

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K13024

研究課題名(和文)野生動物肉の食素材としての機能性と効能の解明

研究課題名(英文)Functionality and usefulness of game meat as a food resource

研究代表者

竹田 志郎 (Takeda, Shiro)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：40710223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：野生動物肉の猪肉と鹿肉は消化酵素で処理することにより、ACE阻害活性や抗酸化活性が発現した。特に鹿肉ではそれらの活性が豚肉や牛肉といった食肉と比べて高いことが認められた。さらに鹿肉のACE阻害活性ペプチドについて、その主たる活性ペプチドを見出した。従って、野生動物肉、特に鹿肉を食することで生体において、抗酸化作用や血圧降下作用といった有益な作用が発現すると推察された。また鹿肉の消化酵素分解産物には、ビフィズス菌を増殖促進する効果が認められた。さらに鹿肉は豚肉と同様に乳酸発酵肉製品の作出が可能であったことから、乳酸発酵鹿肉製品は鹿肉の保存性を向上させ得る加工製品の一つとして期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、野生動物肉(ジビエ)は血圧抑制や抗酸化作用に関連する生理活性を有することを明らかにした。近年、野生動物による農林被害や人的被害が増大しており、個体数調整のため捕獲された野生動物の肉を食資源として有効利用することが望まれている。本研究の成果により、ジビエは生理活性を有する食素材として、社会的に有効利用促進されることにつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidative activities of the digested game meats (venison and boar meat) were expressed by the digestive enzyme treatment. Both activities of venison were higher than those of livestock meats (beef and pork). Also, the main active peptide in the ACE activity of digested venison were found in this study. Thus, the game meat, in particular venison, potentially exert the antioxidation and antihypertensive activity in vivo. In addition, the digested venison was demonstrated the growth promoting of some Bifidobacterium strains in vitro. Furthermore, the lactic acid-fermented meat products which were made from venison instead of pork could be prepared in this study. Thus, the lactic acid-fermentation was expected the suitable processing for the preservation and to improve the shelf life of venison.

研究分野：食品科学

キーワード：野生動物肉 鹿肉 食素材 機能性 乳酸発酵

1. 研究開始当初の背景

近年、野生動物による農林被害や人的被害が増大している。農作物被害の原因としてはシカ、イノシシ、サルによる被害が多く、森林被害の原因としてはシカによるものが多い。そのため、野生動物の密度の適正を保つ対策として、「個体数管理」を目的とした野生動物の捕獲が行われている。そして、それらの野生動物肉(ジビエ)を食素材として有効利用することが望まれている。

現代社会は高齢化社会に突入しており、医療に頼らない健康寿命の延伸が重要である。その方策の一つとして、食品の生体調節機能が注目されている。豚肉や牛肉といった食肉では、食肉由来ペプチド成分の生理活性、特に抗酸化作用や血圧降下作用に関連する報告が多くなされている。従って、ジビエにおいても食肉で認められる機能性を有している可能性が考えられ、それらを解明することにより、ジビエの食素材としての有効利用促進に貢献できるのではないかと考えるに至り、本研究を計画した。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究ではジビエの食素材としての生理活性機能として(1)抗酸化活性と血圧降下作用に関連するアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性(2)ビフィズス菌増殖促進作用に関する評価を行い、その有用性を見出すことを目的とした。さらに、ジビエは食肉に比べ、衛生的観点から保存性を向上させる加工法が望まれると考え、(3)鹿肉を用いた食用加工法として、乳酸発酵の適用性について調べた。

3. 研究の方法

実験で使用した食肉は豚モモ肉(神奈川県産、三元豚)、牛モモ肉(オーストラリアまたはアメリカ産、アンガス種)、野生動物肉は鹿モモ肉(長野県産、ニホンジカ)、猪モモ肉(鳥取県産、ニホンイノシシ)を使用した。

