

オンチョム菌を活用した高機能・高嗜好性低塩味噌の醸造とその活用

助成研究者： 松尾真砂子

所属機関： 岐阜女子大学 家政学部

味噌は我が国の伝統的調味料で、古くから日本人の栄養と健康維持に大きく貢献してきた。しかし、食生活の欧風化にともない消費量が暫減の傾向にある。松尾は、昨年、味噌の消費を維持するために、オンチョム菌で発酵させた大豆(オンチョム麹)を活用して塩分4%の超低塩味噌(オンチョム味噌)を調製し、嗜好性が高く、従来の味噌料理の領域を超えた料理にも使用でき、しかも、抗酸化力、抗変異原力が強いことを証明した。しかし、通常の味噌は高い塩分濃度によって保存性を維持している。超低塩味噌は塩分濃度が低いため保存性が劣るであろう。また、味噌を利用した料理は長い伝統があり、超低塩味噌を直ちに通常の従来の味噌の代替え調味料として普及させることは難しいと思われる。本研究では、オンチョム味噌を実用化・普及させることを目的に、オンチョム麹を活用して塩分濃度が6%の低塩オンチョム味噌(O-味噌)を調製し、その呈味性と抗酸化・抗変異原性物質としての機能性を蒸煮大豆を用いて調製した低塩味噌(塩分6%, S-味噌)と比較した。

O-味噌の70%エタノール抽出物はS-味噌の70%エタノール抽出物より1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジラジカル消去力とスーパーオキシドアニオン消去力、抗変異原力が著しく強かった。O-味噌はS-味噌よりイソフラボンのアグリコンを多く含んでおり、O-味噌の抗酸化力や抗変異原力にはイソフラボンのアグリコンの関与が示唆された。O-味噌を加熱すると抗酸化力は変化せず、抗変異原力はわずかに減弱したが、加熱したS-味噌より強かった。したがって、O-味噌は調理してもS-味噌より強い健康の維持・増進効果が期待できた。O-味噌をラットに投与すると、S-味噌を投与したラットより血清の過酸化物が少なく、血清コレステロールレベルが低く、ステロールの排泄量が多かった。また、血清のグルタチオンペルオキシダーゼやスーパーオキシドアニオンジスムターゼと肝臓のカタラーゼの活性が高かった。肝臓におけるコレステロール7 α -脱水素酵素活性には差が無かったが、盲腸内における短鎖脂肪酸の生成が弱かった。これらの結果から、O-味噌にはS-味噌より強力な活性酸素消去力にもとづく生体内抗酸化力とステロール排泄促進力にもとづく血清コレステロール低下作用のあることが確認できた。O-味噌をマヨネーズ、ドレッシング、ポタージュや蒸しパンの調製に使用すると美味しいと評価された。以上の結果から、O-味噌はS-味噌より健康の維持・増進に役立つ調味料として伝統的味噌料理の範囲を超え、広い領域の料理に活用されることが期待できた。

23

助成番号 0254

オンチヨム菌を活用した高機能・高嗜好性低塩味噌の醸造とその活用

研究助成者：松尾 眞砂子（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、古くから日本人の栄養と健康維持に大きく貢献してきた。しかし、食生活の欧風化にともない消費量が暫減の傾向にある。松尾は、これまでにおからや大豆をオンチヨム菌 (*Neurospora intermedia*) で発酵させたおからオンチヨム (O-オンチヨム)¹⁾ や大豆オンチヨム (S-オンチヨム)²⁾ には独特の旨味があることを報告している。そこで、昨年、味噌の消費を維持するために、従来味噌より塩分濃度が低く、幅広い料理に活用できる味噌の開発をめざして、オンチヨム菌で発酵させた大豆やおからを仕込み原料にして塩分4%の味噌様発酵調味料を調製し、未発酵大豆を原料にした塩分4%の味噌様発酵調味料より抗酸化力、抗変異原力と嗜好性が高いことを証明した³⁾。しかし、通常の味噌はその高い塩分濃度によって保存性を維持している。塩分4%の味噌様発酵調味料は塩分濃度が低いため保存性が劣るであろう。また、味噌の利用・料理法には長い伝統があり、超低塩味噌を直ちにポピュラーな調味料として従来味噌の代わりに普及させることは難しいと思われる。また、味噌にはコレステロール低下作用⁴⁾があることが知られている。本研究ではオンチヨム菌を利用した味噌様発酵調味料の実用化と普及を目的に、オンチヨム菌で発酵させた大豆やおからを仕込み原料にして塩分6%の低塩味噌 (O-味噌) を開発し、その呈味性、抗変異原力、抗酸化力、血清コレステロール低下力を未発酵大豆を用いた低塩味噌 (S-味噌、塩分6%) と比較した。

