赤米色素の分離同定

高橋康次郎・杉本多起哉*・三浦孝志**・鷲巢幸夫**・吉沢淑***

(国税庁醸造試験所)

平成元年6月29日受理

Isolation and Identification of Red Rice Pigments

Kojiro TAKAHASHI, Takiya SUGIMOTO*, Takashi MIURA**, Yukio WASIZU**
and Kiyoshi YOSHIZAWA

(National Research Institute of Brewing, 2-6-30, Takinogawa,
Kita-ku, Tokyo 114, Japan)

Anthocyanin pigments in red rice (*Oryza sativa* var. *Indica*, *Tapol*) were studied in order to utilize them in the manufacture of red sake. They were fully extracted with 95% ethanol containing 0.1% hydrochloric acid. Four anthocyanins were detected as main pigments in crude extracts of red rice. The anthocyanin which comprises about 70% of red rice pigments was identified as cyanidin-3-glucoside (chrysanthemin), and that which comprises 12% of them was identified as peonidin-3-glucoside (oxycoccicyanin). The color stabilities of crude extracts and purified anthocyanins against high temperature and solar irradiation were high, and they were on the same level as violet pigment of corn. Utilization of red rice pigments in sake making did not affect the flavor and taste of produced sake.

Key words: 清酒・赤米・分離

緒 言

赤色を呈する清酒には、*Monascus anka* の生産する色素を利用した新潟県醸造試験場¹⁾が開発した“赤い酒”や酵母のアデニン要求変異株を利用する大内ら²⁾の“桃色にごり酒”がある。なお、古くから飲まれている熊本県の赤酒（灰持酒）、鹿児島県の地酒、島根県の地伝酒、石川県の七尾酒などは、酒中に木灰を添加したもので、微アルカリ性となり着色反応が進行して赤色になったもので雑酒に属する。

これまでの赤い酒は紅麹菌や酵母など微生物を利用したものであるが、筆者らは、米の中に赤色色素を有する赤米または黒米と吸ばれる有色米があることから、この色を利用した清酒の製造を目的として、赤米の主要色素の分離同定及び色素の温度、日光に対する安定性、更には小仕込試験による酒質への影響について検討したので

報告する。

なお、インディカタイプの紫稲や吐血糯の葉鞘、茎、柱頭の色はアントシアニン系色素であり³⁻⁵⁾、ジャポニカタイプの赤米の色はタンニン系⁶⁾色素であることが報告されている。また、赤米色素の清酒リキュールへの利用については筆者ら⁷⁾が既に報告した。

実 験 方 法

1. 供試赤米

昭和61年に熊本県農事試験場で収獲されたインディカタイプの赤米 (*Oryza sativa* var. *Indica*, *Tapol*) を用いた。この赤米は色素蓄積量の最も多い部類に属し、種皮は黒紫色を呈している。色素の抽出には、精米歩合85%までに得られる糠を用いた。

2. 色素の抽出法

赤米の糠をジエチルエーテルで12時間脱脂した後、0.1%塩酸含有95%エタノールを添加(100~1000 ml/g 糠)し、室温に12~24時間放置して抽出を行った。

* 現在 神杉酒造(株)

** 現在 高砂香料工業(株)

*** 現在 東京農業大学

3. 色素の分画・精製法

色素の分画はシリカゲルカラムクロマトグラフィー⁸⁾によった。

内径 23 mm のガラスカラムに水飽和したシリカゲル (Mallinckrodt 製, 100 mesh) 10 g を詰め、展開溶媒には水飽和クロロホルムエタノール系を用いた。

1 フラクション 10 g ずつ分取し、各フラクションの 510 nm における吸光度を測定した。

色素の精製は、シリカゲルカラムによる再クロマトグラフィーまたはプレパック PRC (50 mm × 5 φ) カラムを用い 0.5% リン酸含有メタノールを展開溶媒とする液体クロマトグラフィー (ファルマシア製) によった。

4. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

薄層は Microcrystalline cellulose (スポットフィルム, 東京化成工業製) を用い、展開溶媒には *n*-ブタノール：酢酸：水 (4:1:5, 上層) を用いた。

5. 色素の同定法

色素の構造を決定するために精製色素、酸加水分解生成物及びアルカリ分解生成物について各種分析を行った。

1) 酸加水分解

精製色素を 1 N 塩酸 3 ml 中で 100°C, 4 時間加熱し、NO.5C 濾紙濾過によりアグリコン (アントシアニン, 残渣) と結合糖 (濾液) を得た。これらを濃縮乾固により塩酸を除いて分析に供した。