(1) 野生動物肉の生理活性の検討

各肉サンプルについて脂肪や筋膜・結合部組織を可能な限り除去し、家庭用フードプロセッサーを用いて挽肉にした。調理および食した後の消化酵素処理を考慮して、以下の操作を行った。各種挽肉に2倍量の蒸留水を添加し、ホモジナイザーを用いて30秒間2回氷冷中で攪拌した。このホモジネートを70℃に設定した恒温水槽で30分間振とう加温後、酵素未処理の加熱食肉タンパク質サンプル(未処理区)とした。未処理区を9N HClでpH1.8に調整し、ペプシンをタンパク質量に対して1/1,000倍量添加し、37℃に設定したインキュベーターで2時間、攪拌しながら培養した。5N NaOHを用いてpH6.8に調整し、10分間煮沸した後、溶液温度を40℃まで下げた。この溶液をペプシン処理サンプル(Pep区)とした。さらにトリプシンおよびパンクレアチンをそれぞれペプシンと同量添加し、37℃に設定したインキュベーターで攪拌しながら2時間培養した。最後に10分間煮沸した試料をペプシン/トリプシン/パンクレアチン処理サンプル(Pep/ Try/ Pan区)とした。調製した試料について血圧上昇に関連するアンジオテンシン変換酵素(ACE)の阻害活性および抗酸化活性について評価した。ACE阻害活性はCushmanら(1971)の方法に従った。抗酸化活性については2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)ラジカル消去活性とOxygen Radical Absorbance Capacity(ORAC)活性値を測定した。DPPHラジカル消去活性の測定は、DPPH分光測定法に準じて行った。すなわち、400 μmol/L DPPH、200 mmol/L MES buffer pH 6.0、20%エタノールを同量ずつ加え、混合液を作製した。混合液を20分間室温で反応させた。その後、分光光度計にて吸光度520 nmで測定した。また、サンプルの代わりに、0.2 mmol/L Troloxをスタンダードとして測定し、検量線からサンプルのTrolox相当値を算出した。ORAC法はWatanabeら(2012)の方法をもとに評価した。なお各試験において、サンプル濃度はペプチド濃度10mM(Gly-Leu換算値)に調整し、適宜希釈したものを供試した。

(2) 野生鹿肉の消化酵素分解物によるビフィズス菌増殖促進作用の検討

野生鹿肉を用いて、上記のペプシン処理サンプル(Pep)とペプシン、トリプシンおよびパンクレアチン処理サンプル(Pep/Try/Pan)を調製した。110℃10分間オートクレーブ処理した脱脂粉乳溶液(SMP)に対し、フィルター滅菌したPepおよびPep/Try/Panを終濃度0~30%まで加えた10% SMP培地を調製した。ビフィズス菌は*Bifidobacterium (B.) lactis* Bb-12株、*B. breve* JCM1192株、*B. longum* subsp. *longum* JCM1217株、*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222株、*B. bifidum* JCM1255株、*B. adolescentis* JCM1275株を用いた。前培養として各菌株はGAM液体培地にて37℃で24~48時間嫌気状態で培養した。前培養液を調製したSMP培地の容量に対し、1%無菌的に植菌した。その後、嫌氣的に37℃で培養し、pHおよび生菌数について調べた。pHはpHメーターにて測定した。生菌数は、試料を希釈しGAM寒天培地で混釈培養し、寒天培地上に形成されたコロニー数から算出した。

(3) 野生鹿肉の乳酸発酵性についての検討

鹿肉は長野県産のモモ肉を使用した。原料肉は凍結保存後、半解凍状態で使用し、原料の温度や衛生面には十分に注意を払い作業した。原料として鹿モモ肉(80%)、豚脂肪(20%)を用い、食塩、発色剤製剤、砂糖、ブドウ糖、アスコルビン酸Na、香辛料類を添加後、フードプロセッサーを用いてエマルションを作製した。乳酸菌スターター(*Lactobacillus plantarum* CH株)をエマルションに対して 10^6 colony forming unit(CFU)/gになるように添加した。その後、セルロースケーシングに充填した。恒湿恒温器を用いて、2日間は20℃湿度98%で、3日~7日までは20℃湿度90%で、8日~14日までは18℃湿度80%の条件で、発酵および乾燥を行った。製品のpH、水分活性、断面の色調ならびに微生物生菌数を調べた。pHはpHメーター、水分活性は水分活性測定装置SP-Wで測定した。製品断面の色調は分光測色計を用いて測定した。各種微生物の生菌数は、培養法により調べた。一般生菌数、乳酸菌数および大腸菌群について標準寒天培地、BCP加プレートカウント培地、デゾキシコレート寒天培地を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 野生動物肉の生理活性の検討

各動物肉サンプルのペプチドにおけるACE阻害活性を図1に示した。未処理区では動物肉間における有意差はみられなかったものの、Pep区において猪肉と鹿肉が豚肉と牛肉に比べて有意に高いACE阻害率がみられた。またPep/Try/Pan区においても、猪肉と鹿肉が豚肉と牛肉に比べて有意に高いACE阻害率を示した。阻害率の結果を基に、Pep/Try/Pan区における IC_{50} 値をOPA法で求めたペプチド濃度(Gly-Leu換算)から算出した。その結果、鹿肉が最も高いACE阻害活性を有すると示唆された(IC_{50} 値 豚肉:39.2 mM, 猪肉:19.9mM, 牛肉:33.5mM, 鹿肉:18.6mM)。

