

紅麹菌 (Monascus anka AHU9085) の色素生産性に及ぼす窒素源の効果

誌名	日本栄養・食糧学会誌
ISSN	02873516
著者名	高橋,真美 松本,孝 森高,初恵
発行元	日本栄養・食糧学会
巻/号	62巻1号
掲載ページ	p. 19-23
発行年月	2009年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



紅麹菌 (*Monascus anka* AHU 9085) の色素生産性に 及ぼす窒素源の効果

高橋 真美^{*1}, 松本 孝¹, 森高 初恵¹

(2007年12月27日受付; 2008年9月29日受理)

要旨: *Monascus anka* AHU9085 の色素生産性の向上を目的として, 5種類の窒素源 (ペプトン, L-アスパラギン酸, 硫酸アンモニウム, モノグルタミン酸ナトリウム, 硝酸カリウム) が色素生産性に及ぼす影響を検討した。5種類の窒素源のいずれも, 濃度を0.3%にした場合, 0.03%の場合よりも色素生産性は増大し, 0.3%ペプトンにおいて黄色系色素および赤色系色素の色素生産性が最大になった。さらに, ペプトンにL-アスパラギン酸を添加した場合, ペプトン単独の場合に比べて黄色系色素および赤色系色素の色素生産性がともに増加し, 1.0%ペプトンに0.3% L-アスパラギン酸を組み合わせた場合に最も色素生産性が増加した。黄色系色素に対する赤色系色素の生産割合が最も高かったのはペプトンに0.3% MSGを添加した場合であった。HPLC分析の結果から, 増加した主要色素は monascorubrin, rubropunctatin, monascin, ankaflavin であると推定された。

キーワード: 紅麹菌, 色素, 窒素源, ペプトン

Monascus 属の紅麹菌は中国大陸および台湾で紅酒, 紅露酒, 紅乳腐などの醸造原料, 食品類や肉類の着色および保存剤として広く利用されている。*Monascus* 属の色素は, 1926年西川¹⁾により赤色および黄色の2色素が初めて結晶化され, 主要成分である monascorubrin, rubropunctatin, monascorubramine, rubropunctamine, monascin および ankaflavin の6種類の色素の化学構造が明らかにされている²⁻⁵⁾。これらの色素はいずれも水には不溶~難溶性であるが, タンパク, ペプチドなどに対する親和性が強く, これらとの結合体は水溶性になり得る⁶⁾。また, 紅麹菌の産生する色素は熱に安定であり, 安全性も高く⁷⁾, 安定供給, 量産が可能であることから水産加工品, ハム, ソーセージ等の畜肉加工品の着色に使用されている⁸⁾。紅麹菌の発酵物は色調が暗赤色となることもあるが, 発酵条件を変化させることで, 鮮やかな紅色の色調に改善させることが可能であるとの報告もなされている⁹⁾。近年では, 紅麹菌の産生する色素抽出液に含まれる dimerumic acid に抗酸化機能があり, ラットにおける四塩化炭素誘発肝障害に対する抑制機能などが明らかとなった¹⁰⁾¹¹⁾。さらに, *Monascus* 属の産生する色素類には抗腫瘍プロモーション作用や抗炎症作用¹²⁾¹³⁾, 免疫抑制作用や抗菌作用¹⁴⁾¹⁵⁾, 神経伝達物質のモノアミン (ドーパミン, ノルアドレナリン等) を代謝する酵素であるモノアミノオキシダーゼ阻害作用¹⁶⁾ などの生理活性・薬

理活性が報告されており, これら種々の機能性を生かした健康食品や医薬品の開発が飛躍的に拡大してきている¹⁷⁻¹⁹⁾。

著者らは, 前報²⁰⁾において紅麹色素をパンの製造に応用することでパンの力学および嗜好特性が高まることを報告し, さらに, 紅麹菌 *M.anka* の培養に際し, 培地の炭素源をマルトースからうるち米デンプンに替えることで赤色系色素の rubropunctamine と monascorubramine の色素生産が高まることを報告した²¹⁻²⁴⁾。本研究では, うるち米デンプンを炭素源とした場合, 窒素源の違いが紅麹菌の色素生産性にどのような効果を及ぼすのか検討した。

