

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：32618

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00816

研究課題名(和文) 未利用水産資源を機能性発酵食品へと活用するための生物有機化学的研究

研究課題名(英文) Bioorganic study to utilize unused marine resources to functional fermented food

研究代表者

杉山 靖正 (SUGIYAMA, Yasumasa)

実践女子大学・生活科学部・教授

研究者番号：90347386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、未利用水産資源を有効活用するための発酵食品の開発を行った。未利用資源のタカエビの頭部や小型のヒメアマエビを材料に作製した醤油は、大豆醤油よりも高い抗酸化活性を示した。そこで、作製したタカエビ醤油とヒメアマエビ醤油から抗酸化物質を単離し、得られた抗酸化物質の化学構造を機器分析することで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品廃棄量が世界でもトップクラスの日本において、食品ロスへの対策の一環として、未利用および低利用資源の有効活用に関する研究に取り組んだ。本研究では、未利用および低利用水産資源を発酵食品として有効活用する方法を確立するとともに、独自の製法により作製した発酵食品に含まれる機能性物質を明らかにした。確立した発酵方法は、水産資源に限らず、広く未利用・低利用資源の有効活用へと適用できるものであるため、水産資源以外の低利用資源に加え、現在加工残渣として廃棄されている食品の有効利用の一つとなるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, the development of the fermented food to effectively utilize unused marine resources was carried out. The fish sauces which made from the cephalothorax of prawns (*Haliporoides siboga*; Takaebi) and the small shrimps (*Plesionika semilaevis*; Himeamaebi) showed higher antioxidant activities than that of soybean sauce. The antioxidants were isolated from Takaebi sauce and Himeamaebi sauce. Then, the chemical structures of obtained antioxidative compounds were determined by analyzing NMR spectra.

研究分野：生物有機化学

キーワード：未利用・低利用資源 発酵 生理活性 抗酸化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本の食品廃棄量は世界でもトップクラスであり社会問題の一つである。食品リサイクル法が施行され、製造・流通・販売における食品廃棄量の発生を抑える取組みがなされているものの、未だ十分な対応とは言えない。このことは、水産業界も例外ではなく、価値ある食品素材を多量に廃棄しているのが現状である。水産廃棄物中にはタンパク質が豊富に含まれるため、発酵によりタンパク質をアミノ酸まで分解して製造される魚醤油の材料として利用できる可能性を秘めている。近年では、様々な魚介類を材料に魚醤油が作られるようになり、地域の特産品として販売されるケースも見られるようになったが、販売規模の拡大には至っていない。その一つの理由として、製造された魚醤油の機能性が明らかにされていない点が挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、次に挙げる4点を目的に研究を進めた。

(1) 未利用資源であるタカエビ(ヒゲナガエビ)の頭部を材料とする醤油の作製規模を拡大するとともに、作製した醤油(タカエビ醤油)の機能性を明らかにする。

(2) 作製したタカエビ醤油に含まれる機能性物質を単離し、機器分析を行うことで化学構造を決定する。

(3) 新たな醤油の材料候補として、未利用・低利用資源を検討し、製造工程と機能性に関する知見を得る。

(4) 独自に作製した新規で高機能な醤油に含まれる機能性物質を特定する。

### 3. 研究の方法

(1) 本項目は継続研究であり、これまでの研究からタカエビ頭部と醤油用麹を用いることで醤油(タカエビ醤油)を作製できることが分かっている。そこで、機能性物質を特定できるように作製規模を拡大し20リットル以上のタカエビ醤油の作製を試みた。続いて、作製したタカエビ醤油の抗酸化能を検討するため、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylの退色反応を利用したDPPHラジカル捕捉率、さらに活性酸素により破壊される蛍光物質の量を測定することにより、試料の活性酸素に対する効果を評価するORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity)法を用いた。

(2) 作製したタカエビ醤油を様々なクロマトグラフィーで精製し、抗酸化物質を単離後、各種NMRスペクトルを測定することで化学構造を明らかにした。また、単離した抗酸化物質のタカエビ醤油に含まれる量を高速液体クロマトグラフを用いて定量した。

(3) 未利用・低利用資源で発酵食品の新たな材料として、鹿児島湾内でナミクダヒゲエビ等の比較的大型のエビを漁獲する際に網内に混入するヒメアマエビを検討した。ヒメアマエビは、少しずつ利用されつつあるものの、小型で市場価値が低く、その多くが船上で破棄される低利用資源の一つである。そこで、ヒメアマエビをこれまでと同じように醤油用麹を用いて発酵することでヒメアマエビ醤油の作製を試みた。作製にあたり、ヒメアマエビの内在性のプロテアーゼを利用する効果について検討するため、ヒメアマエビを蒸煮したもの、蒸煮しない生のもの、2種類を材料とした。作製したヒメアマエビ醤油の抗酸化能は、DPPHラジカル捕捉活性を測定することにより明らかにした。

