

## 醤油麴を用いて製造したニギス魚醤油および 蒲鉾製造ロス醤油の発酵初期に起こるタンパク質の分解について

舊谷亜由美,<sup>1</sup> 船津保浩,<sup>2</sup> 小善圭一,<sup>3a</sup> 原田恭行,<sup>3</sup>  
高野隆司,<sup>4</sup> 矢野 豊,<sup>1b</sup> 里見正隆<sup>1\*</sup>

(2011年12月28日受付, 2012年4月20日受理)

<sup>1</sup>海水産総合研究センター中央水産研究所, <sup>2</sup>酪農学園大学 食と健康学類,  
<sup>3</sup>富山県農林水産総合技術センター食品研究所, <sup>4</sup>梅かま

Proteolytic process of two fish sauce mashes prepared from deepsea smelt and waste  
from *kamaboko* processing using soy sauce *koji* mold in the early stage of fermentation

AYUMI FURUTANI,<sup>1</sup> YASUHIRO FUNATSU,<sup>2</sup> KEI-ICHI SHOZEN,<sup>3a</sup> YASUYUKI HARADA,<sup>3</sup>  
TAKASHI TAKANO,<sup>4</sup> YUTAKA YANO<sup>1b</sup> AND MASATAKA SATOMI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Yokohama, Kanagawa 236-8684,

<sup>2</sup>Department of Food Science and Human Wellness, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501,

<sup>3</sup>Food Research Institute, Toyama Prefectural Agricultural, Forestry & Fisheries Research Center, Yoshioka,  
Toyama 939-8153, <sup>4</sup>Umekama Inc., Kainasaki, Toyama 939-3552, Japan

To clarify the pattern and process of protein degradation of fish sauce mashes containing salt and *koji* mold, and deepsea smelt *Glossanodon semifasciatus* or wastes from *kamaboko* processing, which have already been heated during the process of making *kamaboko*, the production of degradation products during fermentation was studied. The liquefaction ratio in deepsea smelt and wastes mash increased markedly during 7 days of fermentation. The insoluble protein content of both mashes also decreased rapidly with the liquefaction despite the difference in main material. These results suggest that the rapid protein degradation in both mashes at the early stage of fermentation could be caused by the *koji* mold rather than endogeneous digestive enzymes contained in viscera of fish. According to SDS-PAGE analysis, the disappearance of protein components and the production of low-molecular-weight components which could not be separated by 12.5% polyacrylamide gel during the fermentation period were different between the two mashes. Moreover, the content of free amino acids in deepsea smelt mash was higher than that in wastes mash. As a result, the production and accumulation of low-molecular-weight protein and free amino acids in fish sauce mash were affected by the characteristics of protein in the main material.

キーワード：蒲鉾ロス, 魚醤油, 醤油麴, タンパク質分解, 遊離アミノ酸

魚醤油は我が国の伝統的な水産発酵食品の一つで、一般的に魚介類に多量の食塩を添加して、魚肉および内臓の内在性自己消化酵素および微生物を作用させて、1年から数年間自然発酵させることにより製造されている。近年では、魚醤油独特の風味の良さが注目され、使用用

途が拡大するとともに需要が増加傾向にある。一方、近年の水産資源の減少にともなう沿岸・沖合域での漁業生産量の低下から、低未利用魚を用いた水産加工品の開発が全国的に行われている。その一環として、低利用魚を主原料に用いて醤油麴を添加した速醸魚醤油についても数多く製造されている。<sup>1-8)</sup> その中で、Taira *et al.*<sup>8)</sup> は醤

\* Tel : 81-45-788-7669. Fax : 81-45-788-5001. Email : msatomi@affrc.go.jp

<sup>a</sup> 現所属：富山県農林水産部水産漁港課 (Fisheries and Fishing Port Division of Agriculture, Forestry and Fisheries Department Toyama Prefectural Government, Shin-Sogawa, Toyama 930-8501, Japan)

<sup>b</sup> 現所属：海水産総合研究センター北海道水産研究所 (Hokkaido National Research Institute, Fisheries Research Agency, Sapporo, Hokkaido 062-0922, Japan)

油麹を添加したトビウオ、シイラおよびニギス魚醤油もろみではそれらの総窒素量、遊離アミノ酸 (FAA) 総量および有機酸量が発酵開始から 14 日までに増加し、これに続いて、発酵 14 日目を以降に好塩菌数および高度好塩菌数が増加すると報じている。これらの結果は、醤油麹を用いた魚醤油では、発酵に重要とされる好塩性乳酸菌が増殖する前に、タンパク質の分解が速やかに起こることを示唆するものである。これまでの速醸魚醤油に関する報告<sup>1-8)</sup>は、魚醤油もろみの化学成分の変化や微生物の菌叢の変化について検討したものが多く、魚醤油の発酵にともなうタンパク質の分解については、研究例が少なく未だに不明な点が多いのが現状である。さらに、魚醤油の発酵は長期に亘ることから、試料を採取する間隔も長期のため、魚醤油もろみの発酵初期に起こる変化については極めて知見が少ない。しかし、魚醤油の呈味有効成分<sup>9)</sup>である FAA は、タンパク質の分解によって生成することから、発酵初期におけるタンパク質の分解過程と分解様式を明らかにし、その制御を図ることは魚醤油の品質向上に重要であると考えられる。

また、水産加工残渣の低減および再利用を目的として、残滓から魚醤油を製造する試みが数多く行われている。<sup>10-12)</sup>しかし、練り製品の製造時に発生する規格外品等の蒲鉾製造ロス (以下、単にロスとする) については成分や形態が多様であることから、一律的な方法による再利用や再資源化に向けた取り組みはほとんどみられない。このような背景から、小善ら<sup>13)</sup>はロスに醤油麹を添加した発酵様調味料 (以下、単にロス醤油とする) を試作し、発酵にともなう品質変化を検討した結果、ロス醤油もろみとニギス魚醤油もろみでは、発酵中に起こる成分変化の様相が異なること、また、ロス醤油はニギス魚醤油と比較して最終製品の FAA 総量が少ないことを明らかにしている。しかし、ロス醤油の発酵中に起こるタンパク質の分解過程についても、その詳細は明らかではない。

そこで本研究では、まず、醤油麹を用いてニギス魚肉を主原料とした魚醤油もろみを調製し、それらの発酵にともなう起こるタンパク質の分解を、特に発酵初期に注目して詳細に追跡した。さらに、ニギスと同様にロス

