

とうふようの香味成分に関する研究
—分離大豆たん白質による「とうふよう」と伝統的なとう
ふようの呈味成分についての比較検討—

STUDIES ON FLAVOR OF TOFUYO —A COMPARISON OF TASTY
COMPONENTS BETWEEN FABRICATED “TOFUYO” FROM SOY
PROTEIN ISOLATE AND TRADITIONAL TOFUYO—

安田正昭・森川誠司・松本哲也・金城さきえ（琉球大学農学部）

Masaaki YASUDA, Seiji MORIKAWA, Tetsuya MATSUMOTO and Sakie
KINJYO

College of Agriculture, University of the Ryukyus, Okinawa 903-01

ABSTRACT

Traditional tofuyo is a vegetable protein food and is made from tofu by the action of microorganisms. Fabricated tofuyo is made from soy protein isolate (SPI) as the same way of traditional one. However, they are different in tastes. In this paper, changes in activities of enzymes and formation of tasty components during both of fabricated and traditional tofuyo fermentation were investigated. Protease is considered to be concerned with ripening, and amylases are concerned with providing the taste of the product. Although remaining activities of α -amylase, glucoamylase and protease decreased for initial 15-days of the ripening, these values were maintained until the end of ripening, respectively. Changes in these enzymes' activities of fabricated tofuyo were similar to those of traditional one. The ratio of water soluble nitrogen to total nitrogen and that of amino nitrogen to water soluble nitrogen increased during ripening period. These values of fabricated tofuyo were higher than those of traditional one. Amino acids, organic acids and nucleic acid related compounds were analyzed by high pressure liquid chromatographies. Each free amino acid in tofuyo was increased during maturation. Amounts of glutamic acid, aspartic acid, alanine and glycine in traditional tofuyo were higher than those of fabricated one. However, amounts of leucine, arginine, tyrosine and phenylalanine in the fabricated tofuyo were higher than those of traditional one. It was observed that reducing sugars of both traditional and fabricated tofuyo increased during ripening period, and it was detected as glucose by thin layer chromatography and the method of glucose oxidase. Amount of total organic acids in fabricated tofuyo was higher than that of traditional one. Citric acid, malic acid, lactic acid and malonic acid were abundant in both of fabricated and traditional tofuyo. Amount of 5'-guanylic acid in traditional tofuyo was higher than that of fabricated one. A small amount of 5'-inosinic acid was found to occur in both of fabricated and traditional tofuyo. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **12**, 7-13, 1991.

沖縄に古くから伝わるとうふよう¹⁾はチーズ様風味を有するユニークな大豆たん白質の発酵食品として最近注目されつつある。しかしながら、この食品製造に関する科学的な知見はほとんど得られていなかった。著者らはとうふよう製造の技術的特徴を明らかにするために、これまで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²⁻⁴⁾。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ーする製造技術の確立が必要とされ、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」の製造法について検討を行ってきた⁵⁻⁷⁾。SPIによる「とうふよう」は伝統的なものに比べて、香味が淡白で深みに乏しいことからその改善策が必要である。そこで、本報においては、まず、その基礎的知見を得るために呈味成分を解析することとし、熟成過程における遊離アミノ酸、有機酸、糖及び核酸関連物質の変化について調べ、SPIによる「とうふよう」と伝統的なそれとの比較検討を行ったので報告する。

実験方法

「とうふよう」の製造

1) 紅麴の製麹

紅麴菌(*Monascus* sp. No. 3404)を蒸米に生育させた米麴の調製は既報³⁾の方法に従って行った。

2) 黄麴の製麹

黄麴(*Aspergillus oryzae* No. 3100)を蒸米に生育させた米麴の調製は既報⁸⁾の方法に従って行った。

3) 豆腐及び乾燥豆腐の調製

豆腐及び乾燥豆腐の調製は既報⁴⁾の方法に従って行った。

4) 伝統的なとうふようの調製

とうふようの調製は既報⁹⁾の方法に準じ、紅麴と黄麴を併用した諸味に(3)で得られた乾燥豆腐を漬け込み、30℃で150日間熟成させることにより行った。なお、今回使用した泡盛のアルコール濃度は35%のものであった。

