

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.66, No. 4, pp. 727~732, 1992]

大豆オリゴ糖を原料とした食酢の製造および ヒト腸内フローラに及ぼす影響

沖 裕治, 橋本 香, 松本貴至, 久保田昭正

江本三男*, 小橋恭一**

(タマノ井酢株式会社第2研究所,

*大塚食品株式会社琵琶湖研究所, **富山医科薬科大学薬学部)

平成3年10月24日受理

Production of Vinegar from Soybean Oligosaccharides, *in vitro* and *in vivo* Effects of the Vinegar on Human Fecal Microflora

Yuji OKI, Kaori HASHIMOTO, Takashi MATSUMOTO, Terumasa KUBOTA,

Mitsuo EMOTO*, and Kyoichi KOBASHI**

Tamanoi Vinegar Co., Ltd., Research Laboratory II, Kurumano-cho,
Sakai, Osaka 590

*Otsuka Foods Co., Ltd., Biwako Research Institute, Karasaki,
Otsu, Shiga 540

**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and
Pharmaceutical University, Sugitani, Toyama 930-01

A vinegar made from soybean oligosaccharides was prepared and examined for its effect on human intestinal bacteria. During alcohol fermentation, stachyose and raffinose converted completely to manninotriose and melibiose, respectively. During acetic acid fermentation, neither manninotriose nor melibiose was altered. An *in vitro* assimilation test done with intestinal bacteria, showed that manninotriose and melibiose were utilized by *Bifidobacterium* (except for *B. bifidum*), but utilized little at all by other organisms. In an ingestion test of ten healthy adult volunteers (six men and four women), the ingestion of 20 ml/day of the vinegar for two weeks caused a significant increase ($p < 0.01$) in fecal bifidobacteria.

(Received October 24, 1991)

緒 言

近年、食品の生理活性が注目されており積極的に活性物質を添加する研究も行われている。われわれは、日常的に使用される調味料である食酢に生理活性を付与することを目的として以下実験を行った。

ヒトの腸内には、約百種、百兆個もの細菌が常在し腸内フローラを構成している。そのなかで近頃、腸内細菌の1つである *Bifidobacterium* の有用性が明らかとなり、腸内で *Bifidobacterium* を優勢にしておくことが健康維持のうえで望ましいものと考えられてきた。Mizu-

tani らは、C3H/He ノトバイオート雌マウスで *Bifidobacterium* の存在が他菌種組合せによる肝腫瘍発生を抑制することを報告している⁽¹⁾。そこで種々の *Bifidobacterium* 増殖促進作用のあるオリゴ糖が注目を集めている⁽²⁾。なかでも大豆ホーネーからの大量生産方法が確立されている大豆オリゴ糖⁽³⁾は天然由来のものであり、他の合成されたオリゴ糖と違って、食酢の原料として違和感がなく、発酵性糖類を多量に含有するため発酵も容易である。

本報では、大豆オリゴ糖を原料として食酢を製造する際の発酵過程における糖組成の変化、大豆オリゴ糖酢に

含まれる糖成分の *in vitro* における腸内菌の資化性およびヒトが大豆オリゴ糖酢を1日 20 ml, 14 日間連続摂取したときの腸内フローラに及ぼす影響について検討した。

実験方法

1. 糖の定量 マンニトリオース以外の各糖質は、市販特級試薬を用いた。マンニトリオースは、和田らの方法⁽⁴⁾に従い市販試薬スタキオースより調製した。糖の定量は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC, カラム; 旭化成製 Asahipak-NH 2 P) により溶媒として、アセトニトリル:水 (70:30) を用いて行った。

2. アルコール発酵および酢酸発酵 大豆オリゴ糖 (ソーヤ・オリゴ・ジャパン社製) を糖濃度 25% に調整し、本溶液に炭酸アンモニウム 0.1%, リン酸水素 2 カリウム 0.05%, 硫酸マグネシウム 0.05% および生酵母 0.13% を添加し、30°C で4日間アルコール発酵を行った。次いで酵母を濾過除去後通気酢酸発酵を行った。原料大豆オリゴ糖の糖組成を Table I に示す。

3. 食酢中でのスタキオース (Sta) およびラフィノース (Raf) の安定性試験 市販食酢と同じ酢酸濃度 4.2% 溶液にスタキオースおよびラフィノースを 1% 添加し、37°C および 50°C に保存し経日的な変化を HPLC により追跡した。

