

伝統的な大豆発酵食品の科学

江 崎 秀 男

1. はじめに

大豆は畑の肉といわれるように、良質のタンパク質や脂質等の栄養成分を豊富に含む。また、大豆には様々な生体調節機能を示す種々の微量成分が含まれており¹⁾、機能性食品素材としても有望である。最近、米国等においても、豆乳をはじめとする大豆食品の消費が伸びている。ところで、我が国をはじめとする東アジアの国々では、この大豆を原料として様々な大豆発酵食品が造られてきた。納豆、味噌、醤油等がその代表的な食品であろう。これらの大豆発酵食品は、その発酵・熟成過程において、微生物の働きにより、原料大豆の消化性を向上し、特有の風味を付与するのみならず、原料中には存在しない新たな生理・生体調節機能を発現する場合も多い。納豆のもつ血栓溶解作用²⁾、血圧上昇抑制作用³⁾、発癌プロモーション抑制作用⁴⁾、味噌のもつ発癌抑制作用^{5, 6)}、コレステロール低下作用⁷⁾、放射性物質の排泄促進作用⁸⁾、また醤油のもつ高血圧抑制作用（ACE 阻害能）⁹⁾ 等、原料大豆には認められない発酵食品特有の生体調節機能が知られている（図1）。

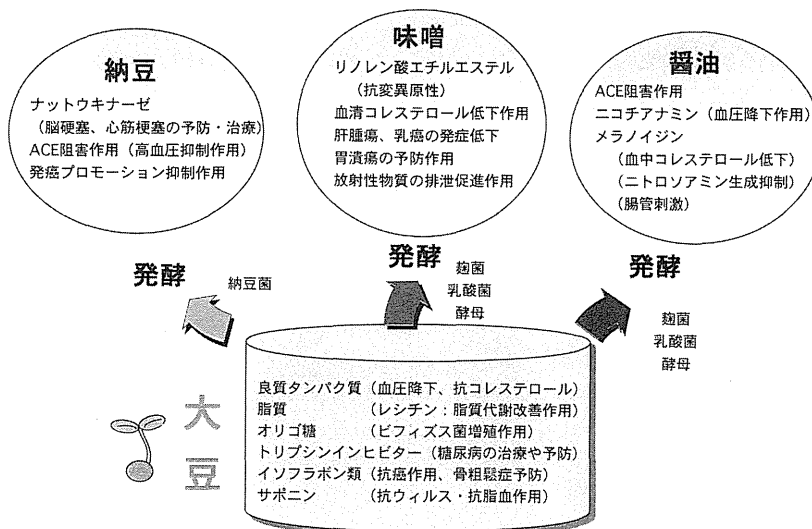


図1 大豆および大豆発酵食品の生体調節機能

著者らも、種々の大豆発酵食品を試料として、活性酸素による発癌、生活習慣病の発症、或いは老化促進の予防に關与する抗酸化性について研究を進めてきた。本稿では、その概要を紹介する。

2. 食物抗酸化成分の役割

大気中には、約 20%の酸素が存在する。この酸素より生成する反応性の高い活性酸素種は、食品の酸化的品質劣化や栄養成分の損失を招いたり、食品の物性を変化させることもある（図 2）。

