

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

乳酸球菌 CCRC 14016 抑制組胺酸脫羧酶及產生組胺酸脫氨酶的研究

Inhibition of histidine decarboxylase and production of histidine deaminase by  
*Lactococcus lactis* CCRC 14016

計劃編號：NSC 88-2313-B-019-015

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：陳幸臣 國立台灣海洋大學 食品科學系

## 一、摘要

本研究旨在瞭解未經殺菌處理的鯖魚片浸泡 *Lactococcus lactis* CCRC 14016 菌懸液後，在 4°C 貯藏 20 天後，和對照組 (濾菌之上清液) 相比，組織胺不繼續增加，而揮發性鹽基態氮 (VBN) 有上升趨勢的原因。經由酵素受質與細菌受質模式試驗，發現 *L. lactis* CCRC 14016 的代謝產物 (nisin) 無法抑制組胺酸脫羧酶活性，但所產生的組胺酸脫氨酶 (histidine ammonia-lyase) 能將組胺酸代謝而產生氨。可知鯖魚片不增加組織胺的原因，是因組胺酸被代謝為氨，使產生組織胺的受質 (組胺酸) 降低的緣故。

關鍵詞：Lactococcus lactis、histamine inhibition、histidine ammonia-lyase

## Abstract

Investigation was conducted to figure out the causes when mackerel fillets were soaked in *Lactococcus lactis* CCRC 14016 cell suspension for 24 days, and then stored at 4°C for 20 days, the histamine content in the fillets was not increased, but the content of volatile basic nitrogen (VBN) was increased. By using enzyme-substrate test and bacterion-substrate test, we found nisin could not inhibit the

activity of histidine decarboxylase. But *L. lactis* CCRC 14016 may metabolite histidine into ammonia by histidine ammonia-lyase. We concluded that the reason of histamine inhibition in mackerel fillets is substrate (histidine) decreasing which caused by metabolized into ammonia.

## 二、緣由與目的

組織胺 (histamine) 在 50 年前就已經被發現是攝食鯖科魚類引起食物中毒的主因。至今它的存在仍然帶給人類很大的不便。1998 年台灣天然毒類中毒中，組織胺中毒共有 26 件 (衛生署, 1998); 由於鯖科魚類的肉中含有較多量的游離組胺酸 (Mackie 等, 1997)。因此當鯖魚肉受汙染菌，如 *Morganella morganii* 和 *Enterobacter aerogenes* 的作用，組胺酸就會被脫羧而產生組織胺 (Taylor 等, 1978)，將使攝食者引起鯖魚食物中毒 (Scombrototoxin) (Morrow 等, 1991)。所以在鯖魚漁獲後需要以低溫保鮮之外，加工過程中，尤需注意處理。

鹽鯖在加工及貯藏期間可使用食鹽及化學防腐劑 (Taylor 等, 1984) 以防止微生物的增殖。但因攝食用大量的食鹽及化學防腐劑處理過的食物有礙健康，而不被消費者的接受。因此使用生物防腐劑來保存食品已蔚為趨勢。要兼顧延長保存期限、提高食品的風味及質感，雖然方法很多，

但可考慮使用乳酸菌處理 (Adam 等, 1995; Gould 等, 1995; Stiles 等, 1996)。

為使調味鯖魚片不增加組織胺的產生, 本研究曾在鯖魚片加工過程中於調味前浸泡 *L.lactis* CCRC 14016 的菌懸液之後, 在加工及貯藏 (4°C) 20 天之後, 和對照組 (濾菌之上清液) 相比, 發現組織胺不繼續增加, 而揮發性鹽基態氮 (VBN) 有上升的趨勢 (陳等, 1997)。

因此推測: (1) 此乳酸菌的代謝產物 (nisin) 可能會抑制組胺酸脫羧酶活性; (2) 乳酸菌可能會產生組胺酸酶 (histidine ammonia-lyase), 將組胺酸代謝成氨。因此本研究即針對這方面探討這些物質降低及上升的原因。

