光線および貯蔵による清酒の変化に関する研究

(第9報) 日光着色機構の総括

中村 欽一・佐藤 信・蓼沼 誠・浜地正昭*・小関 隆

(国税庁醸造試験所)

昭和 45 年 6 月 22 日受理

清酒の日光着色には反応系ⅠおよびⅡがあることをすでに報告した。本報ではモデルによるこの両反応系の日光着色が、定性的に清酒の日光着色と一致すること、また種々の方法で推定した結果、この両反応系で清酒の日光着色の 75% が説明できることを示し、更に、各種成分含量から清酒の日光着色の難易を推定する方法を示した。

緒 言

前報^{1,2,3,4)}で清酒の日光着色にはデフェリフェリクリシン (DFCY) の関与する反応系Ⅰと、非関与の反応系Ⅱが存在することを報告した。そこで、実際の清酒の日光着色の機構が、この二つの反応を主体としていて考えてよいかどうか、また、両反応系でどの程度清酒の日光着色が説明できるかを検討する必要がある。

本報では、モデル系と清酒の日光着色を比較するために、共存物質の影響、着色のスペクトルパターン等の観点から定性的に検討し、ついで、両反応系が清酒の日光着色中に占める比率を構成成分毎に定量的に推定し、最後に、日光着色の難易を判定する判別函数を導き出した結果について報告する。

実 験 方 法

1. 試 薬

下記以外は市販試薬特級を用いた。

i) DFCY: TADENUMA ら⁵⁾の方法により、清酒から分離した。

ii) チロソール: 蓼沼ら⁶⁾の方法により、清酒から分離した。

2. 供 試 清 酒

本報で用いた清酒は 4 種類ある。単に清酒という場合は醸造試験所で試験した清酒 (精米歩合 75% の内地新米を用い、アルコール無添加、サリチル酸、活性炭共に未使用) をいう。清酒群 (A) は第 1 報⁷⁾で用いた 18 点の清酒をいう。清酒群 (B) は醸造試験所で 43 酒造年

度に試験された 25 点の清酒をいう。清酒群 (C) は 44 酒造年度に製造され全国各地の 22 酒造場から提出された普通アル添酒で、サリチル酸、活性炭共に未使用の清酒をビン火入 (60°C, 30 分) したのち 1 週間経過したものゝを指す。

3. 日光着色量の測定

日光照射および着色度の測定は第 6 報¹⁾の方法によった。

i) 反応系Ⅰ着色量の測定: モデル系における反応系Ⅰによる日光着色量の測定には第 6 報¹⁾で述べた $\Delta OD_{350}^{1\%}(DF)$ を用いた。

ii) 反応系Ⅱ着色量の測定: モデル系における反応系Ⅱ着色量は日光照射前後における着色度の差 $\Delta OD_{350}^{1\%}(h\nu)$ で表わした。

4. 反応モデル系の組成

反応系ⅠおよびⅡのモデル系として、反応基質にチロシンを用いた場合とトリプトファンを用いた場合、光増感剤にキヌレン酸を用いた場合とリボフラビンを用いた場合の合計 8 通りの組合わせがあり、その組成を第 1 表に示した。なお、pH はすべて比較に用いた清酒と同一の 4.5 とした。

5. 可視部吸収スペクトルの測定

日立 EPS-2 形自記分光光度計を用い、対照セル中に反応系Ⅰの場合は DFCY 無添加区 (日光照射後のもの) を、清酒および反応系Ⅱの場合には非照射溶液を入れ、それに対する照射試料の 350 mμ から 600 mμ までの吸収スペクトルを差スペクトルとして記録した。

6. 着色に対する照射波長の影響

日本分光, CRM-50 型凹面格子照射分光器を用い、佐

* 現大関酒造株式会社

第1表 日光着色反応モデル系の組成（最終濃度）

KA：キヌレン酸，FR：リボフラビン

反応系 I-Tyr-KA			
DFCY	50ppm	Mn ²⁺	50μM
Tyr	300ppm	Cit. (pH 4.5)	5mM
KA	0.5ppm		
反応系 I-Try-KA			
DFCY	50ppm	Mn ²⁺	50μM
Try	300ppm	Cit. (pH 4.5)	5mM
KA	0.5ppm		
反応系 I-Tyr-FR			
DFCY	50ppm	Mn ²⁺	50μM
Tyr	300ppm	Cit. (pH 4.5)	5mM
FR	0.25ppm		
反応系 I-Try-FR			
DFCY	50ppm	Mn ²⁺	50μM
Try	300ppm	Cit. (pH 4.5)	5mM
FR	0.25ppm		
反応系 II-Tyr-KA			
Tyr	300ppm	KA	5ppm
pH	4.5		
反応系 II-Try-KA			
Try	300ppm	KA	5ppm
pH	4.5		
反応系 II-Tyr-FR			
Tyr	300ppm	FR	0.25ppm
pH	5.5		
反応系 II-Try-FR			
Try	300ppm	FR	0.25ppm
pH	4.5		