5) 大豆たん白ゲルの調製

大豆たん白ゲルの調製は既報⁵⁾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。

6) SPIによる「とうふよう」の調製

「とうふよう」の調製は既報^{6,7)}の方法に従い、紅麴と黄麴を併用した諸味に(5)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。

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、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10 g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分間抽出を行った。

プロテアーゼ活性¹⁰⁾、グルコアミラーゼ活性¹¹⁾の測定はそれぞれ既報の方法に従い、 α -アミラーゼ活性の測定は山田¹²⁾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』¹³⁾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』¹⁴⁾に準じて行った。すなわち、予め、試料中のホルモール態窒素量を求め、これよりアンモニウム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』¹⁵⁾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分析条件は以下のとおりである。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/SI504 (長さ15 cm, 内径4.0 mm, Na⁺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パック C-R3A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』¹⁴⁾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¹⁶⁾の方法に準じた。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어의分析条件は以下のとおりである。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-R1B にて算出した。

5) 核酸関連物質の分析

核酸関連物質の分析に用いる試料の調製は『食品分析ハンドブック』¹⁵⁾の方法に従い, ヌクレオチドの抽出および精製を行い, 高速液体クロマトグラフィにより分析した。高速液体クロマトグラフィの分析条件は以下のとおりである。高速液体クロマトグラフ：島津 LC-5A, カラム：三菱化成 MCL-GEL CDR-10 (長さ250 mm, 内径4.6 mm), 移動相は1 M 酢酸-酢酸アンモニウム(pH 3.9), 流速1.0 mL/min とした。検出器は島津 SPD-2A で, 254 nm で測定した。各ヌクレオチドは島津クロマトパック C-R1B にて算出した。

ヌクレオシドの分析は, 同上ヌクレオチドの試料溶液を希釈し, 高速液体クロマトグラフィにより分析した。分析条件は, 高速液体クロマトグラフ：島津 LC-5A, カラム：Shim-pack CLS-ODS (長さ150 mm, 内径6.0 mm), カラム温度：40℃, 移動相：25 mM リン酸塩緩衝液 (pH 5.8) 39容：アセトニトリル1容, 流速：1.0 mL/min とした。検出器は島津 SPD-2A で, 260 nm で測定した。各ヌクレオシドは島津クロマトパック C-R1B 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, α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼ活性の変化

とうふようの熟成や呈味形成に重要な役割を担っている諸味中のプロテアーゼ, α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼ活性の変化について調べ, その結果を Fig. 1 に示した。熟成過程における諸味中各種酵素活性の変化はSPIによる「とうふよう」と伝統的なとうふようとの間でよく似た傾向を示した。これらの酵素活性は熟成15日目までに低下したものの, それ以降は熟成後期に至るまではほぼ同程度の値を維持した。プロテアーゼ活性は諸味中の泡盛(アルコール)の影響を受け抑制された^{3,8)}。このことは, 大豆たん白質が本酵素の作用により限定的な分解を受け, その結果, 製品の物性形成に寄与したものと考えられる。また, プロテアーゼはとうふようの呈味成分である各種アミノ酸の生成にも大きく寄与する酵素である。一方, α -アミラーゼ活性は熟成過程で比較的高い残存活性を維持し, グルコアミラーゼ活性は中程度の残存活性を示した。 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼは製品の甘味成分である糖の生成に寄与していると思われる。

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じるには, 熟成過程における製品の各種窒素成分の変化を明らかにする必要がある。そこで, 熟成過程における製品の水溶性窒素量

