
報 文

テンペについての食品栄養学的研究 —テンペの呈味成分に関する研究—

栄養科学研究所
根 岸 由紀子

Nutritional and Chemical Studies on Tempe

Yukiko NEGISHI
(*Institute of Nutrition Sciences*)

Studies on nutritional components of tempe

Tempe is a traditional fermented food in Java Island, Indonesia. The most popular tempe is made from soybean, however, the other beans may also be used for economic reason. Using 6 kinds of beans, namely, velvet bean, pigeon pea, winged bean, lima bean, cowpea and soybean, tempes were made up on inoculation of two starters, a pure culture of *Rhizopus oligosporus* (*R. oligosporus*) and a traditional inoculum, Usar. In nutritional aspect, proximate compositions, dietary fiber contents and mineral compositions were determined. The results are summarized as follows.

- (1) The contents of protein were 32~52%. So, tempe is thought to be a protein rich food. Tempes were classified into two groups, that is, one group which contains high protein and fat, such as winged bean and soybean tempes, and the other which contains high protein and carbohydrates but low fat, such as velvet bean, pigeon pea, lima bean and cowpea tempes.
- (2) Total dietary fiber contents were as much as 18~34%.
- (3) The contents of phosphorus and potassium were high and zinc contents were 4.7~12.2 mg/100g of dry matter, so tempe seemed to be a good source of minerals. In particular, velvet bean tempe contained much of iron.

Studies on flavor components of tempe

Free amino acids, free sugars and organic acids were determined, and then low-molecular weight peptides compositions were examined.

- (1) The contents of alanine and glutamic acid were high.
- (2) The contents of fructose, glucose and stachyose were high.
- (3) Several organic acids were detected. They were probably produced in the process of fermentation and it is noted that malic acid and succinic acid were abundant.

Present results suggest that these taste components may play an important role in mildness of taste.

- (4) Since peptides also participate as taste components, the low-molecular weight peptides were extracted from soybean tempe and their constituents were studied. Peptide

rich fractions were prepared by fractionation of the extract using ion-exchange and gel-filtration column chromatography. Glutamic acid, aspartic acid, glycine and phenylalanine were largely liberated by acid hydrolysis.

Some of these fractions were further fractionated and purified by HPLC to obtain low-molecular weight peptides. Some unknown compounds were obtained and their amino acid compositions and N-terminal amino acids were determined. Two of these peptides were identified to be glutamyltyrosine and glutamylphenylalanine.

Finally, it is concluded that tempe is an excellent food in a nutritional aspect and has a good prospect as economic sources of protein and mineral in Indonesia.

Though tempe itself is not agreeable to eat for Japanese, extracted materials will be available for food processing.

目 次

緒 論

第1章 各種テンペの成分組成の比較とその栄養価

第1項 実験方法

1. 試料および調製法

2. 分析方法

(1) 一般成分

(2) 食物繊維

(3) 無機質

第2項 結 果

第3項 考 察

第4項 要 約

第2章 各種テンペの呈味成分組成の比較

第1項 実験方法

1. 試 料

2. 分析方法

(1) 遊離アミノ酸

(2) 遊離糖

(3) 有機酸

第2項 結 果

(1) 遊離アミノ酸組成

(2) 遊離糖組成

(3) 有機酸組成

第3項 考 察

(1) 遊離アミノ酸

(2) 遊離糖

(3) 有機酸

第4項 要 約

(1) 遊離アミノ酸組成

(2) 遊離糖組成

(3) 有機酸組成

第3章 テンペの低分子ペプチドに関する研究

第1節 テンペの低分子ペプチド画分の調製および成分組成

第1項 実験方法

1. 試料および調製法

2. Peptide-rich 画分の調製

(1) 抽出および分画方法

(2) イオン交換体による分画

(3) ゲル濾過

3. 分析方法

(1) 全窒素

(2) ニンヒドリン反応および-hypochlorite 反応

(3) アミノ酸分析

第2項 結果および考察

第3項 要 約

第2節 テンペの Peptide-rich 画分のイオン交換クロマトグラフィーによる精製

第1項 実験方法

(1) 試 料

(2) Dowex 50W×2 によるカラムクロマトグラフィー

(3) ペーパークロマトグラフィー

第2項 結果および考察

第3項 要 約

第3節 画分VI-3およびVI-4に含まれるジペプチドのHPLCによる精製

第1項 実験方法

(1) 試 料

(2) HPLC による分析方法

(3) HPLC による分取方法

(4) 構成アミノ酸の分析

(5) N末端アミノ酸の決定

第2項 結果および考察

第3項 要 約

総 括

謝 辞

参考文献

緒 論

豆類は五穀の一つとして、米、麦、粟、黍などの穀類とともに、古くから利用されてきた。

豆類は言うまでもなく重要なタンパク質源であり、大豆においては脂質含有量が多いことから、油脂資源としても利用されている。さらには高度加工食品である、東アジアで特有な納豆類、味噌、醤油などの発酵食品¹⁻³⁾の原料としても広く利用されている。

インドネシア共和国には豆類の発酵食品の一つとしてテンペといわれる、糸状菌を使った伝統的発酵食品があり、重要なタンパク質源として日常的に食されている。

テンペは日本の納豆、タイのトゥアナオ、ネパールのキネマ等と共に、照葉樹林食文化の一構成要因である納豆トライアングルを形成しているといわれている⁴⁾。

テンペは本来大豆を原料として製造されるが、インドネシア共和国では大豆の自給率が低いことから大豆以外の豆類の中で自給可能なベルベットビーンやリマビーン、さらに豆腐粕、ピーナッツ搾油粕、ココナツ搾油粕なども利用し⁵⁾製造されている。

多様な優れた特性を持つテンペについては大豆を用いたテンペ製品についてその栄養価や製造方法、また発酵に関与する微生物についての研究が多く見られる。しかしながら、大豆以外の豆類を利用した研究⁵⁻⁸⁾は少ない。

一方、一般に発酵食品を含め食品の旨味や呈味成分の研究は、アミノ酸、糖、有機酸、ペプチドおよびヌクレオチドなどを中心として研究されている。豆類発酵食品の一つである納豆類についての呈味成分の研究は必ずしも多くはない⁹⁻¹¹⁾。特にテンペについての研究^{5, 7, 12, 13)}は少ない。

このことから、本研究では、まず、インドネシア共和国ガジャマダ大学食品科学研究室より、インドネシア共和国で自給可能な豆類を用い、テンペを製造する際の標準菌である *Rhizopus oligosporus* と、インドネシア共和国で実際種菌として使用しているハイビスカス乾燥葉 (Usar^{7, 14)}) の2種を用いて試作されたテンペを入手し、一般成分・無機質および食物繊維の分析を行った。

次に、これらテンペについて、主な呈味成分と考えられる遊離アミノ酸・遊離糖および有機酸の組成の分析を行った。

さらに、呈味成分として、ペプチドの存在も推察されるので、低分子ペプチド画分の抽出・分離・精製を行い、そのアミノ酸組成の検討および同定を試みた。

第1章 各種テンペの成分組成の比較とその栄養価

インドネシア共和国で自給可能な5種類の豆および大豆を原料に、2種類の種菌を用いて調製したテンペ12種類を、インドネシア共和国ガジャマダ大学食品製造科学研究室より提供を受け、さらに日本で市販のテンペを入手した。また、これらの原料豆も参考のため入手した。ともに栄養学的性状を知ることが目的として、一般成分・食物繊維および無機質を分析して、その組成を明らかにした。

第1項 実験方法

1. 試料および調製法

テンペの原料とした豆類は、ベルベットビーン Velvet bean (*Mucuna pruriens*)、ピジョンピー Pigeon pea (*Cajanus cajan*)、ウィングドビーン Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*)、リマビーン Lima bean (*Phaseolus lunatus*)、カウピー Cowpea (*Vigna unguiculata*) および大豆 Soybean (*Glycine max*) の6種類である。これらの豆類は米国産大豆を除き他はすべてインドネシア共和国産であり、Table 1に示したとおり、製造の前処理は、これら豆類を24時間水に浸漬し、25~60分間煮沸、剥皮後、再度、水浸漬と25分間蒸煮を繰り返して行ったものである。

上記処理した豆類を各々二分し、一方には *Rhizopus oligosporus* (以下 *R. oligosporus* と略す) NRRL 2710 株を種菌として接種し、他方には、インドネシア共和国で市販されている Usar を種菌とし接種した。種菌を接種した豆類はプラスチックフィルムに包み室温 (25~30℃) で48時間発酵させテンペ製品とした。1回に200gずつ2回試作しこれらを合わせた。これら合計12種類のテンペ製品の凍結乾燥試料を入手し、粉末とし

Table 1. The Optimum Conditions for Producing Tempes from Several Beans

Phases	Velvet Bean	Pigeon Pea	Winged Bean	Lima Bean	Cowpea	Soybean (Indonesia)	Soybean (Japan)
1st soaking	24 hr. b:w (1:4) (w/v)	No	24 hr. b:w (1:4) (w/v)	24 hr. b:w (1:4) (w/v)	No	24 hr. b:w (1:4) (w/v)	No
Boiling	30 min. b:w (1:4) (w/v)	25 min. b:w (1:3) (w/v)	60 min. b:w (1:4) (w/v)	30 min. b:w (1:4) (w/v)	25 min. b:w (1:3) (w/v)	25 min. b:w (1:3) (w/v)	No
Dehulling	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2nd soaking	24 hr. b:w (1:4) (w/v)	18 hr. b:w (1:4) (w/v)	No	24 hr. b:w (1:4) (w/v)	18 hr. b:w (1:4) (w/v)	18 hr. b:w (1:4) (w/v)	12 hr.
3rd soaking	24 hr. b:w (1:4) (w/v)	No	No	24 hr. b:w (1:4) (w/v)	No	No	No
Steaming	25 min	25 min	25 min	25 min	25 min	25 min	30 min
Fermentation	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

b:w ; bean : water
w/v ; weight/volume

て分析に供した。なお大豆テンペについては、日本で市販されているテンペ（マルサンアイ社製、23時間発酵、中国産大豆使用）も、試料とした。

分析に用いた原料豆類は、大豆を除きインドネシア共和国で収集したものを入手し、大豆については市販の日本産大豆である。これらの豆類は剥皮せず、そのまま粉末とし、分析に供した。

2. 分析方法

(1) 一般成分

- ① 水分：常法通常圧 110℃ 恒量乾燥法を用いた。
- ② タンパク質：常法通常ケルダール分解法により定量した全窒素量に、窒素－タンパク質換算係数^{15, 16)}を乗じて算出した。係数は大豆および大豆製品は 5.71, ベルベットビーンは 5.46, リマビーンは 6.25, その他はすべて 6.25 を用いた。
- ③ 脂質：大豆以外の豆類とそのテンペは、常法通常酸分解法¹⁷⁾を用い、大豆およびそのテンペは、クロロホルム・メタノール混液抽出改良法¹⁷⁾を用いた。

- ④ 粗繊維：常法通常 A. O. A. C. 法を用いた。
- ⑤ 灰分：常法通常 550℃ で残存炭素が無くなり恒量となるまで灰化する方法を用いた。

(2) 食物繊維

- ① 中性界面活性剤繊維（Neutral Detergent Fiber：以下 NDF と略す）：Van-Soest による Detergent fiber 法を用いた。
- ② 総食物繊維（Total Dietary Fiber：以下 TDF と略す）：印南ら^{18, 19)}の酵素－重量法に準じて行った。すなわち消化酵素で試料を分解した後、78% エタノール不溶性画分を分離し、その灰分量を差し引いた値から、別にケルダール法で求めた同画分のタンパク質量を差し引くことにより求めた。

(3) 無機質

- ① Ca・Mg・P・Fe・Cu・Mn および Zn：乾式灰化法を用いて試料溶液を調製した。まず、0.1N 硝酸溶液で処理した磁製ルツボに試料 1g を測り入れ、550℃ で灰化し、これに希塩酸溶液 HCl : H₂O (1 : 1) 10ml を加え温浴上で蒸発乾固した。次に、この残渣

