

大豆胚軸の微生物変換による抗酸化性イソフラボン生産の研究

三村精男*・矢崎伸一

山梨大学工学部

Microbial Transformation of Soybean Germ Components to Antioxidative Isoflavonoids

Akio MIMURA and Shinichi YAZAKI

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Yamanashi University, Kofu 400-8511

ABSTRACT

Soybean is rich in isoflavonoid glycosides such as daidzin and genistin, especially in the part of germ. During the fermentation by microorganisms to produce traditional fermented foods such as miso (soybean paste), soy sauce, natto and tempeh, these isoflavonoid glycosides can be hydrolyzed to aglycon isoflavonoids, and further transformed to biologically active compounds. *Aspergillus niger* IFO 4414 was cultivated in the medium composed of soybean germ extract rich in isoflavonoid glycosides, and it was observed that antioxidative activity, superoxide dismutase (SOD) like activity and anti-tumor promoting activity were increased remarkably during the fermentation. In the previous paper, we reported that one of the transformed products from daidzin was 4', 7, 8-trihydroxyisoflavone (8-hydroxydaidzein) with potent antioxidative and anti-UVB activities. From the chromatographic experiments, it was considered that in the fermented broth there have been produced some other transformed isoflavonoids. These observations indicate the possibility of production of the isoflavonoids with potent antioxidative, SOD like and anti-tumor promoting activities. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 46-51, 1998.

Key words : soybean isoflavonoid, microbial transformation, antioxidant, SOD like activity, anti-tumor promoter

近年、成人病やがんなどは“生活習慣病”として注目されている。これは若年者から高齢者まで食生活を中心とした長期間の生活習慣から発生すると考えられ、種々な予防法が提案されている。こうした生活習慣病は、現代生活がもたらした一種のストレスの総和の結

果と考えると、その対策が具体的に考えられる。

自然と共に生きていくという東洋思想がもたらした、多くの伝統的な植物由来の食品は、生活習慣病の抑制の観点から見ると、興味あるものが多くある。こうした伝統的な食品の中から、大豆を原料とした醗酵食品に注目して本研究を企画した。

大豆を原料とする醗酵食品の健全性は、原料成分が

*〒 400-8511 山梨県甲府市武田 4 -3-11

醗酵によって変換生成する種々な化合物の生理活性によるものである。なかでも、味噌、醤油、テンペ、納豆等の大豆醗酵食品のもつ抗酸化活性は、原料大豆よりも著しく強いことが知られている。即ち、大豆の醗酵によって生成する脂質、ペプチド、メラノイジン、サポニン、イソフラボン等、種々な化合物に強い抗酸化活性が見られている¹⁻⁴⁾。一般に、食品に含まれる抗酸化性物質は、食品成分の酸化を抑制しその品質を維持しているが、一方これらの抗酸化性物質を食品として摂取したときには、生体に抗酸化活性に由来する生理作用をもたらす、それが、食品の健全性につながっていることが考えられる。

大豆イソフラボン化合物が醗酵微生物によって変換されて生成する物質には、大豆イソフラボンよりも強い抗酸化活性をもったものとして、テンペ中に4', 6, 7-トリハイドロキシイソフラボン等が見いだされている⁵⁻⁷⁾。一方我々は、黄粉を黒麹菌 (*Aspergillus niger*) によって醗酵させるとき、強い紫外線障害抑制活性 (抗酸化活性) をもつ物質として、4', 7, 8-トリハイドロキシイソフラボン (8-ハイドロキシダイゼイン) を見いだした⁸⁾。この化合物は大豆中の配糖体ダイジンが加水分解されたアグリコンのダイゼインになり、さらに酸化されて生成したものである (Fig. 1)。しかし、味噌、醤油、納豆等の醗酵食品に含まれているか否かは未検討である。一方、この研究の過程で、4', 7, 8-トリハイドロキシイソフラボンの他にも、種々な代謝変換物質に抗酸化活性があることが観察された。

そこで、本研究では、まず、イソフラボン化合物が豊富に含まれている大豆胚軸を原料として、*Aspergillus niger* による大豆成分の醗酵変換を行ない、大豆イソフラボン化合物から生成する抗酸化活性、SOD 様活性、抗発がんプロモーター活性をもった物質を見だし、マウスなどの動物実験が可能な量のこれらの物質の効率的な生産方法を確立することを最終目的とした。

