

おからに含まれる機能性成分に関する研究

笠原 貢・鎌田 舞・児玉 幸彦・林 裕里子*

石原 浩二*・益岡 典芳*

岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

*岡山理科大学理学部臨床生命科学科

(2009年9月30日受付、2009年11月5日受理)

1. 緒言

大豆を熱処理して豆乳や豆腐などを造る際に出る副産物のおからは、水分量が多く腐敗しやすいために有効利用できず産業廃棄物として処理されることが多い。大豆は食物繊維、脂質、タンパク質を豊富に含んでおり、その有用性は明確にされている(1)。食物繊維は、肥満、動脈硬化、高血圧など生活習慣病を予防する観点から重要な物質の1つである。また、脂質成分には、イソフラボン、植物ステロールを比較的多く含むことが知られている。イソフラボンは、エストロゲン様作用があるので、更年期後に起きる骨粗鬆症の症状を緩和する作用が知られている(2, 3)。植物ステロールは腸でのコレステロールの吸収を抑え、血清コレステロール値を減少させる(4-8)ことから、脂質の代謝を改善し、動脈硬化を抑制する機能が報告されている(9, 10)。大豆から生じるおからを有用に利用するため、おからに含まれる食物繊維中のグルカンと機能性脂質成分であるイソフラボンと植物ステロールの分析を行った。

2. 実験方法

2-1. 材料・試薬

大豆、豆腐(絹ごし)、おからはマーケット(岡山市北区北方)から購入した。ダイゼイン、ダイジン、ゲニステイン、ゲニスチン、グリシテイン(グリシチンのアグリコン)、グリシチンは LKT Lab. Inc. (米国) から、その他の試薬はシグマ・アルドリッチ(米国)、ナカライテスク、および、関東化学(日本)から購入した。

2-2. 高速液体クロマトグラフ(HPLC)・液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS)装置

HPLC 装置は LC-2000 Plus (PU-2089 型 溶媒低圧グラジェントポンプ, CO-2065 型 インテリジェントカラムオープン, UV-2075 型 インテリジェント UV 検出器)から構成、日本分光製)を使用した。カラムは逆相カラムで、カラム温度: 40°C, 流速 1.0 ml/min, 溶出液はアセトニトリルと水を混合して使用した。LC-MS は JMS-T 100CS (日本電子製)で、LC のカラムは逆相カラム(TSK-gel ODS-100V, ϕ 2.0 × 75 mm)を使用した。LC は HPLC と同様の条件で流速 0.2 ml/min で分析した。マススペクトルはエレクトロスプレー負イオン化モード(ESI-)または大気圧化学イオン化モード(APCI+)で、質量(m/z)範囲は 50.0~1000.0 を記録した。

2-3. 食物繊維に含まれるグルカンの測定

前処理としておからと大豆(粉末)、豆腐を凍結乾燥した。試料中の β -グルカンの測定は β -グルカン測定キット(Megazyme, Int. Ireland Ltd., アイルランド)で行った。凍結乾燥試料を 2 分した。1 つ目の試料(50.0 mg)は 2 M 水酸化カリウムに溶かし、緩衝液、アミログリコシダーゼ(1630 U/ml)、インペルターゼ(500 U/ml)各 0.1 ml を加えて α -グルカンを加水分解した。溶液中の D-グルコースをグルコースオキシダーゼ法で測定した(スクロース + α -グルカンの測定)。2 つ目の試料(50.0 mg)は濃塩酸を加え 30°C, 45 分, 続いて 6 M 塩酸で 2 時間加水分解した。中和した後、エキソ-1,3-グルカナナーゼ(100 U/ml)と β -グルコシダーゼ(20U/ml)各 0.1 ml を加え、40°C で 60 分間反応させた。グルコースオキシダーゼ法で測定した(スクロース + 全グルカンの測定)。

