

## 微生物によるジメチルニトロサミンの分解\*

原田勝彦・山田金次郎

### A Preliminary Study on the Microbiological Breakdown of Dimethylnitrosamine

By

Katsuhiko HARADA and Kinjiro YAMADA

Minute amounts of dimethylamine have been demonstrated in certain kinds of raw and processed sea foods. It is, therefore, conceivable that carcinogenic dimethylnitrosamine can be formed if the concentrations of nitrite and the nitrosatable amine in such sea foods are proper and the conditions are appropriate.

Much attention has been given to the inhibition of dimethylnitrosamine formation in the suspectable sea foods, such as when some kinds of compounds are used that could compete with dimethylnitrosamine for the available nitrite.

Recently, it has been made clear that a wide variety of bacterial strains separated from rat alimentary tract can decompose dimethylnitrosamine and produce nitrite as a degradation product.

In this paper, the nitrite liberation from dimethylnitrosamine by various identified strains of non-pathogenic microorganisms (22 species of bacterium, 18 species of mold, and 4 species of yeast) was investigated. Of all the strains tested, only five demonstrated nitrite liberation.

ある種の生鮮魚介類にジメチルアミン (DMA) が存在することは、天野ら<sup>1-3)</sup>、徳永<sup>4)</sup>、原田ら<sup>5-8)</sup>、CASTELLら<sup>9,10)</sup>、BABBITTら<sup>11)</sup>およびFLORESら<sup>12)</sup>の研究から明らかである。また、本来 DMA が存在しないとみなされる魚介類でも、その加工品から DMA が検出されている<sup>3,13,14)</sup>。これは、加熱または還元性物質の存在によるトリメチルアミンオキシサイドからの生成に起因すると考えられている<sup>15-19)</sup>。

このように、生鮮ならびに加工魚介類に DMA が存在することから、硝酸塩および亜硝酸塩の添加によって、これら食品に発がん性物質ジメチルニトロサミン (DMNA) の生成が危惧される。また、魚介類に含まれる3級ならびに4級アミン類が亜硝酸塩と反応して DMNA を生成する可能性もある<sup>20,21)</sup>。

DMNA を含めニトロサミンの生成はアスコルビン酸およびタンニンの添加により抑制される<sup>22-29)</sup>。この抑制効果は、ニトロサミン生成に拮抗して亜硝酸塩がアスコルビン酸またはタンニンと反応するためと考えられている<sup>22,26)</sup>。

一方、ROWLANDら<sup>30)</sup>はラットの腸内細菌について DMNA その他のニトロサミンの分解を調べ、多くの菌株が DMNA を分解し亜硝酸塩を生成することを報告している。このことは、微生物酵素により食品中の

\*水産大学校研究業績 第808号、1977年11月21日受理。  
Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 808.  
Received Nov. 21, 1977.

DMNA を分解し得る可能性を示唆する。この可能性を確かめるため、まず有用微生物 44 種について DMNA 分解能を調べた。結果をここに報告する。

## 実験方法

### 供試微生物とその培養

実験に使用した微生物は、細菌 22 種、糸状菌 18 種と酵母 4 種であり、その種類と使用培地と培養温度は第 1 表のとおりである。

### 菌体懸濁液の作製

細菌ならびに酵母については、第 1 表の培地 25 ml に 1 白金耳量の菌体を接種し、表に示す温度で 2 日間

Table 1. Strains used.

