

pH 調整による魚醤油製造中のヒスタミン蓄積の抑制（ノート）

島岡啓一郎，野口絵理香，才津真子

Suppression of histamine accumulation in fish sauce production by pH adjustment

KEIICHIRO SHIMAOKA, ERIKA NOGUCHI AND MAKO SAITSU

魚醤油は魚肉等に高濃度の食塩を添加して、腐敗を抑制しながら発酵¹⁾させたもので、製造期間は1年以上²⁾を要する。近年は食塩だけを添加する伝統的な製法は減少傾向にあり、麴を添加する製法^{3,4)}が増加している。いずれも、豊富な遊離アミノ酸による濃厚な呈味性を有する。

魚醤油の優占菌種としては、好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* が知られているが、一部の菌株はアレルギー様食中毒の原因物質であるヒスタミン生成能を獲得し、ヒスタミン生成菌へと変質することが報告⁵⁾されている。ヒスタミン生成菌の作用で、魚醤油に高濃度のヒスタミンが蓄積⁶⁾する場合があります。問題となっている。その対策として、乳酸菌発酵スターターの利用等により、ヒスタミン蓄積を抑制する技術が開発⁴⁾されている。

一方、微生物の生育に大きく影響する要因の一つに pH があり、食品製造では pH 調整による微生物の制御が一般的に行われている。*T. halophilus* の増殖下限 pH は 5.0⁵⁾ であることから、麴を添加したもろみの pH を 5.0 以下に調整することで、魚醤油製造中のヒスタミン蓄積を抑制できるか検討した。また、3 種の有機酸で pH を調整したもろみから魚醤油を調製し、その品質を比較した。

材料と方法

もろみの調製 凍結保管していたマアジを流水解凍してミンチにし、マアジミンチ：乾燥米麴（秋田今野商店製）：蒸留水：塩化ナトリウムを 20：20：45：15 で混合して常温で一晩静置した。

もろみの pH 調整 塩酸で *T. halophilus* の増殖下限値よりも高い pH 5.1（高 pH 区）と低い 4.6（低 pH

区）に調整し、あらかじめ培養しておいたヒスタミン生成菌⁴⁾ (*T. halophilus*, FS-4 株) を 10^6 cfu/g になるよう添加して、30°C で 20 週間発酵させた。

また、発酵前のもろみにクエン酸（クエン酸区）、乳酸（乳酸区）、酢酸（酢酸区）を pH が 4.6 になるまで添加し、これを 30°C で 12 週間発酵させた。なお、有機酸を添加しないもろみを対照区とした。

pH の測定 もろみの pH は pH メーター（堀場製作所製）で測定した。

ヒスタミン生成菌数の測定 木村らの方法⁴⁾ に基づいて最確数 (MPN) 法で、ヒスタミン生成菌数を測定した。もろみを 9 倍量のヒスチジンプロスで希釈し、さらにヒスチジンプロスで段階希釈した。各希釈段について 3 本ずつ培養試験管を作成し、30°C で培養した。これらの濁度およびヒスタミン生成の有無を確認し、その陽性管数から最確数表によりヒスタミン生成菌数を算出した。

ヒスタミンの測定 不織布でろ過したもろみのろ液を沸騰水中で加熱後、遠心分離 (10,000×g, 30 分間) し、上清を純水で 50 倍に希釈して、0.22 μm のフィルターでろ過した。これをオルトフタルアルデヒドプレカラム蛍光誘導体化法により、HPLC（島津製作所製）で励起波長 330 nm, 蛍光波長 440 nm の吸光度を測定した。カラムは Kinetex 2.6 μm EVO C18 (150 mm×3 mm), 蛍光検出器は RF-20Axs を用い、カラム温度は 40°C, 移動相は 20 mmol/L リン酸カリウム緩衝液, アセトニトリル, メタノール混液を用いた。

遊離アミノ酸の測定 もろみの上清を蒸留水で 20 倍に希釈後、クエン酸ナトリウム緩衝液で 5 倍に希釈して 0.22 μm のフィルターでろ過し、全自動アミ

ノ酸分析機（日本電子製）で測定した。

測定結果は船津ら³⁾に準じて、うま味 (Asp+Glu)、苦味 (Arg+Lys+His+Phe+Leu+Ile+Met+Val+Tyr)、甘味系アミノ酸 (Pro+Thr+Ala+Gly+Ser) に分類した。

有機酸の測定 もろみの上清を純水で 20 倍に希釈後、0.22 μm のフィルターでろ過し、HPLC で測定した。カラムは Shim-pack SCR102-H (300 mm×φ8 mm)、検出器は CDD-10Avp、カラム温度は 40°C、流速は 0.8 mL/min、移動相は有機酸分析移動相（島津製作所製）を用いた。

