

研究ノート

培地の炭素源による鯉節菌の抗酸化物質生産性について

Antioxidant productivity of Filamentous fungus used in the katsuobushi manufacturing process by carbon source of culture medium.

鈴木美沙*, 萩野目望**, 山本真奈美***, 奥村香名子***
近藤由季子****, 三宅義明*****, 西田淑男†

Misa SUZUKI, Nozomu OGINOME, Manami YAMAMOTO, Kanako OKUMURA
Yukiko KONDOU, Yoshiaki MIYAKE, Yoshio NISHIDA

キーワード：鯉節、鯉節生産菌（鯉節菌）、培地の炭素源、抗酸化物質生産

Key words: Katsuobushi, Filamentous fungus used in the katsuobushi manufacturing process,
Carbon source of culture medium, Antioxidant production

要約

抗酸化化合物は食品中にも存在し、それが酸化を抑制し、また活性酸素の消去作用やラジカル捕捉作用があることが知られている。また、鯉節菌が抗酸化物質を産生することも分かってきている。

そこで今回、鯉節菌がどのような条件の際に抗酸化物質を生産するかを調べるために、10種類の鯉節菌を炭素源としてグルコース、ショ糖またはトレハロースの含まれた培地で培養した。培養は30℃で、2、4、7、14日間行った。培養後の各種鯉節菌の抗酸化物質の生産性については、HPLC分析で求めた。供試菌株のほとんどで、グルコース培地よりもショ糖またはトレハロース培地での抗酸化物質の生産性が高いことが判った。

これらの結果から、鯉節菌にとって資化しにくいと考えられる炭素源の場合、抗酸化物質の生産能力が上がると考えられた。鯉節菌が生体防御の一環として抗酸化物質を産出していると示唆された。

* 東海学園大学健康栄養学部管理栄養学科 ** 株式会社になべん研究開発部

*** 東海学園大学健康栄養学部管理栄養学科 2014 年度卒業

**** 東海学園大学健康栄養学部管理栄養学科 2015 年度卒業

***** 愛知淑徳大学健康医療科学部健康栄養学科 †Correspondance

Abstract

The antioxidant compounds are also present in foods, and it is known that they suppress oxidation and also have an active oxygen scavenging action and a radical scavenging action. It has also been found that *K. bonito* produces antioxidants.

Therefore, in order to investigate under what conditions bonito bacilli produces antioxidants, 10 types of bonito bacilli were cultured in a medium containing glucose, sucrose or trehalose as carbon sources. The culture was carried out at 30° C for 2, 4, 7 or 14 days. After culturing, the productivity of antioxidants of various bonito bacilli was analyzed by HPLC. Most of the tested strains showed higher antioxidant productivity in sucrose or trehalose medium than in glucose medium.

From these results, it was considered that the production capacity of antioxidants is increased in the case of a carbon source that is considered to be difficult to assimilate for bonito bacterium. It was suggested that the bonito bacterium produces antioxidants as part of the defense of the body.

諸言

日本の伝統的な発酵食品の日本酒、焼酎、醤油、味噌などの製造に糸状菌が使用され、その発酵食品中の抗酸化機能や抗酸化物質についての研究は多数行われている(外菌, 大森, 岡崎, 2013; 柏木, 2013; 片岡, 古林, 中台, 2013; 大浦, 秦, 2013)。一方、鰹節(枯節)の製造に使われる鰹節菌についてはあまり調べられていない。

私たちは、これまでに鰹節の枯節の製造工程で使用される *Eurotium* 属の抗酸化活性、ラジカル消去活性、発癌の抗促進活性、および発現抑制効果を有する機能性化合物を生成することを報告している (Miyake, Ito, Itoigawa, 2009; Miyake, Ito, Tokuda, 2010; Miyake, Mochizuki, Ito, 2010)。また、*Eurotium herbariorum* NU-2 の抽出物から芳香族化合物のアントラキノン誘導体、ユーロチノン誘導体、インドール含有ジケトピペラジン誘導体、ベンズアルデヒド誘導体の 17 化合物が同定し、それらのラジカル捕捉活性についても報告している (Miyake, Ito, Kimura, 2014)。

