

研究報文

培養法による醤油諸味中のヒスタミン生成 *Tetragenococcus halophilus*の判別

松本美樹¹ 鈴木昂徳² 高杉菜な子² 辻聡^{3*} 館博²

(¹ 東京農業大学大学院農学研究科醸造学専攻, ² 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科, ³ 東京農業大学国際食料情報学部国際農業開発学科)

(平成30年5月2日受理)

A culture method for detection of histamine-producing *Tetragenococcus halophilus* in soy sauce mash

Miki Matsumoto¹, Takanori Suzuki², Nanako Takasugi², Akira Tsuji^{3*}, Hiroshi Tachi²

¹ Department of Fermentation Science and Technology, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, 156-8052 Tokyo, Japan.

² Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, 156-8052 Tokyo, Japan.

³ Department of International Agriculture Development, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, 156-8052 Tokyo, Japan.

*Corresponding author. Akira Tsuji

Department of International Agriculture Development, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, 156-8052 Tokyo, Japan. Tel. : +81- 3 -5477-2394. FAX : +81- 3 -5477-2659. E-mail : at202493@nodai.ac.jp

ヒスタミン生成乳酸菌が醤油諸味中で優勢か否かを、ガス発生の有無で判別する安価で簡便な方法を構築した。本方法は、醤油諸味中からヒスタミンが検出されるよりも早く、ヒスタミン生成乳酸菌が優勢な環境かを判別可能である。

緒 言

近年、一部の醤油からヒスタミンが検出され問題となっている¹⁾。醤油諸味の熟成初期に *Tetragenococcus halophilus* が増殖する際、ヒスタミン生成能を持つ株が優勢に増殖してしまうことがヒスタミン生成の大きな原因である²⁾。一旦ヒスタミンが生成されると醤油諸味中からの除去が困難であるため、ヒスタミンが生成される前に検出し、対処する必要がある。施設の洗浄と殺菌を行い、有用乳酸菌の添加醸造により野生乳酸菌の増殖を抑制することでヒス

タミン生成の抑制が可能であるが^{3~7)}、作業の継続と効果を常に確認する必要がある。ヒスタミン生成乳酸菌の確認にはPCRによるヒストジニン脱炭酸酵素遺伝子の検出が有効であり^{8~9)}、ヒスタミンの測定にはHPLC¹⁰⁾ やチェックカラーヒスタミン¹¹⁻¹²⁾、バイオセンサ¹³⁾ が有効であるが、これらは測定費用や設備費もかかり、技術を必要とする。そこで、醤油諸味中のヒスタミン生成乳酸菌の増殖を安価で簡便に確認できる方法として、培養法によってヒスタミン生成乳酸菌が優勢かを確認する方法を構築した。*T. halophilus*は

ホモ乳酸菌のため通常グルコースを資化して二酸化炭素は生成しないが、ヒスタミン生成能を有する株ではL-ヒスチジンからL-ヒスタミンを生成する際にヒスチジン脱炭酸酵素の働きにより二酸化炭素が生成される。この酵素反応によって生じた二酸化炭素をダーラム管で捕集し、ガス発生を確認することによりヒスタミン生成乳酸菌が優勢な環境かを判別可能であった。

実験方法

1. 供試菌株

供試菌株として、濃口醤油諸味から分離された当研究室保存の*T. halophilus* No.2 (ヒスタミン非生成株) およびNo.4, No.6 (ヒスタミン生成株) をMRS培地 (Difco社製MRS 5.5%, NaCl 10%) 10 mlに培養液100 μ lを接種し、30°Cで72時間前培養して用いた。

2. ヒスチジン添加量の検討

L-ヒスチジンの添加量を変化させたダーラム管 (ϕ 6 \times 30 mm) 入りヒスチジン添加MRS培地 (Difco社製MRS 5.5%, NaCl 10%, L-ヒスチジン 0%, 0.5%, 1.0%, 2.5%, アジ化ナトリウム0.001%, シクロヘキシミド0.001%) を調製し、培地 5 mlにヒスタミン非生成株No.2またはヒスタミン生成株No.4, No.6の培養液50 μ lをそれぞれ接種し、30°Cで72時間培養を行った。培養後、培養液のpH, ヒスタミン濃度を測定し、分光光度計 (SHIMADZU UV-2000) により660 nmにおける吸光度を測定し生育曲線を作成した。なお、ヒスタミン濃度はキッコーマンバイオケミファ社製チェックカラーヒスタミンを用いて常法に従い測定を行った。