官能検査 水産試験場の職員 17 名を対象に評点法で官能検査を行った。喫食前に色調および好ましい香り、喫食後に生臭さおよび呈味性（うま味、甘味、苦味、酸味）について、5 段階の評価尺度を設け、対照区を基準の 3 点とし、クエン酸区、乳酸区、酢酸区を評価した。結果は Steel-Dwass 法 ($p < 0.05$) により検定した。

結果

pH 発酵期間中の pH の推移を図 1 (A) に示す。高 pH 区では発酵が進むにつれ徐々に pH が低下し、ヒスタミン生成菌の生育限界値である 5.0 を下回ったのは 8 週目以降で、20 週目には 4.7 であった。低 pH 区では 8 週目まで 4.6~4.8 の間で変動した後、8 週目以降徐々に減少し、20 週目には 4.5 であった。

ヒスタミン生成菌数 ヒスタミン生成菌数の推移を図 1 (B) に示す。高 pH 区では 4 週目に 9.3×10^7 MPN/g まで増加したが、8 週目以降減少し、16 週目以降は検出されなかった。低 pH 区では 4 週目まで 10^6 MPN/g で概ね横ばいで推移し、8 週目以降は減少し、16 週目以降は検出されなかった。

ヒスタミン濃度 ヒスタミン濃度の推移を図 1 (C) に示す。高 pH 区では、12 週目まで増加し、565 ppm となった。20 週目にかけて減少したが、CODEX 基準値⁷⁾ の 400 ppm を超える 440 ppm だった。低 pH 区では 4 週目までやや増加して 171 ppm となり、その後は横ばいで推移した。

もろみの pH を 4.6 に調整することで、ヒスタミン生成菌の増殖を抑え、ヒスタミン蓄積を抑制する

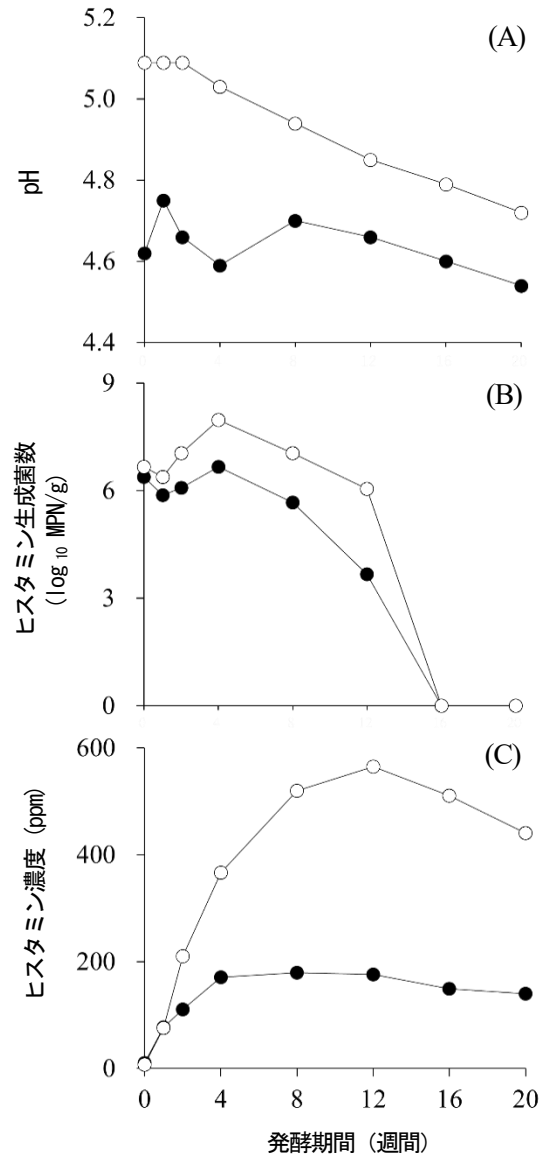


図1 初発 pH が異なるもろみの発酵中の pH、ヒスタミン生成菌数およびヒスタミン濃度の変化

pH を 4.6 (●) または 5.1 (○) に調整してヒスタミン生成菌を添加し、もろみの pH (A)、ヒスタミン生成菌数 (B) およびヒスタミン濃度 (C) を測定した

効果がみられたことから、一般的に食品添加物として使用される 3 種の有機酸を用いて pH を 4.6 に調整し、もろみから試作した魚醤油の品質を比較した。

pH 対照区の pH は試験開始時には 5.6 であったが、1 週目で 5.1 に減少し、その後は徐々に減少して、12 週目には 4.7 となった。有機酸を添加した 3 区の pH は同様に推移し、試験開始時の 4.6 から緩やかに減少し、12 週目には 4.4 となった (図 2)。

