味噌製造における大豆蒸煮液からの イソフラボン誘導体の回収

北田 善三*・溝渕 脩彦*・上田 保之*
山本 政利**・石川 雅章**・川西 祐成***

Recovery of Isoflavones from Soybean Cooking Drain of a Miso Factory

Yoshimi KITADA*, Munehiko MIZOBUCHI*, Yasuyuki UEDA*
Masatoshi YAMAMOTO**, Masaaki ISHIKAWA** and Sukenari KAWANISHI***

* Nara Prefectural Institute of Public Health: 57-6, Ohmori-cho, Nara, 630

** Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental
Science: 4-27-2, Kita-ando, Shizuoka, 420

*** Nara Prefectural Industrial Research Institute: 129-1,
Kashiwagi-cho, Nara, 630

A procedure to recover the isoflavones, such as daidzin, daidzein, genistin and genistein, from the cooking drain which was obtained in the manufacturing process of miso (fermented soy paste) from soybean, was investigated. The drain was treated with 5 kinds of adsorbent. As the result, the adsorbent of "Diaion HP-20" was most effective. After adjusting the drain to pH 4.0 with acetic acid, it was applied to HP-20 resin column chromatography. The applied resin was washed with water followed by 20% ethanol solution, and then was eluted with ethanol. By this method, the isoflavones in the 80% ethanol extract of defatted soybean flakes were purified. The isoflavones in the extract were adsorbed to the resin after diluting the concentration of ethanol to 20%, and then eluted with ethanol quantitatively.

(Received Jan. 11, 1986)

マメ科の植物には、多くのイソフラボン誘導体の含まれていることが知られており、しかもそれらのイソフラボン類はエストロゲン作用¹⁾、抗菌作用²⁾、酸化防止作用³⁾、鎮痙作用等の生理活性をもっていることが知られている。

現在、味噌製造時における大豆蒸煮液は、味噌の再仕込液や醤油製造に用いる酵母の培養液に、また特殊な例としてメタンガス発酵にも用いられており、さらに限外ろ過膜及び逆浸透膜を利用して蛋白質と糖を回収する方法も報告されている⁴⁾。しかし、上述した種々の生理活性をもったイソフラボン類を多量に含んでいると考えられる大豆蒸煮液から、これらイソフラボン類を簡便にか

つ効果的に回収する方法についてはまだ知られていない。

著者らは、先に葛根を原料とした葛澱粉の晒し液から、イソフラボン誘導体であるプエラリン、ダイズイン及びダイゼインを回収する方法について検討した。その結果、合成吸着樹脂であるダイヤイオン HP-20 を用いたカラムクロマトグラフ法により、3成分が定量的に回収されることを報告した⁵⁾。

今回、種々の合成吸着樹脂を用いて大豆蒸煮液からダイズイン、ダイゼインに加えて、ゲニステイン [5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one] 及びゲニスチン (genistein-7-D-glucoside) を効

* 奈良県衛生研究所 (〒 632 奈良市大森町 57-6)

** 静岡県衛生環境センター (〒 420 静岡市北安東 4-27-2)

*** 奈良県工業試験所 (〒 630 奈良市柏木町 129-1)

果的に回収する方法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

大豆蒸煮液: ミズホ(株)より入手した。

脱脂大豆: 市販品を用いた。

標準イソフラボン類: ダイズイン, ダイゼインは著者が葛根より単離同定したもの⁷⁾を用い, ゲニステインは市販脱脂大豆の80%エタノール溶液抽出物からシリカゲルカラム及び分取用の逆相分配高速液体クロマトグラフィーカラムを用いて単離, 同定⁸⁾したものを用い, ゲニステインはK&Kラボラトリーズ社より購入したものをを用いた。

樹脂: 多孔性スチレン-ジビニルベンゼン樹脂であるダイアイオン HP-20 (三菱化成工業(株)), アンバーライト XAD-2, XAD-4 (ローム・アンド・ハース社) 及びデュオライト S-861, S-862 (住友化学工業(株)) の5種類を用いた。

