耐塩性微生物スターターの接種が魚醤油の発酵および品質に与える影響

従来の魚醤油は脂肪酸化臭やアミン臭に代表される不快臭、長期にわたる発酵や麴を使用した場合に色調が濃くなること、および品質のバラツキなどの問題点があった。そこで、著者は麴と対塩性微生物スターターを発酵開始時に魚醤油の諸味に接種すると、魚醤油の色調改善、および醤油様香気とうま味の付与に有効であり、これまで利用困難であった水産資源が活用でき、水産加工副産物の減量化においても有効であり、一部実用化もされているので、解説いただいた。醤油製造者にも参考となるので、是非一読を勧めたい。

吉 川 修 司

1. はじめに

水産発酵食品の中でも魚醤油は、アジアの沿岸地域で最も広く造られており¹⁻⁵⁾、深い味わいを持つだけでなく内臓や魚皮、カット残渣などを利用して製造可能なため、資源の持続的利用および有効活用の点で着目されている。しかし、従来の魚醤油には脂肪酸化臭やアミン臭に代表される不快臭、長期にわたる発酵や麴を使用した場合に色調が濃くなること、および品質のバラツキなど解決しなければならない諸課題が存在する^{2,3,6,7)}。

発酵食品を大量生産する場合は、発酵の促進、風味の増強、雑菌汚染による変敗の防止、および物性の改変などを目的に選抜育種した有用微生物、いわゆるスターターを原料に添加するのが一般的である^{8,9)}。しかし、魚醤油を含む多くの水産発酵食品が環境あるいは原料由来の微生物の中から高食塩濃度や発酵温度などによって有用菌が自然に選択され、増殖するのに頼っているのが現状である。その結果、発酵状態が毎回異なり、場合によっては腐敗に至るなどの問題がある。現在、水産発酵食品の中でスターターを使用しているものは厳密にはカビ付け工程において *Eurotium herbariorum* (無性環は *Aspergillus glaucus* group) を接種して発酵を行う本枯れ節のみにとどまっている⁹⁾。

このため、魚醤油が抱える品質上の諸課題を解決する方法として、微生物スターターの利用が検討されてきた。

本稿では著者らが開発・実用化した麴、2種類の耐塩性酵母および1種類の乳酸菌を用いた魚醤油の発酵技術について^{10,11)}、麴およびスターターが魚醤油の成分および諸味の微生物叢に与える影響についてこれまでの知見を交えて紹介する。

2. 麴およびスターターを用いた魚醤油製造技術

魚醤油の品質改良法の中でも麴のプロテアーゼ活性を利用する方法は広く行われており、麴の種類としては醤油麴^{7,12,13)}、*Actinomucor elegans* を用いた麴¹⁴⁾、*Penicillium nigricans* を用いた麴¹⁵⁾が用いられてきた。他に麴の基質をタンパク価の高い素材に置換してプロテアーゼ活性を高める試みもあり、魚で製造した麴を用いた例がある¹⁶⁻¹⁸⁾。また、麴の基質に前処理を加えることで麴の力価を高めることも可能であり、醤油の醸造において麴の基質となる大豆や澱粉、小麦等に膨化処理を施してから製麴を行うことで麴のプロテアーゼ活性を高め、窒素利用率を向上させた報告がある²²⁻²⁴⁾。同様に魚醤油の素材となるオキアミに膨化処理を行ってから魚醤油を製造した例があり、その結果うま味が強化された²⁹⁾。小島ら¹³⁾および鈴木ら²⁵⁾の

Effect of Halotolerant Starter Microorganisms Inoculation to the Fermentation and the Quality of Fish Sauce
Shuji YOSHIKAWA (Hokkaido Food Processing Research Center, Hokkaido Local Independent Administrative Agency Hokkaido Research Organization)

例では、麴を用いて諸味を仕込むとともに気密性の包装材料で密閉して発酵しており、麴の利用によるタンパク質の分解促進のみならず、発酵期間中に諸味中の成分が酸化することを防止すれば、魚醤油独特の不快臭が抑制可能であると報告されている。

魚醤油製造にスターターを導入した例には、*Tetragenococcus halophilus* と *Zygosaccharomyces rouxii* の添加による魚臭の抑制^{19, 20)}、および Uchida ら²¹⁾の醤油麴と *T. halophilus* の併用などがある。Uchida らの例では、ハクレン (*Hypophthalmichthys molitrix*) に醤油麴と *T. halophilus* を添加して室温で発酵させ、発酵開始後に諸味の pH が低下することを観察している。