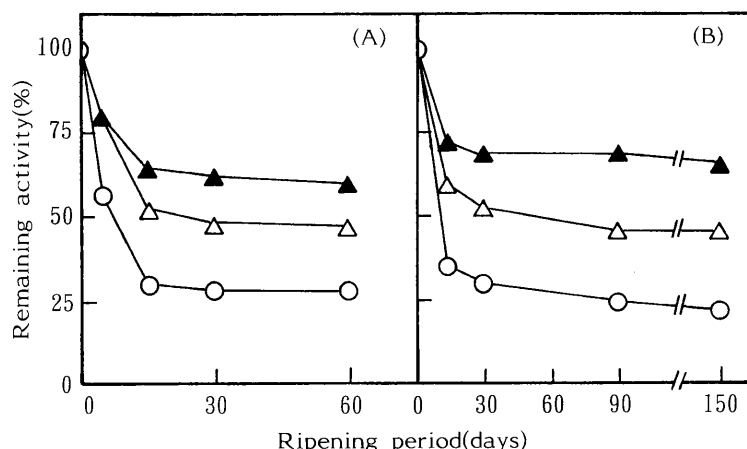


Fig. 1. Changes in α -amylase, glucoamylase and protease activities of soak during ripening period.

(A) : Fabricated tofuyo, (B) : Traditional tofuyo

▲ : α -Amylase, △ : Glucoamylase, ○ : Protease

の総窒素量に対する割合の変化を調べ、その結果を Fig. 2 に示した。この比率で表される数値は味噌やチーズの熟成の程度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。製品の熟成率は熟成の進行に伴い増大した。SPI による「とうふよう」では熟成60日目で、伝統的とうふようでは熟成90日目で丁度食べ頃となった。熟成60日目

における SPI による「とうふよう」の熟成率(約58%)は熟成90日目における伝統的とうふようのそれ(39%)に比べて高い値を示した。なお、熟成40日目における味噌の熟成率は55%と報告¹⁷⁾されており、SPI による「とうふよう」のそれは味噌に比べてわずかながら高い値を示した。

次に、4% TCA 可溶性窒素量に対する総窒素量の比

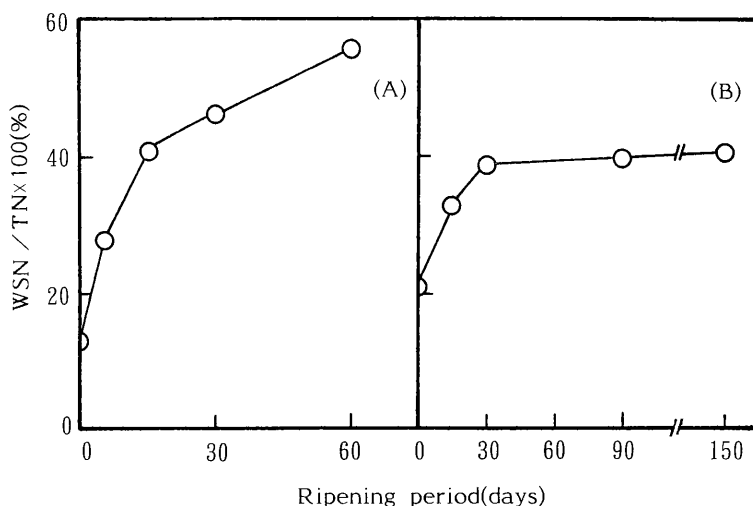


Fig. 2. Changes in the ratio of water soluble nitrogen to total nitrogen of tofuyo during ripening period.
(A) : Fabricated tofuyo, (B) : Traditional tofuyo

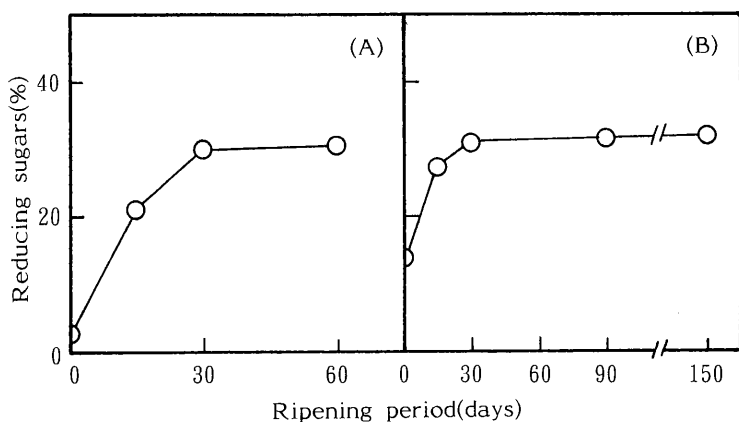


Fig. 3. Changes in reducing sugars of tofuyo during ripening period.
(A) : Fabricated tofuyo, (B) : Traditional tofuyo

