特集

バイオマス系廃棄物のバイオリファイナリー

大麦糠からのアントシアニン系色素の生産

大庭理一郎*・出口智昭**

キーワード：大麦糠，無蒸煮アルコール発酵，アントシアニン，抗酸化作用，機能性色素

1. はじめに

食品工業において大麦を製麦する際多量の糠が発生する。糠は家畜の飼料となる場合もあるが，ほとんど利用されずに廃棄物となる。私たちはこの未利用農産物である大麦の糠を有効利用できないかという製粉会社の依頼もあり，付加価値のある工業用品にリサイクルすることを目的に研究を行なった。その結果，大麦糠をアルコール発酵させ，その後の発酵濾液を冷温静置することで青紫の沈殿物を得ることができた¹⁾。その青紫色素はアントシアニン色素であることから，食品着色料（活性酸素を消去したり，ガンの予防）として有効利用できると思われ，また機能性色素として機能性食品の素材にもなり得ると思われた。アントシアニン色素はイチゴ，リンゴ，ブドウ，ブルーベリーに代表される赤，紫，青色をした安全な可食色素である。一般に発酵により生成されるアントシアニン色素は例がなく，発酵でアントシアニン色素ができるとなれば，この新規な色素を自然界にある色素と比較するため，色素の製造法や物理化学的な性状などを明らかにすることも重要であった。以下に大麦糠からアントシアニン系色素の製造法とその色素の諸性質について実験方法，測定法，実験データを交えて述べる。本色素の名は大麦の学名より由来し，ホルドミン (Hordeumin) と総称名で呼ぶことにする。

2. ホルドミンの生成（製造）方法²⁻⁴⁾

製粉会社で大麦製麦後の有用粉を除いた粕であ

る大麦糠を原料とする。大麦粒子の精白の仕方で大麦糠でんぷん質と繊維質の度合いが異なるが，でんぷん質が少なめの糠がよい。その大麦糠と水を重量比で3：20の割合で混合し，市販の乾燥パン酵母を大麦糠の10%加えてpHを3.5に調整する。パン酵母は10%以上加える必要がなく，1週間で発酵を促し完了させる。pH調整は重要で3.5以下になれば酵母が発酵しなくなる。またpH3.5以上ならば最終的に生産されるホルドミンの色素量が減少してくる。発酵は1週間30℃で静置にて行なう。発酵は炭酸ガスの発生度合いで測定されるが4～5日で発生量が減少し，1週間後には大麦糠の約0.5%にあたる重量の炭酸ガスが発生する。大麦糠は蒸煮しなくて，生のまま発酵（無蒸煮発酵）させる。ここで大麦糠をオートクレーブ（高圧蒸気釜）や加熱で殺菌しさらにでんぷんを α 化（内部を膨潤させる）した後発酵させると，炭酸ガスは出ず，ホルドミンも生成しない⁵⁾。生のままの大麦糠はアミラーゼ活性を保持しており⁶⁾，30℃で静置中に徐々に糖化が行われ，さらに酵母でアルコールと炭酸ガスに分解されていく。この過程は自然に還元状態となり，酸化還元電位はゆるやかに下がっていき，発酵が進むほど，ホルドミン生産量は増す。この発酵過程では大麦糠に含まれる各種の成分が大麦糠の酵素や酵母により分解，溶解などが活発に行なわれていると推定している。

