

62

助成番号 0162

アカパンカビを利用した超低塩味噌の開発とその活用法

助成研究者： 松尾真砂子

所属機関： 岐阜女子大学 教養部

味噌には各種の有益な生理作用があり健康の維持に役立ってきたが、最近では食生活の欧風化と食塩濃度が高いため消費量が暫減している。インドネシアには古くから落花生粕やおから等をアカパンカビ(オンチョム菌、*Neurospora intermedia*)で発酵させたオンチョムと言う伝統的無塩発酵食品がある。私はこれまでに脱脂大豆を原料にして脱脂大豆オンチョムを創製し、各種の機能性があることを報告している。アカパンカビは味噌麹菌とは異なる亜門に属するため、味噌の原料に大豆オンチョム(S-オンチョム)やおからオンチョム(O-オンチョム)を利用すると醸造中に味噌麹菌の酵素とアカパンカビの酵素の共同作業により従来の味噌にはなかった新物質が生成され、新しい機能性が付加される可能性がある。本研究では味噌を食べる伝統的食習慣を維持し、味噌の摂取によって生活習慣病の予防と健康増進に役立てることを目標に、S-オンチョムやO-オンチョムを利用した超低塩味噌の醸造法を検討した。

3種類の超低塩味噌、すなわち、蒸煮大豆のみを使用した大豆味噌、蒸煮S-オンチョムを100%使用したS-オンチョム味噌、S-オンチョム90%とO-オンチョム10%を使用したO-オンチョム味噌を米麴5歩、食塩4%、エタノール2%、水分50%で*Zygosaccharomyces rouxii* IAM4114を 1.0×10^5 添加して30℃で醸造した。

S-オンチョム味噌とO-オンチョム味噌は大豆味噌より1週間速く、5週間で醸造を完了した。味噌のDPPH消去力と O_2^- 消去力の強さはO-オンチョム味噌、S-オンチョム味噌、大豆味噌の順だった。O-オンチョム味噌は70%エタノール可溶物と水可溶物に強い O_2^- 消去力と抗変異原力があり、健康の維持増進に役立つことが示唆された。70%エタノール可溶物のこれらの機能にはイソフラボンのアグリコンが関与すると思われた。O-オンチョム味噌の O_2^- 消去力は加熱により低下したが、非加熱の大豆味噌よりはるかに強力だった。O-オンチョム味噌をおでん味噌やカスタードクリーム調製の調製に使用すると嗜好性が高まった。

今後、超低塩O-オンチョム味噌を利用したレシピを多数開発すれば、超低塩O-オンチョム味噌は新しいタイプの味噌としての普及が期待できる。

アカパンカビを利用した超低塩味噌の開発とその活用法

助成研究者： 松尾真砂子 (岐阜女子大学)

① 研究目的

味噌は我が国の伝統的調味料であるが、近年は食生活の欧風化に伴い消費が衰退・低迷している。最近、味噌に降コレステロール作用¹⁾、発ガン予防作用²⁾、血圧低下作用³⁾、脳卒中予防作用⁴⁾、などの有益な生理作用が発見され、味噌の効用が重要視されるようになった。しかし、味噌は、旨味を増強させ、有害微生物の繁殖を防止するために、高濃度の食塩を含んでおり、この塩分が味覚的に使用量を制限している。また、高血圧症に対する食塩の過剰摂取による悪影響の知識が広まり、味噌の消費を抑制している。このような状況下では、科学的効用だけで味噌の利用を増加させることは困難である。

一方、インドネシアにはおからをアカパンカビでおからや落花生粕を発酵させたオンチョムと言う伝統的発酵食品があり⁵⁾、いずれのオンチョムも原料よりはるかに呈味性が優れている。私は、これまでオンチョムの原料とされなかった脱脂大豆をアカパンカビ(オンチョム菌, *Neurospora intermdia*)で発酵させて脱脂大豆オンチョム(D-オンチョム)を調製し、脱脂大豆より呈味性が改善され⁶⁾降コレステロール作用⁷⁾、抗変異原性⁸⁾、生体内抗酸化作用⁹⁾、が増強されることを報告した。味噌は原料に大豆を使用することが必須条件である¹⁰⁾。味噌の原料に大豆オンチョム(S-オンチョム)を用いると、アカパンカビは味噌麹菌とは異なる亜門に属するため、アカパンカビと味噌麹菌の酵素の共同作用により、醸造中に大豆から新規物質を創成し、新しい機能を付加する可能性がある。また、おからは大豆より栄養成分が少ないため、おからを原料にしたオンチョム(O-オンチョム)ではアカパンカビが培地に適応し、S-オンチョムより各種の酵素活性が高い可能性がある。

