

Lactobacillus plantarum HOKKAIDO による豆乳イソフラボンのアグリコン化

中川良二, 長島浩二

Conversion of Isoflavone Glycosides
to Aglycone Forms in Soymilk
by *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO

Ryoji Nakagawa and Koji Nagashima

Lactobacillus plantarum HOKKAIDO has β -glucosidase activity that hydrolyzes isoflavone glucosides to their corresponding aglycone forms, and the apparent substrate specificity of this activity from the highest to the lowest, was daidzin, genistin, and glycitin. When soymilk was fermented by the HOKKAIDO strain at 30°C for 72h, approximately 90% of the daidzin was hydrolyzed to daidzein after 24h, and similarly, genistin was hydrolyzed to genistein after 48h. These two isoflavone glucosides exist as one major isoflavone compound in soymilk. During the fermentation over 72h, the concentration of isoflavone aglycones in soymilk was increased from 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 116 $\mu\text{g}/\text{ml}$. These results indicate that the HOKKAIDO strain has a great ability for the enhancement of bioactive isoflavones (aglycone forms) in soymilk fermentation.

大豆は栄養価に優れた食素材であり、世界的に重要な作物である。また、最近ではエストロゲン様の生理作用をもつイソフラボンを多く含むなど機能性素材としても注目されている。

大豆には乾燥重量当たり 0.1%以上のイソフラボンが含まれ、構成成分としてはゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインおよびそれらのグリコシル配糖体であるゲニスチン、ダイジン、グリシチン、さらに、それらのアセチル配糖体およびマロニル配糖体の 12 種類が存在する。多くはマロニル配糖体などの配糖体として存在し、遊離のアグリコンは非常に少ない¹⁾が、マロニル配糖体は不安定で、熱や物理的処理により容易にグリコシル配糖体に分解されることが知られている²⁾。そのため、加熱殺菌を伴う豆乳などではグリコシル配糖体が多くなっている。

イソフラボンの機能性として、ガン細胞増殖の抑制^{3),4)}、循環器疾患の予防^{5),6)}、骨粗鬆症の予防^{7),8)}等が報告されている。しかし、大豆中のイソフラボンの主要構

成成分であるイソフラボン配糖体の腸内吸収は、アグリコンに比べて非常に弱いことが知られており⁹⁾、摂取された食品中のイソフラボン配糖体が体内で吸収されるためには、腸内フローラを構成する微生物によって糖鎖が切り取られたアグリコンに加水分解される必要がある¹⁰⁾。

大豆を主成分とする味噌やテンペなどの発酵食品では、*Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*などの微生物の働きにより、イソフラボン配糖体の β -グルコシド結合が加水分解されることが知られている¹¹⁾。これらのアグリコンをイソフラボンの主要構成成分とする発酵食品では、イソフラボンが腸内環境に影響されず、そのままの状態ですべて腸管から体内吸収される。

我々は漬物から新たな *Lactobacillus* 属乳酸菌を分離し、*Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO (HOKKAIDO 株)と名付けた。HOKKAIDO 株は植物原料を良く発酵し、豆乳を用いた場合には HOKKAIDO 株の単一菌株で嗜好性に優れたヨーグルト様の発酵豆乳ができ、この食品がシンバイオティクスとして機能することが示唆された¹²⁾。本研究では、当該発酵豆乳の更なる機能性成分としてイソフラボンに注目し、HOKKAIDO 株の β -グルコシダーゼ活性およびイソフラボンに対する基質特異性を明らかにするとともに、HOKKAIDO 株により製造した豆乳発酵物のイソフラボン組成を調べた。

1. 実験方法

(1) 供試乳酸菌および培養条件

供試乳酸菌 HOKKAIDO 株は MRS 液体培地 (*Lactobacilli* MRS broth, Difco) を用い、35°C、24 時間培養した。培養液は 5,000 \times g、20 分間、遠心分離した後、菌体をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、同溶液で 3 度遠心洗浄後、以下の実験に供した。

(2) β -グルコシダーゼ活性の測定

HOKKAIDO 株の β -グルコシダーゼ活性は、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に懸濁した乳酸菌液 0.1 ml と同緩衝液に溶解した 1 mM p-ニトロフェニール- β -D-グルコシド (pNPG, Sigma) 0.2 mL の混合液を調製し、当該混合液を 35°C で一定時間インキュベーションした後、反応液に 0.5 M Na_2CO_3 の 2.5 mL を添加することで酵素反応を停止した。遊離した p-ニトロフェノール量は分光光度計 (UV-1200, 島津) を用い、 A_{400} によって測定した。検量線は p-ニトロフェノール (Sigma) を標準品として作製した。酵素活性の 1 U は 1 分間で 1 μmol の p-ニトロフェノールが生成する酵素量と定義した。

