

# マグロ魚醤油のヒスタミン生成リスクを低減する乳酸菌を活用した製造技術の確立

Establishment of Production Technology for Tuna Fish Sauce Involving a Lactic Acid Bacterium to Reduce the Risk of Histamine Production

遠藤路子\*・中野陽\*\*・本多美恵\*・加藤愛\*・小谷幸敏\*\*\*

Michiko Endou, Hiroshi Nakano, Mie Honda, Ai Kato and Yukitoshi Kodani

\*食品開発研究所 食品開発科、\*\*企画連携推進部 企画室、\*\*\*食品開発研究所

ヒスタミンを蓄積しないマグロ魚醤油の製造技術を確立するため、発酵乳酸菌スターターとして非ヒスタミン生成乳酸菌ならびに穀物醤油用乳酸菌スターターを用いてマグロ魚醤油を仕込み、ヒスタミン蓄積抑制効果について検討を行った結果、ヒスタミン生成菌に対し、いずれのスターターも  $10^3$  倍以上の菌数を添加することにより、ヒスタミンの蓄積が抑制できることが分かった。

To establish the production technology of Tuna fish sauce with non-histamine production, we prepared samples of Tuna fish sauce with non-histamine productive lactobacillus strain and the lactic acid bacterium starter for sauce, and studied on their inhibiting effects of histamine production. The results revealed that the histamine production can be inhibited if the starter is added more than ten to the third power ( $10^3$ ) times against histamine productive bacterium.

## 1. はじめに

鳥取県境港では毎年6月から8月上旬にかけて旋網漁法によりクロマグロが水揚げされる。水揚げされたクロマグロは漁港にてすぐに解体され、身は競りにかけられるが、内臓は廃棄物として処理される。これまでに当センターでは廃棄物の減量化、資源の有効利用の観点から、内臓重量の約14%に及ぶ幽門垂を原料として、醤油麹、耐塩性酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) を用いた魚醤油を開発した<sup>1)</sup>。その技術を応用し、県内企業によりマグロ魚醤油が製造販売されている。一方、魚醤油製造における問題点としてヒスタミンの蓄積が挙げられ、国際食品規格委員会 (CODEX) では基準値を400ppmと定めている。ヒスタミンは、食品中のヒスチジンがヒスタミン生成菌の有するヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) により生成される。里見ら<sup>2)</sup> は、水産発酵食品のヒスタミンの蓄積は好塩性乳酸菌である *Tetragenococcus spp.* が主なヒスタミン生成菌であり、魚醤油由来の *Thalophilus* の HDC 遺伝子はプラスミ

ドにコードされており、プラスミドごと乳酸菌群内を伝播しているのではないかと報告している。現在までに、マグロ魚醤油においてはヒスタミンが蓄積した事例は観察されていないが、突然ヒスタミンが蓄積する危険性があるため、早急な対策が望まれている。魚醤油製造のヒスタミン蓄積抑制方法として、乳酸菌発酵スターターの利用<sup>2)</sup> が報告されている。また、すでにヒスタミンが蓄積してしまった場合、ヒスタミンをベントナイトに吸着させて排除する方法<sup>3)</sup> が報告されている。木村ら<sup>4)</sup> は、乳酸菌発酵スターターとして非ヒスタミン生成乳酸菌株である NBRC12172株の添加を行うと発酵初期段階でもろみ液中の優占菌種となり、魚醤油製造時のヒスタミン生成菌の増殖抑制に有効なスターターであることを明らかにしている。そこで、今回はヒスタミンの蓄積抑制に有効な乳酸菌発酵スターターを用いてマグロ魚醤油を仕込み、ヒスタミンの蓄積を抑制したマグロ魚醤油の製造が可能であるか検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用菌種と使用培地

#### 2.1.1 耐塩性ヒスタミン生成乳酸菌

魚醤油中のヒスタミン (Hm) の生成量を測定する為、高塩分でも生育することができる耐塩性の Hm 生成乳酸菌を用いた。菌株は水産総合研究センター中央水産研究所の木村ら<sup>4)</sup>より分離された Hm 生成菌を使用した。