実験方法

1. 実験材料

1.1 菌株 北海道大学農学部より分与を受けた *M.anka* AHU 9085 を供試菌株とした。

1.2 培地および培養条件 接種菌の前培養はポテトデキストロース寒天斜面培地で 30°C, 7日間行った。本培養には, うるち米デンプン 10%, リン酸二水素カリウム・2水和物 0.01%, 硫酸マグネシウム・7水和物 0.005%, 酒石酸 0.1%, 各種窒素源 0.03%あるいは0.3%を用いた。窒素源としては, 紅麹菌の色素生産性に効果があると報告²⁵⁻²⁷⁾ されているペプトン, L-アスパラギン

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: mami-t@swu.ac.jp)

¹ 昭和女子大学大学院生活機構研究科 (154-8533 東京都世田谷区太子堂 1-7)

酸、硫酸アンモニウム、モノグルタミン酸ナトリウム、硝酸カリウムの5種類を用いた。さらに、0.3%あるいは1.0%ペプトンに他の4種の窒素源を0.03%および0.3%混合添加した培地を用い、30°C、10日間、pH 5.0で静置培養した。

1.3 色素の抽出および測定 30 mLの培養液を0.1 N水酸化ナトリウム溶液でpH 6.5に調整後、東洋濾紙No. 2で濾過し、濾別した菌体に60°Cに加温した80%エタノール水溶液90 mLを加え、60°Cの恒温水槽中に1時間静置した。濾過後、濾液を0.1 N塩酸溶液でpH 4.2に調整し、抽出液とした。日立製U-3200型 Spectrophotometerを用い、抽出液中の黄色系色素の量は400 nmで、赤色系色素は500 nmで測定した。なお、乾燥菌体重量は105°C、10時間熱風乾燥して求めた。

1.4 色素分析 HPLC条件：検出器はWATERS社製990J型 Photo diode arrayを用い、抽出液20 μ LをGL-PACK Lichrosorb SI 60-5 カラム (ϕ 4.6 mm i.d. \times 250 mm GL Science Inc. 社製)に注入後、470 nmにおける吸光度を測定した。移動相はA液：0.1%ギ酸含有純水、B液：0.1%ギ酸含有アセトニトリルを用い、スタート時はB液0%、40分後にB液80%、50分後にB液100%に上昇させる直線濃度勾配を用いて0.5 mL/minの流速で溶出した。

1.5 統計処理 一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、有意差の検定はTukey法の多重比較により解析した。統計解析はSPSS ver. 16.0を用い、いずれの場合も危険率5%未満をもって有意と判定した。データは、平均値 \pm 標準偏差で表した。

実験結果および考察

1. 色素生産量の比較

窒素源の違いによる色素生産量は、乾燥菌体重量当りで表し、Figure 1~3に示した。

黄色系色素の生産性 (Figure 1a) および赤色系色素の生産性 (Figure 1b) は、5種類の窒素源のいずれにおいても、0.3%の窒素源添加の方が0.03%添加よりも有意に高値を示した。特にペプトンを用いた場合には、0.03%と0.3%添加の差が他の4種の窒素源と比較して有意に

大きくなり、0.3%ペプトン添加時の黄色系色素および赤色系色素生産性は、すべての窒素源の中で最大であった。一方、窒素源としてモノグルタミン酸ナトリウムを用いた場合は、黄色系色素および赤色系色素の生産性が他の窒素源と比較して低くなった。菌体の増殖が遅く菌体量も少なかったことから、その要因として菌体の代謝過程において何らかの生育阻害が生じていたと考えられる。Lin *et al.*²⁸⁾ は、菌株によってはモノグルタミン酸ナトリウムの色素生産性への効果は低く、グリシンとの共存下で色素生産性が高まると報告していることから、生育環境を含めさらに検討する必要があると考えられる。

