The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

〔生物工学会誌 第73巻 第3号 213-223. 1995〕

総合論文

清酒の「ムレ香」に関する研究

（平成6年度 日本生物工学会江田賞受賞）

西 村 顕

白鶴酒造株式会社
〒658 神戸市東灘区住吉南町4-5-5

A Study of Sake *Mureka* —Monograph—

Akira Nishimura (*Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., 4-5-5 Sumiyoshiminami-machi, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658*) Seibutsu-kogaku **73**: 213-223, 1995.

An unfavorable and characteristic smell is often formed in non-pasteurized sake during storage and commercial distribution at room temperature. We named this smell *mureka* and analyzed it by GC and GC-MS together with the use of two newly developed injector systems: a thermal desorption cold trap injector (TCT) and a purge and cold trap injector (PTI) for concentrating volatiles. Three compounds causing *mureka* were isolated from lower volatiles and were identified as *iso*-valeraldehyde (*i*-Val), ethyl *iso*-valerate (EtOVal) and 1,1-diethoxy-3-methylbutane (1,1-DEB) from their GC retention times and mass spectra. Threshold values of these three compounds and their rates of contribution to the intensity and similarity of *mureka* were studied using sensory evaluation methods. The threshold values of *i*-Val, EtOVal and 1,1-DEB in sake were determined to be 1.8, 0.5 and 1.2 ppm, respectively. *i*-Val alone contributed to the intensity, while EtOVal and 1,1-DEB contributed to the similarity of *mureka*. Changes in *mureka* compounds under various storage conditions were measured by the PTI system and GC-MS. The results showed that the compounds were prevented from increasing by ultrafiltration or pasteurization of the sake and that they were repressed during storage at high temperatures of 40°C or 50°C. A clear relationship was observed between a decrease in the *i*-amylalcohol (*i*-AmOH) concentration and an increase in the concentration of *i*-Val, suggesting the existence of a particular enzymatic oxidation pathway converting *i*-AmOH into *i*-Val in non-pasteurized sake. From an experiment in which *i*-Val was added to sake, EtOVal and 1,1-DEB were thought to be formed from *i*-Val by enzymatic and chemical reactions, respectively.

[**Key words:** sake, *mureka*, *iso*-valeraldehyde, volatiles, *koji*]

清酒全体の需要が伸び悩むなかで，新鮮な香味を特徴とする生関連商品（生酒，生貯蔵酒）は確実な広がりを見せている．生酒，生貯蔵酒のもっとも大きな特徴は，香りに代表されるフレッシュな風味である．その特徴を残すため生酒は短期間の貯蔵後，火入れ処理をせずに出荷される．一方，生貯蔵酒は一定期間生で貯蔵した後，火入れ処理を行い出荷される．いずれにせよ生で貯蔵する場合，清酒中の各酵素の酵素活性が残存しており，常温で貯蔵（保存）すると成分の変化に伴う香味などの品質の劣化が起きる．特に，非常に不快な臭いである「ムレ香」やふくらみのない単純な甘みが増加する「甘ダレ」などの劣化が生じると，正常な生酒と比べて明確に品質が劣化していると判別される．[1] その香味の劣化のうち官能的にもっとも重視すべき成分変化は「ムレ香」の発生であり，「ムレ香」の発生を防止することが生酒の品質を安定させる最大の課題であった．

清酒における香味成分の研究のうち，エステルなどの華やかな香り[2] や火入れ貯蔵した清酒の熟成による香味の変化に関する研究は，[3] これまで多数の報告が

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ありその原因などが明らかにされてきた．しかし，生酒の劣化臭である「ムレ香」の研究は少なく，原因なども不明であった．

著者らは，常温流通可能な生酒や生貯蔵酒を開発するにあたり，まず「ムレ香」発生の防止方法の研究[4,5]を行い，すでに実用化し報告した．[6]この「ムレ香」の発生を完全に防止するには，今のところ限外ろ過処理もしくは火入れ処理しかない．

そこで，「ムレ香」の発生機構を解明するとともに，さらなる生酒・生貯蔵酒の品質向上を最終的な目標とし，検討を行った．

「ムレ香」物質の検索と同定[7]

試料の調製　当社通常仕込み酒を用い，Fig. 1 のフローチャートに従って試料を調製した．すなわち，活性炭 500 ppm で処理した生原酒を 3 万分画分子量の限外ろ過処理を行いろ過区分と約100倍に濃縮した濃縮区分に分画後，0.45 μm メンブランフィルターでろ過し 30°C で 1 ヶ月貯蔵する．ろ過区分は「ムレ香」が発生しないので対照とし，濃縮区分は「ムレ香」が非常に強く発生するので「ムレ香」酒として分析用試料とした．

香気成分の分析　低沸点成分の検索と同定に使用したサーマルデソープション・コールドトラップ・インジェクター（TCT 装置：Chrompack 社製）の装置図を Fig. 2 に示す．この TCT 装置で注入し GC (5980A), GC-MS system (HP5970B) で分析したガスクロマトグラムを Fig. 3 に示した．対照 (A) に少なく，「ムレ香」酒 (B) で極端に増加している物質が 3 つ認められ，それぞれを *iso*-valeraldehyde（ピーク 1：以下 *i*-Val と表記），ethyl *iso*-valerate（ピーク 2：以下 EtOVal と表記），1,1-diethoxy-3-methylbutane（ピーク 3：以下 1,1-DEB と表記）と同定した．このうち 1,1-DEB はウイスキー，ブランデー中での存在が報告[8-10]されているが，清酒における報告例はなく，今回初めて認められたものである．その質量分析の結果を Fig. 4 に示す．常法[11]に従い合成した標品との一

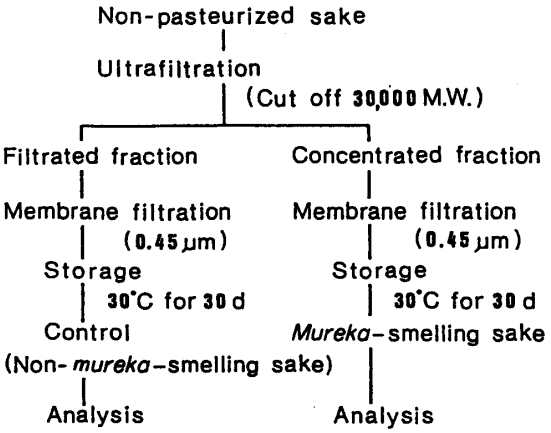


Fig. 1. Preparation of sake sample for *mureka* analysis.

