

## 紅麴菌の発芽促進のための条件検討

食品室 田村博三・照屋比呂子

### 1. はじめに

紅麴菌 (*Monascus*) は、古くから中国・台湾で、紅酒・老紅酒・紅腐乳・乾肉等広く食品に利用されており、本県においても、赤飯・紅梅卵・紅カマボコ・花イカ・お菓子の着色剤として利用されてきた。

紅麴菌 (*Monascus*) 属は、真正子囊菌類 (*Euascmycetidae*) の完全麴菌目 (*Eurotiales*) に属し、菌糸の先端に被子器を形成するが、無性生殖の場合は菌糸の側枝に分生子を連結して着生する<sup>1)</sup>。菌体は無色、橙色、紫赤色など様々である。これらの色調は、菌株の種類や培地組成など培養条件で異なる。生育初期において白色を呈するが、生育が進むにつれ橙色、赤色に変わる。菌糸はいくつかの細胞から成り細長い細胞の両端に色素沈着が現われ、熟成するにつれ増加し、全体に沈着する<sup>2)</sup>。

紅麴菌の色素には、*monascorubrin*を主体として約10種類の色素混合物として存在している<sup>3)</sup>。色素成分は、橙赤色系として *monascorubrin*, *rubropunctatin*, 赤紫色系の *monascorubramine*, *rubropunctatamine*, 黄色系 *monascin*, *ankaflavin*, などの6種類の構造式が決定されている<sup>4)</sup>。

アスペルギルス属の麴菌の胞子は、米麴の製造において、水分を吸収して膨潤し、好適な条件では1から2時間で約半数が発芽し、約40時間の培養によって出麴となる。しかし、モナスカス属の紅麴菌は、他の麴菌と異なり約7日間の培養が必要となる。このため、製造工程や操作が煩雑なため、液体培養により得た菌体を蒸米または蒸したパンフレークに接種する方法<sup>5) 6)</sup>などが考案されている。

本研究は、沖縄で古くから利用されてきた紅麴菌を、今日的な視点で再検討することにより、同麴菌の有用性をあきらかにし、同麴菌を用いた高付加価値製品の開発を図ることを目的とした「紅麴菌利用高付加価値製品の開発事業」の分担課題であり、紅麴菌の発芽促進のための検討を行った。

### 2. 実験方法

#### 2. 1 使用菌株

沖縄県工業試験場保存紅麴菌株8003株を供試した。

#### 2. 2 種菌の処理方法

##### (1) ホモジナイザー処理

スラントから菌体をかきとり、滅菌したビーカーに移し、滅菌生理食塩水5mlを加え、ヤマト科学(株)社製ウルトラディスペーサーを用い、10,000rpmで約1分間ホモジネートしたものをを用いた。

##### (2) 乳鉢処理

ホモジナイザー処理と同様に菌体をかきとり、滅菌した乳鉢に移し滅菌生理食塩水を5mlを加え、大きな菌体の塊が無くなるまで磨細したものをを用いた。

##### (3) 超音波処理

ホモジナイザー処理と同様に白金耳で菌体をかきとり、滅菌したビーカーに移し、タイテック(株)

社製超音波粉碎機を用い、20kHz・300Wで約30秒間超音波粉碎したものをを用いた。

### 2. 3 紅麴被子器の破損処理方法

スラント上の紅麴菌体を超音波処理したネクター状の菌体けん濁液を用い、これに20%NaOH、50%NaOH、25%塩酸、92%乳酸の各溶液を1:1の割合で加え、所定時間後に紅麴菌被子器の状態を顕微鏡で観察した。

### 2. 4 発芽観察用培養条件

#### (1) 培地組成

廣井ら<sup>5)</sup>の用いた培地を参考にし、以下の組成の培地を用いた。

グルコース5%、ポリペプトン1%、リン酸水素二カリウム ( $K_2HPO_4$ ) 0.1%、硫酸マグネシウム・7水和物 ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.05%、L-アスパラギン0.2%

