

〔研究ノート〕

テンペ脂溶性画分の抗酸化性に関する研究

増井利映・渡辺睦行・中津川研一

Antioxidant Activity of Lipid Soluble Fractions in Tempe

Rie MASUI, Nakamichi WATANABE and Kenichi NAKATSUGAWA

Tempe is a traditional fermented soy product native to Indonesia. The purpose of this study was to compare the antioxidant activities in lipid soluble fractions of two kinds of tempes with unfermented soybean by assays using ethanol-buffer and emulsion systems. Lipid soluble fractions were extracted by diethylether from freeze-dried powder of soybean, tempe made by aerobic fermentation of boiled soybean with *Rhizopus microsporus*, and tempe processed with further anaerobic fermentation. The antioxidant activity of tempe and anaerobic tempe was stronger than that of soybean, although that of tempe was similar to that of anaerobic tempe. These results suggested that tempe and anaerobic tempe might be made available as food for preventing lipid peroxidation in vivo.

Key words: antioxidative activity (抗酸化性), tempe (テンペ), soybean (大豆)

1. 緒 言

活性酸素を始めとするフリーラジカルは、老化に密接に関連した疾病、特にがんや動脈硬化、糖尿病の合併症などを引き起こすと考えられている。生体内では、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)やアスコルビン酸を始めとする抗酸化酵素や抗酸化物質によって、このフリーラジカルが消去されることが知られているが¹⁾、過剰な酸化ストレスが生じると生体防御機構では対応出来なくなるため、食品中の抗酸化物質の役割が重要となってくる。

テンペは蒸煮大豆をテンペ菌 (*Rhizopus microsporus*) で無塩発酵させたインドネシアの伝統的な大豆発酵食品である。長期保存後も脂質の過酸化物質は上昇しないといわれており、強い抗酸化物質を含有している可能性が高い²⁾。すでに、テンペ水溶性画分の抗酸化性は未発酵の大豆よりも強く、これ

は発酵中に生じたアミノ酸やペプチド、アグリゴン型イソフラボンによるものであること、さらにこの通常のテンペを嫌気発酵させたテンペでは、抗酸化能が増強されることが報告されている³⁾。一方、脂溶性画分についての報告はあまりみられない。

そこで本研究では、テンペ及び嫌気発酵させたテンペの脂溶性画分の抗酸化性について、エタノールバッファー系及びβ-カロテンエマルジョン系による抗酸化能の検討、及び薄層クロマトグラフィー(TLC)による抗酸化物質の同定を試みた。

2. 方 法

2-1 抗酸化能試験用試料の調製

大豆、テンペ、嫌気発酵させたテンペの凍結乾燥粉末をジエチルエーテルにて抽出し溶媒を留去したものを脂溶性画分とした。

2-2 抗酸化能の測定

2-2-1 エタノール-バッファー系による抗酸化能の評価

50 mM リノール酸-99.5% エタノール溶液 1 ml と、0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) 1.5 ml を混合した後、サンプルを最終濃度が 84 $\mu\text{g/ml}$ (15 mg/g 油) となるよう添加した。ポジティブコントロールとしては α -トコフェロールを最終濃度 1.3 μM (0.1 mg/g 油) となるよう添加した。

水溶性ラジカル開始剤として 50 mM の AAPH (2, 2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) (和光純薬) を 100 μl 添加し、暗所で 40°C の恒温槽にてインキュベートした。

抗酸化能の評価にはロダン鉄法を用いた。すなわち、反応液を 50 μl とり、75% エタノール 2.35 ml, 30% チオシアン酸アンモニウム溶液 50 μl , 20 mM FeCl_2 -3.5% HCl を順に加えてよく攪拌し、正確に 3 分後、分光光度計により波長 500 nm で吸光度を測定した。測定は 2 時間おきに 12 時間行ない、吸光度が 0.3 に達するまでの時間 (一定量のヒドロペルオキシドが生成するのに要する時間) を求めた。