Table 2. Comparison of Compositions in Various Tempes and Raw Materials

Sample	Moisture (g/100g fresh)	Protein	Fat (g/100g dry weight)	Carbohydrates		Ash
				Non-fibrous***	Fiber	
Velvet Bean	11.4	29.8	4.2**	60.9	1.3	3.8
Velvet Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	58.1	32.9	6.0**	58.0	1.6	1.5
Velvet Bean Tempe (Usar)	57.0	32.2	5.8**	59.0	1.3	1.7
Pigeon Pea	11.1	27.9	1.8**	64.1	1.7	4.5
Pigeon Pea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	53.0	37.5	2.5**	56.0	2.0	2.0
Pigeon Pea Tempe (Usar)	52.8	37.8	2.4**	55.9	1.8	2.1
Winged Bean	11.9	39.8	15.1**	38.2	2.9	4.0
Winged Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	62.8	44.6	18.2**	30.2	3.3	3.7
Winged Bean Tempe (Usar)	61.9	44.8	20.1**	28.6	2.8	3.7
Lima Bean	12.2	29.8	1.3**	60.0	1.8	4.1
Lima Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	62.8	35.8	3.2**	57.9	2.5	0.6
Lima Bean Tempe (Usar)	60.2	33.5	2.4**	61.0	2.2	0.9
Cowpea	10.7	33.3	1.5**	59.6	2.1	3.5
Cowpea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	52.2	43.6	3.8**	48.7	2.2	1.7
Cowpea Tempe (Usar)	53.0	44.0	3.8**	48.2	1.9	2.1
Soybean	10.8	34.0	25.4*	32.4	3.9	4.3
Soybean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	65.5	51.5	25.7*	15.9	4.1	2.8
Soybean Tempe (Usar)	64.9	50.3	26.2*	16.9	4.2	2.4
Soybean Tempe (Japan)	61.9	46.7	26.2*	21.3	2.4	3.4

R. oligosporus: *Rhizopus oligosporus*

Usar: Dried Hibiscus leaf

* Chloroform-ethanol Method

** Acid Hydrolysis Method

*** The amount of carbohydrate was estimate by subtracting the amount of protein, fat, fiber and ash from 100%.

に希塩酸溶液 HCl : H₂O (1 : 3) 5 ml と蒸留水 10 ml を加え温浴上で 3 ~ 5 分間加温後 No. 6 定量用濾紙で濾過し, 25 ml に定容した。この試料液の一部を日本電子製 ICP 発光分光分析計を用いて定量した。なお, Ca および Mg の定量には, P の干渉を避けるために試料溶液の 1 % のストロンチウム (SrCl₂) を添加してこれを防止した。

- ② Na および K : 1 % 塩酸抽出法²⁰⁾を用いて試料溶液を調製した。すなわち試料 0.5 g をポリビンに測り入れ, 1 % 塩酸 200 ml を加え 15 分間振盪後吸引濾過して試料溶液とした。この試料液の一部を東京光電 ANA-

10AL 型を用いて炎光光度法により定量した。

第 2 項 結 果

原料として用いた豆 6 種類と, これらに 2 種の種菌を用いて調製した各種テンペ 12 種類および日本で市販されているテンペ 1 種を試料として測定した成分量を Table 2 に無水物 100 g 当たりの g 数で示した。

原料豆の水分含量は, 10.7~12.2 g で, 豆の種類の間に大差は認められなかった。テンペでは, 52.2~65.5 g でカウピーを原料として *R. oligosporus* を用いて調製したテンペが少なく, 大豆を原料と

して *R. oligosporus* を用いて調製したテンペが多かった。

タンパク質含量は、原料豆では 27.9~39.8 g で、11.9 g の差がみられ、ピジョンピーが少なく、ウィングドピーが多かった。テンペでは 32.2~51.5 g と豆類の間で 19.3 g の差がみられ、ベルベットピーンテンペが少なく、大豆テンペが多かった。またタンパク質含量は原料豆で少なく、その豆を用いて調製したテンペで多い傾向がみられた。

脂質の含量は、ウィングドピーンおよび大豆が各々 15.1, 25.4 g と多く、これらの豆を原料とする各々のテンペでも 18.2~26.2 g であり、原料豆類と同様に多かった。一方、ベルベットピーン、ピジョンピー、リマピーンおよびカウピーでは原料豆で 1.3~4.2 g と少なく、各々の豆を原料として調製したテンペも 2.4~6.0 g と少なかった。また脂質含量は原料豆で少なく、その豆を用いて調製したテンペで多い傾向がみられた。

糖質は直接定量せず、試料 100 g からタンパク質・脂質・粗繊維および灰分の合計量を差し引いた値で示した。原料豆の糖質含量は、32.4~64.1 g で、大豆が最も少なく、ピジョンピーが最も多かつ

た。テンペでは 15.9~61.0 g で大差がみられ、大豆テンペが最も少なくベルベットピーン、ピジョンピー、リマピーンおよびカウピーの各テンペで多かった。リマピーンでは原料豆とそのテンペの糖質量がほぼ同じであった外、実験に用いた他の豆では、原料豆の糖質含量が多く、その豆を用いて調製したテンペで少ない傾向がみられた。

粗繊維含量は、原料豆では 1.3~3.9 g でベルベットピーンが少なく、大豆が多かった。テンペでも豆類と同様に 1.3~4.2 g でベルベットピーンテンペが最も少なく、大豆テンペが最も多かった。

食物繊維について、各試料の NDF と TDF の定量結果を Table 3 に無水物 100 g 当たりの g 数で示した。

各種原料豆の不溶性の食物繊維量を示す NDF 量は 14.5~19.5 g で、カウピーが少なく、ピジョンピーが多かった。テンペの NDF は日本の大豆テンペが 3.6 g で最も少なく、これを除くと 4.4~9.0 g で、Usar を用いて調製したウィングドピーンテンペで少なく、*R. oligosporus* を用いて調製したピジョンピーテンペが多かった。

また、原料豆では NDF が多く、その豆類を用

Table 3. Comparison of Dietary Fiber Contents in Various Tempes and Raw Materials
g/100 g dry weight

Sample	NDF	TDF
Velvet Bean	14.8	32.5
Velvet Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	8.7	31.7
Velvet Bean Tempe (Usar)	8.1	31.3
Pigeon Pea	19.5	35.8
Pigeon Pea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	9.0	26.2
Pigeon Pea Tempe (Usar)	6.6	23.8
Winged Bean	18.3	43.2
Winged Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	6.2	33.7
Winged Bean Tempe (Usar)	4.4	33.6
Lima Bean	15.3	37.0
Lima Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	8.8	28.4
Lima Bean Tempe (Usar)	7.8	28.8
Cowpea	14.5	36.0
Cowpea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	5.5	22.9
Cowpea Tempe (Usar)	6.3	17.7
Soybean	15.5	21.7
Soybean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	7.2	24.8
Soybean Tempe (Usar)	7.1	31.7
Soybean Tempe (Japan)	3.6	23.9

R. oligosporus: *Rhizopus oligosporus*
Usar: Dried *Hibiscus* leaf

NDF: Neutral Detergent Fiber
TDF: Total Dietary Fiber

Table 4. Comparison of Mineral Compositions in Various Tempes and Raw Materials

mg/100g dry weight

Sample	Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Mn	Zn
Velvet Bean	40	1138	75	114	379	14.4	2.0	2.0	3.3
Velvet Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	31	116	79	75	249	12.5	3.1	1.7	8.3
Velvet Bean Tempe (Usar)	30	142	54	59	272	12.7	1.5	1.3	8.0
Pigeon Pea	62	1403	95	126	503	5.7	2.1	1.3	4.2
Pigeon Pea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	34	323	60	69	374	5.1	1.8	0.9	6.3
Pigeon Pea Tempe (Usar)	38	255	103	72	402	4.5	1.8	1.0	7.6
Winged Bean	45	1089	377	199	500	7.9	2.5	4.2	4.3
Winged Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	49	606	36	186	569	6.3	2.2	4.2	6.3
Winged Bean Tempe (Usar)	50	640	44	187	541	6.4	2.3	4.1	6.4
Lima Bean	44	1506	45	128	371	8.6	1.0	1.8	3.2
Lima Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	23	88	41	52	241	6.8	0.7	1.1	5.6
Lima Bean Tempe (Usar)	34	78	49	43	236	6.6	0.7	1.0	6.2
Cowpea	46	1191	68	211	604	8.7	1.4	1.6	5.4
Cowpea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	66	151	61	86	487	7.0	0.9	1.2	12.2
Cowpea Tempe (Usar)	43	155	63	86	459	6.9	0.4	1.3	9.9
Soybean	49	1743	165	209	595	6.9	1.3	2.8	4.5
Soybean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	64	422	38	188	643	5.4	1.3	3.3	5.7
Soybean Tempe (Usar)	61	422	32	169	570	5.3	1.6	3.0	4.7
Soybean Tempe (Japan)	51	1204	141	155	509	4.9	1.1	2.5	3.5

R. oligosporus: *Rhizopus oligosporus*Usar: Dried *Hibiscus* leaf

いて調製した、各々のテンペでは少なかった。

NDF 値において 2 種類の種菌の違いによる差異について、一定の傾向は認められなかった。

総食物繊維量を示す TDF 量は原料豆類では 21.7~43.2g で、大豆が少なく、ウイングドビーンが多かった。テンペの TDF は 17.7~33.7g で、Usar を用いて調製したカウピーテンペが少なく、ウイングドビーンテンペが多かった。また、大豆を除き他の豆類の場合は、原料豆の TDF が多く、そのテンペ製品では少なかった。

TDF 値において 2 種類の種菌の違いによる差は大豆を除き大きな差はみられなかった。

灰分含量は、原料豆では 3.5~4.5g とカウピーが最も少なく、ピジョンピーが最も多かった。テンペでは 0.6~3.7g でリマビーンテンペが少なく、ウイングドビーンテンペが多かった。また、灰分量は原料豆で多く、その豆を用いて調製したテンペで少ない傾向がみられた。

無機質について、各試料のそれぞれの含量を Table 4 に無水物 100g 当たりの mg 数で示した。

ナトリウム含量は、原料豆では 40~62mg であり大きな差異はみられなかった。テンペでは 23~66mg であった。

カリウム含量は、原料豆では 1,089~1,743mg でウイングドビーンが少なく、大豆が多かった。テンペでは日本産テンペの 1,204mg を除くと 78~422mg で、リマビーンテンペが少なく、ウイングドビーンが多かった。また、日本の大豆テンペを除き、各々のテンペは、原料豆に比較しカリウム含量は少なかった。

カルシウム含量は、原料豆では 45~377mg で、テンペでは 32~141mg であった。ウイングドビーンおよび大豆においては原料豆でカルシウムを多く含有していたが、これらの豆を原料としたテンペでは少なかった。

マグネシウム含量は、原料豆では 114~211mg でベルベットビーンで少なく、カウピーで多かった。テンペでは 43~188mg でリマビーンテンペで少なく、大豆テンペで多かった。また、原料の豆類に比較して各々の豆で調製したテンペではマグネシウム含量は少なかった。

リンは原料豆では 371~604mg で、テンペでは 236~643mg であった。

鉄含量は、原料豆では、5.7~14.4mg で、ピジョンピーが少なく、ベルベットビーンが多かった。テンペでも 4.5~12.7mg であり、原料豆と同様にピジョンピーで少なく、ベルベットビーンで多かった。また、鉄含量は原料豆で多く、そのテンペで少なかった。

銅含量は、原料豆では 1.0~2.5mg で、テンペでは 0.4~3.1mg であった。

マンガン含量は、原料豆では 1.3~4.2mg でテンペでは 0.9~4.2mg であった。

亜鉛含量は、原料豆では 3.2~5.4mg で、テンペでは 3.5~12.2mg であった。大豆以外の豆類では、亜鉛含量は原料豆で少なく、各々の豆で調製したテンペでは多い傾向がみられた。

第3項 考 察

インドネシア共和国の大豆テンペの一般成分の分析値を MURATA ら¹²⁾、FARDIAZ ら²¹⁾、の分析値と比較すると、タンパク質、灰分についてはほぼ一致していた。脂質含量については本分析で高値の結果が得られた。しかし逆に炭水化物については、低値の結果が得られた。これらの差は、用いた原料大豆の差および発酵方法を含めた調製条件の差に基づくものと考えられる。

テンペの食物繊維については田口ら²²⁾、おからを原料としたテンペについては松尾²³⁾の報告がある。これらの報告によるとテンペの調製過程で食物繊維の変化がみられ、セルロース、リグニンと、ほぼセルロースとリグニンの合計量を示す酸性洗剤繊維 ADF が減少し逆に含窒素食物繊維であるキチンが増加していると報告している。

本実験の分析結果では NDF、TDF を測定したが、原料大豆に対し、ほぼ不溶性の食物繊維量を示す NDF は減少しているが、水溶性および不溶性食物繊維の総量を示すと考えられる TDF は同じか、やや増加の傾向がみられた。また、NDF 量に対し TDF 量が大幅に高値であることから、キチンの定量を含め、さらに、TDF の定量方法の検討が必要であると考えられる。

