かつお節エキスの抗酸化性

鈴木 敏 博*・本 杉 正 義*

Antioxidative Activity of Broiled-Dried Skipjack
(Katuobushi) Extracts

Toshihiro SUZUKI* and Masayoshi MOTOSUGI*

* Shizuoka Industrial Technology Center, 550, Makigaya,
Shizuoka-shi 421-12

The change of antioxidative activity of extracts of Katuobushi during smoking process was investigated. The antioxidative substances in the extracts was examined. Results obtained were as follows: (1) The antioxidative activity of the extracts gradually increased and reached maximum in the half period of smoking process. (2) The extracts of Arabusi (Skipjack meat after smoking process) was fractionated by dialysis. The antioxidative activity was mainly recognized in the dialyzable fraction. The dialyzable fraction was fractionated on ODSmini-column (YMC-DispoC₁₈, Yamamura Co. Ltd) by eluting with mixtures of water-acetonitrile, increasing the ratio of acetonitrile in steps. The fractionation of antioxidative substances eluted with water was applied to HPLC. A number of peaks which appeared in the chromatogram of extracts of Arabusi compared with that of Namaribushi (Skipjack meat is boiled and smoked once for about an hour were seemed to be responsible for antioxidative reinforcement of extracts of Katuobushi. The main antioxidant peak which remarkably increased during smoking gave serine, proline, glycine, alanine and isoleucine after complete hydrolysis. (3) The extracts of Katuobushi showed an antioxidative activity against a minced sardine.

(Received Jan. 4, 1991)

かつお節は日本の伝統的なくん製食品であって独特の風味を有する。そのうえ保存性も優れており、堅固な節の形状のままであれば長期間風味が変化しないとされている。酸化安定性の原因のひとつとして、くん煙成分中のフェノール性化合物の抗酸化力が推定される¹⁾。さらに抗酸化力の認められているペプチド、アミノ酸及び褐変物質などの化合物^{2,3)}も酸化安定性に寄与していると推定される。しかし、かつお節のペプチド、アミノ酸及び褐変物質などの水溶性成分の抗酸化性についての報告はない。そこで、かつお節の水溶性成分、エキスの抗酸化性について検討すると同時に水産食品への応用を試みたので報告する。

実 験 方 法

1. 材料及び試料の調製

(1) かつお節

煮熟後水抜き焙乾したかつお（生利節）及び通風式焙乾方法により製造した1番火（1日焙乾）から7番火（7日焙乾、荒節）のかつお節を用いた。1本約240gのものを3本用い、ウィレー粉碎機（池田理化製）により粉碎し試料とした。

(2) かつお節エキスの調製

かつお節粉末5g（乾物重量）に蒸留水100mlを加え、50℃で1時間時々攪拌しながらエキスを抽出した。上澄み液を東洋ろ紙NO.2でろ過した後、残渣に蒸留水80mlを加えさらに50℃、30分抽出した。両抽出液

* 静岡県静岡工業技術センター（〒421-12 静岡県静岡市牧ヶ谷550）

を合わせて 200 ml に定容した。

(3) リノール酸

純度 98% で抗酸化剤無添加品の和光純薬(株)製を用いた。

(4) 酸化安定性試験用まいわし落し身の調製

まいわし落し身にかつおエキス(かつお煮汁)あるいはかつお節(荒節)エキスを窒素量として 0.1% 添加し、ケンミックスミキサー KM-250 ((株)小平製作所製)にて混合し調製した。落し身は焼津市内の練り製品業者より購入した。使用した落し身の一般成分組成は、水分 75.9%, 粗蛋白質 16.6%, 粗脂肪 4.8% であった。また、過酸化価は 13 meq/kg であった。

エキスは(株)村松から恵を受けたもので、粗蛋白質がかつおエキス 48%, かつお節エキス 33% である。

2. 測定方法

(1) 抗酸化力の測定

すべての抗酸化試験は、かつお節乾物 10 mg 相当のエキスあるいはエキス分画物により以下の反応系で行った。0.25% リノール酸エタノール溶液 1.026 ml, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2.0 ml, 99.5% エタノール 1.0 ml と試料 0.974 ml の混合液を 5 ml 容のねじ口管びん(日電理化硝子)に入れ、密栓して 40℃ の恒温器中に保存した。調製液のリノール酸の過酸化価はロダン鉄法⁴⁾によって測定した。

その際 500 nm の吸光値が、0.300 に達するまでの日数を誘導期間とした。

(2) 全窒素及びアミノ態窒素の測定⁵⁾

常法によって測定した。

(3) 褐変物質の測定

1. (2) で調製したエキスの液層 1 cm, 波長 420 nm の吸光値をもって示した。

(4) フェノールの測定⁶⁾

CHAN らの方法に従い、N, 2-6-トリクロロパラキネイミン発色法で測定した。試験溶液は、エキスをエタノールを加え 50% エタノール溶液 (v/v) としたものをを用いた。

