

# 長期間熟成した黒大豆及び金時豆を添加した米味噌の 抗酸化活性とメラノイジン

姜成宇<sup>1,2</sup>・慈照紅<sup>1,2</sup>・小嶋道之<sup>2,3</sup>

(受付 : 2019 年 4 月 26 日, 受理 : 2019 年 7 月 3 日)

Antioxidant Activity and Melanoidin Content in Rice Miso Supplementary with  
Black Soybean and Kidney Bean for Long-term Fermentation

Chengyu Jiang<sup>1,2</sup>, Zhaohong Ci<sup>1,2</sup>, Michiyuki Kojima<sup>2,3</sup>

## 要 旨

大豆と米麴の発酵食品である米味噌は、日本の伝統的な調味食品で、栄養機能性の高いことが知られている。これまでに黒大豆を添加して長期熟成した米味噌 (RM-BS) 及び金時豆を添加して長期熟成した米味噌 (RM-KB) は、普通の米味噌 (RM) よりも、抗酸化活性とメラノイジン含量が高いことを明らかにした。その原因を探る目的で、ODS カラム分画物の解析を行った。36 ヶ月熟成した RM-BS 及び RM-KB の大きな分子サイズのメラノイジン量は仕込み直後のもの (0 ヶ月熟成) に比べて約 250% 高く、小さな分子サイズのメラノイジン量は約 40% 低かった。この結果は、RM-BS と RM-KB の抗酸化活性が長期間熟成により増加したのは、大きな分子サイズのメラノイジンが増加したことと関係があることを示唆している。

キーワード : 米味噌、黒大豆、金時豆、メラノイジン、抗酸化活性

---

<sup>1</sup> 帯広畜産大学畜産科学食品科学研究部門

<sup>1</sup> Department of Food Science, Obihiro university of Agriculture and Veterinary Medicine

<sup>2</sup> 岩手大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻

<sup>2</sup> Department of Bioresources Science, United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University

<sup>3</sup> 帯広畜産大学畜産科学人間科学研究部門

<sup>3</sup> Department of Human Science, Obihiro university of Agriculture and Veterinary Medicine

連絡先 : 小嶋道之, kojima@obihiro.ac.jp

Address Correspondence : Michiyuki KOJIMA, kojima@obihiro.ac.jp

## 諸 言

北海道産の黒大豆や金時豆などは、品質がよく、ブランド品として取り引きされている。それらの豆類には、多くのポリフェノール類を含んでおり、抗酸化作用、抗肥満作用、心血管疾患や骨粗鬆症のリスク低下作用及び肝保護作用などの生理活性を示すことが報告されている（吉川ら 2009；小嶋ら 2006；齋藤ら 2007；Linら 2016）。

米味噌は、米麴と黄ダイズを用いて、通常6ヵ月程度の熟成により作られる発酵加工品である。また、豆味噌は大豆と豆麴を用いて長期熟成された発酵加工品で、熟成により米味噌よりもうまみやこくが増大することが知られている。これまでに、味噌にはDPPHラジカル消去活性や生体内抗酸化作用のあること（渡邊 2010；桐原ら 2015）や味噌の熟成過程に生じるメラノイジンと抗酸化活性との間に相関のあることが報告されている（呉ら 2015）。しかし、黒大豆や金時豆を添加した味噌の抗酸化活性及びメラノイジン含量に関する報告は見られない。

本研究は、黒大豆及び金時豆を添加して長期熟成した米味噌の抗酸化活性が高くなる原因を探る目的で、米味噌抽出液をODSカラムで分画して得られた画分の成分や特性の解析を行った。

## 実験方法

### 1. 実験材料及び調製

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)は東京化成工業株式会社（東京、日本）、トロロックスはシグマアルドリッチ ジャパン合同会社（東京、日本）、グルコースとグリシンは関東化学株式会社（東京、日本）、Chromatorex ODS(100-200 mesh)はFUJI SILYSIA化学株式会社（ノースカロライナ州、アメリカ）、その他の一般試薬類は和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から購入した。

米味噌製造に用いた黒大豆 (*Glycine max*)、金時豆 (*Phaseolus vulgaris* L.)、黄大豆 (*Glycine max*)、米麴、食塩、種味噌は市内のスーパーで購入した。

