

1. 目的

豆腐の副産物であるオカラは全国で年間70万トンが排出され、これまで卵の花などの惣菜や家畜の飼料、肥料等などに利用されてきたが、近年は産業構造の変化に伴って産業廃棄物として処理される量が増えている。オカラは乾物換算でタンパク質25%、油脂19%、糖質33%、繊維18%を含む栄養価値の高いものであり、食品としての利用を進めることが最も経済的に成り立ちやすいと思われる。しかし、オカラをそのままの形で食品へ添加した場合、オカラ特有の臭いやバサバサとした食感が食味品質を低下させることが多く、オカラ添加率は制限されたものとなっている¹⁾。

これらの欠点を改善するため、テンペ菌、麹菌、オンショム菌及び納豆菌などの微生物を用いたオカラ処理法が提案²⁾されている。我々はそれぞれの微生物を利用してオカラを処理し、得られた素材について検討し、テンペ菌によるものが臭いや物性の改良について最も優れていることを認めた。テンペ菌によるオカラの発酵食品は、インドネシアでテンペギンブスとして実際の食品として販売されており、食品としての安全性はきわめて高いと判断される。

そこで、テンペ菌によるオカラの食品素材化を工業的に行うことを目的に各工程を検討した。その中で前処理としての乳酸発酵の有用性、即ち、乳酸発酵を前段に組み入れることにより、それに続くテンペ発酵を安全かつ安定的に遂行できることがわかったので報告する。

2. 実験方法

2.1 実験材料

オカラは、近在の豆腐工場からできるだけ新鮮な絞りたてのものを入手した。すぐに使用しない場合は凍結貯蔵し、必要時に解凍して用いた。

2.2 使用微生物

乳酸菌は茨城県工業技術センター所有の*Lactobacillus sakei* HS-1⁴⁾を用いた。納豆菌は市販の三浦菌、大腸菌は*E. coli* IF0-3972、テンペ菌はセンター保存株を用いた。

2.3 微生物生菌数の計測法

テンペ中の一般細菌はカピサイジンを追加した標準寒天培地で、テンペ菌はクロラムフェニコール添加ポテトデキストロース寒天培地で培養して計測した。乳酸菌は炭酸カルシウム添加 MRS 寒天培地、大腸菌は X-GAL 寒天培地を使用して計測した。

2.4 オカラの乳酸発酵

L. sakei HS-1 を生オカラ 1g あたり 10^6 CFU となるように添加した。豆腐製造現場で行う場合は、70 L の蓋付きポリ樽に合う 0.05mm 厚のポリエチレン製袋を内袋として、その中に乳酸菌液を噴霧しながらオカラを手でしっかりと詰めて密封とした。容器は室温に 2 ~ 3 日放置してオカラの pH が 5 以

下になるまで発酵させた。

少量のオカラについて、乳酸菌添加後、バリアーフイルム (KON+PE, 0.07mm) による真空包装, 0.03mm 厚のポリエチレン袋に密封及びテンペ発酵用の角形容器詰めとして 30 で発酵させて 24 時間後の性状を比較した。

2.5 乳酸発酵オカラの加熱殺菌

乳酸発酵させたオカラの殺菌処理について、オカラ由来の耐熱性細菌を指標とした加熱時間を検討した。オカラの水懸濁液を 15 分間 90 の温水中で加熱後の生存細菌を標準寒天培地で分離し、普通ブイヨン培地で長期間培養して耐熱性胞子をつくらせた。加熱試験は普通ブイヨン培地 pH を、pH6.8 及び pH4.0 にそれぞれ、調整し、胞子を 4.8×10^6 CFU/ml となるように添加し、沸騰水中で一定時間、加熱後の生残性を判定した。

2.6 テンペ菌によるオカラの発酵法

1kg の生オカラまたは乳酸発酵オカラを荒畑製作所 (株) 製のスチーマーボックスに入れて、100 達温後 30 分間 ~ 1 時間の蒸気殺菌を行った。殺菌後、放冷して 50 以下になったらポリエチレン袋に移してテンペスターター (1g あたりの胞子数 $2 \sim 3 \times 10^6$) を 1% 加えて良く混合した。テンペ菌を接種したオカラ 150g をポリスチレン製角形容器 (17 × 11 × 4.5cm, 北沢産業製) にふんわりと詰めて、35 にセットした恒温器で培養した。一夜 (18 時間) 後に反転させて、培養を続けて、全体で 20 ~ 24 時間後に恒温器から取り出して発酵終了とした。