(3) イソフラボン配糖体の加水分解

HOKKAIDO株 (1×10^8 CFU/mL) $50 \mu\text{L}$, 70%エタノールに溶解したイソフラボン配糖体 (1 mg/mL 濃度のゲニスチン, ダイジンまたはグリシチン, 和光純薬) $10 \mu\text{L}$, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) $40 \mu\text{L}$ を混和し, 35°C で 24, 48, 72 時間インキュベーションした. 反応混合液は遠心分離 ($8,000 \times g$, 15 分間) により固液分離し, 上清をシリンジフィルター (ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$, Millipore) で濾過後, HPLC に供した.

(4) 発酵豆乳サンプルの調製

豆乳 (無調整, 市販品) に HOKKAIDO 株を 1×10^7 CFU/mL となるように添加し, 24, 48, 72 時間, 30°C で発酵後, 凍結乾燥機 (LL-6, LABCONCO) にて凍結乾燥サンプルを調製した.

(5) イソフラボンの抽出

扇谷らの報告¹³⁾を参考に, 各々の凍結乾燥サンプルから室温で 24 時間, 10 倍量 (W/V) の 70%エタノールで抽出した可溶性画分を遠心分離 ($8,000 \times g$, 15 分間) により回収し, シリンジフィルター (ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$) で濾過後, HPLC に供した.

(6) HPLC 分析

HPLC 分析は TOSOH ODS-100 V カラム ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$) を装備した HPLC (東ソー) にて実施した. 溶離液には 0.1%酢酸を含むアセトニトリル (A 液) と 0.1%酢酸を含む純水 (B 液) の混合液を用い, A 液の 10% → 35%直線濃度勾配 (50 分間) で溶出し, その後, 35%を保持 (10 分間) させた. 注入量は $10 \mu\text{L}$, 流速は 1 mL/分とし, イソフラボンを 260 nm の吸光度で検出した. 各イソフラボン濃度は, 各標準品 (和光純薬) のピーク面積と比較して算出した.

2. 実験結果および考察

(1) HOKKAIDO 株によるイソフラボン配糖体の加水分解および β -グルコシダーゼ活性

HOKKAIDO 株を液体培地で培養した場合, β -グルコシダーゼ活性は培養液中には認められず, 細胞表層に当該酵素を保持しているというデータ (中川未発表) を得ていることから, 本研究においては, MRS 液体培地にて生育させた菌体そのものを酵素標品として使用した. 当該酵素活性は, 菌数 1×10^6 CFU/mL までは検出限界以下であったが, それ以上では菌数依存的に増加し (図 1), 菌数 1×10^8 CFU/mL では 300 mU であった. β -グルコシダーゼ活性と反応時間との関係では, 図 2 に示したように, p-ニトロフェノール量は時間経過と共に増加し, 120 分間ではほぼ飽和状態に達した. 次に, 同酵素による各

種イソフラボン配糖体に対する加水分解速度を調べた.

すなわち, イソフラボン配糖体 (ゲニスチン, ダイジンまたはグリシチン) を菌体と共に 72 時間までインキュベーションし, アグリコン化の程度を調べた. 図 3 に示したように, 72 時間後のアグリコンの割合は, それぞれ, ダイジン (36.9%), ゲニスチン (23.9%), グリシチン (5.9%) となり, グリシチンのアグリコン化の程度が非常に低かった.

(2) 発酵豆乳中のイソフラボン組成

HOKKAIDO 株での発酵による豆乳中のイソフラボン組成の変化を調べた. 発酵時間は 24, 48, 72 時間とした. 発酵前の豆乳中では約 $200 \mu\text{g/ml}$ のイソフラボンが含まれ, 中でも配糖体であるゲニスチン, ダイジンの割

