

学位論文題名

魚醤油製造における微生物発酵技術の導入に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、食品に対する自然志向やエスニック料理志向により、味わいの深い天然調味料として魚醤油が注目され、さらに内臓や魚皮、およびカット残渣などを素材として製造可能なことから環境に配慮した調味料としても注目を集めている。しかし、発酵期間中に発生する脂質の酸化による油焼け臭や原料の鮮度低下に起因する短鎖脂肪酸およびトリメチルアミン等の不快臭の存在、熟成不良によるうま味不足を生じるものがあるなどその製品品質は安定しない。さらに、風味を醸成するために麴を加えると、遊離アミノ酸含量が増加し、短鎖脂肪酸の生成が抑制され魚臭さが和らぐが、同時に褐変が促進され、その度合いが過度になると加工品の色に悪影響を及ぼす。このように魚醤油は風味に優れているにもかかわらず、品質上の問題が多く存在する。これらの品質上の諸問題を解決することは、魚醤油をより汎用性のある調味料にするとともに、魚醤油の生産が増加することは水産加工副産物の再利用による資源の有効活用にもつながり、資源の持続可能な利用に資する。

そこで、本研究では魚醤油の製造上で課題となっていた強い魚臭や麴を用いた場合の色調の濃さなど従来の魚醤油が抱える課題を解決するために、耐塩性酵母および乳酸菌スターターによる発酵技術について諸条件の検討を行うとともに、微生物叢の解析や成分解析を行い、品質の改善メカニズムについて検討した。さらに耐塩性微生物の乾燥スターター化と魚醤油製造への応用についても検討した。

第1章では、微生物発酵技術を用いてサケを原料とした高品質魚醤油の製造条件について検討を行った。発酵技術を導入し、高品質なサケ魚醤油を製造するためには、原料として内臓と肉部を混合して用い、適切に復水処理した麴と耐塩性微生物スターター（*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis*, および *Tetragenococcus halophilus*）を接種し、35°Cで諸味を加温醸造することが、スターターの増殖、色調の淡色化、遊離アミノ酸の増強、醤油様香気の生成の観点から有効であることを明らかにした。

また、魚醤油の色調を淡色化する要因として、発酵初期の諸味の大幅なpH低下が必要であり、それには耐塩性微生物スターターの接種が有効であることを明らかにした。麴としては、クエン酸を生産する焼酎麴菌（*Aspergillus awamori*, *A. saitoii* および *A. kawachii*）は酸性化により魚醤油の淡色化を可能とするものの不快な香気を伴うことから魚醤油醸造には不向きと判断され、また、魚醤油の風

味の面から、通常の醤油醸造に用いる *A. oryzae* や *A. sojae* により、米、麦類、ソバ類など穀類を基質とした麴が好ましいと考えられた。

第2章では、大麦麴と耐塩性微生物スターター接種によるサケの魚醤油をモデルとして、種々のスターター微生物の組み合わせと発酵過程における魚醤油成分の変化との関連性を調べ、魚醤油成分に及ぼすスターター接種の影響について検討した。

大麦麴を使用すると、諸味発酵期間中に遊離アミノ酸とともに還元糖も増加するため、メイラード反応による魚醤油の褐変が促進されたが、耐塩性微生物スターターの共存により pH 低下するとともに還元糖が消費され褐変が抑制された。特に耐塩性酵母スターター *Z. rouxii* と *C. versatilis* は、還元糖の消費量が多いために褐変の抑制効果が高く、また、エタノールと同時に醤油の特徴香として知られる、2-フェニルエタノール (2-PE) と 4-ヒドロキシ-2 (or 5)-エチル-5 (or 2)-メチル-3 (2H)-フランノン (HEMF)、4-エチルグアヤコール (4-EG) をそれぞれ生成し、魚醤油に醤油様の香りを付与した。本研究ではそれらの香気成分の定量のために固相マイクロ抽出法 (SPME) を応用して簡便に定量する系を構築した。また、魚醤油の香気成分や呈味成分について発酵期間中の消長をスターターの組み合わせ毎に解析し、その効果を初めて明らかにすることができた。