#### (2) 培養条件

上記の培養液をアドバンティック東洋(株)製0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターを用いてろ過したものを、滅菌した試験管に5ml取り、ホモジナイザー処理した種菌を2滴加え、32°Cで静置培養した。

### 2. 5 紅麴培養ろ液添加試験

#### (1) 培地組成

上記発芽観察用培地に紅麴培養ろ液10%を添加したものをを用いた。

#### (2) 培養条件

500ml容坂口フラスコに、アドバンティック東洋(株)製0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターを用いてろ過した培地100mlを入れ、ホモジナイザー処理した種菌2滴を加え、32°C、120rpmで振とう培養した。

### 2. 6 分析方法

(1) 菌体量の測定：予め105°Cで乾燥し、重量を求めておいたアドバンティック東洋(株)製No. 2のろ紙を用いて培養液をろ過し、ろ紙上の残渣を蒸留水で洗い、105°Cで乾燥し重量を求め、ろ紙の重量を差し引いて菌体量とした。

(2) 酸度およびpH：酸度は、ろ液10mlをpH計を用いpH7.0になるまで0.1NNaOHを用いて滴定し、そのml数で表した。pHは、ガラス電極pH計で測定した。

(3) グルコース：(株)日科機製シュガーアナライザー (YSI MODEL 27) で測定した。

(4) 色素量：廣井ら<sup>5)</sup>の方法により、10mmセルを用いて500nmにおける吸光度を、日本分光(株)社製分光光度計 (Ubest V-560DS) で測定した。

(5) 色：東京電色社製カラーアナライザーを用いて測定した。

酸度、pH、グルコースの分析には、菌体量の測定で得られたろ液をそのまま用い、色素量、色の測定には、0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過した後、pHを7.0に調整したものをを用いた。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 紅麴菌胞子の発芽に関する基礎試験

#### 3. 1. 1 紅麴菌胞子の観察

紅麴菌の発芽を観察するために、まず、顕微鏡を用いて胞子の確認を行った。

ホモジナイザー、乳鉢、超音波で処理した菌体の検鏡写真を図1に示した。

超音波で処理した菌体は、バラバラに粉碎されているものの、被子器内に胞子が残っているもの

も多かった。ホモジナイザーで処理したものは、菌体の厚みが薄くなっているものの、被子器内の胞子は、ほとんど残っていた。乳鉢で処理した菌体は、菌体の厚みが厚く被子器が菌体に隠れていた。

