

[J. Ferment. Technol., Vol. 50, No. 4, p. 257~263, 1972]

醤油の歪に関する研究

(第 6 報) 生醤油中の火入れ歪凝集活性について

橋本 彦堯・横塚 保

(キッコーマン醤油株式会社中央研究所)

Studies on Sediment of *Shoyu* (Soy Sauce)

(VI) Sediment-Forming Activity in Fermented Raw *Shoyu*

Hikotaka Hashimoto and Tamotsu Yokotsuka

(Central Research Laboratories, Kikkoman Shoyu Co., Ltd., Noda, Chiba)

In the previous paper it was reported that the sediment formed in the course of heating fermented raw *shoyu* was mainly composed of protein.

In this paper, the factors that accelerate this sediment formation in raw *shoyu* were studied.

The sediment-forming activity disappeared after treatment of the sample below pH 3.0 or above pH 9.8. The activity was the most stable at pH values around 5.8, where about 55% of the original activity remained after incubation at 40°C for 20 hr.

Inactivation of the activity began with incubation at 45°C for 10 min; the activity was completely lost after heating at 75°C for 10 min. However, activity was again observed after heating above 80°C for 10 min.

The sediment-forming factors in raw *shoyu* were attributed to three components separated on a DEAE-cellulose column; these had proteolytic activities. A similar pattern on a DEAE-cellulose column was observed with *koji* extract for *shoyu*.

Addition of purified alkaline protease from *Aspergillus sojae* greatly reduced the time of sediment formation.

These results strongly suggest that the sediment-forming activity in fermented raw *shoyu* is caused by certain of proteases from *Aspergillus sojae* which still remain in the mash at the final stage of fermentation.

緒 言

著者らは前報^{1,2)}において、本醸造生醤油は火入れにより蛋白質を主成分¹⁾とする火入れ歪を生ずるが、この火入れ歪量は火入れ温度に比例しない²⁾ことを報告した。このことから、火入れ歪の発生機構は生醤油中に溶存する生蛋白質が、火入れにより熱凝固する単純な現象としては説明しきれず、他の要因の存在を示唆した。²⁾ また生揚醤油中の火入れ歪生成母体物質の

分離、精製中、アンバーライト XE-64 処理をすると、歪生成母体物質区分の加熱による混濁の様相が変化し、濁りは発生するが、凝集、沈降しにくくなる現象¹⁾が認められた。これらのことより、本醸造生醤油は、火入れ歪生成母体物質の他に、火入れ歪生成促進物質を同時に含有することを示唆しうるが、いまだこれらに関する報告は見られない。

本報では、本醸造生醤油中に、火入れ歪の凝集、沈降（歪さがり）を促進する活性を確認し、二、三の性

質について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料醤油 丸大豆使用または脱脂大豆使用の濃口本醸造生醤油, および淡口本醸造生醤油を用いた。熟成期間のことなる液汁は, 脱脂大豆使用諸味より採取したものを用いた。

2. 酵素剤 脱脂大豆使用生醤油は蒸留水に一夜透析した後, 冷アルコール (-15°C) を冷却しつつ50%濃度まで添加し, 冷凍遠心して得られた沈澱を凍結乾燥した。凍結乾燥物の収量は生醤油に対して1.56%であった。また醤油麹を3倍量 (v/w) の水で一夜抽出後セライト濾過した粗酵素液から, 同上の方法により粗酵素を得た。収量は抽出液に対して1.18%であった。

Aspergillus sojae の精製アルカリプロテアーゼは, 当研究所, 林和也博士より分与いただいた。

3. 分析方法 醤油の一般分析は, 醤油分析法³⁾によった。クロマトグラフィーにおける蛋白量は, 280 m μ の吸光度をもって表わした。

4. 凝集活性の測定 生醤油または酵素液1 ml に, 脱脂大豆使用の本醸造生醤油を TN 1.60, NaCl 17.50, pH 4.80 に調整し, 85°C 30分火入れ, 急冷した醤油を10 ml 加え, 40°C で反応を行なった。反応中の醤油に凝りのフロックが発生するまでの時間(分)を測定し, 基質である火入れ醤油のみ, または酵素液のかわりに緩衝液を用いた場合の凝りのフロック発生時間に対する, 短縮率を求めた。同条件下で, 凝りのフロック発生に要する時間を50%短縮させるに要する活性を100単位とした。