そこで本研究では、鰹節菌 10 種の菌株について、Glucose 寒天培地、Sucrose 寒天培地または Trehalose 寒天培地で、それぞれ 2、4、7、14 日間培養を行い、*Eurotium* 属が生産し、高いラジカル消去活性を示す Auroglaucin (F3)、Dihydroauroglaucin (F4)、Isohydrolavoglaucin (F2)、Tetrahydrolavoglaucin (KB1)、Flavoglaucin (KB2) の生産性を培地や培養期間における変化について調べることを目的とした。

方法

1. 培養

今回の実験では、表1に示した10種の鯉節菌を使用した。表2に示した3種の培地で培養を行った。培養方法は前報 (Miyake, Ito, Kimura, 2014) と同様にして行い、培養日数は2、4、7、14日間とした。

表 1. 実験に供した鯉節菌

No	鯉節菌	
1	<i>E.amstelodami</i>	NBRC4028
2	<i>E.chevalieri</i>	NBRC4090
3	<i>E.chevalieri</i>	JCM23047
4	<i>E.rubrum</i>	NBRC4089
5	<i>E.repens</i>	KBN2062
6	<i>E.repens</i>	JCM23060
7	<i>E.herbariorum</i>	JCM10081
8	<i>E.herbariorum</i>	NE-1
9	<i>E.herbariorum</i>	NU-2
10	<i>E.herbariorum</i>	NE-4

表 2. 培地組成

	Sucrose 培地	Glucose 培地	Trehalose 培地
Malt extract(g)	10	10	10
Yeast extract(g)	2.5	2.5	2.5
Sucrose(g)	200	—	—
Glucose(g)	—	200	—
Trehalose(g)	—	—	200
Agar(g)	15	15	15
Distilled water(mL)	500	500	500

2. 抗酸化物質の抽出と HPLC 分析

抗酸化物質の抽出方法は、鯉節菌の培養容器に酢酸エチル液を 5mL 添加し、24 時間抽出を行い、デカンテーションで各抽出液を得た。各抽出液中の図 1 に示した抗酸化物質含量を前報 (Miyake, Ito, Kimura, 2014) と同様に HPLC 分析で求めた。産出された抗酸化物質含量は、産出された全体の割合に対してどれだけ占めているか、それぞれの抗酸化物質と比較した。

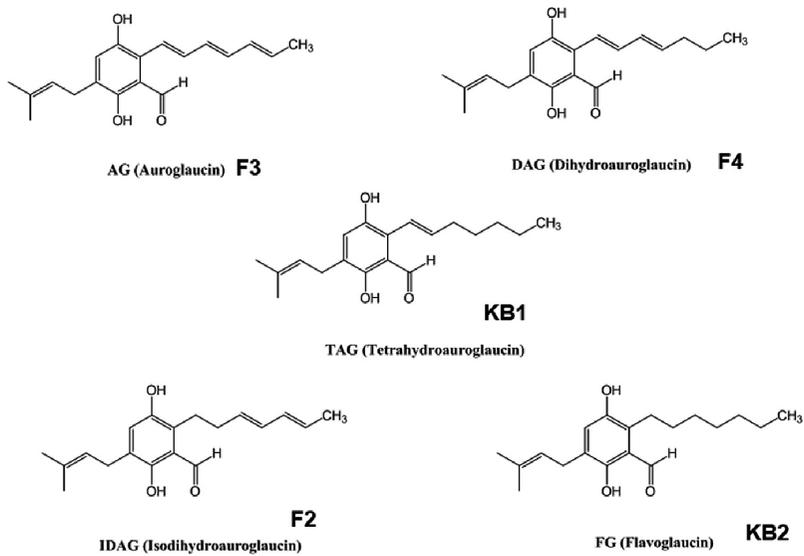


図1. 分析した抗酸化物質

結果及び考察

10種の鯉節菌の2、4、7、14日間培養後の抗酸化物質含量の変化を図2～図11に示した。その結果、*E. amstelodami* NBRC4028においては、抗酸化物質を比較すると、Trehalose培地やSucrose培地において、どの培養日数でもKB2の構成比が高かった(図2)。*E. chevelieri* NBRC4090においては、Trehalose培地やSucrose培地において7日間培養でF4とF3の割合が

