

発表番号 42 (0544)

好塩性ヒスタミン生成菌および分解菌の代謝産物に対する塩分の影響

久田 孝 (石川県立大学生物資源環境学部)
矢野 俊博 (石川県立大学生物資源環境学部)
後藤 秀幸 (石川県立大学生物資源環境学部)

魚醤や魚介類の糠漬けなど、塩蔵を伴う水産加工製品は、その独特な風味から種々の料理や加工食品の材料として注目されているが、製造あるいは貯蔵中にヒスタミン(Hm)が蓄積する場合がある。本研究では比較的長期塩蔵される発酵・熟成される食品中のHm蓄積の抑制法の解明を目的とし、石川県の魚類糠漬け製品を対照として、Hm定量キットを用いた簡易定量と、Hm関連細菌の検出について検討した。また、Hm関連細菌を分離し、そのHm生成あるいは分解能に対する塩分、pH、培養温度の影響について検討した。

その結果、魚類糠漬けにはHmが0~30 mg/100g蓄積されており、その含量は原料魚のヒスチジン(Hd)含量によるが、同じ原料でも製品によってその含量が異なった。Hd培地およびHm培地を用いてHm関連細菌を検出した結果、製品によってHm生成菌が 10^5 /g存在し、またHm培地のHmの減少率も製品によって異なった。

今回の研究では培地中のHm減少させる菌株を分離したが、分離株について塩分濃度やその他の培地成分を変えて再試験した結果、明確な分解能を持つものは分離できなかった。

分離された主なHm生成菌は好気性乳酸球菌の*Tetragenococcus*で、代表的な菌株について16S rDNAを制限酵素*AfaI*で消化しRFLP解析した結果、*T. halophilus*および*T. muriaticus*であった。その他、非好塩性の好気性菌がHm生成菌として分離された。Hm生成能は塩分、pH、温度によりある程度の抑制が可能であったが、通常の製品の条件下(塩分15%、pH5.5前後)での抑制は難しいと思われた。

今後は、いくつかの条件を組み合わせることによってHmを制御する方法(ハードル技術)や、他の発酵食品より有用(腐敗性のない)なHm分解菌の探索を続けたい。

助成番号 0544

好塩性ヒスタミン生成菌および分解菌の代謝産物に対する塩分の影響

久田 孝 (石川県立大学生物資源環境学部食品科学科)
 矢野 俊博 (石川県立大学生物資源環境学部食品科学科)
 後藤 秀幸 (石川県立大学生物資源環境学部食品科学科)

1. 研究目的

魚醤や魚介類の糠漬けなど、塩蔵を伴う水産加工製品は、その独特な風味から種々の料理や加工食品の材料として注目されているが、製造あるいは貯蔵中にヒスタミン(Hm)が蓄積する場合がある⁽¹⁾。これらの製品中の主な Hm 生成菌として好塩性乳酸球菌の *Tetragenococcus* であることが知られているが、*Tetragenococcus* は大豆醤油のもろみ中でも優勢菌である。我々も石川県の魚類糠漬けおよび沖縄県の伝統的な塩辛スクガラス中から優勢菌のひとつとして *Tetragenococcus* が存在していることを本助成研究において報告した⁽²⁻⁵⁾。水産発酵食品は地域の伝統的な食品ではあるものの、ブランド化による流通の拡大が期待されるに伴い、今後はその安全性についても科学的な評価が必要になってくると考えられる。

本研究では比較的長期塩蔵される発酵・熟成される食品中の Hm 蓄積の抑制法の解明を目的とし、石川県の魚類糠漬け製品を対照として、まず Hm 定量キットを用いた簡易定量と、Hm 関連細菌の検出について検討した。次に Hm 関連細菌を分離し、その Hm 生成あるいは分解能に対する塩分、その他の影響について検討した。

2. 研究方法

2.1 魚類糠漬け製品中の Hm 量と関連細菌の分布

2.1.1 試料

石川県内で生産されたマサバの糠漬け 5 製品、イワシの糠漬け(こんかいわし)3 製品、マダラの糠漬け 1 製品およびフグの糠漬け 1 製品の合計 10 製品を試料とした。

