紅麴菌のアルコール発酵による 低アルコール酒の開発

紅麴菌のアルコール発酵能と赤色色素を利用するというユニークな発想で、紅色低アルコール酒が開発された。紅麴にはコレステロール合成阻害物質や血圧降下作用が見いだされており、機能性の点でも興味がもたれている。開発に至った経過や製造法、酒の特徴等について解説していただいた。

桑原秀明・馬場 茂

1. はじめに

清酒需要の低迷の一因として、清酒アルコール濃度の高いことが指摘されており、低発酵能酵母を利用することによりアルコール生成を抑える方法^{1,2)}や物理的手段でのアルコール除去法³⁾等が報告されている。さらに、平成4年の酒税法改正に伴う等級廃止により、清酒メーカーは差別化製品の開発に鎗を削っており、低アルコールの吟醸酒や純米酒が製品化されている。

ところで、世界各地には、その土地の気候や原料に根ざした酒類があるが、ほとんどが酵母のアルコール発酵を利用したものである。アルコールの生合成は、酵母に限らず多くの生物で見られる現象であるが、糸状菌もアルコールを生成することが知られており、中国、台湾で古来から食品、漢方薬で使われてきた *Monascus* 属糸状菌（紅麴菌）の中に、8% 前後のエタノールを生成する菌種があることが報告されている⁴⁾。

そこで、糸状菌のアルコール生成能を利用した全く新しいタイプの低アルコール酒の開発を目的として、研究を行った。また、酒造米の精白で副生する米粉（米糠）は、現在主に米菓用原料として利用されているが、さらなる用途開発が望まれていることから、糸状菌によるアルコール発酵の原料としての利用を試みた。本稿では、これらの結果について紹介する。

2. 糸状菌のアルコール発酵能

糸状菌のアルコール発酵能の検索には、飲料の開発を

目的とすることから、醸造に関連する菌種を対象として行った。また、培地としては、酒造米の精白米粉（主に特上粉）に200%の加水をして、市販酵素剤により糖化した糖化液を使用した。

アルコール発酵は、無酸素状態でのエネルギー獲得手段であり、酵母を使ったアルコール発酵では嫌氣的条件下で発酵を行うが、供試した糸状菌は生育に好氣的条件を必要とすることから、振盪培養によりアルコール発酵能を検索した。その結果、いずれの菌株もエタノールの生成が認められた（第1図）。特に、*Monascus* は、培養6日後において6%以上のエタノールを培養液に蓄積していた。また、*Rhizopus* は、生育速度が速く培養3日後にはエタノール生成も最高に達していた。

そこで、これらの中で比較的高いエタノール濃度の高い培養の遠心上清液について、7名のパネルにより官能評価を行った（第1表）。*Aspergillus* は、酸度が低いため味がボケており、また、麴臭が強く感じられた。*R. javanicus* はさわやかな酸味があり、味の点で最も高い評価であった。*Monascus* は、特徴的な香りがあったが、その評価は比較的高かった。また、味の点では、苦味、渋味を感じる物もあったが、適当な酸味があり、評価も平均して高かった。官能評価の結果から、*Monascus* 及び *Rhizopus* を使用することにより、飲料化が可能と思われた。

Monascus は、赤色、黄色または赤紫色の混合色素を生成することから紅麴菌と言われているが、これらモナスカス色素は、現在我国において食品用天然色素として年間600t生産されている⁵⁾。しかし、前記の米粉糖化液

Development of Low Alcoholic Beverage using Alcohol Fermentation of “Beni-koji” Mold
Hideaki KUWABARA and Shigeru BABA (Reserach Institute of Nagano Prefecture)

