

## 報 文

## 醤油もろみ中のチラミンの生成

(平成 15 年 3 月 24 日受理)

井部明広\*<sup>†</sup> 田端節子\* 貞升友紀\* 安井明子\*  
下井俊子\* 遠藤美代子\* 斉藤和夫\*

## Production of Tyramine in “Moromi” Mash during Soy Sauce Fermentation

Akihiro IBE<sup>†</sup>, Setsuko TABATA, Yuki SADAMASU, Akiko YASUI,  
Toshiko SHIMOI, Miyoko ENDOH and Kazuo SAITO(Tokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku,  
Tokyo 169-0073, Japan; <sup>†</sup> Corresponding author)

The concentrations of 7 non-volatile amines, tyramine (Tym), histamine (Him), phenethylamine (Phm), putrescine (Put), cadaverine (Cad), spermidine (Spd) and spermine (Spm) in the liquid part of “moromi” mash during soy sauce fermentation were studied.

These amines, except for Him and Cad, were detected during fermentation by the conventional production method in the laboratory. Put and Spd were detected at the beginning, and Tym, Phm and Spm appeared later; these 5 amines increased gradually during the fermentation. Put, Spd, Spm and Cad were present in the raw starting material for soy sauce; thus, Tym and Phm were produced by the fermentation.

When “moromi” mash was added to liquid medium and cultivated, Tym was detected in some “moromi” mash and the other amines were not detected. Tym-producing bacterial strains were isolated from the liquid culture media of Tym-positive “moromi” mash. The Tym-producing strain was a gram-positive coccus.

The conditions for production of amines by Tym-producing bacterial strains were examined. These strains grew and produced tyramine under various conditions, which may occur during soy sauce fermentation. Namely, Tym was produced at pH 5–10, at salt concentrations of less than 8%, under either aerobic or anaerobic conditions.

During soy sauce fermentation, it is assumed that Tym would be produced by these strains during the early stages of soy sauce aging within a short period when the salt concentration and pH conditions are optimal for growth.

Based on the bacteriological properties, the strains were identified as *Enterococcus faecium*.

With the exception of Phm and Him, which did not exist in the starting raw material, non-volatile amines (including Put, Cad, Spd and Spm) were not produced and microorganisms producing them are not believed to be present during “moromi” fermentation.

(Received March 24, 2003)

**Key words:** チラミン tyramine; 醤油 soy sauce; 不揮発性アミン non-volatile amine; もろみ “moromi” mash; 熟成 fermentation; 生成 production; チラミン産生菌 tyramine-producing bacteria

## 緒 言

チラミン (Tym), ヒスタミン (Him) などの不揮発性腐敗アミンは魚介, 食肉食品などが腐敗する際生じることから鮮度判定の指標物質として知られるほか, 特にヒスタミンはアレルギー様食中毒の原因物質として食品衛生上問題となっている<sup>1)</sup>. 食品中に含まれる不揮発性腐敗アミン類

は腐敗によるばかりではなく, 発酵, 醸造食品においては製造過程中発酵に関わる微生物によっても産生される<sup>2)~4)</sup>.

これらアミンの中でも特に Him, Tym などはイソニアジドやモノアミンオキシダーゼ阻害薬などある種の医薬品を服用している患者に対して強い悪影響を及ぼす. Tym を含むチーズ, キャビアなどの食品を喫食したことにより頭痛, 高血圧, 心悸亢進など重篤な症状に陥ることも報告されている<sup>1)~4)</sup>. また, Him の毒性は共存する他のアミ

<sup>†</sup> 連絡先

\* 東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

ンによって増強されることも知られ<sup>3)</sup>, これらアミンの含有実態を知り, 摂取による影響をできるだけ避けることが, 健康を保持する上で重要である。

著者らはこれまで発酵食品中のアミンのうち, Tym, Him, フェネチルアミン (Phm), プトレシン (Put), カダベリン (Cad), スペルミジン (Spd) およびスペルミン (Spm) の7種のアミン (以下アミン類と略す) の含有実態とその成因について調査し報告してきた<sup>5)~10)</sup>。それらの中で味噌, 醤油, 中国酒などでは, 特にTymの含有量が他のアミン類に比較して高いことを明らかにし, 更に味噌についてはHimとTymを産生する乳酸菌を分離し, それらが醸造中のアミン生成の一因となることを報告した<sup>7), 8)</sup>。これまでもチーズ, 味噌, 清酒などの発酵醸造食品中でHimやTymなどのアミン類が生成することが報告され, 更にそれらを産生する細菌などが分離されているが<sup>1)~3), 11)~13)</sup>, 実際の製造過程においてこれらの菌がいかに食品中のアミンの存在に関わっているかを解明した報告はほとんど見られない。

