

# 新たな市場を開拓する色鮮やかな新ジャンル日本酒の開発

## Development of a New Genre of Brightly Colored Sake that Opens New Market

### 赤色色素を生産する麹菌による着色

Coloration by Koji Mold that Produces Red Pigment

茂 一孝\*・西垣ひろ美\*・西尾 昭\*\*

Shigeru Kazutaka, Hiromi Nishigaki and Akira Nishio

\*電子・有機素材研究所 有機・発酵グループ、\*\*電子・有機素材研究所

新たな市場を開拓するために、見た目を強く印象づける「色」に着目した新ジャンル日本酒の開発に向け、当センターで見出した赤色色素を生産する麹菌を用いた日本酒の試作を行った。その結果、製麹温度は 38°C、乾燥させない条件で培養することにより赤色成分を生産することが分かった。また、製成酒を pH5 に調整することにより、赤色に発色することを確認した。

## 1. はじめに

成分・品質、製造方法に特徴を持つ日本酒の 1 つとして、色調が赤色の製品が製造されている。本県内でも色調に特徴を持つ製品として有色素米（赤米・紫黒米）を用いた日本酒がこれまでに製造されているが、精米により色素成分が糠（除かれる部分）に多く含まれる等のため、製造上難しい点がある。

また、赤色色素を生産する酵母が市販されているが、増殖力が弱く、完全にろ過してしまうと色が安定しないという課題がある。

これまでに「鳥取オリジナル麹菌の吟醸酒用変異株の育種開発」<sup>1)</sup>に取り組んでいた中で、新たに赤い色素を生成する麹菌 No.1036（変異株）が得られた。特徴は、米麹抽出液が赤色であり、この赤色色素の特性について検討したところ、既存の赤色色素とは異なる成分であることが示唆され、pH5 において赤色を呈した。

そこで、本研究では、赤色色素成分の製麹条件による差異、赤色色素の同定及び発酵試験について検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試素材

#### 2.1.1 供試菌株

麹菌は、当センター保有の麹菌 No.1036<sup>1)</sup>を使用した。また、酵母は協会 7 号（(公財) 日本醸造協会分譲）を使用した。

#### 2.1.2 原料米

シャーレ製麹のため、原料米は  $\alpha$  米（AA-60、徳島精工株式会社製）を使用した。

#### 2.1.3 試薬

赤色色素精製のため、カラムクロマトグラフ用担体として strataC18-T（株式会社島津 GLC 製）及び Wakosil® 40 C18（和光純薬工業株式会社製）を用いた。

### 2.2 試験方法

#### 2.2.1 製麹試験

製麹はシャーレ製麹法<sup>1), 2)</sup>に従い行った。シャーレ（直径 12cm）に  $\alpha$  米 30g を入れ、95°C で 2 時間乾熱殺菌を行った。次いで、麹菌 No.1036 の孢子懸濁製麹水（ $2 \times 10^5$  孢子/ml）12ml を  $\alpha$  米に加え攪拌後、恒温恒湿槽において、30°C、90%RH で 20 時間培養した後、さらに 35°C、85%RH で 24 時間培養を行い、

得られた米麴について赤色色素の生成を確認した。また、温度変化による検討については、20 時間後以降の設定温度を 35°C、38°C及び 42°Cとした。

### 2.2.2 赤色色素成分の生成確認

得られた米麴を、5 倍量の 0.5%NaCl 含む 10mM 酢酸緩衝液 (pH5) 溶液に添加し、5°Cで一昼夜静置後、ろ紙 (No.5C) で濾過し、ろ液を得た。得られたろ液について、分光光度計を用いて 550nm における吸光度 (OD550nm) を測定した。

### 2.2.3 赤色色素成分の同定

得られた米麴から、赤色色素成分を抽出・分画し、LC/MS 分析を行った。赤色色素の抽出・分画方法を図 1 に示す。尚、米麴抽出液 (No.5C によるろ過液) は時間経過と共に赤色に変化するため、限外ろ過工程までは低温環境下 (5°C) で操作し、その後、室温 (20~22°C) において一定時間毎にろ液の一部を固相抽出し、赤色が確認された溶出画分 (②20%エタノール溶出) について、LC/MS 分析を行った。装置は ACQUITY UPLC H-Class/Xevo G2-S QTOF (日本ウォーターズ(株)製)、カラムは BEH C18 1.7 μm (2.1x75mm) を用い、イオン化法は ESI 法で行った。カラムからの溶出は、アセトニトリル 0%から 70%へグラジエントをかけて実施した。

