

【研究論文】

【平成29～30年度 県単研究】

仙台味噌における麴等の品質管理技術の確立

羽生 幸弘, 小山 誠司^{*1}, 櫻井 晃治^{*2}, 畑中 咲子

食品バイオ技術部

(*¹現 企画・事業推進部, *²現 宮城県農業・園芸総合研究所)

長期熟成型の赤色系辛口米味噌である仙台味噌は、他の米味噌に比べ麴歩合が低く、米麴の産生する各種酵素がより呈味に影響を及ぼすものと推察される。今後、減塩や加工用味噌など多様な市場ニーズに対応するためには、品質コントロール力の向上が必要であるため、旨味成分であるアミノ酸・ペプチド生成に関わる麴の新たな評価指標を探索した。本研究では、プロテアーゼの中でも醤油のアミノ酸生成に深く関与していると報告のあった³⁾ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)とトリペプチジルペプチダーゼ(TPP)に着目し、県内12社の味噌用麴に両活性があることを確認した。さらに、麴の酵素活性と味噌のアミノ酸の関係を確認するために、3社の麴を用いた小仕込みを実施した。麴のDPP, TPP活性と味噌のアミノ酸との相関は見出せなかったが、DPP, TPP活性は熟成中にそれぞれ異なる挙動を示すことがわかった。

キーワード: 味噌, 米麴, プロテアーゼ, ペプチダーゼ

1 緒言

米味噌は大豆、米麴、塩を原材料に製造される伝統的発酵食品である。宮城県内で生産される仙台味噌は赤色系辛口米味噌として全国的に知られるブランドであり、大豆由来の旨味と味噌らしい深い香りが特徴である。宮城県味噌醤油工業協同組合の「本場仙台味噌統一仕込要領」¹⁾によれば、原料大豆に対する米の割合は重量換算で60～80%であり、他の米味噌と比較して麴割合が低く、米麴から供給される各種酵素の活性が味噌の品質に大きく影響すると推察される。その中でタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)は旨味に関わるペプチドやアミノ酸生成に関わる重要な酵素である。プロテアーゼ活性にはタンパク質やペプチドの内部を切断し低分子化するエンド型と呼ばれるプロティナーゼ活性と、末端に作用してアミノ酸や短鎖ペプチドを遊離するペプチダーゼ活性の二種があり、それぞれ関与する酵素が厳密に区別される。一方、味噌業界で用いる「基準みそ分析法」²⁾ではプロテアーゼに関しては酸性(pH3.0)、中性(pH6.0)、アルカリ性(pH7.5)の三点におけるカゼイン分解を測定するが、この方法ではプロティナーゼ活性とペプチダーゼ活性を分別して評価することはできない。減塩味噌や加工用味噌など多様な要求品質に対応するためには、品質コントロール力を高める必要があり、アミノ酸・ペプチド生成と直結する麴の評価指標を探索することにした。

本研究では、まず、品温経過の異なる2社の製麴工程における各プロテアーゼ活性の推移を比較した。さらに、味噌用米麴の評価指標としてペプチダーゼ、特にジペプチドやトリペプチドとして末端から切り出すDPPとTPPに着目した。醤油醸造においてプロリン特異的なDPPであるX-プロリルジペプチジルペプチダーゼ(DppB)が醤油諸味中で作用し、アミノペプチダーゼが作用しにくいX-Pro配列(Xは任意のアミノ酸)をペプチドの末端から切り出すことでアミノ酸の生産に関与していることが示されている³⁾ことから、味噌でも同様の作用が期待された。そこで味噌用の米麴におけるDPPやTPPの活性測定を試み、小仕込により熟成過程での活性変化とアミノ酸生成の関係を調査した。

2 実験方法

2.1 試薬, 器具, 試料

特にことわりがない限り、試薬は特級またはそれに準ずるものを使用した。アミノペプチダーゼ基質(表1)は株式会社ペプチド研究所またはBachem社のものを使用した。無菌操作を要する器具についてはオートクレーブ等による滅菌をあらかじめ行うか、無菌処理済みの使い捨て製品を使用した。米麴試料は県内の味噌製造場が製造したものを扱い、出麴以降-20℃で使用まで保存した。