藤ら⁹⁾の方法によって各波長の単色光を照射したのち、波長 420 mμ，セルの厚さ 10 mm における吸光度増減を測定し、その値を各照射波長における照射エネルギーで除した相対着色として表示した。

7. 清酒の日光着色にしめる反応系 I および II の寄与率の推定

これまで明らかにした二つの日光着色反応系が実際の清酒の日光着色において、どの程度の比率をしめているかを推定することは両反応系で基質と光増感剤が共通しているためかなり困難が予想される。そこで、次のような色々な方法を用いて得た推定値を総合して結論を導くよう努めた。

i) 回帰式法：多数の清酒について反応系を構成する成分 (X) の含量を測定し、それらの清酒の日光着色量 ($\Delta OD_{420}^{90}(h\nu)$) を測定する。この両者間の相関係数が有意であれば X の含量が日光着色量の推定の根拠となり得るわけであるから、日光着色量 (y) の構成成分 X の含量 (x) に対する回帰式を求める。この回帰式が $\hat{y} = a + bx$ で示されたと仮定するとこの回帰式に x の平均値 ($\bar{x}$) を代入すると平均日光着色量 ($\bar{y} = \Delta OD_{av}(h\nu)$) が求まる。また、回帰式に $x = 0$ を代入すると、これら清酒群において構成成分 X が全く含まれていないときの日光着色量の推定値が得られる。この両者の差すなわち $\Delta OD_{av}(X) = \bar{y} - a$ は構成成分 X が清酒中に存在するために日光着

色が増大した値（これら清酒群全体に対する平均的な意味における）と考えられる。そこで $\Delta OD_{av}(X)/\bar{y} \times 100$ を計算し構成成分 X の関与する日光着色の全日光着色に対する寄与率の推定値とした。（第 11 図参照）

ii) 構成成分添加法：ある清酒に反応系を構成する成分を添加すると、ある濃度範囲で添加量に比例して日光着色が増大する。そこで 1 つの清酒について構成成分 X の濃度を測定し、段階的に X の濃度を变化させた清酒系の日光着色量 ($\Delta OD_{420}^{90}(h\nu)$) を測定し、X の含量に対して日光着色量をプロットする。直線部分を X 含量 = 0 として外挿したときの y 軸の截片は、構成成分 X 含量 = 0 のときのその清酒の日光着色量の推定値となる。原酒の日光着色量からその値を差し引いた値は、同清酒について構成成分 X 関与の日光着色量の推定値となり、その値から寄与率を求めた。

iii) 阻害物添加法：あるいは物質を添加することにより、例えば反応系 I のみが阻害される場合、その物質を清酒に添加して日光照射した際の着色量の減少は反応系 I の阻害によるものと考えられる。この日光着色量の減少量から反応系 I の寄与率（阻害率）を推定した。

iv) 分画法（キヌレン酸）：後報するように、清酒中のキヌレン酸は他のフェノール系化合物とともにポリアミドに吸着され、フェノール系化合物の大部分が 80% エタノールで脱着されるが、キヌレン酸は脱着されず、そのあと N/10 アンモニア水で脱着される。

そこで、和光純薬製ポリアミド C-200 10 g を水に懸濁してカラムを調製し、清酒 50 ml に蒸留水 200 ml を加えて稀釈しカラムに流した。続いて 80% エタノール 200 ml，蒸留水 200 ml を流し、これらはすべて合して 40°C 以下で減圧乾固したのち原酒と同一 pH の水溶液として非吸着部とした。カラム上に吸着残留する区分は N/10 アンモニア水 200 ml で溶出し、40°C 以下で減圧乾固したのち原酒と同一 pH の水溶液として吸着区分とした。

非吸着区分単独，吸着区分単独および非吸着区分+吸着区分をそれぞれ原酒濃度となるよう調製して日光着色量を測定した。ここで、非吸着区分単独の日光着色量を A，吸着区分単独の日光着色量を B，非吸着区分+吸着区分の日光着色量を C とすると $C - (A + B) = I$ は非吸着区分と吸着区分を組合わせたときに初めて生ずる相互作用である。I+B はキヌレン酸関与の日光着色の推定値となり、この値の分画前清酒の日光着色量に対する比からキヌレン酸関与の日光着色の寄与率を求めた。