2.1.2 Hm およびその他の化学成分の測定

Hm の測定は、キッコーマンの「チェックカラーヒスタミン」を用いたマイクロプレート法で測定した。このキットは、Hm デヒドロゲナーゼによるプロトンの放出により、還元指示薬(WST8)が発色されることにより簡便に定量できる。塩分濃度はデジタル塩分計(ES-412、ATAGO)で、pH は pH 電極を用いて測定した。また、熟成の指標として遊離のタンパク質量を DC Protein Assay キット(BioRad)を用いて、遊離アミノをニンヒドリン法で、揮発性塩基窒素

(TVB-N)を Conway の微量拡散法で測定した。

2.1.3 Hm 生成菌および分解菌の検出

各試料の 5 倍希釈液を 1 段希釈液とし、以後常法の通り 10 倍段階希釈液を調製した。各希釈液 0.5 ml を 3 ml のヒスチジン(Hd)培地(GAM 糖分解用半流動「ニッスイ」から寒天を除き(以下試験培地)、Hd を 0.5% 加えたもの)および Hm 培地(試験培地に Hm を 0.025% 加えたもの)に接種し、30℃で 5 日間培養した。各試験培地は NaCl を 10% 添加したものについても同様に検討した。

培養後、Hm 培地中の残存 Hm 含量は上記と同様に定量し、Hd 培地中の Hm は、目視により観察した。

2.2 Hm 関連細菌の分離およびその性状

2.2.1 試料

マサバの糠漬け 6 製品、マイワシ糠漬け 5 製品の合計 11 製品を試料とした。

2.2.2 Hm 関連細菌の分離

各試料の希釈液を GAM 寒天培地「ニッスイ」および 10% NaCl を添加した GAM 寒天培地に接種し、出現したコロニーを無作為に 5~20 株、合計 261 株を分離した。各分離菌を Hd 培地および Hm 培地に接種し、30℃で 5 日間培養した。培養液中の Hm の検出および定量は上記と同様に行った。Hm 分解については、培地中の Hm を 15% 減少させたものを陽性とした。

2.2.3 Hm 関連細菌の性状試験

Hm 生成あるいは分解能の認められた分離菌について、Hm 生成および分解能の再試験を行った。

分離菌の性状として、グラム染色性、細胞形態、カタラーゼの有無、食塩感受性、静置培養時に菌体の浮遊、40℃での発育、糖利用能を調べた。また、代表的な菌株については PCR で 16S rDNA を増幅し、制限酵素 *Afa-I* で消化した後の断片長を 3%アガロース電気泳動によって観察した(RFLP 解析)。

2.3 Hm 生成能に対する環境因子の影響

2.3.1 菌株

上記実験で分離した Hm 生成菌 6 株を実験に供した。

2.3.2 塩分濃度試験

1/2 濃度の試験培地(GAM1/2)に 0.5% グルコースを加

え、塩分濃度を 0, 5, 10, 15, 20, 25 および 30%(v/w)になるように調製した。供試菌株の前培養液を 0.03 ml ずつ接種し、30°C で 3 日間培養した。培養液の濁度は OD655nm で測定し、培養液中の Hm を上記と同様に測定した。

2. 3. 3 pH、温度の影響

培地 pH の影響は、GAM1/2 に 10%の NaCl および 0.5%のグルコースを加え、pH を HCl で 4.0~6.0 に調製した培地を用いて検討した。

温度の影響は、GAM1/2 に 10% NaCl を加えた培地を用い、10~40°C で培養し、濁度と Hm 濃度を観察した。

3. 結果および考察

3. 1 魚類糠漬け中の Hm、その他化学成分

サバ糠漬け中の Hm 濃度、その他の成分について Table 1 に示した。5 製品中 2 製品で 24 および 31 mg/100g と Hm 濃度が高かった。これはカナダの魚醤油に対する規制値より高い値である。塩分濃度は 9 から 17%と製品によって大きく異なり、pH および遊離アミノ酸量も異なった。最も塩分濃度の低い Sample A は Hm は少ないが、pH が高く、水溶性タンパク質量が大きいことから、発酵や熟成があまり進んでいない製品と考えられた。

