

## 大豆たん白質－油－水系ゲルを用いた新規発酵食品の熟成機構の解析

メタデータ	<p>言語: Japanese</p> <p>出版者: 安田正昭</p> <p>公開日: 2010-03-01</p> <p>キーワード (Ja): 大豆たん白質, 大豆たん白ゲル, 大豆発酵食品, 大豆チーズ, とうふよう, 熟成, 紅麹菌, Monascus属カビ</p> <p>キーワード (En): Monascus, Soybean protein, Soybean protein gel, Fermented soybean food, Soybean cheese, Tofuyo, Ripening</p> <p>作成者: 安田, 正昭, 屋, 宏典, 和田, 浩二, Yasuda, Masaaki, Oku, Hirosuke, Wada, Koji</p> <p>メールアドレス:</p> <p>所属:</p>
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/16007">http://hdl.handle.net/20.500.12000/16007</a>

大豆たん白質－油－水系ゲルを用いた新規発酵食品の熟成機構の解析

課題番号 04660148

平成4～5年度科学研究費補助金（一般研究〔C〕）研究成果報告書

平成6年3月

琉球大学附属図書館



0020034019661

代表者 安 田 正 昭

（琉球大学農学部）教授

## は し が き

大豆は良質のたん白質や脂肪を含み、栄養的に優れていることから、中国、日本、その他のアジア地域で古くから豆腐及びその関連製品、味噌、醤油、納豆、テンペなどの伝統食品に利用されてきた。今日では、大豆は、これらの伝統的な利用法以外にも、大豆たん白質の有するゲル形成性、保水性、起泡性、脂肪分散性などの機能特性が注目され、組立食品を始めとする数多くの食品製造に利用されている。

近年、食生活の洋風化に伴い、肉食化が進行し、食肉のたん白質に伴う脂肪が健康に悪影響を与えつつある。すなわち、脂肪はたん白質や糖質に比べて単位あたりのカロリーが高いばかりでなく、特に、動物性の脂肪はコレステロールを多く含み、かつ飽和脂肪酸で構成されているカロリー過剰摂取による肥満、高血圧、動脈硬化、心臓病などの成人病を引き起こし、社会問題化しつつある。このような背景から、コレステロールフリーの食品開発が必要とされ、植物たん白や植物油などを用いた組立食品の製造が種々試みられている。しかしながら、微生物の機能を利用した植物たん白の組立食品に関する知見は少ない。その中でも大豆たん白を主体としたチーズ様食品の開発も検討されているが、未だ実用に耐え得るものには至っていないようである。

植物性チーズ（vegetable cheese）に相当する伝統食品に“豆腐よう”がある。豆腐ようは、麴と泡盛を含むもろみに乾燥処理を施した木綿豆腐を漬け込んで熟成させた沖縄独特の発酵食品である。このものは、塩あじが薄く、ソフトチーズの食感を呈するユニークな嗜好食品として今後発展する可能性を大きく秘めている。しかしながら、豆腐ようは門外不出の秘伝として特定の家庭で細々と継承されてきたために、一般的な食品として普及されておらず、その食品製造に関する科学的な知見もほとんど得られていなかった。本研究代表者は、豆腐よう製造の振興を図るために、原料の調製法、仕込、熟成条件等の検討を行い、その技術的特徴を科学的に明らかにしてきた。

伝統的な豆腐よう製造では、原料に用いる豆腐の製造法が煩雑で、しかも均質な製品が得られ難いという欠点を有しており、新しい製造技術の確立が必要とさ

れている。本研究代表者らは、この欠点をクリアーするために大豆たん白質の有するゲル化能に着目し、豆腐の代わりに、大豆たん白質－食用油－水系ゲルを用いた新しい発酵食品を作り出すことに思い至った。本研究の特色は、沖縄の豆腐ようを出発点として、大豆たん白を用い、組立法と発酵法による新しい技術展開を図ろうとするところにある。

このような研究の背景から、本研究では、大豆たん白質のゲルを用いた「豆腐よう」類似の新しい発酵食品の熟成機構を食品化学、食品工学及び微生物生化学的に総合的に解析を試みたのである。

#### 研 究 組 織

研究代表者：安 田 正 昭 （琉球大学農学部）

研究分担者：屋 宏 典 （琉球大学農学部）

研究分担者：和 田 浩 二 （琉球大学農学部）

#### 研 究 経 費

平成4年度 1, 6 0 0 千円

平成5年度 5 0 0 千円

計 2, 1 0 0 千円



## 研 究 発 表

### 学会発表等

① 安田正昭，坂口真樹

紅麴菌プロテアーゼによる大豆タンパク質分解様式の検討  
日本食品工業学会第40回大会，西宮（平成5年3月）

② 安田正昭，上唐由紀子，池原加代子，仲地健次，石川達

とうふようの製造に用いられる微生物：紅麴菌におけるカルボキシ  
ペプチダーゼの検索と二・三の酵素化学的性質  
日本食品工業学会第41回大会，東京（平成6年3月）

③ 安田正昭，森川誠司，白木晋平

大豆タンパクを用いた発酵食品に関する研究：熟成過程におけるタ  
ンパク質及び窒素成分の変化  
第48回日本栄養・食糧学会総会，福岡（平成6年5月）

## 目 次

はしがき

研究の成果 .....	5
研究の概要 .....	5
安田 正昭 （琉球大学農学部）	
大豆たん白質－油－水系ゲルを用いた発酵食品の熟成過程における たん白質及び窒素成分の変化 .....	7
屋 宏典 （琉球大学農学部）	
安田 正昭 （琉球大学農学部）	
大豆たん白質－油－水系ゲルを用いた発酵食品の熟成過程における 物性変化 .....	17
和田 浩二 （琉球大学農学部）	
安田 正昭 （琉球大学農学部）	
紅麴菌プロテイナーゼによる大豆たん白質の分解 .....	29
安田 正昭 （琉球大学農学部）	

## 研 究 の 成 果

### 研 究 の 概 要

大豆たん白質、大豆油、水などを主成分とした身近なゲル状食品に豆腐がある。豆腐に麴菌を作用させた“豆腐よう”はチーズ様風味を有する、沖縄独特の発酵食品である。本研究代表者は、これまで、秘伝として細々と継承されてきた豆腐よう製造技法の特徴を科学的に解明した。また、豆腐ようの製造原理を基に、分離大豆たん白、食用油及び水から形成したゲルに微生物（紅麴菌、*Monascus*属菌）を作用させると豆腐よう類似の新しい発酵食品が得られることを見出し、その製造条件を検討してきた。

本研究は大豆たん白による新しい発酵食品の熟成機構を明らかにすることを目的とし、以下の成果を得た。

本発酵食品の熟成機構を明らかにするために、先ず、紅麴菌を用いた製品の熟成過程におけるたん白質及び窒素成分の変化について調べた。本発酵食品のたん白質量は熟成時間の経過に伴い減少し、大豆たん白質が分解を受けていることが明らかとなった。そこで、熟成過程におけるたん白質の分解についてSDSスラブポリアクリルアミド電気泳動法（SDS-PAGE）により詳しく調べた。大豆たん白質の水不溶性試料に現れる熟成0日目におけるバンドは $\beta$ コングリシニンの $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニット、グリシニンの酸性及び塩基性サブユニットに対応するものが主成分をなしていた。熟成60日目においては、 $\beta$ コングリシニンの $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットならびにグリシニンの酸性サブユニットに対応するバンドが消失した。一方、塩基性サブユニットや分子量が30KDa、12KDa付近に位置するバンドが存在した。本発酵食品のたん白質水溶化率（水溶性窒素量の総窒素量に対する割合）は熟成時間の経過に伴い増大し、熟成60日目では52.4%の値を示した。また、非たん白態窒素量の指標される、トリクロロ酢酸（TCA）可溶性窒素量の総窒素量に対する比率は熟成時間の経過に伴い増大し、熟成60日目では46.6%の値を示した。

次に、熟成過程における本発酵食品の物性変化について調べた。テクスチャー

試験（硬さ、凝集性、破断強度等）を行ったところ、これらの数値はいずれも熟成時間の経過に伴い減少した。製品の硬さや凝集性が熟成時間の経過に伴い減少した原因として、大豆たん白質がもろみ中のプロテアーゼにより分解を受けたことによるものと考えられる。熟成過程における製品のクリープ解析を行ったところ、熟成0日目では、変形の主成分はフックの弾性変形であり、ニュートンの粘性はわずかであった。しかし、熟成時間の経過に伴い、全変形に占める弾性変形の割合は減少し、逆に、フォークト体の粘弾性変形の割合が増大した。

紅麹菌のプロテイナーゼは本発酵食品の熟成で鍵酵素としての役割を果たしているものと考えられる。そこで、本酵素の大豆たん白質の分解様式について検討した。まず、紅麹菌を蒸米に固体培養をして得られる紅麹から本酵素を抽出し、各種のカラムクロマトグラフィーを行い、電気泳動的に均一な酵素標品を得た。本精製酵素を用いて各種の研究を行った。本酵素活性に及ぼすエチルアルコール濃度の影響を調べたところ、酵素活性はエチルアルコール濃度が高くなるに従い減少した。本酵素による大豆たん白質加水分解に及ぼすエチルアルコール濃度の影響について調べたところ、T C A可溶性窒素量はエチルアルコール濃度が低いほど増大したが、T C A不溶性窒素量は逆に、エチルアルコール濃度が低い程減少した。本酵素による大豆たん白質の分解についてS D S - P A G E法により調べた。本酵素による大豆たん白質の分解は先ず、 $\beta$ コングリシニンの $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットが、続いてグリシニンの酸性サブユニットが分解を受けるが、グリシニンの塩基性サブユニットは分解を受けずにそのまま残存すること及び酵素反応液中に10 K D a前後に分子量を有するポリペプチドを生成することがわかった。本酵素による大豆たん白質の分解速度は反応系にエチルアルコールを添加することにより抑制された。以上の結果は、本発酵食品の熟成過程におけるS D S - P A G Eの場合とよく一致した。