醤油もろみを調製し、原料の異なる魚醤油もろみにおけるタンパク質の分解過程について比較検討した。

試料および方法

**魚醤油もろみの調製** 富山湾で漁獲されたニギス *Glossanodon semifasciatus* を魚醤油の原料とした。漁獲後、凍結保存したニギスを流水解凍し、採肉機を用いて挽き肉とした (頭部と内臓を含む)。Table 1 に示す配合でフードミキサーを用いてニギス挽き肉、醤油麹、食塩 (並塩) および水を混合してニギス魚醤油もろみ (以下、ニギス区) を調製した。また、採肉機を用いてロスを細切し、ロス醤油もろみ (以下、ロス区) を Table 1 の配合に従って調製した。醤油用乳酸菌には *Tetragenococcus halophilus* (株ビオック) を用いた。調製したもろみは 25°C 下で 70 日間発酵させ、経時的に採取し、以下に示す分析に供した。

**液化率の測定** 採取したもろみを 4°C で 15,880 × g で 30 分間の遠心分離に供し、上清画分と沈殿画分に分離した。得られた上清画分の重量を測定し、遠心分離前のもろみの重量から以下の式によりもろみの液化率を算出した。

$$\text{液化率 (\%)} = \frac{\text{遠心分離後の上清重量 (g)}}{\text{遠心分離前のもろみ重量 (g)}} \times 100$$

液化率は各試験区もろみの分解の程度を表す指標とした。

**もろみの可溶性および尿素-SDS 混液可溶性タンパク質量の測定** 発酵中にもろみで起こるタンパク質成分の変化を調べるために、各試験区のもろみを、沼倉ら<sup>14)</sup>の方法に準じて可溶化した。すなわち、もろみ約 0.4 g に 7.5 mL 尿素-SDS 混液 (8 M 尿素-2% SDS-2% 2-メルカプトエタノール-20 mM Tris-HCl [pH 8.0]) を加え、100°C で 2 分加熱後、冷却し、室温で約 24 時間攪拌溶解した。溶解後、3,000 × g で 15 分間の遠心分離によって得られた上清を尿素-SDS 混液可溶性画分とした。なお、尿素-SDS 混液可溶性画分中のタンパク質は、蒸留水で希釈し、等量の 15% トリクロロ酢酸を加えて 30 分静置した後、遠心分離に供して沈殿させた。沈殿したタンパク質は風乾後、1 N NaOH で溶解し Biuret 法<sup>15)</sup>により定量した。また、もろみの沈殿画分

**Table 1** Ingredient composition for two fish sauce mashes prepared from deepsea smelt and waste from *kamaboko* processing (kg)

	Minced meat of deepsea smelt	Waste from <i>kamaboko</i>	<i>Koji</i> mold*1	Salt	Water	Lactic acid bacteria*2
Deepsea smelt sauce mash	260	—	40	66	86	—
Waste sauce mash	—	40	6	10	13	0.006

\*1 The *koji* mold was prepared by incubating 1 : 1 mixture of steamed defatted soy bean and roasted wheat with *Aspergillus oryzae* (Bio'c, Toyohashi, Japan).

\*2 *Tetragenococcus halophilus* (Bio'c, Toyohashi, Japan)

についても上記と同様の処理を行い, タンパク質量を測定した。

**SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)** もろみ中のタンパク質成分組成の変化を検討するために, 尿素-SDS 混液可溶性画分を Laemmli<sup>16)</sup>の方法に準じて SDS-PAGE 分析に供した。12.5% プレキャストゲル (e-PAGEL E-T12.5L, ATTO) を用いて泳動を行い, タンパク質バンドの染色には Coomassie Brilliant Blue R250 を用いた。

**PCA 可溶性タンパク質量** 各試験区のもろみ 2.5 g に終濃度で 5% となるように過塩素酸 (PCA) を加えてホモジナイザーで磨砕した。得られたホモジネートを 15,880 × g で 30 分間の遠心分離に供して, 上清を回収した。さらに, 沈殿に 5% PCA 溶液を加えて, 同条件でホモジナイズおよび遠心分離を行った。得られた上清を先の上清と併せて混合し, pH を 7.0 ± 0.1 に調整後, 100 mL に定容して PCA 抽出液とした。PCA に可溶性低分子量のタンパク質量の変化を検討するために, PCA 抽出液のタンパク質濃度を Lowry 法<sup>17)</sup>により測定した。

また, PCA に可溶性タンパク質の分子量組成を検討するために, 前出の PCA 抽出液を分子量分画に供した。すなわち, 抽出液の一部を遠心チューブ型の限外濾過膜 [分画分子量 (MWCO) 10,000, Vivaspin 6-10 k, Sartorius] に移し, 遠心分離した。得られた濾液をさらに同型の限外濾過膜 (MWCO 5,000, Vivaspin 6-5 k, Sartorius) に移し, 遠心分離して得られた濾液を同様に限外濾過膜 (MWCO 3,000, Vivaspin 6-3 k, Sartorius) に移して遠心分離に供した。限外濾過膜を通過しなかった画分および MWCO 3,000 の限外濾過膜を通過した濾

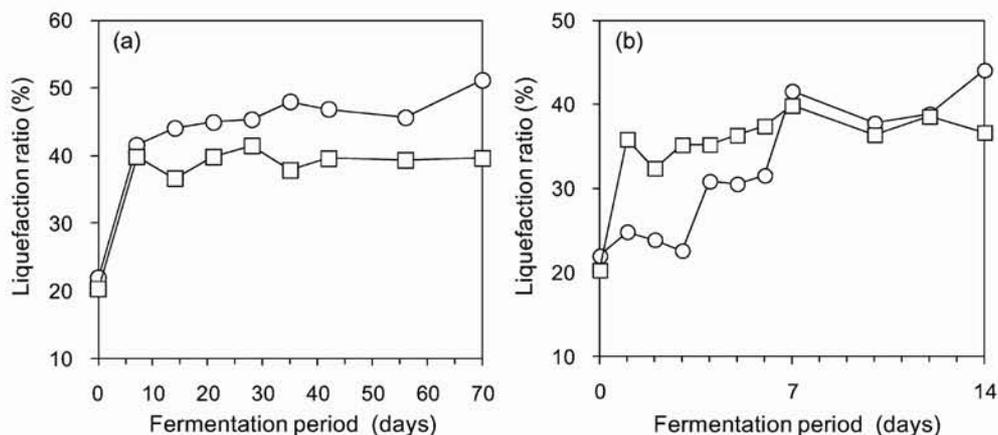
液について定容し, PCA 抽出液と同様にそれらのタンパク質濃度を Lowry 法<sup>17)</sup>を用いて測定した。

