

〔醸工 第45巻, 第4号, p. 312~319, 1967〕

醤油保存に関する研究

(第6報) *Lactobacillus* による醤油中のグルタミン酸,
アスパラギン酸の分解について

花岡 嘉夫

(キッコーマン醤油株式会社中央研究所)

Studies on Preservation of Soy Sauce

(VI) Enzymic Decomposition of L-Glutamic Acid and L-Aspartic Acid in Soy Sauce by *Lactobacilli*

Yoshio Hanaoka

(Central Research Institute of Kikkoman Shoyu Co., Ltd., Noda)

The decreases of L-glutamic and L-aspartic acids in soy sauce were studied and it was found that these decreases were caused mainly by the amino acids decomposing enzymes produced by holo torelant lactic acid bacteria grown in soy sauce.

And it was also found that the amount of these two amino acids utilized by *Saccharomyces rouxii* var. *halomembranis*, a common yeast of soy sauce, was found to be small. These conclusions were obtained from the following experimental results.

1) Sixty five strains of lactic acid bacteria were isolated from rancid soy sauce containing 9% NaCl.

Among them, strains number 2, 7 and 17 were found to be capable of decomposing L-glutamate, L-aspartate and both amino acids respectively.

2) Four strains chosen as representatives of L-glutamate, L-aspartate, and both amino acids decomposing strains and non decomposing strains, were studied taxonomically. They were all *Lactobacillus* Beijerinck, homofermenter producing DL-lactic acid.

3) The cell-free extracts from these cells produced CO₂ and L- α -alanine and L- γ -amino butyric acid from L-aspartate or L-glutamate respectively. No liberation of NH₄⁺ was detected. These results suggested that the enzyme catalyzing the above reactions are L-aspartate-4-decarboxylase or L-glutamate-1-decarboxylase.

4) The optimum pH value of these enzymes was 5.0, and they were stable at 3°C in a pH 5.0 acetate buffer solution over a period of 90 days.

5) These enzyme reactions were inhibited by the presence of sodium chloride in acetate buffer solution and soy sauce.

6) The L-glutamate-1-decarboxylase was almost inactivated by heating at 80°C for 10 minutes and L-aspartate 4-decarboxylase was inactivated at 70~60°C for 10 minutes.

7) The intact-cell of No. 30 strain decomposed L-glutamic and L-aspartic acids, but in the cell-free extract only of L-aspartic acid decarboxylation activity was detected.

緒 言

*E. coli*¹⁾, *Clostridium welchii*²⁾, *Rhodotorula glutinis*³⁾ などは L-グルタミン酸より L- α アミノ酪酸を, また *Clostridium welchii*²⁾, *Nocardia globerula*⁴⁾, *Pseudomycobacterium*⁵⁾, *Pseudomonas* sp. st.-42⁶⁾ は L-アスパラギン酸より L- α アラニンを生合成する脱炭酸酵素を生産することが報告されている. また大山ら⁷⁻⁹⁾は醤油微生物による醤油中のグルタミン酸の分解, 生合成について報告している.

しかし, いまだ *Lactobacillus* がグルタミン酸, アスパラギン酸の脱炭酸酵素を生産すると云う報告はない. 今回低濃度食塩含有醤油に増殖した微生物より *Lactobacillus* を分離し, 当乳酸菌が醤油中のグルタミン酸, アスパラギン酸を酵素的に脱炭酸することなど, 2, 3の知見をえたので報告する.

実 験 方 法

1. 各種醤油成分の定量

- 1) アミノ酸 日立製 KLA 3 型 アミノ酸自動分析計を用い, 定量を行なった.
- 2) グルタミン酸, アスパラギン酸 グルタミン酸は *E. coli*, アスパラギン酸は *Pseudomonas* sp. st.-42 の菌体よりそれぞれ抽出した脱炭酸酵素を使用し, Warburg 検圧計により, 生成する CO₂ を常法通りに測定し, 両アミノ酸を定量した.
- 3) 乳酸 日野ら¹⁰⁾の方法を準用した.
- 4) その他の一般成分 一般醤油分析法により行なった.

