

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K02138

研究課題名(和文)野生鹿肉の乳酸発酵による加工食品としての保存性向上と生理活性発現

研究課題名(英文) Effects of lactic acid fermentation on preservation and bioactivities as the processed venison products

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、野生鹿肉の食材としての利活用を目的に、乳酸発酵による有効性について検討した。供試菌株のうち、*Lactobacillus sakei* No.23 (LS-23) 株は塩漬鹿肉モデル中での良好な発酵性とACE阻害活性と抗酸化活性を示した。LS-23株は乳酸発酵鹿肉製品中で既知の食肉用スターター菌株と併用させることで、良好なpHの低下と水分活性の低下および高い乳酸菌数を示した。また、LS-23株と食肉用スターター菌株との共発酵は乳酸発酵鹿肉製品における強い抗酸化作用とACE阻害活性を発現させるだけでなく、製品のうま味と甘味を増大させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では野生鹿肉の食材としての利活用として乳酸発酵の有用性を示すことを目的に実施し、非加熱食肉製品と同等の基準を満たし、高い生理活性と嗜好性が期待できる成果を示した。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肉を食資源として利用することが望まれている。従って、本研究の成果により、野生動物の機能性を向上させる食用加工として乳酸発酵を有効に利用することでヒトのQOL向上、さらには野生動物との持続可能な共生関係構築に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effects of lactic acid fermentation on the utilization of wild venison as a food ingredient. Among the tested strains, the strain *Lactobacillus sakei* No.23 (LS-23) demonstrated the favorable fermentation, high ACE inhibitory activity, and high antioxidant activity in the cured venison model. In addition, the combination of LS-23 and the commercially available starter cultures for meat demonstrated an acceptable decrease in pH, a reduction in water activity, and a high number of lactic acid bacteria in the fermented venison products. The co-fermentation with the meat starter culture also resulted in high antioxidant and ACE inhibitory activities. Furthermore, the free amino acid results suggested an increase in the umami and sweetness of the products. Further studies are needed on using lactic acid fermentation of wild deer meat for the products.

研究分野：食品科学分野

キーワード：野生動物肉 乳酸発酵 食品加工 乳酸菌 生理活性 保存性

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

野生動物による農林被害が増大しており、個体数管理のために野生動物の捕獲が行われている。それに伴い、捕獲した野生動物肉(ジビエ)の食材利用が強く望まれている。本研究開始当初、我々の研究においては、野生鹿肉は食肉(牛肉、豚肉)と比べて、高い生理活性(特に抗酸化作用や血圧降下作用に関する活性)を有していることを明らかにしつつあった。

ジビエの利活用について、鮮度や衛生的観点から保存性を向上させる食用加工法の確立が重要である。食品加工において乳酸発酵は一般的に使用されており、乳酸菌スターターを用いて食品の保存性を向上させる主たる効果、ならびに乳酸菌体または発酵産物によりヒトの健康への効果をもたらす可能性がある。食肉加工においても、発酵ソーセージなど乳酸発酵を施した製品が存在する。従って、野生鹿肉の食材としての利活用として乳酸発酵が有用であると考えられ、これらを明らかにすることにより、野生鹿肉の利用価値とヒト QOL の向上に貢献でき得ると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では(1)鹿肉の発酵に適した乳酸菌スターター株の探索および鹿肉と食肉として豚肉の乳酸発酵性の違いについて調査。有用な乳酸菌スターター株については、標準菌株との違いや食肉加工での使用について検討を行う。(2)乳酸発酵鹿肉製品と乳酸発酵豚肉製品を作製および、それらの品質の違いについて評価することを通し、乳酸発酵鹿肉製品の加工食品としての価値と、ヒト健康の充進につながる有用性を見出すことを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

実験で使用した鹿肉は、長野県小諸市で捕獲された鹿ロース肉を使用し、豚肉は、相模原市内の食肉専門店で購入した豚ロース肉を使用した。供試した乳酸菌株は市販の食肉用スターター菌株である *Lactiplantibacillus (L.) plantarum* A株 (以下、LP-A)、*L. plantarum* C株 (以下、LP-C)、*Pediococcus (P.) pentosaceus* B株 (以下、PP-B) と、食肉製品より分離した *L. sakei* No. 23株 (以下、LS-23)、*L. curvatus* No. 28株 (以下、LC-28) (Takeda ら 2017)ならびに各標準菌株である *L. sakei* JCM1157 (以下、JCM1157)、*L. curvatus* NBRC15884株 (以下、NBRC15884)を使用した。

