

## 濱納豆中の抗酸化物質の分離・同定

江崎秀男\*・勝田千鶴\*・足立法子\*・志村亜希子\*

Separation and Identification of Antioxidants in Hama-natto

Hideo ESAKI, Chizuru KATSUTA, Noriko ADACHI and Akiko SHIMURA

### 1. はじめに

人々は古くから大豆を、安全で、おいしく、また栄養豊かに食するためにさまざまな加工食品を造り上げてきた。納豆、味噌、醤油などは、大豆を十分に加熱した後、さらに微生物の働きで組織を軟化させて消化性を高めた大豆発酵食品である。これらの発酵食品においては、微生物の働きにより原材料に含まれる物質が、低分子の物質に変化したり、あらたな物質を生成する可能性も多い。

大豆発酵食品の製造過程で生成する抗酸化物質の役割も重要である。大豆中には、リノール酸をはじめとする不飽和脂肪酸が豊富に含まれており、製造中にも酸化変敗を受けやすい状況にある。しかし、味噌や醤油などの多くの大豆発酵食品においては、その醸造過程において多くの抗酸化物質が生成され、脂質の酸化的品質劣化を防いでいる<sup>1)~3)</sup>。これらの抗酸化物質は、大豆発酵食品の醸造・保蔵学的見地からも重要な役割をはたしている。

また、食品中の抗酸化物質は生体内で発生する活性酸素やフリーラジカルを捕捉・消去し、がんをはじめとする生活習慣病の予防<sup>4)5)</sup>や老化の抑制に役立つ。

大豆発酵食品の一つである濱納豆は、まず大豆を水に浸漬した後、高温で蒸煮を行い、30°C近くまで放冷する。ここに黄麹カビ *Aspergillus oryzae* を接種し、数日間製麹（麹発酵）を行う。得られた大豆バラ麹は、塩水とともに数カ月間発酵・熟成を行う。熟成を終えた濱納豆は、天日干しを行った後、製品とする。熟成期間中に、麹菌の産生するプロテアーゼの作用により大豆中のタンパク質は低分子化し、アミノ酸やペプチドなどの旨味成分が生成するとともに、乳酸菌などの細菌類により種々の呈味成分も醸成される。

この濱納豆の製法は豆味噌やたまり醤油に類似しており、その発酵・熟成期間に種々の抗酸化物質が生成していると推察されるが、詳細な研究例は見当たらない。そこで、本研究では、濱納豆中の抗酸化物質の分離・同定を行うとともに、これらの物質の抗酸化活性を調べることにより、濱納豆中での抗酸化的役割を評価した。また、濱納豆製造時に使用

---

\* 生活科学部 管理栄養学科

する大豆バラ麩を入手し、麩中の抗酸化物質の生成機序を調べることにした。

## 2. 実験方法

### 2.1 濱納豆および麩の凍結乾燥物の調製

本実験で使用した濱納豆（3～4カ月熟成，水分含量：46.2%）および製麩日数の異なる大豆バラ麩（1日麩，2日麩，5日麩）は，愛知県豊橋市のK社より入手した。予備凍結後，凍結乾燥機（EYELA FDU-1100）を用いて4日間乾燥を行った後，コーヒーマイルで粉末化した。これらの凍結乾燥粉末FDP（Freeze-dried powder）は，使用時まで-30℃で保存した。

### 2.2 DPPH ラジカル捕捉能試験法による抗酸化活性の測定

抗酸化活性の測定は，DPPH（1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl）ラジカル捕捉能試験法<sup>6)</sup>を用いて行った。各試料溶液80μLずつ（n=4）を96穴マイクロプレートに分注した後，ここに100mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.4）40μL，さらに500μM DPPH/エタノール溶液80μLを加え，10秒間攪拌・混合した。室温，暗所で20分間静置した後，540nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー（benchmark, BIO-RAD）を用いて測定した。コントロール（対照実験）として，試料溶液の代わりに試料を溶解，あるいは抽出した溶媒（エタノールあるいは75%エタノール）を用いて，試料群と同様の操作を行い，540nmにおける吸光度を測定した。

