

植物性食品素材から分離した乳酸菌の大豆 イソフラボンのアグリコンへの変換能

上野八重子, 水谷理絵, 工藤卓伸,
原 崇*, 城斗志夫*[§]

新潟大学大学院自然科学研究科
* 新潟大学農学部

Ability to Convert Soy Isoflavone Glucosides
to Aglycones by Lactic Acid Bacteria
from Various Plant Food Materials

Yaeko Ueno, Rie Mizutani, Takunobu Kudo,
Takashi Hara* and Toshio Joh*[§]

Graduate School of Science and Technology, Niigata
University, 2-8050, Ikarashi, Nishi-ku, Niigata 950-2181

* Faculty of Agriculture, Niigata University, 2-8050,
Ikarashi, Nishi-ku, Niigata 950-2181

The conversion of soy isoflavone glucosides to aglycones by intestinal bacteria is necessary for efficient absorption. In this study, 137 strains of lactic acid bacteria were isolated from 58 kinds of plant food materials, and the ability to ferment soymilk and convert soy isoflavone glucosides to aglycones were examined. Thirty-seven strains fully coagulated soymilk during the fermentation for 48 hours. Among them, 17 strains showed high conversion of isoflavone glucosides to aglycones, and many of them were from fruits and vegetables. Bacterial identification showed that conversion ability is related to the strain characteristics, not the species or genus of bacteria.

(Received Nov. 15, 2010 ; Accepted Jan. 4, 2011)

Keywords : lactic acid bacteria, plant food material, soy isoflavone, aglycone, soymilk

キーワード : 乳酸菌, 植物性食品素材, 大豆イソフラボン, アグリコン, 豆乳

大豆イソフラボンは構造がホルモンの一種エストロゲンに類似しており, 骨粗鬆症, 更年期障害, ガン, 心血管疾患などのホルモン系の病気のリスクを低減することが報告されている¹⁾. 大豆イソフラボンは12の構造異性体を持ち, 3つのアグリコン(ダイゼイン, ゲニステイン, グリシテイン)とそれらのグルコース配糖体, マロニル配糖体, アセチル配糖体からなる. 一般に大豆中でイソフラボンは各種配糖体として存在し, アグリコンとして存在するものは少ない. 大豆イソフラボンは配糖体のままでは生体内に吸収されにくく, 効率の良い吸収には配糖体の構造から糖

を除いた部分, すなわちアグリコンになることが必要であり, 腸内細菌のもつ β -グルコシダーゼの働きが重要と考えられている²⁾. したがってヒトにおける大豆イソフラボンの吸収効率は腸内細菌の状態に大きく左右される.

一方, 乳酸菌は糖質の発酵により乳酸を大量に作る一群の細菌であり, プロバイオティクスとして腸内環境を改善し, 宿主に有益な働きをするヒトにとって最も身近な有用細菌である. 近年, 乳酸菌を生息環境により区別する考えが提唱され, 岡田は乳酸菌をチーズやヨーグルトなど乳の発酵に関わる乳系乳酸菌, ヒトの腸管に生息する腸管系乳酸菌, 穀類, 野菜, 果物など植物質の発酵に関わる植物系乳酸菌の三つに区分している³⁾. 前二者の生息する環境は比較的栄養豊富で安定しているが, 後者の環境は植物質の種類により供給される栄養源の種類や量などが様々であること, 所在温度が異なること, アルカロイド類など生育阻害物質が存在することなど, 実に多様である. このため, その環境の数だけバラエティーに富んだ乳酸菌が存在すると考えられる. しかし, 植物系乳酸菌の性質についてはまだ研究が必ずしも多くなく, 今後の研究が期待されている.

