

## 醤油中不揮発性アミンの簡易低減方法に関する研究 — 耐塩性ヒスタミン分解菌の分離とその応用 —

小熊 哲哉, 柏倉 康平, 小森 浩介

新潟食料農業大学食料産業学部

**概要** しょうゆは、通常ヒスタミン(Hm)を殆ど含まないが、一部の野生醤油乳酸菌が Hm を生成するため、稀ではあるが数百 ppm 以上の高濃度 Hm が検出される場合がある。そこで、しょうゆ業界では、しょうゆの Hm 低減に取り組み、製造ラインの徹底洗浄と Hm を生成しない醤油乳酸菌の添加を業界に広く呼びかけ一定の成果をあげてきた。しかしながら、本対策は手間とコストがかかり、より簡便な低減対策法が強く求められている。

本研究では、Hm 低減菌の検索システムを構築しその有効性を確認した上で、耐塩性 Hm 低減菌を検索し、得られた耐塩性 Hm 低減菌を用いてしょうゆ中の Hm 低減を検討した。

検索で得られた 16%(w/v)食塩濃度の貧栄養培地で生育できる耐塩性 Hm 低減菌は、一時的に培地中の Hm を僅かに低減する菌と、Hm を確実に分解する菌に分かれ、菌株の簡易同定を行った結果、一時的に培地中の Hm を低減する菌は *Halomonas* sp.(H10 株)及び *Salimicrobium* 属(HOY1 株)であり、確実に Hm を低減する菌は *Pseudomonas* sp.(KYA11 株)及び *Brevibacterium* 属(NAS10 株)とそれぞれ簡易同定された。

H10 株、HOY1 株は、Hmを一時的に低減するが、低減状態は不安定であり測定ごとに Hm の濃度が変動した。一方、KYA11 株、NAS10 株は培地中の 5000 ppm Hm 塩酸塩を約 1 か月でほぼ分解した。

次に最も強い Hm 低減能を示した KYA11 株をアルギン酸で固定化し、5000 ppm Hm 塩酸塩を含有した醤油中で 1 か月振盪した結果、明確な低減は認められなかった。また同菌を用いて 5000 ppm Hm 塩酸塩を含有した脱アルコールしょうゆで振盪培養を行ったが、約 1 か月の培養でも Hm の減少は認められなかった。KYA11 株は pH6.0 未満では生育できないため、脱アルコールしょうゆの pH を 7.0 に調整したしょうゆを調製し、KYA11 株を接種したところ、1 か月で最大で約 30%の Hm 低減が確認された。

以上から、KYA11 株を接種して振盪培養することにより、pH を中和した脱アルコールしょうゆの Hm 塩酸塩を、1 か月で約 1500 ppm 低減できることが判明した。今後は、しょうゆと同じ微酸性でも耐塩性を示す Hm 低減菌の検索が必要と考えられる。

### 1. 研究目的

食中毒様アレルギーを引き起こす物質として良く知られているヒスタミン(Hm)は、Codex では複数の基準(腐敗 100 ppm, 取扱・衛生 200 ppm, 魚醤 400 ppm)が設定されており、みそやしょうゆといった伝統的な発酵物でも微量検出されることがある<sup>1)</sup>。しょうゆの製造に関わる微生物では Hm は分解されないが、一方で、一部の野生醤油乳酸菌が Hm を生成するため、稀に製品から数百 ppm 以上の

高濃度な Hm が検出される場合がある<sup>2)</sup>。そこで、しょうゆ業界では、しょうゆの Hm 低減に取り組み、製造ラインの徹底洗浄と Hm を生成しない醤油乳酸菌の添加を業界に広く呼びかけ一定の成果をあげてきた<sup>3,4)</sup>。

しかしながら、上記対策は手間とコストがかかり、特に高齢化が進み人手不足の事業者にとっては、対策が十分に実施できない場合もあり、より簡便な低減対策法が強く求められている。また、上記低減対策を実施していても、気

温の上昇する夏季には、時折、諸味に悪玉醤油乳酸菌が発生し、比較的 Hm の濃度が高いしょうゆができることがある。その場合、工業規模で Hm を選択的に除去できる方法がないため、このようなしょうゆの活用には苦慮している実情がある。さらに、上記低減対策法を実施するとしょうゆタンクや木桶を徹底洗浄することで、Hm を生成する悪玉の野生乳酸菌のみならず、その蔵独自のしょうゆの風味に寄与してきた Hm を生成しない善玉の蔵付き醤油乳酸菌までも死滅させることとなる。その結果、添加する善玉乳酸菌は限られた種類しかないため、個性や特徴が限定された単調な品質となり、しょうゆ品質の一層の画一化も懸念されている。

一方、一部の細菌には、Hm を分解する能力があることが知られている<sup>5)</sup>。しかしながら高塩濃度のしょうゆにおいてはそのような菌の生育は期待できず、久田らの報告にあ

る通り、好塩性の Hm 分解菌の存在は示唆されているものの、菌の分離同定までには至っておらず<sup>6)</sup>、微生物によるしょうゆ中の Hm 低減は難しい状況にあった。ところが、2016 年に、Ying らにより耐塩性微生物である *Halomonas* に複数の生体アミンの分解能があるという報告がなされた<sup>7)</sup>。