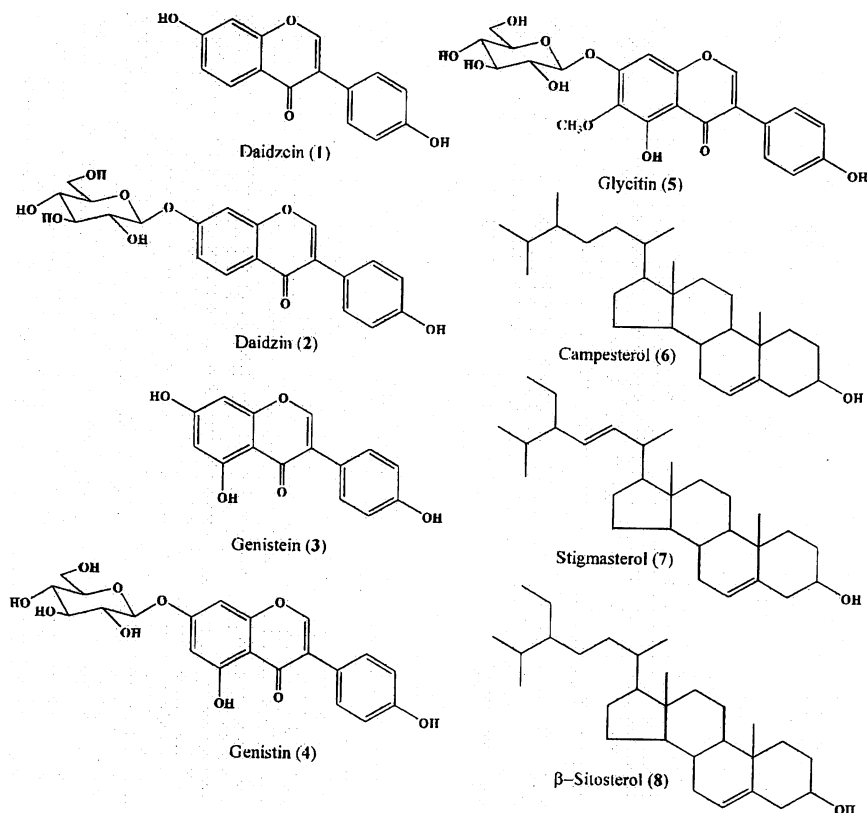


図1 おからに含まれるイソフラボンと植物ステロール

2-4. 脂質成分の分析

おからと豆腐はそのまま、大豆はフードプロセッサーで粉末にして試料とした。

2-4-1. イソフラボンの抽出

試料を 50%エタノール水に浸漬し、ミキサー (1 分) でホモジナイズした後に、1 日静置抽出を行った。抽出後、抽出液をろ別し、残渣は同様の方法 (50%エタノール) で 2 回抽出を行った。その後、抽出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。得られた抽出物を水と酢酸エチルで分配抽出した。酢酸エチル層は飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮した (酢酸エチル抽出物; 分画 1)。水層は続いて、*n*-ブタノールで 3 回抽出し、減圧濃縮した (*n*-ブタノール抽出物; 分画 2)。これらの抽出物はメタノールに溶かして HPLC 分析を行った。

2-4-2. 植物ステロールの抽出

試料を 100%エタノールに浸け、ミキサー (1 分) でホモジナイズした後に、1 日静置抽出を行った。抽出後、抽出液をろ別し、残渣を同様の方法で 2 回抽出を行った。その後、抽出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、得られた抽出物を *n*-ヘキサンと水で分配抽出を行った。*n*-ヘキサン層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮した (ヘキサン抽出物; 分画 3)。抽出物はヘキサンに溶かして HPLC 分析を行った。

3. 結果

3-1. 食物繊維中のグルカン量

おから、豆腐、大豆 各 10.0 g から凍結乾燥物をそれぞれ 2.46, 1.67, 8.92 g 得た。凍結乾燥した試料に含まれるグルカン量の測定結果を表 1 に示した。大豆にはグルカンが 4.7 %含まれ、 α -グルカンと β -グルカンが 4:1 の比であった。 α -グルカンは豆腐に抽出され、 β -グルカンはおからに残ることが示された。

表1 おから, 大豆, 豆腐の凍結乾燥重量 100 g に含まれるグルカン量 (g)

	おから	豆腐	大豆
α -グルカン	0.60 \pm 0.14	1.09 \pm 0.25	3.87 \pm 0.79
β -グルカン	0.53 \pm 0.02	0.05 \pm 0.05	0.83 \pm 0.71
総グルカン	1.13 \pm 0.11	1.13 \pm 0.11	4.71 \pm 0.02