2. 菌の分離, 同定

酸敗した食塩 6, 9% 醤油を希釈後, 平板上に, また重曹法によりつぎの培地を使用して, 30°C, 4 日間培養してえたコロニーより菌を分離した. 培地は米麴汁 (Bllg 10%) と食塩 4% 醤油 (T. N. 1.6%) を等量混合し, pH 6.0 に調整後, 15lb, 15分殺菌したものを使用した. また希釈水としては, ブドウ糖 1%, 酵母エキス 0.1% および食塩 6, 9% 各含有のものを同様に殺菌後使用した.

菌の同定は前報¹¹⁾と同様に行なった.

3. グルタミン酸, アスパラギン酸脱炭酸酵素溶液の調整

前, 本培養培地としては, 米麴汁に醤油 (食塩 4%, T. N. 1.6%) を 10%, グルタミン酸, アスパラギン酸各 1% を添加し, pH 6.0 に調整殺菌後使用した.

当培地に分離保存菌株を接種し, 30°C, 48 時間前培養し, これを本培養の際に 1% 添加し, 30°C, 48 時間培養した. この培養液を遠沈し, えた菌体を生理食塩水にて洗滌後, 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に懸濁させ, 超音波 (20KC) で 10 分処理し, 菌体より酵素を抽出した. 抽出液を遠沈し, 各酵素溶液として使用した. なおこの操作はすべて 5°C 以下にて行ない, また酵素溶液は 3°C に保存した.

この酵素溶液中の蛋白は炭酸ソーダ-Folin 呈色法により測定し, 通常蛋白含量を 5mg/ml に調整し, これを酵素溶液とした.

4. アミノ酸のペーパー・クロマトグラフィー

溶媒として *te* BuOH, Formic acid, Water (75, 15, 15) を用いて 40 時間展開し, 0.2% ニンヒドリン溶液にてアミノ酸のスポットを検出した. アミノ酸含量は 5~10 μ g となるようにスポットした.

5. 酵素反応

基質としてはグルタミン酸またはアスパラギン酸 1mg を酢酸緩衝液 (pH 5.0) 2.5ml にとかした液を, 酵素液としては上記の溶液 0.5ml を使用し, 酵素反応は 37°C, 30 分を行ない, 生成する CO₂ を Warburg 検圧計にて測定し, これより各酵素の脱炭酸能を測定した.

実 験 結 果 と 考 察

1. 乳酸菌増殖後の醤油成分変化

食塩 9% 醤油に乳酸菌, 白かびすなわち産膜酵母 (主として *Sacchromyces rouzii* var. *halomembranis*) の増殖後における醤油の成分変化を Table 1-a, b に示した.

Table 1. Component of soy sauce after the growth of lactic acid bacteria and *S. rouxii* var. *halomembranis*.

(a)				(b)			
Sample component	A	B	C	Amino acid	A	B	C
NaCl	9.35%	9.45%	9.30%	Tryptophan	1.5	1.5	0 mMol
pH	4.85	5.15	4.30	Lysine	33.0	32.0	49.0
R.S. ¹⁾	3.84	1.79	1.17	Histidine	5.5	6.0	0
T.A. ²⁾	1.24	1.17	3.37	Ammonia	30.0	35.0	55.0
Vo.A. ³⁾	0.13	0.10	0.18	Arginine	9.0	8.5	0
EtOH	0.89	0.68	0.82	Cysteic acid	0	0	0
Phenol ⁴⁾	0.79	0.79	0.78	Aspartic acid	33.5	34.5	0.5
T.A.	1.24	1.15	1.22	Threonine	16.0	18.0	22.5
				Serine	31.5	26.5	34.5
				Glutamic acid	77.0	77.0	0
				Proline	31.5	31.0	34.5
				Glycine	26.0	22.0	30.0
				Alanine	45.0	32.0	76.0
				Cysteic acid	0	0	0
				Valine	28.5	24.0	32.0
				Methionine	6.5	5.0	6.0
				Isoleucine	24.5	20.5	26.5
				Tyrosine	4.0	3.5	0
				Phenylalanine	17.5	14.5	18.0
				Leucine	39.5	31.5	40.5

- 1) % of reducing sugar as glucose
 2) % of total acid as lactic acid
 3) % of volatile acid as acetic acid
 4) mg/ml as vanilin