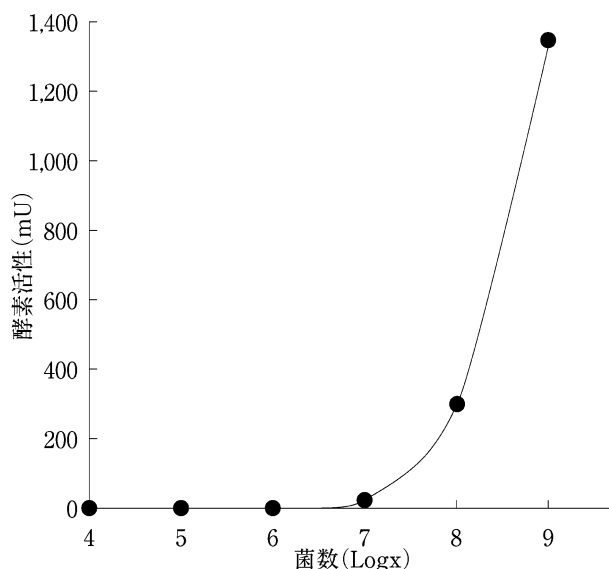


図 1 菌体数依存的 β -グルコシダーゼ活性

酵素反応は, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し, 所定量に調製した乳酸菌液 0.1 mL と同緩衝液に溶解した 1 mM p-ニトロフェニール- β -D-グルコシド 0.2 mL の混合液を用い, 35°C で 30 分間行った.

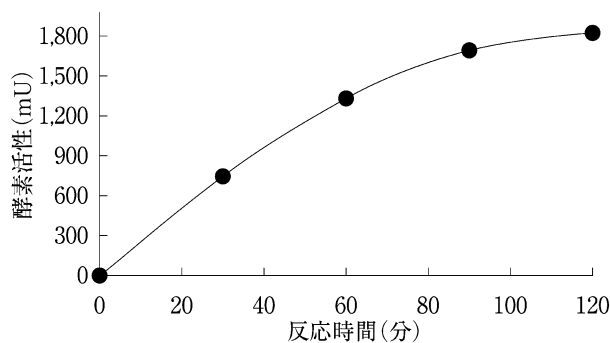


図 2 β -グルコシダーゼ反応の経時変化

酵素反応は, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中に懸濁した乳酸菌液 (5×10^9 CFU/mL) 0.1 mL と同緩衝液に溶解した 1 mM p-ニトロフェニール- β -D-グルコシド 0.2 mL の混合液を用い, 35°C で 120 分間まで行った.

合が高く、それぞれ34%、22%であった。しかし、グリシチンは僅か1%であった。

発酵24時間後にはダイジンの約90%がアグリコンのダイゼインに変換された。また、48時間後にはゲニスチンの約90%がアグリコンのゲニスチンに変換された。グリシチンは72時間後でも殆どが残存していた。豆乳中にそれぞれ27%、13%含まれていたマロニルゲニスチンおよびマロニルダイジンは、発酵後もほぼ全量が残存していた(表1)。

発酵豆乳におけるイソフラボン配糖体のアグリコン化の結果は、HOKKAIDO株由来β-グルコシダーゼのイソフラボン配糖体に対する加水分解特性(すなわち、ダイジン>ゲニスチン>グリシチン)を反映しており、菌体数およびβ-グルコシダーゼ活性と豆乳中のイソフラボン配糖体の加水分解率との間に相関が見られた。

味噌、納豆、テンペなどの発酵食品では、未発酵大豆に比較して、イソフラボンのアグリコン化やトリヒドロキシイソフラボンの生成などにより抗酸化性が高まること示されている¹⁴⁻¹⁶⁾。Matsudaら¹⁷⁾は、イソフラボン配糖体(ダイジンおよびゲニスチン)を用いて*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 由来β-グルコシダーゼの基質特異性を調べており、p-NPGを100%とした場合、ダイジンで62.0%、ゲニスチンで56.7%の加水分解率であることを示した。また、Pyoら¹⁸⁾は、豆乳発酵物からゲニスチン及びダイゼインを得るためのスタータ乳酸菌取得のため、乳酸菌31種のβ-グルコシダーゼ活性を測定し、活性の高い4系統を選抜した。それらは*Lactobacillus*に属する2系統及び*Bifidobacterium*に属する2系統であり、これらの系統は24~48時間以内にダイジンおよびゲニスチンの殆どをアグリコンに加水分解したことから、豆乳発酵における生物活性(腸内吸収効率に優れる)イソフラボンの強化に有望であると報告している。HOKKAIDO株も同様にダイジンおよびゲニスチンを24~48時間以内にアグリコンに加水分解したことから、これらの乳酸菌株に匹敵する能力を有していると考えられる。実際に、72時間の発酵により、