# 大豆たん白質－油－水系ゲルを用いた発酵食品の 熟成過程におけるたん白質及び窒素成分の変化

琉球大学農学部

屋 宏典、安田 正昭

## 1. はじめに

大豆は栄養的に優れていることから、中国、日本その他のアジア地域で古くから豆腐及びその関連製品、味噌、醤油、納豆、テンペなどの伝統食品に利用されてきた。

今日では、大豆は、これらの伝統的な利用法以外に、大豆たん白質の有するゲル形成性、保水性、起泡性、脂肪分散性などの機能特性が注目され、組立食品を始めとする数多くの食品製造に利用されている。しかし微生物を利用したそれに関する知見は少ない。その中でも、大豆たん白質を主体としたチーズ様食品の開発も検討されているが、未だ実用化には至っていないようである。

著者らは、大豆たん白質のゲル形成性に着目し、分離大豆たん白、食用油及び水などから形成したゲルに微生物を作用させると豆腐よう<sup>1,2)</sup>類似の新しい発酵食品が得られることを見出した。本研究は大豆たん白質のゲルを用いた新しいたん白質発酵食品の熟成機構を食品化学的に明らかにすることを目的とし、本報告では、熟成過程における各種の成分変化等について検討した。

## 2. 実験方法

### (1) 大豆たん白ゲルの調製

大豆たん白ゲルの調製は次のとおり行った。分離大豆たん白 54.3 g、植物油 37.2 g、蒸留水 208.5 g、硫酸カルシウム 2.0 g をよく混練し、脱気した。この混練物を塩化ビニリデン製のチューブにケーシングしたのち 80℃ で 60 min 加熱した。得られたゲルは流水で冷却し、さらに 4℃ で 12 hr 放置した。

### (2) 紅麴の製麴

紅麴菌 (*Monascus* sp. No. 3403) を蒸米に生育させた米麴の調製は既報<sup>3)</sup>の方

法に従って行った。

### (3) 豆腐よう類似発酵食品の調製

豆腐よう類似発酵食品の調製は既報<sup>4)</sup>の方法に従い、紅麴によるもろみに乾燥豆腐の代わりに上記で得た大豆たん白質のゲルを漬け込み、30℃で60日間熟成させることにより行った。なお今回使用した泡盛はアルコール濃度が30%のものであった。

### (4) 分析試料の調製

成分分析に供する試料の調製は製品ともろみとに分離し、各々凍結乾燥を行ったのち粉碎、篩別(20/30メッシュ)することにより行った。なお、pH及びプロテアーゼ活性の測定に用いる試料(もろみ)は凍結乾燥を行う前のものとした。

### (5) 試料の分析

#### (i) もろみのpH

水素イオン濃度は試料10g水20mlを加えてよく攪拌、濾過した濾液のpHをpHメーター(堀場pHメーター、F-8)で測定することにより求めた。

#### (ii) もろみ中のプロテアーゼ活性

酵素液の調製は、もろみ10gに0.01Mクエン酸-0.02Mリン酸塩緩衝液(pH5.0)10mlを加えて室温(25℃)で60min抽出を行った。抽出後の濾液または遠心分離後の上澄液を同上緩衝液にて一夜透析したものを酵素液として用いた。プロテアーゼ活性の測定は既報<sup>5)</sup>の方法に従った。

#### (iii) 窒素分析

##### ① 総窒素

試料中の総窒素量の測定は『食品分析法』<sup>6)</sup>に準じ、セミマイクロケルダール法により行った。

##### ② 純たん白態窒素

純たん白態窒素量の測定は『改訂食品分析ハンドブック』<sup>7)</sup>に準じて行い、トリクロル酢酸(TCA)沈澱区分の窒素量を総窒素と同様の方法により測定した。

##### ③ 水溶性窒素

水溶性窒素量の測定に用いる浸出液は『基準味噌分析法』<sup>8)</sup>に準じて調製した。浸出液の一部をとりセミマイクロケルダール法により水溶性窒素量を測定した。

#### ④ T C A 可溶性窒素

4 % T C A 可溶性窒素量の測定は松岡ら<sup>9, 10)</sup>の方法に準じ、既報<sup>4)</sup>に従った。上述の水溶性窒素試料を T C A で処理し、濾液の一部をとり、水溶性窒素と同様の方法により窒素量を測定した。

#### ⑤ アミノ態窒素

アミノ態窒素量の測定は『基準味噌分析法』<sup>8)</sup>に準じて行った。

#### ( 6 ) S D S ポリアクリルアミド電気泳動

電気泳動に用いる試料の調製は、既報<sup>4)</sup>の方法に従い、試料の各熟成時間 ( 0、1、5、10、15、30、60 日間 ) における水不溶性画分を S D S、2-メルカプトエタノール存在下、100℃で3分間加熱した。スラブ電気泳動は Laemmli の方法に準じて行った。標準たん白質はオリエンタル酵母社製分子量キット ( ウマ心筋チトクローム ) を用い、大豆たん白質  $\beta$ -コングリシニン及びグリシニンの調製は Kitamura ら<sup>12)</sup>の方法を参考にし、Con A Sepharose 及び Sephadex G-200 のカラムクロマトグラフィによりそれぞれ精製した。

### 3. 結果及び考察

#### ( 1 ) 熟成過程におけるもろみ中の p H 及び酵素活性の変化

本発酵食品の熟成環境を知るために熟成過程におけるもろみの p H を調べ、その結果を Fig. 1 に示した。もろみの p H は熟成 0 日目で 5.9 であったが熟成 60 日目で 5.5 に低下し、製品の熟成が p H 6.0 ~ 5.5 付近の微酸性のもろみ中で行われていることがわかった。製品の熟成に最も重要な役割を演じているプロテイナーゼ活性の変化を調べ、その結果を Fig. 2 に示した。もろみのプロテイナーゼ活性は熟成 15 日までに急激に低下 ( 残存活性: 37 % ) したが、それ以降 60 日までほぼ同様の値を示した。本酵素活性はもろみ中の泡盛に由来するエチルアルコール濃度の影響を受けて抑制される<sup>3)</sup>が、それがために大豆たん白質の分解も抑制される。その結果として製品の好ましい物性が形成されたものと思われる。

#### ( 2 ) 熟成過程における大豆たん白質の変化

本発酵食品の熟成過程におけるたん白質の変化を調べ、その結果を Fig. 3 に示した。熟成 0 日目 ( たん白質ゲル ) における純たん白質量は 47.2 % の値を示

したが、熟成15日目で27.6%に低下した。それ以降熟成60日目まで低下し大豆たん白質が熟成時間の経過に伴い分解を受けていることが明らかとなった。

そこで、熟成過程における大豆たん白質分解の様子をSDS-PAGEにより観察した。熟成過程における水不溶性試料の電気泳動パターンをFig.4に示した。大豆たん白質ゲルの水不溶性試料に現れるバンドは $\beta$ -コングリシニンの $\alpha'$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニット、グリシニンの酸性及び塩基性サブユニットが主成分をなしており、それ以外にも61, 54, 39, 27.5, 22.8, 16.5 KDaの位置に明確なバンドが、12.5 KDa付近の位置では薄いバンドが見られた。熟成1日目で、分子量が43.5 KDaの位置にバンドが新たに出現した。熟成15日目では、分子量が12.5 KDa付近に位置するバンドの濃度が増大した。熟成60日目においては、 $\beta$ -コングリシニンの $\alpha'$ 、 $\alpha$ 、及び $\beta$ サブユニット、ならびにグリシニンの酸性サブユニットは消失したものの、グリシニンの塩基性サブユニットは残存した。その時、分子量30, 13.5 KDaに位置するバンドのほか、10 KDa前後の比較的低分子量のバンドもブロードに存在することがわかった。従って、紅麹菌を用いて大豆たん白質のゲルより調製した発酵食品のボディーを構成している主要成分は、グリシニンの塩基性サブユニット及び分子量10~12 KDa前後のポリペプチドで、それ以外にも30KDa付近に分子量を有するものの存在が明らかとなった。なお、大豆乳から調製したチーズ様食品<sup>9)</sup>や豆腐よう<sup>4)</sup>においてもグリシニンの塩基性サブユニットの存在が確認されている。

以上のことから、本発酵食品の熟成はもろみ中のプロティナーゼの作用で大豆たん白質が限定分解を受けることにより行われることが明らかとなった。

### (3) 熟成過程における窒素成分の変化

水溶性窒素量の総窒素量に対する比率で表される数値は味噌やチーズの熟成を知る上で重要な指標とされ、たん白質の水溶化率または熟成率とも呼ばれている。熟成過程における本発酵食品の熟成率の経時的变化について調べ、その結果をFig.5に示した。熟成率は熟成時間の変化に伴い増大した。熟成60日目における試料の熟成率は52.4%を示した。一般に、大豆発酵食品の熟成率は白味噌<sup>13)</sup>で39%、赤味噌<sup>13)</sup>で61%、豆味噌<sup>13)</sup>で66%、納豆<sup>14)</sup>で55%であることが知られている。また、熟成3カ月目における豆腐よう<sup>4)</sup>の熟成率は36.3%、熟成3週間目における丸大豆利用チーズ様食品<sup>10)</sup>の熟成率は約60%、テン



ペ<sup>15)</sup>では19%と報告されている。本発酵食品の熟成率は豆腐ようや白味噌のそれより高く納豆のそれに類似した値を示した。

4% T C A可溶性窒素量の総窒素量に対する比率で表される数値は非たん白態窒素量の指標として重要である。そこで、本発酵食品についてその経時的変化を調べた (Fig. 6)。この数値は熟成時間の経過に伴い増大した。熟成60日目における本試料のT C A可溶性窒素量の総窒素量に対する比率は46.6%を示し、豆腐よう<sup>4)</sup>のそれ(35.0%)に比べて高い値を示した。T C A可溶性窒素量の水溶性窒素量に対する比率は、熟成60日目で88.9%の値を示し、水溶性窒素成分中、ペプチドやアミノ酸などが約90%生成されたものと考えられる。

図には示さなかったが、本発酵食品の熟成過程におけるアミノ態窒素量の水溶性窒素量に対する比率の変化を調べたところ、熟成時間の経過に伴い増大した。熟成60日目では、約30%の値を示した。熟成60日目における本試料の遊離アミノ酸について調べたところ、グルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシン、アラニン、セリンなどの順で多く含有していた。特に、グルタミン酸、アスパラギン酸の含有量が高いことは、本発酵食品の呈味性を特徴づける大きな要因と思われる。

