

脱脂大豆製麹過程におけるイソフラボン類の変動と クッキー焼成および貯蔵時における安定性

江崎秀男*・志村亜希子*・中村好志*

Changes of Isoflavone Analogs during Koji Making Process using Defatted Soybeans
and Their Stability during Baking and Storage of Cookies

Hideo ESAKI, Akiko SHIMURA and Yoshiyuki NAKAMURA

1. はじめに

大豆中には種々の生理活性物質が含まれているが、イソフラボン類も多種多様な生理機能を示し、予防医学の面からも特に注目されている¹⁾。イソフラボン類のエストロゲン作用は、骨粗鬆症の予防、更年期障害の改善、前立腺癌の抑制などに寄与する。他方、イソフラボン類はエストロゲンと拮抗的に働き、その活性レベルを低下させる作用も示す。この抗エストロゲン作用は、乳癌の予防に役立つ。また大豆イソフラボン類は抗酸化作用を示し、生体内においても脂質過酸化反応を抑制して動脈硬化を予防し²⁾、さらには癌予防にも効果を示すことが知られている³⁾。

著者らは、これまで種々の大豆発酵食品についてその機能性、特に抗酸化性について研究を行ってきた⁴⁾⁻⁷⁾。この一連の研究のなかで、豆味噌や醤油などはその醸造過程において、原料大豆中のイソフラボン配糖体（Daidzin や Genistin）が麹菌の産生する β -グルコシダーゼおよび水酸化酵素の作用により、強い抗酸化性を示す8-Hydroxydaidzein（8-OHD）や8-Hydroxygenistein（8-OHG）などの*ortho*-Dihydroxyisoflavone（ODI）に変換されることを見出した（図1）⁸⁾。また、この8-OHDはラットを用いた動物実験においても、生体内抗酸化作用を示すことを報告した⁷⁾。

本研究においては、脱脂大豆に味噌や清酒などに使用される各種麹菌を接種して麹造りを行い、この製麹過程における8-OHDや8-OHGなどのイソフラボン類の生成・変動を調べた。また、これらの脱脂大豆麹の抗酸化能を調べるとともに、新しい機能性食品素材としての有用性を検討することにした。

* 生活科学部 管理栄養学科

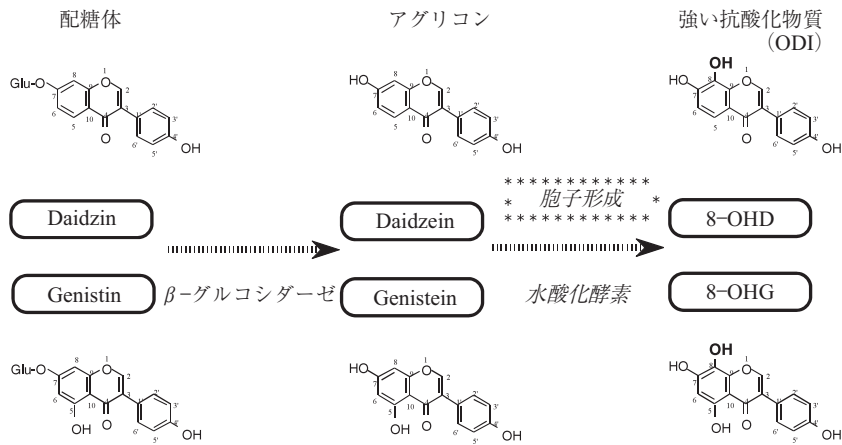


図1 豆味噌の醸造過程における新規イソフラボン類 (8-OHD, 8-OHG) の生成

2. 実験方法

2.1 製麹日数の異なる各種脱脂大豆麹の調製

各種脱脂大豆麹の調製には、豆味噌、米味噌、麦味噌、濃口醤油、甘酒、清酒、泡盛に使用される8種類の麹菌（ビオック株式会社）を使用した。菌株の種類は、*A. oryzae* KBN 606, *A. oryzae* KBN 919, *A. oryzae* KBN 930, *A. oryzae* KBN 943, *A. oryzae* KBN 950, *A. oryzae* KBN 969, *A. oryzae* KBN 1010および*A. saitoi* IAM 2210である。

