

原著

エノキタケTR-19によるアルコールの生成
Production of alcohol by *F.velutipes* TR-19

鮫島 由香^{1), 6)}, 竹本 尚未²⁾, 佐々木 裕子³⁾, 小森 有紀⁴⁾
山口 真弥⁵⁾, 松井 徳光^{4), 6)*}

Sameshima yuka^{1), 6)}, Takemoto naomi²⁾, Sasaki hiroko³⁾, Komori yuki⁴⁾
Ymaguchi sinya⁵⁾, Matsui tokumitsu^{4), 6)*}

ランニングタイトル：きのこによるアルコールの生成

Keywords：エノキタケ，アルコール脱水素酵素，ワイン

要旨

酵母の有するエチルアルコール脱水素酵素（ADH）は、エチルアルコール酸化およびアセトアルデヒド還元の間反応に関与し、分子量は150 kDaであることが報告されている。これまでに、担子菌はエチルアルコールを生成することが明らかにされているが、アセトアルデヒド還元反応に関与するADHの存在については報告されていない。本研究では、アセトアルデヒド還元活性を有するADHの存在を明らかにし、ワインの生産を試みた。エノキタケの粗酵素液においてNative-PAGE後のADH活性染色の結果、ポリアクリルアミドゲル上にてアセトアルデヒド還元活性を有するADHおよびエチルアルコール脱水素活性を有するADHの染色バンドが確認された。今回検討した糖濃度、発酵期間において最も高いアルコール生成が認められたのは、糖度15%（w/v）、発酵期間5週間であった。菌糸体重量とアルコール濃度の関係からアルコールの生成には、一定量の菌糸が必要であることが示唆された。

英文要旨

The production of ethyl alcohol by mushrooms has been elucidated. However, the existence of alcohol dehydrogenase (ADH) that produces ethyl alcohol remains unclear. The purpose of this study was to clarify the presence of ADH that produces ethyl alcohol or ADH that decomposes ethyl alcohol in mushrooms. Furthermore, we tried to prepare wine using ADH of mushrooms. As a result of ADH activity staining after native-PAGE in the crude enzyme solution of mushroom, the staining bands of ADH that decomposes ethyl alcohol and ADH that produces ethyl alcohol were confirmed on the polyacrylamide gel. In wine of mushroom, the highest alcohol production was observed with a sugar content of 15% and a fermentation period of 5 weeks under conditions in this study. The relationship between mycelial weight and alcohol concentration suggested that a certain amount of mycelia was required for alcohol production.

