

博士論文

ワイルドライスと各種有色米を用いたアルコール
飲料の試醸とその特性に関する研究

平成 27 年度

崇城大学 大学院工学研究科

応用微生物工学専攻 博士課程

食品生物科学講座

1318D01

竹下良一

目次

緒論	1
第1章 麹菌の作用によるワイルドライス及び有色米の抗酸化能の変化	
第1節 緒言	3
第2節 実験材料と方法	3
1-2-1 発酵原料	3
1-2-2 黄麹の製麹	3
1-2-3 紅麹の製麹	5
1-2-4 黒米色素の抽出	8
1-2-5 甘酒の製造	8
1-2-6 ワイルドライス及び有色米抽出液と 麹抽出液の調製	8
1-2-7 総フェノール性化合物量測定	8
1-2-8 吸収スペクトル測定	10
1-2-9 DPPH ラジカル消去能測定	10
1-2-10 脂質過酸化阻止能測定	13
第3節 結果と考察	16
1-3-1 加熱による穀物の抗酸化能の変化	16
1-3-2 麹のはたらきによる抗酸化能の変化	16
1-3-3 甘酒の抗酸化能の変化	17
第2章 ワイルドライス及び有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性	
第1節 緒言	29
第2節 実験材料と方法	29
2-2-1 発酵原料	29

2-2-2	糖化剤	29
2-2-3	酵母の培養	29
2-2-4	酵母の洗浄及び酵母懸濁液の調製	30
2-2-5	アルコール飲料の試醸	31
2-2-6	発酵曲線の作製	32
2-2-7	pH 測定	32
2-2-8	酸度測定	33
2-2-9	エタノール濃度測定	33
2-2-10	直接還元糖量測定	34
2-2-11	総フェノール性化合物量測定	35
2-2-12	吸収スペクトル測定	35
2-2-13	DPPH ラジカル消去能測定	35
2-2-14	脂質過酸化阻止能測定	35
2-2-15	アントシアニン含有量測定	35
2-2-16	抗酸化物質の含有部位の検討	36
第3節	結果と考察	38
2-3-1	発酵法の違いによるアルコール飲料の品質と抗酸化能	38
2-3-2	糠部分を取り除いた穀物のアルコール飲料の試醸と 抗酸化能	39
2-3-3	糠部分を段階的に取り除いた穀物のアルコール飲料の 抗酸化能	39

第3章 各種酵母を用いたワイルドライスと有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性

第1節	緒言	48
第2節	実験材料と方法	48
3-2-1	発酵原料	48
3-2-2	糖化剤	48
3-2-3	酵母の培養	48
3-2-4	酵母の洗浄及び酵母懸濁液の調製	48

3-2-5	アルコール飲料の試醸	49
3-2-6	発酵曲線の作製	49
3-2-7	pH 測定	49
3-2-8	酸度測定	49
3-2-9	エタノール濃度測定	49
3-2-10	直接還元糖量測定	49
3-2-11	総フェノール性化合物量	49
3-2-12	吸収スペクトル測定	49
3-2-13	DPPH ラジカル消去能測定	49
3-2-14	脂質過酸化阻止能測定	49
第 3 節	結果と考察	50
3-3-1	発酵法及び酵母による組成の違い	50
3-3-2	酵母による抗酸化能の違い	50
3-3-3	アルコール発酵に及ぼす糠部分の影響	50

第4章 黄麴を用いて試醸したワイルドライス及び有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性 その1（白米黄麴による試醸）

第 1 節	緒言	60
第 2 節	実験材料と方法	60
4-2-1	発酵原料	60
4-2-2	黄麴の製麴	60
4-2-3	酵素抽出	60
4-2-4	グルコアミラーゼ活性の測定	61
4-2-5	酵母の培養	62
4-2-6	酵母の洗浄と酵母懸濁液の調製	62
4-2-7	有色米アルコール飲料の試醸	62
4-2-8	発酵曲線の作製	64
4-2-9	pH 測定	64

4-2-10	酸度測定	64
4-2-11	エタノール濃度測定	64
4-2-12	直接還元糖量測定	64
4-2-13	総フェノール性化合物量測定	64
4-2-14	吸収スペクトル測定	64
4-2-15	DPPH ラジカル消去能測定	64
4-2-16	脂質過酸化阻止能測定	64
4-2-17	穀物及び黄麴の糖量測定	64

第3節	結果と考察	65
4-3-1	黄麴の量を変えて試醸したアルコール飲料の組成と 抗酸化能	65
4-3-2	27%麴で試醸した有色穀物のアルコール飲料の組成と 抗酸化能	65
4-3-3	白米黄麴による生米の発酵試験	66

第5章 黄麴を用いて試醸したワイルドライス及び有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性 その2 (有色穀物黄麴による試醸)

第1節	緒言	75
第2節	実験材料と方法	75
5-2-1	発酵原料	75
5-2-2	黄麴の製麴	75
5-2-3	酵素抽出	75
5-2-4	グルコアミラーゼ活性の測定	75
5-2-5	酵母の培養	75
5-2-6	酵母の洗浄と酵母懸濁液の調製	75
5-2-7	ワイルドライス及び有色米アルコール飲料の試醸	76
5-2-8	発酵曲線の作製	77
5-2-9	pH 測定	77

5-2-10	酸度測定	77
5-2-11	エタノール濃度測定	77
5-2-12	直接還元糖量測定	77
5-2-13	総フェノール性化合物量測定	77
5-2-14	吸収スペクトル測定	77
5-2-15	DPPH ラジカル消去能測定	77
5-2-16	脂質過酸化阻止能測定	77
第3節	結果と考察	78
5-3-1	100%有色穀物黄麴で試醸したアルコール飲料の組成と 抗酸化能	78

第6章 紅麴を用いて試醸したワイルドライス及び有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性 その1 (白米紅麴による試醸)

第1節	緒言	85
第2節	実験材料と方法	85
6-2-1	発酵原料	85
6-2-2	紅麴の製麴	85
6-2-3	酵素抽出	86
6-2-4	グルコアミラーゼ活性の測定	86
6-2-5	酵母の培養	86
6-2-6	酵母の洗浄と酵母懸濁液の作成	86
6-2-7	ワイルドライス及び有色米アルコール飲料の試醸	86
6-2-8	発酵曲線の作製	88
6-2-9	pH 測定	88
6-2-10	酸度測定	88
6-2-11	エタノール濃度測定	88
6-2-12	直接還元糖量測定	88
6-2-13	総フェノール性化合物量	88

6-2-14	吸収スペクトル測定	88
6-2-15	DPPH ラジカル消去能測定	88
6-2-16	脂質過酸化阻止能測定	88
6-2-17	穀物及び紅麴の糖量測定	88
第3節	結果と考察	89
6-3-1	紅麴の酵素活性	89
6-3-2	紅麴の量を変えて試醸したアルコール飲料の組成と 抗酸化能	89
6-3-3	有色穀物を用いて試醸したアルコール飲料の組成と 抗酸化能	89
6-3-4	紅麴量の増加とアルコール濃度の減少の関係	90
6-3-5	紅麴による生米の発酵	91

第7章 紅麴を用いて試醸したワイルドライス及び有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性 その2 (有色穀物紅麴による試醸)

第1節	緒言	104
第2節	実験材料と方法	104
7-2-1	発酵原料	104
7-2-2	紅麴の製麴	104
7-2-3	酵母の培養	105
7-2-4	酵母の洗浄と酵母懸濁液の調製	105
7-2-5	ワイルドライス及び有色米アルコール飲料の試醸	105
7-2-6	発酵曲線の作製	106
7-2-7	pH 測定	106
7-2-8	酸度測定	106
7-2-9	エタノール濃度測定	106
7-2-10	直接還元糖量測定	106
7-2-11	総フェノール性化合物量	106

7-2-12	吸収スペクトル測定	106
7-2-13	DPPH ラジカル消去能測定	106
7-2-14	脂質過酸化阻止能測定	106
第3節	結果と考察	107
7-3-1	有色穀物麴で試醸したアルコール飲料の組成と抗酸化能	107
総括	114
参考文献	119
本論文に関係のある学会発表	122
本論文に関係のある報告文	123
謝辞	124

緒論

日常的に食している米のルーツはいわゆる古代米と呼ばれるもので、強い香りと色を持ち味も異なっている。そのため、有色米とも言われている。その色素の多くは糠部分に多く含まれ、抗酸化成分が豊富に含まれている。有色米の呼称は米に含まれる色素の違いにより大きく次の3種に分類される。i) 黒米あるいは紫黒米と呼ばれ、アントシアニンを含むもの、ii) 赤米と呼ばれ、タンニン、カテキンを含むもの、iii) 緑米と呼ばれ、クロロフィルを含むもの。また、黒米には肝機能の改善や視力回復効果、赤米には降圧作用やアンチエイジング効果、そして緑米には整腸や血行促進作用、造血作用があると言われている¹⁾。具体的な抗酸化物質としては、アントシアニン、プロアントシアニン類、フェノール酸、フラボノイド、トコフェロール、フィチン酸及び γ -オリザノールがある²⁻⁴⁾。しかし、これらの抗酸化物質は、改良された新品種には見つからなかったという報告もある⁵⁾。また、*in vitro*で、米粒中のポリフェノールが一酸化窒素の産生を減少させるという現象やスーパーオキシドジスムターゼおよびカタラーゼなどの抗酸化酵素の活性の増加を観察した報告もある^{6,7)}。有色米の他にアントシアニンを含む有色穀物として研究されている穀物にワイルドライスがある^{8,9)}。ワイルドライスは北米原産の水辺に育つ植物で、古くから原住民の主食としてされてきた。中国や日本では近縁の真菰の茎が肥大したマコモダケを食用としている。また、日本では、マコモダケから採取した黒穂菌の胞子をマコモズミと呼び、お歯黒、眉墨、漆器の顔料などに用いられてきた¹⁰⁾。ワイルドライスは高濃度のタンパク質、アミノ酸、リジンを含む低脂肪の食品である¹¹⁾。

麹菌は穀物の中の食品に含まれる潜在化する体調節因子を顕在化¹²⁾する働きを持つ微生物である。麹は麹菌の一種である黄麹菌や黒麹菌を穀物に培養させたものである¹³⁾。その麹を利用して、日本人は古くから味噌、醤油、酒、漬物といった様々な嗜好品を造ってきた。その一つが酒である。平安時代までは麹の「種」として現在のような、蒸米に木灰を加え優良株を摂取して製造した「種麹」¹⁴⁾は用いられず、前回出来た麹の一部をとっておき、これを次回の製麹の時に使用する方法をとっていた¹⁵⁾。その方法を「友麹」あるいは「友種」といい、現在でも紅麹ではその方法を継承している¹⁶⁾。抗酸化能に対する麹菌の影響に関して、黄麹で製麹した白米を用いた甘酒の抗酸化能が乳酸菌や酵母を用いることで付与されることが報告されている¹⁷⁾。また黒麹菌を用いて、サトウキビを糖化することで、機能性を持つエキスの製造が可能であることや¹⁸⁾、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた抗酸化性の検討から黒米を用いた有色米紅麹甘酒の抗

酸化性を検討した研究等が報告されている¹⁹⁾。紅麴は、*Monascus* 属の糸状菌を麴菌とする紅色の菌で古来より主に中国・台湾地方で紅酒、老紅酒、紅乳腐などの原料として用いられてきた。中国の古書「本草綱目」にも「消食活血」「健脾燥胃」の効能を有する漢薬としても利用されてきた。近年、この紅麴に優れた血圧降下作用があることが発見されている²⁰⁻²²⁾。

清酒は麴を水と酵母を用いて、アルコール発酵させたものであり、その歴史は古く、1000年以上の歴史を持つ。既に明らかなことであるが、多量の飲酒はインスリンの分泌を低下させ耐糖能障害を引き起こす²³⁾。一方で、少量の習慣的な飲酒は血糖値を下げて、末梢組織のインスリン感受性を増加させるという報告もある²⁴⁾。また、清酒中の抗酸化活性の調査結果から、清酒中には原料米中よりも強い抗酸化活性が存在することが確かめられている²⁵⁾。本研究室でも素材の抗酸化特性を変化させない工夫として生米を含む無蒸煮発酵法を用いた様々なアルコール飲料を試醸し、その抗酸化能について研究成果を報告している²⁶⁻²⁹⁾。本研究では、高い抗酸化能特性を持つアルコール飲料の開発をめざし、黒米、赤米、緑米の3種類の有色米とワイルドライスを原料にしたアルコール飲料を試醸し、その抗酸化能を中心に分析評価を行った。基礎研究として、玄米、麴、甘酒、アルコール飲料の各段階での抗酸化能の分析評価を行った。また、これまでの本研究室が継続して取り組んできた無蒸煮アルコール発酵法の有用性を検討するために、糖化剤としてリゾープス属起源のスミチーム、黄麴および紅麴を用いて比較検討を行った³⁰⁻³²⁾。さらに協会7号酵母を含む3種類の教室保存菌でアルコール発酵させ、その抗酸化能の違いを比較した。

本研究を進めるにあたり、主として以下の項目について検討を行った。

- 1) 麴菌による有色穀物の抗酸化能の変化
- 2) 有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性
- 3) 各種酵母を用いた有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性
- 4) 黄麴を用いた有色米酒の組成と抗酸化能特性 その1(白米黄麴による試醸)
- 5) 黄麴を用いた有色米酒の組成と抗酸化能特性 その2(有色穀物黄麴による試醸)
- 6) 紅麴を用いた有色米酒の組成と抗酸化能特性 その1(白米紅麴による試醸)
- 7) 紅麴を用いた有色米酒の組成と抗酸化能特性 その2(有色穀物紅麴による試醸)

第1章 麹菌の作用によるワイルドライス及び

有色米の抗酸化能の変化

第1節 緒言

これまでに各種の麹菌で製麹した白米の甘酒、清酒酵母発酵液および乳酸菌発酵液の抗酸化能を測定することにより、新たに抗酸化能が付与されるという興味深い研究がなされている¹⁷⁾。そこで、本章では、麹菌の働きを黄麹と紅麹を用い、有色穀物が持つ抗酸化能が、穀物から、麹、甘酒へと変化する過程でどう変化するのかを検討した。また、有色穀物の中でも高い抗酸化能を有する黒米の色素が麹菌にどう影響されるのかを色調や抗酸化能に着目して検討した。

第2節 実験材料と方法

1-2-1 発酵原料

白米は精白米「ひのひかり」(*Oryza sativa* var. *Japonica* cv. *Hinohikari*)、を熊本市内の量販店から購入した。黒米は黒米玄米「紫雲」(*Oryza sativa* var. *Japonica* cv. *Shiun*)、赤米は赤米玄米「縁起米」(*Oryza sativa* var. *Japonica* cv. *Engimai*)、緑米は緑米玄米「緑の香」(*Oryza sativa* var. *Japonica* cv. *Midorinoka*) をかじわら米穀店から購入した。ワイルドライスは(*Zizania aquatica*) を鈴商から購入した。いずれの穀物も他に記載がない限り、使用に際しては、(株)東京ユニシスの製粉機「ひきっ粉 1000cc 型 T626」を用いて約2~3 mmに破碎した。

1-2-2 黄麹の製麹

製麹に使用した白米、黒米、赤米、緑米、ワイルドライスは1-2-1に記したものを使用した。黄麹製造に使用する種麹「糖化用の黄麹」は(*Aspergillus oryzae*、糖化用黄麹)を河内源一郎商店から購入した。

黄麹の製麹は常法に習った。白米精米100 gを量り採り、15℃下で、脱イオン水を用いて2時間浸漬した。有色米とワイルドライスの場合は、2~3 mmに砕いたものを使用した。浸漬後、ザルを用いて、白米、赤米、ワイルドライスは6時間、黒米、緑米は24時間水切りした。その後、水切りした穀物をシャーレに移し、121℃、15分間オートクレーブした後、無菌箱の中で40℃以下になるまで放冷した。放冷後、種麹0.1 gを加えて十分にほぐした後、蓋の内側に定性濾

紙 No.1 を入れて蓋をし、30°Cの恒温機で製麴状況を確認しながら 40 時間～48 時間培養を行った。製麴中の黄麴の経時変化を測定するために定期的に麴の一部を取り出し冷凍保存した。製麴が完了した黄麴は使用するまで真空パックで冷凍保存した (Figure 1-1, 1-2)。

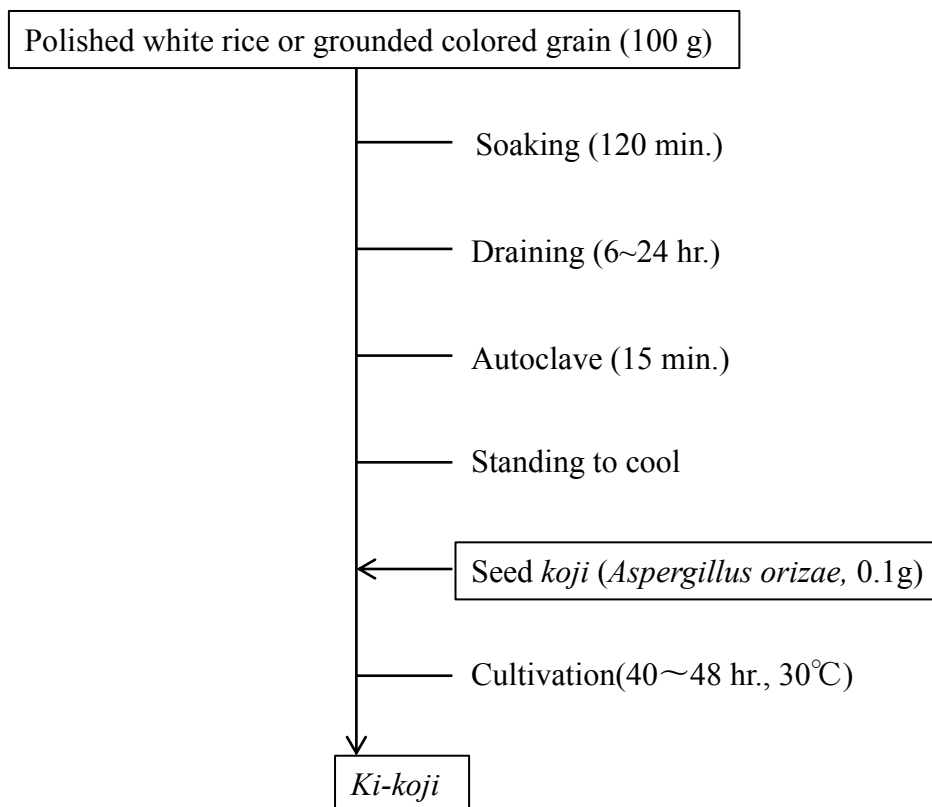


Figure 1-1. Procedure for *ki koji* making.



Figure 1-2. Pictures of various *ki koji*.

1-2-3 紅麴の製麴

《種麴の製造》紅麴は NITE Biological Resource Center より *Monascus purpureus* NBRC 5965 株を入手した。紅麴の製麴は Yasuda らの方法³³⁾を参考にした。各穀物 50 g を量り採り、15℃下で、脱イオン水を用いて 6 時間浸漬し、白米、赤米は 6 時間、緑米、黒米、ワイルドライスは 24 時間かけて水切りした。その後、300 ml 容三角フラスに移し、121℃、15 分間オートクレーブした後、事前に PDA 寒天培地上に培養しておいた種麴の 1 cm 角片を無菌的に接種し、32℃で、14 日間培養して十分に孢子を着生させ、これに別途用意した炊飯米 50 g と水 100 ml を無菌的に添加してよく混合した。この混合物を 32℃で、14 日間再び培養し十分に孢子を着生させ、赤色に発色したものを種麴とした。

《糖化用紅麴の製麴》

製麴用米 50 g を種麴製造の手順で浸漬、水切り、蒸しを行い、種麴 5 g を加えて接種混和した後、32℃で 14 日間培養し、十分に赤色に発色したものを糖化用麴とした。麴の経時変化による酵素活性の観察には、製麴途中の白米麴の一部を取り出す方法をとった。取り出した麴は分析に供するまで冷凍保存した。製麴が完了した紅麴は使用するまで真空パックで冷凍保存した (Figure 1-3, 1-4)。

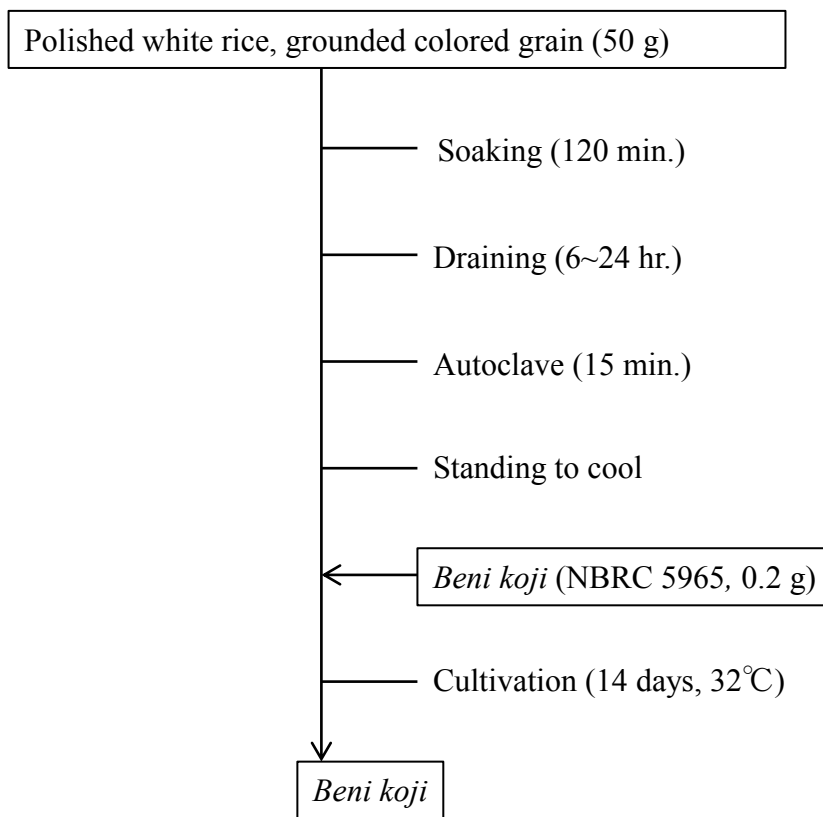


Figure 1-3. Procedure for seed *beni koji* making.



Figure 1-4. Pictures of *beni koji*.

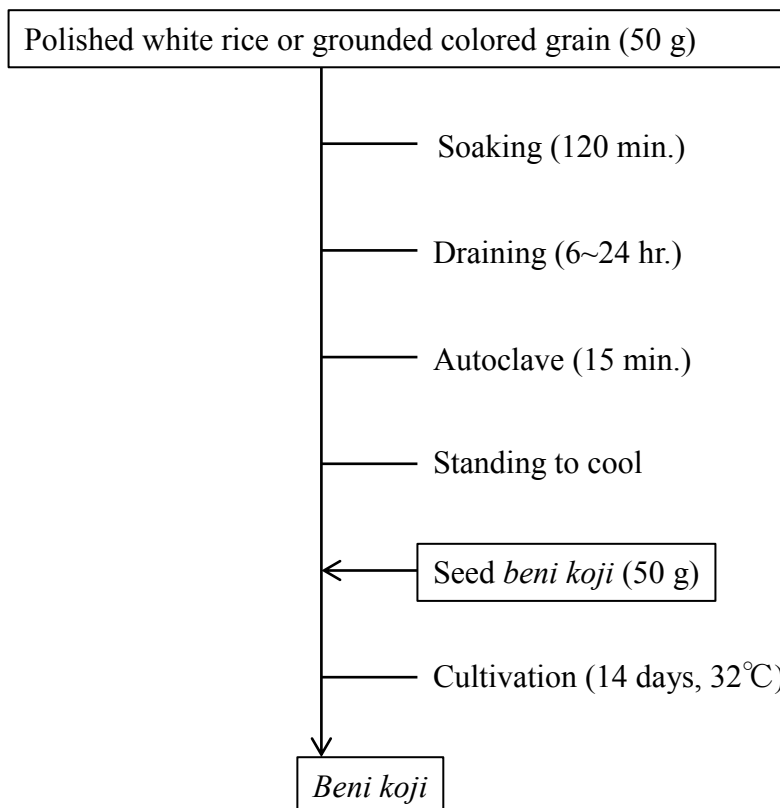


Figure 1-5. Procedure for *beni koji* making.

1-2-4 黒米色素の抽出

黒米の色素を得るために、1-2-1 で記した黒米の表皮部分のみを、慎重にエムケー精工 SM-500 を用いて削り取り、15°C下で、pH 4 に調整したマッキルベイン緩衝液 (McIlvaine buffer) を用いて一晩抽出した。

抽出の割合は、25 g の黒米色素粉に対してマッキルベイン緩衝液 200 ml を用いた。

1-2-5 甘酒の製造

1-1-2 及び 1-2-3 で製麴した黄麴及び紅麴の 20 g を保存用ポリ容器に移し、100 ml の蒸留水と混和したものを 55°Cの恒温槽で糖化させ、2 時間ごとにその一定量 (5 ml) を 10 ml ファルコンチューブに採り分析に供するまで冷凍保存した。

1-2-6 ワイルドライス及び有色米抽出液および麴抽出液の調製

国税庁所定分析法注解³⁴⁾に従い、塩化ナトリウム 1 g を脱イオン水で溶かし、pH 5.0、0.2 M 酢酸緩衝液 10 ml を加え、脱イオン水で 200 ml にメスアップして調製した塩化ナトリウム溶液を無蒸煮穀物、蒸煮穀物及び麴抽出液として使用した。

無蒸煮穀物、蒸煮穀物及び 1-2-2 及び 1-2-3 で冷凍保存した穀物麴を解凍して 50 ml 容ファルコンチューブに移し、各 2 g 対して前述した塩化ナトリウム溶液 10 ml を加え、15°C下で 3 時間、200 rpm の振とう条件において抽出した。

1-2-7 総フェノール性化合物量測定³⁵⁾

フェノール定量試薬 (酸度 ; 1.8 N)、炭酸ナトリウムと没食子酸はナカライテスク株式会社から購入した。

2 倍希釈フェノール定量試薬はフェノール定量試薬と脱イオン水を 1 : 1 の割合で希釈し、10% (w/v) 炭酸ナトリウム溶液は炭酸ナトリウムを 10%の濃度になるように脱イオン水で調製した。没食子酸標準溶液は脱イオン水で 50 µg/ml の濃度に調整し、これをもとにして、40 µg/ml、30 µg/ml、20 µg/ml、10 µg/ml、0 µg/ml の各濃度の溶液を調製した。

標準曲線は、調製した没食子酸標準溶液を Folin-Chiocalteu 法で Hamasaka らの方法を一部改良して測定し、標準曲線から換算係数を求めた (Figure 1-6)。

アルコール飲料の総フェノール性化合物量は、Folin-Chiocalteu 法で Hamasaka

らの方法を一部改良して測定した。脱イオン水で希釈したアルコール飲料の 1.0 ml を短試験管に入れ、2 倍希釈フェノール定量試薬 1.0 ml を添加して速やかに攪拌し、3 分間室温にて静置した。その後、10%炭酸ナトリウム溶液 1.0 ml を添加して攪拌した溶液を 1 時間、室温の暗所で静置した。その後、HITACHI U-1800 分光光度計で 750 nm の吸収値を測定した。この吸収値を A_{sample} とした。ブランクは、サンプルの代わりに脱イオン水を用い、この吸収値を A_{blank} とした。サンプル中の総フェノール性化合物量は、以下の式で計算し、グルコース当量で表した。

$$\text{総フェノール性化合物量 } (\mu\text{g/ml}) = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times \text{換算係数 } (28.0) \times \text{希釈率}$$

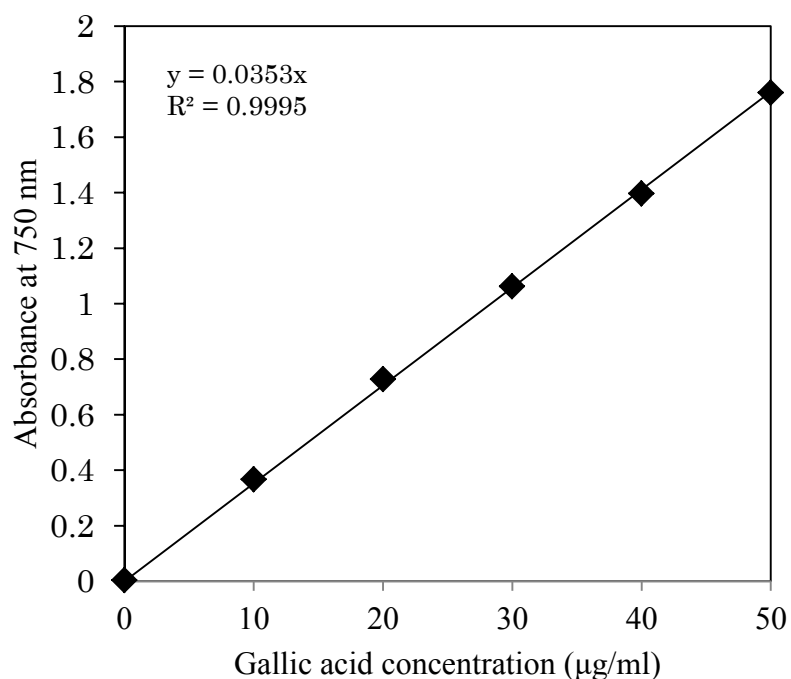


Figure 1-6. Standard curve of gallic acid with Folin-Ciocalteu method.

Range : $0 < y \leq 1.76$

1-2-8 吸収スペクトル測定

適量のサンプルをディスポーザブルメンブレンフィルター(Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) を用いてろ過を行い測定サンプルとした。

サンプルの吸収スペクトルを HITACHI U-3010 分光光度計で 350-650 nm までの波長で測定した。

1-2-9 DPPH ラジカル消去能測定³⁶⁾

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) は溶液中でラジカルの状態で存在する時、溶液は紫色を呈し 520 nm に吸収を持つ。これに、ラジカル消去物質 (RH : 抗酸化物質) が反応すると、DPPH は RH によって還元され、非ラジカル体の 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine になり、淡黄色に変化し、520 nm の吸収が減少する (Figure 2-7)。その変化を分光光度計で測定することで、サンプルに含まれる抗酸化物質の抗酸化能を数値として評価できる。この時、サンプルの白濁をしない利点を持つ緩衝液として、MES 緩衝液を用いた。

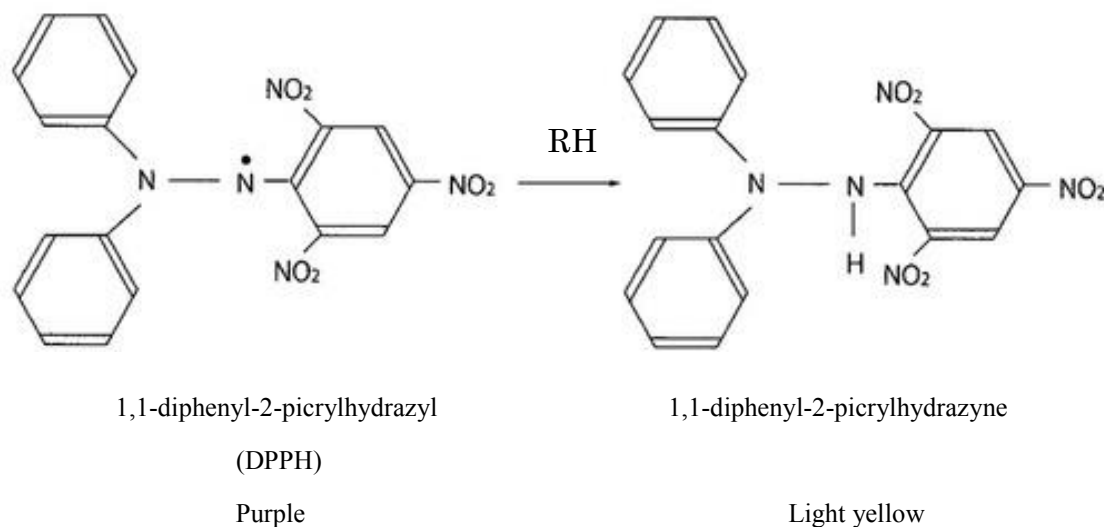


Figure 1-7. Reaction mechanism of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) in the aqueous solution.

DPPH、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES) と水酸化ナトリウムはナカライテスク株式会社から購入し、6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-カルボン酸 (Trolox) はシグマ アルドリッチ ジャパン株式会社から購入し

た。また、99 %エタノールは日本アルコール販売株式会社から購入した。

200 μ M DPPH 溶液は、DPPH 粉末 3.9 mg をアルミホイルで遮光した 50 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、99 %エタノールで 50 ml にメスアップした。その後、スタラーバーを用いて EYELA RCN-7D 上で約 30 分間 200 rpm で攪拌し、調製した。

200 μ M MES 緩衝液は MES 8.53 g を、200 ml 容三角フラスコに量り取り蒸留水を適量加えて溶解した。それを 1 N NaOH で pH 7.0 に調整後、200 μ M DPPH 溶液と 200 μ M MES 緩衝液を 1 : 1 の割合で混合して調整した。

Trolox 標準溶液は脱イオン水で 100 μ M にしたものをもとに、60 μ M、50 μ M、40 μ M、30 μ M、20 μ M、10 μ M、0 μ M の各濃度に調整した。

標準曲線は、Trolox を標準物質として、各濃度に調整した Trolox 溶液を Oki らの方法を一部改良した DPPH ラジカル消去能測定法を用いて作成した。

アルコール飲料の水溶性抗酸化能測定サンプルは、2-2-9 のエタノール濃度測定結果よりエタノールの濃度が 50 %になるように 99 %エタノールと蒸留水を添加して調整した。測定サンプル 2.0 ml に DPPH 試薬 2.0 ml を加え、10 秒間攪拌後、110 秒間静置し、その後 U-1800 分光光度計で 520 nm の吸収値を測定した。このサンプルの吸収値を A_{sample} とし、同様に 50 % エタノールを用いて測定した値を A_{blank} とした。補正值として、各測定サンプル 2.0 ml に、DPPH 試薬の代わりに 99 % エタノールと 200 μ M MES 緩衝液を 1:1 の割合で混合した 50% エタノール溶液 2.0 ml を加えたものを用いて測定した値、 A_{control} を用いた。この時の手順を、Figure 1-8 に示した。尚、DPPH ラジカル消去能は以下の式により算出し、Trolox 当量で表した。この時の標準曲線を Figure 1-9 に示した。

DPPH ラジカル消去能 (μ M) = ($A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} + A_{\text{control}}$) \times 換算係数(100) \times 希釈率

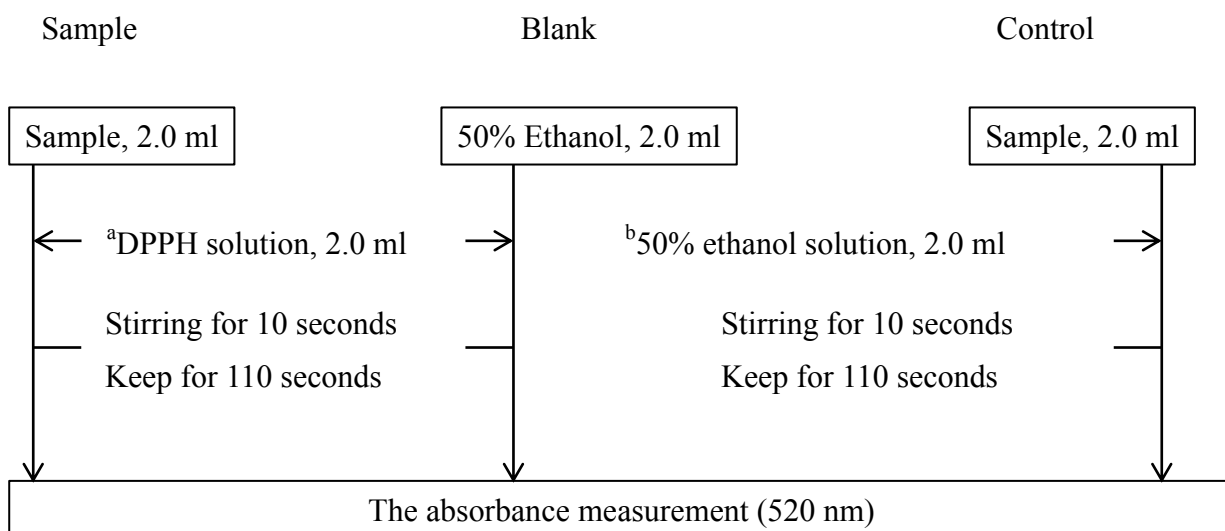


Figure 1-8. Measuring method of DPPH radical scavenging activity.

^aDPPH solution was mixed 200 μM DPPH solution and 200 μM MES buffer (1:1)

^b50% ethanol solution was mixed 99% ethanol and 200 μM MES buffer (1:1)

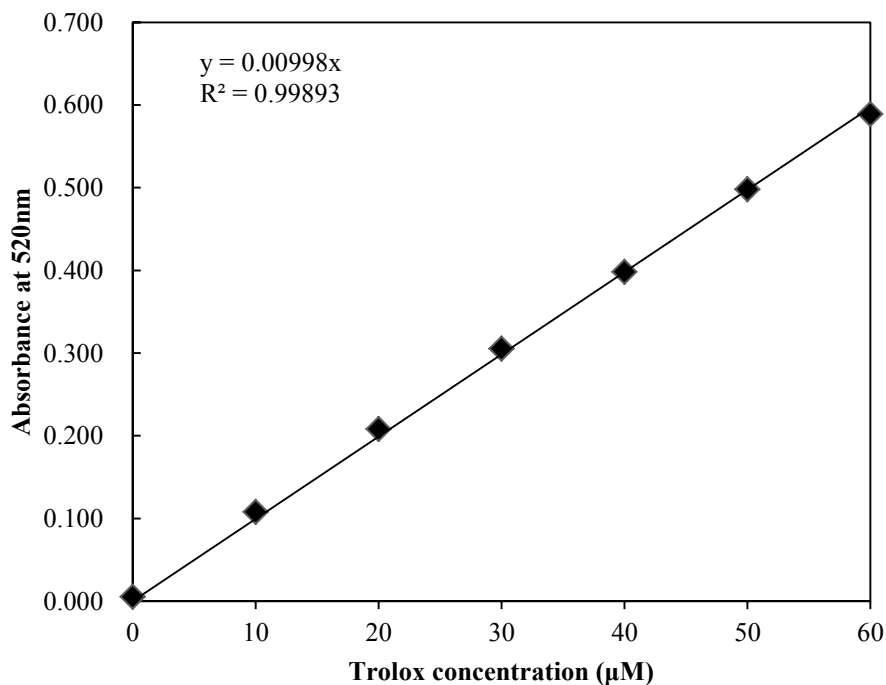


Figure 1-9. Standard curve of Trolox with DPPH radical scavenging method.

Range : $0 < y \leq 0.589$

1-2-10 脂質過酸化阻止能測定 (β-カロテン退色法) ³⁵⁾

この方法は、リノール酸の自動酸化に伴って生じるリノール酸過酸化物が、β-カロテンの二重結合と反応することによって β-カロテンの色が消失することを利用したものである。この方法では、リノール酸と β-カロテンに界面活性剤 (Tween 40) を添加してエマルジョンを調製し、温度を上げることにより自動酸化が促進され、1 時間以内の反応時間でも十分に抗酸化能が測定できる。同時に、サンプル量が少量で済み、複数のサンプルを一斉に測定することも可能な簡便な方法である。

リン酸二水素カリウム、水酸化ナトリウム、クロロホルム、リノール酸とポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート (Tween 40) はナカライテスク株式会社から購入し、β-カロテンと 2, 6-ジ-*t*-ブチル-*p*-クレゾール (BHT) はシグマ アルドリッチ ジャパン株式会社から購入した。また、99 %エタノールは日本アルコール販売株式会社から購入した。

0.2 M リン酸二水素カリウム溶液はリン酸二水素カリウム 2.7 g を 200 ml 容三角フラスコに量り採りとり、蒸留水 100 ml に溶解して調製した。0.2 M 水酸化ナトリウム溶液は、水酸化ナトリウム 0.8 g を 100 ml 容三角フラスコに量り採り、蒸留水 100 ml に溶解して調製した。0.20 M リン酸ナトリウム緩衝液は、0.2 M リン酸二水素カリウム溶液に 0.2 M 水酸化ナトリウム溶液を添加し、pH を 7.0 に調整した。リノール酸溶液は、リノール酸 1.0 g を遮光した 50 ml 容三角フラスコに量り取り、クロロホルム 10 ml と混合して調製した。Tween40 溶液は、2.0 g の Tween40 を遮光した 50 ml 容三角フラスコに量り採り、クロロホルム 10 ml と混合して調製した。β-カロテン溶液はβ-カロテン 10 mg を遮光した 50 ml 容三角フラスコに量り取り、クロロホルム 10 ml に溶解して調製した。リノール酸-β-カロテンエマルジョンの調製法は、遮光した 200 ml 容三角フラスコにリノール酸 0.2 ml、β-カロテン溶液 0.5 ml と Tween 40 溶液 1.0 ml を加え、フラスコ内に窒素ガスを吹き込むことでクロロホルムを完全に飛ばした後、蒸留水 100 ml と 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 8.9 ml を加え、よく混合して調製した (Figure 1-10)。

標準曲線は、BHT を標準物質として用いて作成した。BHT 標準溶液は脱イオン水で 200 μM にしたものをもとに、100 μM、50 μM、20 μM、10 μM、0 μM の各濃度に調製した。各濃度に調製した BHT 溶液を脂質過酸化阻止能測定で Hamasaka らの方法を一部改良して行った。

脂質過酸化阻止能測定サンプルの調製は、エタノールの濃度が 50 %になるように 99 %エタノールと蒸留水を添加して調製した。短試験管に測定サンプル 0.1 ml を予め採っておき、これにリノール酸-β-カロテンエマルジョン 4.9 ml を添加後、10 秒間攪拌し、U-1800 分光光度計で 470 nm の吸収値を測定した。この時の吸収値を A_0 とした。その後、速やかに溶液を試験管に戻し、ビー玉で栓をして 50°C の恒温槽に浸し 30 分間反応させた。反応後、再度 470 nm の吸収値を測定した。この時の吸収値を A_{30} とした。これらの吸収値の差 Y を $A_0 - A_{30} = \Delta A$ とした。この測定手順を Figure 1-11 に示した。

Y は標準曲線 (Figure 1-12) より以下の式で算出した。

$$Y = -0.11 \ln(X) + 0.63$$

脂質過酸化阻止能 (μM) = $(X) \times$ 希釈率

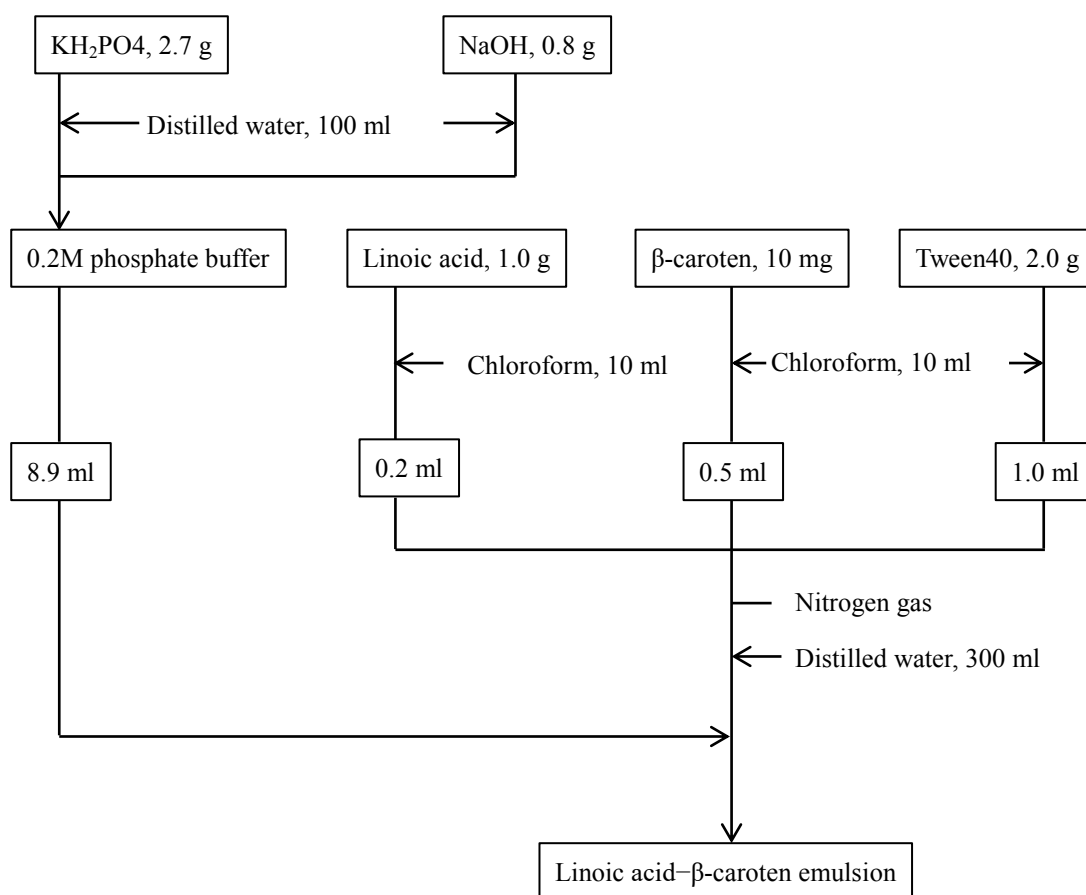


Figure 1-10. Purification method of Linoic acid-β-caroten emulsion.

