鰹節出汁粕を焼酎用白麹菌で分解して得られる調味料

横山定治¹・木場洋次郎²・亀岡恵子³・峰 弘子³
(¹ヤマキ株式会社・²愛媛大学農学部・³松山東雲短期大学)

平成 22 年 10 月 4 日受理

Development of a new type of dried bonito seasoning
using white *koji*

Sadaji YOKOYAMA¹⁾, Yojiro KOBAYASHI²⁾, Keiko KAMEOKA³⁾,
and Hiroko MINE³⁾

(Yamaki Co., LTD.¹⁾, Faculty of Agriculture, Ehime University²⁾, Matsuyama Shinonome Junior College³⁾)

The production of acid protease and acid carboxypeptidase by black and white *koji* on a barley medium was tested. At acidic pH and low NaCl concentrations, extracted dried bonito was hydrolyzed by *koji* 1.5 month at 45°C. The amount of contaminated bacteria in the *moromi* was very low and resulted in a good bonito aroma for the seasoning.

We conducted a sensory test of evaluation by women students for dishes made with the new seasoning. Students felt the seasoning was strong with a salty, acidic and *umami* (good) taste. They judged it against available seasonings. Moreover, according to a factor analysis of the seasoning characteristics, it produces a good, strong flavor with traditional Japanese dried bonito stock, and it has characteristic strong tastes with acidity and bitterness. The seasoning received a good overall evaluation.

Key words : 鰹節分解調味料, 白麹菌, 減塩分解, 官能評価

緒 言

鰹節を熱湯又はエタノール溶液で抽出して出汁を生

産する際に大量の鰹節出汁粕が副生しその有効利用法の開発が課題となっている。ヤマキ(株)に於いても年間約 2,000t の出汁粕が副生するがその多くは養鰹飼料として消費されている。地球規模の回遊魚である鰹は高速遊泳のためにヘモグロビンを豊富に含む赤身筋肉成分が多く、その肉部分のみを焙乾した鰹節は固形分の約 85% が蛋白質である。出汁生産工程に於いても鰹節からは約 5% 程度の成分が抽出されるのみで出汁粕には固形分当たり約 80% の蛋白質が含まれている。

鰹蛋白質は鰹節生産時の焙乾工程でガラス化等の変性を受けるためプロテアーゼの作用を受けにくい。市販の酵素剤を組み合わせて作用させた場合でも遊離アミノ酸の効率的生産は困難で、分解液の FN / TN% は 30% 以下である¹⁾。エタノール抽出で副生する出汁粕を醤油麹で数ヶ月間常温分解して得られる呈味性良好な調味料は報告されている²⁾。

魚醤の品質改良の検討も含め魚介類からの調味料生産に関する検討は大部分が醤油麹菌の利用である。醤油と同様に食塩存在下に醤油麹を添加し、更に場合により乳酸菌、酵母を増殖させることで呈味性の良い調味料となる。しかしながら、風味、色調が醤油に近似して商品としての差別化が困難となる難点もある。

黒麹菌を含む多くの麹菌が酸性 pH 領域で安定かつ高活性である酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼを小麦穀培地で生産することは以前から知られている^{3,4)}。また、醤油、魚醤生産に於いては中性プロテアーゼの作用を主に期待するために雑菌汚染防止に高濃度食塩が必要である⁵⁻⁷⁾。魚介類蛋白質を黒麹菌又はその突然変異株である白麹菌を用いて酸性 pH 条件で分解出来れば諸味への食塩添加を少なくして減塩調味料を開発できる可能性がある。

本報告では焼酎生産用黒麹菌及び白麹菌を大麦培地で製麹した場合のプロテアーゼ活性を比較検討した。白麹を用い、出汁粕を酸性条件下、各種食塩濃度で分解して得られる分解液の成分を比較した。また、各種条件の諸味中の汚染細菌数を比較した。次いで、試作調味料の特性について検討した。女子学生をパネルとして行った官能評価、及び因子分析の結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

実験に使用した菌株、及び種麹は独立行政法人酒類総合研究所、(株)秋田今野商店、及び(株)樋口松之助商店から供与された。*Aspergillus phoenicis* ATCC-14332 (原株:*Aspergillus saitoi* R-3813) は American Type Culture Collection (USA) から購入した。