2.2 酵素活性測定

米麴及び味噌からの酵素抽出法及びプロテアーゼ活性測定法については既報^{4),5)}に準じた。アミノペプチダーゼ活性はp-ニトロアニリン(pNA)が酵素作用で遊離し発色する合成基質(アミノペプチダーゼ基質)を用いて測定した。各基質を10mMとなるようにジメチルスルホキシドに溶解し、これを基質溶液とした。マイクロプレートリーダー(Tecan社製, Spark)を使った測定は2 μ Lの基質溶液を178 μ Lの測定用緩衝液に混和し、20 μ Lの酵素抽出液を加えて30 $^{\circ}$ Cにおける10分間あたりの400nmでの吸光度の増加を結果として示した。また、紫外可視分光光度計(島津製作所製, UV-2700)での測定では基質溶液30 μ Lを2670 μ Lの測定用緩衝溶液に混和し、300 μ Lの酵素抽出液を加え、同様に30 $^{\circ}$ Cにおける10分間あたりの400nmでの吸光度の増加として測定した。

表1 アミノペプチダーゼ基質

基質	測定対象となる酵素
Leu-pNA	ロイシンアミノペプチダーゼ
Arg-Pro-pNA	DppB
Gly-Phe-pNA	DppE, DppF
Phe-Pro-Ala-pNA	TPP

2.3 味噌小仕込試験

一般的な仙台味噌の製造工程(洗浄, 浸漬, 蒸煮, 仕込み, 発酵・熟成)により仕込み重量20 kg, 麴歩合8分, 塩分12.5%, 水分47%で仕込みを行った。大豆は洗浄後, 一晚浸漬を行い, 大豆蒸煮缶(宮城県味噌醤油工業協同組合所有, 株式会社フジワラテクノアート製, ZJ-450)で加圧蒸し(117 $^{\circ}$ C, 30分, 75 kPa)を行った。県内味噌メーカーで製造した麴, 並塩, 蒸し大豆を混合した後, 挽肉機にかけ5Lビーカーに約3 kgずつ分け, 重石を置いてインキュベーター(タイテック株式会社製, BR-300LF)で30 $^{\circ}$ C, 2ヶ月熟成した。熟成期間中, 定期的にサンプリングを行い, 酵素活性とホルモール窒素, 一般成分の測定を行った。サンプリングはビーカーの中心部から行い, 1つのビーカーからのサンプリングは1回とした。サンプリングした味噌は分析まで-60 $^{\circ}$ Cで保存した。

2.4 菌数測定

米麴中の細菌数の測定は3M社のペトリフィルム培地

を使用した。一般生菌数は生菌数測定用ACプレートを, 乳酸菌数については乳酸菌数測定用LABプレートをを用いた。米麴の懸濁液として0.1%ペプトン含有生理食塩水を, 懸濁液の希釈用として生理食塩水を121 $^{\circ}$ C, 20分間オートクレーブ滅菌し使用した。麴菌等の真菌類の増殖を防ぐため, 使用直前に1/1000量の0.25%アンホテリシンB及び1/1000量の0.1%シクロヘキシミドを添加した。米麴を10倍量となるよう懸濁し, 適宜希釈した。各希釈液1mLをペトリフィルム培地に供して25 $^{\circ}$ C, 2日間培養し生じた赤色のコロニーを目視により計数し, 米麴に対する希釈倍率を乗じて菌数とした。耐塩性乳酸菌は0.1%ペプトン含有10%食塩水で懸濁し, 希釈に10%食塩水を使用し, 同様の操作を行った。

3 結果と考察

3.1 製麴工程におけるプロテアーゼと生菌数調査

プロテアーゼ活性の推移を比較するため, 製麴方法の異なる県内2社の味噌製造場から製麴中(19時間, 27時間, 出麴)に試料採取し, 基準みそ分析法による酸性・中性・アルカリ性プロテアーゼを測定した。品温変化は図1のとおり。

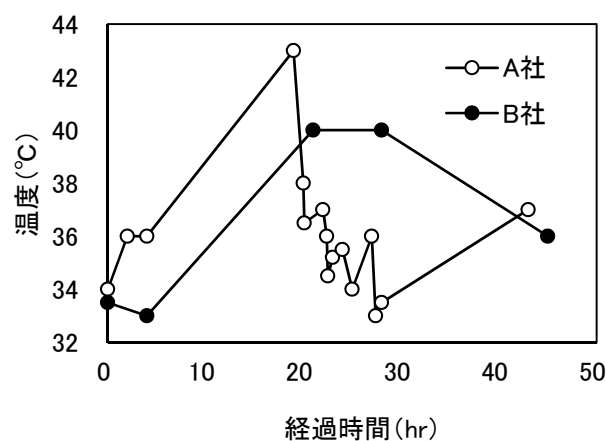


図1 製麴工程中の品温変化

A社は送風機や温調設備などを併用し人手による作業を行う全床製麴, B社は専用の品温管理システムにより工程が自動化されている機械製麴であった。

A社では麴室入れ前(~19hr)までに速やかに40 $^{\circ}$ Cを超える品温に達し, 後半は35 $^{\circ}$ C前後で推移させていたのに対し, B社では20~28hrまで40 $^{\circ}$ Cを維持し, その後38 $^{\circ}$ C前後で推移していた。酸性及び中性プロテアーゼ活性は, A社の経過では前半での活性が低く抑えられ,