各試料のDPPHラジカル捕捉率は，次式により算出した。試料添加時のDPPH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性を示すことになる。

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

また，本実験においては，各試料の抗酸化活性を相対的に評価するために，同時に抗酸化能の指標となるトロロックス（6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid）標準溶液を用いて同様の操作を行い，各試料の抗酸化活性をトロロックス相当量（mol TE）として算出した。

### 2.3 濱納豆の各種溶媒抽出物の調製とその抗酸化活性の測定

濱納豆FDP240gにヘキサン800mLを加え，室温で一晩抽出した後，遠心分離（7,000rpm，室温，15分間）を行い，上清を回収した。残渣に再度ヘキサン800mLを加え，同様の操作を2回繰り返した。3回分のヘキサン抽出液は，エバポレーターで減圧濃縮し，ヘキサン抽出物を得た。3回のヘキサン抽出を終えた残渣には，次に酢酸エチル800mLを加え，同様の抽出操作を3回繰り返し，酢酸エチル抽出物を得た。その後，同様に，75%エタ

ノール抽出物を得た。

各溶媒抽出物の一部を取り出し、そのシラップ濃度が10mg/mLになるように、エタノールあるいは75%エタノールを用いて溶解した。この試料溶液を適宜希釈し、その抗酸化活性をラジカル捕捉能試験法で測定した。

## 2.4 酢酸エチル抽出物中の抗酸化物質の TLC 分析

シリカゲル 60F<sub>254</sub> プレート二枚に、強い抗酸化活性を示した酢酸エチル抽出物 (50mg/mL) 5  $\mu$ L をスポットした。同時に標品として8-OHD (8-Hydroxydaidzein), 8-OHG (8-Hydroxygenistein)<sup>7)</sup>および IK-3 (大豆イソフラボン類を黒麹菌 *A. saitoi* IAM 2210 で培養した発酵物の抽出物であり、強い抗酸化活性を示す8-OHD および8-OHG を高濃度で含有する。) もスポットした。その後、トルエン：ギ酸エチル：ギ酸 (10：8：2, v/v) 混液を用いて展開を行った。

UV254nm で各スポットの位置を確認した後、一枚の TLC プレートには、1.0mM DPPH 溶液を噴霧し、DPPH の紫色が退色する現象を確認することにより、抗酸化性スポット物質を検出した (DPPH スプレー法)。また、もう一枚の TLC プレートには、3.0%大豆油を噴霧し、大豆油に対して抗酸化性を示す物質を検出した (大豆油スプレー法)<sup>8)</sup>。

## 2.5 イソフラボン類およびフェノールカルボン酸類の HPLC 分析

酢酸エチル抽出物 (50mg/mL) の一部をエタノールに溶解した後、フィルター処理し、その20 $\mu$ L 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 (ポンプ：LC-10AT, カラムオープン：CTO-10AC) を用いてイソフラボン類<sup>9)</sup>およびフェノールカルボン酸類の同定および定量を行った。イソフラボン標品として8-OHD, 8-OHG, ダイゼインおよびゲネステインを、またフェノールカルボン酸標品としてシリング酸, フェルラ酸, バニリン酸, ゲンチジン酸, *p*-クマル酸, *p*-ヒドロキシ安息香酸, クロロゲン酸およびサリチル酸を使用した。

HPLC の分析条件は、カラム：Develosil ODS-UG-5 (4.6mm i.d.×250mm, NOMURA CHEMICAL CO., LTD.), カラム温度：35°C, 溶離液：A；メタノール：水：トリフルオロ酢酸 (60：40：0.1, v/v), B；メタノール：水：トリフルオロ酢酸 (10：90：0.1, v/v) 【A:B=0:100 (0分→10分), A:B=(0:100→100:0) (10分→70分), A:B=100:0 (70分→100分), A:B=0:100 (100分→120分)】, 流速：0.7mL/分, 注入量：20 $\mu$ L, 測定波長：200nm–380nm, 検出波長：262nm とした。

各イソフラボンおよびフェノールカルボン酸の検量線より、HPLC に注入した各試料溶液20 $\mu$ L 中の各イソフラボンおよび各フェノールカルボン酸の含有量を求めた後、さらに酢酸エチル抽出物1.0mg 中の各成分量を算出した。

