

# 味噌熟成中の酵素活性について

和 久 豊

## はじめに

味噌醸造における麹の役割は

1. 各種酵素の配給源となる
2. 熟成に関わる乳酸菌、酵母への栄養源の提供
3. 麹菌の生成物などによる香味生成

が主要であると言われる<sup>1)</sup>。また、経験的ではあるが、麹の色調が製品の色に影響を与える、麹のできが浮き麹の残り具合を決定する、などがいわれており麹の品質が、味噌に与える影響は極めて大きい(白味噌において<sup>2)</sup>は米麹の褐変と製品のY値(明度)の間には相関があることが認められ、官能的にも褐変性麹は黒ずんだ色相をもたらすことが指摘されている)。それらの中でも、麹菌の生産する酵素は原料の分解・呈味成分の生成を関与するだけではなく、味噌の色調にも影響を与える<sup>3)</sup>ことから、麹の役割の中で最も重要視されている。第1表<sup>4)</sup>に味噌醸造における主要な酵素とその作用について示した。このように麹菌の生産する酵素は極めて数が多く、それらが米・大豆などに作用し、味噌として必要な成分及び酵母・乳酸菌の生育に必要な栄養源などを生成する。

今回、筆者らは新しい味噌用麹菌を開発するために、現在使用している麹菌の機能を再度見直すこととした。味噌における酵素の研究は出麹での酵素活性と味噌の品質に関するものが多く<sup>3), 5)</sup>、発酵熟成中の酵素活性の変化を中心にした研究は少ない。そこで、まず最初に味噌熟成中の酵素活性の消長を観察し、更に酵素の残存に影響を与えている因子について若干の検討をくわえたので、その結果について紹介させていただく。

## 1. 味噌熟成中の酵素活性の変化

味噌熟成中の酵素活性の変化を観察するため、実験室規模の味噌小仕込試験を行なった。仕込みは麹歩合5歩、水分46%、食塩13%(対水食塩濃度22%)とし、混合物40gをビーカーに分注し30で熟成を行なった。今回の試験では酵母・乳酸菌の添加は行なわなかった。味噌熟成中の酵素活性はビーカーに蒸留水100ml添加し室温で3時間抽出・濾過後、蒸留水に対して透析したものを、試料として、pH3.0、6.0、7.5のプロテアーゼ(以下順にAP、SAP、NP)、 $\alpha$ -アミラーゼ(以下AA)、グルコアミラーゼ(以下GA)、酸性カルボキシペプチダーゼ(以下ACP)、及び3種類のロイシンアミノペプチダーゼ(Leu-Gly-Gly基質:以下LAP-G、Leu-p-NA基質:以下LAP-P、Leu-NA基質:以下LAP-B)の9種類の測定を行なった。第1図に味噌熟成中の各酵素活性の変化を示した。測定した9種類の酵素のうち、3種類のロイシンアミノペプチダーゼで大きな酵素活性の低下が認められ、60日目の酵素活性は初発のそれに比べ、LAP-Gで35%、LAP-Bで33%、LAP-Pで57%となっていた。その他6種類の酵素では、AP・SAP・NPが各々約95%、AAが84%、GAが97%、ACPが93%となっており、大きな活性の低下は認められな

かった。

味噌中に麹菌に由来する各種酵素が残存することは、広く知られており、味噌漬けなどの形で利用されている。醤油においては古く牛山ら<sup>6)</sup>が天然醤油諸味中のプロテアーゼ活性の消長を15ヶ月の長期にわたって調べ酸性、中性プロテアーゼの活性変化は僅少であったと報告している。また、原山ら<sup>7)</sup>は *Aspergillus* 属を用いた食塩濃度4~12%の60日熟成味噌におけるpH3.0、6.0の残存プロテアーゼ活性はそれぞれ80%及び90%以上であったとし、伊東ら<sup>8)、9)</sup>は味噌中に残存する酵素を調べ麹菌由来のプロテアーゼ、アミラーゼを検索し、更に熟成中の高分子の蛋白質を電気泳動法により検討し、145日目まで分解が続いたことを報告している。今回の結果は、これらの報告の内容と一致するものであるが、このように高い割合で活性が維持されることは、味噌の食品加工への応用など今後の味噌の用途開発などの点で注目すべき点であると思われる。

