醤油諸味の粘度と濾過性に関与する麹菌酵素系の解析

中台 忠信, 相島 鐵郎*

(キッコーマン中央研究所, * 野田産業科学研究所)

昭和 57 年 11 月 1 日 受理

Statistical Estimation of Key-Enzymes Determining the Viscosity and Filtration Rate of Soy Mash

Tadanobu NAKADAI and Tetsuo AISHIMA*

Central Research Laboratories of Kikkoman Co., Noda 278

* Noda Institute for Scientific Research, Noda 278

The relationships between enzyme activities of soysauce koji and mash viscosity and filtration rate were analyzed by using the stepwise multiple regression analysis (SRA) method. Carboxymethyl cellulose (CMC) saccharifying activity, pectin liquefying activity and pectin lyase activity were entered at step 1, 2 and 3 into multiple regression models for mash viscosity, and the resulting multiple regression model explained the 64.7% ($R^2=0.647$) mash viscosity. As for filtration rate, pectin liquefying activity, CMC saccharifying activity, pectin lyase activity and pectic acid liquefying activity were selected as independent variables at step 1, 2, 3 and 4 by SRA, and the resulting coefficient of determination (R^2) was 0.577.

Contributing proportions (P_i) of pectin liquefying activity, pectin lyase activity and CMC saccharifying activity for mash viscosity were 21.3%, 19.7% and 17.4%, respectively. P_i of pectin liquefying activity, pectin lyase activity, pectic acid liquefying activity and CMC saccharifying activity for filtration rate were 22.0%, 18.3%, 9.7% and 8.4%, respectively. The correlation coefficient (r) between mash viscosity and filtration rate was -0.772 (significant at 1% level).

(Received November 1, 1982)

緒 言

醤油製造工程において機械化が最も遅れているのは压榨工程で、これは諸味がうまく流れないためともいわれている⁽¹⁾。ここでは、諸味の粘度を低下させ、さらには压榨の改善を図ることを検討した結果につき述べる。

醤油諸味の压榨性に関与する因子として、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ⁽²⁾、セルラーゼ⁽³⁾などの酵素、大豆蛋白質の未分解破片、細菌菌体およびその破片を含む微細粒子群⁽⁴⁾、酸性多糖類⁽⁵⁾、脂質⁽⁶⁾などの物質がすでに報告されている。今回、麹菌の生産する各種酵素の諸味粘度や濾過性に対する影響に着目した。これら酵素が単独または相互作用を通じて諸味粘度や濾過性に対して与える影響はいまだ詳細には知られていない。

そこで重回帰分析を用いて麹菌の複合酵素系の役割を

解析し、醤油諸味の粘度と濾過性に関与する各種麹菌酵素の重要度を明らかにした。

実 験 方 法

1. 製麹と仕込 麹菌を異にする醤油麹 (75 試料) を麹蓋を使用して作り、得られた醤油麹に 25% 食塩水を添加して仕込を行った。

2. 諸味粘度 最終の諸味粘度をビスコテスト VT-02 (リオン製) のローター 1 を使用し、20°C で測定し、ボイズで表示した。

3. 濾過性 得られた醤油諸味 1.6 l を東洋濾紙 No. 2 (ϕ 36 cm) を使用して、24 時間自然濾過した場合に得られる液汁量を ml で表示した。なお醤油 pH (SpH) も測定した。

4. 酵素液の調製 醤油麹 10g に水 100 ml を加

えて、冷蔵庫で1晩抽出後、濾過した。この濾液 5 ml を水に対して1晩透析後、10 ml に定容した。なお麴 pH (K pH) も測定した。

5. 酵素力価の測定 酵素力価は酵素単位/g 麴で表示した。

(1) ペクチン液化酵素 (PLA と略称): 0.5% ペクチン NF (サンキスト製, 0.0625 M リン酸緩衝液 pH 5.5 に溶解) 2 ml に酵素液 0.5 ml を加えて、25°C で 10 分間反応させ、先端部分が内径 1 mm の 0.5 ml ホールピペット (水の落下速度が約 8 秒) を用いて落下速度を測定した。25°C、30 分間でペクチンの粘度を 50% 低下させる酵素量を 1 単位とした。

(2) ペクチン酸液化酵素 (PALA と略称): 1% ペクチン酸 (和光純薬製, 0.05 M 酢酸緩衝液 pH 4.5 に溶解) を基質として前記 (1) と同様に測定した。

