

# 古代米発酵赤酢に関する研究

市橋 ゆき乃 (指導: 林 一也)

Study on red vinegar fermented ancient rice

By Yukino Ichihashi

## 1. 目的

古代米は、糠層にタンニンやアントシアニンの色素を含み、赤や黒に色づいた有色米のことをいう。赤米はその栽培特性が悪く、収量が低いため明治以降栽培が減少した。黒米は玄米の種皮部(糠層)に色素を含み、白米に混ぜて炊くだけで赤飯のように赤く染まる。これらの有色米は、野生種に近い形質を残した米で古代米とも呼ばれる<sup>1)</sup>。1989年以降、多様な形質の米に消費者の関心が高まり、農水省のプロジェクト研究「スーパーライス計画」により、赤米と黒米の品種改良が行われ、全国各地に栽培が広がっている。最近は薬膳料理や健康食ブームから注目されている。

また、麴は日本人の食文化では重要で、甘酒や味噌、醤油などの和食には欠かせない。江戸時代には「甘酒売り」があり、庶民が楽しめる甘味として甘酒は重要なものであったと思われる<sup>2)</sup>。

甘酒の栄養はブドウ糖、麦芽糖であり、これは人が活動する時のエネルギーとして基本的なものである。さらに麴カビの発酵産物であるアミノ酸やビタミンB群を多く含み、庶民は暑い時に甘酒を滋養強壮剤として飲んでいたようである。この江戸時代より続く麴を用いて、古代米で甘酒を造り、その甘酒でアルコール発酵により古代米酒を醸造し、さらに酢酸発酵で古代米酢を醸造することで、色彩豊かな日本酒、米酢を造ることができると考えた。しかし、この紫色をした古代米を麴で発酵させて造った色鮮やかな甘酒や酢は作られておらず、先行研究も見出せない。そこで、本研究で古代米の甘酒、日本酒、米酢の製造過程での色調や成分の変化などを検討し、色鮮やかな古代

米酢の製造に関する基礎研究を行った。

## 2. 実験方法

### 2-1. 黒米および黒米粉の甘酒・酒・酢の製造 2-1-1. 米麴を用いた黒米甘酒および黒米粉甘酒の製造

黒米と黒米粉、市販の米麴を用いて、黒米:米麴1:1、黒米粉:米麴1:1、黒米:黒米粉:米麴1:1:2、黒米:黒米粉:米麴2:1:3の比率で、甘酒の試作を行った。黒米と黒米粉は重量比1.5倍の蒸留水に30分程度浸漬後、炊飯器(象印、NP-YB18-TA)で炊飯した。これに60~70℃の湯と麴を加えて混ぜ、65℃の保温庫に入れて1日以上静置し、発酵させた。

### 2-1-2. 甘酒の糖度の測定

製造した黒米甘酒の糖度を糖度計(アタゴ、atago pocket cat No.3860 PAL-S Pocket Refractometer)を用いて測定した。

### 2-1-3. 甘酒の色調の測定

色の強さは分光色差計(日本電色工業、SE7700)を用いて、反射光(固形物)、透過光(液体)で $L^*a^*b^*$ 値を測定した。

### 2-1-4. 甘酒の可視-紫外分光吸光度の測定

50ml ビーカーに各試料1g取り、10倍量の3%ギ酸で色素を抽出し、13,000rpm、3分、23℃で遠心し上清を回収し、紫外可視分光光度計(Shimadzu、UV-2700)を用いて、515nmの吸光度を測定した。

### 2-1-5. 黒米・黒米粉の甘酒のアルコール発酵および酢酸発酵

甘酒発酵後、最も色調が良くアルコール発酵に

適した米：米粉：麴 = 1 : 1 : 2 の割合で甘酒を調整後、食酢製造会社にてアルコール発酵を行った。

2-1-6. 発酵過程における色素の含有量測定  
発酵過程の各試料 10g を 4 倍量の 3% ギ酸で色素を抽出し、色素量を UPLC で測定した。

2-2. 黒米麴の培養と色素の吸光度・含有量の変化

2-2-1. 黒米麴の製麴

黒米は玄米であるため炊飯が難しく、普通の白米のように炊飯ができない。そこで、黒米の発酵に適した加熱法の検討を行った結果、以下の方法で黒米の加熱を行い、黒米麴の作成を行った。

