

研究報告

納豆製造過程における成分変化(第2報)

—水溶性タンパク質について—

池田 ひろ*, 津野 貞子**

The Componential Changes During the Manufacturing
Process of Natto (Part 2)
—On the Water Soluble Proteins—

Hiro Ikeda, Sadako Tsuno

I 緒 言

納豆は蒸煮大豆に比べ消化性に優れ栄養価値の高い食品である。納豆に使用する大豆には中粒と小粒があり、一般には小粒大豆を使用した納豆が好まれているが、その理由は明らかではない。

そこで、大豆の形態の違いが発酵過程中的成分の変化や製品の出来上り時間などに影響を与えるのではないかと考え、粉末大豆で納豆を製造し、短時間で栄養価値の高い食品として利用出来るかどうかを知るため前報¹⁾において旨味、香り、栄養的価値に関連の深いアミノ態窒素、アンモニア態窒素、糖、ビタミンB₂の各成分について丸大豆使用納豆との比較検討を行った。その結果、形態の違いが納豆菌の繁殖に影響を与え、丸大豆より表面積の大きい粉末大豆においては短時間で納豆化が行われるという結論を得た。

また、納豆菌が生産する加水分解酵素のうち最も納豆の発酵過程に關与する酵素はタンパク質分解酵素であり、この酵素によってタンパク質はペプチドやアミノ酸にまで分解され^{2,3)} 納豆の旨味や消化性に影響を与えていると云われている。

そこで今回はこのタンパク質分解酵素による発酵中の水溶性タンパク質の加水分解過程を、形態の異なる丸大

豆および粉末大豆使用納豆についてゲルろ過および電気泳動により比較検討を行ったのでその結果を報告する。

II 実験方法

1. 試料の調製

納豆菌：宮城野納豆製造所(仙台市)で純粋培養された *Bacillus natto* を使用した。

原料：丸大豆はアメリカ産のものを使用し、粉末大豆はそれを -19°C で瞬間凍結粉碎したものを使用した。

納豆の製造：前報¹⁾ 同様に行い発酵0から20時間まで2時間ごとにとり出し、これを試料とした。

2 実験方法

各試料を乳鉢で充分すりつぶしたのち一定量を秤取りし、約6倍の4M尿素を含む0.1M NaClに懸濁し1時間室温で攪拌抽出を行い、 $8,000\times g$ で20分間遠心分離後その清澄液をとり、これをさらに $56,000\times g$ で1時間遠心分離し、この清澄液を水溶性タンパク質抽出液とした。

1) Sephadexによるゲルろ過

Sephadex G-50を水によく分散させ24時間室温に懸濁放置して完全に膨潤させたのち4M尿素を含む0.1M NaCl溶液で3回洗浄したものを直径1.5cm、

* 京都女子大学食物学科調理学第1研究室

** 日本生活医学研究所

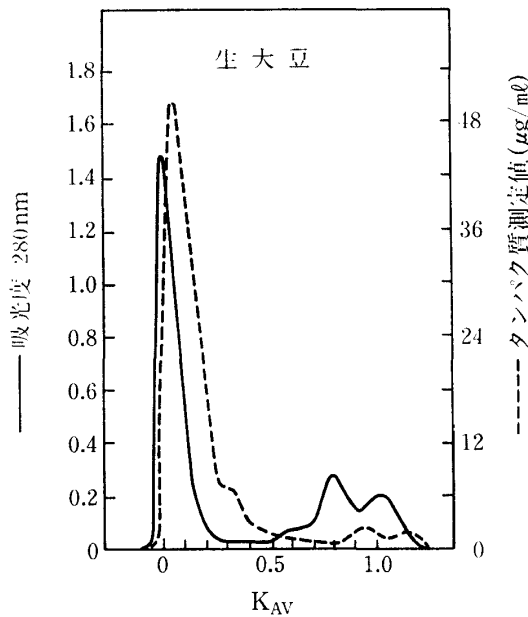


図1 Sephadex G-50 による水溶性タンパク質のゲルろ過

長さ 45 cm のカラムに均一に流し込み、4M 尿素を含む 0.1 M NaCl 溶液で充分平衡化を行ったのち生大豆、蒸煮大豆、発酵 6、10、20 時間の各抽出液についてゲルろ過を行った。

まず、抽出液 0.2 ml をカラムに吸着させ、4M 尿素を含む 0.1 M NaCl で溶出 (10 ml/hr) し、フラクションコレクターで 1.5 ml ずつ秤取して分画を行い、各画分の 280 nm の吸光度を測定した。あわせて Lowry 法によりタンパク質の定量を行い、各ピーク曲線の総面積からこれらピークのタンパク質が全体に占める割合を算出した。

2) ディスク電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Davis¹⁰⁾ らの方法により 8M 尿素を含む 15% ゲルを用い、トリス-グリシン緩衝液中で行った。

3) 分子量の測定

分子量の測定は Weber, Osborn¹⁰⁾ らの SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に従い、0.1% SDS を含む 12.5% ゲルを用い 0.1M リン酸塩緩衝液 (0.1% SDS を含む、pH 7.2) 中で行った。

SDS 測定用には各抽出液の最終濃度が 1% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール, 0.01M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) になるように調製したのち 60°C 30 分間還元させたものを使用した。

III 結果と考察

1) Sephadex によるゲルろ過

Sephadex G-50 による水溶性タンパク質のクロマトグラムを図1および図2に示した。吸光度 280 nm の測定では、生大豆、蒸煮大豆については丸大豆、粉末大豆ともに K_{AV} 0、0.8 および 1.0 付近に 3 つのピークがみられ、発酵 6 時間では K_{AV} 0 のピークが減少し K_{AV} 0.6 の位置に新しいピークが現われ、 K_{AV} 0.8 のピークは増加する。発酵後 10 時間になると丸大豆では K_{AV} 0 のピークはわずかとなり 0.7 付近に新しいピークが現われ、 K_{AV} 0.8 および 1.0 のピークは増加する。発酵 20 時間では 280 nm の吸収のほとんどが K_{AV} 0.9 および 1.0 のピークの位置に観察される。

