研究ノート

米麴を使用して製造したあゆなれずしの熟成中の生菌数, pH, 有機酸および遊離アミノ酸の変化

野村幸司^{1*}, 横井健二¹, 田子泰彦²

¹ 富山県農林水産総合技術センター食品研究所

² 富山県農林水産総合技術センター水産研究所

Microbiological and Chemical Characteristics of Ayu-narezushi Prepared with Rice-koji

Koji Nomura^{1*}, Kenji Yokoi¹ and Yasuhiko Tago²

¹ Food Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural Forestry and Fisheries
Research Center, Yoshioka 360, Toyama, Toyama 939-8153

² Fisheries Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural Forestry and Fisheries
Research Center, Takatsuka 364, Namerikawa, Toyama 936-8536

In the preparation of *ayu-narezushi*, a traditional food in Toyama, Japan, rice-koji is added to the other ingredients and then subjected to a 40-day ripening period. In this study, viable cell counts, pH, organic acids and free amino acids were periodically analysed during ripening. After 8 days of ripening, the number of lactic acid bacteria reached approximately 10^8 cfu/g, and then onward, numbers were maintained in the same order of magnitude. The pH was drastically reduced to 4.8 in the first 8 days of ripening, and was thereafter maintained between 4.6 and 4.8. Lactate content was drastically increased within the first 22 days. Furthermore, total free amino acids were increased by 22 days of ripening; thereafter increasing moderately. These results showed that lactic acid fermentation developed rapidly in the ripening of *ayu-narezushi* made with rice-koji.

(Received Mar. 9, 2015; Accepted Jun. 15, 2015)

Keywords : ayu, narezushi, rice-koji, lactic acid fermentation

キーワード : アユ, なれずし, 米麴, 乳酸発酵

なれずしは, さまざまな魚種を用いて日本各地で伝統的に製造されており¹⁾, 製法についても地域性があると思われる。例えば, 近畿地方では塩と魚と飯だけで漬込む製法(ナレズシ系), 関東以北では麴を加えることによって発酵を早める製法(イズシ系)で作られる場合が多い。一方, 北陸地域はその中間に位置することから両方の食文化が残るとされており²⁾, 北陸地域の東部に位置する富山県では, さばずしではナレズシ系, イズシ系両方の製法が伝えられている³⁾。

富山県では, あゆなれずしは江戸時代には富山藩から徳川幕府への献上品とされるなど越中国(富山県)の名物であったとされ⁴⁾, 古くから作られてきたと思われる。その製法は, 一部にナレズシ系の製法が存在したことが伝え聞かれるが, 現在は主に麴を加えるイズシ系の製法が漁師や愛好家によって伝承されており, 商業的には製造されていない。あゆなれずしに関しては, 科学的な知見は乏しく, 麴を使用しないもの(ナレズシ系)について, 有機酸, カル

シウム, pH 等の経時変化⁵⁾や微生物相⁶⁾を調べた報告等があるが, 麴を使用したもの(イズシ系)についての知見はほとんど見られない。本研究では, 麴を使用したイズシ系製法のあゆなれずしについて, 発酵熟成の状況や特徴を明らかにするため, 生菌数, pH, 有機酸および遊離アミノ酸について分析したので報告する。

1. 実験方法

(1) 試料

i) 原料および製造方法

原料魚体は, 2013年10月21日に富山県射水市の庄川で漁獲したアユ *Plecoglossus altivelis* を使用した。製造方法は, 本論文の著者らによって製造者から聞き取り, マニュアル化した製法⁷⁾とした。すなわち, まず原料の魚体を背開きして内臓を除去した後, 流水で洗浄した。次に, 魚体を5℃で20日間塩漬(5%振り塩)した。塩漬完了後, 流水で5分間塩出しした。そして, 以下のように本漬けを行った。塩出しした魚体約1kg(約50尾)と, 米飯7合,

¹ 〒939-8153 富山県富山市吉岡360, ² 〒936-8536 富山県滑川市高塚364

*連絡先 (Corresponding author), koji.nomura@pref.toyama.lg.jp

Table 1 Microbial counts (cfu/g) and pH of *ayu-narezushi* ripened under the experimental ambience