**遊離アミノ酸 (FAA) 量** 前出の PCA 抽出液の一部を 0.02 N HCl で希釈し, 孔径 0.45 μm のメンブランフィルター (DISMIC 13CP045AS, ADVANTEC) で濾過した。得られた濾液を全自動アミノ酸分析機 (JLC-500/V2, 日本電子株式会社) に供して, FAA をニンヒドリン法により測定した。

## 結 果

**発酵にともなうもろみの液化率の変化** ニギス区およびロス区の液化率を経時的に 70 日まで測定した結果を Fig. 1a に示す。発酵開始時の液化率はニギス区で 22%, ロス区では 20% であった。ニギス区の液化率は発酵 7 日目までに 42%, ロス区では 40% に上昇し, その後, ニギス区は緩やかに上昇して 70 日目には 51% に達したが, ロス区は 40% 程度で推移した。これらのことから, 本研究の発酵条件では発酵開始から 7 日目までに最も液化率が増加し, 発酵開始から極めて早い段階で液化率が増加した。そこで, 発酵 14 日までの液化率を詳細に測定した。その結果, ニギス区の液化率は発酵開始以降, 緩やかに増加したが, ロス区の液化率は発酵開始 1 日後に 36% まで大きく増加し, それ以降は大きく増加せず, 40% 程度で推移することが示された (Fig. 1b)。以上の結果より, ニギス区では発酵開始から緩やかに液化率が増加するが, ロス区では発酵開始後 1 日で液化率が約 2 倍まで増加した後はほとんど変化しないことから, それらのもろみでは発酵 1 日目における液化の進行が異なることが示された。

**原料が異なるもろみのタンパク質成分組成の変化** 魚



**Fig. 1** Changes in liquefaction ratio from fish sauce mashes during fermentation.

The weight of the supernatant obtained by centrifugation of fish sauce mashes prepared from deepsea smelt (○) or wastes from kamaboko processing (□) was measured. The liquefaction ratio was calculated as weight percentage of fish sauce mash. The changes in liquefaction ratio throughout the fermentation and those in the early stage of fermentation are depicted in (a) and (b), respectively.

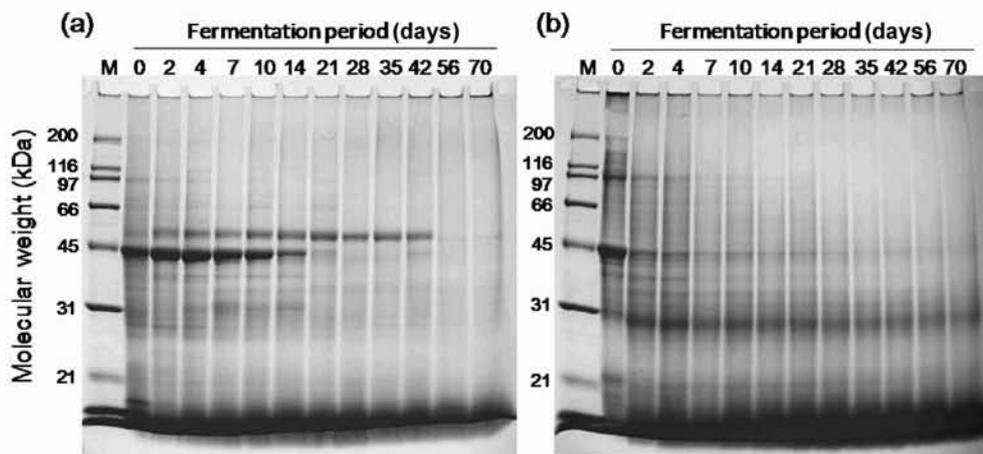
醤油もろみの液化の進行には、それらの主原料である原料タンパク質の分解が関与していると考えられた。そこで、ニギス区とロス区で起こるタンパク質の分解をその組成の変化から比較するために、両試験区のもろみに尿素-SDS 混液を加えてそれらに溶解する尿素-SDS 混液可溶性画分を回収し、SDS-PAGE に供した (Fig. 2a, b)。なお、尿素-SDS 混液可溶性画分から TCA (終濃度 7.5%) で沈殿するタンパク質を回収してタンパク質量を測定し、本研究ではそれらの量を尿素-SDS 混液可溶性タンパク質量とした。両試験区の尿素-SDS 混液可溶性タンパク質量は発酵期間の経過とともに大きく減少した (結果は図示しない)。そのため、本研究では両試験区のもろみのタンパク質成分で起こる変化を追跡するために、SDS-PAGE に供する試料の尿素-SDS 混液可溶性タンパク質濃度を一定に調整してタンパク質組成の変化を調べた。

ニギス区では、発酵開始時における主要なタンパク質成分は 45 kDa に検出され、45 kDa からゲル下端までに無数のバンドが認められた (Fig. 2a)。また、わずかではあるが 97 kDa 付近にもタンパク質成分がみられた。また、開始時にはほとんどみられなかった 45~66 kDa に、1 日目以降からバンドが検出され、それらは発酵 42 日目まで存在していた。45~20 kDa のバンドも発酵にともなって緩やかに消失する傾向が見られ、14 日目以降には発酵開始時に検出されたバンドの大部分が消失した。それらの消失にともなってゲル下端の分離できない低分子成分が増加することも示された。