3-2-1. イソフラボン量

イソフラボンの HPLC 分析のカラムは 5C₁₈-PAQ Waters (Φ 4.6 \times 150 mm) を使用した。試料の分析は 5%CH₃CN で開始して, 40 分間で 5% から 25% CH₃CN に, 続いて 15 分間で 25% から 40% まで CH₃CN 濃度を直線勾配で増加させて行った。検出は紫外波長 248 nm で行った。標準品のイソフラボン: ダイゼイン, ダイジン, ゲニステイン, ゲニスチン, グリシテイン, グリシチンはそれぞれ, 37.6 分, 20.7 分, 46.5 分, 27.2 分, 40.5 分, 22.3 分に溶出され, 検量線はそれぞれの 0.00 - 1.00 mg/ml の範囲で良好な直線性 (r 1.000) を示した。

LC-MS によるマススペクトル(ESI)はダイゼイン m/z 253 (M-1, 100%), 254 (14.3), ダイジン m/z 253 (100%), 254 (14.4), 415 (M-1, 8.3), ゲニステイン m/z 269 (M-1, 100%), 270 (13.5), ゲニスチン m/z 269 (100%), 270 (13.1), 431 (M-1, 35.1), 432 (5.7), グリシテイン m/z 283 (M-1, 100%), 284 (9.7), グリシチン 283 (100%), 284 (5.5%), 445 (M-1, 1.2), 446 (0.5) であった。

おから 10 g (湿重量) から抽出した分画 1 (酢酸エチル抽出物) は 84.6 mg (0.9%), 分画 2 (*n*-ブタノール抽出物) は 38.4 mg (0.4%) 得られた。これらのサンプルを HPLC 分析した。おからからの分画 1 と分画 2 のクロマトグラムを図 2a, 2b に示した。試料に含まれるイソフラボンは, 酢酸エチルおよび *n*-ブタノールで分配抽出すると, 酢酸エチル層にほぼ選択的に抽出されることが明らかになった。LC-MS を使って各ピークのマス クロマトグラフを測定すると標準品のスペクトルと一致した。おからと大豆, 豆腐に含まれるダイゼイン, ダイジン, ゲニステイン, ゲニスチン, グリシチンの定量の結果を表 2 に示した。グリシテインはほとんど検出されなかった (<0.03 mg/100 g)。水分を除くとおからと豆腐では総イソフラボン量は同じくらい含まれると推定された。

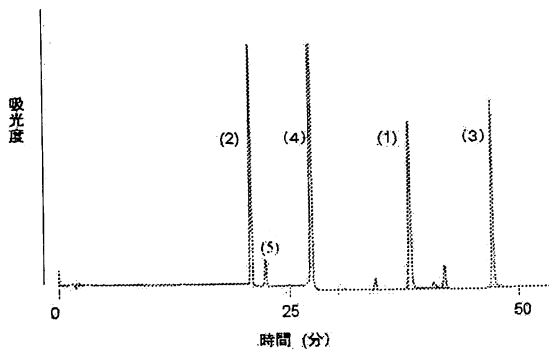


図 2a おからの分画 1 の HPLC クロマトグラム

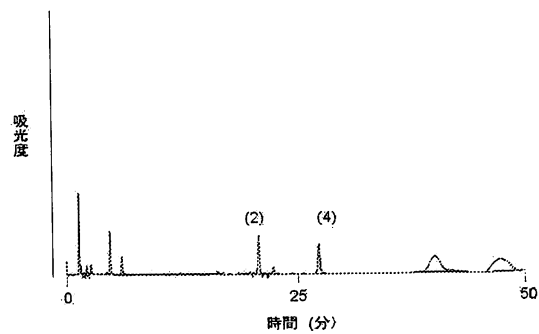


図 2b おからの分画 2 の HPLC クロマトグラム

表2 おから, 大豆, 豆腐の湿重量 100 g に含まれるイソフラボン量 (mg) と水分量 (%)

