

サンマ速醸魚醤の醸造過程におけるタンパク質分解酵素と微生物の動態

角田 出^{*1}・油谷 弘毅^{*2}・高瀬 清美^{*1}

Changes in Protease Activity and in Bacterial Communities during the Rapid Fermentation Process of Fish Sauce Derived from Pacific Saury

Izuru KAKUTA¹, Hiroki ABURATANI² and Kiyomi TAKASE¹

¹Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki 986-8580, Japan

²Miyagi-Suisan High School, Ishinomaki 986-2113, Japan

Abstract

Salt plays important roles in food preservation and cooling, however, excessive salt intake triggers some diseases. We produced fermented fish sauce of 3 kinds from Pacific saury (*Cololabis saira*) by brewing for 8 weeks at 50°C with the different concentrations of table salt, 10%, 20% and 30% Sodium chloride (NaCl). Changes in protease activity and bacterial composition were examined to clarify the protein degradation process of fish sauce mashes. For estimating safety and taste of produced fish sauce, formol nitrogen and free amino acids contents, volatile basic nitrogen (VBN) and histamine levels were also measured. The number of bacteria in 10–30% NaCl fish sauce decreased rapidly below 1/50 of the initial within 1 day. After 4 weeks, only a small number of bacteria such as *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp. and *Lactobacillus* sp. were detected. High protease activity was also maintained during the fermentation, however, the pH profile of protease was changed. Moreover, in fish sauce containing 30% NaCl, the speed of protein decomposition process was suppressed. Formol nitrogen and free amino acids contents increased with a decrease in the amount of adding NaCl. Higher histidine, lysine, valine, leucine and isoleucine contents and slightly lower glutamate and aspartate levels, that is, large amounts of kire and koku components were detected in fish sauce made from saury by a rapid fermentation method at 50°C, comparison with a commercially available fish sauce Shotturu. Negligible levels of VBN and histamine were detected in this rapid fermented fish sauce with 10–30% NaCl. These results suggest that the importance of proteolytic enzymes in the fermentation of Pacific saury at 50°C for 4 to 8 weeks, and that, the safe, health-oriented and marketable fish sauce is produced through the fermentation, even though the concentration of sodium chloride was 10%.

1. 緒言

魚醤は、魚を塩と共に漬け込むことで、魚自身を持つ酵素による自己消化作用に加え、混在する細菌の働きにより発酵が進み、つくられる調味料である⁽¹⁾。カタクチイワシ類を原料としたタイのナンプラーやイワシ、ムロアジ類などの小魚類を原料としたベトナムのニョクマムは世界的に名の知られた魚醤である。日本でも幾つかの地域でつくり続けられてきており、ハタハタやイワシ類を原料とした秋田の“しょつつる”、マイカの内臓、イワシやサバを主に原料とした能登の“いしり”

や“いしる”、香川県の“イカナゴ醤油”は有名である。

これまで魚醤は、特定の地域で、魚の煮物や鍋物を中心とした郷土料理に欠かせない調味料として親しまれてきたほかは、料理や菓子の隠し味として使われる程度であった。近年、食品のブランド化戦略の浸透に伴って、これまで魚醤文化が根付いていなかった地域においても、魚の未利用部分（残渣）の有効利用、地域資源を活用した新商品開発および情報発信を目指して、新たな商品開発が模索されるようになった^(2~5)。

^{*1}石巻専修大学理工学部生物科学科

^{*2}宮城県水産高等学校教諭

東北地方南部の太平洋岸に位置する宮城県石巻圏域でも、地域資源の有効利用に向けた流れが加速している。我々も、魚の風味を活かした石巻圏域独自の新たな魚醬として、また、地域産業を深く理解し、そこで活躍できる人材の育成を目指して、地域特産の魚を用いた高温醸造による魚醬(速醸魚醬)の開発を進めてきた。高温速醸魚醬に限定しているのは、高等学校等における学習の諸活動の範囲内で出来得る限りの発想・創造・具現化力を身につけさせたいがため、および、魚介類加工物で注意すべき項目の一つであるヒスタミンの産生を抑えた商品づくりを目指しているためである。魚醬は、通常、数か月～3年間の長期にわたり、魚の肉や内臓を魚自身の酵素(主にタンパク質分解酵素)や混在する細菌の働きによって分解させることでつくられる⁽¹⁾。しかしながら、高温速醸魚醬の場合、醸造期間は1～2カ月程度である⁽⁶⁾。また、高温速醸法では高温・短期間で発酵が完結するため、ヒスタミン生成菌によるヒスタミンの産生も著しく抑制されると考えられたためである。なお、石巻にある宮城県水産高等学校では、既に、地元の特産品であるサンマ *Cololabis saira* を原料として、50℃という高温で醸造される速醸魚醬である「宇田川乃露」を開発し、委託販売を実施するに至っている⁽⁶⁾。

魚醬の醸造中におけるタンパク質の分解機序については、魚のタンパク質分解酵素による自己消化と醸造系内に混在する微生物の働きのいずれが主であるかという議論が続いてきた。近年、魚醬の醸造には、魚のタンパク質分解酵素による自己消化が中心的な働きを担っており、微生物は主に腐敗に関係するとの考え方が主流となっている^(3, 7, 8)。ただし、魚醬の原料となる魚のタンパク質分解酵素と混在する細菌による分解作用が、魚醬醸造にどのような役割を担っているか、それぞれの貢献度はどの程度のものか等、魚醬の醸造過程には未だ不明な部分も多い。たとえば、魚醬の醸造時には、通常の穀類由来の醬油に比べて、多量の食塩を使用するため、魚醬の塩分濃度は20～30%程度と高く、細菌の生育・増殖は抑制されると考えられてきた^(8, 9)。しかしながら、好塩性の細菌の存在も数多く確認されており、魚醬製造に耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 等

の微生物をスターターとして用いる試みもなされている^(2, 10～13)。一方、魚醬醸造の際に多量に添加される塩は、タンパク質分解酵素の活性も阻害することが報告されている^(8, 14)。また、魚自身のタンパク質分解酵素の活性が1年以上の長期にわたり高い活性を維持できる機構についても良く解っていない。

高温速醸魚醬についても、高温での短期間醸造に係るタンパク質分解酵素や醸造系内に混在する微生物の機序、動態に関する情報はほとんどない。例えば、魚のタンパク質分解酵素は主に内臓に含まれているが、同酵素のpHや温度特性、活性維持期間等に関する情報は少ない^(8, 15～17)。また、50℃という高温で醸造するため、高塩分かつ高温への耐性のある微生物しか生存し得ない^(8, 12, 15)。

