

## いしる製造時の微生物の変遷とヒスタミン量の挙動

—いしるのヒスタミン低減技術の開発に向けて—

石川県水産総合センター

末栄 彩夏

### 目 的

石川県のいしるは、日本の三大魚醤油の一つに数えられる伝統ある魚醤油であり、生産量は国内産の魚醤油のなかで上位を占めている。近年、消費者の食の多様化や食嗜好の変化にともなって魚醤油の需要が拡大しており、いしるの生産量も増加傾向にある。いしるは、原料に由来する微生物を利用した自然発酵によって製造されるものが大半を占めており、ほとんどの場合、発酵の促進や変敗防止などを目的とした麹などの発酵スターターは添加されていない。このため、しばしば発酵状態が不安定となり、アレルギー様食中毒の原因物質であるヒスタミンを蓄積する。いしる製造工程におけるヒスタミンの抑制は、安心・安全な製品製造に欠かすことのできない重要な課題であり、効果的な抑制技術の確立が望まれている。本研究では、発酵スターターを用いたヒスタミンの生成抑制技術に着目して、発酵スターター添加条件の検討に必要な、いしる製造過程での微生物相とヒスタミンを含むポリアミン量の変化について調べている。ここでは、4月から約2ヶ月間の製造初期に得られた結果の概要を報告する。

### 材料および方法

#### 1. 試料

能登地域の製造業者（A社）が、2015年4月に仕込んだもろみを調査対象とした。A社のいしるは、春に原料となるスルメイカ肝臓に20~30%の食塩を混合して仕込みを行い、タンク（ポリカーボネート製、径2m×深さ1.5m）の中で1年から1年半かけて自然発酵・熟成させて製造される。試料の採取は、仕込み後約2ヶ月間に7回（仕込み後4、11、17、25、32、39、64日後）行い、調査対象に定めた3つのタンクの中心部からもろみを採取した。採取したもろみは1時間以内に研究室に持ち帰り、生菌数の測定とポリアミンの定量分析に供した。

#### 2. 生菌数の測定

微生物相の解析は以下のとおり Kuda *et al.* の方法に従った<sup>1)</sup>。もろみサンプルを滅菌リン酸緩衝生理食塩水（0.1%寒天含）で段階的に希釈し、好気性細菌はトリプトソーヤ寒天培地（TSA、日水製薬）、嫌気性細菌はGAM寒天培地（GAM、日水製薬）、乳酸菌はde Man, Rogosa, Shape寒天培地（MRS、Oxoid）酵母はクロラムフェニコール加ポテトデキストロース寒天培地（PDA、日水製薬）に塗抹した。また、好（耐）塩性菌数計測用として、好塩性好気性細菌は10%食塩添加TSA、好塩性嫌気性細菌は10%食塩添加GAM、好塩性乳酸菌はMRS、好塩性酵母は10%食塩添加PDAに塗抹した。菌液を塗抹したTSAおよびPDAは好気条件下で、またGAMおよびMRSはアネロパック嫌気ジャーを用いた嫌気条件下にて30℃で14日間培養した。

ヒスタミン生成菌は、以下のとおり Satomi *et al.* の最確数法に従って測定した<sup>2)</sup>。サンプル5g

に対しヒスチジンブロス (HB) 45ml を添加し、十分攪拌した。この溶液をさらに HB で段階希釈し、各希釈段について 3 本ずつ培養試験管を作成した。これらを 30 °C で 14 日間培養し、濁度およびヒスタミン生成の有無を観察し、その陽性管数から最確数表を用いてヒスタミン生成菌数を算出した。