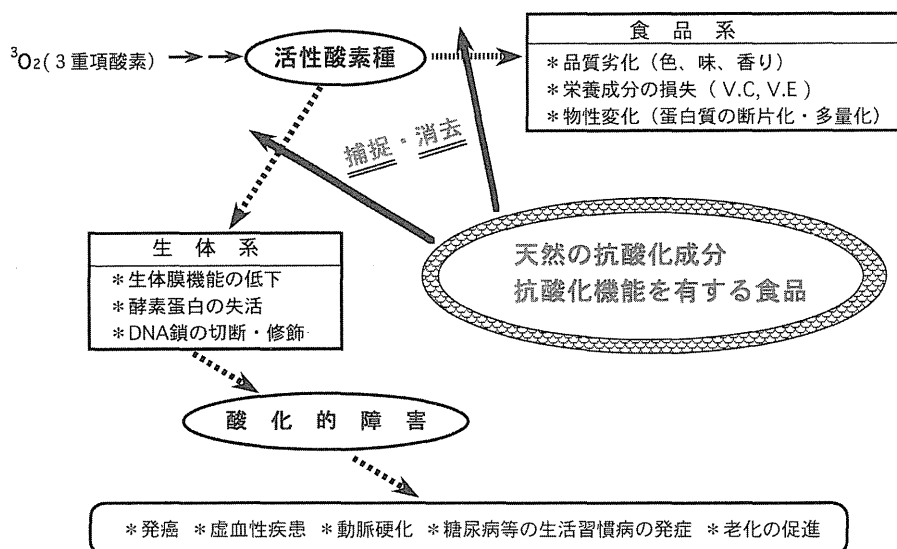


図 2 活性酸素による弊害と抗酸化成分

ヒトは一日あたり、約 500L の酸素を利用して生きている。体内に取り込まれた酸素の約 1%は、生体内において酸化力の強い活性酸素種になる。この活性酸素種、或いは二次的に生成するフリーラジカルは、正常な細胞機能を低下させ、様々な酸化的障害（酸化ストレス）をひき起こす。これらの障害は、発癌、虚血性疾患、動脈硬化、糖尿病等の生活習慣病の発症、ひいては老化の促進に深く関与する¹⁰⁾。従って、我々が日常摂取している食品中の抗酸化成分は、これらの活性酸素種を捕捉・消去する点からも極めて重要となる。すなわち、食物抗酸化成分は、生体内においてスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）をはじめとする抗酸化酵素とともに、これら疾病の予防、老化の抑制・遅延に大いに役立つ。それゆえ、天然の抗酸化成分、或いは高い抗酸化能を有する食品への期待は大きくなる。

3. 大豆発酵食品の抗酸化性

味噌は古くから調味料として利用されてきたが、食品の保蔵性を高める役割をも演じている。味噌漬けのいわしや味噌煮の魚において、味噌が魚の脂質酸化を抑制し、これら食品の保存性を向上させている¹¹⁾。インドネシアにはテンペとよばれる伝統的な大豆発酵食品がある。大豆を一晩水に浸漬させた後、加熱処理を行い、この大豆にくものすカビ

(*Rhizopus* 属) を接種し、発酵させたものである。古い時代には、この高温多湿の気候下のインドネシアにおいて、テンペの乾燥粉末が川や湖で捕えた新鮮な魚の油揚げを防ぐのに利用されていた¹²⁾。

著者らは、まず納豆、テンペおよび豆味噌の凍結乾燥物を調製し、その乾燥粉末を 40℃、暗所に貯蔵して、これら発酵食品中の脂質の過酸化度を調べた。その結果、いずれの大豆発酵食品においても、同様に調製した原料大豆より強い脂質の酸化安定性、すなわち抗酸化性が認められた。特に、味噌およびテンペの抗酸化性は非常に強く、これら発酵食品の粉末を 30 日間貯蔵してもほとんど過酸化物は生成されなかった。一方、納豆、テンペおよび豆味噌の原料大豆中の脂質酸化は著しく進行し、貯蔵後の試料は異臭を放っていた。これらの事実は、これら大豆発酵食品が製造される過程で、微生物の働きで新たな抗酸化物質が二次的に生成された可能性を示唆するものである¹³⁾。

これまで、味噌やテンペの抗酸化物質として、大豆中のイソフラボン配糖体であるダイジンやゲニスチンより発酵中に生成するダイゼインやゲニステインが報告されている¹⁴⁾。しかし、実際にこれらのアグリコン（遊離イソフラボン）の抗酸化性を調べたところ、その抗酸化力は極めて微弱なものであり、他の活性因子の存在が示唆された。著者らは、これら大豆発酵食品を用いて、その発酵・熟成過程で新たに生成する抗酸化物質の探索に努め、いくつかの活性物質を単離し、その化学構造を明らかにしてきた^{15, 16)}。

