みりんの寒冷晶出とグルコース濃度との関係

大屋敷春夫・内田正裕・長浜源壮

境 淳*・大林 晃・岡 智**

(宝酒造<株>中央研究所, *松戸工場

**広島大学工学部醸酵工学科)

昭和 62 年 5 月 11 日受理

Relationship between Chill Haze and Glucose Concentration in *Mirin*

Haruo OYASHIKI, Masahiro UCHIDA, Genzo NAGAHAMA

Kiyoshi SAKAI*, Akira OBAYASHI and Satoru OKA**

(Central Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd., 3-4-1, Seta Otsu-shi, Shiga 520-21; *Matsudo Factory, Takara Shuzo Co., Ltd., 111, Takada Shinsaku, Matsudo-shi, Chiba 271; **Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, Saijo-cho, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, 724)

When *mirin* is stored at below 0°C, a white sediment forms that is called chill haze. This chill haze is undesirable in commercial *mirin*. To find how to prevent the haze, we examined its cause. Chill haze was caused by crystallized glucose in *mirin* with high concentrations of glucose. When stored at -10°C, *mirin* containing 14% (v/v) alcohol formed a chill haze only when the glucose concentration was 38% (w/v) or more. Therefore, the properties of the chill haze depended mainly on the degree of supersaturation of glucose in the *mirin*. Chill haze could be prevented by decreasing the glucose concentration to less than 38% (w/v).

Key words: みりん・寒冷晶出・グルコース濃度

緒 言

みりんは冬期厳寒地で貯蔵した場合、壺底に白い結晶が析出し、甚しい時には内容物全体が白い結晶状になることがある。この現象はみりんの凍結または寒冷晶出と呼ばれ、製品品質上大きな危惧される問題となっている。みりんには、30~50% (w/v) の極めて高濃度のグルコースが含まれているので、この晶出はグルコースの結晶であろうと考えられる。すでに、みりん中のグルコース濃度が 38% (w/v) 以上になると寒冷晶出することが知られ¹⁾、更にトランスグルコニダーゼを使用すれば、グルコース濃度を低下でき寒冷晶出が防止できることは多く報告されている¹⁻⁶⁾。今回は、みりんの寒冷晶出とグルコース濃度の関係を定量的に検討し、寒冷晶出防止対策を再確認した。

実 験 方 法

1. 供試みりん

精製逕過した最終製品みりんを使用した。

2. モデルみりん

モデルみりんの調製には、グルコース (林原生化学, 岡山), 粉末水飴 (林原生化学, 岡山), 合成清酒用アミノ酸, アミックス® (武田薬品工業, 大阪), 乳酸 (半井化学, 京都) および原料用アルコールを使用した。

3. 蒸糯米と麴

蒸糯米および麴は内田ら⁷⁾の方法によって調製した。

4. 使用菌株

麴の調製には種麴 (*Aspergillus oryzae*) (樋口松之助商店, 大阪) および *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* Iizuka IFO 6082 を使用した。

5. みりんの分析法

全糖、直糖、全窒素、アミノ態窒素、酸度、アルコールの分析は内田らの研究⁷⁾で用いた方法によった。

6. 寒冷晶出試験

供試サンプル 20 ml は 18 mm 径の試験管に入れゴム栓で密栓し、 -10°C で静置して保存した。寒冷晶出度は晶出物の容量を供試サンプル全容量に対する比で表示した。全量析出した場合は 1.0 で表わした。

7. 酵素活性

α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性はアルカリ溶解したポテト澱粉を使用して測定した。その方法は WELKER らの報文⁸⁾に記述の通りに行った。

8. 酵素によるマルトースの分解

A. oryzae 麹 (215 DU/g 麹および 35 GU/g 麹) および *A. usamii* mut. *shiro-uramii* 麹 (61 DU/g 麹および 13 GU/g 麹) の各々 20 g は、50 ml の 0.5% NaCl 溶液で酵素を常温 (20°C ~ 25°C) で 2~3 時間抽出し、その抽出液は透析膜により 5°C で 24 時間透析した。反応液 40 ml は、*A. oryzae* 麹、*A. usamii* mut. *shiro-usamii* 麹の抽出酵素および *Rhizopus delemer* 起源の Denazyme SA® (長瀬産業、大阪) のそれぞれグルコアミラーゼ活性 80 GU 相当量、10% マルトース、0.1 M 酢酸バッファー (pH 5.4) の組成で、反応は 40°C で行った。

