凍結粉碎による糸状菌 (*Fusarium graminearum*) 菌体からの分離タンパク質の調製ならびにその性 状について

山田亜樹子*・高野克己*・鴨居郁三*

Preparation and Properties of Protein Isolate with Freeze-crushing Method from Mycelium (*Fusarium graminearum*)

Akiko YAMADA*, Katsumi TAKANO* and Ikuzo KAMOI*

**Department of Agricultural Chemistry,
Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku Tokyo, 156*

As a result of extracting the protein from Mycelium (*Fusarium graminearum*), a freeze-crushing method was the best one compared with autolysis treatment, alkali treatment, enzymatic treatment and ultrasonic treatment, and the extract of the protein recovered with the freeze-crushing was about 82% of the total protein.

The Mycelial protein isolate was precipitated at pH4.5 and the major amino acids composition were almost aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, valine, leucine and lysine, and it has similar to that soybean protein isolate.

Both emulsion stability and fat adsorption properties, the characteristic functional properties of the Mycelial protein isolate, were superior to that soybean protein isolate.

When the Mycelium and the Mycelial protein isolate add to the minced pork then and cooked, the meat color lightness decreased, and the rheology increased. (Received Oct. 7 1991)

緒 言

大豆および小麦より調製した分離タンパク質は、加工食品の素材として広く利用されているが、さらに将来予測されるタンパク質資源の不足を充足するため、微生物タンパク質の利用が検討されている。すでに酵母についてはn-パラフィン資化性酵母などを中心として研究が行われているが、糸状菌については生育速度、タンパク質含量および消化率が酵母に比べて劣るなどの理由からあまり研究がなされていない。

そこで筆者らは、菌体の分取が簡単で生育速度が速く、タンパク質含量の高い新規に分離された糸状菌

(*Fusarium graminearum*) を用いて分離タンパク質の調製を試みた。糸状菌は細胞壁が強固で、効率よくタンパク質を抽出することが困難なため、各種の方法で菌体を前処理した後、タンパク質を抽出することを試み、調製した分離タンパク質の性状ならびに消化酵素による分解率について検討を行った。さらに食品への利用として、食肉へ添加した場合の影響についても調べたので報告する。

実 験 方 法

1. 供試微生物および培養条件

供試微生物は *Fusarium graminearum* 1 M 1

*東京農業大学農学部農芸化学科 (〒156 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

145425を用いた。Table 1 に示した培地を用い、30℃、50時間通気培養を行い、濾過により菌体を集め洗浄した後、遠心分離して菌体を分取し、-20℃で凍結保存して、以下の実験に供した。

Table 1 Composition of the medium of *F. graminearum*

Component	(mg/l)	Component	(mg/l)
Glucose	40,000	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,000	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	2
KH ₂ PO ₄	15,000	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	750	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
Yeast extract	500	FeSO ₄ ·7H ₂ O	20
Pepton	500	H ₃ BO ₃	0.5
NaOH	550	Choline chloride	25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10	Biotin	0.05

2. 菌体の一般分析

凍結乾燥した菌体を試料として、一般分析を行った。

水分は常圧加熱乾燥法¹⁾、粗タンパク質はケルダール法²⁾、粗脂肪はソックスレー法³⁾、粗灰分は直接灰化法⁴⁾、粗繊維はヘンネベルク・ストーマンの改良法⁵⁾により測定した。

3. タンパク質の定量

タンパク質量は、ケルダール法およびビウレット法にて測定を行った。

4. 菌体からのタンパク質の抽出

凍結保存した菌体を試料としたが、水分含量に差異があったので、菌体量は乾物換算して示した。

(1) アルカリ処理 菌体10gに、1.0%、2.0%および4.0%の水酸化ナトリウム溶液300mlを加え、37℃で10時間抽出した。

(2) 酵素処理 菌体10gに0.2M酢酸緩衝液(pH5.0)を300ml加えて分散させ、これにマセロザイム(ヤクルト社製)、セルラーゼ・オノヅカ(ヤクルト社製)メイセラーゼ(明治製菓社製)を各々0.1%濃度となるように添加し、45℃で5時間酵素処理した。