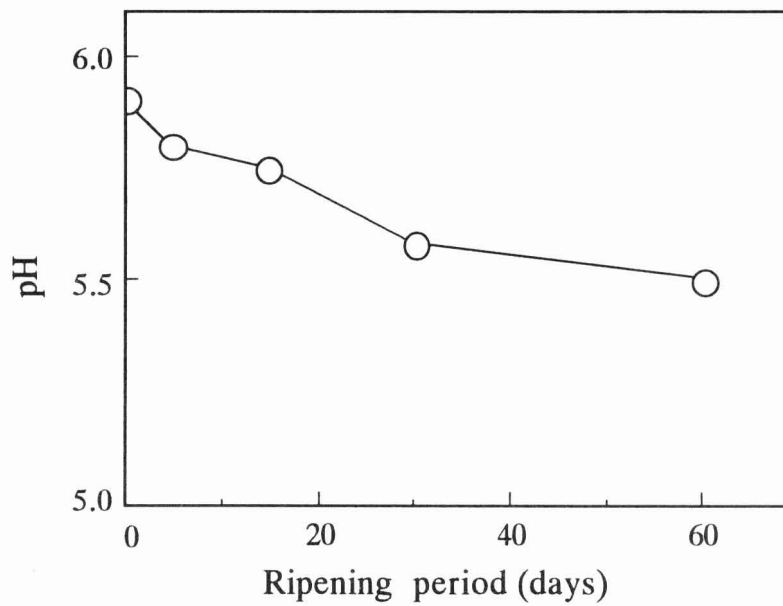


Fig. 1 Changes in pH in the soak during a ripening period

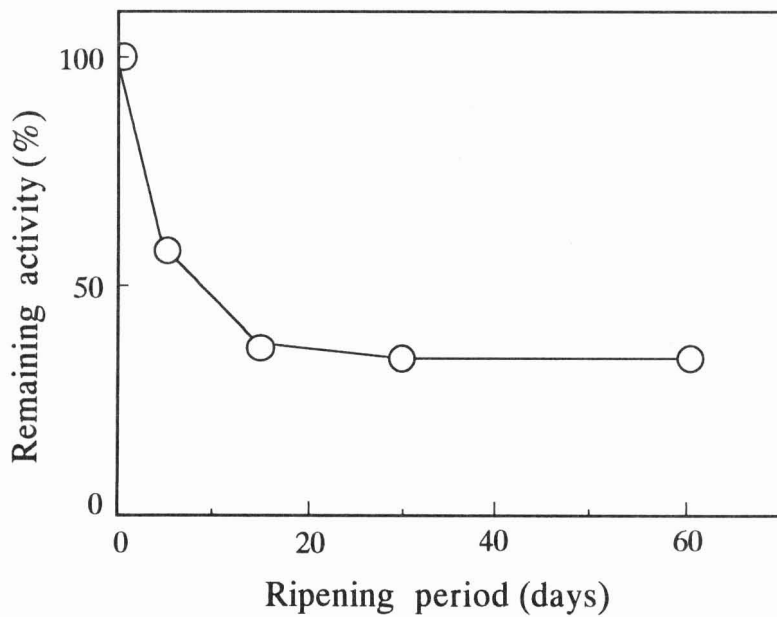


Fig. 2 Changes in proteinase activity in the soak during a ripening period

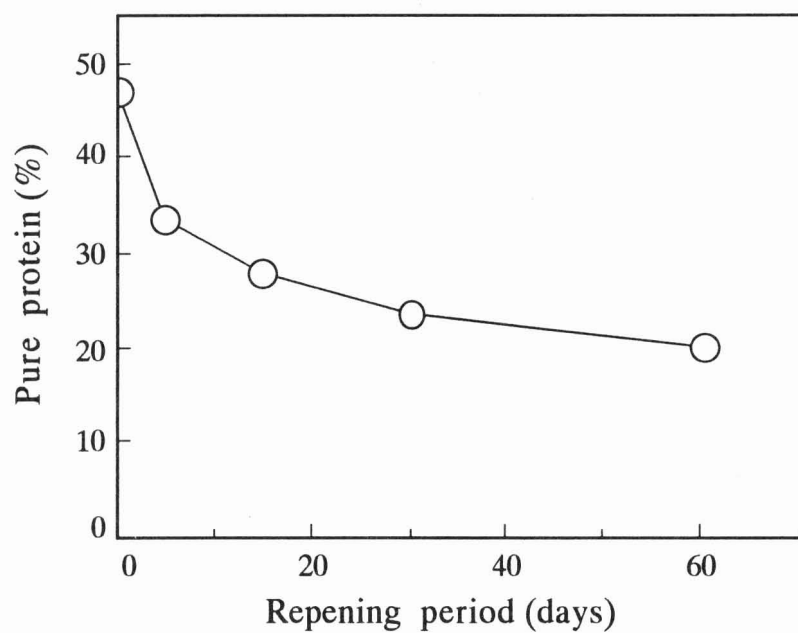


Fig. 3 Changes in pure protein content of the fermented soybean protein-gel-food during a ripening period

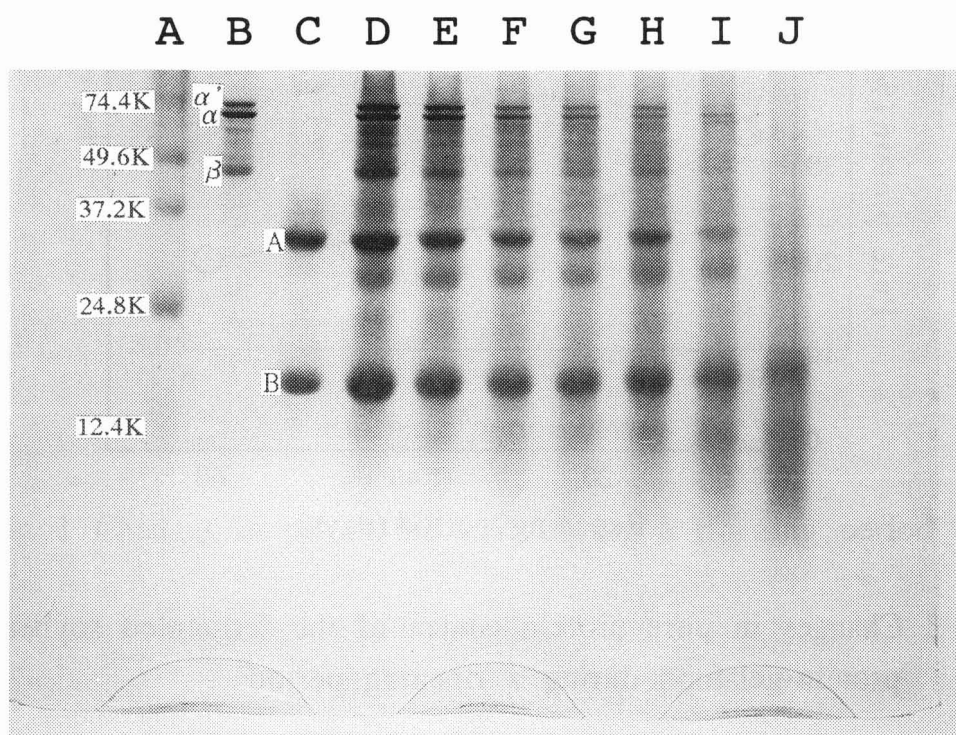


Fig. 4 Slab SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of water-insoluble fraction of the fermented soybean protein-gel-food at various ripening stages

Molecular weights were estimated by mobilities of cytochrome c for horse heart and cross-linked cytochrome c (cytochrome c monomer, dimer, trimer and hexamer). A: Standard proteins described above, B:  $\beta$ -Conglycinin, C: Glycinin, D: Soybean protein gel, E: 1-day, F: 5-day, G: 10-day, H: 15-day, I: 30-day, J: 60-day. Numerous values in the lane A showed each molecular weight.  $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ :  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ -subunits in  $\beta$ -conglycinin; A, B: Acidic and basic subunits in glycinin.

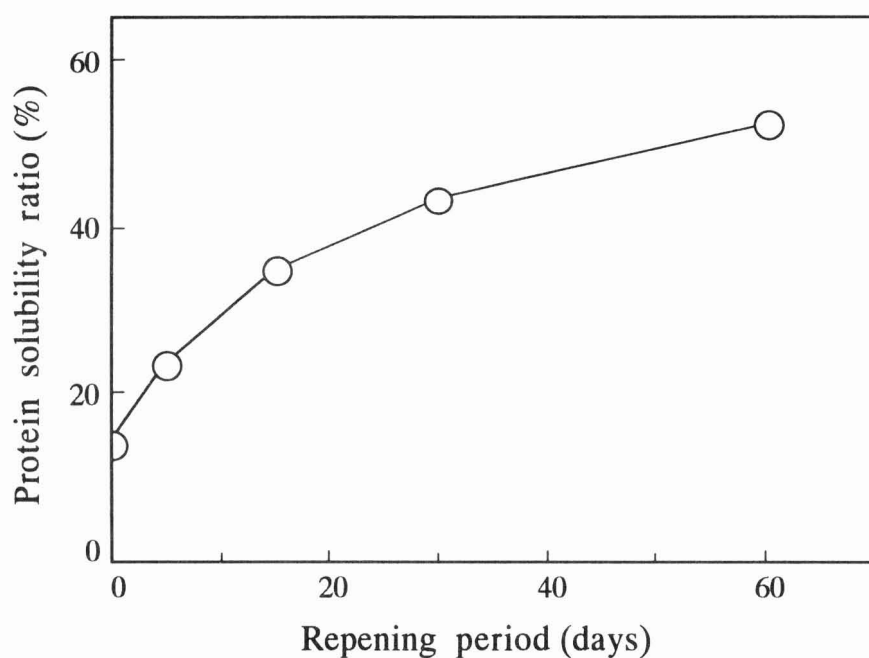


Fig. 5 Changes in protein solubility ratio of the fermented soybean protein-gel-food during a ripening period

Protein solubility ratio was expressed with a water soluble nitrogen content per the total nitrogen content. These nitrogen contents were shown as oven dried basis.