微生物を利用して大豆イソフラボン配糖体をアグリコンに変換し, その吸収効率を上げる様々な試みがこれまでになされている⁴⁾. その中には, 腸内善玉菌である乳酸菌やビフィズス菌を利用した研究も多く, 高いアグリコン変換能を持つ *Lactobacillus acidophilus*⁵⁾, *Lactobacillus casei*⁶⁾, *Bifidobacterium longum*⁷⁾などに属する菌株が得られている. それらの報告における乳酸菌の多くは乳由来のものであり, 植物質由来の乳酸菌に関する報告は少ない. また, 広範な植物質の素材からのスクリーニングに関する報告は私たちの知る限りない. そこで本研究では, 大豆イソフラボンの吸収効率の向上を目的に, 果物や野菜, 植物性発酵食品など様々な植物性食品素材から乳酸菌を分離し, 豆乳を発酵させることで, それらの大豆イソフラボン配糖体のアグリコンへの変換能を調べた.

1. 実験方法

(1) 使用菌株

植物性食品素材由来の乳酸菌は, スーパーや市場から購入あるいは新潟市内で採取した果物, 野菜, 発酵食品, 食用花から分離した. 乳酸菌の分離には10 ppmのシクロヘキシミドとアジ化ナトリウムを含むGYP白亜寒天培地⁸⁾を使用し, 30°Cのインキュベーターで24~48時間培養後, 酸の生成により炭酸カルシウムが溶解してクリアゾーンを形成したコロニーを単離した. 1つの分離源より5~20コロニーを取得したが, その中には同じ菌株由来の菌が存在すると予想されることから, 内村等⁹⁾の方法に従い, 細胞の形態観察, グルコースからのガス発生試験, カタラーゼ試験, 生育温度試験, 糖類発酵性試験により形態的性質および生理的性質を調べ, 異なる性質を示した菌株のみを選択した.

〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050

* 〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050

[§] 連絡先 (Corresponding author), joh@agr.niigata-u.ac.jp

乳由来乳酸菌は、製品評価技術基盤機構から入手した *Lactobacillus acidiphiscis* NBRC102164, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NBRC13953, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* NBRC102622, *Lb. casei* NBRC15883, *Lb. helveticus* NBRC15019, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* NBRC102479, 理化学研究所より入手した *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* JCM20026, *Lactococcus lactis* JCM20101 を用いた。

(2) 豆乳発酵性の評価

植物性食品素材より分離した株と、乳由来の乳酸菌 8 株を用い、豆乳に対する発酵能を試験した。各菌を MRS 液体培地⁹⁾に接種し、18~24 時間培養後、培養液を 600 nm の吸光度が 1.0 になるように同培地で希釈し、さらに滅菌水で 100 倍希釈した。この希釈液を豆乳 10 mL に対して 20 μ L 接種し、30°C で 48 時間培養して、12 時間間隔で豆乳の pH および凝固性を調べた。なお、豆乳は太子食品工業株式会社の無調製豆乳を 105°C、1 分間オートクレーブで滅菌し使用した。

(3) 発酵豆乳中の各種イソフラボンの定量

イソフラボンの分析は財団法人日本健康・栄養食品協会が定められた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた分析法⁹⁾に準拠した。各菌で 30°C、48 時間発酵させた 10 mL の豆乳を凍結乾燥後、ヘキサソで脱脂した。これに 15 mL の 70% エタノールを加えて 3 回抽出し、得られた抽出液を合わせて 50 mL に定容し、HPLC の試料とした。HPLC 分析では株式会社日立製作所高速液体クロマトグラフ L-2130, Inertsil ODS-3 カラム (5 μ m, 4.6 \times 250 mm; ジェエルサイエンス株式会社), UV-VIS 検出器 L-4250 (株式会社日立製作所) を使用し、カラム温度 35°C, 注入量 10 μ L, 検出波長 254 nm で分析した。溶離液は A 液 (アセトニトリル: 水: 酢酸/15: 85: 0.1, v/v/v) と B 液 (アセトニトリル: 水: 酢酸/35: 65: 0.1, v/v/v) を用い、流速 1.0 mL/分で B 液の濃度を 50 分間に 0 から 100% まで直線的に上昇させた。各種イソフラボンの定量には標準物質としてダイジン (フジッコ株式会社) を用い、分析法記載の換算係数により定量計算を行い、アグリコン換算値を算出した。