### 3. ポリアミンの定量分析

ヒスタミンを含む 7 種のポリアミン (チラミン、ヒスタミン、カダベリン、アグマチン、トリプタミン、スペルミジン、プトレシン) について定量を行った。もろみサンプル 1 g に 0.1 M EDTA 溶液 24 ml を添加し、沸騰水中で 20 分加熱および冷却後、遠心分離して得られた上清をメンブランフィルター (0.45  $\mu$ m) でろ過し、分析用試料とした。分析は山中・松本に従って蛍光検出高速液体クロマトグラフを用いて行った<sup>3)</sup>。すなわち、移動相は A 液 : 0.1 M リン酸二水素ナトリウム-0.01 M オクタンスルホン酸ナトリウム (pH 4.28)、B 液 : 移動相 A にメタノールを等量加えた溶液 (pH 4.2) を使い、溶出は 2 液のグラジエントより行った。グラジエントのプログラムはシステムコントローラーによって制御し、流速は 1.3 ml/min とした。反応液は、オルトフタルアルデヒドメルカプトエタノール-ホウ酸溶液を用いて、反応物を流速 0.2 ml/min、蛍光検出器 (励起波長 348 nm、蛍光波長 450 nm) で検出した。

## 結果および考察

### 1. 微生物の挙動

タンク内で優占微生物であった好気性細菌と好塩性乳酸菌の挙動を図 1 に示す。仕込み初期の優占微生物は好気性細菌であり、 $10^4 \sim 10^6$  cfu/g であった。しかし、好気性細菌は一旦減少し、その後好塩性乳酸菌とともに増加、約 1 ヶ月後にはこの 2 つの微生物が優占微生物となった。これは原料由来の好気性細菌の生育限界塩濃度と気温の上昇が関与していると考えられる。仕込み時に添加した食塩によってタンク内の塩濃度が高くなり、高塩濃度に耐えられない好気性細菌が減少、その後 5 月 (仕込みから 25 日目以降) に入り気温が 20°C 近くになると好塩性や耐塩性の好気性細菌や乳酸菌が増加しタンク内がこれらの微生物にとって生育しやすい環境となったのではないかと考えられた。また、5 月以降に TSA および 10% 食塩添加 MRS 培地で出現したコロニーについて、グラム染色、カタラーゼ試験、顕微鏡観察から簡易同定を行ったところ、TSA 培地からは好気性細菌 *Staphylococcus* spp. が、10% 食塩添加 MRS 培地からは好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus* spp. が観察された。仕込み初期は TSA 培地、10% 食塩添加 MRS 培地ともに複数の形状のコロニーが観察されたにも関わらず、5 月以降のサンプルでは培地上に好気性細菌 *Staphylococcus* spp.、好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus* spp. 以外のコロニーは観察されなかったことから、経過とともに微生物の種が淘汰され、仕込みから 1~2 ヶ月後にはこの 2 属がタンク中で優占微生物になったことが明らかになった。

次にヒスタミン生成菌の挙動を図 2 に示す。仕込み直後のヒスタミン生成菌数は検出限界以下であった。しかし、好塩性乳酸菌数の増加とともにヒスタミン生成菌数の増加がみられた。また、ヒスタミン生成菌の増殖速度がタンクごとに異なり、増殖が速いタンクほどタンク内の温度が高い傾向にあった。タンク内の温度が最も高かったタンク A のヒスタミン生成菌数は約 2 ヶ月で  $10^7$  MPN/g にまで増加しており、ヒスタミン生成菌の増殖についても温度が大きく関与していると思われる。

