

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成23年3月23日受理

産技連/食品健康産業分科会
食品機能成分分析研究会 編

オカラ加工食品類の糖脂質(グリコシルセラミド)

作成者：(独)産業技術総合研究所 北海道センター
生物プロセス研究部門 主任研究員 仲山賢一
e-mail: k-nakayama@aist.go.jp

1. オカラ (おから) について

1. 1 概要

オカラは、豆腐を製造する過程で大豆から豆乳を絞った後に残った、繊維質を多く含む食品である。オカラの語源は「絞り滓」の意味の「から」から来ており、古くから食用とされている。その形から、「卵の花」とも呼ばれる。

北海道は、国産大豆の最大生産量を誇っており日本での生産量の約2割を占めている。オカラは大豆の加工過程で生産されることから、オカラも北海道で多く生産されている。

現在では、オカラの食品としての需要が供給を大きく下回っている。またオカラは品質の劣化が早く日持ちがせず、ほとんどが廃棄されている。

このような現状を受けて、オカラを加工して機能性食品とする試みが、北海道で進められている。

オカラは元々、たんぱく質の含有量が高いなど優れた特性を持つことから、機能性食品としても期待される。



1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

オカラの乾物中に、たんぱく質は約26%、脂質は約13%、食物繊維が約15%含まれるとされている。このうち、脂質の半分はリノール酸であり、ホスファチジルコリンも多く含まれている。

1. 2. 1 糖脂質類を含む食品

糖脂質は生物細胞中に普遍的に存在する脂質成分であり、主に細胞の表面膜にマイクロドメインを形成して存在している¹⁾。真核生物の場合、その脂質成分はセラミドであり、皮膚などでは肌の保湿およびバリア機能を保つために機能していることが知られている²⁾。この様なことから、元々生物である食品中には必ず糖脂質が含まれており、その構造も生物により多種多様である。なお、植物の糖脂質としてはグルコシルセラミドの存在が多く報告されている。

<引用・参考文献>

- 1) Hakomori, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 225-232 (2002)
- 2) Robson KJ, Stewart ME, Michelsen S, Lazo ND, Downing DT., J. Lipid Res., **35**, 2060-2068 (1994)

2. 糖脂質についての説明

オカラの糖脂質成分は大豆由来であることから、セラミドが結合した植物由来特有の糖脂質が多く存在すると考えられる。セラミドを持つスフィンゴ糖脂質は、動物などの細胞表層でのレセプター制御に関わっているとされるが、大豆などの植物体での生体機能は未だ明らかとなっていない。動物のほ乳類に対する糖脂質の生理活性作用としては、皮膚の保湿・バリア機能の強化、抗炎症作用などが知られている。

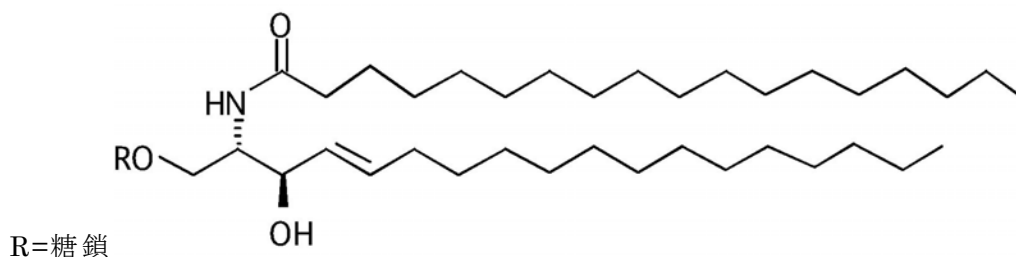


図2-1 一般的な糖脂質の構造

3. 定量分析の方法について

オカラおよび、オカラの加工品からの糖脂質の抽出方法と、TLCによる定性、定量方法を述べる。

3. 1 準備する器具など

1. ファルコンチューブ (15ml 容)
2. 遠心分離器
3. 遠心減圧濃縮装置

4. C18 SepPack カートリッジ (0.1g)
5. 展開槽
6. TLC プレート (シリカゲル)
7. 110°C の電気オーブン

[試薬]

1. エタノール (特級)
2. クロロホルム (特級)
3. メタノール (特級)
4. 0.1M KCl 溶液
5. オルシノール
6. 硫酸 (特級)
7. グルコシルセラミド標準品 (コンニャク由来など)

