

紅麴菌の生産する色素に関する研究

食品室 田村博三・小島樹彦・赤嶺欣哉・照屋比呂子

1. はじめに

紅麴菌 (Monascus) は、古くから中国・台湾で、紅酒・老紅酒・紅腐乳・乾肉等広く食品に利用されており、本県においても、赤飯・紅梅卵・紅カマボコ・花イカ・お菓子の着色剤として利用されてきた。また、天然色素の生産菌としても知られている。

近年、消費者の健康に対する意識の向上とともに、食品添加物についての認識が高まり、着色料においても、合成着色料より安全性の高い天然着色料の利用が望まれるようになった。

紅麴色素の安全性については、急性毒性に関して、マウスの経口投与試験の結果、物理的にそれ以上不可能な量の水準でも異常は認められず、また、亜急性毒性も、ラットへの投与の結果、体重・臓器とも異常は認められていない^{1) 2)}。このため、多くの食品で赤色着色料として利用されるようになった。

紅麴菌の色素には、赤色の monascorubrin, rubropunctatin, 赤紫色の monascorubramine, rubropunctatamine, 黄色の monascin, ankaflavin, など³⁾がある。

一般的に、紅麴菌の色素の製造は、固体培養法と液体培養法とがある。固体培養法は、パン粉・米・麦・大豆を用いた培地に紅麴菌を培養する方法で、乾燥し粉末として用いるか、色素を抽出して用いられる。液体培養法は、グルコースなどの炭素源とポリペプトンなどの窒素源、さらにリンなどの微量元素を含む培地に、紅麴菌を接種する方法である。現在では、固体培養法より色素の生産効率がよく、培養期間の短く、培養後の抽出が容易でかつ効率のよい液体培養法が主流¹⁾となっている。

本研究は、沖縄で古くから利用されてきた紅麴菌を、今日的な視点で再検討することにより、同麴菌の有用性をあきらかにし、同麴菌を用いた高付加価値製品の開発を図ることを目的とした「紅麴菌利用高付加価値製品の開発事業」の分担課題であり、培養条件の検討と種菌処理による色素生産性について検討を行った。

2. 実験方法

2. 1 使用菌株

沖縄県工業試験場保存紅麴菌株8003・8004・8020・8021・8022の5株を供試した。

2. 2 培地組成

廣井ら⁴⁾の用いた培地を参考にし、つぎの3種類について検討した。

Na1 グルコース5%、ポリペプトン1%、リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4) 0.1%、硫酸マグネシウム・7水和物 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.05%

Na2 グルコース5%、ポリペプトン1%、リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4) 0.1%、硫酸マグネシウム・7水和物 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.05%、L-アスパラギン0.2%

Na3 グルコース5%、ポリペプトン1%、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 0.1%、硫酸マグネシウム・7水和物 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.05%、L-アスパラギン0.2%

2. 3 培養条件

500ml容坂口フラスコに、培地100mlを入れ、滅菌する。スラントに、5mlの滅菌した0.9%の食塩水を加え、白金耳でよく菌体を懸濁する。その上澄液をピペットに取り、2滴を予め用意しておいた培地に加え、32℃、120rpmで振とう培養した。

2. 4 種菌の前処理条件

(1) 無処理

スラントに、5mlの滅菌生理食塩水を加え、白金耳でよく菌体を懸濁し、その上澄液を用いた。

(2) 乳鉢処理

スラントに滅菌生理食塩水を5mlを加え、白金耳で菌体をかきとり、滅菌した乳鉢に移し、大きな菌体の塊が無くなるまで磨細したものをを用いた。

(3) ホモジナイザー処理

乳鉢処理と同様に白金耳で菌体をかきとり、滅菌したピーカーに移し、ヤマト科学(株)社製ウルトラディスペーサーを用い、8000rpmで約1分間ホモジネートしたものをを用いた。

(4) 超音波処理

乳鉢処理と同様に白金耳で菌体をかきとり、滅菌したピーカーに移し、タイテック(株)社製超音波破砕機を用い、20kHz・300Wで約1分間超音波粉碎したものをを用いた。

