

## 学位論文の要旨

論文題目 *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆の食品栄養学的研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学 専攻

学生番号 D156219

氏名 亀田 剛 旨

## 第1章 序論

大豆は三大栄養素である炭水化物、タンパク質、脂質を豊富に含み、また大豆オリゴ糖、大豆イソフラボン、大豆サポニンなど大豆特有の機能性成分も有することから、栄養学的に優れた食品素材である。歴史的には、大豆の食習慣はアジア地域にしか存在しなかったが、20世紀初め頃から米国や欧州においてもその栄養価の高さから食される機会が増えてきた。大豆は様々な形態に加工されて食されるが、大豆加工食品は非発酵食品と発酵食品に大別される。日本国内での大豆加工食品においては、前者には豆腐、きな粉、豆乳などが、後者には納豆、醤油、味噌などが挙げられる。一般的に、発酵食品は、微生物や原材料由来の酵素反応により嗜好性や消化吸収性が向上することが知られている。2013年に、和食がユネスコ無形文化遺産に登録されたことも契機となり、和食を特徴づける食品としても、大豆発酵食品には世界的に大きな関心が集まっている。日本以外においても大豆発酵食品が知られ、東南アジア地域、特にインドネシアで多く食されているテンペは、脱皮した大豆を煮た後に、クモノスカビと呼ばれる *Rhizopus* 属の糸状菌により発酵させることにより作られる。外観は白色の菌糸で覆われており、大豆はブロック状に固く結合した形状を呈している。納豆のような特徴的なクセのある臭いや粘りがなく、近年では特にベジタリアンを中心に良質なタンパク源として広く食されており、欧米諸国においても製造、販売されている。

近年、このテンペに関して食品の国際規格であるコーデックスが制定され、発酵菌株として *Rhizopus oligosporus*、*Rhizopus oryzae*、*Rhizopus stolonifer* のいずれかを使用することが定められている。しかしながら、これまでテンペ製造の多くはスターターとして、*R. oligosporus* もしくは *R. oryzae* を使用しており、そのため以前までのほとんどの研究はこれらの菌株を用いて製造したテンペに関するものであった。一方で、*R. stolonifer* の利用は非常に限られており、この菌を用いたテンペの機能性に関する注目がなされていた。さらに、これら3種の菌株を用いたテンペの比較研究についても未だ行われていない。そこで、本研究ではこれら3種の *Rhizopus* 属糸状菌による発酵大豆について、それらの食品栄養学的な特性を明らかにすることを目的とした。

第2章 *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆におけるイソフラボン組成の評価

本章では大豆特有の機能性成分の一種であるイソフラボンに着目し、それぞれの *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆中のイソフラボン組成の特徴を明らかにした。イソフラボンには、抗酸化、抗ガン、抗糖尿など様々な機能性を有することが報告されている。大豆中のイソフラボンは、基本骨格を有するアグリコンであるダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインおよびそれらの種々の配糖体からなる。配糖体としては、 $\beta$ -グルコシド配糖体、マロニル型配糖体、アセチル型配糖体などが報告されている。生大豆中では、イソフラボンの多くはマロニル型配糖体および  $\beta$ -グルコシド配糖体として存在しているが、これら配糖体は食品加工の過程により、アグリコンへと変化することが報告されている。特に発酵大豆においては、発酵中の微生物由来酵素の作用により、アグリコン化が促進されやすい。ア

グリコンは配糖体と比較して吸収性が高いと考えられており、さらに、アグリコンの一種であるダイゼインは腸内細菌叢の代謝により、生理活性のより高いエクオールに変換されることも報告されている。このような背景から、アグリコン型のイソフラボンを高含有する大豆食品の開発が盛んに行われている。