大豆以外の、ベルベットビーン、ピジョンピー、ウイングドビーン、リマビーンおよびカウピーのテンペについては、これらの豆類を用いて調製したテンペについて、このような分析値がないので

比較し得なかった。

無水物 100g 当たりの成分値で、原料豆類とテンペ製品の成分含量を比較すると、タンパク質、脂質、亜鉛が原料豆に比較してテンペ製品におけるこれらの成分が増加していた。これらの事実は、原料豆からテンペを調製する時、豆種実から種皮を剥皮していることから、種皮に多く存在する成分は減少し、子葉に多い成分はさらにその割合が原料豆類の種実より増加することが一因と考えられた。さらに、水に浸漬し、また蒸煮などの加工処理により水可溶性の成分が溶出により損失することも原因となると考えられた。

豆の種類の違いにより、原料豆類とテンペにおける成分増減の割合が異なるのは、豆の種類により、その性状が異なること、さらに豆の種類により種菌を接種、発酵する前の豆の処理方法が異なるためと推定される。

しかし、同一種の豆について、テンペ調製に用いた2種類の種菌のテンペ製品の成分にかなりの差異が認められた原因は、*R. oligosporus* に対し、Usar は複数の菌が混在しており発酵条件が異なるためとも考えられるが、この点については不明である。

本実験で測定した、一般成分、食物繊維および各種無機質の分析結果から、大豆テンペの他、ベルベットピーンテンペ、ビジョンピーテンペ、ウィングドピーンテンペ、リマピーンテンペおよびカウピーテンペともにタンパク質含量が多く、タンパク質の良い供給源となることが明らかとなった。したがって、今後そのタンパク質の栄養価を、アミノ酸価の測定などによりさらに明らかにする必要があると考えられる。

大豆テンペおよびウィングドピーンテンペは脂質含量が多く、その他のベルベットピーンテンペ、ビジョンピーテンペ、リマピーンテンペおよびカウピーテンペは糖質が多いことを示した。

本実験で分析した各種豆類のテンペは食物繊維量が多く、食物繊維の良い供給源であることが示された。同様にマグネシウム、鉄および亜鉛の含量が比較的高いので、これら無機質の良い供給源でもあることを明らかにした。

第4項 要 約

本実験で使用した、調製されたテンペはいずれもタンパク質含量が多かった。また、ウィングドピーンおよび大豆と、それを用いて調製したテンペは、タンパク質および脂質の含量が多かったが、その他の豆類およびそれらの豆類で調製したテンペは、タンパク質含量と糖質含量が多かったが、脂質含量が少なかった。

無水物基準換算値で比較すると、タンパク質および脂質含量は、原料豆より多かった。一方灰分および糖質含量は原料豆で多く、テンペで少なかった。

食物繊維については、原料豆の NDF が多く、それらの豆類を用いて調製した各々のテンペでは少なかった。

大豆以外の豆の場合は、原料豆の TDF が多く、それらのテンペでは少なかった。

無機質については、原料豆類ではカリウムが、次にリンが多かったが、テンペではリンまたはカリウムが多かった。

カリウム、マグネシウムおよび鉄は原料豆で多くテンペで少なかった。

亜鉛は、原料豆より各々の豆で調製したテンペの方が多かった。

第2章 各種テンペの呈味成分組成の比較

各種テンペについて、テンペの主な呈味成分の含量を知る目的で、遊離アミノ酸・遊離糖および有機酸を分析し、その組成を明らかにした。

第1項 実験方法

1. 試 料

第1章、第1項の1で、試料および調製法として前述したものである。

2. 分析方法

(1) 遊離アミノ酸

試料 0.5g に 80% エタノール 50ml を加え、1時間還流抽出し、濾過後抽出残渣をさらに2回同様の方法で抽出した。全抽出液を減圧濃縮後、ジエチルエーテルで脱脂し、濃縮乾固後、pH 2.2 クエン酸リチウム緩衝液に溶解し定容とした。分析は日立 835 型高速アミノ酸分析計により行った。

Table 5. Comparison of Free Amino Acid Compositions in Various Tempes and Raw Materials

mg/100g dry weight

Sample	Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Pro	Gly	Ala	Val	Cys	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe
Velvet Bean	59	6	9	15	67	-	181	9	18	6	21	2,529*	7	2	14	14
Velvet Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	23	51	39	96	43	76	27	29	173	31	-	375*	17	26	52	49
Velvet Bean Tempe (Usar)	9	7	8	13	16	18	9	5	20	5	-	417*	3	6	8	7
Pigeon Pea	42	166	9	97	168	-	13	9	38	15	121	-	4	5	12	85
Pigeon Pea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	34	19	26	68	111	24	15	19	152	15	20	1	7	13	21	30
Pigeon Pea Tempe (Usar)	45	65	42	90	94	46	38	56	255	45	26	4	24	39	69	75
Winged Bean	19	5	10	13	30	-	19	9	32	4	21	+	2	2	26	5
Winged Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	17	14	11	35	55	23	25	8	61	8	18	1	5	10	20	11
Winged Bean Tempe (Usar)	22	30	21	45	65	32	34	24	123	19	19	1	7	14	40	13
Lima Bean	68	5	10	120	88	-	29	8	20	10	101	1	4	4	4	8
Lima Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	4	13	11	17	16	7	5	8	34	11	9	1	8	12	21	14
Lima Bean Tempe (Usar)	40	35	34	35	63	19	33	22	117	44	8	4	35	62	57	62
Cowpea	51	7	6	133	193	-	6	21	25	6	20	1	2	3	7	11
Cowpea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	94	103	82	123	233	52	71	75	470	118	62	11	70	101	219	109
Cowpea Tempe (Usar)	61	112	69	89	180	39	64	76	292	96	87	10	59	80	159	136
Soybean	48	1	4	13	90	-	5	6	38	-	48	3	3	4	4	7
Soybean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	202	176	153	212	583	95	164	114	497	253	22	69	225	363	213	268
Soybean Tempe (Usar)	169	145	126	153	396	58	142	92	437	190	21	41	163	261	158	192
Soybean Tempe (Japan)	13	76	61	78	198	137	30	57	321	26	37	3	11	17	71	32

+ : Trace, - : Not detected

* : May be overlapped with other ninhydrin positive unknown compounds.

R. oligosporus : *Rhizopus oligosporus*Usar : Dried *Hibiscus* leaf

Continued

Trp	Lys	His	Arg	Sar ¹⁾	α -Aaa ²⁾	Cit ³⁾	α -Aba ⁴⁾	Cysthi ⁵⁾	β -Ala ⁶⁾	γ -Aiba ⁷⁾	γ -Aba ⁸⁾	Orn ⁹⁾	1-Mehi ¹⁰⁾	3-Mehi ¹¹⁾	Total
4	11	12	251	33	-	-	-	-	9	-	2	1	-	-	3,283
9	67	45	48	-	11	-	-	4	3	-	62	12	-	+	1,366
-	13	6	12	-	-	-	-	1	-	-	4	5	-	-	592
6	10	39	83	52	16	-	279	-	17	45	3	1	-	-	1,334
-	31	59	26	-	19	-	35	2	9	15	26	3	-	-	802
16	108	114	63	-	25	-	50	4	15	16	50	22	-	-	1,517
4	11	14	141	-	3	-	-	-	5	9	18	2	-	2	407
-	23	33	18	-	5	4	-	+	2	-	9	2	-	2	423
4	46	62	43	-	6	-	-	1	9	-	21	9	-	-	702
10	9	17	242	-	6	-	-	2	3	-	10	2	1	-	786
-	18	12	8	-	-	-	-	+	3	-	22	4	-	-	258
17	79	59	43	-	9	-	-	4	24	4	33	12	-	-	983
8	6	14	122	30	12	-	-	-	-	36	3	2	1	-	726
30	173	127	87	-	46	-	8	9	44	33	161	56	-	2	2,798
135	164	123	100	-	24	-	2	7	38	36	130	39	-	4	2,472
45	5	3	88	-	-	-	-	-	9	5	5	1	-	-	435
90	214	131	152	-	38	72	12	24	14	50	62	27	-	17	4,963
54	168	108	142	-	23	52	9	21	6	19	65	23	-	12	3,710
33	114	104	64	-	15	-	1	12	12	-	21	13	-	2	1,559

¹⁾:Sarcosine, ²⁾: α -Aminoadipic acid, ³⁾:Citrulline, ⁴⁾: α -Amino-n-butyric Acid, ⁵⁾:Cystathionine, ⁶⁾: β -Alanine,

⁷⁾: β -Aminoisobutyric acid, ⁸⁾: γ -Aminobutyric acid, ⁹⁾:Ornithine, ¹⁰⁾1-Methylhistidine, ¹¹⁾:3-Methylhistidine

(2) 遊離糖

試料 2.0g に 80% エタノール 100ml を加え、1 時間還流抽出し、濾過後抽出残渣をさらに 2 回同様の方法で抽出した。全抽出液を 0.1N 水酸化ナトリウム溶液で中和後、減圧濃縮し、Dowex 50W-X8 (100~200 メッシュ) (2×5 cm) と Dowex WGR (20~50 メッシュ) (2×5 cm) の連結カラムに通し、さらにカラム内を水で洗浄した。カラム素通り液の一定量を減圧濃縮乾固し、エタノールを加えてさらに濃縮乾固して脱水し、内部標準物質ピレンのエタノール溶液 (1 mg/ml) 1 ml を加え再度乾固した。次に市販の TMS 化剤を 0.5 ml 加えて TMS 化した。この試料の一部を島津 GAS CHROMATOGRAPH GC-9A 型を用い、2% Silicone OV-17 カラムで糖の定量を行った。

(3) 有機酸

前述の、連結カラムのうちの Dowex WGR カラムのみに、アンモニア水を流し、溶出液は濃縮後、別の Dowex 50W-X8 カラムに通し遊離酸を得、濃縮後定容した。

この溶液の一部をとり、リン酸溶液を加え 0.1% 濃度となるよう希釈した。分析には、東ソー UV8010 高速液体クロマトグラフを用い、Shodex KC-811 (8×300 mm) のカラムに、0.1% リン酸溶液を流し、有機酸を分離した。カラム温度は 60℃、流速は 0.5 ml/mm で、有機酸の検出は 210 nm の吸光度をモニターして行った。なお本分析では、乳酸の溶出時間が他の有機酸と重なり同定できなかった。

そこで溶液の一部は 0.1N 水酸化ナトリウム溶液で中和後、減圧濃縮乾固し、内部標準物質としてマロン酸 10 mg を加え、次に *n*-ブタノール 10 ml、無水硫酸ナトリウム 2 g、および濃硫酸 1 ml を加えて 30 分間静かに煮沸してブチルエステル化した。冷却後蒸留水 5 ml と *n*-ヘキサン 5 ml を用いて有機酸ブチルエステルの抽出を 3 回繰り返し、全抽出液を合わせて定容とした。分析には、その一部を島津 GAS CHROMATOGRAPH GC-9A 型を用い 5%-Reoplex 400 カラムで有機酸ブチルエステルを分離定量した。

第 2 項 結 果

(1) 遊離アミノ酸組成

各試料の遊離アミノ酸含量を Table 5 に無水物 100g 当たりの mg 数で示した。

原料豆の総遊離アミノ酸含量は 407~3,283 mg で、ウイングドビーンが少なく、ベルベットビーンが多かった。

13 種類のテンペの総遊離アミノ酸含量は、258~4,963 mg でかなりの差がみられた。

種菌に *R. oligosporus* を用いて調製したテンペの中で総遊離アミノ酸量を比較すると、リマビーンテンペが最も少く、大豆テンペが最も多かった。

種菌に Usar を用いて調製したテンペの中では、ベルベットビーンテンペが最も少ない 592 mg であり、大豆テンペが最も多い 3,710 mg であった。

各試料中の個々のアミノ酸含量をみると、総て、タンパク質構成アミノ酸がタンパク質非構成アミノ酸より含量が多かった。

ベルベットビーンでは、メチオニンが 2,529 mg と最も多く、これを原料とする 2 種類の種菌によるテンペでも、量的には少ないがメチオニンが各々 375 mg, 417 mg と最も多く特異的であった。次いで、多いアミノ酸は、豆ではアルギニンが 251 mg と多かったが、テンペでは 2 種類ともにアルギニンが少なく、アラニンが 173 mg, 20 mg と多かった。

ビジョンビーでは、タンパク質非構成アミノ酸である α -アミノ酪酸が 279 mg と最も多かったが、テンペではアラニンが 152 mg, 255 mg と最も多く含有されていた。