本研究では、味噌を食べる伝統的食習慣を維持し、生活習慣病の予防と健康増進に役立てることを目標にして、S-オンチョムを主原料に、O-オンチョムを副原料とする超低塩味噌の醸造法と機能性を検討する。次いで、超低塩味噌を料理に活用し、その嗜好性を検討する。

② 研究方法

2. 1 オンチョム調製法 O-オンチョム¹¹⁾は *Neurospora intermedia* FGSC 2559 (Fungal Genetic Stock Center, U. S. A) を純粋培養したおからの凍結乾燥粉末をスターターとして水分 70 %に調整したおからの表面に振りかけ、30 °Cで 18 時間保温して発芽させた。その後 27 °Cでオレンジ色の胞子がうっすらと発生するまで培養した。S-オンチョムは水分を 60 %に調整した大豆を培地にして同様に処理した。

2. 2 超低塩味噌の醸造法と成分分析法

醸造法 蒸煮大豆のみを使用した味噌を大豆味噌、蒸煮大豆の代わりに S-オンチョムを 100 %使用した味噌を S-オンチョム味噌、S-オンチョム 90 %と、O-オンチョム 10 %を使用した味噌を O-オンチョム味噌とした。各味噌は米麹 5 歩で食塩 4 %とエタノール 2 %を添加し、大豆の蒸煮水を全量種水として活用して水分を 50 %に調整し、30 °Cで醸造した。醸造開始時に香りを良くするために *Zygosaccharomyces rouxii* IAM 4114 を 1.0×10^5 になるように添加した¹²⁾。味噌成分分析法 酸度 I、酸度 II、直接還元糖、水溶性窒素、ホルモール窒素はいずれも味噌基準分析法¹³⁾によって分析した。有機酸は 0.2N 塩酸抽出液¹⁴⁾を Finepak SIL-5 カラム (4.6 × 250nm) に導入し、0.5 %リン酸 0.3ml/min で展開し、210nm で検出定量した。香気成分¹⁵⁾は水蒸気蒸留液を 80 °Cの PEG6000 25 % on Celite 545U, 60-80mesh (3mm × 2m) で分析し、150 °Cの FID で検出した。色調は測色色差計 (日本電色工業株式会社、ND-1000 DP) を用い、ハンターの色度を測定した。硬度は 10 × 10 × 10mm に整形した試料を用い、クリープメーター (山電 RE-3305) でプランジャー 10mm φ円筒型、ロードセル 2kg、圧縮率 30 %、圧縮スピード 5mm/s で測定した。イソフラボン は 70 %エタノール抽出物を CrestPak C₁₈S カラム (4.6 × 150nm) を用い、40 °Cで水/酢酸 (95/5) を 1.0ml/min で 10min 流した後、メタノール/酢酸 (95/5) を 40 分かけてグラジエントし、262nm で検出定量した¹⁶⁾。

2. 3 酵素活性測定法

プロテアーゼ (E. C. 3. 4. 21. 14) は 0.5%カゼイン (pH5.7) 1 ml に酵素液 1 ml を加え、30 °Cで 30 分間水解させ後、トリクロール酢酸可溶物を Folin-Lowry 法¹⁷⁾で測定し、生成チロシン量 (μ g/min) を 1 単位とした。ロイシンアミノペプチダーゼ (E. C. 3. 4. 11. 1) は 30 °Cで 1 mM ロイシン-p-ニトロアニリド (pH8.0) 1.8 ml に酵素液 0.2 ml を加え、30 °Cで 30 分間反応させ、遊離する p-ニトロアニリドを 400nm で測定し¹⁸⁾、生成するロイシン量 (μ g/min) を 1 単位とした。グルタミンナーゼ (E. C. 3. 5. 1. 35) は M/30 のグルタミンと mM/30 のヒドロキシルアミンの混合液 (pH8) 0.5 ml に酵素液 1 ml を 30 °Cで 1 時間反応させた後、5% FeCl₃-8N HCl 混合液 0.5 ml を加え 540nm で測定し¹⁸⁾、生成し

