

豆乳ヨーグルトによる酸化ストレス低減効果の検討

木下英樹^{*1}・庄子百香²・星上大貴²・渡邊航平²

¹東海大学農学部バイオサイエンス学科食品バイオ化学研究室

²宮城大学食産業学部フードビジネス学科微生物機能健康科学研究室

Reducing Effects of Oxidative Stress Using Soy Yogurt

Hideki KINOSHITA^{*1}, Momoka SHOJI², Hiroki HOSHIGAMI² and Kohei WATANABE²

¹Laboratory of Food Biochemistry, Department of Bioscience, School of Agriculture,
Tokai University, Kumamoto 862-8652

²Laboratory of Microbial Functional Health Science, Department of Food Management,
School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University, Miyagi 982-0215

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS), such as hydroxyl and superoxide anion radicals, are highly reactive molecules derived from the metabolism of oxygen. ROS play positive roles in cell physiology, but they may also damage cell membranes and DNA, inducing oxidation that causes membrane lipid peroxidation and decreased membrane fluidity. Fermented soy milk (soy yogurt) using lactic acid bacteria (LAB) is a good food that has many functional substances containing antioxidants. In this study, the antioxidative activities of soy yogurt were investigated. The LAB strains which solidified soy milk were 16 strains out of 26 strains. The supernatant of soy yogurt made from *Lactobacillus gasseri* MYU1 showed the highest ORAC and HORAC values. *Leuconostoc mesenteroides* MYU60 and *Pediococcus pentosaceus* MYU759 showed the highest values in ORAC and HORAC tests, respectively. *Leu. mesenteroides* MYU60, *Lb. plantarum* MYU74, *Lb. reuteri* MYU220, and *P. pentosaceus* MYU759 showed significantly high N-acetylcysteine equivalent compared with a control in total ROS reducing assay ($p < 0.05$). These strains were selected and the comet assay were performed. The comet value was decreased in all selected strains compared with a control meaning that there was a DNA protection effect. Finally, the exopolysaccharide (EPS) of the supernatants were purified and quantitated. The results show *Lb. reuteri* MYU220 and *P. pentosaceus* MYU759 produce both natural and acidic EPS. *P. pentosaceus* MYU759 is an especially high-EPS producer. These results suggest EPS is one of the antioxidants

* 〒862-8652 熊本市東区渡鹿9-1-1

of *P. pentosaceus* MYU759 and this strain is a good candidate for functional soy yogurt. *Soy Protein Research, Japan* **19**, 126-131, 2016.

Key words : lactic acid bacteria, antioxidant, soy yogurt, reactive oxygen species, exopolysaccharide

活性酸素種 (ROS) は、好気性生物が体内で酸素を利用し代謝が行われる過程で発生する反応性の高い副産物であり、スーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素などが知られている。ROSは、細菌やウイルス感染時の免疫機構において生体内で利用される¹⁾。しかし、過剰に発生したROSは、DNA、脂質、たん白質といった重要な生体成分を酸化させる。こうした酸化損傷は老化現象の亢進だけでなく、ガン、糖尿病、高血圧、動脈硬化などの生活習慣病をはじめとする様々な疾患の発症に深く関わっている²⁾。豆乳は、優れた栄養性のみならず、イソフラボン、ポリアミンなどの抗酸化物質を含有する優れた食品である。また、未発酵豆乳に含まれるイソフラボンは糖が結合した配糖体型であるのに対し、乳酸菌により発酵した発酵豆乳 (以下、豆乳ヨーグルト) に含まれるイソフラボンは大部分が吸収性の高いアグリコン型として存在していることが分かっている^{3,4)}。ポリアミンも乳酸発酵により増加することも知られている⁵⁾。さらに、そこに乳酸菌自体の機能性も加わるため、豆乳ヨーグルトは大変優れた食品であると言える。そこで本研究では、豆乳ヨーグルトを用いて、酸化ストレスからの細胞保護効果について検討し、大豆の新たな利用へと繋げることを目的とした。