イワシの糠漬けの場合でも 20 mg/100g を超える製品があった (Table 2)。白味のマダラおよびフグでは Hm 量は低かった。

3. 2 魚類糠漬け中の Hm 生成菌レベル

Table 3 に示すように、今回検討した魚類糠漬け中の生菌数は 10^3 から 10^6 /g で、NaCl を加えた培地上でより多く検出された。フグの糠漬け以外で Hm 生成菌が 10^1 から 10^5 /g レベルで検出された。この菌数は製品中の Hm 濃度と相関する傾向であったが、サバ糠漬け B では比較

的に Hm 生成菌数が高かったが、製品中の Hm 濃度は低かった (Table 1)。サバ糠漬け E および F の場合、2, 3 段希釈液の接種によって明確に Hm 生成が認められたが、1 段希釈液ではほとんど認められなかった。このことから、1 段希釈を接種した培養液では Hm 生成菌以外に Hm 分解菌や Hm 生成を抑制する菌群が存在する可能性が示唆される。

3. 3 魚類糠漬け中の Hm 分解菌レベル

0.025% Hd 含有培地に各試料の段階希釈液を接種し、濁度(発育)と Hm 減少率を調べた結果を Table 4 に示す。全ての試料の 1 段希釈液で Hm の減少が認められたが、正否中の Hm 濃度が最も高かったサバ糠漬け C で、Hm 減少率が最も小さかった。一方、Hm 生成菌が比較的多いものの、Hm 濃度が低かったサバ糠漬け B および D では、Hm 減少率が大きかった。

ここまでの実験結果から、魚類糠漬け製品中の Hm 蓄積には、原料中の Hd 含量および Hm 生成菌のレベルの他に、Hm 分解菌の関与も示唆される。しかしながら、Hm 生成菌は好塩性菌が優勢と考えられるが、Hm 分解菌では明確ではなく、また菌数レベルもあまり高くなかった。

3. 4 魚類糠漬け分離菌の Hm 生成能および Hm 分解能

魚類糠漬け製品から分離した 261 株のうち、20 株が明確な Hm 生成能を示した。一方、69 株が Hm 培地中の Hm 濃度を 15%以上減少させる事が示されたが、いずれの菌株も再現性に乏しく、塩分濃度、培地濃度、糖濃度を変えて検討しても明確な Hm 分解性は認められなかった。上記実験で認められた Hm 減少は雑多な菌の混合培養時で見られる可能性もあり、今後検討する必要がある。

Table 1 Salinity, pH, water-soluble protein, free amino acids, TVB-N and histamine contents in mackerel-nukazuke products.

	A	B	C	D	E
Salinity (g/100g)	9.1 ± 0.7	11.5 ± 1.0	16.5 ± 1.1	10.9 ± 1.0	13.6 ± 2.6
pH	6.37 ± 0.20	6.21 ± 0.22	5.26 ± 0.10	6.07 ± 0.31	5.33 ± 0.06
Soluble-protein (mg/100g)	307 ± 18	171 ± 19	181 ± 12	205 ± 7	150 ± 11
Free amino acids (g/100g)	1.04 ± 0.06	1.31 ± 0.08	1.55 ± 0.20	1.63 ± 0.15	3.18 ± 0.32
TVB-N (mg/100g)	77 ± 8	46 ± 7	62 ± 8	41 ± 7	74 ± 20
Histamine (mg/100g)	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1	30.5 ± 2.6	5.3 ± 1.0	24.1 ± 3.1

Values are mean and SD of triplicate measurements.

Table 2 Salinity, pH, water-soluble protein, free amino acids, TVB-N and histamine contents in other fish-nukazuke products.