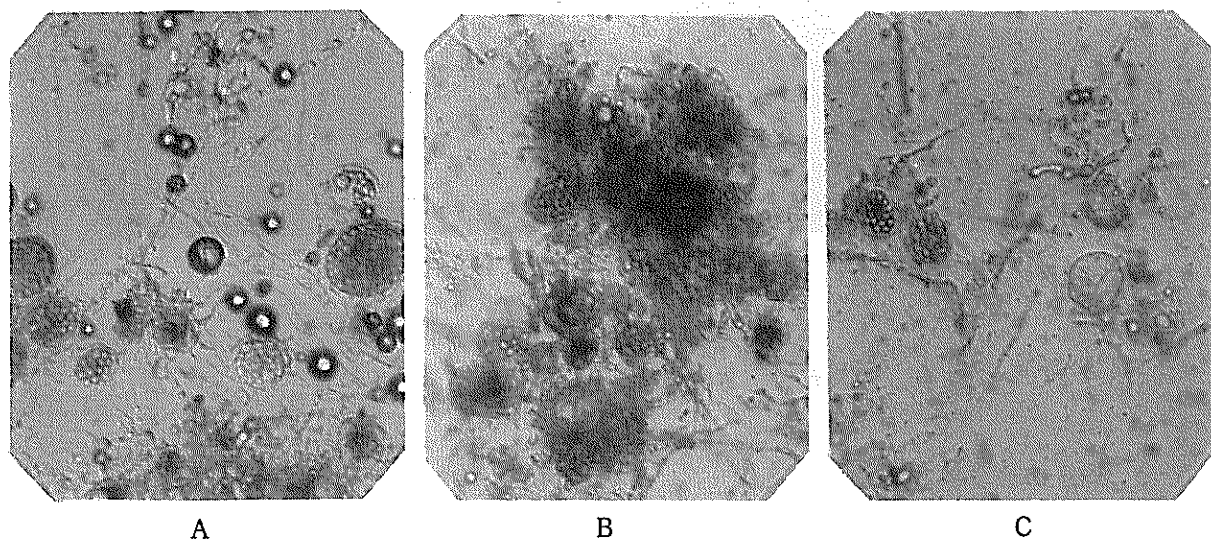


図1 各種処理条件における種菌の観察

A. ホモジナイザー処理 B. 乳鉢処理 C. 超音波処理

透過光を用いた250倍・500倍での検鏡では、胞子とそれ以外の球形の物との区別がかなり難しく、図2に示したとおり、微分干渉を用いた500倍での検鏡で、胞子であろうと推定する程度であった。

上記の胞子以外の物質は、図3のように、菌糸の切断面から胞子と同程度の大きさの球形の物質が出てくるのを確認できたため、ホモジナイザー、乳鉢、超音波等の処理により切断された部分より排出された、細胞内物質であろうと思われる。

