

業務用魚醤油の品質改良および製造期間短縮技術の開発

吉川修司, 古田智絵, 山田加一郎

Quality Improvement and Shortening of the Manufacturing Period of Commercial Fish Soy Sauce

Shuji Yoshikawa, Tomoe Furuta, Kaichiro Yamada

The fish sauce production method involving enzymatic degradation of mash and yeast fermentation was investigated. The proposed method reduced the salt concentration required, shortened the fermentation period, and lightened the color of the final product for mixing with other raw material. The optimum enzyme treatment conditions were as follows: water addition = 30% (w/w) of raw material; temperature = 55°C; working concentration of enzyme = 0.2% (w/w) of mash; and reaction time = 4 h. Extending the enzyme reaction time (> 4 h) did not affect extract yield. Using halo-tolerant yeast in the fermentation process, the final ethanol concentration was 2.0% at an initial glucose concentration of 5%, and the addition of glucose during fermentation increased the final ethanol concentration up to 2.8%. A salt concentration of at least 12% was required to prevent deterioration. Since higher osmolality could be achieved by the concurrent use of ethanol and salt, the initial concentration of salt could be reduced to 10%. The color of the conventional fish sauce is almost equivalent to that of *koikuchi shoyu*; however, sauce produced using the proposed method was clear and bright, similar to *shiro shoyu*. Furthermore, aromatic compounds, including 4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF), 2-phenyl ethanol, and ethyl lactate, which are not detected in the conventional fish sauce, were present in sauce produced using the proposed method. Scale-up trials of the proposed method were conducted at two companies in Hokkaido, and all properties were found to be reproducible.

KEY-WORDS : Fish sauce, Protease, Halo-tolerant yeast, Flavor compound, Quality improvement

キーワード : 魚醤油, プロテアーゼ, 耐塩性酵母, 香気成分, 品質改良

国内の魚醤油は、2002年に1万トンに達して以降、安定した需要があり^{1,2)}、主要な仕向け先は、加工食品製造における調味素材や外食産業での利用といった、いわゆる業務用用途である¹⁾。

業務用魚醤油は、食品の調味原料として使用されることから、不快な魚臭が少なく、色調が淡く、塩分が少ないこと、及び安価であることが求められる。業務用魚醬

油に多く利用される輸入品は、魚介類に食塩を加えて1～2年間発酵させる伝統的な方法で製造される。これらは脂質の酸化などによる不快な魚臭が強く、かつCodex規格³⁾に準じた塩分の高い製品が多いことから、その配合量が制限されている。

これらの品質上の課題を改善する方法の1つに麴を使用する方法があり、魚臭を低減させる他、伝統的な製造

事業名：経常研究

課題名：業務用魚醤油の低コスト製造技術の開発

法に比べて製造期間を短縮可能とする利点がある⁴⁻¹²⁾。しかし、魚には糖が少ないためメイラード反応は生じにくい。麴を加えることで諸味に還元糖が供給され、メイラード反応が進行して色調が濃色化すること⁴⁾、さらに、麴の価格が高いために原材料費が上昇することの2点が課題となっていた。道総研では、麴と微生物(耐塩性酵母及び乳酸菌)を利用して、麴由来の還元糖を微生物に消費させて色調を淡色化するとともに不快な魚臭を低減する技術を開発したが^{13, 14)}、麴の使用による原材料費のコスト高と高塩分が課題であった。

そこで、本研究では不快な魚臭の抑制と淡い色調を維持しつつ、原材料費と塩分の削減が可能な業務用魚醤油の製造方法を開発することとした。その結果、酵素を使用して効率よく諸味を分解して旨味を増加させるとともに、耐塩性酵母が生成するエタノールの静菌効果を活用して塩分を削減し、さらに芳香を付与する製造方法を開発したので報告する。

実験方法

1. 原料

原料として、2016年日高管内えりも町産のシロサケ(*Oncorhynchus keta*)のラウンド冷凍品を使用した。ランクはCブナ、性別はオスとした。冷凍原料を解凍し、頭部を除去した後、内臓、身(魚皮および筋肉)に分別し、それぞれミートグラインダー(C-4, ヒガシモトキカイ)で5mmスクリーンを通してミンチとし、 -20°C で凍結保存した。試験にあたっては、凍結した試料を 5°C で一晩静置して解凍し、原料の構成比率に応じて再混合したものをを用いた。

2. 加水量の検討

プロテアーゼを利用した魚醤油の旨味成分の増量を検討するにあたり、酵素反応時の魚肉への加水量により反応が異なると予想されたため、加水量の影響を確認した。

1. で調製した原料に、原料比0~50% (w/w)相当の蒸留水と0.2% (w/w)相当のプロテアーゼ(スミチームLP-50(新日本化学), 以下LP)を添加し、 55°C の水浴中で酵素反応を行った。反応後、後述の方法により、エキス回収量および遊離アミノ酸量を測定した。

3. 酵素反応条件の検討

プロテアーゼの利用による旨味成分の増強を図るため、酵素の種類、濃度及び反応時間について検討した。プロテアーゼは、プロテアーゼM(アマノエンザイム, 以下AM)、プロテアーゼP(アマノエンザイム, 以下AP)及びLPを用いた。添加量は原料比0.1, 0.2及び0.3%

(w/w)とした。反応温度は $50, 55, 60^{\circ}\text{C}$ 、反応時間は1, 2, 4および5時間とした。

また、食塩添加量が酵素反応に影響を与えることが予想されたため、食塩添加量の影響を確認した。原料に対し30% (w/w)の加水をした後、食塩を対加水原料比0, 4, 8, 12, 16% (w/w)添加し、各区についてLPを0.2% (対原料比)添加し、 55°C で4時間反応させた。

上記記載の酵素反応条件の検討においては、反応後に後述の方法により、エキス回収量および遊離アミノ酸量を測定した。

4. 耐塩性酵母による発酵条件の検討

酵母の生産するエタノールによる静菌効果を活用して、魚醤油の減塩を図るため、スターターの種類、発酵温度がエタノール生産量に与える影響を検討した。また、補糖によるエタノール濃度を上昇させる方法についても併せて検討を行った。スターターは醤油製造で使用されている市販の耐塩性酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)の濃縮スターター(醤油用酵母, 秋田今野商店(以下, A株)及び醤油用主発酵酵母, ビオック(以下, B株))の2株を用いた。魚醤油諸味の代わりに、培地として、0.5% (w/v) ニュートリエントブロス(極東製薬), 0.5 (w/v) Bacto Peptone (BD), 5% (w/v) グルコース, 10% (w/v) 食塩および0.1% (w/v) LPを使用し、1試験当たり300ml調製した。培養は、 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ の静置培養で3反復実施した。試料は培養液をよく混合して採取し、耐塩性酵母数、グルコース濃度、エタノール濃度を測定した。また、諸味中のグルコース濃度が1% (w/v) 台になった時点で、5% (w/v) 補糖した。