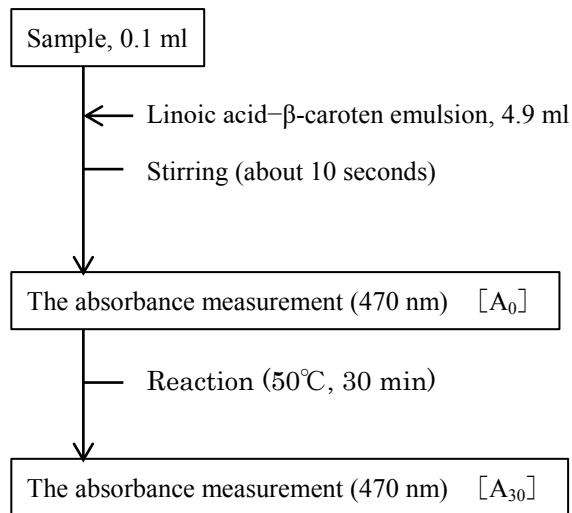


Figure 1-11. Measuring method of inhibitory activity of lipid peroxidation.

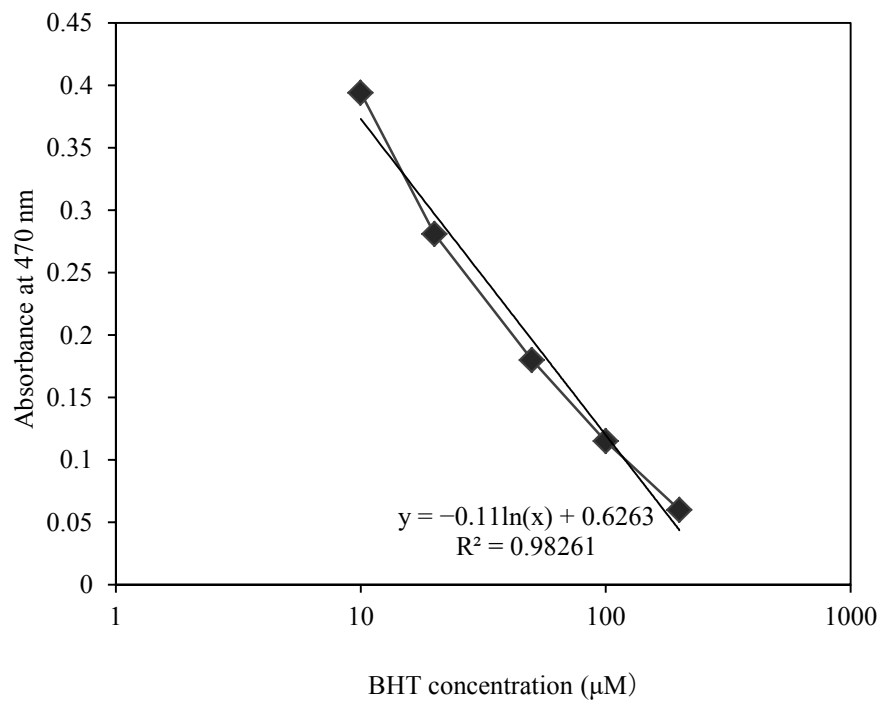


Figure 1-12. Standard curve of inhibitory activity of lipid peroxidation method.

Range : $0 < y \leq 0.39$

第3節 結果と考察

1-3-1 加熱による穀物の抗酸化能の変化

無蒸煮米と蒸煮米の色素抽出物の抗酸化能の比較から、ワイルドライスを除くすべての穀物で、水溶性、及び脂溶性の抗酸化能は若干ではあるが蒸煮することにより減少する傾向が見られた(Figure 1-13, 14)。この結果は、これまで本研究室で研究されてきた蒸煮米と無蒸煮米によるアルコール飲料の結果と一致するものであった。即ち、抗酸化能物質の多くは加熱処理により変性あるいは分解され、抗酸化能が低下した物質に変化すると考えられる。そこで、アントシアニンのような抗酸化物質を含んでいると言われる黒米と黒米の糠部分から1-2-4の方法で抽出した色素を用いて、加熱、非加熱処理による抗酸化能の違いを比較すると、色調の違いは明らかに異なるものの(Figure 1-15)、DPPH ラジカル消去能、総フェノール量、脂質過酸化阻止能には殆ど違いが見られなかった(Figure 1-16, 17, 18 参照)。

これらの事実から、黒米色素自体の加熱による抗酸化能の低下は考えにくく、黒米の抗酸化能の低下は、黒米に含まれるアントシアニン色素以外の抗酸化物質の抗酸化能が低下したためではないかと考えられるが、今後さらなる検討が必要である。

1-3-2 麴のはたらきによる抗酸化能の変化

黄麴菌の働きで蒸米から麴に変化する過程では、実験に用いたすべての穀物でDPPH ラジカル消去能及び脂質過酸化阻止能が増加した(Figure 1-19, 20)。これらの結果は、黄麴菌が穀物を資化することで、抗酸化能が増加することを示している。

一方、1-2-4 で示した方法で抽出した黒米色素に、麴菌を添加し、添加前後の吸収スペクトル変化及び抗酸化能変化を調べたところ、黄麴では、510 nm 付近にピークを持つアントシアニンの吸収帯が時間経過とともに減少し (Figure 1-21)、DPPH ラジカル消去能も時間経過とともに低下した (Figure 1-25)。この現象は、AN-2 やスミチームを添加した場合の吸収スペクトルの変化 (Figure 1-23, 24) と抗酸化能変化 (Figure 1-27) に類似していた。

それに対し、紅麴では、抗酸化能は、5日目まで続いた減少傾向が7日目あたりから増加傾向に転じた (Figure 1-26)。吸収スペクトルもそれに対応して3日目まで減少していたアントシアニンのピークに、5日目ごろから、新たに490 nm

付近にピークを持つ吸収帯が現れた (Figure 1-22)。

以上の結果から、黄麴菌は穀物の抗酸化能を新たに生成することが示唆された。一方で、黒米色素は黄麴菌により AN-2 やスミチームと同様の反応により、黒米色素に基づく抗酸化能が減少すると考えられる。紅麴菌の場合は、黒米色素に紅麴を添加した初めの段階では AN-2、スミチームに類似の反応が起きるが、時間経過とともに次第に新たな色素ができることで抗酸化能が向上したと考えられる。

1-3-3 甘酒の抗酸化能の変化

有色穀物及び白米の黄麴と甘酒の実験結果 (Figure 1-28, 29) は、多くの穀物で、時間経過とともに抗酸化能が増加した。しかしながら、DPPH ラジカル消去能では、緑米とワイルドライス、脂質過酸化阻止能では、黒米とワイルドライスで経過時間が長くなるに従い抗酸化能が低下する現象が見られた。この現象は、紅麴でも同様の結果が得られた (Figure 1-30, 31)。黄麴と紅麴の抗酸化能比較では、DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能ともに穀物の種類には関係なく、1.2 倍ほど高い値が確認された。

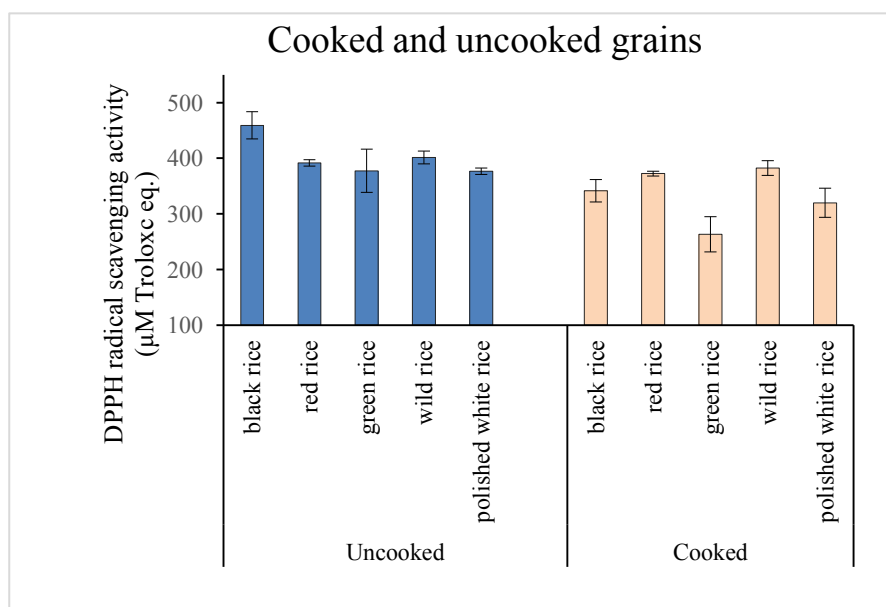


Figure 1-13. Comparison of DPPH radical scavenging activities of uncooked and cooked grains. Values are the mean of triplicates. * p<0.05

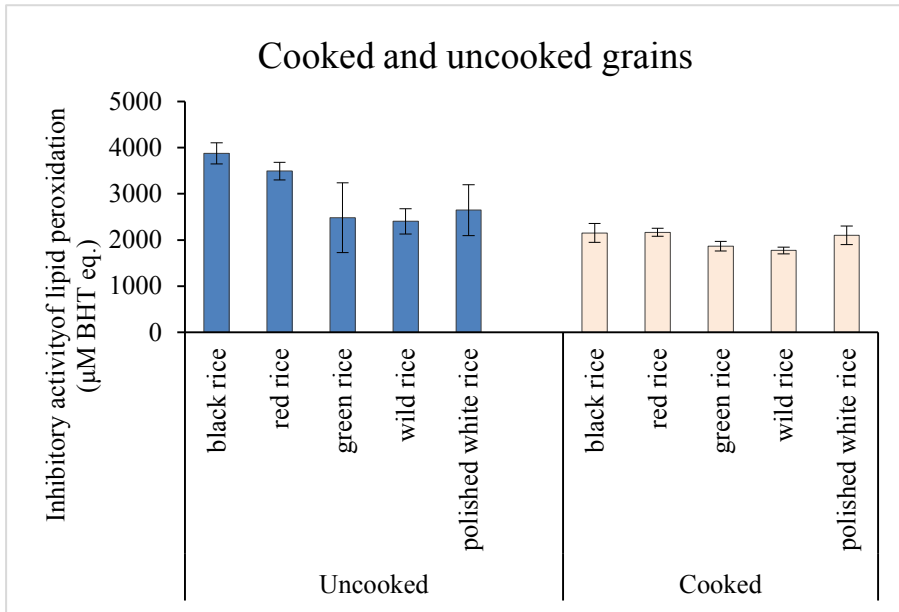


Figure 1-14. Comparison of inhibitory activity of lipid peroxidation of uncooked and cooked grains. Values are the mean of triplicates. * $p < 0.05$

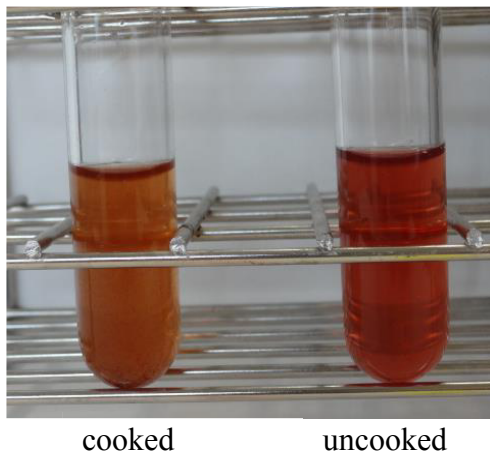


Figure 1-15. Picture of cooked and uncooked black rice bran extracts.

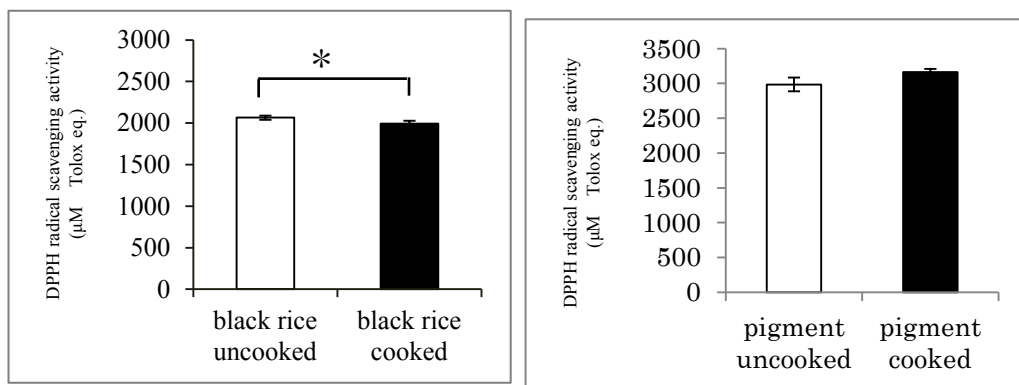


Figure 1-16. DPPH radical scavenging activity of black rice and black rice bran extracts. Values are the mean of triplicates. * $p < 0.05$

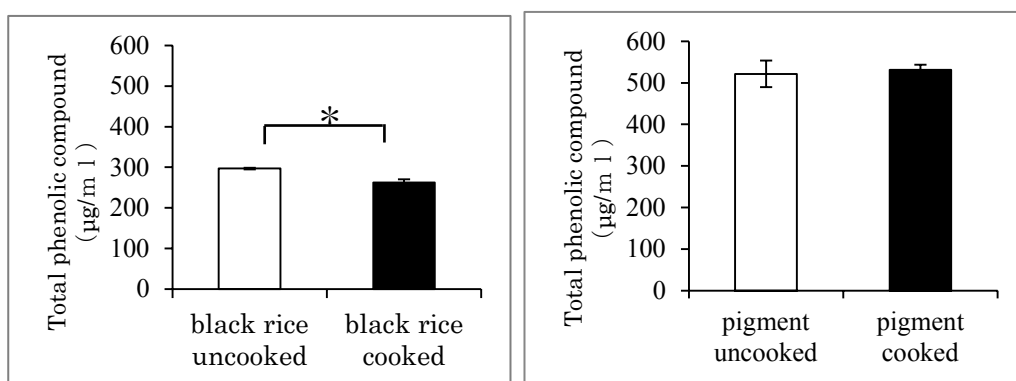


Figure 1-17. Total phenolic compound of black rice and black rice bran extracts. Values are the mean of triplicates. * $p < 0.05$

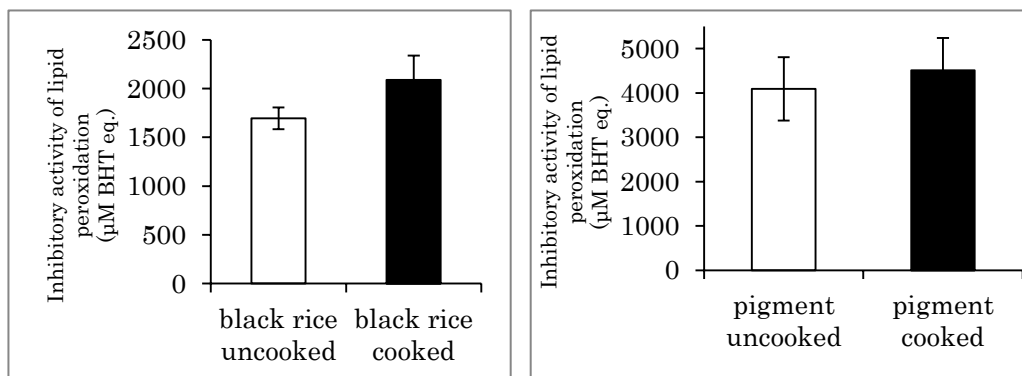


Figure 1-18. Inhibitory activity of lipid peroxidation of black rice and black rice bran extracts. Values are the mean of triplicates.

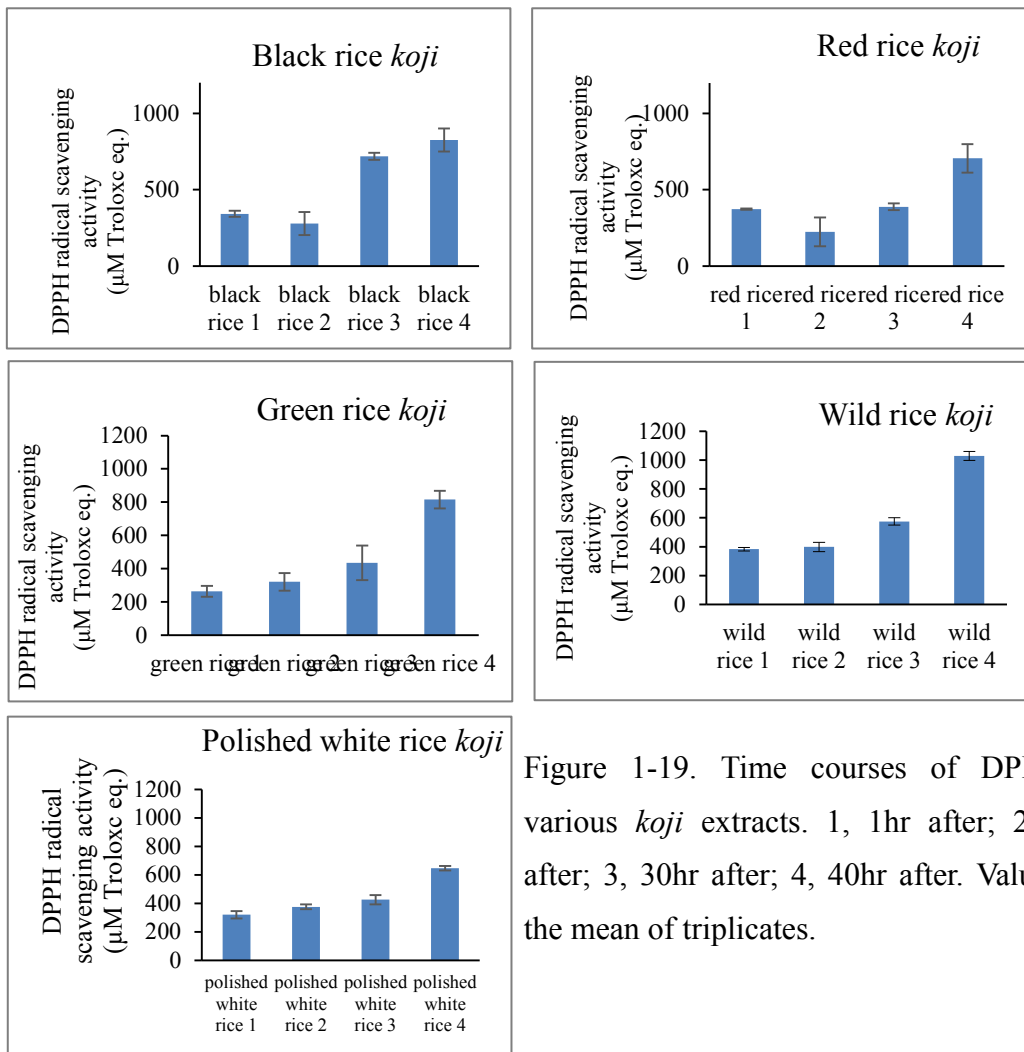


Figure 1-19. Time courses of DPPH of various *koji* extracts. 1, 1hr after; 2, 20hr after; 3, 30hr after; 4, 40hr after. Values are the mean of triplicates.

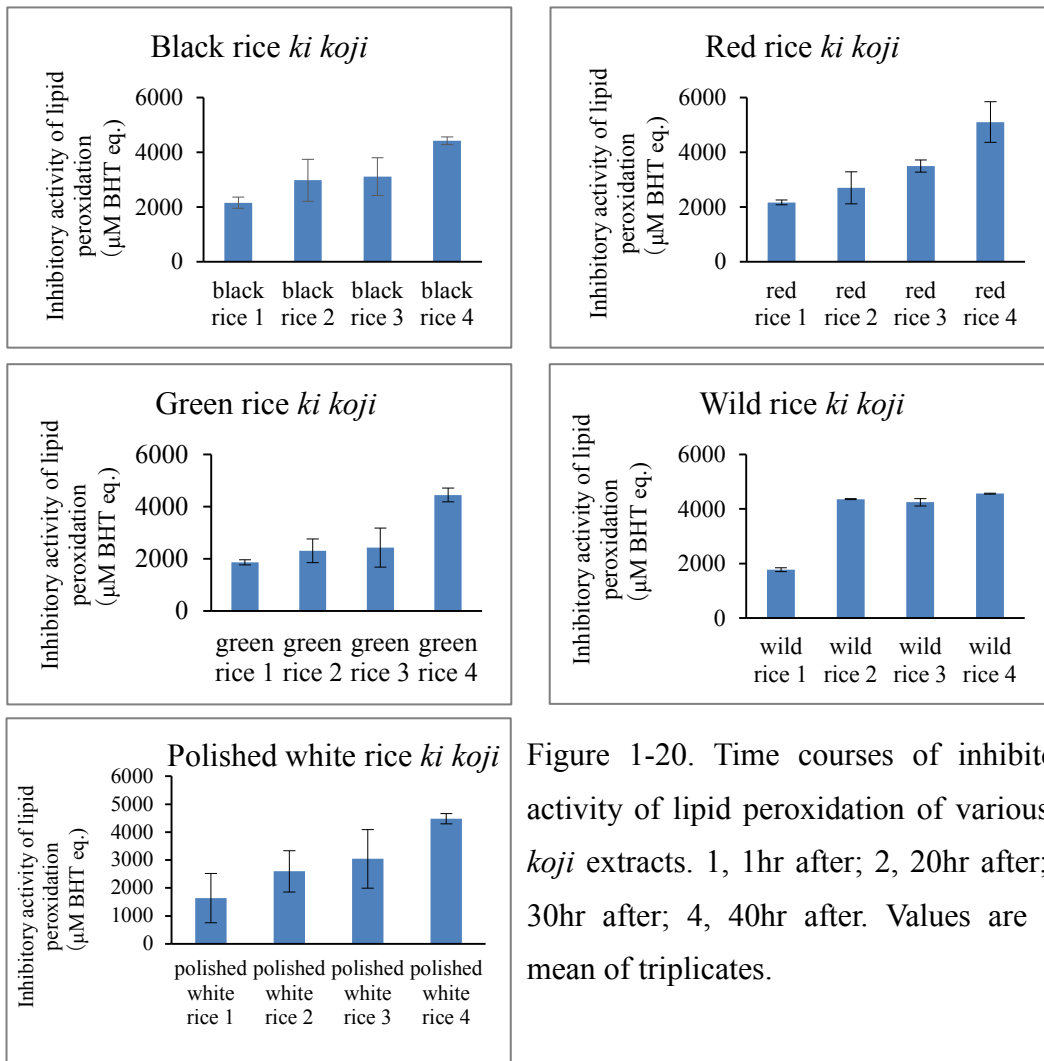


Figure 1-20. Time courses of inhibitory activity of lipid peroxidation of various *ki koji* extracts. 1, 1hr after; 2, 20hr after; 3, 30hr after; 4, 40hr after. Values are the mean of triplicates.

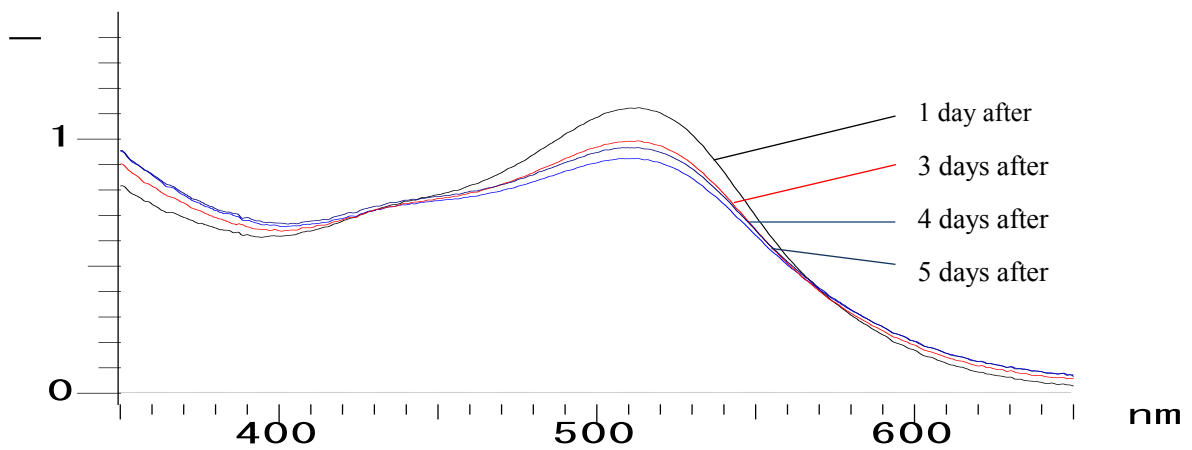


Figure 1-21. Time courses of absorption spectra for black rice bran extracts containing *ki koji*.

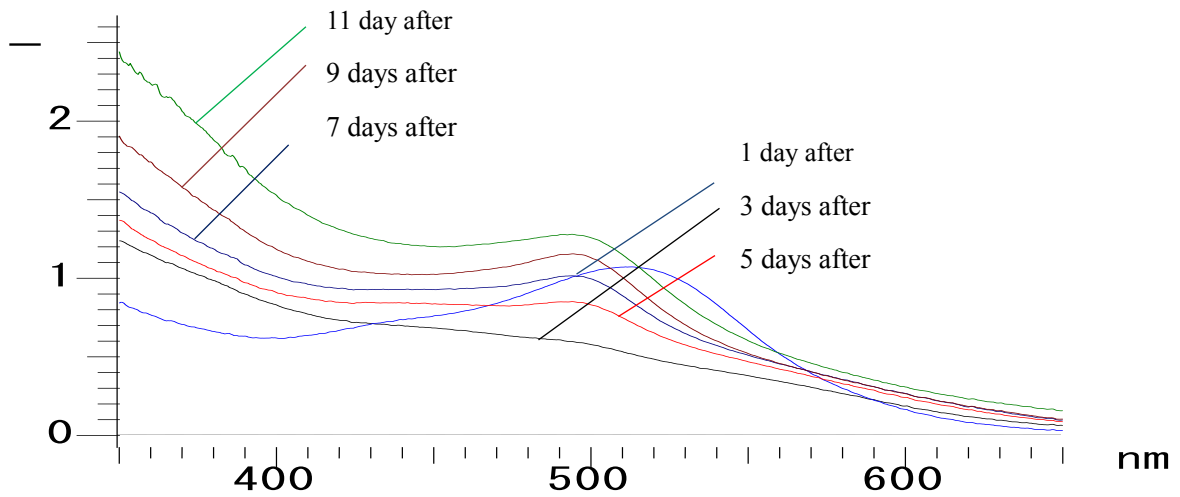


Figure 1-22. Time courses of absorption spectra for black rice bran extracts containing *beni koji*.

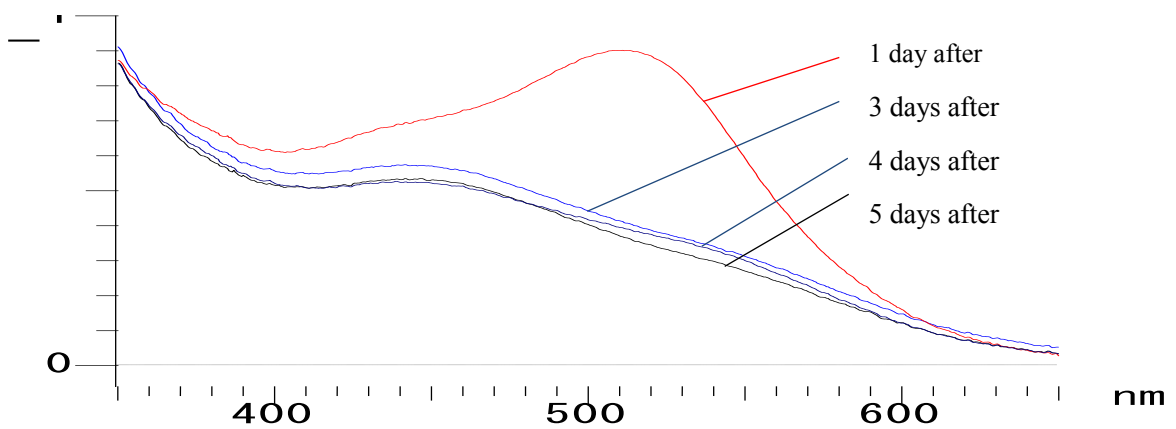


Figure 1-23. Time courses of absorption spectra for black rice bran extracts containing AN-2.

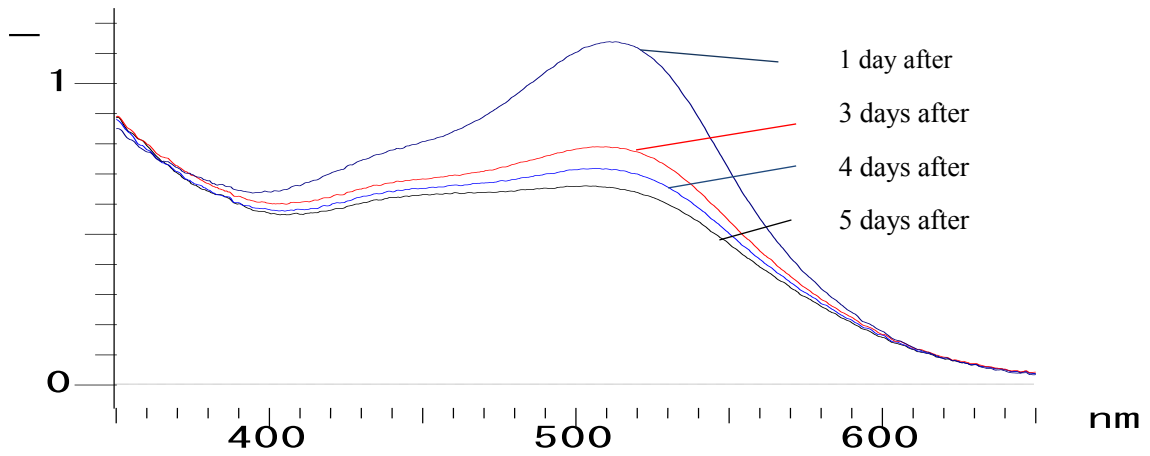


Figure 1-24. Time courses of absorption spectra for black rice bran extracts containing Smizyme.

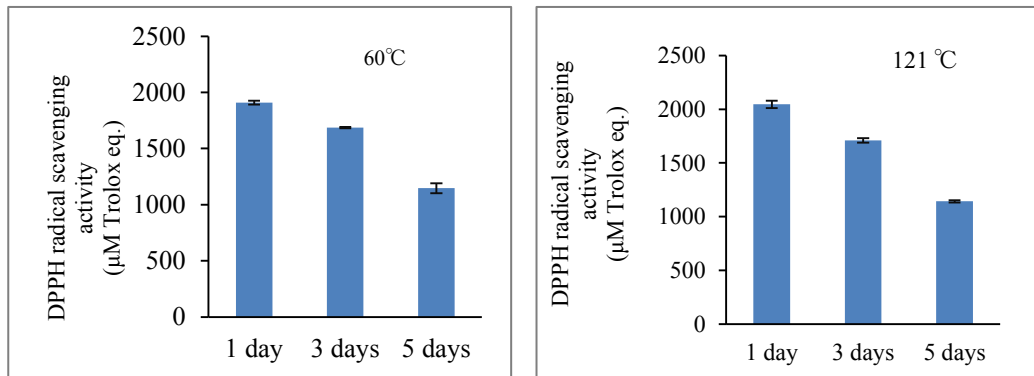


Figure 1-25. Time courses of DPPH of black rice pigment fermented with *ki koji*. Left shows the changes of pigment after Pasteurization in 60 m.n. Right shows the changes of cooked pigment that was autoclaved. Values are the mean of triplicates.

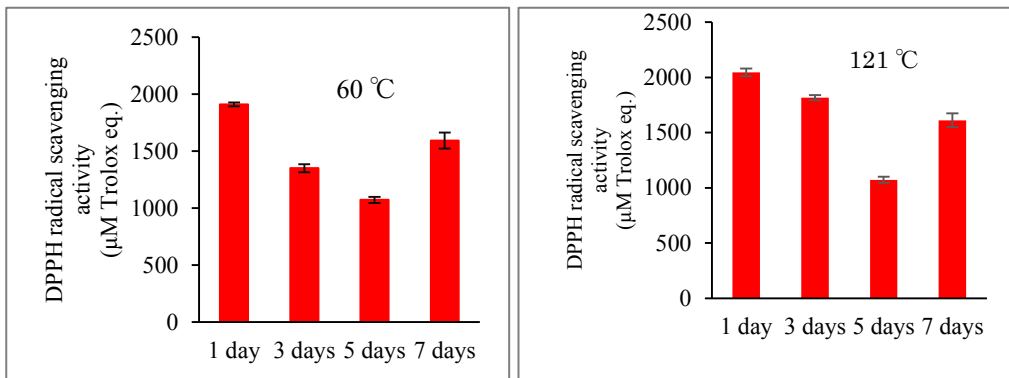


Figure 1-26. Time courses of DPPH of black rice pigment fermented with *beni koji*. Left shows the changes of pigment after Pasteurization in 60 minutes. Right shows the changes of cooked pigment that was autoclaved. Values are the mean of triplicates.

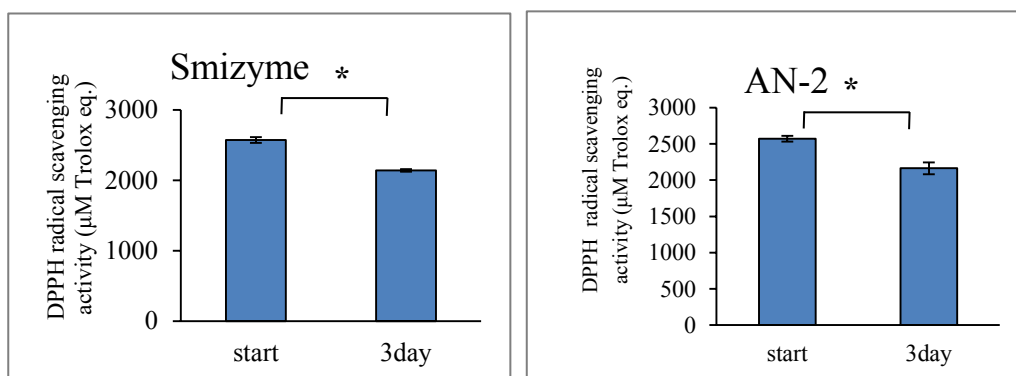


Figure 1-27. DPPH radical scavenging activity of black rice bran extracts. Values are the mean of triplicates. * $p < 0.05$

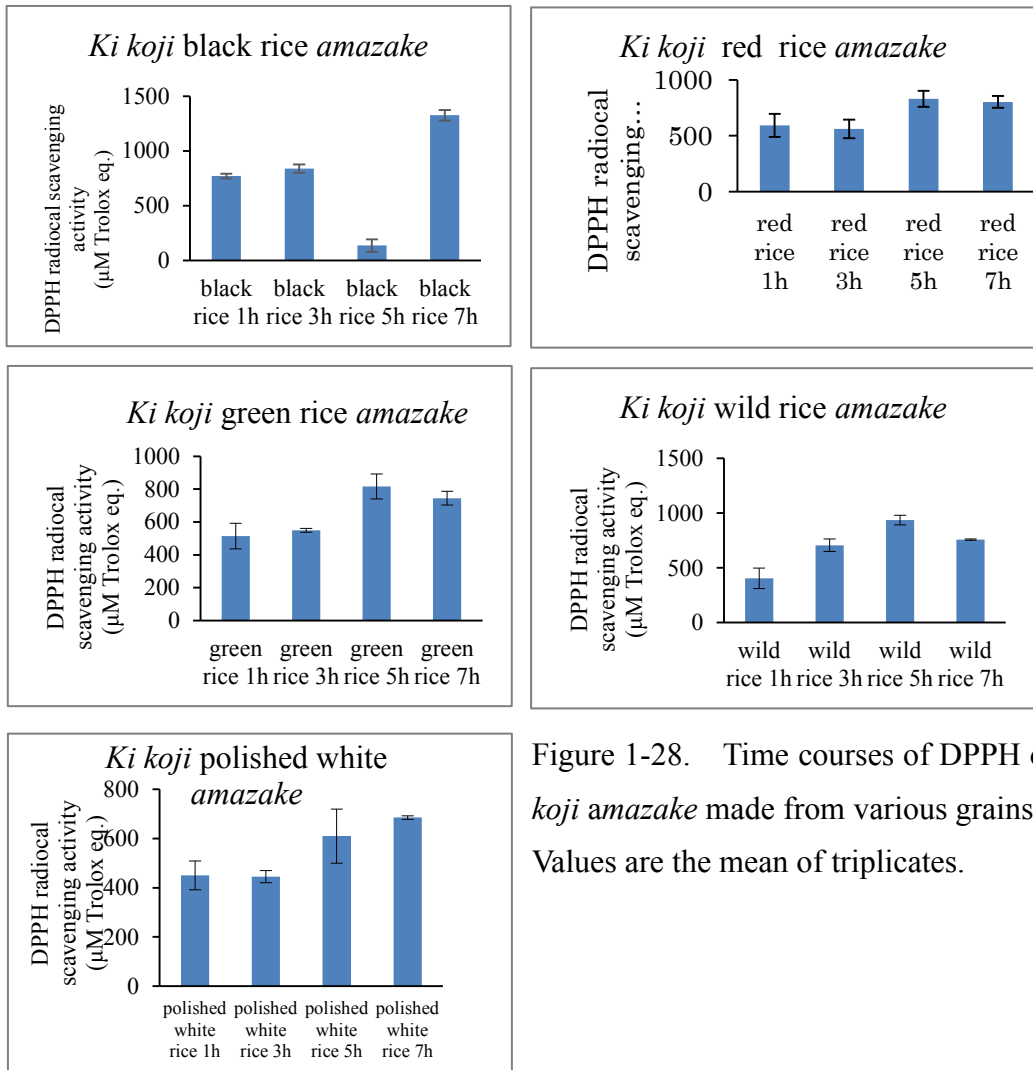


Figure 1-28. Time courses of DPPH of *ki koji amazake* made from various grains. Values are the mean of triplicates.

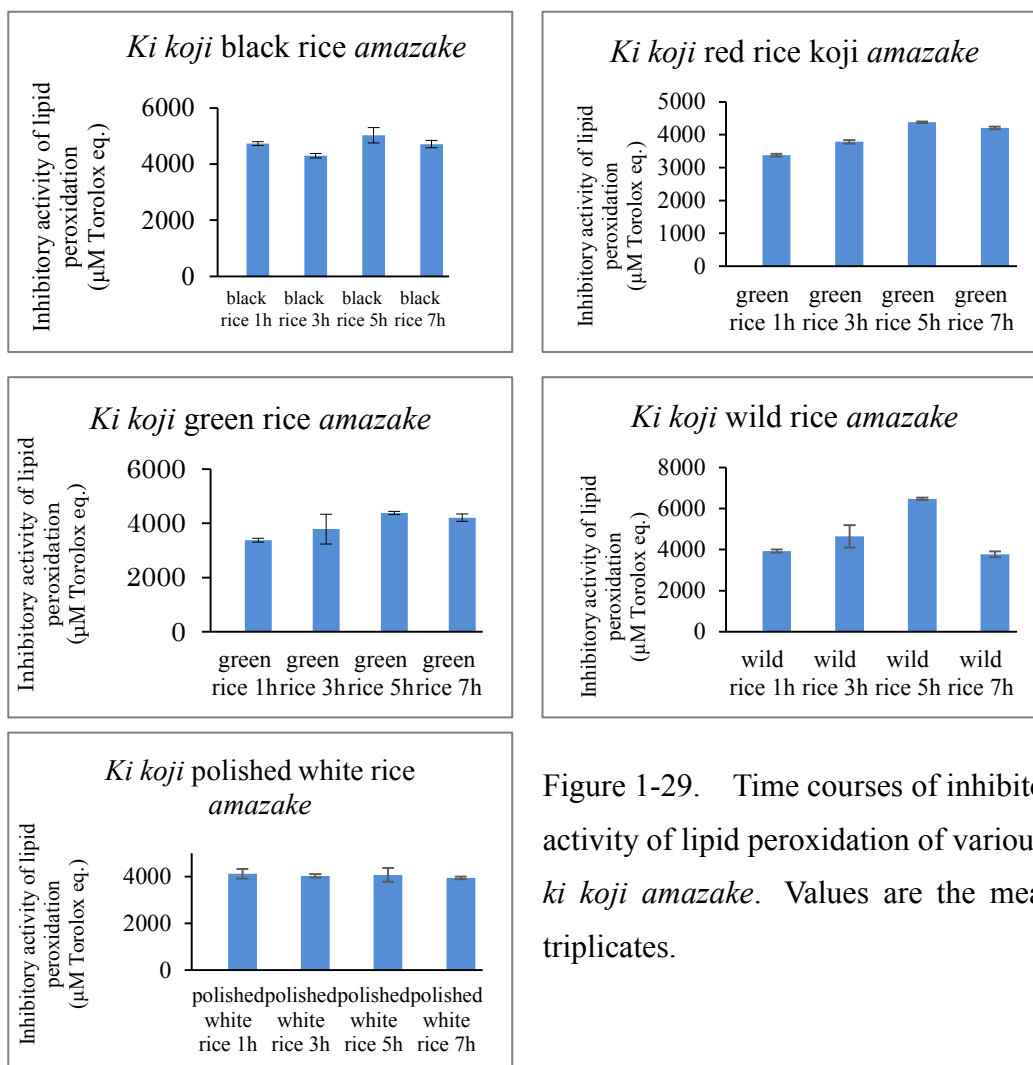


Figure 1-29. Time courses of inhibitory activity of lipid peroxidation of various *ki koji amazake*. Values are the mean of triplicates.

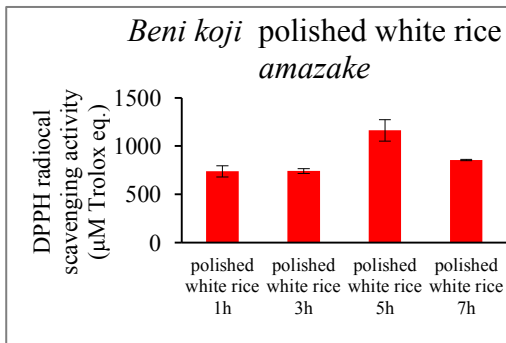
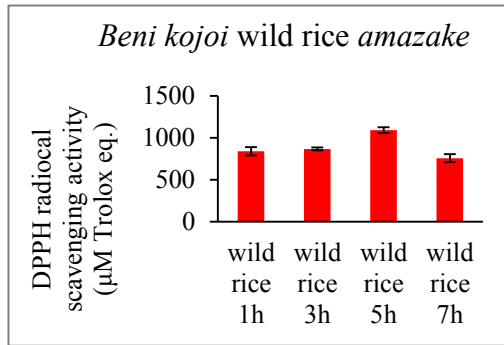
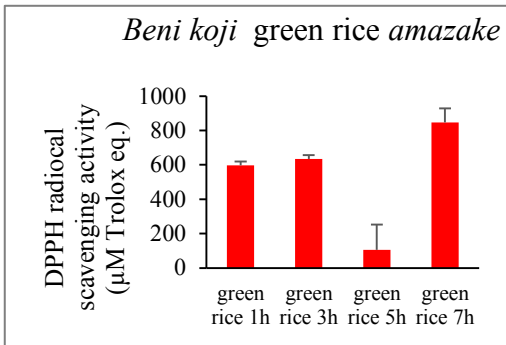
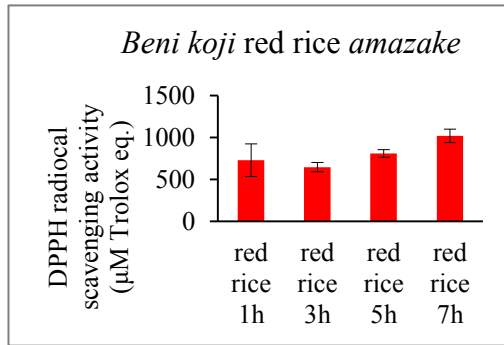
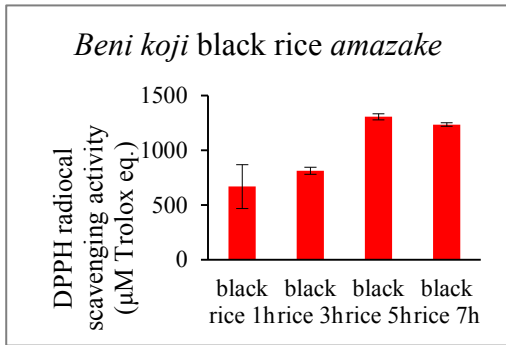


Figure 1-30. Time courses of DPPH of *Beni koji amazake* made from various grains. Values are the mean of triplicates.

