

# 亜臨界水処理によるオカラのイソフラボンおよびその誘導体の消長

## The Behavior of Isoflavone Derivatives content in “OKARA PURE”, Sub-critical Water treated “OKARA”

西 正 人<sup>\*1</sup> 坂 井 良 輔<sup>\*2</sup>

### Abstract

“OKARA” is not favorable for food, because of its taste, smell, etc. Previously, we produced “OKARA PURE” by treating OKARA for 2.7 sec with the sub-critical water under high-pressure (30 MPa) at 250°C or 340°C, respectively, and found out it solves the problem of OKARA. Moreover, “OKARA PURE” has a lot of biological functions such as antioxidative and/or antitumor activity. The aim of this study was to investigate the contents of the isoflavone derivatives contained in OKARA PURE by developing HPLC analytical condition. The content of genistin and genistein in OKARA PURE was more than OKARA, especially; genistein in 340°C OKARA PURE was 2-fold more. Genistein is well known effective estrogen receptor binding compound among isoflavone derivatives. These results suggested that genistein is one of the contributors to the function of OKARA PURE.

キーワード：オカラピューレ／亜臨界水／大豆／イソフラボン／エクオール／  
高速液体クロマトグラフィー

### I 緒 言

#### 大豆イソフラボン

オカラは国内で年間約 100 万トンが副産されているが、オカラには、未利用の大豆栄養素が比較的多く残存しており、有用な食用資源であるにもかかわらず、独特の食感や風味、腐敗しやすく保存性が悪いなどの理由から、その殆どが産業廃棄物として処理されている。そこで、オカラを新たな食材として再利用するため、亜臨界水による処理を行い、非常に滑らかな食感を持つペースト状の食材（以下、オカラピューレ）を得ることが出来た。また、亜臨界水処理後のオカラには、未処理のオカラには見られない抗腫瘍性、発ガン抑制、抗酸化性、アンジオテンシン変換酵素阻害活性（血圧上昇抑制）、などの機能性発現や生理機能性が

より強化されるという実験結果をこれまで報告してきた。しかし、オカラピューレについてその機能性を示す成分については、未だ明らかになっていない。

一方、大豆イソフラボンについては、抗酸化性<sup>1)</sup>や抗がん性<sup>3) 4) 5)</sup>、動脈硬化病変の進展抑制への関与<sup>6)</sup>、骨代謝に関与し骨密度低下抑制<sup>7)</sup>など、種々の生理機能性が明らかにされている。

大豆イソフラボンでは、Genistein と Daidzein の生理活性が比較的強く、含有量と生理活性から特に Genistein が注目される。また、腸内細菌による Daidzein の代謝産物である Equol がイソフラボンより強い生理活性を示すことが明らかにされており、注目されている<sup>8) 9)</sup>。

そこで、上記機能性を示す亜臨界水処理後のオカラ中の成分について、まずイソフラボンや Daidzin または、daidzein の腸内細菌による代謝産物の Equol などに着目し、その消長について調べるため、まずその測定方法について検討した。

<sup>\*1</sup> Masato NISHI  
北陸学院大学短期大学部 食物栄養学科

<sup>\*2</sup> Ryosuke SAKAI  
北陸学院大学短期大学部 食物栄養学科 食品学実験

## Ⅱ 方 法

### 1. オカラの亜臨界水処理

大豆は石川県産エンレイ大豆（中粒）を用いた。大豆を流水中にて約 20 時間浸漬し、絹ごし豆腐用の豆乳（豆乳濃度 13.0% Brix、乾燥固形分濃度約 11%、加熱；103℃、5.0 min）の調製過程で副産されたオカラを用いた。尚、消泡剤は無添加とした。

前記オカラに 1.5 倍量の蒸留水を加え、高圧ホモジナイザー（Niro Soavi 社製）にて 100 MPa、1 パスで連続的にホモジナイズした。ホモジナイズ後、直ちにオカラを氷水で冷却しながら脱気した。