本研究では、コーデックスで定められた3種の *Rhizopus* 属糸状菌を用いて、発酵大豆を調製した。調製した発酵大豆は凍結乾燥後、70%エタノールによりイソフラボン類を抽出し、HPLC法によりイソフラボン組成を分析した。その結果、全ての発酵大豆において、非発酵の蒸煮大豆と比較して、アグリコン含量が増加した。特に、*R. stolonifer* を用いた発酵大豆は他の種を用いた発酵大豆と比較して、アグリコン含量が顕著に高いことがわかった。次に、発酵温度の影響を評価したところ、菌種により発酵可能な温度は異なり、アグリコン含量が最も高くなる最適な発酵温度が異なることが明らかとなった。また、発酵時間のアグリコン含量に与える影響を検討したところ、*R. oligosporus* および *R. stolonifer* では、発酵時間が延びるにつれ、アグリコン含量が高くなったのに対して、*R. oryzae* では24時間のときに最もアグリコン含量が高く、それ以降は減少した。さらに、発酵大豆中のイソフラボン組成の違いの要因を明らかにするために、イソフラボン配糖体からアグリコンの生成に関与するβ-グルコシダーゼ活性を測定した。その結果、イソフラボン組成の結果から予想された結果に反して、*R. oryzae* を用いた発酵大豆のβ-グルコシダーゼ活性が最も高かった。その要因として、酵素活性測定の条件が発酵中の条件と異なることが考えられた。また、アグリコンの生成にβ-グルコシダーゼ以外の酵素が関与している可能性も考えられた。

### 第3章 高脂肪食摂取ラットにおける *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆の摂取影響の評価

本章では、3種の *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆を摂取させた影響について、高脂肪食摂取ラットを用いて評価した。試験食は30%牛脂を含むコントロール食群、およびコントロール食に *R. oligosporus*、*R. oryzae*、および *R. stolonifer* を用いて調製した発酵大豆凍結乾燥粉末をそれぞれ20%ずつ配合した(それぞれ、RM群、RO群、およびRS群とした)計4群に群分けた。各群の脂質、タンパク質、塩類、および食物繊維の量は、それぞれ牛脂、カゼイン、塩類混合粉末、およびセルロースにより補正した。実験動物には、3週齢Sprague-Dawley系雄性ラットを用い、12時間明暗交代の恒温環境下で飼育した。予備飼育後、試験食を一定量の制限食として与え、脱イオン水は自由摂取させて21日間飼育した(各群10匹)。

その結果、最終体重、および食餌摂取量について、各群間での有意差は確認されなかったものの、RM群およびRS群において、体重増加量が僅かではあるが有意に高かった。血清中の肝障害関連パラメーターを測定した結果、RO群においてアンモニアのみが有意に減少したことを除き、RM群とRO群はコントロール群と比較して、AST、ALT、γ-GTP、総ビリルビン、アンモニア、アルブミン、およびLDHへの影響は認められなかった。一方、RS群においては、AST(-21%)、総ビリルビン(-50%)、およびアンモニア(-13%)が有意に減少した。さらにALT(-12%)とLDH(-28%)については、減少傾向が確認された。また、いずれの発酵大豆摂取群においても、肝臓の重量、トリグリセリド、脂質過酸化物質に変化は認められなかったが、総コレステロールはRM群、RO群、およびRS群でいずれも有意に減少した。さらに興味深いことに、いずれの発酵大豆摂取群においても、遊離コレステロールはより顕著に減少していた(RM群、RO群、およびRS群、それぞれ-40%、-45%、および-45%)。肝臓中の遊離コレステロールは非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)を引き起こす要因の一つとなることが近年の研究で報告されている。したがって、RS群において、ASTや総ビリルビン、アンモニアなどの肝障害に関連する血清マーカーが減少した要因の一つとして、肝臓中の遊離コレステロールが減少したことが考えられた。また、*R. stolonifer* を用いた発酵大豆中のいかなる成分が肝臓機能改善に寄与したかについて明らかにすることが、今後の研究課題であると考えられた。

### 第4章 総合考察

本研究は、テンペのコーデックスで規定された3種の *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆について、その食品栄養学的な特性を明らかにすることを目的とした。その結果、*R. stolonifer* を用いた発酵大豆は、他の *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆と比較して、アグリコン型のイソフラボンを高含有する

ことを見出し、*R. stolonifer* を用いた発酵大豆の食品機能性をはじめて明らかにした。さらにラットを用いた動物試験により、*R. stolonifer* を用いた発酵大豆の摂取による肝機能改善効果が示唆され、他の *Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆より優れていることを実証した。本研究は、これまでテンペの発酵菌株として注目されていなかった *R. stolonifer* を用いた発酵大豆に関する新規機能性を示すものであり、*Rhizopus* 属糸状菌を用いた発酵大豆の研究開発において新たな視点を提供する。また、本研究で得られた知見をさらに深めることにより、健康維持や疾病予防に寄与する新規な発酵食品の開発への貢献が期待される。