## 2.6 各種フェノールカルボン酸類の抗酸化活性の測定

8種類のフェノールカルボン酸 (シリング酸, フェルラ酸, バニリン酸, ゲンチジン酸, *p*-クマル酸, *p*-ヒドロキシ安息香酸, クロロゲン酸およびサリチル酸) を、それぞれ必要量精秤し、エタノールを用いて10mM 溶液を調製した。この溶液を適宜希釈した後、2.2の方法で DPPH ラジカル捕捉能を測定した。

## 2.7 濱納豆麴中のイソフラボン類の分析と抗酸化活性の測定

1日麴, 2日麴, 5日麴および濱納豆の FDP0.5g ずつを精秤し, ここに75%エタノール 5 mL を加え, 一晚振とう抽出を行った。遠心分離 (3,500rpm, 室温, 15分間) 後, 各試料の75%エタノール抽出液を回収した。残渣には, 再度同じ抽出溶媒を加え, 2回目の抽出液を回収した。この抽出操作を計3回行い, 3回分の抽出液を集め, エバポレーターで溶媒を留去し, シラップ (75%エタノール抽出物) とした。

1日麴, 2日麴, 5日麴および濱納豆より得られた抽出物は, そのシラップ濃度が10mg/mL になるように75%エタノールで溶解した後, 2.5で述べた条件で HPLC 分析を行うとともに, 2.2の方法で抗酸化活性を測定した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 濱納豆 FDP より得られたヘキササン, 酢酸エチル, 75%エタノール抽出物の収量

濱納豆の凍結乾燥物 (FDP) 240g より得られたヘキササン抽出物, 酢酸エチル抽出物および75%エタノール抽出物の収量は, それぞれ40.1g, 3.2g および87.8g であった。ヘキササン抽出物は油状を呈しており, また酢酸エチル抽出物および75%エタノール抽出物はシラップ状であった。

### 3.2 ヘキササン, 酢酸エチル, 75%エタノール抽出物の抗酸化活性

まず, 各種濃度の Trolox 標準液を用いた DPPH ラジカル捕捉能試験による検量線を図1に示した。80 $\mu$ L 中に含まれる Trolox 物質量が4.0nmol から, 8.0nmol, 12nmol, 16.0 nmol に順次増加するとともに, DPPH ラジカル捕捉率 (%) は濃度依存的に上昇した。Trolox 濃度とラジカル捕捉率との間には高い正の相関性が認められた ( $R^2=0.9989$ )。

3.1で得られたヘキササン抽出物, 酢酸エチル抽出物および75%エタノール抽出物の一定量を用いて DPPH ラジカル捕捉率を求めた。ここで得られた捕捉率より, 図1の検量線を用いて, 各抽出物1.0mg 当たりの抗酸化活性を Trolox 当量 (nmol TE/抽出物1.0mg) として算出し, これを図2に示した。この図から明らかなように, 酢酸エチル抽出物の抗酸化活性は41nmol を示し, 他のヘキササン抽出物および75%エタノール抽出物より有意に ( $p<0.01$ ) 高い値を示した。

### 3.3 酢酸エチル抽出物中の抗酸化物質の探索

図2の結果より, 濱納豆中の酢酸エチル抽出物が強い抗酸化活性を示すことが分かった。そこで, この抽出物中の抗酸化物質の探索を, 薄層クロマトグラフィーを用いた DPPH スプレー法および大豆油スプレー法で行った。

DPPH スプレー法 (図3) においては, 酢酸エチル抽出物中に DPPH ラジカルを捕捉・消去するいくつかの抗酸化性スポット物質が検出された。これらのスポット物質は, 同時に展開した8-OHD (8-Hydroxydaidzein), 8-OHG (8-Hydroxygenistein)<sup>7)</sup>およびIK-3 (イソフラボン類を黒麹菌 *A. saitoi* IAM 2210 で培養した発酵物の抽出物であり, 強い抗酸化活性を示す8-OHD および8-OHG を高濃度で含有する。) の移動度と比較することにより, ゲニステイン (Rf 値: 0.49), ダイゼイン (Rf 値: 0.43), 8-OHG (Rf 値: 0.40), 8-OHD

