

近赤外分光法による大豆発酵食品 「テンペ」の発酵状態評価の可能性

The feasibility of the fermentation condition evaluation of
“tempeh” which is soybean fermented food by NIR Spectroscopy

坂井 絵美^{1,2)}, 片山 詔久²⁾

Emi SAKAI, Norihisa KATAYAMA

テンペはインドネシアの伝統的な発酵食品であるが、近年では良質なたんぱく質源として、さらには健康食品として他の国でも注目されるようになった。日本でも一部地域では学校給食に導入されている。しかし、様々な発酵条件がテンペの嗜好性に影響するにもかかわらず、その見極めは勘に頼るのが現状である。そこで、近赤外分光法を用いた発酵状態の評価の可能性を検討することを目的に本研究を行った。その結果、テンペの発酵による変化や内部の発酵状態を推察することができた。

The fermented soy food “tempeh”, which is a traditional cuisine and ingredient in Indonesia, has recently been drawn attention as healthy food and good source of protein even in the other countries. Tempeh has also been introduced as a school lunch in some parts of Japan. Although the complicated fermentation conditions are very important for both substantial quality and taste, the conventional method is depending on experience and intuition. Therefore, we performed this study for the purpose of examining the feasibility of the evaluation of fermentation condition by using NIR spectroscopy. It is described that NIR is useful non-destructive analysis for chemical changes in fermenting process and internal condition of tempeh.

キーワード：テンペ、発酵、近赤外分光法
tempeh, fermentation, NIR spectroscopy

はじめに

テンペ (tempeh) は、原料にテンペ菌と呼ばれるクモノスカビ (*Rhizopus*) を植菌して発酵させる発酵食品である^{1,2)}。テンペは、もともとはインドネシア

の伝統的な発酵食品であるが、原料として主に大豆が用いられることから良質なたんぱく質源として、さらには健康食品として他の国でも食されるようになった。日本では、1980年代の販売開始当初は一般家庭へ

¹⁾名古屋文理大学短期大学部 ²⁾名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

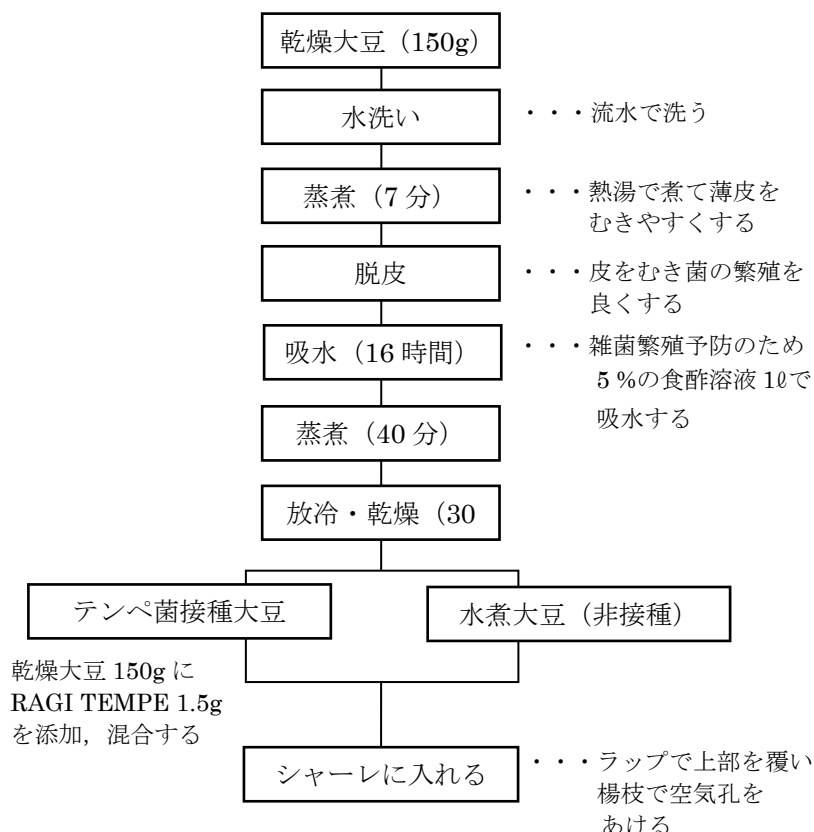


図1 試料の調整工程

の普及が難しい状況であったものの、近年の健康志向、安全・安心志向からテンペの栄養が見直され³⁾、2000年より日本食品標準成分表にもその成分値が記載されるようになった⁴⁾。現在では、オーガニック食品専門店のほか一般の量販店でも購入できるようになりつつあり、その淡白な風味が調理に幅広く応用できる点、地産地消や食糧自給率の向上の観点から、一部地域では国産大豆100%使用のテンペが学校給食などに導入されている。こうした動きは大豆の消費拡大にもつながり、国産大豆の生産振興に取り組む農林水産省も歓迎しており、テンペは今後が期待される食品である⁵⁾。