Lowry 法によるタンパク質の測定では、生大豆では K_{AV} 0.8 および 1.0 の位置にはごくわずかししか検出されず、また蒸煮大豆においても K_{AV} 0.8 および 1.0 の位置のタンパク質量は少ない。このことより生大豆、蒸煮大豆における 0.8 および 1.0 のピークは紫外部吸収をもつ低分子のペプチドやアミノ酸であると推察される。ゲルろ過でみるかぎり丸大豆と粉末大豆の違いは明確でなく、両者ともに発酵時間の経過とともに高分子のタンパク質は納豆菌により加水分解され K_{AV} 0.8 付近のタンパク質量は増加する。発酵 20 時間になると K_{AV} 0.8 のピークのタンパク質量は減少するが 280 nm の吸収はほとんど変化しないところから、さらに分解されて低分子のペプチドやアミノ酸にまで分解が進んだものと推察される。

2) ディスク電気泳動

8M 尿素を含む 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動による結果を図3および図4に示した。図3にみられるように生大豆、蒸煮大豆、発酵 2 時間および 4 時間後の丸大豆および粉末大豆ともにゲルの上部に 6 本の鮮明なバンドを示し、その他数本の不鮮明なバンドがみられる。生大豆ではゲルの上部および中央部に特に濃い鮮明なバンドが 2 本認められるが蒸煮大豆ではこのバンドは消失する。これは高分子のタンパク質が加熱により水解または変性凝固したためと考えられる。蒸煮大豆と発酵 2 時間および 4 時間後の試料では大きな変化は認められないが発酵 6 時間になると急速に水解が進み泳動バンドは中央より先端部に移動し、4~5 本の成分が認められる。粉末大豆は発酵 6 時間後にかなり低分子化した泳動バンドを与え、丸大豆よりも加水分解速度が速いことを示している。図4の発酵 10~20 時間の各泳動図にみられるように発酵時間の経過とともにバンドの数は減少し、粉末大豆では 14 時間で先

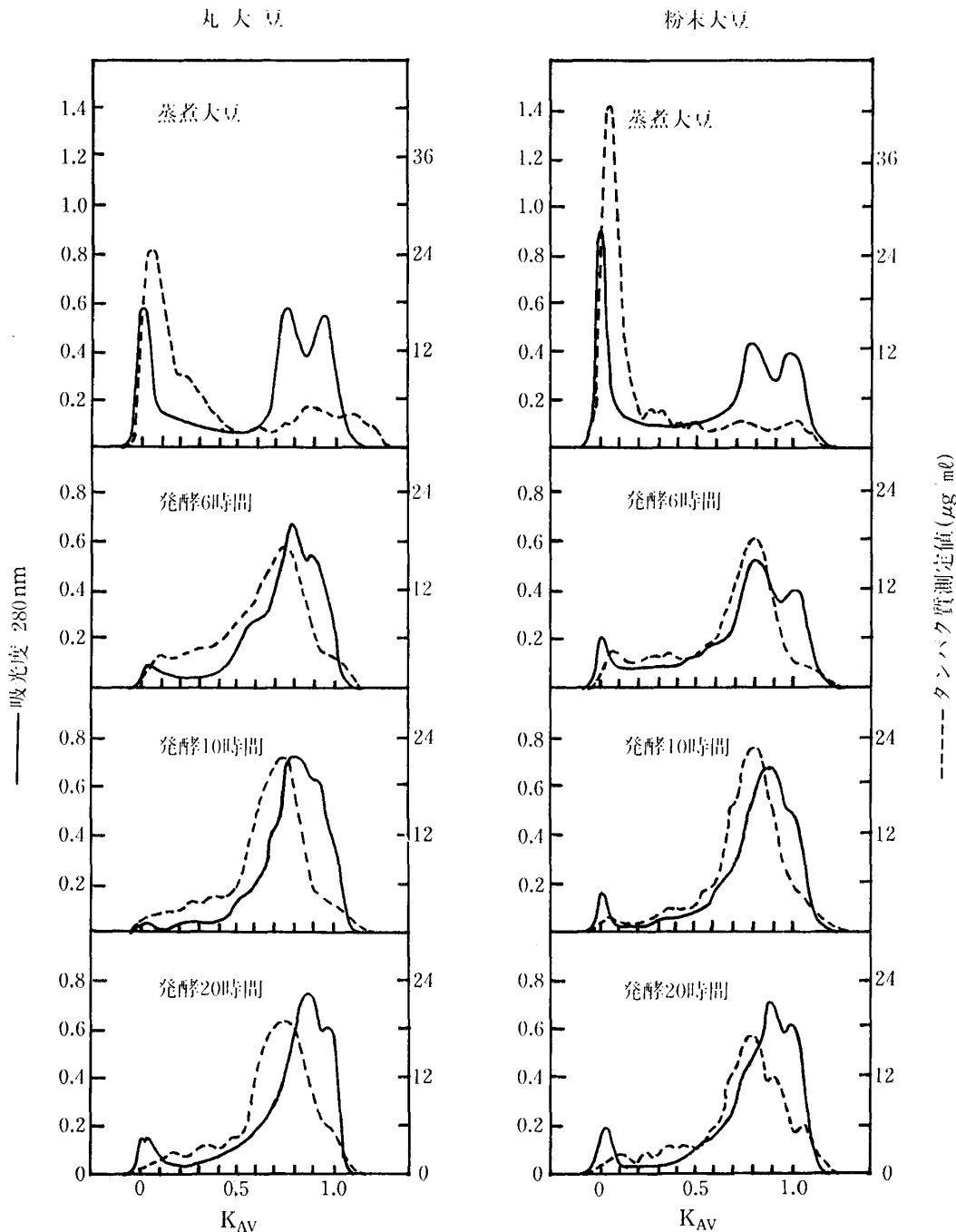


図2 Sephadex G-50 による水溶性タンパク質のゲルろ過

端部に1本の鮮明なバンドの他にいくつかの不鮮明なバンドがみられるが、発酵20時間では先端部の1本のみとなる。丸大豆ではバンドの消失は徐々に進行し、発酵20時間で中央部と先端部に2本のバンドがみられる。

