研究論文

Lactobacillus sakei D-1001 を利用した魚麹の調製

山本晃司*1、加藤丈雄*1、矢野未右紀*2、鬼頭幸男*3

Making of Fish Koji Using *Lactobacillus sakei* D-1001

Koji YAMAMOTO,Takeo KATO ,Miyuki YANO and Yukio KITO,

Food Research Center,AITEC*1,2 Principal Researcher*3

魚麹の調製において、原料であるコウナゴは水分が高く、製麹時に汚染微生物が混入すると腐敗麹となってしまう危険性がある。その対策として、畜肉・魚肉加工品に利用されている乳酸菌 *Lactobacillus sakei* D-1001 を魚麹の調製に利用することを試みた。*L.sakei* を魚麹の製麹工程に利用することにより出麹時の汚染細菌数が大きく減少した。また、*L.sakei* による乳酸発酵の影響で魚麹のα－アミラーゼ活性は低下したが、魚麹に重要なプロテアーゼ活性にはあまり影響がなかった。乳酸発酵に必要なグルコースの添加量は、0.5～1.0%が酵素活性を指標にすると適当であった。*L.sakei* は、魚麹の調製に利用できる有用な乳酸菌の一つであることが明らかとなった。

１．はじめに

知多半島近海で漁獲されるコウナゴは、成長して魚体が大きくなると加工適性が低くなるため、その高付加価値化が望まれている。そのようなコウナゴの新規加工用途開発を目的として魚麹の調製技術の開発及び魚醤・魚味噌への利用の研究[1, 2)]を行ってきた。その際に、原料のコウナゴの水分が高い（約70%）ことから、製麹時の汚染微生物対策が課題として残った。汚染微生物の生育阻止をするには、醸造食品において実績のある乳酸菌を利用したバイオプリザベーション[3－7)]が有効な手段あると考えられた。*L.sakei* については、魚の乳酸発酵に関する報告があり[8)]、いずし用麹において抗菌効果が認められており[9)]、魚麹への利用が期待できる。そこで、魚麹中の汚染微生物の生育阻止を目的として *L.sakei* の魚麹の製麹工程への利用を試みた。すなわち、*L. sakei* によるバイオプリザベーションが出麹時の汚染細菌数並びにプロテアーゼ、アミラーゼ等の活性に与える影響などについて検討した。

２．実験方法

2.1 供試魚

魚麹の原材料として、平成16年5月に知多半島近海で水揚げされたコウナゴ（体長約8㎝）を用いた。漁獲後のコウナゴは直ちに凍結保存し、使用時に解凍して用いた。魚麹の調製に使用したコウナゴの写真を**図１**に示した。

2.2 供試菌

魚麹調製用の種麹菌として *Aspergillus oryzae* KBN606、*Aspergillus sojae* KBN650 を用いた。抗菌性乳酸菌として *Lactobacillus sakei* D-1001 を用いた。

2.3 魚麹の調製

コウナゴを解凍後、蒸し器で１時間蒸煮した。蒸煮後放冷し、*L.sakei* をコウナゴに対して1.0×10^{7}/g 接種し、グルコースを必要量添加した。その後、香煎を６%、種麹を0.02%添加し、30℃で48時間製麹し魚麹を調製した。途中２回手入れを行った。

2.4 微生物菌数の測定

出麹した魚麹の生菌数（乳酸菌を除く）は、ニュートリエント寒天培地を用いて30℃で48時間平板培養して測定した。なお、培地には麹菌の増殖防止のためカビサイジンを添加した。

2.5 過酸化水素の測定

乳酸発酵したコウナゴの過酸化水素量は、過酸化物試験紙（Merckoquant）を用いて測定した。

2.6 酵素活性の測定

魚麹の全プロテアーゼ活性は、しょうゆ試験法に従って測定した。α－アミラーゼ活性は、α－アミラーゼ活性測定キット（キッコーマン（株））を用いて測定した。

2.7 走査型電子顕微鏡観察

魚麹を細切し、グルタルアルデヒド、オスミウム酸を用いて固定した。エタノールで脱水後、酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥、白金蒸着して試料とした。試料