通常の米味噌製造法（東 2008）に従い、黒大豆を添加した米味噌 (RM-BS) を製造した。すなわち、1.25kgの大豆と等量の黒大豆は25℃、16時間浸漬し、110℃、20分間オートクレーブした。煮豆は混合してミキサーで2回潰し、豆餡を得た。2.5kgの米麴を加え、1kgの食塩、適量の種水、400gの種味噌を混合して発酵・熟成させた。また、金時豆を添加した米味噌 (RM-KB) も同様の手順に従い製造した。発酵期間0ヶ月 (0Mと表す、以下同様)、3ヶ月 (3M)、6ヶ月 (6M)、24ヶ月 (24M)、36ヶ月 (36M)の米味噌は、複数箇所から採取して、分析に用いた。

### 2. 米味噌抽出液の調製及びODSカラム分画

米味噌5gに20mLの80%エタノール及び70%アセトンを加えて3回ずつ抽出した（齋藤ら 2007）。得られた抽出液は減圧乾固して、20mLの蒸留水に溶解し、同量のn-ヘキサン及び酢酸エチルを加えて分配して、下層を味噌の水溶性画分として調製した（池田らの改良法 1995）。その一定量はODSカラムに共して、段階的に水-メタノール系溶媒（10:0、8:2、6:4、4:6、2:8、0:10の比率）で溶出させ、各分画物はFra. 0、Fra. 20、Fra. 40、Fra. 60、Fra. 80、Fra. 100とした。

### 3. メラノイジン含量及び抗酸化活性の測定

メラノイジンの定量はMartinsら（2003）の方法により行った。結果は1g乾燥重量当たりのメラノイジン相当量として表示した。また、ABTSラジカル消去活性の測定は沖ら（2005）の改良法により行った。結果は1g乾燥重量当たりのトロロックス相当量として表示した。DPPHラジカル消去活性の測定はBrand-Williamsら（1995）の改良法により行った。結果は1g乾燥重量当たりのトロロックス相当量として表示した。

### 4. 統計処理

それぞれ実験の分析項目は3回以上の測定を行い、

平均値±標準偏差で表した。有意差検定はSAS 7.1 ソフトを用い、一元配置の分散分析及び多重比較としてFisher(LSD) 検定を行った。危険率5%未満の場合を有意差があるとした。

## 結果と考察

### 1. RM-BS と RM-KB 抽出液の ODS カラム分画物に含まれるメラノイジン含量

RM-BS 抽出液と RM-KB 抽出液は、それぞれ ODS カラムに共して、水-メタノール系溶媒で6画分 (Fra. 0、Fra. 20、Fra. 40、Fra. 60、Fra. 80、Fra. 100) に分画した。ODS カラムは、水-メタノール系溶媒のメタノール比率を増やすことにより、低分子量から高分子量の化合物を順に溶出することができる (香川 2011)。各熟成期間のメラノイジン含量の最大値は、RM-BS の 36M で 31.3 mg/g DW miso を示し、RM-KB の 24M では、19.3 mg/g DW miso を示した (Table. 1)。RM-BS 抽出液において、0M の ODS カラム Fra. 0 の割合は 77%、3M のそれは 48%、6M で

は 49%、24M では 42%、36M では 42% を示した。さらに 0M の ODS カラム Fra. 20 の割合は 15%、3M のそれは 16%、6M では 21%、24M では 24%、36M では 24% を示した。ODS カラム Fra. 40 の割合は 0M では 8%、3M では 25%、6M では 21%、24M では 28%、36M では 28% を示した。すなわち、ODS カラム Fra. 0 の割合は 0M から 36M までに 77% から 42% まで減少し、ODS カラム Fra. 20 及び Fra. 40 の割合はそれぞれ 15% から 24% 及び 8% から 28% まで増大した。また、RM-KB 抽出液においても同様の傾向がみられた。すなわち、0M から 36M までに ODS カラム Fra. 0 の割合は 76% から 39% まで減少し、Fra. 20 の割合は 12% から 19% まで、Fra. 40 の割合は 12% から 33% まで増大した。

### 2. RM-BS と RM-KB 抽出液の ODS カラム分画物に含まれる抗酸化活性

ODS カラム溶出画分の ABTS ラジカル消去活性の結果は Table. 2 に示した。今回調製した RM-BS 抽出液と RM-KB の抽出液の全 ABTS ラジカル消去活性は米味噌の熟成期間が長くなるに伴い、いずれも増大した。すなわち、RM-BS の ABTS ラジカル消去活性は、36M が最大値 8.1

Table.1 Melanoidin content in RM-BS and RM-KB fractioned by ODS column.

