

博士論文

Enterobacter aerogenes NBRC13534 による
黒米アントシアニンの色質変化に関する研究

平成 29 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

1518D01

山本 佳子

目次

緒論.....	1
第1章 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.....	4
第1節 緒言.....	4
第2節 実験材料と方法.....	4
1-2-1 黒米由来アントシアニンの抽出液の調製.....	4
1-2-2 黒米アントシアニンと有機酸を含む PDA 培地の調製.....	4
1-2-3 微生物のスクリーニング.....	4
1-2-4 微生物の培養.....	4
1-2-5 色質変化した色素の連続吸光度測定.....	5
1-2-6 色質変化した色素の分離と分取.....	5
1-2-7 分離色素のアントシアニン分析.....	5
第3節 結果と考察.....	6
1-3-1 黒米アントシアニンを色質変化させた微生物.....	6
1-3-2 色質変化した色素の連続吸光度測定.....	6
1-3-3 色質変化した色素の分離と分取.....	6
1-3-4 アントシアニン分析.....	6
第2章 <i>E. aerogenes</i> NBRC13534 の固体培養における黒米アントシ	
アニンの色質変化.....	14
第1節 緒言.....	14
第2節 実験材料と方法.....	14
2-2-1 黒米アントシアニンと有機酸を含む PDA 固体培地の調製.....	14
2-2-2 連続吸光度測定.....	15
2-2-3 各種有機酸を各々含む培地の調製.....	15
2-2-4 色質変化した色素の連続吸光度測定.....	15
2-2-5 色質変化した色素の分離.....	16
第3節 結果と考察.....	16
2-3-1 <i>E. aerogenes</i> NBRC13534 固体培養での黒米アントシアニンの色質変化	
.....	16

2-3-2 黒米アントシアニンの色質変化における有機酸の影響	16
第3章 <i>E. aerogenes</i> NBRC13534 の液体培養における黒米アントシ	
アニンの色質変化.....	23
第1節 緒言	23
第2節 実験材料と方法	23
3-2-1 <i>E. aerogenes</i> NBRC13534 の最適培地による液体培養	23
3-2-2 培養液の濾過	23
3-2-3 培養液と黒米アントシアニン抽出液との混合試験	23
3-2-4 色質変化に及ぼす有機酸の影響	24
3-2-5 連続吸光度測定	24
第3節 結果と考察	25
3-2-1 <i>E. aerogenes</i> NBRC13534 培養液における黒米アントシアニンの色質変化	25
第4章 黒米アントシアニンの色質変化に関わる有機酸の検討	30
第1節 緒言	30
第2節 実験材料と方法	30
4-2-1 黒米アントシアニン抽出液の調製	30
4-2-2 各種有機酸含有培地での <i>E. aerogenes</i> NBRC13534 の液体培養	30
4-2-3 連続吸光度測定	31
4-2-4 色素の分離	31
4-2-5 連続吸光度測定	31
第3節 結果と考察	32
4-3-1 黒米アントシアニンの色質変化における有機酸の影響	32
4-3-2 色質変化した色素の色素分析	32
第5章 <i>E. aerogenes</i> NBRC13534 の固体培養における菌体の色質変化	
.....	52
第1節 緒言	52
第2節 実験材料と方法	52
5-2-1 黒米アントシアニン抽出液の調製	52
5-2-2 メンブレンフィルターを用いた <i>E. aerogenes</i> NBRC13534 の培養	52

5-2-3	菌体と培地の連続吸光度測定	54
5-2-4	メンブレンフィルターを使用した酵母の培養	54
5-2-5	菌体の色質分析	55
5-2-6	菌体と培地の連続吸光度測定	56
第3節	結果と考察	56
5-3-1	菌体内黒米アントシアニンと、菌体外黒米アントシアニンの色質変化	56
第6章 <i>E. aerogenes</i> NBRC13534 の培地の違いによる菌体と黒米アントシアニンの色質変化 63		
第1節	緒言	63
第2節	実験材料と方法	63
6-2-1	黒米アントシアニン抽出液の調製	63
6-2-2	黒米抽出液と有機酸を添加した培地の調製	63
6-2-3	連続吸光度測定	64
6-2-4	pH 測定.....	64
第3節	結果と考察	64
6-3-1	培地の違いによる黒米アントシアニンの色質変化	64
総括	67
参考文献	73
本研究に関係ある報告文	75
謝辞	76

緒論

アントシアニンとは花や果実における赤、青及び紫などの様々な色調を有している植物天然色素である。更にアントシアニンは各種の条件によって構造変化を受け、退色や変色しやすい性質を持つ。色調の変化に与える因子として、pH、温度、酸素、糖がある。このように、わずかな環境因子や共存成分が花色の色調に微妙な変化をもたらし、植物の多彩な色が生じると考えられる。アントシアニンはアントシアニンとアントシアニンの総称であり、結合糖が外れたアグリコンをアントシアニン (anthocyanidin)、その配糖体をアントシアニン (anthocyanin) と呼ぶ。通常見られるアントシアニンにはシアニン、デルフィニン、マルビジン、ペラルゴニン、ペチュニン、ペオニンの 6 種類が存在する¹⁾。アントシアニンは紫外線の増加により、アントシアニン生合成酵素の遺伝子群の発現が促進されることが知られている。そのため、植物内のアントシアニンは天候によって生産量が左右される。

アントシアニンと結合している糖は通常 β -グルコシド結合であり、グルコース、ガラクトース、ラムノースが結合している場合が多い。*p*-クマル酸等の有機酸(芳香族有機酸や脂肪族有機酸)がエステル結合したアントシアニンはアシル化アントシアニンと呼ばれ、安定性が高くなる。反対にアントシアニンのみでは安定性が低く、速やかに分解され退色してしまう。アントシアニンへの結合有機酸は、芳香族有機酸と脂肪族有機酸の 2 種に大別でき、前者の中では *p*-クマル酸、カフェー酸及びフェルラ酸が最も一般的な結合有機酸である。後者ではマロン酸や酢酸が最も一般的であるが、まれにリンゴ酸やコハク酸等も報告されている。

食品におけるアントシアニンの着色料としての有用性は、食品原料の色調の変動を補い食品の色調を一定にすること、食品の加工工程や保存中の変色や退色を補い色調を整えること、食品に彩りを添え美味しさや楽しさを演出すること、及び多様化する新しい加工食品を生み出す重要な因子であることがあげられる。近年様々な加工食品が市場に流通するようになり、食品そのものの色や包装の色彩は、その食品の指向性や消費者の購買意欲を決定する要素とますます重要となっている。しかし、アントシアニンは植物天然色素であるために植物の栽培ならびに抽出という工程が不可欠である。一般的に天然色素は、植物などの天然物(生または乾燥品)を洗浄や異物除去などの前処理を行った上で、水やアルコールなどの溶媒を使用して抽出し、得られた抽出液を精製・凝縮して製造される。また、天然色素の殆どの場合、精製によって品質が向上する場合が多く、同じ色素でもその用途、価値に応じた精製工程を導入してい

るのが現状である。色素中には原料由来の香気成分、呈味成分及びタンパク質などが含まれているため、食品に着色した場合に異味・異臭や白濁・沈殿等の原因となることがある。これらの色素以外の不要な成分を取り除く意味で、精製は重要な工程である。生成の方法としては、極性を持ったイオン交換樹脂や無極性の吸着樹脂、あるいはメンブレンフィルター膜、限外濾過膜、逆浸透膜および電気浸透膜などの機能性高分子膜による生成などさまざまな方法があり、目的に応じて組み合わせて使用されている²⁾。

このようにアントシアニンは食用に使用されている植物由来の天然色素であり、近年では生体調製機能の発見³⁾もあり、年々需要が高まる一方で、アントシアニンを含む植物の栽培と精製も必要である⁴⁾。以上のことからアントシアニンの色調をより安定して利用できる優れた技術の開発や原料植物の改良、製法改良によるコストダウンなどが必要であると考えられている^{5,6,7)}。

そこで、本研究室では短時間に必要なアントシアニンをつくる技術を確立する事を目的に、微生物を利用したアントシアニンの変化について研究を進めている⁸⁾。これまでに微生物によるアントシアニンの構造修飾の報告はあまりされていない。しかし、植物色素であるアントシアニンを微生物で構造修飾することができれば、天候などで不作であった植物とは別の植物から短時間で目的のアントシアニンを作ることができると推察した。

本報では、比較的簡単な構造を持つシアニジン-3-グルコシドを多く含む黒米¹²⁾と、土壌中または人の腸管内に存在する *Enterobacter aerogenes* を利用し、アントシアニンの色質変化についての研究を行った。研究に使用した黒米は日常的に食している米のルーツである古代米（有色米）の一種である。古代米は大きく黒米、赤米、緑米の三種類に分類されている。中でも黒米にはアントシアニンが豊富に含まれており、肝機能の改善や視力回復効果があると言われている^{10,11)}。研究に使用した *E. aerogenes* は通性嫌気性微生物であり、また発酵により水素ガスを発生させるため、環境調和型の次世代エネルギーの生産微生物として注目されている¹²⁾。*E. aerogenes* は複数種類の腸内細菌とカテキン類であるエピガロカテキンガレードを分解するということが報告されている¹³⁾。また、アントシアニンは、腸内微生物によってグルコシド結合の切断及びアントシアニジン複素環の分解が行われているという報告がなされている^{14,15,16)}。以上のことから、*E. aerogenes* によりアントシアニンが分解され、分解されたアントシアニンに新たな有機酸や糖が結合することにより、アントシアニンの変化が起こることが推察された。そこで本研究では、主に *E. aerogenes* NBRC13534 による有機酸を添加した黒米抽出液の色質変化を調査した。

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) 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
- 2) *E. aerogenes* NBRC13534 の固体培養における黒米アントシアニンの色質変化
- 3) *E. aerogenes* NBRC13534 の液体培養における黒米アントシアニンの色質変化
- 4) 黒米アントシアニンの色質変化に関わる有機酸の検討
- 5) *E. aerogenes* NBRC13534 の固体培養における菌体の色質変化
- 6) *E. aerogenes* NBRC13534 の培地の変化による菌体と黒米アントシアニンの色質変化

第1章 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

第1節 緒言

本章では黒米から抽出したアントシアニンと有機酸（カフェー酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸）を含む固体培地を調製し、黒米アントシアニンの色調を変化させる微生物のスクリーニングを行った。

第2節 実験材料と方法

1-2-1 黒米由来アントシアニンの抽出液の調製

黒米（紫雲）を株式会社かじわら米穀（京都）から購入した。酢酸はナカライテスク株式会社（京都）から購入した。黒米をミキサー（ミル&ミキサーTML15、TESCOM、東京）で粉碎し、茶漉し（120メッシュ）を用いて糠部分を回収した。この黒米糠 10.0 g に対して 10%（V/V）酢酸溶液を 200 mL 加え、15°Cの暗所で1晩静置した。この溶液をガーゼでろ過後、遠心分離（3000 rpm、10分、4°C）を行った。上澄み液を No. 2 と No. 5C のろ紙（ADVANTEC、東京）を用いて吸引ろ過を行った。

1-2-2 黒米アントシアニンと有機酸を含む PDA 培地の調製

PDA（ポテトデキストロース寒天）は日水製薬株式会社（東京）から購入した。カフェー酸、マロン酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸はナカライテスク株式会社（京都）から購入した。アントシアニン抽出液 100 ml に、PDA 3.9 g、カフェー酸 0.01 g、マロン酸 0.01 g、フェルラ酸 0.01 g、*p*-ヒドロキシ安息香酸 0.01 g を添加した。これを有機酸添加培地とした。また、有機酸を添加しない PDA 培地の調製も行った。これを有機酸無添加培地とした。各培地を 5 分間沸騰水中にて湯せんし、クリーンベンチ内でシャーレに分注した。

1-2-3 微生物のスクリーニング

バケツ内に崇城大学校内の土壌を採取し、その中にナスの皮を埋めて（約 10 cm）数日放置した。ナスの皮に付着した土を滅菌水に懸濁し、この懸濁液を有機酸添加培地に 0.1 ml 散布し、30°Cで7日間培養を行った。黒米アントシアニンの色質が変化している部分から微生物の単離を行った。

1-2-4 微生物の培養

黒米アントシアニンの色質を変化させた微生物は、有機酸添加培地と、有機

酸無添加培地に白金耳を用いてクリーンベンチ内で植菌した。

1-2-5 色質変化した色素の連続吸光度測定

黒米アントシアニンの色質が変化した培地を分取し、試験管内で攪拌棒を用いて砕き、15% (v/v) 酢酸を混合し、1晩 15°Cで色素を抽出した。その後 No. 5C のろ紙を用いて吸引ろ過を行い、メンブレンフィルター (DISMIC-13HP PTFE 0.2 μm 、ADVANTEC、東京) でろ過した後、15% (v/v) 酢酸と当量で混合し、サンプルとした。このサンプルを分光光度計 (U-3010、株式会社日立ハイテクサイエンス、東京) により測定した。

1-2-6 色質変化した色素の分離と分取

リン酸と酢酸とアセトニトリルはナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。アントシアニンは、CTO-10AC カラムオープンおよび SPD-10AV UV-VIS 検出器を備えた高速液体クロマトグラフ (HPLC) (Shimadzu、京都) を用いて分析した。分析用カラムは Inertsil ODS-3 (4.6 mm I. D. \times 250 mm、ジーエルサイエンス株式会社、東京) を使用した。溶媒は、A (H_3PO_4 : H_2O = 15 : 985 v/v) および B (H_3PO_4 : CH_3COOH : CH_3CN : H_2O = 27.5 : 210 : 197 : 535 v/v/v/v) を使用した。アントシアニン分析は、以下の勾配条件で行った：流速 0.5 ml/min で溶媒 B (35 % \rightarrow 100 分 \rightarrow 55 %)。サンプル注入量は 20 μl であった。分取用カラムは COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Packed Column (10 mm I.D. \times 250 mm、ナカライテスク株式会社、京都) を使用した。溶媒は、A (H_3PO_4 : H_2O = 15 : 985 v/v) および B (H_3PO_4 : CH_3COOH : CH_3CN : H_2O = 27.5 : 210 : 197 : 535 v/v/v/v) を使用した。アントシアニン分析は、以下の勾配条件で行った：流速 0.5 ml/min で溶液 B (35 % \rightarrow 100 分 \rightarrow 55 %)。サンプル注入量は 5.0 ml であった。温度は 37°C とした。1-2-5 のサンプルを溶媒 A、B の混合液 (A : B = 65 : 35 v/v) と等量で混合し、メンブレンフィルターでろ過し、HPLC にて分離した。また、黒米アントシアニンを混合した有機酸添加 PDA 培地において微生物を生育させた培地において、微生物を生育させていない培地には確認されなかった 4 つのピークを分取用カラムで分取した。分取したピークは分光光度計を用いて連続吸光度を測定した。

1-2-7 分離色素のアントシアニン分析

塩酸とイソアミルアルコールはナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。HPLC で分取したピークの内、500 nm に極大吸収値を持つ 2 つのピーク 3.0 ml と 4 N 塩酸 3.0 ml を混合し、40 分沸騰水中にて加水分解を行った。室温にて放冷後、イソアミルアルコールを 2.0 mL 加えて攪拌した。数分後、上層を分取し、エバポレーターを用いて濃縮し、メタノールで溶解した。更に、溶媒 A、B

の混合液 (A : B = 65 : 35 v/v) と等量で混合し、メンブレンフィルターでろ過し、HPLC にて分析した。比較として、標準物質であるシアニジン、マルビジン、ペオニジンを 15% (v/v) 酢酸に溶解し、溶媒 A、B の混合液 (A : B = 65 : 35 v/v) と等量で混合し、メンブレンフィルターでろ過し、HPLC にて分析した。

第 3 節 結果と考察

1-3-1 黒米アントシアニンを色質変化させた微生物

培地の色質変化が見られた部分から微生物を単離し、有機酸培地に各々植菌したところ、培地の色が赤から濃赤色へと変化した (図 1-1)。また、有機酸添加培地で色質が変化している (図 1-2) ことから、新たな色素が作られた可能性が示唆された。

更に分離した微生物を株式会社テクノスルガ・ラボ (静岡県) に委託し同定を行った。結果、16s rDNA 塩基配列を用いた相同性検索の結果、*Enterobacter aerogenes* RW9516 株、同じく RW7M1 株の相同率が 99.8% と高い相同性を示した。また、この菌株は NBRC 番号 13534 と最も高い相同性が確認された。

1-3-2 色質変化した色素の連続吸光度測定

有機酸添加培地に微生物を培養することで 220 nm と 320 nm のピークがなくなっていた。また、有機酸無添加培地に微生物を植菌することで 220 nm と 280 nm のピークがなくなっていた (図 1-4-1)。そして、有機酸添加培地に分離した菌を植菌すると、黒米アントシアニンの極大吸収値が 520 nm から 500 nm の短波長へとシフトしていた (図 1-4-2)。このことから微生物が有機酸を利用して培地中の色素を色質変化させている可能性が確認された。

1-3-3 色質変化した色素の分離と分取

有機酸添加培地で微生物を培養し、色素の抽出をおこない、HPLC で分離した結果、微生物を培養していない場合と比較して微生物培養した培地から、4 つの新しいピーク (ピーク 1~4) が検出された (図 1-5)。さらに、分取カラムにて 1~4 のピークを分取し (図 1-6)、分光光度計を用いて測定し、結果、2 と 3 は 520 nm の極大吸収を示したのに対し 1 と 4 は 500 nm の極大吸収を示した (図 1-7)。この 2 種のピークが新規に生産された色素である可能性が考えられた。

1-3-4 アントシアニン分析

1-3-3 で 500 nm の極大吸収を示した 1 と 4 のピークは、500 nm 付近にピークを示したので、アントシアニンであることを想定してアグリコンの分析をした。標準物質としてシアニジン、マルビジン、ペオニジンの保持時間を HPLC にて

比較した。1と4のピークは3種の標準物質のどの保持時間とも重ならないため、シアニジン、マルビジン、ペオニジン以外のアントシアニンである可能性が確認された（図1-8）。

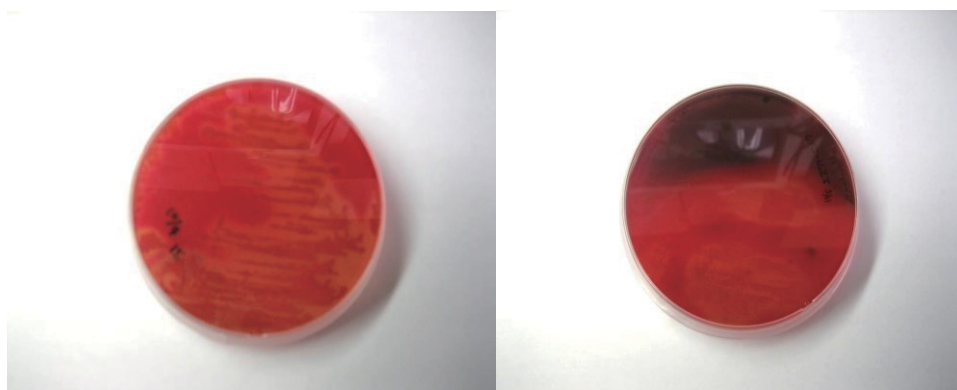


図1-1 微生物による黒米アントシアニンの色質変化

左：微生物による黒米アントシアニンの色質変化のない培地
右：微生物による黒米アントシアニンの色質変化のある培地



図1-2 有機酸無添加培地と有機酸添加培地の比較

上段：有機酸添加培地

下段：有機酸無添加培地

左：微生物無

右：微生物有

有機酸（カフェー酸、フェルラ酸、マロン酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸）

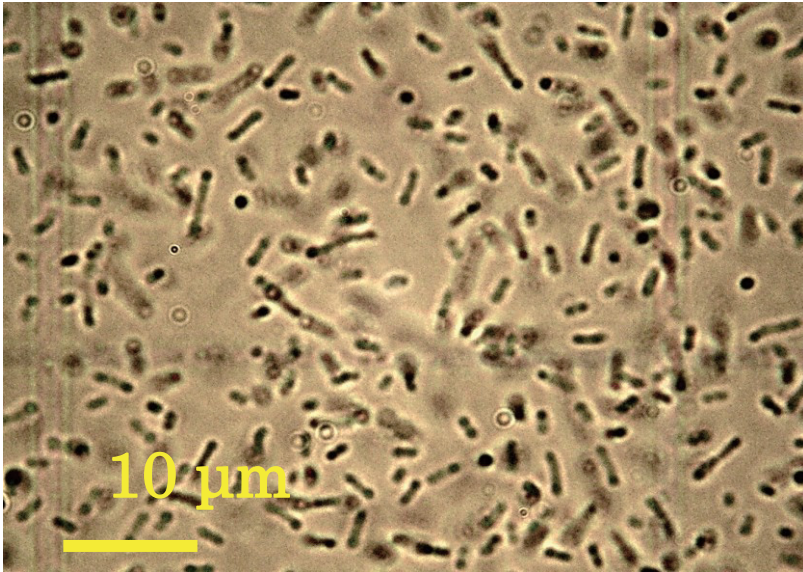


図 1-3 黒米アントシアニンを色質変化させた土壌微生物の顕微鏡写真

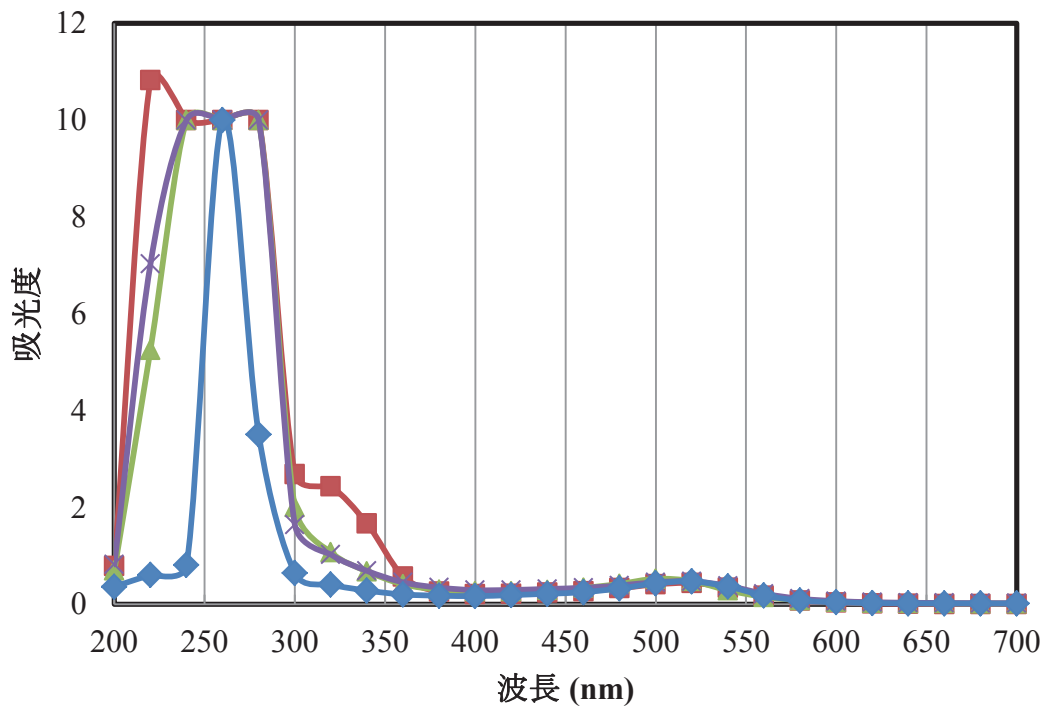


図 1-4-1 培地抽出物の連続吸光度

- 有機酸添加培地（微生物なし）、▲ 有機酸添加培地（微生物あり）
- × 有機酸無添加培地（微生物なし）、◆ 有機酸無添加培地（微生物あり）

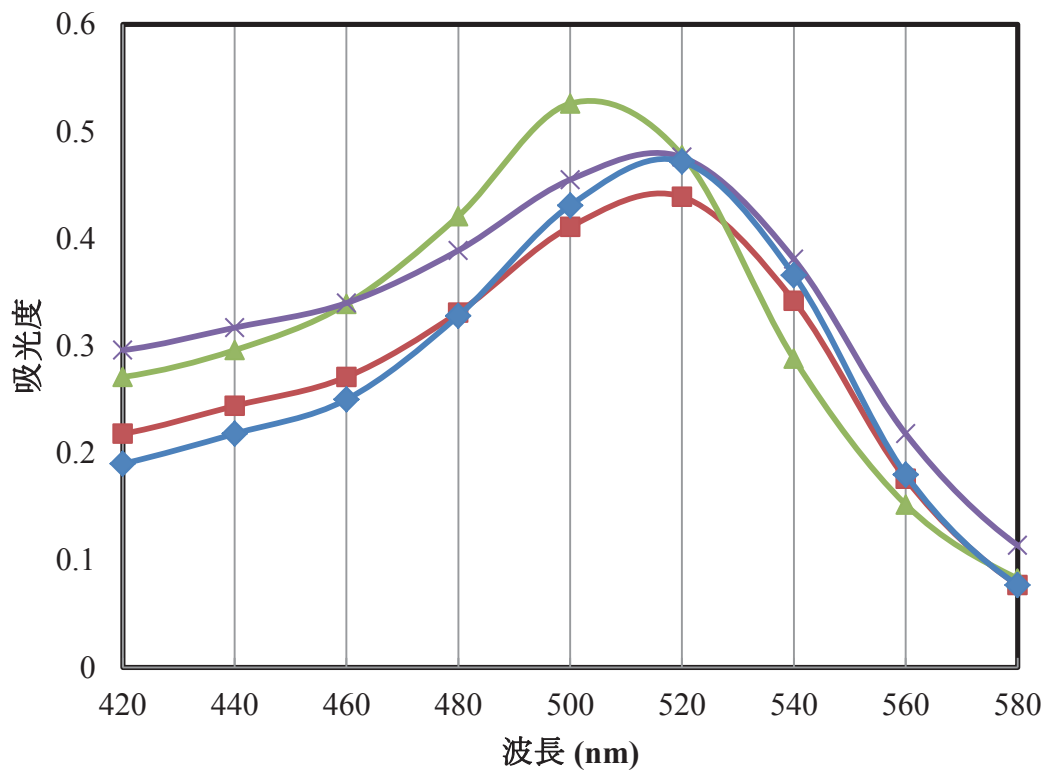


図 1-4-2 培地抽出物の連続吸光度

- 有機酸添加培地 (微生物なし)、▲ 有機酸添加培地 (微生物あり)
- × 有機酸無添加培地 (微生物なし)、◆ 有機酸無添加培地 (微生物あり)