濱納豆中の抗酸化物質の分離・同定

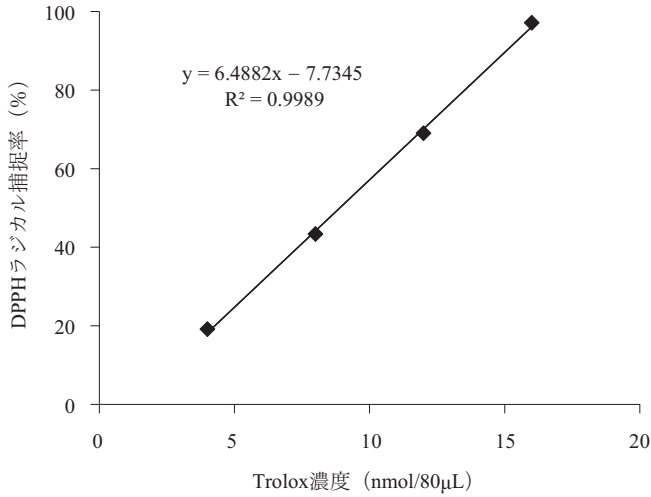


図1 Trolox の検量線

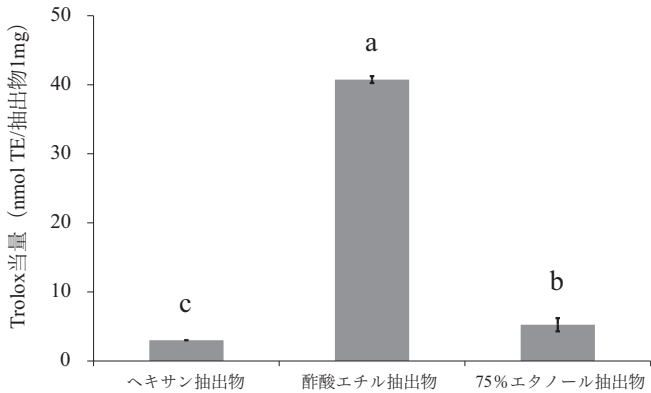


図2 ヘキサン抽出物, 酢酸エチル抽出物, 75%エタノール抽出物 1.0mg の抗酸化活性

それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=4) を示す。異なるアルファベットは有意差 ( $p < 0.01$ , Tukey 検定) があることを示す。

(Rf 値 : 0.31) であると推定された。

また、大豆油スプレー法 (図4) においても、DPPH スプレー法の場合と同様に、特に酢酸エチル抽出物中に抗酸化性を発揮するいくつかのスポット物質が検出された。特に8-OHG および8-OHD は、ゲニステインやダイゼインより強い抗酸化性を示した。この結果より、これらのオルトジヒドロキシ構造を有する抗酸化イソフラボン類 (ODI) は、原料大豆中の脂質の酸化を抑制し、濱納豆の醸造時および保蔵時における酸化的品質劣化を防ぐのに大いに寄与していると推察される。

図3 および図4 において、酢酸エチル抽出物中に Rf 値0.3 以下にもいくつかのスポット物質が見られるが、これらの物質はその極性よりフェノールカルボン酸類の可能性が示唆

