

研究ノート

食品中のL-アラビノース遊離活性の検索とエノキタケの
 α -L-アラビノフラノシダーゼ活性の評価與座 宏一[§], 田伏 美峰, 松木 順子, 徳安 健Screening of L-Arabinose Releasing Activity in Food Materials and Evaluation of
 α -L-Arabinofuranosidase Activity in *Flammulina velutipes*Koh-ichi Yoza[§], Mine Tabuse, Junko Matsuki and Ken Tokuyasu

Abstract

α -L-Arabinofuranosidase activities of 33 food materials were assayed to produce L-arabinose in foods. The activity of *Flammulina velutipes* was highest among the samples. Its optimal pH was 6.5 and its optimal temperature was 40°C. The enzyme solution was fractionated using anion exchange resin, Toyopearl SuperQ to concentrate the activity and the specific activity increased 18 times. However, the enzyme activity was not enough to produce L-arabinose when sugar beet arabinan was used as the substrate.

玄米を水溶液に浸漬すると、内在性酵素の作用により γ -アミノ酪酸が生じるという現象が報告されており¹⁾、食品素材の内在性酵素を利用した食品の付加価値向上技術が注目されている。さらに食品素材に含有される酵素と基質の組み合わせ次第で、応用範囲の広い技術となることが期待できる。しかしながら、食品素材中の酵素を用いた機能性成分の増強については、このような一部の例を除いてほとんど研究が行われておらず、食品素材中に存在する有用酵素に関する情報は殆ど整備されていない。そこで、我々は食品素材由来の酵素を食品に添加することにより食品中の機能性糖質を増強することを目的として、糖質関連酵素の活性を探索することとした。

L-アラビノースは植物のヘミセルロースの構成成分等として天然に存在している。一方、L-アラビノースは人間の消化管のスクラーゼ活性を阻害する性質があり、L-アラビノースとショ糖を同時に摂取した場合に血糖上昇を穏やかにする作用が知られている²⁾。我々は機能性糖質としてのL-アラビノースに着目し、加水分解反応によりL-アラビノースを遊離する酵素であるア

ラビノフラノシダーゼ (α -L-アラビノフラノシドアラビノヒドロラーゼ, EC3.2.1.55, 以下Afと略記) について、食品素材中の活性を調べた。予備的な試験を含め総計100程度の試料について測定したところ、エノキタケのAf活性が最も高いという結果を得た。これまで植物^{3, 4)}、糸状菌^{5, 6)}、細菌^{7, 8)} および放線菌^{9, 10)} 由来のAfに関して数多くの報告があるが、食用キノコ類に関しては十分に調べられていない。そこで、エノキタケのAf活性の性質およびL-アラビノース生成量について検討を行い、食品中のL-アラビノースの増強の可能性について考察したので報告する。

実験方法

1. 実験材料および試薬

エノキタケおよびその他の食品素材は市販品を用いた。4-ニトロフェニル- α -L-アラビノフラノシド、4-ニトロフェニル- α -L-アラビノピラノシドおよび4-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドはシグマ アルドリッチ社 (St. Louis, MO) より購入した。テンサイ由来アラ

2006年12月25日受付, 2007年1月29日受理

[§] 連絡先 (Corresponding author)

ビナン（アラビノース：ガラクトース：ラムノース：ガラクトツロン酸＝88:3:2:7(w/w)）およびアラビノオリゴ糖はメガザイム社（Wicklow, アイルランド）より購入した。

2. 食品材料からの酵素液の抽出

食品材料 1 g を液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒で粉碎した後に、9 ml の精製水を加えてさらに磨砕し、 $15,000\times g$ にて 15 分間、遠心分離した上澄液を試験に用いた。

3. 酵素活性の測定

アラビノフラノシダーゼ活性は 4-ニトロフェニル- α -L-アラビノフラノシドを基質として用いた。試料 10 μ l に対して McIlvine 緩衝液 (pH6.5) に溶解した 1.1 mM の基質 90 μ l を加え、37°C 30 分間反応させて、100 μ l の 0.5 M 炭酸ナトリウムを加えた後、405 nm の吸光度を測定した。1 分間に 1 μ mole の 4-ニトロフェノールを生成する活性を 1 U とした。ただし、各種食品素材中の Af 活性の測定では、基質を精製水に溶解して測定した。