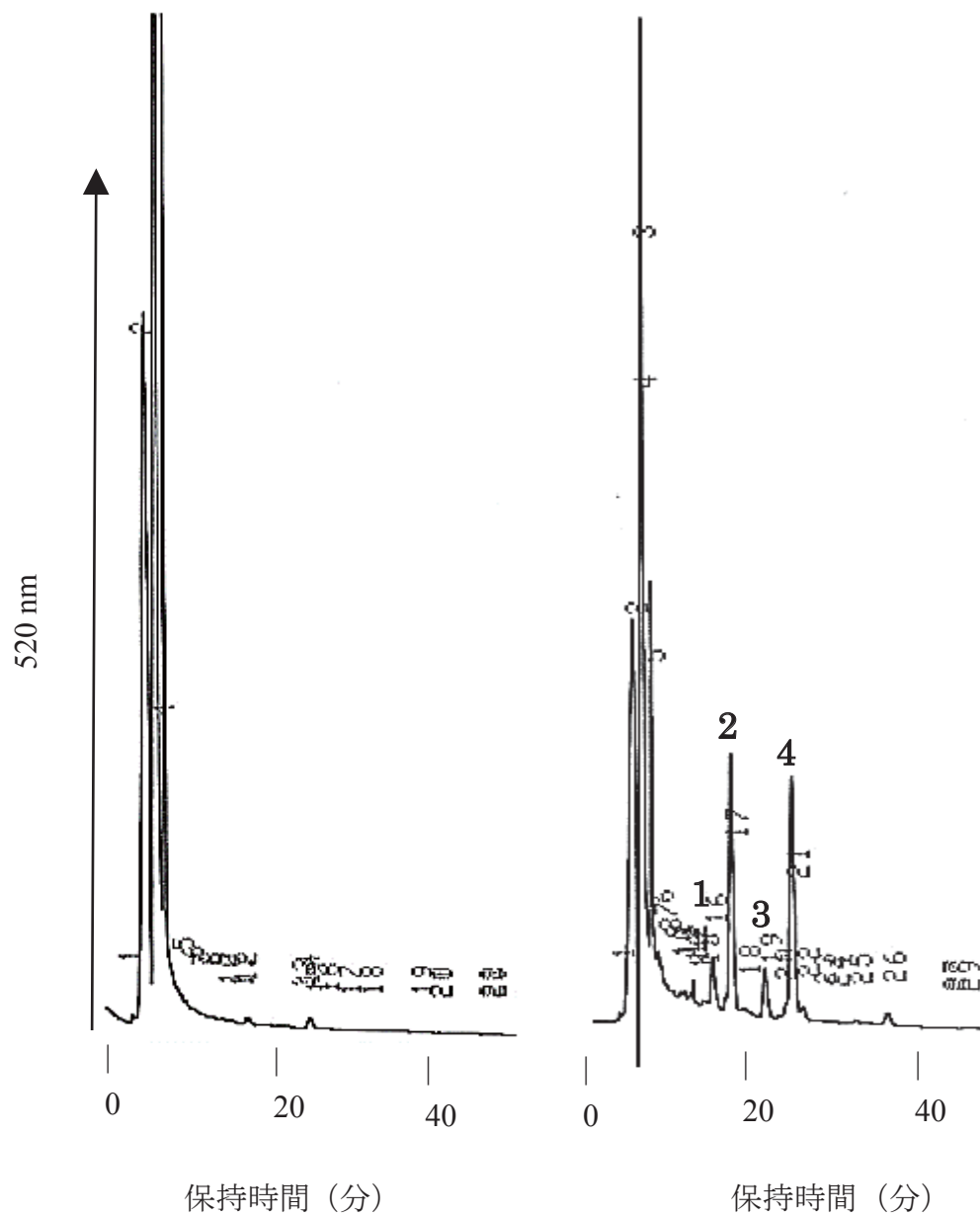


図 1-5 HPLC による色質変化した黒米アントシアニンの分離
 左：微生物を植菌していない培地の HPLC パターン
 右：微生物を植菌した培地の HPLC パターン

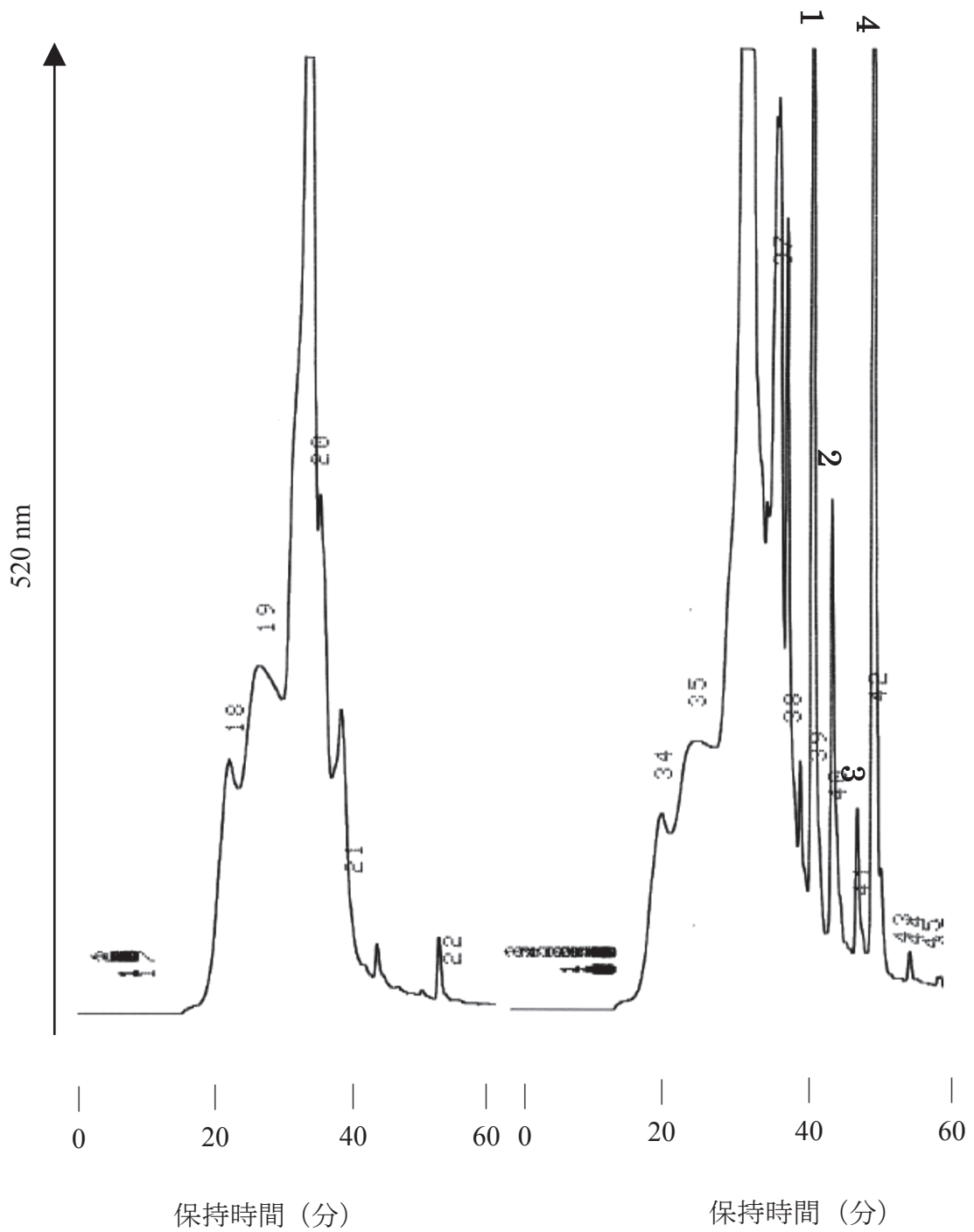


図 1-6 HPLC による色質変化した黒米アントシアニンの分取

左：微生物を植菌していない培地の HPLC パターン

右：微生物を植菌した培地の HPLC パターン

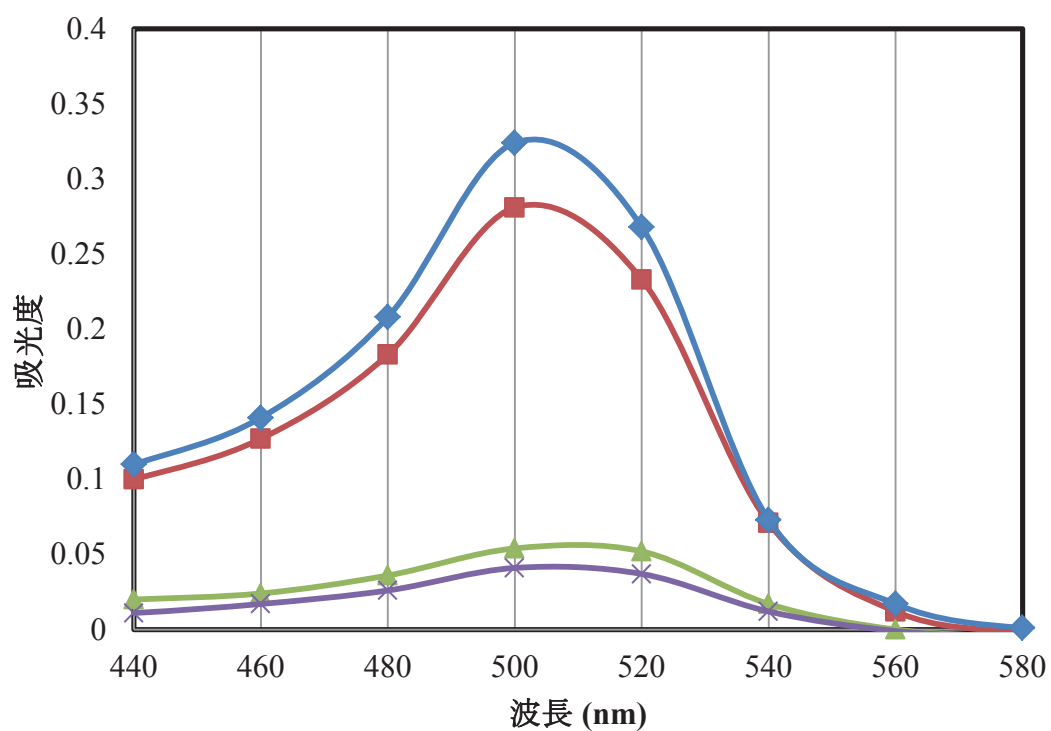


図 1-7 HPLC にて分取したピークの連続吸光度パターン

図 1-6 の HPLC パターンに示した ■ ピーク 1、▲ ピーク 2、× ピーク 3、◆ ピーク 4。

ピーク 1： 500 nm、ピーク 2： 510 nm、ピーク 3： 510 nm、ピーク 4： 500 nm。

第2章 *E. aerogenes* NBRC13534 の固体培養における黒米アントシアニンの色質変化

第1節 緒言

本章では第1章でスクリーニングした黒米アントシアニンの色質を変化させる微生物と高い相同性が確認された、*E. aerogenes* NBRC13534 を使用し、黒米アントシアニンの色質変化を調べた。また、色質の変化に関与する有機酸を検討した。

第2節 実験材料と方法

2-2-1 黒米アントシアニンと有機酸を含む PDA 固体培地の調製

クエン酸とリン酸水素二ナトリウム、カフェー酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸はナカライテスク株式会社（京都）から購入した。PDA（ポテトデキストロース寒天）は日水製薬株式会社（東京）から購入した。クエン酸 19.2 g/L と、リン酸水素二ナトリウム 28.4 g/L を調製し、pH 4.0 の McIlvaine buffer を調製した。McIlvaine buffer に黒米の糠を 1/10 添加し、一晚 15°C で抽出した。この溶液を No.1 のろ紙（ADVANTEC、東京）でろ過した。これを黒米アントシアニン抽出液とした。表 2-1 の通りに培地の調製を行った。調製した培地を沸騰水浴中にて 5 分間湯せんし、その後クリーンベンチ内で分注した。十分に放冷した培地に *E. aerogenes* NBRC13534 を白金耳で植菌した。また、比較として *E. aerogenes* NBRC13534 を植菌しない培地も用意した。培地は 37°C、7 日間暗所で培養した。

表 2-1 黒米アントシアニン抽出液を含む PDA 培地の組成

培地成分	黒米アントシアニン含有 PDA 培地	
PDA	(g)	3.9
カフェー酸	(g)	0.01
フェルラ酸	(g)	0.01
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸	(g)	0.01
マロン酸	(g)	0.01

黒米アントシアニン抽出液	(ml)	100
--------------	------	-----

2-2-2 連続吸光度測定

酢酸はナカライテスク株式会社から購入した。培地 12.5 g を試験管に入れ、攪拌棒で培地を潰し、15% (v/v) 酢酸溶液 20 ml を加え、15°C、暗所で一晚抽出した。その後、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) し、上澄みをメンブレンフィルター(DISMIC-13HP PTFE 0.2 μm、ADVANTEC、東京)でろ過をしたものをサンプルとした。このサンプルを (U-3010、株式会社日立ハイテクサイエンス、東京) により測定した。

2-2-3 各種有機酸を各々含む培地の調製

培地は表 2-2 の通りに調製した。また、比較として有機酸を添加しない培地の調製を行った。各培地を沸騰水浴中にて 5 分間湯煎し、その後、クリーンベンチ内で分注を行った。十分に放冷した培地に *E. aerogenes* NBRC13534 を白金耳で植菌した。すべての培地は 37°C、5 日間暗所で培養した。

表 2-2 各種有機酸と黒米アントシアニン抽出液を含む PDA 培地組成

	有機酸 4 種類 添加	カフェー 酸添加	フェルラ 酸添加	p-ヒドロキ シ安息香酸 添加	マロン酸 添加
PDA (g)	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
カフェー (g)	0.01	0.01			
フェルラ (g)	0.01		0.01		
p-ヒドロキシ 安息香酸 (g)	0.01			0.01	
マロン酸 (g)	0.01				0.01
黒米アントシ アニン抽出液 (ml)	100	100	100	100	100

2-2-4 色質変化した色素の連続吸光度測定

E. aerogenes NBRC13534 を培養した各有機酸添加培地 12.5 g を試験管に入れ、攪拌棒で培地を潰し、15% (v/v) 酢酸溶液 20 ml を加え、1 晩 15°C で色素を抽出した。その後 No. 1 のろ紙を用いて吸引ろ過を行い、サンプルとした。このサンプルを更にメンブレンフィルターでろ過をしたものを分光光度計により測定した。

2-2-5 色質変化した色素の分離

1-2-6 を参照

第3節 結果と考察

2-3-1 *E. aerogenes* NBRC13534 固体培養での黒米アントシアニンの色質変化

NBRC より購入した *E. aerogenes* NBRC13534 も 1 章でスクリーニングした微生物と同じように黒米アントシアニンの色質を赤から紫に変化させた (図 2-1)。また、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養した培地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 に極大吸収値がシフトしていた (図 2-2)。このことから *E. aerogenes* NBRC13534 は、1 章でスクリーニングした微生物と同じ様に黒米アントシアニンの色質を変化させることができることが確認された。

2-3-2 黒米アントシアニンの色質変化における有機酸の影響

E. aerogenes NBRC13534 を植菌した培地では、有機酸 4 種、カフェー酸、フェルラ酸添加培地の色が赤くなり、有機酸無添加、マロン酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸添加培地は色の変化は見られなかった (図 2-3)。カフェー酸のみ、フェルラ酸のみのもので培地の色の変化が見られたので、この 2 種のフェノール性化合物が色の変化に関係していると考えられた。また、HPLC での分離の結果、有機酸 4 種類添加培地は、カフェー酸とフェルラ酸添加培地を合わせたピークが確認された (図 2-4-1、2-4-2)。有機酸無添加培地と、マロン酸と *p*-ヒドロキシ安息香酸添加培地はほぼピークが見られなかった (図 2-4-3、2-4-4)。これにより、培地の色の変化にはカフェー酸とフェルラ酸が関係していると確認された。また前回の実験で、ピーク 1 と 4 が 500 nm に極大吸収を持つものだということが判明している (図 1-8) ので、特にカフェー酸が培地の色の変化に関わっていると思われた。



図 2-1 *E. aerogenes* NBRC13534 による黒米アントシアニンの色質変化
 黒米アントシアニン含有 PDA 培地に *E. aerogenes* NBRC13534 を培養したもの
 (左) と、培養していないもの (右)
 培養条件：37℃、7 日間

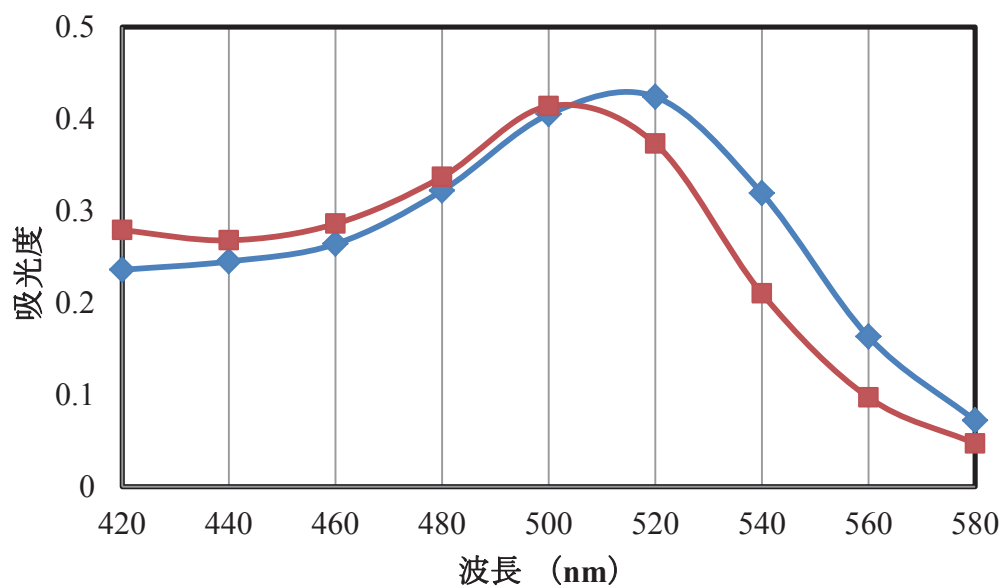


図 2-2 黒米アントシアニン含有 PDA 培地の極大吸収値変化に及ぼす *E. aerogenes* NBRC13534 の影響

◆ *E. aerogenes* NBRC13534 を培養したもの、■ *E. aerogenes* NBRC13534 を培養しなかったもの

培養条件：37 度、7 日間

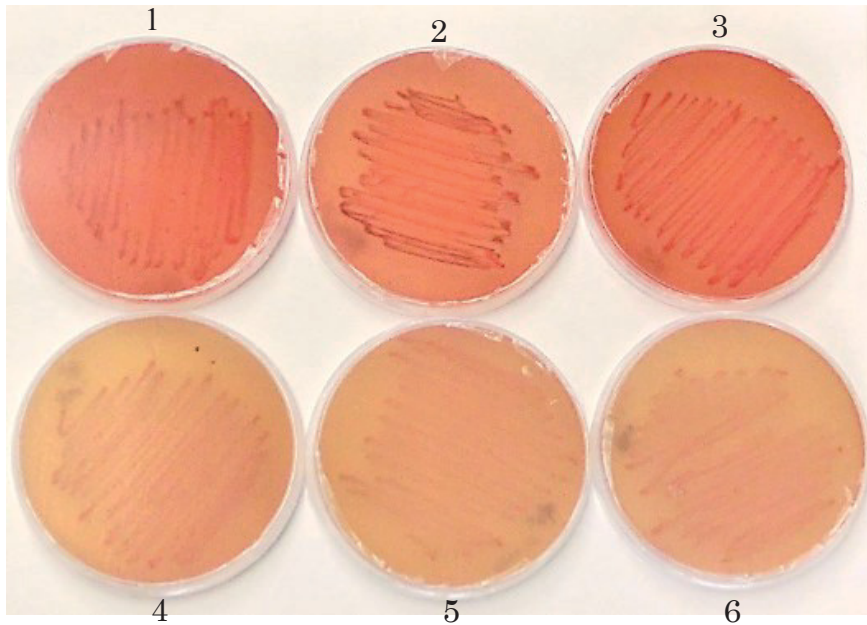


図 2-3 黒米アントシアニン含有 PDA 培地における有機酸の影響
1、有機酸 4 種類添加 2、フェルラ酸添加
3、カフェー酸添加 4、有機酸無添加
5、*p*-ヒドロキシ安息香酸添加 6、マロン酸添加
各々 *E. aerogenes* NBRC13534 を 37°C、5 日間培養した。