テンペは、テンペ菌と大豆があれば家庭で手作りすることができる。しかし、発酵条件によりその状態が異なるにもかかわらず、菌糸がコロニーになるまでの間は視覚的な変化がほとんど無いため、目視観察によって状態を極めることが難しい。また、テンペの発酵状態の判定に従来の成分分析を用いた場合、破壊分析を用いる点、分析に時間がかかる点などから、同一

サンプルの経時的変化を観察することは不可能である。しかし、非破壊かつ簡便な分析法として近年注目されている近赤外法を用いて発酵状態を判定すれば、同一サンプルにおける経時的変化の観察も期待できる。

近赤外分光法とは、波長域800~2500nm (波数で表すと12500~4000cm⁻¹) の光の吸収に基づく分光法であり、スペクトル解析にはケモメトリックスが用いられる。ケモメトリックスとは、近赤外の複雑なスペクトルデータから不要な変動を取り除き必要とするデータのみを分離抽出するために行われるデータ処理のことである。その手法としては、主成分分析を行うことで異なる波長 (バンド) において同じ要素に起因するスペクトルの変動をひとつの主成分としてまとめて解釈し、得られた主成分のスコア (各サンプルの主成分の得点) を用いて分析することが一般的である。

近赤外分光法は透過性に優れていることが特徴であり、水の吸収強度がかなり弱いいため水の影響を受けに



図2 測定の様子

(左：フルーツセレクトー K-BA100R)

(右：VECTOR22/N)

くく、食品のように一般に水を多く含む対象に有効であることから果物・野菜・魚などを丸ごと分析することも可能である。近年、食品・農産物分析分野において多岐にわたり応用されており、米の食味値や醤油のJAS 格付け検査など原料から中間製品および製品の品質管理を目的に広く普及している⁶⁻⁸⁾。また、ポータブルタイプのハンディ分光計を用いれば屋外での測定も可能であり、誰にでも簡単に測定することができる(熟練を要しない)という利点から、畑や魚市場での分析や品質管理にも利用されている。

このような近赤外分光法の特徴を利用し、発酵状態を非破壊分析で逐次追跡することにより、テンペの発酵による内部状態の変化および評価における近赤外分光法適用の可能性を検討することを目的として本研究をおこなった。

方法

1. 試料の調整

試料の調製工程をフローチャートで示すと図1のようになる。

テンペの材料となる大豆は、ユウヅル(平成22年度北海道産)を使用した。まず、乾燥大豆150gを流水で洗浄し、熱湯中で7分間蒸煮して薄皮をむきやすくした。

次に大豆の薄皮を取り除いた。この操作はテンペ菌の繁殖をよくするためにおこなうものである。脱皮した大豆は雑菌繁殖予防のため、5%の食酢溶液で16時間吸水させた。吸水が完了した大豆は、熱湯中で40分間蒸煮し、ザルにあげて水切りしながら30分間放置することで放冷および表面の乾燥をおこなった。

その後、スターターを接種した。スターターとしては RAGI (テンペ菌にキャッサバ澱粉を混合したもの)

を使用した。テンペ菌には純粋培養したものもあるが、今回は一般に流通していて比較的入手しやすいスターターとして RAGI TEMPE (RAPRIMA 社製 インドネシア産) を(有)ファテマより購入し利用した。添加量は乾燥大豆150g に対し、RAGI TEMPE 1.5g とした。