2) アントシアニンのアルカリ分解

1) の酸加水分解で得られたアントシアニンに飽和 Ba(OH)₂ 3 ml を加え、沸騰水中で 1 時間加熱分解後、6 N 塩酸で弱酸性とし、3 ml の酢酸エチルで 3 回抽出した。これを濃縮乾固後メタノールに溶解し TLC 分析に供した。

3) 吸収スペクトル

色素を 0.1% 塩酸-メタノールに溶解し、日立 220 型分光光度計を用いて測定した。

4) ¹H-NMR スペクトル

精製色素及び酸加水分解で得られるアントシアニンを CD₃OD に溶解し Bruker AM-400 (400 MHz) を用いて測定した。

5) 結合糖の同定

酸加水分解で得られた糖を無水酢酸、酢酸ナトリウム処理によりアセチル化し、ガスクロマトグラフィー (GC) により同定した。分析条件は以下のとおりである。機種：島津 GC-9A, カラム：シリコン OV-101 (25 m, φ0.25 mm, キャピラリー), カラム温度：150°C→280°C (4°C/min 昇温)

6. 色素の安定性

試料には、赤米粗色素及び精製色素、更に、比較のため、グレープスキニン色素 (和光純薬)、紫コーン色素 (和光純薬) 及び赤キャベツ色素 (三栄化学, サンレッド RCF) を用いた。

1) 温度に対する安定性

各色素を 5% メタノール含有 0.1 M McIlvaine バッファー (pH 3.0) に OD₅₁₀⁹⁰ 1.0 程度になるように溶解し、8 ml ずつネジ栓付試験管に分注し、20, 40, 60 及び 80°C の各温度に静置し、経時的に OD₅₁₀⁹⁰ を測定した。残存率 (%) は (処理後の OD₅₁₀⁹⁰/処理前の OD₅₁₀⁹⁰) × 100 で求めた。

2) 日光に対する安定性

上記試料を 10 ml ずつ 50 ml 容三角フラスコにとり、栓をして連続的に日光に曝した。残存率は上と同様の方法で求めた。

7. 清酒の小仕込試験

日本晴 (75% 精白) を用いた総米 200 kg (酵母 K-701, 麴歩合, 20%, 汲水歩合 130%, 15°C, 1 段仕込み) の小仕込みを行った。

色素の添加時期は仕込時または上槽直前とし、色素の添加は、脱脂 85% 糠 6 g を直接膠に添加する方法と、糠 6 g を 30% エタノール 40 ml で抽出し、その 20 ml を添加する方法をとった。なお、一般成分の分析は国税庁所定分析法によった。

実験結果と考察

1. 赤米からの色素の抽出

赤米色素がアントシアニン系色素であることから、抽出溶媒のエタノールまたはメタノールの濃度及び抽出時の pH について検討した結果、溶媒は濃度が高い程、pH は低い程色素の抽出量が多かった。従って、色素の抽出溶媒には 0.1% 塩酸-95% エタノールを用いることとした。

一方、赤米における色素の分布をみるため、玄米を精米して得られる各区分の糠 500 mg を 0.1% 塩酸-95% エタノール 10 ml で 3 回抽出し OD₅₁₀⁹⁰ を測定し、OD₅₁₀⁹⁰ × Vol (ml) で求めたところ、90% 糠 (90% 精米で得られる糠, 以下同様) : 1259, 85% 糠 : 911, 80% 糠 : 568, 75% 糠 : 261, 65% 糠 : 106 の結果であり、玄米の表層に多いことがわかった。なお、85% 糠 1 g 当たり 11.4 mg の粗色素が得られた。

2. 赤米粗色素の組成

溶媒で抽出したままの粗色素を TLC で分析した結果、赤米色素には少なくとも Rf 0, 0.27, 0.33 及び 0.43 の 4 種類の色素が存在することがわかった。各ス

Fig. 1 Fractionation of red rice pigments by silicic acid column chromatography. silicic acid: 10g, solvent: 50 ml, one fraction: 10g. Optical density at 510 nm of each tube was determined.

