

論文の内容の要旨

論文題目 : Studies on the volatile compounds in fish sauce

(魚醤の香気成分に関する研究)

氏名 : 深見 克哉

魚醤は、古代より魚と塩を原料として作られた伝統的、褐色の液体調味料で、アジア各国で広く用いられ、各地でそれぞれの固有の名前を持つ。とくに東南アジアにおいて、魚醤は調理には欠かせない素材であるとともに、アミノ酸、ペプチド、ビタミン、ミネラルの供給源としても重要である。近年、アミノ酸バランス、ペプチド、香気などに由来する特徴的な風味とエスニックブームにより、魚醤はヨーロッパ、日本などで市場を拡大し、加工食品へ利用される機会が多くなってきた。しかし、魚醤特有の香気のため、大豆醤油のように一般的に広く浸透するまでに至っていない。

魚醤には3つの特徴的香気、すなわちアンモニア様、チーズ様、肉感様の香気がある。アンモニア様香気には、アンモニア、アミン類、窒素含有化合物が関与し、チーズ様香気には、低分子脂肪酸とメチルケトン類が関与していると考えられている。また、肉感様香気は、ピラジン、ピリジン、ピリミジン類の窒素化合物とアルデヒド類が協調して形成すると考えられている。これらの多くの研究にもかかわらず、魚醤中の香気成分の役割は明確でなく且つ、本質的に不快と感じさせる香気成分の特定には至っておらず、その有効な除去方法は見いだされていなかった。

本研究は、このような背景の下、タイ産の魚醤を対象に、香気成分の同定を試みた。次に、魚醤中の不快と感じる香気成分を軽減する目的として、魚醤中より単離した微生物を

用いる方法を検討した。さらに、有効と認められた微生物の種属の特定と食品中の分布を明らかにしたもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. 魚醤中の特徴的香气成分の同定

まず、タイ産魚醤を対象に従来魚醤の分析に用いられることのなかった、香气成分の化学的变化が少ないと考えられるパーミアントラップ法を用いて、その捕香量とアロマ抽出希釈測定法 (AEDA 法) の希釈に対する有効性を予備実験で調べた。その結果、パーミアン時間と吸着量との間に相関が認められたので、パーミアントラップ法を用いてタイ産魚醤中の特徴的香气成分の詳細な分析と、AEDA 法を用いてそれら香气成分のタイ産魚醤に対する寄与度の測定を行った。まず、回収した香气成分を、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS) を用いた物質の同定を、さらに GC を用いたスニッフィングによるフレーバー希釈値 (抽出した香气成分の希釈した分母の値) の測定を行った。その結果、フレーバー希釈値 64 以上の香气成分として、2-メチルプロパナール (2MP と略記) (焦げ臭)、2-メチルブタナール (2MB) (焦げ臭)、2-ペンタノン (2P) (フルーツ臭)、2-エチルピリジン (2EP) (草臭)、ジメチルトリサルファイド (DMTS) (魚臭)、3-メチルチオプロパナール (3MTP) (草臭)、イソ吉草酸 (3MBA) (蒸れ臭) の 7 種類を同定した。

次に、これら香气成分が魚醤香气にどのように関与しているのかを調べた。まず、脱臭法について検討し、アルカリ処理により脱臭した魚醤の香气成分を測定した結果、2MP、2MB、2EP、DMTS が減少することが判明した。そこでこの脱臭した魚醤に当該 4 種の香气成分を再添加し、定量的記述分析法 (QDA 法) で官能評価し、魚醤の特徴的香气である、焦げ臭、魚臭、蒸れ臭、糞便臭、腐敗臭、チーズ臭、肉感、アンモニア臭に分けて、脱臭魚醤と比較した。その結果、2EP はチーズ臭を強くし、2EP と DMTS は、いずれも魚臭に共役して糞便臭に関与していることが判った。2EP は 2MP および 2MB と共役し、肉感を強くする効果が認められた。さらに 4 種類の香气成分は、いずれも蒸れ臭に共役して腐敗臭に関与することが明らかとなった。

2. マルソウダ魚醤もろみから単離した微生物による魚醤香气成分の改良

富山県において、マルソウダを原料に醤油麴を用いて作成した魚醤がタイ産魚醤に比べ、不快臭が少ないことから、マルソウダ魚醤もろみにタイ産魚醤特有の不快臭の産性を抑制する細菌が存在すると考え、その単離を試みた。22%食塩を含む栄養培地とグルコース・酵母エキス・ペプトン (GYE) 培地より、6 株の微生物が単離された。これら単離した菌を大量培養した後に、遠心単離で集菌してタイ産魚醤に添加して香气改良の効

