醤油粕分画物の抗酸化素材としての有用性

醤油粕の有効利用は、環境問題からいっても避けて通れない。筆者は、醤油粕から各種成分を分離分画し、抗酸化作用などの生理活性機能を見出している。大いに参考になるであろう。

江 崎 秀 男

1. はじめに

醸造・発酵食品には秘められた科学が存在する。東アジアにおける味噌や醤油などの醸造のはじまりは何世紀もさかのぼる。ヒトは大豆を原料として、種々の微生物を利用し、保存性や機能性の高い様々な食品を造り上げてきた。これらの醸造物のなかには、原料大豆には見られない新たな特性が認められる場合が多い。筆者らが見い出してきた豆味噌などの強い抗酸化機能もそのひとつであり、大豆油の脂質過酸化反応を抑制して食品の保存性を高めていると考えられる。また、これらの抗酸化機能は、その食品がヒトに摂取された場合、生体内においてガンをはじめとする種々の生活

習慣病の予防や老化抑制に貢献する可能性も大きい。

豆味噌などに含まれる抗酸化成分

一般に大豆発酵食品中の脂質は、原料大豆より酸化安定性が高い。特に豆味噌は強い抗酸化性を示す¹⁾。著者らはこれまで種々の大豆発酵物中の抗酸化成分を探索してきた。そして、豆味噌中には強い抗酸化性を示す *o*-ジヒドロキシイソフラボン (ODI) 類が存在することを見出した²⁾(第1図)。これらのイソフラボンは、蒸煮大豆に直接に麹菌を接種した場合、特に製麹工程でその多くが生成する。すなわち、原料大豆中のダイジゲンおよびゲニステインは、まず麹菌の生産する 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分解される。これらのイソフラボ

第1図 大豆製麹工程で生成する *o*-ジヒドロキシイソフラボン (ODI)

Utility of the Preparations from Soy Sauce Cake as Antioxidant Materials

Hideo ESAKI (Department of Food and Nutrition, School of Life Studies, Sugiyama Jogakuen University)

ン類は、さらに麴菌の水酸化酵素の作用により、8-ヒドロキシダイゼイン (8-OHD)、8-ヒドロキシゲニステイン (8-OHG) および 6-ヒドロキシダイゼイン (6-OHD) に変換される³⁾。しかし、米麴や麦麴を用いた米味噌や麦味噌では水酸化反応は起こらず、これら味噌中には ODI は検出されない⁴⁾。豆味噌中の ODI は味噌の熟成あるいは貯蔵過程においても、脂質や各種栄養成分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⁾。

醤油中に含まれる抗酸化成分

醤油の製造においても、蒸煮大豆と小麦を原料として製麴が行われる。醸造メーカーより入手した各種醤油麴中には、味噌玉麴 (豆味噌用麴) とほぼ同様のレベルで 8-OHD および 8-OHG が含有されていた⁶⁾。これらの ODI は仕込み後の醤油醸造過程においても抗酸化的役割を演じていると考えられる。醤油中の抗酸化成分として、味噌と同様にアミノ酸やペプチド、またメラノイジンが有名である⁷⁾が、これらの物質がもろみ熟成の比較的后期に形成される可能性を考慮すると、仕込み直後の数カ月での ODI の抗酸化的役割は大きいと考えられる。また、熟成したもろみを圧搾して得られる醤油中の ODI は、豆味噌同様に、加熱に対しても安定であり⁸⁾、煮魚や魚介類の加工品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。

本研究の目的と意義

醤油は我国においても古くから調味料として利用されてきた。この醤油製造において副生する搾り粕 (醤油粕) の量は、年間約 10 万 t と推定されている⁸⁾。醤油粕は家畜用飼料として利用されることもあったが、最近ではこの利用も減少し、多くが産業廃棄物として焼却などにより処分されており、地球環境保全の面からも新たな問題を生じている。