## 文 献

- 1) 安田正昭: 化学と生物, 23, 629 (1985)
- 2) 安田正昭: 日食工誌, 37, 403 (1990)
- 3) 安田正昭・上地玄作・宮里興信: 日食工誌, 30, 75 (1983)
- 4) 安田正昭・松本哲也・坂口真樹・小波本直忠: 日食工誌, 40, 331 (1993)
- 5) YASUDA, M., SOEISHI, K. and MIYAHIRA, M.: Agric. Biol. Chem., 48, 1637 (1984)
- 6) 食品分析法編集委員会・日本食品工業学会編: 食品分析法(光琳, 東京), p. 102 (1982)
- 7) 林淳三・印南敏・菅原龍幸: 改訂食品分析ハンドブック(建帛社, 東京), p. 42 (1982)
- 8) 改訂味噌基準分析法委員会: 基準味噌分析法(全国味噌技術会, 東京), p. 7, 29 (1968)
- 9) 福家洋子・松岡博厚: 日食工誌, 34, 826 (1987)
- 10) 松岡博厚・福家洋子: 日食工誌, 35, 166 (1988)
- 11) LAEMMLI, U. K.: Nature, 227, 680 (1970)
- 12) KITAMURA, K., OKUBO, K. and SHIBASAKI, K.: Agric. Biol. Chem., 38, 1083 (1974)
- 13) 日本醸造協会編: 新版醸造成分一覽((財)日本醸造協会, 東京), p. 337 (1977)
- 14) 太田輝男・海老根英雄・中野政弘・稗田治清・佐々木博国: 食糧研究所報告, 18, 46 (1964)
- 15) 松本伊左男・今井誠一: 日食工誌, 37, 130 (1990)

# 大豆たん白質－油－水系ゲルを用いた発酵食品の 熟成過程における物性変化

琉球大学農学部

和田 浩二，安田 正昭

## 1. はじめに

近年、食生活が豊になるにつれ、成人病対策が重要な課題となり、コレステロールフリー食品の開発が必要とされ、植物たん白を用いた組立食品の製造が種々試みられている。しかし、微生物の機能を利用した植物たん白組立食品に関する知見は少ない。その中でも大豆たん白を主体としたチーズ様食品の開発も検討されているが、未だ実用に耐え得るものには至っていないようである。

著者らは、大豆たん白質のゲル形成性に着目し、分離大豆たん白、食用油及び水などから形成したゲルに微生物を作用させると、ソフトチーズの食感を呈した豆腐よう<sup>1,2)</sup>類似の新しい発酵食品が得られることを見出した。本研究の目的は大豆たん白質のゲルを用いた新しい発酵食品の熟成機構を解明することであり、前章で、熟成過程における製品のたん白質及び窒素成分の変化等について調べた。本発酵食品の熟成機構を解明するためには、製品の化学成分の変化以外にも物理的性質の変化についても調べる必要がある。そこで、本報告においては、熟成過程における製品の物性変化について検討した。

## 2. 実験方法

### (1) 豆腐よう類似発酵食品の製造

#### ① 大豆たん白ゲルの調製

大豆たん白ゲルの調製は前章で述べた方法に従って行った。

#### ② 紅麴の製麴

紅麴菌 (*Monascus* sp. No.3403) を蒸米に生育させた米麴の調製は既報<sup>3)</sup>の方法に従って行った。

#### ③ 黄麴の製麴

黄麴 (*Aspergillus oryzae*) を蒸米に生育させた米麴の調製は既報<sup>4)</sup>の方法に

従って行った。

#### ④ 豆腐よう類似発酵食品の調製

豆腐よう類似発酵食品の調製は前章の方法に従い、紅麴、黄麴および両者の混合麴による諸味に①で得た大豆たん白ゲルを漬け込み、30℃で60日間熟成させることにより行った。

#### (2) 製品の物性測定

##### ① テクスチャー試験

テクスチャー測定は、試料台の上下運動により、試料の変形による応力のテクスチャー曲線を求め、製品の官能的な評価を解析する方法である。

各期間熟成させた試料（試料の形状：φ20×20mm、熟成期間：0，5，15，30，60日）5個ずつの物性値をレオナー（山電（株）製、RE-3305）で測定し、その平均値で表した。硬さ、凝集性、付着性、ガム性、もろさの測定条件は下記の通りである。

プランジャーの材質：ポリアセタール樹脂、プランジャーの形：直径40mmの円板状、圧縮率：10%、荷重回数：2回、試料台速度：1mm/sec、チャートスピード：240mm/min、感度電圧1Vで、得られたテクスチャー曲線から、各パラメータの値を常法により求めた。

##### ② 破断強度

各熟成期間の試料（試料の形状：φ20×20mm、熟成期間：0，5，15，30，60日）5個ずつの破断強度をレオナー（山電（株）製、RE-3305）で測定し、その平均値で表した。

破断強度の測定条件は次の通りである。プランジャーの形：直径5mmの円筒形、クリアランス：5mm、試料台速度：1mm/sec、なお、プランジャーの材質、チャートスピードについては、テクスチャー試験（硬さ、凝集性、付着性、ガム性等）の場合と同様である。得られた破断曲線から、破断した時の荷重量（F）を読み取り、下記の式より破断強度を求めた。

$$\text{破断強度 (dyne/cm}^2\text{)} = F \times 980 / S$$

但し、Sはプランジャーの断面積（cm<sup>2</sup>）、980は重力の加速度である。

##### ③ クリープ測定

クリープ測定は、試料を一定荷重で圧縮変形させ、一定時間後に除去した時の



変形量をチャート紙に記録させ、解析する方法である。

各熟成期間の試料（試料の形状： $\phi 20 \times 20$  mm、熟成期間：0，5，15，30，60日）5個ずつの物性値を20℃で、レオナー（山電（株）製、RE-3305）で測定し、その平均値で表した。

プランジャーの形：直径40 mmの円板状、荷重：300 g、試料台上昇速度：5 mm/sec、荷重時間：5 min、チャートスピード：20 mm/min、感度電圧：0.4 Vで、得られたクリープ曲線および除重後のクリープ回復曲線を1個の弾性模型、2個のフォークト体模型および1個の粘性模型とを直列に連結した6要素模型で解析した。

### 3. 実験結果および考察

#### （1）テクスチャー試験

最終製品の試料がソフトゲルであることから、破断強度を起こさない程度でテクスチャー試験を行った。

##### ① 熟成過程における製品の硬さの変化

硬さは本発酵食品を口の中に入れたとき、舌と上顎の間で押しつぶすのに必要な力の度合を表したものである。熟成過程における本発酵食品の硬さの変化を調べ、その結果をFig. 1に示した。製品の硬さは熟成5日目まで増大し、5日目以降では低下し、熟成30～60日目ではほぼ一定の値を示した。熟成60日目における製品の硬さは紅麴の製品で555 g、混合麴で368 g、黄麴で343 gであった。混合麴による製品は、紅麴と黄麴による製品の中間に位置していた。

##### ② 熟成過程における製品の凝集性の変化

凝集性は、本発酵食品の形態を形成している内部結合の強さを表した数値で示される。熟成過程における製品の凝集性の変化を調べ、その結果をFig.2に示した。製品の凝集性は紅麴、混合麴、黄麴 区のいずれの場合もほぼ同様の傾向で変化し、その値はそれぞれ熟成の進行に伴い低下した。この現象は前章で述べた熟成過程における製品の純たん白質の分解パターンとよく一致していた。従って、大豆たん白質は麴に由来するもろみ中のプロテアーゼの作用により、分解を受け、特にS-S結合が切断されることにより、この数値が低下したものと推定される。熟成60日めにおける製品の凝集性は紅麴の製品で0.84、混合麴で0.78、

黄麴で0.77であり、いずれも0.8前後の値を示した。

### ③ 熟成過程における製品のもろさの変化

もろさは、本発酵食品を口に入れ、舌と上顎で押しつぶし、その崩れ易さの度合いを表したものである。熟成過程における製品のもろさの変化を調べ、その結果をFig.3に示した。紅麴、混合麴、黄麴による製品のもろさの変化は、熟成初期には、硬さの変化の場合とよく似た傾向を示し、熟成後期では、凝集性の場合と同様の変化を示した。

### ④ 熟成過程における製品の付着性の変化

付着性は本発酵食品の表面と口の中で、舌、歯、唇などの表面に付着した状態を引き離すのに必要な力を表される数値である。熟成過程における製品の付着性の変化を調べ、その結果をFig.4に示した。紅麴、混合麴、黄麴いずれの区においても熟成15日目まで増大し、それ以降は低下した。各製品の付着性は紅麴、混合麴、黄麴間で顕著な差異は見られなかった。

### ⑤ 熟成過程における製品のガム性の変化

ガム性は本発酵食品が飲み込める状態にまで崩壊させるのに必要な力で、硬さと凝集性との積で表される数値である。熟成過程における製品のガム性の変化を調べ、その結果をFig.5に示した。製品のガム性の変化は5日目まで増大し、5日目以降では低下した。熟成60日目における製品のガム性は紅麴、混合麴、黄麴の順であった。

## (2) 破断強度

食品にある力を加えて変形を続けると、ついには破壊する現象が見られ、これを破断といい、破断を引き起こすのに必要な力を破断強度と呼んでいる。熟成過程における製品の破断強度の変化を調べ、その結果をFig.6に示した。製品の破断強度は硬さの場合とほぼ同様の変化(Fig.1)を示し、熟成5日目に増大したが、それ以降は熟成の進行に伴い低下した。なお、図には示されていないが、製品の断面積は熟成5日目に減少し、それ以降は若干回復する傾向が見られた。また、製品の水分含量も熟成5日目で減少した。これらの事実から、熟成初期で、大豆たん白ゲルは諸味の浸透圧との関係で離水を起こし、ゲル自体に収縮が起こったものと思われる。その結果、製品の硬さ(Fig.1)、もろさ(Fig.3)、ガム性(Fig.5)および破断強度の値が熟成初期(5日目)に増大したものと思われる。熟