たグルタミン酸量 ($\mu\text{g}/\text{min}$) を1単位とした。リパーゼ (E. C. 3. 1. 1. 3) は5%トリトンで乳化させた10%オリーブ油 (pH6.6) に酵素液5mlを加えて37℃で1時間水解し、遊離する脂肪酸を $\text{N}/100$ NaOH で滴定した¹⁹⁾。1分間に遊離する脂肪酸の $\text{N}/100$ NaOH による滴定量を1単位とした。 β -グルコシダーゼ (E. C. 3. 2. 1. 21)²⁰⁾ は0.01 M p-ニトロフェノール- β -D-グルコピラノシド0.25mlと0.2M酢酸緩衝液 (pH4.5) 0.25mlに酵素液0.25mlを加え、40℃で30分間反応させた後、0.1M炭酸ナトリウム2.5mlを加え、400nmの吸光度を測定した。1分間に遊離する1 μmol の p-ニトロフェノールを生成する酵素量を1単位とした。

2. 4 抗酸化・抗変異原力測定用試料調製法

試料調製法 凍結乾燥した味噌にヘキサンを加えて室温で一夜振盪して脱脂した。ヘキサン残渣にエタノールを加えて一夜振盪し、エタノール可溶物を調整した。エタノール可溶物を低圧下で濃縮乾固した後、70%エタノールを加えて70%エタノール可溶物を調製した。エタノール不溶液に水を加え一夜振盪し、水可溶物を調製した。水可溶物中 Amberlite IRA-400 に吸着され、0.5N NaCl で溶出する画分をアニオン性化合物とした。加熱による抗酸化力の変化は凍結乾燥品を各溶媒で90℃で12時間加熱した試料を用いて測定した。

抗酸化力測定法 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去力0.1mM DPPH 0.4mlと0.1M酢酸緩衝液 (pH5.5) 0.4ml 試料を加え、517nmにおける吸光度を測定し、30秒間に吸光度の1/2を消去する試料量 (mg) を DPPH-IC₅₀とした。スーパーオキシドアニオン (O_2^-) ラジカル消去力²¹⁾ 0.2nM キサンチンとヒドロキシアミンの混合液 (pH8.2) に1/100mU キサンチンオキシダーゼを37℃で30分間作用させ、発生する O_2^- を亜硝酸に変換し、スルファニル酸とナフチルエチレンジアミンを反応させ、発生する紅色の呈色物質を550nmで測定し、 O_2^- の1/2を消去する試料量 (mg) を O_2^- -IC₅₀とした。

抗変異原力測定法 *Salmonella typhimurium* 100TA株を用い、N-nitrosodimethylamine を変異原とした Ames test (プレインキュベーション江幡法²²⁾) で測定した。

2. 5 超低塩味噌を利用した味噌料理

低塩味噌 (塩分 5.8%) のメニューにしたがって調製した²³⁾。

原料配合 カスタードクリーム：味噌10g、牛乳180ml、砂糖50g、薄力粉13g、卵黄20g。おでん味噌：味噌100g、酒30ml、砂糖20g、蜂蜜20g、水5ml。

官能検査法 料理は味噌の種類により6通りの異なる位置に配置し、味、香り、総合評価に関する好みの順位を記入させた。パネリストは食物栄養学専攻の女子学生 (21~22才) 24名を用いた。官能検査に先立ち、被験物の性質と検査目的を詳しく説明し、全員から文書でインフォームドコンセプトを得た。

2. 6 統計処理法

抗変異原力のデータは平均値±標準誤差で求め、SPSS 6.1J for Windows を用いて

Tukey の多重検定を行った。官能検査に関する嗜好順位の合計点を 2 点比較法の場合は Kramer test²⁴⁾ で、3 点比較法の場合は Newell & Farlance 法²⁵⁾ によって有意差を検定した。

