

大豆発酵食品の α -グルコシダーゼ阻害活性に及ぼす影響

藤本(中川) 孝子・細川 ちはる*・条 美智子**

Inhibitory effects of traditional fermented soybean products on α -glucosidase activity

Takako FUJIMOTO(NAKAGAWA), Chiharu HOSOKAWA*, Michiko JO**

E-mail: fuji26@edu.u-toyama.ac.jp

Abstract

Type 2 diabetes has emerged as a major health concern worldwide. For the treatment of type 2 diabetes, α -glucosidase inhibitors are used as a standard medical treatment. In this study, the inhibitory effects of soybean and its fermented products, tempe, natto, hama-natto, and touchi, on the activity of rat intestinal α -glucosidase, a key digestive enzyme linked to type 2 diabetes, were investigated *in vitro*. Fermented soybean products exhibited stronger inhibitory effects than did unfermented soybeans. Although further *in vivo* studies are necessary, these results may partly explain the usefulness of traditional fermented soybean products in promoting health via their ability to reduce postprandial hyperglycemia.

キーワード：大豆, 発酵食品, α -グルコシダーゼ

keywords: soybean, fermented food products, α -glucosidase

I. はじめに

わが国における糖尿病患者数は、食生活の欧米化への変化とともに増加してきた。平成24年国民健康・栄養調査結果によると、「糖尿病が強く疑われる者」は約950万人、「糖尿病の可能性を否定できない者」は約1,100万人と推計されている¹⁾。近年は、これに高齢化の進行が加わり、医療経済面からも深刻な社会問題となっており、その対策が課題となっている。

2型糖尿病は、偏食、過食、運動不足など食生活をはじめとする日頃の生活習慣の影響が指摘されている生活習慣病の代表的なものであり、わが国の糖尿病患者総数の9割以上を占めている。その発症や進展には食後の高血糖状態が深く関与していること、さらに心筋梗塞などの動脈硬化性疾患における独立した危険因子であることが近年の疫学研究より明らかにされている^{2,3)}。このことから、2型糖尿病の発症や進展予防においては、食後の高血糖状態の

コントロールが重要であると考えられている⁴⁾。

食事から摂取された糖質は、唾液や膵液に含まれる α -アミラーゼの作用によって二糖類に分解され、小腸粘膜上皮細胞に存在している α -グルコシダーゼの作用で単糖類にまで分解され、体内に吸収される。このような糖質分解酵素を阻害することは、食事から摂取した糖質の消化と吸収を遅延させ、食後の血糖値上昇を穏やかにすると考えられている。現在、糖質分解酵素の阻害薬であるアカルボースやボグリボースが臨床において用いられており、大規模臨床試験からもその有用性が示されているが、肝障害、低血糖、腹部膨満感、下痢などの副作用のあることも知られている⁵⁾。

このような背景から副作用の少ない食品素材から糖質分解酵素阻害作用をもつ物質の探索がおこなわれ⁶⁻⁹⁾、毎日の食生活へ積極的に取り入れることにより、食事からの糖質の吸収を穏やかにし、食後の血糖値の上昇を抑制し、糖尿病予防へ役立つことが期待されている。

大豆はマメ科の植物であり、重要な植物性たんばく質源として世界中でさまざまに加工して食され、親しまれている。納豆は納豆菌で発酵させた日本の

* 人間発達科学部 (平成27年度卒業)

** 富山大学和漢医薬学総合研究所

伝統的な大豆発酵食品である。一般的な糸引き納豆とは異なり、塩と麴で発酵させた浜納豆や大徳寺納豆のような塩辛納豆（寺納豆）もあり、これらは中国の豆鼓と製法が類似している。テンペは蒸した大豆をテンペ菌で無塩発酵させたインドネシアの伝統食品である。このようにアジアには伝統的な大豆発酵食品が多く存在している。藤田らは豆鼓の水エキスに糖質分解酵素を阻害する作用のあることを見出している^{10,11)}。一方、その他の大豆発酵食品の糖質分解酵素阻害作用についての研究はあまり見られない。そこで、本研究では大豆発酵食品の α -グルコシダーゼに対する阻害作用について比較検討した。