本報告ではアミン類についてその含有原因を知る目的で, 醤油の製造を試みアミン類生成の有無を調査するとともに, それらの生成原因を検討したところ若干の知見が得られたので報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

1) 醤油原料 都内の醤油製造業Y社より分与された醤油原料の蒸し丸大豆, 炒り小麦および種麹菌を用いた。

2) 麹 Y社にて蒸し丸大豆および炒り小麦同量を合わせ種麹菌を加えて25℃3日間培養, 作製した。

3) 醤油もろみ 麹1.9 Lをふた付きガラス容器に採り, 22% (w/v) 食塩水2.28 Lを加えかくはんし, 暗所室温で503日間放置熟成した。熟成期間中初めの1か月間はかくはんせず, 以後は約1週ごとに1回, およびアミン産生検討用の試料をサンプリングする際にかくはんした。なお, 試料は滅菌容器に採取し-80℃中で保存した。また, 熟成期間中の室温は12~34℃であった。

### 2. 試薬

チロシン, アジ化ナトリウム, グルコース (和光純薬工業(株)製 特級), シクロヘキシミド (和光純薬工業(株)製 1級), ニンヒドリンスプレー (和光純薬工業(株)製 薄層クロマトグラフ用), ペプトン (DIFCO), 寒天末 (和光純薬工業(株)製 細菌培地用), MRS ブイヨン (UNIPATH), レンサ球菌同定キット (REMEL Inc., RapID STR System) およびその他試薬は試薬特級を用いた。

### 3. 装置

嫌気培養装置はアネロバック (三菱ガス化学(株)), 高速液体クロマトグラフはTRI ROTAR VI (日本分光(株)), 薄層板はSilicagel 60 HPTLCプレート (Merck社), 展開溶媒にはアセトン-25% アンモニア水 (9:1) を用いた。

### 4. 培地

1) アミン産生用液体培地 ペプトン5 g, 酵母エキス3 g, グルコース1 g, アジ化ナトリウム10 mg およびシクロヘキシミド10 mg を水1 Lに溶解し, 1, 3, 5% となるよう塩化ナトリウムを加え, 小試験管に2 mLずつ分注後オートクレーブで滅菌した。

2) チロシン飽和液体培地 ペプトン5 g, 酵母エキス3 g, グルコース1 g をチロシン飽和水1 Lに溶解し, 1~12% (w/v) になるよう適宜塩化ナトリウムを加え, あるいは水酸化ナトリウム溶液および塩酸でpH 4~10に調整し滅菌後用いた。

3) チロシン加平板培地 特許公報 (平2-39240, 発明者: 内田金治)<sup>14)</sup> に準じた。すなわちMRS ブイヨン52.1 g, シクロヘキシミド10 mg, 寒天15 gを1 Lに溶解し, 10 mLずつ小試験管に分注し滅菌した。使用時に50℃に加温して培地を溶解し, あらかじめ160℃2時間滅菌したチロシン50 mgを素早く混和し, 直ちにシャーレに流し平板培地を作製した。

### 5. チロシン消費菌の判定

上記4.3) のプレートで菌を培養後, コロニー周辺の培地が透明になったコロニーをチロシン消費菌と判定した。

### 6. 菌の生育の判定

液体培地における菌の生育は濁りの有無により判定を行った。

### 7. 分析法

1) 塩分濃度の測定 試料を水で適宜希釈した溶液を衛生試験法・注解に従って測定し<sup>15)</sup>, 塩素濃度から塩化ナトリウムとして換算した。

2) アミン類測定 HPLC 用試験溶液の調製 前報<sup>5)</sup> に従った。ただし, 培地については100  $\mu$ Lを10 mLの褐色試験管に採り, 0.1 mol/L 塩酸で2 mLとした後, 以下同様に操作しHPLC 用試験溶液とした。

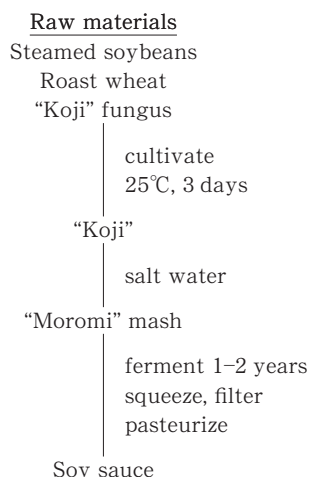
3) HPLCの測定条件 カラム: Cosmosil 5C18 MS 4.6 i.d.  $\times$  150 mm (ナカライテスク(株)); カラム温度: 40℃; 移動相: アセトニトリル-水 (50:50)  $\rightarrow$  80:20/65分; 流速: 0.7 mL/min; 測定波長: Ex. 325 nm, Em. 525 nm

