

琉球大学学術リポジトリ

[報文]沖縄伝統大豆発酵食品「とうふよう」漬け汁の抗酸化能

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2019-08-09 キーワード (Ja): とうふよう, 紅麴, 抗酸化, 漬け汁, 機能性食品素材 キーワード (En): tofuyo, beni-koji, antioxidant, soaking mixture, functional food material 作成者: 屋良, 瞳, 大岩, 迪子, 安田, 正昭, 橘, 信二郎, Yara, Hitomi, Oiwa, Michiko, Yasuda, Masaaki, Tachibana, Shinjiro メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002017069

沖縄伝統大豆発酵食品「とうふよう」漬け汁の抗酸化能

屋良 瞳、大岩 迪子、安田 正昭、橘 信二郎

琉球大学 農学部 亜熱帯生物資源科学科

Antioxidant capacity of soaking mixture for making Okinawa traditional soybean food tofuyo

Hitomi YARA, Michiko OIWA, Masaaki YASUDA, Shinjiro TACHIBANA

*Department of Bioscience and Biotechnology,
Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus*

キーワード：とうふよう、紅麹、抗酸化、漬け汁、機能性食品素材

Key words : tofuyo, beni-koji, antioxidant, soaking mixture, functional food material

1. 緒 言

「とうふよう」は、乾燥させた島豆腐を麹（紅麹および黄麹）、泡盛および少量の食塩で調製した漬け汁に漬け込んで発酵、熟成させた沖縄県の伝統的な大豆発酵食品である¹⁾。とうふようの大豆タンパク質は、熟成期間中に漬け汁の麹菌が産生した各種プロテアーゼの作用によってペプチドおよび遊離アミノ酸に加水分解される²⁾。生成したペプチドや遊離アミノ酸は、製品の呈味性や風味形成に寄与することが報告されている^{3,4)}。

久場らは、とうふようの豆腐由来ペプチドに血圧上昇の要因のひとつとされるアンジオテンシンI変換酵素（ACE）の阻害活性があることを見出し、そのペプチドの単離と性質を解明している⁵⁾。報告されたペプチドのアミノ酸配列は、大豆タンパク質の一次構造に含まれることから、麹菌プロテアーゼの

作用により生成した大豆タンパク質由来のペプチドと推定されている。我々は、豆腐由来ペプチドや遊離アミノ酸は熟成期間中に漬け汁にも相当量が移行していると考え、漬け汁のACE阻害活性について調べた⁶⁾。漬け汁のACE阻害活性は、とうふよう熟成後に漬け込み前よりも有意に高い阻害活性を示したが、熟成後の漬け汁のACE阻害活性は人工消化酵素処理後に顕著に減少した。ところが、酵素処理した漬け汁のACE阻害残存活性は、同じく酵素処理した漬け込み前の漬け汁のACE阻害残存活性とほぼ同じレベルであった。このことから、麹菌由来プロテアーゼの作用によって漬け込んだ豆腐から生成したペプチドが漬け汁に移行していることが示唆されている。すなわち、発酵によって生成した生理活性物質や大豆が本来有している生理活性物質が漬け汁に相当量移行していると考えられた。にもかかわらず、漬け汁の生理活性については、これまでほとんど調べられていない。それ故、とうふよう製造に用いられた漬け汁の大部分は、製造現場におい

て再利用されるか産業廃棄物として廃棄処理されている。2000年には、農林水産省により「食品リサイクル法」が制定され、製造業者も含めて産業廃棄物のリサイクルや減量が義務付けられており、なお一層の廃棄物削減が求められている。本研究では、このような背景を踏まえてとうふよう漬け汁の有効利用と機能性食品素材としての利用を目的として漬け汁の抗酸化能について調べたので以下報告する。

