

Function of Fermented Foods Made from Fish and Squid in the Hokuriku Region

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-07-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Terasawa, Naoko メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00051829

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



北陸地方の魚介発酵食品の機能性に関する研究

17500535

平成 17 年度～平成 19 年度 科学研究費補助金
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成 20 年 5 月

金沢大学附属図書館



1300-05170-1

代表者 寺沢 なお子
大学 教育学部 准教授



北陸地方の魚介発酵食品の機能性に関する研究

17500535

平成17年度～平成19年度 科学研究費補助金
(基盤研究(C))研究成果報告書

金沢大学附属図書館



1300-05170-1

平成20年5月

研究代表者 寺沢 なお子
金沢大学 教育学部 准教授

著 者 寄 贈

はしがき

「北陸地方の魚介発酵食品の機能性に関する研究」は、以下の研究組織・研究経費により実施されたものである。

研究組織

研究代表者：寺沢 なお子（金沢大学 教育学部 准教授）

研究分担者：村田 容常（お茶の水女子大学 生活科学部 教授）

研究協力者：今井 めぐみ，林平 頼子

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	800,000	0	800,000
平成 18 年度	700,000	0	700,000
平成 19 年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,100,000	180,000	2,280,000

研究発表

雑誌論文

寺沢なお子：イシルのラジカル消去活性成分，発表予定

学会発表

今井めぐみ：イシルの抗酸化性成分の検索，日本家政学会中部支部 平成 18 年度
（第 7 回）家政学関連院生・学生研究発表会要旨集， p.16, 2007

研究成果

目次

緒言

第I章 かぶらずしおよびイシルのラジカル消去活性に関する研究

第II章 かぶらずしのアンギオテンシン変換酵素阻害活性に関する研究

第III章 イシルのラジカル消去活性成分の検索

緒言

我が国の平均寿命は世界に類をみない速さで向上し、2005年10月の統計において、男性78.53歳、女性85.49歳¹⁾となり、最長寿国となっている。また同年、出生率が死亡率を下回る人口の自然減が起これ、これら加速する少子高齢化による国民の医療費、社会保障費の負担増大が深刻な問題となっている。一方、近年、食生活の多様化が進み、栄養バランスの偏り等による、がん、循環器系疾患（脳血管疾患、心臓疾患など）、肥満、アレルギー性疾患などの生活習慣病が増加し、全死亡原因の60%¹⁾を占めている。生活習慣病は、高齢者のみならず、若年層にも増加する傾向が見られ、現在、人々の健康への関心の高まり、生活習慣の改善が推奨されている。「医食同源」の言葉が示すように、食品による健康増進、疾病予防が人々の間で再認識され、食品のもつ機能のうち、特に第三次機能である生体調節機能に多くの関心が払われている。

食品の生体調節機能とは、食品における生体防御、体内のリズム調節、疾病の予防・回復、老化の抑制等、健康の維持・増進に寄与する機能のことである。近年、様々な生体調節機能に関する研究が進み、多くの食品素材から抗変異性、制がん性、抗酸化性、血圧調節性、生体防御性、コレステロール調節性、整腸作用等、健康の維持・増進に有効とされる成分が明らかにされ、それらを含む食品は機能性食品（Functional Food）と呼ばれている^{2) 3)}。しかしながら、ほとんどの成分は、まだ研究段階であり、人体に対する効果や安全性が十分に立証されていない。このような中で、安全性に優れ、特定の機能が効率よく発現すると科学的に立証された食品は、1991年、栄養改善法（現・健康増進法）により「特定保健用食品」として法的に制度化された^{4) 5)}（表1）。

一方、1986年に「スローフード」という食スタイル運動がイタリアで提唱され、現在、我が国においても広がりつつある。これは、スピード、効率化優先の現代社会へ警鐘を鳴らし、食材を中心に伝統的な食文化を守り、人々に食のあり方を問い直す運動である。全国各地で地産地消運動が展開されるようになり、地域に根付いた食材や伝統食品等が安全性、栄養的価値の視点からも見直されつつある⁶⁾。

石川県では、伝統野菜をはじめとし、恵まれた地形、気候を生かした様々な農産物が生産されている。また、日本海に面しているため、ブリ、イカ、カニ等の魚介類にも恵まれており、これらを利用した水産加工食品も数多く存在する⁷⁾。地域固有食品の栄養評価はもちろんのこと、それらに含まれる生体調節機能を明らかにすることは、新規食品の開発や地場産業の発展につながると考えられる。

そこで本研究では、金沢市が発祥の地であるかぶらずしと、近年健康ブーム等からもその機能性が注目されている魚醤油イシルを研究対象とした。

かぶらずしは北陸地方、特に金沢における伝統的な郷土料理で、主に冬季に塩漬けたカブとブリを重ね麹とともに重石をして漬け込んだものである。このとき有機酸や遊離アミノ酸が増加し⁸⁾、特有の旨味を与えることがわかっている。遊離アミノ酸の増加は発酵に

伴うブリのタンパク質分解によるものと思われるが、これらアミノ酸やペプチドの機能性に関する詳細な報告はみられない。一方、イシルは石川県能登地方で古くから製造され、秋田のショツツル、香川のイカナゴ醤油とともに日本三大魚醤油とされている。これら魚醤油は、魚介類に食塩を添加し、魚介類中に存在する酵素により自己消化させ、熟成させた発酵食品であり、原料の魚介類に由来するタンパク質やその加水分解物であるペプチド、アミノ酸が豊富に含まれ、特有の旨味を有することが知られている。さらに、ペプチドやアミノ酸には、血圧降下、免疫増強、インスリン分泌増強、血栓予防、鎮静効果等の様々な生理作用があることが明らかになっているほか、発酵食品においては製造過程においてすでに低分子化しているため、新たな酵素処理をせずに、有効な成分を得ることができる⁹⁾。しかし、発酵食品そのものを大量かつ日々摂取することは困難であるため、活性ペプチドの精製等による、効率的な摂取が望まれる。

本研究では、様々な生体調節機能のうち老化や生活習慣病の予防に効果が期待される抗酸化性に着目した。抗酸化性とは、生体内で生成された有毒な活性酸素のはたらきを阻害する機能のことであり、これまでもタンパク質のプロテアーゼ加水分解物から多種多様な抗酸化性成分が分離・同定されている。柘植ら¹⁰⁾は、卵白アルブミンの酵素分解物から抗酸化ペプチドを分離し、その構造から3種類の抗酸化ペプチドを報告した。また、末綱らは、かつお節タンパク質のモルシン分解物から11種類の抗酸化ペプチド¹¹⁾を、さらにマイワシ筋肉のペプシン消化物から抗酸化オクタペプチド¹²⁾を分離・同定した。魚醤油イシルについては、これまでに製造過程における成分変動^{13) 14)}や抗酸化性及びアンギオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性といった機能性を有すること¹⁵⁾が報告されている。しかし、かぶらずしやイシルから抗酸化作用やACE阻害作用を示す物質を単離・同定したという報告は見当たらない。したがって、本研究ではかぶらずしおよびイシルのラジカル消去活性・ACE阻害活性について検討し、さらに高活性の認められたかぶらずしおよびイシルから活性成分を分離精製することを目的とした。

表 1: 特定保健用食品中の生体調節成分¹⁶⁾

分類	成分	作用
食物繊維	難消化デキストリン, ポリデキストロース, 小麦ふすま, ガラクトマンナン, 低分子化アルギン酸ナトリウム 等	整腸作用
	キトサン, 低分子化アルギン酸ナトリウム 等	コレステロール吸収調節
	難消化性デキストリン	血糖調節
オリゴ糖	キシロオリゴ糖, フラクトオリゴ糖, 大豆オリゴ糖, イソマルトオリゴ糖, 乳果オリゴ糖, ガラクトオリゴ糖, ラクチュロース 等	整腸作用
	フラクトオリゴ糖	カルシウム吸収促進
	リン酸化オリゴ糖カルシウム	難う蝕
糖アルコール	パラチノース, マルチトース 等	難う蝕
タンパク質	大豆タンパク質	コレステロール吸収調節
	グロビタンパク分解物	中性脂肪制御
ペプチド	カゼインデカペプチド, サーデンペプチド, ラクトリペプチド 等	血圧低下作用
	カゼインホスホペプチド, ポリグルタミン酸	カルシウム吸収促進
	カゼインホスホペプチド-非結晶リン酸カルシウム複合体	難う蝕
脂質	ジアシルグリセロール, 中鎖脂肪酸, エイコサペンタエン酸, ドコサヘキサエン酸	中性脂肪制御
	植物ステロール(エステル), ジアシルグリセロール	コレステロール吸収調節
カルシウム	クエン酸リンゴ酸カルシウム	カルシウム吸収促進
鉄	ヘム鉄	鉄強化
乳酸菌 等	ラクトバチルス GC 株, ヤクルト菌, ビフィドバクテリウム・ロンガム BB536 等	整腸作用

かぶらずしについて¹⁷⁾

かぶらずしは、加賀百万石の城下町、金沢の郷土料理で、ブリの水揚げが最盛となる冬の名産であり、金沢を代表する正月料理として各家庭でも漬けられている。また、漬ける樽によって味が違い、漬ける年の気温によっても微妙に味が異なる。かぶらずしの製法は、塩漬けにしたカブの間に、あらかじめ塩漬けにしたブリの薄切りを挟み込み、細く切った人参や昆布などとともに、米麴（糀）で漬け込んで発酵させる（図1）。カブのかわりにダイコンを使った「大根寿し」や、ブリのかわりに鯖、サケ、鰯を使う地域や家庭もある。

すしの原型は「なれずし」という、主に川魚を塩と米飯で発酵させた保存食品である。現在では滋賀県、近江の「鮒ずし」が代表としてあげられる。このなれずしは、製法の過程で米を使っているが、食べるのは鮒だけで、製造に要する年月も長い。そこで、飯も魚もともに食べる漬物として「半なれずし」というものが登場し、発酵を促進するために麴が利用されるようになった。このようにして、麴を使う新たなすしが生まれ、現在のかぶらずしが出来上がった。かぶらずしは、麴を使う製法と、魚の熟成したものを使用する製法が、「いずし」や「押しずし」と異なり、「漬物」ともまた異なる独特なものといえる¹⁸⁾。

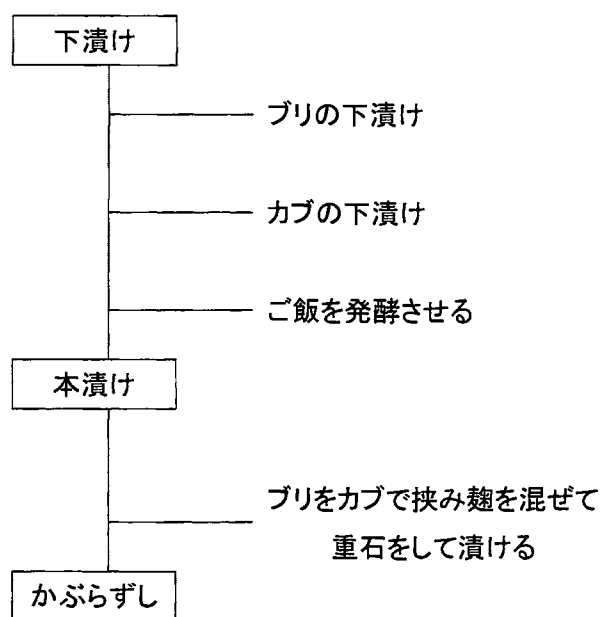


図1:かぶらずしの製法

魚醤油イシルについて

石川県は、本州中央の日本海側に位置し、北部は能登半島となり日本海に突出している（図 2）。能登半島の沖合は、北上する対馬暖流の影響が大きく、かつ南下するリマン寒流と交錯する好漁港で、豊富な海産物に恵まれている。

富山湾に面した能登半島内浦海域は、沈降性の入り組んだ波静かな海岸線が続いている。昔からイカ釣り漁業が盛んに営まれ、特にスルメイカの水揚げ量は日本海側最大を誇る¹⁹⁾。一方、冬季季節風を直接受ける能登外浦海域では、沖合漁業が盛んに営まれ、まき網漁業によるイワシ、サバの漁獲量が多い²⁰⁾。

この石川県奥能登地方に、古くから伝わる「イシル、イシリ、ヨシル、ヨシリ」（以下、イシル）と呼ばれるイカやイワシを原料とした魚醤油がある。

東南アジア諸国では、魚醤油は一般的な調味料として使われており、タイのナンプラー、ベトナムのニョクマム、フィリピンのパティスなどは日本でも広く知られている。日本においても、石川県奥能登地方に古くから伝わるイシルは、ハタハタが原料の秋田の「シヨツツル」、イカナゴが原料の香川の「イカナゴ醤油」とともに日本三大魚醤油として知られている。能登半島内浦地区ではイカ、外浦地区ではイワシが主な原料とされ、各々の漁港における漁獲量の多い魚介類を保存及び嗜好性の観点から利用されてきたと考えられる²¹⁾。イカの内臓を原料とする魚醤油は「イシル」と呼ばれ、イワシを原料とする魚醤油は「ヨシル」と呼ばれている（以下、すべてイシルと称する）²¹⁾。1987年の調査では、イシルの年間生産量は約 33 t²²⁾とされていたが、その後、食文化の多様化や健康ブーム、スローフード運動の広まり等により、2003年の年間生産量は約 200 tとされている¹⁵⁾。

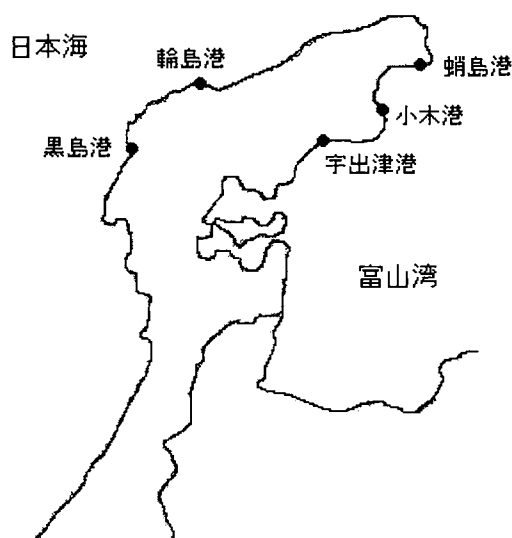


図 2: 能登半島(石川県)

【イシルの製法】 23, 24, 25)

イシルの一般的な製造工程を図3に示した。イシルの製造は、原料を高食塩濃度の環境のもとで自然熟成させて作られ、毎年11月頃から翌年の5月頃までの比較的寒い時期に仕込まれる。

イカイシルの場合は、イカのごろ（内臓）に18%程度の食塩を加えた後、適宜攪拌を行い、約2年間桶の中で熟成させる。一方、イワシイシルの場合は、イワシを丸ごと使用し、20%程度の食塩を加えた後、攪拌を行い、約半年から1年間桶の中で熟成させる。熟成中、桶の中が徐々に上下二層に分かれ、桶の上層部に脂肪分や魚骨残渣分の層ができて蓋の役目をして密閉状態となる。食塩により腐敗細菌の繁殖が抑制されるとともに、原料中の消化酵素プロテアーゼにより魚肉タンパク質が分解され、ペプチドやアミノ酸が生成する。また、脂質もリパーゼの作用を受ける。さらに自己消化と並行して、耐塩性の微生物が繁殖し、特有の香味が醸成される。魚肉には炭水化物がほとんど含まれていないのでアルコール発酵は行われませんが、嫌気的発酵により、有機酸、アミン、カルボニル化合物等が生成され、桶の下層に貯まる。生成したイシル（仕込み量の約60%）は、桶の下部に取り付けられた栓から取り出し、煮沸、殺菌及び除タンパクを行い、上澄みを濾過して製品とする。

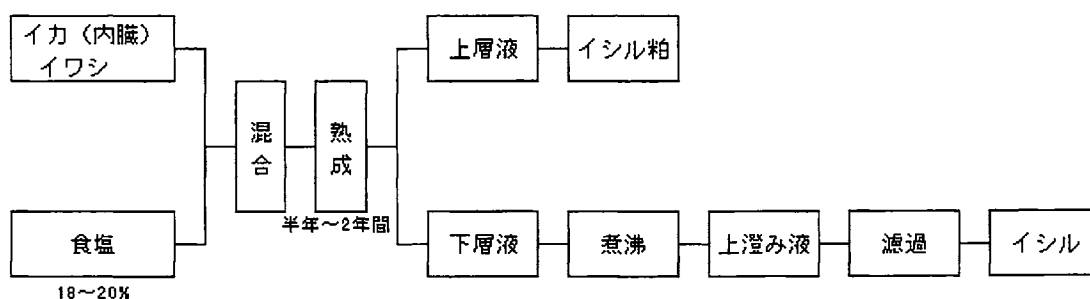


図3: イシルの製造工程

抗酸化性について

今日、がんや心臓病といった生活習慣病が全死亡原因の60%を占め¹⁾、また、10代の子どもにおいても肥満や動脈硬化の兆しが見られるなど、若年層から老年層に至るまで、さまざまな生活習慣病とその予備軍が増加傾向にある。これら生活習慣病の要因の一つとして注目されているのが活性酸素による生体成分の酸化劣化であり、予防医学的な視点から精力的に研究が進められている。

