

研究報文

## 宮崎県における醤油もろみ中のヒスタミンの状況とその低減に 有効な乳酸菌スターターの選抜

高山 清子<sup>1</sup> 福良 奈津子<sup>1</sup>, 山本 英樹<sup>1</sup>, 水谷 政美<sup>1</sup>, 岩佐 達也<sup>2</sup>, 児玉 崇<sup>2</sup>, 吉田 秀恵<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>宮崎県食品開発センター, <sup>2</sup>ヤマエ食品工業株式会社)

(令和元年 6 月 24 日受理)

### Investigation of Soy Sauce Mash in Miyazaki Prefecture and Screening of Halophilic Lactic Acid Bacterium Starter which is Effective for Histamine Reduction.

Kiyoko Takayama, Natsuko Fukura, Hideki Yamamoto, Masami Mizutani, Tatsuya Iwasa,  
Takashi Kodama, Hidetsugu Yoshida

(<sup>1</sup>Miyazaki Prefectural Food Research and Development Center

<sup>2</sup>Yamae Food Products Co., Ltd.)

宮崎県の醤油製造場10社中 8 社でヒスタミンが検出された。醤油もろみ59検体から218株を分離し、ヒスタミン非産生で凝集性を有する乳酸菌を選抜した。小仕込み試験を行ったところ、乳酸菌を添加した 7 試験区全てにおいてヒスタミンの生成が抑制されていた。また、菌株によってアミノ酸の代謝に違いがみられた。生揚げの官能評価においては、アミノ酸を代謝せず、pHの低下が緩やかな MS0204 株を添加した生揚げの評価が最も高く、優良な醤油乳酸菌として選抜した。

#### 緒 言

「和食；日本人の伝統的な食文化」がユネスコ無形文化遺産に登録され、伝統的な発酵食品である醤油の海外における消費拡大が期待されている。宮崎県においては、古くから醸造の町として栄えた日南市大堂津<sup>1)</sup>をはじめ、県内17社中10社で自家製もろみを造っており、他県に比べると一貫製造の工場が多いという特徴がある。また、もろみタンクは、木桶やコンクリート、FRP製と様々であり、乳酸菌や酵母を添加せずに蔵付きの微生物に頼った醤油製造を行っている。

一方、アレルギー様症状を引き起こすヒスタミンに関しては、発酵食品中での蓄積が問題となっている。醤油製造においては、野生乳酸菌 *Tetragenococcus*

*halophilus* (*T. halophilus*) による汚染対策として、工場内の洗浄とヒスタミン非産生乳酸菌スターターの添加が効果的であることが田上ら<sup>2,3)</sup>、袴田ら<sup>4)</sup>により報告されている。また、植木らは、醤油乳酸菌には凝集性を有する菌株があり<sup>5)</sup>、生揚げの透明性向上<sup>6)</sup>及び不揮発性アミン類の低減に有効であること<sup>7)</sup>を報告している。そこで、本研究では本県におけるヒスタミンの実態調査と醤油製造に適したヒスタミン非産生乳酸菌スターターの選抜を行ったので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 宮崎県におけるヒスタミンの実態調査

宮崎県内において自家製もろみを作っている醤油

製造場10工場から59検体の醤油もろみを採取し供試試料とした。乳酸は、醤油もろみを20倍希釈し、0.45  $\mu$ mメンブランフィルターでろ過後、高速液体クロマトグラフ (Prominence有機酸分析システム, (株) 島津製作所) により測定した。ヒスタミンは醤油もろみを1,000倍に希釈し、0.45  $\mu$ mメンブランフィルターでろ過後、LC/MS/MS (API3200, (株) エービー・サイエックス) により測定した(表1)。

各醤油もろみのヒスタミン生成菌の有無を確認するために、PCRによりヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子の有無を確認した。L-ヒスチジンを0.3%, 塩化ナトリウムを10%添加しpH 7.0に調整したMRS培地 (Difco) 10 mlに醤油もろみを0.1 ml接種し、30°Cで6日間培養後、集菌した菌体からPrepman Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher SCIENTIFIC) を用いてDNAを抽出した。

