総 説

新しい酸化防止剤の開発 (微生物起源を中心として)

石 川 行 弘

鳥取大学教育学部 (〒680 鳥取市湖山町南 4-101)

Development of New Types of Antioxidants from Microbial Origin

Yukihiro ISHIKAWA

Laboratory of Food and Nutrition, College of Education, Tottori University
(4-101, Koyama-minami, Tottori-shi, 〒680)

This review is chiefly concerned with the role of microorganisms responsible for antioxidation, and note some of the more recent researches in their use. They have been found to perform an important function in the following cases.

- 1) Metabolites produced by bacteria, yeast, fungi, *Streptomyces* sp., and *Euglena* sp. may serve as antioxidants, synergists, scavengers, and/or lipoxygenase inhibitors.
- 2) Derivatives from food constituents by the action of microbial enzymes have antioxidant and/or synergistic activity.
- 3) Microorganisms have an ability to decompose lipid peroxides and/or to use them as a nutrient. They are also capable of decomposing aldehydes and other odorous compounds originated from lipid peroxidation, and act as a deodorant.

1 はじめに

油脂(脂質)の酸化防止は食品の品質や安全性を保持したり, 生体における諸器官の機能を円滑に発揮させて疾病などの発生を抑えることと密接な関係にある。抗酸化剤は食品, 香粧品, ゴム, 石油製品など広く利用されているが, 最近, 医薬品としての用途で, ラジカル消去作用などを利用して老化制御, 発がん予防なども期待されている。微生物の生産する代謝産物や酵素が抗酸化と関連してどのように利用されているであろうか。それらの接点として次のようなことが考えられるが, それぞれが独立して機能することはまれであろう。

- 1) 菌体内または菌体外に生産された代謝産物を抽出して利用する場合。
- 2) 加水分解酵素などによって食品成分が分解され, 2 次的に生産されたより優れた抗酸化剤や相乗剤を利用する場合。
- 3) 油脂酸化物やその 2 次生成物を分解して, より安定で安全な成分に変換したり, 直接栄養源として資化する場合。酵素を抽出して添加するか固定化微生物(酵素)のようなバイオリアクターとして使用する

ることも可能である。

2 代謝産物の利用

微生物は抗酸化剤, 相乗剤, 活性酸素消去剤, 抗酸化酵素, 酸化酵素阻害剤など多種多様な代謝産物を生産している。フェノール性化合物, アミノ酸, ペプチド, アミンなどが細菌, 酵母, 糸状菌, 放線菌, *Euglena* から得られている。

2.1 抗酸化剤, 相乗剤

Meisinger らは赤血球の溶血防止因子(1)を酵母から得ている¹⁾。Smith らは細菌, 糸状菌, 放線菌, 酵母のスクリーニングを行い, *Aspergillus niger*, *Mucor sufu*, *Penicillium roqueforti*, *P. camemberti* のベンゼン抽出物に抗酸化性を認めた²⁾。ラードを基質にしたときの抗酸化性は対照の約 4 倍であり効果が高いとは言えない。放線菌からは 3-methylthiopropylamine (2)³⁾, *Streptomyces melanogenes* から 5-hydroxy-maltol (3)⁴⁾ (*Gluconobacter* や *Pseudomonas* の生産物でもある), *S. lavendulae* から 2-hydroxy-3-propenoic acid (4)⁵⁾ などが単離されている。また, *S. aeriouwifer* 及び *S. cyaneus* からそれぞれ naphter-

Fig.-1 Antioxidants and scavengers of microbial origin.

pin (5)⁶⁾ と antiostatin 誘導体 (6)⁷⁾ が見いだされた。 α -トコフェロール (Toc) (7) は酵母や細菌中にも認められているが、*Euglena gracilis* Z による発酵生産が試みられている⁸⁾。かつお節は風味の優れた魚加工品で、現在では *Eurotium herbariorum* を用いている。本菌の菌体及び培養液抽出物は Toc と相乗効果を示し、有効成分として flavoglucanin (8) 及びその関連物質を生産する⁹⁾。

著者の経験では細菌、酵母、放線菌などの抗酸化剤生産能は低く、糸状菌、特に *Penicillium* 属に活性の高い物質を多量に生産するものが多いようである。*Penicillium* 属から curvulic acid (9), citrinin (10), protocatechuic acid (11)¹⁰⁾ が、*P. janthinellum* から 2,2'-methylenebis-(5-methyl-6-*t*-butylphenol) (12) とその誘導体¹¹⁾、3-methoxytoluhydroquinone (13)