3. ヒスタミン生成量の測定およびガス発生の観察

ヒスタミン非生成株No.2およびヒスタミン生成株No.4をダーラム管入り2.5%ヒスチジン添加MRS培地 5 mlにそれぞれ50 μ l接種し、30°Cで72時間培養を行った。培養中、経時的にダーラム管内のガス発生を確認し、培養液のヒスタミン濃度の測定および生育曲線を作成した。

4. 初発菌数とヒスタミン生成量・ガス発生の関係

ヒスタミン非生成株No.2およびヒスタミン生成株No.4, No.6を0.85%生理食塩水を用いて菌体洗浄し、 $10^8 \sim 10^9$ 個/mlの菌液を調製した。調製した菌液1mlとヒスタミン非検出の濃口醤油諸味250 μ lをダーラム管入り2.5%ヒスチジン添加MRS培地に接種して角型ジャー (AnaeroPack[®]用) 内に入れ30°Cで60時間嫌気培養 (AnaeroPack[®]・ケンキ; 三菱ガスK.K.) を行った。培養後、ガス発生を確認し、ヒスタミン濃度測定を行った。

5. 各種醤油諸味からの乳酸菌の分離

供試試料としてA社の濃口醤油諸味20種 (A 1 ~ A20) を使用した。各醤油諸味のヒスタミン濃度を測定後、ダーラム管入り2.5%ヒスチジン添加MRS培地に250 μ l接種した。30°Cで60時間嫌気培養を行い、集積培養後ガス発生の確認を行った。さらにMRS平板培地を用いて集積培養液から単一の乳酸菌を分離し、ガス発生およびヒスタミン生成能を確認した。

6. 競合培養によるヒスタミン抑制試験

ヒスタミン非生成株No.2および方法5にて取得したヒスタミン非生成株b5, ヒスタミン生成株b10, b14, b20を30°Cで72時間前培養して使用した。非生成株と生成株を1000:1の割合でダーラム管入り2.5%ヒスチジン添加MRS培地に接種して嫌気条件下で競合培養を行い、ガス発生の確認および培養液のヒスタミン濃度測定を行った。

7. 乳酸菌添加諸味のヒスタミン生成

1 L容三角フラスコに、仕込みの際に供試菌株を

表1 乳酸菌添加諸味

試料名	添加乳酸菌
N	無添加区
A	No.2 (非生成株)
B	No.4 (生成株)
C	No.6 (生成株)
D	No.2:No.4=1000:1
E	No.2:No.6=1000:1

10⁶個/g諸味になるよう添加した計 6 種類の濃口醤油諸味 (825 ml) を仕込んだ (表 1)。各諸味は 1 週間の冷蔵 (4 °C) 後に 30 °C で発酵・熟成を行い, 1 週間毎に試料を採取してヒスタミン濃度を測定した。また, ダーラム管入り 2.5% ヒスチジン添加 MRS 培地 5 ml に採取した諸味 250 μ l を添加して 30 °C 60 時間の嫌気培養を行い, ガス発生確認および培養液のヒスタミン濃度測定を行った。

結 果 および 考 察

1. ヒスチジン添加量の検討

ヒスチジン添加量が乳酸菌の生育に与える影響を

検討した。供試菌株 3 株は全てヒスチジン添加量の増加につれて生育は旺盛になったが, 菌株間では生育の差は認められなかったためヒスチジンによる生育阻害はないと判断した (表 2)。また, ヒスチジンを 0 ~ 1.0% 添加した培地の培養液の pH に菌株間で差はみられなかった。しかし, ヒスチジン 2.5% 添加培地ではヒスタミン生成株 No.4 および No.6 の培養液は, No.2 よりも高い pH を示した (表 2)。これは多量に生成されたヒスタミンにより培養液の pH が上昇したものだと考えられた。

