

## ブナシロサケの新規魚醤油の開発

谷口（山田）亜樹子（管理栄養学科・准教授）・浦川 由美子（管理栄養学科・教授）  
大中 佳子（管理栄養学科・准教授）・山崎 俊介（管理栄養学科・准教授）  
高橋 ひとみ（家政保健学科・准教授）  
舛原 絹子（東京都市大学知識工学部生物学科・講師）  
三森 一司（聖霊女子短期大学生活文化科・教授）

### 緒言

魚醤油は魚介類に多量の食塩を添加して漬け込み熟成させた調味料であり、最近、麺つゆやたれの隠し味として需要が増えている。現在、魚醤油の製造は、熟成期間の短縮やうま味成分のアミノ酸量を増加させるため、微生物起源のプロテアーゼ製剤、醤油麹、アミノ酸および有機酸の添加など様々な方法が検討されている<sup>1)</sup>。本研究ではブナ化したシロサケの有効利用の方策のひとつとして、プロテアーゼおよびコラーゲナーゼ製剤を用い、速醸法による魚醤油を開発することを目的とした。

市販酵素製剤を用い、短期間による熟成を試み、酵素剤の影響をみるため、魚肉に内蔵ホモジネートのみを加えた魚醤油、内蔵ホモジネートとプロテアーゼ製剤を添加した魚醤油、内蔵ホモジネートにプロテアーゼ、コラーゲナーゼ製剤添加した魚醤油の3種の魚醤油を製造した。それぞれを内蔵添加区、プロテアーゼ添加区、コラーゲナーゼ添加区とし、製造法および性状を検討した。また、コラーゲナーゼ添加区の魚醤油の機能性および抗菌作用を検討した。サケ魚醤油を用いた料理を試作して、魚醤油の利用法について検討した。さらに、秋田県の魚醤油しょつつる醸造工場を見学したので、報告する。

### 方法

#### 1. 魚醤油の製造

##### (1) 原料

シロサケ *Oncorhynchus keta* は産卵期に表皮に婚姻色が現れブナ毛となり、ブナ化する。



Fig.1 The mature chum salmon *Oncorhynchus keta*, S, A,B,C and D grade

ブナ毛度合の格付け基準<sup>2-6)</sup>は銀毛、Aブナ、Bブナ、CブナおよびDブナの5段階があるが、本研究は体長約65cm、体重約4kgのAブナを用いた。Aブナは若干婚姻色がみられ、Cブナは婚姻色が強くなり、絶食状態であるため成分が消耗し、食味が低下し、商品価値が低下する (Fig. 1)。本研究ではAブナを用い、魚醤油の原料とした。

## (2) 酵素製剤

使用したプロテアーゼ製剤は、プロテアーゼA (天野製薬、起源 *Aspergillus oryzae*) であり、性状は中性プロテアーゼで、最適pHは7.0、最適温度は50°Cであった。酵素の活性量は基質にカゼインを用い、kunitz法<sup>7)</sup>にて測定し、37°C、1分間に1  $\mu\text{mol}$  のチロシンに相当する分解液の280nmの吸光度の増加させる酵素力価を1unitとした。

コラーゲナーゼ製剤はコラーゲナーゼ (シグマ社製、起源 *Clostridium histolyticum*) を用いた。最適pHは7.5で最適温度は40°Cであった。酵素の活性量はTNBS法<sup>8)</sup>にて測定し、37°C、1分間に1  $\mu\text{mol}$  のフェニルアラニンを遊離する酵素力価を1unitとした。

## (3) 魚醤油の調製

サケより内蔵、頭部、ひれ、尾部および骨を除去し、得られた魚肉を生理食塩にて洗浄後、5cm×2.5cmに細断した。魚肉量に対し食塩を25% (w/w) 加え、これにホモジネートした内蔵を添加し、混合した後、30°Cで120日間熟成させたものを内蔵添加区とした。内蔵添加区にプロテアーゼ製剤2,500unitsを添加したものをプロテアーゼ添加区とし、さらにプロテアーゼ添加区にコラーゲナーゼ100unitsを添加したものをコラーゲナーゼ添加区とした。ホモジネートした内臓は魚肉の3%添加し、これはプロテアーゼ10,000unitsの活性量に相当した。経時的にガーゼで濾過し、試料液を採取し、分析に供した。

