

醤油製造中における遊離グルタミン酸, ピログルタミン酸, グルタミンの消長について

中嶋 昭雄*・近藤 正嗣**・青山 虎彦

Studies on the Patterns of Pyroglutamic Acid, Glutamic Acid and Glutamine Produced during the Course of Shōyu Production

AKIO NAKAJIMA, MASATSUGU KONDO, and TORAHIKO AOYAMA

I. 緒 言

グルタミン酸 (Glu) からピログルタミン酸 (PGA) の移行については以前から報告がある^{1)~3)}。しかし醤油中の PGA 化については明らかでない。Glu の1部が PGA として存在していることが知られている^{4)~6)}。据らは PGA はグルタミン (Glu-NH₂) または Glu から非酵素的作用によって生成されると述べ、諸味中で Glu の脱水反応により PGA に移行すると報告しているが⁷⁾、これらの生成機構については未だ不明な点が多い。著者らは原料より製麹及び諸味熟成過程を通じて PGA の生成と Glu-NH₂ 及び Glu 相互間の関係を解明する目的で、原料から熟成に至る間これらの成分の消長について検討を行ない、二、三の知見を得たので報告する。

II. 実験材料及び方法

(1) 材 料

丸大豆: 市販品, 中共産

脱脂大豆: 市販品, イリノイ州産

小麦: 茨城産

表 1 原材料の一般成分

	水分(%)	全窒素(%)	産 地	品 種
丸大豆	12.1	7.8	中 共	不 明
脱脂大豆	11.8	7.2	イリノイ	雑 種
小 麦	13.0	2.2	茨 城	農林61号

* 茨城県醸造試験所
Brewing Institute, Ibaraki Prefecture

** 東北大学医学部
School of Medicine, Tōhoku University

種麹: 丸福醤油専用麹

一般成分は表1に示す。

(2) Glu, PGA, Glu-NH₂ の分離と定量

(イ) 抽出条件

丸大豆, 脱脂大豆, 小麦の試料についてそれぞれ 20 g を水 100 ml を加え室温で 20 hr マグネチックスターラー上で攪拌抽出を行ない (60 rpm) その後過塩素酸法⁸⁾により除蛋白した。すなわち 1M 過塩素酸を試料の半量 10 ml を加えて冷蔵庫中に 1 hr 放置し冷却遠心し上清を供試液とした。麹からの抽出は水分定量後乾物として 40 g を採り同様条件で抽出を行なった。

(ロ) 高圧濾紙電気泳動法⁹⁾ による Glu, PGA, Glu-NH₂ の分離。

除蛋白処理を行なった試料は凍結乾燥により濃縮し東洋濾紙 No. 51 60 × 60 cm にバンド状にスポットし 3,000V にて 90 分高圧濾紙電気泳動を行なった。その後易動度の差により Glu, PGA, Glu-NH₂ の3成分を単離した。緩衝液には 0.03M ピリジン酢酸塩 (ピリジン: 酢酸: 水 = 1: 10: 289) の pH 3.7 の溶媒を使用し、発色試薬は Glu, Glu-NH₂ は 0.1% ニンヒドリン溶液, PGA には BTB 0.1% 溶液を使用した。

調整法は表2に示す。

(ハ) Glu, PGA, Glu-NH₂ の定量。

高圧濾紙電気泳動法によって分離した Glu, PGA, Glu-NH₂ の3成分のそれぞれのスポットは水で溶出し濃縮し一定量とした後 *Leuconostoc mesenteroides* P-60 および *Lactobacillus fermenti* 36 を使用して Bioassay 法¹⁰⁾によって定量した。PGA は 4N 塩酸にて 100°C 1 hr 加水分解し開環して Glu として定量した。Glu-NH₂ についても同様に塩酸にて 1 hr 分解し再び電気泳動を