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

1. オカラおよびオカラ加工食品 0.5 g を精秤し、70%エタノール 2ml と共にフアルコンチューブに入れ、1 分間 3 回振とう抽出を行う。
2. 3,000 回転で 5 分間遠心した後、70%エタノール抽出液を回収し、残渣にさらに新しい 70%エタノール 2ml を入れ 1 分間 3 回振とう抽出を行う。その後同様に遠心操作をし、70%エタノール抽出液を回収し、最初の抽出液と合わせる。
3. 合わせた 70%エタノール抽出液にさらに 70%エタノールを加え、5ml にメスアップし、総抽出液とする。密栓して-30°C 以下の冷凍庫で保管する。
4. 抽出液 1ml について、遠心乾燥機にて溶媒を完全に留去する。
5. 乾燥した試料に 0.1M KCl を 1ml 加え完全に溶かす。
6. クロロホルム-メタノール (2:1)、メタノール、0.1M KCl で処理した C18 SepPack カートリッジに 5. の試料をアプライし、さらに水 1ml で洗浄する。
7. 水で洗浄した後、メタノール 1ml、クロロホルム-メタノール (2:1) 2ml で糖脂質画分を溶出し、これらの画分は一つに合わせ、遠心乾燥機を用いて完全に溶媒を留去する。
8. 上記の試料に 100 μ l のクロロホルム-メタノール (2:1) を加え、攪拌してよく溶かす。溶けないものについては遠心操作により除く。

3. 3 HPLC による分析方法

1. シリカゲルの TLC プレートへ等間隔に標準品および試料をキャピラリーなどを用いてアプライする。量は、標準品グルコシルセラミド (GlcCer) が 0.5~2 μ g となるようにアプライし、抽出試料は 1 μ l ずつアプライする。
2. クロロホルム-メタノール-水が 65:30:8 の展開溶媒で上記 TLC プレートを展開する。展開溶媒がプレートの 90% の長さには達するまで展開をする。
3. TLC プレートを完全に乾燥させた後、0.4%オルシノール、10%硫酸液を噴霧する。
4. TLC プレートを 110°C のオーブンに入れ加熱し、発色させる。発色の濃度により、量を測定する。

4. 分析例

4. 1 TLC を用いた分析例

TLC クロマトグラフィーにより分離された物質は移動度から標準物質と比べ特定する。定量には同時に展開発色した標準試料を用い、画像解析ソフトにより発色濃度から量を算出する。 図 4. 1 - 1 に TLC プレートを用いたクロマトグラムを示す。

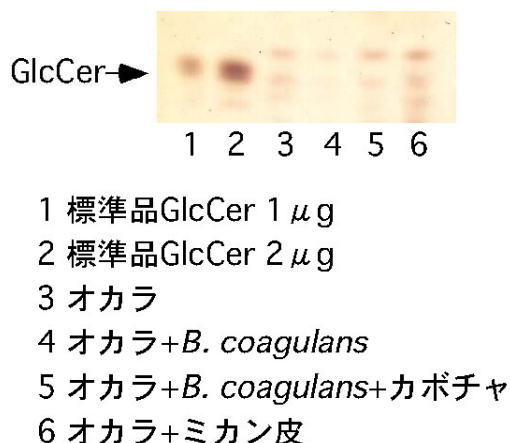


図 4. 1 - 1 TLC クロマトグラフィーによるサンプルの分析例

5. オカラ食品の分析結果例

上記手法により、オカラおよびオカラ加工食品中の糖脂質成分のひとつであるグルコシルセラミド量分析を行った結果を表 5 - 1 に示す。

オカラは大豆から豆乳を絞った滓であるので、大豆細胞膜成分でもある糖脂質類はオカラに多く残っており、グルコシルセラミドは一定量含まれていた。しかし、その量はオカラに微生物 *B. coagulans* を作用させることで減少した。オカラにカボチャやミカン果皮などを添加すると、これら植物成分の持つグルコシルセラミドも加わるために増加した。

表 5-1 オカラおよびオカラ加工食品のグルコシルセラミド量

	グルコシルセラミド量 (μg/g)
オカラ	296
オカラ + <i>B. coagulans</i>	129
オカラ + <i>B. coagulans</i> + カボチャ	247
オカラ + ミカン果皮	356

6. 分析上の留意、注意点

TLCクロマトグラフィーによる糖脂質分析は定性的な分析には優れているが、発色の感度が低いことと、結果を画像として取り込みソフトウェアによる解析を行わなければならない、定量には誤差を含みやすい。発色においても、オルシノールの噴霧の均一性にも個人差が出ることから、定量の際に大きな誤差が含まれる可能性が高い。

そのため、非熟練者においてはこの分析手法の適用は難しく、蒸発光散乱検出器の使用などで糖脂質分析定量性の精度を上げる必要があることが分かった。

7. その他

特になし。

8. 定量法に関する引用・参考文献

特になし

-以上-