

数種かつお節カビ付け菌で発酵したかつお節における抗酸化物質の産生(2)

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産大学校 公開日: 2024-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 上西, 由翁, 伊藤, 算洋, 国本, 正彦 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2011733

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



数種かつお節カビ付け菌で発酵したかつお節における 抗酸化物質の産生 - II

上西由翁^{*1}・伊藤算洋^{*2}・國本正彦^{*1}

Antioxidant Substances on “*Katsuobushi*” Medium Fermented with Several Xerophilous Fungi- II

Yoshio Kaminishi^{*1}, Kazuhiro Ito^{*2}, and Masahiko Kunimoto^{*1}

Antioxidant production was investigated on *katsuobushi* medium and an agar plate, which were cultured with five strains used in *katsuobushi* molding. Five fungus strains had the ability to produce the antioxidant in the *katsuobushi* medium. In the agar plate including different concentrations of glucose, the antioxidative fractions produced different results related to the extract weight, autooxidation test and thin layer chromatogram pattern. From these results, the effects of the *katsuobushi* constituents such as lipid content on the production of the antioxidant substances were discussed. A further discussion was made on the relationship between the antioxidant production and the *katsuobushi* quality.

1 緒言

かつお節はわが国特有の伝統的な水産食品であり、長期貯蔵が可能な食品として知られている。かつお節の製造は大別すると煮熟、焙乾、カビ付けの工程により行われ、その保存性は主に、焙乾による水分活性の低下によって付与される。焙乾では水分量が20~22%まで乾燥されるが、この状態では内部からの腐敗と表面でのネトの発生のため長期貯蔵はできない。さらに乾燥を促進するために耐乾性のカビを用いて発酵が行われるが、4番カビ付けの終了したかつお節では水分量が14~15%まで低下し、長期貯蔵が可能となる。カビ付け菌による発酵過程では乾燥の促進の他に風味も向上し、カビ付け菌が種々の代謝産物を産生していることが報告^{1,2)}されている。一方、良質のかつお節を生産するためには、原料魚のカツオ筋肉に1~3%程度の脂質を含むものが好ましいとされ、脂質含量の低い原料では出来上がりの製品に風味が欠けることが経験から知られ

ている。

カツオ節には高度不飽和脂肪酸が多く含まれ、特にDH A (C_{22:6n-3})では全脂質含量に対して25%以上含まれており^{3,4)}、かつお節の貯蔵時に脂質酸化の促進が予想されるが、カビ付け後のかつお節では長期間貯蔵してもその品質は保持される。鈴木と本杉は、焙乾工程で荒節の表面に付着する燻煙成分のフェノール化合物⁵⁾と焙乾中に生成するエキス成分⁶⁾が、脂質酸化を抑制すると報告している。しかし、焙乾工程後の荒節は、次のカビ付け工程を行う前にその表面が削り落とされるため、再び酸化されやすい状態に変わると思われるが、カビ付け後のかつお節の脂質酸化についてみるとその過酸化物質価(POV)は低い値に保たれている^{3,4,7)}。加藤らは、合成培地あるいは発酵したミール麴を用いて酸化を抑制する微生物をスクリーニングした結果、カビ9株、酵母17株が抗酸化物質を産生したと報告している^{8,9)}。また、古田¹⁰⁾やHossainら¹¹⁾においても、*Aspergillus oryzae*あるいはいくつかのカビの培養物に

2001年6月27日受付。Received Jun. 27, 2001.

*1 水産大学校 食品化学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University).

*2 ㈱マルハ (Maruha Co. Ltd.).

