

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00787

研究課題名(和文)水産発酵食材の機能強化と食の安全性確保に関する研究

研究課題名(英文) Study on improving function of fishery fermented food and securing its safety

研究代表者

幡手 英雄 (HATATE, Hideo)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：10325730

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)：様々な地域で伝統的に製造されてきた発酵食品のもつ抗酸化機能を強化するために、本研究では食品製造工程で広く使用されてきたメイラード反応を応用した。小エビを原料として製造された塩蔵発酵エビペーストと数種類の還元糖とを60℃でインキュベートさせることでメイラード反応が促進され、抗酸化活性は反応の進行につれて著しく強化された。メイラード反応の進行中に、EPAやDHAなどの不飽和脂肪酸の有害な酸化劣化は観察されなかった。さらにアミノ化合物の自己消化によるものと思われる遊離アミノ酸量が有意に増加しており、発酵食品のうま味も強化される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タウリンやEPA、DHAなど特有な機能性成分が豊富に含まれている水産発酵食は、我が国でも最近注目されているが、その抗酸化機能性の強化に関する研究例はほとんどなかった。このような状況で、本研究では各種還元糖を適当な条件で発酵食とインキュベートすることによってメイラード反応が促進され、抗酸化機能が著しく強化されることが実証され、併せて自己消化の進行にともない発酵食品の風味改善も期待された。

研究成果の概要(英文)：In order to enhance the antioxidant function of fermented foods traditionally manufactured in various regions, this study applied the Maillard reaction, which has been widely used in food manufacturing processes. The Maillard reaction was promoted by incubating salt-fermented shrimp paste with several kinds of reducing sugars at 60°C, and the antioxidant activity was markedly enhanced as the reaction progressed. During the Maillard reaction, harmful oxidative deterioration of unsaturated fatty acids such as EPA and DHA was not observed. In addition, the amount of free amino acids significantly increased probably depending on self-digestion of amino compounds, and thus also suggested that the umami taste would be improved in the fermented food.

研究分野：水産食品化学

キーワード：抗酸化活性 メイラード反応 還元糖 アミノ化合物 EPA DHA 塩蔵発酵エビペースト

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 魚介類は、生活習慣病(成人病)予防効果や脳機能改善効果をもつ EPA、DHA、タウリン、アスタキサンチンなどの機能性成分を含んでおり、優れた食材として一般にも認知されている。しかし、EPA、DHA などの多価不飽和脂肪酸は容易に酸化されて過酸化脂質となり、各種活性酸素やフリーラジカルを生じて心臓病さらには老化・発ガンの原因となる。このような状況で、我々は、水産脂質を主体とする利活用に関する研究、過酸化脂質の関連研究や水産生物のもつ抗酸化機能に関する研究などを行っており、その中で食機能の観点から、最近特に注目されている発酵食について、伝統的な方法で製造された塩蔵発酵エビの栄養成分や抗酸化活性を研究してきた。

(2) 塩蔵発酵エビは、小エビ(またはアミ類)を原料としたペースト状食材である。これは魚醤油のように液体成分だけが利用されるわけではなく、体構成成分のすべてがそのまま摂食されるため、EPA や DHA に加えて、エビ特有なアスタキサンチン、タウリン、キチン・キトサンなども含まれる優れた食素材である。原料エビそのものに有意な抗酸化活性が確認されたが、熟成・発酵中に旨味成分だけでなく、食材の抗酸化機能も強化されることが判明した。しかし、熟成・発酵中に進行する水産発酵食素材の成分変化、それに伴う食機能の強化メカニズムなど、食生活の改善に寄与できる食素材を開発するうえで依然として不明瞭な点が多かった。

### 2. 研究の目的

(1) 発酵食品の熟成中に褐変反応の進行することが観察されているが、これは生体構成成分相互の間で進むメイラード反応に原因すると考えられる。メイラード反応は、Maillard により発見されて 100 年以上経過したが、褐変色素(メラノイジン)の構造は未だに解明されていない。また生体内では糖化タンパク質を形成して一部有害な後期糖化産物 AGEs を形成することも知られている。しかし、一方で食品成分相互の非酵素的反応で、食品の着色や香気成分などの風味形成に関わり、食産業では重要な反応である。その反応生成物(MRPs)の食素材の機能に及ぼす影響は大きく、*in vitro* 試験では抗酸化機能や免疫力の強化が報告されている。しかし、水産発酵食の熟成中に増加していく MRPs を経時的にモニターした研究例はほとんどない、そこで本課題では水産発酵食の熟成中に進行する栄養成分等の変化ならびに MRPs 形成と抗酸化活性発現メカニズム等を調べるとともに、優れた食機能が付与された水産発酵食の製造法を探る。