(3) ペクチンリアーゼ (PL と略称): 前報⁽⁷⁾に従って測定した。

(4) CMC 糖化酵素 (CS と略称): 前報⁽⁷⁾に従って測定した。

(5) ペクチン糖化酵素 (PS と略称): 前記 (1) の基質 1 ml と酵素液 1 ml を加えて、40°C で 1 時間反応させ、以下は前記 (4) と同様に測定した。

(6) ペクチン酸糖化酵素 (PAS と略称): 前記 (2) の基質 1 ml に酵素液 0.5 ml と水 0.5 ml を加えて、40°C で 10 分間反応させ、以下は前記 (4) と同様に測定した。

(7) キンラン糖化酵素 (XS と略称): 0.5% キンラン (東京化成製, 最少量の 1 N NaOH に溶解後、0.1 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 溶液にする) 1 ml に酵素液 1 ml を加えて、40°C で 10 分間反応させ、以下は前記 (4) と同様に測定した。

6. 重回帰分析⁽⁸⁾ 重回帰分析では諸味粘度と濾過性をそれぞれ目的変数 (Y), また麴菌の各種酵素力価と K pH, S pH を説明変数 (X) として解析した。重回帰分析は予測に用いるための手法で、結果を表す目的変数 Y と原因を表す説明変数 X_i があったとき、一般的に (1) で表すことができる。

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \cdots + \beta_i X_i + \cdots + \beta_p X_p + \alpha + e \quad (1)$$

β_i , α および e はおのおの偏回帰係数, 定数および誤差と呼ばれ, 最小二乗法により算出される。算出された回帰式の精度は重相関係数 R および分散分析の F 値に

より検定される。変数間の相関に基づき変数間に重複して含まれる情報量を考慮して、自動的に重回帰式中に取り入れる変数を選択し、ある数の変数において最良回帰式を算出する段階的重回帰分析法 (stepwise regression analysis: SRA) を用いて行った。この SRA はユニバック 90-800 II 型で VS/9 システムにより BMDP 2 R⁽⁹⁾ プログラムを用いて行い、各説明変数の重要度は Barylko-Pikiela と Metelski の式 (2)⁽¹⁰⁾ により寄与率 (P_i) として算出した。

$$P_i = \frac{|s_i \beta_i r_{iy}|}{|\sum s_i \beta_i r_{iy}|} \times 100 R^2 \quad (2)$$

ただし s_i , β_i , r_{iy} はおのおの各説明変数の標準偏差, 偏回帰係数および目的変数との単相関係数を示す。

実験結果

1. 各種酵素, pH と諸味粘度および濾過性の関係

Table I. Correlation Coefficients between Enzyme Activity and Mash Viscosity

Enzyme and others	Correlation coefficient (r)
PLA	-0.719**
PL	-0.662**
CS	-0.670**
PSA	-0.581**
PASA	-0.546*
PALA	-0.671**
XS	-0.785**
K pH	0.542*
S pH	0.483*
Proteinase	-0.058
α -Amylase	-0.010
Chitin content	0.842**

$n=18$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$

Table II. Profile of Data

Enzyme and others	Maximum	Minimum	Mean	Standard deviation
PLA	600	14	171	186
PL	62.6	1.3	27.8	16.8
CS	1.84	0.72	1.37	0.25
PSA	2.27	0.38	1.15	0.37
PASA	38.0	7.3	14.7	6.3
PALA	145	2	29	37
XA	10.59	4.04	7.39	1.37
K pH	7.41	6.29	6.78	0.26
S pH	5.35	4.69	5.15	0.14
Mash viscosity	90	6.2	35	20
Filtration rate	920	485	688	81

Table III. Correlation Matrix

Enzyme and others	PL	CS	PALA	PSA	PASA	XS	S pH	K pH
PLA	0.911**	0.673**	0.875**	0.724**	0.796**	0.393**	-0.533**	-0.550**
PL	1.000	0.761**	0.882**	0.738**	0.829**	0.587**	-0.493**	-0.499**
CS		1.000	0.647**	0.649**	0.675**	0.670**	-0.414**	-0.360**
PALA			1.000	0.724**	0.909**	0.540**	-0.414**	-0.480**
PSA				1.000	0.736**	0.279*	-0.342**	-0.550**
PASA					1.000	0.510**	-0.370**	-0.594**
XS						1.000	-0.262*	-0.089
S pH							1.000	0.411**