味噌熟成中の糖及び窒素成分の変化<sup>10)</sup>を第2図及び第3図に示したが、原料の炭水化物の分解率は、ほぼ20~35日目で最高(約80%)となり、その後、微生物や着色などにより、やや減少する。窒素成分も、溶解率(水溶性窒素/全窒素)・分解率(ホルモール窒素/全窒素)共に35日目位まで増加するが、それ以後は、ほとんど増加せず溶解率は約60%、分解率は約20%が最高となる。今回得られた結果から、麹菌の酵素の内、プロテアーゼ、アミラーゼは主な分解が終了した後も、初発とほぼ同じ活性を保持していることがわかる。酵素量の多少は分解速度に影響するが、通常辛口味噌の熟成期間は2ヶ月以上であるため、プロテアーゼ、アミラーゼ活性が多少低くても最終的な分解率に影響がでにくいものと推定される。事実、望月ら<sup>11)</sup>は通常の半分の麹で淡色系辛口味噌を仕込んでみてもアミノ酸量が若干低いだけでほかの成分には差がみられず、また天野ら<sup>12)</sup>は豆味噌においても半麹法が可能であることを示している。

これらのことから、今後の味噌用麹菌の選択・育種では、プロテアーゼ・アミラーゼ活性については必要最小限とし、それ以外の酵素の活性に重点をおくことが有利であると思われる。

今回測定した酵素9種類の内、3種類のロイシンアミノペプチダーゼの活性が熟成中に大きく減少していた。味噌原料中にはグルタミン酸が多く含まれているにもかかわらず、遊離率が低いことが指摘されている<sup>13)</sup>が、松本ら<sup>5)</sup>はペプチダーゼが味噌の蛋白溶解・分解率と相関が高いことを認め、また、中台ら<sup>14)</sup>はプロテアーゼ単独ではタンパク質からのアミノ酸の直接生成はほとんどなく、ペプチダーゼがプロテアーゼの生成したペプチドに作用しアミノ酸を生成することを報告している。このようにペプチダーゼの重要性は極めて高いといえることから、味噌熟成中にロイシンアミノペプチダーゼ活性が大きく低下することは製品の呈味に与えている影響は大きいものと推定される。熟成中のロイシンアミノペプチダーゼ活性の低下が酵素の性質上、不可避な点としても、初発の酵素活性を上昇することが出来れば、グルタミン酸、アスパラギン酸などの遊離アミノ酸の増加が期待でき、味噌醸造に極めて有用である。ロイシンアミノペプチダーゼ活性の高い麹菌の育種は今後検討していく必要があると考えられる。

## 2. 米麹仕込における酵素活性の変化

味噌仕込試験において、熟成中の味噌より抽出した試料中の9種類の酵素のうち、プロテアーゼなど6種類の酵素が、熟成中に活性がほとんど変化しないことを確認した。そこで、活性が保持される要因について知見を得るため、以下の検討を行なった。すなわち、味噌の主要な原料である大豆が熟成中の酵素に何らかの影響を与えることが考えられたため、大豆を除いた仕込みを行ない、酵素活性の変化を

観察した。仕込の条件は水分含量 43%食塩濃度 10%(対水食塩濃度 18%)に調節した。試料の調整、酵素活性の分析などは、味噌小仕込試験と同様に行なった。第 4 図にその結果を示した。図に示す通り、9 種類の酵素活性は、50 日の熟成後も大きな低下はなく比較的安定しており、大豆の存在は熟成中の活性の保持に必ずしも必要ではないと推定された。その中で、味噌小仕込区分で活性の減少が認められたロイシンアミノペプチダーゼの活性が、初発を 100%とした相対値で LAP - G が 99%、LAP - B が 92%、LAP - P が 90%と安定しており、この酵素に関しては大豆の存在が活性の低下を招いていると考えられる結果となった。この点については、両酵素が前述のように重要視されることから、詳細について今後検討する必要があると考えている。