α -L-アラビノピラノシダーゼ活性および β -D-キシロシダーゼ活性についても同様に測定した。熱安定性の試験では、各温度で 30 分間保温した後、残存する活性を測定した。

テンサイ由来アラビナンを基質とした場合の条件は次の通りである。5 % アラビナンを含む McIlvine 緩衝液 (pH6.5) で、37°C 4 時間反応させた時に生じるアラビノース量は、メガザイム社のアラビナン測定キットを用いて酵素法により測定した¹¹⁾。

4. 酵素の 1 段精製

エノキタケの可食部分、約 150 g を試料として、生重量の 4 倍量の 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を加え、家庭用ジューサーによりホモジナイズする操作を 4 回行い得られた液を混合した（生重量の合計は 617 g）。2°C、 $15,000\times g$ 、30 分間、遠心分離した上澄液を粗抽出液とした。この抽出液を陰イオン交換クロマトカラム、トヨパール SuperQ-650M（東ソー）により分離した。0 ~ 0.3 M の塩化ナトリウム勾配で溶出し（溶出液量 1.3 l）、14 ml ごと分画し、画分 40 ~ 42 を回収し濃縮酵素液とした。

5. 薄層クロマトグラフィー

5% (w/v) アラビナンを含む McIlvine 緩衝液 (pH6.5) で、37°C 4 時間反応させた後、9 倍量のエタノールを

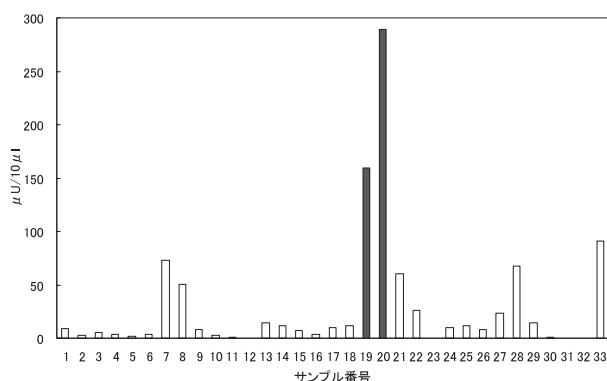


図 1 食品素材のアラビノフラノシダーゼ活性

1.マイタケ（傘）、2.マイタケ（柄）、3.ブナシメジ（傘）、4.ブナシメジ（柄）、5.ホワイトブナシメジ（傘）、6.ホワイトブナシメジ（柄）、7.ヒラタケ（傘）、8.ヒラタケ（柄）、9.ホワイトマッシュルーム（傘）、10.ホワイトマッシュルーム（柄）、11.マッシュルーム（傘）、12.マッシュルーム（柄）、13.エリンギ（傘）、14.エリンギ（柄）、15.シイタケ（傘）、16.シイタケ（柄）、17.ナメコ（傘）、18.ナメコ（柄）、19.エノキタケ（傘）、20.エノキタケ（柄）、21.タラの芽（先端部）、22.タラの芽（元部）、23.ウド（先端部）、24.ウド（元部）、25.タケノコ（先端）、26.タケノコ（元部）、27.ヤマブシタケ（先端）、28.ヤマブシタケ（元部）、29.米ヌカ、30.ヨーグルト（A）、31.ヨーグルト（B）、32.みそ、33.納豆

加え、4°C $15,000\times g$ 15 分間遠心分離した上澄について、窒素気流下で加熱乾固し、数 μ l のエタノールに溶解し、薄層プレートにスポットした。対照には、反応後に酵素液を加えた試料を用いた。

薄層プレートは Whatman 社（Brentford, イギリス）の LHPK シリカゲル 60Å（10 cm $\times$ 10 cm）を使用した。展開溶媒は n-ブタノール：ピリジン：水（6:4:3, v/v/v）を使用し、発色はアニリン、ジフェニルアミン試薬を用いた¹²⁾。

実験結果および考察

1. 食品素材の Af 活性

食品素材に含まれる Af 活性について、野菜類を中心とした予備的な試験を行ったところ、キノコ類の活性が高いと推定されたので、食用キノコ類を中心に測定した。供試した 33 試料の中では、エノキタケの Af 活性が高く、特に柄の部分の活性が高かった（図 1）。その他、ヒラタケ、ヤマブシタケ、タラの芽や納豆の活性も比較的高かった。同じキノコ類でも糞生菌であるマッシュルームの活性は低かった。木材腐生菌のキノコ類の Af 活性が高いことに関しては、Af を生成すること