#### 2.1.2 乳酸菌発酵スターター

Hm 蓄積抑制効果を評価するため、乳酸菌発酵スターターとして以下の菌株を使用した。

##### (1) 非 Hm 生成乳酸菌

穀物醤油もろみから分離された耐塩性の乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* NBRC12172<sup>5)</sup> (以下非 Hm 生成乳酸菌) を使用した。本株は HDC を保有せず、Hm 生成能を有していないことを確認している<sup>4)</sup>。

##### (2) 穀物醤油用乳酸菌

穀物醤油を製造する際に使用されている穀物醤油用乳酸菌スターター ((株) ビオック) を使用した。

### 2.2 モデル培地による Hm 蓄積抑制効果

#### 2.2.1 モデル培地調製

使用培地は MRS 液体培地 (MERCK) に食塩 10%、ヒスチジン塩酸塩 0.5% を添加後 pH6.5 に調整し、118 °C、15 分間オートクレーブした培地 (ヒスチジンプロス) を用いた。

#### 2.2.2 Hm 生成菌と乳酸菌発酵スターターの培養

1 週間培養した Hm 生成菌の培養液をヒスチジンプロスにて 10 倍段階希釈をし、 $10^3 \sim 10^5$  倍希釈液 (Hm 生成菌懸濁液) を調製した。

##### (1) Hm 生成菌区

ヒスチジンプロス 9 ml に  $10^3 \sim 10^5$  倍の Hm 生成菌懸濁液 1 ml を添加した培地を 30 °C で 50 日間培養した。これを Hm 生成菌区 (①Hm 生成菌区) とした。

##### (2) 非 Hm 生成菌区

ヒスチジンプロス 8 ml に Hm 生成菌懸濁液 1 ml と、1 週間培養した非 Hm 生成乳酸菌の培養液 1 ml を添加し同様の条件にて培養した試験区を非 Hm 生成菌区 (②非 Hm 生成菌区) とした。

##### (3) 穀物醤油用乳酸菌区

同様に穀物醤油用乳酸菌 1 ml を添加した試験区を醤油用乳酸菌区 (③穀物醤油用乳酸菌区) とした。

### 2.2.3 Hm 生成菌と発酵乳酸菌スターターの菌数測定と存在比率

培養に用いた Hm 生成菌、非 Hm 生成乳酸菌、穀物醤油用乳酸菌の菌体数を測定した。菌数の測定は最確数法 (MPN 法) を用い、各培養液をヒスチジンプロスにて段階希釈し、希釈液を 30 °C にて 3 日間培養した。それぞれの菌体数より、Hm 生成菌と各種乳酸菌発酵スターターの存在比率を求めた。

### 2.3 Hm 生成量の測定

Hm 量の測定にはキッコーマン社製のチェックカラーヒスタミンを用いた。なお、本キットは生魚用であるため、添加回収試験によりヒスタミンの測定が可能であるか確認後、使用した。

### 2.4 乳酸菌発酵スターターを添加した魚醤油の小仕込み

#### 2.4.1 マグロ内臓の処理 (原料処理)

サイレントカッターにてぶつ切りにしたマグロ内臓 (エラ、胃、食道、肝臓、幽門垂、胆のう、脾臓、腸) 1000 g に、食塩 200 g、醤油麹 150 g、米麹 50 g、20% 食塩水 150 g を混ぜ合わせ、1 週間 5 °C で保存し、マグロ魚醤油もろみとした。

#### 2.4.2 マグロ魚醤油の小仕込み (小仕込み)

##### (1) 小仕込み 1

1 週間保存したマグロ魚醤油もろみに Hm 生成菌および乳酸菌発酵スターターを添加した小仕込みを行った。試験区は Hm 生成菌を添加した試験区 (Hm 生成菌区)、非 Hm 生成菌を Hm 生成菌の  $10^3$  倍添加した試験区 (非 Hm 生成菌区)、穀物醤油用乳酸菌を Hm 生成菌の  $10^4$  倍添加した試験区 (穀物醤油用乳酸菌区)、乳酸菌を添加していない試験区 (乳酸菌無添加区) とした (表 1)。

仕込んだもろみは 30 °C にて培養し、定期的に pH と Hm 生成量を測定した。Hm 生成量の測定にはチェックカラーヒスタミンを使用し、添加回収試験により測定可能であるか確認を行った。