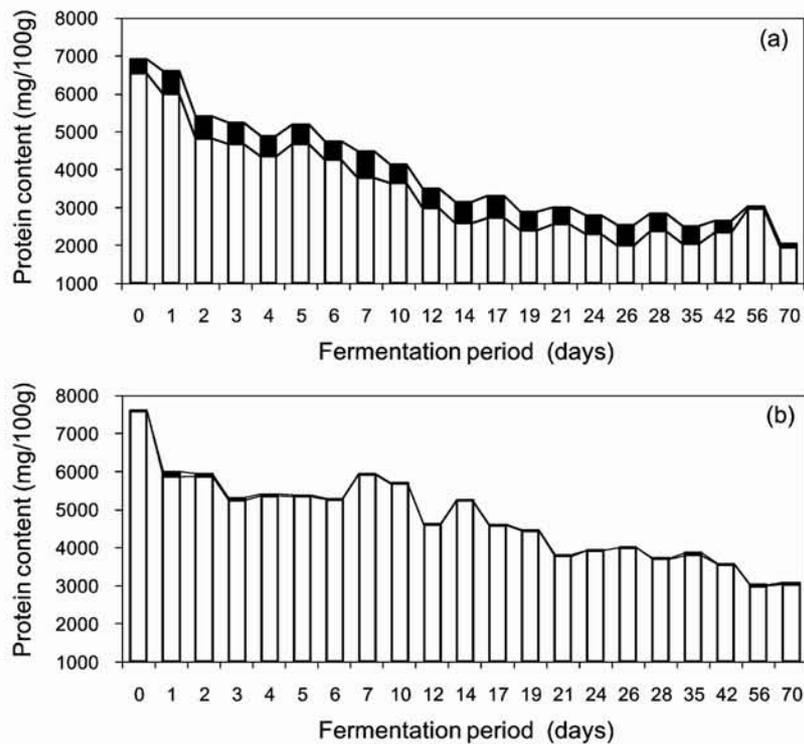
一方、ロス区では発酵開始時にはゲル上端から下端ま

で無数のバンドが検出されたが、発酵 1 日目からゲル上端および 200~100 kDa にみられた成分が消失した (Fig. 2b)。さらに 97~45 kDa にみられたバンドも 4 日目以降には消失した。しかし、発酵 1 日目以降から 31 kDa のバンドが濃くなり、発酵後期まで検出された。45 kDa 以上のバンドの消失にともなって、発酵 7 日目以降からゲル下端の分離できない低分子成分が増加した。以上の結果より、ニギス区とロス区ではタンパク質の分解過程が明らかに異なることが示された。その違いは特に発酵 70 日目において顕著であり、ニギス区ではほとんどのタンパク質成分が消失していたが、ロス区では 31 kDa 以下でタンパク質成分が検出された。

**魚醤油もろみの上清画分および沈殿画分中のタンパク質量の変化** Fig. 2 では、もろみ全体のタンパク質の変化を追跡した結果を示した。次に、もろみの上清画分および沈殿画分のタンパク質量を測定した。もろみを遠心分離に供して得られた上清画分に終濃度で 7.5% の TCA を加えて沈殿したタンパク質を回収し、Biuret 法<sup>15)</sup>を用いてタンパク質量を測定した。沈殿画分については尿素-SDS 混液を加えて溶解し、尿素-SDS 混液可溶性画分と同様にタンパク質量を測定した。ニギス区の結果を Fig. 3a に、ロス区の結果を Fig. 3b にそれぞれ示す。ニギス区では発酵開始時のもろみの上清画分には、もろみ 100 g あたり 386 mg のタンパク質が含まれ、この量は上清画分および沈殿画分のタンパク質総量に対して約 5% 程度であった (Fig. 3a)。その後、35 日目までニギス区の上清画分中のタンパク質量は約 500 mg/100 g で推移し、56 日目および 70 日目には、それ



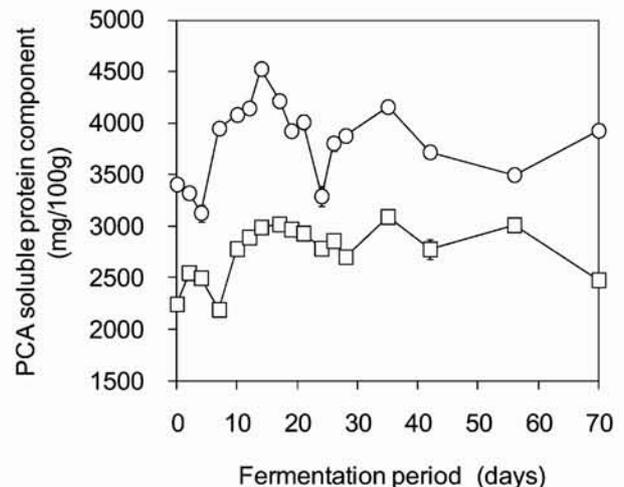
**Fig. 2** Changes in SDS-PAGE pattern of solubilized protein from fish sauce mashes during fermentation. The fish sauce mashes (approx. 0.4 g each) prepared from deepsea smelt (a) or waste from *kamaboko* processing (b) were solubilized with 2% SDS-8 M urea-2% mercaptoethanol-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) by heating at 100°C for 2 min, followed by stirring at room temperature for 24 hours. After centrifugation at 3,000 × g for 15 min, the supernatant was applied to SDS-PAGE analysis by using 12.5 % polyacrylamide gel with a constant protein content (30 μg/well). The protein concentration of supernatant was determined by the Biuret method<sup>15)</sup> and plotted against the fermentation period. The protein components in the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R 250. M: molecular weight marker.



**Fig. 3** Changes in soluble and insoluble protein contents in fish sauce mashes during fermentation. The fish sauce mashes prepared from deepsea smelt (a) or wastes from *kamaboko* processing (b) were separated into supernatant and precipitate by centrifugation at  $15,880 \times g$  for 30 minutes. A portion of precipitate (approx. 0.4 g each) was solubilized with 2% SDS-8 M urea-2% mercaptoethanol-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) as in Fig. 2. It was then centrifuged at  $3,000 \times g$  for 15 min and solubilized protein concentration ( $\square$ ) was determined by the Biuret method.<sup>15)</sup> The protein concentration of the supernatant of the fish sauce mash ( $\blacksquare$ ) was collected by adding trichloroacetic acid (final conc. 7.5%) and determined by the Biuret method<sup>15)</sup>.

