

[J. Ferment. Technol., Vol. 52, No. 5, p 328~334, 1974]

醤油の火入れ¹⁾発酵機構*

橋本 彦堯・横塚 保

キッコーマン醤油株式会社中央研究所

Mechanisms of Sediment Formation during
the Heating of Raw *Shoyu* (Soy Sauce)*

Hikotaka Hashimoto and Tamotsu Yokotsuka

Central Research Laboratories, Kikkoman Shoyu Co., Ltd., Noda-shi, Chiba

The filtrate of aged shoyu mash (raw *shoyu*) is heated in order to stop the greater part of microbial and enzymatic reactions. After this treatment a sediment, mainly composed of protein, is gradually formed.

The time required for forming the sediment was largely influenced by the temperature of heating; heating at 70 to 75°C, but not below 60 or above 80°C, delayed sediment formation. Protease which still remained in raw *shoyu* was very unstable at 70°C below pH 4.8, and at 75°C above pH 4.8. However, by heating above 75°C a part of the activity became stable again, showing that raw *shoyu* contained a thermostable protease.

The addition of three kinds of proteases (i.e., alkaline protease, neutral protease I, and neutral protease II) purified from raw *shoyu* greatly reduced the time of sediment formation. This sediment forming activity of alkaline and neutral proteases disappeared on addition of potato inhibitor or EDTA.

When raw *shoyu* was rapidly heated to 85°C for 30 min after the addition of EDTA at a final concentration of 3×10^{-3} M, then cooled to 60°C for 3 days, no sedimentation occurred. The experimental findings concerning the prevention of the sediment formation could be reasonably explained by mechanisms in which chelator sensitive proteases and other thermolabile proteases affecting the sediment formation in raw *shoyu* were inactivated by the treatment with EDTA and the heating, respectively.

It is concluded that the proteases, especially a thermostable one, which originate *shoyu koji* mold and still remain in raw *shoyu*, play an important role in the mechanisms of sediment formation during the heating of fermented raw *shoyu*.

結 言

生醤油は通常 70~80°C¹⁾ で火入れ後²⁾ 引きし製品となるが、この火入れ操作により醸造醤油では 5~10% (v/v) の火入れ¹⁾ が発生する。 *Aspergillus sojae* KS の生醤油中には、この火入れ¹⁾ の発生を促進する火入れ¹⁾ 凝集酵素が存在した。この酵素は多様性を示し、DEAE セルローズのカラムクロマトグラフィーによる分画の結果、麹菌の産生したプロテアーゼと一致した。²⁾ さらに、40°C における¹⁾ の凝集速度に対して測

定した場合には麹菌アルカリプロテアーゼの関与が最も大きいことも報告した。²⁾ 生醤油中の多成分よりなる¹⁾ 凝集酵素の中には 80°C でも失活しない耐熱性に富んだものが存在したことより、実際の 70~80°C で行なわれる火入れ中の¹⁾ 発生にも生醤油中のプロテアーゼが関与するものと推定した。²⁾ 本報では、実際の火入れ過程での¹⁾ 発生機構を検討し生醤油中に残存する¹⁾ プロテアーゼの関与が極めて大きいことを確認したので報告する。

実 験 方 法

試料醤油 丸大豆または脱脂大豆使用の濃口本醸

* 醤油の¹⁾ に関する研究 (第 8 報)* Studies on Sediment of *Shoyu* (Soy Sauce) (VIII).

造生醤油を TN 1.60%, NaCl 17.50% に調製後使用した。調製生醤油の pH は丸大豆醤油 4.70, 脱脂大豆醤油 4.80 であった。

プロテアーゼ活性の測定 萩原³⁾の方法に従い前報⁴⁾で詳述した方法により, pH 3.0, pH 7.0 および pH 9.5 における活性を測定した。醤油中と近似した条件下でのプロテアーゼ活性の測定は, 酵素液 1 ml に 21% NaCl 含有 0.6% ミルクカゼインの 0.05M Na₂HPO₄ 溶液 (pH 5.0) 5 ml を加え, 30°C で反応した (反応系で NaCl 濃度が 17.5% になる)。その後の操作は前報⁴⁾に準じた。酵素の活性単位は, 本反応条件下で 1 min に 1 μg のチロシン相当の 660 nm の吸光度を増加さす活性を 1 単位とした。