4) TLCによるアミン類の定性 衛生試験法・注解<sup>16)</sup> に従った。すなわち培養液10  $\mu$ Lを薄層板にスポットし展開後風乾し, ニンヒドリンスプレー試薬を噴霧, 標準品と同Rfの紫色スポットの有無を観察した。

## 結果と考察

### 1. 醤油製造所における製品および原料調査

著者らはこれまで市販の味噌および醤油中のアミン類について含有量および生成原因の調査を行ってきた<sup>5)~8)</sup>。その中で味噌中に存在するアミン類のうちTym, Him およびPhmは発酵中に生成し, またPut, Cad, Spd, Spmは原料の大豆成分に由来することを推察した<sup>7)</sup>。更に味噌におけるアミン産生菌として, Tym産生菌では *Enterococ-*



**Scheme 1.** The manufacturing process of soy sauce

*cus faecium*, Him 産生菌では *Lactobacillus* 属の 2 種の乳酸菌を分離し、味噌熟成中これらの菌が他の微生物と共存しながら、熟成初期の生育に適した塩分濃度と pH 条件下で、それぞれが Tym あるいは Him を産生すると推察した<sup>8)</sup>。市販の醤油中の各アミン類の含有量は、味噌同様に Tym および Him が他のアミンに比べ多く、市販品の平均値はそれぞれ 484, 203  $\mu\text{g/g}$  であり<sup>9)</sup>、それらの検出率も味噌より高くほとんどすべての製品から検出された。他のアミンも含有量、検出率ともに味噌に比べて醤油がより高い傾向を示した。

Scheme 1 に醤油の製造法を示した。醤油の場合も味噌とほぼ同じ原料を使っていることから、検出された Tym, Him, Phm は味噌と同様、発酵中に生成するものと考えられた。しかし、これまで醤油中のアミンの生成に関する報告はほとんど見られない。これは製品の醤油では殺菌工程があること、材料の小麦および麹が手に入りにくく、一般に実験室的に醸造を行うことが難しいためと思われる。今

回醤油製造メーカー Y 社において醸造中のもろみを含めサンプリングの機会を得たことから、Y 社の醤油製造工程における調査を開始した。

Y 社における製品、原料および熟成期間の異なるもろみのアミン類含有量を Table 1 に示した。醤油の製品および仕込み直後 (0 日)、4 か月、10 か月後の熟成のもろみからいずれも各アミンが検出され、Tym, Him では 100  $\mu\text{g/g}$  前後、Cad, Spm を除き他のアミンも 10~30  $\mu\text{g/g}$  前後検出された。これに対して原料である蒸し大豆、炒り小麦、種麹菌からは Tym, Him, Phm は全く検出されず、Cad, Put, Spd, Spm が検出された。また、もろみの仕込みには麹と、塩水である仕込み水を用いるが、仕込み水の代わりに用いられた生揚げ醤油から、製品および熟成中のもろみと同様にすべてのアミン類が検出された。麹では原料である大豆、小麦からの由来と思われるアミンが検出された。このことは製品に検出された Tym, Him, Phm は製造中に生成したというより、むしろもろみ仕込み時に加える生揚げ醤油に由来すると判断された。通常仕込み水として塩水を麹に加えもろみを仕込むところを、Y 社では Tym, Him がすでに含まれている既製の生揚げ醤油を用いていたため製品から検出されたことが判明した。このため本実験には Y 社の仕込んだもろみを使ってアミン類の生成を調査することができなかった。

## 2. 熟成もろみ中のアミン含有量の変化

Y 社で作製した麹を用い、実験室で通常の方法である仕込み水として塩水だけを加えたもろみを仕込み、醤油を製造することとした。Y 社での仕込みに従って 4 月にもろみを仕込み実験を開始した。もろみを 503 日間放置熟成し、その間適宜液体部分を採取し熟成期間中のアミン類含有量を測定した。1 試料から 2 分析行い両者の値の平均値から含有量を算出した。もろみ熟成期間中のアミン類の含有量を Table 2 に示した。

