

氏 名 (本籍) ひろ い ただ お
廣 井 忠 夫

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 273 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 59 年 3 月 8 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 紅麴菌による色素の生産と食品への利用
に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教授 木村修一 教授 目黒 熙

教授 山内文男

論文内容要旨

序 論

清酒業界は、1960年代後半以後消費動向の変化に伴う需要の減退から企業倒産が続出し、新製品を求める声が高まりつつあった。一方、わが国における消費者の食生活への関心は、1970年代に入って急速な高まりをみせ、食品添加物の毒性、とりわけ合成食用タール系色素の発癌性の表面化によって使用禁止の処置がとられるようになり、これに代る天然食用色素が再評価されるようになった。天然食用色素は大別して植物系、動物系、微生物系に分けられる。このうち微生物系は酵母のリボフラビン（黄色）と紅麹菌のモノスコルブリン系（赤色）の2種類が知られている。

紅麹菌は、古来中国、台湾およびマレーシア等において紅酒、老酒、紅乳腐などの食品や血行促進剤などの薬剤として用いられてきた。その産生する色素は、1926年西川により赤色および黄色の色素が初めて結晶化され、1931年に Salomon らにより monascin、続いて1932年には monascorubrin および monascoflavin が単離され、化学的性質や誘導体の合成などが検討されてきた。そして今日、その主要成分は、monascorubrin、rubropunctatin、monascin、ankaflavin、monascorubramine、rubropunctamine であることが蘇遠志らによって報告されている。

本研究は、前述の背景のもとで紅麹菌の産生色素を清酒に利用することに端を発し、これを広く食品に利用するための基礎的並びに応用技術について明らかにすることを目的として行ったものである。

第1章 色素高生産変異菌株の分離および色素の生産条件の検討

1) 色素高生産変異菌株の誘導と分離

台湾において紅麹の種菌として用いられている *Monascus anka* Nakazawa et Sato を親株とし、その分生胞子に紫外線を照射して *U. V. mutant* を作って優良菌を分離したのち、N-メチル-N'-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン (N. T. G) 処理を施して変異を誘導し、その中から白米を用いた固体培養において色素を最も多く産生する菌株 UN 202-13 を選択した。この菌株は、親株の21.4倍の色素を生産し、形態上の特長として、集落は不規則な円形を示し、中心部が盛り上がり、集落裏面が空洞化する。色素の沈着は、成熟した菌糸、子のう、分生胞子など菌体全体に認められる。

2) 色素の生産条件の検討

種麹は、グルコース5%、ポリペプトン1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 KH_2PO_4 0.1%、L-アスパラギン0.2% (pH 4.3) の組成の培地を用いて UN 202-13 菌を培養し、得られた菌体を水洗いしてから用いることで雑菌汚染が少なくなり、また、製麹の種付時における種麹の使用量を白米重量の0.05% (乾物菌体として) 以上とし、盛り時の麹堆積層の厚さ15cm、品温37~38℃、風量5~8 m^3/min (自動間歇通風)、水分38~40%で8日間培養すると、汚染の少ない良質の紅麹が得ら

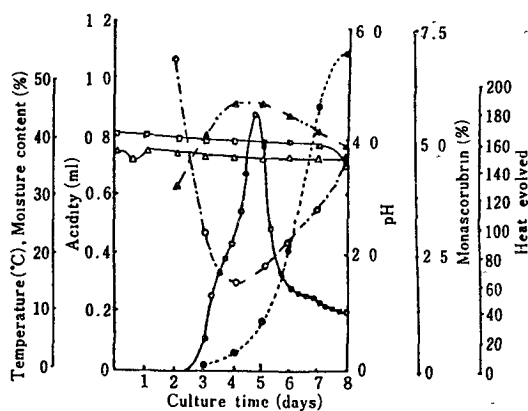


Fig.1 Time Course of Pigment Production by *M anka* UN 202-13 Cultured on Steamed Rice. One hundred kilograms of steamed rice inoculated with 50g of dried seed koji was piled at 37°C. After 24 hr of incubation, piled rice was mixed and transferred in a tent covered koji-making apparatus in which the depth of rice-layer was adjusted to 15 cm and the temperature of layer was regulated at 37~38°C by circulating aeration. The moisture content of koji was kept at 38~40% by sprinkling and mixing. ●---●, monascorubrin(%) in wet koji; ▲---▲, pH; □-□, moisture content; △-△, temperature; ○-○, acidity (ml of 0.1N/g koji); ○-○, heat evolved by growth of mold expressed as the time of aeration device working for each 6 hr of cultivation

