

ホエイを活用した水産糠漬けの 呈味成分と香気成分

田中 彰, 八十川大輔

Taste and Flavor Components of Seafood Fermented in
Whey-Containing Rice Bran

Akira Tanaka and Daisuke Yasokawa

Whey (a byproduct of cheese production) is rich in nutritional and functional components. Its content of live lactic acid bacteria used in cheese production was expected to support its utilization in the production of fermented food. In this study, rice bran-fermented saury fish was produced using whey-containing *nukadoko* (a rice-bran bed traditionally used in Japan for pickling vegetables). The results showed that lactic acid bacteria in the whey were propagated in the rice-bran bed and survived in large numbers during nine days of rice-bran fermentation. It was also found that saury fermented in the whey-containing rice-bran bed contained more free amino acids and volatile components (such as esters) than that fermented in a traditional rice-bran bed without whey. These results suggest that the use of whey in rice-bran fermentation accelerates the fermentation/ process.

チーズホエイ（以下、ホエイ）は、チーズ製造時に副産物として排出され、その量は、製造されるチーズ重量の約9倍にもなると言われている¹⁾。北海道におけるホエイの産出量は、チーズ生産量から算出すると、約19万トンにもなる。一方で、ホエイには、良質なたんぱく質やミネラルなどが豊富に含まれ、栄養的に優れた素材であり²⁾、近年は、ホエイの持つ健康機能性についても関心が高まっている³⁾。ホエイは、チーズ製造量の多い大手乳業会社では、乾燥粉末化されて食品素材や機能性素材として利用されているが、多くの中小規模チーズ製造企業では家畜の飼料とするか、もしくは廃棄されている。糠漬けなどの日本の伝統的な発酵食品の製造では、発酵は食品原料中に存在する微生物による自然発酵に任せられており、発酵や熟成を促進する目的で微生物を製造工程に添加することは少ない⁴⁾。ホエイには、チーズ製造時に使用した乳酸菌が多く含まれており、ホエイを発酵食品製造工程に利用することで、発酵・熟成の促進や、

風味の付加・増強など特長ある発酵食品を製造できる可能性がある。本研究では、糠漬けの製造で使用する糠床にホエイを活用し、ホエイ由来の乳酸菌の糠床中での挙動を調べた。また、ホエイを使用した糠床を用いて糠漬けを試作し、従来の糠漬けとの呈味成分や香気成分の違いを明らかにし、ホエイが糠漬けの発酵や熟成に与える効果を検討した。

実験方法

1. 糠床と糠さんまの試作

糠、ホエイ、塩を重量比で3:2:1の割合で混合して糠床（ホエイ糠床）を調製した。また、ホエイの代わりに水を使用したものを対照（塩水糠床）とした。糠床と同重量のサンマを各糠床に包埋して漬込み、4日後および9日後に糠床およびサンマを取り出して試験に供した。

2. 糠床の細菌数測定

糠床に滅菌した生理食塩水を加え、10%希釈液を調製し、混釈法により行った。一般生菌数は標準寒天培地（日水製薬）、大腸菌群はデソキシコレート寒天培地（日水製薬）、酸生成菌はGYP白亜寒天培地（日水製薬）を用い、定法に従って培養後、各コロニー数を計測した。

3. 糠床の微生物菌叢の解析

酸生成菌測定の培地上に出現したコロニーからランダムに20コロニーを釣菌し、既報に従ってDNAを抽出した。これを鋳型としてPCRにより16SrDNAを増幅した後、塩基配列を決定し、NCBIのデータベースと照合して菌叢を推定した。

