

米味噌麴中のタンパク質分解促進に関する研究

伊藤雅子・加藤丈雄・西田淑男・鳥居貴佳・深谷伊和男

米味噌は大豆と米、及び食塩を原料として醸造される日本の伝統的な発酵調味料である。麴菌が生産したプロテアーゼにより、味噌熟成中に大豆タンパク質と米タンパク質はペプチドやアミノ酸に分解される。これらは味噌の旨味や風味を形成する主要な成分であり、更に近年、血圧上昇抑制効果などを有する機能性物質¹⁾とされるものの存在が明らかとなった。米味噌においては、大豆タンパク質はほぼ完全に分解されるが、米タンパク質の一部は著しく不溶化して完全には分解されずに残存する²⁾。この米タンパク質を完全に分解できれば、一層旨味(アミノ酸)や生理機能性(ペプチド)を強化した米味噌の醸造が期待できる。そこで、米タンパク質を完全分解した米味噌の醸造を最終目的として、本研究では、まず炊飯米及び米麴中の米タンパク質の分解について検討した。

1. 試料及び実験方法

(1) 原料米

市販のコシヒカリ精白米(平成9年,新潟産)を用いた。

(2) 米麴の調製

原料米を洗浄、蒸留水に1晩浸漬、1時間水切り後、1時間蒸した。約35°Cに冷却した蒸米に、原料米重量の0.02% (w/w) の種麴 (*Asp. oryzae* KBN967) と0.05% (w/w) の滅菌した香煎の混合物を接種し、30°Cで48時間製麴した。

(3) 米麴自己消化試験

乳酸でpH 5.0に調整した食塩水中に米麴を40% (w/w) の割合で混合し、滅菌済ポリエチレン製フィルムの袋に密封充填し、30°Cで30日間消化を行った。その際、食塩濃度は6, 9, 12% (w/w) の3段階に調整した。

(4) 炊飯米のプロテアーゼ処理

原料米85gを蒸留水115gに30分浸漬し、電気炊飯器(タイガー(株), JNL-F550型)を用いて炊飯米を調製した。プロテアーゼとしてウマミザイム (20 000u/g, *Asp. oryzae* 由来, 天野法), Protease M (5 500u/g, *Asp. oryzae* 由来, 天野法), Protease S (10 000u/g,

Bacillus 由来, 天野法), プロレザー (10 000u/g, *Bacillus* 由来, 天野法), 及びパバイン (400 u/mg以上, *Carica papaya*由来, パバイン法)((株)天野エンザイム)を使用した。各プロテアーゼを蒸留水に1mg/mlとなるように溶解し、無菌濾過(0.45 μ m, メンブランフィルター, アドバンテック(株))を行って酵素溶液とした。炊飯米に対して5倍重量の酵素溶液を添加、混合し、37°Cで48時間、ゆるやかに振とうして酵素分解を行った。

(5) 粉碎米麴のプロテアーゼ処理

6%食塩水に溶解した1mg/ml ウマミザイム溶液を無菌濾過して酵素溶液とした。乳鉢で粉碎した米麴に対して5倍重量の酵素溶液を添加、滅菌したポリエチレン製フィルムの袋に密封充填し、55°Cで5日間酵素分解を行った。対照として、酵素溶液の代わりに無菌濾過した6%食塩水を混合し、同様の操作を行った。

(6) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

米麴などの固形試料1gに対して2mlの溶解液(64mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% メタノール, 22% グリセロール, pH6.8)を加え、乳鉢で粉碎した。また、粉碎米麴プロテアーゼ処理した試料を遠心分離した上清には、2倍濃度の溶解液を同量加えて混合した。いずれも沸騰水中で5分加熱後、遠心分離(15 000 rpm, 10分, 室温)した。その上清をLaemmliの方法³⁾に従って15%ポリアクリルアミドスラブゲルを使用してSodium dodecyl sulfateポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供した。分子量マーカーとして、Prestained SDS-PAGE standards Low RangeとSDS-PAGE Standards Low Range (BIO-RAD, U.S.A.)を使用した。泳動後、ゲルはクマジーブリリアントブルー(CBB) R-250でタンパク染色した。

(7) Immuno-blotting

SDS-PAGEを行ったゲルをTowbinの緩衝液⁴⁾に15分浸漬後、ポリビニリデンフルオリド膜(PVDF膜, BIO-RAD)に電気泳動プロットティング(15V, 30分, Transblot SD, BIO-RAD)した。このPVDF膜を3%BSA/Tris buffered saline (TBS, 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5)

中で5°Cで一晩振とうしてブロッキングした。1% BSA/TBSで1 000倍希釈した一次抗体(抗16kDaアルブミン抗血清, 抗26kDa α -グロブリン抗血清)と共に, 37°Cで2時間振とうして一次抗原抗体反応を行った。次に, PVDF膜を0.05% Tween 20/TBS (TBST) で3回洗浄して余剰の抗体を取り除いた後, PVDF膜をヤギ抗マウスIgG (Fc) 金コロイド (Amersham Pharmacia Biotech社) 中, 室温で4時間振とうして二次抗原抗体反応を行い, 赤色バンドを検出した。