ヒスタミン生成菌はヒスチジンを添加した全ての培地条件でヒスタミンを生成した。また, ヒスチジン

表 2 ヒスチジン添加量の影響

菌株 No.	分析項目	ヒスチジン濃度			
		0 %	0.5 %	1.0 %	2.5 %
	O.D. ₆₆₀	1.52	1.79	1.88	2.08
	pH	4.5	4.5	4.6	4.8
No.2	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	ガス発生	—	—	—	—
	O.D. ₆₆₀	1.44	1.83	1.97	2.14
	pH	4.5	4.5	4.7	6.0
No.4	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	1443	2952	3200
	ガス発生	—	—	++	+++
	O.D. ₆₆₀	1.48	1.89	1.98	2.19
	pH	4.5	4.5	4.7	6.0
No.6	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	1487	2733	3406
	ガス発生	—	—	+	++

N.D. : Not Detected

ヒスチジン濃度 (%)	0	0.5	1.0	2.5
培養前				
培養後				
ガス発生	—	—	+	++

図1. ガス発生量(No.6)

を1.0%以上添加した培地ではダーラム管内にガス発生も確認され(図1, 表2), 2.5%添加した培地が特に顕著なガス発生を示した。ヒスタミン非生成株は全ての培地条件においてガス発生せず, ヒスタミンも非検出であった。これらの結果により, ヒスチジン2.5%添加MRS培地を用いて, ガス発生によるヒスタミン生成菌の選別が可能であると判断し, 以降の試験に用いた。

2. 乳酸菌の生育とヒスタミン生成およびガス発生の変化

乳酸菌の生育に伴うヒスタミン生成量とガス発生量の変化を調査するために, 経時的にヒスチジン添加MRS培地を用いて培養した培養液のガス発生の有

無と培養液中のヒスタミン濃度測定, 生育曲線の作成を行った。No.4からは対数増殖期の半ばである培養30時間後には200 ppm程度のヒスタミンが確認され, 定常期に達した36時間後には微量なガス発生も確認した(図2-A)。また, 培養60時間程度で目視での確認に十分なガス発生量を確認した。同条件においてNo.2では生育が進行し, 定常期に達してもヒスタミンもガス発生も非検出であった(図2-B)。以上の結果より, ヒスタミン生成とガス発生では検出可能となる時間が異なることが示された。これはチェックカラーヒスタミンに比べてガス発生を確認する方法の検出感度が低いことが原因であると考えられる。ガス発生を目視で確認するためには, 培地中に菌体が増殖し多量のヒスタミンが生成されている必要があると判断した。

3. 初発菌数とヒスタミン生成量・ガス発生との関係

試料を培地中で集積培養することで, 試料中にヒスタミン生成菌が優勢な状態であるか否かの確認に用いることが可能であるか検討するために, 醤油諸味と各供試菌株をヒスチジン培地に添加して培養し, ヒスタミン濃度測定およびガス発生の確認を行った。No.2では醤油諸味を添加した培養液からヒスタミンおよびガス発生は非検出であった(表3)。一方, No.4とNo.6では初発菌数 $10^3 \sim 10^4$ 個/ml以上でヒスタミンとガス