それぞれ 73 mg/100 g および 96 mg/100 g まで減少した。これに対してロス区では発酵開始時のもろみの上清画分のタンパク質量はわずかに 5 mg/100 g であり、タンパク質の総量に対する割合は 0.1% にも満たなかった (Fig. 3b)。ロス区の上清画分に含まれるタンパク質量は発酵 1 日目に 133 mg/100 g に増加したが、それ以上の増加は発酵期間を通じてみられず、発酵 4 日目から 28 日目まで 20~40 mg/100 g で推移し、70 日目の値は 50 mg/100 g であった。発酵開始時のニギス区およびロス区の沈殿画分に含まれるタンパク質量は、それぞれ 6546 および 7592 mg/100 g であった。ニギス区の沈殿画分中のタンパク質量は発酵 14 日目までに大きく減少し発酵開始時の約 40% になったが、その後はほとんど変化しなかった。ロス区の上清画分のタンパク質量は 21 日目に開始時の約 50% (3769 mg/100 g) まで大きく減少し、21 日目を以降も緩やかに減少して 70 日目には開始時の約 40% に相当する 3035 mg/100 g を示した。

**発酵にともなう PCA 可溶性タンパク質成分量およびその組成の変化** 次に、分解産物の分子量分布を明らかにするために、まず、ニギス区およびロス区から PCA 抽出液を調製し、それらに含まれる低分子の PCA 可溶



**Fig. 4** Changes in protein contents in perchloric acid extracts from fish sauce mashes during fermentation. The extracts were prepared from two different fish sauce mashes with 5% perchloric acid (PCA). The protein concentrations of PCA extracts were determined by Lowry's method<sup>17)</sup> and plotted against the fermentation period. Symbols are the same as in Fig. 1.

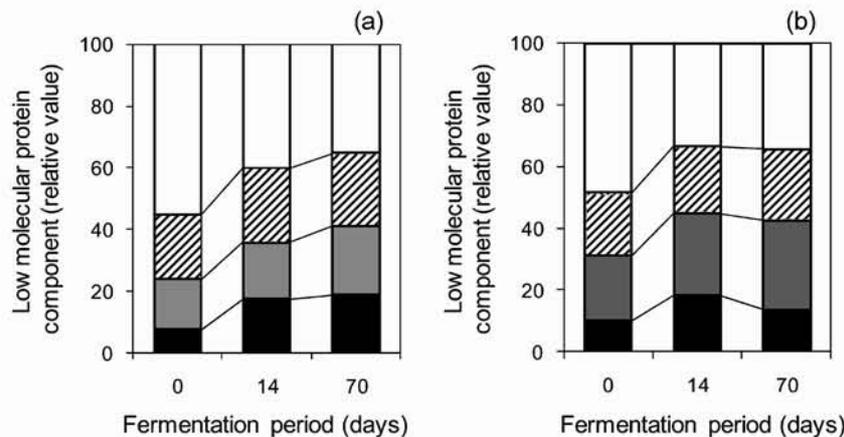
性タンパク質成分の量を測定した (Fig. 4)。発酵開始時におけるニギスおよびロス区の PCA 可溶性タンパク質成分量は、それぞれ 3405.68 および 2242.61 mg/100 g であった。発酵にともなってニギス区とロス区の PCA 可溶性タンパク質成分量はいずれも複雑に増減することが示された。そこで、PCA 可溶性タンパク質成分量を開始時のそれらに対する相対値 (%) として算出した。その結果、ニギス区の PCA 可溶性タンパク質成分量は発酵 4 日目に開始時の 92% に減少し、その後 14 日まで増加して 133% を示した。24 日目に 97% に減少した後は 100~120% 程度で推移した。一方、ロス区の PCA 可溶性タンパク質成分量は発酵開始より増加し、7 日目に一旦 98% まで減少したが、その後は 130% 程度で推移した。以上の結果から、発酵開始よりニギス区の PCA 可溶性タンパク質成分量は増減が大きく、ロス区ではその傾向がやや小さいことが示された。また、発酵 70 日目における PCA 可溶性タンパク質成分量はニギス区で 115%、ロス区では 110% であった。

さらに、それらの PCA 可溶性タンパク質の分子量分布について調べた。すなわち、両試験区の発酵 0 日、14 日および 70 日目の PCA 抽出液について、分子量画分に供して得られた 4 つの異なる分子量画分 (<3,000, 3,000<5,000, 5,000<10,000, >10,000) に含まれるタンパク質量を測定し、それらの総量に対する相対値 (%) を算出した (Fig. 5a, b)。まず、発酵開始時におけるニギス区の PCA 可溶性タンパク質成分中には分子量 10,000 以上の成分が 55% を占めていたが、14 日目には 40% となり、さらに 70 日目には 35% と相対的に減少した (Fig. 5a)。このとき、分子量 10,000>5,000 画分の成分は発酵開始時で 21%、14 日目および 70 日目

はいずれも 24% であった。これに対して、発酵 0, 14 および 70 日目における分子量 5,000>3,000 画分のタンパク質成分の割合はそれぞれ 16, 18 および 22% を示し、分子量 3,000 以下の画分のタンパク質成分の割合はそれぞれ 8, 17 および 19% であり、発酵にともなって低分子量の画分が増加する傾向がみられた。

一方、ロス区では発酵開始時には PCA 可溶性タンパク質成分総量の 49% を分子量 10,000 以上の成分が占めていたが、14 日目および 70 日目にはそれらの割合がそれぞれ 33% および 34% に減少した (Fig. 5b)。これにともなって、14 日目における 5,000>3,000 画分および 3,000 以下の画分のタンパク質成分の割合が発酵開始時よりもそれぞれ 6% および 8% 増加した。発酵 70 日目ではロス区の PCA 可溶性タンパク質成分のうち分子量 3,000 以下の画分の割合が 13% まで減少したが、分子量 10,000>5,000 画分および 5,000>3,000 画分の割合は合計で 52% であった。したがって、ニギス区およびロス区のいずれの場合も発酵にともなって PCA 可溶性タンパク質の量が変化するだけでなく、その分子量分布も変化し、低分子化する傾向にあることが示された。

**発酵にともなう FAA 量の変化** タンパク質の分解過程と最終生成物の FAA の生成との関係を調べるために、ニギス区およびロス区のもろみに含まれる FAA 総量の発酵にともなう変化を検討した。その結果を Table 2 に示す。ニギス区における発酵開始時の FAA 総量は 1513 mg/100 g であったが、発酵 7 日目には約 2 倍に、28 日目には約 3.3 倍に増加したが、その後の増加は緩やかで 70 日目には発酵開始時の約 4.3 倍の 6615 mg/100 g となった。70 日目のニギス区における主要な FAA はグルタミン酸、リジン、およびロイシンであ



**Fig. 5** Changes in molecular weight distribution of PCA soluble protein in the fish sauce mashes during fermentation. PCA extract prepared from deepsea smelt (a) or wastes from *kamaboko* processing (b) were fractionated depending on the molecular weight by an ultrafiltration membrane. The protein concentration of each fraction was determined by Lowry's method.<sup>17)</sup> The ratio of fraction was estimated based on the total protein content of the PCA extract. (a), deepsea smelt; (b), *kamaboko* waste: ■, <3,000; ■, 3,000<5,000; ▨, 5,000<10,000; □, >10,000.