2. 5 分析方法

- (1) 菌体量の測定：予め105℃で乾燥し、重量を求めておいたNa 2の濾紙を用いて培養液を濾過し、濾紙上の残渣を蒸留水で洗い、105℃で乾燥し重量を求め、濾紙の重量を差し引いて菌体量とした。
- (2) 酸度およびpH：酸度は、濾液10mlにBTB・NR混合指示薬を加え、わずかに緑色を呈するまで、0.1N NaOHを用いて滴定し、そのml数で表した。pHは、ガラス電極pH計で測定した。
- (3) グルコース：(株)日科機製シュガーアナライザー(YSI MODEL 27)で測定した。
- (4) 窒素量：濾液をケルダール法で分解し、三菱化成工業(株)製ケルダール分析装置を用いて測定した。
- (5) 色：東京電色社製カラーアナライザーを用いて測定した。

3. 結果および考察

3. 1 培養液の検討

沖工試Na8003株を用い、Na 1・Na 2・Na 3の培地組成で培養を行った。その結果を表1に示した。

菌体は、48時間頃から急激に増殖し、72時間頃から増殖が鈍くなり、測定を行った120時間まで、緩やかに増殖した。菌体量は、L-アスパラギンを含み初発pHの低いことを特徴とするNa 3の培地が最も多い傾向を示した。この培地は、廣井ら⁹⁾も、菌体量が多いという報告をしている。

グルコース量は、菌体の生育が始まる48時間までは、ほとんど減少していないが、その後菌体の増殖にともない、急激に減少し、96時間頃にはほとんど消費されていた。

全窒素量は、菌体の生育が始まる48時間までは、ほとんど減少しないが、その後菌体の増殖にともない、急激に減少した。しかし、菌体の増殖が鈍化する72時間頃からほとんど消費されていなかった。

表1 組成の異なる培養液の分析および菌体量

項目	生育時間 (hr)	菌体量 (g)	pH	酸 度 (ml)	グルコース量 (g)	全窒素量 (g)	ΔL	Δa	Δb	ΔE
No 1	0	0	6.5	0.19	4.76	0.13				
	48	0.04	6.3	0.19	4.70	0.13	- 0.45	-0.03	1.34	1.41
	72	0.66	4.2	1.89	1.37	0.08	- 3.94	2.38	1.83	4.95
	96	0.87	4.8	0.94	0.02	0.08	-10.05	9.70	3.58	14.42
	120	1.03	5.7	0.28	0.02	0.07	-29.09	20.79	1.97	35.81
No 2	0	0	6.5	0.19	4.84	0.17				
	48	0.05	6.3	0.19	4.83	0.17	0.10	-0.03	0.98	0.99
	72	0.72	4.2	1.89	0.88	0.12	- 5.06	3.31	2.49	6.52
	96	0.93	4.8	1.04	0.02	0.12	-32.68	21.55	- 0.81	39.16
	120	1.08	6.2	0.09	0.02	0.11	-66.85	23.92	-17.94	73.23
No 3	0	0	5.9	0.28	4.90	0.17				
	48	0.10	5.4	0.57	4.90	0.16	- 1.60	-0.01	1.92	2.50
	72	0.82	4.0	2.26	0.73	0.11	- 7.41	7.03	8.50	13.29
	96	1.00	4.7	1.13	0.02	0.11	-21.84	27.57	13.59	37.70
	120	1.11	5.8	0.28	0.02	0.11	-30.17	37.17	14.92	50.15

た。全窒素の消費率は、No 1・No 2・No 3の培地で、それぞれ46%・35%・35%と非常に低い結果であった。

酸度は、菌体が増殖するにしたがい多くなっているが、生育が鈍化する72時間頃から滴定酸度が減少した。pHも酸度と同様に、菌体が増殖するにしたがいpHが下がり、生育が鈍化する72時間頃からpHが上がり始めた。

これらの酸度およびpHの挙動については、炭素源であるグルコースが残存している間は、菌体の増殖にともない有機酸が生成されるため、滴定酸度が多くなり、pHが下がっている。しかし、炭素源が欠乏する72時間以降は、自ら生産した有機酸を資化し、増殖をしているために、滴定酸度が少なくなり、pHが上がっていく⁶⁾ものと推測される。

培養液の色素は、どの培養液でもグルコースが消費されつくす頃から急激に生産された。3種類の培養液の中で、No 2が色差(ΔE)が最も大きく、紫がかった赤色になり、色も濃くなった。No 1・No 3は、 ΔL がNo 2の約半分であり、明るく色も薄かった。