方 法

供試材料

微生物は *Aspergillus niger* IFO4414 を使用した。大豆胚軸は不二製油(株)の生胚軸で、イソフラボンを1.0% (ダイジン 85%, ゲニスチン 15%, アグリコン微量) を含むものを使用した。大豆胚軸からのイソフラボンの抽出は以下の方法で行った。1 kg の大豆胚軸を6.5 L のメタノールで抽出し、脱水、減圧濃縮して黄色の胚軸エキス80 mLを得た。この胚軸エキスの80

℃、24 時間乾燥後の乾物濃度は0.73 mg/mLであった。

微生物醗酵

Czapek-dox 培地のスラントに生育させた *Aspergillus niger* IFO4414 の孢子懸濁液を、大豆胚軸 Sabroud 培地 (グルコース40 g, ポリペプトン10 g, 胚軸エキス1.2 ~ 12 g, 蒸留水1 L, pH 6.0) に接種し、30℃、120 rpm の条件で振とう培養した。培養終了の培養液に2倍量のアセトンを添加して抽出した後、抽出液を減圧濃縮して分析用サンプルとした。

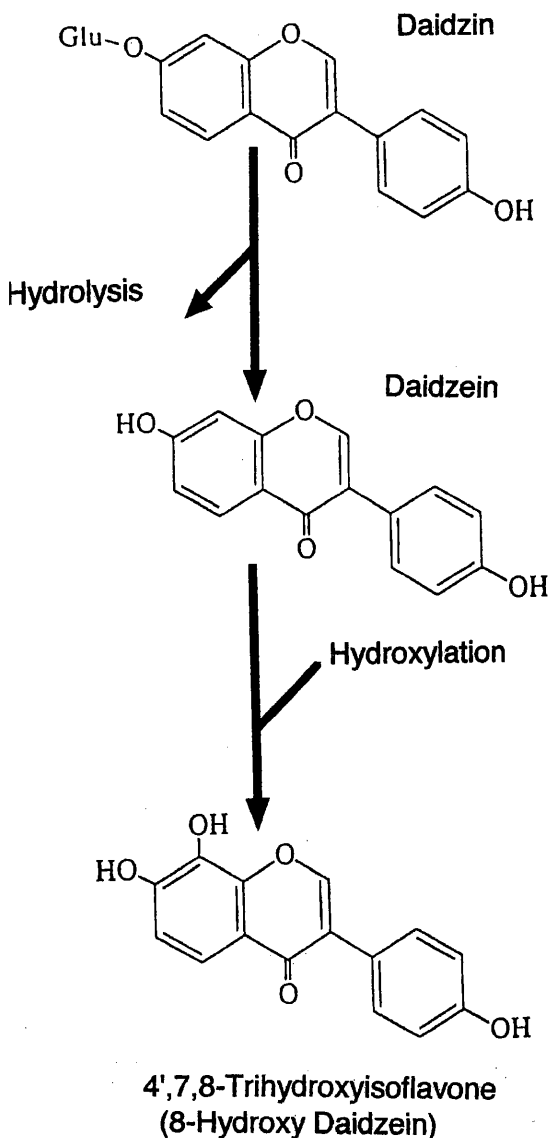


Fig. 1. Proposed pathway of isoflavone transformation by *Aspergillus niger* IFO 4414 from daidzin to 4', 7, 8-trihydroxyisoflavone (8-hydroxydaidzein).

活性酸素消去活性の測定

抗酸化活性の測定はリノール酸のアスコルビン酸/鉄系による過酸化反応の抑制を測定するロダン鉄法で行った。また、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 様活性の測定は、キサンチン/キサンチンオキシダーゼ系によってスーパーオキシドアニオンラジカルを生成させ、この反応系に組み込んだニトロブルーテトラゾリウムの還元によって生成する青紫色のホルマゼンを測定する NBT 還元法⁹⁾で行った。

抗発がんプロモーター活性の測定¹⁰⁾

白血病細胞 (Raji) に組み込まれたエプステイン・バー・ウイルス (EBV) 初期抗原のホルボールエステル (TPA) による発現誘導をサンプル中の化合物が抑制をする度合いを観察する EBV 法によって測定した。

抗酸化物質の単離精製

シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール溶出)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって行った。