人は、一日に約 500L もの酸素（空気にして約 2,500L）を体内に取り入れている*。取り入れられた酸素は、主に TCA 回路においてエネルギー産出に利用されるが、そのうち 2~5%が活性酸素に変換される。活性酸素とは、狭義にはスーパーオキシド (O_2^-)、一重項酸素 (1O_2)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) を示し、広義には脂質過酸化で生成される過酸化脂質 (LOOH) やアミノ酸の代謝により生成される窒素酸化物 (NO) など含まれる^{26, 27)}。これら活性酸素は、体内に侵入してきた病原菌やウイルスを殺す白血球やマクロファージに不可欠であり、また我々の体に必要なホルモンを合成する際にも重要な役割を果たしている²⁸⁾。正常な細胞中には、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼ、グルタチオンペルオキシターゼと呼ばれる酵素系が存在し、役割を果たしたフリーラジカルを水と酸素 (三重項) に変換している²⁹⁾。しかし、加齢による消去系の活性低下やストレス、大気汚染等により、消去能を超えて異常に活性酸素が作られた場合、生体膜を構成している不飽和脂肪酸や LDL (低密度リポタンパク質)、DNA 等を酸化させることが最近の研究で明らかになっている³⁰⁾ (図 4)。さらに、この生体成分の酸化が引き金となり、老化や生活習慣病が発症すると考えられている。

従って、生体内で発生した活性酸素を消去 (無毒化) すること、つまり、酸化を防ぐ成分、抗酸化性成分を多く含む物質を体外から積極的に摂取して、活性酸素による生体劣化を防ぐことが健康維持、疾病予防に重要であると考えられる。食品・栄養の立場からは経口摂取が可能で体内貯留時間の長い低分子性抗酸化物に着目した酸化ストレス抑制に関する数多くの研究がなされている。

抗酸化物質は不飽和脂肪酸の自動酸化を抑制し、過酸化物の生成を阻害するものである。抗酸化物質の作用機構の面から大きく分類すると、①フリーラジカル捕捉機構、②一重項酸素消去機構、③金属キレート機構となる。フリーラジカル捕捉機構の代表的な物質として、ビタミン E (トコフェロール)、ビタミン C (アスコルビン酸) が挙げられる。ビタミン E は、通常生体成分として認識されるとともに、食物成分として植物種子等に広く分布している。天然には α 、 β 、 γ 、 δ の 4 種類の同族体があり、抗酸化には α が最も重要とされる³¹⁾。生体では、脂溶性抗酸化剤として細胞膜等に存在し、脂質ラジカルを捕捉することにより、連鎖的酸化反応を抑制する。一方、ビタミン C は、果物等に多く、抗酸化以外にもいくつかの代謝上の役割を果たしており、食物由来のニトロソアミンの発ガンを抑制する。また、生体内では、水溶性抗酸化剤として細胞質や細胞外液等に存在し、水相で発生するラジカルを捕捉消去することにより酸素ラジカルが脂質や核酸等の生体成分を攻撃するのを防ぐ。さらに、ビタミン C は酸化反応で電子を失ったビタミン E を再生するはたらきももつ。一重項酸素消去機構を示すものには、カロテノイドが挙げられる。カロテノイドはビタミン E 同様、脂

* 一日に約 2,100kcal の食事を摂る健康的な成人の場合

溶性抗酸化剤であるが、一重項酸素消去活性はビタミンEの20~100倍とされる。金属キレート機構を示すものには、フラボノイドが挙げられる。生体を構成する遷移金属イオンの中には、鉄やモリブデンのように、活性酸素の生成を促進するはたらきをもつものもあるため、これらをキレートして不活性化することが重要と考えられる³²⁾。タンパク質やアミノ酸の抗酸化作用は、金属キレート機構に起因していることがYamashojiにより報告されている^{33, 34)}。

抗酸化物質の研究は、食品素材中の抗酸化成分の単離・精製とそれら成分の*in vitro*における各種のラジカル消去能の評価を中心に始まり³⁵⁾、表2のような食品成分が有効なものとして確認されている。

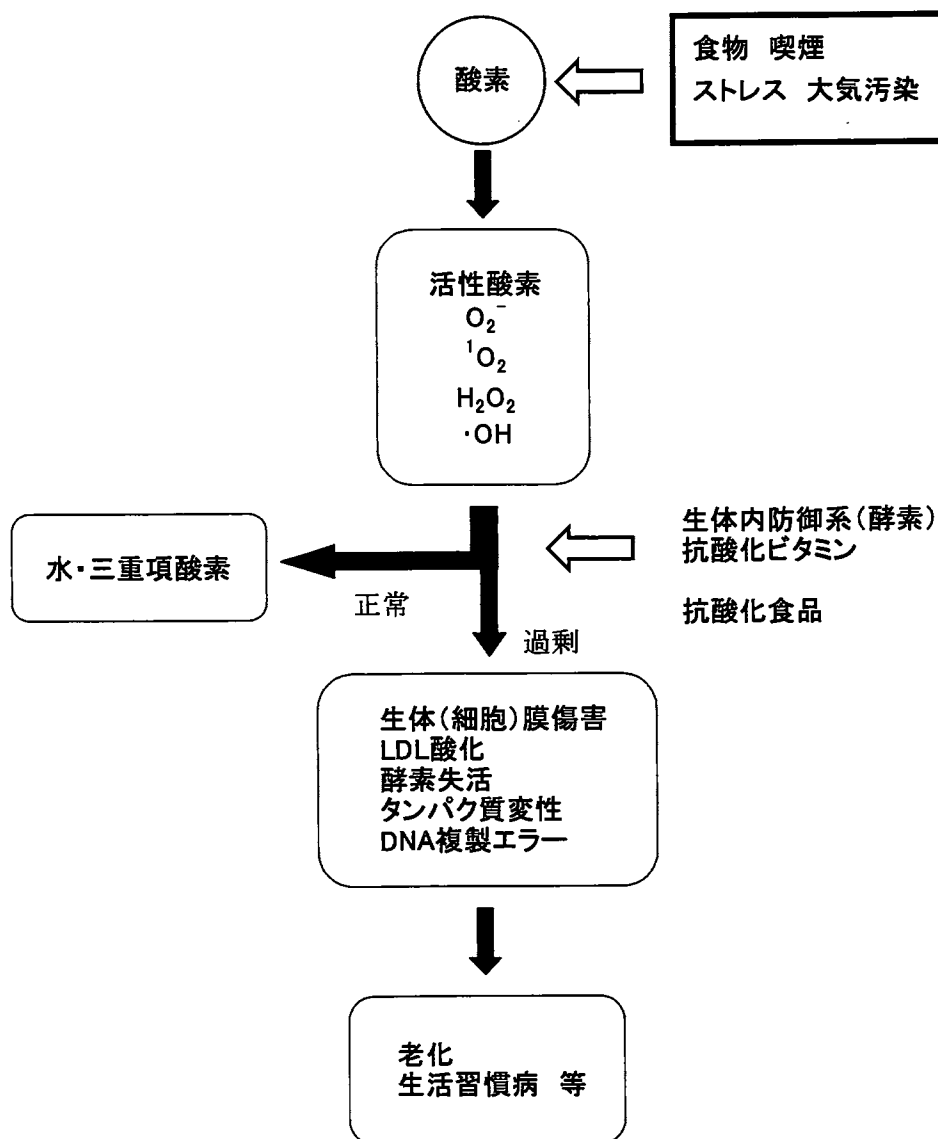


図4: 活性酸素・ラジカルによる生体傷害³⁶⁾

表 2: 食品中の主な抗酸化性成分³⁷⁾

抗酸化成分	多く含まれる食品
ビタミン類	
トコフェノール類(V.E)	種実類, 植物油
アスコルビン酸(V.C)	果物, 野菜
β -カロテン(プロビタミン A)	緑黄色野菜, 根菜類
ポリフェノール類	
フラボノイド類	果物, 穀物, 豆類, 野菜類, 香辛料
イソフラボノイド類	大豆類
カテキン類	茶葉
アントシアニン・アントシアニン	果物, 豆類, 野菜類, 赤ワイン, 香辛料
フェノールカルボン酸類	コーヒー, 穀類, 豆類, 種実類, 香辛料
リグナン類	ゴマ
タンニン類	和漢薬
テルペノイド類	
リモノイド類	カンキツ類
モノテルペノイド類	
ジテルペノイド類	香辛料(セージ, ローズマリー)
トリテルペノイド類	サポニン(豆類)
カロテノイド類	リコピン(トマト), 野菜類, 藻類, 香辛料
アミノ酸・ペプチド	菌類, 発酵食品
多糖類	植物性食品
高分子メラノイジン	カルボニル化合物とアミノ酸の反応最終生成物

アンギオテンシン変換酵素阻害物質について

高血圧は、日本のみならず世界の先進諸国において最も罹患頻度の高い疾病である³⁸⁾。高血圧は「本態性高血圧（一次性高血圧）」と「続発性高血圧（二次性高血圧）」に分類されるが³⁹⁾、その90%以上が原因を特定できない「本態性高血圧」であるといわれている³⁸⁾。これには、食塩と腎性因子との関係、すなわち、腎臓における遺伝的なナトリウム代謝調節異常、およびカリクレイン-キニン系、プロスタグランジン系などの腎降圧系の異常が考えられている。その他、タバコに含まれるニコチン、飲酒、生活習慣、職業、ストレスなどの関与が示唆されている³⁹⁾。続発性高血圧の代表的な例は腎性高血圧である。腎臓の傍系球体細胞にあるタンパク質分解酵素レニンは、糖

タンパク質であるアンギオテンシノーゲンに作用してアンギオテンシン I を産生する。アンギオテンシン I は血管収縮作用をもつペプチドで、血圧を上昇させるが、肺の毛細血管内皮細胞の細胞膜に分布する変換酵素（アンギオテンシン変換酵素；ACE）により C 末端からヒスチジルロイシンが切り離され、血管収縮作用と血圧上昇作用の強いアンギオテンシン II に変わる。このアンギオテンシン II は、副腎皮質にも作用してアルドステロンの分泌を促し、ナトリウムと体液の体内貯留を促進する。また、プロスタグランジン系とカリクレイン-キニン系に作用して、再びレニンの分泌を促す。この一連の反応系は、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系と呼ばれ、腎性高血圧発症の原因である³⁹⁾。アンギオテンシン変換酵素の阻害物質は、降圧剤として実用化されており、また、特定保健用食品として認められているものもある³⁹⁾。特定保健用食品に認められている主な成分は各種のペプチドであるが、これらのペプチドは過度の血圧上昇を抑制する反面、その作用は比較的弱いため、健康な人の血圧を必要以上に低下させるという副作用の心配がない³⁹⁾。

アンギオテンシン変換酵素阻害作用は、味噌類⁴⁰⁾、醤油⁴¹⁾、魚醤¹⁵⁾、イワシ酵素分解物⁴²⁾、食酢⁴³⁾、乳清タンパク質分解物⁴⁴⁾、鶏卵加水分解物⁴⁵⁾、ブラックマッペ⁴⁶⁾、ノニ⁴⁷⁾、みりん⁴⁸⁾ など、様々な食品において認められており、活性成分としていくつかのペプチド等が分離同定されている。

引用および参考文献

- 1) 平成 17 年厚生労働省人口動態統計
- 2) 青柳康夫：「食品機能学」，p. 1-7，建帛社，東京（2003）
- 3) 永井毅・鈴木喜隆：「生活習慣病と食品の機能」，p. 13-24，水産社，東京（2003）
- 4) 中谷延二・清水誠・小城勝相：「食と健康 食品の成分と機能」，p. 19-20，放送大学，東京（2006）
- 5) 中谷延二・小城勝相・菊崎泰枝：「食の科学」，p. 38-49，放送大学，東京（2005）
- 6) 小林雅裕：「食のあり方を問い直す運動ー加賀野菜とスローフード運動」，石川県農業短期大学研究報告，Vol. 32，p. 19-21（2003）
- 7) 榎本俊樹：「北陸地方の農水産物の栄養評価と加工食品への利用」，日本食品科学工学会誌，Vol. 50，No. 9，p. 379-385（2003）
- 8) 寺沢なお子・出村瑞恵・戸田桃子：「かぶらずしの糖，有機酸及び遊離アミノ酸組成」，日本食品科学工学会誌，Vol. 45，No. 2，p. 149-154（1998）
- 9) 山田耕路：「食品成分のはたらき」，p. 67，朝倉書店，東京（2005）
- 10) 柘植信昭・永川山美・野村幸弘・山本正典・杉澤公：「卵アルブミンの酵素分解によって得られるペプチドの抗酸化性について」，日本農芸化学会誌，Vol. 65，No. 11，

- p. 1635-1641 (1991)
- 11) 末綱邦男：「かつお節タンパク質のプロテアーゼ消化物からの抗酸化ペプチドの分離と
同定」, 日本水産学会誌, Vol. 65, No. 1, p. 92-96 (1999)
 - 12) 末綱邦男・受田浩之：「マイワシ筋肉ペプシン消化物からの活性酸素消去能を有するオ
クタペプチドの分離同定およびその活性」, 日本水産学会誌, Vol. 65, No. 6, p. 1096-1099
(1999)
 - 13) 道島俊英・佐渡康夫・榎本俊樹：「イシル（魚醬）に関する研究（第2報）」, 石川県工
業試験場研究報告, No. 47, p. 67-72 (1998)
 - 14) 道島俊英・佐渡康夫・矢野俊博・榎本俊樹：「速醸法によるイシル（魚醬油）の調製と
その醸造過程における成分の消長」, 日本食品科学工学会誌, Vol. 47, No. 3, p. 369-377
(2000)
 - 15) 道島俊英：「能登のイシル（魚醬油）の旨味成分と機能性」, 月刊フードケミカル, p. 38-41,
(2005-1)
 - 16) 滝田聖親・薄木理一郎：「応用食品学」, p. 86, アイ・ケイコーポレーション, 神奈川
(2004)
 - 17) 森雅央：「すしの系統と種類」, 食の科学, 5月号（通巻111号）, p. 12-16 (1987)
 - 18) 税田正幸：「カブラずし」, 食の科学, 10月号（通巻224号）, p. 2-4 (1996)
 - 19) 能都町商工会：広報のと, No. 22, p. 3-19 (2006)
 - 20) 石谷孝佑：「魚醬フォーラム in 酒田」, p. 38-43, 幸書房, 東京 (1995)
 - 21) 道島俊英・榎本俊樹・矢野俊博：「能登の魚醬油ーイシルー」, New Food Industry, Vol. 44,
No. 5, p. 1-8 (2002)
 - 22) 杉元和彦・谷辺礼子：昭和62年度石川県水産試験場事業報告, Vol. 27, p. 27-28 (1989)
 - 23) 『能登の醸し』ブランド発信事業推進委員会 HP：
<http://www.groovy-net.co.jp/ishiri/plofile02.html>
 - 24) 横山理雄・藤井健夫：「伝統食品・食文化 in 金沢」, p. 64-72, 幸書房, 東京 (1996)
 - 25) 吉沢淑・石川雄章・蓼沼誠・長澤道太郎・永見憲三：「醸造・発酵食品の事典」, p. 497-506,
朝倉書店, 東京 (2004)
 - 26) 川岸舜朗：「食品の品質劣化と活性酸素ー過酸化反応の防御・抑制と利用」, 食の科学,
p. 18-25, 光琳, 東京 (1992)
 - 27) 漆山治：「活性酸素はこうして防ぐ」, p. 39-47, 小学館, 東京 (1995)
 - 28) 大澤俊彦：「酸化ストレスの予防と食品因子」, 食品工業, Vol. 41, No. 14, p. 18-25,
光琳, 東京 (1998)
 - 29) 高野光男・横山理雄：「食品科学の基礎」, p. 25-45, 日報, 東京 (2004)
 - 30) 吉川敏一：「フリーラジカルの科学」, p. 125-198, 講談社, 東京 (1997)
 - 31) 若生豊：「抗酸化食品の有効性と評価における諸問題」, 八戸工業大学食品工学研究所
紀要, Vol. 13, p. 11-17 (2002)