原料脱脂大豆に同量の蒸留水を加え、5℃で一晩の吸水を行った後、オートクレーブで加熱処理（115℃、20分間）を行った。この蒸煮脱脂大豆に、脱脂大豆の重量の0.02%に相当する各種麹菌胞子の懸濁液（8種類）を接種し、30℃の恒温器で培養を行った。

この間、製麹日数1日目、2日目、3日目、4日目、6日目、7日目で各種脱脂大豆麹を取り出し、これらを即座に冷凍した。その後、凍結乾燥を行い、コーヒーマイルで粉碎し、凍結乾燥粉末（FDP：Freeze Dried Powder）を得た。

2.2 各種脱脂大豆麹の抗酸化力の測定

製麹日数の異なる各種脱脂大豆麹のFDP0.7gずつを精秤し、ここに70%エタノール7.0mLを加え、振とう抽出（20℃、一晩）を行った。遠心分離（3500rpm、20分間）後、得られた上澄み液をフィルター処理し、その4倍希釈液20 μ Lを試料溶液（サンプル）として抗酸化力の測定を行った（n=4）。

抗酸化力の測定は、DPPH（1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl）ラジカル捕捉能試験法⁹⁾を用いて行った。すなわち、各サンプル溶液20 μ Lにトリス塩酸緩衝液（pH 7.4）80 μ Lを混合し、ここにDPPH / エタノール溶液100 μ Lを加え、10秒間攪拌し、20分後にマイクロプレートリーダーを用いて540nmにおける吸光度を測定した。コントロール（対照実験）として、サンプル溶液の代わりに75%エタノールを用いて、サンプル群と同様の操作を行い、540nmにおける吸光度を測定した。

各サンプルのDPPHラジカル捕捉能は、次式により算出した。サンプル添加時のDPPH

脱脂大豆製麩過程におけるイソフラボン類の変動とクッキー焼成および貯蔵時における安定性

ラジカルの減少に伴う吸光度の減少量を求め、この値をコントロールの吸光度で除し、得られた値に100を乗じてDPPHラジカル捕捉率(%)を算出した。DPPHラジカル捕捉率が高いほど、サンプルは強い抗酸化力を有することになる。

$$\text{DPPHラジカル捕捉率 (\%)} = \frac{\text{サンプルの吸光度の減少量}}{\text{コントロールの吸光度}} \times 100$$
$$= \frac{\text{コントロールの吸光度} - (\text{サンプルの吸光度} - \text{サンプル盲検の吸光度})}{\text{コントロールの吸光度}} \times 100$$

2.3 各種脱脂大豆麩中のイソフラボン類の分析

製麩日数の異なる各種脱脂大豆麩のFDP1.0gずつを精秤し、ここに0.1% BHTおよび内部標準物質として50ppmのクロラムフェニコール (CP) を含む70%エタノール溶液4.0mLを加え、振とう抽出(20℃, 一晚)を行った。遠心分離後、得られた上澄み液をフィルター処理し、その20μLを試料溶液として、フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M10A, Shimadzu) を装備した三次元HPLCにてイソフラボン類の同定および定量を行った。

HPLCの分析条件は、カラム; Develosil ODS-UG-5 (4.6 i.d. × 250mm, NOMURA CHEMICAL CO., LTD.), カラム温度: 35℃, 溶離液: 0.1% トリフルオロ酢酸 / 40% メタノール, 流速: 0.7mL/min, 測定波長: 220nm–370nm, 検出波長: 262nmとした。各イソフラボン類の検量線より、各試料溶液20μL中のダイジン, ゲニスチン, ダイゼイン, ゲニスチン, 8-OHDおよび8-OHGの含有量を求め、さらに各種脱脂大豆麩のFDP100g中に含まれるそれぞれのイソフラボン量を算出した。

2.4 A. *saitoi* 脱脂大豆麩添加クッキーの調製および貯蔵

A. *saitoi* IAM 2210脱脂大豆麩添加クッキーの調製には、薄力小麦粉70g, 製麩日数3日目の大豆麩のFDP30g, 砂糖50g, バター50gおよび卵30gを使用した。これらの材料をそれぞれ混合し、直径4cmの円柱状の生地を調製し、4℃で1時間ねかした後、5mmの厚さに切り分けた。整形したクッキー生地は180℃で10分間の焼成を行った(焼成後)。また、一部の生地は-30℃で保存し、焼成前のクッキーとした。