4. 人工胃液中での Sta および Raf の安定性試験 日本薬局方に基づいて、人工胃液 (0.08 N HCl, 0.2 % NaCl) を調製し、Sta および Raf を 1% 添加し 37°C で保存し経時の変化を HPLC により追跡した。

5. *In vitro* における各種糖質の腸内菌による資化性試験 (1) 供試菌株: 供試菌株として *Bifidobacterium* 属 6 菌種および *Bacteroides*, *Mitsuokella*, *Clostridium*, *Eubacterium* の各属、計 10 株を使用し

た。菌株は、理化学研究所より分譲されたものを用いた。

(2) 培養: Pepton-Yeast-Fildes solution (PYF) 培地⁽⁵⁾に各種糖質を 0.5% になるように添加した滅菌培地 (pH 7.2) 2 ml を調製し、あらかじめ PYFG 培地⁽⁵⁾で前培養しておいた供試菌液 0.03 ml を加え嫌気条件下 37°C, 96 hr スチールウール法⁽⁶⁾で培養を行った。

(3) 資化性の判定: 各種糖類の資化性の判定は、培養後の培養液の pH を測定し判定した。判定は、-, ≥ 7.0 ; +, 7.0~6.0; ++, 5.0~6.0; +++, <5.0 とした。

6. 大豆オリゴ糖酢の摂取試験 (1) ボランティア: 健康な成人 10 名 (男性 6 名, 女性 4 名, 年齢 30~60 歳) について、医薬品類、生菌剤 (乳酸菌製品) およびオリゴ糖含有食品の摂取を制限した。

(2) 供試試料: 大豆オリゴ糖酢を酢酸濃度 2.1% とし、アスパルテーム 0.015%, レモンミントフレーバー 0.125% を添加して、試料とした (以下大豆オリゴ糖酢サンプルという)。

(3) 投与試験: 実験スケジュールは、大豆オリゴ糖酢サンプルを1日2回 20 ml ずつ 14 日間連続摂取させ、摂取直前 (対照区)、摂取 14 日目 (試験区) および摂取中止3週間後 (対照区) に糞便を採取し、糞便フローラの測定を行った。

(4) 糞便フローラの検索: 糞便フローラの検索は、光岡の方法⁽⁶⁾に従って行った。

実験結果

1. アルコール発酵および酢酸発酵過程での大豆オリゴ糖の糖組成の推移

大豆オリゴ糖のアルコール発酵および酢酸発酵過程における糖組成の推移を Table II に示した。

当初存在する Sta および Raf は、アルコール発酵後には完全に消失し、それぞれフラクトース (Fru) 部分が切り離されたマンニトリオース (Mnt) およびメリビオース (Mib) が増加した。アルコール発酵では、発酵性糖類であるシュクロース (Suc), グルコース (Glu), フラクトースが消費され減少した。その後の酢酸発酵過程では、糖組成はほとんど変化せず大豆オリゴ糖酢中の主要糖は、Mnt と Mib となりそれぞれ 2.90%, 0.73% であった。この際、大豆オリゴ糖 25% 溶液 100 ml からアルコール 9.24 ml, 酢酸 8.91 g が生成した。

Table I. Sugar Composition of Soybean Oligosaccharides

Component	%
Stachyose	21.9
Raffinose	5.8
Sucrose	34.6
Glucose	7.2
Fructose	8.3
Manninotriose	5.4
Melibiose	1.1
Others	15.7

Table II. Effect of Alcohol- and Acetic Acid-Fermentation on Sugar Composition

	Moromi* (g/100ml)	Alcohol** (g/100ml)	Vinegar*** (g/100ml)
Stachyose	3.26	0	0
Manninotriose	0.79	3.07	2.90
Raffinose	0.91	0	0
Melibiose	0.18	0.80	0.73
Sucrose	5.27	0.07	0.06
Glucose	1.10	0	0
Fructose	1.26	0.84	0.86

* Starting solution of alcohol fermentation.

** After alcohol fermentation solution.

*** After acetic acid fermentation solution.

All values indicated are calculated to values in vinegar (4.2% acetic acid).