本研究の魚醤油では大麦麴 (*Aspergillus oryzae*) を使用しており、大豆と小麦を原料とする醤油麴と基質は違うが、麴の利用により諸味のタンパク質の分解が促進され、諸味への麴添加が呈味成分の増強に有効であることを確認した。また、麴による糖化とその他の微生物スターターを接種して行われる並行複発酵の試みは、醤油麴と *T. halophilus* および *Z. rouxii* を添加して魚臭を抑制した水谷ら¹⁹⁾、麴 (*Aspergillus tamarii*)、耐塩性乳酸菌 (*Tetragenococcus muriaticus*) と酵母 (*Candida etchellsii*, 旧称 *Torulopsis nodaensis*) を添加してうま味の増強と魚臭の抑制を図った堂本ら²⁶⁻²⁹⁾の例がある。

著者らは *A. oryzae* を接種した大麦麴由来の糖化酵素によりもろみの分解を促進し、*Z. rouxii* および *T. halophilus* に加え、これまで魚醤油の製造に使用されたことのない *Candida versatilis* をもろみに接種することでうま味の増強と醤油用の芳香の付与、魚臭の低

減を同時に実現した³⁰⁾。本製造法は3種の耐塩性微生物による複雑な並行複発酵であるため発酵の解析は複雑であるが、スターター添加による成分への影響に加え、スターター間の相互作用や諸味の菌叢への影響などが解明できれば魚醤油の品質向上に資するところが多いと考えた。

3. 微生物スターターの接種が魚醤油の成分に与える影響

第1表に示す各種の組み合わせの麴およびスターターで発酵させた魚醤油の遊離アミノ酸組成を第2表に示す。全ての魚醤油から主にアスパラギン酸、アラニン、グルタミン酸、グリシン、リジン、およびアンセリンが検出された。麴もしくは耐塩性微生物を接種した魚醤油に比べて、これらを接種しない No.1 ではアルギニンとセリンは少なく、逆にグリシン、チロシン、アンセリン、オルニチンが多かった。他の遊離アミノ酸にはこれらの試料間に特徴的な傾向は見られなかった。オルニチンおよびシトルリンは乳酸菌や麴菌 (*A. oryzae*) がアルギニンを分解して生じることが知られている³¹⁾。このことは、魚醤油のアミノ酸組成において、*T. halophilus* を接種した魚醤油のうち、同時に *Z. rouxii* を接種していない No.5 と 8 でアルギニンの含有量は他の魚醤油より少ないが、オルニチン含量が多いことを説明していると考えられる。*Z. rouxii* と *T. halophilus* を同時に接種した No.7 と 9 において *Z. rouxii* が *T. halophilus* によるアルギニンからオルニチンへの変換を抑制した可能性が考えられる。

Z. rouxii を接種した No.3, 6, 7 および 9 の有機酸総量は他の魚醤油に比べ少なかったのに対し、*T.*

第1表 各試験区のスターター組み合わせ

No.	大麦麴	<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	<i>T. halophilus</i>
1	—	—	—	—
2	+	—	—	—
3	+	+	—	—
4	+	—	+	—
5	+	—	—	+
6	+	+	+	—
7	+	+	—	+
8	+	—	+	+
9	+	+	+	+

第2表 種々に組み合わせた微生物スターターで84日間発酵させた魚醤油の遊離アミノ酸組成(mg/100ml)

アミノ酸	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
アラニン	532	676	710	689	674	750	698	704	667
アルギニン	27	410	697	523	165	758	697	276	670
アスパラギン	89	77	nd	58	81	30	49	78	nd
アスパラギン酸	336	636	566	589	654	600	613	609	604
グルタミン酸	613	715	821	801	806	890	795	826	844
グルタミン	nd	nd	nd	9	15	nd	14	5	nd
グリシン	543	451	479	475	451	520	461	466	475
ヒスチジン	82	127	158	93	150	174	136	164	154
イソロイシン	223	395	428	434	406	439	429	436	446
ロイシン	433	732	731	794	754	730	788	810	822
リジン	695	732	921	864	813	1,010	845	881	912
セリン	18	381	414	398	382	445	401	392	412
メチオニン	189	250	281	282	269	302	269	284	302
フェニルアラニン	176	314	381	373	332	401	358	361	379
プロリン	190	423	410	502	385	432	391	407	392
スレオニン	251	372	416	399	374	443	395	396	408
トリプトファン	25	16	40	14	11	37	42	12	35
チロシン	316	244	196	92	223	203	186	218	192
バリン	312	511	581	565	533	608	565	565	569
β -アラニン	nd	183	118	137	164	94	159	128	115
α -アミノ-n-酪酸	nd	18	21	26	27	nd	23	29	nd
γ -アミノ酪酸	2	54	31	32	23	26	38	22	nd
β -アミノイソ酪酸	nd	37	nd	8	68	nd	nd	46	29
アンセリン	950	523	640	608	611	692	617	636	625
カルノシン	24	7	8	5	13	8	10	7	8
シスタチオニン	nd	nd	nd	3	28	nd	21	27	nd
ヒドロキシリジン	nd	nd	nd	2	nd	nd	nd	nd	nd
ヒドロキシプロリン	35	36	34	46	31	37	33	32	34
1-メチルヒスチジン	0	0	0	3	nd	nd	nd	nd	nd
3-メチルヒスチジン	3	2	2	nd	nd	2	2	nd	2
オルニチン	408	108	6	137	336	7	7	306	9
ホスホセリン	8	37	20	25	31	17	26	27	21
サルコシン	nd	nd	13	17	24	16	22	25	13
合計	6,480	8,467	9,123	9,003	8,834	9,671	9,090	9,175	9,139

