

## カマボコを用いたテンペ様発酵食品に適した *Rhizopus*属菌の選定と製造条件の検討

福田 翼<sup>†</sup>・中田多恵・辰野竜平・古下 学

### Selection of *Rhizopus* strain and investigation of production condition for *kamaboko* fermentation like tempe

Tsubasa FUKUDA, Tae NAKATA, Ryohei TATSUNO and Manabu FURUSHITA

**Abstract :** *Kamaboko* is a traditional Japanese seafood product. Large amounts of non-standard by-products or *kamaboko* pieces are discarded during preparation. *Tempe* is a traditional Indonesian foodstuff produced by solid-state fermentation of soybean with *Rhizopus* strain. We applied the *tempe* fermentation method to efficiently utilize *kamaboko* wastes with the aim of obtaining valuable food products. Glucoamylase and acidic protease are important for *tempe* fermentation. We selected *Rhizopus* strain for *kamaboko* fermentation like *tempe* using glucoamylase activity and acidic protease activity as indexes. Among 13 *Rhizopus* strains, *Rhizopus* sp. MKU18 showed the highest acidic protease activity from fermented *kamaboko*. However, the glucoamylase activity of fermented *kamaboko* by *Rhizopus* sp. MKU18 was not detected. Thus, we investigated the effect of a mixture of *kamaboko* and steamed rice on glucoamylase and acid protease activity by *Rhizopus* sp. MKU18. Supplementation of *kamaboko* with steamed rice suppressed acidic protease production, but increased the glucoamylase production (about 17-36 times). The smells of fermented *kamaboko* are musty and ammonia odors. However, in the case that *kamaboko* with steamed rice, fermented mixture has pleasant smell. Thus, the method described opens up new avenues for novel fermentation food from the *kamaboko* with *Rhizopus* sp. MKU18 like *tempe*.

**Key words :** fermentation, *kamaboko* (minced product), traditional food technology, *Rhizopus* strain

カマボコは伝統的な水産練り製品であり、2016年度の生産量は454,821トンにもものぼる<sup>1)</sup>。一方、カマボコ製造工程では、成型不良の規格外品や切れ端などカマボコ廃棄物が大量に発生する<sup>2)</sup>。そこで、新たな加工手法の提案が望まれ、カマボコの廃棄物利用に関する研究<sup>3-6)</sup>が行われている。

テンペは、*Rhizopus*属菌を用いたインドネシアの伝統的大豆発酵食品である<sup>7)</sup>。*Rhizopus*属菌は、発酵作用により有機酸やアルコールなどの生産<sup>8)</sup>し、香りを改善する<sup>9,10)</sup>。これは*Rhizopus*属菌が生産するグルコアミラーゼがデンプン由来のグルコースを生産し、さらにグルコースを有機酸<sup>11)</sup>やアルコール<sup>11,12)</sup>へ変換するためである。また、*Rhizopus*属菌は、酸性プロテアーゼなどの酵素を生産し、遊離アミ

ノ酸量を増加させる<sup>11,13)</sup>。これにより、テンペは消化性の良い食品として食されてきた<sup>14)</sup>。

近年、*Rhizopus*属菌におけるこれらの能力が注目され、バイオコンバージョン<sup>15,16)</sup>や食品の不要部分を利用したテンペ様発酵食品に関する研究が行われている<sup>17)</sup>。そこで我々は、予備研究によりカマボコ培養基質に増殖可能な*Rhizopus*属菌を見出し、カマボコ培養基質のみでテンペ様食品（以下、カマボコテンペと表記する。）を試作したが、アンモニア臭が強かった。これは、カマボコに含まれるデンプンなどの炭素源が乏しく、有機酸などの生成が弱かったものと推測される。本報告では、市販カマボコをモデル培養基質として利用した*Rhizopus*属菌によるテンペ様発酵