また、テンペ発酵における汚染微生物の影響を調べるため、殺菌後のテンペ菌を加えたオカラ 1g あたり大腸菌あるいは納豆菌を、それぞれ、 2×10^6 、 3×10^6 CFU となるように添加して発酵させた。

2.7 オカラテンペの色及び物性の測定法

オカラテンペは菌糸で覆われたスポンジ状となるので、フードプロセッサーを用いて組織を崩してから測定に供した。色は、日本電色工業 (株) 製の色差計 SE200 を用い、オカラ及び 24 時間発酵させたオカラテンペについて比較した。物性は全研 (株) のテクスチュロメーター GTX-2-IN を用いて測定した。内径 68mm のカップに詰め、サンプルの高さを 20mm、プランジャーをルサイト 18mm、クリアランスを 2mm、入力電圧を 1V として咀嚼した。

2.8 イソフラボンの分析

テンペ菌発酵中に配糖体型からアグリコン型に変化するので 2 時間ごとにサンプリングして、HPLC 法で分析した。サンプリングした試料を耐熱性フィルムに入れて真空包装し、85 で 20 分間加熱後、凍結乾燥した。1g の乾燥粉碎試料に 10mL のメタノールを加えて室温下で 1 時間振とうしてイソフラボン類を抽出し、0.2 μ m の MF ろ過液を HPLC で分析した。カラムは YMC-Pack ODS-A, 150 × 6mm I.D.

を用い、恒温槽温度は50℃、移動相は20～80%メタノールグラジュエント(1%/min)、流量0.7mL/minを用い、検出は254nmの吸光度を用いた。標準物質としてDaidzin, Genistin, Daidzein及びGenisteinを用いたところ、30分以内に分離良く溶出した。

2.9 酵素活性の測定

2.9.1 セルラーゼ

CMCを基質とした粘度降下法を用いた。即ち、カルボキシメチルセルロースナトリウムの5.5gを0.1M-酢酸緩衝液(pH4.5)に溶かした。この基質溶液の9mLをオストワルド粘度計にとり、40℃で暖めておき、その中に酵素溶液1mLを添加・混合した直後及び30分間インキュベート後の粘度を測定し、この条件において、10分間で基質の粘度を半減する酵素力をもって1ユニット(U)とした。

2.9.2 ポリガラクトクロナーゼ (endo-PG)

ペクチンを基質とした粘度降下法を用いた。0.1M-酢酸緩衝液(pH5.0)に溶かした1%ペクチン(citrus pectin)溶液9mLに酵素溶液1mLを加え、40℃における粘度低下を測定し、10分間で基質の粘度を半減する酵素力をもって1ユニット(U)とした。

2.9.3 α-グルコシダーゼ

p-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを基質とした吸光度法を用いた。即ち、 2×10^{-3} M p-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシド 1.0mL、0.1M-酢酸緩衝液(pH5.0) 1.0mL、酵素溶液 1.0mLの混合液を40℃の条件下で反応させ20分間後に0.1M 炭酸ナトリウム溶液の2.0mLを加えて反応を終了させた後、400nmの吸光度を測定した。20分間で吸光度を1増加させる酵素力を1ユニットとした。

2.9.4 プロテアーゼ

味噌基準分析法に基づき、pH6のプロテアーゼ活性を測定した。

2.10 全糖及びアミノ態窒素の分析

全糖はフェノール硫酸法、アミノ態窒素はニンヒドリン発色法で定量した。

3. 実験結果及び考察

3.1 オカラの乳酸発酵方法の比較

豆腐製造工程において分離機から排出された直後の生オカラには、主にバチルスなどの耐熱性細菌のみが残存して、その菌濃度は1gあたり $10 \sim 10^4$ CFUの範囲であり、菌学的には比較的清潔であるが、その後に環境由来の微生物が適度の温度と栄養分のもとで爆発的に増殖して腐敗に至る。腐敗防止のため、分離直後のオカラに乳酸菌を添加して乳酸発酵させる方法を検討した。