歪凝集活性の測定 前報²⁾と同様にして, 酵素液の醤油 1ml に脱脂大豆使用の本醸造生醤油を 85°C 30 分火入れ後, 急冷した醤油を 10 ml 加え 40°C で反応した。反応中の醤油に歪のフロックが発生するまでの時間 (分) を測定し基質である火入れ醤油のみの場合の歪のフロック発生時間に対する短縮率 (%) を求めた。

火入れ方法 特にことわらないかぎり, 前報⁵⁾に準じて行なった。生醤油の一部をミニポンプを用いて, 80°C の恒温水槽につけた蛇管に送り込んで加熱した後これを生醤油に戻す方式により醤油を加温し, 1 時間後に醤油全体の温度を 60°C とす新火入れ方法⁶⁾も用いた。また, 火入れ歪発生所要時間の測定は, 生醤油または, 前処理した醤油を共栓付試験管に採り, 所定温度の恒温槽につけて火入れし, 歪のフロックが発生してくるまでの時間を肉眼で観察する方法によった。

生醤油中の火入れ歪凝集酵素の精製 脱脂大豆使用の本醸造生醤油 1 l を 1 夜蒸留水で透析後, アミコン濃縮機にて, UM-10 のメンブランを用い, 100 ml に濃縮した。濃縮液に, 3 倍量のエタノール (-20°C) を冷却しつつ加え, 4~5°C で 1 夜放置し, 生じた沈澱を冷凍遠心機で集め, 凍結乾燥して粗酵素とした。前報²⁾と同じく, 粗酵素を 0.05M NaCl を含む 0.005 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化した DEAE-セルローズカラム (2×42 cm) に供し, NaCl 濃度の gradient elution を行なった。0.05 M NaCl 存在下では吸着しないアルカリプロテアーゼと, 吸着して 0.1~0.15M NaCl で溶出する中性プロテアーゼ I, および 0.2~0.25 M NaCl で溶出する中性プロテアーゼ II の三成分に分画した。これらの各プロテアーゼは, 同条件で再クロマトグラフィーの後, 活性区分をそれぞれアミコン濃縮機にて, UM-10 のメンブランを用い

濃縮した。5 ml 以下にした濃縮液を, それぞれ 0.002 M CaCl₂ 含有 0.05 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) で緩衝化したセファデックス G-100 のカラム (2.6 × 100 cm) にてゲル濾過し, それぞれの活性区分を集め凍結乾燥し, 精製酵素標品とした。

実験結果

火入れによる生醤油中のプロテアーゼ活性の変化

生醤油を各温度で 10 分間火入れ後, 氷水中で急冷した醤油のプロテアーゼ活性を Table 1 に示した。

Table 1 よりすると, 丸大豆醤油と脱脂大豆醤油では, 含有プロテアーゼの組成が異なり, 前者は酸性側でのプロテアーゼ活性が高かった。また, 酸性 (pH 3.0) のプロテアーゼの熱失活は火入れ温度と比例的であった。一方中性, アルカリ性でのプロテアーゼ活性は丸大豆醤油では 70°C, 脱脂大豆醤油では 75°C で最低となり, それ以上では, むしろ増加した。火入れ歪凝集活性は, 醤油に近い条件 (pH, NaCl) で測定したプロテアーゼ活性と相関⁴⁾が高かったので, 17.5% NaCl 存在下で 0.6% ミルクカゼイン (pH 5.0) を基質にして, 生醤油中のプロテアーゼの熱失活と火入れ温度との関係を検討した。(Fig. 1)

この結果から, Table 1 の pH 7.0, 9.5 の活性と同様, 熱失活は火入れ温度に比例的ではなかった。70°C

Table 1. Effect of heating temperature on the inactivation of protease in raw *shoyu*.