9. 火入滓下処理

供試サンプルは 75°C で 30 秒加熱後、柿渋 (Bé 6 : 岩本亀太郎商店、京都) の 0.11 ml/l 試料を添加し攪拌後、滓下剤 (大日本理化学、徳島) の 0.8 g/l 試料を添加し、再攪拌した後、常温で静置した。

10. ペーパークロマトグラフィーによる糖の検出と定量

糖を含むサンプルは東洋汙紙 No. 50 (東洋汙紙、東京) にスポットし、その汙紙を *n*-ブタノール：ピリジン：水 (6 : 4 : 3 v/v) の溶媒で上昇法により 3 回展開した。その汙紙を乾燥後、硝酸銀浸漬法⁹⁾によって糖を検出した。このペーパークロマトグラフィーで分離された糖 (グルコース、マルトース、イソマルトース、パノースおよびイソマルトリオース) の各々の区分は蒸留水でそれぞれ抽出した。この抽出液はガラスフィルター (3G-2) を通して汙過した後、汙液中の糖量はアンスロン法¹⁰⁾によって定量した。

結果と考察

1. 寒冷晶出物質の分析

みりんは厳寒地で貯蔵すると寒冷晶出して多量の結晶を生ずることがあり、この晶出した物質を分析するため

(A) (B) (C) (D)

Photo 1. *Mirin* with chill haze (A and B) and without (C and D).

The *mirin* was stored at under 0°C for a few months.

Table 1. Chemical composition of liquid and solid phases in *mirin* samples A and B with chill haze.

Component	A		B	
	Phase		Phase	
	Solid	Liquid	Solid	Liquid
Total sugar as glucose (% w/v)	52.9	41.7	48.9	37.3
Reducing sugar as glucose (% w/v)	49.9	36.4	46.8	32.1
Glucose (% w/v)	46.6	31.2	42.1	26.6
Nitrogen (mg w/v)	68.8	72.2	75.6	76.4
Amino form nitrogen (mg w/v)	29.2	29.7	27.0	28.9
Acidity (0.2 N NaOH ml/10 ml)	0.59	0.58	0.42	0.42
pH	5.35	5.38	5.80	5.85
Specific gravity at 15°C	1.195	1.147	1.181	1.126

Table 2. Sugar composition of *mirin* samples A and B with chill haze.

Sugars	Sugar composition (%)			
	A		B	
	Phase		Phase	
	Solid	Liquid	Solid	Liquid
Glucose	85.4	74.5	85.8	71.7
Maltose	3.2	6.4	3.7	6.4
Isomaltose	2.3	3.3	3.2	5.6
Panose	2.0	2.9	1.3	3.9
Isomaltotriose	1.3	2.1	2.0	2.3
Other Oligosaccharides	5.8	10.8	4.0	10.1

寒冷晶出したみりんを用意した。Photo. 1 には用意した寒冷晶出みりん (A, B) と寒冷晶出していない (C, D) を示した。まず、寒冷晶出のあったみりん A, B の上澄をデカンテーションで除き、固形部分は加熱溶解して結晶部とした。それから、上澄部と結晶部の成分を分析し、Table 1 にその結果を示した。結晶部では糖含量が上澄部に比較して多く、特にグルコース含量が明らか

Table 3. Influence of glucose, nitrogen, alcohol, and pH on chill haze of synthesized model *mirin*.

Glucose (%, w/v)	Total sugar (%, w/v)	Total nitrogen (mg%, w/v)	Alcohol (V%)	pH	Degree of chill haze (ml sediment/ml)
9.8	30	30	10	4.0	0.0
		30	14	5.5	0.0
		70	10	5.5	0.0
		70	14	4.0	0.0
16.4	50	30	10	5.5	0.0
		30	14	4.0	0.0
		70	10	4.0	0.0
		70	14	5.5	0.0
29.1	30	30	10	5.5	0.0
		30	14	4.0	0.0
		70	10	4.0	0.0
		70	14	5.5	0.0
48.5	50	30	10	4.0	0.3
		30	10	5.5	1.0
		70	10	5.5	0.7
		70	10	4.5	1.0

The synthesized *mirin* samples were stored at -10°C for 20 days.