4. 糠さんまの遊離アミノ酸と有機酸量の測定

糠さんまの筋肉を細切し、重量に対して9倍量の蒸留水を加えて均質化して抽出液を得た。抽出液に等量の2% (w/v) スルホサリチル酸水溶液を加えて混合し、4℃、30分間静置後、遠心分離（3000rpm、10分、4℃）して、たんぱく質を除去した⁵⁾。上清を0.22μmのフィルターでろ過し、遊離アミノ酸分析に供した。分析にはアミノ酸自動分析計（L-8900形、日立ハイテクノロジーズ）を用い、日立カスタムイオン交換樹脂（4.6mm I.D.×60mm）を用い、生体成分分析法に準じて測定した。有機酸は抽出液を5倍に希釈して、0.45μmのフィルターでろ過し、有機酸分析に供した。分析にはポストカラムpH緩衝化電気伝導度法（島津高速液体クロマトグラフ有機酸分析システム）を用いて測定した⁶⁾。

5. 糠さんまの揮発性成分の測定

糠さんま筋肉をナイフで細切し、スクリュウキャップ

事業名：職員研究奨励事業（シーズ探索型）

課題名：発酵食品製造工程へのチーズホエイ添加の有用性の検討

付きバイアルに3gを入れ、内部標準として0.1mg/mL シクロヘキサノール溶液50μLを添加し、窒素ガスで30秒間置換した。試料を封入したバイアルを40℃で20分間予備加温した後に固相マイクロ抽出ファイバー（SPME ファイバー：85μm CarboxenTM/PDMS）で、揮発性成分を40℃で30分間抽出し、GC/MSに供して分析を行った⁷⁾。GC/MS分析はGCMS-QP2010（島津製作所）で行った。カラムはDB-WAX（30m×0.25mm I.D., 膜厚0.25μm, J&W Scientific）を用い、注入口温度は250℃、線速度36cm/sec, カラム温度は35℃を2分間保持し、その後100℃までは2℃/min, 240℃までは15℃/minで昇温して分析を行った。検出された各成分はマススペクトルデータベース（NIST）との比較により同定した。

結果および考察

1. 糠床の細菌数の変化

図1に各糠床の細菌数の変化を示す。塩水糠床では、糠床調製直後の一般生菌が 2.1×10^4 cfu/gに対して、酸生成菌は 5.0×10^1 cfu/gとほとんど含まれていなかったが、4日後は、それぞれ 4.4×10^4 cfu/g, 5.9×10^4 cfu/g

となり、糠床中の生菌がほとんど酸生成菌で占められ、9日後は 8.1×10^5 cfu/g, 7.2×10^5 cfu/gに増加した。百木ら⁸⁾は、鯖糠漬けの発酵熟成中の糠床の酸生成菌数は、糠漬け開始時に 10^3 cfu/gであるが、4か月後に 10^6 cfu/gに増加し、その後9ヶ月後まで菌数を維持していたことを報じている。糠漬け条件に違いがあり、一概に比較できないが、本研究の塩水糠床でも、糠漬け開始時から熟成期間とともに、酸生成菌数が増加し、酸生成菌数も百木らの報告と同程度であった。一方、ホエイ糠床では、糠床調整直後の一般生菌が 1.0×10^6 cfu/gに対して、酸生成菌は 2.3×10^6 cfu/gと糠床中の生菌のほとんどが酸生成菌で占められており、4日後では、それぞれ 3.2×10^6 cfu/g, 2.4×10^6 cfu/g, 9日後では、 3.2×10^6 cfu/g, 2.2×10^6 cfu/gであった。ホエイ糠床では塩水糠床と比べて、糠床調整直後から9日までの漬込み期間中、一般生菌数と酸生成菌数が多く、酸生成菌は糠床調整直後から約 10^6 cfu/gの菌数を維持していた。糠漬け製品では、酸生成菌である乳酸菌の発酵が、糠漬けの風味などに関与していることが知られている⁹⁾。本結果から、ホエイ糠床は、塩水糠床よりも酸生成菌での発酵が促進され、熟成への効果が強い可能性が示唆された。

