

テンペの製造条件と抗酸化性

掛 中 瞳 米 安 實

緒 言

テンペは、インドネシアに古くから伝わる大豆発酵食品で、煮熟した大豆をクモノスカビ (*Rhizopus oligosporus* など) が棲息する、バナナの葉やハイビスカスの葉に包んで発酵させた無塩発酵大豆食品である。インドネシアでは少なくとも500年あるいはそれ以上前から愛好され、ジャワ島中部東部の住民の常食の一つとして伝えられてきた、いわばインドネシアの納豆である。市場でもよく見かけられ植物性タンパク質の給源となっている。テンペは、煮熟した原料の大豆同士を白色菌糸によって固く結合させたコンパクトなケーキ状になっている。テンペ菌の発酵により大豆臭がほぼ完全に消え、また、納豆のような独特の臭気や粘質物もないことから、納豆嫌いでも食べられる大豆発酵食品として日本でも、注目されている。

大豆は、女性の更年期障害の緩和や骨粗鬆症の進行抑制、さらに各種ガン細胞の増殖を抑制する働きなどが期待されるイソフラボン、血圧の低下、また、心筋梗塞などのような血栓症の予防によいとされているリノール酸、肥満・糖尿病・大腸ガン・血栓の生成などを防ぐ働きが期待される食物繊維、過酸化脂質の生成を抑制する働きが期待されるビタミンE、コレステロール低下作用・冠状動脈性疾患の危険性を低減させる効果がある大豆タンパク質など、多様な機能性成分を含んでいるため、世界的にも大豆加工食品が注目されている。

大豆発酵食品であるテンペは、大豆の各種成分をほぼそのままの状態でも保有しているうえに、テンペ菌の繁殖により、ビタミンB群、ビタミンE等が増加することも認められている¹⁾。さらに、納豆と同様に、テンペ菌による発酵で、各成分の消化吸収性も向上している。

テンペには抗生物質的作用があり、消化系の抗菌による生体調節機能を有している²⁾。元来大豆に含まれているイソフラボン類だけでなく、発酵

の過程で、配糖体から加水分解によってできる種々のイソフラボン類が加わる。トコフェロール類は、このイソフラボン類の抗酸化性を相乗的に高める。さらに、サポニンやクロゲン酸も抗酸化能の発現に加わる。これらの作用は、発ガンや老化の予防に効果があるとされている。レクチン、ナイアシン、シストステロール、ならびに不飽和脂肪酸などによる相乗効果で血中コレステロールの低下が認められている。他にも、テンペの水抽出液に、納豆と同様の強い血栓溶解作用が認められている³⁾。このようにテンペは、いろいろな優れた保健効果が期待できる。

ここでは、テンペを保健食品としてさらに有効に活用するための情報を得る目的で、多くの生理機能の中から抗酸化性を取り上げて、その抗酸化性の実態を調べるとともに、テンペの製造条件が抗酸化性に及ぼす影響などについて検討した。

実験方法

1. テンペの製造

1) テンペ菌

テンペ菌は、広島大学大学院先端物質科学研究科微生物系統保存室保有の *Rhizopus oligosporus* 950118株を使用した。

2) テンペ菌の保存用培地

ポテトデキストロース寒天培地 (ニッスイ製) を使用した。

「1 L中の組成」

・ ポテト浸出液	200.0g
・ ブドウ糖	20.0g
・ 寒天	15.0g
・ pH5.6±0.1	

3) スターターの作成

ナス型フラスコにおから50gを入れ、オートクレーブで殺菌した。ポテトデキストロース寒天培地で培養したテンペ菌をナス型フラスコに入れたおからに接種した。37℃で48時間培養し

た後、凍結乾燥してプラスチックフィルム袋に密封して保存した。

4) テンペの製造

粒径の揃った原料大豆（広島県産アキシロメ）100gを洗浄後、原料大豆の3倍量の0.25%の酢酸水溶液中で60分間煮沸した。煮汁から出して、手で薄皮を除き、更に、原料大豆の3倍量の0.25%の酢酸水溶液中で再び60分間煮沸した。煮汁から上げ水気をきり、37℃付近で、スターター1gをよく混ぜ、無菌シャーレ4～5個に分注し、37℃で48時間培養してテンペを製造した。

2. 水溶性タンパク質の定量

1) 浸出液の調製

テンペ10gを精秤したのち細切し、脱イオン水100mlを加えて、沸騰後約1分間煮沸した。No.2のろ紙で熱ろ過し、残留物を熱水で3～4回洗浄した。ろ液を250mlメスフラスコに集め、脱イオン水で定容とした。これを水溶性タンパク質定量用の浸出液とした。