成5日目以降では、大豆たん白ゲルは諸味の浸透圧に十分なじみ、諸味中のプロテアーゼの作用を受け、製品の物性が変化したものと思われる。

熟成60日目における製品の破断強度は紅麴区で13.7、混合麴区で8.7、黄麴区で $6.6 \times 10^5$  dyne/cm<sup>2</sup>の順であった。紅麴区と黄麴区の間では、製品の物性値に差異のあることが観察された。

### (3) クリープ解析

#### ① 熟成過程における製品のクリープ曲線の変化

本発酵食品の熟成過程におけるクリープ曲線の変化を調べ、その結果をFig.7に示した。紅麴による製品のコンプライアンスは熟成0日目から5日目にかけて減少した。しかし、5日目以降60日目まで、この値に顕著な変化は見られなかった。これに対して混合麴による製品のコンプライアンスは熟成0日目から5日目にかけて減少し、熟成時間の進行に伴い増大した。熟成60日目におけるコンプライアンスは熟成0日目に比べて増大した。黄麴による製品のコンプライアンスは熟成5日目で減少したが、それ以降60日目にかけて増大した。熟成30日目以降は0日目に比べて増大した。以上の事実から、紅麴と黄麴による本発酵食品の一定荷重における変形は紅麴区に比べて黄麴区のものの方が大きいこと、そして黄麴区の製品はその中間型であることが分かった。

#### ② 熟成過程における製品の粘弾性変化

クリープ曲線から求めたフックの弾性変形を $S_1$ 、2つのフォークト体の粘弾性変形を $S_2$ および $S_3$ 、ニュートン粘性変形を $S_4$ とし、熟成過程における製品のこれらの構成成分の変化を求め、Fig.8に示した。紅麴区においては、 $S_1$ 、 $S_2 + S_3$ は減少したがそれ以降はわずかに減少したにすぎなかった。 $S_4$ は熟成期間を通してほとんど変化は見られなかった。熟成0日目における製品のコンプライアンスを比較すると、 $S_1$ による変形は全体の50.2%、 $S_2 + S_3$ で44.2%、 $S_4$ で5.6%であった。このことから、熟成0日目における製品の変形はフックの弾性変形に大きく依存していることがわかった。Kamataら<sup>5,6)</sup>はいくつかの食品たん白から加熱ゲルを調製し、その物性を調べている。それによれば、大豆たん白ゲル変形の主成分は弾性変形であり、ニュートンの粘性はわずかであることが報告され、著者らの結果ともよく一致した。しかし、SPIのゲルを発酵させた製品の物性に関する報告は見られない。熟成60日目における製品のコンプライ

アンスを比較すると、 $S_1$ による変形は全体の57.9%、 $S_2+S_3$ で37.9%、 $S_4$ で4.8%であり、この場合にも製品の変形はフックの弾性変形に大きく依存していることがわかった。

混合麴区においては、熟成5日目まで $S_1$ 、 $S_2+S_3$ は急激に減少したが、それ以降は熟成60日目まで徐々に増大した。 $S_4$ は熟成期間を通してほとんど変化が見られなかった。熟成60日目における製品のコンプライアンスを比較すると、 $S_1$ による変形は全体の49.8%、 $S_2+S_3$ で46.4%、 $S_4$ で3.8%であった。このことから、製品の変形はフックの弾性変形とフォークト体の粘弾性変形にほぼ等しく依存していることがわかった。

黄麴区においては、熟成5日目までは $S_1$ 、 $S_2+S_3$ が急激に減少した。それ以降は熟成60日目まで緩やかに増大した。 $S_4$ は熟成5日目以降緩やかに増大した。熟成60日目における $S_1$ による変形は全体の42.5%、 $S_2+S_3$ で53.0%、 $S_4$ では4.5%であった。このことから、製品の変形はフォークト体粘弾性変形に最も大きく依存していることが分かった。

熟成過程における製品の、フックの弾性率、遅延粘弾性部のフォークト体の弾性率、その粘性率、定常粘性部におけるニュートン体の粘性率を調べたところ、いずれも、紅麴による製品は黄麴による製品に比べてその値が大きく、混合麴による製品のそれらの値は両者の中間に位置していた。従って、紅麴による試料は黄麴によるものに比べて強いスプリングをもち、流動変形も起こし難い構造を有していることが分かった。混合麴区による製品の変形は紅麴区と黄麴区によるものの中間型であった。

本発酵食品の物性はその製造に用いる微生物（紅麴菌<sup>3,7)</sup>、黄麴菌<sup>4)</sup>）の特性と密接な関係があり、特に、両麴菌の生産するプロテアーゼの基質特異性等の酵素化学的性質の差異が製品の物性に影響を与えたものと思われる。

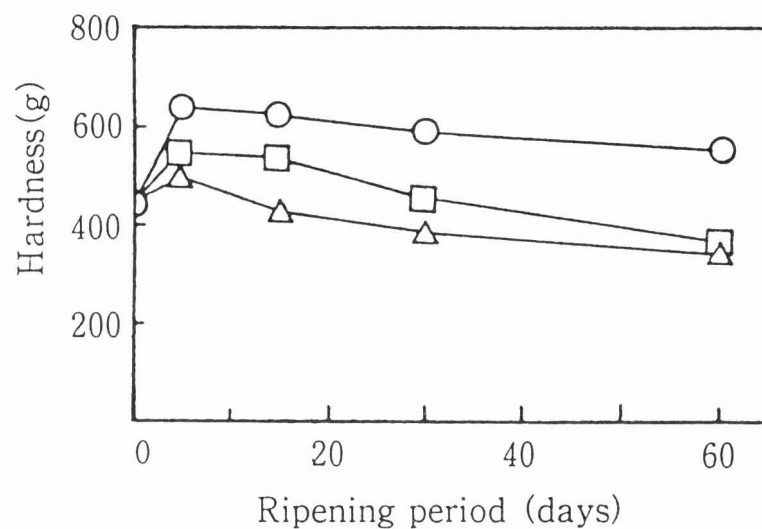


Fig. 1 Changes in hardness of the fermented soybean protein-gel-food during a ripening period  
 -○- ; Red koji, -□- ; Mixed koji, -△- ; Yellow koji

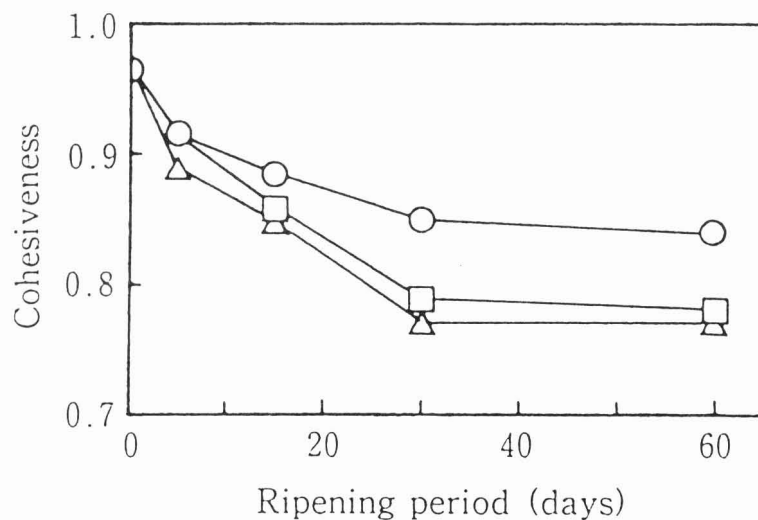


Fig. 2 Changes in cohesiveness of the fermented soybean protein-gel-food during a ripening period  
 -○- ; Red koji, -□- ; Mixed koji, -△- ; Yellow koji

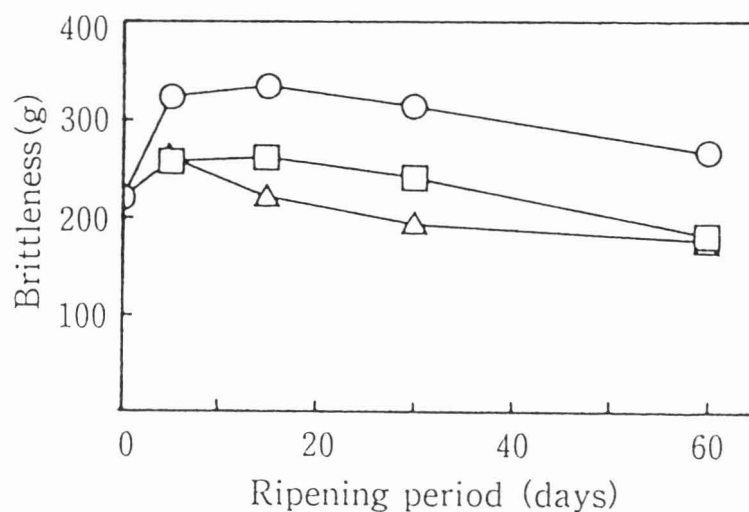


Fig. 3 Changes in brittleness of the fermented soybean protein-gel-food during a ripening period  
 -○- ; Red koji, -□- ; Mixed koji, -△- ; Yellow koji

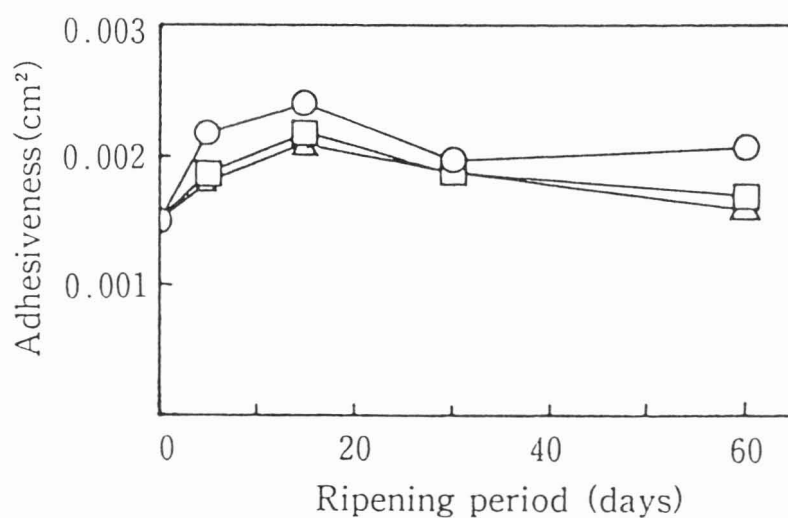


Fig. 4 Changes in adhesiveness of the fermented soybean protein-gel-food during a ripening period  
 -○- ; Red koji, -□- ; Mixed koji, -△- ; Yellow koji

