醤油火入れ渾について

——発生のメカニズムと火入れ渾の出ない生醤油——

醤油の火入れ渾の発生とその対策については多くの研究者によって検討が行われている。仕込んだ麴のできにも大きく影響されることが分かってきた。筆者らは検討の結果、この麴菌によってつくられ、火入れ渾発生に関与する火入れ渾生成促進物質と、これによってはじめて渾り化する火入れ渾母体物質が凝集するという考えを打ち出した。そして、この火入れ渾生成促進物質をカットすることで火入れ渾の出ない醤油造った。

田 村 順 一

はじめに

醸造醤油は醤油諸味を圧搾することによって得られた生醤油（生揚げ醤油とも言われる）を 60～120℃、数秒～数 10 分間加熱してはじめて製品となる。この加熱処理は火入れと呼ばれ、その目的は醤油の殺菌、品質の安定化、色度調整および香気の強化などで、醤油醸造になくてはならない大切な工程である。この際、生醤油中に残存している酵素などのタンパク質^{1,2)}は熱変性して、時間を経るにつれて互いに集合し、高分子多糖などを巻き込んだ変性タンパク質の凝集塊、すなわち火入れ渾となって沈降する。そのため、清澄な製品を得るにはこの火入れ渾を醤油から除去（渾引き）しなければならない。通常、加熱後徐々に温度を下げながら約 1 週間程度静置して火入れ渾を充分沈降させて分離する。しかし、この方法で発生する火入れ渾沈降区分の見かけの容量は火入れした醤油の 5～10% にも達する。ところが火入れ渾そのものの量は醤油のわずか 0.03～0.07 重量% でしかなく、ふわふわした火入れ渾沈降区分のほとんどは醤油なのである。そこで、火入れ渾の沈降を促進し、容積を小さくして渾引きを容易にするため硅藻土や柿渋あるいは酵素剤などを散布する工夫が行われている。それでもこの火入れ渾沈降区分を無視できるほど十分に圧縮することは困難で、含まれている醤油を回収しない限り製品歩留りは著しく低いものになってしまう。そこで従来は、この火入れ渾沈降区分を圧搾直前の醤油諸味に再び戻し、諸味と一緒に圧搾して火入れ渾を醤油粕に移行させる方法が採られてきた。しかし、この方法では少量とはいえ一度加熱処理された醤油が生醤油に混ざるこ

とになり製品を劣化させる原因となるばかりでなく作業性も低下させることになる。また、近年小規模経営や協業化工場傘下の醤油業者の一部にはボトリングだけを行って、火入れ渾を戻すべき醤油諸味を持たない企業も現れている。そこで最近では膜技術を応用した火入れ渾の単独処理³⁾の試みなどがなされているが設備投資費用が嵩むなど問題は少なくない。

醤油火入れ渾生成のメカニズムに関しては橋本ら⁴⁾や茂田井ら⁵⁾の研究があるが筆者らの結果とは必ずしも一致しない。ここでは現在の醤油醸造技術においても問題となっている火入れ渾発生のメカニズムと火入れしても火入れ渾の発生しない生醤油について筆者の見解を述べることにする。

醸造条件によって違う火入れ渾発生量

醤油醸造家の多くは麴菌の種類や麴のできの良し悪し、諸味の温度や pH の経過、アルコール発酵の強弱などの醸造上の諸因子と火入れによって発生してくる火入れ渾量とが深い関係にあることには気付いていた。しかし、それを合理的に説明できるだけの科学的根拠を持ち合せていなかった。

火入れ渾成分の 70～80% はタンパク質であり、麴菌などの酵素が熱変性したものであることは前に述べた。それならば火入れ渾量は生醤油中に存在するタンパク質量に比例するはずである。ところが実際には生醤油中のタンパク質量と火入れ渾量とは必ずしも関係しないことがわかった（第 1 図）。それでは火入れ渾発生量の多少に何が関係しているのだろうか。

麴のでき具合に関係する 1 因子に製麴時間がある。製

Sediments of Soy Sauce during Pasteurization—Mechanism of the Sediment-formation and Production of the Sediment-free Raw Soy Sauce—

Jun-ichi TAMURA (Higeta Shoyu Co., Ltd.)

