

## Monascus 菌に関する文献調査

### 1. 研究目的

*Monascus* 属の安全性を確保するために、JICST 等を用い文献調査を行った。

### 2. 研究方法

*Monascus* 属菌は分類が確立されてないため、*Monascus purpureus* 以外の類縁菌類等の全ての種を調査対象とし基原、を行った *Monascus* 属の分類が確立してないので、全ての種のみならず、紅麴及び *Monascus* 属をキーワードとして検索の対象とした (*Monascus* 属は、和名で紅麴としている場合が多いが、ここでは敢えて紅麴及 *Monascus* 属を区別して検索対象とした)。

### 3. 研究結果

JICST 等を用い文献調査を行った結果、*Monascus* 属で文献が存在した種は、次の 8 種であった (カッコ内は文献数を示す)。

*Monascus anka* (26)

*Monascus araneosus* (2)

*Monascus barkeri* (1)

*Monascus kaoliang* (3)

*Monascus pilosus* (3)

*Monascus purpureus* (31)

*Monascus ruber* (24)

*Monascus rubiginosus* (4)

ベニコウジまたは、紅麴と表記され、種が特定され検索できる文献は 26 文献であった。この場合、紅麴を *Monascus anka* とした文献数が 8、*Monascus koji* とした文献が 1、*Monascus pilosus* とした文献が 1、及び *Monascus* 属が 18 文献であった。

種が特定されず、紅麴のみの記載がされた文献が 26、*Monascus* 属のみの記載がされた文献が 59 文献数であった。

### 4. 各論

種が特定され検索できた、次の種の文献について、種毎に二次代謝産物、作用、分析法、食品衛生、生物学的影響、培養、(生産性)食品への利用、諸外国における紅麴色素の利用、汚染、総説等の文献調査 *Monascus anka*、*Monascus araneosus*、*Monascus barkeri*、*Monascus kaoliang*、*Monascus pilosus*、*Monascus purpureus*、*Monascus ruber*、*Monascus rubiginosus*

## 1. *Monascus anka*

### 1) 二次代謝産物

#### (1) 新規天然色素キサントモナシン A; キサントモナシン B

SATO K らは、*Monascus anka* U - 1 標題菌の変異株が生産する黄色色素であるキサントモナシン A (I) と B を単離した。各種スペクトル、特に CH - COSY, NOESY, および INADEQUATE を併用した NMR 解析に基づき、フラノイソフタリド骨格を有するキサントモナシン A の構造を決定した。13C - 標題化実験に基づいて、ルブロプンクタチン色素からのキサントモナシン A の生合成経路を想定した<sup>30)</sup>。

#### (2) クマリン誘導体モナンカリン A ~ D

*Monascus anka* 由来のモノアミノキシダーゼ阻害作用を持つ一連の新規クマリン誘導体を HOSSAIN C F らは、*Monascus anka* から単離された共役ピラノ - クマリン骨格を持つ一連の新規色素、モナンカリン A ~ F, の構造を、分光法及び化学修飾により明らかにした。モナンカリン A ~ D は、モノアミノキシダーゼ阻害作用を示したが、モナンカリン E 及び F 又は他の単純な何種類かのクマリン誘導体では、その活性は観察されなかった。モナンカリン C は、マウス脳を用いた試験では、モノアミノキシダーゼ - A より強くモノアミノキシダーゼを阻害したが、この特異性はマウス肝臓モノアミノキシダーゼでは見いだされなかった<sup>31)</sup>。

#### (3) アンカラクトン

NOZAKI H らは、*Monascus anka* 培養液のエタノール抽出物より 2 種の赤色色素とともに抗菌活性をもつ新規  $\alpha$ ,  $\beta$  - 不飽和  $\gamma$  - ラクトンを単離し、アンカラクトンと命名した。本化合物は無色針状結晶で、分子式は C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub> と判明した。NMR における COLOC 測定から二環式  $\gamma$  - ラクトンと示唆され、単結晶を作成し、X 線解析による立体構造を決定した。また、前記の 2 種の色素の抗菌性も確認した<sup>32)</sup>。

#### (4) 抗菌性物質

森明彦らは、紅麴菌を振とう培養及び液体表面培養し、両培養方法ともグルコース濃度 7.5 %、酵母エキス濃度 0.8 % の時に抗菌性物質の生産が最大となった。振とう培養と液体表面培養の比較では液体表面培養の方が抗菌性物質の生産効率が高く、有利な事が分かった。

#### (5) アルカリプロテアーゼ

ASO K らは、*Monascus anka*; *Monascus araneosus*; *Monascus kaoliang*; *Monascus purpureus*; *Monascus ruber* の 5 種 6 菌株が増殖中に分泌生産するアルカリプロテアーゼを粗精製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後カゼイン含有ゲルへのプリント法による活性評価を行った。その結果 3 種類に分類され、いずれも PMSF によって阻害を受けたが、キレート剤および SH 試薬には非感受性であった。キモトリプシン又はトリプシンとは違うタイプのセリンプロテアーゼであると判断した<sup>19)</sup>。

## (6) 酸性プロテイナーゼ

YASUDA Mらは、豆腐のような熟成過程における紅麹菌(*Monascus anka*)の酸性プロテイナーゼの役割を明らかにするために、精製酵素を用いて酵素活性に及ぼすエタノール濃度の影響、大豆蛋白質の分解様式について調べた。本酵素活性は反応液中のエタノール濃度の増加に伴い低下した。本酵素による大豆蛋白質の分解様式について SDS - Page 法により調べたところ、電気泳動パターンは、豆腐ようとよく一致した<sup>23)</sup>。

## 2) 作用

### (1) 光保護作用

SWEENY J Gらは、*Monascus anka*の赤色色素 N - グルコシルルプロプンクタミンと N - グルコシルモナスコルブラミンの pH2.8 と 6.0 の水溶液中における日光による光脱色は 1, 4, 6 - トリヒドロキシナフタレンの存在によって阻止される。この阻止作用はナフタレン環の水酸基の数と位置に関して特異的であり、1, 4, 6 - トリヒドロキシナフタレンの N - グルコシルルプロプンクタミンおよび N - グルコシルモナスコルブラミンとの分子複合体を作る能力に関係があるらしい *Monascus anka* の赤色色素の水溶性媒体中における 1, 4, 6 - トリヒドロキシナフタレンによる光に対する保護作用によるものと考えられる<sup>4)</sup>。

### (2) 抗酸化、肝保護作用

ANIYA Yらは、ラットを用いてアセトアミノフェン(AAP)が誘発する肝毒性に対する *Monascus Anka* の抗酸化、肝保護作用を調べた。AAP 投与の 15, 1 時間前に調製物(4ml / kg, 腹腔内)を投与すると AAP(180mg / kg, 腹腔内)による血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタチオン S - トランスフェラーゼ(GST)活性の増加は抑制された。また AAP による肝サイトゾル GST 活性の減少も *Monascus Anka* により遮断された。更にチトクローム P450 活性もまた *Monascus Anka* により阻害された<sup>21)</sup>。

