

# 抗菌性乳酸菌を利用した食塩無添加魚醤の開発

山本晃司<sup>\*1</sup>、加藤丈雄<sup>\*1</sup>

## Development of Unsalted Fish Sauce Using Antibacterial Lactic Acid Bacteria

Koji YAMAMOTO<sup>\*1</sup> and Takeo KATO<sup>\*1</sup>

Food Research Center, AITEC<sup>\*1</sup>

乳酸菌によるバイオプリザベーションを利用した自己消化タイプの食塩無添加魚醤の開発を行った。乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM7638 または *Lactobacillus sakei* D-1001 を用いてコウナゴを乳酸発酵し、その後 50 で自己消化させることで、食塩無添加でコウナゴに存在する微生物の生育を抑えて魚タンパク質を分解することができた。また、酸性域でプロテアーゼ活性の高い市販酵素を用いることで魚醤残渣を低減化することができた。

### 1. はじめに

知多半島近海では、毎年多量のコウナゴが漁獲されており、釜揚げ、佃煮などに加工されているが、魚体が大きくなると加工用途が減少して、大部分が養殖魚の餌用として流通している。そのため、利用価値の低いコウナゴの高付加価値化が求められている。コウナゴの新規用途開拓を目指し、「魚麩の調製技術」及び「魚麩へのバイオプリザベーションによる汚染菌生育抑制技術」の開発を行ってきた<sup>1)~4)</sup>。魚麩の調製には蒸煮及び製麩設備が必要であり、新規設備投資の問題がある。従来の魚醤の製造法である魚を自己消化させる工程で、魚由来の汚染微生物の生育を抑制できれば、熟成タンクのみで設備で低食塩さらには食塩無添加魚醤の製造が期待できる。乳酸菌によるバイオプリザベーション<sup>1)~8)</sup>を鮮度の良い（汚染菌数の少ない）魚を用いた魚醤製造に導入することが、最も有効な手段である。さらに、食塩を使用しないために高い酵素活性で自己消化できるため熟成期間の大幅短縮、さらには、魚醤を様々な食品素材などとして活用することも期待できる。本研究では、バイオプリザベーションを利用した食塩無添加魚醤の製造条件を確立することを目的とした。

### 2. 実験方法

#### 2.1 供試魚

魚醤の原材料として、平成 18 年 4 月に知多半島近海で水揚げされたコウナゴ（体長約 8cm）を直ちに-30 で凍結保存した。使用時にコウナゴは 5 で一晩放置して解凍して用いた。

#### 2.2 供試菌

乳酸菌として、*Lactococcus lactis*(*Lc.*) subsp. *lactis* JCM7638、*Lactobacillus*(*Lb.*) *sakei* D-1001、*Lb. brevis* NBRC12005、*Streptococcus*(*St.*) *thermophilus* NBRC 13957 を使用した。また、汚染指標菌として、*Bacillus subtilis* ATCC19659(枯草菌)、*Staphylococcus aureus* ATCC6538(黄色ブドウ球菌)、*Escherichia coli* ATCC14948(大腸菌)を使用した。

#### 2.3 市販酵素

市販プロテアーゼ酵素剤は、プロテアーゼ M、ペプチダーゼ R、ニューラーゼ F3G(天野エンザイム(株))、及びオリエンターゼ 20A、オリエンターゼ 90N(エイチビィアイ(株))を用いた。各酵素剤は、魚重量に対して 1/200 量使用した。

#### 2.4 微生物菌数の測定

乳酸菌は MRS 寒天培地、パチルス属細菌はニュートリエント寒天培地、黄色ブドウ球菌は卵黄添加マンニト食塩寒天培地、大腸菌はデソキシコレート寒天培地を用いて測定した。なお、大腸菌は混釈法で、それ以外の微生物は塗末法で測定した。また、本試験での生菌数は、乳酸菌との分別測定をするため、ニュートリエント寒天培地を用いた塗抹法で検出された細菌数（検出限界 100 cfu/g）とした。

#### 2.5 食塩無添加魚醤の仕込条件

魚醤は、魚に対して 1/2 重量の滅菌水と 1%グルコースを加えて、乳酸菌を  $1.0 \times 10^6$  cfu/g 接種し、30 あるいは 37 で 24 時間乳酸発酵し、その後 50 で 10 日間自己消化して調製した。

<sup>\*1</sup> 食品工業技術センター 発酵技術室

## 2.6 プロテアーゼ活性の測定

コウナゴのプロテアーゼ活性の測定は、醤油試験法<sup>9)</sup>に従いミルクカゼインを基質として測定した。

## 2.7 魚醤の分析

全窒素、アミノ態窒素は、醤油試験法<sup>9)</sup>に従って行った。遊離アミノ酸分析は、アミノ酸自動分析装置(L-8500、日立計測器サービス(株))を用いて測定した。