れることを知った。なお、製麹装置の殺菌剤は1%塩化ベンザルコニウム液が最も有効であった。

製麹中の色素生産は、6~7日目にかけて急速に増加し、8日目もなお増加傾向を示す。また、紅麹菌の最も盛んな時期は5日目、以後急速に減少することから、菌が成熟したのちに色素生産が行われることを裏づけるものである (Fig. 1.)。

紅麹菌を食品に利用する場合、味の面から有機酸組成が重要な要素になることから、黄麹菌、黒麹菌と比較した結果、ピログルタミン酸、酢酸、リンゴ酸、グルタミン酸が多く、清酒に利用した場合は味に巾があり、旨味に富む製品になることが推察される (Table 1)。

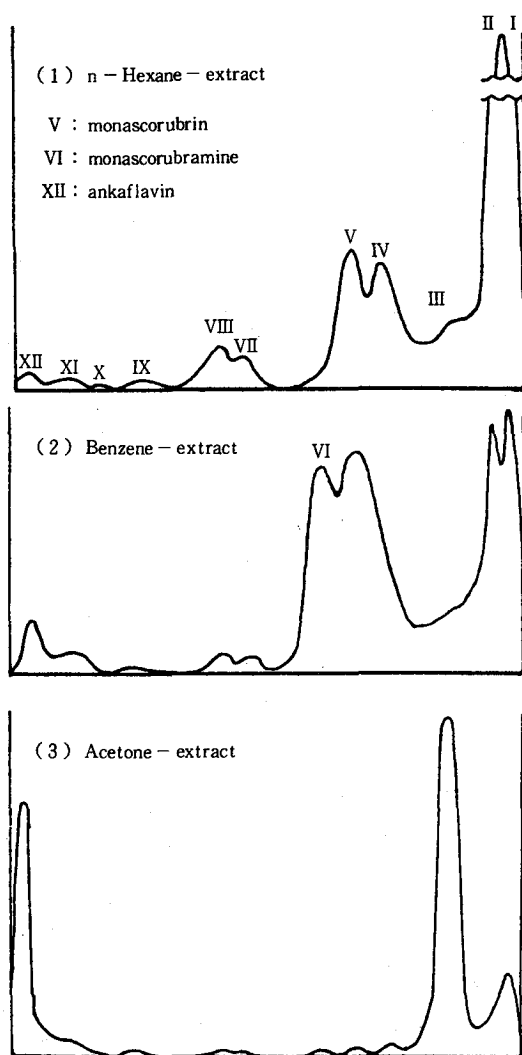
Table 1. Organic Acids in Koji

Organic acids	Asp japonicus	Asp. oryzae	UN 202-13
Pyroglutamic acid	3.0	1.0	57.8
Lactic acid	0.9	0.3	2.9
Acetic acid	2.4	0.8	15.8
Pyruvic acid	-	-	Trace
Formic acid	-	-	Trace
Malic acid	5.6	3.9	46.6
Citric acid	284.2	31.5	103.7
Succinic acid	2.1	1.0	Trace
α -Ketoglutaric acid	9.0	-	9.0
Glutamic acid, etc.	79.1	53.6	311.8

第2章 色素の精製とその理化学的性質および生化学的性質

1) 色素の精製

固体紅麴をn-ヘキサン、ベンゼン、アセトンで順次抽出していくと、現在知られている6種の色素のほか、5~6種の色素が新たに存在することを認めた (Fig. 2.)。



ついで、これらの色素を上記3種の溶剤区分について精製した結果、n-ヘキサン区分から黄色のアンカフラビンと橙色のモナスコルブリンが、また、ベンゼン区分からは紫色のモナスコルブラミンが結晶として単離できた。しかし、アセトン区分からは赤色のペースト状色素が得られたが単離するに至っていない。

(Fig. 2.)