発酵期間中に試料を一部採取し、耐塩性酵母数、エタノール濃度およびグルコース濃度を測定した。

5. 酵素反応と酵母発酵の併用による魚醤油発酵試験

2.~4.で検討した酵素分解及び発酵条件を組み合わせることで、目的とする減塩、淡色化、魚臭の抑制が可能となるか確認した。

まず、酵素の添加方法は原料比0.2% (w/w)のLPを諸味の仕込み時に一括添加する方法と、仕込み時と酵母の添加直前に、それぞれ半量ずつ添加する方法で魚醤油を製造し回収率を比較した。

次に、酵素分解と発酵を組み合わせた製法(以下、本製法)で製造した魚醤油と、米麴を使用した従来の製法(以下、従来法)で製造した魚醤油について、発酵の経過及び試作品の成分を比較した。

本製法では、原料に水(原料比30% (w/w)), 食塩(同10% (w/w)), LP(同0.1% (w/w))を加えて諸味を

調製した。諸味は55℃で4時間、酵素分解した後、35℃に冷却し、LP (同0.1% (w/w)), 耐塩性酵母 (A株, 最終菌数 6 Log CFU/g), グルコース (同5% (w/w)) を添加し、4週間35℃で発酵させた。また、発酵7日目及び14日目に同量のグルコースを添加した。従来法では、原料に食塩 (原料比20% (w/w)), 米麴 (福山醸造, 同20% (w/w)) を加えて調製した諸味を、4週間35℃で発酵させた。なお、米麴は使用に先立ち、水 (麴の重量比20% (w/w)) を加えて40分間復水してから原料に加えた。

各製法により得られた諸味を圧搾して得られた搾汁液について、85℃で30分間加熱し、オリ下げ剤 (コポロックSA, 大塚食品) とケイ藻土 (ムサシノライト, 武蔵野化学) を搾汁液重量の0.5%, 0.2%をそれぞれ添加後、3日間静置し、最後にケイ藻土を敷いたろ紙 (No. 5C, アドバンテック東洋) でろ過して魚醤油を得た。

発酵期間中に諸味を一部採取し、耐塩性酵母数、エタノール濃度及びグルコース濃度を測定した。また、試作した魚醤油の遊離アミノ酸及び有機酸量を測定するとともに香気成分を測定した。

6. 成分分析および耐塩性酵母数の測定

成分分析および耐塩性酵母数の測定は、下記の方法により行った。

(1) エキス回収量

諸味を遠心分離器 (CR-4, 日立工機) で3,500rpm, 20分間遠心した上清の重量を求め、エキス回収量とした。また、エキス回収量から加水量を差し引いた重量に希釈倍率を乗じて可溶化量とした。

(2) 遊離アミノ酸

(1)で調製した上清を蒸留水で10倍希釈し、等量の2% (w/v) スルホサリチル酸水溶液を加えてタンパク質を変性後、孔径0.45 μ mのセルロースアセテートフィルタでろ過し、アミノ酸分析計 (L-8900, 日立ハイテクノロジーズ) で分析した。

(3) 魚醤油の色調

醤油色番の色見本と試作品の色調を比較することにより行い、最も近い番手を選択した。

(4) 耐塩性酵母数

既報の検出法に従い¹⁴⁾, 酵母エキス0.5% (w/w), 食塩10% (w/w) を添加したポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬) に、クロラムフェニコールを終濃度100mg/Lとなるように添加して調製した。諸味を滅菌0.85%食塩水で段階的に10倍ずつ希釈して平板塗抹法 (30℃, 3日間培養) により菌数を測定した。

(5) グルコース

グルコースオキシダーゼ法により、諸味を蒸留水で適宜希釈し、グルコースCIIテストワコー (和光純薬工業) を用い、グルコース量を測定した。

(6) 有機酸量

HPLC (Prominence, 島津製作所) を用い、ポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法により定量した¹⁵⁾。試料1mlを10,000rpm, 4℃, 5分遠心分離し、上清50 μ lを水で50倍希釈後0.45 μ mセルロースアセテートフィルタに通液後、試験に供した。カラムはShim-pack SCR-102H (300mm \times 8.0mm i.d., 島津製作所) を2本直列接続、ガードカラムはShim-pack SCR 102 HG (50mm \times 6.0mm i.d., 島津製作所) を使用した。移動相は20mMビス(2-ヒドロキシエチル)-イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン水溶液 (5mM p-トルエンシルホン酸100 μ M EDTA含有), 流量は0.8ml/min, カラム温度は40℃, 試料注入量は10 μ lとし、検出器は電気伝導度検出器 (CDD-10A VP, 島津製作所) を使用した。

(7) 香気成分

末澤の方法¹⁶⁾を改変して、魚醤油から固層抽出法により抽出した試料を用いてGC-MS (GCMS-QP2010 Plus, 島津製作所) により測定した。魚醤油7mlに食塩3gを添加し、300rpmで10分間振とうして食塩飽和試料を調製した。これを5ml採取し、内部標準として1mg/mlの1-デカノール50 μ lを加えて混合し、メタノールと蒸留水20mlずつでコンディショニングしたSep-Pak C18プラスカートリッジ (Waters) に吸着させ、酢酸メチル0.8mlで溶離させたものを、GC-MSに供した。GC-MSの測定条件は、下記のとおりとした。すなわち、キャピラリーカラムはDB-Wax (30m \times 0.32mm i.d, 膜厚0.25 μ m, J&W Scientific) を使用し、昇温条件は40℃2分間保持, 40℃から160℃まで毎分6℃昇温, 160℃から240℃まで毎分10℃昇温, 240℃6分間保持とした。キャリアーガスはヘリウム, 流速は3ml/min, 注入口温度は250℃, 注入量は1 μ lとし、スプリットレスモードで試料導入した。

(8) エタノール

ガスクロマトグラフィー (263-70型, 日立製作所) により測定した¹⁷⁾。魚醤油に内部標準物質として0.25倍容量のアセトンを加えて測定試料とした。検出器にFIDを用いて、下記の条件で測定した。すなわち、ガラスカラムは ϕ 3mm \times 2.1m, 充填剤は5%ポリエチレングリコール1000 (GLサイエンス), カラム温度は75℃, 注入