② 研究方法

2.1 オンチヨム調製法

O-オンチヨム¹⁾は *Neurospora intermedia* FGSC 2559 (Fungal Genetic Stock Center, USA) 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℃で18時間保温して発芽させ、その後、27℃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-オンチヨムは水分を60%に調整した大豆を培地にして

同様に処理した。

2.2 低塩味噌の醸造法と成分分析法

低塩味噌醸造法 S-味噌は蒸煮大豆1kgに米麴0.5kgを配合し、大豆の蒸煮水の全量を種水として活用して水分を50%に調整し、食塩を6%とエタノールを2%になるように添加して、30℃で醸造した。O-味噌は蒸煮大豆の代わりにS-オンチョム0.9kgとO-オンチョムを0.1kgを使用した(Table 1)。

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: いずれも味噌基準分析法⁵⁾によって分析した。有機酸: 0.2N 塩酸抽出液⁶⁾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。香氣成分⁷⁾: 水蒸気蒸留液を80℃のPEG 6000 25% on Celite 545U, 60-80 mesh (3mm×2m)で分析し、150℃のFIDで検出した。色調: 測色色差計(日本電色工業株式会社、ND-1000DP)を用い、ハンターの色度を測定した。硬度: 10×10×10mmに整形した試料を用い、クランプメーター(山電 RE-3305)でプランジャー10mmφ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: 70%エタノール抽出物をCrestPak C₁₈Sカラム(4.6×150nm)を用い、40℃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⁸⁾。

2.3 動物飼育法

4週齢のWistar系雄ラット(日本SLC)15匹を3群に分け、ステンレス製個別ケージに入れ、24±2℃、湿度55±10%、自動照明8:00-20:00の部屋で試験飼料を14日間投与した。試験飼料はAIN-93に準じた。ただし、各味噌40%、メチオニン0.6%、コレステロール0.5%、コール酸ナトリウム0.25%を配合し、分離大豆タンパク質(不二製油株式会社)でタンパク質レベルを20%に調整し、精製魚油(カイコー株式会社、アンチョビ由来、ドコサヘキサエンサン6.21%、エイコサペンタエンサン23.72%を含む、POV15.9)で脂肪含量を10%に調整した。飼料は調製後、ただちに-30℃で冷凍保存し、毎日必要量を解凍して給餌した。飼育期間を終了したラットはエーテル麻酔下で開腹し、心臓から直接採血した。

2.4 分析法

抗酸化力・抗変異原力測定用試料 室温抽出試料: 凍結乾燥した味噌に10倍量のヘキサンを加えて一夜振盪して脱脂し、脱脂試料に10倍量のエタノールを加えて一夜振盪し、エタノール可溶物を抽出した。エタノール可溶物を低圧下で濃縮乾固した。エタノール抽出残部に70%エタノールを加えて70%エタノール可溶物を抽出・分離した。エタノール抽出残部に水を加えて一夜振盪し、水可溶物を抽出した。水可溶物をAmberlite IRA-400に吸着さ

せ、0.5M NaCl で溶出する画分をアニオン性化合物とした。加熱抽出試料：凍結乾燥試料を室温抽出時と同じ溶媒を用い、90℃で12時間加熱抽出した。

抗酸化力 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 0.4 ml と 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 0.4 ml に試料を加え、30 秒間に 517 nm における吸光度の 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(O₂⁻)ラジカル消去力⁹⁾: 0.2 mM キサンチンとヒドロキシアミンの混合液 (pH 8.2) に 1/100 mU キサンチンオキシダーゼ(EC 1.2.3.2)を 37℃で 30 分間作用させ、発生する O₂⁻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 550 nm で測定し、O₂⁻の 1/2 を消去する試料量 (mg) を O₂⁻-IC₅₀ とした。α-トコフェロール濃度: 血清濃度はビタミン学会法¹⁰⁾によりエタノール:水:ヘキサン(2:1:10)混合液で抽出し、HPLC で分析した。飼料中の濃度はヘキサン抽出液を用いて測定した。過酸化物質価 (Thiobarbituric acid reactive substance value, TBARS 値): 血漿の値は市販の過酸化脂質測定キット(過酸化脂質測定キット、和光純薬)を用い、肝臓の値は Ohkawa らの方法¹¹⁾により比色定量した。

