

耐塩性微生物スターターを用いた発酵ヤナギダコ醤油の開発

吉川修司・田村吉史・阿部 茂・佐藤敬彦*・小山 洋*

Development of the octopus sauce from chestnut octopus (*Octopus conispadiceus*)
by fermentation with halo-tolerant microorganismsShuji YOSHIKAWA*, Yoshifumi TAMURA*, Tsutomu Abe*,
Takahiko SATOU**, Hiroshi KOYAMA**

A fermented octopus sauce (FOS) was prepared from the chestnut octopus (*Octopus conispadiceus*) using rice koji and halo-tolerant microorganisms (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis* and *Tetragenococcus halophilus*). Boiling of the raw material was needed to prevent excess acidification due to the high water content of the boiled material. The quantity of salt required for FOS mash preparation was more than 15% of the weight of the raw materials. According to free amino acid analysis, the main amino acids present were alanine, aspartic acid, arginine, glycine and glutamic acid. The color of FOS was lighter than soy sauce, but possessed a similar flavor.

Keywords: octopus, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Tetragenococcus*, fish sauce, fermentation

ヤナギダコは煮ダコや酢ダコなどのタコ加工品の原料として利用されているが、刺身用タコの加工に際し塩もみ後の剥皮工程で排出されるタコ皮の有効利用は進んでいない。近年、水産加工副産物の有効利用法として我が国をはじめ、アジア各国で生産されている魚醤油の製造が注目されている^{1) 2)}。しかし、タコはアミン類を主体とした魚臭が生じやすく、メイラード反応を起こしやすいアミノ酸であるグリシンやアラニンの含量が多いため³⁾、発酵を促進させるために麹を用いた場合に色調が褐変しやすく、魚醤油の原料としての利用が困難である。麹を利用した場合の魚醤油の褐変を防ぐ方法には、耐塩性微生物を加える方法がある⁴⁾。しかし、醤油醸造においては仕込み時のもろみねらい塩分濃度が低いと本来働いてはならない酢酸菌や腐敗菌が働き品質が劣化することが知られており⁵⁾、タコは魚類に比べ水分含量が高いことから⁶⁾、もろみが異常発酵するおそれがある。

そこで、本研究では利用困難なヤナギダコのタコ皮を

素材とし、麹と耐塩性微生物による発酵技術を活用して、風味に優れた発酵ヤナギダコ醤油 (FOS) を開発することを目的として試験を行った。

1. 実験方法

(1) 原材料

原材料は2007年6月に北海道白糠町沖で漁獲されたヤナギダコ (*Octopus conispadiceus*) を用い、漁獲後に塩もみ後剥皮した皮をそのまま-25℃で凍結保存した。麹は味噌製造用の *Aspergillus oryzae* で製麹された米麹 (福山醸造) を用いた。また、耐塩性乳酸菌 *T. halophilus*、耐塩性酵母 *Z. rouxii* および *C. versatilis* はそれぞれ醤油用乳酸菌、醤油用主発酵酵母および後熟酵母を(株)ビオックより購入して用いた。

(2) 魚醤油の製造方法

原材料のヤナギダコの皮は4℃で解凍、もしくは85℃30分間ボイルした後に急冷したものを細切後、

* (株)釧路丸水 (〒088-0595 北海道白糠郡白糠町庶路甲区6-577)

事業名: 民間共同研究

課題名: ヤナギダコ加工副産物を用いた発酵調味料の開発

チョッパーによりミンチ状にし、試料の20%重量の食塩(並塩, 塩事業センター), および試料の20%重量の米麴を加えてよく混合した。なお, 米麴は麴1000gに水を200mlの割合で加水し, 時折攪拌しながら40分間復水処理したものを用いた。試料の5%重量の5%(w/v)食塩水に *T.halophilus*, *Z.rouxii* および *C.versatilis* をもろみ中のそれぞれの菌の終濃度が $1.0 \times 10^6/g$ となるように加えて混合して菌液を調製した。

