

オカラ麩の機能性

志村亜希子*・中村好志*・江崎秀男*

Functionality of Okara Koji

Akiko SHIMURA, Yoshiyuki NAKAMURA and Hideo ESAKI

1. はじめに

近年、メタボリックシンドロームや糖尿病など様々な生活習慣病が問題視されている。これらの疾病には生体内で発生した活性酸素やフリーラジカルの関与が示唆されており¹⁾、これらの生活習慣病を予防するには、抗酸化能を持つ食品、あるいは食品由来の抗酸化性物質の摂取が有効であると考えられている。

平成26年国民健康・栄養調査では、我が国における肥満者 (BMI \geq 25) の割合は男性28.7%、女性21.3%であるとされている¹⁾。肥満治療は、食事の制御や適切な運動を生活の中に取り入れることが重要であるが、近年では抗肥満薬の有用性も注目されている。日本では、マジンドールが抗肥満薬として承認されているが、薬理作用がアンフェタミンと類似していることから依存性に注意が必要とされ、重度の高血圧や脳血管障害などでは使用禁忌である。さらに、糖尿病でも慎重投与となっていることからメタボリックシンドロームを伴う肥満患者には使用しづらいことが現状である²⁾。ところで、食事から得た脂肪は、膵リパーゼによって脂肪酸とモノグリセリドに分解された後に、腸管から吸収される。従って、膵リパーゼの脂肪分解および脂肪酸やモノグリセリドの吸収の過程を阻害することによって、脂肪の吸収を低下させたり、遅らせることが可能になる³⁾。

メラニンとは生体内に見られる褐色または黒色の色素であり、皮膚の色、毛髪の色を決定する色素である。メラニンが生成される過程として、血中から供給されたチロシンは、チロシナーゼによってドーパに、さらにドーパキノンへと代謝される。このドーパキノンには反応性が高く、自動的に酸化・重合を起こして、ドーパクロム、インドールキノンへと変化し、最終的には黒褐色のメラニンを合成する⁴⁾。直接日光に長時間暴露されると、メラニン生成機能が持続し、シミやソバカスなどの色素沈着や、皮膚の老化が進行する⁵⁾。つまり、チロシナーゼを阻害すれば、メラニン生成を抑制することができ、皮膚の老化を防ぐことができるといえる。

本研究で使用した、大豆から豆腐を製造する際に副産物として発生するオカラは、多く

* 生活科学部 管理栄養学科

の機能性成分を含むことが知られている。例えば、このオカラに含まれる食物繊維は、食物の胃内滞留時間を延長させ、食後の急激な血糖値の変動を緩和するとともにインスリン分泌を抑制する⁶⁾。また、オカラ中には大豆イソフラボン類がかなり残存しており(20mg/100g)⁷⁾、この食品成分は、疫学研究において乳がんをはじめとするがんの予防に有効であると報告されている⁸⁾。しかし、オカラは6.1%のタンパク質や0.6%の糖質を含み、水分含量も多い(75.5%)ため⁹⁾、腐敗しやすい。このため、食品として利用されているのはオカラ生産量の1～2%に過ぎず、多くは産業廃棄物として処理されているのが現状である。一方、大豆をはじめとする多くの食材は、発酵というプロセスを経てより高い機能性が得られる場合が多い。その例として納豆、味噌、醤油などの大豆発酵食品がある¹⁰⁾。

本研究では未利用資源でもあるオカラの有効利用を目的とし、このオカラを麹菌で発酵させてオカラ麴を調製した。このオカラ麴の様々な機能性を検討するため、生活習慣病の予防に關与する抗酸化活性、脂肪の吸収を抑制することができる腭リパーゼ阻害作用および皮膚の老化防止に有用なチロシナーゼ阻害作用を測定した。

2. 実験方法

2.1. 実験試料および試薬

オカラは、M社(名古屋市千種区)より入手した。オカラ麴の調製には、濃口しょうゆ、豆味噌、米味噌、麦味噌、甘酒、清酒に使用される7種類の麹菌(ビオック株)を使用した。菌株の種類は、*Aspergillus oryzae* KBN606, KBN919, KBN930, KBN943, KBN950, KBN969およびKBN1010である。試薬類は、入手可能な限り特級グレードを使用した。