*1 食品工業技術センター　発酵技術室 、*2 食品工業技術センター　保蔵技術室、*3 統括研究員

図1　試験に使用したコウナゴ

A. oryzae　　*A. sojae*

図2　*L. sakei* を使用して調製した魚麹

を走査型電子顕微鏡（日本電子（株）JSM-820型）を用いて加速電圧10kVで微細構造を観察した。

３．実験結果及び考察

3.1 魚麹の出麹時の生菌数

魚麹の写真を**図２**に示した。出麹時の生菌数を調べた結果を**表１**に示した。*A.oryzae* 、*A.sojae* どちらの種麹を用いた場合もコントロールにおいて約 10^7/g の生菌数が確認されたが、*L.sakei* を接種した試験区では出麹時の魚麹の生菌数が 100 以下/gとなった。次に *L.sakei* の接種により出麹の生菌数が大きく減少した理由について検討した。*L.sakei* で乳酸発酵した蒸しコウナゴにおいて抗菌性のペプチド（バクテリオシン）の生産は認められなかたっが、過酸化水素を分析した結果約 40ppm 検出された。加島らの報告[9)]において、いずし用の米麹で *L.sakei* が生産する過酸化水素による汚染細菌への抗菌効果が認められている。これらのことから、魚麹においても過酸化水素が抗菌性に寄与したと考えられた。

なお、出麹した魚麹では、過酸化水素は検出されなかった。これは、製麹中に麹菌のカタラーゼによって過酸化水素が分解されたためと考えられた。

表１　魚麹の生菌数

麹菌	コントロール	*L. sakei* 接種
A.oryzae	9.6×10^6/g	100以下/g
A.sojae	1.0×10^7/g	100以下/g

3.2 魚麹の酵素活性への乳酸菌の影響

魚麹のプロテアーゼ活性の製麹時の変化を**図３**に、α－アミラーゼ活性の変化を**図４**に示した。プロテアーゼ活性については、どちらの麹菌を用いた場合も製麹初期の活性がコントロールと比較して大きく低下したが、出麹時の活性は殆ど差がなかった。プロテアーゼ活性は *A. sojae* を用いた魚麹の方が *A. oryzae* 用いた魚麹より高かった。初期の魚麹のプロテアーゼ活性が低いのは乳酸発酵により魚麹の pH が一時的に低下し、酵素生産が遅れるためであると推察された。α－アミラーゼ活性は、*A. oryzae* 用いた魚麹が *A.sojae* を用いた魚麹に比べてかなり高く。*A.sojae* を用いた魚麹はコントロールと比較して大きな差はなかったが、*A.oryzae* を用いた魚麹については、製麹初期のみでなく、出麹時においても活性が大

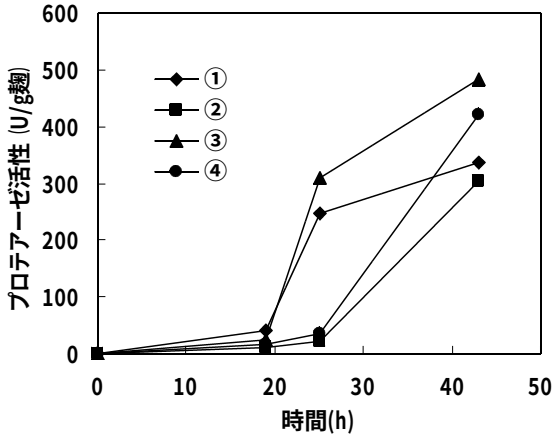


図３　魚麹プロテアーゼ活性の製麹時の変化
① *A.oryzae*（コントロール）
② *A.oryzae*（*L.sakei* 接種）
③ *A.sojae*（コントロール）
④ *A.sojae*（*L.sakei* 接種）