及び homogentisic acid (14)¹²⁾ が得られている。(12) はリノール酸を基質にしたとき BHA より強い抗酸化性を示した。(10) は土壌から分離した *Penicillium* 属からよく単離され顕著な抗酸化性を示す。マイコトキシンとして有名な物質であるが Ames 試験では陰性であり、スクリーニングで得られた物質について種々の安全性の評価を行うことの重要性を示している。*P. commune* は gentisyl alcohol (15)¹³⁾ を生産し、Toc よりはるかに強い抗酸化性を示すが、同時に強い抗菌性も示す。*Penicillium* 属から (16) が得られた¹⁴⁾。isoherqueinone のヒドロキシ誘導体であり、cyclic ether の向きが逆になった herqueinone のヒドロキシ誘導体も *P. herquei* から単離されている¹⁵⁾。これらは Toc (0.04 %) との相乗効果が顕著で、ラード基質に 0.1 % 添加すると AOM 時間は約 400 h である。類縁化合物で

Fig.-2 Antioxidative activity of atrovenetin and its synergism with tocopherol (0.04 %) in lard.

ある atrovenetin (17) は, *P. atrovenetum*, *P. herquei*, *P. paraherquei*, *Gremmeniella abietina* などから単離され顕著な抗酸化性を示す (Fig.-2)¹⁶⁾。*P. aurantio-virens* から単離された auranthione (18) もほぼ同じ効果を示す¹⁷⁾。

アミノ酸にも抗酸化性を示すものがあるが、ほとんど微生物の発酵生産物である。乳酸菌の培養液から α -Toc と相乗効果を示すプロリンを含むペプチド (分子量 300~1000) が得られている¹⁸⁾。*Aspergillus oryzae* は抗酸化剤としてグリシンとアスパラギン酸を等モル含む低分子ペプチドを生産するという¹⁹⁾。こうじ(麹)菌、かつお節菌、酢酸菌、酵母のような食品微生物は種々の機能を示し安全性が高いことから、素材加工や香粧品などの分野での利用が検討されている。

2.2 活性酸素消去剤

活性酸素種は多くの疾病に関与すると考えられており、脂質酸化の初期段階を阻止するためにスカベンジャーの開発が試みられている。Shin-ya らは Toc 欠ラット肝ミクロソーム中でフリーラジカルによって誘導される脂質酸化防止を指標にスクリーニングし、*Acremonium* 属から pyridoxatin (19)²⁰⁾ を、*S. prunicolor* から benthocyanin A (20)²¹⁾ と 7-demethylnaphterpin (21)²²⁾ を得ている。(6) も強いスカベンジャー活性を持つという。

食品微生物以外の代謝産物は食品への利用は著しく制限されるため、抗酸化性、Toc との相乗性、活性酸素消去能をはじめ、その他の生体内での生理機能を生かして応用することが考えられる。医薬品としての用途を目的にした開発には生体系により近いスクリーニング系の利用が必要であろう。

2.3 抗酸化酵素

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD), グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) などが代表的な酵素で

ある。環境破壊による紫外線量の増加と皮膚がんの発生が比例すると予測されるとき、SOD の有用性は高い。SOD は生物が好気的環境下で生きて行くために誘導されたと考えられており、寿命と密接な関連があるとの報告もある。生物界に広く存在し、ウシ肝より分離された SOD (orgotein) は抗炎症作用などを有し臨床応用されている²³⁾。

微生物の SOD についても報告され、最近では *Aerobacter aerogenes* から精製されている²⁴⁾。ヒト SOD を大腸菌で発現させ、医薬品としての応用研究がなされている²⁵⁾。著者は自動酸化したリノール酸メチルを唯一の炭素源として資化する糸状菌を単離した中に、SOD や GSH-Px 活性を認めた。リノール酸ヒドロペルオキシド (HPO) を加えた培地に生育できる耐性酵母 (*Hansenula mrakii*) は GSH-Px を誘導酵素として生産して HPO をアルコールに還元することによって生育できる²⁶⁾。特異環境下で生育する微生物には特殊な機能を有する代謝産物や酵素を生産し、酸化脂質を非ラジカル性の毒性の低い物質に分解するなど食品の安定性、安全性の向上への寄与もできるであろう。