酵素活性 グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px, EC 1.11.1.9)活性¹²⁾: 20 mM GSH(0.1 ml), 4U GSH 還元酵素 (0.1 ml), 1 mM NDDPH(0.1ml), 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0, 0.3ml)と 10mM NaN₃(0.1 ml) を 2.5 mM の過酸化水素と血清や肝臓の上清と 37℃で反応させ、NADPH の消費を 550nm の吸収で測定した。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD, EC 1.15.1.1)¹³⁾ 活性: 65mM リン酸緩衝液 (pH 8.2, 0.1 ml), 0.5 mM キサンチン(0.1 ml), 10 mM ヒドロキシルアミン(0.005 ml), キサンチンオキシダーゼ (EC 1.2.3.2)の混合液に血清や肝臓の上清を 37℃で 30 分反応させた。カタラーゼ (EC 1.11.1.6)活性: 0.025%過酸化水(3ml)に血清や肝臓の上清を加え 25℃で 240nm の吸収の減少を測定した。コレステロール 7α-脱水素酵素 (EC 1.14.13.17)活性: ラットの肝臓から Kamath らの方法¹⁴⁾により分離したマイクロソームの α-コレステロール脱水素酵素活性を Ogishima らの方法¹⁵⁾に従い、HPLC を用いて 240 nm で測定した。

ステロール 血清総コレステロール: コレステロール E-テストワコー (和光純薬)で測定した。糞中ステロールはクロロホルム:メタノール(5:1, v/v)で抽出し、silicone OV-17 (Uniport HP, 60-80 mesh: 2mm×1.5m glass type: oven temp. 150-270℃(5℃/min)で分析した¹⁶⁾。胆汁酸: クロロホルム:メタノール抽出液を蒸発させた後、イソプロピルアルコール溶出物を総胆汁酸-テストワコー (和光純薬)で測定した。

レジスタントプロテイン 牧野らの方法¹⁷⁾で分離したタンパク質を岩井らの方法¹⁸⁾で消化し、その中和液の不溶物を水で数回洗浄した後、凍結乾燥した。さらに、凍結乾燥粉末を 10 倍量のメタノールで 2 回洗浄した。

胆汁酸吸着力 菅野らの方法¹⁹⁾に従ってレジスタントプロテイン 0.1g を 330 μ mol タウロコ

ール酸を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)1.5ml と 37°C で 2時間激しく振盪し、その反応液をセロハンチューブ (Union Carbide Co., USA; 分子量カット 12,00-14,00) に詰めて同上記組成の緩衝液 1ml に 3日間透析した。タウロコール酸は総胆汁酸-テストワコー (和光純薬) で測定した。

短鎖脂肪酸 盲腸内容物 1g をメタノール 1ml に懸濁し、その抽出液を工藤らの方法²⁰⁾を用いて polyethyleneglycol 6000 (Shimalite TPA, 60-80 mesh: 2mm×1.5m glass type: oven temp. 150°C で分析した。

2.5 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 テスト (プレインキュベーション江幡法²¹⁾) で測定した。

2.6 低塩味噌を利用した味噌料理

味噌-マヨネーズ 低塩味噌 25 g と マヨネーズ(Q 社製) 75g を良く混ぜ合わせる。味噌-ドレッシング: 低塩味噌 100g に砂糖 20g 加えてよく混合する。ついで食酢(M 社製) 18 g を加え混ぜる。さらに、サラダ油(N 社製) 20 g を少量ずつ混合する。ミジン切りしたタマネギ 30g を加えて混ぜる。味噌-ポタージュ: 低塩味噌 15g に牛乳 75ml を少しづつ加え、混合する。別容器にミジン切りタマネギ 50g を入れ、水 350ml を加えて柔らかくなるまで加熱し、コンソメスープの素 5.3g、コーンスターチ 1.2g、乾燥裏ごしポテト(K 社製) 50g を加え1分間煮沸する。味噌-蒸しパン: 薄力粉 125g とベーキングパウダー3g を合わせて3回篩っておく。低塩味噌 37.5g 砂糖 62.5g と牛乳 65ml を加え弱火で加熱し、沸騰したら直ちに冷却する。卵 30g を加えよく混ぜる。先に篩っておいた小麦粉に上記混合液を加え、ゴムベラで切るように混ぜ合わせる。アルミカップの中に 47g ずつ入れ、蒸し器(強火)で15分間蒸す。