口および検出器温度は230℃、キャリアーガスは窒素、流速は40ml/minとした。

(9) 塩分濃度

魚醤油 1gに蒸留水 9gを加えてよく混合し、塩分計 (PAL-SALT, アタゴ) を用いて 3 回測定した平均値に希釈倍率を乗じて算出した。

7. 企業による技術実証試験

本製法について、実製造規模における有効性を確認するため、道内の魚醤油製造企業 2 社にて、サケフィレを原料として約50kg規模 2 反復 (うち 1 社ではサバドリスを原料とした試験区を追加)の技術実証試験を行った。

8. 実験計画の設定および統計処理

統計処理ソフト (JMP Ver, 13.1, SAS-Japan) を用い、実験計画法に基づき試験区を設定した。統計処理 (有意差検定) は Tukey-Kramer HSD 検定及び t-検定により有意水準 5% で実施した。

実験結果

1. 諸味酵素分解工程の検討

原料に対する加水量について検討した。加水量の増加に伴い、諸味の可溶化量は減少したが (データ未掲載)、エキスの遊離アミノ酸量は、加水量が対原料比 30% において最大となった (図 1)。これは、加水によって発酵初期の諸味の粘度が低下したことにより、酵素が均一に分散して、酵素分解が効率的に進行したためと考えられ

た。また、30%加水におけるエキス回収量は反応時間 4 時間で横ばいとなった (図 2)。この理由として、酵素の耐熱限界に近い温度で加熱を続けたことによりプロテアーゼ活性が低下したことが考えられた。

エキスの遊離アミノ酸濃度に影響する要因として、諸味の分解に用いる酵素の種類、反応温度、反応時間、酵素添加量および食塩添加量について検討した。酵素の種類では AM 使用区の遊離アミノ酸濃度が、AP 及び LP 使用区に比べて有意に低く、AP 使用区と LP 使用区の間には有意差はなかった (表 1)。反応温度は 50℃ 区が 55℃ 区より有意に低く、その他の組み合わせには有意差がなかった。酵素反応時間が長くなるに伴いエキスの遊離アミノ酸濃度は有意に増加し、反応 4 時間で最も値が高くなった。酵素添加量は、対原料比で 0.1% 添加した区が他区より有意に低く、0.2 と 0.3% では有意差がなかった。

以上の結果から、加水量を 30% とし、酵素は AP または LP を 0.2% 添加し、反応時間を 4 時間とすることで、酵素分解が良好に進行した。反応温度については、50℃ は中温微生物の生育好適温度帯上限に近く、腐敗が懸念されること、60℃ は酵素の失活温度帯に近いことから、55℃ が適切であると考えられた。

上記の試験で設定した酵素反応条件において、食塩添加量を検討したところ、8% 以上では無添加に比べ有意に遊離アミノ酸量が低下したが、8% 以上の区間では有意な差は認められなかった (表 2)。

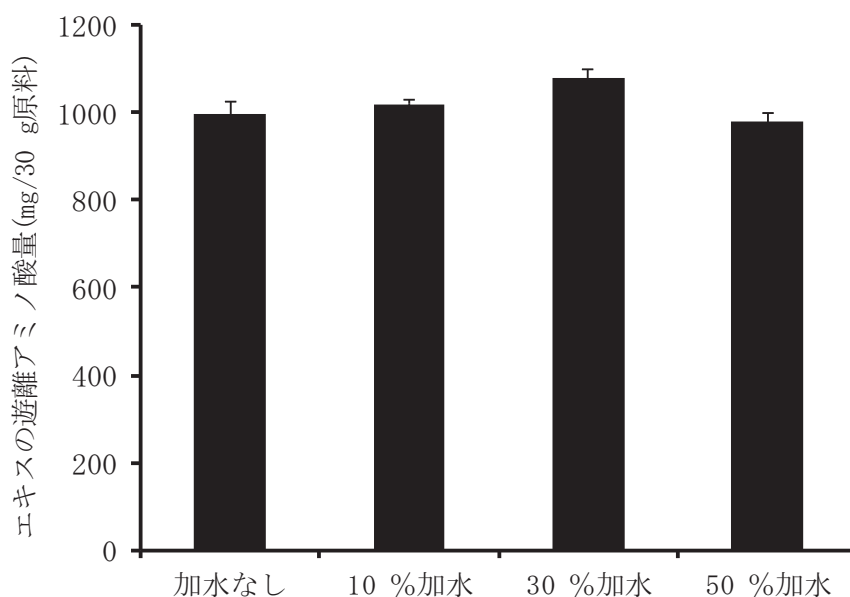


図 1 加水量が遊離アミノ酸量に与える影響

エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$)。

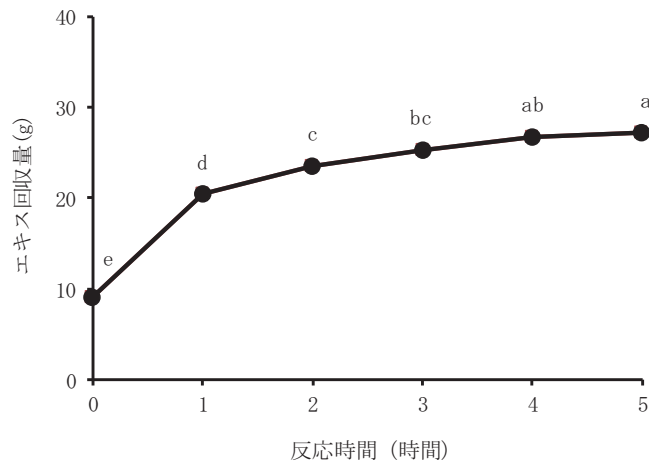


図2 反応時間がエキス回収量に与える影響

異なるアルファベットは、Tukey-KramerのHSD検定により5%の有意差があることを示す (n = 3)。エラーバーは標準偏差を示す。

表1 エキスの遊離アミノ酸濃度に及ぼす要因の解析

| 要因 | 水準 | 遊離アミノ酸濃度 (mg/100 gエキス) | 標準偏差 |
|------------------|-----|---------------------------|----------|
| 酵素 | AM | 3 668 | ± 136 b |
| | AP | 4 609 | ± 164 a |
| | LP | 4 288 | ± 165 a |
| 反応温度 (°C) | 50 | 3 831 | ± 160 b |
| | 55 | 4 575 | ± 150 a |
| | 60 | 4 105 | ± 167 ab |
| 反応時間 (時間) | 1 | 3 139 | ± 117 c |
| | 2 | 4 035 | ± 160 b |
| | 3 | 4 369 | ± 179 b |
| | 4 | 5 151 | ± 156 a |
| 酵素添加量 (対原料比%) | 0.1 | 3 556 | ± 139 b |
| | 0.2 | 4 169 | ± 143 a |
| | 0.3 | 4 900 | ± 153 a |