2. 実験材料および方法

2-1. 実験材料

本研究に使用したとうふよう漬け汁は、(株)紅濱より提供していただき、使用するまで -20°C で保存した。ペプシン(ブタ胃粘膜由来、469 units/mg of solid)、キモトリプシン(ウシ膵臓由来、51 units/mg of solid)、トリプシン(ウシ膵臓由来、13,964 units/mg of solid)はSigma-Aldrich社(St. Louis, MO, USA)より購入した。1,2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。その他の一般試薬は、生化学用または特級を使用した。

2-2. イソフラボン類の定量分析

イソフラボン類の一般的な抽出方法に従い、豆腐およびとうふよう(漬け込み3ヶ月)の凍結乾燥物各1gに70%エタノールを3mL加え、室温で2時間振とう抽出した。抽出した試料を遠心分離(3,000rpm、15分、 25°C)して得られた上清を回収し、沈殿残渣に対して再度70%エタノールを加えて振とう抽出を3回繰り返し、得られた上清を混合して10mLに定容したものを抽出試料として高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析に供した。

得られた試料抽出液に含まれる大豆イソフラボン類の配糖体3種(ダイジン、グリシチン、ゲニスチン)およびアグリコン3種(ダイゼイン、グリシテイン、ゲニステイン)を分離、定量するためにHPLC分析に供した。HPLC送液システムはAlliance 2690 Separations Module (Waters)、検出器は996 Photodiode Array Detector (Waters)を用いた。分析カラムにCOSMOSIL 5C₁₈ AR-II (4.6×250mm、ナカライ社製)を用い、溶出液に10%酢酸：超純水：アセトニトリル系を用いた。溶出のグラジエント条件は溶媒の濃度比を次のように変化

させて行った。1:84:15→1:79:20(10分)、1:79:20(15分)、1:74:25→1:64:35(25分)とした。流速は1.0mL/min、試料注入量は10 μL 、カラム温度は 30°C 、検出波長は254nmで分析した。

2-3. とうふよう漬け汁水抽出物の調製

豆腐漬け込み前と漬け込み後の漬け汁をそれぞれ凍結乾燥し、乾燥重量に対して5倍容の蒸留水を加えて懸濁した後、 25°C で1時間振とう抽出した。抽出液を遠心分離(9,000×g、15分、 25°C)し、得られた上清を漬け汁水抽出物とした。さらに、漬け汁水抽出物と等量の100%メタノールを加えて攪拌した後、遠心分離(9,000×g、10分、 25°C)により高分子タンパク質や多糖類(特に米由来のデンプンなど)を除去した。得られた上清は遠心濃縮した後、乾燥重量濃度が100mg/mLとなるように蒸留水に再溶解して実験に供した。

2-4. 人工消化酵素耐性試験

漬け汁水抽出物の消化酵素に対する消化耐性を*in vitro*で調べた。ペプシン、キモトリプシンおよびトリプシンを用い、久場ら⁵⁾の手順に従って漬け汁水抽出物の連続消化酵素処理を行った。すなわち、豆腐漬け込み前後の漬け汁水抽出物それぞれ0.2mLに対し、0.1M塩酸0.2mLと0.1M塩酸に溶解した0.05%(w/v)ペプシン溶液0.2mLを加えてpH2.0、 37°C の条件で6時間酵素反応させた。反応液を5分間煮沸して酵素反応を停止し、遠心分離(9,000×g、10分、 25°C)で得られた上清を濃縮乾固した。続けてキモトリプシンとトリプシンをそれぞれ0.025%(w/v)濃度で溶解させた0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)0.6mLに先の反応液乾固物を溶解させて 37°C で6時間酵素反応させた。反応液を5分間煮沸して酵素反応を停止し、遠心分離(9,000×g、10分、 25°C)で得られた上清をDPPHラジカル消去活性測定に供した。