焼成後のクッキーは、滅菌シャーレに1個ずつ入れて蓋を被せた後、35℃の恒温器で一定期間貯蔵した。この間、貯蔵日数0, 1, 2, 3, 6, 12, 22日目にそれぞれ麩添加クッキーを取り出し、これらを即座に-30℃で保存した。

2.5 クッキー中のイソフラボン類の分析

-30℃で冷凍保存されていたそれぞれのクッキーおよび焼成前のクッキー生地は、解凍後、乳鉢を用いて粉碎し、クッキー粉末とした。このクッキー粉末2.0gを精秤し、ここに0.1% BHTおよび50ppmのCPを含む70%エタノール溶液4.0mLを加え、振とう抽出(20℃, 一晚)を行った。遠心分離によって得られた上澄み液の油分を除去した後、フィルター処理し、その20μLを用いてイソフラボン類の同定および定量を2.3で述べたHPLC条件で行った。

3. 結果および考察

3.1 各種麹菌を用いた脱脂大豆麹の抗酸化性

大豆麹の抗酸化力評価のための試料溶液の調製には、大豆中のイソフラボン類が効率よく抽出される70%エタノールを使用した。8種類の麹菌 (*A. saitoi* IAM 2210, *A. oryzae* KBN 606, *A. oryzae* KBN 919, *A. oryzae* KBN 930, *A. oryzae* KBN 943, *A. oryzae* KBN 950, *A. oryzae* KBN 969, *A. oryzae* KBN 1010) で培養した製麹日数の異なる脱脂大豆麹より、70%エタノール抽出液を調製し、DPPH法による抗酸化性を調べた。その結果を図2に示した。この図から明らかなように、製麹日数の経過とともにいずれの脱脂大豆麹においても、その抗酸化力は増強した。しかし、その増強の程度には差が認められた。*A. oryzae* KBN 919, *A. oryzae* KBN 969および*A. oryzae* KBN 1010株を用いた麹の発酵にともなう抗酸化力の増強は微弱であった。他方、*A. saitoi* IAM 2210, *A. oryzae* KBN 943および*A. oryzae* KBN 950株を用いた場合には、これらの脱脂大豆麹の抗酸化力はDPPH捕捉率25%以上まで上昇した、なかでも、沖縄地方の泡盛の製造に使用される*A. saitoi* IAM 2210株を用いた場合には、製麹日数1日目において捕捉率34%という抗酸化力を示し、3日目、4日目においては麹の抗酸化力はさらに増大し、それぞれ捕捉率42%、57%という高い値を示した。