方 法

1. 使用菌株と培養条件

本研究では食品等から分離した乳酸菌26菌株を用いた (Table 1)。試験前に乳酸菌は、MRS broth (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に植菌し、37°Cで24 h培養した。さらに、同条件で継代培養 (2%摂取) を2回行った後、37°Cで24 hの本培養を行った。

2. サンプル調製

本培養後の乳酸菌を滅菌した無調整豆乳 (株式会社東京めいらく、千葉) に添加し、37°Cで24 h培養した。さらにそれを無調整豆乳に接種し、37°Cで24 h培養を行い豆乳ヨーグルトを作成した。遠心分離

(8,000 rpm, 5 min, 4°C) 後の上清を各種抗酸化試験におけるサンプル原液として使用した。ORAC法では75 mmol/Lリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) で100倍希釈、HORAC法では4倍希釈し使用した。また、細胞を用いた抗酸化試験では、PBS (pH7.4) にて20倍希釈したものをサンプルとして用いた。

菌体のORAC / HORAC試験では、本培養後に菌体を回収、洗浄し、 5.0×10^8 cells/mLとなるように75 mmol/Lリン酸カリウム緩衝液に懸濁し、サンプルとした。

3. 豆乳凝固性試験

作成した豆乳ヨーグルトの凝固性の有無を目視により確認した。凝固性のある菌株は+、ない菌株は-と表記した。また、豆乳ヨーグルトのpHを測定した。

4. ORACおよびHORAC法による抗酸化能測定

ORAC法では、96穴黒色プレート (BRAND, Wertheim, Germany) にサンプル20 μ Lずつ添加後、フルオレセイン溶液を200 μ L添加し、振とう攪拌直後の蛍光強度を蛍光プレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定した (Ex: 485 nm, Em: 538 nm)。測定後、AAPH (和光純薬工業株式会社、大阪) 溶液を各ウェルに75 μ Lずつ分注した。振とう攪拌後、2 min間隔で45回蛍光強度を測定した。また、ブランクはサンプルの代わりに75 mmol/Lリン酸カリウム緩衝液を、標準溶液にはTrolox溶液をそれぞれ用いた。また、上清のコントロールとして、HClでpHを4に調整した無調整豆乳の上清を用いた。

HORAC法では、AAPHの代わりにフェントン試薬と0.55 mol/L過酸化水素水を、Troloxの代わりに没食子酸を用いて同様に試験した。

5. 酸化ストレスからの細胞保護効果の検討

本試験ではTotal ROS Detection kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) を用いて測定した。 1×10^4 cellsのHCT116細胞を96穴黒色プレート (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Austria)

に添加し、37℃、5% CO₂下で、一晚培養した。PBSで洗浄後、コントロール、N-アセチルシステイン (NAC) またはサンプルを25 μL添加後、同条件で、30 min反応させた。その後、200 μmol/Lピオシアニンを25 μLずつ添加し、30 min反応させた。Detection Solutionを50 μLずつ添加した後、暗所下で60 min反応させ、蛍光強度を測定した (Ex: 485 nm, Em: 538 nm)。

6. コメットアッセイによるDNA保護効果の検討

DNA保護効果は、コメットアッセイキット (Comet Assay[®], TREVIGEN, Gaithersburg, MD, USA) を用いて測定した。1×10⁴ cellsのHCT116細胞を12穴プレートで一晚培養した。洗浄後、サンプルを添加し、37℃、5%CO₂下で60 min反応させた。上清を取り除き、0.1 mmol/L H₂O₂を添加し、再度10 min反応させた。細胞を回収後、LMA agaroseに懸濁し、Comet Slideに広げ固めた。Lysis Solutionに60 min, Alkaline Unwinding Solutionに20 min浸し、冷アルカリ性泳動バッファー (pH>13) で電気泳動した (25 V, 20 min)。泳動後、70%エタノールに5 min、蒸留水に