## 2. 製造した魚醤油の分析

### (1) 一般成分の分析

水分<sup>9)</sup>は赤外線水分測定器 (Mettler 社製、LP16) を用い、135°Cで測定した。タンパク質、可溶性全窒素量はケルダール分解法<sup>10)</sup>、脂肪はソックスレー抽出法<sup>11)</sup>、灰分は直接灰化法<sup>12)</sup>で測定した。pHの測定はpHメーター (掘場社製) を用い、ホルモール態窒素、酸度、塩分の測定は醤油分析法<sup>13)</sup>に準じた。

### (2) 揮発性塩基態窒素量の測定

揮発性塩基態窒素量は衛生試験法注解に従い、コンウェイ微量拡散吸収法<sup>14)</sup>により測定した。

### (3) 遊離アミノ酸の測定

試料は遠心濾過用マイクロチューブ (日本ミリポア工業社製、分画分子量4,000) を用いて濾過し、NBDラベリング処理した。分析はHPLCにより行い、カラムはODS-80TS、3.2mmID×150mm (東ソー社製)、検出器はF-1050型分光光度計 (日立製作所) を使用した。移動相は0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.2)、50%アセトニトリル溶液-水 (50:50) の2液のグラジエント溶液を用い、流速1.0ml/min、カラム温度43°C、励起波長470nm、蛍光波長530nmにて検出した。

### (4) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能の測定

DPPHラジカル消去能の測定<sup>15)</sup>により抗酸化作用について検討した。試料液は、3000r.p.m.にて5分間遠心分離後の上澄液を用いた。400  $\mu\text{M}$  DPPH12ml、200mM MES

緩衝液 (pH6.0) 12ml、20%エタノール12mlの混液を作成し、その混液0.9mlに80%エタノールで希釈した試料液0.3mlを加え20分間反応後、その反応液を520nmにて測定し、吸光度減少率により抗酸化活性を求めた。検量線は Torolox を用いて作成し、Torolox 換算法にて抗酸化作用を調べた。

#### (5) $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の測定

GABA の試料は、魚醤油のタンパク量が0.5mg/100mlとなるように調製し、0.2  $\mu$ l 水系フィルタに通したものをを用いた。カラムは、ShimPack AMINO-Na(6mmI.D.×100mmL.)を使用して、移動相は20mM クエン酸・ナトリウム緩衝液pH5.9、カラム温度は40°C、流量は0.4ml/min、試料注入量は10  $\mu$ l で検出した。検出器は分光蛍光検出器 RF-10AXL を使用し、検出は NaClO 試薬、OPA 試薬を用いた。

#### (6) 抗菌性試験

デソキシコレート培地 (ラクトース10g、ペプトン10g、塩化ナトリウム 5 g、デオキシコール酸ナトリウム 1 g、リン酸水素二カリウム 2 g、クエン酸鉄アンモニウム 2 g、ニュートラルレッド0.03g、寒天15g、蒸留水1L) をpH7.2に調製し、45°Cでシャーレに注いで平板培地を作成後、この上に大腸菌 (土壌分離) を表面に覆った。殺菌したろ紙ディスクに1,000倍希釈した魚醤油を浸し、37°Cで24時間培養した。対照として、魚醤油の食塩濃度と同じ25%食塩水の1,000倍希釈したものをを用いた。大腸菌に対し抗菌作用があれば、ろ紙ディスクの周囲は大腸菌の生育が阻止され、阻止円が形成される。今回は阻止円の有無を観察する定性試験を行った。