表2 調整法

大豆	20g
↓	50 mesh
水抽出	
↓	
除蛋白	
↓	
遠心分離	10,000 rpm
↓	10 min
凍結乾燥	10 ml
↓	
濃縮	2 ml
↓	
高压濾紙電気泳動	0.3 ml
↓	
分離	
↓	
溶出	{ Glu PGA Glu-NH ₂
↓	
溶出液	20 ml
↓	
濃縮	5 ml
↓	
pH調整	N/25 NaOH
↓	
試料	10 ml
↓	
定量	1 ml

表3 原料中の成分

	Glu (mg/100g)		PGA (mg/100g)		Glu-NH ₂ (mg/100g)	
	蒸煮前	蒸煮後	蒸煮前	蒸煮後	蒸煮前	蒸煮後
丸大豆	17.6	18.1	7.7	13.3	32.0	89.0
脱脂大豆	55.5	59.7	13.4	19.2	40.0	98.0
小麦	20.0		3.3		46.7	

Glu, PGA, Glu-NH₂ の定量を行なった結果を表3に示す。

Glu については蒸煮後は幾分増加が見られる。PGA は 40~70% 増加しており (丸, 脱脂大豆とも), Glu-NH₂ の増加は著しく 2.5 倍である。松下¹⁴⁾ は大豆種子中の Glu-NH₂ を定量し 39 mg/100g であり本実験値とはほぼ一致している。

(2) 製麩中の消長

脱脂大豆使用製麩中の Glu, PGA, Glu-NH₂ の消長は表4及び1図に示す。Glu については仕込の際の約 10 倍, Glu-NH₂ は約 15 倍と急激な増加が見られ注目すべき事実である。PGA は漸増の傾向をたどっている

表4 製麩中の消長

	Glu (mg/100g)	PGA (mg/100g)	Glu-NH ₂ (mg/100g)
盛込	27.4	17.2	16.3
手入	167.4	14.9	79.1
3日目朝	229.1	22.4	108.0
出麩	240.6	26.0	250.1

行なってこれを定量した。回収率は既知濃度 Glu-NH₂ 及び Glu 溶液を使用しその都度測定を行ない確認した。

(3) 蒸煮条件

丸大豆の場合 200g を水道水に 12hr 浸漬しこれを 2l ポットに入れ 1.0 kg/cm² にて 1hr オートクレーブにて蒸煮し放冷後風乾量として 20g をとり前記方法により定量した。脱脂大豆の場合 NK 式によった。

(4) 製麩及び仕込

配合割合 脱脂大豆 1,625 kg (14 石)
 小麦 1,500 kg (11 石) 炒熟割砕
 容器 9kl (50 石) 桶
 食塩水 Be' 18 度 5,850 l (13 水)