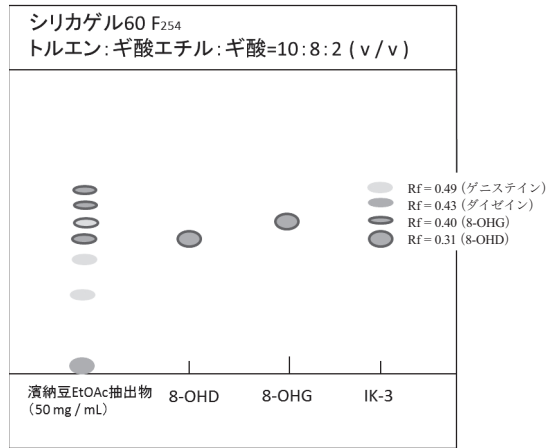


図3 DPPH スプレー法による酢酸エチル抽出物中の抗酸化物質の検出

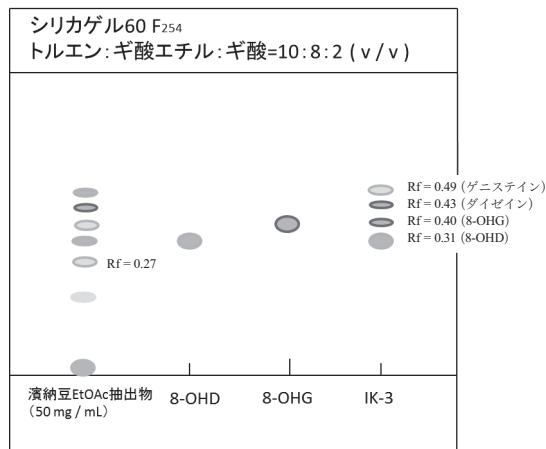


図4 大豆油スプレー法による酢酸エチル抽出物中の抗酸化物質の検出

される。そこで、次にこの酢酸エチル抽出物に含まれるイソフラボン類やフェノールカルボン酸類の分析を行った。

### 3.4 酢酸エチル抽出物中のイソフラボンおよびフェノールカルボン酸の分析

酢酸エチル抽出物中のイソフラボンおよびフェノールカルボン酸の分析は、フォトダイオードアレイを装備した三次元 HPLC を用いて行った (図 5)。HPLC 分析より得られた各ピーク物質の同定は、その溶出時間および UV スペクトルを、各標準物質と比較して行った。また、ピーク面積値よりそれぞれの物質の定量を行った。

その結果、この酢酸エチル抽出物 1.0mg 中のイソフラボンとしては、ゲニステインが 7.88 $\mu$ g、ダイゼインが 2.89 $\mu$ g、また 8-OHG および 8-OHD が、それぞれ 2.91 $\mu$ g および 0.69 $\mu$ g

濱納豆中の抗酸化物質の分離・同定

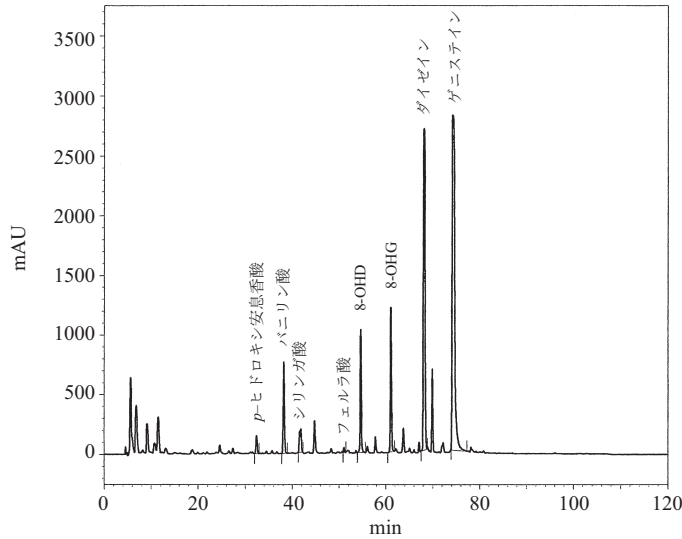


図5 酢酸エチル抽出物のHPLCクロマトグラム (262nm)