5 min浸す作業を2回繰り返した。乾燥後、SYBR Gold (Lifetechnologies, Grand Island, NY, USA) で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。細胞は1サンプルあたり50細胞計測を行い、細胞の損傷具合により点数化し (Fig. 4A), 合計点数を出した。コントロールには無調整豆乳をpH 4.5に調整したものをを用いた。

7. 菌体外多糖 (EPS) の定量

菌体外多糖の抽出はZhangら⁶⁾の方法に従って行った。サンプル原液2 mLに等量の冷エタノールを加え、5℃で一晩放置し、遠心分離 (13,330 rpm, 30 min, 5℃) して沈殿を得た。DNase/RNase処理、4%トリクロロ酢酸処理後、エタノール沈殿により糖質画分を得た。次にDEAE-TOYOPEAL 650S (Tosoh Bioscience, King of Prussia, PA, USA) に供し、素通り画分と吸着画分を得た。得られた溶液の糖含量をフェノール硫酸法にて定量し、グルコース当量を算出した。

Table 1. Lactic acid bacteria used in this study and solidification of soy milk

Strain number	Species	Isolated Source	pH after fermentation	Solidification
MYU1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Japanese Takuan pickle	4.76	+
MYU10	<i>Lactobacillus sakei</i>	Japanese Takuan pickle	5.78	+
MYU17	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Kimchi	4.72	+
MYU20	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Kimchi	6.12	-
MYU26	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Kimchi	6.15	-
MYU29	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Pickled Nozawana vegetable	4.86	+
MYU51	<i>Leuconostoc</i> sp.	Kimchi	5.24	+
MYU57	<i>Lactobacillus sakei</i>	Rice	4.83	+
MYU60	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Kimchi	5.31	+
MYU65	<i>Lactobacillus sakei</i>	Kimchi	4.51	+
MYU67	<i>Lactobacillus sakei</i>	Kimchi	4.87	+
MYU69	<i>Lactobacillus sakei</i>	Kimchi	5.03	+
MYU71	<i>Lactobacillus sakei</i>	Japanese Amazake (non-heated)	4.68	+
MYU74	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Japanese pickle	4.34	+
MYU87	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pickled celery	6.07	-
MYU88	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pickled celery	6.19	-
MYU89	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pickled celery	5.97	-
MYU95	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Nuka-doko (Fermented Rice bran bed)	6.09	-
MYU111	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Soy sauce pickled radish	4.59	+
MYU117	<i>Lactobacillus pentosus/Lb. plantarum</i>	Soy sauce pickled radish	4.5	+
MYU220	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Porcine intestine (called Horumon in Japan)	5.38	+
MYU381	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Porcine intestine (called Horumon in Japan)	5.93	-
MYU382	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Porcine intestine (called Horumon in Japan)	6.25	-
MYU390	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Porcine intestine (called Horumon in Japan)	5.94	-
MYU758	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Rice	6.1	-
MYU759	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Rice	4.7	+

8. 統計解析

データは平均値±SDで示した。多重比較検定は、Dunnett T3 (上清のORAC), Dunnett T (両側検定: 上清のHORAC, 酸化ストレス), Games-Howell (菌体のORAC) およびTukey HSD (菌体のHORAC) を用いた。統計解析用ソフト (IBM SPSS Statistics Ver22, 日本アイ・ピー・エム株式会社, 東京) を使用し, $p < 0.05$ で有意であるとした。

結果と考察

豆乳凝固試験の結果をTable 1に示した。26菌株中16菌株 (62%) が豆乳を凝固させた。凝固した菌株の平均pHは4.88であったのに対し, しなかった菌株では6.08と非常に高い値を示した。大豆たん白質の等電点はpH4.2 ~ 4.5付近であることから豆乳の凝固は, 乳酸菌が産生した乳酸による酸凝固であると考えられた。