この操作は紫沼醤油株式会社にて行なった。

丸大豆を用いた麩は小麦と各 1kg 宛配合して (3) 項に記した方法で製麩を行なった。

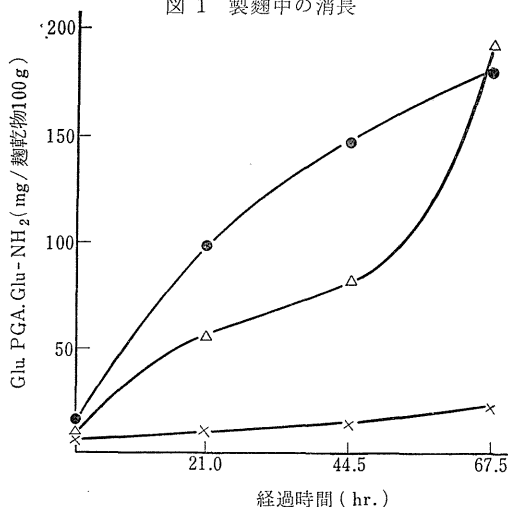
試料は仕込後から熟成まで 10 カ月の間約 1 カ月ごとに採取し分析に供した。

III. 結果及び考察

(1) 原料中の Glu, PGA, Glu-NH₂ について

丸大豆, 脱脂大豆, 小麦の原料についてそれぞれの

図1 製麩中の消長



Glu: —●—●—
 PGA: —×—×— ; Glu-NH₂: —△—△—

表 6 原料，麴，諸味液の消長

	原料	盛込	手入	3日目	出麴	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
						9日	32日	62日	90日	120日	153日	185日	215日	258日	285日	312日
Glu	43.8	27.4	167.4	229.1	240.6	999	1,499	2,230	2,489	2,219	2,587	2,197	2,352	2,508	2,475	2,596
PCA	9.7	17.2	14.9	22.4	26.0	137	161	245	264	504	370	348	376	354	370	276
Glu-NH ₂	49.5	16.3	79.1	108.0	250.1	395	410	312	234	178	220	225	214	227	62	56

(単位は麴乾物 100 g より溶出した液の mg)

がこれに対し森口ら¹²⁾は漸減していることを報告している。

出麴の際の PGA の比較を表 5 に示す。

小浜ら¹³⁾は製麴時間と Glu 量について研究を行ない 72 hr と 96 hr の場合 96 hr の方が約 20% 多く遊離すると報告している。本実験では丸大豆麴においても大差は認められなかった。Glu-NH₂ のようなアמיד態窒素の溶出多く顕著であることは製麴時間により Glu と同様の経過を示すものと推察する。

表 5 出麴の PGA

	麴の種類	PGA (mg/麴100g)
日野 ¹⁵⁾	留釜盛込出麴 (脱脂大豆)	27
	即日盛込出麴 (")	38
上田 ⁶⁾	即日盛込出麴 A (脱脂大豆)	44
	" B (")	21
本実験	即日盛込出麴 (丸大豆)	12
	" (脱脂大豆)	20

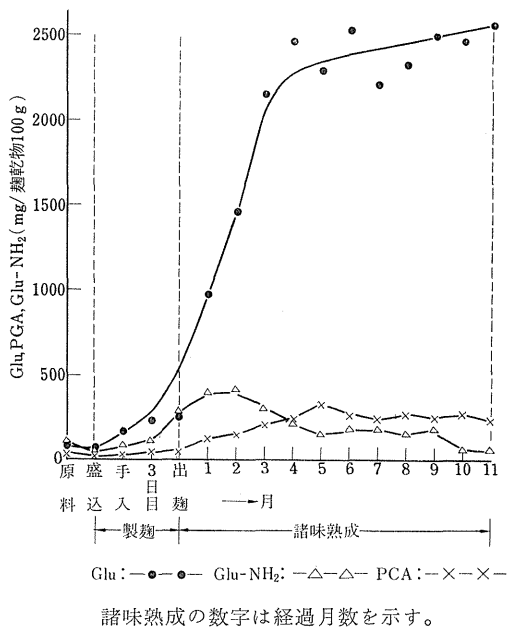
(3) 諸味搾汁液の消長

諸味は予め攪拌した後、均質化させ 500 g を採り、濾紙にて吸引濾過したものを直接高圧濾紙電気泳動を行なって各成分を分離し、それを水で抽出後濃縮し定量を行った。原料，麴，諸味搾汁液の Glu, PGA, Glu-NH₂ の消長を表 6 に示す。すなわち原料麴 100 g (乾物として) より搾汁液 223 ml であり、搾汁液の定量した結果仕込後 9 日において Glu, PGA, Glu-NH₂ はそれぞれ 999 mg, 137 mg, 395 mg (麴 100 g 相当) となり大豆，小麦の原料については図 2 のような結果となる。

Glu については原料から出麴に約 6 倍，出麴から 312 日までに 10 倍，すなわち 60 倍に増加している。アミノ酸の中でとくに Glu は遊離速度が早いことを示しており呈味成分の増加は明瞭である。PGA は出麴まで増加し 120 日で最高になり 50 倍に増加している。