Fig.1. Relationship between degree of chill haze and glucose concentration in *mirin*.

Glucose and maltose were added to the solution to total sugar concentration of 47% (w/v) in 14% (v/v) alcohol. The degree of chill haze is represented by the ratio volume of sediment to the total solution. Symbols (●), (○), (▽), and (◇) show 38.0, 39.3, 40.3, and 41.6% (w/v) of glucose in solution.

に高くなっていた。しかし、含窒素成分、酸度、pHなどは、ほとんど同様であった。次に、結晶部および上澄部の糖質構成を検討した。Table 2 にその分析結果を示した。両方とも糖組成の主成分はグルコースであるが、結晶部のオリゴ糖の含量は上澄部の約半分に減少した。したがって、寒冷晶出の問題はグルコースの晶出条件に関連する問題と考えられた。

2. モデルみりんによる寒冷晶出試験

次に、このグルコースの晶出性がみりんのどのような特性によって支配されるかを検討した。みりんの標準的的化学成分値を中心にして、種々糖、全窒素およびアルコール濃度と pH の異なる 16 種類のモデルみりんをグル

コース、粉末水飴、タンパク分解物、乳酸、アルコールおよび蒸留水で調製し、18 mm 径試験管中に 20 ml 充填して密栓後、 -10°C で 20 日間静置する寒冷晶出試験を行った。Table 3 に各々試料の寒冷晶出結果を示した。晶出が認められたのは、全糖に対する直糖の比 0.97 で、全糖 50% (w/v)、すなわち、グルコース濃度 48.5 % (w/v) 区分のものであり、この 4 試料のうちでは、アルコール濃度 14% (v/v) のものは晶出度 1.0 を与え、アルコール濃度 10% (v/v) では、0.3 および 0.7 の晶出度に止まった。この結果は、アルコールの存在がグルコースの過飽和度を上げるためと考えられた。一方、含窒素成分および pH は晶出にほとんど無関心であることが判った。次に、種々量のグルコースおよびマルトースを含む 14% (v/v) アルコール水溶液を調製し、全糖濃度が、47.0% でグルコースを 38.0, 39.3, 40.3 および 41.6% を含む試料を 40, 80 および 120 日間保存して晶出試験を行った。その結果を Fig. 1 に示した。グルコース濃度が 38.0% (w/v) の場合には晶出を生じなかったが、グルコース濃度が高くなると晶出し、その晶出度は保存期間、 T (日) とほぼ比例した (Fig. 1A)。グルコース濃度と晶出度との関係は、グルコース濃度、 C (%, w/v) と 38.0% (w/v) の濃度差に比例した (Fig. 1B)。したがって、この条件における晶出度、 H は (1) 式によって表現できた。

$$H = 0.0015 \cdot (C - 38.0) \cdot T \quad (1)$$

3. みりんによる寒冷晶出試験

モデルみりんにおける寒冷晶出の結果は、みりん中のグルコース濃度が重要であり、これを再確認するために寒冷晶出性のないみりにグルコミラーゼを作用させて処理し、みりん中のグルコース濃度を上げた場合の晶出性を再検討した。すなわち、晶出性のない全糖 45.4 % (w/v) でグルコース 27.4% (w/v) のみりに全糖 1 g 当りグルコミラーゼ活性 30~90 単位のグルコミラーゼを添加し、 40°C で 1.5~6 時間反応させた後、 75°C で数分加熱し、ついで反応液を滓下げ処理し、滓沍過した試料について晶出試験を行った。その結果を Table 4 に示した。みりん中のグルコース濃度が 38.0% 以上になった試料 2 点にだけ晶出性が認められた。この晶出性についてのグルコースの限界濃度は前述のモデルみりんおよびグルコースとマルトースを含むアルコール水溶液で得られた結果とよく一致した。

4. 麴によるみりん中グルコース濃度の調節

みりん中のグルコース濃度を上昇させると寒冷晶出する。そこで、みりん中の全糖含量を一定に保ち、グルコース濃度を 38.0% (w/v) 以下にする寒冷晶出防止について再確認した。*A. usamii* mut. *shiro-usamii* は

Table 4. Effect of glucose concentration on the chill haze of *mirin* treated with glucoamylase.