米麴  
 ↓←3倍量の10mM 酢酸緩衝液(pH5)、0.5%NaCl  
 5°C、一昼夜  
 ↓  
 ろ過(No.5C)  
 ↓  
 限外ろ過(5,000MWCO)  
 vivaflow200(ザルトリウス製)  
 ↓  
 ろ液  
 ↓  
 固相抽出(逆相分配)  
 担体: strataC18-T(島津GLC製)  
 溶出: ①15%エタノール溶出  
 (エタノール:10mM 酢酸緩衝液(pH5)、0.5%NaCl=15:85)  
 ②20%エタノール溶出  
 (エタノール:10mM 酢酸緩衝液(pH5)、0.5%NaCl=20:80)  
 ③90%エタノール溶出  
 (エタノール:蒸留水=90:10)

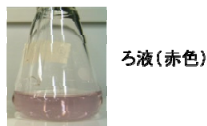


図 1 米麴からの赤色色素成分の分画方法

また、核磁気共鳴分析 (NMR 分析) 装置による構造解析のため、赤色色素成分の大量精製を行った。赤色色素の抽出・精製方法を図 2 に示す。

尚、得られた限外ろ過液は、OD550 の測定値上昇がみられなくなるまで室温下に置き、その後のカラムクロマトグラフィーによる分離・精製操作は、低温環境下 (5°C) で実施した。

本操作を繰り返し行い、回収した画分について strataC18-T カラムを用いた脱塩を行い、その後ロータリーエバポレータを用いて濃縮を行った。得られた色素成分は-20°Cで保管し、NMR 分析 (日本電子 ECP500SS) に供した。

米麴  
 ↓←3倍量の10mM 酢酸緩衝液(pH5)、0.5%NaCl  
 5°C、一昼夜  
 ↓  
 ろ過(No.5C)  
 ↓  
 限外ろ過(5,000MWCO)  
 vivaflow200(ザルトリウス製)  
 ↓  
 ろ液  
 ↓  
 逆相分配による分離・精製  
 担体: Wakosil® 40C18 (和光純薬工業製)  
 溶出: エタノール0%→90% グラジエント

図 2 米麴からの赤色色素成分の精製方法

### 2.2.4 日本酒小仕込み試験

麴菌 No.1036 を用いた米麴を作成し、小仕込み試験を行った。発酵温度は 15°C一定で、遠心分離により上槽を行った。得られた製成酒について、5%重炭酸ソーダ溶液を用いて pH5 に調整後、色調変化を観察した。尚、仕込み配合を表 1 に示す。

表 1 小仕込み試験の配合

仕込み配合	使用量
α化米	180g
米麴 (普通麴 又はNo.1036)	156g
汲み水	380ml
乳酸(90%)	0.34ml
培養酵母(K7)	24ml

### 3. 結果と考察

#### 3.1 製麴温度による赤色色素生産への影響

温度による影響をみるため、麴菌 No.1036 を種付けして培養し、20 時間以後の温度を 35℃、38℃、42℃に変えて米麴を作成し、出来た米麴の抽出液の色調を調べた。その結果、42℃で培養したときに、550nm の吸収がなく赤色色素が生成されず、38℃において多く生産されることが分かった (図 3)。

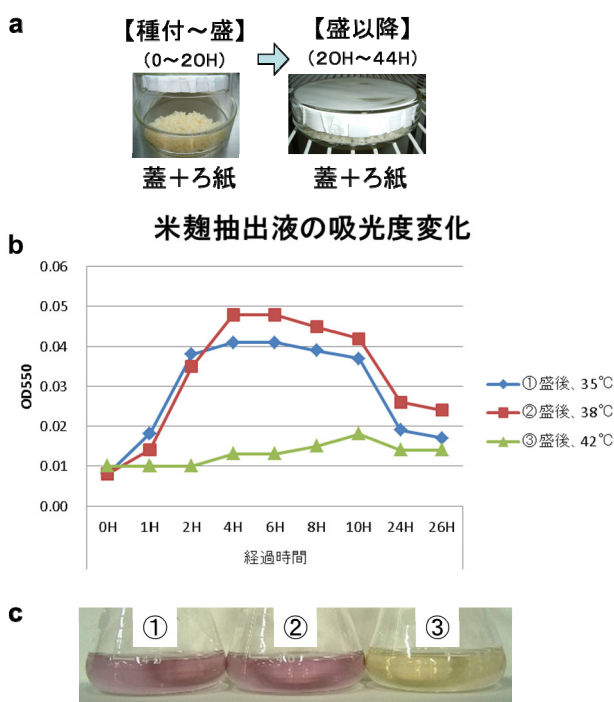


図 3 製麴温度による赤色色素生成の変化

- a : シャーレ製麴
- b : 米麴抽出液の色調の経時変化 (抽出後)
- c : 米麴抽出液の色調差異 (抽出後 4H 経過時)