ヒスタミンを生成する醤油乳酸菌 *T. halophilus* はプラスミドにピルボイル型HDC遺伝子 (*hdcA*) を有していることから、*T. halophilus* の *hdcA* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に特異的なプライマー(2745f: 5'-TTGAACACACTTGGGGTTGA-3', 3566r: 5'-AATTGAGCCACCTGGAATTG-3') を Primer 3 (v. 0.4.0, <http://bioinfo.ut.ee/primer3>

-0.4.0/) にて作成し、PCR (TaKaRa Taq™ HS Fast Detect (タカラバイオ(株)) によりHDC遺伝子の有無を確認した。なお、ポジティブコントロールには、*Tetragenococcus muriaticus* (*T. muriaticus*) NBRC100499<sup>T</sup>から抽出したDNAを使用した。

## 2. 醤油もろみからの乳酸菌の分離と分類

耐塩性乳酸菌の分離には、塩化ナトリウムを10%添加したMRS培地 (pH 7.0) を使用した。前述の方法にてDNAを抽出後、16S rRNA遺伝子解析または *T. halophilus* の16S rRNA遺伝子に特異的な領域のPCRによる分離株の分類を行った。16S rRNA遺伝子解析は、MicroSEQ 500 16S rDNA PCR Kit 及び MicroSEQ 500 16S rDNA Sequencing Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC) を用いて行い、相同性検索にはMicroSEQ微生物同定ソフトウェア v3.0 (Applied Biosystems, U.S.) を用いた。また、16S rRNA遺伝子解析以外の *T. halophilus* の同定法として、*T. halophilus* の16S rDNAに特異的なプライマー(193f: 5'-AGCTCAAAGGCGCTTTAC-3', 480r: 5'-TTCTGGTCAGCTACCGTC-3')<sup>8)</sup> を用いたPCRを試みた。なお、ポジティブコントロールには、*T. halophilus* NBRC12172, 109726, 109727, 100498

表1. LC/MS/MSによるヒスタミンの分析条件(絶対検量線法)

LC条件	
カラム	Inertsil Amide 150 × $\Phi$ 2.1 mm I.D. (ジーエルサイエンス)
移動相	A = 水, B = アセトニトリル, C = 500 mM 酢酸アンモニウム
移動相組成	A : B : C = 45 : 50 : 5
流量	0.2 ml/min
カラム温度	40°C
注入量	2 $\mu$ l
測定時間	15 min
MS/MS条件	
イオン化方法	ESI (positive)
カーテンガス (CUR)	40 psi
イオンスプレーの電圧 (IS)	5500.0 V
温度 (TEM)	600.0 °C
ネブライザーのガス圧 (GS1)	80.0 psi
ターボガス圧 (GS2)	70.0 psi
測定モード	MRM
Q1 / Q3mass	112.1 Da / 95.1 Da

から抽出したDNAを用い, 比較として *T. muriatricus* NBRC 100499<sup>7</sup>から抽出したDNAを使用した。

また, 分離株については前述の方法によりHDC遺伝子の有無を確認した。

### 3. 凝集性を有する乳酸菌の選抜

植木らの方法<sup>5)</sup>を参考に, 乳酸菌のろ紙透過率により凝集性を有する乳酸菌を選抜した。醤油もろみから分離した乳酸菌を16.5%の塩化ナトリウムを含むMRS培地 (pH 7.0) にて30℃, 4日間静置培養した。培養液をろ過 (No.2, ADVANTEC) し, ろ過前後の培養液の濁度 (660 nm) を分光光度計 (UV2100, (株) 島津製作所) で測定した。ろ過前培養液の濁度に対するろ過後培養液の濁度の百分率を透過率として算出し, 透過率が30%以下の乳酸菌を凝集性を有する株として選抜した。

### 4. 乳酸菌を添加した醤油の小仕込み試験

ヤマエ食品工業 (株) において乳酸菌を添加した醤油の小仕込み試験を行った。麴1,215 gに23.2%の塩水2,065 mlを混合し, 果実酒ビン5号 (4 l) に仕込んだ。乳酸菌は凝集性が確認された9株のうち, 過度にメチオノールを生成し漬物・薬品臭を生じた3株を除く