2. 培養条件の検討

培養は 300ml の三角フラスコを使用して 30℃ で静置培養した。大麦培地は浸漬 70% 精麦 7g と大麦麹 3g を培地とした。また、白麹菌“本格焼酎菌麦用「(株)樋口松之助商店」”はフジワラテクノアート(株)製の小型無菌固体培養装置を使用して浸漬 70% 精麦 14kg と大麦麹 6kg を培地として 30℃ で 5 日間培養し、得られた白麹を出汁粕分解実験に使用した。

3. 分解条件の検討

鰹節粉砕物を熱湯抽出し出汁を生産した副産物である鰹節出汁粕(生)を Table1 の条件の諸味 pH 及び食塩濃度下、45℃ で分解した。諸味は初発設定 pH になるように最初の 2 週間は毎日、その後 4 週間までは毎週 1 回、その後は未調整とした。

4. 特性検討のための調味料試作

鰹節出汁粕(水分 50%) 3,750g, 麹 625g, 食塩 625g を水道水 4,380ml に投入し pH を 4.0 に調整した。45℃ で 1.5 ヶ月分解した。諸味は東洋濾紙(株)製濾紙 No.101 でろ過後に 80℃, 30 分加熱処理して実験に使用した。

5. 有機酸分析

高速液体クロマトグラフィーは(株)日立ハイテクノロジーズ製 LaChrom システムを使用してカラムは C-610H-S (7.8mmφx300mmL) を用いた。移動相は 3mM HClO₃ で反応相は 0.1mM BTB, 170mM EtOH,

30mM Na₂HPO₄ である。移動相流速, 反応相流速は夫々 0.5, 0.6ml/min で行った。カラム温度は 60℃, サンプル注入量は 10μl である。検出は L-2420 形 UV-VIS 検出器で 440nm の吸収を測定した。

6. アミノ酸分析

遊離アミノ酸分析は(株)島津製作所製アミノ酸(OPA)分析システムを使用し, 分析用カラム Shim-pack AMINO-Na 型で行った。溶媒は島津製市販品を用いた。溶媒総流速 0.6ml/min., 反応液総流速 0.4ml/min., カラム温度 60℃, サンプル注入量 10μl で行った。

7. 酵素活性の測定

麹を 10 倍量の酢酸緩衝液 (pH3.0) で抽出したのち酵素活性を測定した。なお, 酸性カルボキシペプチダーゼ (ACPase) 活性測定には麹抽出液を一晩酢酸緩衝液 (pH3.0) で透析したものを使用した。酸性プロテアーゼ (APase) 活性の測定はミルクカゼインを用いる国税庁所定分析法を基本にした。尚, 酵素活性 1 単位 (U) はミルクカゼインに pH3.0, 38℃ で作用して 1 分間に 1μmole のチロシン相当量の TCA 可溶性ペプチドを遊離する酵素量とした。酸性カルボキシペプチダーゼは合成基質 Z (= Benzyloxycarbonyl)-L-Glu-L-Tyr に pH3.0, 30℃ で作用して 1 分間に 1μmole のチロシンを遊離する酵素量とした。尚, ニンヒドリン試薬の調製は従来の青酸カリウムに替えて安全なビタミン C を使用した⁸⁾。

8. 試作調味料の特性について

18 ~ 20 歳代の女子学生 34 名をパネルとし, 「色」1 項目, 「香り」6 項目, 「味」7 項目, 「総合評価」3 項目の順に, SD 法により官能評価を行った。評価尺度は, 濃厚な色 - 淡泊な色のように反対語を両端に位置付け, それに +3 ~ -3 の点数をつけた 6 段階とした。「色」の評価は, 試作調味料 1ml を正確にスクリーン管瓶に入れてポリプロピレン製の蓋をした試料を

Table 1 Hydrolysis of extracted dried bonito by barley *koi* on several salts and starting pH conditions.

