報 文

大豆発酵食品のマンニトリオース含量に影響する要因

石川千秋^{1,2*}, 兒玉しずさ¹, 高柿了士³, 森光康次郎⁴

¹ お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科

² 現・農研機構九州沖縄農業研究センター

³ (株)萌芽プランツ

⁴ お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系

Factors Affecting Manninotriose Concentration in Fermented Soybean Foods

Chiaki Ishikawa^{1,2*}, Shizusa Kodama¹, Ryoji Takagaki³ and Yasujiro Morimitsu⁴

¹ Department of Nutrition and Food Science, Graduate School of Humanities and Science,
Ochanomizu University, 2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610

² Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO, 2421 Suya, Koshi, Kumamoto 861-1192

³ Houga Plants K.K., 343-24-202 Matsunaga, Fukuyama, Hiroshima 729-0112

⁴ Faculty of Core Research, Natural Science Division, Ochanomizu University,
2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610

Manninotriose is a characteristic trisaccharide contained in fermented soybean foods, and is produced by desorption of one molecule of fructose from stachyose. In this study, we examined the manninotriose content in several kinds of commercially available fermented soybean foods and homemade foods, such as natto, miso, and tempeh, to clarify the factors affecting manninotriose production. The water-soluble fraction was obtained from both purchased or homemade fermented food, and the oligosaccharide contents were measured using high-performance liquid chromatography. We observed difference in manninotriose content among different kinds of fermented soybean food, which suggests that production of manninotriose is dependent on the microorganisms involved in the fermentation. Manninotriose concentration differed among natto, miso and tempeh in decreasing order. This tendency shows that natto has higher production efficiency of manninotriose, defined as the ratio of manninotriose to the initial stachyose content in the molar basis. The time course study of fermentation demonstrated that manninotriose concentration increased with degradation of stachyose, and the concentration of manninotriose was maintained during fermentation and storage. It was suggested that the factors affecting manninotriose production were the difference in stachyose content in the soybeans used as raw materials, the types of microorganisms involved in fermentation, and the conditions of fermentation, such as temperature and salinity.

(Received Feb. 1, 2019 ; Accepted Aug. 21, 2019)

Keywords : oligosaccharide, manninotriose, soybean fermented food, quantitative analysis

キーワード : オリゴ糖, マンニトリオース, 大豆発酵食品, 定量分析

大豆は、たんぱく質、炭水化物、脂質のいずれの三大栄養素にも富む¹⁾ 豆類で、古くから食用とされてきた。その一方で、トリプシンインヒビターやレクチンなどの有害成分を含むことから、食用には加熱調理・加工が必須である。日本においては、温暖で湿潤な気候を背景として、納豆、味噌、醤油など種々の大豆発酵食品が製造されてきた。微生物による発酵過程を経ることで、大豆中の栄養素は低分子化され、吸収効率や風味が向上する。そのため、大豆発酵食品は調味料や食材そのものの形で、伝統的な和食文化

において重要な役割を担ってきた。

前述の納豆²⁾³⁾ や味噌⁴⁾ などの大豆発酵食品中には、図1に示した、ガラクトース2分子とグルコース1分子からなる三糖類のマンニトリオース (α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucose) が特徴的なオリゴ糖として見出される。これは、四糖類のスタキオースを主要なオリゴ糖として含有する⁵⁾ 大豆の発酵過程において、フルクトースが1分子脱離して生成されと考えられている⁴⁾。

¹ 〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1, ² 〒861-1192 熊本県合志市須屋 2421, ³ 〒729-0112 広島県福山市松永町 343-24-202

⁴ 〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1

*連絡先 (Corresponding author), c.ishikawa@affrc.go.jp

図1 マニノトリオースおよびその前駆体の構造式

マニノトリオースは、植物においてはヒメオドリコソウ (*Lamium purpureum*)⁶⁾、シロネ (*Lycopus lucidus*)⁷⁾、ジオウ (*Rehmannia glutinosa*) を蒸した生薬である熟地黄⁸⁾などに含まれるとされている。食用植物の中では、大豆と同じマメ科のヒヨコマメ (*Cicer arietinum*)⁹⁾¹⁰⁾、レンズマメ (*Lens culinaris*)¹⁰⁾¹¹⁾ に含有されるという報告がある。また、マニノトリオースの主な生理機能性としては、ビフィズス菌に選択的に資化され¹²⁾、それらの菌が増加することによる腸内細菌叢改善効果¹³⁾や血清脂質の改善作用¹⁴⁾を有することがすでに知られている。

