明　細　書

発明の名称 ：

タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤及びその用途

技術分野

[0001]　本発明はタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を有効成分とする酵素剤（タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤）及びその用途に関する。

背景技術

[0002]　タンパク質脱アミド酵素（例えば、プロテイングルタミナーゼ（ＥＣ番号：３．５．１．４４））は、高分子であるタンパク質に作用して脱アミド化する反応を触媒する酵素である。タンパク質脱アミド酵素は、タンパク質中のグルタミン残基を脱アミド化することで負電荷のカルボキシル基を生じさせるため、タンパク質に対し様々な特性変化をもたらす。例えば、タンパク質の等電点が低下することによる水和力の増加及び静電反撥力の上昇は、タンパク質間の相互作用を低下させ（すなわち会合性を低下させ）るため、タンパク質の可溶性及び水分散性を増大させる。また、タンパク質の高次構造が変化することによる内部疎水性領域の表出は、タンパク質に界面活性を付与するため、タンパク質の乳化力、乳化安定性、起泡性、泡沫安定性を向上させる。タンパク質脱アミド酵素は、このようにタンパク質の特性を大きく変化させることができるため、タンパク質の用途を飛躍的に増大させてきた。このため、タンパク質脱アミド酵素は非常に有用性が高く、当該技術分野で高い関心が寄せられている。

[0003]　一方、トランスグルタミナーゼ（ＥＣ番号：２．３．２．１３）（ＴＧとも称する）は、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基のγ－カルボキシルアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素であり、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基のε－アミノ基が作用すると、タンパク質分子の分子内あるいは分子間においてε－（γ－Ｇｌｎ）－Ｌｙｓ架橋結合を形成させる。

トランスグルタミナーゼの作用を利用すればタンパク質又はペプチドの改質を行うことができるため、肉の結着、ソーセージ、豆腐、パン、麺類の製造に使用されている。また、食品分野に限らず、繊維分野、医療分野、香粧品分野等でのトランスグルタミナーゼの利用も検討されている。

[0004] タンパク質脱アミド酵素とトランスグルタミナーゼはグルタミン残基に作用する点は共通しているが、ＥＣ番号も異なる別の酵素である。トランスグルタミナーゼはアシル受容体が存在しない場合、グルタミン残基の脱アミド反応を触媒するが、タンパク質などアシル受容体存在下では脱アミド反応をほとんど触媒しない。そのため、タンパク質脱アミド反応とトランスグルタミナーゼ反応の両方の反応を触媒したい場合、個別に調製した酵素を併用する必要があった。例えば、特許文献１には、プロテイングルタミナーゼ及びトランスグルタミナーゼをタンパク質に作用させてタンパク質を改質する方法が開示されており、牛乳を用いたヨーグルトの製造、豆乳を用いた豆腐の製造、小麦を用いた麺の製造においてプロテイングルタミナーゼとトランスグルタミナーゼとで処理することで、製造される食品の滑らかさを向上したことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第２００９／１１３６２８号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上述したように、プロテイングルタミナーゼとトランスグルタミナーゼを組み合わせて用いることでタンパク質の改質効果が得られることが期待できるが、利用できる酵素は限られていた。また、従来技術では、タンパク質脱アミド反応とトランスグルタミナーゼ反応の両方を進行させるためには２種類の酵素を併用する必要があり、製造工程が煩雑化するとの問題があった。そこで、本発明が解決しようとする課題は、タンパク質脱アミド活性とトラ

ンスグルタミナーゼ活性の両方を有する酵素を有効成分とする新規な酵素剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、今回新たにＬｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来のポリペプチドがタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性の両方を有することを見出した。本発明は、上記の知見に基づいて完成したものである。

[0008] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

＜１＞ 配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

＜２＞ 酵素がLongimycelium属由来である、＜１＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

＜３＞ ＜１＞又は＜２＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド及び架橋方法。

＜４＞ ＜１＞又は＜２＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド及び架橋方法。

＜５＞＜１＞又は＜２＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

＜６＞ ＜１＞又は＜２＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤で処理された飲食品。

＜７＞ Longimycelium属細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法。

＜８＞　配列番号６のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

＜９＞　酵素がCrossiella属由来である、＜８＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

＜１０＞　＜８＞又は＜９＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド及び架橋方法。

＜１１＞　＜８＞又は＜９＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド及び架橋方法。

＜１２＞　＜８＞又は＜９＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

＜１３＞　＜８＞又は＜９＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤で処理された飲食品。

＜１４＞　Crossiella属細菌を培養する工程を含む、配列番号６のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法。

＜１５＞　配列番号１０のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

＜１６＞　酵素がKrasilnikovia属由来である、＜１５＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

＜１７＞　＜１５＞又は＜１６＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパ

ク質又はペプチドの脱アミド及び架橋方法。

＜１８＞　＜１５＞又は＜１６＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド及び架橋方法。

＜１９＞　＜１５＞又は＜１６＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

＜２０＞　＜１５＞又は＜１６＞に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤で処理された飲食品。

＜２１＞　Krasilnikovia属細菌を培養する工程を含む、配列番号１０のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法。

[0009] ＜Ａ＞　タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋のための、酵素剤の使用であって、酵素剤は配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を有効成分として含む、酵素剤の使用。

発明の効果

[0010]　本発明によるタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を含むタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤は、食品や医療用途の分野での使用に適している。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、実施例及び比較例における酵素処理カゼインタンパク質の粘着性評価の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] １．タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤

本発明の第１の実施形態のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤は、配列番号１のアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と等価なアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する

酵素（以下、「タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素」もしくは「本酵素」とも言う）を有効成分として含む。

[0013] 本発明の第２の実施形態のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤は、配列番号６のアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と等価なアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素（以下、「タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素」もしくは「本酵素」とも言う）を有効成分として含む。

[0014] 本発明の第３の実施形態のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤は、配列番号１０のアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と等価なアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素（以下、「タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素」もしくは「本酵素」とも言う）を有効成分として含む。

[0015] なお、本発明は、配列番号１４のアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と等価なアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素（以下、「タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素」もしくは「本酵素」とも言う）を有効成分として含むタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤に関するものであってもよい（第４の実施形態）。

[0016] 本発明のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素は、タンパク質のアミド基含有側鎖を分解又は架橋する作用を示す酵素である。本発明のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素は、具体的にはタンパク質中のグルタミン残基を脱アミド化し、グルタミン酸に変換する活性（プロテイングルタミナーゼ活性）を有し、かつタンパク質中のグルタミン残基のγ－カルボキシルアミド基のアシル転移反応を触媒する。これによりタンパク質の改質を効果的に行うことができる。

[0017] 「等価なアミノ酸配列」とは、基準のアミノ酸配列（配列番号１、６、１０又は１４のアミノ酸配列）と一部で相違するが、当該相違がタンパク質の機能（ここではタンパク質脱アミド活性及びトランスグルタミナーゼ活性）

に実質的な影響を与えていないアミノ酸配列のことをいう。従って、等価なアミノ酸配列を有する酵素は、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素による酵素反応を触媒する。活性の程度は、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素としての機能を発揮できる限り特に限定されない。但し、基準となるアミノ酸配列からなる酵素（配列番号１、６、１０又は１４のアミノ酸配列を有する）と同程度又はそれよりも高いことが好ましい。

[0018] 第１の実施形態において、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素は、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ属由来であることが好ましく、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来であることがより好ましい。配列番号１のアミノ酸配列は、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素のアミノ酸配列（成熟体）である。尚、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の全長アミノ酸配列を配列番号２に示す。

[0019] 第２の実施形態において、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素は、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ属由来であることが好ましく、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来であることがより好ましい。配列番号６のアミノ酸配列は、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素のアミノ酸配列（成熟体）である。尚、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の全長アミノ酸配列を配列番号７に示す。

[0020] 第３の実施形態において、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素はＫｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ属由来であることが好ましく、Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来であることがより好ましい。配列番号１０のアミノ酸配列は、Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素のアミノ酸配列（成熟体）である。尚、Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ

由来のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の全長アミノ酸配列を配列番号１１に示す。

[0021] 第４の実施形態において、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素はＬｏｎｇｉｓｐｏｒａ属由来であることが好ましく、Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来であることがより好ましい。配列番号１４のアミノ酸配列は、Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素のアミノ酸配列（成熟体）である。尚、Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の全長アミノ酸配列を配列番号１５に示す。

[0022] 「アミノ酸配列の一部の相違」は、例えば、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の中の１又は複数のアミノ酸の欠失、置換、アミノ酸配列に対して１又は複数のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの任意の組合せによって生じる。アミノ酸配列の一部の相違はタンパク質脱アミド活性及びトランスグルタミナーゼ活性が保持される限り許容される（活性の多少の変動があってもよい）。この条件を満たす限り、アミノ酸配列の相違する位置は特に限定されない。また、アミノ酸配列の相違が複数の箇所（場所）で生じていてもよい。

[0023] アミノ酸配列の一部の相違をもたらすアミノ酸の数は、アミノ酸配列を構成する全アミノ酸の例えば、約５０％未満、約４０％未満、約３０％未満、約２０％未満、又は約１０％未満に相当する数であり、好ましくは約８％未満に相当する数であり、より好ましくは約６％に相当する数であり、さらに好ましくは約４％未満に相当する数であり、一層好ましくは約２％未満に相当する数であり、最も好ましくは約１％未満に相当する数である。従って、等価タンパク質は、基準のアミノ酸配列と例えば、約５０％以上、約５５％以上、約６０％以上、約６５％以上、約７０％以上、約７５％以上、約８０％以上、約８１％以上、約８２％以上、約８３％以上、約８４％以上、約８５％以上、約８６％以上、約８７％以上、約８８％以上、約８９％以上、約９０％以上、約９１％以上、約９２％以上、好ましくは約９３％以上、より

好ましくは約９４％以上、さらに好ましくは約９５％以上、一層好ましくは約９６％以上、より一層好ましくは約９７％以上、さらに一層好ましくは約９８％以上、最も好ましくは約９９％以上の同一性を有する。

[0024] 「アミノ酸配列の一部の相違」の典型例の一つは、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の中の１～４０個（好ましくは１～３０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～７個、一層好ましくは１～５個、より一層好ましくは１～３個）のアミノ酸の欠失、置換、アミノ酸配列に対して１～４０個（好ましくは１～３０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～７個、一層好ましくは１～５個、より一層好ましくは１～３個）のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変異（変化）が生じていることである。

[0025] 好ましくは、タンパク質脱アミド活性及びトランスグルタミナーゼ活性に必須でないアミノ酸残基において保存的アミノ酸置換が生じることによって等価なアミノ酸配列が得られる。ここでの「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基はその側鎖によって塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

[0026] 二つのアミノ酸配列の同一性（％）は例えば以下の手順で決定することができる。まず、最適な比較ができるよう二つの配列を並べる（例えば、第一の配列にギャップを導入して第二の配列とのアライメントを最適化してもよ

い）。第一の配列の特定位置の分子（アミノ酸残基）が、第二の配列における対応する位置の分子と同じであるとき、その位置の分子が同一であるといえる。二つの配列の同一性は、その二つの配列に共通する同一位置の数の関数であり（すなわち、同一性（％）＝同一位置の数／位置の総数 ×100）、好ましくは、アライメントの最適化に要したギャップの数およびサイズも考慮に入れる。

[0027] 二つの配列の比較及び同一性の決定は数学的アルゴリズムを用いて実現可能である。配列の比較に利用可能な数学的アルゴリズムの具体例としては、KarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68に記載され、KarlinおよびAltschul (1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77において改変されたアルゴリズムがあるが、これに限定されることはない。アミノ酸配列の同一性は例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のblastp(protein-protein BLAST)により得ることが出来る。パラメータはデフォルトのパラメータを用いれば良いが、例えばBLOSUM62マトリックスを使用してGap CostsをExistence:11、Extension:1に設定すればよい。

[0028] 本発明の酵素剤の有効成分であるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素は、より大きいタンパク質（例えば融合タンパク質）の一部であってもよい。融合タンパク質において付加される配列としては、例えば、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、組み換え生産の際の安定性を確保する付加配列等が挙げられる。

[0029] 第１の実施形態におけるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素は、当該タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素を産生する微生物（本酵素産生株）、例えば、ロンギマイセリウム（Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ）属細菌、一例としては、ロンギマイセリウム・ツルファネンス（Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ）を培養することにより得ることができる。すなわち、本発明は、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ属細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有

するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法に関するものであってもよい。本酵素産生株は野生株であっても変異株（例えば紫外線照射によって変異株が得られる）であってもよい。本酵素産生株の具体例は、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ（ＮＢＲＣ１０７７２６）である。Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ（ＮＢＲＣ１０７７２６）は、ＮＢＲＣ（独立行政法人製品評価技術基盤機構　バイオテクノロジーセンター）に保管された菌株であり、所定の手続を経ることによってその分譲を受けることができる。

[0030] 第２の実施形態におけるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素は、当該タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素を産生する微生物（本酵素産生株）、例えば、クロシエラ（Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ）属細菌、一例としては、クロシエラ・クリオフィラ（Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ　ｃｒｙｏｐｈｉｌａ）を培養することにより得ることができる。すなわち、本発明は、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ属細菌を培養する工程を含む、配列番号６のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法に関するものであってもよい。本酵素産生株は野生株であっても変異株（例えば紫外線照射によって変異株が得られる）であってもよい。

[0031] 第３の実施形態におけるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素は、当該タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素を産生する微生物（本酵素産生株）、例えば、クラシルニコビア（Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ）属細菌、一例としては、クラシルニコビア・シナモメア（Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ　ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ）を培養することにより得ることができる。すなわち、本発明は、Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ属細菌を培養する工程を含む、配列番号１０のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法に関するものであってもよい。本酵素産生株は野生株であっても変異株（例えば紫外線照射によって変異株が得られる）であってもよい。

[0032] 第４の実施形態におけるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素は、当該タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素を産生する微生物（本酵素産生株）、例えば、ロンギスポラ（Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ）属細菌、一例としては、ロンギスポラ・フルバ（Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ）を培養することにより得ることができる。すなわち、本発明は、Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ属細菌を培養する工程を含む、配列番号１４のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法に関するものであってもよい。本酵素産生株は野生株であっても変異株（例えば紫外線照射によって変異株が得られる）であってもよい。