8. 定量法

i) DFCY：佐藤ら⁹⁾の迅速定量法によった。

ii) Mn^{2+} ：原子吸光法によった。
 iii) キヌレン酸：後報するポリアミド吸着-蛍光法によった。

iv) リボフラビン：国税庁所定分析法 114-11, ルミフラビン蛍光法によった。

v) アミノ酸組成：日立パーキンエルマー・アミノ酸自動分析機によった。ただし、トリプトファンは小幡ら¹⁰⁾の比色法、シスチン、システインは加藤ら¹¹⁾の比色法によった。なお、一部でチロシンの定量も比色法¹²⁾によった場合もある。

vi) チロソール、フェルラ酸：大塚ら¹³⁾の方法によった。

実験結果と考察

1. モデル系および清酒の日光着色の定性的比較

i) pHと日光着色：塩酸または水酸化ナトリウム溶液でpHを2~7に調整したモデル系および清酒の日光着色は第1図のとおりであった。

清酒ではpH 4.5に着色の極大があり、pH 7以上で着色が増大した。反応系Iの至適pHは5~6により、一方反応系IIでは2~3および6~7にあって清酒の至適であるpH 4~5は着色の谷になっている。両者を合わせると清酒の場合に近似すると考えられる。

第1図 各反応系のpHと日光着色

ii) 金属塩の効果：前報³⁾において Mn^{2+} は濃度が高くなると反応系Iを阻害することを報告した。そこで、 Mn^{2+} および Al^{3+} を1mMとなるように添加して日光着色に対する効果をしらべた結果が第2表である。

Mn^{2+} は清酒および反応系Iの着色を抑制するが反応系IIに対しては効果がない。 Al^{3+} も Mn^{2+} 同様清酒および反応系Iの着色を抑制したが反応系IIに対する効果

第2表 清酒およびモデル系の日光着色に対する金属塩の効果

添加物	清 酒		反 応 系 I-Tyr-KA	反 応 系 II-Tyr-KA
	$4OD_{430}^{1\%}$	$4OD_{430}^{1\%}$	$4OD_{430}^{1\%}$	$4OD_{430}^{1\%}$
対 照	.095	.052	.262	.244
Mn^{2+}	.080	.038	.090	.287
Al^{3+}	.078	.036	.080	— ^{a)}

金属塩添加濃度 1mM

a) 日光照射後濁濁し、測定不能

第3表 清酒およびモデル系の日光着色に対する抗酸化剤その他の効果

添 加 物	濃 度	清 酒	反 応 系 I		反 応 系 II	
			Tyr-KA	Try-KA	Tyr-KA	Try-KA
対 照		.187	.170	.411	.058	.095
上部空間 N_2 ガス置換		.048	.117	.034	.068	.023
メタ重亜硫酸カリウム	100ppm	.198	.005 ^{a)}	.289	.025 ^{a)}	.090
アスコルビン酸	//	.064 ^{a)}	.002 ^{a)}	.030 ^{a)}	.064 ^{a)}	.028 ^{a)}
エリソルビン酸ナトリウム	//	.083 ^{a)}	.001 ^{a)}	.032 ^{a)}	.080	.056
フェルラ酸	//	.085 ^{a)}	.004	.090 ^{a)}	.014	.025 ^{a)}
カ フェ 酸	//	.038	.004	.036	.011	.007
セミカルバジド	10mM	.150	.001	.050	.067	.105
ヒドロキシルアミン	//	.263	.017	.096 ^{a)}	.111	.072
過酸化水素水	0.2%	.059	.016	.232	.041	.059

a) 照射時間 (25 分) を更に長時間とすると阻害効果がなくなる

は日光照射後濁濁したために不明であった。

DFCY と Fe^{3+} が結合したフェリクリシンが光に対して安定なことは第1報⁷⁾でも報告した。 Al^{3+} の清酒に対する着色防止効果は、それがDFCYとキレート結合することによりフェリクリシンの生成をさまたげているためと考えられている¹⁴⁾ので、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} の日光着色に対する効果もそれらがキレート結合してDFCYを非反応性物質に変化させるためと考えるのが妥当であろう。このように考えれば、DFCY非関与の反応系IIに対してはその効果があらわれないことも理解できる。

iii) 抗酸化剤等の効果：清酒の日光着色は第6報¹⁾で述べたように酸素の存在を必要とする反応である。そこで、各種の抗酸化剤と同時にアルデヒド試薬および酸化剤の着色に対する効果をしらべた結果が第3表である。

照射フラスコ内の上部空間の空気を窒素ガスで置換すると、清酒およびすべてのモデル系ともに着色が抑制されることから、酸素の存在は反応系I、IIにおいて必要であることがわかった。若干の着色は初発時の溶液中に溶存する空気のためと考えられ、照射時間を長くするとこの抑制効果は更に顕著になる。

食品の酸化防止剤として用いられる、メタ重亜硫酸カリウム、アスコルビン酸、エリソルビン酸ナトリウムは、日光照射の初期段階で清酒・モデル系ともに着色が抑制され、照射時間が長くなるとともに抑制効果がなくなる。

