

分離大豆たん白質を用いた「とうふよう」の熟成機構に関する研究—紅麴菌プロティナーゼによる大豆たん白質の分解—

STUDIES ON RIPENING MECHANISM OF TOFUYO USING SOY PROTEIN ISOLATE—DEGRADATION OF SOYBEAN PROTEIN BY *MONASCUS*-PROTEINASE—

安田正昭・坂口真樹・小波本直忠（琉球大学農学部）

Masaaki YASUDA, Maki SAKAGUCHI and Naotada KOBAMOTO
College of Agriculture, University of the Ryukyus, Okinawa 903-01

ABSTRACT

The authors have established a simple and new method of tofuyo prepared by soy protein isolate for an “experimental model system”. In this model system, changes in soybean protein and nitrogen compounds, and physical changes of the product during ripening period were examined in order to reveal ripening mechanism of tofuyo. *Monascus*-proteinase is considered to be served as a key enzyme for ripening of the product. It is unique and characteristic that the ripening was carried out under the presence of ethyl alcohol of awamori (distilled liquor). In this study, effects of ethyl alcohol on the activities of the purified enzyme examined, and also mode of its action toward soybean protein by the enzyme were investigated. The enzyme activities decreased as the ethyl alcohol concentration increased. When 10, 20 and 30% of ethyl alcohol were added to the reaction mixture, the relative activities were 70, 25 and 3%, of no addition treatment, respectively. The ratio of trichloroacetic acid (TCA) soluble nitrogen to total nitrogen in the reaction products was found to increase with increasing reaction time. When 0, 10 and 20% of ethyl alcohol were added to the reaction mixture, values of the ratio after incubation for 72 hrs were 82, 62 and 42%, respectively. On the other hand, the ratio of TCA insoluble nitrogen to total nitrogen decreased with increasing reaction time. The ratio of TCA insoluble nitrogen to total nitrogen under presence of a high ethyl alcohol concentration was higher than that of a low ethyl alcohol concentration. And thus, the enzyme activities were depressed by ethyl alcohol. Digestion of soybean protein by the enzyme was examined by the method of slab polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). When ethyl alcohol was absent, some polypeptide bands of soybean globulin such as α' -, α - and β -subunits in β -conglycinin, and acidic subunit in glycinin disappeared after 10 min incubation, but that of basic subunit in glycinin still remained after 24 hr incubation. On the other hand, when 20% of ethyl alcohol was present, polypeptide bands of α' -, α - and β -subunits in β -conglycinin disappeared, but those of acidic and basic subunits in glycinin were detected after 24 hr incubation. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.*, **13**, 7-11, 1992.

紅麴菌 (*Monascus* 属菌) は沖縄では、とうふようや食品の着色に古くから利用されてきた麴カビである。とうふよう¹⁾は、チーズ様風味を有し、貯蔵性、嗜好性に優れたユニークな大豆発酵食品として今後発展する可能性を大きく秘めている。しかしながら伝統的な製造法では、原料豆腐の製造工程が煩雑で、しかも均質な製品が得られ難いという欠点があり、その欠点をクリアする技術開発が必要とされ、著者ら²⁻⁴⁾は分離大豆たん白質 (SPI) を用いた「とうふよう」の新しい製造法を明らかにした。本法は、伝統的な製造法に比べてたん白質ゲルの調製が容易であること及び高純度のたん白質を用いる単純な系であることから「とうふよう」の実験モデルとして有効である。そこで、「とうふよう」の熟成機構を解明するために本法を採用することとし、これまでに、熟成過程における製品のたん白質と窒素成分の変化³⁾及びその物性変化⁴⁾等について調べてきた。

Monascus 属菌を蒸米に生育させた紅麴はとうふようの製造で重要な酵素源である。本菌の生産するプロティナーゼはとうふようの熟成で鍵酵素として重要な役割を担っている。「とうふよう」の熟成のメカニズムを明らかにするためには、本酵素の酵素化学的性質についても明らかにする必要がある。そこで、著者らは、これまでに、紅麴菌プロティナーゼの精製を行い、その基礎的性質について調べてきた⁵⁾。本報においては、紅麴菌プロティ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。