まず黒米を保存密閉袋に入れ、蒸留水で完全に浸るように黒米重量の 0.3 倍量の蒸留水を加え、4℃の低温室で一晩浸漬した。翌日に圧力鍋 (T-FAL、クラシック L) に 600cc の水を加えてから、中かごに黒米を入れ、高圧 (作動圧力 80kPa) に設定し、電熱器で強火 (1200W) にかけた。圧力がかかり始めてから、15 分間、中火 (800 W) にかけた後、10 分間蒸らした。蒸らし後、再び 600 cc の水を加えた圧力鍋で、同様に高圧で強火にし、加圧開始後 15 分間中火で加熱を終えたら、10 分間蒸らした。以上のように黒米を加熱処理後、クリーンベンチ内で 70% エタノールのスプレーを噴射消毒しておいた保存容器 (旭化成、ジブロック 1900ml) に、熱いうちに入れて放冷した。種麴を混ぜつぶし、この黒米の表面に茶こしでふりかけ接種した。保存容器にふたをし、30℃の恒温培養器に入れ 14 日間静置し、麴を培養した。これを培養日数ごとに取り出し、冷凍保存 (-4℃) した。

2-2-2. 黒米麴の可視・紫外分光吸光度測定

培養した黒米麴の可視・紫外分光吸光度 (515nm) は、2-1-4 と同様の方法で測定した。

2-3. 黒米麴・米麴を用いた黒米および黒米粉の甘酒の製造

2-3-1. 黒米麴を用いた黒米甘酒および黒米粉甘酒の製造

黒米、黒米粉および黒米麴、米麴を用いて、黒米：黒米麴 1 : 1、黒米粉：黒米麴 1 : 1、黒米：黒米粉：黒米麴 1 : 1 : 2、黒米：米麴 1 : 1、黒米粉：米麴 1 : 1、黒米：黒米粉：米麴 1 : 1 : 2 の比率で甘酒の試作を行った。

まず、黒米と黒米粉はそれぞれ重量比 1.5 倍の蒸留水を加えて、30 分間浸漬し、炊飯器を用いて炊飯した。炊飯後、ボールに移し、60 ~ 70℃の湯と各麴を加え混ぜた。これにラップをして、65℃の保温庫に入れて 1 日以上静置し、発酵させた。

2-3-2. 各甘酒の糖度と色調および可視・紫外分光吸光度の測定

各甘酒の糖度は糖度計を用いて測定し、515nm の吸光度は 2-1-4 の方法で測定した。

2-4. 黒米色素の分解における加熱の影響

2-4-1. 黒米の色素の減圧濃縮・精製

黒米 500 g をビーカーに取り、3% ギ酸にて 4℃の低温下で 18 時間静置し、色素を抽出後、ろ紙 (ADVANTEC、No.2) でろ過後、ろ液を合成吸着剤 (オルガノ、Amber-lite XAD-7P) に通し、色素を吸着カラムに吸着させた。この吸着色素を回収するため、99.5% (v/v) エタノールを用いて色素を溶出した。紫色の色素の溶出が見られなくなった時点で溶出を停止した。溶出液はロータリーエバポレーターを用いて 40℃の減圧下で蒸発乾固し、黒米抽出色素とした。この黒米抽出色素は、瓶 (アズワン、ビオラモ 15ml ねじ口バイアル (目盛付)) に詰めて、冷凍保存 (-18℃) した。

2-4-2. 黒米抽出色素の加熱による黒米色素の分解と可視・紫外分光吸光度測定

黒米抽出色素に、0.5% NaCl を含む 10mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) を加え、0.2mg/ml 濃度に調整した。これをエッペンチューブに 2ml 入れ、ウォーターバスを用いて 80℃で 5 時間加熱後、紫外可視分光光度計を用いて、515nm の吸光度を測定した。

2-5. 黒米色素の分解における麴菌のアミラーゼの影響

2-5-1. 米麴のアミラーゼ活性の測定法

米麴を国税庁所定分析法注解<sup>3)</sup>に従い抽出した麴抽出液を 50 倍に希釈したものを測定試料とし、 $\alpha$ -アミラーゼ測定キット (キッコーマンバイオケミファ) を用いて、白兼らの方法<sup>4)</sup>に基づき、 $\alpha$ -アミラーゼ活性値を測定した。

2-5-2. 麴菌の  $\alpha$ -アミラーゼによる黒米抽出色素の分解と可視・紫外分光吸光度測定

黒米抽出色素に、0.5% NaCl を含む 10mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) を加え、0.2mg/ml 濃度に調整

し、2mlのエッペンチューブに1ml入れ、0.5mlの麴抽出液を加えた。65℃に設定した恒温槽に6時間入れ、反応させた。その後、13,000rpm、3分、23℃で遠心し、上清を回収し、紫外可視分光光度計を用いて、515nmの吸光度を測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3-1. 黒米および黒米粉の甘酒・酒・酢の製造

