

# 分離大豆たん白質を用いた「とうふよう」の香味成分 に関する研究

## —熟成過程におけるアミノ酸, 糖, 有機酸の変化—

STUDIES ON TOFUYO FLAVOR USING SOY PROTEIN ISOLATE :  
CHANGES IN FREE AMINO ACIDS, REDUCING SUGARS AND  
ORGANIC ACIDS

安田正昭・長松九一郎・森川誠司 (琉球大学農学部)

Masaaki YASUDA, Kyuichiro NAGAMATSU and Seiji MORIKAWA  
College of Agriculture, University of the Ryukyus, Okinawa 903-01

### ABSTRACT

Tofuyo is an excellent vegetable protein food and is made from soybean curd that is called as tofu, by the action of microorganisms in Okinawa prefecture, Japan. It is a creamy cheese-type product with mild flavor, fine texture and good taste. However, it is difficult to obtain uniform quality of tofu as the raw material of tofuyo for the preparation of tofu is complicated, and accordingly not easy to produce uniform quality of tofuyo. Soy protein gel was used instead of tofu itself in order to develop a simple and new method leading to stable production of uniform quality of tofuyo. This new product has more unique flavor than that of traditional product. In this study, changes in activities of enzymes ( $\alpha$ -amylase, glucoamylase and protease), free amino acid composition, reducing sugars and organic acid composition during tofuyo fermentation were investigated. Protease is considered to be concerned with ripening, and amylases are concerned with providing the taste of product. Although remaining activities of  $\alpha$ -amylase, glucoamylase and protease decreased to 43, 43 and 37% for initial 15-days of ripening, these values maintained until the end of 60-days of ripening, respectively. The ratio of amino nitrogen to water soluble nitrogen increased during the ripening period. Amino acids and organic acids were analyzed by high pressure liquid chromatographies. Total amino acid amount of tofuyo was found to increase during maturation. It was also found that leucine, glutamic acid, valine, arginine and serine were contained at a high level. Glutamic acid and aspartic acid of tofuyo were found to be 5.86 and 8.48 mg/100 g at first, and increased with maturing time (60 days) to 356 and 200 mg/100 g, respectively. It was observed that reducing sugars of tofuyo or soak increased during the ripening period. Glucose was the main component of the reducing sugars as detected by thin layer chromatography. Isobutyric, tartaric, lactic, propionic, malic and acetic acids were found at high level. And thus, these amino acids, saccharides and organic acids were considered as the major tasty components. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **10**, 18-22, 1989.

とうふようは沖縄県における伝統的な大豆たん白質の発酵食品であり、チーズのようなテクスチャーとウニのような風味を有するユニークな嗜好食品として最近注目されつつある。このものは木綿豆腐を乾燥処理したのち、麴と泡盛(蒸留酒)を含む諸味に漬けて込んで熟成させた発酵食品<sup>1)</sup>であるが、伝統的な製造手段およびその特徴が科学的に解明されないまま現在に至っている。そこで、著者らはその製造法の技術的特徴を明らかにするために、原料の調製法と製品の品質との関係を明らかにしてきた<sup>2-4)</sup>。しかしながら、その製造工程は煩雑で、しかも均質な製品が得られ難いという欠点を有している。

「とうふよう」製造の振興・発展を図るためには、これらの欠点をクリアする新しい製造技術の確立が必要である。そこで、著者らは分離大豆たん白質(SPI)の有するゲル形成能に着目し、SPIによる新しい「とうふよう」の製造法を明らかにしてきた<sup>5,6)</sup>。

本研究を進める過程においてSPIによる「とうふよう」は伝統的な方法によるものに比べてやや異なるが興味ある香味成分を有することがわかった。そこで、本報においては製品の香味成分、特に味成分について検討した。

## 実験方法

### 「とうふよう」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既報<sup>5)</sup>に従い、分離大豆たん白質(ニューフジプロSE)を用いて行った。

#### (2) 紅麴の製麴

紅麴菌(*Monascus* sp. No.3403)を蒸米に育成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) 「とうふよう」の調製

「とうふよう」の調製は既報<sup>6,7)</sup>の方法に従い、紅麴による諸味に乾燥豆腐の代わりに(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。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。

### 分析試料の調製

成分分析に供する試料の調製は、「とうふよう」と諸味とを分離し、各々凍結乾燥を行った後に粉碎篩別することにより行った。なお、酵素活性の測定に用いる試料は凍結乾燥を行う前のものとした。