**Table 1.** Contents of Amines in Soy Sauce and Its Raw Material

| Sample                        | Contents of amines ( $\mu\text{g/g}$ ) |     |      |     |      |      |      |
|-------------------------------|----------------------------------------|-----|------|-----|------|------|------|
|                               | Tym                                    | Him | Phm  | Cad | Put  | Spd  | Spm  |
| Soy sauce                     |                                        |     |      |     |      |      |      |
| Product                       | 129                                    | 66  | 15.4 | 1.9 | 9.1  | 11.8 | 1.3  |
| “Moromi” mash (for 0 day)     | 91.6                                   | 108 | 6.9  | 1.1 | 16.9 | 25.5 | 3.1  |
| “Moromi” mash (for 4 months)  | 137                                    | 158 | 32.8 | 1.5 | 29.7 | 14.3 | 2.0  |
| “Moromi” mash (for 10 months) | 119                                    | 124 | 28.5 | 1.4 | 30.1 | 12.6 | 1.5  |
| Raw material                  |                                        |     |      |     |      |      |      |
| Steamed soybean               | —                                      | —   | —    | 6.3 | 5.8  | 64.2 | 17.1 |
| Roast wheat                   | —                                      | —   | —    | —   | 1.4  | 6.5  | 3.0  |
| “Koji” fungus                 | —                                      | —   | —    | —   | —    | 2.4  | 0.4  |
| Material of “moromi”          |                                        |     |      |     |      |      |      |
| “Koji”*                       | —                                      | —   | —    | 2.2 | 2.7  | 31.1 | 6.5  |
| Raw soy sauce (“Kiage shoyu”) | 100                                    | 156 | 5.3  | 0.7 | 16.2 | 15.7 | 1.9  |
| Detection limits              | <5                                     | <20 | <2   | <1  | <1   | <1   | <1   |

\* Mixture of steamed soybean, roast wheat and “koji” fungus cultivated for 25°C for 3 days.

Tym: tyramine; Him: histamine; Phm: phenethylamine; Cad: cadaverine; Put: putrescine; Spd: spermidine; Spm: spermine

**Table 2.** Concentration of Amines during “Moromi” Fermentation

| Fermentation days | Concentrations of amines (μg/g) |     |     |      |     |      |     |
|-------------------|---------------------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
|                   | Tym                             | Him | Phm | Put  | Cad | Spd  | Spm |
| 0                 | —                               | —   | —   | 2.0  | —   | 6.0  | —   |
| 3                 | —                               | —   | —   | 2.6  | —   | 5.6  | —   |
| 4                 | —                               | —   | —   | 1.9  | —   | 6.6  | —   |
| 6                 | —                               | —   | —   | 3.7  | —   | 5.7  | —   |
| 7                 | —                               | —   | —   | 5.1  | —   | 7.2  | —   |
| 11                | —                               | —   | —   | 8.0  | —   | 7.8  | —   |
| 19                | —                               | —   | 1.1 | 8.8  | —   | 7.4  | —   |
| 27                | 1.8                             | —   | 2.5 | 8.3  | —   | 10.6 | 1.5 |
| 35                | 2.0                             | —   | 2.9 | 8.1  | —   | 9.4  | 1.4 |
| 55                | 7.2                             | —   | 6.0 | 13.9 | —   | 10.4 | 1.6 |
| 75                | 12.6                            | —   | 9.6 | 13.4 | —   | 10.5 | 1.5 |
| 111               | 13.6                            | —   | 9.2 | 18.7 | —   | 14.1 | 2.3 |
| 217               | 18.9                            | —   | 9.8 | 20.3 | —   | 17.1 | 2.6 |
| 285               | 18.8                            | —   | 9.9 | 20.4 | —   | 16.8 | 2.3 |
| 503               | 17.9                            | —   | 8.6 | 23.1 | —   | 19.5 | 2.4 |
| Detection limits  | <1                              | <5  | <1  | <1   | <1  | <1   | <1  |

仕込み後 11 日までは大豆など原料に由来すると思われる Put, Spd のみが検出され、他のアミンは検出されなかったが、19 日に Phm が、27 日目に Tym, Spm が検出され、以後 Put, Spd とともに漸次増加した。Him, Cad は最終 503 日目まで検出されなかった。これらのアミン類のうち Put, Spd, Spm は原料に存在することから、生成されたのではなく原料から溶出してきたものと考えられた。また醤油はこのもろみに圧力をかけて絞り、製品とすることから、今回液体部分から Cad は検出されなかったものの原料には存在することから、製品から検出される Cad についてもやはり原料からの由来と考えられた。一方 Tym, Phm は原料に存在しないことから熟成中に生成

されたと考えられた。もろみ中の含有量が原料より多かった Put については一部生成されたことも考えられた。検出された各アミン類のうち Tym, Phm は 217 日以降も増加は見られなかったが、Put, Spd についてはわずかに増加する傾向が見られた。