### 3. 研究の方法

(1) 熟成発酵させた塩蔵発酵エビ 5 g に単糖類(グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、マンノース、リボース、アラビノース)を 10~250 mg 添加し、4~60°C で 0~13 日間加熱してメイラード反応を促した。メイラード反応させた試料 1 g に蒸留水 1 ml を加え十分にホモジナイズした後、1000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上層液を回収した。残さに 95% エタノール溶液を 4 ml 加え、同様の処理を 2 回行った。全ての上層液を集めたものに、95% エタノールを加え 10 ml に定容したものを 85% エタノール抽出物とした。この 85% エタノール抽出物を適宜希釈して、420nm の吸光度を測定して褐色物質の生成量を測定した。同様にメイラード反応の進行に伴う蛍光物質の生成量は励起波長 346 nm および蛍光波長 415 nm で測定した。なお、不溶性物質が生じた時は、遠心分離(1000rpm, 10 分間)で除去した。

(2) 抗酸化活性の測定

抗酸化活性は、Peralta らの方法 (2005) に従って DPPH ラジカル捕捉能、リノール酸メチル (ML) の自動酸化に対する抑制力および過酸化水素捕捉能などを測定して評価した。

(3) 塩蔵発酵エビのアミノ酸と脂肪酸分析

栄養 (機能性) 成分は、Peralta らの方法 (2005) に従ってアミノ酸組成と脂肪酸組成から評価した。発酵試料を減圧下で乾固した後、日本電子 (株) の JLC-500/V 全自動アミノ酸分析機を用いてアミノ酸含量を測定した。試料から Bilgh-dyer 法で抽出した全脂質の構成脂肪酸を、脂肪酸メチルエステル誘導体に転換してガスクロマトグラフィー分析した。

引用文献

Peralta Ernestina M., Hatate Hideo, Watanabe Daisuke, Kawabe Daisuke, Murata Hisashi, Hama Youichiro, Tanaka Ryusuke: Antioxidative activity of Philippine salt-fermented shrimp and variation of its constituents during Fermentation, *J. Oleo Sci.*, **54**, 553-558 (2005).

4. 研究成果

メイラード反応は、食品中で糖などのカルボニル基とタンパク質やアミノ酸中のアミノ基が反応することで、褐色物質や蛍光性物質を生成して抗酸化機能を強化させることが一部の食材で報告されている。本実験では、メイラード反応を促進させるため、還元糖を添加し、熱を加えて反応を促した。メイラード反応の進行度は、85 %エタノール抽出物中の褐色物質、蛍光物質の生成量から評価した。

糖濃度、加熱温度のメイラードの反応への影響と抗酸化機能とを関連させて検討した。メイラード反応の進行度は、褐色および蛍光物質の生成量で評価し、抗酸化機能は DPPH ラジカル捕捉能から算出した。塩蔵発酵エビ 5 g にグルコースを 10~250 mg 添加し、至適な反応温度、時間および添加量を検討した。その結果、グルコース濃度の増加に伴ってメイラード反応が進行し、抗酸化機能も強化された。またメイラード反応の進行を確認するには、1%の糖を添加することで十分であった。反応温度の影響を 4~60℃で検討したところ、4℃および 37℃では、メイラード反応はほとんど進行せず、抗酸化機能も強化されなかったが、60℃では顕著にメイラード反応の進行と抗酸化活性の強化が観察された。

7 種の単糖類をそれぞれ添加し、60℃でメイラード反応進行させた塩蔵発酵エビエキス の DPPH ラジカル捕捉能の経日変化から抗酸化機能を評価し、その結果

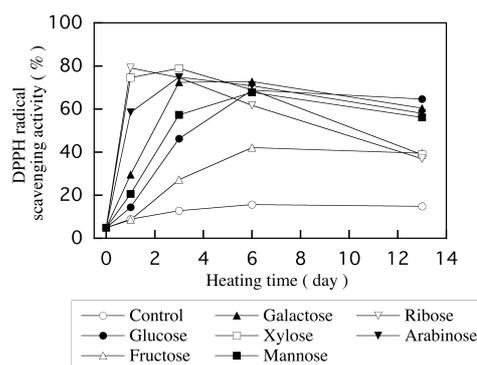


図 1 還元糖と 60℃でインキュベートさせた塩蔵発酵エビの DPPH ラジカル捕捉能の強化

表 1 グルコースと 60℃でインキュベートさせた塩蔵発酵エビの脂肪酸組成

Fatty acid	D-0	D-5	
			+ Glc
14:0	3.1	3.3	3.3
16:0	21.0	21.8	21.2
16:1n-9	6.7	6.8	7.2
18:0	7.8	8.0	7.7
18:1n-9	7.8	8.0	7.8
18:1n-7	2.2	2.3	2.2
20:4n-6	4.8	4.9	4.9
20:5n-3	11.3	11.5	11.2
22:4n-3	1.2	1.3	1.2
22:5n-3	0.6	0.7	0.7
22:6n-3	17.5	17.5	17.6
24:1n-9	0.7	0.7	0.7
Others	15.4	13.3	14.2

