イソフラボンアグリコン含有量の高い納豆の製造

伊部さちえ*・熊田 薫**・吉羽美穂子*・恩賀 勉*

Production of Natto Which Contains a High Level of Isoflavone Aglycons

Sachie IBE*, Kaoru KUMADA**, Mineko YOSHIBA* and Tsutomu ONGA*

*Ohyamatofu Co., Ltd., 575, Shirone, Isehara-shi, Kanagawa-ken 259-1147

**Department of Living Sciences, Tsukuba International Junior College, 6-7-10 manabe, Tsuchiura-shi, Ibaragi-ken 300-0051

Isoflavone glycoside hydrolysing activity of *Bacillus subtilis* (natto) strains, which contain 2 commercial strains (Takahashi and Naruse strain) and 50 isolates isolated from dry rice plants collected in several areas in Japan, were determined. Isoflavone aglycons were liberated little from isoflavone glycosides present in soybeans by commercial strains and most of the isolates during fermentation. But the levels of isoflavone aglycons in fermented soybeans with IF9916 isolated from dry rice plants in Iwate remarkably increased during fermentation. Changes of isoflavone content and β -glucosidase activity were determined in soybeans and soybean extract fermented with IF9916 and the commercial strains chronologically. We found that IF9916 had high level of β -glucosidase activity, showed significant hydrolyzing activity against the isoflavone glycosides in both soybeans and soybean extract. In contrast to IF9916, the commercial strains had only low levels of β -glucosidase activity in both soybeans and soybean extract. The enzymatic activity of both IF9916 and the commercial strains was cell-associated and no activity was detected in the cell-free extract. In soybeans and soybean extract fermented with the commercial strains isoflavone glycosides rapidly decreased followed by cell growing, and it seemed that isoflavone glycosides changed to succinylated isoflavone glycosides rather than releasing isoflavone aglycons. But in soybeans and soybean extract fermented with IF9916 isoflavone aglycons were gradually accumulated during fermentation. To our knowledge, this is the first report to indicate that *B. subtilis* (natto) possesses β -glucosidase with the ability to hydrolyze isoflavone glycoside. (Received Jul. 13, 2000 ; Accepted Oct. 23, 2000)

大豆イソフラボンは、抗癌作用¹⁾、弱いエストロゲン様作用²⁾、抗酸化作用³⁾あるいは抗微生物作用⁴⁾など、様々な生理機能が注目されている。

大豆イソフラボンは大豆中では多くが配糖体の形で存在しているが、味噌、醤油あるいはテンペなどの大豆発酵食品においては、その発酵微生物の β -グルコシダーゼによりイソフラボン配糖体が加水分解され、アグリコンの含有量が高くなっている⁵⁾⁶⁾。しかし、納豆は大豆発酵食品でありながらイソフラボンアグリコンの含有量は発

酵前後でほとんど変わらない⁷⁾、あるいは発酵により減少する⁸⁾、と報告されている。

われわれは数年前から全国各地の稲ワラを採集し、それら稲ワラから納豆菌を分離してきた。その目的は官能のおよび機能的に優れた性質をもつ納豆を生産できる納豆菌を得ることであった。実際そのような菌株を自然界から複数株入手することができ⁹⁾、それら菌株を納豆製造の現場で使用している。また、自然界より納豆菌を分離・選別する過程で自然界の納豆菌は多様な特性を持つ

* 大豆豆腐株式会社 (〒259-1147 神奈川県伊勢原市白根 575)

