

微生物酵素によるプロテアーゼ処理たん白加水分解物の 呈味性改良法の開発

鈴木秀之*・田村友規

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門微生物工学研究室

Improvement of Taste of Protein Hydrolyzate by Protease Using a Microbial Enzyme

Hideyuki SUZUKI* and Tomoki TAMURA

Laboratory of Applied Microbiology, Division of Applied Biology, Graduate School of Science
and Technology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585

ABSTRACT

Commercially available glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* was subjected to Western blot analysis. It reacted with anti-*Escherichia coli* GGT. We therefore invented a method to utilize it as a GGT. Hydrolyzate of soy protein (FUJIPRO F) was made using protease from *B. licheniformis*. The hydrolyzate was γ -glutamylated using glutaminase and L-glutamine. The bitterness of the hydrolyzate of soy protein was dramatically reduced and kokumi was enhanced by γ -glutamylation. The result showed that γ -glutamylation is a powerful method to improve the taste of protein hydrolyzate. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 42-45, 2014.

Key words : kokumi, protein hydrolyzate, umami, glutaminase, γ -glutamyltranspeptidase

大豆たん白質などのたん白加水分解物は、うま味調味料として広く加工食品に用いられている。塩酸加水分解により製造したものは、ほとんどアミノ酸にまで分解されているため、うま味が強く、調味料として優れている。しかし、副生物が混在することが分かり、問題となった。そこで、よりマイルドな方法で加水分解したり、副生物をアルカリ分解するなどの改良がされている。マイルドな加水分解法の一つとしてプロテアーゼ処理が試みられているが、この場合、完全にアミノ酸にまで分解することが難しく、ペプチドが多く

残存する。そのため、うま味が弱いだけでなく、しばしば苦味を伴うという問題がある。最近 γ -グルタミンアミノ酸や γ -グルタミルペプチドの中にごく微量でコク味を生じるものが報告された。^{1~4)} 筆者の研究室では、バクテリア由来の γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) を用いて、グルタミンを γ -グルタミル基供与体、アミノ酸やペプチドを γ -グルタミル基受容体とした γ -グルタミルアミノ酸やペプチドの生産法を開発してきた。⁵⁾ 本研究は、たん白質をプロテアーゼ処理してたん白加水分解物を製造する際に、バクテリア由来のGGTを添加することにより、その呈味性を改善し、うま味調味料としてだけでなく、

*〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

ココ味調味料として優位性を持たせることを目的とした。

材料と方法

大豆たん白質と酵素

大豆たん白質（フジプロF）は不二製油株式会社から、*Bacillus licheniformis*由来のプロテアーゼ（プロチンSD-AY10）と*B. amyloliquefaciens*由来のグルタミナーゼ（ダイワSD-C100S）は天野エンザイム株式会社から提供いただいた。

酵素処理法

たん白質のプロテアーゼ処理法と市販グルタミナーゼによる γ -グルタミル化法をFig. 1に示した。

アミノ酸、ペプチドの分析

陽イオン交換樹脂カラム（島津製作所, Amino Na）を装着したHPLC（島津製作所, model LC-20A）を用いてアミノ酸やペプチドを分離後、ポストカラム法により α -フタルアルデヒドと反応させ、348 nmで励起し、450 nmの蛍光を蛍光光度計（島津製作所, model RF-10AXL）で測定した。⁶⁾

呈味性試験

たん白加水分解物を γ -グルタミル化したサンプルとたん白加水分解物にL-グルタミンを終濃度で5 mMになるように加えただけのサンプルを用いて、苦味とココ味について5点評価法で成人男女11名を対象に試験した。

結果と考察

市販のグルタミナーゼの評価

γ -グルタミル-p-ニトロアニリドを γ -グルタミル基供与体、グリシルグリシンを受容体として酵素活性を測定したところ、66.4 U/mgと高い転移活性を示した。

一方、ネイティブポリアクリルアミド電気泳動後、抗大腸菌GGT抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、市販のグルタミナーゼはこの抗体と反応した。さらに活性染色を行ったところ、それに対応する位置にGGT活性のバンドが見られた（Fig. 2）。

以上のことから、市販のグルタミナーゼ標品はGGTを含んでいると判断した。

大豆たん白加水分解物の γ -グルタミル化

Fig. 1に示した方法で調製した大豆たん白加水分解物のpHを10に調整した後、L-グルタミンを終濃度5 mM、市販のグルタミナーゼを同じく2 μ g/mLとなるように添加し、37°Cで5時間転移反応を行った後、煮沸して反応を停止させた。遠心分離して得られた上清と転移反応前のサンプルをHPLCで分析したところ、Fig. 2に示すように転移反応後、保持時間5～10分の