	Ripening periods (Days)							
	0 (Brined fish)	8	15	22	30	40	60	120
Standard plate count	4.1×10^3	9.6×10^7	1.6×10^8	6.4×10^8	5.2×10^8	2.4×10^7	3.7×10^7	1.0×10^8
Lactic acid bacteria	1.9×10^5	9.8×10^7	3.2×10^8	4.3×10^8	3.2×10^8	1.8×10^8	3.7×10^7	8.0×10^7
Fungi	2.0×10^2	7.3×10^5	8.9×10^5	6.0×10^6	6.5×10^6	5.0×10^5	6.8×10^6	1.1×10^8
pH	6.9	4.8	4.0	4.1	4.6	4.2	4.4	4.5

米麴 150 g を用意した。容量 5 リットルの漬け樽の底に清酒に浸したしゃもじを用いて米飯を敷いてから、米麴と細切りした唐辛子を米飯に振りかけ、さらにその上に開いた魚体を皮が上になるように隙間なく並べた。これを繰り返して、最上部を米飯で覆った後、プラスチック製の中蓋を被せ、重石 (6 kg) を置き、室温で熟成した。同時に 2 樽を製造し、1 樽を試験区として富山県農林水産総合技術センター食品研究所内で熟成した。もう 1 樽は富山県射水市の一般家庭内で熟成し、これを家庭区の試料とした。熟成場所は、直射日光が当たらず、空調設備の影響の少ない場所とした。

ii) 試料の採取

原料魚体、塩漬後の魚体、本漬け 8, 15, 22, 30, 40, 60, 120 日後の試験区の魚体および本漬け 40 日後の家庭区の魚体を試料とした。試料は最上部から順に採取し、魚体は皮を含めた全体を試料とした。

(2) 分析方法

気温を除く全ての分析は、2 回の分析値を平均して表記した。

i) 生菌数

滅菌したピンセットを用いて採取した試料に 9 倍量の滅菌リン酸緩衝液を加え、ストマッカーで均質化したものを段階希釈して試料とした。乳酸菌は GYP 白亜寒天培地⁸⁾を用い、混釈培養法により 30℃ 3 日間培養し、周囲に透明帯の生じたコロニーを計数した。一般生菌数は標準寒天培地を用い、平板塗抹培養法により 37℃ 2 日間培養し、生育したコロニーを計数した。真菌数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を用いて平板塗抹培養法により 28℃ 7 日間培養し、生育したコロニーを計数した。

ii) pH

試料 1 g を蒸留水で 10 ml に定容しホモジナイズした後、pH メーター (東亜ディーケーケー社製) の電極を挿入して測定した。

iii) 有機酸および遊離アミノ酸

Watanabe ら⁹⁾の方法に従い、試料 (約 3 g) を、冷 10% 過塩素酸を加えてホモジナイズし、水酸化カリウムにより中和後、0.45 μm のフィルターでろ過して試料溶液とした。有機酸については、試料溶液を高速液体クロマトグラ

フィー (検出、電気伝導度検出器 (島津製作所製 CDD-6A); カラム, Shim-pack SCR-102H×2 本 (300 mmL×8 mm I. D.); 移動相, 5 mM p-トルエンスルホン酸水溶液; 移動相流速, 0.8 ml/min; カラム温度, 45℃) に供して分析した。遊離アミノ酸については、試料溶液をアミノ酸自動分析装置 (日本電子製 JLC500/V2) に供して分析した。

iv) 気温

記録式温度計 (エスベックミックス社製 RTW-20S) を漬け樽付近に設置し、1 時間毎に気温を記録した。

2. 実験結果と考察

(1) 生菌数および pH

試験区の生菌数および pH の変化について Table 1 に示した。乳酸菌は、本漬け直前の魚体に 1.9×10^5 cfu/g 確認された。本漬け後は、8 日後には 9.8×10^7 cfu/g に増加し、以後 40 日後まで 10^8 台を保ち、60 日後以降は若干減少した。また、一般生菌数は本漬け 8 日後以降、乳酸菌数とはほぼ同等のオーダーで推移した。本研究において一般生菌数測定に用いた標準寒天培地には多くの乳酸菌種も発育するため、本漬け後の細菌叢は、乳酸菌が優占したと考えられる。真菌数は、本漬け 8 日後に 7.3×10^5 cfu/g 確認され、その後 $10^5 \sim 10^6$ cfu/g 台で推移した。pH は、本漬け後急激に低下し、8 日後には 4.8、15 日後には 4.0 となり、以後 4.0~4.6 の範囲で推移した。このように、本漬け後乳酸菌が優占し、pH の低下が急速に進行したことから、乳酸発酵が進行したと考えられた。