実験方法

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⁶⁾の方法に従い、固体培養法により行った。

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、SPI (フジプロ R) は不二製油株式会社、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 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。

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⁵⁾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⁷⁾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 $\mu\text{g/mL}$) 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 を加えて酵素反応を停止した。

本酵素の精製は既報⁵⁾の方法に従った。すなわち、紅麴 (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。

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』⁸⁾に準じてマイ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 $\mu\text{g/mL}$) 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。東洋濾紙 No. 5B で濾過し、濾液中の窒素量 (TCA 可溶性窒素) あるいは残渣部の窒素量 (TCA 不溶性窒素) をそれぞれマイクロケルダール法により定量した。

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、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 Laemmli⁹⁾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, 15%ゲル) とし、泳動は、SDS を 0.1% 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シトクローム 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-ブリリアントブルー-R 液 (酢酸:メタノール:水=10:50:43) を用いた。

結果と考察

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

とうふようは泡盛存在下で、紅麴菌のプロティナー

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。なお、実際のとうふようの熟成はエチルアルコール濃度が15~20%付近で進行することが明らかとなっている。

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、反応液にエチルアルコールを0, 10及び20%を含む系を

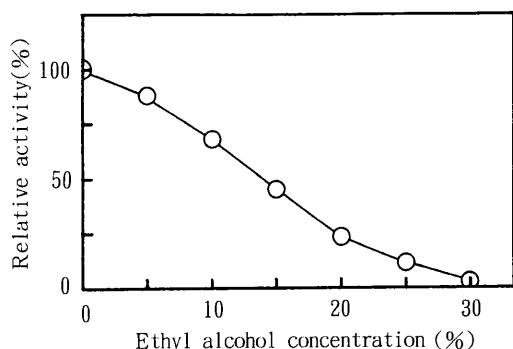


Fig. 1. Effect of ethyl alcohol on the activity of acid proteinase from *Monascus* fungus

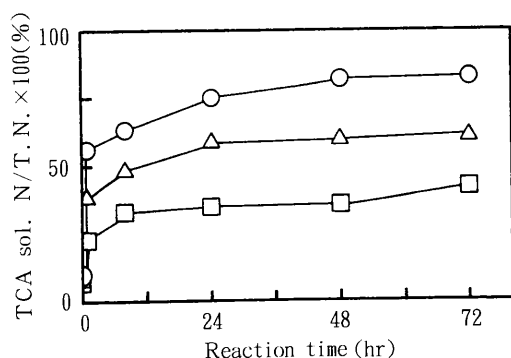


Fig. 2. Changes in the ratio of TCA soluble nitrogen to total nitrogen of soy protein isolate during the enzyme reaction.

○ : 0% of ethyl alcohol
 △ : 10% of ethyl alcohol
 □ : 20% of ethyl alcohol

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「とうふよう」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、TCA可溶性窒素成分に変換されたことがわかった。

2) TCA 不溶性窒素量の変化

1)の場合の同様に、本酵素による SPI 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。TCA 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。TCA 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、いずれの場合にも反応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時間行なったあとで、TCA 不溶性窒素量の総窒素量に対する割合を調べたところ、エチルアルコールが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 TCA 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

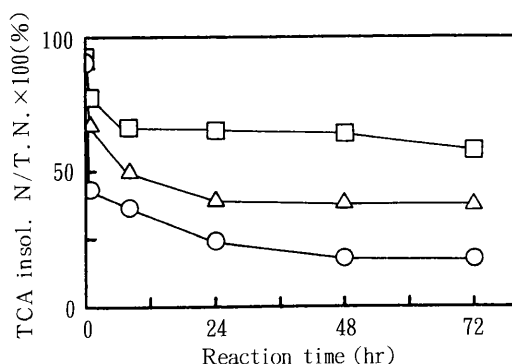


Fig. 3. Changes in the ratio of TCA insoluble nitrogen to total nitrogen of soy protein isolate during the enzyme reaction.

