

API-ZYMシステムによるテンペ抽出液の酵素と原料大豆たん白質可溶性画分の変化

藤尾, 雄策
九州大学農学部食品製造工学教室

スプリアント
九州大学農学部食品製造工学教室

早川, 功
九州大学農学部食品製造工学教室

<https://doi.org/10.15017/23343>

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 45 (1/2), pp.37-40, 1990-12. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

API-ZYM システムによるテンペ抽出液の酵素と 原料大豆たん白質可溶性画分の変化

藤 尾 雄 策・スプリヤント・早 川 功

九州大学農学部食品製造工学教室

(1990年6月25日 受理)

Enzyme Detection of Tempeh Extract with API-ZYM System and Changes of Soluble Protein

YUSAKU FUJIO, SUPRIYANTO and ISAO HAYAKAWA

Laboratory of Food Processing, Faculty of
Agriculture, Kyushu University 46-02, Fukuoka 812

緒 言

テンペは主にインドネシア、マレーシアにおいて、たん白質およびビタミン類の給源として数世紀にわたり食用に供されている大豆発酵食品 (Winarno, 1979; 村田, 1971; Saono *et al.*, 1982 and 1986) である。最近では先進国においても中高年層の成人病予防の為に効果のあるたん白質給源として見直されつつある。テンペに関しては発酵微生物 (Sorenson and Hesseltine, 1966; Saono, *et al.*, 1982 and 1986), 栄養価値 (Murata, *et al.*, 1970; 村田, 1971; Kao and Robinson, 1978; Saono, *et al.*, 1982; Wang, 1984), 抗酸化物質 (Ikehata, *et al.*, 1968; Packett, *et al.*, 1971; 杉本・村田, 1972; Gyorgy, *et al.*, 1974; Stahl and Sims, 1986), ビタミン (Truesdell, *et al.*, 1987), についての研究がなされてきた。テンペに含まれる酵素類に関しては、わずかに β -glucosidase (江幡ら, 1972), phytase (Sudarmadji and Markakis, 1977) に関する研究がみられるのみである。テンペ発酵が原料大豆たん白質の栄養的性質を改善し、大豆臭を消失させ好ましい香気を生成する事実はよく知られており、これらは発酵菌の酵素作用によるものと考えてよい。しかしながら、テンペ発酵菌と発酵テンペに存在する酵素類との関係に関しては、これまで殆ど知られていない。

本研究は、まずテンペ発酵スタータ種により菌体外酵素の検出とその種類、発酵中の可溶性大豆たん白質の変化について知見を得ることを目的とした。

材料と方法

原料大豆：1988年度日本九州産の大豆 (*Glycine max*, 乾物基準粗たん白質含量, 42%) を使用した。

スタータ：インドネシア産、ラギ1, ラギ2, ラギ3 (Ragi, 種麴) とラギから分離した典型菌, *Rhizopus* sp UQM 186F (Sukara and Doelle, 1989) および *R. javanicus* IFO 5442 を使用した。これらのうちラギ1 (Tanuwidjaja and Roestamsjah, 1985) は *R. oligosporus* ITB L 36 を主要菌として調製したもので、基準となるスタータである。

テンペの調製：原料大豆200gを沸騰水中で20分間煮沸した後、大豆表面の薄皮を取り去り、十分に水を切る。この脱皮大豆を121°Cで20分間オートクレーブした。十分冷却して水を切った後、適当なプラスチック袋に入れ、0.2gのラギ、または3mlの孢子懸濁液を添加して十分攪はんした後、平板状にして30~35°Cで24~30時間発酵させテンペとした。

酵素抽出液の調製：酵素抽出液は原料大豆、オートクレーブ大豆、テンペについて調製した。まず、それぞれの試料を微粉碎し、凍結乾燥する。凍結乾燥物2gを10mlの蒸留水に懸濁し、攪はんしながら30°Cで30分抽出した。遠心分離で固形分を除去した上澄液を酵素液とした。

酵素の検出: API-ZYM システム (API ZYM System, La Balme les grottes 38390 montalieu vercieu, France) を酵素の検出に使用した。API-ZYM は19種類の酵素の検出が可能で、酵素活性の強さも大略値が判定できる。

