味噌の調味機能について (第5報)

Tasting Effect of "Miso" as a Seasoning (Part 5)

米味噌タンパク質に関する実験

Experiments on the Protein of Rice-koji fermented "Miso"

(昭和45年4月6日受理)

伊 東 清 枝*

(Kiyoe Ito)

1) The protein component of the rice-koji and Miso made of various kinds of the rice-koji was fractionated by the disc electrophoretic method.

2) The electrophoretic pattern of protein fractions in the water extract of Miso was found to be different with the mixing ratio of raw materials and the fermentation procedure.

3) It was found that the electrophoretic migration values of the water-extracted protein of Miso, prealbumin of bovine albumin, and the enzymatic protein extracted from *Aspergillus oryzae* were the same.

4) The water-extracted protein from the matured Miso which was fermented with rice-koji has given the same migration value with that of the water-extracted protein of rice-koji growing on the above-mentioned matured Miso.

緒 言

前報¹⁾²⁾までの実験で豆味噌水抽出タンパク質について、2, 3の知見を得ることが出来たので、米味噌水抽出タンパク質についても前報と同様、ディスク電気泳動法で分画し、豆味噌と比較しながら、各種米味噌の特性を把握し、しかる後米味噌タンパク質を検索したいと考えた。

米味噌と豆味噌の主な相違は麴の種類と熟成期間の長さにあり、米味噌は米麴を使用し、熟成期間が短い。米味噌は原料の配合割合および醸造方法によって、種類が極めて多く、官能検査の面からもよいとされる味噌の麴歩合と塩切り歩合の組合せ、すなわち原料配合曲線はほぼ決まっており、原料配合曲線を著しく離れたものは官能結果ではよくないことが既に検討されている³⁾⁴⁾。またこれらの組合せは生産地域と関連が深く、一般に北海道、東北、関東、中部地方で生産されるものは麴歩合が少なく、塩切り歩合が多い。関西、中国、四国および九州地方では麴歩合の多い、塩切り歩合の少ないものが多い。そこで水抽出タンパク質の観点から、各種米味噌の共通点および相違点を検索する目的で各地域の市販味噌

を選び実験を行なった。併せて、実験室で米味噌を調製し熟成過程および粒味噌中の米麴タンパク質の挙動について調べ、味噌タンパク質の成因について考察し知見を得たので報告する。

実 験 方 法

(1) 試料

試料として樽詰の市販米味噌を用いた。一般的分類に基づいて分けると表1のようになる。但し麴歩合および塩切り歩合については中野³⁾の分類に準じた。

実験室で醸造した味噌の原料は前報¹⁾と同一のものおよび大豆のみ別種のものも用い、麴歩合を4歩、塩切り歩合を6歩になるように調製した。種麴は日本醸造工業KKの米味噌菌を用いた。

(2) 米味噌調製法

(3) 試料の抽出法

(4) Acrylamide-gel によるディスク電気泳動法

(5) タンパク質定量法

以上の(2)~(5)は既報¹⁾²⁾と同様に行なった。

実験結果および考察

(1) 米味噌タンパク質

* 東京学芸大学

表 1 試 料

種類	麴歩合	塩切歩合	試料 (商品名)
白味噌	20以上	1~2	西京味噌 1. 2. (淡)
甘味噌	10~20	2~4	江戸味噌 (淡) 信州味噌 (淡, 粒) 備前岡山味噌 広島府中味噌 徳島味噌 阿波味噌 (粒) 九州味噌 (粒)
中辛味噌	5~10	4~5	信州味噌 (淡) a b c (粒) d (粒) e (粒) 加賀味噌 (淡, 粒) 富山上市味噌 (淡, 粒) 越後三条味噌 (淡, 粒) 直江津味噌 佐渡味噌 (粒) 津軽中辛味噌 北海道味噌
辛味噌	5 以下	5~10	新潟味噌 会津味噌 (粒) 仙台味噌 津軽三年味噌