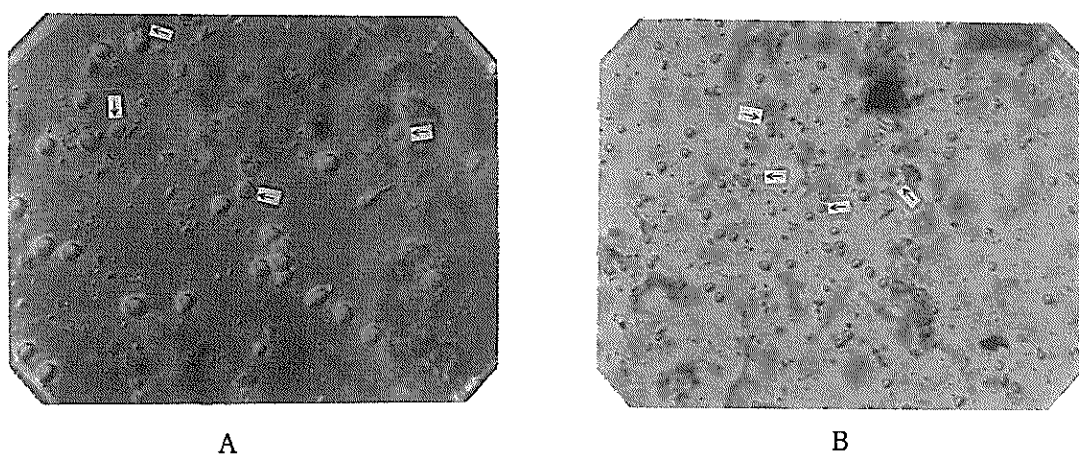


図2 紅麹菌胞子の観察

A. 500倍 B. 250倍

←が胞子

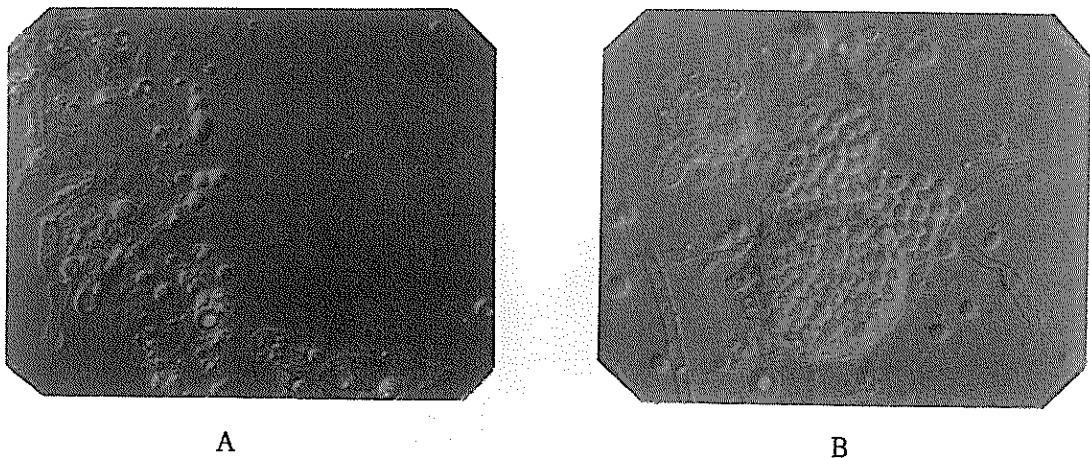


図3 細胞から出る物質の観察

A. 菌糸から出る物質 B. 被子器から出る物質

### 3. 1. 2 胞子の分散性の検討

黄麹菌や黒麹菌等は、気菌糸の一部が柄足細胞となり、ある長さまで垂直に成長して分生子柄となり、先端に胞子をつくるので<sup>7)</sup>、白金耳等で簡単に十分な量の胞子が採取できるが、紅麹菌は、マット状に菌糸を形成し、菌糸の先端に被子器をつくり、成熟すると被子器内に多数の胞子をつくる<sup>1)</sup>。

胞子の発芽条件を種々検討するには、胞子のみを高濃度に採取する必要がある。紅麹菌の子嚢胞子は菌糸よりなる被子器の中にあるため、超音波処理を行った菌体試料においても、なお破壊されない被子器が多く残存する。まず、この被子器を壊し胞子を分散・採取するため、酸・アルカリによる被子器の破損処理を試みた。

麹菌の菌糸と胞子の細胞壁構成成分はキチン質であることが知られており、キチンは濃酸、濃アルカリによってゆっくり加水分解されD-グルコサミンと酢酸を生ずる<sup>8)</sup>。この反応は、固体麹中の菌体量定量法に広く応用されており<sup>9) 10)</sup>、その方法としては酸による加熱分解処理が行われている。

紅麹菌被子器に対する塩酸、乳酸、NaOH溶液の各濃度による常温処理後の顕微鏡による観察結果を図4に示した。20%NaOH処理では、被子器が薄くなっている様子が観察されたが、乳酸、塩酸処理ではいずれも被子器菌糸が鮮明に残存した。キチン質の分解は加熱により促進されることは知られているが、胞子の発芽に影響のない被子器の破損方法について、酸・アルカリの交互処理やあるいは物理的処理の併用、糸状菌細胞膜溶解酵素による処理など多くの検討が必要である。また、さらに加えて、胞子を多数形成させるための培地、及び培養条件の検討が不可欠と考えられる。

### 3. 1. 3 胞子の発芽

スラントから菌体を取り出し、ホモジナイザーで、10,000rpm、60秒処理した後、500、1,000rpm、5分間遠心分離を行い、その上澄みと、沈澱物を検鏡した。

上澄みには胞子が無く、沈澱物に菌体と寒天片とが一緒に存在し、遠心分離での胞子の入手は出来なかった。低速での遠心分離では、ローターの停止後沈澱物が舞い上がり、分離が不可能であった。