(5) ニンヒドリン呈色物質の測定⁷⁾

赤堀らの方法に従い行った。

(6) ジアゾスルファニル酸呈色物質の測定⁸⁾

0.5% ジアゾスルファニル酸の 10% 水酸化ナトリウム溶液を試験液に数滴加え呈色反応を行った。

(7) 塩化第二鉄呈色物質の測定⁹⁾

船久保の方法に従い行った。

(8) かつお節エキスの透析膜による分画

かつお節エキス 20 ml (かつお節乾物 0.5 g 相当)を透析膜(三光純薬(株)製)に入れ、蒸留水 500 ml に対して 5℃ で 3 日間透析した。その間、1 日 1 回外液を交換した。透析後、外液及び内液を減圧濃縮し一定量に定容した。

(9) かつお節エキス透析外液の試料前処理用逆相カラムによる分画

逆相用 YMC-DispoC₁₈ (山村化学製)に、かつお節エキス透析外液のかつお節乾物重量 1 g 相当を添加、溶出した。その溶出液と蒸留水 15 ml で溶出した液を合わせて水溶出画分とした。さらに、20, 40, 60, 100% アセトニトリル 20 ml で順次溶出した。各々の分画画分は、減圧濃縮、乾固後蒸留水で一定量に定容した。

(10) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による YMC-DispoC₁₈ 水溶出画分の分画と分画物の抗酸化試験

YMC-DispoC₁₈ 水溶出画分を島津製作所製 LC-6 A に接続した島津テクノロジー製 ODS-H (4 mmφ×150 mm) により分離、分画した。水-アセトニトリル直線濃度勾配を 2 つの溶媒 (A 液: 0.2% トリフルオロ酢酸, B 液: 100% アセトニトリル/0.2% トリフルオロ酢酸) で作製した。アセトニトリルの直線濃度勾配 (0~100%/100 min) で溶出し、流量は 0.8 ml/min, カラム温度は 30℃, 検出は島津製作所製 SPD-6 A により 300 nm で分析を行った。220, 300 及び 350 nm で YMC-DispoC₁₈ 水溶出画分を上記 HPLC 条件で分析したところ、検出成分数は 300 nm で最も多いため検出波長を 300 nm とした。

かつお節乾物重量 10 mg 相当の YMC-DispoC₁₈ 水溶出画分を HPLC により分画した。分画した各ピークは、5 ml 容ねじ口びんに取り減圧濃縮、乾固後蒸留水 0.974 ml に溶解した。2(1) の反応系により抗酸化試験を行った。

(11) アミノ酸組成の測定

試料を 6 N 塩酸で 110℃, 22 時間加水分解後、島津製作所製 LC-9 A に接続した陽イオン交換樹脂を充填した ISC-07/S 1504 Li カラムにより分離し、O-フタルアルデヒド法にて検出定量した。

(12) まいわし落し身の油脂の変敗度測定

-10, -20 及び -30℃ で 30 日及び 90 日保存した試料の過酸化価を測定した。精製エチルエーテルで油脂を抽出し、その過酸化価をウィラー改良法¹⁰⁾により測定しミリ当量/kg で示した。

実験結果及び考察

1. かつお節焙乾工程中的エキス抗酸化力の変化

焙乾工程中的かつお節エキスの抗酸化力を測定し、Fig. 1 に示した。Fig. 1 に示したように生利節エキスにはほとんど抗酸化力は認められなかったが、焙乾を行うことにより抗酸化力が生ずることが認められた。そして、焙乾が進むに従ってエキスの抗酸化力は、焙乾中期(4番火)まで増加し、中期以降はほとんど変わらないことが明らかとなった。

Fig. 1 Changes in antioxidative activity of extracts of katsuobushi during smoking

Cont., control (without additives); 0, namaribushi (Skipjack meat is boiled and smoked once for about an hour); 1, 1 day smoking; 2, 2 days smoking; 3, 3 days smoking; 4, 4 days smoking; 5, 5 days smoking; 6, 6 days smoking; 7, 7 days smoking (arabushi)

