[農化 第 41 卷, 第 9 号, p. 417~421, 1967]

味 醪 に 関 す る 研 究 (第 5 報)

煮 切 に つ い て

山下 勝, 大倉鎮夫, 河村 聡, 土井新次*

(愛知県食品工業試験所, *名古屋大学農学部)

昭和 42 年 1 月 13 日 受 理

Studies on the Mirin

Part V. On the Haze Formation in Mirin-making

By Masaru YAMASITA, Sizuo OOKURA, Minoru KAWAMURA and Shinji DOI

Food Research Institute, Aichi Prefecture ;

**Faculty of Agriculture, Nagoya University*

We studied on the cause of haze formation in the manufacturing process of Mirin (resumed sake wine). It was found that the haze was formed in the presence of relatively large amount of Koji-enzymes used. Since the amylase well hydrolyzed the starch attached to the protein part contained in glutinous rice, the stripped protein could be easily liberated into the Mirin mash from the rice grain and was partially hydrolyzed by protease present in Mirin mash. It was revealed by chemical and immunochemical methods that the partially hydrolyzed protein was the main constituent of the haze in Mirin. Consequently, the method to reduce the formation of this haze is to use enzymes within the limits of hydrolyzing the starch around the protein. In practice, reduced use of Koji in ratio to rice is raw materials of Mirin-making is important to avoid the haze formation.

(Received January 13, 1967)

緒 言

味醪には煮切という加熱蛋白混濁現象があり、著しく商品価値を劣化させるので、これを防止するために古くより多くの研究⁽¹⁻⁸⁾が行なわれている。この煮切の成因は未だ明らかではないが、その防止には加藤^(2,3)の加圧釜による糯米の蒸餾という方法が最も効果的で、大工場においては実用化されている。この方法は有効であるが、加圧釜という大きな設備が必要なことと、できた味醪の香味がややものたらぬという欠点が認められている。この点の解決をはかるために、煮切の成因を調べ、防止対策をたてるための研究を行ない、前報^(9,10)までに一部報告したが、新たに一応の成果を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 煮切テスト

定 性

加熱試験：試料を小試験管に 1 ml とり加熱し、沸騰

30 秒、冷却後加熱前後の濁度の増加を見て判定する。

加水試験：試料を小試験管に 1 ml とり、これに蒸留水 4 ml を加え、よく攪拌後、加水前後の濁度の増加を見て判定する。

定 量

加熱濁度は加熱定性後 4 ml の蒸留水を加えたもの、加水濁度は定性試験液そのままを径 1 cm のキューベットにて 660 mμ の吸光度を蒸留水を対照として測定した。各表に示した煮切濁度は、とくにことわらぬかぎり加熱濁度で示した。

2. 煮切製造試験

高温糖化試験：麴（または酵素剤）と水を適当な比率に加え 55°, 20 時間の糖化を行なった。アルコールは添加しない。

普通仕込試験：糯米、麴米（または酵素剤）、焼酎（40% アルコールを総米の 60%）を加え合わせ、室温にて

醪日数 60 日後に上槽した。醪温度 30° の場合は醪日数 30 日とした。

3. 塩濃度の測定

試料 50 ml を磁製坩堝にとり、最初はガスバーナーで大部分の水分をとばし、後電気炉 (500°C) で灰白色になるまで加熱灰化し、放冷後秤量し % で表わした。

4. 酵素の精製

液化アミラーゼ：赤堀⁽¹¹⁾の方法を用い精製した。精製酵素の比活性は $D_{40}^{30'} u/g = 186,000$ にて、pH 6.5 におけるプロテアーゼ活性は認められなかった。

糖化アミラーゼ：岡崎⁽¹²⁾の方法によった。精製酵素の比活性は $G mg_{40}^{30'}/g = 13,800$ であった。

アルカリ性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ：布川⁽¹³⁾の方法に従い精製した。アルカリ性プロテアーゼは精製後結晶となった。比活性は $[PU]_{r\ tyf. 30'}^{cas. F. B. 30'}/g = 79,200$ であった。酸性プロテアーゼは比活性は $[PU]_{r\ tyf. 30'}^{cas. F. B. 30'}/g = 11,400$ であった。