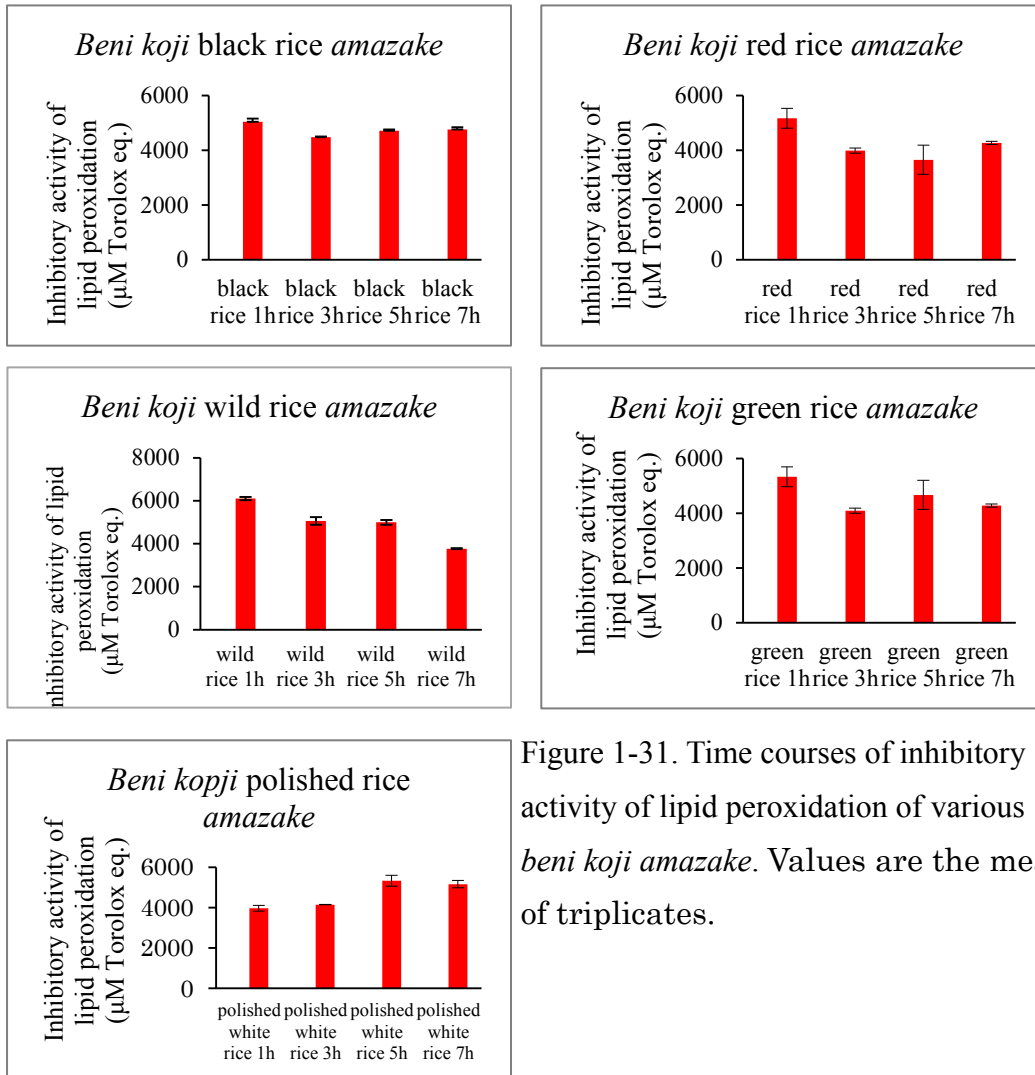


Figure 1-31. Time courses of inhibitory activity of lipid peroxidation of various *beni koji amazake*. Values are the mean of triplicates.

第2章 ワイルドライス及び有色米アルコール飲料の 組成と抗酸化能特性

第1節 緒言

第1章で、穀物は蒸煮過程で抗酸化能は低下するが、麴や甘酒になる過程では抗酸化能は増加することがわかった。また、高い抗酸化能を持つと言われてきた黒米色素の抗酸化能は加熱の影響を受けにくく、黄麴、スミチーム及びAN-2などの糖化剤により抗酸化能が低下することが確認された。

本章では、糖化剤としてスミチームを用い、蒸煮アルコール発酵法及び無蒸煮アルコール発酵法の2法で各種有色米及びワイルドライスのアルコール飲料を試醸し、発酵法の違いがアルコール飲料の組成と特性に及ぼす影響について検討した。更に、これまでの研究で主に糠部分にあるといわれる有色米の抗酸化物質の含有部位についての検討も試みた。

第2節 実験材料と方法

2-2-1 発酵原料

1-2-1 参照。

2-2-2 糖化剤

糖化剤はグルコアミラーゼ製剤スミチーム (*Rhizopus* sp.起源) を使用した。これは、新日本化学工業株式会社より恵与されたものである。

2-2-3 酵母の培養

粉末酵母エキス、ポリペプトンは和光純薬工業株式会社、D(+)-グルコースはナカライテスク株式会社から購入した。また培地用寒天 BA-10 はフナコシ株式会社から購入した。

使用酵母は清酒用酵母である協会7号酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を日本醸造協会から購入した。

酵母の培養はYPD液体培地 (Table 2-1) を用いた。300 ml 容三角フラスコにYPD液体培地 200 ml を入れ、これに酵母を植菌し 30°Cの恒温室で3日間静置培養した。

尚、酵母の保存には YPD 寒天培地 (Table 2-2) を使用し、酵母を培養した YPD 液体培地から白金耳を用いて植菌し、30°Cの恒温室で約 3~4 日間培養し、使用するまで 5°Cの低温室で保存した。

Table 2-1. Components of YPD medium.

Medium composition	% (w/v)
Yeast extract	1
Polypepton	2
D-glucose	2
pH was not adjusted.	

Table 2-2. Components of YPD agar medium.

Medium composition	% (w/v)
Yeast extract	1
Polypepton	2
D-glucose	2
Agar	2
pH was not adjusted.	

2-2-4 酵母の洗浄と酵母懸濁液の作成

塩化ナトリウム、リン酸二水素カリウムとリン酸水素二ナトリウムはナカライテスク株式会社から購入し、メチレンブルーは東京化成販売株式会社から購入した。

酵母の生菌数測定は、YPD 液体培地で培養した酵母液にメチレンブルー-リン酸緩衝液を添加し、ヘマトメーターを用いて行った。生菌数測定後、酵母培養液は遠心分離 (3000 rpm、10 分、5°C) を行い、上清をデカンテーションした。沈殿物として得た酵母に 0.8 %塩化ナトリウム溶液を適量加えてよく攪拌後、再度遠心分離を行い、上清をデカンテーションした。酵母の洗浄はこの操作を 2

回行った。酵母の洗浄後、沈殿した酵母を必要量の脱イオン水で溶解させ、酵母懸濁液とした。

2-2-5 アルコール飲料の試醸

蒸煮アルコール発酵では、2~3 mm にした穀物 30~34 g と脱イオン水 50 ml を 300 ml 容三角フラスコに入れオートクレーブ (121°C、15 分) を行い、冷却後スミチーム 0.2 g、酵母懸濁液 50 ml を添加して、シリコ栓付発酵管を取り付けて 25°C の暗所で 5 日間発酵を行った。

無蒸煮アルコール発酵では、2~3 mm にした穀物 30~34 g と脱イオン水 50 ml を 300 ml 容三角フラスコに入れ、スミチーム 0.2 g、酵母懸濁液 50 ml を添加して、シリコン栓付発酵管を取り付けて 25°C の暗所で 5 日間発酵を行った (Figure 2-1)。

蒸煮及び無蒸煮アルコール発酵ともに、使用する穀物量は、白米アルコール発酵での CO₂ 発生量、12 g に揃えるために、事前に発酵試験を行い決定した。使用量は以下に示した。(Table 2-3)

Table 2-3. Weight of grains used for alcoholic fermentation.

Grains	Uncooked (g)	Cooked (g)
Polished white rice	30	30
Black rice	33	33
Red rice	34	34
Green rice	32	32
Wild rice	33	33

蒸煮及び無蒸煮アルコール発酵ともに、酵母の最終生菌数は 3.0×10^7 cells/ml に調整した。発酵期間中はいずれの発酵法ともに CO₂ の発生量の変化がなくなるまで行った。発酵終了後、遠心分離 (3000 rpm、10 分、5°C) を行い、上清のみ定性濾紙 No.101 (Toyo Roshi kaisha, Ltd.) を用いて自然濾過した。得られた濾液を各穀物発酵アルコール飲料として分析に用いた。アルコール飲料の保存は保用ポリ容器に入れ、分析に供するまで冷凍保存した。

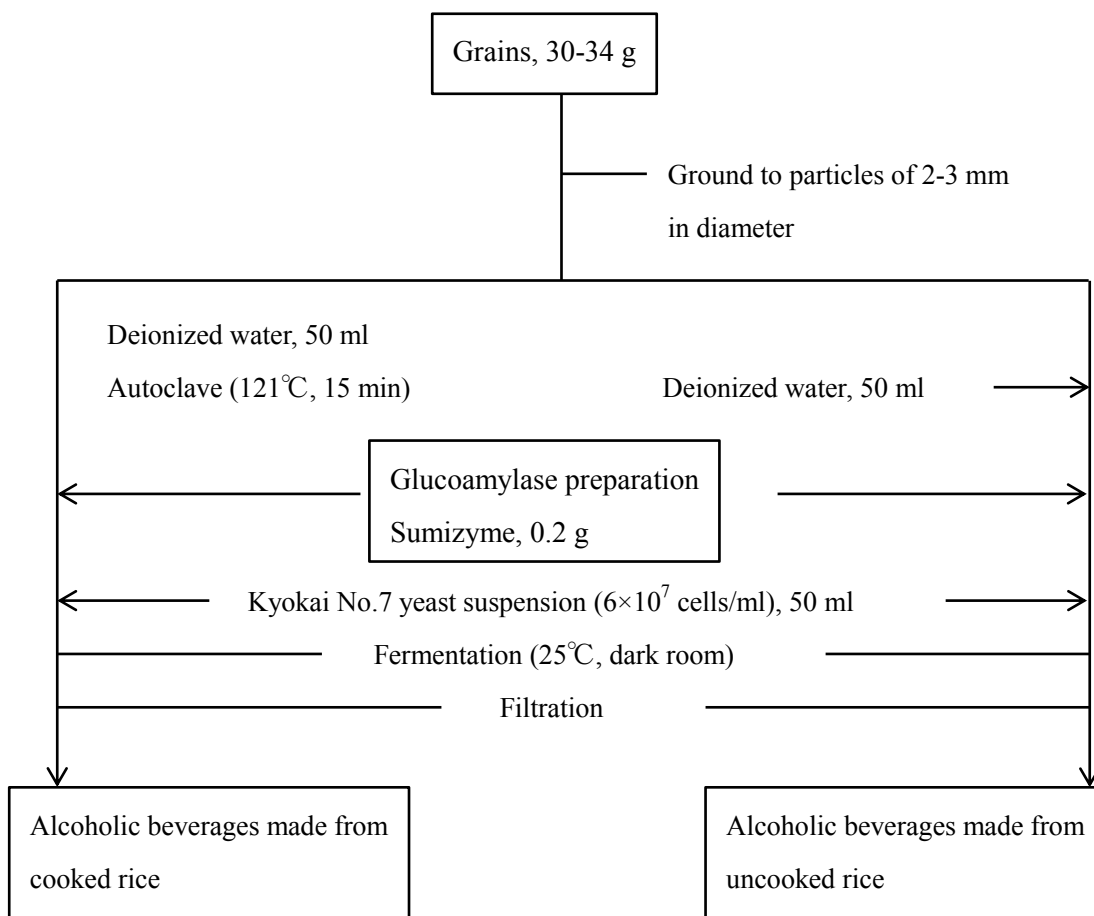


Figure 2-1. Procedure for brewing of alcoholic beverages.

2-2-6 発酵曲線の作製

発酵開始後の重量の減少を CO₂ 発生量として 24 時間毎に測定し、変化量を発酵曲線として作成した。

2-2-7 pH 測定

発酵開始前及び発酵終了後濾過して得られたアルコール飲料の pH を pH メーター (Sartorius 社) で測定した。

2-2-8 酸度測定³⁴⁾

NaOH、1/10 N シュウ酸溶液 (H₂C₂O₅ のファクター、F=1.005) とフェノールフタレン指示薬はナカライテスク株式会社から購入した。

1/10 N NaOH 溶液の F 値の算出は 1/10 N シュウ酸溶液 10 ml に 2~3 滴のフェノールフタレン指示薬を加え、中和に要した 1/10 N NaOH 溶液 a ml から以下の計算式により求めた。

$$10 \times F(1.005) = a \times F$$

酸度はアルコール飲料 10 ml を 1/10 N NaOH 溶液にて中和し、発酵酒 10 ml の 1/10 N NaOH の滴定量と 1/10 N NaOH の F 値から以下の式により算出した。

$$\text{酸度} = \text{滴定量(ml)} \times F$$

2-2-9 エタノール濃度分析

内部標準として使用した n-アミルアルコールは和光純薬工業株式会社から購入した。内部標準溶液は、蒸留水を用いて 1.0 % (w/v) に調整した。

アルコール飲料は卓上遠心分離 (3000 rpm、10 分) 後、上清をサンプルとして使用した。内部標準溶液とサンプルを 4 : 1 の割合で混合し、得られた混合溶液をマイクロシリンジに 5.0 µl 取り、島津製作所 GC14 ガスクロマトグラフィーを用い、内部標準法で分析した。エタノール濃度の計算は以下の式より算出した。

また、ガスクロマトグラフィー条件は Table 2-4 に示した。

$$\text{エタノール濃度 (v/v)} = \text{エタノール濃度 (w/v)} \times 1.27$$

Table 2-4. Gas chromatographic conditions.

Column	PEG-HT 3.1m (glass column)
Carrier gas	N ₂ , 30 ml/min
Column temp.	50°C–150°C (5°C/min)
Inj. temp.	170°C
Det. temp.	170°C
Detector	FID

2-2-10 直接還元糖量測定³⁷⁻³⁹⁾

ソモギ銅試薬とネルソン呈色試薬はシグマ アルドリッチ ジャパン株式会社から購入し、D-グルコースはナカライテスク株式会社から購入した。グルコース標準溶液は脱イオン水で 500 µg/ml の濃度に調整し、これをもとに、400 µg/ml、300 µg/ml、200 µg/ml、100 µg/ml、0 µg/ml の各濃度の溶液を調整した。

標準曲線は、調整したグルコース標準溶液をソモギ・ネルソン法で測定し、標準曲線から換算係数を求めた (Figure 2-2)。

アルコール飲料の還元糖量はソモギ・ネルソン法にて測定した。脱イオン水で希釈したアルコール飲料の 0.5 ml を短試験管に入れ、1.0 ml のソモギ銅試薬を添加し、ビー玉で栓をして正確に 10 分間湯煎した。湯煎後、流水で冷却した後、1.0 ml のネルソン呈色試薬を混合して発色させた。30 分間室温で放置した後、脱イオン水を 5.0 ml 加え、HITACHI U-1800 分光光度計で 520 nm の吸収値を測定した。この吸収値を A_{sample} とした。ブランクは、サンプルの代わりに脱イオン水を用い、この吸収値を A_{blank} とした。サンプル中の直接還元糖量は、以下の式で計算し、グルコース当量で表した。

$$\text{直接還元糖量 } (\mu\text{g/ml}) = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times \text{換算係数 (322)} \times \text{希釈率}$$

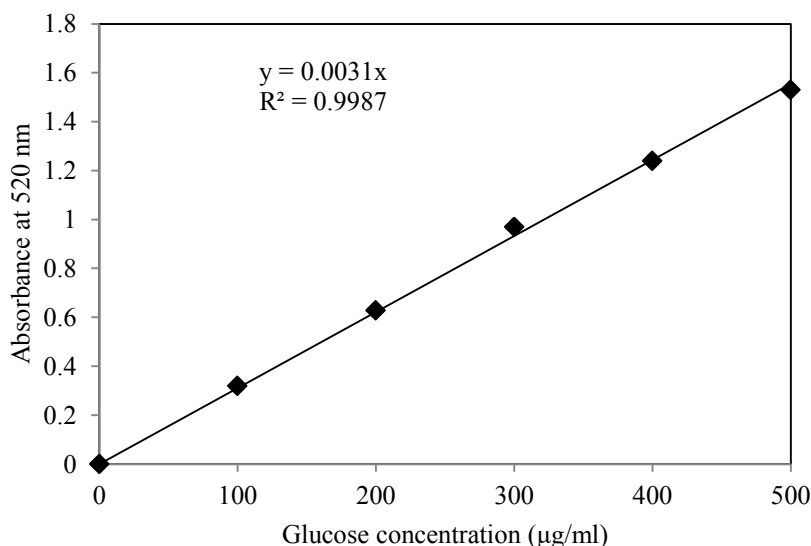


Figure 2-2. Standard curve of glucose with Somogyi-Nelson method.

Range : $0 < y \leq 1.53$

2-2-11 総フェノール性化合物量測定

1-2-7 参照。

2-2-12 吸収スペクトル測定

1-2-8 参照。

2-2-13 DPPH ラジカル消去能測定

1-2-9 参照。

2-2-14 脂質過酸化阻止能測定 (β-カロテン退色法)

1-2-10 参照。

2-2-15 アントシアニン含有量測定⁴⁰⁾

塩酸とメタノールはナカライテスク株式会社から購入し、シアニジン 3-グルコシド (Cy 3-glc) はシグマルドリッチ ジャパン株式会社から購入した。

1%塩酸-メタノール溶液(1%HCl-MeOH)は、塩酸 5 ml を入れた 500 ml 容メスフラスコにメタノール 495 ml を添加して調製した。

標準曲線は、Cy 3-glc を標準物質として用いて作成した。Cy 3-glc 溶液は、1%HCl-MeOH 溶液で 50 µg/ml の濃度に調製し、これをもとに 40 µg/ml, 30 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 0 µg/ml の各濃度の溶液を調製した。各濃度に調製した Cy 3-glc 溶液を用いて、標準曲線を作成した (Figure 2-3)。

アルコール飲料のアントシアニン含量は、Ichiyangi らの方法を一部改良して測定した⁴⁰⁾。5 ml のアルコール飲料はセルロースアセテートタイプメンブレンフィルターを装着したディスポシリンジを用いて濾過し、その濾液 0.5 ml に 1% HCl-MeOH 溶液 4.5 ml を添加して混合し、U-1800 分光光度計にて、530 nm の吸収値を測定した。この吸収値を A_{sample} とした。ブランクは、サンプルの代わりに 1% HCl-MeOH 溶液を用い、この吸収値を測定した。この吸収値を A_{blank} とした。この時のサンプルのアントシアニン含有量は以下の式で算出し、Cy 3-glc 当量で表した。

アントシアニン含有量 (µg/ml) = $(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times \text{換算係数 (17.9)} \times \text{希釈率}$

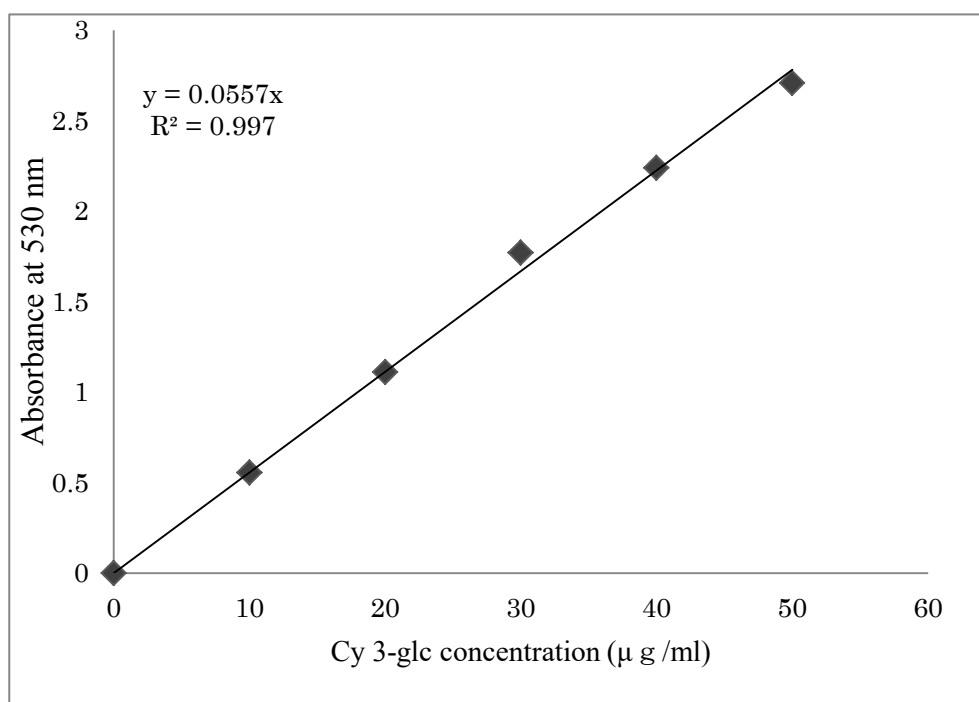


Figure 2-3. Standard curve of anthocyanin.

Range : $0 < y \leq 2.71$

2-2-16 抗酸化物質の含有部位の検討

白米及び有色穀物の各 30 g とエムケー精工 SM-500 を用いて糠部分を、以下の割合で削り除いたものを用いて、無蒸煮アルコール発酵法と蒸煮アルコール発酵法の 2 法を用いてアルコール発酵させ、抗酸化能の差異を比較検討した。

無精米と精米の比較では、穀物量を 2-2-5 で記したものを基準にした。使用した穀物量を Table 2-5 に示した。なお、精米率は、以下の式で求めた。

$$\text{精米歩合 (100 \%)} = (\text{白米の重量} / \text{玄米の重量}) \times 100$$

また、段階的に糠部分を取り除き精米率を変えた穀物で試醸したアルコール飲料の抗酸化能の差異を求める実験では無醸煮アルコール発酵法を用いて試醸した。使用した穀物量は穀物ごとに揃えた。その使用穀物量を Table 2-6 に記した。

Table 2-5. Weight and polishing rate of grains used for alcoholic fermentation.

Grains	Unpolished (g)	Polished (g)
Polishing rate	(%)	(%)
Polished white rice	30	30
Black rice	33 (74)	24.4 (74)
Red rice	34 (84)	28.6 (84)
Green rice	32 (81)	25.9 (81)
Wild rice	33 (80)	26.4 (80)

Table 2-6. Polishing rate of various grains used for alcoholic fermentation

Grains	(g)	Polishing rate (%)
Black rice	33	100, 86, 81, 74
Red rice	34	100, 90, 86, 84
Green rice	32	100, 92, 87, 81
Wild rice	33	100, 98, 87, 80

第 3 節 結果と考察

2-3-1 発酵法の違いによるアルコール飲料の品質と抗酸化能

蒸煮アルコール発酵法と無蒸煮アルコール発酵法の違いによる各種アルコール飲料の性質を Table 2-5 に、発酵曲線を Figure 2-4 に示した。その結果、両発酵法ともに 4 日間で発酵が完了し、アルコール濃度の目安となる二酸化炭素発生量もほとんど同じであった。原料の穀物による違いでは、白米が一番発酵しやすく、次いで黒米、緑米、ワイルドライス、そして赤米が一番発酵しにくいことがわかった。次項で述べるように、赤米は粉碎してない状態では発酵しないことがわかった。ここで示したものは、全て 2~3 mm に粉碎した穀物を用いた時の結果である。アルコール飲料の色調では無蒸煮アルコール法で試醸したものの方が鮮やかであった (Figure 2-5)。その違いは、520~530 nm に吸収ピークを示すアントシアニンのものと思われる無醸煮黒米アルコール飲料吸収スペクトルに顕著に現れている (Figure 2-6)。即ち、第 1 章の実験結果から予測されたように無蒸煮アルコール発酵法では黒米に含まれるアントシアニンの構造が大きく変化しない状態で含まれていることが示唆された。また、総フェノール量は総じて無蒸煮アルコール発酵法で得られたアルコール飲料の値が高くなった (Figure 2-7)。しかし、総フェノール量を除く他の項目では大きな差異は見られなかった。

一方、総フェノール性化合物量と相関関係があると言われている DPPH ラジカル消去能 (Figure 2-8) の値は、白米に比べて有色米やワイルドライスの値が高く、特に黒米、赤米、ワイルドライスの値が高くなった。蒸煮法と無蒸煮法の比較では、黒米と赤米は総フェノール性化合物量の傾向とは逆に蒸煮アルコール法で試醸した方がわずかに高くなった。脂質過酸化阻止能の値は醸煮法、無醸煮法の違いは認められなかった。原料の穀物の違いでは、ワイルドライスを除く穀物ではほとんど同じ値を示した。ワイルドライスの値は他の穀物の約 1.6 倍の値を示した (Figure 2-9)。

アルコール飲料は色や香りとともに、味にも穀物による違いがあった。黒米はアントシアニン類特有の香り、ワイルドライスはお茶の香り、緑米は特有の青臭さを伴った。味香りともに試飲者の好評を得たのは赤米であった。

以上の結果から、アルコール発酵法の違いは総フェノール量以外の値には大きな影響を及ぼさなかった。しかし、原料穀物による違いからは、有色米およびワイルドライスが高い抗酸化能を有するアルコール飲料の原料となり得るこ

とがわかった。とりわけワイルドライスは水溶性、脂溶性の抗酸化能がともに高いアルコール飲料を生産する原料になることがわかった。

2-3-2 糠部分を取り除いた穀物でのアルコール飲料の試醸と抗酸化能

穀物から糠をできるだけ取り除いたものを原料としたアルコール飲料を試醸して抗酸化能を比較した。発酵原料は、糠の分だけ重量が減少している。結果を Figure 2-10, 11 に示した。また、得られたアルコール飲料の写真を Figure 2-12 に示した。DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能はともに減少し、発酵法の違いは見られなかった。穀物による違いではワイルドライスの値がともに高くなったが、それ以外の穀物ではほとんど差異がなくなった。すなわち、有色穀物の表皮部分にある有色部分を少なくすることで、抗酸化能の値は白米とほとんど同じ値になった。これは、有色穀物の成分が、有色穀物の抗酸化能に大きく寄与していることを示している。

2-3-3 糠部分を段階的に取り除いた穀物のアルコール飲料の抗酸化能

穀物から段階的に糠を取り除いたものを原料とし、無蒸煮アルコール発酵法でアルコール飲料を試醸し、抗酸化能を比較した。その際の穀物重量は同じにした。その結果 DPPH ラジカル消去能は緑米、黒米、ワイルドライスが低下したが、赤米はほとんど変化しなかった。一方、脂質過酸化阻止能は、黒米が減少し、赤米、緑米、ワイルドライスが増加した(Figure 2-13, 14)。この結果から以下のことが推察された。

糠部分に含まれる成分が DPPH ラジカル消去能に及ぼす影響は大きく、特に黒米で顕著であった。赤米の DPPH ラジカル消去能に影響を及ぼす成分は、糠部分よりも内部に多く含まれている可能性がある。一方、脂質過酸化阻止能は黒米だけが糠部分の寄与が大きく、赤米では糠部分よりも内部に多く含まれている。また、ワイルドライスや緑米では穀物全体に広く分布している。それは Figure 2-15 に示したように、穀物中の色素の分布状態と深く関係しているのではないかと推察した。すなわち、赤米やワイルドライスのように穀物全体に色素を含むものは、水溶性、脂溶性ともに穀物全体の寄与が大きく、黒米の場合のように表皮部分に多く色素を含む場合には、抗酸化物質は糠部分の寄与が大きいことを示唆している。その結果を Table 2-6 に要約した。なお、糠を除去してしない生の赤米の抗酸化能のデータが記されていないのは、発酵が進まなかつ

たからである。このことは第3章で詳しく記した(p 57)。

Table 2-5. Composition of initial mash and analysis of resulting alcoholic beverages.

Rice	Polished white rice		Black rice		Red rice		Green rice		Wild rice	
	With cooking	Without cooking	With cooking	Without cooking	With cooking	Without cooking	With cooking	Without cooking	With cooking	Without cooking
Initial pH	4.7	4.8	4.9	4.9	4.9	4.9	5.0	5.0	5.0	5.1
Final pH	4.5	4.5	4.6	4.9	4.7	4.8	4.6	4.9	4.9	5.0
CO₂ output (g)	11.8	11.5	11.8	11.3	11.9	12.2	11.9	11.2	11.9	11.8
Filtrate (ml)	76	83	67	75	66	76	73	73	48	63
Acidity (ml)	2.2	2.4	3.3	2.9	3.6	3.3	3.2	2.8	2.8	2.5
Ethanol concentration (% w/v)	12.1	12.6	12.1	12.6	13.8	11.0	12.5	11.4	13.0	13.3
Reducing sugar content (µg/mL)	540	590	660	780	770	630	670	820	800	720
Total phenolic compound (µg/mL)	380	560	470	580	500	640	400	570	600	680
Anthocyanin content (µg/mL)	ND	ND	61.8	94.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Values are the mean of triplicates. ND, not detected.

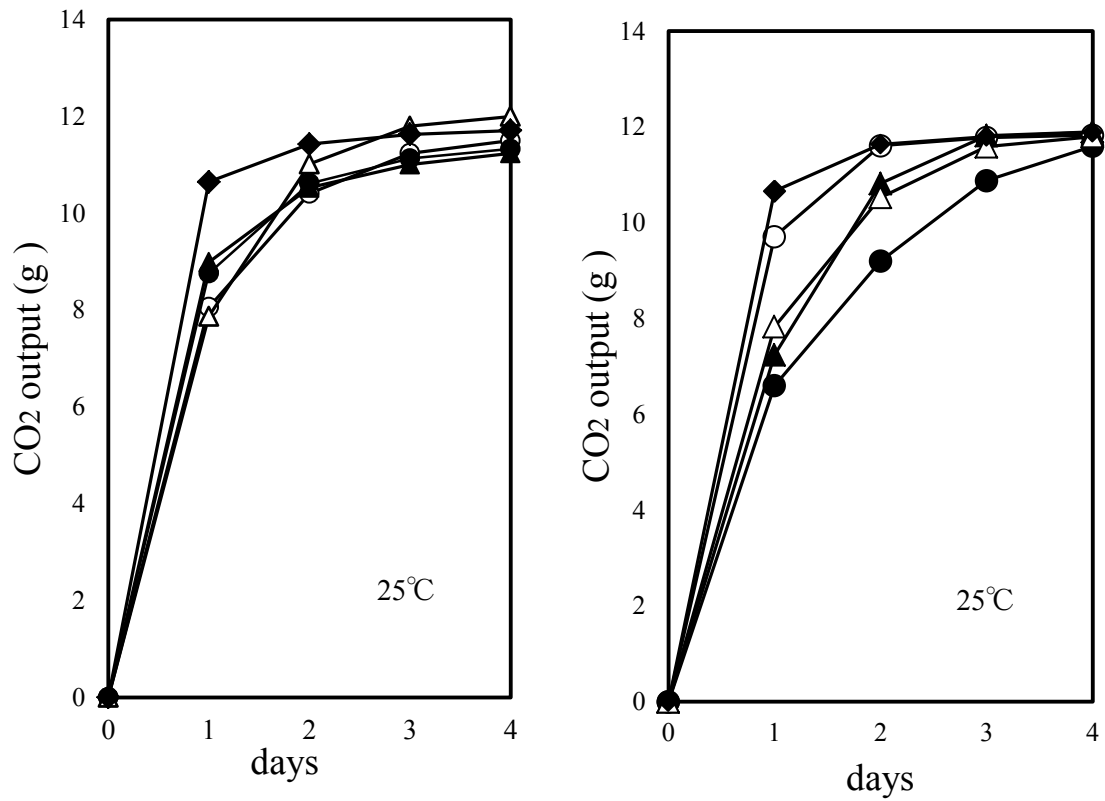


Figure 2-4. Time courses of fermentation of mashes made from various grains with cooking (left) and without cooking (right) using K7 yeast. Symbols: ○, Polished white rice; ●, Black rice; △, Red rice; ▲, Green rice; ◆, Wild rice.

Values are the mean of triplicates.

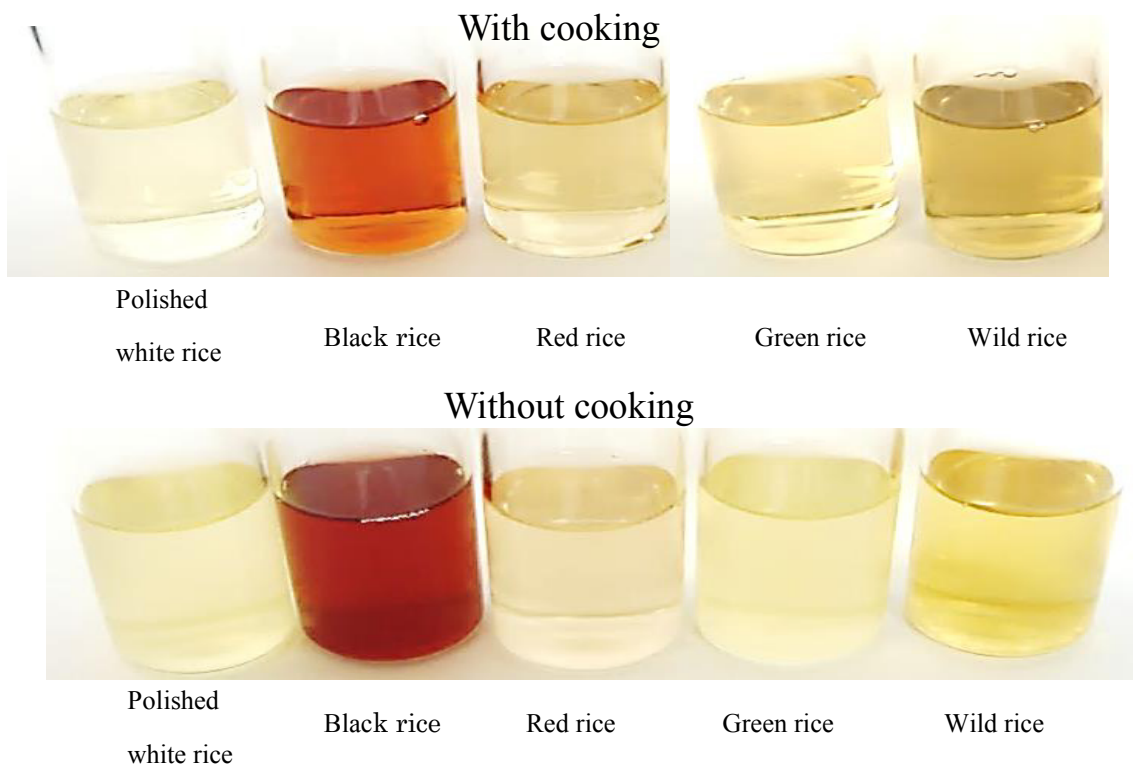


Figure 2-5. Picture of alcoholic beverage made from various grains made using K7 yeast.

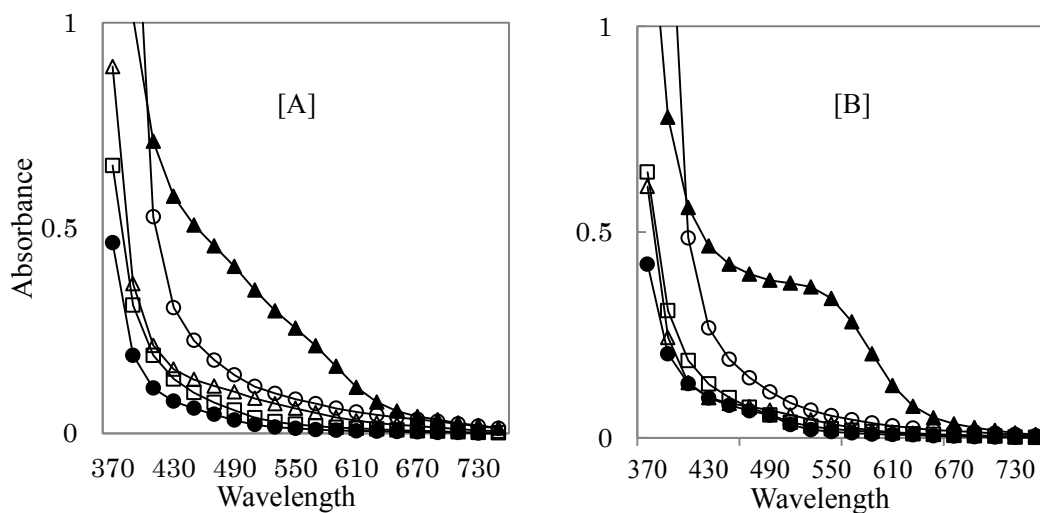


Figure 2-6. Absorption spectra of alcoholic beverages made from various rice grains. [A] shows with cooking and [B] shows without cooking. ▲, Black rice; △, Red rice; □, Green rice; ○, Wild rice; ●, Polished white rice.

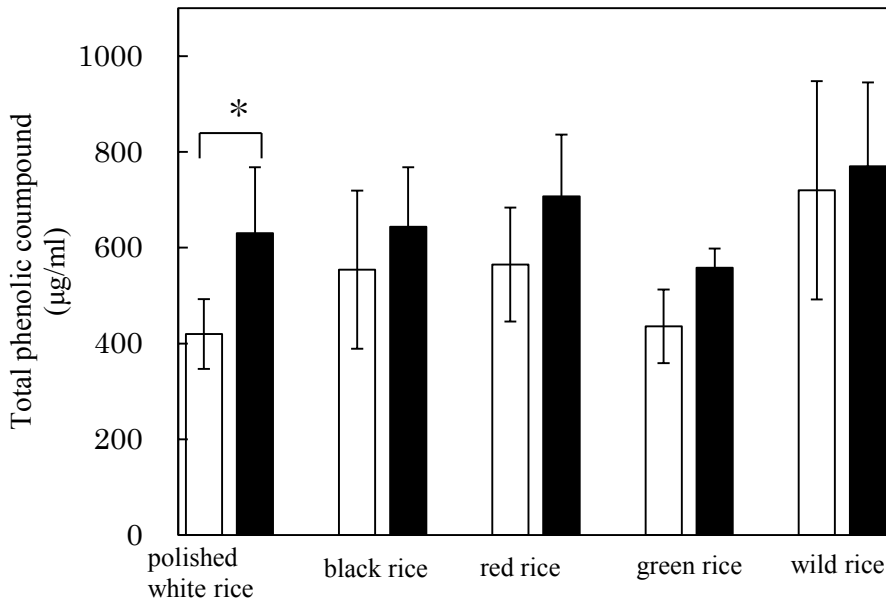


Figure 2-7. Total phenolic compound of alcoholic beverages made from various grains using K7 yeast. Open bars, fermentation with cooking; closed bars without cooking. Values are the mean of triplicates. *: $p < 0.05$

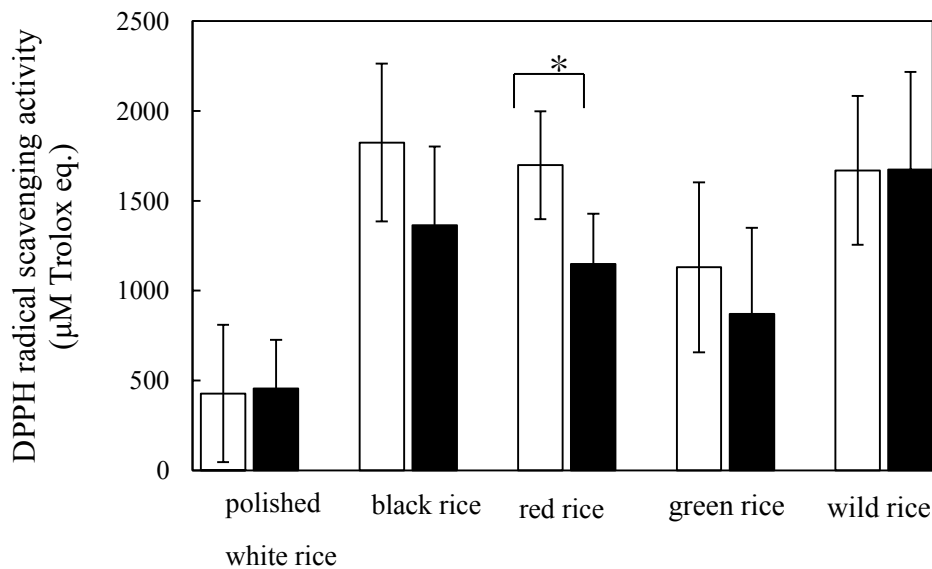


Figure 2-8. DPPH radical scavenging activities of alcoholic beverages made from various grains using K7 yeast. Open bars, fermentation with cooking; closed bars without cooking. Values are the mean of triplicates. *: $p < 0.05$

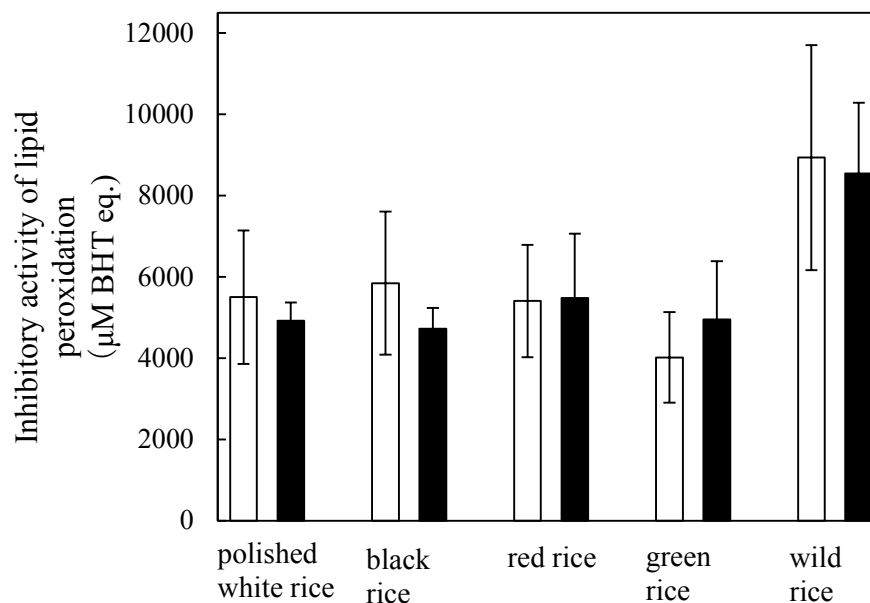


Figure 2-9. Inhibitory activity of lipid peroxidation of alcoholic beverages made from various grains using K7 yeast. Open bars, fermentation with cooking; closed bars without cooking. Values are the mean of triplicates. *: $p < 0.05$

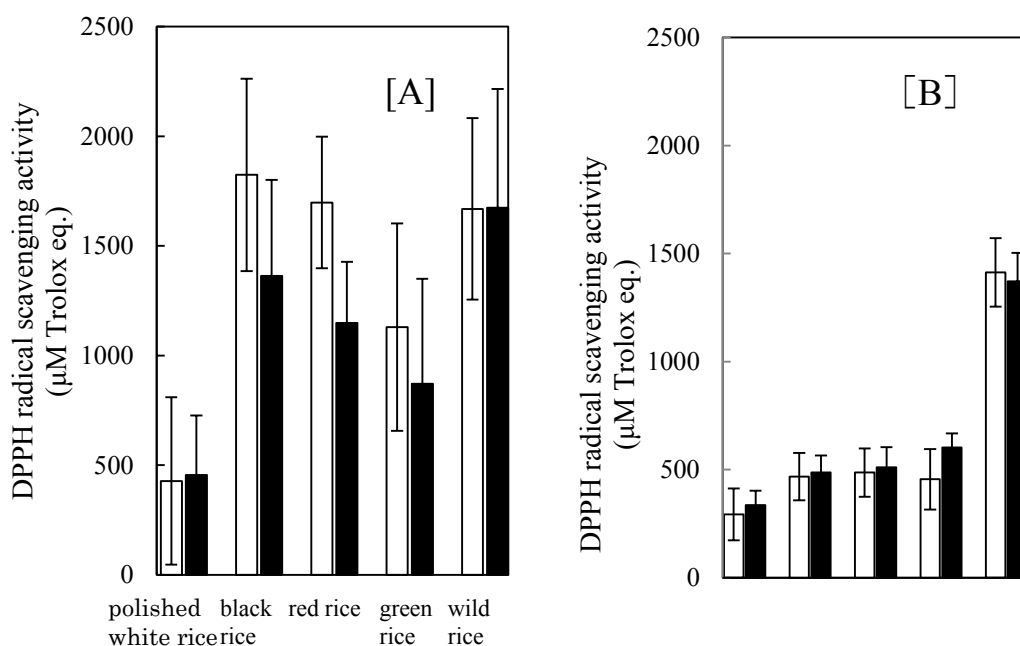


Figure 2-10. Comparison of DPPH radical scavenging activity of various polished and unpolished grains fermented with K7 yeast at 25°C. Open bars, fermentation with cooking; closed bars, fermentation without cooking. [A], with bran; [B], without bran. Values are the mean of triplicates. *: $p < 0.05$

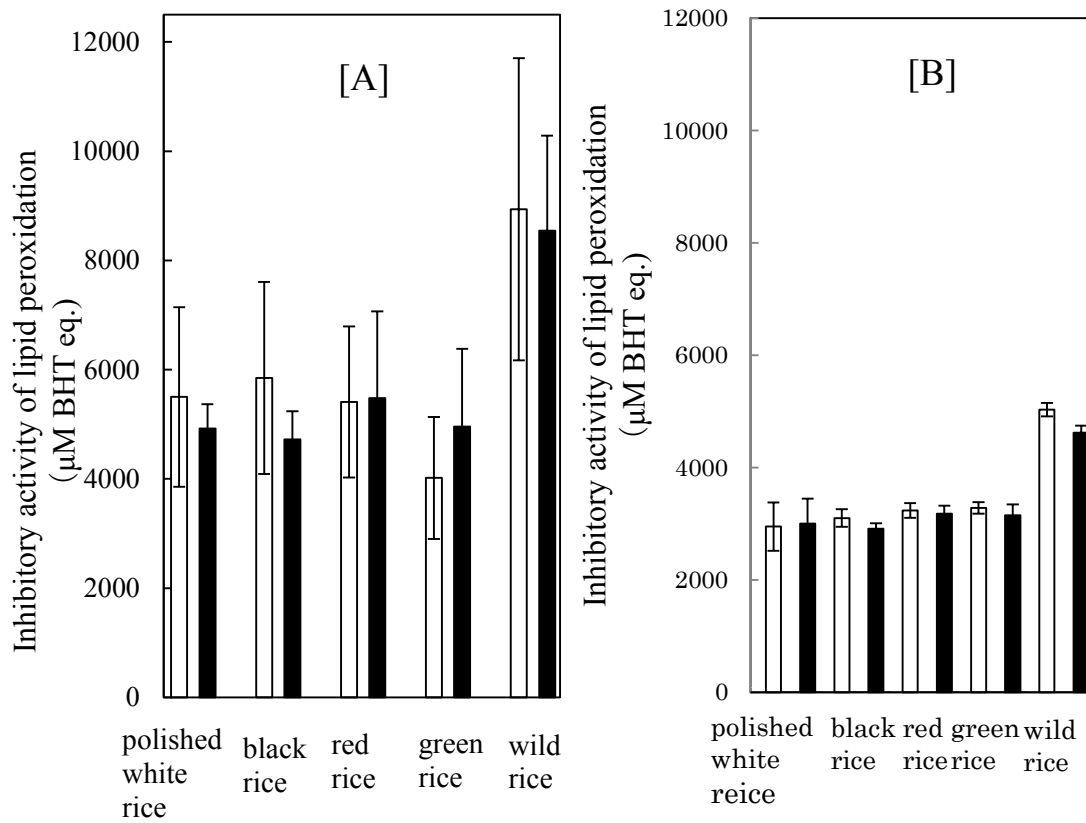


Figure 2-11. Comparison of inhibitory activity of lipid peroxidation of various polished and unpolished grains fermented with K7 yeast at 25 °C. Open bars, fermentation with cooking; closed bars, fermentation without cooking. [A]; with bran and [B] shows without bran. Values are the mean of triplicates.

