

## 129 味噌熟成中における水不溶性画分の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンの変化について

(農水省、食総研) ○新国佐幸、伊藤 寛、太田輝夫

## I. 目的

米味噌は通常、蒸煮大豆と麹及び食塩により醸造される。大豆蛋白質は蒸煮工程において、加熱変性され、大部分は水不溶性となるが、味噌の熟成中に麹の酵素により分解され、遊離のアミノ酸やペプチド等の水溶性窒素として再び可溶化する<sup>1)</sup>ことが知られている。この水溶性窒素の熟成中の変化については、竹内ら<sup>1)</sup>や本藤ら<sup>2)</sup>により詳細な検討がなされている。しかし水溶性窒素の全窒素に対する割合(窒素溶解率)は、通常60%以下<sup>2)</sup>であり、味噌の40%以上を占める水不溶性窒素からの熟成の検討は少ない。望月ら<sup>3)</sup>は、熱水洗浄後の残渣からアルカリ抽出し、酸沈澱して得た画分について、チゼリウス電気泳動、セルロース・アセテート膜による電気泳動法等により熟成中の変化を検討し、仕込み直後と熟成後の泳動パターンの違いを報告した。演者らも、味噌熟成中の大豆蛋白質の分解過程の解明を目的として、水不溶性 SDS あるいは塩酸グアニジン可溶画分につき、SDS 電気泳動法及び塩酸グアニジンによるゲル手廻法により、熟成中の泳動パターン、クロマトグラムの変化を検討した。

## II. 方法

大豆は鶴の子を用い、浸漬後1.3 kg/cm<sup>2</sup>の蒸気圧下で7分間蒸煮し、常法通り7歩麹の味噌を20 kg 醸した。所定の日数後10g採取し、熱水100mlを加えて1分間煮沸した後、遠心分離し、上澄を捨て、更に3回水で洗浄した。凍結乾燥後、エーテルにて脱脂した残渣を不溶性画分とした。あるいは、遠心分離後の沈澱に直接冷アセトンで脱水脱脂した残渣を不溶性画分とした。SDS デュラスク電気泳動はWeberら<sup>4)</sup>の方法により行った。前処理は2% 2-メルカプトエタール(ME)、2% SDS 及び25% グリセリンを含む0.01M リン酸buffer(pH 7.2)で40°C、一晚抽出し、遠心分離後、その上澄について泳動を行った。βDS スラブ電気泳動はTris-HCl buffer系を用いるLaemmli<sup>5) 6)</sup>の方法により行った。塩酸グアニジンによるゲル手廻はSephacrose 6Bを用い、Fishら<sup>7)</sup>の方法により行った。アミノ酸分析は定沸点塩酸により24時間110°Cで処理した分解液について測定した。酵素による消化試験は、米麹抽出液を粗酵素液とし、不溶性画分(1%粗蛋白質として)を基質として、1/10 リン酸buffer(pH 6.0)及び10%食塩を含む1/10 リン酸buffer(pH 6.0)中、30°Cで反応を行い、所定の時間後、TCA可溶画分をフォリン試薬で染色させ、660nmの吸光度を測定した。

## III. 結果

1. 水溶性画分 味噌熟成中の窒素溶解率は仕込み直後の18%から、短期間で急激に増加し、40日後で約56%であった。水溶性画分のSephadex G-100による溶出パターンは、40日後の味噌では、ニヒドリン陽性の大きなピークが認められたが、分子量12,500のチトクロームCより以前に溶出したピークはほとんど認められなかった。

## シンポジウム (醸造物の熟成)

2. 不溶性成分の調製とその溶解性 不溶性成分には7-9%の窒素が含まれ、<sup>この</sup>味噌中の割合は仕込み直後の約80%より順次減少し、40日後で47%であった。所定の日数後の味噌より調製した不溶性成分の、40℃一晩、2%MEを含む2%SDSによる窒素の抽出率は、仕込み直後で約90%であったが、熟成が進むにつれ減少し、40日後では約70%であった。

3 SDS電気泳動 浸漬大豆と仕込み直後の泳動パターンには、著しい差は認められなかったが、仕込み直後には泳動原点よりテーリングが認められた。仕込み後1日では、大豆蛋白質のサブユニットに由来するバンドの減少、消失が認められ、新しい低分子の数のバンドが認められた。10日以後、泳動パターンにはほとんど変化は見られなかったが、これらの低分子のバンドのより低分子への移行が観察された。泳動度よりこれらの分子量は $1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ と推定された。

4. 塩酸グアニジンによるゲル透過 浸漬大豆のクロマトグラムでは、大豆蛋白質のサブユニット由来の3つのピークに分離され、蒸煮大豆でも同様な3つのピークが認められた。仕込み後1日の味噌より調製された不溶性成分のクロマトグラムは、これら3つのピークより少し遅れた位置に1つのピークだけが検出された。40日後では、更に遅い位置にピークが検出され、次の肩まで高原状を呈していた。検出位置よりこのピークの分子量は、 $1.3 \times 10^4$ 、高は $5 \times 10^3$ と推定された。

5. アミノ酸分析と酵素消化試験 40日後の味噌とそれから調製した不溶性成分の全アミノ酸組成は、両者の相関係数は0.956で著しい差は認められなかった。不溶性成分の酵素による消化試験は、蒸大豆と仕込み直後の不溶性成分の消化性はほとんど差は認められなかった。しかし、40日後の不溶性成分は、両者に比べ吸光度が低く、特に10%食塩存在下では両者の半分以下であった。

6. 蒸煮条件による泳動パターンへの影響 浸漬大豆を $1 \text{ kg/cm}^2$ で1分、10分、20分、40分、60分と蒸煮し、その泳動パターンを比較した。その結果、20分までは、サブユニットのバンドが観察されたが、40分以上では明確なバンドは観察されなかった。同様なことは塩酸グアニジンによるゲル透過でも観察された。これらの大豆を用いて、味噌の試験を行った。窒素溶解率は各蒸煮大豆区とも50日後で62-64%を示し、著しい差は認められなかったが、浸漬大豆区では50日後で約43%であった。これらの味噌より調製した不溶性成分の泳動パターンは各蒸煮大豆区間で著しい差は認められなかった。浸漬大豆区では、11S大豆蛋白質のより泳動度の大きいサブユニットの1本のバンドと、2本の新しいバンドが観察された。

7. 味噌の種類による泳動パターン。白味噌、赤辛味噌、淡色辛味噌に著しい泳動パターンの差は認められなかった。

これらの結果より、味噌の熟成について考察する。

参考文献 1) 竹内ら; 醸工 44 934 (1966), 2) 本藤ら; 食品工誌 15 414 (1968), 3) 望月ら; 食品工誌 15 408 (1968), 4) Weber ら; Methods in Enzymology Vol. xxi p.3 (1972), 5) Laemmli; Nature 227 680 (1970), 6) 鈴木; 遺伝 No.11 43 (1977), 7) Fish ら; J. Biol. Chem. 244 4989 (1969).