2.2. 発酵日数の異なる各種オカラ麴の調製

オカラ200gに6%乳酸(食品添加物用)溶液を20mL加え、pH4.5に調整した。その後、電子レンジで水分を蒸発させ(500W, 10分間)、水分含量を50%とした。放冷後、この調製オカラに、Tween80を用いて分散させた7種類の各種*A. oryzae* 孢子懸濁液をオカラ1gあたりの菌数が 10^6 個となるよう接種した。これらを滅菌済みシャーレに10gずつ分配し、温度30°C、湿度50%の条件の恒温培養機で発酵を行った。発酵0, 1, 2, 3, 4日目に、発酵日数の異なる各種オカラ麴を経日的に取りだし、生育状態を観察した後、-30°Cで凍結させた。その後、各発酵日数の麴は凍結乾燥した後、コーヒーミル(Mini Blender, 大阪ケミカル株)で粉末化し、凍結乾燥粉末(Freeze Dried Powder:FDP)を得た。

2.3. 発酵日数の異なる各種オカラ麴の75%エタノール抽出液の調製

発酵日数の異なる各種オカラ麴のFDP1.0gを精秤し、ここに75%エタノールを7.0mLずつ加え、室温で16時間振とう抽出した。その後、遠心分離(3500rpm, 20分間)を行い、それぞれの上清を回収し、これを各種オカラ麴の75%エタノール抽出液とした。

2.4. DPPH法による抗酸化活性の測定

各種オカラ麴の抗酸化活性は、DPPH法により測定した¹¹⁾。2.3.で調製した各種オカラ麴の75%エタノール抽出液は、75%エタノールで適宜希釈した後、その80μLずつを96穴

マイクロプレートに分注した。ここに100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4) を40 μ L, さらに500 μ M DPPH 溶液を80 μ L 加えた後, 十分に混合した。室温, 暗所で20分間静置した後, 540nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (benchmark, BIO-RAD) を用いて測定した。また, 各試料溶液の抗酸化活性測定時には, 同時に抗酸化能の指標となるトロロックス (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 標準溶液を用いて同様の操作を行った。各試料の FDP1.0g の抗酸化活性は, トロロックス相当量 (μ mol TE/g of FDP) として算出した。

2.5. 隣リパーゼ阻害作用の測定

各種オカラ麴の隣リパーゼ阻害作用は, リパーゼキット S (DS ファーマバイオメディカル(株)) を用いて測定した。

エステラーゼ阻害液 (3.48mg/ml フェニルメチルスルホニルフルオリド) を2 μ L ずつ96穴マイクロプレートに分注し, ここに0.1mg/ml の5,5-ジオピス (2-ニトロ安息香酸) を含む発色液を100 μ L ずつ加えた。ここに隣リパーゼ酵素溶液を5 μ L, さらに2.3. で調製し適宜希釈した各種オカラ麴の75%エタノール抽出液を5 μ L ずつ加え, 予備加温を行った (37 $^{\circ}$ C, 5分間)。その後, 基質溶液 (1 mL 中に三酪酸ジメルカプロールを6.69mg およびドデシル硫酸ナトリウムを5.73mg 含む) を10 μ L 加え, 37 $^{\circ}$ C で60分間, 加温を行った。ここに反応停止液を200 μ L 加え, 酵素反応を停止させた後, 415nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (benchmark, BIO-RAD) を用いて測定した。

2.6. チロシナーゼ阻害作用の測定

各種オカラ麴のチロシナーゼ阻害作用の測定は, Mason らの方法¹²⁾を参考に行った。また, 実験に使用したチロシナーゼ酵素液は, (株) SIGUMA のマッシュルーム由来のチロシナーゼ粉末 (T3824, 25000units) を330units/mL に調製したものをを用いた。

2.3. で調製し適宜希釈した各種オカラ麴の75%エタノール抽出液50 μ L に1/15M リン酸緩衝液 (pH6.8) を45 μ L およびチロシナーゼを5 μ L 加え, 予備加温を行った (37 $^{\circ}$ C, 5分間)。その後, 0.18% DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanin) 溶液を50 μ L 加え, 37 $^{\circ}$ C で5分間, 加温を行った。これらの490nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (benchmark, BIO-RAD) を用いて測定した。