Heating temperature for 10 min (°C)	Protease activity remaining in <i>shoyu</i> after the heat treatment (units/ml of <i>shoyu</i>)					
	pH 3.0		pH 7.0		pH 9.5	
	S*	D**	S*	D**	S*	D**
40	22.0	12.8	57.4	98.2	63.6	108.1
50	22.3	12.8	39.5	89.1	48.1	94.4
55	21.4	13.1	17.7	53.0	22.1	55.5
60	15.0	10.8	5.8	17.1	8.7	20.1
65	1.5	2.3	1.3	6.4	1.8	7.6
70	0.4	0.8	0.4	2.3	0.8	2.7
75	0.3	0.3	1.7	1.1	2.0	1.2
80	0	0	1.7	2.7	2.1	2.5
90	0	0	1.7	2.5	2.3	2.1
100	0	0	1.5	1.8	1.5	1.9

1ml of raw *shoyu* was heated for 10 min at different temperatures, and the residual activities were measured at 30°C according to the modified Anson method.

*S; Raw *shoyu* made from whole soybeans

**D; Raw *shoyu* made from defatted soybeans

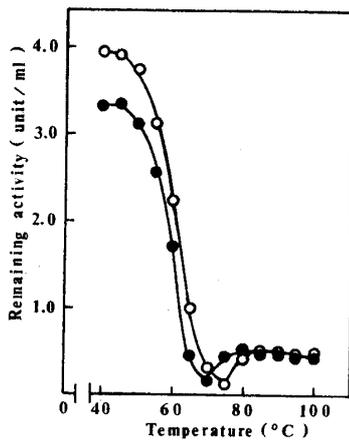


Fig. 1. Effect of heating temperature on the stability of protease in raw *shoyu*.

Raw *shoyu* (1 ml) was incubated for 10 min at different temperatures, and the residual activity was measured at pH 5.0 by using milk casein (pH 5.0) containing 21% NaCl as substrate.

- Raw *shoyu* made from defatted soybeans (pH 4.8)
- Raw *shoyu* made from soybeans (pH 4.7)

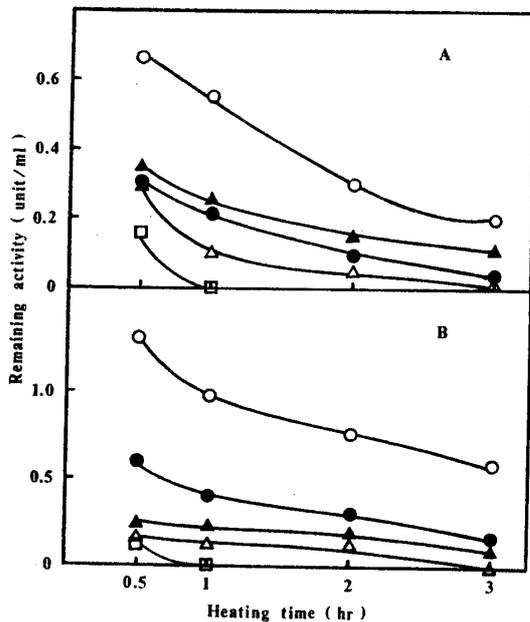


Fig. 2. Change in protease activity in raw *shoyu* during the heating.

Two kinds of raw *shoyu* were each heated at the indicated temperatures (—○—, 60°C; —●—, 65°C; —△—, 70°C; —▲—, 80°C; —□—, 100°C) for 0.5 to 3 hr. The protease activity remaining after the heating was measured by the same method as in Fig. 1.

A; Raw *shoyu* made from soybeans

B; Raw *shoyu* made from defatted soybeans

(丸大豆醬油), 75°C (脱脂大豆醬油) で失活が最大でありそれ以上の温度では残存活性は増加し, 80°C以上でも, 両醬油とも 1 ml あたり約 0.5 unit のプロテアーゼ活性を含有していた。

火入れ中のプロテアーゼ活性の経時的变化を Fig. 2 に示した。

Fig. 2 より明らかなように, 100°C 30分の火入れでもプロテアーゼ活性は残存した。両醬油とも 60°C 火入れでは最大の残存を示し, 3時間後も丸大豆醬油は 0.2 unit/ml, 脱脂大豆醬油は 0.6 unit/ml 残存した。