2-5. DPPHラジカル消去活性測定

とうふよう漬け汁水抽出物および除タンパク質した漬け汁水抽出物のDPPHラジカル消去活性をBrand-Williamsら⁷⁾の方法に従って測定した。各試料0.25mL、メタノール0.25mL、0.2M MES緩衝液(pH6.0)0.25mLおよび0.4mM DPPH溶液0.25mLを混合し遮光して室温で30分間反応させ、520nmにおける吸光度を測定した。対照にはメタノール0.5mL、0.2M MES緩衝液0.25mLお

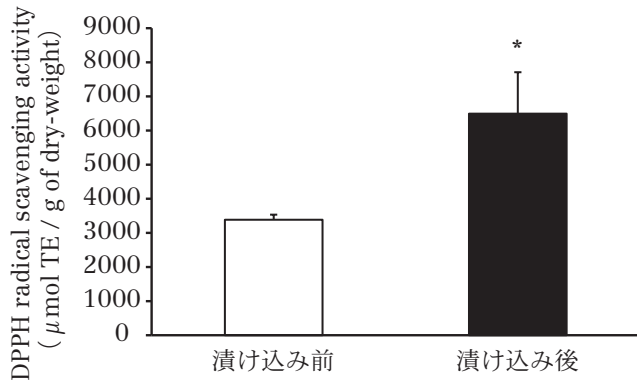


図1 とうふよう漬け汁水抽出物の抗酸化能

豆腐漬け込み前後の漬け汁水抽出液の凍結乾燥重量濃度を 100mg/mL に調製し、抗酸化能を DPPH ラジカル消去活性法に従って測定した。数値は平均値±標準偏差 ($n=3$) で表した。* $P<0.05$

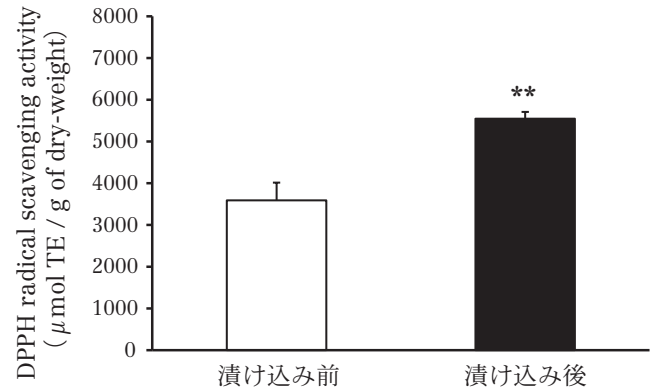


図2 除タンパク質処理後のとうふよう漬け汁水抽出物の抗酸化能

漬け汁水抽出物に等量のメタノールを加えて高分子タンパク質や糖類を遠心分離し、上清の凍結乾燥物重量濃度を 100mg/mL に調製して抗酸化能を DPPH ラジカル消去活性法に従って測定した。数値は平均値±標準偏差 ($n=3$) で表した。** $P<0.01$

よび 0.4mM DPPH 溶液 0.25 mL を混合し、同様に反応させて吸光度を測定した。また、試料由来の色素の影響を排除するための試料ブランクとして、メタノール 0.5 mL、0.2M MES 緩衝液 0.25 mL および各試料希釈液 0.25 mL を混合し、同様の手順で測定した。

抗酸化標準物質として (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; Trolox) を用いて検量線を作成した。抗酸化活性は、各試料のラジカル消去量が 50% となるときのラジカル捕捉濃度 (SC_{50} 値) を求め、試料乾燥重量当たりの Trolox 当量のラジカル消去活性 ($\mu\text{mol Trolox equivalent (TE) / g of sample}$) で表した。漬け汁抽出試料は、乾燥重量濃度 100mg/mL に調製し、メタノールで希釈系列を作成したものを用いた。

2-6. 統計解析

データの統計解析には、統計解析ソフトウェア GraphPad Prism ver. 5 (GraphPad 社製、La Jolla, CA) を用いた。2 群間における統計処理には Student's t -test を用い、2 群間で有意差が認められる項目にはアスタリスクを付した。