2.7. 統計処理

各種オカラ麴の抗酸化活性, 隣リパーゼ阻害率およびチロシナーゼ阻害率は, 平均値 \pm 標準偏差で示した。統計解析には, IBM SPSS Statistics Ver. 20を使用した。平均値の有意差検定は, 分散分析 (ANOVA) により有意差 ($p < 0.01$) が認められたものについて, Tukey の多重比較法を用いて行った。

3. 実験結果および考察

3.1. 各種オカラ麴の生育状況

各種オカラ麴の調製は, 原料オカラを麴菌の生育に適した水分含量50%およびpH4.5に

調整した後に行った。7種類の麹菌を接種した後、30°Cで発酵を行ったところ、各種オカラ麹は24時間後には栄養菌糸が伸長し、オカラの表面は菌糸体で覆われた。発酵2日目には、胞子形成が認められた。

3.2. 各種オカラ麹の発酵に伴う抗酸化能の変動

各種麹菌を用いたオカラ4日目麹の75%エタノール抽出液のDPPH法における抗酸化活性を図1に示した。各種4日目麹の抗酸化活性は、5 $\mu\text{mol TE/g}$ of FDP以上を示し、中でも *A. oryzae* KBN606, KBN930およびKBN943において、約10 $\mu\text{mol TE/g}$ of FDP以上の高い活性が認められた。そこで、特に強い抗酸化活性を示したKBN930における、発酵日数に伴う活性の変化を調べた(図2)。その結果、KBN930麹の抗酸化活性は、発酵日数

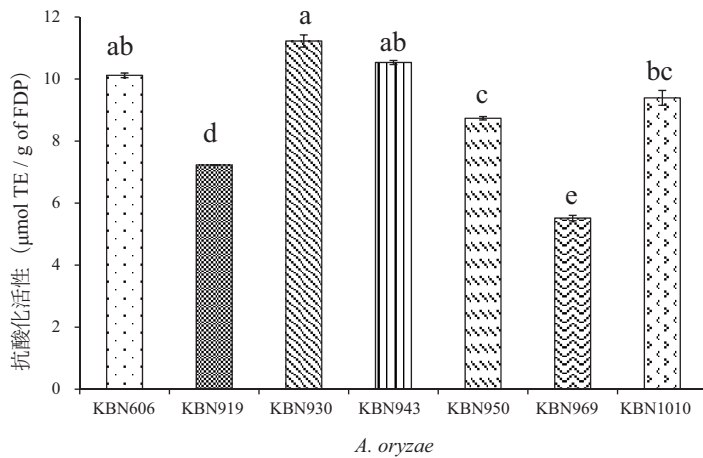


図1 各種麹菌を用いたオカラ4日目麹の抗酸化能

それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットは有意差 ($p < 0.01$, Tukey 検定) があることを示す。

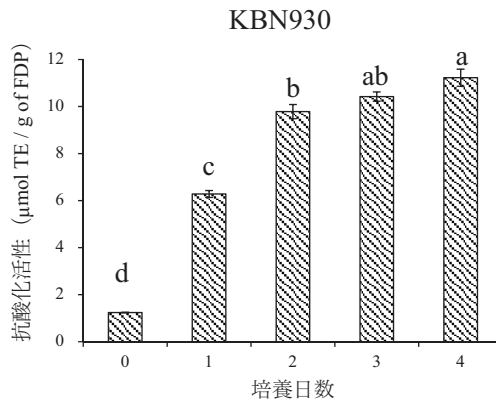


図2 KBN930を用いたオカラ麹の発酵に伴う抗酸化能の変動

それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットは有意差 ($p < 0.01$, Tukey 検定) があることを示す。

の経過とともに上昇したが、特にオカラ麴の孢子形成が認められた発酵2日目の麴において抗酸化能は著しく上昇した。その後も、抗酸化活性は発酵4日目まで緩やかに上昇した。この4日目の麴の抗酸化活性は、原料オカラ（0日目）より有意に ($p < 0.01$) に高く、その抗酸化能は約10倍になった。