Figure 1 よりも推察されるように, 70°C 火入れがプロテアーゼの失活が最も激しかった。

Fig. 1 よりすると, 丸大豆醬油と脱脂大豆醬油では, プロテアーゼの失活が最大となる温度が異なっていた。この相違の原因は, 両醬油の pH が同じであれば, 同一の最大熱失活温度を示したことにより, 原料大豆の違いに起因するのではなく, 生醬油の pH の違いによることが明らかになった。Fig. 3 には, 脱脂大豆醬油のプロテアーゼの熱失活におよぼす pH の影響を示した。

Fig. 3 は, pH 4.8 近辺では生醬油の pH のわずかな差も火入れ中のプロテアーゼの安定性に大きな影響を及ぼし火入れ発生を左右することを示している。

火入れ発生に及ぼす火入れ温度の影響 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C および 90°C に

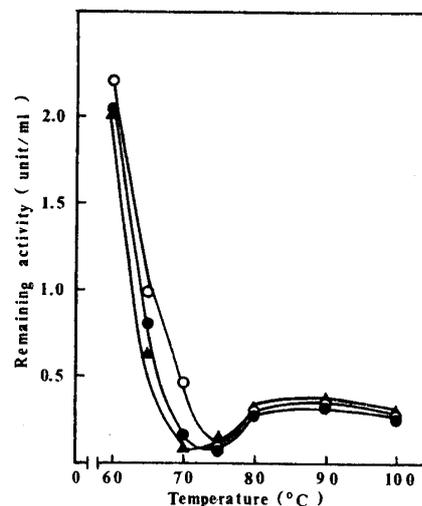


Fig. 3. Effect of pH on the inactivation of protease in raw *shoyu* at different heating temperatures.

pH values of raw *shoyu* were adjusted to 4.6 (—▲—), 4.8 (—●—), and 5.0 (—○—) with appropriately diluted HCl and NaOH. These raw *shoyus* were incubated at different temperatures for 10 min., and the residual activity was measured by the same method as in Fig. 1.

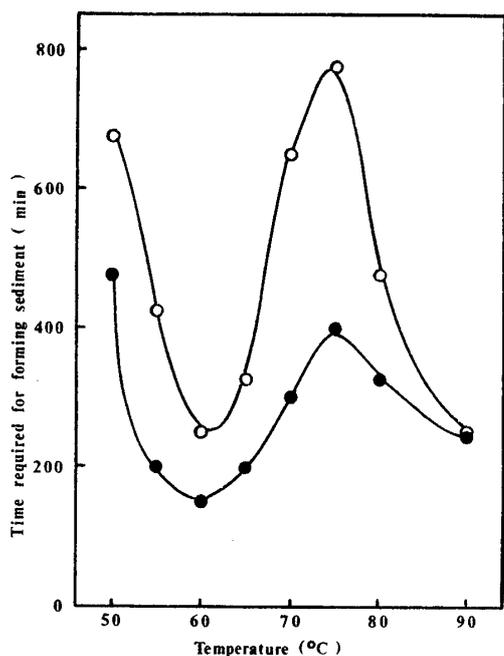


Fig. 4. Effect of heating temperature on the time required for forming sediment.

10 ml of each sample of raw *shoyu* were pipetted into duplicate 10 ml glass-stoppered test tubes, and heated to various temperatures, at which the times required for sediment formation were measured.

- Raw *shoyu* made from soybeans
- Raw *shoyu* made from defatted soybeans

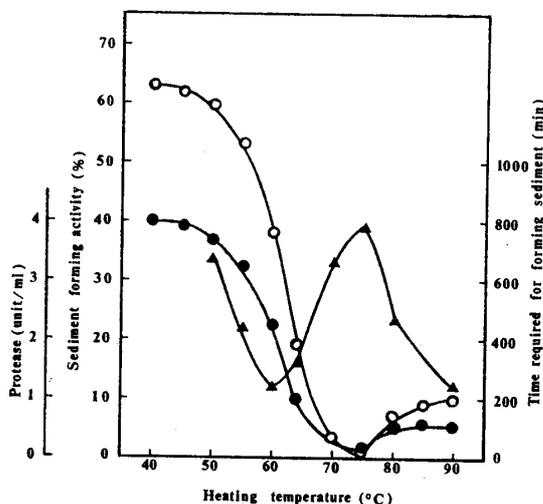


Fig. 5. Relationship between protease activity remaining in *shoyu* and the time required for sediment formation at different heating temperatures.