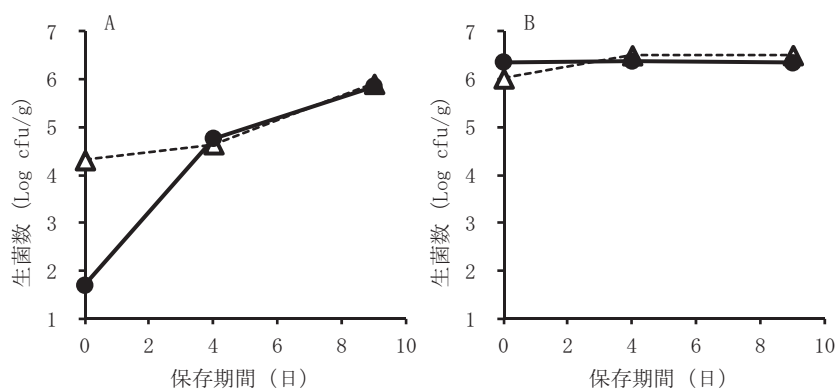


図1 糠漬け期間における各糠床中の生菌数

A, 塩水糠床; B, ホエイ糠床.

△, 一般生菌; ●, 酸生成菌.

表1 各糠床の検出細菌の菌叢

検出細菌	ホエイ糠床						塩水糠床			
	0日目		4日目		9日目		4日目		9日目	
	種の数	%	種の数	%	種の数	%	種の数	%	種の数	%
<i>Streptococcus</i>	20	100	20	100	12	60	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	0	0	0	0	0	0	12	60	0	0
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	0	1	5	2	10	8	40
<i>Microbacterium</i>	0	0	0	0	0	0	2	10	0	0
<i>Agrobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0
<i>Curtobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0
<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	1	5	0	0	2	10
同定不能	0	0	0	0	6	30	2	10	10	50

2. 糠床の菌叢の変化

表1に使用した各糠床に含まれる検出細菌の菌種を同定した結果を示す。塩水糠床では、糠床調整直後は酸生成菌が認められなかったが、4日後の糠床では、*Bacillus*属が約60%と最も優勢であった。この結果は、細菌数測定した結果と必ずしも一致を示さなかったが、平板培地でのハローの有無による酸生成菌の判定が容易ではなかったことによると推定された。また、9日後では、*Staphylococcus*属が約40%と優勢な菌種が変化していた。農産物の糠漬けでは、糠漬け期間と共に*Lactobacillus*属が¹⁰⁾、水産物の糠漬けでは、*Pediococcus*属が優勢になることが報じられている⁸⁾。本結果で優勢となった*Staphylococcus*属は、身欠きにしんに含まれる主要な微生物と報じられている¹¹⁾。これらの微生物は耐塩性があり、塩濃度の高い糠床中で生残し、優勢に存在していると考えられた。一方、ホエイ糠床は、調整直後および4日後では、釣菌したコロニー全てが*Streptococcus*属であり、9日後も*Streptococcus*属が60%と最も優勢であった。ホエイ糠床に含まれていた*Streptococcus*属は*Streptococcus thermophilus*との相同性が最も高かった。*S.thermophilus*はチーズ製造に使用される乳酸菌であり、本研究で使用したホエイに生残していた（データ未掲載）。ホエイ糠床中でも生残し、糠漬け期間である9日間は糠床中で優勢に存在していた。ホエイ糠床は、塩水糠床と異なり、ホエイ由来の乳酸菌を優勢に含むことが示され、それぞれの糠床で漬込んだ水産糠漬けの呈味成分や揮発性成分に違いがある可能性が示された。