表1 乳酸発酵に及ぼす発酵容器の影響

発酵(包装)条件	pH	乳酸菌数	バチルス数
真空包装	4.71	1.7E+09	8.0E+02
0.03mm PE袋密封包装	4.86	1.8E+09	1.0E+04
カップ詰め包装	8.52	7.6E+07	>1.0E+07

表1に容器の形状(外気遮断の程度)が乳酸菌発酵に及ぼす影響を示した。

真空包装及び0.03mm厚さのポリエチレンフィルム密封包装における24時間培養で、pHは5以下に低下し、乳酸菌数は 10^9 台に増殖したことから、乳酸菌が支配的微生物となることがわかった。しかし、空気の通りの良いカップ詰めでは、バチルスが増殖して腐敗臭が発生した。従って、排出直後のオカラに乳酸菌を添加して簡易な密封状態にすれば容易に乳酸発酵をさせることが可能と考えられる。繰り返し試験の結果から、発酵後のpHは4.5～5.0に留まることがわかり、オカラに含まれる糖分が少ないためと考えられた。この状態では冷蔵で1週間程度の貯蔵が限界であった。内藤¹⁾によれば、長期貯蔵が可能なpH4付近に低下させるためには糖分の添加が必要である。

3.2 乳酸発酵オカラの加熱殺菌

前述した乳酸発酵オカラをそのまま殺菌せずにテンペ菌を接種して培養させた場合、テンペにはなるが発酵期間がほぼ2日間かかり、製品は酵母や乳酸菌などの共存微生物の多いものとなった。乳酸発酵させたオカラを加熱殺菌した後にテンペ菌を接種・培養すると、ほぼ1日間でテンペになった。オカラの腐敗微生物として耐熱性孢子菌を有するバチルスが良く知られている。そこでオカラから耐熱性菌を分離し、加熱殺菌試験を行った結果を表2に示した。pH6.8では40分の加熱が必要であったが、pH4では30分の加熱で死滅させることができた。

表2 オカラ由来耐熱性細菌の加熱殺菌

加熱時間(分)	培地pH6.8	培地pH4.0
10	+	+
20	+	+
30	+	-
40	-	-
50	-	-
60	-	-

+ :生存, - :死滅

3.3 テンペ菌の発酵温度条件

テンペ菌の増殖温度は35℃が最もよかったが、一面がテンペ菌菌糸に覆われるまでの時間は、実験の度にばらついた。最も良い条件の時は、培養開始後12時間後から品温の上昇が始まり、続いて3～4時間で40℃以上になり、このころから菌糸の伸長、オカラ臭の消失が観察された。発酵時間のバラツキは、品温上昇の開始時の遅延によるもので、遅い場合は8時間の遅延が見られた。しかし、その後の温度上昇経過はいずれも同様であり、テンペオカラの品質に大きな違いは認められなかった。立ち上がりの遅延原因は不明である。

3.4 テンペ菌発酵における共存微生物の生育に及ぼす乳酸発酵の影響

乳酸発酵させないオカラ及び乳酸発酵オカラを加熱殺菌した。冷却後、テンペ菌を単独または納

大豆菌，大腸菌をテンペ菌と混合接種して培養した。
表3 生オカラ，あるいは乳酸発酵オカラを原料としたテンペ発酵における汚染微生物の影響

原料	汚染微生物	テンペ製品の性状	
		pH	臭い 生菌数 (CFU/g)
生オカラ			
	無し	6.4	正常
	納豆菌	8.1	納豆臭 4.7E+07
	大腸菌	7.5	異臭 1.0E+08
乳酸発酵オカラ			
	無し	6.5	正常
	納豆菌	7.0	正常 3.0E+05
	大腸菌	6.5	正常 6.6E+02

表3に示したとおり，生オカラ及び乳酸発酵オカラは，いずれも殺菌してテンペ菌のみを接種した場合に正常なテンペを得ることができた。しかし，生オカラを用いてテンペ菌接種時に汚染微生物を加えた場合，テンペ菌の菌糸の伸びが悪く，異臭を発生し，最終的に正常なテンペにならなかった。この場合に納豆菌，大腸菌は100倍以上に増殖した。一方，乳酸発酵オカラを原料とした場合，納豆菌，大腸菌の混在に関わらず，正常なテンペとなった。大腸菌は発酵期間中に添加後速やかに死滅，減少した。納豆菌は，乳酸発酵オカラを原料とした場合のテンペ発酵期間中に死滅はしないが増殖も認められず，静菌的に推移した。得られたテンペから納豆臭は認められなかった。