6株 (MS0304, MS0305, MS1308, MS6501, MS6504, MS0204) と市販株1株を醤油培地 (グルコース 2.0 g, 塩化ナトリウム 7.5 g, 淡口生揚げ 25 ml, 水 75 ml, pH 7.0) で前培養し, 10<sup>6</sup> CFU/mlとなるように麴と塩水の混合時に添加した。対照の乳酸菌無添加区と合わせた8試験区をB-1試験区とした。仕込み後30日間は15℃, それ以降は30℃で管理し, 90日で試験を終了した。また, 工場の製造ラインにおける野生乳酸菌の影響を確認するため, 仕込み5日後の屋外タンクからもろみ3 lをサンプリングし, B-1試験区と同様に対照の乳酸菌無添加区と合わせた8試験区をB-2試験区とした。

また, 県内醤油もろみから分離したヒスタミン産生菌38L10株及びMS0204株を添加した小仕込み試験を行った。麴800 gに23.2%塩水960 mlを混合し, 上記培地で前培養した38L10株を10<sup>2</sup>~10<sup>5</sup>, MS0204株を10<sup>5</sup> CFU/mlとなるようにそれぞれ添加した。29日目の酵母添加まで15℃, 添加以降30℃で管理し, 121日で試験を終了した。もろみ上清を2,000倍希釈し0.45 μmフィルターろ過後, LC/MS/MS (API3200, (株) エービー・サイエックス) により測定した (表2)。

表2. LC/MS/MSによるヒスタミンの分析条件 (内部標準法)

LC条件	
カラム	Inertsil Amide 150 × Φ2.1 mm I.D. (ジールサイエンス)
移動相	A = アセトニトリル, B = 0.1% ギ酸-アセトニトリル, C = 40 mM ギ酸アンモニウム
移動相組成	A : B : C = 4 : 3 : 3
流量	0.6 ml/min
カラム温度	40℃
注入量	10 μl
測定時間	10 min
MS/MS条件	
イオン化方法	ESI (positive)
カーテンガス (CUR)	25 psi
イオンスプレーの電圧 (IS)	4500.0 V
温度 (TEM)	400.0 °C
ネブライザーのガス圧 (GS1)	50.0 psi
ターボガス圧 (GS2)	80.0 psi
測定モード	MRM
Q1 / Q3 mass	ヒスタミン: 112.04 Da / 95.00 Da, ヒスタミン-d4 (内部標準): 115.87 Da / 99.00 Da

### 5. もろみ発酵経過中のpH及びアミノ酸の変化

各もろみは 0, 15, 30, 45, 60, 90日後に採取し、pH及び遊離アミノ酸濃度を測定した。遊離アミノ酸は0.02 mol/l 塩酸で200倍に希釈し、0.45  $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過後、高速アミノ酸分析計(L-8900, (株) 日立製作所)を用いてニンヒドリン発色法により測定した。

### 6. *T. halophilus*株のクエン酸資化とジアセチル生成

選抜した*T. halophilus* 6株のクエン酸資化とジアセチル生産性を調べた。クエン酸資化性試験にはクエン酸一水和物0.3%, 塩化ナトリウム10%をMRS培地に添加し、pH 7に調整した培地を使用した。また、比較としてクエン酸を添加しない培地を使用した。6株の前培養液を培地に接種し、30°Cで5日間静置培養後、培養液中のジアセチル及び有機酸濃度を求めた。ジアセチルは、GC/MS (GCMS-QP2010 Plus, AOC-5000 Auto Injector (株) 島津製作所)を用いて測定した(表3)。