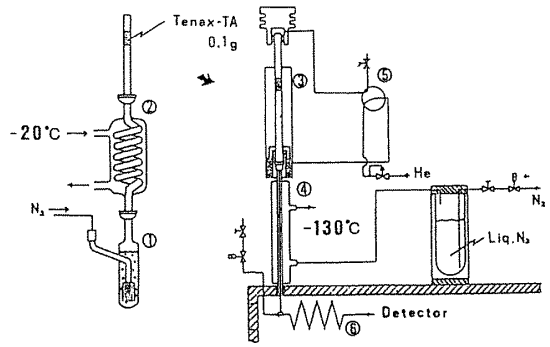


Fig. 2. Schematic diagram of thermal desorption cold trap injector (TCT) system. 1, Purge flask; 2, condenser; 3, heating block; 4, cold trap: trapping column OV-1 (0.32 mmφ); 5, switching valve; 6, capillary column.

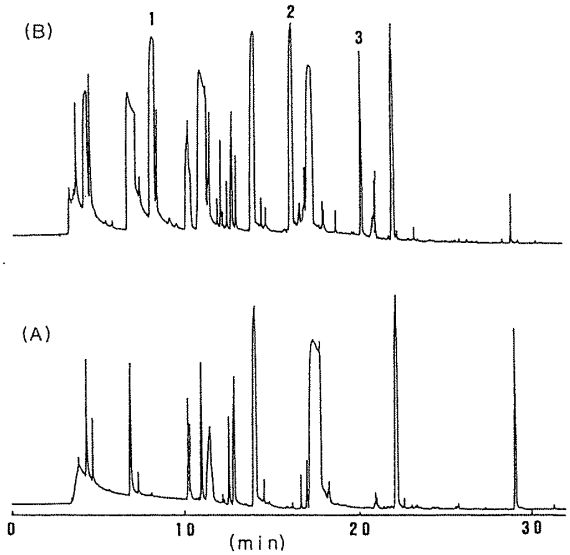


Fig. 3. Total ion chromatogram of volatiles obtained by TCT and GC-MS systems from the control (A) and *mureka*-smelling sake (B). Conditions of TCT systems: purge N_2 flow rate, 5 ml/min; purge time, 30 min; Tenax-TA desorption temperature, 200°C; cold trapping temperature, −130°C (10 min hold) to 200°C. Conditions of GC: column, 50 m × 0.2 mmφ Ultra2 (HP) capillary column; column temperature, 50°C (6 min hold) to 220°C at 10°C/min; injector temperature, 250°C; carrier He pressure, 170 Kpa.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

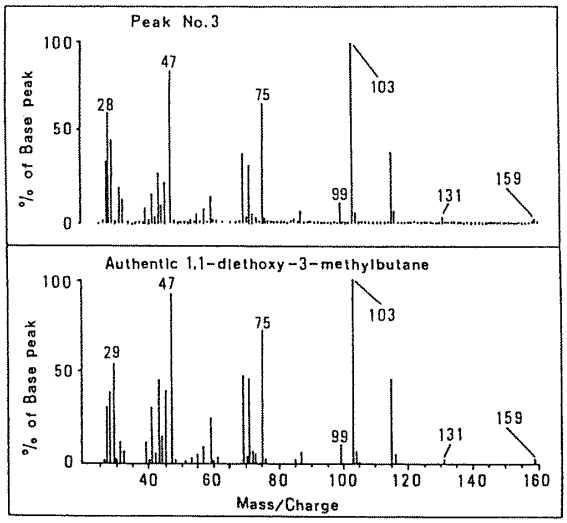


Fig. 4. Mass spectra of Peak No. 3 and authentic 1, 1-diethoxy-3-methylbutane by HP5970B GC-MS system.

致度は95%であり，この物質が1,1-DEBであることを確認した．

GC—匂い嗅ぎ分析(GC Sniffing) ピークを確認するために，特別に訓練したパネラー3名によりGC—匂い嗅ぎ分析を行った．*i*-Valのピーク（ピーク1）を全員が「ムレ香」と，EtOValのピーク（ピーク2）を2名が「甘いムレ香様の香り」と指摘した．1,1-DEBのピーク（ピーク3）についてはパネラーによる指摘はなかったが，この1,1-DEBはコニャック様の香り[10]をもち「ムレ香」に一種の複雑性を付与

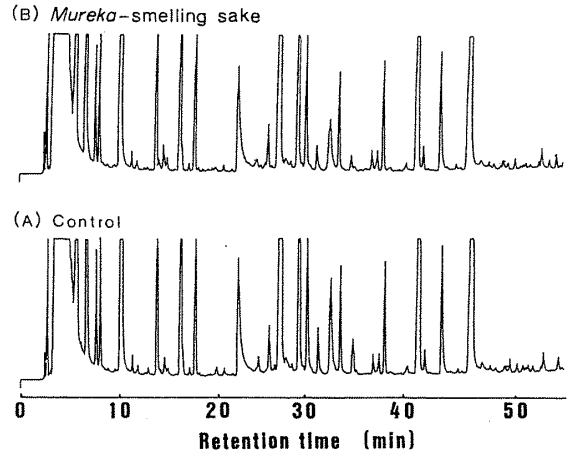


Fig. 5. Gas chromatogram of the CH_2Cl_2 extract from control (A) and *mureka*-smelling sake (B). Conditions: column, 30 m×0.53 mmφ DBWAX (J&W) capillary column; column temperature, 70 to 210°C at 2°C/min with He flow of 2.5 ml/min; injection temperature, 230°C; detector temperature, 230°C.

しているものと考えられた．

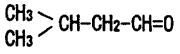
中高沸点成分の検索 秋田らの方法[12]に従って，中高沸点物質を抽出し分析した結果をFig. 5に示す．低沸点物質の分析結果とは異なり，対照(A)と比較して「ムレ香」酒(B)で極端に増加した成分は無く，両者のクロマトグラムにはほとんど差が認められなかった．したがって「ムレ香」に関与する物質は中高沸点成分にないと考えられる．

「ムレ香」物質の官能評価[13]

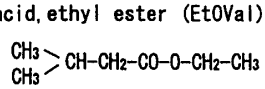
生酒に特有な劣化臭である「ムレ香」は，Fig. 6に示した3物質，すなわち*i*-Val, EtOVal, 1,1-DEBの複合香だと考えられる．これら3物質のうち*i*-Val, EtOValはほとんどすべての醸造産物において確認されている物質である．[14–22]また，1,1-DEBは，ウイスキー，ブランデーなどの蒸留酒中に含まれると報告されている．そこで，これら「ムレ香」3物質の閾値，およびそれぞれの「ムレ香」に対する官能的寄与について検討した．