A: Control

B: After the growth of *S. rouxii* var. *halomembranis*

C: After the growth of lactic acid bacteria

この表より白かび増殖後は醤油中の還元糖の減少, CO₂ の生成, pH の変化が見られるが, 他の成分すなわちN含有成分などの変化はほとんど見られない。しかし乳酸菌増殖後には還元糖の減少, CO₂ 乳酸の生成, pH の低下が見られる他に, アンモニア態Nの増大, アミノ酸成分の変化, とくにグルタミン酸, アスパラギン酸の減少とアラニンの増加が見られる。前報¹¹⁾の漬物中に乳酸菌が増殖した場合, 液汁中の両アミノ酸の減少は起らなかった。

つぎにこれらの乳酸桿菌群を食塩6~18%の各醤油に5×10⁶/ml接種し, 経時的にグルタミン酸, アスパラギン酸を定量し, その結果をFig. 1に示した。これより両アミノ酸とも食塩濃度の増加とともに分解率は減少する。また当乳酸菌は食塩15%以上では醤油中において増殖しないにもかかわらず, 食塩15, 18%の醤油中の両アミノ酸が減少する事実より, 菌の生育のために両アミノ酸が消費されるのではなく, 菌体内の酵素により分解されるものと推測した。

2. 乳酸菌の分離とその性質

グルタミン酸, アスパラギン酸の減少した酸敗醤油より乳酸桿菌65株を分離した。これら菌株のうちグルタミン酸, アスパラギン酸, および両アミノ酸をそれぞれ分解する菌7, 17, 2株をえた。他の31菌株は両アミノ酸分解は全く有しなかった。

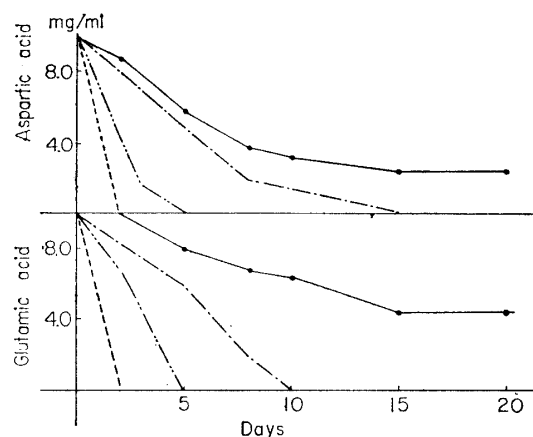


Fig. 1. Relation between concentration of NaCl in soy sauce and decrease of glutamic acid and aspartic acid by lactic acid bacteria cells.

—: NaCl 18% —·—: NaCl 12%
 —·—: NaCl 15% — — —: NaCl 9%

ただし当試験は分離菌を食塩10%醤油に接種し, 30°C, 10日間培養後分析を行なったものである。分解能を有する菌株中より, 分解能の強いもの, すなわち減少するアミノ酸を経時的に測定し, 短期間に減少させる菌株をそれぞれ1株, 計3株と分解能を有しない菌1株について以後の各種試験を行なった。菌株の各 No. はつぎの通りである。

グルタミン酸分解能を有する菌株	No. 29
アスパラギン酸	”
Asparagine	No. 51
Asparagine	”
Asparagine	No. 30
Asparagine	”
Asparagine	No. 24

これら菌株の一般的性質はつぎの通りである。

Description of four strains.

Rods. 0.7 by 1.5 to 3.0 microns, occurring singly or in short chains.

Non motile. Gram positive.

Agar slant: Growth, faint. But No. 29 did not grow.

Broth: Turbid.

Gelatin stab: No. liquefaction

Litmus milk: Not changed.

Catalase negative.

Nitrites not produced from nitrates. Starch not hydrolyzed. Pigment, indole, acetylmethyl-carbinol and hydrogen sulfide not produced.

Lactic acid produced but CO₂, acetic acid and ethanol not produced.

Temperature relations: Opt. 37°C, Max. 42°C Facultative anaerobe.

以上の試験は通常の試験用培地に No. 29 菌株が生育上必要とする heart infusion broth (H. I. B.) 2%を添加して行なった。なお No. 29菌株は通常の乳酸菌用培地には生育せず, H. I. B. または5%以上の醤油を添加することが生育上必要である。ただし他の菌株はいずれも通常の乳酸菌用培地に生育するが, 試験はすべて No. 29菌と同一の培地を使用した。