**Table 2** Free amino acid composition of deepsea smelt sauce and waste sauce mashes during fermentation (mg/100 g)

Fermentation period (days)	Deepsea smelt mash					Waste sauce mash				
	0	7	14	28	70	0	7	14	28	70
Taurine	83	79	89	74	89	10	9	12	12	24
Asparagine	65	157	300	389	543	50	81	136	182	117
Threonine	65	139	250	281	338	24	48	82	106	159
Serine	66	150	250	283	355	31	63	102	129	181
Glutamic acid	151	317	523	627	968	499	547	714	758	968
Glycine	31	58	99	120	178	162	166	212	218	256
Alanine	104	209	328	352	539	56	99	159	195	382
Valine	75	170	277	318	439	33	67	111	140	207
Cystine	5	2	7	18	25	ND	6	8	6	ND
Methionine	40	119	122	130	195	29	64	105	120	150
Isoleucine	76	170	276	301	416	34	71	114	143	203
Leucine	176	357	533	525	699	93	185	278	323	429
Tyrosine	86	159	235	212	224	33	75	113	137	177
Phenylalanine	81	172	247	249	352	30	64	99	116	153
Ornithine	3	2	3	2	179	ND	ND	ND	ND	192
Lysine	191	357	525	537	714	95	186	277	319	419
Histidine	24	56	94	105	3	7	19	35	48	68
Arginine	152	282	399	396	193	60	130	203	238	52
Proline	41	61	92	103	166	20	33	48	59	86
Total	1513	3016	4646	5022	6615	1267	1912	2808	3249	4225

ND: not detected.

り, 総量に占めるそれらの割合はそれぞれ 14.6%, 10.8% および 10.6% であった。

一方, ロス区における発酵開始時の FAA 総量は 1267 mg/100 g であり, 14 日目には 2.2 倍に, 28 日目には 2.6 倍まで増加した。70 日目のロス区における FAA 総量は発酵開始時の 3.3 倍の 4225 mg/100 g を示した。発酵 70 日目のロス区の主要な FAA はニギス区と同様にグルタミン酸, リジン, およびロイシンであるが, それらの割合は異なり, それぞれ 22.9%, 9.9% および 10.2% であった。また, ニギス区では主要 FAA に続いてアスパラギン酸およびアラニンの占める割合が高かったが, ロス区ではアラニンおよびグリシンが高かった。以上の結果より, ロス区においてもニギス区と同様に FAA 総量が増加するが, 発酵期間を通じてニギス区よりも低値を示し, FAA の組成も異なることが示された。

## 考 察

本研究では, ニギスまたはロスに醤油麹を添加して調製したもろみの発酵中に起こるタンパク質の分解過程を比較検討した。その結果, ニギス区およびロス区のいずれにおいても発酵開始直後から原料由来のタンパク質が速やかに分解されるが, その詳細は異なった。

まず, ニギス区ではもろみの液化率が発酵 7 日目までに開始時の約 2 倍に上昇し (Fig. 1b), もろみ中の尿素-SDS 可溶性画分ではタンパク質成分のバンドが消失した (Fig. 2a)。さらに, 液化率の増加と対応してもろみ中の沈殿画分の尿素-SDS 混液可溶性タンパク質量も大きく減少した (Fig. 3a)。沈殿画分の尿素-SDS 混液可溶性タンパク質量の減少は, それらのタンパク質が低分子ペプチドや FAA に分解されたことを示し, タンパク質の低分子化がもろみの液化を引き起こしていることが示唆された。ニギス区の沈殿画分中にはかなりの量の筋原繊維 (Mf) タンパク質が不溶化して存在することが推察された。また, 発酵開始時におけるもろみの尿素-SDS 混液可溶性画分の SDS-PAGE 図型から, Mf タンパク質の主要成分であるミオシン重鎖 (200 kDa) は全く検出されず, 97 kDa 以下の成分が多数存在していた (Fig. 2a)。そこで, 原料のニギス背側筋肉に尿素-SDS 混液を加えて溶解させ, SDS-PAGE に供した結果, ミオシン重鎖とアクチン (42 kDa) に相当するバンドが検出された (結果は図示しない)。そのため, ニギス魚肉の Mf タンパク質がもろみを調製するより以前に塩溶解性を喪失していることやタンパク質分解酵素による分解を受けている可能性は非常に小さい。このことから, ニギスから挽き肉を調製した際に内臓に含まれる

タンパク質分解酵素によって魚肉タンパク質の大部分が分解された可能性が高い。しかし、ニギス区の上清画分にはタンパク質成分がわずかしか存在せず、さらに、もろみの調製過程では約15%の食塩が添加されていることから、もろみ中ではタンパク質の分解反応とともに、未分解のタンパク質や分解したタンパク質成分による凝集反応も進行して不溶化している可能性が考えられる。ニギス区のもろみの沈殿画分におけるタンパク質凝集体の存在量や構造状態およびタンパク質分解酵素による凝集体の分解の詳細については本研究の結果からは明らかではないため、今後の検討が必要である。