たん白質とアミノ酸の定量: 固体試料はケルダール法 (Barker, 1961) による窒素量に換算係数5.71を乗じた値とした。可溶性たん白質は凍結乾燥した試料 1 g を 15ml のリン酸緩衝液 (0.5M, pH7.6) に懸濁し、30°C で24時間攪はんしながら抽出した。遠心分離の後、上澄液に大豆油分が含まれている際には 5 : 1 の割合でクロロホルムを添加し、数分間よく攪はんした後、遠心分離して脱脂した。この上澄液に終濃度が 5 % となるように TCA を添加し、生成した沈澱を遠心分離で除去した上澄液をアミノ酸画分とし、沈澱をさらにリン酸緩衝液に溶解し、これを可溶性たん白質画分とした。可溶性たん白質はビュレット法 (Gornell, *et al.*, 1949) により牛血清アルブミンを基準として定量し、アミノ酸画分はニンヒドリン法 (Moor and Stein, 1954) でグリシンを基準として定量した。結果はそれぞれ凍結乾燥試料基準重量%に換算した。

結果と考察

発酵テンペに検出される酵素

スタータ種によって 5 種類のテンペを調製し、それぞれのテンペより検出された酵素スペクトルを原料大豆、オートクレープし薄皮を除去した大豆とともに第一表に示した。API-ZYM 法 (Sharp *et al.*, 1980) は本来細菌分類のため、その構成酵素を検出する方法として開発された。この方法で19種の酵素が検出可能で、同時に酵素活性の強さが 0 (活性なし) ~ 5 (強い活性) まで酵素反応による発色の程度に従って 6 段階で表示出来る。全試料の酵素スペクトルを比較すると、まず、原料大豆からは13種の酵素が検出された。その殆どは加水分解酵素群で、検出された中でも特にフォスファターゼ関連酵素の活性が強く、ついでたん白質分解酵素活性が強い。これら原料大豆で認められた酵素群は、当然ではあるが、すべてオートクレープ大豆では消失した。*R. sp* UQM 186F, *R. javanicus* IFO 5442, ラギ 1, ラギ 2 をスタータとした 4 種のテンペでは、多少活性の強さに相異が認められるものの、12 種の同一酵素が検出された。ラギ 3 テンペは他のテンペと異なり、たん白質分解酵素系は弱く、他のテンペには検出されなかった α -および β -ガラクトトダーゼの強い活性が認められた。この事実はラギ 3 がバクテ

Table 1. Enzymes detected in Tempeh

| Sample | Auto clave | Soy bean | 186F | IFO 5442 | Ragi 1 | Ragi 2 | Ragi 3 |
|--|---------------|-------------|------|-------------|--------|--------|--------|
| 0) Reference | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1) Phosphatase alkaline | 0 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2) Esterase (C4) | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 3) Esterase Lipase (C8) | 0 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 |
| 4) Lipase (C14) | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5) Leucine arylamidase | 0 | 0 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 |
| 6) Valine arylamidase | 0 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 7) Cystein arylamidase | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 8) Trypsin | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9) Chymotrpsin | 0 | 3 | 1 | 1 | 3 | 2 | 1 |
| 10) Phosphatase acid | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 11) Phosphoamidase | 0 | 5 | 3 | 4 | 5 | 4 | 5 |
| 12) α -galactosidase | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 13) β -galactosidase | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| 14) β -glucuronidase | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15) α -glucosidase | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16) β -glucosidase | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 17) N-acetyl- β -glucosaminidase | 0 | 5 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 |
| 18) α -mannosidase | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 5 |
| 19) α -fucosidase | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Table 2. Protein and Amino Acids Before and After Tempeh Fermentation

| Protein/Amino Acids | Raw soybean | Autoclaved soybean | <i>Rhizopus</i> IFO 5442 | <i>Rhizopus</i> 186F | Ragi 1 | Ragi 2 | Ragi 3 |
|------------------------------|-------------|--------------------|--------------------------|----------------------|--------|--------|--------|
| Crude Prorein ¹ | 41.9 | 45.0 | 44.8 | 44.5 | 44.6 | 45.5 | 45.8 |
| Soluble protein ² | 10.4 | 10.4 | 4.2 | 3.4 | 6.3 | 4.6 | 5.0 |
| Amino acids ³ | 0.5 | 0.4 | 5.2 | 5.6 | 7.0 | 4.3 | 4.2 |

Numerals in table were grams per 100grams of freeze dried soybean (w/w).

