



# 無塩発酵大豆テンペの機能性研究

—*Rhizopus sp.* を混合して調整したテンペのイソフラボン生成—

太田 美穂\* 新宅 賀洋\*\* 合田 麗奈\*

イソフラボンの供給源としてのテンペ (Tempe) の有用性を検討するために、脱皮大豆の加熱条件を標準化し、テンペ菌種の割合を変えた新たなテンペを調製した。大豆の加熱条件を一定に保つ方法を検討した結果、スチームコンベクションオープンでの加熱時間 40 分がテンペづくりに適したので、標準方法として用いた。次にテンペづくりの主要菌である *Rhizopus oligosporus* (*R. olig.*) とインドネシア産 RAGI テンペに含まれる *Rhizopus oryzae* (*R. oryz.*) を組み合わせたブレンドタイプテンペを調整し、単一菌種テンペならびに RAGI テンペとイソフラボン生成パターンを比較した。24 時間発酵後、APCI-LCMS 法により 6 種類のテンペを分析したところ、*R. olig./R. oryz.* (1/1) で調整したテンペにおいて、マロニル化配糖体イソフラボン (Mal-Dzin, Mal-Gtin) ならびにアグリコン型イソフラボン (Dzein, Gtein) が最も多く産生される結果となった。今回の実験から、テンペ菌のブレンドがイソフラボンの多いテンペづくりに有効で、より機能性の高いテンペを提供できる事が示唆された。

キーワード：テンペ (Tempe), *Rhizopus oligosporus*, 大豆発酵食品, 無塩発酵, イソフラボン, スチームコンベクションオープン, APCI-LC/MS

## 1. はじめに

テンペ (Tempe) は大豆の発酵食品の一種で無塩発酵を特徴としているが、無塩発酵大豆食品には他に日本の納豆とネパールのキネマがある。インドネシアの伝統食品であるテンペは数百年の歴史を有し、日常食として良質の植物性たんぱく質源として摂取されてきた<sup>1-3)</sup>。その後、ヘルシーフードとして世界的に注目されるに伴い、日本でも製造・販売、消費されるようになり、2000 年からは日本標準成分表 (五訂)<sup>4)</sup>にも掲載されている。大豆に含まれるイソフラボン (図 1) は、イソフラボノイドの一種で、更年期症状の緩和作

用などエストロゲン様作用を示す事が古くから知られている<sup>5)</sup>。1990 年にスタートした「デザイナーズフーズプログラム」(米国がん研究所 (NCI)) で、がんをはじめとする疾病のフィトケミカルによる予防効果に大豆が最も重要性の高い食品として位置づけられた事がきっかけとなり、大豆イソフラボンの研究が進み、イソフラボンの種類によって生理効果に著しい差がある事が明らかになってきた<sup>6)</sup>。

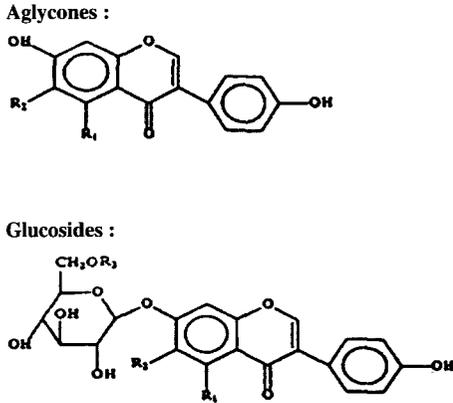
イソフラボンの体内動態の研究から、ゲニステインがダイゼインより摂取量が多く、エストロゲン様活性や他の生理活性も高いと考えられている。さらに腸内細菌の一部がダイゼインの代謝産物であるエクオールを産生し、さらにゲニステイ

\*相愛大学人間発達学部発達栄養学科

\*\*甲子園短期大学生生活環境学科

(略語)

*Rhizopus oligosporus* : *R. olig.* *Rhizopus oryzae* : *R. oryz.*    ダイズイン : Dzin    ゲニステイン : Gtin  
ダイゼイン : Dzein    ゲニステイン : Gtein    マロニルダイズイン : Mal-Dzin    マロニルゲニステイン : Mal-Gtin  
アセチルダイズイン : Ac-Dzin    アセチルゲニステイン : Ac-Gtin



Compounds	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Daidzein	H	H
Genistein	OH	H
Glycitein	H	OCH <sub>3</sub>

Compounds	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Daidzin	H	H	H
Genistin	OH	H	H
Glycitin	H	OCH <sub>3</sub>	H
Acetyldaidzin	H	H	COCH <sub>3</sub>
Acetygenistin	OH	H	COCH <sub>3</sub>
Acetylglycitin	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>
Malonydaidzin	H	H	COCH <sub>2</sub> COOH
Malonygenistin	OH	H	COCH <sub>2</sub> COOH
Malonyglycitin	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> COOH

図1 大豆イソフラボンの種類と化学構造  
F. Yang et al./J. Chromatogr. A 928 (2001) 163-170.

