

麴由来アミン酸化酵素と酢酸菌アルデヒド酸化酵素の共役反応による 水産食品中ヒスタミンの消去技術の確立

水産大学校 食品科学科 食品機能学講座
山口大学 農学部 生物機能科学科 応用微生物学研究室

研究の背景・目的

1. ヒスタミンは、生体アミンとして我々の体内で働く低分子化合物ですが、一般的には食中毒の原因物質として知られています。ヒスタミン食中毒の原因食品の代表は、魚とその加工品であり、チーズや種々の発酵食品からも高濃度のヒスタミンが検出されることがあります。これらのヒスタミンは、アミノ酸脱炭酸酵素を持つ微生物（モルガン菌や一部の乳酸菌等）の汚染や増殖によって、食品に含まれる遊離アミノ酸であるヒスチジンから産生されます。食品の衛生管理が発達した我が国でも、ヒスタミン食中毒の事例は絶えず、消費者庁の公表では2013～2017年の5年間で50件、患者数1,013名となっています。これに、表面化しにくい食卓での発生を加えると、さらに多くの食中毒が発生していることが想定されます。幼児や児童の食中毒は、健康被害が深刻になりやすく、食中毒経験後の魚とその加工品の過剰な回避による食文化の衰退や消費の低迷につながる懸念が懸念されます。
2. 我が国では、厚生労働省、農林水産省、内閣府食品安全委員会から、それぞれ個別にヒスタミン管理指針が示されており、各都道府県では、食品衛生法に基づいて監視指導をしています。欧米では、世界保健機構（WHO）とアメリカ食品医薬品局（FDA）が合同で食品の国際規格（CODEX規格）として、食品中のヒスタミン濃度に対する安全基準を厳密に定めています。多くの場合、ヒスタミン濃度が200ppmを超えないように管理されていますが、登田らの報告^{*1)}では50～100ppmでもヒスタミン食中毒が発症する可能性が指摘されています。
3. ヒスタミン食中毒が発生してしまうと、消費者のみでなく生産者、販売者も多大な損害を被るため徹底した予防管理が求められます。今日では、食品中のヒスタミン量は、比色定量法等で容易に測定することができるため、徹底した温度管理を行うことで中毒リスクを軽減できます。しかしながら、ヒスタミンは、一度産生されると加熱加工による分解や洗浄による除去が困難であり、食品加工の範疇で除去する技術はあり

ませんでした。すなわち、管理指針や安全基準が示されているものの、抜き取り検査と低温管理に依存しており、途上国や我が国の中小零細企業では常に不安と隣合せでした。この不安を裏付けるように、実際に我が国で市販されている食品におけるヒスタミン含有状況の報告例^{*2)}では、干物で約6品に1品、練り製品で約15品に1品の頻度で50ppmを超えるヒスタミンが検出されており、それぞれの最高値は3,400ppm、340ppmでした。同調査では、チーズでも2,000ppmを超えるヒスタミンが検出された事例が複数報告されています。

上述のように、ヒスタミン食中毒は、今日の我が国においても身近で見過ごすことのできない問題です。特に、低温管理のみに依存した予防管理策は薄氷を踏むような状況であり、より強固なヒスタミン食中毒対策が求められます。そこで、本研究では、醸造等を通じて古来より食経験が豊富な麴カビと酢酸菌を活用し、麴由来のアミン酸化酵素（FAO）と酢酸菌由来のアルデヒド酸化酵素複合体（ALOX）の2酵素共役反応によるヒスタミンの消去に取組みました。そして本研究成果を水産食品の衛生管理強化策として応用し、食経験のある微生物を活用した安全で安価なヒスタミン消去技術として、食品加工現場に実装可能にすることを目指しました。

