

醤油製造工程におけるヒスタミン生成菌の迅速検出技術の開発

松本美樹*

A Rapid Histamine-producing *Tetragenococcus halophilus* Technology to Soy Sauce Manufacturing Process

MATSUMOTO Miki*

抄録

醤油業界では製造中におけるヒスタミンの蓄積が問題となっている。現在までにヒスタミンを検出する手法が開発されているが、測定コストが高く、特別な施設・操作技術が必要とするため中小企業での試験は困難であった。そこで、原因となる醤油乳酸菌が、ヒスタミン生成時に二酸化炭素を発生させる特性を利用し、培養時の二酸化炭素を検出することで、醤油もろみ及び製造工程中におけるヒスタミン生成菌の増殖を迅速かつ簡便に検出する技術の開発を試みた。

キーワード：醤油，ヒスタミン，培養法

1 はじめに

不揮発性アミンであるヒスタミンを高濃度で含む食品を摂取した場合、顔面の紅潮、頭痛、蕁麻疹等の症状を呈することがある。近年一部の醤油からヒスタミンが検出され、業界全体でヒスタミン対策が重要視されている¹⁾。醤油醸造には必須である耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* が醤油もろみの熟成初期に増殖する際に、ヒスタミン生成能を持つ株（以下、ヒスタミン生成菌という）が優勢に増殖してしまうことが大きな原因である。ヒスタミンは一旦生成されてしまうと除去が困難であるため、仕込みの早い段階で迅速に確認し対処する必要がある。

これまでにHPLC²⁾や酵素法³⁾などを用いたヒスタミンの測定方法が開発されてきたが、これらは測定費用や設備費もかかるほか、高度な技術を必要とすることから中小企業での利用が困難であった。そこで筆者らは醤油もろみ中のヒスタミン生

成菌の増殖を安価で簡便に確認できる方法として、ヒスタミン生成菌の特性を利用する「培養法」を考案した⁴⁾。この方法はヒスタミン生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素（以下、HDC という）によるヒスタミン生成と同時に生成する二酸化炭素をダーラム管で捕集することによりヒスタミン生成菌が優勢な環境か確認する方法である。

T. halophilus は菌株ごとに特性が異なることが報告されており、特に埼玉県ではもろみを一から作る製造方法が盛んに行われていることから、醤油蔵ごとの醤油乳酸菌の性質が多岐にわたるため、培養法による検出に影響を与える可能性が考えられる。本研究では、培養法を応用し、さらに迅速かつどの企業でも利用可能なヒスタミン生成菌の検出技術構築を試みた。

2 実験方法

2.1 *T. halophilus* の分離

県内協力企業2社より提供された、製造方法の異なる醤油もろみから、10%NaCl 添加 MRS 培地

* 食品・バイオ技術担当

を用いて乳酸菌を分離した。分離した株は簡易同定のため、クリアゾーン形成、グラム染色、形態観察、耐塩性試験を実施した。また、HDC 遺伝子の検出用プライマーを用いて PCR を行い、分離株がヒスタミン生成菌に特異的な HDC 遺伝子を保有しているかを確認した。

2.2 培養法によるヒスタミン生成の確認

分離株をダーラム管入り 2.5%ヒスチジン添加 MRS 培地 (10% NaCl) にて、30°C72 時間嫌気培養を行いダーラム管内の気泡を確認した。

2.3 ヒスタミン生成菌の性質調査

新しく分離したヒスタミン生成菌の糖類資化性の確認及びヒスタミン生成量の測定を実施した。糖類資化性試験は培地の糖源をグルコース、ガラクトース、スクロース、サッカロース、マンニトールにそれぞれ変更して培養し、資化性について検討を行った。

また、ヒスタミン生成量は分離株の培養液をチェックカラーヒスタミン (キッコマンバイオケミファ株式会社) を用いて常法に従い測定した。

2.4 培養法の改良

分離株を 2.5%ヒスチジン添加 10%NaCl MRS 培地にて 30°Cで培養を行い、超小型 CO₂ センサーを用いて培養試験管内の CO₂ の挙動を継続的に確認した。ヒスタミンの生成レベルの異なる 4 菌株を用いて試験を行った。

3 結果及び考察

3.1 *T. halophilus* の分離

各醤油もろみから a1~a44、c1~c3 の合計 47 株を分離した。2.1 の各種生理試験の結果、分離した 47 株は全て *T. halophilus* であると簡易同定した。