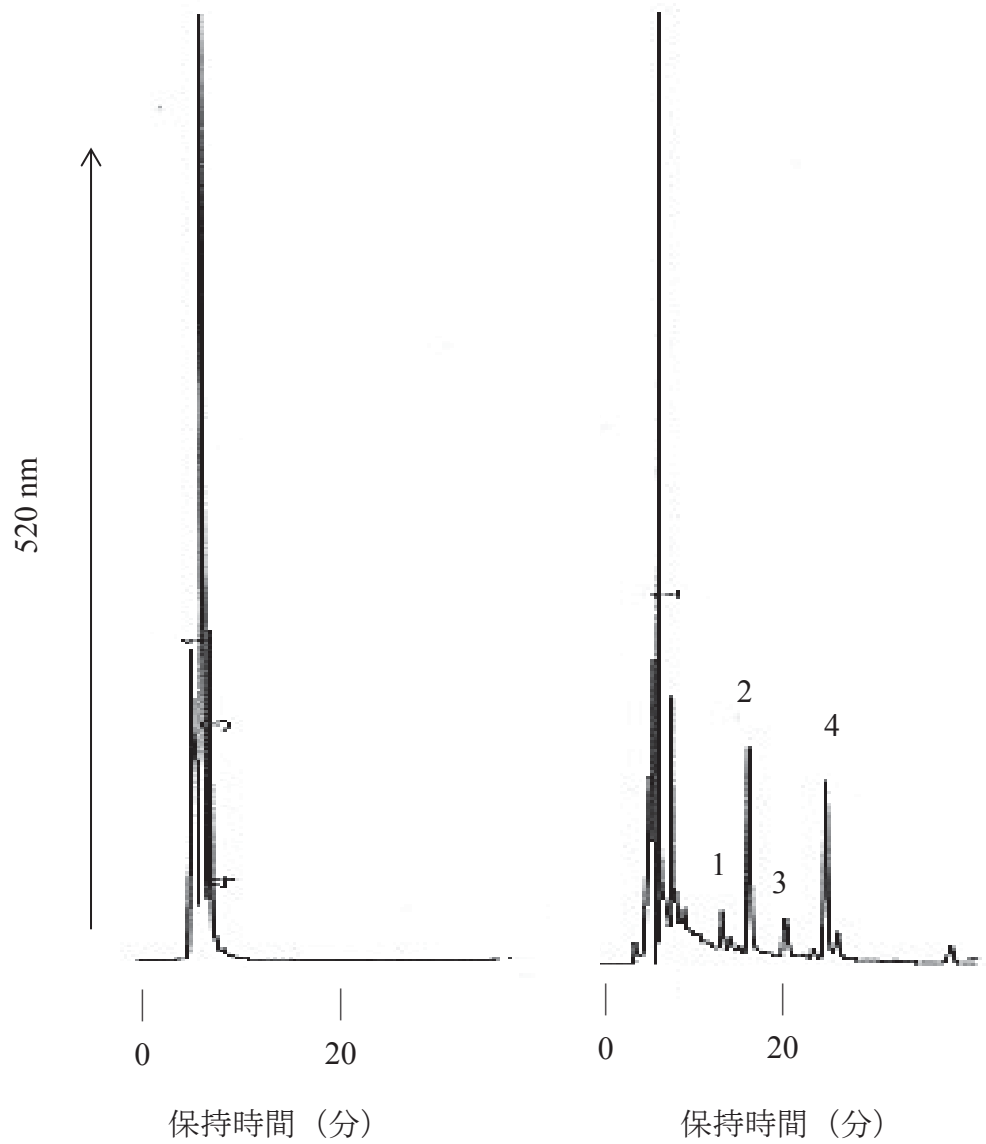


図 2-4-1 *E. aerogenes* NBRC13534 による黒米アントシアニン含有 PDA 培地の HPLC パターン

左：黒米アントシアニン抽出液

右：有機酸 4 種類添加

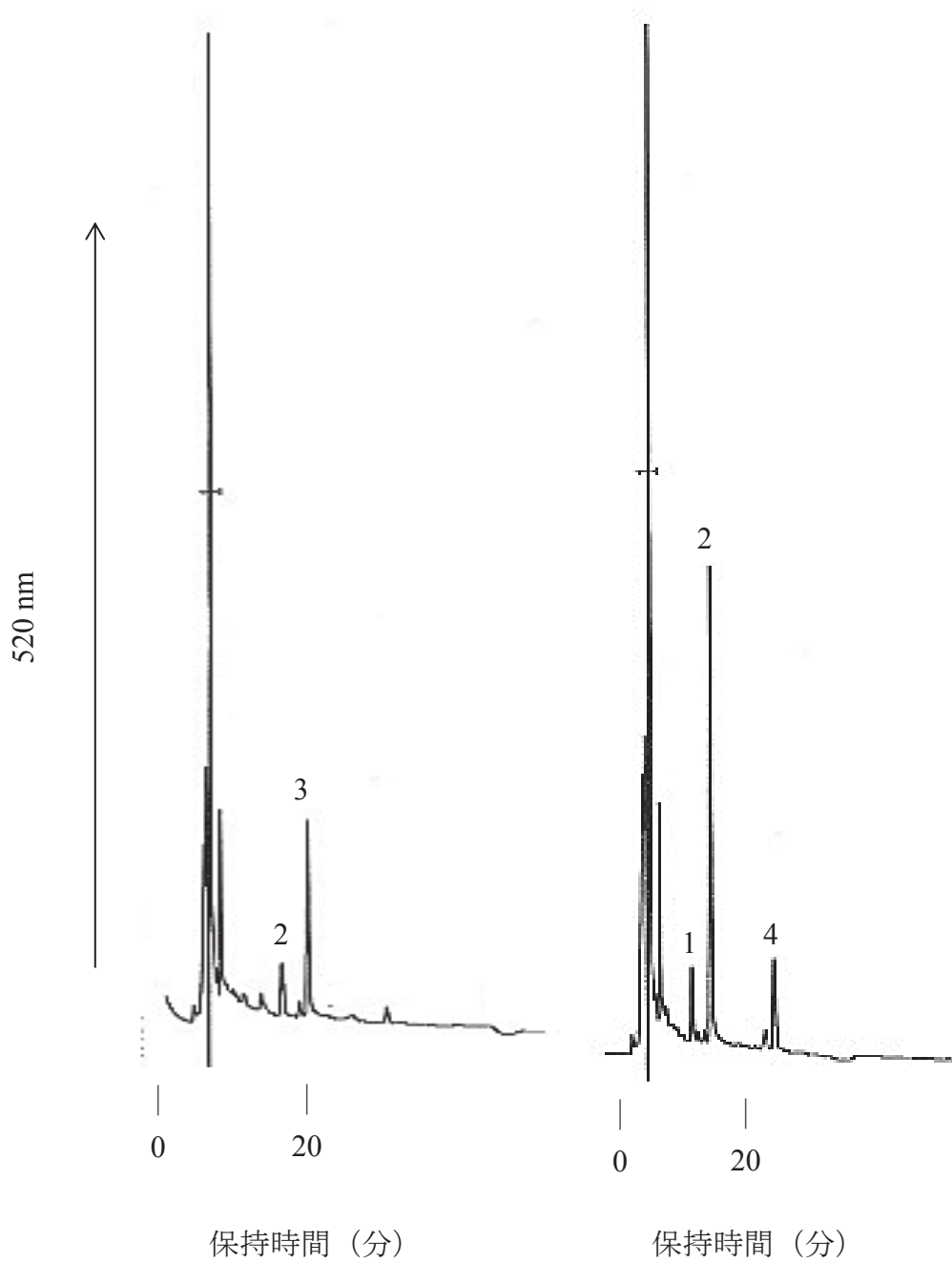


図 2-4-2 *E. aerogenes* NBRC13534 による黒米アントシアニン含有 PDA 培地の HPLC パターン

左：フェルラ酸添加

右：カフェー酸添加

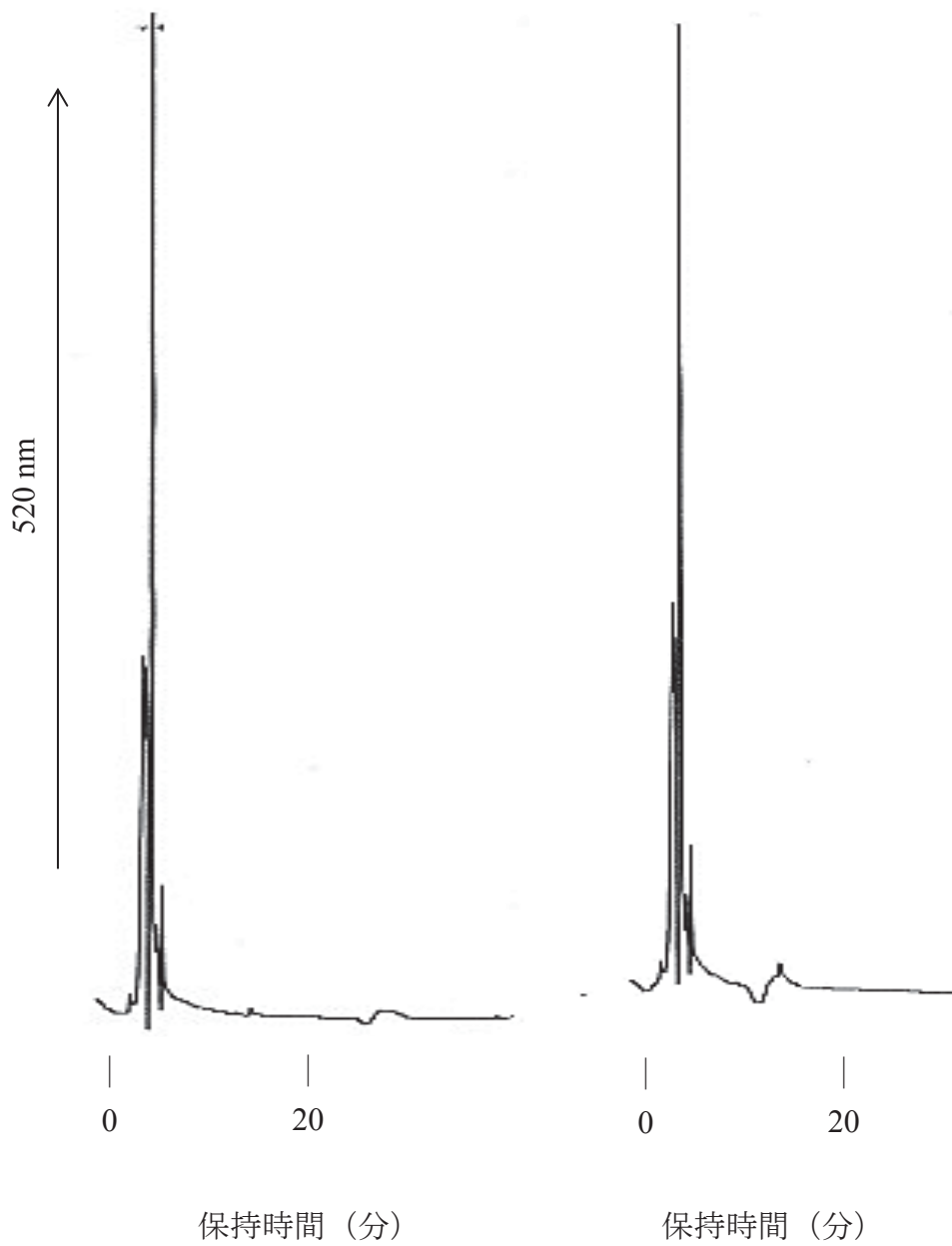


図 2-4-3 *E. aerogenes* NBRC13534 による黒米アントシアニン含有 PDA 培地の HPLC パターン

左： *p*-ヒドロキシ安息香酸添加

右： マロン酸添加

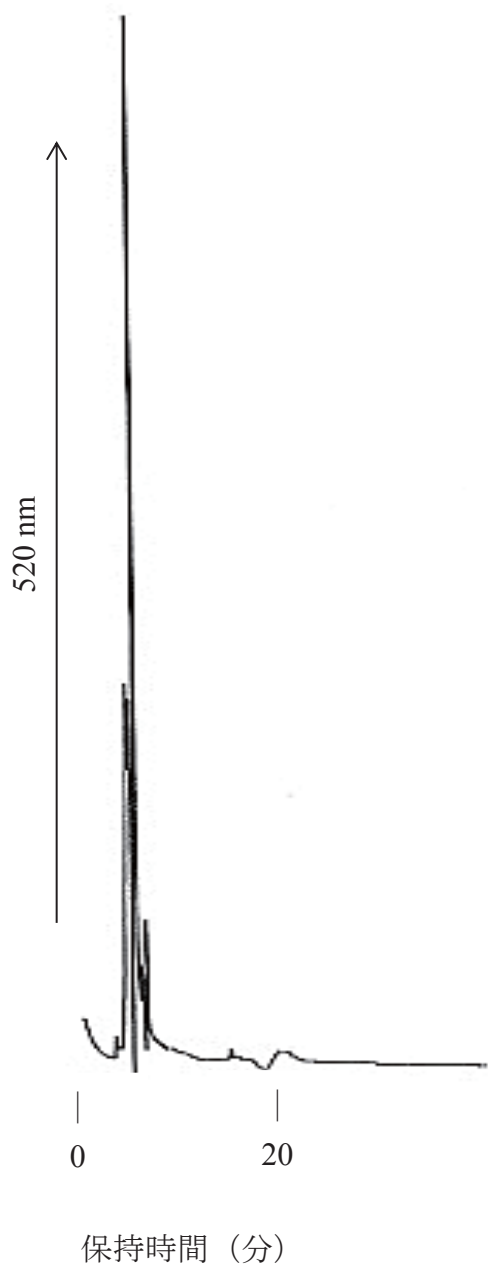


図 2-2-4 *E. aerogenes* NBRC13534 による黒米アントシアニン含有 PDA 培地の HPLC パターン
左：有機酸無添加

第3章 *E. aerogenes* NBRC13534 の液体培養における黒米アントシアニンの色質変化

第1節 緒言

本章では *E. aerogenes* NBRC13534 の培養液を使用した黒米アントシアニンの色質変化について検討した。

第2節 実験材料と方法

3-2-1 *E. aerogenes* NBRC13534 の最適培地による液体培養

ポリペプトンと酵母エキスは日本製薬株式会社（東京）で購入した。MgSO₄・7H₂O はナカライテスク株式会社（京都）で購入した。ポリペプトン 1 g、酵母エキス 0.2 g、MgSO₄・7H₂O 0.1 g、脱イオン水 100 ml を 300 ml 容量三角フラスコに調製し、シリコ栓で栓をしたのちに、オートクレーブで 121°C15 分加熱滅菌した。十分に冷却した後、*E. aerogenes* NBRC13534 を白金耳で植菌し、37°C3 日間、振盪機 MMS-3010（EYELA、福岡）を用いて 100 rpm で振盪培養した。

3-2-2 培養液の濾過

E. aerogenes NBRC13534 を培養した培養液を 50 ml 容量の遠心管（AGC テクノグラス株式会社、静岡）に 30 ml 入れ、遠心分離（3000 rpm、15 分間）を行った。遠心分離後、上澄み液をメンブレンフィルター（DISMIC-13HP PTFE 0.2 μm、ADVANTEC、東京）でろ過した。

3-2-3 培養液と黒米アントシアニン抽出液との混合試験

酢酸とカフェー酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸はナカライテスク株式会社（京都）で購入した。まず、*E. aerogenes* NBRC13534 の培養液による黒米アントシアニン抽出液の混合試験を行った。黒米アントシアニン抽出液（2-2-1 参照）に有機酸 4 種（カフェー酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸、各 0.01 g）を添加し、5 分間沸騰水浴中で湯せんし、室温で放冷した。ろ過した培養液 3 ml と有機酸 4 種添加した黒米アントシアニン抽出液 7 ml を 50 ml 容量の遠心管に混合し、振盪機 MMS-3010 を用いて 100 rpm で 37°C2 日間振盪させた。これをサンプルとした。サンプルをメンブレンフィルターでろ過し、15%（v/v）酢酸と当量で混合し、（U-3010、株式会社日立ハイテクサイエンス、東京）で連続吸光度を測定した。

次に、*E. aerogenes* NBRC13534 の培養液を熱処理し、黒米アントシアニンの色

質を変化させる物質の熱耐性試験を行った。黒米アントシアニン抽出液に有機酸 4 種（カフェー酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸）を各々 0.01 g 添加し、5 分間沸騰水浴中にて湯せんした後、室温で放冷した。ろ過した培養液を試験管に入れ、試験管にビー玉を乗せ、10 分間沸騰水中で湯せんし、熱処理した培養液を水道水で冷却した。熱処理した培養液 3 ml と有機酸 4 種添加した黒米アントシアニン抽出液 7 ml を 50 ml 容量の遠心管に混合し、37°C 2 日間で振盪機 MMS-3010 を用いて 100 rpm で振盪させた。これをサンプルとした。サンプルをメンブレンフィルターでろ過し、15% (v/v) 酢酸と当量で混合し、分光光度計で連続吸光度を測定した。

次に黒米アントシアニンの色質を変化させる物質の分子量を調べるために、*E. aerogenes* NBRC13534 の培養液を透析し、黒米アントシアニン抽出液の混合試験を行った。黒米アントシアニン抽出液に有機酸 4 種（カフェー酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸）を各々 0.01 g 添加し、5 分間沸騰水浴中で湯せんし、室温で放冷した。透析用チューブは透析用セルロースチューブ（分画分子量：約 12000~14000）を日本メデカルサイエンス（大阪）より購入した。ろ過した培養液を透析用チューブに 10 ml 入れ、McIlvaine buffer (pH4) 100 ml と脱イオン水 900 ml を混合した透析液に浸し、スターラーバーで攪拌しながら 5°C で 1 晩透析した。透析膜内の培養液 3 ml と黒米アントシアニン抽出液 7 ml を 15 ml 容量の遠心管（AGC テクノグラス株式会社、静岡）に混合し、37°C、2 日間で振盪機 MMS-3010 を用いて 100 rpm で振盪反応させた。これをサンプルとした。サンプルをメンブレンフィルターでろ過し、15% (v/v) 酢酸と当量混合し、分光光度計で連続吸光度を測定した。

3-2-4 色質変化に及ぼす有機酸の影響

黒米アントシアニン抽出液（2-2-1 参照）に各種有機酸（カフェー酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸、各 0.01 g）をそれぞれ添加し、5 分間沸騰水浴中にて湯せんし、室温で放冷した。ろ過した培養液 6 ml と各種有機酸を含む黒米アントシアニン抽出液 14 ml を 50 ml 容量の遠心管に混合した。混合した溶液から 2 ml 取り出し、0 日目のサンプルとした。混合した溶液は振盪機 MMS-3010 を用いて 100 rpm で 37°C、2 日間振盪反応させた。無菌的に 1 日目、2 日目に 2 ml ずつ溶液を取り出し、それぞれを 1 日目のサンプル、2 日目のサンプルとした。

3-2-5 連続吸光度測定

3-2-3 参照

第3節 結果と考察

3-3-1 *E. aerogenes* NBRC13534 培養液における黒米アントシアニンの色質変化

4種類の有機酸を含む黒米アントシアニン抽出液は *E. aerogenes* NBRC13534 の培養液と反応させることで黒米アントシアニンの極大吸収値である 520 nm から 500 nm に極大吸収値がシフトしていた(図 3-1)。また、*E. aerogenes* NBRC13534 の培養液は加熱処理することで、黒米アントシアニンと混合しても、極大吸収値の変化を確認できなかった(図 3-2)。更に、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させることで、黒米アントシアニンの極大吸収値の変化が見られた(図 3-3)。このことから、黒米アントシアニンを変化させる物質は分子量 10,000 以上の物質であり、*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体遊離型の酵素である可能性が示唆された。

また、2-3-2 と同様に *E. aerogenes* NBRC13534 の培養液においても、黒米アントシアニンと有機酸を添加することで、黒米アントシアニンの極大吸収値を変化させるが、カフェー酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸の 4 種の内、カフェー酸とフェルラ酸が色質を変化させることが確認された。また、各種有機酸を含む黒米アントシアニンと培養液の反応 0 日目、1 日目、2 日目の極大吸収値を確認すると、カフェー酸は 1 日ごとに 520 nm から 500 nm に 10 nm ずつにシフトしたが、フェルラ酸は 1 日目に 520 nm から 510 nm にシフトしただけで、2 日目は 510 nm のままであった。また、*p*-ヒドロキシ安息香酸とマロン酸は 2 日反応させても変化は見られなかった(図 3-4-1、3-4-2)。反応が 2 日間と時間がかかることから、黒米アントシアニンを色質変化させる酵素の不足に原因があると思われた。

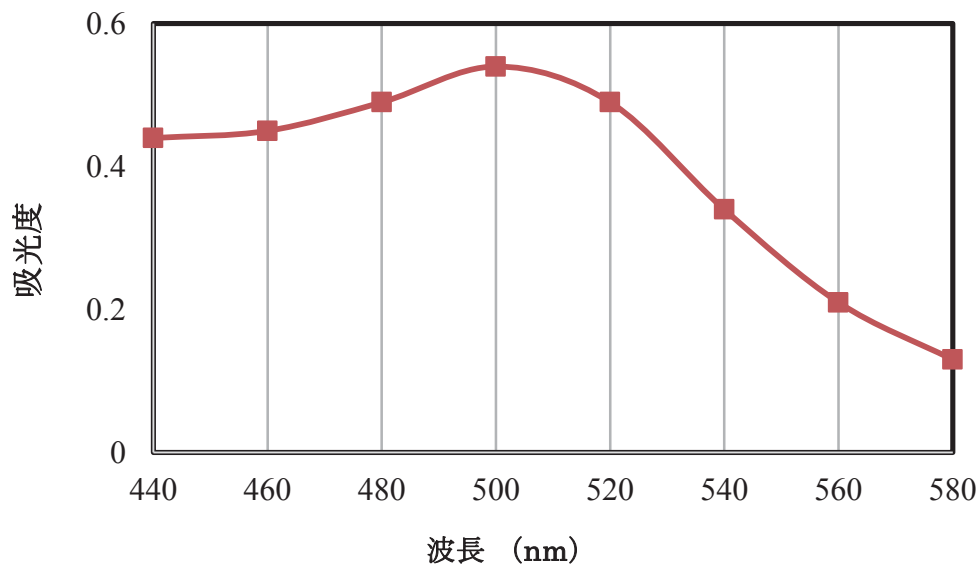


図 3-1 *E. aerogenes* NBRC13534 培養液と混合した黒米アントシアニンの連続吸収パターン

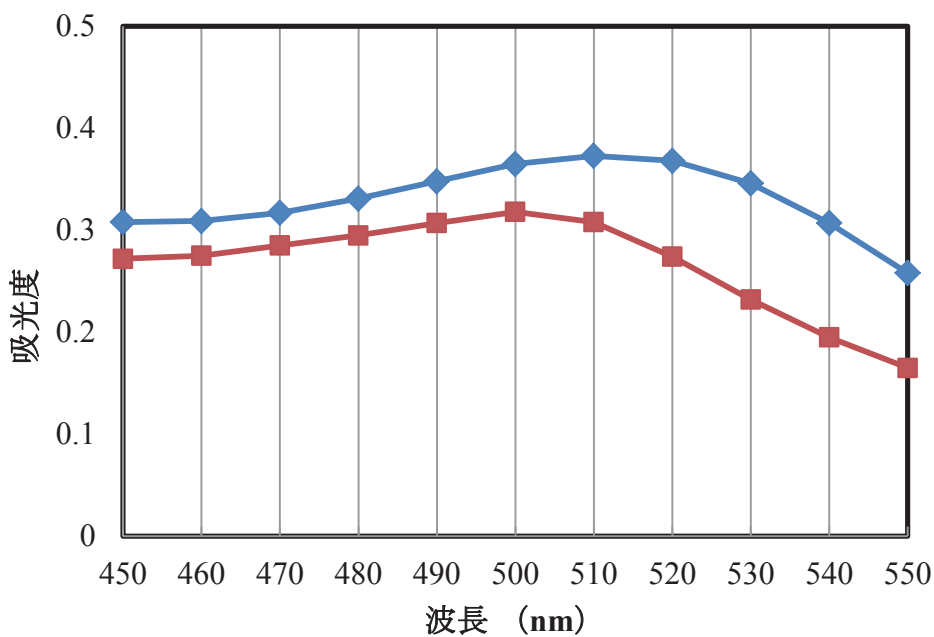


図 3-2 加熱した *E. aerogenes* NBRC13534 培養液と混合した黒米アントシアニンの連続吸収パターン

◆ *E. aerogenes* NBRC13534 加熱処理した培養液による黒米アントシアニンの反応、
 ■ *E. aerogenes* NBRC13534 培養液による黒米アントシアニン反応

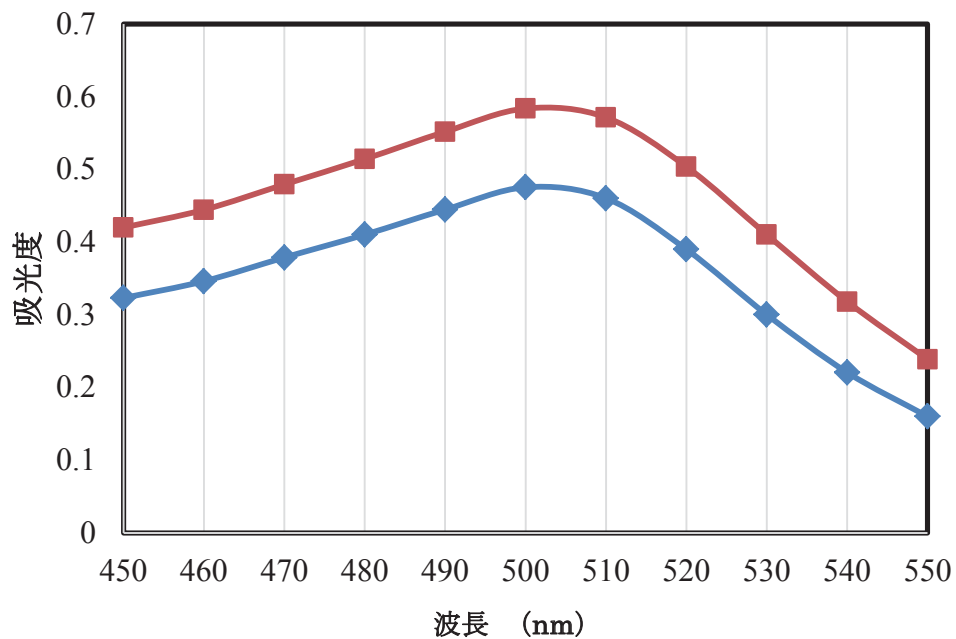
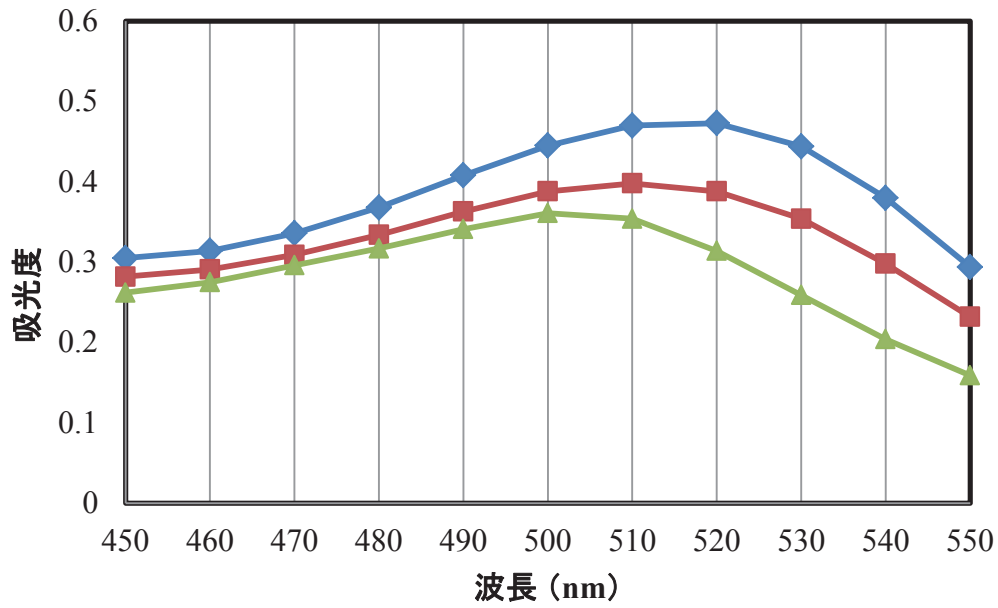
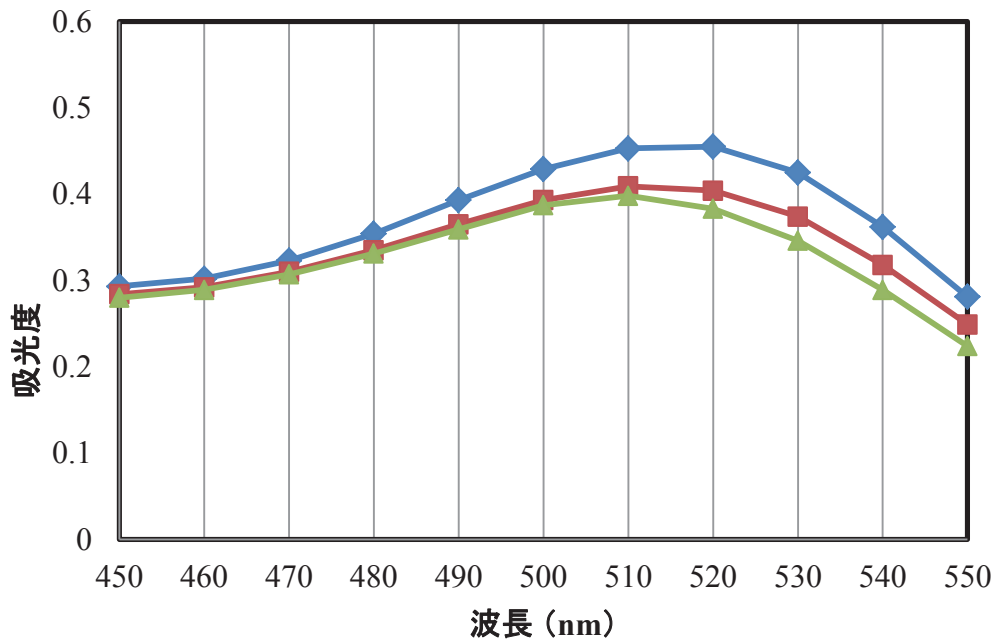


図 3-3 透析した *E. aerogenes* NBRC13534 の培養液と混合した黒米アントシアニンの連続吸収パターン

◆ *E. aerogenes* NBRC13534 透析膜内液と黒米アントシアニン混合液の連続吸収パターン、■ *E. aerogenes* NBRC13534 培養液と黒米アントシアニンの混合液の連続吸収パターン



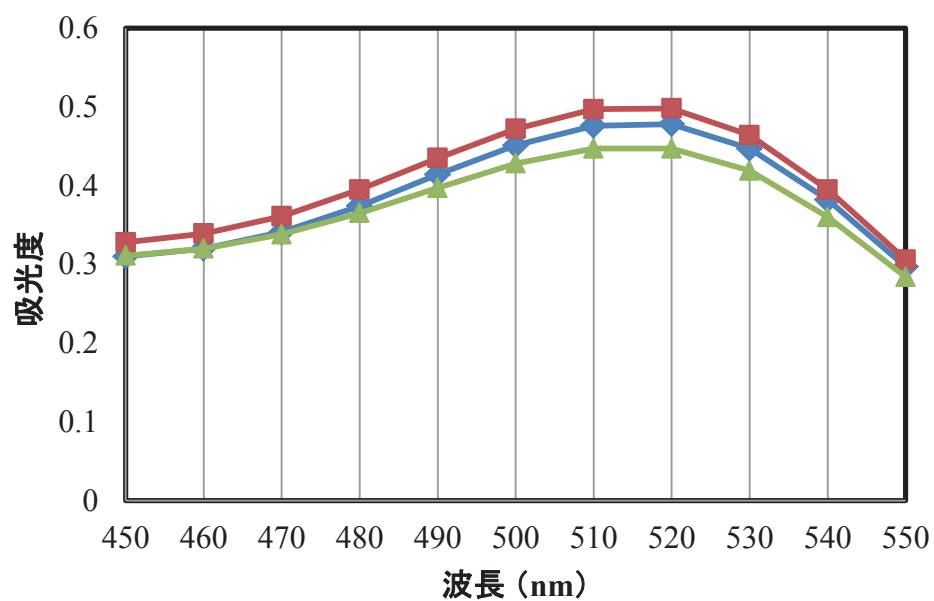
カフェー酸添加培地



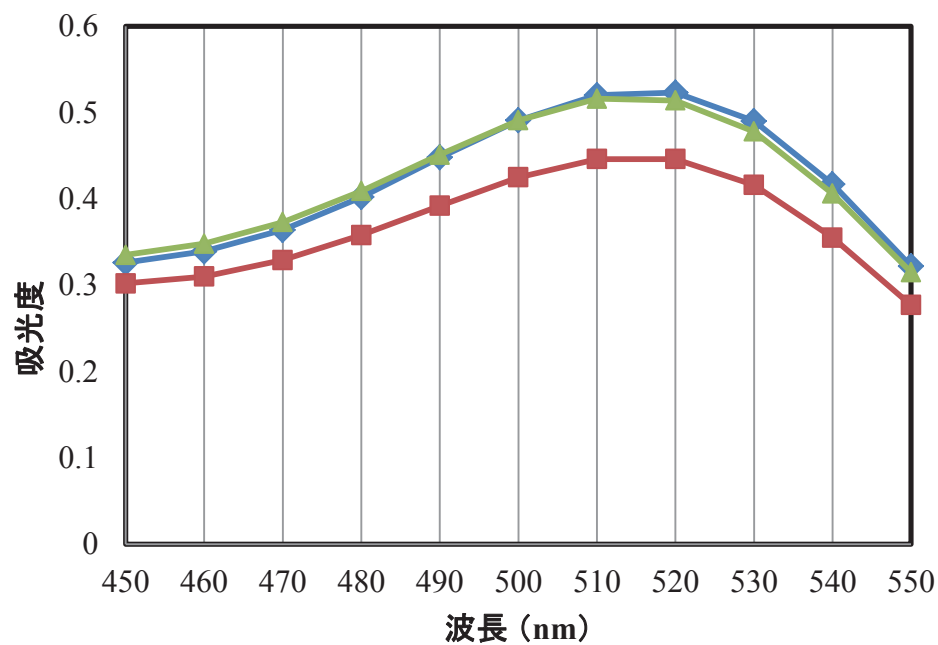
フェルラ酸添加培地

図 3-4-1 *E. aerogenes* NBRC13534 と混合した各種有機酸添加黒米アントシアニンの色質変化

◆0日目、■1日目、▲2日目



マロン酸添加培地



p-ヒドロキシ安息香酸添加培地

図 3-4-2 *E. aerogenes* NBRC13534 と混合した各種有機酸添加黒米アントシアニンの色質変化

◆0日目、■1日目、▲2日目

第4章 黒米アントシアニンの色質変化に関わる有機酸の検討

第1節 緒言

これまでの研究から、黒米アントシアニンの色質を変化させる要因として、*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体外酵素と有機酸が考えられた。変化に関わる有機酸としてカフェー酸とフェルラ酸が考えられ、この2種類の有機酸の構造は酷似ことが確認された(図4-1)。そこで、この2種類の有機酸に類似する *p*-クマル酸、シナピン酸とカフェー酸のベンゼン環と同じ構造を持つピロカテコール(図4-2)を使用し、黒米アントシアニンの色質が変化するか検討した。