(1) 各乳酸菌株の鹿肉および豚肉における発酵性と生理活性の評価

鹿肉と豚肉の発酵性を評価するために、それぞれの塩漬モデル肉を調製した。材料として鹿ロース肉および豚ロース肉を用意し、70%エタノールに1分間浸漬した。浸漬した鹿ロース肉および豚ロース肉の外側をトリミングし、中心部分の肉を100g回収した。トリミングに使用した器具類は家庭用漂白剤で殺菌消毒し、中性洗剤で洗浄したものを使用した。回収した各肉100gに対して、無菌的に終濃度3% NaCl、1% グルコース、200 ppm NaNO₂になるようにホモジナイザーカップに入れ、10,000 rpm、5分間、エースホモジナイザーAM-3型(日本精機製作所、東京)で均一化し、塩漬モデル鹿肉および塩漬モデル豚肉ホモジネートとした。それぞれのホモジネートは一般生菌数が検出限界(10 colony forming unit(CFU)/mL)未満であることを確認し、使用時まで-30℃で保存した。

各乳酸菌株はGYP液体培地を用い、30℃で静置培養した。培養液を鹿肉および豚肉ホモジネートに対して1%分(v/v)植菌し、25℃で24時間静置培養した。その後、ホモジネートのpH、乳酸菌数、乳酸濃度をpHメーター、生菌数測定、HPLC法により評価した。また水溶性のペプチド濃度はChurchら(1983)の方法を用いて測定した。

乳酸菌植菌後の鹿肉および豚肉ホモジネートの生理活性として、血圧上昇に関連するアンジオテンシンI変換酵素(ACE)の阻害活性と抗酸化活性の指標である2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)ラジカル消去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。DPPHラジカル消去活性の測定は、DPPH分光測定法すなわち、400 μM DPPH、200 mM 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 mM 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。

(2) 乳酸発酵鹿肉製品の作製と製品特性の評価

乳酸発酵鹿肉製品のスターターとして使用する乳酸菌株はMRS液体培地を用いて30℃で培養し、遠心分離とPBSによる集菌洗浄を行った。集菌洗浄後、乳酸菌を50 mM グルタミン酸ナトリ

ウム水溶液に懸濁し、凍結乾燥を行った。得られた菌体粉末を乳酸菌スターターとして使用した。

鹿肉は長野県産の野生鹿モモ肉を使用した。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ジョンを作製した。各乳酸菌スターターをエマルジョンに対して 10^6 CFU/g になるように添加し混合した。その後、セルローケーシングに充填した。恒温恒湿器を用いて、2 日間は 20°C 湿度 90% で、3 日~7 日までは 20°C 湿度 80% で、8 日~21 日までは 20°C 、湿度 65% の条件で、発酵および乾燥を行った。

作製した製品特性として、pH、水分活性、遊離アミノ酸ならびに各細菌の生菌数を調べた。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 L^* 値 (明度)、 a^* 値 (赤色度)、 b^* 値 (黄色度) は分光測色計を用いて測定した。各微生物検査は、培養法により一般生菌数、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行った。遊離アミノ酸は細断した各試料 1 g を 9 mL の 0.1mmol/L 塩酸で攪拌および遠心分離後の上清を InertSep C18 へ供試し、溶出液を試料とした。その後、試料および標準溶液を NBD-F 処理で蛍光誘導体化し、HPLC を用いて分析した。HPLC の分析条件は、カラム InertSustainSwift C18 ($5\ \mu\text{m}$, $250 \times 4.6\ \text{mm I.D.}$) (GL Sciences, 東京) を用いて、移動相は 0.1% TFA アセトニトリル溶液と 0.1% TFA 水溶液を用いてグラジエント勾配による溶出を行った。流速は 1 mL/分でカラムオープンに 50°C に設定し、蛍光検出器の励起波長と蛍光波長をそれぞれ 470 nm および 530 nm に設定し分析した。