Sediment forming activity which remained in *shoyu* after the heat treatment was measured at 40°C according to the text, and expressed as the reduction of time for sediment formation (%). Other experimental conditions were identical to those described in Fig. 1 and Fig. 4.

- Sediment forming activity
- Protease activity
- ▲— Time required for forming sediment (min.)

おける火入れ発酵所要時間を Fig. 4 に示した。

Fig. 4 よりすると、丸大豆醤油の方が脱脂大豆醤油よりも発酵が早かった。しかし、60°C 火入れが最も発酵が早く、75°C で特異的に発酵が遅れ、さらに高温では再び早まり、火入れ発酵速度が火入れ温度に比例しない結果は両醤油とも同一であった。脱脂大豆醤油について、発酵集活性の消長を測定し、Fig. 1, Fig. 4 の結果の一部とともに Fig. 5 に示した。

上記結果より、火入れ発酵は生醤油（丸大豆、脱脂大豆）中の発母体物質（蛋白質）が単に火入れにより熱凝固するのではなく、プロテアーゼが火入れ過程において発母体物質に作用する結果起ることが強く示唆された。85°C・30分、60°C・1時間、および発酵集酵素を有効に利用する新火入れ方法⁶⁾で1時間の3条件であらかじめ加熱した醤油（3醤油とも、まだ発酵は認められなかった）を、Fig. 4 と同様にして、さらに各温度で火入れし、発酵所要時間を測定した。（Fig. 6）

Figure 6 より明らかなように、発母体物質がプロテアーゼにより、よく修飾されたと考えられる醤油ほど、

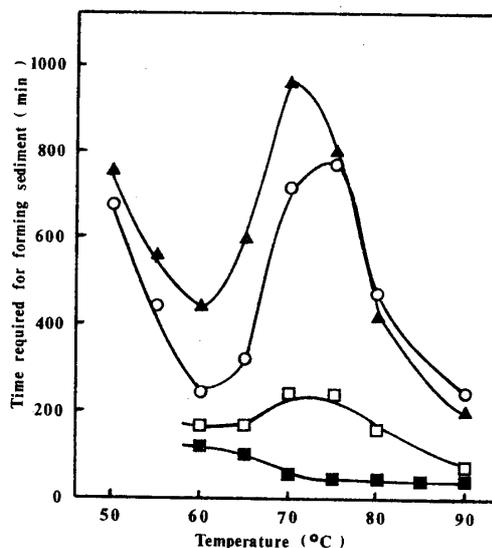


Fig. 6. Effect of protease actions in raw *shoyu* during the heating on the reduction of time required for forming sediment.

Raw *shoyu* and three kinds of pre-heated *shoyu* were incubated at different temperatures, and the time required for forming sediment was measured.

- Raw *shoyu* made from defatted soybeans
- ▲— Pre-heated *shoyu* prepared by heating at 85°C for 30 min
- Pre-heated *shoyu* prepared by heating at 60°C for 1 hr
- Pre-heated *shoyu* prepared by the heating for 1 hr using proteases from raw *shoyu*

Table 2. Effect of purified proteases from raw *shoyu* and the inhibitors on the time required for forming sediment during the heating of *shoyu*.

Protease added	Reagent added	Time required for forming sediment (min)	
		Heated shoyu*	Raw shoyu**
		Incubated at 40°C	Incubated at 60°C
None	None	1450	290
	Potato inhibitor, 0.1%	1450	300
	EDTA, 5×10^{-4} M	1450	390
	EDTA, 5×10^{-3} M	6720	4400
Alkaline protease (500 μ g)	None	360	230
	Potato inhibitor, 0.1%	1450	300
	EDTA, 5×10^{-4} M	360	280
	EDTA, 5×10^{-3} M	370	4100
Neutral protease I (500 μ g)	None	420	250
	Potato inhibitor, 0.1%	420	250
	EDTA, 5×10^{-4} M	1000	400
	EDTA, 5×10^{-3} M	5700	4400
Neutral protease II (500 μ g)	None	650	270
	Potato inhibitor, 0.1%	650	270
	EDTA, 5×10^{-4} M	900	330
	EDTA, 5×10^{-3} M	5000	4400

The mixture of 0.5 ml of purified protease (0.1%) and 0.5 ml of reagent were incubated for 20 min at 30°C. After this period, 9 ml of *shoyu* was added to the mixture, and the time required for the formation of the sediment was measured.