5. 酵素力価の測定

液化アミラーゼ：萩原⁽¹⁴⁾の Wohlgemuth 改変法を用いた。

糖化アミラーゼ：萩原⁽¹⁵⁾の方法によった。

プロテアーゼ：萩原⁽¹⁶⁾の方法に従った。

6. 免疫血清の調製および判定

煮切味醪を 1 晩水道水にて透析後沈澱を 10,000×g 5 分遠沈して集め、蒸留水で数回洗滌したものを免疫原とした。家兎を使い、静脈注射およびアジュバンドを用いる筋肉注射を隔日に 1 カ月行ない、タイターが 128 になりそれ以上の上昇が認められなくなったので全採血を行った。

液内凝集反応：免疫血清を 10 倍にうすめ 1 ml を小試験管にとり、試験液 0.5 ml を加え 24 時間後の凝集を肉眼で判定した。

寒天ゲル内沈降反応：1.5% 寒天液 (含マーゼン 0.01%) を径 9 cm のシャーレに約 30 ml ずつ入れ、寒天をかたまりさせた後、図のような穴をあけ、中心に免疫血清 0.3 ml を入れ、周囲の穴に被試験液を 0.3 ml ずつ入れ、乾燥しないようにして室温静置 7~14 日後に沈降線の生成を肉眼判定した。

実験結果

1. 仕込条件と煮切との関係

仕込条件と煮切生成との関係を調べるために、2nd 型直交表を用いて実験を行なった。数回の実験のうち、そ

第 1 表 味醪製造条件と煮切との関係

要 因	分散比	摘 要
第 1 回	醪 温 度	11.1** 15° と 25°
	掛 米 蒸 餾	26.9** 常圧 60 分、加圧 0.7k, 20 分
	麴 歩 合	1.3 10% と 20%
第 2 回	掛 米 精 白	— 90% と 80%
	醪 温 度	38.4** 15° と 25°
	掛 米 蒸 餾	38.4** 常圧 60 分と加圧 0.7k, 20 分
	麴 歩 合	40.9** 10% と 20%
	掛 米 精 白	— 80% と 90%
第 3 回	醪 日 数	— 40 日 と 80 日
	アルコール濃度	— 36% と 45%
	麴 歩 合	5.1* 11% と 16%
	製 麴 温 度	1.1 最高 38° と 43°
	種 麴 菌 種	4.7* アミラーゼ力価強と弱
第 3 回	プロテアーゼ	— プロテアーゼ添加と無添加
	掛 米 蒸 餾	8.0* 常圧 50 分と加圧 0.7k, 20 分
	pH	— 塩酸添加と添加なし
	仕 込 容 量	0.6 11 kg と 220 kg
食 塩 加 工	食 塩 加 工	— 食塩加工 + と -

れぞれ条件が異なったため煮切の出ない場合もあったので煮切の多く出た 3 例の分散分析表の要因と分散比、そのときの条件を第 1 表に示した。全体を通して醪温度、掛米の蒸し方、麴歩合、麴菌株の種類等が大きく関与している。これらの実験より、煮切を少なくするための条件は醪温度を低くし、糯米を加圧して蒸し、麴歩合を少なくし、アミラーゼ力価の弱い菌を用いればよいということが認められ、加藤、杉山らの意見と一致した。これより、酵素作用をおさえるような方向にもっていくと煮切がでにくいことが予想される。

2. 高温糖化における煮切の生成

高温糖化による麴エキスの製造において、しばしば煮切様物質の生成されることが認められる。この場合の生成の条件は第 2 表にあるとおり麴米に対する水の使用割合が支配因子で、水を多くすると混濁物は生成しない。水を麴に対して 1:1 以下にすると必ず混濁物が生成してくる。これが煮切と同一物であることは免疫反応、加水沈澱、加熱沈澱、電気泳動等により証明される。この点について