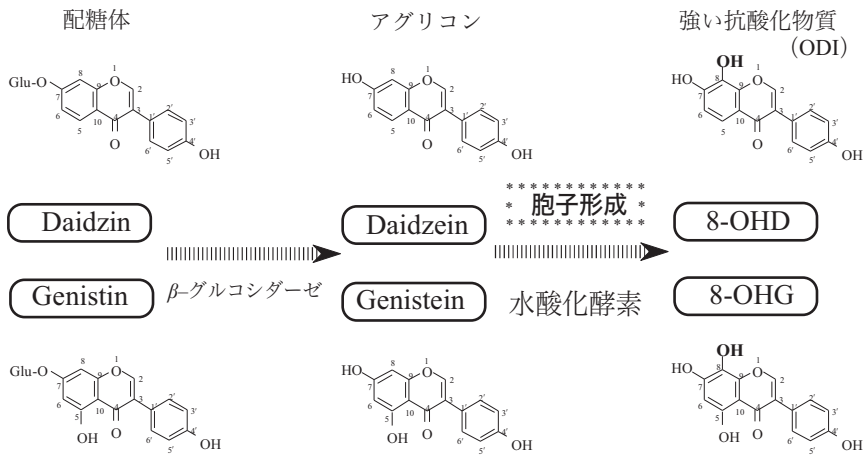


図6 麹発酵による抗酸化イソフラボン類 (8-OHG および8-OHD) の生成

含有されていた。この8-OHG および8-OHD は、先に著者らが見出したオルトジヒドロキシ構造を有する抗酸化イソフラボン (ODI : *ortho*-Dihydroxyisoflavone) であり、豆味噌<sup>3)</sup>や醤油<sup>10)</sup>などの醸造過程において、原料大豆中のイソフラボン配糖体 (ダイゼインやゲニステイン) が麹菌の産生する  $\beta$ -グルコシダーゼおよび水酸化酵素の作用により新たに生成する物質である<sup>11)</sup> (図6)。

濱納豆中にもかなり高濃度で含有されるこれらの ODI は、この大豆発酵食品の酸化的品質劣化の抑制に大いに寄与していると考察される。

また、酢酸エチル抽出物中には、いくつかのフェノールカルボン酸も検出された。抽出



物の1.0mg中には、バニリン酸が2.46 $\mu$ g、シリング酸が1.72 $\mu$ g、*p*-ヒドロキシ安息香酸が0.70 $\mu$ g、フェルラ酸が0.45 $\mu$ g含有されていた。そこで、次にフェノールカルボン酸類のDPPH ラジカル捕捉能試験による抗酸化活性を調べた。

### 3.5 フェノールカルボン酸類の抗酸化性

8種類のフェノールカルボン酸を試料として、80 $\mu$ M ( $\mu$ mol/L)における抗酸化活性を調べ、各フェノールカルボン酸1.0mol当たりの抗酸化活性をTrolox当量 (mol TE/mol)として算出し、これを図7に示した。シリング酸、ゲンチジン酸およびクロロゲン酸は、Trolox以上の強いDPPHラジカル捕捉能を示した。また、フェルラ酸もかなり強い抗酸化性を発揮した。しかし、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-クマル酸およびサリチル酸は、ほとんど抗酸化性を示さなかった。

HPLC分析の結果およびこのDPPHラジカル捕捉能試験の結果より、図2に示される酢酸エチル抽出物の抗酸化性には、8-OHGや8-OHDの他に、シリング酸やフェルラ酸が関与していると考察される。また、バニリン酸の抗酸化活性は多少弱いですが、その含有量が多いこと(2.46 $\mu$ g/抽出物1.0mg)を考慮すると、この物質も濱納豆の抗酸化性に大きく寄与していると考えられる。

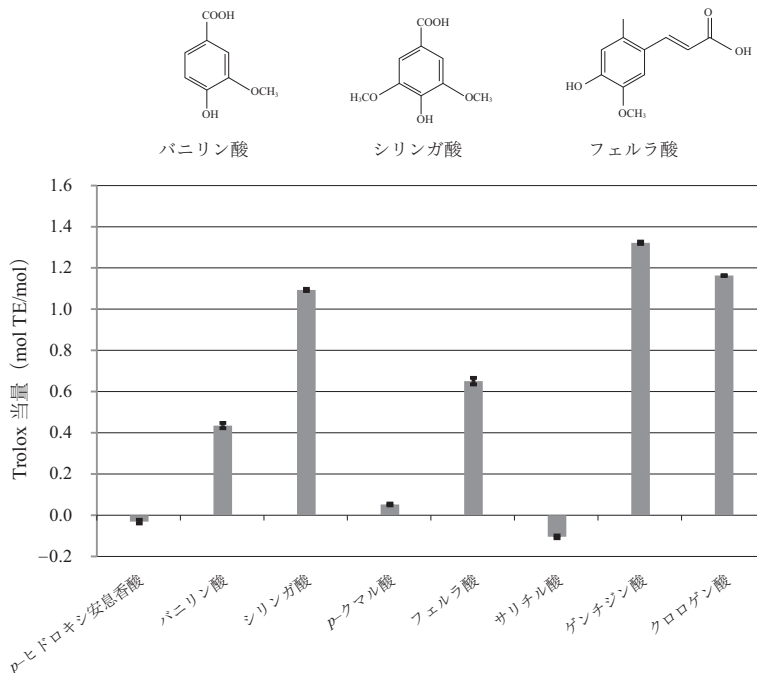


図7 フェノールカルボン酸類の抗酸化活性  
それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=4) を示す。