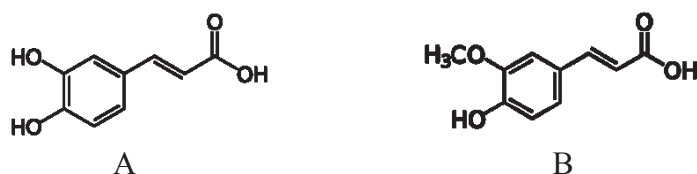


図4-1 カフェー酸とフェルラ酸の構造

A: カフェー酸 B: フェルラ酸

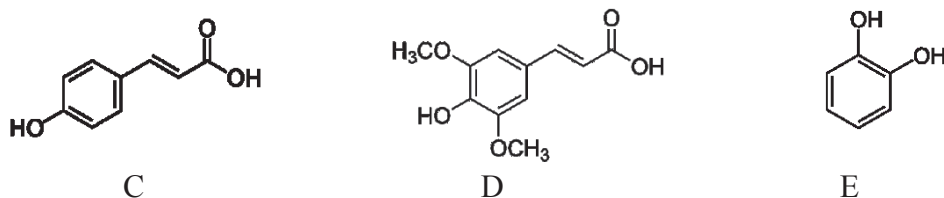


図4-2 カフェー酸、フェルラ酸に類似した構造を持つ有機酸

C: *p*-クマル酸 D: シナピン酸 E: ピロカテコール

第2節 実験材料と方法

4-2-1 黒米アントシアニン抽出液の調製

2-2-1 参照

4-2-2 各種有機酸含有培地での *E. aerogenes* NBRC13534 の液体培養

ポリペプトンと酵母エキスは日本製薬株式会社(東京)から購入した。 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、カフェー酸とフェルラ酸、*p*-クマル酸、シナピン酸、ピロカテコールはナカライテスク株式会社(京都)から購入した。*E. aerogenes* NBRC13534 の最適培地である NBRC No. 702 培地(ポリペプトン 1 g、酵母エキス 0.2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、寒天 1.5 g)を10分の1に希釈した NBRC No. 702 10分の

1 培地と、NBRC No. 702 培地 10 分の 1 培地に各有機酸（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）0.01 g を添加した有機酸添加 NBRC No. 702 10 分の 1 培地を 300 ml 容量三角フラスコに調製し、黒米アントシアニン抽出液 100 ml と混合した。各培地を沸騰水浴中で 5 分間湯せんし、放冷後、*E. aerogenes* NBRC13534 を白金耳で植菌した。また *E. aerogenes* NBRC13534 を植菌しない培地も用意した。振盪培養と反応は振盪機 MMS-3010（EYELA、福岡）を用いて 37°C、2 日間行った。

4-2-3 連続吸光度測定

酢酸はナカライテスク株式会社（京都）から購入した。各培地をメンブレンフィルター（DISMIC-13HP PTFE 0.2 μm、ADVANTEC、東京）でろ過し、15%（v/v）酢酸と当量で混合したサンプルを（U-3010、株式会社日立ハイテクサイエンス、東京）で連続吸光度測定した。

4-2-4 色素の分離

リン酸と酢酸、アセトニトリルはナカライテスク株式会社（京都）から購入した。アントシアニンの分析は、SPD-10A UV-VIS 高速液体クロマトグラフ（HPLC）（Shimadzu、京都）を用いて測定した。分析用カラムは COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Packed Column（4.6 mm I.D.×250 mm、ナカライテスク株式会社、京都）を使用した。溶媒は、A（H₃PO₄ : H₂O = 15 : 985 v/v）および B（H₃PO₄ : CH₃COOH : CH₃CN : H₂O = 27.5 : 210 : 197 : 535 v/v/v/v）を使用した。アントシアニン分析は、以下の勾配条件で行った。流速 0.5 ml/min で溶媒 B（35 %→100 分→55 %）。サンプル注入量は 100 μl であった。検出はアントシアニンの検出波長である 520 nm とアントシアニンの共存物の検出波長である 280 nm で行った。各種サンプルは溶媒 A、B の混合液（A : B = 65 : 35 v/v）と当量で混合し、メンブレンフィルターでろ過し、HPLC で測定した。また検出波長 520 nm で測定した際に、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養したカフェー酸、フェルラ酸、*p*-クマル酸、シナピン酸添加培地で確認された新しいピークの中で最も高いピークをそれぞれ分取した。

4-2-5 連続吸光度測定

4-2-4 で分取した各ピークを分光光度計で連続吸光度測定した。

第3節 結果と考察

4-3-1 黒米アントシアニンの色質変化における有機酸の影響

E. aerogenes NBRC13534 を培養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抽出液と同じ 520 nm を示した (図 4-3)。一方、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養した培地では、*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 の極大吸収値を示した。また、有機酸無添加、シナピン酸を添加した培地、ピロカテコールを添加した培地は黒米抽出液と同じ 520 nm の極大吸収値を示した (図 4-4)。このことから、*E. aerogenes* NBRC13534 による黒米アントシアニンの色質変化に関わる有機酸は *p*-クマル酸、カフェー酸、フェルラ酸であることが判明した。また、これまでに変化に関わる有機酸の構造からベンゼン環につながる側鎖が関わっていると示唆されていたが、側鎖以外の部位も変化に関わっていると推察した。

4-3-2 色質変化した色素の色素分析

アントシアニンを HPLC で測定する場合、おもに可視光線 (500 nm や 520 nm) が用いられ、共存物の検出には紫外線 (280 nm や 380 nm) が用いられている²⁾。520 nm で測定した場合、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養していない培地の内、カフェー酸添加培地で 79 分 (図 4-5-2)、フェルラ酸添加培地で 101 分 (図 4-5-2)、*p*-クマル酸添加培地は 92 分 (図 4-5-3)、シナピン酸添加培地は 102 分 (図 4-5-3) に新しいピークが確認された。しかし、有機酸無添加 (図 4-5-1)、ピロカテコール添加培地 (図 4-5-4) では新しいピークは確認されなかった。そして、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養した培地では、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養しない培地で確認されたピークの増加が確認され、新たなピークも確認された (図 4-6-2、4-6-3)。しかし、シナピン酸のみ増加は確認できなかった (図 4-6-3)。また、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養することで有機酸無添加 (図 4-6-1)、ピロカテコール (図 4-6-4) でも微量のピークが確認された。

また、280 nm で測定した場合、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養していない培地の内、カフェー酸添加培地で 78 分 (図 4-7-2)、フェルラ酸添加培地で 97 分 (図 4-7-2)、シナピン酸添加培地は 61 分と 108 分に新しいピークが確認された (図 4-7-3)。しかし、有機酸無添加 (図 4-7-1)、*p*-クマル酸添加培地 (図 4-7-3)、ピロカテコール添加培地 (図 4-7-4) では新しいピークは確認されなかった。

更に *E. aerogenes* NBRC13534 を培養した培地では、カフェー酸添加培地で 30 分と 76 分 (図 4-8-2)、フェルラ酸添加培地で 81 分と 97 分 (図 4-8-2)、*p*-クマル酸添加培地で 68 分と 88 分 (図 4-8-3) に高いピークが確認された。シナピン酸は 60 分と 107 分にピークが確認されたが、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養し

ていない培地とほぼ変化はなかった（図 4-8-3）。また、有機酸無添加培地（図 4-8-1）とピロカテコール添加培地（図 4-8-4）ではピークは確認されなかった。

また、検出波長 520 nm で確認された各種有機酸添加 *E. aerogenes* NBRC13534 培養培地の新規ピークであるカフェー酸添加培地 79 分、フェルラ酸添加培地で 101 分、*p*-クマル酸添加培地は 92 分、シナピン酸添加培地は 102 分のピークを分取し、分光光度計で測定した。その結果、カフェー酸、フェルラ酸、シナピン酸から分取されたピークは 510 nm に極大吸収値を示し、*p*-クマル酸から分取したピークは 500 nm に極大吸収値を示した（図 4-9）。

これらのことから、黒米アントシアニンにカフェー酸、フェルラ酸、*p*-クマル酸を添加し、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養することにより、黒米アントシアニンには確認されない新たなアントシアニンが作られることが判明した。また、シナピン酸を添加した場合、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養しなくとも、新たな色素が作られることが判明した。そして、*E. aerogenes* NBRC13534 は黒米アントシアニンと有機酸を添加することで、色素だけではなく、有機酸などの複合体を形成させている可能性も示唆された。