そこで本研究では、まず、サンマ内臓に含まれるタンパク質分解酵素のpHや温度特性を調べた。次に、異なった塩分条件下での魚醬の醸造過程における魚自身のタンパク質分解酵素と混在する細菌の働きを明らかにするため、塩分条件を変えて速醸魚醬を作製し、醸造過程におけるタンパク質分解酵素活性や混在する細菌の数や組成の変化(微生物動態)を追跡した。

2. 材料および実験方法

2.1 魚醬の作製(醸造)

魚醬の原料として、9月に宮城県沖で採捕し、海水水で締めかつ保存され、石巻漁港に運ばれた新鮮なサンマ(*Cololabis saira*)、平均体重約140g、を使用した。サンマ湿重量の30%、20%あるいは10%の濃度となるように食卓塩(塩事業センター：塩化ナトリウム99%以上含有)を添加し、十分に混合した後、50℃の恒温装置内で魚醬の醸造を開始した。すなわち、生サンマをフードカッターを用いてペースト状にした後、規定量の食卓塩を添加し、十分に混和し、それぞれを4本ずつの容量50mLディスポーザブル遠心管(コーニング社製)になるべく空気層の無いように充填し、きつく栓をした状態で50℃の恒温装置内に置き、時々かき混ぜながら、最長で8週間醸造した。

魚醬の醸造工程で、醸造開始直前(サンマペースト;0時間)、同開始から3時間、1および3日、1、4、6、8週間後の計8回にわたり、各醸造容器

から無菌的に試料の一部を取り出し、pH メーター（日立-堀場社製）を用いて魚醬作製系内の pH を、デジタル塩分計（ATAGO ES-421）を用いて塩分濃度を調べるとともに、後述の方法により、魚醬中のタンパク質分解酵素活性、微生物の検出と同定、揮発性塩基窒素、総窒素量、および、ホルモル窒素量の測定を行った。また、醸造開始から 4、6 および 8 週間後については、一部の魚醬について遊離アミノ酸組成を調べた。

醸造工程を終えたものは、ティーフィルターでろ過後、85℃で 20 分間加熱して反応を止めた（火入れ）後、孔径 1 μm の滅菌済みグラスファイバーフィルター（アドバンテック社製）でろ過し、表面の浮遊油分等を取り除きつつ、冷蔵庫内で保存した。

2.2 サンマ内臓由来タンパク分解酵素の pH および温度特性の調査

サンマの内臓を取り出し、9 倍量の 0.8% の塩化ナトリウムを含む pH 7.0 の 3 mM リン酸緩衝液を加えてホモジナイズした後、4℃、9,000 g で 20 分間遠心し、遠心上清を粗酵素液とした。同酵素液を試料として、pH 4.5 から pH 10.5 まで、pH の間隔 1 毎に、7 段階の pH 条件を設定（pH 4.5～pH 6.5；0.1 M クエン酸リン酸緩衝液、pH 6.5～pH 8.5；0.1 M リン酸緩衝液、pH 8.5～pH 9.5；0.1 M Tris-塩酸緩衝液、pH 9.5～pH 10.5；0.1 M ホウ酸ナトリウム緩衝液）し、それぞれ、生サンマ内臓のタンパク質分解酵素活性を、カゼイン法¹⁸⁾により測定した。すなわち、2.0% ミルクカゼイン溶液 2 mL、0.1 M リン酸緩衝液 2 mL に粗酵素液 1 mL を加え、30℃で、20 分間反応させた後、0.4 M トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させた。3,000 g で 5 分間遠心後、ろ過し、ろ液 1 mL に 0.4 M 炭酸ナトリウム 5 mL、2 倍希釈フェノール試薬 1 mL を加えて、30℃で 20 分間保温し、660 nm にて吸光度の変化（上昇）を測定した。

また、生サンマの内臓のタンパク分解酵素について求めた至適 pH 条件下において、酵素の温度特性を調べた。すなわち、10℃から 70℃まで、10℃毎に計 7 段階の温度条件を設定して同酵素活性を調べた。

2.3 魚醬中タンパク分解酵素活性の測定

魚醬の醸造中に採取した試料について、上述の方法に準じて、pH 9.5（内臓由来粗酵素液中タンパク質分解酵素の pH プロファイルデータより求めた至適 pH）におけるタンパク質分解酵素活性の変化を調べた。また、醸造開始時、および、食塩添加量が 30% の魚醬の醸造開始から 3 日、1 週間、4 週間、8 週間のものについては、pH 5.5 および 7.5 におけるタンパク質分解酵素活性も合わせて調べた。

2.4 魚醬中微生物の検出と同定

魚醬の醸造工程で無菌的に取り出した試料を、0.8% 食塩溶液にて均一化後、一部を塩分濃度 3.5% および同 20% に調製した Zobell 2216E 寒天培地（BD Bioscience 社製培地基材を使用して作製）上に塗布し、20℃（室温）および 50℃下で、好気状態で培養するとともに、EG 寒天培地（メルク社製）を用いて嫌気培養に供し、最長で 7 間にわたり、菌の増殖過程を調べた。

なお、好気培養については、塩蔵による細菌の弱体化を想定し、細菌の増殖活性を回復させるために、寒天を除いた Zobell 2216E 液体培地とリン酸緩衝液（pH 6.0）、あるいは、そこに食塩を 3.5% になるように添加した溶液で 10 倍に希釈（培地あるいは緩衝液 9 mL に対し、魚醬試料を 1 mL 添加）したものを用意し、20℃で振盪培養（事前培養）した。振盪培養開始から 1 週間後の試料を Zobell 2216E 寒天培地（NaCl 3.5%）に 100 μL ずつ塗布し、3 日を経過した後に、各培地上に形成されたコロニー数を計測した。

また、寒天培地上に生育した細菌の各コロニーについて、常法¹⁹⁾に準じて菌組成を調べた。

2.5 魚醬中揮発性塩基窒素（volatile basic nitrogen：VBN）含量の測定

醸造開始から 4 および 8 週間後の魚醬もろみ中の VBN 含量は、魚醬もろみに蒸留水を加えつつホモジナイズしたものを、4℃、2,000 g で 10 分間遠心して得られた上清に、5% 硫酸を加えて弱酸性とした後、蒸留水で定容して、Conway の微量拡散分析法²⁰⁾により測定した。

2.6 魚醬中有機物の測定

魚醬中の総窒素量はケルダール法で⁽²¹⁾、ホルモル窒素量は、ろ紙（東洋ろ紙 No. 5）でろ過した魚醬について、醤油試験法⁽²²⁾に準じて行なった。すなわち、後者は試料 0.5 g あるいは 0.5 mL を 25 mL のメスフラスコに入れて蒸留水で定容し、pH メーターで測定しながら 0.1 N NaOH 溶液を用いて pH 8.5 に調整し、事前に pH を 8.5 に調整しておいたホルムアルデヒド液 20 mL を加えた後、再度 pH 8.5 になるまで 0.1 N NaOH 溶液にて中和滴定 (X mL) を行い、以下の計算式より求めた：ホルモル窒素 = $X \times 0.0014 \times F \times 25 \div (0.5 \times 25) \times 100 = X \times F \times 0.28$ 。上式中の F は 0.1 規定 NaOH のファクター、X は中和滴定に要した 0.1 N NaOH 溶液の量である。