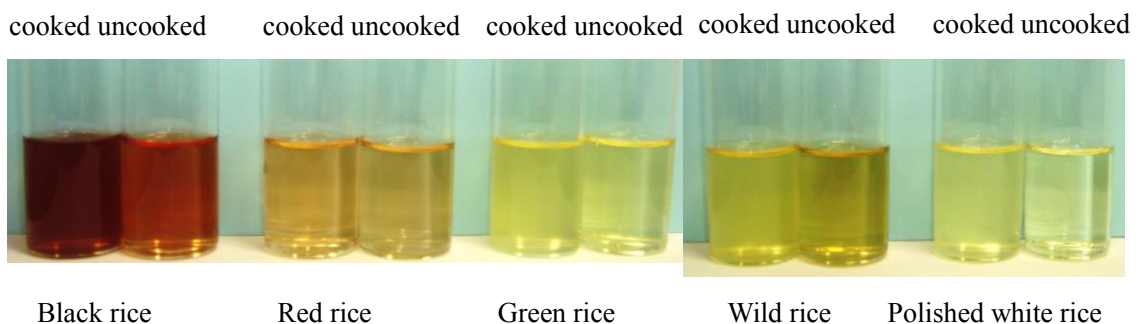


Figure 2-12. Picture of alcoholic beverages made from various grains of which brain was removed.

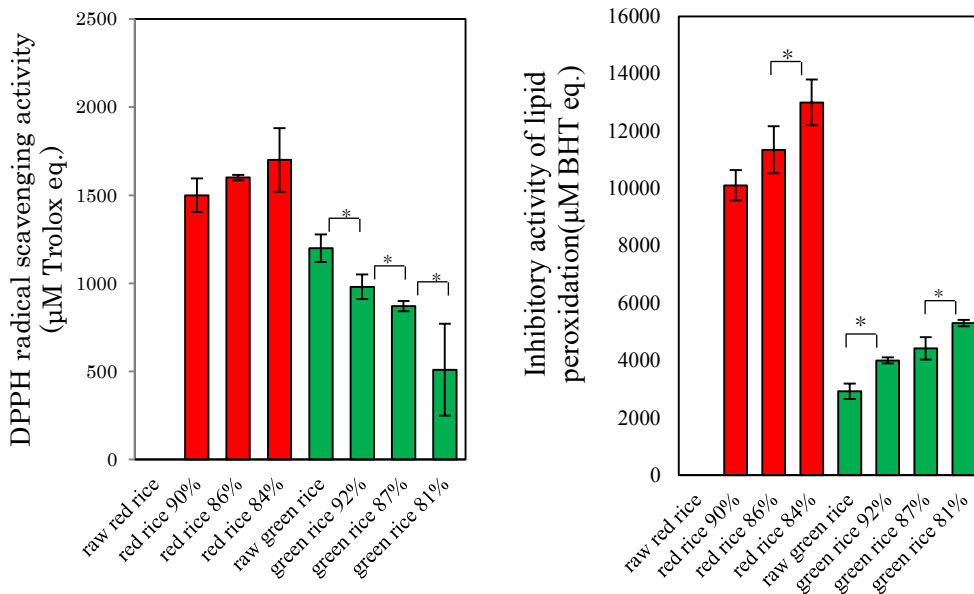


Figure 2-13. Antioxidant activities of alcoholic beverages made from black and wild rice grains of which bran was stepwise removed. Values are the mean of triplicates.

* : p<0.05

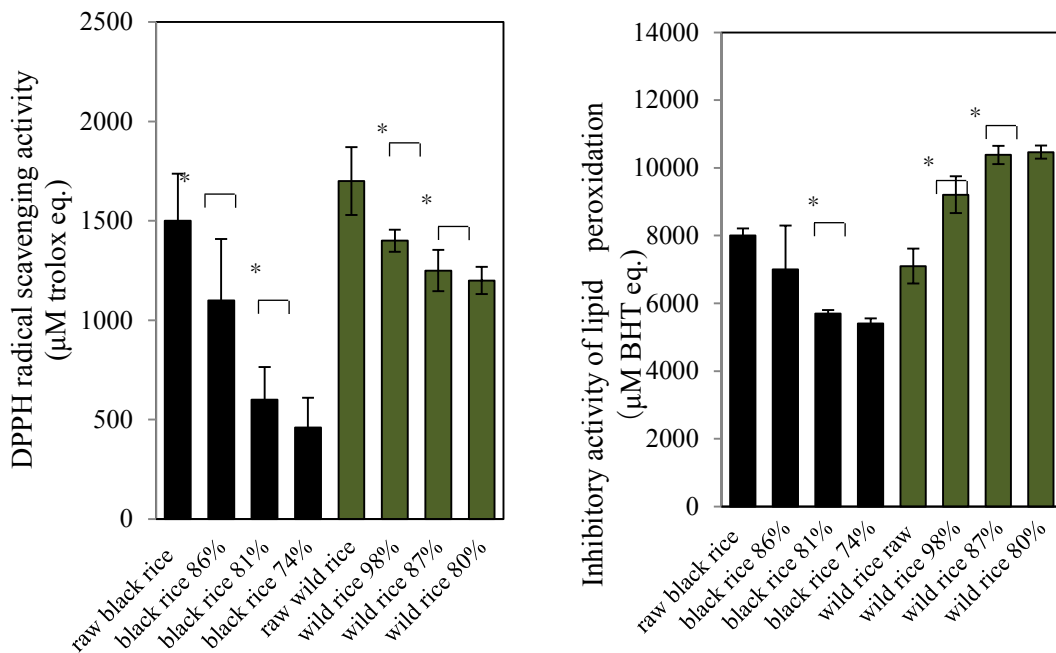


Figure 2-14. Antioxidant activities of alcoholic beverages made from red rice and green rice grains of which bran was stepwise removed. Values are the mean of triplicates.

* : p<0.05

Table 2-6. Distribution of antioxidants in various grains.

Grain	DPPH radical scavenging activity	Inhibitory activity of lipid peroxidation
Black rice	Bran fraction	Bran fraction
Red rice	Whole grain	Whole grain
Green rice	Bran fraction	Whole grain
Wild rice	Whole grain	Whole grain

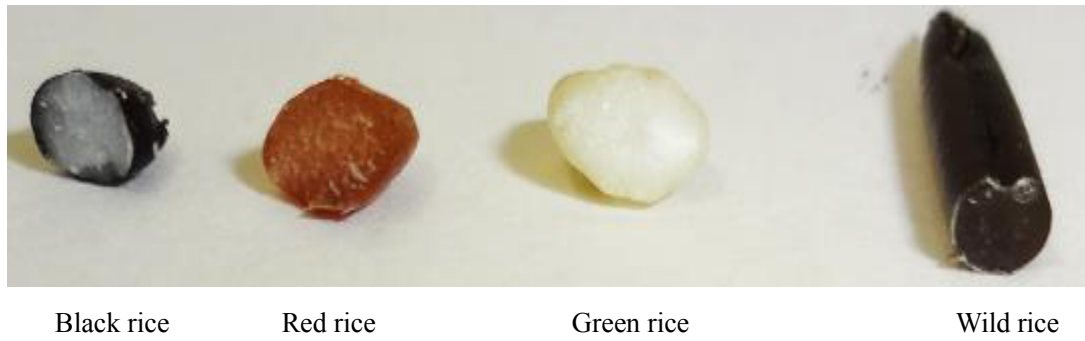


Figure 2-15. Picture of vertical sections of various grains.

第3章 各種酵母を用いた有色米アルコール飲料の

組成と抗酸化能特性

第1節 緒言

第2章ではK7酵母菌を用いて有色米及びワイルドライスをアルコール発酵させることにより、白米に比べて高い抗酸化能を持つアルコール飲料を得ることができた。また、穀物の糠部分を段階的に除去したものを原料にしたアルコール飲料の抗酸化能測定結果から、穀物によって抗酸化物質の含有部位が異なることが明らかになった。

本章では、本研究室で分離した2種類の酵母菌 NP01、Y3、を用いてアルコール飲料を試醸し、酵母の違いが各種有色米アルコール飲料のアルコール発酵の時間や組成、抗酸化能にどのように影響するのかを K7 酵母を用いた時の結果と比較検討した。

第2節 実験材料と方法

3-2-1 発酵原料

1-2-1 参照。

3-2-2 糖化剤

2-2-2 参照。

3-2-3 酵母の培養

培養方法は 2-2-3 を参照。使用酵母は、*Saccharomyces cerevisiae* NP01、*Saccharomyces cerevisiae* Y3 と比較のために日本醸造協会の清酒酵母、協会7号酵母を使用した³²⁾。

3-2-4 酵母の洗浄及び酵母懸濁液の調製

2-2-4 参照。

3-2-5 アルコール飲料の試醸

2-2-5 参照。

3-2-6 発酵曲線の作製

発酵開始後の重量の減少を CO₂ 発生量として 24 時間毎に測定し、変化量を発酵曲線として作成した。用いた酵母の影響を調べるために発酵開始直後から 1 時間毎に 6 時間測定した。

3-2-7 pH 測定

3-2-8 酸度測定

3-2-9 エタノール濃度分析

3-2-10 直接還元糖量測定

3-2-11 総フェノール性化合物量測定

3-2-12 吸収スペクトル測定

3-2-13 DPPH ラジカル消去能測定

3-2-14 脂質過酸化阻止能測定 (β-カロテン退色法)

以上、第 2 章 2-2 を参照。

第 3 節 結果と考察

3-3-1 発酵法及び酵母による組成の違い

NP01、Y3 及び K7 酵母を用いた蒸煮法、無蒸煮法によるアルコール飲料の発酵曲線を Figure 3-1 に示した。第 2 章で得られた K7 酵母による発酵では両法ともにほぼ 4 日で完了したのに対し、Y3、および NP01 では無蒸煮発酵が完了するまで 6 日間を要した。また、蒸煮発酵法でも、NP01 では赤米の発酵が遅れ発酵完了まで 6 日を要した。得られたアルコール飲料の組成を Table 3-1 に示した。発酵法による違いでは、第 2 章で記した K7 酵母を用いた時の結果と同じ傾向が見られた。すなわち、通常の蒸煮アルコール発酵法に比べ、無蒸煮アルコール発酵法で作成したアルコール飲料中の総フェノール量の値の方が高くなった (Figure 3-3,3-4)。しかし、酵母の違いの影響は、観察されなかった。

3-3-2 酵母による抗酸化能の違い

酵母の違いが抗酸化能に及ぼす影響を調べた。DPPH ラジカル消去能 (Figure 3-5,6) も脂質過酸化阻止能も第 2 章で示した K7 酵母を用いた時の結果と同様の傾向が得られた。すなわち、DPPH ラジカル消去能の値では、白米よりも有色米の方が 2 倍～3 倍高い値を示した。特に黒米、赤米、ワイルドライスの値が高くなった。だが、発酵方法による違いはほとんど観察されなかった。脂質過酸化阻止能でも蒸煮、無蒸煮の違いはほとんど認められなかった。また、穀物の種類の違いでは、赤米、緑米及びワイルドライスを除き、その値や順序には大きな違いは確認されなかった。例えば、ワイルドライスの値は Y3 では他の穀物の 1.2 倍～1.5 倍の値を示し、NP01 では逆に他の約 0.9 倍と他の穀物より小さくなった。緑米では、Y3 ではワイルドライスを除く他の穀物の値と同程度で、NP01 では、他の穀物の値の約 1.3 倍と高くなった。

以上の結果と第 2 章で得た結果を合わせて考えると、アルコール発酵における酵母の違いの影響は黒米の場合は、ほとんどないといえる。しかし、発酵が完了する時間は明らかに K7 酵母を用いた時の方が短くなった。

3-3-3 アルコール発酵に及ぼす糠部分の影響

第 2 章で明らかになった有色穀物の糠部分の影響を糠付きの玄米と糠を取り除き精米率 74%～80%にした穀物を原料にしてアルコール発酵させ、発酵曲線を比較した (Table 2-5)。発酵曲線は穀物により明らかな違いが観察された (Figure

3-9, 10)。赤米、緑米、黒米、ワイルドライスの順に二酸化炭素量が減少した。赤米は糠付きの玄米では発酵しなかった。しかし、発酵糠部分を取り除くことで、白米と殆ど同じ発酵パターンを示した。これは糠部分が酵母によるアルコール発酵を阻害しているからではないかと推察した。一方、酵母の違いを発酵曲線から見てみた (Figure 2-4, 3-1, 3-2)。その結果、発酵開始直後には多少の違いはあるものの、ほとんど違いは観察されなかった (Figure 3-11, 12, 13)。

Table 3-1. Composition of initial mash and analysis of resulting alcoholic beverages.

	yeast	Polished white		Black rice		Red rice		Green rice		Wild rice	
		Cooked	uncooked	Cooked	Uncooked	Cooked	Uncooked	Cooked	Uncooked	Cooked	Uncooked
Initial pH	K7	4.7	4.8	4.9	4.9	4.9	4.9	5.0	5.0	5.0	5.1
	NP01	5.0	5.4	5.0	5.0	5.0	5.0	5.1	5.3	5.2	5.3
	Y3	5.1	5.0	5.1	5.2	5.0	5.0	5.2	5.3	5.2	5.4
Final pH	K7	4.5	4.5	4.6	4.9	4.7	4.8	4.6	4.9	4.9	5.0
	NP01	4.7	4.6	4.7	5.0	4.9	4.6	5.0	5.0	5.0	5.1
	Y3	4.8	4.7	5.0	4.6	4.9	4.6	5.1	5.0	5.2	5.1
CO ₂ output(g)	K7	11.8	11.5	11.8	11.3	11.9	12.2	11.9	11.2	11.9	11.8
	NP01	11.3	11.3	11.5	10.7	12.0	11.3	11.3	11.1	11.5	11.4
	Y3	11.3	11.3	11.6	10.8	11.1	11.7	11.2	11.3	11.4	11.3
Filtrate(mL)	K7	76	83	67	75	66	76	73	73	48	63
	NP01	70	83	62	70	59	62	65	78	43	59
	Y3	70	88	68	78	62	63	70	70	40	59
Acidity(mL)	K7	2.2	2.4	3.3	2.9	3.6	3.3	3.2	2.8	2.8	2.5
	NP01	2.1	2.7	3.7	2.8	2.9	3.0	2.9	2.6	2.7	2.8
	Y3	2.2	2.4	3.2	3.6	3.3	3.7	3.0	2.8	2.6	2.7
Ethanol concentration(% _{w/v})	K7	12.1	12.6	12.1	12.6	13.8	11.0	12.5	11.4	13.0	13.3
	NP01	12.6	12.2	13.2	12.2	14.1	12.6	13.3	13.8	13.5	11.1
	Y3	12.7	11.5	13.3	11.3	12.2	11.0	12.5	11.5	13.3	10.6
Reducing sugar content(μg/mL)	K7	540	590	660	780	770	630	670	820	800	720
	NP01	760	660	800	660	880	660	1000	895	820	860
	Y3	800	790	820	790	900	820	970	1100	1000	920
Total phenolic compound(μg/mL)	K7	380	560	500	640	470	580	400	570	600	680
	NP01	470	520	630	770	540	650	420	470	800	810
	Y3	540	660	530	770	690	650	512	481	800	810

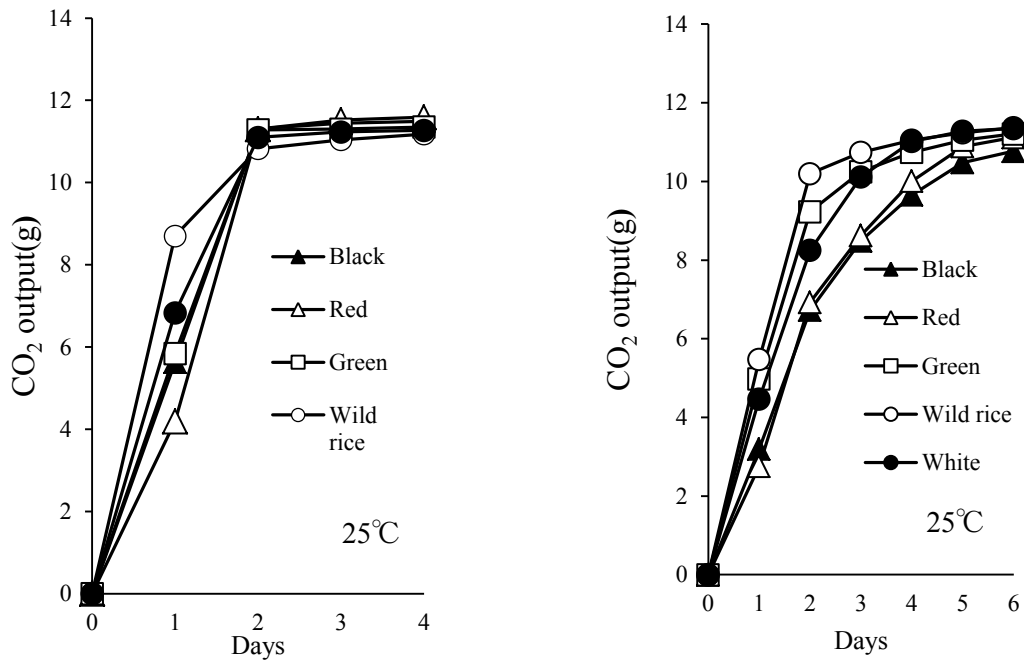


Figure 3-1. Time courses of fermentation of mashes made from various grains with Y3 yeast. Left shows fermentation with cooking and right shows without cooking. Values are the mean of triplicates.

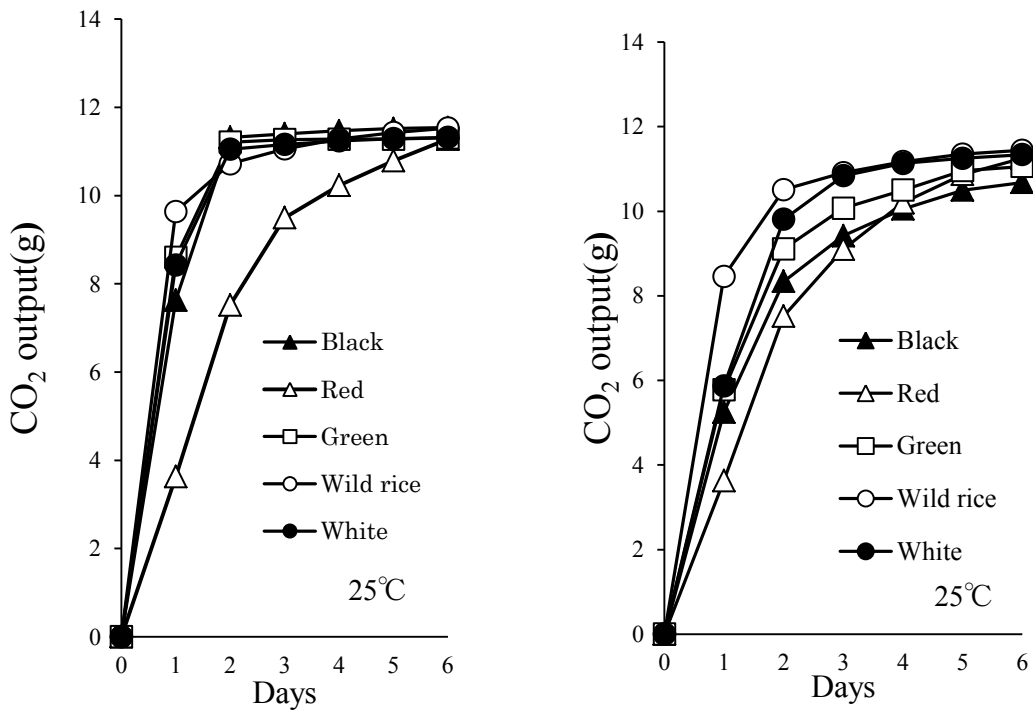


Figure 3-2. Time courses of fermentation of mashes made from various grains with NP01 yeast. Left shows fermentation with cooking and right shows without cooking. Values are the mean of triplicates.

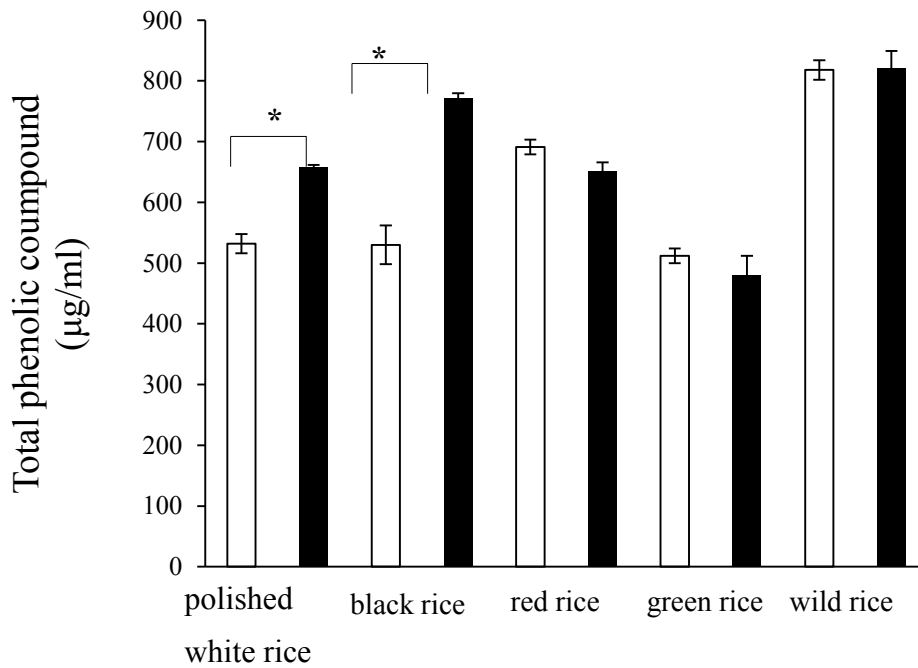


Figure 3-3. Total phenolic compound of alcoholic beverages made from various grains using Y3 yeast. Open bars, fermentation with cooking; closed bars without cooking. Values are the mean of triplicates. * : $p < 0.05$

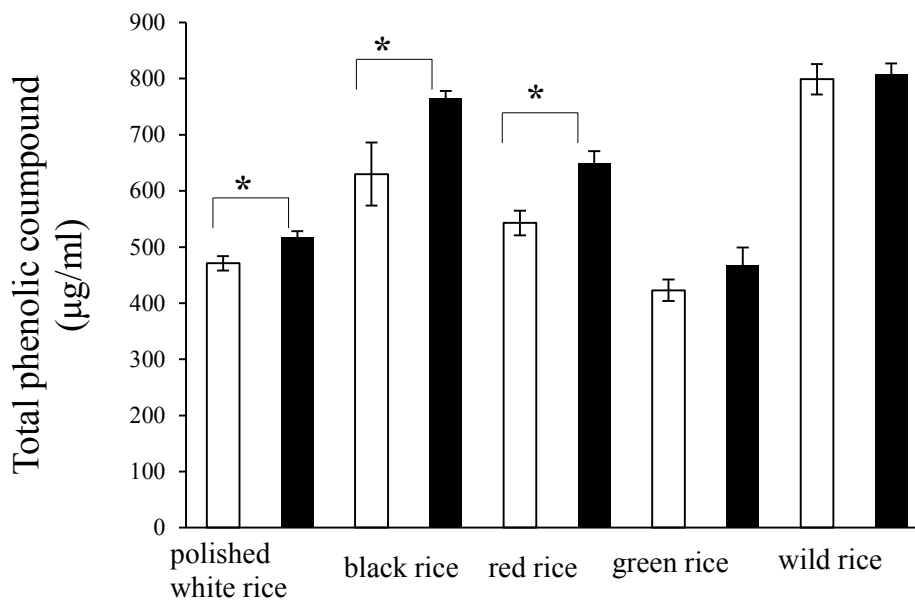


Figure 3-4. Total phenolic compound of alcoholic beverages made from various grains using NP01 yeast. Open bars, fermentation with cooking; closed bars without cooking. Values are the mean of triplicates. * : $p < 0.05$

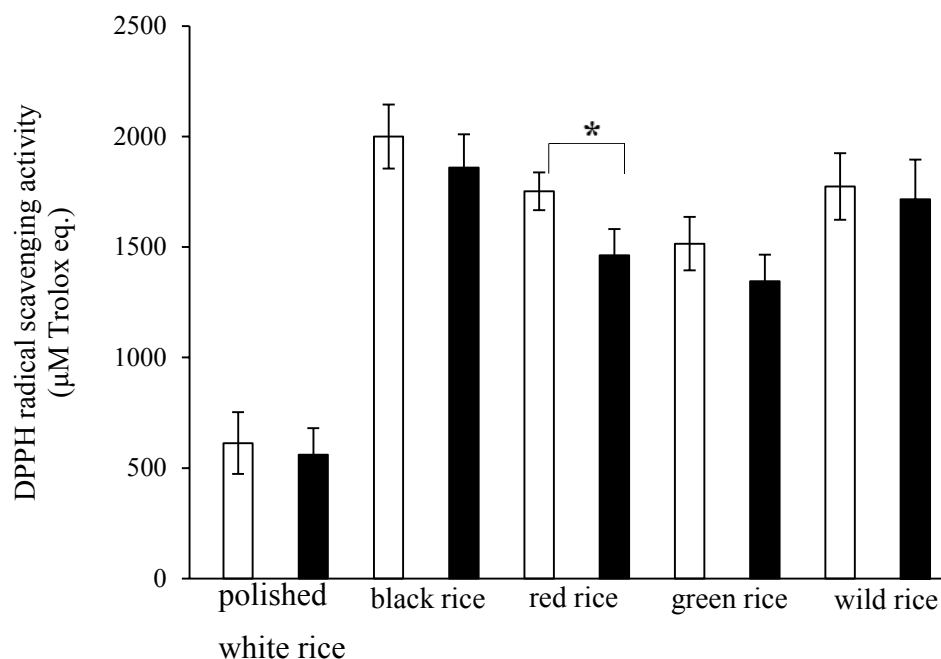


Figure 3-5. DPPH radical scavenging activities of alcoholic beverages made from various grains using Y3 yeast. Open bars, fermentation with cooking; closed bars without cooking. Values are the mean of triplicates. *: $p < 0.05$

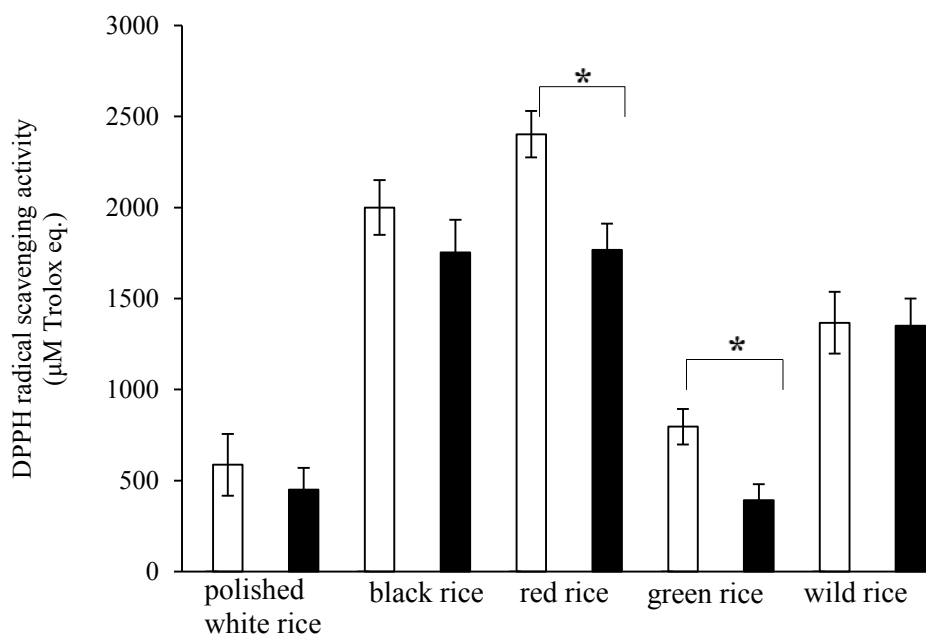


Figure 3-6. DPPH radical scavenging activities of alcoholic beverages made from various grains using NP01 yeast. Open bars, fermentation with cooking; closed bars without cooking. *: $p < 0.05$

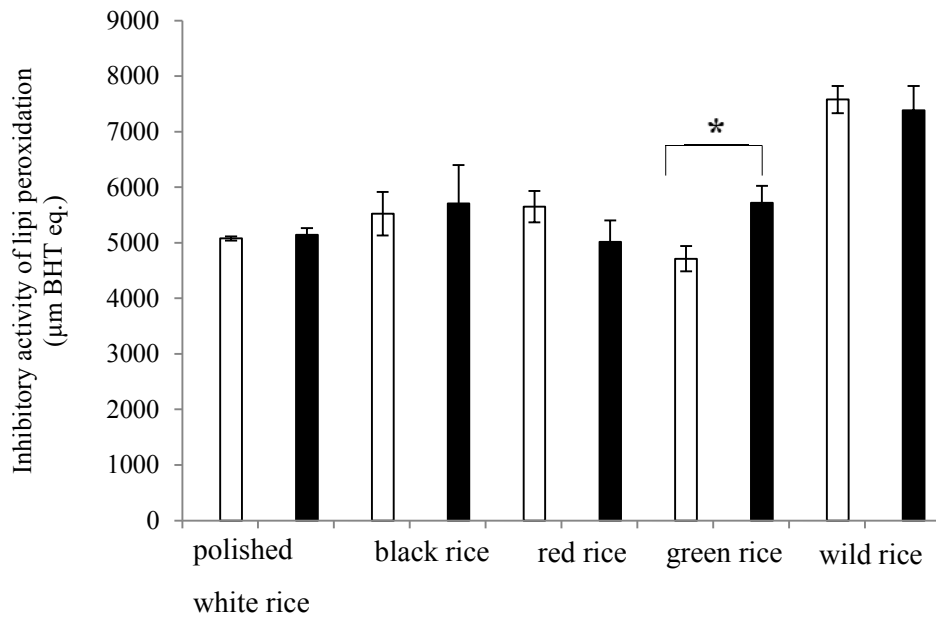


Figure 3-7. Inhibitory activity of lipid peroxidation of alcoholic beverages made from various grains using Y3 yeast. Open bars, fermentation with cooking; closed bars without cooking. Values are the mean of triplicates. *: $p < 0.05$

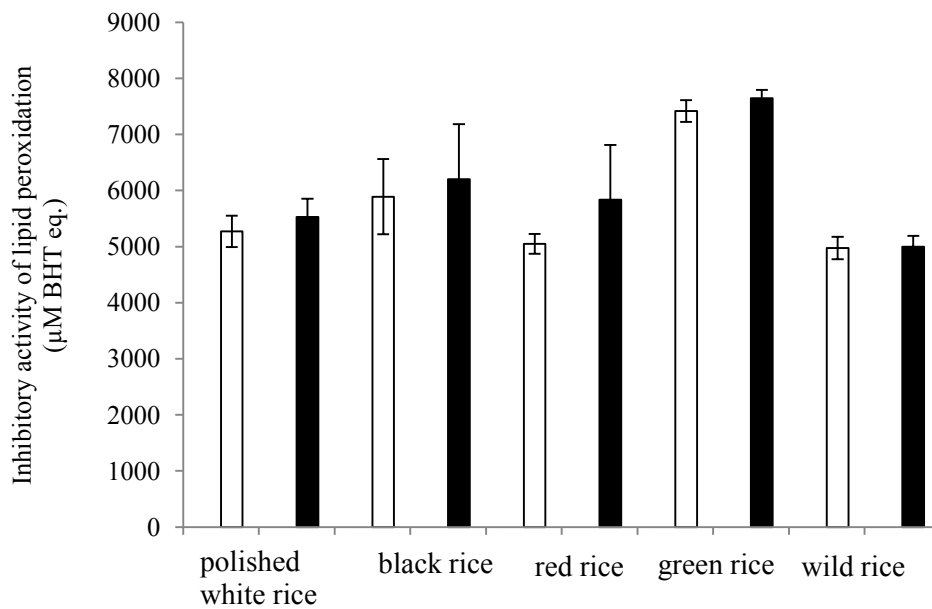


Figure 3-8. Inhibitory activity of lipid peroxidation of alcoholic beverages made from various grains using NP01 yeast. Open bars, fermentation with cooking; closed bars without cooking.

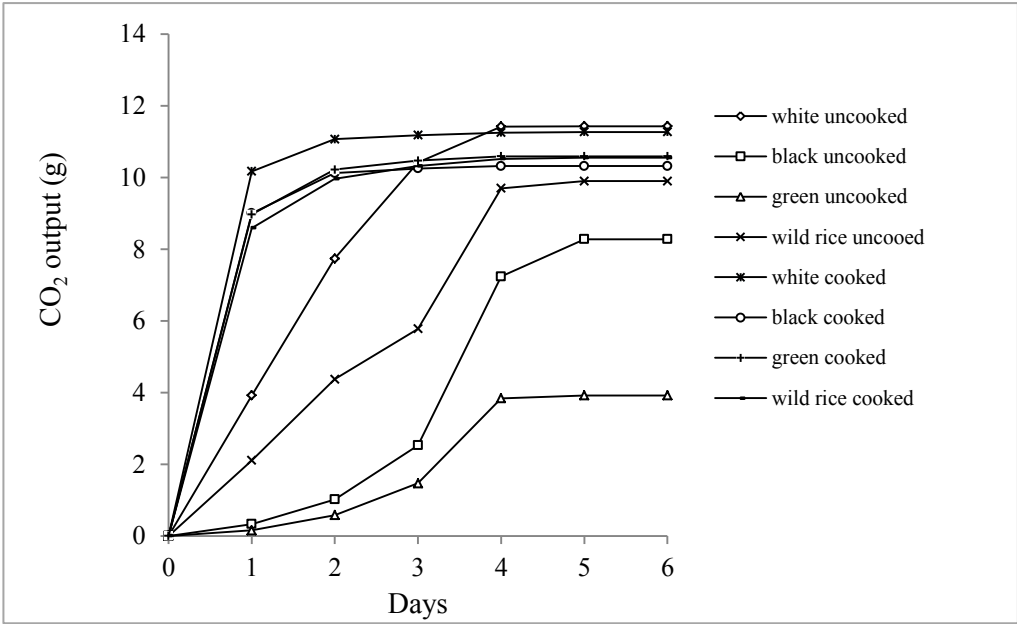


Figure 3-9. Time courses of fermentation of mashes made from various grains of which bran was not removed. Fermentation was performed with K7 yeast.

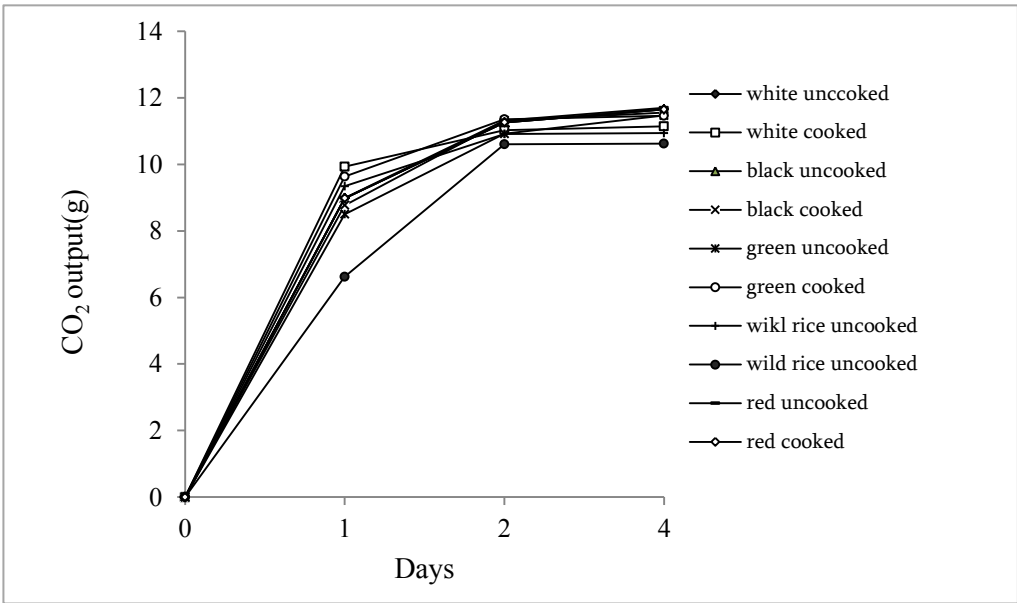


Figure 3-10. Time courses of fermentation of mashes made from various grains of which bran was removed. Fermentation was performed with K7 yeast.

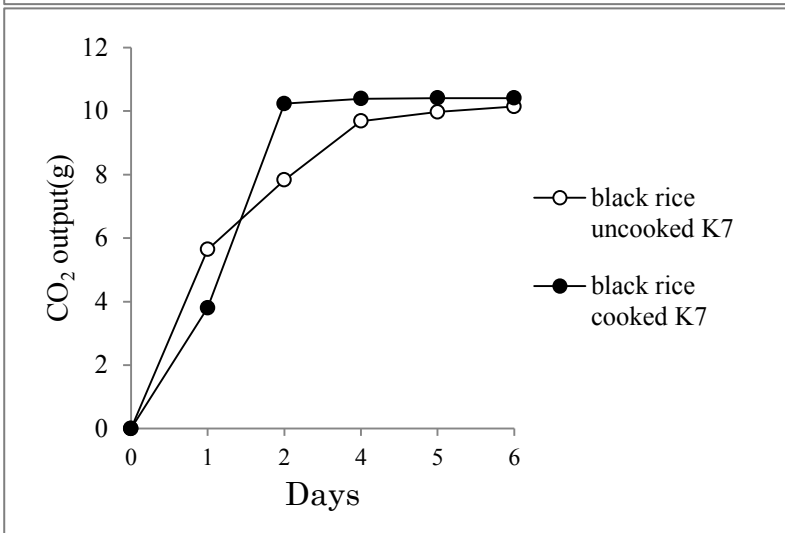
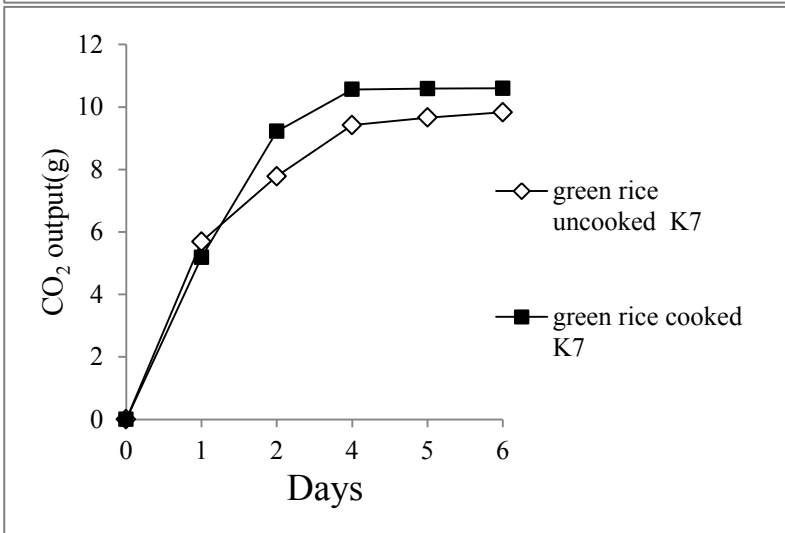
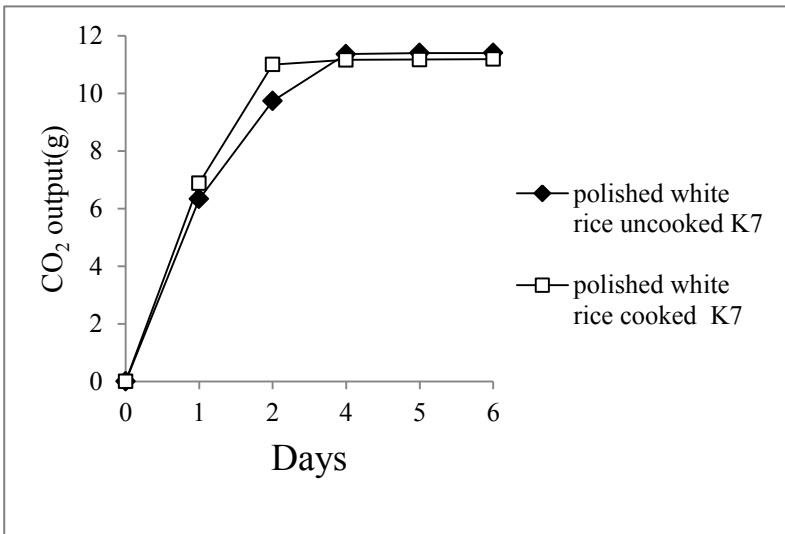


Figure 3-11. Time courses of fermentation of mashes made from various grains with K7 yeast.

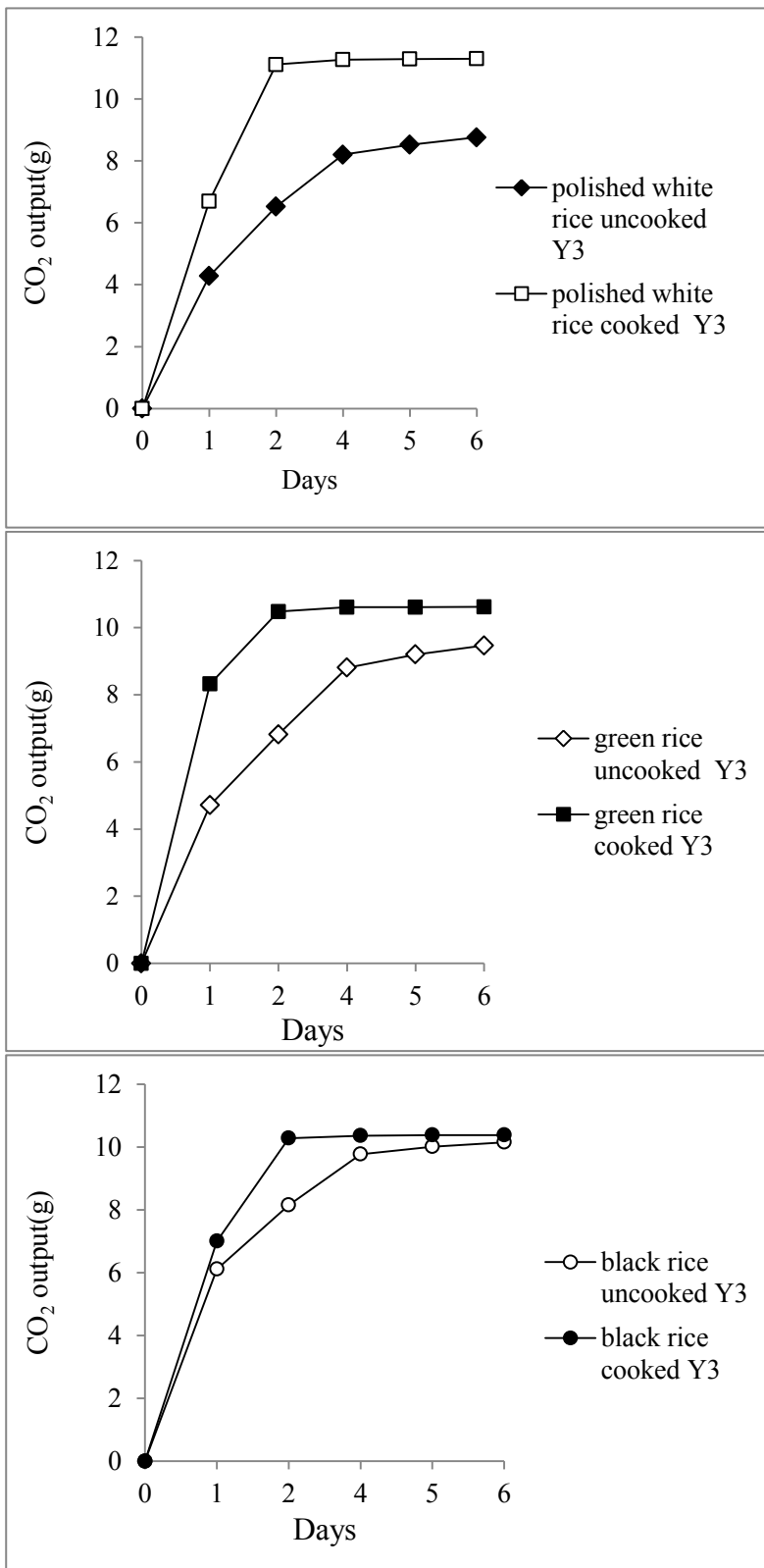


Figure 3-12. Time courses of fermentation of mashes made from various grains with Y3 yeast.