2. 食酢中での Sta および Raf の安定性

市販食酢と同じ酢酸濃度 (4.2%) の Sta, Raf の安定性を調べた結果を Fig. 1 に示した。

37°C では Sta, Raf とともに 12 日間で 50% 以下まで分解され、50°C では、7 日間で 10% 以下まで分解されることが明らかとなった。

3. 人工胃液中での Sta および Raf の安定性

人工胃液中での Sta, Raf の安定性を調べた結果を Fig. 2 に示した。

5 時間で Sta, Raf とともに約 40% 分解されることが明らかとなった。

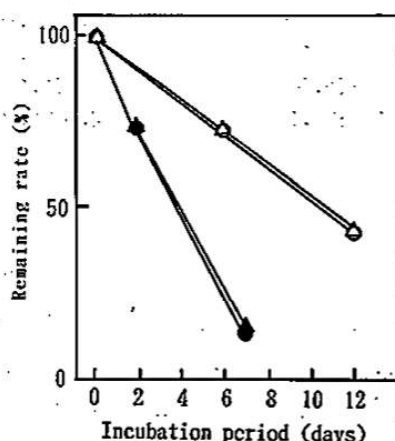


Fig. 1. Stability of Stachyose and Raffinose in Vinegar.

Stachyose and raffinose in 4.2% acetic acid solution were incubated at 37°C or 50°C for several days and residual amount were assayed. Sta: Δ, 37°C; ▲, 50°C. Raf: ○, 37°C; ●, 50°C.

4. *In vitro* における腸内菌による Mnt, Mlb の資化性

各種腸内菌による資化性試験結果を Table III に示した。Mnt および Mlb は, *Bifidobacterium bifidum* 以外の *B. longum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. lactentis*, *B. liberorum* によく利用された。この他に *Mitsuokella multiacida* によく利用され, *Bacteroides vulgatus* で Mnt が弱い資化性を示したが, *Clostridium sordellii*, *Eubacterium aerofaciens* にはまったく利用されなかった。

Sta, Raf もほぼ同様の傾向を示した。

5. 大豆オリゴ糖酢摂取による腸内フローラの変動

腸内フローラの検索結果を Table IV に示した。大豆オリゴ糖酢の摂取により, *Bifidobacterium* が有意 ($p < 0.01$) に増加した。その他の菌群については、菌数の変動は認められなかった。

考 察

最近、食品の持つ機能性が注目され、潜在的な生体調節機能の研究も盛んに行われてきている⁽⁷⁾。一方、積極的に生理活性を持つ物質の食品への添加に関する研究も盛んである。われわれは、通常の食生活のなかで自然に摂取できるように、調味料である食酢に生理活性を付与することを目的とした。

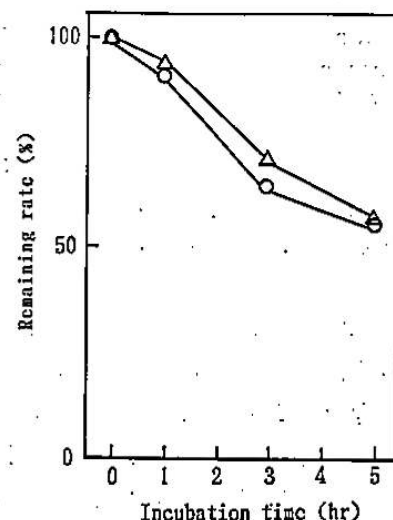


Fig. 2. Stability of Stachyose and Raffinose in Artificial Gastric Juice.

Stachyose and raffinose in artificial gastric juice (0.08 N HCl, 0.2% NaCl) were incubated at 37°C for several hours and residual amount were assayed. Δ, Sta; ○, Raf.

Table III. Utilization of Sugars by Various Intestinal Bacteria

Bacteria species	Glu	SOS*	SAS**	Mnt	Mlb	Sta	Raf
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	+++	—	—	—	—	—	—
" <i>adolescentis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" <i>longum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" <i>breve</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" <i>lactentis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" <i>liberorum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Bacteroides vulgatus</i>	+++	+++	—	+	—	+++	+
<i>Mitsuokella multiacida</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	+++	+++	—	—	—	—	—
<i>Clostridium sordellii</i>	+++	—	—	—	—	—	—

* SOS, Soybean oligosaccharides.

** SAS, Sugar component of alcohol-fermented broth made from soybean oligosaccharides. Glu, Glucose; Mnt, Manninotriose; Mlb, Melibiose; Sta, Stachyose; Raf, Raffinose.

Bacteria growth (judged from the final pHs of culture): +, <5.0; ++, 5.0~6.0; +, 6.0~7.0; —, ≥7.0.