註 淡…淡色, 粒…粒味噌の略

濃味噌の水抽出液, 残渣, およびその各種溶液抽出液の泳動図より米味噌タンパク質を把握し, 次に各種味噌の特色を試べた。米味噌は実用上はけんだく液を用いるものであるから, 水抽出タンパク質のみならず, 残渣中に含まれるタンパク質についても検討を要するものと考え, 残渣の泳動図を求めた。仙台味噌の場合は図1の通りである。試料濃度は味噌:水 = 1:2 とした。

タンパク質としては4あるいは5分画され, A区分は35~60%を占める。パターンは全般的に豆味噌と類似であるが, C区分のゾーンは認めがたい味噌が多い。白味噌にはC区分が認められないが, 麴歩合の少ない味噌にはわずかに検出される。このことと豆味噌のC区分がかなりの割合を占めることを考え併せて, 味噌のC区分は主に大豆タンパク質に起因する分解物であろうと推察される。

残渣の泳動図にはA区分とB区分との境界が不明瞭なものが多いが, A₂に近接する濃厚なゾーンを一応 A₃区

図 1 仙台味噌泳動図

分として扱った。これは前報で報告したようにペプチドの溶媒和したものである。パターンの味噌の種類による著しい相違は見い出せなかった。

次に各種溶液抽出液について試べた。図1の仙台味噌のようにKCl溶液で抽出した場合に認められないA₁区分はNaCl抽出の場合にはいずれの味噌にも検出される。KOHあるいはNaOH抽出の場合には図1のように水抽出では検出出来ない区分が認められる。特に淡色系の白味噌, 信州味噌の各種溶液抽出液および残渣にはC区分のゾーンが認められる。C区分の検出されない試料はD区分の割合が他のものより多い。

米味噌けんだく液を泳動するとgelのB区分にリボフラビンと類似の白濁ゾーンが認められる。濾紙で濾過した場合は検出されないものが多く, また豆味噌には認められなかった。蛍光物質については醸造用麹菌による醸造物蛍光物質に関する報告⁵⁾⁶⁾があり, このことについては今後検討する予定である。

次に各種味噌の特色を検討する目的で濃度 1:2 の水抽出液の泳動図のA区分を比較した。結果を図2に示す

15種類の濃味噌について比較した結果をまとめると, (A), (B), (C)および(D)の4つのパターンに分類することが出来る。(A)には淡色系甘味噌の白, 江戸(甘),

図2 米味噌水抽出液のA区分の型

これは製品を淡色に仕上げる目的のため、大豆の加熱方法が他の味噌と異なるので、微生物によるタンパク質の分解および合成の速度の相違によるのではないであろうか、(C)の場合は米麴に由来すると思われる A_3 区分は認め難い。(D)の場合は A_3 区分は(A)の味噌と異なり、部分的に A_2 と重なって泳動する。

以上の味噌のA区分の分画割合は表2の通りである。

(A),(B)型の味噌は A_3 区分の割合が多く、(C),(D)型の大部分は A_2 区分の割合が多い。例外の(D)型の4の場合は甘味の強い濃厚色の味噌である。分画割合とタンパク質含有量との相関は見い出せなかった。

以上の結果をまとめると、濃度 1:2 の水抽出液の泳動図より、淡色系の甘、中辛味噌と濃厚色系の甘、辛味噌とに分けることが出来る。すなわち泳動図より醸造方法と原料配合割合を推察することが出来た。米味噌の特徴である米麴に由来すると思われるゾーンは麴歩合10以上の味噌に顕著に認められる。