(2) 有機酸および遊離アミノ酸

試験区の有機酸の変化について Table 2 に示した。有機酸は、乳酸が多くの割合を占めた。本漬け後乳酸は急増し、その後増加速度は低下したが、120 日後まで増加を続け、約 3.7 g/100 g に達した (Fig. 1)。他の有機酸では、酢酸が乳酸の約 1/10 程度の量が生成していたほか、生成れずしの熟成の目安のひとつとされる¹⁰⁾ コハク酸が経時的に増加しており、とくに本漬け 22 日後までの増加量が多かった。ピルビン酸は本漬け開始から急増したが、30 日後以降急減した。なれずし類では、ハタハタすし¹¹⁾ やあゆずし⁵⁾ でピルビン酸の減少が示されている。ピルビン酸は糖から解糖系を経て乳酸やアルコールが生成する過程における中間代謝物であることから、その消長に乳酸菌や酵母の関与が推

Table 2 Organic acids of *ayu-narezushi* ripened under the experimental ambience
(mg/100 g)

Organic acid	Ripening periods (Days)							
	0 (Brined fish)	8	15	22	30	40	60	120
Lactic acid	195	1 435	2 206	2 443	2 409	2 826	3 114	3 684
Acetic acid	0	84	116	163	190	235	192	358
Succinic acid	0	30	39	41	35	44	47	66
Pyruvic acid	0	180	202	236	217	34	41	50
Formic acid	0	69	63	59	45	46	53	51

Table 3 Free amino acid composition of *ayu-narezushi* ripened under the experimental ambience
(mg/100 g)

Amino acid	Ripening periods (Days)							
	0 (Brined fish)	8	15	22	30	40	60	120
Tau	112	27	33	38	33	35	32	41
Asp	15	13	34	12	50	68	83	151
Thr	11	15	31	45	39	47	54	86
Ser	19	7	16	28	29	36	48	85
Asn	N.D.	7	14	22	20	27	31	38
Glu	22	41	99	131	118	154	173	257
Gln	5	4	8	15	14	20	24	46
Sar	0	12	15	29	21	21	N.D.	17
Gly	28	16	31	38	36	46	52	86
Ala	27	25	60	76	60	82	84	145
Cit	9	8	15	22	13	18	14	26
Val	13	17	39	49	42	53	57	84
Cys	0	3	3	3	3	4	3	6
Met	8	18	33	49	43	49	53	78
Pro	10	6	12	17	15	17	13	24
Arg	7	8	8	19	8	3	4	23
Ans	91	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lys	28	32	61	81	77	97	102	151
His	10	7	11	13	13	18	21	32
Ile	8	19	40	57	51	60	62	93
Leu	16	46	86	123	108	127	137	205
Tyr	18	10	20	38	32	43	44	67
Phe	10	22	40	56	50	60	72	107
GABA	0	1	2	3	4	4	3	10
Trp	N.D.	N.D.	N.D.	11	11	13	N.D.	25
Total	467	362	708	978	892	1 103	1 169	1 882

測される。本研究では、本漬け初期に乳酸菌に加え真菌の増加 (Table 1) が認められたことから、ピルビン酸の消長には、乳酸菌や酵母のほかに、麴によるデンプンの糖化との関連性も考えられる。

試験区の遊離アミノ酸の個々の数値および総量の変化について Table 3 に示した。遊離アミノ酸は、種別ではその増減の傾向に差があったが、総量では本漬け 8 日後から 22 日後までの間に急増し、その後も漸増した。増加した遊離アミノ酸は、魚肉等に含まれるタンパク質が、プロテアー

ゼにより分解されて生じたと考えられるが、麴由来の酵素の作用か否かは不明である。遊離アミノ酸組成を見ると、主要アミノ酸は Glu, Leu, Lys, Ala であり、この傾向はふなずしに関する既報¹²⁾ と同様であった。これらのことから、試験区では前述のとおり、乳酸発酵が進行するとともに、本漬け 22 日後以降であればタンパク質の分解が進んでおり、呈味成分も生成されていたと考えられる。