表 1. 小仕込み 1 の仕込み条件

試験区	Hm生成菌 (H) (個/100ml)	スターター (S) (個/100ml)	存在比率 (H : S)
Hm生成菌区	200	0	1 : 0
非Hm生成菌区	200	$1.7 \times 10^5$	1 : $10^3$
穀物醤油用乳酸菌区	200	$3.6 \times 10^6$	1 : $10^4$
乳酸菌無添加区	0	0	0

## (2) 小仕込み 2

小仕込み 1 と同様の小仕込みを行い、定期的に pH と Hm 生成量を測定した。仕込み条件は、非 Hm 生成菌区では Hm 生成菌に対し  $10^5$  倍、穀物醤油用乳酸菌区では  $10^6$  倍添加した (表 2)。

表 2. 小仕込み 2 の仕込み条件

試験区	Hm生成菌 (H) (個/100ml)	スターター (S) (個/100ml)	存在比率 (H : S)
Hm生成菌区	49	0	1 : 0
非Hm生成菌区	49	$2.4 \times 10^7$	1 : $10^5$
穀物醤油用乳酸菌区	49	$9.0 \times 10^7$	1 : $10^6$
乳酸菌無添加区	0	0	0

## 3. 結果と考察

### 3.1 モデル培地中の乳酸菌発酵スターターによる Hm 生成の抑制

①Hm 生成菌区、②非 Hm 生成菌区、③穀物醤油用乳酸菌区の菌体数と Hm 生成菌と乳酸菌発酵スターターの存在比率および Hm 生成量を表 3 に示した。①では、ヒスタミン生成菌が 100 ml 中に 350、35、3.5 個の存在下で 2300ppm 以上の Hm を生成した。②では Hm 生成菌に対し乳酸菌スターター存在比率が  $10^2$  倍で 69ppm、 $10^3$  倍以上では検出限界以下であった。③では Hm 生成菌に対し乳酸菌スターター存在比率が  $10^2$  倍で 17ppm、 $10^3$  倍以上では検出限界以下であった。この結果より非 Hm 生成菌と穀物醤油用乳酸菌は Hm 生成菌の菌体数の  $10^3$  倍以上の存在比率にすることで、Hm の蓄積が抑制され、乳酸菌発酵スターターとして使用の可能性があることがわかった。

表 3. モデル培地での培養条件と Hm 生成量

試験区	Hm生成菌 (H) (個/100ml)	スターター (S) (個/100ml)	存在比率 (H : S)	Hm生成量 (ppm)
①Hm生成菌区	350	0	1 : 0	2,300
	35	0	1 : 0	2,600
	3.5	0	1 : 0	2,400
②非Hm生成菌区	350	$7.9 \times 10^4$	1 : $10^2$	69
	35	$7.9 \times 10^4$	1 : $10^3$	10以下
	3.5	$7.9 \times 10^4$	1 : $10^4$	10以下
③穀物醤油用乳酸菌区	350	$1.0 \times 10^5$	1 : $10^2$	17
	35	$1.0 \times 10^5$	1 : $10^3$	10以下
	3.5	$1.0 \times 10^5$	1 : $10^4$	10以下

### 3.2 乳酸菌発酵スターターを添加した魚醤油の小仕込み

乳酸菌発酵スターターが Hm 生成菌の菌体数に対し  $10^3$  倍以上存在することで、Hm の蓄積を抑制する可能性があることがわかったことから、Hm 生成菌の  $10^3$  倍以上となるように非 Hm 生成菌と穀物醤油用乳酸菌をそれぞれ添加して魚醤油の小仕込みを行った。

#### 3.2.1 Hm 生成菌と乳酸菌発酵スターターの菌数測定と存在比率

#### 3.2.2 もろみ中の pH の挙動追跡

##### (1) 小仕込み 1

乳酸菌発酵スターターを添加した日を 0 日として、小仕込み 1 の pH の挙動を図 1 に示した。0 日目の各試験区の pH は 5.8~6.0 を示し、3 日後には pH 5.4 付近になった。その後いずれの試験区も日数の経過によりゆっくりと pH が下がり 280 日(40 週)後には pH 5.0~5.2 付近を示した。