4. 研究成果

(1) 各乳酸菌株の塩漬鹿肉および豚肉ホモジネートにおける発酵性と生理活性の検討

塩漬鹿肉モデルホモジネートおよび塩漬豚肉モデルホモジネートの pH を調べたところ、塩漬鹿肉モデルホモジネートと塩漬豚肉モデルホモジネートは pH5.61 と pH5.74 に対し、それぞれ乳酸菌株を添加することで pH4.29~5.11 および pH4.86~5.35 へ低下した。また、ACE 阻害活性と DPPH ラジカル消去活性の測定を測定した。塩漬鹿肉モデルホモジネートと塩漬豚肉モデルホモジネートの ACE 阻害率は 56.86% および 41.52% に対し、各乳酸菌株を添加することでそれぞれ 59.23~78.34% および 50.09~60.92% と増加した。DPPH ラジカル消去活性においては、塩漬鹿肉モデルホモジネートと塩漬豚肉モデルホモジネートは既知の抗酸化作用物質の Trolox 換算値で 0.43 μM および 0.70 μM に対し、各乳酸菌株を添加することでそれぞれ 0.70~3.52 μM および 0.33~4.80 μM と増加した。その中で LS-23 株を添加した塩漬鹿肉モデルホモジネートと塩漬豚肉モデルホモジネートは他の乳酸菌株と比較したところ、pH の低下に加えて、良好な生菌数の増加とペプチド濃度の上昇が認められた。さらに、ACE 阻害率と DPPH ラジカル消去活性でも高値を示した。表 1 に LS-23 株および標準菌株の JCM1157 株添加区の pH、生菌数およびペプチド濃度の結果を示す。また図 1 と図 2 に ACE 阻害率と DPPH ラジカル消去活性の結果を示す。

先行研究において LS-23 株は豚肉を用いた発酵食肉製品の作製で、高い発酵性と ACE 阻害活性と抗酸化活性を示すことが認められており (Takeda ら 2017)、本研究の結果は先行研究の傾向と一致しており、LS-23 株は豚肉だけでなく鹿肉においても高い発酵性を有する可能性を示した。発酵食肉製品の製造において、製品の pH を速やかに低下させることは、スターター以外の微生物増殖を抑制する効果が期待できるため、LS-23 株は乳酸発酵鹿肉製品のスターターとして有用であると考えられた。肉素材における ACE 阻害活性と抗酸化活性の発現は、多くの場合いずれも肉由来の生理活性ペプチドが寄与していることが知られている。従って、LS-23 株を添加した塩漬鹿肉ホモジネートの ACE 阻害率と DPPH ラジカル消去活性の増大には、同菌株の発酵により生じた鹿肉由来の生理活性ペプチドが寄与していることが推察された。以上より、LS-23 株は生理活性を有した発酵鹿肉製品への応用が期待された。

表 1. 乳酸菌添加による塩漬肉ホモジネートの pH、乳酸菌、ペプチド濃度

菌株	pH		乳酸菌数 (Log_{10} CFU/g)		ペプチド濃度 (mM :Gly-Leu 換算値)	
	豚肉	鹿肉	豚肉	鹿肉	豚肉	鹿肉
無添加区	5.74±0.20 ^a	5.62±0.23 ^a	NT	NT	4.96±0.29	5.74±0.55
JCM1157	5.01±0.33 ^b	5.04±0.06 ^b	8.28±0.39	7.81±0.15	5.60±0.62	6.78±1.48
LS-23	4.86±0.09 ^b	4.35±0.14 ^c	8.68±0.36	8.68±0.11	5.97±0.73	6.82±1.31

各列において、異なる文字間は有意差を示す ($P < 0.05$)

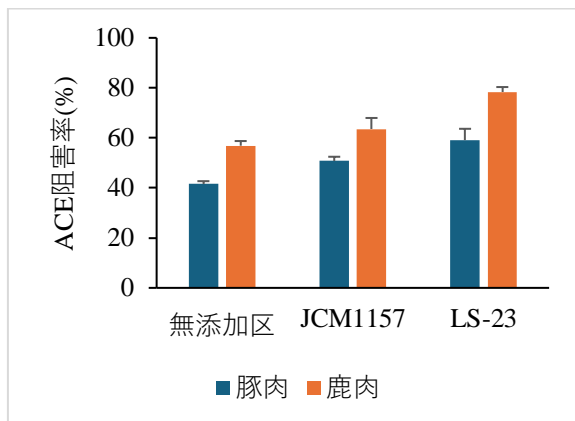


図 1. 乳酸菌添加による塩漬肉ホモジネートの ACE 阻害率

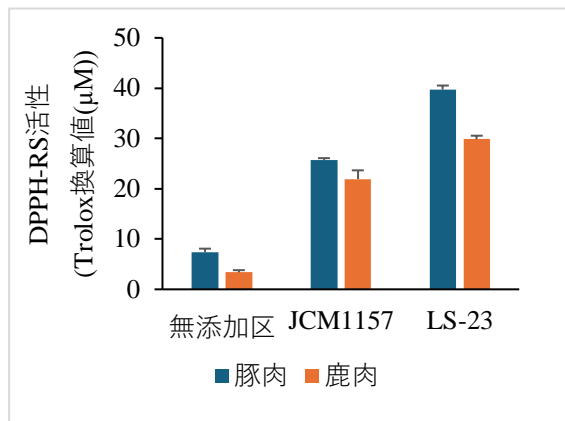


図 2. 乳酸菌添加による塩漬肉ホモジネートの DPPH ラジカル消去活性

(2) 乳酸発酵鹿肉製品の作製と製品特性の評価

乳酸発酵鹿肉製品の作製として、LS-23 株、JCM1157 株に加えて食肉用スターター菌株である PP-B 株を用いて検討を行った。また、LS-23 株の補助スターターとしての可能性を検討するため、PP-B 株との併用についても検討した。