閾値の測定 「ムレ香」を鋭敏に感じ，日常のきき酒において，これを指摘することができる酒造技術者7名を被験者として極限法[23]によりエタノール水溶液中では上立香のみを，生酒中では上立香および口中香（含み香）での各物質の閾値を測定した．その結果をTable 1に示した．*i*-Valの閾値は，エタノール水溶液中では0.04 ppm(上立香)であったのに対し，酒中では1.7 ppm（上立香）と約40倍の値を示した．この差は主として酒中の他の香気成分による*i*-Valに対するマスキング効果によるものと考えられる．口中香の識別においてはさらに顕著に作用し，酒中における*i*-Valの口中香としての閾値は2.4 ppmであった．このように共存する他の溶質の影響の他に溶媒の組成の違いも*i*-Valの閾値に影響を及ぼすと考えられる．この点については水中における*i*-Valの閾値が0.15～12 ppbと報告されていることからも明らかであり官

1. *iso*-Valeraldehyde (*i*-Val)



2. *iso*-Valeric acid, ethyl ester (EtOVal)



3. 1, 1-Diethoxy-3-methylbutane (1, 1-DEB)

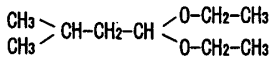


Fig. 6. Compounds of *mureka*.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 1. Olfactory threshold values of *mureka* compounds obtained by the limits method.

Compound	Sniffing in EtOH	Sniffing in sake	Tasting in sake
i-Val	0.04	1.8	2.4
EtOVal	0.03	0.5	0.6
1,1-DEB	0.6	1.2	1.2

Threshold values are expressed as parts per 10^6 (ppm) of EtOH [15%(v/v)] or sake.

能検査時に留意すべき点である．EtOVal の閾値は，エタノール水溶液中で 0.03 ppm（上立香），酒中では 0.5 ppm（上立香）で，その差は *i*-Val の場合ほど大きくなかった．また口中香としての閾値は 0.6 ppm で上立香とほぼ等しかった．同じ傾向が 1,1-DEB に関しても認められ，その閾値はエタノール水溶液中で 0.4 ppm（上立香），酒中で 1.2 ppm（上立香），口中香としての閾値も 1.2 ppm となった．

以上より EtOVal, 1,1-DEB は *i*-Val に比べ他の香気成分によるマスキング効果を受けにくいことを示しており興味深い．閾値の確認はエタノール水溶液および酒に「ムレ香」3 物質をそれぞれ測定した閾値濃度になるように添加した試料と，無添加の試料について 3 点比較法[23]により上立香での判別試験を行った．その結果，3 物質とも 1 %以下の危険率で添加による差が認められ，被験者が判別能力を有することが確認できた．

「ムレ香」の強さ，らしさへの 3 物質の寄与　「ムレ香」酒に同定した 3 物質が多いこと，および複合香に関する知見が少ないことから，これら 3 物質がどのように「ムレ香」の官能に寄与しているかを検討した．各物質の濃度を *i*-Val (1, 2, 3 ppm), EtOVal (10, 20, 30 ppb), 1,1-DEB (10, 20, 30 ppb) のそれぞれ 3 段階に設定し計27点の試料系列を調整した．この試料系列について，「ムレ香」の強さ，らしさを官能的に評価し，評価結果について「ムレ香」3 物質を因子とする 3 元配置分散分析を行った．分散分析表 (Table 2) から「ムレ香」の強さには *i*-Val が単独で強く寄与していることがわかった．「ムレ香」らしさについては被験者の誤差が大きく，各物質の寄与を明確に示すことができなかった．この理由としては，試料数が多すぎ複雑であったこと，「ムレ香」の強さの主体である *i*-Val の影響が大きいことが考えられた．

そこで EtOVal, 1,1-DEB の 2 成分が「ムレ香」らしさに寄与するのかどうかを調べるために，*i*-Val の他に 2 成分を添加した試料酒と，しなかったものを比較した．試料および評点を Table 3 に示した．この結果を用いて，対応のある平均値の差の検定を行ったところ，*i*-Val の濃度 1 ppm および 3 ppm の場合は危険率 1 %以下，2 ppm の場合は危険率 5 %以下で *i*-Val の他に 2 成分を添加したほうが有為に「ムレ香」らしいと判断された．よって EtOVal, 1,1-DEB は *i*-Val と共存することで，より「ムレ香」らしさを付与する物質といえる．これら 2 物質は「ムレ香」が発生している酒中にも閾値に満たない濃度しか存在せず，今回の官能試験も酒中の値に準じて行ったが，閾値以下でも「ムレ香」らしさに寄与していることが明らかになったことは酒中の微量香気成分の官能的役割の複雑さを示すものであり，今後の研究が期待される．

Table 2. Rates of contribution to *mureka* characteristics by three-dimensional analysis of variance (two replications).

Source	Intensity	Similarity
i-Val (α)	60.4 (%)	44.4 (%)
EtOVal (β)	4.5	3.1
1,1-DEB (γ)	0.3	0.8
$\alpha\beta$	1.3	1.0
$\beta\gamma$	0.0	−0.1
$\gamma\alpha$	−0.3	−0.5
$\alpha\beta\gamma$	0.6	0.1
Residual	33.2	51.2

Concentrations of *i*-Val, EtOVal and 1,1-DEB were adjusted to 1, 2, 3 ppm, 10, 20, 30 ppb and 10, 20, 30 ppb, respectively.

Sensory evalutions for these 27 samples were performed by the 5-point method.

「ムレ香」の他に生酒の劣化臭として「生老香」という表現が用いられることがあるが，大阪国税局鑑定官室によれば[24]「生老香」は色の濃さ，味の多さ，老香の強さなど通常の清酒としての劣化を表わす官能検査項目と相関が高いのに対し，「ムレ香」は各項目との間にほとんど相関がない．これは，同じ *i*-Val を主体とする香りに対して，「ムレ香」は本研究で同定した 3 物質の複合香を表現するきき酒用語であり，「生老香」は老香[25]の存在する複合香を表現するきき酒用語と考えている．

定量方法の検討[7]

清酒中の香気成分を分析する方法としてヘッドス

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 3. Sensory evaluation of *mureka* similarity in sake samples with added *mureka* compounds.

i-Val conc. EtOVal, 1,1-DEB addition		1 (ppm)		2 (ppm)		3 (ppm)	
		−	+	−	+	−	+
Panel	a	4	3	2	3	3	2
	b	5	2	4	1	4	1
	c	4	2	4	2	4	2
	d	5	3	4	2	4	2
	e	4	3	3	1	2	1
	f	4	3	4	3	2	1
Mean		4.33	2.67	3.50	2.00	3.17	1.50
δ		0.47	0.47	0.76	0.82	0.90	0.50

Similarity: 1 (similar)−5 (not similar).