### 3) 分析法

ダイオードアレイ検出及びタンデム質量分析計を用いた液体クロマトグラフィーによる *Anka* 色素の分析について、TENG S Sらは、*Monascus purpureus Anka* 色素 6 種の分析法を提案した。二次元薄層クロマトグラフィーまたは液体クロマトグラフィー(LC)を検討した結果、C18 カラムに移動相としてアセトニトリル - 水(80:20)を用い、紫外吸収検出器(233nm)を用いて定量する LC 法を開発した。このほか、同定のために LC - 大気圧化学イオン化タンデム質量分析及び直接プローブ質量分析を、また UV スペクトル測定にダイオードアレイ検出器を適用した<sup>70)</sup>。

## 4) 生物学的影響

### (1) 抗高血圧症作用

紅麹の抽出物と色素が高血圧自然発症ラットの血圧、ミネラル出納、コレステロール代謝に与える影響について、辻啓介らは、高血圧自然発症ラット(SHR)において 2 種の紅麹

菌 [*Monascus pilosus* (MP), *M. anka* (MA)] の麴抽出物と MA の産生色素 (MAP) が血圧、各種陽イオンの出納、血しょうコレステロールレベルのどのような変化を及ぼすかを比較検討した。1) 対照群のラットの血圧は急激に上昇したが、紅麴抽出物は検討した 2 菌種では紅麴換算で 0.03 % 相当の添加により、いずれも SHR の血圧上昇を飼育 10 日目あるいは 15 日目で有意に抑制した。MAP はそのような効果は示さなかった。2) 血しょうの Na / K 比は MP と MA 両群で低下した。血圧と Na / K 比との相関が得られた。しかし、ミネラルバランスには有意差がなかった。3) 1 % MAP 群ではミネラル (Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe) の糞中排せつ量が増えたが、0.1 % ではそのような現象は認められなかった。4) 血しょう総コレステロール値は紅麴 2 種と色素添加により低下した。以上、紅麴抽出物は SHR の血圧、血しょうコレステロールレベルを改善し、そのメカニズムの一端は、尿中 Na 量の排せつ増加に伴う血中 Na / K 比の改善によるものと推定した<sup>10)</sup>。

#### (2) モノアミノオキシダーゼ阻害作用

*M. anka* から単離された共役ピラノ - クマリン骨格を持つ一連の新規色素、モナンカリン A ~ D は、モノアミノオキシダーゼ阻害作用を示したが、モナンカリン E 及び F 又は他の単純な何種類かのクマリン誘導体では、その活性は観察されなかった。モナンカリン C は、マウス脳を用いた試験では、モノアミノオキシダーゼ - A より強くモノアミノオキシダーゼを阻害したが、この特異性はマウス肝臓モノアミノオキシダーゼでは見いだされなかった<sup>2)</sup>。

#### (3) Ames 試験

複素環アミンの変異誘発性に及ぼす *Monascus* 属由来の食用着色料の抑制効果について、IZAWA S らは、*Monascus anka* 及び *M. purpureus* (紅麴) から抽出した赤色及び黄色色素とラッカイン酸は、Ames 試験において、3 - ヒドロキシアミノ - 1 - メチル - 5H - ピリド [4,、3 - b] インドール [Trp - P - 2(NHOH)] の変異誘発性を阻害した。紅麴の両色素は 2 - アミノ - 3 - メチルイミダゾ [4, 5 - f] キノリン、2 - アミノ - 3, 4 ジメチルイミダゾ [4, 5 - f] キノリン及び調理 - 肉抽出液の変異誘発性を阻害した。また、紅麴色素による変異誘発性の阻害は Trp - P - 2(NHOH) の分解によると示唆した<sup>23)</sup>。

古泉快夫らは、紅きく菌変異株 *Monascus anka* UN202 - 13 の産生する赤色色素について、微生物に対する突然変異誘発活性の有無を賀田の方法により調べた。*B. subtilis* H - 17 および M - 45 を用いた Rec assay, *Salmonella* Ames set 株を用いた Reversion plate test, 色素試料液の 10 倍希釈液を 2 年間連続投与したマウスで Host mediated Rec assay を行った結果、変異誘発活性を証明し得なかった<sup>4)</sup>。

#### (4) 抗菌性

森明彦らは、紅麴 (*Monascus* 属の作る麴) は深紅色の色素と共に抗菌物質を生産し、保存剤としての効果がある。食品色素生産菌 *M. anka* の抗菌物質生産の動特性に関する知見を紹介し、特に培養条件として、振とう培養と液体表面培養の違い、培地濃度の違いに注目し、それらが菌体、抗菌活性の収量、生産速度に及ぼす影響につき述べた。生産物質は複数で、脂溶性物質はルプロパンクタチンが主成分であると紹介<sup>25)</sup>。

## 5) 培養

### (1) 変種株

広井忠夫は、変異誘導した紅麹菌 (*Monascus anka*) 変異株を用いた紅麹及びそのエタノール抽出色素について、食品衛生学的及び栄養学的検討、4 種のアフラトキシンは存在せず、微生物に対する変異誘導性はなく、コレステロール合成阻害物質を生産せず、食品衛生学的安全性を認めた。紅麹による中国酒は退色した酒を最良とするが、産生する赤色素そのものの食品への利用を種々行った<sup>35)</sup>。

月岡本らは、*Monascus* 菌による酒類製造に関する研究の際に、*Monascus* 菌とその変異株による赤色素の生産性について、IFO 保存の *Monascus* 菌 21 株と、*M.anka* Nakazawa et sato IFO4778 を親株とした変異株 53 株の、色素生産性を検討した。IFO4478 は薄い赤色、UN - 2602 - 7 はとう桃色、UN - 5504 - 4 は赤色を呈した。IFO4478 は高い赤色素生産性を示したが、変異株 (UN - 5504 - 4) は親株の 21 倍の色素生産能を有していた<sup>40)</sup>。

古泉快夫らは、紅きく菌変異株 *Monascus anka* UN202 - 13 の産生する赤色素について、生産性、Ames 試験等の検討を行った<sup>41)</sup>。

### (2) 液体培養

森明彦らは、紅麹菌を振とう培養及び液体表面培養し、グルコース濃度及び酵母エキス濃度が抗菌性物質の生産に及ぼす影響を調べた。両培養方法ともグルコース濃度 7.5 %、酵母エキス濃度 0.8 % の時に抗菌性物質の生産が最大となった。振とう培養と液体表面培養の比較では液体表面培養の方が抗菌性物質の生産効率が高く、有利な事が分かった<sup>42)</sup>。

### (3) クエン酸の影響

クエン酸処理による汚染菌の低減化について、桑原秀明らは、紅麹菌 (*Monascus anka*) の製麹において、雑菌による汚染を低減させるためクエン酸処理を行った。原料米を 0.5 % 以上のクエン酸溶液で浸漬することにより、麹及びその発酵液中の菌数を 10<sup>2</sup> 以下に抑えることができた。しかし 0.5 % 以上の処理は蒸米が軟化して製麹には不相当と考えられた。又、クエン酸処理により生育、色素生成、麹の酵素活性が低下した<sup>43)</sup>。

### (4) 回転瓶培養

回転瓶培養による *Monascus* 色素の発酵産生の向上について、MAK N K らは、*M. anka* を深部培養・寒天表面培養・回転瓶培養の 3 種条件で回分培養し、*Monascus* 色素 (赤色 + 黄色) の産生を比較した。回転瓶の場合、かびは器壁に付着して、菌体内色素・菌体外色素とも大量に産生。他 2 法と比べて、産生量は 10 倍、最大量到達日数は約半分、また色素中の赤色素の比が著しく大であったと報告している<sup>44)</sup>。