Fig. 2. Thin-layer Chromatographic Pattern of Various Extracted Dye by Chromatoscana.

Analytical condition: λ_R 700nm, λ_S 480nm, scan speed 40,
Solvent system : ethyl acetate/n-hexane/acetone/
ethanol/dichloromethane/water (3/15/10/2/2/3),
allowed to stand for 30 min and used to upper layer.

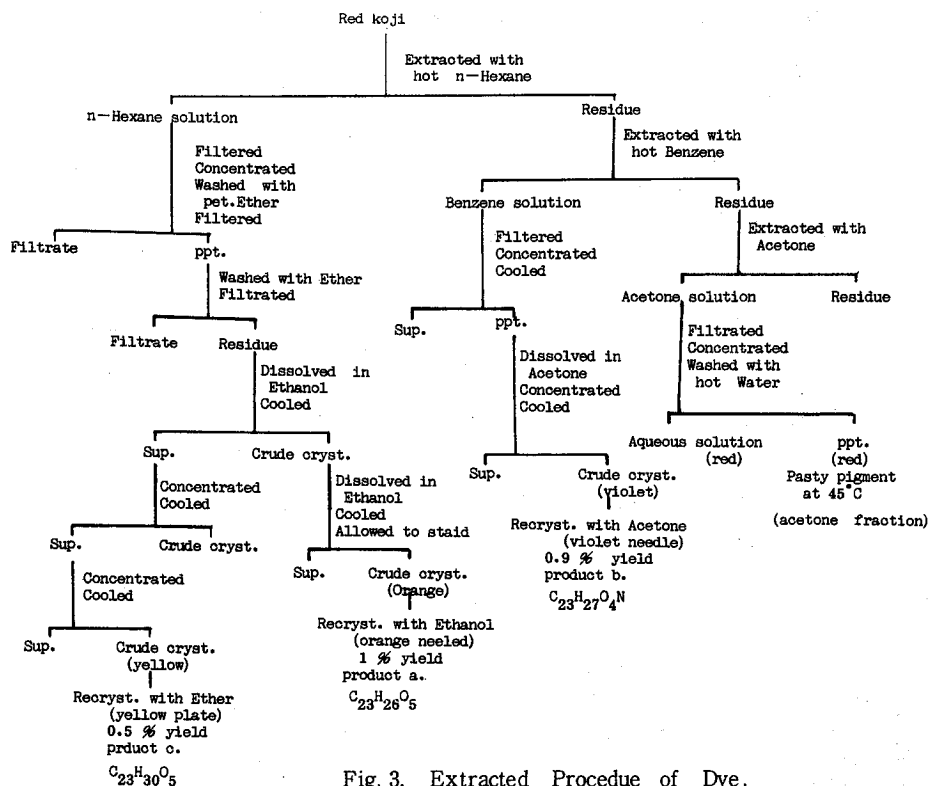


Fig. 3. Extracted Procedure of Dye.

2) 色素の理化学的性質

1) で得た色素を用いて、有機溶剤に対する溶解性並びに pH の影響について検討した結果、これらの色素はエタノール、酢酸によく溶けエタノールでは82%、酢酸では78%溶液で溶解度が最も高くなる。また、水溶液では pH が高くなる程よく溶解する。

色素の pH 変動による色調の変化は、エタノール、メタノール色素溶液の場合顕著である。すなわち、酸性側において赤色、アルカリ側において赤紫ないし紫色を呈する。この色調変化を引き起す色素はモナスコルブリンであることが明らかとなり、色素量測定にあたって pH を決めておく必要が生じてくるのである。このため、紅麹菌が産生する全色素量を表わす必要のあるときは、700 nm から 400 nm の可視部の吸光度を積分した値で表わす方が望ましく、この積分値からモナスコルブリン量を換算する方法を明らかにした（モナスコルブリンの 1 mg は積分値 700 に相当する）。