第1図 糸状菌のアルコール生成能

□: 8日後, ■: 6日後

第1表 糸状菌発酵液の官能評価結果

	味	香り	コメント
<i>A. oryzae</i> RIB 128	2.3	2.4	味ボケ, 麴臭
<i>R. oligosporus</i> NRRL 2710	1.9	1.9	味ボケ, エステル香
<i>R. javanicus</i> IFO 5542	1.3	2.0	さわやか, エステル香
<i>R. oryzae</i> AHU 6555	2.3	2.3	酸ばなれ, エステル香
<i>M. anka</i> AHU 9085	2.0	1.3	苦味, 特徴香
<i>M. major</i> AHU 9089	2.1	1.7	渋味, 特徴香
<i>M. pilosus</i> AHU 9090	1.9	1.6	さわやかな香味
<i>M. purpureus</i> AHU 9451	1.7	1.9	味に幅, 特徴香
<i>M. ruber</i> AHU 9092	2.1	1.9	苦味, 特徴香
<i>M. vitreus</i> AHU 9095	1.4	2.0	ソフト, まるい

評価は, 良好=1, 飲料化可能=2, 飲料化不適=3 で行った。

を使った振盪培養では, *Monascus* のいずれの供試株も色素をほとんど生産しなかった。*Monascus* を使った低アルコール酒の開発に当たっては, この色素を利用することにより色彩の点でも特徴のある酒の開発が期待できることから, 色素生成の容易な固体培養, すなわち紅麴

の利用を試みた。

3. 紅麴を使ったアルコール発酵

我国の醸造に使用される *Aspergillus* 麴 (黄麴) の製麴においても, 製麴ガス中に多種類のアルコール類が検出されている⁶⁾。*Monascus* を蒸米に培養する場合でも, 通気が充分に行われないと, 強いアルコール臭が感じられる。シャーレを用いて密閉状態で培養した紅麴のアルコール含量を測定したところ, 麴中に3%以上のエタノールが認められ, *Monascus* が固体培養においても相当量のエタノールを生成することが分かった。

そこで, 70% 精白米を原料として, 18 cm シャーレ中で 34°C, 5 日間無菌的に調製した6種の紅麴に, 麴と等量の滅菌水を加えて, 8日間 30°C で保温したところ, 5~10% のエタノールを含む赤色の発酵液が得られた (第2図)。発酵液のアルコール組成を調べた結果, 50~120 ppm のイソブチルアルコール並びにイソアミルアルコール, 10~20 ppm の *n*-プロピルアルコールが認

第2図 紅麴のアルコール発酵

□: 4日後, ■: 8日後

第2表 紅麴発酵液のアルコール組成

供 試 菌 株	EtOH % (v/v)	n- PrOH (ppm)	n- BuOH (ppm)	i- BuOH (ppm)	i- AmOH (ppm)
<i>M. anka</i> AHU 9085	9.91	17	10	68	76
<i>M. major</i> AHU 9089	9.61	14	<1	108	78
<i>M. pilosus</i> AHU 9090	4.31	25	4	111	57
<i>M. purpureus</i> AHU 9451	6.46	20	2	103	91
<i>M. ruber</i> AHU 9092	9.39	8	3	50	67
<i>M. vitreus</i> AHU 9095	5.49	14	<1	99	119

められ、酵母による発酵に比べて高級アルコール類が多く含まれており、特徴的な香気を醸し出しているものと思われる（第2表）。ただし、*n*-ブチルアルコールの生成が見られる株もあり、問題点として指摘される。

発酵液中の有機酸は、菌株により特徴があり、大きく2つのグループに分かれた（第3表）。*M. anka*、*M. major* 及び *M. ruber* はコハク酸を主体に生成したが、*M. pilosus*、*M. purpureus* 及び *M. vitreus* はリンゴ酸を主体に生成しており、菌株により特徴のある酸味を構成しているものと思われた。

発酵液は、清酒に比べ酸味が強く特徴のある香味を有していた。しかし、*M. purpureus* と *M. vitreus* の発酵液は苦味が強く感じられ、飲料には不向きと思われた。また、いずれの発酵液にも、紅麴の特徴とも思われるやや不快な含み香があった。飲料化には、苦味が少なく、含み香の比較的良好な *M. anka* が適当と考えられた。