亜臨界水処理は 30 MPa で 250℃、340℃でそれぞれ行い、反応時間は約 2.7 sec とした。亜臨界水処理は株式会社高井製作所製、連続処理実験装置にて行った。連続処理装置の概要は脱気後の試料を高圧ポンプで送液しながら、予備加熱部にて約 85℃にて予備加熱した。その後反応部にて熱水（320～450℃）と混合して目的の温度に調整し、亜臨界水処理を行った。反応終了後直ちに冷却水にて冷却し、反応を停止した。系内の圧力は試料取り出し口に設置した背圧弁にて 30 MPa に調整した。

亜臨界水処理後のオカラ（以下、オカラピューレ）は凍結乾燥装置（東京理化工機製）により乾燥品を調製し、イソフラボン、Equol 測定に用いた。

### 2. 標準試料の調製

大豆イソフラボンの内、Daidzin、Glycitin、Genistin、Daidzein、Glycitein、Genistein（以上、長良サイエンス製）と Daidzin や Daidzein の腸内細菌による代謝産物である Equol の標準試薬（和光純薬工業製）をそれぞれ、0.5 mg ずつ直示天秤で計り、70 %エタノール<sup>10)</sup>に溶解して 50 ml に定容した（10 mg/l）。

標準試薬を 70 %エタノールに溶解する場合は、30～40℃に加温し、よく攪拌した。イソフラボン、Equol を完全に溶解した後、分子量 5,000 の遠心濾過ユニットを用いて限外濾過し、HPLC 用標準試料とした。

### 3. イソフラボンの抽出

イソフラボンの抽出は、80 %メタノール<sup>11)</sup>、

70 %エタノール<sup>10)</sup>、0.1 N 塩酸－アセトニトリル<sup>12)</sup>を用いて行った扇谷ら<sup>13)</sup>によると、70 %エタノールが最もイソフラボンの抽出率がよいことから、本実験でも 70 %エタノールを用いた。

オカラピューレ、オカラホモジナイズ凍結乾燥品各々 1.0 g に 35 ml の 70 %エタノールを加え、室温（約 7℃）にて攪拌しながら、60 min 放置した。3,000 rpm、10 min、5℃で遠心後、上清を採取した。残渣について同様な操作を繰り返し、集めた上清を 70 %エタノールで 100 ml に定容した。

採取した上清は定容後、分子量 5,000 の遠心濾過ユニットを用いて限外濾過し、HPLC 分析用サンプルとした。

### 4. 移動相

#### (1) 移動相の組成と HPLC 測定条件

##### ①移動相 1

HPLC メーカー（日立製作所）の測定例を参考に A 液 水：酢酸＝100：1、B 液 アセトニトリル：水：酢酸＝50：50：1、2 種類の移動相を調製し、グラジエントプログラムは表 1 の通りに設定した。

表－1 Gradient program

Time (min)	A (%)	B (%)	Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	70	30	40.0	30	70
5.0	70	30	40.1	70	30
35.0	30	70	55.0	70	30

##### ② HPLC 測定条件

UV 検出器を用い、測定波長は 254 nm、カラムオーブンの設定温度は 40℃とした。注入量は 10 μl とし、流量は 1.0 ml/min とした。記録計は島津製作所製の CR7A を使用し、分析時間は 50 min とした。

##### ③移動相 2 の組成

A 液 水：酢酸＝90：10、B 液 アセトニトリルとした。グラジエントプログラムは表 2 のようにステップグラジエントとした。

表-2 Gradient program

Time (min)	A (%)	B (%)	Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	80	20	20.1	30	70
10.0	80	20	30.0	30	70
10.1	70	30	30.1	80	20
20.0	70	30	40.0	80	20

## ④ HPLC 測定条件

UV 検出器を用い、イソフラボンは 250 nm、Equol は 280 nm で測定した。カラムオープンの設定温度は 40 ℃、注入量は 10  $\mu$ l、HPLC の流量は 1.0 ml/min、分析時間は 50 min とした。

## ⑤ 移動相 3 の組成

A 液 アセトニトリル：水：酢酸=15：85：0.1  
 B 液 アセトニトリル：水：酢酸=35：65：0.1

表-3 Gradient program

Time (min)	A (%)	B (%)	Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	100	0	55.1	100	0
50.0	0	100	70.0	100	0
55.0	0	100	—	—	—

## ⑥ HPLC 測定条件

UV 検出器の測定波長 254 nm、注入量 10  $\mu$ l、流量 1.0 ml/min、カラムオープン設定温度 45.0℃、測定時間 50 min とした。