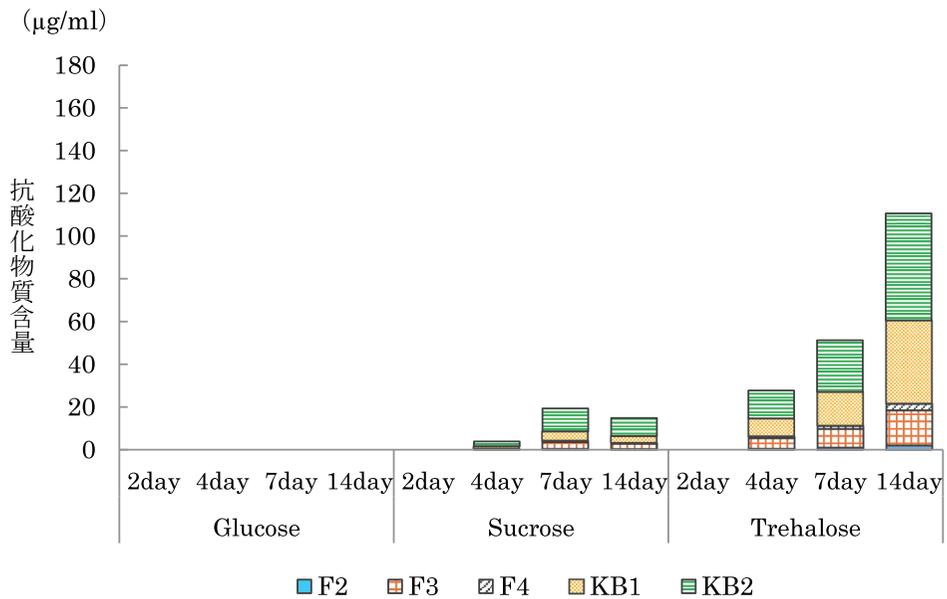


図2. *E. amstelodami* NBRC4028の抗酸化物生産量変化

高く、Glucose 培地において 14 日間培養で KB1 の割合が高かった (図 3)。*E. chevalieri* JCM23047 においては、4、7、14 日間培養で F3 と F4 の割合が高いことがわかった (図 4)。