甘酒の発酵後、黒米：黒米粉の比率が1：1の甘酒の方が2：1よりやや明めの赤紫色になっていた。また米粉よりも米の糖度の方が上がった。この米粉を使用した甘酒の糖度が上がらなかった理由として、鍋での過熱不足によって発酵不足、黒米粉の色素成分などの影響と考えられる。糖度は米の割合と発酵日数を増やしてもそれほど変わらないことがわかった。この甘酒の色調と糖度の結果から、米：米粉：麴=1：1：2の時が最もアルコール発酵に適していると考え、甘酒の分量をこの割合で調整後、酵母菌でアルコール発酵させて黒米酒を醸造し、さらに酢酸発酵させて黒米酢を造った。各製造過程のHPLC分析した結果、各過程の総アントシアニン量の差において、発酵前と発酵後の差の方が、発酵後と黒米酒の差よりも大きいということがわかった。このため、発酵中の麴のアミラーゼによるアントシアニン系色素の分解量が、発酵後から黒米酒になる過程のアルコール発酵におけるアントシアニン系色素の分解量よりも多いと考えられた。次に、各製造過程の各種アントシアニンのHPLC分析の結果、甘酒では発酵前に含まれていたCy-G.R（シアニジン-グルコシルルチノシド）がアルコール発酵中の作用で消失し、Pn-G（ペオニジン）がかなり少なくなった。Cy-2G（シアニジン-3,5ジグルコシド）は若干減少し、Cy-G（シアニジン-グルコシド）は微増した。黒米酒ではアルコール発酵により、Cy-2GとPn-Gが消失し、Cy-Gがやや増加した。また、黒米酢では酢酸発酵によりCy-Gがさらに減少した。以上の結果から、黒米アントシアニン系色素は、甘酒の発酵のみならず、アルコール発酵、酢酸発酵時に顕著に減少することが示された。

#### 3-2. 黒米麴の培養と色素の吸光度・含有量の変化 黒米麴を培養した結果、黒米麴は培養が進むに

つれ、黒米麴より抽出した抽出液の吸光度の減少がみられたことから、培養が進むに従って色素が分解すると考えられる。

#### 3-3. 黒米麴・米麴を用いた黒米および黒米粉の甘酒の製造

%吸光度で発酵前後の色素の分解率を比較した結果、普通の米麴を用いた甘酒は、発酵により糖度の顕著な上昇が認められるが、黒米麴を用いた黒米および黒米粉の甘酒の糖度は、発酵日数を増やしても米麴の甘酒の糖度の半分にも及ばず、低いことが示された。黒米粉のみの甘酒においても、発酵日数を増やしても米麴の甘酒の糖度の6割にも及ばず、低いことが示された。色調の変化では、黒米麴甘酒の発酵が進むにつれ、吸光度の減少がみられた。この結果から、黒米麴および米麴を用いた黒米および黒米粉の甘酒では、発酵にともない、双方の麴とも黒米の色素が分解されていることがわかった。このうち、図7に示した黒米：黒米麴1：1の甘酒では、発酵1日目、2日目で色素残存率が約70%となり、黒米：米麴が1：1の甘酒の変化と比べて、色素の分解率が顕著に改善されていることが明らかとなった。これらの結果から、黒米麴を使用した甘酒の方が、米麴を使用した甘酒と比べて、発酵期間に糖化率は低くなったが、色素の分解率が顕著に改善されたことが判明した。次に、吸光度実数値の平均値で甘酒の実際の色残りの良さ、色調を比較した結果、黒米・黒米麴の甘酒の吸光度が0.41と最も高く色残りがよく、黒米・米麴の甘酒の約2倍の色調（色の濃さ）となり、色調も色素の分解率と同様に顕著に改善されたことが明らかとなった。また米麴、黒米麴ともに、黒米・黒米粉よりも、黒米粉単独の方が色調は約2倍になり、さらに黒米麴甘酒では黒米のみの方でも約2倍であったことから、黒米粉の利用は色調の改善に有効であることが示された。このことから、色調を基本とすると黒米粉・米麴および黒米・黒米麴の組み合わせが色調改善に良い結果が示された。糖度および色調の結果を総合して判断すると、黒米麴を使って甘酒をつくると、色調は改善されるものの、糖度が上昇せず、アルコール発酵に適した糖度が得られないため、アルコール発酵に不向きと考えられた。また、黒米粉

