

## かごしまの水産物付加価値創出研究事業－Ⅱ (ボンタン抽出液による水産加工品のヒスタミン生成抑制試験)

保聖子, 加治屋大, 稲盛重弘

### 【目的】

ヒスタミン（以下Hmという）は、魚肉中の遊離アミノ酸であるヒスチジン（以下Hisという）が、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）の作用を受けてHmに変換されたものである。昨年度までに、His含有量が高くHmの生成が懸念されるイワシ丸干品については、内臓を含んだ原料形態での現状の加工工程では、Hm生成リスクを完全に回避することは困難との知見を得た。一方、数種の植物抽出物にHDC活性抑制効果があることが既に知られている。そこで、本県農産加工品の加工残滓であるボンタン外皮抽出物（以下ボンタン抽出液という）に着目し、Hm生成リスクを回避する新たな加工技術を開発することを目的とする。

### 試験1. ボンタン抽出液のHDC活性阻害試験

#### 【材料及び方法】

#### ボンタン抽出液

阿久根市内のボンタン漬け加工業者が製造販売する市販品を用いた。

#### 菌粗酵素液の調整

Hm生成菌は、(独)水産総合研究センター中央水産研究所より菌株分与された*Morganelia morgani*及び*Photobacterium damsela*を用いた。それぞれ、0.5%のL-Hisを加えたトリプチケースソイブロス(以下TSBという)培地で37℃・24時間の培養を行った(ただし、*P. damsela*は、前述培地に2.5%のNaClを添加)。培養した菌液を遠心分離し(8,000rpm, 20分, 4℃)、得られた沈殿物を滅菌リン酸緩衝液(以下PBSという)で3回洗浄したものを洗浄菌体とした。次に、洗浄菌体をPBSに懸濁し、超音波粉碎機(UD-21P トミー精工製)で冷却しながら、10分間の間欠粉碎を行った。その後、遠心分離(14,000rpm, 30分, 4℃)して得られた上清を粗酵素液とした。

#### HDC活性阻害の測定法

予め200mM酢酸緩衝液にL-Hisを25mMになるよう添加し基質とした。また、HDC活性阻害剤として基質にボンタン抽出液及びボンタン抽出液に代えて滅菌水を加えたものを添加した。基質にそれぞれの粗酵素液を加え、37℃で19時間の酵素反応を行った。16%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させ、基質中に生成したHm濃度をEIA Histamarine kit (Beckman Coulter製)を用いて測定した。なお、測定は、マイクロプレートリーダー(MPR 東ソー製)で400nmにおける吸光度を求めた後、Hm標準品の吸光度と濃度の検量線からHm濃度を求めた。

表1 HDC活性阻害試験の条件

粗酵素液の種類	基質	阻害剤等	阻害剤等の添加割合(%)	反応条件
<i>M.morgani</i> 粗酵素	25mM L-His,200mM酢酸バッファー	ボンタン抽出液	4	37℃・19時間
<i>M.morgani</i> 粗酵素	25mM L-His,200mM酢酸バッファー	水	4	
<i>P.damsela</i> 粗酵素	25mM L-His,200mM酢酸バッファー	ボンタン抽出液	4	
<i>P.damsela</i> 粗酵素	25mM L-His,200mM酢酸バッファー	水	4	

## 【結果及び考察】

結果を図1に示す。*M. morgani*のHDC活性については、滅菌水添加区のHmが34.1ppmであったのに対し、ボンタン抽出液添加区では、5.5ppmと低い値であった。このことから、ボンタン抽出液が*M. morgani*のHDC活性を阻害する効果があることが確認された。

同様に*P. damsela*eのHDCについても、滅菌水添加区のHmが69.1

ppmであったのに対し、ボンタン抽出液添加区では、4.5ppmと低い値であった。以上のことから、ボンタン抽出液は、*M. morgani*のHDCと*P. damsela*eのHDCの両方の活性を阻害する効果があることが確認された。

以上の結果から、イワシ丸干加工において、Hmの生成を抑制するためにボンタン抽出が有効であることが示唆された。

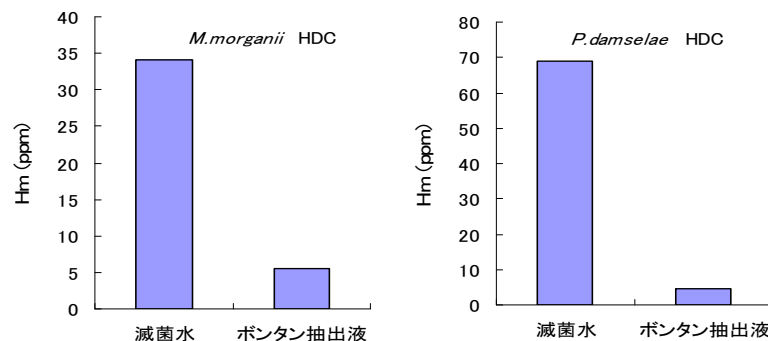


図1 ボンタン抽出液のHDC活性抑制結果

## 試験2. 魚肉でのHm生成抑制試験

### 【材料及び方法】

#### ボンタン抽出液

上記同様、市販品を用いた。

#### 供試魚

2012年5月に鹿児島県北薩海域で漁獲された新鮮なカタクチイワシ（体重 $15.7 \pm 2.3$ g，尾叉長 $12.7 \pm 0.7$ cm）を用いた。供試魚は、三枚に卸し、フィーレとした。冷水で洗浄し内臓等の付着物を取り除いた後、水気を拭き取り保存袋に入れ、試験に供するまで $-35^{\circ}\text{C}$ で保管した。