ペース法[26]が用いられてきたが，感度的に問題がありエタノールなどの多量成分の影響を受け微量成分の測定は困難であった．また，清酒中のアルデヒドについては高橋らがカルボニル化合物をDNPS化してGCに注入する定量法を報告[27]しているが，*i*-Valを直接定量した報告例はない．そこで，*i*-Valを主体とする「ムレ香」物質を直接分析し，感度の高い定量法について検討した．

各物質濃度とピーク面積との関係　Fig. 7に示したパージアンドコールドトラップ・インジェクター（PTI装置：Chrompack社製）および内部標準法（内部標準物質：methyl *n*-caproate）を用いGC, GC-MS systemのSelected Ion Monitoring (SIM) modeで分析した．*i*-Val, EtOVal, 1,1-DEBの3物質を定量したときの各物質の濃度とピーク面積との関係をFig. 8に示した．3物質とも濃度とピーク面積には良好な直線関係が得られ，この方法で定量が可能であることが判明した．

検量線の作成　各物質を所定の濃度になるように添加した20% (v/v) エタノール溶液を用いて作成した検量線をFig. 9に示した．各物質とも良好な直線関係が得られた．特に，EtOVal, 1,1-DEBはppbのオーダーで定量可能であり感度の良い定量法であった．

添加回収試験　3物質をほとんど含まない原酒に各物質を所定濃度添加し定量した結果をFig. 10に示す．3物質とも良好な直線関係が得られ，それぞれの回収率を求めたところ*i*-Val 99%, EtOVal 88%, 1,1-DEB 87%であった．

再現性　同一試料を繰り返し分析し，本定量法の再現性を調べた結果をTable 4に示す．3物質とも非常に高い再現性が得られ，定量方法としてほぼ満足できる精度を示した．

以上の結果より，今回設定した定量法を用いることにより今まで測定が困難であった清酒中の微量成分をppbオーダーで定量することが可能となった．

「ムレ香」物質の貯蔵中の変化[28]

「ムレ香」3物質の清酒中での濃度を経時的に測定し，保存日数あるいは保存温度が3物質の生成におよぼす影響について検討した．

酒中における3物質の経時変化　それぞれ20°Cに貯蔵した，生酒，火入れ酒，UF処理酒，およびUF濃縮酒の4種類の清酒中で「ムレ香」3物質を経時的に測定した結果をFig. 11に示した．各物質ともに火入れ酒，UF処理酒では増加は認められず，また官能的にも「ムレ香」は感じられず，火入れ，UF処

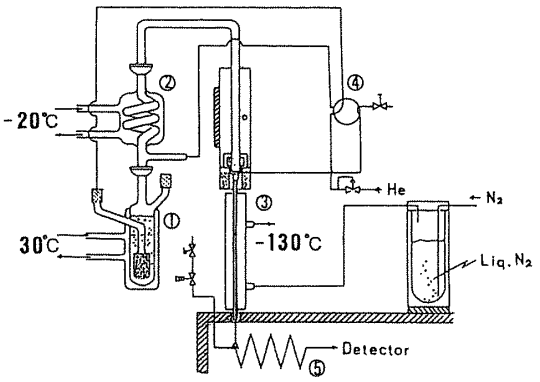


Fig. 7. Schematic diagram of purge and cold trap injector (PTI) system. 1, Purge flask; 2, condenser; 3, coldtrap; trapping column OV-1 (0.32 mmϕ); 4, switching valve; 5, capillary column.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

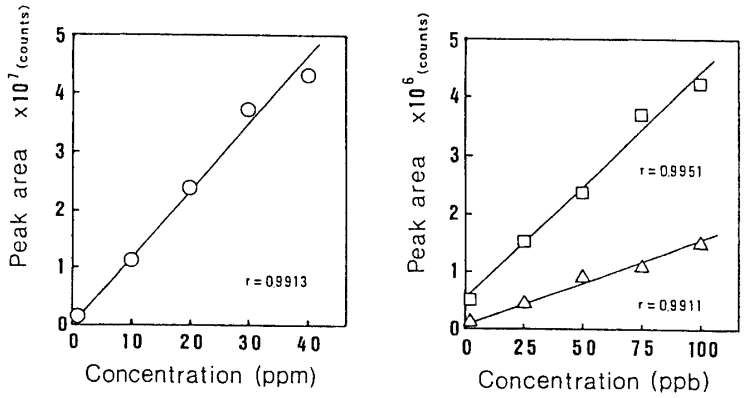


Fig. 8. Relation between concentration of 3 compounds and peak area by PTI and GC-MS systems. Conditions of PTI system: purge He flow rate, 5 ml/min; purge time, 10 min; cold trapping column, OV-1 (0.33 mmφ). Conditions of GC-MS system: column, 50 m × 0.2 mmφ Ultra2 (HP) capillary column; column temperature, 50°C (6 min hold) to 220°C at 10°C/min; injector temperature, 250°C; carrier He pressure, 170 Kpa; mode, SIM. Symbols: ○, *i*-Val; △, EtOVal; □, 1,1-DEB.

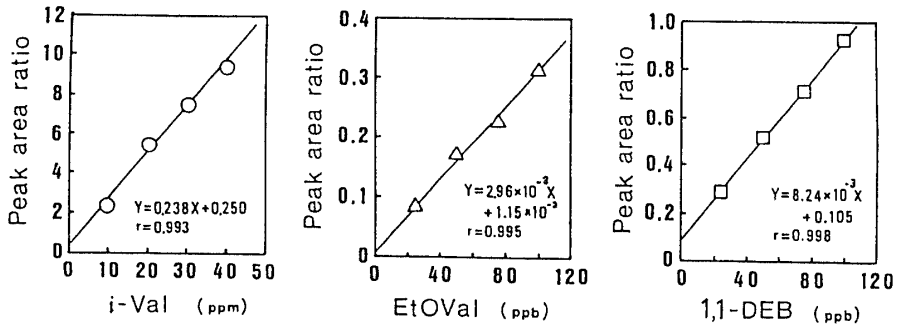


Fig. 9. Standard curves of *i*-Val, EtOVal and 1,1-DEB by PTI and GC-MS systems. Standard solutions contained 1.0ppm of the internal standard (methyl *n*-caproate). The conditions of the PTI and GC-MS systems and the symbols are the same as in Fig. 8.

理による「ムレ香」発生の抑制効果を確認した.

これに対しUF濃縮酒，および未処理の生酒中では3物質ともに増加し，官能的にも「ムレ香」の発生が確認された.「ムレ香」の主体である*i*-Valは生酒中で20日間保存後に，清酒中の閾値である1.8 ppmに達し，その後も増加を続けた. UF濃縮酒中では*i*-Valは20日後に生酒中の約4倍の6.9 ppmに達した.