各動物肉におけるDPPHラジカル消去活性をTrolox換算値(Trolox μ mol/g)で示した(図2)。未処理区についてはラジカル消去作用が認められなかった。各動物肉のPep区において、ラジカル消去活性が認められたが、動物肉間の違いは認められなかった。各動物肉のPep/Try/Pan区ではPep区よりもさらに高いラジカル消去作用が認められた。特に鹿肉では、他の動物肉と比べて有意に高い活性を示した。DPPHラジカル消去活性において活性が高く認められた各動物肉のPep/Try/Pan区について、ORAC法において抗酸化活性を評価した。各種動物肉のORAC値を算出したところ、鹿肉がその他の動物肉に比べて高い値を示す傾向にあり、野生動物肉間における猪肉と比べると鹿肉より高い活性が認められた(抗酸化活性値(Trolox μ mol/g) 豚肉:7.13, 猪肉:7.67, 牛肉:8.31, 鹿肉:9.56)。

以上の結果より、特に鹿肉はACE阻害活性および抗酸化能の両方ともに高い活性が示され、いずれも消化酵素処理を施したサンプルの方が、生理活性機能が高い傾向にあると認められた。また、鹿肉を消化吸収した際に体内で生理活性能として働くことが期待された。さらに本研究成果では、鹿肉のPep/Try/Pan区における消化酵素分解物のACE阻害活性を示すペプチドとして、各種クロマトグラフィーによる分画作業とLC-MS/MSによる解析および合成ペプチドによるACE阻害活性の検討より、IKEVTERを見出すことができた。抗酸化ペプチドの解析は今後の課題である。

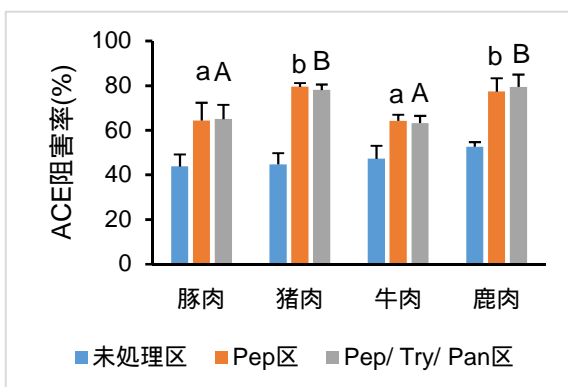


図1. 消化酵素分解産物によるACE阻害活性

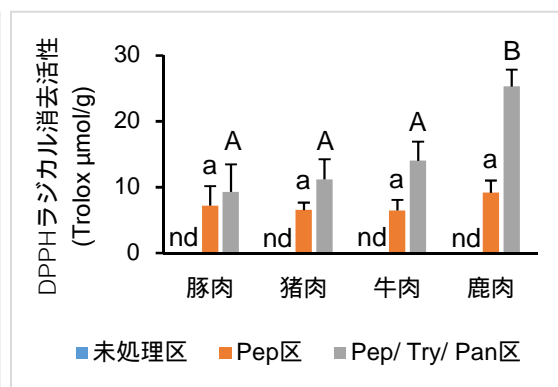


図2. 消化酵素分解産物による抗酸化活性

(2) 野生鹿肉の消化酵素分解物によるピフィズ菌増殖促進作用の検討

鹿肉消化酵素分解物であるPepおよびPep/Try/Panを添加したSMP培地(Pep添加区およびPep/Try/Pan添加区)を用いて、*B. lactis* Bb-12株の発酵によるpH変化および増殖に及ぼす影響を調べた。*B. lactis* Bb-12株を植菌後、対照区、Pep区、Pep/Try/Pan区は培地中のpHが低下した。PepおよびPep/Try/Panを1~30%添加したSMP培地は対照区と比べ、培養12~18時間以降でより低いpHを示した。Pep/Try/Pan 30%添加および10%添加SMPのpHは他の試験区と比べ、特にpHの低下が著しかった。

生菌数について調べたところ、Pep/Try/Pan添加区の生菌数は、培養6時間以降、Pep/Try/Pan

を 1~30%添加することにより、他の試験区と比べ高い生菌数が認められた。従って、鹿肉消化酵素分解産物 Pep/Try/Pan にはビフィズス菌増殖促進作用があることが示唆された。