(2)米麴タンパク質

表2 各種濃味噌のA区分 分画割合

型	試料	分 画 割 合			備 考
		A_1	A_2	A_3	
A	白 1	18.6	16.9	16.9	13.1
	色 2	5.0	16.6	25.0	12.8
	3	15.7	20.0	22.8	16.1
B	淡 1	16.1	16.1	16.1	21.0
	色 2	8.9	8.9	19.6	15.2
	3	13.4	7.6	15.3	15.4
C	濃 1	24.0	28.0	—	25.2
	厚 2	18.1	29.5	—	26.5
	色 3	10.0	16.6	—	16.1
D	濃 4	10.0	13.8	17.5	3層に分離 18.2
	5	15.2	18.6	18.6	17.8
	厚 6	23.8	23.8	11.9	22.0
	色 7	16.1	23.2	12.2	22.9
	8	23.8	26.1	14.2	21.0
	9	17.7	22.2	15.5	24.2

註 備考の数字はタンパク質量 (mg/ml) を示す。

(B)には信州,(C)には濃厚色の岡山,九州,津軽(中辛),そして(D)には中辛,辛味噌の新潟,会津,仙台,津軽,北海道味噌が属する。(A)の場合は A_3 区分が豆味噌のように A_2 と部分的に重なって泳動せず,やや遅れて泳動する。麴歩合の多い味噌に認められることから推察して,米麴に由来するペプチッドであろうと考えた。(B)の場合は A_3 区分の泳動峰が A_2 と重なり,しかもやや高い。

図3 水抽出タンパク質

表 3 米, 米飯, 米麴, 白味噌タンパク質の分画割合

	試料		A			B					C			D	
米	H ₂ O	抽出液	11.2			6.1	9.5	6.1	1.6	17.9	10.1	13.6	7.7	15.7	0.1
		残渣	8.3			2.5	2.5	11.6	16.7	21.9		18.7	8.0	9.6	
	NaCl	抽出液	7.0		7.0	24.7		8.8				32.8	6.1		13.2
		残渣	9.0		11.5	26.4				35.5		14.0		3.5	
	NaOH	抽出液	4.6			3.4	4.6	8.0	11.5	23.0	11.5		25.0		8.0
		残渣	3.3		10.0			78.3							8.3
	HCl	抽出液	8.2			4.7	5.8	11.6	14.1	30.5		18.8			5.8
		残渣	5.7		10.3	37.9		16.0	17.2	4.5					8.0
EtOH	抽出液		23.9		10.8				60.8					4.3	
	残渣	4.1		6.9	18.0				30.5	19.4		9.7		11.1	
米飯	H ₂ O	抽出液	22.4			8.1	10.2	12.2	5.1	37.7					4.0
		残渣	—												
	NaCl	抽出液	12.9		19.5	41.9						22.5			3.2
		残渣	38.2					57.8							4.0
	NaOH	抽出液	14.2			11.6		9.0	11.6	40.6	6.4		3.2		3.2
		残渣		26.7				69.6							3.5
	HCl	抽出液		20.9				79.1							
		残渣		25.6				71.7							2.6
EtOH	抽出液	7.0		6.0	13.0		11.0	15.0	39.0		4.0			5.0	
	残渣		32.6					67.4							
米麴	H ₂ O	抽出液	12.6		23.9	16.9		16.9		10.5	9.1	3.5		5.6	0.7
		〃S-濃縮	14.6		26.5	21.0		14.6	5.6	7.7	2.8		5.6		1.4
		〃水透析	9.0		12.9	12.9		29.8		11.6			18.0		5.8
		残渣	23.9		18.4	8.9	8.9	7.5	8.2	7.5	5.4	2.7		2.7	5.4
	NaCl	抽出液	8.7	18.2	23.2	13.5		17.7		3.7		8.9	2.5		3.6
		残渣		17.0		30.4		7.3	15.8	7.3		6.0			15.8
	KCl	抽出液	6.9	15.2	16.6			55.5							5.5
		残渣	24.7		16.8	28.0				8.9	5.6		5.6		10.1
	NaOH	抽出液	22.6		16.3	9.2	6.3	4.9	19.1	5.6	6.3		5.6		3.5
		残渣	23.4		18.5	16.0		8.6	9.4	6.1	4.3		2.2		10.8
	KOH	抽出液	26.9		11.5	46.0				5.7		3.8			5.7
		残渣	20.5		14.5	6.5	6.5	4.1	24.6		5.4		2.7		15.0
	EtOH	抽出液	8.1					88.7							3.2
		残渣	20.8		19.4	18.0		8.3	8.3	6.6					18.0
白味噌	H ₂ O	抽出液	18.6	16.9	16.9			42.3							5.3
		〃S-濃縮	15.8		22.4	14.2		26.5		15.8					5.3
		〃水透析		16.0				80.0							4.0
		残渣	23.1		28.7	15.7		20.3		4.6				7.0	
	NaCl	抽出液	11.1	22.2	16.6			42.4				3.8			3.8
		残渣	1.9	11.9	50.3	24.2						6.3			5.1
	KCl	抽出液	11.8					75.0							13.2
		残渣	14.9		47.0			22.1				11.3			4.7
	NaOH	抽出液	15.1			62.1						15.1			7.6
		残渣	14.1		35.4			38.2				9.2			2.8
	KOH	抽出液	15.0			54.1						19.8			10.9
		残渣		12.0				85.0							3.0