KBN930は味噌用の麴菌であることから、他の菌に比べ、プロテアーゼ活性が高いと考えられる。村本らは、発酵に伴う抗酸化活性の増強には大豆たんぱく質の酵素分解物であるペプチドやアミノ酸¹³⁾が関与していると報告しているが、このKBN930の麴においてもペプチドやアミノ酸が抗酸化活性に関与していると推察される。また、*Aspergillus* 属は β -グルコシダーゼを産生することが知られている¹⁴⁾。オカラ中に残存しているダイジンおよびゲニスチンなどの配糖体は、発酵に伴い、 β -グルコシダーゼによってより強い抗酸化活性を有するダイゼインおよびゲニステインなどのアグリコンに変換される¹⁵⁾。さらに、これらのアグリコンは、発酵に伴い顕著に強い抗酸化性を示すオルトヒドロキシイソフラボン (8-OHD (8-Hydroxydaizein) や8-OHG (8-Hydroxygenistein)) に変換されることも報告されている¹⁶⁾。KBN930を用いた麴の高い抗酸化性には、これらのイソフラボン類が寄与していることが考察される。

3.3. 各種オカラ麴の発酵に伴う腓リパーゼ阻害作用の変動

各種麴菌を用いたオカラ4日目麴の75%エタノール抽出液の腓リパーゼ阻害作用を図3に示した。各種4日目麴の腓リパーゼ阻害作用は、*A. oryzae* KBN950を用いたオカラ麴が、他の麴に比べ、有意に ($p < 0.01$) 高い阻害作用が認められ、その活性は約70%を示した。KBN950麴の経日的な阻害作用の変化を調べた結果 (図4)、発酵日数の経過とともに阻害率の上昇が認められ、特に孢子形成が認められた2日目の麴において著しく上昇した。

大豆発酵物はリパーゼ阻害作用を示すことが報告されている¹⁷⁾。また、イソフラボン類やケルセチンをはじめとする各種フラボノイドにおいてもリパーゼ阻害作用が認められて

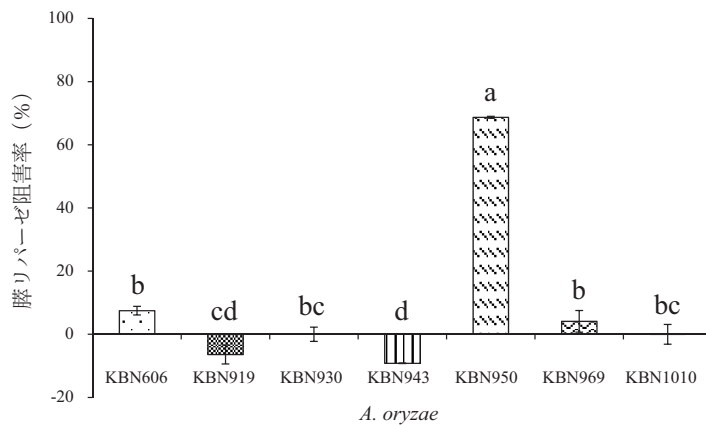


図3 各種麴菌を用いたオカラ4日目麴の腓リパーゼ阻害作用

それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットは有意差 ($p < 0.05$, Tukey 検定) があることを示す。

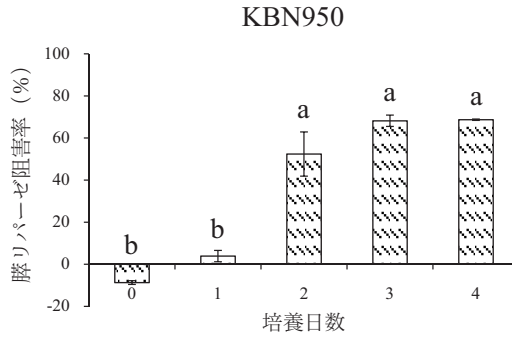


図4 KBN950を用いたオカラ麴の発酵に伴う脛リパーゼ阻害作用の変動
それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベットは有意差 ($p < 0.05$, Tukey 検定) があることを示す。

いる¹⁸⁾。発酵に伴うリパーゼ阻害作用の上昇には、オカラ麴の発酵によって新たに生成したフラボノイド類の関与が考えられる。

3.3. 各種オカラ麴の発酵に伴うチロシナーゼ阻害作用の変動

各種麴菌を用いたオカラ4日目麴の75%エタノール抽出液のチロシナーゼ阻害作用を図5に示した。各種4日目麴のチロシナーゼ阻害作用は、*A. oryzae* KBN943を用いた麴以外において阻害作用が認められた。阻害作用が認められた麴のうち、強い傾向を示した *A. oryzae* KBN930麴の発酵日数に伴う阻害作用の変化を調べたところ、発酵日数の経過とともに阻害作用は、発酵3日目に最大まで上昇が認められた (図6)。この3日目麴の阻害活性は約50%を示した。