(3) 自己消化処理 菌体10gに、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)300mlおよび少量のトルエンを加え、34℃24時間振とうして自己消化させた後、0.4%および1.0%濃度となるように水酸化ナトリウム溶液を加え30分間攪拌抽出した。

(4) 物理的処理 菌体10gに0.2~1.0%水酸化ナトリウム溶液300mlを加え、ホモゲナイザー(ヒスコトロ、日音医理科機器製作所製)または超音波砕碎機(日本精機製作所製)にて5分間処理した後、35℃に1時間

置き、タンパク質を抽出した。凍結粉碎処理は菌体10gを液体窒素にて急速凍結し、ドライアイスとともに粉碎機(協立理工製)にて粉碎した後、0.2~1.0%水酸化ナトリウム溶液300mlを加えて、35℃で1時間、抽出した。

5. 顕微鏡観察

菌体を適量採取し、顕微鏡(オリンパス光学製、EC ETR-2型)を用いて観察した。

6. アミノ酸組成

分離タンパク質1mgに6N塩酸1mlを加え、110℃、24時間加水分解した。加水分解後、減圧乾固し、高速アミノ酸分析計(日立835-50型)にて測定した。

7. 分離タンパク質の機能特性の測定

(1) 乳化性⁷⁾ 試料に蒸留水または0.5M塩化ナトリウム溶液(16倍量)を加え、0.1M水酸化ナトリウム溶液にてpHを7.0および10.0に調整した後、同量の大豆油(日本薬局方)を加えホモゲナイズ(10000r.p.m., 3分間)して、生成した乳化層の一定量を採取し、遠心分離(3500r.p.m., 5分間)を行い乳化層の容量を測定し、次式により乳化性(%)を求めた。

$$\text{乳化性}(\%) = \frac{\text{遠心分離後の乳化層量}}{\text{乳化層量}} \times 100$$

(2) 乳化安定性⁷⁾ 前記の乳化性の測定方法に従い乳化層を調製し、この一定量を採取し、80℃にて30分間加熱後、15分間冷却して遠心分離し、次式により乳化安定性(%)を求めた。

$$\text{乳化安定性}(\%) = \frac{\text{遠心分離後の乳化層量}}{\text{乳化層量}} \times 100$$

(3) 保水性⁸⁾ 試料に蒸留水(15倍量)を加え攪拌し、室温に2時間置いた後、遠心分離(10000r.p.m., 15分間)を行い試料に吸着されている水分重量を測定し、次式により保水性(%)を求めた。

$$\text{保水性}(\%) = \frac{\text{試料中の水分重}}{\text{量試料重}} \times 100$$

(4) 保油性⁹⁾ 試料に大豆油(6倍量)を加え攪拌し、室温に1時間放置後、遠心分離(2000r.p.m., 25分間)を行い、試料に吸着されている油の重量を測定し、次式により保油性(%)を求めた。

$$\text{保油性}(\%) = \frac{\text{試料中の油の重量}}{\text{量試料重}} \times 100$$

8. 分離タンパク質の消化試験

試料および大豆分離タンパク質にpH1.8または8.0の緩衝液を加えて0.4%溶液とし、30分間置いた後、ペプシン溶液(pH1.8)およびトリプシン溶液(pH8.0)を加え、30℃で24時間反応させた後、20%トリクロル酢酸溶液を加えて未分解のタンパク質を沈殿させ、上澄液

について吸光度 (280nm) を測定し、次式により分解率を求めた。

$$\text{タンパク質分解率(\%)} = \frac{\text{酵素反応後の上澄液中のタンパク質量}^*}{\text{試料中タンパク質量}} \times 100$$

*280nmの吸光度を測定し、1.O.Dを1mgタンパク質として算出

9. 食肉への菌体および分離タンパク質の添加

(1) 試料の調製 豚もも挽き肉を液体窒素にて急速凍結し凍結粉碎した後、同様に凍結粉碎処理した菌体または分離タンパク質を0, 5, 10, 20%となるように添加して混和した後、内径 1.8cm, 高さ 3cm のガラス容器に入れ、180℃, 10分間加熱後、20℃で10分間放冷し、ミートローフ様食品を調製し試料とした。