第 2 表 高温糖化による煮切生成試験

麴 : 水 (g) (ml)	煮 切 混濁度
1 1	++
1 1.5	±
1 2	—
1 3	—

はくわしく次報で報告する。この混濁の生成の原因として、水を多くすると何らかの要因が稀釈されるためではないかと考え、塩濃度、糖濃度、酵素濃度、酵素の種類

第 3 表 塩濃度と煮切生成
(高温糖化)

麴 : 水 (g) (ml)	塩濃度 (%)	煮 切 混濁度
1 1	—	+
1 1.5	—	±
1 1.5	1	+
1 2	—	—
1 2	0.1	—
1 2	0.5	±
1 2	1	+

第 4 表 味醃仕込方法と塩濃度

	麴歩合 (%)	煮 切	塩濃度 (%)
加圧糯米	10	—	0.08
"	20	—	0.08
"	30	十少	0.09
無圧糯米	10	—	0.08
"	20	+	0.08
"	30	+	0.09

これほど認められるか否かを調べたのが第 4 表である。予想に反して煮切のあるものとなないものの塩濃度の差は認められず、その濃度も 0.1% 以下と非常に低いものである。したがって、実際の味醃製造においては煮切が生

第 5 表 糖添加と煮切生成
(高温糖化)

麴 (g)	水 (ml)	グ ル コ ー ス (g)	煮 切 混濁度
30	20	—	+
30	30	—	+
30	40	—	—
30	60	—	—
30	45	5	+
30	45	10	+
30	60	15	+

第 6 表 糖濃度と煮切

	煮 切	糖濃度
酵素剤使用味醃 (高温糖化)	—	18.5
"	+	25.6
"	+	27.2
"	—	20.8
普通仕込味醃	—	30.0
"	—	35.0
"	—	32.0
"	+	35.0
"	+	36.5

をとりあげ検討した。

3. 塩濃度と煮切生成

高温糖化試験の結果、および従来煮切は塩可溶性のグロブリンであると考えられている点より、まず塩濃度を取りあげ、これと煮切生成との関係を試験したのが第 3 表である。塩を 1% も加えると必ず加熱混濁物ができる。しかし 0.1% ぐらいではできていない。実際の味醃において、煮切のあるものとなないものとの間に塩濃度の差が

成するか否かは塩濃度とは関係がないと考えられる。

4. 糖濃度と煮切生成

糖の濃度と煮切生成との関係を調べたのが第 5 表である。糖を最初から 10~20% 加えておいて製造試験を行なうと、たしかに煮切が生成してくる。そこで、いろいろの条件で造った煮切のあるものとなないものとの糖濃度を比較してみたのが第 6 表である。たしかに同一製造条件では糖濃度の高い方が煮切が出やすい。しかし糖濃度

が絶対のものでない証拠に 25~27% でも煮切ができて、30~35% でもできていないものもある。次の酵素との関係のところで説明するとおり、この場合の糖はアミラーゼによる澱粉の分解の程度を示す一つの目安であり、煮切生成の原因というよりは結果を示しているものと思われる。

5. 酵素と煮切の生成

以上の実験結果より考えられることは、酵素との関係が一番大きいのではないかということである。そこで麴歩合を変えた場合と市販酵素剤(天野製業バイオアス)を用い、その濃度を変えた場合の煮切生成を調べたのが第 1 図、第 2 図である。明らかに大きな相関が認められる。そこで酵素を精製して、どの酵素が大きく関与しているのか調べてみた。液化型アミラーゼを精製して試験した結果が第 3 図である。液化型アミラーゼのみでも糯米 1g 当り 600 U 加え、糯米に対する水の歩合を 100% 以下にして高温糖化させると混濁物質が生成してくる。糖化型アミラーゼのみの場合は米が溶けず味醃らしいものは生成されない。もちろんアルカリ性プロテアーゼ、

第 1 図 麴歩合と煮切との関係 (30°, 30 日)
●—● 無圧蒸し ×---× 加圧蒸し 第 2 図 酵素濃度と煮切との関係 (高温糖化)
●—● 無圧蒸し ×---× 加圧蒸し