ウイングドビーンでは、アルギニンが 141 mg と最も多く、次いで、アラニンが 32 mg であった。テンペでは 2 種類ともにアルギニンは少なく、アラニンが各々 61, 123 mg と多かった。リマビーンでは、ウイングドビーンと同様アルギニンが 242 mg と最も多かったが、2 種類のテンペともにアルギニンが少なく、アラニンが各々 34 mg, 117 mg と多かった。

カウビーでは、グルタミン酸が 193 mg と多かったが、テンペでは 2 種類ともに、アラニンが 470 mg, 292 mg と最も多く、グルタミン酸がこれに次いでいた。

大豆ではカウビーと同様グルタミン酸が 90 mg と最も多く、*R. oligosporus* を種菌としたインドネシア共和国の大豆テンペもグルタミン酸が 583

Table 6. Comparison of Free Sugar Compositions in Various Tempes and Raw Materials
mg/100g dry weight

Sample	Frc	Glc	Suc	Raf	Stc	Total
Velvet Bean	108	601	2,556	875	1,765	5,905
Velvet Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	20	175	24	41	51	311
Velvet Bean Tempe (Usar)	53	280	17	40	56	446
Pigeon Pea	1,672	226	1,568	625	873	4,964
Pigeon Pea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	205	159	23	95	225	707
Pigeon Pea Tempe (Usar)	337	958	32	52	154	1,533
Winged Bean	21	168	645	178	142	1,154
Winged Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	1,139	589	82	97	235	2,142
Winged Bean Tempe (Usar)	42	122	118	224	459	965
Lima Bean	912	113	159	26	99	1,309
Lima Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	248	1,173	3	-	-	1,424
Lima Bean Tempe (Usar)	171	1,286	-	-	-	1,457
Cowpea	-	44	1,899	570	4,922	7,235
Cowpea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	235	1,442	+	34	43	1,754
Cowpea Tempe (Usar)	221	3,403	3	32	59	3,718
Soybean	2,014	497	6,561	1,003	2,556	12,631
Soybean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	138	199	17	-	-	354
Soybean Tempe (Usar)	76	123	7	-	-	206
Soybean Tempe (Japan)	1,058	418	2,791	368	2,058	6,693

+:Trace, -:Not detected,

R. oligosporus: *Rhizopus oligosporus*, Usar: Dried *Hibiscus* leaf,

Frc:Fructose, Glc:Glucose, Suc:Sucrose, Raf:Raffinose, Stc:Stachyose

mg と最も多く、Usar を種菌としたテンペおよび日本のテンペではアラニンが各々 437mg, 321mg と最も多く、グルタミン酸はこれに次いで多かった。

(2) 遊離糖組成

各試料の遊離糖組成を Table 6 に、無水物 100g 当たりの mg 数で示した。検出された主要な糖は、原料豆と各々の豆で調製した各種テンペともに、フラクトース、グルコース、スクロース、ラフィノースおよびスタキオースの 5 種類であった。

原料の豆類の総遊離糖含量は 1,309~12,631mg で、リマビーンが最も少なく、大豆が最も多かつ

た。13 種類のテンペの総遊離糖含量は 206~6,693mg であった。

種菌に *R. oligosporus* を用いて調製したテンペの中では、ベルベットビーンを用いたものが最も少ない 311mg であり、ウィングドビーンを用いたものが最も多い 2,142mg で、日本で市販されている大豆テンペでは 6,693mg とさらに多かった。

種菌に Usar を用いて調製したテンペの中では、大豆を用いたものが最も少ない 206mg であり、カウビーを用いたものが最も多い 3,718mg であった。

Table 7. Comparison of Organic Acid Compositions in Various Tempes and Raw Materials

Sample	mg/100g dry weight										
	Oxalic	α -Keto-glutaric	Citric	Tartaric	Malic	Succinic	Fumalic	Formic	Acetic	Pyro-glutamic	Total
Velvet Bean	21	-	1,083	-	533	250	5	203	156	239	4,119
Velvet Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	93	-	50	70	162	88	24	258	-	27	773
Velvet Bean Tempe (Usar)	25	13	96	118	212	186	25	233	49	23	977
Pigeon Pea	-	-	508	-	835	414	26	-	509	114	2,406
Pigeon Pea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	172	-	191	54	546	315	39	-	223	94	1,644
Pigeon Pea Tempe (Usar)	-	23	279	109	692	575	59	-	-	66	1,803
Winged Bean	-	-	792	-	809	738	5	227	167	374	3,113
Winged Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	18	11	147	-	429	252	11	327	468	29	1,692
Winged Bean Tempe (Usar)	19	-	169	28	453	324	16	-	165	39	1,212
Lima Bean	-	-	316	-	671	1,169	4	606	-	65	2,831
Lima Bean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	54	58	98	-	833	709	155	-	-	53	1,961
Lima Bean Tempe (Usar)	46	20	95	-	675	100	58	-	-	37	1,032
Cowpea	-	-	764	-	467	367	16	-	204	49	1,867
Cowpea Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	36	18	190	-	1,230	1,276	59	-	732	107	3,648
Cowpea Tempe (Usar)	-	39	145	-	1,067	1,336	100	-	-	51	2,739
Soybean	18	18	1,229	311	935	648	2	245	237	18	3,661
Soybean Tempe (<i>R. oligosporus</i>)	-	13	136	-	830	559	14	-	372	178	2,102
Soybean Tempe (Usar)	28	29	145	39	412	973	27	-	538	170	2,363
Soybean Tempe (Japan)	20	-	915	-	1,231	283	16	257	211	100	3,034

+: Trace, -: Not detected

R. oligosporus: *Rhizopus oligosporus*Usar: Dried *Hibiscus* leaf

各試料中の個々の遊離糖含量をみると、ベルベットピーンではスクロースが2,556mgで最も多かった。この豆を用いて調製した2種類のテンペではスクロースは少なく、グルコースの割合が最も多くなったが、含有量としては各々175mg, 280mgと原料豆より少なかった。

ビジョンピーでは、フラクトースが1,672mgで最も多かった。この豆を用い、*R. oligosporus* を種菌としたテンペでは、スタキオースが225mgで最も多く、Usarを種菌としたテンペでは、グルコースが958mgで最も多かった。

ウィングドピーンでは、スクロースが645mgで最も多かった。この豆を用いて調製し*R. oligosporus* を種菌としたテンペではフラクトースが1,139mgで最も多く、Usarを種菌としたテンペでは、スタキオースが459mgで最も多かった。

リマピーンでは、ビジョンピーと同様、原料豆ではフラクトースが912mgで最も多く、2種類のリマピーンテンペでは、総遊離糖量はほとんど変わらないが、その構成糖類はグルコースが各々1,173mg, 1,286mgと最も多かった。しかし、他のスクロース、ラフィノースおよびスタキオースはほとんど含有されていなかった。

カウピーでは、スタキオースが、4,922mgで量および割合ともに最も多かったが、この豆を用いて調製した2種類のテンペでは、ともにグルコースが最も多かった。

大豆でもスクロースが6,561mgと最も多かった。大豆を用いて調製したインドネシア共和国の2種類のテンペではグルコースが各々199mg, 123mgと最も多く、日本で市販されているテンペではスクロースが2,791mgで最も多く含有されていた。

(3) 有機酸組成

各試料の有機酸組成をTable 7に無水物100g当たりのmg数で示した。検出された主要な有機酸は、シュウ酸、 α -ケトグルタル酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、フマル酸、ギ酸、酢酸、およびピログルタミン酸であった。

原料の豆類の総有機酸含量は1,867~4,119mgで、カウピーで最も少なく、ベルベットピーンで最も多かった。13種類のテンペの総有機酸含量は773~3,648mgであった。

種菌に*R. oligosporus*を用いて調製したテンペの中では、ベルベットピーンを用いたものが最も少ない773mgであり、カウピーを用いたものが最も多い3,648mgであった。

種菌にUsarを用いて調製したテンペの中でも同様に、ベルベットピーンを用いたものが最も少なく977mgであり、カウピーを用いたものが最も多く2,739mgであった。

各試料中の個々の有機酸含量をみると、ベルベットピーンでは、クエン酸が最も多く、次にリンゴ酸が多かった。この豆を用いて調製した2種類のテンペではともにクエン酸の含量は少なかった。量的には原料豆と変わらないが、ギ酸の割合が最も多くなり、次いでリンゴ酸の割合が多くなった。

ビジョンピーでは、リンゴ酸が最も多かった。この豆を用いて調製した2種類の種菌のテンペでもともに、量的にはわずかに少ないが、リンゴ酸が最も多く、次いで、コハク酸が多かった。

ウィングドピーンでは、リンゴ酸が最も多かった。この豆を原料にして種菌に*R. oligosporus*を用いて調製したテンペでは、酢酸が最も多く、Usarを種菌としたテンペでは原料豆と同様リンゴ酸が最も多かった。

リマピーンではコハク酸が最も多く、次にリンゴ酸が多かった。その2種類の種菌のテンペではともに逆にリンゴ酸が最も多く、次いで、コハク酸が多かった。

カウピー及び大豆ではクエン酸が最も多く次にリンゴ酸が多かった。それらのテンペではリンゴ酸あるいはコハク酸が多い傾向が認められた。

なお乳酸については、*R. oligosporus*による大豆テンペにのみ認められた。またベルベットピーン以外の豆を原料としたテンペには2,3の未同定のピークが検出された。

第3項 考 察

(1) 遊離アミノ酸

テンペのアミノ酸含量は豆の種類により異なるが、無水物基準換算値で100g当たり258~4,963mgとかなり多く、各々のテンペの呈味に係わっていると推定される。遊離アミノ酸の種類ではタンパク質構成アミノ酸が非構成アミノ酸より多く、

多くの食品の例と異ならなかった。

個々のアミノ酸の種類では、ベルベットピーンでメチオニンが最も多い遊離アミノ酸であった他は、アラニンが最も多く、次いで、グルタミン酸が多い傾向が認められた。これら2種のアミノ酸は、アラニンは甘味、グルタミン酸は旨味を持つことが良く知られており、これらのアミノ酸がテンペの味の一部を構成しているものと推定される。

ベルベットピーンに遊離アミノ酸として、メチオニンが異常に多く、またそのテンペにおいてもメチオニンが多いのは特異的で、今後、分析において、溶出時間がメチオニンと同じとなるメチオニン以外のニンヒドリン陽性物質の存在の可能性を検討する必要があるだろう。

大豆を原料としたテンペの遊離アミノ酸については、Smithら²⁴⁾、Stillingら²⁵⁾、Murataら¹²⁾、瓦井ら⁷⁾、松本ら¹³⁾の多くの報告があるが、発酵による遊離アミノ酸の増加は顕著であるが、個々のアミノ酸の遊離度の高低や遊離度の高いアミノ酸の種類については、必ずしも一致していない。大豆を原料とするテンペにアラニン、グルタミン酸が多く含まれているという傾向は、本実験の大豆およびベルベットピーン以外の豆を原料としたテンペでも同様であった。原料豆の処理法や発酵条件などが、アミノ酸の遊離度や増加比に関係すると予想され、松本ら¹³⁾は、*R. oligosporus*を含めた *Rhizopus* 属では酸性プロテアーゼ活性が高いため、タンパク質溶解率は比較的高いが、しかしペプチダーゼ活性が弱いため遊離アミノ酸増加比はそれほど高くないであろうと示唆している。

本実験での、これら遊離アミノ酸についての結果の違いは、テンペ試作時の水浸漬、煮沸による損失、その後の発酵過程での遊離アミノ酸の増加の程度が豆類により異なるためと推察された。

(2) 遊離糖

原料豆類および各々の豆類で調製されたテンペとも、遊離糖類を構成する主な糖は、フラクトース、グルコース、スクロース、ラフィノースおよびスタキオースの5種類であった。

各種テンペ中の総遊離糖は無水物基準換算値で100g当たり206~6,693mgの範囲であり、このことからテンペの呈味にこれらの糖の関与が推察さ

れた。

遊離糖については、瓦井ら⁷⁾、松本ら¹³⁾、Sorensonら²⁶⁾の報告がある。Sorensonら²⁶⁾によると、*R. oligosporus* NRRL 2710株は、グルコース、フラクトース、ガラクトース、マルトースを利用するがスクロース、スタキオース、ラフィノースは利用しない。本実験の試作テンペでは、ほとんどの試料のスクロース含量が少なく、またラフィノース、カウビーおよび大豆では、ラフィノース、スタキオースの含量が少ないので、テンペ試作時の煮沸による損失とさらに発酵中のこれらの糖の減少も推察される。松本ら¹³⁾、岡田¹⁴⁾の指摘するように、発酵条件により混入する菌がこれらの糖を分解し、その後、*Rhizopus* 属がその構成単糖類を利用する可能性も考えられる。なお、実験に使用した大豆についての分析結果は、平ら²⁷⁾の報告とほぼ一致していた。