培地へのペプトン単独添加の実験では、0.03%と0.3%の二つの濃度について色素生産性を測定したが (Figure 1)、廣井ら²⁹⁾ が、1.0%ペプトンで色素生産性が高まるとの報告をしていることから、さらに、1.0%ペプトン単独についても検討した。その結果、ペプトン濃度を0.3%から1.0%に上昇させることにより、黄色系色素の生産性は顕著に高まった (Figure 2a, 2bの横軸ゼロのときの値)。しかし、赤色系色素では0.3%ペプトン単独と1.0%ペプトン単独間で変化は認められなかった (Figure 3a, 3bの横軸ゼロのときの値)。

さらに、窒素源の組み合わせにより色素生産性が高まるとの報告³⁰⁾³¹⁾ がなされていることから、0.3%および1.0%ペプトンと他の4種の窒素源を組み合わせで検討し、黄色系色素を Figure 2a, 2bに、赤色系色素を Figure 3a, 3bに示した。なお、0.03%ペプトンでは他の窒素源の添加による色素生産の効果が認められなかったため、ここでは示さなかった。

Figure 2の黄色系色素においては、0.3%、1.0%ペプトン添加ともに、L-アスパラギン酸との混合添加で他の3種の窒素源を添加した場合よりも色素生産性は有意に高まった。一方、モノグルタミン酸ナトリウムと硝酸カリウムにおいては、0.3%、1.0%ペプトンとの混合添加による効果は認められなかった。

Figure 3の赤色系色素においても、0.3%ペプトン、1.0%ペプトンともに、L-アスパラギン酸との混合添加では他の3種の窒素源を添加した場合よりも色素生産性が

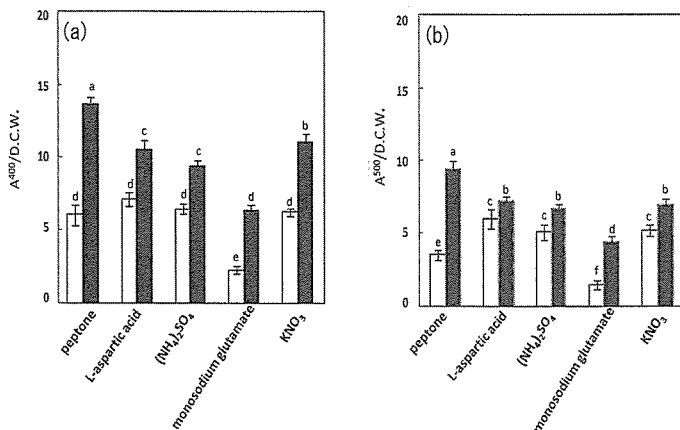


Figure 1 Effects of nitrogen sources on the pigment production.

(a) yellow pigment, (b) red pigment. ^{a,b,c,d,e,f} Values not sharing a superscript letter are significantly different ($p < 0.05$). □, 0.03% nitrogen sources; ■, 0.3% nitrogen sources; D.C.W., dry cell weight (g).