2.4 酸化酵素阻害剤

リポキシゲナーゼ (LOX) やシクロオキシゲナーゼは長鎖の高度不飽和脂肪酸に酸素を添加する酵素であり、生体にとって極めて重要な役割を果たす。一方で、LOX は比較的熱安定性が高く失活しにくい、酵素作用を制御できなくなった状態で油脂酸化が著しく進行していることがある。通常、油脂製品については脱酸素剤の封入が効果的であるが、食品素材には阻害剤を添加して品質の劣化を抑えることが望ましい。阻害剤として NDGA, クエルセチン, クロロゲン酸, アスコルビン酸, BHA などのように植物由来の抗酸化剤や合成物が報告されている。著者はかつお節菌体のアセトン抽出物が阻害効果を示し、また、Fig.-3 のように菌体は LOX の作用による EPA からの特異的な 1-penten-3-ol の生成を顕著に抑えているため²⁷⁾、もっと優れた微量で作用する非キレート阻害剤を開発し、初期段階での酸化防止のできることを期待している。ペプチド (L-carnosine) も阻害剤になるため²⁸⁾ 微生物及び酵素によるタンパク質分解物中には有効成分が含まれている可能性が高い。微生物の発酵生産物は意図的に利用しない限り目的にそくした物質は得られないので多様なスクリーニング系の確立が重要となる。

3 食品成分由来物質の利用

食品中には多種多様の抗酸化成分が含まれており、加水分解酵素などの作用によってさらに有効な抗酸化剤や相乗剤が生成することが考えられる。含油脂材料を用いても油脂が安定に保持されている代表は発酵食品であ

Fig.-3 Changes in the amounts of volatiles from sardine mince stored with and without *Eurotium herbariorum*. Peaks 4 and 26: propanal and 1-penten-3-ol. GLC: FID, DB-WAX (60 m×0.25 mm id)

う。日本ではこうじ菌、酵母、酢酸菌などが用いられ、みそやしょう油などの調味料が抗酸化性を示すことはよく知られており²⁹⁾、製品中の油脂酸化はほとんど問題にならない。

テンペーは大豆に *Rhizopus oligosporus* が生育してできるもので、抽出油の酸化安定性は著しく高い³⁰⁾。主な有効成分は菌の生産する β -グルコシダーゼによって配糖体から生成する daidzein (22) 及び genistein (23) であるが^{31), 32)}、抗酸化性よりもむしろ Toc と高い相乗効果を示す。納豆や東南アジアの発酵食品に用いられる糸状菌を大豆に培養して得られた発酵品抽出油の Toc との相乗性を試験し、納豆では浜納豆が、糸状菌では *Actinomucor elegans* や *R. oligosporus* が優れていた³³⁾。テンペーは3 d 程度で製品になっているが、2週間～1 か月培養した抽出油の色は濃く安定性も著しく高い。このように発酵食品には抗酸化剤として一般に、タンパク質分解物、褐変反応物、配糖体分解物など

を含み、Toc を含めた多成分間相乗効果によって安定化していると思われる。

4 酸化油の分解及び資化

油脂が酸化して HPO になり、2 次酸化生成物を生成して自動酸化の連鎖反応を促進し、変敗臭を発生し、異味を呈し、毒性を示すことはよく知られている。微生物は油脂酸化物を安定な化合物に変換したり、人間が最も感知しやすいにおいを矯臭して食品品質の改善に寄与している。

イワシのような高度不飽和脂肪酸を多く含む魚は新鮮なときにはあまりにおいはいないが、鮮度が低下するに連れて魚臭を発生し、加工品の消費拡大にとって大きな障害になっている。魚皮など体組織中には LOX が存在してしきい(閾)値の低いプロパナルなどのアルデヒド類が生成し、魚臭の主成分になっている。大豆の場合にも、LOX 欠失品種を開発して豆臭の生成を抑制するこ

とが試みられているが、ヘキサナールなどの生成が大豆加工品の受容性に大きく影響している。対策として、①アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) 及びアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) を有効利用する。その起源は酵母、細菌、糸状菌、動物肝臓などである。②酵素の生産を期待して微生物を用いる。③微生物に油脂酸化物を資化させる、などが考えられる。

①の場合、選択性に優れているためアルデヒド臭を低減することができる。酵母起源の酵素及びその補酵素である NAD や NADPH が高価であること、イワシなどを加工するとき高濃度の食塩で処理すると完全に失活するので実用性に乏しい³⁴⁾。イワシの加熱肉のプロパナールやペンタナールは酵素処理すると減少するが官能検査では魚臭は改善されておらず、分解できないアルデヒドやケトンの存在が予測されている³⁵⁾。