### 試料の分析

#### (1) 諸味中の酵素活性

酵素液の調製は、諸味10gに0.01 Mクエン酸-0.02 Mリン酸塩緩衝液(pH 5.0)10 mlを加えて室温(25℃)

で60分抽出を行った。プロテアーゼ活性<sup>8)</sup>、グルコアミラーゼ活性<sup>9)</sup>の測定はそれぞれ既報の方法に従い、 $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定は山田<sup>10)</sup>の方法に準じて行った。

#### (2) 窒素成分

##### ① 総窒素

試料中の総窒素量の測定は『食品分析法』<sup>11)</sup>に準じて、セミマイクロケルダール法により行った。

##### ② アミノ態窒素量

試料中のアミノ態窒素量の測定は『基準味噌分析法』<sup>12)</sup>に準じて行った。すなわち、予め、試料中のホルモル態窒素量を求め、これよりアンモニア態窒素量を減じた値をアミノ態窒素量として求めた。

##### ③ 遊離アミノ酸の分析

遊離アミノ酸の分析に用いる試料の調製は『食品分析ハンドブック』<sup>13)</sup>に準じて行った。試料中遊離アミノ酸の分析は高速液体クロマトグラフにより行った。高速液体クロマトグラフィーの条件は以下の通りである。高速液体クロマトグラフ：島津アミノ酸分析システム LC-6A, カラム：島津 ISC-07/S1504 (長さ15cm, 内径4.0 mm, Na<sup>+</sup>型強酸性陽イオン交換樹脂を充填したもの), 温度：55℃, 移動相：0.2 Nクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 3.2), 流速：0.3 ml/min で、検出方法はo-フタルアルデヒド(OPA)を用いた検出器で、Ex 385 nm, Em 450 nm に設定した。各アミノ酸量は島津製作所製クロマトバック C-R 3 Aにて算出した。

#### (3) 還元糖

「とうふよう」の還元糖量の測定は、『基準味噌分析法』<sup>12)</sup>に従い、還元糖を含む試料を調製し、Somogyi-Nelson 比色定量法により行った。

#### (4) 有機酸の分析

有機酸の分析に用いる試料の調製はR. T. Marsiliら<sup>14)</sup>の方法に準じた。すなわち、試料(凍結乾燥した粉末試料)1gに蒸留水5 mlとアセトニトリル20 mlを加え、ウルトラディスペーサ(ヤマト科学社製 LK-22型)にて5分間抽出し、6000 rpmで5分間遠心分離した。上澄み液を集め、沈澱物はさらに同様の方法で抽出を行い、抽出物を得た。両者を混合し、濃縮し、25 mlに定容した。このものをさらに0.2  $\mu$ mメンブランフィルターでろ過したものを分析に供した。試料中の有機酸分析は高速液体クロマトグラフにより行った。高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。高速液体クロマトグラフ：島津 LC-5A, カラム：島津 SCR-101H (長さ30 cm, 内径7.9 mm), 移動相は過塩素酸でpH 2.1に調整した水, 流速0.5 ml/minとした。検出器は島津 SPD-2Aで、210 nm

で測定した。各有機酸量は島津クロマトパック C-R1 B にて算出した。

## 結果と考察

### 熟成過程における諸味のプロテアーゼ、アミラーゼ活性の変化

「とうふよう」の熟成や香味形成に重要な役割を演じているプロテアーゼやアミラーゼの挙動について調べ、その結果を Fig. 1 に示した。これらの酵素活性は熟成15日目までに低下した（残存活性： $\alpha$ -アミラーゼ：43%，グルコアミラーゼ：43%，プロテアーゼ：37%）ものの、それ以降は60日目まではほぼ同程度の値（残存活性： $\alpha$ -アミラーゼ：38%，グルコアミラーゼ：40%，プロテアーゼ：34%）を維持した。 $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼは「とうふよう」の甘味成

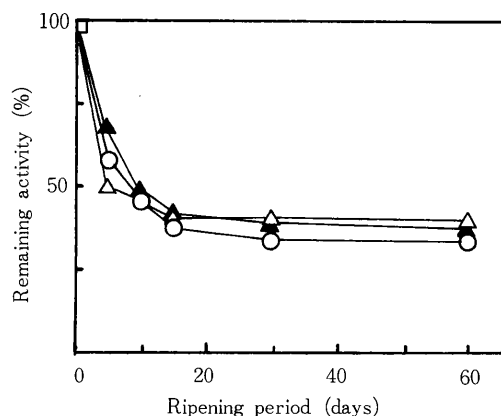


Fig. 1. Changes in  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, and protease activities during ripening period.