2-2-2 β -カロテン退色法による抗酸化能の評価

200 ml 容三角フラスコに 1 g のリノール酸をクロロホルムに溶解し 10 ml にしたものを 0.2 ml, 10 mg の β -カロテンをクロロホルムに溶解して 10 ml にしたものを 0.5 ml, 2 g のツイーン 40 をクロロホルムに溶解して 10 ml にしたものを 1 ml とり、攪拌後窒素ガスでクロロホルムを完全に留去した後、90 ml の酸素飽和蒸留水を加えて溶解した。この溶液に 0.2 M リン酸緩衝液を 10 ml 加え、これをリノール酸- β -カロテンエマルジョン溶液とした。試験管にサンプル 0.1 μl を入れ、窒素ガスにてクロロホルムを完全に留去した後、リノール酸- β -カロテンエマルジョン溶液を 5 ml 加えて溶解し、50°C の恒温水槽にて反応を促進させた。合計 90 分間反応させ、470 nm の吸光度を測定した。コントロールには、 α -トコフェロールを用いた。

2-3 TLC による抗酸化物質の同定

大豆、テンペ、嫌気発酵させたテンペの脂溶性画分をヘキサン:エーテル:酢酸 (80:30:1) の展開溶媒で展開し、1%-リノール酸を含むヘキサン溶液を噴霧した。15 分間紫外線ランプを当てリノール酸を酸化させた後、N, N-ジメチル-P フェニレンジアミンジヒドロコライドまたは 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンを噴霧し、リノール酸ヒドロペルオキシド、またはカルボニル基を発色させた。コントロールには、 α -トコフェロールを用いた。

2-4 統計処理

データ平均値±標準誤差で示し、群間の差はチューキーの多重比較で分析した。有意水準 5% 以下の場合を有意差ありとした。

3. 結 果

3-1 エタノール-バッファー系による抗酸化能の評価

500 nm の吸光度が 0.3 まで達するのに要する時間を求め、コントロールを 1 として相対的に比較した (図 1)。反応液中ではリノール酸の酸化が起こり、コントロールと比較して吸光度の上昇が遅ければ、サンプルは抗酸化性が高いといえる。大豆と比較して、テンペ及び嫌気発酵させたテンペで有意に高い抗酸化能を示したが、テンペと嫌気発酵させたテンペの抗酸化能は同程度であった。

3-2 β -カロテン退色法による抗酸化能の評価

反応開始直後の吸光度を 1 として相対的に比較した (図 2)。大豆と比較して、テンペ及び嫌気発酵させたテンペで高い抗酸化能を示したが、テンペと嫌気発酵させたテンペの抗酸化能は同程度であった。2 連で行なったため、有意差の検定は出来なかったが 2 連の差は極めて小さかった。

