微生物の産生する赤紫色物質ネオプルブラチンの 食用色素としての評価

今田勝美*・大島正志*・吉田孝利*
安田 侃**・吉野秀一郎***

Evaluation of Neopurpuratin, a Purplish-red Substance Produced by Microorganism, as Food Colors

Katsumi IMADA*, Masayuki OHSHIMA*, Takatoshi YOSHIDA*,
Sunao YASUDA** and Shuichiro YOSHINO***

* Central Research Institute, Daiichi Seiyaku Co. Ltd.,
Kitakasai 1-16-13, Edogawa-Ku, Tokyo, 134

** San-ei Chemical Industries, 1-11, 1-Chome, Sanwacho, Toyonaka, 561

*** The Federation of Food Additives Association in Japan,
Jingumae 2-6-1, Shibuya-Ku, Tokyo, 150,

Aqueous solution of neopurpuratin, obtained by mixed culture of *Streptomyces propurpuratus* with *Bacillus* sp. No. 751, shows a vivid purplish-red. Therefore, it's use for food colors was studied. By the physicochemical studies, it was revealed that the stability constant ($\log K$) of neopurpuratin, chelate complex of Fe^{2+} , was 14.19 (pH 5, 25°C) which was as high as that of EDTA and Fe^{2+} . The color tone in aqueous solution on neopurpuratin was fairly stable in a wide range of pH (3.6~8.2) and was not affected by light but it's fading was observed by heating and also by the addition of chelating agents or metal ions such as Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} etc. It was possible to prevent fading significantly by the addition of reducing agents such as vitamin C. Application of neopurpuratin as food colors was studied on non-cooked foods and it was found to be available for coloring soft drinks, jellies, pickles and others. Neopurpuratin was suggested to be safe in the biological tests (acute toxicity and mutagenicity). (Received Oct, 29, 1982)

ネオプルブラチンは *Streptomyces propurpuratus* と *Bacillus* sp. no. 751 の混合培養によって産生され、Fig. 1 に示す化学構造式を有しており、その水溶液は食用赤色 106 号類似の美しい赤紫色を呈する。^{1)~3)}

周知のごとく食用色素は食品を加工する場合、味や香りとともに人々に食欲を起こさせるなど不可欠な要素である。大別すると合成着色料と天然色素に分類できるが、最近では合成着色料から天然色素への志向が強くなってきている。しかし天然色素も原料供給の安定性や経済性をはじめ、色調の伸び、耐光性、耐熱性、pH 安定性、

Fig. 1 Chemical structure of neopurpuratin

* 第一製薬(株)中央研究所 (〒134 東京都江戸川区北葛西 1-16-13)

** 三栄化学工業(株) (〒561 大阪府豊中市三和町 1-1-11)

*** 日本食品添加物連合会 (〒150 東京都渋谷区神宮前 2-6-1)

染色性など多くの面で問題があるといわれている⁴⁾。ネオブンプラチンは、水溶液が美しい赤紫色を呈することや他の多くの天然色素が原料を海外に依存しているのに対して醗酵法によって製造するという特徴がある。そこで、われわれは本物質の新規な赤色食用色素としての可能性を追求するべく基礎的検討を行い、さらに各種食品への利用適性などについて評価した。

実験材料および方法

1. 供試試料

供試ネオブンプラチンは既報の方法³⁾、すなわち醗酵法によって製造後、単離精製したものを用いた。

2. 分光学的測定

分光測定には日立 124 型自記分光光度計を用いた。ネオブンプラチン量は 555 nm の吸光度にて測定した。

3. 安定度定数 (log *K*) の測定

ネオブンプラチンは Fe^{2+} を含むキレート化合物であるから、各種 pH 域における安定度定数を下記のごとくモル比法⁵⁾によって求めた。

すなわち、硫酸第一鉄アンモニウム $[\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 7.84 mg を 100 ml の pH 2, 3, 4, 5 および 6 の緩衝液 (pH 2~5 は 1 M 酢酸ナトリウム—塩酸緩衝液, pH 6 は 0.1 M 酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液) にそれぞれ溶解して Fe^{2+} 溶液を調製した ($2 \times 10^{-4} \text{M}$)。一方、ネオブンプラチンのリガンド⁶⁾ も、その 4.17 mg を同様にして pH 2, 3, 4, 5, および 6 の緩衝液にそれぞれ溶解した ($2 \times 10^{-4} \text{M}$)。ついで Fe^{2+} 溶液 1 ml に本リガンド溶液 1~9 ml を加え、同じ pH の緩衝液にて全量を 10 ml とし、保温セルを用いて 25°C, 555 nm における吸光度を測定した。