(4) 16S リボソーム DNA の塩基配列による乳酸菌の同定
森の方法¹⁰⁾に従い、分離した菌株の 16S リボソーム DNA を PCR により増幅し、塩基配列を決定した。DNA の抽出にはインスタジーン DNA 精製マトリクス (バイオラッド ラボラトリーズ株式会社) を用い、得られた DNA を鋳型として 16S リボソーム DNA の 5' 末端から約 500 塩基までの領域を文献記載のプライマーを使用して *TaKaRa Ex Taq* (タカラバイオ株式会社) により PCR で増幅した。増幅した DNA 断片の塩基配列を赤外色素標識した M13 プライマーおよび SequiTherm EXEL II DNA Sequencing Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES 社) を用いたジ

デオキシ法で決定した。DNA シーケンサーは LI-COR 社の Model 4000 を用いた。16S リボソーム DNA の相同性検索は BLAST プログラムを用いて行った。

2. 実験結果および考察

(1) 様々な植物性食品素材からの乳酸菌の分離

分離源として 24 種類の果物 (柿 (佐渡産), 柿 (新潟産), 温州みかん, きんかん, 洋梨 (アメリカ産), 洋梨 (ラ・フランス), 洋梨 (ル・レクチェ), 梨 (秀玉), 梨 (幸水), ナツメ, マンゴー, プラム, プルーン, ソルダム, ネクタリン, イチジク, メロン, スイカ, 山法師, カリン, りんご, ブドウ, オレンジ, キウイフルーツ), 13 種類の野菜 (フルーツマト, ゴーヤ, 野菜ミックス, レタス, 白菜, セロリ, ニラ, ホウレンソウ, 青紫蘇, 大根の葉, 長芋, 里芋, ジャガイモ), 17 種類の植物性発酵食品 (白菜キムチ, 大根キムチ, 胡瓜キムチ, 韓国産キムチ, 胡瓜糠漬, ミックス野菜糠床, 芋漬物床, 沢庵, ぶどう漬, にしんの野菜漬, 浅漬野菜, 飯寿司, 麦麴, 豆麴, 発酵茶, 味噌, 生醤油), 4 種類の食用花 (セイジ, キンモクセイ, ナスタチューム, バジルの花) から乳酸菌を分離した。なお、分離のための培養条件として、植物が生育する環境に合わせて好気条件, 培養温度も一般的に乳や腸管系乳酸菌の培養で用いられる 37°C より低い 30°C で培養した。本培養条件で多くの分離源から多数のコロニーが得られ, 1 つの分離源より 5~20 コロニーを取得した。同一分離源由来のコロニーには同じ菌株由来の菌が存在すると予想されるため, それらの形態的および生理的性質を調べ, 性質の異なる菌株のみを分離菌株として選択した。その結果, 58 種類の植物性食品素材から合計 137 株の乳酸菌を分離できた。

様々な分離源のうち, 果物では良く熟したものの, 野菜では傷ついたものから多数の乳酸菌を分離することができ, 逆に果皮が硬く未熟な果実や新鮮な野菜からは分離できなかった。発酵食品ではキムチや糠漬, 糠床から乳酸菌を分離できたが, 浅漬, 味噌, 生醤油, 飯寿司, 芋漬物床, 麴からは分離できなかった。味噌や醤油では発酵初期に存在していた乳酸菌が発酵終期には残存していなかったため, また浅漬では発酵期間がほとんどなかったために乳酸菌が分離できなかったと推察される。内部が嫌気状態にある飯寿司や塩分濃度が非常に高かった芋漬物床からも乳酸菌を分離できなかったが, 本研究では好気条件および一般的な培地で乳酸菌を分離しており, これら特殊な食品素材では各素材に適した条件で培養すれば乳酸菌を得ることができたかもしれない。一方, 食用花ではセイジとキンモクセイより乳酸菌を分離できた。セイジやキンモクセイは蜂蜜の蜜源として利用される花であり, 今回用いたセイジにも浸み出すほどの蜜が存在していた。花の蜜の主要な糖はスクロースであり, 糖類発酵性試験においてセイジとキンモクセイから分離された全ての菌がスクロースを資化したことから (データ示さず), 花に存在する乳酸菌は蜜中の糖を栄