2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるイソフラボン類の定量

著者らの方法⁹⁾に従い, カラムにメルク社製 LiChrosord RP-8 (5 μ m, 4 mmid $\times$ 25 cm) を, 移動相に 0.05 M リン酸二水素-カリウム溶液 (pH 2.0) / アセトニトリル (85:15) を用い, 検出は電気化学検出器 (医理化学工業製 E-502 型) と紫外可視分光光度計 (島津製作所製 SPD-1 型) を併用して行った。

実験結果及び考察

1. 大豆蒸煮液中のイソフラボン類の定量

前処理はミリポア社製 Sep Pak C₁₈ カートリッジを用いた PETERSON らの方法⁹⁾に従った。すなわち, あらかじめメタノール 5 ml, 水 5 ml で洗浄したカートリッジに蒸煮液 1 ml を添加し, 水 2 ml 及び 20% メタノール溶液 2 ml で洗浄し, 80% メタノール溶液 2 ml でイソフラボン類を溶出した後, HPLC で定量した。同時にカートリッジの耐久性も調べた。その結果, 蒸煮液中のダイズイン, ゲニステイン, ダイゼイン及びゲニステインの濃度はそれぞれ 189.5, 186.0, 23.3 及び 7.4 ppm であり, また1個のカートリッジを繰り返し7回使用したが支障はみられなかった。なお, 7回使用した時の4成分の定量値の変動係数はそれぞれ 5.11, 4.26, 4.55 及び 4.19% であった。

Fig. 1 Adsorption rate of isoflavone derivatives to various resins

Resin: 1, Amberlite XAD-2; 2, Amberlite XAD-4; 3, Diaion HP-20; 4, Duolite S-861; 5, Duolite S-862

●—●; daidzin (D), ▲—▲; genistin (G), ○—○; daidzein (De), △—△; genistein (Ge)

2. 合成吸着樹脂によるイソフラボン類の回収

(1) 樹脂の検討 大豆蒸煮液 50 ml に, あらかじめメタノールに続いて水で洗浄した各樹脂 5 ml を加え, 時々攪拌しながら室温で2時間放置した時の溶液中のイソフラボン類の濃度を測定した。4成分の樹脂への吸着率の比較を Fig. 1 に示したが, いずれもダイアイオン HP-20 への吸着率をもっとも高く, 次のデュオライト S-861 であった。従って, 以降の実験にはダイアイオン HP-20 を用いることとした。なお, 樹脂量は前報⁹⁾の結果に従い溶液の1/10量とした。

(2) 吸着性に及ぼす大豆蒸煮液の pH 大豆蒸煮液の pH は 5.70 であり, それより塩基性側はアンモニアで, pH 4.0 は酢酸で, pH 2.0 はりん酸でそれぞれ調整し, (1)の方法に従って樹脂への4成分の吸着を求めた。結果を Fig. 2 に示したが, ダイズインとゲニステインは

Fig. 2 Relationship between adsorption rate to Diaion HP-20 resin and pH of soybean cooking drain

pH 4.0~8.0 で最高の吸着率を示し、2.0 及び 10.0 で低下した。一方、ダイゼインとゲニステインは 4.0 で最高を示し、それより塩基性側で徐々に低下し、特にゲニステインは 6.0 で急激に低下した。以上の結果から、樹脂に添加する大豆蒸煮液の pH を 4.0 に調整することとした。