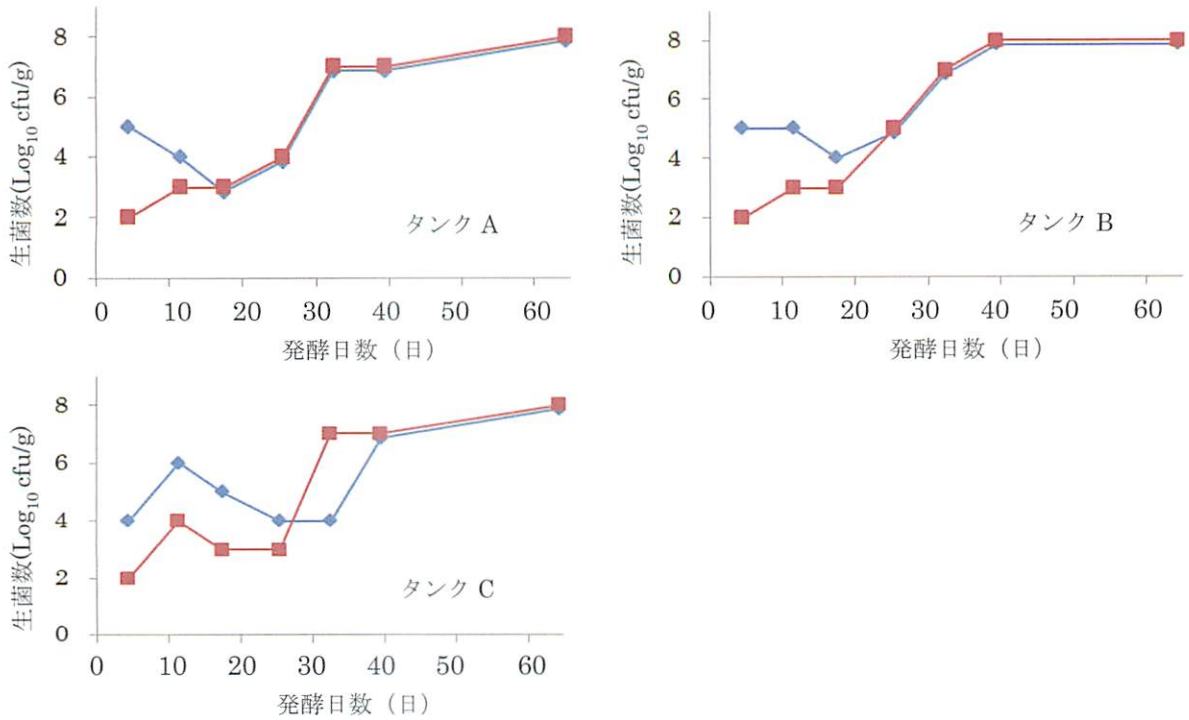


図 1: 優占微生物の挙動 (◆: 好気性細菌、■: 好塩性乳酸菌)