Glu-NH₂ は原料から出麴まで 5 倍，熟成 62 日で最高となる。この現象と逆比例して PGA が増加している。

図 2 3成分の消長



(4) Glutamic dehydrase の検討

田中ら¹⁴⁾は *Microoccus glutamicus* の Glu 酵液中に Glu-NH₂ が生成することを認め、秋田ら¹⁵⁾は *Pseudomonas cruciviae* の菌体より Glu を特異的に脱水閉環して PGA 化する酵素を分離した。本酵素の至適 pH は 8.0 であり諸味は 4.6 として pH 8.0 及び pH 4.6 のマツキルベン緩衝液を用いて実験を行なった。結果を表 7 に示す。

醤油諸味に近い pH 4.6 の方は 15% PGA 化しており，一方 pH 8.0 は 4 hr で 83% 移行している。

表 7 脱水酵素による Glu の PGA ×

	原液 (γ)	2 hr (γ)	4 hr (γ)	6 hr (γ)
PH 4.6	29.4 (100)	24.6 (83.5)	25.0 (85.0)	25.0 (85.0)
PH 8.0	29.4 (100)	6.0 (20.4)	5.0 (17.0)	3.0以下

以上の結果は熟成期間中諸味中に存在する微生物の有する glutamic dehydrase が Glu に作用して PGA を生成する可能性のあることを示している。

IV. 要 約

1. 醤油に存在する PGA の生成機構を明らかにするため原料(大豆, 小麦)麴, 諸味の PGA, Glu, Glu-NH₂ を定量しその消長について検討を行なった。

2. 原料中には遊離の PGA は少なくまた遊離の Glu-NH₂, Glu も少なかった。製麴過程に入って成分の中 Glu は急激な増加を示し, 諸味中においても同じ傾向であった, Glu-NH₂ は麴から諸味熟成の中期まで増加し以後減少し, PGA は仕込後急激な増加をし熟成の中期から漸次減少を示した。

終りに臨みご指導を頂きました味の素中央研究所桐村二郎, 成井喜久子両氏及び種々ご便宜を支えていただいた紫沼醤油株式会社, 同社山田潤氏, 本学副島正美 高村義親両先生に深謝いたします。

本研究は文部省科学研究費により実施したものである。

文 献

- 1) Connell, G. E. and C. S. Hanes: *Nature*, **177**, 377 (1956)
- 2) Akita, S., K. Tanaka, and S. Kinoshita: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1**, 179 (1956)
- 3) 青山・中嶋: 茨大農学術報告, **No. 4**, 71 (1956)
- 4) 堀・小川・青木・大田・近藤: *農化*, **30**, 519 (1956)
- 5) 後安: *調味科学*, **3**, 36 (1957)
- 6) 上田・永井・森口・蒲原: *醸工*, **42**, 88 (1964)
- 7) 堀・小川: 農化支部大会講演, 1956年2月
- 8) 東大農化編: 実験農芸化学, 下, p400 (1957) 朝倉書店
- 9) 平井・島尾: *電気泳動法*, p101 (1958) 共立出版
- 10) 桐村・成井: 農化大会講演, 1964年7月
- 11) 松下: *農化*, **32**, 833 (1958)
- 12) 森口・石川・上田・村田・米田: *醸工*, **42**, 38 (1964)
- 13) 小浜・後安: *調味科学*, **12**, 5 (1965)
- 14) 大嶋・田中・木下: *Amino Acids*, **7**, 73 (1963)
- 15) 日野・岩瀬・林: *調味科学*, **2**, 3 (1957)
- 16) 秋田・田中・木下: 第12回酵素化学シンポジウム講演 (1960)

Summary

To investigate the mechanism of formation of pyroglutamic acid in Shōyu, free glutamic acid, glutamine and pyroglutamic acid produced during the course of Shōyu production were estimated by bioassay using *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus arabinosus*, after separation of each compound by high voltage paper electrophoresis.

Amount of free pyroglutamic acid initially present in the materials (wheat, soy bean and defatted soy beans) was considerably low. Glutamic acid was increased remarkably both in the process of Kōji production and mash fermentation.

On the other hand, pyroglutamic acid was not increased in the process of Kōji production, but in the process of mash fermentation it was increased significantly.