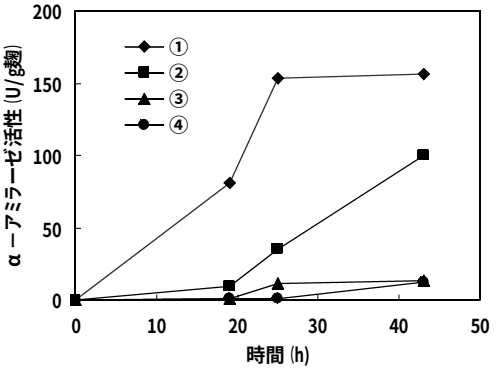


図４　魚麹α－アミラーゼ活性の製麹時の変化
① *A.oryzae*（コントロール）
② *A.oryzae*（*L.sakei* 接種）
③ *A.sojae*（コントロール）
④ *A.sojae*（*L.sakei* 接種）

きく低下していた。

調製した魚麹の主用途は、魚麹に食塩、水を加えて魚醤、魚味噌を製造することである。そのため、香煎のでん粉をα－アミラーゼ分解することも必要であるが、魚のたんぱく質をプロテアーゼで分解することがより重要である。また、*A.oryzae* 試験区のα－アミラーゼ活性に関しても、*L.sakei* を用いた試験区でも100U/g麹あり、コントロールに比べて低いが、問題になるほどではなかった。

従って、乳酸菌 *L.sakei* を用いたバイオプリザベーションを魚麹の製麹時に利用しても、魚麹のプロテアーゼ活性を低下させず､汚染細菌数を減少することができた。そのため、バイオプリザベーションは魚麹の製麹工程を大幅に変更せず導入できる有効な手段であると考えられた。

3.3 乳酸発酵魚麹の酵素活性へのグルコースの影響

魚麹の原料であるコウナゴには、グルコースが殆ど存在せず、副原料である香煎についてもグルコース量は少ない。そのため、乳酸菌 *L.sakei* を利用するには、グルコースの添加が必要と思われたので、グルコース添加量の魚麹の酵素活性に及ぼす影響を調べることにした。添加量については、0.5～2.0%の範囲で設定した。プロテアーゼ活性への影響を**図5**に、α－アミラーゼ活性への影響を**図6**に示した。プロテアーゼ活性は、どちらの麹菌を用いた場合も1.0%の添加量までは、大きな差はなかったが、それ以上添加量を増やすと活性が低下した。α－アミラーゼ活性については、*L.sakei* を使用することによる低下は認められたが、グルコース添加量による活性の差は殆どなかった。出麹時の生菌数はすべての試験区で100以下/gとなった。グルコース添加量は、プロテアーゼ活性が高い0.5%～1.0%が適当であった。

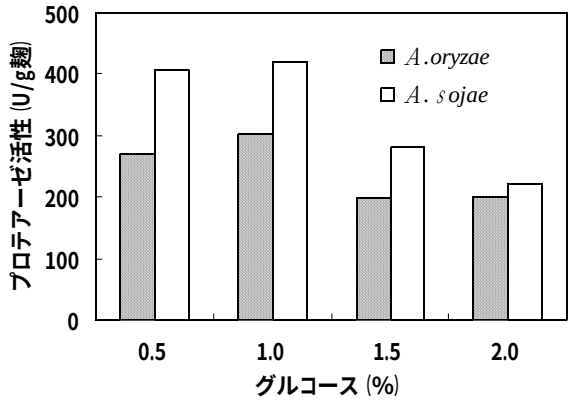


図5　プロテアーゼ活性へのグルコース添加量の影響

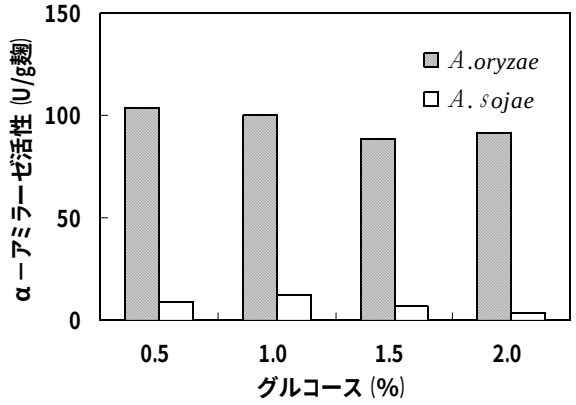
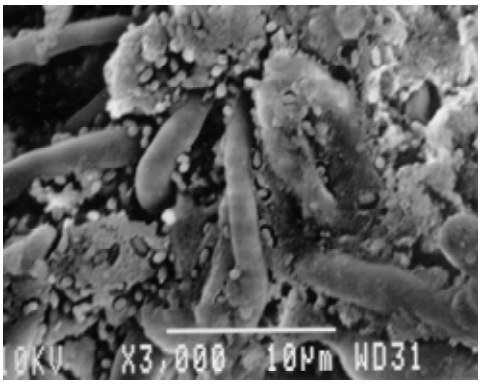