フェルラ酸は清酒、モデル系ともに着色を抑制しているが、照射時間を長くすると清酒およびトリプトファンを用いた反応系I、IIの場合効果が消滅した。

カフェ酸は清酒、モデル系とも着色を抑制し、その効果は極めて顕著であった。

セミカルバジド、ヒドロキシルアミン等のカルボニル試薬は反応系Iに対して抑制効果を有する。

着色反応自体が酸素の存在を必要とする反応でありな

がら、過酸化水素水の添加が清酒およびモデル系の着色を抑制することは矛盾するようであるが、生成した日光着色物質は過酸化水素水を添加しても退色しないことから、反応途中の中間物あるいは前駆物質に別の作用を及ぼすためと想像される。

以上のように、各種添加物の効果が清酒およびモデル系に共通していることは、清酒の日光着色の主体が反応系ⅠおよびⅡにあることを示しているものと考えられる。

iv) 可視部吸収スペクトルの変化：清酒を日光照射した際の生成着色物は佐藤ら¹⁵⁾が報告しているシリカゲルクロマトグラムから複雑なものであろうと予想される。そこで、生成物を個々に同定することはやめて、各反応系モデルを日光照射したときに、系全体として可視部吸収スペクトルがどのように変化するかを清酒の場合と比較することにした。

第2図はキヌレン酸を用いた反応モデル系で、各系とも巨視的には短波長部から長波長部へかけてはほぼ一様に低下するパターンを示しているが、チロシンを用いた系では470 mμ 附近に小さなピークがみられる。

第2図 日光照射前後の可視部吸収の差スペクトル

第3図 日光照射前後の可視部吸収の差スペクトル

第3図はリボフラビンをを用いた系で前図と同様な傾向である。

しかるに、清酒の場合は第4図にみられるとおり、370 mμ 附近を極大として、350 mμ 以下の短波長部では逆に照射前より吸光度が減少するパターンを示し、モデル系と著しく相違する。そこで、清酒の DFCY, Mn^{2+} , キヌレン酸, リボフラビン, アミノ酸組成, を定量し、ブドウ糖, 有機酸を配合して第4図の組成の合成清酒を作成し日光照射を行なって、両反応系構成成分以外の糖, アミノ酸の影響をしらべたが第4図にみられるとおり第2図, 第3図と同様のパターンを示して清酒と

合成清酒の組成 (ppm, pH 4.5, アルコール分 20%)

DFCY	13.2	Tyr	296	CySH·HCl·H ₂ O	10
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8.5	Try	88	Cys	132
クエン酸·H ₂ O	118	Gly	250	Met	96
キヌレン酸	3.2	Ala	416	Phe	190
リボフラビン	0.052	Val	300	Asp	126
ブドウ糖	50,000	Leu	336	Glu	350
コハク酸	600	Ileu	166	Lys·HCl	256
乳酸	500	Ser	116	His·HCl·H ₂ O	100
リンゴ酸	400	Thr	96	Arg·HCl	326
		Pro	256		

モデル清酒の組成

上記合成清酒に

フェルラ酸 28ppm } となるよう加えたもの
チロソール 121ppm }

日光着色モデル系の組成 (ppm, pH 4.5, アルコール分 20%)

DFCY	13.2	キヌレン酸	3.2	チロソール	121
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8.5	リボフラビン	0.052	Tyr	296
クエン酸·H ₂ O	118	フェルラ酸	28	Try	88

第4図 モデル清酒の日光照射前後の可視部吸収の差スペクトル

は異なる結果が得られた。

前報^{3,4)}において反応系ⅠおよびⅡがチロソールやフェルラ酸等の清酒中のフェノール化合物によって阻害されることが明らかになっているので、清酒中のチロソール, フェルラ酸含量を測定し上記合成清酒に添加したモデル清酒について実験したところ、第4図に示したとおり極めてよく清酒のパターンと一致した。清酒で短波長部が日光照射により吸光度の減少をみるのはフェルラ酸, チロソールの効果であること, 380 mμ 以上の可視領域においてもフェルラ酸, チロソールの着色阻害のあることが明らかとなった。このことは次の照射波長と着色の実験において, 250 mμ 付近の波長の光による着色反応がフェノール化合物で阻害されるということから説明できる。

なお、第4図にはフェルラ酸, チロソールを含む両反応系関与成分のみから成る日光着色モデル系についての結果も示したが短波長部では上記モデル清酒と全く一致し, 390 mμ 以上でやや吸光度が大となるパターンを得た。これはチロシン, トリプトファン以外のアミノ酸が390 mμ 以上での着色を阻害しているためと考えられる。

v) 照射波長と着色

凹面格子照射分光器によって 210~686 mμ の間の単色光を照射し, 着色に対する有効波長を清酒とモデル系について比較した。

第5図は反応系Ⅰでキヌレン酸を用いた場合で, 250

m μ および 320 m μ 附近に二つのピークがある。チロシン系では 250 m μ のピークの方が大きい、トリプトファン系では 320 m μ のピークの方が大きくてより清酒のパターンに近い。なお、この両ピークはキヌレン酸の極大吸収 246 m μ および 330 m μ に相当し、キヌレン酸が光増感剤として働いていることを示している。