Fig. 2 TLC of pigments in each fraction obtained from silicic acid column chromatography. Solvent: BAW (4-1-5), Support: Microcrystalline cellulose

ポットを TLC よりかき取り OD_{510}^{510} を測定して各色素の割合を求めたところ、Rf 0.27: 69.6%, Rf 0.33: 12.4%, Rf 0.43: 4%, Rf 0: 14.2% であった。そこで、割合的に多い Rf 0.27 の赤紫系の色素を A, Rf 0.33 の赤色系の色素を B として、この 2 種類の色素の精製単離を行うこととした。

3. 色素の分画精製

色素 A 及び B を単離する目的で粗色素 (OD_{510}^{510} 246 のもの 1 ml) をシリカゲルカラムで分画後、各区分を TLC 分析に供した。クロマトグラムを Fig. 1 に示したが、5 区分 (I ~ V) に分画された。なお、回収率は 75.8% であり、カラムの上端でシリカゲルに吸着されたままの暗褐色の色は溶出されなかった。

各区分の TLC 分析結果を Fig. 2 に示したが、Rf 0.27 の色素 A は II 区分にはほぼ単一スポットとして検出

Fig. 3 Absorption spectra of red rice pigments.

—: Crude pigments
 ----: Pigment A (Rf: 0.27)
: Pigment B (Rf: 0.33)
 Solvent: 0.1% HCl-MeOH

され、Rf 0.33 の色素 B は I 区分に Rf 0.43 の色素と混在していた。N 及び V 区分の色は褐色～暗褐色を呈し、原点に滞ったままであった。

以上の結果を参考に、粗色素約 30 mg を用いて大量処理を行った。

シリカゲル 100 g を用い、展開溶媒の水飽和クロロホルム: エタノール (8: 2) 1 l で溶出される I 区分を色素 B の未精製区分とした。また、水飽和クロロホルム: エタノール (5: 5) 1 l で溶出される色素 A の区分を 15 g ずつ分取し、TLC によって単一スポットの区分のみを集め色素 A 精製区分とした。

色素 A 精製区分を再度シリカゲルカラムクロマトを行った後、凍結乾燥により粉末化した (収量約 8 mg)。

また、色素 B については、未精製区分をプレバック RPC カラムを用いた液体クロマトによって色素 B 区分を分取後、再びシリカゲルカラムクロマトで精製し凍結乾燥により粉末化した (収量約 2 mg)。

4. 色素 A, B の構造解析

1) 吸収スペクトル

粗色素及び色素 A, B を 0.1% 塩酸-メタノールに溶解し、吸収スペクトルを測定した結果を Fig. 3 に示した。

いずれの色素も紫外部の 280 nm 付近と可視部の 530 nm 付近に最大吸収がみられ、色素 A に比べ色素 B の吸収波長がわずかに低波長側にシフトしており、粗色素の吸収曲線は両者の中間を示した。L. W. WULF⁹⁾ の測定値と比較すると、色素 A はシアニジン-3-グルコシドと、色素 B はペオニジン-3-グルコシドの値と近似していた。

2) $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

色素 A 及び B の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Fig. 4 及び

Fig. 4 ^1H -NMR spectrum of pigment A isolated from red rice.

Sample was dissolved in CD_3OD .

Fig. 5 ^1H -NMR spectrum of pigment B isolated from red rice.

Sample was dissolved in CD_3OD .

Fig. 5 に示した。また、各々のアントシアニジンを含め各プロトン吸収の帰属をまとめて Table 1 に示した。

Fig. 5 において、B 環に基づく吸収が 7.01 ($J=8.7$

Hz), 8.04 ($J=2.0$ Hz), 8.25 ($J=8.7, 2.0$ Hz) ppm に 1 H 分ずつ観察され、A 環に基づく吸収が 6.66, 6.89, 9.01 ppm に 1 H 分ずつ観察された。B 環が

また、結合糖のアノマープロトンに由来する吸収が 5.28 ppm ($J=7.7$ Hz) に 1 H 分観察されることより、3, 5, 7 位のいずれかの炭素に糖が 1 分子 β 結合していると推定された。

以上から、色素 A はシアニジン骨架とし、糖が 1 分子結合した構造を持つと考えられた。

色素 B について、Fig. 6 から B 環に基づく吸収が 7.06 ($J=8.7$ Hz), 8.22 ($J=2.2$ Hz), 8.26 ppm ($J=8.7, 2.2$ Hz) に 1 H 分ずつ観察され、かつ、4.02 ppm に芳香環に結合した $-\text{OCH}_3$ 基に基づく吸収が 3 H 分観