抗酸化活性があるとし、Kawaiらは、食品にみられるカビ45株の中で *Aspergillus niger* にもっとも抗酸化活性が高かったことを報告している¹⁰⁾。したがって、カビの種は異なるが、かつお節の発酵過程においてもカビ付け菌が抗酸化物質を産生していることが予測される。

先にかつお節のカビ付け菌である麹カビを20%のグルコースを含む合成培地で培養すると、培地抽出物に複数の抗酸化物質が認められ、カビ付け菌が抗酸化物質の産生能力を有していることを報告した¹⁰⁾。しかし、かつお節において麹カビが抗酸化物質を産生するかについては、不明のままである。そこで本研究では、実際に麹カビがかつお節においても抗酸化物質を産生しているか、培地に削り節を用いて検討した。さらに、異なる糖質濃度の寒天培地をモデルとして、かつお節カビ付け菌の抗酸化物質の産生に及ぼす培地成分の影響についてもあわせて検討した。

2 試料および実験方法

2.1 供試菌および培地

供試菌として *Aspergillus (A.) repens* (IFO 8914), *A. ruber* (IFO 7712) と株式会社 にんべん (東京) より分与いただいた *Eurotium herbariorum* NE-1, NU-1 および NU-2 株の5菌株を用いた。

天然培地としてのかつお節培地には、市販の削り節をフードプロセッサーで細切し、これに蒸留水を1/2容加えた後、それぞれ25gをフラスコに分取し、オートクレーブで滅菌したものを用いた。

モデル実験に用いた培地には、グルコースを含む寒天培地に次のろ過滅菌溶液を混合することによって調製した。すなわち、終濃度で0.3%の麦芽エキス、0.3%の酵母エキス、0.5%のペプトンおよび10%のグリシンを含む溶液を0.45 μ mのフィルターでろ過滅菌して加えた。グルコースの終濃度は1%もしくは5%になるように調製した。

かつお節培地においては25°Cで14日間、寒天培地においては25°Cで50日間、培養を行った。

2.2 抗酸化物質の抽出方法

寒天培地からの抗酸化物質の抽出は、先の報告¹⁰⁾にしたがい、メタノール、クロロホルム、酢酸エチルを用いて行った。抽出物はエバポレーターで溶媒を除去した後、さらに真空デシケーター中で乾燥し、重量を測定した。かつ

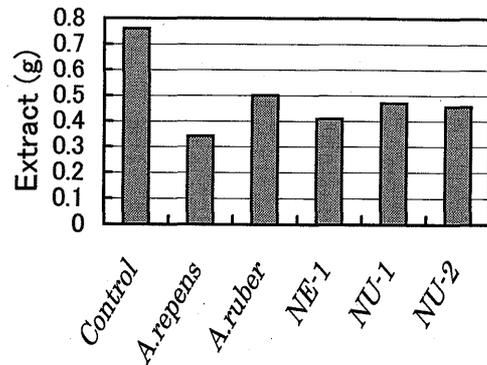


Fig. 1. The weight of extracts from *katsuobushi* media cultured with several fungi.

The *katsuobushi* medium was cultured for 14 days, and the extraction was performed using organic solvents in order of methanol, chloroform and ethyl acetate.

お節培地においても上記方法で抗酸化物質の抽出を行ったが、多量の夾雑物が混在していたため、さらにケイ酸カラムにより抗酸化物質画分の分離を試みた。すなわち、全抽出物の50倍量のケイ酸カラム (Mallinckrodt製, 100 mesh) を用いて、カラム容量の2倍量のクロロホルムで抽出された画分I, 同溶媒の0.5倍量で溶出される画分II, 2倍量のメタノールで溶出される画分IIIに分離した。

2.3 自動酸化の測定

自動酸化の測定は0.28%のリノール酸を含む50mMリン酸緩衝液-40%メタノール (pH 7.0) に終濃度で0.01%の抽出物もしくは α -トコフェロールを加えた反応液を用い¹⁰⁾、0.05%の2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)の添加により反応を開始した。反応液を37°Cでインキュベートした後、自動酸化の指標として経時的にOsawaら¹⁰⁾のログン鉄法によるPOVとチオバルビツール酸 (TBA) との反応によって得られるTBA値を求めた。POVは α -トコフェロールの最大値を100としたときの相対値で、TBA値はマロンアルデヒドの相当量として表示した。