5. プロテアーゼ活性の測定法 萩原⁴⁾の方法に従い, 0.6%ミルクカゼインを基質にして 30°C 反応を行ない, 沈澱試薬B (0.11 M CCl_3COOH , 0.22 M CH_3COONa , 0.33 M CH_3COOH) により反応停止後, 濾液の 275 m μ の吸光度の増加を測定する方法によった。三種類のプロテアーゼの分別定量法は, Misaki⁵⁾の方法に準じた。

a. 酸性プロテアーゼ活性 生醤油を 0.05M 酢酸緩衝液 (pH 3.0) で50倍希釈にした酵素液1 ml に 0.05M 乳酸を含む0.6%ミルクカゼイン 5 ml を加え 30°C で60分反応後, 沈澱試薬Bを 5 ml 加えて反応を停止させた。生じた沈澱を東洋濾紙 No. 5C にて濾過し, 蒸留水を対照にして, 275 m μ での吸光度を測定した。測定試料の吸光度から, それぞれのブランクの吸光度を差し引いた値を測定値とした。

b. 中性プロテアーゼ活性 生醤油を 0.05 M

Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で50倍希釈したものを酵素液とし (クロマトグラフィーでは適当に希釈した), 0.05M Na_2HPO_4 を含むミルクカゼイン (pH 7.0) を基質にして測定した値から, 0.01M EDTA で 30°C 15分前処理した酵素液で同様に測定した値を差し引いた値を中性プロテアーゼ活性とした。

c. アルカリ性プロテアーゼ活性 0.01 M EDTA で前処理し中性プロテアーゼを失活させた酵素液を用い, 0.05M 硼酸を含む0.6% ミルクカゼイン (pH 9.5) を基質にして, 前述の方法と同様に測定した。それぞれのプロテアーゼの活性の表示は, 本反応条件下で 1 min に 1 μg のチロシン相当の吸光度を増加させる活性を1単位とし, $[\text{pu}]_{\gamma\text{tyr}}^{\text{Oas. 275B}}$ として示した。

実験結果

1. 生醤油中の火入れ近凝集作用 丸大豆使用, 脱脂大豆使用の濃口生揚醤油と淡口生揚醤油を, セライト濾過した三種類の生醤油を, 85°C 30分火入れ後, 急冷してまだ凝りの発生が認められない火入れ醤油を作

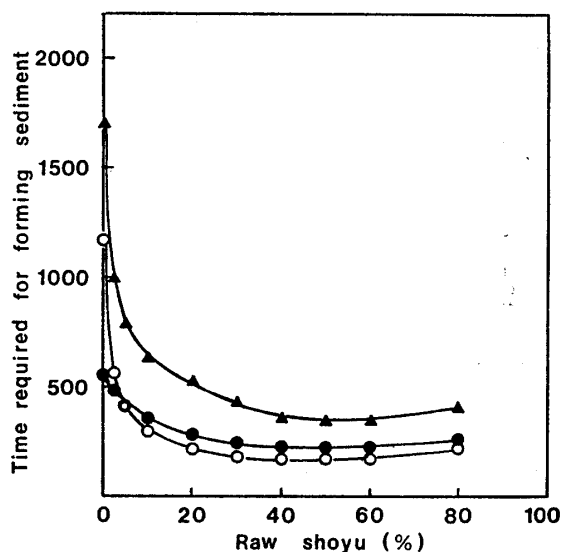


Fig. 1. Relationship between the concentration of raw shoyu added to heated shoyu and the time required for forming sediment at 40°C .

Raw shoyu was added to heated shoyu prepared by heating at 85°C for 30 min in the proportion of 0–100% (v/v). The blended shoyu was incubated at 40°C , and the time required for the formation of the sediment was measured.