1) 羽衣国際大学人間生活学部食物栄養学科
〒592-8344 大阪府堺市西区浜寺南町1-89-1

2) 武庫川女子大学生活環境学研究所食物栄養学専攻
〒663-8558 兵庫県西宮市池開町6-46

3) 甲子園大学栄養学部栄養学科
〒665-0006 兵庫県宝塚市紅葉ガ丘10-1

4) 武庫川女子大学食物栄養科学部食物栄養学科
〒663-8558 兵庫県西宮市池開町6-46

5) 中野市農業協同組合
〒383-0043 長野県中野市大字三ツ和1031-1

6) 武庫川女子大学栄養科学研究所
〒663-8558 兵庫県西宮市池開町6-46

* 責任著者. tokamura@mukogawa-u.ac.jp

緒言

酒税法によるアルコール飲料製造の発酵様式には大きく分けて2種類あり複発酵と単発酵が知られている¹⁾。複発酵とは、発酵の過程で糖化を必要とするものであり、麦芽の有するアミラーゼにより麦芽に含まれるデンプンなどの糖化を行った後、酵母によりアルコール発酵をするビール、コウジカビの有するアミラーゼにより、米のデンプンの糖化を行った後、酵母によるアルコール発酵を行う清酒などがある。一方、単発酵とは発酵の過程で糖化を必要とせず、酵母によるアルコール発酵のみで製造される発酵様式であり、代表的なものにワインがあげられる。ワインは主にブドウを原料とし、酵母の一種である *Saccharomyces cerevisiae* のアルコール発酵により製造されている²⁾。アルコール発酵能を有する酵母は、原料中のブドウに含まれているNAD⁺を補酵素としグルコースやフルクトースからピルビン酸およびアセトアルデヒドを経てアルコール脱水素酵素 (ADH) によりアセトアルデヒドが還元されエチルアルコールを生成することが知られている。酵母の有するADHは、前述のようなアセトアルデヒド還元活性を有するADHとエチルアルコールを脱水素反応により酸化し、アセトアルデヒドを生成するADHの存在が知られており、両者はアイソザイムであることが報告されている³⁾。

一方、これまでに松井らは担子菌の発酵能による発酵食品においてタモギダケ、マツタケ、アガリクス茸などの担子菌においてエチルアルコール脱水素活性を示すADHの存在について明らかにしており、アセトアルデヒド還元活性を有するADHについては詳細に検討していないものの、これらの担子菌を用いたアルコール飲料の生産について報告している⁴⁻⁶⁾。一方、担子菌の中でも食用として広く流通しており、含有成分において血圧降下作用⁷⁾や脂肪吸収抑制作用⁸⁾が明らかにされているエノキタケについて、アセトアルデヒド還元活性を示すADHおよびワイン生産は報告されていない。

そこで本研究では、エノキタケの有するADHの解明を試みると共に、応用としてワインを生産し、アルコール生成の継時的変化について推察した。

方法

1. 供試菌株と培養方法

エノキタケの菌株TR-19は中野市農業協同組合から提供を受けた。供試菌株の前培養にはポテトデキストロース寒天培地（日水製薬株式会社製）を使用した。TR-19の菌糸を平板培地に接種し、25°C、10日間培養した。

300 mL容三角フラスコに、マルトエキス（ナカライテスク社製）4.0 gを入れ、水道水200 mLを加え、オートクレーブ（121°C、20分）滅菌した。平板培地で生育したTR-19の菌糸を5 mm角に切断し、5片ずつ接種後、25°C、2週間回転振とう培養を行った。

培養後、菌糸を取り出し水気を切った後、2 mLのチューブに1.5 g採集し水中にて超音波破碎機を用いて10分間破碎（on time 30秒、off time 30秒）後、遠心分離（15000 rpm、4°C、10分）し、上清液を粗酵素液とした。

2. 電気泳動法およびADH活性染色

ポリアクリルアミド電気泳動（Native-PAGE）および活性染色は中村らの方法に従って実施した⁹⁾。分離ゲルと濃縮ゲルのゲル濃度はそれぞれ7.5%と3.1%とした。1 wellに分子量マーカーおよび粗酵素液を各10 μLアプライした組み合わせを1セットとし、9.0 cm × 6.5 cmの平板ゲル1枚中に3セットアプライし、20 mA、25°Cにて1.5時間泳動した。分子量マーカーには、ワイドビューTMプレステインたん白質サイズマーカーⅢ（富士フィルム和光純薬株式会社製）を用いた。泳動終了後、ゲルを1セットごとの組み合わせになるよう3枚に切り分け、エチルアルコール脱水素活性を示すADHおよびアセトアルデヒド還元活性を有するADHの活性染色、ならびに、コマジープリリアントブルー-R-250（ナカライテスク株式会社製）により染色（CBB染色）を行った。エチルアルコール脱水素活性を示すADHの検出に使用する活性染色液は、20 mMエチルアルコールおよび0.1 mMフェナジンメトサルフェート、2.5 mM ニトロブルーテトラゾリウムおよび0.5 mM β-NAD⁺を含む50 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.5) を用い、アセトアルデヒド還元活性を有するADHの検出に使用する活性染色液は、20 mMアセトアルデヒドおよび0.1 mMフェナジン

メトサルフェート, 2.5 mM ニトロブルーテトラゾリウムおよび0.5 mM NADHを含む50 mM Tris-HCl Buffer (pH 8.5) を用いた. 両ADHの活性染色は遮光下にて30°C, 18時間緩く振とうしながら行い, CBB染色は25°C, 18時間緩く振とうしながら行った.