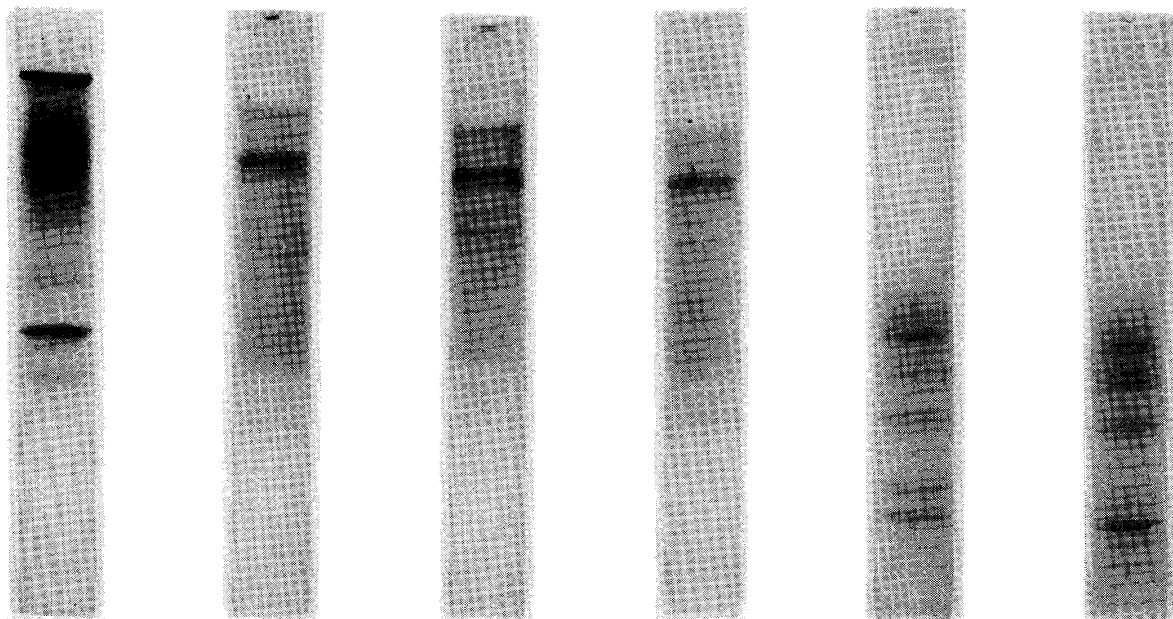
この結果より、プロテアーゼによって粉末大豆では約14時間でタンパク質の大部分が低分子のペプチドやアミノ酸にまで分解されるが、丸大豆が同程度まで分解されるためには発酵20時間が必要であると推察され

る。

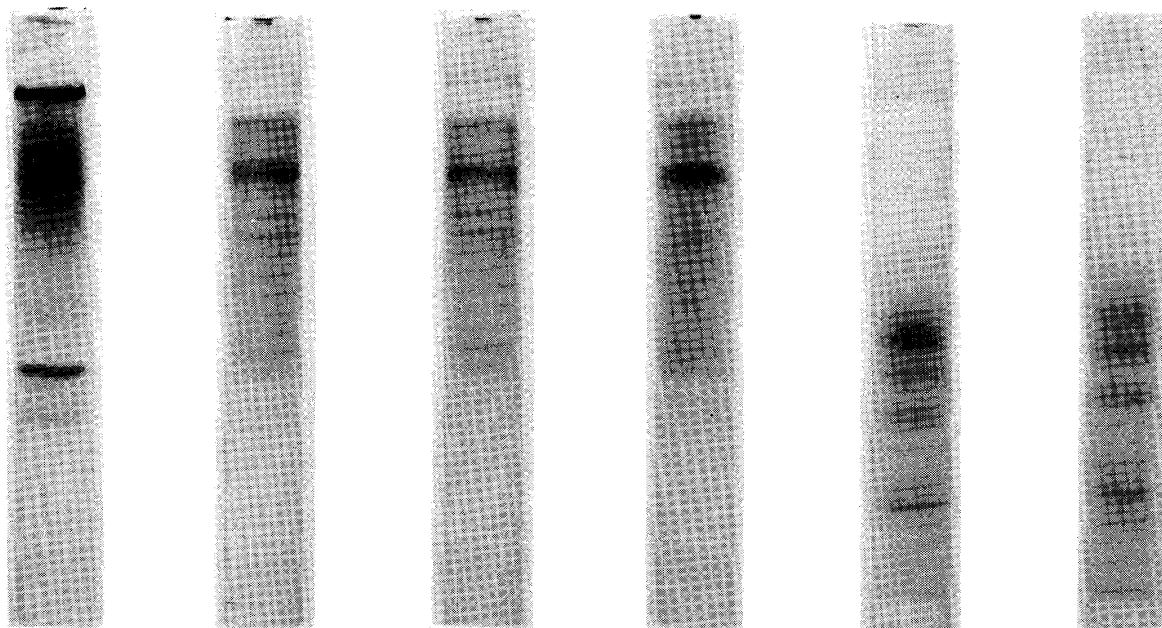
3) 分子量の推定

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による標準タンパク質の分子量と泳動速度の関係を図5に示した。この関係に基づいて泳動距離を分子量に変換し、発酵過程における分子量の経時的変化を示すデンストメトリーによるパターン(図6および図7)を作成した。図6にみられるように生大豆では分子量分布は100,000~10,000の広範囲にわたっており、分子量100,000近く