3 結果

3.1 かつお節培地における抗酸化物質の産生

カビ付け5菌株をそれぞれのかつお節培地に接種し、14日間培養したときの抽出物量の変化を調べた。カビ付けしていない培地 (対照区) においては、メタノール、クロロ

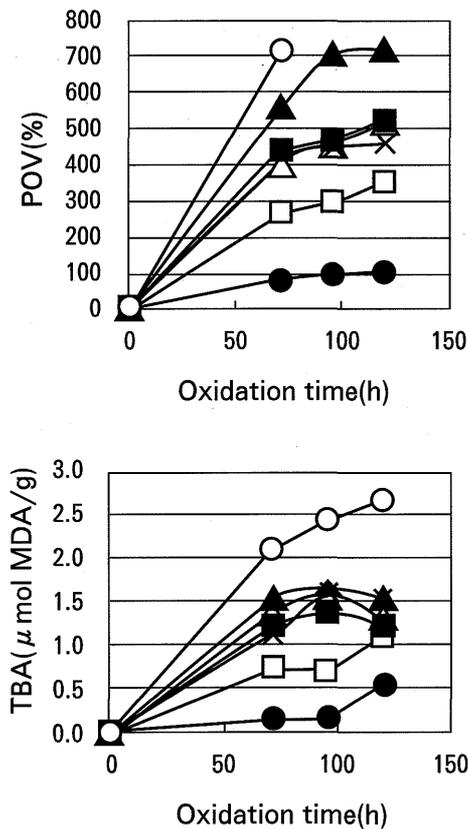


Fig. 2. Antioxidant activity of fraction III partially purified by silicic acid column chromatography. The fraction III was eluted with 2 column volumes of methanol after the removal of the substances with 2.5 column volumes of chloroform. The extracts and α -tocopherol were added at the concentration of 0.01% to the reaction mixture.
Symbols : ○, control; ●, α -tocopherol; △, *A. repens*; ▲, *A. ruber*; ×, NE-1; □, NU-1; ■, NU-2.

ホルムで抽出した時の抽出物量がかつお節培地の初期湿重量25gに対して0.996gであり、これは加水前の削り節に換算すると5.9%、生肉での水分量を70%とすると、およそ2%の有機溶媒抽出成分が含まれていたことになる。さらに、この抽出物を酢酸エチルで再溶解した時の重量はFig.1に示すように、対照区において0.76g/25g培地であり、これに対してカビ付けしたかつお節での抽出物重量は0.3~0.5gであった。

各カビ付け後の培地から抽出された成分をクロロホルム：メタノール (88 : 12, v/v) の展開溶液を用いて薄層クロマトグラフィー (TLC, Kiesel Gel 60G, Merck) を行い、紫外線照射により検出したところ、展開溶媒先端のバンドと展開点付近に多量のスポットが認められた。そこで、これら抽出物をケイ酸カラムにより、カラムの2倍容