現在までの魚醤油に関する研究には、最終製品の成分や香りに関するものが多く、発酵中の微生物の動態については解明されていない。そこで、第3章では、スターターを接種した魚醤油諸味の微生物叢の解析と発酵過程における変遷について検討した。本研究では、寒天平板培養法に加え、培養不能な微生物も含めて菌叢の網羅的解析が可能な変成剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (PCR-DGGE 法) による真菌叢の解析を魚醤油諸味に適用した。その結果、発酵期間中に検出された真菌は、*A. oryzae*, *Z. rouxii*, *C. versatilis*, および *Pichia guilliermondii* の4種類のみであり、接種スターター由来の真菌 (*A. oryzae*, *Z. rouxii*, *C. versatilis*) が主要真菌叢を占めたが、*P. guilliermondii* のような野生酵母の増殖も認められた。野生酵母の増殖は、風味や香気成分などに影響を及ぼしたが、非無菌的条件下における好ましくない野生酵母の増殖抑制には、発酵開始時に *Z. rouxii* を接種することが効果的であることを明らかにした。

第4章では、発酵技術を導入したサケ魚醤油の生産を容易にするためには、従来の生菌体スターターよりも取り扱いやすく保存性に優れたスターターが望まれることから、魚醤油醸造用乾燥スターターの開発を試みた。本研究では、スターターの乾燥方法として、被乾燥物を温風で舞い上げながら乾燥する方法で、被乾燥菌に熱的な負荷がかからず、しかもコストの低い乾燥方法である流動層乾燥法に着目した。流動層乾燥法を用いて発酵に用いる *Z. rouxii*, *C. versatilis* および *T. halophilus* の乾燥菌体を新規に開発した。乾燥前に割砕小麦を混合して菌体水分を 40~50% に調整することで乾燥後生残率が高まり、乾燥菌体の保存性も良好であった。84日間 35℃ で保存後の乾燥菌体で魚醤油を製造したところ、生菌スターターを使用した場合と発酵経過、遊離アミノ酸組成ともにほぼ変わらない醸造性能を示した。

以上のように、本研究では、魚醤油製造に純粋培養した微生物をスターターとして添加する手法を導入することにより、呈味成分の増強や香気成分の付与が可能であることを明らかにするとともに、発酵過程の成分ならびに菌叢変化について解析し、スターターの導入により魚醤油の発酵管理、換言すれば野生微生物の増殖による品質不安定化を防ぎうることを示した。すなわち、本研究では、従来から魚醤油で要望されてきた改善点である、明るい色調、濃厚なうま味、および魚臭の改善のすべてを満たす製法を確立した。さらに、魚醤油の製造を容易に行うために初めてスターターの乾燥化技術を確認するとともに、乾燥スターターの利用により従来の生菌体と遜色ない製品が製造可能なことを初めて明らかにした。

本論文で示した一連の研究成果は水産加工副産物の有効活用に関する新たな基礎的技術上の知見であり、食品産業における副産物の減量化、およびサステナビリティの観点から重要な示唆を与えるものである。さらに、スターターの積極的な利用により、従来の非発酵水産加工品とは異なる発酵による風味が増強された新規な食品の開発など、水産発酵食品産業の発展にもつながると予想され、本研究の成果の一部はすでに実産業で利用されており、今後もさらなる技術的展開が期待されている。

学位論文審査の要旨

主査	教授	川合祐史
副査	教授	吉水守
副査	准教授	山崎浩司
副査	准教授	栗原秀幸

学位論文題名

魚醤油製造における微生物発酵技術の導入に関する研究

魚醤油は、特徴ある風味を有するため需要が増大しており、低利用魚や水産加工副産物の有効利用の観点からも注目されている。しかし、魚醤油製造においては、発酵期間中の脂質酸化による油焼け臭や原料の鮮度低下に起因する短鎖脂肪酸およびトリメチルアミン等の不快臭の存在、熟成良否による製品品質の不安定さ、さらに、風味を醸成するための麹添加による過度の褐変が課題として指摘されている。本研究では、このような従来の魚醤油製造が抱える課題を解決するために、耐塩性酵母および乳酸菌スターターによる発酵技術の導入を行い、微生物叢と製品品質との関連性について検討し、さらに耐塩性微生物の乾燥スターター化と魚醤油製造への応用についても検討を加えている。得られた成果は以下のように要約される。