2.7 官能検査と統計処理法

官能検査はパネリストに食物栄養学専攻の女子学生(21~22 才)40 名を用い、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てから行なった。非加熱味噌の官能検査は苦味と甘い香りをより強く感ずるものを選ばせ、味噌を用いた料理の官能検査は不味い(-2)、やや不味い(-1)、不味くもおいしくもない(0)、やや美味しい(+1)、美味しい(+2)の5段階に評価させ、一対比較嗜好テスト²³⁾で有意差を検討した。

抗変異原力、抗酸化力のデータは平均値±標準誤差を求め、SPSS 6.1J for Windows を用いて Tukey の多重検定を行った。

③ 結果と考察

3.1 低塩味噌の特色

醸造期間中、定期的に 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、それらの値が定常値に達した時を醸造の完了時とすると、S-味噌は 7 週、O-味噌は 6 週で醸造を完了した。醸造を完了した低塩味噌の物理・化学的特色を Table 2 に示す。各項目の値は O-味噌と S-味噌の間にいずれも大きな差は認められなかった。色調に関しては O-味噌は S-味噌よりやや赤味がかって暗かった。原料のオンチョムがオンチョム菌のオレンジ色の孢子を含んでいることも一因であろう。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¹⁾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。

3.2 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。低塩味噌の加熱による抗酸化力の変化を 70%エタノール抽出物と水抽出物の DPPH-IC₅₀と O₂⁻-IC₅₀ で比較した(Table 3)。低塩味噌の DPPH ラジカル消去力と O₂⁻消去力はいずれの味噌も 70%エタノール抽出物が水抽出物より著しく強く、O-味噌の 70%エタノール抽出物は S-味噌の 70%エタノール抽出物より強かった。S-味噌を 90℃で 12h 加熱すると DPPH ラジカル消去力は 70%エタノール抽出物と水抽出物のいずれにおいても増大した。O-味噌のラジカル消去力は 70%エタノール抽出物では変化しなかったが、水抽出物では増大した。しかし、70%エタノール抽出物の消去力には及ばなかった。O₂⁻消去力に関しては 70%エタノール抽出物はいずれの味噌も加熱によりほとんど変化しなかった。しかし、O-味噌の場合、加熱により著しく増強された。DPPH は非生体物質であるため、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って反映されると仮定すると、O-味噌は生体内でも強い抗酸化力を発揮し、その効力は S-味噌より強く、加熱調理操作後も効力が持続することが期待できた。

イソフラボンのアグリコンは抗酸化力が強いことが知られており²³⁾、超低塩オンチョム味噌は多量のソフラボン-アグリコンを含んでいた³⁾。低塩味噌の 70%エタノール抽出物を分析すると(Table 4)、O-味噌は S-低塩味噌よりイソフラボンのアグリコンが著しく多く、加熱するとやや減少したが、非加熱 S-味噌よりはるかに多かった。この結果からも O-味噌には強い抗酸化力が期待できた。

3.3 低塩味噌の生体内抗酸化力

低塩味噌の生体内抗酸化力を検討するため、ラットに低塩味噌を 40%含む飼料を 2 週間投与し、飼育期間中の飼料摂取量と体重増加量、血清の TBARS 値、血清の α-

トコフェロールレベルを比較した(Table 5)。O-味噌飼料群のラットはS-味噌飼料群のラットに比べ飼料摂取量はやや少なかったが、体重増加量は同程度だった。さらに、O-味噌を摂取したラットは血清のTBARS値が低く、血清の α -トコフェロールレベルが高かった。この事実は低塩オンチョム味噌の成分が生体内で抗酸化力を発揮し、 α -トコフェロールの消費を抑制したことを示唆していた。

TBARS値はヒドロキシラジカルや O_2^- の増加のような酸化ストレスにより上昇する²⁴⁾が、ハーブのような抗酸化物質はSODやGSH-Px活性を促進してTBARS値を低下させた²⁵⁾との報告がある。血清と肝臓について過酸化物の生成抑制に関与する酵素活性を測定すると(Table 6)、O-味噌群はS-味噌群に比べ、血清のGSH-Px活性とSOD活性、さらに、肝臓のカタラーゼ活性が高かった。この結果からO-味噌のある種の成分がペルヒドロキシ化合物のような過酸化物の還元を促進し、生体内抗酸化作用を発揮したことが示唆された。