また、魚醬中の遊離アミノ酸組成は、魚醬を限外ろ過ユニット（日本ミリボア工業製、分画分子量 5,000）でろ過した後、同希釈液を Shimadzu 高速液体クロマトグラフ装置（2 台の LC6A を用いた高圧混合方式、カラム；Shim-pack ISC07/S、0.1 M クエン酸リチウム溶液多段勾配溶出、オルトフタルアルデヒドポストカラム発色法）を用いて測定した。

2.7 魚醬中ヒスタミン濃度の測定

醸造開始から 4 および 8 週間後の魚醬もろみを良くホモジナイズ後、ヒスタミン濃度をチェックカラーヒスタミンキット（キッコーマンバイオケ

ミファ社製）を用い、光路長 50 mm の分光光度計を使用して測定した。本法によるヒスタミンの検出感度は 4 ppm (mg/kg) とされている。

2.8 統計

各種指標の結果については、分散分析により交互作用を確認後、Tukey の検定あるいは Mann-Whitney の U 検定により統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意の限界とした。

3. 結果

3.1 サンマ内臓由来酵素液中タンパク質分解酵素の pH および温度特性

サンマ内臓由来粗酵素液中のタンパク質分解酵素の pH および温度依存性を Fig. 1 に示す。サンマ内臓由来タンパク質分解酵素の至適 pH は 9.5 付近、同温度は 40℃（～50℃）付近にあった。ただし、醸造初期における魚醬もろみの pH 付近（後述）でも、最大活性の数十％程度の値を示すことが分かった。

3.2 異なる塩分条件下で醸造した魚醬の pH、タンパク質分解酵素活性、および、微生物組成の経時的変化

食塩をサンマ湿重量の 10、20 および 30％添加して作製した魚醬の塩分濃度は、それぞれ、9.8～10.0％、18.5～19.4％、26.8～28.9％であった。

異なる塩分条件下で醸造した 3 種類の魚醬もろ

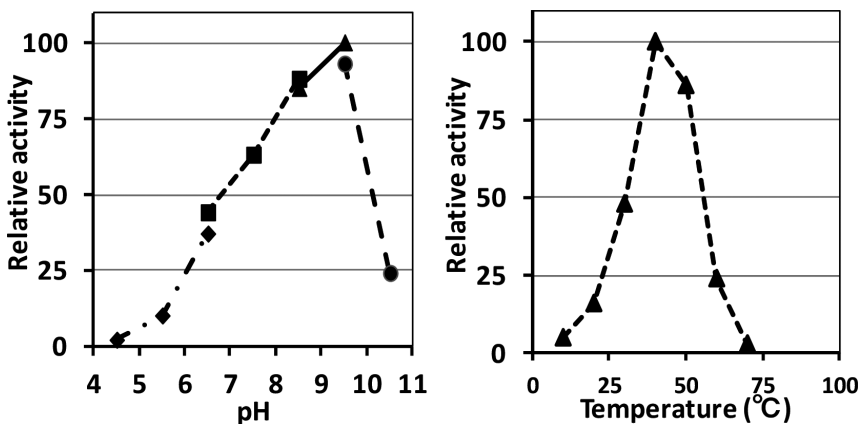


Fig. 1 The properties of pH at 30°C and temperature at pH 9.5 of the protease derived from the viscera of Pacific saury
 ◆ ; Citrate-phosphate buffer, ■ ; Phosphate buffer,
 ▲ ; Tris-HCl buffer, ● ; Borate buffer

みの経時的な pH 変化を Fig. 2 に示す。醸造開始当初は中性から弱酸性であったものが、時間経過とともに酸性化し、開始から 4 週間以内に pH 5.5 付近ではほぼ一定の値となった。なお、初期の変化は食塩添加量が多いと緩慢なものとなった。

異なる塩分条件下で醸造した 3 種類の魚醬もろみ中におけるタンパク質分解酵素活性の経時変化を Fig. 3 に示す。すべての塩分条件とも、醸造開始から 3 日後までにタンパク質分解酵素の活性が 30~70% も低下した。その変化は、塩分濃度が 20% 以上で大きかった。醸造開始から 1 週間後には、平均活性は開始当初の 50~80% に回復し、各塩分条件とも、わずかに低下しつつも、8 週間後までその活性を保った。なお、塩分濃度が低い程、活性は高く維持される傾向にあり、4 週間以降、塩分濃度 30% での値は同 10% 時に比べ、常に低かった。

塩分 30% の条件で異なった期間醸造した魚醬もろみ中のタンパク質分解酵素における pH 特性を Fig. 4 に示す。醸造開始時における酵素の至適 pH は 9.5 であり、pH 5.5 における活性値は有意に低かったが、開始から 3 日後には、pH 7.5 および pH 9.5 において、急激な値の低下がみられたのに対して、pH 5.5 では値の変化がほとんど認められなかった。1 週間後では、全ての pH において活性の再上昇がみられたが、pH 5.5 における値が有意な上昇を示したのに対し、pH 7.5 は開始時と同程度の値を、pH 9.5 は開始時の 30~50% 程度の低い値を、それぞれ、8 週間後まで維持した。

異なる塩分条件下で醸造した 3 種類の魚醬もろみ中から、好気および嫌気培養により、室温での培養により検出された（塩分を 3.5% 量含む培地上に生育した）従属栄養細菌の数の経時変化を Fig. 5 に示す。醸造開始時における細菌数は、好気培養では 1,700 CFU/g、嫌気培養では 8,300 CFU/g であった。好気、嫌気培養ともに、醸造開始から 3 時間後には、塩分条件が 10% と 20% では開始時の 40~50% 程度の数に、同 30% では開始時の 10% 程度に激減した。また、1 日を経た後は、すべての塩分条件下において、好気的な直接培養ではほとんど検出されなくなり、嫌気培養でも検出数は著しく減少した。なお、50℃での培養

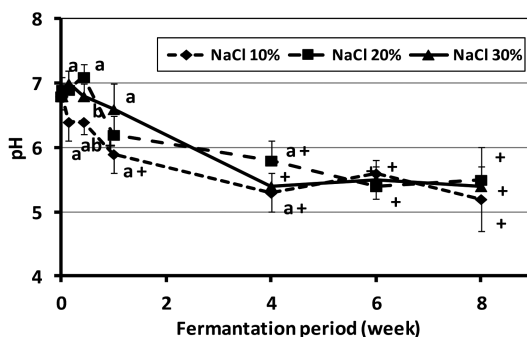


Fig. 2 Changes in pH of three fish sauce mashes during rapid fermentation
Data are given as mean $\pm$ S.D., $n=4$.
a, b : The same superscript at the same time indicates a significant difference ($p<0.05$).
+ : Significant difference from the initial ($p<0.05$).

