

# 納豆菌発酵生産物の抗酸化性に関する研究

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科  
微生物部 大庭匠翔

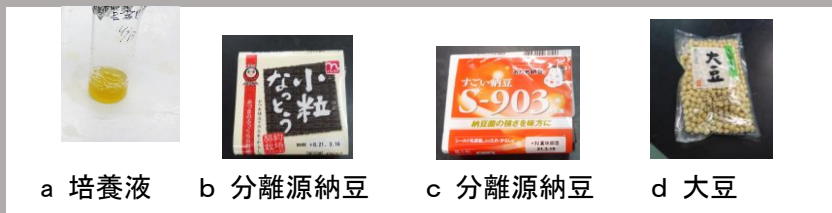
## はじめに:

納豆には動脈硬化や糖尿病などの生活習慣病防止に効果を発揮する成分を含有するといわれている。健康効果を検証するにあたって原料の大豆と納豆菌生産物である納豆を比較したいと考えそのエキスを試料として抗酸化活性測定を試みた。又、その要因の一つと考えられるポリフェノール定量も行った。その結果を報告する。

## 実験1 大豆から納豆作成

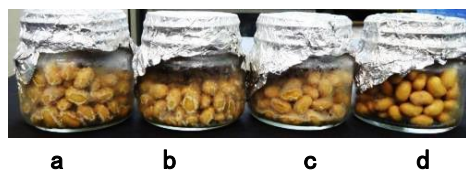
準備: 納豆懸濁液作成

(菌株: a 宮城野納豆菌、b 市販-あづま食品、c 市販-おかめ-効ノース、d 原料大豆)



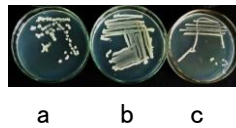
方法: 大豆を(重量の4倍の水)を一晩浸漬、4区分(a,b,c,d)とし各100gを秤量し容器に入れオートクレーブで121℃、15分間滅菌処理。滅菌した大豆に種菌培養液(a,b,c)を3ml接種し、均質化するために、滅菌スパーテルで混捏し30℃で48時間培養した。尚、dは種菌培養液のかわりに無菌水3mlを加えた。

結果: 培養後、観察(右図)から大豆(a~c)は納豆菌の作用で表層が白っぽく皺性を呈しており納豆に変化した。



## 実験2 使用納豆菌の走査電子顕微鏡観察

試料作成は固体培地に生育した納豆菌コロニー(右図)を前処理(2%グルタルアルデヒド固定→1%オウウム酸後固定→エタノール脱水→臨界点乾燥)しSEM2万倍で細胞を観察しそのスケール(長径×短径μm)を計測した。細胞の形状はa、cは桿菌でbは短桿菌であった。



## 実験3 納豆成分の抽出(試料作成)

順序: 抽出液作成

↓  
ミキサに納豆50gと10mM酢酸バッファー100mlを加え攪拌、ミキシング  
↓  
振とう抽出(6℃24時間)  
↓  
遠心分離(3000rpm)  
↓  
無菌濾過(φ0.25μmフィルター)



## 実験4 納豆成分の抗酸化活性測定

測定方法はABTS法で行った。数ある測定法でABTS法は水溶性、脂溶性の抗酸化物質を測定できる有利さがある。その原理はABTSであるアジノービスにペルオキシニ硫酸カウムを加えて活性化させたABTSラジカルと抗酸化物質との反応により青色が消失する。青色退色度合を725nmの吸光度測定から活性を評価できる。



方法: I液のABTS working solutionは、50%エタノールに溶解した7mM ABTS溶液100mlに140mMペルオキシニ硫酸カリウム溶液1.7mlをよく混和し、常温で暗所に24時間放置して作成した。この溶液の725nmにおける吸光度が0.7±0.02となるように50%エタノールで希釈し使用した。試験管にABTS working solutionを3ml採り、各試料(Sa, Sb, Sc, Sd, C)溶液30μlを添加した。尚コントロールは10mM酢酸バッファーを使用した。添加後攪拌し常温で4分間インキュベーションした後、725nmにおける吸光度を測定した。

結果と考察: 呈色反応(図1)から試料Sa, Sb, Scは抗酸化活性が高く測定不能のために適正範囲になるように試料を希釈して測定した(図2)。測定結果は各試料のブランク(b)も測定しABTSラジカル消去率を計算し表1にまとめた。