食品の製造を目的とし、テンペ発酵の指標とされるグルコアミラーゼ及び酸性プロテアーゼ活性を用いた<sup>18)</sup>最適な *Rhizopus* 属菌の選定を試みた。さらに、一般的にデンプン源として使用される蒸米を混合し、カマボコテンペ製造におけるグルコアミラーゼ及び酸性プロテアーゼ活性への影響を調査した。

*Rhizopus* 属菌は13菌株を使用した。菌株はPDA (Potato Dextrose Agar, 日水製薬株式会社製) 斜面培地に接種後、30°C・7日間前培養したものをを用いた。胞子懸濁液は前培養したPDA斜面培地に滅菌生理食塩水を9 mL添加したものをを使用した。

市販カマボコ (山口県) は、約0.5 cm角にカットしたものをを用いた。カットしたカマボコは水切りを行い、さらに水分を取り除く為、滅菌済キムタオルで包み0°C条件下で48時間保存した。なお、滅菌済キムタオルは、24時間毎に交換した。

蒸米は次の様に作製した。まず、コメ (福岡県) は、水道水を用いて研いだ。コメの2倍量の水道水で含浸し、10°C条件下で24時間保存した。さらに10°C条件下にて水切りを3時間行った。コメは指で軽く押しつぶせるまで蒸しあげた。蒸し作業終了後、蒸気を逃がしながら、約40°Cまでコメの温度を下げた。これを蒸米とした。

カマボコと蒸米を混合した培養基質は、上記の方法で処理したカマボコを0%(w/w)、25%(w/w)、50%(w/w)、75%(w/w)、100%(w/w)の割合で蒸米と混合したものをを使用した。この時、混合割合は基質全体量に占めるカマボコの割合で示した。

プラスチック製袋 (12×8cm・アズワン (株)) に基質を60 g測り取って入れた。さらに胞子懸濁液を0.6 mL添加し、よく攪拌した。シーリング処理を行い密封した後、ピンを用いて穴を開けた。培養は各プラスチック製袋を滅菌済プラスチック製容器に入れ軽く蓋をし、30°Cにて培養を行った。

粗酵素溶液は次の様に作製した。まず、試料と同量の滅菌済蒸留水を加え、4°C静置にて24時間抽出を行った。抽出終了後、ろ紙 (アドバンテック東洋 (株)) にて自然濾過を行い、得られた溶液を粗酵素溶液とした。

グルコアミラーゼ活性は、反応基質に2%(w/v)可溶性デンプン (和光純薬工業 (株)) 液 (0.1 M酢酸緩衝液、pH4.5) を1 ml用い、粗酵素溶液1 ml加え、40°Cで20分間反応させた。反応終了後、100°Cで10分間処理を行い、反応を停止させた。遊離したグルコース量はグルコース CII

テストワコー (和光純薬工業 (株)) を用いて測定した。酵素単位1 unitは、1 minに1 µgのグルコースを生成する酵素量とし、培養基質1 gあたりの酵素活性を酵素生産性の指標とした。

酸性プロテアーゼ活性は、ヘモグロビン (Sigma-Aldrich Co. LLC) を反応基質として使用し0.05 M酢酸緩衝液 (pH 4.5) に最終濃度が0.6% (w/v) となる様調整したものを反応基質溶液として用いた。反応基質溶液1 mLに粗酵素溶液1 mLを加え、40°Cで30 min反応後、5% (w/v) トリクロロ酢酸5 mLを加えて反応を停止した。反応液は40°Cで30 min放置することにより沈殿を形成させた後、濾紙を用いて自然濾過を行い、濾液について280 nmにおける吸光度を測定した。反応量はチロシン相当量に換算した。酵素単位1 unitは、1 minに1 µgのチロシン相当量を生成する酵素量として換算し、培養基質1 gあたりの酵素活性を酵素生産性の指標とした。