(8) 生菌数の測定

カビサイジン100ppmとなるように添加した標準寒天培地を用いて, 塗抹法により30°Cで48時間平板培養して出現したコロニー数を測定した。

2. 実験結果及び考察

(1) 米麴自己消化試験

図1に食塩濃度12%の米麴自己消化区のSDS-PAGEの結果を示した。熟成30日後においても, 米麴中には矢印で示した米の主要なタンパク質であるグルテリン(37~38kDa塩基性サブユニット, 22~23kDa酸性サブユニット), α -グロブリン(26kDa), アルブミン(14~16kDa), プロラミン(13kDa)と考えられるタンパク質が残存した。プロテアーゼ活性が高いと推定される食塩濃度を6%, 及び9%の試料区においても同様の結果が得られた(結果は省略)。この結果から, 米麴中のプロテアーゼによって米タンパク質は完全には分解されないことが確認された。新国¹⁾も熟成30日後の米味噌に主要な米タンパク質が分解されずに残存することを報告している。味噌熟成中に大豆タンパク質はほぼ完全に分解される²⁾ことから, 米タンパク質は大豆タンパク質に比べて米麴のプロテアーゼの作用を受けにくいと考えられた。

(2) 炊飯米のプロテアーゼ処理

プロテアーゼ添加による炊飯米中の米タンパク質の分

解を試みた。その際, プロテアーゼの活性低下を避けるために, 食塩無添加で検討を行った。図2にウマミザイム処理した炊飯米試料のSDS-PAGEの結果を示した。13kDa付近にタンパク質バンドが若干認められたが, 主要な米タンパク質バンドはほとんど消失し, 分解されたと考えられた。Protease M, Protease S, プロレザー, 及びパバインで処理した試料においては, 全てにグルテリンが残存した。プロレザー処理試料にはアルブミンが, パバイン処理試料には α -グロブリン, アルブミンと考えられるタンパク質が残存した(結果は省略)。そこで, 以後の実験にはタンパク分解力が最も強いウマミザイムを使用することとした。

(3) 粉碎米麴のプロテアーゼ処理

プロテアーゼが作用し易くするために米麴を粉碎し, ウマミザイムの至適温度である55°Cで酵素分解を行った。図3にウマミザイム処理試料を遠心分離して得られた上清部と沈殿部のSDS-PAGEの結果を示した。上清部には, 14kDa付近以外にはタンパク質バンドは認められなかった。沈殿部には, 30kDa, 22~23kDa, 14~16kDaにタンパク質バンドが認められた。次に, 消化酵素により分解されにくいと言われる α -グロブリンとアルブミン⁴⁾の分解を確認するため, 抗16kDaアルブミン抗血清と抗26kDa α -グロブリン抗血清を用いたImmuno-blottingを行った。図4に示すように, ウマミザイム処理を行った沈殿, 上清ともに発色が認められず, ウマミザイム処理を行うことにより米麴中のアルブミンと α -グロブリンが分解できたと考えられた。難消化性である α -グロブリン(26kDa)やアルブミン(14~16kDa)を分解する事ができたのは, 粉碎によるプロテアーゼとの接触面積の拡大が一要因と考えられた。なお, ウマミザイム処理した米麴の生菌数は300以下/gであり, 汚染菌由来のプロテアーゼの影響はないと考えられた。