3-3 TLC による抗酸化物質の同定

抗酸化物質があれば、TLC 上に白抜きのスポットが現れるはずであったが、今回は、白いスポットが見られず、抗酸化物質を同定できなかった。

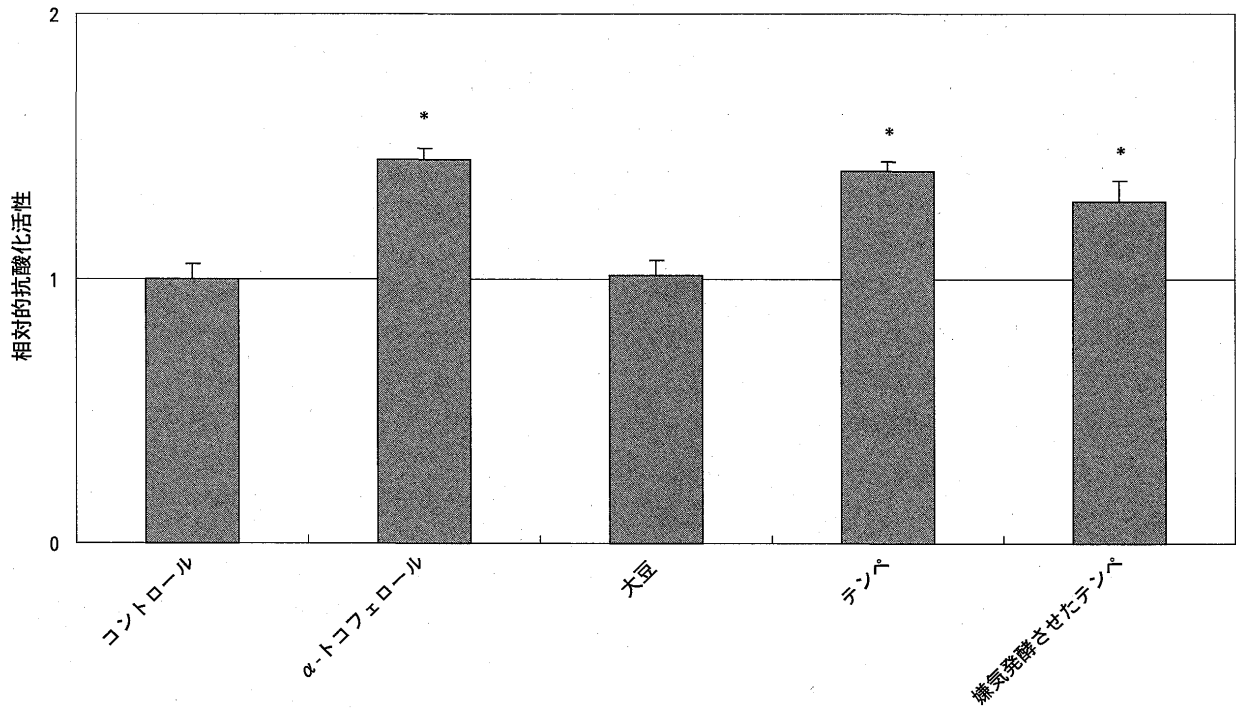


図1. ロダン鉄法によるエタノール-バッファー系抗酸化試験
*: 大豆と比較した際の有意差を示す (P<0.05)