## 2.8 魚醤残渣率の測定

50 で 10 日間自己消化した魚醤もろみを遠心分離(10,000rpm、20分、5 )し、遠心分離の残渣(沈殿物)重量を測定した。魚醤もろみに占める残渣重量の割合(%)を魚醤残渣率とした。

## 3 . 実験結果及び考察

### 3.1 乳酸菌の選定及び汚染菌の生育抑制について

食塩無添加魚醤に適した乳酸菌を選定するため、魚麹の調製においてバイオプリザベーション効果の認められた *Lc. lactis* (ナイシン生産菌) と *Lb. sakei* (低温発酵菌)<sup>1)-4)</sup>、及び *Lb. brevis* ( - アミノ酪酸生産菌)<sup>10)</sup>、*St. thermophilus* (高温発酵菌)<sup>11)</sup>をそれぞれ  $1.0 \times 10^6$  cfu/g となるように接種した。炭素源としてグルコースを魚重量に対して 1% 添加し、30 (*St. thermophilus* は 37 )で 24 時間乳酸発酵した。その時の乳酸菌数及び生菌数を表 1 に示した。*Lc. lactis* と *Lb. sakei* については、乳酸菌数が  $10^6$  から  $10^9$  cfu/g に増加し、生菌数は 100 cfu/g 以下(検出限界以下)となり、

表 1 乳酸菌発酵後のコウナゴの細菌数

乳酸菌	乳酸菌数	生菌数
<i>Lc. lactis</i>	$3.0 \times 10^9$	100以下
<i>Lb. sakei</i>	$1.6 \times 10^9$	100以下
<i>Lb. brevis</i>	$2.3 \times 10^9$	$3.1 \times 10^4$
<i>St. thermophilus</i>	$2.4 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$

(cfu/g)

バイオプリザベーション効果が認められた。一方 *Lb. brevis* は、 $10^9$  cfu/g に増加したものの、生菌数の抑制も認められず、乳酸発酵後の魚臭も好ましくなかった。*St. thermophilus* は、乳酸菌数も  $10^6$  から  $10^4$  cfu/g に減少した。コウナゴには *St. thermophilus* 増殖に必要な栄養源が欠けているためと推測された。以上の結果から、*Lc. lactis* と *Lb. sakei* を今後の食塩無添加魚醤の試験に用いることにした。

バイオプリザベーション効果の認められた *Lc. lactis* と *Lb. sakei* をコウナゴに  $1.0 \times 10^6$  cfu/g 接種し、さらに汚染指標菌である *B. subtilis*、*S. aureus*、*E. coli* をコウナゴに  $1.0 \times 10^4$  cfu/g 接種して乳酸発酵した。汚染指標菌の生育抑制効果を表 2 に示した。*B. subtilis* と *S. aureus* については、乳酸発酵後の菌数は 100cfu/g 以下となりほぼ完全に生育抑制できた(殺菌効果)。一方、*E. coli* については、増殖は抑制できたが、生育は阻止できなかった(静菌効果)。50 で 1 週間自己消化した後に *E. coli* 数を測定したところ検出されなかった。乳酸発酵後の自己消化期間を 1 週間以上とすることで、大腸菌群も生育阻止できた。

### 3.2 食塩無添加魚醤の調製条件について

食塩無添加魚醤では、魚を乳酸発酵するため通常の魚醤に比べて、より酸性領域下で自己消化(タンパク質分解)が進行する。そこで、コウナゴの各 pH でのプロテアーゼ活性を調べた。その結果を図 1 に示した。コウナゴのプロテアーゼ活性は、中性付近で高く、酸性域にな

表 2 乳酸菌による汚染指標菌の生育抑制効果

乳酸菌	汚染指標菌	乳酸菌数	汚染指標菌数
<i>Lc. lactis</i>	<i>B. subtilis</i>	$2.9 \times 10^9$	100以下
	<i>S. aureus</i>	$2.0 \times 10^9$	100以下
	<i>E. coli</i>	$2.4 \times 10^9$	$8.8 \times 10^6$
<i>Lb. sakei</i>	<i>B. subtilis</i>	$1.1 \times 10^9$	100以下
	<i>S. aureus</i>	$5.3 \times 10^9$	100以下
	<i>E. coli</i>	$1.5 \times 10^9$	$1.6 \times 10^7$
コントロール	<i>B. subtilis</i>		$2.0 \times 10^7$
	<i>S. aureus</i>		$5.0 \times 10^7$
	<i>E. coli</i>		$1.7 \times 10^8$

(cfu/g)