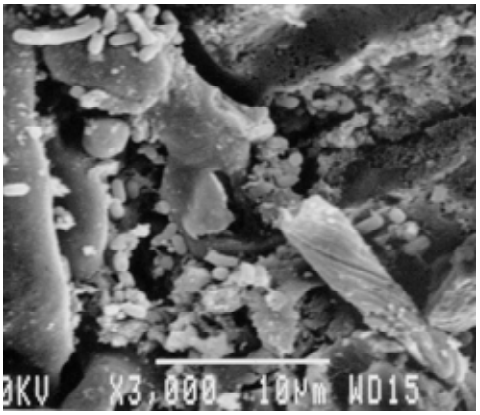
図6　α－アミラーゼ活性へのグルコース添加量の影響

3.4 魚麹の走査型電子顕微鏡写真

魚麹の調製時に、*L.sakei*　と種麹を接種し、24時間経過した魚麹の表面の走査型電子顕微鏡写真を**図7**に示した。*A.oryzae*、*A.sojae* どちらの麹菌を用いた魚麹も、*L.sakei* が麹菌の菌糸の周辺に多数の乳酸菌が生育している様子が観察でき、乳酸菌の利用が麹菌の生育に影響がないことが明らかとなった。また、魚麹中の麹菌体量を麹菌体量測定キット（キッコーマン（株））を用いて測定した。その結果、魚麹の菌体量は、コントロールと *L.sakei* を用いた試験区で *A.oryzae* と *A.sojae* ともに差が無く、麹菌の増殖に影響を与えていないことが確認できた。このことから、*L.sakei* は麹菌の生育を阻害せず、汚染微生物の生育を強く阻止する効果が認められた。



A.oryzae（*L.sakei* 接種）



A.sojae（*L.sakei* 接種）

図7　乳酸菌を添加した魚麹の走査型電子顕微鏡写真

４．結び

コウナゴを魚麹に調製する際の汚染細菌対策として乳酸菌 *L.sakei* を魚麹の製麹工程に利用することを検討した。*L.sakei* を用いたバイオプリザベーションを魚麹に利用することにより、魚麹出麹時の汚染細菌数を大きく減少させることができた。*L.sakei* の影響で *A.oryzae* を用いた試験区でα－アミラーゼ活性は低下したが、魚麹に重要なプロテアーゼ活性、麹菌の生育には殆ど影響が無かった。魚麹調製時に添加するグルコースは、0.5%～1.0%が適当であった。これらの結果から、*L.sakei* よるバイオプリザベーションは魚麹の汚染菌対策に有効な手段と考えられた。

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,**3**,106(2004)

３）Kato, T. , Maeda, K. , Kasuya, H. , and Matuda, T. , ：*Biosci . Biotechnol . Biochem* . , **63**, 642（1999）

４）加藤丈雄：日本醸造協会誌,**94**,696（1999）

５）加藤丈雄：食品工業 **42**,33（1999)

６）Kato, T. , Inozuka, L. , Kondo, M. , and Matuda, T. , ：B*iosci . Biotechnol . Biochem* . ,65,330（2000）

７）鳥居貴佳，加藤丈雄，山本晃司，西田淑男，伊藤彰敏，山崎久義，天野誠，山崎厚夫，深谷伊和男：愛知県産業技術研究所研究報告,3,**99**,(2004)

８）山本晃司，加藤丈雄，木島勲，村瀬誠：愛知県食品工業技術センター年報,**41**,17(2000)

９）加島隆洋，加藤丈雄：日本食品科学工学会第51回大会講演要旨集53，(2004)