Table IV. Effect of Vinegar Made from Soybean Oligosaccharides on Intestinal Flora of Volunteers

	Before administration	During administration	After administration
Total counts	10.8±0.2*	10.9±0.2	10.8±0.2
<i>Bacteroidaceae</i>	10.5±0.2	10.6±0.3	10.6±0.3
<i>Bifidobacterium</i>	9.4±0.3 ^a	9.9±0.4 ^b	9.6±0.4
<i>Eubacterium</i>	9.9±0.4	9.9±0.4	9.5±1.1
<i>Peptostreptococcus</i>	9.7±0.4	9.8±0.3	9.6±0.5
<i>Veillonella</i>	8.0±2.2	9.1±1.3	9.2±1.2
<i>Megasphaera</i>	9.0±0.7	9.1±0.9	9.5±0.2
<i>Clostridium perfringens</i>	5.1±2.9	3.8±2.4	3.4±1.4
<i>Clostridium</i> others	9.0±1.6	9.5±0.3	9.5±0.3
<i>Lactobacillus</i>	6.1±2.4	6.7±2.1	7.6±1.6
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.0±1.4	7.8±1.2	7.1±1.2
<i>Streptococcus</i>	7.6±1.9	7.5±1.9	7.7±0.4
<i>Staphylococcus</i>	2.5±0.2	5.6±0.0	2.6±0.0
<i>Corynebacterium</i>	3.5±0.0	<2.0	2.3±0.0
<i>Bacillus</i>	<2.0	<2.0	<2.0
Yeasts	3.7±0.9	3.5±0.9	4.6±0.0

* Mean±SD of log No. of bacteria per g wet feces.

Significance: ^a vs., ^b p<0.01.

ヒトの腸内には、約百種、百兆個もの細菌が常在し、腸内フローラを構成している。そのなかでもビフィズス菌が有用な働きをしていることが示唆されている⁽⁹⁾。そこで、ビフィズス菌を増殖させる効果のある各種オリゴ糖が開発されつつある。われわれは、食酢の原料として違和感がなく、穀物由来の天然物である大豆オリゴ糖を原料として食酢を製造し、その食酢の *Bifidobacterium* 増殖促進効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

すでに大豆オリゴ糖中の Sta および Raf が、*in vitro* と *in vivo* で *Bifidobacterium* 増殖促進効果のある

ことが報告されている⁽⁹⁾。一方、Sta および Raf は納豆を製造する発酵工程中に消失し、Mnt および Mlb に変換すると報告されている⁽¹⁰⁾。そこで、まず、大豆オリゴ糖の発酵過程での糖組成の変化を検討したところ、アルコール発酵過程で Suc, Glu, Fru が消費され、大豆オリゴ糖中の *Bifidobacterium* 増殖促進物質としてその効果の確認されている Sta, Raf が完全に消失し、それぞれの Fru 部分が切り離された Mnt および Mlb に変換されることが明らかとなった。その後の酢酸発酵過程では、糖組成はほとんど変化しなかった。データには示さ

なかったが、酵母由来の市販インベルターゼを大豆オリゴ糖に作用させると、Sta, Raf は容易にそれぞれ Mnt, Mlb に変換された。このことから、アルコール発酵過程でのこれらの変換は酵母の持つインベルターゼ活性によるものと考えられる。

次いで Sta, Raf が発酵により消失してしまうために、食酢に後から添加することを想定して、食酢中での安定性を検討したところ、経時的に分解し、食酢に大豆オリゴ糖を添加しても Sta, Raf の持つ *Bifidobacterium* 増殖促進効果は、期待できないことがわかった。

さらに、人工胃液中での Sta, Raf の安定性を検討したところ、経時的に分解することがわかった。加藤ら⁽¹¹⁾は、マウス、ラットを用いた実験で Sta, Raf は、分解を受けずに大腸まで達するとの報告を行っているが、以上の結果より、Sta, Raf を経口摂取した場合は、ある程度分解されて Mnt, Mlb となって大腸に達するものと考えられる。とくに、食酢のような酸性の食品に添加した場合は、経時的に分解を受け、空腹時に摂取した場合も胃の中である程度分解を受けると考えられるため、Sta, Raf は Mnt, Mlb となって大腸に達するのではないかと考えられる。そこで、Mnt, Mlb の *in vitro* および *in vivo* での試験を行った。*In vitro* の腸内菌の資化性試験で Mnt, Mlb は、Sta, Raf と同様に、*Bifidobacterium bifidum* 以外の *Bifidobacterium* にはよく利用され、他の菌には、利用されにくいことが明らかとなった。これは、和田ら⁽⁴⁾の結果と一致するものであった。