丸大豆



粉末大豆



生大豆

蒸煮大豆

発酵2時間

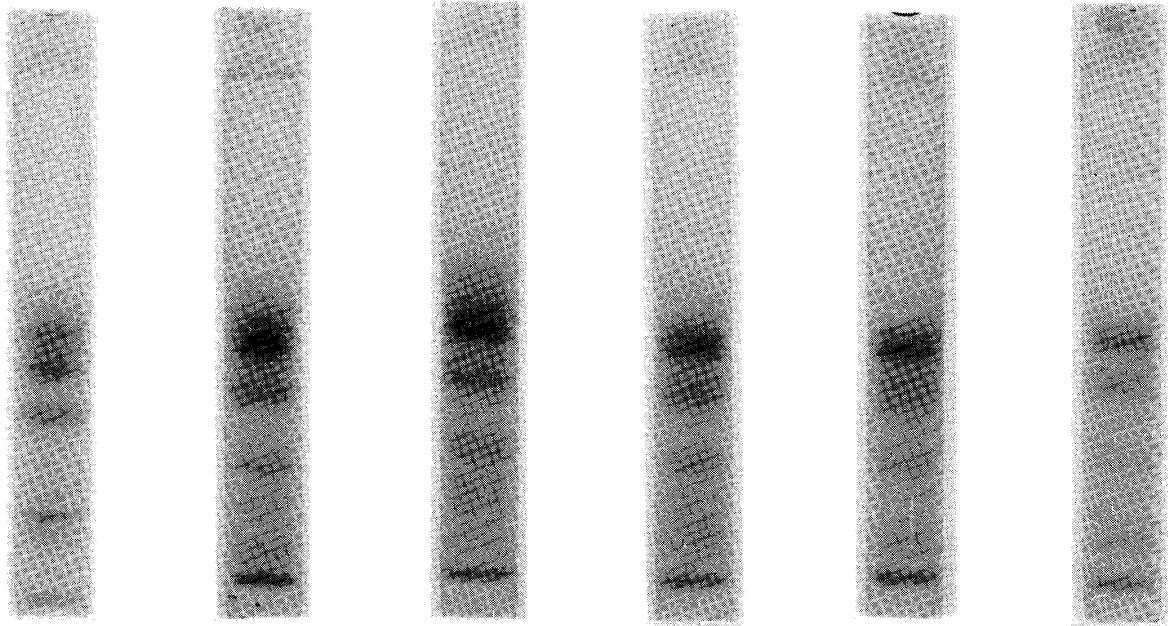
発酵4時間

発酵6時間

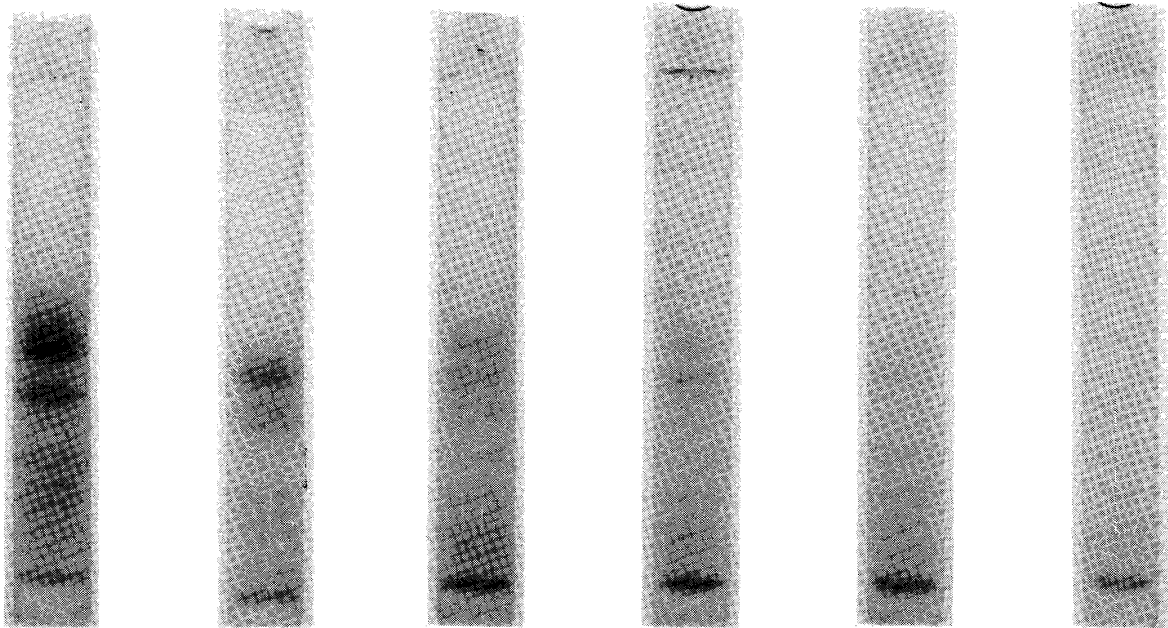
発酵8時間

図3 製造過程中的水溶性タンパク質の変化
(8M 尿素-15%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動)

丸大豆



粉末大豆



発酵
10時間

発酵
12時間

発酵
14時間

発酵
16時間

発酵
18時間

発酵
20時間

図4 製造過程中的水溶性タンパク質の変化
(8M 尿素-15%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動)