- ▲— Dark colored shoyu made from defatted soybeans
- Dark colored shoyu made from whole soybeans
- Light colored shoyu made from defatted soybeans

った。これと、三種類の火入れ醤油に相当する生醤油とを割合をかえて混合し、40℃および60℃で火入れ歪の発生に要する時間を測定した。この結果を Fig. 1, Fig. 2 に示した。Fig. 1 より 40℃ 反応では、生醤油単独では歪が発生しないにもかかわらず、これを火入れ醤油に添加すると火入れ歪の発生が著しくはやまった。30~40%の添加で一定値を示した。Fig. 2 より反応温度が60℃の場合には、前報²⁾ よりも明らかなように、生醤油からも火入れ歪が発生するので、40℃反応よりも複雑ではあるが、いずれの生醤油も火入れ歪の凝集作用を持っていた。Fig. 1, Fig. 2 よりすると、反応温度は40℃より60℃の方が、原料大豆は丸大豆のものが脱脂大豆のものより、歪発生がはやかった。また淡口生醤油が最も火入れ歪凝集力が強かった。

2. 歪凝集活性の測定方法 正常に醸造された本醸造生醤油は、原料大豆の種類および、濃口、淡口などの諸味管理条件の相違に関係なく、いずれも火入れ歪凝集活性を持っていた。この火入れ歪凝集活性は、生醤油からアルコール沈澱により調製した沈澱区分に移行することが認められた。沈澱区分の添加量と、火入れ歪凝集時間との関係は、Fig. 3 に示した。Fig. 3 よりすると酵素量に比例して、歪凝集時間は急速に短くなった。醤油麹の抽出液から調製した沈澱区分も同様の作用を持っているが、生醤油よりの沈澱区分よりも、重量あたりの歪凝集活性は強い。歪凝集時間の短縮率と沈澱区分濃度を両対数目盛にプロットすると、Fig. 4 のごとく短縮率20~90%の範囲において直線関係が得られた。生醤油および醤油麹より得た沈澱区分は、重量あたりにすると凝集活性に差はあるが、両直線の傾きはほぼ同一であった。この結果は生醤油中の歪凝集活性は醤油麹に由来することを示している。

3 生醤油中の歪凝集活性の性質 適当に希釈した HCl, NaOH で各 pH に調整した醤油を40℃で20 hr 放置し、歪凝集活性の pH 安定性を測定した。その結果を Fig. 5 に示した。仕込み後2ヶ月経過諸味の生醤油も、6ヶ月経過の生醤油の歪凝集活性の pH 安定性は近似しており、pH 5~6.5 に安定域があった。最も安定なのは pH 5.8 あたりであり、pH 5.8 では40℃ 20 hr 処理で歪凝集活性は50~55% 残存した。pH 3.0 以下、pH 9.8 以上では不安定であった。つぎに2ヶ月経過生醤油 (pH 5.30) と6ヶ月経過生醤油 (pH 4.90) について、各温度で10分間処理し、残存活性を測定した。その結果を Fig. 6 に示した。Fig. 6 より歪凝集活性は、45℃あたりから失活しはじめ、55℃処理では約60%の活性が残存するが、75℃10分処理で完全に失活した。しかし80℃以上の処理では再び

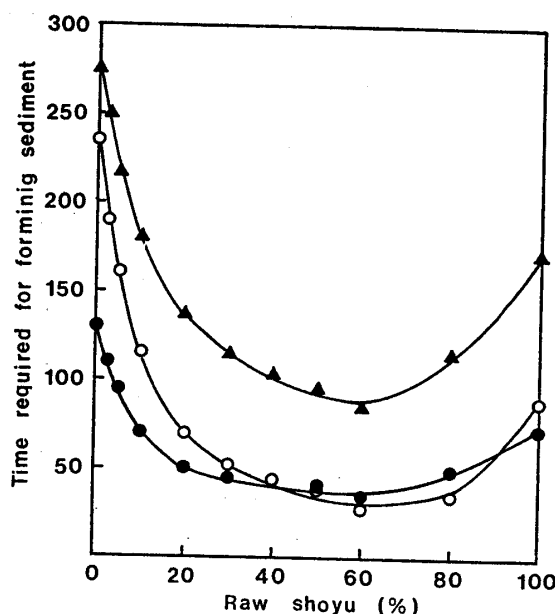


Fig. 2. Relationship between the concentration of raw *shoyu* added to heated *shoyu* and the time required for forming sediment at 60°C.

Symbols and experimental conditions, except for the incubation temperature, were identical to those described in Fig. 1.