3) 色素の退色とその防止

色素の退色に著しい影響を与える要因は、光、熱、pH、アルコール濃度などであることが明らかになった。

光に対しては（5,000 lux 照射）、0.01%プロピレングリコール（PG）色素溶液の場合アルカリ

側で退色が遅いのに対し、70%エタノール溶液では酸性側で遅くなる (Fig. 4. Fig. 5.)。

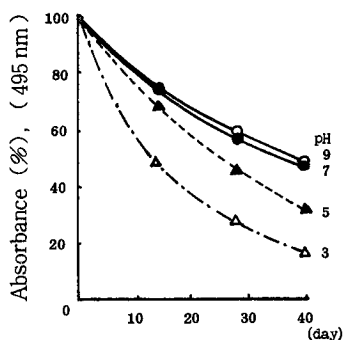


Fig. 4. Photodecomposition of Pigment (0.01% PG)

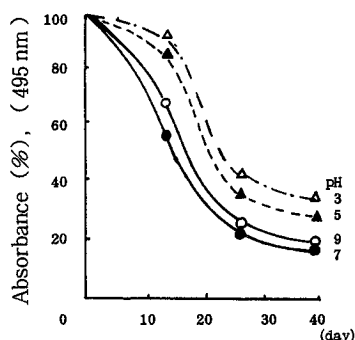


Fig. 5. Photodecomposition of Pigment (70% ethanol)

熱に対しては、0.01% PG色素溶液の場合 130 °C 15分の処理でその60%が分解するのに対し、70%エタノール溶液では25%の分解にとどまった。このことからエタノール色素溶液の分解が少ないことが伺われる。一方、清酒の通常の殺菌温度である62°C 30分処理では、両者とも2~3%が分解するにすぎなかった (Fig. 6 Fig. 7.)。

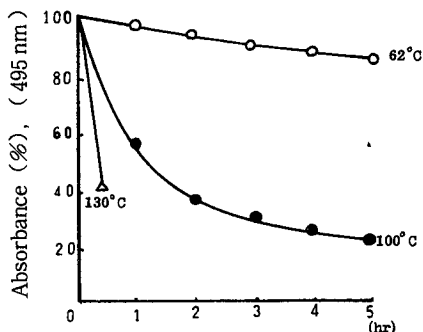


Fig. 6. Thermodecomposition of Pigment (0.01% PG)

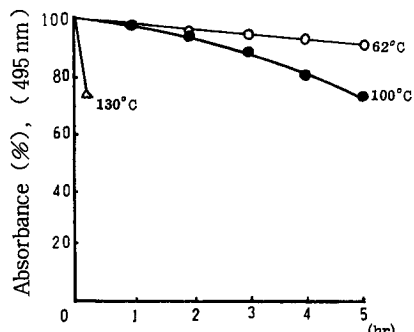


Fig. 7. Thermodecomposition of Pigment (70% ethanol)

一方、色素濃度の高い溶液は、低いものより退色が遅かった。このことは、紅麴色素の食品への利用面で重要な点である。すなわち、紅色清酒の場合色素濃度を高めておけば、たとえ退色が起こったとしてもその退色率低下と相まって残存色素量の多いことから視覚では退色を認めにくくなるのである。

酸素による影響は、脱気するか、窒素ガス置換することによって、退色が幾分抑えられることが明らかになった。

エタノール濃度と退色の関係では、エタノール濃度が高くなるにつれて退色は遅く、また、メタノールとクロロホルムでは、メタノールが早く退色する。

これらの結果から、退色要因の1つとして、溶媒の極性の高いものは低いものより退色が早いという事実から、溶媒の極性増加が活性エネルギーを低下させ、イオン反動的に分解して発色団の共役系がくずれて退色すると考えられる。一方、光が退色に関与することから、光による分子内の歪の発生

とエネルギーの不安定が発色団の共役系に影響を与えて退色が起るのではないかと推察される。そこで若干の抗酸化作用物質の防護作用を検討した結果、ビタミンCの0.01%溶液においてかなりの効果を認めた (Fig. 8.)。