LS-23 株添加した最終製品 (21 日目) の製品 pH は JCM1157 株および PP-B 株添加区よりも低い値を示し、水分活性値は同等以下の数値であった。PP-B 株と LS-23 株の併用区 (PP-B+LS-23 株区) は製品の中で最も低い pH (pH5.05) であり、水分活性値は 0.82 であった (表 2)。なお、各製品からの大腸菌群は検出されず、断面の色調については、製品間で同等であった。生理活性については無添加区以外のすべての試験区で高い ACE 阻害活性を認めた。DPPH ラジカル消去活性では、特に PP-B+LS-23 株区は他の試験区よりも DPPH ラジカル消去活性が著しく有意に高い値を示した (図 3)。各試験区における最終製品の遊離アミノ酸濃度の結果、LS-23 株区は、JCM1157 株および PP-B 株添加区よりもうま味を呈するアスパラギン酸とグルタミン酸量が高かった (図 4)。また PP-B+LS-23 株区では他の試験区と比べ、グルタミン酸、ロイシン、リジンに加え、甘味を呈するグリシン、アラニンが高値を示し、アルギニンは低値を示した (図 4)。

本研究で作製した乳酸発酵鹿肉製品は国内の食肉製品分類でいう非加熱食肉製品 (肉塊のみを原料食肉とする場合以外) に位置すると考えられる。その規格基準に従うと、常温で保存することを想定した場合、「pH が 5.1 未満かつ水分活性が 0.93 未満」という基準が挙げられる。PP-B 株、JCM1157 株および LS-23 株区は水分活性 0.93 未満という基準を満たしたが、pH5.1 以上であったため非加熱食肉製品の規格基準にそぐわなかった。しかしながら、PP-B+LS-23 株区は pH および水分活性の数値基準を満たしていた。今後、製品保存における品質について、経時的な検討が望まれる。また、PP-B+LS-23 株区製品の ACE 阻害および DPPH ラジカル消去活性値は試験区の中で最も高い活性を示した。PP-B+LS-23 株区の乳酸菌数は試料中で最も高かったため (表 2)、両菌株は互いに阻害することなく発酵したと考えられた。従って、強い ACE 阻害および DPPH ラジカル消去の活性の発現には、PP-B 株と LS-23 株が鹿肉中で共発酵することで生じる生理活性ペプチドが関与していると考えられた。アミノ酸は、それぞれ甘味、苦味、酸味やうま味といった呈味性を有しており、それらアミノ酸の組み合わせは食品の味を決める要素の一つとなっている。PP-B+LS-23 株区では、うま味、甘味を呈するアミノ酸量が増大する傾向であった。乳酸発酵肉製品は乳酸菌が産生する乳酸の影響のため、特徴的な酸味がある。従って、LS-23 株と PP-B 株を混合させたスターターを使用することで、うま味と甘味が向上し、乳酸発酵製品の特徴的な酸っぱさを抑えたより好ましい製品を作製できる可能性が推察された。

表 2. 乳酸発酵鹿肉製品の pH、水分活性および乳酸菌数

試験区	pH	水分活性	乳酸菌数 (Log ₁₀ CFU/g)
無添加区	5.85±0.07 ^a	0.85±0.03	7.29±0.91
PP-B 株区	5.91±0.10 ^a	0.84±0.01	8.30 ± 0.83
JCM1157 株区	5.66±0.28 ^a	0.83±0.02	8.43 ± 1.69
LS-23 株区	5.29±0.001 ^b	0.83±0.01	8.50 ± 0.78
PP-B+LS-23 株区	5.05±0.05 ^c	0.82±0.01	8.95 ± 1.53

各列において、異なる文字間は有意差を示す (P<0.05)