2) タンパク質量の定量

浸出液2mlを分解フラスコに入れ、その中に濃硫酸約6mlを入れて、ダイジェスダール分解器（セントラル科学株式会社製）で加熱分解した。分解液をケールダール蒸留装置で水蒸気蒸留し、4%ホウ酸溶液で捕集した留液を0.05N-硫酸溶液で滴定し、次式を用いてタンパク質量を算出した。

滴定値 (ml) $\times F \times 0.7$ = 全窒素量 (mg)

全窒素量 (mg) $\times 5.71$ = タンパク質量 (mg)

タンパク質量 (mg) $\times 250 / 2 \div$ 試料採取量 (mg) $\times 100$ = 水溶性タンパク質含量 (%)

ここで、Fは0.05N-硫酸溶液のファクタ、5.71は大豆の窒素-たんぱく質換算係数を表す。

3. 抗酸化性の測定

テンペの抗酸化性は、工藤ら⁶⁾の方法を改変して測定した。

1) 試料液の調製

包丁で細かく刻んだテンペ2gに、50%エタノール4mlを加え、ガラス製ホモジナイザーで

均質化後、3,000rpm、10分間の遠心分離を行った。その上澄み液をNo.5Cのろ紙でろ過し、50mlメスフラスコに集めた。残渣に50%エタノール5mlを加え、振とうした後、同様に遠心分離して得た上澄み液をNo.5Cのろ紙でろ過し、50mlメスフラスコに集めた。この操作をさらに2回繰り返して、抽出液を50%エタノールで50mlに定容とした。これを抗酸化性測定用の試料液とした。

2) 抗酸化性の測定

リノール酸の酸化物が β -カロテンを退色させる作用を利用したMILLERら⁷⁾の方法を応用した津志田ら⁸⁾や松田ら⁹⁾の方法を改変して用いた。すなわち、 β -カロテン溶液 (0.02mg/10mlクロロホルム)、リノール酸溶液 (1g/10mlクロロホルム)、ツイーン40溶液 (2g/10mlクロロホルム)をそれぞれ0.5ml、0.2ml、1.0mlずつ200mlの三角フラスコにとり、窒素ガスでクロロホルムを完全に除去した後、100mlの脱イオン水を加えて溶解し、更に、8.9mlの0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.0)を添加して、リノール酸- β -カロテン溶液を作成した。次に、あらかじめ試料液0.1mlを分注した試験管に、上記のリノール酸- β -カロテン溶液4.9mlを加え、攪拌後直ちに、470nmにおける吸光度 (A_o)を測定した。なお、リノール酸- β -カロテン溶液の調製に際しては、 A_o が1.3程度 (1.2～1.3)になるよう β -カロテン溶液の添加量を調整した。 A_o 測定後、直ちに試験管を55℃の恒温槽に入れ、一定時間 (t 分間) インキュベートした。インキュベート終了後、直ちに吸光度 A_t を測定し、 t 分間における470nmの吸光度の低下量、すなわち、 $\Delta A = A_o - A_t$ を算出した。インキュベートの時間 t は吸光度 A_t が A_o の約6割程度 (OD0.8～0.7)に低下するまでの時間とした。ここでは、実験の結果から、30分間を採用した。試料液の抗酸化性は、ジブチルヒドロキシルトルエン (BHT)を用いて測定した ΔA とBHT濃度との関係を表す検量線から、BHT濃度に換算して表示した。

3) 検量線の作成

抗酸化性測定用の検量線は、標準溶液として、

0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 μ M, BHT溶液 (50%エタノール溶液) を用いて作成した。すなわち、それぞれの ΔA を、BHT濃度に対してプロットしたものである。

4. テンペの抗酸化性に及ぼす培養温度と時間の影響

テンペについて、培養時間を48時間一定とし、培養温度を15, 20, 25, 28, 32, 35, 37, 40 $^{\circ}$ Cの8段階に、また、培養温度を37 $^{\circ}$ C一定とし、培養時間を0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 108, 120, 144時間の10段階に、それぞれ変えて調製したものについて、抗酸化性を測定した。

5. 炭素源の添加がテンペの抗酸化性に及ぼす影響

添加する炭素源として、一般的で低価格の入手しやすいシュクロースを取り上げた。

煮熟大豆50gに対し、シュクロースを、0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15%の9段階に濃度を変えて添加してテンペ菌を接種し、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養し、抗酸化性を測定した。