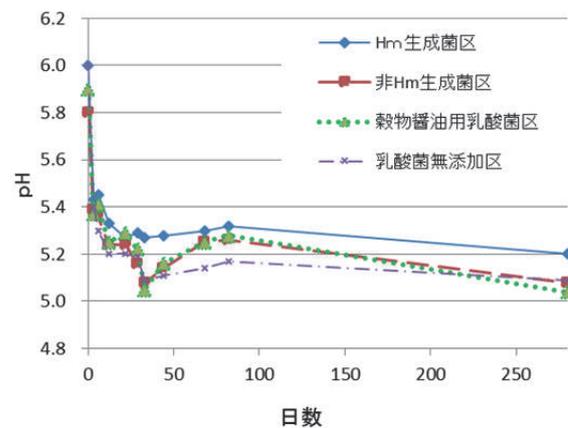


図 1. 小仕込み 1 のもろみの pH

##### (2) 小仕込み 2

小仕込み 2 の pH の挙動を図 2 に示した。0 日目に

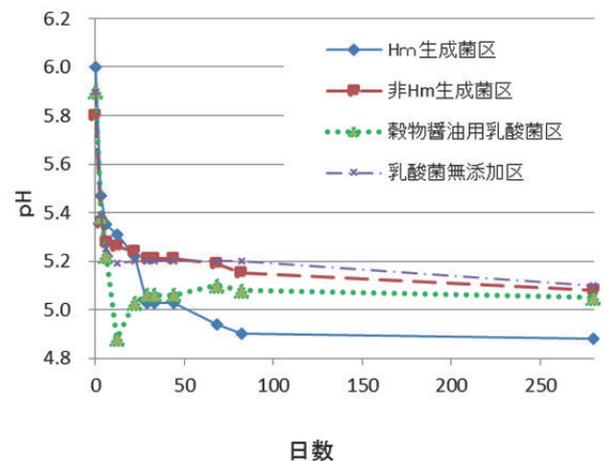


図 2. 小仕込み 2 のもろみの pH

示した各試験区の pH は 5.8~6.0 であり、3 日後には pH 5.4~5.5 付近を示した。穀物醤油用乳酸菌を添加した試験区は 12 日目に pH 4.9 を示し、その後 pH 5.0 を示して以降 pH は安定した値を示した。また、Hm 生成菌区はゆっくりと pH が下がっており、280 日(40 週)後には pH 4.9 を示した。

### 3.2.3 Hm 生成量

#### (1) 小仕込み 1

小仕込み 1 のもろみの Hm 生成量を表 4 に示した。いずれの試験区も Hm 生成量は CODEX の基準値よりも少なかった。また、Hm 生成菌区でも Hm の蓄積は少量であった。

表 4. 小仕込み 1 の Hm 生成量

試験区	Hm生成量 (ppm)	
	12週目	42週目
Hm生成菌区	23	26
非Hm生成菌区	31	25
穀物醤油用乳酸菌区	41	32
乳酸菌無添加区	26	31

#### (2) 小仕込み 2

小仕込み 2 のもろみの Hm 生成量を表 5 に示した。その結果、Hm 生成菌を添加したもろみは 10 週目で Hm 生成量が 500ppm であり、Hm 生成菌を添加したもろみは CODEX に規定されている 400ppm よりも高い値を示した(表 5)。Hm 生成菌のみを添加した試験区については 10 週目以降も CODEX の規定以上の Hm 生成が生成されていたため廃棄した。非 Hm 生成菌区、穀物醤油用乳酸菌区、乳酸菌無添加区については 40 週目を経過しても Hm の生成量は少なかった。

表 5. 小仕込み 2 の Hm 生成量

試験区	Hm生成量 (ppm)	
	10週目	40週目
Hm生成菌区	500	n.t.
非Hm生成菌区	26	30
穀物醤油用乳酸菌区	15	22
乳酸菌無添加区	32	27