II. 実験方法

(1) 試料の抽出

蒸煮大豆（市販の大豆を蒸煮した大豆）、蒸煮黒大豆（市販の黒大豆を蒸煮した大豆）、テンペ（みのうら発酵食品ラボラトリーより供与）、黒大豆テンペ（みのうら発酵食品ラボラトリーより供与）、納豆（市販品）、浜納豆（市販品）、豆鼓（市販品）の7種類の大豆および大豆発酵食品を用いた。抽出は扇谷ら¹²⁾の方法を参考に、細切し乳鉢ですりつぶした各試料3gに対し、70%エタノールを30mLずつ加え、超音波装置により30分間（室温）抽出した。次いで、遠心分離（3,000 rpm, 5分間）し、得られた上清を分取、濾紙で濾過した。残渣に再び70%エタノールを添加し、同様の抽出操作を3回行った。濾過した上清をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥させ、粉末状にした。

(2) α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

スクラーゼ活性およびマルターゼ活性の測定は、ラット腸管アセトン粉末を α -グルコシダーゼ粗酵素液として使用し、既報^{13,14)}を参考に以下のように測定した。

① 粗酵素液の調製

ラット腸管アセトン粉末に20倍量の50 mMマレイン酸緩衝液（pH 6.0）を加え、水中にてホモジナイザーで均質化した。ホモジネート液を遠心分離（3,000 rpm, 10分間, 4°C）し、得られた上清を粗酵素液とした。

② スクラーゼ活性の測定

試料溶液200 μ Lに2%スクロース溶液を200 μ Lずつ入れた。37°Cでプレインキュベート後、粗酵

素液200 μ Lを加え、37°Cで反応させた。60分または120分後、沸騰水中で10分間加熱し、酵素反応を停止させた。次いで、遠心分離（3,000 rpm, 10分間）し、得られた上清のグルコース濃度をグルコースCII-テストワコー（和光純薬株式会社）で測定した。

③ マルターゼ活性の測定

試料溶液200 μ Lに2%マルトース溶液を200 μ Lずつ入れた。37°Cでプレインキュベート後、10倍希釈した粗酵素液200 μ Lを加え、37°Cで反応させた。60分または120分後、沸騰水中で10分間加熱し、酵素反応を停止させた。次いで、遠心分離（3,000 rpm, 10分間）し、得られた上清のグルコース濃度をグルコースCII-テストワコー（和光純薬株式会社）で測定した。

(3) 大豆イソフラボンの分析

高速液体クロマトグラフはPD-8020システム（東ソー株式会社）を用いた。カラムはYMC-Pack ODS-AM-303（YMC株式会社）を使用した。既報^{12,15)}を参考に測定条件を次のようにした。注入量；10 μ L, 検出波長；260nm, 溶離液；(A) アセトニトリル：水：酢酸（15：85：0.1, v/v/v), (B) アセトニトリル：水：酢酸（35：65：0.1, v/v/v), (B)液を0から100%まで直線濃度勾配（50分）で溶出, 流速；1.0 mL/min. 大豆イソフラボンの標準物質として, daidzin, genistin, daidzein, genisteinの4種類（フジッコ株式会社）を用いた。

(4) 統計解析

統計ソフトはSAS JMP8.0を用い、一元配置分散分析を行った後、Dunnettの多重比較検定を行った。有意水準は5%以下とした。

III. 結果と考察

発酵食品は発酵させることにより、風味や保存性などが高まることに特徴があるが、近年はこれに生体調節面での働きが注目されている。 α -グルコシダーゼは小腸粘膜上皮細胞に存在している二糖類を加水分解する消化酵素である。 α -グルコシダーゼ活性を阻害することによって、食後の血糖値上昇を穏やかにすることは2型糖尿病の発症や進行の抑制に有効であると考えられている。本研究では、ラット腸管アセトン粉末を用い、未発酵の蒸煮大豆と蒸煮黒大豆並びに5種類の大豆発酵食品（テンペ、黒