[0033] 本酵素は、本酵素を産生する微生物の培養液及び／又は菌体より調製することができる。培養条件や培養法は、本酵素が生産されるものである限り特に限定されない。即ち、本酵素が生産されることを条件として、使用する微生物の培養に適合した方法や培養条件を適宜設定できる。培養法としては液体培養、固体培養のいずれでも良いが、好ましくは液体培養が利用される。液体培養を例にとり、その培養条件を説明する。

[0034] 培地としては、使用する微生物が生育可能な培地であれば、特に限定されない。例えば、グルコース、シュクロース、ゲンチオビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、さらに硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、あるいは、ゼラチン、ペプトン、酵母エキス、コーンスティープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、さらにカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものを用いることができる。使用する微生物の生育を促進するためにビタミン、アミノ酸などを培地に添加してもよい。培地のｐＨは例えば約３～８、好ましくは約４～７程度に調整し、培養温度は通常約２０～４０℃、好ましくは約２５～３５℃程度で、１～２０日間、好ましくは３～１０日間程度好気的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジ

ャーファーメンターによる好気的深部培養法が利用できる。

[0035] 以上の条件で培養した後、培養液又は菌体より目的の酵素を回収する。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理等することによって不溶物を除去した後、限外ろ過膜による濃縮、硫安沈殿等の塩析、透析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーなどを適宜組み合わせて分離、精製を行うことにより本酵素を得ることができる。他方、菌体内から回収する場合には、例えば菌体を加圧処理、超音波処理などによって破砕した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより本酵素を得ることができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程（菌体の破砕、分離、精製）を行ってもよい。

[0036] 本酵素は、遺伝子工学的手法によっても容易に調製することができる。例えば、本酵素をコードするＤＮＡで適当な宿主細胞（例えば大腸菌）を形質転換し、形質転換体内で発現されたタンパク質を回収することにより調製することができる。回収されたタンパク質は目的に応じて適宜精製される。このように組換えタンパク質として目的の酵素を得ることにすれば種々の修飾が可能である。例えば、本酵素をコードするＤＮＡと他の適当なＤＮＡとを同じベクターに挿入し、当該ベクターを用いて組換えタンパク質の生産を行えば、任意のペプチドないしタンパク質が連結された組換えタンパク質からなる本酵素を得ることができる。また、糖鎖及び／又は脂質の付加や、あるいはＮ末端若しくはＣ末端のプロセッシングが生ずるような修飾を施してもよい。以上のような修飾により、組換えタンパク質の抽出、精製の簡便化、又は生物学的機能の付加等が可能である。

[0037] 通常は、以上のように適当な宿主－ベクター系を利用して遺伝子の発現～発現産物（本酵素）の回収を行うが、無細胞合成系を利用することにしてもよい。ここで、「無細胞合成系（無細胞転写系、無細胞転写／翻訳系）」とは、生細胞を用いるのではく、生細胞由来の（或いは遺伝子工学的手法で得られた）リボソームや転写・翻訳因子などを用いて、鋳型である核酸（DNAやmRNA）からそれがコードするmRNAやタンパク質をin vitroで合成することを

いう。無細胞合成系では一般に、細胞破砕液を必要に応じて精製して得られる細胞抽出液が使用される。細胞抽出液には一般に、タンパク質合成に必要なリボソーム、開始因子などの各種因子、tRNAなどの各種酵素が含まれる。タンパク質の合成を行う際には、この細胞抽出液に各種アミノ酸、ATP、GTPなどのエネルギー源、クレアチンリン酸など、タンパク質の合成に必要なその他の物質を添加する。勿論、タンパク質合成の際に、別途用意したリボソームや各種因子、及び／又は各種酵素などを必要に応じて補充してもよい。

[0038] タンパク質合成に必要な各分子（因子）を再構成した転写／翻訳系の開発も報告されている（Shimizu, Y. et al.: Nature Biotech., 19, 751-755, 2001）。この合成系では、バクテリアのタンパク質合成系を構成する３種類の開始因子、３種類の伸長因子、終結に関与する４種類の因子、各アミノ酸をtRNAに結合させる２０種類のアミノアシルtRNA合成酵素、及びメチオニルtRNAホルミル転移酵素からなる３１種類の因子の遺伝子を大腸菌ゲノムから増幅し、これらを用いてタンパク質合成系をin vitroで再構成している。本発明ではこのような再構成した合成系を利用してもよい。

[0039] 用語「無細胞転写／翻訳系」は、無細胞タンパク質合成系、in vitro翻訳系又はin vitro転写／翻訳系と交換可能に使用される。in vitro翻訳系ではRNAが鋳型として用いられてタンパク質が合成される。鋳型RNAとしては全RNA、mRNA、in vitro転写産物などが使用される。他方のin vitro転写／翻訳系ではDNAが鋳型として用いられる。鋳型DNAはリボソーム結合領域を含むべきであって、また適切なターミネータ配列を含むことが好ましい。尚、in vitro転写／翻訳系では、転写反応及び翻訳反応が連続して進行するように各反応に必要な因子が添加された条件が設定される。

[0040] 上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥や真空乾燥或いはスプレードライなどにより粉末化して提供することも可能である。その際、精製酵素を予め酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液、トリス塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解させておいてもよい。好ましくは、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液を使用することが

できる。尚、ここでGOODの緩衝液としてはPIPES、MES又はMOPSが挙げられる。

[0041] 酵素の精製度は特に限定されない。また、最終的な形態は液体状であっても固体状（粉体状を含む）であってもよい。

[0042] 本酵素はタンパク質中のグルタミン残基のγ－アミド基を脱アミドする反応と、タンパク質中のグルタミン残基のγ－アミド基とリジン残基のε－アミノ基との間のアシル転移反応の両方を触媒する酵素である。本発明の酵素剤における有効成分（本酵素）の含有量は特に限定されないが、例えば、本酵素剤１ｇ当たりのタンパク質脱アミド活性が０．０１Ｕ～５０００Ｕ、好ましくは０．１Ｕ～２０００Ｕ、より好ましくは１Ｕ～１０００Ｕになるように有効成分の含有量を設定ないし調整することができる。また、本酵素剤1g当たりのトランスグルタミナーゼ活性が０．０１Ｕ～５０００Ｕ、好ましくは０．１Ｕ～２０００Ｕ、より好ましくは１Ｕ～１０００Ｕになるように有効成分の含有量を設定ないし調整することができる。

[0043] トランスグルタミナーゼ活性の測定方法としては、以下の方法を採用できる。酵素を０．４％システインを含む２００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ６．０に溶解して３０℃１時間処理後、２００ｍＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ６．０で適当な濃度に希釈する（サンプル溶液）。サンプル溶液１０μＬに後述する方法で得られた基質溶液（Ｒ－１） １００μＬを添加し混合した後、３７℃で１０分間反応させる。後述する方法で得られた発色溶液（Ｒ－２） １００μＬを加えて反応を停止させるとともにＦｅ錯体を形成させた後、５２５ｎｍの吸光度を測定する。対照として、予め熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、サンプル溶液との吸光度差を求める。別途、酵素液の代わりにＬ－グルタミン酸－γ－モノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、前記吸光度差より生成されたヒドロキサム酸の量を求める。１分間に１μモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を１単位（１Ｕ）とする。

[0044] （基質溶液（Ｒ－１））

２－アミノ－２－ヒドロキシメチル－１．３－プロパンジオール２．４２ｇ、塩酸ヒドロキシアンモニウム０．７０ｇ、還元型グルタチオン０．３１ｇ、Ｚ－ＧＩｎ－ＧＩｙ（ベンジルオキシカルボニル－Ｌ－グルタミニルグリシン）１．０１ｇを蒸留水に溶解し総量１００ｍＬとする（ｐＨ ６．０）。

[0045]（基質溶液（Ｒ－２））

３Ｍ 塩酸溶液３０ｍＬ、１２％トリクロロ酢酸溶液３０ｍＬ、５％ 塩化鉄(III)溶液３０ｍＬを混合する。

[0046] タンパク質脱アミド活性の測定方法としては、合成基質を用いた以下の方法を採用できる。３０ｍＭ Ｚ－ＧＩｎ－ＧＩｙを含む０．２Ｍリン酸バッファー（ｐＨ６．５）１ｍＬにタンパク質脱アミド酵素を含む試料溶液０．１ｍＬを添加して、３７℃、１０分間放置した後、０．４Ｍ ＴＣＡ（トリクロロ酢酸）溶液を１ｍＬ加えて反応を停止する。ブランクとして、３０ｍＭ Ｚ－ＧＩｎ－ＧＩｙを含む０．２Ｍリン酸バッファー（ｐＨ６．５）１ｍＬに０．４Ｍ ＴＣＡ溶液を１ｍＬ加え、さらにタンパク質脱アミド酵素を含む試料溶液０．１ｍＬを添加して、３７℃で１０分間放置する。

[0047] 上記で得られた溶液についてアンモニアテストワコー（富士フイルム和光純薬）を用い、反応液中に生じたアンモニア量の測定を行う。アンモニア標準液（塩化アンモニウム）を用いて作成したアンモニア濃度と吸光度（６３０ｎｍ）との関係を表す検量線より、反応液中のアンモニア濃度を求める。

[0048] タンパク質脱アミド酵素の活性を、１分間に１μｍｏｌのアンモニアを生成する酵素量を１単位（１Ｕ）とし、以下の式から算出する。式中、反応液量は２．１、酵素溶液量は０．１、Ｄｆは酵素溶液の希釈倍率である。また、１７．０３はアンモニアの分子量である。

[0049] [数1]

タンパク質脱アミド酵素活性(U/mL)
＝反応液中のアンモニア濃度(mg/L)×(1/17.03)×(反応液量／酵素溶液量)×(1/10)×Df

[0050] 一方、タンパク質基質に対するタンパク質脱アミド活性を測定し、タンパ

ク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性の比率を算出する際には、インスリンＢ鎖を基質として用いた場合の脱アミド化インスリンＢ鎖生産量とインスリンＢ鎖減少量の比率から算出することができる。測定条件、測定手順などの詳細は後述の実施例に示す。

[0051] 本発明の酵素剤におけるタンパク質脱アミド活性は特に限定されないが、例えば、インスリンＢ鎖を用いた評価方法における脱アミド率の下限値は４％以上、５％以上、７％以上、好ましくは１０％以上、より好ましくは１５％以上であり、脱アミド率の上限値は９９％以下、９０％以下、８０％以下、７０％以下、６０％以下、５０％以下、４０％以下、好ましくは３０％以下、より好ましくは２０％以下である。

[0052] 本発明の酵素剤におけるトランスグルタミナーゼ活性は特に限定されないが、例えば、インスリンＢ鎖を用いた評価方法における架橋率の下限値は１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは６０％以上であり、架橋率の上限値は９５％以下、９２％以下、９０％以下、好ましくは８８％以下、より好ましくは８５％以下である。

[0053] 本酵素剤におけるタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性の比率は特に限定されないが、例えば、インスリンＢ鎖を用いた評価方法における「タンパク質脱アミド活性／トランスグルタミナーゼ活性」が０．０４以上、０．０５以上、０．０６以上、０．０７以上、０．０８以上、０．０９以上、０．１０以上、０．１１以上、０．１２以上、０．１３以上、０．１４以上、０．１５以上、０．１６以上、０．１７以上、０．１８以上、０．１９以上、０．２０以上が挙げられる。

[0054] また、本発明の酵素剤におけるタンパク質脱アミド活性及びトランスグルタミナーゼ活性は、上述したように、合成基質との反応を行った後に反応停止液についてＨＰＬＣを用いて分析を行い、ピークの遷移を検出することによって評価することもできる、測定条件、測定手順などの詳細は後述の実施例に示す。

[0055] 本発明の酵素剤は、有効成分（本発明のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素）の他、賦形剤、緩衝剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水、各種タンパク質、各種タンパク質の分解物、各種エキス類、各種塩類、各種酸化防止剤、システイン、グルタチオン、グルタミン酸ナトリウム、イノシン酸ナトリウム、グアニル酸ナトリウム、貝殻焼成カルシウム、二酸化ケイ素などを含有していてもよい。賦形剤としてはデンプン、デキストリン、マルトース、トレハロース、乳糖、D-グルコース、ソルビトール、D-マンニトール、白糖、グリセロール等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としてはエタノール、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。タンパク質の例は、大豆タンパク質、小麦タンパク質、トウモロコシタンパク質、乳タンパク質、動物由来タンパク質などである。エキス類の例は肉エキス、植物エキス、酵母エキスなどである。塩類の例は、塩化塩、リン酸塩、ポリリン酸塩、ピロリン酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、炭酸塩などである。酸化防止剤の例は、L-アスコルビン酸塩、亜硫酸水素ナトリウムなどである。本発明の酵素剤の形状は特に限定されず、例えば粉末状、顆粒状、液体状、カプセル状等である。

[0056] ２．遺伝子

第１の実施形態では、本酵素をコードする遺伝子は、配列番号１のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするＤＮＡからなる。当該態様の具体例は、配列番号３に示す塩基配列からなるＤＮＡ、及び配列番号４に示す塩基配列からなるＤＮＡである。配列番号３のＤＮＡは、成熟体のアミノ酸配列（配列番号１）のみをコードするものであり、配列番号４のＤＮＡは、成熟体（配列番号１のアミノ酸配列）に加え、シグナルペプチドとプロ配列をコードしている。

[0057] 第２の実施形態では、本酵素をコードする遺伝子は、配列番号６のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするＤＮＡからなる。当該態様の具体例は、配列番号８に示す塩基配列からなるＤＮＡ、及び配列番号９に示す塩基配列からなるＤＮＡである。配列番号８のＤＮＡは、成熟体のアミノ酸配列（配列番号６）のみをコードするものであり、配列番号９のＤＮＡは、成熟体（配列番号６のアミノ酸配列）に加え、シグナルペプチドとプロ配列をコードしている。

[0058] 第３の実施形態では、本酵素をコードする遺伝子は、配列番号１０のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするＤＮＡからなる。当該態様の具体例は、配列番号１２に示す塩基配列からなるＤＮＡ、及び配列番号１３に示す塩基配列からなるＤＮＡである。配列番号１２のＤＮＡは、成熟体のアミノ酸配列（配列番号１０）のみをコードするものであり、配列番号１３のＤＮＡは、成熟体（配列番号１０のアミノ酸配列）に加え、シグナルペプチドとプロ配列をコードしている。