(2) 肉色および物性の測定 試料を高さ 1.3cm になるように切断し、その切断面を測色色差計 (日本電色工業株式会社製, ND-K5) により測定し、明度 (L), 赤色度 (a), 黄色度 (b) を求めた。また、レオロメーター (飯尾電機株式会社製, RMT-1301) を用い、硬さ、凝集性、および付着性を測定した。

実験結果

1. 菌体の一般分析

一般分析の結果を Table 2 に示した。菌体のタンパク質含量は57.2%であり、青カビ約16%, 麹菌約23%, パン酵母約50%に比べかなり高いタンパク質含量であった¹⁰⁾。

Table 2 Composition of *F. graminearum*

Component	%
Moisture	4.8
Crude protein	57.2
Crude fat	3.0
Carbohydrate	19.9
Crude fiber	7.3
Crude ash	7.8

2. 菌体からのタンパク質抽出法の検討

菌体の細胞壁を破壊し、効率よくタンパク質を抽出するため、アルカリ処理、酵素処理、自己消化処理および物理的処理を行い、その抽出率を比較した結果を Table 3 に示した。物理的な超音波処理および凍結粉碎処理では、粉碎後の水酸化ナトリウム濃度が0.2%の希アルカリ性溶液で高い抽出率を示し、菌体中のタンパク質に対しそれぞれ74.7%, 81.8%の抽出率であった。特に凍結粉碎処理法ではアルカリ処理の約1.8倍、酵素処理の

Table 3 Extraction of protein with alkali, enzymatic and physical treatment from *F. graminearum*

Treatment	Protein(%)
Alkali	
1.0 %NaOH	23.8
2.0 %NaOH	35.3
4.0 %NaOH	44.9
Enzymatic	
Macerozyme	34.5
Cellulase "ONOZUKA"	36.4
Meicelase	29.0
Autolysis	
0.4%NaOH	11.2
1.0%NaOH	19.3
Physical	
Homogenizer(phycotron)(1.0%)*	24.7
Ultrasonic homogenizer(0.2%)*	74.7
Freeze-crusing(0.2%)*	81.8

*concentration of NaOH

2.2倍、自己消化処理の約4.2倍のタンパク質抽出量であった。

各処理における破碎菌体の顕微鏡写真を Photo. 1 に示した。凍結粉碎処理が最も良く菌体が破碎されており、このことからタンパク質抽出に凍結粉碎処理法が優れていることが裏付けられた。

3. 分離タンパク質の性状

(1) 分離タンパク質の収量 上記の試験で、凍結粉碎—アルカリ抽出が最も収率が高かったので、以下次の方法により分離タンパク質を調製した。

凍結粉碎した菌体に0.4%水酸化ナトリウム溶液30倍量を加えてタンパク質を抽出し、これをpH 4.5に調製

Fig. 1 pH solubility profiles of protein isolate

Photo. 1 Light Micrograph of Mycelium (×100)

A : Untreatment

B : Alkali treatment

C : Enzymatic treatment
(Cellulase "ONOZUKA")

D : Homogeniszer
(Physcotron)

E : Ultrasonic homogenizer

F : Freeze-crusing

してタンパク質を沈殿させ洗浄した後、凍結乾燥して分離タンパク質試料とした。なお、菌体 100 g (粗タンパク質 57.2%) より約 40g の分離タンパク質 (粗タンパク質 96.5%) が得られ、タンパク質収率は約 67.5% であった。

(2) 分離タンパク質の溶解性 分離タンパク質水溶液を各 pH に調製した後、遠心分離して上澄のタンパク質量を測定し、その結果を Fig. 1 に示した。pH 約 4.5 で溶解度は最少となり、pH 9.5 以上では 100% 溶解し、大豆分離タンパク質¹¹⁾ とほぼ同様の溶解性を示した。

Table 5 Emulsifying activity and emulsion stability of protein isolate

Protein isolate	Emulsifying activity (%)				Emulsion stability (%)			
	pH 7.0		pH 10.0		pH 7.0		pH 10.0	
	D. W. ↓	0.5M NaCl	D. W. ↓	0.5M NaCl	D. W. ↓	0.5M NaCl	D. W. ↓	0.5M NaCl
<i>F. graminearum</i>	54.0	54.8	60.0	62.0	54.4	80.3	63.5	62.5
Soy bean	69.0	63.5	59.0	58.7	51.7	52.4	51.8	53.4