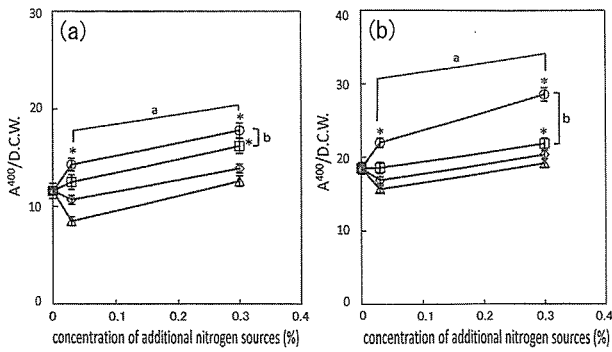


Figure 2 Effects of additional nitrogen sources on the yellow pigment production in the peptone medium. (a) 0.3% peptone medium. * $p < 0.05$ (vs 0.3% peptone only). ^a $p < 0.05$; 0.03% L-aspartic acid < 0.3% L-aspartic acid. ^b $p < 0.05$; 0.3% (NH₄)₂SO₄ < 0.3% L-aspartic acid. (b) 1.0% peptone medium. * $p < 0.05$ (vs 1.0% peptone only). ^a $p < 0.05$; 0.03% L-aspartic acid < 0.3% L-aspartic acid. ^b $p < 0.05$; 0.3% (NH₄)₂SO₄ < 0.3% L-aspartic acid. ○, L-aspartic acid; □, (NH₄)₂SO₄; △, monosodium glutamate; ◇, KNO₃; D.C.W., dry cell weight (g).

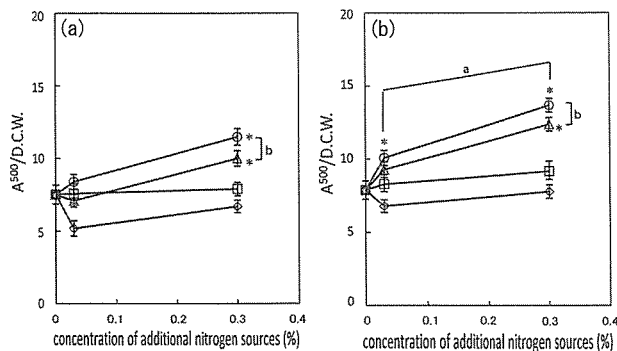


Figure 3 Effects of additional nitrogen sources on the red pigment production in the peptone medium. (a) 0.3% peptone medium. * $p < 0.05$ (vs 0.3% peptone only). ^b $p < 0.05$, 0.3% monosodium glutamate < 0.3% L-aspartic acid. (b) 1.0% peptone medium. * $p < 0.05$ (vs 1.0% peptone only). ^a $p < 0.05$, 0.03% L-aspartic acid < 0.3% L-aspartic acid; ^b $p < 0.05$, 0.3% monosodium glutamate < 0.3% L-aspartic acid. ○, L-aspartic acid; □, (NH₄)₂SO₄; △, monosodium glutamate; ◇, KNO₃; D.C.W., dry cell weight (g).

有意に高まり、反対に、硫酸アンモニウムと硝酸カリウムでは添加効果が認められなかった。

菌体重量当たりの 500 nm および 400 nm の吸光度比 (A^{500}/A^{400}) を算出した結果を Table 1 に示した。0.3% モノグルタミン酸ナトリウムと 0.3% および 1.0% ペプトンの混合添加では、 A^{500}/A^{400} は 0.75 と 0.94 であり、おの他の窒素源の A^{500}/A^{400} 比と比較して高くなり、赤色素の生産割合が高まることが判明した。

紅麹菌の色素生産は、被子器を多くつくる環境におくと色素が多量に生産され、窒素源が消費されつくす頃か

Table 1 Effects of additional nitrogen sources on the red color/yellow color ratio of the peptone medium. Each value shows the ratio of A^{500}/A^{400} .

	0.3% peptone	1.0% peptone
None	0.65	0.43
0.3% L-aspartic acid	0.65	0.48
0.3% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.47	0.43
0.3% monosodium glutamate	0.75	0.94
0.3% KNO ₃	0.48	0.37