以上の結果から、菌体の生産では、No 3の培地が適していると思われるが、色素の生産は、No 2の培地が良い結果を示した。

グルコースが、96時間目から殆ど無くなり、滴定酸度が減少することから、大量培養するときには、さらにグルコース量の検討が必要である。また、全窒素の測定結果から、窒素の消費量が、50%にも達していないことから、窒素源であるポリペプトン量の検討も必要である。

以後の実験には、色素生産の良好なNo 2の培地を使用した。

3. 2 紅麴菌株の選択

沖工試No.8003・No.8004・No.8020・No.8021・No.8022株を用い、培養を行った。その結果を表2に示した。

表2 菌株の違いによる菌体量および培養液の分析結果

項目	生育時間 (hr)	菌体量 (g)	pH	酸度 (ml)	グルコース量 (g)	全窒素量 (g)	ΔL	Δa	Δb	ΔE
培養液	0	0	6.4	0.19	4.79	0.18				
8003	120	0.91	4.8	1.13	0.02	0.13	-38.52	26.68	-2.79	46.94
8004	120	0.93	4.3	1.79	0.02	0.12	-20.23	26.30	5.99	33.72
8020	120	0.79	4.6	1.41	0.02	0.13	-19.11	21.47	4.19	29.05
8021	120	0.76	4.4	1.70	0.02	0.14	-21.22	15.18	1.27	26.12
8022	120	0.81	4.0	2.73	0.04	0.13	-13.18	18.78	6.07	23.73

菌体量は、8004・8003株が多く、ついで8022・8020・8021株の順であった。

グルコース量は、培養液の検討の時と同様に、培養途中で殆ど消費されていた。

菌体量の多い菌株ほど、窒素の消費量が多かった。また、培養液の検討の時と同様、全窒素として30%程度しか消費していなかった。

酸度は、8022株を除き、培養液の検討と同様、グルコースが消費されたのち、滴定量が少なくなった。8022株は、グルコースの消費が遅いため、有機酸の資化を行っていないものと思われる。

培養液の色は、8003株が色差 (ΔE)、赤さ (Δa) が最も大きく、明るさ (ΔL) が最も小さく暗いため、赤色素を多く生産しているものと思われる。

以上の結果から、菌体量は8004株が多いものの、色の濃さは、8003株が他の菌株に較べかなり濃いことから、今後の実験には、8003株を用いることとした。

3. 3 種菌の前処理方法による色素生成の検討

沖工試No 8003株を用い、無処理・乳鉢処理・ホモジナイザー処理・超音波処理の4種類の方法で種菌を処理し、培養を行った。その結果を表3に示した。

処理の違いによる菌体量の変化はほとんど見られなかったが、無処理と比較すると、各処理とも若干菌体の生育が早いようであった。

これまでの実験と同様に、グルコースは菌体の増殖が始まる培養時間48時間程度までは、わずしか消費されないが、その後の24時間で、ほとんど消費されていた。その中で、ホモジナイザー処理区は、他の処理区に比べ、48時間での消費量が多かった。これは、48時間での菌体量が、他の処理区に比べ多く、グルコースの消費も多くなったものと思われる。

全窒素量もこれまでの実験と同様で、培養120時間の窒素消費量は、41% (超音波処理区) ~ 34% (無処理区) と少なかった。その中で、グルコース量と同様に、ホモジナイザー処理区が、培養48時間での消費量が多かった。またこれと対応して、48時間での菌体量が他の処理区に比べ多かった。

酸度も、これまでの実験と同様にグルコースが消費されたのち、滴定量が少なくなった。培養48時間はホモジナイザー処理区が多くなったが、76時間では、超音波処理区・無処理区が高い値を示し、96時間では、無処理区が最も高く、超音波処理区が最も低い値を示した。