[0059] 第４の実施形態では、本酵素をコードする遺伝子は、配列番号１４のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするＤＮＡからなる。当該態様の具体例は、配列番号１６に示す塩基配列からなるＤＮＡ、及び配列番号１７に示す塩基配列からなるＤＮＡである。配列番号１６のＤＮＡは、成熟体のアミノ酸配列（配列番号１４）のみをコードするものであり、配列番号１７のＤＮＡは、成熟体（配列番号１４のアミノ酸配列）に加え、シグナルペプチドとプロ配列をコードしている。

[0060] 本酵素をコードする遺伝子は典型的には本酵素の調製に利用される。本酵素をコードする遺伝子を用いた遺伝子工学的調製法によれば、より均質な状態の本酵素を得ることが可能である。また、当該方法は大量の本酵素を調製する場合にも好適な方法といえる。尚、本酵素をコードする遺伝子の用途は本酵素の調製に限られない。例えば、本酵素の作用機構の解明などを目的とした実験用のツールとして、或いは本酵素の変異体（改変体）をデザイン又は作製するためのツールとして、当該核酸を利用することもできる。

[0061] 本明細書において「本酵素をコードする遺伝子」とは、それを発現させた場合に本酵素が得られる核酸のことをいい、本酵素のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する核酸は勿論のこと、そのような核酸にアミノ酸配列をコードしない配列が付加されてなる核酸をも含む。また、コドンの縮重も考慮される。

[0062] 核酸は、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法、化学合成、PCR法（例えばオーバーラップPCR）或いはこれらの組合せによって、単離された状態に調製することができる。

[0063] 本酵素をコードする遺伝子の塩基配列と比較した場合にそれがコードするタンパク質の機能は同等であるものの一部において塩基配列が相違する核酸（以下、「等価核酸」ともいう。また、等価核酸を規定する塩基配列を「等価塩基配列」ともいう）を使用してもよい。等価核酸の例として、本酵素をコードする核酸の塩基配列を基準として１若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、本酵素に特徴的な酵素活性（即ち、タンパク質脱アミド活性及びトランスグルタミナーゼ活性）を有するタンパク質をコードするＤＮＡを挙げることができる。塩基の置換や欠失などは複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは、当該核酸がコードするタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置や種類によっても異なるが例えば２～４０塩基、好ましくは２～２０塩基、より好ましくは２～１０塩基である。等価核酸は、基準となる塩基配列（配列番号３、４、８、９、１２、１３、１６又は１７）に対して、例えば５０％以上、６０％以上、６５％以上、７０％以上、８０％以上、８１％以上、８２％以上、８３％以上、８４％以上、８５％以上、８６％以上、８７％以上、８８％以上、８９％以上、９０％以上であり、９１％以上、９２％以上、好ましくは９３％以上、より好ましくは９４％以上、さらに好ましくは９５％以上、一層好ましくは９６％以上、より一層好ましくは９７％以上、さらに一層好ましくは約９８％以上、最も好ましくは９９％以上の配列同一性を有する。

[0064] 以上のような等価核酸は例えば、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼやDNAリガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13,Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）やランダム突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13 ,Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）による変異の導入などによって得られる。また、紫外線照射など他の方法によっても等価核酸を得ることができる。

[0065] 本酵素をコードする遺伝子の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸を使用してもよい。本酵素をコードする遺伝子の塩基配列、或いはそれに相補的な塩基配列に対して少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％同一な塩基配列を有する核酸を使用してもよい。

[0066] 本酵素をコードする遺伝子の塩基配列又はその等価塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する核酸を使用してもよい。「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。このようなストリンジェントな条件は当業者に公知であって例えばMolecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)やCurrent protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) を参照して設定することができる。ストリンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液（50%ホルムアミド、10×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、5×Denhardt溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10μg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5)）を用いて約50℃でインキュベーションし、その後0.1×SSC、0.1%SDSを用いて約65℃で洗浄する条件を挙げることができる。さらに好ましいストリンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液として50%ホルムアミド、5×SSC(0.15M NaCl,15mM sodium citrate,

pH 7.0)、1×Denhardt溶液、1%SDS、10%デキストラン硫酸、10μg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5)）を用いる条件を挙げることができる。

[0067] 本酵素をコードする遺伝子を含む組換えDNAを使用してもよい。組換えDNAは例えばベクターの形態で提供される。本明細書において用語「ベクター」は、それに挿入された核酸を細胞等のターゲット内へと輸送することができる核酸性分子をいう。

[0068] 使用目的（クローニング、タンパク質の発現）に応じて、また宿主細胞の種類を考慮して適当なベクターが選択される。大腸菌を宿主とするベクターとしてはM13ファージ又はその改変体、λファージ又はその改変体、pBR322又はその改変体（pB325、pAT153、pUC8など）等、酵母を宿主とするベクターとしてはpYepSec1、pMFa、pYES2等、昆虫細胞を宿主とするベクターとしてはpAc、pVL等、哺乳類細胞を宿主とするベクターとしてはpCDM8、pMT2PC等を例示することができる。

[0069] ベクターは好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、それに挿入された核酸を目的の細胞（宿主細胞）内に導入することができ、且つ当該細胞内において発現させることが可能なベクターをいう。発現ベクターは通常、挿入された核酸の発現に必要なプロモーター配列や、発現を促進させるエンハンサー配列等を含む。選択マーカーを含む発現ベクターを使用することもできる。かかる発現ベクターを用いた場合には、選択マーカーを利用して発現ベクターの導入の有無（及びその程度）を確認することができる。

[0070] 核酸のベクターへの挿入、選択マーカー遺伝子の挿入（必要な場合）、プロモーターの挿入（必要な場合）等は標準的な組換えDNA技術（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkを参照することができる、制限酵素及びDNAリガーゼを用いた周知の方法）を用いて行うことができる。

[0071] 宿主細胞としては、取り扱いの容易さの点から、大腸菌（エシェリヒア・

コリ）、糸状菌（アスペルギルス・オリゼ）、放線菌（ストレプトマイセス属、ストレプトマイセス・リビダンス、ストレプトマイセス・モバラエンシス）、枯草菌(バチルス・サブティリス)、出芽酵母（サッカロマイセス・セレビシエ）などの微生物を用いることが好ましいが、組換えDNAが複製可能で且つ本酵素の遺伝子が発現可能な宿主細胞であれば利用可能である。大腸菌の例としてT7系プロモーターを利用する場合は大腸菌BL21(DE3)pLysS、そうでない場合は大腸菌JM109を挙げることができる。また、出芽酵母の例として出芽酵母SHY2、出芽酵母AH22あるいは出芽酵母INVSc1（インビトロジェン社）を挙げることができる。

[0072] 組換えDNAを保有する微生物（即ち形質転換体）を使用することができる。微生物は、上記本発明のベクターを用いたトランスフェクション乃至はトランスフォーメーションによって得ることができる。例えば、塩化カルシウム法（ジャーナル オブモレキュラー バイオロジー(J.Mol. Biol.)、第53巻、第159頁（1970)）、ハナハン（Hanahan）法（ジャーナル オブモレキュラー バイオロジー、第166巻、第557頁（1983)）、SEM法（ジーン（Gene)、第96巻、第23頁(1990)〕、チャング（Chung）らの方法（プロシーディングズ オブザ ナショナル アカデミーオブ サイエンシーズ オブザ USA、第86巻、第2172頁(1989)）、リン酸カルシウム共沈降法、エレクトロポーレーション(Potter,H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))、リポフェクション(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84,7413-7417(1984))、接合伝達法等によって実施することができる。上記した微生物は、本酵素を生産することに利用することができる。

[0073] ３．酵素剤の用途

本発明はさらに、本発明の酵素剤の用途に関する。

即ち、本発明の酵素剤を基質（タンパク質又はペプチド）に作用させることによって、タンパク質又はペプチドを改質（例えば、保水性、保油性、乳化性、乳化安定性、起泡性、泡沫安定性、タンパク質溶解性、成形性等の改良）することができる。具体的には、本発明の酵素剤をグルタミン残基とリ

ジン残基を含有するタンパク質又はペプチドに作用させることによって、タンパク質のグルタミン残基の脱アミド又はグルタミン残基とリジン残基の架橋をすることにより酵素処理後のタンパク質又はペプチドの粘着性（ｓｔｉｃｋｙ）を向上させることができる。すなわち、本発明は、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド及び架橋方法に関するものであってもよい。中でも、タンパク質又はペプチドは、タンパク質含有飲食品に含まれるものであることが好ましく、本発明は、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド及び架橋方法に関するものであることが好ましい。

[0074] 本発明は、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法に関するものであってもよい。例えば、本発明の酵素剤をタンパク質又はペプチドを含む飲食品又は飲食品素材（タンパク質含有飲食品等）に作用させることによって、脱アミド及び架橋化タンパク質を含む飲食品又は飲食品素材（脱アミド及び架橋化タンパク質含有飲食品等）を製造することができる。本発明の酵素剤を飲食品に作用させることによって、飲食品の品質を改良することができる。本発明によれば、本発明の酵素剤で処理された飲食品（脱アミド及び架橋化タンパク質含有飲食品）が提供される。また、本発明の酵素剤は、飲食品又は飲食品素材（タンパク質含有飲食品等）以外にも産業用素材や医薬原料の製造用途にも使用できる。

[0075] タンパク質含有飲食品の品質の改良の具体例としては、特には限定されないが、動物性タンパク質や植物性タンパク質の粘着性を向上させる用途（例えば、肉製品（ハンバーグ、結着肉、とんかつ、ソーセージ、ステーキ、ハム、肉団子など）、魚介類製品（魚介類、魚卵、かまぼこ、ツナナゲットなど）、加工卵製品（茶碗蒸し、マヨネーズなど）、穀類や穀類加工品（米、小麦、そば、雑穀、トウモロコシ、パスタ、うどん）、製パン・製菓（パン

ケーキ、クッキーなど）、乳製品（ミルク、チーズ、ヨーグルト、クリーム、アイスクリーム、バターなど）、植物性ミルク、植物性チーズ、植物性ヨーグルト、動物性ゼラチン、植物性ゲル、動物性ゲル、豆腐、代替肉、ドレッシングなどの製造用途）等が挙げられる。

[0076] 本酵素剤を用いた飲食品の製造方法は特に限定されないが、例えば以下の工程（ａ）を含む方法が挙げられる。さらに、工程（ａ）の後に工程（ｂ）及び又は（ｃ）を含んでいても良い。

（ａ）タンパク質を含有する飲食品又は飲食品素材（タンパク質含有飲食品）に本酵素剤を作用させる工程

（ｂ）脱アミド及び架橋化タンパク質を含む飲食品又は飲食品素材を回収する工程

（ｃ）得られた酵素処理飲食品又は酵素処理飲食品素材に含まれる本酵素を失活又は除去する工程。

実施例

[0077] 例１：Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素の調製

Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅの菌体（独立行政法人 製品評価技術基盤機構（ＮＩＴＥ）から入手）（ＮＢＲＣ１０７７２６）を、トリプトソーヤブイヨン培地（日水製薬株式会社製）にて３７℃、４日間培養を行い、上清を回収した。得られた上清を、常法に従い２０ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ６）にて透析を行った。透析後のサンプルは、同緩衝液で平衡化した陽イオン交換カラム（ＳＰセファロース ＦＦ，ＧＥ ｈｅａｌｔｈ ｃａｒｅ製）にて、イオン交換クロマトを実施し、活性画分を脱塩濃縮後、さらにＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００ＨＲでゲル濾過に供することにより本酵素サンプルを取得した。

[0078] 本酵素のアミノ酸配列と、塩基配列を以下に示す。

アミノ酸配列（成熟体配列のみ）（配列番号１）

ATSLPPIAPPLPRGVQSKSWSVPDYIAAWEKQHGRPMTAEERYHLARGCIGVTVVNLDREDAPNPPLNL

SFGTYQRAMEVQAALNEIVATRPSPREYAEQVRKHPALQGVQNLVRAFPTFIDPANLHAAIFSKRFYSK
QDPNWTDEQAAEMYRPNPRTGQVDMSTYRYRARPGYVNFDYGWYDEQTNNWWHANHAEPGMKVYQSTLR
YYSRPLLDFDEQVFTVAFARVA

[0079] アミノ酸配列（全長）*下線部は成熟体配列（配列番号２）

MKKWLPRALVALFVLLGLPAGLAGTAHAAVVAHAAVATSLPPIAPPLPRGVQSKSWSVPDYIAAWEKQH
GRPMTAEERYHLARGCIGVTVVNLDREDAPNPPLNLSFGTYQRAMEVQAALNEIVATRPSPREYAEQVR
KHPALQGVQNLVRAFPTFIDPANLHAAIFSKRFYSKQDPNWTDEQAAEMYRPNPRTGQVDMSTYRYRAR
PGYVNFDYGWYDEQTNNWWHANHAEPGMKVYQSTLRYYSRPLLDFDEQVFTVAFARVA

[0080] 塩基配列（成熟体）（配列番号３）

gccacgtcgctgccaccgatcgcaccgccgcttccccggggcgtgcagagcaagagctggtcggtgccg
gactacattgccgcctgggagaagcaacacggtaggccgatgacggccgaggagcggtaccacctcgcc
cggggctgcatcggcgtcaccgtggtcaacctcgaccgggaggacgcgccgaacccgccgctcaacctg
tcgttcggcacttaccagcgggccatggaagtgcaggccgcgctgaacgagatcgtcgcgacccggccg
tcgccgcgggagtacgccgagcaggtgcgcaagcacccggcgctgcagggcgtgcagaacctggtgcgg
gcgttccccacgttcatcgacccggcgaacctgcacgccgccatcttctccaagcggttctactcgaag
caggacccgaactggaccgacgagcaggcggccgagatgtaccggccgaatccgcggaccggccaggtc
gacatgagcacctaccgctaccgggcgcggccgggttacgtgaacttcgactacggttggtacgacgag
cagacgaacaactggtggcacgccaaccacgcggagccgggcatgaaggtctaccagagcacgttgcgg
tactactcccggccgctgctggatttcgacgagcaggttttcaccgtggcgttcgcgcgggtcgcctga