納豆²⁾³⁾あるいは味噌⁴⁾、インドネシアの無塩大豆発酵食品であるテンペ¹⁵⁾の製造中における経時的な糖含量の変化については、これまでにいくつかの研究が行われている。しかしながら、大豆使用量あたりのマニノトリオース含量の比較、あるいは異なる大豆発酵食品間で横断的にマニノトリオースおよびその他のガラクトオリゴ糖含量の比較を行った研究はない。また、発酵・貯蔵の期間や発酵に関与する微生物の違いがマニノトリオースの含量に及ぼす影響についても未解明である。

そこで本研究においては、市販大豆発酵食品に加え、自ら調製した大豆発酵食品について大豆使用量あたりのマニノトリオース含量や大豆中のスタキオースからマニノトリオースが生成する割合について調べることで、発酵・貯蔵期間、発酵関与微生物、発酵様式などマニノトリオース生成に関わる諸条件の影響について検討した。

実験方法

1. 大豆発酵食品の調製

原料大豆 (カナダ産、アメリカ産、九州産フクユタカ) は市販のものを使用した。水戻ししていない乾燥状態の生大豆を秤量し、洗浄、浸漬 (4℃, 24時間)、蒸煮 (圧力鍋, 121℃, 約20分) を行い、蒸し豆を調製した。

(1). 味噌: 蒸し豆をフードプロセッサーでペースト状にした後、市販の米麹 (みやここうじ, 伊勢惣)、種水用の大豆煮汁および塩を表1に示した混合割合¹⁶⁾で混合して調製した。

(2). 納豆: 納豆メーカーの紹介する家庭での納豆づくり

の方法¹⁾に従い調製した。国内メーカー2社の菌株が異なる市販小粒納豆2種類 (XまたはY, いずれも原料大豆はアメリカまたはカナダ産)、各10gを100mLの湯に懸濁して静置した上清液 (菌液) 15mLを蒸し豆約320gに加え、ゴムべらで攪拌し、混合した。

(3). テンペ: 0.2% 酢酸水溶液に浸漬した大豆を脱皮してから同様に蒸煮し、市販のインドネシア製テンペ菌粉末3gを片栗粉27gに加えて攪拌して調製した菌粉末を蒸し豆約600gに加え、ゴムべらで攪拌し、混合した。

甘口味噌および辛口味噌は、混合後に40℃の恒温槽で24時間以上、最長180日間発酵させた。それ以外の大豆発酵食品は、既報³⁾¹⁵⁾による微生物の至適温度に応じて、ヨーグルトメーカー (IYM-012, アイリスオーヤマ) を用いた発酵を行った。すなわち、納豆は既往研究³⁾に基づき40℃で24時間、テンペは松本らの処理に則り有孔ポリ袋に小分けに入れ30℃で18時間¹⁵⁾、甘味噌も同様に有孔ポリ袋に小分けに入れ、60℃で8時間¹⁷⁾発酵させた。

納豆、テンペ、甘味噌については、所定の時間経過後に、各大豆発酵食品を取り出して室温で2時間放冷し、さらに48時間、4℃の低温室で保管したものを基本試料として大豆発酵食品間の比較に用いた。

2. 経時変化測定試料のサンプリング

(1). 納豆は、発酵期間中2時間ごと、貯蔵期間中24時間ごとに発酵容器を上下に20回程度振盪し、十分に攪拌した後約20gのサンプルを採取し、-20℃の冷凍庫で凍結して分析まで保管した。

(2)-i. 甘口味噌および辛口味噌は、10日目まで1日おき、その後は10日または30日おきにサンプルを採取した。サンプルは同様に-20℃の冷凍庫で凍結して分析まで保管した。

(2)-ii. 甘味噌は、発酵期間中8時間まで2時間ごとに有孔ポリ袋に小分けに入れた約20gのサンプルを取り出し、-20℃の冷凍庫で凍結して分析まで保管した。

(3). テンペは、発酵期間中2時間ごと、貯蔵期間中24時間ごとに小分けにした袋を取り出し、同様に-20℃の冷凍庫で凍結して分析まで保管した。

3. 市販大豆発酵食品の処理

納豆 (ア, イおよびA~P)、丸大豆醤油、米味噌ア (甘口・淡色こし味噌, 長野県)、米味噌イ (甘口・淡色味噌, 京都府)、麦味噌 (甘口・淡色味噌, 大分県)、テンペ、豆乳ヨーグルト、発酵豆乳はいずれも市販のものを供試した。丸大豆醤油 (1~2年)、米味噌イ (1~3年) は熟成期間の異なる製品を入手し、実験試料とした。

醤油以外市販大豆発酵食品は、購入後に重量を測定し-20℃の冷凍庫で凍結して凍結乾燥を行うまで保管した。凍結乾燥以降の手順は自作大豆発酵食品と同様に行った。

醤油については Milli-Q 水で1mLに定容し、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (4000kDa, Merck-Millipore)