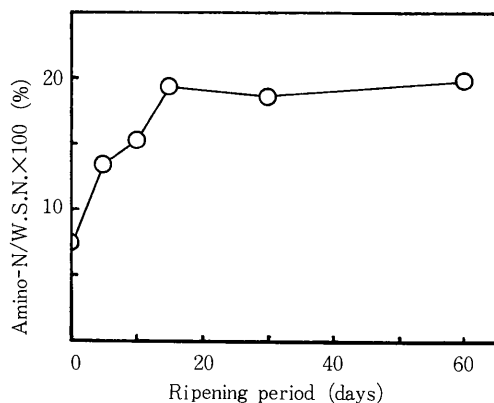


Fig. 2. Changes in the ratio of amino nitrogen to water soluble nitrogen of tofuyo during ripening period.

分である糖の生成、プロテアーゼは製品の熟成ならびに味成分である各種アミノ酸の生成に関与しているものと思われる。なお、「とうふよう」の味を論じるためには、熟成過程における諸味中カルボキシペプチダーゼやアミノペプチダーゼの挙動を明らかにする必要がある、今後の検討課題である。

### 熟成過程における製品のアミノ酸の変化

「とうふよう」のアミノ酸を論ずるにあたって、まず、熟成過程における製品の窒素成分を明らかにする必要がある。味噌やチーズの熟成において、水溶性窒素と総窒素量の比で表わされる数値は「熟成率」とも呼ばれ、製品の熟成を知る上で重要な指標ともされること、4% TCA 可溶性窒素量の水溶性窒素量に対する比で表される数値は製品の非たん白態窒素量の指標として重要であることから、「とうふよう」においてもこれらの窒素成分について調べ、その結果はすでに報告した<sup>6)</sup>。水溶性窒素成分中、アミノ酸の占める割合は製品の味に直接影響を与えるので、熟成過程における製品のアミノ態窒素量の変化を調べ、その結果を Fig. 2 に示した。製品のアミノ態窒素量の水溶性窒素量に占める割合は、熟成過程の進行に伴い増大した。この値は熟成0日目で7.5%，15日目で19.4%，60日目で20%であった。従って、製品の水溶性窒素成分中20%がアミノ態窒素成分であることがわかった。

Table 1. Changes in free amino acid composition of tofuyo during ripening period

| Amino acids<br>(mg/100 g) | Ripening period (days) |         |         |         |
|---------------------------|------------------------|---------|---------|---------|
|                           | 0                      | 5       | 30      | 60      |
| Aspartic acid             | 8.48                   | 32.93   | 150.88  | 200.13  |
| Threonine                 | 3.75                   | 75.17   | 184.22  | 195.60  |
| Serine                    | 4.77                   | 67.48   | 196.18  | 226.22  |
| Glutamic acid             | 5.86                   | 89.25   | 306.79  | 356.22  |
| Glycine                   | 4.38                   | 44.84   | 128.33  | 146.76  |
| Proline                   | 0                      | 2.25    | 5.58    | 6.79    |
| Alanine                   | 4.17                   | 79.69   | 201.82  | 226.27  |
| Cystine                   | 3.33                   | 45.47   | 140.28  | 152.83  |
| Valine                    | 1.69                   | 145.24  | 260.38  | 283.31  |
| Methionine                | 1.58                   | 14.92   | 34.20   | 51.37   |
| Isoleucine                | 3.82                   | 36.64   | 119.37  | 129.47  |
| Leucine                   | 7.54                   | 100.48  | 296.06  | 396.91  |
| Tyrosine                  | 4.00                   | 52.17   | 148.52  | 160.90  |
| Phenylalanine             | 5.75                   | 66.62   | 189.65  | 209.58  |
| Histidine                 | 3.47                   | 26.93   | 58.39   | 67.38   |
| Lysine                    | 4.15                   | 62.60   | 177.25  | 208.76  |
| Arginine                  | 8.94                   | 78.80   | 243.09  | 278.15  |
| Total                     | 75.68                  | 1021.48 | 2840.99 | 3296.65 |