統計処理にはエクセル統計 ((株) 社会情報サービス) を用い、検定の有意水準は5%とした。*Rhizopus* 属菌間の酵素活性の比較は、一元配置分散分析及び多重比較を行った。また、異なる培養基質を用いた発酵期間中における酵素活性変化は、二元配置分散分析及び多重比較により検定した。二元配置分散分析は被験者間因子を試験試料 (因子1) と培養時間 (因子2) とした。分析過程においてはMauchlyの球面検定を行い、球面性の仮定もしくはHuynh-Feldtのイプシロン修正により被験者内効果 (sample effect, cultivation time effect) および交互作用 (sample×cultivation time) をそれぞれ検定した。いずれの多重比較もTukey法を用いた。

*Rhizopus* 属菌13菌株におけるカマボコおよび蒸米を培養基質としたグルコアミラーゼ活性の結果をFig. 1に示す。カマボコを基質とした場合、いずれの菌株もグルコアミラーゼ活性を示さなかった。一方、蒸米の場合、*R. cohnii* P5が最も活性が高く、次いで*R. peka* P8、*R. oryzae* IFO4955、*Rhizopus* sp. MKU18、*R. oligosporus* P12、*R. oligosporus* P13となった。これらの菌株間では有意な差は見られなかった。

*Rhizopus* 属13菌株におけるカマボコおよび蒸米を培養基質とした酸性プロテアーゼ活性の結果をFig. 2に示す。カマボコを培養基質とした場合、*Rhizopus* sp. MKU18が最も活性が高かった。次いで、*R. oryzae* P17、*R. cohnii* P5であるが*Rhizopus* sp. MKU18よりも有意に低かった。一方、蒸米を培養基質とした場合、*R. oryzae* IFO5413が最も活性が

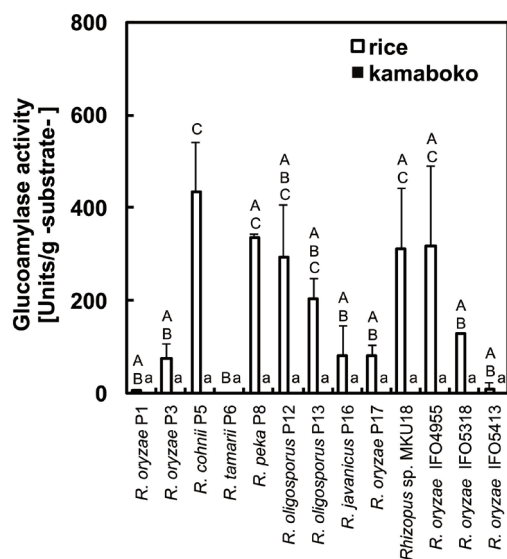


Fig. 1 Glucoamylase production by various *Rhizopus* strains using the *kamaoko*/rice as substrate. Means denoted by the same letters are statistically similar ( $p > 0.05$ ). Lower-case alphabetic characters indicates there is a significant difference under the *kamaboko* as substrate. Upper-case alphabetic characters indicates there is a significant difference under the rice as substrate.

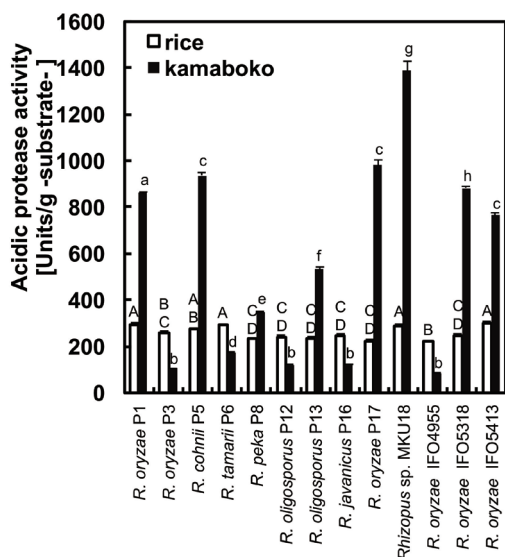


Fig. 2 Acidic protease (pH 4.5) production by various *Rhizopus* strains using the mixture of *kamaboko*/rice as substrate. Means denoted by the same letters are statistically similar ( $p > 0.05$ ). Lower-case alphabetic characters indicates there is a significant difference under the *kamaboko* as substrate. Upper-case alphabetic characters indicates there is a significant difference under the rice as substrate.