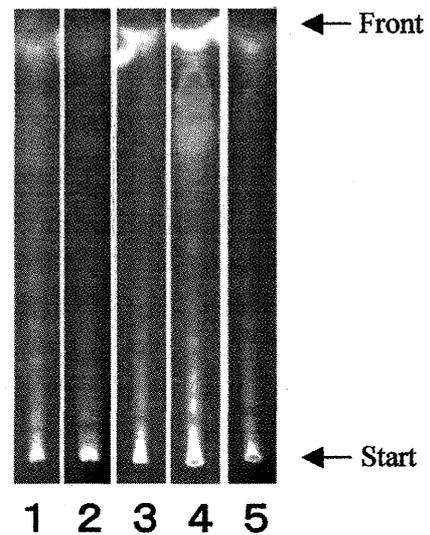
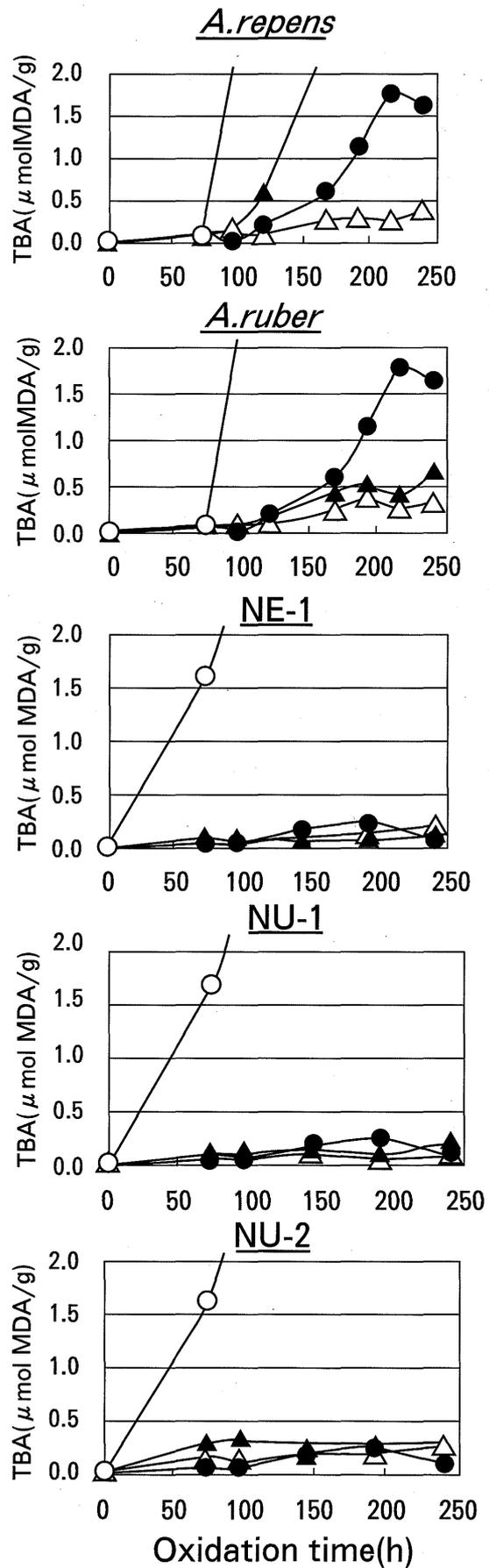
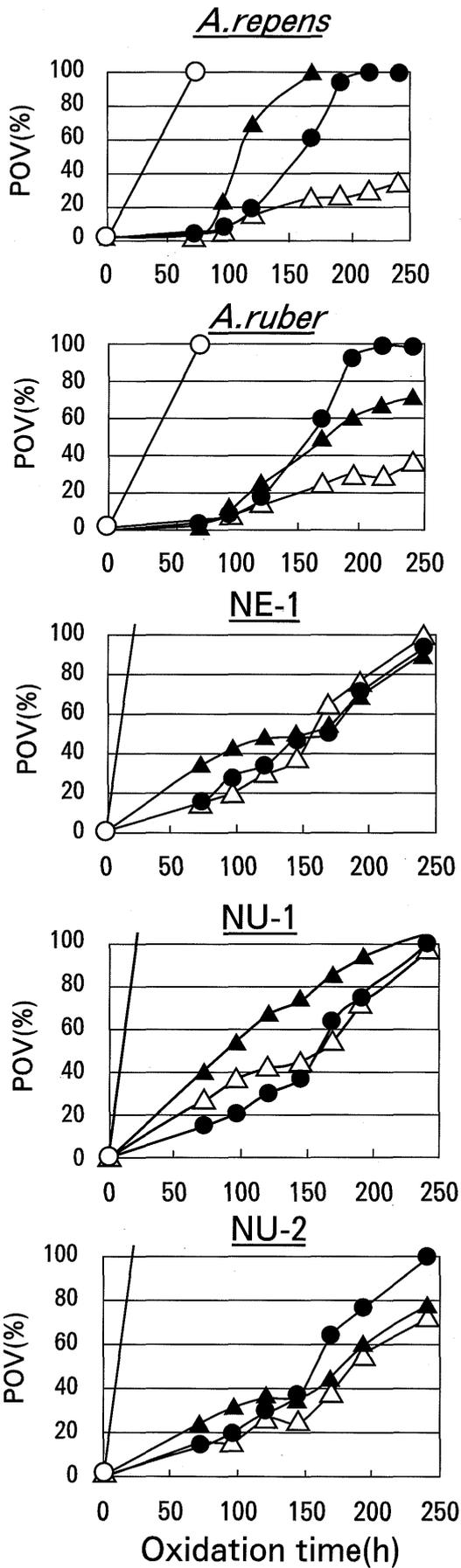