### 3. 魚醤油の利用法の検討

魚醤油を用いた加工食品、料理を考案し、操作方法および調理方法、栄養計算を行った。料理については、季節により分類した。

### 結果および考察

#### 1. 原料の一般成分

ブナシロサケ肉質の成分値を測定した。水分は69.3%、タンパク質22.7%、脂質6.8%、灰分は1.2%であった。日本食品標準成分表2010<sup>16)</sup>によるシロサケの成分値は水分72.3%、タンパク質22.3%、脂質4.1%、灰分1.2%と本原料と大きな差はみられなかった。ブナ化の度合が強くなるに従い、水分が増加し、脂質が減少することが知られている<sup>2)</sup>が、本原料はAブナとランクが高いため、同様の値を示したと推察した。

#### 2. 魚醤油の経時的变化

##### (1) 酸度およびpHの経時的变化

魚醤油熟成中の滴定酸度および pH の経時的变化について検討した結果 (Fig.2)、酸度はpHと相関性を示し、pH の低下した順であるコラーゲナーゼ、プロテアーゼ、内蔵添加区の順に酸度の増加がみられ、コラーゲナーゼ添加区では内蔵添加に比べ、1.4倍、酸度が上昇した。酸度の上昇が大きかったプロテアーゼおよびコラーゲナーゼ添加区のpHは仕込30日後から徐々に低下し、120日後の pH は pH5.2~5.3であった。各添加区で、pH に大きな差がみられなかったのは、アミノ酸やペプチドによる緩衝能による影響と考えられた。

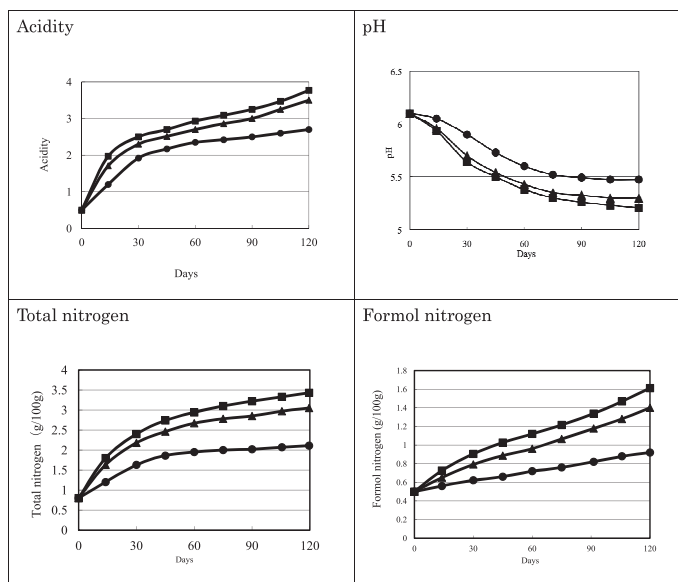


Fig.2 Changes of components during maturation of salmon fish sauce

●Organs, ▲Protease A added, ■Protease A and Collagenase added

## (2) 全窒素およびホルモル窒素の経時的変化

可溶性画分の全窒素量は、コラーゲナーゼ添加区が最も全窒素量が多く、最もタンパク質の分解が進行していることが推察された (Fig.2)。内蔵添加区では120日後、全窒素量は2.1と分解は進んでいたが、その分解率は全タンパク質量の58%であるのに対し、コラーゲナーゼ、プロテアーゼ添加区の分解率はそれぞれ94%、84%と酵素を添加することによりタンパク質の可溶化が進むことが確認された。

さらに窒素成分の分解挙動を調べるため、ホルモル窒素量を測定した結果、全窒素と同様の傾向を示し、コラーゲナーゼ、プロテアーゼ、内蔵添加区の順であり、コラーゲナーゼ添加区は内蔵添加区の約1.8倍と内蔵添加区に比べ、低分子ペプチドやアミノ酸に分解されていることが推察された。