3. 結果および考察

豆腐の漬け込み前後の漬け汁水抽出物の抗酸化活性の変化を DPPH ラジカル消去活性により調べ、その結果を図 1 に示す。豆腐漬け込み後の漬け汁水抽出物試料は、漬け込み前の試料 ($3,390 \pm 148 \mu$

mol TE/g of dry-weight sample) に比べて有意に高い DPPH ラジカル消去活性を示した ($6,490 \pm 1,210 \mu\text{mol TE/g}$, $P<0.05$)。このとき、漬け込み前の漬け汁では SC_{50} 値が $35.7 \pm 2.1 \text{ mg/mL}$ であったのに対し、漬け込み後の漬け汁では SC_{50} 値は $20.3 \pm 3.4 \text{ mg/mL}$ であった。これは、豆腐を漬け汁に漬け込んだことにより、豆腐の熟成に伴って漬け汁に抗酸化成分が滲出していることを示唆している。この現象は、とうふよう漬け汁中の ACE 阻害活性が豆腐の発酵、熟成後に有意に増大するという我々の以前の研究結果とも一致している⁶⁾。

また、漬け汁試料に含まれる高分子タンパク質や多糖類が抗酸化活性に及ぼす影響を排除する目的で、除タンパク質した漬け汁水抽出液試料の抗酸化活性の変化についても調べた (図 2)。その結果、豆腐の漬け込みの有無にかかわらず、いずれの試料においても除タンパク処理前の試料と比べて抗酸化活性に有意差は認められなかった (図 1 参照)。それでもなお、豆腐漬け込み後の試料において漬け込み前の試料よりも有意に高い抗酸化活性を示した ($P<0.01$)。このことから、漬け汁水抽出物の抗酸化活性は除タンパク処理の影響を受けないことがわかった。すなわち、豆腐漬け込みによって熟成期間中に生成された抗酸化成分は、低分子量ペプチドや大豆イソフラボン類配糖体の酵素加水分解物に由来する抗酸化活性が起因していると考えられた。

表 1 漬け込み前後の豆腐イソフラボン類の変化

	漬け込み前	漬け込み後 (3 ヶ月熟成)
ダイジン	422	49.8
グリシチン	56.5	1.40
ゲニスチン	585	8.36
ダイゼイン	14.2	242
グリシテイン	8.80	24.6
ゲニステイン	0.34	173

($\mu\text{g/g}$ of sample)

豆腐の原料大豆に含まれるイソフラボン類は抗酸化能を有するため⁸⁾、漬け込み前の原料豆腐と発酵後の豆腐のイソフラボン類について定量した(表1)。その結果、原料豆腐に含まれていたダイジン、グリシチンおよびゲニスチンといったイソフラボン類配糖体は、漬け込み3ヶ月で劇的に減少していた。一方、それら配糖体のアグリコンであるダイゼイン、グリシテインおよびゲニステインの漬け込み前の漬け汁含有量は、それぞれ14.2 $\mu\text{g/g}$ 、8.80 $\mu\text{g/g}$ および0.34 $\mu\text{g/g}$ of dry weightであった。これらのアグリコン含有量は、漬け込み3ヶ月後にはそれぞれダイゼインで17倍、グリシテインで3倍、ゲニステインで509倍に増大していた。漬け込んだ豆腐のイソフラボン類およびそれらのアグリコンの変動は、漬け込み期間に配糖体が麴由来酵素によって分解を受け、とうふよう熟成期間に原料豆腐由来の抗酸化物質が漬け汁へ滲出していることも示唆している。池田ら(1995)は、大豆に含まれるイソフラボン類配糖体が微生物の産生する β -グルコシダーゼによって分解され、より抗酸化力の強いダイゼインやゲニステインなどのアグリコンとなり、味噌の抗酸化性に寄与することを報告している⁸⁾。こうした低分子化合物類は消化管吸収により生体内においてその機能を発揮することが十分考えられる。