4. 豆味噌中に見出された新規イソフラボン類

最近、著者らは、麹菌を用いた豆味噌^{17, 18)}、醤油¹⁹⁾、漬納豆²⁰⁾ 等大豆発酵食品より、顕著に強い抗酸化性を示す新しいタイプのイソフラボン²¹⁾、すなわち 8-ヒドロキシダイゼイン (8-OHD) および 8-ヒドロキシゲニステイン (8-OHG) 等を見出した。これらの *o*-ジヒドロキシイソフラボン (ODI) は、米麹や麦麹を蒸煮大豆とともに仕込みを行った米味噌や麦味噌中には、全く含まれていなかった。すなわち、味噌醸造における ODI の生成には、蒸煮大豆に直接に麹菌を接種して製麹することが重要となる。一方、豆味噌醸造の製麹過程（味噌玉麹）における ODI の生成・変動について調べたところ、この抗酸化物質は製麹日数 2 日目の孢子形成とともに生成し、その後孢子着生の進行とともにその含量が増加することが分かった（図 3）。すなわち、豆味噌製麹工程において、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、麹菌の持つ β -グルコシダーゼの作用によってダイゼインおよびゲニステインを生成する。これらのアグリコンは、同時に麹菌より産生された水酸化酵素によってイソフラボン骨格

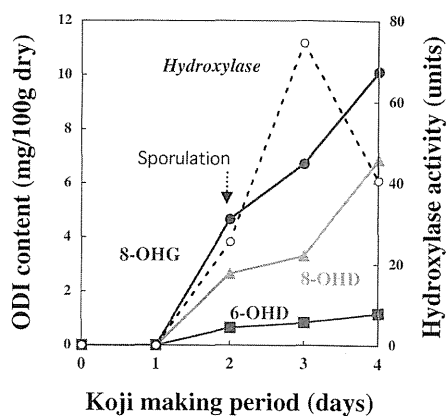


図 3 味噌玉製麹中の ODI および水酸化酵素活性の変動

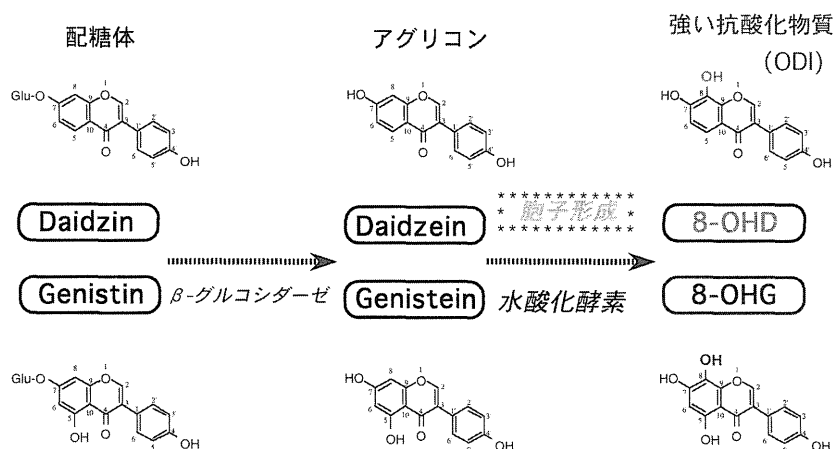


図4 大豆製麹時における8-OHDおよび8-OHGの生成機序

の8位に水酸基が導入され、8-OHDおよび8-OHGを生成することが判明した(図4)²²⁾。

豆味噌は通常1年から2年間の熟成期間を必要とする。また、味噌の原料となる大豆の脂質成分中には不飽和脂肪酸含量も高く、極めて過酸化されやすい状況にある。確かに、ダイゼインやゲニステインも味噌中で抗酸化的に作用するが、その抗酸化力が微弱であることを考慮すると、ODIの抗酸化的役割は大きいと推定される。