## (2) HPLC 測定共通条件

## ① HPLC カラム

Colum Packing : Intersil ODS-3 5  $\mu$ m  
 Colum Dimension : 4.6 I.D.  $\times$  150 mm  
 Guarantee : N=13,000

## ② HPLC

日立製オートサンプラー (L-7200)、UV 検出器 (L-7405)、ポンプ (L-7100) を使用した。また、GL サイエンス製デガッサ (DG660B) にて移動相を脱気し、Sugai 製カラムオープン (U-620) にてカラムを設定温度に調整した。

## ③ 移動相の調製

調製した移動相は 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターで濾過し、超音波発振装置にかけながら、減圧し、気泡がなくなるまで脱気し、測定に用いた。

移動相に用いたアセトニトリルは全て高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学)、酢酸は特級試薬 (関東化学) を用いた。

## Ⅲ 結果

## 1. 検量線の作成 (標準試料の測定)

## ① 移動相の組成の決定

## 移動相 1

標準試料のクロマトチャートに、目的以外の不純物と思われるピークが多く検出された。また、特にイソフラボンアグリコンの分離能が低くなった。

## 移動相 2

クロマトチャートのベースラインが測定時間の経過と共に上昇し、イソフラボンアグリコンの分離能も低下した。Equol とと思われるピークを検出することはできなかった。また、不純物と思われるピークが多数見られ、同定と定量性の両方について問題があった。

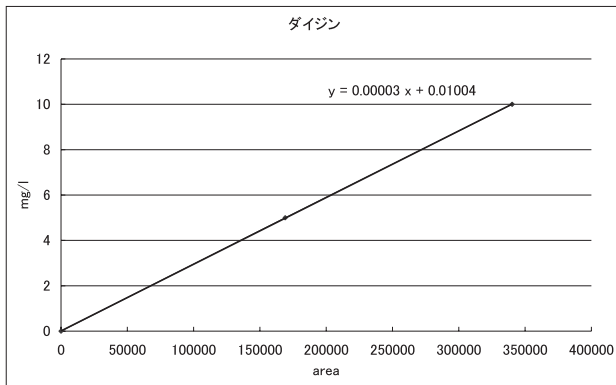
Equol についてもピークが多数みられ、Equol のピークを同定できなかった。

## 移動相 3

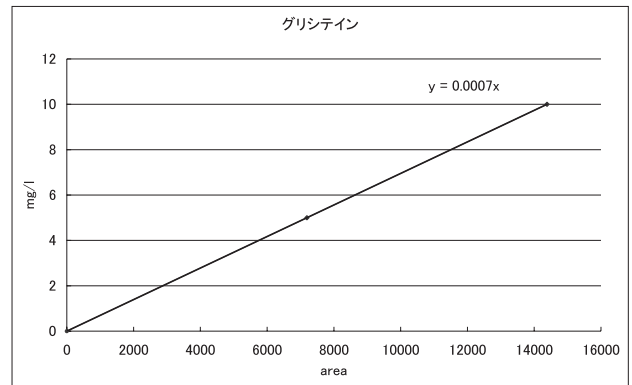
移動相 3 ではイソフラボン以外の不純物と思われるピークは殆どなく、定量性や再現性も良いため、移動相 3 の組成と測定条件を用いることにした。

グラフ 1~6 に Daidzin (ダイジン)、Glycitin (グリシチン)、Genistin (ゲニスチン)、Daidzein (ダイゼイン)、Glycitein (グリシテイン)、Genistein (ゲニステイン) の検量線を示した。しかし、移動相 3 においても Equol のピークを検出することは出来なかった。