原料由来の魚肉タンパク質が発酵開始から速やかに分解され低分子化することが明らかとなったが、発酵にもなうそれらの分解産物の挙動、すなわち低分子量のタンパク質やポリペプチドを含むペプチドの挙動については、それらの機能性に関するものを除けば研究例は極めて少ない<sup>18)</sup>。そこで、本研究ではもろみのPCA抽出液に含まれるタンパク質成分量を検討した結果、ニギス区におけるPCA可溶性のタンパク質成分量は発酵期間中に定常状態になることなく増減を繰り返して変動した(Fig. 4)。この結果は、タンパク質分解酵素の作用によってもろみ中のタンパク質、特に沈殿画分中の不溶性タンパク質からのPCA可溶の低分子成分の生成が起ると同時に、未分解のタンパク質やPCA可溶性のタンパク質成分の分解により、さらに段階的あるいは無作為に断片化して低分子ペプチドやFAAの生成が進行することを示唆している。そのため、タンパク質分解の中間生成物であるPCA可溶性タンパク質成分が蓄積しないものと考えられた。そこで、ニギス区におけるPCA可溶性タンパク質成分の分子量分布を検討したところ(Fig. 5a)、発酵開始から14日目までに分子量10,000以下の成分が減少するとともに、分子量3,000以下の成分が増加して、PCA可溶性タンパク質成分の低分子化が進行することが示された。しかし、発酵14日目と70日目のPCA可溶性タンパク質成分の分子量分布には大きな差異がみられなかった。この理由として、不溶性タンパク質の分解による低分子タンパク質(PCA可溶性タンパク質成分)の生成とPCA可溶性タンパク質成分の低分子ペプチドまたはアミノ酸レベルへの分解がもろみ中で同時に進行し、見かけ上、両者が平衡状態にある可能性が考えられた。このとき、ニギス区のFAA総量が発酵14日目以降において大きく増加したこともその可能性を裏付けるものである。

一方、ロス区では、発酵開始1日以内に液化率が著しく増加し、沈殿画分の尿素-SDS混液可溶性タンパク質量が大きく減少した(Fig. 1bおよびFig. 3b)。ロス区の主原料である規格外品はニギス区と異なり製造時に加熱されているため、魚肉由来の消化酵素は失活してい

る。これまでに、本研究で使用した*Aspergillus oryzae*と同じ黄麹菌である*Aspergillus sojae*には耐塩性の高いタンパク質分解酵素を産生する株が存在すると報じられている<sup>19)</sup>。さらに、林ら<sup>20)</sup>は、*A. sojae*が産生するアルカリプロテアーゼの活性は20%食塩の存在下においても60%程度が維持されることを報告していることから、ロス区の発酵初期におけるタンパク質の分解は*A. oryzae*が産生した耐塩性のタンパク質分解酵素の作用によって起こることが示唆された。麹由来のタンパク質分解酵素は、ニギス区でも同様に作用していると考えられるが、発酵開始直後の液化率の上昇や沈殿画分のタンパク質成分の減少の度合はニギス区よりもロス区で大きい。この結果は、魚肉あるいは内臓由来の消化酵素<sup>21)</sup>の活性が、高濃度の食塩存在下で大きく抑制されている可能性が高いというこれまでの報告<sup>22)</sup>と一致する。

ロス区では発酵2日目以降では沈殿画分中の尿素-SDS混液可溶性タンパク質量は緩やかに減少し(Fig. 3b)、液化率も同様に大きな上昇はみられなかった(Fig. 1b)。発酵7日目のニギス区およびロス区の液化率は同程度であるが、このときの両試験区のもろみの尿素-SDS混液可溶性のタンパク質成分組成は、原料タンパク質によって異なることがSDS-PAGE図型から明らかである(Fig. 2a, b)。特に、ゲル下端にみられる低分子成分は、ニギス区よりもロス区で蓄積し、発酵28日目以降においてその差は顕著であった。

そこで、ロス区のPCA可溶性タンパク質成分の分子量分布を検討したところ、ニギス区と同様に発酵14日目までに分子量10,000以下の成分の減少とともに、分子量3,000以下の成分が増加した(Fig. 5b)。さらに、発酵14日目と70日目を比較すると、ニギス区と同様にそれらの分子量分布に大きな差異はみられなかった。このとき、ニギス区ではFAA総量も発酵期間を通じて大きく増加したため(Table 2)、各種タンパク質成分の分解とそれらからのアミノ酸レベルへの分解が同時に進行している可能性が高いと推察された。しかし、ロス区ではニギス区よりもPCA可溶性のタンパク質成分量の増減の幅が小さく(Fig. 5)、FAAの増加率も小さい。小善ら<sup>13)</sup>は、醤油麹を用いてロスから製造したもろみのFAA総量の変化を検討し、発酵28日目までにFAA総量が約1.6倍に増加するが、その後発酵180日目まで大きく増加しないことを報じている。本研究のニギス区およびロス区においても、発酵開始からの14日間におけるFAA増加量はそれぞれ3106 mg/100 gおよび1541 mg/100 gであった(Table 2)。発酵14日目から70日目までの56日間でのFAA増加量はニギス区で1969 mg/100 g、ロス区では1417 mg/100 gで、14日目以降は緩やかに増加するとともに発酵期間を通じてロス区では遊離アミノ酸の増加率が低い傾向を示した。

以上の結果から、ロス区のもろみでは発酵開始時に麴由来のタンパク質分解酵素によってゲル化したタンパク質から低分子のタンパク質成分やポリペプチドへの分解およびそれらの分解による FAA の生成が速やかに進行するものの、麴由来のタンパク質分解酵素の作用が低下すると、最終生成物である FAA への分解が律速になり、低分子のタンパク質成分やポリペプチドがもろみ中に蓄積することが推察された。ニギス区では発酵後期においても魚肉あるいは内臓由来の消化酵素の作用によって低分子ペプチドや FAA への分解が緩やかに進行するため、FAA 総量の増加量がロス区よりも高いものと考えられる。さらに、魚肉あるいは内臓由来の消化酵素だけでなく、基質であるタンパク質量や成分組成の違い、加熱の有無による食塩や温度に対する影響の差異もタンパク質の分解や FAA 蓄積に影響を及ぼしていると考えられるため、ニギス区で起こるタンパク質の凝集と併せて今後の検討が必要である。

タンパク質の分解や FAA の生成に対して発酵微生物の関与も考えられるが、本研究では菌叢の主体となる好塩性乳酸菌の関与については直接検討していない。しかし、これまでに藤井ら<sup>23)</sup>は、イカ塩辛熟成中の FAA の生成における微生物の関与について研究し、FAA 生成に関して発酵微生物の役割は小さいと報じている。また、原田ら<sup>24)</sup>は、クエン酸処理した小アジを用いた魚味噌では微生物の増殖が抑制されるものの、FAA 量は対照区のそれと同程度であったと報じている。これらの一連の結果と本研究での好塩性乳酸菌が主体となるとされる<sup>9)</sup>発酵開始 28 日目以降にはいずれの試験区においても液化率がほとんど上昇せず、FAA の増加も緩やかに起こることを考慮すると、好塩性乳酸菌はタンパク質の分解への関与が低いことが推察される。しかし、ロス区の発酵 70 日目における FAA 組成は 28 日目と比較すると変化していた (Table 2)。以上のことから、もろみの発酵中に増殖したアミノ酸を資化する微生物によって FAA の組成が変化することが推察された。