3. 糠さんまの呈味成分の変化

表2に各糠床で試作した糠さんまの遊離アミノ酸量を示した。ホエイ糠床で試作した糠さんま（ホエイ糠さんま）と塩水糠床で試作した糠さんま（塩水糠さんま）の総遊離アミノ酸を比較すると、4日後では、ホエイ糠さんまが乾燥重量当たり45.8mg/gに対して塩水糠さんまが36.1mg/g、9日後では、51.2mg/gに対して39.0mg/gであり、ホエイ糠さんまで総遊離アミノ酸の含有量が多かった。また、グルタミン酸やアラニンなどの旨みや甘みに関与するアミノ酸も同じ傾向を示していた。糠にしんなどの水産物の糠漬けは、糠漬け中に、微生物による発酵や原料魚の自己消化作用により、たんぱく質が分解されて、遊離アミノ酸が増加する¹²⁾。魚種や漬込み条件は異なるが、張¹²⁾らは9か月間糠漬けした糠にしんの遊離アミノ酸が3 380～3 890mg/100g（乾燥重量当たり60.8～69.3mg/g）と報じている。本結果では、ホエイ糠さんまの遊離アミノ酸量が張らの分析値に近い結

果となった。乳酸菌数の多いホエイ糠床では、乳酸菌の発酵がより促進されて遊離アミノ酸が増加している可能性が示唆された。

表3に各糠さんまの有機酸量を示した。どちらの糠さんまも有機酸のほとんどが乳酸であり、ホエイ糠さんまの乳酸は乾燥重量当たり、4日後が9.19mg/g、9日後が9.25mg/gとほぼ変わらなかった。塩水糠さんまでは、4日後が10.89mg/g、9日後が7.71mg/gと乳酸が減少していた。また、ホエイ糠さんまは酢酸やクエン酸などの有機酸も塩水糠さんまに比べて多く含まれていた。乳酸量の減少は、糠漬け中における糠へ溶出や、酵母などの乳酸を資化できる微生物による影響などが考えられる¹⁰⁾。ホエイ糠さんまは、一時的に乳酸が減少するものの、乳酸発酵による乳酸生成により補填されていると推察され

表2 各糠さんまの遊離アミノ酸 (mg/g)

アミノ酸	原料	ホエイ糠さんま		塩水糠さんま	
	0日目	4日目	9日目	4日目	9日目
Taurine	5.12	3.06	3.37	3.75	2.96
Aspartic acid	0.03	2.01	2.18	0.97	1.49
Threonine	0.09	1.41	1.65	0.72	1.09
Serine	0.10	1.51	1.70	0.87	1.19
Asparagine	0.01	0.12	0.14	0.11	0.10
Glutamic acid	0.34	2.54	2.88	1.42	1.92
Glutamine	0.08	0.97	1.06	0.54	0.72
Proline	0.05	0.55	0.76	0.41	0.48
Glycine	0.32	1.06	1.22	0.67	0.86
Alanine	0.52	3.12	3.67	1.93	2.47
Valine	0.16	2.04	2.37	1.10	1.58
Methionine	0.07	1.19	1.33	0.61	0.90
Isoleucine	0.08	1.52	1.75	0.76	1.15
Leucine	0.15	3.11	3.51	1.56	2.37
Tyrosine	0.12	1.22	1.32	0.65	0.98
Phenylalanine	0.05	1.55	1.75	0.81	1.20
Tryptophan	0.00	0.40	0.44	0.20	0.30
Lysine	0.38	3.18	3.65	1.67	2.41
Histidine	18.42	12.44	13.31	15.96	12.71
Arginine	0.06	2.38	2.60	1.16	1.78
その他	0.03	0.49	0.53	0.27	0.41
総量	26.2	45.8	51.2	36.1	39.0

※値は乾燥重量当たり

表3 各糠さんまの有機酸 (mg/g)

有機酸	原料	ホエイ糠さんま		塩水糠さんま	
	0日目	4日目	9日目	4日目	9日目
乳酸	14.61	9.19	9.25	10.89	7.71
酢酸	0.24	0.18	0.35	0.12	0.20
クエン酸	0.00	0.42	0.54	0.27	0.44
その他	0.13	0.20	0.27	0.14	0.22
総量	14.99	9.99	10.42	11.42	8.57