## 3. 魚醤油の分析

### (1) 一般分析

魚醤油の一般分析の結果は、Table 1 に示した。pH は酵素製剤を添加した方が若干低く、酸度も酵素製剤添加の方が高かった。この値はいずれも一般に市販されている魚醤油<sup>17)</sup>と同様であった。全窒素量は酵素剤を添加した魚醤油の方が高く、コラーゲナーゼ添加区が最も分解が高かった。アミノ化率も、コラーゲナーゼ、プロテアーゼ、内蔵添加区の順であり、コラーゲナーゼ添加区はアミノ化率が約69%と最も高く、内蔵添加区に比べ2倍以上であった。プロテアーゼAは耐塩性の酵素であり、プロテアーゼの添加の効果が明らかに認められた。

### (2) 揮発性塩基態窒素量

コンウェイの微量拡散吸収法を用いて、揮発性塩基態窒素量を調べた (Table 2)。タン



**Table 1** Chemical analysis of salmon fish sauce

	Organs	Protease A added	ProteaseA, Collagenase added
pH	5.5	5.3	5.2
Acidity *	2.7	3.5	3.8
NaCl (g/100g)	25.0	21.5	21.3
Total nitrogen (g/100g)	2.11	3.05	3.40
Amino acid nitrogen (g/100g)	0.66	1.94	2.34
Amino acid (%)	31.3	63.6	68.8

\* Volume (ml) of 0.1N NaOH necessary to the titration of 1ml of sample to pH8.5.

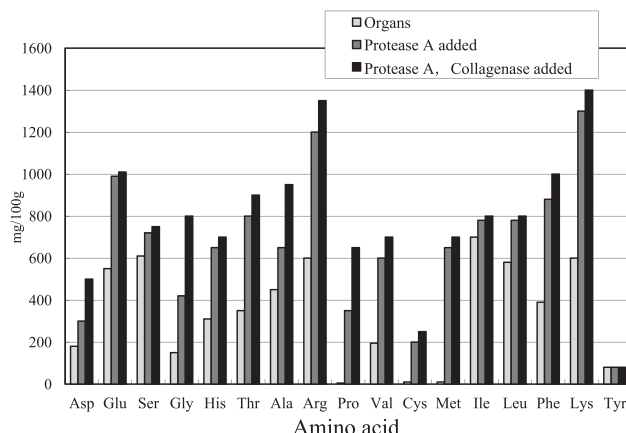
パク質の分解物がさらに酵素等により分解されると、トリメチルアミン、ジメチルアミンやアンモニアなどの揮発性塩基態窒素が生成される。これは、魚醤油の独特な香りとなる成分になるが、過剰に生成すると腐敗臭の原因となる。ほかに、ミネラルと結合すると沈殿の原因ともなる。揮発性塩基態窒素量を結果、酵素剤を添加することにより内蔵添加区に比べ、揮発性塩基態窒素量は1/2以下に低下した。酵素を添加することにより、揮発性塩基態窒素は分解され、適度な量となり、魚醤油の品質が上昇することが示唆された。

**Table 2** Volatile base nitrogen of salmon fish sauce

Organs	Protease A added	ProteaseA, Collagenase added
164	62	73

### (3) 遊離アミノ酸

Fig.3 に120日後の遊離アミノ酸の分析結果を示した。遊離アミノ酸量はコラーゲナーゼ添加区が最も多く、次にプロテアーゼ添加、内蔵添加区の順であった。内蔵添加区と酵素添加区ではアミノ酸組成は異なり、特にプロリン、シスチン、メチオニンが酵素を添加することにより、遊離してくることが確認された。また、グルタミン酸、ヒスチジン、トレオニン、バリン、フェニルアラニン、リジンも酵素を添加することにより増加し、アミノ酸生成量の差がはっきりみられた。また、コラーゲナーゼを添加することにより、グリシンやプロリンの生成量が増加することも確認された。



**Fig.3** Free amino acid composition during maturation of salmon fish sauce

#### (4) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル消去能の測定

最近、食品の機能性として、食品中の抗酸化活性が非常に注目されている。魚醤油の抗酸化活性を測定した結果 (Table 3)、コラーゲナーゼ、プロテアーゼ、内蔵添加区各々100g中に155  $\mu\text{mol}$  Trolox、152  $\mu\text{mol}$  Trolox、127  $\mu\text{mol}$  Troloxであった。酵素製剤を用いた魚醤油のほうが内蔵のみの魚醤油より抗酸化活性は高く認められた。この結果から、酵素添加による熟成過程で抗酸化作用のある成分が生成され、機能性の魚醤油となったことが確認できた。