また、pH 5 における安定度定数の温度による変化 (25, 40 および 60°C) もこの方法に準じて測定した。

安定度定数 (log *K*) は、ネオブンプラチン対 Fe^{2+} のモル比 3:1 および 7~10:1 の吸光度値から解離度を求め算出した。

4. 溶解度について

溶解度は日本薬局方⁷⁾の方法に準じて測定を行い、その表現法に従った。

実験結果および考察

1. 食用色素としての基礎的諸性質

(1) 安定度定数について

ネオブンプラチンの 25°C, pH 2, 3, 4, 5, 6 ならびに pH 5, 25, 40, 60°C における安定度定数 log *K* の

Table 1 Stability constants of neopurpuratin at pH 2~6 (25°C) and 25~60°C (pH 5)

pH	Temperature (°C)	Stability constant (log <i>K</i>)
2	25	13.04
3	25	13.32
4	25	14.19
5	25	14.19
5	40	14.04
5	60	13.44
6	25	14.21

測定結果を Table 1 に示した。

Table 1 より明らかなごとく、リガンドと Fe^{2+} のキレート化合物であるネオブンプラチンの安定度定数は、例えば pH 5, 25°C の場合 14.19 であり、キレート化剤 EDTA と Fe^{2+} の錯体の値 14.33⁸⁾ とほぼ同程度の高い値であった。しかし pH が低いときや温度が高い場合若干高くなった。

(2) pH による色調の変化

ネオブンプラチンを 0.1 M 酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.6, 5.2), 0.05 M ペロナルナトリウム—塩酸緩衝液 (pH 6.7, 8.2) および脱イオン水にそれぞれ溶解し 0.0034% 溶液となし可視部吸収スペクトルを測定した。

Fig. 2 に見られるごとく、本溶液の示す吸収曲線は pH 3.6 の場合若干低くなっているものの、いずれの pH においても形状は異ならない。

Fig. 2 Absorption spectra of neopurpuratin at various pH values

Fig. 3 Effect of pH on the stability of neopurpuratin (at 80°C)

□ : 30 min
○ : 60 min
● : 120 min

市販の天然色素のうち赤色もしくは赤紫色系統の色素としてブドウ果皮色素（エノシアンチン）、ラック色素（ラッカイン酸）あるいはコチニール色素（カルミン酸）などが挙げられるが、これらの色素は pH による色調変化が認められている⁴⁾のに対し、ネオブプルプラチン水溶液は広い pH 域において色調の変化がなかった。

(3) 溶解性

ネオブプルプラチンは水、メタノールには溶け易い。エタノールにはやや溶け易い。*n*-ブタノールには溶けにくい。アセトン、エチルエーテル、酢酸エチルエステル、ベンゼン、*n*-ヘキサン、石油エーテル、ジオキサン、ピリジン、クロロホルム、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドにはほとんど溶けない。

(4) 熱に対する安定性

ネオブプルプラチンを 0.1 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.6, 5.2) および 0.05 M ペロナルナトリウム-塩酸緩衝液 (pH 6.7, 8.2) にそれぞれ溶解し 0.0032% 溶液となし、80°C にて 30, 60 および 120 分間加熱した。放冷後、残存色素量を測定して無処理に対する百分率を求め、その結果を Fig. 3 に示した。

Fig. 3 より明らかなごとく、熱に対する安定性は概してよくなく、特に pH 3.6 および 8.2 において悪かった。

(5) 光に対する安定性

脱イオン水、0.1 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.6) および 0.05 M ペロナルナトリウム-塩酸緩衝液

Fig. 4 Effect of UV-light on the stability of neopurpuratin

(pH 8.2) に溶解したネオブプルプラチン溶液 (0.0032%) に室温 (20~24°C) において紫外線灯 (ナショナル殺菌灯 GL-15, 15 ワット) 2 個を 60 cm の距離から 1, 3.5 および 7 時間照射して光劣化性を調べた。光照射後の残存色素量を無処理に対する百分率で示した (Fig. 4)。

