

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700884

研究課題名(和文)発酵食品の熟成期間における物質と微生物に関する生物有機化学的研究

研究課題名(英文)Bioorganic study on compounds in maturing period of the fermented foods

研究代表者

杉山 靖正 (SUGIYAMA, Yasumasa)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号：90347386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：発酵食品の熟成過程における化合物の変化について明らかにすることを目的に研究を行い、豆味噌の発酵・熟成期間中にfrazin誘導体が生産されることを明らかにした。

また、未利用資源の有効活用と発酵食品への利用などの観点から、水産未利用資源としてエビ頭部およびガンガゼを材料に魚醤油を作成した。作成した魚醤油の遊離アミノ酸組成を分析した後、抗酸化活性を測定したところ、エビ頭部から作成した魚醤油は高い抗酸化能を有することがわかり、生物有機化学的手法による解析から含まれる抗酸化物質の構造を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was clarifying the change of compounds in the maturational process of fermented foods. The frazin derivatives were isolated from soybean miso in fermenting and maturing period.

From the viewpoint of effective utilization of unused resources, fish sauces were produced from the cephalothorax of prawn and the reproductive gland of *Diadema setosum* as fisheries unused resources. The free amino acid compositions and antioxidant activities of fish sauces were determined by HPLC and DPPH method, respectively. The fish sauce which made from the cephalothorax of prawn showed high antioxidant activity.

The antioxidants contained in the fish sauce were identified by analyzing NMR spectra of isolated compounds.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食素材 発酵食品 熟成期間 未利用資源 機能性

1. 研究開始当初の背景

微生物の酵素を利用して旨味成分を増加させた発酵食品は、芳醇な風味を獲得するために熟成期間を要する。この熟成過程において、特定の化合物がそれ自体の性質あるいは微生物によって微量な有効成分へと変化する必要がある。熟成過程に関しては、これまで詳細に検討されていないため曖昧な知見が多く、微量成分の精密な構造解析とその生合成過程の詳細な検討が必須である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、発酵食品の中でも長い熟成期間が必要な伝統発酵食品である豆味噌の熟成過程に焦点を当て、生物有機化学的手法を用いて微量成分の構造解析を進め、熟成過程の本質を解明することを目的とした。

(2) 豆味噌と同様の手法により他の発酵食品の熟成過程についての解析を進めることを目的とした。

(3) 平成 24 年度からは、主な研究対象を鰹節および魚醤油などの水産発酵食品とすることとした。

3. 研究の方法

(1) 豆味噌の熟成期間中に増加する化合物を各種クロマトグラフィーで生成することにより単離し、それらの構造を NMR および MS スペクトルなどの機器分析結果から決定する。

(2) 他の発酵食品（鰹節および魚醤油など）について、発酵 - 熟成期間での物質の変化を HPLC 分析結果などから明らかにする。

(3) 新たな発酵食品の可能性について、実験室レベルでの製造を試みる。

4. 研究成果

(1) まず、豆味噌 5kg から得られたメタノール抽出物を溶媒分画することにより、酸性画分と中性画分に分画した。次に、酸性画分を 2 度のシリカゲルカラムクロマトグラフィー、Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC で精製した後、再度 Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィーに供することにより、1 個の化合物を精製した。続いて、得られた化合物の HPLC などを用いた詳細な分析の結果、本化合物はこれまでに豆味噌から得られたものとは異なる化合物であることが推測された。そこで、NMR および MS スペクトル解析することにより、その構造を明らかにすることを試みた。高分解能 FAB-MS スペクトルより分子式が明らかとなり、1H-、13C-および各種 2D-NMR スペクトルを詳細に解析することにより本化合物の構造が明らかになった。その結果から本化合物は frazin に leucine あるいは isoleucine が結合した 2

種の frazin 誘導体の混合物であることが示唆された。frazin は醤油、食酢、日本酒等の発酵食品からも単離されている化合物であるが、抗菌活性や抗 HIV 活性などが報告されている有用化合物である。本研究では frazin 誘導体の高い抗酸化活性を明らかにしており、今後のさらなる生理活性の解明に期待が持たれる。