#### Hm生成菌の調整及び菌の接種方法

試験1同様、(独)水産総合研究センター中央水産研究所より菌株分与された*M. morgani*及び*P. damsela*eを用いた。それぞれの菌体は、0.5%L-Hisを加えたTSB培地で培養した。培養条件は、それぞれ $37^{\circ}\text{C}$ ならびに $30^{\circ}\text{C}$ で、 $10^7$ cfu/mlになるまで培養を行った（ただし、*P. damsela*eは、前述培地に2.5%のNaClを添加）。それぞれの菌は、滅菌PBSで $10^4$ cfu/mlに希釈し、試験用菌液とした。菌の接種方法は、供試フィーレを3分間菌液に浸漬して行う浸漬法とした。

#### 試験の方法

イワシ丸干加工を想定し、塩漬工程中にボンタン抽出液を添加することで、Hmの生成を抑制する手法を検討した。ボンタン抽出液を10%食塩水に対し、0%、0.3%、0.5%及び1.0%の割合で添加した浸漬液を準備し、これらに予め菌液で浸漬により汚染したカタクチフィーレそれぞれに6枚ずつ、30分間漬け込んだ。漬け込み後、浸漬液から取り出し、保存袋に入れ、 $25^{\circ}\text{C}$ で16時間保存した後、すべてのフィーレについてHm濃度を測定し、6枚の平均値を求めた。

#### Hm測定

サンプル約2gを正確に量り取り、8倍量のイオン交換水を加え、ポリトンホモジナイザーでホモジネート（ $18,000\text{rpm} \times 1\text{min}$ ）し、遠心分離（ $10,000\text{rpm}$ ，5分， $4^{\circ}\text{C}$ ）後、上清を得た。得られた上清

を試験1同様の方法で分析し、Hm濃度を求めた。

### 【結果及び考察】

結果を図2に示す。10%食塩水が魚肉中に浸透している状態にも関わらず、25°Cの高温下で保存したため、ボンタン抽出液0%の場合は、魚肉に付着した細菌によってHmの生成は $209.7 \pm 36.3$ ppmと高濃度に蓄積した。一方、ボンタン抽出液の添加量が0.3%の場合のHmの生成は、 $117.3 \pm 21.9$ ppmとボンタン抽出液0%の場合に比べて、有意に低い値であった。添加量が0.5%の場合には、 $55.8 \pm 32.6$ ppm、1.0%の場合には、 $73.3 \pm 32.8$ ppmと高温保存条件下であってもHmの生成が低く抑えられていた。このことから、イワシ丸干し等の塩漬工程中にボンタン抽出液を添加することで、Hmの生成を抑制することが明らかとなった。また、ボンタン抽出液の添加濃度が高くなる程Hmの生成が抑制される傾向が確認されたが、添加濃度の0.5%と1.0%の間には有意差は認められなかった。

以上のことから、今回実施した細菌への浸漬ならびに保存条件下において、Hm生成抑制効果をもたらすボンタン抽出液の最適添加量は、0.5%であると推察された。しかしながら、得られたデータを詳細に検討すると、ボンタン抽出液を0.5%添加したサンプルフィーレにおいても、Hm生成濃度が100ppm程度まで蓄積しているサンプルもあるなどバラツキが認められた。このことは、ボンタン抽出液が難水溶性であることが原因ではないかと推察している。そのため、実用化にあたっては、浸漬液中にボンタン抽出液が均等に添加されるよう加工工程中の作業に配慮が必要である。

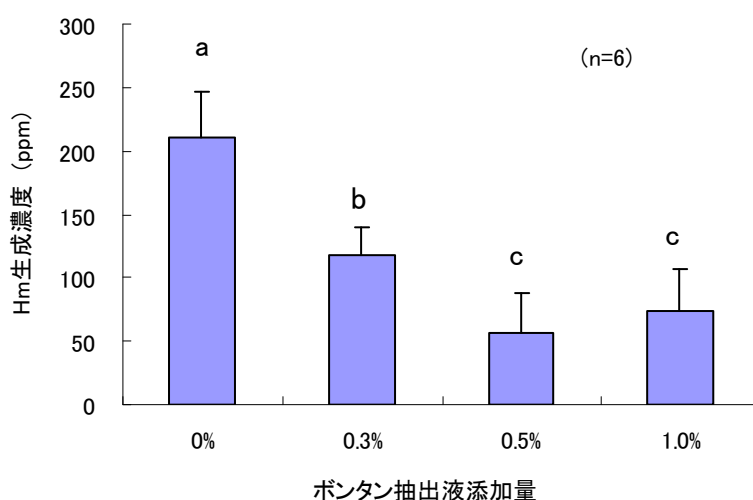


図2 ボンタン抽出液添加量とHm生成濃度の関係

※異符号間では有意差あり (p<0.01)