つぎに醤油(食塩4%, T.N. 1.6%) 10%, ブドウ糖7%添加の前報の乳酸生成培地¹¹⁾を用い, 30°C, 10日間培養後の消費糖に対する乳酸生成率は No.24:81.8%, No.29:80.8%, No.30:77.2%, No.51:81.9%であり, また生成乳酸は Zn 塩の結晶水よりすべて DL 型であった。また培地とし醤油を用いた場合, 生成率はほぼ同程度であっても, No. 24 菌株以外は CO₂ の生成が見られた。これはグルタミン酸, アスパラギン酸を含まない培地よりは CO₂ を生成しないことから両アミノ酸の脱炭酸により生成するもので, 糖より生成するものではないと推測される。

以上の結果, 4 菌株とも DL 乳酸を生成する homo 型の *Lactobacillus* Beijerinck に属するものである。栄養要求, 糖の醗酵性などよりさらに検討のうえ同定する考えである。

これらの菌株はいずれも醤油中の食塩が15%以上では生育は認められず, 死滅の傾向にあった。

3. 分離4乳酸菌増殖後の醤油成分変化

食塩5, 10, 15%の各醤油に食塩5%醤油に30°C, 3日間前培養した4菌株をそれぞれ5×10⁶/ml になるように接種し, 30°C, 15日間培養後各醤油成分の分析を行ない, その結果を Table 2 に示した。

すなわち乳酸の生成は低濃度食塩の場合に著しく, 食塩15%の場合には乳酸の生成は認められない。しかし15%食塩醤油中では4菌株とも生育は生菌数より認められず, 減少の傾向にあるにもかかわらず, グルタミン酸, アスパラギン酸とも低濃度食塩の場合に比し, 分解率は低下するがそれぞれ減少が認められた。

4. 抽出脱炭酸酵素の性質

以上の試験より No. 29, 30, 51の各菌にはそれぞれグルタミン酸, アスパラギン酸, または両アミノ酸分解能を有する酵素の存在が推測されるため, つぎに培養菌体より超音波処理により各酵素を抽出した。その結果 No.29はグルタミン酸分解活性, No.30, 51はアスパラギン酸分解活性の存在を確認したので, つぎにこれら酵素液の諸性質を検討した。ただし No.30の菌株は intact cell では両アミノ酸分解能を有していたが, 菌体よりえた酵素溶液中にはグルタミン酸分解能は見出せず, 酵素抽出条件を再検討したが同様であった。したがって

Table 2. Component of soy sauce after the growth of four kinds of lactic acid bacteria.
(Incubation time: 15 days)

Strains	NaCl %	R.S. %	pH	Titrate acidity*	Acetic acid%	Lactic acid%	EtOH %	Glutamic acid mg/ml	Aspartic acid mg/ml
No. 24	5.0	1.8	4.0	46.2	0.16	2.77	0.63	10.4	8.4
29	"	1.2	4.2	47.0	0.14	3.22	"	0	7.9
30	"	1.0	"	43.2	0.16	3.16	"	0	0
51	"	1.5	4.1	48.8	0.13	2.94	"	10.2	0
Cont.	"	3.5	4.8	16.0	0.15	1.50	0.71	10.3	8.3
No. 24	10.0	2.8	4.3	35.7	0.13	1.80	0.56	10.8	8.3
29	"	1.5	4.2	41.0	"	2.52	"	0	8.7
30	"	"	4.4	30.3	"	2.65	0.57	0	1.2
51	"	2.4	4.3	34.7	"	2.13	"	10.6	0
Cont.	"	3.5	4.8	18.7	"	1.34	0.63	10.9	8.8
No. 24	15.0	3.4	4.7	21.3	0.10	1.13	0.53	10.4	8.4
29	"	"	4.8	19.2	0.09	1.09	0.56	7.5	8.2
30	"	3.3	"	19.6	"	1.15	"	9.5	7.7
51	"	3.4	"	20.0	0.08	1.00	0.52	9.4	7.4
Cont.	"	3.5	"	20.8	1.00	1.25	0.56	10.2	8.8