大豆中のイソフラボン配糖体は麴菌の発酵に伴い、イソフラボンアグリコンや、顕著に強い抗酸化性を示すオルトヒドロキシイソフラボンに変換されることが報告されてい

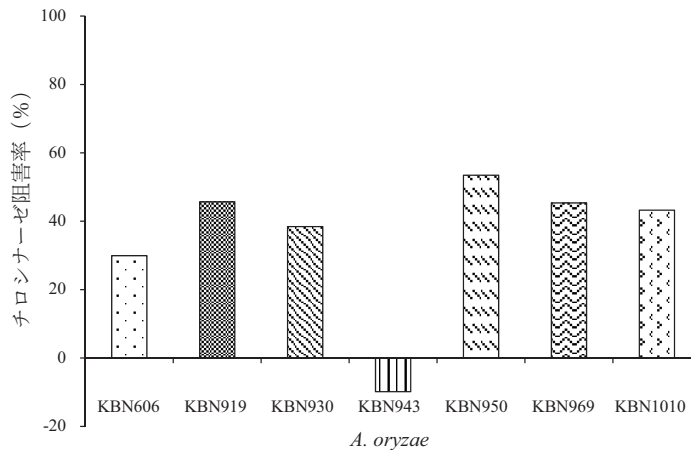


図5 各種麴菌を用いたオカラ4日目麴のチロシナーゼ阻害作用
それぞれのグラフの値は、平均値 (n=2) を示す。

オカラ麴の機能性

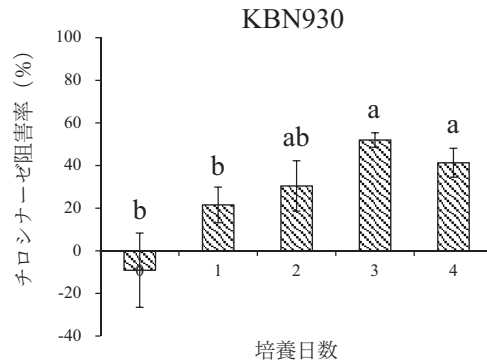


図6 KBN930を用いたオカラ麴の発酵に伴うチロシナーゼ阻害作用の変動
それぞれのグラフの値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。異なるアルファベツトは有意差 ($p < 0.05$, Tukey 検定) があることを示す。

る¹⁶⁾。これらのイソフラボン類は、チロシナーゼなどの酸化酵素を強く阻害することが見出されており¹⁹⁾、オカラ麴の発酵に伴うチロシナーゼ阻害作用の変動に関与していることが推測される。

4. まとめ

本研究ではオカラの有効利用を目的とし、このオカラを麴菌で発酵させてオカラ麴を調製した。このオカラ麴の様々な機能性を調べるため、抗酸化活性、腭リパーゼ阻害作用およびチロシナーゼ阻害作用を検討した。

その結果、各種オカラ麴の抗酸化活性は、*A. oryzae* KBN930において高かった。この麴の抗酸化活性は、発酵日数の経過とともに上昇し、4日目麴は原料オカラ（0日目）より有意に ($p < 0.01$) に高い抗酸化能を示した。この抗酸化活性の増強には、大豆たんぱく質の酵素分解物であるペプチドやアミノ酸、イソフラボンアグリコンおよびオルトヒドロキシイソフラボンが関与していることが推察される。

各種オカラ4日目麴の腭リパーゼ阻害作用を測定したところ、*A. oryzae* KBN950を用いた麴が、他の麴に比べ、有意に ($p < 0.01$) 高い阻害作用が認められた。KBN950麴は発酵日数の経過とともに阻害率の上昇が認められ、特に胞子形成が認められた2日目の麴において著しく上昇した。各種オカラ4日目麴のチロシナーゼ阻害作用は、*A. oryzae* KBN943を用いた麴以外において阻害作用が認められた。阻害作用が認められた麴のうち、*A. oryzae* KBN930の発酵日数に伴う阻害作用の変化を調べたところ、阻害作用は発酵日数の経過とともに上昇が認められた。腭リパーゼ阻害作用およびチロシナーゼ阻害作用の上昇には、麴菌の発酵に伴い生成した、イソフラボン類をはじめとする各種フラボノイドの関与が考えられる。