Fig. 3. Thin layer chromatogram of the fraction III from *katsuobushi* media. Lane: 1, *A. repens*; 2, *A. ruber*; 3, NE-1; 4, NU-1; 5, NU-2. TLC was developed using silicic acid (Kiesel Gel 60G, Merck) with chloroform-methanol (88 : 12, v/v), and was detected under ultra-violet light.

量のクロロホルムで抽出される画分I、さらに同溶媒の0.5倍容量で抽出される画分II、カラムの2倍容量のメタノールで抽出される画分IIIに分画した。その結果、展開点付近のスポットは画分Iに溶出され、分離することができた。通常、ケイ酸カラムを用いてクロロホルムで溶出すると中性脂質が得られ、TLCでは展開溶媒の先端部分に現れる。しかし、このスポットについても画分Iに溶出したことからケイ酸非吸着成分と思われるが、不明である。予備試験において、画分I~IIIに対して自動酸化の測定を行ったところ、カビ付けしていない培地からの抽出物には抗酸化活性は認められず、カビ付けしたかつお節培地から抽出した画分IIと画分IIIの両者に抗酸化活性が認められた。両者の比較では、画分IIIでより強い抗酸化活性がみられたので、画分IIIについてリノール酸の自動酸化抑制力を経時的に調べた。その結果、Fig.2に示すように、各カビ付け抽出物に抗酸化活性は認められているものの、 α -トコフェロールと比べて活性は低かった。抽出画分IIではTLCの展開溶媒の先端付近 (図示していない) にのみ蛍光物質が認められたが、抽出画分IIIでは先に報告¹³⁾ したような複数のバンドが検出できた (Fig. 3)。しかし、メタノール画分においても夾雑物が混入していたためか、分離は全体的に不明瞭な状態であった。



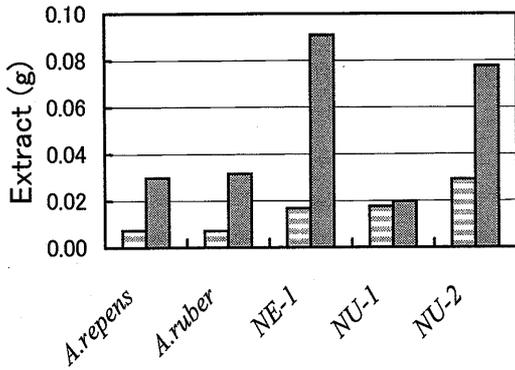


Fig. 4. The weight of extract from semi-defined plates which was cultured with 5 xerophilous fungi.
 The media (20g) included 0.3% malt and 0.3% yeast extract, 0.5% peptone, 10% glycine and 1% or 5% glucose.
 The left and right bars indicated the extracts weight from the media in the presence of 1% and 5% glucose were added, respectively.