M. anka の紅麴を用いて、製麴日数と汲水歩合を検討した（第4表）。3日麴、5日麴及び7日麴に100~400%の汲水を加えて発酵を行った結果、製麴日数によるアルコール発酵能の差はなく、3日麴で十分な発酵力があることが明らかになった。なお、麴の色素生成は3日では不十分であり、色素生成の点では製麴時間を長くした方が良好であった。

一方、汲水歩合を増すことにより、得られる発酵液のエタノール濃度は低下した。しかし、麴当たりのエタノール生成量は、汲水歩合の増加とともに増加した。このことから汲水歩合の低い場合は、生成エタノールにより発酵が抑制されているものと考えられ、*M. anka* によるエタノール生成は10%前後が限界と考えられた。また、

第4表 製麴日数と汲水歩合の影響

製 麴 日 数	汲 水 歩 合 (%)	エタノール (% (v/v))	エタノール (mg/g 麴)
3 日	100	10.8	86
	200	9.8	157
	300	7.4	177
	400	6.2	197
5 日	100	9.8	78
	200	9.7	155
	300	7.8	186
	400	6.2	197
7 日	100	10.7	85
	200	9.4	149
	300	7.3	174
	400	6.0	191

発酵は、麴に所定量の煮沸殺菌水を加えて、30℃で6日間行った。

汲水歩合300~400%では、麴中の糖質がほぼ消費され、生成エタノールがほぼ限界に達しているものと推察された。

そこで、発酵基質を補給するため、汲水に米粉糖化液の利用を検討した。第3図に Bx.20 の米粉糖化液を100~500% 汲水した場合のエタノール生成経過を示し

第3図 糖化液の添加歩合とエタノール生成経過
添加歩合：…○… 100%，…◇… 200%，…□… 300%，
—△— 400%，…●… 500%

第3表 紅麴発酵液の酸組成

供 試 菌 株	pH	酸 度 (ml/10 ml)	クエン酸 (mg%)	リンゴ酸 (mg%)	コハク酸 (mg%)	フマル酸 (mg%)	乳 酸 (mg%)	酢 酸 (mg%)
<i>M. anka</i> AHU 9085	4.72	4.50	13	17	175	—	—	49
<i>M. major</i> AHU 9089	4.32	4.60	12	25	201	—	—	25
<i>M. pilosus</i> AHU 9090	4.07	4.80	37	209	82	10	—	tr
<i>M. purpureus</i> AHU 9451	4.38	3.80	14	119	104	5	—	—
<i>M. ruber</i> AHU 9092	4.49	5.80	21	35	174	—	25	48
<i>M. vitreus</i> AHU 9095	4.18	4.78	11	171	115	tr	—	3

た。汲水歩合を 500% まで増加しても、発酵速度はやや低下するが、最終的なエタノール濃度に差はなく、汲水に米粉糖化液を利用することにより、より多くの発酵液を得ることが可能であった。

15℃～38℃ の発酵温度における紅麴のエタノール生成経過を第 4 図に示した。発酵温度が高いほど発酵速度は速かったが、発酵液のエタノール濃度は 30℃ が最も高くなった。酒質の点では高温発酵ではあらかるることから、発酵温度は 25～30℃ が適当と考えられた。酵母を使った清酒製造では、低温長期発酵により高品質の発酵液を得ているが、*Monascus* の発酵は 15℃ 以下の発酵温度では、著しく発酵速度が低下した。このため、室温においての自然発酵は困難と思われ、加温の必要があった。