*: 10 ml of soy sauce broth was titrated N/20 NaOH ml

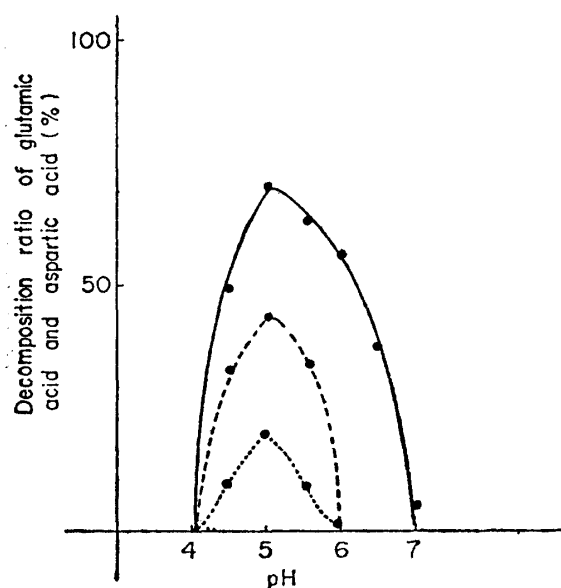


Fig. 2. pH activity curves of glutamic acid and aspartic acid decarboxylases.

—: No. 29 strain glutamic acid decarboxylase
 ---: No. 30 " aspartic acid "
: No. 51 " " "

No. 30菌株の酵素試験は以後基質としてはアスパラギン酸のみを使用した。

1) opt. pH, pH 安定性 一般のアミノ酸脱炭酸酵素とはほぼ同様にすべて opt. pH は5.0であった。つぎにアミノ酸に対する脱アミノ酵素活性

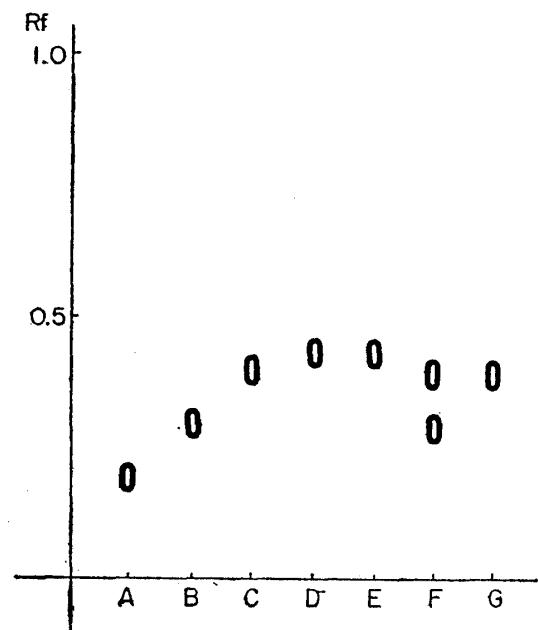


Fig. 3. Paper-chromatogram of amino acids.

A: L-Aspartic acid

B: L-Glutamic acid

C: L- α -Alanine

D: L- γ -Amino butyric acid

After enzymic reaction by

E: No. 29 strain extracts (Substrate G.A.)

F: No. 30 " (" A.A., G.A.)

G: No. 51 " (" A.A.)

を pH6.5~8.5間で検討したがこれらいずれにもその活性を認めなかった。

また3つの酵素液は酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で, 3°C, 90日間保存したが, 活性の低下は起らなかった。

2) 作用様式 試験管内には基質をグルタミン酸, またはアスパラギン酸として各酵素液を37°C, 2時間作用させた後, 熱処理を行ない, 濾過し, 濾液についてペーパー・クロマトグラフィーにより反応生成物を検討した。その結果は Fig. 3 に示すごとく, L-グルタミン酸より L- γ アミノ酪酸を, L-アスパラギン酸より L- α -アラニンを生産することが明らかとなった。したがって No. 29 菌株より得た酵素は L-glutamate 1-decarboxylase であり, 他の2菌株の酵素は L-aspartate 4-decarboxylase であることが明らかとなった。

3) 食塩などの酵素におよぼす影響 脱炭酸酵素に対する食塩の反応阻害を pH5.0の酢酸緩衝液, 醤油中で検討し, その結果を Fig. 4, Table 4 にそれぞれ示した。

すなわち酢酸緩衝液中における最終食塩濃度を0~20%とし, 反応は37°C, 30分行ない生成する CO₂ より反応阻害率を求めた。また反応時における酵素蛋白は約0.8mg/ml である。つぎに醤油中における場合は, 各食塩濃度3~15%の各醤油に酵素溶液を酵素蛋白が約0.8mg/ml なるように添加し, さらに安息香酸を防腐の目的に, 2×10^{-3} Mol になるよう添加した。これらの醤油を30°Cに保存し, 経時的に残存する両アミノ酸を常法通りに定量した。

Klein ら¹²⁾によれば安息香酸はアミノ酸酸化酵素阻害剤であると報告している。したがって予備試験として安息香酸, 醤油の保存剤である *n*-buthyl *p*-hydroxy-benzoate について阻害作用を酢酸緩衝液中で検討した結果は Table 3 に示すごとく, 酵素作用には影響を与えないことが判明した。

Table 3. Effects of benzoic acid and *n*-buthyl *p*-hydroxy benzoic acid on the amino acid decarboxylase.