これらのことから、本実験のもろみ中には Tym および Phm あるいは Put を産生する細菌などが存在し、これによって生成されることが推察された。

### 3. もろみの培養から Tym 生成

熟成期間中 285 日までは含有量の調査とともに、別に採取し冷凍保管しておいたもろみの 1 白金耳を採り、それぞれ 1, 3, 5% 食塩を含む液体培地で室温 (20~25℃) 4 日間放置培養し、菌の生育とアミン類生成の有無を調査した。その結果を Table 3 に示した。培地の食塩濃度については、仕込み水の濃度が 22% ではあるが、その中で生育する菌は限られること、塩分が全体に浸透するまでの間にも熟成に関わっている多くの菌、特に微好塩菌が存在すると考えられたため、5% までの濃度を設定した。

いずれのもろみにおいても各食塩濃度で菌の生育が観察された。アミン類の生成の有無を TLC により行ったところ、いずれの食塩濃度においても 27 日目のもろみで Tym の濃い発色スポットが認められた。1% 食塩濃度の培養液では 6 日目のもろみで濃い発色スポットを認め、2, 4, 7, 11, 55 日目のもろみからも Tym のスポットが検出された。いずれの Tym も高速液体クロマトグラム上でも確認された。しかしその他のアミンはいずれも検出されなかった。また 75 日目以降のもろみからは、菌の生育が認められたにもかかわらず、アミン類の生成は全く見られなかった。これはアミン産生菌が存在していても、それ以外の耐塩性あるいは好塩性の菌が優勢になったためと思われる。

**Table 3.** Growth of Microorganisms and Production of Amines after Culture of “Moromi” Mash in Salt-supplemented Medium

| “Moromi” mash | Medium  |        |        |         |        |        |         |        |        |
|---------------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|
|               | 1% NaCl |        |        | 3% NaCl |        |        | 5% NaCl |        |        |
|               | Growth  | Amines |        | Growth  | Amines |        | Growth  | Amines |        |
|               |         | Tym    | Others |         | Tym    | Others |         | Tym    | Others |
| 0             | +       | —      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 2             | +       | +      | —      | ±       | —      | —      | +       | —      | —      |
| 3             | +       | —      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 4             | +       | +      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 6             | +       | ≡      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 7             | +       | +      | —      | ±       | —      | —      | +       | —      | —      |
| 11            | +       | +      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 19            | +       | —      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 27            | +       | ≡      | —      | ±       | ≡      | —      | +       | ≡      | —      |
| 55            | +       | +      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 75            | +       | —      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 111           | +       | —      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 217           | +       | —      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |
| 285           | +       | —      | —      | ±       | —      | —      | ±       | —      | —      |

Growth: +, growth; ±, marginal growth

Amines: —, not detected; +, detected; ≡, detected in large amount



このことから、もろみ中には Tym 産生菌が存在し、これによって醤油熟成中においても生成されることが推察された。

#### 4. Tym 産生菌の検索

これら Tym の検出された培養液を、Tym の前駆物質であるチロシン加平板培地に画線塗抹、培養したところ、同一形状の多数のチロシン消費コロニーが検出された。そこで Tym 産生量の多かった 6 日目のもろみの 1% 食塩濃度培養液、27 日目のもろみの 1, 3, 5% の食塩濃度培養液を培養した各プレートから得られたチロシン消費コロニーから釣菌し、更に単離菌をチロシン飽和液体培地を用いて培養した。それらの培養液について TLC を用い Tym 産生能を調べたところ、いずれのコロニーも Tym を産生することが判明した。

#### 5. Tym 産生菌による Tym 産生条件

醤油熟成中の環境を想定して、分離した Tym 産生菌を用いて各条件下における Tym の産生能を検討した。

1) pH および好、嫌気下における産生 もろみ熟成期間中、仕込み直後の約 1 か月はかくはんすることなく放置した。この間もろみの内部は嫌气的条件であることが予想された。そこで、チロシン飽和液体培地を用いて Tym 産生菌による Tym の産生を嫌气的および好气的条件下で比較した。同時に培地の pH による影響も併せて検討し Table 4 に示した。

室温に 2 日間放置したとき、pH 4 から 10 までの培養液のうち、pH 5 以上で菌は生育し、好气的、嫌气的いずれの条件下でも Tym を産生した。好気、嫌气的条件下では pH 5 以上でいずれも、それぞれおよそ 140  $\mu\text{g/mL}$ 、190  $\mu\text{g/mL}$  前後と pH にかかわらず同様に産生することが分かった。しかしながら好気、嫌気下の両者を比べると嫌気条件下の方が若干産生量が多い傾向が見られた。今回