	Sardine nukazuke			Codfish-nukazuke	Pufferfish-nukazuke
	A	B	C		
Salinity (g/100g)	12.6 ± 0.8	15.7 ± 1.4	10.5 ± 0.4	12.6 ± 1.0	11.6 ± 1.4
pH	5.08 ± 0.08	4.95 ± 0.16	5.07 ± 0.21	5.11 ± 0.12	5.12 ± 0.13
Soluble-protein (mg/100g)	87 ± 9	160 ± 16	172 ± 14	163 ± 10	287 ± 30
Free amino acids (g/100g)	1.04 ± 0.06	1.31 ± 0.08	1.55 ± 0.20	1.63 ± 0.15	3.18 ± 0.32
TVB-N (mg/100g)	108 ± 19	136 ± 25	123 ± 21	128 ± 23	185 ± 23
Histamine (mg/100g)	12.6 ± 0.5	2.7 ± 0.3	25.1 ± 2.6	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1

Values are mean and SD of triplicate measurements.

Table 3 Level of histamine-forming bacteria in fish-nukazuke products.

	Mackerel					Sardine			Cod-fish	Puffer fish				
	A	B	C	D	E	A	B	C						
Medium NaCl (%)	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10				
Decimal dilutions	Bacterial growth in medium													
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+
3	w	+	w	-	+	+	-	w	w	+	+	+	-	w
4	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	w	-
5	-	-	w	-	+	-	w	-	-	w	+	-	-	-
6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	w	+	-	-	-
Decimal dilutions	Histamine-forming in medium													
1	+	+	-	w	+	w	-	-	+	+	w	+	-	-
2	-	+	-	+	w	w	+	w	+	-	w	+	w	w
3	-	-	-	+	+	+	-	w	-	-	+	+	w	w
4	-	-	+	-	+	w	-	-	-	+	+	w	w	-
5	-	-	+	-	-	w	-	-	-	w	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Data are from duplicate experiments using GAM broth containing 0.5% histidine.
 +: Positive; w: weakly positive; - Not detected.

Table 4 Level of histamine-decomposing bacteria in fish-nukazuke products.

	Mackerel					Sardine			Cod-fish	Puffer fish											
	A	B	C	D	E	A	B	C													
Medium NaCl (%)	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10											
Decimal dilutions	Bacterial growth in medium																				
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
3	+	+	+	-	+	+	+	-	+	w	+	w	+	-							
4	-	w	-	+	-	+	+	-	w	-	+	-	-	-							
5	-	-	-	w	-	+	+	-	-	-	w	+	-	-							
6	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-							
Decimal dilutions	Histamine-forming in medium (%)																				
1	15	47	74	59	14	-	37	83	12	55	-	41	27	27	2	44	3	38	-	41	
2	24	-	8	16	11	-	61	44	-	-	-	8	-	7	-	10	-	-	18	12	
3	-	5	6	-	-	-	-	-	-	-	-	17	1	6	3	0	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	16	12	-	-	-	9	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	12	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Data are from duplicate experiments using GAM broth containing 0.025% histamine
 See footnotes of Table 2.

3.5 Hm 生成菌の性状試験

Hm 生成能を示した 20 株について性状試験を行った結果を Table 5 に示す。20 株中 2 株がグラム陽性カタラーゼ陽性の桿菌、3 株がカタラーゼ陽性の球菌であった。その他 15 株はグラム陽性の 4 連球菌 (Fig. 1) で、カタラーゼ陰性、10% NaCl 含有培地でよく発育し、グルコースから乳酸を産生することから、好塩性乳酸球菌 *Tetragenococcus* であると推定された。このうち Table 中の IV, V 群は比較的多種類の糖類を資化し、液体静置培養時に菌体が培地全体に浮遊した。

これらの菌群のうち最も多くの糖を資化し NaCl 0% でも良く増殖した IV 群、およびグルコース以外の糖は資化せず、NaCl 0% での増殖が弱かった IX 群から 3 株ずつ PCR-RFLP に供した。Fig. 1 に示すように、IV 群は *T. halophilus*、IX 群は *T. muriaticus* の断片長と一致した。これまでの研究では Hm 生成菌として *T. muriaticus* がよ