Reagents	Conc.	Inhibition ratio (%) substrate Glutamic Aspartic acid		
		No. 29	No. 30	No. 51
B.A.	2×10^{-3}	95.8	94.2	101.4
"	2×10^{-5}	99.7	98.4	103.3
B.H.B.	2×10^{-5}	92.8	98.9	103.5

Fig. 4 で明らかなごとく, 食塩濃度の増加とともに酵素作用は阻害を受け, No. 51, No. 30の各酵素は食塩15, 20%で脱炭酸能はほぼ完全に消滅するが, No. 29の酵素は食塩20%の溶液中においても対照に対し約20%の残存活性を示した。

つぎに醤油中における食塩による酵素作用阻害は Table 5 に示した。これより intact cell を用いた場合には15%食塩濃度の醤油中においても, 両アミノ酸の分解が認められたのに反し, 抽出酵素の場合には No. 51, 30の各酵素は食塩12%, No. 29 の酵素は9%にて完全に酵素作用は阻止された。

この試験結果より2菌株のアスパラギン酸分解酵素はほぼ同一の阻害効果を受けるものと思われる。またアスパラギン酸分解酵素はグルタミン酸分解酵素に比し, 酢酸緩衝液中で食塩により阻害を受けるが, 醤油中では逆の結果を示した。

4) 熱による失活 酵素蛋白5mg/ml の溶液を試験管にて, 50~80°Cの各温度で10分熱処理を行ない, 残存活性を測定した結果を Fig. 5 に示した。

すなわちグルタミン酸分解酵素はアスパラギン酸分解酵素に比し, 熱抵抗性は大きい, 80°C, 10分の熱処理により失活した。2菌株のアスパラギン酸分解酵素は熱処理に対しほぼ同様の傾向を示した。

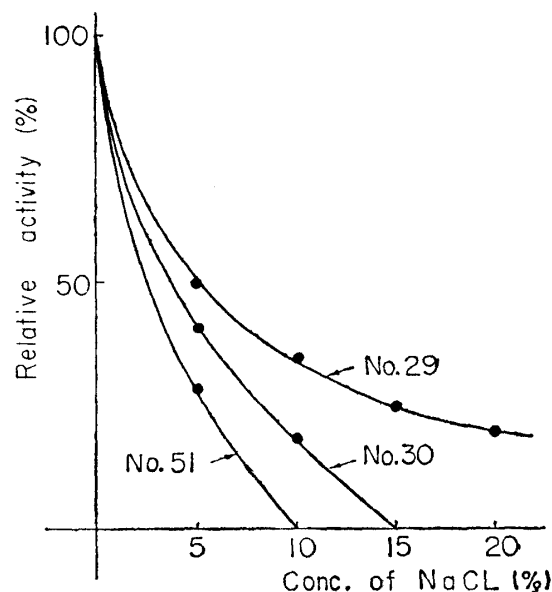


Fig. 4. Effects of NaCl in acetate buffer solution (pH 5.0) on glutamic acid and aspartic acid decarboxylases.

Table 4. Effects of NaCl concentration in soy sauce on glutamic acid and aspartic acid decarboxylase.

Strains	Substrate	Days	NaCl(%)				
			3	6	9	12	15
No. 29	Glutamic acid	5	1.0*	1.1	90.0	Not	decreased
		10	0	0	46.1		"
		20	"	"	1.0		"
No. 30	Aspartic acid	5	80.2	98.9	100.0		"
		10	40.7	60.3	"		"
		20	0	0	"		"
No. 51	"	5	"	40.1	"		"
		10	"	0.9	70.3		"
		20	"	0	1.0		"

要 約

産膜性酵母の増殖後、醤油中のグルタミン酸、アスパラギン酸の減少は認められないが、乳酸菌増殖後の酸敗醤油中の両アミノ酸は明らかに減少する。この事実について研究を行ないつぎの知見をえた。