### 三、結果與討論

#### (一) *L. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14016 對 histidine 和 histamine 分解的情形

為使試驗容易判讀 *L. lactis* CCRC 14016 分解受質 histidine 和 histamine 的情形, 本試驗先利用 HPLC 分析標準品 (組織胺和組胺酸) 之圖譜 (圖一), 發現組胺酸在 7.13 分鐘被層析出來, 而組織胺則在 8.44 分鐘被層析出來。分析的條件和 Sato 等人的方法 (1995) 略有不同; 本試驗將移動相 A 液改為 60% 的 acetonitrile 溶於 50 mM、pH4.5 的 sodium acetate buffer, 移動相 B 液則為 5% 的 acetonitrile 溶於上述的 buffer, 由此所分析出的波峰較平穩。將 *L. lactis* CCRC14016 培養於各含有 0.5 mM 組胺酸和 0.5mM 組織胺之基礎培養基內, 發現組胺酸的濃度在第 36 小時降到 0.4 mM 而氨濃度則升到 4 ppm (圖二)。在第 48 小時, 組胺酸濃度下降到 0 mM, 此時氨濃度為 24ppm。將組胺酸之利用情形和組織胺比較, 此株乳酸菌在利用組胺酸 (圖三) 的能力比利用組織胺 (圖三) 為佳。以 *L. lactis* CCRC14016 產生氨的情形而言, 在 36 到 48 小時, 氨的產量為最高, 故由此試驗可確定此菌有產氨的能力, 亦即具分泌組胺酸脫氨的能力, 代謝路徑與 *Aspergillus nidulans* 類似 (Polkinghorne 等, 1982; Kiee 等, 1975), 以組胺酸為氮源, 先初步代謝成 urocanic acid 放出 ammonia 然後經一連串代謝成終產物 glutamate。此結果和 Leuschner 等人 (1998<sup>a</sup>) 發現之結果不同, 他們發現一些食品發酵菌, 如 *Lactobacillus*

*plantarum*、*Lactobacillus sake*、*Lactobacillus pentosus*、*Pediococcus acidilactici* 以及 *Micrococcus* 在好氣狀態下, 可分解 histamine。除此之外, 若將 *Brevibacterium lines* 種於 Muster Cheese 裡, 也具有分解乾酪中組織胺的效果 (Leuschner 等, 1998<sup>b</sup>)。其分解 histamine 的原因, 可能是細菌產生胺氧化酵素將組織胺氧化分解。

#### (二) Nisin 對 histidine decarboxylase 活性的抑制

乳酸球菌細菌素 (nisin) 是 *Lactococcus lactis* 所產生的一種細菌素 (bacteriocin)。為含 34 個胺基酸, 分子量 3.5 kDa 之短鏈蛋白質, 具特殊的胺基酸, 如 lanthionine、 $\beta$ -methyllanthionine、dehydroalanine (Dha), 和 dehydrobutyrine (Dhb)。其抑菌的可能原因在於其鏈上二端各攜有不同的陰陽電荷, 附著於標的菌, 使菌體破裂, 細胞液流出而死亡 (Vuyst 等, 1994)。由此測試 nisin 是否有抑制 histidine decarboxylase 活性的能力, 而使組織胺不增加。histidine decarboxylase 之最大活性以產物組織胺濃度表示。取 0.1 mg/ml histidine decarboxylase, 反應溫度和 pH 各為 37°C 與 4.5, 基質為 1 mM 組胺酸 (Coton 等, 1998)。結果在反應 6 小時, 酵素具有最大活性, 產生最高組織胺的濃度為 0.65 mM (圖四)。將此反應條件應用於探討 nisin 抑制能力, 取三種濃度的 nisin, 0.5 mg/ml (a)、50 mg/m (b) 和 100 mg/ml (c) (如圖五) 抑制 histidine decarboxylase 活性。結果發現此三種濃度之 nisin, 經過 6 小時後其組織胺的含量並無明顯下降。故 nisin 並無抑制 histidine decarboxylase 的能力。有人曾以會產生細菌素的乳酸菌應用於乾酪加工以防止組織胺生成, 發現以會產生 nisin 之 *Lactococcus lactis esi* 561 當作種菌 (starter), 可抑制乾酪中組織胺之形成, 他們推測可能是由於細菌素抑制組織胺產生菌所分泌之 histidine decarboxylase, 但未再進一步加以探討細菌素是否有抑制作用 (Joosten 等, 1996) 除此之外, 自文獻中未發現會產生 nisin, 但不會產生 histidine deaminase 的乳酸菌。