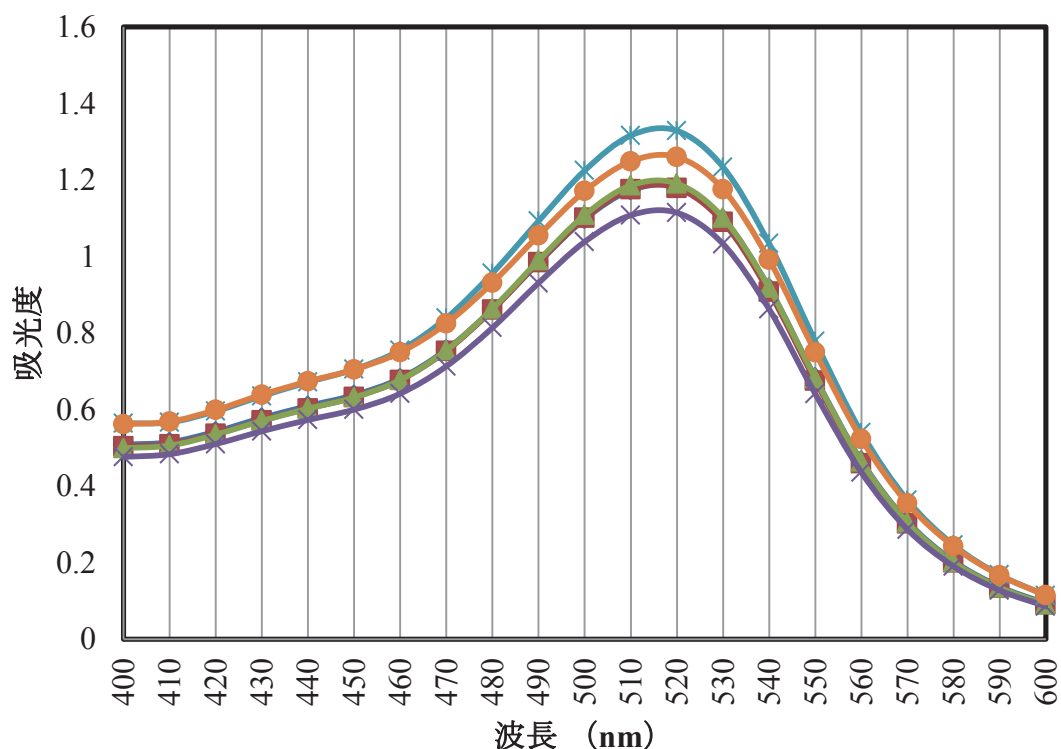


図 4-3 黒米アントシアニンの色質変化に及ぼす有機酸の影響

◆有機酸無添加培地、■カフェー酸添加培地、▲フェルラ酸添加培地、×*p*-クマル酸添加培地、*シナピン酸添加培地、●ピロカテコール添加培地

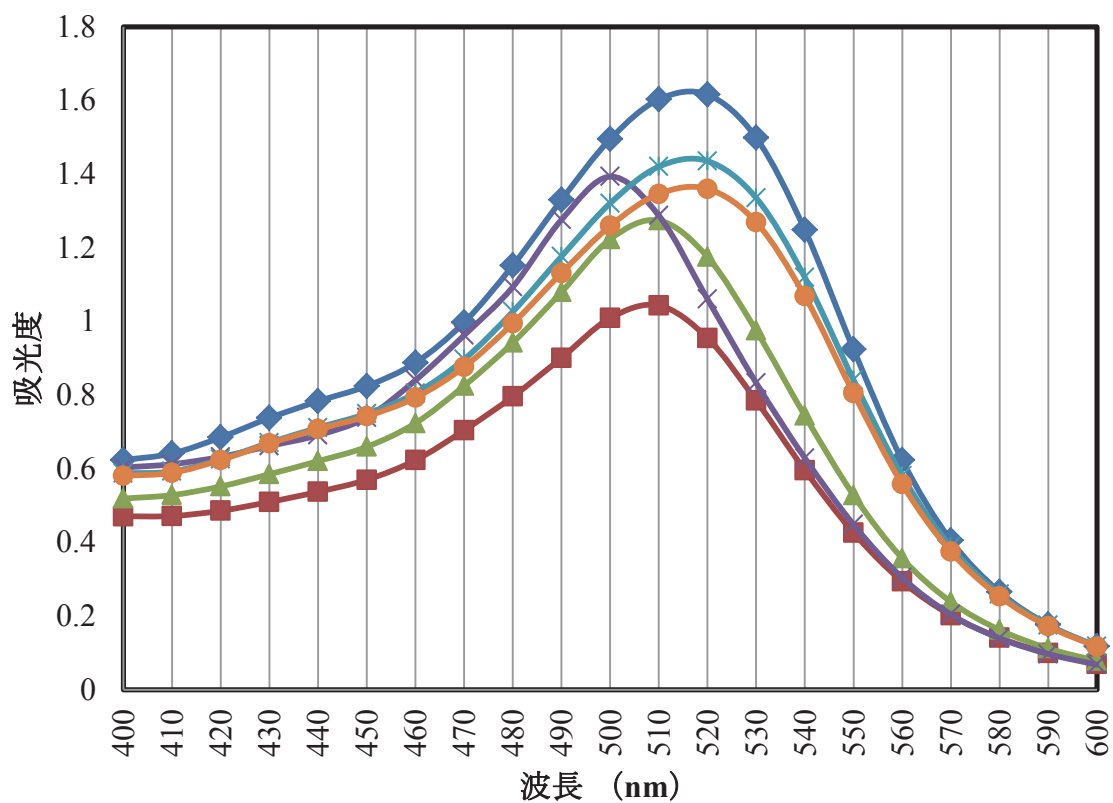


図 4-4 *E. aerogenes* NBRC13534 による黒米アントシアニンの色質変化に及ぼす有機酸の影響

◆有機酸無添加培地、■カフェー酸添加培地、▲フェルラ酸添加培地、×*p*-クマール酸添加培地、*シナピン酸添加培地、●ピロカテコール添加培地

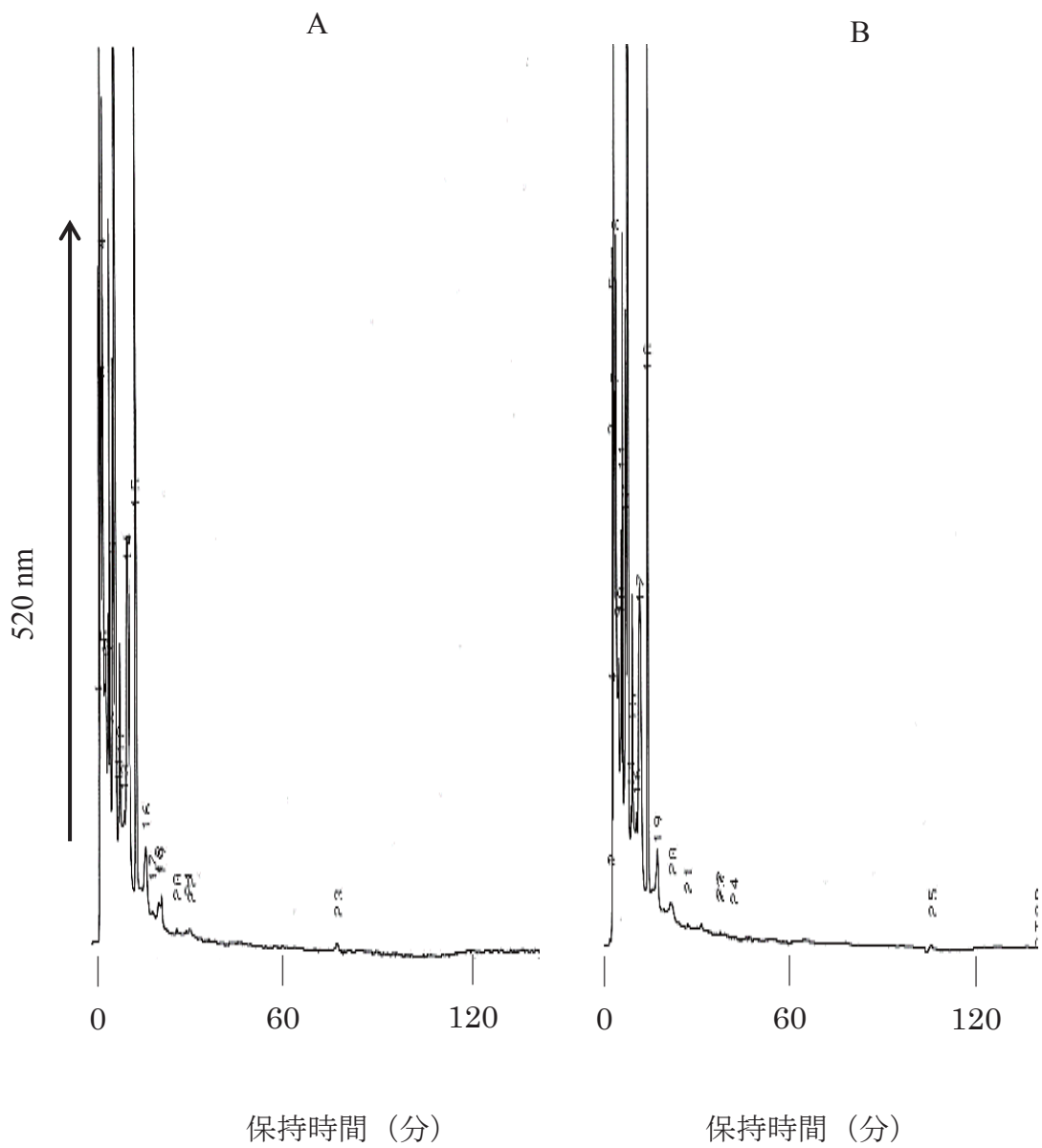


図4-5-1 520 nm による有機酸を含む黒米アントシアニン反応液のHPLCパターン
 A: 黒米抽出液 B: 有機酸無添加培地

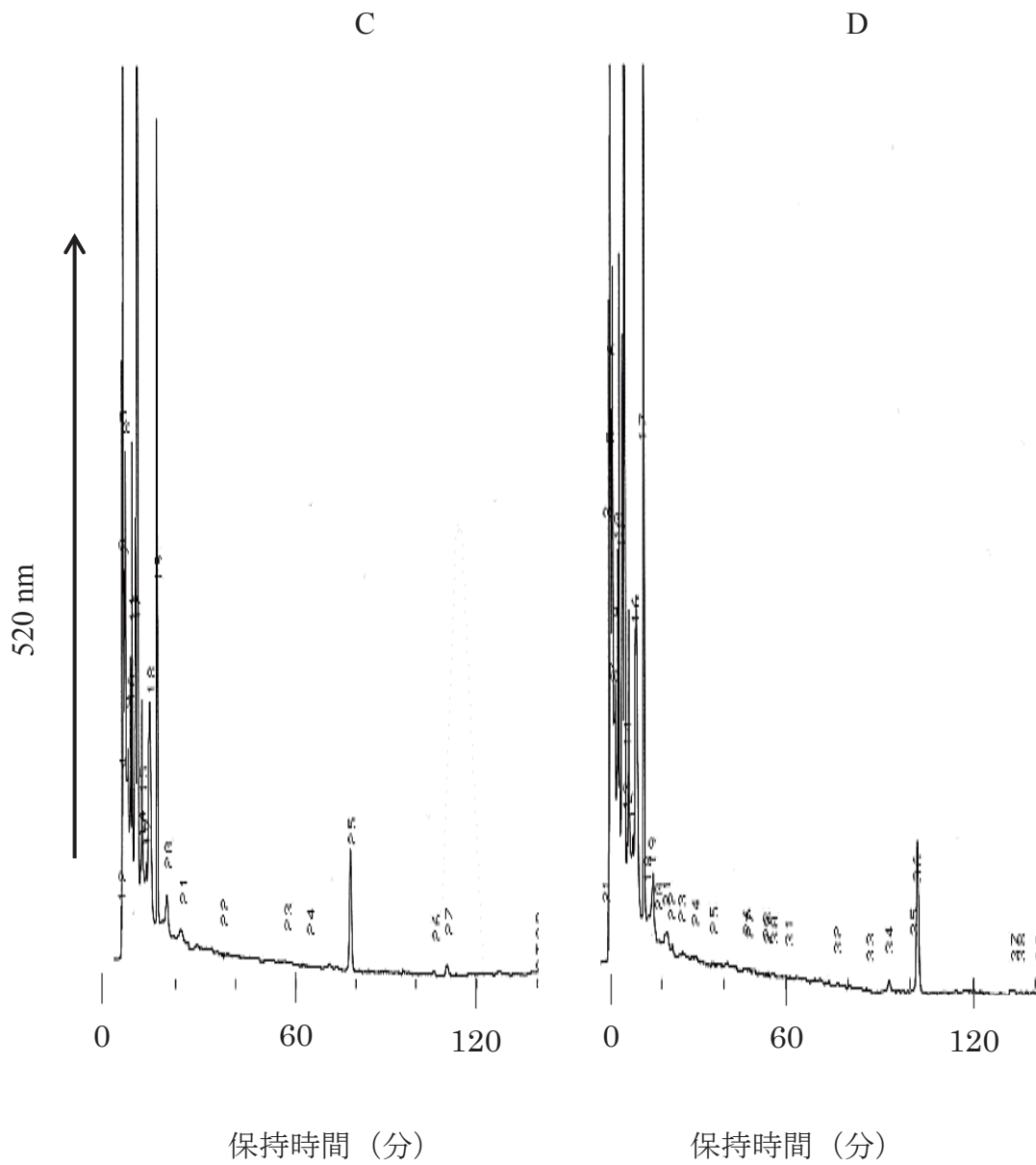


図4-5-2 520 nmによる有機酸を含む黒米アントシアニン反応液のHPLCパターン

C: カフェー酸添加培地 D: フェルラ酸添加培地

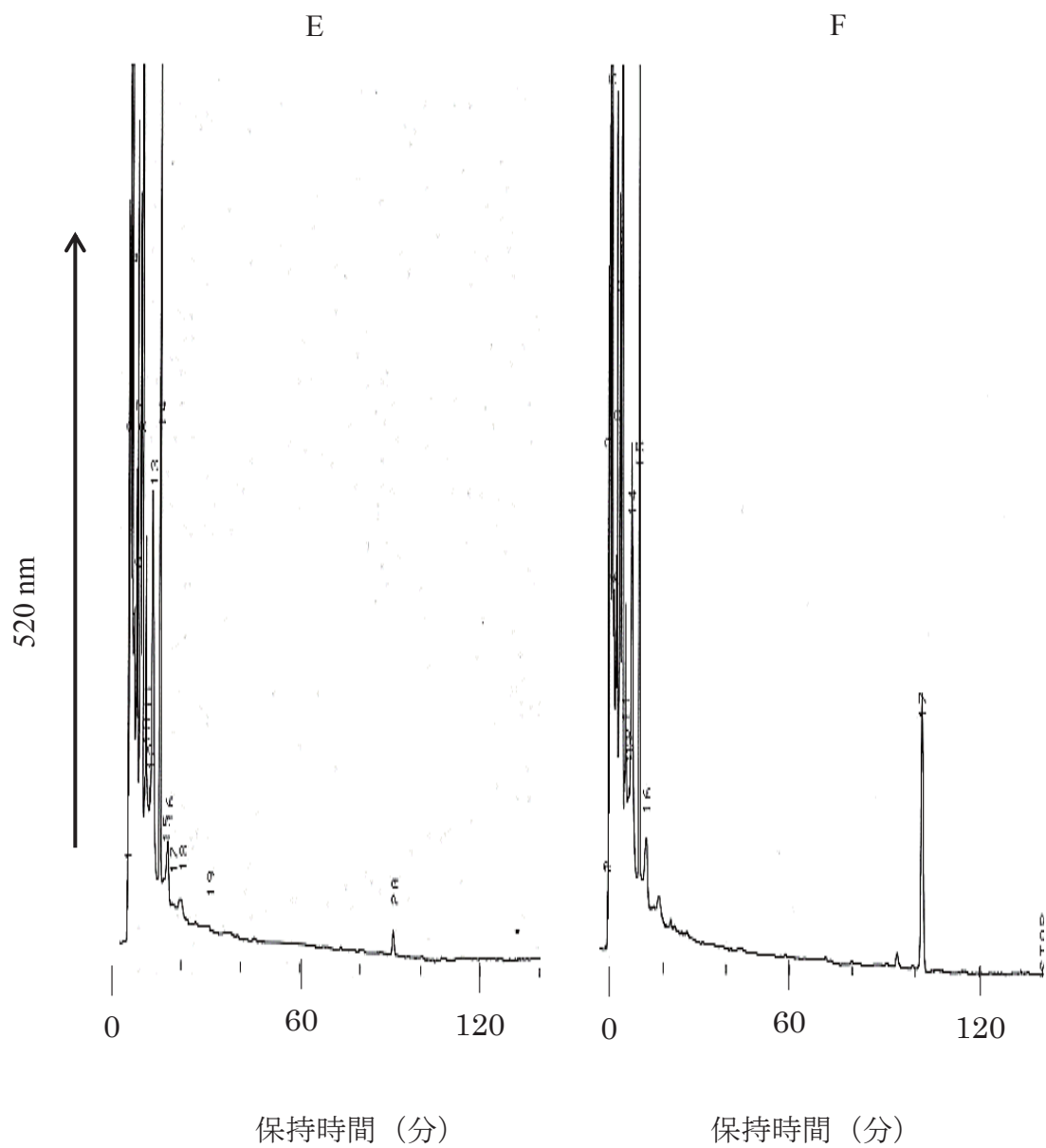


図 4-5-3 520 nm による有機酸を含む黒米アントシアニン反応液の HPLC パターン

E: *p*-クマル酸添加培地 F: シナピン酸添加培地

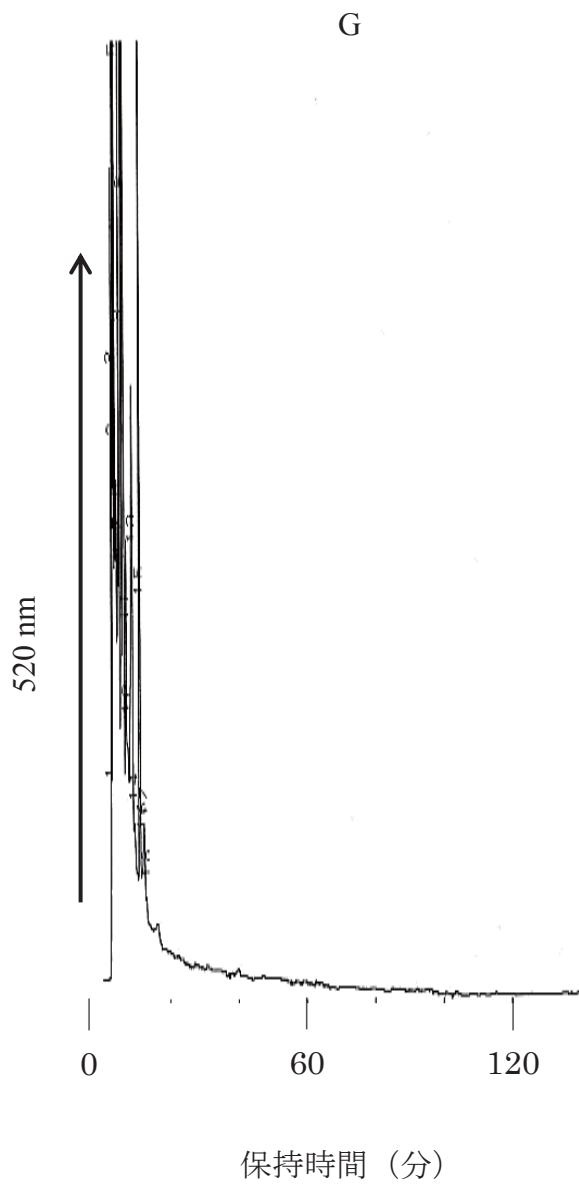


図 4-5-4 520 nm による有機酸を含む黒米アントシアニン反応液の HPLC パター
ン
G: ピロカテコール添加培地

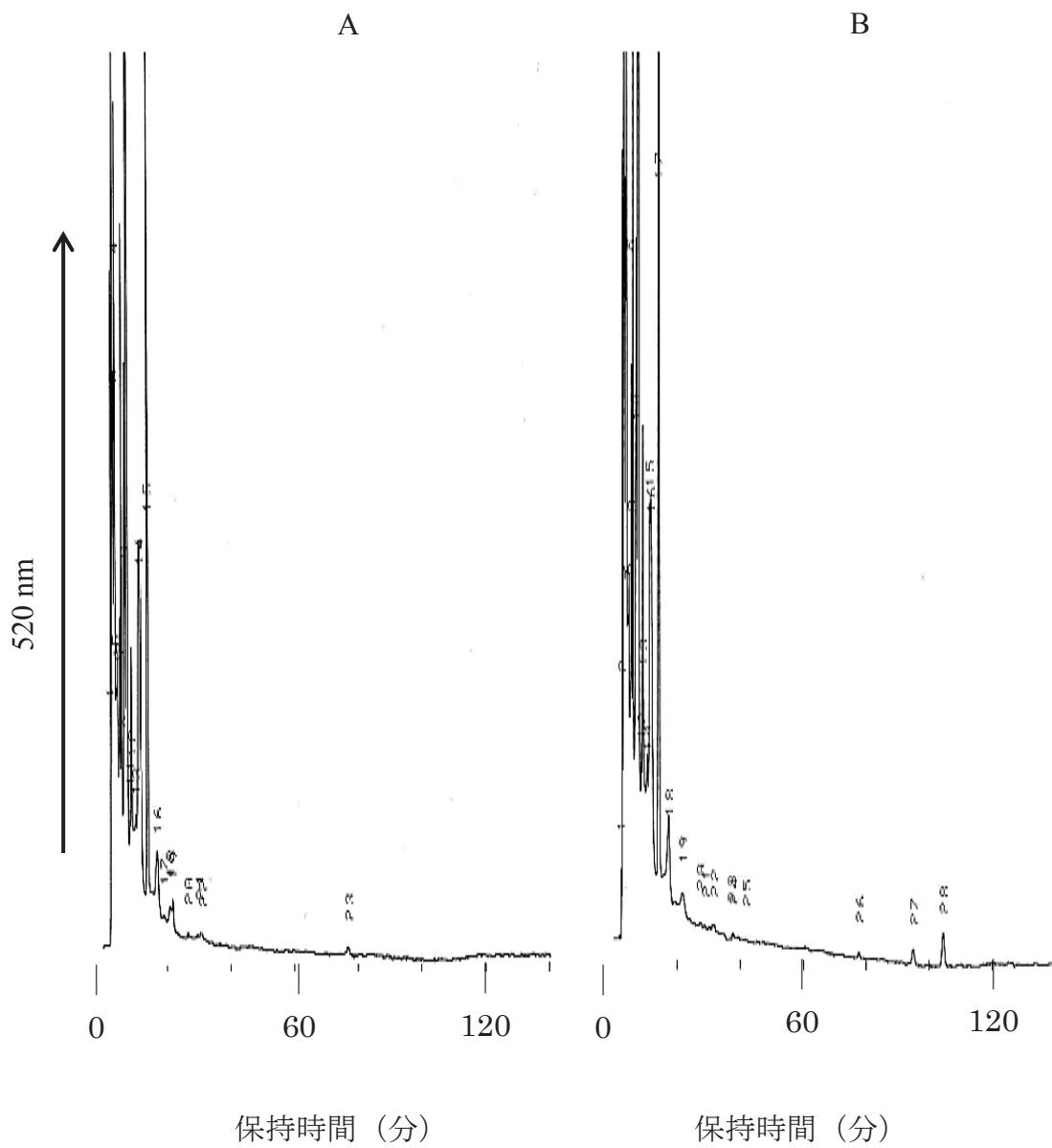


図 4-6-1 520 nm による有機酸を含む黒米アントシアニンと *E. aerogenes* NBRC13534 培養液の HPLC パターン
 A: 黒米抽出液 B: 有機酸無添加培地

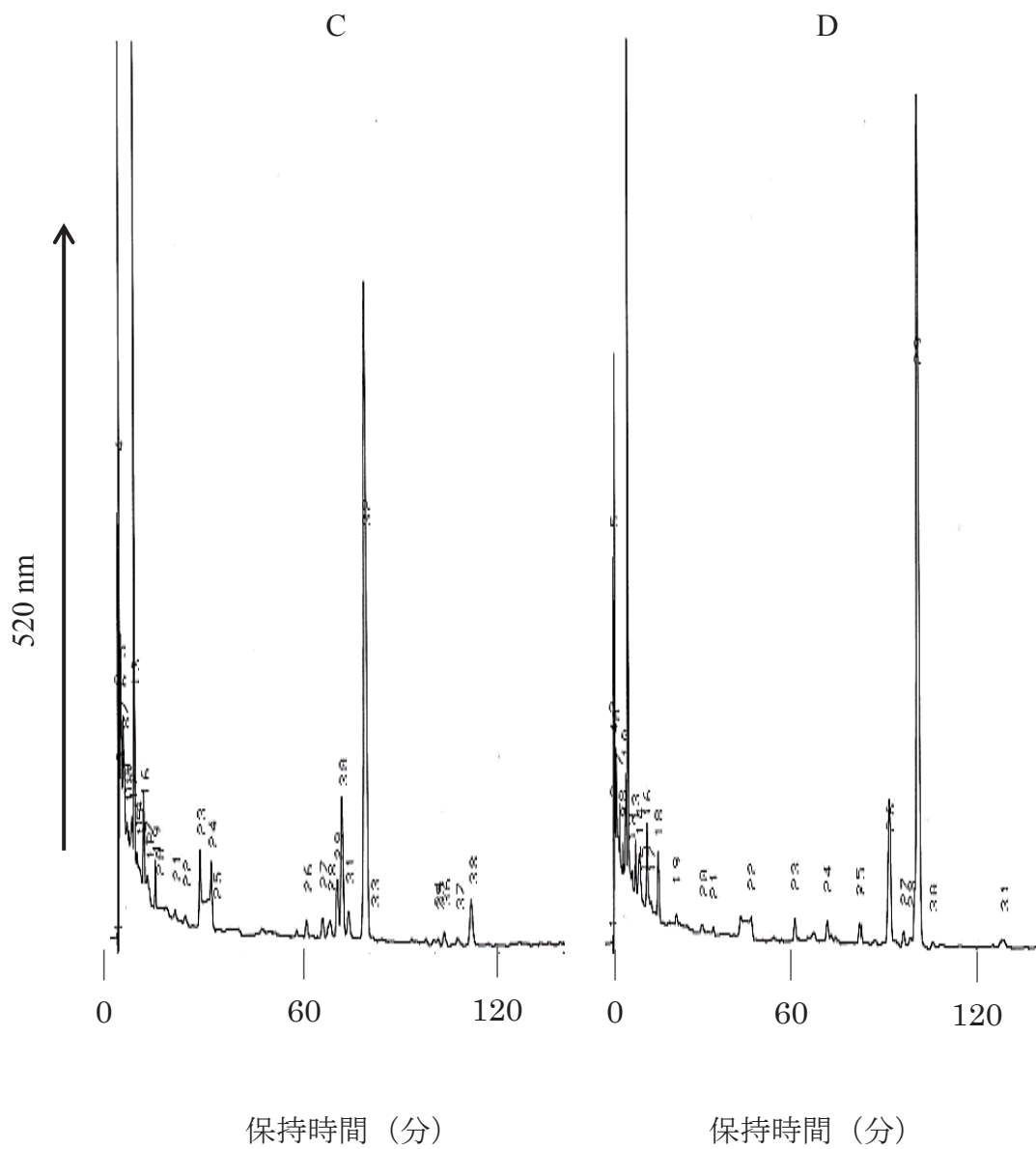


図 4-6-2 520 nm による有機酸を含む黒米アントシアニンと *E. aerogenes* NBRC13534 培養液の HPLC パターン
 C: カフェー酸添加培地 D: フェルラ酸添加培地

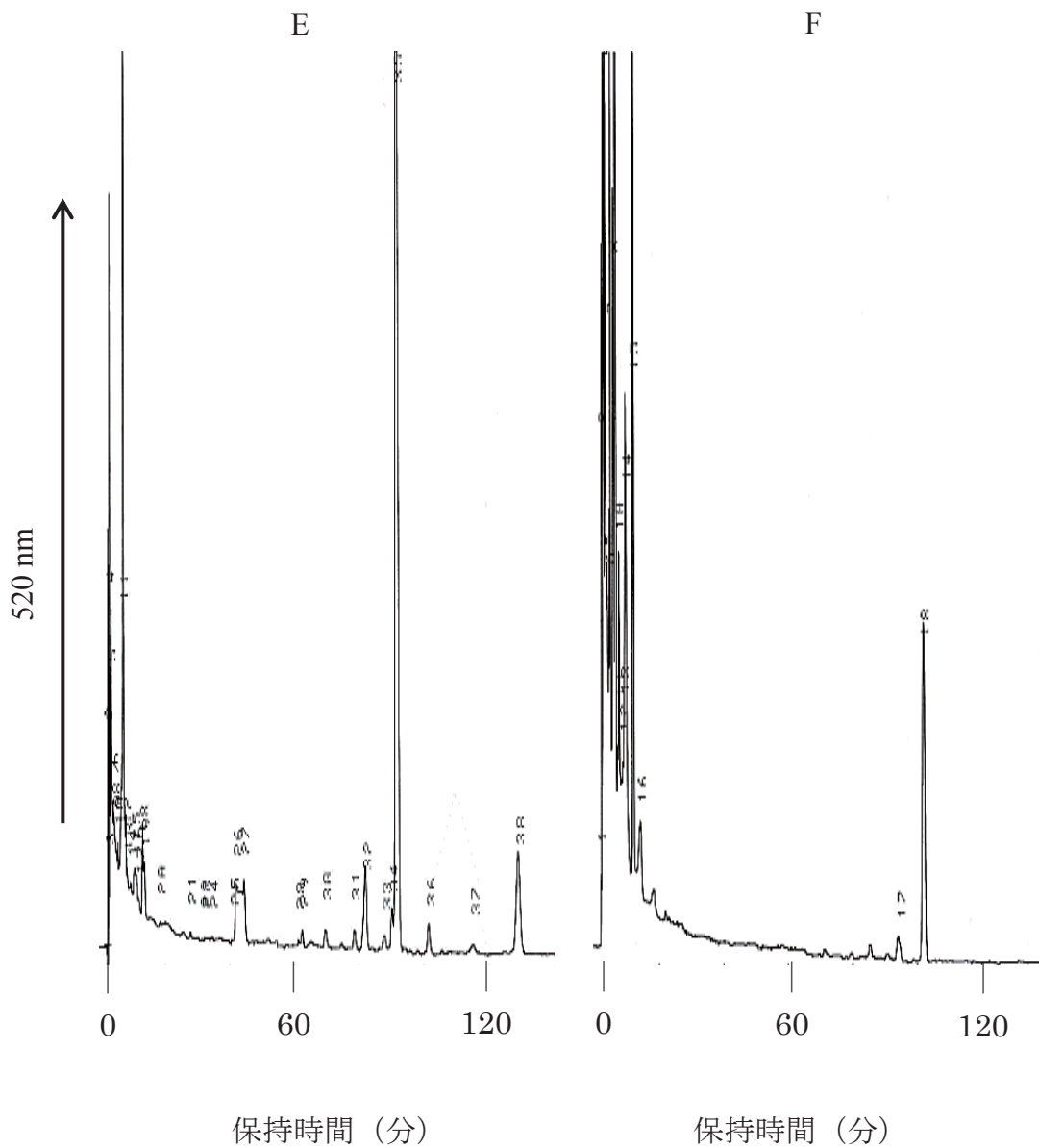


図 4-6-3 520 nm による有機酸を含む黒米アントシアニンと *E. aerogenes* NBRC13534 培養液の HPLC パターン
 E: *p*-クマル酸添加培地 F: シナピン酸添加培地

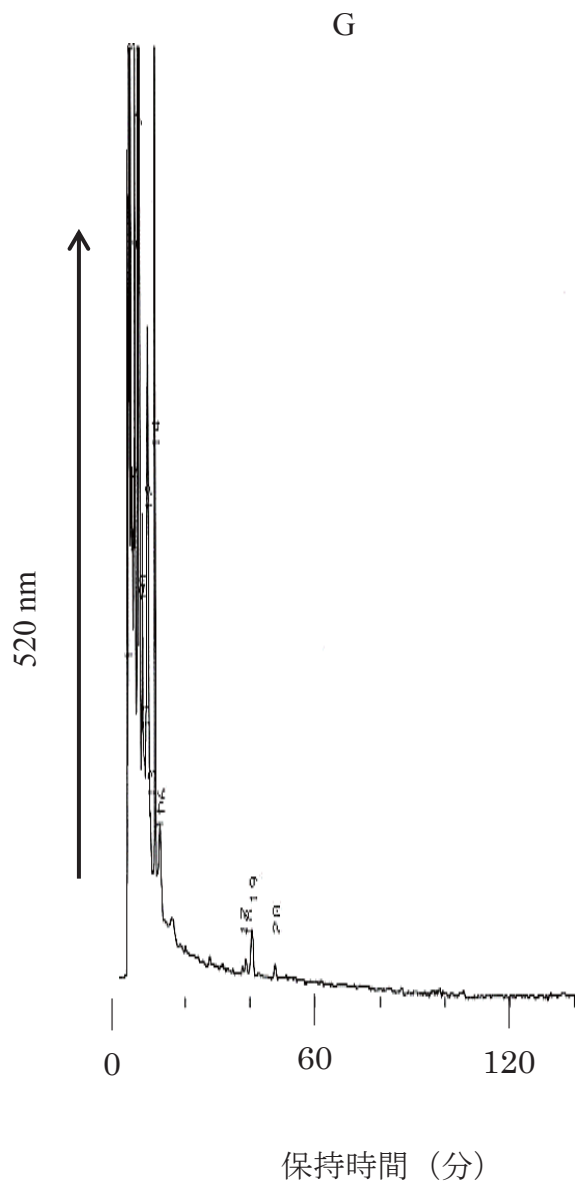


図 4-6-4 520 nm による有機酸を含む黒米アントシアニンと *E. aerogenes* NBRC13534 培養液の HPLC パターン
 G: ピロカテコール添加培地