Pep および Pep/Try/Pan のビフィズス菌増殖作用について、添加する各ペプチド濃度を 10mM と一定にしたうえで、培養 18 時間後の生菌数について検討した。また *B. lactis* Bb-12 株以外の菌種株も併せて検討した。図 3 に示したように、*B. lactis* Bb-12 株で増殖促進傾向が見られた。その他、*B. breve* (JCM 1192)、*B. longum* subsp. *longum* (JCM 1217) および *B. longum* subsp. *infantis* (JCM 1222) においても増殖促進傾向が認められた。一方、*B. bifidum* と *B. adolescentis* の 2 種においてはその効果が見られなかった。従って、鹿肉消化酵素分解物の生育促進効果はビフィズス菌の菌株間で異なることが示された。さらに、活性成分を検討するため、各種クロマトグラフィーにより分画したフラクションを脱脂粉乳に一定量加え、*B. lactis* Bb-12 株の増殖性について調べたが、安定的増殖効果を示すフラクションを見出すことはできなかった。

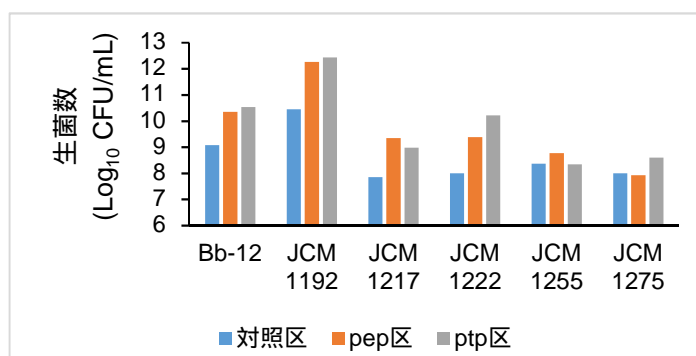


図 3. 消化酵素分解鹿肉産物によるビフィズス菌増殖作用

(3) 野生鹿肉の乳酸発酵性についての検討

鹿肉の食用加工法として乳酸発酵の適用性について調べた。発酵ソーセージ用乳酸菌スターターを用い、試験区として鹿肉、対照区として豚肉を用いた発酵ソーセージを作製した。発酵乾燥期間を通して、発酵鹿肉ソーセージの pH は発酵豚肉ソーセージよりも高い数値で推移した(図 4)。作製後の発酵鹿肉ソーセージは発酵豚肉ソーセージに比べ赤色度が高く、明度が低い色調であった(L^{*}値：発酵鹿肉 37.50±0.90, 発酵豚肉 55.46±0.99、a^{*}値：発酵鹿肉 7.11±1.16, 発酵豚肉 6.25±0.02)。発酵鹿肉ソーセージの乳酸菌生菌数の増加(製品中の乳酸菌数：発酵鹿肉 7.8±0.3 Log₁₀ CFU/g, 発酵豚肉 7.3±0.4 Log₁₀ CFU/g)および水分活性の低下(製品の水分活性：発酵鹿肉 0.885, 発酵豚肉 0.870)は発酵豚肉ソーセージと同様に認められた。なお、両製品において製品由来の大腸菌群は検出されなかった。一般的に乳酸発酵は、食品の保存性を向上させる加工方法の一つである。従って、鹿肉を使用した乳酸発酵ソーセージの品質特性についての検討が期待される。

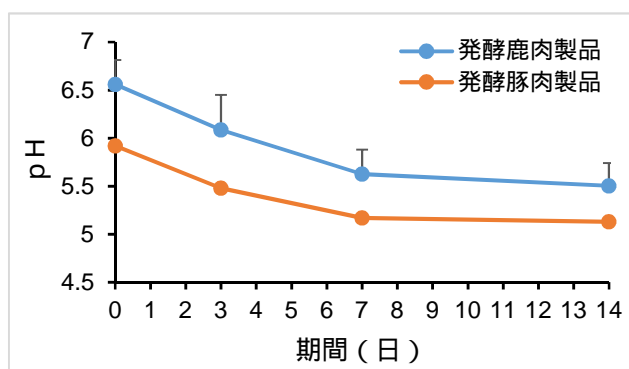


図 4. 乳酸発酵乾燥における製品の pH 変化

参考文献

- Cushman DW & Cheung HS. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol.*, 20(7), 1637-1648.
- Watanabe J, Oki T, Takebayashi J, Yamasaki K, Takano-Ishikawa Y, Hino A, Yasui A. (2012) Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Anal Sci.*, 28(2), 159-165.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeda S, Kaneko S, Sogawa K, Ahhmed AM, Enomoto H, Kawarai S, Taira K, Mizunoya W, Minami M, Sakata R.	4. 巻 9
2. 論文標題 Isolation, Evaluation, and Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Game Meat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 1168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods9091168.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹田志郎, 金子桜子, 曽川一幸, 水野谷 航, 川原井晋平, 平 健介, 南 正人, 坂田亮一
2. 発表標題 鹿肉の消化酵素分解物のアンジオテンシン 変換酵素阻害活性について
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	金子 桜子 (Kaneko Sakurako)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------