3.2 糖濃度の異なる培地における抗酸化物質の産生

かつお節の製造においては、適当な脂質含量を含む原料を用いた場合に良質の製品ができるといわれているため、当初、0.3%の麦芽エキス、0.3%の酵母エキス、0.5%のペプトン、10%のグリシンおよび1~5%のリノール酸を含む液体培地を用いて脂質含量と抗酸化物質の産生との関連性について検討したところ、供試5菌株のいずれにおいても振とう培養条件下では良好な発育が認められなかった。そこで、液体培地の代わりに異なるグルコース濃度を含む

寒天培地を用い、各菌株からの代謝産物の産生量と単位重量あたりの抗酸化活性を調べた。

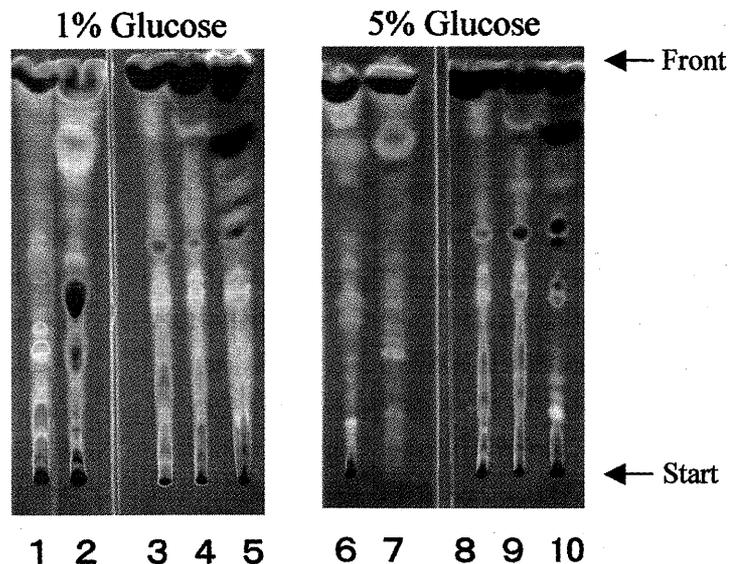
グルコースを1%もしくは5%含む寒天培地で50日間カビを培養し、それぞれの培地から3種類の溶媒を用いて得られた抽出物の重量をFig.4に示した。各抽出物の重量は、寒天培地の20mLに各菌株を接種・培養し、2枚のシャーレより各種有機溶媒で抽出した結果を表示してある。その結果、いずれの菌株においても糖濃度が増加すると菌体の発育はよく、抽出物量も増加した。一方、各抽出物を0.01%になるようにリノール酸溶液に加えた時の抗酸化活性は、NE-1、NU-1およびNU-2において糖濃度の如何に関わらず活性は変わらないが、*A. repens*と*A. ruber*では糖濃度の増加とともに単位重量あたりの抗酸化活性は高くなった (Fig.5)。これら抽出物成分をTLCで調べたところ、Fig.6のように、NE-1、NU-1およびNU-2では糖濃度が異なってもTLCの分離パターンにほとんど差異は認められなかったが、*A. repens*と*A. ruber*ではそのバンドパターンに違いがみられ、糖濃度の増加とともに抗酸化活性の高い代謝産物を産生することが示唆された。

4 考察

かつお節のカビ付けは通常、4番カビ付けまで行われ、およそ3ヶ月の月日を費やす。そのために、多くはカビ付けをせずに削り節として出荷されているが、今日でも全生産量の13%がカビ付けされたかつお節として販売されている¹⁵⁾。かつお節のカビ付けの意義としては、風味の向上(フェノール化合物のメチル化によるまろやかさの付与¹⁵⁾)、

←Fig. 5. Antioxidant activity of extracts from media that were cultured with fungi in the presence of 1% or 5% glucose.
 Symbols : ○, control; ●, α -tocopherol; ▲, 1% glucose addition; △, 5% glucose addition.

Fig. 6. Thin layer chromatogram of the extracts from media that were cultured with fungi in the presence of 1% or 5% glucose.
 Lane: 1, 6, *A. repens*; 2, 7, *A. ruber*; 3, 8, NE-1; 4, 9, NU-1; 5, 10, NU-2.
 TLC was developed and detected as shown in Fig. 3.