察されたことから、B 環は $-\text{OCH}_3$ の構造であると考えられる。また、A 環に基づく吸収が、6.66, 6.93, 9.05 ppm に 1 H 分ずつ観察された。更に、結合糖のアノマープロトン由来の吸収が 5.31 ppm ($J=7.7$ Hz) に観察されることから、3, 5, 7 位のいずれかの炭素に糖が 1 分子 β 結合していると推定される。

以上の結果から、色素 B はペオニジン骨架とし、糖 1 分子結合した構造をもつと考えられた。

3) 結合糖の同定

色素 A 及び B の酸加水分解で得られた糖をアセチル化後 GC 分析を行った結果を Fig. 6 に示した。標準糖との保持時間の比較から、結合糖は色素 A, B ともにグルコースであると同定された。また、 ^1H -NMR スペクトルにおいてのアノマープロトンのカップリング定数 (J

Table 1 H. n. m. r. analyses of pigment A, B and their anthocyanidins in CD_3OD .

	Pigment A		Anthocyanidin		Pigment B		Anthocyanidin	
	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
H-4	9.01	not clear	8.54	0.8	9.05	not clear	8.61	0.6
H-6	6.66	"	6.60	1.9	6.66	"	6.63	2.0
H-8	6.89	"	6.84	1.9, 0.8	6.93	"	6.91	2.0, 0.6
H-2'	8.04	2.0	8.07	2.2	8.22	2.2	8.16	2.1
H-5'	7.01	8.7	6.98	8.8	7.06	8.7	7.06	8.7
H-6'	8.25	8.7, 2.0	8.19	8.8, 2.2	8.26	8.7, 2.2	8.33	8.7, 2.1
Ar- OCH_3					4.02		4.00	
Anomeric H	5.28	7.7			5.31	7.7		
Estimated compound	Cyanidin-3-glucoside		Cyanidin		Peonidin-3-glucoside		Peonidin	

δ : chemical shift, J : coupling constant

Fig. 6 GC analysis of saccharide obtained from acid hydrolysis of pigment A and B.

GC analysis condition; Column, HP-methylsilicon 0.2 mm×50 m; Column temp., 80~250°C/4 min; Inj., 290°C Det., 290°C

=7.7 Hz) からグルコースは β 結合 (α は $J=3.8$ Hz) していると推定される。

糖の結合位置に関しては、合成を行って確認する必要があるが、これまで同定されているアントシアニン系色素が一般的に3位の炭素に糖が結合していること¹⁰⁾、及び Table 1 において、色素と各々のアントシアニジンのプロトン吸収の差異を比較すると4位の炭素のプロトン吸収のみが色素Aで 9.05 ppm→8.61 ppm, 色素Bで 9.01 ppm→8.54 ppm とアントシアニンで低磁場にシフトしており、これが糖の遊離による吸収の変化と考えられることから、グルコースは3位の炭素に結合していると推定した。

4) アントシアニジンの確認

¹H-NMR スペクトルより、色素Aはシアニジンを、色素Bはペオニジンを骨格とすることが推定された。そこで、再確認するために両色素のアントシアニジンを Ba(OH)₂ 飽和溶液で加熱分解して得られるフェノール酸とフロログルシノールの同定を TLC で行った¹⁰⁾ (データは省略)。

その結果、色素Aのアントシアニンからはプロトカテキュ酸とフロログルシノールが、また、色素Bのアントシアニンからはバニリン酸とフロログルシノールが得られ、¹H-NMR スペクトルから推定された構造が支持された。

以上の結果、色素A及びBは、Fig. 7 に示した構造をもつシアニジン-3-グルコシド(クリサンテミン)及びペオニジン-3-グルコシド(オキシコクシアニン)と同定された。なお、シアニジン-3-グルコシドは、紫稲や吐血糯等の葉鞘、葉身、柱頭及び芒等に見出されており^{3~5)}、紫コーン色素の主要成分である¹¹⁾。

また、ペオニジン-3-グルコシドは三色薔やピンクチェリー等に含まれている¹⁰⁾。

5. 色素の安定性

実用的な面を考慮して、色素の温度及び日光に対する

Fig. 7 Structures of pigment A and B isolated from red rice.