近年、食品産業におけるゼロエミッション化が求められるなか、廃棄物の再資源化、リサイクルの促進などが急務となっている。醤油粕においても、これを利用した食用茸の栽培⁹⁾、土壌改良資材としての有効利用¹⁰⁾、また微生物処理によるコンポスト化やサイレージなど⁸⁾の高度利用について検討されている。他方、醤油粕より有望な機能性 (生理活性) をもった有効成分を抽出し、それらを食品、化粧品、医薬品などに利用しようとする試みも検討されている¹¹⁾。松田¹²⁾は醤油粕を用いて、ヒトの疾病や老化の予防に役立つ抗

酸化物質の分離を行った。醤油粕の 80% メタノール抽出画分に強い抗酸化性を認めるとともに、活性成分として原料ダイズ由来のイソフラボン配糖体から生成したダイゼインおよびゲニステインを報告している。

本研究では、ダイゼインやゲニステインより顕著に強い抗酸化性を示す 8-OHD および 8-OHG に注目して、抗酸化画分を調製することにした。これらの ODI はその化学構造から類推して、醤油もろみの圧搾工程においてその多くが醤油粕中に残存すると推察される。そこで、まずもろみ圧搾時における ODI を含めた各種イソフラボン類の、生醤油および醤油粕への分配の割合を調べた。また、醤油粕よりエタノール抽出物、酢酸エチル抽出物を調製し、さらには特に強い抗酸化能を示す ODI に注目し、これを高濃度に含有する分画物を調製し、これらの抗酸化的な有効利用の可能性を検討した¹³⁾。

2. もろみ圧搾時におけるイソフラボン類の分配

熟成を終えた醤油もろみ中には、原料大豆中のイソフラボン配糖体より生成したダイゼインやゲニステインが多く含まれる。また、製麴時にこのダイゼインやゲニステインの 8 位が水酸化反応を受けて生成した 8-OHD や 8-OHG も含有される⁹⁾。このもろみを圧搾し、得られた生醤油および醤油粕中の各種イソフラボン類の含有量を HPLC 分析し、その結果を第 2 図に示した。この図から明らかなように、もろみ 220 g よ

第 2 図 熟成もろみから得られた生醤油および醤油粕中のイソフラボン量

り得られた生醤油 172 ml 中に含まれる 8-OHD, 8-OHG, ダイゼインおよびゲニステイン量は、それぞれ 0.87 mg, 0.57 mg, 1.08 mg および 0.53 mg であった。他方、同時に得られた醤油粕 19.0 g 中のこれら 4 種類のイソフラボン含量は、それぞれ 1.63 mg, 2.77 mg, 8.31 mg および 10.1 mg を示し、粕への各イソフラボンの分配率はそれぞれ、65.2%, 82.9%, 88.5% および 95.0% となった。すなわち、もろみ中に含まれるイソフラボン類の多くは、圧搾工程において醤油粕中に残存することが明らかになった。粕中への各イソフラボン類の残存率は、その疎水性が高まるとともに大きくなった。この結果より、醤油粕はイソフラボン類の新たな供給源として注目される。

3. 各種醤油粕中のイソフラボン量

濃口醤油の醸造には、蒸煮大豆とほぼ等量の焙煎小麦が使用される。他方、溜り醤油ではダイズが主原料となる。イソフラボン類がダイズに含まれる特殊成分

であることを考えると、その含有量は、後者の溜り醤油を搾った粕の方が多いと考えられる。醸造メーカーより入手した各種醤油粕中の 8-OHD, 8-OHG, ダイゼインおよびゲニステインの含有量を調べ、その結果を第 3 図に示した。A 社, B 社, C 社および D 社の各溜り醤油粕 (TS-cake A, TS-cake B, TS-cake C, TS-cake D) 中に含有されるイソフラボン類の総和量は、M 社の濃口醤油粕 (KS-cake M) より高い値を示した。8-OHD や 8-OHG においては、溜り醤油粕のなかにも濃口醤油粕とほぼ同程度の含有量であるものもあった。しかし、8-OHD および 8-OHG の示す強い抗酸化力を考慮すると、いずれの醤油粕も抗酸化画分を調製するのに十分な ODI 量が含有されていた。ここでは、ダイゼインやゲニステインも比較的多く含み、特に 8-OHD および 8-OHG を高濃度 (ODI 総和量: 60.4 mg / 100 g) に含む A 社の溜り醤油粕 (TS-cake A) を用いて、抗酸化画分の分離を行うことにした。