(3) 溶出に及ぼすエタノール濃度の影響 樹脂からのイソフラボン類の溶出に、前報⁹⁾ではメタノールを用いたが、同時に検討したエタノール及びイソプロパノールとも溶出力にほとんど差がみられなかったところから、今回は溶出溶媒としてエタノールを用い以降の検討を行った。まず、4成分の溶出に及ぼすエタノール濃度の影響を調べた。ガラス製カラム (20 mm i.d. × 30 cm) に HP-20 を 20 ml 充てんし、酢酸で pH 4.0 に調整した大豆蒸煮液 200 ml を SV (空間速度) 2~3 で流し、樹脂の 2 倍量すなわち 40 ml の水で洗浄した後、同じく 2 倍量の 20, 30, 50 及び 70% エタノール溶液を、最後に 8 倍量の 99.5% エタノール (以後はエタノールと略す) を流し、各 20 ml ずつに分画して 4 成分の溶出状況を調べた。溶出パターンを Fig. 3 に示したが、ダイゼインがもっとも早く 30% エタノール溶液で、次いでゲニステインが 50% で、ダイゼインが 70% でそれぞれ溶出し始め、最後にゲニステインがエタノールで溶出した。4成分の分別溶出については、Fig. 3 から推測できるように 4成分が互いに重複して溶出したため困難で

Fig. 3 Elution curve of isoflavone derivatives from Diaion HP-20 resin by various concentration of ethanol solution

Fig. 4 Elution pattern of isoflavone derivatives from Diaion HP-20 resin

あった。

そこで、4成分を一度にエタノールで溶出することとし、各成分の溶出パターンと必要なエタノール量を検討した。pH 4.0 に調整した大豆蒸煮液 200 ml を、樹脂 20 ml を充てんしたガラスカラムに添加し、樹脂の 2 倍量の水及び 20% エタノール溶液で洗浄後、10 倍量のエタノールでイソフラボン類を溶出した。結果を Fig. 4 に示したが、本法で大豆蒸煮液より 4成分を効果的に回収するためには、樹脂の 6 倍量のエタノールが必要であることがわかり、次に規模を大きくして検討した。

3. 中規模実験による 4 成分の回収

300 ml の HP-20 を充てんしたガラスカラム (40 mm i.d. × 60 cm) に、酢酸で pH 4.0 に調整した大豆蒸煮液 3 l を添加し、SV 2~3 で流し、600 ml の水及び 20% エタノール溶液で洗浄した後、1.8 l のエタノールで 4 成分を溶出した。その結果、ダイゼイン、ゲニステイン、ダイゼイン及びゲニステインの回収率はそれぞれ 96.0, 95.6, 96.2 及び 84.7% であった。また、大豆蒸煮液 3 l 中の固形分 139.7 g の推移を調べた。その結果、Table 1 に示したように大豆蒸煮液中の固形分の 2.9%, すなわち 4.0 g にイソフラボン類が濃縮されたことになる。

4. 脱脂大豆抽出液中のイソフラボン類の精製

以上の方法を用い、脱脂大豆の 80% エタノール抽出

Table 1 The Amounts of solid in soybean cooking drain before and after Diaion HP-20 resin column chromatography

Cooking drain	Passing solution	Washing solution		Eluting solution	Remaining in column
		H ₂ O	20% EtOH		
139.7g	121.9g	8.6g	1.9g	4.0g	3.3g
	87.3%	6.2%	1.4%	2.9%	2.4%

Table 2 The effect of the concentration of ethanol on the adsorption rate of daidzin and genistin to the diaion HP-20 resin column

Conc. in passing soln.	Conc. of EtOH (%)			
	20	30	40	50
Daidzin	2.4	45.3	59.4	63.2
Genistin	2.3	5.0	39.0	58.4

液中のイソフラボン類の精製方法を検討した。脱脂大豆からのイソフラボン類の抽出はおおむね ELDRIDGE ら¹⁰⁾の方法に従った。すなわちコーヒーマルで粉碎した脱脂大豆 20 g に 80% エタノール溶液 500 ml を加えて 4 時間還流抽出し、冷後綿栓濾過を行った。イソフラボン類の精製方法の検討は、本濾液 50 ml にエタノール濃度が 20, 30, 40 及び 50% となるように水またはエタノールを加えて全量 200 ml とし、酢酸で pH 4.0 とした溶液を、樹脂 20 ml を充てんしたガラスカラムに添加した後、まずカラム通過液中の 4 成分を調べた。その結果、ダイゼイン及びゲニステインは樹脂への吸着力が強く、いずれのエタノール濃度においても吸着されたが、ダイゼイン、ゲニステインは Table 2 に示したように、エタノール濃度が 30% の時ダイゼインの 45.3% 及びゲニステインの 5.0% が樹脂に吸着されずに素通りした。従って、脱脂大豆の 80% エタノール抽出液中の 4 成分を樹脂に吸着させるためには、エタノール濃度を 20% まで希釈する必要があった。