結 果

胚軸エキスの醗酵変換

大豆胚軸 Sabroud 培地に *Aspergillus niger* IFO 4414 を接種して 2～10 日間培養変換した結果、TLC、HPLC 分析によって胚軸エキスのダイジン、ゲニスチンから加水分解したそれぞれのアグリコン以外にも、変換物質と考えられる複数の物質が認められた。

Fig. 2 に醗酵時間の経過による生成物の抗酸化活性の変化を示した。未醗酵の大豆胚軸に比較して、醗酵変換したものでは、抗酸化活性が著しく上昇している。また、Fig. 3 に示したように、SOD 様活性も醗酵時間と共に上昇した。これらの結果は大豆胚軸中のイソフラボン等から微生物変換によって、活性酸素消去活性をもった物質が蓄積していることを示している。先の我々の研究で、黄粉培地の醗酵で見いだした 4', 7, 8-トリハイドロキシイソフラボンも含まれていると考えられるが、この化合物以外にも活性酸素消去活性をもった物質が生成しているものと考えている。

そこで、これらの醗酵変換物質を単離精製し、その化学的性質と生理活性の関係を明らかにすることが重要であるので、次に大量培養を行った。

胚軸エキスの大量醗酵とクロマトグラフィー

300 mL 三角フラスコ (70 mL 培地) による最適培養条件を検討して、6.0 g/L 胚軸エキス Sabroud 培地を用い、30℃、8 日間培養によって得た 3,360 mL の培養

液 (胚軸エキス 20 g) から 480 mL (乾燥物 67.2 g) の醗酵変換液を取得した。得られた醗酵変換液の一部 100 mL (乾燥物 14 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけて、クロロホルム/メタノール系溶媒で溶出して分画した。そのマスバランスを Fig. 4 に示した。

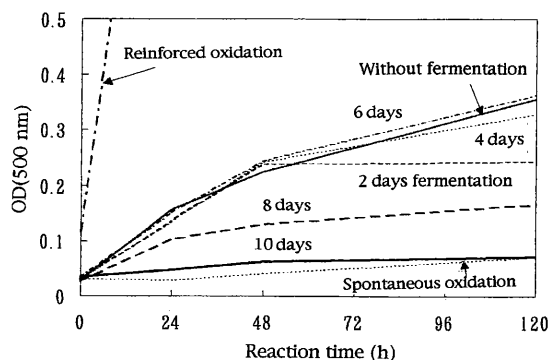


Fig. 2. Production of antioxidative compounds from soybean germ extract during cultivation of *Aspergillus niger* IFO 4414. Reinforced oxidation of linoleic acid was conducted with ascorbic acid. Optical density at 500 nm shows the oxidation level of linoleic acid.

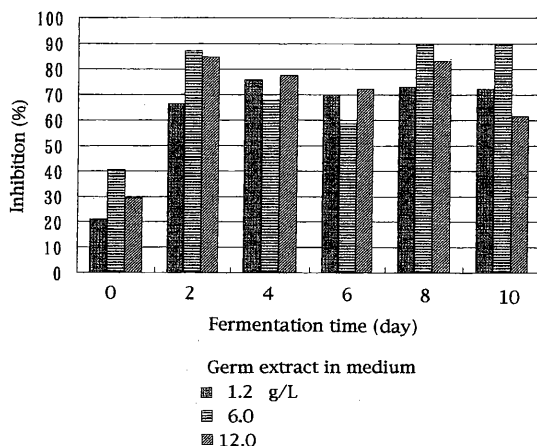


Fig. 3. Production of superoxide dismutase (SOD) like activity from soybean extract during fermentation of *Aspergillus niger* IFO 4414. Inhibition(%) shows the intensity of superoxide dismutase like activity analyzed by *in vitro* assay system.

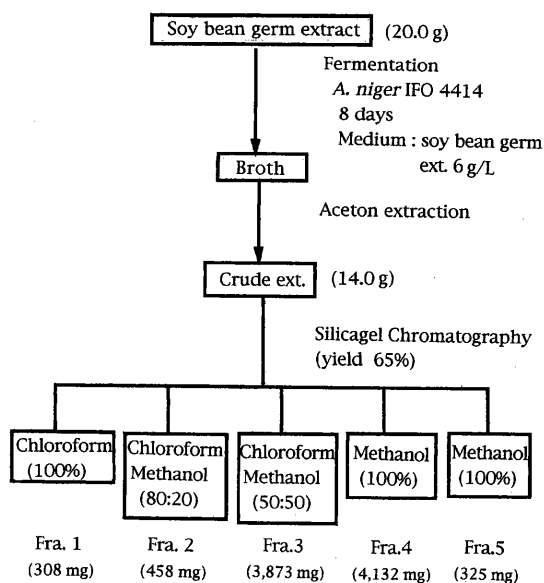


Fig. 4. Mass balance of purification process of anti-oxidative compounds produced from soybean germ extract by cultivation of *Aspergillus niger* IFO 4414.