D-0、D-5 : 0 または 5 日間インキュベート

を図1に示している。還元力を持つすべての単糖類で、反応の進行およびそれに伴う抗酸化機能の強化も確認された。またリボースなどのアルドペントースでは反応速度が速く、ケトヘキソースであるフルクトースはいくぶん進行が遅かった。これらは過酸化水素捕捉能、脂質過酸化抑制能に関して強化されており、優れた抗酸化機能を付与されたこと明示された。

塩蔵発酵エビの加熱およびメイラード反応の進行が脂肪酸の酸化劣化におよぼす影響を検討した。その結果、水産物特有の機能性脂肪酸である EPA (20:5n-3) や DHA (22:6n-3) などの高度不飽和脂肪酸組成はほとんど変化せず、加熱やメイラード反応による悪影響はなかった(表1)。さらに、塩蔵発酵エビの加熱およびメイラード反応の進行がアミノ酸組成におよぼす影響を検討した。メイラード反応は食品中のアミノ酸やタンパク質を基質とした反応であるため、本実験で製造された塩蔵発酵エビにおいても有効なアミノ酸の損失が起きる可能性が危惧された。しかしながら、グルコースの添加の有無にかかわらず、インキュベーション時間の延長により自己消化等が進行することでアミノ酸量は増加する傾向を示し、栄養機能や旨味成分も強化されることが示唆された(表2)。

表2 グルコースと 60℃でインキュベートさせた塩蔵発酵エビエキスの含有アミノ酸量 (mg/100 g WW)

Amino acid	D-0	D-1		D-6		D-13	
			+Glc		+Glc		+Glc
o-Phosphoserine	13	19	12	15	17	13	13
Taurine	752	884	859	899	837	739	715
L-Aspartic Acid	139	188	165	200	206	151	120
L-Threonine	144	202	194	240	248	213	200
L-Serine	92	121	122	127	135	117	105
Asparagine	19	36	30	48	52	40	31
Glu+Gln	386	468	437	426	452	334	321
Glycine	122	175	161	190	167	163	140
L-Alanine	769	973	902	769	757	932	913
DL-α-Amino-n-butyric Acid	4	5	5	5	4	4	4
L-Valine	248	369	345	458	451	355	381
L-Methionine	71	57	128	83	93	90	90
L-Cystathionine	3	3	4	3	0	4	0
L-Isoleucine	138	203	180	282	282	220	216
L-Leucine	303	460	415	633	624	471	466
L-Tyrosine	110	175	151	78	162	138	150
L-Phenylalanine	142	263	210	253	298	253	246
L-Ornithine	12	14	9	13	26	42	24
L-Histidine	36	79	55	48	26	11	19
L-Lysine	377	564	534	724	665	549	538
L-Tryptophan	34	78	13	26	31	30	39
L-Arginine	91	349	258	372	364	309	266
L-proline	149	191	161	169	185	152	171
Ammonia	42	43	54	68	51	49	60
Total	4197	5921	5404	6131	6133	5378	5228

D-0, D-1, D-6, D-13: 0, 1, 6 または 13 日間インキュベート

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Ishimaru Mami, Muto Yuma, Nakayama Akari, Hatate Hideo, Tanaka Ryusuke: Determination of biogenic amines in fish meat and fermented foods using column-switching High-Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 12, 166-175 (2019). (査読有り)
- ② Mori Akihiro, Hikiyama Risako, Ishimaru Mami, Hatate Hideo, Tanaka Ryusuke: Evaluation of histidine-containing dipeptides in twelve marine organisms and four land animal meats by hydrophilic interaction liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 41, 849-854 (2018). (査読有り)
- ③ Ishimaru Mami, Haraoka Masato, Hatate Hideo, Tanaka Ryusuke: High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for simultaneous analysis of retinoids (retinyl palmitate, retinyl acetate, and retinol) and α-, β-, γ-, and δ-tocopherols in Foods. *Food Analytical Methods*, 10, 92-99 (2017). (査読有り)
- ④ Ishimaru Mami, Haraoka Masato, Hatate Hideo, Tanaka Ryusuke: Simultaneous analysis of purine and pyrimidine compounds associated with the freshness and taste of marine foods. *Food Analytical Methods*, 9, 1606-1615 (2016). (査読有り)

[学会発表] (計2件)

- ① 隅山友晶・黒木結生・田中竜介・幡手英雄: 塩蔵発酵エビペーストの原料素材のもつ抗酸化機能の評価、平成28年度日本水産学会秋季大会, (2016)

- ② 幡手英雄・川辺大輔・湯之上諒・田中竜介・Ernestina Peralta：塩蔵発酵エビペーストの食機能強化-メイラード反応産物の影響-、平成27年度日本水産学会秋季大会, (2015)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：田中 竜介

ローマ字氏名：(TANAKA, ryusuke)

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号 (8桁)：30399654

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。