これらのことが、原料豆の種類の違いによる構成糖の種類、量の違い、テンペ調製時の前処理の違いとともに、各々のテンペの構成糖の種類と量に影響している可能性が推察された。

(3) 有機酸

テンペの有機酸についての報告⁷⁾は、少ない。また本実験の結果も、酢酸など揮発性の有機酸類が、発酵中あるいは試料の凍結乾燥中に損失する可能性があることを考慮すると必ずしも総量とは言えない。さらにテンペ試作時の煮沸での有機酸の溶出による損失もあると考えられる。またテンペは微生物による発酵食品なので各種の有機酸の増加も考えられる。実際、本実験ではテンペ中にリンゴ酸とコハク酸が特に多い事が示されたが、それらのまろやかな味がテンペの呈味に関係していると考えられる。本実験ではテンペの呈味成分組成は原料とする豆類の成分にかなり影響されると推察された。一方、2種類の種菌による大きな差は認められなかった。本実験の試作テンペは室温で長時間培養したので他の菌の関与も考えられ、発酵条件の差が呈味成分にも影響していると思われるので、発酵の前後での組成の違いを比較するために、さらに検討する必要がある。

第4項 要 約

(1) 遊離アミノ酸組成では、アラニンおよびグル

タミン酸の多いテンベが多かった。リマビーン以外の豆類のテンベでは、*R. oligosporus* と Usar の2種類の種菌によるアミノ酸の種類の違いは認められなかった。総遊離アミノ酸含量は、カウピーテンベと大豆テンベで多かった。

- (2) 遊離糖組成では、フラクトース、グルコースおよびスタキオースの多いテンベが多かった。総遊離糖含有量は日本で市販されている大豆テンベと、カウピーのテンベで多く、インドネシア共和国の大豆テンベとベルベットビーンテンベで少なかった。リマビーン、カウピーおよび大豆のテンベでは豆由来のスクロース、ラフィノースおよびスタキオースがかなり減少していた。

- (3) 有機酸組成では、2, 3の未同定のものを含め発酵によると考えられるいくつかの有機酸類の存在が認められた。これらの有機酸のうちリンゴ酸とコハク酸の多いテンベが多かった。総有機酸含量の多いのは、カウピーおよび大豆のテンベで、少ないのはベルベットビーンのテンベであった。

第3章 テンベの低分子ペプチドに関する研究

呈味成分として、遊離アミノ酸、遊離糖および有機酸の他に、低分子ペプチドも考えられる。低分子ペプチドがテンベの呈味にいかに関与しているかを調べるために、以下のように、テンベの低分子ペプチドを分離・精製し、同定を試みた。

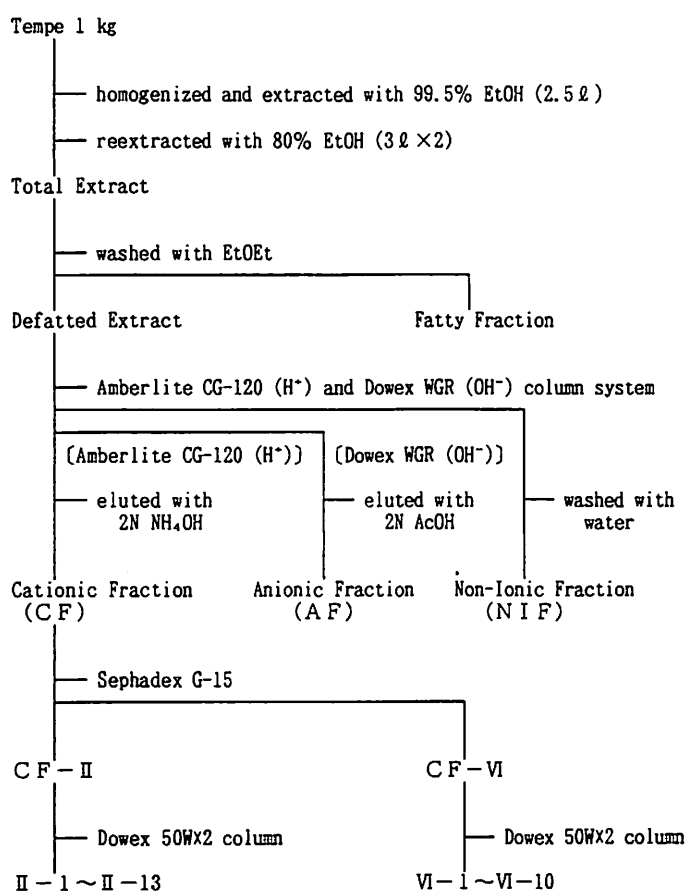


Fig. 1. Fractionation Procedure

大豆テンペより低分子ペプチド画分を調製するために、大豆テンペを80%エタノールで抽出し、その抽出液を溶媒抽出、イオン交換体およびゲル濾過により分画した。これにより得られた各画分の全窒素、ニンヒドリン陽性物質、遊離および総アミノ酸の分析により低分子ペプチド画分の構成アミノ酸を明らかにした。この結果を基にしてさらに精製するために、陽イオン交換クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を行って、2, 3の低分子ペプチドの構造の解明を試みた。

第1節 テンペの低分子ペプチド画分の調製および成分組成

第1項 実験方法

1. 試料および調製法

大豆テンペは、中国産大豆を使用して、23時間発酵のものを、マルサンアイ社より入手し、使用時まで冷凍保存した。

2. Peptide-rich 画分の調製

(1) 抽出および分画方法

抽出および分画方法の概略をFig. 1に示した。

テンペ1kgを99.5%エタノール2.5lとともにホモジェナイズし、一夜冷蔵庫中に放置後濾過し濾液を得た。さらに残渣に80%エタノール3lを加えて同様に処理し、濾液をあわせ抽出液とした。

次に、この抽出液をロータリーエバポレーターで約500mlまで減圧濃縮した後、250mlのエチル

エーテルで3回抽出した。水層は減圧濃縮して約50mlの脱脂抽出液とし、またエチルエーテル層は、脂質画分とした。

(2) イオン交換体による分画

脱脂抽出液について、Ozawaら²⁸⁾が醤油でまた青柳ら²⁹⁾が干しシイタケで用いた方法を参考にし、以下のように分画を行った。

陽イオン交換樹脂アンバーライトCG-120(H⁺)のカラム(4×30cm)と陰イオン交換樹脂Dowex WGR(OH⁻)のカラム(4×30cm)各々2本を交互に連結し、脱脂抽出液を流して吸着させた後、10lの蒸留水を流した。この2種類のイオン交換体に吸着しなかった画分を、非イオン性画分(NIF)とした。この画分を50mlまで減圧濃縮した。

次に、2本のアンバーライトCG-120のカラムを直結し、2Nアンモニア水9lで溶出した。溶出液は、減圧下濃縮乾固を繰り返し、アンモニアを除去した後、蒸留水を加えて50lとした。この画分を陽イオン性画分(CF)とした。

また、Dowex WGRのカラムも同様に直結し2N酢酸9lで溶出した。溶出液は減圧下濃縮乾固し、

Table 8. Ninhydrin Positive Components on Each Fractions

Fraction	mg/1 kg	
	Ninhydrin positive components calculated as glutamic acid	
CF	3368.9	98.78%
AF	26.6	0.79
NIF	14.7	0.43

Table 9. Nitrogen and Ninhydrin Positive Components on Each Fractions
mg/1 kg

Fraction	Dry matter		Nitrogen		Ninhydrin positive components calculated as glutamic acid	
CF-I	202	2.6 %	27.9	3.3 %	6.6	0.2 %
II	1484	18.9	214.0	25.3	32.8	1.0
III	3919	50.0	440.8	52.1	2242.3	68.2
IV	1210	15.4	117.9	13.9	593.1	18.0
V	386	4.9	37.9	4.5	190.7	5.8
VI	333	4.3	4.7	0.5	109.8	3.3
VII	298	3.9	2.8	0.3	113.0	3.5

蒸留水に溶解して 50 ml の陰イオン性画分 (AF) を得た。

(3) ゲル濾過

CF について、さらに Sephadex G-15 を用いたゲル濾過法により以下のように分画を行った。

あらかじめ 0.3N 酢酸で平衡化した Sephadex G-15 のカラム (2.5×110cm) に、CF10ml をのせ 0.3N 酢酸で溶出した。溶出液は、フラクションコレクターを用い、各々 5 ml ずつ分画した。各フラクションについて 260 nm における吸光度を測定するとともに、ニンヒドリン反応および *tert*-butylhypochlorite を用いた H.N. Rydon と P.W. G. Smith の変法による検出も行った。

この分画操作を 5 回繰り返した。

3. 分析方法

(1) 全窒素

各画分の全窒素の測定は、ケルダール法を用いた。

(2) ニンヒドリン反応および *tert*-butylhypochlorite 反応

ニンヒドリン反応は Yemm と Cocking³⁰⁾ の方法に従って行った。各画分のニンヒドリン陽性物質の総量は、標準物質として用いたグルタミン酸量に換算して表示した。

H.N. Rydon と P.W.G. Smith の変法^{31, 32)} により、*tert*-butylhypochlorite 反応を行った。真空デシケーター中で乾燥した試料に、酢酸：ジクロロエタン (1:9 v/v) 中に溶解した 1% *tert*-butylhypochlorite 液を 0.1 ml 加えて、攪拌し、再度脱水乾燥させた。これに酢酸 0.5 ml と 0.05M-KI 溶液 3.0 ml の混合液を加え、室温で 30 分放置後、355 nm での吸光度を測定した。

(3) アミノ酸分析

各画分の遊離アミノ酸は一定量を pH 2.2 クエン酸リチウム緩衝液に溶解し、定容とした分析は日立 835 型高速アミノ酸分析計を用い行った。

全アミノ酸は試料の一定量を加水分解用試験管に採り、6N 塩酸を加え冷却後油拡散ポンプを用いて脱気し、脱気後ガラス細工用バーナーを用いて封管した後、ドライブロックバス中で 110℃, 24

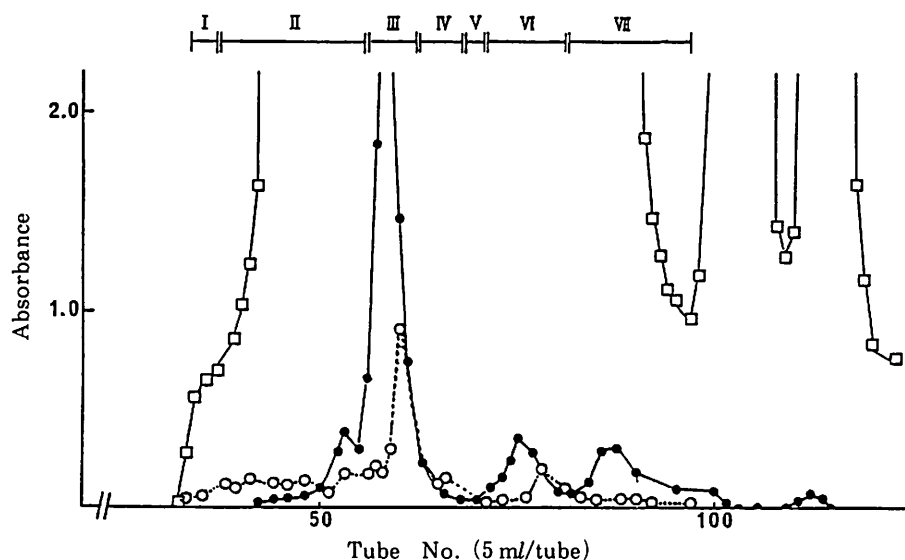


Fig. 2. Gel-filtration of CF on a Sephadex G-15 Column (2.5×110cm)

Elution was performed with 0.3 N acetic acid at a flow rate of 1 ml/min. ●—●, ninhydrin test, 0.005 ml of each fractions was tested and absorbance at 570 nm was measured; ○—○, *tert*-butylhypochlorite test, 0.01 ml of each fractions was tested and absorbance at 355 nm was measured; □—□, absorbance at 260 nm was measured.