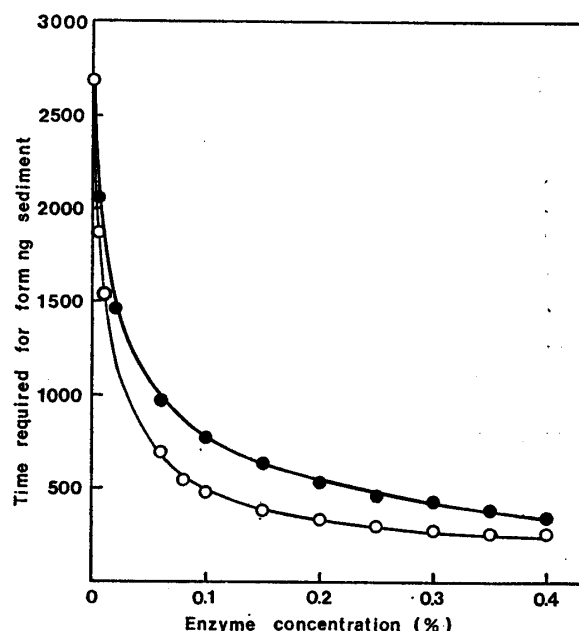


Fig. 3. Relationship between the concentration of enzyme and the time required for forming sediment.

To 10 ml of heated *shoyu* made from defatted soybeans (TN 1.60, NaCl 17.5, pH 4.8), 1.0 ml of appropriately diluted enzyme solution was added, and the mixture was incubated at 40°C.

The time required for the formation of the sediment was measured.

—●— Crude enzyme prepared from raw *shoyu*
—○— Crude enzyme prepared from *shoyu koji*

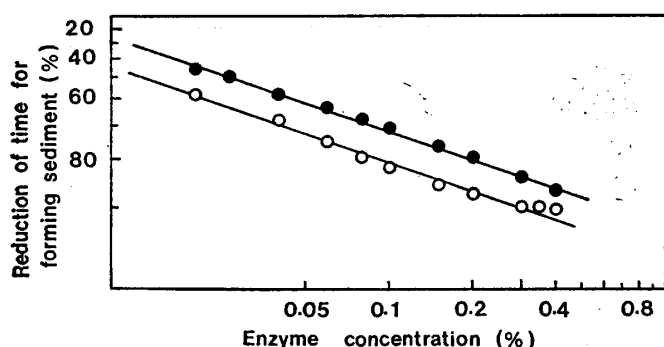


Fig. 4. Relationship between the concentration of enzyme and the reduction of the time required for forming sediment.

Symbols and experimental conditions were identical to those described in Fig. 3.

The reduction of the time (%) for forming sediment was calculated from the following equation.

$$\frac{T_0 - T}{T_0} \times 100$$

T_0 : the time required for forming sediment when the reaction mixture contained 1.0 ml of buffer and 10 ml of heated *shoyu*

T : the time required for forming sediment when the reaction mixture contained 1.0 ml of enzyme solution and 10 ml of heated *shoyu*

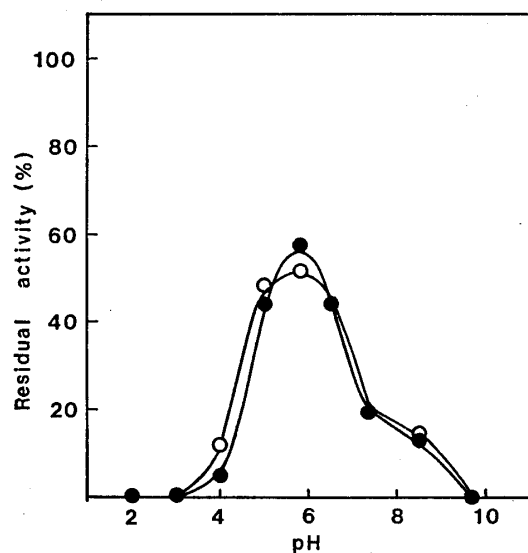


Fig. 5. Effect of pH on the stability of sediment-forming activity.

pH values of raw *shoyu* were adjusted to 2.0–10.0 with appropriately diluted HCl and NaOH, and the prepared *shoyu* incubated at 40°C for 20 hr. The residual activities were measured by the same method as in Fig. 4.