食塩と米麴を加えた魚肉に菌液を添加後よく混合してもろみとし, ふた付きのプラスチック容器中で室温 $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の保温庫内で12週間発酵した。発酵後, もろみを $6,800 \times g$, 4°C で30分間遠心分離し, 最上面の脂質の層が混入しないよう留意して上清を回収し, 85°C の水浴中で30分加熱後, 2.5%容量のシリカゾル(コボロックSA, 大塚食品)を加え緩やかに15分間攪拌し, 0.2%重量のセライトを加えて攪拌後, 3日間室温で静置した。No.5Cのろ紙およびセライト(セルピュアS1000, Advanced Mineral Co., USA)を用いて減圧ろ過後のろ液を製品とした。

(3) 分析方法

化学成分としてはもろみのpH, 製品の遊離アミノ酸組成を測定した。

遊離アミノ酸組成は魚醤油1mlを蒸留水4mlで希釈後混合し, うち1mlを分取し99.5%エタノール4mlを加えて除タンパク後に, 上清0.3mlを減圧乾燥し, 溶媒を0.02N塩酸1mlに置換したものを試料として全自動アミノ酸分析計(日立, L-9200)で分析した。

製品の褐変度合いは波長550nmにおけるODを分光光度計(SHIMADZU, UV-1200)により測定した。

もろみ中の耐塩性酵母, および耐塩性乳酸菌の計数には以下の組成の培地を使用した。耐塩性酵母菌数測定用(ポテトデキストロース寒天培地(日水製薬)39g, 塩化ナトリウム80g, 酵母エキス(オリエンタル酵母)5g, 寒天(伊那寒天)5g, 蒸留水1000ml, 121°C 15分滅菌後, 60°C に冷却し, 孔径 $0.2\mu\text{m}$ のセルロースアセテートフィルターで除菌したクロラムフェニコールエタノール溶液を終濃度100ppmになるよう添加), 耐塩性乳酸菌数測定用(GAMブイヨン(日水製薬)59g, 塩化ナトリウム80g, 寒天(伊那寒天)20g, 蒸留水1000ml, 121°C 15分滅菌後, 60°C に冷却し, 孔径 $0.2\mu\text{m}$ のセルロースアセテートフィルターで除菌したシクロヘキシミドエタノール溶液を終濃度100ppmになるよう添加)。培養は 30°C で耐塩性酵母数測定は6日間, 耐塩性乳酸菌数測定は10日間行った。

2. 結果および考察

(1) ボイル処理の検討

ボイルにより原料重量はボイル前の20%程度に減少した。

生原料では解凍時に塩もみに使用した食塩の作用で原料の離水が間断なく生じ, ミートチョッパーでの処理後に原料を小分けする際に水分がバラツキやすく, その調整に手間取った。一方, ボイル処理により塩分による水分のバラツキはなくなるものの, 原料重量は処理前の20%強にまで減少した。

ボイル処理の有無にかかわらず, もろみのpHは発酵開始後2週間までに急激に低下したが, 低下の度合いは生区(ボイル処理なし)がボイル処理区に比べて著しかった(Fig.1)。

耐塩性酵母数は生原料を用いた場合, 発酵開始21日目を最後に検出されなくなったのに対し, ボイル原料では耐塩性酵母数が発酵42日目まで緩やかに減少した後増加に転じた。耐塩性乳酸菌数は生原料が発酵開始7日目を最後に検出されなくなったのに対し, ボイル原料では発酵開始21日目まで検出され, 生原料よりも菌数の減少が緩やかであった(Fig.2)。

以上のデータより, 生原料を使用すると乳酸菌と酵母が急激に減少し, pHも発酵初期にボイル原料に比べて著しく低下した。醤油醸造においては仕込み時のもろみねらい塩分濃度が低いと本来働いてはならない酢酸菌や腐敗菌が働き品質が劣化することが知られている⁵⁾。このことからボイル原料よりも生原料の水分が高いため,

