

学 位 論 文 題 名

糸状菌*Aspergillus niger*の産生する抗酸化物質に関する研究

学位論文内容の要旨

トコフェロールを含めて天然物由来の抗酸化剤は、BHAやBHTなどの化学合成抗酸化剤より抗酸化効果が小さく、安定性も低いことが大きな欠点である。そこで、トコフェロールよりも効果の優れた合成抗酸化剤並みの効果を有する抗酸化性天然物あるいはトコフェロールの機能を大幅に向上させるような相乗剤の探索が精力的に行われている。

本研究では、糸状菌の抗酸化物質産生機能の食品への応用を目的として、抗酸化物質を産生する糸状菌の検索と同定を行うとともに、抗酸化物質産生菌として分離した *Aspergillus niger* 群糸状菌によって産生される主要抗酸化物質について検討した。

まず、抗酸化物質産生糸状菌を検索するため、32の食品検体から48株の糸状菌を分離し、それらの菌株をMYPG液体培地で培養した後、培養物の酢酸エチル抽出物のリノール酸に対する抗酸化性をスクリーニングしたところ、44株に抗酸化性を認め、中でも乾燥椎茸から分離した菌株A-12の抽出物が最も強い抗酸化力を示した。この菌株は、その形態学的特徴から、*Aspergillus niger* に同定でき、*Aspergillus niger* ATCC 90831株としてAmerican Type Culture Collectionに寄託・登録された。

次に、この抗酸化物質産生菌 *Aspergillus niger* ATCC 90831株の培養濾液の酢酸エチル抽出物から、調製薄層クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などによって主要抗酸化物質として物質Jを単離した。この抗酸化物質Jの構造は、質量分析およびNMRな

どの情報を総合的に検討して、3,6,7,9-テトラヒドロキシ-8-メトキシ-4-メチルフェナレン-1-オン (TMMP) と推定した。本物質は、各種データベース検索の結果、新規物質と判断された。

TMMPのリノール酸に対する200ppm添加系の抗酸化力は、 α -トコフェロール200ppm添加系の約1/4であったが、TMMPとトコフェロールのそれぞれ200ppm混合添加系では相乗効果を発揮し、特に δ -トコフェロールを主成分とするイーミックス-Dよりも α -トコフェロールとの相乗性に優れていた。また、180℃で6時間加熱処理したTMMPのリノール酸に対する抗酸化力は、熱安定性の低いトコフェロール類とは対照的に、非加熱TMMPの抗酸化力の4.8倍に上昇し、 α -トコフェロール以上の抗酸化力を示した。さらにこの加熱処理TMMPは非加熱TMMPよりもトコフェロールとの相乗効果が大きく、さらにはアスコルビン酸パルミテートのトコフェロールに対する相乗効果をも上回った。

さらに、*Aspergillus niger* ATCC 90831株と同じ *Aspergillus niger* 群に属する糸状菌の中で、*Aspergillus niger* IFO 31125株が極めて強い抗酸化物質産生機能を示すことを見出し、この菌株によって産生される抗酸化物質の機能についても検討した。

Aspergillus niger IFO 31125株のYG液体培地による培養濾液から酢酸エチルによる中性抽出画分から逆相HPLCによって分取した主要な7ピーク成分 (No.1~7) は、いずれもリノール酸に対する過酸化物質生成抑制、フェノール試薬の還元およびDPPHのラジカル消去の効果を有し、それらの中でもNo.2の成分が各指標において優れていた。

No.2成分のリノール酸に対する200ppm添加系の抗酸化力は、 α -トコフェロール200ppm添加系の約2/3であった。また、No.2成分は、トコフェロール類とそれぞれ200ppmの混合添加系においては相乗効果は認められなかったが、アスコルビン酸パルミテートとのそれぞれ200ppm混合添加系においては約2.8倍の酸化誘導期の延長が認められた。No.1~7の各ピーク成分は、紫外-可視吸収スペクトルおよびGibbs試薬による呈色反応からアウラスペロンなどのナフト- γ -ピロン類が主成分と推定された。