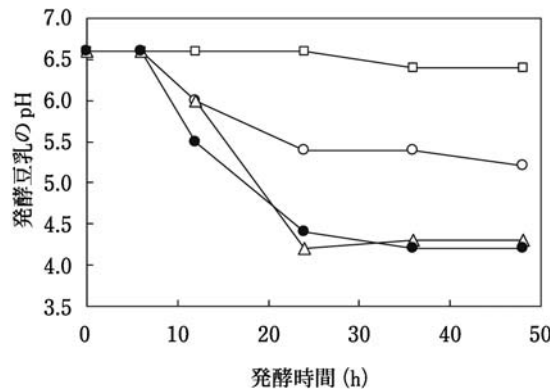


図 1 乳酸菌を接種した豆乳の発酵過程における pH の変化

●, Ret5; △, Pru1; ○, Ka1; □, *Lactobacillus casei*.

表 1 様々な植物性食品素材から分離した乳酸菌の豆乳発酵性

分離源	分離源数	分離株数	豆乳発酵株	アグリコン高変換株
果物	24	66	20 (30.3)	11 (16.7)
野菜	13	17	6 (35.3)	3 (17.6)
発酵食品	17	42	8 (19.0)	2 (4.8)
食用花	4	12	3 (25.0)	1 (8.3)
合計	58	137	37 (27.0)	17 (12.4)

() 内の数字は分離株数に占める豆乳発酵株数およびアグリコン高変換株数の割合 (%) を示している。

養源としており、蜜の多い花は乳酸菌の分離源となり得ることが示された。

(2) 分離した乳酸菌の豆乳発酵性

分離した 137 株の乳酸菌を豆乳に接種し、30°C、48 時間培養後の豆乳の性状を調べた。その結果、85 株では豆乳に凝固が見られたが、52 株では何の変化も観察されず、それらの株には豆乳発酵性がないと判断した。次に、豆乳発酵性が認められた 85 株について発酵過程における豆乳の凝固の様子および pH の変化を調べた。図 1 に示した Pru1 と Ret5 に代表される 37 株では、培養 6 時間以降 pH が急激に低下し、24 時間後には 4.5 以下に達した。それらの菌の発酵豆乳はしっかりと凝固し、48 時間後では豆腐様のゲルを形成した (図 2A)。一方、Ka1 に代表される 48 株では、pH の低下は緩やかであり、48 時間後でも pH は 5.0 以下にならず、凝固した豆乳の強度も低かった。豆乳発酵性の高い 37 株を分離源別に見ると、果物由来が 20 株、野菜由来が 6 株、発酵食品由来が 8 株、食用花由来が 3 株であったが (表 1)、特定の分離源から発酵性の高い菌が多く取れるということとはなかった。分離した乳酸菌と比較するために 8 種類の乳系乳酸菌でも同様に豆乳発酵性を試験した。しかし、*Lb. casei* に代表されるように発酵過程における豆乳の pH の低下はわずかであり、いずれの菌でも 48 時間後の pH は最大 6.0 までしか下がらず (図 1)、豆乳も

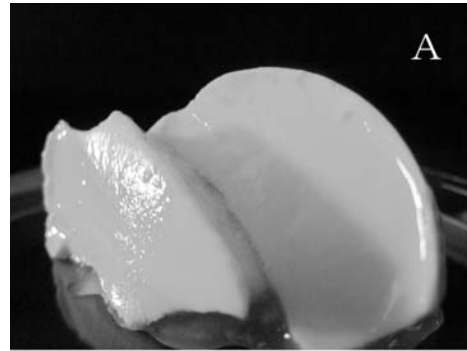


図 2 植物性食品素材から分離した乳酸菌で発酵させた豆乳の性状

A, Pru1; B, Se3.