③ 結果と考察

3. 1 S-オンチョムとO-オンチョムの成分組成

蒸煮大豆、S-オンチョムとO-オンチョムの成分組成を Table 1 に示す。S-オンチョムは蒸煮大豆に比べ、水分と炭水化物が少なく、相対的に祖タンパク質と祖脂肪が多かったが、その差は少なかった S-オンチョムを原料にした味噌は大豆を原料にした味噌と成分に大きな差はないであろう。O-オンチョムは蒸煮大豆に比べ、祖脂肪は少し少なかったが祖タンパク質量はほぼ同量だった。使用量が少なければ味噌の栄養価を低下させる恐れはないだろう。

3. 2 米麴、S-オンチョムとO-オンチョムの各種酵素活性

超低塩味噌の醸造には有害微生物の繁殖を防止するため最小限の食塩（4%）とアルコール（2%）の添加が必要とされている²⁶⁾。オンチョムを味噌の素材として活用する前に、米麴、S-オンチョムとO-オンチョムの各種酵素活性とそれらに対する4%食塩と2%アルコールの影響を比較した（Table 2）。S-オンチョムはプロテアーゼ活性とロイシニアミノペプチダーゼ活性が低く、食塩やアルコールによりさらに抑制された。したがって、S-オンチョムを味噌原料として用いても醸造中にタンパク質の分解を促進することは期待できなかった。しかしS-オンチョム調製時に大豆のタンパク質がアカパンカビのプロテアーゼやロイシニアミノペプチダーゼにより部分分解されているであろう。また、醸造中もこれらの酵素が米麴の酵素と共同的に作用して更にタンパク質を分解するであろう。S-オンチョムは米麴よりグルタミナーゼ活性、リパーゼ活性や β -グルコシダーゼ活性が同等もしくはより強力で、低濃度の食塩とアルコールが存在するところの傾向が強化された。味噌独特の香り成分の一部は遊離脂肪酸に由来する²⁷⁾とされている。大豆のイソフラボン配糖体は β -グルコシダーゼによってアグリコンに分解され²⁸⁾、強い抗酸化力を発揮する²⁹⁾ことが知られている。したがって、S-オンチョム味噌は味と香りが高く、抗酸化力が強いことが示唆された。O-オンチョムはいずれの酵素もS-オンチョムより活性が高かった。O-オンチョムでは大豆より栄養成分の少ないおからを培地にしてアカパンカビを培養するため、S-オンチョムより各種酵素活性が高められたのであろう。O-オンチョムの使用を少量に制限すれば、呈味性を低下させず、しかも味噌の醸造を促進し、抗酸化力を増進することが期待できた。

3. 3 超低塩味噌の特色

醸造期間中、毎週、pH、ホルモール窒素量、酸度Ⅰ、酸度Ⅱと直接還元糖量を測定し、それらが定常値に達した時を醸造の完了とすると、大豆味噌は6週間、S-オンチョム味噌とO-オンチョム味噌は5週間で醸造を完了した。醸造を完了した超低塩味噌の分析結果をTable 3に示す。S-オンチョム味噌は大豆味噌よりpHが高く、酸度Ⅰが小さかった。乳酸生成量が少ないことも影響していると思われる。オンチョムの成分が乳酸菌の増殖を妨げる可能性が示唆された。また、還元糖量が多く、糖加水分解率が高かった。アカパンカビのキシラナーゼやセルラーゼ活性が強い¹⁰⁾ ことに基づく現象であろう。タンパク質の変化に関してはホルモール窒素が多く、タンパク質分解率が高かった。この現象はアカパンカビによる前発酵と醸造中における米麹酵素とS-オンチョム酵素の協同作業の結果であろう。アルコール量に関しては、大豆味噌では仕込み時より増加したが、S-オンチョム味噌では減少し、アセトアルデヒドとエチルアセテートが増加していた。アルコールの一部がアセトアルデヒドに代謝されたり、S-オンチョムの強いリパーゼ (Table 2) により遊離した脂肪酸と結合してエステルを形成したのでであろう。色調はやや赤味がかって暗かった。還元糖とホルモール窒素が多いことから、メイラード反応が進行した結果と思われる。硬度は著しく低かった。アカパンカビはキシラナーゼやセルラーゼ活性が強い¹⁰⁾ ことから、大豆の細胞壁成分 (繊維) の分解促進が示唆された。O-オンチョム味噌でもこれらの傾向が顕著に認められた。