2. かつお節エキスの抗酸化成分の検索

(1) かつお節エキスの全窒素、アミノ態窒素、褐変物質及びフェノール量の焙乾中の変化

かつお節エキスの抗酸化成分としてアミノ酸、ペプチド、褐変物質あるいはフェノール性化合物が推定される。

そこで、エキスの全窒素、アミノ態窒素、褐変物質及びフェノール量の焙乾工程中的変化について検討をした。

かつお節エキスの全窒素、アミノ態窒素は、Table 1 に示したように焙乾中顕著な変化は認められなかった。褐変物質は、Fig. 2 に示したように焙乾が進むに従って増加したが、中期以降の生成量は低い。褐変物質は抗酸化力の強い物質であり、エキスの抗酸化力に寄与することは考えられる。また、フェノール量は Table 2 に示したように4番火以降若干増加したが、増加量は少ないことから、かつお節エキスの抗酸化力が増加する原因としてフェノール性化合物以外の抗酸化成分の生成が推定される。

そこで、荒節エキに含まれる抗酸化成分について検討を行った。

Fig. 2 Changes in browning substances of extracts of katsuobushi during smoking

Numbers in figure are the same Fig. 1.

Table 1 Changes in nitrogenous compounds of Katsuobushi during smoking

	After ^{a)} broiling	Days of smoking						
		1	2	3	4	5	6	7 ^{b)}
Total N ^{c)}	15.40	15.60	15.30	15.80	15.30	15.50	15.50	15.30
Extracted N ^{c)}	2.66	2.79	2.70	2.67	2.68	2.65	2.69	2.55
Amino N ^{c)}	0.34	0.35	0.34	0.34	0.38	0.33	0.36	0.35

^{a)} namaribushi

^{b)} arabushi

^{c)} Each value given as g per 100 g dry matter

Table 2 Changes in the content of phenolic compounds of extracts of Katsubushi during smoking

	After broiling	Days of smoking						
		1	2	3	4	5	6	7
Phenolic ^{a)} Compounds	0	2.46	2.50	2.51	2.97	2.57	2.90	2.86

^{a)} Each value given as mg per 100 g dried matter

(2) かつお節エキスの透析膜による分画

透析膜を用いて荒節エキスを透析外液と透析内液に分画し、両画分の抗酸化力を測定した。

その結果、Table 3 に示したように透析外液に強い抗酸化力が認められた。しかし、透析外液の抗酸化力は荒節エキスを比べて弱く、内液との相乗作用により荒節エキスの抗酸化力を形成しているものと推定される。

(3) 荒節エキス透析外液の YMC-DispoC₁₈ による分画

荒節エキス透析外液を YMC-DispoC₁₈ により分画し、各画分の抗酸化力を測定した。Table 4 に示したように、水溶出画分に荒節エキス透析外液の抗酸化成分がほとんど溶出していた。

(4) HPLC による YMC-DispoC₁₈ 水溶出画分の分画

荒節エキス透析外液の YMC-DispoC₁₈ 水溶出画分と荒節と同様に処理した生利節エキス YMC-DispoC₁₈ 水溶出画分を HPLC により比較検討した。その結果を Fig. 3 と 4 に示した。

荒節のエキスを認められた各ピークを分取し、抗酸化試験を行った結果を Fig. 3 に示した。45 成分中約半分に抗酸化力が認められたが、焙乾により著しく増加あるいは新たに生成したと推定される成分で、抗酸化力の強い成分はピーク 1, 9, 21, 23, 27, 31, 32 と 43 であった。荒節エキスの抗酸化試験の誘導期間は約 45 日であるのに対して、それらのピークは 8~11 日でそれほど抗酸化力は強くなかった。各ピークはいずれもニンヒドリン反応陽性であった。塩化第二鉄試薬及びジアゾスルファニル酸試薬には、ピーク 1 のみ陽性であった。ピーク 1 にはフェノール性化合物が含まれていると推定された。

抗酸化力の最も強いピーク 21 及び 43 についてアミノ酸組成を検討した。Table 5 に示したように、ピーク 21 は主要アミノ酸としてセリン、プロリン、グリシン、アラニン、イソロイシンを含有していた。また、ピーク 43 はアスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、グリシ

Table 3 Comparison of antioxidative activities of dialyzable and non-dialyzable fraction from extracts of arabushi

Fraction	Induction period (day)
Control	4.6
Extracts of Arabushi	42.1
Non-dialyzable fraction	7.6
Dialyzable fraction	23.1

Table 4 Antioxidative activities of respective fractions separated on a YMC-Dispo C₁₈ of dialyzable fraction

Fraction	Induction period (day)
Control	5.2
Dialyzable fraction	26.2
Water eluted fraction	22.1
20% Acetonitrile eluted fraction	9.1
40, 60, 100% Acetonitrile eluted fraction	<5.2

ン、アラニンが主要アミノ酸であった。

かつお節エキスの抗酸化力は焙乾工程中に増加するが、その原因として焙乾中に増加あるいは新たに生成すると推定される抗酸化性ペプチドも 1 つの要因と考えられる。それらペプチド以外に、褐変物質や煙由来のフェノール等もエキスの抗酸化力に寄与すると推定される。