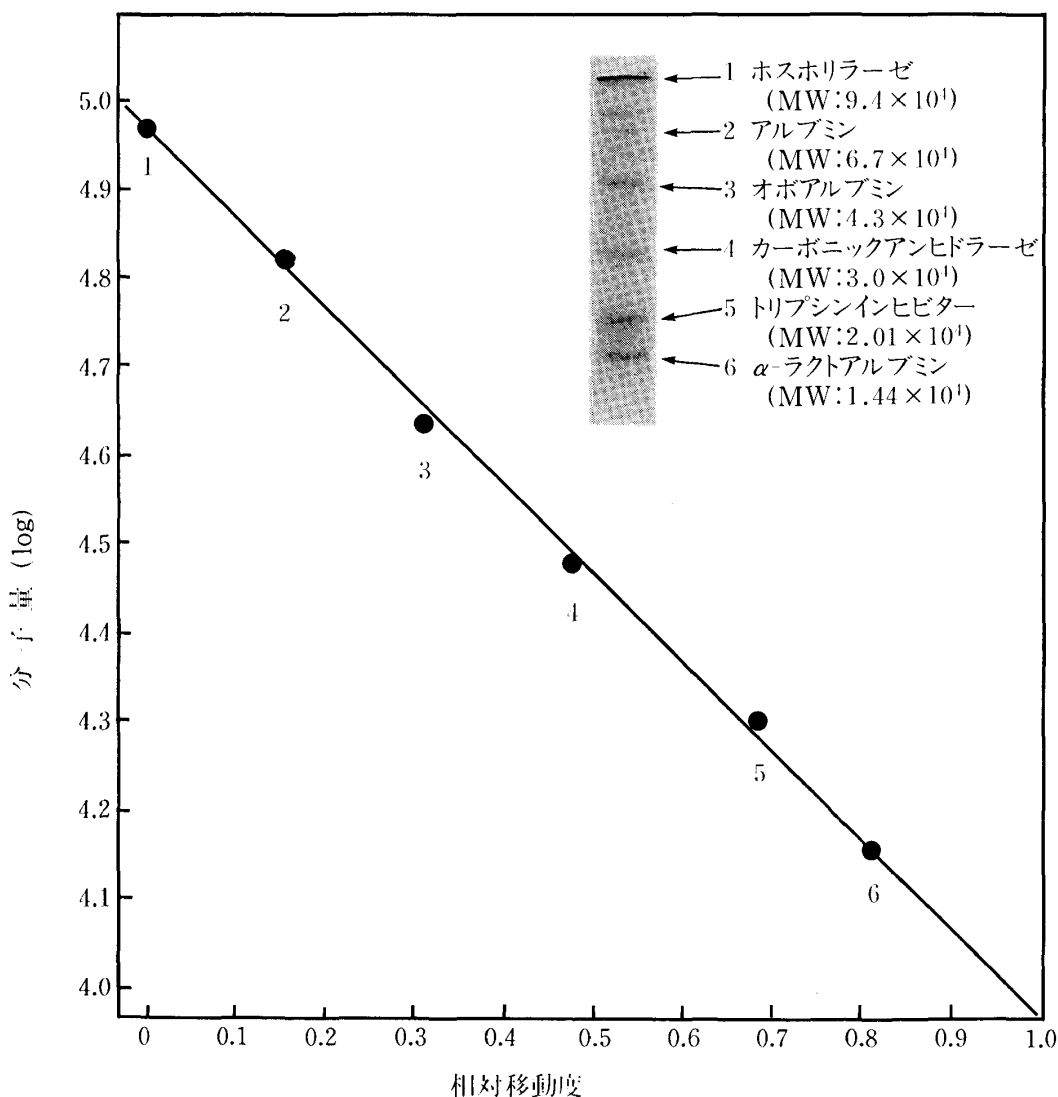


図5 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による標準タンパク質の移動度

に大きなピークがある。蒸煮大豆では加熱により水解されて分子量 100,000 近くのタンパク質は減少し、60,000~40,000のタンパク質が増加する。発酵2時間および4時間では蒸煮大豆に比べ著しい差はみられないが、発酵6時間になると分子量40,000以上のものは著しく減少して30,000~18,000の範囲に多く分布し、発酵4時間まで存在していた分子量15,000~10,000のものは減少している。これらのタンパク質は納豆菌のプロテアーゼによって色素と結合できない程度に低分子化されたものと考えられる。その後発酵8~20時間では時間経過に伴って徐々に分子量30,000前後のものが減少し、20,000~10,000のポリペプチドが増加する。

図7に示すように粉末大豆は丸大豆とほぼ同様な傾向を示すが、蒸煮大豆の分子量 100,000 近くのタンパク質の減少は丸大豆ほど顕著ではない。これは粉末大豆の方が表面積が大きいこと加熱の影響が大きくタン

パク質の熱変性が著しいためと考えられる。しかし発酵6時間になると急速にプロテアーゼによる加水分解が進み、分子量40,000以上のものは減少し30,000~15,000のものが増加する。発酵8~12時間では徐々に加水分解が進み分子量30,000のポリペプチドは減少し、20,000前後のものが増加する。発酵14時間になるとほとんどが20,000~10,000の間に分布し、丸大豆の20時間発酵のものとはほぼ同程度の分布状態であった。その後も徐々に分解は進み、分子量20,000近くのポリペプチドはさらに減少し、10,000に近いものが増加する。

丸大豆、粉末大豆ともに発酵過程にみられる分子量20,000~10,000のポリペプチドの増加は高分子のタンパク質の減少度より小さいが、これはこれらのタンパク質のほとんどがさらに低分子のペプチドやアミノ酸にまで分解されたためと考えられる。