図1 納豆エキスの抗酸化活性測定

試料は左から Sa, Sb, Sc, Sd, Cの順



図2 納豆エキス(5倍希釈液)の抗酸化活性測定

試料は左から Sa, Sb, Sc, Cの順

試料種類	吸光度(abs)	吸光度差(abs)÷倍率	ラジカル消去率(%)
/希釈倍率(D)	(S, C)	(S-Sb)÷D	{(C-Cb)-(S-Sb)÷D} ÷ {(C-Cb)} × 100
Sa	5	0.110	(0.110-0) ÷ 5 { 0.7 - 0.011 } ÷ 0.7 × 100 = 98.4
Sab	5	0	
Sb	5	0.186	(0.186-0) ÷ 5 { 0.7 - 0.0372 } ÷ 0.7 × 100 = 94.7
Sbb	5	0	
Sc	5	0.155	(0.155-0) ÷ 5 { 0.7 - 0.031 } ÷ 0.7 × 100 = 95.6
Scb	5	0	
Sd	1	0.510	{ 0.7 - 0.51 } ÷ 0.7 × 100 = 27.1
Sdb	1	0	
C		0.700	(0.70-0)
Cb		0	

3種納豆の抗酸化力は原料の大豆を大きく凌いだ。納豆菌がもたらす発酵現象により抗酸化物質が生起したと考えられる。3種納豆成分の抗酸化力はラジカル消去率が90%以上で近い値なので優劣はつけ難い。

## 実験5 納豆の含有ポリフェノール定量

納豆試料の高い抗酸化活性はポリフェノール量に相関すると予想し、ポリフェノール定量を行った。納豆試料のポリフェノール量を標準物質のタンニン酸相当量として定量した。

### 5.1 標準物質タンニン酸の定量

方法: タンニン酸濃度5区分(0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/ml)の0.1mlと10%炭酸ナトリウムアルカリ溶液1mlとフェノール試薬1mlの混合液を60分間室温で反応、呈色液の750nm吸光度を測定し測定値を基に検量線を作成した。

結果: 呈色反応(図3)からタンニン酸濃度が高いほど青色が濃くなることを確認できた。又、検量線(図4)の傾きからタンニン酸0.05mg/mlが吸光度差0.304アブソーバンスに相当した。



図3 タンニン酸(濃度5区分)の呈色反応 (試験管左から 0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1mg/ml)

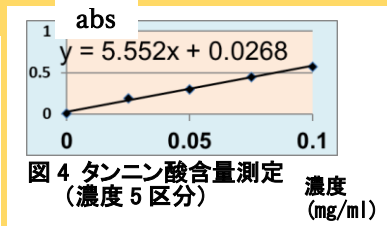


図4 タンニン酸含量測定 (濃度5区分)

### 5.2 納豆エキスのポリフェノール含量の測定

結果と考察: 4.1と同様の方法で納豆試料3種(Sa, Sb, Sc)と大豆試料(Sd)を測定した。尚コントロール(C)は10mM酢酸バッファーを用いた。吸光度差からポリフェノール濃度を算出しグラフ化した(図6)。

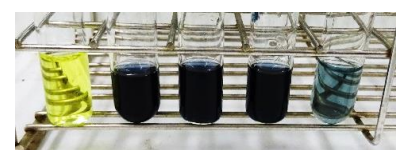


図5 納豆各試料のポリフェノール定量 (左から C, Sa, Sb, Sc, Sdの順)

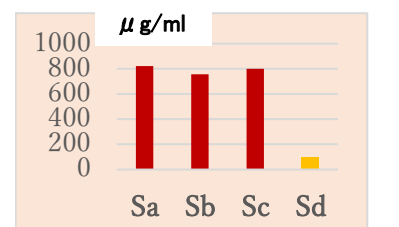


図6 納豆(大豆)含有ポリフェノール量

納豆試料のポリフェノール量(Sa: 824, Sb: 756, Sc: 802 μg/ml)は大豆試料のポリフェノール量(Sd: 101 μg/ml)の約8倍に達し含有ポリフェノール量は抗酸化活性と相関性の高いことが判明した。今後、納豆の健康効果として新たな機能性として抗菌性についてしらべることを課題としたい。