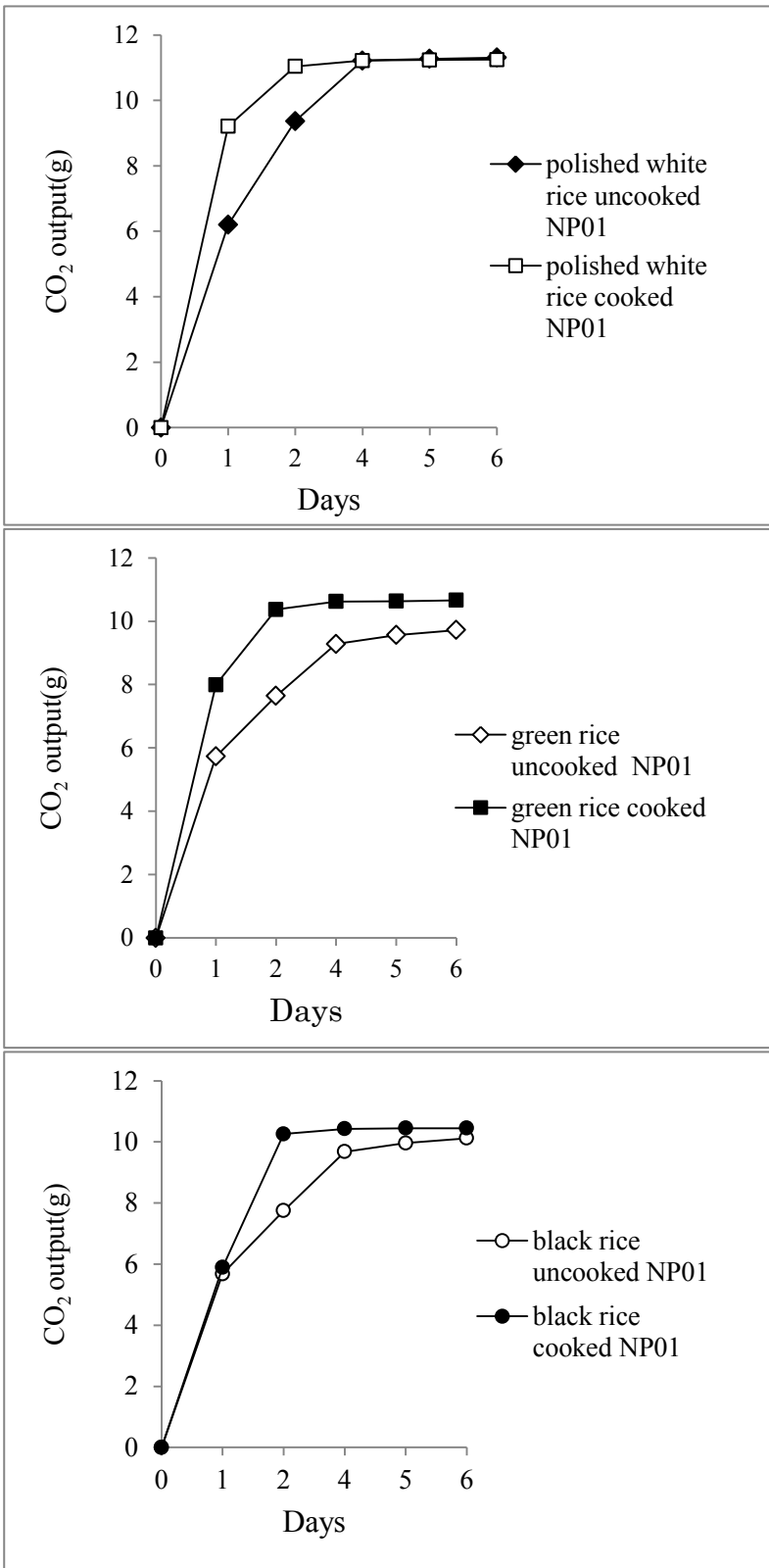


Figure 3-13. Time courses of fermentation of mashes made from various grains with NP01 yeast.

第4章 黄麹を用いて試醸したワイルドライス及び

有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性

その1

(白米黄麹による試醸)

第1節 緒言

第2章、3章ではスミチームを糖化剤、酵母はK7、NP01及びY3の3種類を用い、蒸煮。無蒸煮アルコール発酵法で試醸した有色米のアルコール飲料の組成と抗酸化能を調べた。その結果、酵母の違いが抗酸化能や組成に影響を及ぼすことが赤米、緑米及びワイルドライスで確認された。また、穀物の違いが抗酸化能の値に影響を及ぼすことが明らかになった。特に、黒米やワイルドライスの抗酸化能の値が高くなることが分かった。本章では、糖化剤として黄麹を用いたときのアルコール飲料の組成と抗酸化能について検討した。

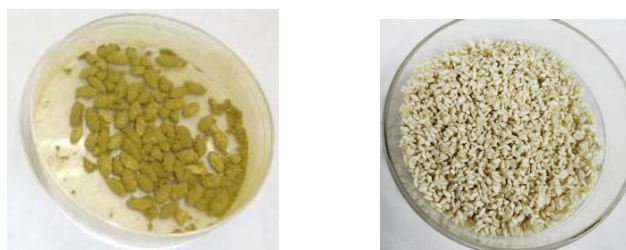
第2節 実験材料と方法

4-2-1 発酵原料

1-2-1 参照。

4-2-2 黄麹の製麹

1-2-2 参照。製麹法は Figure 1-1 参照。



Aspergillus oryzae Polished white rice *koji*

Figure 4-1. Pictures of *ki koji*.

4-2-3 酵素抽出

〈使用試薬〉

- ・酢酸 (ナカライテスク株式会社)
- ・酢酸ナトリウム三水和物 (ナカライテスク株式会社)
- ・塩化ナトリウム (ナカライテスク株式会社)

〈試薬調製〉

0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)

酢酸 3 ml を脱イオン水で 250 ml にメスアップし A 液とした。酢酸ナトリウム三水和物 5.44 g を脱イオン水で 200 ml にメスアップし B 液とした。その後、B 液に A 液を混合し、pH 5.0 に調整した。

0.5%塩化ナトリウムを含む 10 mM 酢酸緩衝液

塩化ナトリウム 1 g を脱イオン水で溶解し、0.2 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) を 10 ml 加え、脱イオン水で 200 ml にメスアップした。

0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0)

0.2 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) 100 ml と脱イオン水 1900 ml を混合し、2 L にした。

〈実験操作〉

国税庁所定分析法注解³⁴⁾に従い、以下の手順で酵素抽出を行った。

10 g の紅麴を測り取り、0.5 %塩化ナトリウムを含む 10 mM 酢酸緩衝液 50 ml と混合し、ときどき混ぜながら 15°C で 3 時間浸出した。この浸出液をろ紙 (ADVANTEC TOYO No.5C 55 mm) を用いて吸引ろ過し、ろ液を酵素溶液とした。

4-2-4 グルコアミラーゼ活性の測定

〈使用試薬〉

キッコーマン醸造分析キット 糖化力測定キット (キッコーマンバイオケミファ株式会社)

- ・基質溶液 4-ニトロフェニル β-マルトシド (G2-β-PNP)
- ・酵素溶液 β-グルコシダーゼ

- ・反応停止液 炭酸ナトリウム

〈実験操作〉

サンプルには、**4-2-3** で抽出した酵素溶液を蒸留水で 2 倍希釈したものをを用いた。

短試験管に基質溶液 0.5 ml と酵素溶液 0.5 ml を入れ、37℃にした恒温槽で 5 分間予備加温を行った。これにサンプルを 0.1 ml 加えて混合し、反応を開始した。正確に 37℃で 10 分間反応させた後、反応停止液を 2 ml 加えてよく混合し、反応を停止させた。この反応液をガラスセルに入れ、550 nm の吸光度を測定しサンプル値とした。

ブランク値の測定は、基質溶液と酵素溶液を 37℃で 15 分間加温後、反応停止液を 2.0 ml 加えて混合し、さらにサンプルを 0.1 ml 加えて再び混合した。その後、この反応液をガラスセルに入れ 550 nm の吸光度を測定しブランク値とした。

GA 活性は、次式により求めた。

$$\text{GA 活性 (U/g 麴)} = (\text{Es}-\text{Eb}) \times 0.171 \times \text{Df} \times \text{抽出率 (5 倍)}$$

Es サンプルの吸光度 Eb ブランクの吸光度 Df サンプルの希釈率 (2 倍)

ここでの GA 活性は、G2-β-PNP の分解活性を指す。1U はここに記した測定条件において、1 時間に 1 μmol の 4-ニトロフェノール (PNP) を遊離する力価と定義した。

4-2-5 酵母の培養

2-2-3 参照。

4-2-6 酵母の洗浄と酵母懸濁液の調製

2-2-4 参照。

4-2-7 有色米アルコール飲料の試醸

2~3 mm に破碎した穀物 30~34 g と脱イオン水 50 ml を 300 ml 容三角フラスコに入れオートクレーブ (121℃、15 分) を行い、冷却後、脱イオン水 40 ml と製麴した黄麴を 3 g~30 g、酵母懸濁液 10 ml を添加して、シリコン栓付発酵管

を取り付けて 25°C の暗所で発酵を行った。酵母懸濁液中の最終生菌数は 3.0×10^7 cells/ml に調整し、発酵完了の目安は前日との比較で 0.2 g 以下とした。

使用する穀物量は、白米アルコール発酵での CO₂ 発生量である 12 g に揃えるために、事前に発酵試験を行い、決定した。使用量は 2-2-3 に準じた。発酵終了後は上清を定性濾紙 No.101 で自然濾過した。得られた濾液を各種有色米発酵酒として分析に供した。尚、発酵酒は保存ポリ容器に入れ、分析に使用するまで冷凍保存した。

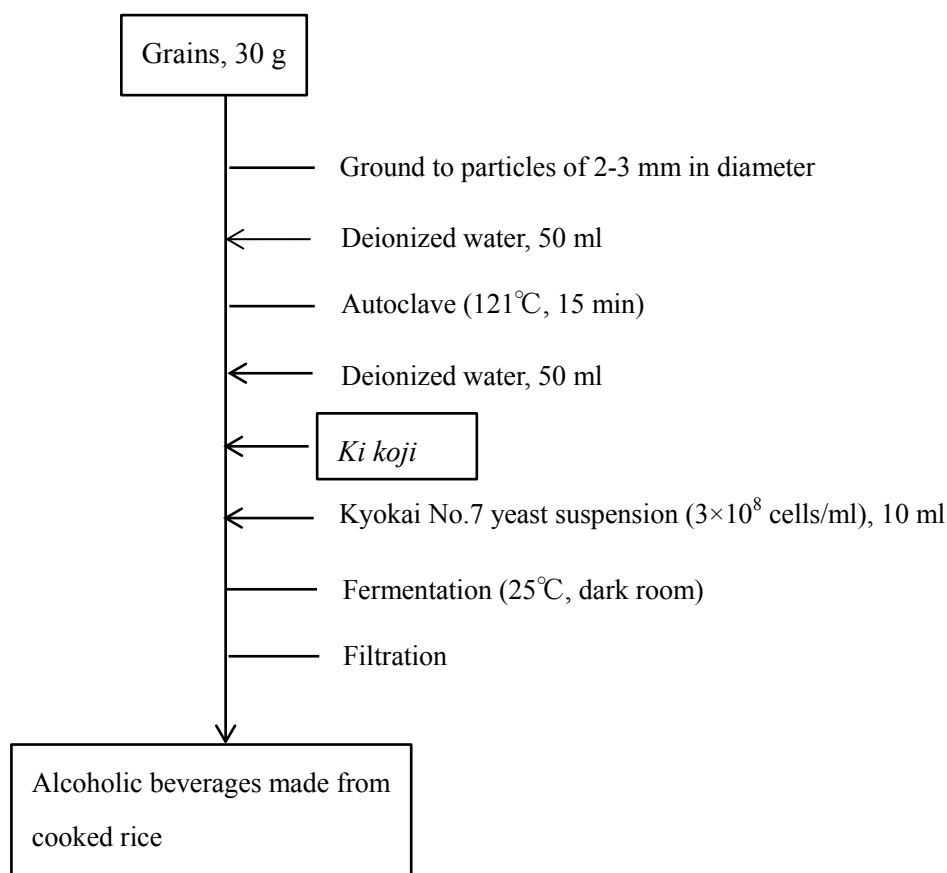


Figure 4-2. Procedure for brewing of alcoholic beverages.

Table 4-1. Composition of alcoholic beverages made from various ratio of *ki koji*.

	10% <i>koji</i>	30% <i>koji</i>	50% <i>koji</i>	100% <i>koji</i>
Polished white rice (g)	27	21	15	0
<i>Ki koji</i> (g)	3	9	15	30
Water (ml)	90	90	90	90
K7 yeast (ml)	10	10	10	10

4-2-8 発酵曲線の作製

4-2-9 pH 測定

4-2-10 酸度測定

4-2-11 エタノール濃度分析

4-2-12 直接還元糖量測定

4-2-13 総フェノール性化合物量測定

4-2-14 吸収スペクトル測定

4-2-15 DPPH ラジカル消去能測定

4-2-16 脂質過酸化阻止能測定 (β-カロテン退色法)

以上 2-2 参照。

4-2-17 穀物及び黄麴の糖量測定

細かく砕いた穀物 0.05 g を短試験管に量りとり、1 N 塩酸 3 ml と混合したのち、冷却管を取り付け、沸騰水浴中にて 2 時間、酸化水分解を行った。加水分解終了後、流水で冷却した後上清 0.5 ml を別の試験管に分取し、その中に泡が出なくなるまで少量の炭酸水素ナトリウムを加え中和した。中和した液を脱イオン水で試験管を洗浄しながら 10 ml にメスアップしてサンプル溶液とした。麴の場合は、製麴した黄麴 0.5 g を量りとり、穀物の場合と同様の操作でサンプル溶液を調整した。サンプル溶液の糖量は、ソモジ・ネルソン法による直接還元糖量測定にて決定した。

第 3 節 結果と考察

4-3-1 黄麴の量を変えて試醸したアルコール飲料の組成と抗酸化能

白米で製麴した黄麴の量を 4 段階に変えて、アルコール飲料を試醸した。発酵は、ほぼ 6 日で完了し、前日との重量差が 0.2 g 以下になった。また、この時の二酸化炭素発生量は、麴量の増加に伴って減少した。同時に、麴量が増えるに従い、アルコール発酵も少なくなった (Table 4-3)。この原因としては、酵素活性が低く発酵に時間を要した、麴に含まれる糖量が少ない、の 2 点が考えられた。そこで、用いた麴のグルコアミラーゼ活性を測定した (Figure 4-5)。その結果は、岩間の報告⁴¹⁾と同程度であったことから、酵素活性に起因するのではないと考えた。次に、アルコール飲料中の残糖量が、麴量が増えるほど高くなったことから (Table 4-3)、発酵期間をそれまでの一週間以内から 2 週間にして測定したところ、Figure 4-6 に示したように、予定した発酵量 12 g にはならないものの、67.5 %にあたる 8.1 g にまで増加した。そこで、麴中の糖量が関係していると考え、4-2-17 の方法に従って穀物中と麴中の糖量を測定した (Table 4-5)。その結果、白米黄麴中の糖分は白米中の約 70 %であることが分かった。以上の結果から、麴量が増えるに従って二酸化炭素発生量が減少したのは同量の穀物に比べ麴中の糖量が減少していることに起因していると推察した。

試醸したアルコール飲料の写真を Figure 4-5 に示した。4 種類のアルコール飲料の色調も香りもほとんど差異はなく、味わいとしては、麴量が少ない方がすっきりとした感じを受けた。麴量が多いほど麴の香りが強く酸味が強く感じられた。エタノール濃度は、二酸化炭素量と相関し、麴量の増加に伴って減少したが、総フェノール量は増加した (Table 4-3, Figure 4-7)。抗酸化能では、DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能ともに総フェノール量の変化と同じ傾向を示した。

4-3-2 27 %麴で試醸した有色穀物のアルコール飲料の組成と抗酸化

全ての穀物で発酵は 5 日以内に完了した。発酵量は穀物によって多少の差異はあるものの、大きな差異は見られなかった。試醸したアルコール飲料は色調、香り、味ともに穀物による違いが見られた。特に色調では、黒米とワイルドライスが他のアルコール飲料に比べ濃くなった (Figure 4-11, 12)。黒米、ワイルドライスは特有の香りがあった。赤米はわずかに赤味を帯びており、他の酒にな

いうまみがあった。緑米のアルコール飲料の色調は白米に近いけれども味は青臭さがあった。

アルコール飲料の組成では、総フェノール量以外は大きな相違が見られなかったが、白米に比べ有色穀物の総フェノール量の値が高くなった (Table 4-4、Figure 4-13)。抗酸化能では DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能ともに、白米に比べて高くなった。脂質過酸化阻止能は、スミチームを糖化剤として用いた第 2 章の実験結果とは異なり、DPPH ラジカル消去能の傾向とほとんど同じであった (Figure 2-8, 9, 4-14)。DPPH ラジカル消去能の値はほとんど差異が認められなかったが、脂質過酸化阻止能ではスミチームを糖化剤としたときの黒米、ワイルドライスの値の、それぞれ 1.1 倍~1.4 倍になった。すなわち、麴を用いることで、脂質過酸化阻止能の値が若干高くなった。

4-3-3 白米黄麴による生米の発酵試験

黒米と白米の生米を用いて黄麴 27 %仕込みで発酵試験を行った (Figure 4-15)。その結果、アルコール発酵することがわかった。しかし、発酵量は蒸米に比べて半分以下になり、糖化剤としてスミチームを用いた時に比べて発酵に時間がかかった。このことから、白米黄麴は生米の糖化剤としては不十分であると判断した。

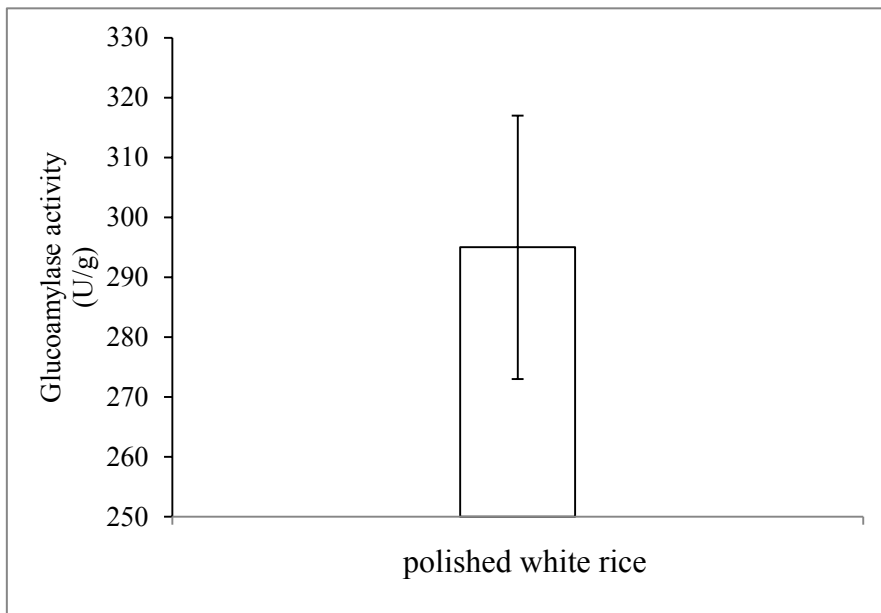


Figure 4-3. Glucoamylase activity of *ki koji* made from polished white rice. Values are the mean of triplicates.

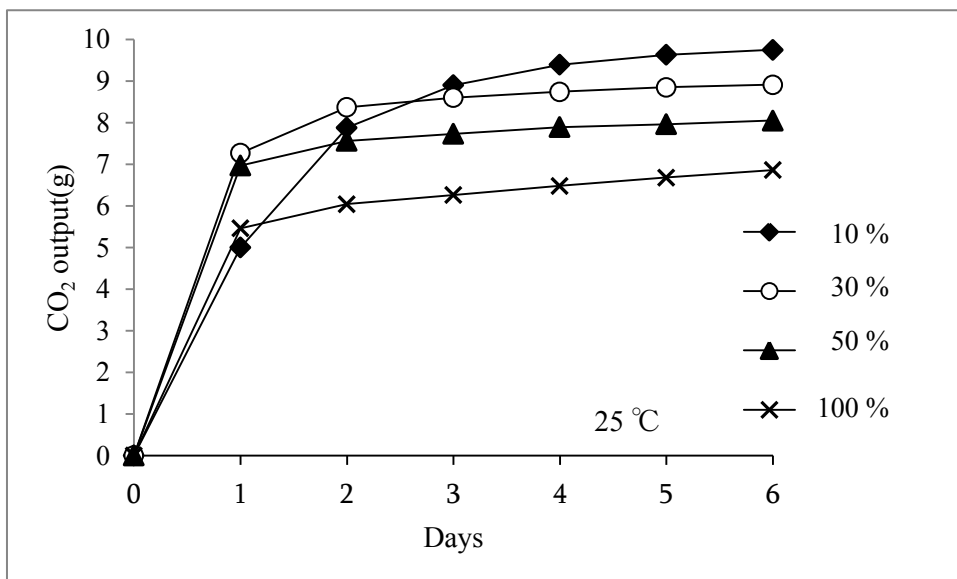


Figure 4-4. Time courses of fermentation of mashes made from polished white rice using various ratio of *ki koji*. Values are the mean of triplicates.



10 % koji 30 % koji 50 % koji 100 % koji

Figure 4-5. Picture of alcoholic beverages made from polished white rice fermented using various *ki koji* ratios.

Table 4-3. Comparison of characteristics of various alcoholic beverages made using various *ki koji* ratio.

	10 % koji	30 % koji	50 % koji	100 % koji
Final pH	4.8	4.7	4.7	4.5
CO ₂ output (g)	9.7	8.9	8.1	6.9
Volume of filtrate (ml)	78.0	76.0	74.0	70.0
Acidity (ml)	2.0	2.1	2.1	2.2
Ethanol concentration (% w/v)	9.2	8.7	7.1	6.2
Reducing sugar content (μg/ml)	1300	1420	1450	1540
Total phenolic compound (μg/ml)	240	250	250	330

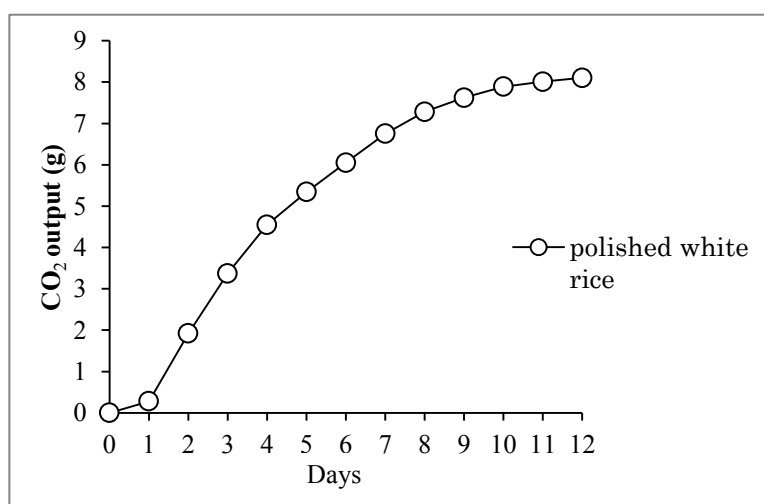


Figure 4-6. Time course of fermentation of the mash containing *ki koji* prepared with only polished white rice.

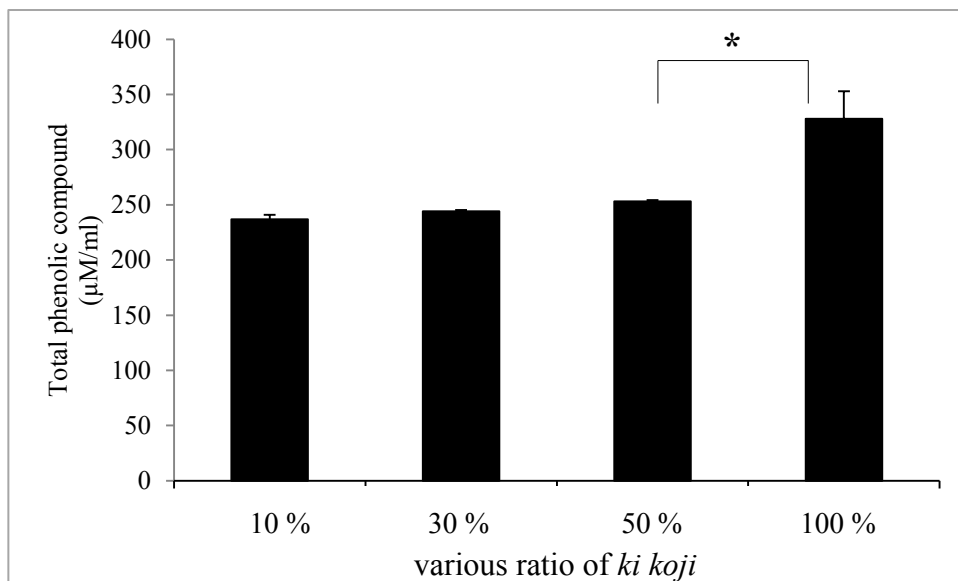


Figure 4-7. Total phenolic compound of alcoholic beverages made from polished white rice fermented using various ratio of *ki koji*. Values are the mean of triplicates. * : $p < 0.05$

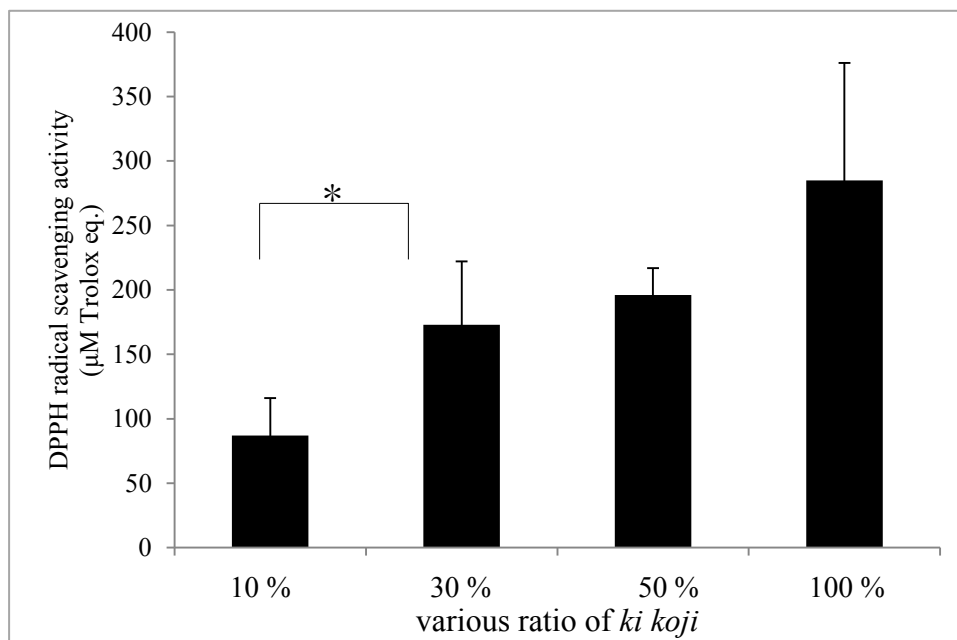


Figure 4-8. DPPH radical scavenging activity of alcoholic beverages made from polished white rice fermented using various ratio of *ki koji*. Values are the mean of triplicates. * : $p < 0.05$

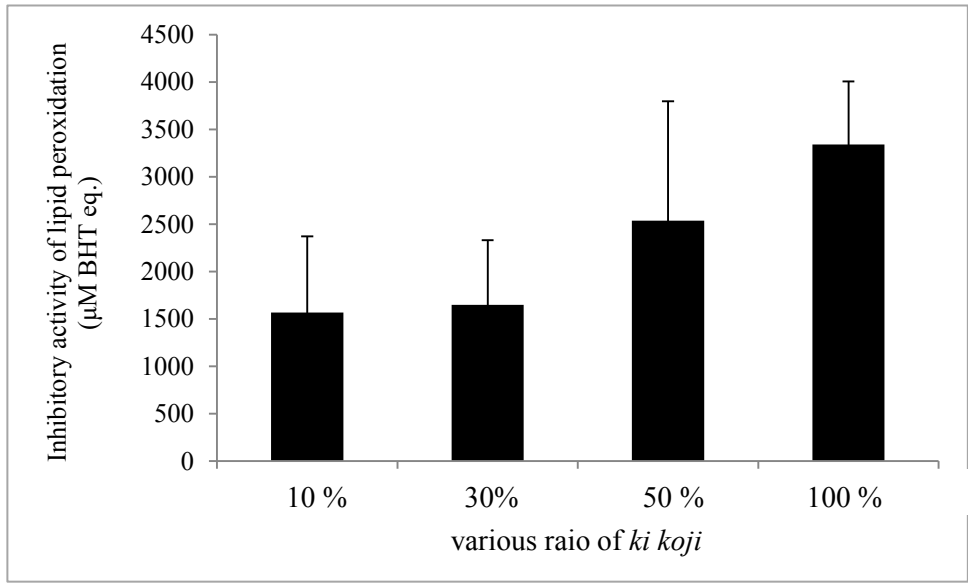


Figure 4-9. Inhibitory activity of lipid peroxidation of alcoholic beverages made from polished white rice fermented using various ratio of *ki koji*. Values are the mean of triplicates.

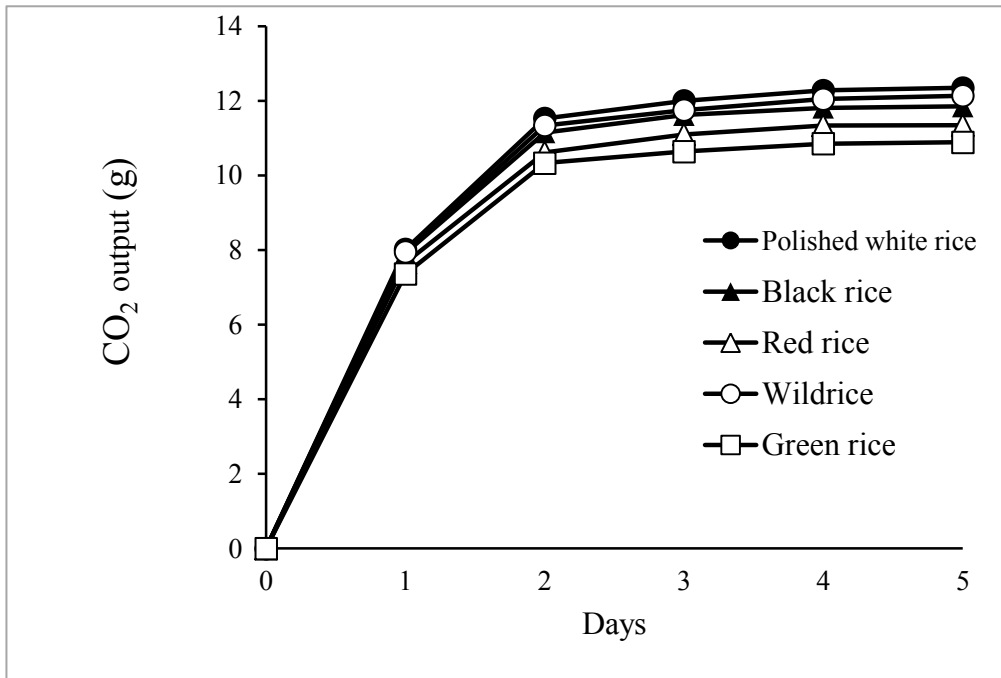


Figure 4-10. Time courses of fermentation of mashes made from various grains using 27 % ratio of *ki koji*.



Polished white rice Black rice Red rice Green rice Wild rice

Figure 4-11. Picture of alcoholic beverages made from various grains fermented using 27 % *ki koji* ratio.

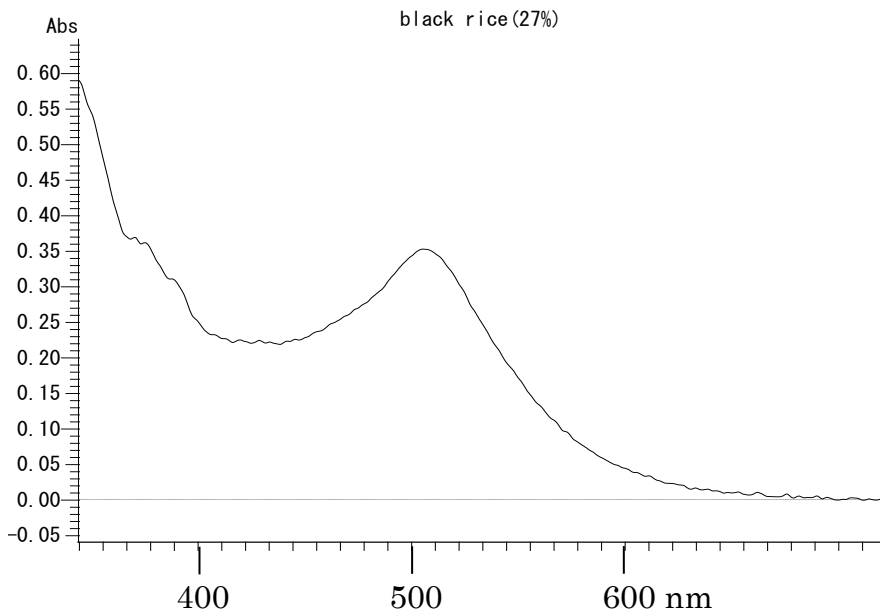


Figure 4-12. Absorption spectrum of alcoholic beverages made from black rice.

Table 4-4. Comparison of characteristics of various alcoholic beverages made using 27% *ki koji* ratio.

	polished white rice	black rice	red rice	green rice	wild rice
Final pH	4.4	4.9	4.8	4.8	5.0
CO ₂ output (g)	12.3	11.8	11.3	10.9	12.0
Volume of filtration (ml)	92	81	79	81	79
Acidity (ml)	2.3	3.0	3.3	2.5	2.5
Ethanol concentration (% w/v)	11.8	10.4	11.1	9.2	10.4
Reducing sugar content (µg/ml)	550	970	990	940	980
Total phenolic compound (µg/ml)	390	810	670	700	890

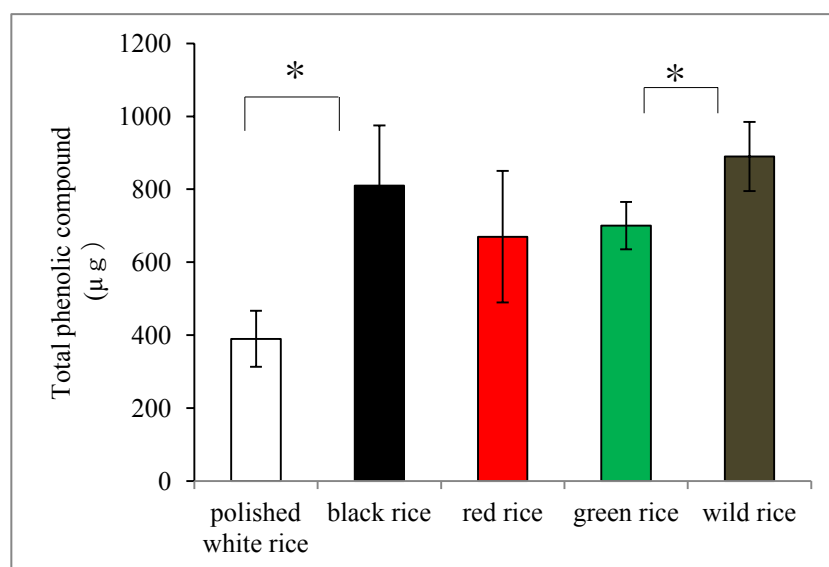


Figure 4-13. Total phenolic compound of alcoholic beverages made from various grains fermented using 27 % ratio of *ki koji*. Values are the mean of triplicates.

* : $p < 0.05$

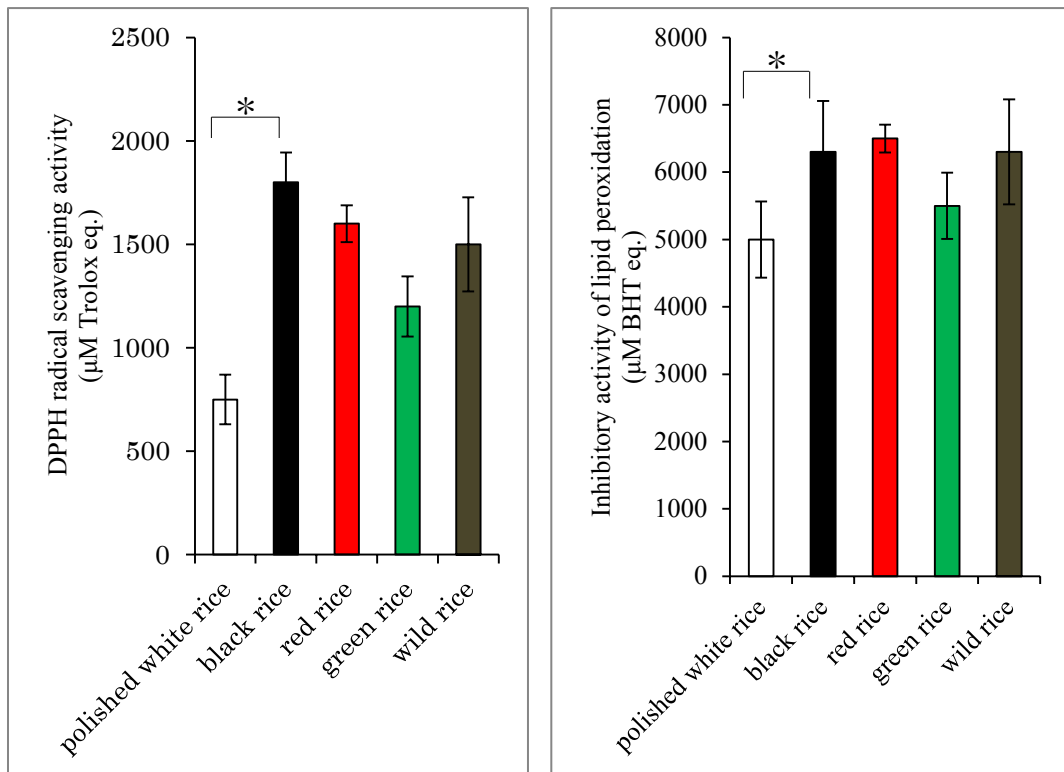


Figure 4-14. Two types of antioxidant activity of alcoholic beverages made from various grains fermented using 27 % ratio of *ki koji*. Values are the mean of triplicates. *: $p < 0.05$

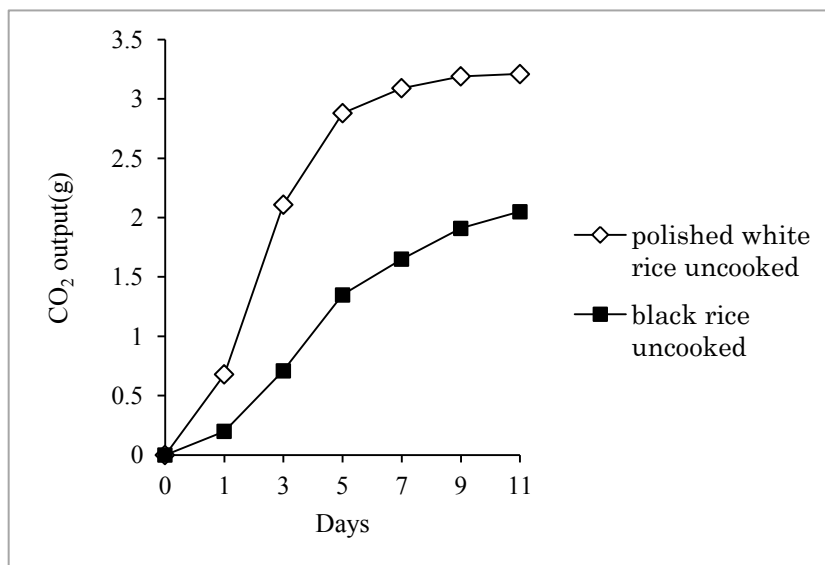


Figure 4-15. Time courses of fermentation of mashes made from uncooked polished white rice and black rice using 27 % ratio of *ki koji*.

Table 4-5. Sugar contents in various grains and *ki koji*.

	rice (mg/g)	<i>ki koji</i> (mg/g)
Polished white rice	870	610
Black rice	840	520
Red rice	810	560
Green rice	780	580
Wild rice	840	280

第5章 黄麴を用いて試醸したワイルドライス及び

有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性

その2 (有色穀物黄麴による試醸)

第1節 緒言

第4章では黄麴を用いて製麴した白米の麴で試醸した有色穀物のアルコール飲料の組成と、抗酸化能を測定し、第2章で求めたスミチームを糖化剤としたアルコール飲料と比較した。その結果、黄麴を用いたアルコール飲料のほうが若干ではあるが高い抗酸化能と、より穀物特有の色調と香りを持ったアルコール飲料になることが分かった。この章では、製麴した有色穀物の黄麴を用いて全麴仕込みで試醸したアルコール飲料の組成と抗酸化能の変化を検討した。

第2節 実験材料と方法

5-2-1 発酵原料

1-2-1 参照。

5-2-2 黄麴の製麴

1-2-2、4-2-2 参照。製麴法は Figure 1-1 参照。

5-2-3 酵素抽出

使用試薬、試薬調製及び実験操作は 4-2-3 参照。

5-2-4 グルコアミラーゼ活性の測定

使用試薬及び実験操作は 4-2-4 参照。

5-2-5 酵母の培養

2-2-3 参照。

5-2-6 酵母の洗浄と酵母懸濁液の作成

2-2-4 参照。

5-2-7 ワイルドライス及び有色米アルコール飲料の試醸

製麴した有色穀物の黄麴を 30 g、酵母懸濁液 10 ml を添加して、シリコ栓付発酵管を取り付けて 25°C の暗所で発酵を行った。酵母懸濁液中の最終生菌数は 3.0×10^7 cells/ml に調製し、発酵完了の目安は前日との比較で 0.2 g 以下とした。

発酵終了後は上清を定性濾紙 No.101 で自然濾過した。得られた濾液を各種有色米発酵酒として分析に供した。尚、発酵酒は保存ポリ容器に入れ、分析に使用するまで冷凍保存した。

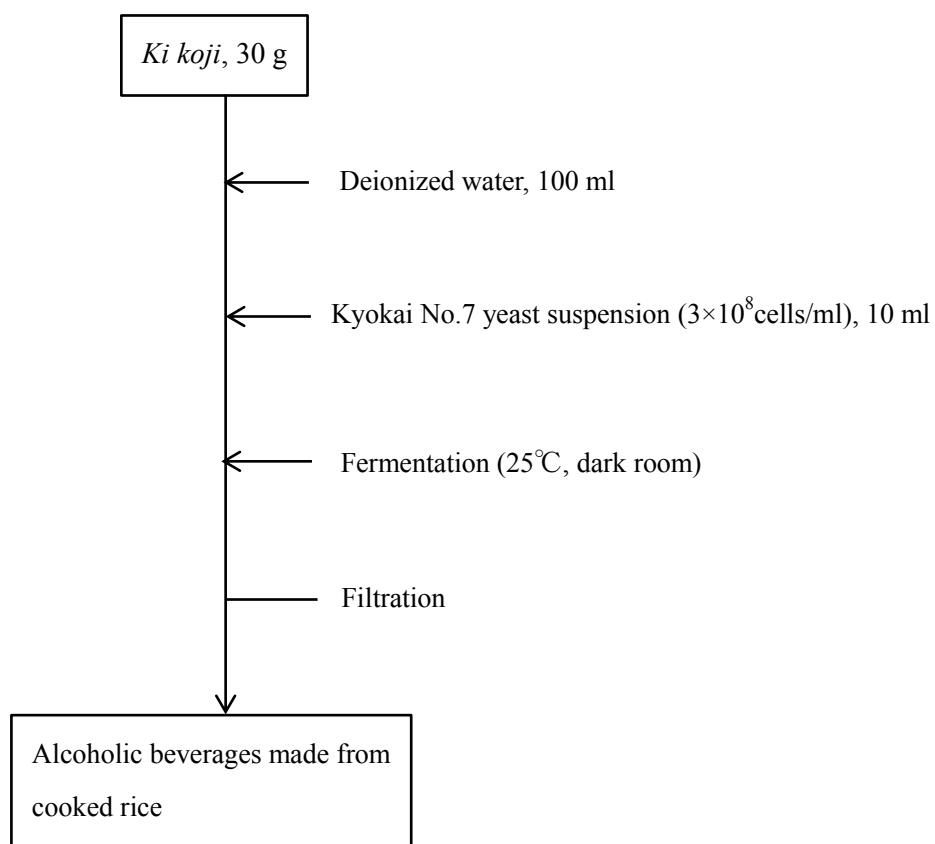


Figure 5-1. Procedure for brewing of alcoholic beverages.