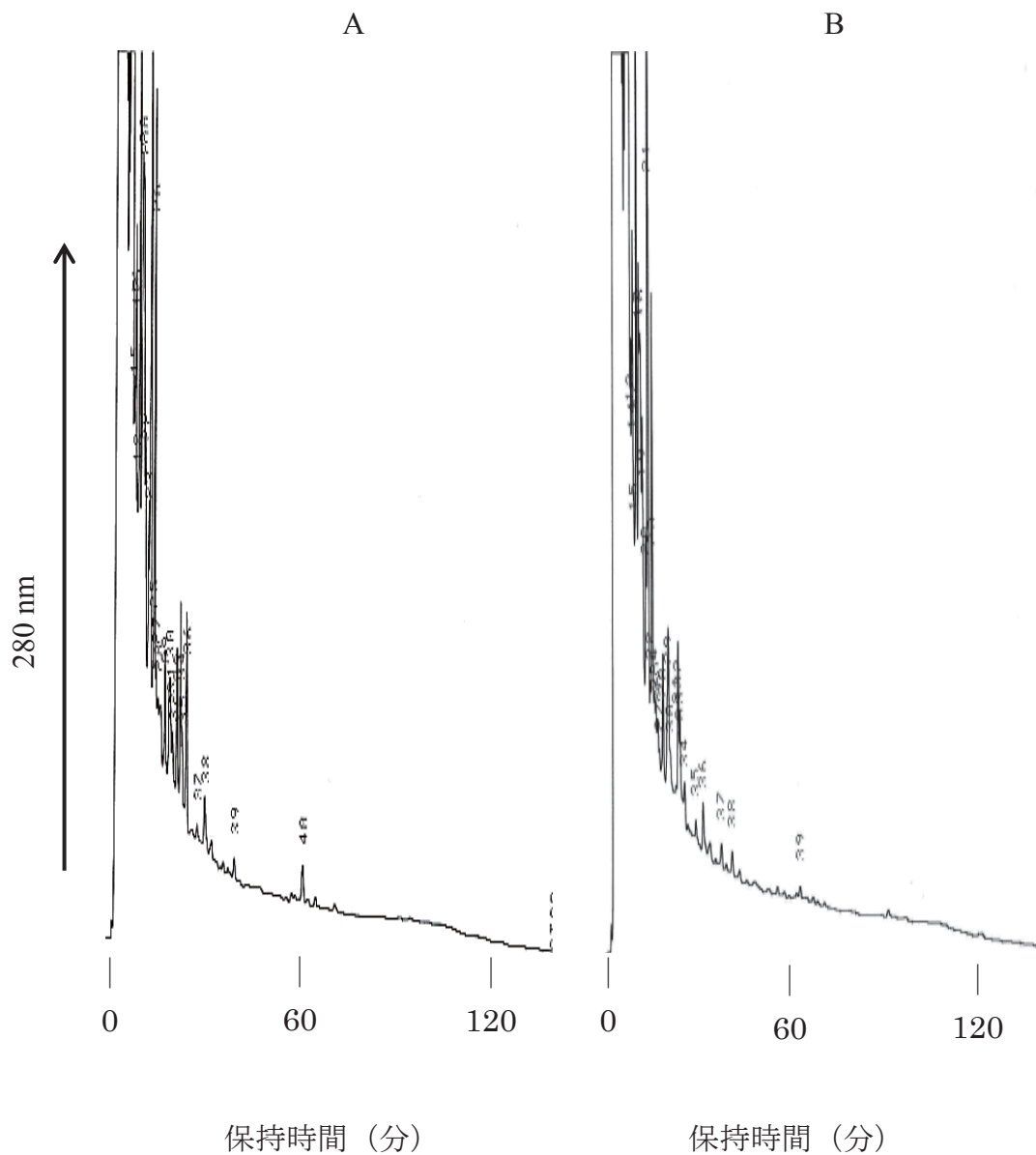


図 4-7-1 280 nm による有機酸を含む黒米アントシアニン反応液の HPLC パターン
 A: 黒米抽出液 B: 有機酸無添加培地

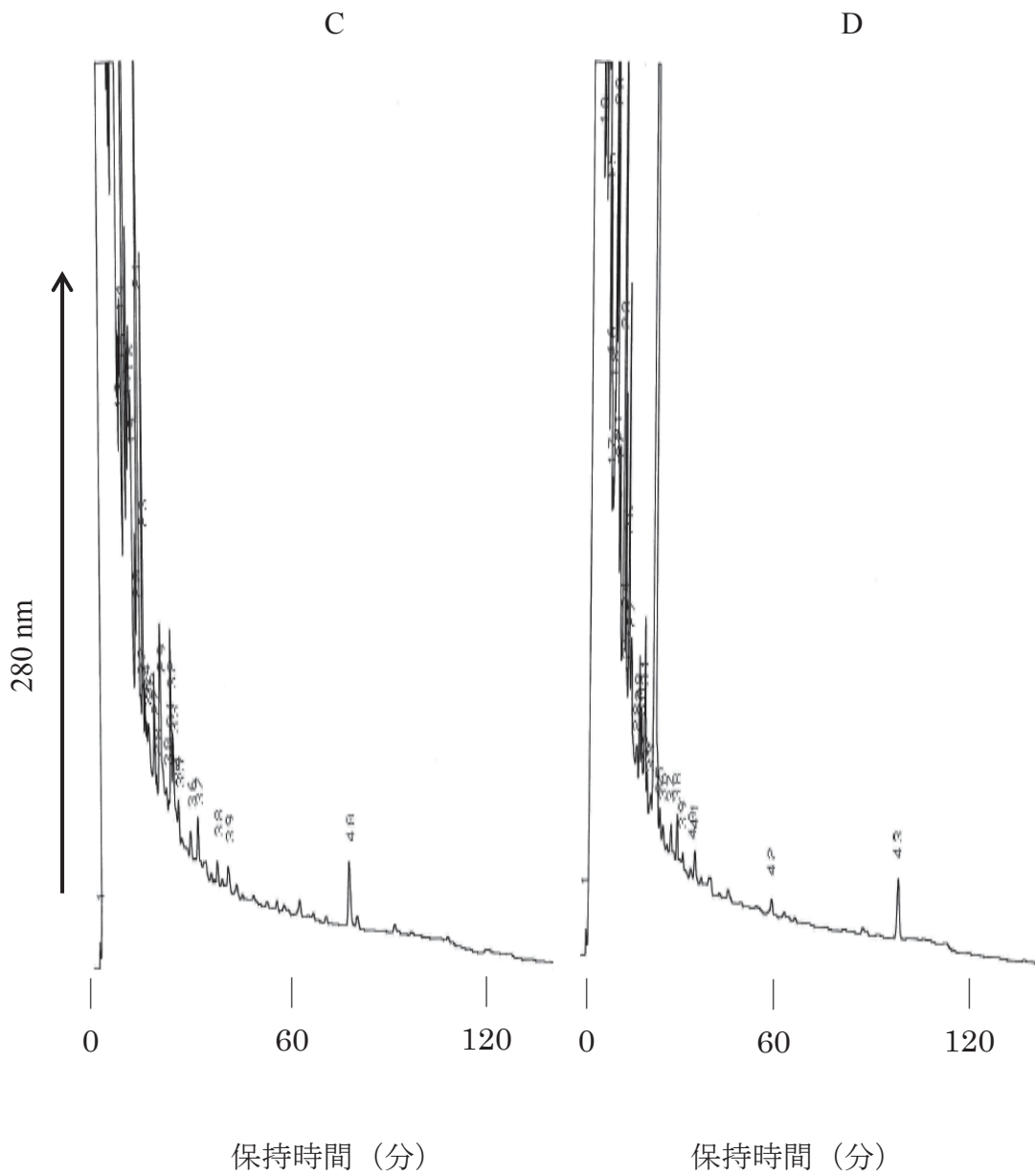


図4-7-2 280 nmによる有機酸を含む黒米アントシアニン反応液のHPLCパターン
 C: カフェー酸添加培地 D: フェルラ酸添加培地

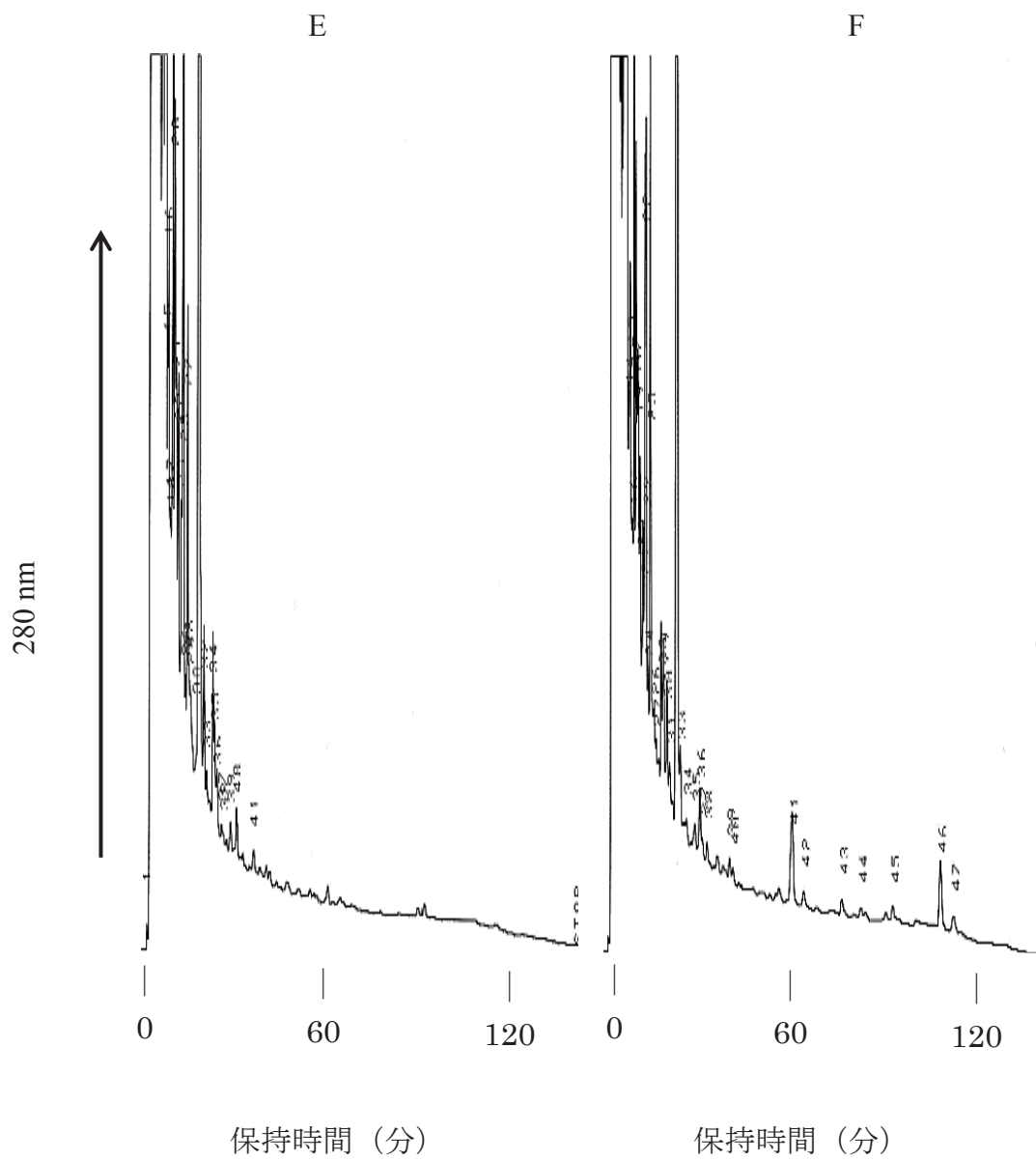


図 4-7-3 280 nm による有機酸を含む黒米アントシアニン反応液の HPLC パターン
 E: *p*-クマル酸添加培地 F: シナピン酸添加培地

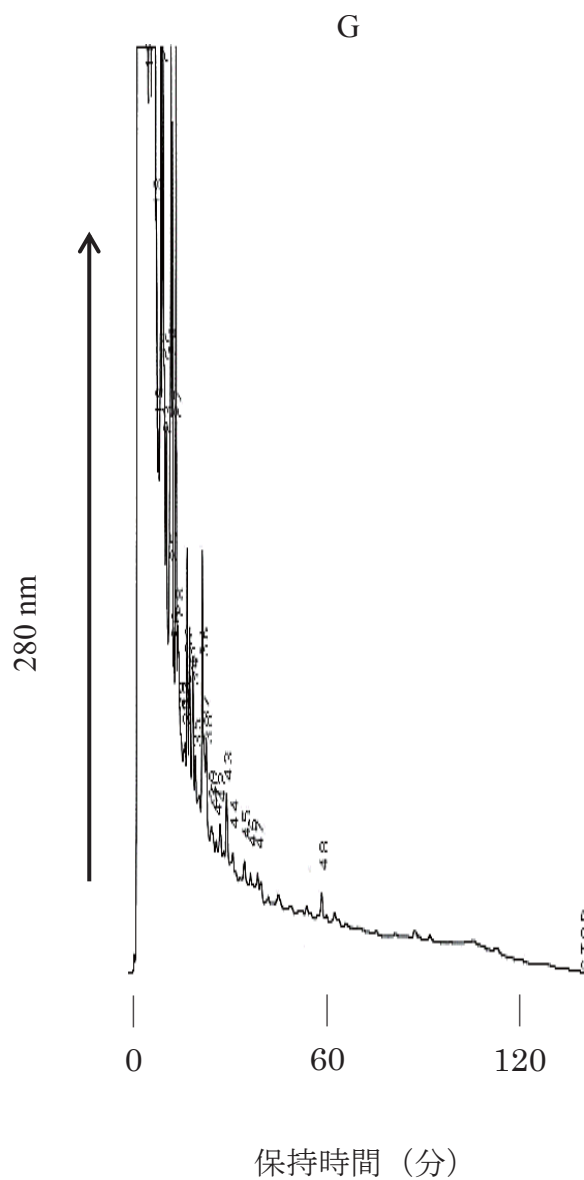


図4-7-4 280 nm による有機酸を含む黒米アントシアニン反応液のHPLCパターン
 G: ピロカテコール添加培地

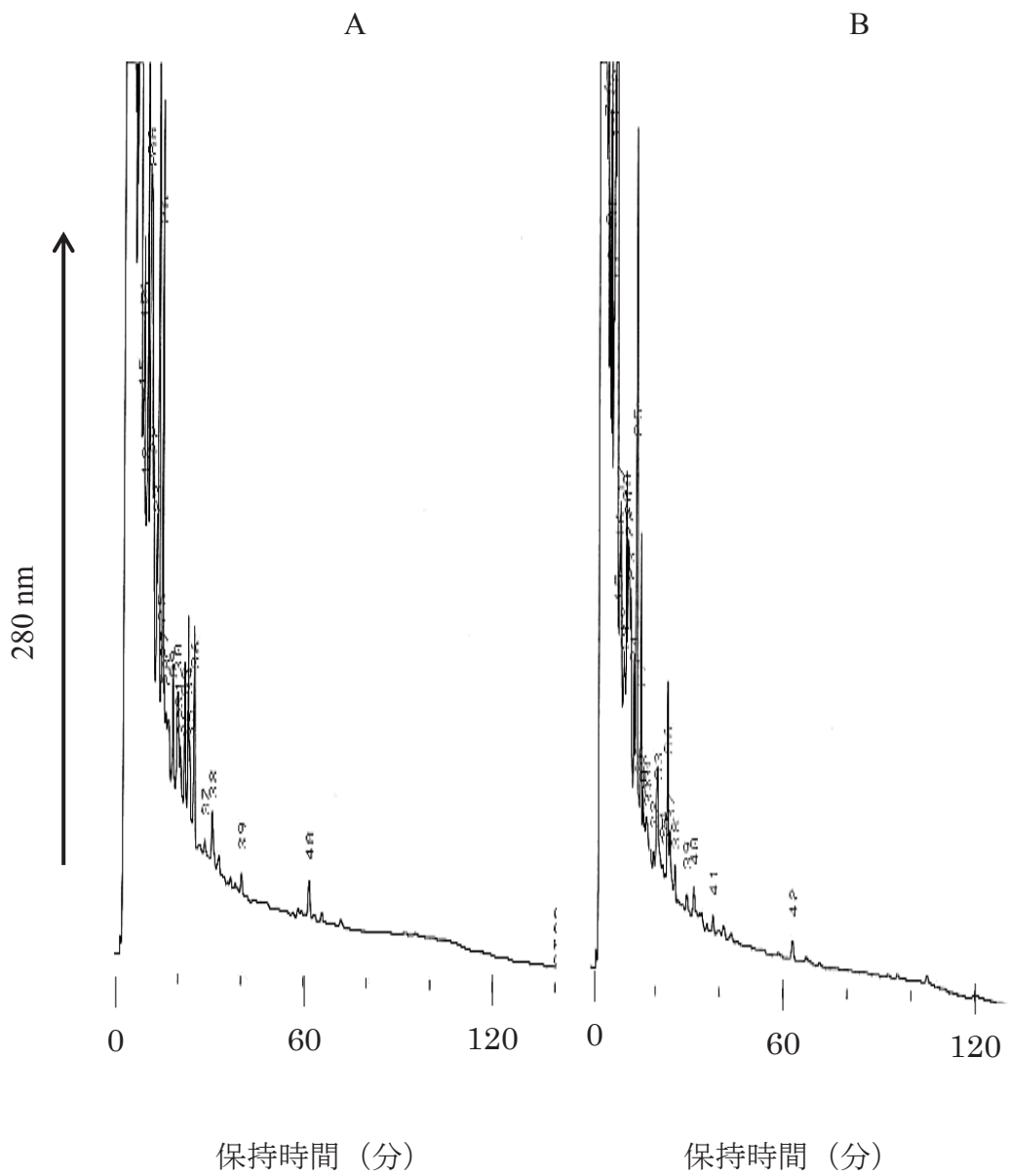


図 4-8-1 280 nm による有機酸を含む黒米アントシアニンと *E. aerogenes* NBRC13534 培養液の HPLC パターン
 A: 黒米抽出液 B: 有機酸無添加培地

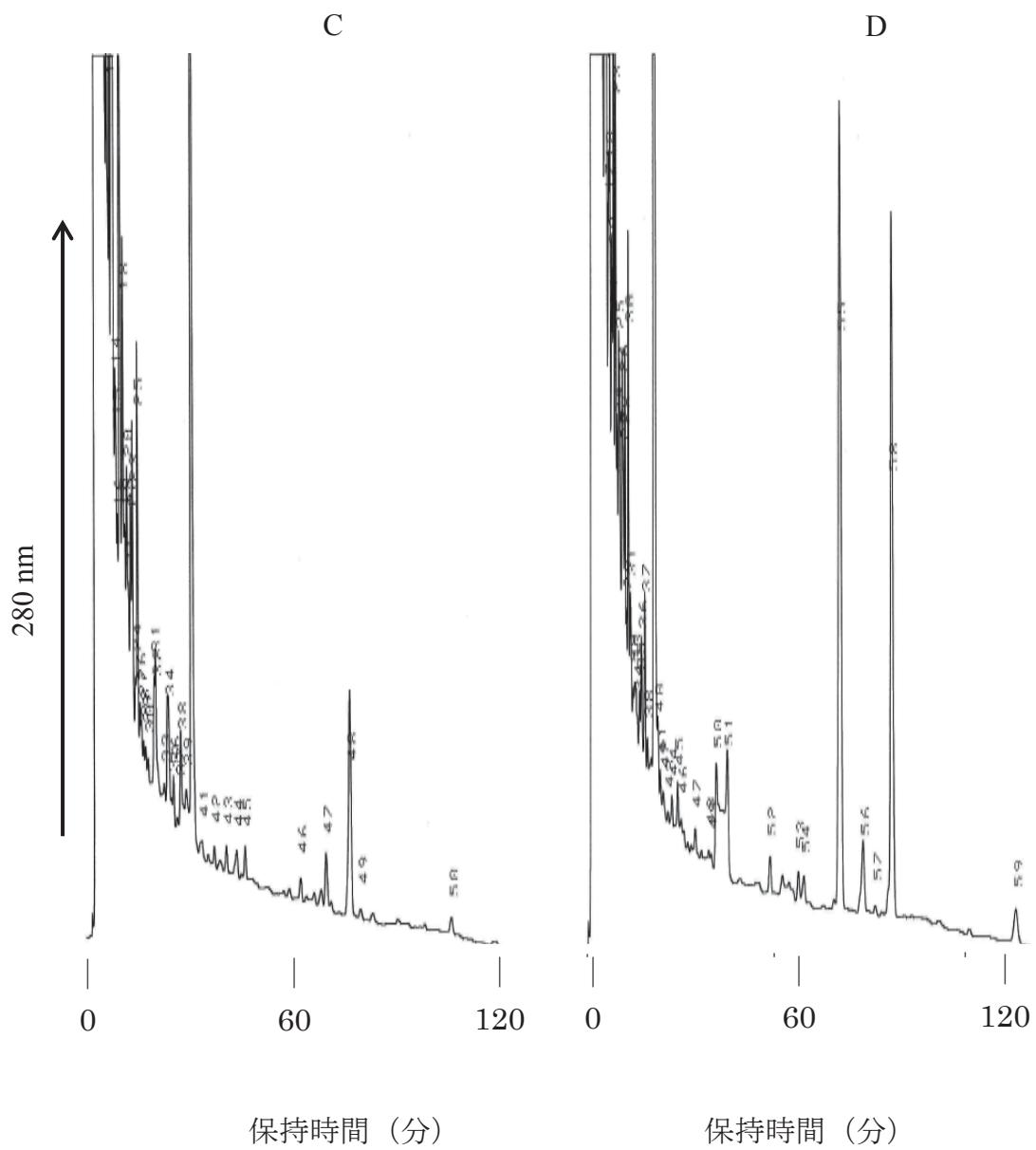


図 4-8-2 280 nm による有機酸を含む黒米アントシアニンと *E. aerogenes* NBRC13534 培養液の HPLC パターン
 C: カフェー酸添加培地 D: フェルラ酸添加培地

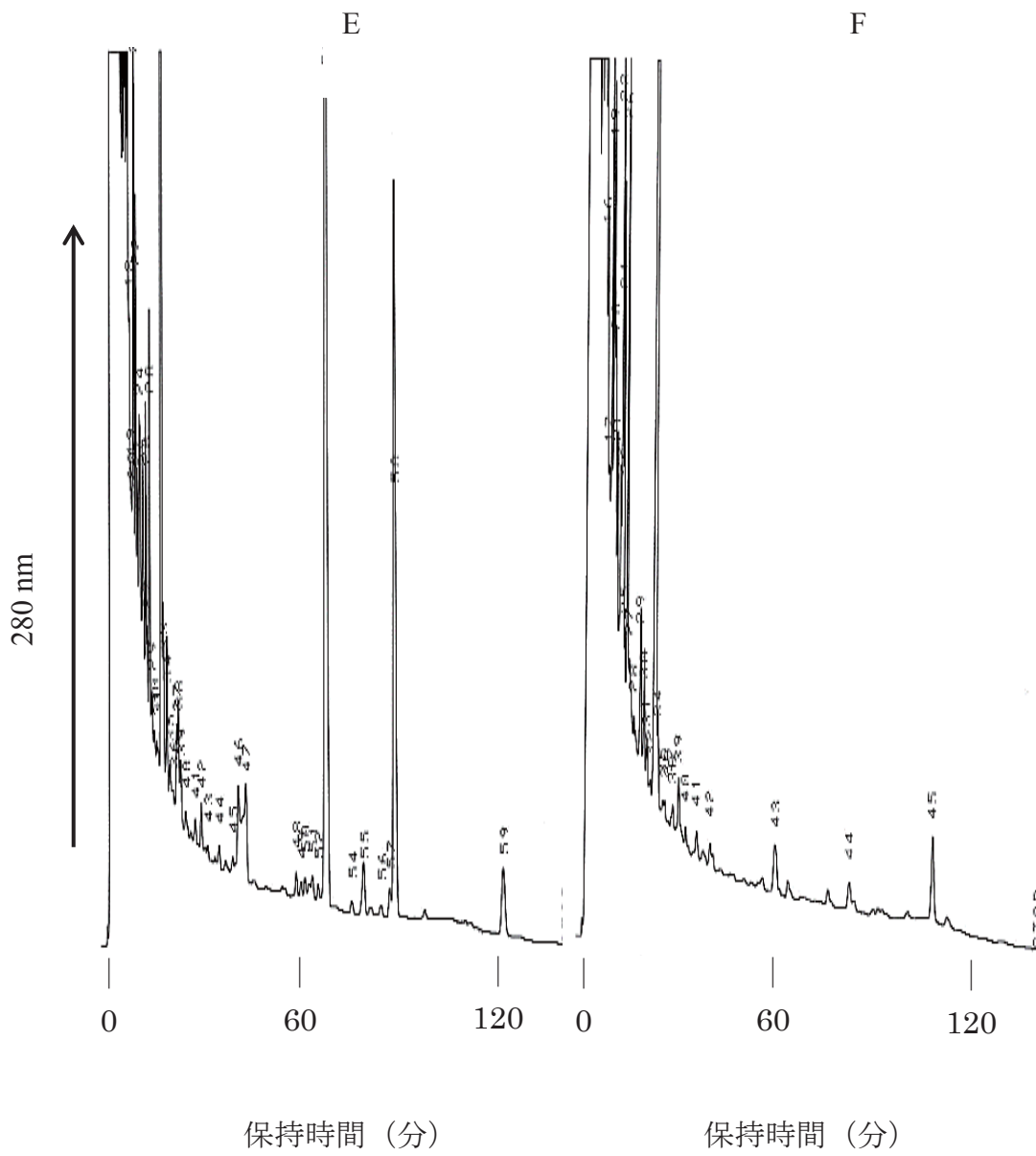


図 4-8-3 280 nm による有機酸を含む黒米アントシアニンと *E. aerogenes* NBRC13534 培養液の HPLC パターン

E: *p*-クマル酸添加培地 F: シナピン酸添加培地

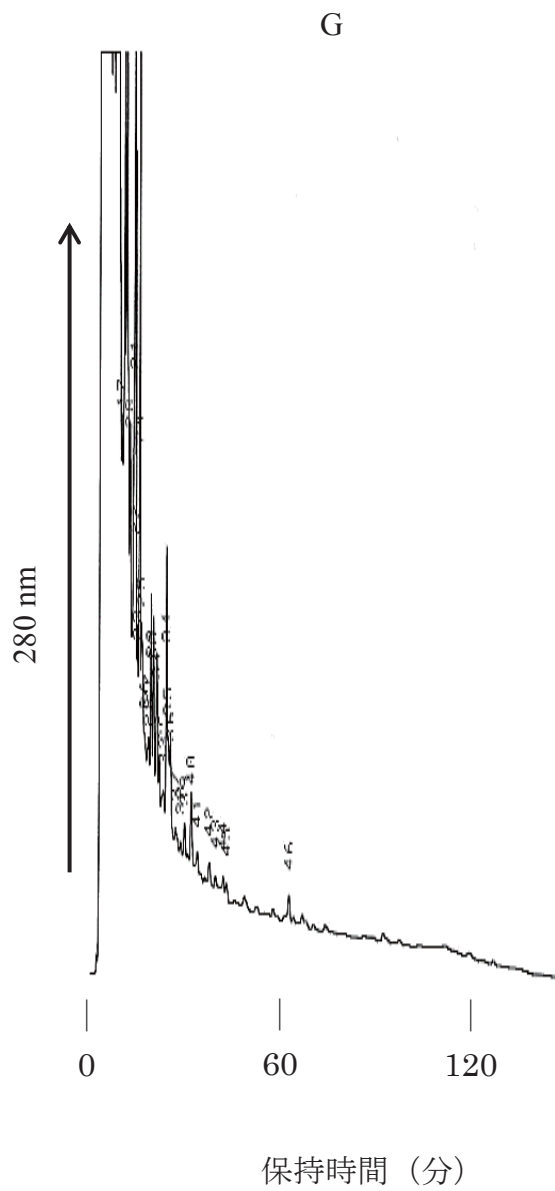


図 4-8-4 280 nm による有機酸を含む黒米アントシアニンと *E. aerogenes* NBRC13534 培養液の HPLC パターン
 G: ピロカテコール添加培地

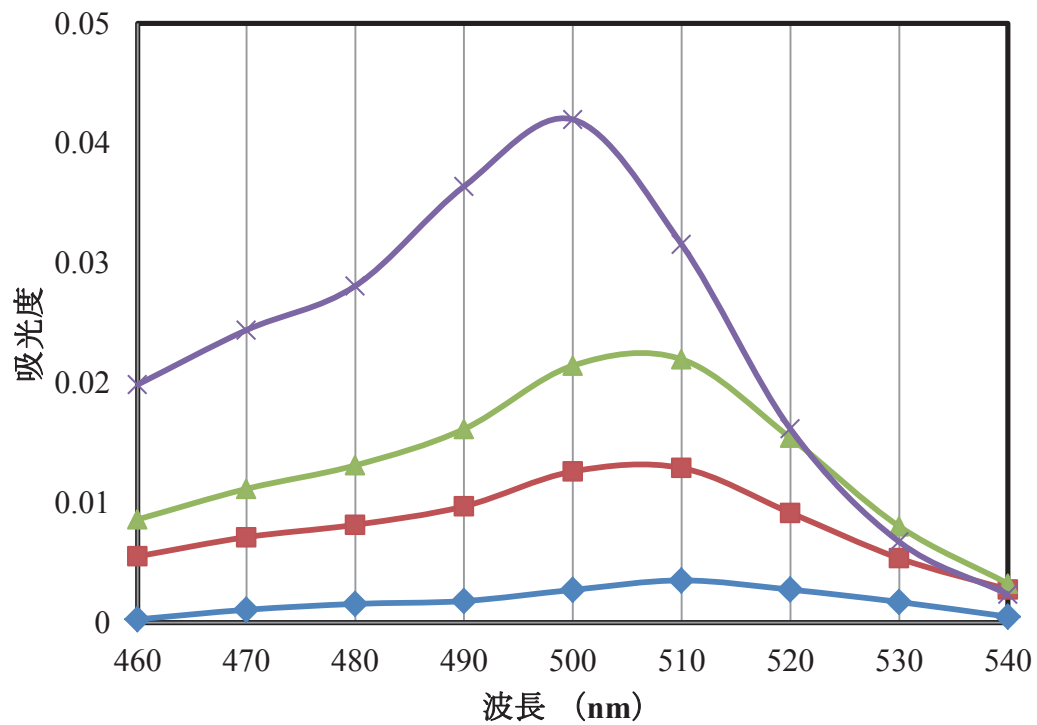


図 4-9 有機酸と *E. aerogenes* NBRC13534 による新規色素の吸収スペクトル
 ■カフェー酸添加培地、▲フェルラ酸添加培地、×*p*-クマル酸、◆シナピン酸
 検出波長 520 nm で確認された各種有機酸添加 *E. aerogenes* NBRC13534 培養培地の新規ピーク。カフェー酸添加培地 79 分、フェルラ酸添加培地で 101 分、*p*-クマル酸添加培地は 92 分、シナピン酸添加培地は 102 分。

第5章 *E. aerogenes* NBRC13534 の固体培養における菌体の色質変化

第1節 緒言

E. aerogenes NBRC13534 は黒米抽出液と有機酸を添加した最適固体培地である NBRC No. 802 上で培養した場合、菌体の色はクリーム色に変化した。しかし、黒米抽出液と有機酸を添加した PDA 培地では菌体は赤色に変化していた。このことから、*E. aerogenes* NBRC13534 は体内にアントシアニンを吸収し、変化させると思われた。

そこで、本章ではアントシアニンを吸収する *E. aerogenes* NBRC13534 の色質変化について検討した。また、黒米糠醗酵のアントシアニン、フェノール含量を変化させる可能性が酵母で報告¹⁷⁾されているので、*E. aerogenes* NBRC13534 の比較として、酵母による検討も行った。

第2節 実験材料と方法

5-2-1 黒米アントシアニン抽出液の調製

2-2-1 参照

5-2-2 メンブレンフィルターを用いた *E. aerogenes* NBRC13534 の培養

ポリペプトンと酵母エキス、PDA（ポテトデキストロース寒天）は日本製薬株式会社（東京）から購入した。MgSO₄・7H₂O、カフェー酸とフェルラ酸はナカライテスク株式会社（京都）から購入した。*E. aerogenes* NBRC13534 の最適培地である NBRC No. 802 培地（ポリペプトン 1 g、酵母エキス 0.2 g、MgSO₄・7H₂O 0.1 g、寒天 1.5 g、脱イオン水 100 ml）と、NBRC No. 802 培地に各有機酸（カフェー酸、フェルラ酸）0.01 g を添加した有機酸添加 NBRC No. 802 を三角フラスコに調製した。各培地をオートクレーブ後、無菌状態でシャーレに分注し、冷却した。メンブレンフィルター（MATERIAL: MIXED CELLULOSE ESTER、PORE SIZE: 0.2 μ、DIAMETER: 47 mm）は ADVANTEC（東京）から購入した。NBRC No. 802 培地上に UV 殺菌したメンブレンフィルターを空気が入らないようにピンセットでのせ、メンブレンフィルター上に *E. aerogenes* NBRC13534 を白金耳で植菌した。培養は2日間 37°Cで行った。黒米アントシアニン抽出液 100 mL、PDA 3.9 g を三角フラスコ内で調製し、黒米 PDA 培地とした。また、各有機酸（カフェー酸、フェルラ酸）0.01 g を添加した有機酸添加黒米 PDA 培地を調製した。各培地を沸騰水浴中で5分間湯せんし、無菌状態でシャーレに分注し、冷却した。NBRC No. 802 のメンブレンフィルター上で培養した *E. aerogenes*

NBRC13534 をメンブレンフィルターごとピンセットで NBRC No. 802 培地から取出し、黒米 PDA 培地に移した。黒米 PDA 培地上での培養は 5 日間 37°C で行った。また、メンブレンフィルターの移動は、①NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、②NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、④有機酸添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地の 4 種類の移動を行った。

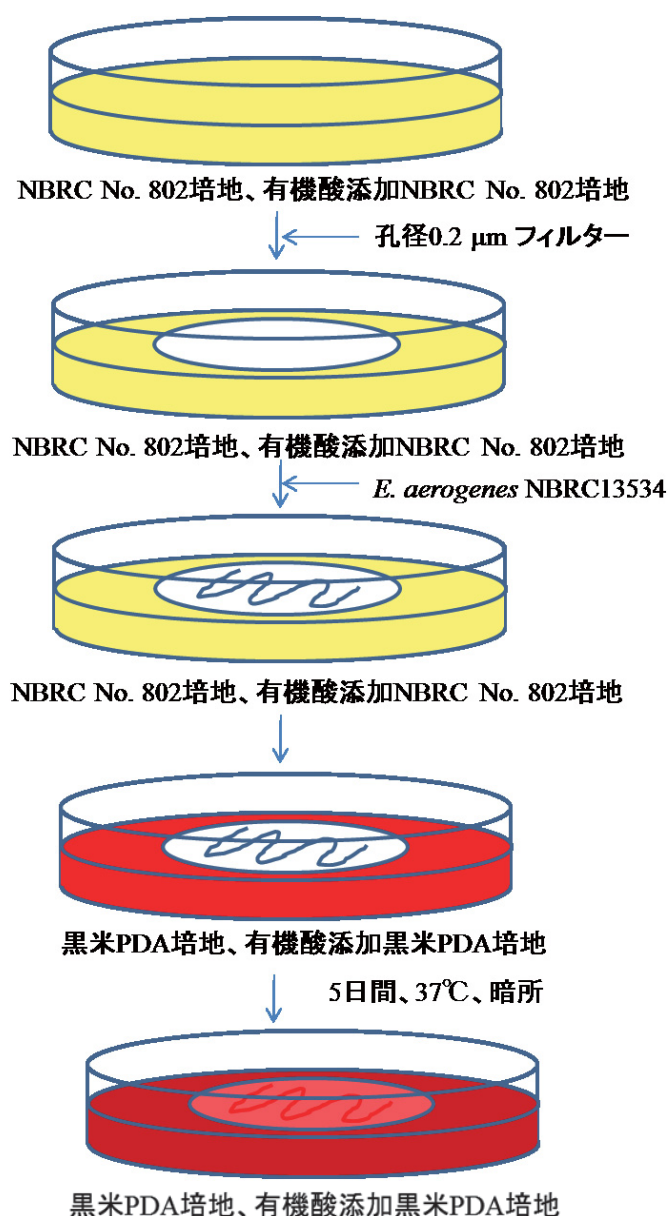


図 5-1 メンブレンフィルターを使用した *E. aerogenes* NBRC13534 の培養

5-2-3 菌体と培地の連続吸光度測定

菌体の連続吸光度測定は、黒米 PDA 培地と有機酸添加黒米 PDA 培地のメンブレンフィルター上で *E. aerogenes* NBRC13534 を 5 日間 37°C で培養した後に、メンブレンフィルターをピンセットで培地から取出し、二枚分のメンブレンフィルターを 15%酢酸 50 ml の中に *E. aerogenes* NBRC13534 を懸濁した。懸濁のうち、メンブレンフィルターを取り出し、1 時間 15°C で色素抽出を行った。抽出した溶液をメンブレンフィルター (DISMIC-13HP PTFE 0.2 μm、ADVANTEC、東京) でろ過し、連続吸光度測定を行った。培地の連続吸光度測定は、メンブレンフィルターを取り除いた各培地を潰し、培地 12.5 g と 15%酢酸 15 ml を混合し、一晩 15°C で色素抽出を行った。抽出した溶液をメンブレンフィルターでろ過し、分光光度計 (U-3010、株式会社日立ハイテクサイエンス、東京) を用いて連続吸光度測定を行った。

5-2-4 メンブレンフィルターを使用した酵母の培養

E. aerogenes NBRC13534 の比較として、清酒用酵母であるきょうかい 7 号 (K-7) とワイン用酵母であるきょうかいブドウ酒用酵母 4 号 (W-4) を使用した。ポリペプトンと酵母エキスは日本製薬株式会社 (東京) から購入した。グルコース、カフェー酸、フェルラ酸はナカライテスク株式会社 (京都) から購入した。酵母の最適培地である YPD 培地 (ポリペプトン 2 g、酵母エキス 1 g、グルコース 2 g、寒天 1.5 g、脱イオン水 100 ml) と、YPD 培地に各有機酸 (カフェー酸、フェルラ酸) 0.01 g を添加した有機酸添加 YPD 培地を三角フラスコに調製した。各培地をオートクレーブ後、無菌状態でシャーレに分注し、冷却した。YPD 培地上に UV 殺菌したメンブレンフィルターを空気が入らないようにピンセットでのせ、メンブレンフィルター上に K-7 と W-4 を白金耳で植菌した。培養は 2 日間 37°C で行った。PDA は日水製薬株式会社から購入した。黒米アントシアニン抽出液 100 mL、PDA 3.9 g を三角フラスコ内で調製し、黒米 PDA 培地とした。また、各有機酸 (カフェー酸、フェルラ酸) 0.01 g を添加した有機酸添加黒米 PDA 培地を調製した。各培地を沸騰水浴中で 5 分間湯せんし、無菌状態でシャーレに分注し、冷却した。NBRC No. 802 のメンブレンフィルター上で培養した K-7 と W-4 をメンブレンフィルターごとピンセットで NBRC No. 802 培地から取出し、黒米 PDA 培地に移した。黒米 PDA 培地上での培養は 2 日間 37°C で行った。また、メンブレンフィルターの移動は、⑤YPD 培地から黒米 PDA 培地、⑥YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、⑦有機酸添加 YPD 培地から黒米 PDA 培地、⑧有機酸添加 YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地の 4 種類の移動を行った。