大豆テンペ、納豆、浜納豆、豆鼓)の α -グルコシダーゼに対する阻害活性を比較検討した。

Figure 1は、マルトースと粗酵素液を濃度の異なる各試料液とともに反応させ、産生されるグルコース量を測定した結果である。反応時間60分では、すべての試料において濃度が高くなるほど、グルコース産生率を抑制し、マルターゼ活性を阻害する作用が認められた。なかでも浜納豆の作用が最も強く、高濃度群において、コントロール群に比べ26.0 \pm 2.8%にまで抑制していた。次いで、豆鼓46.9 \pm 2.7%、黒大豆テンペ51.5 \pm 1.1%、テンペ56.4 \pm 2.0%、納豆66.6 \pm 4.3%の順であった(Figure 1(A))。未発酵の蒸煮大豆、蒸煮黒大豆のグルコース産生量はコントロール群に比べ、それぞれ81.6 \pm 3.6%、84.8 \pm 2.4%と抑制が認められたが、発酵大豆よりも高値であった(Figure 1(A))。このように本研究に供した大豆試料にマルターゼ活性を阻害する作用が認められた。また、未発酵の大豆よりも発酵大豆の方が強い作用を発現することが明らかとなった。反応時間120分においても同様の結果が得られた(Figure 1(B))。

スクロースと粗酵素液を各試料液と反応させた結果をFigure 2に示す。浜納豆(高濃度)のグルコース産生率がコントロール群に比べ12.9 \pm 0.9%と強

く抑制することがわかった(Figure 2(A))。次いで、豆鼓45.0 \pm 2.8%、黒大豆テンペ54.0 \pm 5.5%、テンペ62.3 \pm 4.4%、納豆63.3 \pm 15.1%の順であった。このように大豆発酵食品に、スクラーゼ活性を有意に阻害する作用が認められた。一方、未発酵の蒸煮大豆と蒸煮黒大豆の場合は、グルコース産生量が増加しており、スクラーゼ活性に対する阻害作用は認められなかった。反応時間120分においても同様の結果が得られた(Figure 2(B))。

本実験において、マルトース反応、スクロース反応のいずれにおいても、強い阻害活性を示したのが浜納豆であった。納豆の種類には、大別して糸引き納豆と塩辛納豆の2種類がある。浜納豆は塩辛納豆の一種であり大豆に麹菌を繁殖させて、塩水に浸漬して仕込み、熟成させて製造する。浜納豆は糸引き納豆とは違い、味噌に近い味わいで、外見や製法が豆鼓に似ていることから、中国から日本に伝わったものだと考えられている。豆鼓は中華料理の調味料として用いられている大豆発酵食品である。藤田らは、中国の伝統食品である豆鼓の水エキスに α -グルコシダーゼの強力な阻害活性を見出し、ラットやヒトを対象とした検討から、スクロース負荷による血糖上昇抑制作用を明らかにしている¹⁰⁾。さらに、2型糖尿病患者に投与した結果、空腹時血糖が低下