* Heated *shoyu* was prepared by heating at 85°C for 30 min and cooling immediately.

The heated *shoyu* was added to the mixture of protease and reagent, and incubated at 40°C.

** Raw *shoyu* was added to the mixture of protease and reagent, and incubated at 60°C.

発酵は火入れ温度に比例して早くなった。一方、あらかじめ、85°C、30分火入れした醤油は、アルカリ性プロテアーゼ等の耐熱性の乏しい酵素が失活しているため、70°C以下の低温での発酵は対照の生醤油に比べて遅かった。

生醤油より精製したプロテアーゼおよび二、三の試薬による火入れ発酵機構の解明 生醤油より精製したアルカリプロテアーゼ I、および中性プロテアーゼ II と、これらの阻害剤であるポテトインヒビターおよび EDTA (Ethylene diamine tetraacetate) の火入れ発酵に及ぼす影響を調べた。(Table 2)

Table 2 より、85°C 30分火入れした醤油の 40°C における発酵には、ポテトインヒビターは変化を与えなかったが、EDTA は著しく阻害した。一方、アルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ I および中性プロテアーゼ II の添加は、いずれも発酵を促進した。また、アルカリプロテアーゼの発酵促進効果はポテ

トインヒビターで消失したが、EDTA では大きな変化はなかった。中性プロテアーゼ I、中性プロテアーゼ II の効果は逆に EDTA で消失したが、ポテトインヒビターでは変化しなかった。一方、生醤油を 60°C 一定に保った場合にはアルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ I の発酵促進効果が認められたが、耐熱性に富む中性プロテアーゼ II の促進効果、および EDTA の発酵防止効果が顕著であった。

EDTA の火入れ発酵に及ぼす影響をさらに詳細に検討して、Fig. 7 に示した。各濃度の EDTA 溶液 1 ml に、19.5% NaCl 含有脱脂大豆醤油 9 ml を加え(反応系で 17.5% NaCl になる)、60°C で発酵所要時間を測定した。EDTA の添加方法は、(A); 生醤油に添加し、85°C・30分火入れ後 60°C 反応、(B); 生醤油に添加し、直接 60°C 反応、(C); 85°C・30分火入れした後に添加し、60°C 反応、の三通りとした。Fig. 7 より明らかにように、発酵は EDTA 無添加

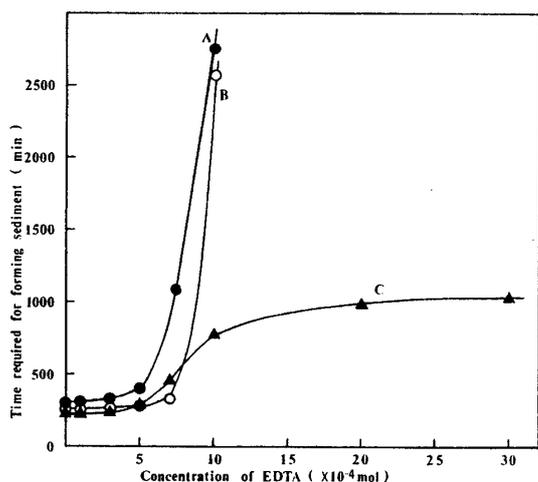


Fig. 7. Effect of EDTA concentration on the prevention of sediment formation during the heating of *shoyu*.

To 9 ml of *shoyu*, 1.0 ml of EDTA solution was added, and the mixture was incubated at 60°C. The time required for the formation of the sediment was measured.

A (●—); Raw *shoyu* with added EDTA was heated at 85°C for 30 min, and the *shoyu* was incubated at 60°C.

B (○—); Raw *shoyu* with added EDTA was incubated at 60°C.

C (▲—); Raw *shoyu* was heated at 85°C for 30 min and immediately cooled, and then EDTA was added to the *shoyu*. The mixture was incubated at 60°C.