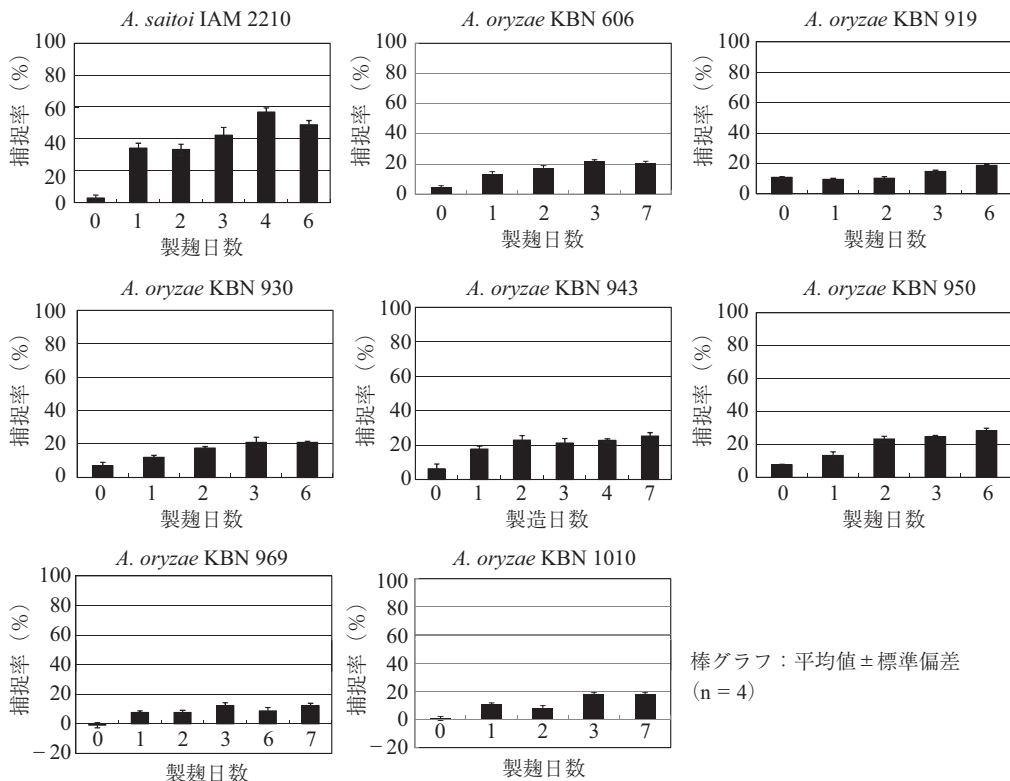


図2 各種麹菌を用いた脱脂大豆麹の抗酸化性の変動

3.2 各種脱脂大豆麹の製麹過程におけるイソフラボン類の変動

著者らは、これまでに豆味噌用の味噌玉麹¹⁰⁾や醤油麹¹¹⁾中に強い抗酸化性を示すODI、すなわち8-OHDや8-OHGなどのイソフラボン水酸化物が含まれていることを明らかにした。また、これらのイソフラボン類は、味噌や醤油の醸造過程で分解されることもなく、日常摂取しているこれらの食品中に含有されていることを考慮すると、ODIの抗酸化的作用は大きく、味噌や醤油の製造時および流通・貯蔵時における酸化的品質低下を防ぐのみならず、生体内における酸化ストレスの防御に繋がる可能性⁷⁾を有している。

本研究では、脱脂大豆を原料として、豆味噌、米味噌、麦味噌、濃口醤油、甘酒、清酒、泡盛に使用される8種類の麹菌を用いて製麹日数の異なる各種大豆麹を調製し、これらの麹中の強い抗酸化力を有する8-OHDおよび8-OHGをはじめとする各種イソフラボン類の変動を調べた。その結果を図3に示したが、いずれの麹菌においても、大豆中の主要なイソフラボン配糖体であるダイゼインおよびゲニステインは、これら麹菌の産生する β -グルコシダーゼによりそれぞれダイゼインおよびゲニステインに変換された。製麹日数2日目において、脱脂大豆中の配糖体はほとんど分解されていた。2日目以降のイソフラボン類の変動は、麹菌の菌株によって大きな差異が認められた。*A. oryzae* KBN 919および*A. oryzae* KBN 969では、製麹日数の経過とともにダイゼイン含量は顕著に増加したが、ゲニステイン含量は製麹日数1日目が最大値を示し、その後減少傾向にあった。ダイゼインやゲニステインの8位が水酸化された8-OHDや8-OHGの生成は、*A. saitoi* IAM 2210、*A. oryzae* KBN 606、*A. oryzae* KBN 930、*A. oryzae* KBN 943、*A. oryzae* KBN 950および*A. oryzae* KBN 1010で認められたが、その生成量および出現のパターンは菌株の種類によって大きく異なっていた。なかでも、*A. saitoi* IAM 2210を用いた脱脂大豆麹では、8-OHGの生成が顕著に進行し、製麹1日目、2日目、3日目においてそれぞれ23mg、33mg、34mg/100g乾物というレベルまで高含量化した。図2において、この菌株を用いた脱脂大豆麹が、他の麹に比べ顕著に強い抗酸化性を示しているが、その主要な活性成分としてこの8-OHGの役割は大きいと考察される。また、8-OHDの生成量も他の脱脂大豆麹よりも多いことから、このイソフラボンも*A. saitoi* IAM 2210を用いた麹の抗酸化力の増強に寄与していると考えられる。