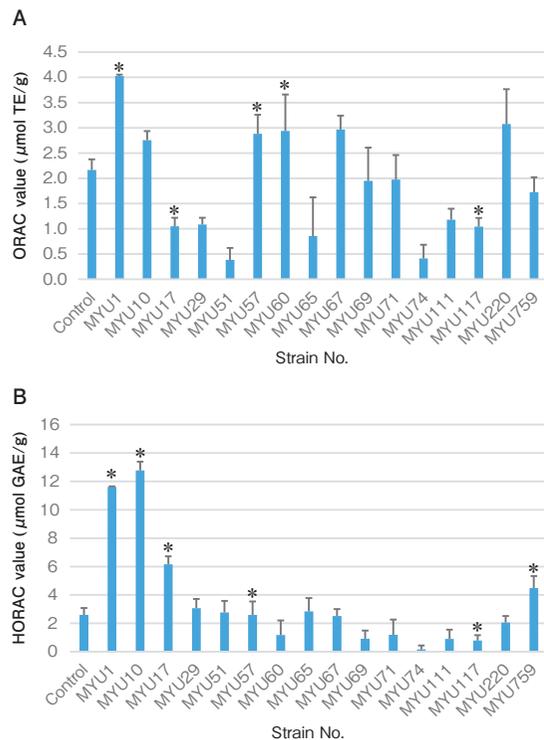


Fig. 1. ORAC (A) and HORAC (B) values of supernatants of soy yogurt. The data shows the average value±SD. ORAC and HORAC values indicate Trolox equivalent (TE) and gallic acid equivalent (GAE) per 1 g of supernatant of soy yogurt. *: vs. control at $p < 0.05$.

次に, 凝固性を示した16菌株を選抜し抗酸化試験を行った。上清での試験の結果, *Lb. gasseri* MYU1, *Leuconostoc mesenteroides* MYU60, *Lb. sakei* MYU57はORAC法にてコントロールと比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 1A)。中でも最も高い値を示したMYU1株は, $4.03 \pm 0.03 \mu\text{mol TE/g}$ とコントロールに比べ約二倍の高値を示した。HORAC法では, *Lb. sakei* MYU10, MYU1株, *Lb. gasseri* MYU17, *P. pentosaceus* MYU759が, それぞれ 12.77 ± 0.62 , 11.61 ± 0.05 , 6.16 ± 0.56 , $4.49 \pm 0.85 \mu\text{mol GAE/g}$ とコントロールに比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 1B)。菌体でのORAC試験では, 4菌株において高い値を示し, 中でもMYU60株が最も高く $16.50 \pm 2.25 \mu\text{mol TE}/1 \times 10^{11}$ cellsを示した (Fig. 2A)。菌体のHORAC値は, MYU759株が最も高く, $254.39 \pm 39.75 \mu\text{mol GAE}/1 \times 10^{11}$ cellsだった (Fig. 2B)。

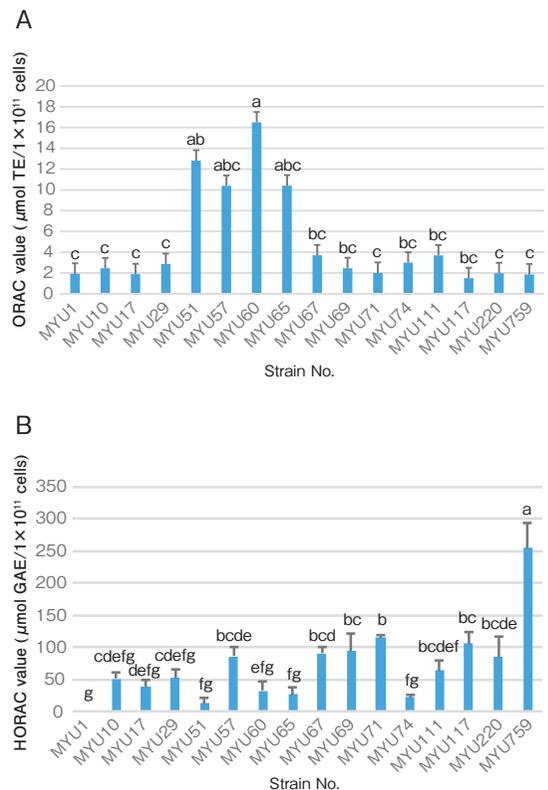


Fig. 2. ORAC (A) and HORAC (B) values of LAB cells. The data shows the average value±SD. ORAC and HORAC values indicate Trolox equivalent (TE) and gallic acid equivalent (GAE) per 1×10^{11} cells of LAB. Different letters show significant differences ($p < 0.05$).