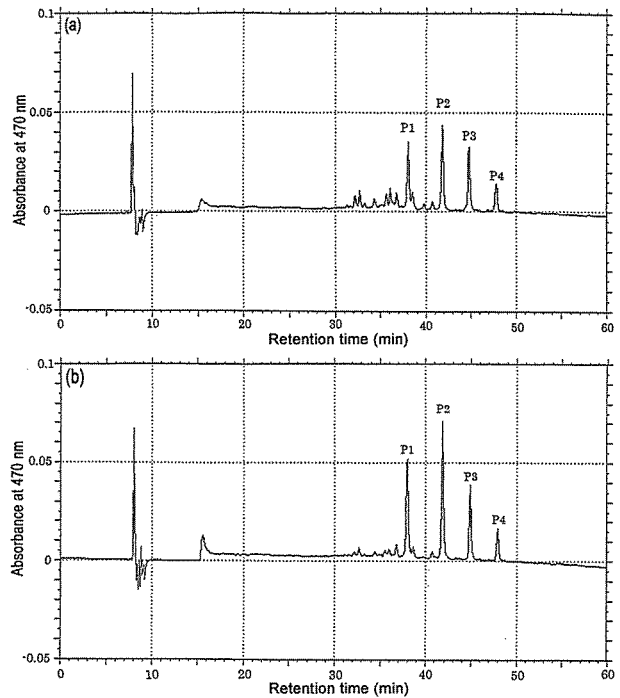


Figure 4 HPLC chromatograms of *M.anka* AHU 9085 extracts.

(a) 1.0% peptone medium, (b) 1.0% peptone + 0.3% L-aspartic acid medium. Column, GL-PACK Lichrosorb SI 60-5 (4.6 mm i.d. × 250 mm). Flow rate, 0.5 mL/min; Detection, 470 nm; Column temperature, 30°C. Mobile phase: (A), 0.1% formic acid in water; (B), 0.1% formic acid in acetonitrile. Linear gradient: (B), 0% $\xrightarrow{40 \text{ min}}$ 80% $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 100%.

ら色素生産が活発になるとの報告³²⁾がある。また、一方では、菌株の違い、培養方法および培地組成の違いなどによっては窒素源はあまり消費されず、炭素源であるグルコースが残存している間は、菌体の増殖に伴い有機酸が生成されるため pH が下がり、グルコースが消費されると自ら生産した有機酸を資化し、増殖するため pH が上昇することにより色素生産性が活発になるという報告³³⁾もある。本実験で L-アスパラギン酸の添加効果が高かったことから、菌体の生育環境における pH あるいは窒素源の組み合わせ効果が色素生産性と関与しているものと考えられる。なお、この点については今後さらに検

討を加える必要がある。

2. 抽出色素の分析

1.0%ペプトン添加培地と色素生産性が最も高かった1.0%ペプトンに0.3% L-アスパラギン酸を添加した培地の抽出色素のHPLC分析をFigure 4に示した。高いピークとしてP1-P4が確認された。2種の培地のP1-P4それぞれのピーク面積比は、1.0%ペプトン単独添加培地よりも1.0%ペプトンに0.3% L-アスパラギン酸を添加した混合培地の方が高く、P1では1.5倍、P2では1.6倍、P3およびP4ではいずれも1.2倍であった。

P1, P2の吸収スペクトルは、254, 306, 424 nm および538 nm に極大吸収をもつ類似した色素で、吸収スペクトルおよび溶出時間のいずれも前報²²⁾で測定した結果と一致した。このことから、P1, P2はそれぞれ赤色系色素のrubropunctamine, monascorubramineと推定された。また、P3, P4の吸収スペクトルは、231 nm と391 nm に極大吸収をもつ色素で、既知化合物のmonascin, ankaflavinの吸収スペクトルと一致しており、溶出時間もP3が44.9 min, P4が47.8 minで既知化合物のmonascin, ankaflavinと一致した。このことから、P3, P4はそれぞれ黄色系色素のmonascin, ankaflavinであると推定された。

これらのことから生産される色素は、L-アスパラギン酸の添加の有無に関わらず、rubropunctamine, monascorubramine, monascin, ankaflavinの4種であると推定された。

要 約

窒素源の異なる5種類の培地における色素生産性の比較を行い生成する色素成分の検討を行った。

(1) 5種類の窒素源を単独で用いた場合、0.03%添加よりも0.3%添加の方が効果的であり、0.3%添加ではペプトンにおいて黄色系および赤色系色素ともに最も色素生産性が高まった。