豆味噌の製麹工程で生成した強い抗酸化性を示す8-OHDや8-OHGは、味噌の熟成期間中もほとんど分解、消失することなく、そのほとんどが最終製品まで残存した。この事実は、豆味噌醸造において非常に好都合である。すなわち、これらODIは、味噌の熟成工程においても脂質過酸化や各種栄養成分の酸化的劣化の抑制に大いに寄与することができる。また、豆味噌中の総ODIのモル濃度を算出すると、約0.6～1.2mMとなるが、この値はODIの強い抗酸化力を考慮すると、味噌中の脂質の酸化的劣化を抑制するのに十分な濃度である。一方、豆味噌を30℃で約9ヶ月間貯蔵しても、8-OHDや8-OHGはほとんど分解されなかった。

これらの事実より、ODIは、豆味噌中の重要な抗酸化成分であり、その醸造過程、また流通・貯蔵過程における脂質等の酸化的劣化の抑制に大いに寄与していると考えられる。

5. イソフラボン類の生理・生体調節機能

大豆中のイソフラボン類は多種多様の生理機能を示し²³⁾、予防医学の面からも特に注目されている(図5)。このイソフラボンはその化学構造が女性ホルモンであるエストロゲンに類似しており、エストロゲン作用・抗エストロゲン作用(エストロゲン拮抗作用)を示す。エストロゲン活性は骨粗鬆症の予防^{24, 25)}、更年期障害の改善²⁶⁾、前立腺癌の抑制²⁷⁾等に寄与していると推測される。他方、イソフラボン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場合もある。この抗エストロゲン作用は、乳癌や子宮内膜癌の予防に役立つ²⁸⁾。

その他、イソフラボン類には抗酸化作用、美白作用、肥満防止作用等の多様な生理機能が知られている。特にゲニステインは、EGF (epidermal growth factor: 上皮生長因子) レセプターのチロシンキナーゼを抑制したり²⁹⁾、悪性腫瘍周縁の毛細血管の増殖を抑える³⁰⁾等の様々な機能を示す。このイソフラボンは抗酸化性を含め、最も生物学的に活性のある化合物であり、種々の癌予防のための有望な食品因子としても期待されている。

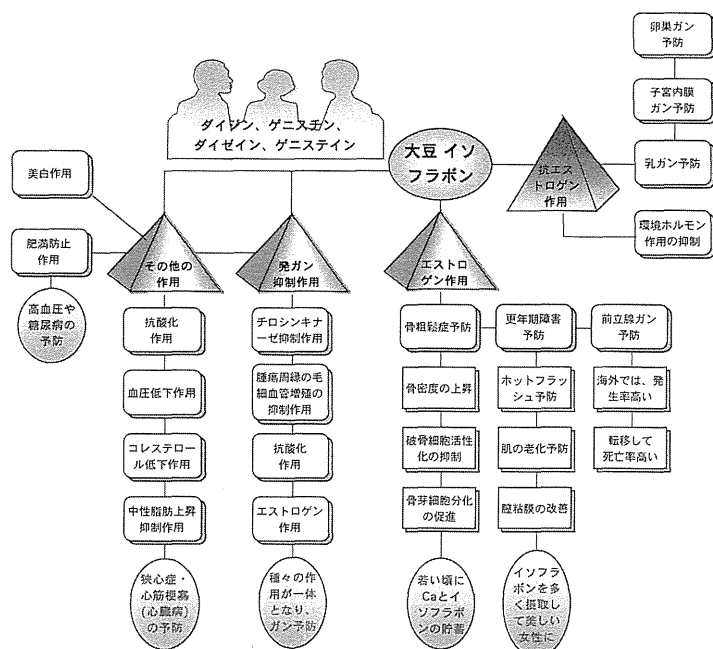


図5 大豆イソフラボンの生理・生体調節機能

ところで、著者らが豆味噌等の大豆発酵食品に見出した8-OHDや8-OHGは、生体膜モデルであるリポソームを用いた抗酸化性試験法において、ダイゼインやゲニステインの約10倍近くの強い抗酸化性を示した(図6)。また、これらODIは、ダイゼインやゲニステインより有意に強いラジカル捕捉能を発揮するとともに、強いSOD様活性、チロシナーゼ(メラニン色素の生成に関与する酵素)阻害活性等を示した³¹⁾。