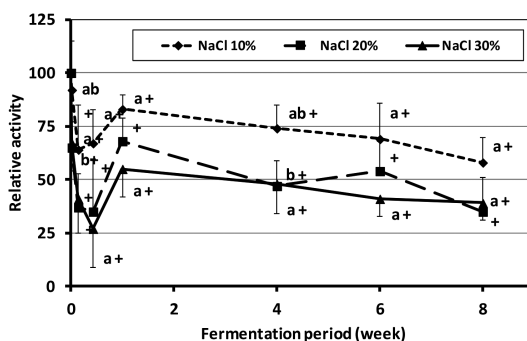


Fig. 3 Changes in the proteolytic activities of three fish sauce mashes during rapid fermentation
Data are given as mean $\pm$ S.D., $n=4$.
a, b : The same superscript at the same time indicates a significant difference ($p<0.05$).
+ : Significant difference from the initial ($p<0.05$).

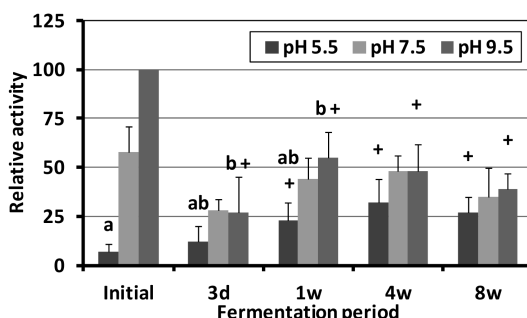


Fig. 4 Changes in the proteolytic activities measured at pH 5.5, 7.5 and 9.5 in fish sauce mashes during rapid fermentation
Data are given as mean $\pm$ S.D., $n=4$.
a, b : The same superscript at the same time indicates a significant difference ($p<0.05$).
+ : Significant difference from the initial ($p<0.05$).

サンマ速醸魚醤の醸造過程におけるタンパク質分解酵素と微生物の動態

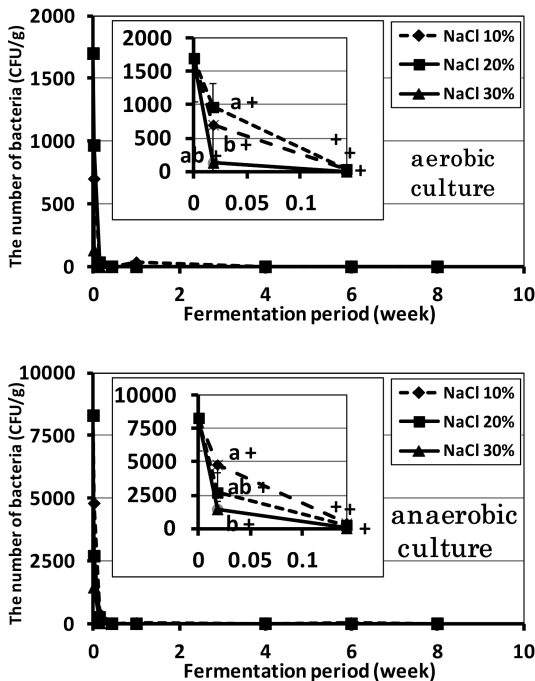


Fig. 5 Changes in the number of bacteria from three fish sauce mashes during rapid fermentation. Data are given as mean $\pm$ S.D., $n=4$.
a, b : The same superscript at the same time indicates a significant difference ($p<0.05$).
+ : Significant difference from the initial ($p<0.05$).

では、醸造開始時を含め、すべての培養試料において細菌の生育は認められなかった。また、塩分を20%量含む培地上では、室温下での7日間の培養期間中に、一部培地上に極少数かつ微細な細菌コロニーの形成が認められたのみであった。

異なる塩分条件下で醸造した3種類の魚醤もろみ中から好気培養により検出された細菌（好気および通性嫌気性細菌）、および嫌気培養により検出された細菌（偏性および通性嫌気性細菌）の組成における経時変化を Fig. 6 に示す。ただし、好気培養下における4週間以降については、すべて一旦液体培地で事前培養した後、液体培地中で生育あるいは生存していた細菌を平板培地上で生育させた場合の結果である。好気培養では、醸造開始時には、*Aeromonas*、*Alteromonas*、*Bacillus*、*Corynebacterium*、*Flavobacterium*、*Moraxella*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、*Staphylococcus*、*Streptococcus* 属の10種類の細菌が検出され、中でも *Aeromonas*、*Pseudomonas*、*Vibrio* 属細菌は多く、

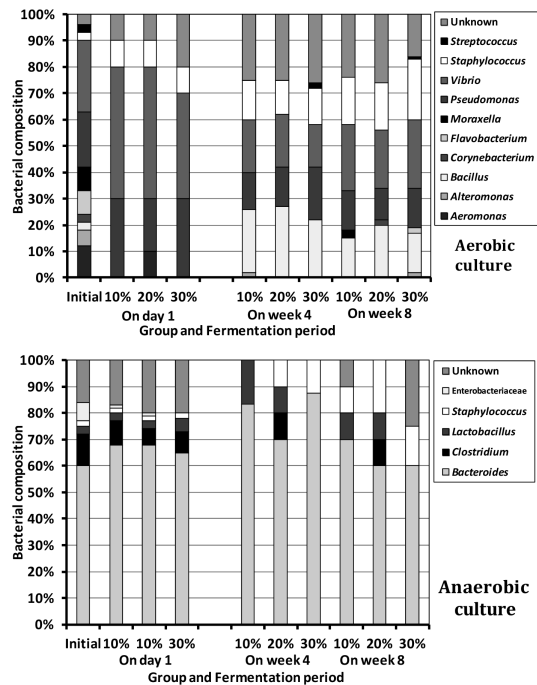


Fig. 6 Changes in the bacterial compositions from the fish sauce mashes containing 30% NaCl during rapid fermentation. Data are given as the mean value ($n=4$).
In case of aerobic culture, the initial and on day 1, bacterial colonies were given by a direct culture on the Zobell plate. On weeks 4 and 8, however, data were given by using bacteria precultured in a liquid Zobell medium.