白味噌は米味噌の中で麴歩合が最も多く、麴歩合を20～25とし、熟成期間が短く、1～2週間である。白味噌水抽出タンパク質は米麴の依存度合が最も高いものである点に着目して、白味噌と比較しながら、米麴の米味噌に対する作用機序を解明する目的で原料および熟成中の米麴および完熟味噌中の米麴タンパク質について試べた。

(a) 米麴と原料の比較

米麴、米、米飯および白味噌の水抽出タンパク質の泳動図を図3に、その分画割合を表3に示す。

米麴の水抽出液のA区分の割合はかなり多く36.5%でその中、米味噌のA₃に該当する区分が多い。

米のタンパク質は味噌のB、C区分に該当するゾーンが明瞭に認められるが、米飯に加工した場合にはC区分のグロブリン系の高分子のものは検出されにくい。これは加熱大豆の場合と同様に不溶化によるためであろう。次に水抽出液の残渣を既報¹⁾と同様に10%NaClで抽出して泳動した結果を図4に示す。

図4 NaCl 抽出タンパク質

米麴と白味噌のA区分の泳動図は相似している。いずれの試料にもNaCl溶出によるA₁のゾーンが検出される。しかし、米麴、白味噌の水透析残渣液中には検出されない。米麴の分画はNaCl溶出における泳動図を味噌

に準じて区分し、以下A₁、A₂、A₃、B、CおよびDとする。

次に白味噌生成過程を考察したいと考え米、米飯、米麴および白味噌のA区分の分画割合を表4にまとめた。

表4 各種抽出液のA区分の分画割合

抽出条件 食品名	水抽出	NaCl抽出	KCl抽出
米	11.2	14.0	—
米 飯	22.4	34.2	—
米 麴	36.5	50.1	38.7
白 味 噌	52.4	49.9	11.8

白味噌の水抽出はNaCl抽出液である。米より白味噌に至るまでのA区分の割合から前報の大豆、麴大豆、八丁味噌の場合と同様に米麴中の微生物の作用による著増が認められる。NaCl溶液抽出の場合は水抽出の場合より多く特に米麴と白味噌の割合が等しい。NaClとKCl溶液抽出のA区分の割合を比較すると、NaCl抽出の場合の方が著しく多い。この結果と大豆タンパク質がNaCl溶液に溶出し易いことと考え併せて、味噌醸造におけるNaClは味噌醸酵中における正常醸酵、変敗防止に必須であるばかりでなく、タンパク質の溶出上重要であると再確認した。