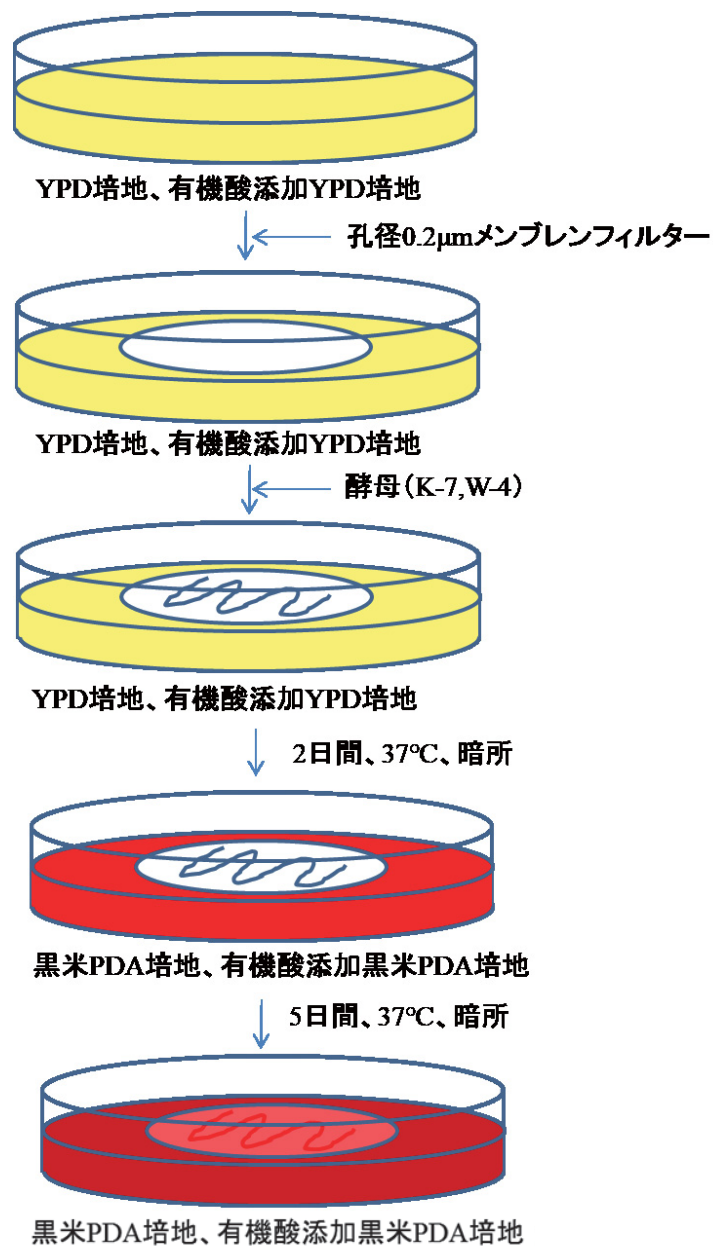


図 5-2 メンブレンフィルターを使用した酵母の培養

5-2-5 菌体の色質分析

各種最適培地から黒米 PDA 培地にメンブレンフィルターを移動した後の時間経過と共に色質が変化する様子を 0 分、10 分、50 分、1 日、2 日後を観察した。

5-2-6 菌体と培地の連続吸光度測定

菌体の連続吸光度測定は、黒米 PDA 培地と有機酸添加黒米 PDA 培地のメンブレンフィルター上で W-4 と *E. aerogenes* NBRC13534 を 2 日間 37°C で培養した後に、メンブレンフィルターをピンセットで培地から取出し、二枚分のメンブレンフィルターを 15%酢酸 50 ml の中に W-4 と *E. aerogenes* NBRC13534 を懸濁した。懸濁のち、メンブレンフィルターを取り出し、1 時間 15°C で色素抽出をした。抽出した溶液をメンブレンフィルター (DISMIC-13HP PTFE 0.2 μm 、ADVANTEC、東京) でろ過し、連続吸光度測定を行った。培地の連続吸光度測定は、メンブレンフィルターを取り除いた各培地を潰し、培地 12.5 g と 15%酢酸 15 ml を混合し、一晚 15°C で色素抽出を行った。抽出した溶液をメンブレンフィルターでろ過し、連続吸光度測定を行った。

第 3 節 結果と考察

5-3-1 菌体内黒米アントシアニンと、菌体外黒米アントシアニンの色質変化

E. aerogenes NBRC13534 の培養に用いたメンブレンフィルターは、①NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、②NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、④有機酸添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、の 4 種類の移動を行った。有機酸を添加していない培地で培養した *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体は紫色をしており、培地の色の变化も見られなかった。有機酸を最初に添加した培地は *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体は赤く、培地の色も少し赤くなっていた。有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地の *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体は赤く、培地の色は有機酸を最初に添加した培地よりも濃い赤色に変化していた。また、有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地からメンブレンフィルターを取り除くと *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体が存在した場所の色が抜けていた (図 5-3)。このことから、*E. aerogenes* NBRC13534 は有機酸存在下で培養することで、菌体の色質が赤色に変化し、更には黒米抽出液と有機酸が同時に存在することでより多くの黒米アントシアニンを分解、吸収していると推察した。*E. aerogenes* NBRC13534 を 15%酢酸で色素抽出した菌体抽出液は有機酸を添加していない培地が黒米抽出液と同じ 520 nm の極大吸収値を示した。また、有機酸を最初に添加した培地は 510 nm、有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地は 500 nm に極大吸収値を示した (図 5-4)。培地を 15%酢酸で色素抽出した培地抽出液は有機酸を添加していない培地が黒米抽出液と同じ 520 nm であり、有機酸を一度でも添加した培地は 510 nm の極大吸収値を示した (図 5-4)。

このことから、菌体を通さないメンブレンフィルター上で *E. aerogenes* NBRC13534 を培養することで、*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体外酵素で黒米アントシアニンを変化させていることが判明した。また、菌体内でもアントシアニンの色質の変化が示唆され、菌体外酵素、菌体内酵素共に黒米アントシアニンが変化していると判明した。

また、K-7、W-4、*E. aerogenes* NBRC13534 をそれぞれの最適培地で、メンブレンフィルター上で培養した後に、黒米 PDA 培地と有機酸添加黒米 PDA 培地にメンブレンフィルターを移動した。移動後、0 分、10 分、50 分、1 日、2 日目の色質変化を確認した。*E. aerogenes* NBRC13534 は①NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、②NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、④有機酸添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地の 4 種類の移動を行った。

酵母は⑤YPD 培地から黒米 PDA 培地、⑥YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、⑦有機酸添加 YPD 培地から黒米 PDA 培地、⑧有機酸添加 YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地の 4 種類の移動を行った。K-7、W-4、*E. aerogenes* NBRC13534 の最適培地で培養した際の菌体の色はどれもクリーム色であった。

菌体を培養したメンブレンフィルターを黒米 PDA 培地または有機酸添加黒米 PDA 培地に移動すると、K-7 は、50 分後も菌体の色の変化は確認できなかった。W-4 は、10 分後には少し菌体が赤く変化し、50 分後にはさらに菌体が赤く変化していた。*E. aerogenes* NBRC13534 も W-4 と同様に 10 分後に少し菌体が赤く編みあしたが、50 分後の菌体の色は W-4 よりも薄い赤色であった。また、1 日目、2 日目の K-7 は 0 日目より若干赤く菌体の色の変化していた。W-4 は 0 日目よりも菌体は赤色を示した。しかし、1 日目と 2 日目の変化は確認されなかった。*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体は 0 日目よりも有機酸を添加していない培地と有機酸を最初に添加した培地が紫色に変化し、有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地は赤色に変化した。また、1 日ごとに菌体の色は濃くなっていた (図 5-5)。このことから次に W-4 と *E. aerogenes* NBRC13534 の極大吸収値を測定したところ、W-4 の菌体抽出液はどの培地で培養しても 510 nm の極大吸収値を示した。また、*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体抽出液は有機酸を添加していない培地と、有機酸を最初に添加した培地が 520 nm であり、有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地が 510 nm の極大吸収値を示した (図 5-6)。そして、W-4 の培地抽出液の極大吸収値はすべて 520 nm であり、*E. aerogenes* NBRC13534 の培地抽出液の極大吸収値は有機酸を添加していない培地と、有機酸を最初に添加した培地が 520 nm、有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地が 510 nm を示した (図 5-7)。

これらのことから、*E. aerogenes* NBRC13534 は黒米アントシアニンの色質を変

化させるのに適していると思われた。また、K-7 と W-4 のうち、W-4 のみ色の
変化が見られることから、赤ワインなどに使われている W-4 のようにアントシ
アニンと密に関わる微生物はアントシアニンを変化させる可能性が示唆された。

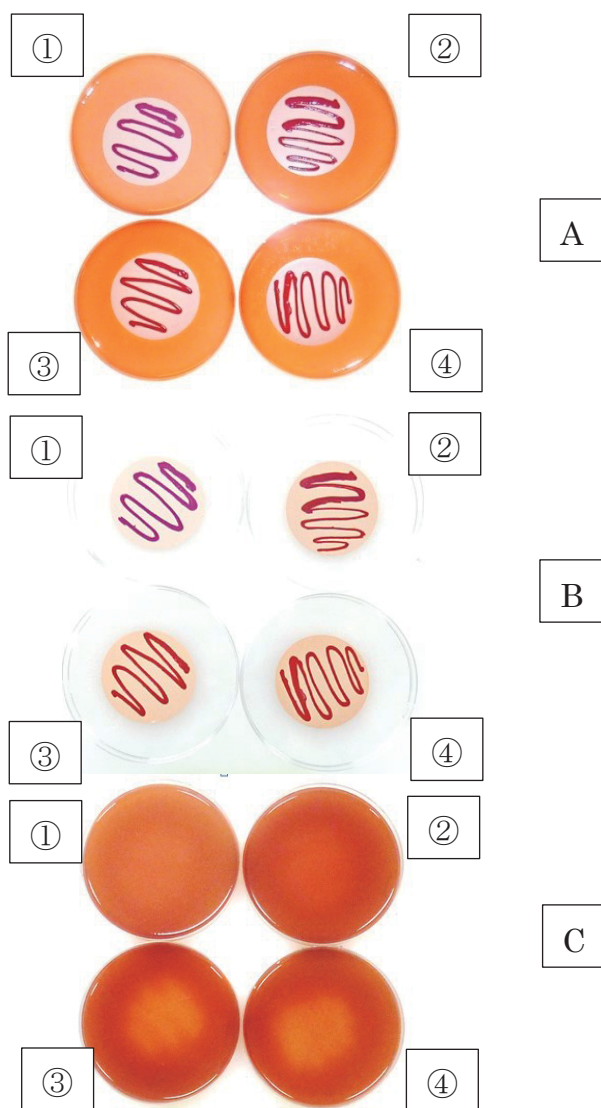


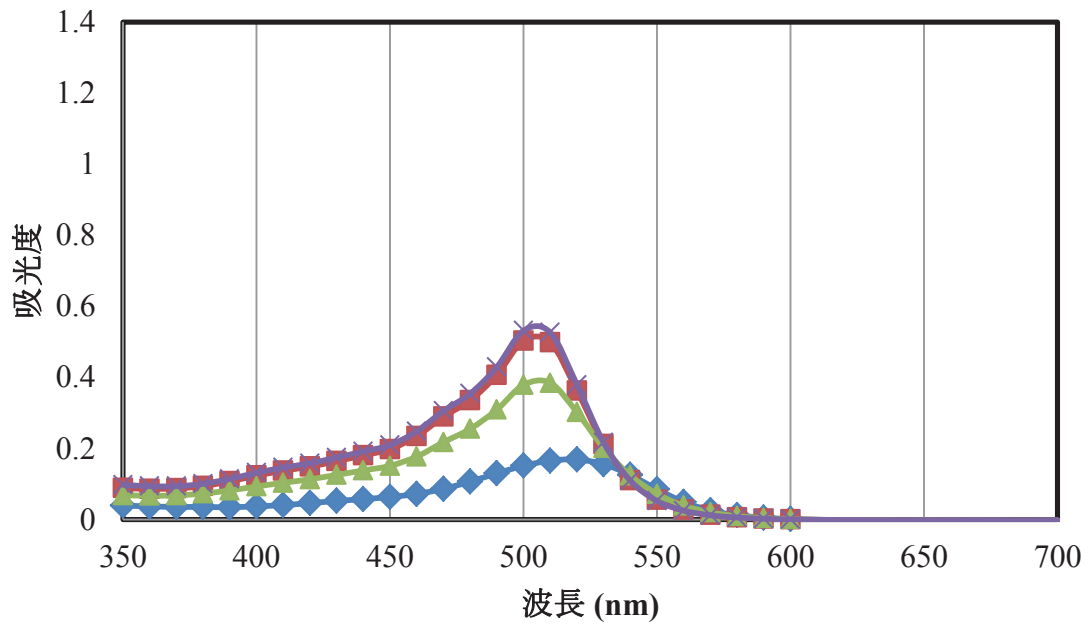
図 5-3 培地に含まれる黒米アントシアニンと *E. aerogenes* NBRC13534 の色質
に及ぼす有機酸の影響

A: メンブレンフィルター上で 5 日間 37°C 培養した *E. aerogenes* NBRC13534

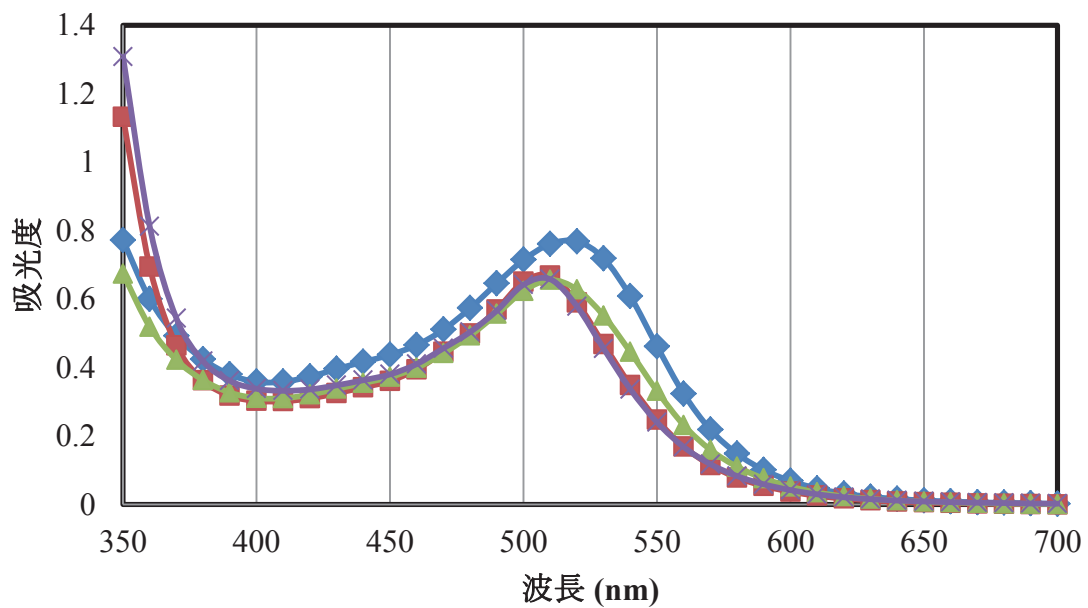
B: *E. aerogenes* NBRC13534 を培養したメンブレンフィルター

C: *E. aerogenes* NBRC13534 を培養したメンブレンフィルターを取り除いた各種
黒米 PDA 培地培地

① NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、②NBRC No. 802 培地から有機酸添加
黒米 PDA 培地、③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、④有機酸
添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地



菌体抽出液の連続吸光度測定



培地抽出液の連続吸光度測定

図 5-4 菌体抽出液と培地抽出液のアントシアニンの変化

- ◆①NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、
- ②NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、
- ▲③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地
- ×④有機酸添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地

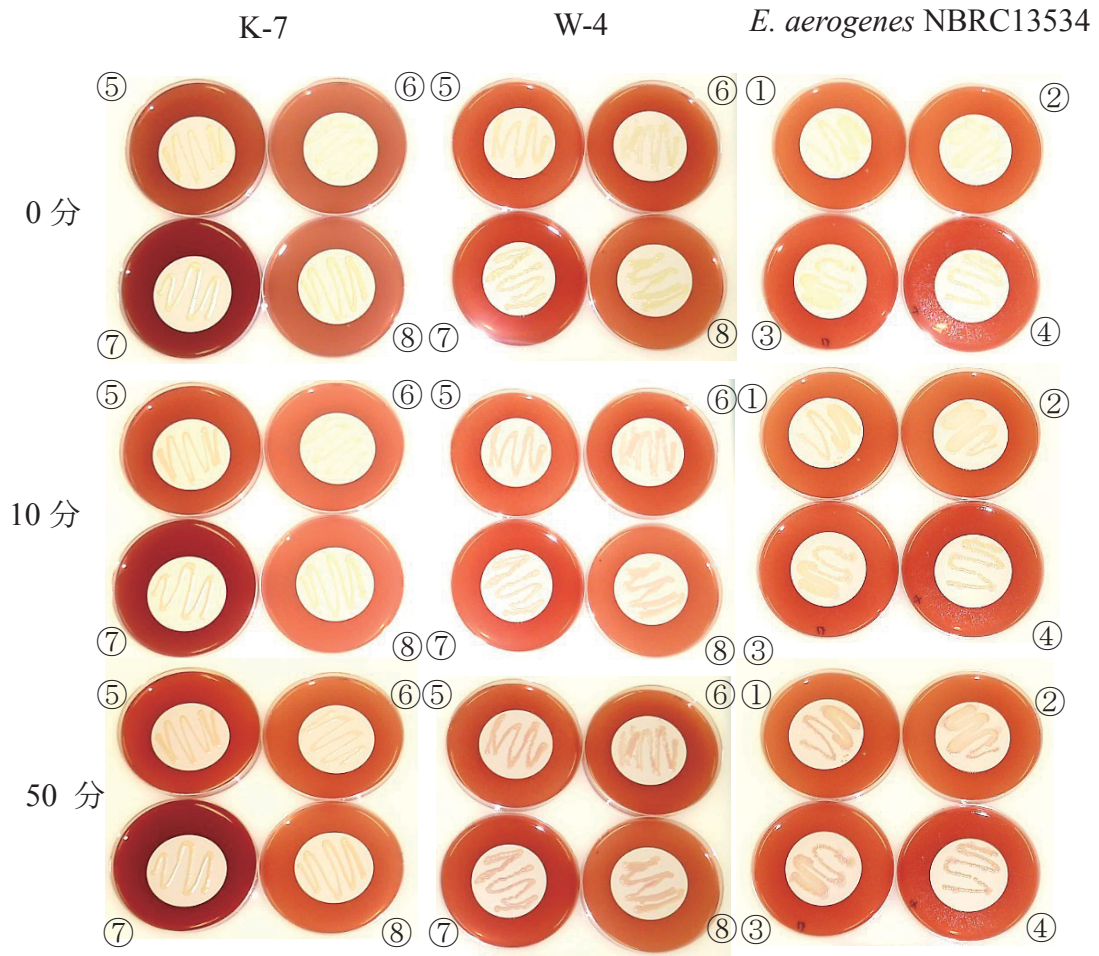
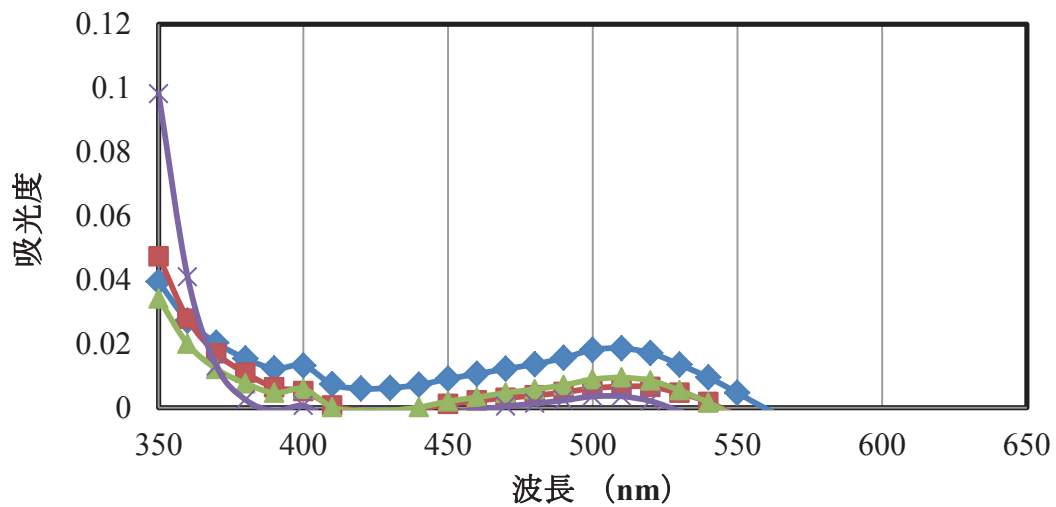
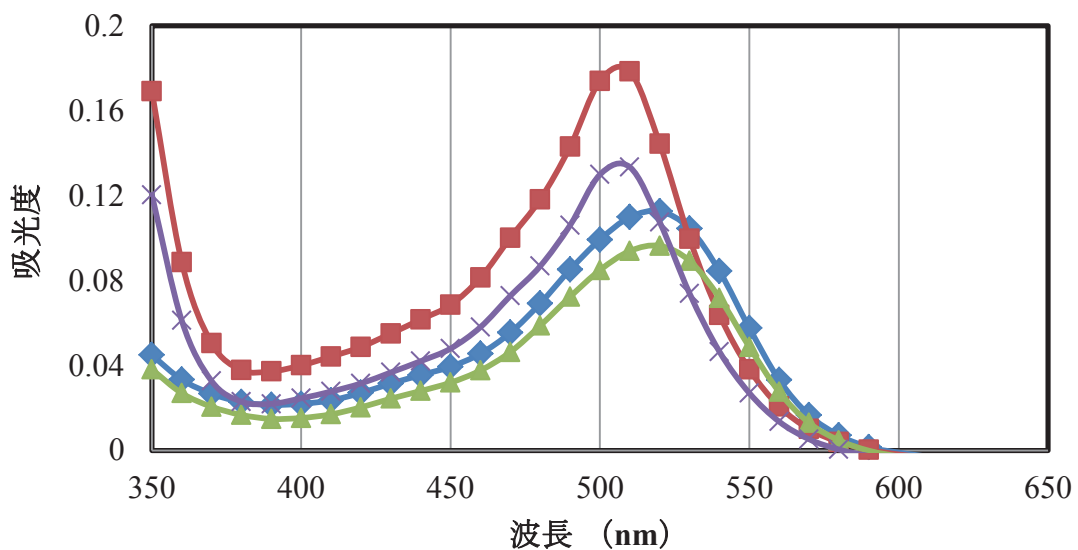


図 5-5 各種菌体の色調と時間の関係

- ① NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、②NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、④有機酸添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、⑤YPD 培地から黒米 PDA 培地、⑥YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、⑦有機酸添加 YPD 培地から黒米 PDA 培地、⑧有機酸添加 YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地



W-4



E. aerogenes NBRC13534

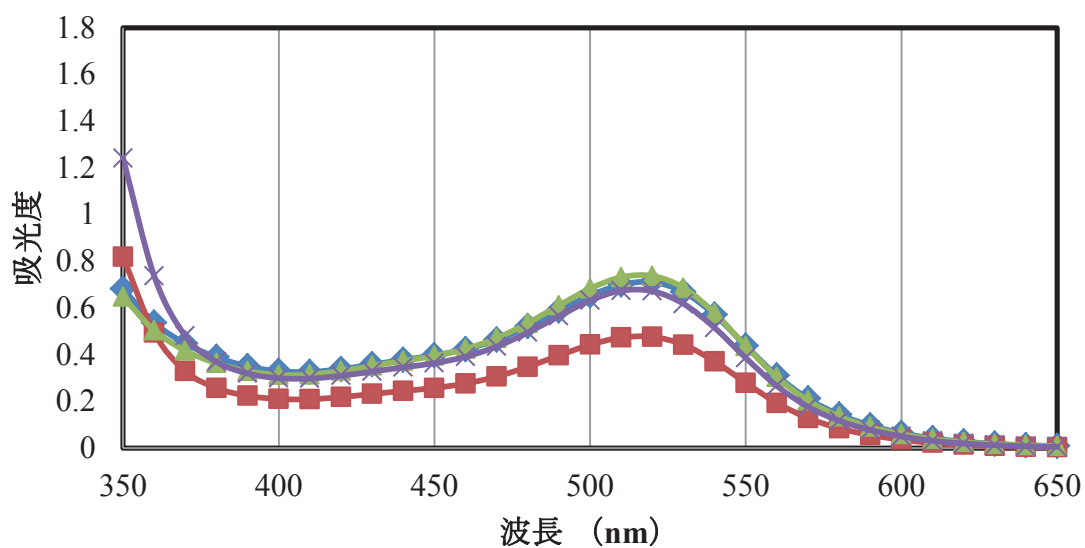
図 5-6 W-4 と *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体抽出液のアントシアニン変化

W-4

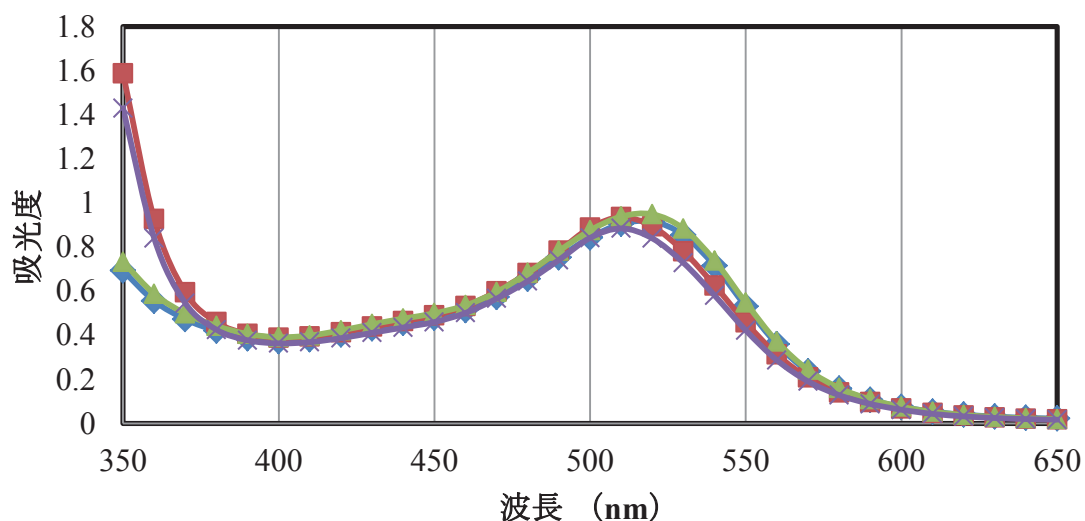
◆①YPD 培地から黒米 PDA 培地、■②YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、
▲③有機酸添加 YPD 培地から黒米 PDA 培地、×④有機酸添加 YPD 培地から有
機酸添加黒米 PDA 培地

E. aerogenes NBRC13534

◆①NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、■②NBRC No. 802 培地から有
機酸添加黒米 PDA 培地、▲③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地
×④有機酸添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地



W-4



E. aerogenes NBRC13534

図 5-7 W-4 と *E. aerogenes* NBRC13534 の培地抽出液のアントシアニン変化

W-4

- ◆①YPD 培地から黒米 PDA 培地、■②YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、
- ▲③有機酸添加 YPD 培地から黒米 PDA 培地、×④有機酸添加 YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地