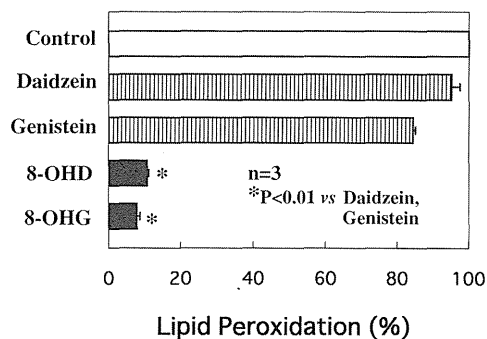


図6 8-OHDおよび8-OHGの抗酸化性(リポソーム系)

6. 8-ヒドロキシダイゼイン(8-OHD)の吸収・動態

最近、食物として摂取した食品成分が、ヒトの体内でどのように吸収され、また各組織や器官にどの程度取り込まれて、その生理活性を発揮するのかについての関心が高まり、フラボノイド類を始めとする各種天然物の吸収、分布、代謝、排泄に関する研究(体内動態)が進展している。大豆イソフラボン類についても同様の研究は進んでいるが、この豆味噌等に含まれる強い抗酸化性を示すODIについては、その情報は全く見当たらない。著者らは、まず実験動物を用いて、8-ヒドロキシダイゼイン(8-OHD)の吸収・動態を調べ、この物質が生体内においても抗酸化作用を示すかを調べることにした。

(1) 8-OHD の投与と解剖

8-OHD の調製には、産業副産物であり、多くのイソフラボン類が残存する溜り醤油粕を利用した³²⁾。すなわち、この粕のメタノール抽出物より分取 HPLC を含む種々のクロマトグラフィーにて 8-OHD を分離・精製した。

実験動物として、5 週齢の SD 系雄ラットを入手し、市販固形試料 (CA-1) にて 1 週間予備飼育した (25℃、12 時間の明暗サイクル)。イソフラボン類を含まない特餌で、さらに 6 日間の飼育を続けた後、24 時間の絶食を行った。このラット (7 週齢) に、先に調製した 8-OHD (70%グリセロール溶液) を、体重 1kg 当たり 15mg となるようにゾンデにて経口投与した。投与前 (0 時間) および投与 1、2、4、6、10、14、18 時間後に、エーテル麻酔下でラットの解剖を行うとともに、心臓より採血した。血液は即座に遠心分離し、血漿を調製した。また、生理食塩水で灌流した肝臓および腎臓も摘出した。他方、8-OHD 投与後の各時間帯に排泄された尿および糞も同時に回収した。

(2) 肝臓および腎臓中の 8-OHD

フラボノイド類は、一般に小腸や肝臓でグルクロン酸や硫酸との抱合化反応を受ける場合が多い³³⁾。その後、これらの抱合体は血流に入り、末梢組織に移行するが、最終的には腎臓を経て尿中に排泄される。しかし、ある種のフラボノイドは抱合化されず、遊離の状態で吸収・代謝されることも知られている³⁴⁾。従って、各臓器、血液、尿中のフラボノイド量を調べるには、遊離型および抱合型の両者を測定する必要がある。すなわち、グルクロニダーゼ/スルファターゼ処理を行ったものと無処理のものの分析が必要となる。イソフラボン類についても同様である³⁵⁾。

まず、8-OHD 投与後の各時間に解剖・摘出した肝臓中の遊離型 8-OHD (Free 8-OHD) を、電気化学検出器 (ECD) を用いた HPLC にて定量した。同時に、同じ肝臓試料にグルクロニダーゼ/スルファターゼの酵素処理を行い、抱合型 8-OHD をすべて遊離型 8-OHD とした。この酵素処理物より得られた 8-OHD 量を全 8-OHD 量 (Total 8-OHD) とした (図 7)。肝臓中の全 8-OHD 量は、投与 1 時間後に最大となり、約 3 時間後にはその量は半減した。しかし、その後は緩やかな減少を示し、投与 10 時間後までかなりの量の 8-OHD が残存していた。この肝臓中の 8-OHD は、いずれの時間帯においてもそのほとんどが遊離型で存在した。