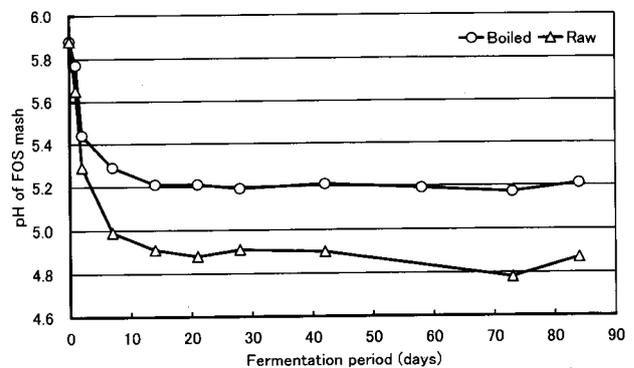


Fig. 1 Changes in pH of fermented chestnut octopus sauce (FOS) mashes made from raw and boiled material during fermentation

Boiled or raw chestnut octopus was minced and was inoculated with halo-tolerant yeast (HTY) and halo-tolerant lactic acid bacteria (HTL) starters. FOS mash was then prepared and fermented at $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Symbols: Boiled, ○; Raw, △

対水食塩濃度（発酵系の全水分に対する食塩濃度）が低すぎ、ボイル原料よりも乳酸発酵が過剰になり、もろみのpHが急低下するとともにスターターの増殖が抑制されたと考えられた。

遊離アミノ酸量はボイル原料の方が高い値を示した（Fig.3）。これはボイル処理によりヤナギダコのタンパク質が熱変性し、麴のプロテアーゼ（タンパク質分解酵素）の作用を受けやすくなったためと考えられた。

褐変度は発酵日数が長くなるにつれて著しくなり、ボイル原料の方が生原料よりも褐変が進んだ（Fig.4）。これはボイル原料の方が生原料よりももろみの分解が進んだため、メイラード反応の基質である遊離アミノ酸が多く生成したことと、発酵初期に生原料を使用したもろみのpHが急低下し、メイラード反応による褐変が抑制されたと考えられた。

以上より、原料の目減りが著しいものの、発酵過程が安定であること、および遊離アミノ酸が早期に高まり、風味が良好になることから原料のボイル処理が有効と考えられた。

(2) ボイル原料使用時の食塩配合量の検討

もろみのpHはいずれの区も発酵開始7日目までに急激に低下した。その後、10%食塩添加区ではpHが発酵終了まで上昇し続け、腐敗傾向を示した。15および20%食塩添加区では発酵28日目以降もろみのpHはほとんど変化しなかった（Fig.5）。

耐塩性酵母数は20%食塩添加区で試験期間を通じほぼ横ばいであったが、15%食塩添加区では発酵28日目に耐塩性酵母が検出されなくなり、その後70日目以降再度検出された。10%食塩添加区では発酵42日目以降耐塩性酵母は検出されなかった（Fig.6）。

耐塩性乳酸菌数は15%食塩添加区で発酵14日目、20%食塩添加区で発酵開始42日目を最後に検出されなくなったのに対し、10%食塩添加区では発酵開始28日目まで検出され、検出されている間は初発乳酸菌濃度よりも高い乳酸菌数を示した。10%食塩添加区では発酵42日目以降、耐塩性乳酸菌は見られなかったが、その他の明らかに乳酸菌と異なる外観の耐塩性微生物が検出され、総数は常時 10^8 台を維持していた（Fig.6）。

もろみの香りは15および20%食塩添加区ではアルコールやフラノン類など耐塩性酵母および乳酸菌を加えた場合の正常な発酵で生じる芳香を感じたが、10%食塩添加区では発酵7日目に若干のアルコール臭を感じ、以降はアミン系の腐敗臭を強く感じた。