今後、この溶媒の極性と光酸化防止の面から、さらに検討が必要であり、色素の食品への利用面で最も致命的な退色現象を防止する観点から、何らかの端緒が得られるのではないかと現在なおこの点を追求中である。

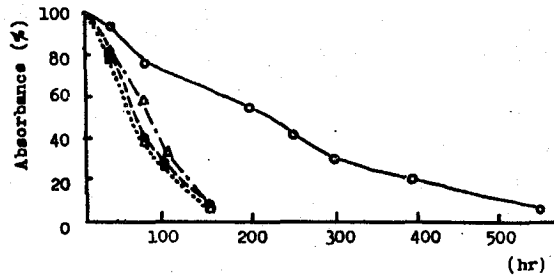


Fig. 8. Inhibitory effect of Vitamine E and Vitamine C on the Photodecomposition of Dye.

Solvent : ethanol 4 : dimethylsulfoxide 1.

- control
- 0.01% vitamine E
- 0.01% vitamine C
- △---△ 0.01% meranoidine

4) 色素の生化学的性質

一般に微生物の生産する物質は、その菌種にとっての栄養貯蔵のため、他の菌に対して自己を有利にするため、あるいは、不用のものを排泄するためなど、種々の機能が考えられるが、必ずしもその機能が明らかでないものもある。この色素モナスコルブリンが紅麹菌すなわちUN 202-13菌に対して、いかなる栄養生理的役割をもっているかを検討した結果、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.01 mol/dl, KH_2PO_4 0.1 g/dl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/dlおよび99.5%エタノール3 ml/dlを含む培地に微量のモナスコルブリンを添加すると、生育および色素生産量が顕著に増加することを認めた (Fig. 9. Fig. 10.)。

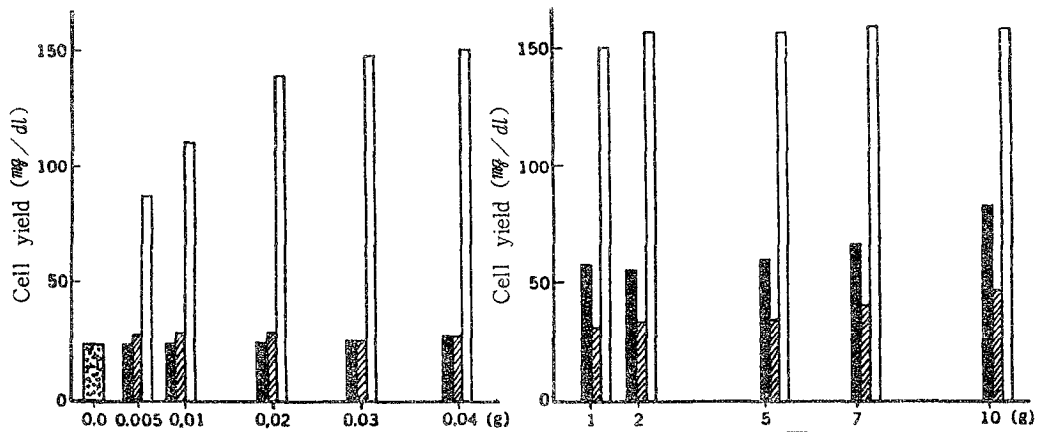


Fig. 9. Comparison of growth in the media containing glucose, or sucrose, or monascorubin.