表 3 コウナゴへのグルコース及び食塩添加によるタンパク質分解に対する効果

	グルコース(1%)	食塩(1%)	pH	全窒素	アミノ態窒素
<i>Lc. lactis</i>	-	-	5.81	1.70	0.83
	+	-	4.91	1.69	0.74
	+	+	4.86	1.73	0.76
<i>Lb. sakei</i>	-	-	5.81	1.69	0.93
	+	-	4.77	1.70	0.71
	+	+	4.75	1.70	0.73

全窒素、アミノ態窒素(g/100mL)

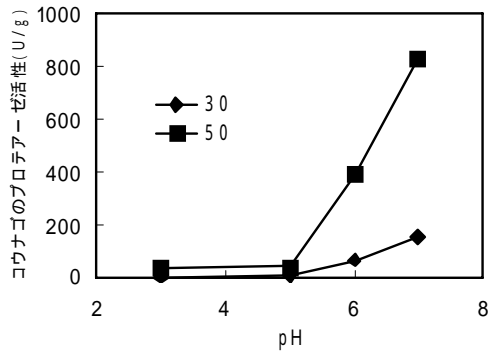


図1 コウナゴのプロテアーゼ活性

るにつれて低下した。また、50の方が30より活性が高かった。そのため乳酸発酵後の自己消化は50で行うことにした。なお、50自己消化(培養)によって低・中温性細菌の生育を阻止できるため、腐敗や乳酸菌による過発酵を防止することができる。

乳酸発酵に必要な炭素源及び魚肉タンパク質の溶解(主成分のアクトミオシンは塩溶性タンパク質)を考えると、少量のグルコースと食塩添加が発酵及びタンパク質分解を促進する可能性がある。コウナゴへのグルコース及び食塩添加の影響について検討した結果を表3に示した。グルコース無添加では、乳酸発酵が正常に行われず、コウナゴから腐敗臭がした。グルコース添加はバイオリザベーションに不可欠であると判断した。また、グルコース添加区についてさらに食塩1%添加区と食塩無添加区と比較した結果、自己消化後の全窒素、アミノ態窒素、pH値についてほとんど差が認められなかった。なお、原料のコウナゴに約1%の食塩が存在したため、

食塩添加区の最終食塩濃度は約2%であった。*Lc. lactis*、*Lb. sakei*を用いグルコースを1%添加すれば、食塩無添加魚醬が製造できると考えられた。

### 3.3 食塩無添加魚醬への市販酵素の利用

市販酵素利用による魚醬残渣低減効果について検討するため、6試験区で食塩無添加魚醬を調製し、酵素添加効果を検討した。市販酵素は、オリエンターゼ90N以外は比較的酸性域で活性の高いプロテアーゼ製剤を用いた。乳酸発酵後の魚醬pHがカゼインの等電点付近であり、酵素活性の正確な測定が困難であったため、比活性でなく、添加量で統一した。経時的に全窒素、アミノ態窒素を分析し、10日後のもろみを使用して魚醬残渣率を測定した。窒素成分の変化を表4に示した。すべての試験区において乳酸発酵中から自己消化は速やかに進み、大部分の魚肉タンパク質は50、1日間の自己消化で分解され、その後は大きな成分変化はなかった。また、全窒素、アミノ態窒素の値からは、酵素添加区と酵素無添加区では大きな差は認められなかった。コウナゴのプロテアーゼ活性測定結果(図1)からは、自己消化が不十分となることが懸念されたが、魚肉タンパク質は十分に分解した。10日間自己消化した魚醬もろみについて魚醬残渣率を測定した結果を表5に示した。オリエンターゼ90Nを除く4種類の酵素において酵素無添加区と比較して明らかな残渣低減化が認められた。*Lc. lactis*を用いた試験区では、ペプチダーゼR、オリエンターゼ20A、プロテアーゼMを添加したものが、残渣率が低下していた。*Lb. sakei*を用いた試験区は、コントロールの残渣率が低く、大きな低減化効果はなかったが、ニューラーゼF3G、オリエンターゼ20A、ペプチダーゼRで残渣低減化が認められた。以上の結果から、酸性域で活性の高い市販酵

表4 食塩無添加魚醬の窒素成分の変化

全窒素(g/100mL)		<i>Lc. lactis</i>				<i>Lb. sakei</i>			
市販酵素	発酵後	1日	4日	10日	発酵後	1日	4日	10日	
コントロール	1.22	1.48	1.51	1.58	1.29	1.50	1.53	1.60	
プロテアーゼM	1.28	1.43	1.53	1.62	1.29	1.48	1.53	1.57	
ペプチダーゼR	1.34	1.61	1.62	1.65	1.34	1.62	1.59	1.63	
ニューラーゼF3G	1.23	1.49	1.52	1.59	1.30	1.53	1.59	1.63	
オリエンターゼ20A	1.42	1.55	1.58	1.61	1.37	1.61	1.64	1.67	
オリエンターゼ90N	1.26	1.55	1.57	1.60	1.26	1.55	1.57	1.60	