3. 4 超低塩味噌の抗酸化力

一般に味噌は抗酸化力が強いことが知られている。超低塩味噌の加熱による抗酸化力の変化をDPPH-IC₅₀とO₂⁻-IC₅₀で比較した (Table 4)。非加熱味噌のDPPH-IC₅₀とO₂⁻-IC₅₀は70%エタノール可溶物と水可溶物のいずれもO-オンチョム味噌、S-オンチョム味噌、大豆味噌の順に小さかった。すなわち、抗酸化力はO-オンチョム味噌、S-オンチョム味噌、大豆味噌の順に強かった。この結果から、アカパンカビが生成した抗酸化物質は味噌醸造中も保持されるか、醸造により増強される可能性が示唆された。味噌を加熱 (90℃、12h) すると、DPPH-IC₅₀とO₂⁻-IC₅₀の数値はすべての味噌で増大し、抗酸化力が低下した。しかし、加熱O-オンチョム味噌は、70%エタノール可溶物と水可溶物のいずれにおいても非加熱大豆味噌より小さい値にとどまった。私は脱脂大豆オンチョムの水可溶物は生体外のみならず、生体内でも強い抗酸化活性を示すことを報告している⁹⁾。生体内抗酸化力はDPPHラジカル消去力よりO₂⁻-ラジカル消去力により反映されると仮定すると、O-オンチョム味噌も生体内で強い抗酸化力を発揮し、その作用が大豆味噌より強い期待できた。

O-オンチョム味噌の70%エタノール可溶物はO₂⁻消去力が強かった。大豆イソフラボン¹¹⁾は70%エタノールに可溶で、配糖体はβ-グルコシダーゼにより水解され

てアグリコンになり²⁸⁾、イソフラボンのアグリコンは配糖体より抗酸化力が強い²⁹⁾ことが知られている。O-オンチョムは β -グルコシダーゼ活性が著しく強い (Table 2) ことから、O-オンチョム味噌-70%エタノール可溶物の抗酸化力にはイソフラボン-アグリコンが関与していることが示唆された。超低塩味噌のイソフラボン量を分析し、その結果を Table 5 に示す。アグリコン量は、O-オンチョム味噌、S-オンチョム味噌、大豆味噌の順であった。O-オンチョム-70%エタノール可溶物の抗酸化力には豊富に含まれているイソフラボンのアグリコンが関与しているであろう。

3. 5 超低塩味噌の抗変異原力

超低塩味噌の70%エタノール可溶物と水可溶物の抗変異原力を比較した (Table 6)。S-オンチョム味噌とO-オンチョム味噌は70%エタノール可溶物、水可溶物の順序で強い抗変異原力が確認された。味噌のメタノール可溶物には抗変異原力があり、主たる原因物質はダイゼインとゲニステインであると報告されている³⁰⁾。O-オンチョム味噌とS-オンチョム味噌はこの順序でイソフラボンのアグリコン量が多い (Table 5) ことから、O-オンチョムの70%エタノール可溶物の抗変異原力の一部はイソフラボンのアグリコンによるものであろう。私は脱脂大豆をオンチョムに加工すると水可溶物の抗変異原力が増大することを発表している⁸⁾。アカパンカビによって生成された抗変異原物質は味噌に加工しても作用効力が保続することが示唆された。

3. 6 超低塩味噌の具体的活用例と嗜好性

超低塩味噌を利用して調製したおでん味噌とカスタードクリームとの嗜好順位の合計点を Table 7 に示す。おでん味噌の場合、味噌の種類による嗜好性に差は認められなかった。カスタードクリームの場合、大豆味噌を使用すると味に深みが増し、卵臭が弱くなって嗜好度が向上した。3種の味噌を比較するとO-オンチョム味噌を使用したクリームが他の2種の味噌より有意に好まれた。ホルモール窒素量 (Table 3) の多さが味の評価を高めた可能性がある。

