ゲルの物性評価を行ったところ、いずれの物性値においても酵素未処理乳の酸性ゲルに対して有意な差は認められなかった。一方、保水性は酵素処理乳で増加する傾向が認められた(約 10%)。酵素処理条件の検討は今後の課題である。

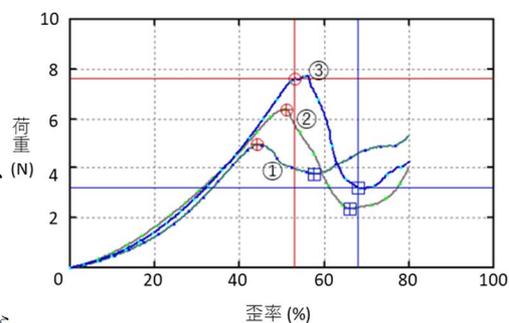


図 2 クリープメーターによる卵白加熱ゲル物性の測定

① 未処理卵白, ② MtLac処理卵白(フェルラ酸), ③ MtLac処理卵白(コーヒー酸)
No.6プランジャー(φ8 x 20H), 1mm/sec., 20N ロードセル

(4) 食品モデル系での評価

表 3. に MtLac で処理を行った乳 (スキムミルク) により調製したセットタイプヨーグルトの物性を示した。フェルラ酸のみでは未処理乳に対して硬さ、凝集性では著差は認められなかったが、付着性が低下する傾向であった。フェルラ酸存在下で MtLac と反応させたものでは、硬さ、凝集性、付着性いずれの値も未処理に比べて低い値を示した。尚、今回検討条件においては、離水量には著差は認められなかった。

表3. 各種ヨーグルトの物性 (N)

	硬さ	凝集性	付着性
未処理乳	0.60±0.13	0.41±0.02	186.0±69.8
フェルラ酸のみ	0.67±0.59	0.45±0.02	82.1±30.6
MtLac 処理 (フェルラ酸あり)	0.25±0.03	0.25±0.03	47.0±0.1

(n=3)

表 4. に MtLac で処理を行った乳 (スキムミルク) により調製したチーズカードの収率及び水分含量を示した。フェルラ酸存在下で MtLac と反応させたものでは、未処理乳及びフェルラ酸なしでの MtLac 処理に比べてやや高い収率を示した。この際、水分含量の値も大きく、カードの収量増加分は水分によるものと示唆された。尚、酵素処理に関わらず凝乳開始時間には著差は認められなかったが、カードの形成はやや遅れる傾向が認められた。

表4. 各種乳によるカード収率と水分含量 (%)

	カード収率	水分含量
未処理乳	26.0±0.74	76.6±2.29
MtLac 処理 (フェルラ酸なし)	27.0±0.29	ND
MtLac 処理 (フェルラ酸あり)	29.9±0.34	79.2±1.50

ND, Not determined.

(n=3)

以上、ラッカーゼ処理乳のヨーグルト及びチーズにおける影響の評価を試みたが、今回検討条件では明確な有用性は確認できなかった。今後、更に処理条件の検討、乳以外の食品実系における効果や基質の変性状態と反応性の変化等の詳細検討が今後の課題である。

以上

<参考文献>

- 1) N. Miwa, Innovation in the food industry using microbial transglutaminase: Keys to success and future prospects, *Analytical Biochemistry*, 597, 113638, 2020.
- 2) R. Berka et al., Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3151-3157, 1997.
- 3) K. Miyazaki, A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27, *Extremophiles*, 9, 415-425, 2005.
- 4) T. Naraoka, et al., Purification, characterization, and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mullusk, *Illex argentinus*, *Eur. J. Biochem.*, 270(19), 4026-4038, 2003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤兼邦太
2. 発表標題 組換えラッカーゼによるシログチアクトミオシンの架橋
3. 学会等名 令和3年度 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤兼那太
2. 発表標題 好熱菌ラッカーゼによる食品タンパク質の架橋解析
3. 学会等名 農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本健太郎
2. 発表標題 ラッカーゼによるタンパク質架橋反応に対するタンパク質架橋メディエーターの効果
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第71回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本健太郎
2. 発表標題 好冷性放線菌の有するラッカーゼのタンパク質架橋解析
3. 学会等名 食品科学工学会 第69回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田昌人
2. 発表標題 イカスミチロシナーゼの生化学的特性とタンパク質架橋能の評価
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会 第71回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木美柚
2. 発表標題 酸化還元酵素によるカゼインの架橋重合
3. 学会等名 食品科学工学会 第69回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	時下 進一 (Tokishita Shinichi) (60266898)	東京薬科大学・生命科学部・准教授 (32659)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------