佃煮調味加工条件下でのヒトエグサ酢酸エチル 可溶部の抗酸化活性の維持

森 口 貴 代*

The Stability of Antioxidative Activity of Ethylacetate Extracts of *Hitoegusa* (*Monostroma nitidum*) during Preparation of *Tsukudani*

Takayo MORIGUCHI*

* Kagawa Prefectural Fermentation and Food Experimental Station,
1351-1, Nohma, Uchinomi-cho, Syouzu-gun, Kagawa 761-44

Monostroma nitidum ("Hitoegusa" in Japanese), a kind of greenish seaweeds, is used as a raw material for "Nori-Tsukudani." Strong antioxidative activity was found in ethylacetate-soluble fraction of its methanol extract. Several unidentified component in this fraction showed the activities. "Nori-Tsukudani" is made of *Hitoegusa*, soy sauce and sugar by heating at ca. 80°C for 30 min. The antioxidative activity was stable at such a high temperature, under an acidic and alkaline conditions and also under the presence of high concentration of salt and sugar. The ethylacetate-soluble fraction of soy sauce, which also showed an antioxidative activity, synergistically enhanced the activity of *Hitoegusa*.

(Received Jun. 10, 1992)

ヒトエグサ (*Monostroma nitidum*) は緑藻類アオサ亜目ヒトエグサ科に属する海藻で、食用として伊勢湾を中心に各地で養殖されている。主にのり佃煮の原料となるが、有機溶媒抽出部に、強い抗酸化活性が確認されている¹⁾。特にメタノール抽出物より得られた酢酸エチル可溶部は、 α -トコフェロール以上の抗酸化性を有することを、前報²⁾で報告した。

のり佃煮は、醤油及び砂糖を主原料とした調味液で加熱調味加工して作られる。その為、ヒトエグサに含まれる生理活性物質は、佃煮調味加工条件下で安定でなければ、その有効性が期待できないものと考えられた。

今回、ヒトエグサ酢酸エチル可溶部抗酸化活性の佃煮調味加工条件下での安定性を検討した結果、食品加工上有益な知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 実験材料

ヒトエグサは三重県漁連海苔共販所国府漁協より、平成2年4月に採取した原藻の乾燥品を購入した。

醤油は、香川県内産本醸造濃口特級 JAS の生揚げ醤油 (窒素量 1.65 g/100 mL, 食塩量 16.5 g/100 mL) を用いた。

砂糖は市販上白糖を用いた。

のり佃煮は、香川県内佃煮製造会社より、商品名 (のり佃煮 岩) を購入した。本品の原材料はのり (ヒトエグサ)、醤油、水飴、砂糖、ソルビット、調味料 (アミノ酸等)、カラメル色素、増粘多糖類、酸味料、甘味料 (ステビア、甘草抽出物)、保存料 (ソルビン酸カリウム) であった。

* 香川県発酵食品試験場 (現在: 農水省中国農業試験場 〒721 福山市西深津町 6-12-1) 新姓 三枝

2. 市販のり佃煮からの酢酸エチル可溶部調製

ノリ佃煮 6.00 kg を、メタノール 17.0 l で抽出、濃縮後、再びメタノールを加え、生じた沈澱をろ紙 (No. 101, ADVANTEC 製) で除去した。ろ液を 50℃ で減圧濃縮し、1967 g のメタノール抽出物を得た。これを水 19.0 l, 酢酸エチル 12.0 l 混合液に懸濁し、分液ロートで二層に分離後、得られた酢酸エチル層を 50℃ で減圧濃縮し、17.93 g の酢酸エチル可溶部を得た。

3. 調味加工条件下での安定性の検討

ヒトエグサ 10.0 g に、醤油 40.0 ml, 砂糖 27.0 g, 水 50.0 ml を加え、室温で 60 分間浸漬した後、80℃ で 30 分間加熱処理し、佃煮調味加工品モデルとした。酢酸エチル可溶部の抗酸化性を、水 90.0 ml に室温で 90 分間浸漬したヒトエグサ 10.0 g の酢酸エチル可溶部と比較した。