[0081] 塩基配列（全長）（配列番号４）

gtgaagaagtggttgccgcgcgccctggtcgcgctgttcgtgctcctggggttacccgccggcctggcc
ggaacggcacatgccgcggtcgtcgcgcacgccgccgtcgccacgtcgctgccaccgatcgcaccgccg
cttccccggggcgtgcagagcaagagctggtcggtgccggactacattgccgcctgggagaagcaacac
ggtaggccgatgacggccgaggagcggtaccacctcgcccggggctgcatcggcgtcaccgtggtcaac
ctcgaccgggaggacgcgccgaacccgccgctcaacctgtcgttcggcacttaccagcgggccatggaa
gtgcaggccgcgctgaacgagatcgtcgcgacccggccgtcgccgcgggagtacgccgagcaggtgcgc
aagcacccggcgctgcagggcgtgcagaacctggtgcgggcgttccccacgttcatcgacccggcgaac
ctgcacgccgccatcttctccaagcggttctactcgaagcaggacccgaactggaccgacgagcaggcg

gccgagatgtaccggccgaatccgcggaccggccaggtcgacatgagcacctaccgctaccgggcgcgg
ccgggttacgtgaacttcgactacggttggtacgacgagcagacgaacaactggtggcacgccaaccac
gcggagccgggcatgaaggtctaccagagcacgttgcggtactactcccggccgctgctggatttcgac
gagcaggttttcaccgtggcgttcgcgcgggtcgcctga

[0082] 例２：タンパク質改質効果の確認

本酵素サンプルを用いて、カゼイン溶液を基質としたときのタンパク質の改質効果（粘着性向上）を確認した。

（方法）

ミルクカゼイン（Casein, Bovine Milk, Carbohydrate and Fatty Acid Free、Merck KGaA社）を水に溶解し、１１．１％（ｗ/ｖ） カゼイン溶液を調製した。１１．１％（ｗ/ｖ）カゼイン溶液９ｍＬに対し、カゼインタンパク質１ｇあたり０．２５ｍｇ、１ｍｇとなるように酵素溶液を添加し、５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．０）にて１０ｍＬにメスアップした。その後、全量の反応液をΦ５６ｍｍのプラスティックシャーレに流し入れて、４０℃で２時間インキュベート、その後さらに４℃で一晩(１２～１６時間)静置し、酵素処理カゼインタンパク質を得た。比較のため、本酵素のかわりにＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼ（天野エンザイム株式会社製）を用いて同様に実施した。

〈粘着性評価〉

酵素処理カゼインタンパク質の物性評価するため、レオメーターを用いて評価した。具体的には、直径２０ｍｍの金属製のプランジャーを用いて、６０ｍｍ/ｍｉｎでサンプル進度が４ｍｍになるように押し込み、その後、プランジャーがサンプルから離れる時に発生した応力（粘着力）が継続した距離を測定した。

[0083] （結果）

結果を図１及び表１に示す。

[表1]

酵素添加量	粘着性（mm）	
	本酵素	Streptomyces 由来 トランスグルタミナーゼ
0.25mg	14	5
1mg	5	1

[0084]（考察）

図１及び表１に示す結果において、既存のトランスグルタミナーゼと比べ、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する本酵素では、粘着性の顕著な増加が確認できた。

[0085]例３：タンパク質基質に対するタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性の評価

（方法）

５ｍｇのインスリンＢ鎖（インスリンＢ鎖，酸化型 ウシ膵臓由来、Sigma-Aldrich 社、配列：Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO_3H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO_3H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala（配列番号５））を２ｍＬの超純水に溶解させ、基質溶液とした。その後基質溶液 ９０μＬに対し、１ｍｇ／ｍＬ精製酵素溶液２０μＬと、０．２Ｍ リン酸二水素カリウム・リン酸水素二ナトリウム緩衝液（ｐＨ ６．５）を総量１８０μＬになるように添加し、反応溶液とした。反応溶液をインキュベーター内部で４０℃に加温し、１時間静置の後に１Ｎ ＨＣｌを２０μＬ添加して反応を停止させた。記載の反応停止液をＨＰＬＣを用いて分析した。インスリンＢ鎖から脱アミド化インスリンＢ鎖へのピーク遷移によって脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を検出した。比較例としてＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼ（天野エンザイム株式会社製）を用いて同様に活性を検出した。

〈タンパク質脱アミド活性〉

クロマトグラムより算出されるインスリンＢ鎖および脱アミド化インスリンＢ鎖のピーク面積から脱アミド化インスリンＢ鎖生産量を算出し、脱アミ

ド率（脱アミド化インスリンＢ鎖生産量÷基質インスリンＢ鎖量×１００）でタンパク質脱アミド活性を評価した。

（トランスグルタミナーゼ活性）

クロマトグラムより算出される各ピーク面積からインスリンＢ鎖残存量と脱アミド化インスリンＢ鎖生産量を算出し、架橋率（（１００－（インスリンＢ鎖残存量÷基質インスリンＢ鎖量×１００）－脱アミド率）で評価した。

上記の方法で算出した脱アミド率と架橋率の比率から、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性の比率を算出した。

[0086]（結果）

結果を表２に示す。

[表2]

	比較例	実施例
使用酵素	Streptomyces 由来トランスグルタミナーゼ	本酵素
タンパク質脱アミド活性比率（%）	3.5	18.9
トランスグルタミナーゼ活性比率（%）	96.5	81.1
タンパク質脱アミド活性／トランスグルタミナーゼ活性	0.036	0.23

[0087] 例４：タンパク質改質効果の確認（物性が改変された加工タンパク質含有乾燥組成物の製造）

（方法）

下表に示すタンパク質材料を水に溶解又は懸濁させた終濃度５質量％のタンパク質液を調製した。

[表3]

製品名	由来	タンパク質含有量（質量%）	メーカー
ソイプロ	大豆	50%	株式会社J-オイルミルズ
NUTRALYS F85M	エンドウ	85%	ロケットジャパン株式会社
リョクトウタンパク質	リョクトウ	80%	Ingredion
ファヴァタンパク質	ソラマメ	80%	Ingredion
レンズ豆タンパク質	レンズ豆	50%	オルガノ株式会社
ひよこ豆タンパク質	ひよこ豆	84%	オルガノ株式会社
オーツタンパク質	オーツ麦	75%	オルガノ株式会社
ライスタンパク質	コメ	85%	オルガノ株式会社
大麦全粒粉	大麦	6.7%	富澤商店
ソルガム全粒粉	ソルガム	9.6%	富澤商店
ライムギ全粒粉	ライムギ	8.5%	富澤商店
Corn gluten meal asia	トウモロコシ	-	ロケット社
アーモンドタンパク質	アーモンド	85%	バイオアクティヴ株式会社
ピーナッツ粉末	ピーナッツ	85%	バイオアクティヴ株式会社
クルミ粉末	クルミ	14.6%	富澤商店
ヘーゼルナッツ粉末	ヘーゼルナッツ	13%	富澤商店
カシューナッツ粉末	カシューナッツ	20%	みの屋社
ココナッツ粉末	ココナッツ	7%	アリサン
ピスタチオ粉末	ピスタチオ	17%	みの屋社
チアシードタンパク質	チアシード	83%	オルガノ株式会社
ヘンプタンパク質	産業用ヘンプ※1	85%	バイオアクティヴ株式会社
カゼイン from bovine milk	ミルクカゼイン	94%	Merck
Pork powder	牛粉末	70%	不明
Beef powder	豚粉末	70%	不明
Chicken powder	鳥粉末	70%	不明
Egg albumin	卵アルブミン	100%	和光純薬工業

※1：所謂産業用ヘンプを指しており、具体的には、知覚変容を引き起こすＴＨＣ（テトラヒドロカンナビノール）を含まない又はＴＨＣ濃度が低い品種を指す。

[0088] 上記表に記載されたそれぞれのタンパク質材料１ｇあたり、１ｍｇの例１で調製した酵素をタンパク質液に添加し、５０℃にて１６時間インキュベートした。その後、１００℃、５分間の加熱処理により酵素を失活させた。得られた酵素処理済みタンパク質液を凍結乾燥し、加工タンパク質含有乾燥組成物（本酵素で処理）を得た。また、酵素処理を行わなかったタンパク質含有乾燥組成物（酵素未処理）を別途得た。得られた加工タンパク質含有乾燥組成物及びタンパク質含有乾燥組成物（酵素未処理）について、以下に示すＡ～Ｇの観点で物性改変効果を評価した。なお、一部のタンパク質材料については、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した

、加工タンパク質含有乾燥組成物も得て、同様の評価を行った。

[0089]（Ａ：保水性評価）

０．１ｇの加工タンパク質含有乾燥組成物を１ｇの脱イオン水に懸濁し、３０秒間ボルテックスすることで、水懸濁液を調製した。３０分の静置後、水懸濁液を２，０００ｇで１０分間遠心分離し、上清を回収した。回収した上清の質量を測定し、得られた測定値を１ｇ（懸濁に用いた脱イオン水の質量）から差し引くことで、タンパク質が吸収した水の質量を算出した。さらに、加工タンパク質含有乾燥組成物１ｇあたりが吸収した水の質量を算出し、得られた値を「保水性」とした。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物についても同様に保水性を算出した。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物の保水性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の保水性の相対値を、保水性の評価値として求めた。また、一部のタンパク質材料では、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した場合の加工タンパク質含有乾燥組成物の保水性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の保水性の相対値を、保水性の評価値として求めた。

[0090]（結果）

結果を下表に示す。

[表4]

	由来		保水性
莢穀類	大豆	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.37**
	エンドウ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.80**
	ソラマメ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.13**
	レンズ豆	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.80**
	ひよこ豆	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.15**
禾穀類	ライ麦	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.13**
	トウモロコシ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.04**
	ソルガム	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.06**
種実類	カシューナッツ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.56**
	アーモンド	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.39**
	ピーナッツ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.57**
	産業用ヘンプ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.15**

[表5]

	由来		保水性
莢穀類	ソラマメ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.13**
	レンズ豆	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.33
		本酵素	**1.80**
	ひよこ豆	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.81
		本酵素	**1.15**
禾穀類	ライ麦	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.96
		本酵素	**1.13**
	ソルガム	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.03
		本酵素	**1.06**
種実類	カシューナッツ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.33
		本酵素	**1.56**
	アーモンド	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.13
		本酵素	**1.39**
	産業用ヘンプ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.10
		本酵素	**1.15**

[表6]

	由来		保水性
禾穀類	コメ	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.17**
種実類	ヘーゼルナッツ	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.12**
	ココナッツ	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.31**

[0091] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いた際に大豆、エンドウ、ソラマメ、レンズ豆、ひよこ豆、ライ麦、トウモロコシ、ソルガム、カシューナッツ、アーモンド、ピーナッツ、産業用ヘンプで保水性の向上が認められた。中でも、ソラマメ、レンズ豆、ひよこ豆、ライ麦、ソルガム、カシューナッツ、アーモンド、産業用ヘンプは、本酵素による保水性向上効果がＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた時よりも高かった。

[0092] （Ｂ：保油性評価）

０．１ｇの加工タンパク質含有乾燥組成物を１ｇのキャノーラ油に懸濁し、３０秒間ボルテックスすることで、油懸濁液を調製した。３０分の静置後、油懸濁液を２，０００ｇで１０分間遠心分離し、上清を回収した。回収した上清の質量を測定し、得られた測定値を１ｇ（懸濁に用いたキャノーラ油の質量）から差し引くことで、タンパク質が吸収した油の質量を算出した。さらに、加工タンパク質含有乾燥組成物１ｇあたりが吸収した油の質量を算出し、得られた値を「保油性」とした。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物についても同様に保油性を算出した。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物の保油性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の保油性の相対値を、保油性の評価値として求めた。また、一部のタンパク質材料では、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した場合の加工タンパク質含有乾燥組成物の保油性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の保油性の相対値を、保油性の評価値として求めた。

[0093]（結果）

結果を下表に示す。

[表7]

	由来		保油性
莢穀類	レンズ豆	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.12**
禾穀類	トウモロコシ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.04**
種実類	カシューナッツ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.13**
	アーモンド	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.03**
	クルミ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.02**
	ココナッツ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.06**
	産業用ヘンプ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.05**

[表8]

	由来		保油性
豆穀類	レンズ豆	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.98
		本酵素	**1.12**
禾穀類	トウモロコシ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.98
		本酵素	**1.04**
種実類	カシューナッツ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.97
		本酵素	**1.13**
	アーモンド	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.94
		本酵素	**1.03**
	クルミ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.88
		本酵素	**1.02**

[表9]

	由来		保油性
豆穀類	リョクトウ	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.79**
	ひよこ豆	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.23**
禾穀類	コメ	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.18**
	ライ麦	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.18**
	ソルガム	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.02**
種実類	チアシード	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.10**

[0094] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いた際にレンズ豆、トウモロコシ、カシューナッツ、アーモンド、クルミ、ココナッツ、産業用ヘンプで保油性の向上が認められた。中でも、レンズ豆、トウモロコシ、カシューナッツ、アーモンド、クルミは、本酵素による保油性向上効果がＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた時よりも高かった。

[0095]（Ｃ：乳化性評価）

加工タンパク質含有乾燥組成物を脱イオン水に懸濁し、１重量％のタンパク質を含む水懸濁液３０ｍＬを調製した。３０ｍＬの水懸濁液と１０ｍＬのキャノーラ油とを混合し、１０，０００ｒｐｍで２分間ホモジナイズ処理す

ることで、乳化組成物を調製した。調製直後の乳化組成物５０μＬをとり、５ｍＬの０．１％ＳＤＳ溶液に添加した。吸光度５００ｎｍにてその濁度（Ａ０）を測定し、下記計算式を用いて「乳化性」を算出した。

[数2]

$$乳化性\ (m^2/g) = (2\times 2.303\times A0) \ / \ (0.25\times タンパク質重量)$$

[0096] 酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物についても同様に乳化性を算出した。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物の乳化性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の乳化性の相対値を、乳化性の評価値として求めた。また、一部のタンパク質材料では、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した場合の加工タンパク質含有乾燥組成物の乳化性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の乳化性の相対値を、乳化性の評価値として求めた。

[0097] （結果）

結果を下表に示す。

[表10]