(3) 気温と熟成状況

試験区と家庭区の気温の変化を Fig. 1 に示した。11 月

Fig. 1 Changes in temperature around *ayu-narezushi* batches during ripening under the experimental (solid line) and household (dotted line) ambience

中旬の熟成開始時は試験区、家庭区とも16~17℃台だったが、試験区では徐々に低下して35日後頃(12月中旬)に10℃以下となった。家庭区では温度変化が大きかったが、試験区より低めに推移し、概ね30日後頃に10℃以下となった。熟成温度と品質に関しては、サケいずしについて詳細な研究があり¹³⁾、10℃以上では短期間にうちに乳酸菌が増加するとともに、遊離アミノ酸などの低分子物質や、乳酸が多く生成することが報じられている。本研究では、熟成初期の温度が高めに推移したことから、乳酸菌が増殖して乳酸が蓄積し、遊離アミノ酸の生成も進行したと考えられる。一方で、10℃以上では、短期間のうちに多くの乳酸が生成することで、風味が醸成されないうちに熟成過多となり酸敗に至ることから、5℃での熟成が好ましいことも報じられており¹³⁾、試験区よりも温度が低く推移した家庭区では、風味が醸成される期間が長かった可能性が考えられる。

本研究のあゆなれずしの製法では、伝承的に本漬け40日後頃が食べ頃とされている。本漬け40日後の家庭区の試料を分析したところ、乳酸量と遊離アミノ酸総量はそれぞれ、2277 mg/100 g、828 mg/100 gであり、試験区よりも低かった。乳酸量と遊離アミノ酸総量を指標とし、家庭区の40日後を食べ頃と仮定すると、試験区では15~22日後頃が食べ頃となる。しかし、試験区では熟成温度の高い日が多かったため、前述のとおり熟成過多や酸敗に至る可能性がある。今後、一定の品質を保つための製造方法を検討する場合は、いくつかの一定の温度管理下において熟成を行い比較する必要がある。

既往の文献によれば、麴を使用しないあゆなれずしでは、本漬け38日後の乳酸量は488 mg/100 gであったが、65日後は2001 mg/100 gに達しており⁵⁾、有機酸の蓄積が緩やかに長期間にわたり進行したことが示唆されている。本研究の試験区では、22日後の段階で2443 mg/100 gに達した。篠田¹⁴⁾は、北陸は気温が低くて尋常の漬け方ではなかなか

馴れないため、馴れを促進するためにジアスターゼ(アミラーゼ)に富んだ米麴を混入することが考えだされたと推測している。また、石毛ら¹⁵⁾は、麴をいれることは発酵に時間のかかる寒冷な気候の場所でのスシづくりには効果的であるとしている。本研究においても、麴が生産するアミラーゼにより米飯中のデンプンが分解され、乳酸菌の栄養源となるブドウ糖が生成したため、気温が低く米飯が容易に分解されない環境においても、乳酸菌が糖を資化して増殖できたと推定される。なお、既報⁵⁾では乳酸菌数や遊離アミノ酸量等が調べられておらず、麴の使用・不使用以外にも原料や配合、分析方法など諸条件が異なるため厳密な比較は困難である。麴使用がなれずしの品質におよぼす影響を明らかにするためには、今後同一条件で試験して比較する必要がある。

なれずしの類では、ボツリヌス菌を原因とする食中毒が過去に発生している¹⁶⁾。ボツリヌス菌は20℃では3日で毒化する場合もあり¹⁷⁾、増殖を阻止するためには、増殖する前にpHを少なくとも5.5以下とすることが必要とされている¹⁷⁾。本実験では気温が20℃を上回ることがなかったが、本漬け後は乳酸発酵が速やかに進行し、8日以内にpHが5.5よりも低い値に到達した。また、3日後に漬け汁のpHを測定したところ、pHは5.3まで下がっており、ボツリヌス菌を原因とする食中毒の危険性は概ね低いと推測される。しかしながら、本漬け時の乳酸発酵が確実に起こるか否かなど、留意すべき課題も残されている。阪口¹⁸⁾は、原料魚の鮮度管理や低温保持など取扱いに注意するとともに、本漬け時の乳酸発酵を促進するため、乳酸菌スターターの利用を提案している。衛生観念の高まった現代に、美味で安全なあゆなれずしを製造するためには、今後、これらの情報を考慮して工程を改良する必要がある。