6. テンペ中の抗酸化性ペプチドの分離

テンペ中の抗酸化性ペプチドの分離は、工藤ら¹⁰⁾¹¹⁾の方法を一部改変して行った。

1) テンペ抽出液の調製

包丁で細かく刻んだテンペ10gを精秤後、脱イオン水80ml加え、マグネティック・スターラーを用いて30分間攪拌し、ホモジナイザーで均質化後、1N-塩酸溶液でpH4.3に調整し、ガラス棒で攪拌後、遠心分離 (6,000rpm, 25 $^{\circ}$ C, 30分間) し、その上澄み液をNo.2のろ紙でろ過し、そのろ液3容量に対してエタノールを7容量の割合で混合した。3 $^{\circ}$ Cで一晩静置後、遠心分離 (10,000rpm, 3 $^{\circ}$ C, 30分間) し、その上澄み液をNo.5Cのろ紙でろ過して、テンペ抽出液を調製した。

2) 抗酸化性ペプチドの分離

テンペ抽出液200mlをロータリーエバポレーター (減圧下, 45 $^{\circ}$ C) を用いて10mlまで濃縮し、その5mlをSephadex LH-20カラム (Φ 3.0

cm \times 40cm)に負荷した。条件は、移動相: 70%エタノール, 流速: 0.5ml/min, 検出波長290nmとした。なお、分画は3ml(120drop)ごとに行った。

3) ピークフラクションの抗酸化性

得られた各フラクションをピークごとに集めて、ロータリーエバポレーター (減圧下, 45 $^{\circ}$ C) で濃縮後、10mlメスフラスコに集め、50%エタノールで10mlに定容した。これを、抗酸化性測定用の試料液とし、テンペの場合と同じ方法で抗酸化性を測定した。

4) 抗酸化性ペプチドの分子量推定用マーカー

テンペ抽出液から分離された、抗酸化性ペプチドの分子量を推定する目的で、現時点で入手可能なマーカーを使用した。マーカーは、インスリン (牛肝臓, MW: 5,733, Sigma社製), リゾチム (卵白, MW: 14,000, 和光純薬株式会社製), γ -グロブリン (コーンフラクション, MW: 150,000, Sigma社製) を用いた。

実験結果および考察

1. テンペの水溶性タンパク質含量に及ぼす培養温度と時間の影響

テンペ菌による大豆タンパク質の分解の目安として、生成される水溶性タンパク質量を取り上げた。テンペの製造条件の違いがタンパク質の分解に及ぼす影響を明らかにする目的で、製造条件変えて調製したテンペの水溶性タンパク質含量を測定した。

1) 培養温度が水溶性タンパク質含量に及ぼす影響

培養時間を48時間で一定にし、培養温度を15, 20, 25, 28, 32, 35, 37, 40 $^{\circ}$ Cの8段階に変えて、製造したテンペの水溶性タンパク質含量を測定し、その結果を図1に示した。

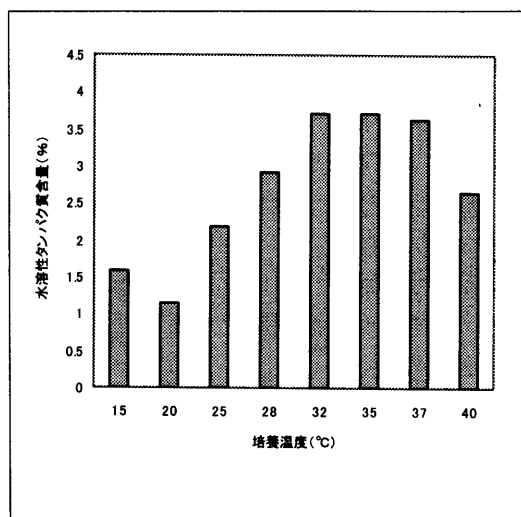


図1 培養温度がテンペの水溶性タンパク質含量に及ぼす影響

この図から、32℃、35℃、37℃の培養温度で水溶性タンパク質含量が増えることが認められた。このことから、テンペ菌の活動力が32～37℃付近で、最大になることが推察された。

2) 培養時間が水溶性タンパク質含量に及ぼす影響

培養温度を37℃で一定にし、培養時間を0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 108, 120, 144時間の10段階に変えて、製造したテンペの水溶性タンパク質含量を測定し、その結果を図2に示した。