○ : 0% of ethyl alcohol
 △ : 10% of ethyl alcohol
 □ : 20% of ethyl alcohol

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。

プロティ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 β -コングリシニンの α' , α 及び β 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 KDa 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、 β -コングリシニンの α' , α 及び β 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 KDa 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起り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 KDa 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 KDa 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 β -コングリシニンの α' , α 及び β 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 KDa 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 KDa 付近のポリペプチドバンドが増大した。反応6時間で、 β -コングリシニンの α' , α 及び β サブユニットのポリ

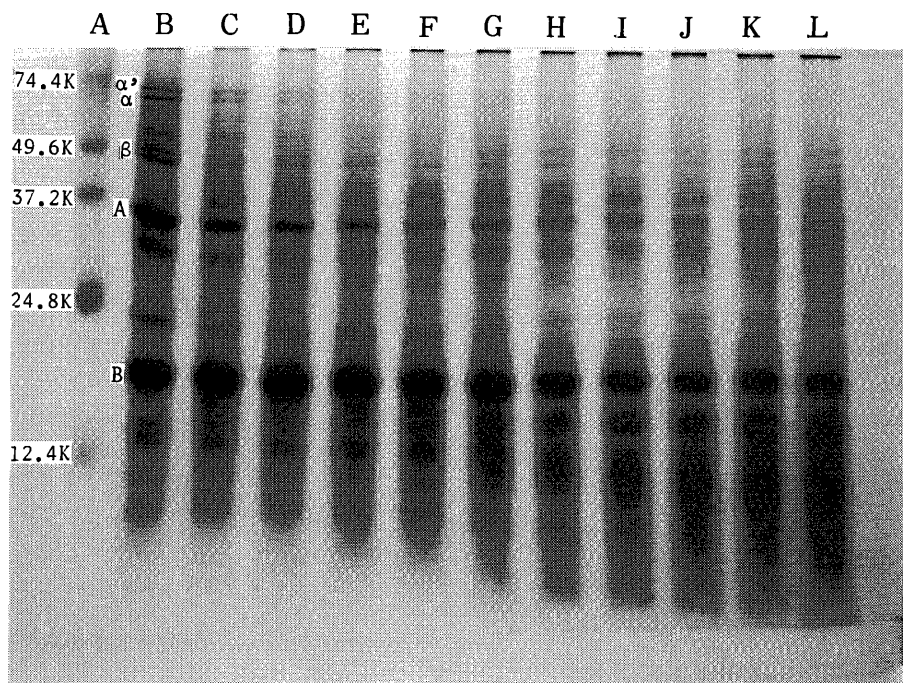


Fig. 4. Slab SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of soy protein isolate at various enzyme reaction stages.

The enzyme reaction was carried out under presence of 20% of ethyl alcohol. Molecular weights were estimated by mobilities of cytochrome c from horse heart and cross-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 A showed each molecular weight. α' , α and β : α' , α and β -subunits in β -conglycinin; A, B: Acidic and Basic subunits in glycinin.

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 KDa 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 SPI の分解はまず、 β -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 KDa 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 SPI 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。図には示さなかったが、SPI を用いた「とうふよう」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を調べたところ、熟成過程で、 β -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を確かめており、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、紅麴菌プロティ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、「とうふよう」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。

文 献

1) 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.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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—熟成過程における物性変化. 大豆たん白質栄養研究会会誌, 11, 11-16.
- 5) Yasuda M, Soeshi K and Miyahira M (1984): Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3403. *Agric Biol Chem*, 48, 1637-1639.
- 6) 安田正昭, 上地玄作, 宮里興信(1983):豆腐よりの製造に用いる紅麴の製造. 日本食品工業学会誌, 30, 63-67.
- 7) Lowry OH, Rosebrough N J, Farr AL and Landall RJ (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- 8) 日本食品工業学会・食品分析法編集委員会編(1982):『食品分析法』p.102 光琳
- 9) Laemmli UK (1990): Cleavage of structural properties during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227, 680-685.