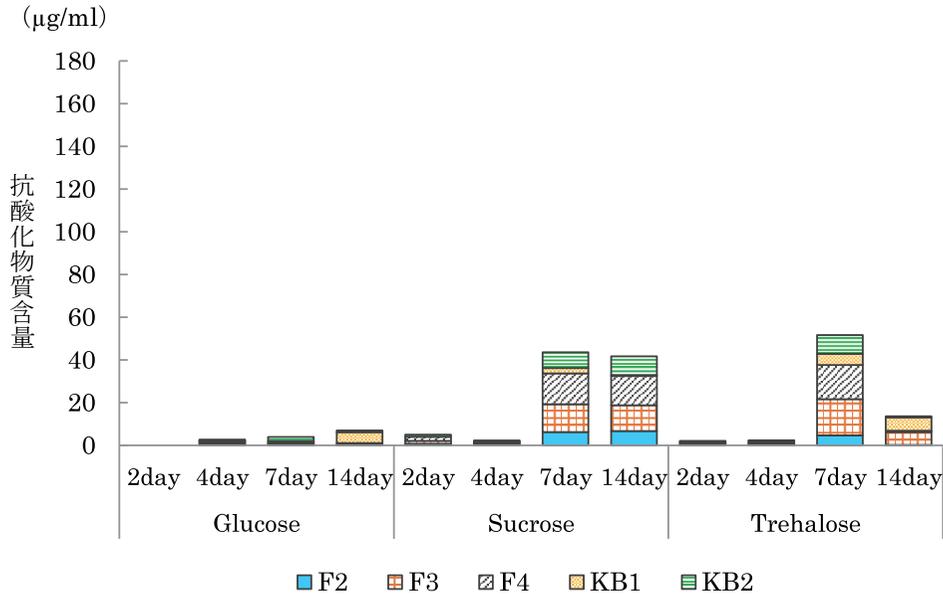


図 3. *E.chevalieri* NBRC4090 の抗酸化物生産量変化

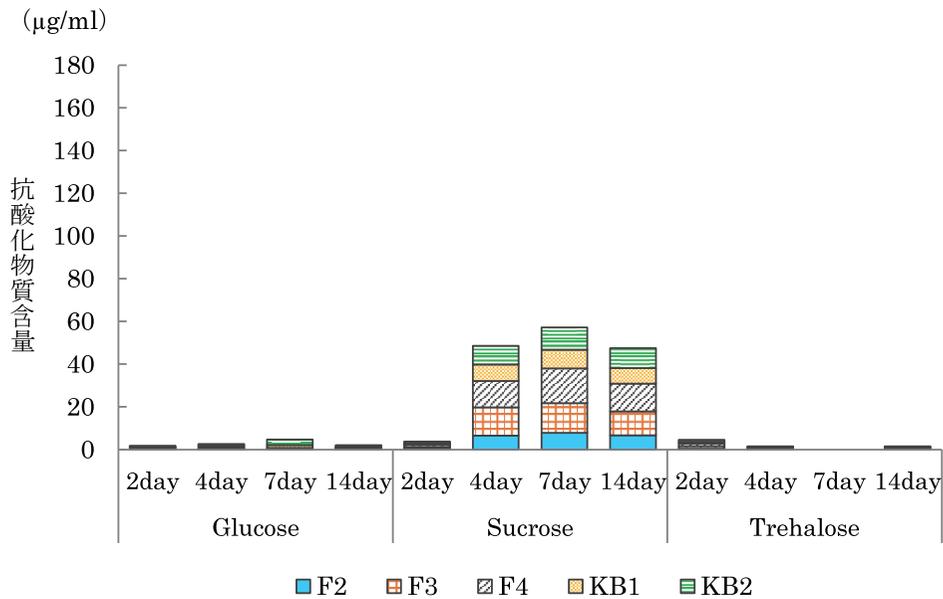


図 4. *E.chevalieri* JCM23047 の抗酸化物生産量変化

E. rubrum NBRC4089 においては、Glucose 培地や Trehalose 培地において 14 日間培養で F3 の割合が高く、Sucrose 培地において 7 日間培養で KB2 の割合が高かった (図 5)。*E. repens* KBN2062 においては、14 日間培養で F4 と KB1 の割合が高かった (図 6)。*E. repens* JCM23060 においては、14 日間培養で F4 の割合が高かった (図 7)。*E. herbariorum* JCM10081 においては、Sucrose 培地において抗酸化物質の構成割合に差は認められなかったが、Trehalose 培地において 14 日間培養で F3、F4 と KB2 の割合が高かった (図 8)。