1. 微生物発酵技術を用いた魚醤油製造条件の検討

微生物発酵技術を導入し、サケの高品質発酵魚醤油の製造のためには、原料として内臓と肉部を混合して用い、適切に復水处理した麹(*Aspergillus oryzae* あるいは *A. sojae*) と耐塩性微生物スターター (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis* および *Tetragenococcus halophilus*) を接種し、35℃で諸味を加温醸造することが、スターターの増殖、色調の淡色化、遊離アミノ酸の増強、醤油様香気の生成の観点から有効であることを明らかにした。また、発酵魚醤油の色調を淡色化する要因として、発酵初期の諸味の大幅な pH 低下が必要であり、それには耐塩性微生物スターターの接種が有効であることを明らかにした。

2. 魚醤油成分に及ぼすスターター接種の影響

大麦麹と各種の耐塩性微生物スターターを接種したサケの魚醤油の発酵過程における成分の変化について検討した。大麦麹を使用すると、諸味発酵期間中に遊離アミノ酸とともに還元糖も増加するため、メイラード反応による魚醤油の褐変が促進されたが、耐塩性微生物の共存によ

り pH 低下するとともに還元糖が消費され褐変が抑制された。特に耐塩性酵母スターター *Z. rouxii* と *C. versatilis* は、還元糖の消費量が多いために褐変の抑制効果が高く、また、エタノールと同時に醤油の特徴香として知られる 2-フェニルエタノールと 4-ヒドロキシ-2(or 5)-エチル-5(or 2)-メチル-3(2H)-フラノン、4-エチルグアヤコールをそれぞれ生成し、魚醤油に醤油様の香りを付与した。本研究ではそれらの香気成分を固相マイクロ抽出法によって簡便に定量する系を構築した。

3. スターターを接種した魚醤油諸味の微生物叢の解析

寒天平板培養法に加え、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（PCR-DGGE 法）によって、スターターを接種した魚醤油諸味の発酵過程における微生物叢の変遷について検討した。発酵期間中に検出された真菌は、*A. oryzae*、*Z. rouxii*、*C. versatilis* および *Pichia guilliermondii* の 4 種類のみであり、接種スターター由来の真菌（*A. oryzae*、*Z. rouxii*、*C. versatilis*）が主要真菌叢を占めたが、*P. guilliermondii* のような野生酵母の増殖も認められた。野生酵母の増殖は、風味や香気成分などに影響を及ぼしたが、非無菌的条件下における好ましくない野生酵母の増殖抑制には、発酵開始時に *Z. rouxii* を接種することが効果的であることを明らかにした。

4. 発酵魚醤油醸造用乾燥スターターの開発

発酵技術の導入を簡便に行えるようにするため、発酵魚醤油醸造用乾燥スターターの開発を試み、流動層乾燥法を用いて発酵魚醤油の製造に用いる *Z. rouxii*、*C. versatilis* および *T. halophilus* の乾燥菌体を新規開発に成功した。乾燥前に割砕小麦を混合して菌体水分を 40～50%に調整することで乾燥後生残率が高まり、乾燥菌体の保存性も良好であった。35℃で 84 日間保存後の乾燥菌体で発酵魚醤油を製造したところ、生菌スターターを使用した場合と発酵経過、遊離アミノ酸組成ともにほぼ変わらない醸造性能を示すことを実証した。

以上のように、本研究では、魚醤油製造に純粋培養した微生物をスターターとして添加する手法を導入することにより、従来から魚醤油で指摘されていた課題をすべて解決する製法を確立した。本研究の成果は、魚醤油製造において微生物スターターが製品品質向上と発酵管理に利用可能であることを示すものであり、水産発酵食品産業全体の発展に大きく貢献するものとして高く評価できる。よって審査員一同は申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。