3.5 発酵テンペの殺菌条件

テンペ菌が十分に繁殖したオカラテンペをフードプロセッサーで崩してペースト状として殺菌条件を検討した。表4に示した試料は，一般細菌が特に多かったが100℃で15分間の加熱で十分に殺菌できた。多くの場合，発酵後のオカラテンペの一般細菌数は1gあたり100～1,000 CFU台であった。

表4 オカラテンペの加熱殺菌

加熱条件	一般細菌	テンペ菌
加熱前	7.8E+06	9.5E+05
60℃ 30m in	130	<10
65℃ 30m in	20	<10
70℃ 30m in	15	<10
100℃ 15m in	<10	<10

3.6 発酵テンペの色価及びテクスチャー

表5 テンペ発酵による色の变化

	L	a	b
発酵前オカラ	79.0	0.4	14.8
24時間発酵物	72.5	1.0	18.1
44時間発酵物	56.0	0.7	23.6

オカラテンペはオカラより明度がやや低下し，赤 (a*) 方向と黄色 (b*) 方向にシフトした。発酵時間が長くなると明度の低下と黄色方向へのシフトが大きくなった (表5)。

オカラはバサついているが，テンペ発酵によって柔らかくなる。テクスチャーメーターによるテクスチャーの測定によれば，硬さ (A1) が低下すると共に粘性を示す A3 がチャート上に出現した。

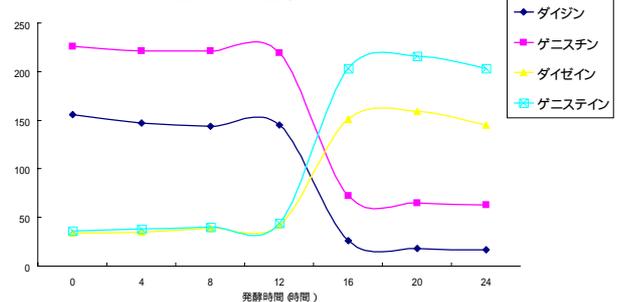
表6 テンペ発酵によるテクスチャーの変化

	A1	A2	A3
発酵前オカラ	14.2	2.9	0
24時間発酵物	9.4	3.6	1.4

3.7 テンペ発酵におけるイソフラボン類の変化

テンペ発酵前のオカラに含まれるイソフラボン類はほとんどが配糖体型であったが，テンペ菌の増殖に伴ってアグリコン型になった (図1)。テクスチャーの変化やオカラ臭の消失が同時期に起こることからテンペ菌の酵素活性が大きく影響していると思われる。

図1 テンペ発酵中のイソフラボンの変化



3.8 テンペ発酵における酵素活性の変化

表7に発酵16時間以降の4時間ごとに調べた酵素活性の変化を示した。繊維分を分解し，ゼラチンの低減をもたらすポリガラクトシダーゼ及びセルラーゼ活性が発酵後期に急増した。β-グルコシダーゼ活性はイソフラボンのアグリコン化の時期とほぼ一致した。

表7 テンペ発酵における酵素活性の変化

発酵時間 (時間)	酵素の種類			
	endo-ポリガラクトシダーゼ	-グルコシダーゼ	endo-セルラーゼ	中性プロテアーゼ
12	0.16	2.4	1.1	0~3
16	0.57	12	4.3	17.5
20	0.67	15.2	11.2	26.7
24	0.81	12.4	15.2	21.4

4. 要約

豆腐製造の副産物であるオカラを原料として微生物を利用した食品素材への変換技術を検討した。乳酸菌 HS-1 (*Lactobacillus sakei* HS-1) による乳酸発酵及びそれに続くテンペ菌発酵によって，オカラ臭がない粘性のある素材ができた。乳酸発酵は，オカラの保存性の向上，加熱における殺菌効率の向上，テンペ菌発酵における雑菌の増殖防止に有効であった。また，テンペ菌発酵中にポリガラクトシダーゼ，β-グルコシダーゼ，セルラーゼ及びプロテアーゼ活性が顕著に増加し，イソフラボン類のアグリコン化，バサツキの低下，オカラ臭の消失が認められた。

1. 文献

- 1) 日本食品工業学会誌，33，837 (1986)