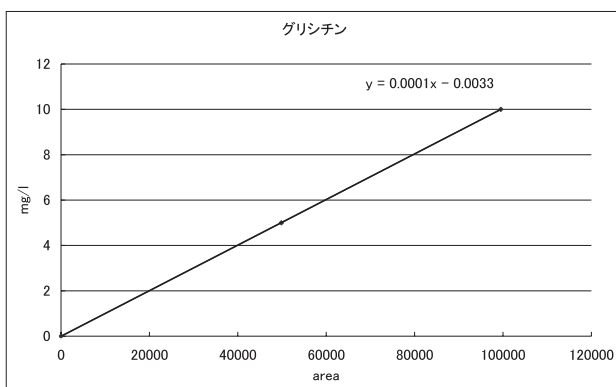
【グラフ 1】



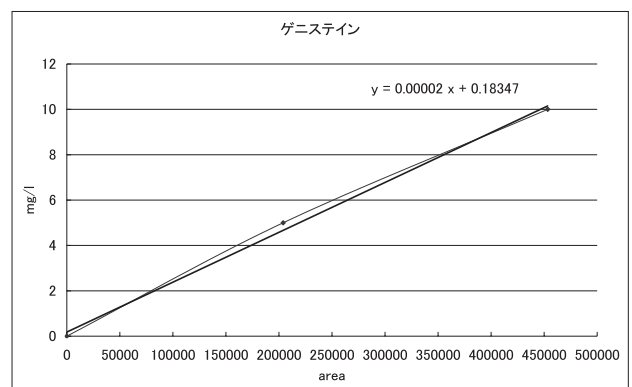
【グラフ 5】



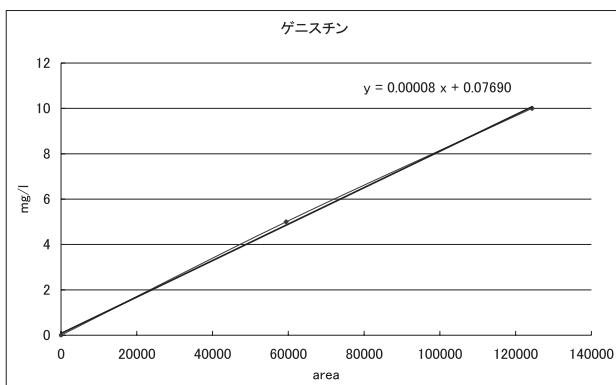
【グラフ 2】



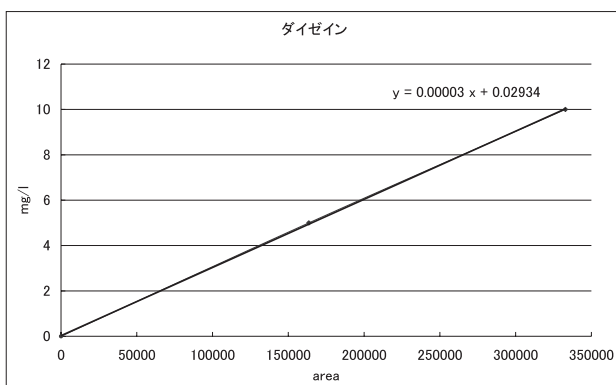
【グラフ 6】



【グラフ 3】



【グラフ 4】



## ②未処理のオカラおよびオカラピューレのイソフラボン含量測定

移動相 3 の組成と条件にて対照区にオカラホモジナイズ、試験区として 250℃、30MPa、反応時間約 2.7sec、さらに 340℃、30MPa、反応時間約 2.7sec で得られたオカラピューレ、それぞれの凍結乾燥品からイソフラボンを抽出し、測定した結果を表 1 およびグラフ 7 に示した。340℃で処理されたオカラピューレの Genistein の含有量が対照区や 250℃で処理されたオカラピューレの約 2 倍近い値を示した。一方、Equol の測定を試みたが、本実験での移動相組成と測定条件では、得られた測定ピークから Equol を同定することができなかった。またクロマトチャートのピークにおける再現性も悪く、定量性においても問題があった。

表 1

	未処理 オカラ	オカラ ピューレ 250℃	オカラ ピューレ 340℃
D	0.058	0.061	0.065
GL	0.136	0.122	0.077
G	0.311	0.439	0.397
De	0.853	0.564	0.817
Gle	—	—	—
Ge	0.044	0.034	0.071
配糖体	0.505	0.622	0.538
アグリコン	0.897	0.598	0.888
合計	1.402	1.219	1.426