Strain*	Medium**	Incubation temperature(°C)
<b>Bacteria</b>		
<i>Acetobacter aceti</i> IFO 3281	No.1	30
<i>Acetobacter acetigenus</i> IFO 3277	"	"
<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3223	"	"
<i>Acetobacter xylinum</i> IFO 3288	"	"
<i>Bacillus natto</i> AKU	No.2	"
<i>Gluconobacter gluconicus</i> IFO 3171	No.1	"
<i>Gluconobacter roseus</i> IFO 3990	"	"
<i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3130	"	"
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3205	No.3	37
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IFO 3533	No.4	"
<i>Lactobacillus casei</i> IFO 3425	No.3	30
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> IFO 3202	"	"
<i>Lactobacillus fermenti</i> IFO 3071	"	37
<i>Lactobacillus leichmannii</i> IFO 3073	"	"
<i>Lactobacillus plantarum</i> IFO 3070	"	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IFO 3426	No.4	37
<i>Pediococcus pentosaceus</i> IFO 3182	No.3	30
<i>Pseudomonas ovalis</i> IFO 3738	No.2	"
<i>Streptococcus cremoris</i> IFO 3427	No.3	"
<i>Streptococcus faecalis</i> IFO 3826	"	37
<i>Streptococcus lactis</i> IFO 12007	"	30
<i>Streptococcus thermophilus</i> IFO 3535	No.4	37
<b>Molds</b>		
<i>Aspergillus clavatus</i> AKU	No.5	25
<i>Aspergillus niger</i> AKU	"	"
<i>Aspergillus oryzae</i> AKU	"	"
<i>Aspergillus sojae</i> IFO 5241	"	"
<i>Aspergillus usami</i> IFO 4388	"	"
<i>Mucor mucedo</i> IFO 5776	"	"
<i>Mucor racemosus</i> IFO 4581	"	"
<i>Mucor rouxianus</i> IFO 5773	"	"
<i>Penicillium camemberti</i> IFO 5855	"	"
<i>Penicillium chrysogenum</i> IFO 4626	"	"
<i>Penicillium italicum</i> AKU	"	"
<i>Penicillium notatum</i> AKU	"	"
<i>Penicillium roquefortii</i> IFO 5754	"	"
<i>Penicillium rugulosum</i> AKU	"	"
<i>Rhizopus chinensis</i> AKU	"	"
<i>Rhizopus javanicus</i> IFO 5441	"	"
<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4705	"	"
<i>Rhizopus stolonifer</i> IFO 4781	"	"

Table 1. (Cont'd)

Strain*	Medium**	Incubation temperature(°C)
Yeasts		
<i>Candida utilis</i> IFO 0396	No.5	25
<i>Hansenula anomala</i> IFO 0122	"	"
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 0209	"	"
<i>Saccharomyces rouxii</i> IFO 0495	"	"

\* Numbers with IFO and signs of AKU indicate the strains obtained from the Institute for Fermentation, Osaka and the Faculty of Agriculture, Kyoto University respectively.

\*\* Medium No. 1 : 1% peptone, 1% yeast extract, 0.5% CaCO<sub>3</sub>, pH adjusted to 6.8.

Medium No. 2 : nutrient broth, pH adjusted to 7.0-7.2.

Medium No. 3 : 40% tomato juice, 1.5% peptone, 2% glucose, 0.5% NaCl, 0.6% yeast extract, 0.1% Tween 80, 0.05% soluble starch, pH adjusted to 7.0-7.2.

Medium No. 4 : 10% powdered skim milk, 10% tomato juice, 0.5% yeast extract, pH adjusted to 7.0-7.2.

Medium No. 5 : 0.8% malt extract, 14% potato infusion, 4% glucose, pH adjusted to 5.6.

培養した。培養後、遠心分離し、菌体をリン酸緩衝液 (1/15M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-1/15M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0) に懸濁して菌体懸濁液 (10<sup>9</sup> cells/ml) を調製した。一方、糸状菌については、第1表に示す培地 25 ml に4日間培養した。培養後、遠心分離し、得られた菌体を、この場合、上記のリン酸緩衝液 30 ml に懸濁した。

#### DMNA 分解能の測定

対照を含め第2表の6種の反応混液について試験し、被検微生物のDMNA分解能を測定した。すなわち、反応混液をそれぞれの温度(第1表の培養温度)に2日間ふ置した後、反応混液をろ過し、ろ液について生成亜硝酸根を定量した。

Table 2. Reaction mixtures used in nitrite determination.

	Reaction mixture					
	A			B		
	Control mixture	Control mixture	Complete mixture	Control mixture	Control mixture	Complete mixture
	ml	ml	ml	ml	ml	ml
Cell suspension	5	0	5	1	0	1
DMNA* (1 μmole/ml)	0	1	1	0	1	1
Phosphate buffer (pH 7.0)	1	5	0	1	1	0
Medium**		Omission		4	4	4

\* Dimethylnitrosamine.

\*\* See the footnote of Table 1.