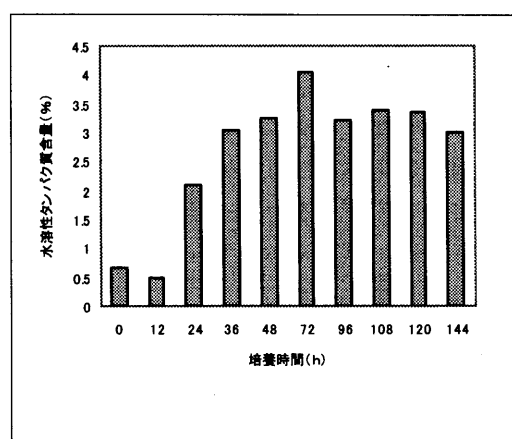


図2 培養時間がテンペの水溶性タンパク質含量に及ぼす影響

この図から、24時間の培養で水溶性タンパク質含量が増え始めることが認められた。その後72時間付近で、テンペの水溶性タンパク質含量が最大となることが認められた。

このことから、テンペ菌の活動が72時間あた

りで最も活発となることが推察された。

2. 抗酸化性測定用の検量線

テンペの抗酸化性を測定するための検量線を作成する目的で、代表的な抗酸化剤であるBHTを取り上げて、リノール酸-β-カロテン溶液に対する抗酸化性を測定した。

BHT濃度とΔAとの関係を求め、図3に示した。

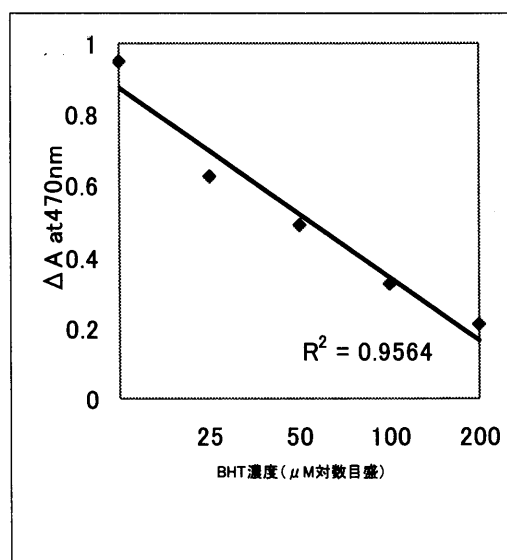


図3 BHT濃度とΔAの関係

この図から、ΔAは、BHT濃度（対数）の増加に比例してある程度直線的に低下することが認められた。この関係を利用して、テンペの抗酸化性をBHT濃度に換算して評価した。

3. テンペの抗酸化性

テンペの製造条件の違いが抗酸化性に及ぼす影響を明らかにする目的で、製造条件を変えて調製したテンペの抗酸化性を測定した。

1) 培養温度がテンペの抗酸化性に及ぼす影響

培養時間を48時間で一定にし、培養温度を15, 20, 25, 28, 32, 35, 37, 40℃の8段階に変えて、製造したテンペの抗酸化性を測定した結果を図4に示した。

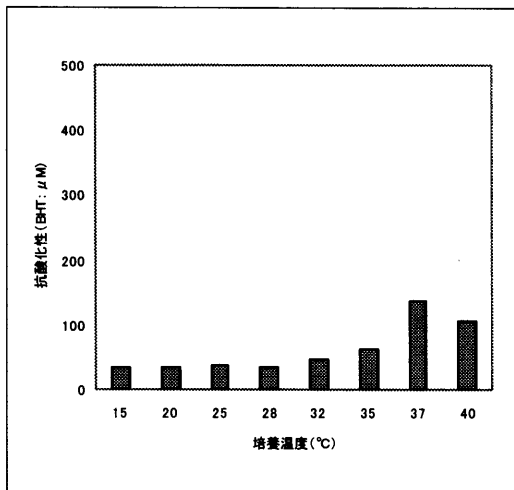


図4 培養温度がテンペの抗酸化性に及ぼす影響

この図から、テンペは37°Cの条件で培養した場合に、抗酸化性が最も強いことが認められた。37°Cで培養すると孢子が着生するため、外観がネズミ色でよくなかった。28°Cで培養した場合が、白い菌糸で覆われて外観が良好であった。

2) 培養時間がテンペの抗酸化性に及ぼす影響

培養温度を37°Cで一定にし、培養時間を0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 108, 120, 144時間の10段階に変えて、抗酸化性を測定した結果を図5に示した。