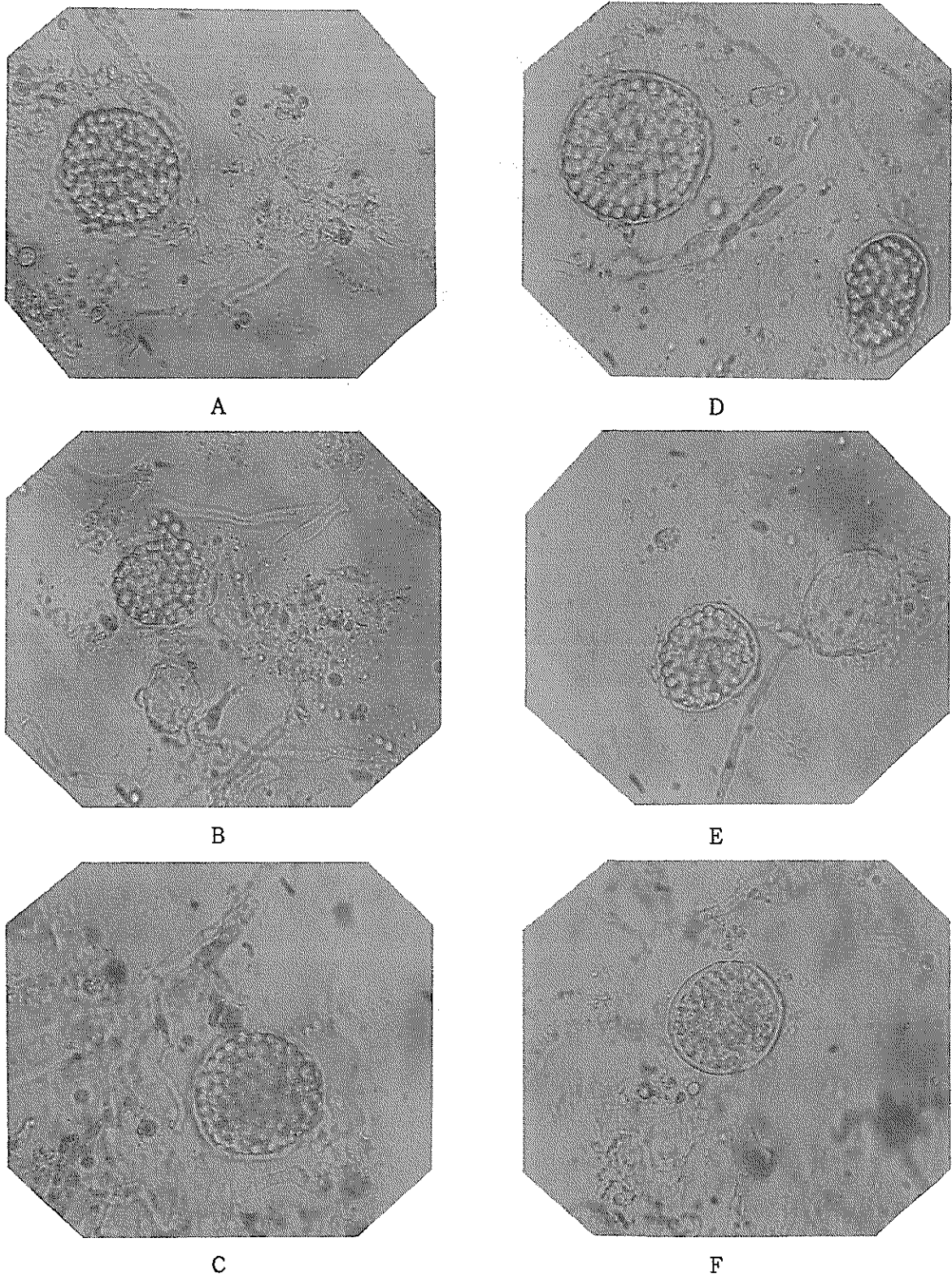


図4 各種処理条件における紅麹菌被子器の観察

- A. 20% NaOH 処理, 30分
- B. 20% NaOH 処理, 3時間
- C. 50% NaOH 処理, 2時間
- D. 92% 乳酸 処理, 30分
- E. 92% 乳酸 処理, 3時間
- F. 25% 乳酸 処理, 2時間