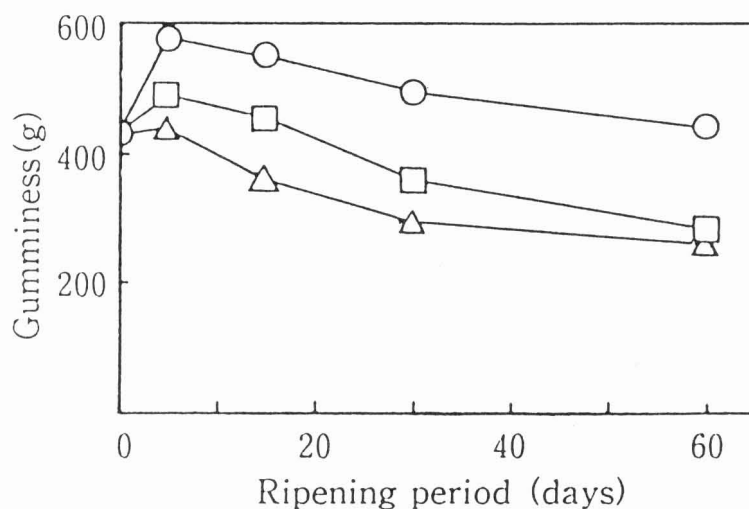


Fig. 5 Changes in gumminess of the fermented soybean protein-gel-food during a ripening period  
 -○- ; Red koji, -□- ; Mixed koji, -△- ; Yellow koji

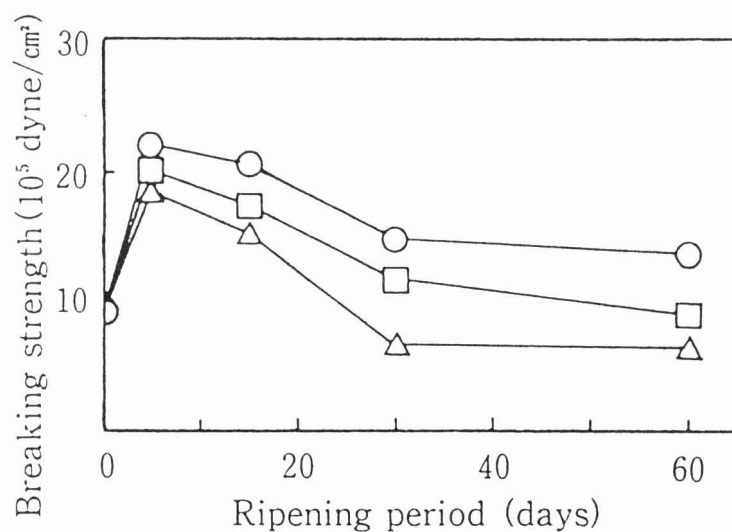


Fig. 6 Changes in breaking strength of the fermented soybean protein-gel-food during a ripening period  
 -○- ; Red koji, -□- ; Mixed koji, -△- ; Yellow koji

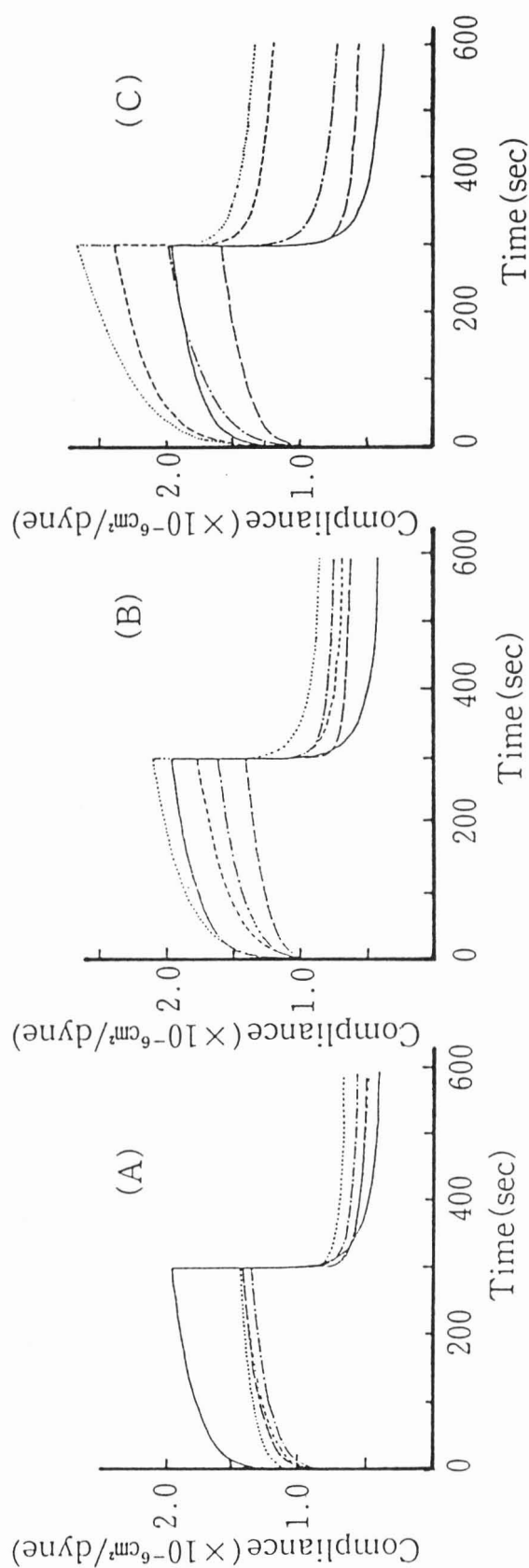


Fig. 7 Changes in creep behavior curves of the fermented soybean protein-gel-food during a ripening period (A) ; Red koji, (B) ; Mixed koji, (C) ; Yellow koji  
 — ; 0-day, — — ; 5-day, - - - - ; 15-day, - . - . ; 30-day, ..... ; 60-day



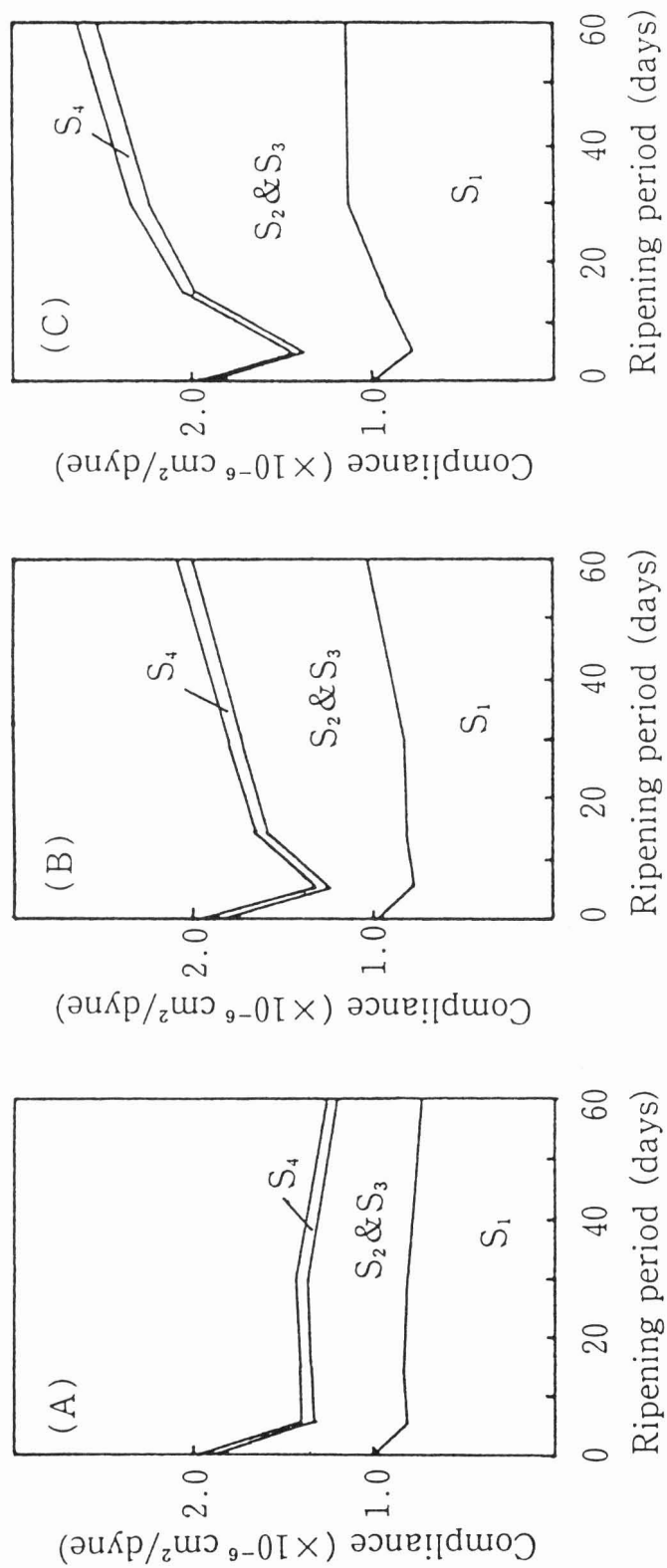


Fig. 8 Changes in each rheological component to deformation behavior of the fermented soybean protein-gel food during a ripening period  
(A) ; Red koji, (B) ; Mixed koji, (C) ; Yellow koji

## 文 献

- 1) 安田正昭: 食品と科学, 29 (10), 106 (1987)
- 2) 安田正昭: 日本食品工業学会誌, 37, 403 (1990)
- 3) 安田正昭, 上地玄作, 宮里興信: 日本食品工業学会誌, 30, 63  
(1983)
- 4) 安田正昭, 上地玄作, 宮里興信: 琉球大学農学部学術報告, 28, 111  
(1981)
- 5) Kamata Y., Rector D. and Kinsella J. E.: J. Food Science, 53, 589  
(1988)
- 6) Kamata Y., Rector D. and Kinsella J. E.: J. Food Science, 54, 170  
(1989)
- 7) Yasuda M., Soeishi K. and Miyahira M.: Agric. Biol. Chem., 53, 247  
(1984)