次に米麴の緩衝能について調べ、白味噌と比較した。結果は図5に示す。酸性側においては米麴は白味噌と殆んど変らないが、アルカリ側でやや白味噌より弱いのは大豆を含まないことおよび未分解物が多いことを示すものであろう。米麴の水透析残渣液の緩衝能の減少はA₂区分以外の区分、すなわちアミノ酸、ペプチッドなどの外液への溶出によるものであろう。以上の結果から米麴水抽出液中、アミノ酸ペプチッドなどの占める割合が多いものと推定した。

(b) A₂区分の検索

次に米麴水抽出タンパク質を検索するためにポビンアルブミンおよび純粋培養した種麴を用いて実験を行なった。水抽出タンパク質の24時間水透析した残渣液とポビンアルブミンと混合して泳動した。結果を図6に示す。

米麴のA₂区分はブレアルブミンと重なり、A₃はアルブミンより泳動速度が速いことがわかった。米麴の酵素抽出条件⁷⁾を参考として、種麴菌の菌体をトリスグリシン緩衝液にけんだくし、No. 2あるいはNo. 4の濾紙で濾過した。

濾液を顕微鏡で観察すると、No. 2の濾液中には、*Aspergillus oryzae*の孢子柄および芽孢子が認められ、芽孢子にはアミドブラック10Bで着色するものと、着色しないものがある。No. 4の濾液中には孢子柄および芽

図 5 水抽出液の滴定曲線

図 6 米麴タンパク質の検索(1)

胞子は認められず、多角形または楕円形の塊状のものがみられる。No. 4 の濾液とその緩衝液で透析した残留液の泳動図は図 6 の通りである。No. 2 の場合も殆んど同一のパターンが得られるが、No. 2 の透析液は No. 4 のように A_2 区分が 100% にはならなかった。No. 4 の透析液に米味噌および豆味噌の水抽出液の水透析残留液を混合して泳動した結果、No. 4 の水透析液の泳動図と類似の 1 個のゾーンが得られた。以上の実験、前報¹⁾の結果および山崎ら²⁾の報告より考察して、味噌水抽出タンパク質は酵素タンパク質であると判断したがなお検討中である。

次に米麴の A_2 が生成される過程を知りたいと考え、米飯とポビナアルブミンの混合物を泳動した。結果を図 7

に示す。米飯の A 区分中にグレアアルブミンおよびアルブミンと重なる区分があることがわかった。このことから考察すると米麴タンパク質の A_2 区分は素材として既に米飯中に含まれ、麴菌によって酵素タンパク質と同様のものに作りかえられるのであろう。また米麴の A_3 区分は米飯に微生物が作用して、米の B、C 区分の変性物として生成されるものと推考した。

(c) 熟成過程中的挙動

米麴タンパク質の熟成過程中的変化について検索するために米味噌を研究室で調製し米麴について検索した。前回のような乾燥をさけるため種水を多くした。したがって麴大豆は 38 日に至っても良好であった。

図7 米飯水抽出タンパク質のA区分の検索

熟成期間中のピーカー内の米麴を観察すると、仕込後5日目には重石の直下のものは粒の形をとどめず、数粒が連って大豆の周囲に被膜状に附着する。日数経過に伴って、次第に被膜状のものは増加する。20日目には水分の減少が著しくなり、ガラス壁に接する大豆には白い粉状のものが附着し、さらに38日経過すると白粉状のものの増加がみられた。ガラス壁に接していない内部には水分が多く、麴は被膜状であった。また底面の麴は38日経過しても米粒の原形を留めていた。

以上の試料の中、5日経過した被膜状の米麴と30日経

過した白粉状のものおよび米粒状のものを緩衝液で抽出して泳動した結果を図8に示す。

結果、米麴のA₁区分は検出されなかった。A₂区分は熟成期間に関係なく検出されるが、A₃区分は熟成するにしたがって検出されにくくなり、A₂区分のみ検出された。

(d)粒味噌中の状態

味噌中に粒のまま(原型をとどめたもの)混合されている米麴について検索した。粒味噌の水抽出液、麴粒のけんだく液の泳動図は図9の通りである。検索した淡色系の粒味噌10種類の水抽出液はいずれも白味噌と同一のA型のパターンであった。麴歩合に関係なくA₂区分がA₂にやや遅れて泳動することは前述のA₃区分が米麴に起因するものであろうとの推論を裏付けるものである。A区分の分画割合は例外なくA₂区分の割合が多いものであった。