Fig. 3には豆乳ヨーグルト上清のROS消去活性について示した。値はROS消去剤であるNAC濃度に換算したNAC当量で示した。コントロールと比較して有意に高いNAC当量を示した菌株は、9菌株見られ

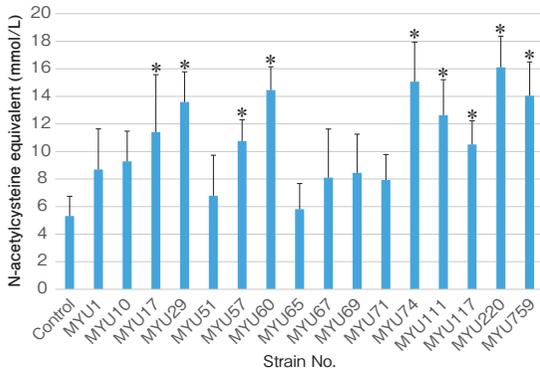


Fig. 3. Reducing effects of total ROS using supernatants of soy yogurt in HCT116 cells. The data shows the average value \pm SD at N-acetylcysteine (NAC) equivalent (mmol/L) *: vs. control at $p < 0.05$

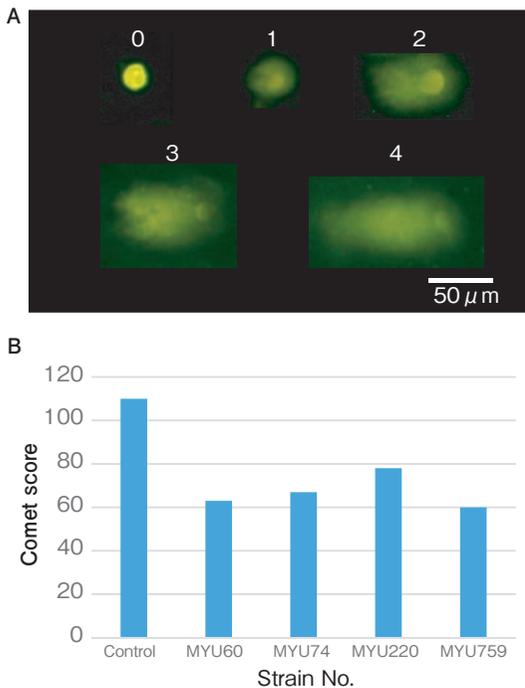


Fig. 4. DNA protective effects of supernatants of soy yogurt by comet assay. (A) the criteria for scoring the comet assay results, (B) the sum of score for each sample (n=50).

た ($p < 0.05$). 最も高い値を示したのは、*Lb. reuteri* MYU220の 16.1 ± 2.3 mmol/Lであった。そこで上位4菌株 (MYU220株, MYU74株, MYU60株, MYU759株) を選抜し、DNA保護効果をコメットアッセイにより評価した (Fig. 4)。その結果、選抜菌すべてにおいてコントロールより低いコメット値を示し、豆乳ヨーグルトのDNA保護効果が確認された。最も低いコメット値を示したのがMYU759株であり、次いでMYU60という結果となった。

以上の結果から選抜乳酸菌により豆乳を発酵させることで新たな抗酸化物質が産生されていることが明らかとなった。乳酸菌が産生する抗酸化物質としてEPSが知られている^{6,7)}。そこで選抜菌で作成した豆乳ヨーグルトの上清からEPSを抽出したところ、MYU220株とMYU759株において、中性および酸性EPSが検出された (Fig. 5)。特にMYU759株は中性および酸性EPSの両方が高い値を示しEPSはMYU759株における抗酸化に寄与していると考えられた。EPSは抗酸化性のほか、免疫賦活化作用⁸⁾も報告されていることからMYU759株で作った豆乳ヨーグルトを食べることで、様々な疾病を予防できる可能性が示された。