第6図は反応系Ⅱでキヌレン酸を用いた場合である。チロシン系では 250~280 m μ に1ピークとなるが、トリプトファン系では反応系Ⅰと同様二つのピークが現われしかも 320 m μ の方が大きい。

第7図は反応系Ⅰでリボフラビンをを用いた場合で、200~250 m μ および 450 m μ に二つのピークがある。清酒のピークに相当する 320 m μ はこのモデル系では着色の谷にあたり大分様相を異にする。リボフラビンの吸収極大は 260 m μ 、375 m μ および 450 m μ にあるがその1番目と3番目に相当する波長が有効であった。

第8図は反応系Ⅱでリボフラビンをを用いた場合で、250~280 m μ および 450 m μ に二つのピークがあるが、反応系Ⅰの場合と同様清酒のピークである 320 m μ 附近は着色の谷になっている。

以上、有効波長からみる限り、清酒の日光着色は反応系Ⅰ、Ⅱともトリプトファン-キヌレン酸系に近いものといえよう。しかし、細かくみると 250 m μ にピークが出現するといった相違がみられる。

そこで、前項第4図で用いたモデル清酒について照射波長の効果をしらべ第9図の結果を得た。モデル清酒で

は各反応系モデルにみられた 250 m μ 附近のピークが消失して、320~350 m μ の単一のピークのみとなり、清酒のパターン（第10図）と全く一致した。すなわち、清酒においてはモデル系の着色に有効な 250 m μ 付近および 320~350 m μ の波長の光のうち 250 m μ 付近の波長の光はフェルラ酸およびチロソール等によってその作用が阻害されており 320~350 m μ の波長の光のみが清酒の着色に関与していると考えられる。

2. 清酒の日光着色に占める両反応系の定量的考察

以上によって、清酒の日光着色が反応系ⅠおよびⅡを主体と考えて誤りのないことが明らかとなったので、実際の清酒中での日光着色のうち反応系ⅠおよびⅡがどの程度の比率をしめているかを推定しようと試みた。

i) DFCY 関与の日光着色：反応系Ⅰは DECY を必須の構成成分とすることで反応系Ⅱと区別される。また、清酒中で反応系Ⅰは DFCY が制限因子となっている可能性が大きい⁹⁾。従って、DFCY 関与の日光着色から反応系Ⅰの比率が推定できる。

イ) 回帰式法（生酒）：清酒群（A）の生酒の日光着色量を DFCY 含量に対してプロットすると第11図が得られ、回帰式法によって DFCY の寄与率は 46.3% と推定された。

ロ) 回帰式法（火入酒）：清酒群（A）を火入れしたものについて、同様に回帰式法によって DFCY の寄与

第9図 各種波長光線照射によるモデル清酒の着色の変化

第10図 各種波長光線照射による清酒の着色の変化

第5図 反応系Ⅰ（キヌレン酸）の着色と照射波長

第6図 反応系Ⅱ（キヌレン酸）の着色と照射波長

第7図 反応系Ⅰ（リボフラビン）の着色と照射波長

第8図 反応系Ⅱ（リボフラビン）の着色と照射波長

$$\text{DFCY の寄与率} = \frac{\Delta OD_{av}(\text{DF})}{\Delta OD_{av}(h\nu)} \times 100 = 46.3\%$$

ただし、 $\bar{x} = 0.1425$ ，したがって $\bar{y} = 0.2335$

第11図 DFCY の関与する日光着色（その1）
回帰式法（生酒）

$$\text{DFCY の寄与率} = \frac{\Delta OD_{420}(\text{DF})}{\Delta OD_{420}(\text{h}\nu)} \times 100 = 34.9\%$$

ただし、 $\bar{x} = 0.1136$, したがって $\bar{y} = 0.1947$

第 12 図 DFCY の関与する日光着色（その 2）
回帰式法（火入酒）

率を求めると第 12 図のとおり 34.9% となる。

ハ) 阻害物添加法：第 3 表において、セミカルバジドは反応系 I のみを阻害し、反応系 II は阻害しないことが知られた。そこで、清酒に 10 mM となるようセミカルバジド塩酸塩を添加したのち原清酒の pH にもどしたもののおよび対照を同時に日光照射して第 4 表の結果を得た。セミカルバジドによる反応系 I 阻害率を 100% と考えると DFCY の寄与率は 20.3% となる。

第 2 表において、 Al^{3+} および Mn^{2+} は反応系 I をある程度阻害した。同表から両金属イオンの反応系 I に対する阻害率を求め、その値で清酒に対する両金属イオンの阻害率を除することによって清酒における反応系 I の寄与率を求めた。その結果は第 5 表のとおりで、 Al^{3+} による阻害から 25.8%, Mn^{2+} による阻害から 24.0% と推定された。