4. 紅麴の製麴に関する検討

紅麴の製麴に関しては、すでに多くの報告⁷⁻⁹⁾があるが、主に色素生産や麴としての酵素生産のための検討であり、アルコール発酵に関する報告はない。そこで、アルコール発酵に及ぼす製麴温度の影響を調べた¹⁰⁾。製麴は、18 cm シャーレを使用して 25～38℃ の温度勾配培養器で行った。34℃ 及び 38℃ の高温試験区では、2 日後の切返し時に既に着色が認められ、生育が盛んであったが、3 日以降着色は進まなくなった。一方、25℃ 及び 27℃ の低温試験区では、生育、着色が 1 日程度遅れたが、3 日以降も着色が順調に進み、7 日後には麴が暗赤色になった。酵素力価（糖化力、pH 3 プロテアーゼ）の点では、高温試験区ほど初期の生育が盛んであったことから酵素力価も高かったが、38℃ では 3 日以降糖化力が低下した。25℃ 及び 27℃ では 7 日麴、また 30～38℃ では 5 日麴を使ってアルコール発酵を行ったところ、25～34℃ では高温試験区の方が速いエタノール生成を示したが、生成量に大差はなかった。しかし、38℃ 麴は、発酵力が低下していた。38℃ の製麴では、色素生成の不良や糖化力の低下の点からも、異常が生じたものと思われた。

廣井ら⁸⁾は、紅麴の製麴に際して生育の旺盛な *Aspergillus* の汚染を防ぐために、製麴初期での品温を 37℃ 付近にするのが良好であると報告していることから、38℃ での製麴でも大きな支障はないと思われる。今回の試験では、シャーレを使って製麴を行ったが、34℃ 及び 38℃ の培養では強いアルコール臭が感じられたことから、通気及び換気の悪い条件下で、生育中に発生したアルコールにより、正常な生育が阻害されたものと推察される。このことから、紅麴の製麴では、通気及び製麴器内の換気に特に留意する必要があると考えられた。製麴

第 4 図 発酵温度の違いによるエタノール生成経過

発酵温度：—○— 15℃, …◇… 20℃, …□… 25℃, —△— 30℃, …●… 34℃, …●… 38℃

温度に関しては、通気装置の付いた製麴器を使って再検討する必要がある。

一方、実用規模で紅麴の製麴を行う場合、*Monascus* は生育が遅いことから細菌の汚染を受けやすく、酒質への影響が懸念される。清酒製造における着色蒸米（赤めし）の発生に関して、浸漬水に有機酸を用いることにより、着色蒸米の発生を防止し、麴中の雑菌数を低減できることが報告されている¹¹⁾。

そこで、紅麴の製麴に関しても、有機酸の利用による雑菌数の低減化を試みた¹²⁾。有機酸としては、酒質への影響を考慮してクエン酸を使用した。その結果、米浸漬水にクエン酸を 0.5% 以上添加して処理することにより、無処理に比べ一般生菌数を $1/10^3 \sim 1/10^4$ に低減することが可能であった。また、クエン酸の使用により麴及び発酵液中のリンゴ酸及びコハク酸含量が低下し、クエン酸が主要な有機酸となり、味覚的にも良好な発酵液が得られた。しかし、1% クエン酸処理ではエタノール生成に若干の影響が見られ、浸漬米のクエン酸処理は、0.5% 前後が適当と考えられた。

5. 紅麴を充填したリアクターによる連続発酵

バイオリアクターにより酵母の連続アルコール発酵を行う場合、酵母が単細胞微生物であることからアルギン酸等による固定化が必要となる。しかし、糸状菌は、菌糸の絡まりによりそれぞれ独自でペレットを形成する。菊池ら¹³⁾は、*Rhizopus* 菌糸ペレットを利用したバイオリアクターにより、発酵調味液の連続生産を報告している。一方、米麴は、麴菌が蒸米中に菌糸を伸ばして菌糸の塊となった一種の固定化菌体と考えることができる。そこで、紅麴を固定化菌体としたバイオリアクターによる連

続アルコール発酵を試みた。

容積 600 ml の対流型リアクターに 240 g の紅麴を充填し、米粉糖化液の遠心上清液を連続的に供給しながら通気運転した結果を第 5 図に示した。流出液のエタノール濃度は、運転開始 4 日後には 6% 以上を示し、6 日後に約 9% と最高に達した。その後 7% に減少したが、15 日後まで 6% 以上の濃度を維持した。その結果、約 10 日間にわたりエタノール濃度 6% 以上の発酵液が連続して得られ、その総量は約 2,800 ml となった。また、この発酵液は、バッチ発酵液で感じられる不快な含み香がなく、香味に優れていた。しかし、流出液の 500 nm における吸光度は、日数の経過とともに漸減し、充填した紅麴の色素が溶出した後、新たな色素生成はないものと考えられた。紅麴によるアルコール発酵の特徴である色彩の点からは、リアクターによる長期の連続発酵は難しいと思われる。また、運転期間後期には、麴からの菌糸の伸長により原料供給孔、散気孔等の目詰まりが起こり、運転不可能な状態になった。