3.4 低塩味噌の血清コレステロール低下作用

大豆のレジスタントプロテインは胆汁酸吸着力が強く、血清コレステロールレベルを低下させることが知られている¹⁹⁾。また、脱塩した味噌が血清コレステロールレベルを低下させたとの報告がある⁴⁾。本研究ではO-味噌とS-味噌を脱塩しないでラットに投与し、血清コレステロールレベルと糞中ステロール量を比較した(Table 7)。O-味噌を投与したラットはS-味噌を投与したラットより血清コレステロールレベルが低く、糞中胆汁酸排泄量が多かった。

低塩味噌のレジスタントプロテイン含量と胆汁酸吸着力を測定すると(Table 8)、O-味噌はS-味噌よりレジスタントプロテイン含量が多く、レジスタントプロテインの胆汁酸吸着力は弱かったが、味噌の単位重量当たりの胆汁酸吸着量が多かった。この結果から、O-味噌の胆汁酸排泄作用はレジスタントプロテイン含量が多いことが一つの要因であろう。

腸内細菌により生成される短鎖脂肪酸はコレステロールの合成を抑制することが知られている²⁶⁾。

また、コレステロールの胆汁酸への代謝はコレステロール7 α 脱水素酵素によって律速されることが知られている¹⁵⁾。そこでラットの盲腸内短鎖脂肪酸量と肝臓ミクロソームのコレステロール7 α 脱水素酵素活性を測定した(Table 9)。O-味噌投与群はS-味噌投与群より盲腸内の酢酸、プロピオン酸、酪酸量がいずれも少なく、コレステロール7 α 脱水素酵素の活性には差が無かった。したがって、O-味噌のコレステロール低下作用は水溶性食物繊維から生成される短鎖脂肪酸によるコレステロールの合成抑制やコレステロールの胆汁酸への代謝促進によるものではなく、主としてレジスタントプロテインによる胆汁酸排泄促進作用によるものであろう。

3.5 低塩味噌の抗変異原力

低塩味噌の抗変異原力を測定すると(Table 10)、70%エタノール抽出物の抗変異原力は水抽出物より著しく強く、O-味噌はS-味噌より強かった。味噌を加熱すると70%エタノール抽出物の抗変異原力は約80%に低下したが、O-味噌はS-味噌より強かった。すなわち、O-味噌を使用した料理はS-味噌を使用した料理より健康の維持・増進に役立つことが示唆された。

3.6 低塩味噌の嗜好性

O-味噌の特徴を把握するため、非加熱低塩味噌の味と香りについて官能検査を行うと、O-味噌はS-味噌よりかすかに苦味が強く、甘い香りが弱かった(Table 11)。O-味噌はイソフラボンのアグリコンが多く(Table 4)、イソフラボンのアグリコンは収斂性が強いことが知られている²⁷⁾。O-味噌の苦味の一部はイソフラボンのアグリコンに基づきものである。

味噌の風味がかすかに感じられる程度に低塩味噌を使用した洋風料理や甘い菓子を調製し、それらの嗜好性を官能検査で評価した(Table 12)。O-味噌を使用した料理はS-味噌を使用した料理より嗜好性が少し劣るが、いずれも美味しいと評価された。

以上の結果から、O-味噌は健康の維持増進に役立つ新しい調味料として伝統的味噌料理の範囲を越えて広い領域の料理にも活用されることが期待できた。

④ 今後の課題

本報告のO-味噌はかすかな苦味を有する。オンチョムの配合率を検討し、苦味を感じさせないO-味噌が調製できるように醸造法を改善する必要がある。

⑤ 文献

- 1) 松尾真砂子. おからオンチョムの調製法と成分特性. (1997). 食科工誌, 44, 632-639.
- 2) Matsuo, M. and Yumoto, Y. (1999). Preparations of tasty improved defatted soybean Ontjoms (fermented products with *Neurospora intermedia*). *Food Sci. Technol. Res.*, 5, 168-170.