No.1～9のスターターの組み合わせは第1表のとおり。nd: 検出されず。

halophilus を接種した No.5 および 8 では、有機酸総量が高い値を示した（第3表）。全ての魚醤油から主に乳酸、酢酸およびピログルタミン酸が検出され、コハク酸は酵母を加えた魚醤油のみから検出された。醤油醸造において酵母が自己消化する際にコハク酸を生

じることが知られており³²⁾、魚醤油のコハク酸も醤油と同様の機序で生成したものと考えられる。*Z. rouxii* を添加した No.3, 6, 7 および 9 でコハク酸含量が多く、乳酸含量が少なかった。醤油の発酵において、*Z. rouxii* の生育が *T. halophilus* に比べて優勢な

第3表 異なる組み合わせのスターターで84日間発酵させた魚醤油の有機酸組成(mg/100ml)

有機酸	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
リンゴ酸	93	102	171	123	111	183	163	112	165
ピログルタミン酸	420	653	662	637	637	675	626	617	628
乳酸	2,870	3,642	1,365	2,959	4,245	1,333	1,324	3,880	1,352
酢酸	914	489	701	621	536	227	591	425	431
コハク酸	nd	nd	415	113	nd	443	273	64	412
ピルビン酸	2	10	4	4	5	3	3	7	5
ギ酸	38	20	12	3	1	4	10	2	5
クエン酸	5	nd	47	16	10	41	36	13	35
合計	4,342	4,916	3,377	4,476	5,545	2,909	3,026	5,120	3,033

No.1～9のスターターの組み合わせは第1表のとおり。nd：検出されず

場合、*T. halophilus* の増殖が抑制されるため、諸味のpHが高くなることが知られているが³³⁻³⁵⁾、これらの試験区においても*Z. rouxii*による*T. halophilus*の増殖抑制により乳酸生成量が減少したと考えられる。

*T. halophilus*と*C. versatilis*を混合した諸味は、*T. halophilus*を単独接種した諸味とほぼ同じpHの低下傾向を示し¹⁰⁾、両試験区の有機酸組成は酵母に由来すると考えられるコハク酸以外において酷似していた。醤油醸造においては*T. halophilus*と*C. versatilis*が互いの生育に強い相互作用を及ぼさない関係にあることが知られており³⁶⁾、魚醤油の諸味中においても同様の関係があると推察された。

Parkら³⁷⁾は、ベトナムの魚醤油の味に寄与する成分が、アラニン、アスパラギン酸、シスチン、グルタミン酸、ヒスチジン、メチオニン、プロリン、チロシン、バリンおよびピログルタミン酸であると報告している。第2表および第3表より魚醤油の遊離アミノ酸量と有機酸の総量に対するこれらの呈味成分の割合を求めると、麴非添加区の21.7%に対し、麴添加区では30.7～33.6%と高い値を示した。このことは麴の添加が単にタンパク質分解により遊離アミノ酸量を増加させるだけでなく、味を強化するのに有効であることを示唆している。官能的にも麴を加えた魚醤油は先味および後味が強かった。

魚醤油の還元糖量の変化を第1図に示した。麴も耐塩性微生物も加えていないNo.1の還元糖量は発酵期間を通じて魚醤油の中で最も低く、麴を加えた試験区では28日目までに還元糖の増加が認められ、麴のみを加えたNo.2は最も高い値を示した。麴と

*T. halophilus*を接種したNo.5の還元糖量は42日目以後に急激に減少した。麴と*C. versatilis*を接種したNo.4および麴と*C. versatilis*、*T. halophilus*を同時に接種したNo.8においては還元糖の減少度が56日目以降急激に緩やかになった。一方、他の耐塩性微生物を接種した魚醤油の還元糖量はわずかに変化しただけであった。発酵28日目の還元糖量は麴を添加していない魚醤油では著しく少ないのに対し、麴のみを添加したものでは9,000mg/100mlを超える量が存在した。これらのことは魚醤油中の還元糖はほとんどが麴の糖化作用によって供給されることを示しており、麴と耐塩性微生物の双方を接種していないNo.1は、糖質の大量供給源がないため、特に還元糖が少ないと考えることができる。麴に加えて耐塩性微生物を接種したNo.3～9が麴のみを添加したNo.2に比べて低い還元糖量を示したことは、耐塩性微生物によって還元糖が消費されることを示唆している。また、耐塩性微生物を接種した魚醤油の発酵28日目の還元糖量は*T. halophilus*を単独で接種したものが最も高く、*C. versatilis*を単独接種したNo.4および*C. versatilis*と*T. halophilus*を同時に接種したNo.8がそれに次いで高く、*Z. rouxii*を含む耐塩性微生物を接種した魚醤油(No.3, 6, 7, 9)の還元糖量はこれらより著しく低かった。これらの結果より、還元糖の消費は*T. halophilus*より耐塩性酵母(*Z. rouxii*, *C. versatilis*)の方が多く、耐塩性酵母では*C. versatilis*よりも*Z. rouxii*の方が多いことを示唆している。著者らは発酵初期の還元糖量が魚醤油の褐変度に影響し、褐変が麴の添加により進行し、耐塩性微生物、特に酵母スターターを