第3図 液化型アミラーゼと煮切 (高温糖化)

酸性プロテアーゼのみでは味酥らしいものではない。そこで液化型アミラーゼ, 糖化型アミラーゼ, アルカリ性プロテアーゼ, 酸性プロテアーゼの4者を用いて, 2nd型直交表を使用し, 煮切生成との相関をみたのが第7表で, 液化型アミラーゼ, 糖化型アミラーゼの関与が大きいことがわかる。この結果より, 煮切は米の澱粉がアミラーゼにより溶解されたため, 蛋白が味酥中に溶出してきたものであることが予想される。したがって澱粉の溶解ということが最も大きく関与する要因ということになる。この酵素の組合わせ実験ではプロテアーゼ作用が大きな要因とはならなかった。その原因としては, 第8表

第7表 精製酵素による煮切製造試験

	液化型 アミラ ーゼ	糖化型 アミラ ーゼ	アルカリ 性プロテ アーゼ	酸性プロ テアー ゼ	煮切 濁度	免疫血 清沈降 反応
1	1	1	1	1	0.04	—
2	1	1	2	2	0.02	—
3	1	2	2	2	0.10	+
4	1	2	1	1	0.09	+
5	2	1	2	2	0.35	++
6	2	1	1	1	0.32	++
7	2	2	1	1	0.65	++
8	2	2	2	2	0.40	++
液化型 アミラーゼ	1	3,000 U	糖化型 アミラーゼ	1	800 U	
"	2	6,000 U	"	2	1,600 U	
アルカリ性 プロテアーゼ	1	125	酸性 プロテアーゼ	1	125	
"	2	250	"	2	250	
米 10 g 水 10 ml						

分散分析表

要 因	平方和	自由度	分散	分散比
液化型アミラーゼ	2701	1	2701	38**
糖化型アミラーゼ	325	1	325	4.6
アルカリ性プロテアーゼ	120	1	120	1.7
酸性プロテアーゼ	66	1	66	—
誤 差	212	3	71	

第8表 醗日数と煮切の生成

	仕込	10日	20日	30日	40日	50日	60日
煮濁 切度	I	0	0	0	0.04	0.14	0.16
	II	0	0	0	0.08	0.16	0.20

にあるとおり, アミラーゼの量が煮切のできる限界線の上下のところを用いているために, アミラーゼの影響が極度に大きく出たためであると考えられる。また, 煮切は醗の中期以後でないと液中に溶出してこない。この時期においては加藤⁽¹⁷⁾, 井上⁽⁸⁾の報告よりも明らかなように, アミラーゼ力は非常に多く残存しているが, プロテアーゼ力は非常に弱くなっている。したがって醗液中に溶出してきた蛋白は部分的に分解されるのみで, 完全に分解するというようなことはないと考えられる。

6. 煮切の本体

以上で煮切生成機構のおおよそを明らかにしたのであるが, さらに煮切の本体を調べるために免疫血清および精製酵素を組合わせて試験を行なってみた。その結果を第9表に示した。この試験においては糯米 10 g, 水 10 ml, 液化型アミラーゼ 3,000 U, 糖化型アミラーゼ 1,000 U, アルカリ性プロテアーゼ [PU]=100, 酸性プロテアーゼ [PU]=100 を用い高温糖化した。表にあるとおり, アミラーゼだけでも混濁物質はできるが, プロテアーゼのある方が免疫血清による凝集反応が顕著であった。

したがって, 煮切の本体はアミラーゼによりそのまわ

第9表 酵素の組合せと煮切生成

液化型 アミラ ーゼ	糖化型 アミラ ーゼ	アルカリ プロテ アーゼ	酸性プロ テアー ゼ	加熱 混濁	免疫 反応
○				—	—
○	○			—	—
○	○			+	+
○	○	○		+	+
○	○		○	+	+
○	○	○	○	+	+