全く凝固しなかった。培養温度を乳系乳酸菌に適した 37°C に上げてても結果は同じであった。乳系乳酸菌でも豆乳を凝固させたという報告は多い¹¹⁾。それらと本研究では豆乳への菌の接種量に大きな違いがあり、他の報告では前培養液を直接 5% (v/v) 程度加えている。しかし、本研究では数百倍希釈した前培養液を 0.2% (v/v) しか加えておらず、それでも豆乳を凝固させることができた。このことは分離した乳酸菌の豆乳発酵性が極めて高いことを示している。

豆乳発酵性の高い 37 株のうちセロリと長芋、メロンから分離した各 1 株 (Se3, Ng5, Me7) では培養 6~12 時間目において糸を引く様な粘性物質の産生が観察された (図 2B)。一部の乳酸菌は菌体外に粘性多糖を生産することが知られている。その代表的なものは *Leuc. mesenteroides* が産生するデキストランで他にもレバン、グルコースとフルクトースからなる粘性多糖などが報告されており、それらには抗腫瘍活性などの生理機能が期待されている¹²⁾。これら粘性多糖はいずれもスクロースの構成糖であるグルコースとフルクトースの重合体であり、豆乳にもスクロースが含まれることから、本研究における 3 株が産生する粘性物質も同様の構造であるかもしれない。

(3) 分離した乳酸菌の大豆イソフラボンのアグリコンへの変換能

高い豆乳発酵性を示した 37 株を用いて発酵豆乳を調製し、発酵によるイソフラボンの変化を調べた。始めに未発酵豆乳のイソフラボンを分析したところ、マロニル配糖体

がアグリコン換算で 210.4 μg/mL とイソフラボン総量の 65% を占めていた (図 3)。一方、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインのアグリコンは合計 22.6 μg/mL 含まれ、総量の 7% と少なかった。ダイジン、ゲニスチンとグリシチンのグルコース配糖体は合計 90.9 μg/mL 含まれ、総量の 28% であった。また、マロニルグリシチンと 3 つのアセチル配糖体はほとんど検出されなかった。37 株の菌を接種し、30°C で 48 時間発酵させた豆乳中のイソフラボンを分析したところ、菌によりその成分に大きな違いがあった。37 株中 12 株ではグルコース配糖体が 80 μg/mL 以上残っ

ており、発酵による顕著な減少は見られなかった。しかし、25 株では明らかにグルコース配糖体が減少し、それに伴いアグリコンが増加した。一方、マロニル配糖体の量はほとんど変化しなかった。Champagne らは *Lb. helveticus* R 0052 が、Chien らは *Stc. thermophilus* CCRC14085 が豆乳中のマロニル配糖体を減少させたと報告しているが、その減少に見合うアグリコンの増加は見いだされなかった¹³⁾。また、他の多くの研究でもマロニル配糖体のアグリコン化に成功しておらず、今回の結果もそれらと同様であった。なお、一部の発酵豆乳で未発酵豆乳よりマロニル配糖体総