すでに第 1 報⁷⁾において、偏相関係数を用いる方法により DFCY の日光着色に対する寄与率を 22.5%, 第 6 報¹⁾において、DFCY 添加法によりその寄与率を約 15% と推定している。従って、以上を総合して、DFCY 関与の日光着色すなわち反応系 I は清酒の日光着色全体の 20~45% と推定される。

第 4 表 DFCY の関与する日光着色（その 3）
阻害物添加法

添加物	濃度	$\Delta OD_{420}^{20}(\text{h}\nu)$
対 照		.265
セミカルバジド	10mM	.211
DFCY の寄与率=セミカルバジドによる阻害率		
$= \frac{.265 - .211}{.265} \times 100 = 20.3\%$		

第 5 表 DFCY の関与する日光着色（その 4）
阻害物添加法

添加物	濃度	日光着色の阻害率		DFCY の寄与率 ^{a)}
		反 応 系 I-Tyr-KA	清 酒	
Al^{3+}	1mM	69.4%	17.9%	25.8%
Mn^{2+}	1mM	65.6%	15.8%	24.0%

a) 清酒に対する阻害率を反応系 I に対する阻害率で補正して求めた

ii) キヌレン酸関与の日光着色：

イ) 回帰式法：清酒群 (B) におけるキヌレン酸含量に対する日光着色量の回帰式は第 13 図のとおりで、この式から求めたキヌレン酸の寄与率は 44.0% となる。

ロ) キヌレン酸添加法：清酒中に存在する日光着色阻害物質の影響を少なくするため、キヌレン酸含量 3.85 ppm の原酒を 261/1,000 倍に稀釈したものにキヌレン酸を添加し 1~6 ppm となるよう調整した溶液の日光着色を測定して第 14 図の結果を得た。キヌレン酸濃度 1~3 ppm の直線部分を外挿して求めた寄与率は 38.8% である。

ハ) 分画法：実験方法の項記載の方法によって分画した清酒画分を原酒濃度で日照射したときの着色量は第 6 表のとおりであった。これから求めたキヌレン酸の寄与率は 38.2% である。

$$\text{キヌレン酸の寄与率} = \frac{\Delta OD_{420}(\text{KA})}{\Delta OD_{420}(\text{h}\nu)} \times 100 = 44.0\%$$

ただし、 $\bar{x} = 2.281$, したがって $\bar{y} = 0.3767$

第 13 図 キヌレン酸の関与する日光着色（その 1）
回帰式法（キヌレン酸定量螢光法）

$$\text{キヌレン酸の寄与率} = \frac{\Delta OD_{420}(\text{KA})}{\Delta OD_{420}(\text{h}\nu)} \times 100 = 38.8\%$$

ただし、原酒のキヌレン酸定量螢光法

第 14 図 キヌレン酸の関与する日光着色（その 2）
キヌレン酸添加法

第 6 表 キヌレン酸の関与する日光着色（その 3）
ポリアミド分画法

組 合 わ せ	$\Delta OD_{420}^{20}(\text{h}\nu)$	日光着色の相互作用
ポリアミド非吸着区分	.068	
ポリアミド吸着区分	.015	
吸着区分+非吸着区分	.132	.049
分画前清酒	.165	

カラム ポリアミド C-200 (和光純薬) 10g

試 料 清酒 50ml + 蒸留水 200ml
溶 出 80% エタノール 200ml } 非吸着区分
水 200ml }
N/10 NH_4OH 200ml 吸着区分

$$\text{キヌレン酸の寄与率} = \frac{\text{吸着区分の日光着色} + \text{相互作用}}{\text{分画前清酒の日光着色}} \times 100 = 38.2\%$$

フラビンの寄与率 = $\frac{\Delta OD_{av}(FR)}{\Delta OD_{av}(h\nu)} \times 100 = 35.3\%$
 ただし、 $\bar{x} = 204.9$, したがって $\bar{y} = 0.2335$

第 15 図 フラビンの関与する日光着色（その 1）
回帰式法（生酒）

フラビンの寄与率 = $\frac{\Delta OD_{av}(FR)}{\Delta OD_{av}(h\nu)} \times 100 = 27.2\%$
 ただし、 $\bar{x} = 203.1$, したがって $\bar{y} = 0.1947$

第 16 図 フラビンの関与する日光着色（その 2）
回帰式法（火入酒）

以上を総合すると、キヌレン酸関与の日光着色は清酒の日光着色全体の 38~44% と推定される。

iii) フラビン関与の日光着色：清酒群（A）のフラビン含量に対する日光着色量の回帰式は、生酒について第 15 図、火入酒について第 16 図のとおりで、フラビンの寄与率はそれぞれ 35.3%、27.2% であった。