発酵開始時点に接種することで発酵中の魚醤油の褐変化が抑制されることを確認している¹⁰⁾。

エタノールは酵母を接種した魚醤油で生成した(第2図)。すなわち、*Z. rouxii*を接種したNo.3, 6, 7および9の魚醤油では、発酵開始後28日間でエタノールが多く生成し、その後減少した。一方、*C. versatilis*を接種した魚醤油(No.4, 8)では28日目以降に

エタノール含量は増加し、*C. versatilis*を単独で接種したNo.4と*C. versatilis*と*T. halophilus*を接種したNo.8では、発酵中盤にエタノール量が最大になった。よって、*Z. rouxii*と*C. versatilis*の双方を接種したNo.9の魚醤油におけるエタノールの生成は、発酵期間の前半は*Z. rouxii*、後半は*C. versatilis*によると考えられる。No.5の諸味には耐塩性酵母を接種してい

第1図 異なる組み合わせのスターターを接種して発酵させた魚醤油の還元糖量
還元糖量はグルコース換算
No.1～9のスターターの組み合わせは第1表のとおり。
凡例：×, No.1; +, No.2; ●, No.3; ◆, No.4; ▲, No.5; ○, No.6; ◇, No.7; △, No.8; *, No.9。

第2図 異なる組み合わせのスターターを接種して発酵させた魚醤油のエタノール量
No.1～9のスターターの組み合わせは第1表のとおり。
凡例：×, No.1; +, No.2; ●, No.3; ◆, No.4; ▲, No.5; ○, No.6; ◇, No.7; △, No.8; *, No.9。

ないにもかかわらず、56日目以降エタノール濃度が増加し続けた。さらに、エタノールが増加するにつれて還元糖量が急激に低下した（第1図）。この試験は

実際の魚醤油生産と同様に非無菌的に行っており、このエタノール生産は汚染酵母により還元糖が消費されたことによると推察された。以上のようにエタノール

第3図 異なる組み合わせのスターターを接種して発酵させた魚醤油の香気成分
No.1～9のスターターの組み合わせは第1表のとおり。

香気成分：(a) 2-PE；(b) HEMF；(c) 4-EG。

凡例：●, No.3；◆, No.4；▲, No.5；○, No.6；◇, No.7；△, No.8；*, No.9。

No.1 および No.2 では 2-PE, HEMF および 4-EG は検出されなかった。

の含量は耐塩性酵母の生育と密接な関係があると強く示唆されたが、魚醤油発酵期間において生成したエタノールの減少は、エチルエステルなど他の化合物への変換のために消費されたと考えられる。

魚醤油が従来の魚醤油と品質が大きく異なる点の一つに耐塩性微生物の接種により良好な香気が付与されることにある³⁰⁾。そこで、耐塩性酵母で発酵させた魚醤油に特徴的ないくつかの香気成分も分析した。

発酵期間中における魚醤油中の2-フェニルエタノール(2-PE)、4-ヒドロキシ-2(or 5)-エチル-5(or 2)-メチル3(2H)-フラノン(HEMF)、および4-エチルグアヤコール(4-EG)の含有量変化を第3図に示す。

2-PEの濃度は耐塩性微生物を加えた魚醤油の多くで10ppm以下であった。しかし、*C.versatilis*と*T. halophilus*を接種したNo.8の魚醤油では70日目に20ppmに達した。HEMFはNo.3、4および5では15ppm以下であったが、No.6～9では20ppmを超えた。特にNo.6の魚醤油では56日目に試料中で最高の45ppmに達した。No.8の魚醤油はどのサンプリング時点においても試料中で最高の4-EG濃度を示し、最高値は5ppmに達した。2-PEは*Z. rouxii*を接種した全ての魚醤油から、4-EGは*C. versatilis*を接種した全ての魚醤油から検出された。

HEMFは醤油の特徴香成分の一つであり、特にHEMFは酵母が生成する化合物であることが知られている^{38, 39)}。これまでの魚醤油の香気成分に関する報告はいくつかあるが^{8, 20, 40-42)}、これらの成分が検出されたという報告は無く、魚醤油発酵においてこれらの香気成分が検出された場合は、諸味に耐塩性酵母を接種したことで生成したと考えることができる。