同3属で全体の60%を占めていた。醸造開始1日後では、菌組成では単調となり、*Pseudomonas*、*Vibrio* の2属で全体の70%を占めた。醸造開始から4および8週間後では、*Bacillus*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、*Staphylococcus* の4属で全体の70%以上を占めていたが、醸造開始1日後とは異なり、*Pseudomonas* と *Vibrio* 属の割合が減少し、逆に、*Bacillus* と *Staphylococcus* 属の割合が増加していた。嫌気培養では、*Bacteroides*、*Clostridium*、*Lactobacillus*、*Staphylococcus* 属、*Enterobacteriaceae* 等の細菌が検出された。嫌気培養では、醸造開始時および開始から1日後では、*Bacteroides*、*Clostridium*、*Lactobacillus*、*Staphylococcus* 属、*Enterobacteriaceae* の4属1科の細菌が検出され、中でも *Bacteroides* 属の割合が60~70%を占めていた。醸造開始から4および8週間後では、*Bacteroides* 属細菌が優占（60~90%）し、残りを

Clostridium、*Lactobacillus*、*Staphylococcus* 属細菌が占めていた。

3.3 異なる塩分条件下で醸造した魚醬中の揮発性塩基窒素 (VBN)、有機物・遊離アミノ酸含有量、および、ヒスタミン濃度の変化

異なる塩分条件下で4および8週間醸造した3種類の魚醬もろみ中の VBN 含有量を Fig. 7 に示す。魚醬もろみ中は、VBN 含有量は 26~43 mg/100 g の範囲で、醸造期間および塩分条件の違いによる差は認められなかった。

異なる塩分条件下で醸造した3種類の魚醬もろみ中の全窒素量は、醸造開始から8週間後まで、すべての塩分濃度条件下ともに、1.66~1.78 g/100 g であった。

異なる塩分条件下で醸造した3種類の魚醬もろみ中におけるホルモル窒素量の経時変化を Fig. 8 に示す。魚醬もろみ中のホルモル窒素量は、醸造が進むにつれて、すべての塩分濃度下で徐々に増加し、4週間以降では塩分10%条件での値が、同30%条件の値に比べ有意に高くなった。

異なる塩分条件下で醸造した3種類の魚醬もろみ中の全窒素量とホルモル窒素の割合 (タンパク質分解率: $\text{ホルモル窒素量} \div \text{全窒素量} \times 100$) は、醸造開始時の12.3%から、塩分10%、20%、30%の場合、それぞれ、1週間後には27.8%、25.3%、20.3%、4週間後には54.6%、48.2%、42.6%、6週間後には64.3%、55.5%、47.9%、8週間後には66.5%、55.7%、49.5%となり、いずれの塩分条件下でも、醸造開始から4週間後の値の上昇は鈍化し、6週間以降はほぼ平衡状態となった。

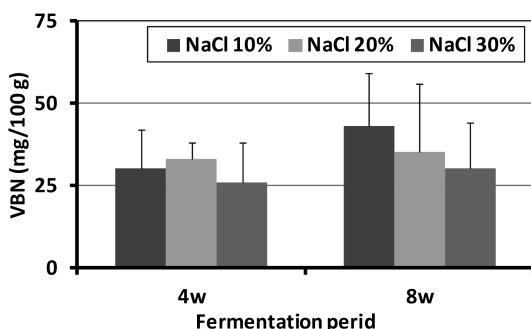


Fig. 7 Changes in the content of VBN from three fish sauce mashes during rapid fermentation
Data are given as mean±S.D., n=3.

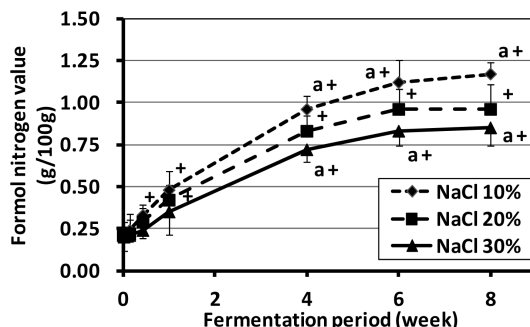


Fig. 8 Changes in the content of formol nitrogen from three fish sauce mashes during rapid fermentation
Data are given as mean±S.D., n=4.
a, b : The same superscript at the same time indicates a significant difference ($p<0.05$).
+ : Significant difference from the initial ($p<0.05$).

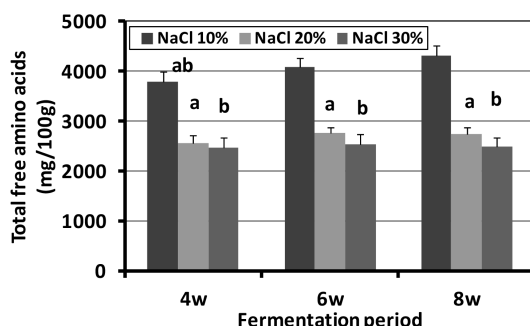


Fig. 9 Changes in the content of total free amino acids from three fish sauce mashes during rapid fermentation
Data are given as mean±S.D., n=4.
a, b : The same superscript at the same time indicates a significant difference ($p<0.05$).

異なる塩分条件下で醸造した3種類の魚醬もろみ中における総遊離アミノ酸量を Fig. 9 に示す。塩分10%の場合、同20%や同30%の場合と異なり、遊離アミノ酸量は有意に多くなった (約1.6倍)。また、各塩分濃度とも、醸造開始から4週間以降、8週間後まで魚醬もろみ中の総遊離アミノ酸量に大きな変化は認められなかった。

異なる塩分条件下で醸造した3種類の魚醬の遊離アミノ酸組成比にはほとんど差が無かった。そこで、8週間醸造した3種類の魚醬のアミノ酸組成から得られた、キレ (ヒスチジン、リジン、バリン、ロイシン、イソロイシン)、旨味 (グルタミン酸、アスパラギン酸)、甘味 (セリン、グリシン、アラニン、スレオニン、プロリン)、コク (アルギニン、アンセリン) の相関図を、しょっつるのデー