### 7. 生揚げ醤油の官能評価

B-1試験区の官能評価を評点法、順位法の2段階に分けて実施した。

評点法では、市販株を使用した生揚げ醤油を基準品(評点3)に設定し、他の試料を5段階(1:評価低

い~5:評価高い)で、宮崎県食品開発センターの職員5名とヤマエ食品工業(株)の社員7名をパネリストとして評価した。

順位法では、評点法で選抜した3試料と基準品とした市販株製生揚げについて、再度宮崎県食品開発センターの職員5名とヤマエ食品工業(株)の社員6名をパネリストとした官能評価により順位をつけ、1位の菌株を定めた。

なお、全ての官能評価は試料名を伏せて実施し、味、香り、総合の3項目について評価した。

## 結果及び考察

### 1. 宮崎県におけるヒスタミンの実態調査

宮崎県内の醤油もろみの有機酸及びヒスタミン濃度を調査した結果、野生乳酸菌によるヒスタミン生成が確認され、ヒスタミン濃度が高いもろみは乳酸濃度が高い傾向にあった。(図1)。また、コーデックスにおける魚醤のヒスタミン濃度の基準は400 mg/kgであるが、全てのもろみで基準値以下の値であった。PCRにより、醤油もろみ59検体中31検体でHDC遺伝子が検出された。また、ヒスタミンを検出せず、かつ、PCRによりHDC遺伝子が検出されなかったのは、10工場中2工場であった。

表3. GC/MSによるジアセチルの分析条件

SPME	
SPMEファイバー	60 mm Polyethylene Glycol
試料	3 ml / 10 ml/バイアル
SPME条件	バイアル温度 40°C, 抽出時間 30分間 (アジテーション ON), ヘッドスペース法
GC	
注入口温度	230°C
カラム	DB-WAX 30 m, Diam. 0.25 mm, Film 0.25 mm
オープン	40°C (10分) - 4°C/min - 230°C (5分)
インターフェース温度	230°C
MS	
イオン化モード	EI
イオン源温度	200°C
測定モード	選択イオン検出法 (SIM) m/z = 86

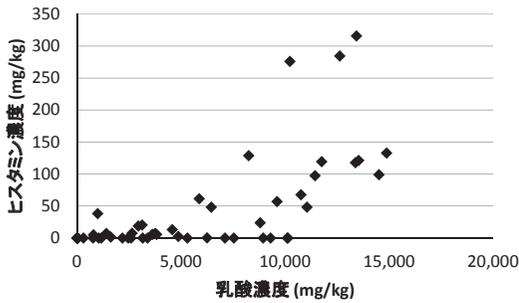


図 1. 宮崎県内の醤油もろみ中の乳酸濃度とヒスタミン濃度

## 2. 醤油もろみからの醤油乳酸菌の分離と分類

採取した醤油もろみから218株を分離した。16S rRNA遺伝子解析の結果、醤油もろみから分離した218株中206株が*T. halophilus*、12株が*Staphylococcus*属と分類された。また、16S rRNA遺伝子解析で*T. halophilus*と分類された全ての菌株について、*T. halophilus*に特異的な約300 bpのバンドが確認された。また、PCRによりHDC遺伝子の有無を確認したところ、4株でHDC遺伝子が検出された。これはもろみ中のHDC遺伝子検出頻度に対して低い割合であるが、もろみが古くHDC遺伝子保有株の残存が少なかった、あるいは分離培地での保有株の生育が悪かったためであると考えられた。

## 3. 凝集性を有する乳酸菌の選抜

乳酸菌の選抜には、HDC遺伝子が検出された4株を除く202株で凝集性試験を行った。その結果、ほとんどの乳酸菌の凝集性が低い中、透過率30%以下の乳酸菌が9株確認された(図2)。

## 4. 小仕込み試験におけるヒスタミン生成確認

野生乳酸菌の影響を確認するため、屋外タンクで5日間発酵させたもろみを同様に仕込んだB-2試験区の90日後のヒスタミン濃度を測定した。その結果、乳酸菌を添加した全ての試験区ではヒスタミンのピークは確認されなかったが、乳酸菌を添加しなかった対照試験区では定量下限値(10 µg/l)未満のヒスタミンのピーク(保持時間 7.9 分)が確認された(図3)。こ