- 3) Matsuo, M and Takeuchi, T. (2003). Preparation of low salt Miso-like fermented seasonings using soy-oncom (fermented soybeans and okara with *Neurospora intermedia*) and their antioxidant activity and antimutagenicity. *Food Sci. Technol. Res.*, **9**, in press.
- 4) Horii M., Ide T., Kawashima K. and Yamamoto T. Hypocholesterolemic activity of desalted miso in rats fed an atherogenic diet. 日食工誌, **37**,148-153 (1990).
- 5) 全国味噌技術会編, 基準味噌分析法 (改訂版), 東京, pp.3-35 (1968) .
- 6) 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), (1993). 味噌の科学と技術, **41**, 144-146.
- 7) 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,(1973). 家政誌, **24**, 177- 183.
- 8) Matsuo M. (1997). *In vivo* antioxidant activity of okara koji, a fermented okara, by *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1968-1972.
- 9) Oyanagi Y. (1984). Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide Dismutase activity. *Anal. Biochem.*, **142**, 290-296.
- 10) 五十嵐脩, ビタミン E: ビタミン分析法 (日本ビタミン学会編) 、(1989), p.34. 化学同人、京都
- 11) Ohkawa M., Ohishi N. and Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- 12) Gunzler WA, Steffens GJ, Grossmann A, Kim SMA, Ottig F, Wendel A, Flohe L (1984) The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. *Hoppe- Seyler' Z Physiol Chem* **365**: 195-212.
- 13) Oyanagi Y (1984) Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* **142**: 290-6.
- 14) Kamath, SA and Rubin, E. (1972). Interaction of calcium with microsomes: a modified method for the rapid isolation of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 52-59.
- 15) Ogishima, T. and Okuda, K. (1989). An improved method for assay of cholesterol 7 α -hydroxylase activity. *Anal. Biochem.* **158**, 228-232.
- 16) Igarashi, K. and Ohmura, M. (1995). Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 595-601.

- 17) Makino S., Nakashima H., Minami K., Moriyama R., Takano S. (1988). Bile acid-binding protein from soybean seed: Isolation, partial characterization and insulin-stimulating activity. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 803-809.
- 18) Iwai K., Sakakibara K., Ibuki F. (1986). Involvement of post-digestion 'hydrophobic' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1217-1222.
- 19) Sugano M., Yamada Y., Yoshida K., Hahimoto Y., Maruo T., Kinmoto M. (1988). The hypo-cholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis*, **72**, 115-122.
- 20) Kudoh K., Shimizu J., Wada M., Takita T., Kanke Y., Innami S. (1998). Effect of indigestible saccharides on lymphocyte response of intestinal mucosa and cecal fermentation in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **44**, 103-112.
- 21) Ebata J. and Furukawa H. (1997). Enhancement of mutagenicity of N-nitroso-dimethylamine (NDMA) by a modified microsomal bacterial preincubation assay. *Mutat. Res.*, **37**, S175.
- 22) Roessler E.B., Pangborn R.M., Sidel J.L. and Stone H. (1978). Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo-trio and triangle tests. *J. Food Sci.* **43**, 940-943.
- 23) Pratt D.E. and Birac P.M. (1979). Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, **44**, 1720-1722.
- 24) Banerjee S.K., Maulik M., Mancahanda S.C., Dinda A.K., Gupta S.K., Maulik S.K. (2002) Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. *Life Sci* **70**, 1509-18.
- 25) Zeng N., Meng X., Zhang Y., Lai X., Zheng J., Chen L., Ren C. (1997). Antioxidative effect of constituents of herba epimedii (ESPS). *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **22**: 46-8 (in Chinese).
- 26) Hara, H. and Haga, S., Aoyama, Y. and Kiriyama, S. (1999). Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *J. Nutr.*, **129**, 942-948.
- 27) Kudou K., Fleury Y., Welti D., Magnolato D., Uchida T., Kitamura K. and Okubo K. (1991). Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max Merrill*), *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2227-2233.

Table 1. Material composition of low-salt miso.

Materials	Low-salt miso	
	S-Miso	O-Miso
Steamed soybeans (g)	1,000	0
S-Oncom (g)	0	900
O-Oncom (g)	0	100
Rice-koji (g)	500	500
Salt (g)	108	106
Water (ml)	163	128
Ethanol	36	35
Total (g)	1,807	1,769

Table 2. Physical and chemical characteristics of low-salt miso.

Item	S-Miso	O-Miso
Water (%)	51.4	50.6
Salt (%)	6.3	6.2
pH	5.3	5.8
Taitalable acidity I (ml)	13.2	9.1
Taitalable acidity II (ml)	12.5	13.0
Total sugar (%)	24.6	23.8
Reducing sugar (%)	18.2	18.0
Sugar hydrolysis (%)	74.0	75.5
Ethanol (%)	0.9	1.2
Acetaldehyde (mg/100g)	17	35
Ethyl acetate (mg/100g)	12	12
Total nitrogen (%)	1.9	2.0
Soluble nitrogen (%)	1.1	1.2
Formol nitrogen (%)	0.4	0.5
Protein solubility (%)	57.9	58.8
Protein hydrolysis (%)	21.1	25.0
Citric acid (mg/100g)	138	154
Succinic acid (mg/100g)	45	21
Lactic acid (mg/100g)	94	138
Acetic acid (mg/100g)	58	35
Pyroglutamic acid (mg/100g)	134	170
Color L	29.1	26.4
a	9.6	10.2
b	14.8	13.3
Hardness ($\times 10^3 \text{N/m}^2$)	1.8	1.1

Table 3. Antioxidant activity of low-salt miso.