乾燥の促進、だし汁の清澄化などの効果があるといわれている¹⁾。

長期間かつお節を貯蔵する際、かつお節に含まれる脂質成分の変敗が危惧される。脂質成分の変化に及ぼすカビ付け工程の意義として、國本らは次のように報告している¹⁶⁾。すなわち、カビ付け菌が菌体外リパーゼを産生し、菌糸の発育とともに遊離した脂肪酸を資化する。それにともない脂質含量は減少し、だし汁が清澄化するのではないかとしている。全体量としての脂質含量の減少は、長期貯蔵にともなう変敗を軽減するのに重要な役割を果たす。本実験においても、カビ付けされたかつお節培地からの有機溶媒抽出量は対照区と比較して低い値を示し、供試菌が脂質成分を資化していることが認められた(Fig.1)。

一方、かつお節カビ付け菌の産生するリパーゼは、トリアシルグリセロール中の不飽和脂肪酸のエステル結合を加水分解しやすい性質を有しており¹⁷⁾、実際にカビ付け後のかつお節表面でもDHA (C_{22:6n-3})の組成比が増加すると報告されている^{3,4)}。これら不飽和脂肪酸は貯蔵中に酸化することが考えられるが、須山、和田らあるいは本杉らが報告しているように、カビ付け後のPOVの上昇は抑制されている^{3,4,7)}。本実験においてもカビ付けされたかつお節培地には、有機溶媒で抽出される成分に酸化活性が認められたことから、これらがPOVを低い水準に保った一因であると考えられた。さらに、一部の脂質成分は菌体の発育に利用され、代謝産物としての抗酸化物質を産生しながらかつお節中の脂質含量を減少させたことが考えられた。

脂質濃度が抗酸化物質の産生に及ぼす影響を調べる目的で、1%リノール酸を含む液体培地を用いて当初麴カビを振とう培養したが、いずれにおいてもほとんど発育が認められなかった。麴カビの一つである*Aspergillus oryzae*においては、液体培養と固体培養とでは遺伝子発現機構が異なり、一般に固体培養において有用な酵素が大量生産され、発育も良好であるという報告¹⁸⁾があり、本供試菌においても液体培養では良好な発育ができなかったと考えた。

そこで、寒天培地を用いて炭素源としての異なる濃度の糖質が代謝産物に及ぼす影響を5菌株に対して調べた。その結果、いずれの菌株においてもグルコース濃度の増加により抗酸化物質の産生量は増加した。*A. repens*と*A. ruber*においては、グルコース濃度が減少すると酸化活性の低下やTLCからみた代謝産物に差異が認められた。一方、NE-1、NU-1およびNU-2株においては糖濃度の如何に関わらず、酸化活性やTLCの分離パターンは同様の結果を示した。本実験に用いたNE-1、NU-1およびNU-2

株は環境温度に対して発育速度は異なるものの、発育良好な選抜菌株として産業レベルで広く利用されている。このように広く利用されている理由については、グルコース濃度の低い培地でも資化・代謝能力に優れていたことから推測すると、脂質より遊離した脂肪酸を炭素源として資化・代謝する能力に優れ、良好な発育を保持していることが一因として考えられた。さらに、脂質含量の高い原料から作られたしらす節が正常なかつお節よりPOVをより低い水準に維持したという竹永ら¹⁹⁾の報告ともあわせて考察すると、原料中の脂質濃度は代謝産物としての抗酸化物質の産生量と、*A. repens*と*A. ruber*においては酸化活性に影響を及ぼすものと考えられる。