** つくば国際短期大学 (〒300-0051 茨城県土浦市真鍋 6-7-10)

ことを確認してきた¹⁰⁾。そこで、自然界の多様な納豆菌株の中には高い β -グルコシダーゼ活性をもち大豆中のイソフラボン配糖体をアグリコンに分解できるものが存在するのではないかと考え、これまでに全国各地で分離選別してきた納豆菌株の β -グルコシダーゼ活性を測定した。その結果、ほとんどの納豆菌はごく弱い β -グルコシダーゼ活性しかもたないこと、弱いながらも菌株間で活性に差が見られることを確認した(未発表データ)。しかし 1999 年に岩手県藤沢町の稲ワラより分離した納豆菌株 IF9916 は非常に高い β -グルコシダーゼ活性を示し、これを用いて製造した納豆においては、イソフラボンアグリコン含有量が通常の納豆と比較して顕著に高いことがわかった¹¹⁾。そこで大豆および大豆抽出液において IF9916 の発酵過程における β -グルコシダーゼ活性およびイソフラボンアグリコンの変化について経時的に調べるとともに市販納豆菌と比較した。

大豆中のイソフラボン配糖体にはダイジン、ゲニスチンおよびグリシチンが存在するが、今回は含有量の多いダイジンおよびゲニスチン、およびそ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変化を調べた(Fig. 1)。また、戸田らにより報告された納豆特有のイソフラボン⁹⁾であるサキシニルイソフラボンがイソフラボン配糖体の経時変化において非常に重要な要素であることがわかったので、サキシニルダイジンおよびサキシニルゲニスチン(Fig. 1)の含有量の変化も追跡した。

本報告はわれわれが知る限り、納豆菌の β -グルコシダーゼ活性とイソフラボンアグリコン生成の関連についての初めての報告である。

実 験 方 法

1. 使用菌株

市販納豆菌として Naruse 株および Takahashi 株を使用した。自然界からの納豆菌として、岩手県、茨城県、栃木県および沖縄県の稲ワラから分離・選別したもの 50 株について調査した。これら納豆菌株はすべてアビ 50CH (bioMerieux) により *Bacillus subtilis* と同定され、さらに官能的に食用となる納豆を作るものである。また、枯草菌 *Bacillus subtilis* ATCC6051 で大豆を発酵させたものについてもイソフラボン含有量を調査した。

2. 納豆の製造および大豆抽出液による納豆菌の培養

大豆は北米産小粒大豆でイソフラボン含有量が比較的高い銘柄を使用し、室温で一晩浸漬後オートクレーブにて 126°C 16 分蒸煮した。納豆菌芽胞は蒸煮大豆 1 g あたり約 1.0×10^4 個接種し、納豆用の発泡スチロール容器に

Fig. 1 Structure of isoflavones

40 g ずつ充填し、39°C のインキュベータ中で発酵させた。

大豆抽出液の調製は ESAKI¹²⁾ らの方法に従った。すなわち、大豆に 4 倍量の水を加えて室温で約 18 時間浸漬し、浸漬水と共に 105°C 60 分オートクレーブ処理後、大豆を除去し遠心分離 (2 300 × g 10 分) にかけて上清を 200 ml バッフル付きフラスコに 50 ml ずつ分注し、それを 121°C 15 分滅菌して培地とした。培養は、ロータリーシェーカーにて 37°C、110 rpm/分で行った。

納豆および大豆抽出液培養液は、経時的にサンプリングを行い生菌数、pH、芽胞形成、イソフラボン含有量および β -グルコシダーゼ活性を測定した。

3. β -グルコシダーゼ活性の測定

われわれは菌体外に分泌される β -グルコシダーゼを確認していないので¹¹⁾、菌体に存在する β -グルコシダーゼ活性のみを測定した。納豆の場合は納豆 10 g に 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 50 ml を加え、4°C で 1.5 時間抽出した。その抽出液を遠心分離 (2 300 × g 15 分)、菌体を含む沈殿物を 50 mM リン酸緩衝液で 2 回洗浄し、最後に 50 mM リン酸緩衝液に浮遊させたものを酵素測定用試料液とした。大豆抽出液の場合は、遠心分離により菌体を集め、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄したものを 50 mM リン酸緩衝液に浮遊させ酵素測定に用いた。酵素活性の測定は合成基質 *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (*p*NPG) を用いて酵素反応