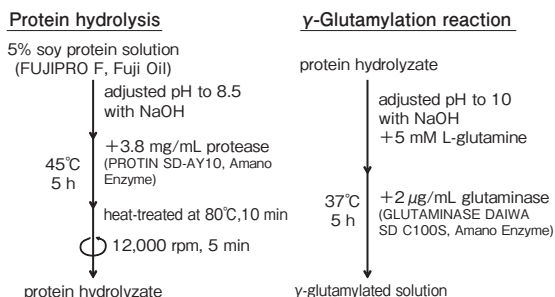


Fig. 1. Amino acids and peptides were measured by HPLC. Before being subjected to HPLC analysis, the samples were mixed with 1/10 volume of 100% TCA to deproteinize.

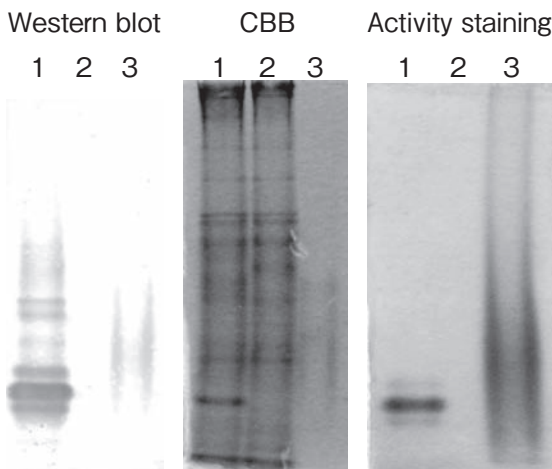


Fig. 2. Analysis of commercially available glutaminase. Cell-free extracts of strain SH642 and SH643, and the commercially available glutaminase were subjected to a native polyacrylamide gel electrophoresis. Then, they were analyzed by Coomassie staining, activity staining by GGT activity, and Western blot analysis using anti-*E. coli* GGT antibody. Lane 1, cell free extracts of strain SH642 (pUC18:*ggt*/ Δ *ggt-2 recA*); lane 2, cell free extracts of strain SH643 (pUC18/ Δ *ggt-2 recA*); lane 3, glutaminase (SD-C100S).

位置に複数の新たなピークが出現した。通常この位置に γ -グルタミル化合物が溶出することから、次にこれらのピークが γ -グルタミル化合物であることを確

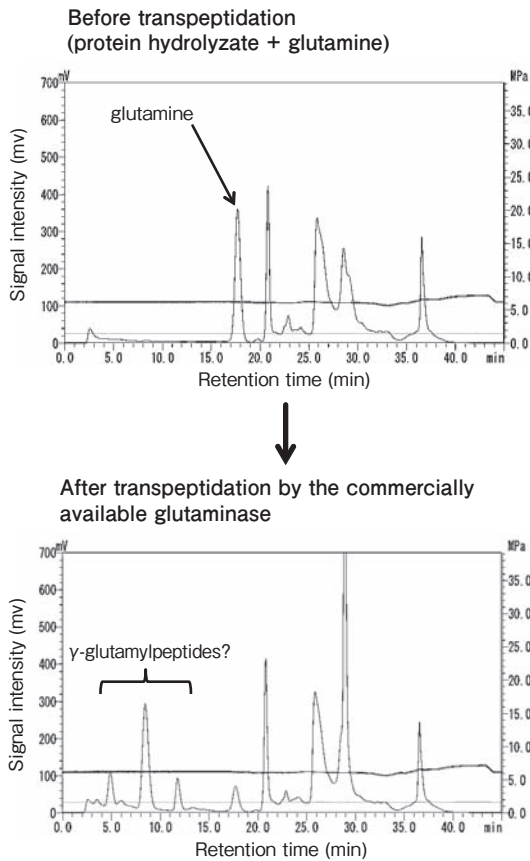


Fig. 3. HPLC analysis of the protein hydrolyzate before and after γ -glutamylation with commercially available glutaminase.