次に、ガラスフィルター（G3）を用いてろ過を行った。ろ液には、孢子、寒天、細断された菌糸片が存在したが、発芽試験を行うための十分な孢子を得ることが出来なかった。

その他、アドバンティック東洋製ろ紙No. 2、No. 5Cを用いてろ過を行ったが、前記と同様十分な孢子が得られなかった。

以上のことから、孢子のみを用いた発芽試験を断念し、菌糸、被子器、孢子の混在した試料を用い、孢子の発芽を検鏡した。図5に孢子の発芽の様子を示した。

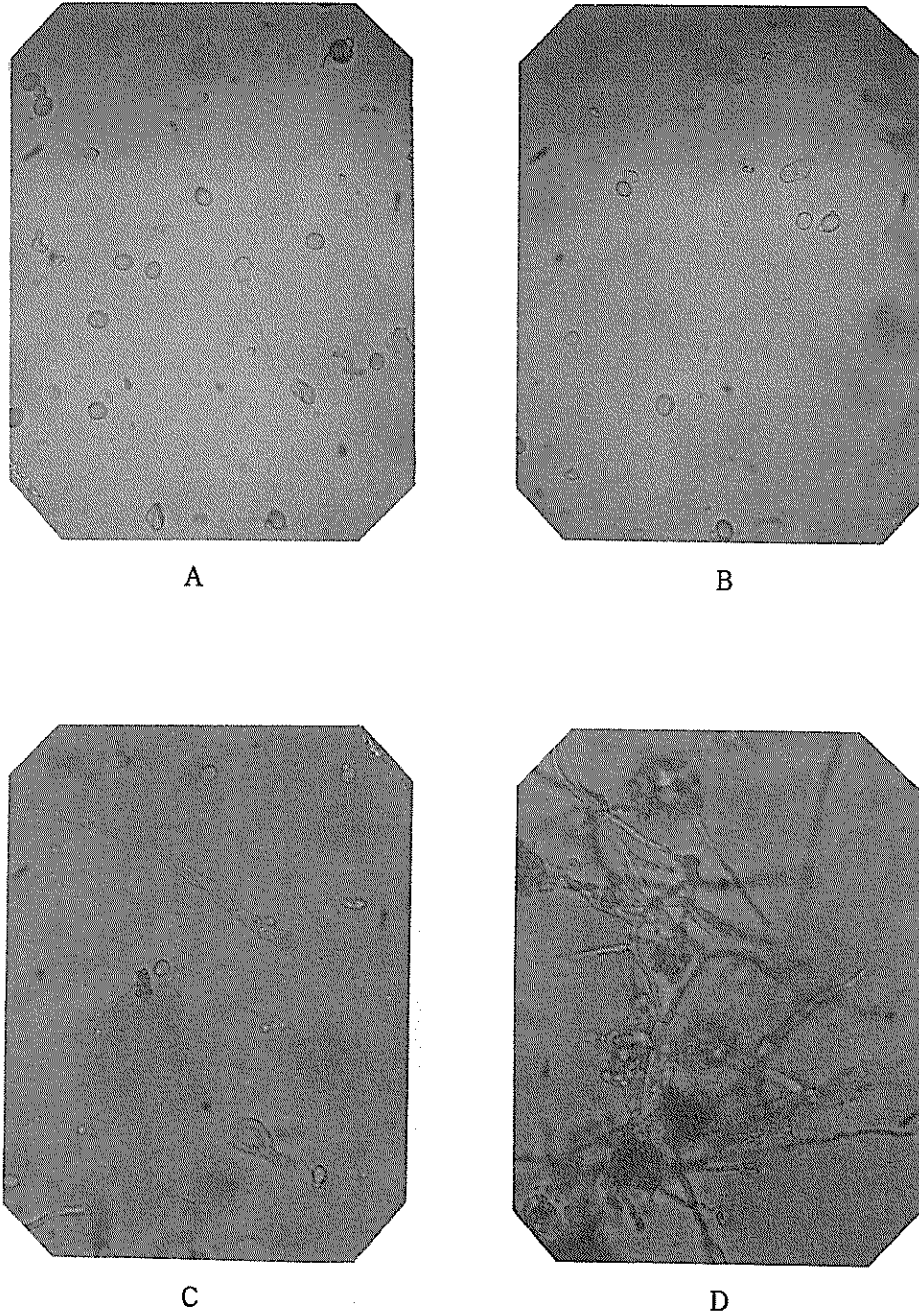


図5 紅麴孢子の発芽の観察

- A. 培養24時間      B. 培養27時間  
C. 培養36時間      D. 培養42時間

胞子の発芽は、20時間前後から始まり観察終了の42時間まで観察できたが、まだ発芽していない胞子も存在した。

胞子は、楕円形のものが多く円形のものも見られた。円形の胞子は、楕円形のものより大きいため、芽胞子であると思われる。Monascus ankaの子嚢胞子は楕円形で2~3 $\mu\text{m}$ 、芽胞子は球形で5~12 $\mu\text{m}$ あるため<sup>11)</sup>、供試した菌株は、Monascus ankaであると思われる。