一方で、食品または発酵食品由来の生理活性物質は、腸管で吸収されて生体内で機能するために消化管内の環境や消化酵素群による分解に耐性を有する

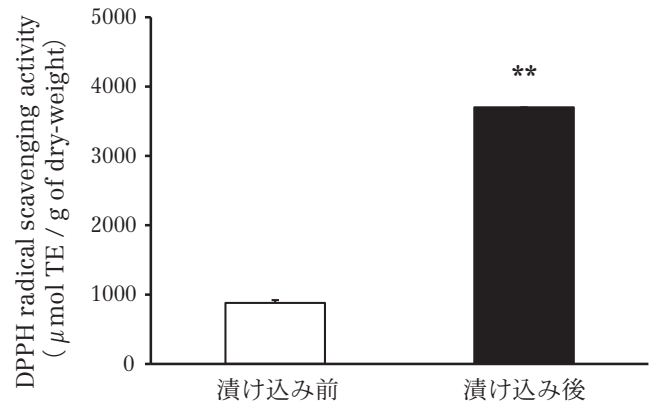


図 3 人工消化酵素処理後のとうふよう漬け汁水抽出物の抗酸化能

除タンパク質後の各試料を方法に記載の手順に従って、人工消化酵素処理した。遠心分離で得られた上清の凍結乾燥物重量濃度を100 mg/mL に調製して抗酸化能をDPPHラジカル消去活性法に従って測定した。数値は平均値±標準偏差($n=3$)で表した。 $**P<0.01$

必要があると考えられている⁵⁾。本研究においても、これまでと同様に *in vitro* で人工消化酵素処理を行った試料の抗酸化活性についてDPPHラジカル消去活性を調べた(図3)。その結果、酵素処理後においても処理前の試料に対して約66.7%の抗酸化活性が漬け込み後の漬け汁試料(3,700 \pm 0.0 $\mu\text{mol TE/g}$)で保持されていたのに対し、漬け込み前の試料(880 \pm 40 $\mu\text{mol TE/g}$)では処理前の試料に対して24.5%しか抗酸化活性は保持されていなかった。結果として、豆腐漬け込み後の漬け汁試料の抗酸化活性は、漬け込み前の漬け汁試料に比べて有意に高い抗酸化活性($P<0.01$)を有していた。すなわち、これらの結果は、豆腐の漬け込みにより消化酵素耐性の抗酸化成分が滲出したとともに、発酵・熟成によって生成した抗酸化成分には消化酵素耐性の抗酸化物質が十分含まれていることを示唆している。

とうふよう熟成の為の漬け汁は、紅麴、黄麴、泡盛および少量の食塩を加えて混合し、麴が十分に軟化したところで磨碎して調製される⁹⁾。このため、豆腐漬け込み前の漬け汁には、麴(紅麴、黄麴)に由来する抗酸化物質が含まれていると考えられる。特に、紅麴は *Monascus* 属菌によって産生される色素やジメルミン酸などの二次代謝産物において抗酸化活性が報告されている¹⁰⁾。また、とうふよう漬け汁の調製には *Aspergillus oryzae* で調製される黄麴が用いられるが、黄麴もまた発酵中にラジカル捕捉抗酸化活性の増加が報告されている⁸⁾。本研

究において、これらの麴由来抗酸化活性は消化酵素処理によってほとんど減少していないことから、豆腐漬け込み中に滲出した抗酸化成分はペプチド性というよりもむしろ非ペプチド性の抗酸化物質に起因していると考えられる。さらに、紅麴菌で発酵した大豆において原料大豆よりも高い水溶性の抗酸化活性が報告されており¹¹⁾、漬け汁も豆腐の発酵・熟成期間に紅麴菌の作用によって水溶性の抗酸化成分を産生したのではないかと考えられる。現在、当研究室では漬け汁の抗酸化成分について、さらなる性質の解明のために各種カラムクロマトグラフィーを用いて単離を行っている。