- Raw *shoyu* prepared from mash of a 2 months period of fermentation
- Raw *shoyu* prepared from mash of a 6 months period of fermentation

凝集活性が確認され 90°C10分処理後も、2ヶ月経過生醤油で3%, 6ヶ月経過生醤油では10%の活性が残存していた。

4. 近凝集活性の多様性 生醤油中に存在する近凝集活性は、その pH 安定性、熱安定性などより単一成分とは考えにくいので、生醤油および醤油麹より調製した粗酵素を用いて、近凝集活性の分画を行なった。0.05M NaCl を含む 0.005M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化した DEAE-セルロースのカラム (2.0×42 cm) に粗酵素1.0 g を 100 ml の同上緩衝液で溶解したものを供し、同じ緩衝液 1 l の混合容器に 0.4M NaCl を含む 0.005M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を連結し、gradient elution を行なった。生醤油での結果を Fig. 7 に、醤油麹の粗酵素の結果を Fig. 8 に示した。Fig. 7 より、生醤油の持つ近凝集活性は、0.05M NaCl 存在下では吸着しない成分と、吸着して、0.1~0.15M NaCl で溶出する成分および 0.2~0.25M NaCl で溶出する成分の少なくとも三成分に分離された。また各フラクションの、

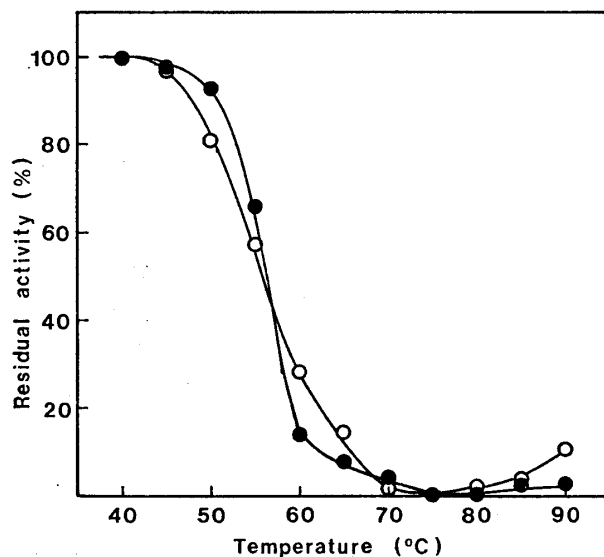


Fig. 6. Effect of temperature on the stability of sediment-forming activity.

Raw *shoyu* was incubated at various temperatures for 10 min, and the residual activities were measured by the same method as in Fig. 4.

- Raw *shoyu* (pH 5.3) prepared from mash of a 2 months period of fermentation
- Raw *shoyu* (pH 4.9) prepared from mash of a 6 months period of fermentation