Fig. 8 Effect of temperature on the stability of red rice pigments.

Solution: 0.1 M McIlvaine buffer (pH 3)

—○—: Crude pig. —●—: Grape skin pig.
—○—: Pig. A —×—: Corn pig.
—●—: Pig. B —×—: Red cabbage pig.

安定性を3種の天然色素と比較して Fig. 8, 9 に示した。

温度に対しては、40°C 以下ではいずれの色素も 95% 以上の安定性を示したが、温度が高くなるにつれ残存率は低下した。赤米色素は粗色素と精製色素A及びBの間では大差はなく、紫コーン色素と同程度の安定性であった。

日光に対しては、処理条件がかなり厳しい条件であったため、いずれも急激な褪色を示したが、赤米色素はやはり紫コーン色素と同程度の安定性を示した。

Table 2 Composition of sake made using red rice pigments.

States of Pigments	Stage of pigments addition	OD ₅₂₀	Alc. (%)	Sake-meter	pH	Acidity	Amino acidity
Rice bran	First stage	0.569	17.4	- 1.2	4.03	2.92	2.93
	Last stage	1.148					
Alc. ext.	First stage	0.667	18.0	-13.7	4.26	2.37	2.11
	Last stage	1.140					
Control (not added)		0.015	16.7	- 8.5	4.32	2.82	2.83

Rice bran: 6 g/200 g rice

Alc. ext.: Six g of rice bran was extracted with 30% ethanol (40ml), and 20 ml of it was added.

Fig. 9 Effect of solar irradiation on the stability of red rice pigments.

Solution: 0.1M McIlvaine buffer (pH 3)

実際には、温度、日光ともこのような厳しい条件に出合うことはなく、十分に実用に耐える色素といえる。

6. 色素の酒類への利用

赤米色素の添加方法及び添加時期を変え清酒醸造を行い、その製成酒の一般成分を Table 2 に示した。

醪の初期に色素を添加すると米粒に吸着されるため、上槽直前に添加した場合に比べ赤色が約半分に減少した。

添加方法における差はみられないが、アルコール抽出物を添加した場合には、酒税法上リキュール類として取扱われることになる。

低精白赤米 (90% 程度) で清酒を仕込むことも考えられるが、赤米はインディカタイプであること、Kや Mg が内部まで多く (75% 精白赤米 K : 1,560 ppm, Mg : 77

ppm, 日本晴 K : 426 ppm, Mg : 35 ppm) 発酵が急進することなどから、良質の清酒は得られなかった。

Table 2 の製成酒についての官能評価は、香りに関しては色素無添加に比べ特に差はなく、味は色素を添加した方にまろみを感じられるという結果であった。

以上の結果から、赤米の脱脂した 85% 糠を上槽直前に醪に添加することにより、温度や日光に安定な赤色を呈し、香味ともに孫色ない清酒を製造できることがわかった。

最後に貴重な赤米を御恵与下さいました 美少年酒造 (株) 佐々木定氏及び実験に際し御助言を頂きました飯村稔、五味勝也氏に深謝致します。

文 献

- 1) 嶋 梯二: 第 61 回酒類講習・技術テキスト, p.163, 日本醸造協会 (昭 50 年)
- 2) 大内弘造, 西谷尚道, 飯村 稔, 秋山裕一, 小嶋 弥之祐: 特許番号 1251170
- 3) 熊切茂雄: 農学会報, 170, 725 (1916)
- 4) 林 孝三: 資源研彙報, 9, 1 (1946)
- 5) 涼野 元, 畑中 昭, 鈴木健之, 永井威三郎: 日本大学農獣医学部学術研究報告, 8, 65 (1957)
- 6) 山中信介, 松沢一幸, 川西祐成: 奈良県工業試験場研究報告, 12, 4 (1986)
- 7) 吉永和彦, 高橋 康次郎, 吉沢 淑: 醸協, 81, (5) 337 (1986)
- 8) 蓼沼 誠, 高橋康次郎, 佐藤 信: 醸協, 61, (10) 946 (1966)
- 9) L. WULF and C.W. NAGEL: *Am. J. Enol Vitic.*, 29, 42 (1978)
- 10) 天然着色料ハンドブック, 光琳 (1979)
- 11) 中谷延二, 福田ひとみ, 不破英二: 昭和 52 年度 農化大会講演要旨集, p.361 (1977)