で表される数値も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⁶⁾。水溶性窒素成分中、アミノ酸量の占める割合は製品の呈味性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た。その結果、

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。水溶性窒素量に占めるアミノ態窒素量の割合はSPIによる「とうふよう」の方が伝統的なとうふように比べて高い傾向を示した。

そこで、とうふようの熟成過程における遊離アミノ酸量の変化を調べ、その結果を Table 1 に示した。各

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

Amino acids <i>mg/100 g</i>	Ripening period (days)					
	Fabricated tofuyo			Traditional tofuyo		
	0	30	60	0	30	90
Aspartic acid	4.3	432	510	29	636	750
Threonine	0.2	259	311	25	108	126
Serine	1.0	272	374	53	212	377
Glutamic acid	6.6	467	689	56	660	1,041
Proline	tr	56	57	49	334	440
Glycine	1.1	229	248	67	259	324
Alanine	2.5	323	371	90	397	506
Cystine	tr	9	10	0.4	5	9
Valine	0.3	263	321	19	145	211
Methionine	0.6	64	72	4	59	62
Isoleucine	0.7	197	248	15	119	178
Leucine	1.3	422	626	65	288	432
Tyrosine	1.0	301	342	10	126	190
Phenylalanine	2.1	264	327	50	119	220
Histidine	1.0	52	65	5	31	48
Lysine	0.4	245	298	4	108	171
Arginine	3.4	543	519	2	107	112
Total	26.5	4,398	5,388	543	3,713	5,247

tr : trace

Table 2. Changes in organic acids of tofuyo during ripening period

Organic acids <i>mg/100 g</i>	Ripening period (days)					
	Fabricated tofuyo			Traditional tofuyo		
	0	30	60	0	30	90
Citric acid	167	2,728	2,654	83	1,673	1,834
Malic acid	0	799	1,495	154	327	1,130
Malonic acid	0	608	701	0	811	604
Diglycolic acid	0	78	135	0	0	0
Lactic acid	0	985	1,217	46	613	673
Acetic acid	0	253	239	0	191	122
Fumaric acid	0	2	2	0	tr	tr
Propionic acid	1,002	373	284	0	0	0
Pyroglutamic acid	0	33	67	0	14	21
iso-Butyric acid	0	192	450	657	373	352
Total	1,169	6,051	7,244	940	4,002	4,736

tr : trace

製品の遊離アミノ酸量は熟成の進行に伴い増大した。SPI による「とうふよう」(熟成60日目)と伝統的なとうふよう(熟成90日目)の呈味性に関するアミノ酸について比較すると、旨味を発現するグルタミン酸、アスパラギン酸含量は伝統的なとうふようでは、SPI による「とうふよう」に比べて約1.5倍高い値を示した。甘味性アミノ酸を比較すると、アラニンやグリシン含量は前者の方が後者のものに比べて高い値を、セリンではほぼ同様の値を示した。スレオニンではむしろ、SPI による製品の方が伝統的なそれに比べて高い値を示した。一方、ロイシン、アルギニン、チロシン、フェニルアラニン、イソロイシンなどの苦味性アミノ酸は SPI による製品の方が伝統的なそれに比べて高い値を示した。このように両製品には呈味性アミノ酸の組成に大きな相違があることが判明した。従って、このことが両者間で呈味性の相違に大きく影響を与えたものと思われる。

熟成過程における還元糖の変化

とうふようの呈味性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。とうふようの還元糖量はいずれも熟成の進行に伴い増大し、両者のパターンはきわめてよく似た傾向を示した。このことは、Fig. 1 にも示されているように、諸味中の α -アミラーゼやグルコアミラーゼが