### (5) かつお節残さの利用

斎藤宗久らは、調味料の製造の際に廃出されるかつお節残さの効果的利用を図るために、残さの微生物処理法について試みた。かつお節残さと糖質として加えた小

麦粉、米ヌカあるいは小麦フスマの混合物に十種類の微生物 (*Aspergillus oryzae*, *Asp. sojae* IFO - 4200, *Asp. sojae* IFO - 30112, *Asp. niger*, *Rhizopus javanicus* IFO - 5541, *Mucor javanicus* IFO - 4569, *Penicillium chrysogenum* IFO - 8648, *Monascus purpureus*, *Monascus anka*, *Asp. sojae* + *Asp. oryzae*) をそれぞれ接種し、水分が 50 % になるように滅菌水を添加した後、30 °C で 10 日間醗酵を行い、抽出した粗酵素液について酵素活性を測定した。その結果、*Asp. sojae* と *Asp. oryzae* の混合菌を使用した場合に中性プロテアーゼ活性が最も高く、中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼおよびグルタミンナーゼの活性は、それぞれ 1238.08、167.66、152.99、0.47、5.54 units / g d.m. であった。醗酵は、かつお節残さにいり小麦粉を 10 - 20 % (wt.%) 添加し、醗酵における水分を 55 % として 30 °C、7 - 9 日間が適した。続いて、醗酵とその分解物の熱水抽出液の蛋白含量との関連について調べた結果、溶解率は 30 °C、9 日間では 28.50 %、30 °C、30 日間では 34.91 % と低かった。しかしながら、醗酵に引き続き熟成を行った結果、熟成期間が長くなるに従って溶解性蛋白含量は増大し、溶解率は 30 °C、30 日間では 77.17 %、35 °C、30 日間では 74.34 % であった<sup>31)</sup>。

## 6) 食品 (酒類) への利用

広井忠夫は、変異誘導した紅麹菌 (*Monascus anka*) 変異株を用いた紅麹及びそのエタノール抽出色素について、4 種のアフラトキシンは存在せず、微生物に対する変異誘導性はなく、コレステロール合成阻害物質を生産せず、食品衛生学的安全性を認めた。紅麹による中国酒は退色した酒を最良とするが、産生する赤色素そのものの食品への利用を種々行った<sup>35)</sup>。台湾紅かく (アンカ) 中より分離した菌 (*Monascus anka*) を親株とする色素高生産変異菌を用いて、紅麹の大量生産条件を明らかにした。産生する色素の構造を同定し、食品に利用するための理化学的性質を示した。また、生産色素の安全性を確認するためアフラトキシン、微生物に対する変異原性、コレステロール合成阻害性の有無を検討し、食品への利用方法について検討した<sup>36)</sup>。紅麹菌の親株 *Monascus anka* から色素高生産変異株を分離して、産生色素群を薄層クロマトで確認し、色素の退色要因と退色防止とを検討した。該菌からつくった麹は安全で、産生色素には変異誘発性はない。さらに清酒製造工程における紅麹の使用、製品貯蔵中の退色試験を行い、紅色清酒の開発並びに漬物、赤色水飴その他の食品への利用について検討をした<sup>37)</sup>。

月岡本は、*Monascus anka* 菌の産生する鮮明な赤色色素を清酒に加えた「あかい酒」における、紅麹のカビ臭の改良と色素生産性の向上を目的に研究した。*Monascus anka* IFO 4478 が最も高い色素生産性を示した。次に、IFO 4478 の中から親株の 21 倍の色素生産を示す変異株 UN 5504 - 4 (I) を得た。I を使用し二度麹法による紅麹を製造した。色素の生産性は紅麹に比べて二度麹の方が高かった。二度麹法によって製造した紅麹を用いた清酒は紅麹臭を少なくすることができた<sup>38)</sup>。

## 7) 諸外国における紅麹色素の利用

### (1) 肉製品に亜硝酸塩の代替物としての *Monascus* 抽出物の使用

#### ① バイオテクノロジー

プロトプラスト融合による *Monascus anka* と *Aspergillus oryzae* との遺伝子間のハイブリ

ダイゼーションについて、KIYOHARA Hらは、増殖が遅く、赤色色素を生産する工業的に有用な *Monascus anka* を育種する目的で *M. anka* MAK1(arg)と *Aspergillus oryzae* AOK1 (met, thr)のプロトプラストを細胞融合した。細胞融合株を UV 光で照射したところ、長くて白い菌糸を形成する安定なヘテロ接合二倍体を得た。これらの二倍体の核の中の DNA 含量は親株の2倍であり、親株より増殖が速く、また、エタノールを親株より早い時期に生産した<sup>3)</sup>。

## 8) 総説等

森明彦は、「食品加工技術の話題 紅麴菌による食品用抗菌物質生産の動特性」紅麴 (*Monascus* 属の作る麴)は深紅色の色素と共に抗菌物質を生産し、保存剤としての効果がある。食品色素生産菌 *M.anka* の抗菌物質生産の動特性に関する知見を紹介し、特に培養条件として、振とう培養と液体表面培養の違い、培地濃度の違いに注目し、それらが菌体、抗菌活性の収量、生産速度に及ぼす影響につき述べた。生産物質は複数で、脂溶性物質はルプロバンクタチンが主成分であると紹介<sup>3)</sup>。

桑原秀明は、「糸状菌だけでお酒を造る」中国、台湾等で古くから天然色素(モナスカス色素)の生産菌として知られている *Monascus* 属糸状菌を利用して酒を製造した。この菌を米粉の糖化発酵に使用すると、34℃ 5日間で5～10%のエチルアルコールを含む赤色の発酵液ができた。i-ブチルアルコール等の高級アルコール含量が低く、また酸度も低くなったが特徴的な香味と適度の酸味を呈していた<sup>3)</sup>。

加工食品へのモナスカスの利用について、鈴木秀昭は、*Monascus anka*, *M.purpureus*, *M.barkeri* などによるモナスカス色素の一般的性質を述べ、耐熱性・染着性にすぐれ、発酵法で安定供給できる天然色素として、カニ足様カマボコを主に水産加工・畜肉加工・菓子等への利用、耐酸・耐塩性モナスカス色素の開発による醤油・醤油関連食品(たれ・つゆ、米菓、水産関連食品)への応用について、さらに紅麴の加工食品への応用に関する特許を紹介している<sup>3)</sup>。

布谷昭らは、分類、菌学的性質、工業的培養法を説明。利用法は色素が *Monascus anka* を用い液体培養で生産。色調は数種、色素成分は6種判明。水産加工で主に使用。食品では防腐効果に着目し味噌、乳腐、清酒等を製造販売。毒性、変異原性試験の結果を紹介、安全性を確認。紅麴の生理活性物質は防腐作用、コレステロール合成阻害剤や血糖値抑制物質として注目されることなどを解説<sup>3)</sup>。