により遊離した

-トロフェニルの量を測定する MATSUURA らの方法¹³⁾の一部を変えて行った。すなわち 1 mM pNPG/50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2.0 ml を 37°C 5 分加熱しておき、0.5 ml の試料液を加え、攪拌し、37°C で正確に 60 分間反応させた。2.5 ml の 0.5 M 炭酸カルシウムを加えて反応を停止させ、2300×g 10 分間遠心分離し、上清の

-トロフェニル含有量を吸光度 420 nm で測定した。あらかじめ 1~50 μmol の

-トロフェニルを用いて 420 nm の吸光度の標準曲線を作っておき、これから上清中の

-トロフェニル濃度を計算した。1 分間に 1 μmol の

-トロフェニルを遊離する酵素力を 1 U とした。

4. イソフラボンの定量

試料 5 g にメタノールを 25 ml 加えてホモゲナイザー (日本精機 model AM-6) で 15000 rpm 4 分処理し、これを 25°C で 16 時間抽出し、濾過したものを HPLC 用サンプルとした。HPLC 分析は島津(株)LC-10A を用い、カラムは LUNA C18 (2) 250×4.60 mm (phenomenex) を使用した。操作条件は、試料導入力 10 μl、流速 1 ml/分、カラム温度 40°C、検出 260 nm、15~40% アセトリトリル/0.1% トリフルオロ酢酸グラジェント溶出とした。イソフラボン標準品として、フジッコ(株)製ダイジン、ゲニスチン、マロニルダイジン、マロニルゲニスチン、ダイゼインおよびゲニステインを用いた。サクシニルダイジンおよびサクシニルゲニスチンの定量は、マロニルダイジンおよびマロニルゲニスチン標準品に対するピーク面積値の比率を求め、分子量比で補正した。

実験結果および考察

1. 自然界からの分離株、市販納豆菌および枯草菌のイソフラボン配糖体加水分解活性

自然界からの分離株 50 種類および市販納豆菌を用いて発酵させた納豆あるいは枯草菌による大豆発酵物において、発酵により大豆中のイソフラボンアグリコンの含有量が増えるかどうかを調べた。32 時間発酵させた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とそ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含有量を蒸煮大豆を対照として比較した。その代表的なものを Fig. 2 に isolate 1~11 として示した (n=3)。残りの 39 株はこれらのいずれかの菌株とほとんど変わらなかった。

イソフラボン配糖体の分解物アグリコンが顕著に増えているのは枯草菌 *Bacillus subtilis* ATCC6051 および IF9916 株だけであった。枯草菌においては、対照と比較

Fig. 2 Comparison of isoflavone-hydrolyzing activities of *Bacillus subtilis* strains in soybeans incubated at 39°C for 32 h

The control is steamed soybeans.

してダイゼインが約 4 倍に、ゲニステインが約 2.5 倍に増加した。IF9916 株においては、同様にダイゼインが約 15 倍、ゲニステインが約 10 倍に増加した。

他の菌株では、発酵前後でアグリコン含量にほとんど差がないもの (isolate 6, 9 および 10)、ゲニステインのみがわずかに (<3 倍) 増加しているもの (isolate 2, 3, 5, Naruse および Takahashi)、およびダイゼインおよびゲニステインともにわずかに増加 (<3 倍) しているもの (isolate 4, 7, 8 および 11) があつた。

ESAKI ら⁷⁾は市販納豆菌である Miyagino 株を用いて納豆を製造し、発酵前後でイソフラボンアグリコンの量は変わらなかったとしている。また、TODA ら⁸⁾は同じ Miyagino 株を用いた発酵によりアグリコン含有量は減少したと報告している。われわれは市販納豆菌として Takahashi 株および Naruse 株を用いたが、両菌株ともゲニステインはわずかではあるが増加していた。

2. β-グルコシダーゼ活性

市販納豆菌および IF9916 株のβ-グルコシダーゼ活性を経時的に調べた結果を Fig. 3 に示す。

Fig. 3 Changes of β -glucosidase activity and cell number of commercial strains and IF9916 in fermented soybeans and soybean extract

Each value is the mean of three independent experiments.