Control, Glucose, Sucrose, Monascorubin

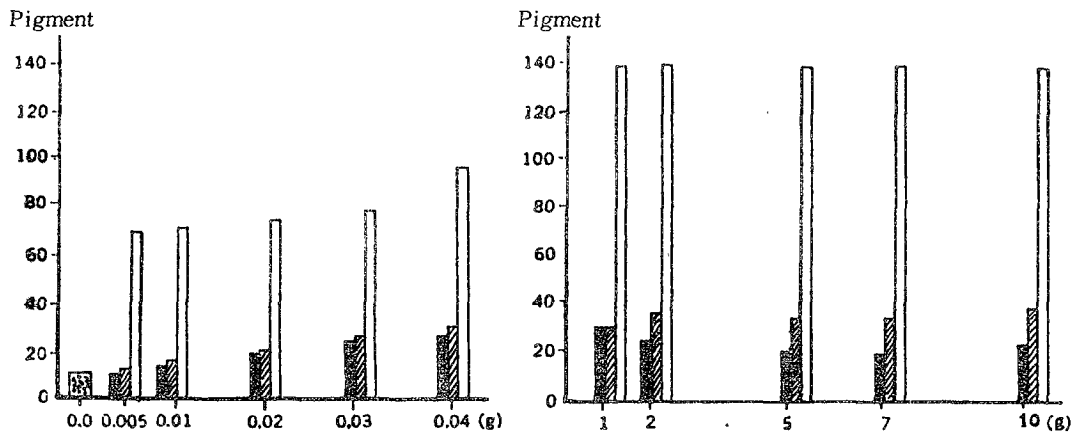


Fig. 10. Comparison of pigment production in the media containing glucose, or sucrose, or monascorubin.

Control, Glucose, Sucrose, Monascorubin

この現象は、UN 202-13 菌がモナスコルブリンを単に排泄物として産生するのではなく、エタノールを有効利用するための賦活剤としての効果を有するものと考えられ、紅麹菌の生体内におけるエネルギー獲得と関係する代謝に関与しているものと推察される。

第3章 紅麹菌産生物質の食品衛生学および栄養学的検討

本章では、第1章で述べた色素高生産変異菌UN 202-13を用いて製造した固体紅麹および色素を含むエタノール抽出物が、有害物質を含んでいるかもしれないという疑いをはらすため、食品衛生学的並びに栄養生理学的面から検討を加えた結果について述べる。

1) アフラトキシンの検出および変異原性の検索

前述の紅麹についてアフラトキシンの抽出を行ない、薄層クロマトグラフィーで検出した結果、アフラトキシン B₁、B₂、G₁、G₂、を対照とした R_f 値に一致するスポットは認められなかった。

また、紅麹のエタノール抽出色素について *B. subtilis* H-17 および M-45 を用いて Rec-assay をおこなった結果、DNA-attacking 陰性であり、*Salmonella* Ames set 株 (TA 1535, 1536, 1537, 1538) を用いて Reversion plate test を行った結果、塩基交換型並びに frameshift 型変異原としての作用が認められなかった。さらに、*B. subtilis* 17A および 45T を用いて色素試料液の 10 倍希釈液を 2 年間連続投与したマウスについて Host mediated rec-assay を行った結果、両菌の生存率に差異が認められず、マウス体内に DNA 損傷物質の存在は推定されなかった。このことから、UN 202-13 が産生する色素は変異誘発性のないことが証明された。

2) 色素の栄養生理学的性質

近年遠藤らは、*Monascus ruber* M 4681 および Na 1005 が産生するコレステロール合成阻害物質 モナコリン J、K、L を発見し、血中コレステロール値の上昇を抑える効果のあることを報告した。このことは、紅麹およびその色素が食品に利用されるにあたって、健康人が常時食物からこれら活性物質を摂取した場合、何らかの薬理的ないしは栄養生理的影響を受ける可能性が懸念される。このような見地から同種属の UN 202-13 菌を含む 8 株の紅麹菌から作った麹について、コレステロール合成阻害活性を知る目的で経口投与による白色ウサギの血清コレステロール値を測定した結果、UN 202-13 には何らそのような作用が認められなかった。したがって、こゝで使用されている紅麹菌にはコレステロール合成阻害物質の生産はなく、安全性が確認できた (Table 2.)。

Table 2. Cholesterol-lowering Activity of the *Monascus* Species

Organisms	Monacolin K μg/g. koji	Serum cholesterol-lowering rate (%)		
		4 days	8 days	12 days
<i>M. anka</i> IFO 4478	<1	<5	<5	<5
<i>M. anka</i> IFO 6540	<1	<5	-	<5
<i>M. paxi</i> IFO 8201	<1	<5	-	<5
<i>M. purupureus</i> IFO 4513	<1	<5	-	<5
<i>M. vitreus</i> IFO 4532	<10	<5	<10	<10
<i>M. anka</i> s.p. UN 202-13	<1	<5	<5	<5
<i>M. ruber</i> No. 1005	540	13.0	13.9	18.7
<i>M. ruber</i> M 4681	3200	26.3	29.0	40.2