Aspergillus niger ATCC 90831株、IFO 31125株の両菌株から、本研究で分離した抗酸化物質は、ともに Folin・Ciocalteuのフェノール試薬の還元性を持ち、フェノール性化合物としての水素供与体あるいは電子供与体として、油脂の自動酸化において生成されるラジカルを捕捉する機能を保有しており、それが主要な抗酸化機構と考えられる。

Aspergillus niger ATCC 90831株によって産生されるTMMPは、それ自体の抗酸化力よりも、トコフェロール類との相乗効果に優れている点が特徴であり、一方、*Aspergillus niger* IFO 31125株によって産生される抗酸化物質（ピークNo.2）は、トコフェロールとの相乗効果は見られないが、それ自体による抗酸化力はTMMPよりも強い点が特徴である。IFO 31125株からは TMMPに相当する物質の産生も認められ、これとともに、No.2と同時に分離されたNo.1～7の類縁物質群は、*Aspergillus niger* IFO 31125株の代謝産物としての抗酸化機能に大きく寄与するものと推察される。

両菌株による抗酸化物質の効果は加熱に対しても低下せず、むしろTMMPは加熱によって効果が著しく向上することが観察された。紫外・可視吸収スペクトルなどからTMMPの構造が加熱によって変化することが推察された。

Aspergillus niger 糸状菌を固体基質に培養した場合、菌株、基質の種類によって生成する抗酸化物質のプロフィールが異なり、TMMPやナフトピロン類をはじめとする抗酸化物質の産生によって抗酸化機能が発揮されることに加えて、糸状菌による酸化生成物の分解作用も考えられた。

本研究では、*Aspergillus niger* に属する2菌株の抗酸化機能としての抗酸化物質産生について検討を行ったが、単離された抗酸化物質以外にも、抗酸化活性、水素供与性あるいは電子供与性を有する多数の化合物が共存することを抽出・分画の過程で観察した。これらの物質は、単独ではさほど抗酸化力を示さないが、いくつかの物質が共存する粗画分の場合には比較的強力な抗酸化力を示すことがあった。種々の抗酸化機能を持った物質が共存し、相互作用する場合には 優れた抗酸化機能を発揮

するものと考えられ、実際に抗酸化剤として使用するに当たっては、各物質の機能をもとに組成を処方し、抗酸化剤をデザインすることが重要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 信 濃 晴 雄

副 査 教 授 羽 田 野 六 男

副 査 教 授 猪 上 徳 雄

学 位 論 文 題 名

糸状菌*Aspergillus niger*の産生する抗酸化物質に関する研究

本研究では、糸状菌の抗酸化物質産生機能の食品への応用を目的として、抗酸化物質を産生する糸状菌の検索と同定を行い、その培養によって得られた抗酸化物質の構造と機能特性について検討するとともに、既知の *Aspergillus niger* 群糸状菌によって産生される主要抗酸化物質の構造と機能についても比較検討している。

まず、抗酸化物質産生糸状菌を検索するため、32の食品検体から48株の糸状菌を分離し、それらの菌株をMYPG液体培地で培養した後、培養物の酢酸エチル抽出物のリノール酸に対する抗酸化性をスクリーニングしたところ、44株に抗酸化性を認め、中でも乾燥椎茸から分離した菌株A-12の抽出物が最も強い抗酸化力を示すことを確認している。この菌株は、その形態学的特徴から、*Aspergillus niger* に同定でき、現在 *Aspergillus niger* ATCC 90831株としてAmerican Type Culture Collectionに寄託・登録されている。