前述のように、紅麴菌の胞子をはっきりと特定できないことや、被子器や菌糸も混在しているので、発芽した胞子の菌糸が、死滅した菌糸と絡み合うと区別がつかないため、発芽率などのデータは取れなかった。

### 3. 2 紅麴菌培養ろ液添加による菌体及び色素の生成経過

廣井<sup>12)</sup> は、紅麴菌が産生する色素の一種、モナスコルブリンを結晶単離し、この色素を無機物とエタノールを加えた培地に微量加えて振盪培養すると、グルコースや、シュクロースを10%添加した培地よりも生育がよくなり、色素を多く生産すると報告し、さらにこの色素が紅麴菌の排泄物ではなく、一種のホルモンの働きをもっていることを意味していると述べている。そこで、紅麴菌の培養ろ液を添加することによる、色素及び菌体量の生成を検討した。

10%の紅麴菌培養ろ液を添加して培養したもの、添加せずに培養したものを、添加区、無添加区とする。

表1に菌体量及び培養ろ液の分析結果を、表2に培養液の色の経時的变化を示した。

添加区は、48時間頃から菌体の増殖が始まり、96時間頃に最大となったが、無添加区では、72時間頃から増殖が始まり、120時間頃に添加区と同程度の菌体量となった。

pH、酸度は、添加区、無添加区とも菌体の増殖にともなう有機酸の生産により、pHが下がり、酸度が増加したが、添加区は、炭素源としてのグルコースが無くなる96時間頃から有機酸を炭素源として資化しているため、120時間の培養液では、96時間の培養液よりpHが高くなり、酸度が低下した。モナスコルブリン量は、菌体の増殖とともに増加しているが、添加区でグルコースが無くなると、それ以上増加しなかった。モナスコルブリンの生産速度は、添加区が無添加区より早く生産するが、生産量は、無添加区が多く生産した。

表1 菌体量及び培養ろ液の分析結果

培地	生育時間 (hr)	菌体量 (g)	pH	酸度 (m $\ell$ )	グルコース量 (g)	モナスコルブリン (%/m $\ell$ $\times 10^{-3}$ )
無添加区	0	0	7.1	0	4.34	0
	48	0.01	7.0	0	4.30	0.01
	72	0.12	6.4	0.33	3.79	0.41
	96	0.61	5.1	1.00	2.76	5.13
	120	1.12	4.5	1.81	0.77	5.99
10% 添加区	0	0	6.9	0.15	4.31	0.65
	48	0.10	6.5	0.55	3.78	0.65
	72	0.72	4.9	1.23	2.26	3.24
	96	1.21	4.5	2.46	0.11	4.73
	120	1.15	5.0	1.33	0.09	4.46