果を予備的に調べた。R4Nu および R5G の 2 株が有望と考えられたので、まず、R4Nu を用いてタイ産の魚醤を処理し、詳細に官能評価した。その結果、口に入れての評価、臭いを嗅いだときの評価とも、魚臭、蒸れ臭、糞便臭、腐敗臭が軽減するとともに、未処理魚醤に比べて、好ましい(+2)から嫌い(-2)と配点した QDA 法による評価は、それぞれ+0.143 および+0.857 を得た。一方、GC-MS を用いて魚醤に特徴的な 7 香気成分の微生物添加による変化を調べたところ、2EP、DMTS はいずれも約 1/2 に減少し、3MBA はわずかに増加したが、2MP、2MB、2P および 3MTP は変化しなかった。さらに上記 7 成分以外の香気成分で、チメチルジサルファイド(DMDS)(魚臭)および酪酸(BA)(チーズ臭)はそれぞれ約 1/2 および 2/3 に減少し、3-メチルブタノール(3MBoI)および 2,6-ジメチルピラジン(2,6DMPyr)はそれぞれ約 10 倍および 80 倍に増加した。なお、3MBoI および 2,6DMPyr は閾値が高いため、魚醤の香気改良には、影響がないと判断された。

以上の結果を基に、試験管内のモデル実験により、分離微生物 R4Nu 株による 2MP, 2MB, 2P, 2EP, DMTS, 3MTP, 3MBA, DMDS および BA の 9 香気成分の資化の可能性を検討した。その結果、2MP, 2MB, 2EP, 3MTP および DMDS は、微生物の作用により減少することが判った。2EP および DMDS の変化は魚醤中の変化と一致したが、モデル実験では 2MP および 2MB が減少して、3MBA が増加する点で、魚醤中の変化とは一致しなかった。また、分析した全 9 香気成分については微生物単独による 2 次代謝産物の産生は認められなかった。従って、タイ産魚醤への微生物添加で減少しなかった香気成分 2MP, 2MB および 3MBA、さらに微生物添加で増加した香気成分 3MBoI および 2,6DMPyr は、魚醤中のアミノ酸から生成されている可能性が考えられた。そこで、タイ産魚醤と同じアミノ酸濃度と 22%食塩および pH5.4 に調整した合成魚醤で香気成分の生成を観察したところ、2MB および 2MP はそれぞれ、イソロイシンおよびバリンから生成されることが示された。さらに、ロイシンから経時的に 3-メチルブタノールが生成し 2 次代謝産物として 3MBoI が生成すること、および 3MBoI より 3 次代謝産物として 3MBA が生成されること、が明らかになった。

以上の微生物処理した魚醤の香気成分の変化、香気成分添加モデル実験結果、合成魚醤による香気成分生成試験結果の比較、および魚醤中の微生物添加後の香気成分の変化と香気成分の添加モデル実験による資化分析結果から、(1)当該微生物 R4Nu 株は、2MP, 2MB, 2EP, 3MTP および DMDS を減少させる能力をもつこと、(2)合成魚醤中のアミノ酸から 2MB, 2MP, 3MBoI および 3MBA が合成されるため、微生物を魚醤に添加したときの香気成分の変化において見かけ上これら香気成分が減少しなかった、ことが示唆された。一方、(3)微生物による 3MTP の資化能力は認められたにもかかわらず魚醤中で変化せず、合成魚醤からの生成もみられなかったこと、(4) 2,6DMPyr の微生物処理魚醤での増加に

ついでの原因は明らかにできなかったこと、などからさらに検討が必要と考えられた。

3. 単離した微生物の同定と食品中の分布

マルソウダを原料に、醤油麴を用いて作成した魚醤より単離した R4Nu および R5G の種属を決定し、食品中の分布について検討した。両菌株とも、生理性状より *Staphylococcus* 属と推定されたので、当該分離菌の 16S rRNA および rpoB 遺伝子の塩基配列を決定し、*Staphylococcus* 属のデータベースより当該分離菌 2 株は同一種で、*Staphylococcus nepalensis* に非常に近い種属と特定した。最終的にヒマラヤ産山羊の食道から単離された *S. nepalensis* との DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる分析から、本菌株を *S. nepalensis* と同定した。

次に、当該分離菌の rpoB 遺伝子の特異的プライマーを設計して、東南アジアより集めた魚醤と醤油麴を対象に、*S. nepalensis* の分布を調べた。各試料より、18%NaCl の栄養培地に生育する菌株 37 株を単離して PCR に供試した結果、*S. nepalensis* はベトナム、タイ、フィリッピン、日本産の魚醤 19 種類からは単離されなかったが、マルソウダを原料に製造した魚醤の醤油麴に見つかった。*S. nepalensis* が食品から単離された例は本研究が初めてである。醤油麴は、富山県下の醤油製造場で作られていることから、本菌は醤油製造場に定着し醤油麴を製造するときに混入したものと考えられ、食経験のある菌であることが推測された。

以上、本研究により、魚醤から 7 種類の特徴的香り成分が特定され、その中の 4 種類の香り成分が、焦げ臭、腐敗臭、蒸れ臭および糞便臭に関与することが見い出された。さらに、魚醤の香り改善能力を示す微生物をマルソウダを原料とした魚醤もろみより単離し、上述した特徴的香りに対する作用を明らかにした。本微生物は *S. nepalensis* と同定され、伝統的な醤油麴中に由来することが示唆された。これらの成果は魚醤の香りに関する新しい知見を示したもので、食品化学、生物化学工学に資するところが大きいものと考えられる。