Fractions	RM-BS										RM-KB									
	0M		3M		6M		24M		36M		0M		3M		6M		24M		36M	
	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)
Fra.0	1.0	77	2.9	48	9.3	49	12.7	42	13.0	42	1.3	76	1.3	46	5.5	48	7.9	42	6.0	39
Fra.20	0.2	15	1.0	16	4.0	21	7.1	24	7.4	24	0.2	12	0.4	14	2.1	18	3.6	19	2.9	19
Fra.40	0.1	8	1.5	25	4.0	21	8.5	28	8.8	28	0.2	12	0.8	29	2.8	24	6.4	34	5.0	33
Fra.60	nd	nd	0.1	2	0.3	2	0.9	3	1.1	4	nd	nd	0.1	4	0.3	3	0.3	2	0.6	4
Fra.80	nd	nd	0.3	5	0.2	1	0.2	1	0.3	1	nd	nd	nd	nd	0.2	2	0.2	1	0.2	1
Fra.100	nd	nd	0.3	5	1.0	5	0.5	2	0.7	2	nd	nd	0.2	7	0.6	3	0.3	2	0.6	4
Total value	1.3	100	6.1	100	18.8	100	29.9	100	31.3	100	1.7	100	2.8	100	11.5	100	18.7	100	15.3	100

Abbreviations: M, month; RM-BS, rice miso with black soybean; RM-KB, rice miso with kidney bean; nd, not detected

Table.2 ABTS radical scavenging activity in RM-BS and RM-KB fractioned by ODS column.

Fractions	RM-BS										RM-KB									
	0M		3M		6M		24M		36M		0M		3M		6M		24M		36M	
	( $\mu$ mol/g)	(%)	( $\mu$ mol/g)	(%)	( $\mu$ mol/g)	(%)	( $\mu$ mol/g)	(%)	( $\mu$ mol/g)	(%)	( $\mu$ mol/g)	(%)	( $\mu$ mol/g)	(%)	( $\mu$ mol/g)	(%)	( $\mu$ mol/g)	(%)	( $\mu$ mol/g)	(%)
Fra.0	0.5	83	2.0	77	3.0	65	4.0	56	4.1	51	0.5	83	0.8	73	1.7	66	2.5	59	2.3	57
Fra.20	0.1	17	0.5	19	1.3	28	2.4	34	2.7	33	0.1	17	0.2	18	0.7	26	1.2	28	1.0	25
Fra.40	nd	nd	0.1	4	0.3	7	0.7	10	1.0	12	nd	nd	0.1	5	0.2	7	0.5	11	0.5	12
Fra.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.2	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	3
Fra.80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	2
Fra.100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total value	0.6	100	2.6	100	4.6	100	7.1	100	8.1	100	0.6	100	1.1	100	2.6	100	4.2	100	4.0	100

Abbreviations: M, month; RM-BS, rice miso with black soybean; RM-KB, rice miso with kidney bean; nd, not detected

μmol/g DW miso を示し、RM-KB のそれは、24M が最大値 4.2 μmol/g DW miso を示した。RM-BS 抽出液の ODS カラム Fra. 0 の抗酸化活性の割合は 0M では 83%、3M では 77%、6M では 65%、24M では 56%、36M では 51% に変化した。また、ODS カラム Fra. 20 の抗酸化活性の割合は 0M では 17%、3M では 19%、6M では 28%、24M では 34%、36M では 33% に変化した。また、ODS カラム Fra. 40 の抗酸化活性の割合は 0M では 0%、3M では 4%、6M では 7%、24M では 10%、36M では 12% に変化した。すなわち、ODS カラム Fra. 0 の抗酸化活性の割合が熟成開始時に 83% であったものが、36M で 51% に減少し、ODS カラム Fra. 20 のそれは熟成開始に 17% であったものが 36M で 33%、ODS カラム Fra. 40 のそれは熟成開始に 0% であったものが 36M で 12% に増大することが分かった。また、RM-KB 抽出液においても同様の傾向がみられた。すなわち、ODS カラム Fra. 0 の割合は 83% から 57% まで減少し、Fra. 20 の割合は 17% から 25% まで、Fra. 40 の割合は 0% から 12% ま