②については食品微生物を用いて豆臭や魚臭の矯臭という実用的研究がなされている。パン酵母の無細胞抽出液によるヘキサナールの除去について試験し、嫌気的条件下では還元されてアルコールを生成し、好気的条件下では酸化されてカルボン酸を生成する³⁶⁾。ただし、酵母は豆臭を除去するが独特の発酵臭が付随するので、実用上は脱臭と呼べないという³⁷⁾。*Acetobacter aceti* の膜結合型 ALDH は NAD を全く必要とせず、食塩存在下でも、また、包括固定化しても効率よく作用した³⁸⁾。*A. oryzae* の分生胞子は ADH 活性を示して豆臭を脱臭し、ヘキサナールをヘキサノールに還元するが、ケトンには作用しなかった。

マイワシ、スケトウダラの魚粉をタンパク源として有効利用するため、タンパク加水分解物を調製して酵母又は酢酸菌処理すると、アルデヒドに由来する魚臭が著しく軽減された。酵母では ADH の作用により平衡がアルコール生成方向に傾き、酢酸菌では膜結合型 ALDH の関与が大きい³⁹⁾。著者らはかつお節菌がアルデヒド分解力を示し矯臭効果の高いこと、イワシと混合すると過酸化物質 (POV) やカルボニル値が低下することなどから、その利用について検討している。

③酸化油脂が *Staphylococcus*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* などによって分解され、POV が低下するなどの効果が認められている^{40)~43)}。魚油の酸化を抑え抗酸化性を示す微生物を検索し、魚粉の製造が試みられている。*Saccharomyces cerevisiae*, *A. oryzae*, *A. sojae* が有効で、POV と TBA 値が低下し、*n*-3 系脂肪酸は原料の約 70 % が残存していたという^{44), 45)}。

微生物は油脂酸化物を直接栄養源として資化することもでき、製品や食品素材中の油脂の酸化にともなって発生する欠点を克服するために、微生物はそのまま、また抽出して酵素剤として使用することが可能になろう。

5 おわりに

油脂酸化への対応策として

- 1) 酸化原因の除去、消去——油脂の酸化に関与する酸素 (活性酸素)、光、酸化酵素、金属イオンなど種々の要因に対してスカベンジャー、クエンチャー、抗酸化酵素、酵素阻害剤、キレート剤などを利用する、
 - 2) 自動酸化の防止——連鎖反応を開始した油脂のラジカルを抗酸化剤、相乗剤、過酸化分解剤などを用いて連鎖反応を断ったり、非ラジカル物質に分解する、
 - 3) 酸化物による異味、異臭、毒性の除去——マスキング剤や包接化合物を用いる他に、酸化物の分解やしきい値の低い物質への転換を行う、
- などが考えられる。今まで 1), 2) の点について多くの検討がなされてきたが、酸化防止の観点からすれば、酸化の結果への対策である 3) についてももっと考慮されるべきである。油脂食品及びその素材の品質の向上を計るには、上述した種々の方法を有機的に結び付け有効な手段を施し総合的な視野にたって考える必要がある。油脂食品の摂取が健康に寄与するために、多くの可能性を秘めた微生物の効果的利用が役立てば幸いである。

〔平成 4 年 (1992 年) 4 月 1 日受理〕

文 献

- 1) M.A.P. Meisinger, F.A. Kuehl, Jr., E.L. Rickes, N.G. Brink, K. Folkers, M. Forbes, F. Zilliken, P. Gyorgy, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4979 (1959)
- 2) L.L. Zaika, J.L. Smith, *J. Sci. Fd. Agric.*, **26**, 1357 (1975)
- 3) 長野雄治, 栄養食糧学会講演要旨 (東京), p. 37 (1973)
- 4) Y. Nakakita, T. Aoyama, H. Sakai, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2385 (1984)
- 5) 許 元勲, 中川昌平, 広田 陽, 島 昭二, 酒井平一, 磯貝 彰, 中山 充, 日農化関西西日本大会要旨 (山口) (1987)
- 6) K. Shin-ya, S. Imai, K. Furihata, Y. Hayakawa, Y. Kato, G.D. Vanduyne, J. Clardy, H. Seto, *J. Antibiotics*, **43**, 444 (1990)
- 7) C-J. Mo, K. Shin-ya, K. Furihata, K. Furihata, A. Shimau, Y. Hayakawa, H. Seto, *J. Antibiotics*, **43**, 1337 (1990)
- 8) Y. Tani, H. Tsumura, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 305 (1989)
- 9) Y. Ishikawa, K. Morimoto, T. Hamasaki, *J. Food Sci.*, **50**, 1742 (1985)
- 10) T. Aoyama, Y. Nakakita, M. Nakagawa, H. Sakai, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2369 (1982)
- 11) Y. Nakakita, K. Yomosa, A. Hirota, H. Sakai, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 239 (1984)
- 12) Y. Nakakita, T. Aoyama, H. Sakai, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2385 (1984)
- 13) Y. Ishikawa, K. Morimoto, T. Hamasaki, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, **35**, 903