(4) 作製したヒメアマエビ醤油を様々なクロマトグラフィーで精製し、抗酸化物質を単離後、各種NMRスペクトルを測定することで化学構造を明らかにした。

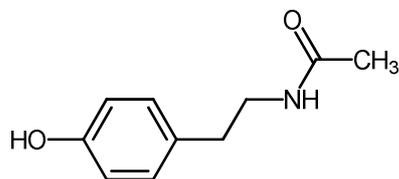
### 4. 研究成果

(1) タカエビの頭部50kgに水を37.5L加え、30分間ボイルした。その後、煮汁(41.6L)と残渣(33.6kg)に分け、残渣に塩12kgと醤油用麹10.2kgを加えてよく混ぜた。続いて、塩と醤油用麹をよく混ぜた残渣に30以下まで冷ました煮汁を戻し、よく攪拌した。12ヶ月間の発酵期間を経た後、ろ過、火入れ(85℃、15分間)低温で静置(4℃、1週間)最終ろ過により、タカエビ醤油21Lを得た。次に、作製したタカエビ醤油を酢酸緩衝液(pH5.5)で40倍希釈してDPPHラジカル捕捉活性を測定した。比較のため市販品のナンプラーも同様にDPPHラジカル捕捉活性を測定した。その結果、タカエビ醤油のDPPHラジカル捕捉率は、59.6%でありナンプラーの39.2%を大きく上回った。(表1) 次に、ORAC法によるタカエビ醤油の抗酸化能を調べたところ、6156(μmol TE / 100 ml)を示した。大豆醤油:4944(μmol TE / 100 ml)、しよつふる:1001(μmol TE / 100 ml)「文献値(Harada K, *et al.*, *Molecular medicine reports* (2010) 663-668)」との報告があり、数値を比較することにより、タカエビ醤油の抗酸化能の強さがORAC法によっても示された。すなわち、タカエビ醤油はナンプラー、しよつふる、大豆醤油よりも抗酸化能に優れており、機能性物質を豊富に含むことが予想された。

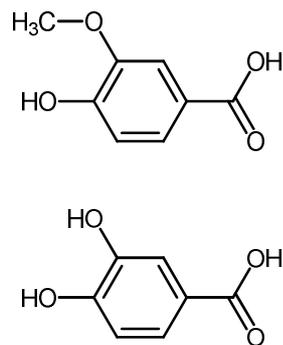
(2) 強い抗酸化能が示されたタカエビ醤油に含まれる抗酸化物質を特定するため、作製した

タカエビ醤油から抗酸化物質の単離を試みた。

1 Lのタカエビ醤油を、DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーに供し、水で洗浄後、25%メタノール水溶液で溶出した。これを濃縮後、溶媒分画して中性画分を得た。続いて固相抽出、逆相分取 HPLC で精製し、2.4 mg の化合物を抗酸化物質として単離した。この化合物の <sup>1</sup>H-および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定して化学構造を決定したところ、*N*-(4-hydroxyphenethyl)acetamide であることが明らかになった。なお、本化合物は抗腫瘍活性を有することが報告 (Hong *et al.*, 2006 年) されていた。そこで、タカエビ醤油に含まれる量について、HPLC を用いて定量分析を行ったところ、タカエビ醤油 1 L に含まれる *N*-(4-hydroxyphenethyl)acetamide は、21 mg であることが明らかになった。



次に、6.6 Lのタカエビ醤油から抗酸化物質の単離を試みた。溶媒分画により得られた酸性画分を固相抽出後、逆相分取 HPLC およびリサイクル HPLC で精製することで 2.3 mg と 13.6 mg の 2 個の化合物を抗酸化物質として単離した。各種 NMR スペクトル解析の結果、それぞれパニリン酸とプロトカテク酸であることが明らかになった。パニリン酸は、抗酸化作用以外に抗菌作用、肝臓保護効果、腸内改善効果、メラニン生成阻害など、プロトカテク酸も抗酸化作用以外に抗菌活性、血中中性脂肪上昇抑制、血清コレステロール低下など多くの機能が報告されている化合物である。タカエビ醤油にこのような機能性物質が含まれていることが明らかになり、未利用資源であるタカエビ頭部の有効な活用方法を見出すことができた。



(3) 鹿児島湾内で底引き網により 23 kg のヒメアマエビを得た。このうち 16.5 kg に 16.5 L の水を加え、30 分間ボイルした。続いて、煮汁と残渣に分け、残渣をミンチ状にし、塩と醤油用麴を加えてよく混ぜた後、30 以下に冷ました煮汁を戻し、再度よく攪拌した。これを 9 ヶ月間発酵し、ろ過、火入れ (85 °C、15 分間) 静置 (4 °C、1 週間) 最終ろ過することで、ヒメアマエビ醤油 [蒸煮工程あり] を 17 L 得た。(図 1)

また、ヒメアマエビ 4.4 kg をミンチ状にした後、塩、水、醤油用麴 ([蒸煮工程あり]と同じ比率)を加え、その後の操作は蒸煮工程ありと同様に行うことで、蒸煮工程のみ行わないで作製したヒメアマエビ醤油 [蒸煮工程なし] を 6 L 得た。