第1図 火入れ量と生醤油中タンパク質量との関係

第1表 製麹時間と火入れ量との関係

製 麹 時 間 (h)	火入れ量 (v/v%)	サ ン プ ル
24	0	J
48	25	K
72	27	L

麹時間を 24～72 時間とした時、それぞれに発生する火入れ量には違いができる (第1表)。また、その時の生醤油タンパク質を SDS-ゲル電気泳動してみると (第2図) 矢印のタンパク質 (分子量約 3 万) が特徴のある変化を示すことがわかる。この麹菌によってつくられ、火入れ量に関与するこのタンパク質を仮に火入れ促進生成促進物質として話を進める。それ以外のタンパク質は加熱後、火入れ促進生成促進物質 (以下、促進物質と略す) によってはじめて変性化 (変性タンパク質の凝集体が生成) する火入れ母体物質 (以下、母体物質と略す) である。

次に高温経過諸味や既にでき上がった醤油諸味あるいは生醤油を比較的高い温度に数日～数週間保つと火入れ量は減少する。そして、この時の火入れ促進減少率と促進物質の減少率の間には第3図に示す直線関係が成り立

第2図 製麹時間の違いによる生醤油中のタンパク質
製麹時間 J: 24 時間, K: 48 時間, L: 72 時間

第3図 温度の影響 (火入れ促進 VS 生成促進物質)

第4図 pH, エタノールの火入れ促進に及ぼす影響
上段: 火入時点での影響, 下段: 熟成諸味液汁での影響

つ。

さらに諸味の pH 履歴を反映していると考えられる熟成諸味液汁 pH と火入れ量の間にも深い関係がある。熟成諸味 pH が低いものほど火入れ量は少なく、pH が高いと火入れ量も多くなる (第4図, 下)。ところが、加熱直前に pH を調整したような生醤油では pH と火入れ量との関係はむしろ逆で、低い pH のもので火入れ量が増加する (第4図, 上)。一方、SDS-ゲル電気泳動で促進物質を調べると pH の影響による促進物質減少率と火入れ量の減少率とは矢張り強い正の相関関係がある (第5図)。このことは pH そのものが残存タンパク質の熱変性に影響しているのではなく、その諸味の pH 履歴によって影響された促進物質が火入れ促進生成量に関係していることを示している。

次にエタノールの場合、3.5% 以下の濃度においてはエタノール濃度が高いほど促進物質は諸味中で減少する。そのため火入れ量とエタノール濃度とは負の相関関係になる。ただし、エタノール濃度が 4% を遙かに越えるようになると母体物質も促進物質の関与なしに火入

第5図 pH の影響 (火入れ産 VS 生成促進物質)

れによって火入れ産になる⁶⁾。このように 促進物質は温度、pH およびアルコール発酵の履歴によって変性し易いタンパク質であり、この促進物質の生醬油中での残り具合が直接火入れ産の生成量に影響を与えていると考えられる。

火入れ産生成促進物質

火入れ産生成促進物質すなわち生醬油タンパク質のうち SDS-ゲル電気泳動で分子量約 3 万に現れるタンパク質を生醬油中から精製した。その結果、促進物質はアルカリ領域にプロテアーゼ活性を持ち、ポテトインヒビターで活性が阻害されることから麹菌アルカリプロテアーゼであることが判明した。

また、UF-膜 2 枚を使って分子量 1~4 万の範囲のタンパク質を除去した生醬油を造った (後述)。

この生醬油は促進物質を含まないため火入れしても火入れ産は発生しない生醬油である。しかし、分子量 1~4 万の範囲にはもう一つ重要なタンパク質 (分子量 25,000 に現れるピーク) がある。このタンパク質も精製したところ麹菌の中性プロテアーゼ II であることが分かった。

さて、この母体物質だけを含む生醬油に精製アルカリプロテアーゼあるいは精製中性プロテアーゼを添加して火入れした。するとアルカリプロテアーゼを添加した生醬油では定量的に火入れ産が生成し、中性プロテアーゼ II を添加した生醬油では火入れ産の生成はほとんど見られなかった。このことは促進物質が麹菌アルカリプロテアーゼであり、他のタンパク質は促進物質によって火入れ産となる母体物質であることを示すものである。周知のようにアルカリプロテアーゼは耐熱性の弱い酵素であり、そのタンパク分解力が火入れ産生成に関与しているとは期待できない。アルカリプロテアーゼがタンパク質として持っている強い疎水結合力が熱変性母体物質の凝