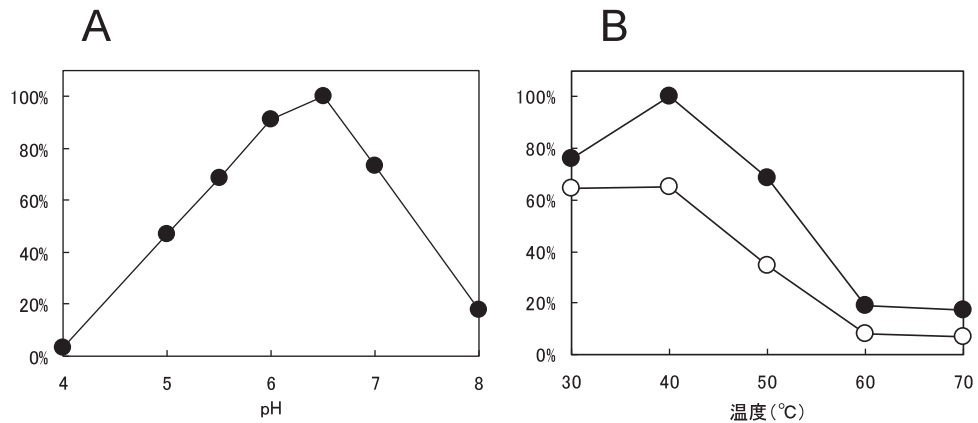


図2 エノキタケ抽出液のAf活性の至適pH・温度および温度安定性

A:各pHでの活性, B:各温度での活性および温度安定性;●:活性, ○:安定性

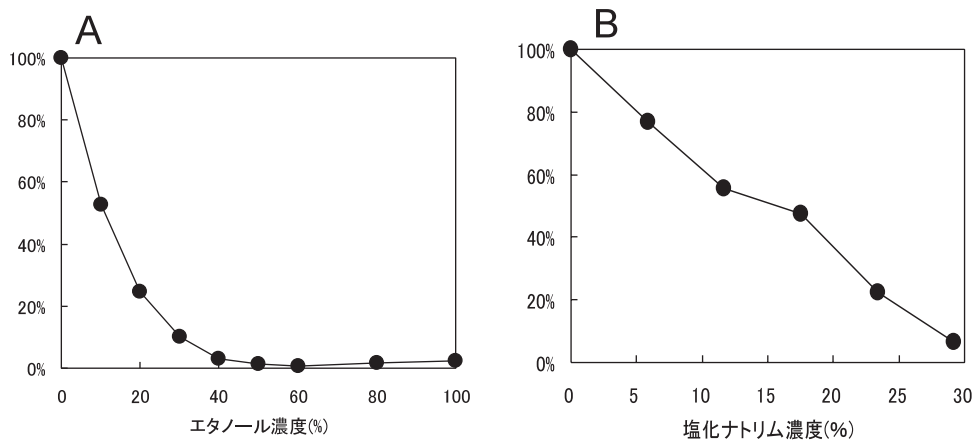


図3 エノキタケ抽出液のAf活性のエタノールおよび塩化ナトリウム添加時の残存活性

A:エタノール, B:塩化ナトリウム

で、木材に含まれるヘミセルロースの分解を促進し、その分解物を栄養としているためと考えることができる。しかしながら、木材腐生菌でもマイタケやシイタケなどはAf活性が低かった。その原因としては、その生物種の特性という他に、キノコが生育した培地のヘミセルロース中のアラビノース含量が低いことが考えられる。ヘミセルロースの主要成分であるキシランに含まれるアラビノースは、カバノキでは1%しか存在しないが、トウモロコシ繊維では35%程度含まれている¹³⁾。また、醤油麹カビ (*Aspergillus oryzae*) のAfはダイズ多糖により誘導されることが報告されており¹⁴⁾、培地に含まれる糖の組成により、Afが誘導される可能性がある。例えば、アラビノース含量の高いコーンコブ培地の使用などにより、Afを誘導するなど、栽培方法により食品素材の持つ酵素の量や質が制御できる可能