	おから	豆腐	大豆
ダイゼイン (1)	0.90±0.03	0.68±0.02	14.09±0.08
ダイジン (2)	2.37±0.02	1.61±0.02	25.73±0.04
ゲニステイン(3)	1.13±0.02	0.96±0.01	12.07±0.01
ゲニスチン (4)	5.21±0.09	4.66±0.04	34.41±0.55
グリシチン (5)	1.90±0.07	0.85±0.01	3.04±0.07
水分量* (%)	78.3±2.8*	86.4±3.0*	11.3±2.0*

* (凍結乾燥重量/湿重量) X 100

3-2-2. 植物ステロール量

植物ステロールの HPLC 分析カラムは TSK-gel ODS-100V (ϕ 4.6 × 150 mm) を使用した。試料は 88 % CH₃CN の水溶液で溶出し分析した。検出を紫外波長 210 nm で行うと標準品のカンペステロール, スチグマステロール, β -シトステロールはそれぞれ 40.4 分, 43.1 分, 50.0 分に溶出された。それぞれの検量線は 0.00 - 2.00 mg/ml の範囲で良好な直線性 (γ 1.000) を示した。LC-MS によるマススペクトル (APCI⁺) はカンペステロール m/z 383 (M-18+1, 100%), 384 (28.9), ステグマステロール m/z 395 (M-18+1, 100%), 396 (26.2), β -シトステロール m/z 397 (M-18+1, 100%), 398 (24.4) であった。

おから 10 g から分画 3 (ヘキサン抽出物) は 410.1 mg (4.1 %) 得られた。おからの分画 3 の HPLC クロマトグラムを図 3 に示した。おからを 100 % エタノールの代わりにメタノール: クロロホルム=1:3 混合溶媒で抽出した場合も同様の結果が得られ, 試料 (おから) 中の植物ステロールは 100 % エタノールで抽出されると推定された (データは示していない)。LC-MS を使って各ピークのマスプロマトグラフを測定すると標準品のスペクトルと一致した。おからと大豆, 豆腐に含まれる植物ステロールのうちのカンペステロールとスチグマステロール, β -シトステロールの定量結果を表 3 に示した。豆腐には植物ステロールはほとんど含まれておらず, おからに残ることがわかった。

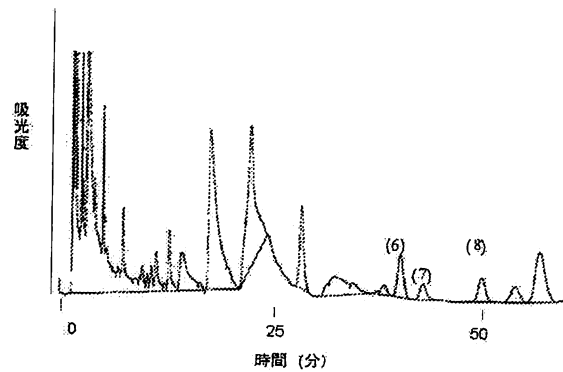


図3 おからの分画3のHPLCクロマトグラム

表3 おから, 大豆, 豆腐の湿重量 100 g に含まれる植物ステロール量 (mg)

	おから	豆腐	大豆
カンペステロール (6)	10.29±0.10	< 0.62*	8.01±0.42
スチグマステロール(7)	3.29±0.30	< 0.39*	8.61±1.01
β -シトステロール (8)	7.95±0.09	< 0.22*	26.99±0.88

* 定量下限値 (S/N=3)

4. 考察

大豆は、脂質、タンパク質、食物繊維を豊富に含むことから栄養学的に注目されてきた(1)。本研究で大豆、大豆を熱水抽出し凝固させた豆腐、豆腐を調製した残りである”おから”のグルカンと脂質成分のイソフラボンと植物ステロールを分析した。これら大豆製品に含まれる炭水化物の完全加水分解で生じる総グルコース量が少ないことから、大豆に含まれるグルカンは少ないと考えられる。また、大豆と比較して、おからに含まれるβ-グルカンとα-グルカンの比がより高値を示したことから、豆腐に含まれる比が低値を示したことから、大豆に含まれるβ-グルカンはより不溶性でおからに残り、α-グルカンは溶けやすいため豆腐に含まれたと推定される。