第4章 色素の酒類等食品への利用

第1章より第3章までの検討結果をふまえ、紅麹およびその色素の清酒等食品への利用技術並びに

商品化のための諸問題について検討を加えた。

1) 紅色清酒（あかい酒）の製造について

紅色清酒の開発にあたり、清酒製造工程中における紅麴の使用時期、使用量、使用方法を検討した結果、60%エタノール2,272ℓ中に180kg（白米300kg）の紅麴を入れて一夜放置し、発酵終了もろみと一緒に圧搾濾過することによって、紅色の多い原酒を得ることができ、また、この紅色原酒4に対し従来の普通清酒6の割合いで混合、濾過すると、香味、色沢とも良好な紅色清酒が得られることが明らかになった。

紅色清酒の色素量はOD₄₉₅ 2.0をびん詰時の基準と定めた。このびん詰製品を30℃の暗所で貯蔵すると、40～50日間で薄いオレンジ色に退色するが、3℃の場合は殆ど退色が進まなかった。

びん容器については、光に対する影響が少なく、紅色も外観から認知できるスモーク黒びんを選定した。

これらの結果から、紅色清酒は冷暗所保存すれば6ヶ月以上の長期保存が可能であることから、商品化することとした。

2) 赤い水飴の製造について

清酒製造工程中に赤い水飴を加えれば、紅色清酒の製造が可能であり、酒税法で水飴の使用が認められていることから、赤い水飴の製造法を検討した。

50～55℃の水200ℓにアミラーゼ400gを溶解し、この中へ紅麴90kg（白米として150kg）を加えて品温55～60℃とし、24時間糖化後、95%エタノール200ℓ加えて4～5日間放置して色素の溶出を図る。その後濾過し、濾液を減圧濃縮すると赤い水飴が得られる。この水飴は総糖分65.3%、pH5.2で、紅色清酒の270倍の色素量に相当するので、3.7kgの水飴を1,000ℓの清酒に加えれば紅色清酒が得られる。また、この水飴を用いて米菓、カマボコ、畜肉、魚肉、味噌、正油などの着色が可能である。

3) 蛋白性食品の漬床の製造について

豆腐、畜肉、魚肉、魚卵などの蛋白質を漬物素材とし、紅麴を用いて作った漬床にこれらの素材を漬込んで、1～3ヶ月間熟成させると、色、風味、食感共に勝れた食品が得られる。この漬床の研究過程において、低塩漬物をつくる上で興味ある知見を得た。

すなわち、普通の漬物は食塩濃度が7～15%と高く健康上食塩過多の弊害を招き易いことから、5%程度にとどめ、製品の腐敗防止をエタノールと有機酸添加によってこの低塩化を可能にさせた。この場合、エタノール濃度が高くなるとエタノール臭が強くなって商品価値を損ねる。エタノール濃度12～16%の場合、黄麴や色素生産性の低い紅麴菌で作った紅麴を15～16%漬床に用いるとエタノール臭を強く感じるが、UN 202-13菌のように色素生産性の高い菌で作った色素量の多い紅麴を2%程度用いると、それほど臭いを感じなくなるのである。この現象は、色素量とエタノール臭との間に何

らかの関係があるものと思われる、現在なおこの点を追求中である。

4) 紅麴色素の利用について

エタノールによる紅麴色素抽出液を食品に利用することを試みた。

パンフレークで作った紅麴41kgに、80%エタノール130ℓ加えて色素を抽出したのち、圧搾濾過して3時間静置し、その上澄液を食品の着色料として使用する。この抽出色素液はOD₆₈₀ 700で、脂肪の少ない白身の魚、カマボコ（カニ風味など）、タコ、米菓などの食品の着色料に適していることが明らかになった。