- 32) 井上正康：「活性酸素と医食同源」, p.165-169, 共立出版, 東京 (1996)
- 33) S. Yamashoji・H. Yoshida・G. Kajimoto：「Prooxidative effects of Cu²⁺-amino acid complexes on the autoxidation of linoleic acid」, Agric. Biol. Chem., Vol.41, p.1947-1951 (1977)
- 34) S. Yamashoji・G. Kajimoto：「Antioxidant effect of Gly-Gly-His on Cu(II)-catalyzed autoxidation and photosensitized oxidation of lipids」, Agric. Biol. Chem., Vol. 44, p.2735-2736 (1980)
- 35) 荒井綜一監修：「機能性食品の研究」, p.137-143, 学会出版センター, 東京 (1995)
- 36) 久保田紀久枝・森光康次郎：「食品学—食品成分と機能性」, p.155, 化学同人, 東京 (2004)
- 37) 福田靖子：「調理と食品の抗酸化機能性」, 日本調理科学会誌, Vol. 34, No. 3, p.321-328 (2001)
- 38) 河村幸雄・大久保一良：「ダイズのヘルシーテクノロジー」, p.94-95, 光琳, 東京 (1998)
- 39) 久保田紀久枝・森光康次郎：「食品学—食品成分と機能性」, p.150-151, 165, 化学同人, 東京 (2003)
- 40) 寺中毅頼・江澤 真・松山 惇・海老根英雄・清澤 功：「米味噌, 麦味噌, および豆味噌抽出液のアンジオテンシン I 変換酵素抑制効果」, 日本農芸化学会誌, Vol.69, No. 9, p.1163-1169 (1995)
- 41) E. Kinoshita・J. Yamakoshi・M. Kikuchi：「Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce」, Biosci. Biotech. Biochem., Vol. 57, No. 7, p.1107-1110 (1993)
- 42) 関 英治・箴島克裕・松藤 寛・松井利郎・箴島 豊：「イワシ筋肉由来アルカリプロテアーゼ分解物からのアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの分離精製」, 日本食品工業学会誌, Vol.40, No. 11, p.783-791 (1993)
- 43) W. Tsuzuki・Y. Kikuchi・K. Shinohara・T. Suzuki：「Fluorometric assay of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of vinegars」, 日本食品工業学会誌, Vol. 39, No. 2, p.188-192 (1992)
- 44) 江藤義春・伊藤友美・西岡茂子：「乳清タンパク質のアルカリプロテアーゼ分解物中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害ジペプチド」, 日本栄養・食糧学会誌, Vol.51, No. 6, p.355-359 (1998)
- 45) 吉井 寛・城 憲秀・坂村 修・武山英麿・大庭理一郎・井谷 徹：「鶏卵由来オリゴペプチドの血圧降下作用」, 日本食品科学工学会誌, Vol.46, No. 2, p.45-50 (1999)
- 46) 吉田恵子・四十九院成子・福場博保・島村理美子・田所忠弘・前川昭男：「ブラックマッペのアンジオテンシン I 変換酵素阻害因子の検索(第2報)」, 日本栄養・食糧学会誌, Vol.52, No. 3, p.153-156 (1999)
- 47) 山口信也・大西 淳・十河政信, 丸 勇史・太田泰弘・塚田陽二：「ノニ (*Morinda citrifolia*) 果汁のアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性」, 日本食品科学工学会誌, Vol.49, No. 9,

p. 624-627 (2002)

- 48) 福井 裕・石田丈博・松田秀喜・松井利郎：「本みりんのアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性を有するペプチドについて」, 日本調理科学会誌, Vol. 38, No. 5, p. 430-434 (2005)

第 I 章 かぶらずしおよびイシルのラジカル消去活性に関する研究

第 1 節 かぶらずしのラジカル消去活性の測定

1-1. ブリ漬け汁のラジカル消去活性

目的

かぶらずしは、本漬けを行う前に前もってカブやブリを塩漬けにする。この間にも発酵が進むと考えられることから、本実験ではブリの塩漬け（下漬け）期間中のラジカル消去活性の変化について調べた。

実験方法

(1) 試料

金沢市内の漬物店から分与された、下漬けのブリ漬け汁 3 検体を試料とした。下漬けは、3 枚におろしたブリに塩をかけ、重石をのせて行った。平成 18 年 3 月に漬け始め、生じた漬け汁を 1 ヶ月ごとに採取した（4～12 月までの計 9 ヶ月分）。試料は-20℃で凍結保存し、使用直前に自然解凍して 15 分間遠心分離（10℃, 3,000 回転）した後、上澄み液を No. 2 のろ紙でろ過し、0.1M 酢酸緩衝液（pH 5.5）で適宜希釈して試料液とした。

(2) ラジカル消去活性測定

試料のラジカル消去活性を、DPPH 法を用いて測定した。

試料液 2 ml, エタノール 2 ml, 500 μM DPPH/エタノール溶液 1 ml を加え混合した。このとき試料液の代わりに、0.1M 酢酸緩衝液 2 ml を加えたものをコントロールとした。試料液を加えたものは 30 分後に、コントロールは 0 分後（混合直後）および 30 分後に、波長 517 nm における吸光度測定を行った。測定は 3 連で行い、平均値を用いた。

ラジカル消去活性は以下の式に従って算出した。

$$\frac{\text{対照の0分後の吸光度} - \text{試料30分後の吸光度}}{\text{対照30分後の吸光度}} \times 100(\%)$$

また、Trolox（6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸）について濃度とラジカル消去活性の関係を検量線に表し、試料のラジカル消去活性を Trolox の重量（μg/g）あたりに換算して示した。

実験結果および考察

結果を図 1 に示した。

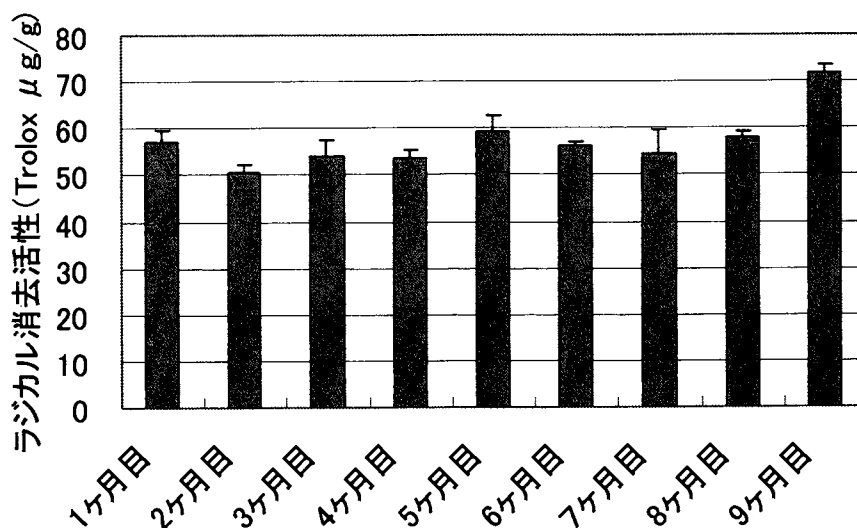


図1 かぶらずし(ブリ漬け汁)

ブリ漬け汁のラジカル消去活性は Trolox 量換算で約 $50\sim 70\ \mu\text{g/g}$ であり、1~9ヶ月の間、大きな変化は見られなかった。かぶらずし作製の際、一般的には、ブリ下漬け期間は約 2 週間である。今回の実験では、それよりも長期間下漬けを行い、生じた漬け汁について調べたが、下漬け期間におけるブリのタンパク質分解による抗酸化ペプチドの生成は少ないと考えられた。

1-2. かぶらずしのラジカル消去活性の経時変化

目的

かぶらずしは材料の下漬けを行った後、カブにブリを挟みこうじとともに重石をして漬ける。これが本漬けである。本実験では、本漬け期間中におけるかぶらずし各材料のラジカル消去活性の変化について調べた。

実験方法

(1) 試料

金沢市内の漬物店から平成 18 年に分与された、本漬けの 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 日目のかぶらずし 3 検体 (こうじについては 1 検体)、及びかぶらずしの漬け

樽に生じた漬け汁を試料とした。かぶらずしは、カブ、ブリ、こうじに分けてそれぞれラジカル消去活性を測定した。

【カブ、ブリ】

試料は凍結乾燥した後、乳鉢ですりつぶし、それぞれ0.1gを採取して0.1M酢酸緩衝液5mlを加え、超音波洗浄器で10分間抽出した。この抽出液をNo. 2のろ紙でろ過し、0.1M酢酸緩衝液を用いて適宜希釈して試料液とした。

【こうじ】

試料は凍結乾燥した後、乳鉢ですりつぶし、0.2gを採取して0.1M酢酸緩衝液10mlを加え、超音波洗浄器で10分間抽出した。抽出液を15分間遠心分離し(10℃, 3,000回転)、上澄を0.1M酢酸緩衝液で適宜希釈して試料液とした。

【かぶらずしの漬け汁】

試料は-20℃で凍結保存したものを自然解凍し、15分間遠心分離した(10℃, 3,000回転)。上澄をフィルターろ過(0.45μm)し、0.1M酢酸緩衝液で適宜希釈して試料液とした。

(2) ラジカル消去活性測定

前項と同様、DPPH法を用いた。

実験結果および考察

かぶらずし各材料のラジカル消去活性測定結果を図2~5に示した。

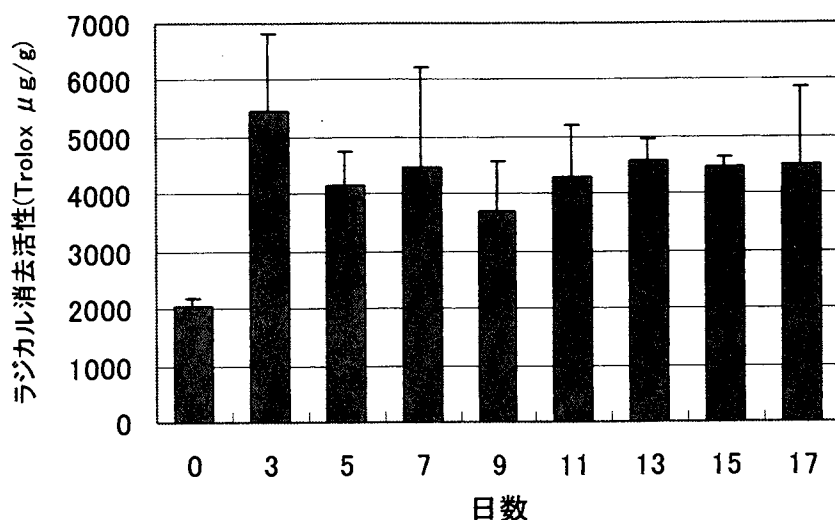


図2 かぶらずし(カブ)

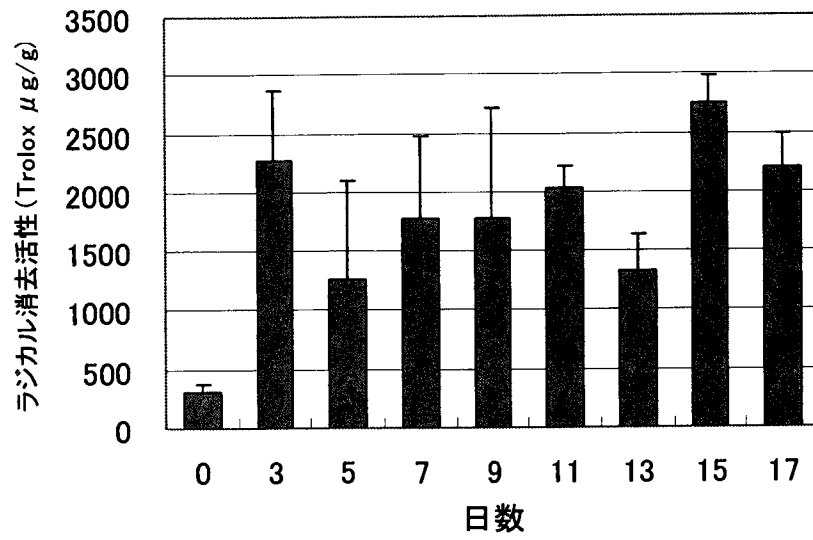


図3 かぶらずし(ブリ)

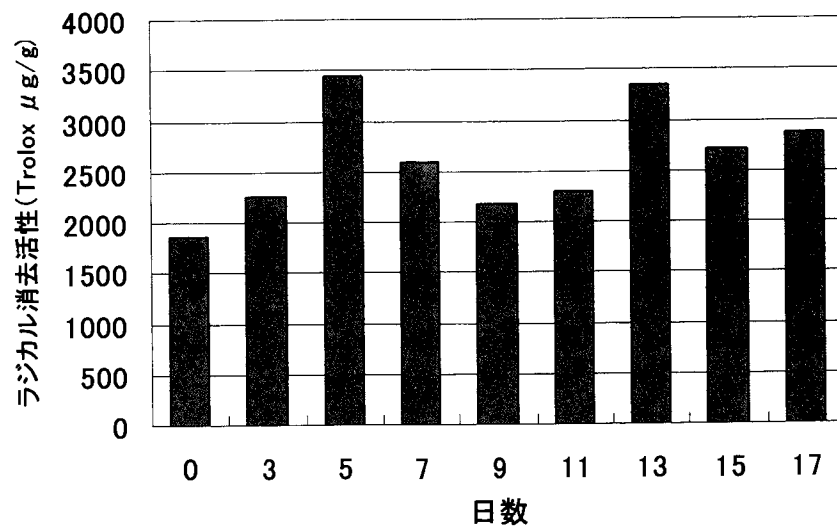


図4 かぶらずし(こうじ)

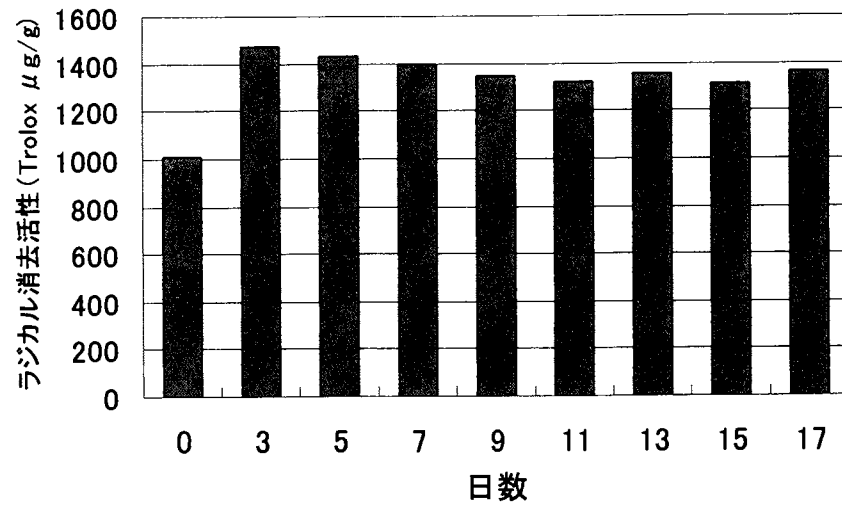


図5 かぶらずし(漬け汁)

カブ、ブリおよびこうじについては凍結乾燥試料を用いているため、生のかぶらずし材料のラジカル消去活性よりも高い値となっている。

カブのラジカル消去活性(図2)はTrolox量換算で約2,000~5,500 μg/gと非常に高い値を示した。3日目に活性が上昇し、それ以降は大きな変化が見られなかった。またブリのラジカル消去活性(図3)は約300~2,700 μg Trolox/gであり、0日目が低く3日目以降はばらつきが見られた。ブリは、部位によって脂の量や、タンパク質の量が異なる。よって個体差は大きくなり、ラジカル消去活性にもその差が現れたと考えられる。こうじのラジカル消去活性(図4)は約1,900~3,500 μg Trolox/gであり、5日目と13日目が高かったが、全体的にあまり規則性は見られなかった。かぶらずしの漬け汁(図5)は、約1,000~1,500 μg Trolox/gであり、0日目が低く、3日目以降はほぼ横ばいという結果であった。

測定したかぶらずしのカブ、ブリおよびこうじのラジカル消去活性を合計し、図6に示した。

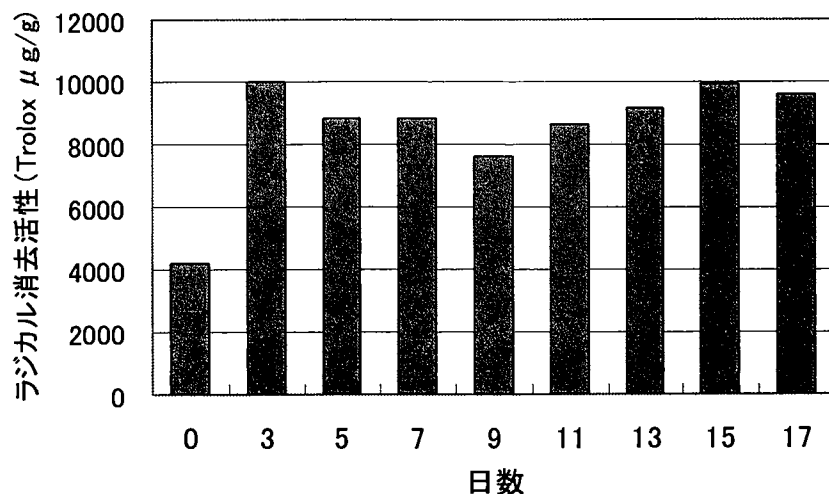


図6 かぶらずし(カブ、ブリ及びびこうじ)の経時変化

カブ、ブリおよびこうじのラジカル消去活性を合わせると約 4,200~10,000 $\mu\text{g Trolox/g}$ となり、3 日目に活性が上昇した後は大きな変化はみられなかった。荻谷ら¹⁾は、福井県若狭地方のサバなれずしは漬け込みによって全構成アミノ酸量が約 2 倍に、ペプチドは 2.2 倍に増加し、同様に遊離型アミノ酸は約 11 倍に増加したと報告している。このことから、本実験において 3 日目に活性が上昇したのは、漬け込みによってラジカル消去活性を有するアミノ酸やペプチドが増加したためと推察される。

一般にかぶらずしは本漬け期間がおおよそ 7~10 日目のものを製品とするが、今回の実験結果では 17 日目まで漬けてもラジカル消去活性に大差がなかったため、この点においては漬け込みは 7 日間程度で十分と考えられる。