*T. halophilus*のみを接種した魚醤油(No.5)からは、発酵70日目以降に耐塩性酵母が特異的に生成する2-PE、HEMF、4-EGが検出された。No.5では発酵後半に還元糖量の急激な減少とともにエタノール濃度が増加していることから、これらは一時的に混入した汚染酵母によって生成されたと考えられた。

4-EGは過剰に含まれると、不快な薬品臭として感じられることが知られている。横塚ら⁴⁴⁾は官能評価が良好な醤油における4-EGの濃度範囲を調べ、その好ましい濃度範囲が0.5～1ppmであり、2ppmを上回らないことを報告している。この基準に照らし合わせると、本研究の魚醤油では、*C. versatilis*を含む耐

塩性微生物スターターを添加した魚醤油の全てが84日目には好ましい濃度範囲に相当する4-EGを生成していた。

醤油様香、酸味、塩味、甘味、うま味、色調の明るさ、および総合的な好ましさの7項目について、スターターの組合せの異なる魚醤油を官能評価したところ、醤油様の香り、色調の明るさ、うま味、総合的な好ましさについて明らかな有意な品質向上効果が見られた(第4図)。醤油様香は麴と耐塩性微生物の双方を加えた試験区全て(No.3～9)において付与された。この結果は醤油の製造において耐塩性酵母により生成する3種類の典型的な醤油香成分が、これらの試験区から検出された先の分析結果と符合する。*Z. rouxii*のみを接種した魚醤油(No.3)、または3種の耐塩性微生物のうち2種を接種した魚醤油(No.6, 7, 8)は、麴も耐塩性微生物も接種していない魚醤油(No.1)に比べてうま味が有意に高かった。一方、色調の明るさに関する評価は、褐変度の評価とほぼ一致し、麴の添加により色調が暗くなり、耐塩性酵母の接種によって麴を加えているにもかかわらず色調が暗くならない傾向があった。

麴を加えた魚醤油は総合的な好ましさで高い値を示し各試験区間の相対的な官能評価の傾向がうま味と醤油様香におけるそれと類似していることから、これら二つの要素が魚醤油の官能評価上の好ましさ強く影響を与えていると考えられる。

4. 魚醤油発酵中の微生物スターター間の相互作用および微生物叢に与える影響

菌叢の変化と魚醤油の成分変化との関連性、諸味中の微生物間の相互関係を明らかにするには、発酵中の諸味の菌叢の変化と魚醤油に含まれる成分の経時変化を照合しなければならないが、これまで微生物スターターを使用した魚醤油製造の報告において発酵期間中の微生物の消長を追った例はない。そこで、発酵中の諸味の菌叢変化を培養法および培養に依存しない遺伝子学的手法であるPCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE)を用いて解析し、スターターが菌叢に与える影響のみならずスターター間の相互作用などについても調べた。

PCR-DGGEでは試料に含まれる個々の菌株の定量

第4図 異なる組み合わせのスターターで発酵させた魚醤油の官能評価

接種した麹およびスターターの組み合わせは第1表に示したとおり。麹のみに添加したNo.2を基準に他の魚醤油について、(a)醤油様香、(b)うま味、(c)色調の明るさ、(d)色調の明るさを評価した。色調の明るさは6段階で評価した：0=極めて暗い；1=暗い；2=やや暗い；3=標準品と同程度；4=やや明るい；5=明るい；6=極めて明るい。他の項目は5段階で評価した：1=とても弱い(極めて好ましくない)；2=弱い(好ましくない)；3=標準品と同程度；4=強い(好ましい)；5=とても強い(極めて好ましい)。評点は二元配置法による分散分析によって処理した⁴³⁾。異なる上付文字は有意差を示す $p<0.05$ 。

はできないが、培養不可能な微生物も含め菌叢を構成する微生物種を容易に解析可能で、腸内細菌叢の解析⁴⁵⁾や食品の発酵中の微生物叢変化の解析⁴⁶⁻⁵¹⁾に応用されている。

耐塩性微生物を接種しなかった諸味 (No.1 と 2) からは、耐塩性酵母は発酵期間を通じて検出されず、麴やサケには優勢を占める耐塩性酵母が存在しないことが確認された (第 5a 図)。No.5 の諸味では、*T. halophilus* のみを接種したにもかかわらず、発酵 42 日目以降に耐塩性酵母が検出された。*C. versatilis* を単独で接種した No.4 と *C. versatilis* と *T. halophilus* を接種した No.8 は類似した耐塩性酵母数の推移を示した。*Z. rouxii* と *C. versatilis* を接種した No.6 では発酵期間を通じて耐塩性酵母数はほぼ一定であった。*Z. rouxii* を単独接種した No.3 と *Z. rouxii* と *T. halophilus* を接種した No.7 では、ほぼ同じ耐塩性酵母数の推移を示した。3 種類の耐塩性微生物を全て接種した No.9 の耐塩性酵母数は、発酵前半は No.3 および 7 と同様の傾向を示し、56 日目以降に再度増加した。