単独での利用は、色調改善に有効であったが、濁りや最終的なろ過工程等を考えると利用にやや難があると思われることから、黒米と黒米粉と米麴の甘酒が色調や糖度の面で、総合的に良いことが明らかになった。

### 3-4. 黒米色素の分解における加熱の影響

黒米抽出色素液を80℃で5時間加熱した時の各サンプルの加熱時間における吸光度の平均値(n=3)を求め、加熱前を100%として、黒米抽出色素液は加熱5時間後に残存率が93%となった。この結果、通常の炊飯加熱ではデンプンが $\alpha$ 化する約80~95℃の加熱を1時間程度行うが、今回の80℃、5時間の加熱で黒米抽出色素に影響が認められず、炊飯加熱による黒米色素の分解への影響は少ないと推察された。

### 3-5. 黒米色素の分解における麴菌のアミラーゼの影響

実験時の米麴の $\alpha$ -アミラーゼ活性は21.7 U/g米麴であった。黒米抽出色素液を、米麴の抽出液に含まれる $\alpha$ -アミラーゼの酵素で6時間反応させ、処理前を100%として、黒米抽出色素の麴アミラーゼによる吸光度の変化を調べた結果、6時間酵素反応後に約72%に色素残存率が落ちていたが、甘酒製造時は約40%の色素残存率と比べ30%も開きがあり、黒米色素分解は麴酵素反応だけでなく、それ以外の大きな要因が推察された。

## 4. まとめ

古代米の1つである黒米を原料とした甘酒や醸造酒、醸造酢の各製造過程で、黒米の色素(アントシアニン)は分解され、色調が悪くなり、特に甘酒製造時の分解が顕著だった。そこで色調改善のため甘酒の黒米配合比や黒米粉の利用を検討し、麴にも黒米を利用した黒米麴を用いて検討した。黒米は玄米であり炊飯が難しいため、加熱法の検討を行い、圧力鍋で2度圧力をかける蒸し加熱が麴の培養に最適と考えられた。この方法で黒米麴を作り、培養が進むと吸光度は減少した。麴培養による色素分解が顕著だが、黒米麴を利用することで、白米を用いた米麴より甘酒の色調が改善できると思われ、黒米麴で甘酒を作った結果、色調は改善し、特に黒米:黒米麴が1:1の甘酒

は顕著だったが、アルコール発酵に適した糖度まで上昇しなかった。これは黒米麴が普通の麴よりも培養しにくく、黒米中の色素などの影響で $\alpha$ -アミラーゼ活性が低くなり、糖化が不十分のためと推察され、黒米麴を用いた場合はアルコール発酵に必要な補糖についての検討が必要と考えられた。また黒米粉単独での利用は、色調改善に有効だったが、濁りや最終的なろ過等を考えると利用にやや難があり、色調や糖度の面で、黒米・黒米粉と米麴を利用した甘酒が、総合的に良いと明らかになった。甘酒製造時の顕著な色調変化から、炊飯加熱と、米麴の酵素である $\alpha$ -アミラーゼの糖化時の酵素反応の黒米色素の分解への影響に注目し、黒米精製色素を用いて検討した。その結果、加熱の色素分解への影響は少ないと考えられた。麴酵素による色素残存率は、甘酒製造時の1日培養後と比べてかなり高く、色素分解が麴酵素反応だけでなく、それ以外の大きな要因によるものと推察される。

本研究の今後の課題として、甘酒製造時の黒米色素の分解機構や、今回検討できなかった黒米酒製造時の酵母や黒米酢の製造時の酢酸菌の黒米色素に及ぼす影響や、各発酵時の環境要因など検討が必要である。さらに、黒米酢の商品化においては色素の安定性を増加させる添加物等や、品質の高さや保存性の検討が必要である。古代米の色素を生かして色鮮やかで安定した色調で、健康機能性が高い古代米酢は、イタリアの伝統酢「バルサミコ酢」に匹敵するだけの可能性を秘めた「日本の高級酢」として需要が可能と思われ、今後のさらなる検討と製品への応用が期待される。

## 5. 参考文献

- 1) 猪谷富雄:多様なイネで日本の水田を守る, 温古知新, 50, 102-110 (2013)
- 2) 岸野嘉宣:甘酒, 日本醸造協会誌, 71, 42 (1976)
- 3) 注解編集長会編:第四回改正国税庁所定分析法注解, 財団法人日本醸造協会, p.213-214 (1993)
- 4) 白兼孝雄・徳武昌一・戸辺光一郎・鈴木勝:米麴中の $\alpha$ -アミラーゼの簡便測定法, 日本醸造協会誌, 91, 889-894 (1996)