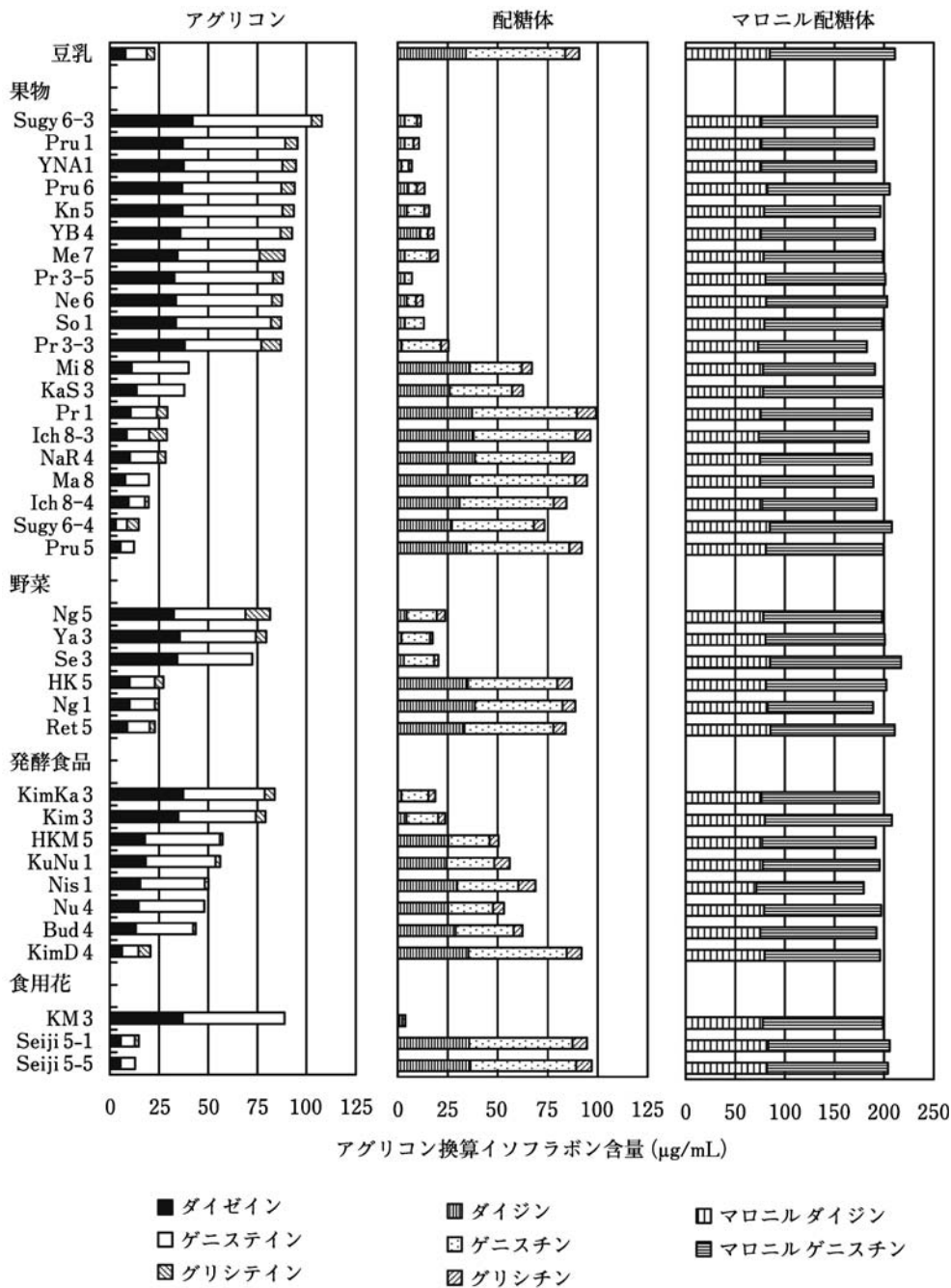


図 3 植物性食品素材から分離した乳酸菌で発酵させた豆乳のイソフラボン含量

量や配糖体総量がわずかに多くなるなど値にバラツキが見られた。発酵豆乳の調製には製造日の異なる複数のロットの市販豆乳を用いており、未発酵豆乳中の各イソフラボンの量はロットにより若干異なった（データ示さず）。したがって、イソフラボン量のバラツキは使用した豆乳のロットの違いによるものと考えられる。

使用した株により発酵豆乳中のアグリコン量が大きく異なったため、各株のイソフラボン配糖体のアグリコンへの変換能を発酵豆乳中のアグリコン量で比較したところ、発酵豆乳中のアグリコン量が70 µg/mL以上に大きく増加したもの（高変換株）、25 µg/mL以下でほとんど増えなかったもの（低変換株）、その中間のもの（中変換株）の3つのグループに大別でき、37株のうち17株が高変換株、11株が中変換株、9株が低変換株に分類された。17株の高変換株のうち14株は果物と野菜由来の株であったが（表1）、特定の分離源から高変換株が多く分離されたということとはなかった。本研究で分離した高変換株は既報の動物由来の高変換株に比べ豆乳発酵性が非常に高いことから、豆乳発酵食品の製造に利用することで大豆イソフラボンの吸収率を向上させることが可能であると考えられた。