粗酵素液中のタンパク質量は, 牛血清アルブミンを標準タンパク質としてプロテインアッセイBCAキット (富士フイルム和光純薬株式会社製) を用いて算出した.

3. TR-19ワイン生産の基礎的検討

ワインの生産に使用したブドウ果汁液は赤ブドウ果汁液 (株式会社木村商店, 大阪府) を用いた. 水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 5.6に調整後, 蒸留水で希釈し糖濃度を5, 10, 15% (w/v) とした後, 100 mLを200 mL容三角フラスコに入れ, オートクレーブ (121°C, 20分) 滅菌を行った. 平板培地に生育したTR-19の菌糸を5 mm角に切断したものを, 各フラスコに5片ずつ接種後, 25°C, 7週間回転振とう培養を行った.

4. エチルアルコール濃度の測定

エチルアルコール濃度の測定はHPLCを用いて行った. HPLCは送液ポンプにDP-8020 (東ソー), 検出器にRI-8020 (東ソー) を使用し屈折率の差により検出した. カラムはTSKgel Oapak-A (7.8 mm D. I. × 30.0 cm, 東ソー), 移動相には超蒸留水を用い, 流速は1 mL /分で行った.

試料中のエチルアルコールの濃度 (v/v) は, エチルアルコールの標品を用いて得られたピーク面積とエチルアルコール濃度(v/v)の検量線より求めた.

5. 糖濃度の測定

ブドウ果汁液およびワインの糖濃度 (w/v) は, ポケット糖度計PAL-1 (ATAGO社製) を用いて測定した.

6. 菌糸体重量の測定

発酵開始から7週間経過したフラスコ中のワインをろ過し, 十分に水気が出なくなったことを確認した後, 残った菌糸体の重量を電子天秤を用いて測定した.

7. 統計解析

各糖濃度に調整したブドウ果汁液の発酵により得られた菌糸体重量の平均値の差の検定を一元配置分散分析により行った後, TukeyのHDS法による多重比較検定を行った. 有意水準は5%未満とした ($n = 3$). なお, 統計ソフトはSPSS (Version.26.0.0.1) を用いた.

結果

1. エチルアルコール脱水素活性を示すADHおよびアセトアルデヒド還元活性を示すADHの検出

TR-19粗酵素液のエチルアルコール脱水素活性を有するADHおよびアセトアルデヒド還元活性を示すADHの活性染色ならびにCBB染色の結果を図1に示した. エチルアルコール脱水素活性を有するADHの活性染色 (図1A) では180 kDa付近に青色 (白黒写真のためバンドは灰色) のADHの活性染色バンドおよび135 kDa付近に白色のバンド (白黒写真のためゲルは灰色, バンドは白) も観られた. アセトアルデヒド還元活性を有するADHの活性染色液を用いて活性染色 (図1B) を行ったところ, 青色 (灰色) の活性染色バンドは観察されず, 135 kDa付近に白色のバンドのみが観られた. CBB染色 (図1C) においては, 75, 135, 180 kDa付近にバンドが検出された. なお, それぞれのADHの分子量は, 用いた分子量マーカーに基づき推定した. 1 wellあたりの粗酵素液中のタンパク質量は35.5 μ gであった.

2. アルコール濃度および糖濃度の測定

ブドウ果汁液の糖濃度を5, 10, 15% (w/v) に調整し, それぞれの糖度の果汁液をエノキタケTR-19の菌糸により発酵させワインを生産した. それぞれのワインのアルコール濃度および糖度の経時変化を測定した結果を図2a, b, cに示した.