**Table 4.** Production of Tyramine by a Tyramine-producing Strain under Aerobic and Anaerobic Conditions

| pH of medium | Growth <sup>1)</sup> | Concentration of Tym ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>2)</sup> |           |
|--------------|----------------------|---------------------------------------------------------|-----------|
|              |                      | Aerobic                                                 | Anaerobic |
| 4            | —                    | —                                                       | —         |
| 5            | +                    | 145                                                     | 186       |
| 6            | +                    | 148                                                     | 208       |
| 7            | +                    | 144                                                     | 168       |
| 8            | +                    | 143                                                     | 206       |
| 10           | +                    | 137                                                     | 168       |

<sup>1)</sup> —: no growth; +: growth

<sup>2)</sup> Values are means of data from 3 samples; —: below 10  $\mu\text{g/mL}$

の実験で醤油の熟成期間中、もろみの pH が仕込み時の 5.6 から最終時の 4.8 であったことを考えあわせると、いずれの期間においても Tym を産生する条件は満たされていることが分かった。

2) 塩分濃度 もろみは仕込み時、原料に 22% 食塩水を加えて熟成を開始したが、熟成 285 日後の液体部の食塩濃度は 15.5% であった。熟成期間中塩分は固体部分に浸透分散し希釈されていく。通常醤油製品の食塩濃度は 12~16% であることから、食塩濃度 1~12% のチロシン飽和液体培地を用いて産生菌の生育と Tym 産生能について検討を行った。4. で各もろみより分離した産生菌および冷凍保存の 27 日目のもろみ 1 白木耳を培養したときの結果を Table 5 に示した。

各 Tym 産生菌は塩分濃度 8% まで菌は発育可能でいずれも Tym を産生した。また複数の菌が存在すると思われる 27 日目のもろみでは塩分 12% まですべての濃度において菌の生育が観察されたが、Tym が産生されたのは 7% までで、それ以上の塩分濃度では Tym の産生は見ら

**Table 5.** Growth and Tyramine Production of Tyramine-producing Strains in Salt-supplemented Medium

| Strain and "moromi" mash    |            | Salt concentration of medium (%) |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|-----------------------------|------------|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
|                             |            | 1                                | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 6-1-1 Strain <sup>1)</sup>  | Growth     | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
|                             | Production | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
| 27-1-1 Strain               | Growth     | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
|                             | Production | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
| 27-3-1 Strain <sup>2)</sup> | Growth     | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
|                             | Production | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
| 27-5-4 Strain               | Growth     | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
|                             | Production | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
| 27-5-5 Strain               | Growth     | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
|                             | Production | +                                | + | + | + | + | + | + | + | — | —  | —  | —  |
| 27 days "Moromi" mash       | Growth     | +                                | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  |
|                             | Production | +                                | + | + | + | + | + | ± | — | — | —  | —  | —  |

<sup>1)</sup> 6-1-1 Strain: strain which is colony No. 1 from 6-day "moromi" in 1% NaCl medium

<sup>2)</sup> 27-3-1 Strain: strain which is colony No. 1 from 27-day "moromi" in 3% NaCl medium

Growth: —, no growth; +, growth

Production: —, negative; ±, weakly positive; +, positive

れなかった。これはもろみには産生菌以外の微生物も共存しているため、産生菌と一緒に他の菌も増殖したためで、特に8%以上ではTymの産生が見られないことから、他の好塩性の菌にTym産生菌の生育が抑制されたものと思われた。特に6%以下でTymの産生が十分観察され、7%でわずかにしか観察されなかったことは、産生菌が8%まで生育および産生可能であるにもかかわらず、7%では生育が遅かったため初期段階でTymをわずかに産生したものの、その後他の好塩性の菌に増殖を取って代わられたものと考えられた。8%においては産生菌が生育しTymを産生する前に他の好塩性の菌が先に増殖したものと考えられた。このことは熟成中のもろみの中では生育条件の適する時期、場所で菌による競合、拮抗が行われていることが推察され、熟成中Tym産生菌の生育に良い塩分濃度の場所が存在し、他の好塩性あるいは耐塩性の菌にその生育を妨げられる前にTymを産生するものと考えられた。

#### 6. 産生菌の性状および菌の同定

分離したこれらTym産生菌はいずれも通性嫌気性、グラム陽性球菌であり、オキシダーゼ、カタラーゼ陰性、ラクトースを分解し酸を産生した。そこで6および27日目のもろみより分離したTym産生菌3株をレンサ球菌同定キットにより同定を試みた結果をTable 6に示した。いずれのコロニーも*Enterococcus faecium*と同定された。他のもろみから得られた菌も性状が同じことから本菌であり、今回作製したもろみにおけるTym産生の原因菌は*E. faecium*であると考えられた。