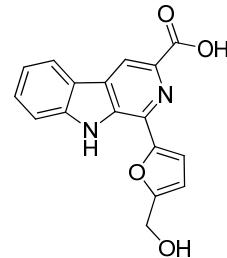


図 1 frazin の構造

(2) 未利用資源の発酵食品原料としての可能性の追求と、そこに含まれる機能性物質に焦点を当て研究を行った。

まず、廃棄処分対象のエビ頭部および駆除対象のガンガゼを材料として選り魚醤油の作成を試みた。エビ頭部は水を加え茹でた後、塩、醤油麹を加えた。ガンガゼは生殖腺のみを取り出し、水、塩、醤油麹を加えた。9 ヶ月間室温で静置後、圧搾、火入れ、ろ過の順で作業を行い 2 種類の魚醤油を作成した。

次に、作成したそれぞれの魚醤油に含まれる遊離アミノ酸分析を行った。(図 2 および図 3) エビ頭部を用いた魚醤油は、アルギニン、スレオニン、セリン含量が極めて低く、100ml あたり 189mg のタウリンを含むことが明らかになった。ガンガゼを用いた魚醤油は、エビ頭部魚醤油と同様に 3 種類のアミノ酸含量が極めて低く、100ml あたりのタウリン含量は 72mg であったが、GABA ( - アミノ酪酸) は 26mg 含まれることが明らかになった。

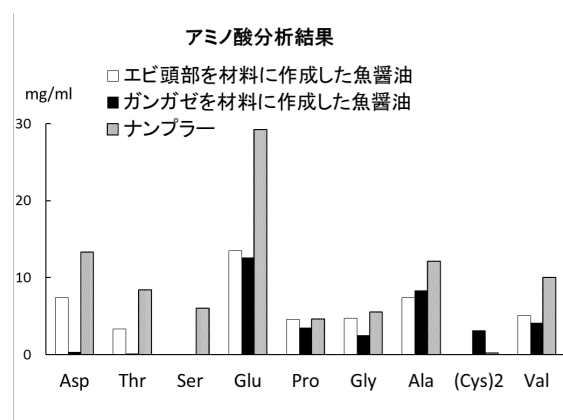


図 2 作成した魚醤油およびナンブラーの遊離アミノ酸分析結果 (1)

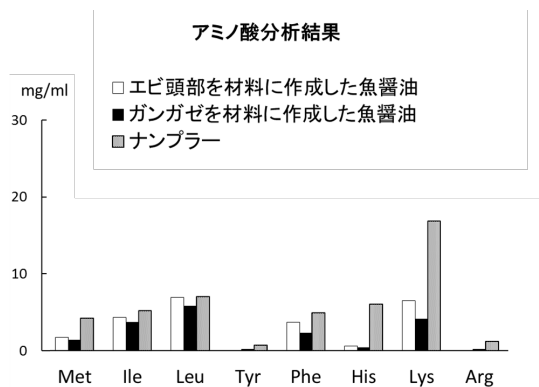


図3 作成した魚醤油およびナンプラーの遊離アミノ酸分析結果(2)

続いて、作成した魚醤油の抗酸化活性を DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 法により測定したところ、市販品であるナンプラーと比較してガンガゼ魚醤油は同程度、エビ頭部魚醤油は非常に高い活性を有することが明らかになった。そこで、エビ頭部魚醤油を溶媒分画し酸性、中性、塩基性画分を得た。さらに DIAION HP-20 を用いて分画し、高極性および低極性画分を得た。得られた全ての画分は非常に高い抗酸化活性を有することが明らかになり、含まれる抗酸化物質の多彩さが推定された。本研究により、未利用資源の食品素材としての利用価値が明らかになるとともに機能性を併せ持つことが示された。また、未利用資源を食品へ利用する可能性を高めたことから、今後の地域産業の発展に貢献できるものと考えられた。