麴粒のけんだく液のパターンは図9のようにそれぞれ異なり、淡色系のものは前出の米麴水抽出液のパターンに類するものである。しかし、水抽出液の場合はいずれもA₂とA₃区分が認められ、図8の被膜状の麴の泳動図と同様のものであり、また水透析残留液にはA₂区分のみが検出された。濃厚系系味噌の麴粒のけんだく液はA₂区分のみであった。これらの味噌の水抽出液は淡色系の粒味噌と異なり、図2のC型で米麴に由来すると思われるA₃区分は認められなかった。以上の麴粒けんだく液のパターンの相違は醸造方法、熟成期間、麴の混合時期に関係があるように思われる。すなわち、四国、九州味

図8 水抽出液の泳動図

図 9 粒味噌と米麴の泳動図

噌は熟成期間が長いので、十分に分解、合成されているので、ゾーンが1個なのではないであろうか、また淡色系味噌の中には完熟後混合した米麴があるのではないかと考えた。

同時に調製味噌の麴大豆の水抽出タンパク質について検討したが、麴被膜で覆われた大豆と被覆されない大豆の水抽出液のパターンは同一で、前報¹⁾と全く同様の結果であった。他に品種の異なる大豆についても試したが同様であった。

以上の結果を麴粒と粒大豆の混在する市販加賀味噌について再び考察すると、図8に示すように粒大豆の水抽出液の泳動図は味噌全体の水抽出液および前出の麴歩合の少ない味噌と同一のD型であった。またA区分の割合はA₂区分が多い点は他の粒味噌と同じである。大豆と麴粒のパターンは同型であるが、麴粒の場合はA₂区分が特に多い。

調製味噌の場合は麴大豆と同型でB型に属するパターンであるが、A₂とA₃区分を分画することは困難であった。

以上のことから麴歩合の少ない辛味噌の水抽出液のパターンは混在する大豆パターンによる影響が大きいがわかる。前述のように完熟味噌の水抽出液の泳動図の相違は原料配合割合および醸造方法の差を示すものと解せられる。

なお、味噌水抽出タンパク質あるいはペプチドの調味機能を支配する要因としての役割については今後の課題として取り上げる予定である。

要 約

- (1) 各種米味噌および米麴タンパク質を検索するために電気泳動法で分画した。
- (2) 各種米味噌の濃度 1:2 の水抽出液泳動図はそれぞれ特色があり、味噌の醸造方法および原料配合によって分類することが出来るものと思われた。
- (3) 米味噌の水抽出タンパク質はボビナルブミンのブレアルブミンおよび麴菌より抽出した酵素タンパク質と同一の移動値を示した。
- (4) 米麴で醸酵させた味噌の水抽出タンパク質は完熟味噌中の米麴水抽出タンパク質と同一の移動値を示した。

研究に対して、ご懇篤なるご鞭撻を賜りました醸造協会理事長松本憲次博士に厚くお礼申し上げます。

本研究の一部は昭和44年6月日本家政学会関東支部例会において報告した。

文 献

- 1) 伊東清枝：栄養と食糧，23，196 (1970)
- 2) 伊東清枝：栄養と食糧，23，205 (1970)
- 3) 中野政弘，吉川誠次他：味噌科学，1，1(1955)
- 4) 海老根英雄，吉川誠次他：味噌科学，5，1(1958)
- 5) 金子安之：日農化，40，227 (1966)
- 6) 真鍋勝，松浦慎治他：日食工，15，341 (1968)
- 7) 服部英作，松山正宣：調味科学，9，22 (1961)
- 8) 山崎謙次，藤島鉄郎他：調味科学，16，7(1969)