要因ごとにTukey-KramerのHSD検定により5%水準で有意差検定を行った。異なるアルファベット間には、有意差があることを示す。

表2 エキスの遊離アミノ酸濃度に及ぼす食塩添加量の影響

| 水準 (対原料比%) | 遊離アミノ酸濃度 (mg/100gエキス) | 標準偏差 |
|---------------|--------------------------|----------|
| 0 | 4 164 | ± 909 a |
| 4 | 2 998 | ± 378 ab |
| 8 | 2 670 | ± 475 b |
| 12 | 2 526 | ± 492 b |
| 16 | 2 341 | ± 470 b |

異なるアルファベット間には、Tukey-KramerのHSD検定により5%の有意差があることを示す (n = 4)。

2. 発酵工程の検討

本製法の普及にあたり、微生物を培養する設備を所有していない企業でも製造を可能とするため、スターターの培養を行う必要がない市販の耐塩性酵母 (*Z.rouxii*) の濃縮菌株2株を用いて、発酵条件を検討した。

耐塩性酵母数は、両株とも30℃及び35℃において発酵初期の増殖は良好であったが、40℃では増殖がやや抑制された。また、B株はA株に比べ、40℃において発酵初期の増殖の立ち上がりが遅れた (図3a)。

エタノール濃度の最高値は、発酵温度にかかわらず約2%となった (図3b)。エタノールが最高濃度に達するまでの時間は30、35℃が70時間であるのに対し、40℃ではほぼ2倍の137時間を要した。エタノール濃度は最高濃度2%に達した後、濃度が維持されずに減少する傾向が認められた。

グルコース濃度は耐塩性酵母数の増加と関連して減少する傾向にあり、35℃においては発酵初期に早く減少する傾向が見られた。また、A株を用いるとB株よりもグルコース濃度の減少が早くなり、その差は40℃において顕著であった (図3c)。

企業等において魚醤油製造を行う場合は、製造規模が大きく、実験室規模の恒温槽とは温度制御の精度が異なるため、発酵時の諸味の温度変動が大きくなることが予想された。このため、使用する酵母は増殖やエタノール生成に発酵温度の影響が少ないことが望まれた。また、腐敗防止の観点からエタノールが速やかに生成されるこ

とも求められた。以上の理由からA株が優れていると判断し、以降の試験で用いることにした。

本試験においてA株を発酵に用いると、エタノールが最大2%生成することを確認した。エタノールは食塩と同程度の浸透圧があり、さらに、エタノールと食塩を併用すると、より高い浸透圧となることが知られている¹⁸⁾。また、小島らはヤマメを原料とした魚醤油を安定的に製造するためには食塩添加量が10~12%必要だと報告している¹⁹⁾。

そこで、耐塩性酵母が生成するエタノールにより魚醤油の減塩が期待できるため、食塩濃度を10%まで減らして試作を行った。しかし、前述の通りエタノールは2%まで生成した後に徐々に減少するため、発酵期間中にグルコースを補糖することで、エタノール濃度を維持する方法を試みた。

耐塩性酵母数は発酵温度による顕著な差はなく、発酵終了時の耐塩性酵母数は30℃で約8 Log CFU/ml、35℃で約7 Log CFU/mlであった (図4a)。

エタノール濃度は補糖を2回行うことにより最高3.6%に達し、その後発酵終了まで2%以上を維持できた (図4b)。

グルコース濃度は、補糖を行った場合においても1%程度で推移しており、メイラード反応による濃色化を抑制可能であると考えられた (図4c)。

本試験における発酵工程はプロテアーゼによる酵素分解反応を併用しており、発酵温度は酵素活性の高い35℃

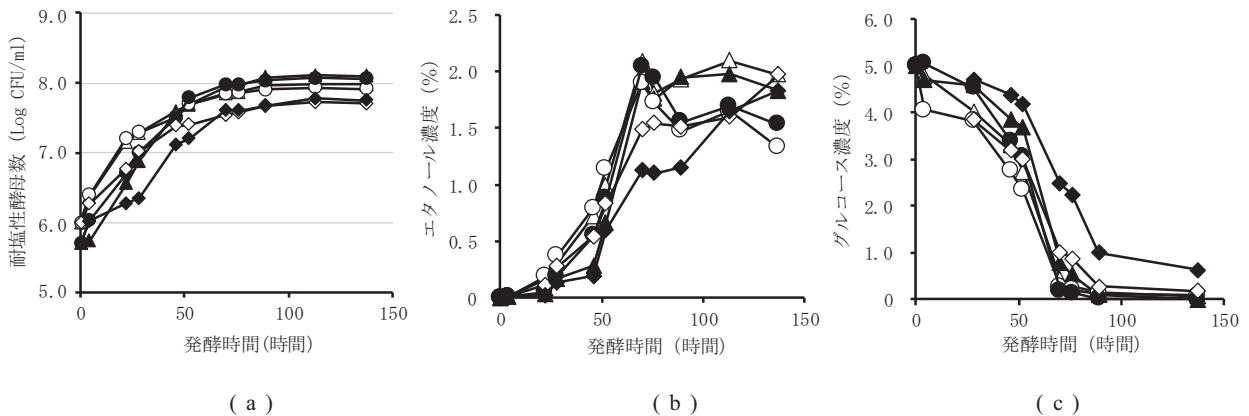


図3 発酵温度が耐塩性酵母数 (a)、エタノール濃度 (b)、グルコース濃度 (c) に与える影響

発酵温度 △, ▲: 30℃, ○, ●: 35℃, ◇, ◆: 40℃

菌株 △, ○, ◇: A株, ▲, ●, ◆: B株

が適していると考えられた。

以上の結果から、発酵工程ではA株を用い、発酵温度を35℃とし、グルコースを2回補糖することにより、発酵終了時のエタノール濃度を2%以上に保つことが可能となり、減塩及び濃色化の防止に有効であると考えられた。