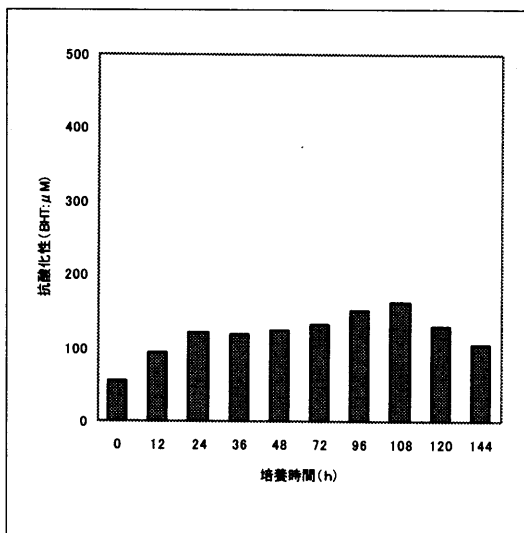


図5 培養時間がテンペの抗酸化性に及ぼす影響

この図から、テンペの抗酸化性は、24時間の培養で、一度一定となり、その後72時間を経過したあたりから再び増大して108時間でピークに達することが認められた。なお、36時間以上培養しないと、テンペ菌の菌糸は十分に着生せずテンペとは言えない状態であった。従って、時間的に見れ

ば、108時間が最も高い抗酸化性を示したが、テンペ菌の孢子が着生し、外観が悪くなり、テンペとしての品質が低いことが認められたので、48時間培養がテンペとしては良好な状態であった。

3) 炭素源の添加がテンペの抗酸化性に及ぼす影響

煮熟大豆50gに対し、シュクロースを、0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15%の9段階に濃度を変えて添加し、37°Cで48時間培養して抗酸化性を測定した結果を、図6に示した。

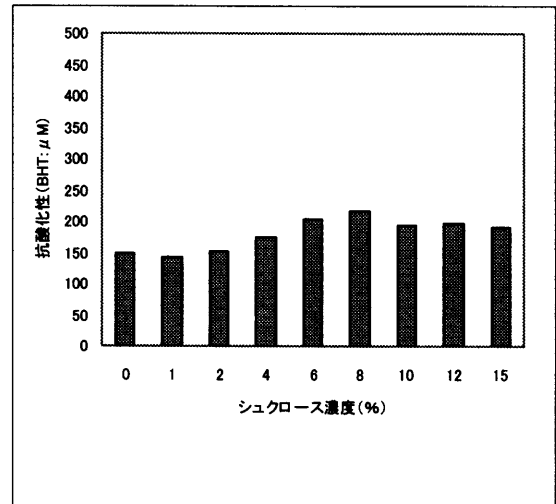


図6 シュクロースの添加がテンペの抗酸化性に及ぼす影響

この図から、テンペの抗酸化性は、添加するシュクロースの濃度が高くなるにしたがって強くなり、8%の添加濃度でほぼ最大になることが認められた。シュクロース添加により抗酸化性が強くなるのは、添加したシュクロースがテンペ菌の炭素源となり良く発育するためではないかと考えられた。一方、添加するシュクロース濃度が12%を超えると、水分活性が低くなり、テンペ菌の発育が低下することが推察された。

4. テンペ中の抗酸化性ペプチドの分離

培養温度を37°Cで一定にし、培養時間を24, 48, 108時間、と3段階に変えて調製したテンペについて抗酸化性ペプチド分離用の抽出液を調製し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。その結果を図7, 図8, 図9に示した。これらのテンペは、抗酸化性の測定結果から代表的なものを選抜したもので、試験の結果、比較的強い抗酸化性が認められた品である。

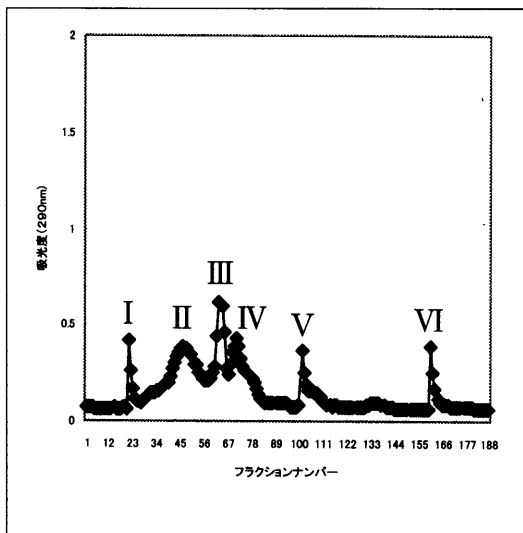


図7 テンペ (37°C・24h培養品) 抽出液の
ゲルろ過カラムクロマトグラム

この図から、37°Cで24時間培養のテンペでは、フラクションナンバーで21~24 (フラクション I), 40~54 (フラクション II), 62~65 (フラクション III), 69~73 (フラクション IV), 101~103 (フラクション V), および161~162 (フラクション VI) 付近の6つのピークが認められた。