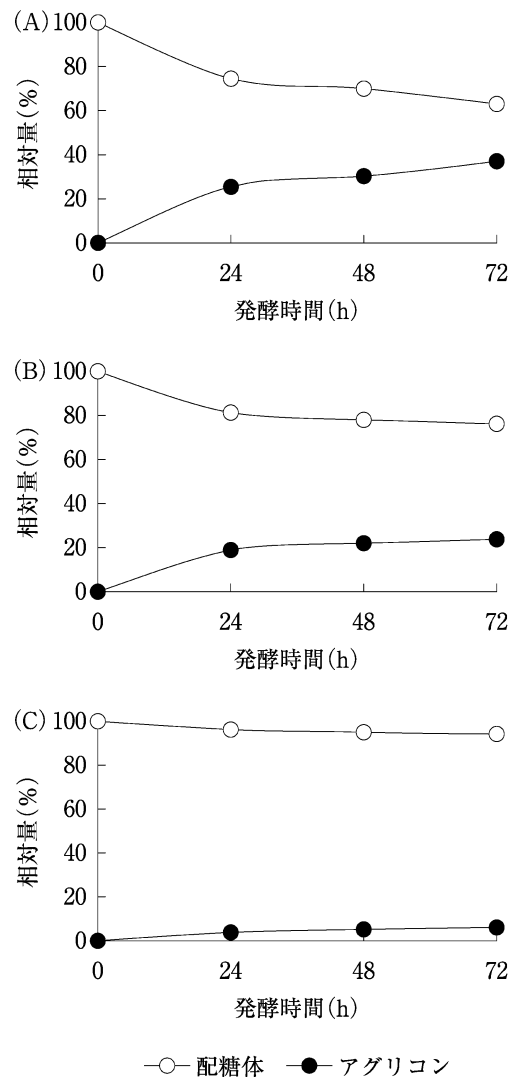


図3 HOKKAIDO株によるイソフラボン配糖体の加水分解

(A) ダイジン, (B) ゲニスチン, (C) グリシチン
反応液中のイソフラボン濃度: 0.1 mg/ml

豆乳中のイソフラボンの約58% (116 μg/ml)がアグリコンとなった。

本試験において、発酵豆乳中のマロニル配糖体は発酵前と同量残存していた(41%, 82 μg/ml)ことから、HOKKAIDO株がマロニル配糖体を加水分解しないことが解った。Otienoら¹⁹⁾は、腸内フローラを構成しプロ

表1 HOKKAIDO株での発酵による豆乳中のイソフラボン組成の変化*

発酵時間 (h)	マロニルダイジン	ダイジン	ダイゼイン	マロニルゲニスチン	ゲニスチン	ゲニスチン	グリシチン	グリシチン
0	13	22	1	27	34	1	1	0
24	14	2	20	28	11	24	1	0
48	14	0	22	28	4	32	1	0
72	13	0	22	28	0	36	1	0

*値は相対量 (%) で示した。このとき、イソフラボン総量は約 200 μg/ml であった。

バイオティクスとして有望な *Lactobacillus* 属乳酸菌 5 株と *Bifidobacterium* 1 株を用いて大豆イソフラボンの加水分解を調べたところ、本研究結果と同様に、マロニル配糖体の含量に変化がなかったことを報告した。これらの事実から考えると、一般的に乳酸菌などの細菌類はマロニル配糖体を分解できないことが示唆されているが、マロニル配糖体が加熱に対して不安定であり、容易にグルコシル配糖体に変換すること²⁾から、発酵豆乳の製造において、十分な加熱処理工程を導入することで、マロニル配糖体が HOKKAIDO 株で加水分解されず残存する問題は解消されると考えられる。

最近、アグリコンであるダイゼインが腸内フローラにおいて、より強力なエストロゲン作用や抗酸化性を有するエコールに代謝されることが示されている²⁰⁾。HOKKAIDO 株の β -グルコシダーゼはダイゼインの分解活性に優れ、豆乳の発酵においても迅速にダイゼインを生成させたことから、HOKKAIDO 株による発酵豆乳は腸内におけるエコール産生を高める食品であると思われる。

また、HOKKAIDO 株は生きて腸まで到達することが示唆されている¹²⁾²¹⁾ ことから、本菌の生菌の摂取によりイソフラボン配糖体の腸内での効率的なアグリコン化も期待される。

以上から、HOKKAIDO 株による発酵豆乳の健康食品としての利用が望まれる。

3. 要 約

Lactobacillus plantarum HOKKAIDO (HOKKAIDO 株) の β -グルコシダーゼ活性および同菌株で製造した豆乳発酵物のイソフラボン組成を調べた。HOKKAIDO 株由来 β -グルコシダーゼはイソフラボン配糖体を基質としたとき、その基質特異性はダイゼイン>ゲニスチン>グリシチンの順で高かった。