ブドウ果汁の糖濃度を5% (w/v) に調整しワイン生産を行った条件についてはエチルアルコールの生成が認められなかった. 糖濃度は発酵期間中減少を続け, 7週間経過時点で培養開始時より1.5% (w/v) 減少した (図2a).

ブドウ果汁液の糖濃度を10, 15% (w/v) に調整しワイン生産を行った条件においてはどちらもエチルアルコールの生成が認められた (図2b, c). ブド

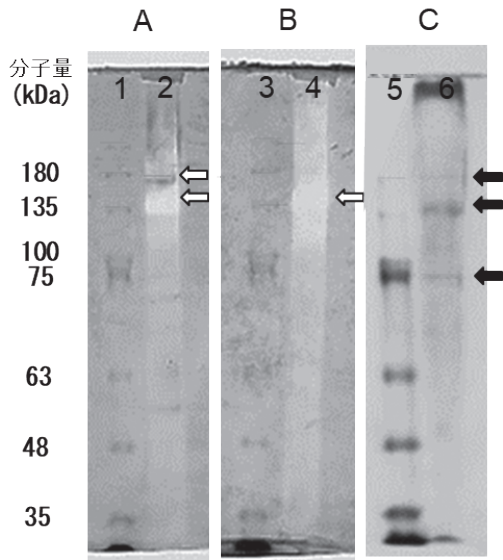


図1 Native-PAGE後のADH活性染色およびCBB染色
Native-PAGE後のゲルを以下の3種類の染色方法により染色を行った。A：エチルアルコール脱水素活性を示すADHの活性染色，B：アセトアルデヒド還元活性を示すADHの活性染色，C：CBB染色。レーン1, 3, 5：分子量マーカー，レーン2, 4, 6：TR-19粗酵素液。白矢印はエチルアルコール脱水素活性を有するADHまたはアセトアルデヒド還元活性を有するADHのバンド，黒矢印はCBB染色によるバンドを示す。なお，粗酵素液中のタンパク質量は35.5 μg / wellであった。

ウ果汁液の糖濃度を10% (w/v) に調整しワイン生産を行った条件についてはブドウ果汁液の糖濃度を5% (w/v) に調整しワイン生産を行った条件と同様に発酵期間中，糖濃度が減少を続け，7週間経過時点で，培養開始時よりも3.8% (w/v) 減少した。発酵開始から7週目において最もエチルアルコールを生成しており，その濃度は $2.3 \pm 0.05\%$ (v/v) であった (図2b)。

ブドウ果汁液の糖濃度を15% (w/v) に調整しワイン生産を行った条件については，糖濃度が発酵開始1週目から2週目にかけて減少，2週目から3週目にかけて増加し，その後，緩やかに減少する傾向がみられた。7週間経過時点で，糖濃度は，培養開始時と比べて2.5% (w/v) 減少した。発酵開始から5週間目において，今回ワイン生産を行った条件の中で最も高いエチルアルコール濃度を示し $5.8 \pm 0.07\%$ (v/v) であった (図2c)。