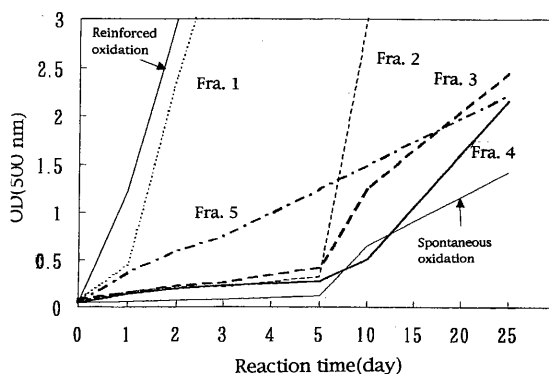


Fig. 5. Antioxidative activity in the fractions from silica gel chromatography.

クロマト画分の活性酸素消去活性

各画分の活性酸素消去活性を分析し、抗酸化活性については Fig. 5 に、SOD 様活性について Fig. 6 に示した。また EBV 法による抗発がんプロモーター活性を Fig. 7 に示した。これらの結果から、各画分には様々な化合物が変換生成していることが推察される。これらの活性はほぼ同じ画分 3 と 4 に認められているが、これらに含まれる物質が抗酸化活性とどのような関係にあるのかを明らかにするためには、活性をもった物

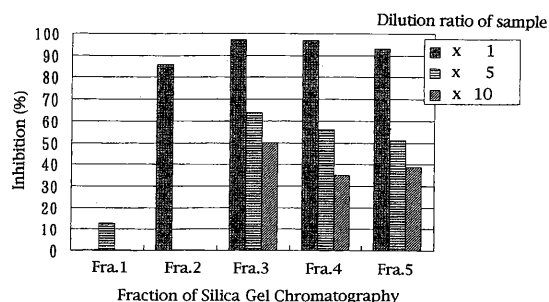


Fig. 6. Superoxide dismutase(SOD) like activity in the fractions from silica gel chromatography. Dilution ratio of sample shows the concentration of active compounds in each fraction.

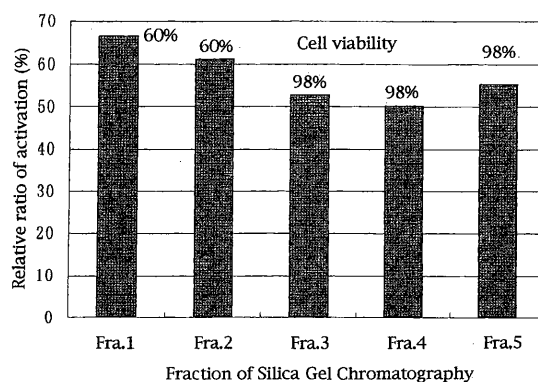


Fig. 7. Activity of anti-tumor promotion measured by Raji cells with Epstein-Barr virus (EBV) early antigen. Activation of Raji cells by phorbol ester (TPA) of 20 ng/mL is set as 100% of the relative ratio of activation. Lesser level of the relative ratio of activation shows the stronger activity of anti-tumor promotion.

質を純品化する必要があり今後の課題である。

考 察

大豆醗酵食品の抗酸化活性に注目して、そのモデルとして *Aspergillus niger* IFO 4414 により大豆胚軸のメタノール抽出物を原料として醗酵変換を試みた結果、未醗酵の物より、活性酸素消去活性が著しく向上した。これまでの我々の研究で、胚軸中に豊富に含まれるダ

イジンからの加水分解, 酸化物として4', 7, 8-トリハイドロキシイソフラボン (8-ハイドロキシダイゼイン) を見いだしており, この変換反応の経路を Fig. 1 のように推察した. ここでは示していないが, TLC や HPLC 分析により, ダイゼイン, ゲニステイン以外にも種々な変換物質が認められている. 抗生物質の発酵生産には培地成分として, 脱脂大豆をよく使用するが, このような脱脂大豆培地においても, 種々なイソフラボノイド代謝生産物が見いだされている¹¹⁻¹³⁾. 従って,

微生物醗酵による, 大豆胚軸中のイソフラボンからの生理活性物質の生産は, 多くの可能性を持っているものと考えている.