フラビン添加法は添加したフラビン自体の退色のため、フロリジルカラムによる分画法はフロリジルから鉄の溶出のため、ともに推定の根拠とすることは出来なかった。

従って、フラビン関与の日光着色は清酒の日光着色全体の 27~35% と推定される。

iv) チロシンおよびトリプトファン関与の日光着色：清酒群（B）についてチロシン含量を 1-ニトロソ-2-ナフトール法¹²⁾で定量し、回帰式法でチロシンの寄与率を

チロシンの寄与率 = $\frac{\Delta OD_{av}(Tyr)}{\Delta OD_{av}(h\nu)} \times 100 = 59.5\%$
 ただし、 $\bar{x} = 430.4$, したがって $\bar{y} = 0.3767$

第 17 図 チロシンの関与する日光着色 回帰式法

トリプトファンの寄与率 = $\frac{\Delta OD_{av}(Try)}{\Delta OD_{av}(h\nu)} \times 100 = 51.2\%$
 ただし、 $\bar{x} = 58.51$, したがって $\bar{y} = 0.3767$

第 18 図 トリプトファンの関与する日光着色 回帰式法

求めると第 17 図のとおり 59.5% となる。

また、トリプトファン含量を *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド法¹⁰⁾で定量し、同様に回帰式法でトリプトファンの寄与率を求めると第 18 図のとおり 51.2% となる。

添加法ではいずれの場合も他の構成成分が制限因子となっているようで添加による日光着色の増大がみられず、推定できなかった。

両者の和が 100% を超過するのは、チロシン、トリプトファンを別個に測定しており、これに対する日光着色の制限因子が不足しているためと解される。

v) モデル清酒の日光着色：

第 4 図で用いたモデル清酒の日光着色は同図から読むと 0.030 であり、同時照射した清酒の日光着色は同図から 0.040 である。このモデル清酒は反応系 I、II 構成成分を清酒の定量値に従って添加されており、また、阻害物のフェルラ酸、チロソールも清酒において分別定量した値によって添加され、反応系 I および II についてはモデルとしてはほぼ完全なものと考えられる。

上記の日光着色から計算すると清酒の日光着色のうち 75.0% は反応系 I および II によると推定される。

以上の諸結果から、反応系 I、II を通じて、キヌレン酸関与のものが全着色に対して 38~44%、フラビン関与のものが 27~35%、合算して清酒の日光着色の 65~79% は反応系 I および II によるものであり、これはモデル清酒からも確かめられた。そのうち反応系 I は全着色に対し 20~45% で、従って、反応系 II は 20~59% と推定される。

残りの 25% の日光着色として DFCY 以外のフェリシアナイド還元性物質⁷⁾、特に清酒中に見出されたプロトカテキュ酸、インドール酢酸の関与するもの¹⁶⁾が推定される。

3. 日光着色の予測

ある清酒が日光着色し易いか否かは出荷酒の品質管理上是非チェックしておく必要があると考えられる。しかし、それを絶対的な値として求めることは日光エネルギーが季節により天候により変動するので実際の日光照射

によっては不可能である。そこで、総体の品質の良否を個々の特性の一次結合と考えて判断する判別函数を用いる方法を検討した。

i) 判別函数の作成：清酒群(B)について、キヌレン酸, DFCY, Mn^{2+} , チロシン, トリプトファン, フラビン含量を測定し、それぞれの日光着色に対する相関係数を計算して第7表の結果を得た。なお測定値はppmの単位で表示した。

相関の有意なキヌレン酸, DFCY, Mn^{2+} , チロシン含量を選びそれぞれの測定値を x_1, x_2, x_3, x_4 として判別函数を求める¹⁷⁾と第7表下欄の式が得られた。臨界値としてをZ計算すると11.16が得られ、Zがこれより大きい清酒は着色し易く、これより小さい清酒は着色しにくいと判定された。

そこで、清酒群(B)の各清酒についてZを算出し、日光着色の大小でグループ分けして対比させると、その判定の適否は第8表のとおりで、22点中Zの値が臨界値を越えて着色しやすいと判定された清酒が実際の日光着色は小さい方のグループに3点あったのみでよく適合した。

第7表 判別函数による日光着色しやすい清酒の判定法

日光着色と各成分間の相関 ($n=22$)

成分	測定法	相関係数
キヌレン酸 (x_1)	ポリアミド-螢光法	.819**
DFCY (x_2)	迅速定量法	.603**
Mn^{2+} (x_3)	原子吸光法	.717**
Tyr (x_4)	1-ニトロソ-2-ナフトール法	.824**
Try	p-DAB 法	.212
FR	ルミフラビン螢光法	-.007