なお、テンペとの比較のためにテンペ菌接種以外の工程は同様に処理した水煮大豆を作成した。

テンペ菌接種大豆および水煮大豆は6個のガラス製のシャーレに入れ、ラップで上部を覆い、楊枝で空気孔をあけた。

2. 発酵と近赤外スペクトル測定

発酵は32℃で24時間とし、インキュベーターは、サンブラテック製の P-BOX を用いた。近赤外吸収スペクトルは、2種類の装置を用いて測定した。可視領域から近赤外第1領域の測定にはクボタ製の青果物品質評価装置フルーツセレクトー K-BA100R を用い、測定条件を波長域500~1000nm (波数域20000~10000cm⁻¹)、蓄積時間80~160nm、スキャン回数10回として測定した。一方、波長域が近赤外第2領域および第3領域の測定には、積分球を付加した Bruker 製の VECTOR22/N を用い、測定条件を波長域800~2500nm (波数域12500~4000cm⁻¹)、分解能 8 cm⁻¹、積分回数64回として測定した。

いずれのスペクトル測定においても、シャーレ下部から近赤外光をあて、いくつかの部位を発酵開始から1時間ごとに測定した。

3. ケモメトリックス

本研究では、得られた近赤外スペクトルについて主成分分析を用いたケモメトリックスによる解析を行

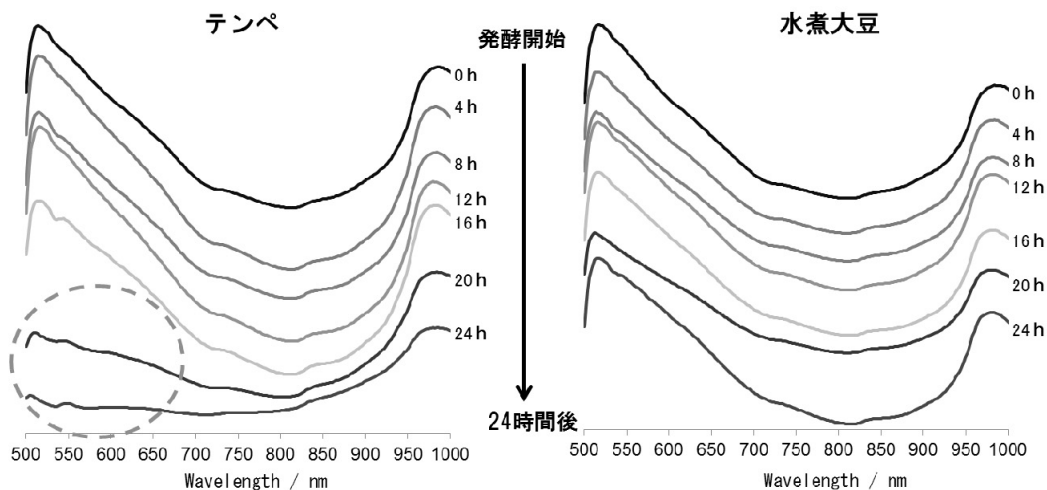


図3 テンペおよび水煮大豆における発酵開始から24時間の近赤外呼吸スペクトル

い、テンペの発酵状態の判定方法を検討した。

ケモメトリックス計算は市販ソフトウェアである Unscrambler X を使用し、主成分分析およびクラスター分析をおこなった。その際、スペクトルデータの前処理は特にせず、測定した波長領域のうち550～950nm または900～2500nm のデータを使用した。

結果および考察

1. ポータブル近赤外分光計による測定結果 (500～1000nm)

1-1 テンペ（接種）と大豆（非接種）の近赤外スペクトル

図3にポータブル型装置による、テンペ（接種したもの）と大豆（接種していない水煮大豆）の近赤外吸収スペクトルを示す。

発酵開始から終了までのどの状態において、テンペ、大豆のどちらの場合も、可視領域に相当する700nmより短波長領域と800～900nmに幅広い吸収があり、650～800nm付近では吸収は弱いことが分かった。

テンペと大豆の近赤外スペクトルを比較すると、発酵開始時は互いに似たスペクトルを示したが、発酵が進むにつれて発酵過程でテンペだけに起こる変化を観察することができた。このことから、テンペと大豆の何らかの違いを近赤外分光計で測定できることが分かった。