他の2物質(EtOVal, 1,1-DEB)も，UF濃縮酒中に

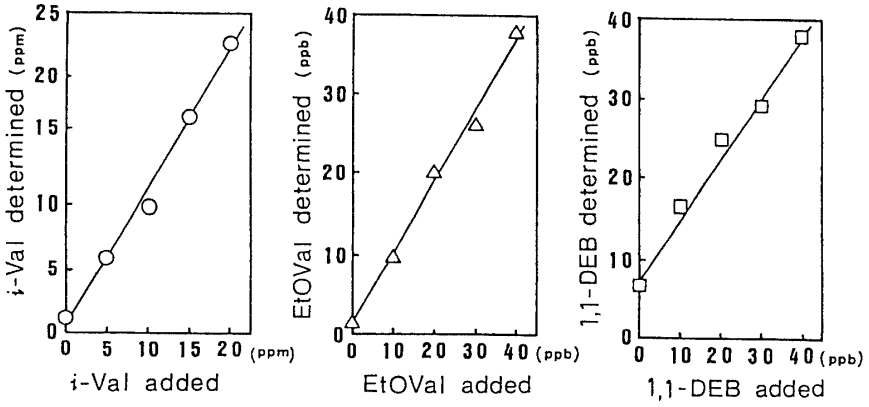


Fig. 10. Quantitative determination of *i*-Val, EtOVal and 1,1-DEB in sake by PTI and GC-MS systems. The conditions of the PTI and GC-MS systems and the symbols are the same as in Fig. 8.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 4. Reproducibility of *i*-Val, EtOVal and 1,1-DEB determination in sake by PTI and GC-MS systems.

Run	*i*-Val (ppm)	EtOVal (ppb)	1,1-DEB (ppb)
1	5.52	13.6	41.7
2	5.22	12.2	42.3
3	5.96	12.2	37.0
4	5.12	11.9	37.7
$\bar{X}$*	5.46	12.5	39.7
S**	0.377	0.763	2.711
C.V. (%)***	6.9	6.1	6.8

Samples for analysis were UF-concentrated fractions stored for 10 d at 30°C.

The conditions of the PTI and GC-MS systems are the same as in Fig. 8.

*Average, **Standard deviation, ***C.V. = S/$\bar{X}$ × 100.

おいて顕著な増加が認められた．すなわち20日間保存後でUF濃縮酒中と生酒中での濃度を比較すると，EtOValはUF濃縮酒中で170 ppb, 生酒中で19 ppbと約9倍，1,1-DEBはそれぞれ225 ppbと14 ppbで約16倍の差が認められ，UF処理による「ムレ香」発生因子の濃縮が示唆された．

各温度における「ムレ香」3物質の経時変化 「ムレ香」3物質がもっとも顕著に増加したUF濃縮酒を用いて0, 10, 20, 30, 40, 50°Cの各温度における「ムレ香」3物質の経時変化を測定し，結果をFig. 12に示した．3物質ともに0°Cではほとんど増加せず，10, 20, 30°Cにおいて顕著に増加した．また40, 50°CではI-Val, 1,1-DEBはわずかに増加したがEtOValはほとんど増加しなかった．このことから3物質の増加は保存温度に強く依存していることが明らかである．

そこで温度を横軸にとって3物質の挙動をFig. 13に示した．*i*-Valは10日間保存の場合には30°C付近にその増加のピークが認められたが，保存日数が増すごとにピーク位置が低温側へシフトし，40日間保存の場合には20°C付近となった．EtOValも*i*-Valと同様の傾向を示し，10日間保存では20°C付近であった増加のピークが40日間保存では10°C付近となった．

1,1-DEBは*i*-Val, EtOValとは異なり，保存日数によるピークの移動は見られず各保存日数とともに増加のピークは15°C付近であった．

i-Val, EtOValの増加のピークが保存日数とともに低温側へシフトすることは，Fig. 12からも明らかなように，*i*-Valでは30°C以上，EtOValでは20°C以上の条件において，保存日数が増すとともに増加速度が鈍っていくことを示すものであり，これらの生成には温度による失活を伴う酵素反応が関与していることが考えられた．

「ムレ香」物質生成機構の推定[28]

i-Valを添加した時の「ムレ香」3物質の経時変化 EtOVal, 1,1-DEBは，その構造式から，ともに*i*-Valを前駆体として，Fig. 14に示すような経路によって生成すると考えられる．したがって，EtOVal, 1,1-

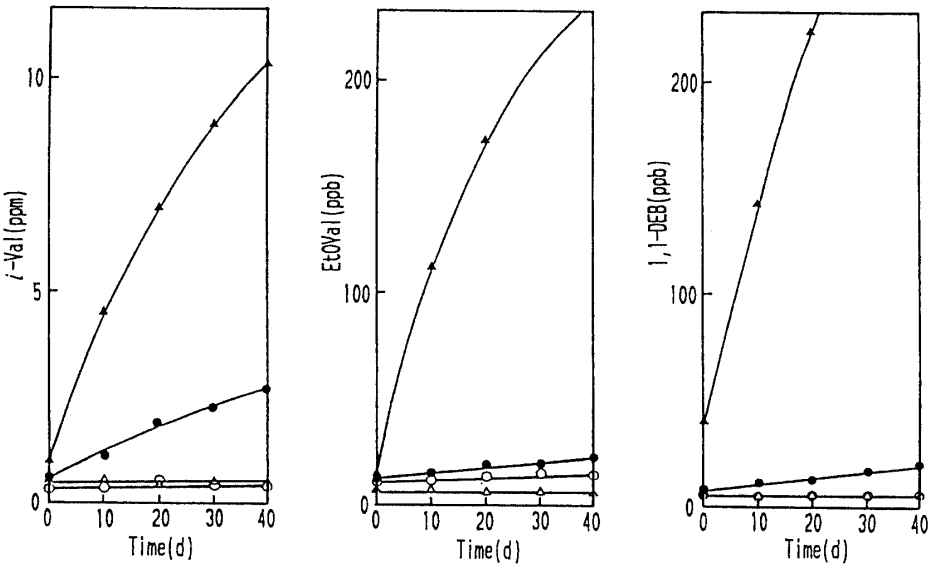


Fig. 11. Formation of *mureka* compounds in sake. Each sake was stored at a constant 20°C. Symbols: ○, UF-treated sake; ●, non-pasteurized sake; △, pasteurized sake; ▲, UF-concentrated sake.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