以上より、5%食塩添加区では加えたスターターが発

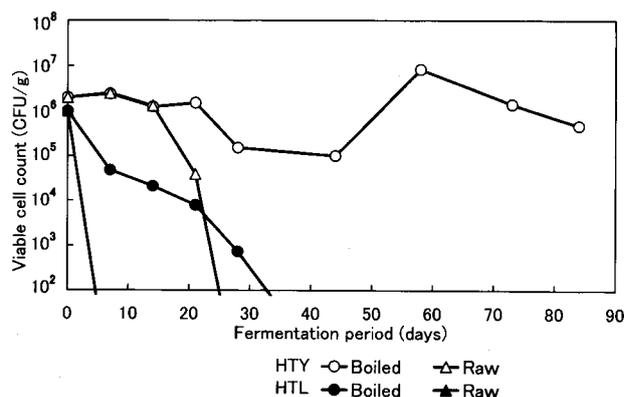


Fig. 2 Time course of the viable halo-tolerant yeast (HTY) and halo-tolerant lactic acid bacterium (HTL) count in FOS mash made from raw and boiled material during fermentation

Symbols: HTY (Boiled, ○; Raw, △), HTL (Boiled, ●; Raw, ▲)

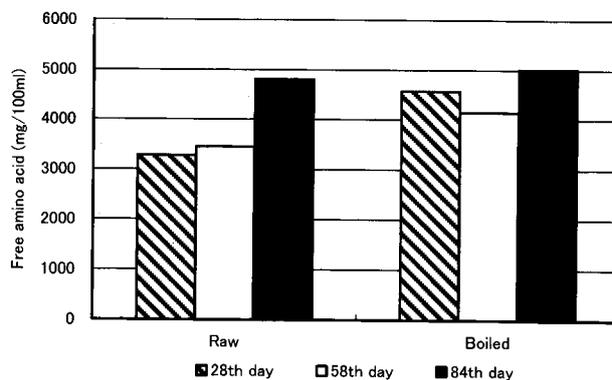


Fig. 3. Changes in free amino acid concentration in FOS made from raw and boiled material during fermentation

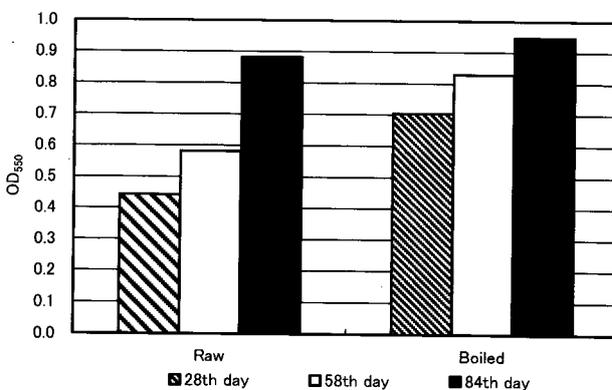


Fig. 4. Changes in OD₅₅₀ of FOS made from raw and boiled material during fermentation

酵7日目までは発酵を主導したものの、食塩濃度が低すぎるため、発酵14～21日目までには乳酸菌の菌数が高くなり腐敗を生じる微生物群（特に揮発性塩基窒素

を生じる細菌群)の増殖が発酵14日目以降優勢となり腐敗に転じたと考えられた。また、醤油発酵において酵母が生成するアルコールにより細菌群が抑制されるとの報告があるが、腐敗関連の細菌群が優勢になり、静菌に必要なアルコールを生成する間もなく、菌叢上劣勢になったことが示唆された。このことから食塩添加量は少なくとも対ボイル原料の15%以上必要であることが判明した。

遊離アミノ酸は食塩添加量が低いほど高い値を示した。また、食塩添加量が10%の場合は発酵28日目では遊離アミノ酸量が一定になるのに対し、15%および20%食塩添加区では発酵日数が長くなるにつれ、遊離アミノ酸量が高まった (Fig.7)。また、遊離アミノ酸の総量は筆者が過去に測定した濃口醤油の遊離アミノ酸含量とほ