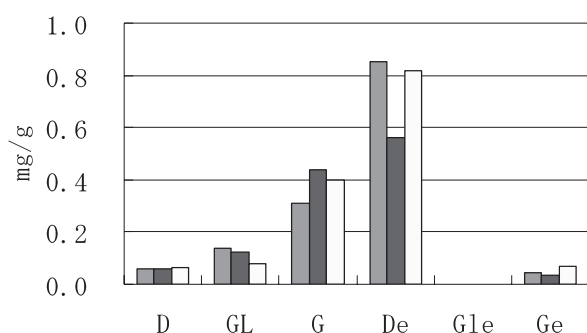
mg/ 乾燥品 g

D : Daidzin, GL : Glycitin, G : Genistin

De : Daidzein, Gle : Glycitein, Ge : Genistein

【グラフ 7】

■ オカラホモジナイズ ■ オカラピューレ250℃  
□ オカラピューレ340℃



#### Ⅳ 考 察

未処理のオカラ、オカラピューレ各々の乾燥固形分 1g 当たりのイソフラボン含量を比較するとグラフ 7 に示したように、Daidzein が最も多く、次いで Genistin というようなパターンを対照区、試験区ともに示した。乾燥大豆中のイソフラボンの約 80 % 以上は 6-*o*-malonyldaidzin、6-*o*-malonylgenistin、daidzin、genistin<sup>13,14)</sup> との報告例があるが、malonyl 体イソフラボンは熱に不安定<sup>10)</sup> であり、大豆の加熱によって malonyl 体イソフラボンが減少し Daidzin や Genistin が増加することが報告されているが、Daidzein や Genistein の顕著な増加は見られないとされている<sup>15)</sup>。本

実験では malonyl 体イソフラボンは測定していないが、測定したすべての試料において Daidzein の割合が最も多いという特徴を示したことは、これまでの報告例とは異なっており、注目すべき点である。また、340℃で処理されたオカラピューレにおいて、Genistein の値が他に比較して約 2 倍近い結果となったが、Genistein はエストロゲンの代謝に関与するシトクローム P-450 を誘導し、活性なエストロゲンの生成を抑制する可能性が考えられている。またチロシンキナーゼ活性を阻害することから、この経路を介して生理機能性を発現する可能性も考えられている。このように Genistein は生理機能性の面からも重要な働きをしていると考えられている。

Daidzin (配糖体) から Daidzein (アグリコン) への変化は例えば、微生物による発酵過程において  $\beta$ -glucosidase の作用によることが知られており、味噌や納豆といった大豆発酵食品には比較的イソフラボンアグリコンが多く含まれる。イソフラボンアグリコンは配糖体に比べ、吸収がよく<sup>17)</sup> アグリコンの割合が多いことは生理機能性の面からは好ましいといえる。

イソフラボンを摂取することによる作用はエストロゲンレセプターを介したヒトのエストロゲンと同様なメカニズムで起こると考えられている。エストロゲンレセプターへの結合活性は配糖体よりもアグリコンの方が強く、中でも、Genistein が最も強く、次いで Daidzein である。また、Daidzein の代謝産物である Equol は、エストロゲンレセプターへの結合活性が Genistein よりさらに強く、よってその生理効果も大きいといえる。イソフラボンの代謝産物については、腸内細菌によって daidzein から dihydrodaidzein、4-hydroxy-equol を経て Equol が生成される。しかし、Equol 産生能を持つ腸内細菌叢を有するヒトは約 30 % 程度といわれており、Equol 産生菌を持つヒトはその意義が注目されている<sup>9)</sup>。また、Equol を産生する乳酸菌が発見され、Equol 産生能がないヒトへの応用や Equol の商品化が期待される。本実験では Equol の測定条件を定めることができなかったが、Equol の測定方法も検討する必要がある。

一方、これまでの研究でオカラピューレが示した種々の生理機能性について、イソフラボン誘導



体やイソフラボン以外の機能性成分の関与も検討しなければならない。

本実験ではオカラピューレが示した生理機能性を示す活性本体を検討するために、まずイソフラボンの測定を行った。しかし、対照区、試験区とも配糖体よりもアグリコンの割合が多く、それぞれのイソフラボンの割合も同様なパターンを示したことから、イソフラボン以外の機能性成分の関与が示唆される。