今後はこれらの機能性に関与する成分を分離、生成し、化学構造を明らかにする必要がある。

謝辞

本研究において、各種麹菌を提供いただきました株式会社ビオックの和久豊氏に感謝の意を表します。共同研究者である平成23年度の佐藤真梨子さん、西山由衣さんおよび堀江瑞穂さんに感謝致します。

参考文献

- 1) Roberts, C. K. and Sindhu, K. K., Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.*, **84**, 705–712 (2009).
- 2) 上野浩晶, 中里雅光, 新たに登場する抗肥満薬の動向と展望, 日本内科学会雑誌, **103**, 753–759 (2015).
- 3) 奥田拓道, 韓立坤, 生薬および関連代謝調節薬, 日本薬理学雑誌, **118**, 347–351 (2001).
- 4) 清水宏, 皮膚の構造と機能, 「新しい皮膚科学」, 第2版 (中山書店, 東京), pp. 10–11 (2014).
- 5) 須賀康, 2. 皮膚老化のバイオロジー; アンチエイジングの時代, 日本老年医学会雑誌, **41**, 601–603 (2004).
- 6) 海老原清, 桐山修八, 食物繊維の物理・化学的性質と生理機能, 日本食品工業学会誌, **37**, 916–933 (1990).
- 7) 高村基治, 食品加工副産物の有効利用—おからの再利用に向けて—, 生物機能開発研究所紀要, **10**, 56–62 (2010).
- 8) Adlercreutz, C. H., Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Höckerstedt, K. A., Watanabe, S., Hämäläinen, E. K., Markkanen, M. H., Mäkelä, T. H., Wähälä, K. T. and Adlercreutz, T., Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.*, **125**, 757–770 (1995).
- 9) 4豆類, 「七訂食品成分表2016」, 第1版, 香川芳子監修 (女子栄養大学出版部, 東京), p. 36 (2016).
- 10) 工藤重光, 下山田真, 安田正昭, 堀井正治, 6. 大豆の発酵食品, 「大豆の機能と科学」, 初版, 小野伴忠, 下山田真, 村本光次編 (朝倉書店, 東京), pp. 117–151 (2012).
- 11) 沖智之, DPPH ラジカル消去活性評価法, 「食品機能性評価マニュアル集」, 第II集, 食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編, pp. 71–78 (2008).
- 12) Mason, H. S. and Peterson, E. W., Melanoproteins. I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **111**, 134–146 (1965).
- 13) 村本光二, 陳華敏, 9. 大豆ペプチドの抗酸化性, 「ダイズのヘルシーテクノロジー」, 河村幸男・大久保一良編 (光琳, 東京), p. 147 (1998).
- 14) MaoBin, C., Hong, L., Da, Z. and Shangling, F., Research on the esterification property of esterase produced by *Monascus* sp. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**, 5166–5172 (2011).
- 15) 志村亜希子, 江崎秀男, 森久美子, 熊谷百慶, 中村好志, オカラ紅麹の抗酸化性の評価およびクッキーへの利用, 日本食品科学誌, **61**, 409–417 (2014).
- 16) 江崎秀男, 川岸舜朗, 井上昇, 大澤俊彦, 味噌中のオルトヒドロキシイソフラボンとその抗酸化性, 日本食品科学工学会誌, **48**, 51–57 (2001).
- 17) 小島正明, 落俊行, 明尾一美, 田内由遊, 大谷元, 米麹による無添加大豆発酵粉末の高脂肪誘導肥満マウスに対する抗肥満効果, 日本栄養・食糧学会誌, **62**, 171–178 (2009).
- 18) Susumu, S., Yoshio, I., Akiko, Y., Ayako, K., Tsutomu, H., Takashi, Y. and Takuo, O., Inhibitory Effects of Flavonoids on Lipase, *Nippon Shokuhin Gogyo Gakkaishi*, **41**, 847–850 (1994).
- 19) 白崎友美, 江崎秀男, 武藤ゆうみ, 大矢友子, 川岸舜朗, *o*-ヒドロキシイソフラボンの酸化傷害関連酵素への影響, 日本農芸化学会2002年度大会講演要旨集, p. 253, 仙台 (2002).

オカラ麴の機能性

引用 URL

i) <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000106405.html>