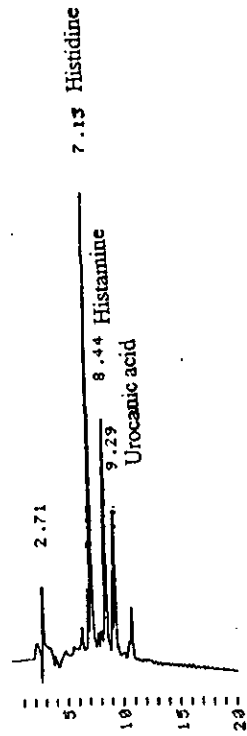
#### 四、計畫成果自評

本研究比較困難的部分在於應用 HPLC 分析 histidine 和 histamine, 但終究得到 *L. lactis* CCRC14016 菌體本身防止組織胺形

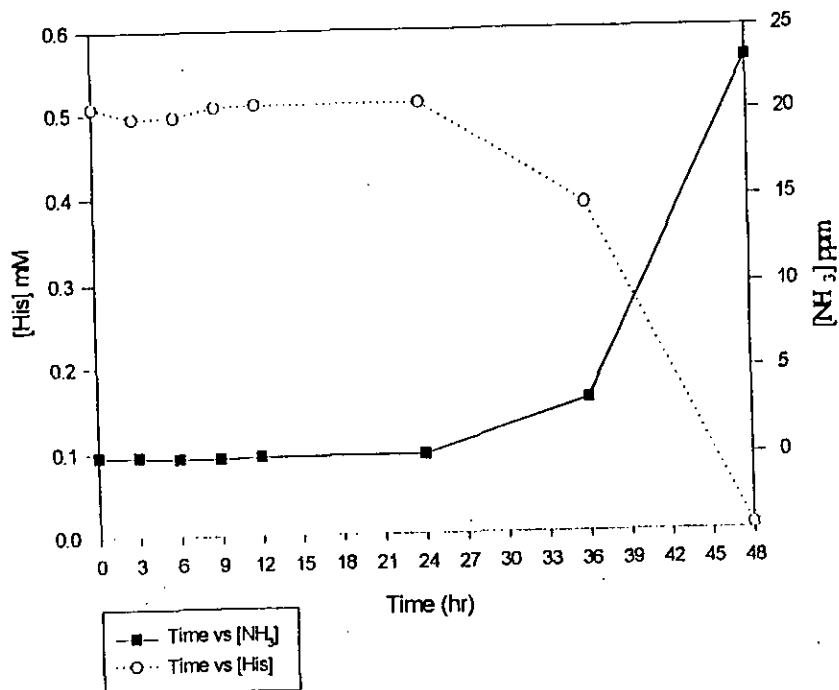
成的原因；本試驗可確定此菌會分泌組胺酸脫氨酵素將組胺酸脫氨，但由於未殺菌經浸泡 *L. lactis* CCRC 14016 菌液的鯖魚片，本身是一個複雜的生物相，有可能其原因是非單一因子所影響，若續探討 *L. lactis* CCRC14016 分別和產氨菌、組織胺產生菌之拮抗作用，所得的結果將會更深入、有趣。