4. 醤油粕より抗酸化画分 (分画物) の調製

エタノール抽出物、酢酸エチル抽出物、ODI 画分の調製

まず、A 社の溜り醤油粕を試料として、エタノール抽出を行った。得られたエタノール抽出液より脂質を取り除くためにヘキサン脱脂を行い、エタノール抽出物を調製した。一方、この脱脂したエタノール抽出液より、イソフラボン類などの抗酸化物質を酢酸エチルで抽出した。他方、脱脂したエタノール抽出液を用いて、Amberlite XAD-2 カラムクロマトグラフィーにて抗酸化成分の分画を行った。60% メタノール溶出画分に 8-OHD および 8-OHG の多くが溶出したので、この画分を集めて ODI 画分とした。

醤油粕分画物中のイソフラボン量

エタノール抽出物、酢酸エチル抽出物および ODI 画分中のイソフラボン量を HPLC 分析し、各シラッ

第 3 図 醸造メーカーより入手した醤油粕中のイソフラボン量

第 1 表 醤油粕分画物中の各種イソフラボン量

	(mg/1.0 g sirup)			
	8-OHD	8-OHG	Daidzein	Genistein
EtOH extract	1.6	1.9	13.2	16.2
EtOAc extract	3.4	3.6	26.9	30.5
ODI faction	23	37.9	52.2	14.3

プ1g中に含まれるそれぞれの値を第1表に示した。エタノール抽出物1g中には、8-OHD、8-OHG、ダイゼインおよびゲニステインは、それぞれ1.6mg、1.9mg、13.2mg および 16.2mg ずつ含有されていた。酢酸エチル抽出物においては、これらの各イソフラボン類の含有量は、エタノール抽出物の約2倍程度であった。他方、強い抗酸化性が期待されるODI画分においては、8-OHDはエタノール抽出物の約14倍に、また8-OHGは約20倍に高含量化することができた。

5. 醤油粕分画物の魚油に対する抗酸化性

食品中における脂質の酸化は、オフフレーバーの発生、色調やテクスチャーの劣化をもたらすのみならず、栄養価や機能特性、また安全性などの低下を招くことが知られている¹⁴⁾。魚類中には多くの生理機能をもつ高度不飽和脂肪酸が豊富に含まれているが¹⁵⁾、これらの脂肪酸は極めて酸化されやすい¹⁶⁾。本研究では、醤油粕より調製した各分画物を用いて、まずこの魚油に対する抗酸化性を油系および水系で調べてみた。

油系での抗酸化性

魚油（イワシ油）400mgに各醤油粕分画物（エタノール抽出物、酢酸エチル抽出物、ODI画分）5mgを混合し、40℃の暗所での重量変化を経日的に測定し

第4図 醤油粕分画物の魚油に対する抗酸化性(油系) 棒グラフの値(IP)は各試料3検体の平均値±標準偏差値を示す。グラフの長いものほど、強い抗酸化性を示す。*；P<0.01(他のすべての試料に対して)

た。各試料の抗酸化活性は、魚油重量の5% (20mg)が増加した日数(誘導日数:IP)で評価した。その結果を第4図に示した。試料無添加(コントロール)での脂質過酸化のIPは13日間を示した。ここに魚油重量の1.25%に相当するエタノール抽出物を添加すると、脂質過酸化が抑制され、そのIPは26日間を示した。酢酸エチル抽出物の抗酸化性はさらに強い傾向にあった。この抽出物の脂質過酸化抑制効果は、天然の抗酸化剤である α -トコフェロールとほぼ同程度であった。他方、8-OHDおよび8-OHGを高含量化したODI画分においては、コントロールの約3倍に相当するIPの遅延が認められた。この画分の示す抗酸化活性は、他のどの試料よりも有意に(p<0.01)強かった。