1-3. 市販かぶらずしのラジカル消去活性

目的

本実験では、市販品のかぶらずしのラジカル消去活性について比較検討した。

実験方法

(1) 試料

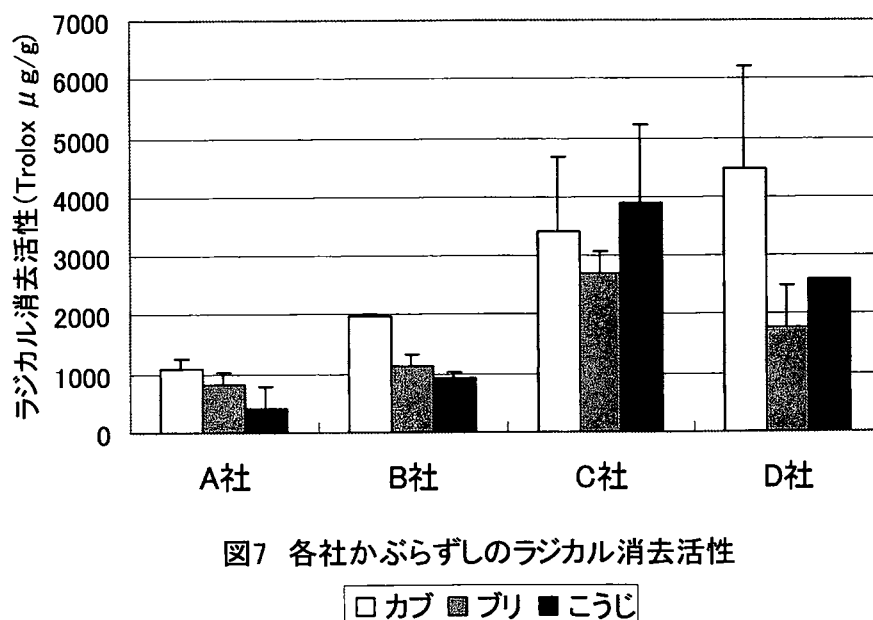
平成 17 年 11 月~12 月に、金沢市内の漬物店 4 社 (A~D 社) でかぶらずしを 3 個ずつ購入した。これをそれぞれ、カブ、ブリおよびこうじに分け、凍結乾燥して試料とした。

(2) ラジカル消去活性測定

前項と同様、DPPH法を用いた。

実験結果および考察

各社のかぶらずしのラジカル消去活性を図7に示した。



D社のラジカル消去活性は、前項で行ったかぶらずしの経時変化（図2～4）で得られた7日目の試料の結果を転載した（7日目のものを製品とするため）。

各試料は凍結乾燥しているため、生のかぶらずしよりも高い活性となっている。各社とも高いラジカル消去活性が認められ、特にC社とD社が高かった。予備実験によると、生のカブのラジカル消去活性は96.7 μg Trolox/gとあまり高くなかったことから、凍結乾燥試料であることを考慮しても、今回の結果は漬け込みにより活性が大きく上昇していることが示された。これは、どの製品も漬け込みの際にアミノ酸などの調味料が使われていることが大きく影響していると考えられる。また、A社、B社に比べてC社が高いラジカル消去活性を示したのは、原材料に酸化防止剤（ビタミンC）、甘味料（ステビア）を用いているためと考えられる。ビタミンCにラジカル消去活性があることはよく知られているが、ステビアにも抗酸化性が認められる²⁾ことが報告されている。以上より、市販のかぶらずしは調味料や添加物の有無によってもラジカル消去活性に差異があることが示された。

第2節 イシルのラジカル消去活性の測定

2-1. 市販イシルのラジカル消去活性

目的

様々な原料から製造された市販のイシルのラジカル消去活性を測定し、原料・製品による活性の違いについて検討した。

実験方法

(1) 試料

石川県内で製造・販売されている、いわしイシル 3 点（ヤマサ商事，山喜商店，ヤマト醤油）と，いかイシル 3 点（ヤマサ商事，スギヨ，潮屋），あじ・さば混合イシル（玉谷信一），メグスイシル（魚醤油料理専門店いしり亭）の計 8 点を用いた。これらの試料はそれぞれ酢酸緩衝液（pH 5.5）で適宜希釈して用いた。

(2) ラジカル消去活性測定

前項と同様，DPPH 法を用いた。なお，試料液 2 ml，エタノール 2 ml，さらに DPPH/エタノール溶液の代わりにエタノール 1 ml を加えたものを色ブランクとした。

ラジカル消去活性は以下の式に従って算出した。

$$\frac{\text{対照の0分後の吸光度} - (\text{試料30分後の吸光度} - \text{色ブランク30分後の吸光度})}{\text{対照30分後の吸光度}} \times 100 (\%)$$

(3) 吸光度測定

イシルの 500 nm における吸光度を測定した。

実験結果および考察

各イシルのラジカル消去活性を図 8 に示した。

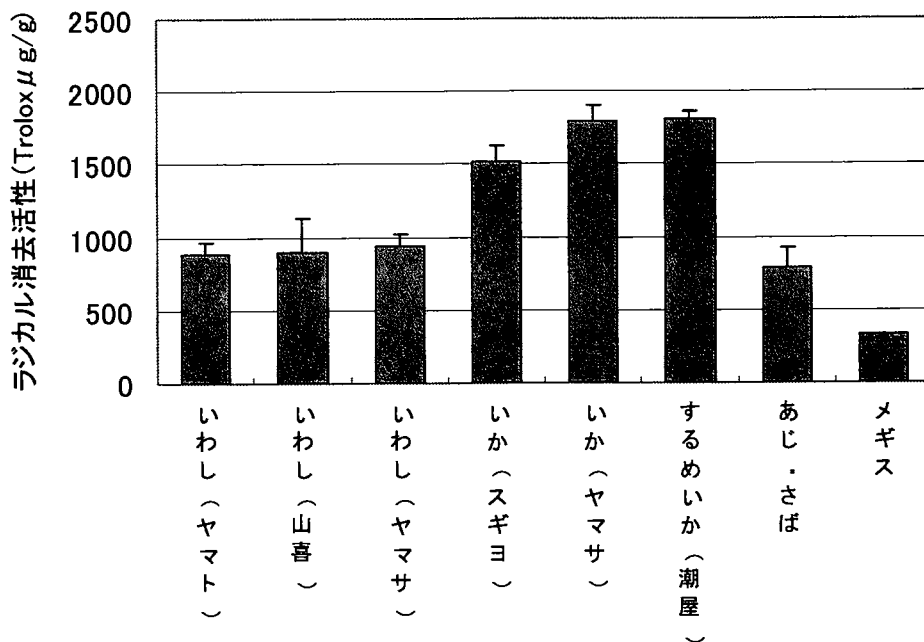


図8 各イシルのラジカル消去活性

全てのイシルについて高いラジカル消去活性が認められたが、いかイシルが Trolox 量換算で約 1,500~1,800 $\mu\text{g/g}$ と最も高かった。いわしイシルの活性は平均で約 900 $\mu\text{g Trolox/g}$ 、あじ・さば混合イシルは約 800 $\mu\text{g Trolox/g}$ であったが、メギスイシルは約 300 $\mu\text{g Trolox/g}$ と今回測定したイシルの中では最も低かった。

下橋ら³⁾は、濃口しょうゆ、薄口しょうゆ、白しょうゆの DPPH ラジカル消去活性は、それぞれ 3,000, 1,000 及び 96 nm Trolox/ml で、色の濃いしょうゆほど活性が高いと報告している。しょうゆの色素はメラノイジンであり、これは抗酸化成分である⁴⁾。メラノイジンが多いほど、すなわちイシルの色が濃いほどラジカル消去活性が高くなると考えられたため、今回使用したイシルについて吸光度 (波長 500nm) を測定し、ラジカル消去活性と比較した。結果は図 9 に示した。

製造元の異なる 3 種のおいしイシルについては吸光度に若干の差がみられたが、おいしイシル平均、いかイシル平均、あじ・さば混合イシル、メギスイシルを比較すると、着色度とラジカル消去活性に相関関係が認められた。下橋ら⁵⁾は 6 種の魚醬を用いた研究において、それらの抗酸化性と着色度は必ずしも比例関係にあるとはいえないと述べているが、今回の測定では一部を除き、比例関係が認められたといえる。従って、魚醬のラジカル消去活性にはその着色度が影響している可能性が示唆された。

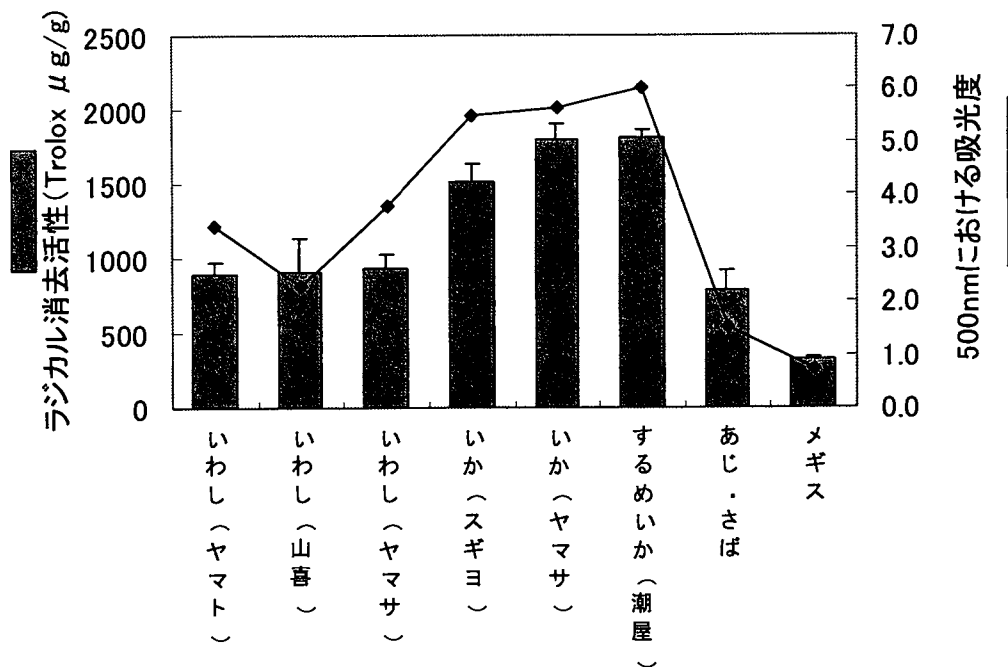


図9 イシルのラジカル消去活性と着色度との関係

2-2. イシルの加熱によるラジカル消去活性の変化

目的

イシルは加熱調理にも用いられることから、加熱の際アミノカルボニル反応が進む可能性を考慮し、イシルの加熱によるラジカル消去活性の変化について検討した。

実験方法

(1) 試料

前項と同様のイシルを用いた。これらについて、90℃以上の湯浴中でそれぞれ 10, 20, 30 分間加熱したのち急冷し、適宜希釈して試料液とした。

(2) ラジカル消去活性測定および吸光度測定

前項と同様の方法で行った。

実験結果および考察

各イシルの加熱によるラジカル消去活性の変化を、以下の図に示した (図 10~17)。なお、0 分 (未加熱) のものは前項で行った実験結果を転載した。また、今回の実験で

は、加熱時間は 30 分間までとした。これは、一般にしょうゆを使って料理を作る際、一般的に加熱時間は 30 分間程度までであるためである。

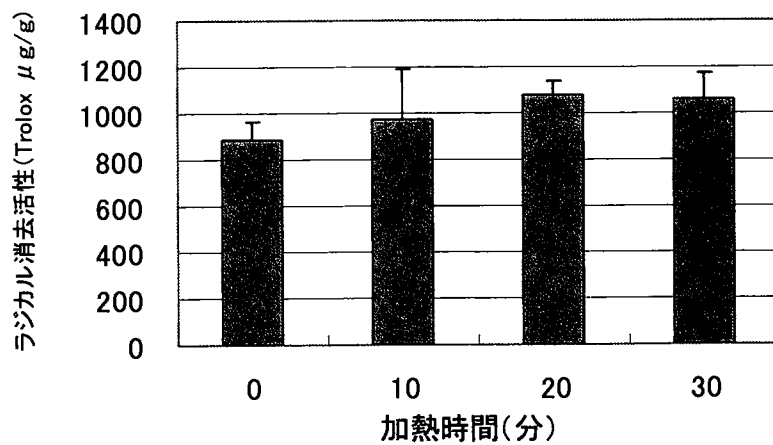


図10 いわしシル(ヤマト)

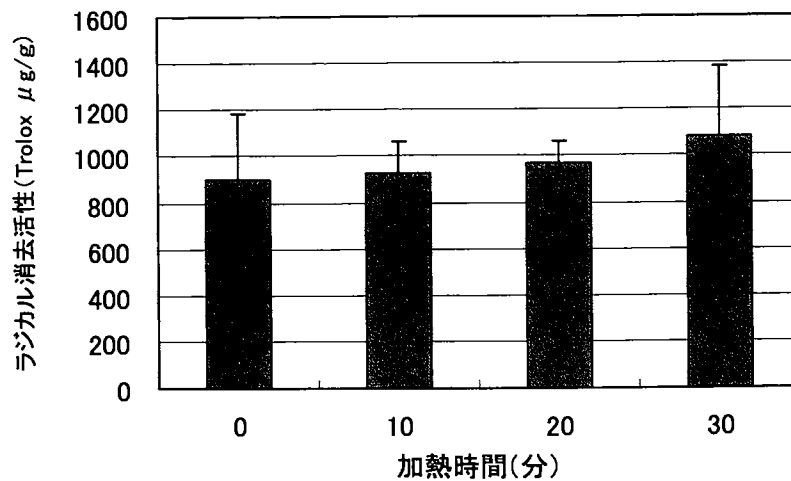


図11 いわしシル(山喜商店)

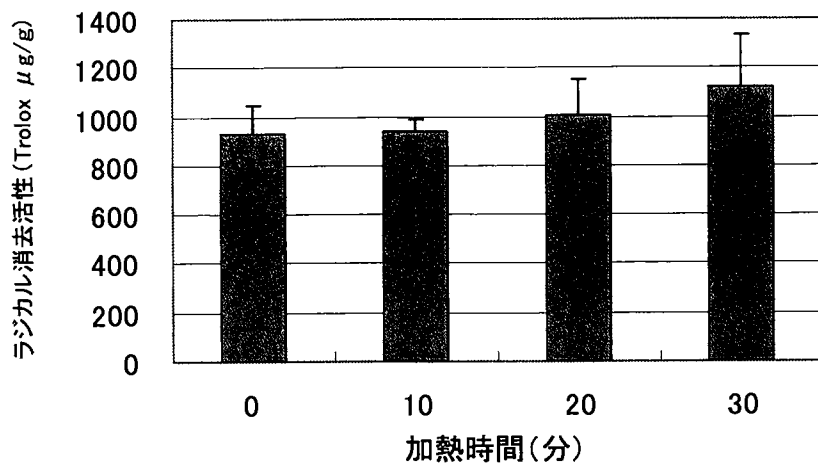


図12 いわしイシル(ヤマサ)

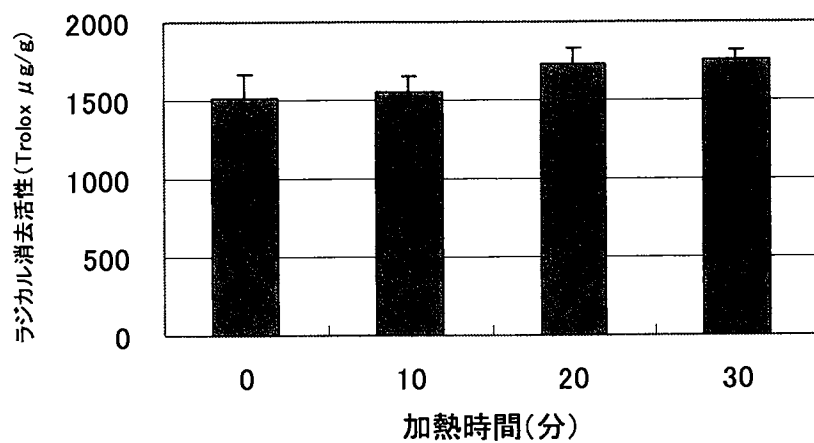


図13 いかイシル(スギヨ)

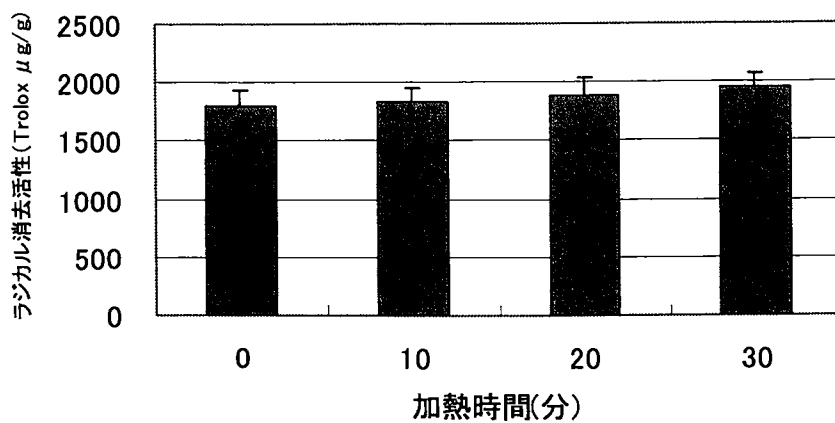


図14 いかイシル(ヤマサ)