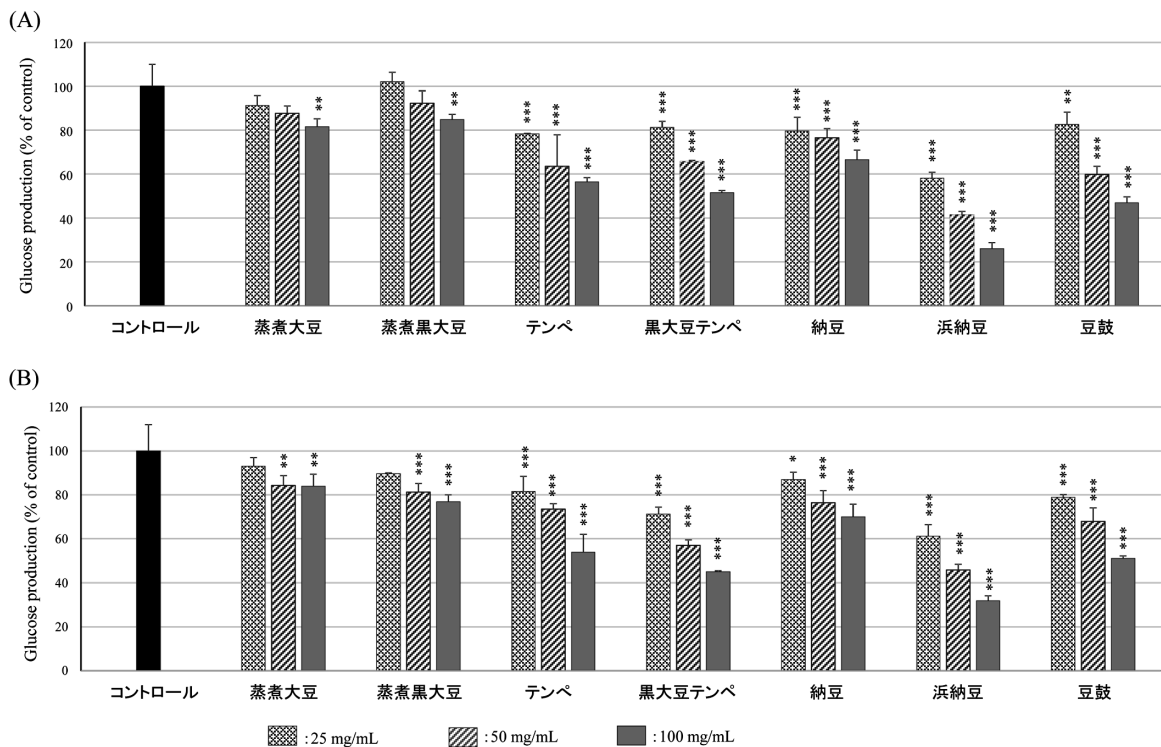


Fig. 1 Effects of soybean and its fermented products on α -glucosidase activity after reaction with maltose at 60 min (A) and at 120 min (B). * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 indicate significant differences from the control.

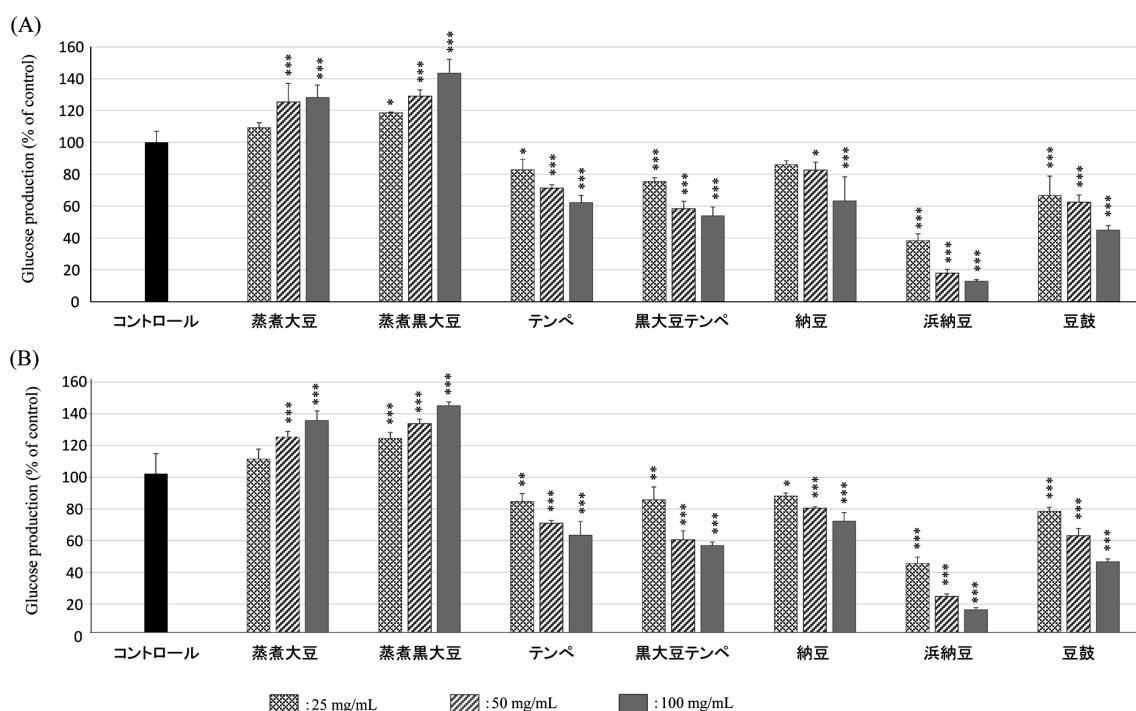


Fig. 2 Effects of soybean and its fermented products on α -glucosidase activity after reaction with sucrose at 60 min (A) and at 120 min (B). *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 indicate significant differences from the control.