で増大した。

DPPH ラジカル消去活性の結果は Table. 3 に示した。主な抗酸化活性は ODS カラム Fra. 0 に見られた。しかし、ODS カラム Fra. 0 と Fra. 20 及び Fra. 40 の割合は熟成が長くなるにつれて変化が見られた。特に、RM-BS では、0M から 36M までに ODS カラム Fra. 0 の割合は 100% から 41% まで減少し、Fra. 20 の割合は 0% から 35% まで、Fra. 40 の割合は 0% から 14% まで増加した。または、長期熟成により RM-KB 抽出液も同様な変化が見られ、ODS カラム Fra. 0 の割合は減少し、Fra. 20 と Fra. 40 の割合は増大した。

### 3. RM-BS 抽出液と RM-KB 抽出液の ODS カラム分画物に含まれる抗酸化活性とメラノイジン含量との関係

米味噌抽出液のメラノイジン含量と ABTS ラジカル消去活性の相関関係は Figure 1 に示した。RM-BS の相関係数  $R_1$  は 0.9642、RM-KB のその  $R_2$  は 0.9479 で、それ

Table.3 DPPH radical scavenging activity in RM-BS and RM-KB fractioned by ODS column.

Fractions	RM-BS										RM-KB									
	0M		3M		6M		24M		36M		0M		3M		6M		24M		36M	
	(μmol/g)	(%)	(μmol/g)	(%)	(μmol/g)	(%)	(μmol/g)	(%)	(μmol/g)	(%)	(μmol/g)	(%)	(μmol/g)	(%)	(μmol/g)	(%)	(μmol/g)	(%)	(μmol/g)	(%)
Fra.0	0.2	100	1.0	91	2.3	68	1.8	42	2.0	41	0.1	100	0.4	100	1.2	63	1.6	52	1.2	46
Fra.20	nd	nd	0.1	9	0.9	26	1.6	37	1.7	35	nd	nd	nd	nd	0.4	21	0.8	25	0.9	33
Fra.40	nd	nd	nd	nd	0.2	6	0.7	16	0.7	14	nd	nd	nd	nd	0.2	11	0.4	12	0.4	16
Fra.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	2	0.2	4	nd	nd	nd	nd	0.1	5	0.2	7	0.1	5
Fra.80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	2	0.2	4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	5	nd	nd
Fra.100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total value	0.2	100	1.1	100	3.4	100	4.3	100	4.9	100	0.1	100	0.4	100	1.9	100	3.1	100	2.6	100

Abbreviations: M, month; RM-BS, rice miso with black soybean; RM-KB, rice miso with kidney bean; nd, not detected

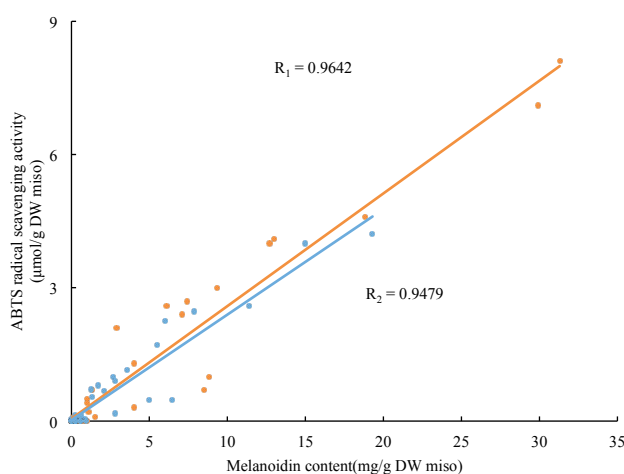


Figure 1. The relationship between ABTS radical scavenging activity and melanoidin content in RM-BS and RM-KB.  $R_1$ : correlation coefficient of RM-BS,  $R_2$ : correlation coefficient of RM-KB.