本研究は、耐塩性 Hm 低減菌を検索し、得られた耐塩性 Hm 低減菌を活用したしょうゆ中の簡易な Hm 低減方法を提供することを目指した。

## 2. 研究方法

### 2.1 耐塩性 Hm 低減菌の検索

#### 2.1.1 試料

**Table 1** に示した市販及び自家製の漬物、塩辛等の各種含塩発酵物、及び **Table 2** に示した各種野菜類を耐塩性ヒスタミン低減菌の分離源試料とした。

**Table 1.** The list of processed foods containing salt used for salt-tolerant histamine-reducing bacteria search.

Sample Name	NaCl in 100 g of sample	Source
ピリ辛胡瓜漬け	4.4 g	A company
禅もろみ	6.4 g	B company
亀田郷梨蜜入り南蛮味噌	6.6 g	C company
手作り風南蛮味噌	9.0 g	D company
しそ漬け梅	8.0 g	E company
酒盗	10.1 g	F company
明太子	4.6 g	G company
イカの塩辛 A	5.9 g	G company
海苔の佃煮	6.9 g	H company
アミの塩辛	15.2 g	I company
イカの塩辛 B	6.4 g	J company
しその実味噌漬け	11.4 g	K company
みょうが味噌漬け	11.4 g	K company
大根味噌漬け	11.4 g	K company
塩モズク	Not displayed	L company
宮城県産生ホヤ	13.0 g	Homemade
味噌漬け	Not displayed	Homemade
味噌	12.0 g	Homemade

**Table 2.** The list of vegetables and fruits for salt-tolerant histamine-reducing bacteria search.

キュウリ (cucumber)	ジャガイモ (potato)	ナス (eggplant)	トマト (tomato)
タマネギ (onion)	キャベツ (cabbage)	ニンジン (carrot)	ダイコン (Japanese white radish)
ブロッコリー (broccoli)	ほうレンソウ (spinach)	ラディッシュ (radish)	ニンニクの芽 (garlic sprout)
レンコン (lotus root)	ゴボウ (burdock)	サトイモ (taro)	落下ブドウ (fallen grape)

### 2. 1. 2 Hm 及び pH の測定

Hm の測定は、酵素法及び HPLC 法にて実施した。酵素法についてはチェックカラーヒスタミン(キッコーマンバイオケミファ)を用いて実施したが、測定容器は、分析効率化のため、試験管ではなくマイクロプレートを用いた。また培養液やしょうゆ中の Hm 測定に際し、培養液やしょうゆを脱イオン水で 1100 倍に希釈したものをサンプルとした。

HPLC 法においては、試料を脱イオン水又は酢酸緩衝液で 200 倍に希釈したサンプルを用い、既報に準じて実施した<sup>8)</sup>。具体的にはアミノ酸分析用カラムで分離後オルトフタルアルデヒド(OPA)によりポストラベルし、蛍光検出器で検出した。使用機器は、アミノ酸分析機(島津製作所)を使用した。また、pH 測定は、試料が少量の場合には、簡易 pH 計(LAQUA twinpH-11B)を用いたが、それ以外は通常の pH 計(堀場製作所)で測定した。

### 2. 1. 3 Hm 低減菌検索用培地と Hm 低減菌の検索

Hm 低減菌検索用貧栄養培地は、0.5% (w/v) Hm 塩酸塩(富士フィルム和光純薬)、0.1%(w/v)酵母エキス(ベクトン&ディッキンソン)、0.5%(w/v)塩化ナトリウム(富士フィルム和光純薬)の培地組成で、pH を 7.0 に調整した後、滅菌処理したものをを用いた。また耐塩性 Hm 低減菌検索用貧栄養培地は、上記培地のうち、塩化ナトリウムの濃度を 16%(w/v)に調整したものをを用いた。Hm 低減菌検索用プレートは、上記の各培地組成に 1.5%(w/v)寒天を加えて調製した。

Hm 低減菌の検索は、上記培地 5 ml が入った 15 ml 容試験管に、各分離源試料 0.5 g を添加した後、25°Cにて、3 日間振盪(120 rpm)または静置培養を行い、Hm 資化菌を濃縮した後、滅菌済み 0.85%(w/v)塩化ナトリウムの生理食塩水で適宜希釈して Hm 低減菌検索用プレートに塗布した。得られたモノコロニーを再度、Hm 低減菌検索用貧栄養培地に接種し、25°Cで 3 日間振盪または静置培養した。培養液を遠心分離処理して得た培養上清液中の Hm を酵素法にて定量した。尚、最初は本検索システムの有効性を確認するため、塩化ナトリウム濃度が 0.5%(w/v)の貧栄養培地で実施し、本検索系が機能していることが確認された後は、16%(w/v)塩化ナトリウムの貧栄養培地を用いた。

### 2. 1. 4 Hm 低減菌の簡易菌株同定

簡易菌株同定は、得られた微生物の 16S rDNA 解析により実施した。具体的には以下の通りである。Hm 低減菌の培養液 50 µl から、アルカリ熱抽出法で DNA を抽出後、PCR キット(Bacterial 16S rDNA PCR Kit Fast (800) (タカラバイオ))を使用して PCR を実施した。PCR 装置は Takara PCR Thermal Cycler Dice(タカラバイオ)を用い、PCR 条件は、常法に従い 94°C5 秒、55°C1 秒、68°C4 秒を 25 サイクルの条件で行った。得られた PCR 産物を High Pure PCR Product Purification Kit(Roche)を使用して精製した後、DNA 塩基配列解析を委託して決定した。得られた塩基配列情報を日本 DNA データバンク(DDBJ)またはアメリカ国立生物工学情報センター(NCBI)のデータ情報に対して Blast 解析を行い、簡易菌株同定を行った。