3.3 クッキー焼成時および貯蔵時におけるイソフラボン類の安定性

強い抗酸化力を有する8-OHDおよび8-OHGは酸化反応を受けやすく、容易に分解される可能性は大きい。特に、これらのイソフラボン類が水溶液中で単独に存在する場合、比較的容易に分解・消失する。しかし、味噌汁という複合系食品中では8-OHDおよび8-OHGは沸騰水中で30分間加熱しても、有意な減少は認められなかった。また、豆味噌を30℃で9か月間貯蔵しても、これらのイソフラボン類はほとんど減少しないことを報告した⁶⁾。本研究では、この8-OHDおよび8-OHGを多く含有する*A. saitoi* IAM 2210を用いた3日目の脱脂大豆麹(*A. saitoi* 脱脂大豆麹)の食品素材としての有用性を検討するために、この麹中の8-OHDおよび8-OHGなどのイソフラボン類が、クッキーという脂質含量が多く、水分活性が低い食品中で安定であるか否かを調べた。

まず、*A. saitoi* 脱脂大豆麹添加クッキーの焼成時における各種イソフラボン類の変化を図4に示した。この図から明らかのように、クッキー生地中の8-OHD、8-OHG、ダイゼ

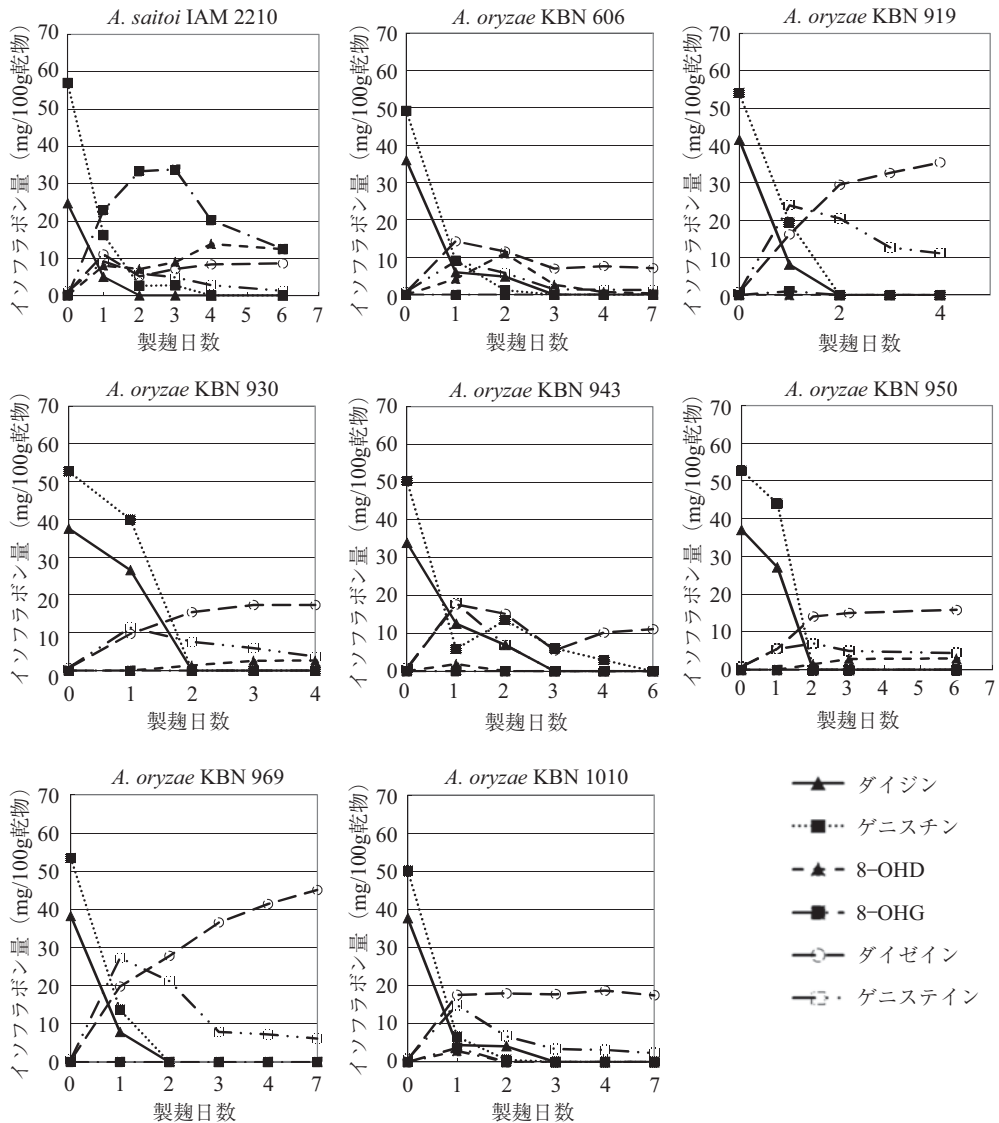


図3 各種脱脂大豆麴の製麹過程におけるイソフラボン類の変動