つぎに発酵が終わった段階で混合液をろ紙でろ過して黄色のろ液を得た。清澄なる液のpHを3.5に調整して，5℃の冷蔵庫に容器に綿栓をして2

Production of anthocyanin pigment from barley bran

* 崇城大学生物生命学部応用微生物工学科 Riichiro OHBA

** 有明工業高等専門学校物質工学科 Tomoaki DEGUCHI

●：暗所，○：明所，△：酸素+明所
▲：酸素+暗所，□：窒素+明所，■：窒素+暗所

図-1 ホルドミン生成への光と酸素の影響

週間静置した。2週間冷所保存後、ろ液は赤黒くなり、底部に沈殿が生じた。この沈殿溶液を遠心分離で沈殿部分を回収すると青紫色の色素が得られ、この色素をホルドミンと名付けた。図-1にそれを示す結果を示している⁷⁾。ろ過後、フラスコに窒素を吹き込み、酸素を追い出して暗所に置いた時、ホルドミンの生成量は最小であり、フラスコに酸素（空気）が常に入る状態で光（3000ルクスの蛍光灯）を当てた時、ホルドミンの生成量は最大であった（図-1参照）。色素生成過程は酸化過程であり、酸素なくしてホルドミンは生成せず、酸素がある状態で酸素ラジカル消去試薬を共存させるとホルドミン量は減少した⁶⁾。後の項でホルドミンの成分について述べるが、ホルドミンはポリアントシアニン、他のポリフェノール、タンパク質（ペプチド含む）や糖類がラジカル重合して、色素生成過程で沈殿を生じたものと推察している。ホルドミンの生成量は大麦糠の0.1%前後であった。

3. ホルドミンの物理・化学的性質

3.1 ホルドミンの色素の性質

ホルドミン（乾燥品）は難水性でアルコール類やアセトンには可溶であった。ホルドミン溶液はpHによって溶液の色が異なった。酸性領域では青紫色、弱酸性領域では紫色、中性付近は薄青色、アルカリ性領域では緑色と変化した。酸性からアルカリ性での色の変化は可逆性であった²⁾。ホルドミンの酸性（1%塩酸メタノール）溶液中での

図-2 ホルドミンの吸収スペクトル

吸収スペクトルを図-2に示す。410nm付近に最小吸収値、260と500nm付近に最大吸収値を有するアントシアニン系に特有な吸収パターンを示した。280nm付近に大きなピークがあるのはアントシアニン以外のポリフェノールが存在していることを表わしている。

ホルドミン溶液に塩酸を加え、酸分解すると深紅となった。この深紅の色素の基本構造の定性を定性試薬（薄層クロマトグラフィ²⁾）および高速液体クロマトグラフィで行なうと、シアニジンとデルフィニジンであった。以上の結果より、ホルドミンはアントシアニン系の色素であると判明した。

ホルドミンの酸分解溶液より糖の定性を行なったところ、グルコースが検出された。さらにアントシアニンに結合している有機酸を定性すると

シアニジン

デルフィニジン

β-D-グルコース

p-クマール酸

図-3 ホルドミンの色素構成成分

p-クマール酸が検出された。よって、ホルドミンのアントシアニン部分の構成成分はシアニジン、デルフィニジンとグルコースさらにp-クマール酸であると思われる(図-3参照)。またホルドミンのタンパク質定性からも多くのアミノ酸基が検出された。これらは精製ホルドミンの成分であることも確認した。さらに精製ホルドミンの分子量は分子篩膜を用いた実験で1万以下の分子量も10~20%あり、1万以上の分子量を持ったものが80%以上であった。

このことより、ホルドミンはアントシアニンがポリフェノールやタンパク質とさらには糖類と結合して複合体となっているアモルファス(組成が一定でなく、種々の)高分子化合物(分子量が数万前後)であると推定している。

3.2 ホルドミンの安定性と安全性

アントシアニン系の色素は溶液中では不安定であり、光、空気中や高温では数時間または数日で減色する。天然色素の中でもアントシアニン類は減色が早い。しかし、本色素ホルドミンは一般のアントシアニン色素より安定性がよく、数十日