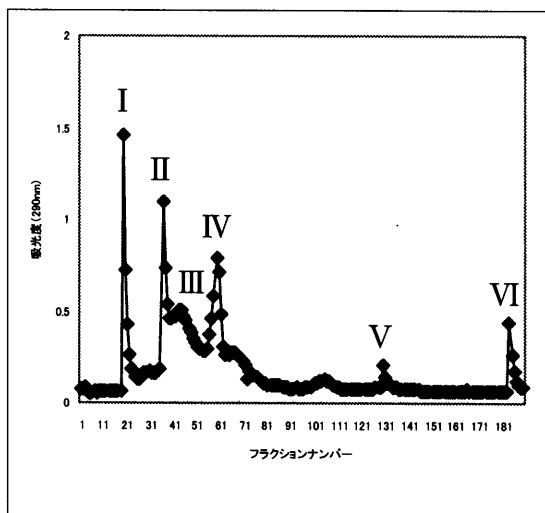


図8 テンペ (37°C・48h培養品) 抽出液の
ゲルろ過カラムクロマトグラム

この図から、37°Cで48時間培養のテンペでは、フラクションナンバーで19~22 (フラクション I), 36~38 (フラクション II), 42~44 (フラクション III), 57~61 (フラクション IV), 130~132 (フラクション V), および184~186 (フラクション VI) 付近の6つのピークが認められた。

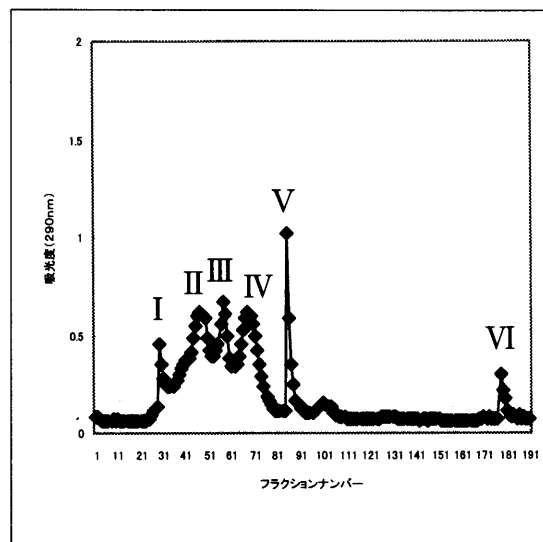


図9 テンペ (37°C・108h培養品) 抽出液の
ゲルろ過カラムクロマトグラム

この図から、37°Cで108時間培養のテンペでは、フラクションナンバーで30~32 (フラクション I), 47~49 (フラクション II), 57~59 (フラクション III), 68~70 (フラクション IV), 86~87 (フラクション V) および179~180 (フラクション VI) 付近の6つのピークが認められた。

5. テンペから分離したペプチドの抗酸化性

テンペについて行ったゲルろ過カラムクロマトグラフィーの各ピークフラクションを集めて、濃縮し、それぞれについて抗酸化性を測定した結果を図10、図11および図12に示した。