Fig. 4 に見られるごとく、紫外線によるネオブプルプラチンの退色は比較的少なかった。

また、脱イオン水溶液について室温 (20~24°C) において陽光ランプ (東芝陽光ランプ D 400, 400 ワット) を 100 cm の距離から 6 日間照射後、残存色素量を測定した結果、無照射の値と差が全く認められなかった。

多くの天然色素が耐光性に難点をもつ⁴⁾のに対し、ネオブプルプラチンは光に対しかなり安定な物質であることが判明した。

(6) 金属塩の影響

ネオブプルプラチンと 7 種類の金属イオン (Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) を 1 M 酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液 (pH 5) にそれぞれ溶解した。濃度はすべて 1×10^{-4} M とした。ネオブプルプラチンと各金属イオン両溶液の混合比は、 Zn^{2+} , Fe^{3+} の場合 2:1, その他の金属イオンの場合 3:1 とし、室温に 4 日放置もしくは 90°C, 30 分加熱してネオブプルプラチンの呈色におよぼす金属イオンの影響を調べた。実験の対照としてネオブプルプラチンを金属イオン無添加の緩衝液 (pH 5) と混合したものを用いたが、その混合比は同様に 2:1 もしくは 3:1 とした。対照群も同様に室温放置または加熱した。始発時のネオブプルプラチン濃度に対する金属イオ

Fig. 5 Effect of metal salts on the stability of neopurpuratin

■ : pH 5, 25°C, 4 days
□ : pH 5, 90°C, 30 min

ン添加群ならびに対照群の残存率は Fig. 5 のとおりであった。

Fig. 5 に示すごとく、 Cu^{2+} による退色がもっとも著しく、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} によっても退色が認められた。

一般に 2 価金属イオンのキレート体の安定度は、 $\text{Pd} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Mg} > \text{Ca}$ であり、キレート形成する金属イオンは安定度のより高い金属イオンと置換するといわれている。⁹⁾¹⁰⁾

ネオブンプラチン水溶液が Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} などの影響を受けて退色することは、構成成分の Fe^{2+} がこれらの金属イオンによって置換を受けたためと考える。

(7) 薬剤の影響

脱イオン水ならびに 1 M 酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液 (pH 5) に溶解したネオブンプラチン溶液 (ネオブンプラチン濃度は $1 \times 10^{-4} \text{M}$) 1 ml にクエン酸、メタリン酸ナトリウム、ビタミン C、イソビタミン C およびシステインの各水溶液 (各薬剤の濃度はすべて $1 \times 10^{-4} \text{M}$) をそれぞれ 3 ml 添加し、90°C、30 分加熱した。薬剤無添加の対照としては、ネオブンプラチン溶液 1 ml に対して脱イオン水 3 ml を添加して同様に加熱処理した。加熱後の残存色素量を加熱前の色素量に対する百分率で表わし Fig. 6 に示した。

ネオブンプラチンはクエン酸、メタリン酸ナトリウムによって退色した。しかしビタミン C、イソビタミン C、システインによってその色調の安定化が保たれた。

特にビタミン C の効果が著しい。

クエン酸ならびにメタリン酸ソーダによるネオブンプラチンの退色は、ネオブンプラチンのリガンドが Fe^{2+} では呈色しない⁶⁾ ことから推定すると、ネオブンプラチン

Fig. 6 Effect of various reagents on the stability of neopurpuratin

■ : Buffer (pH 5), 90°C, 30 min
□ : Deionized water, 90°C, 30 min

ンの構成成分の Fe^{2+} がその安定度定数の面からきわめて微量とはいえ水溶液中で解離を起こし、その解離 Fe^{2+} がこれら薬剤のもつキレート力によって捕捉され、ついで Fe^{3+} へ酸化されたためと考えられる。

一方、ビタミン C などによる色調安定化作用は、これらの薬剤のもつ還元力によって構成成分の Fe^{2+} が Fe^{3+} への酸化を防止するためと考えられ、ネオブンプラチンと化学構造が比較的類似のジビリジルによる Fe^{2+} の比色定量分析の際、還元力を共存させると Fe^{2+} の Fe^{3+} への酸化が防止されて呈色が安定化する¹¹⁾ という現象と似ている。

色素類のなかには、アゾ系の合成品やフラボノイド系天然色素などビタミン C によって多少とも退色するものが知られているが⁴⁾¹²⁾、ネオブンプラチンの場合ビタミン C など還元剤は逆に呈色の安定剤となる。このことはビタミン C 強化清涼飲料水などの着色に応用の可能性を示唆するものである。