### 3 . 酵素抽出液による保存テスト

#### ( 1 ) 粗酵素液保存試験

味噌小仕込試験、米麹仕込試験では一部の酵素を除いて酵素活性は良好に保持された。そこで、米麹より抽出した粗酵素液を有塩・無塩下で保存し、その酵素活性の変化を観察した。すなわち、常法により抽出した粗酵素液に最終濃度 20%となるように食塩を溶解した後、2 倍にメスアップした粗酵素有塩区分、食塩を添加せず同様に処理した粗酵素無塩区分を設定した。この両区分をメンブランフィルターにて除菌、30 で保存した。経時的に酵素活性を測定した結果を第 5 図に示した。AP、ASP において粗酵素有塩区分で活性が保持されたが、粗酵素無塩区分では活性の低下が認められた。NP での活性では、両区分ともに酵素活性は低下したが、有塩区分の方が低下する割合が大きくなっていた。AA は、有塩区分で 10 日目に初発の活性の 80%に低下したが、無塩区分では 20 日目まで初発と同程度の活性を維持した。それ以後漸時低下し、40 日目には活性は有塩区分より低くなった。GA は、やや有塩区分の方が活性の低下が早い傾向が認められたが、30 日目、40 日目では差は認められなかった。ACP も GA とほぼ同じ傾向を示した。LAP - G は有塩、無塩両区分とも活性の低下が激しく、10 日目には 40%程度の活性となり、以後漸減した。LAP - B は、10 日目迄に大きな活性の低下が認められ、それ以後微減した。減少の割合は無塩区分の方がやや大きくなっていた。LAP - P は 40 日目で有塩区分で 96%、無塩区分で 75%の活性を保持していた。以上の結果を、活性の動きにより酵素の種類を分類すると、

有塩・無塩区分とも大きな減少のない酵素として、AA、GA、ACP、LAP - P

有塩区分で活性が保持され無塩区分で活性の低下が大きかった酵素として AP、SAP、及び LAP - B  
有塩区分の酵素活性低下が、無塩区分に比べ早かった NP

有塩・無塩区分とも活性が大きく低下した LAP - G

の 4 グループに分けることができた。この試験は米麹仕込みと比較すると、米麹の有無が大きな相違点である。つまり、有塩下での米麹の存在は、・グループでは活性の保持に影響が少なく、・グループでは活性の保持に大きな影響を与えていた。食塩の存在はグループで酵素活性保持に、グループでは低下に働いており、・グループでは影響が少なくなっていた。食塩の存在は、味噌熟成中の酵素活性の保持に対してマイナスの面は少ないと考えられた。

#### ( 2 ) 透析酵素液保存試験

粗酵素液の保存においても、酵素の種類により差はあるものの、活性は比較的良好に保持された。そこで透析処理した酵素液を用いて同様に活性の変化を観察した。結果を第 2 表に示した。これまでの結

果より、保存 10 日目ではほぼそれ以後の酵素活性の変化の傾向が出るため、活性の測定は 10 日目のみとした。粗酵素液保存試験の結果に比較し、無塩区分での酵素活性残存率が AP・SAP・NP・LAP-G・LAP-B で上昇し、AA・GA で低下した。有塩区分では、AA が無塩区分と同様に、大きく残存率が低下し、無塩区分で低下の認められなかった LAP-B 及び LAP-P でも、大きく残存率が低下した。両者の違いは、その液中に透析処理によって取り除かれる分子の小さい化合物の有無あることから、それらの存在が酵素活性の保持に有効に働いていることが推定された。そこで次に透析酵素液に添加物を加え活性の変化を観察した。