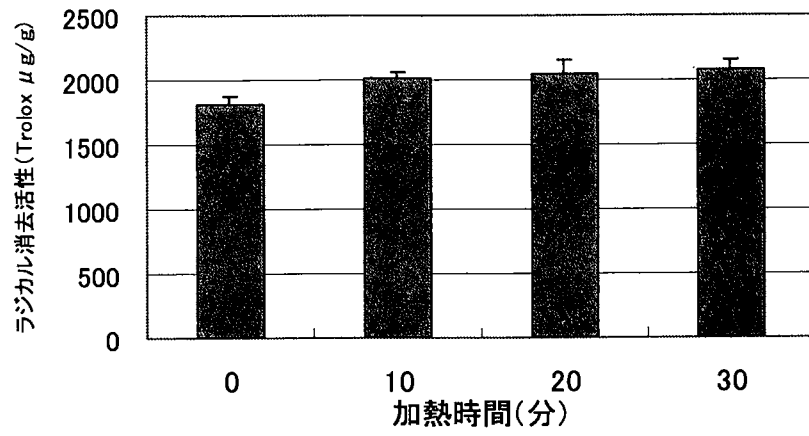


図15 するめいかイシル

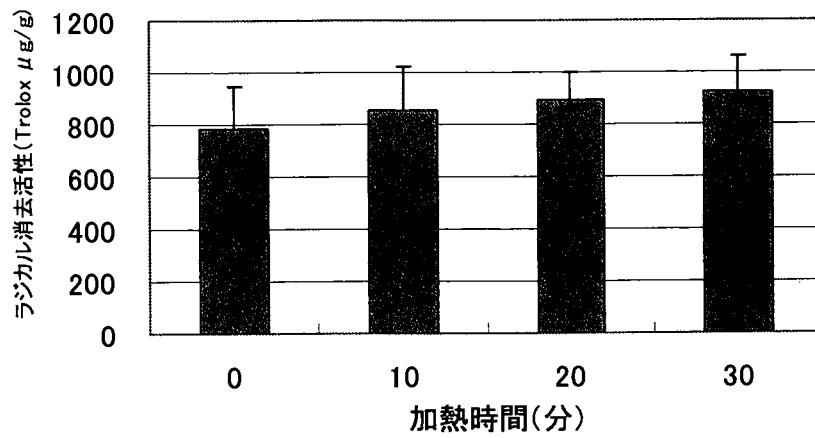


図16 あじ・さばイシル

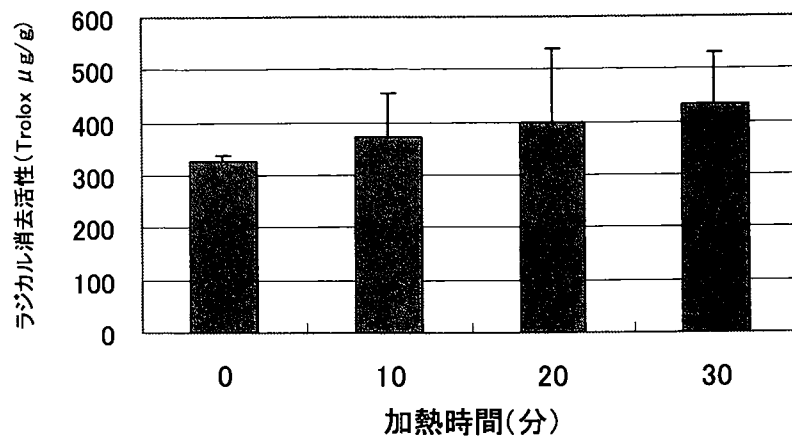


図17 メグスイシル

ほぼ全てのイシルについて、若干ではあるが、加熱時間の延長に伴ってラジカル消去活性が高くなるという結果が得られた。

しょうゆの褐変色素であるメラノイジンは、アミノカルボニル反応（メイラード反応ともいう）によって起こる。アミノカルボニル反応とは、アミノ化合物（アミノ酸、ペプチド、タンパク質など）とカルボニル化合物（単糖、グルコース、フルクトースなど）が反応して、最終的にはメラノイジンと呼ばれる着色重合物を生成する反応である⁶⁾。下橋ら⁵⁾は、アミノカルボニル反応によって生成された褐変物質は、非常に高いDPPHラジカル消去活性をもつと報告している。メラノイジンを生成させるアミノカルボニル反応は、食品の保存中あるいは加熱中に起こる。今回の実験で加熱によってラジカル消去活性が上昇したのも、アミノカルボニル反応が影響していると考えられる。

2-3. イシル中の粗タンパク質量の測定

目的

これまでイシルのラジカル消去活性や、イシルの加熱によるラジカル消去活性の変化について検討してきた。その結果、いわしイシルおよびいかイシルのラジカル消去活性は、それぞれ約900 μ g Trolox/g および約1,500~1,800 μ g Trolox/g であり、いかイシルのほうが活性が高かった。山口ら⁷⁾は、3種のしょうゆについて、その抗酸化性はしょうゆの全窒素量に比例すると報告している。また道畠ら⁸⁾は、いかイシルといわしイシルの一般成分について分析し、全窒素含有量はそれぞれ1.73~2.49 g/100ml, 1.42~2.16 g/100ml であり、いかイシルのほうがいわしイシルよりも高かったと報告している。このことから、今回用いたイシルのラジカル消去活性についても、全窒素含有量が関係していると考えられた。そこで本実験では、タンパク質の含有量をケルダール法により測定し、イシルのラジカル消去活性との関連について検討した。

実験方法

(1) 試料

前項と同様のイシルを用いた。

(2) 粗タンパク質量測定

マイクロケルダール法で行った。

①分解

分解フラスコに試料約1.5gを精秤し、さらに酸化剤（硫酸カリウム：硫酸銅=9：1）3gと濃硫酸10mlを加え、ドラフト内で吸引しながら分解台上で加熱した。最初は弱

火とし、煙が出なくなったら吸引を止め、強火にした。液が透明になってからもしばらく加熱を続けた。その後、分解液を放冷し、蒸留水約 30 ml を徐々に加えて希釈した。希釈した分解液を 100 ml メスフラスコに移し、標線まで水を加え振り混ぜ、これを試料液とした。一方、試料を入れない分解フラスコで同様の操作を行い、空試験とした。

②蒸留

100 ml に定容化した試料から 10 ml を正確に評取し、十分に空蒸留し洗浄したマイクロケルダール窒素蒸留装置に流し込み、蒸留を行った。生じたアンモニアを三角フラスコ中の N/10 硫酸溶液に吸収させた。

③滴定

流出したアンモニアによって中和された N/10 硫酸溶液の、未中和の部分を N/10 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。滴定の終点は、赤紫色→無色→緑色と変色する微緑色の点とした。空試験も同色を終点とした。

④計算方法

試料中の粗タンパク質 (%) は次式に従って算出した。

$$\text{粗タンパク質 (\%)} = \frac{0.0014 \times \{ (A - F) \times (B - F) \} \times C \times D}{S} \times 100$$

S : 試料秤取量 (g)

A : 空試験の N/10 NaOH 溶液の滴定値 (ml)

B : 本試験の N/10 NaOH 溶液の滴定値 (ml)

C : 窒素係数※

D : 希釈倍数 (100/10=10)

F : N/10 NaOH 溶液の Factor

※ 窒素係数⁹⁾

タンパク質はアミノ酸の重化合物であり、その構成元素には窒素を含むのが特徴である。これに対し、一般成分のうち、タンパク質以外、すなわち脂質、繊維、灰分、糖質はいずれも窒素を含んでいない。そこで、食品中の窒素定量値からタンパク質量を求めることができる。食品中には性質の異なるいくつかのタンパク質が存在し、その種類も食品群ごとに異なっているが、種々のタンパク質の窒素含量はほぼ一定で平均して約 16% である。そこで、タンパク質の定量は、窒素の含量を測定してその値に $100/16=6.25$ という「窒素・タンパク質換算係数」を乗ずることにより行われる。

しかしながら、食品はタンパク質以外にも各種の窒素化合物を含むことから、

食品中の窒素を定量してそのまま換算係数を乗じた場合、これらの非タンパク質態窒素化合物もすべてタンパク質として換算されてしまう。そこで、窒素量に単に換算係数を乗じて求めたタンパク質を粗タンパク質とよぶ。

タンパク質の窒素含量は平均して約 16%であるが、各食品についてその構成タンパク質が異なるため 6.25 という窒素・タンパク換算係数は必ずしも妥当な数値ではない。そこで主要な食品については正確な窒素含量が測定され、その値に基づいて換算係数が求められている。今回研究で使用したイシルは調味料及び香辛料類に含まれるため、その窒素・タンパク質換算係数を 5.71 として算出した¹⁰⁾。

実験結果および考察

ケルダール法により測定した、各イシルの粗タンパク質量 (%) を表 1 に示した。また、各イシルのラジカル消去活性と粗タンパク質量の関係を図 18 に示した。

表 1 粗タンパク質量 (%)

試料	粗タンパク質 (%)
いわし(ヤマト)	8.92±0.08
いわし(山喜)	9.71±0.04
いわし(ヤマサ)	10.73±0.02
いか(スギヨ)	10.99±0.09
いか(ヤマサ)	9.87±0.03
するめいか(潮屋)	10.61±0.03
あじ・さば	11.50±0.02
メギス	5.61±0.17

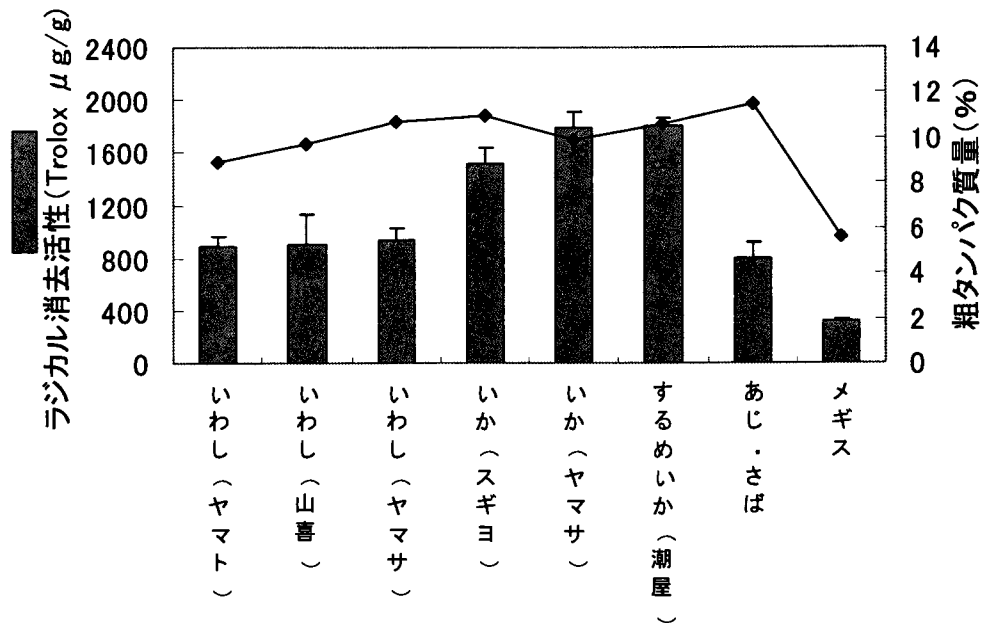


図18 イシルのラジカル消去活性と粗タンパク質量の関係

いかイシルの粗タンパク質量は約 9.9~11.0%, いわしイシルは約 8.9~10.7%であり, いかイシルの方がいわしイシルよりも若干粗タンパク質量が多かった。道畠ら⁸⁾によると, いかイシルといわしイシルの一般成分の分析結果において, 全窒素含有量はそれぞれ 1.73~2.49 g/100ml, 1.42~2.16 g/100ml であり, いかイシルのほうがいわしイシルよりも高かった。今回の結果はこれと同様の傾向が得られた。

また, 各イシルのラジカル消去活性 (図 8 を転載) と粗タンパク質量を比較すると (図 18), いわしイシルのラジカル消去活性はヤマサ, 山喜, ヤマトの順に高く, 粗タンパク質量も同様の順で高かった。また, メギスイシルのラジカル消去活性は約 300 $\mu\text{g Trolox/g}$ と最も低く, 粗タンパク質量も同様に低かった。一方, いかイシル (ヤマサ) はラジカル消去活性が高いにもかかわらず, 粗タンパク質量はやや少なかった。これはいかイシル (ヤマサ) の原材料に米や麦が含まれていたため, 他のいかイシルよりタンパク質量が少なかった可能性が考えられる。一方, 米などの植物は, 外界からのストレスから身を守るために活性酸素消去物質などの防御システムを発達させている。米は γ -オリザノールなど多くの抗酸化物質を含んでおり¹¹⁾, それがいかにイシル (ヤマサ) のラジカル消去活性を増大させた可能性も考えられる。また逆に, あじ・さば混合イシルは粗タンパク質量が多いにも関わらず, ラジカル消去活性は低かった。あじ・さば混合イシルの吸光度はいかにイシルやいわしイシルより低かったため (図 9), その点では合致した結果といえる。また, タンパク質は発酵の際, 自己消化酵素など

によってペプチドやアミノ酸に分解される¹²⁾。いわしに含まれるペプチドに抗酸化性があるという報告¹³⁾はみられるが、あじやさばでは報告がない。したがって、あじ・さば混合イシルのラジカル消去活性が低かったのは、あじ・さば混合イシルに含まれるペプチドやアミノ酸がラジカル消去活性を示すものではなかった可能性も考えられる。

本実験により、粗タンパク質量とラジカル消去活性は必ずしも相関関係にあるとはいえないことが示された。また、発酵食品でもその原材料によりラジカル消去活性の発現には差異があることが示唆された。

総括

従来、食品の特性は、栄養に関わる一次機能と感覚に関わる二次機能に大別されてきたが、近年はさらに、食事による生活習慣病の予防や健康維持などがクローズアップされ、食品の生態調節機能（三次機能）としての働きが注目されるようになってきている¹⁴⁾。

本研究では、北陸地方の発酵食品であるかぶらずしとイシルのラジカル消去活性について検討した。かぶらずしについては、発酵初期段階においてラジカル消去活性が高くなることがわかった。また、全体的に予想以上に高い活性が認められたが、これはアミノ酸などの調味料や添加物を使用している影響もあると考えられる。今後は、そういった物質を除いた試料、例えば自家製のかぶらずしを試料とし、かぶらずしの自己発酵に伴うラジカル消去活性の変化を検討することが必要である。一方、イシルについては、ラジカル消去活性と吸光度に概ね正の相関があることが示唆され、イシルの発酵過程や調理における加熱時にラジカル消去活性物質である褐成色素メラノイジンが生成されることが活性に大きく影響していると考えられた。また、発酵中にタンパク質がアミノ酸やペプチドに分解されることもラジカル消去活性を増大させる要因のひとつであることが示唆された。今後は、かぶらずしやイシルのラジカル消去活性に関わるペプチドの解明を進めたい。

引用文献および参考文献

- 1) 荻谷泰弘, 木内律子, 三上尚美, 土井下仁美, 小玉健吉:「福井県若狭地方のサバなれずしの特徴」, 日本栄養・食糧学会誌 Vol.43 No.1 p.43-48 1990年
- 2) 佐藤実, 滝浪哲郎, 塩崎一弘ら他:「ステビア抽出物の抗酸化成分」, 和漢医薬学会大会要旨集 Vol.16 p.171 1999年
- 3) 下橋淳子, 寺田和子:「果実のラジカル消去能と食品の加熱および褐変化によるラジカ

- ル消去能への影響」, 駒澤女子短期大学 研究紀要 第36号 p.1-6 2003年
- 4) しょうゆ情報センター:「しょうゆを科学する SOY SAUSE SCIENTIFIC REPORTS」, p.12-13 2004年
 - 5) 下橋淳子:「褐変物質の DPPH ラジカル消去能」, 駒澤女子短期大学 研究紀要 第37号 p.17-22 2004年
 - 6) 花田朋美, 中村アツコ:「アミノカルボニル反応による着色度の評価に対する測色計と色素計の利用と比較」, 東京家政学院大学紀要 第44号 p.1-4 2004年
 - 7) 山口直彦:「ペプチドの抗酸化性」, New Food Industry Vol.31 No.8 p.18-22 1999年
 - 8) 道島俊英, 佐渡康夫, 矢野俊博, 榎本俊樹:「イシル(魚醤油)のアミノ酸, オリゴペプチド, 有機酸, 核酸関連物質」, 日本食品科学工学会誌 第47巻 第3号 p.241-248 2000年
 - 9) 松本清:「食品分析学 機器分析から応用まで」, 株式会社培風館, 東京 p.10-11 2006年
 - 10) 財団法人日本食品分析センター:「分析実務者が書いた 五訂 日本食品標準成分表 分析マニュアルの解説」, 中央法規, 東京 p.30-31 2004年
 - 11) 秋山美展:「米の活性酸素消去活性とその相乗作用」, 化学と生物 Vol.42 No.6 p.416-421 2004年
 - 12) 野白喜久雄, 小崎道雄, 好井久雄:「醸造学」, 講談社, 東京 p.195 1992年
 - 13) 末綱邦男, 受田浩之:「マイワシ筋肉ペプシン消化物からの活性酸素消去能を有するオクトペプチドの分離同定およびその活性」, 日本水産学会誌 Vol.65 No.6 p.1096-1099 1999年
 - 14) 久保田紀久枝, 森光康次郎:「スタンダード栄養・食物シリーズ 5 食品学—食品成分と機能性」, p.3 2003年