(8) 退色防止にビタミン C の利用

クエン酸および銅イオンによるネオブンプラチンの退色を防止するため、ビタミン C の添加効果を検討した。

ネオブンプラチンを $1.5 \times 10^{-2} \text{M}$ クエン酸溶液 (pH 2.9) および $1.67 \times 10^{-5} \text{M}$ 硫酸銅溶液 (pH 5, 1 M 酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液にて調製) に $0.5 \times 10^{-4} \text{M}$ となるように溶解し、その各々の溶液にビタミン C を添加して、その濃度を $1.5 \times 10^{-4} \text{M}$ とした後、90°C、30 分加熱

Table 2 Stabilization of neopurpuratin in citric acid and cupric sulfate solution by vitamin C

Vitamin C	Residual neopurpuratin after heating (90°C, 30 min)	
	Citric acid	Cupric sulfate
0	86.4% (—)	88.3% (—)
1.5×10^{-4} M	97.1% (99.8)	93.8% (99.5)

(): Residual vitamin C (%)

して残存ネオブルプラチン量を求め、ビタミンC無添加の対照と比較して Table 2 に示した。また、添加ビタミンCについて加熱後の残存率をヨード滴定法にて求めて、同じく Table 2 に示した。

Table 2 に見られるごとく、ビタミンCはクエン酸および銅イオンによるネオブルプラチンの退色をかなり防止した。また、添加ビタミンCは本実験条件下ではほとんど分解しなかった。

2. 食品への応用

ネオブルプラチンは熱によって退色する傾向にあるから、カマボコ、ドロップ、焼菓子など製造過程で熱を加える食品への応用には不適と考えられる。そこで加熱工程を含まない食品への応用を試みた。

(1) 清涼飲料水への応用

Table 3 に示した処方にてネオブルプラチンを含む清涼飲料水を調製した。

本清涼飲料水は鮮明なグレープ色を呈した。本品は1ヶ月室外放置および30時間紫外線照射(ナショナル殺菌灯 GL-15, 15ワット2個, 距離60cm)を行った場合ともに退色が認められなかった。

(2) シバ漬への応用

0.05%ネオブルプラチン水溶液を用いて、キュウリ、ナスよりなるシバ漬の着色を行った結果、天然シバ漬と

Table 3 Ingredient of a soft drink dyed with neopurpuratin

Granulated sugar	27.0 kg
Citric acid	0.105 kg
Tartaric acid	0.050 kg
Vitamin C	0.100 kg
Grape essence syrup	0.200 l
Neopurpuratin	0.044 kg
Caramel BC-2	0.120 kg
Water	100.0 l
Soda water	100.0 l

ほぼ同色調のシバ漬が得られた。この色調は、冷蔵庫内にて1ヶ月保存した場合でも全く変化が認められなかった。食用赤色106号を使った市販シバ漬と比較すると、見かけは同色調であるが、固形物に対する染着性は劣った。

(3) 乳飲料への応用

牛乳1lの着色にネオブルプラチンの0.5gを使用した。比較対照に用いた市販赤色天然色素のブドウ果皮色素、コーン色素(ムラサキトウモロコシ色素)の場合、乳蛋白と結合して灰色に退色したのに対し、ネオブルプラチンにて着色した牛乳は紅色を呈し、60°C, 15分の加熱によっても退色を起こさなかった。

(4) フルーツゼリーへの応用

板ゼラチン6g, 砂糖50g, 水250ml, ネオブルプラチン0.125gにてゼリーを作り、ぶどうにて上部を飾った。ゼリー部分は美しい赤紫色を呈し、この呈色は1ヶ月間冷蔵庫に保存しても変化がなかった。

(5) 粉末アンの染着性

粉末アン5gに0.01%ネオブルプラチンおよび0.003%食用赤色2号水溶液をそれぞれ別々に40ml加えて2時間ゆっくりと攪拌後、遠心分離(2,000rpm, 20分), その上澄液の吸光度を測定したところ、それぞれ1.47および0.65(525nmにて測定)であった。

一方、イオン交換水のみを用いて同様操作して得られた上澄液にネオブルプラチンおよび食用赤色2号をそれぞれ溶解して0.01%および0.003%溶液として吸光度を測定したところ、それぞれ1.48および1.37であった。