Low salt miso	DPPH-IC ₅₀ (mg/ml)		O ₂ -IC ₅₀ (mg/ml)							
	Extracts		70% Ethanol		Water		70% Ethanol		Water	
	Unheat	Heat	Unheat	Heat	Unheat	Heat	Unheat	Heat	Unheat	Heat
<i>S-Miso</i>	36	22	112	84	25.1	21.1	102.9	130.0		
<i>O-Miso</i>	11	12	74	45	12.7	14.1	100.3	47.3		

Table 4. Effect of heating on isoflavone content of low-salt miso.

Isoflavones (mg/100g)	<i>S-Miso</i>		<i>O-Miso</i>	
	Unheat	Heat	Unheat	Heat
Daidzin	5.6 ± 0.0	4.4 ± 0.0	N.D.	N.D.
Genistin	2.7 ± 0.3	2.5 ± 0.1	N.D.	N.D.
Daidzein	3.2 ± 0.0	1.6 ± 0.1	11.7 ± 0.0	8.0 ± 0.0
Genistein	1.2 ± 0.0	0.97 ± 0.1	7.2 ± 0.0	5.2 ± 0.1

Table 5. Body weight gain, food intake, TBARS value and serum α-tocopherol of rats fed low-salt miso.

Diet group	Body weight gain (g/14d)		Food intake (g/14d/100g bw)		TBARS (nmol MAD/ml)		α-Tocopherol (μg/ml)	
	Unheat	Heat	Unheat	Heat	Serum	Liver	Serum	Serum
<i>S-Miso</i>	84 ± 2	126 ± 1 ^b	126 ± 1 ^b	124 ± 3	0.6 ± 0.1 ^b	124 ± 3	980 ± 15 ^a	
<i>O-Miso</i>	82 ± 1	114 ± 2 ^a	114 ± 2 ^a	128 ± 3	0.4 ± 0.0 ^a	128 ± 3	1290 ± 20 ^b	

Table 6. Activities of GSH-Px, SOD and catalase of rats fed low-salt miso.

Diet group	GSH-Px		SOD		Catalase
	Serum (U/ml)	Liver (U/g)	Serum (U/ml)	Liver (U/g)	Liver (10^4 U/g)
<i>S-Miso</i>	44 ± 2 ^a	440 ± 15	59.5 ± 3.5 ^a	1540 ± 125	2.6 ± 0.3 ^a
<i>O-Miso</i>	51 ± 1 ^b	435 ± 30	65.7 ± 3.6 ^b	1560 ± 70	3.2 ± 0.2 ^b

Table 7. Sterol level of serum and feces of rats fed low-salt miso.

Diet group	Serum		Feces	
	Cholesterol (mg/dl)	Cholesterol (mg/3d/100g bw)	Bile acid (mg/3d/100g bw)	Coprostanol (mg/3d/100g bw)
<i>S-Miso</i>	76.2 ± 4.9 ^b	84 ± 4	10.5 ± 0.4 ^a	25.6 ± 3.1
<i>O-Miso</i>	64.4 ± 4.1 ^a	87 ± 4	12.8 ± 0.5 ^b	23.7 ± 1.6

Table 8. Resistant protein content and its bile acid adsorption of low-salt miso.

Low salt miso	Resistant protein (mg/100g miso)	Bile acid adsorption	
		(μ g/g R.P)	(μ g/100g miso)
<i>S-Miso</i>	182.4	633	115.5
<i>O-Miso</i>	349.4	406	141.8

Table 9. Short chain fatty acids in cecum and hepatic microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase activity of rats fed low-salt miso.

Diet group	Short chain fatty acids			Cholesterol 7 α -hydroxylase activity (pmol/min/mg protein)
	Acetate (ng/100 g bw)	Propionate (ng/100 g bw)	Butyrate (ng/100 g bw)	
<i>S-Miso</i>	560 \pm 10 ^b	230 \pm 10 ^c	100 \pm 5 ^c	300 \pm 7
<i>O-Miso</i>	375 \pm 15 ^a	170 \pm 5 ^b	75 \pm 1 ^b	280 \pm 10

Table 10. Antimutagenicity of low-salt miso.