	由来		乳化性
莢穀類	エンドウ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.04**
	リョクトウ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.02**
	ソラマメ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.74**
	レンズ豆	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.32**
	ひよこ豆	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.20**
禾穀類	コメ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.02**
	オーツ麦	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.14**
種実類	チアシード	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.20**
動物性蛋白質	ミルクカゼイン	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.10**
	卵アルブミン	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.13**

[表11]

	由来		乳化性
穀穀類	エンドウ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.97
		本酵素	**1.04**
	リョクトウ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.86
		本酵素	**1.02**
	ソラマメ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.68
		本酵素	**1.74**
	レンズ豆	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.27
		本酵素	**1.32**
	ひよこ豆	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.96
		本酵素	**1.20**
禾穀類	オーツ麦	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.05
		本酵素	**1.14**
種実類	チアシード	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.01
		本酵素	**1.20**
動物性蛋白質	ミルクカゼイン	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.96
		本酵素	**1.10**
	卵アルブミン	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.02
		本酵素	**1.13**

[表12]

	由来		乳化性
動物性蛋白質	鶏粉末	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.02**

[0098] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いた際にエンドウ、リョクトウ、ソラマメ、レンズ豆、ひよこ豆、オーツ麦、コメ、チアシード、ミルクカゼイン、卵アルブミンで乳化性の向上が認められた。中でも、エンドウ、リョクトウ、ソラマメ、レンズ豆、ひよこ豆、オーツ麦、チアシード、ミルクカゼイン、卵アルブミンは、本酵素による乳化性向上効果がＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた時よりも高かった。

[0099] （Ｄ：乳化安定性評価）

乳化性評価で調製した乳化組成物を用いて評価した。調製直後の乳化組成

物５０μＬをとり、５ｍＬの０．１％ＳＤＳ溶液に添加し、吸光度５００ｎｍにてその濁度（Ａ０）を測定した。１０分間放置した乳化組成物５０μＬをとり、５ｍＬの０．１％ＳＤＳ溶液に添加し、吸光度５００ｎｍにてその濁度（Ａ１０）を測定した。下記計算式を用いて「乳化安定性」を算出した。

[数3]

$$\text{乳化安定性（%）} = \{ (A10\times10) / (A0-A10) \} \times100$$

[0100] 酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物についても同様に乳化安定性を算出した。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物の乳化安定性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の乳化安定性の相対値を、乳化安定性の評価値として求めた。また、一部のタンパク質材料では、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した場合の加工タンパク質含有乾燥組成物の乳化安定性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の乳化安定性の相対値を、乳化安定性の評価値として求めた。

[0101] （結果）

結果を下表に示す。

[表13]

	由来		乳化安定性
豆穀類	大豆	酵素未処理	1.00
		本酵素	**3.07**
	リョクトウ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.15**
	ソラマメ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.24**
	レンズ豆	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.62**
	ひよこ豆	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.04**
動物性蛋白質	ミルクカゼイン	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.20**
	豚粉末	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.27**
	鶏粉末	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.23**
	卵アルブミン	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.17**

[表14]

	由来		乳化安定性
豆類	大豆	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	2.28
		本酵素	**3.07**
	レンズ豆	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	1.45
		本酵素	**1.62**
	ひよこ豆	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	0.95
		本酵素	**1.04**
動物性蛋白質	ミルクカゼイン	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	1.08
		本酵素	**1.20**
	豚粉末	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	1.22
		本酵素	**1.27**
	鶏粉末	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	1.11
		本酵素	**1.23**

[表15]

	由来		乳化安定性
豆類	エンドウ	Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	1.00
		本酵素	**1.04**
禾穀類	コメ	Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	1.00
		本酵素	**1.07**
	オーツ麦	Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	1.00
		本酵素	**1.01**
動物性蛋白質	牛粉末	Streptomyces由来トランスグルタミナーゼ	1.00
		本酵素	**1.04**

[0102] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いた際に大豆、リョクトウ、ソラマメ、レンズ豆、ひよこ豆、ミルクカゼイン、豚粉末、鶏粉末、卵アルブミンで乳化安定性の向上が認められた。中でも、大豆、レンズ豆、ひよこ豆、ミルクカゼイン、豚粉末、鶏粉末は、本酵素による乳化安定性向上効果がＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた時よりも高かった。

[0103] （Ｅ：起泡性評価）

加工タンパク質含有乾燥組成物を脱イオン水に懸濁し、５０ｍＬの０．５重量％水懸濁液を調製した。水懸濁液を１８，０００ｒｐｍで３０分間ホモジナイズ処理し、すぐに、１００ｍＬメスシリンダーに移した。泡沫を含め

た水懸濁液の体積ＶＦ０を計量し、下記計算式を用いて「起泡性」を算出した。

[数4]

起泡性（%）＝100×（VF0-50）／50

[0104] 酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物についても同様に起泡性を算出した。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物の起泡性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の起泡性の相対値を、起泡性の評価値として求めた。また、一部のタンパク質材料では、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した場合の加工タンパク質含有乾燥組成物の起泡性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の起泡性の相対値を、起泡性の評価値として求めた。

[0105]（結果）

結果を下表に示す。

[表16]

	由来		起泡性
豆穀類	エンドウ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.75**
	ソラマメ	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.20**

[表17]

	由来		起泡性
豆穀類	エンドウ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.25
		本酵素	**1.75**

[表18]

	由来		起泡性
禾穀類	コメ	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**2.00**

[0106] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いた際にエンドウ、ソラマメで起泡性の向上が認められた。中でもエンドウは、本酵素による起泡性向上効果がＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた時よりも高かっ

た。

[0107] （Ｆ：泡沫安定性評価）

加工タンパク質含有乾燥組成物を脱イオン水に懸濁し、５０ｍＬの０．５重量％水懸濁液を調製した。水懸濁液を１８，０００ｒｐｍで３０分間ホモジナイズ処理し、すぐに１００ｍＬメスシリンダーに移して泡沫を含めた水懸濁液の体積ＶＦ０を計量した。３０分後同様に泡沫を含めた水懸濁液の体積ＶＦ３０を計量し、下記計算式を用いて「泡沫安定性」を算出した。

[数5]

$$泡沫安定性（\%）＝100\times（VF30／VF0）$$

[0108] 酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物についても同様に泡沫安定性を算出した。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物の泡沫安定性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の泡沫安定性の相対値を、泡沫安定性の評価値として求めた。また、一部のタンパク質材料では、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した場合の加工タンパク質含有乾燥組成物の泡沫安定性を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物の泡沫安定性の相対値を、泡沫安定性の評価値として求めた。

[0109] （結果）

結果を下表に示す。

[表19]

	由来		泡沫安定性
動物性蛋白質	ミルクカゼイン	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.01**
	卵アルブミン	酵素未処理	1.00
		本酵素	**1.05**

[表20]

	由来		泡沫安定性
動物性蛋白質	卵アルブミン	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.05**

[表21]

	由来		泡沫安定性
穀穀類	エンドウ	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.01**
	リョクトウ	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.04**

[0110] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いた際にミルクカゼイン、卵アルブミンで泡沫安定性の向上が認められた。中でも卵アルブミンは、本酵素による泡沫安定性向上効果がＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた時よりも高かった。

[0111] （Ｇ：タンパク質溶解性評価）

加工タンパク質含有乾燥組成物を脱イオン水に懸濁し、５重量％水懸濁液を調製した。調製した５重量％水懸濁液を、１５，０００ｇで５分間の条件で遠心分離を行った。遠心上清を回収し、ＢＩＯ－ＲＡＤ社製のＢｒａｄｆｏｒｄ試薬を用いてタンパク質濃度（ｍｇ／ｍＬ）を定量した。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物についても同様にタンパク質濃度（ｍｇ／ｍＬ）を定量した。酵素未処理のタンパク質含有乾燥組成物のタンパク質濃度を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物のタンパク質濃度の相対値を、タンパク質溶解性の評価値として求めた。また、一部のタンパク質材料では、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した場合の加工タンパク質含有乾燥組成物のタンパク質濃度を１とした場合の、加工タンパク質含有乾燥組成物のタンパク質濃度の相対値を、タンパク質溶解性の評価値として求めた。

[0112] （結果）

結果を下表に示す。

[表22]

	由来		タンパク質溶解性
穀穀類	リョクトウ	酵素未処理	1.00
		Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	0.55
		本酵素	**1.54**

[表23]

	由来		タンパク質溶解性
穀類	レンズ豆	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.09**
動物性蛋白質	牛粉末	Streptomyces由来ﾄﾗﾝｽｸﾞﾙﾀﾐﾅｰｾﾞ	1.00
		本酵素	**1.68**

[0113] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いた際にリョクトウでタンパク質溶解性の向上が認められ、さらにＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた時よりも高かった。

[0114] 例５：タンパク質改質効果の確認（物性が改変された飲食品の製造）

（１．かまぼこ）

万能すりみパウダー（鈴廣かまぼこ（株）、たんぱく質：５７．８重量％）に対して、４倍量の水を加えてすり身を調製した。９ｇのすり身に対して、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を０．５ｍＬ、水を０．５ｍＬそれぞれ添加、混合し、急ぎ直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに詰めて成形した。蓋をして５０℃で５時間インキュベートし、かまぼこ（本酵素で処理）を得た。得られたかまぼこについてレオメーター（株式会社サン科学製）を用い、応力（最初の圧縮中に記録された最大の力）を測定した。また、酵素処理を行わなかったかまぼこ（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理のかまぼこの応力を１とした場合の、本酵素で処理したかまぼこの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0115] （結果）

結果を下表に示す。

[表24]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	3.63

[0116] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで顕著な応力の向上が認められ

た。

[0117] （２．ヨーグルト）

５００ｍＬの牛乳（明治（株）　おいしい牛乳、たんぱく質：３４ｍｇ／ｍＬ）に対して、１包の種菌（（株）太田胃散　王様のヨーグルト種菌）を添加した。９ｍＬの種菌入り牛乳に対して、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を０．２５ｍＬ、水を０．７５ｍＬそれぞれ添加、混合した。混合後、直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに流し込み、蓋をして２８℃で２４時間インキュベートし、ヨーグルト（本酵素で処理）を得た。得られたヨーグルトについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかったヨーグルト（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理のヨーグルトの応力を1とした場合の、本酵素で処理したヨーグルトの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0118] （結果）

結果を下表に示す。

[表25]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.93

[0119] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0120] （３．チーズ）

３０ｇの市販チェダーチーズに対して、ｐＨ６．８６の０．２Ｍリン酸緩衝液を１５ｍＬ添加し、７０℃で攪拌しながら完全に溶解させた。溶解後、５０℃まで冷まして直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに２０ｇずつ分注し、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ１ｍＬ添加、混合した。蓋をして５０℃で１時間インキュベートし、チーズ（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を

得た。得られたチーズについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかったチーズ（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理のチーズの応力を1とした場合の、本酵素で処理したチーズ、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理したチーズの応力の相対値を、それぞれ応力向上率として算出し評価した。

[0121]（結果）

結果を下表に示す。

[表26]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.0
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	17.2
本酵素	58.4

[0122] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも顕著に高い応力を得ることができた。

[0123]（４．ハンバーグ）

２００ｇの牛肉ミンチ（国産牛１００％、たんぱく質：１７．１重量％）に対して、終濃度１％となるように食塩を添加し、粘り気が出るまで十分に混合した。続けて１４０ｍＬの水を添加し、再び混合して２０ｇずつに小分けした。小分けした肉種に例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を１ｍＬ添加、混合し成形した。成形した肉種をラップでくるみ、５０℃で１時間インキュベートした。インキュベート後、フライパンで片面を中火で２分間、両面焼成した。焼成後、常温まで冷却しハンバーグ（本酵素で処理）を得た。得られたハンバーグについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかったハンバーグ（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理のハンバーグの応力を１とした場合の、本酵素で処理したハンバーグの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0124]（結果）

結果を下表に示す。

[表27]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.09

[0125] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0126]（５．鶏ハム）

フォークで適当間隔あけて刺し、軟化させた１００ｇの鶏むね肉（たんぱく質：２３．３重量％）を、麺棒を用いて延ばし厚さを均一にした。１．６ｇの砂糖を両面になじませ、次いで１．６ｇの食塩も擦り込み、前処理を行った。チャック付きポリ袋内で、２５ｇの前処理済鶏むね肉に対して５ｍＬの水と、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ５ｍＬ添加、混合した。できるだけ空気を抜いてチャックし、５０℃で５時間インキュベートした。インキュベート後、チャック付きポリ袋から鶏むね肉を取り出し、アルミホイルでハム状に丸め、成形した。成形後、沸騰水中でボイルした。ボイル後、常温まで冷却し鶏ハム（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られた鶏ハムについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかった鶏ハム（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理の鶏ハムの応力を１とした場合の、本酵素で処理した鶏ハム、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した鶏ハムの応力の相対値を、それぞれ応力向上率として算出し評価した。

[0127]（結果）

結果を下表に示す。

[表28]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	1.38
本酵素	1.80

[0128] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも顕著に高い応力を得ることができた。

[0129] （６．茶碗蒸し）

卵１個分の溶き卵（たんぱく質：１２．２重量％）に対して１８０ｍＬの水を添加し、茶こしで濾した。９ｍＬの溶き卵に対して０．５ｍＬの水と、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を１ｍＬ添加、混合し、５０℃で４時間インキュベートした。インキュベート後、煮沸鍋中で蒸した。その後常温まで冷却し、茶碗蒸し（本酵素で処理）を得た。また、酵素処理を行わなかった茶碗蒸し（酵素未処理）も別途得た。得られた茶碗蒸しそれぞれをスプーンですくい、その物性を目視で評価した。

[0130] （結果）

酵素未処理の茶碗蒸しが僅かにざらついた断面であったのに対し、本酵素を用いた茶碗蒸しは滑らかな断面であった。

[0131] （７．パンケーキ）

１００ｇのクッキングフラワー薄力小麦粉（(株)日清製粉ウェルナ社、たんぱく質：８重量％）および４ｇのホームベーカリー用スーパーカメリヤドライイースト（(株)日清製粉ウェルナ社）を１００ｍＬの水と充分に混合し、砂糖および溶き卵を適量添加した。２０ｇずつ小分けし、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を１ｍＬ添加、混合して５０℃で１時間インキュベートした。インキュベート後、フライパンで片面を中火で２分間、両面焼成した。焼成後、常温まで冷却しパンケーキ（本酵素で処理）を得た。得られたパンケーキについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかったパンケーキ（酵素未処理）を