1) Crude nitrogen was determined by Kjeldahl method with a conversion factor of 5.71.

2) Soluble protein was determined by Biuret method with a standard of BSA.

3) Amino acid including oligopeptide was determined by Ninhydrin method based on glycine standard.

リア, 酵母を含む特殊用途のスタータであることに由来するものと考えられる。原料大豆に存在するトリプシンの強い活性はテンペには認められなかった。いずれにしても、原料大豆成分からするとテンペ発酵では、最終品質に拘わる主要酵素はエステラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼと考えてよい。多糖分解酵素では原料大豆に検出されない β -グルコシダーゼが発酵により生成するが、 α -グルコシダーゼは、5種のテンペいずれにも検出されなかった。これは原料大豆に含まれる多糖成分によるものと考えられる。

テンペ発酵による原料大豆可溶性たん白質の変化

それぞれの試料について、粗たん白質、可溶性たん白質、アミノ酸(5% TCA で沈澱しないオリゴペプチドを含む)の分析値を第二表に示した。基準となるテンペ発酵前の分析値はオートクレーブ大豆が相当する。原料大豆とオートクレーブ大豆とを比較すると、粗たん白質量がオートクレーブ大豆で増加しているが、これは凍結乾燥物を基準としたため、剥皮による原料大豆重量の減量効果と、オートクレーブによって原料大豆に含まれる糖質の溶出(浅野ら, 1989)によるものである。テンペ発酵により、オートクレーブ大豆に含まれる不溶性たん白質量に変化が認められないが、可溶性たん白質はその半量程度がアミノ酸画分へ変化していることが明らかとなった。この変化は発酵によって生成するプロテアーゼによって可溶性たん白質が加水分解されて生じると考えてよい。このアミノ酸画分は第一表のキモトリプシン活性の強さに相当している。アミノ酸画分はテンペの食味に関係するものと考えられる。特にラギ1では第一表に示されるように、キモトリプシン活性が強くアミノ酸画分の量が多い。ラギ1が食味のよいテンペ製造のスタータとしてインドネシアで広く使用されている理由であろう。テンペの食味はほとんどこの画分に依存しているものと推察される。一方、特に注目されるのは、不溶性たん白質量が

発酵前後で殆ど変化しない点にある。つまり、24時間のテンペ発酵では不溶性たん白質は可溶性しないことを意味している。不溶性たん白質の適切な構造分析法が見当たらないので、このたん白質が改質、変化しているか否かは不明である。

要 約

大豆テンペの酵素系をAPI-ZYM法で19種の酵素について明らかにした。その結果、ラギをスタータとしたテンペでは、12~15種の酵素が生成していることが判明した。また、リゾプス典型菌2種をスタータとしたテンペでは、12種の酵素が検出された。これら検出された酵素はいずれも加水分解酵素を主体とするものであった。

テンペ発酵によって、原料大豆たん白質の可溶性画分のうち、約半量がアミノ酸画分に変化した。このアミノ酸画分の量はテンペに含まれるプロテアーゼ活性の強さに相当する傾向を示した。一方、不溶性たん白質画分はテンペ発酵によっても変化しないことが示された。大豆のテンペ化による大豆食味の改善は、発酵によって生成するプロテアーゼによって可溶性たん白質が低分子化することによるものと推察された。

文 献

- 浅野三夫・大久保一良・山内文男 1989 大豆からのしんじゅつ成分挙動に及ぼす浸漬温度の影響。日本食品工業学会誌, 36: 636~642.
- Barker, P. R. W., 1961 The micro-Kjeldahl determination of nitrogen. *Talanta*, 8: 57-71.
- 江幡淳子・福田靖子・平井和子・村田希久 1972 テンペの抗酸化性物質の生成に関与する β -グルコシダーゼ。日本農芸化学会誌, 46: 323~329.
- Gornell, A. G., C. S. Bardawill and M. M. David 1949 Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177: 751~766.
- Georgy, P., K. Murata and Y. Sugimoto 1974