ンより強いエストロゲン様活性を有する事が示唆されている<sup>7,8)</sup>が、その代謝の個人差が大きい事から、実際の食事としては機能性の高いゲニステインのみを摂取するよりもイソフラボンを豊富に含む食品をとることが望ましいのではないかとわれている。適正な摂取量については種々の議論があり、サプリメントなどに依存した摂取の弊害<sup>8)</sup>も指摘されている。長期間または大量にカプセルや錠剤の形で摂取することは避けるべきで、食品からの摂取が望ましいと考えられている。著者は、これまでに抗菌性の確認された *Rhizopus* 属テンペ菌を用いてテンペを調製し、その栄養成分、機能性成分（イソフラボン、GABA など）の分析<sup>9-12)</sup>と同時に調理性や嗜好性<sup>13, 14)</sup>を検討し、テンペが日本人にとっても健康の維持増進や生活習慣病予防に役立つ可能性の高い食材であることを報告してきた。今回、テンペ菌種の割合を変える事によってイソフラボン量の多いテンペが出来たので、その内容について報告する。

## 2. 実験方法

### (1) テンペづくりの条件

材料：原料大豆は北海道産音更大豆（脱皮）を用いた。テンペ菌は次の3種類を用いた。インドネシア産ラギ（RAGI）テンペ菌（インドネシア

科学院応用化学研究開発センター；RDC for Applied Chemistry, LIPI 製）を（有）ホットプランニングから、テンペの主要菌 *Rhizopus oligosporus* と *Rhizopus oryzae* は秋田田野商店から購入した。テンペ菌の混合割合：R. oligo./R. oryz. を 1/1, 1/2, 2/1 に混合したもの計3種類を調整した。大豆の加熱条件ならびにテンペの調整：脱皮大豆は浸漬後、スチームコンベクションオーブンをを用いて40分加熱した。スチームコンベクションオーブンは（株）フジマックコンビオーブン FSCC 6（100℃ スターミングモード）を使用した。その手順を表1に示した。他の条件は既報<sup>9)</sup>のとおりである。

### (2) テンペイソフラボンの分析

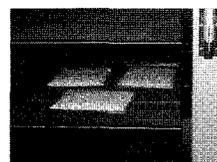
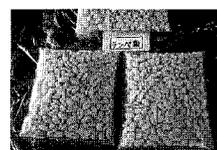
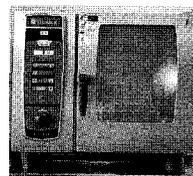
産生する大豆テンペイソフラボンの分離と同定は APCI-LC/MS 法により実施した。

試薬：イソフラボン誘導体（daidzin, daidzein, genistin, genistein）は sigma 社製、HPLC に用いた溶媒は HPLC grade、その他の試薬、溶媒は特級を用いた。

分析試料の調整：テンペ凍結乾燥粉末（0.3 g）に 70% EtOH/H<sub>2</sub>O 溶液 5 ml を加え攪拌後、4℃、24 時間静置した。この液を遠心分離後、上澄を 0.45 μm メンブランフィルターでろ過した。イソフラボンの抽出は Kudou らの方法<sup>15)</sup>に準じた。

表1 スチームコンベクションオープンを用いたテンペの調整方法

- ①洗浄：脱皮大豆 1 kg を十分に流水で洗浄後、ザルで水を切る。  
↓  
②浸漬：5%の食酢（穀物酢）を加えた熱水（4 L）に①を加え2時間保温する。  
↓  
③加熱：②をスチームコンベクションオープンで40分蒸す。  
↓  
④風乾：③をザルに取り出して広げ、表面の水分を除去する。  
↓  
⑤テンペ菌：④にテンペ菌をまぶしてよくかき混ぜる。  
※分子ふるいにかけたものを使用  
（目開き：150 μm）  
↓  
⑥袋詰：小穴（1.0～1.5 cm 間隔）をあけたポリ袋（A7サイズ、シール付き）に⑤をしっかりと板状に詰める。  
（90～100 g/袋）  
↓  
⑦発酵：30℃で24時間発酵させる。  
↓  
⑧保存：-80℃で保存する。