## 2. *Monascus araneosus*

### 1) 二次代謝産物

#### (1) L - りんご酸生成

LUMYONG S らは、*Monascus araneosus* 菌を N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジンで変異し 18 株の色素非生産株を得た。これらをストリークし 22 株の安定白色株を得た。深部培養で親株のりんご酸生産量は 19.8g / l であったのに対し、白色株では 27.9g / l であった。ピルビン酸、 $\alpha$  - ケトグルタル酸、フマル酸、こはく酸が少量生成したがくえん酸は認められなかった<sup>102)</sup>。

#### (2) アルカリプロテアーゼ

ASO K らは、*Monascus anka*; *Monascus araneosus*; *Monascus kaoliang*; *Monascus purpureus*; *Monascus ruber* の 5 種 6 菌株が増殖中に分泌生産するアルカリプロテアーゼを粗精製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後カゼイン含有ゲルへのプリント法による活性評価を行った。その結果 3 種類に分類され、いずれも PMSF によって阻害を受けたが、キレート剤および SH 試薬には非感受性であった。キモトリプシン又はトリプシンとは違うタイプのセリンプロテアーゼであると判断した<sup>103)</sup>。



### 3. *Monascus barkeri*

#### 1). 総説等

加工食品へのモナスカスの利用について、鈴木秀昭は、*Monascus anka*, *M. purpureus*, *M. barkeri* などによるモナスカス色素の一般的性質を述べ、耐熱性・染着性にすぐれ、発酵法で安定供給できる天然色素として、カニ足様カマボコを主に水産加工・畜肉加工・菓子等への利用、耐酸・耐塩性モナスカス色素の開発による醤油・醤油関連食品(たれ・つゆ、米菓、水産関連食品)への応用について、さらに紅麴の加工食品への応用に関する特許を紹介している<sup>37)</sup>。

#### 4. *Monascus kaoliang*

##### 1) 二次代謝産物

###### (1) *Monascus* 種の変異株による黄色色素の産生

UEDA Mらは、赤色色素)を産生する *M.kaoliang* をさらに変異させたところ、黄色色素を産生した。黄色色素は赤色色素よりも水溶性であった。赤色色素と黄色色素とを混合し、これに EDTA, Fe, Na を添加し、30℃, 7日間振とうしたところ、赤色色素を示すλ max420, 500nm は変化したが黄色色素を示すλ max370nm には変化がなかった。また無細胞抽出液による実験においても赤色色素から黄色色素への変化を認めた<sup>14)</sup>。

###### (2) *Monascus kaoliang* sp. nov.の変異株による細胞外性色素生成

LIN C - Fらは、*M.kaoliang* F - 2(ATCC26264)の変異誘発により、野生株より約100倍多くの色素を生成する変異株、R - 10847を分離した。蒸しパンの固体培養変異株は細胞外に色素を粘性物質と共に塊で押し出す。変異株は孢子形成能を欠き、生育速度が減少し、分生子の大きさや量もまた減少した。変異株の生成する色素の色はオレンジから暗赤色に変化した<sup>14)</sup>。

###### (3) アルカリプロテアーゼ

ASO Kらは、らは、*Monascus anka*; *Monascus araneosus*; *Monascus kaoliang*; *Monascus purpureus*; *Monascus ruber* の5種6菌株が増殖中に分泌生産するアルカリプロテアーゼを粗精製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後カゼイン含有ゲルへのプリント法による活性評価を行った。その結果3種類に分類され、いずれもPMSFによって阻害を受けたが、キレート剤およびSH試薬には非感受性であった。キモトリプシン又はトリプシンとは違うタイプのセリンプロテアーゼであると判断した<sup>15)</sup>。

###### (4) シトリニン

食品赤色色素として使用される *M.ruber*、*M.pilosus*、*M.purpureus* を各種培地と、深部培養又は固相培養の培養条件下でシトリニン(モナシジン A)の産生を検討した。*M.ruber* と *M.purpureus* が産生した。*M.purpureus* は深部培養で最大シトリニン 240mg / L を産生した。*M.ruber* のシトリニン産生は N 源を尿素又はメチオニンとした場合、色素産生と共に減少したが、グルタミン酸ナトリウムの場合増加した<sup>16)</sup>。

## 5. *Monascus pilosus*

### 1) 二次代謝産物

#### (1) 酸性プロテイナーゼ

YASUDA M らは、発酵食品を開発するため紅麴中のプロテイナーゼ(I)活性の高い菌株を選抜した。I の最適 pH は 2.5, 最適温度は 50 °C, 熱安定性は 55 °C であった。ヒトヘモグロビン, 牛乳カゼイン, ウシ血清アルブミン, 大豆蛋白質によく作用し,  $\beta$ -ラクトグロブリン, ゼラチンには全く作用しなかった。I の反応はペプスタチンにより顕著に阻害された<sup>100)</sup>。

#### (2) $\beta$ -ガラクトシダーゼ生成

WONG H - C らは、ガラクトースは標記酵素(I)に対する生成基質として最適。ゲルろ過によると I の分子量は約 150000。I 反応に対する最適 pH および温度はそれぞれ 4.5 ~ 5.0, 55 °C。精製 I は 55 °C 以下, pH 3 ~ 8 緩衝液中で安定。Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> および Cu<sup>2+</sup> は活性を阻害。p-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-ガラクトシド基質に対する  $K_m$  と  $V_{max}$  を測定<sup>133)</sup>。

### 2) 分析法

#### (1) 食品中の *Monascus* 属菌の免疫学的検出

COUSIN M A らは、抗原を検出する二重サンドウィッチ ELISA を開発, 検出限界 (ng/ml) は Botrytis で 0.5 ~ 1, *Monascus* で 2 ~ 4 であった。市販の果実及び香辛料製品からは Botrytis 抗原だけが検出された。*B.tulipae* と *M.pilosus* の免疫活性画分は、酸・アルカリ耐性が高く, 主成分は単糖類であったが, *M.pilosus* の画分にはキシロース等も含まれていた<sup>134)</sup>。

### 3) 生物学的影響

#### (1) 抗高血圧症作用

紅麴の抽出物と色素が高血圧自然発症ラットの血圧, ミネラル出納, コレステロール代謝に与える影響について, 辻啓介らは、高血圧自然発症ラット (SHR) において 2 種の紅麴菌 [*Monascus pilosus* (MP), *M.ankar* (MA)] の麴抽出物と MA の産生色素 (MAP) が血圧, 各種陽イオンの出納, 血しょうコレステロールレベルのどのような変化を及ぼすかを比較検討した。1) 対照群のラットの血圧は急激に上昇したが, 紅麴抽出物は検討した 2 菌種では紅麴換算で 0.03 % 相当の添加により, いずれも SHR の血圧上昇を飼育 10 日目あるいは 15 日目まで有意に抑制した。MAP はそのような効果は示さなかった。2) 血しょうの Na / K 比は MP と MA 両群で低下した。血圧と Na / K 比との相関が得られた。しかし, ミネラルバランスには有意差がなかった。3) 1 % MAP 群ではミネラル (Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe) の糞中排せつ量が増えたが, 0.1 % ではそのような現象は認められなかった。4) 血しょう総コレステロール値は紅麴 2 種と色素添加により低下した。以上, 紅麴抽出物は SHR の血圧, 血しょうコレステロールレベルを改善し, そのメカニズムの一端は, 尿中 Na 量の排せつ増加に伴う血中 Na / K 比の改善によるものと推定した<sup>103)</sup>。