### 2. 1. 5 Hm 代謝物の解析

Hm 代謝物の解析は、OPA によるポストラベルが適用できなかったため、マルチフォトダイオードアレイ(MPDA)を用いた HPLC 法により実施した。具体的には脱イオン水で 100 倍に希釈したサンプルを用い、ODS カラム(東ソー)と MPDA 検出器を用いた HPLC システム(島津製作所)で親水性低分子用の分析条件により溶出した物質の 210~254 nm の吸収をモニタリングすることで実施した。

## 2. 2 しょうゆ中 Hm の低減

### 2. 2. 1 脱エタノールしょうゆの調製及び中和

しょうゆは、市販品(特選しょうゆ;キッコーマン)を用いた。固定化菌体を用いたバイオリクター法の際には、しょうゆに粉末の Hm 塩酸塩を添加した 0.5%(w/v) Hm 塩酸塩含有しょうゆを用いた。培養法の場合、市販しょうゆは、一般に品質の安定化と風味維持のために一定量のエタノールを含んでおり、Hm 低減菌の生育を著しく阻害することが想定されたため、ロータリーエバポレーターにより 40°Cの条件下で蒸留することで、エタノールを除去した脱エタノールしょうゆを調製した。得られた脱エタノールしょうゆに粉末の Hm 塩酸塩を混和することで 0.5%(w/v) Hm 塩酸塩含有脱エタノールしょうゆとした。また、脱エタノールしょうゆの中和は、5 N 水酸化ナトリウムで中和することで調製した。

### 2. 2. 2 固定化菌体の作製

Hm 低減菌(*Pseudomonas* sp. KYA11 株)の固定化は、2.5 倍の濃度に濃縮懸濁した Hm 低減菌の培養液 40 ml

と 2.5% (w/v) アルギン酸(富士フィルム和光純薬)水溶液 40ml を混和後、1.5% (w/v) 塩化カルシウム(富士フィルム和光純薬)水溶液に滴下して固定化菌体を調製した。得られた固定化菌体は、0.5% (w/v) Hm 塩酸塩含有のしょうゆに 30 分間浸漬して固定化菌体中の Hm 濃度と食塩濃度を平衡化した後に使用した。

### 2. 2. 3 固定化菌体を用いたバイオリアクター法によるしょうゆ中 Hm の低減

固定化菌体を用いたしょうゆ中 Hm の低減は、前項で調製した固定化菌体全量を、0.5% (w/v) Hm 塩酸塩含有しょうゆ 100 ml に添加した後、25°C、150 rpm の条件でインキュベートし、経時的にサンプリングして、しょうゆ中の Hm 濃度の変化をモニタリングした。

### 2. 2. 4 培養法による脱エタノールしょうゆ中の Hm 低減

0.5% (w/v) Hm 塩酸塩含有脱エタノールしょうゆ又は 0.5% (w/v) Hm 塩酸塩含有中和脱エタノールしょうゆ (pH7.0) に KYA11 株を接種した後、25°C で振盪培養し、経時的にサンプリングして Hm を測定することで、脱エタノールしょうゆ中の Hm 濃度の変化をモニタリングした。

## 3. 研究結果

### 3. 1 Hm 低減菌検索システムの構築

#### 3. 1. 1 Hm 低減菌検索システムの確認

落下ブドウ果及びピリ辛きゅうり糠漬けから、それぞれ複数株の Hm 低減菌が分離され、落下ブドウ果から分離された株を HG1~3 株、きゅうりの糠漬けから分離された株を NK1, NK2 株とそれぞれ命名した。これらは、Fig. 1 に示したように Hm を低減し、約 1 か月で、NK1 株及び HG2 株の残存 Hm は 20% 以下となった。そこで、これらの菌株に関して、簡易菌株同定を実施した結果、Table 3 に示したように、NK 菌は、*Pseudomonas* 属、HG 菌は、*Achromobacter* 属とそれぞれ簡易同定され、特に NK1 株は、*Pseudomonas putida* と簡易同定された。以上の結果から、Hm 含有貧栄養培地を用いた Hm 低減菌検索システムで生育してくる菌は、概ね Hm 低減菌であり、本システムは有効に機能していることが確認された。

#### 3. 1. 2 NK 菌と HG 菌の耐塩性の検討

前項で、Hm 低減が確認された菌の耐塩性を検討するため、NK1 菌と HG3 菌を、0~12% (w/v) の塩化ナトリウムを含んだ Hm 低減菌検食用貧栄養培地に接種し、経時的に残存 Hm の変化をモニタリングした。Fig. 2, 3 に示した

ように、それぞれ 3% (w/v) 塩化ナトリウムを含んだ培地までは順調に生育し、特に HG3 株は、120 時間で Hm 残存率は 0 となった。一方、NK1 株は、3% (w/v) 塩化ナトリウム存在下では、低減速度が低下し、192 時間経過しても残存 Hm は 0 にはならなかった。さらに、塩化ナトリウム濃度が 6% (w/v) 以上になると、いずれの菌も生育がほぼ認められず、Hm の低減も認められなかった。したがって、これら 2 種類の菌は、塩化ナトリウム濃度 3% (w/v) 程度までしか耐塩性が無い Hm 低減菌であることが確認された。

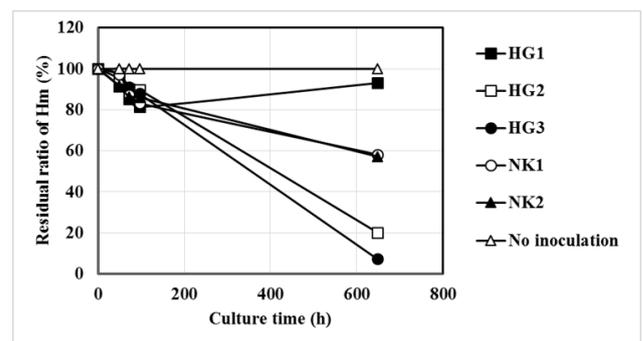


Fig. 1 Hm reduction of Hm-reducing bacteria in oligotrophic medium.