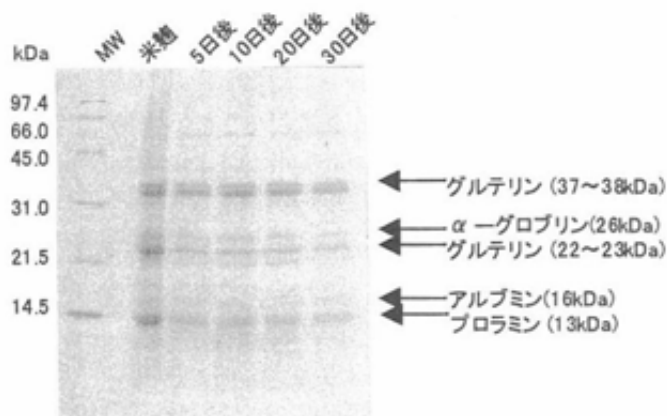


図1 米麴自己消化区(食塩濃度12%)のSDS-PAGE

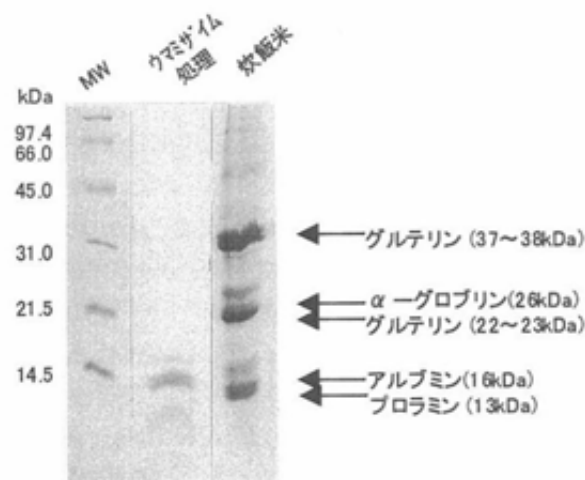


図2 炊飯米ウマミザイム処理区のSDS-PAGE

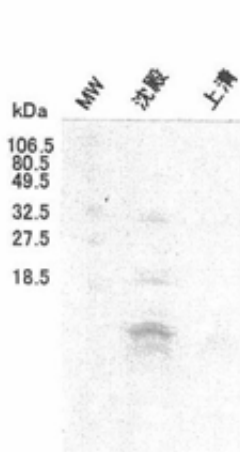


図3 粉碎米麴ウマミザイム処理区のSDS-PAGE

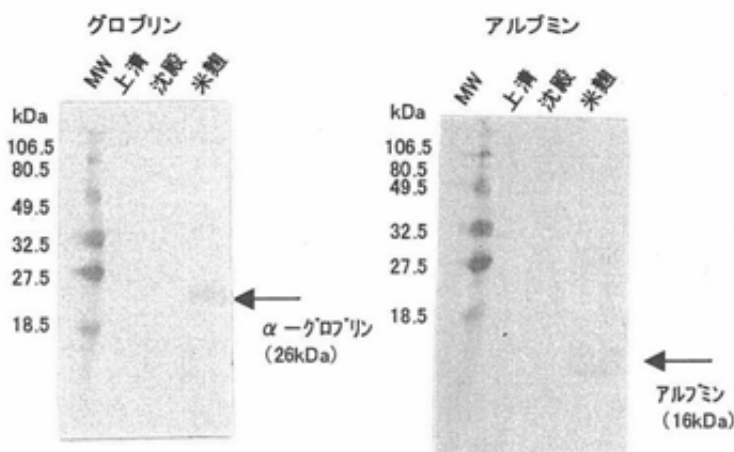


図4 粉碎米麴ウマミザイム処理区のImmuno-blotting

以上の結果から、図3の30kDa, 22~23kDa, 14~16 kDaのタンパク質はそれぞれ、グルテリンの塩基性サブユニット、グルテリンの酸性サブユニット、プロラミンと推定された。グルテリンとプロラミンはプロテインボディと呼ばれる顆粒として米の胚乳中に存在し、難溶性のタンパク質である⁹⁾。ウマミザイム処理により炊飯米中のグルテリンはほとんど分解されたが(図2)、米麴中のグルテリンは若干残存した(図3)。これは炊飯米処理区と粉碎米麴処理区の食塩濃度の違いや、炊飯米と米麴での水分含量、でん粉のα化度、タンパク質の存在状態(プロテインボディの有無)、及び変性程度などが異なるためと考えられた。米麴中のグルテリンも炊飯米に近い状態でプロテアーゼ処理を行えば、完全分解が期待できると考えられた。

ウマミザイムは使用したプロテアーゼの中で最も活性が高く(20 000u/g以上)、エンドペプチダーゼ活性のみでなくエクソペプチダーゼ活性(70u/g以上, LGG法)も持っていた。米タンパク質の完全分解には、エンドペプチダーゼ活性とエクソペプチダーゼ活性の両方が必要かも知れない。

粉碎した米麴を使用し、仕込み時にプロテアーゼを添加して味噌中の米タンパク質を完全分解することで、アミノ酸の増加による旨味の強化、あるいはペプチドの増加による機能性を強化した米味噌の調製が期待できる。

3. 要約

米味噌中には、熟成後も米タンパク質の残存が認められたので、製麹工程後にプロテアーゼ処理することにより、米タンパク質を分解することを検討した。米麴を粉碎し、プロテアーゼ(ウマミザイム)処理することで米の難消化性タンパク質であるα-グロブリン(26kDa)、アルブミン(14~16kDa)を完全分解し、その他の主要な貯蔵タンパク質をほぼ分解することができた。この方法を使用して、米タンパク質完全分解米味噌醸造の可能性が示された。

文 献

- 1) 寺中毅頼・江澤真・松山惇・海老根英雄・清澤功：農化，69，1163(1995)。
- 2) 伊藤雅子・加藤丈雄・松田幹：未発表。
- 3) Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680(1970)。
- 4) Towbin, H.・Stachelin, T.・Gorodon, J.: *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, 76, 4350(1979)。
- 5) 藤山公雄・国定則行：醸酵工誌，33，28(1955)。
- 6) 中村良・松田幹：*Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1215(1996)。
- 7) 新国佐幸・石山朋治・鈴木チセ：日食工誌，38, 316(1991)。
- 8) 増村威宏・田中国介：醸協，88，414(1993)。