T. halophilus を接種しなかった諸味 (No.1 ~ 4 および 6) では発酵期間を通じて、耐塩性乳酸菌は検出されなかった (第 5b 図)。

耐塩性酵母と耐塩性乳酸菌の双方を接種した魚醤油の諸味における耐塩性乳酸菌の菌数変化は 2 つのパターンに分けられる。一方のパターンは、*T. halophilus* と *C. versatilis* を接種した No.8 の諸味に見られるパターンで、*T. halophilus* のみを接種した No.5 の諸味におけるパターンに類似していた。したがって、*C. versatilis* は耐塩性乳酸菌の増殖に影響を与えないことを示唆している。他方のパターンは No.7 と 9 の諸味に見られるもので、耐塩性乳酸菌の生菌数は発酵開始直後から低下し始め、発酵 28 日目を最後に検出限界以下になった。

諸味中から検出された真菌類は *Z. rouxii*, *C. versatilis*, *Pichia guilliermondii*, および *A. oryzae* の 4 種のみであった (第 6 図)。*Aspergillus* 由来のバンドは麴を添加した全ての区で検出された。麴も耐塩性微生物も用いなかった No.1 からは真菌類が検出されず、サケのミンチ中には元々優勢となっている真菌類は存在しないことが示された。酵母非添加の No.1 と 2 では、発酵期間を通じて酵母に由来するバンドは検出されなかった。醤油では高塩分下の醸造により非耐塩性

の微生物が淘汰されるが⁵²⁾、魚醤油においても同様の理由で諸味中に存在する真菌の種類が限られているものと考えられる。

Z. rouxii を接種した No.3, 6, 7 および 9 では、添加した麴および酵母のみが検出されたのに対し、*Z. rouxii* を接種していない No.2, 4, 5 および 8 では、麴および接種した酵母に由来しないバンドが検出された。特に *T. halophilus* と麴のみを添加した No.5 では発酵後半に *C. versatilis* および *P. guilliermondii* が検出された。この結果は諸味の耐塩性酵母数の経時変化と一致している (第 5 図)。

培養法および PCR-DGGE による解析結果から、*C. versatilis* は他の酵母および乳酸菌の増殖に影響を与えないが、*Z. rouxii* は野生酵母および乳酸菌の増殖を抑制することが示唆された (第 7a 図)。*P. guilliermondii* は耐塩性を有し⁵³⁾、醤油の熟成香として重要な 4-EG⁴⁴⁾ など有用な香気を生成する一方で変敗の原因となる産膜酵母の一種としても知られ⁵⁴⁾、産膜に伴い高濃度のイソブチルアルコール、イソアミルアルコール、イソ酪酸、イソ吉草酸および 2-PE からなる不快臭を生成する⁵⁵⁾。このように *P. guilliermondii* の増殖は魚醤油の品質を不安定化するので発酵上好ましくない。

魚醤油の製造は非無菌的な条件下で行われることから野生酵母が生育することは常に起こりえる。野生酵母の偶発的な増殖や乳酸菌の過度な増殖は、香りや呈味などが不安定化する原因となる。よって、魚醤油の発酵開始時における諸味への *Z. rouxii* の接種は、野生酵母の増殖や乳酸菌の過剰発酵による品質低下の防止に効果的であると考えられる。

以上を総合すると、麴と耐塩性微生物スターターを発酵開始時に魚醤油の諸味に接種すると、魚醤油の色調改善、および醤油様香とうま味の付与に有効であり (第 7b 図)、特に、麴 + *Z. rouxii* + *T. halophilus*, 麴 + *Z. rouxii* + *C. versatilis*, 麴 + *Z. rouxii* + *C. versatilis* + *T. halophilus* の組み合わせが理想的な品質の魚醤油を製造する上で適していることが明らかになった。

5. おわりに

本稿では魚臭さなど従来の魚醤油が持つ諸課題の解決に向けて微生物を用いた魚醤油の発酵技術に関する

第5図 異なる組み合わせのスターターで発酵させた魚醤油諸味中の耐塩性酵母数(a)および耐塩性乳酸菌数(b)の経時変化
 凡例: ●, No.3; ◆, No.4; ▲, No.5; ○, No.6; ◇, No.7; △, No.8; *, No.9.
 接種した麹およびスターターの組み合わせは第1表に示したとおり。No.1
 および No.2 では耐塩性酵母は検出されず, No.1 ~ 4 および 6 では耐塩性乳
 酸菌は検出されなかった。

諸研究や著者らが開発した麹と *Z.rouxii*, *C.versatilis* および *T.halophilus* をスターターとして添加する発酵技術を導入することにより, 呈味成分の増強や香り成分の付与, 野生微生物の増殖による品質不安定化の防止などのスターターの添加効果について紹介した。

本技術は刺身用タコの製造工程で排出されるタコ皮や剥きウニの製造工程で排出される消化管など, 腐敗

しやすくこれまで魚醤油の製造に利用できなかった未利用水産資源を素材とした魚醤油製造において実用化され, これらの調味料及びこれらを使用した加工品も好評である^{56,57)}。さらに, 油脂含量が多い上に特有の臭気があり魚醤油の原料に適さなかった魚類の頭部や魚醤油諸味の搾汁残渣を原料に発酵技術を用いて魚醤油を製造する実証試験が行われ, 魚醤油やそれを用い

第 6 図 異なる組み合わせのスターターを接種した魚醤油諸味における真菌叢の DGGE プロファイル

接種した麹およびスターターの組み合わせは第 1 表に示したとおり。

凡例：1, *P. guilliermondii*; 2, *Z. rouxii*; 3, *C. versatilis*; 4, No. 4; *A. oryzae*.