一般的に言われているように、食品のスペクトルには様々な要因が相互にかかわりあっているため、本研

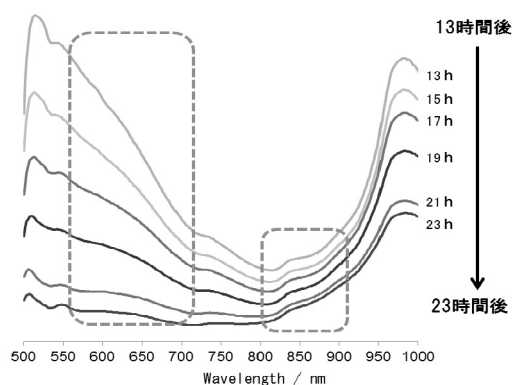


図4 菌糸確認後のテンペの近赤外呼吸スペクトル

究で得られたスペクトルからそれぞれの吸収バンドを帰属することは難しいが、発酵による成分変化や構造変化がこのようなスペクトルの変化の要因の一つと考えられる。

1-2 テンペ発酵過程の測定スペクトルの変化

いずれのテンペのスペクトルも発酵が進むにしたがって、可視領域に相当する700nmより短波長領域の吸収が大きく減少したほか、800～900nmの吸収がやや強くなった。スペクトル変化のタイミングは菌糸を肉眼で観察してから2時間後であった。発酵過程に個体差があったものの、変化のタイミングは全ての試料に共通しており、目視観察とこの近赤外領域でのスペクトル変化との間には相関がみられた。

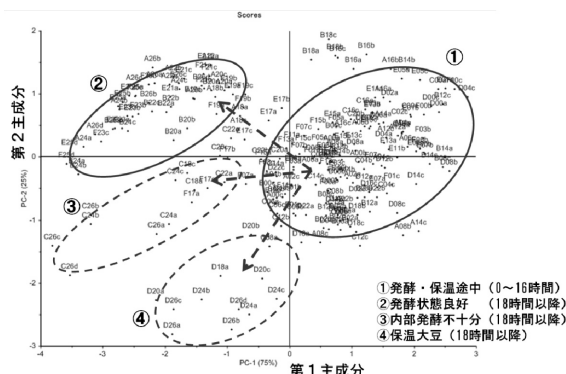


図5 ポータブル近赤外分光計で測定した発酵過程の近赤外スペクトルにおける主成分分析のスコアプロット

菌糸確認後の近赤外吸収スペクトルを図4に示す。菌糸確認（13時間後）から2時間後に600nmと980nm付近の吸収が同程度の吸収強度になり、その後700nmより短波長の領域の吸収強度が特に弱まることが分かった。なお、この傾向はすべてのテンペにおいて同様にみられた。

700nmより短波長の領域は、可視領域の波長であることから、白い菌糸の密生による色の変化や、菌糸の密生による光の透過率の変化がスペクトルの大きな変化に関係していると考えられる。

1-3 ケモメトリックスを用いた主成分分析によるスペクトルの解析 (550~950nm)

図5は、ポータブル近赤外分光計の測定データを主成分分析し、第1主成分と第2主成分のスコアをプロットしたものである。その結果、発酵状態によっていくつかのグループに分けることができた。

発酵開始から約15時間が経過するまでは、テンペ菌の接種の有無や発酵状態にかかわらずスコア値は図の①付近に集まった。発酵が進むにつれて、スコアは左へ移行する傾向があり、発酵・保温過程後半になるとテンペ菌接種の有無や発酵状態によって3つに分かれた。テンペ菌を接種した試料は、②または③付近に、テンペ菌を接種しなかったものは④付近にスコア値が集まった。

ここで、②付近と③付近にあらわれたテンペを切断した際の断面を図6に示す。

図に示した2つのテンペは、どちらも白い菌糸に覆われており見た目に差が無いように見えた。しかし、

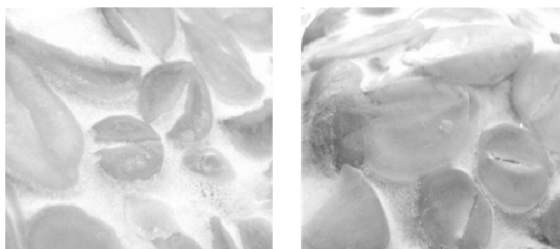


図6 テンペの断面
(左: ②発酵状態良好 右: ③内部発酵不十分)

切断面を観察すると②のテンペの方が菌糸の成長が良く、内部の発酵状態が良好であった。一方、③はテンペ内部で菌糸が確認できたものの成長が不十分であり、豆と豆の間に若干隙間が残っていた。この結果から、スコアプロットにおいて内部まで菌糸が密集し発酵状態が良好なものは②付近に、内部の発酵が不十分なものは③付近に分類されたことが分かった。このように、外観やテンペの表面からは判断できない、テンペ内部の発酵状態の判断に近赤外分光法を利用できる可能性があることが分かった。