第4図 煮切の免疫血清による寒天ゲル内沈降反応

りの澱粉層を剥離された米粒中の蛋白が醃液中に溶出され、これが醃中のプロテアーゼにより部分的に分解されたものであると考えられる。さらに寒天ゲル内沈降反応で煮切を調べた結果が第4図である。この図より認められるように、煮切血清は麴の水抽出物（主として酵素混合物）とは沈降反応を行なわない。したがって煮切は酵素そのものではないと考えられる。また通常の加熱、加水で混濁の認められない煮切なし味醃とも沈降反応を示さない。塩を1%加えて生成した加熱、加水混濁味醃（米蛋白グロブリンを含むと考えられる）も寒天内で沈降線が認められない。しかし、このものは免疫血清による液内沈降反応は認められるので、粒子が大きいために寒天内を拡散できないのではないかと考えられる。同じように、免疫血清による液内沈降反応では明らかに沈降が認められる高温糖化で生成した混濁物は、寒天内沈降反応ではもとの場所で白沈となつてとどまっております、寒天内での沈降線を示さないが、これは蛋白粒子のプロテアーゼによる分解がほとんど進んでいないので、粒子が大きいために寒天層の中を拡散できないためであろうと思われる。加水沈殿させた煮切も寒天内沈降反応では同じ1本の沈降線を生じるので、当然のことではあるが沈降反応の本体は加水沈殿するものと同じもので一種類であると思われる。

7. 煮切製造防止条件の検討

以上の実験より、味醃煮切の生成はアミラーゼによる蛋白粒子のまわりの澱粉層の分解剥離が主要な原因をなすものと思われるので、煮切の防止のための対策としてはアミラーゼ作用が十分でなく、蛋白が完全に露出して醃液中に溶解しないようにすればよいと考えられる。そこで酵素力を変えるために麴歩合を変えて醃温度を30°（いちばん煮切のしやすい夏の気温を考えて）で行なつて煮切のできない条件を探してみたのが第1図であ

る。図にあるとおり、麴歩合を約11%以下にすればほとんど完全に煮切はできない。実際には醃温度は30°より相当低いので、麴歩合はいま少し多くしてもよいことは予想できる。しかし従来使用している麴歩合（20~14%）よりもやや少なくする必要があることが、その後の試験で判明している。

要 約

(1) 味醃の煮切はアミラーゼにより、そのまわりの澱粉層を剥離された米粒中の蛋白が醃液中に溶出され、これが醃中のプロテアーゼにより部分的に分解されたものと考えられ、この蛋白は米麴の酵素蛋白とは異なるものである。

(2) 味醃の煮切の生成にはいろいろの条件が関与しているが、最も大きいものはアミラーゼによる澱粉の分解作用の強弱である。

(3) 酵素力のある線以下におさえることによって、味醃製造における煮切の生成を防ぐことが可能である。

- (1) 加藤弁三郎：醸学, **3**, 555 (1925).
- (2) 加藤弁三郎：同上, **4**, 18 (1926).
- (3) 加藤弁三郎：同上, **9**, 26, 104 (1931).
- (4) 杉山晋湖：醸試, **106**, 156 (1930).
- (5) 杉山晋湖：同上, **110**, 85 (1930).
- (6) 杉山晋湖：同上, **113**, 114 (1931).
- (7) 杉山晋湖：同上, **115**, 120 (1932).
- (8) 井上 浩ら：醸工, **42**, 503 (1964).
- (9) 徳村治彦ら：愛食試, **4**, 1 (1963).
- (10) 山下 勝ら：同上, **6**, 27 (1965).
- (11) 赤堀四郎ら：実験化学講座, 24巻II, 1958, p. 289.
- (12) 岡崎 浩：本誌, **29**, 181 (1955).
- (13) 布川弥太郎：醸協, **58**, 305 (1963).
- (14) 萩原文二：酵素研究法(赤堀編), 第2巻, p. 108.
- (15) 萩原文二：実験化学講座, 24巻II, p. 282.
- (16) 萩原文二：酵素研究法(赤堀編), 第2巻, p. 240.
- (17) 加藤百一ら：醸協, **47**, K 62 (1952).