以上の結果を踏まえると、とうふよう製造工程で多量に調製される漬け汁は、消化酵素耐性の抗酸化成分に富んだ優れた機能性食品素材であると言える。水溶性の抗酸化成分は食品添加物としての応用も容易であり、今後紅麴菌を用いた様々な機能性食品の開発に新たな可能性を付与することができると期待される。さらなる研究の進展により、とうふよう漬け汁の有効利用が広がることを期待する。

要 約

沖縄県の伝統大豆発酵食品である「とうふよう」は、島豆腐を麴、泡盛、食塩で作った漬け汁に漬け込んで発酵・熟成させる大変ユニークな発酵食品である。賞味されるのは、主に漬け込んで熟成した豆腐であり、漬け汁はほとんど食されない。しかし、我々のこれまでの研究において、とうふよう漬け汁の機能が明らかにされつつある。本研究では、漬け汁の有効利用と機能性食品素材としての優位性を明らかにするため、豆腐漬け込み前後の漬け汁の抗酸化能について検証した。その結果、漬け込み前および漬け込み後の漬け汁試料はともに、良好な抗酸化活性を有しており、漬け込み後にさらに増強されることが示された。さらに、人工消化酵素処理後においても抗酸化活性は保持されており、消化酵素耐性の抗酸化成分であることが示唆されている。また、漬け込んだ豆腐中において大豆由来の抗酸化成分イソフラボン類のアグリコン量が漬け込み後に著量増加していた。これらの結果より、とうふよう漬け汁の抗酸化能は極めて優れていることが証明され、漬け汁の機能性食品素材としての有効利用が期待できる結果が得られた。

謝 辞

本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会の「研究拠点形成事業（A. 先端拠点形成型）」の助成を得て行われた。

引用文献

- 1) 安田正昭：豆腐ようと紅麴 (1), 日本醸造協会誌. 78(11), 839-842(1983).
- 2) 安田正昭, 松本哲也, 坂口真樹, 小波本直忠： *Monascus* 属菌を用いたとうふようの熟成過程における化学成分の変化, 日本食品工業学会誌. 40(5), 331-338(1993).
- 3) Liu F., and Yasuda M.: Debitting effect of *Monascus* carboxypeptidase during the hydrolysis of soybean protein. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32(10), 487-489 (2005).
- 4) 安田正昭：大豆発酵食品「豆腐よう」に関する食品科学的研究, 日本食品科学工学会誌. 57(5), 181-190(2010).
- 5) Kuba M., Tanaka K., Tawata S., Takeda Y., and Yasuda M.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(6), 1278-1283 (2003).
- 6) 屋良瞳, 手島寛子, 安田正昭, 橘信二郎：沖縄の伝統大豆発酵食品「とうふよう」もろみのアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性, ニューフードインダストリー. 55(11), 29-33(2013).
- 7) Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and Berset C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28(1), 25-30 (1995).
- 8) 池田稜子, 太田直一, 渡辺忠雄：大豆発酵過程における抗酸化物質イソフラボンの変化, 日本食品科学工学会誌. 42(5), 322-327(1995).
- 9) 安田正昭：とうふよう製造に関する研究 製造秘伝の科学的解析と技術展開, 日本食品工業学会誌. 37(5), 403-409(1990).
- 10) Aniya Y., Ohtani I.I., Higa T., Miyagi C., Gibo H., Shimabukuro M., Nakanishi H., and Taira J.: Dimerumic acid as an antioxidant of the mold. *Monascus anka*. *Free Radic. Biol. Med.*, 28(6),

- 999-1004 (2000).
- 11) Lee Y-L., Yang J-H., Mau J-L.: Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. *Food Chem.*, 106(3), 1128-1137 (2008).