- Studies on antioxidant activity of tempeh oil. *JAACS*, **51**: 377~389.
- Ikehata, H., M. Wakaizumi and K. Murata 1968 Antioxidant and antihemolytic activity of a new isoflavone "factor 2" isolated from tempeh. *Agric. Biol. Chem.*, **32**: 740~746.
- Kao, C., and R. J. Robinson 1978 Nutritional aspects of fermented foods from chickpea, horsebean, and soybean. *Cereal Chem.*, **55**: 512~517.
- Moor, S. and W. H. Stein 1954 A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, **211**: 907~913.
- Murata, K., T. Miyamoto, E. Kokufu and Y. Sanke 1970 Studies on the nutritional value of tempeh. *J. Vitaminol.*, **16**: 281~284.
- 村田希久 1971 発酵大豆, テンペイ (Tempeh) の栄養価に関する研究. 大阪市立大学家政学部紀要, **18**: 19~33.
- Packett, L. V., L. H. Chen and J. Y. Liu 1971 Antioxidant potential of tempeh as compared to tocopherol. *J. Food Sci.*, **36**: 798~799.
- Saono, S. 1982 Traditional food fermentation as industrial resources in ASCA countries, (Proceedings of a technical seminar, February 9~11, 1981, Medan Indonesia) eds. Saono, S., F. G. Winarno and D. Karjadi Published by the Indonesian institute of science (LIPI), Jakarta, Indonesia.
- Saono, S. 1986 A concise handbook of indigenous fermented foods in the ASCA countries, eds. Saono, S., R. R. Hull and B. Dhamcharee Published by the Indonesian institute of science (LIPI), Jakarta, Indonesia.
- Sharp, R. J., K. J. Brown and A. Atkinson 1980 Phenotypic and genotypic characterization of some thermophilic species of *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, **117**: 201~210.
- Sorenson, W. G. and C. W. Hesseltine 1966 Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus oligosporus*. *Mycologia* **58**: 681~680.
- Stahl, H. D. and R. J. Sims 1986 Tempeh oil antioxidant (?). *JAACS* **63**: 555~556.
- Sudarmadji, S. and P. Markakis 1977 The phytate and phytase of soybean tempeh. *J. Sci. Fd. Agric.*, **28**: 381~383.
- 杉本温美・村田希久 1972 テンペイの抗酸化性有効物質の検索. 大阪市立大学家政学部紀要, **20**: 13~19.
- Sukara, E. and H. W. Doelle 1989 A one-step process for the production of single cell protein and amyloglucosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**: 135~140.
- Tanuwidjaja, L. and Roestamsjah 1985 Preparation and utilization of powder form inoculum for tempe fermentation. *ASEAN Food Journal*, **1**: 22~24.
- Truesdell, D. D., N. R. Green and P. B. Acosta 1987 Vitamin B₁₂ activity in miso and tempeh. *J. Food Sci.*, **52**: 493~494.
- Wang, H. L. 1984 Tofu and tempeh as potential sources in the western diet. *JAACS* **61**: 528~534.
- Winarno, F. G. 1979 Fermented vegetable protein and related foods of southeast asia with special reference to Indonesia. *JAACS* **56**: 363~366.

Summary

Roughly 12 to 15 kinds of enzymes, most of which belong to hydrolase, can be detected in soybean tempeh by API ZYM system. The formation of these enzymes and their activities are dependent on the type of tempeh starter, such as *Rhizopus* strain and Ragi, used for the fermentation. Among the commonly used starters, Ragi 1, 2, and 3, which are Indonesian tempeh starters, produce a higher protease activity compared to the *Rhizopus* strain. Although soluble protein content in an autoclaved soybean (starting material) decreases to about one half of the initial value during the tempeh fermentation, free amino acids increases by about 10 folds compared to the initial value. It has been determined that the free amino acids can be produced by the hydrolysis of soluble proteins contained in the autoclaved soybean under the existence of the protease formed in the tempeh.