別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理のパンケーキの応力を1とした場合の、本酵素で処理したパンケーキの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0132]（結果）

結果を下表に示す。

[表29]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.32

[0133] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0134]（８．豆腐）

９ｍＬの豆乳（スジャータめいらくグループ　豆腐もできます有機豆乳、たんぱく質：５０ｍｇ／ｍＬ）と０．５ｍＬのにがり溶液（塩化マグネシウム）、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を０．５ｍＬ添加し、混合した。混合後、直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに流し込み、蓋をして４０℃で２０時間インキュベートし、豆腐（本酵素で処理）を得た。得られた豆腐について「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかった豆腐（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理の豆腐の応力を１とした場合の、本酵素で処理した豆腐の応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0135]（結果）

結果を下表に示す。

[表30]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.70

[0136] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0137]（９．豆乳ヨーグルト）

５００ｍＬの豆乳（スジャータめいらくグループ　豆腐もできます有機豆乳、たんぱく質：５０ｍｇ／ｍＬ）に対して、１包の種菌（（株）太田胃散　王様のヨーグルト種菌）を添加した。９ｍＬの種菌入り豆乳に対して０．５ｍＬの水と、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を０．５ｍＬ添加、混合した。混合後、直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに流し込み、蓋をして２８℃で２４時間インキュベートし、豆乳ヨーグルト（本酵素で処理）を得た。得られた豆乳ヨーグルトについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかった豆乳ヨーグルト（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理の豆乳ヨーグルトの応力を１とした場合の、本酵素で処理した豆乳ヨーグルトの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0138]（結果）

結果を下表に示す。

[表31]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.93

[0139]　酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0140]（１０．代替ハンバーグ）

粒状植物性タンパク質（マルコメ（株）　ダイズラボ　大豆のお肉ミンチ乾燥タイプ、たんぱく質：４５．４重量%）を６倍量のお湯で１０分間水戻し、膨潤させた。膨潤した粒状植物性タンパク質２５ｇに対して、１ｇのメチルセルロース（信越化学工業（株）　メトローズ）および２．７５ｇのエンドウタンパク質（ロケット社　Ｎｕｔｒａｌｙｓ　Ｆ８５Ｍ）を添加し、最後に水を２０ｍＬ添加、混合した。混合してできた生パテに対して、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ１ｍＬ添加、混合し、室温で１時間インキュベートした。インキュベート後、オーブンにて１５０

℃で片面を５分ずつ焼成した。焼成後、常温まで冷却し代替ハンバーグ（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られた代替ハンバーグについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかった代替ハンバーグ（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理の代替ハンバーグの応力を１とした場合の、本酵素で処理した代替ハンバーグ、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した代替ハンバーグの応力の相対値を、それぞれ応力向上率として算出し評価した。

[0141]（結果）

結果を下表に示す。

[表32]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	1.00
本酵素	1.10

[0142] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも高い応力を得ることができた。

[0143]（１１．代替チーズ）

代替チーズの材料として、１８．８ｇのエンドウタンパク質（ロケット社ＬＹＳＡＭＩＮＥ　ＧＰＳ）、１０ｇのタピオカスターチ、２ｇのキャノーラ油、１２ｇのココナッツ油（事前に溶解）、０．６ｇの食塩、１．８ｇのリン酸カルシウム、１ｇのカラギーナンを添加し、合計で１００ｇとなるよう水を添加、混合した。混合物を５０℃で保温しながら１，０００ｒｐｍで１０分間ホモジナイズした。ホモジナイズ後の混合物を直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに１０ｇずつ分注し、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ０．５ｍＬ添加、混合した。蓋をして４０℃で２０時間インキュベートし、代替チーズ（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍ

ｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られた代替チーズについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかった代替チーズ（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理の代替チーズの応力を１とした場合の、本酵素で処理した代替チーズ、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した代替チーズの応力の相対値を、それぞれ応力向上率として算出し評価した。

[0144]（結果）

結果を下表に示す。

[表33]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	2.35
本酵素	6.65

[0145] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも顕著に高い応力を得ることができた。

[0146]（１２．牛骨ゼラチン、豚皮ゼラチン、魚ゼラチン）

終濃度５質量％となるよう下表に示す各ゼラチンを５０ｍＭリン酸緩衝液に溶解させ、ゼラチン溶液を調製した。

[表34]

製品名	タンパク質含有量	メーカー
牛骨ゼラチン	100%	新田ゼラチン
豚皮ゼラチン	100%	新田ゼラチン
魚ゼラチン	100%	新田ゼラチン

[0147] ９ｍＬの各ゼラチン溶液に対して０．５ｍＬの水と、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を０．５ｍＬ添加、混合した。混合後、直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに流し込み、蓋をして４０℃で２０時間インキュベートし、凝固ゼラチン（本酵素で処理）を得た。得られた

凝固ゼラチンについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。なお、酵素処理を行わなかった場合、ゼラチンは凝固しなかった。

[0148]（結果）

結果を下表に示す。

[表35]

素材	牛骨ゼラチン	豚皮ゼラチン	魚ゼラチン
	応力(N)	応力(N)	応力(N)
酵素未処理	0	0	0
本酵素	2.9	7.3	0.7

[0149] いずれのゼラチンにおいても、本酵素を用いることで凝固が認められた。

[0150]（１３．牛乳ゲル・豆乳ゲル）

１０ｍＬの牛乳（明治（株） おいしい牛乳）、もしくは、１０ｍＬの豆乳（スジャータめいらくグループ 豆腐もできます有機豆乳）に対して、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ０．５ｍＬ添加、混合した。混合後、直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに流し込み、蓋をして４０℃で２０時間インキュベートし、牛乳ゲル、もしくは、豆乳ゲル（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られたゲルについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかった場合、牛乳、豆乳のいずれも凝固しなかった。

[0151]（結果）

結果を下表に示す。

[表36]

条件	牛乳ゲル	豆乳ゲル
	応力(N)	応力(N)
酵素未処理	0	0
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	0.2	0.2
本酵素	0.5	0.7

[0152] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも高い応力を得ることができた。

[0153] （１４．卵白ゲル）

鶏卵から卵白（たんぱく質：１０．１重量%）を取り出し、１８０ｍＬの水を添加し、茶こしで濾した。９ｍＬの卵白溶液に対して０．５ｍＬの水と、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ１ｍＬ添加、混合した。混合後、直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに流し込み、蓋をして５０℃で４時間インキュベートした。インキュベート後、煮沸鍋中で蒸した。常温まで冷却し、卵白ゲル（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られた卵白ゲルについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかった卵白ゲル（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理の卵白ゲルの応力を１とした場合の、本酵素で処理した卵白ゲル、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した卵白ゲルの応力の相対値を、それぞれ応力向上率として算出し評価した。

[0154] （結果）

結果を下表に示す。

[表37]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	1.53
本酵素	1.68

[0155] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも高い応力を得ることができた。

[0156] （１５．鶏卵黄ゲル）

鶏卵から取り分けた卵黄９ｍＬ（たんぱく質：１６．５重量%）に対して０．５ｍＬの水と、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶

液を０．５ｍＬ添加、混合した。混合後、直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに流し込み、蓋をして５０℃で５時間インキュベートし、鶏卵黄ゲル（本酵素で処理）を得た。得られた鶏卵黄ゲルについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わなかった鶏卵黄ゲル（酵素未処理）を別途得て、同様に応力を測定した。酵素未処理の鶏卵黄ゲルの応力を１とした場合の、本酵素で処理した鶏卵黄ゲルの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0157]（結果）

結果を下表に示す。

[表38]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.85

[0158] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0159]（１６．カゼイン熱可逆性ゲル）

終濃度１１．１質量％となるようにミルクカゼインを５０ｍＭリン酸緩衝液に懸濁し、水酸化ナトリウムによってｐＨ７に調整した。次いでミルクカゼイン懸濁液を沸騰水中で加熱し、完全に溶解させた。９ｍＬのカゼイン溶液に対して０．７５ｍＬの水と、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ０．２５ｍＬ添加、混合した。充分に混合した後、４０℃で２０時間インキュベートし、ゲル化させた。得られたゲル化物をオートクレーブ処理（１２０℃、２０分の条件）して、常温まで冷ました。

[0160]（結果）

Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来のトランスグルタミナーゼによって形成されたゲルは、オートクレーブ後もゲル形状を維持したままだった。一方で、本酵素によって形成されたゲルは、オートクレーブ後には液状となり、常温にまで冷却すると再度ゲル化した。この熱可逆的なゲル形成は、熱処理（オ

ートクレーブ処理）と冷却を最低３回繰り返しても引き起こされた。

[0161]（１７．オーツミルクでのタンパク架橋）

オーツミルクに本酵素を作用させたところ、オーツ麦タンパク質の架橋が確認できた。

[0162]（１８．ツナナゲット）

調味液を含む、７０ｇのまぐろフレーク（いなば　ライトツナフレーク（いなば食品（株））、たんぱく質：１１．８重量%）に３７．５ｇの小麦粉と少量の食塩を加え混合した。得られた肉だねを２０ｇずつに小分けし、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ１ｍＬ添加してさらに混合した。直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに肉だねを詰めて成形し、蓋をして５０℃で２時間インキュベートした。インキュベート後、シャーレから肉だねを取り出し、１７０℃に熱したサラダ油で片面２分間、両面揚げ焼きした。油切り網で余分な油を切り、常温まで冷却しツナナゲット（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られたツナナゲットについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途ツナナゲット（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のツナナゲットの応力を１とした場合の、本酵素で処理したツナナゲット、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理したツナナゲットの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0163]（結果）

結果を下表に示す。

[表39]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	1.25
本酵素	1.32

[0164] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも高い応力を得ることができた。

[0165]（１９．バター）

１５ｇの有塩バター（雪印北海道バター（雪印メグミルク（株））、たんぱく質：０．６重量％）に対して、ｐＨ６．８６の０．２Ｍリン酸緩衝液を２．２５ｍＬ添加し、５０℃で１５分間攪拌した。ここに、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ０．７５ｍＬ添加し、さらに混合した。混合後、５０℃で１時間インキュベートした。インキュベート後、直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレにバターを流し込み、蓋をして冷蔵庫にて一晩冷やし固めた。一晩冷却後、常温になるまで放置し、バター（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られたバターについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途バター（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のバターの応力を１とした場合の、本酵素で処理したバター、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理したバターの応力の相対値を、それぞれ応力向上率として算出し評価した。

[0166]（結果）

結果を下表に示す。

[表40]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	1.17
本酵素	1.77

[0167] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも顕著に高い応力を得ることができた。

[0168]（２０．とんかつ）

フォークで適当間隔あけて刺し、軟化させた３５ｇの豚もも肉（たんぱく質：２０．５重量%）をラップでくるみ、麺棒を用いて厚さを均一にした。厚さを均一にした豚もも肉の両面に少量の食塩をなじませた。チャック付きポリ袋に前述の豚もも肉を入れ、ここに例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を５ｍＬと、水を５ｍＬ添加し、さらになじませた。できるだけ空気を抜いてチャックし、４０℃で３時間インキュベートした。インキュベート後、チャック付きポリ袋から豚もも肉を取り出し、小麦粉を肉全体に軽くまぶした。さらに溶き卵にくぐらせ、パン粉を全体にまぶした。１８０℃に熱したサラダ油で２分３０秒間揚げ、油切り網で余分な油を切った。そのまま常温まで冷却し、とんかつ（本酵素で処理）を得た。得られたとんかつについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途とんかつ（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のとんかつの応力を１とした場合の、本酵素で処理したとんかつの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0169] （結果）

結果を下表に示す。

[表41]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.89

[0170] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで顕著な応力の向上が認められた。

[0171] （２１．ソーセージ）

豚あらびき肉（たんぱく質：１７．７重量%）５０ｇに１．２５ｇの食塩、１．８７５ｇの砂糖、１．２５ｍＬの水、および例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を５ｍＬ添加し、混合した。水に１５分間浸した、長さ２０ｃｍの羊腸を別途準備した。ソーセージスタッファーを用

いて調味済の肉だねを羊腸に詰め、ラップでくるみ、５０℃で３．５時間インキュベートした。ソーセージ一つ当たり、５０ｇの肉だねが含まれ、全長は６ｃｍであった。インキュベート後、約８０℃の湯中で２０分間茹で、さらにフライパンでソーセージ全体を中火で５分間焼成した。焼成後、常温まで冷却しソーセージ（本酵素で処理）を得た。得られたソーセージについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途ソーセージ（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のソーセージの応力を１とした場合の、本酵素で処理したソーセージの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0172]（結果）

結果を下表に示す。

[表42]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.64

[0173] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0174]（２２．鶏団子）

適量の鶏もも肉（たんぱく質：１６．６重量%）をフードプロセッサーにかけ、ミンチ状にした。得られた鶏ももミンチ肉３００ｇに１．２５ｇの食塩と５ｇの砂糖を加え、粘り気が出るまでよく捏ねた。さらに溶き卵（鶏卵一つ分）と１５ｇの小麦粉を加えて、なじむまで肉だねを混合した。肉だねを２５ｇずつに小分けし、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を１ｍＬ添加、混合した。直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに肉だねを詰めて成形し、蓋をして５０℃で１時間インキュベートした。インキュベート後、沸騰水中で５分間ボイルした。ボイル後、常温まで冷却し鶏団子（本酵素で処理）を得た。得られた鶏団子について「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途鶏団子（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処

理の鶏団子の応力を１とした場合の、本酵素で処理した鶏団子の応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0175]（結果）

結果を下表に示す。

[表43]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.18

[0176] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0177]（２３．牛ステーキ）

フォークで適当間隔あけて刺した４０ｇの牛ヒレ肉（たんぱく質：２０．５重量%）をラップでくるみ、麺棒を用いて厚さを均一にした。厚さを均一にした牛ヒレ肉の両面に少量の食塩をなじませた。チャック付きポリ袋に前述の牛ヒレ肉を入れ、ここに例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ５ｍＬと、水を５ｍＬ添加し、さらになじませた。できるだけ空気を抜いてチャックし、４０℃で４時間インキュベートした。インキュベート後、チャック付きポリ袋から牛ヒレ肉を取り出し、フライパンで片面を中火で２分間、両面焼成した。焼成後、常温まで冷却し牛ステーキ（本酵素で処理又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られた牛ステーキについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途牛ステーキ（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理の牛ステーキの応力を１とした場合の、本酵素で処理した牛ステーキ、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理した牛ステーキの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0178]（結果）