#### 亜硝酸根の定量

ADRIAANSE ら<sup>31)</sup>の方法に準拠して亜硝酸根を定量した。すなわち、ろ液 2 ml に0.12% クレーブス酸 50% 酢酸溶液と1.2% スルファニル酸 50% 酢酸溶液の混液 (1:1) 3 ml を加え、室温で暗所に30分間放置した後、530 nm で亜硝酸根を比色定量した。

Table 3. Microbiological degradation of dimethylnitrosamine.

Strain*	Nitrite formed ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Reaction mixture A	Reaction mixture B
<b>Bacteria</b>		
<i>Acetobacter aceti</i> IFO 3281	Nil	Nil
<i>Acetobacter acetigenus</i> IFO 3277	"	"
<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3223	"	"
<i>Acetobacter xylinum</i> IFO 3288	"	"
<i>Bacillus natto</i> AKU	"	"
<i>Gluconobacter gluconicus</i> IFO 3171	"	"
<i>Gluconobacter roseus</i> IFO 3990	"	"
<i>Gluconobacter suboxydans</i> IFO 3130	"	"
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3205	"	"
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> IFO 3533	"	"
<i>Lactobacillus casei</i> IFO 3425	"	"
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> IFO 3292	"	"
<i>Lactobacillus fermenti</i> IFO 3071	"	"
<i>Lactobacillus leichmannii</i> IFO 3073	"	"
<i>Lactobacillus plantarum</i> IFO 3070	"	"
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IFO 3426	"	1.2
<i>Pediococcus pentosaceus</i> IFO 3182	"	Nil
<i>Pseudomonas ovalis</i> IFO 3738	"	"
<i>Streptococcus cremoris</i> IFO 3427	"	0-1.4
<i>Streptococcus faecalis</i> IFO 3826	"	Nil
<i>Streptococcus lactis</i> IFO 12007	"	"
<i>Streptococcus thermophilus</i> IFO 3535	"	"
<b>Molds</b>		
<i>Aspergillus clavatus</i> AKU	Nil	Nil
<i>Aspergillus niger</i> AKU	"	"
<i>Aspergillus oryzae</i> AKU	"	"
<i>Aspergillus sojae</i> IFO 5241	"	"
<i>Aspergillus usami</i> IFO 4388	"	"
<i>Mucor mucedo</i> IFO 5776	"	"
<i>Mucor racemosus</i> IFO 4581	"	"
<i>Mucor rouxianus</i> IFO 5773	"	"
<i>Penicillium camemberti</i> IFO 5855	"	"
<i>Penicillium chrysogenum</i> IFO 4626	"	0-0.5
<i>Penicillium italicum</i> AKU	"	Nil
<i>Penicillium notatum</i> AKU	"	"
<i>Penicillium roquefortii</i> IFO 5754	"	"
<i>Penicillium rugulosum</i> AKU	"	"
<i>Rhizopus chinensis</i> AKU	"	"
<i>Rhizopus javanicus</i> IFO 5441	"	"
<i>Rhizopus oryzae</i> IFO 4705	"	0.2
<i>Rhizopus stolonifer</i> IFO 4781	"	Nil
<b>Yeasts</b>		
<i>Candida utilis</i> IFO 0396	Nil	Nil
<i>Hansenula anomala</i> IFO 0122	"	"
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 0209	"	"
<i>Saccharomyces rouxii</i> IFO 0495	"	0-0.2

\* See the footnote of Table 1.

## 結果および考察

供試微生物の DMNA 分解能を調べた結果は、第 3 表のとおりである。第 3 表からして、基質、菌体懸濁液と菌の増殖を支持する培地からなる反応混液 B で亜硝酸根の生成が認められる菌種はわずかに *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus cremoris*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oryzae* および *Saccharomyces rouxii* の 5 種である。このことは、ROWLAND ら<sup>30)</sup>の結果と一致しない。ROWLAND らは、腸内細菌についてはあるが、かなり高い亜硝酸検出率（例えば被検 *Lactobacillus* 11 菌株で 63%）を得ている。一方、培地を含まない反応混液 A では、いずれの菌種も DMNA 分解能を示さない。これは、微生物による DMNA の分解が適応酵素による可能性を示唆している。

以上の結果において、亜硝酸を生成しない菌種がすべて DMNA 分解能をもたないと断定するのは早計である。というのは、DMNA が亜硝酸を経ないで分解する反応が考えられるし、また亜硝酸を生成しても、その亜硝酸がさらに分解する可能性があるからである。これについては、今後さらに検討する予定である。