また、第2章で述べた色素精製法を用いれば、赤紫、赤、橙、黄色の着色料が得られ、この4色を配合することによって、前述のエタノール抽出色素より純度の高い多種多様な着色料を作ることができた。

要 約

1) *Monascus anka* Nakazawa et Sato を親株とし、これにU. V. 照射に引き続きN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン処理を施して変異菌を分離し、親株の21.4倍の色素を生産する色素高生産変異株UN 202-13菌を得ることができた。この変異菌を用いた固体紅麴を、省力的、かつ、確実に作るため、製麴機の殺菌方法、種麴の製造方法および使用量、品温経過、水分、通気量などの条件を明らかにした。

2) n-ヘキサン、ベンゼン、アセトンなどの有機溶剤を用いて紅麴色素の精製を行い、n-ヘキサンからアンカフラビン、熱n-ヘキサンからモナスコルブリン、ベンゼンからモナスコルブラミンを結晶状に単離することができた。また、アセトンからはペースト状の赤色々素が得られたが単離するに至っていない。

3) これらの色素は、82%のエタノール溶液によく溶け、酸性側で安定であるが、光や熱によって分解され易く、エタノール濃度および色素濃度が低い程不安定であることが明らかになった。

4) 光に対する退色防止を検討した結果、ビタミンCがやや効果を示した。

5) 紅麴菌の産生する色素の一種、モナスコルブリンが紅麴菌自身にどのような栄養生理的役割をもっているかを検討した結果、色素が単なる排泄物でなく、エタノールを有効利用するためのもので、菌のエネルギー代謝に何らかに関与しているものと推察された。

6) 紅麴およびその色素抽出液について、アフラトキシン、微生物に対する変異原性、コレステロール合成阻害活性などを検討した結果、いずれも異状が認められず安全性が確認された。

7) これまでに明らかになった検討結果をふまえ、この紅麴を食品に有効利用するための検討を行った結果、紅色清酒をはじめ、赤い水飴、紅麴を用いた蛋白質の漬物、天然食用色素など新しい食品や添加物を開発することができた。

審査結果の要旨

紅麴菌は古くから中国で紅酒、老酒、紅乳腐などの酒類あるいは食品に広く用いられてきたもので *monascus* 菌の一種である。その産生する色素は 1926 年西川によって初めて結晶化され、その後の研究で主要成分が *monascorubrin*, *rubropunctatin*, *monascin*, *ankaflavin*, *monascorubramine*, *rubropunctamine* であることが分ってきている。

本研究は、この紅麴菌の産生する色素を清酒に利用して「赤い酒」をつくろうとしたことに端を発し、この色素に毒性や変異原性が全くないことから、天然食用色素としての利用をも考え、その基礎的な諸問題について検討したものである。その内容は、(1)色素高生産変異菌株の分離および色素の生産条件の検討、(2)色素の精製とその理化学的・生化学的性質の検討、(3)紅麴菌産生物質の食品衛生ならびに栄養学的検討、(4)色素の酒類等食品への利用、からなっている。

概略すると、まず台湾で紅麴の種菌として用いられている *Monascus anka* Nakazawa et Sato を親株として紫外線照射および N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン 処理で色素高生産変異菌を分離し、色素を精製し、その主要なものを *ankaflavin*, *monascorubrin* および *monascorubramine* であることを同定した。また、その光による退色防止の方法を検討し、ビタミン C がやや効果のあることを見出した。ついで、この色素が、これを産生する菌自体にとってどのような栄養生理的役割をもつのかについて検討し、色素がたんなる菌の排せつ物ではなく、エタノール資化に役立っていることを示した。さらに色素抽出物について、アフラトキシンの存在しないこと、変異原性のないこと、あるいはコレステロール合成阻害活性のないことなどをたしかめ、酒類や食品に応用するについての安全性を確認した。

このような基礎的知見をもとに、清酒をはじめ種々の食品への応用技術についても研究を発展させた。

以上のように、本研究は紅麴菌の産生する色素の酒類や食品への応用のための基礎的事実を数多く見出し、食糧化学の分野に新しい知見を加えた。よって、著者に農学博士の学位を授与する資格があると認定した。