4. 熱安定性の検討

ヒトエグサ 10.0 g に水 50.0 ml を加え、40, 50, 60, 70, 80, 90, 110, 120℃ で 30 分間加熱処理し、酢酸エチル可溶部の抗酸化性を、室温で浸漬した場合と比較した。

5. pH 安定性の検討

ヒトエグサ 10.0 g に、それぞれ 30.0 ml の緩衝液または水溶液を加え、108℃、5 分間加熱処理した後、酢酸エチル可溶部の活性を測定した。

各緩衝液、及び水溶液組成は以下の通りである。pH 1.0, 塩酸水溶液; pH 3.0~6.0, 0.1 M-Na クエン酸緩衝液; pH 6.0~8.0, 0.1 M-Na リン酸緩衝液; pH 11.0, 水酸化ナトリウム水溶液。

6. 調味料の影響

ヒトエグサ 10.0 g に、それぞれ 40.0 ml の水または 17.0% (w/v) 食塩水、醤油を加え、121℃、5 分間加熱処理した後、酢酸エチル可溶部の活性を測定した。

7. 実験 3~6 における酢酸エチル可溶部調製

加熱処理後のヒトエグサ (乾燥品 10.0 g に相当) を、メタノール 40 ml で 7 回、計 280 ml で抽出し、ろ紙 (No. 101, No. 131, ADVANTEC 製) で 2 回ろ過した後、50℃ で減圧濃縮して、メタノール抽出物を得た。

これを水：酢酸エチル、1：1 (v/v) 混合液 80 ml に懸濁し、分液ロートで二層に分離後、得られた酢酸エチル層を 50℃ で減圧濃縮し、10.0 ml に定容したものを、酢酸エチル可溶部とした。

8. 醤油酢酸エチル可溶部の調製

醤油 40.0 ml にメタノール 280 ml を加え、生じた沈澱をろ過 (No. 101, No. 131, ADVANTEC 製)

によって除去し、得られたろ液を濃縮乾固し、メタノール抽出物を得た。

これを水：酢酸エチル、1：1 (v/v) 混合液 80 ml に懸濁し、分液ロートで二層に分離後、得られた酢酸エチル層を 50℃ で減圧濃縮し、10.0 ml に定容したものを、醤油酢酸エチル可溶部とした。

9. 抗酸化性の測定³⁾

9-1. 酸化処理

実験方法 7 に示した酢酸エチル可溶部をエタノールで 100 倍に希釈し、試料溶液とした。

試料溶液 8.00 ml を、0.2 M-Na リン酸緩衝液 (pH 7.0) 4.00 ml, 蒸留水 20.0 ml, 2.60% (w/v) リノール酸エタノール溶液 8.00 ml と共に、直径 52 mm, 高さ 66 mm のネジ口試料瓶中に入れ、混合、暗所、37.2℃ で静置した。

9-2. ロダン鉄法⁴⁾

9-1 で処理した試料混合液 50 μ l に、エタノール 3.65 ml, 蒸留水 1.20 ml, 30% (w/v) チオシアン酸アンモニウム溶液 50 μ l, 0.05 M-塩酸第一鉄 3.5% (v/v) 塩酸水溶液 50 μ l を加え混合し、5 分後 500 nm での吸光度を測定した。

酸化と共に増大する吸光度の推移を空試験によって記録し、吸光度増加の抑制を抗酸化性とした。

9-3. TBA 法⁵⁾

9-1 で処理した試料混合液 1.50 ml に、20% (w/v) トリクロル酢酸溶液 1.50 ml, 0.67% (w/v) チオバルビツール酸溶液 0.50 ml を加え、湯浴中で 10 分間煮沸処理した。放冷後、15 000 rpm で 7 分間冷却遠心 (10℃) し、上澄の 532 nm での吸光度を測定した。