### 3.6 濱納豆の製造時における抗酸化物質の生成と変動

以上の実験結果より、濱納豆中には、強いDPPHラジカル捕捉能を示す8-OHGや8-OHDなどの抗酸化イソフラボンの他、シリング酸、フェルラ酸、バニリン酸などの抗酸化物質が存在することが明らかとなった。本研究では、これらの抗酸化物質が濱納豆の製造過程においてどのように生成するかを、濱納豆およびその製造過程の1日麹、2日麹および5日麹を用いて検討した。

1日麹、2日麹、5日麹および濱納豆のFDP0.5gより得られた75%エタノール抽出物の収量は、それぞれ92.4mg、91.1mg、92.3mgおよび327mgであった。これらの抽出物のHPLC分析の結果、1日麹、2日麹および5日麹の75%エタノール抽出物1.0mg中には、シリング酸が0.70~1.1μgの範囲で含有されていたが、濱納豆においてはその量は顕著に増加し、麹の約9倍量であった。

濱納豆製造過程における抗酸化成分は、特にイソフラボン類において顕著に変動した。1日麹、2日麹、5日麹および濱納豆の75%エタノール抽出物1.0mg中の各種イソフラボン量を図8に示した。この図から明らかなように、1日麹中のイソフラボン類は原料大豆とほぼ同様の組成であり、その多くは配糖体の形で存在していた。抽出物1.0mg中には、ダイゼインが3.8μg、ゲニステインが11.3μg含有されていたが、これらのアグリコンであるダイゼインおよびゲニステインの量は極めて少なかった。製麹2日目の孢子着生が始まった麹、さらに孢子着生が進行した5日麹においては、配糖体であるダイゼインおよびゲニステインは、麹菌が産生するβ-グルコシダーゼの作用によりアグリコン化が進み、ダイゼインおよびゲニステインが生成した。また、これらのダイゼインおよびゲニステインの一部は、麹菌の産生する水酸化酵素により酸素が付加され、それぞれ強い抗酸化性を示す8-OHDおよび8-OHGに変換された<sup>11)</sup>(図6)。

図8において、濱納豆中の8-OHG含有量は2.9μg/抽出物1.0mgであり、2日麹(1.1μg)や5日麹(0.5μg)より増加しているが、豆味噌の場合<sup>12)</sup>と同様に麹を食塩水とともに仕込んだ後も、濱納豆においてもゲニステインの水酸化反応が進行していると推察される。また、濱納豆のFDP0.5gより得られた75%エタノール抽出物の収量は327mgであることを考慮すると、濱納豆FDP1.0g中の8-OHG含有量は1.90mgとなる。この含有量は豆味噌以上の値である。