水系での抗酸化性

醤油粕より調製した各分画物は、この魚油を基質とした水系の試験法においても抗酸化性を発揮した(第5図)。特にODI画分においては、脂質過酸化の抑制

第5図 醤油粕分画物の魚油に対する抗酸化性(水系) 魚油をエタノールに溶解した後、各試料およびリン酸緩衝液(pH7)を加え、AAPHにて脂質過酸化反応を誘導させた(30℃,暗所)。反応液7mlに含まれる各試料の量は0.42mgであった。反応時間0,48,72時間後にTBARS量を測定した。図中の値は各試料3検体の平均値±標準偏差値を示す。*；P<0.01(他のすべての試料に対して)
○；試料無添加,●；エタノール抽出物,▲；酢酸エチル抽出物,◆； α -トコフェロール,■；ODI画分

効果は大きく、 α -トコフェロール以上に有意に ($p < 0.01$) 強い抗酸化性を示した。鮮魚、干物、すり身などに含まれる油脂の状態は様々であり、また種々の複合因子が関与して脂質過酸化は促進する¹⁷⁾。これら食品中の水分活性も脂質の自動酸化に大きく影響することが知られている¹⁸⁾。本実験の結果より、醤油粕より調製した各分画物中の ODI を始めとする抗酸化物質は、油系および水系の両者において有効的に酸化を抑制することが判明した。すなわち、これら醤油粕分画物が魚やその加工品の酸化的品質劣化の抑制に役立つ可能性が示唆された。今後、実際に鮮魚や干物などを用いて、この分画物の抗酸化素材としての実用化についても積極的に研究を行ってゆきたい。また、本実験では魚油に対する抗酸化性を検討したが、ODI がリノール酸メチルなどの過酸化反応をも強く抑制すること¹⁹⁾を考慮すると、各種油脂食品に対してもこの醤油粕分画物が抗酸化剤として利用される可能性も大きい。

6. 醤油粕分画物のラジカル捕捉能

生体内に発生する活性酸素種やフリーラジカルは、各種生体成分を攻撃して種々の疾病、発癌、老化などを引き起すことが知られている²⁰⁾。最近、生体内でのこれら酸素障害を抑制する食品中の抗酸化物質を積極的に利用しようとする多くの試みがなされている²¹⁾。すなわち、種々の食品に抗酸化物質を付与したり、バイオテクノロジーの手法により食品素材中の抗酸化物質を高含量化することにより、ヒトの疾病予防や健康

維持に役立てる努力がなされている。本研究では、醤油粕より調製した ODI を含む各分画物の機能性素材としての有効利用を目的として、まず、DPPH ラジカルに対する捕捉能を調べた。本実験では、反応液 2 ml 中に各分画物のシラップ 200 μ g を添加した (第 6 図)。エタノール抽出物で弱いラジカル捕捉能が認められた。また、酢酸エチル抽出物においては 25% の捕捉能が観察された。他方、8-OHD および 8-OHG を高含量化した ODI 画分では、 α -トコフェロールには多少劣るが、78% という強いラジカル捕捉能が確認された。

他方、これらの醤油粕分画物は、生体膜モデルとしてのリポソームに対しても強い抗酸化性を示した。エタノール抽出物の酸化率は 28% となり、強い抗酸化性が認められた。酢酸エチル抽出物においては、脂質酸化率は 7% となり、さらに強い抗酸化性が確認された。また、ODI 画分においては、酸化率は 5% となり、 α -トコフェロールに匹敵する非常に強い活性が認められた。