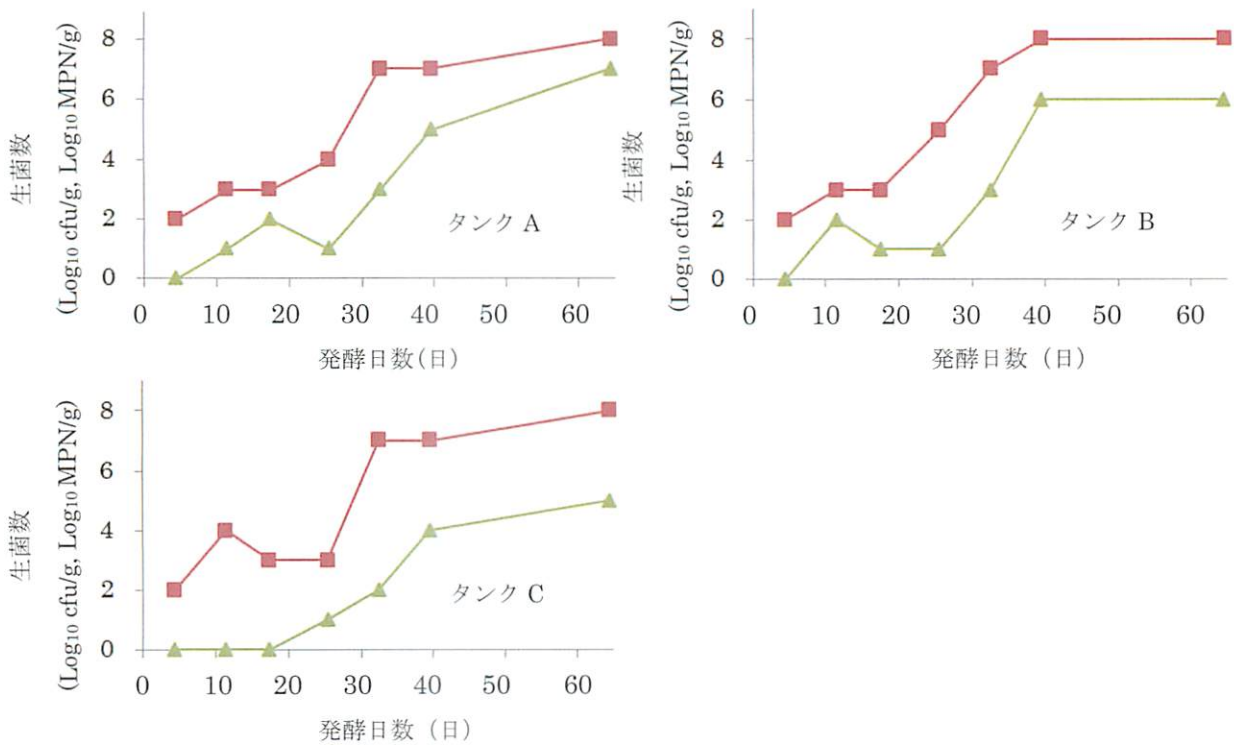


図 2: ヒスタミン生成菌の挙動 (▲: ヒスタミン生成菌、■: 好塩性乳酸菌)



## 2. ポリアミン量

仕込み直後はカダベリン、アグマチン、ヒスタミンが非常に多く含まれていた。チラミン、プトレシンの含量は仕込みから約2ヶ月間大きな変動はなく、トリプタミン、スペルミジンはほとんど検出されなかった。例としてヒスタミン量の経時変化を図3に示す。仕込み直後にヒスタミン量が高い値を示すのは、タンク全体にヒスタミンが拡散する前段階でのサンプリングであるため、原料の自己消化による混合が進んでいないことから、サンプル中に含まれていた原料組織の値を反映したものと考えられる。その後、自己消化により原料が液化して混合が進むことで、ヒスタミンはタンク内に拡散して濃度に変化し、サンプル中のヒスタミン量は一旦減少するが、40日後から60日後にかけては増加する傾向がみられた。これはヒスタミン生成菌によるヒスタミンの生成が顕著になったためと考えられた。実際に、ヒスタミン生成菌数は3つのタンクとも仕込みから30日目以降増加している。また、ヒスタミン生成菌数が多いタンクほどヒスタミン蓄積量が多い傾向にあった。カダベリン、アグマチンについてもヒスタミン同様、仕込み直後に減少はみられたが、特にカダベリンは約1ヶ月経過しても1,000 ppm近く含まれていた。山中らおよび道島らの報告<sup>4)5)</sup>では生鮮イカまたはいしるにおいてカダベリンの蓄積量は少ないとされているが、中里らは魚醤油の種類によりカダベリン量が検出限界以下から3,300 ppmまで変化することを報告<sup>6)</sup>するなど、魚醤油のカダベリン量、その由来および発酵中の挙動については不明である。さらにカダベリンはヒスタミンの毒性を高める<sup>7)</sup>との報告があるので今後も注意して経過観察していかなければならない。