性があると考えられる。

2. エノキタケのAf活性の至適条件および安定性

エノキタケ水抽出液のAf活性の至適条件および安定性を調べた。図2に示したように、至適pHは6.5であった。また、至適温度は約40°Cであり、安定性については50°C以上では急速に活性が低下した。エノキタケのAf活性は通常の加熱処理により大部分が失活するものと考えられた。これまでに報告されたカビや細菌のAfの至適pHは3.3~9であり、弱酸性域に至適pHを持つものが多い¹⁵⁾。至適反応温度は50°C以上の酵素が多く、中には*Thermobacillus*の例で90°Cという例も報告されている¹⁶⁾。エノキタケのAf活性はこれらと比較すると至適温度が低かった。その他、食品に関連した素材として醤油麹カビのAfは至適pH5.5、至適温度60°Cという報

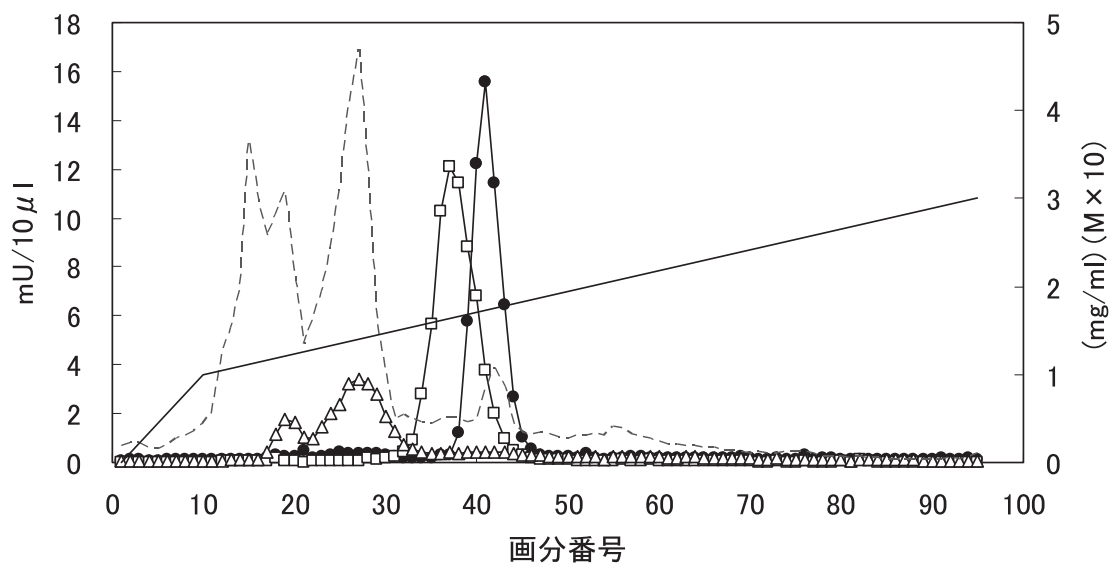


図4 エノキタケ抽出液の陰イオン交換樹脂による分離パターン

●:Af活性, □: α -L-アラビノピラノシダーゼ活性, △: β -D-キシロシダーゼ活性, --- :タンパク質(mg/ml),
— :塩化ナトリウム(M $\times$ 10)

告がある¹⁴⁾。

食品に添加して発酵を行う場合を想定して、食塩やエタノール存在下での活性について測定した(図3)。10%エタノールで、活性は5割となり、エタノール耐性は特に高くはないと考えられた。5%塩化ナトリウム存在下では8割程度の活性を保持していた。漬け物で使用される塩化ナトリウム濃度は5%程度であり、この濃度でのAf活性への影響は小さいと考えられた。

3. エノキタケ抽出液の1段階精製

食品中にショ糖の約3%のアラビノースが存在すれば、血糖上昇緩和効果が期待できる²⁾。仮に食品中の砂糖含量を20%と想定すると、100gの食品中に24時間で有効量のアラビノースを生じさせるには、2.8U必要である。

エノキタケ抽出液の酵素活性は約60mU/mlであった。この活性では食品中にアラビノースを生成するには十分でないと考えられたので陰イオン交換樹脂による1段階精製を行った(図4)。酵素活性は1.1U/mlと約18倍に濃縮された。

エノキタケ抽出液にはAf活性の他に、 β -キシロシダーゼ、 α -L-アラビノピラノシダーゼ活性も検出された。Afとキシロシダーゼ活性を同時に持つ酵素も存在するが^{17, 18)}、エノキタケの溶出画分では別のフラクションに活性のピークが存在したので、それぞれ別の酵素による活性だと考えられた。