したことを報告している¹¹⁾。一方、糖尿病予防における浜納豆の先行研究はあまり見られない。本研究から、浜納豆の α -グルコシダーゼの阻害活性も高いことが明らかとなり、豆鼓と同様に2型糖尿病予防に有用である可能性が示唆された。

納豆は蒸煮大豆を納豆菌で発酵させ、独特の粘性、臭気などの風味をもつ日本の伝統的な食品である。石川らは、健康な成人男性を対象とし、納豆及び蒸煮大豆による食後血糖値の上昇抑制効果を検討した結果、納豆と共に米飯を摂取することで米飯のみを摂取したときよりも食後血糖値の上昇を抑制できることを確認している¹⁶⁾。また、このような納豆の効果は蒸煮大豆による効果よりも強いものと推測している。本実験からは、蒸煮大豆よりも納豆に α -グルコシダーゼ活性を阻害する作用が認められた。

テンペは蒸煮大豆をテンペ菌で発酵させたインドネシアの伝統的な食品で、日本の納豆と同様少なくとも400~500年以上の歴史がある¹⁷⁾。日本の糸引き納豆のような粘性や臭気はなく、淡白な風味をもつ。最近では、日本においてもテンペが知られるようになり、機能性に関する研究も行われている。これまで、抗酸化作用や血栓溶解作用などが報告されているが^{18,19)}、糖尿病に関連した研究報告はみられない。本研究では、従来の大豆を原料としてつくら

れているテンペに加え、黒大豆を原料とした黒大豆テンペも試料として用いた。その結果、テンペ、黒大豆テンペいずれも α -グルコシダーゼに対して有意な抑制作用を有することが明らかとなった。

以上より、豆鼓だけではなく、他の大豆発酵食品にも糖質分解酵素であるマルターゼやスクラーゼの働きを阻害し、グルコースへの分解を抑制あるいは遅延することにより、食後の血糖値の上昇を穏やかにする効果のある可能性が示唆された。

大豆には、大豆たんぱく質、植物ステロール、大豆オリゴ糖、大豆イソフラボンなど様々な機能性成分が含まれている。なかでも大豆イソフラボンについては骨粗鬆症の予防、更年期障害の改善、前立腺癌の抑制、乳がんの予防に関与することが研究されている²⁰⁾。Leeらは、大豆イソフラボンのgenisteinに α -グルコシダーゼを強く阻害する作用のあることを報告している²¹⁾。そこで、本研究では、HPLCを用い、各試料中に含まれる大豆イソフラボン(daidzin, genistin, daidzein, genistein)含有量を測定した。Figure 3に示すように、他の試料と比べ浜納豆と豆鼓にはイソフラボン配糖体であるdaidzin, genistinは検出されず、アグリコンであるdaidzein, genisteinが比較的多く含まれていた。強い α -グルコシダーゼ阻害作用を示した浜納豆の