後半の品温を35℃付近に保持することで経時的な増加が認められた。B社では前半での品温経過がA社よりも抑えられ、活性が早い段階で高めたかったが、品温が維持された中盤では活性の推移が鈍く、品温低下後活性が上昇したものの、出麴時の活性はA社よりも低いという結果であった。アルカリプロテアーゼ活性は、A社では前半に高くなることが認められたが、後半の増加は緩慢であった。B社では全体的に活性が低調だった(表2)。

生菌数は、麴の品質上重要な因子であることから併せて調査を行った。工程を通じ人の手が触れることがないB社の方がやや高めであったが、酸の生成によるpH低下など酵素作用への影響が懸念される程度ではなかった。また両社とも耐塩性乳酸菌は検出されなかった。

表2 麴1gあたりのプロテアーゼ活性と生菌数の推移

A社	19hr	27hr	出麴
酸性プロテアーゼ	4.0	44.0	95.6
中性プロテアーゼ	9.4	38.7	64.7
アルカリプロテアーゼ	4.9	5.3	5.5
一般生菌数	ND	1.1×10 ⁴	1.5×10 ⁴
乳酸菌数	ND	1.1×10 ³	< 10 ²
耐塩性乳酸菌	ND	ND	ND
B社	20hr	28hr	出麴
酸性プロテアーゼ	14.9	18.9	65.6
中性プロテアーゼ	18.0	19.8	46.3
アルカリプロテアーゼ	2.5	2.6	2.7
一般生菌数	< 10 ³	1.3×10 ⁴	7.9×10 ⁵
乳酸菌数	ND	ND	ND
耐塩性乳酸菌	ND	ND	ND

3.2 アミノペプチダーゼ測定

麴のロイシンアミノペプチダーゼ(LAP), DPP, TPP活性の測定を行うために、まず、各酵素の至適pHを確認することにした。DPPはDppBとDppE,Fの2種類の基質を用いた。このうち、DppBが醤油の氨基酸生成との関連が報告された基質だが、今回はDppE,F, さらにTPPについても調査を行うことにした。A社の米麴を使用してpH3.0~8.0間でマイクロプレートリーダーを用いて各活性を測定した。その結果、LAPは中性からアルカリ領域、DPPは中性領域、TPPは中性から酸性領域で活性が高かった(図2)。味噌の熟成に伴いpHが5以下に低下してもTPPは作用する可能性が考えられた。

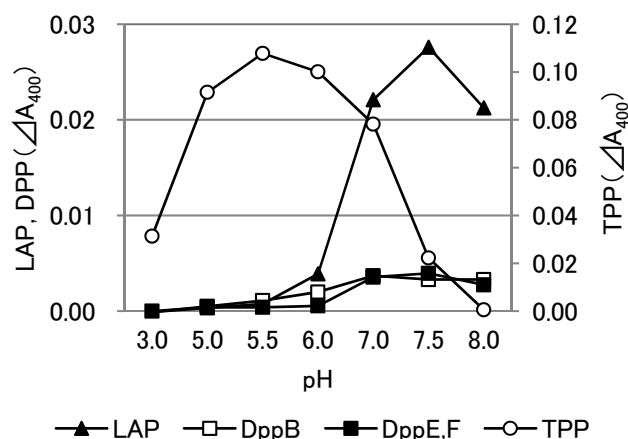


図2 各pHでのペプチダーゼ活性

至適pHの測定結果から、県内12社の米麴の活性測定をLAPはpH8.0, DPPはpH7.0, TPPはpH5.5で行った。その結果、全ての米麴で活性が確認された(図3)。酵素活性間に明確な関係性はみられなかったが、LAP活性が高い試料は他のペプチダーゼも高い傾向もみられ、総合的な酵素生産量の違いによるものと推察された。これらについては、製麴中の温度経過、種麴の違いなどの影響が考えられ、さらに検討が必要である。DppBとDppE,Fで明確な差や傾向がみられなかったため、今後の実験はDppBのみ行うことにした。