結果を下表に示す。

[表44]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	1.33
本酵素	1.65

[0179] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも高い応力を得ることができた。

[0180]（２４．クッキー）

５０ｇの強力小麦粉（日清カメリヤ強力小麦粉（（株）日清製粉ウェルナ社）、たんぱく質：１２．６重量%）、２５ｇの有塩バター（雪印北海道バター（雪印メグミルク（株））、２５ｇの砂糖、３０ｇの溶き卵、０．４ｇのベーキングパウダー、および少量の食塩をボウルに添加し、十分に混合した。混合してできたクッキー生地を１５ｇずつに小分けし、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ１ｍＬ添加、混合した。クッキー生地が入っているボウルにラップを被せ、５０℃で４時間インキュベートした。その後、冷蔵庫で生地を１時間休ませ、麺棒を用いて生地を成形した。１６０℃に予熱したオーブンで表面、裏面をそれぞれ１０分間ずつ焼成した（焼成温度は１６０℃）。焼成後、常温まで冷却しクッキー（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られたクッキーについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。なお、測定中にクッキーが割れた時点で、測定終了とした。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途クッキー（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のクッキーの応力を１とした場合の、本酵素で処理したクッキー、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理したクッキーの応力の相対値を、それぞれ応力向上率として算出し評価した。

[0181]（結果）

結果を下表に示す。

[表45]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	1.02
本酵素	1.13

[0182] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも高い応力を得ることができた。

[0183] （２５．マグロの切り身）

チャック付きポリ袋に生のマグロ（たんぱく質：２５．４重量％）の切り身２０ｇと、２ｍＬの水を加えなじませた。ここに例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ２ｍＬ添加して、さらになじませた。できるだけ空気を抜いてチャックし、４０℃で４時間インキュベートした。インキュベート後、チャック付きポリ袋からマグロの切り身を取り出して流水ですすいだ。水気を切って常温まで冷却し、酵素処理済みのマグロの切り身（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られたマグロの切り身について「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途マグロの切り身（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のマグロの切り身の応力を１とした場合の、本酵素で処理したマグロの切り身、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理したマグロの切り身の応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0184] （結果）

結果を下表に示す。

[表46]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	1.58
本酵素	1.81

[0185] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも高い応力を得ることが出来た。

[0186]（２６．イカの切り身）

チャック付きポリ袋に生のイカ（たんぱく質：１８．６重量％）の切り身２０ｇと、２ｍＬの水を加えなじませた。ここに例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を２ｍＬ添加して、さらになじませた。できるだけ空気を抜いてチャックし、４０℃で４時間インキュベートした。インキュベート後、チャック付きポリ袋からイカの切り身を取り出して流水ですすいだ。水気を切って常温まで冷却し、酵素処理済みのイカの切り身（本酵素で処理）を得た。得られたイカの切り身について「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途イカの切り身（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のイカの切り身の応力を１とした場合の、本酵素で処理したイカの切り身の応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0187]（結果）

結果を下表に示す。

[表47]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	3.38

[0188] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0189]（２７．ホタテ貝柱）

チャック付きポリ袋に生のホタテ貝柱（たんぱく質：１６．９重量％）１

６０ｇと、２ｍＬの水を加えなじませた。ここに例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を２ｍＬ添加して、さらになじませた。できるだけ空気を抜いてチャックし、４０℃で４時間インキュベートした。インキュベート後、チャック付きポリ袋からホタテ貝柱を取り出して流水ですすいだ。水気を切って常温まで冷却し、酵素処理済みのホタテ貝柱（本酵素で処理）を得た。得られたホタテ貝柱について「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途ホタテ貝柱（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のホタテ貝柱の応力を１とした場合の、本酵素で処理したホタテ貝柱の応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0190] （結果）

結果を下表に示す。

[表48]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.28

[0191] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0192] （２８．たらこ）

たらこ（たんぱく質：２４．０重量％）から薄皮を除き、５ｇ分秤量してビーカーに入れた。ここに０．５ｍＬの水と、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ０．５ｍＬ添加して混合した。直径５６ｍｍ、高さ１６ｍｍのシャーレに前述のたらこを詰め、蓋をして４０℃で４時間インキュベートした。インキュベート後、常温まで冷却し、酵素処理済みのたらこ（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られた、たらこについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途たらこ（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のたら

この応力を１とした場合の、本酵素で処理したたらこ、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理したたらこの応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0193]（結果）

結果を下表に示す。

[表49]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	2.40
本酵素	3.70

[0194] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも高い応力を得ることが出来た。

[0195]（２９．アイスクリーム）

鍋に、２５０ｍＬの牛乳（明治（株） おいしい牛乳、たんぱく質：３４ｍｇ／ｍＬ）、５０ｇの砂糖、３０ｇの溶き卵（たんぱく質：１２．２重量％）を入れてよく混ぜ、弱火でとろみがつくまで温めて、牛乳液を調製した。粗熱を取った後、６０ｇの牛乳液に対して、例１で調製した酵素又は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液をそれぞれ３ｍＬ添加、混合し、４０℃で３時間インキュベートした。インキュベート後、シャーレに酵素処理済み牛乳液を２０ｇずつ小分けし、蓋をして－２５℃の冷凍庫にて一晩冷凍した。一晩冷凍後、酵素処理済みのアイスクリーム（本酵素で処理、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理）を得た。得られたアイスクリームについて「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途アイスクリーム（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理のアイスクリームの応力を１とした場合の、本酵素で処理したアイスクリーム、又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼで処理したアイスクリームの応力の相対値を、応力向

上率として算出し評価した。

[0196]（結果）

結果を下表に示す。

[表50]

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
*Streptomyces*由来トランスグルタミナーゼ	1.45
本酵素	3.50

[0197] 本酵素を用いることで、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼを用いた場合よりも高い応力を得ることが出来た。

[0198]（３０．白米・玄米）

８．６５ｇの水洗した白米（たんぱく質：６．１重量％）又は玄米（たんぱく質：６．８重量％）に対して、８ｍＬの水と、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を２ｍＬ添加、混合した。４０℃で４時間インキュベートし、その後、炊飯を行った。粗熱を取った後に成形し、酵素処理済みの白米又は玄米（本酵素で処理）を得た。得られた白米又は玄米について「１．かまぼこ」の手順と同様に応力を測定した。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途白米又は玄米（酵素未処理）を得て応力を測定した。酵素未処理の白米又は玄米のそれぞれの応力を１とした場合の、本酵素で処理した白米又は玄米の応力の相対値を、応力向上率として算出し評価した。

[0199]（結果）

結果を下表に示す。

[表51]

白米

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.16

[表52]

玄米

条件	応力向上率
酵素未処理	1.00
本酵素	1.26

[0200] 酵素未処理に比べて、本酵素を用いることで応力の向上が認められた。

[0201]（３１．パスタ）

１１５ｇのデュラムセモリナ粉（たんぱく質：１３．３重量%）と、５０ｇの溶き卵（たんぱく質：１２．２重量%）、５ｇの食塩とを混合し、生地がまとまるまで１０分間捏ねた。前述の生地に、例１で調製した酵素を１．０ｍｇ／ｍＬの濃度で含む溶液を１０ｍＬ添加し、さらに１０分間捏ねた。生地をラップで包み、冷蔵庫で３０分間寝かせた。その後、もう一度生地が均一になるよう捏ね、麺棒で生地厚が１ｍｍとなるよう延ばした。延ばした生地を縦・横幅５ｃｍで切り分けた。切り分けた生地をトレーに並べてラップし、４０℃で２時間インキュベートした。インキュベート後、沸騰水中で２分間生地を茹で、冷水にさらした。常温まで冷却し、酵素処理済みのパスタ（本酵素で処理）を得た。また、酵素処理を行わないことを除いて同様の操作をし、別途パスタ（酵素未処理）を得た。酵素未処理のパスタと本酵素で処理したパスタについて、官能検査員２名が茹でた後の生地の手触り感を評価した。

[0202]（結果）

酵素未処理に比べて本酵素を用いることで、茹でた後の生地の手触り感がもっちりとした。

[0203] 例６：Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ　ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素（本酵素２）及びＫｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ　ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素（本酵素３）の調製

１．形質転換体の作製

Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属微生物用は発現ベクターを使用して、目的配列を組み込んだ。ＰＣＲで増幅し、常法を用いて形質転換体（Ｃ．ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来異種発現株、及びＫ．ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来異種発現株）を取得した。取得した形質転換体のシーケンス解析を行い、目的の配列が組み込まれているか確認した。

[0204] ２．Ｃ．ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来異種発現株、Ｋ．ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来異種発現株

取得した形質転換体をトリプトソーヤブイヨン培地（日水製薬株式会社製）にて３２℃、４日間培養を行い、上清を回収した。得られた上清について、常法に従い２０ｍＭ　リン酸緩衝液（ｐＨ６）にて透析を行った。透析後のサンプルは、同緩衝液にて平衡化した陽イオン交換カラム（ＳＰセファロースＦＦ，ＧＥ　ｈｅａｌｔｈ　ｃａｒｅ製）にて、イオン交換クロマトグラフィーを実施した。その後さらにＨｉｓ　ｔａｇ蛋白質精製用カラム（Ｈｉｓ　ｔｒａｐ　ＨＰ，Ｃｙｔｉｖａ製）にて精製することで各酵素サンプルを取得した。

[0205] Ｃ．ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列と、塩基配列を以下に示す。

アミノ酸配列（成熟体配列のみ）（配列番号６）

GLPIAPPLRPGVESKTWKVADYIKAWETYHGRPMTADERENLARGCIGVTVVNLERGDVGNPPLGLSFG
TFGKAREVQAALNEIIKSKPSAAQYAAAVRSHPLLSKLENVQRALPADLNTGELTAAIFSKRFYSKQNP
NWTDEFAEKMYRANARGQVDMNSYRYVARPGYVNFDYGWYDENTRNWWHANHAEPGMKVYQSTFDYYSR
DLLDFDRQVFTVAFAKKV

[0206] アミノ酸配列（全長）*下線部は成熟体配列（配列番号７）

MRNSVLIRTLTTAALGLGLLIPGAAAATAAPAPSTAAAVSIV<u>GLPIAPPLRPGVESKTWKVADYIKAWE
TYHGRPMTADERENLARGCIGVTVVNLERGDVGNPPLGLSFGTFGKAREVQAALNEIIKSKPSAAQYAA
AVRSHPLLSKLENVQRALPADLNTGELTAAIFSKRFYSKQNPNWTDEFAEKMYRANARGQVDMNSYRYV
ARPGYVNFDYGWYDENTRNWWHANHAEPGMKVYQSTFDYYSRDLLDFDRQVFTVAFAKKV</u>

[0207] 塩基配列（成熟体）（配列番号８）

ggcctccccatcgccccccgctgcgcccgggcgtcgagtcgaagacgtggaaggtcgcggactacatc
aaggcgtgggagacgtaccatggccgcccgatgaccgcggacgaacgggagaacctcgcgcggggctgc
atcggggtcaccgtggtcaacctcgagcggggcgacgtggggaatccgccgctcggcctctcgttcggc
acgttcggcaaagcgcgggaggtccaagcggcgctcaacgagatcatcaagtcgaagccgtcggcggcg
cagtacgcggccgcggtccgctcgcacccccctgctctcgaagctcgagaacgtgcagcgggccctcccg
gcggatctcaacacgggcgagctcacggcggcgatcttctcgaagcggttctactcgaagcagaacccg
aactggacggacgagttcgcggagaagatgtaccgggcgaacgcgcggggccaagtcgacatgaactcg
taccggtacgtcgcgcggccgggctacgtcaacttcgactacggctggtacgacgagaacacgcggaac
tggtggcacgcgaatcacgcggagccgggcatgaaggtctatcagtcgacgttcgactactactcgcgg
gatctcctcgacttcgaccggcaagtcttcacggtcgcgttcgcgaagaaggtc

[0208] 塩基配列（全長）（配列番号９）

atgcggaactccgtgctcatccgcacgctgaccaccgccgccctcggcctgggcctcctgatccccggg
gcggcggccgcgacggcggccccggcgccctccaccgcggcggccgtctccattgtcggcctccccatc
gccccccgctgcgcccgggcgtcgagtcgaagacgtggaaggtcgcggactacatcaaggcgtgggag
acgtaccatggccgcccgatgaccgcggacgaacgggagaacctcgcgcggggctgcatcggggtcacc
gtggtcaacctcgagcggggcgacgtggggaatccgccgctcggcctctcgttcggcacgttcggcaaa
gcgcgggaggtccaagcggcgctcaacgagatcatcaagtcgaagccgtcggcggcgcagtacgcggcc
gcggtccgctcgcacccccctgctctcgaagctcgagaacgtgcagcgggccctcccggcggatctcaac
acgggcgagctcacggcggcgatcttctcgaagcggttctactcgaagcagaacccgaactggacggac
gagttcgcggagaagatgtaccgggcgaacgcgcggggccaagtcgacatgaactcgtaccggtacgtc
gcgcggccgggctacgtcaacttcgactacggctggtacgacgagaacacgcggaactggtggcacgcg
aatcacgcggagccgggcatgaaggtctatcagtcgacgttcgactactactcgcgggatctcctcgac
ttcgaccggcaagtcttcacggtcgcgttcgcgaagaaggtc

[0209] Ｋ．ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列と、塩基配列を以下に示す。

アミノ酸配列（成熟体配列のみ）（配列番号１０）

TESDPRSPTPARTATQAPIAEVRPAERSLANANAATATELTPLAPALPPGVSTRTWSVEDFVELFERKY

GRPMTQDERNALARGCIGVTTVNLERGNINPPLGMSFGTFATSRDVQNAINDILATNPSRTQFVAAVAQ
HPLLSRIDNVTDSLPGGPTSQWTAVIFSKRFYSKQDPSWTDEQADQAFRPDPATGQVDMTDYRYRAKPG
YVNFDYGWLDEGSGNWWHANHAEPGMKVYQSTLRHYSRPLLDFDRQVFSVTFGRVHP