3. 酵素反応と酵母発酵の併用による小規模魚醤油発酵試験

酵素分解工程において、図2に示したとおり反応時間が経過するにつれてエキス回収量がほぼ横ばいになることから、加熱により酵素活性が低下したことが考えられ

た。そこで、諸味の仕込み開始時に酵素を一括して添加する方法と、諸味の仕込み時と酵母を添加する直前の2回に分けて添加方法を比較した。

その結果、発酵2日目以降、分割添加区のエキス回収率は一括添加区よりも有意に高い値で推移し、最終の28日目では前者が85.8%、後者が77.1%で分割添加区のエキス回収率が高かった(図5)。よって、酵素は対原料比0.1%を諸味の仕込み時と酵母を添加する直前にそれぞれ添加することとした。

本製法の諸味中の耐塩性酵母数は、発酵3日目でピークに達したのち、急激に菌数が低下したが、発酵24日目

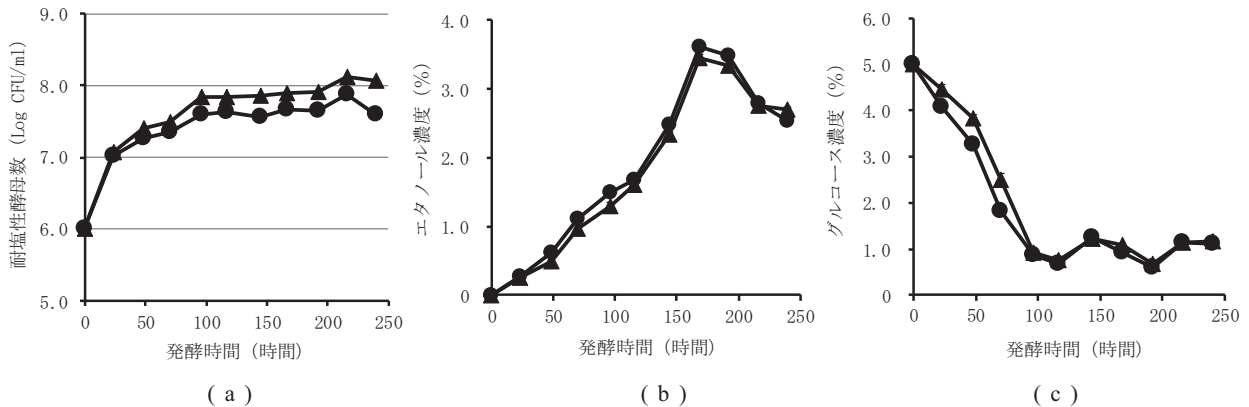


図4 培養温度が諸味中の耐塩性酵母数 (a)、エタノール濃度 (b) およびグルコース濃度 (c) に与える影響
▲：30℃，●：35℃
供試菌株：A株

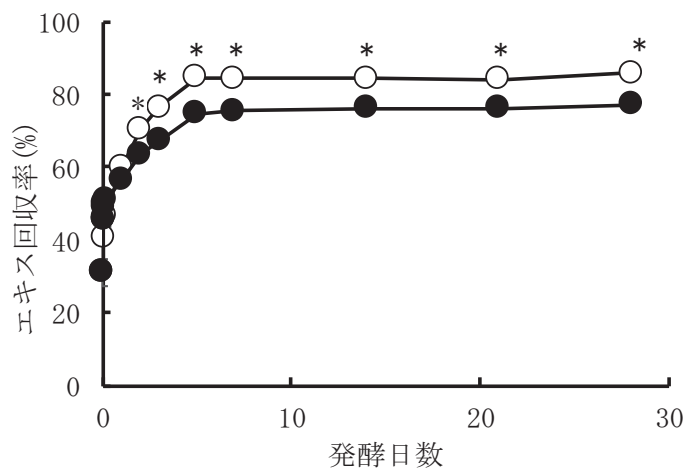


図5 酵素添加方法がエキス回収率に及ぼす影響
○：分割添加，●：一括添加

*は同一発酵日数の試験区間においてt検定により5%水準で有意差があることを示す (n = 3)。

以降に再び検出されるようになった(図6a)。エタノール濃度は、本製法では発酵後7日目で目的濃度である2%に達し、発酵終了時には約3%に達した(図6b)。一方、従来法ではエタノール濃度が発酵期間を通じ0.4%以上になることはなかった。諸味中のグルコース濃度は、本製法では10日目から0.5%以下を維持しており、添加したグルコースは速やかに消費された(図6c)。一方、従来法では3日から10%以上を示し、メイラード反応による濃色化が進むことが推察された。

本製法及び従来法で製造した魚醤油について、有機酸及び遊離アミノ酸組成を表3に示した。遊離アミノ酸に関しては、本製法で試作した魚醤油は、従来法に比べ、遊離アミノ酸の総量が多く、種類別ではリジン、グルタミン酸、アスパラギンなどが多く、特にアスパラギンの含有量が高かったが、ロイシンが低かった。有機酸に関しては、本製法で試作した魚醤油は、従来法に比べて有機酸量が2割弱増加し、特に乳酸が多かった。

塩分は、従来法が14.7%であったのに対し、本製法は9.2%であった。色調は、従来法が醤油色番の13番でいくち醤油相当であったのに対し、本製法では35番でしる醤油相当であった。

本製法及び従来法で製造した魚醤油の香り成分を比較した(表4)。本製法で製造した魚醤油からは、耐塩性

酵母の添加により、従来法で製造したものにはほとんど含まれていない4-ヒドロキシ-2(or5)-エチル-5(or2)-メチル-3(2H)フラノン(HEMF)などのフラノン類、2-フェニルエタノールや乳酸エチルなどの香り成分が検出された。また、1-ペンテン-3-オールなど不快臭の原因となる魚介類の脂質酸化に由来する成分は検出されなかった。

本製法による試作品を当センター職員及び協力企業により官能評価を行ったところ、旨味を有し、すっきりした味であり、魚臭さ感じない仕上がりであると評価された(データ非掲載)。

4. 企業による技術実証試験

実製造規模における本製法の有効性を確認するため、北海道内の魚醤油製造企業2社にて、図7に示した工程に基づき、技術実証試験を行った。その結果、本製法では従来法に比べ、発酵期間が2ヶ月から1ヶ月に短縮するとともに、色調の淡色化、塩分の低減(10%)、芳香成分の付与が確認され、原料魚をサバとした場合も同様の効果を確認した(データ非掲載)。協力企業により、本製法は従来法に対して製造コストが2割程度削減可能であると試算された。