次に、この抗酸化物質産生菌 *Aspergillus niger* ATCC 90831株の培養濾液の酢酸エチル抽出物から、調製薄層クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などによって主要抗酸化物質として物質Jを単離した。この抗酸化物質Jの構造は、質量分析およびNMRなどの情報を総合的に検討して、3,6,7,9-テトラヒドロキシ-8-メトキシ-4-メチルフェナレン-1-オン (TMMP) と推定した。本物質は、各種データベース検索の結果、新規物質と判断しているが、この成果は新しい知見として評価できる。

TMMPのリノール酸に対する200ppm添加系の抗酸化力は、 α -トコフェロール200ppm添加系の約1/4であったが、TMMPとトコフェロールのそれぞれ200ppm混合添加系では相乗効果を発揮し、特に δ -トコフェロールを主成分とするイーミックス-Dよりも α -トコフェロールとの相乗性に優れていた。また、180℃で6時間加熱処理したTMMPのリノール酸に対する抗酸化力は、熱安定性の低いトコフェロール類とは対照的に、非加熱TMMPの

抗酸化力の4.8倍に上昇し、 α -トコフェロール以上の抗酸化力を示した。さらにこの加熱処理TMMPは非加熱TMMPよりもトコフェロールとの相乗効果が大きく、さらにアスコルビン酸パルミテートのトコフェロールに対する相乗効果をも上回る結果を確認しているが、特異的な相乗効果と耐熱性を有することから考えられる加熱加工食品に対する応用など、興味ある結果である。なお、この結果は紫外-可視吸収スペクトルなどからTMMPの構造が加熱によって変化することを推察させた。

さらに、*Aspergillus niger* ATCC 90831株と同じ *Aspergillus niger* 群に属する糸状菌の中で、*Aspergillus niger* IFO 31125株が極めて強い抗酸化物質産生機能を示すことを見出し、この菌株によって産生される抗酸化物質の機能についても検討した。

Aspergillus niger IFO 31125株のYG液体培地培養濾液から酢酸エチルによる中性抽出画分から逆相HPLCによって分取した主要な7ピーク成分(No.1~7)は、いずれもリノール酸に対する抗酸化効果を有し、それらの中でもNo.2の成分が最も優れていることをみている。

No.2成分のリノール酸に対する200ppm添加系の抗酸化力は、 α -トコフェロール200ppm添加系の約2/3で、また、No.2成分は、TMMPとは異なりトコフェロール類とのそれぞれ200ppmの混合添加系においては相乗効果が認められないことを観察している。No.1~7の各ピーク成分は、紫外-可視吸収スペクトルおよびGibbs試薬による呈色反応からアウラスペロンなどのナフト- γ -ピロン類が主成分と推定しており、また、TMMPに相当する物質の産生も認めている。これらの結果はこの種糸状菌の代謝機能が同一種であっても極めて多様であり、今後の研究の方向付けに大きく寄与するものとして評価できよう。

Aspergillus niger ATCC 90831株、IFO 31125株の両菌株から、本研究で分離した抗酸化物質は、ともにFolin-Ciocalteuのフェノール試薬の還元性を持ち、フェノール性化合物としての水素供与体あるいは電子供与体として、油脂の自動酸化において生成されるラジカルを捕捉する機能を保有しており、それが主要な抗酸化機構と考えている。

また、両菌株の抗酸化物質産生プロファイルの検討の結果、単離された抗酸化物質以外にも、水素供与性を有する多数の化合物を観察しており、これらの種々の抗酸化機能を持った物質が共存し、相互作用する場合には優れた抗酸化効果を発揮するものと考えられ、実際に抗酸化剤として使用するに当たっては、各物質の機能をもとに組成を処方し、抗酸化剤をデザインすることの重要性を指摘している。

以上の本研究で得られた成果は、古くて新しい課題である食品の酸化防止の分野に貢献するところ大きく、また、微生物機能開発の面でも新しい方途を示唆するものとして高く評価できる。よって審査員一同は申請者が博士(水産学)の学位を受けるに十分な資質を有するものと認定した。