そこで Sephadex G-10 を用い 6M 塩酸グアニジ

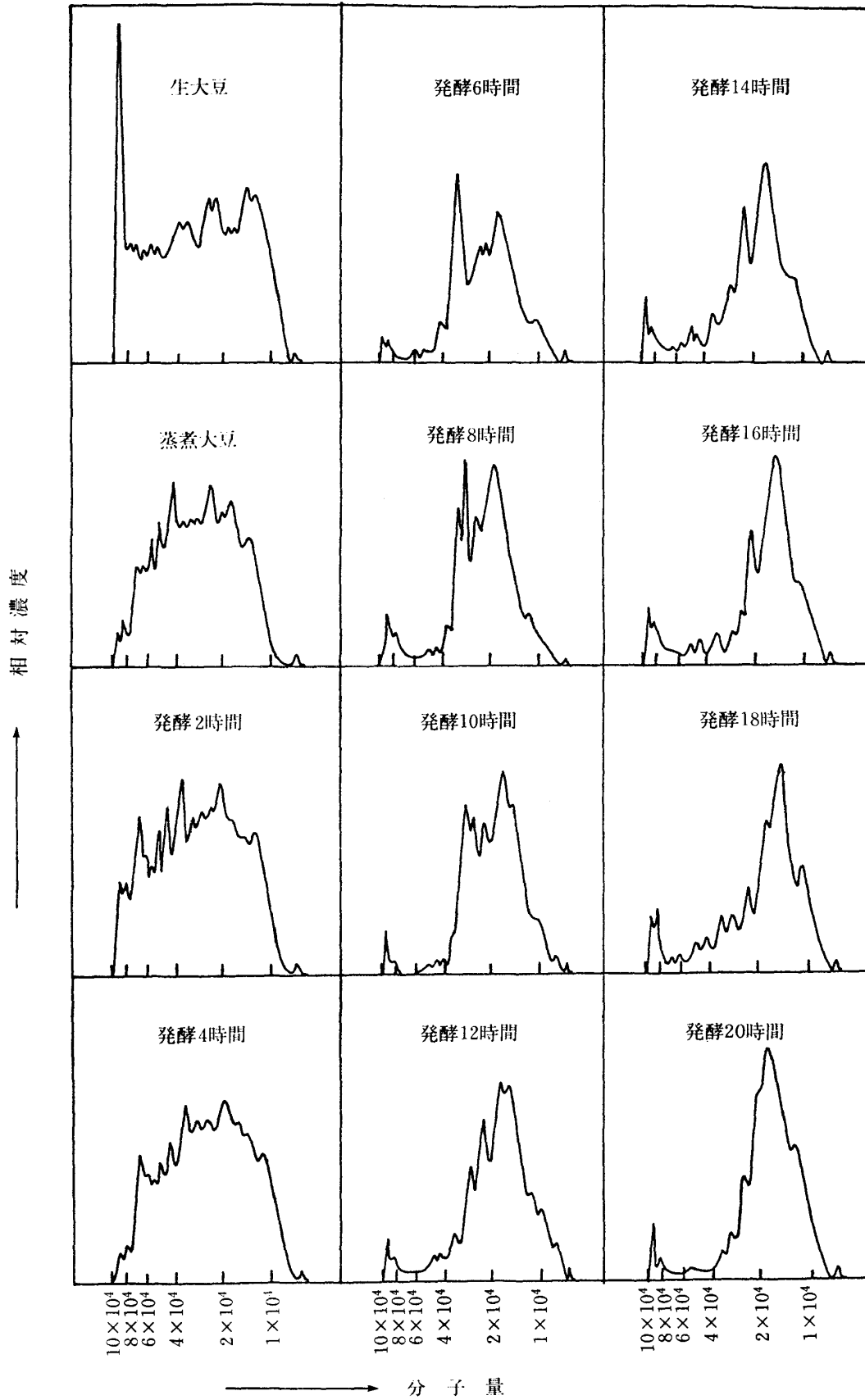


図6 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるデンストメトリー図 (丸大豆)
 波長: λ_{Ex} 553 nm; スリット: 0.2×3 mm; モード: 透過リニアスキャンニング法;
 スキャンニング速度: 50 mm/min; チャート速度: 50 mm/min

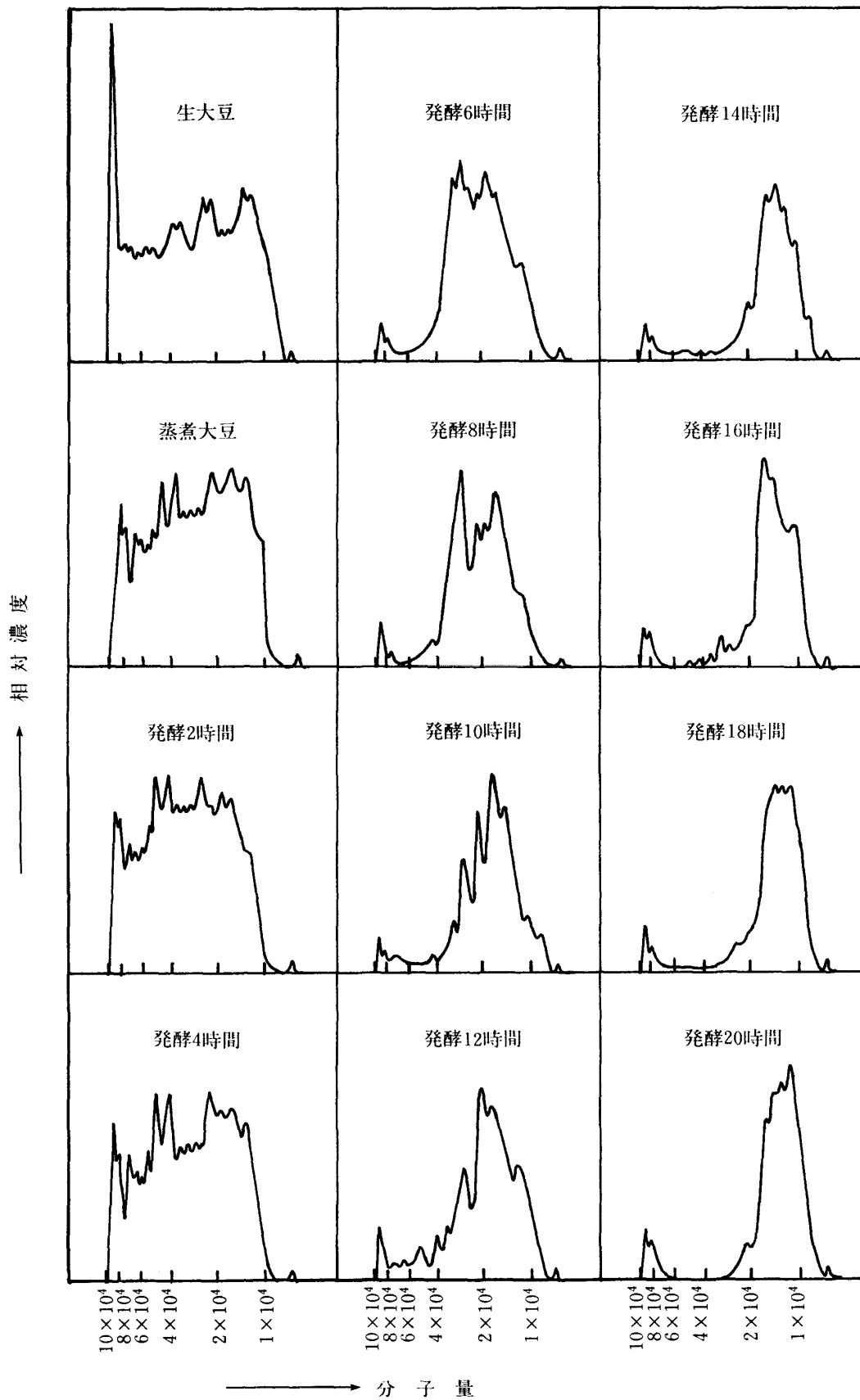


図7 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるデンストメトリー図 (粉末大豆)
 波長: λ_{Ex} 553 nm; スリット: 0.2×3 mm; モード: 透過リニアスキャンニング法; ス
 キャンニング速度: 50 mm/min; チャート速度: 50 mm/min