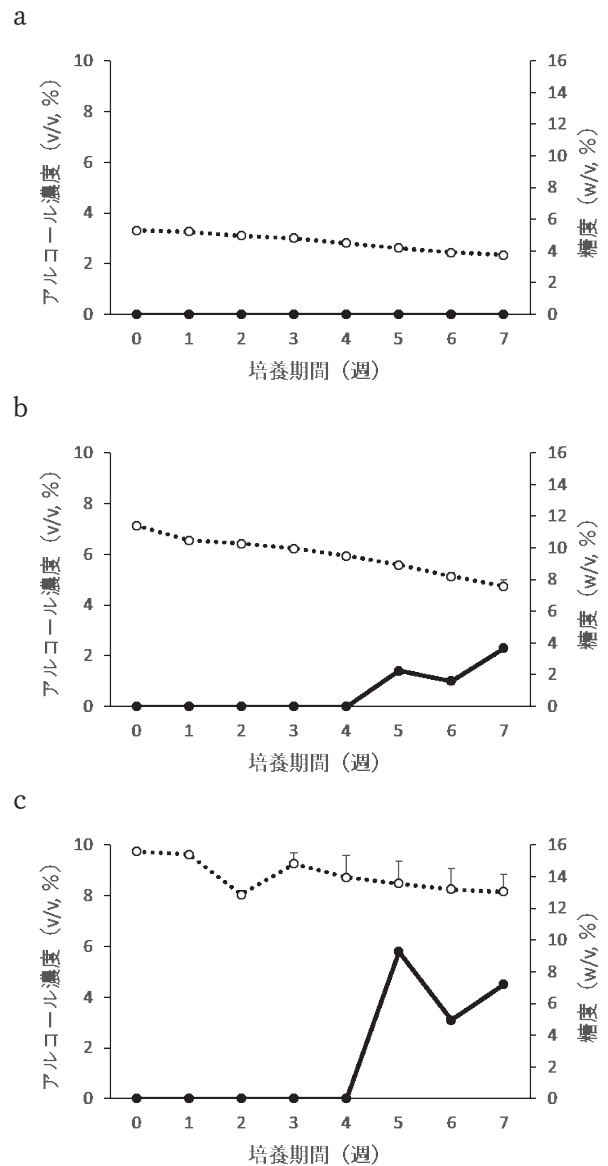


図2 エチルアルコール生産および糖濃度におけるタイムコース

a：糖濃度5% (w/v) ブドウ果汁液，b：糖濃度10% (w/v) ブドウ果汁液，c：糖濃度15% (w/v) ブドウ果汁液。実線はエチルアルコール濃度，点線は糖濃度，エラーバーは平均 \pm 標準偏差 ($n = 3$) を示す。

3. 菌糸体重量

ブドウ果汁液の糖濃度を5, 10, 15% (w/v) に調整しTR-19により7週間発酵させたワイン中の菌糸体の重量を図3に示した。それぞれのワインより得られた菌糸体の重量は 20.7 ± 3.65 g, 37.0 ± 5.70 g, 35.9 ± 4.52 gであり，ブドウ果汁液の糖濃度を5% (w/v) に調整し発酵を行ったワイン中の菌糸体重量と比較して，ブドウ果汁液の糖濃度を10, 15% (w/v) に調整し発酵を行ったワイン中の菌糸体重量が有意に高値を示した。なお，それぞれのp値は0.013, 0.017であった。

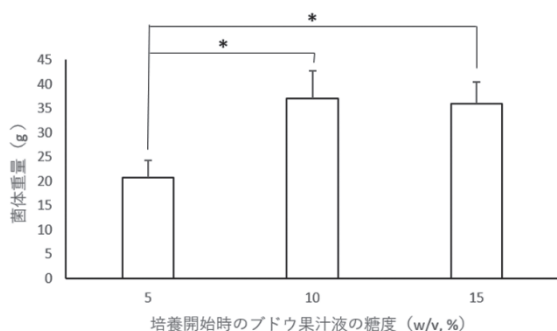


図3 培養後の菌糸体重量

エラーバーは平均±標準偏差 ($n = 3$) を示す。一元配置分散分析の後、TukeyのHSD法により多重比較検定を行った。*は有意水準5%において差があることを表す。

考察

これまでに酵母が有する NAD^+ を補酵素とするADH (EC.1.1.1.1) の反応機構はエチルアルコール + $\beta\text{-NAD}^+ \rightleftharpoons$ アセトアルデヒド + $\text{NADH} + \text{H}^+$ (水素イオン) であるとされており、アセトアルデヒド還元に関与するADHとエチルアルコール酸化に関与するADHはアイソザイムの関係にあり、両者の分子量もほぼ同一であることが報告されている。さらに、エチルアルコール脱水素活性を有するADHについては、PavolらによりNative-PAGE後のADH活性染色が行われ、分子量は150 kDaであることが報告されている¹⁰⁾。