2. 積分球型近赤外分光計による測定結果 (800~2500nm)

1) テンペ発酵過程の測定スペクトルの変化

積分球型近赤外分光計による、発酵開始から28時間後までの同一試料における測定スペクトルを図7に示す。なお、他のテンペを測定した結果についてもほぼ同様のスペクトルが得られた。

水の吸収バンドは1200nm, 1450nm, 1950nm付近にみられ、1700~1800nmには脂質、2300nm付近には脂質およびたんぱく質の吸収バンドがみられた。

テンペの発酵が進むにつれて測定スペクトルの吸収は全体的に弱まり、脂質やたんぱく質に起因するバンドは特に吸収が弱まった。スペクトルの吸収強度の減少は肉眼で菌糸を観察できる状態から目立ち始めるが、特に大きな減少はその2時間後に起こった。

このことから、スペクトル全体の吸収強度の減少には菌糸の成長による光の透過率の変化が影響していると考えられる。しかし、脂質やたんぱく質に起因するバンドの吸収が特に弱まることから、スペクトルの吸収強度の減少は単に近赤外光の透過率の変化だけが影響しているのではなく、大豆に含まれる成分の変化が関係している。テンペ発酵過程では、大豆の中性脂肪が遊離脂肪酸に、たんぱく質が遊離アミノ酸に分解さ