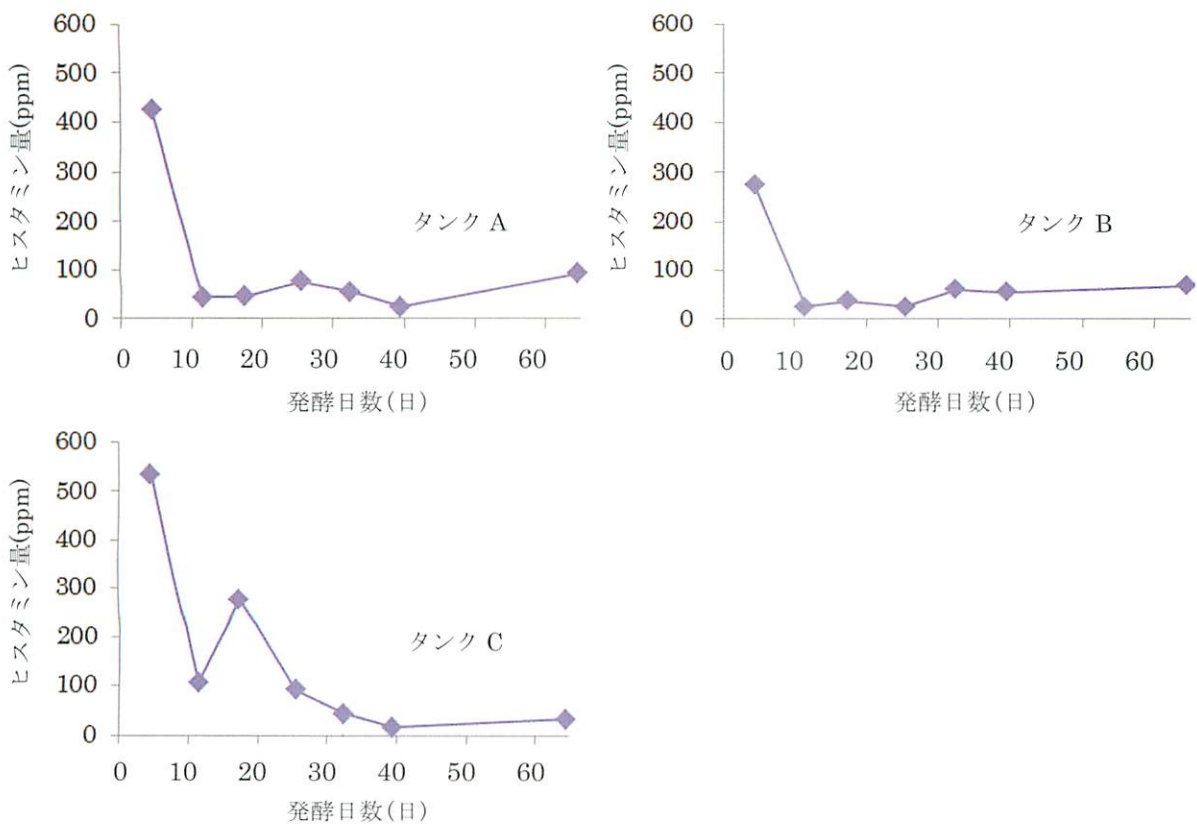


図3: ヒスタミン量の変化

文 献

- 1) Kuda T, Tanibe R, Mori M, Take H, Michihata T, Yano T, Takahashi H, Kimura B. Microbial and chemical properties of aji-no-susu, a traditional fermented fish with rice product in the Noto Peninsula, Japan. *Fisheries Science*. 2009 ; 75 : 1499-1506
- 2) Satomi M, Furushita M, Oikawa H, Yoshikawa-Takahashi M, Yano Y. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. *Int. J. Food Microbiol.* 2008 ; 126: 202-209
- 3) 山中 英明, 松本 美鈴. 高速液体クロマトグラフィーによる赤身魚中のポリアミン類の同時定量及び鮮度の判定. 食品衛生学雑誌 1989; 30: 396-400
- 4) 山中 英明, 嶋倉 邦嘉, 塩見 一雄, 菊池 武昭, 奥積 昌世. イカ及びホタテガイ貯蔵中のポリアミンの消長. 食品衛生学雑誌 1989; 30(4): 289-294
- 5) 道島 俊英, 加藤 大亮, 矢野 俊博, 榎本 俊樹. イシル(魚醤油)中のポリアミン含量について. 日本食品科学工学会誌 2006; 53(6): 337-343
- 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. 東京都立衛生研究所研究年報 2002; 53: 95-100
- 7) Stratton, J.E., Hutkins, R.W. and Taylor, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods - a review. *Journal of Food Protection* . 1991; 54: 460-470