Table 10. Free and Total Amino Acids Contents in Each Fraction

 $\mu\text{mol/tempe 1 kg}$

Amino Acid	C F		C F-II		C F-III		C F-IV		C F-V	
	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total
ASP	690.2	5060.9	5.1	823.8	22.0	297.5	3.8	31.4	0.7	13.0
THR	2404.1	3662.7	14.5	316.8	1068.3	1124.0	43.0	55.6	7.1	10.9
SER	1870.5	3074.0	6.6	291.3	915.3	903.6	34.8	43.5	0.3	4.4
GLU	5318.6	12438.1	4.1	1000.8	2561.5	3121.4	130.8	155.4	3.6	12.9
GLY	2105.4	4721.2	17.9	460.1	703.9	902.3	70.4	110.4	2.4	14.5
ALA	11890.0	12867.3	30.4	339.6	10521.1	10865.7	328.8	388.7	4.9	9.8
VAL	887.4	1829.9	10.5	232.8	546.9	614.4	24.2	34.8	5.1	7.9
CYS	266.8	287.1	48.2	31.0	-	34.4	1.3	4.6	1.5	1.5
MET	124.7	298.7	10.0	79.2	25.5	64.7	31.1	37.9	1.4	1.9
ILE	345.1	1352.4	16.2	202.5	221.8	294.8	24.0	39.1	2.9	5.7
LEU	716.3	1856.0	42.7	248.0	388.5	473.9	56.9	72.0	3.3	6.9
TYR	1928.5	2291.0	4.1	51.7	-	33.1	0.9	12.9	2.8	7.2
PHE	759.8	1655.9	8.7	110.7	-	45.5	2.3	17.6	22.0	24.9
LYS	2586.8	3671.4	779.1	1013.2	150.1	214.9	5.7	15.3	0.8	3.2
HIS	2166.3	2810.1	241.2	374.0	562.2	615.7	8.0	12.3	-	1.8
ARG	739.5	1682.0	1.2	224.5	-	44.1	1.8	8.6	-	3.3
PRO	1310.8	3584.4	1.7	518.6	991.1	1091.0	6.9	31.9	-	8.4

Continued

Amino Acid	C F-VI		C F-VII	
	Free	Total	Free	Total
ASP	0.3	41.8	0.1	25.6
THR	4.3	20.3	2.0	11.4
SER	3.5	21.7	9.0	10.5
GLU	18.8	202.7	19.0	32.5
GLY	3.0	123.0	1.3	29.9
ALA	30.0	55.4	25.7	13.7
VAL	3.7	19.7	-	11.6
CYS	-	2.3	1.1	1.3
MET	1.8	4.6	1.7	2.3
ILE	4.3	12.7	0.9	8.1
LEU	4.1	20.2	-	10.9
TYR	5.9	34.9	767.5	64.1
PHE	453.3	574.0	18.7	24.7
LYS	4.0	12.9	6.8	13.1
HIS	2.8	8.4	2.5	4.8
ARG	1.3	9.6	-	5.3
PRO	8.3	25.9	-	13.8

時間加水分解した。終了後直ちに濾過し、繰り返し濃縮乾固して、塩酸を留去した。乾固後遊離アミノ酸と同様に分析した。

第2項 結果および考察

テンベの全窒素量は、第1章のタンパク質の定量の結果のとおり、テンベ1 kg 当たり 31.12g であった。80 % エタノール抽出では、1.043g、約 4 % が抽出された。イオン交換樹脂による分画では、Table 8 に示したとおり、ニンヒドリン陽性物質の各画分への分布は、そのほとんどがイオン性であり、特に CF には約 98.78 % が分布していた。Table 10 に示すように、この画分の主要遊離アミノ酸は、アラニンおよびグルタミン酸であった。また、加水分解することにより、多くのアミノ酸が遊離したため、二つ以上のアミノ酸を構成成分とする化合物の存在が示唆された。特にアスパラギン酸は7倍、グルタミン酸、グリシン、バリン、イソロイシン、ロイシンおよびフェニルアラニンは2倍に増加しており、これらを構成成分とする

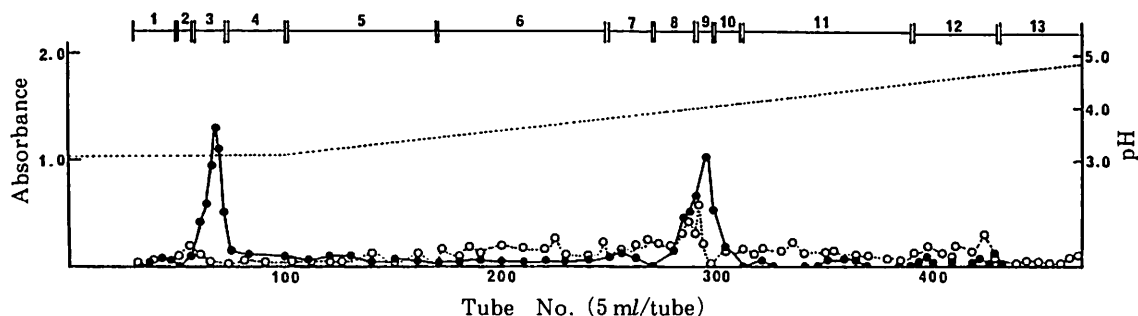


Fig. 3. Chromatography of CF-II on a Dowex 50W×2 Column.

CF-II was chromatographed on a 3.5×41cm column of Dowex 50W×2 (100-200 mesh) equilibrated with pyridine-acetic acid buffer, pH 3.1. Elution was performed with a linear gradient of pyridine-acetic acid buffer from pH 3.1 to 5.0 at a flow rate of 1 ml/min.

●—●, ninhydrin test, 0.02ml of each fractions was tested.

○—○, *tert*-butylhypochlorite test, 0.02ml of each fractions was tested.

化合物が存在していると考えられる。

さらに, Sephadex G-15を用いたゲル濾過による分画の結果を Fig. 2 に示すとともに, まとめた7個の画分 (CF-I ~ CF-VII) の重量, 窒素量およびニンヒドリン陽性物質量の分析結果を Table 9 に示した。Fig. 2 で大きなピークを示した CF-III には, 重量で CF の約 50 % が, CF の全窒素量の 52.1 % が分布していた。さらにこれらの画分のアミノ酸組成を Table 10 に示した。大部分の遊離アミノ酸は CF-III ~ CF-V に存在していた。特に CF-III はアミノ酸が多い画分であり, アラニンおよびグルタミン酸が多かった。

遊離アミノ酸および加水分解後の全アミノ酸を比較すると, CF-II では, 酸加水分解によりグルタミン酸は 250 倍, アスパラギン酸は 160 倍と遊離しており, その他多くのアミノ酸も多量に遊離しており peptide-rich な画分と考えられる。

次に, CF-VI の画分では, 酸加水分解により, アスパラギン酸は 140 倍, グルタミン酸は 10 倍と遊離しており, やはりアミノ酸を構成成分とする化合物の存在が示唆された。

CF-VI には, 遊離のフェニルアラニンが CF-VII には, チロシンが分布しており, また紫外吸収を示す画分であり, 核酸関連化合物を含むと推定される。酸加水分解によりグリシンを生成していることから, プリン骨格の存在³³⁾が示唆された。

また, フェニルアラニンについては, 一般に苦

味系の呈味を示し, さらにはフェニルアラニンおよびチロシンを含むペプチド³⁴⁾は苦味ペプチドであることも推定される。

CF-I は加水分解すると多種のアミノ酸が遊離し, 比較的高分子ペプチドであると考えられる。しかし, 量が少なく, 以後の処理も困難であった。

これらの結果より, CF-II および CF-VI の画分を peptide-rich な画分として, 以後の分離・精製を進めた。

第3項 要 約

大豆テンペから低分子ペプチド画分を調製するために, 大豆テンペを 80 % エタノールで抽出し, その抽出物を溶媒抽出, イオン交換体による分画および Sephadex G-15 によるゲル濾過により分離・精製した。これら各画分の遊離および酸加水分解後の総アミノ酸の分析により, 低分子ペプチド画分の構成アミノ酸を明らかにした。

遊離のアミノ酸はアラニンおよびグルタミン酸が多く, また酸加水分解後はグルタミン酸, アスパラギン酸およびフェニルアラニンが多く遊離しており, これらのアミノ酸を構成成分とする化合物の存在が示唆された。

第2節 テンペの Peptide-rich 画分のイオン交換クロマトグラフィーによる精製

Sephadex G-15 によるゲル濾過により, 得られ

た peptide-rich 画分 CF-II および CF-VI 中に含まれる低分子ペプチドを、さらに精製するためにイオン交換クロマトグラフィーを行った。分別された画分については、構成アミノ酸を調べた。

第1項 実験方法

1. 試料

画分 CF-II は、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固後、蒸留水に溶解し全量を 50 ml とし、CF-VI は、同様に乾固後、蒸留水で全量を 25 ml とした。

2. Dowex 50W×2 によるカラムクロマトグラフィー

ピリジン型に調製し、さらに pH 3.1 のピリジン-酢酸緩衝液（ピリジン濃度 0.2M）で平衡化した陽イオン交換樹脂 Dowex 50W×2（100-200 メッシュ）の 3.5×40cm のカラムに試料液を吸着させ、pH 3.1 のピリジン-酢酸緩衝液（ピリジン濃度 0.2M）と pH 5.0 のピリジン-酢酸緩衝液（ピリジン濃度 2.0M）を各々 1 l を用いてリニヤー

グラジェントにより溶出した溶出液は 5 ml ずつ分画し、各フラクション中に含まれるアミノ酸およびペプチドをニンヒドリン反応および *tert*-butylhypochlorite 反応により検出した。

3. ペーパークロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーは、Whatman No.1 filter paper を使い、*n*-ブタノール-酢酸-水（4:1:1 v/v）の展開溶媒で、上昇法により展開した。スポットの検出は、ニンヒドリン反応および UV ランプ（254 nm）下で行った。

第2項 結果および考察

CF-II を Dowex 50W×2 を用いたカラムクロマトグラフィーにより分画すると、Fig. 3 に示すような結果が得られた。画分 II-1 ~ II-13 のうち、特にニンヒドリン反応の強いピークは II-3 および II-9 の二つであった。

主な画分の遊離および総アミノ酸を Table 11 に示した。

ピーク II-3 は、酸加水分解後アスパラギン酸

Table 11. Free and Total Amino Acids Contents in Each Fraction

μ mol/tempe 1 kg

Amino Acid	II-1		II-2		II-3		II-9	
	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total
ASP	—	8.0	—	15.8	11.4	91.8	—	4.2
THR	—	5.0	0.2	6.3	8.5	23.6	—	2.4
SER	—	5.2	—	7.0	—	23.0	—	5.2
GLU	—	21.9	—	17.6	—	83.4	—	5.7
GLY	—	12.6	—	10.4	—	37.9	—	4.9
ALA	—	4.7	—	5.4	—	21.2	—	1.9
VAL	—	—	—	7.4	—	17.2	—	—
CYS	0.8	1.9	—	1.0	—	—	—	—
MET	—	0.6	0.1	0.8	—	15.8	—	—
ILE	—	—	—	2.2	—	7.4	—	1.2
LEU	—	1.9	—	2.6	—	8.1	—	1.4
TYR	—	1.9	—	—	—	1.6	1.4	—
PHE	—	—	—	—	—	—	—	—
LYS	—	0.7	—	1.6	0.2	5.3	113.3	99.3
HIS	—	—	—	—	—	5.3	18.5	17.1
ARG	0.1	—	—	—	—	—	—	0.8
PRO	—	5.1	—	5.9	—	19.0	—	4.2

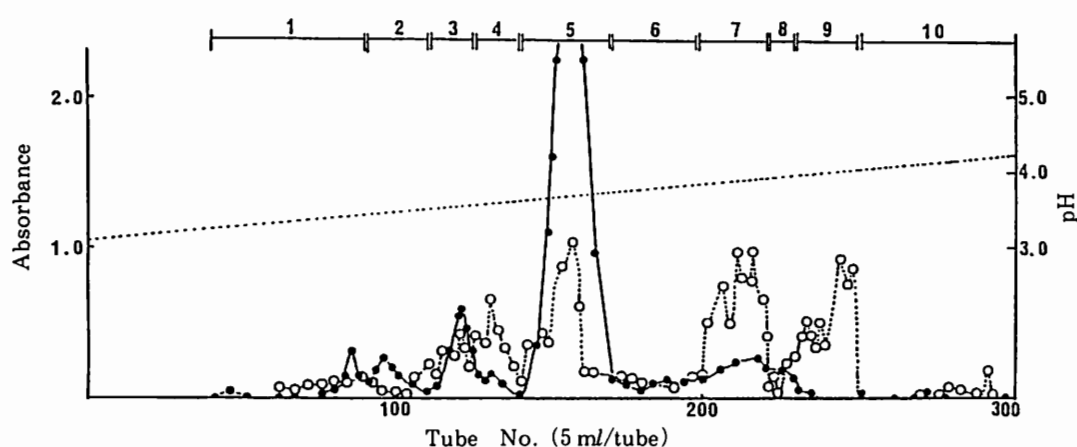


Fig. 4. Chromatography of CF-VI on a Dowex 50W×2 Column.