次に、エタノール濃度を 20% まで希釈し、pH を 4.0 に調整した脱脂大豆抽出液をカラムに添加した後、エタノール 120 ml で溶出した時の 4 成分及び固形分の推移を調べた。その結果、脱脂大豆抽出液に含まれていたダイゼイン、ゲニステイン、ダイゼイン及びゲニステインの 102.6, 105.2, 98.5 及び 104.7% がそれぞれエタノール溶出液中に回収されていた。また、大豆抽出液中の固形分の推移を調べた結果、エタノール溶出液中には 24.8% が移行しており、そのうちの 2.6% がイソフラボン類であった。なお、カラム通過液には 64.5% の固形分が移行していた。

要 約

合成吸着樹脂を用いた大豆蒸煮液からのイソフラボン類の回収方法を検討した。

(1) 大豆蒸煮液にはダイゼイン、ゲニステイン、ダイゼイン及びゲニステインがそれぞれ 189.5, 186.0, 23.3 及

び 7.4 ppm 含まれていた。

(2) 5 種類の合成吸着樹脂を用い、イソフラボン類の吸着率を調べたところ、ダイアイオン HP-20 がもっとも良好であった。

(3) カラムに充てんした樹脂に、pH 4.0 に調整した大豆蒸煮液を樹脂の 10 倍量負荷し、水及び 20% エタノール溶液で洗浄後、エタノールで 4 成分を溶出させたところ、84% 以上の回収率が得られた。

(4) 本法による脱脂大豆 80% エタノール抽出液中のイソフラボン類の精製方法を検討したところ、抽出液のアルコール濃度を 20% まで希釈して樹脂に負荷した後、エタノールで 4 成分を溶出する方法により可能となった。

最後に、試料の提供をいただいたミヅホ(株)及びデュオライト樹脂の提供をいただいた住友化学工業(株)中村氏にそれぞれ深謝いたします。

文 献

- 1) CHENG, E. W. K., YODER, L., STORG, C. D. and BURROUGHS, W.: *Science*, **120**, 575 (1954).
- 2) NAIM, M., GESTETNER, B., BONDI, A. and BIRK, Y.: *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1174 (1976).
- 3) PRATT, D. E. and BIRAC, P. M.: *J. Food Sci.*, **44**, 1720 (1979).
- 4) 柴田承二・原田正敏・村上孝夫: 菓誌, **79**, 863 (1959).
- 5) NAKAO, S., YUMOTO, S., WATANABE, A. and KIMURA, S.: *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi*, **30**, 442 (1983).
- 6) 小菅卓夫・石田均司・北田善三・上田保之: 日食工誌, **33**, 492 (1986).
- 7) KITADA, Y., MIZOBUCHI, M., UEDA, Y. and NAKAZAWA, H.: *J. Chromatogr.*, **347**, 438 (1985).
- 8) KITADA, Y., UEDA, Y., YAMAMOTO, M., ISHIKAWA, M., NAKAZAWA, H., FUJITA, M.: *J. Chromatogr.*, **366**, 403 (1986).

-
- 9) PETTERSON, H. and KIESSLING, K. H. : *J. Food Chem.*, **31**, 394 (1983).
Assoc. Off. Anal. Chem., **67**, 503 (1984). (昭和 61 年 1 月 11 日受理)
- 10) ELDRIDGE, A. and KWOLEK, W. F. : *J. Agric.*
-