により遠心ろ過 (6000 rpm, 45 min, 25℃) を行った。ろ液 150 μ L を等量のアセトニトリルで希釈し、0.45 μ m の HPLC 用前処理フィルター (エキクロディスク 3, 日本ポール) で処理したのち、20 μ L を HPLC 分析に供した。

4. 水分含量

生大豆以外のサンプルは、冷凍庫で 24 時間以上凍結させた後に凍結乾燥を行った。冷凍前と凍結乾燥後に秤量し、水分含量を算出して、各オリゴ糖の新鮮重量中の含量を換算した。

5. HPLC によるオリゴ糖の定量分析

生大豆はそのままミルサー (Labo Milser LM-PLUS, 岩谷産業) で粉碎して大豆粉末を得た。蒸煮大豆、大豆発酵食品については、-20℃ で冷凍したサンプルを凍結乾燥した後、ミルサーで粉碎して凍結乾燥粉末試料を得た。凍結乾燥粉末試料は、-20℃ の冷凍庫で抽出まで保管した。

凍結乾燥試料 1 g にホットプレートで加熱した 90℃ 以上の熱水 (Milli-Q 水) 30 mL を加え、ボルテックス (VORTEX-GENIE2, Scientific Industries) で 3 分間攪拌、遠心分離 (3000 rpm, 5 min, 25℃) してから上清部分をブフナー漏斗でろ紙 (No. 2, 東洋濾紙) を用いて吸引ろ過し、ろ液を得た。さらに、沈殿に 20 mL の熱 Milli-Q 水を加え、同様の抽出操作を 3 回繰り返した。その後、上清の Brix を糖度計 (Atago, PR-201a) で測定し、0.1% 以下になるまで同様の操作を繰り返した。さらに Milli-Q 水でろ紙を洗浄し、洗浄液も回収した。

得られた上清のろ液はすべてナスフラスコに集め、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した後に、凍結乾燥して水溶性画分粉末を得た。この水溶性画分粉末 50~200 mg を Milli-Q 水で 1 mL に定容し、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (4000 kDa, Merck-Millipore) により遠心ろ過 (6000 rpm, 45 min, 25℃) を行った。ろ液 150 μ L を等量のアセトニトリルで希釈し、0.45 μ m の HPLC 用前処理フィルター (エキクロディスク 3, 日本ポール) で処理したのち、20 μ L を HPLC 分析に供した。

オリゴ糖の HPLC 分析は以下の条件で実施した。カラム: NH2P50-4E (Asahipak, 4.6 $\times$ 250 mm), プレカラム: NH2P-50G 4 A (Asahipak), カラム温度: 35℃, 溶離液: アセトニトリル: Milli-Q 水 = 7:3 (v/v), 流速: 1.0 mL/min, 検出: 示差屈折率 (RI) 検出器 (RI-101, Shodex)。

各オリゴ糖の同定は、ラフィノース, メリビオース, スタキオース, マンニトリオース (和光) の標準品を用い、クロマトグラムにおける標準品と試料の保持時間を比較して行った。また、標準品を用いて検量線を作成し、外部標準法により定量を行った。結果は 3 回分析の平均面積値から算出した。

納豆については、菌液中のオリゴ糖含量も定量し、菌液由来のオリゴ糖を引いた値とした。

甘口味噌および辛口味噌について、甘口味噌は 5~20 日

表 1 各味噌の混合比

	甘口味噌	辛口味噌	甘味噌
蒸煮大豆 (g)	650	900	227
米麴 (g)	450	280	200
食塩濃度 (g)	145	183	30
仕込み用 RO 水 (g)	135-136	90	0
種水用大豆煮汁 (g)	165	32	200

目まで、辛口味噌は 60 日から 90 日目までを標準的な熟成期間とし、この期間の平均値を大豆発酵食品間の数値の比較に用いた。

実験結果および考察

1. 市販大豆発酵食品中マンニトリオース含量

図 2 に大豆を原料とする市販発酵食品中のマンニトリオース含量を、生大豆と比較して示した。

納豆や味噌などの固体の食品と、醤油や発酵豆乳など液体状の食品が混在しているため、食品新鮮重あたりの含量で表した。

これまで醤油中の糖類については報告があった¹⁸⁾ものの、マンニトリオースの存在は明確には確認されていなかった¹⁸⁾が、本研究において初めて定量された。

丸大豆醤油と米味噌イについては、熟成度の異なる試料を供試した。その結果、米味噌イにおいては発酵期間が長くなるに従い減少する傾向 (2 年熟成: 7.16 mg/gFW, 3 年熟成: 5.80 mg/gFW) が、丸大豆醤油についてはわずかに増加する傾向 (2 年熟成: 12.9 mg/gFW, 3 年熟成: 13.5 mg/gFW) が確認された。