●—●, ninhydrin test, 0.02ml of each fractions was tested.

○—○, *tert*-butylhypochlorite test, 0.02ml of each fractions was tested. Other informations: see Fig. 3.

Table 12. Free and Total Amino Acids Contents in Each Fraction

$\mu\text{mol/tempe 1 kg}$

Amino Acid	VI-3		VI-4		VI-5		VI-7		VI-9	
	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total	Free	Total
ASP	-	0.93	-	0.12	-	0.02	-	0.11	-	0.04
THR	-	-	0.01	0.02	-	0.02	-	0.07	-	0.05
SER	0.01	-	0.01	0.04	-	0.04	-	0.15	-	0.07
GLU	0.02	4.29	-	1.71	-	0.05	-	0.15	-	0.08
GLY	0.09	1.12	0.02	0.12	-	0.38	0.03	1.81	-	0.14
ALA	0.20	0.19	0.08	0.03	-	0.05	-	0.03	-	0.04
VAL	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYS	0.01	-	-	0.04	-	-	0.03	-	0.04	0.03
MET	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ILE	-	0.02	-	0.01	-	-	-	0.04	-	0.03
LEU	-	0.01	-	0.01	-	-	-	0.03	-	0.04
TYR	-	0.15	0.06	0.91	0.04	0.05	-	0.21	-	0.19
PHE	0.57	4.22	0.06	0.73	4.85	4.42	-	0.54	-	0.14
LYS	-	0.01	-	0.01	-	-	0.01	-	0.07	0.08
HIS	-	-	-	0.02	-	-	-	0.02	-	-
ARG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRO	0.04	0.05	-	0.07	-	-	-	0.36	0.01	0.12

およびグルタミン酸をはじめ、多くのアミノ酸が遊離しており、peptide-richな複雑な画分と考えられる。さらに分離・精製するために、イオン交

換クロマトグラフィーによる分画を検討中である。

ピークⅡ-9は、そのほとんどがリジンであった。

CF-VIのDowex 50w×2のカラムによる分画では、Fig. 4に示すように顕著なピークが多く検出された。画分VI-1～VI-10のうちニンヒドリン反応および *tert*-butylhypochlorite 反応に陽性なピークの遊離および総アミノ酸を、Table 12に示した。

ピークVI-3は、酸加水分解によりグルタミン酸、フェニルアラニン、アスパラギン酸およびグリシンが顕著に遊離しており、これらのアミノ酸を構成成分とするペプチドの存在が示唆された。

ピークVI-4は、酸加水分解によりグルタミン酸、チロシンおよびフェニルアラニンが顕著に遊離しており、VI-3と同様に、これらを構成成分とするペプチドの存在が考えられる。

ピークVI-3, 4はSephadex G-15によるゲル濾過 (Fig. 2) の溶出位置から、トリペプチド以上のものではなく、2個のアミノ酸が結合したジペプチドである可能性が高い。またVI-4は、VI-3と近いため、VI-3の一部の混入も考えられる。したがって、酸加水分解後のアミノ酸分析から、VI-3ではグルタミン酸とフェニルアラニン、およびアスパラギン酸とグリシンが、ほぼ1対1のモル比で存在しているため、これらの組み合わせのペプチドが推定される。またVI-4では、VI-3からのグルタミン酸とフェニルアラニンの組合せのペプチドの混入を考慮すると、グルタミン酸とチロシンが1対1のモル比で存在していることになる。したがってVI-4ではグルタミン酸とチロシンとのジペプチドが推定される。

ピークVI-5は、ほとんどがフェニルアラニンであった。

ピークVI-7は、酸加水分解によりグリシンが遊離しており、プリン骨格を持つ化合物の存在が示唆された。そこでペーパークロマトグラフィーを行ったところ、254 nm 下で黒紫色のスポットを与え、*R_f* 値が標準のアデニンと一致したため、これをアデニンと同定した。

第3項 要 約

Sephadex G-15によるゲル濾過によって得られた画分CF-IIおよびCF-VIをDowex 50W×2を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。CF-IIからは酸加水分解後アスパラギン酸および

グルタミン酸をはじめ多くのアミノ酸が遊離する、peptide-ric なピークII-3を得た。

CF-VIを分画した結果、グルタミン酸とフェニルアラニン、およびアスパラギン酸とグリシンの組合せと推定される、二つのジペプチドを含む画分VI-3を得た。また、隣り合った画分VI-4では、グルタミン酸とフェニルアラニンの他に、チロシンとグルタミン酸との組合せと推定されるジペプチドの存在が示唆された。

第3節 画分VI-3およびVI-4に含まれるジペプチドのHPLCによる精製

前節まではSephadex G-15およびイオン交換体を用いたカラムクロマトグラフィーにより分離・精製を行ってきたが、本節では、比較的精製が容易と考えられる画分VI-3およびVI-4について、原理の異なる、逆相担体を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による精製を試みた。

第1項 実験方法

1. 試 料

VI-3はDowex 50w×2を用いて再カラムクロマトグラフィーを行って精製したが、VI-4はそのまま実験に供した。両画分をロータリーエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥した。この時の両画分の量は、VI-3では14.2 mg、VI-4では7.5 mgであった。

2. HPLCによる分析方法

機器は、日本分光株式会社のTRI ROTAR High Pressure Liquid ChromatographおよびUVIDEC-100-IIIを使用した。カラムは、GLサイエンス株式会社のInertsil prep-ODS 6.0×250 mmを使用し、0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) (pH 2.3): アセトニトリルの溶媒系で分析した。流速は1 ml/min (29~32 kg/cm²) で、モニターは225 nmで行った。

さらに、(株) 島津製作所のPhotodiode Array UV-VIS detector (SPD-M6A) を用いたモニターも行った。

3. HPLCによる分取方法

上記と同様の機器およびカラムを用い、上記分析より得られた結果に基づいて分取を行った。

VI-3は0.6 mlに、VI-4は0.3 mlの溶媒に溶解

して、試料を1回につき30~50 μ l注入し、UV検出器でモニターしながら、分別された各ピークを手動で分取した。

不分離ピークについては、溶媒の組成比を変えて再度分取を行った。

4. 構成アミノ酸の分析

分取したジペプチドについて、前記同様の方法で構成アミノ酸の分析を行った。

5. N末端アミノ酸の決定

Sanger³⁵⁾によって開発されたジニトロフルオロベンゼン法(DNP法)³⁶⁾を用い、N末端アミノ酸を決定した。

少量のペプチド(約0.1 μ mol)を小試験管にとり、1%トリメチルアミン水溶液0.1mlに溶かし、5%1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(FDNB)-エタノール溶液0.2mlを加えて2時間

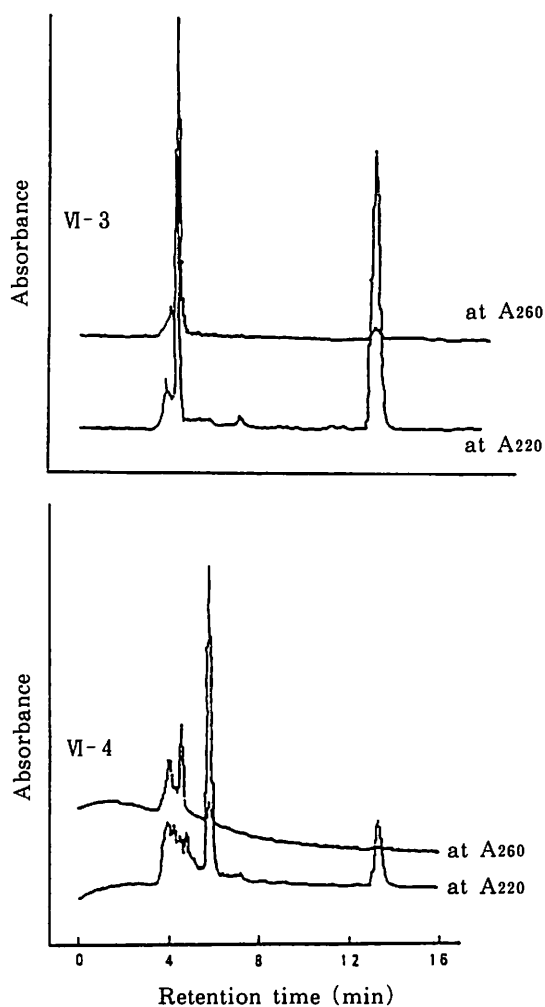


Fig. 5. Analysis of VI-3 and VI-4 by HPLC.

Column, Inertsil prep-ODS (6.0 $\times$ 250mm); Solvent, 0.05% TFA (pH 2.3): CH₃CN (85:15); Flow rate, 1ml/min; Pressure, 29~32kg/cm²; Temperature, 22 $^{\circ}$ C; Detection, 220nm and 260nm.

室温に放置し、DNP 化した。反応物に蒸留水 1 ml と 30% トリメチルアミン水溶液 30 μ l を加えジエチルエーテル抽出を 5 回繰り返して過剰の FDNB を除いた後、水溶液を減圧濃縮乾固して DNP-ペプチドを得た。

同様に標準アミノ酸も DNP 化した。

DNP-ペプチドに 6N 塩酸 1 ml を加えて減圧下で封管した後、105 $^{\circ}$ C, 12 時間加水分解して DNP-アミノ酸とした。

加水分解によって得られた DNP-アミノ酸および遊離のアミノ酸 (C-末端由来のアミノ酸) をペーパークロマトグラフィーによって、各々同定した。東洋濾紙 No.51-C を用い、DNP-アミノ酸では、pH 5.6 リン酸緩衝液 (1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 0.5\text{M}$

NaH_2PO_4) の展開溶媒で、またアミノ酸では *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2, v/v) の展開溶媒で上昇法により展開した。DNP-アミノ酸は、黄色のスポットとして検出され、また、遊離のアミノ酸については、ニンヒドリン反応によって検出した。

第 2 項 結果および考察

VI-3 および VI-4 を ODS のカラムを用いた HPLC によって分析した結果を Fig. 5 に示した。

0.05% TFA: アセトニトリル (85:15) の溶媒系を用いることによって、VI-3 および VI-4 ともに、主な二つのピークに分離した。各々の後ろのピークは溶出時間も等しく、また、VI-3 と VI-4

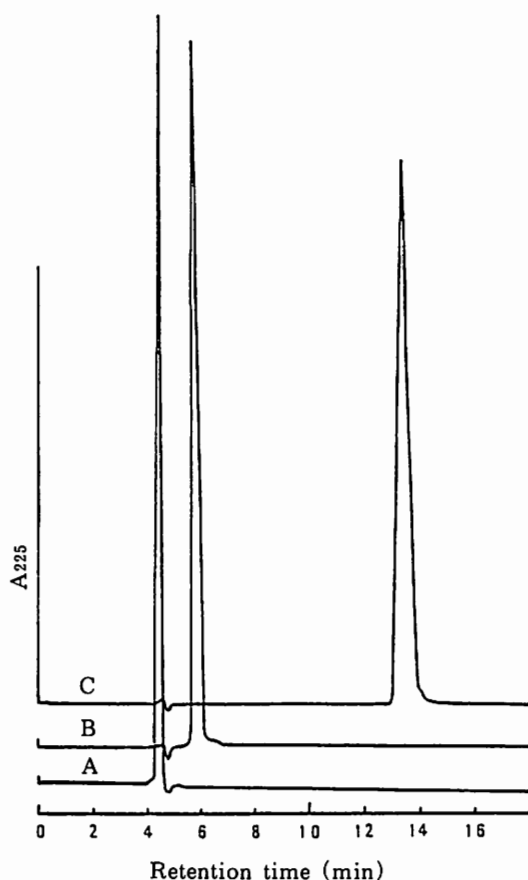


Fig. 6. Analysis of A, B and C by HPLC.

Analytical conditions are as same as indicated in Fig. 5.