市販納豆菌の β -グルコシダーゼ活性は非常に弱いものであったが、まったく存在しないわけではなかった。納豆および大豆抽出液においてその活性は、培養約 20 時間で最大に達した。IF9916 の β -グルコシダーゼ活性は細胞数の増加に伴い上昇し、増殖期が終わり定常期に入る頃にピークに達した。その後は徐々に活性が低下するが、これは芽胞形成が進むためと考えられた。

納豆においてピーク時の酵素活性は、Naruse 株の 267 mU、Takahashi 株の 180 mU に比較し、IF9916 株は 4990 mU と非常に高い活性を示した。この高い酵素活性によりイソフラボン配糖体は加水分解を受けアグリコンが生成されたと考えられた。

3. IF9916 株および市販納豆菌による納豆および大豆抽出液中のイソフラボンの経時変化

Fig. 4 は Takahashi 株および Naruse 株による納豆および大豆抽出液の 0 時間から 40 時間までのイソフラボン、生菌数および pH の変化を示したものである。

Naruse 株 (Fig. 4 A) では、納豆において対数増殖期にイソフラボン配糖体は急激に減少し、発酵 20 時間目付近ではダイジンは発酵前の約 64%、ゲニステインは同じく 59% となり、その後は増加に転じた。サクシニル配糖

体の含有量の変化はダイジンおよびゲニステインとはまったく逆で、対数増殖期に急激に増加し、発酵 20 時間目付近でピークに達し、その後は減少に転じた。イソフラボンアグリコンであるゲニステインは発酵 24 時間目以降に徐々に増加し、40 時間で発酵前の約 2.8 倍となったが、ダイゼインの量はほとんど変化がなかった。

大豆抽出液の場合も同様、対数増殖期にイソフラボン配糖体は急激に減少し、定常期に入る 16 時間目付近で、ダイジンは発酵前の約 50% に、ゲニステインは約 24% に減少した。定常期に入ってから徐々に減少を続け、約 28 時間でダイジンは発酵前の約 16% に、ゲニステインは同じく約 13% と最低の値になり、その後は増加に転じた。サクシニル配糖体は納豆の場合と同様、ダイジンおよびゲニステインとは逆に対数増殖期に急激に増加し、24 時間目付近で最大値に達し、その後は減少した。

Takahashi 株 (Fig. 4 B) も Naruse 株とほぼ同様のパターンを示した。納豆の場合、発酵 20 時間目でダイジンは発酵前の 58%、ゲニステインは 50% にまで減少した。大豆抽出液の場合には、発酵 16 時間目でダイジンは発酵前の 7% に、ゲニステインは 6% に減少した。

このように Naruse 株および Takahashi 株では、あ

Fig. 4 Changes of isoflavone content, cell number and pH in soybeans and soybean extract during fermentation with *Bacillus subtilis* (natto) (Naruse) (A) and *Bacillus subtilis* (natto) (Takahashi) (B)

Each value is the mean of three independent experiments.

Symbols : ■ daidzin, □ genistin, ▲ succinyldaidzin, △ succinylgenistin, ● Daidzein, ○ genistein.

る時間まではイソフラボン配糖体は発酵時間とともに減少するがその後再び増加する。サクシニル配糖体はまったく逆で、イソフラボン配糖体が減少するとともに増加し、イソフラボン配糖体が増加に転じると減少に転じる。このような変化のパターンはTODA ら⁸⁾のMiyagino 株での結果と一致している。

IF9916 株では (Fig. 5), 納豆の場合、対数増殖期にダイジンおよびゲニスチンが減少しサクシニル配糖体が増加するという Naruse 株および Takahashi 株と同様のパターンを示したが、定常期においてもダイジンおよびゲニスチンは減少を続け、発酵 40 時間でダイジンは発酵前の約 20% に、ゲニスチンは約 38% になった。サクシニルダイジンおよびサクシニルゲニスチンは共に、発酵 8 時間目から検出され市販株と同様のレベルまで増加した。イソフラボンアグリコンの変化は Naruse 株および Takahashi 株とは大きく異なり、対数増殖期が終わる 16 時間目付近から増加を続け 40 時間目には、ダイゼインは発酵前の約 20 倍、ゲニステインは約 11 倍となった。大豆抽出液においては、対数増殖期に Naruse 株お