イソフラボンの含有分析から、イソフラボンは豆腐とおからの両方に含まれことが示された。一方、植物ステロールは豆腐に含まれず、おからに残っていた。これらの違いは化合物の疎水性の差によるものと推定される。おからは植物ステロール類を多く含むと推定されることから、腸管でのコレステロールの吸収を低下させることができると推定される(4-8)。大豆に含まれるタンパク質、脂質が熱水により一部取り除かれたおからは、エネルギー量が低い。そして、豊富に含まれる難消化性の食物繊維、生理活性作用を持つ脂質成分を含むことから、エネルギー過剰摂取(肥満)に対する予防、生活習慣病、メタボリックシンドロームを予防する健康食品素材としての利用が十分期待できる(11)。

さらに、本研究でおからを50%エタノール水で抽出するとイソフラボンを濃縮でき、100%エタノールで抽出すると植物ステロールとイソフラボンが濃縮できることが明らかとなり、おからを使ったニーズの高い食品開発を行うために、より成分を強化したおからの作成が可能になったと言える。今後の課題としては、大豆に含まれる炭水化物ラフィノース、スタキオース、おからに含まれる食物繊維の更なる分析が必要であろう。

5. 謝辞

本研究の一部は文部科学省学術高度化推進事業「社会連携研究推進事業」岡山理科大学「地域社会とのコラボレーションによるQOL向上の一体的アプローチ」研究の一環として行った。

6. 文献

- 1) 香川芳子編. 食品成分表 2006, 58-63 (2005)
- 2) K. Tsuchida, S. Mizushima, M. Toba and K. Soda. Dietary soybeans intake and bone mineral density among 995 middle-aged women in Yokohama. *J. Epidemiol.*, 9, 14-19 (1999)
- 3) A. Brezezinski, R. Aldercentz, A. Shaoul, A. Rosler, V. Shmueli, V. Tanos and J. G. Schenker. Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. *Menopause*, 4, 89-94 (1997)
- 4) R. E. Ostlund, S. B. Racette and W. F. Stenson. Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1385-1589 (2003)
- 5) D. W. Peterson. Effect of soybean sterol in the diet on plasma and liver cholesterol in *Chicks*. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 78, 219-225 (1951)
- 6) O. J. Pollak. Prevention of hypercholesterolemia in the rabbit: Successful prevention of cholesterol atherosclerosis. Reduction of cholesterol in man. *Circulation*, 6, 459 (1952)
- 7) O. J. Pollak. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation*, 7, 702-706 (1953)
- 8) T. A. Miettinen and H. Vanhanen. Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis*, 105, 217-226 (1994)
- 9) J. R. Crouse, T. Morgan, J. G. Terry, J. Ellis, M. Vitolins and G. L. Burke. A randomized trial comparing the effects of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch. Intern. Med.*, 159, 2070-2076 (1999)
- 10) K. Stein. FDA approves health claim labeling for foods containing soy protein. *J. Am. Diet. Assoc.*, 100, 292-298 (2000)
- 11) K. Matsumoto, Y. Watanabe and S. Yokoyama. Okara, soybean residue, prevents obesity in a diet-induced murine obesity model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 720-727 (2007)

Studies on bioactive compounds in okara for developing a new food stuff

Mitsugu KASAHARA, Mai KAMADA, Hiroyuki KODAMA,
Yuriko HAYASHI*, Kohji ISHIIHARA* and Noriyoshi MASUOKA*

Graduate School of Science.

** Department of Life Science, Faculty of Science,*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama, 700-0005 Japan

(Received September 30, 2009; accepted November 5, 2009)

Okara is a residue obtained from soybeans after extracting soymilk or tofu, and is thought to contain beneficial health components though the disposal has become a significant problem. We examined diet fiber (glucan) and some lipids (phytosterols and isoflavones) in okara, tofu, and soybeans. Soybeans contained a low concentration of β -glucan and the most part of β -glucan remained in okara. Analysis of lipids indicated that okara contained most part of phytosterols from soybeans and both okara and tofu contained considerably amounts of isoflavones from soybeans. It is suggested that okara is an excellent food stuff contained beneficial health components for preventing obesity and the lifestyle related disease.

Keyword: Soybean; tofu; okara; diet fiber; phytosterols; isoflavones.