Table 5-1. Composition of alcoholic beverages made from various ratio of *ki koji*.

	100 % <i>koji</i>
grains (g)	0
<i>ki koji</i> (g)	30
water (ml)	90
K7 yeast (ml)	10

5-2-8 発酵曲線の作製

5-2-9 pH 測定

5-2-10 酸度測定

5-2-11 エタノール濃度分析

5-2-12 直接還元糖量測定

5-2-13 総フェノール性化合物量測定

5-2-14 吸収スペクトル測定

5-2-15 DPPH ラジカル消去能測定

5-2-16 脂質過酸化阻止能測定 (β-カロテン退色法)

以上 2-2 参照。

第3節 結果と考察

5-3-1 100%有色穀物黄麴で試醸したアルコール飲料の組成と抗酸化能

有色穀物で製麴した黄麴を用いてアルコール飲料を試醸した。すべてのアルコール飲料はこれまでのアルコール飲料の発酵日数に比べて長く、ほぼ8日前日との重量差が0.2g以下になった (Figure 5-2)。また、この時の二酸化炭素発生量は、白米が一番高く、他の麴の1.1倍から1.2倍であった。これは、糖化剤としてスミチームを用いたときの傾向と一致しており、穀物に含まれるデンプン量に関係していると考えた。用いた麴のグルコアミラーゼ活性を白米と比較して示した (Figure 5-4)。その結果、赤米黄麴の酵素活性が多少低いものの、岩間の報告⁴⁾と同程度であった。試醸したアルコール飲料の写真を Figure 5-3 に示した。5種類のアルコール飲料の色調も香りも穀物によって異なるが、糖化剤としてスミチームを用いたものと明らかに異なっていた。また、麴特有の香りがあり、酸味が強く感じられた。色調は白米、赤米および緑米の3種類が類似していた。このことは吸収スペクトルからも推察された (Figure 5-8, 9, 10, 11, 12)。エタノール濃度は、黄麴27%仕込みで試醸したアルコール飲料に比べて3~4%低く、6% (w/v)から7% (w/v)であった。総フェノール量の傾向はこれまで試醸したアルコール飲料の傾向と類似しており、ワイルドライス、黒米の値が多少高く他のアルコール飲料の値はほぼ同じであった (Table 5-2, Figure 5-5)。抗酸化能は、DPPHラジカル消去能では総フェノール量の傾向と類似して、黒米とワイルドライスの値が高くなった (Figure 5-6)。一方、脂質過酸化阻止能の値は全ての穀物間で有意差が確認されなかった (Figure 5-7)。また、これらの値の大きさは、27%の白米黄麴を用いて試醸した時に比べてすべて低くなった。すなわち、抗酸化能を向上させることを目的とした場合は、全麴で試醸するよりも、麴量を減らして試醸する方が良いことが推察された。

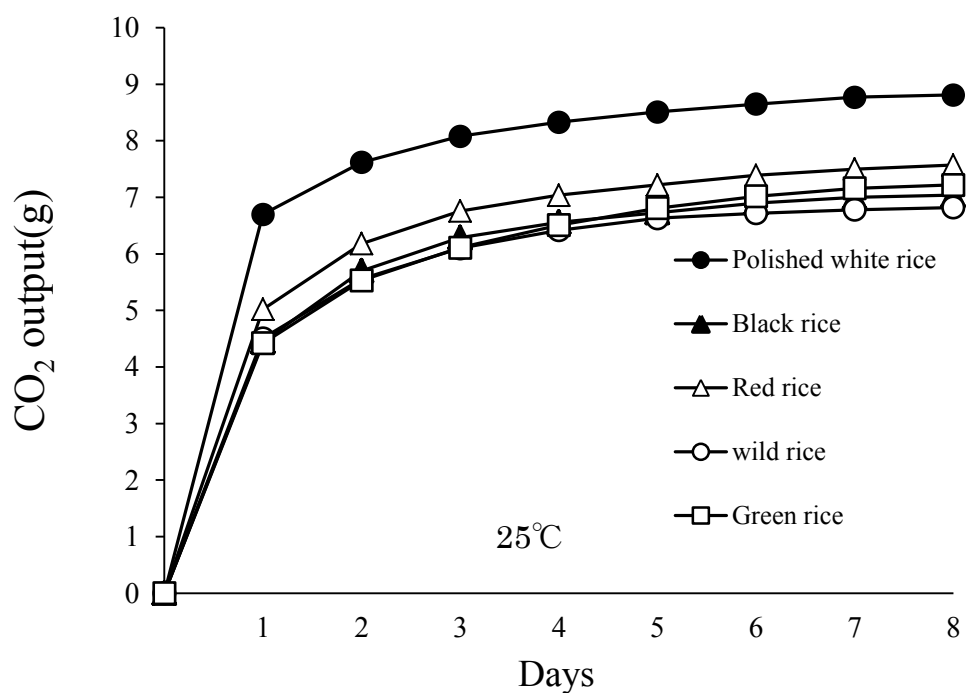
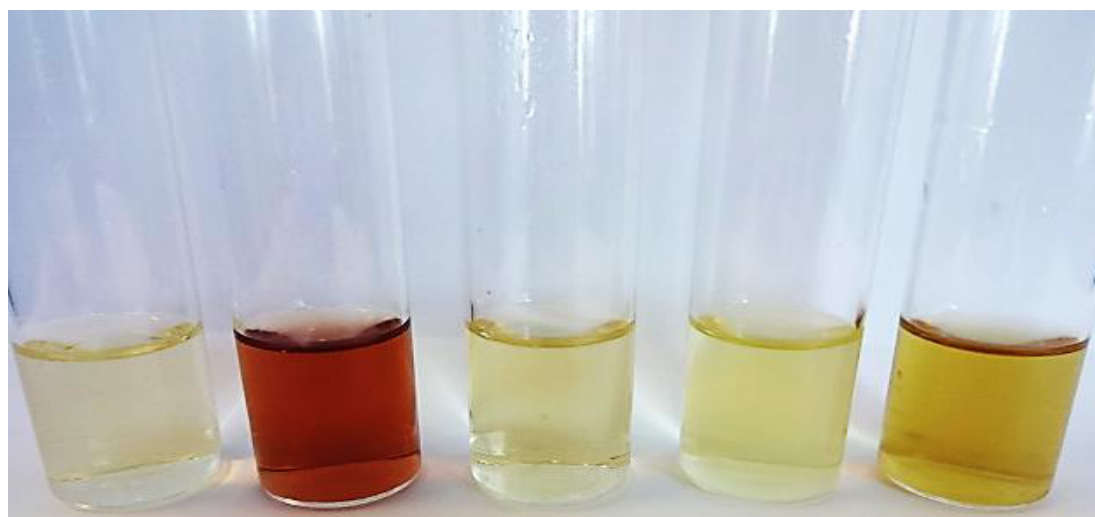


Figure 5-2. Time courses of fermentation of the mashes containing *ki koji* prepared with only various grains. Values are the mean of triplicates.



Polished white rice Black rice Red rice Green rice Wild rice

Figure 5-3. Picture of alcoholic beverages made from *ki koji* prepared with only various grains.

Table 5-2. Comparison of characteristics of alcoholic beverages made from *ki koji* prepared with only various grains.

	polished white rice	black rice	red rice	green rice	wild rice
Final pH	4.7	4.5	4.6	4.5	4.9
CO ₂ output (g)	8.8	7.1	7.2	7.6	6.9
Volume of filtration (ml)	78	76	70	73	45
Acidity (ml)	2.3	3.0	3.3	2.5	10.4
Ethanol concentration (% w/v)	6.2	6.3	6.4	6.1	7.1
Reducing sugar content (µg/ml)	550	970	990	940	980
Total phenolic compound (µg/ml)	390	450	430	400	510

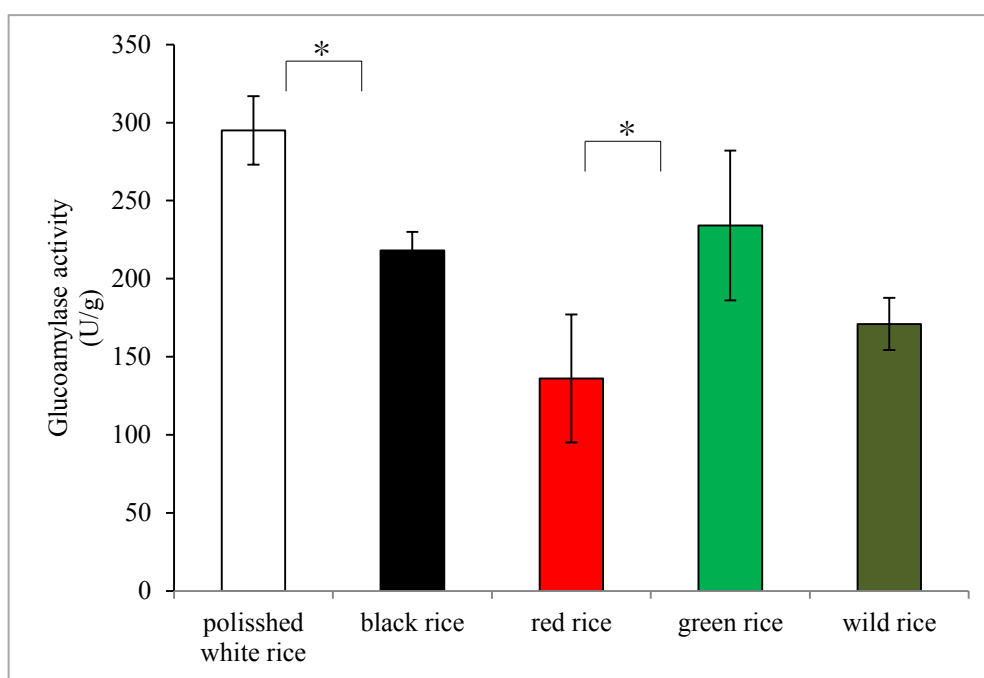


Figure 5-4. Glucoamylase activity of *ki koji* prepared with various grains. Values are the mean of triplicates. * : p<0.05

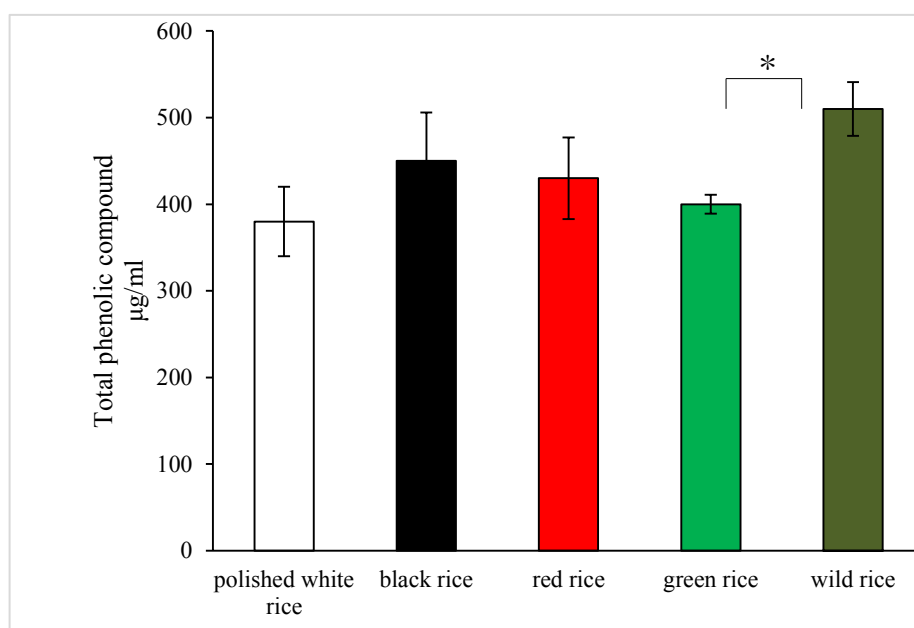


Figure 5-5. Total phenolic compound of alcoholic beverages made from *ki koji* prepared with only various grains. Values are the mean of triplicates. *: $p < 0.05$

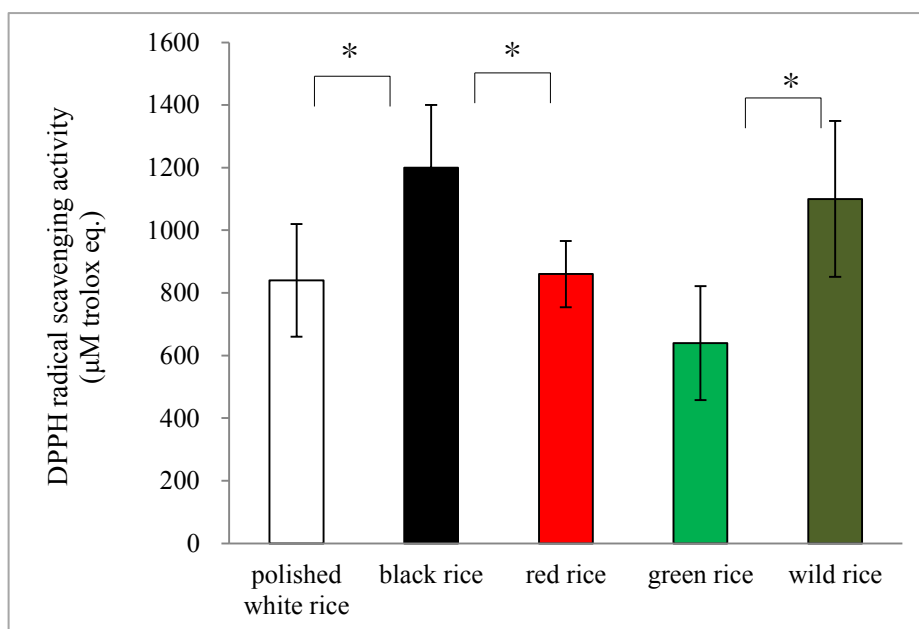


Figure 5-6. DPPH radical scavenging activity of alcoholic beverages made from *ki koji* prepared with only various grains. Values are the mean of triplicates. *: $p < 0.05$

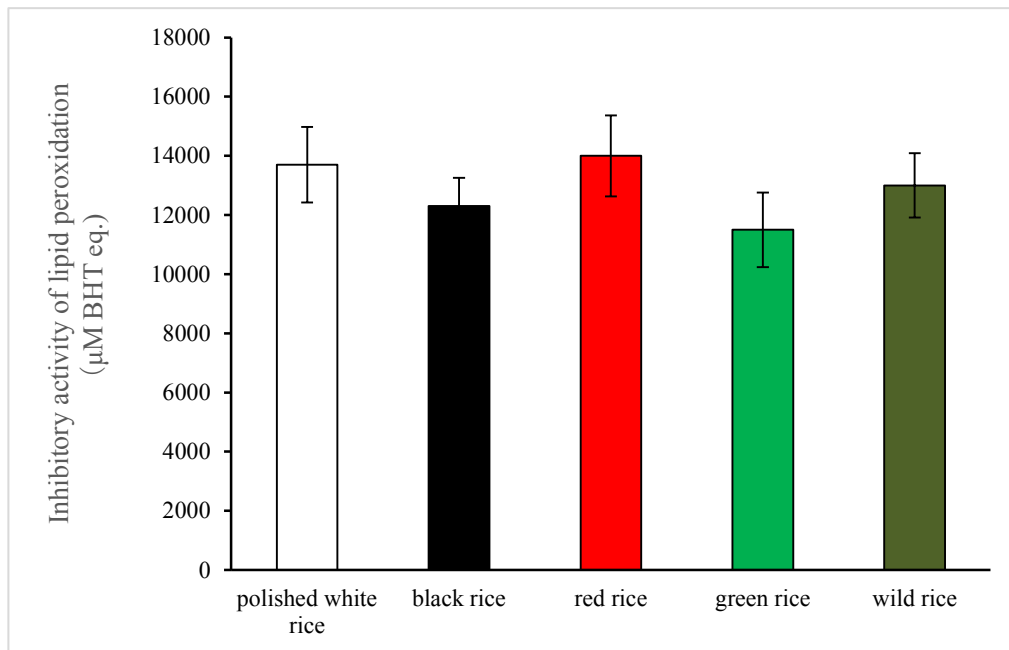


Figure 5-7. Inhibitory activity of lipid peroxidation of alcoholic beverages made from *ki koji* prepared with only various grains. Values are the mean of triplicates.

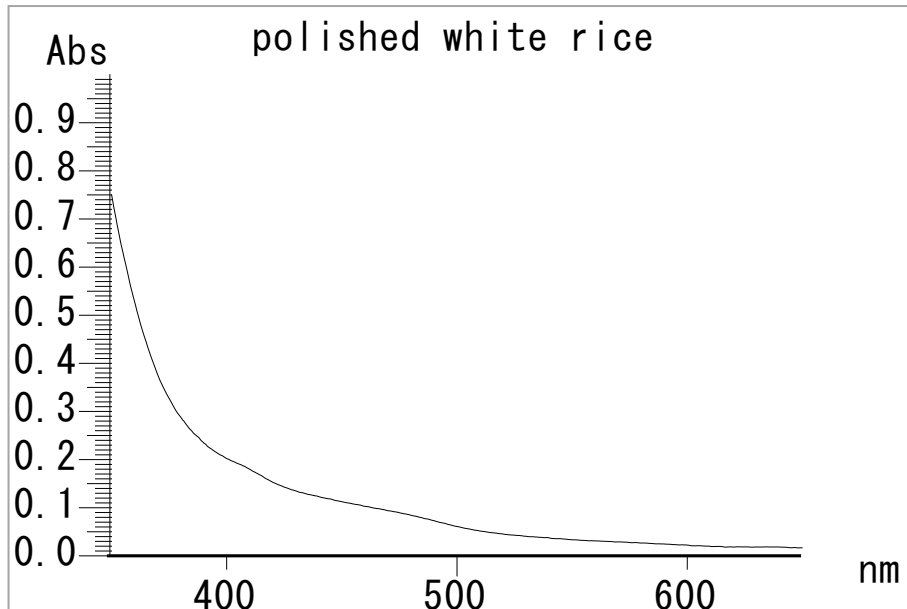


Figure 5-8. Absorption spectrum of alcoholic beverages from *ki koji* prepared with only polished white rice.

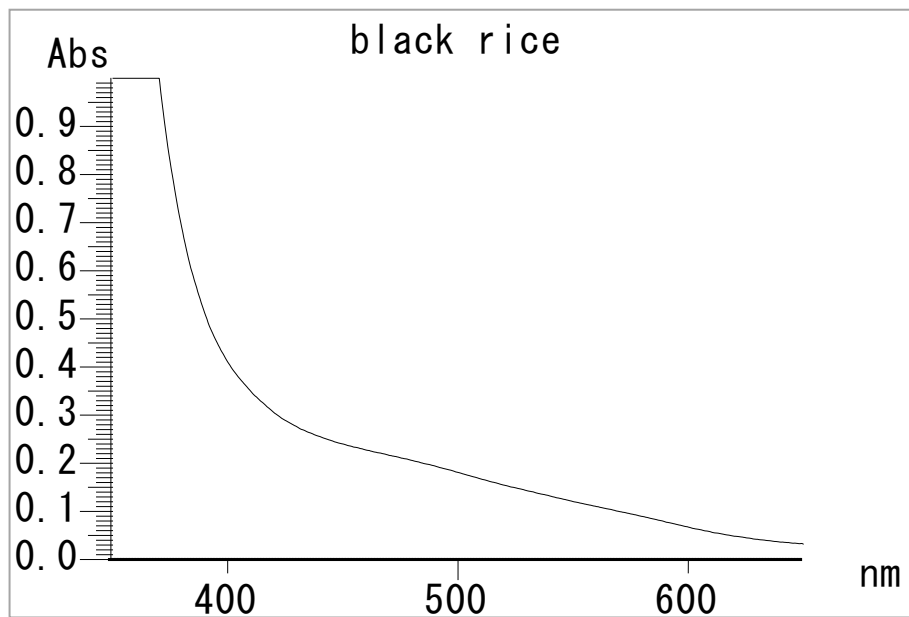


Figure 5-9. Absorption spectrum of alcoholic beverages from *ki koji* prepared with only black rice.

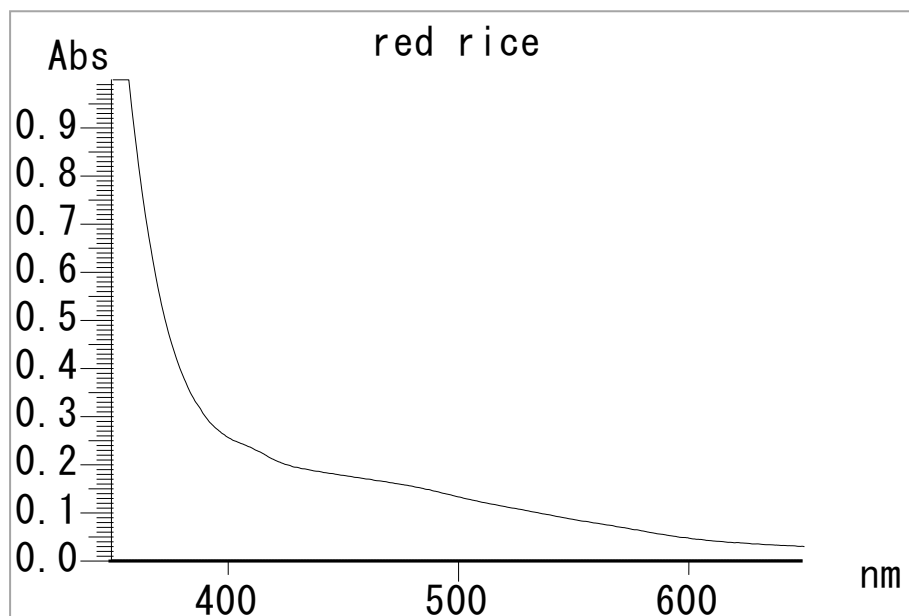


Figure 5-10. Absorption spectrum of alcoholic beverages from *ki koji* prepared with only red rice.

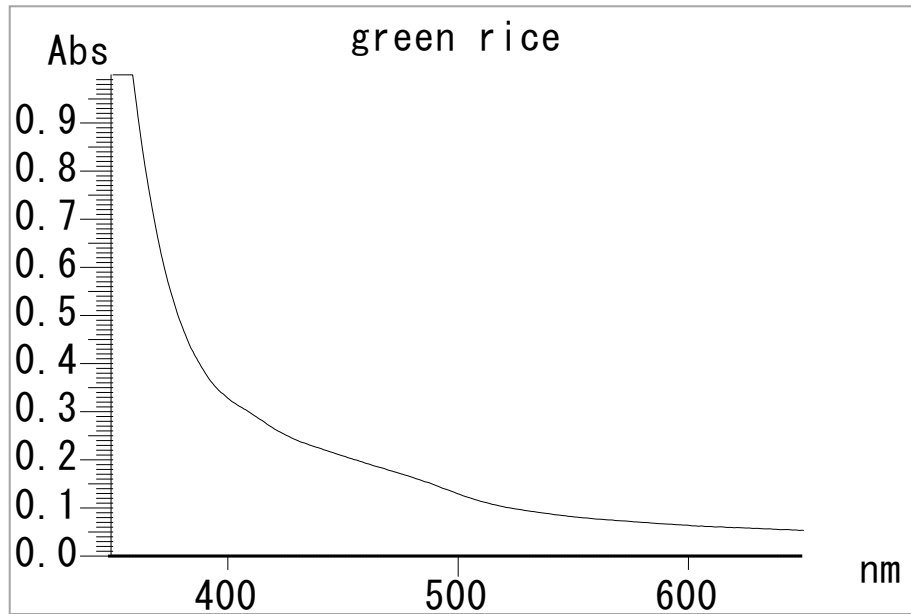


Figure 5-11. Absorption spectrum of alcoholic beverages from *ki koji* prepared with only green rice.

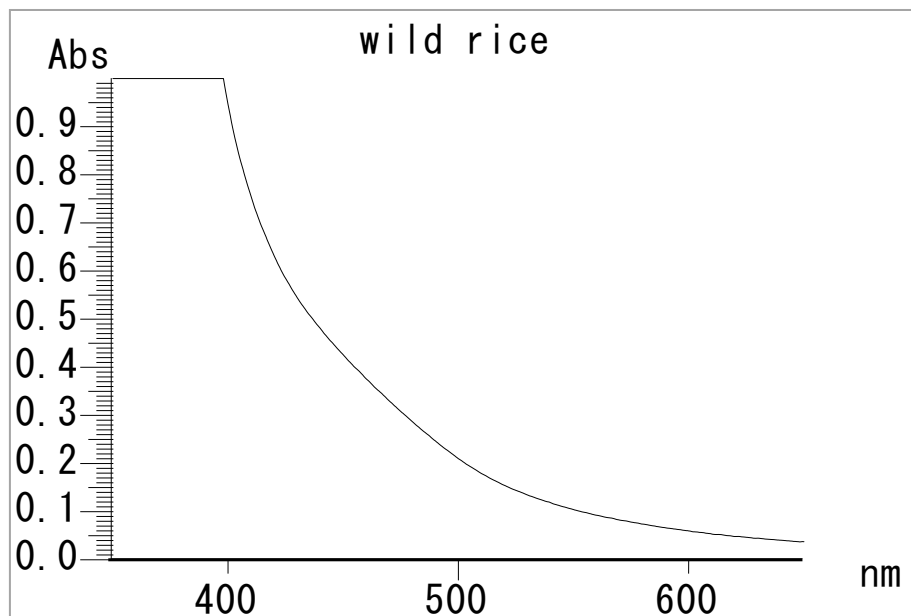


Figure 5-12. Absorption spectrum of alcoholic beverages from *ki koji* prepared with wild rice.

第6章 紅麴を用いて試醸したワイルドライス及び

有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性 その

1 (白米紅麴による試醸)

第1節 緒言

第4と5章では、黄麴で製麴した白米麴を用いて4種類の有色穀物のアルコール飲料を試醸し組成と抗酸化能の値を、糖化剤としてスミチームを用いて試醸したアルコール飲料と比較した。本章では、紅麴を用いて製麴した白米麴を用いて試醸した4種類の有色穀物のアルコール飲料の組成と抗酸化能について検討した。

第2節 実験材料と方法

6-2-1 発酵原料

2-2-1 参照。

6-2-2 紅麴の製麴

《種麴の製造》及び《糖化用紅麴の製麴》は1-2-3参照。使用した麴の製麴過程及び麴の写真は(Figure 1-3,4, 6-1)参照。



Figure 6-1. Picture of seed *koji* (*Monascus purpureus* NBRC 5965 株).

6-2-3 酵素抽出

使用試薬、試薬調製及び実験操作は 4-2-3 参照。

6-2-4 グルコアミラーゼ活性の測定

使用試薬及び実験操作は 4-2-4 参照。

6-2-5 酵母の培養

2-2-3 参照。

6-2-6 酵母の洗浄と酵母懸濁液の作成

2-2-4 参照。

6-2-7 ワイルドライス及び有色米アルコール飲料の試醸

[掛け米を白米にしたときのアルコール飲料の試醸]

2~3 mm に破碎した白米 30~34 g と脱イオン水 50 ml を 300 ml 容三角フラスコに入れオートクレーブ (121℃、15 分) を行い、冷却後、脱イオン水 40 ml と製麴した紅麴を 3 g~30 g と変えて混合し、これに酵母懸濁液 10 ml を添加して、シリコ栓付発酵管を取り付け 25℃ の暗所で発酵を行った (Table 6-1)。酵母懸濁液中の最終生菌数は 3.0×10^7 cells/ml に調製し、発酵完了の目安は前日との比較で 0.2 g 以下とした。

[掛け米を有色米にしたときのアルコール飲料の試醸]

使用する穀物量は 30 g に揃えた。Table 6-2 に 30 % 麴仕込みの際の組成表を示した。発酵終了後は上清を定性濾紙 No.101 で自然濾過した。得られた濾液は各種有色米発酵酒として分析に供した。尚、発酵酒は保存ポリ容器に入れ、分析に使用するまで冷凍保存した。

Table 6-1. Composition of alcoholic beverages made from *beni koji* of various ratio .

	10 % <i>koji</i>	30 % <i>koji</i>	50 % <i>koji</i>	100 % <i>koji</i>
Polished white rice (g)	27	21	15	0
<i>Ki koji</i> (g)	3	9	15	30
Water (ml)	90	90	90	90
K7 yeast (ml)	10	10	10	10

Table 6-2. Composition of alcoholic beverages made from various grains of *beni koji*.

	Polished white rice	Black rice	Red rice	Green rice	Wild rice
Material (g)	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0
<i>Beni koji</i> (g)	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0

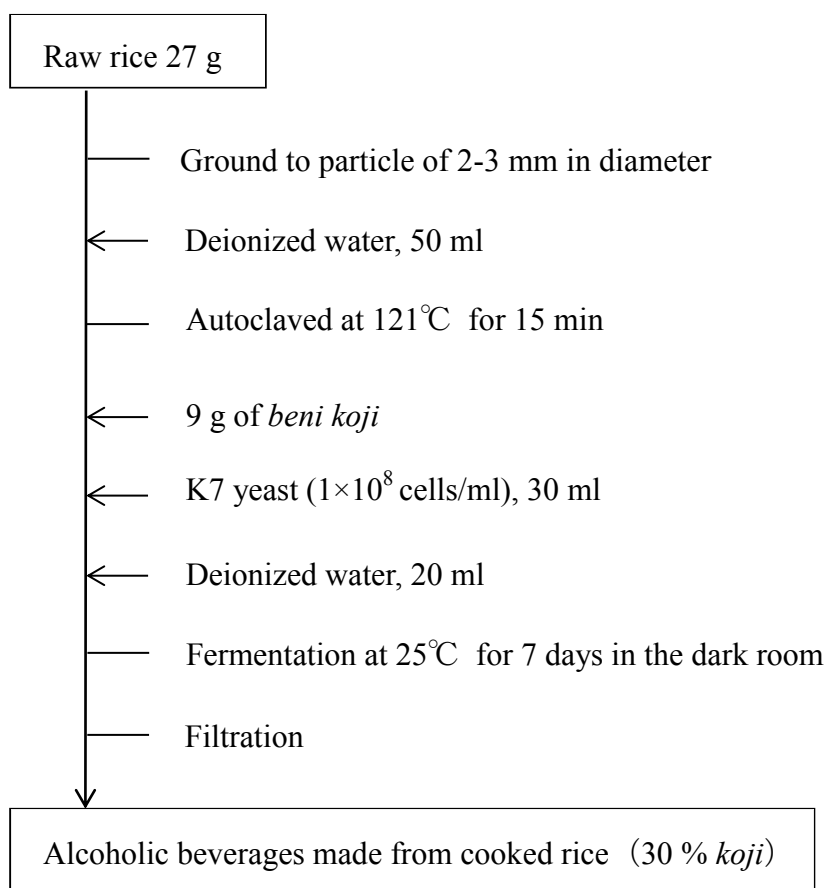


Figure 6-2. Procedure for brewing alcoholic beverages.

- 6-2-8 発酵曲線の作製
- 6-2-9 pH 測定
- 6-2-10 酸度測定
- 6-2-11 エタノール濃度分析
- 6-2-12 直接還元糖量測定
- 6-2-13 総フェノール性化合物量測定
- 6-2-14 吸収スペクトル測定
- 6-2-15 DPPH ラジカル消去能測定
- 6-2-16 脂質過酸化阻止能測定 (β-カロテン退色法)

以上、第 2 章 2-2 を参照。

- 6-2-17 穀物及び麴の糖量測定

4-2-17 を参照。

第3節 結果と考察

6-3-1 紅麴の酵素活性

白米で製麴した紅麴のグルコアミラーゼ活性を測定した。その結果、350 U/g *koji* で、黄麴の値 270 U/g *koji* より若干高い値になった (Figure 6-3)。この値は、グラフからわかるように取り込みの時期や製麴条件で多少異なることが分かった。また、酵素活性は 2 週間で安定し、高い値を維持することがわかった。そこで、酵素活性および色調が安定する 2 週間を麴の取り込み時期とした (Figure 6-4)。

6-3-2 紅麴の量を変えて試醸したアルコール飲料の組成と抗酸化能

白米で製麴した紅麴の量を変えて 10%、30%、50%、100% と 4 段階で白米のアルコール飲料を試醸した (Table 6-1)。発酵は、何れもほぼ 7 日間で完了した。ただ、発酵曲線は上記の酵素活性の値から予想された結果に反して、麴量が増えるほど二酸化炭素発生量が低下した (Figure 6-5)。この現象に関しての考察は後述する。一方、得られた酒は紅麴特有の色と芳香を持つ明るい赤色を呈し、紅麴の量が増えるほど赤身が増加した (Figure 6-6)。組成ではアルコール濃度と総フェノール量に違いが見られたが、それ以外の項目に関しては大きな差異は認められなかった。アルコール濃度は紅麴の量が増えると、減少する傾向が見られたのに対し、総フェノール量に関しては紅麴の量が増えるほど増加する傾向が見られた (Table 6-3、Figure 6-7)。

得られたアルコール飲料の抗酸化能では、DPPH ラジカル消去能は、総フェノール量と同じ傾向を示した (Figure 6-8)。すなわち麴の量が増えるほど値が大きくなった。一方、脂質過酸化阻止能には有意差は認められず、紅麴の量と相関関係は認められなかった。アルコール飲料の香りは全て紅麴特有の甘い香りがした。また、黄麴を用いた白米酒に比べ、旨味が増した。

6-3-3 有色穀物を用いて試醸したアルコール飲料の組成と抗酸化能

白米紅麴の量を 30%、掛け米量を 27 g にして、各種有色穀物のアルコール飲料を試醸した (Table 6-2)。いずれの穀物もアルコール発酵はほぼ 7 日間で完了した。発酵量は、スミチームや白米黄麴を用いて試醸した時の値とは多少異なり、黒米、緑米の発酵量が白米よりも多くなった (Figure 6-9)。しかし、穀物の種類による極端な違いは観察されなかった。得られた酒は、総じて赤味を帯び、紅麴特有の香りがした。ただ、黒米とワイルドライスは穀物の色素の影響で赤黒

い色を呈した (Figure 6-10)。それはアルコール飲料の香りにも影響し、紅麴の香りに黒米及びワイルドライスの香りを加えたものになった。組成では、紅麴の量を変えて仕込んだ場合と同様に、総フェノール量以外は大きな違いは見られなかった (Table 6-3)。

得られたアルコール飲料の抗酸化能では、DPPH ラジカル消去能は、総フェノール量と同じ傾向を示した。すなわち麴の量が増えるほど値が大きくなった。その値は高く、スミチームで糖化した時の値と比較すると、黒米で 1.8 倍、ワイルドライスで 1.2 倍になった (Figure 2-10、6-11, 12)。脂質過酸化阻止能でも高い値が得られ、スミチームで糖化した時の値と比較すると、黒米で約 3 倍、ワイルドライスでは 1.7 倍になった (Figure 2-10、6-12)。

6-3-4 紅麴量の増加とアルコール濃度の減少の関係

第 4 章において、黄麴でも類似の減少が見られたが、これは麴中の糖量が白米に比べて少ないために起きることが分かった。これに対し、紅麴の場合は、製麴時間が不十分な場合は、発酵に時間がかかるが、アルコール濃度には大きな変化はなかった (Figure 6-13)。そこでこの現象の説明に以下の 2 つの仮説を立てて検証した。

- ① 糖化用紅麴の糖量が少ない。
- ② 紅麴が K7 酵母の発酵を阻害する。

① [糖化用紅麴の糖量が少ない]の検証

報告にもあるように紅麴は糖化とアルコール発酵をする麴である⁴²⁾。そこで、アルコール発酵試験を、K7 酵母を添加せずに、14 日間製麴した麴 30 g だけを用いてアルコール発酵試験を行った。その結果、アルコール濃度が 3% ~5% になった。その時のガスクロチャートを (Figure 6-14) に示した。このことから、紅麴は製麴した時点でアルコール発酵が進行し、糖量が十分ではなくなっている可能性がある。また、第 4 章の実験結果に倣い、6-2-17 の方法で、紅麴中の糖量を測定した。その結果、白米の 45% しか含まれていないことが分かった。以上の結果から、麴中の糖量が減少しているために起きる現象ではないかと推察された。

② [紅麴が K7 酵母の発酵を阻害する]の検証

14 日間製麴した紅麴 0 g、2 g、5 g、10 g にそれぞれ蒸煮白米 30 g を混合し、

3×10^7 cells/ml の K7 酵母 10 ml、スミチーム 0.2 g を添加して、発酵試験を行った。紅麴が発酵阻害をしない場合は、紅麴に含まれる糖の分だけ二酸化炭素発酵量が増加するはずである。その結果を (Figure 6-15) に示した。発酵量は 10 g、0 g、2 g、5 g の順に減少した。もろみ中の全糖量は、10 g が一番多く、5 g、2 g、0 g の順に減少しているため、二酸化炭素発生量も、この順になるはずである。しかし、10 g を除き、0 g から 5 g までは、この順序が逆になった。このことから、麴に含まれる成分が、糖化と阻害の両面を持っているのではないかと考えた。すなわち、麴量が多いほど発酵阻害を起こすため、0 g、2 g、5 g の順に二酸化炭素発生量が減少する。しかし、麴量 10 g の場合には、麴中の糖の量も増加するため、二酸化炭素発生量が多くなると考えた。

① と②の結果から、麴中の糖量が減少していることと、紅麴は発酵阻害をするという二つの原因が推察された。

前述したように、糖化剤としてスミチームを用いて試醸したアルコール飲料に比べ、黒米紅麴を用いて試醸したアルコール飲料の抗酸化能は高い。その原因を調べるために黒米紅麴アルコール飲料の吸収スペクトルを測定し、他の紅麴酒と比較した。その結果、黒米紅麴アルコール飲料では、他と異なり、520 nm 付近に、黒米の糠部分に含まれるというアントシアニンの吸収ピークが確認された (Figure 6-16,17,18,19,20,21)。さらに、pH を変えて測定した実験では、酸性側で赤色、アルカリ性側で青みを帯びる様子が吸収スペクトルからも伺えた (Figure 6-22)。

6-3-5 紅麴による生米の発酵

白米で製麴した紅麴を用いて無蒸煮の黒米と白米の発酵能力を調べた。発酵試験は 7 日間で終了させたが、十分に発酵する能力を持つことが分かった (Figure 6-23)。さらに、抗酸化能をそれぞれの蒸煮米と比較した値を示した (Figure 6-24)。発酵期間が短かったせいか、蒸煮米に比べて多少値は低いですが、生米は黄麴やスミチームを糖化剤に用いた場合に比べて高い値を示した。このことから、紅麴は生米を糖化させる働きを持つことが分かった。

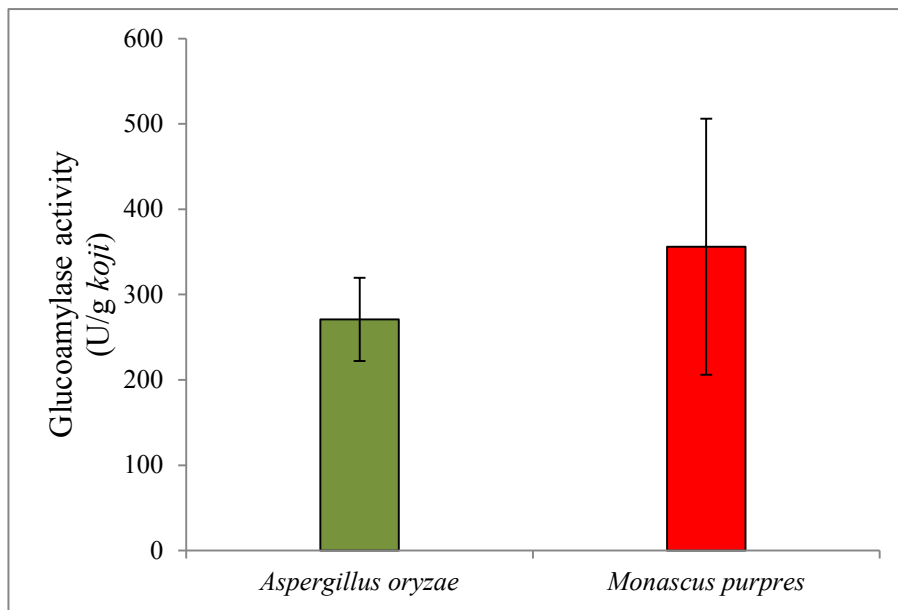


Figure 6-3. Comparison of glucoamylase activity of *koji* made with *ki koji* and *beni koji*. Values are the mean of triplicates.

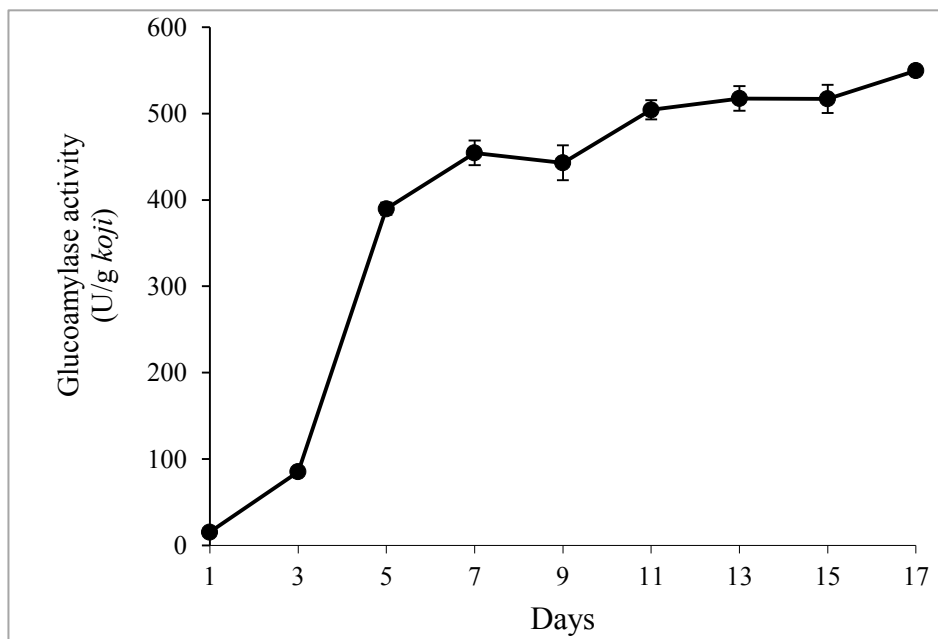


Figure 6-4. Time courses of glucoamylase activity for *beni koji*. Values are the mean of triplicates.

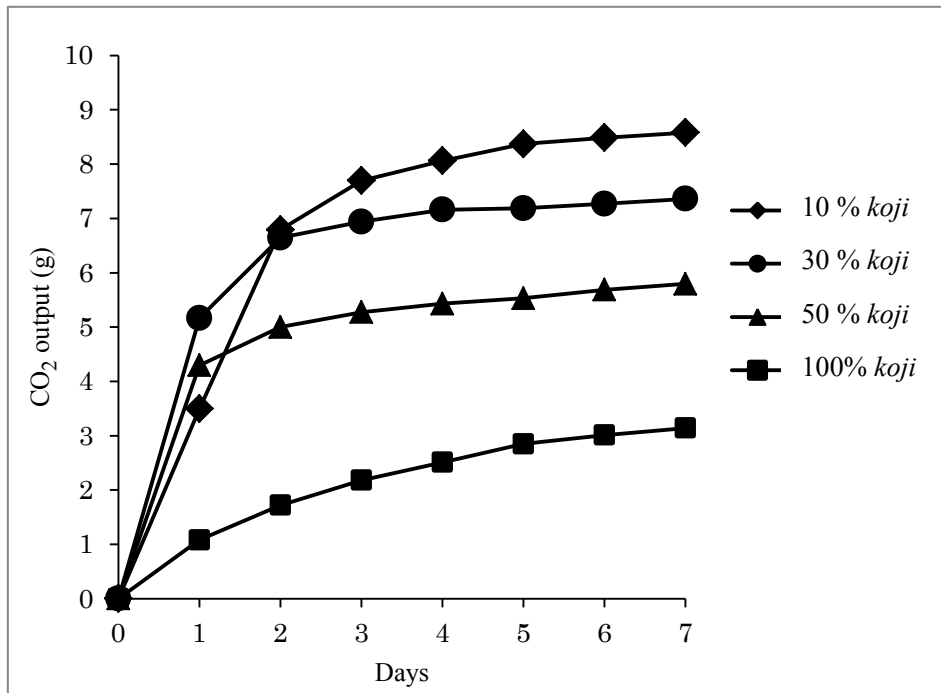


Figure 6-5. Time courses of fermentation of the mash containing various ratio of *beni koji*.