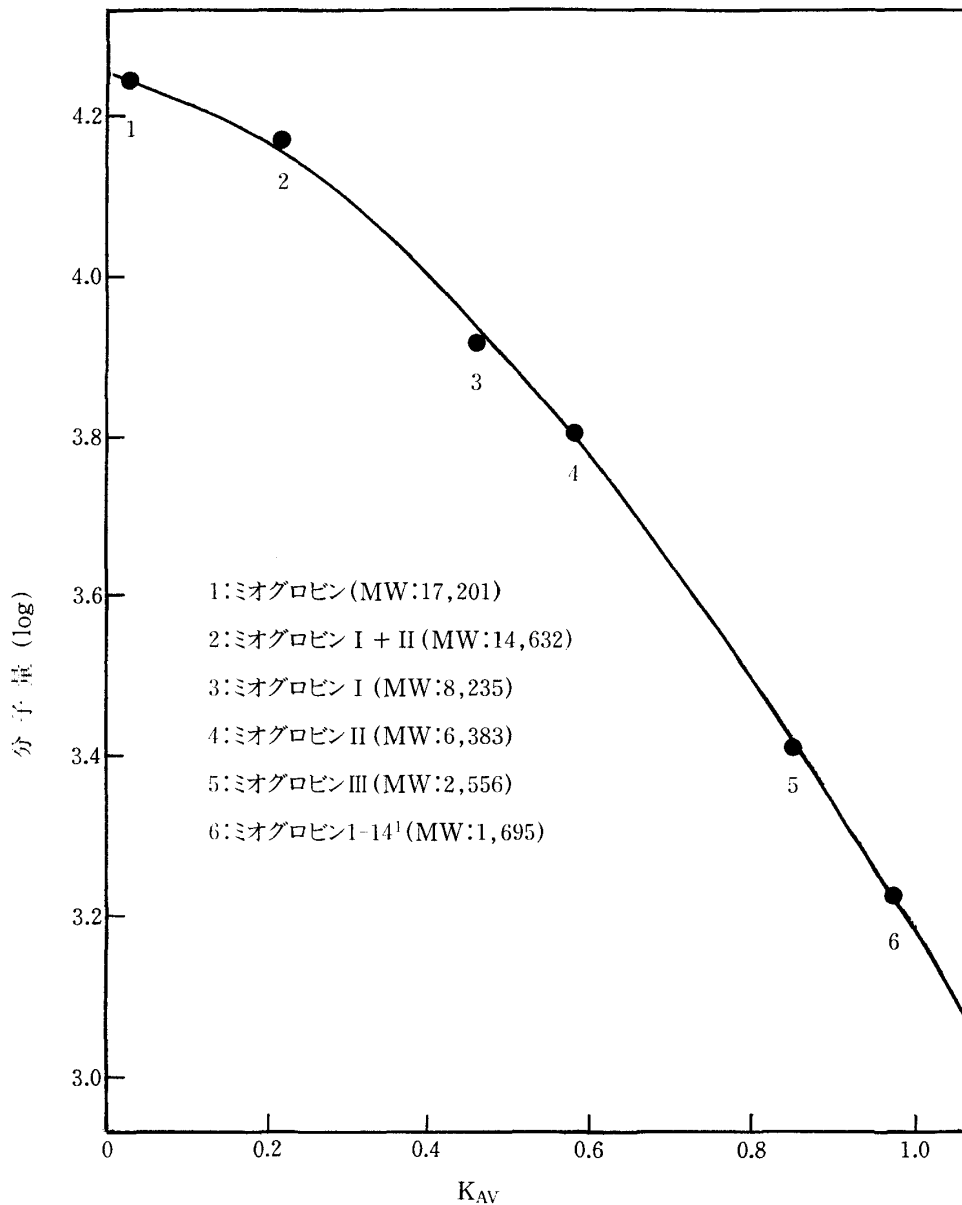


図8 Sephadex G-10 による 6M 塩酸グアニジン存在下でのポリペプチドの標準曲線

ンを溶媒とし、生大豆および丸大豆の蒸煮大豆、発酵6時間、20時間の各抽出液を塩酸グアニジン 6M および2-メルカプトエタノール1%の濃度になるよう調製したのち 60°C、30分間で還元させた溶液についてゲルろ過を行い、ポリペプチドの標準曲線により分子量の測定を行い、その結果を図8および図9に示した。図9にみられるように生大豆では分子量17,000(1)、8,100(2)、5,300(3)の3つのピークが溶出されるが、蒸煮大豆では加熱によってピーク(1)のタンパク質およびピーク(2)のペプチドが減少するがピーク(3)が増加し、新たに分子量4,200のピーク(4)が溶出される。発酵6時間になるとプロテアーゼによってタンパク質やペプチドは水解されて、さらに(1)のピークは減少し代りに

(2)および(3)のピークが増加し、分子量3,600のピーク(5)が新たに溶出される。発酵20時間になると著しく水解が進み、(1)(2)のピークは減少し、(3)のピークは著しく減少、(5)のピークは著しく増加し、新たに分子量3,100(6)、3,000(7)、2,300(8)、1,600(9)のピークが溶出される。この結果にみられるように発酵20時間になると大部分のタンパク質が分子量4,000以下のペプチドにまで分解されていることが裏付けられる。

以上の結果より大豆中の水溶性タンパク質の発酵中のプロテアーゼによる水解は発酵4時間以後急速に進み、納豆になると一部のタンパク質は残存するが大部分のものは分子量20,000~10,000のポリペプチドおよび低分子のペプチドやアミノ酸にまで水解される。ま