④ 今後の課題

今後、超低塩O-オンチョム味噌を利用したレシピを多数の開発すれば、超低塩O-オンチョム味噌は新しいタイプの味噌としての普及が期待できる。

⑤ 文献

- 1) Horii, M., Ido, T., Kawashima, K. and Yamamoto, T. Hypocholesterolemic activity of desalted miso in rats fed an atherogenic diet. *日食科工誌*, 37, 148 - 153 (1990).
- 2) Ohara, M., Lu, H., Shiraki, K., Ishimura, Y., Uesaka, T., Katoh, O., Watanabe, H. Prevention by long-term fermented miso of induction of colonic aberrant crypt foci by azoxymethane in F344 rats. *Oncol Rep.*, 9 (1), 69 - 73 (2002).
- 3) Kanda, A., Hoshiyama, Y., Kawaguchi, T. Association of lifestyle parameters with the prevention of hypertension in elderly Japanese men and women: a four-year follow-up of normotensive subjects. *Asia Pac J Public Health*, 11 (2), 77 - 81 (1999).
- 4) Kanazawa, T., Osanai, T., Zhang, X. S., Uemura, T., Yin, X. Z., Onodera, K., Oike, Y., Ohkubo, K. Protective effects of soy protein on the peroxidizability of lipoproteins in cerebrovascular diseases. *J. Nutr.* 125, 639S - 646S (1995).
- 5) Sastraatmadja, D. D., Tomita, F. and Kasai, T. Production of high-quality oncom, a Traditional Indonesian fermented food, by the inoculation with selected mold strains in the form of pure culture and solid inoculum. *J. Grad. Sch. Agr. Hokkaido univ.*, 70 (2), 111 - 127 (2002).
- 6) Matsuo, M. and Yumoto, Y. Preparations of tasty improved defatted soybean Ontjoms (fermented products with *Neurospora intermedia*). *Food Sci. Technol. Res.*, 5, 168 - 170 (1999).
- 7) Matsuo, M. Plasma cholesterol reduction by defatted soy ontjom (fermented with *Neurospora intermedia*) in rats fed a cholesterol-free diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 46, 33 - 33 (2000).
- 8) 松尾眞砂子. 脱脂大豆オンチョム (*Neurospora intermedia* 発酵物) の抗変異原性の特質、第5回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, p. 247 (2001).
- 9) 松尾眞砂子. アカパンカビで発酵させた脱脂大豆 (D-オンチョム) の抗酸化作用、*栄食誌*, 54, 305 - 309 (2001).
- 10) 味噌品質表示基準、農林省告示第607号、(1974).
- 11) 松尾眞砂子. おからオンチョムの調製法と成分特性. *日食料工誌*, 44, 632 - 639 (1997).

- 12) 今井誠一, 松本勲. 低食塩味噌の製造に関する研究 (第1報). 醸協, 72, 897 - 900 (1997).
- 13) 全国味噌技術会編, 基準味噌分析法 (改定版), 東京. pp. 3 - 35 (1968).
- 14) 館博, 綾部浩太郎, 菊地修平. おからを用いた味噌風調味料の製造 (第2報), 味噌の科学と技術, 41, 144 - 146 (1993).
- 15) 本間伸夫, 稲越徳子, 澁谷歌子, 石原和夫, 岡田玲子. 加熱によるみそ汁低沸点香氣成分の変化, 家政誌, 24, 177 - 183 (1973).
- 16) Matsuo, M. *In vivo* antioxidant activity of okara koji, a fermented okara, by *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1968 - 1972 (1997).
- 17) 菅原潔・副島正美. フェノール試薬法, 「蛋白質の定量法」, (学会出版センター, 東京), pp98 - 108 (1986).
- 18) 中台忠信. 醤油麹菌の生産する各酵素の役割. 醬研, 11, 67 - 79 (1985).
- 19) Lilian, A. D. In "Worthington enzyme Manual", (Worthington Biochemical Corporation, U. S. A.), p. 122 (1977).
- 20) Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimoi, H. and Ito, K. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β - glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1938 - 1946 (1998).
- 21) Oyanagi, Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, 142, 290 - 296 (1984).
- 22) Ebata, J. and Furukawa, H. Enhancement of mutagenicity of N - nitroso - dimethylamine (NDMA) by a modified microsomal bacterial preincubation assay. *Mutat. Res.*, 37, S175 (1997).
- 23) 斎藤孔男, 味噌を用いた加工食品の開発, 合津若松工誌, 昭和58年版, 71 - 78 (1984)
- 24) Kramer, A. Revised tables for determining significance of differences. *Food Technol.*, 17, 124 - 126 (1963)
- 25) Newell, G. J. and MacFarlane, J. D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *J. Food Sci.*, 52, 1721 - 1725 (1987).
- 26) 岡田安司, 竹内徳男. 低食塩味噌について. 醸協, 72, 181 - 184 (1977).
- 27) 海老根英雄. 味噌醸造微生物の進歩 (1). 醸協, 80, 102 - 108 (1985).