サンマ速醸魚醤の醸造過程におけるタンパク質分解酵素と微生物の動態

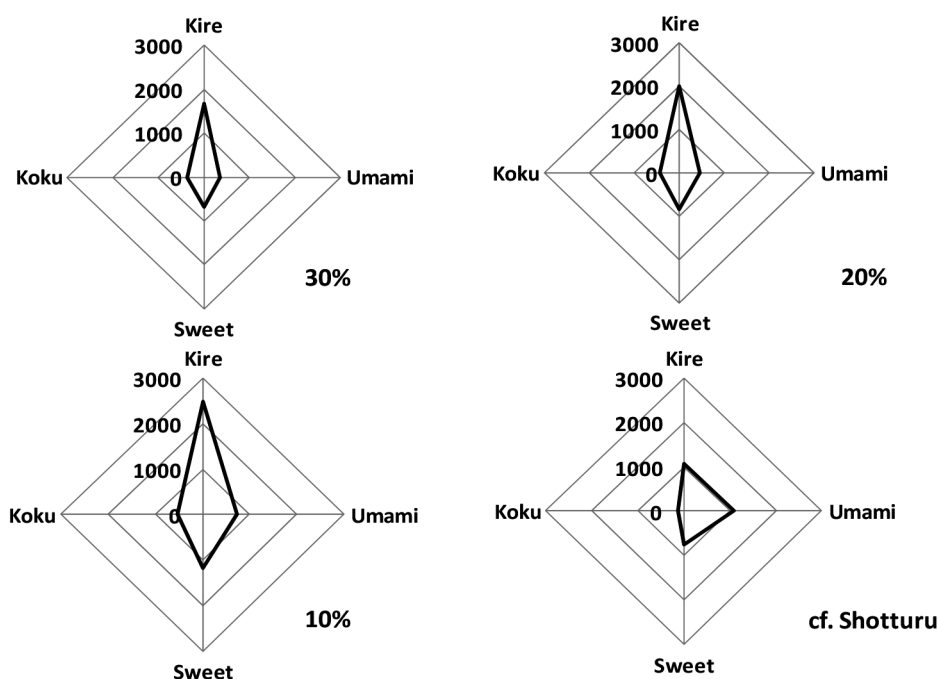


Fig. 10 Kire, Umami, Sweet (Amami), and Koku of the three fish sauce (on week 8) derived from Pacific saury and Shotturu. Amino acids levels [mg/100g] in the fermented fish sauce are given as the mean value (n=3).

Kire : His, Lys, Val, Leu, Ile
 Umami : Glu, Asp
 Sweet : Ser, Gly, Ala, Thr, Pro
 Koku : Arg, Ans

タと比較して、Fig. 10 に示す。今回作製したサンマ魚醤は、キレとコクの数値が際立って高く、しょつつと比べた場合、塩分 30% では、キレとコクの数値が高く、甘味はほぼ同等の値であったが、旨味は 1/3 程度と低値を示した。一方、塩分 10% の場合では、旨味がわずかに低いものの、他の項目はすべて高値であった。

醸造開始から 4 および 8 週間後の魚醤もろみ中のヒスタミン濃度は、全て 20 mg/kg 以下であった：NaCl 10%、20% および 30% 添加群の魚醤もろみ中の当該値は、醸造開始から 4 週間後では、それぞれ、 15 ± 3 、 11 ± 3 、 8 ± 2 mg/kg、8 週間後では、それぞれ、 13 ± 3 、 14 ± 6 、 10 ± 7 mg/kg であった（各 3 試料の平均値 $\pm$ 標準偏差）。

4. 考察

本研究内において、サンマ内臓由来タンパク質分解酵素は、橋本らの報告⁽¹⁷⁾と同様、pH 9.5 で 20 分間保持した場合の最適温度が 40℃（～50℃）

にあった。とは言え、今回の魚醤作製温度条件（50℃）下では、保持時間の延長が早々に酵素の失活に繋がることは想像に難くない。しかしながら、魚醤もろみ中のタンパク質分解酵素活性（pH 9.5）は、醸造開始から 3 日後までに一旦低下したものの、1 週間後以降は再び上昇し、8 週間後においても醸造開始時の 50～80% 程度の値を維持していた。また、魚醤もろみの pH は醸造の進行に伴い pH 5.5 付近まで低下したが、もろみ内で発現していたタンパク質分解酵素の活性も低 pH 側で高くなった。これらの結果は、少なくとも 10% 以上の塩分存在下では、もろみ内に存在するタンパク質分解酵素が酸性側で失活し難い性質を有していたことに加え、酸性側に至適 pH を持つタンパク質分解酵素の継続的な供給があったこと、あるいは、醸造の進行すなわち魚体の分解が進むにつれて、魚醤もろみ内において酸性側に至適条件を持つ別種のタンパク質分解酵素の活性が高まった（酸性プロテアーゼの活性が上昇した）ことを

暗示する。ただし、現状では、タンパク質分解酵素の至適 pH シフトの機序に関する直接的証拠は得られておらず、同関連酵素の起源（魚自身か混在する細菌由来か）についても言及できるだけのデータはない。今後、酵素特異的な阻害剤を利用したり、タンパク質の分子量や形状解析等を行ったりすることで、醸造の進行に伴う酵素群の動的変動、役割分担の推移を明らかにする必要がある。

ところで、魚醬醸造時に使用する食塩の量が多くなると、速醸工程における魚醬もろみ中のタンパク質分解酵素活性の低下に加え、もろみ中で活動している微生物の数は激減し、組成や活性も大きく変化した。これはサバ内臓を用いた魚醬づくりを行った宇田川の報告⁽⁸⁾と同様であった。そして、タンパク質分解酵素活性低下と微生物活性抑制の結果として、醸造速度が著しく低下し、もろみ中のホルモル窒素濃度やタンパク質分解率の上昇、遊離アミノ酸含有量の増加等が抑制された。それ故、魚醬の醸造を遅延なく進めるためには加える食塩量をなるべく減らすことが望ましい。50℃という高温で魚醬醸造を行った場合、食塩の添加量に係わらずほとんどの細菌の生育・増殖が抑えられたこと、および、塩分 10% 条件下で魚醬の醸造を行っても、醸造開始から 1 日以内に通常の平板培養では細菌の検出ができないほどに細菌数が激減、あるいは、細菌の生理活性が（直接の平板培養では生育を確認し辛いほどに）低下していたこと等から、50℃で魚醬醸造を行うと、食塩を魚体重の 10% 量程度添加するだけでも、雑菌の繁殖を抑えつつ、減塩に配慮した形で、しかも短期間でアミノ酸含有量の多い魚醬の醸造が可能になるものと考えられた。

魚醬内の細菌組成では、醸造開始時に好気・嫌気培養により十数種類の細菌が検出されたものの、醸造過程が進むと菌組成は単調となり、醸造開始から 4 週間以降では、好気培養では *Bacillus*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、*Staphylococcus* 属が、嫌気培養では *Bacteroides*、*Clostridium*、*Lactobacillus*、*Staphylococcus* 属の細菌が、それぞれ、大半を占めていた。中でも、芽胞形成能を有し高塩分にも耐性を持つ *Bacillus* sp. や *Clostridium* sp.、高い塩分耐性を持つ *Staphylococcus* sp.、乳酸等を産生し酸性下でも良く生育する *Lactobacillus* sp.