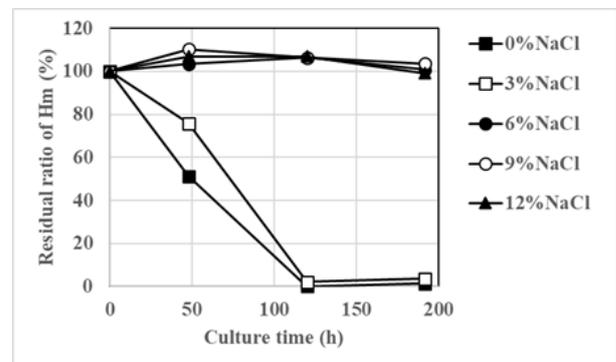


Fig. 2 Hm reduction in the presence of salt by HG3 strain.

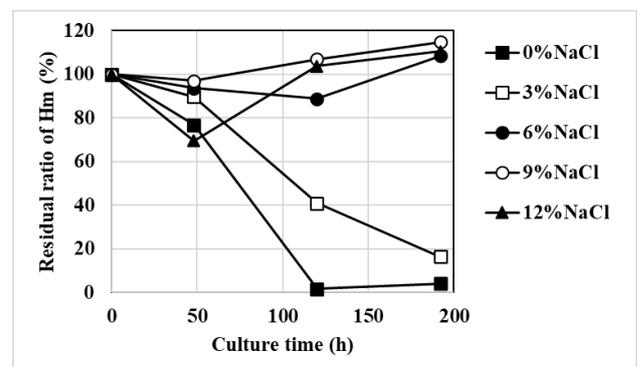


Fig. 3 Hm reduction in the presence of salt by NK1 strain.

**Table 3.** Simplified identification results of Hm reduced strains.

Strain name	Identified name	Similarity
NK1	<i>Pseudomonas putida</i>	100%
NK2	<i>Pseudomonas</i> sp.	94%
HG2	<i>Achromobacter</i> sp.	98%
HG3	<i>Achromobacter</i> sp.	98%

**Table 4.** Simplified identification results of Hm reduced strains.

Strain name	Identified name	Similarity
H10	<i>Halomonas</i> sp.	98%
HOY1	<i>Salimicrobium</i> sp.	95%
KYA11	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%
NAS10	<i>Brevibacterium</i> sp.	99%

### 3. 2 耐塩性 Hm 低減菌の検索

3. 1. 1により 0.5%(w/v) 塩化ナトリウムを含んだ Hm 低減菌検索システムが良好に機能することが確認されたので、次に 16%(w/v) 塩化ナトリウムを含んだ耐塩性 Hm 低減菌検索システムにより、耐塩性 Hm 低減菌を検索した。分離源として用いた食塩含有加工食品を **Table 1** に示し、また、食塩含有加工食品以外に、広く分離源を求め、**Table 2** に示した 16 種類の野菜類も分離源として用いた。さらに、**Table** には示さないが、大学構内土壌から採取した土壌サンプルも 30 サンプル分離源として用いた。

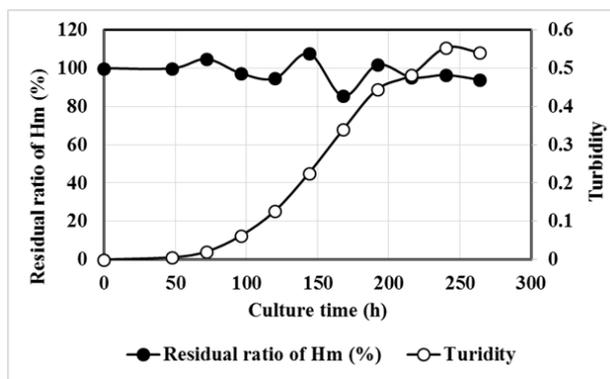
検索の結果、2 つのタイプの菌種が、検索されてきた。まず、1 つ目のタイプであるが、16%(w/v) 塩化ナトリウムを含んだ Hm 含有貧栄養培地でも良好に生育し、僅かに Hm 低減が認められるタイプである。その Hm 低減の経過を **Fig. 4, 5** に示した。このタイプの特徴は、菌の生育と共に一旦 Hm が僅かに低減するが、その後、Hm の残存率が不安定に変動した。一方、2 つ目は確実に Hm を低減するタイプであり、16%(w/v) 塩化ナトリウムを含んだ Hm 含有貧栄養培地で、ゆっくりと生育し確実に Hm が減少するタイプであった。本タイプによる Hm 低減の経過を **Fig. 6, 7** に示した。本タイプは、生育速度は遅いものの菌の生育とともに、Hm 減少が進み、キャベツからの分離菌は 30 日後には、Hm 残存率がほぼ 0 に、なすからの分離菌は 25 日後には、Hm 残存率が約 10% になった。以上をまとめると、1 つ目のタイプの菌は、菌の生育とともに、Hm が低減するが、後に Hm の濃度が戻ることから、一旦 Hm を菌体に吸着して Hm が低減するが、その後、菌体から Hm が離脱することにより、Hm の濃度が元に戻るものと推定された。一方、2 つ目のタイプは、生育が遅いものの、確実に Hm が