判別函数

$$Z = x_1 + 0.02435x_2 + 2.745x_3 + 0.004126x_4$$

臨界値

$$Z \geq 11.16$$

第8表 判別函数を用いた結果

着色しやすいグループ			着色しにくいグループ		
$\Delta OD_{430}^{450}(h\nu)$	Z	判定	$\Delta OD_{430}^{450}(h\nu)$	Z	判定
.367	13.35	○	.297	13.33	×
.364	13.59	○	.293	11.86	×
.357	12.38	○	.293	12.46	×
.353	13.22	○	.237	9.11	○
.350	12.96	○	.222	10.18	○
.344	12.10	○	.220	8.56	○
.340	12.18	○	.218	9.77	○
.336	12.67	○	.198	8.24	○
.327	12.79	○	.185	8.21	○
.327	12.39	○	.150	7.01	○
.315	11.60	○	.149	7.61	○

*: 臨界値 $Z \geq 11.16$ を着色しやすい清酒としたときの判定のあやまり

ii) 判別函数の応用：前項で求めた判別函数は43酒造年度に醸造試験所で試験した清酒から導いたものである。これが他の清酒にも適用できるかどうかを44酒造年度に実際の酒造場で製造した清酒についてしらべた。清酒群(C)を60°C, 30分間ビン火入し、1週間後に日光照射を行なって着色をしらべ、キヌレン酸, DFCY, Mn^{2+} , チロシン含量から前式を用いて求めたZの値に対して散布図を作成すると第19図のとおりとなり、相関係数は $r=0.677$ ($n=22$)

で有意である。従って、この判別函数は清酒が異なっても適用することが可能である。ただし、この清酒においてはZの値は最大が10.5で前記の

臨界値を使うとすべてが第19図日光着色とZの値日光着色しにくいと判定されてしまう。この理由は、醸造試験所の清酒は一般にアル添加量が少なく各種成分が多いためZの値が高いのに対し、酒造場からの清酒ではアル添加量が多いためと考えられる。従って、普通アル添酒、増醸酒、市販酒というように母集団毎にZの臨界値を定めておけば使用可能である。

終りに臨み、原子吸光分析について種々御便宜をいただいた当所難波第5研究室長に深謝する。

文 献

- 1) 佐藤 信, 中村欽一, 蓼沼 誠: 本誌, 65, 255 (1970)
- 2) S. SATO, K. NAKAMURA and M. TADENUMA: *Agr. Biol. Chem.*, 投稿中
- 3) 中村欽一, 佐藤 信, 蓼沼 誠, 吉江輝征: 本誌, 65, 1120 (1970)
- 4) 佐藤 信, 中村欽一, 蓼沼 誠, 飯村 稔: 本誌, 65, 57 (1971)
- 5) M. TADENUMA and S. SATO: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 1482 (1967)
- 6) 蓼沼 誠, 高橋康次郎, 佐藤 信: 本誌, 61, 946 (1966)
- 7) 佐藤 信, 中村欽一, 蓼沼 誠, 蓮尾徹夫, 矢尾武広, 茂木宏治, 重藤久敏: 本誌, 64, 541 (1969)
- 8) 佐藤 信, 中村欽一, 蓼沼 誠, 茂木宏治: 本誌, 65, 433 (1970)
- 9) 佐藤 信, 大場皓蔵, 蓼沼 誠: 本誌, 62, 875 (1967)
- 10) 小幡弥太郎, 坂村貞雄, 垣坂 登: 農化, 26, 202 (1952)
- 11) 加藤有造, 蓼沼 誠, 佐藤 信: 本誌, 60, 731 (1965)
- 12) 赤堀四郎ほか編: タンパク質化学, 1, アミノ酸・ペプチド, p. 305 共立 (1969)
- 13) 大塚謙一, 原 昌道, 土辺美恵子: 本誌, 62, 72 (1967)
- 14) 蓼沼 誠, 佐藤 信: 本誌, 62, 1288 (1967)
- 15) 佐藤 信, 中村欽一, 矢尾武広, 蓼沼 誠: 本誌, 63, 457 (1968)
- 16) 中村欽一, 蓼沼 誠, 茂木宏治, 浜地正昭, 佐藤 信: 本誌, 65, 153 (1970)
- 17) 奥津 恭: 工場における推計学の問題とその解き方, p. 131, 共立出版 (1952)

J. Soc. Brew. Japan, 1971, Vol. 66, No. 1, p. 62~p. 70

Studies on Changes in Color and Flavor of Sake caused by Exposure to Light and Storage

(IX) Summary of Color Development caused
by Exposure to Sunlight

by

Kin-ichi NAKAMURA, Shin SATO, Makoto TADENUMA,
Masaaki HAMACHI*, Takashi OZEKI

(Research Institute of Brewing, Tax Administration Agency, Kita-ku, Tokyo)

The presence of two reaction systems in color development of sake caused by exposure to sunlight has been reported in previous papers. In this paper, these two reactions were proved to be the main reaction systems in actual sake qualitatively and quantitatively, and it was demonstrated that as high as 75% of color development of sake caused by exposure to sunlight can be explained by these two reactions. Furthermore, the method for estimating the extent of color development of individual sake caused by exposure to sunlight was proposed.

* Present address : Ôzeki Shuzo Co. Ltd.