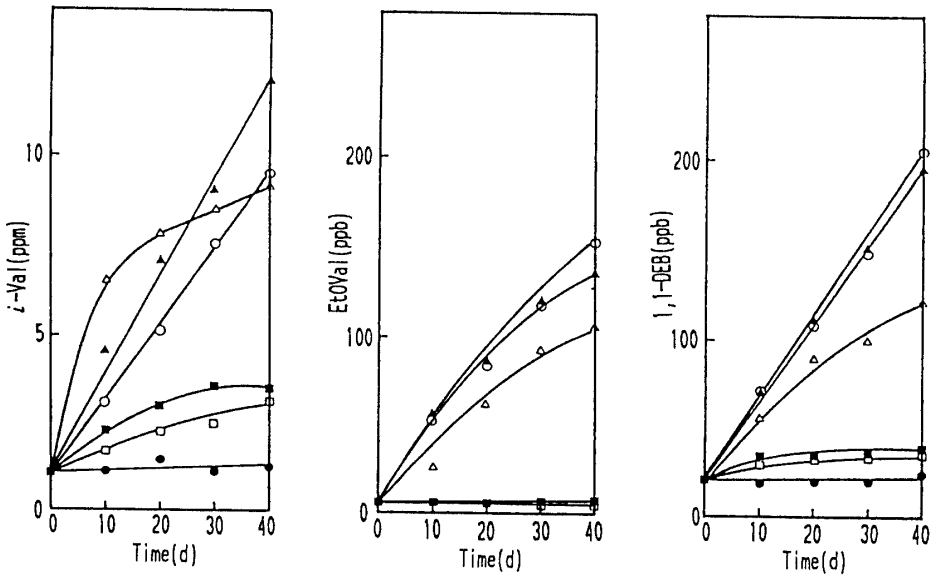


Fig. 12. Formation of *mureka* compounds in UF-concentrated sake at each temperature. Symbols: ●, 0°C; ○, 10°C; ▲, 20°C; △, 30°C; ■, 40°C; □, 50°C.

DEB が 0, 40, 50°C で増加が見られなかったのは温度による影響のみに限定できず，EtOVal, 1,1-DEB の前駆体であると考えられる *i*-Val の濃度が 0, 40, 50°C では低レベルであることによるものと考えられる．そこで，UF 濃縮酒に *i*-Val を 20 ppm 添加して各温度で保存し，40日後の 3 物質の濃度を測定した結果は Fig. 15 に示すように，*i*-Val は添加量に相当する分が無添加の場合に積算された値を示した．

また EtOVal については，*i*-Val を添加した系においても各温度で *i*-Val 添加の効果は見られたものの，無添加の系と同様の温度による影響を受ける傾向がみられ，0, 40, 50°C ではその増加は抑制され，その生成には酵素反応が関与しているものと考えられた．

一方，1,1-DEB は 0°C では *i*-Val 添加，無添加とも増加しなかったが，40, 50°C でも *i*-Val を添加したものについては増加が見られた．また，*i*-Val を添加して保存した火入れ酒中では EtOVal の生成は見られなかったが，1,1-DEB は UF 濃縮酒中と同様に増加が見られた．これらのことより，1,1-DEB の増加は，酒類中の他のアセタールの生成と同様,[9,10] 化学反応によ

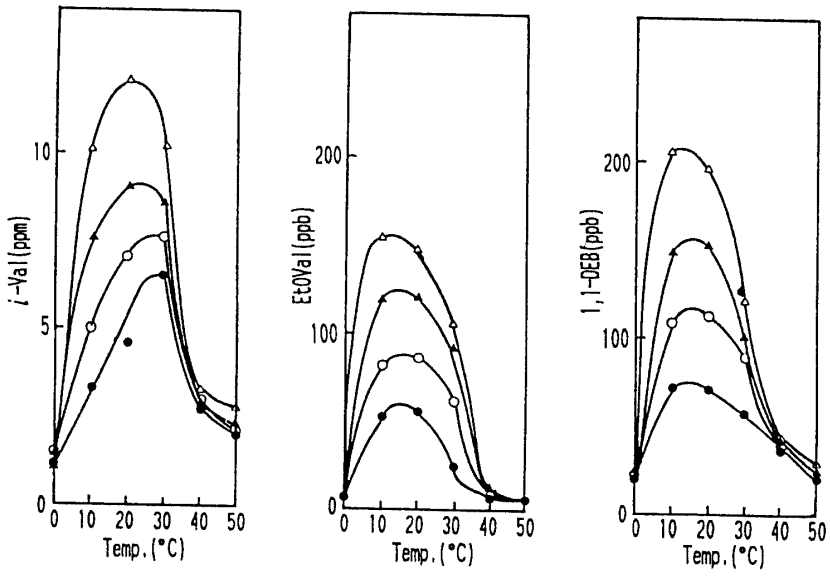


Fig. 13. Formation of *mureka* compounds in UF-concentrated sake during storage for various periods. Symbols: ●, 10 d; ○, 20 d; ▲, 30 d; △, 40 d.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

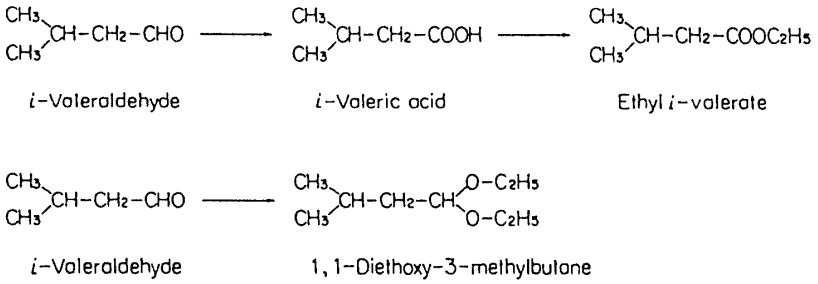


Fig. 14. Presumed schemes of EtOVal and 1,1-DEB formation.