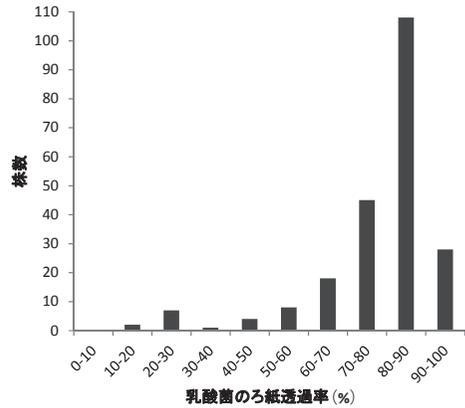


図 2. 醤油もろみから分離した*T. halophilus*のろ紙透過率

のにより、仕込み時に乳酸菌を添加することは混入する野生乳酸菌によるヒスタミン生成に対する抑制に効果があることを確認できた。

そこでさらに、ヒスタミン産生抑制について確認するため、もろみから分離したヒスタミン産生乳酸菌38L10株及びMS0204株を1/1000~1/1まで比率を変えて添加した小仕込み試験を実施し、ヒスタミン濃度を測定した。図4のとおり、産生菌に対して1000倍量の非産生菌を添加した試験区において仕込み121日後ヒスタミンは検出されず、MS0204株のヒスタミン産生抑制能が確認された。

## 5. 乳酸菌を添加した醤油の小仕込み試験におけるpHの変化

B-1試験区各醤油もろみの0, 15, 30, 45, 60, 90日後のpHを測定した(図5)。乳酸菌を添加したもろみは15日を過ぎて徐々にpHが低下し始め、温度を30℃に上げた30日後から急激にpHが低下した。その後はpHの変動は小さかった。醤油醸造に使用される*T. halophilus*の至適pHは中性付近であり、pH 5.0以下では生育が抑制され、pH 4.6程度で発酵は停止すると言われている<sup>9)</sup>。MS0304株とMS0305株の90日後のpHは4.6であり、酸耐性の強い菌株であると考えられた。また、MS0204株はpHの低下が緩やかであった。

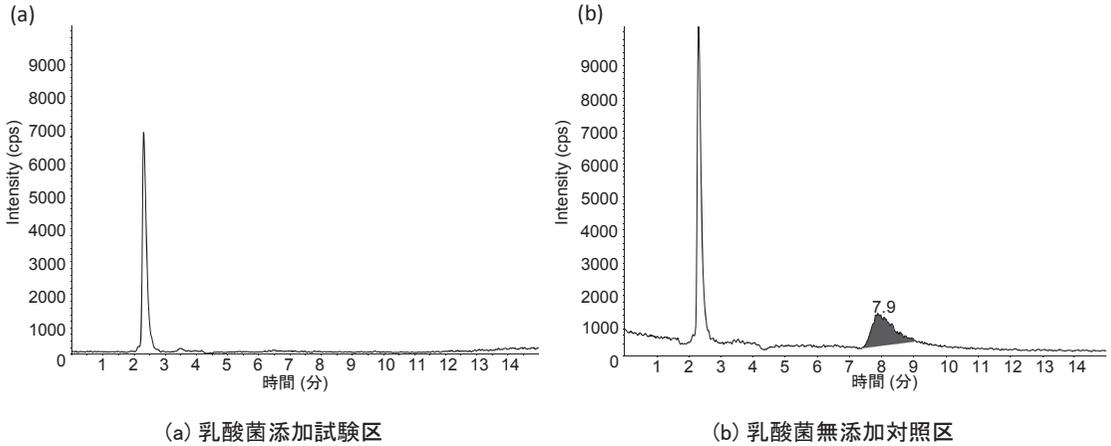


図 3. 90日間発酵後の醤油もろみのLC/MS/MSクロマトグラム(B-2 試験区)