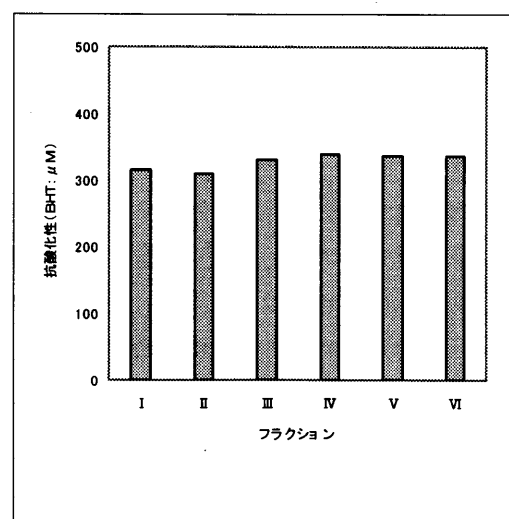


図10 テンペ (37°C・24h培養品) から
分離されたペプチドの抗酸化性

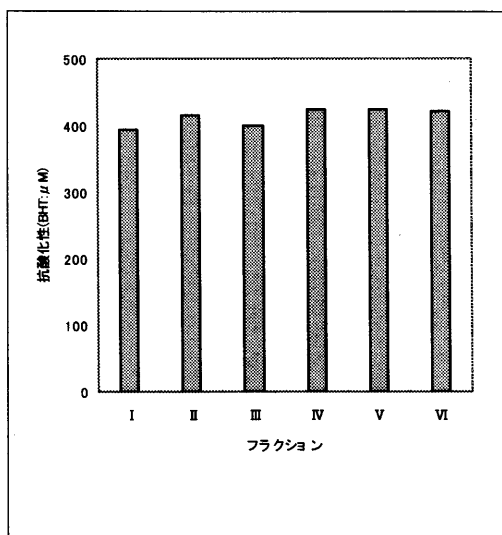


図11 テンペ (37°C・48h培養品) から分離されたペプチドの抗酸化性

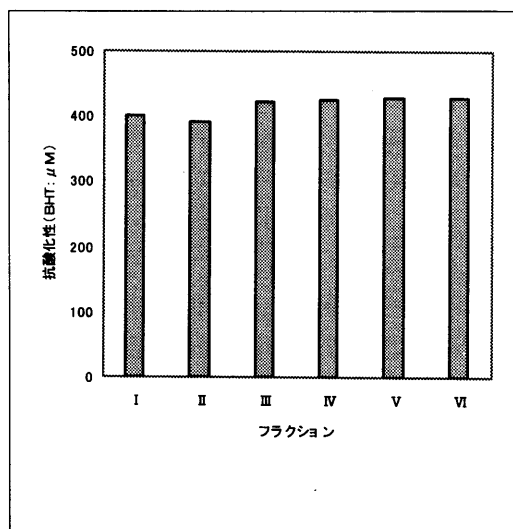


図12 テンペ (37°C・108h培養品) から分離されたペプチドの抗酸化性

全般的に見て、どの培養条件のテンペから分離された6種類のペプチドも強い抗酸化性が認められた。また、37°Cで培養した場合、培養時間が長いテンペほど、ペプチド全般に抗酸化性が強くなることが認められた。

6. 分子量マーカーのゲルろ過カラムクロマトグラフィー

現時点で入手できた分子量マーカー3点について、テンペ中の抗酸化性ペプチドの分離に使用したカラムを用いて、ゲルろ過カラムクロマ

トグラフィーを行った。その結果を図13に示した。

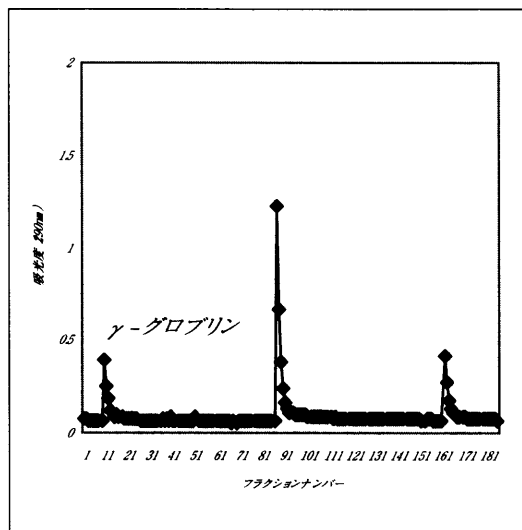


図13 分子量マーカーのゲルろ過カラムクロマトグラム

この図から、分子量が150,000のγ-グロブリンが10~18, 分子量が14,000のリゾチーム(卵白)が87~95, 分子量が5,733のインスリンが162~167の各フラクションで溶出することが認められた。