エチルアルコール脱水素活性を有するADHの活性染色¹¹⁾においては、エチルアルコールからアセトアルデヒドを生成する反応に伴い、 $\beta\text{-NAD}^+$ が $\text{NADH} + \text{H}^+$ に変化することで発生する水素イオンをフェナジンメトサルフェートおよびニトロブルーテトラゾリウムテトラゾリウムが連鎖反応的に受け取り、ニトロフェノールブルーテトラゾリウムが還元されることで青色のホルマザンに変化する。したがって、エチルアルコール脱水素活性を有するADHがゲル上に存在すると、一連の反応によりADHの存在部位に青色の活性染色バンドとなって現れる¹²⁾。また、長時間反応させることにより活性染色液中に含まれる反応に使用されなかったエチルアルコールも、ゲル上に存在するADHにより徐々にアセトアルデヒドへと変化し、 NADH および水素イオンを生成する。この水素イオンについてもフェナジンメトサルフェートおよびニトロブルーテトラゾリウムが連鎖反応的に受け取り活性染色液も青く変化するためゲルが薄く青く染色(薄い灰色)される。TR-19において、180 kDa付近に青色(灰色)

の活性染色バンドが検出された(図1A)ため、エチルアルコール脱水素活性を有するADHが存在することが推察された。さらに、酵母のエチルアルコール脱水素活性を有するADHの分子量が150 kDaであることからTR-19のエチルアルコール脱水素活性を有するADHとは分子量が異なる可能性が示唆された。

一方、アセトアルデヒド還元活性を有するADHの活性染色においては、活性染色液中に存在するアセトアルデヒド、 NADH 、水素イオンのうち水素イオンをフェナジンメトサルフェートおよびニトロブルーテトラゾリウムが連鎖反応的に受け取ることによりゲル全体が薄い青色に染色される。この際、アセトアルデヒド還元活性を有するADHが存在する場合、アセトアルデヒドからエチルアルコールへの生成反応に伴い NADH および水素イオンが消費される。その結果、フェナジンメトサルフェートおよびニトロブルーテトラゾリウムへの連鎖的な水素イオンの受け渡しが起こらないためアセトアルデヒド還元活性を有するADHの存在部位は青く染色されず、白色のバンドが形成される¹²⁾。TR-19において、135 kDa付近に白色の活性染色バンドが検出された(図1B)ため、アセトアルデヒド還元活性を有するADHの存在が推察され、酵母のアセトアルデヒド還元活性を有するADHの分子量は150 kDaであることからTR-19のアセトアルデヒド還元活性を有するADHとは分子量が異なる可能性が示唆された。

エチルアルコール脱水素活性を有するADHの検出の際に、青色の活性染色バンドのみならず白色のバンドも確認された(図1A)。この原因として、TR-19には、エチルアルコール脱水素活性を有するADHおよびアセトアルデヒド還元活性を有するADHのそれぞれの活性を示すADHが存在し(図1A, B)、薄く青く染色されたゲル上において、エチルアルコールの脱水素反応が起こる部位では青色の活性染色バンドが現れ、アセトアルデヒドの還元反応が起こる部位では、白色のバンドとして現れたためであると推察された。活性染色を行った1枚のゲル上に両ADHの活性染色バンドが現れたことから(図1A)、TR-19の有するADHは、酵母が持つ両反応に関与するADHとは分子量が異なり、それぞれのADHの分子量も異なることが示唆された。

TR-19を用いてワインの生産を試みた。ブドウ果汁液の糖濃度を5% (w/v) に調整し培養を行ったワインにおいてはエチルアルコールの生成が認められず、培養期間中は糖濃度が減少を続け、開始時と比較して1.5% (w/v) 減少した (図2a)。ブドウ果汁液の糖濃度を10, 15% (w/v) に調整し培養を行ったワインにおいては培養開始から4週間目の時点でエチルアルコールの生成が確認されはじめ、糖濃度は、培養開始時から3週間目にかけて1.0% (w/v) 程度減少し、その後さらに減少がみられた (図2b, c)。