研究成果

1. 図1に示したFAOとALOXの共役反応系（FAO/ALOX）によるヒスタミンのイミダゾール-4-酢酸（I4AA）への酸化を実証しました。共役反応とは複数反応が組み合わさり連動しておこる化学反応を意味します。FAOとALOXのような酵素反応においても、一方の反応生成物が他方の反応の基質となるような一連の反応系列を作っている場合、これらの酵素は共役して反応するといいます。FAO/ALOXは、2段階で進む共役酸化反応であり、第1段階ではヒスタミンをFAOが酸化して対応するアルデヒド、すなわちイミダゾール-4-アセトアルデヒドに変換しま

す。このイミダゾール-4-アセトアルデヒドは文字通りアルデヒドであるため未だ有害です。そこで第2段階で ALOX がイミダゾール-4-アセトアルデヒドを対応するカルボン酸である I4AA に酸化します。I4AA はヒトの体内で行われるヒスタミン代謝(解毒)でも生じる化合物です。また FAO/ALOX の主旨はアルデヒド生成後に間髪を入れず直ちにカルボン酸へと酸化することにあるため、ヒスタミンの減少と I4AA の生成が反応の開始から終了まで化学量論的に一致する必要があります。FAO と ALOX を共役させずに FAO のみでヒスタミンを酸化した場合は、生じたイミダゾール-4-アセトアルデヒドが共存するタンパク質等と無秩序に反応してしまい、意図しない様々な化合物が多量に生じてしまいます。当然ながら、その後に ALOX を作用させても当初のヒスタミン量に応じた I4AA は回収できません。ゆえに FAO と ALOX が冒頭に述べた共役反応を行うことについて検証しました。高速液体クロマトグラフ (HPLC) による両物質の定量分析法を用いて、両化合物の増減量の一致から、間接的ですがアミンから生じたアルデヒドが他の分子と自由に反応することなくカルボン酸まで酸化されることを証明しました。

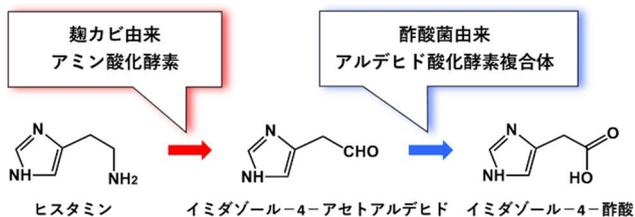


図1. FAO/ALOX によるヒスタミン消去の概要

2. 実際の食品保蔵条件でも FAO/ALOX が成立することを証明しました。まず、一般的な水産塩蔵品など高塩濃度の食品では、酵素活性が低下することが懸念されるため、高塩濃度条件下での FAO/ALOX のヒスタミン消去活性について検討した結果、5% 塩化ナトリウム (NaCl) 存在下では、NaCl 非存在下と比較してヒスタミン消去活性に変化は見られませんでした。他方、10% NaCl 存在下では活性が半減し、15%以上では 1/3 以下に低下しました。多くの塩蔵品は食塩濃度が 5% 以下であることから、FAO/ALOX の適用範囲は十分に広いことが示唆されました。さらに、低温条件下 (10°C または 4°C) でもヒスタミンを I4AA へと変換可能であることを確認しました。
3. アジの干物や市販顆粒出汁をモデルに、FAO と

ALOX の実用例を示しました。ヒスタミン生成が起こった魚肉を模したヒスタミン添加マアジフィレー一夜干しやヒスタミン添加市販顆粒出汁において、FAO/ALOX によるヒスタミン消去と I4AA の生成について確認した結果、マアジフィレー一夜干しでは、当初 646 ± 59 nmol/mL であったヒスタミン濃度が FAO/ALOX を添加して 10°C で 9 時間静置した後ではヒスタミン濃度は 10 ± 15 nmol/mL に低下しました。I4AA の濃度は 120 時間後で 619 ± 87 nmol/mL まで増加し、ヒスタミンの消去率は、 $96 \pm 13\%$ に達しました (図2)。