pHも、酸度と同様に、滴定量が多い処理区が低い値を示した。

表3 種菌処理による菌体量および培養液の分析結果

項目	生育時間 (hr)	菌体量 (g)	pH	酸度 (ml)	グルコース量 (g)	全窒素量 (g)	ΔL	Δa	Δb	ΔE
無処理	0	0	6.4	0	4.58	0.18				
	48	0.16	6.0	0.19	4.35	0.16	-0.65	-0.31	-2.20	2.32
	72	0.88	4.3	1.60	0.02	0.11	-12.11	14.86	4.12	19.61
	96	1.01	4.9	0.94	0.01	0.11	-46.64	25.32	-4.19	53.24
	120	1.14	5.7	0.38	0.01	0.12	-53.74	31.68	-6.74	62.75
乳鉢処理	0	0	6.4	0	4.58	0.18				
	48	0.31	5.5	0.28	4.03	0.15	-5.62	3.72	-1.96	7.02
	72	0.91	4.6	1.13	0.02	0.11	-36.97	19.48	-0.64	41.80
	96	1.07	5.4	0.47	0.02	0.11	-59.77	27.52	-10.28	66.60
	120	1.18	5.8	0.38	0.02	0.11	-61.28	34.53	-8.66	70.87
ホモジ ナイザ 処理	0	0	6.4	0	4.58	0.18				
	48	0.45	5.0	0.57	3.56	0.14	-6.92	6.13	-0.51	9.26
	72	0.87	4.5	1.23	0.02	0.11	-20.85	17.35	2.94	27.28
	96	1.05	5.2	0.75	0.02	0.11	-67.86	26.79	-13.02	74.11
120	1.18	6.0	0.19	0.02	0.11	-57.55	33.33	-7.70	66.95	
超音波処理	0	0	6.4	0	4.58	0.18				
	48	0.27	5.8	0.38	4.11	0.16	-5.26	8.20	-1.54	9.86
	72	0.95	4.3	1.70	0.27	0.11	-24.00	27.05	3.85	36.37
	96	1.09	5.4	0.38	0.02	0.11	-59.76	32.23	-8.40	68.42
	120	1.17	5.9	0.19	0.01	0.10	-71.53	27.04	-17.17	78.37

培養液の色は、どの処理区でもグルコースが消費されつくす頃から、急激に色素が生産されている。明るさ (ΔL) は、培養時間が長くなるにつれて小さくなり、色が濃くなっていった。赤さ (Δa) は、培養時間が長くなるにつれて大きくなり、赤色が増加してきた。色差 (ΔE) は、超音波処理区が最も大きく、ついで乳鉢処理区、ホモジナイザー処理区、無処理区の順であった。このことから、超音波処理区がもっとも色素の生産が多いものと思われる。

以上の結果から、接種胞子量の最も少ないと思われる無処理区と、接種胞子量の最も多いと思われる超音波処理区とは、菌体の生育曲線・滴定酸度・pH・窒素量とも、それほど大きな差異は見られないが、色素の生成量は明らかに異なっていた。紅麹菌の色素の生産は、菌糸の先端に分生胞子と子嚢を形成し、被子器を多くつくる環境におくと色素が多量に生産され¹⁾と言われ、また、培地の栄養面からみると、窒素源が消費されつくす頃から色素生産が活発となる¹⁾とされるが、今回行った実験では、菌株の違いか、培養方法の違いか、あるいは組成比の違いによるか明らかでないが、窒素源はあまり消費されず、グルコースが消費されつくす頃から、色素の生産が活発になった。

今後、培地の組成については、さらに検討が必要と思われる。

4. まとめ

紅麹菌の色素生産に関して、培養液、菌株の選択及び種菌の前処理条件を検討して、次の結果を得た。

- (1) 3種類の液体培地で検討した結果、32℃120時間培養で、菌体量が最も多く増加したのは、Na 3の培地であった。色素生産量は、これと異なり、Na 2の培地が色差(ΔE)が大きく、最もよい結果が得られた。
- (2) 沖工試保存紅麹菌株5株を用い、Na 2の培地で32℃120時間培養した結果、菌体量が最も多い菌株は8004株であったが、色素生産については、8003株が最大値を示した。
- (3) 乳鉢処理、ホモジナイザー処理、超音波処理により種菌の前処理を行って、色素生産について検討した結果、処理の違いによる菌体量の変化はほとんど見られなかったが、超音波処理区の色素の生成が最も多かった。

5. 参考文献

- 1) 布谷昭、志水数史、八木和幸、干飯勝則、永浜広子：食品と開発、Vol.23、No 1、51-55、1992
- 2) 谷村顕雄、片山脩、遠藤英美、黒川和男、吉積智司：天然着色料ハンドブック、光琳、1978、453
- 3) 村上英也編著：麹学、日本醸造協会、1986、478
- 4) 廣井忠夫、高橋剛、嶋悌司、鈴木恒夫、月岡本、小笠原長広：農化、Vol.55、No 1、1-6、1981
- 5) M.Yosimura S.Yamanaka K.Mitsuji Y.Hirose : Agr.Biol.Chem.、Vol.39、No 9、1789-1795、1975

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。