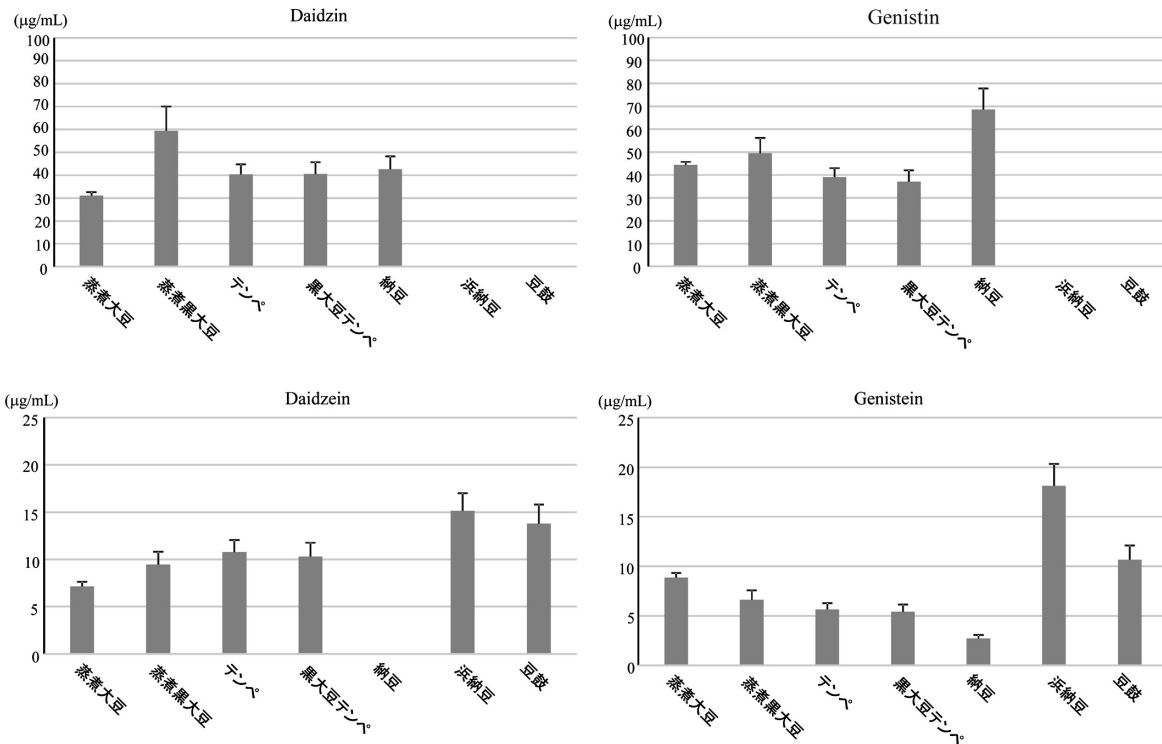


Fig. 3 Isoflavone content in soybean and its fermented products.

genistein 含有量が最も多かったが、各試料中の genistein 含有量と作用発現の強度に0.7以上の強い相関は見られなかった。大豆発酵食品においては発酵中に原料大豆中の daidzin, genistin から daidzein, genistein を経て 8-hydroxydaidzein や 8-hydroxygenistein が産生されることが知られている²²⁾。江崎らは、daidzein, genistein, 8-hydroxydaidzein や 8-hydroxygenistein を多く含む大豆イソフラボン麴発酵物に、強いマルターゼ阻害作用やスクラーゼ阻害作用が認められることを報告している²³⁾。このことから、daidzein, genistein さらに 8-hydroxydaidzein や 8-hydroxygenistein が α -グルコシダーゼの阻害作用に寄与し、これらの含有量が各発酵食品の作用発現の強さに影響を与えている可能性が示唆される。また、活性成分は一成分だけではなく、発酵中に変化した成分を含め複数の成分が作用発現に寄与していると推測される。活性成分の解明について、さらなる検討が必要である。

本研究から浜納豆、テンペ、黒大豆テンペ、納豆に α -グルコシダーゼ阻害作用が認められ、糖尿病の予防や進展の遅延における有用性が豆鼓以外の大豆発酵食品にも期待される知見が得られた。これらの *in vivo* での糖質の消化と吸収に及ぼす影響の評価についても今後の課題であるが、現代の日本人の

食生活の見直しにおいて、伝統的な大豆発酵食品の役割が再認識されることが期待される。

文献

- 1) 厚生労働省 (2013) : 平成24年国民健康・栄養調査結果の概要, 厚生労働省.
- 2) Cavalot, F., Pagliarino, A., Valle, M., Di Martino, L., Bonomo, K., Massucco, P., Anfossi, G., Trovati, M. (2011) : Postprandial blood glucose predicts cardiovascular events and all-cause mortality in type 2 diabetes in a 14-year follow-up. *Diabetes Care*, 34, 2237-2243.
- 3) Hanefeld, M., Koehler, C., Henkel, E., Fuecker, K., Schaper, F., Temelkova-Kurktschiev, T. (2000) : Post-challenge hyperglycaemia relates more strongly than fasting hyperglycaemia with carotid intima-media thickness: the RIAD Study. *Diabetic Med.*, 17(12), 835-840.
- 4) Chiasson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., for the STOP-NIDDM Trial Research Group. (2002) : Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, 359, 2072-2077.