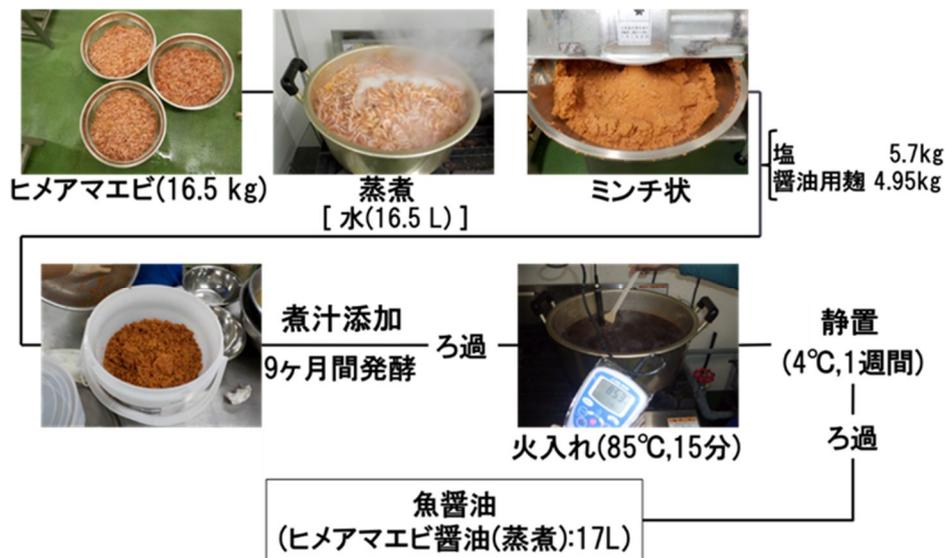


図 1 ヒメアマエビ醤油 [蒸煮工程あり] の作製

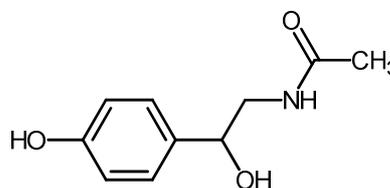
作製した 2 種類のヒメアマエビ醤油 ([蒸煮工程あり]と[蒸煮工程なし]) の DPPH ラジカル捕捉活性を測定したところ、[蒸煮工程あり]のヒメアマエビ醤油の方が[蒸煮工程なし]のものより高い DPPH ラジカル捕捉率を示した。(表 1) なお、本研究で作製したタカエビ醤油や大豆醤油よりも抗酸化能に優れていることも明らかになった。同様に作製した大豆醤油は、ヒメアマエビが入っていないことのみが、ヒメアマエビ醤油と異なる点であることを考慮すると、ヒメアマエビ醤油にはヒメアマエビ由来の高い抗酸化活性を有する化合物の存在が示唆された。

表1 作製した醤油（ヒメアマエビ、タカエビ、大豆）の DPPH ラジカル捕捉率

サンプル	DPPH ラジカル捕捉率 (%) <sup>*</sup>
ヒメアマエビ醤油 [蒸煮工程あり]	82.2
ヒメアマエビ醤油 [蒸煮工程なし]	80.2
タカエビ醤油 (本研究で作製)	59.6
大豆醤油 (本研究で作製)	67.4
大豆醤油 (市販品)	53.9
ナンプラー (市販品)	39.2

<sup>\*</sup> 全て酢酸 buffer (pH 5.5) で 40 倍希釈して測定

(4) 4 L のヒメアマエビ醤油 [蒸煮工程あり] を溶媒分画後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、固相抽出、逆相分取 HPLC で精製することで、1 個の抗酸化物質を 2.9 mg 単離した。そこで、本化合物を重メタノールに溶解し、各種 NMR スペクトルを測定して化学構造を決定したところ、*N*-アセチルオクトパミンであることが明らかになった。*N*-アセチルオクトパミンは、チロシンの脱カルボキシ化により生じたチラミンが  $\beta$ -ヒドロキシ化してオクトパミンとなった後、アセチル化されることで生じたものと考えられた。また、オクトパミンは無脊椎動物に含まれることが知られており、ヒメアマエビに含まれるオクトパミンが魚醤油製造工程でアセチル化されたことも考えられた。



本研究では、未利用・低利用水産資源を発酵食品として有効活用する方法を確立するとともに、生物有機化学的手法により作製した発酵食品に含まれる機能性物質を明らかにした。確立した発酵方法は、水産資源に限らず、広く未利用・低利用資源の有効活用へと適用できるものであり、食品ロスへの対策の一つとなるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山 靖正, 吉岡 涼代, 久木野 千波, 福山 智未, 山田 章二, 小松 正治
2. 発表標題 ヒゲナガエビ頭部を原料とした醤油の機能性に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉山 靖正, 久木野 千波, 福山 智未, 吉岡 涼代, 山田 章二, 小松 正治
2. 発表標題 ヒゲナガエビ頭部の有効利用と機能性
3. 学会等名 日本農芸化学会 2017年度大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考