## (2) 降圧物質の単離および同定

KOHAMA Yらは、*Monascus pilosus* 感染米(紅麴)をエタノールで抽出し、Amberlite CG-120 カラムクロマトグラフィーおよび HPLC で分画、精製した。各分画を自然発症高血圧ラットに静注した結果、A - 3 分画と B - 1 分画に降圧作用を認めた。前者は塩化アセチルコリン、後者は $\gamma$ -アミノ酪酸であった<sup>129)</sup>。辻啓介らは、食塩が 1 %含む半合成飼料に、黄麴(*Aspergillus oryzae*)または紅麴(*Monascus pilosus*)を添加し、高血圧自然発症ラットに 3 週間与え、血圧とミネラル代謝に及ぼす影響を調べた。各麴を 10 %添加すると両麴ともに血圧降下作用を示した。特に、紅麴群では 29mmHg もの低下を生じた。血圧に関与するミネラルの出納にはあまり変化はなかった<sup>130)</sup>。

## (3) 本態性高血圧者の血圧に及ぼす影響

井上清らは、蒸煮米に *Monascus pilosus* を植菌して得た紅麴抽出物を本態性高血圧者に摂取させ、血圧および血液生化学的指標、臨床病態への影響を調べた。2 週間および 1 カ月間の摂取試験では紅麴 27g / 日相当のエキスを摂取した場合に血圧が有意に降下した。また、6 カ月間の摂取試験では紅麴 9g / 日の摂取で血圧降下と血清コレステロール低下作用を認めた。その他の臨床検査値には有意な変動はなかった<sup>131)</sup>。

## 4) 食品への利用

### (1) 紅麴の各種調味料への応用

玉田英明は、半子囊菌科の *Monascus* 属の紅麴を日本で工業的に製造するようになったのは、1970 年代に天然色素を得るためであった。紅麴独特の色調、風味を有する乳腐、清酒、焼豚、パンなどの食品が既に商品化されている。*M.pilosus* からの紅麴を利用した食酢、醤油、味噌の発酵調味料への応用について、製造工程、開発した商品の特徴および用途などを説明<sup>132)</sup>。

## 6. *Monascus purpureus*

### 1) 二次代謝産物

#### (1) 生産物

##### ① シトリニン

腎毒性を示すシトリニンの産生性等については、次のような報告がある。

BLANC P Jらは、*Monascus purpureus* 及び *M. ruber* は液体培養で色素とシトリニンを生産した。両菌によるシトリニンの生成量はそれぞれ 240mg / l、370mg / lであった。一方、米を基質とした固体培養では基質 1kg 当たりそれぞれ 100mg、300mg のシトリニンを生産した<sup>3)</sup>。

食品赤色色素として使用される *M. ruber*、*M. pilosus*、*M. purpureus* を各種培地と、深部培養又は固相培養の培養条件下でシトリニン(モナシジン A)の産生を検討した。*M. ruber* と *M. purpureus* が産生した。*M. purpureus* は深部培養で最大シトリニン 240mg / L を産生した。*M. ruber* のシトリニン産生は N 源を尿素又はメチオニンとした場合、色素産生と共に減少したが、グルタミン酸ナトリウムの場合増加した<sup>4)</sup>。

BLANC P Jらは、*Monascus* の産生するシトリニン(モナシジン A) の性状について、*M. purpureus*、*M. ruber* が産生するモナシジン A について、生物学的性状に関する試験、質量分析、NMR 解析等の結果、種々の真菌の産生する腎毒素、シトリニンの性状を示すことを認めた。*M. purpureus*、*M. ruber* の産生する毒素は、液内培養ではそれぞれ 270、340mg / l、固形培養ではそれぞれ 100、300mg / kg 乾重であった<sup>5)</sup>。

##### ② モナスカス色素の生産

###### 培養法の改良による

EE Y - Kらは、炭素源として 50g / l のタピオカ澱粉での *Monascus* の単純な回分培養で、乾燥菌体重量は 8g / l に達した。培養開始後 40 時間目に菌体の増殖が停止してからポリケタイド色素の生産が始まり、OD が 31 (500nm)、26.5 (400nm) に達した。400g / l のゼラチン化した澱粉ケーキを用いた 2 段階(液 - 固)回分培養で、菌体量は 37.5g / l、色素濃度は 145 (400、500nm) に達した<sup>6)</sup>。

##### ③ 色素生産

BLANC P Jらは、*Monascus purpureus* の液体及び固体培地の培養による色素の生産<sup>3)</sup>

BLANC P Jらは、窒素源としてグルタミン酸を含む化学合成培地に *Monascus purpureus* を培養し、遊離型と結合型色素を生産した。の化学構造を IR、UV NMR と MS を用いて調べ、グルタミン酸のアミノ基と I の遊離型が結合しており、窒素は、ピロノイド酸素に置換した構造であった<sup>7)</sup>。

紫色素成分の生産について、MARTINKOVA Lらは、*M. purpureus* の色素は、オレンジ色素成分化合物の形成は、培養培地の組成や培養法に影響され、アミノ酸、ペプチ

ドまたは蛋白質が培養期に利用されると、生物活性化合物は不活性複合体や、いくつかの生物活性を保持する紫色素成分に変換した<sup>44)</sup>。

MARTINKOVA Lらは、らは、*M.purpureus* の色素は、細菌に対するだけでなく酵母や糸状菌類のいくつかの種に対する抗生物質作用及びはい毒性と催奇性を含む生物活性を持つ。これらの活性は、オレンジ色素成分(モノスコルブリン及びルブプロンクタチン)の存在に依存する。これらの化合物の形成は、培養培地の組成や培養法に影響され、アミノ酸、ペプチドまたは蛋白質が培養期に利用できると、生物活性化合物は不活性複合体や、いくつかの生物活性を保持する紫色素成分に変換した<sup>45)</sup>。

#### ④脂肪酸

##### (a) 脂質の高濃度生産

RASHEVA Tらは、らは、赤色色素生産性 DSM1379 の親株から *Monascus purpureus* 色素脱失変異株を MEPAG 固体培地上で選別し、深部培養における生合成速度を Chapec Dox 培地の C / N 比を塩化アンモニウムで 10:1 及び 80:1 に調整して求めた。グルコース及び窒素の比消費速度と脂質生産から C / N 比 80:1 がより効率的に脂質を生合成することが分かった。C / N 比及び窒素源によって中性脂質、りん脂質及び糖脂質の組成は影響されなかった。遊離脂肪酸の組成は主に C18:1(45.5 %)と C16(22.1 %)で構成されていた。51 %の飽和脂肪酸を含むトリグリセリドの割合が 88 %の脂質を高濃度生産した<sup>46)</sup>。

##### (b) 長鎖脂肪酸

JUZLOVA Pらは、らは、*Monascus purpureus* の赤色及び白色突然変異体から採取した長鎖脂肪酸をガスクロマトグラフィー質量分析により同定し、定量した。C12 ~ C24 の脂肪酸を採取し、39 種の脂肪酸(22 飽和脂肪酸、14 モノエノン脂肪酸、2 ジエノン脂肪酸及びアルファ-リノレン酸)を同定した。2 変異体間の脂肪酸組成の違いを調べた<sup>47)</sup>。