(2) 0.3%, 1.0%ペプトンのいずれの場合も、0.3% L-アスパラギン酸を添加した場合、黄色系および赤色系色素の生産量は他の窒素源を添加した場合よりも効果的であった。

(3) 黄色系色素に対する赤色系色素の生産比 (A^{500}/A^{400}) は、1.0%ペプトンと0.3%モノグルタミン酸の組み合わせの場合に高くなった。

(4) 生産および増加した色素成分は、rubropunctamine, monascorubramine, monascin, ankaflavinの4種の色素と推定された。

文 献

- 1) 西川栄次郎 (1926) 紅麹菌の色素について. 日本農芸化学会誌 **2**, 688-8.
- 2) Fielding BC, Haws EJ, Holker JSE, Powell ADG, Robertson A, Stanway DN, Whalley WB (1960)

- Monascorubrin. *Tetrahedron Lett* **5**: 4-27.
- 3) Fielding BC, Holker JSE, Powell ADG, Richmond KW, Robertson A, Whally WB (1961) The chemistry of fungi. *J Chem Soc* **21**: 4579-89.
- 4) Kumasaki S, Nakanishi K, Nishikawa E, Ohashi M (1962) Structure of monascorubrin. *Tetrahedron Lett* **18**: 1171-84.
- 5) Manchand PS, Whalley WB, Chen FC (1973) Isolation and structure of ankaflavin. *Phytochemistry* **12**: 2531-2.
- 6) 石綿 肇, 渡部美和, 谷村顕雄 (1974) 紅麹色素の衛生化学的研究 (第1報). 日本食品衛生会誌 **15**, 36-42.
- 7) 蘇 遠志 (1975) 紅麹菌の性質及びその利用について. 日本醗酵会誌 **33**, 28-36.
- 8) 廣井忠夫 (1988) 紅麹菌の食品加工への利用. *New Food Ind* **30**, 1-6.
- 9) 前田剛希, 比嘉賢一, 平賀淳誠 (2007) 紅麹米発酵物飲料の発酵条件による色調と色素組成変化. 日本食品科学工学会誌 **54**, 401-5.
- 10) Aniya Y, Ohtani I, Higa T, Miyagi C, Gibo H, Shimabukuro M, Nakanishi H, Taira J (2000) Dimerumic acid as antioxidant of the mold. *Monascus anka*. *Free Radic Biol Med* **28**: 999-1004.
- 11) Taira J, Miyagi C, Aniya Y (2002) Dimerumic acid as an antioxidant from the mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and heme protein-mediated oxidation. *Biochem Pharmacol* **63**: 1019-26.
- 12) Yasukawa K, Takahashi M, Natori S, Kawai K, Yamazaki M, Takeuchi M, Takido M (1994) Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mice. *Oncology* **51**: 108-12.
- 13) Yasukawa K, Takahashi M, Yamanouchi S, Takido M (1996) Inhibitory effect of oral administration of *Monascus* pigment on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* **53**: 247-9.
- 14) Martinkova L, Patakova-Juzlova P, Kren V, Kucerova Z, Havlicek V, Olsovsky P, Hovorka O, Rihova B, Vesely D, Vesely D, Vesela D, Ulrichova J, Prikrylova V (1999) Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit Contam* **16**: 15-24.
- 15) Wong HC, Koehler PE (1981) Antibacterial substance produced by *Monascus paxii*. *J Food Sci* **46**: 589-92.
- 16) Hossain CF, Okuyama E, Yamazaki M (1996) A new series of coumarin derivatives having monoamine oxidase inhibitory activity from *Monascus anka*. *Chem Pharmacol Bull* **44**: 1533-5.
- 17) 濱崎孝治 (2005) 着色料に関する最近の動向. 月刊フードケミカル **21**, 19-25.
- 18) CMP ジャパン編集部 (2006) 天然色素市場の動向—安全と健康イメージを訴求—. 食品と開発 **41**, 56-61.
- 19) 谷村顕雄 (1998) アザフィロノイド, 植物資源の生理活性物質ハンドブック, (吉積智司, 古賀邦正, 伊藤 汎編), p. 122-8, サイエンスフォーラム, 東京.