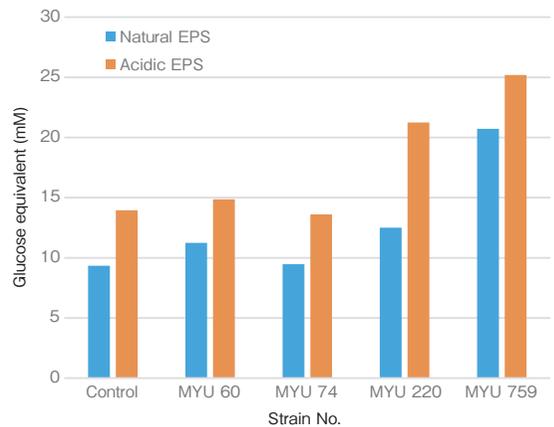


Fig. 5. The quantification of the EPS produced by selected LAB after the anion-exchange column chromatography. The data are showed at a glucose equivalent.

要 約

ROSによる酸化ストレスは様々な疾病の原因となるため、抗酸化食品の摂取が健康維持に重要である。豆乳ヨーグルトは豆乳の優れた特性に加え、乳酸菌の機能性も加わることから現在注目されている機能性食品である。そこで本研究では、豆乳ヨーグルトの抗酸化性を検討した。乳酸菌を無調整豆乳に添加し37℃で24 h培養し、凝固性を確認したところ、豆乳を凝固した乳酸菌は、26菌株中16菌株だった。選抜菌を用いて抗酸化能を測定したところ、上清ではMYU1株がORAC, HORAC共に高い値を示した。菌体のORACではMYU60株, HORACではMYU759株がそれぞれ最も高い値を示した。そこで酸化ストレスからの細胞保護効果を検証したところ、MYU60株, MYU74株, MYU220株, MYU759株に高い細胞保護効果が認められた。本4菌株を選抜し、コメントアッセイを行ったところ、全ての菌株でDNA保護効果が認められたが、MYU759株が最も効果が高かった。さらに、EPSを定量したところ、MYU220株とMYU759株は中性および酸性EPSを産生していることが明らかとなり、抗酸化に寄与している可能性が示唆された。以上のことから、MYU759株等の乳酸菌を用いることで、人々の健康に寄与できる高い抗酸化力を有した機能性豆乳ヨーグルトが作成できると考えられた。これにより大豆の利用性の拡大に繋がることが期待される。

文 献

- 1) Schwarz KB (1996): Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med*, **21**, 641-649.
- 2) Waris G and Ahsan H (2006): Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*, **5**, 14.
- 3) 池田稜子, 太田直一, 渡辺忠雄 (1995) : 大豆発酵過程における抗酸化性物質イソフラボンの変化. 日本食品科学工学会誌, **42**, 322-237.
- 4) Chen Y, Shih T, Chiu CP, Pan T and Tsai T. (2013): Effects of lactic acid bacteria-fermented soy milk on melanogenesis in B16F0 melanocytes. *J Funct foods*, **5**, 395-405.
- 5) 高木尚紘, 北脇涼子, 西村侑子, 原田智子, 岩崎充弘, 都築公子, 福田 満 (2009) : 乳酸発酵オカラ豆乳がラット盲腸内の短鎖脂肪酸およびポリアミン含量に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌, **56**, 585-590.
- 6) Zhang L, Liu C, Li D, Zhao Y, Zhang X, Zeng X, Yang Z and Li S (2013) : Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *Int J Biol Macromol*, **54**, 270-275.
- 7) Pan D and Mei X (2010) : Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydrate Polymers*, **80**, 908-914.
- 8) Makino S, Ikegami S, Kano H, Sashihara T, Sugano H, Horiuchi H, Saito T and Oda M (2006): Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *J Dairy Sci*, **89**, 2873-2881.