また味噌については、使用する麴の種類が異なる米味噌、麦味噌の間で、マンニトリオース含量に若干の差異が認められた。米味噌イについては発酵・熟成期間が長くなるにつれて発酵関与菌による糖の分解が大きく影響するようになり、減少傾向が見られた可能性が考えられた。本研究では試料に含まれていないが、豆味噌はコメ、ムギなどの穀物由来麴を用いる味噌と異なり、デンプン質から生じる糖が少ないため、糖を栄養素とする乳酸菌や酵母の発酵が弱いとされており¹⁶⁾、さらなる検討が望まれる。

大豆発酵食品間で比較すると、テンペ、発酵豆乳などのマンニトリオース含量は、納豆、醤油、味噌といった日本の伝統的な発酵食品よりも著しく少なく、含まれていても痕跡程度であった。テンペ、発酵豆乳などには四糖類のスタキオースが多く含まれていることから、テンペ、発酵豆乳や豆乳ヨーグルトなどにおいてはスタキオースからのフルクトース 1 分子脱離によるマンニトリオース生成が起こっておらず、前駆体であるスタキオースが残存していると判断された。すなわち、発酵に関与する微生物の糖加水分解酵素によるフルクトースの脱離活性の違いが、発酵産物中のマンニトリオース含量に影響することが示唆さ

図 2 市販大豆発酵食品中のマンニノトリオース含量

N.D.: ピーク非検出

FW: 新鮮重量

Tr: 含量が ≤ 0.1 mg/gFW 未満

図 3 市販納豆中のオリゴ糖含量

製造元別に異なるアルファベットを付し、複数製品がある場合はさらに数字を付した。

+: 中粒・大粒納豆, #: ひきわり納豆, †: 黒豆納豆

その他無印は極小・小粒納豆

右端の極小・小粒は 16 種の平均値 $\pm$ 標準偏差, 中・大粒は 3 種の平均値 $\pm$ 標準偏差

*: 5% 水準で有意差あり (マン・ホイットニーの U 検定)

れた。味噌、醤油は耐塩性乳酸菌、耐塩性酵母、麹菌など、納豆は納豆菌、テンペはテンペ菌（クモノスカビ）、発酵豆乳は乳酸菌などにより発酵が行われる。このような発酵関与微生物の種類が、マンニノトリオース生成においては重要であると考えられる。

先行研究においては、浸漬および蒸煮大豆³⁾、あるいは大豆タンパク質製造時に大豆ホエーから副産物として得られるオリゴ糖シロップ中¹⁹⁾にマンニノトリオースを確認している報告も存在する。しかし、本研究においては、川村らによる既往研究²⁰⁾と同様に、蒸煮大豆中には、明確なマンニノトリオースの存在が確認できなかった（データ省略）。したがって、マンニノトリオース生成反応は、加熱処理単独では起こらず、微生物などによる酵素反応を介して起こると推察された。

図 2 においてマンニノトリオース含量が高い傾向を示した納豆に関して、さらに図 3 に示すように 22 種・16 製造

元の市販製品を購入して、マンニノトリオース含量を比較した。本研究において調査対象とした市販納豆のマンニノトリオース含量には大きな幅があり、また製造元が同じ製品間にも差異が認められた。これは、原料大豆の品種・産地、形状や、発酵に用いられた納豆菌株等が異なるためと推察された。

また、原料に中粒以上的大豆を使用した製品と小粒大豆を使用したものを比較すると、小粒大豆で有意にマンニノトリオース含量が多くなっていた ($p < 0.05$)。したがって、より粒の小さい大豆の方が表面積は大きくなり、効率よく発酵が進みマンニノトリオースが生成しやすいという可能性が考えられた。

さらに、図 3 において製品を製造元別の平均マンニノトリオース含量の多い順に並べ、マンニノトリオースからガラクトースが 1 分子脱離した構造を持つ二糖類のメリビオース含量を合わせて示した。同一製造所で複数のサンプル

図 4 発酵期間中における自作納豆中オリゴ糖含量の変化

カナダ産の大豆を原料として使用。

2~3 反復の平均値およびマンニトリオースについては平均値±標準偏差を示した。

図 5 発酵期間中における自作味噌中オリゴ糖含量の変化

ルを得た F, G, O で比較すると、マンニトリオース/メリビオース比が 2 未満の製品は、右側に位置していた。したがって、メリビオース含量が多い製品ほどマンニトリオース含量が少なくなる、つまりマンニトリオースがさらに分解されてメリビオースが生成する可能性が示唆された。

ただし、本比較においては、製造後経過日数や原料大豆などの条件が製品ごとに異なり、マンニトリオース含量の差異に影響を及ぼした要因を特定することはできなかった。そこで、同一の原料大豆から発酵食品を自ら調製することにより、マンニトリオース含量に影響を及ぼす要因の特定を試みた。