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

同時仕込の 18 試料で、醤油麴の酵素力価、K pH および S pH と諸味粘度との相関係数を求めた (Table I)。その結果、酵素の PLA, PL, CS, PSA, PASA, PALA, XS, 酵素反応の場である K pH (初発 pH に相当) と S pH (最終 pH に相当) の 9 項目が諸味粘度との間に有意な相関を示したので、それらを重回帰分析の説明変数として選んだ。

説明変数として選んだ 9 項目の特性を Table II に示した。各種ベクチナーゼの基質との関係において、液化力を比較するとベクチンを基質とした場合のほうがベクチン酸を用いた際より強く、糖化力は逆の傾向を示した。

Table III に各種酵素と pH の相関行列を示した。各種酵素間では XS と PSA 間が 5% 有意にすぎなかったほかは、すべて 1% 有意であった。K pH が低いほど、各種ベクチナーゼと CS の生産が 1% 有意で増大する傾向を示した。K pH と S pH の関係も、1% 有意の相関を示した。諸味粘度と濾過性の相関係数は -0.772 (1% 有意) で、粘度の低下が濾過性の増加に重要であることを示した。

2. 重回帰分析

Table IV に醤油麴の酵素力価等と諸味粘度との SRA 結果を示した。決定係数 (R^2) の増大はステップ 5 以降はほとんどなく、説明変数として選んだ 9 項目のなかに含まれる諸味粘度を説明する情報が、重回帰式中に取り入れられた 5 変数中に集約されていることを示す。なお決定係数はステップ 5 で 0.692 で、3 種酵素と 2 種の pH で諸味粘度の 69% が説明できることがわかった。

Table V に醤油麴の酵素力価等と濾過性との SRA 結果を示した。決定係数の増大はステップ 4 以降はほとんどないので、予測式としては 4 変数で十分であった。なお決定係数はステップ 4 で 0.607 で、4 酵素により濾過性の約 61% が説明できることがわかった。

Table IV. Summary Table of SRA of Mash Viscosity

Step No.	Enzyme and others	Multiple correlation coefficient (R)	Coefficient of multiple determination (R^2)	Analysis of variance (F)
1	CS	0.691	0.4777	66.77**
2	PLA	0.742	0.5498	11.53**
3	PL	0.804	0.6470	19.55**
4	S pH	0.822	0.6763	6.34**
5	K pH	0.832	0.6918	3.47**
6	PSA	0.835	0.6968	1.11
7	PASA	0.835	0.6969	0.03
8	PALA	0.835	0.6971	0.05
9	XS	0.835	0.6971	0.001

** $P < 0.01$

Table V. Summary Table of SRA of Filtration Rate

Step No.	Enzyme and others	Multiple correlation coefficient (R)	Coefficient of multiple determination (R^2)	Analysis of variance (F)
1	PLA	0.714	0.5102	76.03**
2	CS	0.739	0.5464	5.75**
3	PL	0.760	0.5771	5.16**
4	PALA	0.779	0.6066	5.24**
5	XS	0.782	0.6120	0.96
6	K pH	0.784	0.6138	0.32
7	PSA	0.784	0.6140	0.03
8	S pH	0.784	0.6140	0.07
9	PASA	0.784	0.6140	0.0008

** $P < 0.01$

SRA のステップ 1 と 2 において算出された諸味粘度に対する予測式を Fig. 1 に示した。ステップ 1 で選ばれた CS のみで、諸味粘度が約 48% 説明されることがわかった。

Step 1

$$Y = -56.2 X_1 + 112.2$$

(66.8**)

$$R = 0.691, R^2 = 0.478, F = 66.8^{**}$$

Std. error of Est. = 14.5

$$^{**} P < 0.01, F(1, 73; 0.01) = 6.94$$

Step 2

$$Y = -36.3 X_1 - 0.039 X_2 + 91.6$$

(17.5**) (11.5**)

$$R = 0.742, R^2 = 0.550, F = 44.0^{**}$$

Std. error of Est. = 13.6

$$^{**} P < 0.01, F(2, 72; 0.01) = 4.91$$

Fig. 1. Multiple Regression Models Computed at Step 1 and 2 for Mash Viscosity. X_1 =CS, X_2 =PLA