以上より、実製造規模においても本製法の有効性が確認された。

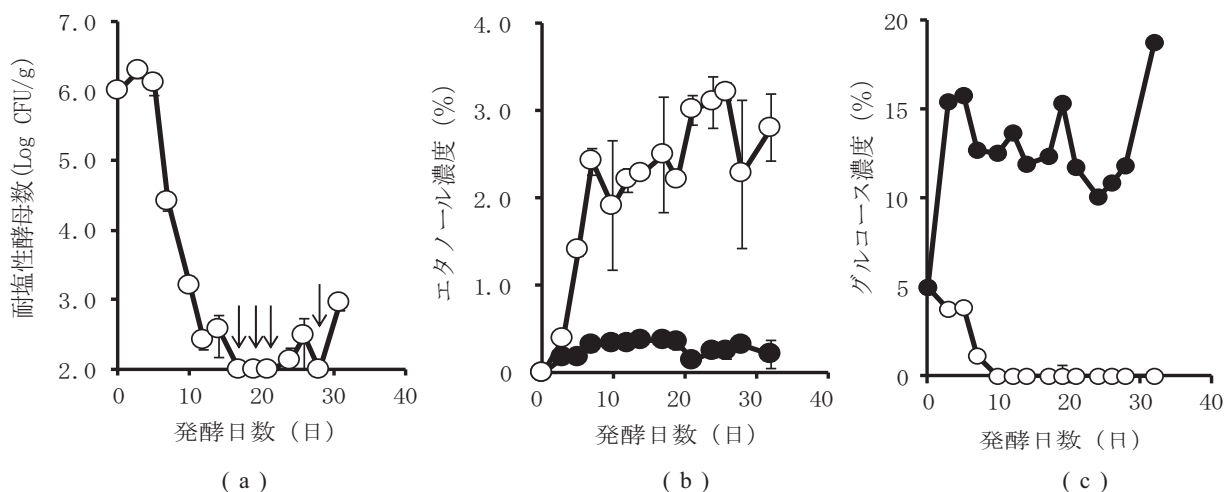


図6 本製法及び従来法で発酵させた魚醤油諸味中の耐塩性酵母数(a)、エタノール濃度(b)及びグルコース濃度(c)の推移

○：分割添加，●：一括添加

エラーバーは標準偏差を示す。(a)の矢印は菌数が検出限界以下であったことを示す。また、発酵期間を通じて従来法の諸味からは耐塩性酵母は検出されなかった。

表3 本製法ならび従来法で製造した魚醤油の有機酸量および遊離アミノ酸組成

| 有機酸 | (mg/100g) | | アミノ酸 | (mg/100g) | |
|----------|-----------|-----|----------|-----------|-------|
| | 従来法 | 本法 | | 従来法 | 本法 |
| ギ酸 | <25 | <25 | アスパラギン | 150 | 278 |
| クエン酸 | <25 | <25 | アスパラギン酸 | 346 | 346 |
| コハク酸 | 64 | 83 | アラニン | 506 | 599 |
| ピログルタミン酸 | 223 | 200 | アルギニン | 473 | 725 |
| ピルビン酸 | n.d. | <25 | イソロイシン | 311 | 434 |
| リンゴ酸 | 27 | 27 | グリシン | 287 | 306 |
| 酢酸 | 46 | 48 | グルタミン | n.d. | n.d. |
| 乳酸 | 291 | 499 | グルタミン酸 | 574 | 784 |
| 合計 | 651 | 774 | シスチン | 60 | 93 |
| | | | スレオニン | 281 | 394 |
| | | | セリン | 312 | 393 |
| | | | チロシン | 162 | 188 |
| | | | トリプトファン | 29 | 44 |
| | | | バリン | 387 | 479 |
| | | | ヒスチジン | 92 | 140 |
| | | | フェニルアラニン | 291 | 422 |
| | | | プロリン | 204 | 251 |
| | | | メチオニン | 247 | 305 |
| | | | リジン | 560 | 796 |
| | | | ロイシン | 550 | 364 |
| | | | 総遊離アミノ酸 | 5 822 | 7 341 |

表4 本製法と従来法で製造した魚醤油の香気成分

| 香気成分 | ピーク面積比 (香気成分/内部標準) | |
|-------------|--------------------|------|
| | 本法 | 従来法 |
| 乳酸エチル | 0.34 | 0.02 |
| 2-フェニルエタノール | 4.98 | 0.04 |
| HEMF | 0.35 | n.d. |

HEMF: 4-ヒドロキシ-2(or5)-エチル-5(or2)-メチル-3(2H)フラノン

考察

伝統的な製法により得られた魚醤油は、魚介類の腐敗を防ぐために食塩を大量に加え、自己消化酵素や、環境及び原料由来の微生物の作用により原料を分解して、通常1年以上かけて製造される。この製法は、脂質の酸化により生じるアルデヒドや短鎖脂肪酸、タンパク質の分解により生じるトリメチルアミンなどの不快臭が発生する他、熟成不良に起因する旨味不足を生じるなど多くの課題があることが知られている²⁰⁾。

これらの課題を解決する方法の一つに麴を使用した製法がある。麴を使用することにより原料中のタンパク質の分解が促進し、遊離アミノ酸含量が増加して旨味が強化される他⁴⁾、短鎖脂肪酸の生成抑制による魚臭さの低減¹⁹⁾やメイラードペプチドによるコク味の付与²¹⁾など風味改善効果が報告されている。その反面、諸味に麴由来の糖分が供給され、メイラード反応により色調が濃色

化することが知られている⁴⁾。また麴の価格は高価であり、製造原料中の使用比率も多いため、製造コストが高くなる一因になっている。さらに、麴を用いた道産魚醤油の製造期間は最短でも2ヶ月を要しており、製造期間の短縮も課題となっている。

魚臭低減のために耐塩性酵母などの微生物スターターを利用する方法は、著者らの方法の他に、*Tetragenococcus halophilus*の使用や*T.halophilus*と*Z.rouxii*の併用などの事例がある^{5, 7, 8, 14, 22, 23)}。特に耐塩性酵母を用いた場合には、伝統的な魚醤油にはない芳香成分が生成される長所がある¹⁴⁾。微生物の増殖及び代謝の維持には糖類の供給が必要であり、これらの引用文献では、糖源として麴が使用されているため、原材料費が高くなる課題は解決できていない。