高く、次いで*R. oryzae* P1、*R. tamarii* P6、*Rhizopus* sp. MKU18、*R. cohnii* P5となった。これらの菌株間では有意な差は見られなかった。

以上の結果より、グルコアミラーゼおよび酸性プロテアーゼ活性が高い*Rhizopus* sp. MKU18および*R. cohnii* P5菌株が有用株であると示唆された。酸性プロテアーゼ活性が最も高い*Rhizopus* sp. MKU18を最適株とし、以後の研究に使用した。

*Rhizopus* sp. MKU18は、カマボコのみを培養基質とした場合、グルコアミラーゼ活性を示さなかった。そこで、カマボコと蒸米を混合した培養基質を用いてカマボコテンペのグルコアミラーゼおよびプロテアーゼ活性への影響を調査した。カマボコと蒸米を混合した培養基質を用いたカマボコテンペに含まれるグルコアミラーゼ活性の結果をFig. 3に示す。カマボコ混合割合0-50%の場合、72時間発酵後が有意に高い結果となった。75%の場合、有意差は認められなかったが同様に72時間発酵後が最も高かった。72時間発酵後の値は、カマボコ混合割合0%、50%、25%、75%および100%の順に高かった。ただし、カマボコ混合割合25%と50%の値は、有意差が見られなかった。

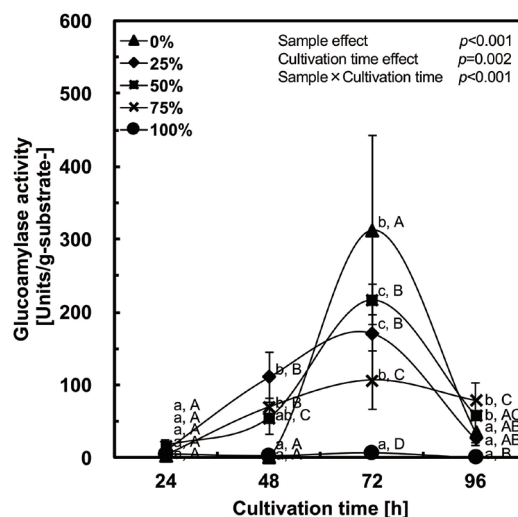


Fig. 3 Changes in glucoamylase production in the fermented mixture of *kamaboko* and rice by *Rhizopus* sp. MKU18. Mixing ratio indicates the quantity of *kamaboko* to total amount of rice and *kamaboko*. Means denoted by the same letters are statistically similar ( $p > 0.05$ ). Lower-case alphabetic characters indicates there is a significant difference under same mixing ratio. Upper-case alphabetic characters indicates there is a significant difference under same cultivation time.

カマボコと蒸米を混合した培養基質を用いたカマボコテンペに含まれる酸性プロテアーゼ活性の結果をFig. 4に示す。カマボコ混合割合25-75%の場合、発酵1日目に最大活性値を示し発酵期間の経過と共に有意に活性が低下した。一方、0%および100%の場合には発酵期間の経過と共に有意に増大した。発酵3日目にはカマボコ混合割合0-50%の場合において、統計的有意差は認められなかった。75%の場合について、有意差は認められるが同程度の活性となった。以上の結果より、カマボコと蒸米を混合した培養基質を用いることにより、グルコアミラーゼとプロテアーゼ活性を有するカマボコテンペの製造が可能であることが示唆された。カマボコと蒸米を混合した培養基質を用いた場合、*Rhizopus* sp. MKU18のグルコアミラーゼ活性は72時間発酵後まで時間と共に増加した。一方、酸性プロテアーゼ活性は24時間培養後が最も高く、72時間発酵後まで時間と共に低下した。Fukudaら<sup>15)</sup>はイグサ廃棄物を基質とした*Rhizopus*属菌のグルコアミラーゼ生産はC/N比による影響を受け、培養開始時にアミノ酸やペプチドを含むペプトンや酵母エキスを添加する事で、無添加時よりもグルコアミラーゼ活性が増加する事を報告している。また、酸性プロ