*Monascus purpureus* による遊離の脂肪酸混合物のメチルケトン類への転換

KRANZ Cらは、らは、*Monascus purpureus* 培養における短鎖遊離脂肪酸混合物のメチルケトン類への変換について検討した。2 %グルコースと 0.5 %トリプトンからなる培地に脂肪酸を 1 ~ 1.5mM 加え、30 °C で振とうした。代謝経路の調節は *Penicillium roquefortii* と類似したが、代謝前駆物質の量には差異があった。脂肪酸の代謝は前駆物質の組成に依存した<sup>48)</sup>。

#### ⑤アルカリプロテアーゼ

ASO Kらは、らは、*Monascus anka*; *Monascus araneosus*; *Monascus kaoliang*; *Monascus purpureus*; *Monascus ruber* の 5 種 6 菌株が増殖中に分泌生産するアルカリプロテアーゼを粗精製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後カゼイン含有ゲルへのプリント法による活性評価を行った。その結果 3 種類に分類され、いずれも PMSF によって阻害を受けたが、キレート剤および SH 試薬には非感受性であった。キモトリプシン又はトリプシンとは違うタイプのセリンプロテアーゼであると判断した<sup>49)</sup>。

#### ⑥ヌクレアーゼ阻害剤

SARUNO Rらは、らは、*Monascus purpureus* 菌体抽出液から、酵素阻害剤をゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーにて精製し、電気泳動的に均一な標品を得た。分子量は 2500 で、糖、りんを含む熱安定性の高いペプチドであり、同時に生産のヌクレアーゼのほか、ヌクレアーゼ P1、だ毒ホスホジエステラーゼなどを非きつ抗的に阻害した<sup>144)</sup>。

## 2) 分析法

### (1) 生鮮魚介類からのモナスカス色素の分析法

鮮魚介類などに使用することが禁止されているモナスカス色素の検出法について次のような報告がある。

高槻圭悟らは、魚体そのままを室温で 30 分間メタノールに浸漬することによる表皮からの抽出を 1 回行い、抽出液またはその濃縮液の可視部吸収スペクトル、アンモニア水-アセトン反応による緑色蛍光、薄層クロマトグラフィーなどにより、モナスカス色素の存在を推定した。さらに抽出液をジクロロメタン-水に分配した後ジクロロメタン層を濃縮し、高速液体クロマトグラフィーによる可視部・蛍光両検出器に現れる顕著なピークを調べることや、ガスクロマトグラフィー・質量分析法を用いてモナスカス色素に含まれる成分のマススペクトルを得ることなどにより、モナスカス色素を識別、確認することができる鮮魚の表皮に着色されたモナスカス色素の確認法を開発した<sup>125)</sup>。

吉田政晴らは、セルロースとシリカゲルの薄層クロマトグラフィーの Rf 値、HPLC の可視、蛍光両検出器に現れるピーク、吸光分光分析及びモナスカス色素の特異反応を用い総合的に判断する方法を確立した<sup>39)</sup>。

吉田政晴らは、モナスカス色素はセルロース TLC およびシリカゲル TLC の Rf 値、分光光度計による吸収パターン、モナスカス色素の特異反応(アンモニアとアセトン混液中加温による緑色蛍光の観察)により同定した<sup>146)</sup>。

ダイオードアレイ検出及びタンデム質量分析計を用いた液体クロマトグラフィーによる Anka 色素の分析について、TENG S Sらは、*Monascus purpureus* Anka 色素 6 種の分析法を提案した。二次元薄層クロマトグラフィーまたは液体クロマトグラフィー(LC)を検討した結果、C18 カラムに移動相としてアセトニトリル-水(80:20)を用い、紫外吸収検出器(233nm)を用いて定量する LC 法を開発した。このほか、同定のために LC-大気圧化学イオン化タンデム質量分析及び直接プローブ質量分析を、また UV スペクトル測定にダイオードアレイ検出器を適用した<sup>70)</sup>。

## 3) 食品衛生

### (1) 赤貝及びアカウオ

市販むきみ赤貝及びアカウオについて、次のような報告がある。

吉田政晴らは、生鮮魚介類などに使用することが禁止されているモナスカス色素について分析法を検討し、セルロースとシリカゲルの薄層クロマトグラフィーの Rf 値、HPLC の可視、蛍光両検出器に現れるピーク、吸光分光分析及びモナスカス色素の特異反応を用い、市販むきみ赤貝の使用実態調査の結果、モナスカス色素等の不正使用が認められた<sup>39)</sup>。

### (2) アカウオ

吉田政晴らは、昭和 62 年～平成 2 年に実施したアカウオ 71 検体の色素使用実態調査の違反事例 2 件から赤色 102 号とモナスカス色素を検出した。赤色 102 号はセルロース TLC の Rf 値、分光光度計の吸収パターン、UV 吸収による色調から同定した。モナスカス色素はセルロース TLC およびシリカゲル TLC の Rf 値、分光光度計による吸収パターン、モナスカス色素の特異反応(アンモニアとアセトン混液中加温による緑色蛍光の観察)により同定した<sup>40)</sup>。

#### 4) 生物学的影響

##### (1) 血清コレステロールやトリグリセリドの低下作用

*Monascus purpureus* が発酵した米(赤酵母米) 高コレステロール血症動物モデルの血液コレステロールの低下について、LI Cらは、らは、25%カゼイン飼料摂取により血清コレステロールが上昇したウサギに、同じ飼料を与え続けながら標題の発酵赤酵母米を一日 0.2、0.4 及び 0.8g / kg・体重与えると、いずれの群でも摂取量に応じて血清総コレステロールは減少した。また卵黄、ラード、コレステロールを含む飼料の摂取によりコレステロールの上昇した状態でも発酵赤酵母米投与により血清コレステロールは減少した。ラード、大豆油にコレステロールを添加した飼料を与えたウサギでも、発酵赤酵母米投与により血清コレステロールやトリグリセリドの低下が観察された<sup>41)</sup>。

FINK - GREMMELS Jらは、らは、*Monascus purpureus* から分離したメタノール抽出性色素の毒性試験およびラットの血液中コレステロールを減少させるかどうかについて調査した。これらの色素は経口投与ではなんら悪影響を及ぼさなかった。コレステロール、HDL - コレステロールとトリグリセリドの減少があったが、これらの薬理作用は色素によるのかどうかは明らかでなかった<sup>42)</sup>。

##### (2) 安全性試験

FINK - GREMMELS Jらは、らは、*Monascus purpureus* から分離したメタノール抽出性色素の毒性試験およびラットの血液中コレステロールを減少させるかどうかについて調査した結果、これらの色素は経口投与ではなんら悪影響を及ぼさなかった。コレステロール、HDL - コレステロールとトリグリセリドの減少があったが、これらの薬理作用は色素によるのかどうかは明らかではなかった<sup>42)</sup>。