り多く分離されるが、Hm 脱炭酸酵素 *hdc* 遺伝子はプスミド上に存在していることも指摘されている。

3.6 Hm 生成菌の増殖および Hm 生成に及ぼす環境因子

3.6.1 塩分濃度

魚介類から分離した *Tetragenococcus* の増殖および Hm 生成に対する塩分濃度の影響を Fig. 2 に示した。*T. halophilus* 増殖の至適塩分濃度は 10% 前後で、*T. muriaticus* は 15% 前後であった。Hm 生成に対する至適塩分濃度は *T. halophilus* で 0~5%、*T. muriaticus* で 10% 前後であった。魚類糠漬け製品の塩分濃度は 10~20% と製品によって異なる (Table 1, 2) が、塩分濃度 10% では Hm の生成はほとんど抑制されず、20% 以上の塩分ではある程度抑制されるものと考えられる。また、存在する Hm 生成菌が *T. muriaticus* の場合、塩分濃度による Hm 生成の抑制はより難しいと思われる。

Table 5
Characterization of histamine forming bacteria isolated from nukazuke

Group	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Cell shape	r	c	c	c	c	c	c	c	c
Gram stain	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Buoyant	+	+	+	+	+	w	w	w	w
NaCl 0%	+	+	+	+	+	w	w	w	w
NaCl 10%	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 40°C	-	+	+	+	+	+/w	w	w	w
Acids from									
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Sorbitole	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lactose	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No. of strains	2	2	1	5	1	2	1	2	4

r: rods; c: cocci; +: positive; -: negative; w: weakly positive.

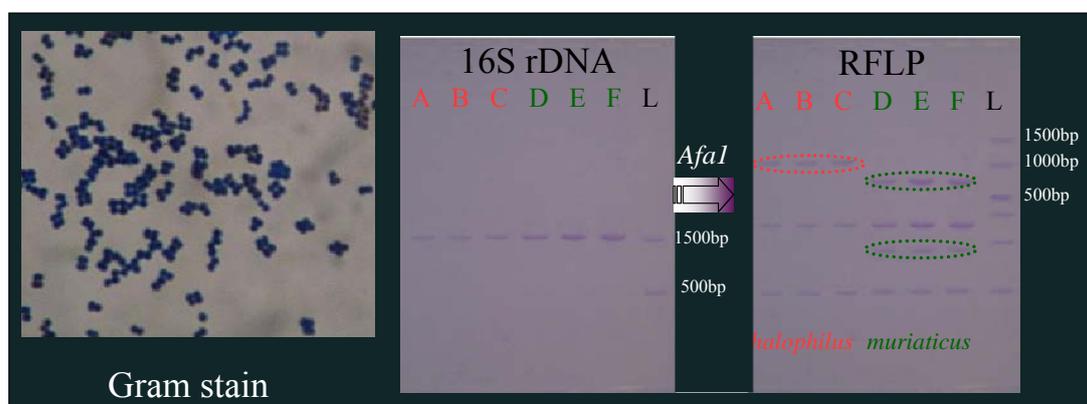


Fig. 1 RFLP of *Tetragenococcus* isolated from fish 'nukazuke' product .

A-C: group IV in Table 5; D-F: group IX in Table 5. 16S rDNA amplification: Primer: 27f and 1492r; Detection: 1% agarose gel and Mupid-Blue. RFLP: 3% agarose gel.

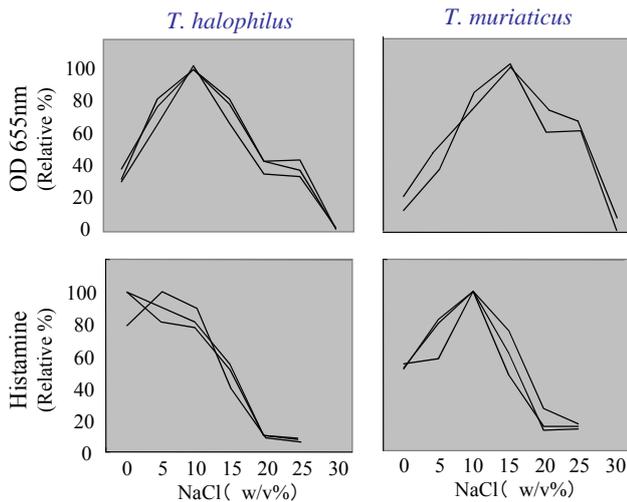


Fig. 2 Effect of salt concentration on growth and histamine production of *Tetragenococcus* isolated from fish ‘nukazuke’. The strains were incubated at 30 °C for 3 days.