イソおよびゲニステインは、180℃で10分間加熱（焼成）してもほとんど分解されることもなく安定であった。また、このクッキーを35℃の恒温器で22日間貯蔵し、経時的にイソフラボン類の定量を行い、その結果を図5に示した。最も強い抗酸化力を有する8-OHG¹²⁾は、焼成後（貯蔵日数0日目）のクッキー100g中に6.0mg含まれていたが、その含有量はこのクッキーを22日間貯蔵してもほとんど減少することもなく、ほぼ一定値を示した。また、8-OHGに次いで抗酸化力の強い8-OHD、ゲニステインおよびダイゼインも、同様に減少しなかった。

この実験においては、麴の原料である脱脂大豆を、大豆麴と同じ割合で添加したクッキー

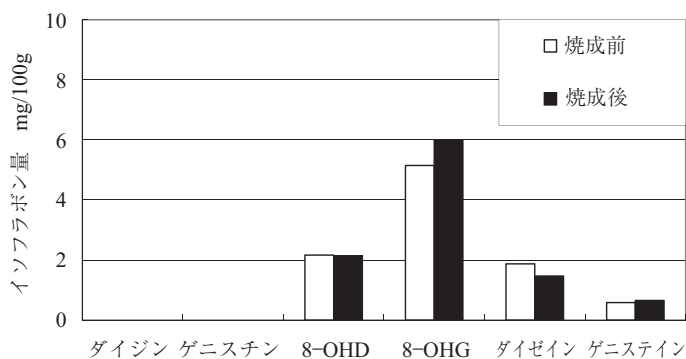


図4 クッキー焼成時におけるイソフラボン類の変化

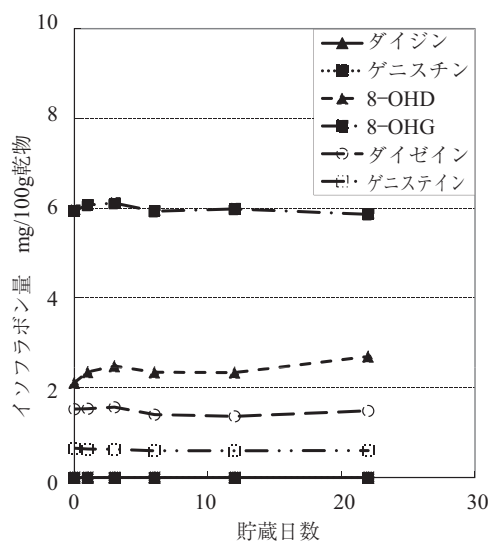


図5 クッキー貯蔵時におけるイソフラボン類の変動

(脱脂大豆クッキー)も調製し、*A. saitoi*脱脂大豆麹添加クッキーとともに35℃で貯蔵した。22日間貯蔵後の両クッキーの匂いの評価を行ったところ(データ掲載せず)、脱脂大豆クッキーは脂質酸化にともなう異臭が認められた。一方、*A. saitoi*脱脂大豆麹添加クッキーではこの異臭は全く認められず、脂質酸化が十分に抑制されていたと推察される。この大豆麹添加クッキーの酸化抑制には、特にクッキー中の麹由来の8-OHGや8-OHDが大きく寄与していると考察される。