- 20) 高橋真美, 森高初恵 (2007) 紅麴色素がパンの組織と色調に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌 **54**, 67-74.
- 21) 高橋真美, 菊池俊彦 (1994) *Monascus* 属菌の色素生産性の向上. 昭和女子大学学苑 **654**, 17-22.
- 22) 高橋真美, 松本 孝, 菊池俊彦 (1997) *Monascus* 属菌の色素生産性の向上~第2報~. 昭和女子大学学苑 **691**, 58-66.
- 23) 高橋真美, 松本 孝, 小此木成夫 (2004) 紅麴菌 (*M.anka* sp.) の色素生産性に及ぼす米デンプンの効果. 日本食品科学工学会誌 **51**, 67-71.
- 24) 高橋真美, 松本 孝, 小此木成夫 (2003) *Monascus anka* sp. 色素生産性の向上について. 昭和女子大学学苑 **758**, 72-9.
- 25) Yoshimura M, Yamanaka S, Mitsugi K (1975) Production of *Monascus* pigment in a submerged culture. *Agric Biol Chem* **39**: 1789-95.
- 26) Lin TF, Demain LA (1991) Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**: 70-5.
- 27) Michael RJ, Deidre MS (1991) Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. *J Indust Microbiol* **8**: 23-8.
- 28) Lin TF, Demain AL (1995) Negative effect of ammonium nitrate as nitrogen source on the production of water-soluble red pigments by *Monascus* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 701-5.
- 29) 廣井忠夫, 高橋 剛, 嶋 悌司, 鈴木恒夫, 月岡 本, 小笠原長宏 (1981) 固体培養による紅麴の生産. 日本農芸化学会誌 **55**, 5-10.
- 30) Yongsmith B, Tabloka W, Yongmanitchai W, Bavavoda R (1993) Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB10 grown on cassava medium. *World J Microbiol Biotechnol* **9**: 85-90.
- 31) Tseng YY, Chen MT, Lin CF (2000) Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. *J Appl Microbiol* **88**: 31-7.
- 32) 布谷 昭, 志水数史, 八木和幸, 千飯勝則, 永浜広子 (1992) 紅麴を利用した食品の開発. 食品と開発 **23**, 51-5.
- 33) 田村博三, 小島樹彦, 赤嶺欣哉, 照屋比呂子 (1992) 紅麴菌の生産する色素に関する研究. 沖縄県工業試験所研究報告 **20**, 92-7.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **62**: 19-23 (2009)

Research Note

Pigments Production on Nitrogen Sources by *Monascus anka* AHU 9085

Mami Takahashi^{*1}, Takashi Matsumoto¹, and Hatsue Moritaka¹

(Received December 27, 2007 ; Accepted September 29, 2008)

Summary: The effects of five nitrogen sources (peptone, L-aspartic acid, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, monosodium glutamate, KNO_3) on the production of pigments by *Monascus anka* AHU 9085 were investigated. Pigment production in the presence of a 0.3% nitrogen source was greater than that in the presence of a 0.03% nitrogen source, and this increase was greatest when 0.3% peptone was used to produce yellow pigments and red pigments. As for the amount of pigment production, peptone gave the best yield among the five nitrogen sources, and addition of 0.3% L-aspartic acid to 1.0% peptone promoted the increase further. The ratio of A^{500}/A^{400} was the largest for the combination of 1.0% peptone and 0.3% monosodium glutamate. In the case of peptone with L-aspartic acid, the main pigments increased were assumed to be monascorubrin, rubropunctatin, monascin and ankaflavin by HPLC analysis.

Key Words: *Monascus anka*, pigment, nitrogen sources, peptone

* Corresponding author (E-mail : mami-t@swu.ac.jp)

¹ Graduate School of Human Life Science, Showa Women's University, 1-7 Taishido, Setagaya-ku, Tokyo 154-8533, Japan