その他、オカラピューレは栄養成分の分析結果から、処理温度に比例して糖質の割合も増加することがわかっており、生じた還元糖または多糖の還元性末端とアミノ酸、ペプチド、たんぱく質、アミン類などが加熱によってアミノカルボニル反応を引き起こし、最終的にメラノイジンが生じている可能性がある。実際に亜臨界水処理においては、処理温度が高くなるに比例して、オカラピューレの色調が乳白色から褐色へと変化する。味噌やしょうゆの色もこのメイラード反応の結果生じたメラノイジンによるが、メラノイジンには抗酸化性や発ガン抑制が報告されており、340℃で生成されたオカラピューレが示した生理機能性はこのメラノイジンによる関与も考えられる。

さらに、大豆の種皮にはウロン酸の一種であるガラクトン酸が多く含まれるが、例えばキャベツなどに含まれるウロン酸から、高温高压水条件下で抗がん性を示す、シクロペンテノン類が生成することがわかっており、同様に亜臨界水条件下にてオカラに含まれるウロン酸の一種、ガラクトン酸からシクロペンテノン類が生成される可能性も考えられる<sup>19)</sup>。

本実験におけるオカラピューレを提供頂いた、株式会社高井製作所ならびにご指導頂いた株式会社高井製作所研究開発室長、天野原成様、ご指導並びに Equol 標準品をご提供頂いた東京農工大学、三浦先生に対し深甚の謝意を表します。

尚、「オカラピューレ」は、2008.11.17 に商願 2005-84856 として商標登録された。

#### <文献>

- 1) Pyo Y, Lee T, Lee Y (2005) "Effect of lactic acid fermentation on enrichment of antioxidant properties and bioactive isoflavones in soybean." *Journal of Food Science*, 70, 215-220.
- 2) Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y (1995) "Antioxidant and antipromotional effect of the soybean isoflavone genistein." *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 124-130.
- 3) Presky V, Horn LV (1995) "Epidemiology of soy and cancer : Perspectives and directions." *Journal of Nutrition*, 125, 709-712.
- 4) Barnes S (1995) "Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer." *Journal of Nutrition*, 125, 777-783.
- 5) Person G (1995) "Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells." *Journal of Nutrition*, 125, 784-789.
- 6) Jiang F, Jones GT, Husband AJ, Dusting GJ (2003) "Cardiovascular protective effects of synthetic isoflavone derivatives in apolipoprotein E-deficient mice." *Journal of Vascular Research*, 40, 276-284.
- 7) Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K, Tsuji K (1998) "Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet." *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21, 62-66.
- 8) Chang HH, Robinson AR and Common RH (1975) "Excretion of radioactive daidzein and equol as monosulfates and disulfates in the urine of the laying hen." *Canadian Journal of Biochemistry*, 53, 223-230.
- 9) Setchell KD, Brown NM and Iyengar-Kim E (2002) "The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones." *Journal of Nutrition*, 132, 3577-3584.
- 10) Kudous S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K (1991) "Malonylisoflavone glycosides in soybean seeds (glycine max merrill)." *Agricultural Biological Chemistry*, 55, 2227-2233.
- 11) Kitada Y, Mizobuchi M, Ueda Y (1985) "Analysis of isoflavones in Puerariae radix by high-performance liquid chromatography with amperometric detection." *Journal of Chromatography*, 347, 438-442.
- 12) Murphy PA (1981) "Separation of genistin, daidzin and their aglycones, and coumestrol by gradient high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography*, 211, 166-169.
- 13) 扇谷容子, 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.
- 14) Wang H, Murphy PA (1994) "Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location." *Journal of Agricultural*

- and Food Chemistry, 42, 1674-1677.
- 15) Toda T, Sakamoto A, Takayanagi T, Yokotsuka T (2000) "Changes in isoflavone compositions of soybean foods during cooking process." Food Science and Technology Research, 6, 314-319.
- 16) 臼井 健 (2006) 大豆に含まれるゲニステイン、ダイゼインおよびその代謝産物エクオールの分子生物学的薬理作用の検討およびその生体内濃度の臨床的意義 大豆たんぱく白質研究 Vol.9 (2006) : 153-157.
- 17) Izumi T, Piskkulra MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M (2000) "Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans." Journal of Nutrition, 130, 1695-1699.
- 18) Wang H, Murphy PA, (1994) "Isoflavone content in commercial soybean foods." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 1666-1673.
- 19) 特許第 3790273 号 タカラバイオ株式会社 登録日 2006, 4, 7 発明の名称 シクロペンテノン類、その製造方法及び用途