

学 位 論 文 要 旨

氏 名 太 院 和 也

題 目 耐糖性酵母ジゴサッカロマイシス・ロクシーの抗酸化活性に関する研究
(Antioxidant Activity of Sugar-tolerant Yeast *Zygosaccharomyces rouxii*)

酵母の抗酸化活性を調べるために種々の耐糖性、耐塩性酵母の DPPH 捕捉活性を測定し、スクリーニングした。培養液を酢酸エチルで抽出し、DPPH 活性を測定したところ、*Z.rouxii* (MAFF 23755) が最も活性が高かったのでこの株について詳しく調べた。すなわち、酵母を様々の培養条件下で培養し、そのときの抽出物の抗酸化活性を DPPH 捕捉活性、FRAP (ferric reducing/antioxidant power) 活性、リノール酸酸化防止活性、スーパーオキシド・フリーラジカル捕捉活性、過酸化水素酸化防止活性で測定した。ビタミンCやビタミンEと比較して *Z. rouxii* の粗抽出液の活性はそれほど高くなかったが、幅広い抗酸化性を示すことが判明した。

活性物質を特定するため酵母を大量培養し、培養液を酢酸エチルで抽出した。抽出物を中性画分と酸性画分に別け、中性画分はシリカゲルカラムとセファデクス LH-20 カラムにより精製した。活性の高いフラクションを集め、メタノールで結晶させてその結晶を GC-MS や NMR で構造分析した結果、チロゾール (para-hydroxy phenyl ethanol) と同定された。酸性画分はアセトンで結晶させ、同溶媒で再結晶させた。その結晶はコハク酸と同定された。残りの母液はさらにシリカゲルカラムと HPLC を用いて精製し、二つの化合物を分離した。それらはバニリン酸とパラヒドロキシ安息香酸と同定された。

次に市販の標準物を用いて、これら化合物の抗酸化活性を種々の方法で測定した。単離した化合物はそれぞれの方法により相対的な抗酸化活性が異なり、すべての測定法で強い抗酸化活性を示す物質はなかった。すなわち、*Z. rouxii* の粗抽出液の幅広い抗酸化性は、複数の抗酸化物質が含まれることで説明できる。

DPPH 捕捉活性及び、FRAP 活性を測定し、チロゾールの抗酸化活性に対するコハク酸、バニリン酸、パラヒドロキシ安息香酸の添加影響を調べた。互いに低濃度では相乗的に効果が増加した。

Z. rouxii によるチロゾールの生産性について調べた。グルコース濃度に大きく依存することが分かった。グルコース濃度を倍にするとチロゾール生成量は倍以上に増加した。グルコース濃度 20% ではチロゾール生産は 7.07 g/L まで達した。

以上、*Z. rouxii* は天然の抗酸化物質の資源として利用できる可能性がある。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 TAIN KAZUYA

題 目 Antioxidant Activity of Sugar-tolerant Yeast *Zygosaccharomyces rouxii*
(耐糖性酵母ジゴサッカロマイシス・ロクシーの抗酸化活性に関する研究)

To investigate the antioxidant activity of yeasts, various species of sugar-tolerant and salt-tolerant yeasts were screened based on their DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)-scavenging activity. The ethylacetate extracts of cultural broths were assayed for DPPH activity. *Z. rouxii* (MAFF 237555) with the highest activity was selected for further study. Next, it was cultured under various conditions and the antioxidant activities of the extracts were assayed by DPPH-scavenging activity, FRAP (ferric reducing/antioxidant power), inhibiting of linoleic acid oxidation, superoxide free radical scavenging activity and inhibiting of hydrogen peroxide oxidation. It was demonstrated that the activity of *Z. rouxii* extract was moderate, compared to vitamin C or vitamin E, but the extract showed the wide-spectrum of antioxidant activity.

To isolate the active substances, the yeast was cultured in large amount and the broth was extracted with ethyl acetate. The extract was separated into neutral and acidic portions. The neutral portion was fractionated on a silica gel column and purified on a Sephadex LH-20 column. The active fractions were combined and crystallized in methanol. The crystals were identified by GC-MS and NMR as tyrosol (para-hydroxy phenyl ethanol). The acidic portion was crystallized in acetone. The crystals purified by recrystallization was identified as succinic acid. The mother liquor was further purified on silica gel columns, and HPLC to obtain vanillic acid and *p*-hydroxy benzoic acid.

Using commercially available compounds, various antioxidant activities of the isolated substances were determined. The activities of isolated substances were diverse and had different values with different assay methods. No single substance could be pointed out as the all-round antioxidant compound. Therefore, the wide-spectrum of antioxidant activity of *Z. rouxii* extract could be explained by the mixture of the antioxidant substances.

The effects on the antioxidant activity of tyrosol by addition of succinic acid, vanillic acid and *p*-hydroxy benzoic acid were also studied with DPPH and FRAP assays. In both assays, the synergetic effect was clearly observed at their low concentrations.

Tyrosol production from *Z. rouxii* under various cultural conditions was investigated. It was clear that glucose concentration in the medium affected a profound influence. Tyrosol production was more than doubled when the glucose concentration was doubled. It reached maximum of 7.07 g / L at glucose concentration of 20%.