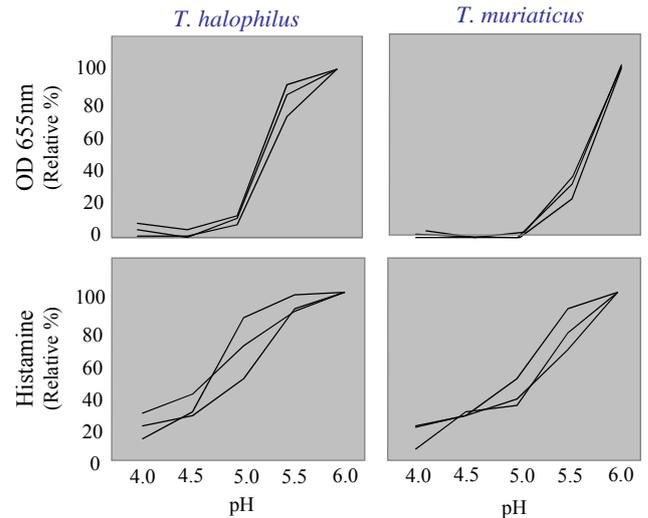


Fig. 3 Effect of pH on growth and histamine production of *Tetragenococcus* isolated from fish ‘nukazuke’. The strains were incubated at 30 °C for 3 days.

3. 6. 2 pH

魚介類糠漬け製品の多くの pH は 5 から 6 である。今回分離した *Tetragenococcus* 特に *T. muriaticus* の増殖は pH 5 で抑制され、Hm 生成能も抑制された。実際の製品でも乳酸発酵によって pH を低く抑えることが望ましいと考えられる (Fig. 3)。

3. 6. 3 温度

T. halophilus、*T. muriaticus* とも至適温度は 30°C 付近で、増殖温度域は *T. halophilus* がより大きかった (Fig. 4)。Hm の生成は 20°C 以下で抑制されたが、10°C の培養でもその速度は遅いが、増殖および Hm の蓄積は進行した (Fig. 5)。

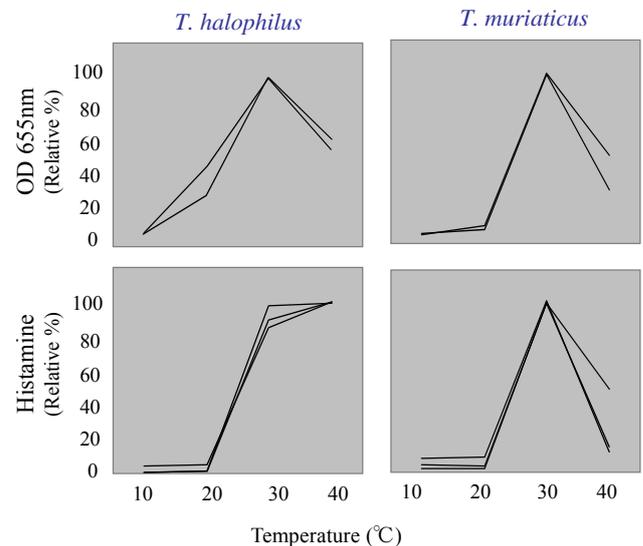


Fig. 4 Effect of temperature on growth and histamine production of *Tetragenococcus* isolated from fish ‘nukazuke’. The strains were incubated at for 3 days.