(3) エビ頭部を原料に作成した魚醤油の高い抗酸化活性に寄与する有機化合物の特定を試みた。

まず、エビ頭部魚醤油からの抗酸化物質の探索研究を行った。作成した魚醤油 1L を DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーに供し、脱イオン水で洗浄後、25%メタノール水溶液、50%メタノール水溶液、メタノールで順次溶出した。25%メタノール水溶液および50%メタノール水溶液溶出画分に異なる化合物に由来すると考えられる抗酸化活性が見られた。そこで、これらの画分をそれぞれ溶媒分画後、Sep-Pak C18 カートリッジ、逆相 HPLC を用いて精製した。その結果、DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーの 25%メタノール水溶液および 50%メタノール水溶液溶出画分からそれぞれ 1 個の化合物を抗酸化物質として単離した。

次に、単離した 2 個の化合物を NMR スペクトル等の機器分析を行い、それぞれの化学構造を明らかにした。その結果、エビ頭部を原

料に作成した魚醤油には化合物 A および daidzein が抗酸化活性物質として含まれることが明らかになった。daidzein は、魚醤油の作成において添加した醤油麹から溶出したものであることが考えられた。

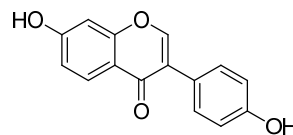


図4 daidzein の構造

化合物 A は既知化合物であったが、発酵食品はもちろん食品中に含まれる報告はなく、これまでに深海由来の放線菌が生産する抗酸化物質として知られているものであった。エビ頭部の抽出物中には化合物 A を検出できなかったこと、構造から化合物 A はアミノ酸が 2 段階と比較的単純な反応を経ることにより生産されるものと予想されたことから、発酵 - 熟成期間において麹あるいは他の微生物により生産される化合物であると推定された。化合物 A の機能性には今後期待が持たれ、生産する微生物を特定することは、発酵食品に関わる微生物についての新たな知見を与えるばかりでなく、発酵技術の発展に貢献できるものと示唆され、本研究はその契機になるものと考えられる。

(4) その他の発酵食品の発酵 - 熟成に関する知見を得ることを目的として、製造工程で微生物を利用する鰹節、すなわち本枯節に含まれる化合物について調べた。本枯節は裸節にカビ付作業を数回行って製造されるものであるため、裸節および本枯節に含まれる成分を比較し、カビの鰹節における成分変化への関与について検討した。まず、裸節および本枯節をそれぞれ粉砕後、メタノールに浸漬した。これをろ過および濃縮して得られたメタノール抽出物を溶媒分画や Sep-Pak C18 カートリッジ処理、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどを用いて精製した。次に、精製した画分を HPLC 分析することで含まれる化合物を調べた。その結果、低極性画分において、裸節にはなく本枯節にのみ含まれる化合物が 8 個以上存在することが明らかになった。すなわち、鰹節製造工程において、カビ付作業以降に数多くの化合物が微生物によって生産されることが示された。鰹節の成分研究では、香気成分以外のこのような知見は少ないため、本研究を継続し、本枯節にのみ含まれる化合物の化学構造および機能性を明らかにする必要があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

杉山 靖正、醗酵食品中の微量成分 豆味噌中の化合物について -、食品と容器、査読無、52 巻、2011、232-237

〔学会発表〕(計 2件)

杉山 靖正、かつお節の健康機能、地域漁業学会 第 55 回大会 シンポジウム 招待講演、鹿児島大学、2013 年 10 月 26 日

太田 洸一郎、桜井 八千代、小松 正治、廣田 陽、杉山 靖正、豆味噌に含まれる微量成分に関する研究、平成 23 年度 日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会、宮崎大学、2011 年 9 月 17 日

〔その他〕

ホームページ等

杉山 靖正、水圏資源からの生理活性物質の探索と水産未利用資源の有効活用、鹿児島大学ラボツアー、2013 年 9 月 13 日、<http://www.kagoshima-u.ac.jp/event/2013/130913labo.jpg>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 靖正 (SUGIYAMA, Yasumasa)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号： 90347386