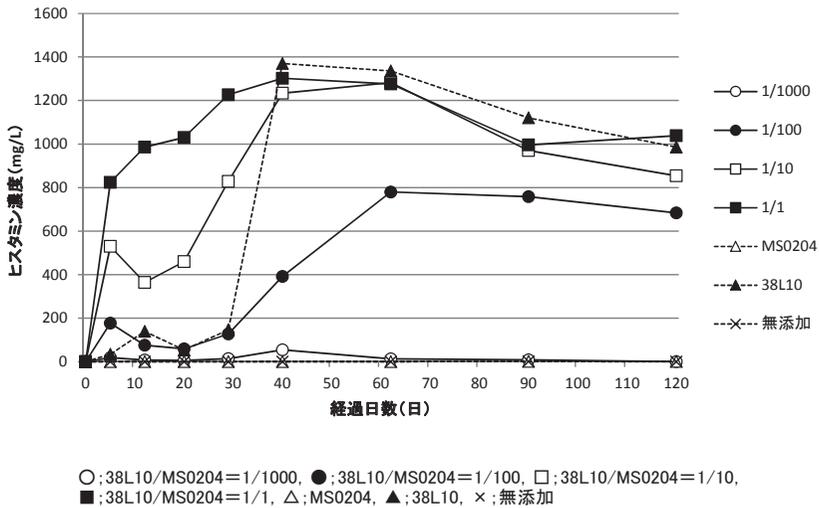


図 4. ヒスタミン産生乳酸菌(38L10)及び非産生乳酸菌株(MS0204)を添加した醤油もろみのヒスタミン含量

### 6. 乳酸菌を添加した醤油の小仕込み試験におけるアミノ酸の変化

B-1 試験区の各醤油もろみの 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90日後の遊離アミノ酸濃度を測定し, 菌株による違いが見られたアスパラギン酸, アラニン, アルギニン, オルニチン含量の変化を図 6 に示した。*T. halophilus*によるアミノ酸の脱炭酸反応は既知のものであり, 酸味のあるアスパラギン酸をマイルドな味を持つアラニンへ変換する菌株は, 醤油の香味を

改善すると言われている<sup>10)</sup>。MS6504株は30日後からアスパラギン酸の濃度が減少し, アラニンの濃度が増加したことから, アスパラギン酸からアラニンへの変換能を有する菌株であると考えられた。MS6501, MS6504, MS1308株は30日後からアルギニンの濃度が減少し, オルニチンの濃度が増加したことから, アルギニンからオルニチンへの変換能を有する菌株であると考えられた。また, アルギニンをオルニチンに変換する際, アンモニア 2 分子が生成されたことにつ