ブドウ果汁液の糖濃度を5% (w/v) に調整し発酵を行ったワインの中の菌糸体重量は 20.7 ± 3.65 gであり、ブドウ果汁液の糖濃度を10, 15% (w/v) に調整し発酵を行った菌糸体重量と比較して有意に低値を示した (図3)。

これらのことから、ブドウ果汁液中の糖濃度を5% (w/v) に調整したワインについてアルコール生成が認められなかった原因として、ブドウ果汁液中の糖はTR-19 菌糸の生育の用途に使用したためではないかと推察された。また、ブドウ果汁液中の糖濃度を10, 15% (w/v) に調整したワインにおいては、発酵開始3週目までは1.0% (w/v) 程度の糖濃度の減少がみられ、発酵開始4週目以降においてアルコールを生成していることから、アルコールの生成のためには、ある程度の菌糸の成長が必要であることが明らかとなった。

アルコールを生成したワインにおいてアルコール濃度の増減が観られた要因として、ADH活性染色の項目でも述べたように、TR-19の菌糸中にはエチルアルコール脱水素活性を有するADHおよびアセトアルデヒド還元活性を有するADH、つまりエチルアルコールを分解するADHおよびエチルアルコールを生成するADHの両方が存在していることによるものであると推察される。2種類のADHの存在により徐々にブドウ果汁液中の糖を消費しながら、エチルアルコールの分解と生成を繰り返したため、見かけ上のエチルアルコール濃度が示されたものであると考えられる。

以上のことから、本論文では、これまでにエノキタケにおいて報告されていなかった2種のADHの存在について示し、ワインの生産が可能であることを明らかにした。今後、ワイン生産における最適条

件やワイン生産時における菌糸体の重量とアルコール生産量の関係についてはさらに検討する必要がある。

参考文献

- 1) 徳岡昌文：成分から見た清酒のオリジナリティーとは. 生物工学会誌100 : 452, 2022
- 2) John Clifton Ayres, Josephine Oriven Mundt and William E. Sandine : Alcoholic yeast fermentations. Microbiology of Foods : 147-179, 1980
- 3) 藤井孝明：アルコールと微生物ならびにその酵素. Jpn. J. Food. Microbiol. 7 : 137-150, 1991
- 4) Tokumitsu Okamura, Tomoko Ogata, Mashiho Toyoda et al. : Production of sake by mushroom fermentation. Mushroom Sci. and Biotech. 8 : 109-114, 2000
- 5) Tokumitsu Okamura, Tomoko Ogata, Norie Minamoto et al. : Characteristics of wine produced by mushroom fermentation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 1596-1600, 2001
- 6) Tokumitsu Okamura-Matsui, Tomomi Tomoda, Shoko Fukuda et al. : Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcohol beverages. J. Mol. Catal. B : Enzymol. 23 : 133-144, 2003
- 7) 西井孝文：ハタケシメジの血圧降下作用をはかる. 森林科学47 : 66, 2006
- 8) 宮澤 紀子, 栗原 昭一, 浜屋 忠生 ほか：肥満モデル動物におけるキノコキトサンの抗肥満効果. 日本きのこ学会誌21, 30-35, 2013
- 9) 日本生化学会編：日本生化学会編基礎生化学実験法3, 東京化学同人, 84-106, 2001
- 10) Pavol Utekal, Csaba Toth, Aniko Illesova, et al. : Expression of soluble *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase in *Escherichia coli* applicable to oxido-reduction bioconversions. Biologia. 69 : 722-726, 2014
- 11) 駒形和男 編：微生物の化学分類実験法. 学会出版センター, p194-196, 1985
- 12) 露木あかね, 飯野久和, 松本孝, *Bifidobacterium bifidum*の乳酸脱水素酵素. 学苑・生活科学紀要, 806 : 50-55, 2007