Components in <i>mirin</i>		Degree of chill haze (ml sediment/ml)
Glucose (%, w/v)	Reducing sugar (%, w/v)	
36.0	39.4	0
37.5	41.2	0
38.0	41.5	0
39.4	41.7	0.10
40.6	42.0	0.15

Before treatment with glucoamylase, the *mirin* was composed of 45.4% total sugar, 36.0% glucose, 69.1 mg% total nitrogen, and 14% alcohol at pH 5.72. The glucose in the *mirin* was controlled by glucoamylase (30~90 GU/g of total sugar in *mirin*) with 1.5~6 hr of incubation. After the incubated *mirin* was heated at 75°C for 30 sec, the sediment was removed by filtering, and the filtrate was stored at -10°C for 40 days.

Table 5. Effect of *kōji* enzymes with *A. oryzae* and *A. usamii* on glucose and oligosaccharide formation from 10% maltose.

Sugars	Sugar concentration (%)					
	Enzymes extracted from <i>kōji</i> of				Control glucoamylase	
	<i>A. oryzae</i>		<i>A. usamii</i>			
	Incubation (hr)		Incubation (hr)		Incubation (hr)	
	24	48	24	48	24	48
Glucose	3.39	5.47	5.23	5.64	3.21	6.11
Isomaltose	0.70	1.35	3.76	4.20	0	0
Panose	0.54	0.80	0.23	0.12	0	0
Isomaltotriose	0.13	0.21	0.51	0.62	0	0

The glucoamylase preparation originated from *Rhizopus delemere* and contained 8,200 GU/g of glucoamylase activity. *Kōji* with *A. oryzae* and *A. usamii* contained 35 and 13 GU glucoamylase activity per gram of *kōji*, respectively. The enzymes of *kōji* were extracted with 0.5% NaCl and dialyzed against water at 5°C for 24 hr. The mixture (40 ml) had 80 GU of glucoamylase activity, 4 g of maltose, and 0.2 M, acetate buffer at pH 5.4, and was incubated at 40°C.

A. oryzae に比べグルコアミラーゼ活性が弱く、トランスグルコンターゼ活性が強いと報告¹¹⁾されている。両麹菌の米麴を調製した。それぞれの米麴から抽出した粗酵素は 10% (w/v) マルトース溶液中に 40°C で反応させ、反応液中の糖組成をペーパークロマトグラフィーで分析した。Table 5 にその分析結果を示した。*A. usamii* mut. *shiro-usamii* のオリゴ糖生成は、特にイソマルトースおよびイソマルトトリオースが *A. oryzae* の場合に比べて顕著であった。次に、*A. usamii* mut. *shiro-usamii* 麴 93 g、蒸糯米 628 g および 42% (v/v) アルコール 279 g を混合し、30°C で 30 日間熟成後、みりと粕に分離し、みりはグルコアミラーゼで処理した場合と同様にして、加熱滓下げ、汙紙汙過後、これら

Table 6. Chill haze and sugar composition of *mirin* using *kōji* prepared with *A. usamii* and *A. oryzae*.

Sugars	Sugar composition (%)	
	<i>Mirin</i> using <i>kōji</i> with	
	<i>A. usamii</i>	<i>A. oryzae</i>
Glucose	72.1	85.1
Maltose	3.5	4.6
Isomaltose	11.0	1.9
Panose	4.9	1.0
Isomaltotriose	4.0	1.0
Other oligosaccharides	5.6	6.4
Glucose (% w/v) in <i>mirin</i>	33.9	40.0
Total sugar (% w/v) in <i>mirin</i>	48.2	47.2
Degree of chill haze (ml sediment/ml <i>mirin</i>)	0.0	0.9

Mirin was stored at -10°C for 20 days.