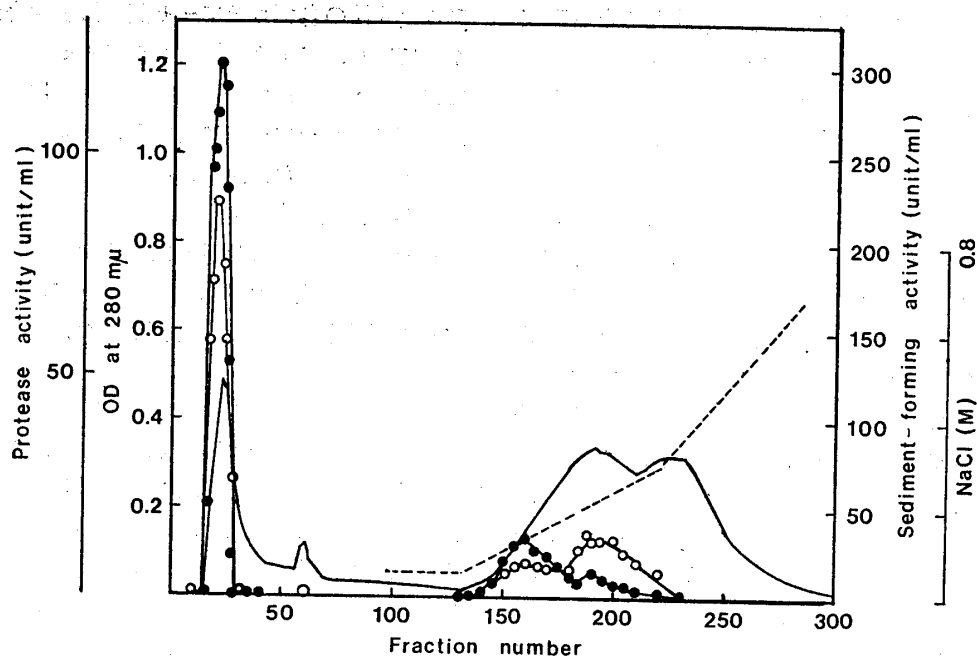


Fig. 7. Column chromatogram of crude enzyme from raw *shoyu* on DEAE-cellulose.

One gram of crude enzyme prepared by alcohol precipitation of dialyzed raw *shoyu* was applied on a DEAE-cellulose column (2.0×42 cm) equilibrated with 5×10^{-3} M tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 5×10^{-2} M NaCl.

Elution was carried out with a gradient of NaCl ranging from 5×10^{-2} M to 4×10^{-1} M buffered at pH 7.0 with 5×10^{-3} M tris-HCl buffer. Flow rate, 30 ml/hr. Fraction size, 10 ml/tube.

- OD at $280\text{ m}\mu$
- Sediment forming activity (unit/ml)
- Protease activity at pH 7.0
- NaCl

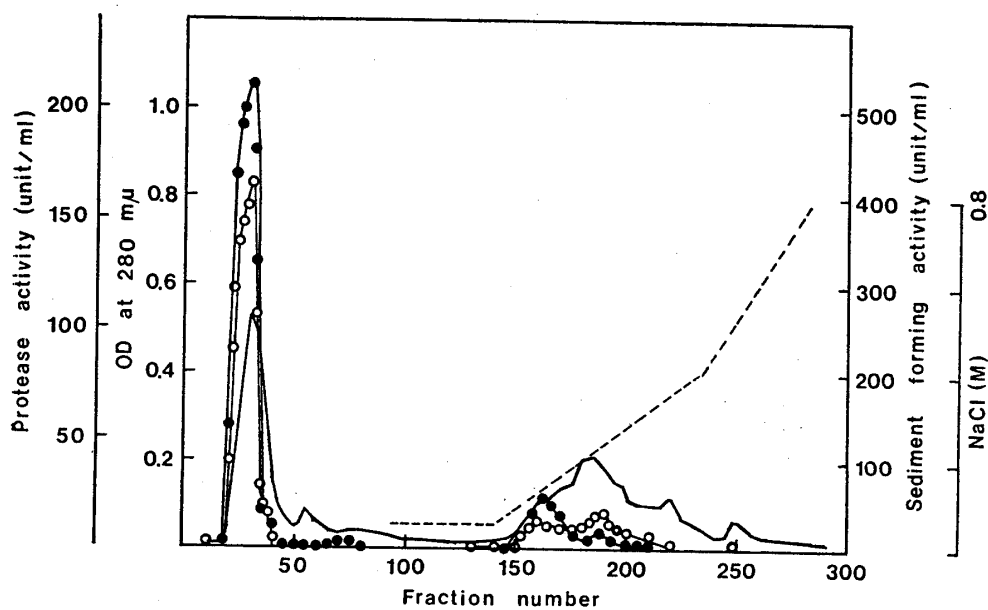


Fig. 8. Column chromatogram of crude enzyme from *shoyu koji* extract on DEAE-cellulose.

Symbols and experimental conditions were identical to those described in Fig. 7.

pH 7.0 におけるプロテアーゼ活性も少なくとも三成分に分離され、しかも凝集活性の存在するフラクションと一致した。また、Fig. 8 の醤油麹のクロマトグラムにおいても、Fig. 7 と同様のパターンが得られた。これより、生醤油中の凝集活性は、醤油麹に由来することが確認できた。さらに生醤油および醤油麹の持つ凝集活性は単一成分ではなくて、多成分よりなることも明らかになった。Fig. 7, Fig. 8 の最初に流出する非吸着区分のプロテアーゼ活性は、potato inhibitor では阻害されたが、0.01M EDTA では失活は認められなかった。これらの結果から、この非吸着区分のプロテアーゼは、林ら⁶⁾の結果から判断して醤油麹菌 *Asp. sojae* のアルカリプロテアーゼであると考えられた。また *Asp. sojae* の精製アルカリプロテアーゼは強い凝集活性を示した。Fig. 7, Fig. 8 の吸着区分の二つのプロテアーゼは、*Asp. sojae* の中性プロテアーゼ^{7,8)} と推定された。以上より生醤油中の凝集活性は、醤油麹菌の産生したプロテアーゼ群の示す作用であると思われる。