(4) 分離した乳酸菌の同定

分離した乳酸菌のうち高変換株と低変換株の各3株について16SリボソームDNAの部分塩基配列を決定し、DNAデータベースを用いて相同性検索を行った。その結果、高変換株である梨（秀玉）由来の Sugy6-3 は *Leuconostoc citreum*、ブルーベリー由来の Pru1 は *Leuconostoc pseudo-mesenteroides*、洋梨（アメリカ産）由来の YNA1 は *Weiselia cibaria*、低変換株であるレタス由来の Ret5 は *Lactococcus lactis*、セイジ由来の Seiji5-1 は *Leuc. citreum* と同定できたが、白菜由来の HK5 は *Leuc. lactis* と *Leuconostoc garlicum* に対し全く同じ99.7%の相同性を示し種の同定はできなかった。同定した6株のうち4株が *Leuconostoc* 属であり、同属の乳酸菌は漬物など発酵野菜からよく分離されることから、植物性食品素材を分離源とした本研究で得られた菌にも同属の菌が多く含まれると推察される。また、乳酸菌の属や種とイソフラボン配糖体のアグリコンへの変換能の関係を見ると、同じ *Leuc. citreum* でも Sugy6-3 は高変換株、Seiji5-1 は低変換株と分かれており、アグリコン変換能は乳酸菌の属や種とは関係なく各株の特性であることが示された。

3. 要 約

様々な植物性食品素材から乳酸菌を分離し、豆乳発酵性および大豆イソフラボン配糖体のアグリコンへの変換能を調べた。58種類の果物、野菜、植物性発酵食品、食用花から137株の乳酸菌を分離した。37株は48時間の発酵により豆乳をしっかりと凝固させ、乳由来の乳酸菌より高い豆乳発酵性を示した。そのうち17株はイソフラボン配糖体

のアグリコンへの変換能が高く、その多くは果物と野菜由来であった。一部の菌の同定結果より、本研究で得られた菌には *Leuconostoc* 属の菌が多く含まれると推察され、アグリコン変換能は乳酸菌の属や種とは関係なく各株の特性であることが示された。

文 献

- 1) Frank, M.S., Alice, L., Linda, V.H., William, H., Penny, K. E. and Mary, W., Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health, circulation. *J. Am. Heart Assoc.*, **113**, 1034-1044 (2006).
- 2) Setchell, D.R., Kenneth, B.M.N., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W., Wolfe, E.B., Kirschner, S.A. and Heubi, E. J., Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 447-453 (2002).
- 3) 岡田早苗, 乳酸菌の定義と分類・同定, 「乳酸菌の科学と技術」, 第1版, 乳酸菌研究集談会編, (学会出版センター, 東京), pp. 12-16 (2003).
- 4) Tsangalis, D., Ashton, J.F., McGill, A.E.J. and Shah, N.P., Biotransformation of isoflavones by bifidobacteria in fermented soymilk supplemented with D-glucose and L-cysteine. *J. Food Sci.*, **68**, 623-631 (2003).
- 5) Chien, H., Huang, H. and Chou, C., Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, **23**, 772-778 (2006).
- 6) Otieno, D.O., Ashto, 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).
- 7) Tangalis, D., Ashton, J.F., McGill, A.E.J. and Shah, N.P., Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase-producing bifidobacteria. *J. Food Sci.*, **67**, 3104-3113 (2002).
- 8) 内村 泰, 岡田早苗, 乳酸菌の分離・保存法および乳酸菌の同定実験法, 「乳酸菌実験マニュアル—分析から同定まで—」, 小崎道雄監修 (朝倉書店, 東京), pp. 6-61 (1992).
- 9) 大豆イソフラボンの試験方法, 「健康補助食品規格基準集その2」, (財団法人日本健康・栄養食品協会, 東京), pp. 140-143 (2003).
- 10) 森 勝美, 16SリボソームRNA遺伝子情報を利用した乳酸菌の同定システム, 醸協, **92**, 188-194 (1997).
- 11) Marazza, J.A., Garro, M.S. and Giori, G.S., Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. *Food Microbiol.*, **26**, 333-339 (2009).
- 12) 内田金治, 乳酸菌の構造と菌体成分, 「乳酸菌の科学と技術」, 第1版, 乳酸菌研究集談会編 (学会出版センター, 東京), pp. 84-88 (2003).
- 13) Champagne, C.P., Tompkins, T.A., Buckley, N.D. and Green-Johnson, J.M., Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiol.*, **27**, 968-972 (2010).

(平成22年11月15日受付, 平成23年1月4日受理)