##### (3) 抗菌性

WONG H - Cらは、らは、抗生物質 Monascidin A 生成の培養条件、分離方法についてテストした。3 種の濃度の酵母エキスとグルコースでテストの結果、酵母エキス 0.8%、グルコース 10%の静置液状培地が抗生物質の生成に最適であった。抗生物質の生成は増加する色素生成に伴うので、シリカゲル吸着クロマトグラフィーで、ベンゼン、メタノール、クロロホルムの混合溶媒を用いて抗生物質を含む色素成分を分離した。さらに精製の結果、けい光黄色色素、淡黄抗生物質の 2 物質が分離できた。*Bacillus subtilis* に対する精製の抗生物質の反応量を測定した結果、最少効果量は 6mm のペーパーディスク当たり約 1.5  $\mu$ g であった<sup>43)</sup>。

WONG H Cらは、らは、野性種の菌株に、殺菌用紫外線(254nm、水銀低圧ランプ)を 10



分間照射して、変種の *Monascus purpureus* G1 を得。この菌株と従来種の *Monascus purpureus* N11S 菌株とを比較し、*Bacillus subtilis* 菌株に対する抗菌作用をテストした結果、N11S 菌株に比較して G1 菌株は非常に低い抗菌性を示した<sup>41)</sup>。

OBER P らは、らは、*Monascus purpureus* Went DSM 1379 株の代謝生成物が大腸菌などの微生物に及ぼす影響について調べた試験。代謝生成物は微生物の発育になんら影響を及ぼさなかった<sup>42)</sup>。

#### (4) Ames 試験

複素環アミンの変異誘発性に及ぼす *Monascus* 属由来の食用着色料の抑制効果について、IZAWA S らは、らは、*Monascus anka* 及び *M.purpureus* (紅麴) から抽出した赤色及び黄色色素とラッカイン酸は、Ames 試験において、3 - ヒドロキシアミノ - 1 - メチル - 5H - ピリド [4, 3 - b] インドール [Trp - P - 2(NHOH)] の変異誘発性を阻害した。紅麴の両色素は 2 - アミノ - 3 - メチルイミダゾ [4, 5 - f] キノリン、2 - アミノ - 3, 4 ジメチルイミダゾ [4, 5 - f] キノリン及び調理 - 肉抽出液の変異誘発性を阻害した。また、紅麴色素による変異誘発性の阻害は Trp - P - 2(NHOH) の分解によると示唆した<sup>43)</sup>。

#### (5) シトリニン

腎毒性を示すシトリニンの産生性等については、次のような報告がある。

BLANC P J らは、*Monascus purpureus* 及び *M.ruber* は液体培養で色素とシトリニンを生産した。両菌によるシトリニンの生成量はそれぞれ 240mg / l、370mg / l であった。一方、米を基質とした固体培養では基質 1kg 当たりそれぞれ 100mg、300mg のシトリニンを生産した<sup>44)</sup>。

食品赤色色素として使用される *M.ruber*、*M.pilosus*、*M.purpureus* を各種培地と、深部培養又は固相培養の培養条件下でシトリニン(モナジジン A) の産生を検討した。*M.ruber* と *M.purpureus* が産生した。*M.purpureus* は深部培養で最大シトリニン 240mg / L を産生した。*M.ruber* のシトリニン産生は N 源を尿素又はメチオニンとした場合、色素産生と共に減少したが、グルタミン酸ナトリウムの場合増加した<sup>45)</sup>。

BLANC P J らは、*Monascus* の産生するシトリニン(モナジジン A) の性状について、*M.purpureus*、*M.ruber* が産生するモナジジン A について、生物学的性状に関する試験、質量分析、NMR 解析等の結果、種々の真菌の産生する腎毒素、シトリニンの性状を示すことを認めた。*M.purpureus*、*M.ruber* の産生する毒素は、液内培養ではそれぞれ 270、340mg / l、固形培養ではそれぞれ 100、300mg / kg 乾重であった<sup>46)</sup>。

#### 6) ヌクレアーゼ阻害

SARUNO R らは、らは、*Monascus purpureus* 菌体抽出液から、酵素阻害剤をゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーにて精製し、電気泳動的に均一な標品を得た。分子量は 2500 で、糖、りんを含む熱安定性の高いペプチドであり、同時に生産のヌクレアーゼのほか、ヌクレアーゼ P1、だ毒ホスホジエステラーゼなどを非きつ抗的に阻害した<sup>47)</sup>。

#### 5) 培養

## (1) 変種株

モナスカス - 色素生成用の変種株について、WONG H Cらは、野性種の菌株に、殺菌用紫外線(254nm、水銀低圧ランプ)を10分間照射して、変種の *Monascus purpureus* G1を得、この菌株と従来種の *Monascus purpureus* N11S 菌株とを比較した。N11Sはオレンジレッドの色を呈するが、G1は酵母エキス寒天培地で暗赤色を呈し、培地上にN11Sより多くの色素を生成し、菌糸に蓄積される。この色素生成量は30分間の音波照射(sonification)により増大した。また、*Bacillus subtilis* 菌株に対する抗菌作用をテストした結果、N11S菌株に比較してG1菌株は非常に低い抗菌性を示した<sup>4)</sup>。

## (2) 色素の生産

培養法の改良により、EE Y - Kらは、炭素源として50g / lのタピオカ澱粉での *Monascus* の単純な回分培養で、乾燥菌体重量は8g / lに達した。培養開始後40時間目に菌体の増殖が停止してからポリケチド色素の生産が始まり、ODが31(500nm)、26.5(400nm)に達した。400g / lのゼラチン化した澱粉ケーキを用いた2段階(液・固)回分培養で、菌体量は37.5g / l、色素濃度は145(400、500nm)に達した<sup>5)</sup>。

BLANC P Jらは、*Monascus purpureus* の液体及び固体培地の培養による色素の生産<sup>6)</sup>。

BLANC P Jらは、窒素源としてグルタミン酸を含む化学合成培地に *Monascus purpureus* を培養し、遊離型と結合型色素を生産した。の化学構造をIR、UV NMRとMSを用いて調べ、グルタミン酸のアミノ基とIの遊離型が結合しており、窒素は、ピロノイド酸素に置換した構造であった<sup>7)</sup>。

紫色素成分の生産について、MARTINKOVA Lらは、*M.purpureus* の色素は、オレンジ色素成分化合物の形成は、培養培地の組成や培養法に影響され、アミノ酸、ペプチドまたは蛋白質が培養期に利用されると、生物活性化合物は不活性複合体や、いくつかの生物活性を保持する紫色素成分に変換した<sup>8)</sup>。

## (3) 基質

### ① エタノールの影響

色素生産のための基質としてのエタノールについて、JUZLOVA Pらは、*Monascus purpureus* の黄色(アンカフラビン、モナシン)、オレンジ(モナスコルブリン)、赤色、(モナスコルブラミン)などポリケチド色素生産のために2%エタノールを単一炭素源として用いたところ、マルトースで培養した時よりも高い色素生産性を示した。この時窒素源が大変重要な要因であり、生産される色素の色が大きな影響を受けた。エタノール利用効率を上げるために、まずマルトースで培養するという2段階法が有効で、色素生産のための基質としてのエタノールが重要な要素であった<sup>9)</sup>。