た加工品が試験販売された⁵⁷⁾。このように魚醤油の製造に発酵技術を用いると、諸課題の解決及びこれまで利用困難であった資源が活用可能となり、水産加工副産物の減量化を図る上でその有効性は増している。今後も、魚醤油の製造技術がより進化し、限りある水産資源がより有効活用されるとともに、活用方法がさらに開発されることで魚醤油の持つ優れた風味が広く認知され、よりいっそう需要が高まることを期待している。

6. 謝辞

魚醤油の香気成分分析法に関し、貴重なアドバイスをいただいた（財）日本醤油技術センターの中台忠信博士、（地独）北海道立総合研究機構 食品加工研究センター 阿部茂博士、DGGE 法による魚醤油の諸味の微生物叢解析に際し御指導、御助言をいただいた新聞共同運輸（株）南田公子博士、北海道大学大学院農学研究科 太田恭平氏、（地独）北海道立総合研究機構 食品加工研究センター 長島浩二博士に深く感謝申し上げます。

(a) 麹菌,耐塩性微生物スターターおよび野生酵母の相互作用

(b) 耐塩性微生物スターターの接種が魚醤油の品質に与える影響

第7図 耐塩性微生物スターターの接種が魚醤油の発酵および品質に与える影響

また, HPLC による有機酸分析および GC によるエタノール含量の測定にご助力いただいた(地独)北海道立総合研究機構 食品加工研究センター 田村吉史研究参事, 田中彰研究主任に深謝申し上げます。

参考文献

- 1) 任 恵峰, 林 哲仁, 遠藤英明, 渡辺悦生: 醸協, **59**, 1929-1935 (1993)
- 2) 野田文雄: 醸協, **88**, 531-536 (1993)
- 3) 柳田藤治, 小泉幸道, 村 清司, 田中秀夫: 醸協, **89**, 698-703 (1994)
- 4) P.C.Sanchez: 日本乳酸菌学会誌 **10**, 19-28 (1999)
- 5) W.R. Aryanta: 日本乳酸菌学会誌 **10**, 90-102 (2000)

- 6) 藤井建夫: 魚の発酵食品(成山堂書店, 東京), 57-75 (2001)
- 7) 竹島文雄, 鍋島裕佳子, 船津保宏, 川崎賢一: 富山県食品研究所研究報告, **4**, 1-8 (2001)
- 8) S.E.Gilliland: Bacterial Starter Cultures for Foods, (CRC Press, Boca Raton) (1985)
- 9) 食品工業微生物利用研究会: 食品工業微生物データブック, (東京化学同人, 東京) (1994)
- 10) S.Yoshikawa, H.Kurihara, Y.Kawai, A.Tanaka, T.Nishikiori and T.Ohta: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 6410-6417 (2010)
- 11) S.Yoshikawa, K.Yamazaki, H.Kurihara, A.Tanaka, T.Nishikiori, T.Ohta and Y.Kawai: *Food Microbiol.*, **27**, 509-514 (2010)
- 12) 小島登貴子, 尾畑賢一, 大島貞雄: 埼玉県工業