- 5) 水島 裕 編 (2000) : 今日の治療薬, 南江堂, 302-303.
- 6) 三浦理代・五明紀春 (1996) : 市販香辛料の α -アミラーゼ活性および α -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響, 日本食品科学工学会誌, 43 (2), 157-163.
- 7) 大内和美・青柳康夫 (2010) : α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼに対するキノコ抽出物の阻害活性, 日本食品科学工学会誌, 57(12), 532-538.
- 8) 阿武尚彦・田村幸一・大野弘美・富 裕孝 (2004) : 桑 (*Morus alba* L.) 葉エキスのマルターゼ, スクララーゼおよび α -アミラーゼ阻害作用について, 日本食品保蔵科学会誌, 30 (5), 223-229.
- 9) Satoh, T., Igarashi, M., Yamada, S., Takahashi, N., Watanabe, K. (2015): Inhibitory effect of black tea and its combination with acarbose on small intestinal α -glucosidase activity. *J. Ethnopharm.*, 161, 147-155.
- 10) Fujita, H., Yamagami, T., Ohshima, K. (2001): Fermented soybean-derived water-soluble Touchi extract inhibits α -glucosidase and is antiglycemic in rats and humans after single oral treatments. *J. Nutr.*, 131(4), 1211-1213.
- 11) Fujita, H., Yamagami, T., Ohshima, K. (2001): Efficacy and safety of Touchi Extract, an α -glucosidase inhibitor derived from fermented soybeans, in non-insulin-dependent diabetic mellitus. *J. Nutr. Biochem.*, 12, 351-356.
- 12) 扇谷陽子・相澤 博・大谷倫子・藤田晃三 (2002) : 大豆イソフラボン量について ; 産地による比較, 札幌市衛研年報, 29, 83-89.
- 13) 出口ヨリ子・長田邦子・内田和美・木村広子・芳川雅樹・工藤辰幸・保井久子・綿貫雅章 (1998) : グァバ葉熱水抽出物の db/db マウスにおける抗糖尿病効果およびヒト飲用試験による食後血糖値上昇抑制効果, 日本農芸化学会誌, 72(8), 923-931.
- 14) 出口ヨリ子・長田邦子・綿貫雅章 (2003) : グァバ葉抽出液と経口糖尿病薬アカルボースあるいはボグリボースの併用による正常マウスの血糖値上昇抑制への作用, 日本栄養・食糧学会誌, 56 (4), 207-212.
- 15) 西場洋一・須田郁夫・沖 智之・菅原晃美 (2007) : 国内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ロール含量の変動, 日本食品科学工学会誌, 54 (6), 295-303.
- 16) 石川篤誌・岸 幹也・山上圭吾 (2009) : 納豆, 大豆が健常成人の食後血糖値に与える影響, 生活衛生, 53(4), 257-260.
- 17) 社団法人農山漁村文化協会編 (2013) : 地域食材大百科第10巻こうじ, 味噌, 醤油, 納豆, テンペ, 社団法人農山漁村文化協会, 366-367.
- 18) 増井利映・渡辺睦行・中津川研一 (2007) : テンペ脂溶性画分の抗酸化性に関する研究, 学苑・生活科学紀要, 806, 29-32.
- 19) 須見洋行・岡本 猛 (2003) : テンペ水抽出液の血栓溶解活性, 日本家政学会誌, 54 (5), 337-342.
- 20) 食品機能性の科学編集委員会編 (2008) : 食品機能性の科学, 株式会社産業技術センター, 193-232.
- 21) Lee, D.S., Lee, S.H. (2001) : Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. *FEBS Letters*, 501, 84-86.
- 22) Esaki, H., Watanabe, R., Onozaki, H., Kawakishi, S., Osawa, T. (1999) : Formation mechanism for potent antioxidative *o*-dihydroxyisoflavones in soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(5), 851-858.
- 23) 江崎秀男・石田景子・高須 萌・林 萌美・森久美子・中村好志 (2013) : 大豆イソフラボン麴発酵物の糖質消化酵素に対する阻害作用, 椛山女学園大学研究論集, 44, 19-28.

(2016年10月20日受付)

(2016年12月7日受理)