

平成 30 年 2 月 2 日





崇城大学大学院
工学研究科委員会
研究科長 山 川 烈 殿

論文審査委員

主査 寺 本 祐 司



論文審査結果の報告 (甲)

論文提出者	山 本 佳 子 (1518D01)
論文題名	<i>Enterobacter aerogenes</i> NBRC13534 による 黒米アントシアニンの色質変化に関する研究
審査委員	主査 教授 寺 本 祐 司  副査 教授 安 藤 祥 司  副査 教授 山 田 耕 路  副査 教授 三 枝 敬 明 

論文審査結果の要旨

アントシアニンは古くから食品に使用されている植物由来の天然色素である。近年では生体調節機能の報告も多数あり、年々需要が高まる一方で、アントシアニンの環境に対する不安定な性質のために用途が限られるのも事実である。また、アントシアニンを含む植物の栽培と色素の精製にも多くの時間と労力を要している。そのため今後は、機能性や色調などの需要に応じたアントシアニンを効率的に供給させることが必要であると考えられる。

そこで、短時間に必要なアントシアニンを合成する技術を確認することを目的に、微生物酵素を利用したアントシアニンの構造修飾について研究を進めた。

1. 黒米アントシアニンの色質を変化させる微生物のスクリーニング

黒米抽出液と 4 種の有機酸（カフェー酸、フェルラ酸、p-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸）を添加した PDA 培地を使用し、土壌からのスクリーニングを行った。スクリーニングした微生物を同定した結果、*E. aerogenes* NBRC13534 と高い相同性が確認された。また、*E. aerogenes* NBRC13534 も黒米アントシアニンの色質を同様に変化させ、変化した色素のピークは黒米アントシアニンの極大吸収値である 520 nm から 500 nm シフトしていた。変色した培地の色素を HPLC で分離した結果、黒米アントシアニンには見られない新規な 4

つのピークが確認された。さらに、その4つのピークを分取し、連続吸光度を測定したところ、4つのピークの内2つのピークは500 nmにおいて極大吸収値を示した。

つぎに500 nmに極大吸収値を持つ2つのピークを酸加水分解し、アントシアニンの基本骨格であるアントシアニジンをHPLCで比較した。その結果、黒米アントシアニンの主な色素であるシアニジンとは保持時間が異なっていた。また、マルビジン、ペオニジンの保持時間とも異なった。このため、新たに確認されたピークは、シアニジン、マルビジン、ペオニジン以外を基本骨格とする色素である可能性が示唆された。

2. 黒米アントシアニンの色質に及ぼす *E. aerogenes* NBRC13534 培養液の影響

黒米抽出液に上記4種有機酸を各々添加し、*E. aerogenes* NBRC13534 培養液と混合し、37°Cで2日間培養した。培養後、培養液の連続吸光度を測定した結果、4種の有機酸の内、カフェー酸とフェルラ酸が黒米アントシアニンの色質を変化させることを確認した。また、培養液の反応0日目、1日目、2日目の極大吸収値を各々調べたところ、カフェー酸は1日ごとに520 nmから500 nmに10 nmずつにシフトし、フェルラ酸は1日目で520 nmから510 nmにシフトすることが確認された。

さらに *E. aerogenes* NBRC13534 培養液を透析し、透析膜内の培養液と黒米アントシアニンを混合したところ、黒米アントシアニンの極大吸収値が520 nmから510 nmにシフトした。

これらのことから、黒米アントシアニンを変化させる物質は分子量10,000以上の物質で、*E. aerogenes* NBRC13534の菌体遊離型の酵素である可能性が示唆された。

3. 黒米アントシアニンの色質変化に及ぼす種々の有機酸の影響

黒米抽出液100 ml、各種有機酸（カフェー酸、フェルラ酸、p-クマル酸、シナピン酸、ピロカテコール）各々0.01 gを含むNBRC No. 802培地（*E. aerogenes* NBRC13534の最適液体培地）を調製した。各培地は5分間湯せんをした後、十分に冷まし、*E. aerogenes* NBRC13534を植菌した。37°C、2日間で振とう培養し、極大吸収値を測定した。

E. aerogenes NBRC13534を植菌していない培地の極大吸収値は、全て黒米アントシアニンと同じ520 nmを示した。一方、*E. aerogenes* NBRC13534を植菌して培養した培地では、p-クマル酸添加培地で500 nm、カフェー酸、フェルラ酸添加培地は510 nmにおいて極大吸収値を示した。また、有機酸無添加、シナピン酸および、ピロカテコールを添加した培地は黒米アントシアニンと同じ520 nmの極大吸収値を示した。

p-クマル酸、カフェー酸、およびフェルラ酸は構造が類似しており、このことから、黒米アントシアニンの色質変化は有機酸の構造に関係することが示唆された。

最終試験結果の要旨

論文審査は、主査と3名の副査によって行なわれた。論文公聴会は平成30年2月2日に約60分間応用微生物工学科H号館4階ゼミナール室で開催された。論文に基づく内容の説明がパワーポイントを用いた口頭発表形式で30分行われた。質問および討論がその後、30分間行なわれた。最終試験は、論文公聴会に引き続いて開催された。その結果は応用微生物工学科の内規を満足するものであった。専攻内会議にかけた結果、最終試験に合格したものと認めた。