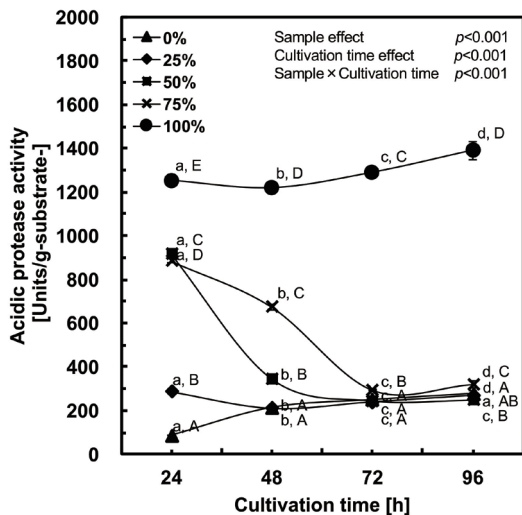


Fig. 4 Changes in acidic protease production in the fermented mixture of kamaboko and rice by *Rhizopus* sp. MKU18. Mixing ratio indicates the quantity of kamaboko to total amount of rice and kamaboko. Means denoted by the same letters are statistically similar ( $p > 0.05$ ). Lower-case alphabetic characters indicates there is a significant difference under same mixing ratio. Upper-case alphabetic characters indicates there is a significant difference under same cultivation time.

テアーゼ活性は、無添加時は時間経過と共に増加するが、ペプトンや酵母エキスの添加により48時間発酵後以降は低下する事を報告している。これらの結果は、本報告と類似している。すなわち、発酵初期の酸性プロテアーゼ生産は、培養基質であるカマボコまたは蒸米のタンパク質を分解し、高いグルコアミラーゼ活性を誘導している可能性がある。*Rhizopus*属菌のグルコアミラーゼは、産生されたプロテアーゼにより生デンプン認識部位が切断される事が報告されている<sup>19)</sup>。カマボコと蒸米を混合した培養基質は酸性プロテアーゼの生産を抑制し、グルコアミラーゼの生デンプン分解能を向上させると推察される。

Fig. 5にカマボコテンペの外観を示す。試食を行った結果、カマボコのみを基質としたカマボコテンペはアンモニアの臭いや不快な臭いといったネガティブな意見が多かった。一方、カマボコと蒸米を混合した培養基質を用いた場合、アルコール臭や甘い香りといったポジティブな意見が多かった。そこで発酵3日目のpHを測定した結果、カマボコ混合割合100%時で6.5であったのに対し、カマボコ混合割合75%、50%、25%時はそれぞれ5.1、4.5、4.1であった。一般にpH 7以下ではアンモニアはアンモニウムイオンの存在形態をとるため、臭いの改善につながったものと思われる。

今後は、*Rhizopus*属菌によるカマボコと蒸米を混合した培養基質の発酵において、プロテアーゼ生産が影響するアミノ酸やペプチド量を測定し、グルコアミラーゼ生産への影響を評価しなければならない。さらに、グルコアミラーゼ生産が影響する有機酸量やアルコール量なども測定し、カマボコテンペの呈味性を評価する必要がある。さらに、におい成分の分析や官能評価等を実施し、カマボコテンペにおける蒸米の添加効果を明らかにした上で、総合的に最適な発酵条件を決定する必要がある。また、カマボコサイズ・デンプン源の選定など、最適な製造条件を明らかにする必要があり、今後の検討課題とする。以上の研究成果より、*Rhizopus*属菌を用いたカマボコテンペの可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) 農林水産省：平成28年 水産加工統計調査
- 2) 樽井義和：水産系残渣の発生と回収。坂口守彦，平田孝（編），水産資源の先進的有効利用法 -ゼロエミッションをめざして-。エヌ・ティー・エス，東京，15-