3. 要 約

富山県に伝承されるアユなれずしは、麴を使って漬け込み、約40日間の熟成後が食べ頃とされる。本研究では、こ

のアユなれずしを試作し、熟成中の生菌数、有機酸、遊離アミノ酸などを分析した。乳酸菌数は熟成8日後以降、 10^8 cfu/g 台のオーダーで推移し、pHは8日後に4.8に低下し、その後は4.6-4で推移した。乳酸は22日後までに急増し、遊離アミノ酸総量も同様の傾向が見られたが、それ以降は緩やかに増加した。これらの結果から、麴を使用して伝承的製法で作るあゆなれずしは、乳酸発酵が速やかに進行することが示唆された。

アユ採捕について富山県農林水産総合技術センター水産研究所村木誠一主任研究員（当時）にご協力いただきました。また、本研究は日本海学推進機構（富山県）の平成25年度日本海学研究グループ支援事業により実施しました。関係各位に深く御礼申し上げます。

文 献

- 山下倫明, 堀越昌子, 佐々木政則, 水産漬け物, 「全国水産加工品総覧」, 福田 裕, 山澤正勝, 岡崎恵美子監修, (光琳, 東京), pp.353-386 (2005).
- 久田 孝, 矢野俊博, 魚介類の乳酸発酵食品—能登のナレズシと加賀のカブラズシー, 日本食品微生物学会雑誌, **27**, 185-195 (2010).
- 中川 眸, 越中の古寺に継承されている鯖の馴れずしの食事史的研究, 調理科学, **7**, 23-29 (1974).
- 廣瀬 誠, 舟橋をめぐって, 「神通川と呉羽丘陵」, (桂書房, 富山), pp.129-138 (2003).
- 水谷令子, 久保さつき, 松本亜希子, 成田美代, あゆずし熟成中の成分変化, 日本調理科学会誌, **31**, 192-197 (1998).
- Matsui, H., Saka, E., Isobe, Y. and Narita M., Comparison of the bacterial community structures of Ayu-narezushi produced by two different manufactures. *Biocontrol Sci.*, **15**, 63-68 (2010).
- 野村幸司, 田子泰彦, 富山県のアユ熟れ鮓に関する研究, 水産物の利用に関する共同研究 第55集, 地方独立行政法人鳥取県産業技術センター, 鳥取, 17-20 (2015).
- 小崎道雄, 乳酸菌実験マニュアル, (朝倉書店, 東京), p.15 (1992).
- Watanabe, H., Yamanaka, H. and Yamakawa, H., Seasonal variations of extractive components in the muscle of disk abalone. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 921-925 (1992).
- 篠田 統, 生成, 「すしの本」, (岩波書店, 東京), pp.147-148 (2002).
- 阿部輝雄, 露木英男, ハタハタすしにおける有機酸の変動, 日本食品工業学会誌, **18**, 27-27 (1971).
- 藤井建夫, 馴れずし, 「塩辛・くさや・かつお節」, 増補版 (恒星社厚生閣, 東京), pp.71-90 (2001).
- 佐々木政則, 川合祐史, 吉水 守, 信濃晴雄, サケいずしの化学的, 微生物学的性状に及ぼす熟成温度の影響, 日本水産学会誌, **72**, 223-230 (2006).
- 篠田 統, すしの種類と分布, 「すしの本」, (岩波書店, 東京), pp.2-14 (2002).
- 石毛直道, ケネス・ラドル, ナレズシの発展, 「魚醬とナレズシの研究」, (岩波書店, 東京), pp.84-89 (1990).
- 阪口玄二, ボツリスムと私, 食品と微生物, **7**, 43-46 (1990).
- 横関源延, 藤井建夫, 食品におけるボツリヌス菌の増殖と毒生成, 日本食品工業学会誌, **24**, 420-431 (1977).
- 阪口玄二, いずしとE型ボツリヌス中毒, 日本食品微生物学会雑誌, **7**, 1-6 (1997).

(平成27年3月9日受付, 平成27年6月15日受理)