また、PCR により、分離株のうち 12 株(a1~a12) は HDC 遺伝子を保有していることを確認した。

本研究で新しく分離した株は 12 株がヒスタミン生成菌、35 株がヒスタミン非生成菌であった。

3.2 培養法によるヒスタミン生成の確認

培養法による培養試験を実施した結果、ヒスタミン生成菌 12 株(a1~a12) は培養 72 時間後からガス発生 (CO₂) が確認できた。一方ヒスタミン非生成菌ではガス発生が確認されなかった。これらの結果から、培養法は菌株の分離源となる醤油もろみや菌株の差異に影響を受けることなく、様々な醤油蔵で利用可能であると推測される。

3.3 ヒスタミン生成菌の性質調査

3.3.1 糖類資化性試験

栄養源となる糖類を変化させた全ての培地において、全ヒスタミン生成菌が旺盛に増殖した。従って試験を実施したヒスタミン生成菌には特異的な糖類資化性はないと考えられる。

3.3.2 ヒスタミン生成量測定

分離株のヒスタミン生成量は表 1 のとおりであった。今回新たに分離したヒスタミン生成菌は培養法を実施した際に Positive control のヒスタミン生成菌と比較して、培養 72 時間時点でのガス発生量が少なく、a2、a5、a7、a10 などは目視での確認が困難であったが、これは表 1 に示すように、ヒスタミン生成量が少ないことが原因だと考えられる。培地中のヒスタミン生成量が培養法での検出感度に影響を与えることが示唆された。

表1 ヒスタミン生成量

菌株	濃度(ppm)	菌株	濃度(ppm)
a1	114	a7	18
a2	31	a8	<10
a3	58	a9	39
a4	60	a10	18
a5	12	Positive1(No.4)	515
a6	63	Positive2(No.6)	201

3.4 培養法の改良

ヒスタミン生成量の異なる菌株 (ヒスタミンを高濃度生成する Positive control1(No.4)、Positive

control2(No.6)、中程度生成する a1、低濃度生成する a2) を用いて CO₂ センサーを用いた培養試験を行った結果、全ての菌株において培養開始後約 12 時間～18 時間で CO₂ の増加を確認した (図 1)。ダーラム管の代わりに CO₂ センサーを使用することで、従来の培養法の最短 72 時間の検出時間よりさらに迅速かつ、生成されるヒスタミン濃度の低い菌株でも高感度に検出可能となる可能性が示唆された。

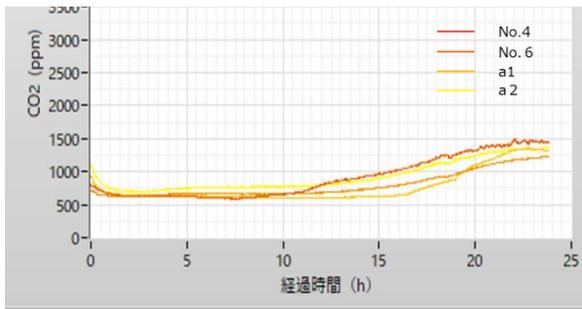


図 1 CO₂センサーによる培養時のCO₂濃度測定

4 まとめ

ヒスタミン生成菌を簡便に検出できる培養法は、先行研究⁴⁾と異なる企業の醤油もろみから分離した菌株でも利用可能であったことから、どの醤油蔵でも利用可能な技術であると考えられる。またダーラム管を用いた培養法は検出感度に課題があったが、CO₂ センサーを活用することで、迅速かつ高感度な検出が可能になると考えられる。今後 CO₂ センサーを用いて迅速にヒスタミン生成菌を検出することによって、醤油もろみ中でヒスタミンが生成される前に対応可能となり、埼玉県内の醤油製造がさらに安心・安全に実施できることが期待される。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、客員研究員として御指導いただきました高崎健康福祉大学の辻助教に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 田上秀男, 醤油の研究と技術, 41, 165(2015)
- 2) B. Kimura et al. , *Int. J. Food Microbiological* , 70, 71(2001)
- 3) 一柳悠子, 大野尚子, 鈴木繁哉, 本間茂, 醤油の研究と技術, 41, 385(2015)
- 4) 松本美樹, 鈴木昂徳, 高杉菜な子, 辻聡, 館博, 醤油の研究と技術, 44, 233(2018)