そして、動物の腸内細菌の優勢菌叢を構成し、無芽胞ではあるが酸産生能を有する種を含む *Bacteroides* sp. の割合が高かった。ただし、今回未同定とした部分には、耐塩性の *Tetragenococcus* 属細菌や好塩性の *Halobacterium* 属細菌等が含まれる可能性も高く、今後、遺伝子を用いた同定を進める必要がある。

なお、上記の検出細菌類についても、魚醬試料から直接、平板培地に植え継いだのみでは増える事ができない程度にその生理活性の低いものが多く、また、魚醬もろみ中の VBN 値が、醸造開始から 4 および 8 週間後においても、26~43 mg/100 g とこれまで報告されている値⁽²³⁾と比較しても極めて低かったことから、本醸造法では微生物による腐敗の進行は著しく抑制されており、これらの細菌が魚醬の腐敗や変質に係わる可能性は低いと考えられた。

また、本研究で作製した塩分条件の異なるサンマ魚醬は、塩分 10% で作製したものは同 20% および 30% で作製したものに比べて、総遊離アミノ酸量こそ大きく異なった（前者は後者の約 1.6 倍）が、3 者間で遊離アミノ酸組成比に大きな差は認められなかった。そこで、醸造開始から 8 週間後の魚醬の遊離アミノ酸組成データを基に、キレの指標となるヒスチジン、リジン、バリン、ロイシン、イソロイシンの和、旨味の指標となるグルタミン酸とアスパラギン酸の和、甘味の指標となるセリン、グリシン、アラニン、スレオニン、プロリンの和、コクの指標となるアルギニンとアンセリンの和から魚醬の風味の相関図を作成すると共に、既報に示されていた“しょつつる”のデータ⁽²³⁻²⁵⁾と比較したところ、本サンマ魚醬は、キレとコクの数値が際立って高く、甘味も同等あるいは若干高めの値となったが、旨味はわずかに低い（塩分 10% 添加時）から 1/3 程度の低い（塩分 30% 添加時）という特性を備えた魚醬であることが分かった。

さらに、ヒスチジン含量の高い赤身の魚を原料とした食品の安全性を脅かすヒスタミンも、今回作製したサンマ速醸魚醬では、20 mg/kg 以下と低く保たれていた。ヒスタミンは長時間発酵中にヒスチジン脱炭酸酵素を持つ微生物が増殖した場合に生成されと言われているが、速醸法では高温

短期間で発酵が完結するため、ヒスタミン生成菌が生育できず、魚醬中のヒスタミン濃度は食品安全上全く問題にならない程度 (40 mg/100 g 以下) の低濃度に保たれるという報告^(8, 23)を支持する結果となった。すなわち、赤身の魚を原料としても、新鮮な原料を使用する限り、高温・短期間の魚醬醸造 (醸造期間: 4~8 週間。ホルモル窒素量からは 6~8 週間が推奨される) により、ヒスタミン濃度の極めて低い商品ができることが分かった。

以上の事から、地域の特産物であるサンマを用いた高温醸造による魚醬 (速醸魚醬) は、その醸造期間が 1~2 カ月と短く、高等学校における学習活動範囲内でも十分に彼らの発想・創造・具現化力向上に寄与し得るとともに、魚介類加工物で注意すべき項目の一つであるヒスタミンの産生を抑えた、安全な、高品質の商品づくりに道を開くものであると考える。

5. 結語

塩分濃度の異なる条件下で、地域の特産品であるサンマを原料とした速醸魚醬をつくり、醸造過程におけるタンパク質分解酵素と微生物の動態を調べた。

- 1) サンマ内臓由来タンパク質分解酵素の至適 pH は 9.5、至適温度が 40 (~50) °C であった。
- 2) 食塩を魚体重量の 10、20 あるいは 30% になるように添加して醸造したサンマ魚醬もろみの pH は、醸造開始時は中性から弱酸性であったが、時間とともに酸性化し、開始から 4 週間以降は pH 5.5 付近となった。なお、初期変化は食塩添加量が多いと遅かった。
- 3) タンパク分解酵素活性は、醸造開始当初に著しく低下し、開始から 1 週間後に上昇して、初期値の 50~80% となった後、再びわずかに低下した。醸造初期の活性低下は高塩分条件ほど大きかった。
- 4) 醸造途中のタンパク分解酵素の pH 依存性は変化し、低 pH 側の活性が上昇した。
- 5) 魚醬もろみ中の細菌数は、初期に著しく減少し、3 時間以内に塩分 30% で開始時の 10%、塩分 10% と 20% では同 40~50% 程度となった。その後、好気条件下の平板培養では、細菌の生育がほ

とんど検出されなくなった。ただし、液体培地で事前培養後に平板培養すると一部細菌が生育した。また、嫌気培養では、極めて少数の菌の生育のみが確認された。

6) 醸造開始時には十数種類の細菌が検出されたが、醸造開始 1 日後以降は菌組成が単調となった。4 および 8 週間後では、好気培養では、*Bacillus*、*Pseudomonas*、*Vibrio*、*Staphylococcus* の 4 属が、嫌気培養では、*Bacteroides*、*Clostridium*、*Lactobacillus*、*Staphylococcus* の 4 属が高頻度で検出された。

7) 魚醬もろみ中のタンパク質分解率では、塩分 30% での値は同 10% 時に比べて有意に小さかった。醸造開始から 4 週間後の同値は 43~55% 程度であり、8 週間後にかけてゆっくりと上昇し 50~67% の値となった。

8) 高温速醸魚醬もろみ中の VBN 値は 50 mg/100 g 以下と低く、ヒスタミン濃度も 20 mg/100 g 以下と低かった。

9) 魚醬もろみ中の遊離アミノ酸量は、低塩分醸造時に有意に多くなった。各塩分濃度とも、醸造開始から 4 週間以降の値に大きな変化は認められなかった。

10) 遊離アミノ酸組成を指標として、魚醬の風味をみたところ、本魚醬はキレとコクの数値が際立って高く、市販のしょつつつと比べて、旨味の数値がわずかに低いことが分かった。

以上の結果は、魚醬の醸造には主にタンパク質分解酵素が主役として作用しているが、途中に種類の交代が生じている可能性のあること、微生物の直接的な働きはかなり初期に限定されるとみられるものの、有芽胞性細菌、耐塩性の高い *Staphylococcus* 属細菌、*Bacteroides* や *Lactobacillus* 属のような酸産生菌は生存しており、継続的に何らかの作用を有していた可能性は無視できない。ただし、VBN 値は低く、魚醬の腐敗や変質に係わる可能性は低いと考えられた。また、高塩分は、微生物活性のみでなく、タンパク質分解酵素活性を抑制して醸造速度を低下させるため、雑菌の繁殖が認められなかった。さらに、50°C で魚醬醸造 (高温速醸魚醬の作製) を行うと、食塩を魚体重の 10% 量程度添加するだけでも、雑菌の繁殖を抑えつつ、従来の魚醬に比べて低塩分量で、しかも短