2. 自作大豆発酵食品の製造過程におけるオリゴ糖含量の変動

大豆発酵食品の発酵期間におけるオリゴ糖含量については、菅野ら³⁾が納豆ではマンニトリオースが発酵後 12 時間で最大値を示したあと緩慢に減少すること、本藤ら⁴⁾が味噌熟成中にスタキオースが漸減することを報告している。しかしながら本研究では、既報と異なり、自作した納豆の発酵期間におけるマンニトリオース含量は、スターターとして利用した市販納豆の種類にかかわらず、増加後

にはほぼ一定となる傾向が認められた (図 4)。マンニトリオースの分解がほとんど進行しなかったと推察される本研究の結果は、大豆オリゴ糖の分解は主にフルクトース側から行われ、ガラクトース側の分解は緩やかであったとする報告³⁾と一致していた。したがって納豆の発酵過程におけるオリゴ糖含量の変化には、大豆オリゴ糖をフルクトース側から分解する酵素として知られているレバンシュクラゼと β フルクトシダーゼの寄与が大きいと推察された。

納豆と同様に、自作した甘口味噌および辛口味噌の発酵期間中のオリゴ糖含量を経時的に測定した。いずれの味噌についても発酵開始から約 1 週間でスタキオースが急激に減少し、同時にマンニトリオースの増加が見られた。また図 4 と図 5 の比較から、甘口・辛口味噌では納豆と比較してスタキオースの減少速度は緩やかであった。辛口味噌では熟成期間の後期にメリビオースの増加とマンニトリオースの減少が見られ、マンニトリオースの緩やかな分解の可能性が考えられた。一方、高麹歩合、低塩分濃度で酵素の分解作用を主とする分解型熟成¹⁶⁾の甘口味噌では発酵開始から 4 時間でスタキオースが半減しており (データ省略)、味噌においては麹の割合、および食塩などの副材料の使用量がマンニトリオース含量に影響していることが示

表 2 貯蔵期間中における自作大豆発酵食品中オリゴ糖含量の変化

	納豆 X		納豆 Y		テンペ	
	マンニノ トリオース	メリビ オース	マンニノ トリオース	メリビ オース	マンニノ トリオース	メリビ オース
発酵終了時点	12.7±3.48	3.56	8.81±0.34	4.93	N.D.	N.D.
2hr 放冷後	12.7±1.74	2.17	9.06±0.26	5.13	0.91±1.29	N.D.
2hr 放冷+4℃保管 (22hrs)	13.2±4.20	2.91	8.43±0.30	3.46	1.78±0.34	N.D.
2hr 放冷+4℃保管 (46hrs)	14.2±6.48	3.89	6.94±1.95	4.40	1.63±1.18	N.D.
2hr 放冷+4℃保管 (9days)	12.6±0.45	4.86	10.7±2.44	4.13	—	—
2hr 放冷+4℃保管 (41days)	8.47±3.39	2.26	12.9±3.58	9.43	—	—

オリゴ糖含量 (mg/gFW), N.D.: ピーク非検出

2~3 反復の平均値と, マンニノトリオース含量の標準偏差を示した.

図 6 原料大豆, 市販納豆製品自作納豆および菌液中オリゴ糖含量の比較
カナダ産の大豆を原料として使用.

唆された.

自作したテンペでは, 24 時間の発酵期間中にスタキオース含量は漸減したものの, マンニノトリオース含量はごく微量であり, 発酵終了時点では検出されなかった (データ省略).

自作大豆発酵食品の発酵終了後に, 2 時間の室温での放冷や 4℃での冷蔵保管がオリゴ糖含量に及ぼす影響を示した (表 2). 納豆中のマンニノトリオースをはじめとしたオリゴ糖の含量は, 放冷および冷蔵期間中には大きく変化しなかった. したがって, 発酵を停止させた納豆を冷蔵保管する場合には, マンニノトリオース含量が維持されることが示唆された.

テンペでは, 発酵終了時点で検出されなかったマンニノトリオースが, 放冷, 冷蔵したサンプルで検出されたことから, 4℃の冷蔵条件においても, 微弱ではあるが発酵が継続していた可能性が推察された.

以上の結果より, 大豆発酵食品においては, 冷蔵保管中にマンニノトリオース含量の大幅な減少は生じないことが推察された.

3. 市販品と自作の大豆発酵食品間での比較

原料生大豆, 自作納豆の調製にスターターとして利用し

た市販納豆, 自作納豆 (24 時間発酵, 放冷・冷蔵 48 時間), 市販納豆 10 g を 100 mL の湯に懸濁した菌液 (市販納豆 1 g あたりに換算) に含まれるオリゴ糖含量を示した (図 6).