間安定であることが判明した^{8,9)}。特にアントシアニジンと比較し、光に強く減色が緩慢であった。これは高分子であるがゆえに分子内転移(スタッキング)でアントシアニンに結合している他分子の保護作用があると推定している。また市販飲料へのホルドミンの着色効果および保存効果を調べたのが図-4である。炭酸飲料中ではホルドミンは市販キャベツ、ブドウ、トウモロコシ起源のアントシアニン標品(いずれも安定剤が含まれる)とほぼ等しく、長期間色調を保持できた。酒中ではブドウの色素が不安定であり、一方、焼酎の中では3種の市販色素は不安定であった。この安定性は主にpHに関係があり、中性付近ではホルドミンが最も安定であった(図-4参照)。

ホルドミンの安全性を明らかにするためエームス法(*Salmonella typhimurium* TA98, S-9 mix)^{10,11)}を用いて変異誘発作用(復帰変異株数)の有無を調べた。結果は2 mg/plate まで調査範囲において陰性で、ホルドミンは変異原をもたない(ガン誘発性がない)ことが分かり¹²⁾、食品学的に安全な色素であると推定された。

注) Pは色素純度を表す計算値

図-4 飲料中でのホルドミンの安定性

4. ホルドミンの食品学的機能性

ホルドミン色素とそれをさらに精製した部分精製色素を使用して、標準的で重要な生体調節作用を試験した。ただし、部分精製ホルドミンはホルドミンを1%塩酸メタノールに溶解した後、ジイソプロピルエーテルで沈殿した画分を部分精製ホルドミンとした。

4.1 抗変異原性¹²⁾ (抗ガン作用)

ガン誘発性の物質 (Trp-1, Trp-2, IQ) とともにホルドミンを混合した場合、はたして変異原性を起こすかまたはどの程度抑制 (抗変異原性) を示すか、エームス法 (微生物のDNAが変異を起こすか否かの試験) の変法で実験した。ホルドミン1mg/plateまで直線的に70~80%の変異原性の阻害を示した (図-5 参照)。また日常の変異原物質である焼き牛肉の抽出物液を使用してホルドミンの抗変異原性を調べると、ホルドミン1mg/plateで74%の阻害を示した。よってホルドミンは効果的な抗変異原性 (抗ガン作用と相関性が強い) をもった色素であることが判明した。

4.2 抗酸化性¹³⁾ (活性酸素消去作用)

キサンチンとキサンチンオキシダーゼで発生させたスーパーオキシドラジカルの消去をESR法で測定した。一定のラジカル強度をもつコントロールより、ホルドミンがあればラジカル強度が減少 (消去) した (図-6 参照)。粗ホルドミンと部分精製ホルドミンでは部分精製ホルドミンの

○: Trp-P-1, △: Trp-P-2, □: B[a]P, ●: 活性化 Trp-P-1, ▲: DEGB, ■: IQ

図-5 ホルドミンの抗変異原性

方が強い消去活性を示した。

つぎにフリーラジカルで青色に呈色している DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 試薬を使用して抗酸化性のテストを行なった。図-7に示すように、粗ホルドミンは40μg/mlの濃度で約10%の消去を示し、部分精製ホルドミンは約40%の消去活性を示した。以上の実験結果よりホルドミン色素に抗酸化作用があることが判明した。これらの抗酸化活性はアントシアニンに起因していると思ったが、大麦糠の抽出液にも同様な抗酸化活性があった。よって、ホルドミンの抗酸化活性は大麦糠のポリフェノール、特にプロシアニジンに起因していると思われる。抗酸化性があることはこのホルドミンが体内に取りこまれ、吸収されれば、活性酸素や過酸化脂質により誘導される疾病 (白内障、動脈硬化、心筋梗塞、脳血栓、脳出