In vivo の実験で大豆オリゴ糖酢サンプルの連続摂取により *Bifidobacterium* の菌数が有意に増加し、*in vitro* の試験結果と一致した。また、有意差はなかったが、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、大豆オリゴ糖酢の摂取により、減少する傾向が認められた。Sta, Raf から Fru 部分が切り離された Mnt, Mlb も *in vitro*, *in vivo* とともに同様の活性を示すことから、Sta, Raf の Fru 部分は、*Bifidobacterium* の選択的利用性には、重要な因子とはなりえないものと考えられる。また、この実験では、料理で摂取される通常の食酢量を摂取させたが、このサンプル中の Mnt と Mlb の合計量は、0.72 g/day となる。和田ら⁽⁴⁾は、Mnt の 3 g/day の連続 7 日間摂取により、*Bifidobacterium* の菌数が増加するとの報告をしている。Sta と Raf の合計で、3 g/day 連続 3 週間の摂取で、*Bifidobacterium* の菌数が増加したとの

報告がある⁽⁹⁾。すなわち、大豆オリゴ糖酢中のオリゴ糖としては従来の報告よりも少ない量で効果を発現したことになる。

Sta, Raf の Fru 部分が切り離されたために少量でも効果を現わすようになったものか、食酢として摂取することで効果を現わすようになったのか不明であるが、今後検討する必要がある。

また、和田ら⁽¹²⁾は、老人への大豆オリゴ糖の投与によって便秘を改善する効果があるとの報告を行っているが、本実験中にも、ボランティアのなかにそのような例が認められた。このことについてもさらに検討する必要がある。

要 約

大豆オリゴ糖を原料として食酢を製造し、その糖組成、主要糖成分である Mnt, Mlb の *in vitro* での資化性試験および *in vivo* 摂取試験を行い以下の結果を得た。

1) 大豆オリゴ糖酢中の Sta, Raf は、アルコール発酵過程でそれぞれ Mnt, Mlb に変換した。その後の酢酸発酵では、糖組成にはほとんど変化は認められなかった。

2) Sta, Raf は、食酢中で容易に Mnt, Mlb へと分解した。

3) *In vitro* 試験で、Mnt, Mlb は、Sta, Raf と同様に、*Bifidobacterium* に選択的に資化されることがわかった。

4) 大豆オリゴ糖酢の摂取試験により、1日 20 ml 摂取すれば *Bifidobacterium* の菌数は有意に ($p < 0.01$) 増加することが認められた。

以上のことから、大豆オリゴ糖を原料とした食酢は、Mnt と Mlb を主要糖として含み、通常の料理摂取量でビフィズス菌を増加させる効果のあることがわかった。本研究は、1991 年度日本農芸化学学会大会で発表した。

(1) T. Mizutani and T. Mitsuoka : *Cancer Lett.*, 11, 89—95 (1980).

(2) 斎藤安弘 : 食品と開発, 22, 20—25 (1987).

(3) 正井輝久 : ジャパンフードサイエンス, 26, 56—64 (1987).

(4) 和田光一, 水谷 潤, 鈴木宏美, 早川邦彦 : 栄食誌, 44, 171—176 (1991).

(5) 光岡知足 : 「腸内菌の世界—嫌気性菌の分離と同定」, 叢文社, 東京, 1982, p. 319, p. 45.

- (6) C. A. Parker : *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 33, 33—37 (1955).
- (7) 千葉英雄, 吉川正明 : 化学と生物, 25, 396—405 (1987).
- (8) 光岡知足 : 「驚異のビフィズス菌健康法」1, 講談社, 1984, pp.55.
- (9) K. Hayakawa, J. Mizutani, K. Wada, T. Masai, I. Yoshihara, and T. Mitsuoka : *Microb. Ecol. Health Dis.*, 3, 293—303 (1990).
- (10) 菅野彰重, 高松晴樹, 高野伸子, 秋本隆司 : 日食工学会誌, 29, 105—110 (1982).
- (11) 加藤康仁, 池田なぎさ, 岩波健文, 尾崎 明, 大村和隆 : 栄食誌, 44, 29—35 (1991).
- (12) 和田光一, 渡部絢子, 水谷 潤, 鈴木宏美, 桐生直美, 早川邦彦, 山口知恵子 : ビフィズス, 4, 135—140 (1991).