自作品では市販製品と比べ, マンニノトリオース含量は低い傾向が見られたが, 納豆 X の方が納豆 Y に比べいずれの試料でもマンニノトリオース含量が高い傾向は共通していた.

納豆 X では菌液において, 市販製品よりもメリビオースおよびスタキオース量が高くなっていた. 納豆 X では粘液成分中にこれらの成分が多く含まれていた可能性が考えられる.

本実験においては, 同一の原料大豆を用いて, 同様の製造条件で納豆を調製しているため, スターターとして利用した市販納豆の違いが, 各段階のマンニノトリオース含量に同様の影響を及ぼしたと推察された. 自作納豆のマンニノトリオース含量は, 市販納豆で用いられている納豆菌の分解性の違いを反映したと考えられ, 使用する納豆菌の菌株により, スタキオースの分解性が異なることが示唆された.

4. 自作大豆発酵食品間における比較

さらに, 自ら調製した大豆発酵食品中のマンニノトリ

表 3 自作大豆発酵食品間におけるマンニトリオース含量および生成効率の比較

品目	種類	大豆産地	測定の時期	含量 (mg/gFW)		生成効率 (%)
				製品 1g あたり	大豆使用量 1g あたり	マンニトリオース含量 /初期スタキオース含量 (mol/mol)
味噌	甘口	米国	5~20 日目の平均値	3.71	18.5	73.7
	甘口	日本	5~20 日目の平均値	2.09	10.6	45.5
	甘	カナダ	発酵終了~放冷・冷蔵 48 時間後	3.18	18.5	77.2
	辛口	米国	2~3 か月目の平均値	2.31	8.32	33.0
納豆	X	カナダ	発酵終了~放冷・冷蔵 48 時間後	14.2	33.3	115
	Y	カナダ	発酵終了~放冷・冷蔵 48 時間後	6.94	16.1	58.7
テンペ		カナダ	発酵終了~放冷・冷蔵 48 時間後	1.63	3.44	16.3

マンニトリオース生成効率 (%) = 調製終了時点のマンニトリオース含量 (mol) / 初期 (発酵開始時点) のスタキオース含量 (mol) × 100

調製終了時点の値はそれぞれ発酵終了後放冷, 冷蔵期間を経過したものを採用した。

オース含量を測定し, 比較したところ, 市販食品での傾向 (図 2) と同様に, 納豆で高く, テンペで低くなった (表 3)。また, 製造過程で副材料が多く使用され, 相対的に大豆の使用比率が小さい発酵食品では, 食品 1g あたりで換算した際にマンニトリオースの含量が低く算出される可能性を考慮して, 原料大豆使用量あたりのマンニトリオース含量 (1g の大豆から調製された大豆発酵食品に含まれるマンニトリオース含量) を算出した。この大豆使用量あたりマンニトリオース含量が高い発酵食品では, より効率的にマンニトリオースが生成されていると考えられる。

表 3 に示した自作の甘味噌, 納豆およびテンペは同じ原料大豆を使用し, ほぼ同じ条件で大豆を蒸煮していることから, 発酵に関与する微生物の分解性を比較できる。算出した大豆使用量あたりマンニトリオース含量は, 納豆 ≥ 味噌 > テンペという傾向が認められた。また, 納豆については, スターターの違いにより数値が異なったことから, 菌株によってスタキオースからフルクトースを脱離する酵素の活性が異なる可能性が推察された。

原料大豆などが異なるため, 参考として味噌の種類間で大豆使用量あたりのマンニトリオース含量の比較を行うと, 甘味噌 ≥ 甘口味噌 > 辛口味噌の順であった。甘味噌, 甘口味噌は大豆に対する麴の割合が高く, 塩分量が少ないという特徴がある¹⁶⁾。そのため, 麴の割合が低く塩分量が多い辛口味噌に比べ, 甘味噌では麴由来の酵素などによる影響を強く受けたと考えられる。

さらに, 発酵開始時点で調製した食品中に含まれていた大豆由来のスタキオース含量と, 発酵終了時のマンニトリオース含量の割合 (%) を「マンニトリオース生成効率」として, モル比で算出して比較したところ, 大豆使用量あたりのマンニトリオース含量とほぼ同様の傾向を示した (表 3)。

また, 納豆間では, 「マンニトリオース生成効率」の低い納豆 Y の方が, マンニトリオース以外のオリゴ糖である二糖類のメリビオース (表 2) を, より多く含有していた。したがって, 納豆 Y のスターターは, 納豆 X に比べてガラクトースを脱離させる酵素活性が高い可能性が示唆された。