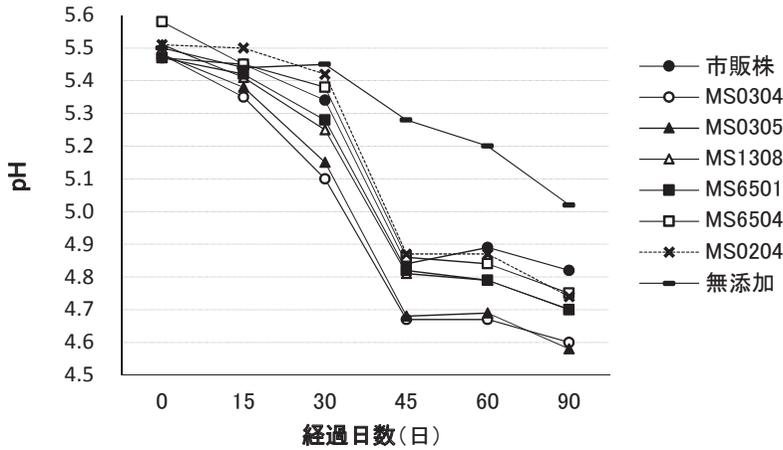
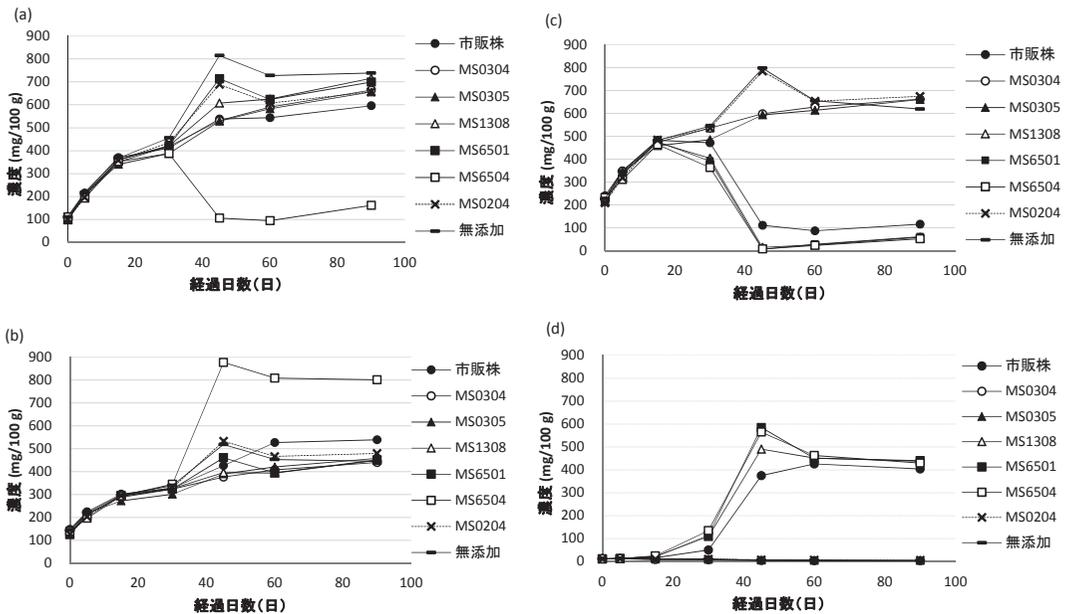


図 5. 各乳酸菌株を添加した醤油もろみのpH変化 (B-1 試験区)



(a) アスパラギン酸, (b) アラニン, (c) アルギニン, (d) オルニチン

図 6. 90日間発酵後の醤油もろみのLC/MS/MSクロマトグラム(B-2 試験区)

いては、脱炭酸によりpHの低下を抑制することで生育に有利な環境を作り出していると報告されている<sup>10)</sup>。MS0204株はアミノ酸を代謝せず、発がん性物質の前駆体を生成しない点で醤油醸造に適した株であると考えられた。

### 7. *T. halophilus*株のクエン酸資化とジアセチル生成

醤油もろみから分離、選抜した6株 (MS0304, MS0305, MS1308, MS6501, MS6504, MS0204) のクエン酸添加及び無添加培地における培養後の有機酸及びジアセチル濃度を表5に示す。MS0304, MS0305,

表 4. 分離株のクエン酸添加及び無添加培地における培養後の有機酸及びジアセチル濃度

	MRS培地						0.3%クエン酸添加MRS培地					
	MS0304	MS0305	MS1308	MS6501	MS6504	MS0204	MS0304	MS0305	MS1308	MS6501	MS6504	MS0204
クエン酸 (mmol/l)	N.D.	N.D.	9	10	9	N.D.						
乳酸 (mmol/l)	74	76	67	61	64	72	93	94	81	72	70	92
酢酸 (mmol/l)	90	92	90	89	90	93	110	110	93	91	92	110
ギ酸 (mmol/l)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4
ジアセチル ( $\mu$ mol/l)	N.D.	N.D.	N.D.	2.0	1.0	4.0	1.0	N.D.	2.0	3.0	3.0	13

N.D.: not detected

MS0204株では、培地中の全てのクエン酸が資化されており、酢酸濃度が増加した。また、MS0204株はクエン酸を添加した培地でジアセチルを高生産した。

### 8. 生揚げ醤油の官能評価

市販株、選抜した乳酸菌 6 株を添加した生揚げ及び乳酸菌を添加していない対照生揚げ (B-1 試験区) の官能評価結果の結果、8 試験区による評価法ではMS0204株を添加した生揚げが香り、味、総合ともに最も評価が高かった (表 5)。また、MS0305、