麴を使用しない製造法としては、プロテアーゼによって諸味の分解を加速する手法がある²⁴⁾。この手法を用いることにより、製造期間の短縮に加え、麴を使用しない

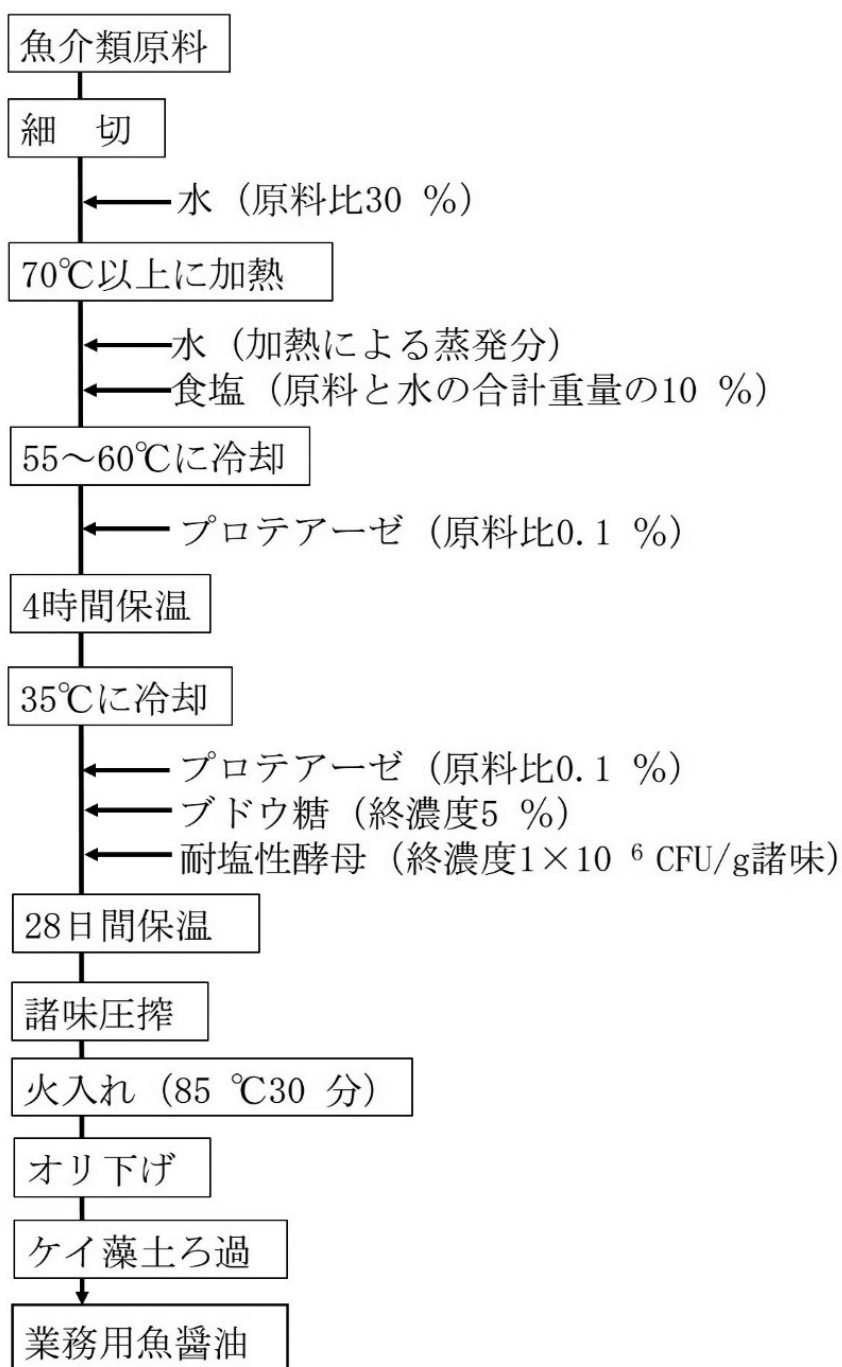


図7 本研究で確立した業務用魚醤油の製造方法

ことから原料費の低減を図ることが可能である。しかし、プロテアーゼには微生物スターターを利用した製法のような香気の改善に繋がる作用が無い。

そこで、著者らは、プロテアーゼの使用と耐塩性酵母による発酵を併用することにより両者の長所を活かし、短所を補う製法、すなわち、麴の代わりにプロテアーゼを用いて諸味の分解を促進して製造期間を短縮し、耐塩性酵母により芳香成分を付与する製法を試みた。その結果、麴を用いる方法で製造した魚醤油に比べて遊離アミノ酸濃度が高い魚醤油を製造することができた。また、2ヶ月を要していた発酵期間が約半分の1ヶ月程度に短縮された。さらに、耐塩性酵母により、糖類を分割添加して製造した魚醤油に芳香成分（HEMF、2-フェニルエタノールならびに乳酸エチル）が付与されることを確認し、本製法が意図した発酵期間の短縮と芳香成分の付与を同時に満たすことが可能であることを示すことができた。

耐塩性酵母は発酵に伴いエタノールを生成する。エタノールは食塩と同程度の浸透圧を示し、食塩とほぼ同等の静菌力があることが知られている^{18, 19)}。腐敗防止には食塩添加量が10～12%必要であるが¹⁹⁾、上記の理由により、耐塩性酵母が生成したアルコールと同濃度だけ減塩が可能となる。しかし、発酵開始時だけの補糖では耐塩性酵母により生成するエタノールの濃度は、最高でも2%にとどまり、しかも発酵後半に減少した。この要因としては、エタノールが乳酸エチルなどエステル合成に、エタノールの前駆体であるアセトアルデヒドがHEMFの合成にそれぞれ消費されることが考えられた^{25, 26)}。そこで、エタノールの濃度を維持するためにグルコースをさらに数回に分けて追加することとした。その結果、発酵終了時のエタノール濃度を2%以上に維持され、魚醤油の塩分濃度を10%に低減することが可能となった。さらに、グルコースを分割して添加することにより、耐塩性酵母が諸味中のグルコースを随時消費することにより、メイラード反応が抑えられて色の淡い魚醤油の製造が可能となった。

北海道の魚醤油製造企業2社において、本製法による魚醤油の技術実証試験を行ったところ、1ヶ月の発酵期間で、色調が薄く、塩分が10%に低減された魚醤油が製造可能であること及び3種の芳香成分が付与され、試験室規模での試験結果が再現できることを確認した。また、協力企業により、本製法は同社の従来法を用いた魚醤油に対して製造コストが2割程度削減可能であると試算された。