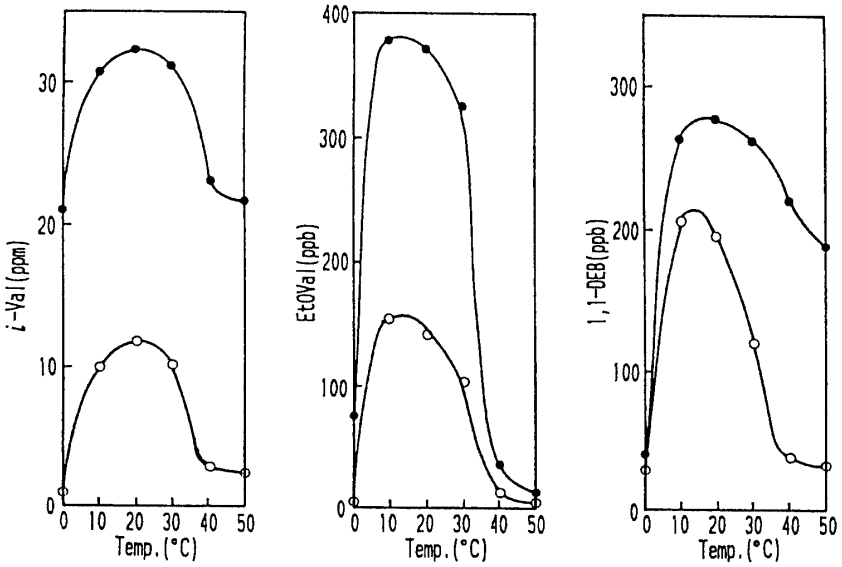


Fig. 15. Effect of *i*-Val addition on formation of *mureka* compounds. 20 ppm of *i*-Val was added to UF-concentrated sake stored for 40 d at different temperatures. Symbols: ●, *i*-Val added; ○, *i*-Val not added.

るものと推察された.

i-Val 生成経路の推測 「ムレ香」3物質のうち他の2物質の前駆体と考えられ，かつ，官能的にもっとも「ムレ香」に寄与している *i*-Val の清酒中での生成経路については，①清酒中に100～200 ppm 程度含まれるイソアミルアルコール (*i*-AmOH)[29] が酸化され *i*-Val が生成する．②ポリフェノールが酸化され[30] キノンが生成し，このキノンとロイシンの反応生成物が Strecker 分解することにより *i*-Val が生成する．あるいは，③ロイシンからケト酸を経て *i*-Val が生成する Krebs のアミノ酸代謝経路の3経路が考えられる．②，③についてはポリフェノールがあるカテコールとロイシン，またはロイシンのみを UF 濃縮酒に添加して *i*-Val の生成を調べたが，Table 5 に示すように，無添加の対照区との間に差が認められず，清酒中での *i*-Val 生成に関してこれらの経路は否定された．一方，

Table 5. Effect of leucine and catechol addition on *i*-Val formation.

	Initial	After storage (30°C, 40 d)		
		Control	+Leu.	+Leu. +Cat.
UF-concentrated sake	1.8 ppm	9.5 ppm	9.4 ppm	10.6 ppm
Non-pasteurized sake	1.2	3.6	3.4	3.3
UF-treated sake	0.7	0.9	1.0	1.0

+Leu.: Leucine was added at 1,000 ppm to each sake.
+Cat.: Catechol was added at 1,000 ppm to each sake.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

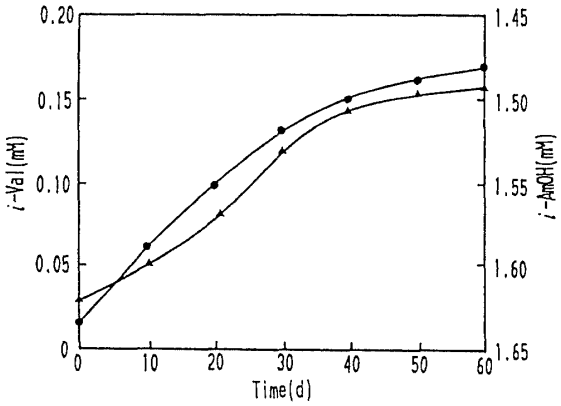


Fig. 16. Relationship between increase of *i*-Val and decrease of *i*-AmOH in UF-concentrated sake. UF-concentrated sake was stored at 30°C. Symbols: ●, *i*-Val; ▲, *i*-AmOH.

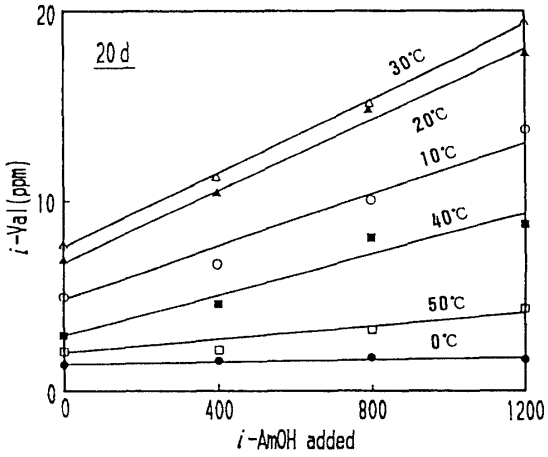


Fig. 17. Effect of *i*-AmOH addition on *i*-Val formation. *i*-AmOH was added to UF-concentrated sake stored for 20 d at different temperatures. Symbols: ●, 0°C; ○, 10°C; ▲, 20°C; △, 30°C; ■, 40°C; □, 50°C.

Fig. 16 に示すように UF 濃縮酒を 30°C で保存した場合，*i*-AmOH と *i*-Val との濃度の変化，すなわち，*i*-AmOH の減少と *i*-Val の増加とは，モル濃度で正の相関を示しており，①の経路，つまり *i*-AmOH が酸化されることによって *i*-Val が生成されると推定した．

そこで UF 濃縮酒に *i*-AmOH を 0～1,200 ppm 適宜添加し，0～50°C の 10°C 刻みの各温度で保存して *i*-Val の濃度を測定した結果，Fig. 17 に示したとおり，0°C ではほとんど *i*-Val の増加は見られなかったが，10～50°C では *i*-AmOH の添加量に応じてほぼ直線的に *i*-Val が増加しており，生酒の保存中の *i*-Val の生成は *i*-AmOH が前駆物質になっていることが確認された．

以上の結果より，「ムレ香」の主体をなす *i*-Val は①の経路，つまり清酒中の *i*-AmOH が酵素的酸化反応により生成してくるものと推定された．

i-Val 生成酵素の由来　*i*-Val 生成酵素が清酒醸造に関与している微生物，つまり清酒酵母と麹のいずれに由来するかを検討した．[31] その試料調整フローを Fig. 18 に示した．酵母は醪中より分離した菌体の cell free 液を *i*-AmOH を含む緩衝液に添加し，また麹菌は麹より単離した菌を用い無菌的に再び麹を造り，その麹を緩衝液に添加し，それぞれ生成する *i*-Val 量を測定した．

その結果を，Table 6 に示す．酵母を添加した系ではまったく *i*-Val は生成しないが，麹菌を添加した系では *i*-Val の生成が認められ，*i*-Val 生成酵素が麹菌由来であることが明らかになった．

「ムレ香」生成経路　生酒の劣化臭である「ムレ香」の主体をなす *i*-Val は，清酒中の *i*-AmOH を前駆体とし，麹菌由来の酵素により生成する．さらに「ムレ香」に，よりらしさを付与する EtOVal, 1,1-DEB は Fig. 14 に示したように，*i*-Val を前駆体として酵素反応あるいは化学反応により生成することが推定され