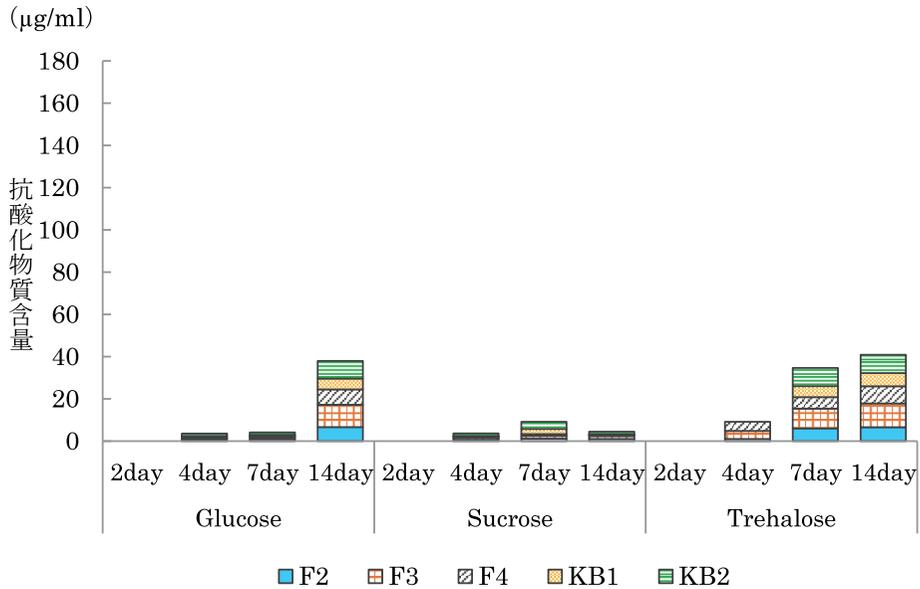


図 5. *E. rubrum* NBRC4089 の抗酸化物生産量変化



図 6. *E. repens* KBN2062 の抗酸化物生産量変化



図 7. *E. repens* JCM23060 の抗酸化物質生産量変化

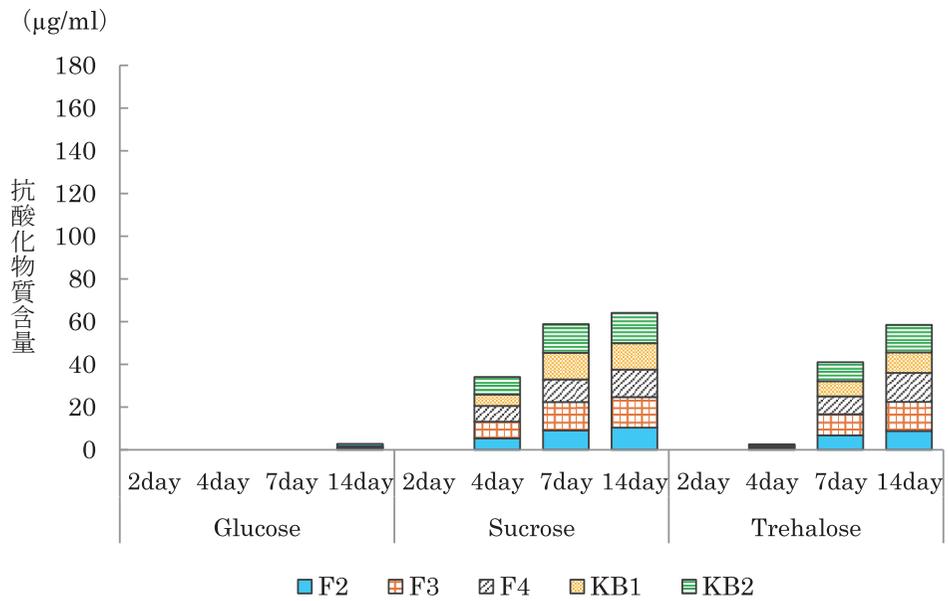


図 8. *E. herbariorum* JCM10081 の抗酸化物質生産量変化

E. herbariorum NE-1 においては、Sucrose 培地において7日間培養で F2 と KB2 の割合が高かった (図9)。*E. herbariorum* NU-2 においては、Trehalose 培地において14日間培養で KB1 と KB2 の割合が高かった (図10)。*E. herbariorum* NE-4 においては、Trehalose 培地において7日間培養で KB1、KB2 と F2 の割合が高かった (図11)。