減少したことから、これらの菌は、Hm を分解している可能性が強く示唆された。

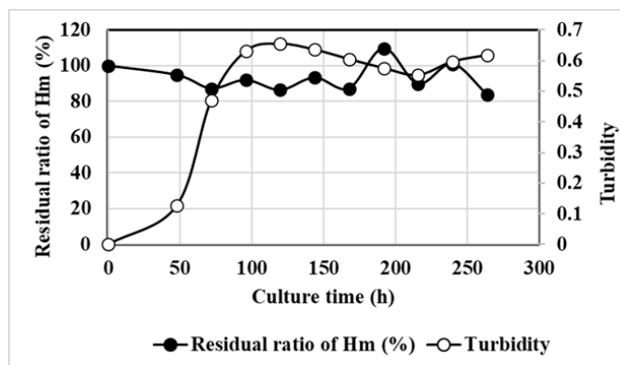
次にこれらの菌株の簡易菌株同定を行った。まず、1 つ目のタイプの菌株簡易同定を実施した結果、**Table 4** に示したように、あみの塩辛から分離された H10 株は、*Halomonas* 属、自家製生ホヤから分離された HOY1 株は *Salimicrobium* 属とそれぞれ簡易同定された。

一方、2 つ目のタイプの菌株同定を行った結果、**Table 4** に示したようにキャベツから分離された KYA11 株は *Pseudomonas* 属、なすから分離された NAS10 株は *Brevibacterium* 属とそれぞれ簡易同定された。

**Fig. 6** に示したように、16%(w/v) 塩化ナトリウムを含んだ 0.5%(w/v) Hm 塩酸塩含有貧栄養培地で、残存 Hm 塩酸塩を 0 にまで減少させる能力及び生育は、*Pseudomonas* sp. KYA11 株が最も強かったため、本菌を以後の実験に用いた。



**Fig. 4** Time course of Hm reduction by H10 isolated from salted mysid fish.



**Fig. 5** Time course of Hm reduction by HOY1 isolated from fresh ascidians.

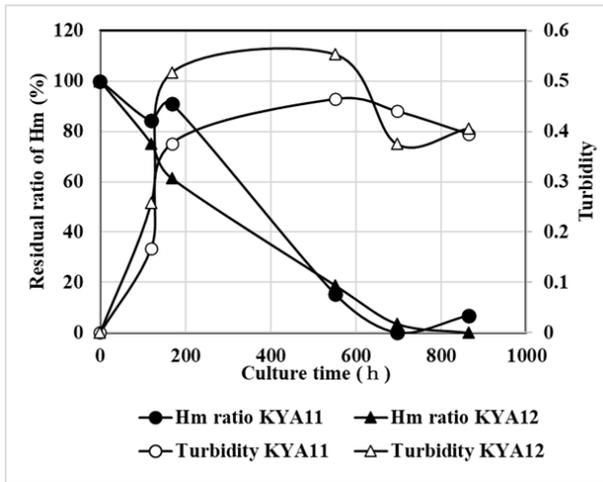


Fig. 6 Time course of Hm reduction by KYA11 and KYA12 isolate from cabbage.

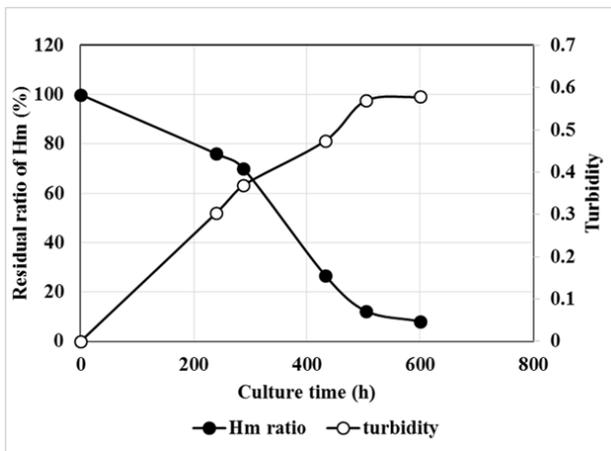


Fig. 7 Time course of Hm reduction by KYA11 and KYA12 isolate from cabbage.

### 3. 3 Hm 代謝物の解析

Fig. 8 に示したように、16% (w/v) 塩化ナトリウムを含んだ Hm 含有貧栄養培地において *Pseudomonas* sp. KYA11 株により Hm は減少し、それと対応するようにイミダゾール酢酸と極めて近いリテンションタイムを持つ物質 (unknown peak) が僅かに増加することが示された。しかしながら、本物質はイミダゾール酢酸の溶出時間より数秒遅く、生成量も微量であることから、イミダゾール酢酸ではないことが明らかとなった。従って、KYA11 株による Hm 分解は、ジア