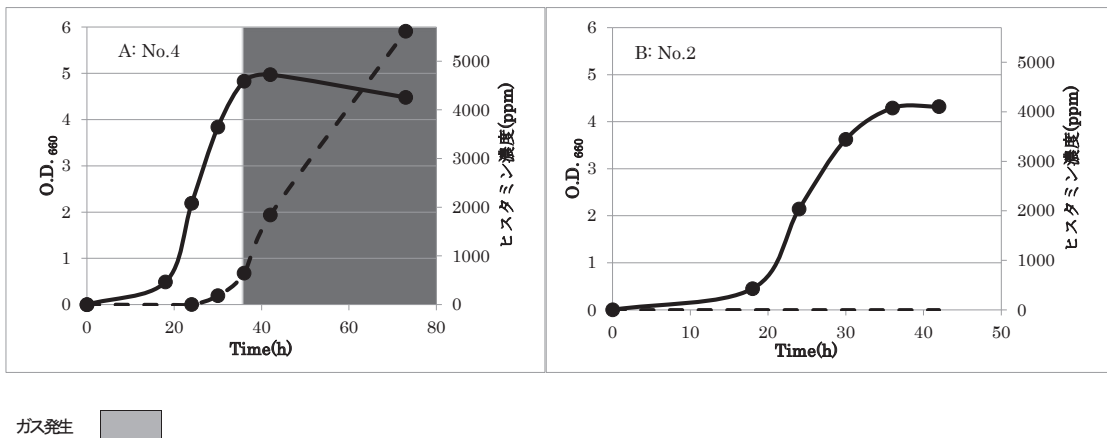


図2. 乳酸菌の生育に伴うヒスタミン生成とガス発生
 実線: O.D.₆₆₀, 点線: ヒスタミン濃度

表3 初発菌数とヒスタミン濃度・ガス発生

初発菌数	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
No.2	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	ガス発生	—	—	—	—	—	—	—	—
No.4	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	N.D.	2310	5260	5090	5000	5090	5270
	ガス発生	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++
No.6	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	N.D.	N.D.	2370	5180	4670	5510	5390
	ガス発生	—	—	—	+	++	+++	+++	+++

N.D. : Not detected

表4 醤油諸味からの乳酸菌分離

諸味	ヒスタミン濃度 (ppm)	集積培養による ガス発生	取得乳酸菌名 (ヒスタミン生成能)
A1	N.D.	—	
A2	35	—	
A3	44	—	
A4	N.D.	—	
A5	N.D.	—	b5 (—)
A6	55	—	
A7	55	—	
A8	N.D.	—	
A9	20	—	
A10	19	+++	b10 (+)
A11	N.D.	—	
A12	N.D.	—	
A13	N.D.	—	
A14	54	+++	b14 (+)
A15	28	—	
A16	33	—	
A17	36	—	
A18	16	—	
A19	10	—	
A20	N.D.	+++	b20 (+)

N.D. : Not detected

発生を検出した(表3)。また、初発菌数 10^6 個/ml以上の試料からは定量限界を超過するヒスタミン濃度が検出された。これは高い初発菌数により短い培養時間でも、多量のヒスタミンを生成可能な環境が構築されたためだと考えられる。初発菌数 $10^1 \sim 10^3$ 個/mlの範囲で検出できなかった原因は乳酸菌数が少ないことによると考えられる。ガス発生を目視で確認するためには菌体が増殖し多量のヒスタミンを生成する必要がある、初発菌数が少ない場合には培養60時間では生育量が足りなかったと考えられた。したがって、ガス発生による判別は諸味中に 10^4 個/ml以上のヒスタミン生成株が存在していれば、他の微生物や諸味中の成分の影響を受けずに利用可能であると判断した。

4. ガス発生法を用いた醤油諸味からの乳酸菌の分離

ヒスタミン濃度測定の結果、20種のうち12種(A2, A3, A6, A7, A9, A10, A14, A15, A16, A17, A18, A19)の諸味から10~55 ppmの濃度でヒスタミンが検出された(表4)。また各諸味を集積培養した結果、培養液3種(A10, A14, A20)においてガス発生を確認した(表4)。ヒスタミンを生成した諸味の培養液が必ずしもガス発生するとは限らなかったが、これは諸味の熟成進行に伴い、諸味中の乳酸菌数が減少したためだと考えている。各集積培養液から、3株(b10, b14, b20)のヒスタミン生成株を取得した(表4)。また同集積培養液から対照として1株(b5)のヒスタミン非生成株を取得した(表4)。取得した全てのヒスタミン生成株とヒスタミン非生成株は、ヒスチジン添加MRS培地中でヒスタミン生成とガス発生が図2で示したヒスタミン生成株No.4、ヒスタミン非生成株No.2と同様の挙動を示すことを確認した(データ記載せず)。