## 「能登とり貝」の冷凍保存方法の検討

石川県水産総合センター

末栄 彩夏

### 目 的

石川県能登半島に位置する七尾湾は、天然トリガイの産地として知られている。しかし、七尾湾産トリガイの漁獲量は年によって豊凶の差が激しく、安定供給が難しいという課題を有している。当センターでは、七尾湾産トリガイの安定供給体制の確立を目指して養殖技術の開発に取り組み、平成 27 年度から本格出荷をはじめたところであり、「能登とり貝」としてブランド化が図られている。一方で、「能登とり貝」の出荷時期は、旬を迎える 4 月から 6 月の 2 ヶ月間に限られ、飲食店関係者等からは周年利用を希望する意見が多くあった。そこで当センターでは、これらのニーズに対応できるよう、トリガイを冷凍保存して周年利用を可能にすることを考えた。トリガイは刺身や寿司ネタとして重宝され、さつと湯通ししたものが使われる場合が多い。「能登とり貝」は七尾湾産の天然物と同様、身が大きく肉厚で程よい“歯ごたえ”と上品な“甘み”があることが特徴となっており、市場でも高く評価されている。このため、「能登とり貝」のこれら特徴を損なわない“高品質冷凍”を目的として、最適処理方法を整理した。ここではその結果を報告する。なお、この試験は株式会社能登半島と共同で行ったものである。

### 材料および方法

#### 1. 試料

試料には、七尾湾で養殖されたトリガイ（軟体部平均重量 27.13 g）を用いた。殻を開けて身を取り出し、内臓を除去した後、沸騰させた塩分 1%の塩水で湯通しした。その後、重石をして成形し、プラスチック製トレーに入れて真空包装した。真空包装後、① $-20^{\circ}\text{C}$ エアープラスト、② $-30^{\circ}\text{C}$ エアープラスト、③ $-30^{\circ}\text{C}$ ブラインで 12 時間冷凍し、その後は $-30^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。試料は冷凍した翌日と 10 ヶ月後に $10^{\circ}\text{C}$ の冷水で 10 分間の流水解凍を行い、分析に供した。ここでは、冷凍した翌日に解凍した試料の結果を示す。

#### 2. 測定方法

冷凍速度を調べるために、トリガイの身の中に温度ロガー（(株)T&D 製 おんどとり Jr）を差し込み、温度を 1 分ごとに測定した。このデータから最大氷結晶生成帯である $-1\sim-5^{\circ}\text{C}$ の通過時間および冷凍温度に達する時間を調べた。自然ドリップは、解凍後のトリガイの水分をキムタオルで軽く拭いた後の重量を測定し、冷凍前重量と比較することによって求めた。剪断強度はレオメーター（株式会社サン化学製、CR-100）を用いて測定した。カミソリ刃剪断用プランジャーを用いて、テープスピード 6.0cm/min で測定した。試料台に固定し、トリガイ 1 個体につき 6 点をカミソリ刃背側で剪断した。剪断時に得られた最大荷重をトリガイの厚みで補正し、剪断強度（kg）を求めた。



## 結果および考察

### 1. 前処理方法

新鮮なトリガイの身の色は、黒と白のあざやかなコントラストが特徴だが、この色素ははがれやすいため、寿司職人は、まな板の代わりにガラス板を使うなど、細心の注意を払っている。色落ちの防止策を検討した結果、冷凍する前に湯通し処理を行うことが最も効果的であることが分かった(図1)。また、湯通ししたものは冷凍後も冷凍前の硬さを保持できているが、湯通しせず生の状態で冷凍すると冷凍前の半分以下にまで軟らかくなってしまふことが分かった(図2)。さらに、湯通し時間が長いほど身は硬くなったが、官能試験により、湯通し処理の時間を30秒間とすることにより、トリガイの好ましい食感を保ったまま黒い色素を残すことが可能となることが示された。