- (1986)
- 14) Y. Ishikawa, S. Iseki, Proc. of ISF-JOCS World Congress 1988, (Tokyo) p. 324 (1989)
- 15) K. Morimoto, T. Yoshiwa, Y. Ishikawa, T. Hamasaki, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, **36**, 10 (1987)
- 16) Y. Ishikawa, K. Morimoto, S. Iseki, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 666 (1991)
- 17) Y. Ishikawa, K. Morimoto, T. Sada, T. Fujiwara, submitted to *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)* "Aurantionone Produced by *Penicillium aurantio-virens*, and Its Antioxidant Activities"
- 18) 細谷英雄, 秋山幸子, 小山隆子, 市岡 稔, 遠藤寛, 日本香粧品科学会第7回学術大会要旨, p. 59 (1982)
- 19) ルシッド・ムハメド, 加藤富民雄, 村田 晃, 川村吉也, 日農化西日本大会要旨(松江) (1991)
- 20) Y. Teshima, K. Shin-ya, A. Shimazu, K. Furihata, H.S. Chul, K. Furihata, Y. Hayakawa, K. Nagai, H. Seto, *J. Antibiotics*, **44**, 685 (1991)
- 21) K. Shin-ya, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 943 (1991)
- 22) K. Shin-ya, A. Shimazu, Y. Hayakawa, H. Seto, *J. Antibiotics*, **45**, 124 (1992)
- 23) 二木鋭雄・島崎弘幸(編), 八木國夫・中野 稔(監), 活性酸素, 医歯薬出版 (1987)
- 24) S.W. Kim, S.O. Lee, T.H. Lee, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 101 (1991)
- 25) 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦(編), 活性酸素, 蛋白質核酸酵素, **33** (16), (1988)
- 26) Y. Inoue, T. Ichiryu, K. Yoshikawa, L-T. Tran, K. Murata, A. Kimura, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3289 (1990)
- 27) 守本京三, 吉和哲朗, 第39回食品工業学会講演要旨(東京) (1992)
- 28) E.A. Decker, A.D. Crum, *J. Food Sci.*, **56**, 1179 (1991)
- 29) 山口直彦, 横尾良夫, 藤巻正生, 食品工誌, **26**, 71 (1979)
- 30) P. Gyorgy, K. Murata, Y. Sugimoto, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 377 (1974)
- 31) 村田希久, 阪市大家政学部紀要, **18**, 19 (1970)
- 32) H. Murakami, T. Asakawa, J. Terao, S. Matsushita, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2971 (1984)
- 33) 石川行弘, 守本京三, 井関重康, 油化学, **33**, 855 (1984)
- 34) 徳永俊夫, 水産ねり製品技術研究会誌, **11**, 97 (1985)
- 35) 遠藤泰志, 藤本健四郎, 食品工誌, **36**, 563 (1989)
- 36) 野村幸弘, 駒谷陽子, 山本正典, 杉沢 公, 日農化, **65**, 993 (1991)
- 37) 山口雄三, 服部鍊三, 菊池満雄, 諸江辰男, 日農化, **49**, 113 (1975)
- 38) 野村幸弘, 杉沢 公, 足立収生, 飴山 實, 日農化, **61**, 1079 (1987); **62**, 143 (1988)
- 39) 杉山圭吉, 高田康二, 山本郁雄, 恩塚 博, 大場健吉, 日農化, **64**, 1597 (1990)
- 40) J.L. Smith, J.A. Alford, *J. Food Sci.*, **33**, 93 (1968); **34**, 75 (1969)
- 41) 島原健三, 松井優之, 橋爪義夫, 発酵工学雑誌, **46**, 69 (1968)
- 42) H.D. Lilly, J.L. Smith, J.A. Alford, *Can. J. Microbiol.*, **16**, 855 (1970)
- 43) W. Grosch, F. Senser, K. Fischer, *Z. Lebensm. Unt. Forsch.*, **147**, 140 (1971)
- 44) 加藤富民雄, 中里一郎, 白石 剛, 林 浩司, 村田 晃, 米 康夫, 日農化, **59**, 901 (1985)
- 45) 加藤富民雄, 中里一郎, 村田 晃, 岡本 悟, 米 康夫, 日農化, **60**, 287 (1986)