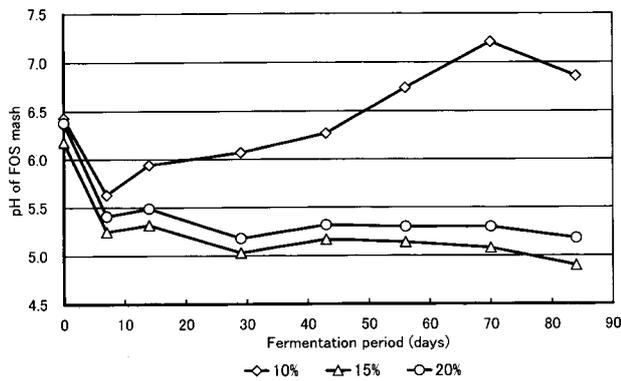


Fig. 5 Changes in pH of FOS mashes prepared with different quantities of salt during fermentation

Symbols: Salt added at a concentration of 10% w/v of raw materials, ◇; 15% w/v of raw materials, △; 20% w/v of raw materials, ○

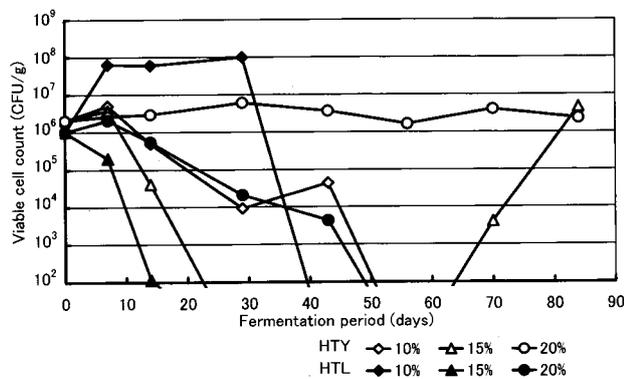


Fig. 6 Time course of the viable HTY and halo-tolerant lactic acid bacterium HTL count in FOS mash prepared with different quantities of salt during fermentation

Symbols: HTY (Boiled, ○; Raw, △), HTL (Boiled, ●; Raw, ▲)

ぼ同レベルであった。

アミノ酸組成はアスパラギン酸, アルギニン, アラニン, グリシン, グルタミン酸が多かった (データ未掲載)。アルギニンを多く含むのは、海産軟体動物に多く含まれるアルギニンリン酸に由来するものと考えられた。FOSは独特の甘味があるが、アラニンやグリシンが多いことが一因と考えられるが、タコ類は甘味の元となるアラニン, グリシン, ベタインを多く含むことが知られており⁵⁾、その原料特性を反映したと考えられた。

褐変度は発酵日数が長くなるにつれて著しくなり、食塩15%添加区が最も褐変が進んだ (Fig.8)。しかし、同様の条件で濃口醤油の褐変度を測定した場合のOD₅₅₀は1.884であり、このことから試作品の色調は醤油に対して淡いことが判明した。魚醤油の色調が濃いと、製品自体の品質を損なうだけでなく、魚醤油を使用した加工品の色調も濃くなることから、試作品の色調は淡く魚醤油として優れた品質を持つと考えられた。

FOSは醤油様の香りが強かった。本試験でスターター

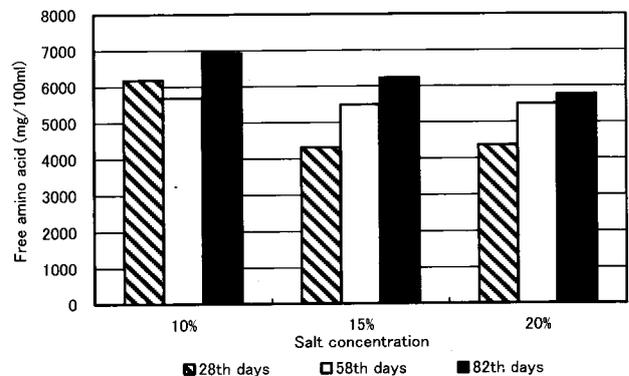


Fig. 7. Changes in free amino acid concentration in FOS prepared with different quantities of salt during fermentation