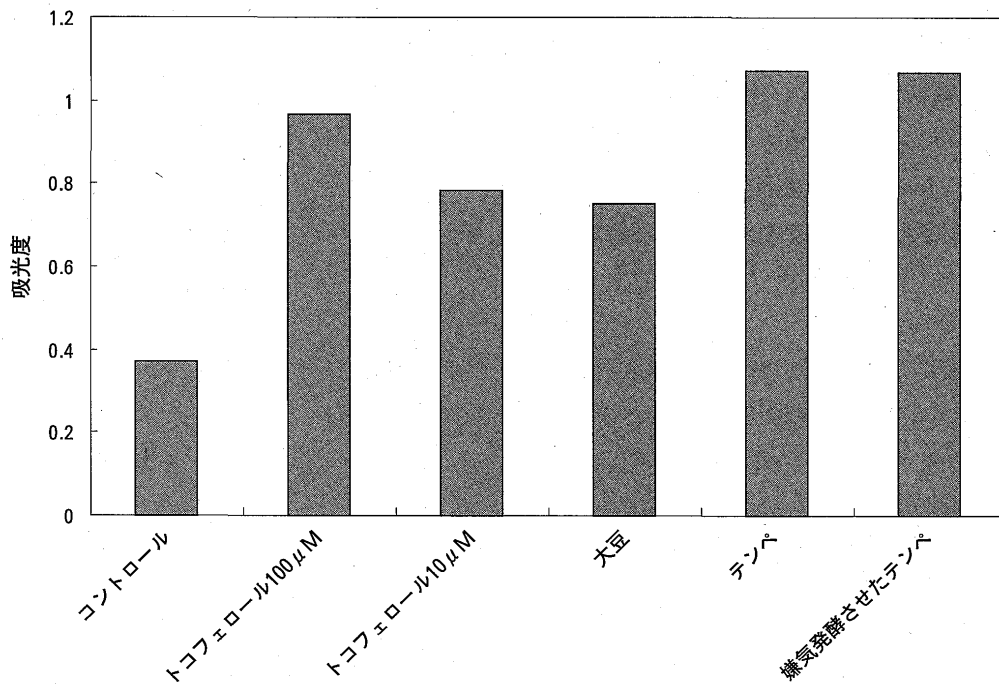


図2. β-カロテン退色法による抗酸化能の測定

4. 考 察

本研究では、テンペと嫌気発酵させたテンペの脂溶性画分を用いて、エタノール-バッファー系試験と β -カロテン退色法により、抗酸化能の検討及び抗酸化物質の同定を行なった。テンペ及び嫌気発酵させたテンペの抗酸化性は大豆より強かったが、テンペと嫌気発酵させたテンペに差はなかった。

テンペの脂溶性画分には、リノール酸などの不飽和脂肪酸の他に、 α -トコフェロールが含まれている。 α -トコフェロールは強い抗酸化性を示すが、トコフェロールの総量は大豆発酵期間中一定であること⁴⁾、また、大豆脂溶性画分の抗酸化性は、 α -トコフェロール量と相関がないとの報告があることから⁵⁾、テンペや嫌気発酵させたテンペの抗酸化能がトコフェロールによるものではないことが推測される。一方、テンペのアルコール抽出液から抗酸化性物質として、6,7,4'-Trihydroxy-isoflavoneが分離されており、溶血試験や酸素吸収試験において抗酸化力を示すことが認められている⁶⁾。この化合物を始めとする種々の物質が発酵中に新たに生成している可能性も高い。

抗酸化物質の同定は今後の課題であるが、エタノール-バッファー系だけでなく、比較的生体内の条件に類似したエマルジョン系でも強い抗酸化性がみられたことから、テンペ脂溶性画分は、生体内での過酸化を抑制するうえで有効であると考えられた。

5. 要 約

テンペ水溶性画分の抗酸化性は、未発酵大豆よりも強く、さらにこのテンペを嫌気発酵させたテンペでは抗酸化能が増強されることが報告されている。そこで、脂溶性画分においても強い抗酸化能が得られるかを、エタノール-バッファー系及び β -カロテンエマルジョン系による抗酸化能の検討で試みた。

その結果、テンペ及び嫌気発酵させたテンペの抗酸化性は未発酵大豆より強かったが、テンペと嫌気発酵させたテンペの抗酸化性に差はなかった。

6. 参考文献

- 1) 藤本大三郎編: 老化のメカニズムと制御, IPC, 412-426 (1993)
- 2) K. Katoh, T. Ohta: Quality Assessment of Tempe Products—Triglyceride Profile of Tempe and Oncom Chips of Indonesia. 食品総合研究所研究報告; 48, 86 (1986)
- 3) N. Watanabe, K. Fujimoto and H. Aoki: Antioxidant activities of the water-soluble fraction in tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh). *Int. J. Food Sci. Nutr.*, In press.
- 4) J. Denter, H. J. Rehm and B. Bisping: Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 45, 129-134 (1998)
- 5) 三枝貴代, 堀野俊郎, 小野田明彦: 大豆モヤシの抗酸化性に対する光照射の影響, 近畿中国農業研究成果情報; 1995, 157-158 (1996)
- 6) P. Gyorgy, K. Murata and H. Ikehata: Antioxidants isolated from Fermented Soybeans (Tempeh). *Nature*, 203, 870-872 (1964)

(ますい りえ 生活科学科)

(わたなべ なかみち 生活科学科)

(なかつがわ けんいち 生活機構研究科)