次にマーカーの分子量とピークフラクションナンバーとの関係について図14に示した。

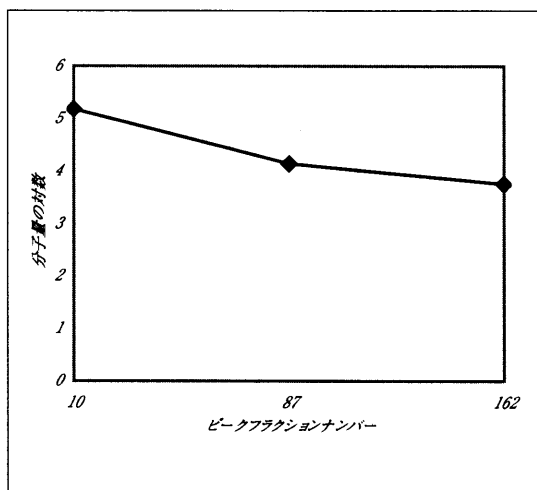


図14 マーカーの分子量とピークフラクションナンバーとの関係

極めておおまかではあるが、この関係を用いて、37°Cで培養時間を24, 48, 108時間、と3段階に変えて調製したテンペから分離されたペプチドの分

子量を推定することにした。

その結果、37℃・24時間培養のテンペにおいては、フラクションⅠの分子量は約142,000、フラクションⅡは約22,400、フラクションⅢは約12,500、

フラクションⅣは約10,000、フラクションⅤは約9,000、フラクションⅥは約7,000であることが推定された。また、37℃・48時間培養のテンペにおいては、フラクションⅠの分子量は約282,000、フラクションⅡは約56,000、フラクションⅢは約12,000、フラクションⅣは約8,500、フラクションⅤは約8,000、フラクションⅥは約6,000であることが推定された。また、37℃・108時間培養のテンペにおいては、フラクションⅠの分子量は約224,000、フラクションⅡは約13,500、フラクションⅢは約12,000、フラクションⅣは約10,000、フラクションⅤは約9,000、フラクションⅥは約7,000であることが推定された。

これらの結果から、テンペ中のペプチドの分子量が大きくなるにつれて、わずかに抗酸化性が強くなり、また、培養時間が長くなるにつれて、強い抗酸化性をもつペプチドが増えることが分かった。

要 約

インドネシアに古くから伝わる大豆発酵食品であるテンペは、大豆の各種成分をほぼそのままの状態では保有しているうえに、テンペ菌の繁殖に伴ってビタミン類の増加や有効な機能性成分を各種類含むことなどから、最近、機能性食品素材として注目されている。ここでは、テンペが有する多様な機能性の中から、抗酸化性を取り上げて、主として、製造条件との関係を調べた。その結果、次のようなことが明らかになった。

1. タンパク質分解の目安となるテンペの水溶性タンパク質含量は、培養温度が32～37℃の培養温度で増加することが認められた。また、培養開始24時間後から水溶性タンパク質含量が増え始め、その後72時間付近で、テンペの水溶性タンパク質含量が最大となることが認められた。
2. テンペの抗酸化性は48時間の培養時間では、培養温度が37℃のとき、最も強いことが認められた。培養温度が37℃の場合、テンペの抗酸化性は、24～48時間で、一度一定となり、その後72時間を経過したあたりから再び増大して、108

時間で最大になることが認められた。

3. テンペの抗酸化性をさらに増大させる一つの試みとしてシュクロースを炭素源として添加したところ、添加するシュクロースの濃度が高くなるにしたがってテンペの抗酸化性が強くなり、8%の添加濃度でほぼ最大になることが認められた。
4. テンペ中の抗酸化性ペプチドは、除タンパクした水抽出液からエタノール抽出して得た試料抽出液をSephadex LH-20カラムでクロマトグラフィーを行うことによって分離できることがわかった。
5. 特徴的な抗酸化性を示した3種類のテンペについてペプチドを分離し、その抗酸化性を測定した結果、各テンペから、それぞれ6種類のペプチドが分離され、それぞれ強い抗酸化性を示した。各ペプチドの抗酸化性は、分子量の減少に伴って、わずかに抗酸化性が強くなり、また、培養時間が長くなるにつれて、全体的にそれぞれの抗酸化性が増大する傾向があった。
6. 抗酸化性が認められた各ピークフラクションの推定分子量はおよそ7,000から280,000の範囲に分布していることが認められた。

参考文献

- 1) 村田希久：大豆月報，第125号，p.9 (1985)。
- 2) 岡田憲幸：醸協，85，p.358，(1990)。
- 3) 須見洋行・岡本猛：日本家政学会誌，45，337～342 (2003)。
- 4) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編：食品分析法，光琳，p.66，(1984)。
- 5) 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編：食品分析法，光琳，p.136，(1984)。
- 6) 工藤康文・松田茂樹：日本食品科学工学会誌，47，727 (2000)。
- 7) MILLER, H., E. : J. Am. OilChem, SOC., 48, 91 (1971)。
- 8) 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木証吉：日本食品科学工学会誌，41，611 (1994)。
- 9) 松田茂樹・湯之上雅子：醬研，23，263 (1997)。
- 10) 工藤康文・松田茂樹・井越敬司・沖智之，日本食品科学工学会誌，48，44，(2001)。
- 11) 工藤康文・松田茂樹：日本食品科学工学会誌，47，619，(2000)。