著者らは前報において味噌の熟成発酵中にTym、Himが生成しその生成原因が、Tymは*E. faecium*、Himについては*Lactobacillus*属の菌によることを報告した<sup>8)</sup>。今回醤油においても同様にTym産生菌として*E. faecium*が分離され、本菌が生成の一因と考えられた。これまでチーズやソーセージなど発酵食品中から分離されたTym産生菌は*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Streptococcus* (*Enterococcus*)属などの乳酸菌が報告されており、実際の醸造中におけるアミン類生成との関連が推察されてはいるが、実際の発酵中にいつどんな機序で産生するかの証明はされていない。前報<sup>8)</sup>の味噌、今回の醤油では初めてこれら産生菌が発酵熟成中に生成原因となりうることを確認した。しかし、醤油においても発酵に*Tetragenococcus halophilus*を含めた*Pediococcus*属、*Leuconostoc*属など多くの乳酸菌が関わっており<sup>17)</sup>、*E. faecium*以外で耐塩性の強い菌がTym産生に大きく関わっていることも考えられる。市販製品に見られるTym含有量を今回の生成量と比較すると、今回最終試料の含有量約18 µg/gが市販品の平均値484 µg/g<sup>9)</sup>よりはるかに少ないことから、今回分離した*E. faecium*も生成原因菌の1つではあるが、一般に醤油においてはこの菌のほかに他の産生菌、特に*T. halophilus*のような耐塩菌で、かつTym産生能を有する菌の関与がより大きいことが考えられた。

**Table 6.** Bacteriological Properties of Tyramine-producing Strains

|                                                  | Strains (colony No.) |        |        |
|--------------------------------------------------|----------------------|--------|--------|
|                                                  | 6-1-3                | 27-1-4 | 27-5-5 |
| Gram stain                                       | +                    | +      | +      |
| Cell morphology                                  | cocci                | cocci  | cocci  |
| Catalase                                         | —                    | —      | —      |
| Oxydase                                          | —                    | —      | —      |
| OF-test                                          | F                    | F      | F      |
| Lactose                                          | +                    | +      | +      |
| L-Arginine                                       | +                    | +      | +      |
| Esculin                                          | +                    | +      | +      |
| Mannitol                                         | +                    | +      | +      |
| Sorbitol                                         | —                    | —      | —      |
| Raffinose                                        | —                    | —      | —      |
| Inulin                                           | —                    | —      | —      |
| p-Nitrophenyl- $\alpha$ ,D-galactoside           | +                    | ±      | ±      |
| p-Nitrophenyl- $\alpha$ ,D-glucoside             | —                    | —      | —      |
| p-Nitrophenyl-n-acetyl- $\beta$ ,D-glucosaminide | +                    | —      | —      |
| p-Nitrophenyl phosphate                          | —                    | —      | —      |
| Tyrosine $\beta$ -naphthylamide                  | —                    | —      | —      |
| Hydroxyproline $\beta$ -naphthylamide            | —                    | —      | —      |
| Lysine $\beta$ -naphthylamide                    | —                    | —      | —      |
| Pyrrolidine $\beta$ -naphthylamide               | +                    | +      | +      |
| Hemolysis                                        | —                    | —      | —      |

+: positive; —: negative; F: fermentation type

\* Results of RapID STR System

#### 7. 産生菌の由来

本Tym産生菌の由来を究明する目的で、試料提供先のY社において、製造工程の各設備をふき取り、それぞれについてTym産生菌を検索したが検出することができなかった。これはY社においてはすでに醤油の製造を中止して1年以上経過していたため、菌が残存していなかったものと思われた。*E. faecium*を含む腸球菌*Enterococcus*属は糞便汚染指標細菌として知られる<sup>18)</sup>ほか、これまでも食中毒発生時に分離され、その原因菌として疑われている<sup>19)</sup>。一方、やはりTym産生菌として知られている*E. faecalis*とともにみそや醤油もろみをはじめ多くの食品から検出される<sup>17)</sup>など生活環境中にも見いだされることから、本菌は醤油の各原料に存在していたか、製造所内で麹製造中もしくはもろみ調製時に周りの施設、環境から混入したものと推察された。