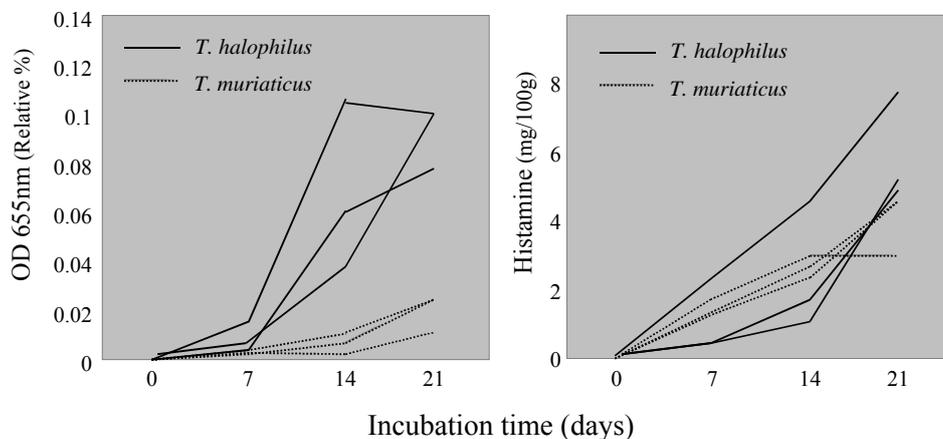


Fig. 5 Growth and histamine production of *Tetragenococcus* isolated from fish ‘nukazuke’ at 10 °C.

4. まとめと今後の課題

- 以上のように、魚類糠漬けは製品によっては Hm が蓄積されており、その含量は原料魚の Hd 含量の他に、Hm 生成菌や Hm 分解菌の存在が影響していると考えられた。
- 今回の研究では明確に Hm を分解する菌の分離はできなかったが、今後も様々な発酵食品から有用な(腐敗性のない)Hm 分解菌の探索を続けたい。
- Hm 生成菌(*T. halophilus* および *T. muriaticus*)の Hm 生成能は塩分、pH、温度である程度の抑制が可能であるが、通常の製品の品質を保つ条件下での抑制は難しいと思われる。そのためいくつかの条件を組み合わせることによって Hm を制御する方法(ハードル技術)を検討したい。

文 献

- 1) 佐藤常雄・木村 凡・藤井建夫 (1995) 魚醤油諸味中のヒスタミン量と関連細菌フローラ. 食衛誌, 36, 763-768.
- 2) 久田 孝 (2001) 石川県産の伝統的な水産塩蔵製品中の好塩性微生物. 財団法人ソルト・サイエンス研

究財団平成 11 年度助成研究報告集,II, 259-268.

- 3) 久田 孝 (2001) 石川県で製造された魚介類の糠漬け製品中の微生物フローラ. 日水誌, 67, 296-301.
- 4) 久田 孝 (2003) 沖縄県産スクガラス(アイゴ塩辛製品)中の高塩性細菌に関する研究. 財団法人ソルト・サイエンス研究財団平成 13 年度助成研究報告集, II, 233-242.
- 5) Takashi, K., Okamoto, K., & Yano, T. (2002) Population of halophilic bacteria in salted fish products made in the Loochoo Islands, Okinawa and the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. *Fisheries Sci.*, 68, 1265-1273.

本研究の一部は

- Kuda, T., Mihara, T., & Yano, T. (2006) Detection of histamine and histamine-related bacteria in fish-nukazuke, a salted and fermented fish with rice-bran, by simple colorimetric microplate assay. *Food Control*, (In Press, Available online 22 March 2006).

として報告した。

0544

Effects of salt on metabolites of halophilic histamine-related bacteria

Takashi Kuda, Hideyuki Goto, Toshihiro Yano
Ishikawa Prefectural University

Summary

Histamine content and numbers of histamine-forming and histamine-decomposing bacteria in 10 fish-nukazuke (a salted and fermented fish with rice-bran) products (five mackerel-nukazuke, three sardine-nukazuke, one codfish-nukazuke and one puffer-nukazuke) were determined with a simple method using histamine-dehydrogenase microplate assay. Two mackerel-nukazuke and two sardine-nukazuke products showed high content of histamine from 12.6 to 30.5 mg/100g. The both number of halophilic histamine-forming and histamine-decomposing bacteria were various in the fish-nukazuke products. The histamine concentration was tended to be low in the product containing high number of halophilic histamine-decomposing bacteria. These results suggest that accumulation of histamine in fish-nukazuke may be affected by histidine content and halophilic histamine-related bacteria. Main histamine forming bacteria were *Tetragenococcus*. The RFLP analysis of 16S rDNA of the histamine forming bacteria indicated that the strains were *T. halophilus* or *T. muriaticus*. They could grow and produce histamine in the 'nukazuke' condition, e.g. NaCl 15% and pH 5.5.