第Ⅱ章 かぶらずしのアンギオテンシン変換酵素阻害活性に関する研究

目的

アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性は、これまでにイシルにおいて認められたとの報告¹⁾はみられるが、かぶらずしについては見当たらない。そこで本研究では、かぶらずしの ACE 阻害活性について、市販および製造過程の製品を試料として検討した。

実験方法

(1) 試料

試料は、石川県内で購入したかぶらずし 4 検体 (A~D 社) と、D 社のかぶらずし本漬け段階の上層液 (本漬け汁, 0 日目及び 7 日目) を用いた。かぶらずしは、カブ、ブリ及び麴に分けてそれぞれ凍結乾燥し、試料とした。また、本漬け汁は、-20℃で凍結保存したものを自然解凍した後、遠心分離 (6,000 rpm, 25℃, 15 分間) し、0.45 μm のフィルターで濾過した。各試料は、ホウ酸緩衝液で適宜希釈して用いた。

(2) ACE 阻害活性測定²⁾

ACE 阻害活性は、福井らの方法³⁾を改変して行った。

試料 50 μl に、6mM ヒプリル-L-ヒスチジル-L-ロイシン溶液 (1M 塩化ナトリウム含有 125mM ホウ酸緩衝液 pH 8.3 に溶解したもの) 150 μl を混合し、37℃で 5 分間プレインキュベートした後、100 mUnit/ml ACE 溶液 (ホウ酸緩衝液で溶解したもの) 50 μl 添加し、37℃で 1 時間反応させた。1N 塩酸を 250 μl 加え反応を停止した後、酢酸エチル 1 ml を加え、ACE が基質から遊離した馬尿酸を抽出した。これを遠心分離 (10,000 rpm, 3℃, 3 分間) した後、上層 600 μl を分取し、エバポレーターで乾固した。さらに、デシケーター内で 10 分間静置後、1M 塩化ナトリウム溶液 3 ml を加えて攪拌溶解し、228 nm で吸光度を測定した。同時に、試料の代わりにホウ酸緩衝液 50 μl を用いて同様に操作を行い、これをコントロールとした。また、試料及びコントロールそれぞれについて基質を加える前に 1N 塩酸を加えて酵素を失活させた後、同様に操作を行い、測定した吸光度をそれぞれのブランク値とした。

ACE 阻害活性は以下の式によって求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (E_s - E_{SB}) / (E_c - E_{CB})\} \times 100$$

E_s : 試料を用いた場合の吸光値

E_{SB} : 試料を用いた場合のブランク値

E_c : コントロールの吸光値

E_{CB} : コントロールのブランク値

結果は、ACE 阻害率 50%を示す試料濃度である IC₅₀ で表した。

結果および考察

各社かぶらずし材料における ACE 阻害活性を図 1 に示した。カブ、ブリ、麴を比較した結果、B、C、D 社についてはブリに比較的高い ACE 阻害活性 (約 100~200 mg/ml) が認められた。

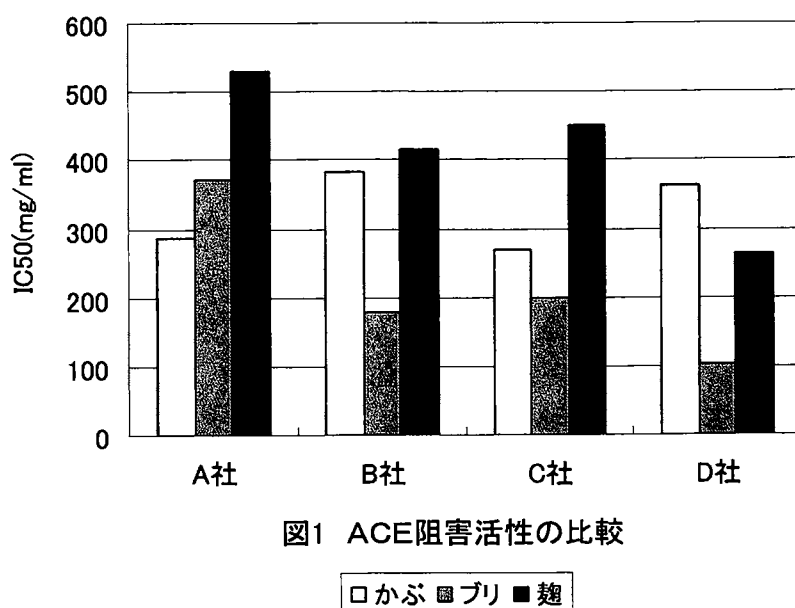


図1 ACE阻害活性の比較

□かぶ ▨ブリ ■麴

また、本漬け段階における上層液 (本漬け汁) の ACE 阻害活性を図 2 に示した。本漬け 0 日目では IC₅₀ が 660 mg/ml, 7 日目では 520 mg/ml と, 図 1 の各材料別の活性と比べると低かったが, 日数の経過とともに活性が上昇した。

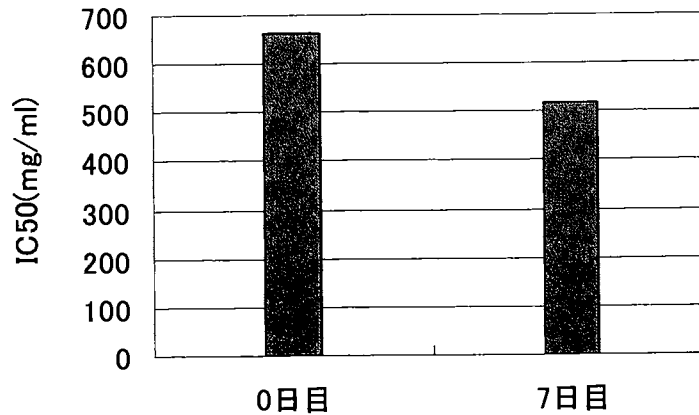


図2 ACE阻害活性の経時変化(本漬け汁)

各種食品の ACE 阻害活性 (IC₅₀) は、乾燥熟成味噌および乾燥未熟成味噌で平均約 2.0 mg/ml 及び約 1.7 mg/ml⁴⁾、鶏卵由来オリゴペプチド粉末では 1.22 mg/ml⁵⁾、本みりん原液では 97.1 mg/ml⁶⁾、ノニ市販果汁では産地により約 5~60 μl/ml⁷⁾ と報告されており、これらと比較すると今回用いたかぶらずしは、D 社のブリ部分の活性が本みりん原液と同程度であった。しかし全体的にかぶらずしの活性はそれほど高くなかった。

ACE 阻害活性を示す成分については様々な食品で調べられており、ペプチドでは乳性タンパク質から Phe-Leu (IC₅₀ 16.0 μM)、Val-Tyr (IC₅₀ 17.7 μM)、Ile-Leu (IC₅₀ 21.2 μM)、Val-Phe (IC₅₀ 55.5 μM) が単離されている⁸⁾。Val-Tyr はイワシ筋肉、人乳カゼイン、ニンニク、清酒からも単離されており、これらの IC₅₀ は 2.7~11.0 μM⁸⁾、また Val-Phe はイワシ筋肉アルカリプロテアーゼ分解物からも単離されており、IC₅₀ が約 50 μM⁸⁾ と報告されている。また本みりん原液からも、Gly-Tyr, Ala-Tyr, Val-Tyr, Gly-Phe などが単離されている⁶⁾。一方、米糠⁴⁾ やブラックマッペ⁹⁾ の ACE 阻害物質としてはフィチン酸が明らかになっている。

本研究で用いたかぶらずしの ACE 阻害活性はそれほど高くなかったが、発酵に伴い活性が上昇した。これはブリのタンパク質の分解によるものと考えられる。今後は、ブリの ACE 阻害活性物質について詳細な検討を行う予定である。

引用文献および参考文献

- 1) 道嶋俊英:「能登のイシル(魚醤油)の旨味成分と機能性」, 月刊フードケミカル, p. 38-41, (2005-1)
- 2) 篠原和毅・鈴木健夫・上野川修一:「食品機能研究法」, p. 109-112, 光琳, 東京 (2000)
- 3) 福井 裕・石田丈博・松田秀喜・松井利郎:「本みりんのアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性を有するペプチドについて」, 日本調理科学会誌, Vol. 38, No. 5, p. 430-434 (2005)
- 4) 寺中毅頼・江澤 真・松山 惇・海老根英雄・清澤 功:「米味噌, 麦味噌, および豆味噌抽出液のアンジオテンシン I 変換酵素抑制効果」, 日本農芸化学会誌, Vol. 69, No. 9, p. 1163-1169 (1995)
- 5) 吉井 寛・城 憲秀・坂村 修・武山英麿・大庭理一郎・井谷 徹:「鶏卵由来オリゴペプチドの血圧降下作用」, 日本食品科学工学会誌, Vol. 46, No. 2, p. 45-50 (1999)
- 6) 福井 裕・石田丈博・松田秀喜・松井利郎:「本みりんのアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性を有するペプチドについて」, 日本調理科学会誌, Vol. 38, No. 5, p. 430-434 (2005)
- 7) 山口信也・大西 淳・十河政信, 丸 勇史・太田泰弘・塚田陽二:「ノニ (*Morinda citrifolia*) 果汁のアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性」, 日本食品科学工学会誌, Vol. 49, No. 9, p. 624-627 (2002)
- 8) 江藤義春・伊藤友美・西岡茂子:「乳清タンパク質のアルカリプロテアーゼ分解物中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害ジペプチド」, 日本栄養・食糧学会誌, Vol. 51, No. 6, p. 355-359 (1998)
- 9) 吉田恵子・四十九院成子・福場博保・島村理美子・田所忠弘・前川昭男:「ブラックマッペのアンジオテンシン I 変換酵素阻害因子の検索 (第 2 報)」, 日本栄養・食糧学会誌, Vol. 52, No. 3, p. 153-156 (1999)

第三章 イシルのラジカル消去活性成分の検索

第1節 各種イシルのラジカル消去活性の比較

目的

第I章により、イシルがラジカル消去活性を有することが明らかになったため、本実験では最も活性の高いイシルを選択することを目的とし、再度各種イシルのラジカル消去活性の比較を行った。

実験方法

(1) 試料

試料は、石川県内で製造・販売されているイカイシル3点(SQ-1~SQ-3)、イワシイシル3点(SA-1~SA-3)とした(表1)。各試料は、0.1M酢酸緩衝液(pH 5.5)で適宜希釈し試料液とした。

表1:イシルの原材料名

	試料名	原材料名(商品記載事項)	製造者(所在地)
イカイシル	SQ-1	イカ, 米, 麦, 食塩 *米および麦は米麴としてイカ重量の0.25%添加	ヤマサ商事 (鳳至郡能登町)
	SQ-2	イカ, 食塩	スギヨ (七尾市府中町)
	SQ-3	スルメイカ, 粉碎塩	宮商【潮屋】 (金沢市西金沢)
イワシイシル	SA-1	イワシ, 食塩	ヤマサ商事 (鳳至郡能登町)
	SA-2	イワシ, 食塩	ヤマト醤油味噌 (金沢市大野町)
	SA-3	イワシ, 食塩	山喜商店 (輪島市水守町)

(2) ラジカル消去活性測定

本実験でのDPPHラジカル消去活性測定は、長島ら¹⁾の方法を改変して行った。

すなわち、試料液2ml, エタノール2ml, 500 μ M DPPH/エタノール溶液1mlを試験管中で混合し反応液とした。反応液調製直後(0分後)と30分後に517nmで吸

光度測定を行い、DPPH ラジカルの減少に伴う吸光度の減少量と、コントロール（試料液の代わりに 0.1M 酢酸緩衝液加えたもの）の値から、ラジカル消去活性を算出した。また、試料液の色が測定結果に与える影響を考慮し、500 μM DPPH/エタノール溶液の代わりにエタノールを加えて混合したものを色ブランクとした。測定はいずれも 3 連で行い、平均値を用いた。ラジカル消去活性は以下の式に従い算出した。

$$\frac{(\text{コントロール0分後のO.D.}) - \{ (\text{試料30分後のO.D.}) - (\text{試料の色ブランク30分後のO.D.}) \}}{(\text{コントロール30分後のO.D.})} \times 100(\%)$$

色ブランクを用いなかった試料については以下の式に従って算出した。

$$\frac{(\text{コントロール 0分後の O.D.}) - (\text{試料 30分後の O.D.})}{(\text{コントロール 30分後の O.D.})} \times 100 (\%)$$

また、第 I 章と同様、DPPH ラジカル消去活性測定により算出された活性値は Trolox 相当量に換算して表した。

結果および考察

図 1 に、イシルのラジカル消去活性を示した。イカイシル SQ-1~SQ-3 が約 1,500 ~1,650 μg Trolox/g, イワシイシル SA-1~SA-3 が 900~1,100 μg Trolox/g と非常に高いラジカル消去活性が確認された。また、いずれの試料もイカイシルの方が高い抗酸化性を示した。山口ら²⁾は、3 種の醤油における抗酸化性を比較し、抗酸化性は全窒素量に比例すると報告している。道畠ら³⁾によれば、イカイシルの全窒素含量は 1.73 ~2.49 g/100ml, イワシイシルでは 1.42~2.16 g/100ml であり、総遊離アミノ酸量においても、イカイシルでは 7,307~10,202 mg/100ml, イワシイシルでは 5,660~9,648 mg/100ml といずれもイカイシルの方がイワシイシルに比べて高いことを示している。

これらのことから、醤油と同様に、イシルにおいてもタンパク質分解物が抗酸化性に関与していると考えられる。

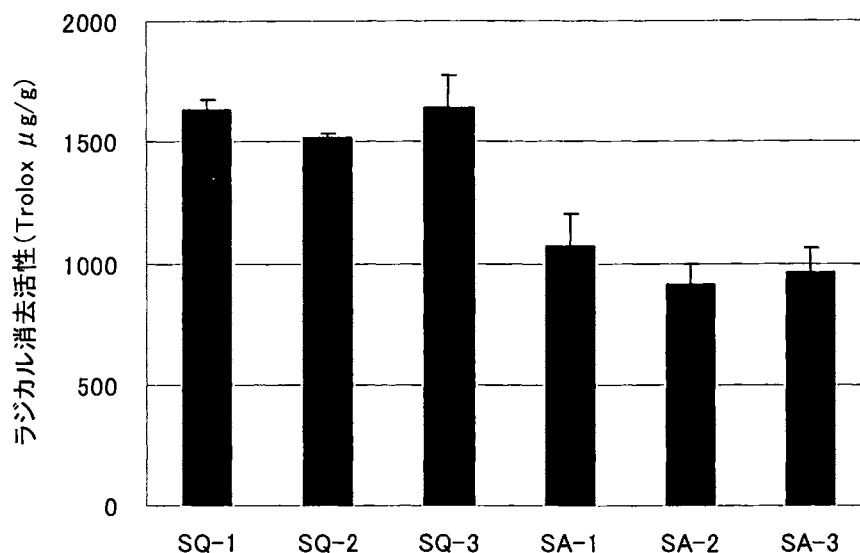


図1: イシルのDPPHラジカル消去活性

第2節 イシル中のラジカル消去活性成分の分離・精製⁴⁾

目的

イシルのラジカル消去活性成分が、発酵に伴うタンパク質分解によって生成するペプチドである可能性が考えられたため、本実験ではイシルを分画し、活性の高いペプチド画分を得ることを目的とした。

実験方法

(1) 試料⁵⁾

試料は、第1節において高いラジカル消去活性を示したイカイシル SQ-1 (pH 5.0) を用いた。イシル 120 ml を遠心分離 (6,000 rpm, 25°C, 30 分間) し、その上澄液 3 容量に対してエタノール 7 容量の割合で混合した。混合液を遮光密閉し、冷蔵庫中 (8°C) で 22 時間静置後、遠心分離 (10,000 rpm, 3°C, 30 分間) を行った。その上澄液を No. 5B の濾紙で濾過し、イカイシル 70%エタノール抽出液を得た (図 2)。