It was concluded that *Z. rouxii* was a potent source of natural antioxidant.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	太 院 和 也
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 鹿児島大学 教授 田寺 謙次郎
	副査 宮崎大学 教授 辰巳 保夫
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
	副査 琉球大学 教授 多和田 真吉
審査協力者	鹿児島女子短期大学教授 (鹿児島大学名誉教授) 橋永 文男
題 目	Antioxidant Activity of Sugar-tolerant Yeast <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (耐糖性酵母ジゴサッカロマイシス・ロクシーの抗酸化活性に関する研究)

近年、食品中に含まれる天然の抗酸化成分が注目されている。東南アジアには数多くの伝統的な発酵食品がある。酵母の抗酸化活性を調べるために、発酵食品などから分離した種々の耐糖性、耐塩性酵母の DPPH 捕捉活性を測定し、スクリーニングした。培養液を酢酸エチルで抽出し、DPPH 捕捉活性を測定したところ、*Z.rouxii* (MAFF 23755) が最も活性が高かったのでこの株について詳しく調べた。すなわち、酵母を様々の培養条件下で培養し、そのときの抽出物の抗酸化活性を DPPH 捕捉活性、FRAP (ferric reducing/antioxidant power) 活性、リノール酸酸化防止活性、スーパーオキシド・フリーラジカル捕捉活性、過酸化水素酸化防止活性で測定した。ビタミンCやビタミンEと比較して *Z. rouxii* の粗抽出液の活性はそれほど高くなかったが、幅広い抗酸化性を示すことが判明した。

活性物質を特定するため酵母を大量培養し、培養液を酢酸エチルで抽出した。抽出物を中性画分と酸性画分に分けて、中性画分はシリカゲルカラムとセファデックスLH-20カラムにより精製した。活性の高いフラクションを集め、メタノールで結晶させてその結晶を GC-MSやNMR で構造解析した結果、チロゾール と同定

された。酸性画分はアセトンで結晶させ、同溶媒で再結晶させた。その結晶はコハク酸と同定された。残りの母液はさらにシリカゲルカラムと HPLC を用いて精製し、二つの化合物を分離した。それらはバニリン酸とパラヒドロキシ安息香酸と同定された。

次に市販品を用いて、これら化合物の抗酸化活性を種々の方法で測定した。単離した化合物はそれぞれの方法により相対的な抗酸化活性が異なり、すべての測定法で強い抗酸化活性を示す物質はなかった。すなわち、*Z. rouxii* の粗抽出液の幅広い抗酸化性は、複数の抗酸化物質が含まれることで説明できる。

DPPH 捕捉活性及び、FRAP 活性を測定し、チロゾールの抗酸化活性に対するコハク酸、バニリン酸、パラヒドロキシ安息香酸の添加効果を調べた。互いに低濃度では相乗的に効果が増大した。

Z. rouxii によるチロゾールの生産性について調べた。グルコース濃度に大きく依存することが分かった。グルコース濃度を倍にするとチロゾール生成量は倍以上に増加した。グルコース濃度 20% ではチロゾール生産は 7.07 g/L まで達した。

以上、食品中に含まれる天然の抗酸化成分の研究としては、従来は植物中の抗酸化成分を研究対象とする場合が多いが、本研究では、東南アジアの伝統的発酵食品に関連のある耐糖性酵母 *Z. rouxii* は抗酸化活性を示し、その培養液は天然の抗酸化物質の資源として利用できる可能性があることを示した。酵母の抗酸化物質の生産と機能に関し、基礎と応用の両面で新たな知見を得ており、大いに評価できる。博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	太 院 和 也
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 鹿児島大学 教授 田寺 謙次郎
	副査 宮崎大学 教授 辰巳 保夫
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
	副査 琉球大学 教授 多和田 真吉
審査協力者	鹿児島女子短期大学教授 (鹿児島大学名誉教授) 橋永 文男
実施年月日	平成 18 年 1 月 12 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 答・筆答	
<p>主査及び副査の5名は、前指導教員である審査協力者1名を加えて、平成18年1月12日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力並びに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

太 院 和 也

〔質問1〕本研究では、耐糖性酵母の抗酸化活性のみを調べているが、近年抗酸化活性と抗ガン活性との相関などの研究がある。他の生理活性を測定したことがあるか。

〔回答1〕今回は、多くの耐糖性酵母の分離株の中から、抗酸化活性の強い株を検索し*Z.rouxii* (MAFF 23755)を見出した。先ず抗酸化活性に焦点を当てて、研究を推進したので、抗酸化活性の測定法としてはDPPH捕捉活性、FRAP (ferric reducing /antioxidant power) 活性、リノール酸酸化防止活性、スーパーオキシド・フリーラジカル捕捉活性、過酸化水素酸化防止活性など種々の方法で行った。他の生理活性との相関までは時間の関係で調べられなかった。

〔質問2〕バニリン酸とパラヒドロキシ安息香酸は非常に近い構造をしているので、液体クロマトであっても非常に分離が困難だったのではないか。

〔回答2〕酸性画分をシリカゲルカラム、ゲルろ過カラム、逆相カラムを順次使用し、最後はフェニル基の付いたカラムにより分離することができた。

〔質問3〕耐糖性酵母の抗酸化性ということだが、菌体自体も抗酸化性を持っているのか。

〔回答3〕酵母菌体自体を粉砕して、その抽出物の抗酸化活性を測定したことではない。今回は、酵母を培養した培養液を酢酸エチル抽出して、それに含まれる抗酸化物質を単離・同定した。したがって、チロゾールのような抗酸化物質を本菌は生産し、その生産条件を調べた。

〔質問4〕チロゾールはそれほど広く知られた物質ではないと思うが、酵母以外ではどういったところで天然に存在するのか。

〔回答4〕オリーブ油とかある種のハーブであるとか植物界で見出されている。