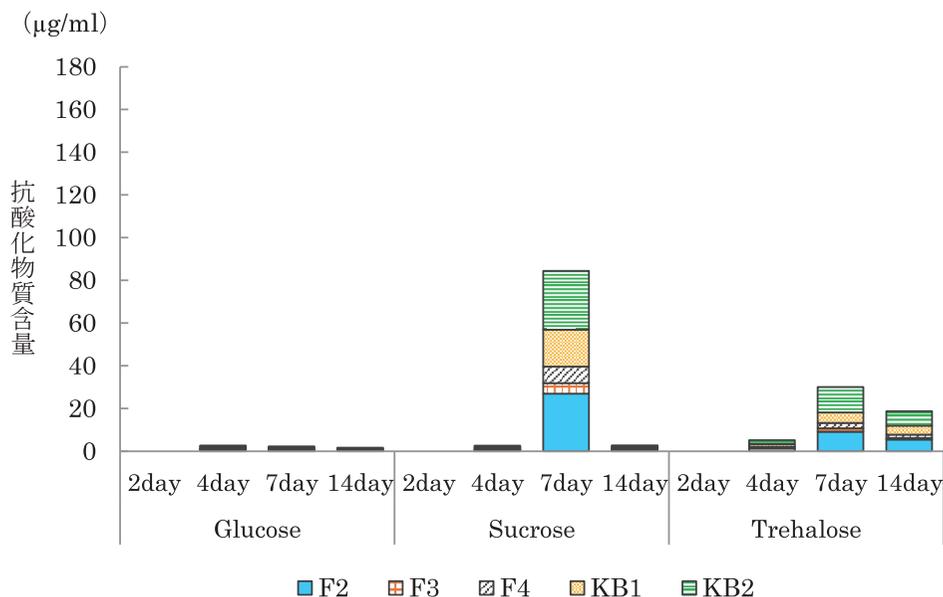


図9. *E. herbariorum* NE-1 の抗酸化物生産量変化

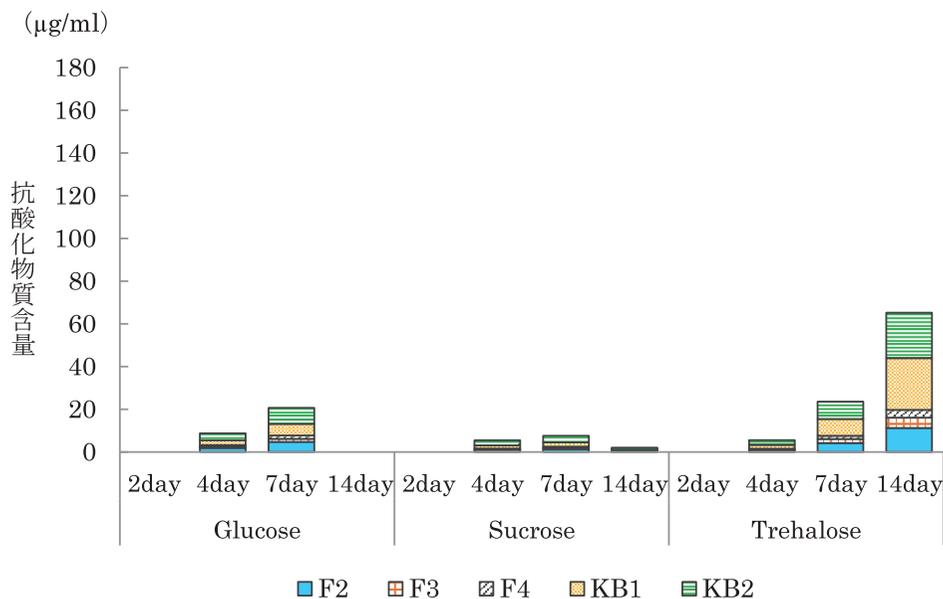


図10. *E. herbariorum* NU-2 の抗酸化物生産量変化

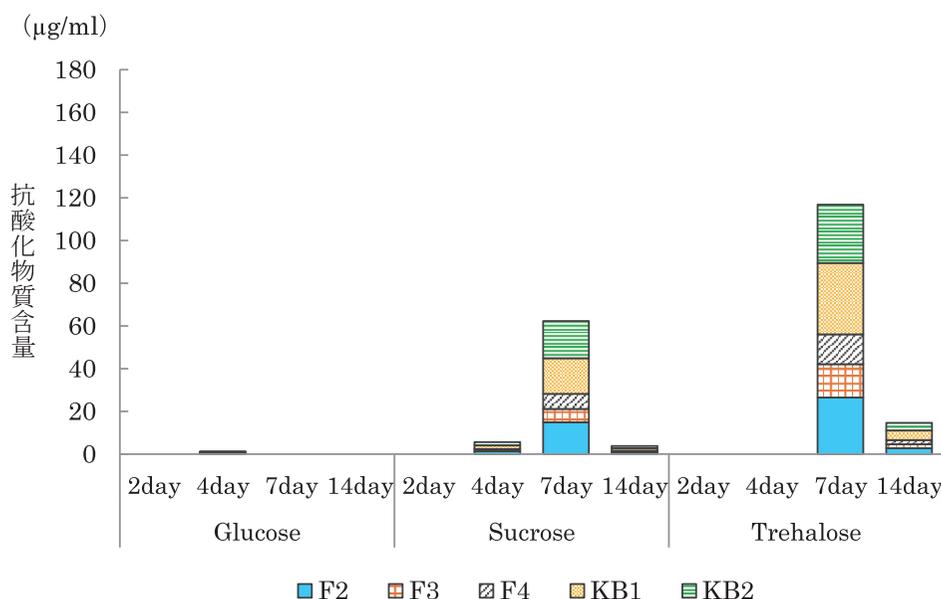


図 11. *E. herbariorum* NE-4 の抗酸化物質生産量変化

以上の結果から、菌種により種々の抗酸化物質生産性に差が生じることが明らかになった。

E. chevelieri NBRC4090、*E. chevalieri* JCM23047、*E. herbariorum* NE-1 と *E. herbariorum* NE-4 においては、他の培養期間と比べて 7 日間培養で抗酸化物質の含量が多くなっていた。一方、*E. amstelodami* NBRC4028、*E. rubrum* NBRC4089、*E. repens* KBN2062、*E. repens* JCM23060、*E. herbariorum* JCM10081 と *E. herbariorum* NU-2 においては、他の培養期間と比べて 14 日間培養で抗酸化物質の含量が多かった。これらの結果から、*E. chevelieri* と *E. herbariorum* の半分の菌種では、抗酸化物質の生産が、培養の早い段階から始まっていると考えられた。7 日間で抗酸化物質含量がピークになり、その後減少した理由については今後検討すべきことと考えられた。

また、今回の実験結果から、*E. rubrum* NBRC4089 では Glucose 培地と Trehalose 培地で、*E. chevelieri* NBRC4090、*E. chevalieri* JCM23047、*E. herbariorum* JCM10081 と *E. herbariorum* NE-1 では Sucrose 培地や Trehalose 培地で、*E. amstelodami* NBRC4028、*E. repens* KBN2062、*E. repens* JCM23060、*E. herbariorum* NU-2 と *E. herbariorum* NE-4 では Trehalose 培地での抗酸化物質の生産性が高いことが示されたが、これらの結果は、菌種の差によるものと考えられた。

供試菌株のほとんどで、グルコース培地よりもショ糖またはトレハロース培地での抗酸化物質の生産性が高い結果になった。これらの結果から、鯉節菌にとって資化しにくいと考えられる炭素源の場合、抗酸化物質の生産能力が上がると思われる、鯉節菌が生体防御の一環として抗酸化物質を産出していることが示唆された。