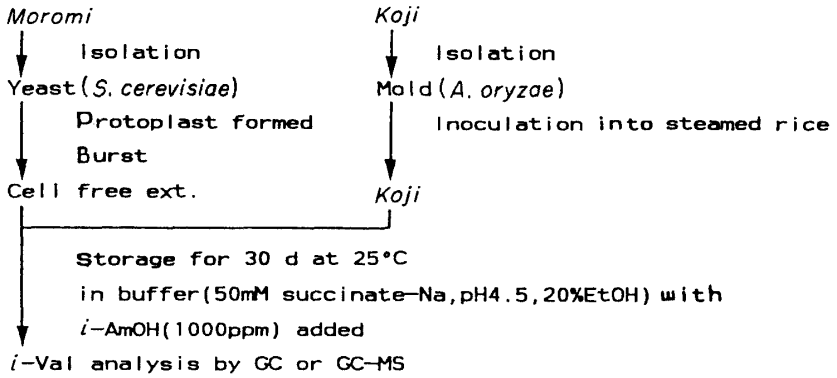


Fig. 18. Scheme for measuring the enzyme activity of sake-making organisms.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 6. Formation of *i*-Val by a yeast and a mold.

	i-AmOH addition	*i*-Val formation
Control	+	0.0 (ppm)
S. cerevisiae	−	0.0
	+	0.0
A. oryzae	−	0.0
	+	1.9

i-AmOH was added at 1,000 ppm.
The *i*-Val concentration was measured after storage for 30 d at 25°C.

た.

伊藤は，製麹において酸素濃度不足になると考えられる仲仕事時に，麹が *i*-Val を多量に放出すると報告している.[32] このことは，麹菌がどのような機構で「ムレ香」生成酵素を生産するかはいまだ不明であるが，製麹条件が「ムレ香」生成能の差に関与している可能性を示しており興味深い.

おわりに

生酒・生貯蔵酒の商品開発に始まる本研究は，それらの品質向上を目的として実施してきたものである. 限外ろ過処理という新技術の導入から基礎的な香りの研究を経て，清酒醸造ではもっとも重要でありながらもっとも神秘的な麹へとたどり着いたことは，さらなる新技術開発へと結び付くものと信じている. この一連の研究成果は，すぐれた品質の生酒・生貯蔵酒を市場に送り出すことを可能とし業界の発展に役立ったものと考えている.

しかし，「ムレ香」発生を防止する方法である限外ろ過処理法は，いまだ一部の企業にしか導入されておらず，より簡便で安価な防止法の開発という課題が残されている.「ムレ香」生成酵素の活性測定法が確立されるなど[33] 本研究がさらに進み酵素の性質や生成条件などが明らかになれば，「ムレ香」生成酵素を生産しない麹菌の開発や製麹条件を見いだすことも可能である. それらが実現すれば課題も解決され，清酒業界がよりいっそう発展する日もそう遠くないと考えている.

本研究の遂行に際し，終始ご懇篤なるご助言を賜りました故竹村成三博士に厚く御礼申し上げます.
また，本研究に協力していただいた多くの共同研究者の方々に深謝いたします.

文献

1) 近藤恭一，草間 透，中沢英五郎，竹村成三：醸協，**78**, 303–305 (1983).
2) 吉沢 淑：醸協，**75**, 451–457 (1980).
3) 高橋康次郎：醸協，**72**, 839–844 (1977).
4) 近藤恭一，草間 透，中沢英五郎，竹村成三：醸協，**78**, 303–305 (1983).
5) 近藤恭一，大場俊輝，中村欽一：醸協，**79**, 267–270 (1984).
6) 西村 顕：醸協，**84**, 583–587 (1989).
7) 西村 顕，近藤恭一，中沢英五郎，三島秀夫，竹村成三：醗酵工学，**67**, 237–244 (1989).
8) Schaefer, I. and Timer, R.: *J. Food Sci.*, **35**, 10–12 (1970).
9) 増田正裕，杉林勝男：醸協，**75**, 480–484 (1980).
10) 西村驥一：醸協，**75**, 485–491 (1980).
11) 日本化学会編：新実験化学講座，有機化合物の合成と反応〔I〕, p. 611–631 (1985).
12) 秋田 修，蓮尾徹夫，宮野信之，吉沢 淑：醸協，**82**, 369–374 (1987).
13) 西村 顕，元吉 徹，近藤恭一，中沢英五郎，三島秀夫，竹村成三：醸協，**85**, 576–579 (1990).
14) 横塚 保：農化，**27**, 359–363 (1953).
15) 山本銀三，嘉納成三，菅間誠之助：農化，**27**, 114–117 (1953).
16) 上野喬宏，延原明男：農化，**34**, 229–233 (1960).
17) 佐々木喜代：農化，**38**, 309–313 (1964).
18) 吉川光一，奥村幸正，寺本四郎：醗酵工学，**41**, 357–363 (1963).
19) 高橋康次郎，大場俊輝，佐藤 信：醸協，**71**, 799–802 (1976).
20) 季 孔培，菅間誠之助：醸協，**64**, 836–837 (1969).
21) 高橋康次郎：醸協，**62**, 173–175 (1967).
22) Kahn, J. H.: *J. of the AOAC*, **52**, 1166–1178 (1970).
23) 日科技連官能検査委員会編：新版官能検査ハンドブック，p. 398, p. 252, 日科技連 (1973).
24) 山本奈美，筒井謙之，白上公久，斎藤富男：醸協，**83**, 775–777 (1988).
25) Takahashi, K., Tadenuma, M. and Sato, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 325–330 (1976).
26) 西谷尚道：醸協，**78**, 275–278 (1983).
27) 高橋康次郎，大場俊輝，佐藤 信：醸協，**71**, 799–802 (1976).
28) 元吉 徹，西村 顕，近藤恭一，中沢英五郎，三島秀夫，竹村成三：醗酵工学，**69**, 1–6 (1991).
29) 日本醸造協会：醸造成分一覧，p. 88–98 (1977).
30) 大塚謙一，吉沢 淑，原 昌道，吉本謙二郎，大脇京子：醗酵工学，**43**, 881–888 (1965).
31) 元吉 徹，西村 顕，近藤恭一，中沢英五郎，三島秀夫，竹村成三：平成2年度日本醗酵工学会大会要旨集，p. 97 (1990).
32) 伊藤 清：生物工学，**71**, 115–127 (1993).
33) 西村 顕，武内素子，近藤恭一，三島秀夫，竹村成三：醸協，**90**, 151–153 (1995).

NII-Electronic Library Service