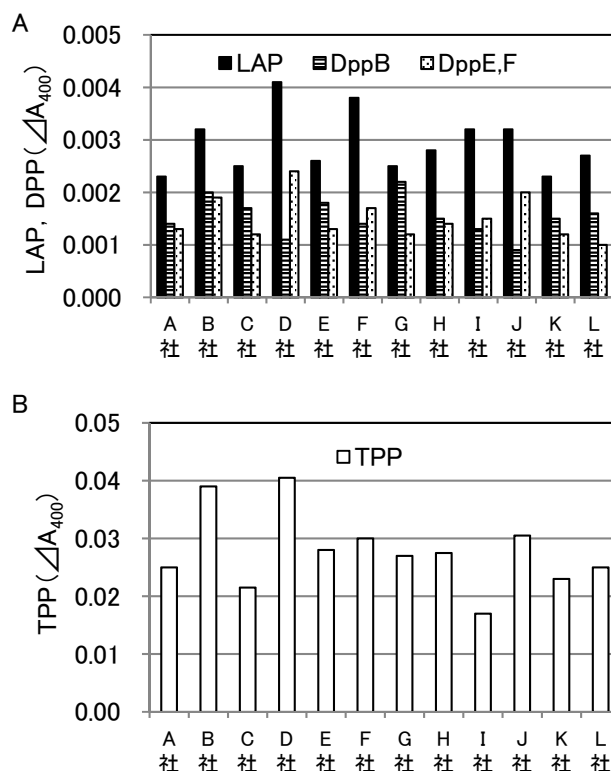


図3 各社の米麴アミノペプチダーゼ活性の比較

3.3 試験仕込

醤油熟成過程において、DppB活性が消失し、ホルモール窒素が増加する逆相関がみられることから、DppB活性の消失が原料タンパク質分解の大まかな指標となりうることが報告されている⁶⁾。味噌と醤油は大豆を主原料に高塩分存在下の発酵熟成という共通点もあることから、味噌熟成過程においてもDppB活性がタンパク質分解の指標となることが期待できる。熟成過程におけるDppB活性およびTPP活性とホルモール窒素の経時変化について小仕込による調査を行った(図4)。なお、3-3以降の酵素活性測定は紫外可視分光光度計で行った。

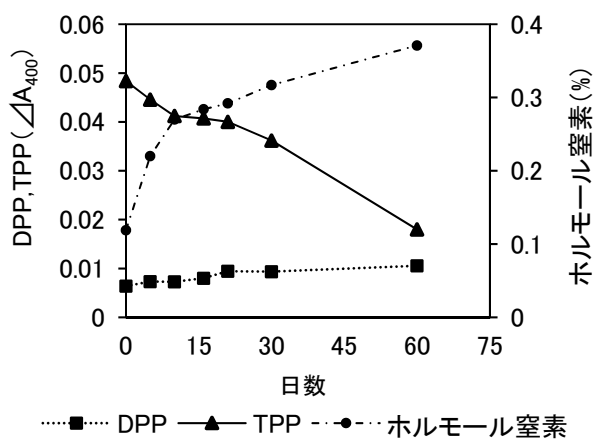


図4 味噌熟成におけるDPP及びTPP活性とホルモール窒素の経時変化

味噌では、醤油でみられたDPP活性の急激な変化はなく、一方で、TPP活性は熟成に伴い活性が低下する異なる挙動が見られた。今回の味噌仕込時のpHは5.74で、熟成に伴い低下し、仕込後60日には5.30となった。熟成期間中のpHの変動は小さく、各酵素活性に急激な変化はないものと考えられた。しかし、TPP活性が低下し、DPP活性は増加したことから、酵素自体の安定性等の検討が必要と考えられた。

3.4 米麴のDPP活性・TPP活性とアミノ酸生成

次に、米麴のDPP活性・TPP活性と味噌のアミノ酸生成との関係を調査するため、DPP活性・TPP活性が異なる米麴を用いて小仕込試験を行った。米麴は、県内の味噌メーカー3社が製造したものを用い、米麴以外の条件は同一とした。麴の酵素活性と熟成60日目のホルモール窒素量との関係を調査した結果、DPP、TPP活性と

も熟成後のホルモール窒素量との関係は見出せなかった(図5)。

醤油では製品から大豆タンパク質が検出されない⁷⁾ほど分解が進んでいるのに対し、味噌は米麴のためタンパク分解酵素が醤油麹ほど生産されず、水分も低いことから原料タンパク質の分解は醤油ほど進まない。また、本研究の小仕込みは加温熟成を行ったためにペースが限られ、1樽が約3kgと少量だった。通常の味噌に比べ空気に触れる面積が多く、発酵・熟成が早まった影響も無視できない。醤油と味噌の違い、小仕込みにおける条件設定など、さらに考察・検討が必要である。