図1: 湯通しの有無による色調の違い  
(上) 湯通ししてから冷解凍したトリガイ  
(下) 湯通しせずに冷解凍したトリガイ

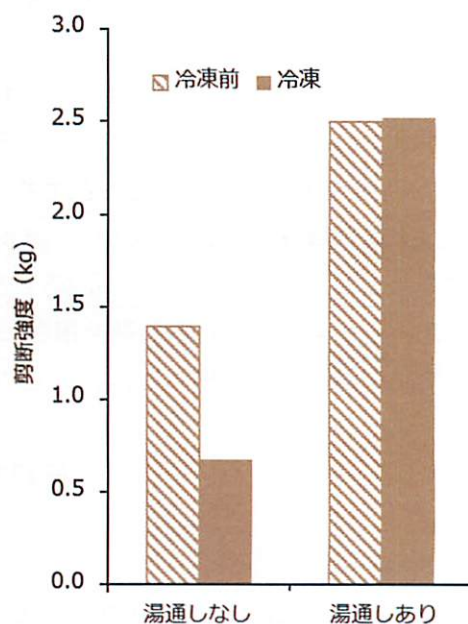


図2: 湯通しの有無による剪断強度の違い

### 2. 冷凍時の温度変化

湯通ししたトリガイをいくつかの方法で冷凍し、冷凍前の品質を最も保持できる冷凍方法を調べた。今後、トリガイの冷凍品を製造する場所は、生産地の七尾湾周辺と想定されるので、この地域の加工場で保有されている冷凍機器で製造することを想定し、冷凍方法の検討を行った。トリガイを3種類の方法で冷凍したときの温度変化を図3に示した。エアースラスト区では、温度変化が緩やかで冷凍温度になるまで2時間以上かかった。一方、ブライン区では冷凍温度になるまでわずか15分で冷凍温度に達した。

最大氷結晶生成帯である $-1\sim-5^{\circ}\text{C}$ の通過時間はブライン区で3分であったのに対し、エアースラスト区では20倍以上の62分、71分を要した。以上より、ブラインを利用することによりエアースラストの20倍以上の急速冷凍が可能であることが分かった。