期間でアミノ酸含有量が多く、ヒスタミン濃度も低い、安全な魚醬ができると考えられた。

本研究は、平成 25 年度 文部科学省「石巻専修大学における復興共生プロジェクト推進のためのセンター的機能整備事業（大学等における地域復興のためのセンター的機能整備事業）：取扱代表者中込真二共創研究センター長（理工学部教授）」の支援を受けて行われたことを申し添える。

引用文献

- (1) T. Fujii, "Gyoshoyou ha Kakushiajini", Sakana no Hakkou Syokuhin, pp.57-75, Beruso books, Tokyo (2010)
- (2) N. Dohmoto, K.C. Wang, T. Mori, I. Kimura, T. Koriyama and H. Abe, "Development of a New Type Fish Sauce Using the Soy Sauce Fermentation Method (in Japanese)", Nippon Suisan Gakkaishi, 67(6), 1103-1109 (2001)
- (3) Y.A. Yamada, H. Sato, H. Mitsumori, S. Kikuchi and K. Takano, "Effect of Various Kinds of Protease on Fish Sauce with Salmon *Oncorhynchus keta* of The Maturation (in Japanese)", Food Preservation Science, 29(1), 17-23 (2003)
- (4) T. Mori, T. Kakuta and T. Koizumi, "Development of a New Type Fish Sauce (in Japanese)", J. Integr. Stud. Diet Habits., 16(3), 262-265 (2005)
- (5) H. Saegusa, Y. Ito and N. Miyazaki, "Development of Low-salt Fish Sauce from Mackerel Scad, Blue Mackerel, and Flying Fish Caught Near The Izu Islands of Tokyo Prefecture (in Japanese)", Bull. Tokyo Metro. Agri. Res. Cent., 8, 49-59 (2013)
- (6) D. Fujita, "Sanma Gyosho" wo Hukkou no Chomiryo ni Miyagi Suisan Kotou Gakko", Someone (Leave a Nest Shuppan), 22, 18-19 (2013)
- (7) R. Yoshinaka, M. Sato, N. Tsuchiya and S. Ikeda, "Production of Fish Sauce from Sardine by Utilization of Its Visceral Enzymes (in Japanese)", Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 49(3), 463-469 (1983)
- (8) T. Utagawa, "Rapid Fermentation of Fish Sauce and Its Use (in Japanese)", J. Brew. Soc. Japan, 107(7), 477-484 (2012)
- (9) M. Takeuchi, T. Hujii and M. Yamazawa, "Suisan Syokuhin no Jiten", p.250, Asakura Shoten, Tokyo (2000)
- (10) T. Nakano, H. Watanabe, M. Hata, D. van Qua and T. Miura, "An Application of Protease Produced by a Moderately Halophilic Narine Bacterium to Fish Sauce Processing", Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 52(9), 1581-1587 (1986)
- (11) Y. Finatsu, K. Kawasaki, C. Yuan, M. Uchida, M. Satomi and Y. Fukuda, "A comparison of Volatile Compounds in Fish Sauces Prepared from Silver Carp by Use of Soy Sauce Koji and Lactic Acid Bacteria with those in Chinese Commercial Fish Sauces (in Japanese)", Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku kaishi, 49(2), 106-118 (2002)
- (12) K. Yamamoto and T. Kato, "Development of Unsalted Fish Sauce Using Antibacterial Lactic Acid Bacteria (in Japanese)", Aichi-inst Shokuhin Research Center Report, 6, 114-117 (2007)
- (13) S. Yoshikawa, "Effect of Halotolerant Starter Microorganisms Inoculation to the Fermentation and the Quality of Fish Sauce (in Japanese)", J. Brew. Soc. Japan, 106(8), 515-527 (2011)
- (14) M. Ishida, N. Sugiyama, M. Sato and F. Nagayama, "Two Kinds of Neutral Serine Proteases in Salted Muscle of Anchovy *Engraulis japonica*", Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1107-1112 (1995)
- (15) K. Hashimoto, M. Konno and S. Takeda, "Utilization of Enzyme from Marine Product (in Japanese)", Miyagiken Kougyo Gijutsu Center Kenkyu Houkoku, 27, 73-76 (1995)
- (16) T. Michihata, Y. Sado, H. Enomoto and T. Yano, "Sokujohou wo Mochiita Ishiru (Gyoshoyu) no Seizou", Heisei 10 nendo Kenkyu Houkoku, 48 (2007) http://www.iri.jp/randd/theme/h10/63_01.htm
- (17) K. Hashimoto, S. Takeda, H. Ito, I. Shishido and H. Ichishima, "Gyorui yuraino Protease, sono Seizouhou oyobi Tansyokuchomiryo no Seizouho", Tokkyo 1997-084583 gou. <http://astamuse.com/ja/published/JP/No?997084583>
- (18) K. Igoshi, H. Hara and H. Kobayashi, "Two Kinds of Extracellular Protease from Wheat Bran Medium Cultured by *Penicillium roqueforti* (in Japanese)", Milk Science. 56(1), 1-7 (2007)
- (19) K. Yamasato, T. Utagawa, T. Kodama, T. Morichi, "Biseibutsu no Bunrihou", R&D Planning,

サンマ速醸魚醤の醸造過程におけるタンパク質分解酵素と微生物の動態

Tokyo, pp.1-902 (1986)

(20) E.J. Conway, "Microdiffusion Analysis and Volumetric Error", pp.1-465, Grosby, Lockwood and Sons Ltd., London (1957)

(21) Dokuritsu Gyoseihoujin Nourin Suisan Shohi Anzen Gijutsu Center, "Humi Chomiryo no Zen-chisso-bun (Kjeldahl method · Auto-distilled) Sokutei te-junsho" (2013) http://www.famic.go.jp/technical_information/datousei/pdf/2513.pdf

(22) Shoyu Shikenhō Henshu Iinkai, "Shoyu Bunsekihou", Shoyu Shikenhō, Daidanhoujin Nihon Shoyu Kenkyusho, Tokyo, pp.1-21 (1985)

(23) M. Nakazato, C. Kobayashi, Y. Yamajima, Y.

Tateishi, Y. Kawai and K. Yasuda, "Determination of Volatile Basic Nitrogen (VBN) and Non Volatile Amines in Fish Sauce (in Japanese)", Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H., 53, 95-100 (2002)

(24) K. Ishikawa, I. Kakuta and K. Takase, "Development of fish sauce for salt intake reduction (in Japanese)", H25 nendo Urakamizaidan Seikahoukusho, 22, 71-79 (2015) <http://www.urakamizaidan.or.jp/hp/jsseki/vol22/vol22urakamif-10ishikawa.pdf>

(25) T. Fujii and H. Sakai, "Chemical Composition and Microflora of Fish Sauce "Shotturu" (in Japanese)", Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 50(6), 1061-1066 (1984)