色素生産に及ぼすpHと窒素源の影響について、CHEN M - Hらは、*Monascus purpureus* のグルコース培地での色素アンカフラビン生産は低pH(pH4.0)が適し、モナシン、ルプロプンクタチン、モナスコルブラミン生産にはpHの影響は少なかった。窒素源は硝酸塩よりもアンモニウムとペプトンが生育、色素生産ともに好適であった。モナスコルブラミンは主生成色素であり、モナスコルブラミンの生産はグルコース-ペプトン培地、

pH6.5 で培養したときに最大となった<sup>53)</sup>。

CHEN M - Hらは、らは、*Monascus purpureus* の抽出液から黄色色素2種、オレンジ色素2種および赤色色素1種を検出した。赤色色素のモノスコルブラミンが主要な生産物であった。グルコースをマルトースに変えることでモノスコルブラミン生産性が向上した。炭素源濃度 50gl - 1 では、通気条件で多量のエタノールが生産された。このことは呼吸発酵同時代謝が起こっていることを示唆している。20gl - 1 のグルコースを含む培地ではエタノール生産は最少、モノスコルブラミン生産は高レベルであった<sup>54)</sup>。

## ②固体培養

固体発酵における *Monascus* の増殖と色素生産に与える酸素と二酸化炭素分圧の影響について、HAN Oらは、らは、*Monascus purpureus* の米での固体培養における色素の生産は、酸素分圧が 0.5atm の時に最大であった。しかし、二酸化炭素分圧を高めると色素生産を阻害し、1.0atm で完全に阻害された。流動床型リアクタ(クローズト系)では、二酸化炭素分圧を 0.02atm とすると、酸素分圧が 0.5atm の時に、また、前者が低い時は、後者が 0.21atm の時、色素収量は最大であった<sup>55)</sup>。

JOHNS M Rらは、らは、*Monascus purpureus* の固体培養による色素の産生について、色素産生に対する培養条件を、米培地及びカラジーンで固定化し米粒状に加工したゲル状合成培地で検討した結果、米培地における培養当初の最適条件は pH6、水分 56 %であった。水分量が低いと色素生産量は大幅に低下した。ゲル状培地における赤色及び黄色色素は、同一組成の液体培地より3倍増加したが、米粒培地の方が生産量が高かった<sup>56)</sup>。

SOOKSON Rらは、らは、*Monascus purpureus* の胞子を蒸煮した米に接種し、25、30、35、40℃で培養した。色素は70%エタノールで抽出し、比色分析した。最終的に色素生産量は30℃が最高であった。N源としては硝酸アンモニウム、グルタミン酸ソーダが最適であったが、非添加の場合においても全色素量は高かった。最終製品の色には差がないのでN源の添加は必要がなかった<sup>60)</sup>。

JOHNS M Rらは、らは、標題菌の色素産生に対する培養条件を、米培地及びカラジーンで固定化し米粒状に加工したゲル状合成培地で検討した。米培地における最適条件は初発 pH6、初発水分 56 %であった。水分量が低いと色素生産量は大幅に低下した。ゲル状培地における赤色及び黄色色素は、同一組成の液体培地より3倍増加したが、米粒培地の方が生産量が高かった<sup>59)</sup>。

## ③ウチワサボテンの果汁

ウチワサボテンの果汁による *Monascus purpureus* 培養での赤色色素の生産における通気条件の影響について、HAMDI Mらは、らは、*Monascus purpureus* の増殖におけるガス環境の影響を pO<sub>2</sub> を変化させて研究した。第1発酵は短期間、第2発酵は長期間各々低 pO<sub>2</sub> (10%) に保ちながら比較した。バイオマスは糖消費とエタノール生成、次いでエタノール消費に続いて赤色色素の蓄積という二段階において増加した。赤色色素形成はグルコースとフルクトースが完全に同化され、エタノール消費が始まったときにスタートした<sup>47)</sup>。

## ④澱粉処理廃水の利用

発酵における澱粉処理廃水の利用について、MERCER D Gらは、らは、約1%の固型分を含むコメ調理工程よりの廃水を、限外ろ過により2~10倍に濃縮し、赤色色素を産生する *Monascus purpureus* の発酵の基質として使用した場合の、生育性に対する影響を分析。4%濃度が細胞生育には最適な条件で、同濃度の市販のコメ澱粉よりも高い収率を得たが、これは工程廃水中に存在するリピッド、特にリゾレシチンの影響が強いと考えられる<sup>41)</sup>。

#### ⑤かつお節残さの利用

斎藤宗久らは、らは、調味料の製造の際に廃出されるかつお節残さの効果的利用を図るために、残さの微生物処理法について試みた。かつお節残さと糖質として加えたいり小麦粉、米ヌカあるいは小麦フスマの混合物に十種類の微生物 (*Aspergillus oryzae*, *Asp. sojae* IFO - 4200, *Asp. sojae* IFO - 30112, *Asp. niger*, *Rhizopus javanicus* IFO - 5541, *Mucor javanicus* IFO - 4569, *Penicillium chrysogenum* IFO - 8648, *Monascus purpureus*, *Monascus anka*, *Asp. sojae* + *Asp. oryzae*) をそれぞれ接種し、水分が50%になるように滅菌水を添加した後、30℃で10日間醗酵を行い、抽出した粗酵素液について酵素活性を測定した。その結果、*Asp. sojae* と *Asp. oryzae* の混合菌を使用した場合に中性プロテアーゼ活性が最も高く、中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼおよびグルタミナーゼの活性は、それぞれ1238.08、167.66、152.99、0.47、5.54 units / g d.m.であった。醗酵は、かつお節残さにいり小麦粉を10 - 20% (wt.%) 添加し、醗酵における水分を55%として30℃、7 - 9日間が適した。続いて、醗酵とその分解物の熱水抽出液の蛋白含量との関連について調べた結果、溶解率は30℃、9日間では28.50%、30℃、30日間では34.91%と低かった。しかしながら、醗酵に引き続き熟成を行った結果、熟成期間が長くなるに従って溶解性蛋白含量は増大し、溶解率は30℃、30日間では77.17%、35℃、30日間では74.34%であった<sup>42)</sup>。

#### ⑥ガラス製エアリフト型発酵そうによる培養

MALFAIT J Lらは、らは、*Monascus purpureus* を4%でんぷん培地中でガラス製エアリフト型発酵そう(操作容量55l)で培養し、良好な運転性能がえられた。菌体収率はかくはんそうの場合の32%に対しエアリフト型では38%と向上した。さらに所要動力はかくはんそうの約1/2であった。エアリフト型は機械的せん断力が低いので温和なせん断条件下におくことができせん断力に弱い糸状菌の培養に適している。酸素移動性能も良好であり、実際の培養系で90~280hr<sup>-1</sup>がえられた(類似条件のかくはんそうは、60~80hr<sup>-1</sup>)<sup>43)</sup>。

#### ⑦脂肪酸代謝に及ぼす炭水化物の異化作用の影響

PETERS Nらは、らは、*Monascus purpureus* 菌の振とう培養(30℃)において、糖質(グルコース)に脂肪酸(オクタン酸)を添加した培地ではジオキシ的増殖が観察された。糖質の代謝に先立って脂肪酸の酸化が生じ増殖が開始された。この系に前駆体(2 - ペンタノン)を共存させると増殖の誘導期にオクタン酸の酸化と2 - ペンタノンの代謝が開始され、そののちにグルコースが代謝された<sup>44)</sup>。