5. 醸造中の凝集活性の消長 醸造期間のことなる諸味液汁の凝集活性および三種類のプロテアーゼ活性を測定した。その結果を Table 1 に示した。Table 1 よりすると、凝集活性は2ヶ月経過液汁を100%とすると4ヶ月が40%、6ヶ月は25.7%と醸造期間中にしだいに減少した。一方プロテアーゼ活性は、醸造期間が長くなるにつれて減少するが、酸性、中性、

アルカリ性の各プロテアーゼ間で減少割合がかなりちがっていた。アルカリ性プロテアーゼは活性の絶対量では最も多かったが、醸造中の失活もはげしかった。三種類のプロテアーゼに対する、凝集活性の比を Table 2 に示した。酸性、中性プロテアーゼに対する比は各液汁間で大きく変化した。アルカリ性プロテアーゼに対する比はほぼ一定値を示した。この結果から、40℃で測定した凝集活性は、アルカリ性プロテアーゼ活性との相関が最も高かった。

考 察

火入れ直後で、まだ火入れ歪が発生していない醤油に、本醸造生醤油を添加して、40℃に保つと生醤油自身からは、歪は発生しないにもかかわらず、火入れ歪の発生が著しく促進された。これは60℃に保った場合にも確認された。この結果より生醤油は、火入れ歪母体物質の他に火入れ歪の凝集沈降を引き起こす物質を同時に含有することが明らかになった。この物質はpH 安定性、熱安定性などから酵素であると考えられた。この凝集活性は、70~75℃近辺で一度完全に失活するにもかかわらず、これより高温では明らかに活性が認められるという興味ある現象が見られた。第1報²⁾において、火入れ歪は60℃近辺で発生しやすく、70℃では発生しにくく、これ以上ではまた発生しやすくなり、火入れ温度に比例しないことを報告したが理由は明らかではなかった。この特異的な現象も、生醬

Table 1. Change in sediment-forming activity and proteolytic activity in *shoyu* fermentation.

Fermentation period (month)	Protease activity [PU] ^{Ca275B} _{γ tyr} /ml			Time required for forming sediment (min)	Reducing rate of time for forming sediment (%)	Sediment forming activity (units)
	Acid	Neutral	Alkaline			
2	71.9	173.6	1150.8	307	81.9	792.5
4	69.5	143.9	466.3	510	70.0	317.0
6	54.6	91.8	292.7	630	62.9	203.8
				1700(Blank)		

Table 2. Ratio of sediment-forming activity to proteolytic activity in various aged *shoyu* mashes.

Fermentation period (month)	SFA*	R. V. **	SFA*	R. V. **	SFA*	R. V. **
	Acid protease		Neutral protease		Alkaline protease	
2	11.02	100	4.57	100	0.69	100
4	4.56	41.4	2.20	48.3	0.68	98.7
6	3.73	33.9	2.22	48.6	0.70	101.0