# 紅麴菌プロテイナーゼによる大豆たん白質の分解

琉球大学農学部

安田 正昭

## 1. はじめに

近年、健康志向を反映したコレステロールフリー食品に対する人々の関心が高まり、植物たん白を用いた組立食品の製造が種々試みられている。しかしながら、微生物の機能を利用した植物たん白の組立食品に関する知見は少ない。その中でも、大豆たん白を主体としたチーズ様食品の開発も検討されているが、未だ実用に耐えるものには至っていないようである。

著者らは、伝統的な大豆たん白質の発酵食品である沖縄の豆腐よう<sup>1)</sup>に着目し、分離大豆たん白、食用油及び水から形成したゲルに紅麴菌 (*Monascus* 属菌) を作用させることにより、大豆たん白を主体とした新しい発酵食品を作り出すことに成功した。本研究の目的は、この発酵食品の熟成機構を解析することであり、前章において熟成過程における製品のたん白質、窒素成分の変化及びその物性変化等について述べた。本発酵食品の熟成機構を明らかにするためには、本菌の生産する酵素の諸性質についても明らかにする必要がある。

紅麴菌プロテイナーゼは本発酵食品の熟成に関与する鍵酵素としての役割を担っていると考えられ、これまでに本酵素の精製を行い、その基礎的性質について調べてきた<sup>2, 3)</sup>。本報においては、紅麴菌プロテイナーゼによる大豆たん白質の分解様式について調べたので報告する。

## 2. 実験方法

### (1) 供試菌株と培養

供試菌株として *Monascus* sp. No. 3403 を使用した。本菌株の培養は既報<sup>4)</sup>の方法に従い、固体培養法により行った。

### (2) 試薬

実験に供する試薬として、ハンマーステンミルクカゼインはメルク社、分離大豆たん白 (SPI) は不二製油 (株) 社製、DEAE-セルロース、DEAE-セファデックス

クスA-50, QAE-セファデックスA-50及びセファデックスG-75はファルマシア社製を使用した。その他の試薬は試薬特級を使用した。

### (3) 酵素活性の測定と酵素の精製

プロティナーゼ活性の測定は既報<sup>5)</sup>の方法に従い, ハンマーステンミルクカゼインあるいはSPIを基質に用いて酵素反応を行い, 反応で生成するチロシン量をFolin法<sup>5)</sup>で測定することにより求めた。SPIを基質に用いた時の本酵素活性に及ぼすエチルアルコール濃度の影響を調べるための反応液配合割合は, 次の通りとした。0.4 M乳酸緩衝液(pH 3.0) 0.20 ml, 2% SPI溶液 0.25 ml, 酵素液(15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 0.50 ml, エチルアルコール及び水で, 総量2.0 mlとし, 37°Cで60分間酵素反応を行い, 0.4 Mトリクロル酢酸(TCA)溶液1.0 ml加えて酵素反応を停止した。

本酵素の精製は既報<sup>2)</sup>の方法に従った。すなわち, 紅麹(2 kg)より本酵素を抽出し, DEAE-セルロース, DEAE-セファデックスA-50, QAE-セファデックスA-50及びセファデックスG-75のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて行った。本精製酵素はディスク電気泳動的に均一であることが確かめられた。

### (4) 窒素量の測定

#### ① 総窒素量

酵素反応液中の総窒素量の測定は『食品分析法』<sup>6)</sup>に準じてミクロケルダール法により行った。

#### ② TCA可溶性窒素量とTCA不溶性窒素量

酵素反応で生成したTCA可溶性窒素量あるいはその不溶性窒素量は次の方法で測定した。酵素反応液の配合割合は, 2% SPI溶液5.0 ml, 0.4 M乳酸緩衝液(pH 3.0) 5.0 ml, 酵素液(15.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 10.0 ml, 合計30 mlにトルエンを添加した。37°Cで振とうしながら, 各時間酵素反応を行った。各時間反応させた酵素反応液1.5 mlに0.4 M TCA溶液を1 ml添加して酵素反応を停止した。東洋ろしNo. 5Bでろかし, ろ液中の窒素量(TCA可溶性窒素)あるいは残渣部の窒素量(TCA不溶性窒素)をそれぞれミクロケルダール法により定量した。

### (5) ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動

電気泳動に用いる試料の調製は, (4), ②の方法で各時間酵素反応を行った

反応液 1 ml をとり、SDS、2メルカプトエタノール存在下で2分間加熱したのち、凍結乾燥を行った。

スラブ電気泳動はLaemmli<sup>7)</sup>の方法に従って行った。ゲルはポリアクリルアミドのSDSゲル(10×14×0.2 cm)とし、泳動は、SDSを含むトリス-グリシン緩衝液(pH 8.3)を使用し、15 mAで14時間行った。標準たん白質には馬心筋チトクロームCの分子量キット(オリエンタル酵母社製)を用いた。染色には、0.25%コオマジーブリリアントブルーR溶液(酢酸:メタノール:水=10:50:43)を用いた。

### 3. 結果及び考察

#### (1) プロティナーゼ活性に及ぼすエチルアルコール濃度の影響

本発酵食品は泡盛存在下で、紅麹菌のプロティナーゼの作用により熟成が進行するので、本酵素活性に及ぼすエチルアルコール濃度の影響について調べ、その結果をFig. 1に示した。本酵素活性は、エチルアルコール濃度の増大に伴い減少した。反応液にエチルアルコールを10、20及び30%添加した時の本酵素の相対活性は無添加のそれに比べて、それぞれ、70、25及び3%の値を示し、本酵素活性は反応液中のエチルアルコール濃度の影響を受けることが判明した。

#### (2) プロティナーゼによるSPIの加水分解に及ぼすエチルアルコール濃度の影響

##### ① TCA可溶性窒素量の変化

本酵素によるSPIの加水分解の程度を知るために、反応液にエチアルコールを0、10及び20%を含む系を設定し、酵素反応をおこなった。酵素反応におけるTCA可溶性窒素量の総窒素量に対する割合の変化を調べた結果をFig. 2に示した。TCA可溶性窒素成分は本発酵食品の低分子成分、特に、ペプチドやアミノ酸に相当する成分である。TCA可溶性窒素量の総窒素量に対する割合で表される数値は、いずれの場合にも反応時間の経過に伴い増大した。エチルアルコール無添加区では、反応24時間目で75.4%、反応72時間目で82.1%の値を示した。一方、反応液にエチルアルコール10及び20%を添加した区における反応72時間におけるTCA可溶性窒素量の総窒素量に対する割合の値はそれぞれ61.5及び42.0%であった。これらのことから、反応液中のエチ

ルアルコールの濃度の影響を受けるものの、本酵素の作用により大豆たん白質は、T C A可溶性窒素成分に変換されたことがわかった。

## ② T C A不溶性窒素量の変化

①の場合と同様に、本酵素によるS P Iの不溶性窒素量の変化について調べ、その結果をFig. 3に示した。T C A不溶性窒素成分は「とうふよう」のボディーを構成するポリペプチドに相当する成分である。T C A不溶性窒素量に対する総窒素量の割合で表される数値はいづれの場合にも反応1時間目までに急激に減少したが、その後、酵素反応時間の経過に伴い徐々に減少した。本酵素反応を72時間行ったあとで、T C A不溶性窒素量の総窒素量に対する割合を調べたところ、エチルアルコールを0、10及び20%存在する区では、それぞれ、17.9、38.5及び58.0%の値をそれぞれ示した。この事実は、エチルアルコール濃度が高くなるにつれてT C A不溶性窒素成分すなわち、未分解のたん白質含量が高いことを示している。以上の結果から、本酵素による大豆たん白質の分解は反応液中のエチルアルコール濃度の影響を受けていることが明らかとなった。

## (3) プロテイナーゼによる大豆たん白質の分解

反応液にエチルアルコールを0、10及び20%含む系を設定し、0から24時間本酵素反応を行った後、大豆たん白質分解の様子をスラブゲル電気泳動法により観察した。図には示さなかったが、エチルアルコール無添加の場合には、反応0分では、大豆グロブリンの典型的な成分である $\beta$ コングリシニンの $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニット、グリシニンの酸性及び塩基性サブユニットがそれぞれ観察された。反応5分間では、10～15 K D aの範囲に数本のポリペプチドバンドが出現した。反応10分間では、 $\beta$ -コングリシニンの $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニット、グリシニンの酸性サブユニットに対応するバンドが消失した。反応24時間では、13～15 K D a付近のポリペプチドバンドが薄くなった。一方、グリシニンの塩基性サブユニットのポリペプチドバンドは反応24時間でも存在し、本酵素による加水分解がきわめて受けにくいことが判明した。また、分子量の比較的小さなポリペプチドバンド(10 K D a前後)は反応24時間経過しても存在した。エチルアルコール10%含む系においては、反応5分で、10～15 K D aの範囲に数本のポリペプチドバンドが出現した。反応15分で $\beta$ -コングリシニンの $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットのポリペプチドバンドが、反応2時間で、グ

リシニンの酸性サブユニットのポリペプチドバンドがそれぞれ消失した。反応24時間では、分子量の比較的小さなポリペプチドバンド（10 K D a 前後）やグリシニンの塩基性サブユニットのポリペプチドバンドが存在した。エチルアルコール20%を含む系におけるスラブゲル電気泳動のパターンをFig.4 に示した。反応30分以降に、10～12 K D a 付近のポリペプチドバンドが増大した。反応6時間で、 $\beta$ コングリシニンの $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットのポリペプチドバンドが消失した。一方、グリシニンの酸性サブユニットや塩基性サブユニットのポリペプチドバンド及び分子量の比較的小さなポリペプチドバンド（10 K D a 前後）は反応24時間においても確認された。