Low salt miso	Suppression of His ⁺ revertants (%)			
	70% Ethanol extract		Water extract	
	Unheat (2.5 mg miso/plate)	Heat (2.5 mg miso/plate)	Unheat (50 mg miso/plate)	Heat (50 mg miso/plate)
<i>S-Miso</i>	32.3 \pm 0.4 ^b	21.2 \pm 4.5 ^b	0.0 \pm 1.1 ^a	0.0 \pm 1.3 ^a
<i>O-Miso</i>	37.9 \pm 0.5 ^a	28.7 \pm 1.3 ^a	6.15 \pm 0.89 ^b	5.12 \pm 1.41 ^c

Table 11. Which unheat low-salt miso do you feel next flavor strongly?

Unheat miso	Detection rate (%)	
	Bitter taste	Sweet flavor
<i>S-Miso</i>	10.0	82.5*
<i>O-Miso</i>	90.0*	17.5

Forty female students, 21 or 22 years old, were asked her sensitive on unheat low salt miso.

The significant differences between the number were established by the paired preference test. $p < 0.001$.

Table 12. Sensory ranking scores of dishes used low-salt miso.

Miso-Dish	<i>S-Miso</i>	<i>O-Miso</i>
Mayonnaise	1.1 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2
Dressing	1.4 \pm 0.2*	0.3 \pm 0.2
Pottage	1.3 \pm 0.2*	0.3 \pm 0.2
Steamed sweet bun	1.3 \pm 0.2*	0.4 \pm 0.2

Twenty-nine female students, 21 or 22 years old, were asked to evaluate organoleptically using 5-point rating scale; good(+2); somewhat tasty(+1), neither good nor poor(0); rather poor(-1), poor(-2) of the dishes used *miso*. * $p < 0.001$

Preparation and Utilization of a New Tasty Functional Low-Salt Miso Using *Neurospora intermedia*

Masako Matsuo

Faculty of Home Economics, Gifu Women's University

Summary

Miso, a traditional Japanese seasoning, has contributed to good nutrition and health for several centuries in Japan. However, the consumption of miso in Japan is currently decreasing due to the popularization of western food. To counter this drop in miso consumption, last year the author prepared a new 4% salt miso-like fermented seasoning (called *O-miso-like seasoning*) using soybeans fermented with *Neurospora intermedia*, and found its antioxidant and antimutagen activities were higher than those of 4% salt miso-like fermented seasoning using unfermented soybeans. The long life of miso is assured by its high salt concentration, and so *O-miso-like seasoning* could not be served as long as miso. Miso has been customarily used as a seasoning for many kinds of Japanese cooking. *O-miso-like seasoning*, however, can not gain popularity over miso in a short time. In this study, another low salt miso (*O-miso*, 6% salt) was prepared using soybeans fermented with *Neurospora intermedia*. The taste and its functions as an antimutagen, antioxidant and suppressor of serum cholesterol were then compared with those of 6% salt miso prepared with unfermented soybeans (*S-miso*).

The seventy-percent ethanol extract of *O-miso* strongly exhibited higher 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical scavenging, superoxide anion scavenging and antimutagenicity than *S-miso*. *O-miso* contained much more isoflavone aglycones than *S-miso*, and these activities of antioxidant and antimutagen of *O-miso* may be attributed to the Isoflavone aglycones it contains. These radical scavenging activities of *O-miso* were not changed by heating, and cooking did not affect the antioxidant activity. In rats fed *O-miso*, the serum thiobarbituric acid value was lower, and serum activities of glutathione peroxidase, superoxide anion dismutase, and hepatic catalase were higher than in rats fed *S-miso*. Certainly, *O-miso* had a stronger antioxidant activity *in vivo* due to stronger scavenging activities of active oxygen. Furthermore, the serum sterol level was lower, fecal sterol excretion was significantly larger, while production of short chain fatty acids in the cecum were lower than in rats fed a *S-miso* diet. *O-Miso* had a stronger serum cholesterol-reducing action than *S-miso* due to the acceleration of fecal sterol excretion. Moreover, dishes such as mayonnaise, dressing, pottage and steamed sweet bun used *O-miso* were all found to be delicious. Based on these results, *O-miso* would have better health effects than *S-miso*, and could be increasingly used for many kinds of food preparation.