##### 五、參考文獻

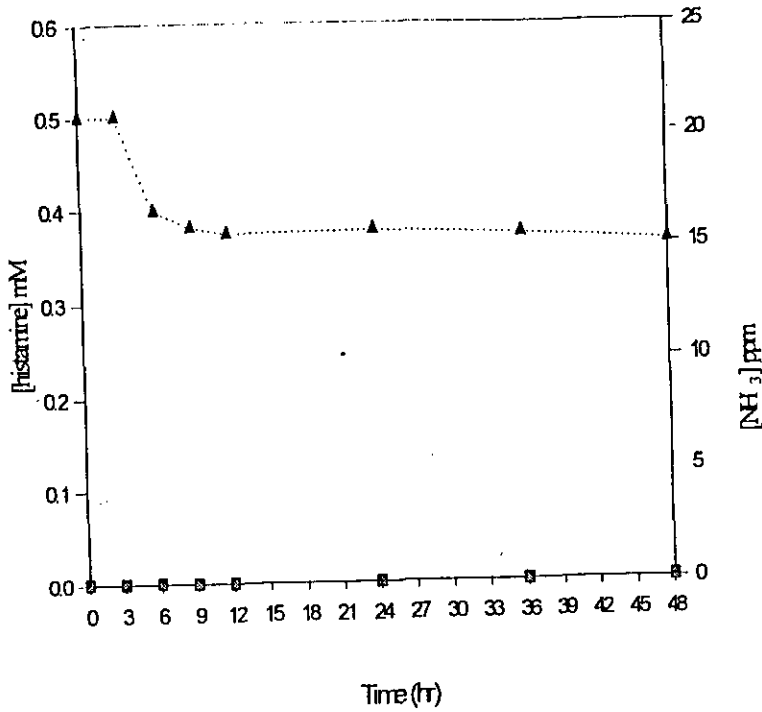
- 陳美惠，張育甄，陳幸臣。1997。以生物防腐劑製造低鹽鯖魚片。台灣水產學刊。24(4)：327-336。
- Adams, M. R. and P. Marteau. 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Micro.* 27:263-264.
- Baranowski, J. D., H. A. Frank, P.A. Burst, M. Chongsiriwatana and R. J. Premaratne. 1990. Decomposition and histamine content in Mahimahi (*Coryphaena Hippurus*). *J. Food Prot.* 53:217-222.
- Coton, E. G., C. Rollan and A. Lonvand-Funel. 1998. Histidine carboxylase of *Leuconostoc anos* 9204: purification kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *J. Appl. Micro.* 84:143-151.
- Gould, G. W. 1995. New methods of food preservation. p.22-38. Chapman & Hall. UK.
- Jossten, H. M. and M. Nunez. 1996. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Env. Micro.* 62(4): 1178-1181.
- Kiee, C. B., K. L. Kirk, L. A. Cohen and P. Mcphie. 1975. Histidine ammonia-lyase. *J. Biol. Chem.* 250:5033-5040.
- Leuschner, R. G. K. and W. P. Hammers. 1998. Degradation of histamine and tyramine by *Brevibacterium linens* during surface ripening of Munster cheese. *J. Food Prot.* 61(7): 874-878.
- Leuschner, R. G., M. Heidel and W. P. Hammes. 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int. J. Food Micro.* 39:1-10.
- Mackie, I. M., L. Pirie, A. H. Ritchie and H. Yamanaka. 1997. The formation of non-volatile amines in relation to concentrations of free basic amino acids during postmortem storage of the muscle scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Chemistry* 60(3): 291-295.
- Morrow, J. D., G. R. Margolies, J. Rowland and L. J. Roberts. 1991. Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid fish poisoning. *N. Eng. L. Med.* 324(11):716-720.
- Polkinghorne, M. A. and M. J. Hynes. 1982. L-histidine utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Bact.* 149:931-940
- Sato, M., T. Nakano, M. Takeuchi, T. Kumagai, N. Kanoo, E. Nagahisa and Y. Sato. 1995. Specific determination of histamine in fish by high-performance liquid chromatography after diazo coupling. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(7):1208-1210.
- Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *An Onie van Leeu.* 70:330-345.
- Taylor, S. L., L. S. Guthertz, M. L. F. Tillman and E. R. Lieber, 1978. Histamine production by food born bacterial species. *J. Food Safety.* 1:113-187.
- Taylor, S. L. and M. W. Speckhard. 1984. Inhibition of bacterial histamine production by sorbate and other antimicrobial agents. *J. Food Prot.* 47:508-511.
- Vuyst, L. D. and E. J. Vandamme. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. p. 13-90. Blackie Academic & Professional. UK.