がDowex 50w×2のカラムクロマトグラフィーで続いて溶出された画分であったことから、同じ化合物であると断定した。

ここでVI-3およびVI-4から得られた三つのピークを溶出順にA, B, Cとする。同条件で分取を行うと、ピークCについては単独なピークであるため、他の夾雑物と分離することができた。しかしピークAおよびBについては前後の夾雑物と分別できなかった。そこで、溶媒の組成比(0.05% TFA:アセトニトリル)を、Aでは95:5に、Bでは90:10に変えて再度HPLCによる分取を行った。その結果、ピークAおよびBは夾雑ピークと完全に分離することができた。

分取したピークA, BおよびCをロータリーエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥した。ここで得られたA, BおよびCは、各々1.2mg, 2.0mgおよび9.4mgであった。

これらの純度を調べるために、同カラム同溶媒で分析を行った結果は、Fig. 6に示したとおりである。A, BおよびCはそれぞれ他成分を全く含まないクロマト的に単一のピークを与えた。

第2節で推定したように画分VI-3とVI-4では、(Glu, Phe), (Asp, Gly), (Glu, Tyr)の三つのジペプチドが考えられた。

(Glu, Phe)と(Glu, Tyr)は一方の構成アミノ酸が等しく、また、もう一方はどちらも芳香族アミノ酸である。これらのペプチドでは芳香族アミノ酸の性質が強く現われると考えられる。そこで、Photodiode Arrayによる分析を行ったところ、この二つのペプチドのスペクトルは、各々フェニルアラニンとチロシンのスペクトルとほぼ一致した(Fig. 5では、Photodiode Arrayによる検出は220nmと260nmであるが、B, Cともに、わずかに260nmにおける吸収がみられる)。また、HPLCにおける溶出順序は、チロシン、フェニルアラニンの順であり、ジペプチドの場合と同様であった。

これらのことから、Bは(Glu, Tyr), Cは(Glu, Phe)の組み合わせのジペプチドであると推定される。

Aは、そのスペクトルより280nm付近に強く吸収が現われることから、アミノ酸を構成成分とする化合物ではないと考えられる。Aが含まれて

いた画分VI-3では、酸加水分解後、グリシンが多くみられたことから(Table 12)、Aは画分VI-7のアデニンのように核酸構成成分の可能性がある。

また、VI-3中の(Asp, Gly)の組合せのジペプチドについては、HPLCにおける溶出位置は推定できなかった。

A, BおよびCをペーパークロマトグラフィーで分析した結果、Aのスポットはニンヒドリン陰性でありBおよびCはニンヒドリン陽性の単一のスポットを得た。さらに、DNP化後酸加水分解してDNP-アミノ酸およびアミノ酸を同定した結果、BはDNP-Gluとチロシン、CはDNP-Gluとフェニルアラニンが検出された。

BおよびCを酸加水分解後、構成アミノ酸を確認し、BはGlutamyltyrosine, CはGlutamylphenylalanineのジペプチドであると同定した。

さらに、ジペプチドの構造(二ケのアミノ酸の結合様式)を明確にし、官能検査も行いテンペの呈味への係わりを明らかにしたい。

第3項 要 約

画分VI-3およびVI-4について、ODSカラムを用いたHPLCによる分取を行った結果単一の画分を三つ(A, 1.2mg; B, 2.0mg; C, 9.4mg)得ることができた。

これらのうち、BはGlutamyltyrosine, CはGlutamylphenylalanineのジペプチドであると同定された。また、Aは核酸構成成分と推定された。

総 括

インドネシア共和国・ジャワ島の発酵食品の一つであるテンペは、本来大豆を原料として製造されるが、インドネシア共和国では大豆の自給率が低いことから、大豆以外の豆類の利用が考えられている。

本研究で入手した、インドネシア共和国で自給可能な5種類の豆、すなわちベルベットピーン(*Mucuna pruriens*)、ピジョンピー(*Cajanus cajan*)、ウイングドピーン(*Psophocarpus tetragonolobus*)、リマピーン(*Phaseolus lunatus*)、カウピー(*Vigna unguiculata*)および大豆(*Glycine max*)を原料として調製した各

種豆類のテンペについて食品栄養学的な観点から検討を行った。

食品成分分析の結果、タンパク質含量が無水物 100g 当たり 32~52% であり、重要なタンパク質源である知見を得た。また、大豆テンペおよびウィングドビーンテンペのように、タンパク質および脂質の含量が多い群と、ベルベットビーンテンペ、ピジョンピーテンペ、リマビーンテンペおよびカウピーテンペのようにタンパク質および糖質含量が多く脂質含量が少ない群の 2 群に分かれた。

総食物繊維量を示す TDF も 18~34% と多かった。

無機質組成では、リン、カリウムが多く、亜鉛含量が多い特徴と、一部の豆、特にベルベットビーンでは鉄が多い知見を得た。

次に、各種食品の主な呈味成分である遊離アミノ酸、遊離糖および有機酸の組成を分析した。その結果、各種テンペとも、遊離アミノ酸では、アラニンおよびグルタミン酸が、遊離糖では、フラクトース、グルコースおよびスタキオースの多いテンペが多く、有機酸では、リンゴ酸とコハク酸が多いことを知りこれらのまろやかな味がテンペの呈味に関与しているものと推定された。

また、標準菌である *Rhizopus oligosporus* と伝統的スターターであるハイビスカス乾燥葉 (Usar) を利用した種菌の 2 種の種菌によるテンペ成分の差異は、各種豆類において一定の傾向は認められなかった。

また、呈味成分としては、ペプチドも関与すると考えられるが、テンペの場合どのようなペプチドが関係するのか不明である。そこで、これを明らかにするために、低分子ペプチド成分の研究を行った。

まず、日本産大豆テンペ中の低分子ペプチド画分を 80% エタノールで抽出後、イオン交換体およびゲル濾過により分画した。得られた各画分の全窒素、ニンヒドリン陽性物質、遊離および総アミノ酸の分析を行ったところ遊離のアミノ酸はアラニンおよびグルタミン酸が多く、また酸加水分解することによりグルタミン酸、アスパラギン酸、グリシンおよびフェニルアラニンが多く遊離したことからこれらを構成成分とする化合物の存在が示唆された。

これら、いくつかの低分子ペプチド画分のうち、ジペプチドと考えられ、HPLC で分離・精製し、単一となった画分についてアミノ酸分析および DNP 法で N 末端を決定した結果、Glutamyl-phenylalanine および Glutamyltyrosine のジペプチドであると同定した。

以上のことから、大豆ほか各種豆類を原料として調製されたテンペはいずれも食品栄養学的に優れた食品であり、インドネシア共和国においてはタンパク質および無機質の供給源として推奨でき、さらに、大豆テンペは、そのまろやかな呈味から我が国においても複合食品の素材としての利用価値も高いと判断された。

謝 辞

終わりにのぞみ、本研究に関し御指導戴いた農学博士菅原龍幸教授に深く感謝の意を表します。

本論文をまとめるにあたり、御助言を賜った医学博士香川芳子学長、医学博士菊地正一教授、医学博士若林孝雄教授、ならびに理学博士佐久間慶子教授に心から感謝いたします。

また、試料収集と分析に御助言を賜った、女子栄養短期大学 農学博士青柳康夫助教授、医学博士川井英雄助教授、女子栄養大学 佐々木弘子助手、一部成分分析につき御助言と御協力戴いた、関東学院女子短期大学 農学博士吉田博教授、女子栄養短期大学 春日敦子助手、山田聡子氏、筑波大学 農学博士小澤哲夫助教授、農学博士根岸 紀助手、分析に御協力下さった女子栄養大学食品化学研究室の陳淑良、苦井暁子、日笠志津、須藤文乃、中村珠美、中村幸子の諸嬢ならびに、テンペにつき種々御教授して戴き、日本のテンペ入手にも御助力戴きました東京農業大学 農学博士小崎道雄教授、テンペを提供下さいましたマルサンアイ株式会社に深く感謝の意を表します。

なお、本論文は 1992 年女子栄養大学博士 (栄養学) 学位請求論文として提出し、学位授与して戴いたものです。

文 献

- 1) 前田和美: マメと人間, 初版 (古今書院, 東京), p.174 (1987).
- 2) 吉川誠次: 大豆, 初版 (女子栄養大学, 東京),

- p.166 (1984).
- 3) 渡辺篤二・海老根英雄・太田輝夫：大豆食品，3 版（光琳，東京），p.8 (1984).
 - 4) 小崎道雄，内村 泰：食の科学，144，23 (1990).
 - 5) TRANGGONO, SUTARDI, SUDARMANTO: Oligosaccharides and Phytates at Various Stages of Producing Tempehs from unconventional Beans, p.1 (1990).
 - 6) AGOSIN, E., DIAZ, D., ARAVENA, R., and YANEZ, E.: *J. Food Sci.*, **54**, 102 (1989).
 - 7) 瓦井くみ子，菊地恭二，青木定夫：栃木県食品工業指導所昭和59年度新製品開発事業報告書，1 (1985).
 - 8) SUTARDI and BUCKLE, K.A.: *J. Appl. Bacteriol.*, **58**, 539 (1985).
 - 9) 草野愛子：栄養と食糧，24，8 (1971).
 - 10) 高橋 慧，島川 武：愛媛県工業試験場業績 **199**，14 (1976).
 - 11) 菅原悦子，伊東哲雄，米倉裕一：日食工誌，**37**，520 (1990).
 - 12) MURATA, K., IKEHATA, H. and MIYAMOTO T.: *J. Food Sci.*, **32**, 580 (1967).
 - 13) 松本伊左尾，今井成一：日食工誌，**37**，130 (1990).
 - 14) 岡田憲幸：醸協，**81**，464 (1986).
 - 15) 科学技術庁資源調査会：四訂日本食品標準成分表，初版，24 (1982).
 - 16) Report of the Committee on Calorie Conversion Factors and Food Composition Tables: Energy-Yielding Components of Food and Computation of Calorie Values, (FAO, Washington, D.C.) (1947).
 - 17) 農林水産技術会議事務局：食品分析研究会報告書，29 (1973).
 - 18) 印南 敏，池上幸江，中村カホル，土橋文江，綾野雄幸，菅原龍幸，森 文平，中村尚夫，石原英子，米山 智，金田よしみ，金谷健一郎，山田浩平，吉岡敏夫：栄食誌，**41**，43 (1988).
 - 19) 関千加代，佐藤耕一：農林規格検査所調査研究報告，**12**，26 (1988).
 - 20) 堤 忠一，小泉英夫，吉川誠次，森井ふじ，小林純：食総研研究報告，**34**，132 (1979).
 - 21) FARDIAZ, D., NOOR, Z., KOZAKI, M., SUGAHARA, T., TSUJIMURA, M. and TADOKORO T.: Studies on the Nutrition Aspects of Indigenous Fruits, Vegetables and Some Processed Foods in Indonesia, p.26 (1989).
 - 22) 田口邦子，河端 信，大槻耕三，田中敬子：栄食誌，**39**，203 (1986).
 - 23) 松尾真砂子，湯本淑子：栄食誌，**42**，385 (1989).
 - 24) SMITH, A.K., RACKIS, J.J., HESSELTINE, C.W., SMITH, M., ROBBINS, D.J. and Booth, A.N.: *Cereal Chem.*, **41**, 173 (1962).
 - 25) STILLING, B.R., HACKLER, L.R.: *J. Food Sci.*, **30**, 1043 (1965).
 - 26) SORENSON, W.G. and HESSELTINE, C.W.: *Mycologia*, **58**, 681 (1966).
 - 27) 平 春枝，田中弘美，斉藤昌義，斉藤正隆：日食工誌，**37**，203 (1990).
 - 28) OZAWA, Y., SUZUKI, K., TAJIMA, O. and Mogi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1371 (1972).
 - 29) 青柳康夫：女子栄養大学紀要，**14**，111 (1983).
 - 30) YEMM, E.W. and COOKING, E.C.: *Analyst*, **80**, 209 (1955).
 - 31) RYDON, N. and SMITH, P.W.G.: *Nature*, **169**, 922 (1953).
 - 32) KIMURA, M., MURATA, K., NOMOTO, M. and FUJITA, Y.: *J. Chromatogr.*, **41**, 458 (1969).
 - 33) MARKHAM, R. and SUMITH, J.D.: *Nature*, **164**, 1052 (1949).
 - 34) 岡井秀雄：食品と開発，**23**，28 (1989).
 - 35) SANGER, N.: *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
 - 36) 池中徳治：生化学実験講座 **1**，タンパク質の化学Ⅱ，（東京化学同人，東京），p.121 (1976).