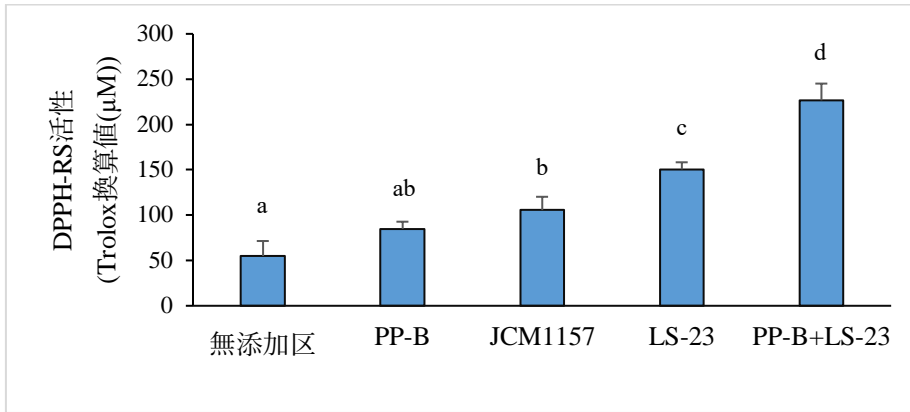


図 3. 乳酸発酵鹿肉製品の DPPH ラジカル消去活性異なる文字間は有意差を示す(P<0.05)

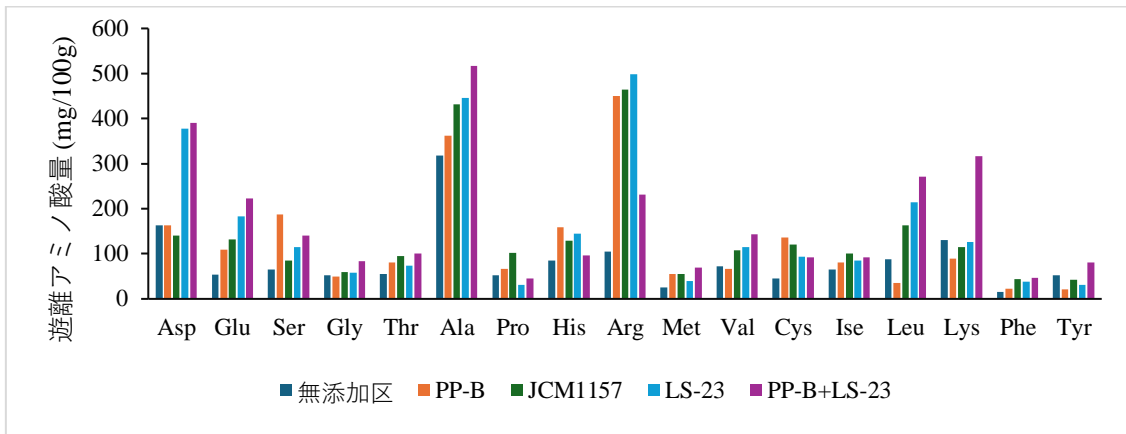


図 4. 乳酸発酵鹿肉製品の遊離アミノ酸量

参考文献

Takeda S, Matsufuji H, Nakade K, *et al.* Investigation of lactic acid bacterial strains for meat fermentation and the product's antioxidant and angiotensin-I-converting-enzyme inhibitory activities. *Anim Sci J.* 2017;88(3):507-516.

Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol.* 1971;20(7):1637-1648.

Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, *et al.* Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci.* 1983;66(6):1219-1227.

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 Shiro, Ahmed Abdulatef M., Sogawa Kazuki, Mouri Saki, Kaneko Sakurako, Sakata Ryoichi, Mizunoya Wataru	4. 巻 94
2. 論文標題 Antioxidant activity of venison subjected to in vitro cooking and gastrointestinal digestion and isolation of its 2,2 diphenyl 1 picrylhydrazyl radical scavenging peptides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogata Masaya, Uchiyama Jumpei, Ahmed Abdulatef M., Sakuraoaka Seiichi, Taharaguchi Satoshi, Sakata Ryoichi, Mizunoya Wataru, Takeda Shiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of Inherent Lactic Acid Bacteria on Inhibition of Angiotensin I-Converting Enzyme and Antioxidant Activities in Dry-Cured Meat Products	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 2123 ~ 2123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods11142123	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 毛利 彩紀、水野谷 航、竹田 志郎
2. 発表標題 野生鹿肉のLatilactobacillus sakei No.23株による発酵性と鹿肉製品特性の検討
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 毛利彩紀、鈴木波瑠、水野谷 航、竹田志郎
2. 発表標題 野生鹿肉を用いた乳酸菌スターター菌株の選抜
3. 学会等名 日本食品科学工学会 関東支部大会
4. 発表年 2023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	水野谷 航 (Mizunoya Wataru)	麻布大学・獣医学部 動物応用科学科・准教授	
研究協力者	毛利 彩紀 (Mouri Saki)		
研究協力者	小方 雅也 (Ogata Masaya)		

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
---------	---------