**LC 条件**：HPLC 装置は Shimazu (LC-20 AD) を用い、セミマイクロ LC カラム：Develosil RPAQUEOUS (2×150 mm)，LC 移動相の溶媒：10-40% CH<sub>3</sub>CN/0.1% CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O (gradient system/60 min)，流速：0.2 ml/min，カラム温度：40℃，UV 検出：A 260 nm で実施した。

**APCI-LC/MS (Atmospheric Pressure Chemical Ionization：大気圧イオン化) 法**：イオントラップ型 LCQ 装置 (Finnigan LCQ ADVANTAGEMAX) に APCI probe を装着し，正イオンモードで各試料のマスペクトルを測定し，出現する分子イオンピークや特徴的なフラグメントイオンピークを観察した。その他の測定条件は既報<sup>9)</sup>のとおりである。

### 3. 結果と考察

**標準品イソフラボン誘導体の質量分析**：APCI-LC/MS 法で分析した結果を表2にまとめた。いずれの場合にも分子ピーク [MH<sup>+</sup>] が観察された。さらに Dzin と Gtin では [MH<sup>+</sup>-162] のピ

ークが検出された。このフラグメントイオンはイソフラボン配糖体の糖部分が離脱したアグリコンの分子イオンに一致する。マロニルイソフラボンでは Dzin 系列，Gtin 系列とも分子ピーク [MH<sup>+</sup>] の他，[MH<sup>+</sup>-44] と各々のアグリコンに相当するフラグメントイオンが観察された。アセチルイソフラボンでは Dzin 系列，Gtin 系列とも分子ピーク [MH<sup>+</sup>] と，アグリコンに相当するフラグメントイオンが観察された。APCI 法はソフトなイオン化であり，いずれのイソフラボンにおいても分子イオンと共通性の高いフラグメントを観察する事ができ，今回用いた APCI-LC/MS 法は発酵過程での生成する様々なイソフラボンの生成過程をモニターするのに大変有効であった。また，イソフラボンは多くの水酸基を有するが，今回の条件では水酸基が離脱したフラグメントイオン [MH<sup>+</sup>-18] は検出されなかった。

**ブレンドタイプテンペ (R. oligo./R. oryz. = 1/1) のイソフラボンの測定**：図2は発酵24時間後に生成するイソフラボンのマスキロマトグラムとそ

表2 APCI-LCMS 法によるイソフラボン（標準品）の検出

イソフラボン	分子量	分子ピーク	APCI-LC/MS		
	Mw	MH <sup>+</sup>	検出イオンピーク(m/z)		
Daidzin (Dzin)	416	417	417	255	-
Malonyl-Dzin	502	503	459	255	503
Acetyl-Dzin	458	459	459	255	-
Daidzein (Dzein)	254	255	255	-	-
Genistin (Gtin)	432	433	433	271	-
Malonyl-Gtin	518	519	475	271	519
Acetyl-Gtin	474	475	475	271	-
Genistein(Gtein)	270	271	271	-	-

のマススペクトルを示している。その特徴より①は Dzein, ②は Mal-Dzin, ③は Gtein, ④は Mal-Gtin と同定された。いずれも 24 時間発酵後は配糖体のピークがほとんど検出されず、マロニル化配糖体とアグリコンが増加していた。これらの検

出結果はこれまでの報告<sup>9)</sup>と一致する。一方グリシチン系列の生成物は微量で検出感度以下であった。

6 種類の調整テンペのイソフラボン生成パターンの比較：一般にテンペの製造に用いられる発酵時間は 20~24 時間であることから、24 時間発酵後のイソフラボンの生成パターンを 6 種類のテンペについて比較した。図 3 は単一菌種ならびに RAGI テンペについて比較したものである。RAGI と *R. oryz.* は 24 時間までに配糖体である Dzin と Gtin が急速に減少し、それに対応してアグリコン型イソフラボンが増加している。*R. olig.* の場合は 24 時間後も一定量の配糖体 Dzin, Gtin が検出され、テンペ中の配糖体を加水分解しアグリコンに変換する  $\beta$ -グルコシダーゼ活性が他の 2 種のテンペより低い事を示している。一方、マロニル化配糖体は Dzin 系列より Gtin 系列でより多く産生された。より詳細な分析が必要である