腎臓についても、同様に、投与後の各時間における 8-OHD 量を分析した。この臓器中の全 8-OHD 量も、肝臓と同様に、投与 1 時間後に最大となった。この量は投与 2 時間後においてもほとんど減少せず、高含量の状態が維持された。しかし、その後は一様に減少し、投与 6 時間後にはその量は半減した。また、14 時間後には最大量の約 9 割が消失した。この腎臓においては、全 8-OHD 量の約 6 割程度が遊離型で存在していた。

(3) 血漿中の 8-OHD

8-OHD 投与後の各時間における血漿中の遊離型 8-OHD 量および全 8-OHD 量 (遊離型と

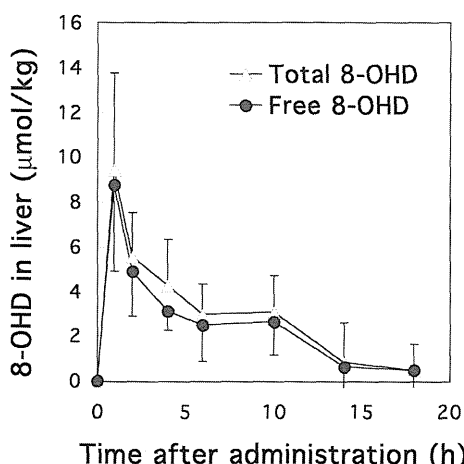


図7 8-OHD 投与後の肝臓中イソフラボン濃度の変化

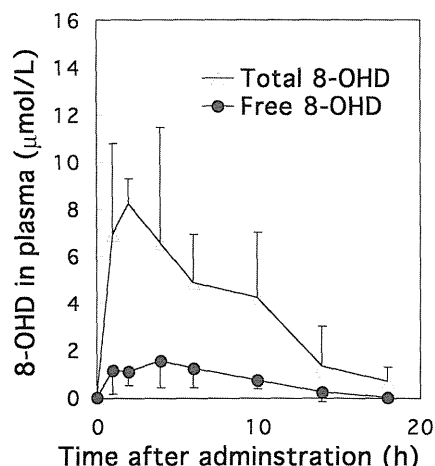


図8 8-OHD 投与後の血中イソフラボン濃度の変化

抱合型の和)を測定した(図8)。血漿中の全8-OHD量は、投与1時間後に急激な上昇を示した。この吸収量はその後増加し、2時間後に最大値を示した。その後、この血漿においても、投与後の時間の経過とともに、8-OHD量の緩やかな減少が見られた。その減少速度は、肝臓に比較すると非常に遅く、2時間後の最大吸収量が半減したのは10時間後であった。この血漿中においては、8-OHDの約8割が抱合型で、残りの2割は遊離型で存在していた。

肝臓中の8-OHDは、そのほとんどが遊離型で存在した(図7)が、血漿中においてはその多くが抱合型であった。すなわち、腸管より肝臓に取り込まれた8-OHDの多くは、ここでグルクロン酸や硫酸による抱合化反応を受け、順次、血流に移行したと考察される。

(4) 尿中の8-OHD

8-OHD投与後の尿は、それぞれの解剖までの各時間帯(0-1、1-2、2-4、4-6、6-10、10-14、14-18時間)に排泄されたものを回収した。また、8-OHD投与前の24時間絶食中に回収した尿を、投与0時間(Pre)のラットの尿とした。これらの各時間帯に排泄された全尿中の8-OHD量を同様に分析した。得られた8-OHD量より、一匹のラットより、投与後の各時間帯1時間当たりに排泄された8-OHD量を算出した(図9)。この図においては、全8-OHD量から遊離型8-OHD量を差し引いた抱合型8-OHD(Conjugated 8-OHD)量を、遊離型8-OHD量とともに示した。

投与前(Pre)の尿からは、8-OHDは全く検出されなかった。8-OHDの投与とともに、尿中にも比較的早い時期より少量の8-OHDの排泄が認められた。投与後の時間経過とともに8-OHD排泄