7. 8-OHD の体内動態と抗酸化作用

ODI は *in vitro* では強い抗酸化性を示すことが分かった。ここでは、醤油粕より分離した 8-OHD が、実際に生体内にどのように吸収、さらには排泄されていくのか、また生体内において抗酸化作用を示すかを調べてみることにした。本研究²²⁾では、ラットに 8-OHD を経口投与し (20 mg / 体重 1 kg)、投与後 18 時間までの一定時間に血液、肝臓、腎臓および尿を回収した。各組織中の遊離 8-OHD は直接に、他方、結合物は β -グルクロニダーゼ / スルファターゼ処理した後に電気化学検出器を用いた HPLC で定量した。肝臓中の総 8-OHD は投与 1 時間後に高濃度 (9.4 nmol/g) を示し、その後 10 時間まで比較的高い濃度を維持した (第 7 図)。肝臓では 8-OHD の大部分は遊離型で存在し、他方、血漿中では抱合型が多くを占めた。すなわち、肝臓中で遊離 8-OHD は順次グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体に変換され、これら抱合体が血流に移行すると推察された。血漿や腎臓中の総 8-OHD 濃度は、投与後 2 時間以内に最大となり、その後徐々に減少した。尿への 8-OHD の排泄は投与後 1-2 時間の間に始まり、その割合は、血漿や腎臓中の 8-OHD 濃度が急速に減少した 2-4 時間および 4-6 時

第 6 図 醤油粕分画物のラジカル捕捉活性 (DPPH 法)

第 7 図 8-OHD 投与後の肝臓中イソフラボン濃度の変化
図中の値は各ラット 6 匹の平均値±標準偏差値を示す。

間の間で高い値を示した。投与後 0-18 時間の間に尿中に回収された累積 8-OHD 量は、投与量の約 36% であった。また、高濃度の遊離 8-OHD を含有する投与後 1, 2 時間の肝臓ホモジネートは、0 時間（投与前）のものより AAPH や Cu^{2+} で誘導される脂質過酸化反応を有意に抑制した（第 8 図）。これらの結果より、8-OHD はラット体内に比較的容易に吸収され、また、生体内においても抗酸化作用を含めた生物学的活性を十分に発揮するであろうと推察される。

8. おわりに

ダイゼインやゲニステインなどのイソフラボン類は、乳癌や前立腺癌の抑制、骨粗鬆症の予防、更年期障害の軽減などの生理機能を示す食品成分であり²³⁾、世界的にも注目を浴びている。最近、著者らは、味噌や醤油などの大豆発酵食品中に存在する 8-OHD や 8-OHG が強い抗酸化性を示すのみならず、ダイゼインやゲニステインより有意に強い SOD 様活性を示し、またチロシナーゼなどの酸化酵素を強く阻害することを見い出した²⁴⁾。また、広田ら²⁵⁾は、各種イソフラボン類の癌細胞に対する影響を調べ、8-OHG が低濃

第 8 図 8-OHD 投与後の肝臓ホモジネートの酸化安定性

8-OHD 投与後の各時間に肝臓を摘出し（各ラット 3 匹）、この肝ホモジネートに AAPH を加え、脂質過酸化反応を誘導させた（図 A、白棒；過酸化反応の誘導前、黒棒；過酸化反応の誘導後）。

他方、同じ肝ホモジネートに Cu^{2+} を加え、過酸化反応を誘導させた（図 B、白棒；過酸化反応の誘導前、黒棒；過酸化反応の誘導後）。

*； $P < 0.05$ （0 h のラットに対して）**； $P < 0.01$ （0 h のラットに対して）

度で HL-60 細胞の増殖を抑制することを報告している。

ところで、この醤油粕中に含まれるメラノイジンには、血中コレステロールの低下作用、善玉乳酸菌の増殖作用、耐糖能改善効果、トリプシンインヒビター活性、抗変異原活性などの多彩な生理機能が知られている²⁶⁾。以上、これらイソフラボンやメラノイジンの多種多様な生理機能を考慮すると、今回醤油粕より調製した各分画物は、抗酸化剤としての有効利用にとどまらず²⁷⁾、その他の機能をも示す新しい機能性素材として利用される可能性も十分にあり得る。今後、醤油粕