Table 4 Amino acid composition of protein isolate obtained *F. graminearum*

Amino acid	mol(%)
Asp	10.4
Thr	2.6
Ser	6.1
Glu	11.5
Pro	5.9
Gly	9.4
Ala	10.5
Cys	0.2
Met	0.6
Ile	5.6
Leu	8.9
Tyr	1.1
Phe	3.9
Lys	7.7
His	2.2
Arg	5.7

(3) 分離タンパク質のアミノ酸組成 分離タンパク質のアミノ酸組成を調べた結果 (Table 4), アスパラギン酸, グルタミン酸, グリシン, アラニン, バリン, ロイシン, リジンの含量が多く, シスチン, メチオニンなどの含硫アミノ酸が少なかった。これは, 大豆タンパク質と類似したアミノ酸組成¹¹⁾であり, 比較的良質なタンパク質と考えられた。

(4) 分離タンパク質の消化性 ペプシンおよびトリプシンによる分解率を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

Fig. 2 Digestive rate of protein isolate by pepsin. The reaction was carried out at 30°C for 24hr at pH 1.8. —○—, Mycelial protein isolate; —●—, soybean protein isolate **Fig. 3** Digestive rate of protein isolate by trypsin. The reaction was carried out at 30°C for 24hr at pH 8.0. —○—, Mycelial protein isolate; —●—, soybean protein isolate

両酵素による分解率は, 菌体より調製した分離タンパク質が高く, 特にトリプシンでは大豆タンパク質の約50%に対し, 菌体分離タンパクでは約75%と高い分解率を示した。

4. 分離タンパク質の機能特性

(1) 乳化活性および乳化安定性 大豆タンパク質と比較した結果を Table 5 に示した。乳化活性は pH 7.0 では54.0~54.8%と大豆タンパク質の63.5~69.0%より低い値を示したが, pH 10.0では60.0~62.0%と大豆タンパク質の約59%に比べやや高い値であった。乳化安定性はいずれの条件でも分離タンパク質の方が高い値を示し, 乳化安定性は大豆分離タンパク質より優れていた。

Table 6 Water and fat adsorption of protein isolate

Protein isolate	Water adsorption(%)	Fat adsorption(%)
<i>F. graminearum</i>	355	220
Soy bean	448	175

(2) 保水性および保油性 大豆分離タンパク質と比較した結果を Table 6 に示した。保水性は355%と大豆分離タンパク質の448%に比べ低い値を示したが, 保油性は220%と大豆分離タンパク質の約1.3倍の値を示し, 保油性に優れていることが認められた。

5. 食肉への菌体および分離タンパク質の添加

(1) 肉色 豚もも挽き肉に, 菌体および分離タンパク質を5~20%添加して加熱した場合の肉色の測定結

Table 7 Color difference meter index of cooked meat

Addition (%)	L	a	b
0	56.9	6.5	10.2
Mycelium			
5	54.6	6.2	11.6
10	53.7	7.1	11.7
20	50.4	6.7	11.6
Protein isolate			
5	53.5	6.1	11.1
10	50.6	6.2	11.6
20	49.2	5.4	12.3

果を Table 7 に示した。

明度は、菌体および分離タンパク質の添加量が増加するにしたがって減少する傾向にあり、無添加と比較すると菌体20%添加では約88.6%、分離タンパク質20%添加では約86.5%に明度は減少した。

赤色度は、菌体の添加量が増加するとやや増大したが、分離タンパク質では添加量が増加すると減少する傾向が認められた。

黄色度は菌体および分離タンパク質とも添加量が増加すると高くなることが認められた。

(2) 物 性 豚もも挽き肉に菌体および分離タンパク質を添加し加熱した後、硬さ、凝集性、付着性を測定し、結果を Table 8 に示した。

Table 8 Texture index of cooked meat

Addition (%)	Hardness	Cohesiveness	Adhesiveness*
0	0.5892	0.6720	0.0730
Mycelium			
5	0.6368	0.6394	0.0972
10	0.6134	0.6138	0.1354
20	0.6994	0.5708	0.1539
Protein isolate			
5	0.7410	0.6574	0.0455
10	1.0344	0.6532	0.0885
20	1.2984	0.6476	0.1224

(Rheometer unit)

*Measuring condition of texture

Plunger, 3φmm; Voltage sensitivity, 12V; Movement speed, 12cycles/min; Movement cycles, 2cycles; Chart speed, 1500mm/min; Clearance, 4mm.