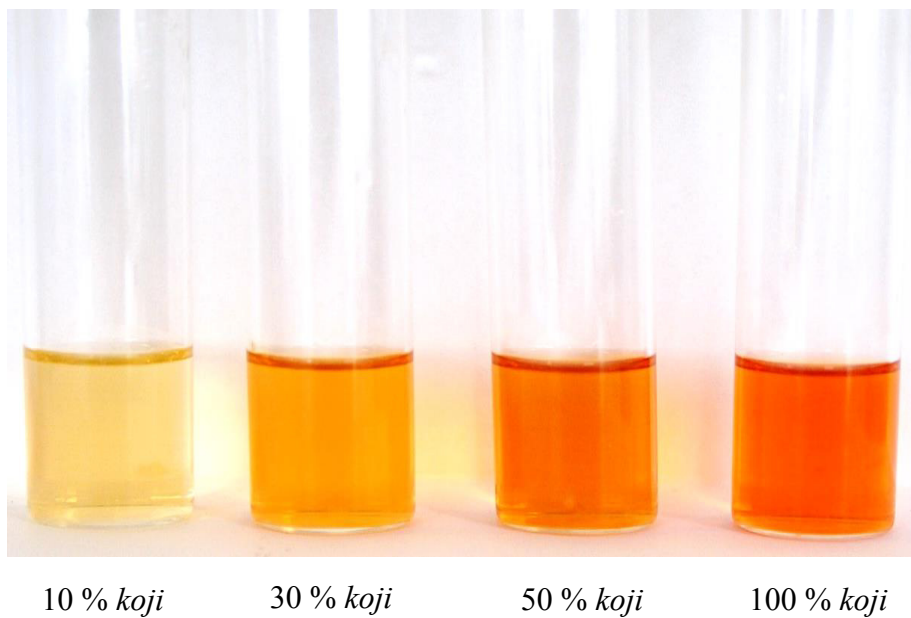


Figure 6-6. Alcoholic beverages made from various ratio of polished white rice prepared using *beni koji*.

Table 6-3. Comparison of characteristics of various alcoholic beverages made using various *beni koji* ratios.

	10 % <i>koji</i>	30 % <i>koji</i>	50 % <i>koji</i>	100 % <i>koji</i>
Polished white rice (g)	27	21	15	0
<i>Beni koji</i> (g)	3	9	15	30
Final pH	4.2	4.3	4.3	4.3
CO ₂ Output (g)	8.6	7.4	5.8	3.1
Volume of Filtrate (ml)	75	72	70	67
Acidity (ml)	2.5	2.4	2.4	4.0
Ethanol concentration (% w/v)	7.4	6.2	5.8	5.7
Reducing sugar content (μ g/ml)	260	390	500	980
Total phenolic compound (μ g/ml)	325	448	492	612

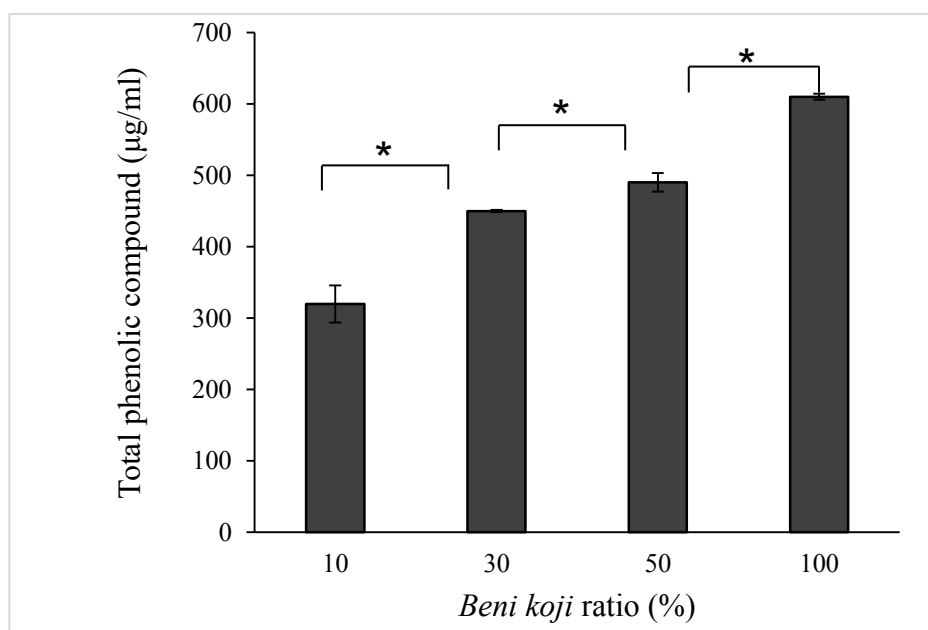


Figure 6-7. Total phenolic compounds of alcoholic beverages made from various ratio of *beni koji*. Values are the mean of triplicates. * $p < 0.05$

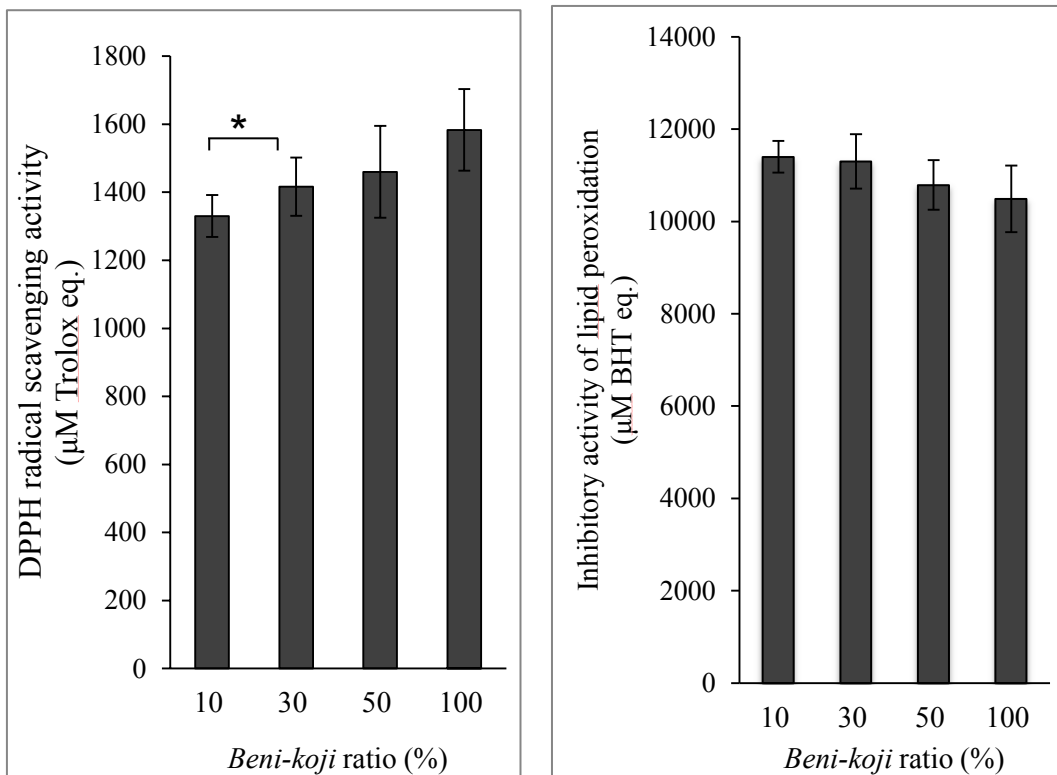


Figure 6-8. DPPH radical scavenging activity and Inhibitory activity of lipid peroxidation of alcoholic beverages made from various ratio of *beni koji*.

Values are the mean of triplicates. * p<0.05

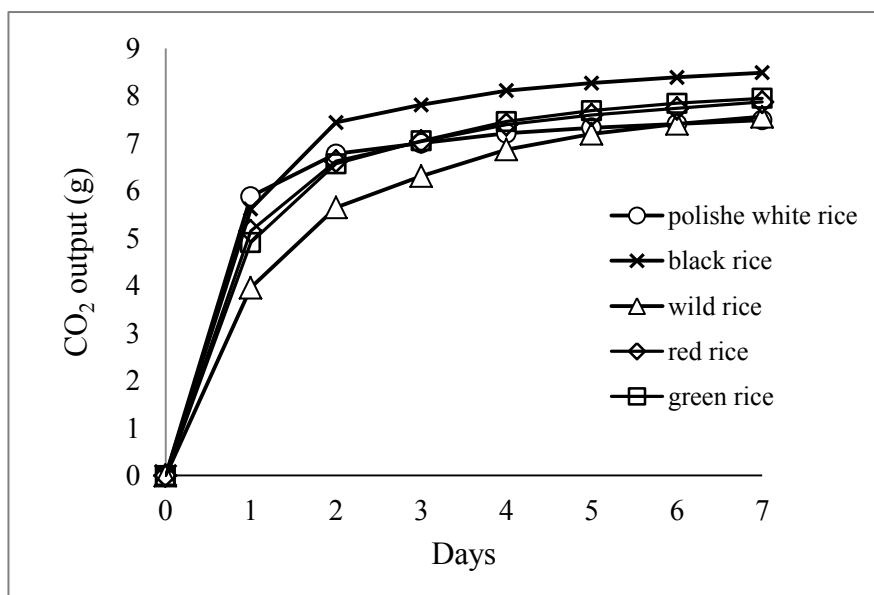


Figure 6-9. Time courses of fermentation of the mash made from various grains using *beni koji*.

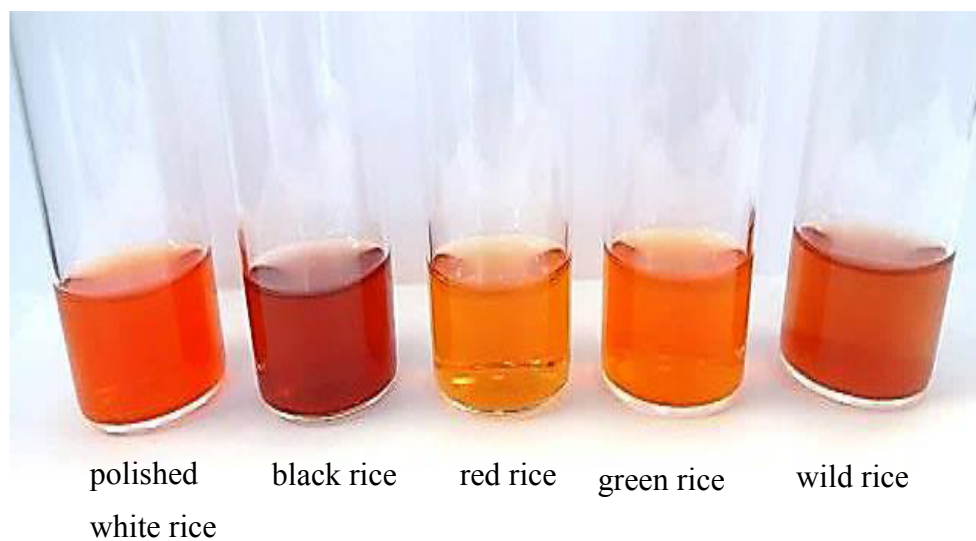


Figure 6-10. Alcoholic beverages made from various grains using *beni koji*.

Table 6-4. Comparison of characteristics of various alcoholic beverages made from various grains using *beni koji*.

	polished white rice	black rice	red rice	green rice	wild rice
Final pH	4.4	4.6	4.5	4.5	4.5
CO ₂ output (g)	7.9	8.5	7.9	8	7.9
Volume of filtration (ml)	67	64	65	62	42
Acidity (ml)	6.5	5.1	5.5	5.5	5.2
Ethanol concentration (% w/v)	8.2	8.7	6.1	6.9	7.8
Reducing sugar content (µg/ml)	315	302	402	438	364
Total phenolic compound (µg/ml)	649	952	461	584	832

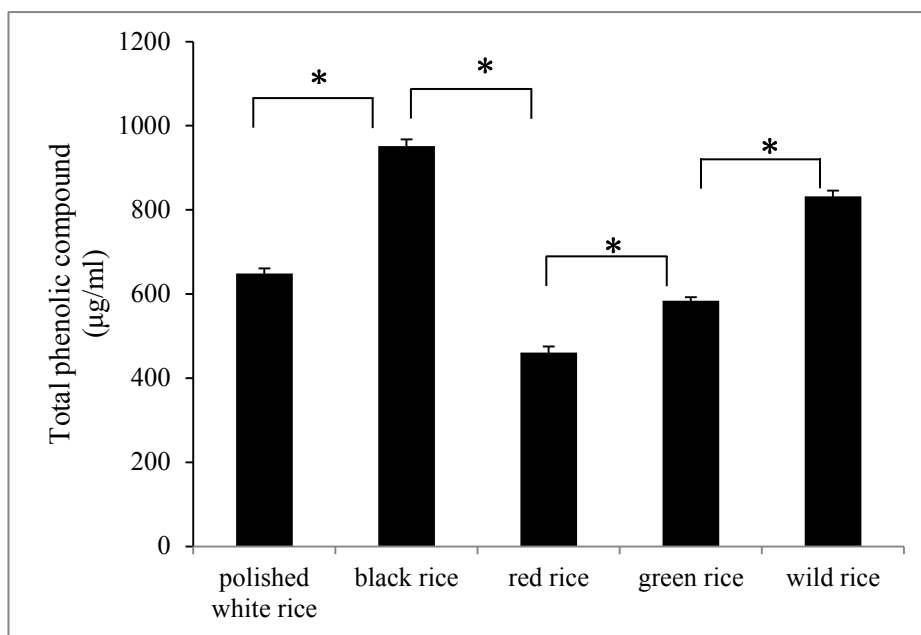


Figure6-11. Total phenolic compounds of alcoholic beverages made from various ratio of *beni koji*. Values are the mean of triplicates. * $p < 0.05$

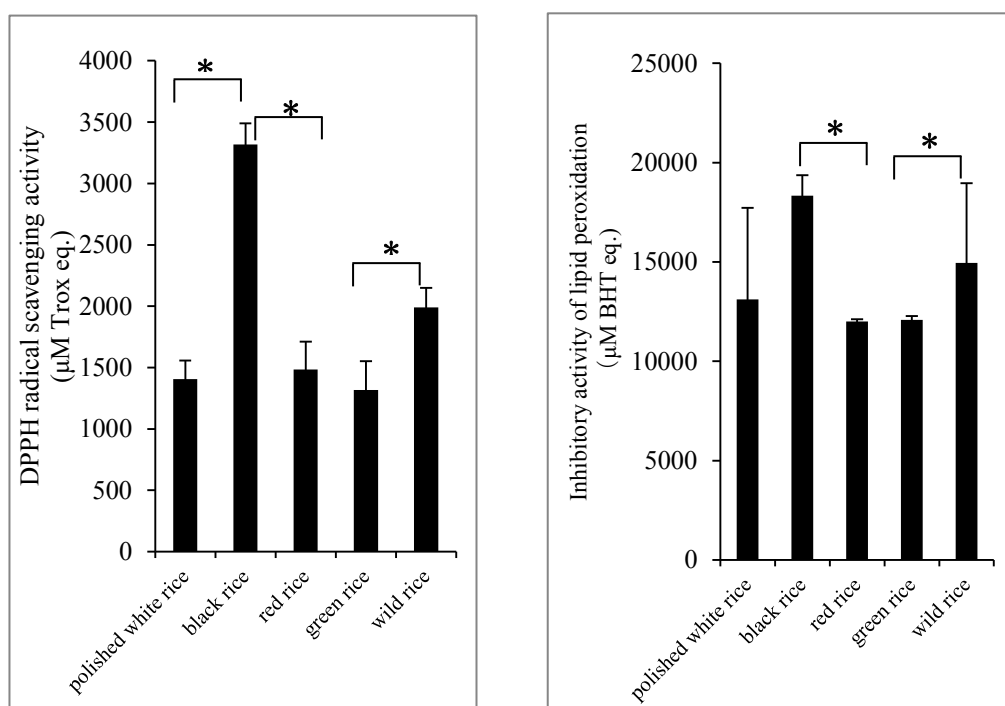


Figure 6-12. DPPH radical scavenging activity and inhibitory activity of lipid peroxidation of alcoholic beverages made from various ratio of *beni koji*.

Values are the mean of triplicates. * $p < 0.05$

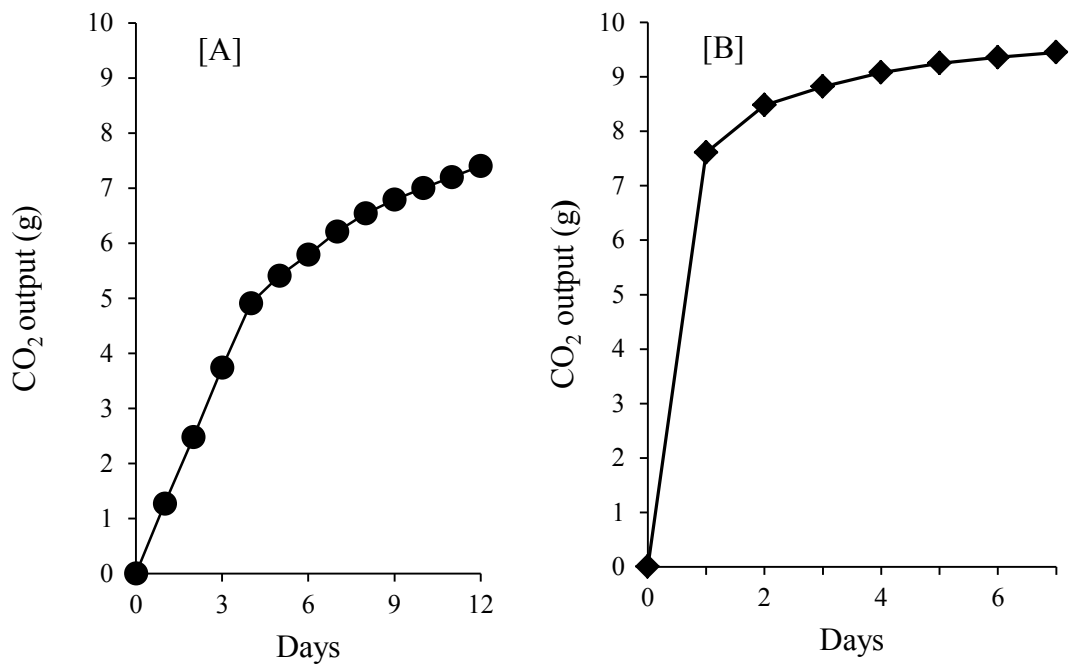


Figure 6-13. Time course of fermentation of the mash made from polished white rice using 30% *beni koji*. [A], Incubation time 10 days; [B], Incubation time 14 days.

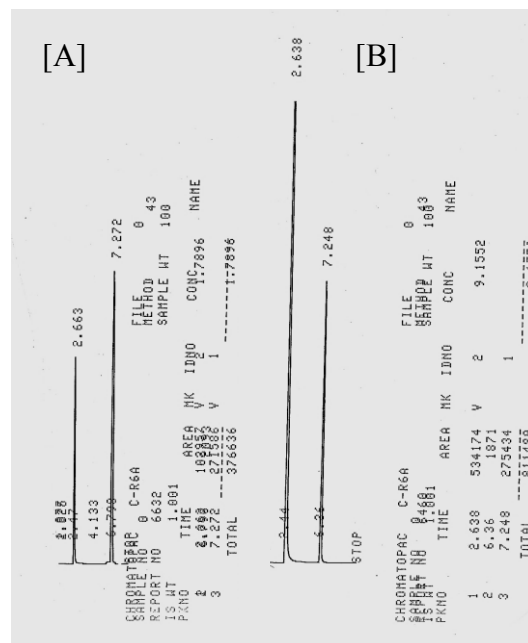


Figure 6-14. Gas chromatographic behavior of alcoholic beverages fermented using *beni koji*. [A], Fermentation was performed with only using *beni koji* ; [B], with K7 yeast and *beni koji*.

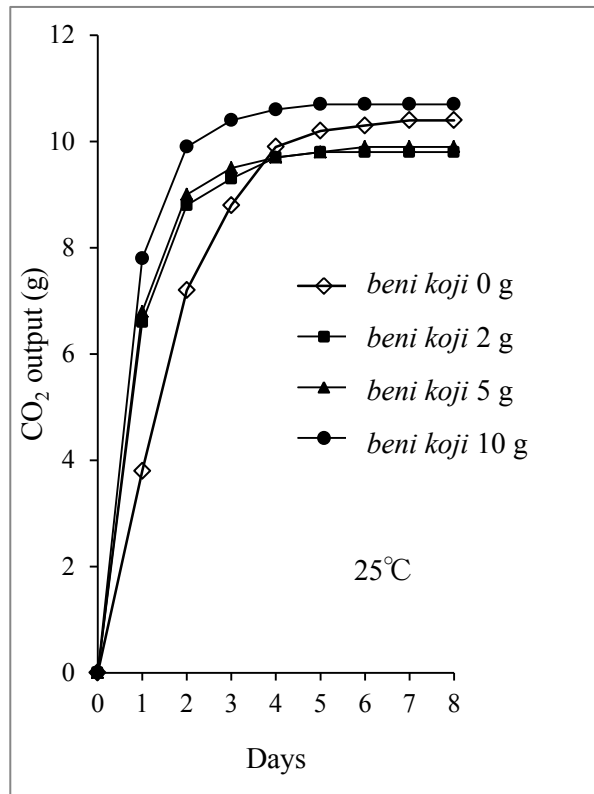


Figure 6-15. Time courses of fermentation of the mash made from polished white rice using various amounts of *beni koji*.

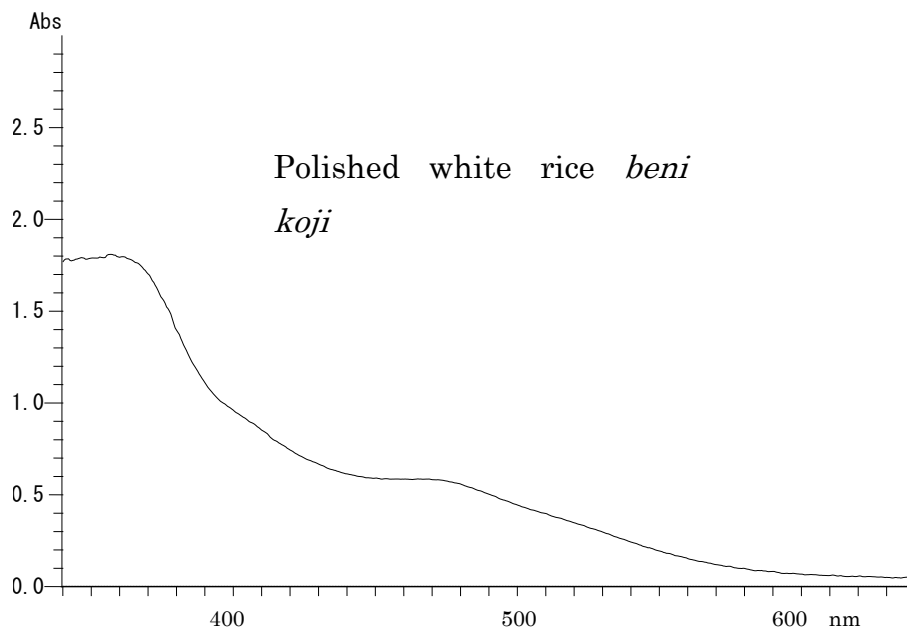


Figure 6-16. Absorption spectrum of various alcoholic beverages using *beni koji*.

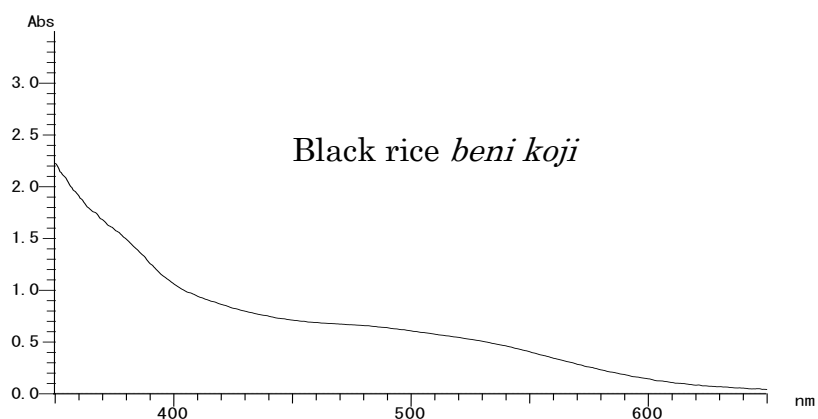


Figure 6-17. Absorption spectrum of various alcoholic beverages using *beni koji*.

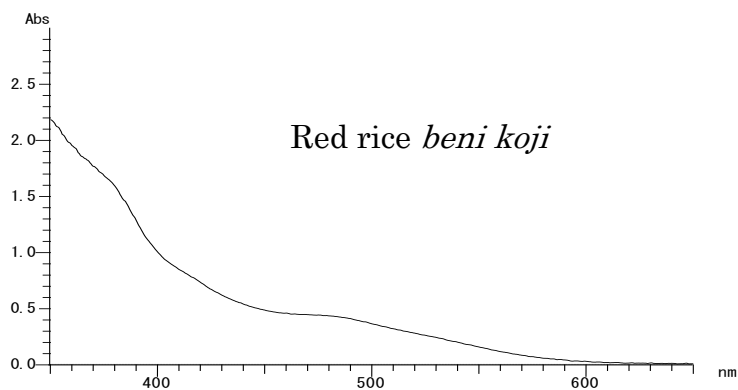


Figure 6-18. Absorption spectrum of various alcoholic beverages using *beni koji*.

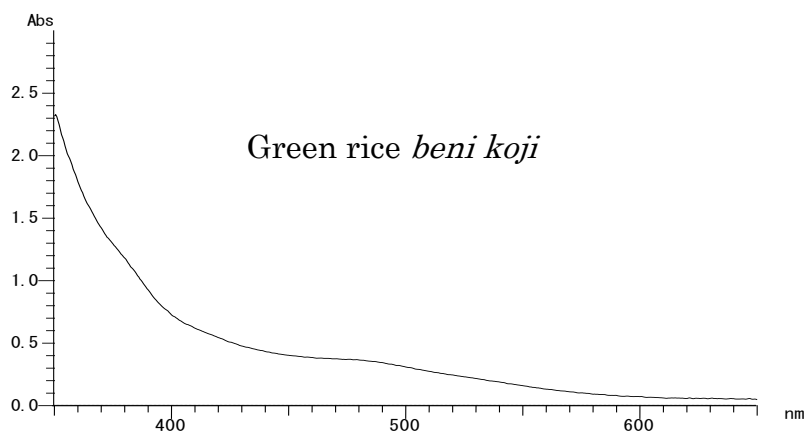


Figure 6-19. Absorption spectrum of various alcoholic beverages using *beni koji*.

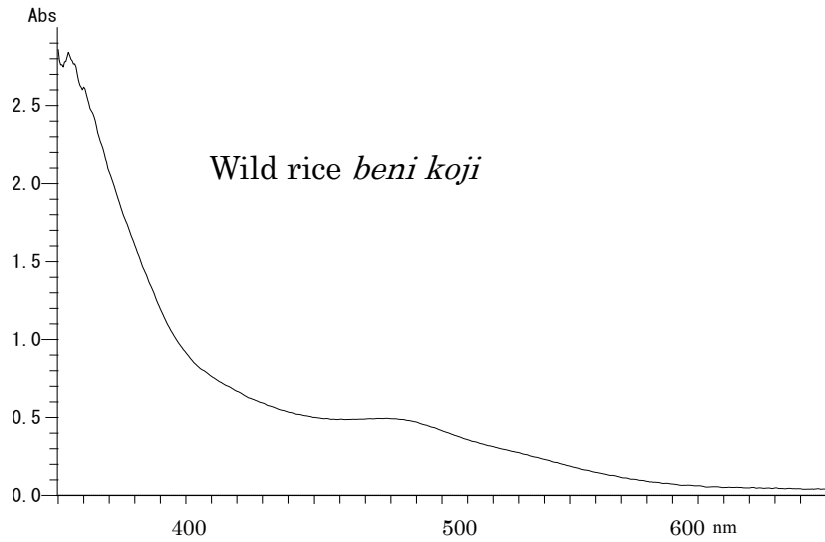


Figure 6-20. Absorption spectrum of various alcoholic beverages using *beni koji*.

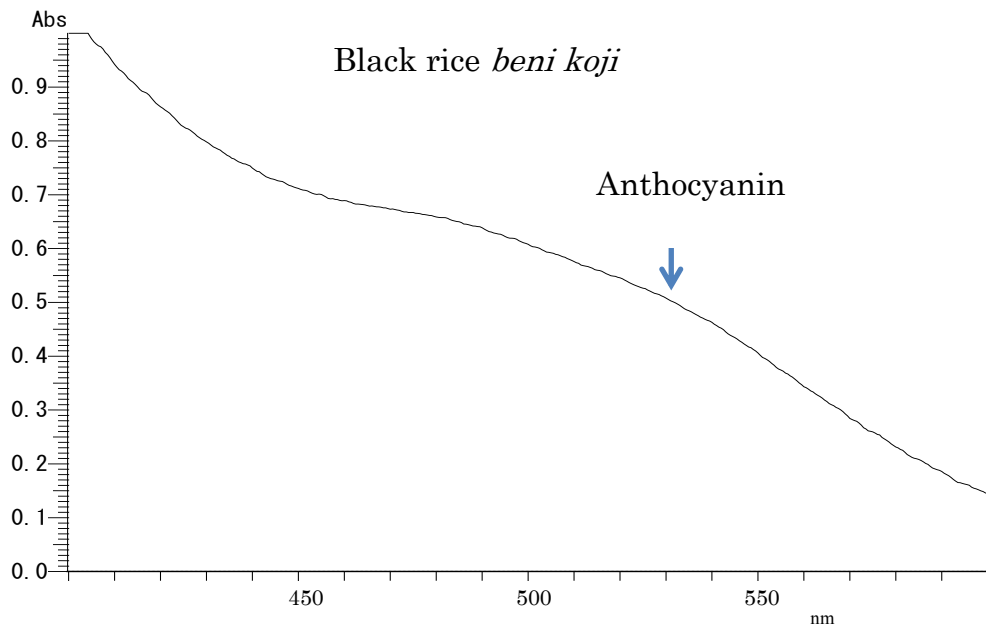


Figure 6-21. Absorption spectrum of black rice alcoholic beverages using *beni koji*.

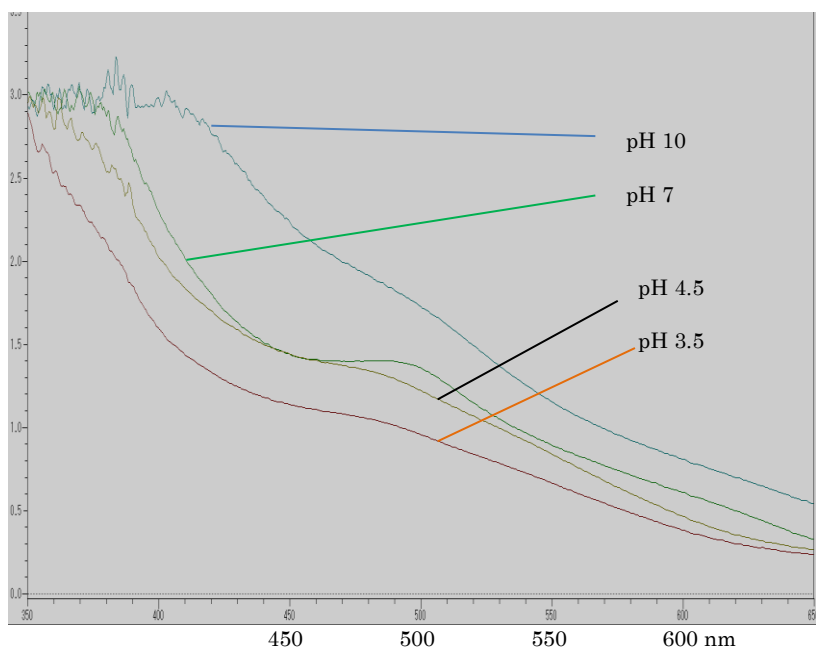


Figure 6-22. Absorption spectra of alcoholic beverages made from black rice using *beni koji* under the condition of various pH.

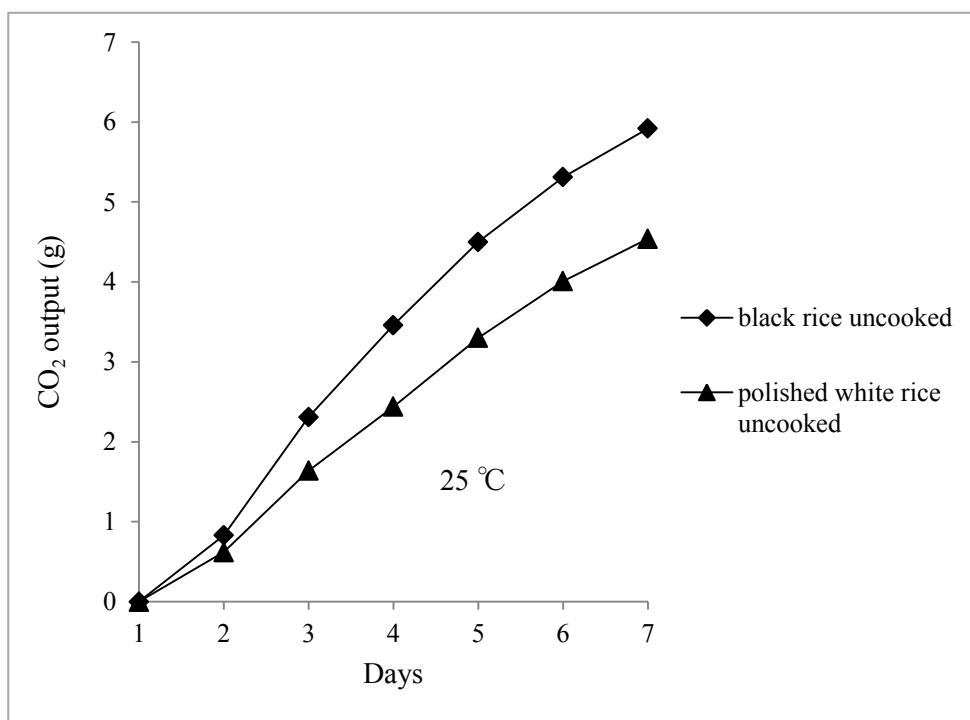


Figure 6-23. Time courses of fermentation of the mash made from uncooked polished white rice and black rice using *beni koji*.

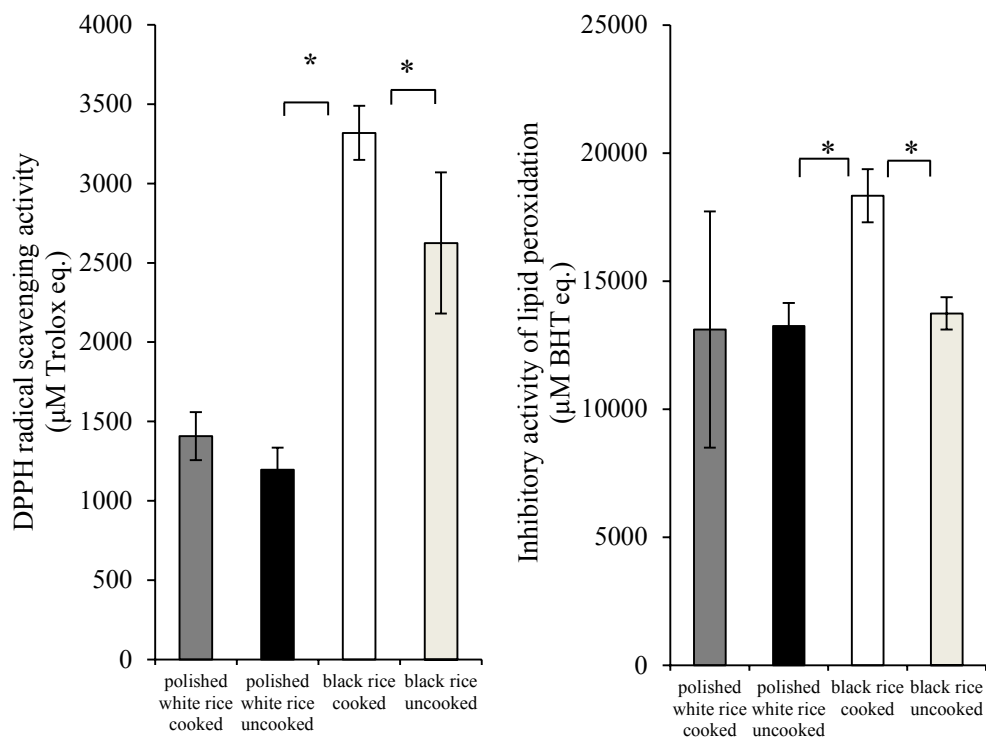


Figure 6-24. DPPH radical scavenging activity and inhibitory activity of lipid peroxidation of alcoholic beverages made from black rice and polished white rice using *beni koji*. Values are the mean of triplicates. * $p < 0.05$

Table 6-5. Sugar contents in various grain and *beni koji*.

	rice (mg/g)	<i>beni koji</i> (mg/g)
Polished white rice	870	390
Black rice	840	350
Red rice	810	200
Green rice	780	160
Wild rice	840	110

第7章 紅麴を用いて試醸したワイルドライス及び

有色米アルコール飲料の組成と抗酸化能特性

その2 (有色穀物米紅麴による試醸)

第1節 緒言

第6章では、紅麴で製麴した白米麴を用いて4種類の有色穀物のアルコール飲料を試醸し、黄麴を用いて試醸したアルコール飲料の組成と抗酸化能を比較した。その結果、黄麴で製麴したアルコール飲料に比べ、DPPHラジカル消去能、脂質過酸化阻止能ともに、白米麴で試醸したアルコール飲料と比較して高いことがわかった。本章では、紅麴を用いて製麴した有色穀物麴を用いて試醸した4種類の有色穀物のアルコール飲料の組成と抗酸化能について検討した。

第2節 実験材料と方法

7-2-1 発酵原料

2-2-1 参照。

7-2-2 紅麴の製麴

《種麴の製造》及び《糖化用紅麴の製麴》は1-2-3参照。使用した麴の製麴過程及び麴の写真は(Figure 1-3, 4, 6-1)参照。

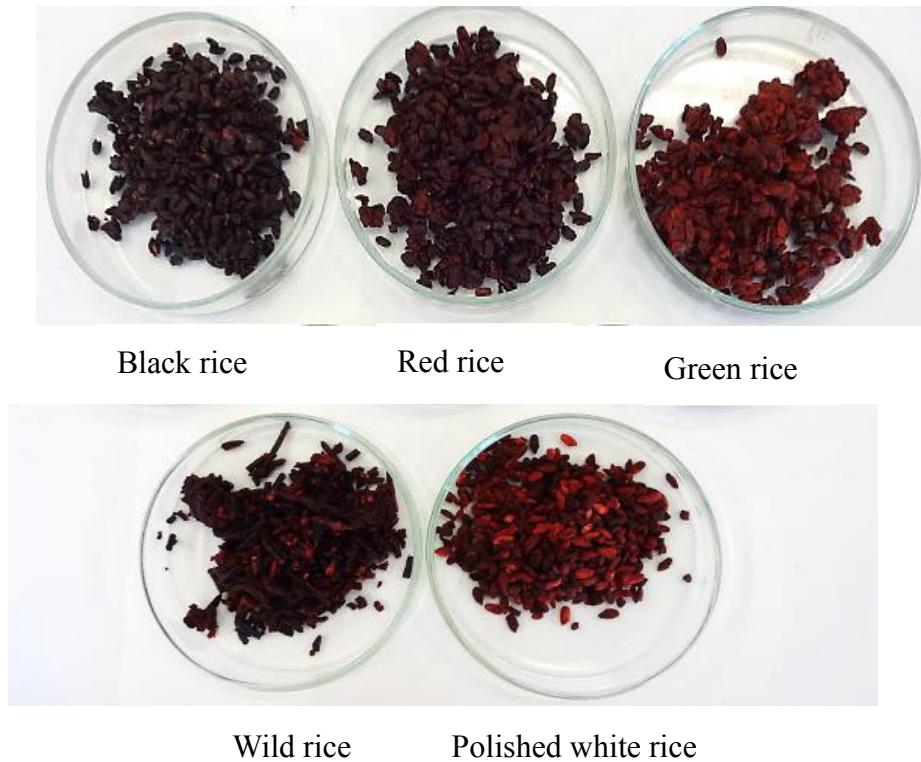


Figure 7-1. Pictures of *beni koji* as saccharification agent.

7-2-3 酵母の培養

2-2-3 参照。

7-2-4 酵母の洗浄と酵母懸濁液の調製

2-2-4 参照。

7-2-5 ワイルドライス及び有色米アルコール飲料の試醸

使用する有色穀物麴量は、30 g に揃えた。発酵終了後は上清を定性濾紙 No.101 で自然濾過した。得られた濾液は各種有色米発酵酒として分析に供した。尚、発酵酒は保存ポリ容器に入れ、分析に使用するまで冷凍保存した。

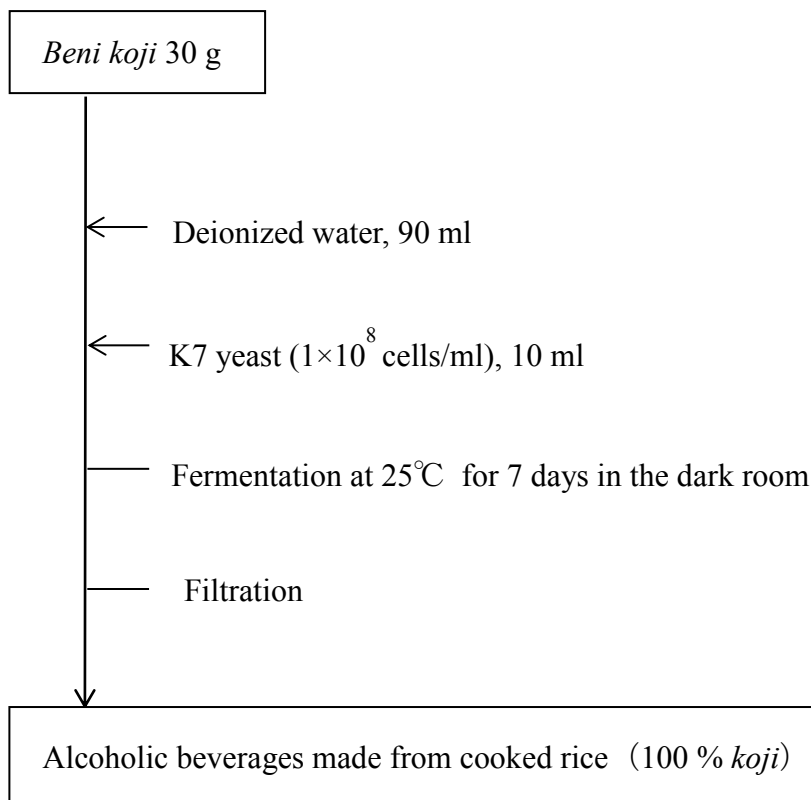


Figure 7-2. Procedure for brewing of alcoholic fermentation.