そこで、「とうふよう」の熟成過程における遊離アミノ酸の変化を調べ、その結果を Table 1 に示した。「とうふよう」の各種アミノ酸量は熟成の進行に伴い増大し、熟成 0, 5, 30 および 60 日目における全アミノ酸量はそれぞれ 76, 1021, 2841, 3297 mg/100 g と算出された。熟成 60 日目における製品の最も多い遊離アミノ酸はロイシン (397 mg/100 g) であり、次に、グルタミン酸、バリン、アルギニンの順であった。必須アミノ酸について比較すると、ロイシンが最も多く、次に、バリン、フェニルアラニン、リジン、スレオニン、イソロイシン、メチオニンの順であった。なお、トリプトファンについては、数値に疑問がありデータは掲げなかった。今後、さらに検討する予定である。味に関与するアミノ酸について比較すると、製品のうまみを発現するアミノ酸として、グルタミン酸が最も多く、次にアスパラギン酸の順であった。熟成 30 日目および 60 日目におけるグルタミン酸の遊離量はそれぞれ 307 および 356 mg/100 g であった。アスパラギン酸の遊離量はそれぞれ 151 および 200 mg/100 g であった。15°C で 3 週間熟成させた丸大豆を利用したチーズよう食品のグルタミン酸およびアスパラギン酸の遊離量はそれぞれ 187 および 37 mg/100 g であることが報告されている<sup>15)</sup>。従って、SPI による「とうふよう」はチーズよう食品に比べてうまみを発現するこれらの遊離アミノ酸含量が高いことがわかった。甘味性アミノ酸としては、アラニン (226 mg/100 g)、セリン (226 mg/100 g) が最も多く含まれており、次に、スレオニン、グリシン、プロリンの順であった。苦味性アミノ酸としてはロイシンが最も多く、バリン、アルギニン、フェニルアラニン、イソロイシンの順であった。

#### 熟成過程における還元糖の変化

「とうふよう」の味を特徴づける成分として、糖もまた重要な要素である。そこで、熟成過程における「とうふよう」および諸味の還元糖量の変化を調べ、その結果を Fig. 3 に示した。「とうふよう」区および諸味区の還元糖量はいずれも熟成の進行に伴い増大した。「とうふよう」区および諸味区に存在する糖類を薄層クロマトグラフィーにより調べたところ、グルコースが検出された。このことは、Fig. 1 にも示されているように、諸味中の  $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼが熟成期間中に麴の米デンプンに作用してグルコースを生成することによるものと思われる。このグルコースが製品の甘味形成に大きく寄与していることが判明した。

#### 熟成過程における有機酸の変化

各種の有機酸も「とうふよう」の味を構成する重要な成分である。そこで、熟成過程における製品の有機酸について調べ、その結果を Table 2 に示した。熟成 0 日目では、イソ酪酸、プロピオン酸、クエン酸が定量されたが、その他の有機酸は全く検出されなかった。熟成 5 日目以降では各種の有機酸が検出された。熟成 60 日目における製品の主要な有機酸は、イソ酪酸、酒石酸、乳酸、プロピオン酸、リンゴ酸、酢酸などであった。一方、ジグリコール酸、ピログルタミン酸、フマル酸の含有量は低い値を示した。供試「とうふよう」には、クエン酸やマロン酸は検出されなかった。味噌の有機酸はピログルタミン酸 (341~406 mg/100 g)、クエン酸 (166~340 mg/100 g)、乳酸 (53~103 mg/100 g)、酢酸 (107~122 mg/100 g) が主成分であ

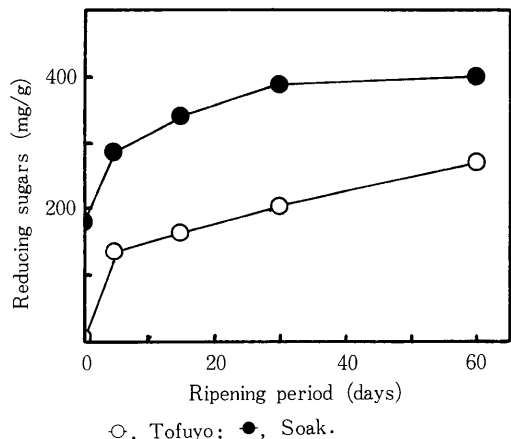


Fig. 3. Changes in reducing sugars of tofuyo and soak during ripening period.