- 28 (2005)
- 3) Takano T, Shozen K, Satomi M, Taira W, Abe H, Funatsu Y: Quality of fish sauce products from recycled by-products from fish gel and kamaboko processing. *J Food Qual*, **35**, 217-227 (2012)
- 4) 小善圭一, 高野隆司, 里見正隆, 高橋努, 船津保浩: 発酵中の魚醤油もろみの品質に及ぼす蒲鉾製造ロスの影響. 日本水産学会誌, **76**, 1083-1085 (2012)
- 5) 舊谷亜由美, 船津保浩, 小善圭一, 原田恭行, 高野隆司, 矢野豊, 里見正隆: 醤油麹を用いて製造したニギス魚醤油および蒲鉾製造ロス醤油の発酵初期に起こるタンパク質の分解について. 日本水産学会誌, **78**, 726-735 (2012)
- 6) 福田翼, 楯崎かれん, 辰野竜平, 古下学: 豆腐鯨の製造方法を応用した新規かまぼこ発酵食品の開発. 水産大学校研究報告, **65**, 255-259 (2017)
- 7) Hesseltine CW: A millennium of fungi, food, and fermentation. *Mycologia*, **57**, 149-197 (1965)
- 8) 米屋武文, 佐藤 泰: *Rhizopus javanicus*の有機酸およびエタノール生産に及ぼす好気培養条件の影響. 日本農芸化学会誌, **53**, 363-367 (1979)
- 9) Feng XM, Larsen TO, Schnurer J: Production of volatile compounds by *Rhizopus oligosporus* during soybean and barley tempeh fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **113**, 133-141 (2007)
- 10) 野崎信行: テンペを素材とする味噌およびその他の食品. 日本醸造協会誌, **89**, 446-451 (1994)
- 11) Ghosh B, Ray RR: Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: a review. *J Appl Sci*, **11**, 2470-2486 (2011)
- 12) Fujio Y, Ogata M, Ueda S: Ethanol fermentation of raw cassava starch with *Rhizopus koji* in a gas circulation type fermentor. *Biotechnology Bioengineering*, **27**, 1270-1273 (1985)
- 13) Baumann U, Bisping B: Proteolysis during tempe fermentation, *Food Microbiology*, **12**, 39-17 (1995)
- 14) Nout MJR, Kiers JL: Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. *Journal of Applied Microbiology*, **98**, 789-805 (2005)
- 15) Fukuda T, Sato T, Ishino Y, Tsutsumi K, Morita H: IGUSA waste: a novel substrate for *Rhizopus* strains to produce glucoamylase. *Japan Journal of Food Engineering*, **9**, 261-269 (2008)



**Fig. 5** Fermented Kamaboko by *Rhizopus* strain

This picture shows fermented Kamaboko from a mixture of kamaboko and steamed rice with *Rhizopus* sp. MKU18. Mixing ratio of the quantity of kamaboko to total amount of rice and kamaboko was 25%.

- 16) Praneetrattananon S, Wakisaka M, Shirai Y, Kitpreechavanich V: Kitchen refuse: a novel substrate for L (+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. *Japan Journal of Food Engineering*, **6**, 45-51 (2005)
- 17) 伊藤寛：テンペ。バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究会(編), 発酵ハンドブック。共立出版, 東京, 617-619 (2001)
- 18) Lim G, Tan TK, Rahim NA: Variations in amylase and protease activities among *Rhizopus* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **3**, 319-322 (1987)
- 19) Takahashi T, Kato K, Ikegami Y, Irie M: Different behavior towards raw starch of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* sp.. *J Biochem*, **98**, 663-671 (1985)