ミンオキシダーゼによる酸化分解ではなく、モノアミノキシダーゼ、ヒスタミンデヒドロゲナーゼ、又はその他の酵素としてデアミナーゼ等による代謝物であると推察された。

### 3. 4 しょうゆ中の Hm 低減

#### 3. 4. 1 バイオリアクター法によるしょうゆ中の Hm 低減

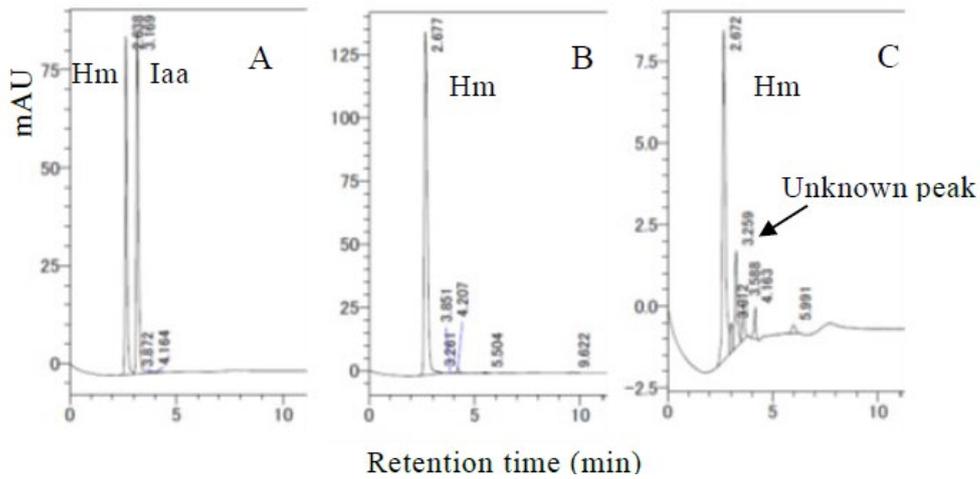
2. 2. 2項で調製した固定化菌体は、0.5% (w/v) Hm 塩酸塩含有しょうゆ中で 25°C, 150 rpm の条件で約 1 か月振盪したが、振盪2時間目に、約 10%程度低減した後は、殆ど変化が無かった(データは示さない)。2 時間目の低下理由は、おそらく Hm 塩酸塩含有しょうゆでの平衡化が不十分だったため、僅かに希釈され低下したものと思われる。従って、KYA11 株を用いたバイオリアクターによる通常のしょうゆ中の Hm 低減は難しいと判断した。

#### 3. 4. 2 培養法による脱アルコールしょうゆからの Hm 低減

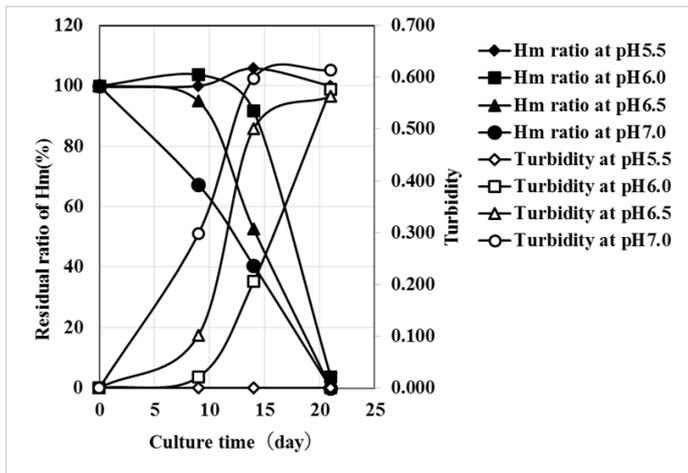
KYA11 株を、0.5% (w/v) Hm 塩酸塩を含んだ脱アルコールしょうゆに接種し、25°Cで振盪培養を 1 か月間行ったが、全く Hm の低減は認められなかった(データは示さない)。そこで、16% (w/v) 塩化ナトリウムを含んだ Hm 低減菌検索用培地の pH を変化させて、KYA11 株の生育 pH を検討したところ、Fig. 9 に示した通り、KYA11 株は、pH 6.0 以上では生育できるが、6.0 未満では、生育できないことが判明した。従って、脱アルコールしょうゆでは KYA11 株は生育できないため、Hm を低減できないことが判明した。

#### 3. 4. 3 培養法による pH 調整した脱アルコールしょうゆからの Hm 低減

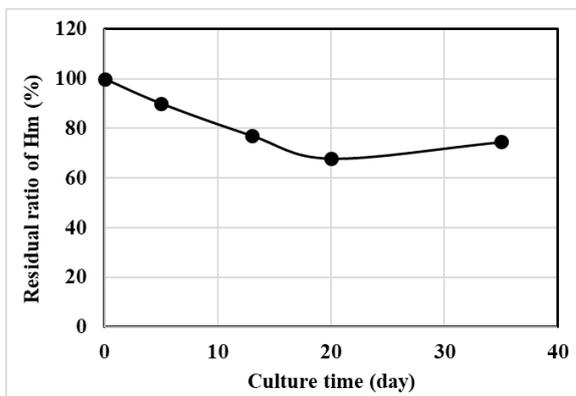
前項で KYA11 株はしょうゆの pH では生育できないことが明らかとなったため、2. 2. 4項で示したように、水酸化ナトリウムで pH 7.0 に中和した 0.5% (w/v) Hm 塩酸塩含有脱アルコールしょうゆに KYA11 株を接種して、約 1 か月振盪培養したところ、Fig. 10 に示したように最大で約 30% の Hm 低減が確認された。しかしながら、その低減量は低く、Hm 残存率は 60% 以下にはならなかった。



**Fig. 8** HPLC profiles of Hm containing samples.  
 A; Standard sample solution: Hm; Histamine, Iaa; Imidazole acetic acid  
 B; Hm containing medium (no inoculation)  
 C; 27th days KYA11 strain culture of Hm containing medium