3. かつお及びかつお節エキ스가まいわし落し身の酸化安定性に及ぼす影響

かつお及びかつお節エキスをまいわし落し身に添加し、まいわし落し身脂質の酸化安定性に及ぼすエキスの影響を検討した。その結果を Fig. 5 に示した。

かつお及びかつお節エキスのいずれも抗酸化力が認められたが、かつお節エキスの方が強い抗酸化力を示した。

Fig. 3 HPLC chromatogram of water eluted fraction separated on a YMC-Dispo C₁₈ from Arabushi and antioxidative activities of respective peaks separated
C.; control (without additives)

Fig. 4 HPLC chromatogram of water eluted fraction separated on a YMC-Dispo C₁₈ from Namaribushi

かつおエキスの抗酸化力は、アミノ酸、ペプチド類や抽出・濃縮工程中に生成する褐変物質等の影響が考えられる。一方、かつお節エキスでは、それら以外に焙乾中に生成するペプチド類、褐変物質やフェノール類等の抗酸化力への寄与も推定される。

要 約

かつお節エキスの抗酸化力について検討し次の結果を

得た。

(1) かつお節焙乾工程中のかつお節エキスの抗酸化力を測定したところ、抗酸化力は焙乾中期まで増加するが、中期以降は変化がないことが認められた。

(2) かつお節エキスの抗酸化成分について検討した。エキスを透析膜で透析したところ、抗酸化力は主に透析外液に認められた。透析外液を試料前処理用逆相カラム(YMC-DispoC₁₈, 山村化学)により、水とアセトニ

Table 5 Amino acid patterns of fractions 21 and 43 separated by HPLC

Amino acid ^{a)}	Fr. 21	Fr. 43
Tau	0.6	0.4
Asp	3.7	9.9
Thr	1.5	3.5
Ser	7.0	9.2
Glu	3.0	11.0
Pro	21.7	6.7
Gly	8.2	19.8
Ala	21.6	12.0
Val	1.6	4.6
Ile	13.9	2.1
Leu	2.4	4.2
Phe	0.7	3.2
β -Ala	1.4	0.7
HIS	4.7	4.2
IM-HIS	1.6	
Lys	6.4	6.4
Arg		2.1

^{a)} Each value given as molar ratio (%)

トリルの混合液でアセトニトリル濃度を段階的に増加させ溶出した。抗酸化力の認められた水溶出画分を HPLC により分画した。分画した 45 成分の抗酸化力を測定したところ、約半分の成分に抗酸化力が認められた。しかし、強い抗酸化力を示す成分は認められなかった。

(3) かつお節エキスには、焙乾していない生利節にはないかあっても微量な成分で焙乾により新たに生成されるか増加する抗酸化力を持つ成分が HPLC により認められた。それらの成分の中で抗酸化力の強い 2 種の成分のアミノ酸組成を検討した結果、1 つの成分はセリン、プロリン、グリシン、アラニン、イソロイシンが主要アミノ酸であった。他方の成分は、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニンが主要アミノ酸であった。

(4) かつお及びかつお節エキスは、まいわし落し身脂質の酸化を抑制した。

終りにかつお及びかつお節エキスを頂いた(株) 村松に深謝致します。

Fig. 5 Antioxidative activities of extracts of Skipjack and Katsuoobushi on fat contained in minced sardine

▨ control □ extracts of skipjack
■ extracts of katsuoobushi

文 献

- 1) グェン ヴァン チュエン・加藤博通: 日食工誌, 30, 57 (1983).
- 2) 太田静行: ニュー・フード・インダストリー, 27, 85 (1985).
- 3) 加藤博通: 食衛誌, 14, 343 (1973).
- 4) 満田久輝・安本教傳・岩見公和: 栄養と食糧, 19, 210 (1966).
- 5) 永沢 信・後藤たへ・和田せつ・曾根清秀: 食品と栄養の実験 (光生館, 東京), p. 68, 73 (1973).
- 6) W.S. CHAN, R.T. TOLEJO and J. DENG: *J. Food Sci.*, 40, 240 (1975).
- 7) 赤堀四郎・水島三一郎: 蛋白質化学 I (共立出版, 東京), p. 201 (1957).
- 8) 鈴木郁生: 薄層クロマトグラフィーの実際 (廣川書店, 東京), p. 177 (1976).
- 9) 船久保英一: 有機化合物確認法 I, 第 3 版 (養賢堂, 東京), p. 9 (1977).
- 10) 日本油化学協会編: 油脂化学便覧 (丸善, 東京), p. 360 (1958).

(平成 3 年 1 月 4 日受理)