酸化と共に増大する吸光度増加の推移を空試験によって記録し、吸光度増加の抑制を抗酸化性とした。

実験結果

実験の結果は、ロダン鉄法と TBA 法のいずれかで示すが、すべての実験において、両方法での結果は一致した。

1. 市販のり佃煮酢酸エチル可溶部の抗酸化性

市販ノリ佃煮の酢酸エチル可溶部の抗酸化性とヒトエグサ標品の酢酸エチル可溶部の抗酸化性を比較した (Fig. 1)。

重量当りの比較で、佃煮の酢酸エチル可溶部の方が抗酸化性が高いことが示唆された。

2. 佃煮調味加工モデルの抗酸化性

佃煮調味加工品モデルとヒトエグサ標品とのヒトエグ

サ一定重量当りの抗酸化性を比較した結果を、Fig. 2 に示した。

加工品モデルの方が、ヒトエグサ重量当りの抗酸化活性が高いことが確認された。その原因を明らかにする為に、佃煮調味加工時の各条件である、加熱温度、pH、調味料についてそれぞれ検討することにした。

3. 加熱温度の影響

加熱温度による抗酸化活性への影響を、Fig. 3 に示した。

Fig. 1 Antioxidative activity of ethylacetate-soluble fraction extracted from *Hitoegusa* and *Tsukudani* (Ferric thiocyanate method)

The concentration of sample solution is 0.1 mg/ml

○, *Hitoegusa*; ●, *Tsukudani*

Fig. 2 Antioxidative activity of ethylacetate extracts from *Hitoegusa* and Model of *Tsukudani* (Ferric thiocyanate method)

○, *Hitoegusa*; ●, Model of *Tsukudani*

Fig. 3 Effects of temperature on antioxidative activity of ethylacetate-soluble fraction extracted from *Hitoegusa* (TBA method)

The sample mixtures were incubated for 160 h.

通常の佃煮調味加工温度 (80°C) において、佃煮調味加工モデルに見られるレベルの活性の増大は認められない。

4. pH の影響

結果を、Fig. 4 に示した。

pH の影響は認められない。

この時、pH 4.74 の醤油を比較に用いたが、同じ程度の pH の緩衝液より強い活性が確認された。醤油中に何等かの抗酸化活性物質の存在が示唆された。

5. 調味料の影響

結果を Fig. 5 に示した。

砂糖や食塩の添加で活性の増大は認められない。活性の増大は、醤油の添加のみによる事が示唆された。

6. 醤油酢酸エチル可溶部の抗酸化性

醤油酢酸エチル可溶部の抗酸化性について Fig. 6 に示した。醤油 40 ml 当りの抗酸化活性は、ヒトエグサ 10 g 当りの活性より、はるかに弱い。

そこで、ヒトエグサ 20.0 g 当りの抗酸化活性と、醤油 80.0 ml 当りの抗酸化性、ヒトエグサ 10.0 g と醤油 40.0 ml を加えた時の抗酸化性を比較検討した結果を、Fig. 7 に示した。

ヒトエグサが倍量存在するときよりも、ヒトエグサと醤油が両方存在する方が高い活性が得られた。

Fig. 4 Effects of pH on antioxidative activity of ethylacetate-soluble fraction extracted from *Hitoegusa* (TBA method)

The sample mixtures were incubated for 216 h.

* Concentration 0.1 mg/ml

Fig. 5 Effects of seasonings on antioxidative activity of ethylacetate-soluble fraction extracted from *Hitoegusa* (TBA method)

The sample mixtures were incubated for 8 days.

考 察

抗酸化剤には水溶性の物質と脂溶性の物質が存在するが、現在広く天然より検索され、求められている物質は、脂溶性の抗酸化剤である。

脂溶性の抗酸化剤には、安全性、効果性、経済性の全ての条件を満たす物質が、現在のところ実用化されてい

Fig. 6 Antioxidative activity of soy sauce (Ferric thiocyanate method)

○, control (without additives);
●, soy sauce; △, *Hitoegusa*;
▲, *Hitoegusa* and soy sauce.