※値は乾燥重量当たり

た。

4. 糠さんまの揮発性成分の変化

表4に各糠さんまの揮発性成分を示した。漬込み前のさんまは、Hexanalなどのアルデヒドや1-Penten-3-olなどのアルコール、2,3-Pentanedioneなどのケトンが含まれていた。糠漬け後では、どちらの糠さんまもアルデヒド、アルコール、ケトンの種類と量が多く含まれていた。また、塩水糠さんまは、9日後にエタノールとエステル、酸（短鎖脂肪酸）が含まれていたが、ホエイ糠床では、これらの成分が4日後から含まれ、9日後ではこれらの成分が増加し、塩水糠床よりも多く含有していた。Hexanalや1-Penten-3-ol、2,3-Pentanedioneなどは魚の脂質酸化に

より生じるにおい成分として報告されており^{13~14)}、原料魚であるサンマの脂質酸化により生じたと推察された。エタノールや短鎖脂肪酸は微生物の発酵代謝物として生成され¹⁵⁾、エチルエステルは酵母が作り出す香り成分として日本酒などの主要な香りとなっている¹⁶⁾。笠原ら¹⁷⁾は、糠漬イワシの香気成分には、アルデヒドなどのカルボニル化合物やアルコール、エステル、短鎖脂肪酸などにより構成されていることを報じており、糠さんまでも、これらの成分が複合的に存在して特有の香りを形成していると考えられる。本研究で使用したホエイ糠床は塩水糠床に比べて生菌数が多く、微生物の発酵が促進されていることが推察される。これにより、ホエイ糠床で試作

表4 各糠さんまの揮発性成分

揮発性成分	原料 0日目	ホエイ糠さんま		塩水糠さんま	
		4日目	9日目	4日目	9日目
Aldehyde					
Propanal	0.811	0.669	0.414	1.537	0.493
Butanal	0.235	0.177	0.117	0.409	0.165
2-Methyl-butanal	—	0.159	0.176	0.180	0.168
3-Methyl-butanal	0.049	0.373	0.379	0.437	0.435
Hexanal	0.511	0.674	0.709	1.653	0.581
Heptanal	0.058	0.115	0.159	0.239	0.072
2-Hexenal	0.079	0.232	0.182	0.350	0.221
4-Heptenal	0.118	0.086	0.097	0.257	0.129
Alcohol					
Ethanol	0.511	4.635	6.210	0.680	5.073
1-Propanol	0.050	0.256	0.215	0.173	0.244
2-Methyl-1-propanol	—	0.464	0.524	0.013	0.550
1-Penten-3-ol	3.042	4.940	3.656	5.817	4.369
3-Methyl-1-butanol	—	2.935	4.049	0.156	3.465
1-Pentanol	0.052	0.168	0.142	0.152	0.134
Cyclopentanol	0.079	0.185	0.166	0.265	0.162
2-Penten-1-ol	0.460	0.962	0.843	1.483	0.770
Ketone					
2-Propanone	0.013	0.172	0.126	0.050	0.226
2-Butanone	0.029	0.090	0.103	0.053	0.056
2,3-Pentanedione	1.087	2.037	1.705	4.392	1.552
3-Hydroxy-2-Butanone	—	0.924	1.225	0.046	1.719
Ester					
Ethyl acetate	—	0.155	0.334	—	0.214
Ethyl propanoate	—	0.033	0.043	—	0.028
Ethyl isobutyrate	—	0.058	0.101	—	0.066
Ethyl isopentanoate	—	—	0.026	—	0.016
Acid					
Acetic acid	—	0.021	0.109	—	0.041
Butanoic acid	—	0.016	0.016	—	0.010
3-Methyl butanoic acid	—	0.094	0.212	—	0.188
Others					
2-Pentene	0.351	0.434	0.340	0.523	0.438
Heptane	0.102	0.282	0.229	0.305	0.258
3-Methyl-1,4-heptadiene	0.335	0.884	0.925	1.371	0.933

※値は内部標準に対するピーク面積比

※—は検出限界以下

した糠さんまでは、エステルや短鎖脂肪酸が多く含まれていると考えられた。

以上のことから、ホエイを糠床に用いることで乳酸菌による発酵が促進され、塩水の糠床よりも短時間で熟成が進み、呈味成分や香気成分を多く含む糠さんが製造できることが明らかとなった。