- 28) Hsieh MC, Graham T. L. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*, 58, 995 - 1005 (2001).
- 29) Pratt, DE. and Birac, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, 44, 1720 - 1722 (1979).
- 30) Kiyosawa, I., Matsuyama, J., Arai, C., Setoguchi, T. Suppressing effects of the methanol extracts from soybean products on SOS response of *Salmonella typhimurium* induced by mutagens and their contents of isoflavones. *日食科工誌*, 42, 835 - 842 (1995) (in English).

Table 1. Chemical compositiona of cooked soybean, S-ontjom and O-ontjom.

	Cooked soybean		S-Ontjtm		O-Ontjom	
Moisture	63.5	59.8	50.9			
Crude protein	13.8	17.4	13.1			
Crude fat	7.0	9.0	4.5			
Carbohydrate	13.9	11.8	29.7			
Ash	2.0	2.0	1.8			
Total	100.0	100.0	100.0			

Table 2. Effect of 4% salt and 2% ethanol on enzyme activities of three kind kojis for miso.

Enzymes	NaCl (%)	Ethanol (%)	Activity(U/g)						Activity(%)		
			Rice koji		S-Ontjom		O-Ontjom		Rice koji	S-Ontjom	O-Ontjom
Protease	0	0	65.2	19.7	35.7			100	30	55	
	4	2	45.4	15.5	9.5			70	24	15	
Leu. Ami. pep	0	0	4.2	2.1	3.0			100	50	71	
	4	2	2.3	1.4	0			54	33	0	
Glutaminase	0	0	0.15	0.15	0.30			100	100	200	
	2	2	0.05	0.17	0.23			30	110	150	
Lipase	0	0	0.087	0.131	0.357			100	151	410	
	4	2	0.011	0.025	0.032			12	29	37	
β -Glucosidase	0	0	113	3000	7750			100	266	688	
	4	2	87	2650	7420			77	235	658	

Table 3. Chemical character of ultra-low-salted misos.

Item	Soybeans	S-Ontjom	O-Ontjom
Water(%)	52.9	52.0	51.8
Salt(%)	3.8	3.7	3.8
pH	5.2	5.8	5.7
Acidity I (ml)	11.3	9.1	8.9
Acidity II (ml)	11.0	13.2	12.8
Total Sugar(%)	16.9	17.5	18.0
Reducig Sugar(%)	12.1	13.4	14.5
Sugar hydrolysis(%)	71.9	76.3	81.0
Total nitrogen(%)	1.9	2.1	2.1
Soluble nitrogen(%)	1.1	1.1	1.2
Formol nitrogen(%)	0.5	0.6	0.7
Protein solubility(%)	56.7	53.0	56.4
Protein hydrolysis(%)	22.6	27.5	32.5
Ethanol(%)	2.38	1.93	1.57
Acetaldehyde(mg%)	10	19	20
Ethyl acetate(mg%)	7	9	9
Citric acid(mg%)	107	142	135
Lactic acid(mg%)	112	93	91
Acetic acid(mg%)	223	230	219
Pyroglutamic acid(mg%)	29	36	34
Color L	35.2	24.3	26.3
a	9.5	10.9	10.8
b	16.5	12.6	14.0
Hardness($\times 10^3 N/m^2$)	12.2	4.3	4.0

Table 4. DPPH-IC₅₀ and O₂⁻-IC₅₀ of ultra-low-salted misos.

Ultra-low-salted misos	DPPH-IC ₅₀						O ₂ ⁻ -IC ₅₀						
	Hexane			70%EtOH			70%EtOH			Water			
	Raw	Cooked	Water	Raw	Cooked	Water	Raw	Cooked	Water	Raw	Cooked	Water	
Soybeans	805	16.2	5.9	26.3	14.3	31.1	45.8	32.2	70.0	31.1	45.8	32.2	70.0
S-Ontjom	400	11.6	5.5	9.8	6.7	29.7	35.7	14.4	33.1	29.7	35.7	14.4	33.1
O-Ontjom	710	7.9	5.0	8.6	5.5	17.1	28.5	11.3	25.3	17.1	28.5	11.3	25.3

Table 5. Isoflavones of ultra-low-salted misos.