以上の結果から、本酵素によるS P I の分解は先ず、 $\beta$ コングリシニンの各サブユニットが、続いて、グリシニンの酸性サブユニットが分解を受けるが、グリシニンの塩基性サブユニットは本酵素により分解を受けず、そのまま残存すること及び酵素反応中に、10 K D a 前後に分子量を有する数種のポリペプチドを生成することがわかった。本酵素によるS P I の分解速度は反応系にエチルアルコールを添加することにより抑制された。一方、本発酵食品の熟成過程における水不溶性フラクションの電気泳動パターンは、熟成過程で、 $\beta$ コングリシニンやグリシニンの酸性サブユニットが分解を受けるが、塩基性サブユニットはほとんど分解を受けないこと、分子量1万前後のポリペプチド成分が生成することが前章で確かめられており、精製酵素を用いた実験結果とよく一致した。これらの事実から、紅麹菌プロテイナーゼはもろみ中の泡盛（エチルアルコール）存在下で、大豆たん白質を限定分解し、本発酵食品の熟成に大きく貢献していることが明らかとなった。本酵素活性は、もろみ中の泡盛のエチルアルコール濃度の影響を受けて抑制されたが、そのことが、製品の物性形成や保蔵性に大きく寄与しているものと思われる。今後、熟成時間の短縮化法及び製品の保蔵方法などの適性化技術の確立を図りたい。

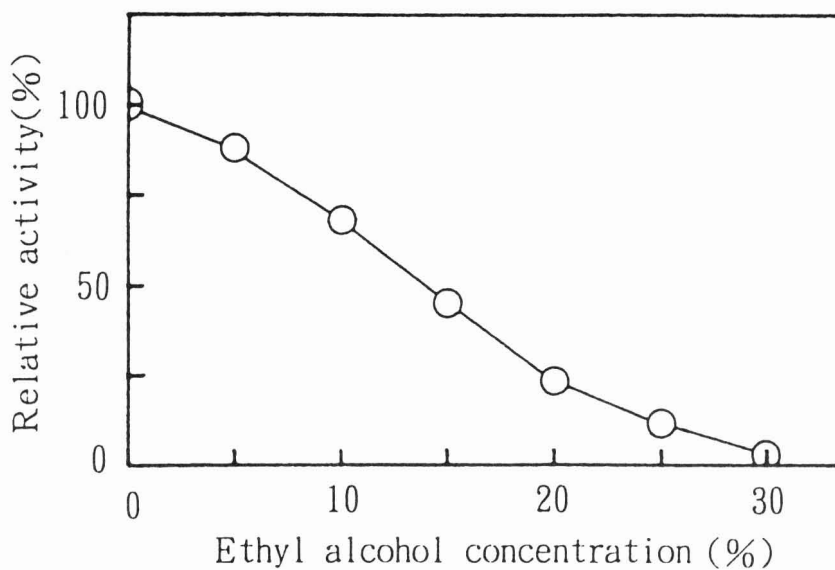


Fig. 1 Effect of ethyl alcohol on the activity of acid proteinase from *Monascus* fungus

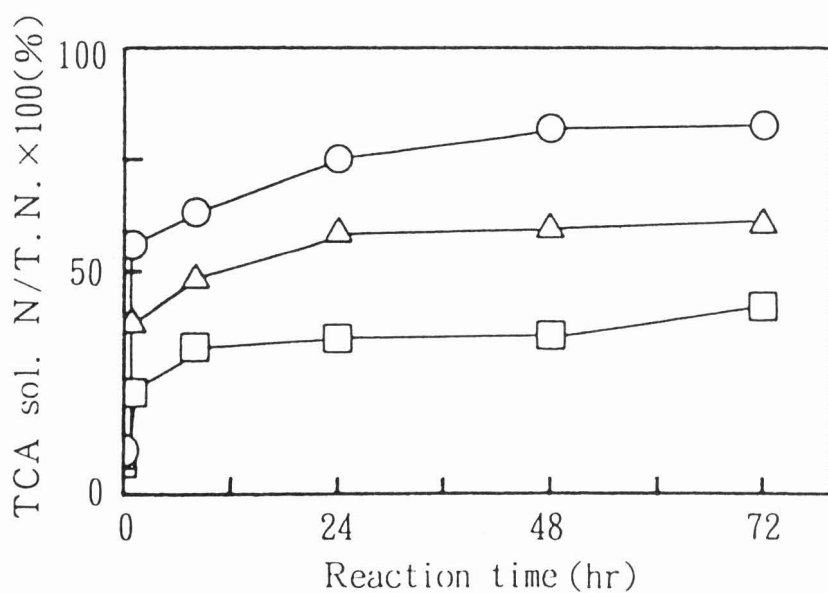


Fig. 2 Changes in the ratio of TCA soluble nitrogen to total nitrogen of soy protein isolate during the enzyme reaction  
 ○ ; 0% of ethyl alcohol, △ ; 10% of ethyl alcohol,  
 □ ; 20% of ethyl alcohol



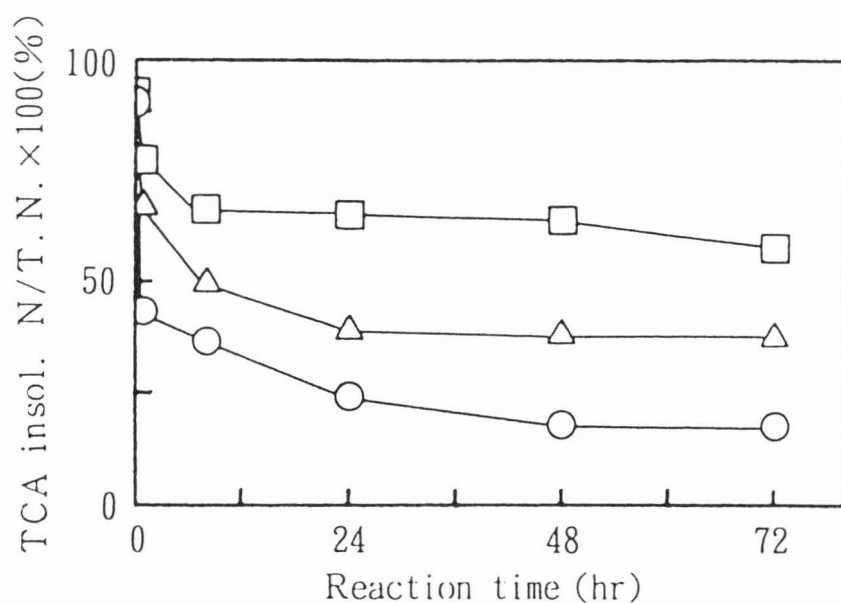


Fig. 3 Changes in the ratio of TCA insoluble nitrogen to total nitrogen of soy protein isolate during the enzyme reaction  
 ○ ; 0% of ethyl alcohol, △ ; 10% of ethyl alcohol,  
 □ ; 20% of ethyl alcohol

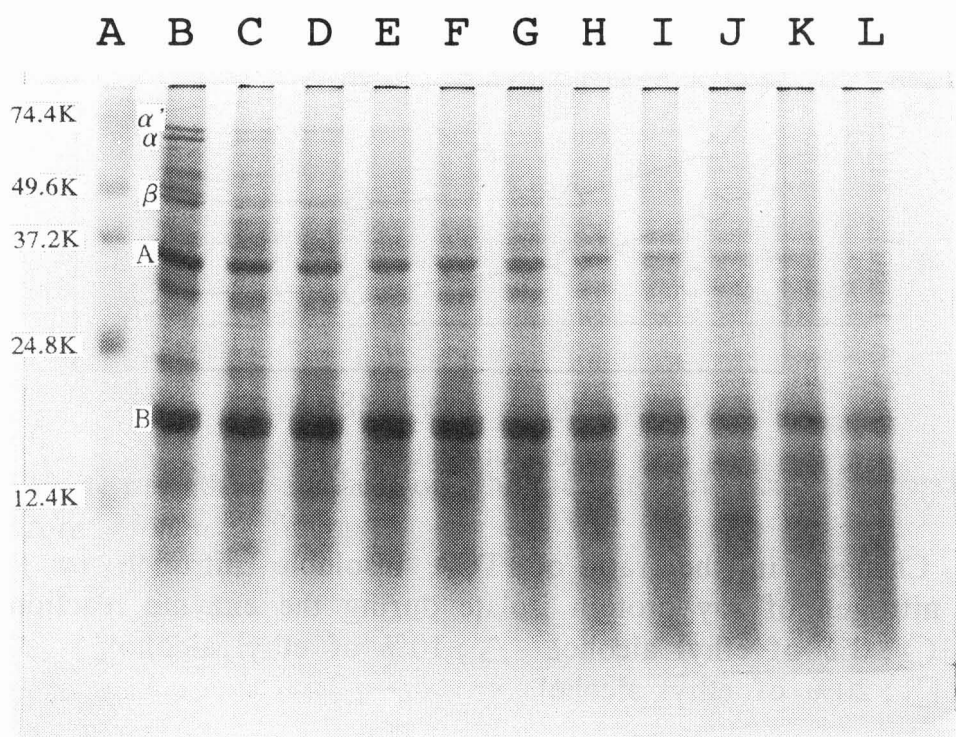


Fig. 4 Slab SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of soy protein isolate at various enzyme reaction stages

The enzyme reaction was carried out under presense of 20% of ethyl alcohol. Molecular weights were estimated by mobilities of cytochrome c from horse heart and crossed-linked cytochrome c (cytochrome c monomer, dimer, trimer, tetramer and hexamer). A: Standard proteins described above. B: 0 min, C: 5 min, D: 10 min, E: 15 min, F: 20 min, G: 30 min, H: 1 hr, I: 2 hr, J: 4 hr, K: 8 hr, L: 24 hr. Numerical values in the lane A showed each molecular weight.  $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ :  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ -subunits in  $\beta$ -conglycinin; A, B: Acidic and basic subunits in glycinin

## 文 献

- 1) 安田正昭: 食品と科学, 29 (10), 106 (1987)
- 2) Yasuda M., Soeshi K. and Miyahira M.: Agric. Biol. Chem., 48, 1637 (1984)
- 3) Yasuda M., Shimabukuro M. and Kikuchi S.: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 38, 954 (1991)
- 4) 安田正昭, 上地玄作, 宮里興信: 日食工誌, 30, 63 (1983)
- 5) Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L. and Landall R.J.: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
- 6) 日本食品工業学会・食品分析法編集委員会編: 『食品分析法』 p. 102 光琳 (1982)
- 7) Laemmli U.K.: Nature, 227, 680 (1990)