本研究の結果から、醤油麴を用いた魚醤油の製造過程では、発酵基質の加熱の有無にかかわらず麴由来のタンパク質分解酵素の作用により速やかに原料タンパク質は分解されて低分子化するが、その分解産物の内訳や挙動は分解基質によって異なるとともに非常に複雑に進行することが明らかとなった。特に、FAA については麴由来のタンパク質分解酵素の作用が低下すると考えられる発酵後期においても緩やかに増加することから、FAA とともに発酵後期における種々の成分変化や品質形成に及ぼす麴菌や内在性の消化酵素および好塩性乳酸菌を含む微生物の役割について明らかにすることが、今後の研究で必要である。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご助言を頂いた福井県立大学海洋生物資源学部教授 大泉 徹博士に深く謝意を表します。また、本研究を行う上で補助して頂いた鮎水産総合研究センター中央水産研究所の坂井直枝・端野なおみの両氏に深謝します。本研究は、第 14 回うま味研究会研究助成の一環として実施した。ここに記して感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) 阿部憲治, 鈴木健治, 橋本周久. 南極オキアミ魚醤油の試作. 日本誌 1979; **45**: 1013-1017.
- 2) 堂本信彦, 王 鏗智, 森 徹, 木村郁夫, 郡山 剛, 阿部宏喜. 穀醤油醸造技術を応用した新規魚醤油の開発. 日本誌 2001; **67**: 1103-1109.
- 3) 船津保浩, 砂子良治, 小長谷史郎, 今井 徹, 川崎賢一, 竹島文雄. 醤油麴を用いて製造したマルソウダ魚醤油と国内産魚醤油および大豆こいくち醤油との呈味成分の比較. 日本誌 2000; **66**: 1036-1045.
- 4) 船津保浩, 川崎賢一, 小長谷史郎. 醤油麴を用いて製造したマルソウダ魚醤油と国内産魚醤油および大豆こいくち醤油との揮発性成分の比較, とくに匂いとの関係. 日本誌 2001; **67**: 1110-1119.
- 5) 竹島文雄, 鍋島裕佳子, 船津保浩, 川崎賢一. ブナザケを原料とした魚醤油の開発. 富山県食品研究所研究報告 2001; **4**: 1-8.
- 6) Osako K, Hossain M A, Kuwahara K, Okamoto A, Yamaguchi A, Nozaki Y. Quality aspect of fish sauce prepared from underutilized fatty Japanese anchovy and rabbit fish. *Fish. Sci.* 2005; **71**: 1347-1355.
- 7) Uchida M, Ou J, Chen B, Yuan C, Zhang X, Chen S, Funatsu Y, Kawasaki K, Satomi M, Fukuda Y. Effects soy sauce *koji* and lactic acid bacteria on the fermentation of fish sauce from freshwater silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Fish. Sci.* 2005; **71**: 422-430.
- 8) Taira W, Funatsu Y, Satomi M, Takano T, Abe H. Changes in extractive components and microbial proliferation during fermentation of fish sauce from underutilized fish species and quality of final products. *Fish. Sci.* 2007; **73**: 913-923.
- 9) Park J-N, Watanabe T, Endoh K, Watanabe K, Abe H. Taste-active components in a Vietnamese fish sauce. *Fish. Sci.* 2002; **68**: 913-920.
- 10) 船津保浩, 小長谷史郎, 加藤一郎, 竹島文雄, 川崎賢一, 井野慎吾. マルソウダ加工残滓から調製した魚醤油と数種アジア産魚醤油との呈味成分の比較. 日本誌 2000; **66**: 1026-1035.
- 11) 船津保浩, 加藤一郎, 川崎賢一, 小長谷史郎, 臼井一茂. マルソウダ加工残滓から調製した魚醤油と数種アジア産魚醤油との揮発性成分の比較. 日本誌 2001; **67**: 489-496.
- 12) 酒井 昇. 鮭, 鱈の加工残滓を原料とした調味料の製造方法並びに製品の特性. *BIO R & D* 1993; **10**: 763-771.
- 13) 小善圭一, 高野隆司, 里見正隆, 高橋 努, 船津保浩. 発酵中の魚醤油もろみの品質に及ぼす蒲鉾製造ロスの影響. 日本誌 2010; **76**: 1083-1085.
- 14) 沼倉忠弘, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一. 坐りによる肉糊のゲル形成とミオシンの交差結合反応. 日本誌 1985; **51**: 1559-1565.

- 15) Gornall A G, Bardwill C J, David M M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 1949; **177**: 751-765.
- 16) Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
- 17) Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; **193**: 265-275.
- 18) 道嶋俊英. 2.石川県の伝統食品：能登のイシル（魚醤油）のうま味と機能性(伝統食品の科学—ルーツ, おいしさ, 機能性—2). *日本味と匂学会誌* 2007; **14**: 95-104.
- 19) 原山文徳, 安平仁美. *Aspergillus* 属と *Rhizopus* 属の大豆蛋白分解作用の比較. *醸協* 1988; **83**: 828-833.
- 20) 林 和也, 寺田 勝, 水沼武二, 茂木孝也. 高濃度食塩存在下に於ける麹菌プロテアーゼの蛋白分解作用. *調味科学* 1974; **21**: 17-32.
- 21) Morioka K, Fujii S, Itoh Y, Liu C, Obatake A. Recovery of amino acid from the protein in the head and viscera of frigate mackerel by autolysis. *Fish Sci.* 1999; **65**: 588-591.
- 22) 山下倫明, 藤井建夫, 小長谷史郎. 熟成中のしょっつる諸味のプロテアーゼ. *中央水研研報* 1991; **2**: 25-31.
- 23) 藤井建夫, 松原まゆみ, 伊藤慶明, 奥積昌世. いか塩辛熟成中のアミノ酸生成における微生物の関与について. *日水誌* 1994; **60**: 265-270.
- 24) 原田恭行, 小善圭一, 里見正隆, 横井健二. 小アジを原料とした魚味噌の品質に及ぼすクエン酸処理の影響. *食科工* 2008; **55**: 25-31.