を原料とした種々の分離・精製物が、食品のみならず、化粧品や医薬品にも利用されることがあれば、環境保全の面からも大いに評価されることになるであろう。

< 椋山女学園大学 生活科学部 食品栄養学科 >

参考文献

- 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 DC, pp. 353-360 (1994).
- 2) Esaki, H., Kawakishi, S., Morimitsu, Y. and Osawa, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1637-1639 (1999).
- 3) Esaki, H., Watanabe, R., Onozaki, H., Kawakishi, S. and Osawa, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 851-858 (1999).
- 4) 江崎秀男, 川岸舜朗, 井上昂, 大澤俊彦: 食科工, **48**, 51-57 (2001).
- 5) 江崎秀男, 渡部綾子, 増田均, 大澤俊彦, 川岸舜朗: 食科工, **48**, 189-195 (2001).
- 6) 江崎秀男, 大澤俊彦, 川岸舜朗: 食科工, **49**, 476-483 (2002).
- 7) 山口直彦: 醸協, **87**, 721-725 (1992).
- 8) 恩田 匠: 食品と技術, NO. 327, 11-13 (1998).
- 9) 門脇 清: 醤研, **4**, 237-239 (1978).
- 10) 遠藤勝之: 醸協, **90**, 512-518 (1995).
- 11) 中島田豊, 古林万木夫, 野村暢彦: バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 807-812 (2002).
- 12) 松田茂樹: 醸協, **93**, 263-269 (1998).
- 13) 江崎秀男, 渡部綾子, 菱川進弘, 大澤俊彦, 川岸舜朗: 食科工, **51**, 47-53 (2004).
- 14) 川岸舜朗: 食の科学, 通巻177号, pp. 18-25 (1992).
- 15) 藤本健四郎: 脂質と健康, 「魚の科学」, (朝倉書店, 東京) pp. 92-100 (1994).
- 16) Cho, S.-Y., Miyashita, K., Miyazawa, T., Fujimoto, K. and Kaneda, T.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 876-879 (1987).
- 17) 瀬戸美江, 遠藤泰志, 藤本健四郎: 食科工, **49**, 703-711 (2002).
- 18) Labuza, T. P., McNally, L., Gallagher, D., Hawkes, J. and Hurtado, F.: *J. Food. Sci.*, **37**, 154-159 (1972).
- 19) Esaki, H., Onozaki, H., Morimitsu, Y., Kawakishi, S. and Osawa, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 740-746 (1998).
- 20) 二木鋭雄: フリーラジカル障害の分子メカニズム, 「成人病予防食品の開発」, (シーエムシー, 東京) pp. 1-6 (1998).
- 21) 寺尾純二: 食品と抗酸化物質, 「活性酸素と食同源」, (共立出版, 東京) pp. 150-153 (1996).
- 22) Esaki, H., Shirasaki, T., Yamashita, K., Nakamura, Y., Kawakishi, S. and Osawa, T.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 80-86 (2005).
- 23) 渡邊 昌: イソフラボンの生理活性, 「大豆イソフラボン」, (幸書房, 東京) pp. 39-47 (2001).
- 24) 白崎友美, 江崎秀男, 武藤ゆうみ, 大矢友子, 川岸舜朗: 農化2002年度大会講演要旨集, p. 253, 仙台 (2002).
- 25) Hirota, A., Taki, S., Kawai, S., Yano, M. and Abe, N.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 1038-1040 (2000).
- 26) 三浦理代: 醸協, **97**, 253-256 (2002).
- 27) 江崎秀男, 菱川進弘, 渡部綾子: 特願第2001-113501号 (2001).