**Fig. 9** Effect of pH on growth and Hm reduction of KYA11 strain in 16% salt-containing medium.



**Fig. 10** Time course of Hm reduction in pH-adjusted de-alcoholized soy sauce by strain KYA11.

#### 4. 考察

今回、Hm 低減菌の検索を効率的に行うため、最初に 0.5% (w/v) 塩化ナトリウム存在下での Hm 低減菌の検索を実施し、*Achromobacter* 属の菌と、既報で報告されている非耐塩性の *Pseudomonas putida* が得られた。これまで Hm 分解能を示す *Achromobacter* の報告は無く、本報告が初めての報告となる。さらに検索用貧栄養培地の塩化ナトリウム濃度を 16% (w/v) にした検索系を用いて耐塩性 Hm 低減菌を検索し、4 種類の耐塩性 Hm 低減菌を得た。そのうちの 2 種類 (*Halomonas* 属と *Salimicrobium* 属) は、一時的に培地中の Hm 濃度を僅かに低減するが、培養時間の経過とともに、元の濃度に戻った。この理由は、おそらく培養初期には、菌の生育と共に Hm が菌体に付着することにより一時的に Hm 濃度が僅かに低減するが、培養時間の経過とともに、原因は不明であるが Hm が菌体を離脱するため、培地中の Hm 濃度が元に戻るものと推定された。Ying らの報告によれば、*Halomonas shantousis* SWA25 株は、不揮発性アミンを分解する能力があるとされ、20 時間で 100 ppm の Hm を 66.7% 分解しており、我々の得た *Halomonas* sp. H10 株の結果とは異なった<sup>7)</sup>。これは、同じ *Halomonas* 属ではあるが、菌株の違いによるものと推察した。

一方、明らかに Hm を分解していると考えられる *Pseudomonas* 属の KYA11 株や *Brevibacterium* 属の NAS10 株は、最終的に 0.5% (w/v) Hm 塩酸塩 (約 5000 ppm 塩酸塩) を含んだ 16% (w/v) 塩化ナトリウム含有貧栄養培地で、良好に生育し、Hm を約 1 か月でほぼ分解きった。本結果の Hm 塩酸塩を、Hm に換算すると約 3000 ppm となり、Ying らの実験の約 30 倍濃度の Hm を約 30 倍の時間をかけて分解したことから、Ying らの結果とほぼ同等の Hm 分解力と考えられた。また、本分解能は、振盪培養で初めて発揮されることから、Hm オキシダーゼによる分解であるものと推定された。しかしながら本推定を検証するために行った Hm 代謝物解析で、Hm がイミダゾール酢酸に分解していることが確認できなかったことから、KYA11 株の Hm 分解は、ジアミノオキシダーゼ以外の Hm オキシダーゼ、Hm デヒドロゲナーゼ、又はその他の酵素としてデアミンナーゼ等の脱アミン酵素による作用であることが強く示唆された。*Pseudomonas* 属には塩ストレス緩和に関わっている可能性のある 1-アミノシクロプロパン-1-カルボキシレート (ACC) デアミンナーゼ活性を有する株が知られており<sup>9)</sup>、*Pseudomonas* sp. KYA11 株は、

16S rDNA 解析で ACC 遺伝子を有している *P. marginalis* や *P. grimontii* に近いと考えられることから、ACC デアミンナーゼを生成している可能性も十分に考えられる。

耐塩性 Hm 低減菌を検索し、*Pseudomonas* sp. KYA11 株や *Brevibacterium* sp. NAS10 株が分離された際に意外だったのが、分離源が塩の入った漬物や塩辛等の加工品からではなく、キャベツやナスといった極めてありふれた野菜から分離されたことである。明確に菌の分離までには至っていないが、ダイコン、レンコン、キュウリなどのサンプルを入れた検索培養液からも、耐塩性 Hm 低減菌の存在が示唆されており、これらの結果は、通常の野菜には、耐塩性の菌が比較的普遍的に付着していることを示唆している。Dilfuza らの報告によれば、*Pseudomonas* 属や *Brevibacterium* 属は、根粒環境菌として、植物の耐塩性に関連することが知られていることから<sup>10)</sup>、野菜から耐塩性の微生物が分離されることは理にかなった結果と言えるのかもしれない。データは示さないが、土壌も分離源サンプルとして検索を行ったが、その際にはこのような菌は分離されなかったことから、今回の起源は土壌のみならず大気中に浮遊する菌が主だったのかもしれない。今後も、耐塩性菌の検索の分離源には、あまり塩の含有にこだわったサンプルにする必要が無いと思われる。

そして今回分離された耐塩性 Hm 低減菌の中で、最も Hm 低減能力が高いと判断された *Pseudomonas* sp. KYA11 株を用いた固定化菌体によるバイオリクター法でのしょうゆ中の Hm 分解、及び脱アルコールしょうゆに本菌を接種し、振盪培養したが全く Hm は分解されなかった。その理由の一つは、本菌株の生育可能 pH 範囲が 6.0 以上であったことである。pH を中性 (pH7.0) に調整した脱アルコールしょうゆに接種した場合には、1 か月で 1500 ppm 程度の Hm 塩酸塩の減少が認められたことから、本菌の生育可能な pH 範囲であれば、Hm の低減は可能であると考えられるが、その低減速度は遅く、かつ、分解も完全には行われなかったことから、依然として不十分であると考えられた。また、官能的にも、しょうゆ香が失われており、本菌を用いたしょうゆ中 Hm の低減は、未だ実用的なレベルではないことが明らかとなった。