集に強く関係していることが想像される。醬油の熱変性タンパク質、すなわち火入れ産前駆体物質が凝集する力の一つは変性タンパク質同士の疎水結合力⁷⁾によるとされており、変性アルカリプロテアーゼタンパクは強い糊の役目を果していると思われる。

なぜ火入れ産が生じないか

促進物質を含まない生醬油は火入れされてもなぜ火入れ産を生じないのだろうか。

普通の生醬油とある種の吸着剤 (後述) を用いて促進物質を除去した生醬油について加熱時 (80°C) のタンパク質の変化を観察した。その結果、普通の生醬油では 3 分間ほどの加熱によって電気泳動ゲル中のタンパク質は減少する。さらに、加熱時間が 12 分になるとほとんどのタンパク質は消失してしまう。生醬油中タンパク質は熱変性することで本来の分子量を維持することができず、SDS-ゲル電気泳動で測定可能な 1~10 数万の範囲からなくなってしまい、さらに 60°C、20 時間保温すると火入れ産となって沈降する。

一方、同じ条件の加熱で促進物質を欠く生醬油においては未加熱の生醬油によく似た電気泳動パターンを示し、依然としてタンパク質すなわち母体物質の多くが醬油中に残存していることが分かった。

それでは加熱された時、普通の生醬油において電気泳動ゲルから消失した母体物質は一体どこへ行ってしまったのだろうか。

そこで、普通の生醬油と促進物質を含まない生醬油とを先と同様に加熱した時、より高分子側にどのような変化が生じるのか検討した。その結果、普通の生醬油では 80°C 加熱後、30 秒以内に生醬油では存在しなかった分子量 200 万以上のタンパク質の凝集体が生成した。生成量は 1 分後にさらに増加し、2 分~10 分ではほぼ最大量に達した。次いで 60°C に 20 時間保ってさらに凝集を促すと分子量 200 万以上の凝集体は消失し、火入れした醬油中には火入れ産が発生した。従ってこの凝集体は火入れ産前駆物質と考えられた。

一方、促進物質を含まない生醬油では加熱 5 分後に凝集体すなわち火入れ産前駆物質がかすかに現れて 10 分で最大となった。しかし、その量は普通醬油の 30% 以下であった。さらに 60°C に 20 時間保って凝集体の成長を促したが分子量 200 万以上の火入れ産前駆物質は醬油中に残存しており火入れした醬油に火入れ産の発生は認められなかった。

このことは 80°C の加熱において普通の生醬油では母体物質が速やかに変性、凝集して分子量 200 万以上の火入れ産前駆物質になるのに対し促進物質を含まない生醬

第6図 醤油火入れ逆の生成

油にあっては母体物質のかなりの部分が未変性に近い状態で醤油中に留まっていることを示している。そして一部は凝集体に移行するがさらに成長して火入れ逆になることはなかった。

また、この現象は重要な事実をも示唆している。それは促進物質の有無によって母体物質の熱による変化が支配されていることである。同じ加熱条件であるならば母体物質である各タンパク質の受け取る熱エネルギーは促進物質の有無にかかわらず一定であり、その熱変性の程度も同じはずである。にもかかわらず促進物質の有無でその後の行き先が大きく異なるのは促進物質が一部熱変性した母体物質に積極的に作用していることを示唆している。火入れ逆のできる様子を第6図に示す。

火入れ逆の出ない生醤油の製造

以上述べてきた火入れ逆の生成メカニズムから考えると促進物質を少なくするかあるいは完全に除いてしまう

ことにより火入れしても火入れ逆の少ないあるいは生じない生醤油を製造することができるはずである。

1) 醤油諸味あるいは生醤油を加熱処理する

アルカリプロテアーゼは熱に弱いタンパク質でその役割が終わったと考えられる圧搾直前の諸味や生醤油を加温することで促進物質も火入れ逆も減少させることができる。ちなみに生醤油を42℃で2週間保温すれば50%程度の火入れ逆の減少が期待できる。