**Table 3** Antioxidant activity of salmon fish sauces as determined by the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method\*

Organs	( Trolox $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )	
	Protease A added	ProteaseA, Collagenase added
120	152	155

\* The DPPH method, in which the radical scavenging capacity of Trolox is used as an indicator.

#### (5) $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)の測定

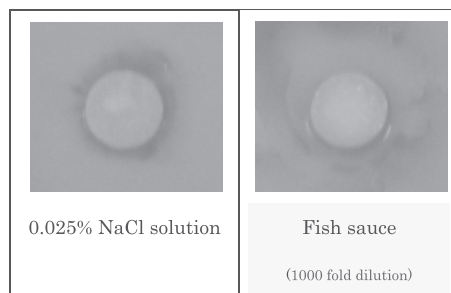
GABAは、脳の血流や機能を高め、脳卒中後遺症の改善に有効であるとされ、近年注目されている。ブナシロサケ魚醤油のGABA量について調べた結果 (Table 4)、コラーゲナーゼ、プロテアーゼ、内蔵添加区各々100g中に1.2mg、1.6mg、1.8mgであった。GABAはサケの内蔵にあることがわかっているが、さらに酵素作用により生成され、酵素添加の魚醤油に多く含まれていた。この結果から機能性の魚醤油として充分注目できる値であった。

**Table 4**  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content of salmon fish sauces (mg/100g)

Organs	(mg/100g)	
	Protease A added	ProteaseA, Collagenase added
1.2	1.6	1.8

#### (6) 抗菌性試験

コラーゲナーゼ添加区魚醤油による大腸菌の抗菌作用を検討したところ (Fig.4)、対照の食塩水にみられなかった阻止円が形成され、抗菌性が確認できた。このことから、魚醤油中に大腸菌の生育阻害因子があることが推察された。この結果は魚醤油を1000倍希釈したものであり、魚醤油には十分な抗菌作用があることが認められた。



**Fig.4** Antimicrobial activity of salmon fish sauce using paper disk

#### 4. 魚醤油の利用法の検討

魚醤油は様々な料理に用いることができた。魚醤油は炒め物、蒸し物、揚げ物などの料理に塩味、うま味を与え、香りとコクを与えた。魚醤油を用いて春夏秋冬の季節にあった料理を約30品目考案した。その一部の料理をFig.5に紹介した。考案した魚醤油料理については一冊の料理集にまとめた。






春			
	鮭の手ごね寿司	じゃがいものコロコロ煮	鮭しゅうまい
夏			
	簡単パエリア	ゴーヤチャンプル	トムヤンクン風スープ
秋			
	オイスターソース炒め	和風ハンバーグ	オムレツきのこあん
冬			
	長芋と人参の煮物鮭	グラタン	けんちん汁

Fig.5 Seasonal dishes with salmon fish sauce

## 5. 魚醤油醸造工場の見学

魚醤油について、さらに知見を得るため、聖霊女子短期大学にて、秋田の魚醤油しょつつるおよび世界の魚醤油の特徴、化学的成分、機能性などの研究についての勉強会を開催した。また、秋田県男鹿半島にある株式会社諸井醸造の代表取締役社長諸井秀樹氏を訪ねて、現在開発中の魚醤油の紹介および魚醤油の歴史、製造工程、しょつつるの現状等の講義を受けた。サメ魚醤油、すっぽん魚醤油、うなぎ魚醤油、さざえやあわび魚醤油など非常に珍しい魚醤油を紹介してもらい、官能評価を行った。その後、魚醤油醸造工場を見学した。他の魚醤油会社では、醸造過程をなかなか見学させてもらうことはできないが、特別な配慮により、醸造工場を見学することができ、魚醤油の熟成過程、特性などさまざまな方向から魚醤油の知見を得ることができ、とても貴重な体験ができた (Fig.6)。