「マンニトリオース生成効率」が納豆 X において 100 を超えていたひとつの要因として, 発酵開始時点のスタキオース含量の測定値を過小評価した可能性が想定された。別の要因として, スタキオース以外のマンニトリオース前駆体の存在が仮定された。後者については, より高分子の前駆体として, 四糖類のスタキオースにさらにガラクトースが 1 分子結合した五糖類のベルバスコース, ガラクトースが 2 分子結合した六糖類のアユゴースなどが想定されるが, これらの糖は大豆中に痕跡程度しか確認されていない⁵⁾²¹⁾。したがって, これらの五糖, 六糖はマンニトリオース含量に大きく影響を及ぼすことはなかったと推察された。

その一方で, 酵母 α -ガラクトシダーゼが関与するマンニトリオース生成系において, ガラクトース転移活性が観察され, メリビオースからのマンニトリオース生成が確認されている²²⁾。そのため, マンニトリオース生成経路として従来考えられてきたスタキオースからのフルクトース 1 分子脱離以外に, メリビオースへのガラクトース 1 分子付加が関与する可能性も推察された。今後, 単糖の定量などを含め, さらなる検証を進める必要があると判断された。

本研究において, 大豆発酵食品におけるマンニトリオース生成に関わる諸条件を初めて明らかにすることができた。マンニトリオースの生成量に関与する要因としては, 原料大豆中のスタキオース含量, 形状, 発酵関与菌の種類 (菌株を含む), 発酵条件 (時間, 温度, 食塩濃度) が

示唆された。特に今回は納豆，味噌，テンペという食品に限って自作し，マニノトリオース生成効率を算出したが，納豆とテンペはほぼ単独の菌による発酵であるのに対して，味噌や醤油は耐塩性麹，耐塩性乳酸菌，耐塩性酵母など複数の菌による複合発酵が行われている。そうした発酵条件の違いが及ぼす影響についても今後検討が必要であると考えられる。

要 約

市販大豆発酵食品のオリゴ糖含量を定量した結果，マニノトリオースは納豆，味噌，醤油中に比較的多く含まれる一方，テンペや発酵豆乳，豆乳ヨーグルト中の含量はごく微量であった。したがって，発酵に関与する微生物のフルクトース脱離酵素活性の違いが，発酵産物のマニノトリオース含量に影響することが示唆された。

さらに市販納豆についてマニノトリオース，二糖類のメリビオース含量を定量した結果，マニノトリオース含量には製品間で大きな幅があり，メリビオース含量が高い製品ほどマニノトリオース含量は低くなっていた。

大豆発酵食品（味噌，納豆，テンペ）を自作して発酵期間中のオリゴ糖含量の経時変化を調べた結果，納豆では発酵期間中生成したマニノトリオースはほぼそのままの含量を維持していた。また冷蔵期間中の変化もわずかであった。味噌では発酵期間中にマニノトリオースの減少が見られ，麹歩合や塩分濃度による差異が見られた。

大豆発酵食品 1g あたりのマニノトリオース含量は，市販食品での傾向と同様に，納豆で高くテンペで低かった。

大豆使用量あたりのマニノトリオース含量およびスタキオースからのマニノトリオース生成効率は，納豆≒味噌>テンペという傾向であり，使用菌株ごとのフルクトース脱離酵素の活性のほか，麹歩合や塩分濃度など微生物の生育条件の影響を受ける可能性が示唆された。