アミノ態窒素(g/100mL)		<i>Lc. lactis</i>				<i>Lb. sakei</i>			
市販酵素	発酵後	1日	4日	10日	発酵後	1日	4日	10日	
コントロール	0.49	0.82	0.94	0.97	0.50	0.84	0.92	1.02	
プロテアーゼM	0.48	0.82	0.88	0.96	0.46	0.75	0.83	0.98	
ペプチダーゼR	0.50	0.74	0.86	0.97	0.54	0.79	0.84	0.92	
ニューラーゼF3G	0.50	0.84	0.97	1.02	0.55	0.88	0.94	0.97	
オリエンターゼ20A	0.56	0.77	0.88	0.96	0.56	0.73	0.88	1.00	
オリエンターゼ90N	0.52	0.80	0.92	0.98	0.51	0.78	0.92	0.99	

表5 市販酵素による残渣低減効果

市販酵素	残渣率 (%)	
	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. sakei</i>
酵素無添加	21.7	19.3
プロテアーゼM	18.3	18.5
ペプチダーゼR	17.1	18.1
ニューラーゼF3G	21.0	17.7
オリエンターゼ20A	18.4	18.0
オリエンターゼ90N	20.3	20.6

表6 食塩無添加魚醤の遊離アミノ酸

アミノ酸(mol%)	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. sakei</i>
タウリン	3.31	3.45
アスパラギン酸	8.80	7.40
スレオニン	5.88	6.25
セリン	7.08	5.16
アスパラギン	0.00	0.00
グルタミン酸	9.39	10.69
グルタミン	0.00	0.00
プロリン	3.53	2.22
グリシン	10.07	9.35
アラニン	10.80	11.74
バリン	6.81	7.01
システイン	0.27	0.48
メチオニン	3.36	3.30
イソロイシン	5.90	5.91
ロイシン	9.30	9.31
チロシン	0.94	2.09
フェニルアラニン	4.14	4.13
トリプトファン	0.81	0.67
リジン	7.50	7.47
ヒスチジン	1.87	1.90
アルギニン	0.19	1.36
GABA	0.06	0.10
総アミノ酸量(mg/100mL)	8590	8910

素の利用は、魚醤残渣低減化に有効であると考えられた。

酵素剤無添加区の魚醤について、遊離アミノ酸を分析した結果を表6に示した。乳酸菌 *Lc. lactis* と *Lb. sakei* を使用した試験区を比較すると総アミノ酸量とアミノ酸組成はほぼ同じであり、旨味アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸が多かった。また、チロシン、アル

ギニンなどに顕著な差が認められた。アルギニンは乳酸菌が資化した可能性が高く、チロシンは自己消化中に白色結晶が生じており、結晶の生成量の差が原因であると考えられた。市販酵素を利用した試験区についても分析したが、アミノ酸組成に大きな差はなかった。今回の試験では、市販酵素よりも、魚に存在するプロテアーゼがタンパク質の分解に大きく寄与したと考えられた。

#### 4. 結び

乳酸菌 *Lc. lactis* または *Lb. sakei* 用いてコウナゴを乳酸発酵し、その後 50 で自己消化させることで、微生物の生育を抑えて原料魚のタンパク質を分解する速醸タイプの食塩無添加魚醤を製造することができた。また、酸性域で活性の高い市販のプロテアーゼ酵素剤を用いることで魚醤残渣を低減化することができた。

#### 文献

- 1) 山本晃司, 加藤丈雄, 伊藤彰敏, 鳥居貴佳, 深谷伊和男: 日本食品科学工学会第 50 回大会講演要旨集, 65 (2003)
- 2) 山本晃司, 加藤丈雄, 伊藤彰敏, 鳥居貴佳, 深谷伊和男: 愛知県産業技術研究所研究報告, 110 (2004)
- 3) 山本晃司, 加藤丈雄, 矢野未右紀, 鬼頭幸男: 愛知県産業技術研究所研究報告, 134 (2005)
- 4) 特許公開 2006-254828
- 5) Kato, T., Maeda, K., Kasuya, H., and Matuda, T., : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 642 (1999)
- 6) 加藤丈雄: 日本醸造協会誌, **94**, 696 (1999)
- 7) 加藤丈雄: 食品工業 **42**, 33 (1999)
- 8) Kato, T., Inozuka, L., Kondo, M., and Matuda, T., : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 330 (2000)
- 9) しょうゆ試験法: 日本醤油研究所 (1985)
- 10) 上野義栄, 宮島直人, 河村真也, 早川 潔: 京都府中小企業技術センター技報, **29**, 63 (2001)
- 11) Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Krusch, U., and Neve, H., : *Appl. Microbiol.*, **14**, 386 (1991)