Fig.6 Brewing plant tour and study of salmon fish sauce

### 要約

本研究ではブナ化したシロサケの有効利用として、プロテアーゼ製剤、コラーゲナーゼ製剤を用い、良質な魚醤油を開発することを目的とした。魚醤熟成中の成分の経時的变化を調べたところ、魚醤油の可溶性全窒素量、アミノ化率からプロテアーゼの利用効果が認められ、さらにコラーゲナーゼを添加することにより、より分解の進んだ効率のよい製造法を確立することができた。プロテアーゼ製剤を使用して魚醤油を製造するためには、魚醤熟成時の pH で活性の高い酵素を用い、かつ耐塩性プロテアーゼの使用によって、よりタンパク質分解速度が大きくなり、効率のよい魚醤油が製造できることが推察された。

製造した魚醤熟成中の機能性成分について調べたところ、酵素添加の魚醤油は内蔵のみの魚醤油に比べ、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 量は1.3-1.5倍、抗酸化活性は約1.3倍高く、機能が認められた。この結果から、酵素を用いて熟成させることにより、分解物から機能性に富んだ成分の生成が得られることが推察された。さらに、製造した魚醤油には抗菌作用が認められ、加工食品への利用も考えられた。魚醤油を用いた加工食品、料理の利用法について検討した結果、魚醤油を使用することにより、塩味とうま味を付与するだけでなく、香りとコクを引き出すことが確認できた。

## 文献

- 1) 太田静行：魚醤油の知識、第1章 魚醤油とは、東京、幸書房、p.1、1996.
- 2) 相沢悟、佐々木政則：ブナサケ利用試験、昭和51年度釧路水試事業報告書、146 (1977).
- 3) 一杉哲郎、加藤健二、金子博実、竹谷 弘：ブナサケに関する試験研究.昭和55年度網走水試事業報告書、347 (1982).
- 4) 上村俊一：ブナサケの加工利用について.New Food Industry、26、4 (1984) .
- 5) 辻浩司、川合祐史：秋サケ筋肉タンパク質の粘性と筋肉 のレオロジーに及ぼすブナ化と加熱処理の影響、北水試研報、34、21 (1990) .
- 6) 羽田野六男：水産シリーズ 秋サケの資源と利用、東京、恒星社厚生閣 (1985) .
- 7) Kunitz: Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol、29、149 (1969).
- 8) 奥山典生、笠井久隆：TNBS法による蛋白質の定量法、蛋白質・核酸・酵素、18、1153 (1973) .
- 9) 堤 忠一：食品分析ハンドブック (小原哲二郎監修)、食品成分の分析1. 水分、東京、建帛社、p.17 (1972) .
- 10) 柳田藤治編著：醸造・食品学実験書、3.3.2タンパク質、東京、食品研究社、p.226 (1985) .
- 11) 堤 忠一：食品分析ハンドブック (小原哲二郎監修)、食品成分の分析3.B.脂肪の定量、東京、建帛社、p.119 (1972) .
- 12) 岩尾裕之：食品分析ハンドブック (小原哲二郎監修)、食品成分の分析5.A.灰分の定量、東京、建帛社、p.259 (1972) .
- 13) 日本醤油研究所編集：しょうゆ試験法、1. しょうゆ分析法、東京、日本醤油研究所、p.1 (1985) .
- 14) 谷村和八郎：食品衛生学実験、微量拡散法、地人書館、p.197 (1996) .
- 15) 須田郁夫：食品機能研究法、3-3-9抗酸化機能①分光学的抗酸化機能評価、東京、光琳、p.218 (2000).
- 16) 文部科学省科学技術学術審議会資源調査分科会編:日本食品標準成分表2010、魚介類しろさけ、p.176 (2010) .
- 17) 太田静行：魚醤油の知識、第3章 魚醤油の成分、東京、幸書房、p.54 (1996) .