Table 2. Changes in organic acid content of tofuyo during ripening period

| Organic acids<br>(mg/100 g) | Ripening period (days) |       |       |       |
|-----------------------------|------------------------|-------|-------|-------|
|                             | 0                      | 5     | 30    | 60    |
| Citric acid                 | 442                    | 0     | 0     | 0     |
| Tartaric acid               | 0                      | 2,395 | 3,644 | 3,260 |
| Malic acid                  | 0                      | 610   | 1,035 | 1,321 |
| Diglycolic acid             | 0                      | 100   | 103   | 165   |
| Malonic acid                | 0                      | 0     | 0     | 0     |
| Lactic acid                 | 0                      | 2,042 | 1,771 | 1,881 |
| Acetic acid                 | 0                      | 1,044 | 1,281 | 1,266 |
| Fumaric acid                | 0                      | 0     | 10    | 15    |
| Propionic acid              | 1,361                  | 1,331 | 1,198 | 1,599 |
| Pyroglutamic acid           | 0                      | 0     | 61    | 138   |
| iso-Butyric acid            | 5,124                  | 4,750 | 3,598 | 3,543 |

ることが報告されている<sup>16)</sup>。「とうふよう」においては、クエン酸やピログルタミン酸の含有量がきわめて少ない点が指摘される。

「とうふよう」の味を論ずるには、製品のアミノ酸、糖類、有機酸のほか、核酸関連物質や遊離脂肪酸等についても調べる必要があり、今後検討したい。なお、製造条件によるこれらの味成分の違いや、伝統的な「とうふよう」とSPIによるものとの差異等についても明らかにする必要があり、現在検討中である。また、「とうふよう」の香味成分として“かおり”成分についても明らかにする必要があり、今後の検討課題である。

## 文 献

- 1) 安田正昭 (1983) : 豆腐ようと紅麴. 日本醸造協会雑誌, **78**, 839-842.
- 2) 安田正昭 (1987) : とうふようの製造と特性. 食品と科学, **29**(10) 106-109.
- 3) 安田正昭, 上地玄作, 宮里興信 (1983) : 豆腐よう製造に用いる紅麴の製造. 日本食品工業学会誌, **30**, 63-67.
- 4) 安田正昭, 外間郁夫 (1984) : 豆腐よう製造に用いる原料豆腐の製造. 日本食品工業学会誌, **31**, 19-23.
- 5) 安田正昭, 長松九一郎 (1987) : 分離大豆たん白質を用いた「とうふよう」の製造に関する研究—大豆たん白ゲル調製条件の検討. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 12-16.
- 6) 安田正昭, 長松九一郎, 森川誠司 (1988) : 分離大豆たん白質を用いた「とうふよう」の製造に関する研究—熟成過程における大豆たん白質の分解. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **9**, 19-24.
- 7) 宮里興信, 安田正昭, 上地玄作 (1980) : 紅麴菌を用いた豆腐よう熟成過程における一般成分の変化について. 琉球大学農学部学術報告, **27**, 103-108.
- 8) Yasuda M., Soeishi K. and Miyahira M. (1984) : Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3403, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1637-1639.
- 9) Yasuda M., Kuwae M. and Matsushita H. (1989) : Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Monascus* sp. No. 3403. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 247-249.
- 10) 山田覃洋 (1963) : 耐酸性アミラーゼに関する研究 (第2報) アミラーゼ力価の新測定法. 農化, **37**, 633-636.
- 11) 食品分析法編集委員会. 日本食品工業学会編 (1982) : 『食品分析法』 p. 102, 光琳.
- 12) 改訂味噌基準分析法委員会 (1968) 『基準味噌分析法』 p. 7, 29 全国味噌技術会.
- 13) 林 淳三, 印南 敏, 菅原龍幸 (1982) : 『改訂食品分析ハンドブック』 p. 81, 建帛社.
- 14) Marsili R. T., Ostapenko, H., Simmons, R. E. and Green, D. E. (1981) : High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *J. Food Sci.*, **46**, 52-57.
- 15) 松岡博厚, 福家洋子 (1988) : *Penicillium casei-colum* を用い熟成した丸大豆利用チーズよう食品の製造. 日本食品工業学会誌, **35**, 166-172.
- 16) 加藤美千子, 木内 幹, 森 隆, 田部井英夫, 鷹見 勲 (1983) : 辛口米みその有機酸の含有量と組成. 日本食品工業学会誌, **30**, 99-107.