5. 競合培養によるヒスタミン抑制試験

ヒスタミン生成株とヒスタミン非生成株の競合培養試験の結果、全ての組み合わせにおいてヒスタミンもガス発生も非検出であった(表5)。ヒスタミン生成株は単体で培養した際にはヒスタミンを生成し、ガス発生も確認された。このことから、培養法は様々な諸味由来のヒスタミン生成株を用いても、ヒスタミン

表5 分離源の異なる乳酸菌の競合培養によるヒスタミン生成抑制

ヒスタミン非生成株	ヒスタミン生成株	ヒスタミン濃度(ppm)	ガス発生
No.2	b10	N.D.	—
No.2	b14	N.D.	—
No.2	b20	N.D.	—
b5	b10	N.D.	—
b5	b14	N.D.	—
b5	b20	N.D.	—

N.D. : Not Detected

生成株が優勢な環境を判別可能であると判断した。

6. 乳酸菌添加諸味のヒスタミン生成

ヒスタミン非生成株のみ(A諸味)、または乳酸菌無添加の試料諸味(N諸味)からはヒスタミンが検出されなかった。また、各諸味を1週毎に採取し集積培養した培養液でも、A諸味とN諸味はヒスタミンもガス発生も非検出であった(表6)。一方、ヒスタミン生成株のみを添加した試料諸味(B諸味・C諸味)では、熟成4週目から81 ppmと67 ppmのヒスタミンが検出された。また、この諸味を1週毎に採取し集積培養したところ、熟成3週目の諸味培養液から122 ppm・176 ppmのヒスタミンとガス発生を検出した(表6)。そのため、集積培養を用いることで諸味からヒスタミンが検出されるより1週間早くヒスタミン生成菌の優勢状態を確認可能であると示した。

また、ヒスタミン非生成株とヒスタミン生成株を1000:1の競合条件で添加した試料諸味(D諸味・E諸味)からはヒスタミンが検出されず、諸味を1週毎に回収し集積培養した培養液からもヒスタミンもガス発生も非検出であった(表6)。したがって、ヒスタミン生成菌が諸味中に混在している状態であっても、優勢に生育していない環境でなければヒスタミンは検出されずガス発生もしないことを示した。以上の結果から研究室内の試醸規模ではガス発生によりヒスタミン

表 6 乳酸菌を添加した試醸諸味を用いたガス発生法の確認

期間 (週)		諸味					諸味の集積培養液						
		N	A	B	C	D	E	N	A	B	C	D	E
1	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	ガス発生	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	ガス発生	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	122	176	N.D.	N.D.
	ガス発生	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	—
4	ヒスタミン濃度 (ppm)	N.D.	N.D.	81	67	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	327	330	N.D.	N.D.
	ガス発生	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	—	—

N.D. : Not Detected

生成株が諸味中で優勢な状態であるかを確認可能であると判断した。

参 考 文 献

- 1) 田上秀男: 本誌, 41, 165 (2015)
- 2) 中台忠信: 本誌, 38, 70 (2012)
- 3) 田上秀男, 野田義治, 日高修, 松岡清司, 小林真志, 紅林孝幸: 本誌, 41, 327 (2015)
- 4) 植木達朗, 片岡由希子, 脇山元気, 案浦謙二, 大場和徳, 野田義治: 本誌, 42, 155 (2016)
- 5) 脇山元気, 植木達朗, 大場和徳, 野田義治: 本誌, 43, 387 (2017)
- 6) 脇山元気, 植木達朗, 大場和徳, 野田義治: 本誌, 43, 395 (2017)
- 7) N. Udomsil et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 59, 8401 (2011)
- 8) J. Landete et al.: *Int. J. Food Microbiology*, 117, 258 (2007)
- 9) E. Coton et al.: *Journal of Microbiological Methods*, 63, 296 (2005)
- 10) B. Kimura et al.: *Int. J. Food Microbiology*, 70, 71 (2001)
- 11) T. Kuda et al.: *Food Chemistry*, 130, 596 (2012)
- 12) 一柳 悠子, 大野 尚子, 鈴木 繁哉, 本間 茂: 本誌, 41 (6), 385 (2015)
- 13) 花江佳孝, 橋本忠明, 築山良一: 本誌, 42 (3), 205 (2016)