Ingredients of <i>moromi</i>	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6	Exp.7	Exp.8	Exp.9	Exp.10	Exp.11	Exp.12
Initial pH	3.0	←	←	3.5	←	←	4.0	←	←	4.5	←	←
Sodium chloride (g)	70	47	23	70	47	23	70	47	23	94	70	47
Extracted dried bonito (g)	450	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
Barley <i>koi</i> (g) White <i>koi</i> mold	75	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
Tap water (g)	281	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←

a: *Higuchi matsunosuke shoten* Co., LTD. “*Honkaku shochu* mold (Barley type)”

上質紙の上に載せて実施した。「香り」は、常温で試料の蓋を開け、これを鼻に近付けて数回嗅いで評価し、「味」は、その試料を少量スプーンにとり、口に含み評価し、最後に「総合評価」を実施した。実施時期は2009年7月である。

得られた官能評価結果は、統計解析ソフト“エクセル統計2008(SSRI社)”を用いて主因子法による因子分析を行った。なお、因子数は固有値から4とし、バリマックス法による回転を行った。

実験結果及び考察

1. 製麹試験

大麦培地での30℃、3日培養時での酵素活性をTable2に示した。市販の焼酎生産用の種麹はアルコール生産の目的からアミラーゼ活性の高い麹菌が選択されており、プロテアーゼ生産能は余り考慮されていないと考えられる。“本格焼酎麦用”種麹でも精麦のみ培地では酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ活性は低い値であった。しかしながら、培地に大麦麹を添加することで両者ともに約3倍に酵素生産量は増大し、夫々2.28及び0.59 U/g 麹の値を示した。将来の製麹機での運転の作業性能を考慮して、種麹が市販されている麹菌であり、胞子の白い“本格焼酎菌麦用”を以後の実験に使用した。

2. 鯉節出汁粕分解条件の検討

Table3のように分解諸味の全窒素(TN)はpH3.0と3.5(実験1-6)で高く、ホルモール窒素(FN)はpH3.5と4.0(実験4-9)で高い値を示した。諸味食塩濃度が小さい程FN, TN値共に大きくなる傾向が見られた。FN, TN値の変動は食塩によるプロテアーゼの反応阻害効果と考えられる。諸味中の一般細菌数及び耐熱性菌数共に、pH4.5条件では諸味中食塩濃度が高い程雑菌数は少ない傾向が見られた。

pH4.0条件に於いては、食塩濃度4.9%でも一般細菌数、及び耐熱性菌数は夫々、 $1.7E + 03$ cfu/g 麹、及び $1.2E + 03$ cfu/g 麹であった。醤油諸味中の一般細菌数が通常 10^8 cfu/g 諸味程度であるのと比較すると非常に少ない。諸味pHを酸性に設定することで減塩条件に於いても雑菌汚染の少ない条件で調味料生産が可能であることが確認できた。

3. 調味料の試作

特性検討のために試作された調味料はTN1.76(w/v)%, FN0.76(w/v)%, FN/TN%43, pH4.2, 食塩9.6(w/v)%, 比重1.103であった。有機酸濃度はクエン酸270mg/100ml, 乳酸35mg/100ml, 酢酸19mg/100mlであった。クエン酸は白麹菌が麹中に生産されたものが諸味に持ち込まれたものと考えられる。上槽時点の諸味中の一般細菌数は $1.1E + 03$ cfu/g 諸

Table 2 Production of acid protease (APase) and acid carboxypeptidase (ACPase) by black *koji* molds and white *koji* molds.

Strain	APase activity (U/g <i>koji</i>)	APase activity (U/g <i>koji</i>)
<i>Aspergillus awamori</i> RIB-2013	0.56	1.63
<i>Aspergillus foetidus</i> RIB-2611	0.51	1.89
<i>Aspergillus kawachii</i> RIB-SC60	0.92	2.35
<i>Aspergillus niger</i> RIB-2002	1.23	3.25
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>intermedius</i> RIB-2642	0.72	2.71
<i>Aspergillus phoenicis</i> RIB-2621	2.64	2.98
<i>Aspergillus phoenicis</i> ATCC-14332 (saitoi R-3813)	1.52	2.15
<i>Aspergillus usamii</i> RIB-2004	0.41	0.80
Shochu white <i>koji</i> ^a	0.51	3.12
Shochu white <i>koji</i> (Flavor enriched type) ^a	0.36	2.02
Shochu black <i>koji</i> (Pure) ^a	0.89	0.33
Shochu black <i>koji</i> (Mild) ^a	0.59	3.07
Fukkoku black <i>koji</i> (Inui) ^a	0.20	1.35
Honkaku shochu mold (Rice type) ^b	0.39	1.63
Honkaku shochu mold (Barley type) ^b	0.59	2.28
Black <i>koji</i> moldb	0.68	2.69

^aAkita konno shoten Co.,LTD.