これらの結果から、万が一ヒスタミンが生じた場合でも、FAO と ALOX を添加することで低温保存中にヒスタミンを消去することが示唆されました。

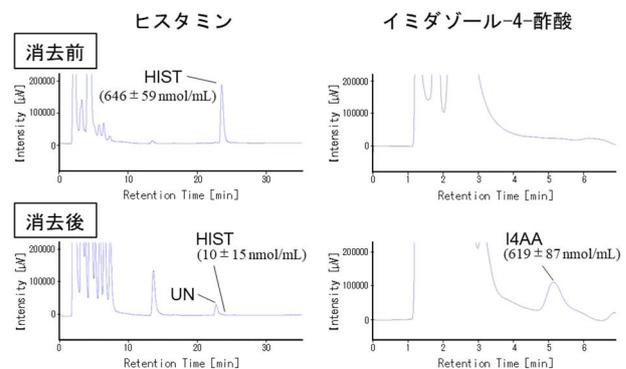


図2. ヒスタミン消去共役反応のヒスタミン含有魚肉 (マアジフィレー) への応用例

顆粒出汁では、こんぶ、いりこ、あご、かつお出汁として市販されている風味調味料各 1 種を用いて、各商品に記載されている方法で出汁溶液を調製し、各出汁溶液に 250 nmol/mL となるようにヒスタミンを添加することで、ヒスタミンが発生した出汁溶液を模して検証を行いました。同溶液に FAO 及び ALOX を加え、20°C で酵素処理した結果、各出汁中のヒスタミンは、酵素処理 10 分後に 1/2~2/3 が消去され、24 時間後までに大半が消失しました (表1)。I4AA 回収率は、こんぶ出汁、いりこ出汁及びあご出汁で 24 時間後までに添加したヒスタミンの 8 割に相当する I4AA が生成されました。他方、かつお出汁では 6 割に留まりました (表2)。以上の結果より、出汁の種類によって効果の違いは見られるものの、適切な FAO 及び ALOX の添加によって出汁中のヒスタミンを消去できることが示されました。

表1. 各出汁溶液におけるFAO/ALOXによるヒスタミン消去率

	10min	20min	30min	24h
こんぶ	57.02%	78.97%	91.83%	99.10%
いりこ	43.84%	65.47%	81.78%	98.26%
あご	45.56%	68.13%	81.99%	98.01%
かつお	53.80%	64.01%	86.91%	94.66%

*表中の時間は酵素添加後の経過時間

表2. 各出汁溶液におけるFAO/ALOXによるI4AA回収率

	10min	20min	30min	24h
こんぶ	0.46%	2.11%	4.06%	82.10%
いりこ	1.21%	3.05%	5.01%	82.47%
あご	0.35%	1.71%	2.90%	83.53%
かつお	0.55%	3.39%	5.20%	59.57%

*表中の時間は酵素添加後の経過時間

アウトカム

1. 世界で初めて水産食品等に適用可能で安全安価なヒスタミン消去技術を確立し、その応用例とともに論文報告しました。
2. 共同研究機関の山口大学にて、本技術の特許申請がなされ、令和4年11月に権利化されました。
【発明名称：アミンの酸化方法、特許第7176745号】

本成果が記された論文

M. Usui, S.Kawabe,*et al.*(2022).Histamine elimination by a coupling reaction of fungal amine oxidase and bacterial aldehyde oxidase.*Bioscience Biotechnology and Biochemistry*,**86**(10).1438-1447.
<https://doi.org/10.1093/bbb/zbac121>

引用文献

- 1) 登田美桜, 山本 都, 畝山 智香子, 森川 馨(2009). 国立医薬品食品衛生研究所報告, **127**.31-38.
<https://www.nihs.go.jp/library/eikenhoukoku/2009/031-038.pdf>
- 2) 井部明広(2014).日本調理科学会誌,**47**(6).341-347.
<https://doi.org/10.11402/cookeryscience.47.341>