E. herbariorum は菌株や幾代を培養すると、時として *E. rubrum* や *E. repens* の特徴が出現す

る場合がある。両者の違いは子嚢胞子に溝が明確にあるものと、無いものを元に判別されている(宇田川, 椿, 堀江他, 1978)。 *E. herbariorum* の子嚢胞子には、ときに溝の痕跡がみとめられる場合があり、 *E. rubrum* の子嚢胞子の模様の特徴と重なり合う。これは、各菌株が *E. repens* と *E. rubrum* 間にグラデーションのように菌学的な特徴が分布している。そこで、分類学上 *E. herbariorum* という名称が与えられた(宇田川, 松田, 1984)。そのため、NU-2は形態学的特徴では分類学上 *E. herbariorum* であるが、生理学的では *E. rubrum* の特徴が強いため、 *E. rubrum* NBRC4089と同様の抗酸化物質が生産されたと考えられた。

一方、 *E. repens* JCM23060 と *E. repens* KBN2062 は分類学上では同じ種であり、抗酸化物質の産生パターンも似ていることが考えられた。NE-1 と NE-4 は分類学上 *E. herbariorum* であるが、産生される抗酸化物から、生理学的特徴は *E. repens* の特徴が強いためだと考えられた(Miyake, Ito, Itoigawa, 2009)

今回の実験結果から、今回使用した鯉節菌は培地の違いにより、産生する抗酸化物質に違いがあることが示された。またその要因の一つとして、菌の生理学的な特徴の違いにより、生産される抗酸化物質が違うことが示唆された。今後、これらの結果を鯉節で鯉節菌が生産する抗酸化物質の研究の応用に生かしたいと考えている。

引用文献

- 外菌英樹, 大森俊郎, 岡崎直人, 2013. 本格焼酎とその副産物(焼酎粕)の機能性. In: 北本勝ひこ(編), 増補 醸造物の機能性. 公益社団法人日本醸造協会, 14-17.
- 柏木豊, 2013. 味噌の機能性. In: 北本勝ひこ(編), 増補 醸造物の機能性. 公益社団法人日本醸造協会, 76-81.
- 片岡茂博, 古林万木夫, 中台忠信, 2013. 醤油の機能性. In: 北本勝ひこ(編), 増補 醸造物の機能性. 公益社団法人日本醸造協会, 55-76.
- Miyake, Y., Ito, C., Itoigawa, M., 2009. Antioxidants Produced by *Eurotium herbariorum* of Filamentous Fungi Used for the Manufacture of Karebushi, Dried Bonito (katsuobushi). *Biosci Biotechnol Biochem* 73 : 1323-1327.
- Miyake, Y., Ito, C., Tokuda, H., 2010. Evaluation of Flavoglucin, Its Derivatives and Pyranonigrins Produced by Molds Used in Fermented Foods for Inhibiting Tumor Promotion. *Biosci Biotechnol Biochem* 74 : 1120-1112.
- Miyake, Y., Mochizuki, M., Ito, C., 2010. Peroxynitrite Scavengers Produced by Filamentous Fungus Used in the Katsuobushi Manufacturing Process. *Food Sci Technol Res* 16 : 493-498.
- Miyake, Y., Ito, C., Kimura, T., et al., 2014. Isolation of Aromatic Compounds Produced by *Eurotium herbariorum* NU-2 from Karebushi, a Katsuobushi, and their DPPH-Radical Scavenging Activities.

Food Science and Technology Research 20 : 139-146.

大浦新, 秦洋二, 2013. 清酒の機能性. In: 北本勝ひこ(編), 増補 醸造物の機能性. 公益社団法人日本醸造協会. 4-12.

宇田川俊一, 椿啓介, 堀江義一 他, 1978. 菌類図鑑 (上). 株式会社 講談社.

宇田川俊一, 松田良夫, 1984. 食品菌類ハンドブック. 医歯薬出版株式会社.