Step 1

$$Y = 0.312 X_1 + 634.1$$

(76.0**)

$$R = 0.714, R^2 = 0.512, F = 76.0^{**}$$

Std. error of Est. = 57.2

$$^{**} P < 0.01, F(1, 73; 0.01) = 6.94$$

Step 2

$$Y = 0.236 X_1 + 84.9 X_2 + 530.3$$

(25.4**) (5.8**)

$$R = 0.739, R^2 = 0.546, F = 43.4^{**}$$

Std. error of Est. = 55.4

$$^{**} P < 0.01, F(2, 72; 0.01) = 4.91$$

Fig. 2. Multiple Regression Models Computed at Step 1 and 2 for Filtration Rate. X_1 =PLA, X_2 =CS

SRA のステップ 1 と 2 において算出された濾過性に対する予測式を Fig. 2 に示した。ステップ 1 で選ばれた PLA 単独で、濾過性が約 51% 説明されることがわかった。

3. 寄 与 率

各説明変数の重回帰式中における相対的重要度は単なる従属変数との相関とは異なる。式 (2) により、各変数の寄与率を算出した。Table VI と Table VII にそれぞれ諸味粘度と濾過性に及ぼす各種酵素等の寄与率を示した。(2) 式からも明らかのように、寄与率は各説明変数とその重回帰式中で目的変数を説明できる割合(%)であり、情報が各変数中に重複することを考慮して算出される。諸味粘度は PLA, PL, CS の 3 酵素で約 58% 説明できることがわかった。また PLA, PL, CS, PALA の 4 酵素で濾過性を約 58% 説明できた。K pH と SpH の諸味粘度に対する寄与率は約 6% であり、濾過性に対して

Table VI. Contributing Proportion (P_i %) of Each Item for Mash Viscosity

Enzyme and others	Correlation coefficient (r)	Contributing proportion (P_i %)
PLA	-0.664**	21.29
PL	-0.558**	19.74
CS	-0.691**	17.43
PSA	-0.579**	2.60
PASA	-0.558**	1.22
PALA	-0.542**	1.09
XS	-0.303**	0.05
S pH	0.529**	4.14
K pH	0.486**	2.15
Total		69.71

** $P < 0.01$

Table VII. Contributing Proportion (P_i %) of Each Item for Filtration Rate

Enzyme and others	Correlation coefficient (r)	Contributing proportion (P_i %)
PLA	0.714**	21.99
PL	0.626**	18.29
PALA	0.682**	9.67
CS	0.622**	8.43
XS	0.408**	1.56
PSA	0.534**	0.38
PASA	0.628**	0.16
S pH	-0.418**	0.83
K pH	-0.372**	0.10
Total		61.40

** $P < 0.01$

は約 1% と低かった。

考 察

段階的重回帰分析は変数間の相関を考慮し、情報量の最大化を図るように変数の組を選ぶので、必ずしもステップで選ばれる順序と寄与率は一致しない。変数間に相関がほとんどないか零の場合は寄与率の大きさとステップで選ばれた順序が一致する。つまり濾過性に寄与する酵素の順序は PLA, PL, PALA, CS であるが (Table VII), 予測に対する情報量の最大化を図り、相関を考えると、ステップ 2 で選ばれたのは CS であった (Fig. 2)。これは PLA と PL または PALA 間の相関が 0.911, 0.875 と非常に高く、PLA と CS 間の相関が 0.673 と若干低いと考えられる (Table III)。

すでに石井らにより麹菌においてはポリメチルガラク

チュロナーゼなる酵素は存在せず、ペクチン液化酵素はペクチンリアーゼによるものと考えられている⁽¹¹⁾。したがって PLA と PL, PALA, PSA, PASA 間の相関が高いことから (Table III), 本報告の PLA はペクチナーゼの総合的な酵素作用によるものと考えられる。

細胞壁に含まれているペクチン質はそのカルボキシル基がほかの多糖体 (セルロース, ヘミセルロースなど) の水酸基とエステル結合するなど重複した原因により水不溶性になり, この状態のペクチン質をプロトペクチンと呼んでいる。プロトペクチンの崩壊は植物組織の軟化, 崩壊を引き起すと考えられている⁽¹²⁾。したがって CS が諸味粘度や濾過性に寄与しているということは, この酵素がセルロースの非結晶領域を分解するとともにプロトペクチンのセルロース部分を分解するためと考えられる。