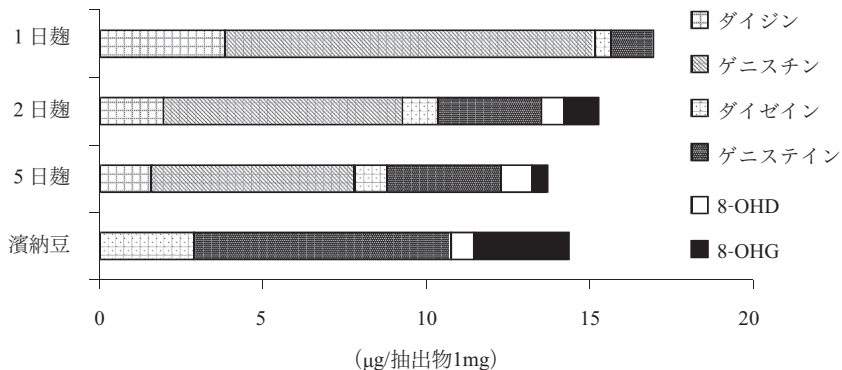


図8 濱納豆の製造時におけるイソフラボン類の変動

### 3.7 濱納豆の製造時における抗酸化性の変動

濱納豆の製造時における抗酸化性の変動を調べるため、濱納豆および各麴の FDP より調製した75%エタノール抽出液を用いて DPPH ラジカル捕捉能を調べた。その結果、1日麴、2日麴および5日麴の FDP1.0g 当たりの Trolox 当量は、それぞれ8.46 $\mu$ mol, 9.16 $\mu$ mol および8.44 $\mu$ mol であったが、発酵・熟成を終えた濱納豆においては56.8 $\mu$ mol となり、原料麴に比べ、約6.6倍の抗酸化能の増強が認められた。この抗酸化能の増強には、発酵・熟成中に麴菌が産生した酵素の作用により新たに生成した8-OHG などの抗酸化イソフラボンや種々のフェノールカルボン酸が寄与しているが、その他にもプロテアーゼ作用によるペプチドやアミノ酸なども関与していると推察される。今後、これらの点についても研究を進める必要がある。

## 4. まとめ

濱納豆は、長期保存の可能な伝統的な大豆発酵食品である。本研究においては、この濱納豆中の抗酸化物質の分離・同定を行うとともに、これらの物質が濱納豆の醸造時における品質の向上に寄与していることを検証した。また、これらの抗酸化物質の多くは、濱納豆の製造過程において新たに生成することを確認した。

濱納豆中の主要な抗酸化物質は酢酸エチルに可溶なものであり、三次元 HPLC 分析の結果、イソフラボン類やフェノールカルボン酸類がこの大豆発酵食品の抗酸化性に関与していることが明らかとなった。特に、濱納豆の製麴時に、麴菌の産生する $\beta$ -グルコシダーゼおよび水酸化酵素の作用により、原料大豆中のイソフラボン配糖体（ダイジンおよびゲニスチン）はアグリコン（ダイゼインおよびゲニステイン）となり、さらにこのアグリコンの一部は水酸化されて強い抗酸化能をもつ8-OHD および8-OHG に変換されることを確認することができた。また、8-OHG は、麴を食塩水とともに仕込んだ後にも増加し、濱納豆中にかなり高含量で存在することから、この大豆発酵食品の抗酸化能の増強に大きく寄与している物質であると考察される。

濱納豆中には、抗酸化活性を示すシリング酸、フェルラ酸、バニリン酸などのフェノールカルボン酸類も検出され、その含有量は発酵・熟成に伴って増加した。特に、シリング酸の増加は大きく、抗酸化性への寄与も大きいと考えられる。これらのフェノールカルボン酸類も、麴菌の産生するセルラーゼやヘミセルラーゼの作用によって、細胞壁に結合したものが遊離型のフェノールカルボン酸に変換されたと推察されるが、今後の研究課題としたい。

### 謝辞

本研究において、濱納豆およびその原料となる大豆麴をご提供いただきました國松本店に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 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).
- 2) 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).
  - 3) 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ソフラボンとその抗酸化性, *食科工*, **48**, 51–57 (2001).
  - 4) 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).
  - 5) 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).
  - 6) Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, J., HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1201–1204 (1998).
  - 7) 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).
  - 8) Chang, W. A., Luu, H. X. and Cheng, A. C., A TLC-Fluorescent Method of Detecting and Evaluating Individual Antioxidative Components. *J. Food. Sci.*, **48**, 658–659 (1983).
  - 9) 西山美樹, 江崎秀男, 森久美子, 山本晃司, 加藤丈雄, 中村好志, 豆乳を用いたチーズ様食品の調製とその抗酸化性および特性, *食科工*, **60**, 480–489 (2013).
  - 10) 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ソフラボン含量とその抗酸化性, *食科工*, **49**, 476–483 (2002).
  - 11) 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).
  - 12) 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ソフラボンの生成と変動, *食科工*, **48**, 189–195 (2001).