#### 3.2 製麴湿度による赤色色素生産への影響

湿度の影響をみるため、麴菌 No.1036 を種付けして培養し、湿度条件を変えて (培養中に上にかぶせる蓋や濾紙を調節)、①～④の区分を設定し製麴した。その結果、盛以降 (培養 20 時間後以降) も蓋と濾紙をかぶせた出来上がり水分が 30.5%の、乾燥させない条件でのみ赤色色素を生産し、乾燥条件で製麴すると色素が生成されないことが分かった (図 4)。

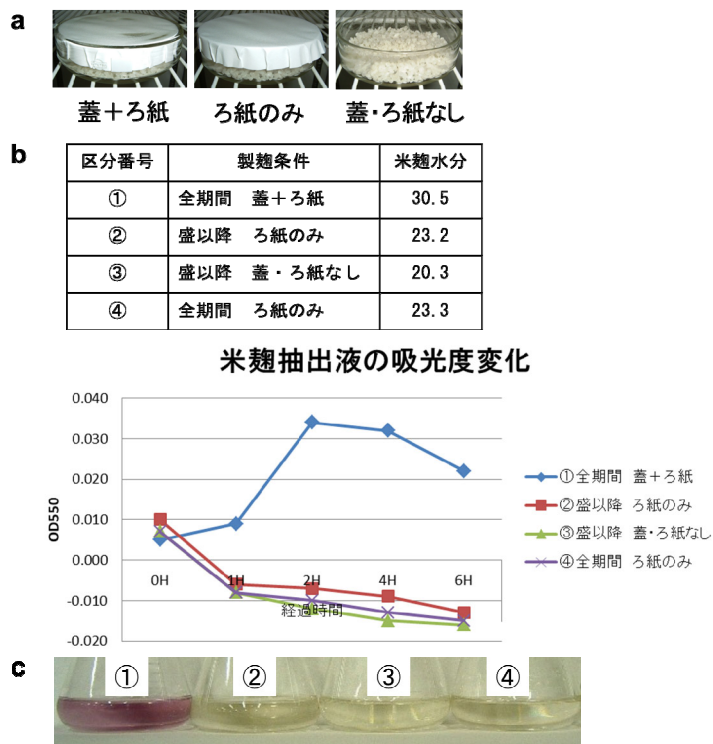


図 4 製麴湿度による赤色色素生成の変化

- a : シャーレ製麴中の湿度調節
- b : 出来上がりの米麴水分と米麴抽出液の色調の経時変化 (抽出後)
- c : 米麴抽出液の色調差異 (抽出後 4H 経過時)

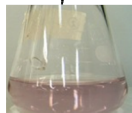
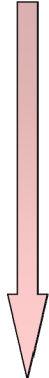
#### 3.3 赤色色素成分の同定

麴菌 No.1036 を使って作成した米麴を緩衝液に浸けて、色素成分を抽出し、ろ過と限外ろ過で、低分子のものを採取した後に、時間経過毎に固相抽出を行った。この 20%エタノール溶出画分②について LC/MS 分析を行った (図 5)。米麴抽出液が時間経過と共に赤色に変化するため、それに伴って増加する成分を調べた。その結果、550nm に吸収を持つ 2 つのピークが検出され、質量測定により①が 318.18、②が 313.15 という質量であることが分かった。また、それぞれの元素組成も推定された。

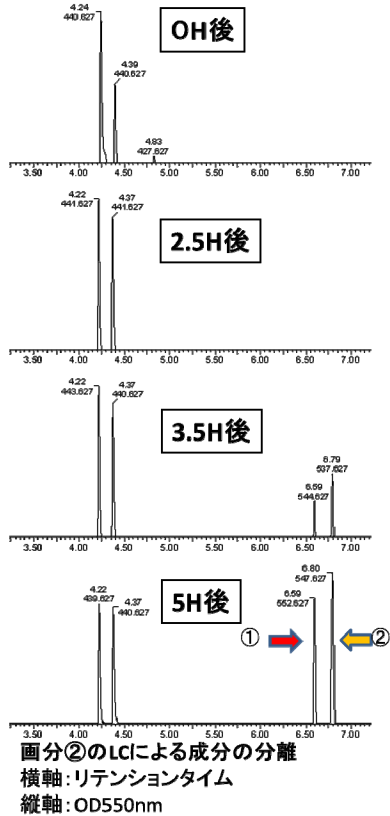
### 米麴抽出液の色調変化



淡黄色



赤色



MSIによる測定

ピーク番号	分子の質量 (m/z)	元素組成 (推定)
①	318.18	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
②	313.15	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>