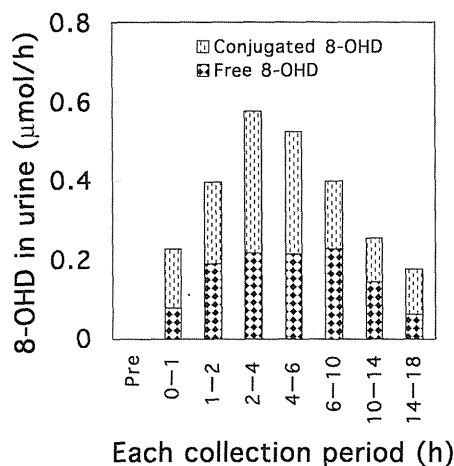


図9 8-OHD 投与後の尿中へのイソフラボン排泄量

量は増加し、投与 2-4 h の時間帯で最大値を示した。この時間帯は、腎臓における 8-OHD 量がかなり急激に減少した時期である。その後、投与後の時間経過にともなって、8-OHD の排泄量も順次減少した。尿中の遊離型：抱合型 8-OHD 量の比率は、投与後の各時間帯で多少の差異が認められたが、1：1～1：1.5 の含有比であった。

7. 投与した 8- ヒドロキシダイゼイン（8-OHD）の生体内抗酸化作用

King ら³⁶⁾ は、ラットにゲニステインを経口投与し、血漿および尿中のゲニステイン量の分析を行った。この実験結果に比較すると、8-OHD は、かなり早い時期（投与 1 時間以内）から効率良く生体内に吸収されたと推察される。この理由としては、8-OHD がゲニステインより親水性がかなり高いことが考えられる。8-OHD は強い抗酸化性を示す。ここでは、8-OHD 投与後の各時間に屠殺・摘出した肝臓よりホモジネートを調製し、それぞれの酸化安定性を比較することにより、このイソフラボンの肝臓での抗酸化効果を調べた。すなわち、各時間の肝臓ホモジネートに水溶性のラジカル発生剤である AAPH を加え、脂質過酸化を誘導した³⁷⁾。37℃ で、0.5、1、2、4 時間の反応を行い、生成した過酸化物量を TBA 法で測定した（図10）。8-OHD 投与後 1 時間および 2 時間の肝臓より生成した脂質過酸化物の量は、投与前の肝臓に比べ、有意に ($P<0.01$, $P<0.05$) 低かった。すなわち、投与 1 時間後や 2 時間後の肝臓中には、かなり高濃度の 8-OHD が含有されており、しかもその多くが遊離型の状態で存在するため（図 7）、8-OHD の生体内抗酸化効果（酸化抵抗性）が認められたと考察される。

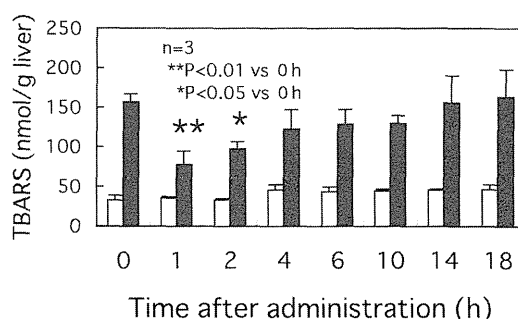


図10 8-OHD の生体内抗酸化作用（肝臓）

□：脂質過酸化誘導 0h
■：脂質過酸化誘導 4h

8. おわりに

我が国には様々な伝統食品が存在し、ヒトは長い間その恩恵をうけてきた。これらの食品に秘められた科学は、我々にとっても非常に興味深いものである。特に、微生物を利用した伝統的な大豆発酵食品においては、食品の一次機能（栄養機能）や二次機能（嗜好機能）を改善・向上させるのみならず、生活習慣病や老化の予防に寄与する三次機能を増強させる可能性も大きい。

本稿においては、特に豆味噌中に見出された新規イソフラボンが、麹菌を用いた大豆の製麹過程で生成し、この抗酸化物質が豆味噌の酸化的品質劣化を抑制するのみならず、食品として摂取された場合、ヒトの生体内においても抗酸化的に働き、種々の酸化ストレスを抑制してくれる可能性について述べた。