文 献

- 1) 本間清一，村田容常 (2010). 「スタンダード栄養・食物シリーズ7 食品加工貯蔵学 (第2版)」，東京化学同人，東京，pp. 25-26.
- 2) Kihara, Y. and Namba, R. (1964). Chemical constituents of natto. Part II oligosaccharides in natto. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan (Nippon Nogeikagaku Kaishi)*, **38**, 257-261 (木原芳次郎，難波理美子，納豆の成分について (第2報)，日本農芸化学会誌).
- 3) Kanno, A., Takamatsu, H., Takano, N., and Akimoto, T. (1982). Change of saccharides in soybeans during manufacturing of natto (Studies on natto part I). *Journal of food science and technology (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi)*, **29**, 105-110 (菅野彰重，高松晴樹，高野伸子，秋本隆司，納豆製造工程における糖成分の動向，日本食品工業学会誌).
- 4) Hondo, S. and Mochizuki, T. (1979). Free sugars in miso. *Journal of food science and technology (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi)*, **26**, 469-474 (本藤 智，望月 務，みその遊離糖について，日本食品工業学会誌).
- 5) Kawamura, S., Tada, M., and Narasaki, T. (1966-1967). Sugars of the cotyledon, hull, and hypocotyl of soybeans. *Journal of Japanese Society of Food and Nutrition (Eiyo To Shokuryo)*, **19**, 268-275 (川村信一郎，多田 稔，植崎丁市，大豆の種実，種皮，胚軸の糖類，栄養と食糧).
- 6) dos Santos, R., Vergauwen, R., Pacolet, P., Lescrinier, E., and Van den Ende, W. (2013). Manninotriose is a major carbohydrate in red deadnettle (*Lamium purpureum*, Lamiaceae). *Annals of Botany*, **111**, 385-393.
- 7) Nakahara, K. (1955). A brief note on the sugars of *Lycopus lucidus*. *The botanical magazine, Tokyo (Shokubutsugaku Zasshi)*, **68**, 81-85.
- 8) Kubo, M., Asano, T., Matsuda, H., Yutani, S., and Honda, S. (1996). Studies on *Rehmannia Radix*. III. The relation between changes of constituents and improvable effects on hemorheology with the processing of roots of *Rehmannia glutinosa*. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan (Yakugaku Zasshi)*, **116** (2), 158-168 (久保道徳，浅野年紀，松田秀秋，湯谷勝治，本田 進，地黄の研究 (第3報) 地黄の修治法の違いによる成分変化と血液レオロジー改善作用との関連性，薬学雑誌).
- 9) Rossi, M., Germondari, I., and Casini, P. (1984). Comparison of chickpea cultivars: Chemical composition, nutritional evaluation, and oligosaccharide content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **32**, 811-814.
- 10) Sosulski, F. W., Elkowicz, L., and Reichert, R. D. (1982). Oligosaccharides in eleven legumes and their air-classified protein and starch fractions. *Journal of Food Science*, **47**, 498-502.
- 11) Vidal-Valverde, C., Frias, J., and Valverde, S., Effect of processing on the soluble carbohydrate content of lentils. *Journal of Food Protection*, **55**, 301-304.
- 12) Yazawa, K. and Tamura, Z. (1982). Search for sugar sources for selective increase of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*, **1**, 39-44.
- 13) Wada, K., Mizutani, J., Suzuki, H., and Hayakawa, K. (1991). Effect of manninotriose on human fecal microflora. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science (Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi)*, **44**, 171-176 (和田光一，水谷 潤，鈴木宏美，早川邦彦，マニノトリオースのヒト腸内フローラに及ぼす影響，日本栄養・食糧学会誌).
- 14) Yonemoto, C., Kohda, Y., Uenakai, K., and Nakano, Y. (1995). Effect of vinegar made from soybean oligosaccharides on lipid metabolism in rat. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science (Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi)*, **48**, 441-449 (米本千春，香田祐美子，上中居和男，中野長久，大豆オリゴ糖を発酵原料とした食酢のラット脂質代謝に及ぼす影響，日本栄養・食糧学会誌).
- 15) Matsumoto, I. and Imai, S. (1990). Change of chemical composition of tempe during fermentation. *Journal of food science and technology (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi)*, **37**, 130-138 (松本伊左尾，今井誠一，テンペ発酵中の成分変化，日本食品工業学会誌).
- 16) 山内文男，大久保一良 (1992). シリーズ食品の科学. 大豆の科学，朝倉書店，東京.
- 17) ヨーグルトメーカープレミアム. おうちでできる発酵食品レシピブック，アイリスオーヤマ株式会社.
- 18) Yoshino, H. (1951). Studies on shoyu-manufacture by paper partition chromatography.: II. Sugars in shoyu (soy sauce). *Journal of the Brewing Society of Japan (Nippon Jozo Kyokaiishi)*, **46**, 98-105.
- 19) Takano, Y., Furihata, K., Okubo, A., and Toda, S. (1991). Identification and composition of low molecular weight

- carbonhydrates in commecial soybean oligosaccharide syrup. *Journal of Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi)*, **38**, 681–683 (高野 豊, 降旗一夫, 山崎素直, 大久保 明, 戸田昭三. 市販大豆オリゴ糖シロップ中の低分子量炭水化物の同定とその組成, 日本食品工業学会誌).
- 20) Kawamura, S. and Kuwahara, K. (1967). Effect on sugars of steaming the soybeans as the first process for preparing miso. *Journal of Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi)*, **12**, 535–538 (川村信一郎, 桑原健治. みそ製造の第 1 工程として大豆の蒸煮による糖類の変化, 日本食品工業学会誌).
- 21) Tanushi, S., Kasai, T., and Kawamura, S. (1972). Determination of oligosaccharides in some edible legume seeds. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Science (Eiyo To Shokuryo)*, **25**, 25–27 (田主澄三, 笠井 忠, 川村信一郎. 各種豆類の少糖類の含有量, 栄養と食糧).
- 22) 小林秀行 (2013). α -ガラクトシダーゼの構造と機能 I. 鯉淵学園教育研究報告, **29**, 3–12.

引用 URL

- i) <http://www.takanofoods.co.jp/fun/study/tsukuri.shtml#q3> (2017. 7. 4)

(平成 31 年 2 月 1 日受付, 令和元年 8 月 21 日受理)