(EDTAのかわりに蒸留水添加)では, (A); 4.7時間, (B); 4.0時間, (C); 3.3時間を要したが, EDTAの添加量の増加につれて, 歪は発生しにくくなり, 終濃度が 10×10^{-4} Mでは, (A); 47時間, (B); 43時間, (C); 13時間を示した. 30×10^{-4} M添加の場合, (A)および(B)では, 丸3日後も歪は発生せず, 特に(A)は完全に清澄な状態を保っていたが, (C)では, 16時間で歪発生が認められ, (A), (B)に比べてEDTAの火入れ歪発生防止効果は少なかった. これは, EDTA無添加で行なった85°C・30分の火入れ中に, すでに生醤油中の耐熱性プロテアーゼが歪母体物質に作用したためと考えられる.

これらの結果より, 火入れ歪形成機構としては, (1) 60°C近辺の低温火入れでは, 耐熱性に富む中性プロテアーゼIIのみならず, アルカリプロテアーゼ, 中性プロテアーゼI, 酸性プロテアーゼ等の耐熱性に乏しいプロテアーゼ群も火入れ歪発生に関与すること, (2) 通常の80°C近辺の高温火入れでは, 耐熱性に乏しいプロテアーゼの関与は少なく, 主に中性プロテアーゼIIの作用により, 火入れ歪のフロック形成反応が行な

われる二つがあげられる.

考 察

本醸造生醤油の火入れ歪発生は, 温度に比例して早くなるのではなく, 60°Cで早く, 70~75°Cで特異的に遅くなるという興味ある現象を示した (Fig. 4). この原因を明らかにするために, 生醤油中に残存する麹菌由来のプロテアーゼおよび火入れ歪凝集活性の火入れ中の消長を検討した結果, 火入れ歪発生が遅れる75°C近辺でプロテアーゼ活性, 歪凝集活性の失活が激しいことが明らかになり (Fig. 5), 火入れ歪発生は生醤油中に存在するプロテアーゼにより引き起こされることが強く示唆された. 丸大豆生醤油は, 脱脂大豆生醤油に比べ, pH 5.0で測定したプロテアーゼ量が少ないにもかかわらず (Fig. 1, Fig. 2), 火入れ歪発生に要する時間は短かった (Fig. 4). この相違の原因が両醤油の含有プロテアーゼ組成の違いのためか, あるいは丸大豆生醤油中には火入れ歪の酵素凝集を促進する物質が存在するためなのか, 本報の結果からは明らかではない. 小坂⁷⁾は, 丸大豆生醤油より分離した歪は, 脱脂大豆生醤油よりの歪に比べ, 灰分含量が高く, 特に燐酸に富むと報告している. 生醤油中に存在する, 蛋白質と結合しやすい有機燐化合物や, 金属類はプロテアーゼによる火入れ歪の凝集に促進的に作用していることも考えられる. 85°C 30分火入れによりアルカリプロテアーゼ等の耐熱性に乏しい酵素を失活させた醤油は, EDTAの添加により, 火入れ歪の発生は著しく阻害され長時間清澄な状態を保った. これは, 85°C, 30分火入れで失活しなかった中性プロテアーゼIIによる凝集活性がEDTAで阻害されたためと考えられる. EDTAの火入れ歪発生防止効果は, 生醤油中より精製したアルカリプロテアーゼを添加した場合には認められなかった. これらの結果より, 火入れ歪発生における耐熱性中性プロテアーゼの重要性が明らかになった. 第2報⁸⁾において, EDTA, hydroxy ethylethylene diamine triacetate, diethylene triamine pentaacetateなどのキレート剤は強力な二次歪防止効果を持つことを報告したが, ここでは二次歪発生に醤油中の金属の関与を示唆するとどまり, 詳細な理由は不明であった. EDTAの特異的な二次歪防止作用も, 85°C, 30分火入れで失活しないプロテアーゼの歪凝集活性を, EDTAが不活性化するという本結果よりすれば理解できる. 火入れ温度域で失活しない耐熱性プロテアーゼをEDTAにより失活させ, 耐熱性の乏しい酸性プロテアーゼやアルカリプロテアーゼは生醤油