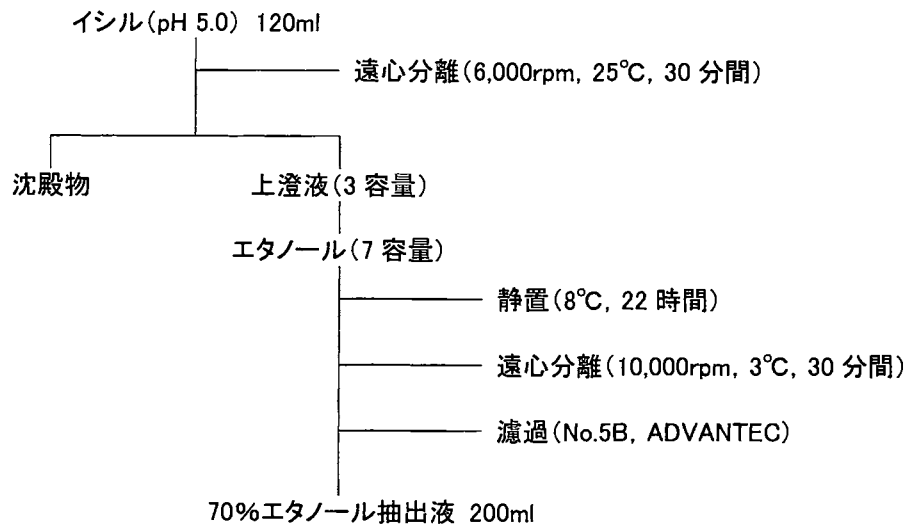


図 2: 70%エタノール抽出方法

(2) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離^{6, 7)}

イカイシル 70%エタノール抽出液 200 ml をロータリーエバポレーターを用いて 20 ml に濃縮し、0.45 μ m のフィルター (DISMIC-25) で濾過後、その 2 ml を Sephadex LH-20 カラム (ϕ 2.70 cm \times 80.0 cm) に共した。溶出条件は、移動相: 70%エタノール溶液、流速: 0.7 ml/min、検出波長: 220 nm 及び 500 nm、分画: 6.0 ml とした。分画はフラクションコレクターで行った。また、分子量マーカーには、Insulin (分子量=3,076, Sigma 社) を用いた。

(3) ラジカル消去活性測定

得られた各フラクションのラジカル消去活性について、DPPH ラジカル消去活性測定法を一部変更して行った。すなわち、各フラクションからそれぞれ 0.2 ml を分取し、70%エタノール溶液で 10 倍希釈したものを試料液とした。試薬最終濃度が 50%エタノール溶液になるように、試料液 (2 ml) にあらかじめ混合しておいた 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) と 30%エタノール溶液 (2 ml) を添加後、常法に従い測定した。

結果および考察

イカイシル 70%エタノール抽出液のラジカル消去活性は、Trolox 相当量で 2,930 μ g/g となり、イカイシル本体の約 1.8 倍の抗酸化性を示した。

図 3, 4 に、ゲル濾過パターン (Abs. 220 nm 及び Abs. 500 nm) とラジカル消去活性を示した。その結果、溶出量 198 ml 付近 (F-33) 及び 366 ml 付近 (F-61) に高い

活性が認められた。各フラクションのラジカル消去活性は、F-33 (収量: 約 13 mg) では約 43,000 $\mu\text{g Trolox/g}$, F-61 (収量: 約 13 mg) では約 21,000 $\mu\text{g Trolox/g}$ であった。いずれのフラクションも分子量 3,076 以下の低分子量画分であった。Kawashima ら⁸⁾は、ゼラチンの加水分解物について抗酸化性を測定し、分子量 2,000 程度のペプチドが強い効力を示したと報告している。また、山口⁹⁾は、大豆タンパク質のプロテアーゼ分解物において分子量 2,500~3,000 のペプチド画分に高い抗酸化性の存在を報告した。これらのことから、イシルにおいても低分子量画分に強い抗酸化性成分の存在が示唆される。

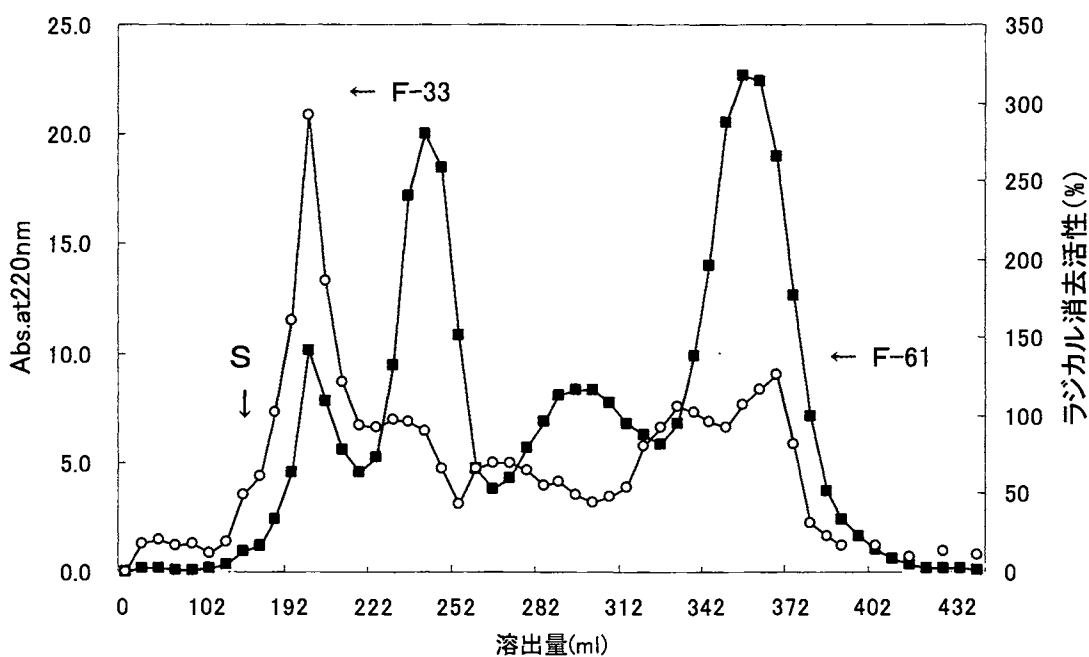


図3: Abs.220nmにおけるゲル濾過パターンとラジカル消去活性
 ■— Abs.220nm ○— ラジカル消去能(%) S: Insulin (MW=3.076)

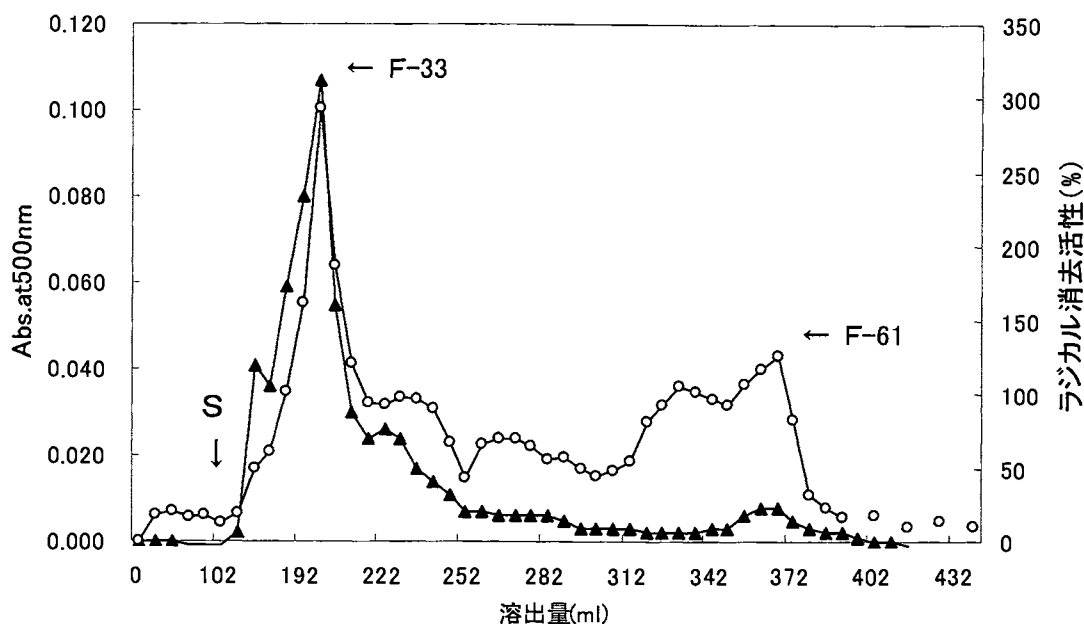


図4: Abs.500nmにおけるゲル濾過パターンとラジカル消去活性
 ▲ Abs.500nm ○ ラジカル消去能(%) S: Insulin (MW=3.076)

一方、溶出量 150 ml 付近より分画液に褐変の影響が見られ、F-33において Abs. 500 nm がもっとも高い値を示した。一般に、食品において加工貯蔵あるいは調理過程で成分間反応が起こり、食品が褐変する場合がある。これは、主に食品中のアミノ化合物（遊離アミノ酸、ペプチド、タンパク質、アミン類、アンモニア等）とカルボニル化合物（還元糖、アルデヒド、ケトン等）が化学反応を起こすことによるもので、アミノカルボニル反応（またはメイラード反応）と呼ばれる^{10, 11)}。アミノカルボニル反応は、初期、中間、後期の三段階に分けて考えられ、初期段階では、アミノ基とカルボニル基が縮合結合し窒素配糖体を生成する。その後、窒素配糖体の二重結合が転位（アマドリ転位）してアマドリ転位生成物と呼ばれるアミノレダクトンやアミノケトンを生成する。中間段階においては、アマドリ転位生成物は脱水、酸化、脱アミノ反応等によりグルコソンやフルフラール等の反応性の強いカルボニル化合物を生成する。終期段階では、カルボニル化合物がアミノ化合物と重合反応をし、褐色色素メラノイジンを生成する¹²⁾。イシルにおいても、成分中にアミノ酸や還元糖の存在が確認されており³⁾、また本実験で用いたイカイシル (pH 5.0) は、アミノカルボニル反応の活性条件である pH 3~8 の範囲¹³⁾に存在することから、褐色色素メラノイジンが生成されたと考えられる。Franke ら¹⁴⁾は、Glc-Gly 系等のメラノイジンをマーガリンに加えると

抗酸化能が向上することを明らかにした。また、山口¹⁵⁾は、スクロースの代わりにグルコースを使ったクッキーは褐変とともに抗酸化性が著しく増大することを報告した。さらに、下橋ら^{16, 17)}によると、グルコースとグリシンによるアミノカルボニル反応を行ったところ、着色度を示す吸光度と抗酸化性には非常に高い正の相関関係が認められた。これらのことから、F-33 では、イシル製造過程で生成された褐色色素メラノイジンがラジカル消去活性に寄与したと考えられる。

一方、F-61 では Abs. 220 nm が比較的高く、褐色物質メラノイジン以外の窒素化合物が多く溶出したと考えられる。すなわち、F-61 においては、メラノイジンの他にもラジカル消去活性に寄与する低分子窒素化合物が多く含まれると考えられる。

以下、本実験で高いラジカル消去活性を示した F-33 及び F-61 を用いて、活性成分の精製を進めた。

第3節 逆相クロマトグラフィーによる分離・精製^{18, 19, 20)}

目的

逆相クロマトグラフィーは、疎水性のアルキル基を導入したものを固定相として含水性有機溶媒で溶出する方法である。固定相の極性が移動相の極性より小さいため、逆相クロマトグラフィーと呼ばれる。固定相と移動相との結合は、その成分間にはたらく疎水性相互作用で行われ、試料の疎水度が強いほど結合が強く遅れて溶出される。

本実験では、ゲル濾過クロマトグラフィーで高いラジカル消去活性を示した F-33 及び F-61 を、逆相 HPLC でグラジエント溶出し、ピークフラクションごとに分画を行った。

実験方法

F-33 及び F-61 をロータリーエバポレーターで乾固後、0.1% TFA (Trifluoro acetic acid) 水溶液 1 ml を添加し、超音波洗浄器で 10 分間溶解した。溶解した各フラクションは、0.45 μ m のフィルターで濾過後、HPLC に供した。条件は、カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (ϕ 4.60 mm \times 250 mm), 移動相: A 液 - 0.1% TFA 水溶液, B 液 - 0.1% TFA アセトニトリル溶液, 100%A 液 (5 分間) \rightarrow 50%A 液 (135 分後) のグラジエント溶出, 流速: 0.8 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出波長: 220 nm, 分画: ピークフラクション毎, 検出器: 島津 SPD-2A 紫外分光光度計, ポンプ: 島津 LC-9A, データ処理: 島津クロマトパック C-R5A とした。

分画したフラクションはロータリーエバポレーターで乾固後、50%エタノール溶液 1 ml を添加し、超音波洗浄器で 10 分間溶解した。

溶解した各フラクションのラジカル消去活性測定方法は、第 2 節と同様とした。

結果

F-33 の HPLC パターンを図 5 に示した。33-A (保持時間: 約 30 分), 33-B (保持時間: 約 43 分) 及び 33-C (保持時間: 約 45 分) に高いラジカル消去活性が認められた。同様に, F-61 (図 6) では, 61-A (保持時間: 約 7 分) に高いラジカル消去活性が認められた。各フラクションは, 約 16,000~22,000 $\mu\text{g Trolox/g}$ と非常に高い活性が認められた (図 7)。これは, イカイシル本体の 10~13 倍に相当する活性であった。

また, 表 2 に各ピークフラクションの収量を示した。

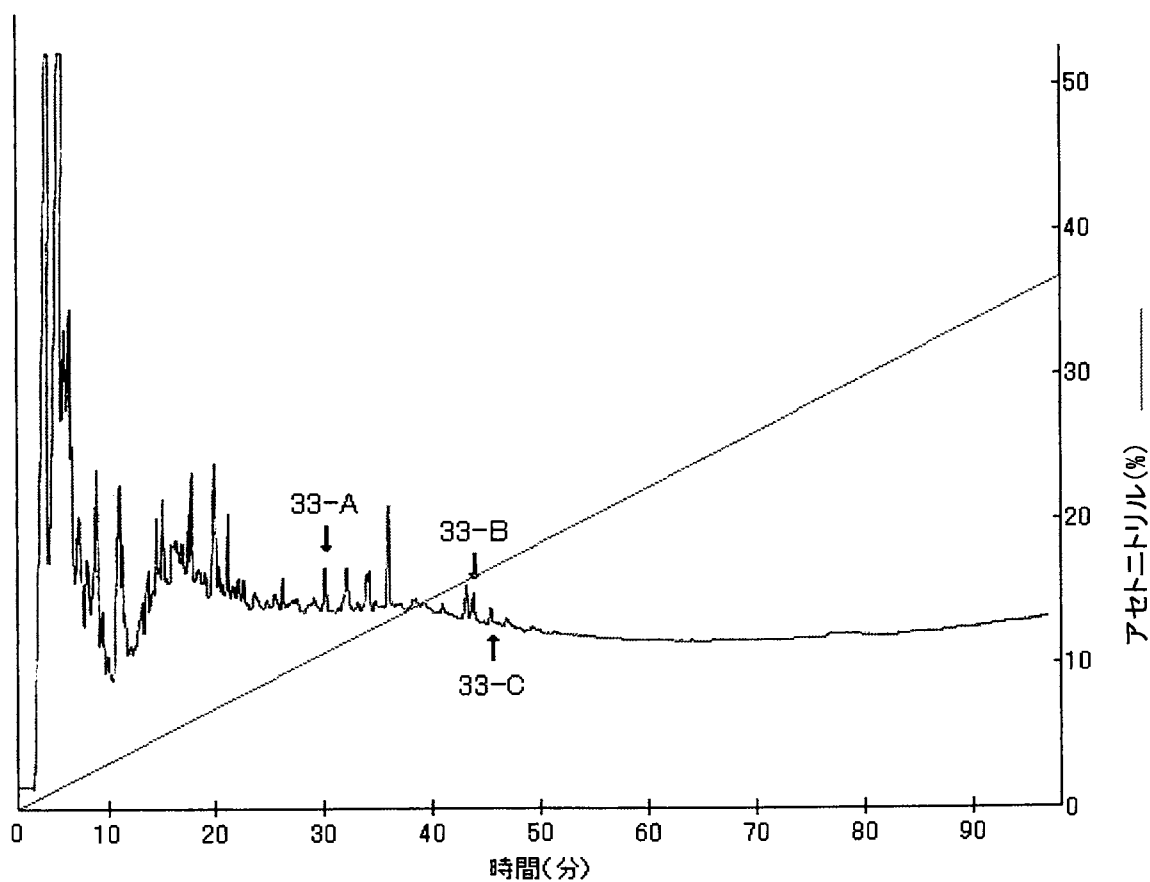


図 5: 逆相 HPLC による分画(F-33)