7-2-6 発酵曲線の作製

7-2-7 pH 測定

7-2-8 酸度測定

7-2-9 エタノール濃度分析

7-2-10 直接還元糖量測定

7-2-11 総フェノール性化合物量測定

7-2-12 吸収スペクトル測定

7-2-13 DPPH ラジカル消去能測定

7-2-14 脂質過酸化阻止能測定 (β-カロテン退色法)

以上、第 2 章 2-2 を参照。

第 3 節 結果と考察

7-3-1 有色穀物麴で試醸したアルコール飲料の組成と抗酸化能

有色穀物で製麴した紅麴を全麴仕込みで試醸した結果、これまでの発酵と異なり、発酵完了までには、2 週間程度かかった。分析に使用したアルコール飲料は何れも 7 日間で取り込んだものを使用した (Figure 7-3)。二酸化炭素発生量は穀物によって大きく異なり、白米、黒米、赤米、緑米、ワイルドライスの順に低下した。この順序は、第 6 章でも述べたように麴中の糖量及び麴の発酵阻害と関係しているように見えた (Table 6-5)。得られたアルコール飲料の写真を Figure 7-4 に示した。赤色の色調の違いは吸収スペクトルでは、500 nm 付近の吸光度に観察された (Figure 7-8, 9, 10, 11)。味や香りでは紅麴 30 %仕込みの穀物酒に比べ希薄になった。また、酸味が強く、旨みはかなり低下した。組成にも違いが見られ、残糖量は赤米と緑米の値が高く、総フェノール量はワイルドライスの値が高くなった。アルコール濃度は低く、紅麴 30 %仕込みで試醸したアルコール飲料の 16 %~55 %量に低下した (Table 7-1、Figure 7-5)。

抗酸化能では、DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能ともに、総フェノール量に類似の傾向を示し、ワイルドライスの値が他の穀物酒に比べて高くなった (Figure 7-6, 7)。また、その値も紅麴 30 %仕込みのアルコール飲料の値に近くなった。

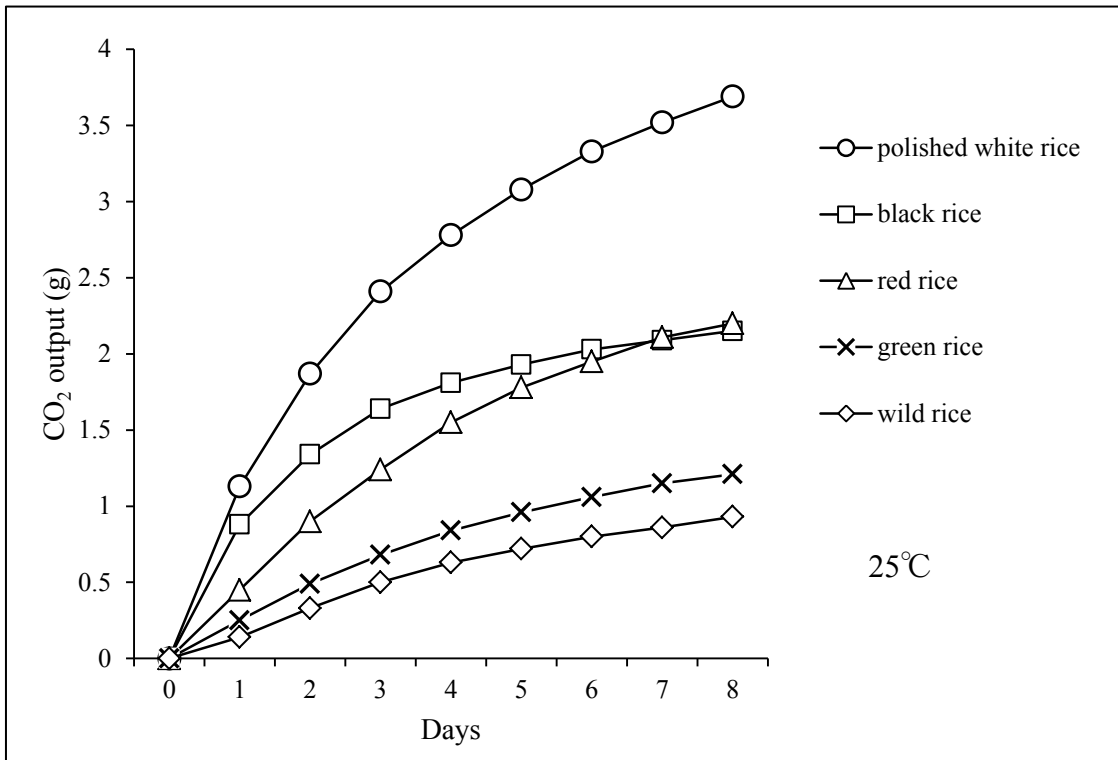


Figure 7-3. Time courses of fermentation of the mash containing *beni koji* prepared with only various grains.

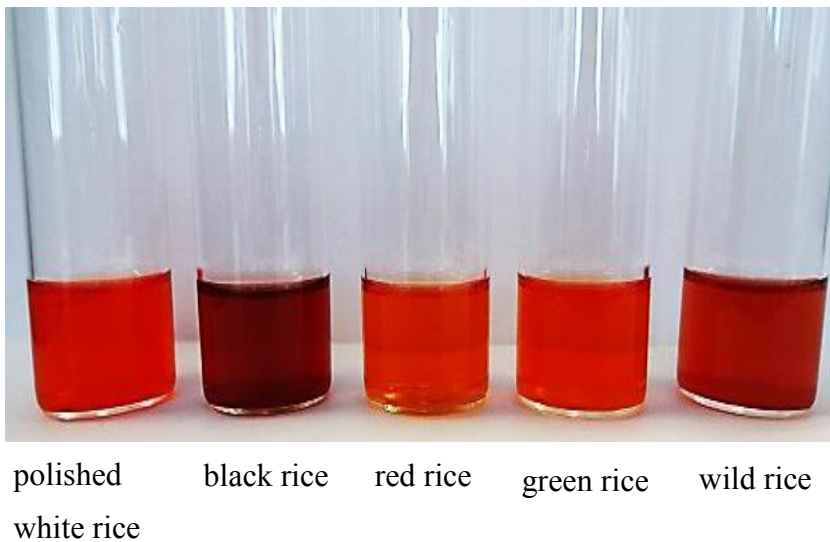


Figure 7-4. Picture of various alcoholic beverages made from *beni koji* prepared with only various grains.

Table 7-1. Comparison of characteristics of various alcoholic beverages made from *beni koji* prepared with only various grains..

	polished white rice	black rice	red rice	green rice	wild rice
Final pH	4.1	4.4	4.6	5	4.4
CO ₂ output (g)	3.7	2.2	2.2	1.2	0.95
Volume of filtration (ml)	67	64	61	58	42
Acidity (ml)	3.2	3.4	2.8	2.4	4.3
Ethanol concentration (% w/v)	4.5	2.2	2.1	2.6	1.3
Reducing sugar content (µg/ml)	420	480	1970	1100	470
Total phenolic compound (µg/ml)	600	670	670	650	740

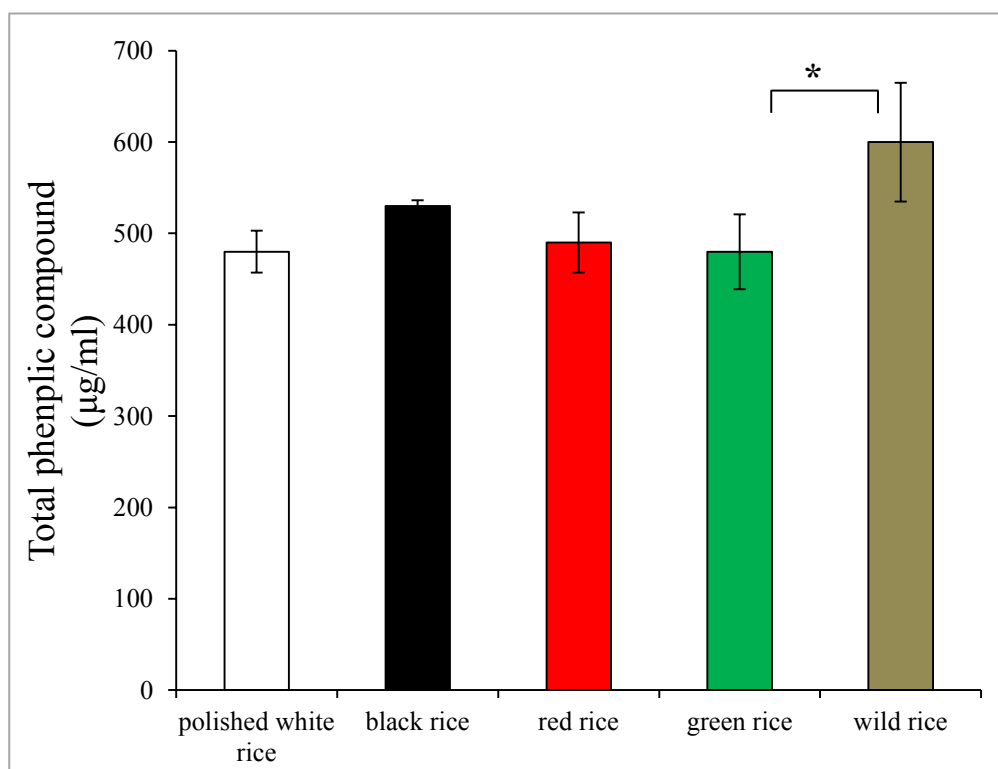


Figure 7-5. Total phenolic compounds of alcoholic beverages made from *beni koji* prepared with only various grains. Values are the mean of triplicates. * p<0.05

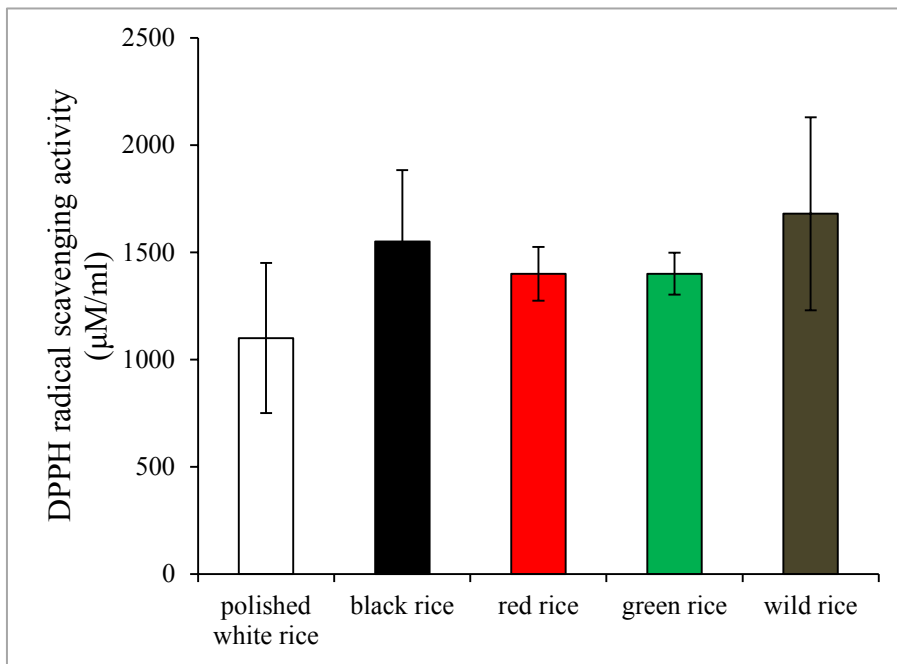


Figure 7-6. DPPH radical scavenging activity of alcoholic beverages made from *beni koji* prepared with only various grains. Values are the mean of triplicates.

* $p < 0.05$

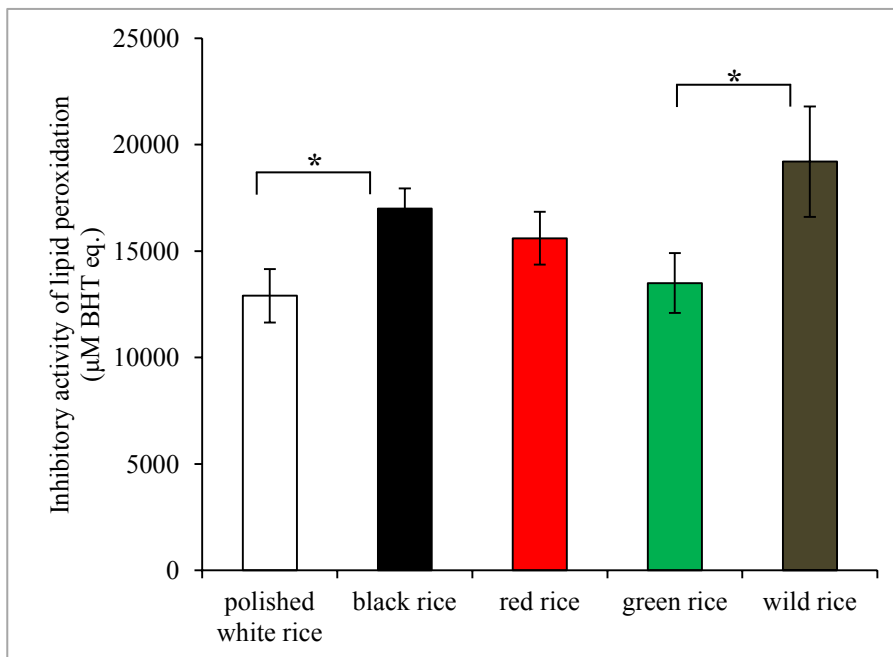


Figure 7-7. Inhibitory activity of lipid peroxidation of alcoholic beverages made from *beni koji* prepared with only various grains. Values are the mean of triplicates.

* < 0.05

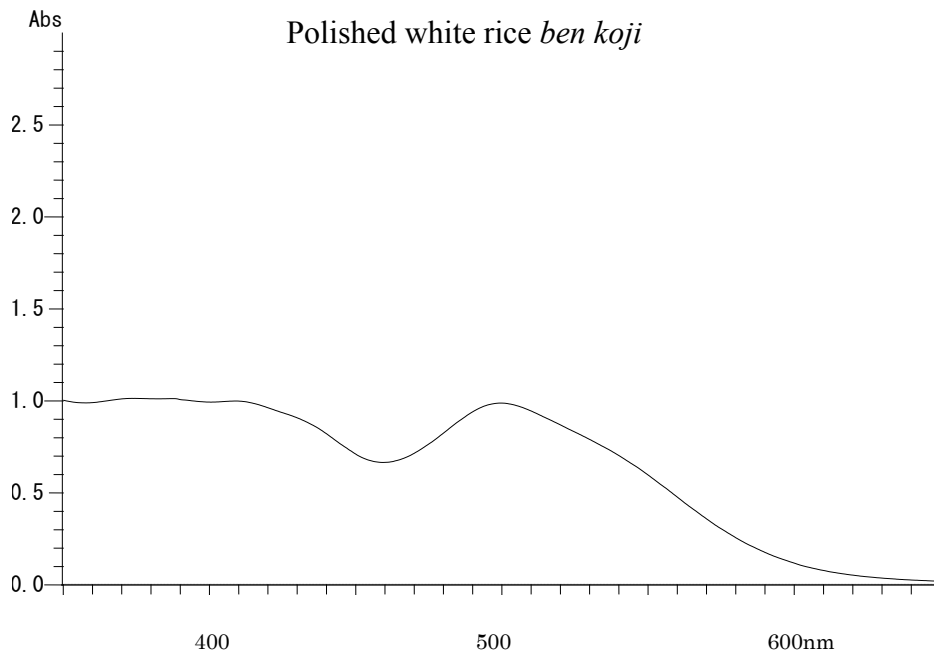


Figure 7-8. Absorption spectrum of alcoholic beverages made from polished white rice *beni koji*.

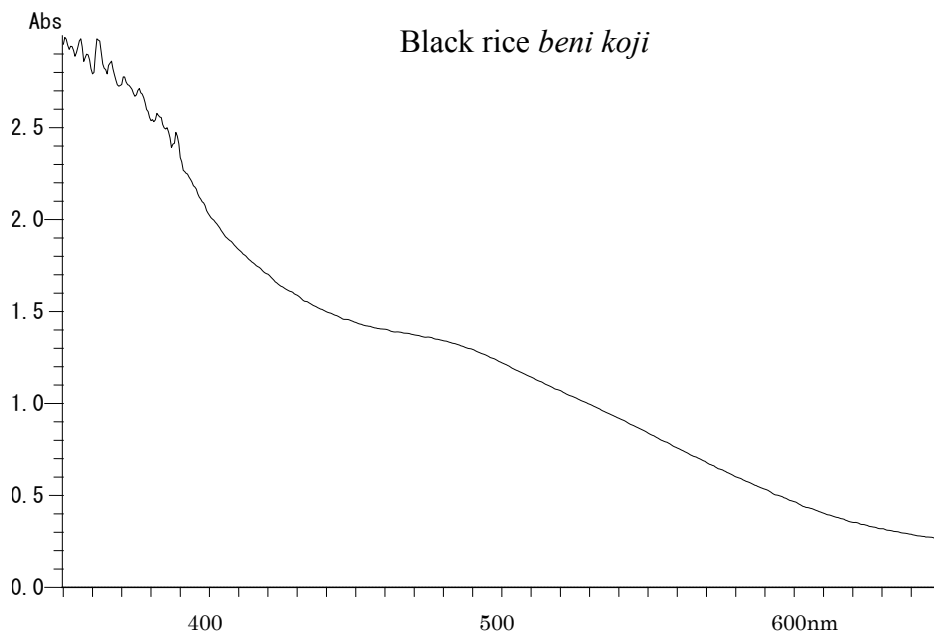


Figure 7-9. Absorption spectrum of alcoholic beverages made from black rice *beni koji*.

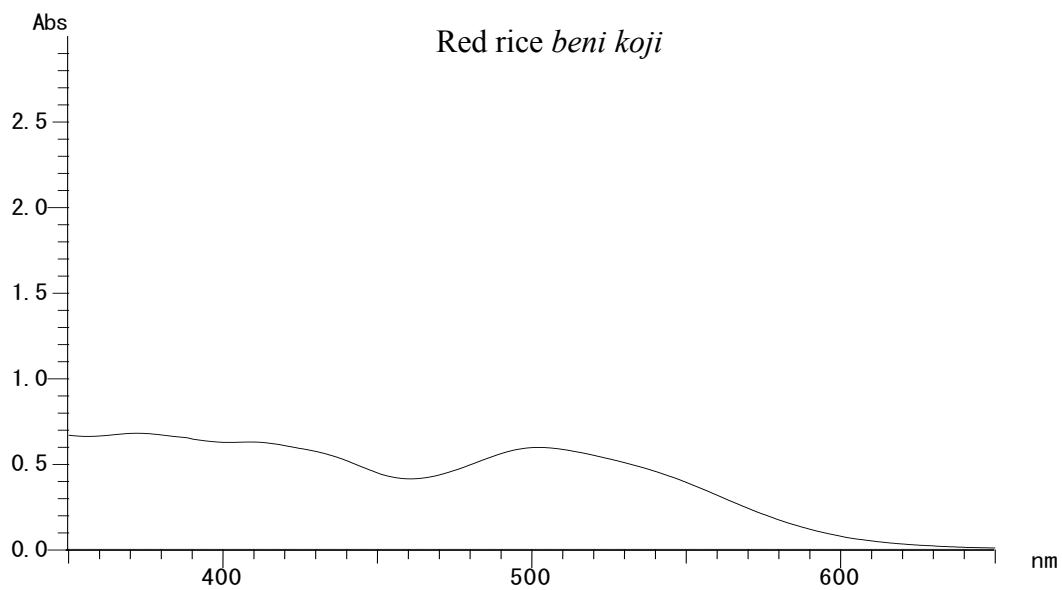


Figure 7-10. Absorption spectrum of alcoholic beverages made from red rice *beni koji*.

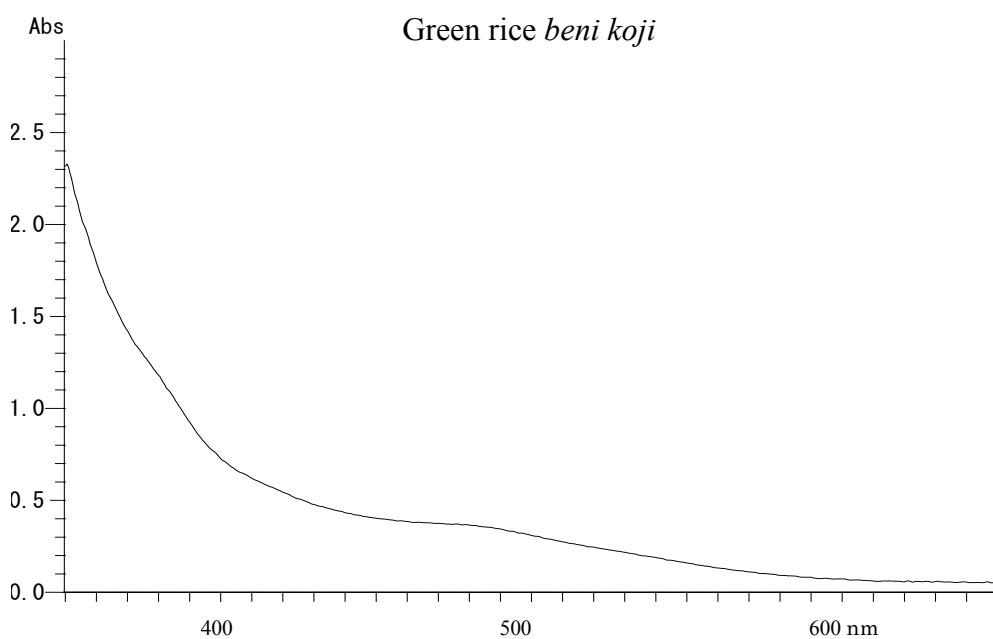


Figure 7-11. Absorption spectrum of alcoholic beverages made from green rice *beni koji*.

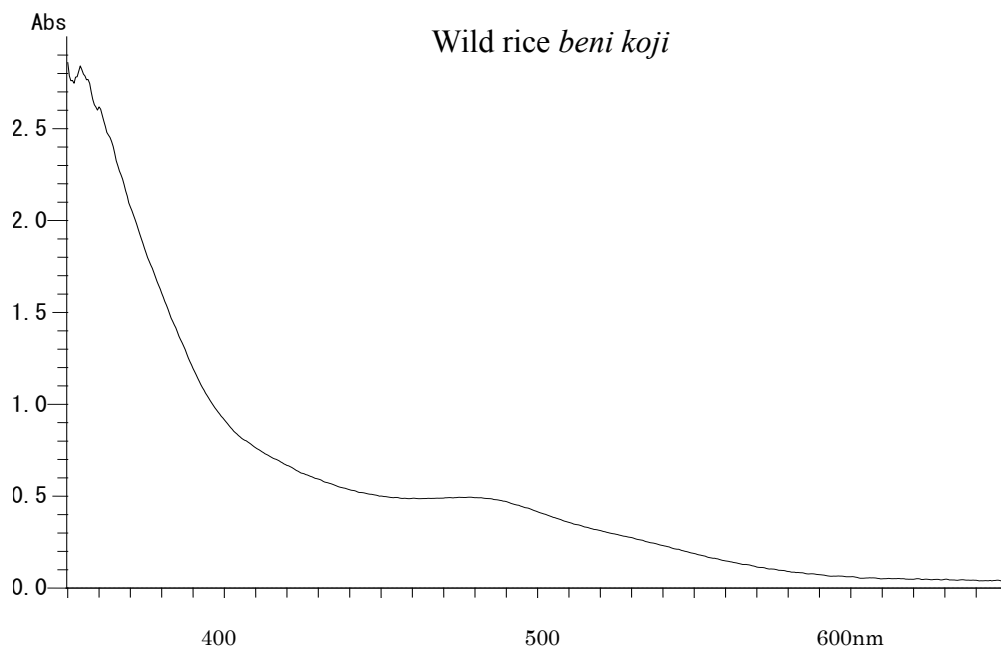


Figure 7-12. Absorption spectrum of alcoholic beverages made from wild rice *beni koji*.

総括

第 1 章では、穀物の持つ抗酸化能が、加熱することでどう変化するのか、またそれを麴にした時、そして、甘酒にした時にどのように変化するのかを中心に検討を行った。その結果、ワイルドライスを除くすべての穀物で、DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能ともに若干ではあるが加熱することにより減少する傾向が見られた (Figure 1-13, 14)。この結果は、これまで本研究室で研究されてきた蒸煮米と無蒸煮米によるアルコール飲料の抗酸化能の傾向と一致するものであった。即ち、アルコール発酵過程では抗酸化能物質の多くは加熱処理した穀物では変性あるいは分解され、抗酸化能が低下した物質に変化すると推察される。

黒米の糠部分から抽出した黒米色素を用いて、加熱、非加熱処理による抗酸化能を比較した実験からは、色調では明らかに異なるものの (Figure 1-15)、DPPH ラジカル消去能、総フェノール量、脂質過酸化阻止能には差異は確認されなかった (Figure 1-16, 17, 18)。このことから、黒米色素は加熱による抗酸化能の低下の影響を受けにくく、黒米の抗酸化能の低下は、黒米に含まれるアントシアニン色素以外の抗酸化物質による抗酸化能の低下によるものではないかと推察した。

さらに、黄麴菌で製麴した有色穀物麴抽出液すべてについて、DPPH ラジカル消去能及び脂質過酸化阻止能が増加したことから (Figure 1-19, 20)、黄麴菌が穀物に新たな抗酸化能を付与すると推察した。この結果は、黄麴で製麴した白米麴に、乳酸菌を添加することで新たな抗酸化能を付与することを報告した尾関¹⁷⁾らの研究結果と類似している。

黒米色素に黄麴菌と紅麴菌を添加して、添加前後の吸収スペクトル及び抗酸化能を測定した結果、黄麴菌では、510 nm 付近にピークを持つアントシアニンの吸収帯が時間経過とともに減少し (Figure 1-21)、DPPH ラジカル消去能も時間経過とともに低下した (Figure 1-25)。この現象は、AN-2 やスミチームを添加した場合の吸収スペクトルの変化 (Figure 1-23, 24) と抗酸化能変化 (Figure 1-27) に類似することがわかった。それに対し、紅麴菌では、抗酸化能は、アントシアニンのピークの減少と新たな吸収帯の増加を確認した (Figure 1-22, 26)。これらの結果から、黄麴菌が黒米に対して新たな抗酸化物質を付与するという働きと黒米色素を変化させ、抗酸化能を低下させるという二つの相反する作用を持つと推察した。一方、紅麴菌は、黒米色素に紅麴を添加した初期段階では AN-2 やスミチームに類似の反応が起きるが、時間経過とともに次第に高い抗酸化能を持った新たな色素を生成すると推察した。

白米および有色穀物で製麴した黄麴と紅麴を用いた甘酒の抗酸化能の経時変化を測定した (Figure 1-28, 29)。全ての穀物で抗酸化能は増加したが、黄麴、紅

麴ともに一部の穀物麴で培養時間が長くなるに従い DPPH ラジカル消去能および脂質過酸化阻止能の値が低下する現象が見られた (Figure 1-30, 31)。この現象のメカニズムについては今後更なる検討を要する。また、紅麴甘酒と黄麴甘酒の抗酸化能を比較すると紅麴の値の方が高くなることが分かった。このことから、甘酒よりも発酵期間が長いアルコール飲料における紅麴の有用性が示唆された。

第 2 章では、糖化剤としてスミチームを用い、アルコール発酵法の違いが有色穀物のアルコール飲料の組成と抗酸化能にどのように影響するのかを検討した。その結果、両発酵法ともに 4 日間で発酵が完了し、二酸化炭素発生量は白米が多く、黒米、赤米、緑米、ワイルドライスでほとんど同じであった (Figure 2-4、Table 2-5)。抗酸化能の値は、DPPH ラジカル消去能では黒米、赤米、ワイルドライスの値が高くなった (Figure 2-8)。脂質過酸化阻止能では唯一、ワイルドライスの値が高くなり、他の穀物の値はほとんど同じになった (Figure 2-9)。アルコール発酵法の違いに影響が見られたのは、総フェノール量で、無蒸煮発酵法の方が蒸煮発酵法に比べて高くなった (Figure 2-7)。しかしながら、DPPH ラジカル消去能や脂質過酸化阻止能の値にはほとんど影響しないことが分かった。

糠部分を取り除いた 80%精白の各有色穀物における抗酸化能が、ワイルドライスを除き、白米の値に近似したことから (Figure 2-10, 11)、糠部分に含まれる色素成分が高い抗酸化能を持つことが明らかになった。有色穀物では、蒸煮アルコール発酵法と無蒸煮アルコール発酵法による違いが抗酸化能の差異として現れないのは、その抗酸化能成分が加熱の影響を受けにくいからではないかと推察した。

糠部分を段階的に取り除いた有色穀物のアルコール飲料を試醸し、その抗酸化能の変化を測定した。その結果から、有色穀物に含まれる抗酸化物質が多く存在する部位を推察した (Table 2-6)。ワイルドライスは他の有色穀物と異なり、精白歩合を高くした場合 DPPH ラジカル消去能は低い低下率を示し、脂質過酸化阻止能は増加した。これは、ワイルドライスの抗酸化物質が穀物全体に広がっているからではないかと推察した。高い抗酸化能に加え、発酵のし易さや味、香りの特徴から、新たな機能性を持つアルコール飲料の原料としてワイルドライスが有望であると考えた。

第 3 章では、有色穀物のアルコール飲料の抗酸化能を、K7、NP01、Y3 の 3 種類の酵母を用いて測定した。清酒用酵母 K7 との差異は、アルコール発酵曲線に現れた。即ち、K7 酵母による発酵では蒸煮、無蒸煮発酵法ともにほぼ 4 日で

完了したのに対し、Y3、および NP01 による無蒸煮発酵法ではアルコール発酵が完了するまでに 6 日間を要した。しかし、発酵量 (Figure 3-1)には差は確認できなかった。また、緑米とワイルドライスでは抗酸化能 (Figure 3-5, 6, 7, 8)の値に差異が確認された。本章の結果から、NP01、Y3 酵母ともに K7 酵母と同様、無蒸煮発酵法における酵母として十分利用できることが確認された。

第 4 章では、掛け米としての白米と黄麴の割合を 4 段階に変えてアルコール飲料を試醸した時の組成と抗酸化能の差異を測定した。アルコール飲料中のアルコール濃度は麴の量が増えるにしたがって減少した (Table 4-3)。これは、麴に含まれる酵素の量や糖量に関係する現象ではないかと仮定し、酵素活性及び麴中の糖量を測定した。その結果、酵素活性の数値は十分大きさを持っていたが (Figure 4-3)、糖量が白米に比べておよそ 70%に減少していた (Table 4-5)。このことから、アルコール濃度の差異は黄麴中の糖量が深く関係していると推察した。

白米麴を 27 %にして有色穀物のアルコール飲料を試醸した結果からは、二酸化炭素発酵量には多少の差はあったものの、すべての穀物でアルコール発酵は 5 日間で完了した。試醸したアルコール飲料の DPPH ラジカル消去能の値は、白米に比べて有色米の方が高く、スミチームを用いた時の結果と類似した傾向が見られた。しかし、脂質過酸化阻止能の値はスミチームでの値とは異なり、ワイルドライスの値が他の穀物の値とほぼ一致した (Figure 4-12, 13)。試醸したアルコール飲料は、総じてスミチームを用いて試醸したもの比べて、穀物特有の香りを残した口当たりの柔らかいものになった。特に、黒米やワイルドライスは特徴的な味と香りがした。赤米は、特徴は少ないが、クセがなく飲みやすいアルコール飲料になった。

白米黄麴を用いて白米生米を試醸した結果、蒸し米に比べて発酵時間が長く、発酵量も蒸米の約 50 %になった。このことから、黄麴を用いた白米麴は白米生米を糖化する能力は低く生米の糖化剤としては適切でないと判断した。

第 5 章では黄麴で製麴した有色穀物を用いて全麴仕込みでアルコール飲料を試醸した。発酵曲線で示された二酸化炭素発生量は、スミチームを糖化剤として用いた時の結果と類似して、白米は有色穀物の 1.1 倍~1.2 倍と高く、有色穀物間ではほとんど差異が見られなかった (Figure 5-2)。抗酸化能は、DPPH ラジカル消去能は総フェノール量の傾向と類似したが、脂質過酸化阻止能の値は全ての穀物間で有意差が確認されなかった (Figure 5-6, 7)。試醸したアルコール飲料は、何れも酸味が勝り、アルコール飲料としては適していないと判断した。また、27 %仕込みのアルコール飲料では試飲者の評価が良かった黒米とワイル

ドライスは、ともに酸味が強く薬草の味と香の強いものになった。

第 6 章では、紅麴を用いたアルコール飲料を試醸しその組成と抗酸化能を測定した。糖化用麴として用いた紅麴の培養期間中の酵素活性はほぼ 2 週間で一定値を示し、その値は黄麴よりも若干高くなった (Figure 6-3)。糖化用紅麴の取り込み時期は、酵素活性および色調が安定する 14 日とした (Figure 6-4)。

白米で製麴した紅麴と掛け米としての白米の割合を変えて 10 %、30 %、50 %、100 % の 4 段階で白米の紅麴アルコール飲料を試醸し (Table 6-1)、組成と抗酸化能を測定した。発酵は、何れもほぼ 7 日間で完了したが、発酵曲線は、麴量が増えるほど二酸化炭素発生量が低下した (Figure 6-5)。その原因を検討した結果、麴中の糖量、及び紅麴による発酵阻害の両面が関係していることが推察された (Figure 6-15、Table 6-5)。得られたアルコール飲料は紅麴特有の赤色と芳香を持ち、麴量の増加とともに、総フェノール量、DPPH ラジカル消去能が増加した。脂質過酸化阻止能は仕込みに用いた麴量とは相関せず、ほぼ一定の値を示した。紅麴の量が増えるほど赤身が増加したアルコール飲料は紅麴特有の甘い香りがした (Figure 6-6)。また、黄麴を用いた白米酒に比べ、旨味や香りがともに増した。特に、30%麴で試醸したアルコール飲料は味、香り、酸味のバランスが優れたものになった。

白米紅麴の量を 30 %、掛け米量として有色穀物を用いたアルコール飲料を試醸した (Table 6-2)。何れのアルコール飲料もほぼ 7 日間で発酵が完了したが、これまでの発酵曲線とは異なり、黒米、緑米の発酵量が白米よりも多くなった (Figure 6-9)。得られたアルコール飲料は、赤味を帯びており、紅麴特有の芳香がした。黒米とワイルドライスは穀物色素の影響で赤黒い色を呈し (Figure 6-10)、穀物特有の味と香りを保持したアルコール飲料になった。組成では、紅麴の量を変えて仕込んだ場合と同様に、唯一総フェノール量で差異を生じた (Table 6-3)。DPPH ラジカル消去能はスミチームで糖化した時の値と比較した場合、黒米で 1.8 倍、ワイルドライスで 1.2 倍になった (Figure 2-10, 6-12)。脂質過酸化阻止能でも高い値が得られ、スミチームで糖化した時の値と比較して、黒米で約 3 倍、ワイルドライスでは 1.7 倍になった (Figure 2-10, 6-12)。

第 2 章及び第 4 章で観察された黒米アルコール飲料の高い抗酸化能は、光退色という課題を持つと言われてきているが、紅麴との組み合わせによってある程度解消される可能性が出てきた。ただ、黒米における抗酸化能の高い値は、紅麴と黒米色素との相乗作用によるものかが不明であり、今後更なる検討を要する課題となった。

紅麴の生米糖化能力を検討するために、白米紅麴を用いた無蒸煮の黒米と白米の発酵試験を行った (Figure 6-24)。発酵曲線から、白米紅麴は無蒸煮米を十

分に発酵する能力を持つことが分かった。また、試醸したアルコール飲料の抗酸化能も黄麴やスミチームを糖化剤に用いた場合と比較して高い値を示した。このことから、無蒸煮発酵の糖化剤としても十分に対応できると考えた。

第 7 章では有色穀物麴を用いて全麴仕込みで試醸したアルコール飲料の組成と抗酸化能を検討した。これまでのアルコール発酵とは異なり、発酵完了までに、二週間を要した。また、得られたアルコール飲料のアルコール濃度は 30 % 紅麴酒の 16 %~55 % と低くなった (Table 7-1、Figure 7-3)。また、DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能ともに、総フェノール量と類似した傾向を示し、ワイルドライスの値が他の穀物酒に比べて高くなった (Figure 7-5, 6, 7)。また、その値も 30%紅麴を用いて試醸した時の値に近くなった。

高い抗酸化能特性を持つアルコール飲料の開発をめざし、ワイルドライスと各種有色米を原料に、糖化剤としてスミチーム、黄麴、紅麴の 3 種類、酵母を K7 酵母、Y3 酵母、NP01 酵母の 3 種類を用いてアルコール飲料を試醸した。その結果、30%の白米紅麴で掛け米に黒米を用いたアルコール飲料が、明るい赤い色調と、特徴的な芳香、及び味を持ち、白米黄麴を用いた白米アルコール飲料に比べて DPPH ラジカル消去能の値で 4 倍、脂質過酸化阻止能の値で 3 倍の高い抗酸化能を持つことが分かった。

参考文献

- 1) Fujita A., Fujitake H., Kawakami k. and Nomura M.: Antioxidant activity of colored rice bran obtained at different milling yield : *J. Oleo Sci.*59, 563-568 (2010)
- 2) Tian S., Nakamura K. and Kayahara H.: Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4808-4813. (2004)
- 3) Ito M., Ohara E., Kobayasi A., Yamasaki A., Kaji R., Yamaguti M., Isizaki K., Nara E. and Otubo K.: Antioxidant Capacities and Polyphenol Content of Colored Rice Cultivars : *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 58, 576~582 (2011)
- 4) 寺尾純二、山西倫太郎、高村仁知:食品機能学:株式会社 光生館、東京(2001)
- 5) Gunaratne A., Wu K., Li D., Bentota A., Corke H., Cai YZ. : Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chem.*, 138, 1153~1161 (2013)
- 6) Hu C., Zawistowski J., Ling W. and Kitts DD.: Black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5271-5277 (2003)
- 7) Chung M.J., Walker P. A. and Hogstrand C. : Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and Trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis. *Aquat Toxicol*, 80, 321-328 (2006)
- 8) Kim MK., Kim HA., Koh K., Kim HS., Lee YS., Kim YH. : Identification and quantification of anthocyanin pigments in colored rice. *Nutr. Res. Pract.*, 2, 46-49 (2008)
- 9) Abdel A., Young JR. : Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4696-704 (2006)
- 10) 中村重正 : 菌食の民俗誌 -マコモと黒穂菌の利用-: 八坂書房、(2000)
- 11) National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22,
http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400525/Data/SR26/sr26_doc.pdf
- 12) 食と健康データブック: 山田耕路、門司印刷株式会社 (2010)
- 13) 永田十蔵: わが家で作るこだわり麴 米・豆・麦から雑穀まで: 社団法人 農産山漁村文化協会、東京 (2005)
- 14) 野白喜久雄、小崎 道雄、好井久雄、小泉武夫: 改訂 醸造学: 株式会社 講談社、東京 (2007)

- 15) 小泉武夫：発酵食品学：株式会社 講談社、東京 (2012)
- 16) Kawano I. and Himeno K.: *Beni-koji (Monascus sp.) Making with the Multiple Tomo koji Addition Technique. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 48, 863-866 (2001)
- 17) 尾関健二、桐藤万裕、筒井健司、若泉賢功、尾関清子：米麴の糖化及び発酵による抗酸化能の付与：食品・臨床栄養, 4, 19-26 (2008)
- 18) 広瀬直人、照屋亮、農芸化学会 2010 年度大会要旨 p. 42
- 19) 河野勇人、三宅剛史、産本弘之、野崎信行：岡山県工業技術センター報告, 32, 57 (2006)
- 20) 辻啓介、市川富夫、田辺伸和、阿部士朗、樽井庄一、中川康枝：紅麴食品が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響：Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi , 39, 919-924 (1992)
- 21) Lin T. F. and Demain A. L.: Effect of nutrition of *Monascus* sp. On formation of red pigments. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 36,70-75 (1991)
- 22) 河野勇人、姫野国夫：紅麴の嫌気処理によるγ-アミノ酪酸の蓄積：J. Brew. Soc. Japan, 97, 785-790 (2002)
- 23) Facchini F., Chen Y.D., Reaven G.M.: Light-to-moderate alcohol intake is associated with enhanced insulin sensitivity. *Diabetes Care*, 17, 115-119 (1994)
- 24) Shah J.H.: Alcohol decreases insulin sensitivity in healthy subjects. *Alcohol and Alcoholism*, 23,103-109 (1988)
- 25) 太田剛雄、高下秀春、轟木康一、岩野君夫、大場俊輝：清酒中に存在する抗酸化物質：日本醸造協会誌 87 (12) , 922-926 (1992)
- 26) Koguchi N., Saigusa N. and Teramoto Y. : Antioxidative Activity of Alcoholic Beverages made from Purple Rice (*Oryza sativa* var. *Indica* cv. *Shiun*) : *Food Sci. Technol. Res.*, 16 , 157-162 (2010)
- 27) Teramoto Y., Saigusa N. and Ueda S.: Effects of proteolytic activity on the characteristics of aromatic red rice wine: *J. Inst. Brew.*, 100, 163-166 (1994)
- 28) Teramoto Y., Saigusa N. and Ueda S.: Ethanol fermentation of various red rice without cooking: *J. Inst. Brew.*, 100, 7-9 (1994)
- 29) 大庭理一郎・三枝 敬明：熊本オリジナル・紫イモの醸造酒：生物工学会誌、第 86 巻、p. 28
- 30) Takeshita R., Saigusa N. and Teramoto Y.: Production and antioxidant activity of alcoholic beverages made from various colored rice and wild rice: *African Journal of Biochemistry Research*, 9, 130-136, (2015)
- 31) Takeshita R., Saigusa N. and Teramoto Y.: Production and antioxidant activity of

- alcoholic beverages made from various cereal grains using *Monascus purpureus* NBRC 5965: *Journal of the Institute of Brewing*, 122,(2),(2016)
- 32) Hao P., Takeshita R., Saigusa N., Dung N. T. P., Wongwicharn A. and Teramoto Y.: Production and antioxidative activity of alcoholic beverages made from newly isolated Vietnamese *men* yeast: *International Journal of Biomass and Renewables*, 4,17-21,(2015)
- 33) 安田正昭、上地玄作、宮里興信：豆腐よう製造に用いる紅麴の製造：*Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaisi*, 30, 63-67 (1983)
- 34) 第4回改正国税庁所定分析法注解：社団法人 日本醸造協会
- 35) Hamasaka T., Kumazawa S., Fujimoto T. and Nakayama T.: Antioxidant Activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan.: *Food Sci., Technol. Res.*, 10, 86-92 (2004)
- 36) Oki T., Masuda M., Furuta S., Nishiba Y., Terahara N., and Suda I. : Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. : *J. Food Sci.*, 67, 1752-1756 (2002)
- 37) 日本生物工学会編：生物工学実験書：培風館、p. 21
- 38) Nelson T.: A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose.: *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380 (1944)
- 39) Somogyi M.: Notes on sugar determination.: *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23 (1952)
- 40) Ichianagi T., Okikawa K., Tateyama C. and Konishi T.: Acid mediated hydrolysis of blue berry anthocyanins.: *Chem. Pharm. Bull.*, 49, 114-117 (2001)
- 41) 石田一則、村中文人、齋藤知明、岩間直子、高橋匡：華想い用種麴菌の開発（第4報）：平成17年度青森県工業総合研究センター事業報告
- 42) 遠藤章：発酵と工業, 43, 544, (1985)

本論文の研究結果の一部を以下の学会等で報告した。

- 1 「ワイルドライスと有色米を用いた醸造酒」 日本農芸化学会・2014年度大会、2014年3月26日（東京明治大学）
- 2 「各種有色米とワイルドライスを用いたアルコール飲料の特性」 化学関連支部合同九州大会（第310回）、2014年6月（九州国際会議場）
- 3 「Characteristics of alcoholic beverages made from wild rice and colored rice」 日本生物工学会・第66回大会、2014年9月（札幌コンベンションセンター）
- 4 「各種穀物を用いたアルコール飲料の特性」 日本農芸化学会・2015年度大会、2015年3月（岡山大学）
- 5 「有色米及びワイルドライスの麴を用いたアルコール飲料の特性」 化学関連支部合同九州大会（第311回）、2015年6月（九州国際会議場）
- 6 「紅麴を用いたアルコール飲料の試醸とその特性」 日本農芸化学会・中四国・西日本支部合同大会、2015年9月(愛媛大学)

その他

- 7 Characteristics of alcoholic beverages made from colored rice and wild rice 'Kyung-sung-Sojo University' Research Workshop, 2014年11月（韓国・慶星大学）
- 8 Characteristics of alcoholic beverages made from colored rice and wild rice 2 The 5th SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research, 2015年9月(崇城大学)
- 9 Characteristics of alcoholic beverages made from black rice and wild rice fermented with *beni koji* 'Kyung-sung-Sojo University' Research Workshop, 2015年11月（韓国・慶星大学）

本論文に関係のある報文

1. Production and antioxidant activity of alcoholic beverages made from various colored rice and wild rice

African Journal of Biochemistry Research Vol. 9,(11), pp. 130-136 (2015).

Ryoichi Takeshita, Noriaki Saigusa and Yuji Teramoto

2. Production and antioxidative activity of alcoholic beverages made from newly isolated Vietnamese *men* yeast

International Journal of Biomass and Renewables Vol. 4, (2), pp. 17-21, (2015).

Hao Pan, Ryoichi Takeshita, Noriaki Saigusa, Ngo Thi Phuong Dung,

Aporn Wongwicharn and Yuji Teramoto

3. Production and antioxidant activity of alcoholic beverages made from various cereal grains using *Monascus purpureus* NBRC 5965

Journal of the Institute of Brewing Vol. 122, (2), (2016).

Ryoichi Takeshita, Noriaki Saigusa and Yuji Teramoto in press

2015年12月1日に受理

謝 辞

本研究は、平成25年4月から平成28年3月まで崇城大学大学院 工学研究科 応用微生物工学専攻 食品生物科学講座 寺本研究室に席を置き、研究を行った結果であります。

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始ご懇切なるご指導とご助言を与え、励まして下さいました恩師、崇城大学応用微生物工学科 寺本 祐司 教授に心から深甚なる感謝の意を表します。

本研究の遂行および論文作成にあたり、常に有益なるご助言と激励を頂きました恩師、崇城大学 応用微生物工学科 三枝敬明 准教授に心から深甚なる感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂いた潘 浩氏にはここに深く感謝致します。また、寺本研究室で知り合い、苦楽を共にしてきた伊東光一氏、佐々木優一氏、池側公稀氏、川野祥子氏、河野丞太郎氏、川野徳嗣氏、下川光氏、中村貴騎氏、馬場仁美氏、山本怜奈氏、山本佳子氏ならびに寺本研究室の諸氏に心から感謝いたします。

平成28年2月
著者