図5 LC/MSによる色素成分の分析

低温環境において、米麴抽出液 (pH5) を限外ろ過し、低分子画分を取得。得られた低分子画分を室温に静置後から経過時間毎に分析。

### 3.4 赤色色素成分の構造解析

核磁気共鳴分析 (NMR 分析) 装置による構造解析のため、色素成分の大量精製を行った。分離・精製は、カラムによる分離でグラジエント溶出を行った。その結果、色素のバンドが2つ確認され、A が青っぽい色、B が赤っぽい色であった。この A、B 画分を繰り返し精製・回収し、それぞれ得られた 0.004g、0.01 g のサンプルの内、ピーク B について NMR 構造解析を行った (図 6)。

その結果、ベンゼン環を持つことは確認できたが、サンプル量が少なく、それ以上の情報を得ることはできなかった (データ非掲載)。

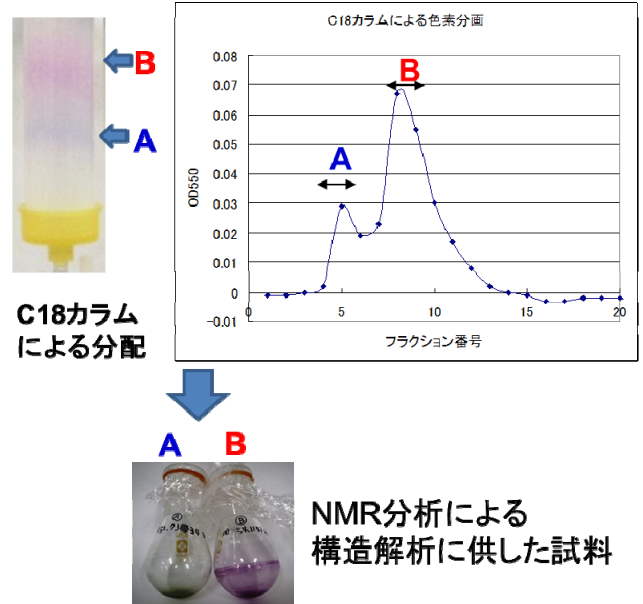


図6 NMR 分析のためのカラムクロマトグラフィーによる精製

### 3.5 小仕込み日本酒の色調変化

麹菌 No.1036 の赤色色素は pH5 の環境のみで赤色を呈するが、pH5 に調整した後に長時間放置すると退色するため、飲酒時の pH 調整方法の検討を行った。麹菌 No.1036 で米麴を作成し、小仕込み試験を行い、日本酒を製造した (図 7a)。日本酒の pH は 4 前後であり、食品で使用可能な重曹を用いて pH5 に調整した (図 7b)。

尚、一般の市販麹菌で作られた米麴 (普通麴) を使用したものを比較対照とした。

その結果、普通麴のものは色調の変化はみられなかったが、色素を生成する麹菌 No.1036 の方は、赤色に変化させることが出来たが、徐々に退色し 26 時間後には赤色の色調がほぼ元に戻っていた。

a

成分	市販麹菌使用の普通麹	No.1036使用の米麹
アルコール(%)	17.4	17.5
日本酒度	-29.8	-26.3
酸度(ml)	3.6	4.5
アミノ酸度(ml)	3.2	3.2
pH	4.3	4.0

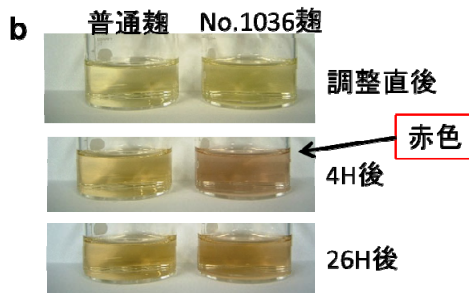


図7 pH調整による色調変化

a : 製成酒の成分値、b : pH5 に調整後の色調変化

## 文献

- 1) 茂一孝; 鳥取県産業技術センター研究報告, 15, p28-31(2012)
- 2) 岡崎直人; 日本醸造協会誌, 74(11), p.738-739(1979)

## 4. おわりに

今回、赤色色素を生成する麹菌 No.1036 について、製麹条件による違いをみたところ、乾燥させず、温度は 38℃までの条件で製麹することで赤色成分を生成することが分かった。その赤色色素成分の同定を試みたところ、2つの成分が検出され、質量はそれぞれ①318.18 と②313.15 と推定された。

また、小仕込み試験による製成酒について、pH5 に調整することで赤色の色調に変化することを確認した。

赤色色素成分の同定、構造解析にはいならず、成分の構造解析や工場生産レベルでの製麹条件の検討が今後の課題である。

## 謝辞

赤色色素についてご助言・ご支援いただいた株式会社 樋口松之助商店 山下秀行 様に厚くお礼申し上げます。また、本研究の一部は、鳥取県産学共同事業化プロジェクト支援事業（平成 29～令和元年度）で実施されたものです（6つの企業・支援機関で構成）。ご協力いただいた参画メンバーの皆様に深く感謝申し上げます。