リアクターによる連続発酵というには、あまりにも短期間ではあるが、紅麴のアルコール発酵における品質改善の一手段として有効ではないかと考えている。

6. お わ り に

M. anka のアルコール発酵能を利用して造った発酵液は、赤色の色彩と同時に酸味と独特な香味を特徴とする発酵液である。清酒で高く評価される雑味の少ない酒とは趣を異にするものであるが、その濃厚な味わいが大きな特徴でもある。しかし、一般的に受け入れられるためには、今後さらに菌の改良や醸造法の検討を行う必要があると考えている。

なお、この酒は、米と米麴（ただし、紅麴）を使い発酵後濾過して製品とすることから、酒税法上の清酒の範疇に入るとの見解もあるが、これまでにない糸状菌のアルコール発酵による酒であることから、酒税法上の分類は定かでない。願わくば清酒として、清酒多様化の一助となればと期待するところである。

また、紅麴は、中国で漢方薬としても使われてきた歴史があるが、最近の研究でコレステロール合成阻害物質（モノコリン K）¹⁴⁾ や血圧降下作用¹⁵⁾ が見いだされており、特定保健食品素材として注目されている¹⁶⁾。今後さらに、紅麴菌の生理作用が解明され、健康維持のため多くの食品に利用されることを期待したい。

第 5 図 紅麴を充填したリアクターによる連続発酵試験

●：エタノール濃度，○：残糖，△：吸光度

本稿を終るにあたり、菌株の分譲をいただいた国税庁醸造試験所第 4 研究室、東京大学分子細胞生物学研究所（旧応用微生物研究所）並びに北海道大学応用菌学研究室に感謝の意を表します。

<長野県食品工業試験場>

文 献

- 1) 原 昌道，嶋崎孝行，北野一好，飯村 稔：醸協，78，（5）390（1983）
- 2) 中野成美，佐藤和幸，千田 茂，脇田征也，斎藤至正，須田安彦，長縄真琴，大内弘造：醸協，79，（10）695（1984）
- 3) 佐藤 信，中村欽一，大場俊輝，西野伊史：醸協，78，（8）641（1983）
- 4) 遠藤 章：発酵と工業，43，544（1985）
- 5) 「食品と開発」編集部：食品と開発，29，35（1994）
- 6) 鈴木昌治，小泉武夫：醸協，77，（5）272（1982）
- 7) 蘇遠志：醸協，33，（1）28（1975）
- 8) 廣井忠夫，高橋 剛，嶋 梯司，鈴木恒夫，月岡本，小笠原長宏：農化，55，1（1981）
- 9) 安田正昭，上地玄作，宮里興信：日食工誌，30，63（1983）
- 10) 桑原秀明，近藤君夫，吉川茂利，福澤幹雄：長野食工試研報，21，39（1993）
- 11) 馬場 茂，酒井 寛，福澤幹雄，小栗 勇，西沢直子，飯田俊彦：長野食工試研報，11，1（1983）
- 12) 桑原秀明，近藤君夫，蛭川幸彦，吉川茂利，小栗勇：長野食工試研報，20，43（1992）
- 13) 菊池恭二，古口久美子，高橋順子，伊藤 進：栃木県食品工業指導所研究報告，5，15（1991）
- 14) 根岸忠則，黄 正 財，蓮見恵司，村川茂雄，遠藤章：醸酵工学，64，509（1986）
- 15) 辻 啓介：醸協，89，（3）207（1994）
- 16) 樽井庄一：食品と開発，28，47（1993）