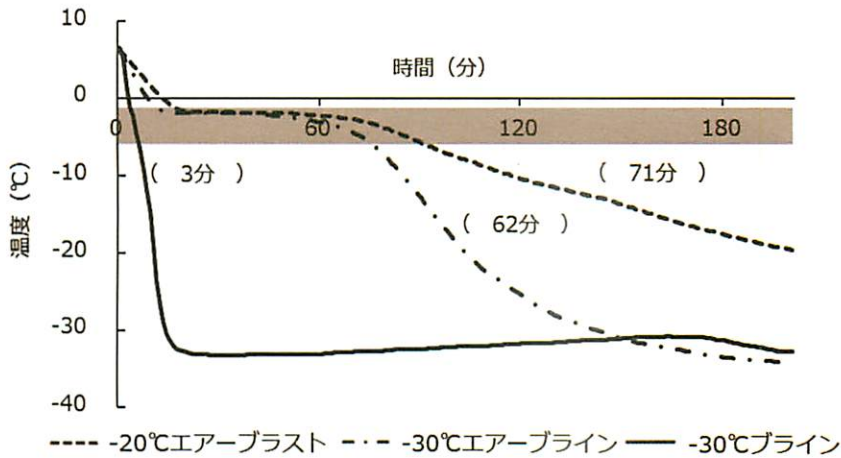


図3：冷凍中の温度変化 ※ ( ) 内は最大氷結晶生成帯通過時間

### 3. 冷凍方法の違いによる品質の変化

解凍したトリガイの硬さを比較した結果を図4に示した。ブライン区は冷凍前と比較して剪断強度が低下したが、その変化はわずかであった。一方、エアースラスト区では、温度に関わらず、剪断強度が冷凍前に比べて大きく低下した。また、自然ドリップ量を図5に示した。エアースラスト区は解凍時にドリップが多く流出したが、ブライン区では少なかった。ブライン区では冷凍による細胞の破壊を最小限に抑えるため、食感の保持やドリップ流出の抑制ができることが分かった。さらに、官能試験で-30°Cブラインによる冷凍品と冷蔵品を比較したところ、「外観の良さ」、「歯ごたえの良さ」、「うまみの強さ」のすべての項目で冷蔵品よりも冷凍品の評価が高かった。

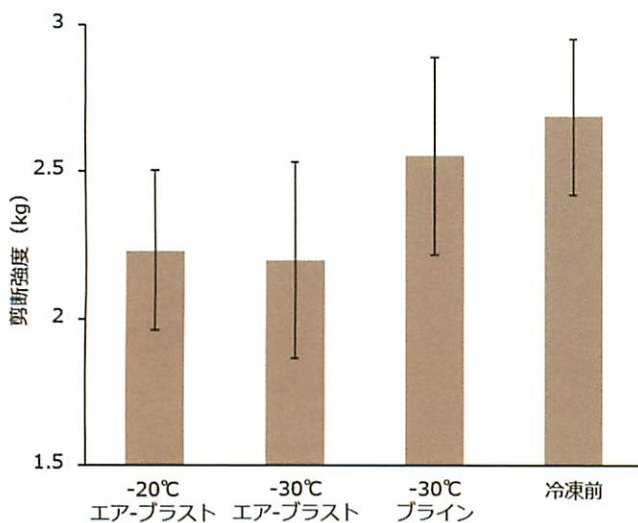


図4：剪断強度の違い

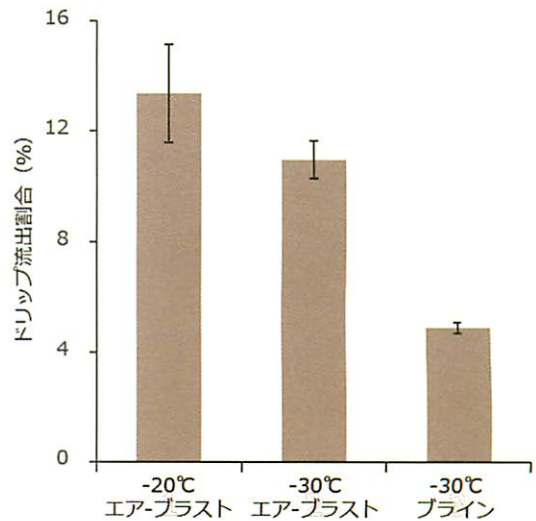


図5：ドリップ量の違い



以上の結果より、「能登とり貝」を高品質な状態で冷凍保存するためには、冷凍の前処理として30秒の湯通しを行うこと、そして $-30^{\circ}\text{C}$ ブライン冷凍を行うことが有効であることが分かった。また、5月に冷凍加工したトリガイを翌年出荷直前の4月まで貯蔵した場合でも、同様にブライン区は品質変化が極めて少なかった。また、賞味期限確認のため微生物検査も行ったが問題はなかった（大腸菌：陰性、ビブリオ：陰性、一般生菌数： $10^2$  cfu/g）。この結果を受け、石川県漁業協同組合と養殖業者は高品質な冷凍品の商品化に向けた取り組みを始めており、当センターでは、「能登とり貝」の周年出荷による養殖経営体の安定した収入の確保に向け、引き続き支援していく。