ぞれ正の高い相関が認められた。すなわち、メラノイジン量が高いほど、抗酸化活性も高い傾向にあることが示された。煎じた鎮江香酢の抗酸化活性は、メラノイジン含量の増大と共に増加することが報告されている (Liuら 2016)。また、麦味噌の熟成期間が長いとその抗酸化活性が増大し、抗酸化活性と熟成中に生じる着色物質との間に相関性のあることが報告されている (岩屋ら 2001)。大きな分子サイズのメラノイジンは著しく強い抗酸化活性を有し、メラノイジン組成が抗酸化活性の強さに影響を及ぼすことが報告されている (Adamsら 2012)。黒大豆及び金時豆を添加した米味噌を長期間熟成すると抗酸化活性が増加したのは、大きな分子サイズのメラノイジン量が増加したことに関係していると考えられている。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、岩手大学連合農学研究科に深甚なる謝意を示します。また、実験に御協力頂いた帯広畜産大学食品科学の大学院生ならびに学部学生諸氏に深謝いたします。

## 参考文献

Adams A, Kitrytė V, Venskutonis R, & De Kimpe N. 2012. Impact of lipid oxidation-derived aldehydes and ascorbic acid on the antioxidant activity of model melanoidins. *Food Chemistry*, 135(3). 1273-1283.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel -Wissenschaft & Technologie*, 28:25-30.

吉川秀樹, 桑島千栄, 小垂 眞. 2009. インゲン豆中の  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性とその性質. 京

都光華女子大学研究紀要, 47:227-237.

呉 珊, 豊 碩, 小嶋道之. 2015. 日本味噌2種と中国味噌(醬)3種の理化学特性及び抗酸化活性. 帯広畜産大学学術研究報告, 36:29-36.

東 和男. 2008. 東 和男編, 発酵と醸造 I (味噌・醤油の生産ラインと分析の手引き), 第3版, pp.61-90. 光琳株式会社, 東京.

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(5):322-327.

岩屋あまね, 亀沢浩幸, 下野かおり, 間世田春作. 2001. 多麴麦味噌の機能性に関する研究. 鹿児島県工業技術センター研究報告, 14:31-34.

香川信之. 2011. 高速液体クロマトグラフィーを用いた高分子の分析. *ネットワークポリマー*, 32(5):283-289.

桐原広成, 古口久美子, 松本健一. 2015. 米味噌の抗酸化能を高める製造方法に関する研究. 栃木県産業技術センター研究報告, No. 12.

小嶋道之, 山下慎司, 西 繁典, 齋藤優介, 前田龍一郎. 2006. 小豆ポリフェノールの生体内抗酸化活性と肝臓保護作用. *日本食品科学工学会誌*, 53(7):386-392.

Lin WH, Yang HW, Hsu CK, Jhan HK, Lo DY. 2016. Black Soybean Shows Protective Function against Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage in Sprague-dawely Rats. *Journal of Botanical Sciences*, 5(1): 7-15.

Liu JY, Gan J, Yu YJ, Zhu SH, Yin LJ, Cheng YQ. 2016. Effect of laboratory-scale decoction on the antioxidative activity of Zhenjiang Aromatic Vinegar: The contribution of melanoidins. *Journal of Functional Foods*, 21:75-86.

Martins SIFS, Van Boeke MAJS. 2003. Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. *Food Chemistry*, 83:135-142.

- 沖 智之, 永井沙樹, 太田英明, 須田郁夫. 2005. シークワーサー果汁のラジカル消去活性. *九州農業研究*, 67:43.
- 齋藤優介, 西 繁典, 小嶋 浩, 弘中和憲, 小嶋道之. 2007. 豆類ポリフェノールの抗酸化活性ならびに $\alpha$ -アマラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性. *日本食品科学工学会誌*, 54(12):563-567.
- 渡邊敦光. 2010. お味噌の効能. *日本醸造協会誌*, 105:714-723.

## Abstract

Rice miso is a traditional Japanese seasoning food which is fermented by soybean and rice-koji with high nutritional functionality. Rice miso supplementary with black soybean (RM-BS) and rice miso supplementary with kidney bean (RM-KB) have significantly higher antioxidant activity and melanoidins content than those of rice miso, and they are increased with prolong the fermentation period. In the present study, to investigate the reason of increasing antioxidant activity and melanoidin content, we analyzed the fractions after ODS column. To compared with rice miso of 0 Months fermented, the ratio of large molecular size of melanoidins contained in RM-BS-36M and RM-KB-36M were increased about 250%, and small molecular size of melanoidins were decreased to about 40%. Therefore, it is expected that antioxidant activity of RM-BS and RM-KB was related to large molecular size of melanoidins.

**Keywords:** rice miso, black soybean, kidney bean, melanoidins, antioxidant activity