を急速に加熱し熱失活させる方法で火入れすれば、火入れ歪は事実上発生しなかった (Fig. 7). これらの結果より、本醸造生醤油の火入れ歪発生が、生醤油中に残存するプロテアーゼにより引き起こされるとということが明らかになった。最近、Sekine⁹⁾ は、醤油麹菌 *Aspergillus sojae* KS の麴麹より単離した耐熱性中性プロテアーゼ II は、75°C 近辺で特異的に失活しこれが自己消化によることを報告した。古来より醤油の火入れは、“一麹、二糶入、三火入”といわれ、醤油製造上重要な工程の一つに数えられている。本報より、歪の発生は、温度によって著しく異なることが明らかになったので、実際の火入れ条件の設定は、殺菌、香気の改良、色沢の調整のみならず、火入れ歪の凝集沈降をも考慮して行なうべきである。著者等の開拓した生醤油中に多量に存在する耐熱性の乏しいプロテアーゼをも火入れ歪の凝集に有効に利用する新火入れ方法^{6, 10)} では、火入れ歪の発生、沈降は従来法より促進されるのが認められた (Fig. 6)。また、本結果は、麹菌の改良、選択を含む製麹条件が、最終工程である火入れ、清澄化にも極めて大きな影響を及ぼすことを示しており興味深い。

要 約

1. *Aspergillus sojae* KS の本醸造生醤油に含有されるプロテアーゼの火入れ中の消長を測定したところ、pH 4.8 以下の醤油では 70°C で、pH 4.8 以上の醤油では 75°C で失活が最大となり、これ以上の温度ではむしろ残存活性量は増加した。
2. 火入れ温度と火入れ歪発生との関係を検討したところ、歪は 70~75°C では極めて発生しにくく、60°C および 80°C 以上では発生し易く、火入れ歪発生所要時間は火入れ温度に比例しなかった。
3. 生醤油中のプロテアーゼが、共存する歪母体物質 (蛋白質) によく作用するような条件で、予熱した醤油を、2. と同様にしてさらに各温度で火入れした結果、生醤油を直接火入れした場合に見られた 75°C 近辺での歪発生の特異的な遅れは消失し、歪発生所要時

間は火入れ温度に比例して短くなった。

4. 生醤油より精製した火入れ歪凝集活性を有する麹菌由来のアルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ I、中性プロテアーゼ II の示す顕著な火入れ歪発生促進効果は、アルカリプロテアーゼはポテトインヒターにより、中性プロテアーゼは EDTA によりそれぞれ消失した。

5. 生醤油に 3×10^{-3} M の EDTA を添加した後、急速に 85°C とし 30 分間火入れした醤油を、最も歪が発生し易い 60°C で 3 日間保持しても歪の発生は全く認められなかった。

6. 以上より、醸造醤油の火入れ歪は、まず生醤油中のプロテアーゼが火入れ変性した歪母体物質に作用して、フロックが生じ、次いで熱凝固によりこれが促進されるという機構により発生することを認めた。また、80°C 近辺の比較的高温での歪発生には、耐熱性プロテアーゼが主に作用することも明らかになった。

本報告を終了するにあたり、実験に御協力いただきました、金子行雄氏、早川とも子嬢、ならびに本報告の発表を許可された、本社役員の各位に深謝いたします。

本報の概要は昭和47年4月3日、日本農芸化学会大会で発表した。

文 献

- 1) Yokotsuka, T.: *Advances in Food Research*, **10**, 75 (1940).
- 2) 橋本, 横塚: 醸工, **50**, 257 (1972).
- 3) 赤堀編: 酵素研究法, **2**, 242, 朝倉書店 (1962).
- 4) 橋本, 横塚: 醸工, **51**, 661 (1973).
- 5) 橋本, 吉田, 横塚: 醸工, **48**, 493 (1970).
- 6) 横塚, 吉田, 橋本: 日本特許646002 (公告昭46-39079).
- 7) 小坂: 野田醤油研究報告, **1**, 81 (1956).
- 8) 橋本, 吉田, 横塚: 醸工, **48**, 501 (1970).
- 9) Sekine, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 207 (1972).
- 10) 横塚, 吉田, 橋本: 日本特許646001 (公告昭46-39078).

(昭48. 12. 14受付)