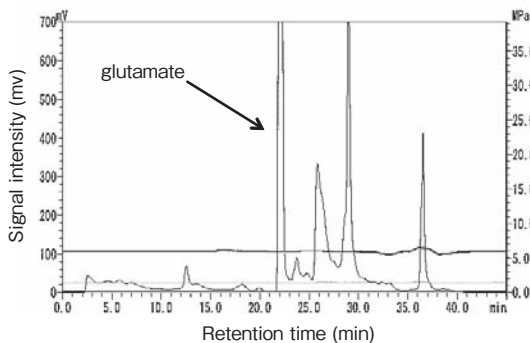


Fig. 4. HPLC analysis of γ -glutamylated protein hydrolyzate after hydrolysis by *E. coli* GGT at pH 5.5.

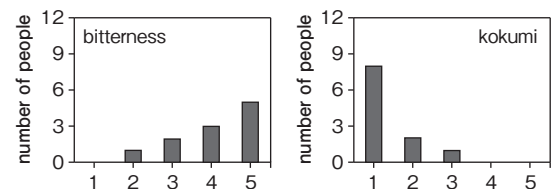
認した。大腸菌のGGTはpH5.5で γ -グルタミル結合の加水分解のみを触媒する。そこで、pHを5.5に調整し、大腸菌のGGTを終濃度1.8 mU/mLとなるよう加え、37°Cで3時間加水分解反応を行った。Fig. 3に示すように、保持時間5～10分の位置にあった複数のピークと残存していたグルタミンのピークが消失し、グルタミン酸の大きなピークが現れたことから、保持時間5～10分のピークは γ -グルタミル化合物であることが確認できた (Fig. 4)。

γ -グルタミル化が呈味性に及ぼす影響

大豆たん白加水分解物とそれを γ -グルタミル化したものの呈味性を比較した。Fig. 5に示すように、*Bacillus licheniformis*由来のプロテアーゼで調製した大豆たん白加水分解物は苦味が強いが、 γ -グルタミル化することにより、苦味が劇的に低減することが明らかとなった。さらに、 γ -グルタミル化により、より強くコク味を感じるようになった。

以上のことから、 γ -グルタミル化により、大豆たん白加水分解物の苦味を低減し、コク味を増すことができること、単にグルタミンを混ぜるだけではこの効果は得られず γ -グルタミル化する必要があることが明らかとなった。

Before γ -glutamylation



After γ -glutamylation

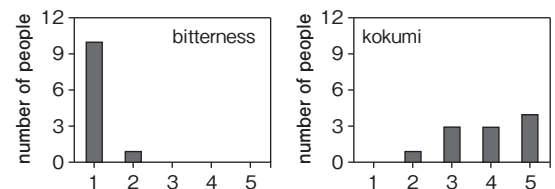


Fig. 5. Results of the taste test. The tastes of soy protein hydrolyzates were compared before and after γ -glutamylation. The pHs of the hydrolyzates were adjusted to 8 before the test. The horizontal axes indicate the intensity of the taste: 1, not perceive; 2, perceived weakly; 3, perceived; 4, perceived a bit strongly; and 5, perceived strongly.

要 約

食品添加物として市販されている*Bacillus amyloliquefaciens*由来のグルタミナーゼをウエスタンプロットに供したところ、抗大腸菌GGT抗体と反応するバンドを検出した。そこで、この酵素をGGTとして利用することを考えた。大豆たん白質（フジプロF）を*B. licheniformis*由来のプロテアーゼで処理してたん白加水分解物を作成したのち、このたん白加水分解物を上記グルタミナーゼで γ -グルタミル化できることを確認した。また、呈味性試験を行ったところ、 γ -グルタミル化により、たん白加水分解物の苦味が激減し、コク味が増強した。

文 献

- 1) Dunkel A, Koster J and Hofmann T (2007): Molecular and sensory characterization of γ -glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *J Agric Food Chem*, **55**, 6712-6719.
- 2) Toelstede S, Dunkel A and Hofmann T (2009): A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese. *J Agric Food Chem*, **57**, 1440-1448.
- 3) Toelstede S and Hofmann T (2009): Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogenesis by *Penicillium roquefortii*. *J Agric Food Chem*, **57**, 3738-3748.
- 4) Ohsu T, Amino Y, Nagasaki H, Yamanaka T, Takeshita S, Hatanaka T, Maruyama Y, Miyamura N and Eto Y (2010): Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception. *J Biol Chem*, **285**, 1016-1022.
- 5) Suzuki H, Yamada C and Kato K (2007): γ -Glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial γ -glutamyltranspeptidase. *Amino Acids*, **32**, 333-340.
- 6) Suzuki H, Izuka S, Minami H, Miyakawa N, Ishihara S and Kumagai H (2003): Use of bacterial γ -glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of γ -D-glutamyl compounds. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 6399-6404.