^bHiguchi matsunosuke shoten Co.,LTD.

Table 3 Effects of pHs and salt concentrations of *moromi* to product parameters.

Components	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp4	Exp5	Exp6	Exp7	Exp.8	Exp.9	Exp10	Exp11	Exp.12
(Analytical data)												
pH	3.38	3.47	3.38	3.66	3.66	3.70	4.23	4.23	4.23	4.48	4.48	4.35
Sodium chloride % (w/v)	14.7	10.4	6.8	14.1	10.1	6.2	13.1	8.8	4.9	17.6	12.8	8.7
Total nitrogen (TN) % (w/v)	1.90	2.29	2.43	2.00	2.33	2.61	1.81	2.10	2.51	1.61	1.74	2.09
Formol nitrogen (FN) % (w/v)	0.74	0.92	0.96	0.81	0.95	1.17	0.79	0.90	1.26	0.69	0.77	0.94
FN/TN (%)	39.0	39.9	37.8	40.6	40.8	44.7	43.8	43.1	50.2	43.2	44.4	44.9
(Organic acid mg/100ml)												
Citric acid	865	873	924	719	806	970	478	438	402	420	441	521
Lactic acid	57	54	90	56	58	659	58	65	40	68	65	54
Acetic acid	71	76	90	28	21	326	49	47	18	55	36	83
(Contaminated bacteria , cfu/g <i>moromi</i>)												
General bacteria	60	90	2.7E + 02	1.0E + 02	2.3E + 02	2.4E + 02	3.8E + 02	1.4E + 02	1.7E + 03	1.2E + 02	2.7E + 03	1.0E + 04
Heat stable bacteria	80	90	95	90	1.2E + 02	2.2E + 02	3.6E + 02	75	1.2E + 03	1.3E + 02	2.2E + 03	1.0E + 04

Fig.1 Sensory evaluation score by SD method

◆ : Each core is average of numbers,34.

味、耐熱性菌数は $7.4E + 02$ cfu/g 諸味であった。遊離アミノ酸の含有量 ($\mu\text{mole/ml}$) は Asp22.2, Thr31.0, Ser22.0, Glu61.0, Pro11.8, Gly15.2, Ala61.5, Val32.0, Met16.6, Ile19.4, Leu65.9, Tyr7.1, Phe19.7, His20.8, Lys34.8, Arg33.7 であっ

た。

4. 試作調味料の特性について

試作調味料の官能評価の平均値を Fig.1 に示した。香りは好ましい香りで、強く、上品であり、味は濃厚で、9.6%の食塩濃度であるため、調味料そのものは塩

Table 4 The results of factor loading after the Varimax-method.

Evaluatory items		Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
like	- dislike	0.823	0.070	-0.136	-0.058
delicious	- not delicious	0.783	0.113	0.008	-0.324
useful	- useless	0.722	-0.140	-0.048	-0.173
good aftertaste	- bad aftertaste	0.686	0.117	0.030	-0.094
well-balanced taste	- unbalanced taste	0.632	-0.073	0.235	-0.083
pleasant smell	- unpleasant smell	0.093	0.724	-0.122	0.104
mild smell	- sharp smell	-0.115	0.702	-0.340	0.091
elegant smell	- inelegant smell	-0.131	0.693	-0.032	-0.115
consistent smell	- unique smell	0.316	0.681	0.084	-0.119
strong smell	- weak smell	0.007	-0.081	0.960	0.162
heavy smell	- light smell	0.001	-0.444	0.578	-0.132
strong sour taste	- weak sour taste	-0.145	0.234	0.022	0.647
heavy taste	- light taste	-0.152	-0.153	0.222	0.631
strong bitter taste	- weak bitter taste	-0.276	-0.119	-0.320	0.622
Eigenvalue		2.939	2.313	1.624	1.448
Contribution ratios (%)		21.00	16.52	11.60	10.34
Accumulated contribution ratios		21.00	37.51	49.11	59.45