## 要 約

被検微生物 44 種（細菌 22 種、糸状菌 18 種、酵母 4 種）について、その亜硝酸生成からジメチルニトロサミン分解能を調べた。その結果、*Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus cremoris*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oryzae* および *Saccharomyces rouxii* のわずかに 5 種がジメチルニトロサミン分解能を示した。

本研究は財団法人東和食品研究振興会の学術奨励金によった。

## 文 献

- 1) 天野慶之・山田金次郎・尾藤方通, 1963: 日水誌, **29**, 860-864.
- 2) YAMADA, K. and K. AMANO, 1965: *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **41**, 89-96.
- 3) AMANO, K., K. YAMADA, K. HARADA and Y. KAMIMOTO, 1968: *ibid.*, **53**, 95-102.
- 4) 徳永俊夫, 1964: 北水研報, **29**, 108-122.
- 5) 原田勝彦・山田金次郎, 1970: 本報告, **18**, 296-302.
- 6) 原田勝彦・山田金次郎, 1971: 本報告, **19**, 91-94.
- 7) 原田勝彦・山田金次郎, 1972: 本報告, **21**, 229-237.
- 8) 原田勝彦・山田金次郎, 1973: 本報告, **22**, 77-94.
- 9) CASTELL, C. H., W. NEAL and B. SMITH, 1970: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **27**, 1685-1690.
- 10) CASTELL, C. H., B. SMITH and W. NEAL, 1971: *ibid.*, **28**, 1-5.
- 11) BABBITT, J. K., D. L. CRAWFORD and D. K. LAW, 1972: *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 1052-1054.
- 12) FLORES, S. C. and D. L. CRAWFORD, 1973: *J. Food Sci.*, **38**, 575-579.
- 13) 太田冬雄, 1958: 日水誌, **24**, 338-341.
- 14) 山中英明・菊地武昭・天野慶之, 1977: 同誌, **43**, 115-120.
- 15) VAISEY, E. B., 1956: *Canadian J. Biochem. Physiol.*, **34**, 1085-1090.
- 16) HUGHES, R. B., 1958: *Nature*, **181**, 1281-1282.
- 17) SOUDAN, F., 1959: *Rev. Trav. Inst. Pêches Mar.*, **23**, 203-210.
- 18) 伊藤誉志男・作田広子・高田広美・谷村顕雄, 1971: 食衛誌, **12**, 404-407.
- 19) 徳永俊夫, 1975: 日水誌, **41**, 535-546.
- 20) FIDDLER, W., J. W. PENSABENE, R. C. DOERR and A. E. WASSERMAN, 1959: *Nature*, **23**, 307.

- 21) LJINSKY, W., L. KEEFER, E. CONRAD and R. VAN DE BOGART, 1972 : *J. Nat. Cans. Inst.*, **49**, 1239-1249.
- 22) BOGOVSKI, D., M. CASTEGNARD, B. DIGNATELLI and E.A. WALKER, 1971 : *Proceeding at a Working Conference on N-Nitroso Compounds Analysis and Formation, Heiderberg, Oct. 13-15.*
- 23) MIRVISH, S.S., L. WALLCAVE, M. EAGEN and D. SHUBIK, 1972 : *Science*, **177**, 65~68.
- 24) GREENBERG, R.A., 1973 : *Proc. Inst. Symp. on Nitrate in Meat Products, Netherlands, Sept. 10-14.*
- 25) 河端俊治・栗原道彦・葛西英一・吉田千恵子, 1973 : 日水誌, **39**, 883-889.
- 26) MIRVISH, S.S. and D. SHUBIK, 1974 : *Nature*, **252**, 179.
- 27) 戸沢晴己・佐藤理子, 1974 : 日水誌, **40**, 425-430.
- 28) 河端俊治・赤築秀憲・石橋亨, 1974 : 日水誌, **40**, 1251-1256.
- 29) AKIN, F.J. and A.E. WASSERMAN, 1975 : *Food Cosmet. Toxicol.*, **13**, 239-242.
- 30) ROWLAND, L.R. and P. GRASSO, 1975 : *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 185-188.
- 31) ADRIANSE, A. and J.E. ROBBERS, 1969 : *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 321-325.