硬さは、菌体および分離タンパク質の添加量が増加するとともに増大し、特に分離タンパク質を20%添加した場合の硬さは無添加の約2倍を示した。

凝集性は菌体の添加量が増加するに従って減少する傾

向を示したが、分離タンパク質の添加では大きな影響は見られなかった。

付着性は菌体の添加量と共に増加したが、分離タンパク質は5%添加では減少し、10%、20%添加ではそれぞれ1.2倍、1.7倍に増大した。

要 約

菌体から効率よくタンパク質を抽出する方法としてアルカリ処理、酵素処理、自己消化処理、物理的処理について試験を行った。

その結果、物理的処理の凍結粉碎処理が最も優れており、約82%と高いタンパク質抽出率を得たので、この凍結粉碎処理法を用いて分離タンパク質を調製し、その性状について検討した。分離タンパク質の溶解性はpH4.5付近で最少となり、また、アミノ酸組成を調べた結果、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、リジンの含量が多く、大豆タンパク質とほぼ同様な組成であった。

なお、ペプシンおよびトリプシンによる分解率を試験したところ、両酵素とも大豆分離タンパク質に比べ、菌体より調製した分離タンパク質を良く分解し、特にトリプシンでは約75%の分解率であった。

分離タンパク質の機能特性として、乳化性、乳化安定性、保水性、保油性について調べたところ、乳化安定性、保油性は大豆分離タンパク質に比べ優れており、乳化性についても pH 10 の条件では高い値を示した。

このように分離タンパク質は消化性および機能性に優れていることが明らかになったため、肉製品への利用の可能性を考慮し、次の試験を行った。豚もも肉に菌体および分離タンパク質を添加し、調理後の肉色の変化および物性について検討した。その結果、肉色の明度は両者の添加によりやや低下したが、赤色度は分離タンパク質添加により減少する傾向が見られ、黄色度は両者の添加によりやや増加することが認められた。また、物性については菌体および分離タンパク質を添加することによって硬さは増加したが、凝集性はやや減少した。付着性は添加量により差異が見られたが、一般に増大する傾向が認められた。

以上の結果から、Fusarium 菌体より調製した分離タンパク質は、アミノ酸組成、乳化性、保油性などの機能特性も大豆タンパク質に比べて遜色なく、消化率も高く、飼料および食品素材として使用し得るものと考えられた。

実験に御協力下さった北條晋也君ならびに試料の分与について御高配を賜った三井製糖㈱に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 小原哲二郎編：食品分析ハンドブック（建帛社，東京），P.21, (1973)
- 2) 小原哲二郎編：食品分析ハンドブック（建帛社，東京），P.35, (1973)
- 3) 小原哲二郎編：食品分析ハンドブック（建帛社，東京），P.129, (1973)
- 4) 小原哲二郎編：食品分析ハンドブック（建帛社，東京），P.256, (1973)
- 5) 小原哲二郎編：食品分析ハンドブック（建帛社，東京），P.254, (1973)
- 6) 副島正美，菅原潔著：蛋白質の定量法「生物化学実験法」（東京大学出版会，東京）P.65, (1971)
- 7) YASUMATSU, K : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 719 (1972)
- 8) SOSULSKI, F. W. : *Cereal.Chem.*, **39**, 344, (1962)
- 9) LIN, M.J.Y.; *J. Food. Sci.*, **39**, 368, (1974)
- 10) 山口和夫，山口辰良編著：応用微生物学入門（技報堂，東京），P.98, (1972)
- 11) 山内文男編著：食品タンパク質の科学（食品資材研究会，東京）P.8, (1983)

（平成3年10月7日受理）