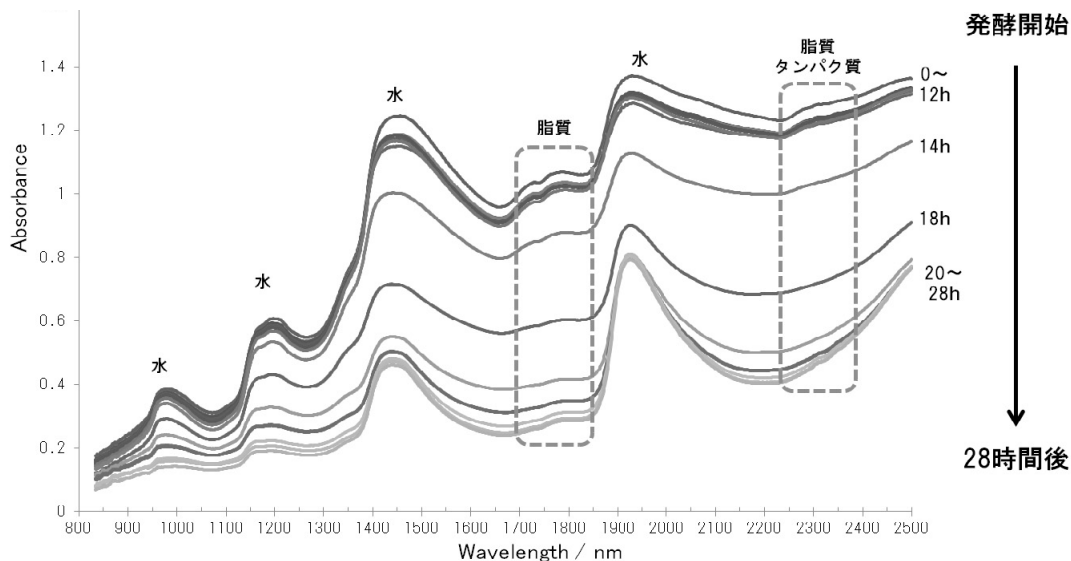


図7 テンペ発酵過程の近赤外吸収スペクトル

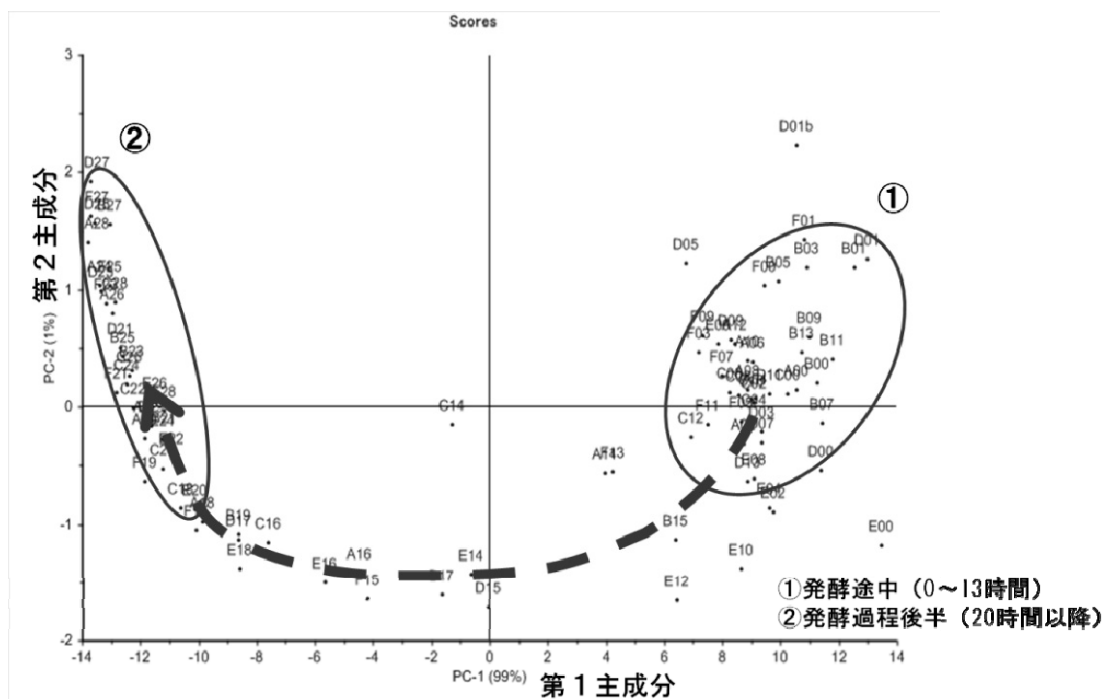


図8 積分球型近赤外分光計で測定した発酵過程の近赤外スペクトルにおける主成分分析のスコアプロット

れることから、脂質やたんぱく質に起因するバンドが変化した原因の一つとして、発酵による脂質やたんぱく質の成分変化があげられる。

2) ケモメトリックスを用いた主成分分析によるスペクトルの解析 (900~2500nm)