E. aerogenes NBRC13534

- ◆①NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、■②NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、
- ▲③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地
- ×④有機酸添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地

第6章 *E. aerogenes* NBRC13534 の培地の違いによる菌体と黒米アントシアニンの色質変化

第1節 緒言

これまでに、*E. aerogenes* NBRC13534 による黒米アントシアニンを含んだ PDA 培地の色質変化を確認した。本章では、*E. aerogenes* NBRC13534 の最適培地である NBRC No. 802 培地を使用した、*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体と黒米アントシアニン抽出液の色質変化を検討した。

第2節 実験材料と方法

6-2-1 黒米アントシアニン抽出液の調製

2-2-1 参照

6-2-2 黒米抽出液と有機酸を添加した培地の調製

ポリペプトンと酵母エキス、PDA（ポテトデキストロース寒天）は日本製薬株式会社（東京）から購入した。MgSO₄・7H₂O、カフェー酸とフェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸はナカライテスク株式会社（京都）から購入した。各培地を表 6-1 の通りに調製した。各培地を沸騰水浴中で 5 分間湯せんし、無菌状態でシャーレに培地を分注した。十分に冷却した後、*E. aerogenes* NBRC13534 を白金耳で植菌した。また、比較として、*E. aerogenes* NBRC13534 を植菌しない培地も用意した。これらの培地を 37°C、5 日間培養した。

表 6-1 黒米抽出液を使用した NBRC No. 802 培地と PDA 培地の培地組成

		NBRC No. 802	PDA
ポリペプトン	(g)	1	
酵母エキス	(g)	0.2	
MgSO ₄ ・7H ₂ O	(g)	0.1	
PDA	(g)		3.9
カフェー酸	(g)	0.01	0.01
フェルラ酸	(g)	0.01	0.01
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸	(g)	0.01	0.01
マロン酸	(g)	0.01	0.01
寒天	(g)	1.5	
黒米抽出液	(ml)	100	100

6-2-3 連続吸光度測定

2-2-2 参照

6-2-4 pH 測定

各種培地 5 g に脱イオン水 3 ml を加え、培地をよく潰した後に、pH メーターで培地の pH を測定した。

第 3 節 結果と考察

6-3-1 培地の違いによる黒米アントシアニンの色質変化

NBRC No. 802 と PDA 培地共に、色の変化が見られた。また、NBRC No. 802 は培地の色が濃い紫に変化し、PDA 培地は培地の色が赤紫色に変化した。また、NBRC No. 802 は菌体が白色になり、PDA 培地は菌体が赤色に変化した(図 6-1)。

NBRC No. 802 と PDA 培地共に同じように菌無培地では 520 nm にピークがあり、菌を植菌した培地では 500 nm にピークがシフトしていた。また、推奨培地は菌を植菌培地はピークが緩やかに出ているので、アントシアニンが退色していると考えられた(図 6-2、図 6-3) また、アントシアニンを含む NBRC 推奨培地 No. 802 では菌無しで pH4.60、菌を植菌すると pH8.08 に変化し。アントシアニンを含む PDA 培地では菌無しで pH4.52、菌を植菌すると pH4.23 に変化していた。

推奨培地は菌が生えることによって pH が上がり、アントシアニンが退色すると考えられた。このことから、アントシアニンの修飾に適している寒天培地は PDA 培地であると推察した。



黒米アントシアニンを含む
NBRC No. 802 菌有



黒米アントシアニンを含む
NBRC No. 802 菌無



黒米アントシアニンを含む
PDA 培地 菌有



黒米アントシアニンを含む
PDA 培地 菌無



図 6-1 培地の違いによる色質の比較

上段： 黒米アントシアニン含む NBRC No. 802 培地、下段： 黒米アントシアニン含む PDA 培地

左： *E. aerogenes* NBRC13534 培養培地裏面、中央： *E. aerogenes* NBRC13534 培養培地表面、右： *E. aerogenes* NBRC13534 を培養していない培地裏面

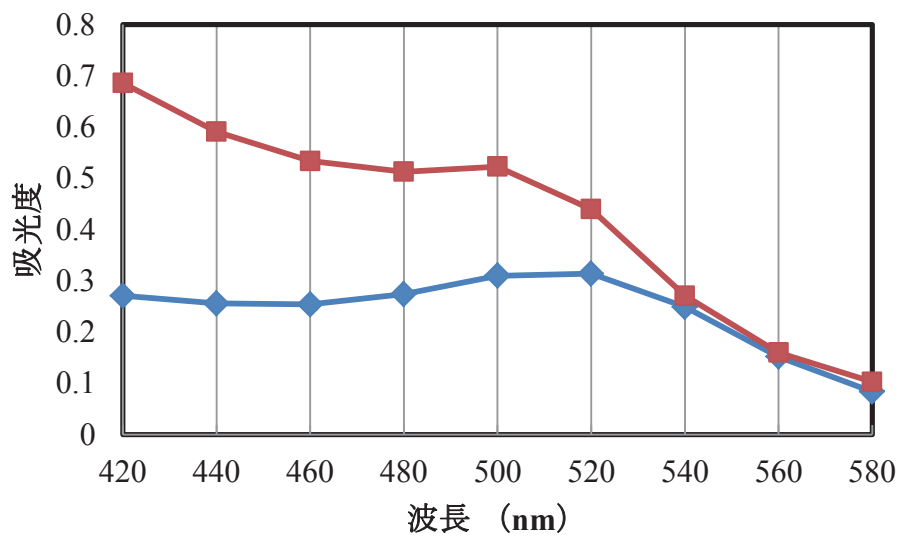


図 6-2 アントシアニンを含む No. 802 培地の連続吸収パターン

◆ *E. aerogenes* NBRC13534 培養培地、■ *E. aerogenes* NBRC13534 を培養していない培地

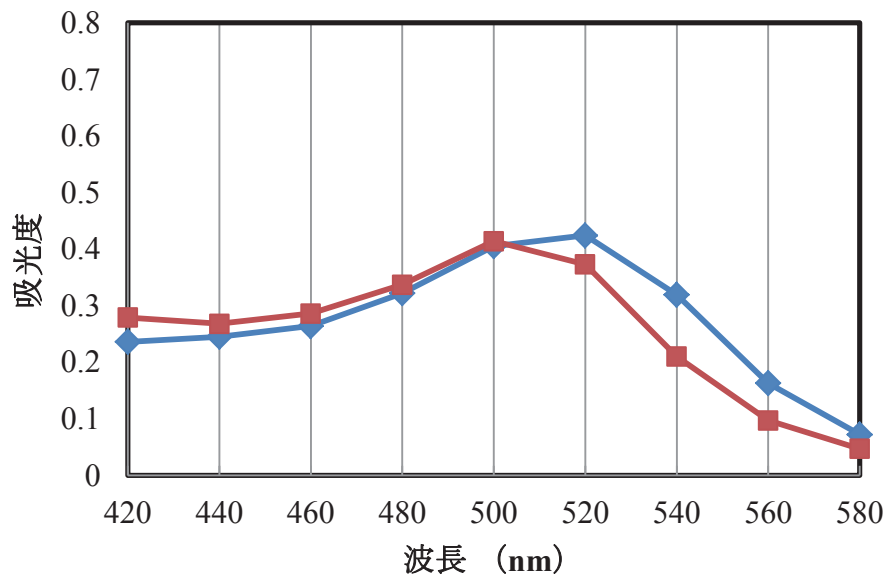


図 6-3 アントシアニンを含む PDA 培地の連続吸収パターン

◆ *E. aerogenes* NBRC13534 培養培地、■ *E. aerogenes* NBRC13534 を培養していない培地

総括

第 1 章では黒米アントシアニンの色質を変化せる微生物のスクリーニングを行った。黒米アントシアニンは、黒米の糠からアントシアニンを抽出した黒米アントシアニン抽出液を使用した。黒米アントシアニン抽出液と 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 培地において、黒米アントシアニンの色質を濃い赤色に変化させる微生物を確認した。色質変化した黒米アントシアニンの極大吸収値は、黒米抽出液の 520 nm よりも短波長の 500 nm にシフトしていた。また、HPLC を用いて色質変化した黒米アントシアニンの色素の分離を行った。

その結果、黒米アントシアニンでは確認されなかった新たな 4 つのピーク (1,2,3,4) が確認された。更に、新たな 4 種のピークを連続吸光度測定により測定したところ、4 種類の内 2 つのピーク (2,3) は 520 nm に極大吸収値を示し、残りの 2 つのピーク (1,4) は 500 nm の極大吸収値を示した。500 nm に極大吸収値を持つ 2 種類の色素を酸加水分解し、アントシアニンの基本骨格であるアントシアニジンの分析は HPLC を用いて比較した。その結果、標準物質であるシアニジン、マルビジン、ペオニジンのどの保持時間とも重ならなかった。このため、新たに確認された色素のアグリコンは、シアニジン、マルビジン、ペオニジン以外のものである可能性が判明した。また、分離した微生物を株式会社テクノスルガ・ラボに委託し同定を行った 16s rDNA 塩基配列を用いた相同性検索の結果、*Enterobacter aerogenes* NBRC13534 株の相同率が 99.8% と高い相同性を示した。

第 2 章では 1 章でスクリーニングした黒米アントシアニンの色質を変化させる微生物と高い相同性が確認された、*E. aerogenes* NBRC13534 を使用した黒米アントシアニンの色質変化の検討を行った。第 1 章と同様に、*E. aerogenes* NBRC13534 は黒米抽出液と 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 培地において、黒米アントシアニンの色質を変化させた。また、色質変化した黒米アントシアニン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 にシフトしていた。黒米抽出液と 4 種類の有機酸を各々添加した PDA 培地を調製し、*E. aerogenes* NBRC13534 を植菌することで、どの有機酸が色質の変化に関わっているかを検討した。その結果、カフェー酸を添加した培地では 4 種類の有機酸を添加した培地とほぼ同じ濃い赤色を示し、フェルラ酸を添加した培地はカフェー酸よりも薄い赤色に変化した。しかし、*p*-ヒドロキシ安息香酸とマロン酸を添加した培地では色

質の変化は見られなかった。また、各培地は HPLC を用いて色素の分離を行った。その結果、有機酸 4 種類を添加した培地において、黒米アントシアニンでは確認できなかった新たな 4 つのピーク (1,2,3,4) が確認され、カフェー酸では新たな 3 つのピーク (1,2,4)、フェルラ酸では 2 つのピーク (2,3) が確認された。一方、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸、有機酸無添加の培地では新たなピークは確認されなかった。このことから、黒米アントシアニンの色質の変化に関わっている有機酸は、カフェー酸と、フェルラ酸であるということが判明した。また、第 1 章で 4 種の有機酸を入れた培地で新たな 4 種類の内 2 つのピーク (2,3) は 520 nm に極大吸収値を示し、残りの 2 つのピーク (1,4) は 500 nm の極大吸収値を示したことから、カフェー酸で確認された新たなピーク (1,2,4) とフェルラ酸で確認された新たなピーク (2,3) でも同様の結果が得られると思われた。

第 3 章では *E. aerogenes* NBRC13534 培養液における検討を行った。その結果、4 種有機酸を添加した黒米抽出液は *E. aerogenes* NBRC13534 の培養液と反応させることで黒米アントシアニンの極大吸収値である 520 nm から 500 nm に極大吸収値がシフトしていた。このことから、*E. aerogenes* NBRC13534 が作り出す菌体遊離型の物質が黒米アントシアニンを変化させていると思われた。また、*E. aerogenes* NBRC13534 の培養液は熱処理することで、黒米アントシアニンと混合しても、極大吸収値の変化を確認できなかった。そして、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させることで、黒米アントシアニンの極大吸収値の変化が見られた。このことから、黒米アントシアニンを変化させる物質は分子量 10,000 以上の物質であり、*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体遊離型の酵素である可能性が示唆された。

また、*E. aerogenes* NBRC13534 の培養液は黒米アントシアニンと有機酸を添加することで、黒米アントシアニンの極大吸収値を変化させるが、カフェー酸、フェルラ酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、マロン酸の 4 種の内、カフェー酸とフェルラ酸が色質を変化させることが確認された。また、各種有機酸を添加させた黒米アントシアニンと培養液の反応 0 日目、1 日目、2 日目の極大吸収値を確認すると、カフェー酸は 1 日ごとに 520 nm から 500 nm に 10 nm ずつにシフトしたが、フェルラ酸は 1 日目に 520 nm から 510 nm にシフトしただけで、2 日目は 510 nm のままであった。また、*p*-ヒドロキシ安息香酸とマロン酸は 2 日反応させてもシフトしなかった。反応が 2 日間と時間がかかることから、黒米アントシアニンを色質変化させる物質の量が少量であるために変化に時間がかかっていると思われた。

第 4 章では *E. aerogenes* NBRC13534 による黒米アントシアニンの色質変化に

おける有機酸の影響を検討した。これまでに黒米アントシアニンの色質を変化させる要因として、*E. aerogenes* NBRC13534 と有機酸があげられている。変化に関わる有機酸はカフェー酸とフェルラ酸であり、この二種類の有機酸の構造は酷似している。なので、この二種類の有機酸に類似する *p*-クマル酸、シナピン酸、ピロカテコールを使用し、黒米アントシアニンの色質が変化するか検討した。*E. aerogenes* NBRC13534 を培養していない培地の極大吸収値は、全て黒米抽出液と同じ 520 nm を示した。一方、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養した培地では、*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 の極大吸収値を示した。また、有機酸無添加、シナピン酸を添加した培地、ピロカテコールを添加した培地は黒米抽出液と同じ 520 nm の極大吸収値を示した。また、各培地の色素は HPLC を用いて色素の分離を行った。アントシアニンを HPLC で測定する場合、おもに可視光線 (500 nm や 520 nm) が用いられ、共存物の検出には紫外線 (280 nm や 380 nm) が用いられている²⁾。

520 nm で測定した場合、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養していない培地の内、カフェー酸添加培地で 79 分、フェルラ酸添加培地で 101 分、*p*-クマル酸添加培地は 92 分、シナピン酸添加培地は 102 分に新しいピークが確認された。しかし、有機酸無添加、ピロカテコール添加培地では新しいピークは確認されなかった。そして、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養した培地では、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養しない培地で確認されたピークの増加が確認され、新たなピークも確認された。しかし、シナピン酸のみ増加は確認できなかった。また、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養することで有機酸無添加、ピロカテコールでも微量のピークが確認された。

また、280 nm で測定した場合、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養していない培地の内、カフェー酸添加培地で 78 分、フェルラ酸添加培地で 97 分、シナピン酸添加培地は 61 分と 108 分に新しいピークが確認された。しかし、有機酸無添加、*p*-クマル酸添加培地、ピロカテコール添加培地では新しいピークは確認されなかった。そして *E. aerogenes* NBRC13534 を培養した培地では、カフェー酸添加培地で 30 分と 76 分、フェルラ酸添加培地で 81 分と 97 分、*p*-クマル酸添加培地で 68 分と 88 分に高いピークが確認された。シナピン酸は 60 分と 107 分にピークが確認されたが、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養していない培地とほぼ変化はなかった。また、有機酸無添加培地とピロカテコール添加培地ではピークは確認されなかった。

そして、検出波長 520 nm で確認された各種有機酸添加 *E. aerogenes* NBRC13534 培養培地の新規ピークであるカフェー酸添加培地 79 分、フェルラ酸添加培地で 101 分、*p*-クマル酸添加培地は 92 分、シナピン酸添加培地は 102 分のピークを分取し、分光光度計で測定した。その結果、カフェー酸、フェル

ラ酸、シナピン酸から分取されたピークは 510 nm に極大吸収値を示し、*p*-クマル酸から分取したピークは 500 nm に極大吸収値を示した (図 4-9)。

これらのことから、黒米アントシアニンにカフェー酸、フェルラ酸、*p*-クマル酸を添加し、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養することにより、黒米アントシアニンには確認されない新たなアントシアニンが作られることが判明した。また、シナピン酸を添加した場合、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養しなくとも、新たな色素が作られることが判明した。そして、*E. aerogenes* NBRC13534 は黒米アントシアニンと有機酸を添加することで、色素だけではなく、有機酸などの複合体を形成させている可能性も示唆された。

第 5 章では有機酸による *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体色質変化を観察する為に、メンブレンフィルターを使用した *E. aerogenes* NBRC13534 の培養を行った。*E. aerogenes* NBRC13534 の培養に用いたメンブレンフィルターは、①NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、②NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、④有機酸添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、の 4 種類の移動を行った。

有機酸を添加していない培地で培養した *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体は紫色をしており、培地の色の変化も見られなかった。また、有機酸を最初だけ添加した培地は *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体は赤く、培地の色も少し赤くなっていた。有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地の *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体は赤く、培地の色は有機酸を最初に添加した培地よりも濃い赤色に変化していた。また、有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地からメンブレンフィルターを取り除くと *E. aerogenes* NBRC13534 の菌体が存在した場所の色が抜けていた。このことから、*E. aerogenes* NBRC13534 は有機酸存在下で培養することで、菌体の色質が赤色に変化し、更には黒米抽出液と有機酸が同時に存在することでより多くの黒米アントシアニンを分解、吸収していると判明した。

E. aerogenes NBRC13534 を 15%酢酸で色素抽出した菌体抽出液は有機酸を添加していない培地が黒米抽出液と同じ 520 nm の極大吸収値を示した。また、有機酸を最初に添加した培地は 510 nm、有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地は 500 nm に極大吸収値を示した。

培地を 15%酢酸で色素抽出した培地抽出液は有機酸を添加していない培地が黒米抽出液と同じ 520 nm であり、有機酸を一度でも添加した培地は 510 nm の極大吸収値を示した。このことから、菌体を通さないメンブレンフィルター上で *E. aerogenes* NBRC13534 を培養することで、*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体外酵素で黒米アントシアニンを変化させていることが判明した。また、菌体内

でもアントシアニンの色質の変化が示唆され、菌体外酵素、菌体内酵素共に黒米アントシアニンが変化していると判明した。

また、*E. aerogenes* NBRC13534 と身近に存在する清酒用酵母であるきょうかい7号 (K-7)、ワイン用酵母であるきょうかいブドウ酒用酵母第4号 (W-4) を使用し、菌体内に黒米アントシアニンを吸収と黒米アントシアニンの色質変化の比較を行った。K-7、W-4、*E. aerogenes* NBRC13534 をそれぞれの最適培地で、メンブレンフィルター上で培養した後に、黒米 PDA 培地と有機酸添加黒米 PDA 培地にメンブレンフィルターを移動した。移動後、0分、10分、50分、1日、2日目の色質変化を確認した。*E. aerogenes* NBRC13534 は①NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、②NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、③有機酸添加 NBRC No. 802 培地から黒米 PDA 培地、④有機酸添加 NBRC No. 802 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地の4種類の移動を行った。酵母は⑤YPD 培地から黒米 PDA 培地、⑥YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地、⑦有機酸添加 YPD 培地から黒米 PDA 培地、⑧有機酸添加 YPD 培地から有機酸添加黒米 PDA 培地の4種類の移動を行った。

K-7、W-4、*E. aerogenes* NBRC13534 の最適培地で培養した際の菌体の色はどれもクリーム色であった。菌体を培養したメンブレンフィルターを黒米 PDA 培地または有機酸添加黒米 PDA 培地に移動すると、K-7 は、50分後も菌体の色の変化は確認できなかった。W-4 は、10分後には少し菌体が赤く変化し、50分後にはさらに菌体が赤く変化していた。*E. aerogenes* NBRC13534 も W-4 と同様に10分後に少し菌体が赤く変化したが、50分後の菌体の色は W-4 よりも薄い赤色であった。また、1日目、2日目の K-7 は0日目より若干赤く菌体の色に変化していた。W-4 は0日目よりも菌体は赤色を示した。しかし、1日目と2日目の変化は確認されなかった。*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体は0日目よりも有機酸を添加していない培地と、有機酸を最初に添加した培地で紫色に変化し、有機酸を後に添加した培地と、有機酸を両方添加した培地では赤色に変化した。また、1日ごとに菌体の色は濃くなっていた。このことから次に W-4 と *E. aerogenes* NBRC13534 の極大吸収値を測定したところ、W-4 の菌体抽出液はどの培地で培養しても 510 nm の極大吸収値を示した。また、*E. aerogenes* NBRC13534 の菌体抽出液は有機酸を添加していない培地と、有機酸を最初に添加した培地で 520 nm であり、有機酸を後に添加した培地と有機酸を両方添加した培地では 510 nm の極大吸収値を示した。そして、W-4 の培地抽出液の極大吸収値はすべて 520 nm であり、*E. aerogenes* NBRC13534 の培地抽出液の極大吸収値は有機酸を添加していない培地と有機酸を最初に添加した培地が 520 nm、有機酸を後に添加した培地と有機酸を両方添加した培地が 510 nm を示した。

これらのことから、*E. aerogenes* NBRC13534 は黒米アントシアニンの色質を変

化させるのに適していると判明した。また、K-7 と W-4 のうち、W-4 のみ色の変化が見られることから、赤ワインなどに使われている W-4 のようにアントシアニンと密に関わる微生物はアントシアニンを変化させる可能性が示唆された。

第 6 章で黒米抽出液の色質変化に影響する *E. aerogenes* NBRC13534 の培養栄養素の検討をした。NBRC No. 802 と PDA 培地共に、色の変化が見られた。また、NBRC No. 802 は培地の色が濃い紫に変化し、PDA 培地は培地の色が赤紫色に変化した。また、NBRC No. 802 は菌体が白色になり、PDA 培地は菌体が赤色に変化した。NBRC No. 802 と PDA 培地共に同じように菌無培地では 520 nm にピークがあり、菌を植菌した培地では 500 nm にピークがシフトしていた。また、推奨培地は菌を植菌培地はピークが緩やかに出ているので、アントシアニンが退色していると思われた。アントシアニンを含む NBRC 推奨培地 No. 802 では菌無しで pH4.60、菌を植菌すると pH8.08 に変化し。アントシアニンを含む PDA 培地では菌無しで pH4.52、菌を植菌すると pH4.23 に変化していた。推奨培地は菌が生えることによって pH が上がり、アントシアニンが退色すると考えられた。このことから、アントシアニンの修飾に適している寒天培地は PDA 培地であると推察した。

以上のことから、黒米アントシアニンを変化させる *E. aerogenes* NBRC13534 由来の物質は菌体外物質であり、分子量は 10,000 以上の可能性が示唆された。また、*E. aerogenes* NBRC13534 は菌体内にアントシアニンを多く吸収することが確認された。そして、黒米アントシアニンにカフェー酸、フェルラ酸、*p*-クマル酸を添加し、*E. aerogenes* NBRC13534 を培養することにより、黒米アントシアニンには確認されない新たなアントシアニンが作られることが推察された。また、*E. aerogenes* NBRC13534 は黒米アントシアニンと有機酸を添加することで、色素だけではなく、有機酸などの複合体を形成させている可能性も示唆された。以上のことから微生物を用いたアントシアニンの構造修飾の可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Zhao C., Chen Z., Bai X., Ding C., Long T., Wei F. and Miao K. (2014). Structure–activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Molecular Diversity*, **18**, 687-700.
- 2) 足立 泰二,吉玉 国二郎. (2014). 植物色素研究法. 扶桑印刷社
- 3) Tsuda T. (2012). Anthocyanins as functional food factors - Chemistry, nutrition and health promotion - . *Food Chemistry*, **18**, 315-324.
- 4) 大庭 理一郎, 五十嵐 喜治, 津久井 亜紀夫. (2000). アントシアニン - 食品の色と健康 - . 建帛社.
- 5) Gregorio B., Stephan G., Christoph C., Tsaneta D., Bjarne J., Finn O., Henrik L. and Renate M. (2017). Foliar-applied ethephon enhances the content of anthocyanin of black carrot roots (*Daucus carota ssp. sativus* var. *atrorubens* Alef.). *BMC Plant Biology*, DOI 10.1186/s12870-017-1021-7.
- 6) Hamade R., Kinoshita Y., Yamamoto Y., Tanaka M. and Yamada Y. (1994). Anthocyanin production in cultured *Euphorbia millii* cells using film culture vessels. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **58**, 1530-1531.
- 7) Asano S., Ohtsubo S., Nakajima M., Kusunoki M., Kaneko K., Katayama H. and Nawa Y. (2002). Production of anthocyanins by habituated cultured cells of nyoho strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, **8**, 64-69.
- 8) Saigusa N., Yamamoto K., Tsutsui M. and Teramoto Y. (2014). Microbial production of novel pigments from black rice anthocyanin. *Food Science and Technology Research*,

20, 1013-1016.

9) Nakagawa K. and Maeda H. (2017). Investigating pigment radicals in black rice using HPLC and Multi-EPR. *Journal of Oleo Science*, **66**, 543-547.

10) Fujita A., Fujitake H., Kawakami K. and Nomura M. (2010). Antioxidant activity of colored rice bran obtained at different milling yields. *Journal of Oleo Science*, **59**, 563-568.

11) Gabriela H. A., Cristiano D. F., Patrícia G. V., Jander L. F. M., Moacir C. E., Nathan L. V. and Maurício de O. (2016). The revisited levels of free and bound phenolics in rice: Effects of the extraction procedure. *Food Chemistry*, **208**, 116-123.

12) Hongo A. and Tanisho S. (2011). Research of selection of seaweed that grows to oki that is appropriate for fermentative hydrogen production. *Journal of Environmental Biotechnology*, **11**, 89-93.

13) 漆原 次郎: 緑茶の健康効果は「カテキンの分解」が鍵だった. (2015). <http://jbpress.ismedia.jp/articles/-/44125?page=3>

14) Aura A. M., Martin-Lopez P., O'Leary K. A., Williamson G., Oksman-Caldentey K. M., Poutanen K. and Santos-Buelga C. (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*, **44**, 133-142.

15) Cheng J., Liu X., Chen Z., Zhang Y. and Zhang Y. (2016). Mulberry anthocyanin biotransformation by intestinal probiotics. *Food Chemistry*, **213**, 721-727.

16) Mueller D., Jung K., Winter M., Rogoll D., Melcher R. and Richling E. (2017). Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food Chemistry*, **231**, 275-286.

17) Chaiyavat C., Noppawat P., Sasithorn S., Sartjin P., Suchanat K. and Bhagavathi S. S. (2017). Assessment of changes in the content of anthocyanins, phenolic acids, and antioxidant property of *Saccharomyces cerevisiae* mediated fermented black rice bran. *AMB Express*, PMID: PMC5459781.

本研究に関係ある報告文

1. Microbial production of novel pigments from black rice anthocyanin
Food Science and Technology Research, 20, 1013-1016, (2014)
Saigusa N., Yamamoto K., Tsutsui M., Teramoto Y.
2. Effect of organic acids on the alteration of black rice anthocyanins by *Enterobacter aerogenes* NBRC 13534
African Journal of Biochemistry Research, (2018)
Yamamoto K., Saigusa N., Teramoto Y. (投稿中)

謝辞

本研究は平成27年4月から平成30年3月まで崇城大学 大学院 博士課程 工学研究科 応用微生物工学専攻 食品生物科学講座 寺本・三枝研究室に席を置き、研究を行った結果です。

本研究の遂行及び論文作成に当たり、本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた恩師、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。

本研究の遂行及び論文作成に当たり、常に有益なご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いた恩師、崇城大学 応用微生物工学科 三枝 敬明 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当たり本専攻 寺本・三枝研究室の各位には日頃より有益なご討論、ご助言を頂いた。ここに感謝の意を表します。

平成 30 年 2 月
著者