Isoflavones (mg%)	Ultra-low-salted misoes		
	Soybeans	S-Ontjom	O-Ontjom
Daidzin	4.3	1.7	N. D.
Genistin	2.03	0.5	N. D.
Daidzein	3.93	6.3	8.7
Genisrein	4.93	8.6	15.0
N. D. not detected.			

Table 6. Antimutagenesis of ultra-low-salted misos extracted with 70% ethanol and water.

Ultra-low-salted misos	Extract	
	70% ethanol (3mg miso/plate) Suppression(%)	Water (4mg miso/plate) Suppression(%)
Soybeans	45.8±5.2 ^b	26.3±7.0 ^{ab}
S-Ontjom	53.5±2.3 ^{ab}	13.3±5.0 ^b
O-Ontjom	60.9±2.7 ^a	30.1±2.6 ^a

Values in the column not aharing a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test Mean±SE(n=3).

Table 7. Sensory rank sum of dishes used ultra-low-salted misos.

Ultra-low-salted misos	Oden-miso			Custard cream		
	Taste	Smell	Overall preference	Taste	Smell	Overall preference
Nonuse				42	43	42
Soybeans				30*	29*	30*
Soybeans	46	53	49	50	60	56
S-Ontjom	51	42	49	48	49	49
O-Ontjom	47	49	46	46	35*	39*

Twenty-four female students 21 or 22 y old specializing in food science were asked to rank about her preference for the three samples in different orders from the viewpoint of taste, smell and their combined evaluation.

The ranked data were analyzed for differences between rank sums by Kramer's test and the table for multiple comparison procedures of Newell and Macfarlane. * $p < 0.05$.

Development and Utilization of Ultra—low—salted Miso by *Neurospora intermedia*.

Masako MATSUO

Gifu Women's University, Faculty of General Education

S u m m a r y

Miso has various valuable physiological functions and been used in healthy maintenance. However, nowadays the consumption of miso is decreasing along with the popularization of western food in Japan and also due to its high salt content. In Indonesia, *ontjoms*, non—salt traditional fermentation foods made from peanut press cake, soybean curd (okara) etc. by *Neurospora intermedia* have been developed and consumed. Recently I have prepared defatted soybean ontjom using defatted soybean as raw material and found to have various physiological functions. Since *Neurospora* and *Aspergillus* belong to different mycotina, namely, *Ascomycotina* and *Deuteromycotina* respectively, if soybean—ontjom(s—ontjom) and okara—ontjom(o—ontjom) are used together to make miso, new bioactive substances which may never been found in conventional miso might be produced via the collaborative effects of the different fungal enzymes. This study deals with the preparation of ultra—low—salted miso using S—ontjom and O—ontjom in order to preserve the traditional miso—eating habit, to prevent life—style related diseases and to enhance health.

Three kinds of ultra—low—salted misos, namely, soy—miso using 100% soybeans, S—ontjom—miso using 100% S—ontjom and O—ontjom—miso using 90% S—ontjom and 10% O—ontjom respectively, were brewed with 50% rice koji (malted rice), 4% salt, 2% alcohol and 1.0×10^5 *Zygosaccharomyces rouxii* IAM 4114 at 30°C.

Fermentation of S—ontjom—miso and O—ontjom—miso was completed for 5 weeks that was one week shorter than that of soy—miso. 1,1—Diphenyl—2—picryl—hydrazil(DPPH) and superoxide anion (O_2^-) of scavenging activity of the 3 misos decreased as follows: O—ontjom—miso, S—ontjom—miso and soy—miso. Seventy percent ethanol soluble substances as well as water soluble substances from O—ontjom—miso showed strong O_2^- scavenging and antimutagenesis activity. Therefore, O—ontjom—miso could be expected to be useful for healthy improvement and maintenance. The effects of 70% ethanol soluble substances might be contributed to isoflavone—aglycones. The antioxidative activity of O—ontjom—miso was weakened while it was over—heated. Oben—miso and custardcream prepared with O—ontjom—miso have improved taste that enhanced the preference. Therefore, the more new recipes using ultra—low—salted misos as an ingredient are created, the more popularity O—ontjom—miso will win in the future.