4. まとめ

脱脂大豆は良質のたんぱく質の他、イソフラボン類やサポニン類などの多種多様な機能性成分を含んでいる。また、我が国の伝統的な発酵食品に利用されてきた麹菌は、種々の

酵素を豊富に産生し、発酵食品の一次機能、二次機能、三次機能を高めることが知られている。本研究では、この脱脂大豆を各種麹菌で発酵させ、特に抗酸化能の高い食品素材を調製するとともに、麹菌の微生物変換によって新たに生成する抗酸化成分（特に、8-OHGおよび8-OHD）の分析を行った。8種類の麹菌のなかでは、黒麹菌 *A. saitoi* で発酵させた脱脂大豆麹が最も強い抗酸化活性を示し、この活性の発揮には特に8-OHGおよび8-OHDが大きく寄与していた。

この抗酸化能の高い *A. saitoi* 脱脂大豆麹を用いてクッキーを調製し、35℃で22日間の貯蔵試験を行った。焼成時に8-OHGおよび8-OHDが分解されることもなく、また貯蔵時においてもこれらのイソフラボン類は減少せず、クッキーの脂質酸化を抑制し品質劣化を防ぐことができた。今後、この脱脂大豆麹の新たな機能性食品素材としての有用性をさらに評価する必要がある。

謝辞

本研究において、各種麹菌を提供いただきました株式会社ビオックの和久豊氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 渡邊昌, イソフラボン類の生理活性, 「大豆イソフラボン」, 家森幸男, 大田静行, 渡邊昌編 (幸書房, 東京), pp. 39-47 (2001).
- 2) Tikkanen, M. J., Wähälä, K., Ojala, S., Vihma, V. and Adlercreutz, H., Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 3106-3110 (1998).
- 3) Watanabe, S., Haba, R., Tarashima, K., Arai, Y., Miura, T., Chiba, D. and Takamatsu, M., Antioxidant activity of isoflavones in humans. *BioMarker*, **10**, 227-232 (2000).
- 4) Esaki, H., Onozaki, H. and Osawa, T., "Antioxidative Activity of Fermented Soybean Products." in Food Phytochemicals for Cancer Prevention I, ed. by Huang, M.-T., Osawa, T., Ho, C.-T. and Rosen, R.-T., American Chemical Society, Washington, pp. 353-360 (1994).
- 5) Esaki, H., Kawakishi, S., Morimitsu, Y. and Osawa, T., New Potent Antioxidative *o*-Dihydroxyisoflavones in Fermented Japanese Soybean Products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1637-1639 (1999).
- 6) 江崎秀男, 川岸舜朗, 井上昂, 大澤俊彦, 味噌中のオルトジヒドロキシイソフラボンとその抗酸化性, 食科工, **48**, 51-57 (2001).
- 7) Esaki, H., Shirasaki, T., Yamashita, K., Nakamura, Y., Kawakishi, S. and Osawa, T., Absorption and Excretion of the 8-Hydroxydaidzein in Rats after Oral Administration and Its Antioxidant Effect. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 80-86 (2005).
- 8) Esaki, H., Watanabe, R., Onozaki, H., Kawakishi, S. and Osawa, T., Formation Mechanism for Potent Antioxidative *o*-Dihydroxyisoflavones in Soybeans Fermented with *Aspergillus saitoi*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 851-858 (1999).
- 9) Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1201-1204 (1998).
- 10) 江崎秀男, 渡部綾子, 増田均, 大澤俊彦, 川岸舜朗, 豆味噌醸造中のオルトジヒドロキシイソフラボンの生成と変動, 食科工, **48**, 189-195 (2001).

脱脂大豆製麴過程におけるイソフラボン類の変動とクッキー焼成および貯蔵時における安定性

- 11) 江崎秀男, 大澤俊彦, 川岸舜朗, 醤油中のオルトジヒドロキシイソフラボン含量とその抗酸化性, 食科工, **49**, 476-483 (2002).
- 12) Esaki, H., Onozaki, H., Morimitsu, Y., Kawakishi, S. and Osawa, T., Potent Antioxidative Isoflavones Isolated from Soybeans Fermented with *Aspergillus saitoi*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 740-746 (1998).