図5 テンサイ由来アラビナンとエノキタケ酵素の反応液の薄層クロマトグラフィー

1: 標準アラビノース,
2: エノキタケ酵素反応液,
3: 対照(反応後に酵素液添加)

次に、天然の基質であるテンサイ由来のアラビナンからのアラビノース遊離活性について検討した。まず、アラビナンに1段濃縮したエノキタケ酵素液を加えて反応させ、薄層クロマトグラフィーによりアラビノースが生成していることを確認した(図5)。この濃縮した酵素液のアラビナンに対する活性は31 mU/mlと人工基質の場合の3%程度であり、実用的にアラビノースを生成させるにはさらに酵素活性を高める必要があると考えられた。本酵素はエキソ型の酵素であり、基質の非還元末端の数の増加により、分解速度が向上するものと期待できる。非還元末端の数を増加させるためエンド型アラビナナーゼとの併用によりアラビナンを

分解することが考えられる。これまで、アラビナナーゼについては、カビ¹⁹⁾ や細菌²⁰⁾ 由来の酵素に関する報告が大半であるが、食品素材由来のアラビナナーゼが利用できれば有用であろう。

また、可食部以外の菌床近くの非食部や菌床そのものの利用可能性が残されており、食品製造廃棄物バイオマスの有効利用につながる可能性が考えられる。

要 約

食品中に機能性糖質としてのL-アラビノースを生成させるために、食用キノコを中心に33の食品素材の α -L-アラビノフラノシダーゼ活性を測定した。調査した中では、エノキタケの活性が最も高かった。この活性の至適pHは6.5で至適温度は約40℃であった。トヨパールSuperQを用いて活性を濃縮し、比活性は18倍となった。しかしながら、天然基質であるテンサイ由来アラビナンを反応に用いたところ、その活性は低く、さらにアラビノースの生成量を高める工夫が必要と考えられた。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト「安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発」により行われた。

文 献

- 1) T. Saikusa, T. Horino and Y. Mori, *Biosci Biotechnol Biochem*, **58**, 2291-2 (1994).
- 2) K. Seri, K. Sanai, N. Matsuo, K. Kawakubo, C. Xue and S. Inoue, *Metabolism*, **45**, 1368-74 (1996).
- 3) M. Tanaka and T. Uchida, *Biochim. Biophys. Acta.*, **522**, 531-40 (1978).
- 4) R. C. Lee, R. A. Burton, M. Hrmova and G. B. Fincher, *Biochem. J.*, **356**, 181-9 (2001).
- 5) A. Kaji, K. Talawa and T. Ichimi, *Biochim. Biophys. Acta.*, **171**, 186-8 (1969).
- 6) E. X. Filho, J. Puls and M. P. Coughlan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 168-73 (1996).
- 7) S. Kaneko, M. Sano and I. Kusakabe, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3425-8 (1994).
- 8) A. Margolles and C. G. de los Reyes-Gavilan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5096-103 (2003).
- 9) E. Tajana, A. Fiechter and W. Zimmermann, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1447-50 (1992).
- 10) C. Manin, F. Shareek, R. Morosoli and D. Kluepfel, *Biochem. J.*, **302** (Pt 2), 443-9 (1994).
- 11) H. Carlsson, P. Ljungcrantz, C. Lindblad, M. Persson and L. Bulow, *Anal. Biochem.*, **218**, 278-83 (1994).
- 12) K. Anderson, S. C. Li and Y. T. Li, *Anal. Biochem.*, **287**, 337-9 (2000).
- 13) B. C. Saha, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 279-91 (2003).
- 14) T. Hashimoto and Y. Nakata, *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 164-9 (2003).
- 15) M. T. Numan and N. B. Bhosle, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 247-60 (2006).
- 16) K. Miyazaki, *Extremophiles*, **9**, 399-406 (2005).
- 17) R. C. Lee, M. Hrmova, R. A. Burton, J. Lahnstein and G. B. Fincher, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5377-87 (2003).
- 18) T. Kotake, K. Tsuchiya, T. Aohara, T. Konishi, S. Kaneko, K. Igarashi, M. Samejima and Y. Tsumuraya, *J. Exp. Bot.*, **57**, 2353-62 (2006).
- 19) D. Ramon, P. vd Veen and J. Visser, *FEMS Microbiol Lett*, **113**, 15-22 (1993).
- 20) A. Kaji and T. Saheki, *Biochim. Biophys. Acta.*, **410**, 354-60 (1975).