遊離アミノ酸 対照区および各試験区の遊離アミノ酸量を表 1 に示す。対照区、クエン酸区、乳酸区

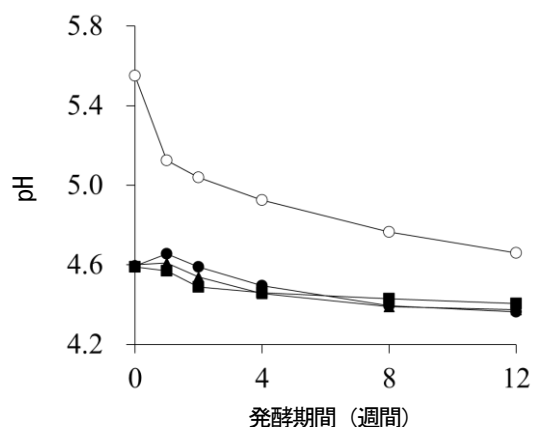


図2 数種有機酸を加えたもろみの pH の変化

クエン酸 (●), 乳酸 (▲) および酢酸 (■) で初発 pH を 4.6 に調整したもろみの pH の推移, 未調整の対照は (○) で示した

および酢酸区におけるうま味系アミノ酸は 504, 482, 443 および 444 mg/100 mL, 苦味系アミノ酸は 1,596, 1,681, 1,571 および 1,544 mg/100 mL, 甘味系アミノ酸は 772, 787, 701 および 731 mg/100 mL で, いずれも概ね同等の量で, 苦味系, 甘味系, うま味系の順に多かった。

有機酸 対照区および各試験区の有機酸の量 (クエン酸, 乳酸, 酢酸, その他はリンゴ酸+コハク酸+ギ酸+ピログルタミン酸の合計) を表 2 に示す。対照区と各試験区を比較すると, クエン酸区ではクエン酸が 106 mg/100 mL, 乳酸区では乳酸が 176 mg/100 mL, 酢酸区では酢酸が 109 mg/100 mL, 当然ながら対照区よりも多かった。添加していない有機酸では, 乳酸区でクエン酸が検出されなかったものの, 概ね対照区と同等であった。

有機酸の合計は, 対照区が 485 mg/100 mL で, 各試験区はこれよりも多い 597~620 mg/100 mL であった。

官能検査 色調はクエン酸区で 2.1, 乳酸区で 1.9 と対照区よりも有意に低く, 薄い色調であった。酢酸区は 3.4 で対照区と有意な差は無く, 濃い色調であった。クエン酸区, 乳酸区および酢酸区における好ましい香りは 2.8, 2.5 および 3.2, 生臭さは 2.7, 2.8 および 2.8, うま味は 3.0, 3.2 および 3.3, 苦みは 3.1, 3.2 および 3.0, 甘味は 2.8, 2.7 および 3.2, 酸味は 3.4, 3.4 および 3.2 で, いずれも対照区と有意な差は無かった (表 3)。

考察

もろみの初発 pH を *T. halophilus* の生育下限以下の 4.6 にすることで, pH は発酵初期から 4.8 以下を維持してヒスタミン生成菌の増殖を抑え, 初発 pH を 5.1 に調整した場合よりヒスタミンの蓄積は少なかった。もろみの初発 pH を低下させることで, ヒスタミン蓄積の抑制効果が認められたので, pH 低下が品質に及ぼす影響を確認した。

魚醤油発酵中の優占菌種は好塩性乳酸菌の *Tetragenococcus* 属であり, 乳酸菌が生成する乳酸は雑菌の増殖抑制だけでなく, 風味に影響する可能性がある。また, pH 低下により魚肉内在や麴由来のプロテアーゼ活性が変化し, 魚醤油の重要な品質であるうま味成分にも影響を及ぼす可能性がある。そこで, 一般的に使用されている 3 種の有機酸で pH を調整したもろみから魚醤油を調製し, その品質を有機酸無添加の対照と比較した。

各試験区では添加した有機酸の量が, 対照区よりも 106~176 mg/100 mL, 有機酸の総量は 2~3 割多く, 酸味への影響が懸念されたが, 官能検査による酸味の評価は, 対照区の 3.0 に対して各試験区で 3.2~3.4 と有意な差は無かった。

対照区および各試験区の遊離アミノ酸は, 量や組成に大きな差が無く, pH 低下が遊離アミノ酸の生成に及ぼす影響は少なかったと推測した。また, 官能検査によるうま味の評価は, 対照区の 3.0 に対して各試験区で 3.0~3.3 と有意な差は無かった。同様に甘味や苦味の評価も, 対照区と各試験区で有意な差は無く, 有機酸無添加の魚醤油と同程度の呈味性を有すると判断した。