- 技術センター報告, **1**, 188-192 (1999)
- 13) 船津保宏: 日食科工, **49**, 1-11 (2002)
- 14) 藤井幹夫, 丸本千草: 特許 4024445 号 (1999)
- 15) 藤井建夫: 香料, **113**, 46-48 (1975)
- 16) 早川 潔, 上野義栄, 中西貞博, 本多 靖, 小室 均, 菊島 直, 莊 咲子: 生物工学, **71**, 245-251 (1993)
- 17) 酒井 昇: 特開平 8-56606 号 (1995)
- 18) 横山定治: ジャパンフードサイエンス, **45** (9), 34-39 (2006)
- 19) 水谷忠士, 平井佐知, 上田要一, 前橋明佳, 加藤哲也, 大平利明: 特開 2002-191321 号 (2000)
- 20) 堂本信彦, 王 鏗智, 森 徹, 木村郁夫, 郡山剛, 阿部宏喜: 日水誌, **67**, 1103-1109 (2001)
- 21) M.Uchida, J.Ou, B.W.Chen, C.H.Yuan, X.H.Zhang, S.S.Chen, Y.Funatsu, K.Kawasaki, M.Satomi and Y.Fukuda: *Fish. Sci.*, **71**, 422-430 (2005)
- 22) 大石章夫, 宇津野紀美子, 渡部一憲, 漆細益己, 幾田一哉, 杉本 馨, 原田 宏: 日食科工, **44**, 265-270 (1997)
- 23) 岸 圭一: 醸協, **76**, 223-227 (1981)
- 24) 竹田良作, 谷川善弘, 土屋徹明: 醬研, **5**, 215-220 (1979)
- 25) 鈴木義克: 特開 2009-213453 (2009)
- 26) 堂本信彦, 王 鏗智, 浜田晋吾: 特許 3537211 号 (2004)
- 27) 堂本信彦, 三ヶ尻昭博: 特許 3503885 号 (2003)
- 28) 堂本信彦, 吉富文司, 王 鏗智: 特許 3681210 号 (2005)
- 29) 堂本信彦, 吉富文司: 特許 3881147 号 (2006)
- 30) 吉川修司, 田中 彰, 錦織孝史, 太田智樹: 日食科工, **53**, 281-286 (2006)
- 31) 小笠原武, 伊藤克己, 阿部信行, 本間英雄: 農化, **37**, 208-213 (1963)
- 32) 中山重徳, 竹田良作: 調味科学, **16**, 1-6 (1969)
- 33) 楠本英蔵, 稲森和夫, 内田一生, 吉野 宏: 醬研, **3**, 283-289 (1977)
- 34) 松本伊左尾, 今井誠一: 醸協, **76**, 696-700 (1981).
- 35) 藤元秀雄: 醬研, **8**, 260-266 (1982)
- 36) 藤元秀雄: 醤油の科学と技術 (増補, 枅倉辰六郎編), (日本醸造協会, 東京), 152-227 (1994)
- 37) J-N.Park, K.Ishida, T.Watanabe, K.Endoh, K.Watanabe, M.Murakami and H.Abe: *Fish. Sci.*, **68**, 913-920 (2002)
- 38) N.Nunomura, M.Sasaki, Y.Asao and T.Yokotsuka: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 491-495 (1976)
- 39) 佐々木正興, 布村伸武: 日本化学会誌, **1981**, 736-745 (1981)
- 40) 船津保宏, 加藤一郎, 川崎賢一, 小長谷史郎, 白井一茂: 日水誌, **67**, 489-496 (2001)
- 41) 船津保宏, 川崎賢一, 小長谷史郎: 日水誌, **67**, 1110-1119 (2001)
- 42) K.Fukami, S.Ishiyama, H.Yaguramaki, T.Masuzawa, Y.Nabeta, K.Endo and M.Shimoda: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5412-5416 (2002)
- 43) G.W.Snedecor and W.G.Cochran: *Statistical Methods* (6th ed.), (Iowa State University Press, Ames.) (1967)
- 44) 横塚 保, 浅尾保夫, 逆井利夫: 農化, **41**, 442-447 (1967)
- 45) K.Minamida, IN.Sujaya, A.Tamura, N.Shigematsu, T.Sone, A.Yokota, K.Asano, Y.Benno and F.Tomita: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 244-250 (2004)
- 46) L.Cocolin, L.F.Bisson and D.A.Mills: *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**, 81-87 (2000)
- 47) C.B.Meroth, W.P.Hammes and C.Hertel: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 7453-7461 (2003)
- 48) W.Masoud, L.B.Cesar, L.Jespersen and M.Jakobsen: *Yeast*, **21**, 549-556 (2004)
- 49) K.Rantisou, R.Urso, L.Iacumin, C.Cantoni, P.Cattaneo, G.Comi and L.Cocolin: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1977-1986 (2005)
- 50) D.S.Nielsen, S.Hønholt, K.Tano-Debrah and L.Jespersen: *Yeast*, **22**, 271-284 (2005)
- 51) D.S.Nielsen, T.S.Anderson, O.D.Teniola, L.BanKoffi, M.Owusu and W.H.Holzappel: *Int. J. Food Microbiol.*, **114**, 168-186 (2007)
- 52) 門脇 清: 醤油の科学と技術 (増補, 枅倉辰六郎編), (日本醸造協会, 東京), 121 -151 (1994)
- 53) L.Butinar, N.Gunde-Cimerman, S.Santos and I.Spencer-Martines: *FEMS Microbiol. Lett.*, **244**, 229-234 (2005)
- 54) 恩田 匠, 乙黒親男, 飯野修一, 後藤昭二: 日食科工, **44**, 463-469 (1997)
- 55) 富田 実, 山本澄人: 醸協, **92**, 853-859 (1997)
- 56) 吉川修司, 田村吉史, 阿部 茂, 佐藤敬彦, 小山 洋: 北海道立食品加工研究センター報告, **8**, 29-33 (2009)
- 57) 吉川修司: *Techno-Innovation*, **75**, 24-28 (2010)