要 約

チーズホエイを使用した糠床と従来の糠床（チーズホエイ不使用：塩水糠床）を調製して、水産糠漬け製品の糠さんまの試作を行い、糠床および糠さんまの微生物菌叢や遊離アミノ酸などの呈味成分の比較を行った。その結果、ホエイを使用した糠床は、ホエイ由来の乳酸菌が付加され、9日間の糠漬け期間中も糠床中で優勢に存在していることが明らかとなった。また、ホエイを使用した糠床で製造した糠さんまは、従来の方法で製造した糠さんまよりも、遊離アミノ酸やエステルなどの揮発性成分が多く含まれており、短時間の糠漬け期間で、風味成分を多く含有させることが可能であった。

文 献

- 1) 坂野弘一, (2011), 製品素材としての新しいホエーの機能と利用, 乳業技術, **61**, 1-12.
- 2) 清澤功, (2002), ホエータンパク質濃縮物とその機能性に関する最近の研究動向, Milk Science, **51**, 1, 13-26.
- 3) 今井哲也, (2007), ホエータンパク質の健康機能と利用, Milk Science, **55**, 4, 227-235.
- 4) 福田裕, 山澤正勝, 岡崎恵美子編, (2005), 「全国水産加工品総覧」(光琳, 東京), 387-394.
- 5) (社) 日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会編, (1996), 遊離アミノ酸測定用試料溶液調整法, 「新・食品分析法」, (光琳, 東京), 499-504.
- 6) 中川良二, 濱岡直裕, (2013), 知床自生果実から分離した酵母によるワインの試作, 北海道立総合研究機構食品加工研究センター研究報告, **10**, 17-21.
- 7) 佐々木茂文, 田中彰, (2015), ホエイを活用したホッケのにおい低減技術の開発, 戦略研究報告書 北海道の総合力を活かした付加価値向上による食産業活性化の推進, 92-95.
- 8) 百木華奈子, 駒野小百合, 小林恭一, 谷政八, (2009) 鯖糠漬 “へしこ” からの乳酸菌の分離と発酵微生物の変化, 仁愛女子短期大学研究紀要, **41**, 43-50.
- 9) 久田孝, 宮本浩衣, 坂尻誠, 安藤琴美, 矢野俊博, (2001), 石川県で製造された魚介類の糠漬け製品中の微生物フローラ, 日水誌, **67**, 2, 296-301.
- 10) 阪本直茂, 中山二郎, (2011), 糠床のミクロフローラと乳酸菌の共生, 生物工学, **89**, 8, 482-485.
- 11) 中川良二, 能登裕子, 八十川大輔, 釜谷豊和, (2007), 八分乾ミガキニシン製造工程における菌叢変化, 日食誌, **54**, 1, 26-32.
- 12) 張俊明, 大島敏明, 小泉千秋, (1991), いわし糠漬けの脂質, 遊離アミノ酸および有機酸組成について, 日食誌, **57**, 8, 1579-1585.
- 13) Mansur, M.A., Bhadra, A., Takamura, H. and Matoba, T., (2003), Volatile flavor compounds of some sea fish and prawn species. *Fisheries Science*, **69**, 864-866.
- 14) 平塚聖一, 青島秀治, 小泉鏡子, 加藤登, (2011), カツオ血合肉の貯蔵中における揮発性成分の変化, 日水誌, **77**, 6, 1089-1094.
- 15) 乳酸菌研究集談会, (1996), 「乳酸菌の科学と技術」, (学会出版センター, 東京) 197-205.
- 16) 堤浩子, (2011), 清酒酵母の香気生成の研究, 生物工学, **89**, 12, 717-719.
- 17) 笠原賀代子, 西堀幸吉, (1981), 糠漬イワシの香気成分, 日水誌, **47**, 1, 121-125.