これらの結果から染着率を求めると、食用赤色2号の場合 $[(1.37-0.65) \div 1.37] \times 100 = 52.6\%$ であったのに対し、ネオブルプラチンの場合は $[(1.48-1.47) \div 1.48] \times 100 = 0.68\%$ と比べて小さかった。このことからネオブルプラチンは粉末アンに対して染着性をほとんど示さないといえる。

3. 安全性について

ネオブルプラチンを食用色素として応用する場合、重要な問題として安全性が挙げられる。今回は急性毒性試験ならびに突然変異誘発性試験を行った。

(1) 急性毒性試験

マウスの雄性による急性毒性実験を経口および静脈内投与で行った結果、7日間判定で経口の場合のLD₅₀値は10g/kg以上、静脈内投与の場合のLD₅₀値は3,141mg/kgであった。

(2) 突然変異誘発性試験

Salmonella typhimurium を用いた AMES test によると、ネオブンプラチンは 100~10,000 μg /平板の範囲で試験に使用した 4 菌株 (TA 1535, TA 100, TA 1537, TA 98) のすべてに対して突然変異の誘発を認めなかった。また、S-9 添加による代謝活性化試験においても陰性の結果を示した¹³⁾。

以上よりネオブンプラチンは、その急性毒性値を目安として分類¹⁴⁾すると、きわめて毒性の低い物質に属し、突然変異誘発性も有しないと推定されるに至った。

しかし、今後食用色素として実際に利用してゆくには、慢性毒性試験ならびに哺乳動物に使った遺伝的安全性の検討などが必要と考えられる。

要 約

Streptomyces purpuratus と *Bacillus* sp. no. 751 との混合培養によって生産されたネオブンプラチンは、水溶液において美麗な赤紫色を呈するので食品用の色素としての可能性を検討した。

基礎的検討の結果、 Fe^{2+} のキレート化合物であるネオブンプラチンの安定度定数 ($\log K$) は 14.19 (pH 5, 25°C) であり、その大きさは EDTA と Fe^{2+} のキレート体の値 14.33 に匹敵することが判明した。

また、その色調は pH 3.6~8.2 の範囲で安定であり、紫外線および陽光の照射によってもほとんど退色しなかった。しかし、加熱やキレート作用のある薬剤あるいは金属イオン (Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} など) によって退色を起こした。これらの退色は、ビタミン C などの還元剤を共存させるとかなり防止できた。

応用研究の結果、ネオブンプラチンは清涼飲料水、ゼリー、シバ漬など調理過程に加熱操作を要しない食品の着色に利用できることがわかった。

安全性については初期試験の段階であるが、その急性毒性値はきわめて低く、また突然変異誘発性も有しないと推定された。

本色素は醗酵法によって高収量で生産されるので¹⁵⁾、さらに安全性面での保証が十分得られるならば、食品用の色素としての開発が可能と考えられる。

文 献

- 1) SHINOBU, R. and KANDA, N.: *J. Antibiotics*, **23**, 125 (1970).
- 2) OHSHIMA, M., ISHIZAKI, N., HANDA, A., TONOOKA, Y. and KANDA, N.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 209 (1981).
- 3) OHSHIMA, M., ISHIZAKI, N., HANDA, A., TONOOKA, Y. and KANDA, N.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 335 (1981).
- 4) 楠八重克己編：食品添加物年鑑，（食品化学新聞社，東京），p. 45 (1979).
- 5) 石館守三・山根靖弘：薬誌，**77**，386 (1957).
- 6) 未発表。
- 7) 財団法人日本公定書協会：第9改正日本薬局方，（広川書店，東京），p. 5 (1976).
- 8) SKOCHDOPOLE, P. and CHABEREK, S.: *Inorg. Nucl. Chem. Acta*, **11**, 222 (1959).
- 9) MELLOR, D. P. and MALEY, L. E.: *Nature*, **159**, 370 (1947).
- 10) MELLOR, D. P. and MALEY, L. E.: *Nature*, **161**, 436 (1948).
- 11) 山本勇麗：金属キレート 2巻，坂口武一・上野景平編（南江堂，東京），p. 228 (1969).
- 12) 元田節士：日食工誌，**29**，25 (1982).
- 13) 未発表（財団法人食品薬品安全センター泰野研究所にて実施）。
- 14) 谷村顕雄：化学と薬学の教室，**1980**，7.
- 15) OHSHIMA, M., ISHIZAKI, N., HANDA, A. and TONOOKA, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **61**, 31 (1983).

（昭和57年10月29日受理）