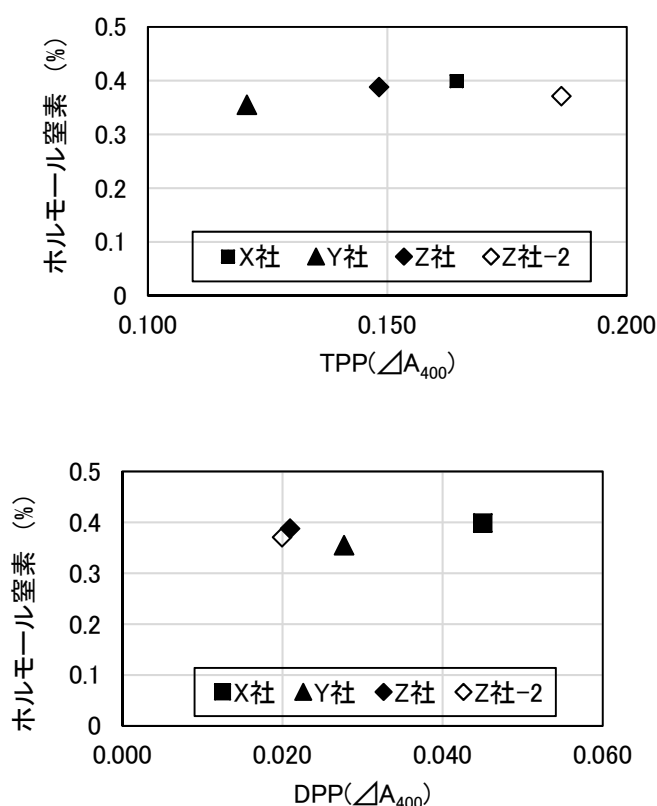


図5 各味噌のDPPおよびTPP活性とホルモール窒素との関係 (上：TPP活性，下：DPP活性)

4 結言

本研究では味噌用米麴の新たな評価指標を探索するために、醤油でアミノ酸生成に関わることが報告されたDPPとTPPに着目し調査を行った。

- (1) 製麴条件とプロテアーゼ活性の推移を確認するため、県内2社の麴の酸性・中性・アルカリ性プロテアーゼを調査した。
- (2) 麴のロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)、DPP、TPPの至適pHを確認し、LAPはpH8.0、DPPはpH7.0、TPP

はpH5.5で測定することにした。県内12社の米麴の各酵素活性を測定した結果、全てで活性が確認された。

- (3)味噌熟成過程におけるDPP活性およびTPP活性とホルモール窒素の経時変化について小仕込による調査を行った。醤油と異なり、味噌ではDPP活性の急激な変化は見られず、一方で、TPP活性は熟成に伴い活性が低下する異なる挙動が見られた。
- (4)麴の酵素活性と味噌のアミノ酸の関係を確認したが、今回は麴のDPP, TPP活性と味噌のアミノ酸との相関は見出せなかった。

謝辞

本研究を進めるにあたり東京農工大学山形洋平教授、前田浩助教にはペプチダーゼ基質の検討について、酒類総合研究所織田主任研究員には関連遺伝子の固相条件での発現状況について、多大なる御助言を頂きました。また、宮城県味噌醤油工業協同組合技術部高橋清部長を始めとする技術部の皆様には試験仕込やホルモール窒素等の分析にご協力をいただきました。宮城県味噌醤油工業協同組合の組合員の皆様には、味噌等をご提供頂きました。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) 宮城県味噌醤油工業協同組合. 本場仙台味噌統一仕込要領. 2008. p.4.
- 2) 全国味噌技術会. 新・みそ技術ハンドブック 付基準みそ分析法. 2006. p.42-44.
- 3) 館博. 醤油モデル系熟成過程のタンパク質分解におけるX-プロリルジペプチジル-アミノペプチダーゼの役割. 日本醸造協会誌. 1998, 93 (4), p. 307-311.
- 4) 小山誠司, 櫻井晃治, 畑中咲子. 仙台味噌における麴等の品質管理技術の確立. 宮城県産業技術総合センター研究報告No.15. 2017, p.37-40.
- 5) 和久豊. 味噌熟成中の酵素活性について. 日本醸造協会誌. 1993, 88 (6), p. 433-438.
- 6) 館博. X-プロリルペプチジル-アミノペプチダーゼと醤油熟成過程. 日本醸造協会誌. 1996, 91 (2), p.138-140.
- 7) 古林万木夫. 醤油の機能性に関する研究. 生物工学会誌. 2008, 86 (2), p.65-72.