味が強く感じられ、酸味やうま味も強く、総合的には利用してみたい調味料であると捉えられていた。船津、加藤の報告⁹⁾による濃口醤油の官能評価平均値と比較すると、評点 1.0 以上の差異があった評価項目は、塩味、色、酸味、味のバランスで、濃口醤油より塩味、酸味は強く、色は薄く、味のバランスはあまり良くないという結果であった。小早川らによって、塩味の弁別閾値は薄口醤油の閾値が濃口醤油よりも低いことが明らかにされている¹⁰⁾。試作調味料は市販濃口醤油より塩分濃度はかなり低く、うま味成分であるグルタミン酸含有量は市販薄口しょうゆより少ないため塩味が強く感じられたものと推察される。また、酸味が強いことと味のバランスの面から、醤油とはやや異なるタイプの調味料であることがうかがわれた。

この官能評価結果を因子分析した結果を Table4 に示す。官能評価全項目の 17 項目による因子分析では、「濃厚な色－淡泊な色」の共通性の推定値が 0.374 と他の説明変数に比べて小さく、4 因子の因子負荷量の絶対値も 0.4 未満となったため、次にこの項目を除外して 16 項目で因子分析を行った。この場合の共通性の推定値は、「塩味が強い－塩味が弱い」で 0.271、「うま味が強い－うま味が弱い」で 0.351 と他の説明変数に比べて小さく、4 因子の因子負荷量の絶対値も 0.4 未満となり、4 因子では説明しきれない変数であると考えられたためこれら 3 項目を除外して因子負荷量を算出した。尚、この 14 項目での因子分析におけ

る共通性の推定値は全て 0.4 以上であった。

因子負荷量から、この試作調味料の第 1 因子は、好き、おいしいなど総合的に捉えられる味、第 2 因子は、好ましい、まろやかななど鰹だし汁風味の香り、第 3 因子は重厚な香り、第 4 因子は濃厚で酸味、苦味があるなど個性的な味で因子の意味づけができ、これらの味、香りの特徴を有す調味料であることがわかった。第 4 因子の酸味については、調味料の pH が 4.2 と酸性であることから、酸味に特徴がある調味料と捉えられたと考えられる。SD 法による官能評価では、「味のバランス」の評価項目の平均値は - 0.441 でやや悪いに近い評価であり、第 4 因子である個性的な味の特徴の影響によるものと推察された。尚第 4 因子までの固有値はいずれも 1 以上で、累積寄与率は 59.45% であった。試作調味料を用いた調理試験結果は別に報告した¹¹⁾。

謝 辞

本研究の一部は経済産業省所管の“戦略的基盤技術高度化支援事業”委託費に依った。

文 献

- 1) 横山定治, 福井 裕, 中嶋隆太, 坂井和男, 鳥居数敏, 川北貞夫: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 256 (2000)
- 2) 横山定治, 垂水彰二, 小関佐貴代, 菊地恵美,

- 山田幸子, 早川 潔, 八田 一: 食科工, **49** (3), 171-181 (2002)
- 3) E.Ichishima:*Biochim.Biophys.Acta*, **258**, 274-288 (1972)
- 4) E.Ichishima, A.Yamane, T.Nitta, M.Kinoshita, S.Nikkuni, T.Oka.andS. Yokoyama:*Appl.Microiol.***26**, 327-331 (1973)
- 5) 横山定治: ジャパンフードサイエンス, **45** (9), 34-39 (2006)
- 6) 横山定治, 小関佐貴代, 山田幸子: 調理食品と技術, **13** (3), 118-121 (2007)
- 7) 横山定治, 佐藤健司, 亀岡恵子, 峰 弘子: 醸協, **103** (7), 553-561 (2008)
- 8) S.Yokoyama, and J.Hiramatsu: *J.Biosci. Bioeng.* **95**, 204-205 (2003)
- 9) 船津保浩, 加藤一郎: 日水誌, **67**, 267-273, (2001)
- 10) 小早川知子, 松尾和吉, 橋本忠明, 築山良一: 食科工, 57, 336-345 (2010)
- 11) 亀岡恵子, 峰 弘子, 横山定治: 松山東雲短期大学研究論集, **40**, 37-43 (2010)
-