図8は積分球型近赤外分光計の測定データを主成分分析し、第1主成分と第2主成分のスコアをプロット

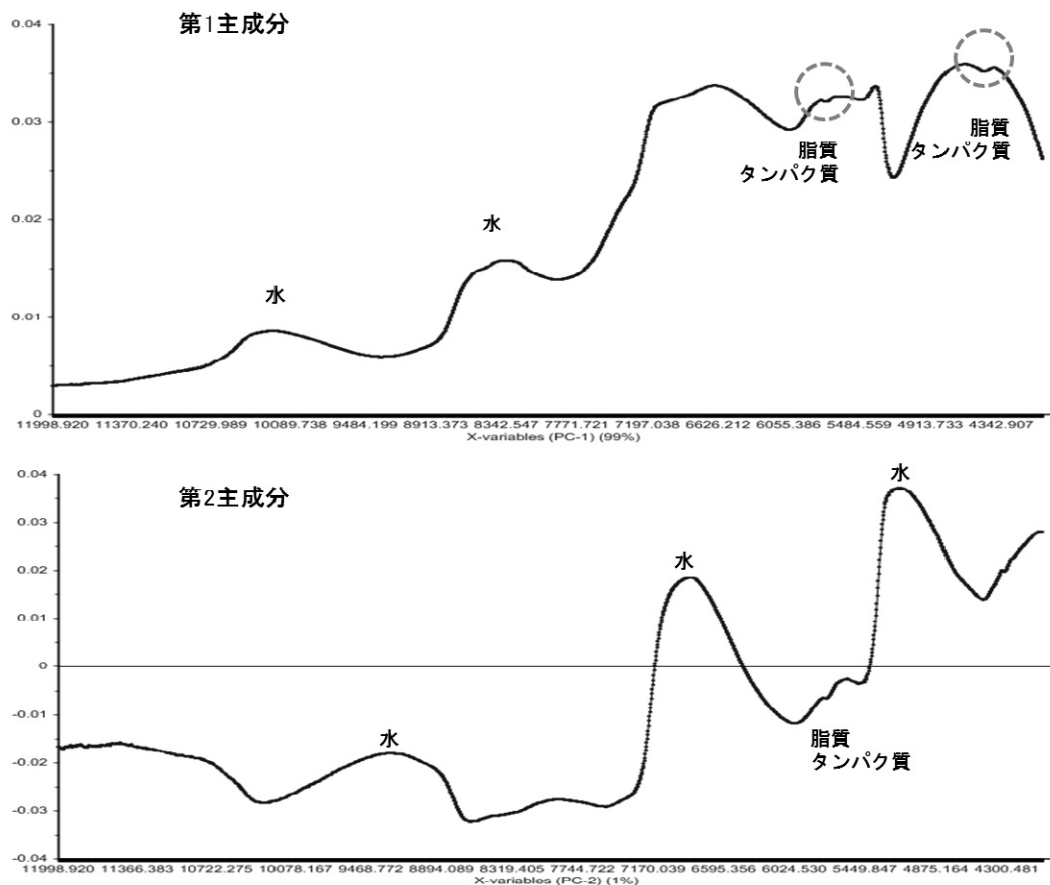


図9 積分球型近赤外分光計で測定した発酵過程の近赤外スペクトルにおける主成分分析のスコアプロット

したものである。その結果、発酵途中と発酵完了の2つのグループに分けることができた。

発酵開始から約13時間が経過するまでは①にスコア値が集まり、菌糸が肉眼で十分に観察できる状態になると第1主成分のスコア値が減少し始めた。その後、発酵が完了に近づく②にスコア値が集まり始めた。

第1主成分と第2主成分のローディングプロットを図9に示す。ローディングプロットからは、それぞれの主成分に大きな影響を与えている要因を推測することができる。第1主成分のローディングには脂質やたんぱく質に特徴的なバンドがみられることから、発酵によりこれらの物質の化学変化^{9,10)}が観察されたものと考えられる。一方、第2主成分は水に特徴的なバンドが多くみられることから、発酵過程での水分量の変化や近赤外光の透過性の変化があらわれた可能性が考えられる。

各主成分に影響を与えている要因は必ずしも明確ではないが、発酵が進むに従ってローディングプロットのスコア値が移行していることから、積分球型近赤外分光計で測定したスペクトルからテンペの発酵度合いを推察できることが分かった。

まとめ

近赤外分光法を用いたテンペや大豆のスペクトル測定の結果から、テンペの発酵過程において有意なスペクトル変化がみられ、発酵状態を近赤外分光法で観察できることが分かった。

測定領域500～1000nmでは、拡散や散乱などに起因する、全体的な光の透過具合による変化が観察されたのに対し、測定領域800～2500nmでは、脂質やタンパク質の吸収バンドの強度変化から発酵状態を推察することができた。

さらに、内部の発酵状態が良好なものと不十分なものでは測定したスペクトルが異なっており、テンペ内部の発酵状態の判断に近赤外分光法とケモメトリックスを利用できる可能性があることが分かった。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご助言、励ましの言葉をくださいました本学の諸先生方に、この場を借りて深くお礼申しあげます。

引用文献

- 1) 吉澤淑, 石川雄章, 蓼沼誠, 長澤道太郎, 永見憲三, 醸造・発酵食品の辞典, 朝倉書店, 518-523 (2009)
- 2) 岡田憲幸, テンペ インドネシアの大豆発酵食品, 食糧—その科学と技術—27号, 農林水産省食品総合研究所, 65-93 (1988)
- 3) 宮澤節子, 鈴木 豊子, 松尾真砂子, 坂井 絵美, 大豆テンペおよびピーナッツテンペの調理と嗜好性の考察, 名古屋文理大学紀要 第8号, 29-32 (2008)
- 4) 五訂増補日本食品標準成分表, 文部科学省ホームページ
http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802/002/004.p
- 5) 農業者戸別所得補償制度, 農林水産省ホームページ
<http://www.maff.go.jp/j/pr/aff/1102/report.html>
- 6) 岩元睦夫, 河野澄夫, 魚住純, 近赤外分光法入門, 幸書房, 130-147 (1995)
- 7) 近藤みゆき, 近赤外分光法による食品の化学的分析, 名古屋文理大学紀要 第7号, 23-28 (2007)
- 8) 岩西恩, 近赤外分光法による冷凍サトイモの水晶症状に関する研究, 名古屋市立大学大学院システム自然研究科2007年度博士前期過程学位論文 (2008)
- 9) 松尾伊左尾, テンペ発酵中の成分変化, 日本食品工業学会誌, 37-2, 130-138 (1990)
- 10) 兒玉徹, 川本伸一, 食品と微生物, 光琳, 28 (2008)