1. 酸敗した低濃度醤油中より分離した乳酸菌65株の中にグルタミン酸、アスパラギン酸および両アミノ酸を分解するものをそれぞれ7, 17および2菌株認めた。

2. 各アミノ酸分解能の強い菌株、すなわちグルタミン酸分解菌株 No. 29, アスパラギン酸分解菌株 No. 51, 両アミノ酸分解菌株 No. 30, および分解能を全く有しない菌株 No. 24 はいずれも DL 乳酸を生成する homo 型の *Lactobacillus* Beijerinck に属する菌であった。

3. これら4菌株は食塩15%以上の醤油中では生育できず、死滅傾向を示すが、当醤油に各乳酸菌の intact cell を添加すると、グルタミン酸、アスパラギン酸、または両アミノ酸が減少することから、菌の生育により各アミノ酸が減少するのでなく、酵素的に分解を受け、当反応速度は醤油中の食塩濃度の増大とともに低下することが明らかとなった。

4. 3菌株の菌体より各酵素を抽出し、この酵素液についてつぎのごとき性質を有することが確認された。

i) 当酵素はいずれも脱炭酸酵素であり、L-グルタミン酸より L- γ アミノ酪酸に、L-アスパラギン酸より L- α アラニンに分解した。ただし No. 30 菌株は intact cell では両アミノ酸を分解したが、抽出酵素にはグルタミン酸分解能は存在しなかった。

ii) 当酵素の作用至適 pH は5.0であり、当酵素は3°C, 90日間の保存により活性の低下は見られなかった。

iii) 当酵素には脱アミノ作用は有しなかった。

iv) 当酵素は酢酸緩衝液、醤油中の食塩により反応阻害を受けた。また L-グルタミン酸分解酵素は80°C, アスパラギン酸分解酵素は70°Cまたは60°C各10分の熱処理により失活した。

本報告を終了するに当り、御指導を賜りました当研究所長横塚博士、吉田次長、本報告の発表を許可されました本社取締役各位、アミノ酸分析を行なって下さいました野村図夫君、ならびに本実験に御協力いただきました中田政子嬢、大上忠男君に厚く御礼申し上げます。

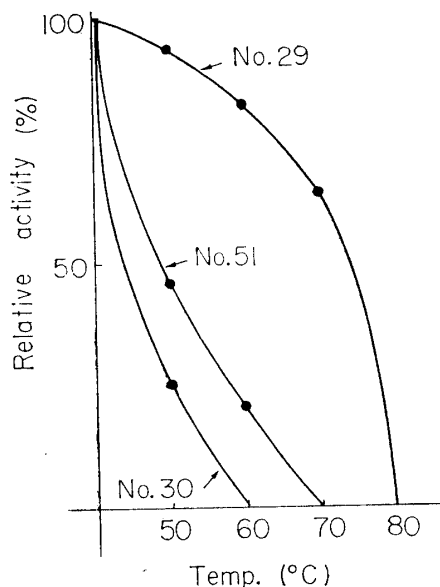


Fig. 5. Loss in activity of glutamic acid and aspartic acid decarboxylases at various temperature.

文 献

- 1) Gale, E. F.: *Biochem. J.*, **34**, 392 (1940). (1963, 11月).
- 2) Meister, A., Sober, H. A., Tice, S. V.: *J. B. C.*, **189**, 577 (1951). 8) 黒島, 大山, 松尾: 日本醸酵工学会 大会 講演 (1964, 11月).
- 3) Krishnaswamy, P. R., Giri, K. V.: *Current Sci.*, (India), **22**, 143 (1953). 9) 黒島, 大山, 松尾: 日本醸酵工学会 大会 講演 (1965, 11月).
- 4) Crawford, L. A.: *Biochem. J.*, **68**, 221 (1958). 10) 日野, 岩瀬, 林: 調味科学, **3**, 6 (1957).
- 5) Mardashev, S. R.: *Mikrobiologia*, **16**, 469 (1947), *Chem. Abstract*, **42**, 8859 (1948). 11) 花岡: 本誌, **43**, 72 (1966).
- 6) 杉山: 農化関東支部会講演 (1959, 2 月). 12) Klein, J. R., Kamin, H.: *J. B. C.*, **138**, 507 (1941).
- 7) 黒島, 大山, 松尾: 日本醸酵工学会大会講演 (昭41. 10. 3受付)