#### 8. 醤油熟成中のTym生成

以上の結果から、一般に醤油中に存在するTymはもろみ熟成中、塩分が完全にその内部に浸透する前、塩分6~7%以下の部位を有する初期段階において、*E. faecium*あるいは*E. faecalis*などの比較的耐塩性のあるTym産生能を有する乳酸菌によってまず生成、蓄積する。その後塩分が浸透しこれらの菌が生育できなくなった時点では、塩分8%以上でも生育する好塩性あるいは耐塩性の強いTym産生菌が存在するとTymは更に生成され蓄積するものと推察された。

## ま と め

醤油もろみ熟成中における7種のアミン生成の有無を調査した。醤油のもろみを仕込み、503日間熟成し経時的にもろみを採取し分析したところ、TymおよびPhmが生成されることを確認した。それらのもろみからTymを産生する菌を単離し、*E. faecium*と同定した。本菌の性状を検討した結果、醤油中のTymは、熟成中塩分が完全にもろみ内部に浸透する前の初期段階において、これらTym産生菌によって生成、蓄積されることが一因であると推察された。

## 謝 辞

本研究に当たり、チロシン加平板培地の作製および操作などでご助言をいただいた元キッコーマン(株)、内田金治氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Rice, S. L., Eitenmiller, R. R., Koehler, P. E., Biologically active amines in food: A review. *J. Milk Food Technol.*, **39**, 353-358 (1976).
- 2) Edwards, S. T., Sandine, W. E., Public health significance of amines in cheese. *J. Dairy Sci.*, **64**, 2,431-2,438 (1981).
- 3) Stratton, J. E., Hutkins, R. W., Taylor, S. L., Biogenic amine in cheese and other fermented foods: A review. *J. Food Prot.*, **54**, 460-470 (1991).
- 4) Blackwell, B., Mabbitt, L. A., Tyramine in cheese related to hypertensive crises after monoamine-oxidase inhibition. *Lancet*, **1965**, 938-940.
- 5) Ibe, A., Tamura, Y., Kamimura, H., Tabata, S., Hashimoto, H., Iida, M., Nishima, T., Determination and contents of non-volatile amines in soybean paste and soy sauce. *Eisei Kagaku (Jpn. J. Toxicol. Environ. Health)*, **37**, 379-386 (1991).
- 6) Ibe, A., Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Fujinuma, K., Nishima, T., Quantitative determination of amines in wine by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 695-698 (1991).
- 7) Ibe, A., Nishima, T., Kasai, N., Formation of tyramine and histamine during soybean paste (miso) fermentation. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 181-187 (1992).
- 8) Ibe, A., Nishima, T., Kasai, N., Bacteriological properties of and amine-production conditions for tyramine- and histamine-producing bacterial strains isolated from soybean paste (miso) starting materials. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 403-409 (1992).
- 9) Ibe, A., Kamimura, H., Tabata, S., Hayano, K., Tamura, Y., Contents of non-volatile amines in fermented foods (I). Tokyo Eiken Nenpo (Ann. Rep. Tokyo Metro. Res. Lab. P.H.), **46**, 102-107 (1995).
- 10) Ibe, A., Kamimura, H., Tabata, S., Hayano, K., Kimura, Y., Tomomatsu, T., Contents of non-volatile amines in fermented foods (II). Tokyo Eiken Nenpo (Ann. Rep. Tokyo Metro. Res. Lab. P.H.), **47**, 90-94 (1996).
- 11) Umezu, M., Shibata, A., Maeda, M., Production of amine by nitrate reducing-bacteria and lactobacilli for sake-brewing. *Hakko Kougaku (J. Ferment. Technol.)*, **55**, 68-74 (1977).
- 12) Takagi, H., Okamoto, R., Formation of tryptamine by microbes. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **23**, 125-131 (1976).
- 13) Chin, K.-D. H., Koehler, P. E., Effect of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenethylamine, tryptamine and tyramine during miso fermentation. *J. Food Prot.*, **49**, 423-427 (1986).
- 14) Uchida, K., Japan Kokai Tokkyo Koho, 2-39240 (Sep. 4, 1990).
- 15) 日本薬学会編 “衛生試験法・注解 2000” 東京, 金原出版, 2000, p. 714. (ISBN 4-307-47033-8)
- 16) 日本薬学会編 “衛生試験法・注解 2000” 東京, 金原出版, 2000, p. 173-174. (ISBN 4-307-47033-8)
- 17) 農林省食糧研究所編 “発酵食品の微生物管理技術” 東京, 農林省食糧研究所, 1967, p. 23-24.
- 18) 厚生省生活衛生局監修 “食品衛生検査指針・微生物編 1990” 東京, 日本食品衛生協会, 1990, p. 91-93.
- 19) Riemann, H., ed., “Food-borne Infections and Intoxications”, New York and London, Academic Press, 1969, p. 225-234.