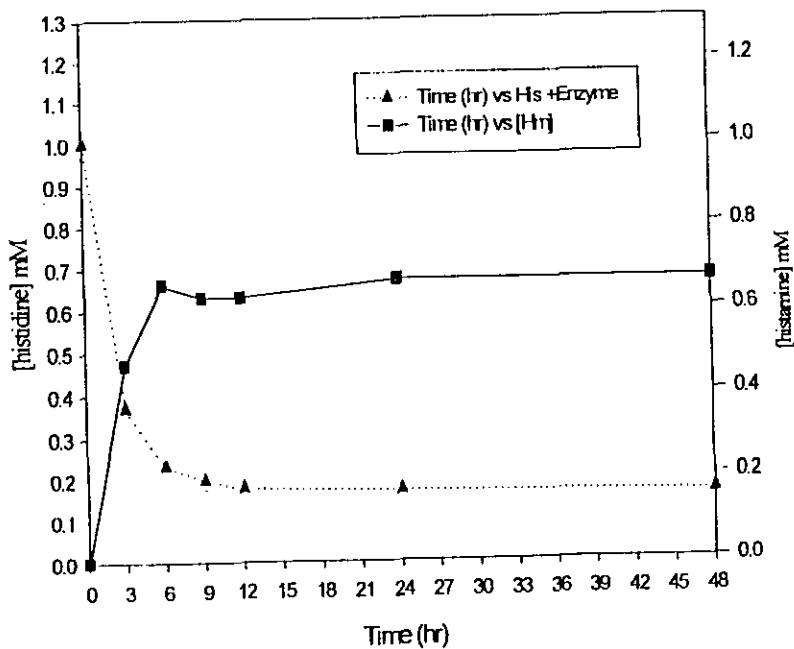
圖一. 組胺酸和組織胺標準品之 HPLC 層析圖  
(吸收波長 420nm)



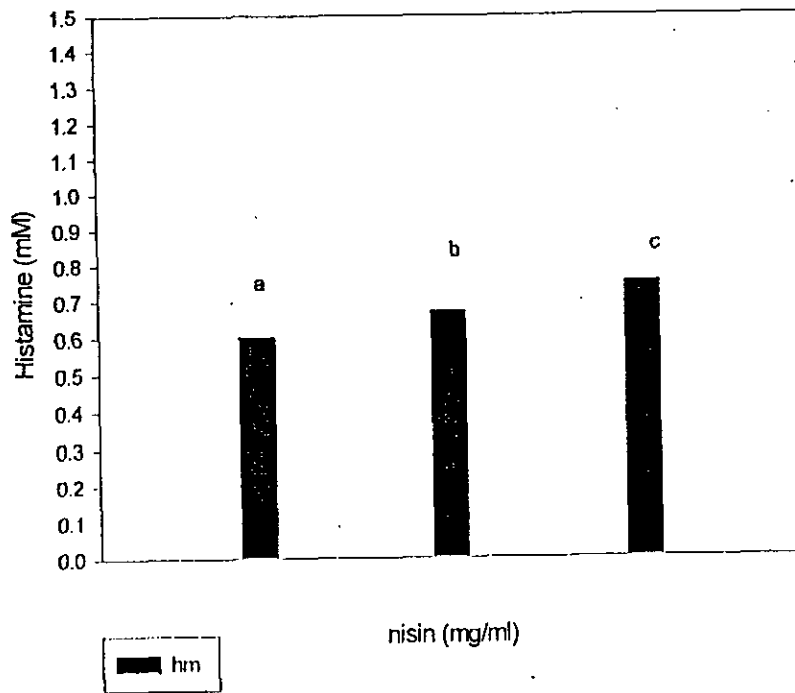
圖二. *L. lactis* CCRC14016 在 48 小時內利用組胺酸 (○)  
及產氨 (■) 之情形



圖三. *L. lactis* CCRC14016 在 48 小時內利用組織胺 (▲) 及產氨 (■) 之情形



圖四 . 0.1mg/ml Histidine decarboxylase 在 48 小時內 組胺酸 (▲) 變化及組織胺 (■) 產生的情形



圖五. nisin 抑制 histidine decarboxylase 的情形。

a : 0.5 mg/L nisin,

b : 50 mg/L nisin

c : 100 mg/L nisin