2) 生醤油をUF膜処理する

次に現実的な方法として物理的に促進物質だけを除去する方法について述べる。最近の膜技術の進歩は目覚ましいものがあり優秀な分離膜が次々に登場している。そこで火入れ逆促進物質だけを2枚の分離膜(分画分子量5万と1万のもの)を利用して分離、除去する方法が考えられる(第7図)。

分画した分子量1万以下の醤油と母体物質だけを含む分子量5万以上の区分を混合すると火入れしても火入れ

第7図 生醤油中タンパク質の分子量的分画

逅のほとんど出ない生醤油ができる。

もちろん、分子量1万以下の醤油は促進物質も母体物質も共に含まないため火入れしても火入れ逅は発生しない。しかし、分子量5万以上の区分には醤油に醤油らしい濃厚感を与えている分子量が数10万の酸性多糖が含まれている。従って5万以上の区分は本醸造醤油には欠かせない成分であると考えられる。

3) 生醤油を疎水性吸着剤で処理する

火入れ逅生成促進物質の促進物質たる所以はその強い疎水結合力にあると考えられる。そして醤油のような高イオン強度下では疎水結合力が一層強められている。

もし、促進物質が疎水性の担体に遭遇するならその担体に吸着されるはずであり、とりわけ促進物質の大きさの数倍～10数倍(40～数100オングストローム)のサイズの孔を持つ疎水性の担体なら促進物質はその孔に強くトラップされてしまうはずである。

疎水性で多孔性の吸着剤で生醤油を処理すると生醤油中の1～4万のタンパク質が特徴的に吸着されることが分かった。この吸着した区分にはアルカリプロテアーゼだけでなく中性プロテアーゼⅡも含まれていた。そして、チロシンが10%ほど吸着された以外、他のアミノ酸の吸着は認められなかった。

従って、疎水性吸着剤で処理された生醤油は熱変性タンパク質の凝集体形成に重要な役割を果していると考えられるプロテアーゼを欠いた生醤油である。そして、この生醤油は火入れしても火入れ逅を生じない生醤油である。

ところで生醤油を処理した疎水性担体をカラムに詰めて牛乳や脱脂粉乳溶液を通過させると通過液は凝乳してカードをつくった。すなわち酵素活性を持つ固定化プロテアーゼができていた。プロテアーゼと多孔性の疎水性担体との結合は非常に強力でイオン強度の低い状態でも酵素が漏出することはなかった。この多孔性疎水担体は

酵素の固定化が簡単である上に高分子基質にも作用できる点で特徴ある素材であると思われる。

おわりに

はじめに述べたように醤油火入れ逅の問題は最後に残された醤油醸造上の課題のひとつである。従来は火入れしてから逅を沈降させるまで長い間をかけることができた。しかし、流通環境が激しく変化する今、受注から出荷までの時間の短縮化に対する要望は強い。今後ますますその傾向は強まって行くと予想され、火入れ工程の短縮化は急務である。また、先に述べたように火入れ逅を生じない生醤油製造技術は火入れ逅の後処理の合理化、製品化率や品質の向上など醤油醸造技術の改善に大きく貢献するものと考えられる。

今回ここで紹介した火入れ逅の出ない生醤油の製造法はいまだコストの点で完成されたものではない。しかし、最近の工業技術の進歩は著しいものがあり、いつの日にか火入れ逅の問題も解決されるものと期待され、この小論がその一助になればと希望している。

<ヒゲタ醤油(株)研究所>

文 献

- 1) 橋本彦亮, 岩浅 孝, 横塚 保: 醸工, 54, 21 (1976)
- 2) 田村順一, 相羽富夫, 茂木孝也: 醬研, 13, 199 (1987)
- 3) 楠戸 修, 浜本義人, 三宅紹資: 醬研, 7, 108 (1981)
- 4) 橋本彦亮: 醸酵工学, 55, 294 (1977)
- 5) 茂田井 宏, 林 和也, 石山 孝, 曾根原豪志: 農化, 57, 27 (1983)
- 6) 田村順一, 相羽富夫, 茂木孝也: 醬研, 13, 244 250 (1987)
- 7) H. HASHIMOTO, T. YOKOTSUKA: *J. Ferment. Technol.*, 52, 747 (1974)