Fig. 7 Combination of antioxidative activity of ethylacetate-soluble fraction extracted from *Hitoegusa* and soy sauce (Ferric thiocyanate method)

○, soy sauce 40.0 ml; ●, soy sauce 80.0 ml; △, *Hitoegusa* 10.0 g; ▲, *Hitoegusa* 20.0 g; □, *Hitoegusa* 10.0 g and soy sauce 40.0 ml.

ない⁶⁾ 為でもあるが、それ以上に、食品の酸化においては脂質の酸化が最も発生し易く深刻な問題である点と、酸素による細胞傷害が主として細胞膜結合系で生じることなどの理由があげられる。

前報²⁾ でヒトエグサ酢酸エチルの可溶部より抗酸化活性物質の単離を試みたが、活性は広い極性にわたって

り、多数の成分が存在することが示唆された。これらの成分は大部分有色であり、その中にはヒトエグサ近縁緑藻アオノリより単離同定されている、フィオフィチン^{a7)}の様な、クロロフィル改変物質やカロチノイドが含まれる可能性が高い。

醤油中に強い抗酸化活性があることはすでに山口⁸⁾によって報告されており、その原因物質は主として、メラノイジン、アミノ酸、ペプチド、核酸等のチッ素化合物と考えられている⁹⁾。

ノリ佃煮加工において、醤油の使用量は、ヒトエグサとの重量比で 0~500% と多岐にわたっているが、酢酸エチル可溶部に限定すれば、最大(本実験での佃煮調味加工品モデルでの重量比)でも、醤油単独での活性はヒトエグサの活性に遠く及ばなかった(Fig. 6)。しかし、ヒトエグサと共存することによって、ヒトエグサを倍量用いたとき以上の活性を得ることが出来。二つの食品の成分が抗酸化において相乗作用を示すことが示唆された(Fig. 7)。

山口⁸⁾は、ペプチドの抗酸化性から、醤油を各種油脂食品に使用することを推奨しているが、今回の結果から、この効果は、ヒトエグサにおいて特に大きいことが示唆された。

要 約

佃煮原藻ヒトエグサの酢酸エチル可溶部が有する強い抗酸化活性の佃煮調味加工条件における安定性を検討した。

(1) 市販佃煮の酢酸エチル可溶部の抗酸化活性はヒトエグサより大きい。これは、ヒトエグサ、醤油、砂糖、

水のみから作った佃煮調味加工品モデルでも同様であった。

(2) ヒトエグサ酢酸エチル可溶部の抗酸化活性は、加熱、pH の変化、食塩や砂糖の添加等の条件下で、ほぼ不変であった。

(3) ヒトエグサ酢酸エチル可溶部の抗酸化活性は醤油の添加によって増大した。

(4) 醤油の酢酸エチル可溶部に抗酸化活性を確認したが、ヒトエグサと比べてその活性は非常に小さかった。

(5) ヒトエグサと醤油の脂溶性抗酸化物質は、相互作用によって強い抗酸化活性を示す事が示唆された。

文 献

- 1) 藤田修三・中井晴美・藤田静子・広川 清・曾根良昭・中谷延二: 栄食誌, 41, 411 (1988).
- 2) 森口貴代: 香川県発酵食品試験場報告, 83, 25 (1990).
- 3) INATANI, R., NAKATANI, N. and FUWA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 47, 521 (1983).
- 4) 満田久輝・安本教傳・岩見公和: 栄養と食糧, 19, 210 (1966).
- 5) OTTOLENGHI, A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 79, 355 (1959).
- 6) 山口直彦: *New Food Industry*, 32-1, 68 (1990).
- 7) 西堀 すき江・並木和子: 家政誌, 39, 1173 (1988).
- 8) 山口直彦・梶原良夫・藤巻正夫: 日食工誌, 26, 71 (1979).
- 9) 山口直彦: *New Food Industry*, 31-8, 18 (1989).

(平成 4 年 6 月 10 日受理)