この研究では, モデルとして *Aspergillus niger* IFO 4414 を用いたが, この研究を発展させて, さらに種々な醗酵変換微生物を探索することによって, 大豆胚軸を原料とし, 種々なイソフラボン系の生理活性物質の探索を行っている.

要 約

大豆を主原料とする醗酵食品は, 醗酵の進行に伴って抗酸化活性の増加が認められている. その原因成分としては大豆由来のペプチド, 脂質化合物, メラノイジン色素, イソフラボン等が考えられ, これらの物質が大豆およびその醗酵食品の健全性の根拠の一つである. 特に, イソフラボン類は胚軸に豊富に含まれているが, 必ずしも美味ではないため, 何らかの加工処理を必要とする. 我々はこれまでの研究で, 大豆イソフラボン配糖体に微生物を作用させたとき, 培養と共に抗酸化活性が強くなる現象を観察した. 本研究では, TLC, HPLC 分析でダイゼイン, ゲニステイン以外にも, 種々な微生物代謝産物の生成が認められている. これらの代謝産物は大豆胚軸中のダイジン, ゲニステイン, グリシチン等の配糖体から変換したものと考えられた. これらの成分 (カラムクロマト画分) には, 抗酸化活性, SOD 様活性, 抗発がんプロモーター活性が観察されている. 現在, 代謝生産物の分離精製を行っており, これらの生理活性と変換物質の関係を特定することが今後の課題である.

文 献

- 1) 海老根英男 (1995): 味噌の生理調節機能. 味噌の科学と技術, **43**, 339-361.
- 2) 岡本章子, 柳田藤治 (1997): 大豆醗酵食品の機能性. 食品工業, **40**(8), 70-79.
- 3) 村本光二, 陳 華敏 (1997): 大豆ペプチドの抗酸化性. 食品工業, **40**(6), 69-79.
- 4) 松田茂樹 (1998): 醤油粕に含まれる抗酸化性物質について. 醸造協会誌, **93**, 263-269.
- 5) Ikehara H, Wakaizumi M and Murata K (1968): Antioxidant and antihemolytic activity of a new isoflavone, "Factor 2" isolated from tempeh. *Agric Biol Chem*, **32**, 740-746.
- 6) Murakami H, Asakawa T, Terao J and Matsushita S (1984): Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation. *Agric Biol Chem*, **48**, 2971-2975.
- 7) Hoppe MB, Jha HC and Egge H (1997): Structure of an antioxidant from fermented soy beans (tempeh). *J Am Oil Chem Soc*, **74**, 477-479.
- 8) Mimura A and Tanimura H (1998): A potent anti-UVB isoflavonoid transformed microbiologically from soy bean components. In: *Functional Foods: Overview and Disease Prevention*, American Chemical Society Symposium Series No. 701, Chapt. 13, in press (ACS Symposium, Apr. 13-17, 1997 San Francisco).
- 9) 大柳善彦 (1988): SOD の測定法. 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 2906-2913.
- 10) Ito Y, Yanase S, Fujita J, Harayama T, Takashima M and Imanaka H (1981): A short-term *in vitro* assay for promoter substances using human lymphoblastoid cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Cancer Letters*, **13**, 29-37.
- 11) Chimura H, Sawa T, Kumada Y, Naganawa H and Umezawa H (1975): New isoflavones, inhibiting

- catechol-*O*-methyltransferase produced by *Streptomyces*. *J Antibiotics*, **28**, 619-626.
- 12) Jeffrey AM, Knight M and Evans WC (1972): The bacterial degradation of flavonoids, hydroxylation of the A-ring taxifolin by a soil *Pseudomonad*. *Biochem J*, **130**, 373-381.
- 13) Komiyama K, Funayama S, Anraku Y, Takahashi Y and Omura S (1989): Isolation of isoflavonoids possessing antioxidant activity from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. *J Antibiotics*, **42**, 1344-1349.