のみりんを分析し、寒冷晶出試験を行った。Table 6 に得られたみりん中の糖組成と寒冷晶出の結果を示した。*A. usamii* mut. *shiro-usamii* 麴を使用したみりんは *A. oryzae* 麴を使用したみりと比較して、全糖含量はほぼ同じであったが、オリゴ糖含量が増加し、グルコース濃度は 33.9% (w/v) と *A. oryzae* の場合の 40.0% (w/v) に比べて低下した。また、寒冷晶出は認められなかった。

以上の結果を総合すると、みりんにおける寒冷晶出性は主としてみりん中のグルコースの過飽和度に支配されると考えられた。この過飽和度に関係する因子としては、グリコース濃度のほかにアルコール濃度および貯蔵温度が中心になり、今回はアルコール 14% (v/v)、貯蔵温度 -10°C の条件で 38.0% (w/v) のグルコース限界濃度と晶出およびグルコース濃度との関係を解析した。なお、グルコースの晶出条件として、ここでは過飽和度だけを問題にしたが、晶出速度もある場合には重要な因子となる可能性がある。中村ら¹²⁾はソルビトール、グリセロールなど多価アルコール添加で寒冷晶出は防止出来ると報告しており、これは晶出速度の面からも検討の必要があることを示唆している。

要 約

みりんを厳寒地で貯蔵すると多量の白色結晶が析出することがあり、この現象はみりんの凍結または寒冷晶出と呼ばれ、みりん品質上問題となっていた。寒冷晶出の防止策にはすでに多くの研究があり、この晶出性とグルコース濃度との関係を定量的に把握し、防止策を再確認した。

1. 寒冷晶出はみりん中のグルコースが析出するものであり、アルコール濃度 14% (v/v) で、貯蔵温度 -10°C の条件では、みりん中のグルコース濃度が 38.0%

(w/v) 以上で寒冷晶出を生じ、この濃度以下では晶出は生じなかった。

2. みりんの寒冷晶出性は、主としてみりん中のグルコース過飽和度に支配され、晶出度は(1)式によって表現できた。

$$H=0.0015 \cdot (C-38.0) \cdot T \quad (1)$$

ここで、 H は晶出度、 C はグルコース濃度(%, w/v), $C \geq 38.0\%$ (w/v), T は -10°C での貯蔵期間(日)である。

3. 寒冷晶出防止には、*A. oryzae* 麴の代りにトラングルコシダーゼ活性の強い麴(*A. usamii* mut. *shiro-usamii*) を用いみりん全糖中のオリゴ糖を増加させ、グルコース含量を 38.0% (w/v) 以下に低下させることによって寒冷晶出が防止できることを再確認した。

なお、本研究の一部は、第9回醸造に関するシンポジウム講演集 p.12 (昭和52年) に報告した。

文 献

- 1) 内田正裕：第9回醸造に関するシンポジウム講演

集, p.12, 日本醸造協会 (1977)

- 2) 長浜源壮, 松田秀喜, 森田日出男：第18回醸造に関するシンポジウム講演集, p.49, 日本醸造協会 (1986)
- 3) 内田正裕, 長浜源壮, 境 淳, 井上 浩：昭和52年農化大会講演要旨集, p.277 (1977)
- 4) 深谷伊和男, 横井信正, 酒井敏秀, 徳村治彦：醸協, 78, (7) 552 (1983)
- 5) 布川弥太郎, 岩野君夫, 秋葉哲典：醸協, 76, (10) 655 (1981)
- 6) 今井富雄, 入江淑郎, 梅本春一, 石家駿治：醸協, 63, (1) 80 (1968)
- 7) M. UCHIDA, S. OKA : *J. Ferment. Technol.*, 61, 13 (1983)
- 8) N. E. WELKER, L. L. CAMPBELL : *J. Bacteriol.*, 86, 681 (1963)
- 9) M. UCHIDA, H. OYASHIKI, G. NAGAHAMA, S. HANAI : *J. Ferment. Technol.*, 61, 247 (1983)
- 10) D. L. MORRIS : *Science*, 107, 254 (1948)
- 11) 小巻利章, 松葉 豊, 岡本 昇, 山田哲也, 沢田達造：澱粉工誌, 7, 89 (1960)
- 12) 中村精二, 山川正三郎：味醂の凍結防止法, 特許昭 39-24574 (1974)