[0210] アミノ酸配列（全長）*下線部は成熟体配列（配列番号１１）

MPKRLLRLFVIFVAGLSISTMVAAPALATESDPRSPTPARTATQAPIAEVRPAERSLANANAATATELT
PLAPALPPGVSTRTWSVEDFVELFERKYGRPMTQDERNALARGCIGVTTVNLERGNINPPLGMSFGTFA
TSRDVQNAINDILATNPSRTQFVAAVAQHPLLSRIDNVTDSLPGGPTSQWTAVIFSKRFYSKQDPSWTD
EQADQAFRPDPATGQVDMTDYRYRAKPGYVNFDYGWLDEGSGNWWHANHAEPGMKVYQSTLRHYSRPLL
DFDRQVFSVTFGRVHP

[0211] 塩基配列（成熟体）（配列番号１２）

accgaatccgacccgcggtcccccaccccgcgcgcacggccacgcaagcgccgatcgcggaagtgcgg
ccggcggaacgctcgctggcgaacgccaatgccgccaccgccaccgaactgacccccctcgccccgcc
ctcccccgggggtgtcgacgcggacgtggtcggtcgaggacttcgtcgagctcttcgagcggaagtac
gggcggccgatgacccaagacgaacgcaatgccctcgcgcggggctgcatcggcgtcacgacggtcaac
ctcgagcggggcaacatcaacccgccgctcggcatgtcgttcggcacgttcgcgacgtcgcgggacgtg
cagaacgcgatcaacgacatcctcgcgaccaatccctcccggacccaatttgtggcggccgtggcgcag
cacccgctcctctcgcggatcgacaacgtcacggactcgctcccgggcggcccgacgtcgcagtggacg
gcggtcatcttctcgaagcggttctactcgaagcaagacccgtcgtggacggacgagcaagcggatcaa
gcgttccgccccgatccggcgacgggccaagtcgacatgacggactaccggtaccgggcgaagccgggc
tacgtcaacttcgactacggctggctcgacgagggctcgggcaactggtggcacgcgaaccacgcggag
ccggggatgaaggtgtatcagtcgacgctccggcactactcgcggccgctcctcgacttcgaccggcaa
gtcttctcggtcacgttcggccgggtccacccg

[0212] 塩基配列（全長）（配列番号１３）

atgccgaagcggctcctccggctcttcgtcatcttcgtcgcgggcctctcgatttcgaccatggtggcc
gccccggccctcgcgaccgaatccgacccgcggtcccccaccccccgcgcgcacggccacgcaagcgccg
atcgcggaagtgcggccggcggaacgctcgctggcgaacgccaatgccgccaccgccaccgaactgacc
cccctcgccccgcccctcccccgggggtgtcgacgcggacgtggtcggtcgaggacttcgtcgagctc
ttcgagcggaagtacgggcggccgatgacccaagacgaacgcaatgccctcgcgcggggctgcatcggc

gtcacgacggtcaacctcgagcggggcaacatcaacccgccgctcggcatgtcgttcggcacgttcgcg
acgtcgcgggacgtgcagaacgcgatcaacgacatcctcgcgaccaatccctcccggacccaatttgtg
gcggccgtggcgcagcacccgctcctctcgcggatcgacaacgtcacggactcgctcccgggcggcccg
acgtcgcagtggacggcggtcatcttctcgaagcggttctactcgaagcaagacccgtcgtggacggac
gagcaagcggatcaagcgttccgccccgatccggcgacgggccaagtcgacatgacggactaccggtac
cgggcgaagccgggctacgtcaacttcgactacggctggctcgacgagggctcgggcaactggtggcac
gcgaaccacgcggagccggggatgaaggtgtatcagtcgacgctccggcactactcgcggccgctcctc
gacttcgaccggcaagtcttctcggtcacgttcggccgggtccacccg

[0213] 例７：タンパク質基質に対するタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性の評価

（方法）

５ｍｇのインスリンＢ鎖（インスリンＢ鎖，酸化型 ウシ膵臓由来、Sigma-Aldrich社、配列：Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO3H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO3H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala（配列番号５））を２ｍＬの超純水に溶解させ、基質溶液とした。その後基質溶液２２．５μＬに対し、０．２ｍｇ／ｍＬ　各精製酵素溶液１０μＬと、０．１Ｍ　リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５）２５μＬと、プロテアーゼインヒビター（ProteoGuard EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail(TaKaRa)）０．９μＬを総量５８．４μＬになるように添加し、反応溶液とした。反応溶液をインキュベーター内部で４０℃に加温し、一晩静置の後に１００℃で１０分間加温し反応を停止させた。記載の反応停止液をＨＰＬＣを用いて分析した。インスリンＢ鎖から脱アミド化インスリンＢ鎖へのピーク遷移によって脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を検出した。

〈タンパク質脱アミド活性〉

クロマトグラムより算出されるインスリンＢ鎖および脱アミド化インスリンＢ鎖のピーク面積から脱アミド化インスリンＢ鎖生産量を算出し、脱アミド率（脱アミド化インスリンＢ鎖生産量÷基質インスリンＢ鎖量×１００）

でタンパク質脱アミド活性を評価した。

（トランスグルタミナーゼ活性）

クロマトグラムより算出される各ピーク面積からインスリンＢ鎖残存量と脱アミド化インスリンＢ鎖生産量を算出し、架橋率（（１００－（インスリンＢ鎖残存量÷基質インスリンＢ鎖量×１００）－脱アミド率）で評価した。

上記の方法で算出した脱アミド率と架橋率の比率から、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性の比率を算出した。

[0214] （結果）

結果を下表に示す。

[表53]

	実施例	実施例
	本酵素２ (C. cryophila 由来)	本酵素３ (K. cinnamomea 由来)
タンパク質脱アミド率(%)	４４	２０
トランスグルタミナーゼ活性比率(%)	５６	８０
タンパク質脱アミド活性/トランスグルタミナーゼ活性	０．７８	０．２５

[0215] （考察）

上記表に示す結果において、本発明の本酵素２及び本酵素３は、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有していることが示された。また、本酵素２を例２の方法にならって粘着性を評価した結果、粘着性の増加を確認できた。本酵素２（C. cryophila）、本酵素３（K. cinnamomea）ともに、本酵素（L. tulufanense）と同様の効果が得られると推察される。

[0216] 例８：Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素（本酵素４）の調製

Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａの菌体を、トリプトソーヤブイヨン培地（日水製薬株式会社製）にて２８℃、６日間培養を行い、上清を回収した

。得られた上清を、常法に従い２０ｍＭ　リン酸緩衝液（ｐＨ６）にて透析を行った。透析後のサンプルは、同緩衝液で平衡化した陽イオン交換カラム（ＳＰセファロース　ＦＦ，ＧＥ　ｈｅａｌｔｈ　ｃａｒｅ製）にて、イオン交換クロマトを実施し、活性画分を脱塩濃縮し粗精製酵素サンプルを得た。

[0217]　Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列と、塩基配列を以下に示す。

アミノ酸配列（成熟体配列のみ）（配列番号１４）

APPTSADRSGTPVAGLRVPSSLSAVRGAARFDAVAPEATPLPVGQKTRTWTIARYAAAWRTANGRAMTD
RERDALARGCIGVTTVNIERGNINPPLGLSFGTFEKATAVRDALDAVLAGAAGRTDYAARVGADPLLST
LDNVTESLPAGDPDQWAAVVFSKRFHSGQDSTWTAAETDRAFRPDARGQVDMSAYHYRAKPGYVNFDYG
WYDPATGSWWHANHAEPGMEIYQSTLKYYSRPLLDFDRQVYSVTFARKAAPAWRSSTN

[0218] アミノ酸配列（全長）*下線部は成熟体配列（配列番号１５）

MRNRLLRITMAAVLGVGATVGLAATTGYAAPPTSADRSGTPVAGLRVPSSLSAVRGAARFDAVAPEATP
LPVGQKTRTWTIARYAAAWRTANGRAMTDRERDALARGCIGVTTVNIERGNINPPLGLSFGTFEKATAV
RDALDAVLAGAAGRTDYAARVGADPLLSTLDNVTESLPAGDPDQWAAVVFSKRFHSGQDSTWTAAETDR
AFRPDARGQVDMSAYHYRAKPGYVNFDYGWYDPATGSWWHANHAEPGMEIYQSTLKYYSRPLLDFDRQV
YSVTFARKAAPAWRSSTN

[0219] 塩基配列（成熟体）（配列番号１６）

gccccgccgacgtccgccgaccgctcggggacccccgtggcggggctgcgggtcccgtcgtccctctcc
gccgtgcgcggcgccgcccggtttgacgccgtggcgccggaagccaccccgctcccggtcgggcaaaag
acccgcacgtggacgattgcccgctacgccgcggcctggcggaccgcgaacggccgcgccatgaccgat
cgggagcgcgatgccctcgcccggggctgcatcggcgtcacgacggtcaacatcgagcggggcaacatc
aacccgccgctcggcctctccttcggcacgtttgaaaaagcgaccgcggtccgcgacgcgctggacgcc
gtcctcgccggggccgcgggccgcaccgactacgccgcgcgcgtcggcgcggatccgctcctctccacg
ctcgataatgtcacggaatcgctcccggcgggggacccggatcagtgggcggcggtcgtcttctcgaag
cgctttcattccgggcaagattccacctggaccgccgcggagaccgaccgggcgtttcggcccgatgcg

cgcggccaagtcgacatgtcggcgtaccactaccgggcgaagccgggctacgtcaacttcgactacggc
tggtacgacccggcgacgggctcgtggtggcacgcgaaccacgcggagccgggcatggagatctatcag
tcgacgctcaagtactactcgcggccgctcctcgacttcgaccggcaagtctactcggtcacgttcgcg
cggaaggcggcgccggcgtggcggtcgtcgacgaac

[0220] 塩基配列（全長）（配列番号１７）

atgcggaaccgcctgctccggatcacgatggccgcggtcctgggggtgggcgccaccgtggggctcgcc
gcgaccacgggctatgcggccccgccgacgtccgccgaccgctcggggacccccgtggcggggctgcgg
gtcccgtcgtccctctccgccgtgcgcggcgccgcccggtttgacgccgtggcgccggaagccaccccg
ctcccggtcgggcaaaagacccgcacgtggacgattgcccgctacgccgcggcctggcggaccgcgaac
ggccgcgccatgaccgatcgggagcgcgatgccctcgcccggggctgcatcggcgtcacgacggtcaac
atcgagcggggcaacatcaacccgccgctcggcctctccttcggcacgtttgaaaaagcgaccgcggtc
cgcgacgcgctggacgccgtcctcgccggggccgcgggccgcaccgactacgccgcgcgcgtcggcgcg
gatccgctcctctccacgctcgataatgtcacggaatcgctcccggcgggggacccggatcagtgggcg
gcggtcgtcttctcgaagcgctttcattccgggcaagattccacctggaccgccgcggagaccgaccgg
gcgtttcggcccgatgcgcgcggccaagtcgacatgtcggcgtaccactaccgggcgaagccgggctac
gtcaacttcgactacggctggtacgacccggcgacgggctcgtggtggcacgcgaaccacgcggagccg
ggcatggagatctatcagtcgacgctcaagtactactcgcggccgctcctcgacttcgaccggcaagtc
tactcggtcacgttcgcgcggaaggcggcgccggcgtggcggtcgtcgacgaac

[0221] 例９：タンパク質基質に対するタンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性の評価

（方法）

５ｍｇのインスリンＢ鎖（インスリンＢ鎖，酸化型 ウシ膵臓由来、Sigma-Aldrich 社、配列：Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO3H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO3H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala（配列番号５））を２ｍＬの超純水に溶解させ、基質溶液とした。その後基質溶液９０μＬに対し、１ｍｇ／ｍＬ精製酵素溶液４０μＬと、０．１Ｍ　リン酸二水素カリウム・リン酸水素二ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５）を総量１８０μＬになるように添加し、反応溶液とした。反応溶液

をインキュベーター内部で４０℃に加温し、５時間静置の後に１００℃で１０分間加温し反応を停止させた。反応停止液をＨＰＬＣを用いて分析した。インスリンＢ鎖から脱アミド化インスリンＢ鎖へのピーク遷移によって脱アミド活性及びトランスグルタミナーゼ活性を検出した。

[0222]（結果）

ＨＰＬＣを用いた分析の結果、本酵素４を用いた場合、脱アミド反応に基づくピークが確認された。また、本酵素４は、トランスグルタミナーゼ活性を有していることも推定された。

産業上の利用可能性

[0223] 本発明の酵素剤は、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を有効成分とする。従って、食品や医療用途の分野での使用に適し、産業上の利用価値は高い。

[0224] 本発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

[請求項2] 前記酵素がLongimycelium属由来である、請求項１に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

[請求項3] 請求項１又は２に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド及び架橋方法。

[請求項4] 請求項１又は２に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド及び架橋方法。

[請求項5] 請求項１又は２に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

[請求項6] 請求項１又は２に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤で処理された飲食品。

[請求項7] Longimycelium属細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法。

[請求項8] 配列番号６のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

[請求項9] 前記酵素がCrossiella属由来である、請求項８に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

[請求項10] 請求項８又は９に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵

素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド及び架橋方法。

[請求項11] 請求項８又は９に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド及び架橋方法。

[請求項12] 請求項８又は９に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

[請求項13] 請求項８又は９に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤で処理された飲食品。

[請求項14] Crossiella属細菌を培養する工程を含む、配列番号６のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法。

[請求項15] 配列番号１０のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、タンパク質脱アミド活性とトランスグルタミナーゼ活性を有する酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

[請求項16] 前記酵素がKrasilnikovia属由来である、請求項１５に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤。

[請求項17] 請求項１５又は１６に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド及び架橋方法。

[請求項18] 請求項１５又は１６に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド及び架橋方法。

[請求項19] 請求項１５又は１６に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

[請求項20] 請求項１５又は１６に記載のタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋用酵素剤で処理された飲食品。

[請求項21] Krasilnikovia属細菌を培養する工程を含む、配列番号１０のアミノ酸配列と６５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド及びタンパク質架橋酵素の製造方法。