* Sediment forming activity

** Relative value

油が胚母体物質と凝集活性の両方を含み, 70~75°C では凝集活性が特異的に不活性化するという本結果よりすれば理解できる。DEAE-セルロースのカラムクロマトグラフィーにより, 凝集活性は少なくとも性質の異なる三成分に分離され, この各成分の含有割合が生醤油間で異なること (Table 1) などが, 醤油の火入れ凝下げを非常に複雑なものにしているものと思われる。本報の結果より, 生醤油中の凝集作用は, *Asp. sojae* の産生したプロテアーゼ群の示す作用であることが判明した。なかでも, 酸性, 中性プロテアーゼにくらべ, アルカリ性プロテアーゼとの相関が最も高いこともわかった。これは生醤油中での残存量がアルカリ性プロテアーゼが最も多いためであろう。凝集活性は生醤油中には, 80°C 以上の高温処理でも失活しない (または活性化される) 成分の存在が認められるが, これは通常行なわれる醤油の火入れの際にも, この成分が凝下がりに関与することをうらづけるものである。松島ら⁹⁾は, 麹菌プロテアーゼ (タカジアスターゼまたはビオジアスターゼ) 中に80°C 1時間加熱で80%, 100°C 1時間でも約50%の残存を示す耐熱性中性プロテアーゼ (Opt. pH 5.5~6.0) の存在を報告している。また, 山本ら⁷⁾は, *Asp. sojae* KS に, 同菌の生産する不活性体のアルカリ性プロテアーゼを活性化する, 耐熱性プロテアーゼ (中性プロテアーゼ II) の存在を指摘している。これらのことより, 生醤油中の耐熱性凝集活性は, 麹中に存在する耐熱性プロテアーゼが残存したものと推定される。生醤油中の多成分よりなる凝集酵素の性質や, 実際の火入れ凝さがりへの関与割合などについては, さらに今後の検討を必要とする。また, Fig. 7, Fig. 8 の DEAE-セルロースのカラムクロマトグラフィーでは, 酸性プロテアーゼに起因する凝集活性は確認できなかったが, これは使用した粗酵素剤中に酸性プロテアーゼが少なかったためなのかもしれない。しかし, プロテアーゼ活性を持っておれば, 起源のことなる, 動植物, カビ, バクテリア, 放線菌などの酵素でもすべて醤油の火入れ凝集作用を示すかどうかは疑問であり, 今後さらに検討してゆきたい。

要 約

1. 本醸造生醤油は, 原料大豆の種類や諸味管理のちがいにより, 量的には差はあるが, いずれも火入れ凝集作用を持っていた。
2. 生醤油中の火入れ凝集活性は, pH 5~6.5 で比

較的安定であり, pH 3.0 以下または pH 9.8 以上では不安定であった。45°C から失活が起こり, 75°C 10分処理では完全に失活したが, これ以上の温度では活性が認められることより, 耐熱性の成分も存在するものと考えられた。

3. 生醤油および醤油麹の水抽出液中の凝集活性は, DEAE-セルロースのカラムクロマトグラフィーにより, 両者とも三成分に分画された。さらに凝集活性のパターンは三成分とも, pH 7.0 で測定したプロテアーゼ活性のパターンと一致した。
4. 醸造期間中の凝集活性の変化を三種類のプロテアーゼ活性と対比して測定したところ, アルカリ性プロテアーゼ活性との相関が最も高かった。また醤油麹菌 *Asp. sojae* の精製アルカリプロテアーゼは強い火入れ凝集力を持っていた。
5. 以上より, 生醤油中の火入れ凝集作用は, 生醤油中に残存する, 醤油麹菌のプロテアーゼ群の示す作用であると考えられた。

本報告を終了するにあたり, 御助言, 御鞭撻いただきました, 京都府立大学, 中浜敏雄教授, 今原次助教授, *Asp. sojae* の精製プロテアーゼを御恵みくださった, 当研究所, 林和也博士ならびに有益な御助言をいただきました, 当研究所, 吉田広務氏, 岩浅孝氏, 野田産業科学研究所, 関根広氏および分析の一部を担当された, 早川とも子嬢, 本報告の発表を許可された, 本社役員の各位に深謝いたします。

本報の概要は昭和46年4月1日, 日本農芸化学会大会で発表した。

文 献

- 1) 橋本, 吉田, 横塚: 本誌, **49**, 642 (1971).
- 2) 橋本, 吉田, 横塚: 本誌, **48**, 493 (1970).
- 3) 日本醤油技術会編: しょうゆ分析法 (1966).
- 4) 赤堀編: 酵素研究法, **2**, 242, 朝倉書店 (1962).
- 5) Misaki, T., Yamada, M., Okazaki, T., Sawada, J.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1383 (1970).
- 6) Hayashi, K., Terada, M., Mogi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 627 (1970).
- 7) 山本, 林: 酵素化学シンポジウム, **18**, 21 (1962).
- 8) Sekine, H., Nasuno, S., Iguchi, N.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1690 (1970).
- 9) 松島, 嶋田: 農化, **36**, 193 (1962).

(昭47.1.19受付)