表2 培養液の色の経時的变化

項目	培養時間	L値	a値	b値	ΔL	Δa	Δb	ΔE
無添加区	0	97.86	- 0.49	1.50				
	48	99.37	- 0.39	1.70	1.51	0.10	0.20	1.53
		99.62	- 0.18	1.84	1.76	0.31	0.35	1.82
	72	95.89	4.63	4.59	- 1.96	5.12	3.09	6.29
		98.68	0.81	2.60	0.83	1.30	1.11	1.90
	96	69.55	40.66	23.67	- 28.30	41.15	22.17	54.65
		67.76	42.62	25.67	- 30.10	43.11	24.17	57.87
	120	62.82	40.40	32.67	- 35.04	40.89	31.17	62.22
		63.35	39.27	32.94	- 34.50	39.76	31.44	61.32
	10% 添加区	0	93.75	5.32	10.40	- 4.10	5.81	8.90
48		93.98	3.22	10.88	- 3.87	3.71	9.38	10.81
		95.10	3.28	11.43	- 2.76	3.77	9.93	10.98
72		76.74	27.86	25.01	- 21.12	28.35	23.51	42.45
		76.31	28.80	24.53	- 21.55	29.29	23.04	43.05
96		69.82	30.67	33.14	- 28.04	31.16	31.65	52.52
		67.44	32.79	32.77	- 30.42	33.28	31.27	54.87
120		71.44	29.79	34.05	- 26.42	30.28	32.56	51.72
		71.74	31.02	34.00	- 26.12	31.51	32.50	52.26

\* L・a・b値は、蒸留水を基準にしたときの値である。

\*\* ΔL・Δa・Δb・ΔE値は、無添加区0時間を基準にしたときの値である。

培養液の色は、無添加区で72時間から96時間の間で、添加区では48時間から72時間の間で、Δa Δbが急激に増加している。これは、菌体量の増加と一致しているが、モノスコルブリン量と同様無添加区でのΔaが添加区の値より大きく、より多くのモノスコルブリンを生産していることがうかがえる。

紅麴菌培養液の添加による効果は、菌体の生育速度及び色素の生産速度には大きな影響を与えるが、モノスコルブリンの生産には効果は無いように思われる。

#### 4. まとめ

紅麴菌の発芽促進のための検討をし、次の結果を得た。

(1) ホモジナイザー、乳鉢、超音波で菌体を処理したが、被子器内に胞子が残った。微分干渉を用いた検鏡で、胞子であろうと推定する程度であった。

菌糸の切断面と球形の被子器から大きさが胞子と同程度の球形の物質が出ているのを確認できたため、液胞等の細胞内物質であろうと思われる。

(2) 被子器を壊し胞子を分散・採取するため、酸・アルカリによる被子器の破損処理を試みた結果、20%NaOH処理では、被子器が薄くなっている様子が観察されたが、乳酸、塩酸処理ではいずれも被子器菌糸が鮮明に残存した。

(3) 胞子の発芽は、20時間前後から始まり観察終了の42時間まで観察できたが、まだ発芽していない胞子も存在した。胞子は、楕円形のものが多く円形のものも見られた。



- (4) 紅麴菌の培養ろ液を添加することによる、菌体および色素の生成を検討した結果、紅麴菌培養ろ液の添加による効果は、菌体及び色素の生育速度には大きな影響を与えるが、モノスコルブリンの生産量には効果は無いように思われた。

## 5. 参考文献

- 1) 相田浩、高尾彰一、板倉辰六郎、斎藤日向、高橋甫、1988：新版応用微生物学 I、50、朝倉書店
- 2) 村上英也、1986：麴学、475、日本醸造協会
- 3) 谷村顕雄、片山脩、遠藤英美、黒川和男、吉積智司、1979：天然着色料ハンドブック、445、光琳
- 4) 蘇遠志、1979：発酵と工業、37 No. 2、103
- 5) 廣井忠夫、高橋剛、嶋悌司、鈴木恒夫、月岡本、小笠原長宏、1981：日本農芸化学会誌、55 No. 1、1
- 6) 谷村顕雄、片山脩、遠藤英美、黒川和男、吉積智司、1979：天然着色料ハンドブック、447、光琳
- 7) 村上英也、1986：麴学、50、日本醸造協会
- 8) 化学大事典編集委員会、1979：化学大事典 2、P. 746、共立出版
- 9) 小崎道雄、北原覚雄：日食工誌、21、38(1974)
- 10) 大内弘造、岡崎直人、菅間誠之助、野白喜久雄、1967：醸協、62、1029
- 11) 蘇遠志、1979：発酵と工業、37 No. 2、111
- 12) 廣井忠夫、1978：食品化学新聞、1月12日号

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。