n.t.: Not tested

以上の結果より、Hm 生成菌が存在するマグロ魚醬もろみに、乳酸菌発酵スターターとして、非 Hm 生成菌の NBRC12172 および穀物醤油用乳酸菌スターターを Hm 生成菌に対し  $10^3$  倍以上の菌体数を添加することで、Hm の蓄積を抑制することができることが分かった。Hm 生成菌は低 pH ストレスに応答して Hm を生成する<sup>2)</sup>と報告されている。Hm の生成が確認された小仕込み 2 の Hm 生成菌区のもろみは、Hm 生成菌が増殖したことで、もろみ中の pH が低くなり、pH の低下がストレスとなって Hm を生成したのではないかと考えた。また、小仕込み 2 の穀物醤油用乳酸菌区のもろみは、pH の低下がみられたが Hm の生成が確認されなかった。これは Hm 生成菌および穀物醤油用乳酸菌スターターが生成する酸によって pH が低下したが、Hm 生成菌が少ないため pH の低下をストレスと感じ前に穀物醤油用乳酸菌数が優性に働いたため、Hm の蓄積が抑制されたのではないかと考えた。小仕込み 1 の Hm 生成菌のみを添加した Hm 生成菌区では、Hm の蓄積が確認できなかったが、小仕込み 2 の Hm 生成菌区では Hm が蓄積されていた。これはマグロ魚醬油の製造方法に Hm を蓄積させない原因があるのではないかと考え、今後さらに検討していく予定である。

## 4. おわりに

Hm の蓄積抑制に有効な乳酸菌発酵スターターを用いてマグロ魚醬油を仕込み、Hm の蓄積を抑制したマグロ魚醬油の製造が可能であるか検討を行った。

- 1) 乳酸菌発酵スターター候補株として、穀物醤油由来の *Tetragenococcus halophilus* NBRC12172 と穀物醤油用乳酸菌スターターについて Hm の蓄積抑制効果を検討した。
- 2) マグロ魚醬油のモデル培地として塩分濃度が 10% となるように調整した MRS 培地を用いて、Hm 生成菌のみを添加した Hm 生成菌区、非ヒスタミン生成菌である NBRC12172 を Hm 生成菌に対し菌体存在比率が  $10^2 \sim 10^4$  倍の非 Hm 生成菌区、穀物醤油用乳酸菌の菌体存在比率が  $10^2 \sim 10^4$  倍となる

穀物醤油用乳酸菌区について Hm の蓄積抑制効果を検討した。その結果、Hm 生成菌に対し乳酸菌発酵スターター候補株の菌体数が  $10^3$  倍以上の比率において Hm の蓄積が抑制される可能性があることが分かった。

- 3) Hm 生成菌に対し発酵乳酸菌スターター候補株の菌体数が  $10^3$  倍以上となるよう添加したマグロ魚醤油の仕込みを行った。
- 4) pH の挙動追跡した結果、仕込み後 3 日目には pH の低下が確認された。Hm の蓄積が確認された試験区ではゆっくりと pH が低下しており、60 日を経過後には pH 5.0 より低い値を示した。
- 5) 仕込み 1 は、Hm 生成菌区、Hm 生成菌に対し NBRC12172 を  $10^3$  倍添加した非 Hm 生成菌区と穀物醤油用乳酸菌を  $10^4$  倍添加した穀物醤油用乳酸菌区、乳酸菌を添加していない乳酸菌無添加区について仕込みを行った。その結果、いずれの試験区も Hm 生成量は少なかった。
- 6) 仕込み 2 も仕込み 1 と同様の試験区で仕込みを行った。発酵乳酸菌スターターの添加量は非 Hm 生成菌区では Hm 生成菌に対し  $10^5$  倍添加し、穀物醤油用乳酸菌区では  $10^6$  倍添加した。その結果、非 Hm 生成菌区、穀物醤油用乳酸菌区は、Hm 生成区よりも Hm 生成量が少なく、Hm の蓄積が抑制されていた。一方、Hm 生成区では仕込み 10 週目で Hm 生成量が 512ppm であり、CODEX に規定されている 400ppm よりも高い値を示した。
- 7) Hm 生成菌数に対し発酵乳酸菌スターター菌数が  $10^3$  倍以上存在することで、Hm の蓄積を抑制したマグロ魚醤油の製造は可能ではないかと考えられる。

## 文献

- 1) 加藤愛・小谷幸敏; マグロ内臓を原料とした魚醤油の開発, 醸協, 105(1), p.31-35(2010).
- 2) 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, 107(11), p.842-852(2012).
- 3) 小善圭一・森真由美・原田恭行・横川健二・

里見正隆・船津保浩; ベントナイトによる魚醤油中のヒスタミン低減, 食科工

誌, 59(1), p.17-21(2012).

- 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, 81(1), p.97-106(2015).
- 5) [http://www.nite.go.jp/nbrc/genome/project/annotation/analyzed/th1\\_d.html](http://www.nite.go.jp/nbrc/genome/project/annotation/analyzed/th1_d.html)