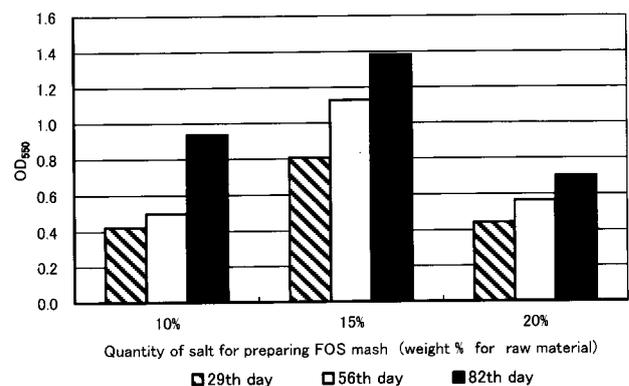


Fig. 8. Changes in OD₅₅₀ of FOS prepared with different quantities of salt during fermentation

として用いた *C.versatilis* は醤油の煙香様の香ばしい香りの成分である 4-EP (4-エチルフェノール) や 4-EG (4-エチルグアヤコール, エチル-2-メトキシフェノール) を, *Z.rouxii* はカラメル様の甘い香りを有する HEMF (4-ヒドロキシ-2 (or5) -エチル-5 (or2) -メチル 3 (2H) -フラノン) を生産することが知られている^{7) 8)}. 著者はこれらの微生物をスターターとして添加した発酵シロサケ醤油において, これらの化合物がスターターによって生成されることを確認しており (データ未発表), FOS が有する醤油様の香りは接種した耐塩性酵母スターターの添加によって付与されたと考えられた.

要 約

耐塩性微生物スターター (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis* and *Tetragenococcus halophilus*) と米麴を用い, 刺身用ヤナギダコの加工の際に排出される皮を素材とした発酵タコ醤油を開発した. 芳香を生成する酵母スターターの菌数を維持するためには, タコ皮をボイル処理してから用いることが必須であった. また, 食塩添加量はボイルしたタコ皮に対し 15% 以上添加することが必要で, 食塩添加量が低すぎると, もろみが腐敗した. 開発したヤナギダコ醤油は, 濃口醤油とほぼ同程度の遊離アミノ酸含量があり, 色調は濃口醤油よりも薄かった. 遊離アミノ酸組成はアスパラギン酸, アルギニン, アラニン, グリシン, グルタミン酸が多かった. FOS は醤油様の香りが強かった.

謝 辞

本研究に際し, 麴を提供いただいた北海道醤油株式会社の澤田明夫部長, 北海道味噌株式会社の大西拓也次長に心より感謝申し上げます.

文 献

- 1) Sanchez, P. C., Microorganisms and Technology of Philippine Fermented Foods, Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, **10**, 19-28 (1999).
- 2) Aryanta, W. R., Traditional Fermented Foods in Indonesia, Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, **10**, 90-102 (2000).
- 3) 中村全良編, 北の水産加工事典, 北日本海洋センター, 143-151 (1990).
- 4) 吉川修司, 田中 彰, 錦織孝史, 太田智樹 大麦麴と耐塩性微生物を用いて調製したシロサケ魚醤油の開発 日本食品科学工学会誌 **53** 281 ~ 286 (2006).
- 5) 門脇 清, 醸造, 「醤油の科学と技術」, 増補, 枳倉辰六郎編, ((財) 日本醸造協会, 東京) pp.121-151 (1994)
- 6) 香川芳子編, 5訂 日本食品標準成分表, 女子栄養大学出版部, 134-174 (2002).
- 7) 佐々木正興, 森修三, 醤油の香り, 醸協, **86**, 913-922 (1991).
- 8) 古屋武, 藤元秀雄, 森治彦, 枳倉辰六郎, 中台忠信, 微生物, 「醤油の科学と技術」, 増補, 枳倉辰六郎編, ((財) 日本醸造協会, 東京) pp.152-227 (1994).