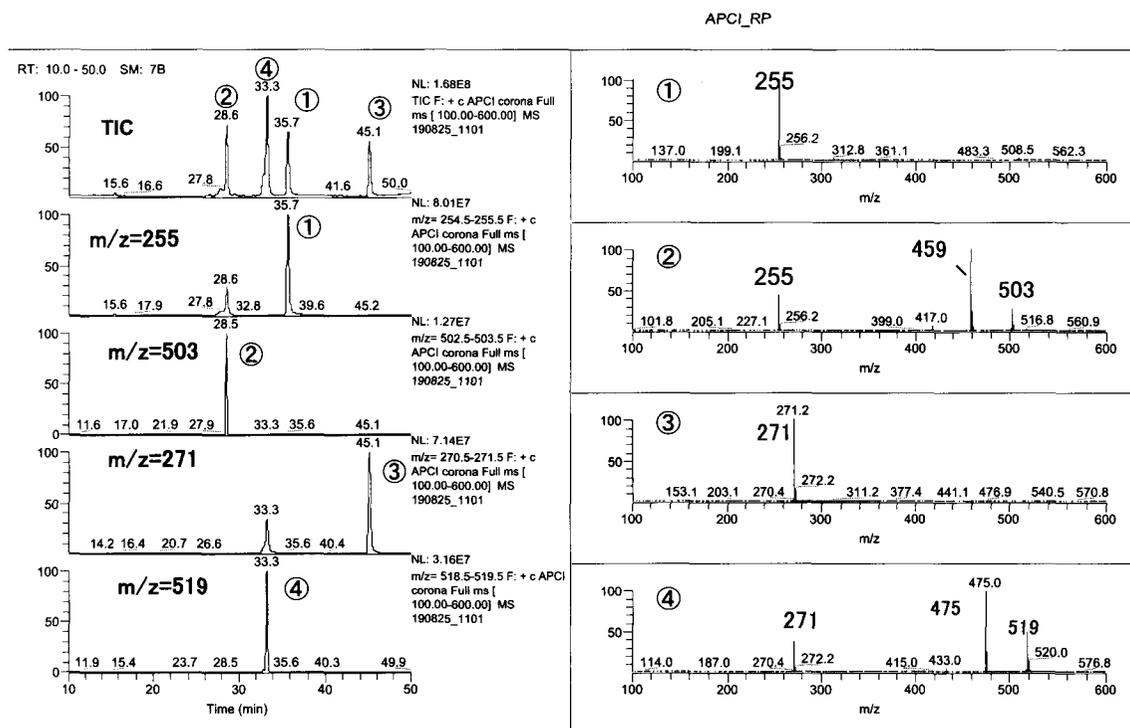


図2 ブレンドタイプテンペのイソフラボンの同定  
①Dzein, ②Mal-Dzin, ③Gtein, ④Mal-Gtin

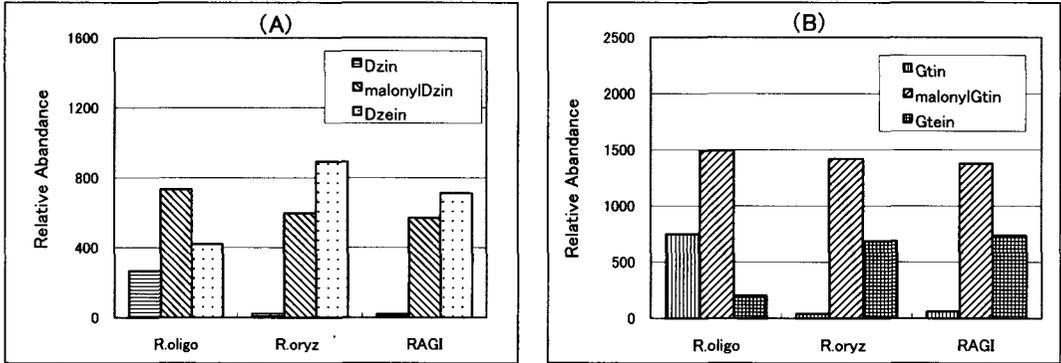


図3 単一菌種と RAGI テンペのイソフラボン生成パターンの比較  
(A) ダイズイン系列 (B) ゲニステイン系列  
グラフ内 菌種 (左より) R. olig., R. oryz, RAGI