よび Takahashi 株のような劇的な変化は見られず、配糖体は徐々に減少を続け、ダイジンは発酵 40 時間目において発酵前の約 63%、ゲニスチンは発酵 28 時間目において約 62% で最低値を示した。ダイゼインおよびゲニステインは発酵 16 時間目まではほとんど変化がなく、20 時間目付近から増加した。ダイゼインは発酵 40 時間目で発酵前の約 8 倍に、ゲニステインは約 2.7 倍になった。サクシニル配糖体は発酵 8 時間目から検出され、徐々に増加し、32 時間目でピークを迎え、その後減少に転じた。

Table 1 は、市販納豆菌株で 40 時間発酵させた納豆におけるイソフラボン配糖体とサクシニル配糖体の相関係数、および IF9916 株で発酵させた納豆中のイソフラボン配糖体とサクシニル配糖体、およびイソフラボン配糖体とイソフラボンアグリコンの相関係数を示した。

Naruse 株および Takahashi 株で発酵させた納豆においてはイソフラボン配糖体とサクシニル配糖体間には明らかに負の相関があった。IF9916 においてはダイジンとサクシニルダイジンの相関係数は 5% 水準で有意で

Fig. 5 Changes of isoflavone content, cell number and pH in soybeans and soybean extract during fermentation with *Bacillus subtilis* (natto) IF9916

Each value is the mean of three independent experiments.

Symbols: ■ daidzin, □ genistin, ▲ succinyldaidzin, △ succinylgenistin, ● Daidzein, ○ genistein.

Table 1 Correlation coefficients between the isoflavone glycosides and the corresponding succinylated isoflavone glycosides (strain Naruse, Takahashi and IF9916) and between the isoflavone glycosides and the corresponding free isoflavones (IF9916) in soybeans fermented for 40 h

Strain	Daidzin -succinyldaidzin	Genistin -succinylgenistin	Daidzin -daidzein	Genistin -genistein
Naruse	-0.86*	-0.91**		
Takahashi	-0.77*	-0.92**		
IF9916	-0.48	-0.76*	-0.97**	-0.91**
	(0~20 h: -0.90*)	(0~20 h: -0.97**)	(20~40 h: -0.99**)	(20~40 h: -0.97**)

Figures in parentheses mean correlation coefficients during the first 20 h or the latter 20 h.

*Significant at the 5% level.

**Significant at the 1% level.

はなかったが、発酵過程の前半 20 時間におけるその相関係数は -0.90 であり 5% 水準で有意であった。ゲニスチンとサクシニルゲニスチンとの関係も同様であり、発酵 20 時間までの相関係数は全発酵過程におけるよりも高かった。これとは逆にイソフラボン配糖体とアグリコン間の相関係数は、発酵過程の後半 20 時間においてさらに高くなった。

IF9916 株は高い β -グルコシダーゼ活性を持ち、イソフラボン配糖体を分解してアグリコンを生成するが、納豆においては市販納豆菌と同レベルのサクシニル配糖体も生成する。サクシニル配糖体は発酵の初期 (8 時間~16 時間) に急激に増加しているが、アグリコンは発酵 16 時間目以降に生成されている (Fig. 5)。このことから発酵初期においては、 β -グルコシダーゼの作用を受ける前にイソフラボン配糖体からサクシニル配糖体を形成する力 (酵素) の影響を受け、16 時間目以降は β -グルコシダーゼの影響を強く受けてアグリコンを遊離すると考えられた。Table 1 に示した発酵過程の前半と後半の相関係数の相違はこれを裏付けるものである。Naruse 株および Takahashi 株においても、わずかではあるがアグリコンを遊離するのは発酵 20 時間目以降であり、これら菌株においてもこのような酵素の影響の時間的な差が推察された。