#### 5. 今後の課題

上述してきたように、単に耐塩性を示す Hm 低減菌を利用しても、しょうゆ中での Hm 低減はうまくいかないことが判明した。今後の課題としては、単なる耐塩性だけではなく、しょうゆの pH 範囲である微酸性でも生育可能で耐塩性を示

す Hm 低減菌の検索が必須であると考えられる。そこで pH を酢酸緩衝液で pH 4.8 に保った Hm 含有貧栄養培地を用いて現在も検索を継続している。

## 6. 文献

1. 井部明広:食品に含まれるアミン類, 日本調理科学会誌, 47(6), 341 (2014)
2. 農林水産省有害化学物質含有実態調査結果データ集(平成 23~24 年度), p107 (2014)
3. 田上秀男, 野田義治, 日高修, 松岡清司, 小林真志, 紅林孝幸:醤油工場におけるアミン低減の検証, 醤油の研究と技術, 41 (5), 327 (2015)
4. 野田義治, 日高修, 松岡清司, 小林真志, 紅林孝幸, 田上秀男, 小熊哲哉:小規模・中規模工場における不揮発性アミン低減対策取り組みの現状, 醤油の研究と技術, 44(1), 31 (2018)
5. Tsuneo Sato, Masayo Okuzumi, Tomoyuki Masuda, and Tateo Fuji : Distribution and Genus/Species Composition of Histamine-Decomposing Bacteria during Storage of Common Mackerel, Fisheries Science, 61(1), 83 (1995)
6. 久田孝, 矢野俊博, 後藤秀幸: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, 平成 17 年度ソルトサイエンス助成研究報告集, 189 (2007)
7. Ying Xu, Yu Liu, Binghong Xu, Dongfeng Wang, Wei Jiang: Characterization and application of *Halomonas shantousis* SWA25, a halotolerant bacterium with multiple biogenic amine degradation activity, Food Additives & Contaminants: Part A, 33 (4), 674 (2016)
8. 田上秀男, 小熊哲哉:醤油乳酸菌の分離・培養法及びヒスタミン等の不揮発性アミン分析法に関する参考資料, 日本醤油協会 (2016)
9. Cheng-Huan Liu, Wanyi Siew, Yu-Ting Hung, Yu-Ti Tieng, and Cheng-Hua Huang: 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase Gene in *Pseudomonas azotoformans* Is Associated with the Amelioration of Salinity Stress in Tomato, J. Agric. Food Chem., 69 (3), 913 (2021)
10. Dilfuza Egamberdieva, Jakhongir Alimov, Vyacheslav Shurigin, Burak Alaylar, Stephan Wirth, and Sonoko Dorothea Bellingrath-Kimura : Diversity and Plant Growth-Promoting Ability of Endophytic, Halotolerant Bacteria Associated with *Tetragonia tetragonioides* (Pall.) Kuntze, Plants, 11(1), 49 (2022)

## Study on a Simple Method for Reducing Nonvolatile Amines in Soy Sauce - Isolation and application of salt-tolerant histamine-reducing bacteria -

Tetsuya Oguma, Kohei Kashiwagura, Kosuke Komori

Niigata Agro-Food University, Faculty of Agro-Food Science

### Summary

In general soy sauce has no histamine (Hm) or contains a small amount of Hm, but it rarely contains high levels of Hm, which is produced by some wild soy sauce lactic acid bacteria. Therefore, the Japan Soy Sauce Association has been working to reduce Hm in soy sauce, and has achieved a certain level of quality by calling for thorough cleaning of production lines and the addition of the soy sauce lactic acid bacterium that does not produce Hm. However, these processes are time-consuming and costly, and there is a strong need for a simpler method to reduce Hm in soy sauce.

In this study, we established a search system for Hm-reducing bacteria, confirmed its effectiveness, searched for salt-tolerant Hm-reducing bacteria, and investigated Hm reduction in soy sauce using the obtained salt-tolerant Hm-reducing bacteria. The salt-tolerant Hm-reducing bacteria that could grow in oligotrophic medium with 16% (w/v) salt concentration were divided into two groups: those that temporarily reduced Hm in the medium only slightly and those that degraded Hm steadily. The results of the simple identification of the strains showed that *Halomonas* sp. (strain H10) and *Salimicrobium* sp. (strain HOY1) were the bacteria that temporarily reduced Hm in the medium, and *Pseudomonas* sp. (strain KYA11) and *Brevibacterium* sp. (strain NAS10) were identified as the bacteria that degraded Hm, respectively. H10 and HOY1 temporarily reduced Hm, but the reduction state was unstable. On the other hand, strains KYA11 and NAS10 almost degraded 5000 ppm Hm hydrochloride in the medium in about one month.

Next, strain KYA11, which showed the strongest Hm degradation, was immobilized with alginate and shaken in soy sauce containing 5000 ppm Hm hydrochloride for one month, and no clear reduction was observed. Since KYA11 cannot grow at pH less than 6.0, soy sauce prepared by adjusting the pH of de-alcoholized soy sauce to 7.0 was used to inoculate KYA11. When strain KYA11 was inoculated in it, a maximum Hm reduction of approximately 30% was observed within one month. From the above, it was found that Hm hydrochloride in pH-neutralized de-alcoholized soy sauce could be reduced by about 1500 ppm in one month by inoculating KYA11 strain and shaking culture.

In the future, it will be necessary to search for Hm-reducing bacteria that show salt tolerance even in the same slightly acidic condition as soy sauce.