クエン酸区と乳酸区の色調は, 対照区および酢酸区よりも淡くなった。一般に麴添加法では麴由来の糖質によりメイラード反応が起き, 魚醤油の色調が濃色化⁸⁾する。メイラード反応の進行⁹⁾には温度, 水分, 酸素, pH, 陰イオンなどが影響する。pH については, 3 以上では大きくなるほど反応の進行が早くなるため, pH の高かった対照区でメイラード反応が進行した可能性がある。一方, 同等の pH であったクエン酸区, 乳酸区, 酢酸区のうち酢酸区のみ色調が濃かった原因は不明である。

表1 魚醤油中の遊離アミノ酸含量 (mg/100 mL)

	対照区	添加した有機酸		
		クエン酸	乳酸	酢酸
Asp	229	195	174	178
Glu	275	287	269	266
うま味	504	482	443	444
Arg	216	224	209	216
Lys	271	294	277	270
His	79	85	79	78
Phe	146	158	146	136
Leu	286	306	284	279
Ile	177	184	172	170
Met	95	98	90	85
Val	195	204	188	187
Tyr	130	128	127	123
苦味	1,596	1,681	1,571	1,544
Pro	114	126	108	113
Thr	146	150	137	142
Ala	249	257	231	240
Gly	112	105	91	97
Ser	152	149	135	138
甘味	772	787	701	731
合計	2,873	2,950	2,715	2,718

表2 魚醤油中の有機酸含量 (mg/100 mL)

	対照区	添加した有機酸		
		クエン酸	乳酸	酢酸
クエン酸	10.2	116.0	0.0	9.8
乳酸	100.9	124.5	277.1	100.0
酢酸	202.6	197.0	174.0	311.3
その他	171.4	165.4	169.0	176.0
合計	485.1	602.9	620.1	597.0

表3 官能検査結果 (n=17)

評価項目		対照区	添加した有機酸		
			クエン酸	乳酸	酢酸
色調	1:薄い-5:濃い	3.0	2.1±0.7*	1.9±0.8*	3.4±0.8
好ましい香り	1:しない-5:する	3.0	2.8±0.7	2.5±1.0	3.2±1.0
生臭さ	1:しない-5:する	3.0	2.7±0.8	2.8±0.7	2.8±0.9
うま味	1:薄い-5:濃い	3.0	3.0±0.9	3.2±1.0	3.3±0.9
甘味	1:ない-5:ある	3.0	3.1±0.8	3.2±0.7	3.0±1.0
苦味	1:ない-5:ある	3.0	2.8±0.9	2.7±1.1	3.2±0.9
酸味	1:ない-5:ある	3.0	3.4±1.0	3.4±0.8	3.2±1.1

*: 対照区と5%水準で有意差あり

本研究により, もろみの初発 pH を食品添加物の有機酸で低下させることで, 発酵過程におけるヒスタミンの蓄積を抑制し, pH 調整しない通常の魚醤油と同程度の呈味性を有する魚醤油を製造可能であると示唆された。本技術については, 安全・安心な魚醤油の製法として, 現場での普及に活用していきたい。

文献

- 1) 石毛直道, ケネス・ラドル. 「魚醬とナレズシの研究」岩波書店, 東京. 1990.
- 2) 宇多川隆. 速醸魚醬の開発とその利用. 醸協 2012; 107: 477-484.
- 3) 舩津保浩, 砂子良治, 小長谷史郎, 今井徹, 川崎賢一, 竹島文雄. 醤油麹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. 日水誌 2000; 66: 1036-1045.
- 4) 木村メイコ, 舊谷亜由美, 福井洋平, 柴田由起, 根井大介, 矢野豊, 里見正隆. 魚醤油発酵時のヒスタミン蓄積に関わる原因菌の同定および乳酸菌発酵スターター接種によるヒスタミン蓄積抑制効果について. 日水誌 2015; 81: 97-106.
- 5) 里見正隆. 魚醤油のヒスタミン蓄積機構と除去法について. 醸協 2012; 107: 842-852.
- 6) 中里光男, 小林千種, 山嶋裕季子, 立石恭也, 川合由華, 安田和男. 魚醤油中の揮発性塩基窒素及び不揮発性アミン類の分析. 東京衛生年報 2002; 53: 95-100.
- 7) FAO, WHO: Standard for fish sauce CXS 302-2011. Codex Alimentarius standard. Rome. 2024.
- 8) 竹島文雄, 鍋島裕佳子, 舩津保浩, 川崎賢一. ブナザケを原料とした魚醤油の開発. 富山食研研報. 2001; 4: 1-8.
- 9) 加藤博通. 褐変に影響する環境条件. 「食品の変色の化学」(木村進, 中林敏郎, 加藤博通編著) 光琳, 東京. 1995; 331-336.