以上より、本製法により旨味に富み、かつ低塩分で淡色の魚醤油が1ヶ月で製造可能となることが示された。本製法で製造された魚醤油は、従来品よりも他の食品への配合割合を多くすることが可能となり、魚醤油の使用量の増加が期待できる他、原材料費や製造期間の短縮による製造コストの削減が期待できると考えられた。

要約

プロテアーゼと耐塩性酵母を用いて、原材料費の削減、発酵期間の短縮、塩分の低減および色調の淡色化が可能な魚醤油製造法を検討した。酵素分解工程における最適条件は、加水量が対原料比30%、反応温度が55℃、酵素添加量が対原料比0.2%、反応時間が4時間であった。耐塩性酵母による発酵工程では、初発のグルコース濃度を5%とした場合、エタノールの最終濃度は最高で2%にとどまったが、発酵中にグルコースを添加することで2.8%まで高めることができた。発酵中の変敗を防ぐには12%の食塩濃度が必要となるが、エタノールは同濃度の食塩と同じ効果を有することから、初発食塩濃度を10%まで低減することが可能となった。色調は、従来法がこいくち醤油とほぼ同じであったのに対し、本製法ではしる醤油相当まで淡色化できた。本製法で製造した魚醤油では、HEMF、2-フェニルエタノール、乳酸エチルなど、従来品から検出されなかった香気成分が検出された。これらの特徴は魚醤油製造企業における実製造規模の試作によっても再現することを確認した。

以上のことから、原材料費の削減、発酵期間の短縮、塩分の低減、色調の淡色化が可能となるプロテアーゼによる諸味分解と酵母発酵を併用した魚醤油製造法を確立した。

本研究の技術実証試験に御協力いただきました、小樽海洋水産株式会社、株式会社マルデン、試作品の官能評価にご協力いただいた北海道醤油株式会社をはじめ、多くのご協力を賜った関係各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) 食品と開発 編集部 (2002). 天然調味料の市場動向. 食品と開発, 37 (12), 31-38
- 2) 安藤弘志 (2002). 天然調味料の近況と新傾向 天然調味料の近況と今後の動向. ジャパンフードサイエンス535 (9), 26-31
- 3) STANDARD FOR FISH SAUCE (CODEX STAN 302-2011)
- 4) 竹島文夫, 鍋島由佳子, 船津保浩, 川崎賢一 (2001).

- ブナザケを原料とした魚醤油の開発. 富山県食品研究所研究報告 4, 1-8.
- 5) 小泉武夫, 協和キリン株式会社, 株式会社高知県商品計画機構 (1999). 調味料の製造方法. 特開平11-178540 (1997.12.24)
 - 6) 株式会社柳屋本店, 味の素株式会社, 株式会社かつお技術研究所 (2004):特開2004-1103046 (2002.9.25)
 - 7) 味の素株式会社, 株式会社柳屋本店, 株式会社かつお技術研究所 (2002). 特開2002-191321号 (2000.12.25)
 - 8) 株式会社木の屋石巻水産 (2015). 発酵調味料および発酵調味料の製造方法. 特開2015-181414 (2014.3.25)
 - 9) はごろもフーズ株式会社, 株式会社テクノスルガ・ラボ, 株式会社鈴勝 (2014). 魚類由来の醤油風発酵調味料, 及びその製造方法. 特開2014-117165 (2012.12.13)
 - 10) 日本水産株式会社 (2000). 濃厚で風味の改良された魚醤油およびその製造方法. 特許第3881147号 (2000.2.10)
 - 11) 株式会社マルハニチロ (1999). 魚醤油の製造方法. 特開平11-318383 (1998.5.19)
 - 12) 日本水産株式会社 (1996). 魚醤油の製造方法. 特許第3537211号 (1995.3.21)
 - 13) 北海道 (2004). 魚介類を素材とした発酵調味料. 特許第3834774号 (2003.4.10)
 - 14) Yoshikawa S., Kurihara H., Kawai Y., Yamazaki K., Tanaka A., Nishikiori T., and Ohta T. (2010). Effect of halotolerant starter microorganisms on chemical characteristics of fermented chum salmon (*Oncorhynchus keta*) sauce. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 6410-6417.
 - 15) 林 守正 (1992). ポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法を用いたHPLCによる食品の有機酸の分析, 島津評論, **49** (1・2) 59-64.
 - 16) 末澤保彦 (1998). 固相抽出法を用いた醤油中の2-フェニルエタノール, 4-エチルグアヤコールおよび4-エチルフェノールの迅速分析. 日本醤油研究所雑誌, **24**, 付21-25
 - 17) Tamura, Y. (2000), Manufacture of the vinegar from cheese whey. *Milk Sci.*, **49**, 15-20.
 - 18) 小川敏男 (1989). 塩と漬物, 「漬物製造学」, 光琳, 東京, pp. 25-56.
 - 19) 小島登貴子, 尾畑賢一, 大島貞雄 (2000). 魚醤の新製造システムの構築と実用化試験. 日本醤油研究所雑誌, **26**,付11-16
 - 20) 野田文雄 (1993). 東南アジアの魚醤油. 日本醸造協会誌, **88** 531-536.
 - 21) 斉藤知明 (2004). 食品のこくとかく味. 日本味と匂学会誌, **11** 165-174.
 - 22) 堂本信彦, 王 鏗智, 森 徹, 木村郁夫, 郡山 剛, 阿部宏喜 (2001). 穀醤油醸造技術を応用した新規魚醤油の開発. 日本水産学会誌, **67**, 1103-1109.
 - 23) Uchida, M., Ou, J., Chen, B.W., Yuan, C.H., Zhang, X. H., Chen, S.S., Funatsu, Y., Kawasaki, K., Satomi, M. and Fukuda, Y. (2005) . Effect of soy sauce koji and lactic acid bacteria on the fermentation of fish sauce from freshwater silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Fish. Sci.*, **71**, 422-430.
 - 24) 三菱瓦斯化学株式会社 (1998). 魚醤油の製造方法. 特開平10-42828 (1996.7.31)
 - 25) 渡部潤 (2018). 醤油酵母における香気成分生成機構に関する研究, 生物工学会誌, **96**, (3) , 106-112.
 - 26) Yuan, H.W., Tan, L., Luo, S., Chen, H., Yi, X., Sun, Z.Y., Zhang, W.X., Tang, Y.Q., Kida, K. (2015). Development of a process for producing ethyl caproate and ethyl lactate rich rice shochu. *Journal of Institute of Brewing*, **121**, 432-439.