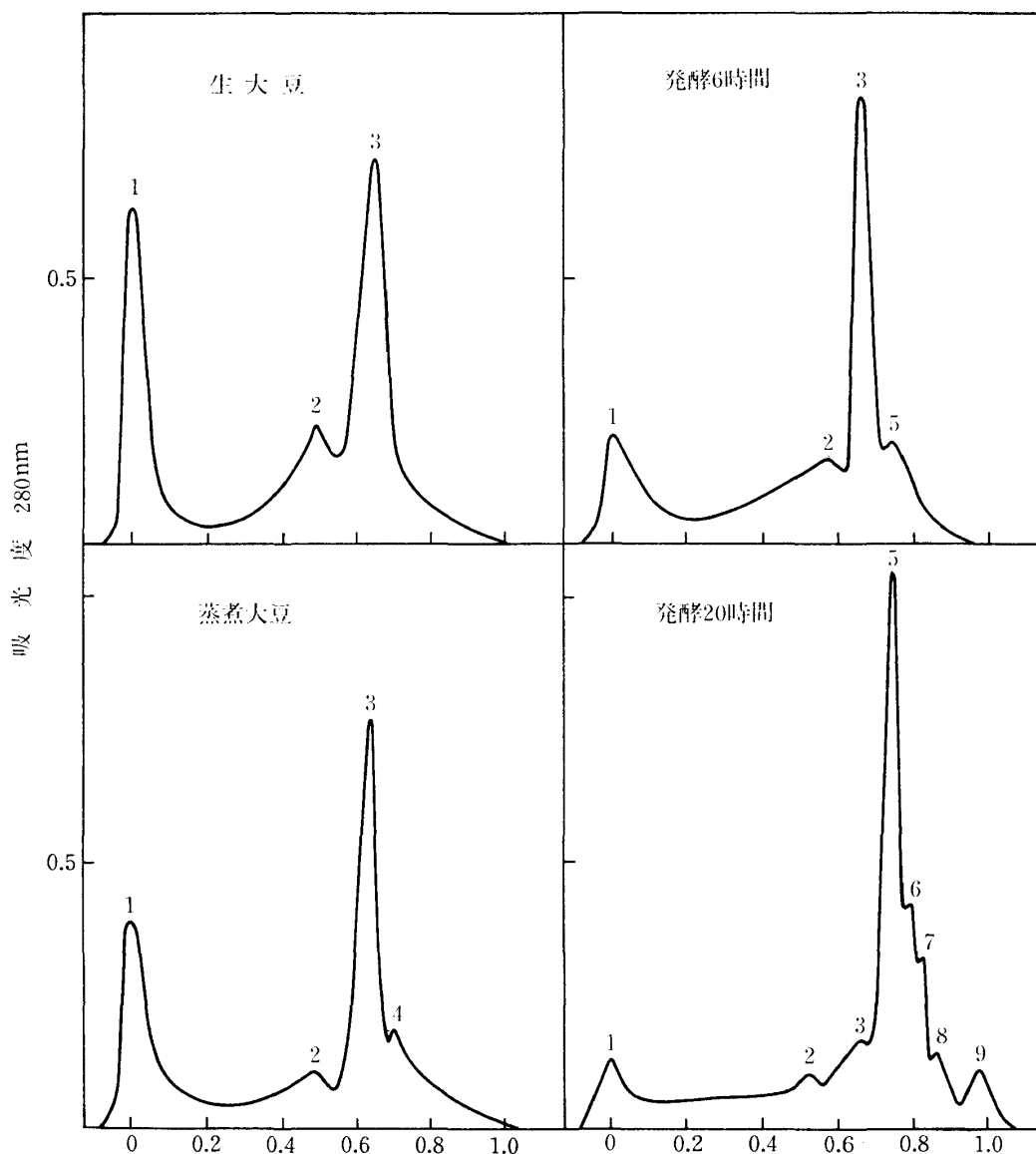


図9 Sephadex G-10 による 6M 塩酸グアニジン存在下でのゲルろ過
 分子量: 1: 1.7×10^4 ; 2: 8.1×10^3 ; 3: 5.3×10^3 ; 4: 4.2×10^3 ; 5: 3.6×10^3 ;
 6: 3.1×10^3 ; 7: 3.0×10^3 ; 8: 2.3×10^3 ; 9: 1.6×10^3

た分子量推定やディスク電気泳動により丸大豆の発酵20時間のものと同量大豆の発酵14時間のものとの水解程度はほぼ同じであると考えられる。

前報においてもほとんどの成分は発酵4時間までの変化は少く、またエネルギー源である糖を添加して納豆製造を行った場合にも粘質物の生成は発酵4時間までほとんどおこらないところから、納豆菌の発芽や増殖のためには温度 40°C 、湿度80%で最低4時間が必要であると推察される。

また前報でのアミノ態窒素、アンモニア態窒素、pH、ビタミン B_2 、糖の各成分の増減は丸大豆の発酵20時間と粉末大豆の発酵14時間の値がほぼ等しく、形態の違いにより丸大豆より表面積の大きい粉末大豆の

方が各成分の変化が速く、今回の水溶性タンパク質の水解過程と一致した。さらに今後旨味と関係するアミノ酸組成の変化についての検討が必要である。

IV 要 約

納豆製造過程中的水溶性タンパク質の水解過程をゲルろ過法、ポリアクリルアミド電気泳動法を用いて明らかにし、また大豆の形態の違いがタンパク質の水解過程にどのような影響を与えるかを知るため丸大豆と粉末大豆を使用して検討を行った結果は次のとおりである。

(1) Sephadex G-50 によるゲルろ過では発酵時間の経過とともに $K_{\text{Av}0}$ に溶出されたタンパク質の大部分

は水解され、 $K_{AV} 0.8$ 付近に溶出されたタンパク質が増加する。また一部のタンパク質は 280 nm の紫外部吸収をもつ低分子のペプチドやアミノ酸にまで分解された。しかしゲルろ過では丸大豆と粉末大豆の違いを明らかにすることは出来なかった。

(2) 蒸煮大豆、発酵 2 および 4 時間の水溶性タンパク質は分子量 100,000~10,000 の広い範囲に分布し、発酵 6 時間では 40,000~10,000 の範囲に分布する。発酵時間の経過とともに分子量 40,000 近くものは減少し、20,000~10,000 の範囲のポリペプチドが増加した。また丸大豆の発酵 20 時間と粉末大豆の発酵 14 時間のポリペプチドの分子量分布はほぼ同じであった。

以上の結果より、大豆の形態の違いが納豆菌の繁殖に影響を与え、表面積の大きい粉末大豆においてプロテアーゼの活性も盛んとなってタンパク質の水解が速くすみ、発酵 14 時間で納豆になることが明らかとなった。

最後に試料大豆を御提供いただいた大阪ガス株式会社に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 池田ひろ, 津野貞子: 本誌, **39**, 19, (1984)
- 2) 渡辺篤二, 中山 修: 農芸化学会誌, **36**, 890, (1962)
- 3) 越山育則, 福島男児: 栄養と食糧, **23**, 297, (1971)
- 4) 大塚一止, 武 恒子: 新潟大学教育学部紀要, **18**, 37, (1966)
- 5) 斎尾恭子, 若林 昭, 渡辺篤二: 農芸化学会誌, **42**, 2, 90, (1968)
- 6) 浅野三夫, 宮本義広, 大久保一良, 紫崎一雄: 日本食品工誌, **21**, 262, (1974)
- 7) 伊藤清枝: 栄養と食糧, **23**, 196, (1971)
- 8) 平 宏和, 蛭名春枝, 杉村敬一郎, 桜井芳人: 栄養と食糧, **11**, 351, (1958)
- 9) 平 春枝, 平 宏和, 桜井芳人: 栄養と食糧, **17**, 219, (1964)
- 10) 電気泳動学会編: 電気泳動実験法, 文光堂(1978)