熟成期間中に麴の米でんぷん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。なお、製品の還元糖を薄層クロマトグラフィーおよびグルコースオキシダーゼ法により調べたところ、グルコースであることが確認された。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。有機酸の総量は熟成の進行に伴い増大傾向を示した。SPI による製品の各有機酸量は伝統的なそれに比べて高い値を示した。両者ともリンゴ酸は熟成の進行に伴い増大したが、クエン酸や乳酸ではほぼ同様の値を示した。両製品中にはいずれもクエン酸、リンゴ酸、乳酸、マロン酸などが高い値を示した。

熟成過程における核酸関連物質の変化

熟成過程における製品の核酸関連物質の変化について調べ、その結果を Table 3 に示した。総量については、伝統的なとうふようの方が SPI のそれに比べて若干高い値を示した。旨味に関するヌクレオチドを比較すると、5'-グアニル酸 (5'-GMP) では、伝統的なとうふようの方が SPI によるものに比べて約 6 倍高いことがわかった。5'-イノシン酸 (5'-IMP) では、SPI によるもので微量、伝統的なものでは、痕跡程度では

Table 3. Changes in nucleic acid related compounds of tofuyo during ripening period

Compounds <i>mg/100 g</i>	Ripening period (days)					
	Fabricated tofuyo			Traditional tofuyo		
	0	30	60	0	30	90
Adenine	0	0	0	2.66	4.03	4.98
Cytosine	0	0	0	5.23	3.40	6.46
Uracil	1.85	2.57	3.60	13.29	7.18	6.96
Adenosine	0	1.55	tr	2.66	4.03	4.98
Guanosine	0	0.17	tr	0	0	0
Cytidine	0	28.29	22.47	9.85	28.78	23.67
Uridine	2.05	31.43	33.62	3.50	29.72	52.79
Inosine	2.06	1.44	2.48	0.33	0.77	0.99
5'-Adenylic acid	8.60	2.12	0.16	3.49	0.20	0.09
5'-Guanylic acid	1.30	0.16	0.18	5.46	1.27	1.15
5'-Cytidylic acid	0.58	4.40	0.56	18.88	0.10	tr
5'-Uridylic acid	0.47	0.27	0.17	3.16	1.44	1.63
5'-Inosinic acid	0.17	0.11	0.09	2.95	tr	tr
Xanthine	0.83	10.38	8.47	5.82	19.45	18.15
Hypoxanthine	2.60	63.36	59.09	7.31	20.79	21.68
Total	20.51	146.25	130.89	84.51	121.16	143.53

tr : trace

あったもののその存在が確認された。一般に、5'-GMPや5'-IMPはグルタミン酸ナトリウムとの間で旨味の相乗効果のあることがよく知られている。従って、Table 2の結果と考え合わせると、伝統的なとうふのような複雑な呈味性にこれらのヌクレオチドも関与しているものと考えられる。

伝統的なとうふようがSPIによるものに比べて複雑で、深みのある独特な呈味性を有しているのはアミノ酸を始めとする上記呈味成分以外にも脂質、その他の微量成分が大きくかかわっているものと考えられ、今後明らかにしたい。また、とうふのような風味に大きくかわる香気成分についても明らかにする必要がある、今後の検討課題である。

最後に、アミノ酸分析に御協力下さった琉球大学農学部、本郷富士弥教授に深謝致します。

文 献

- 1) 安田正昭 (1983): 豆腐よう和红麴. 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) 安田正昭, 森川誠司 (1990): 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—熟成過程における製品の物性変化. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 11-16.
- 8) 安田正昭, 上地玄作, 宮里興信 (1981): 豆腐よう原料用黄麴の製造について. 琉球大学農学部学術報告, **28**, 111-118.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 山田 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. 日本農芸化学会誌, **37**, 633-636.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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, 382, 建帛社.
- 16) 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.
- 17) Nikkuni S., Itoh H., Tanaka M. and Ohta T. (1984): Changes in SDS polyacrylamide gel electrophoretic pattern of water soluble fraction during miso fermentation. *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.*, **31**, 502-510.