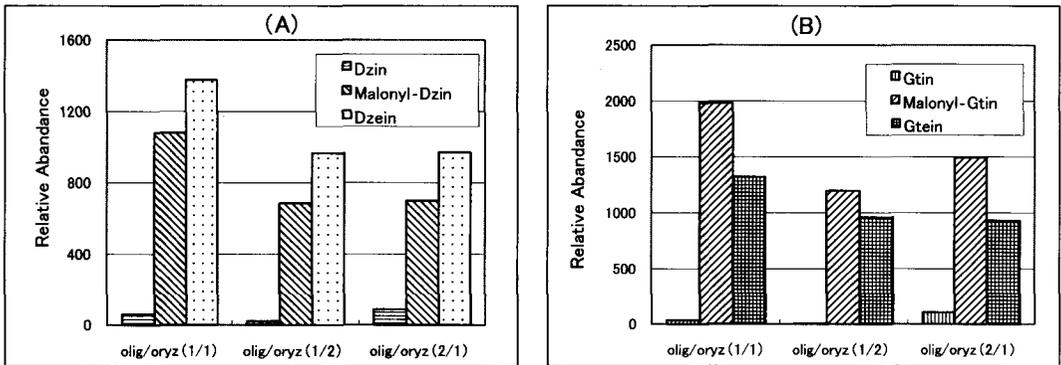


図4 ブレンドテンペのイソフラボン生成パターンの比較  
(A) ダイズイン系列 (B) ゲニステイン系列

が、Dzin 系列はアグリコンに変換されやすいが、Gtin 系列ではマロニル化配糖体の蓄積が多く、Gtein の産生が若干抑えられる傾向がみられた。

図4はブレンド型テンペ3種類を比較した結果である。ブレンドタイプのテンペでは混合割合が R. olig./R. oryz. = 1/1 の場合にイソフラボン生成量が最も高く、またアグリコン型への変換も多い結果となった。今回の実験から、テンペ菌のブレンドがイソフラボンの多いテンペづくりに有効である事が明らかになった。

前報<sup>11)</sup>で述べたように、RAGI や R. oryz. を用いて調整したテンペは、24 時間発酵後に葉酸や GABA 量が著しく増加する。葉酸は 20~30 歳代の女性に不足しがちなビタミンの一種であるが、

妊娠後には胎児の神経管閉鎖障害の原因となる事から妊娠 1 ヶ月から 3 ヶ月の間の食事には食事の摂取に加えて栄養補助食品などで不足分(1 日 400  $\mu\text{g}$  程度)を補うように国が推奨している。一方、GABA は血圧上昇抑制効果や精神安定作用などを示す生理活性物質である。今回調製したブレンドテンペが RAGI を上回るイソフラボンを生成したことは興味深い。テンペ菌種ブレンドは代謝系に対して相補的、相乗的に作用する可能性が考えられるので、今後、食事に不足しがちな葉酸や生理活性物質である GABA についてもブレンドタイプテンペで生成が増加するかどうかを検討し、食材としてのテンペの有用性を評価する研究を進めたい。さらに大学における実験教育の役割として、科学的根拠がどのようにして得られるの

かを理解させるために、構築した分析システムを活用してイソフラボンをはじめとする機能性成分の分析や教材作りを行い、教育内容の充実を図りたい。

本稿は、大学教育高度化推進特別経費「教育・学習方法の改善」採択課題（平成 18-20 年度）による研究成果の一部である。

#### 参考文献

- 1) 相田浩, 上田誠之助, 村田希久, 渡辺忠雄編 1986 『アジアの無塩発酵大豆食品』, Step 社.
- 2) 東和男編著 2004 発酵と醸造Ⅲ, 光琳 121-127.
- 3) 岡田憲幸: 食糧-化学とその技術- 1988 日本醸造協会雑誌, 27 65-93.
- 4) 科学技術庁資源調査会編 2000 『五訂日本食品標準成分表』, 64-65.
- 5) E. W. Cheng et al 1954 *Science* (Washington, D. C.) 120 575.
- 6) H. Adlereretz, T. et al 1994 *Cancer Detect. Prev.* 18 259-271.
- 7) 家森幸男ら編 2001 『大豆イソフラボン』, 幸書房.
- 8) 石見佳子 2005 *臨床栄養*, 106 593-599.
- 9) 太田美穂, 新宅賀洋 2005 甲子園短期大学紀要, 24 1-7.
- 10) 太田美穂, 新宅賀洋, 野崎信行 2004 *日本調理科学会誌*, 37 115.
- 11) 太田美穂, 新宅賀洋 2007 *相愛大学研究論集*, 23 97-110.
- 12) H. Nishise, N. Matsui & M. Ohta 2007 *Bulletin of Koshien University* 35 35-38.
- 13) 新宅賀洋, 太田美穂 2005 甲子園短期大学紀要, 24 63-66.
- 14) 新宅賀洋, 太田美穂 2006 甲子園短期大学紀要, 25 57-62.
- 15) S. Kudou et al. 1991 Maronyl isoflavone glucosides in soybeanseeds *Agric. Biol. Chem.* 55 2227-2233.