ところで、乳酸菌が GRAS (Generally Recognized As Safe) バクテリアとよばれると同様、味噌、醤油、清酒、焼酎、甘酒等の発酵食品の製造に長年利用されてきた麹菌も、安全性と優れた機能をもつ微生物である。麹菌は種々の酵素を豊富に産生し、特に原料中の各種成分を微生物変換する可能性は大きい。近年、食品産業界においても、ゼロ・エミッション（廃棄物ゼロ）化が求められている。我々は、産業副産物として発生する種々の未利用資源（米ぬか、小麦ふすま、コーンフィード、おから、蒟蒻粉等）を素材として、これらを麹発酵することにより、抗酸化性を始めとする種々の機能性を高め、この発酵物の新しい機能性食品素材としての有効利用についても研究を進めている。

今後も、伝統的な発酵食品の醸造技術の中に秘められた各種微生物の生理的機能を明らかにし、さらに、これらの機能を新規食品や機能性素材の創製に活用させることができればと考えている。

参考文献

- 1) 山内文男, 大久保一良編: 大豆の科学 (朝倉書店), P 69 (1992)
- 2) Sumi, H. et al. : *Experimentia*, 43, 1110 (1987)
- 3) Okamoto, A. et al. : *Plant Foods Human Nutr.*, 47, 39 (1995)
- 4) Takahashi, C. et al. : *Carcinogenesis*, 16, 471 (1995)
- 5) Ito, A. et al. : *Int. J. Oncology*, 2, 773 (1993)
- 6) Ito, A. et al. : *Cancer Res.*, 37, 271 (1996)
- 7) 堀井正治ら: 日本食品工業学会誌, 37, 148 (1990)
- 8) 伊藤明弘: みそサイエンス, P 1 (1993)
- 9) Kinoshita, E. et al. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1107 (1993)
- 10) 井上正康: 化学と生物, 30, 184 (1992)
- 11) 海老根英男ら: 味噌・醤油入門 (日本食糧新聞社), P 100 (1994)
- 12) Gyorgy, P. et al. : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51, 377 (1974)
- 13) Esaki, H. et al. : *In Food Phytochemicals for Cancer Prevention I* ; Huang, M.-T. et al. Eds. ; ACS : Washington, DC, 1994 ; pp 353
- 14) 池田稜子ら: 日本食品科学工学会誌, 42, 322 (1995)
- 15) Esaki, H. et al. : *J. Agric. Food Chem.*, 44, 696 (1996)
- 16) Esaki, H. et al. : *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2020 (1997)
- 17) 江崎秀男ら: 食科工, 48, 51 (2001).
- 18) 江崎秀男ら: 食科工, 48, 189 (2001).
- 19) 江崎秀男ら: 食科工, 49, 476 (2002).
- 20) Esaki, H. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 1637 (1999).
- 21) Esaki, H. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62, 740 (1998).
- 22) Esaki, H. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 63, 851 (1999).
- 23) 家森幸男ら: 大豆イソフラボン, 幸書房 (東京), (1998).
- 24) Picherit, S. W. et al.: *J. Nutr.*, 131, 723 (2001).
- 25) Somekawa, Y. et al.: *Obstet. Gynecol.*, 97, 109 (2001).

- 26) Dalais, F. S. et al.: *Climacteric*, 1, 124 (1998).
- 27) Wei, Z. et al.: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 8, 35 (1999).
- 28) Lamartiniere, C. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 217, 358 (1998).
- 29) Akiyama, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 262, 5592 (1987).
- 30) Evans, B. A. J. et al.: *J. Endocrinol.*, 147, 295 (1995).
- 31) 白崎友美：修士論文, (2003).
- 32) 江崎秀男ら：食科工, 51, 47 (2004).
- 33) Manach, C. et al.: *J. Nutr. Biochem.*, 7, 375 (1996).
- 34) 宮澤陽夫ら：化学と生物, 38, 104 (2000).
- 35) Lundh, O. J. T. et al.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 938, (1988).
- 36) King, R. A. et al.: *J. Nutr.*, 126, 176 (1996).
- 37) Tsuda, T. et al.: *Lipids*, 33, 583 (1998).
- 38) Esaki, H. et al.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 51, 80 (2005).