移動相: A 液-0.1%TFA 水溶液 B 液-0.1%TFA アセトニトリル溶液

グラジエント: 100%A 液(5 分間)→50%A 液(135 分後) 流速: 0.8ml/min 吸光度: 220nm 注入量: 100 μl

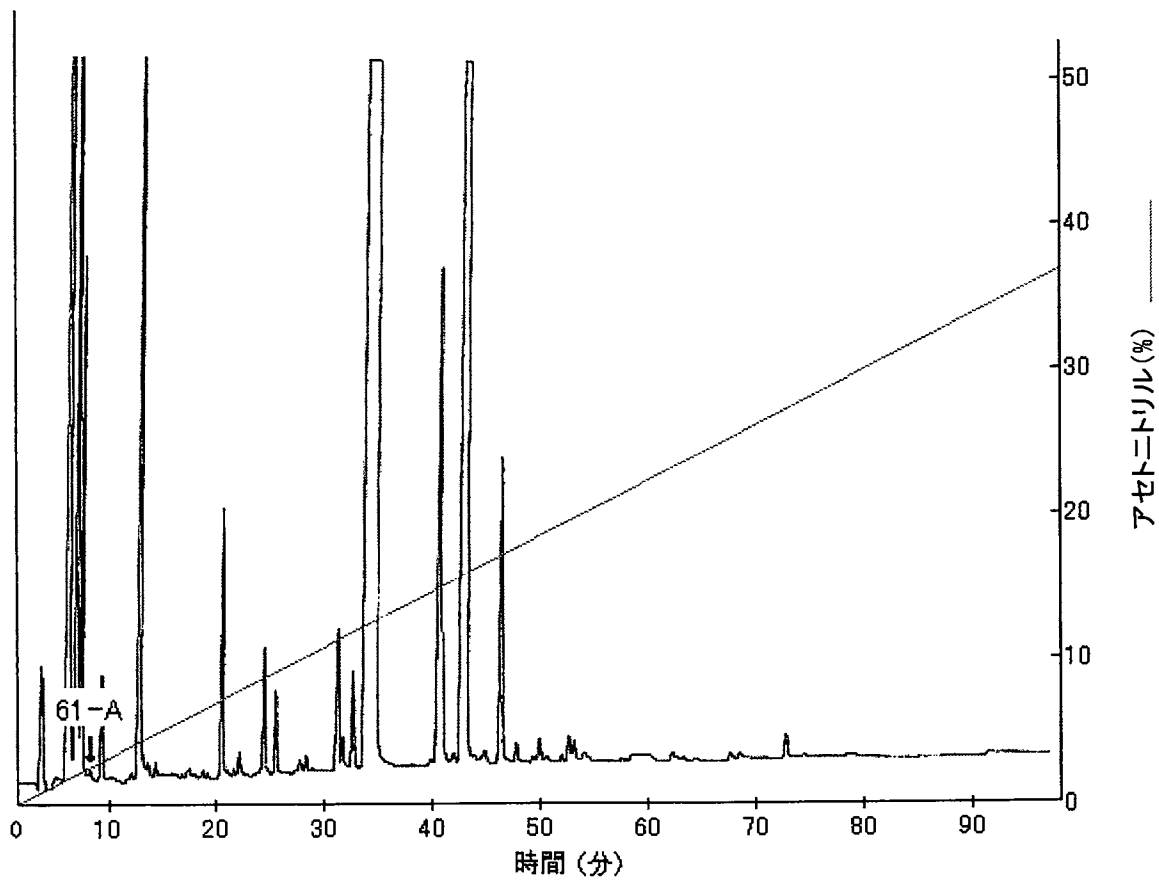


図 6: 逆相 HPLC による分画 (F-61)

移動相: A 液-0.1%TFA 水溶液 B 液-0.1%TFA アセトニトリル溶液

グラジエント: 100%A 液(5 分間)→50%A 液(135 分後) 流速: 0.8ml/min 吸光度: 220nm 注入量: 100 μ l

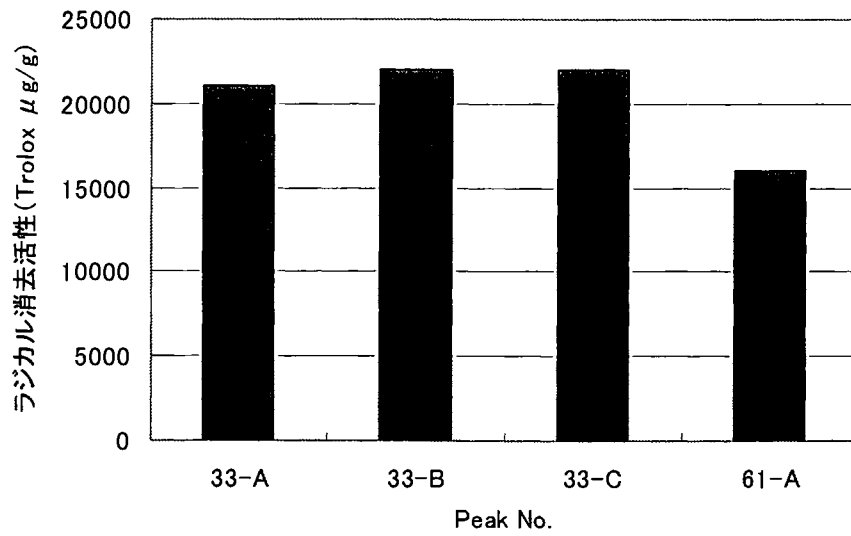


図7: 各ピークフラクションのラジカル消去活性

表 2: 各ピークフラクションの収量

Peak No.	収量 (mg)
33-A	0.7
33-B	0.5
33-C	0.6
61-A	0.9

第4節 イシル中のラジカル消去活性成分の同定

実験方法

(1) リクロマトグラフィーによる単離

逆相クロマトグラフィー（第3節）において高いラジカル消去活性を示した 33-A, 33-B, 33-C, 及び 61-A をロータリーエバポレーターで乾固後, 0.1%TFA 水溶液 1 ml を添加し, 超音波洗浄器で 10 分間溶解した。溶解した各フラクションは, 0.45 μ m のフィルターで濾過後, Phenomenex Luna 5 μ C₁₈(2) (ϕ 4.60 mm \times 150 mm) カラムを用いたリクロマトグラフィーにより単離した。溶出条件は第3節と同様である。

(2) アミノ酸配列分析

リクロマトグラフィーにより得られた単一ピークフラクションについて, MALDI-TOF MS (Voyager-DE STR : Applied Biosystems, USA) による精密質量分析および N 末端アミノ酸配列分析 (Procise 494 HT Protein Sequencing System : Applied Biosystems, USA) に供した。分析は, タカラバイオ(株)および(株)アプロサイエンスに依頼した。

結果

リクロマトグラフィーにより, 表 3 に示した画分が得られた。現在, これらのアミノ酸配列分析を行っている。

表 3: 得られたピークフラクション

Peak No.	アミノ酸配列	
33-A	} 分析中	
33-B		33-B-1
		33-B-2
		33-B-3
33-C		
61-A		

今後, 配列が確認できたペプチドを用いて, 再度ラジカル消去活性を評価する予定である。

総 括

近年、少子高齢化の進行、生活習慣病の増加、医療費の負担増大等を背景に、食の三次機能と呼ばれる生体調節機能に多くの関心が払われ、生体の健全性維持に役立てようとする研究も盛んに行われている。三次機能は、免疫力を高めたり、生活習慣病を予防したりする等範囲が広く、未知の機能も多い。特に、老化やがんをはじめとする生活習慣病は、生体内で発生する活性酸素が生体膜を構成している不飽和脂肪酸や LDL (低密度リポタンパク質)、DNA 等を酸化させることが最近の研究で明らかになっている²¹⁾。従って、これらの酸化障害を抑制する抗酸化物質の重要性が認識され、特に食品中に含まれる抗酸化物質による予防の重要性が注目されている。

一方、スローフード活動の広まりにも見られるように、全国各地で地産地消や伝統食品の継承等が重要視されている。地域固有食品の栄養評価はもちろんのこと、それらに含まれる生体調節機能を明らかにすることは、新規食品の開発や地場産業の発展につながると考えられる。

本研究では数ある地元伝統食品の中から、現在機能性が注目されているかぶらずし及びイシルを取り上げた。特にイシルは、製造過程において自己消化酵素によりタンパク質等が低分子化しているため、新たな酵素処理をせずに、アミノ酸やペプチド等の有効な成分を得ることができると考えられる。これまでも、多くの窒素化合物において抗酸化性の存在が明らかになっており、特に分子量 2,000~3,000 程度のペプチドに高い抗酸化性が確認されている^{8, 9)}。イシルについては、これまでに製造過程における成分変動^{22, 23)}や抗酸化性及びアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性といった機能性を有すること²⁴⁾が報告されている。しかし、イシルから抗酸化作用を示す物質を単離・同定したという報告は見当たらない。したがって、本研究では魚醤油イシルから抗酸化性成分を精製し、その有効性について検討することを目的とした。

まず、イカイシル及びイワシイシルのラジカル消去活性について検討したところ、イカイシルが約 1,500~1,650 $\mu\text{g Trolox/g}$ 、イワシイシルが 900~1,100 $\mu\text{g Trolox/g}$ と非常に高い活性を示した。平均では、イカイシルはイワシイシルの約 1.6 倍の活性であった。一般に、食品の発酵過程において食品由来の酵素あるいは発酵菌により、食品タンパク質はペプチドやアミノ酸といった低分子物質に分解されるが、これらペプチドやアミノ酸の一部は抗酸化性物質として知られている。山口ら²⁾は、3 種の醤油における抗酸化性を比較し、抗酸化性は全窒素量に比例すると報告した。また、道島ら³⁾によれば、イカイシルの全窒素含量は 1.73~2.49 g/100ml、イワシイシルでは 1.42~2.16 g/100ml であり、イカイシルの方がイワシイシルに比べて高いことを示している。これらのことから、醤油と同様に、イシルにおいても発酵過程において生成した窒素化合物が抗酸化性に関与していると考えられる。よって、活性の高いイカイシルを用いて、それらに含まれるラジカル消去活性成分の精製を行った。

イカイシル 70%エタノール抽出液を、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分離したところ、分子量 3,076 以下の低分子量画分に高いラジカル消去活性が認められ、F-33 では約 43,000 $\mu\text{g Trolox/g}$ 、F-61 では約 21,000 $\mu\text{g Trolox/g}$ であった。F-33 においては、Abs. 500 nm が最高値を示し、イシル製造過程中的のアミノカルボニル反応によって生成された褐色色素メラノイジン等が溶出し、ラジカル消去活性に寄与したと考えられる。また、F-61 においては、Abs. 220 nm が比較的高く、低分子窒素化合物が多く溶出し、ラジカル消去活性に影響を及ぼしたと推測される。

ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて高いラジカル消去活性を示した F-33 及び F-61 を逆相クロマトグラフィーにより精製したところ、約 16,000~22,000 $\mu\text{g Trolox/g}$ と非常に高い活性ピークが得られた。これは、イカイシル本体の 10~13 倍に相当する活性であった。

これまでに、タンパク質のプロテアーゼ加水分解物から多種多様な抗酸化成分が分離・同定されている。末綱ら²⁵⁾は、かつお節タンパク質のモルシン分解物から、Val-Lys-Leu 他 10 種類の抗酸化ペプチドを単離し、C 末端ならびに N 末端に分岐鎖アミノ酸 (Val, Leu, Ile) を持つ構造は高い抗酸化活性を発現したと報告している。また、山口²⁶⁾によれば、天然に存在する 20 種類程度のアミノ酸の中で、Met, Try, His 及び Tyr を多く含むペプチドの抗酸化性が強いとされる。さらに、山口ら⁹⁾は、抗酸化性の強い Met, Try, His 及び Tyr のジペプチド中の位置による抗酸化性の変化を測定している。その結果、ジペプチドの抗酸化性はペプチド中のアミノ酸の位置によって変化し、Met 及び His は C 末端にある方が抗酸化性は大きく、逆に Try 及び Tyr は N 末端に位置する方が効力は大きかった。柘植ら²⁷⁾は、卵白アルブミンのプロテアーゼ加水分解物から 3 種類の抗酸化ペプチド (Ala-His-Lys, Val-His-His, Val-His-His-Ala-Asn-Glu-Asn) を分離・同定した。彼らは、同定したペプチドの構成アミノ酸として His が含まれていることが重要であると述べている。Chen ら²⁸⁾は、大豆タンパク質である β -コングリシニンのプロテアーゼ加水分解物から、Leu-Leu-Pro-His-His 他 5 種類のペプチドを分離・同定した。さらに、Chen ら²⁹⁾は、Leu-Leu-Pro-His-His を骨格ペプチドとして、抗酸化ペプチドの構造と活性との相関について検討を行い、ペプチドを構成しているアミノ酸残基と同様に、配列によって抗酸化性が大きく異なることを明示している。また、その中で His-Pro-His, His-Pro-His-Leu がリノール酸の自動酸化に対して抗酸化性を示すことを報告している。

本研究では今後、得られたペプチドのアミノ酸配列を分析し、さらにこのペプチドのラジカル消去活性を評価した上で再度既報の知見と比較する予定である。また、今回得られた活性画分は、*in vitro* において非常に高いラジカル消去活性を示したが、これらの成分が体内摂取後も同様の作用を示し得るかどうかは別の問題である。今後、*in vivo* においてその有効性が実証されるとともに、伝統食品由来のラジカル消去活性

成分として活用されることを期待する。

引用文献および参考文献

- 1) 長島万弓・福田靖子・井藤龍平：「黒ゴマ種子水洗廃液に含まれる抗酸化性リグナン」, 日本食品科学工学会誌, Vol. 46, No. 6, p. 382-388 (1999)
- 2) 山口直彦・内藤茂三：「油脂の安定性に及ぼすアミノ化合物の影響-11-抗酸化物質としてたんぱく質加水分解物を油脂食品へ応用」, 愛知県食品工試年報, No. 26, p. 16 (1985)
- 3) 道島俊英・佐渡康夫・矢野俊博・榎本俊樹：「イシル（魚醤油）の遊離アミノ酸, オリゴペプチド, 有機酸, 核酸関連物質」, 日本食品科学工学会誌, Vol. 47, No. 3, p. 241-248 (2000)
- 4) 工藤康文・松田茂樹・井越敬司・沖智之：「発酵させた発酵乳から分離された抗酸化ペプチド」, 日本食品科学工学会誌, Vol. 48, No. 1, p. 44-50 (2001)
- 5) 岡田雅人・宮崎香：「タンパク質実験ノート④」, p. 72-79, 羊土社, 東京 (2004)
- 6) 志村憲助：「ゲル濾過法」, p. 55-76, 学会出版センター, 東京 (1990)
- 7) 日本生化学会：「タンパク質の化学 I 一分離精製」, p. 180-196, 東京化学同人, 東京 (1976)
- 8) K. Kawashima：「Synergistic Ternary Antioxidant Compositions Comprising Tocopherol, Partially Hydrolyzate of Gelatin and Organic Acid」, Agric. Biol. Chem., Vol. 43, p. 827-831 (1979)
- 9) 山口直彦・横尾良夫・藤巻正生：「油脂の安定性に及ぼすアミノ化合物の影響」, 日本食品工学会誌, Vol. 22, No. 9, p. 425-430 (1974)
- 10) 並木満夫・松下雪郎：「食品の品質と成分間反応」, p. 216-219, 講談社, 東京 (1999)
- 11) 五明紀春：「大豆発酵食品の機能性研究動向-味噌・醤油の褐色色素の生理機能」, 食品と開発, Vol. 34, No. 7, p. 12-14 (1999)
- 12) 長澤治子：「食品学・食品機能学・食品加工学」, p. 90-93, 医歯薬出版, 東京 (2005)
- 13) 木村進・中林敏郎・加藤博通：「食品の変色の化学」, p. 331-335, 光琳, 東京 (1995)
- 14) グェン・ヴァン・チェエン：「アミノカルボニル反応生成物の抗酸化能」, 食品と開発, Vol. 28, No. 10, p. 14-17 (1993)
- 15) 山口直彦：「アミノカルボニル反応物の抗酸化性」, 澱粉科学, Vol. 38, No. 1, p. 99-107 (1991)
- 16) 下橋淳子・寺田和子：「果実のラジカル消去能と食品の加熱および褐変化によるラジカル消去能への影響」, 駒澤女子大学研究紀要, Vol. 36, p. 1-6 (2003)
- 17) 下橋淳子：「褐変物質のDPPH ラジカル消去能」, 駒澤女子大学研究紀要, Vol. 37, p. 17-22 (2004)

- 18) 寺田弘：「タンパク質と核酸の分離精製—基礎と実験—」, p. 301-304, 廣川書店, 東京 (2001)
- 19) 宇井信生・岩永貞昭・崎山文夫：「タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー」, p. 127-139, 化学同人, 東京 (1984)
- 20) 日本生化学会：「タンパク質 I 検出・構造解析法」, p. 77-83, 東京化学同人, 東京 (2001)
- 21) 吉川敏一：「フリーラジカルの科学」, p. 125-198, 講談社, 東京 (1997)
- 22) 道島俊英・佐渡康夫・榎本俊樹：「イシル（魚醬）に関する研究（第 2 報）」, 石川県工業試験場研究報告, No. 47, p. 67-72 (1998)
- 23) 道島俊英・佐渡康夫・矢野俊博・榎本俊樹：「速醸法によるイシル（魚醬油）の調製とその醸造過程における成分の消長」, 日本食品科学工学会誌, Vol. 47, No. 3, p. 369-377 (2000)
- 24) 道島俊英：「能登のイシル（魚醬油）の旨味成分と機能性」, 月刊フードケミカル, p. 38-41 (2005-1)
- 25) 末綱邦男：「かつお節タンパク質のプロテアーゼ消化物からの抗酸化ペプチドの分離と同定」, 日本水産学会誌, Vol. 65, No. 1, p. 92-96 (1999)
- 26) 山口直彦：「ペプチドの抗酸化性」, New Food Industry, Vol. 31, No. 8, p. 18-22 (1989)
- 27) 柘植信昭・永川山美・野村幸弘・山本正典・杉澤公：「卵アルブミンの酵素分解によって得られるペプチドの抗酸化性について」, 日本農芸化学会誌, Vol. 65, No. 11, p. 1635-1641 (1991)
- 28) H.-M. Chen：「Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin」, J. Agric. Food Chem., Vol. 43, p. 574-578 (1995)
- 29) H.-M. Chen・K. Muramoto・F. Yamaguchi・K. Nokihara：「Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein」, J. Agric. Food Chem., Vol. 44, p. 2619-2623 (1996)