○: 粗ホルドミン, ●: 部分精製ホルドミン

図-6 ホルドミンのスーパーオキシドラジカル消去活性

○: 粗ホルドミン, ●: 部分精製ホルドミン

図-7 ホルドミンのDPPHラジカル消去活性

血など)の予防になると思われる。

4.3 ホルドミンによるラットの肝障害軽減作用¹⁴⁾

ラットは Wistar 系の 5 週齢の雄 (体重170～190 g) を使用した。ホルドミンは生理食塩水に 1 % 溶解し、体重100 g に対して0.8mlを胃ゾンデを用いて投与した。肝臓障害の誘起物質には四塩化炭素を用いた。生体抗酸化作用は肝臓と血液の TBA - RS 値および血液中の GOT, GTP, LDH 値によって評価した。この実験の結果は、ホルドミンを投与することで体重と肝臓の重さの変化はなかった。ホルドミンは四塩化炭素誘起肝臓障害ラットの肝臓 TBA - RS の上昇値を減少させた (図 - 8 参照)。また血液中の GOT, GTP, LDH 値の上昇値も抑制した。以上のことからホルドミンをあらかじめラットに投与することで生体内においてホルドミンは抗酸化作用を示し、四塩化炭素による肝障害を軽減することが明らかとなった。

5. おわりに

大麦には種子として栄養成分を多く含んでいる。その一部を私達は食品として食品加工されたパンや麺類として摂取している。その加工の過程には大麦の外皮を含む多くの部分と成分が廃棄されている。このような食品加工廃棄物の一部は畜産動物の飼料になってはいるが、金銭と絡んで、処分に困り果てている会社もあり、果てに腐らせ、環境汚染問題に発展している場合もある。21世紀は環境循環型の社会構築が叫ばれているなか、加

工食品廃棄物に、まだまだ人間にとって有用なものが含まれていると研究している人が多くなった。本研究もその一環であり一つの例にすぎない。

本ホルドミン色素は世界で初めての発酵によるアントシアニン系色素である点が非常に魅力あるテーマであった。今のところ穀類のなかで大麦、小麦、裸麦、麦芽⁵⁾以外の糠 (外皮を含む) からアントシアニン系色素が生成することは見出されていない。これは種子の成分構成によるものと推定している。発酵・醸造工業で大麦類の発酵液から色素が生成しなかったのは原料を蒸煮していたからで、無蒸煮発酵をすれば大小問わず色素沈殿が問題となって、新しい発見ができたかもしれないが、幸い私達の研究室でそれが実現化して、廃棄物の有効利用となって新しいページが開かれた。しかし、ビール工場では寒冷沈殿や長期保存中に大分子の沈殿物 (おり) が生じる場合がある¹⁵⁾。これは本研究のようにプロアントシアニンやカテキン類がタンパク質やペプチドまた糖類とラジカル重合をしているとみなされる。廃棄物・大麦糠から生じた機能性色素・ホルドミンは安全な色素で、食品添加物として使用した場合、活性酸素の消去、ガンの予防、肝臓障害軽減作用などを期待できるものと思われる。最後に実験結果には記述していないホルドミンの有効利用として染色剤 (特に絹織物) として紺紫色の珍しい色染めが安定してできることを確かめている。本研究で未解決の第一の問題はホルドミンの化学構造が未定である点である。また、水難溶解性をもっと水溶性にする点もある。さらに安全性と機能性を追及し、自然食品添加物として工業化する点にある。この色素を有用物として工業化しても、なお、廃棄物が出る点も解決しなければならない。多くの点を残しながら、一層研究を進めていく予定である。

引用文献

- 1) 大庭理一郎, 五十嵐喜治, 津久井亜紀夫 編: アントシアニン - 食品の色と健康 -, 建帛社, 195-200 (2000)
- 2) Ohba R, Kitaoka S, Ueda S: Properties and precursor of hordeumin produced from uncooked barley bran by ethanol fermentation, J. Ferment. Bioeng., **75**, 121-125 (1993)
- 3) 上田誠之助, 木場洋次郎, 大庭理一郎: 麦類の無蒸煮ア

■: 標準食, □: 標準食 + ホルドミン

グループ 1: 対象 (標準食), グループ 2: ホルドミン投与, グループ 3: 四塩化炭素処理, グループ 4: ホルドミン投与, 四塩化炭素処理

図 - 8 ホルドミンの肝臓 TBA-RS 値への影響