### (3) 添加試験

透析酵素液にグルコース、ポリペプトン、カザミノ酸を各々10%の濃度に溶解し、前述と同様に酵素液の保存試験を行なった。酵素活性の測定は、粗酵素液の有塩区分で活性の低下が大きかった、NP、AA、LAP-G、LAP-B、LAP-P の計 5 種類の酵素とした。第 3 表にその結果を示した。グルコースの添加では、LAP-G で無添加区分に比べ保存後の活性が極めて高く維持され、他の 4 種の酵素でも上昇する割合は少ないが同様の現象が認められた。ポリペプトン、カザミノ酸添加では、測定した 5 種類の酵素で、保存後の酵素活性が無添加区分に比べ上昇し、特にカザミノ酸を添加した区分では、LAP-B、LAP-P は初発とほぼ同じ活性を示した。これは、食塩による酵素の変性・失活が液中に添加されたグルコース、ポリペプトン、カザミノ酸などにより阻害されたためと考えられる。特にポリペプトン・カザミノ酸の窒素源を多く含む物質にその作用が強いことは、味噌などのタンパク質を多く含む発酵食品の熟成中にこのような作用が働いていることが推測され興味深い。

## おわりに

味噌熟成中の酵素活性の消長を検討し、多くの酵素が長期間にわたり、その活性を維持していることが明らかになった。各原料を取り除いた試験より、活性の維持に原料の存在が与える影響は極めて少ないものと推定された。酵素液を使用した試験で、食塩の存在は酵素活性保持にマイナスに働くことは少なく、一部の酵素ではポリペプトン・カザミノ酸添加により酵素活性の低下が軽減された。

以上、簡単ではあるが、筆者らの味噌熟成中の酵素について検討した内容を紹介させていただいた。検討が足りない点が多々あり不十分ではあるが、話題提供になれば幸いである。今回は比較的測定の容易な酵素を中心に検討を行ったが、今後は、その重要性が指摘されているヘミセルラーゼ<sup>15)</sup>、<sup>16)</sup>、グルタミナーゼ<sup>17)</sup>などについても検討を加えていく必要があると考えている。また、ペプチダーゼを含めたそれら酵素の高生産性麹菌の育種も大きな課題である。

味噌は極めて種類が多く各地方に根付いた日本の代表的な発酵調味食品である。味噌業界がその地方独特の特徴を維持しつつ健全に発展することを願うと共に筆者らも種麹メーカーとしてその発展の一助となる研究を進めていきたいと考えている。

稿の終わりに臨み、本稿をまとめる機会をお与え下さいました中央味噌研究所所長海老根英雄先生に深く感謝いたします。

<(株)ビオック>

## 文 献

- 1) 中野正弘編著:味噌の醸造技術 p.65(1982)
- 2) 姫野国男、小出 巖、富部忠篤:味噌と科学と技術、**227**、28(1973)
- 3) 原山文徳、本藤 智、安平仁美:醸協、**87**、(11)829(1992)
- 4) 好井久男:醸協、**68**、(10)741(1973)
- 5) 松本伊佐男、今井誠一:日本食品工業学会誌、**23**、362(1976)
- 6) 牛山悦男、宇梶保郎:調味科学、**7**、(3)1(1959)
- 7) 原山文徳、安平仁美:醸協、**83**、(12)828(1988)
- 8) 伊藤清枝:日本食品工業学会誌、**30**、38(1983)
- 9) 伊藤清枝:日本食品工業学会誌、**30**、43(1983)
- 10) 望月 務、六川功一、本藤 智、大内功一、松木和子:日本食品工業学会誌、**15**、408(1968)
- 11) 望月 務、本藤 智、佐藤 正、関 雄、小口喜代人:信州味噌研究所研究報告 **4-5**、11  
(1964)
- 12) 天野武雄、竹内徳男、好井久雄:愛知県食品工業試験場年報、**7**、33(1966)
- 13) 大内一郎、望月 務:日本食品工業学会誌、**15**、418(1968)
- 14) 中台忠伸:日本醤油研究所雑誌、**11**、67(1985)
- 15) 松本伊左男、今井誠一:味噌の科学と技術、**35**、442(1987)
- 16) 松本伊左男、秋本隆司、今井誠一:味噌の科学と技術、**39**、252(1991)
- 17) 原山文徳:醸協、**87**、(7)503(1992)