9 説明変数に基づく SRA において, 寄与率から, 諸味粘度ではさらに約 30%, 濾過性ではさらに約 39% を説明できる分析項目を見出すことが, 諸味物性の解明に必要なことが示唆された。そこでもっと高い寄与率を得るためには CMC 液化酵素, キチナーゼ, グルカナーゼ, プロトペクチナーゼ, マセレーティング活性, 濾紙崩壊活性, ペクチンエステラーゼ, リパーゼなどの酵素, キチン含量などの物質, 仕込約 1 カ月後の諸味 pH, 醬油の食塩濃度などの酵素反応の場のなかから適切な説明変数を選択し, SRA 中に取り入れることが有効と考えられる。

諸味粘度を低下させるためには諸味を低 pH 経過をたどらせるほうがよかったが, これに関与する酵素の最適 pH が微酸性側にあるためと考えられる^(11,13)。本報告における濾過性とは実際の圧搾工程における自然垂に相当すると考えられる。本 SRA よりとくに PLA 活性の強い麹菌を選択し, 諸味粘度を低下させれば, 諸味圧搾性の改良につながると考えられる。

要 約

醬油諸味の粘度と濾過性に関する麹菌酵素系を段階的重回帰分析を用いて解析した。

(1) 諸味粘度の予測式にはステップ 1 で CMC 糖化酵素 (決定係数: R^2 , 0.478, 以下同), ステップ 2 でペクチン液化酵素 (0.550), ステップ 3 でペクチンリアー

ゼ (0.647) が選択され, 説明変数として取り入れられた。

(2) 濾過性の予測式にはステップ 1 でペクチン液化酵素 (0.510), ステップ 2 で CMC 糖化酵素 (0.546), ステップ 3 でペクチンリアーゼ (0.577), ステップ 4 でペクチン酸液化酵素 (0.607) が説明変数として選択された。

(3) 諸味粘度に対して寄与率の大きな酵素はペクチン液化酵素 (21.3%), ペクチンリアーゼ (19.7%), CMC 糖化酵素 (17.4%) であった。

(4) 濾過性に対して寄与率の大きな酵素はペクチン液化酵素 (22.0%), ペクチンリアーゼ (18.3%), ペクチン酸液化酵素 (9.7%), CMC 糖化酵素 (8.4%) であった。

(5) 諸味粘度と濾過性との相関係数は -0.772 (1% 有意) であった。

終りに臨み, ご指導いただきました当社中央研究所内田金治博士, 水沼武二博士, 重回帰分析にご協力いただいた当社東京支店植松和雄氏, 発表をご許可くださいました常務取締役井口信義博士, 中央研究所長吉田文彦博士ほか役員各位, 実験にご協力いただきました小山宏子氏に感謝いたします。

- (1) 宮本 弘: 醸協, **74**, 516 (1979).
- (2) 石井茂孝, 菊地忠昭, 大上忠男, 横塚 保: 農化, **46**, 349 (1972).
- (3) 高松 洋, 岩浅 孝: 日本醸酵工学会昭和55年度大会講演要旨集, 1980, p. 11.
- (4) 加藤 威, 泉 保廣: 醸工, **53**, 177 (1975).
- (5) 菊地忠昭, 杉本 洋, 横塚 保: 農化, **50**, 279 (1976).
- (6) 有賀敏明, 杉本 洋: 日本農芸化学会昭和56年度大会講演要旨集, 1981, p. 40.
- (7) T. Nakadai and S. Nasuno: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 273 (1977).
- (8) 奥野忠一, 久米 均, 芳賀敏郎, 吉沢 正: 「多変量解析法」, 日科技連, 1973, p. 25.
- (9) Biomedical Computer Programs, Univ. of Calif. Press, 1975, p. 491.
- (10) N. Barylko-Pikiela and K. Metelski: *J. Food Sci.*, **31**, 566 (1966).
- (11) 石井茂孝, 川村 敏, 横塚 保: 農化, **44**, 299 (1970).
- (12) 坂井拓夫: 発酵と工業, **37**, 928 (1979).
- (13) 石井茂孝, 菊地忠昭, 横塚 保: 農化, **43**, 544 (1969).