配糖体の形でヒトの体内に取り入れられたイソフラボンは腸内細菌の β -グルコシダーゼにより加水分解され、最終的にはアグリコンに変えられて腸管より吸収されると考えられている。納豆製品中にアグリコン含量が高ければ個人差の大きい腸内菌叢にたよらずイソフラボンの吸収性が高いと考えられる。したがって IF9916 株は“イソフラボンの吸収性の良い納豆”製造への応用が考えられる。

要 約

自然界より分離した納豆菌株、市販納豆菌株および枯草菌 *Bacillus subtilis* ATCC6051 株を用いて発酵させた大豆中のイソフラボン配糖体およびそのアグリコン含有量を調べた。岩手県の稲ワラより分離した IF9916 株および枯草菌 *Bacillus subtilis* ATCC6051 株を除いて、納豆菌による発酵後のイソフラボンアグリコンの増加はわずかなものであったが、菌株により若干の相違が見られた。

大豆および大豆抽出液において IF9916 株および市販納豆菌の β -グルコシダーゼ活性およびイソフラボン含有量の変化について経時的に調べた。IF9916 株は強い β -グルコシダーゼ活性を持っていたが、市販納豆菌の β -グルコシダーゼ活性は非常に弱いものであった。

市販納豆菌で発酵させた大豆および大豆抽出液においては、納豆菌の対数増殖期にイソフラボン配糖体の著しい減少が見られたが、アグリコンに分解されたのではなく、サクシニルイソフラボンに変わるためであった。納豆においては減少したイソフラボン配糖体は再び増加し、それとは逆にサクシニル配糖体は減少した。

IF9916 株で発酵させた納豆において、発酵の初期にイソフラボン配糖体の減少に伴ない市販納豆菌と同レベルのサクシニル配糖体が生成されたが、発酵 20 時間目からはイソフラボンアグリコンの急激な増加が認められた。培養 40 時間でダイゼインは発酵前の 20 倍に、ゲニステインは約 11 倍に増加した。

文 献

- 1) PETERSON, G. and BARNET, S. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 661 (1991).
- 2) KITTS, D.D., KRISHNAMURTI, C.R. and KITTS, W.D. : *J. Anim. Sci.* **60**, 531 (1980).
- 3) PRATT, D.E. and BIRAC, P.M. : *J. Food Sci.*, **44**, 1720 (1979).
- 4) NAIM, M., GESTETNER, B., ZILKAH, S., BIRK, Y. and BONDE, A. : *J. Agric. Food Chem.* **22**, 806 (1974).
- 5) 戸田登志也・奥平武則・家森幸男 : 食品と開発, **31**, 44 (1996).
- 6) 池田稜子・太田直一・渡辺忠雄 : 食科工, **42**, 322 (1995).
- 7) ESAKI, H., NOHARA, Y., ONOZAKI, H. and OSAWA, T. : *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 474 (1990).
- 8) TODA, T., UESUGI, T., HIRAI, K., NUKAYA, H., TSUJI, K. and ISHIDA, H. : *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1193 (1999).
- 9) 熊田 薫・恩賀 勉・星野尋志・友寄るみ子・小池和子 : 医学と生物学, **128**, 111 (1994).
- 10) 熊田 薫・恩賀 勉・星野尋志・友寄るみ子・小池和子 : 医学と生物学, **126**, 299 (1993).
- 11) 伊部さちえ・吉羽美穂子・恩賀 勉・熊田 薫 : 日本食品科学工学会第 47 回大会講演要旨集, p. 52, 東京 (2000).
- 12) ESAKI, H., WATANABE, R., ONOZAKI, H., KAWAKISHI, S. and OSAWA, T. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 851 (1999).
- 13) MATSUURA, M., SASAKI, J. and MURAO, S. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1623 (1995).

(平成 12 年 7 月 13 日受付, 平成 12 年 10 月 23 日受理)