かつお節の製造に用いられるカビ付け菌は、かつお節上で濃緑色の孢子を形成するものが最上のものとして取り引きされる。今回用いた5菌株の培養体においてそれぞれの孢子の色調は異なっていたが、有機溶媒ならびに水溶性溶媒でも色素成分は抽出されず、孢子の色調と酸化活性との関連性は確認できなかった。かつお節から有機溶媒で抽出された画分ⅢのTLCの展開物は無色であり、紫外線の照射によって様々な蛍光色を発する。先に20%グルコースを含む寒天培地を用いて本供試菌5株を培養し、これら培地の抽出物からTLC上で蛍光を発した複数のバンドに α -トコフェロールと同等の酸化活性が認められた¹⁹⁾。Yagiら²⁰⁾も、20%グルコースを含む寒天培地を用いて*A. repens*を培養した後、培養産物の中からひとつの酸化化合物Neochinin Aを分離し、この化合物が α -トコフェロール以上の酸化活性を有していることを報告している。今回のかつお節培地においても、TLC上で蛍光を発した複数のバンドに有効な酸化成分が含まれていると推察され、これらがかつお節表面の酸化を抑制しているのではないかと考えられた。

以上を要約すると、かつお節のカビ付け工程では、①カビからのリパーゼの産生、②遊離脂肪酸の資化、③菌体の成長・孢子の形成にともなう脂質含量の減少、④代謝産物としての抗酸化物質の産生が起こることで、脂質酸化が抑制されていると思われる。従来、良質のかつお節製造にはある程度の脂質を含む原料が要求されるが、この理由については脂質が炭素源として利用されることで菌体の発育を促進し、発育したカビ付け菌が風味を改善するとともに、脂質酸化の抑制で風味を保持していることが、主な理由ではないかと考えている。

文 献

- 1) 大田静行 : *New Food Industry*, 25(5), 35-41 (1983).
- 2) 大田静行 : *New Food Industry*, 25(6), 18-23 (1983).
- 3) 本杉正義・土肥慎吾・鈴木敏博・石川正人 : 静岡県工業試験場報告, 25, 117-122 (1981).
- 4) L. Dimici and S. Wada : *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 43, 470-478 (1994).
- 5) 鈴木敏博・本杉正義 : 日食工誌, 43, 29-35 (1996).
- 6) 鈴木敏博・本杉正義 : 日食工誌, 38, 675-680 (1991).
- 7) 須山三千三 : 日水誌, 15, 327-331 (1949).
- 8) 加藤富民雄・中里訓之・白石剛・林浩司・村田晃・米康夫 : 農化誌, 59, 901-907 (1985).
- 9) M. Rashid, F. Kato, and A. Murata : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1058-1061 (1992).
- 10) 古田均 : 基質をオカラとした麴の抗酸化性に関する研究. 北海道大学大学院水産学研究科, 1986, (修士論文).
- 11) M. Hossain, M. Furuichi, and Y. Yone : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1629-1632 (1987).
- 12) Y. Kawai, Y. Oeda, M. Otaka, T. Kasakawa, N. Inoue, and H. Shinano : *Bull. Fac. Fish. Hokkaido. Univ.*, 44, 141-146 (1993).
- 13) Y. Kaminishi, J. Egusa and M. Kunimoto : *J. Nat. Fish. Univ.*, 47, 113-120 (1999).
- 14) 大澤俊彦 : 食品中の生体機能調節物質研究法 (川岸舜朗編著). 生物化学実験法38. 学会出版センター, 1996, pp.13-17.
- 15) 土居幹治 : 化学と生物, 34, 570-571 (1996).
- 16) M. Kunimoto, Y. Kaminishi, K. Minami and M. Hatano : *Fisheries Sci.*, 62, 594-599 (1996).
- 17) Y. Kaminishi, H. Tanie and M. Kunimoto : *Fisheries Sci.*, 35, 274-278 (1999).
- 18) 秦 洋二 : 化学と生物, 39, 113-120 (2001).
- 19) 竹中章生・伊藤真吾・露木英男 : 日食工誌, 38, 280-287 (1991).
- 20) R. Yagi and M. Doi : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 932-933 (1999).