MS6504株は市販株よりも味と総合評価が高く良好な醤油乳酸菌と考えられた。したがって、これら 3 株について次の順位法による官能評価を行ったところ、順位法においてもMS0204株の評価が最も高い結果が得られた。MS0204株は、前述のとおりジアセチル生産性が高い特性を持っている。醤油には非常に多くの香り成分が含まれているが、市販醤油にジアセチルを添加した官能評価において約800 mg/Lのジアセチル濃度の醤油で官能的に高い評価が得られたことから、本報の官能評価の結果においては、ジアセチルが少なからず香味に影響を与えたものと考えられた。また、MS0204株は前述のとおりアミノ酸を代謝せず、pHの低下も緩やかな特性を有していることから、MS0204株は、醤油製造に適した乳酸菌であることが推察された。

表 5. 乳酸菌を添加した生揚げ醤油の官能評価結果 (B-1 試験区)

乳酸菌株	評価法 (1:評価低い~5:評価高い)		
	平均点		
	香り	味	総合
市販株	3.00	3.00	3.00
MS0304	2.67	3.00	2.88
MS0305	2.63	3.33	3.21
MS1308	2.67	3.17	2.88
MS6501	2.92	3.08	3.04
MS6504	2.92	3.50	3.29
MS0204	3.54	3.50	3.83
無添加	3.04	3.00	2.96

乳酸菌株	順位法 (1位:評価高い~4位:評価低い)		
	平均順位		
	香り	味	総合
市販株	3.00	3.18	3.18
MS0305	3.00	3.18	3.18
MS6504	3.36	3.64	3.64
MS0204	2.27	2.00	2.00

### 要 約

1. 県内の醤油もろみ 59 検体のヒスタミン濃度は全てコーデックスにおける魚醤の基準値以下であったが、31 検体で HDC 遺伝子が検出された。一方、ヒスタミン及び HDC 遺伝子のいずれも検出されなかったのは、10 工場中 2 工場であった。
2. 醤油もろみから 218 株を分離し、206 株が *T. halophilus* と分類された。また、そのうち 4 株で HDC 遺伝子が検出された。
3. 凝集性試験の結果、透過率 30% 以下の乳酸菌が 9 株確認された。
4. 製造ラインからサンプリングしたもろみを用いた小仕込み試験において乳酸菌を添加した全ての試験区でヒスタミンのピークは検出されなかった。さらに、ヒスタミン産生菌及び非産生菌の混合小仕込み試験において、MS0204 株のヒスタミン産

生抑制能を確認した。

- 5) 生揚げ醤油の官能評価の結果, アミノ酸を代謝せず pH の低下も緩やかでジアセチル生産性の高い MS0204 株を添加した生揚げが最も官能的に優れていた。

### 謝 辞

醤油乳酸菌の研究に携わっていただいた古市佳代氏, 杉本未奈子氏, 醤油もろみの採取に協力していただいた宮崎県内の醤油製造場及び宮崎県味噌醤油工業協同組合の皆様に感謝申し上げます。

### 参 考 文 献

- 1) 日南市産業活性化協議会: 大堂津 醸造のまちをひも解く (2014)
- 2) 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, 327-338 (2015)
- 3) 田上秀男: 醸協, 112, 179-192 (2017)
- 4) 袴田雅俊, 上村慎子, 遠藤衛作, 大坪倫子, 杉山直人, 鈴木邦明: 本誌, 42, 61-66 (2016)
- 5) 植木達朗, 井沢圭史, 大場和徳, 野田義治: 本誌, 26, 197-207 (2000)
- 6) 植木達朗, 井沢圭史, 大場和徳, 野田義治: 本誌, 28, 105-110 (2002)
- 7) 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, 155-160 (2016)
- 8) A. Juste', B. Lievens, M. Klingeberg, C. W. Michiels, T. L. Marsh, K. A. Willems: *Food Microbiology*, 25, 413-421 (2008)
- 9) 枡倉辰六郎: 醤油の科学と技術, (日本醸造協会, 東京)
- 10) 日本乳酸菌学会: 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, (京都大学学術出版会, 京都)