また、HOKKAIDO 株での発酵前後における豆乳中のイソフラボン組成の変化を調べたところ、ダイゼインは発酵 24 時間後に、ゲニスチンは発酵 48 時間後にほぼ 90% がアグリコンに変換された。

これらの結果から、豆乳を HOKKAIDO 株で発酵させると、HOKKAIDO 株由来 β -グルコシダーゼにより、イソフラボン配糖体が体内吸収に優れるアグリコンに効率良く変換されることが示された。

文 献

- 1) 西場洋一, 須田郁夫, 沖智之, 菅原晃美, 国産大豆のイソフラボン, チアミン, リボフラビンおよびトコフェノール含量の変動, 食科工, **54**, 295-303, (2007)
- 2) Kudou, S., Fleury Y., Welti D., Magnolato D., Uchida T., Kitamura K. and Okubo K., Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine-max* Merrill). *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2227-2233 (1991).
- 3) Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y., Genistein, a specific inhibitor of Tyrosine-specific protein kinases, *J of Biolog. Chem.*, **262**, 5592-5595 (1987).
- 4) Peterson, G. and Barnes, S., Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 661-667 (1991).
- 5) Balmir, F., Staack, R., Jeffrey, E., Jimenez, M. D., Wang, L. and Potter, S. M., An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *J. Nutr.*, **126**, 3046-3053 (1996).
- 6) Crouse, J. R. 3rd, Morgan, T., Terry, J. G., Ellis, J., Vitols, M. and Burke, G. L., A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins, *Arch. Intern. Med.*, **159**, 2070-2076 (1999).
- 7) Arjmandi, B. H., Alekel, L., Hollis, B. W., Amin, D., Stracewicz-Sapuyntzakis, M., Guo, P. and Kukreja, S. C., Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis, *J. Nutr.*, **126**, 161-167 (1996).
- 8) Ishida, H., Uesugi, T., Hirai, K., Toda, T., Nukaya, H., Yokotsuka, K. and Tsuji, K., Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistein, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 62-66 (1998).
- 9) Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y. and Kiuchi, M., Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans, *J. Nutr.*, **130**, 1695-1699 (2000).

- 10) Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wahala, K., Williamson, G. and Cassidy, A., Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br. J. Nutr.*, **89**, 45-58 (2003).
- 11) 戸田登志也, 大豆食品に含まれるイソフラボンとその摂取量, 「大豆イソフラボン」, 家森幸男, 太田静行, 渡辺昌 編, (幸書房, 東京), pp.130-142(1994).
- 12) 中川良二, 能登裕子, 八十川大輔, 長島浩二, *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO を用いた豆乳ヨーグルト及びその機能性, *食科工*, **52**, 3, 140-143 (2005)
- 13) 扇谷陽子, 相澤博, 大谷倫子, 藤田晃三, 大豆のイソフラボン量について: 産地による比較, *札幌市衛生研究所年報*, **29**, 83-89 (2002).
- 14) Ikeda, H., Watanabe, M. and Murata, K., Antioxidant antihemolytic activity of a new isoflavone, "factor 2" isolate from tempeh. *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 740-746 (1968).
- 15) 江崎秀男, 野原優子, 小野崎博道, 大沢俊彦, 納豆の抗酸化力, *日食工誌*, **37**, 474-477 (1990)
- 16) 工藤重光, 打田悌治, 尾島聡, 大久保一良, 藤波博子, 海老根英雄, 各種味噌の大豆配当体成分組成および味噌の品質に及ぼす大豆サポニンの影響, *日食工誌*, **37**, 786-792 (1990)
- 17) Matsuda, S., Morimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., Ohta, N. and Ueda, S., Solubilization of a novel isoflavone glycoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 439-441, (1994).
- 18) Pyo, Y. H., Lee, T. C. and Lee, Y. C., Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase producing lactic acid bacteria, *Food Res. Int.*, **38**, 551-559, (2005).
- 19) Otieno, D. O., Ashton, J. F. and Shah, N. P., Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*, *Food Res. Int.*, **39**, 394-407, (2006).
- 20) Setchell, K. D., Clerici, C., Lephart, E. D., Cole, S. J., Heenan, C., Castellani, D., Wolfe, B. E., Nechemias-Zimmer, L., Brown, N. M, Lund, T. D., Handa, R. J. and Heubi, J. E., S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora, *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 1072-1079 (2005).
- 21) 中川良二, 能登裕子, 八十川大輔, *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO でつくった発酵豆乳摂取によるヒト糞便性状および有用菌数の変化, 北海道立食品加工研究センター研究報告, **8**, 35-38(2009).