

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580362

研究課題名(和文)発色剤無添加食肉製品の品質に及ぼす亜鉛プロトポルフィリンIXの影響

研究課題名(英文)Effect of zinc protoporphyrin IX on the qualities of meat products without nitrite/nitrate

研究代表者

若松 純一 (WAKAMATSU, JUN-ICHI)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：30344493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：肉・食肉製品中のZnPP形成にはpHだけでなく、pHを調節する酸の種類によっても強く影響されることを明らかにし、検証した最適条件でサラミを作ると、発色剤を加えたものと同等の色調を示した。さらに、ZnPP形成を促す微生物の存在も明らかにし、色調改善効果が期待される。さらに、多くの種類の骨格筋でZnPP形成の最適pHを検証したところ、従来のpHよりも低いpHにもあり、遅筋型筋線維の割合と正に相関することが示された。一方、ZnPPの亜鉛補給効果を検証したけれども、残念ながら無機亜鉛と比べて高い効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We elucidated that ZnPP-formation in meat or meat products is strongly influenced from pH as well as acidifier. As to salami which pH was adjusted by using a certain acidifier, the color was almost same as that of salami with nitrite. In addition, we found several microorganisms that facilitated to form ZnPP in raw meat products. When we investigated the optimum pH to form ZnPP by using various muscles, another optimum pH differing from previous optimum pH was found. ZnPP-formation at the new optimum pH was significantly correlated positively with a proportion of type I muscle fiber. On the other hand, the effect of supplemental zinc by ZnPP was not higher than that of inorganic zinc.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 畜産学・草地学

キーワード：亜鉛プロトポルフィリンIX 食肉製品 色調 栄養

## 1. 研究開始当初の背景

食肉製品においては色調改善の目的で硝酸塩や亜硝酸塩などの発色剤の使用が認められており、食肉中のミオグロビン分子内のヘムがニトロシル化することにより、加熱しても安定な桃赤色の色調を呈する。しかしながら、亜硝酸塩は酸性条件下でアミン類と反応することにより、強い発がん性物質であるニトロソアミンを形成することが知られており、安全性の点からもその使用量の削減が望まれている。

イタリアのプロシュート・ディ・パルマ(パルマハム)などの伝統的に長期熟成した乾塩漬非加熱食肉製品にはヘムの鉄分子が亜鉛分子に置き換わった亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) が存在することを明らかにした (Wakamatsu et al., 2004; Wakamatsu et al., 2007)。さらに、抗生物質を添加して、ミオグロビンと食肉を嫌氣的に保持することにより、ZnPP がモデル的に形成されることを確認し、pH や温度、食肉添加量、イオン強度などに依存性を示すことから、その形成は微生物以外の食肉内在成分の関与の可能性を強く示唆する報告を行った (Wakamatsu et al., 2004)。

その後の ZnPP 形成モデル系を用いて化学量論的に各種ポルフィリンを定量したところ、ヘムの減少は見られず、ZnPP の増加が見られたことから、ヘムから鉄が解離して、その後亜鉛が挿入される鉄-亜鉛置換反応が起こっていない可能性を示した (Wakamatsu et al., 2007)。また、金属キレート剤の添加では ZnPP の形成やヘムの減少が見られない代わりに、ZnPP に亜鉛が配位していないプロトポルフィリン IX (PPIX) が増加したことから、ZnPP 形成は、ヘムが脱鉄してから亜鉛が挿入されて形成するのではなく、ヘム以外から形成した PPIX に亜鉛が挿入されて形成される可能性が示唆された (Wakamatsu et al., 2007)。その後の ZnPP 形成機構解明のための発展研究「亜鉛プロトポルフィリン IX 形成機構の解明とその応用(20580288) 基盤研究(C), 2008-2010」の中で、ヘム生合成経路からの PPIX 形成は、アミノレブリン酸以降の物質より合成されたコプロポルフィリノーゲン III がコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼによってプロトポルフィリノーゲン IX となり、プロトポルフィリノーゲン IX が非酵素的に酸化されて PPIX が形成される経路が存在する可能性を示した (未発表データ)。ヘム合成酵素の 1 つで鉄を挿入するフェロケラターゼ (EC 4.99.1.1) は、PPIX に亜鉛を挿入することも多数報告されており、ZnPP 形成に関与しているものと想像される。一方ごく最近、フェロケラターゼがヘムから鉄の除去を触媒するという報告が行われ (Taketani et al., 2007; Chau et al., 2010)。その至適 pH などは我々のモデル系の結果と一致していた (Wakamatsu et al., 2004)。しかし、申請者

らは形成に寄与する成分を探索しているところ、豚肉を分画すると、筋原線維などの不溶性成分と、10 kDa 以上の筋漿タンパク質画分ならびに 10 kDa 以下の成分の最低 3 成分が不可欠で、10 kDa 以上の筋漿タンパク質画分ではゲル濾過によりミオグロビンを除いても、ZnPP の形成が認められたことから (未発表データ)、ZnPP 形成におけるミオグロビンの必要性、ヘムからの形成については、未だに不明のままである。

発色剤を添加しないパルマハム様の乾塩漬生ハムを製造したところ、海塩中の不純物は ZnPP 形成にほとんど影響を及ぼさないことや、ZnPP の熟成中期以降で著しく増加することを明らかにした (Wakamatsu et al., 2009)。さらに、ZnPP の蛍光特性より、パルマハム中の ZnPP の局在を観察することにより、ZnPP が表層などの特定の部分から浸透・拡散したのではないことが示唆された (Wakamatsu et al., 2006)。パルマハム中の ZnPP とヘムについて測定したところ、ヘムよりも ZnPP 含量の方が多量に形成され、発色剤使用の同様の製品と比べても色調も遜色ないことを明らかにした (未発表データ)。しかしながら、形成された ZnPP 量と、理化学的色調 ( $L^*a^*b^*$ ) や官能的色調 (見ため) との間に明瞭な関係が認められず (未発表データ)、製品の色調への ZnPP の寄与について未だ不明のままである。サラミは生ハムとは異なり、原料肉以外の素材を混ぜることができることから、申請者がこれまでに明らかにしたモデル系による結果を基にすると、ZnPP の形成を通常よりも促進させることも可能ではないかと考えられる。

一方、亜鉛は多くの酵素に含まれ、遺伝子発現、たんぱく質合成など、細胞の成長と分化に中心的役割を果たしており、ヒトの健康と栄養維持に重要な必須微量元素のひとつである。しかし、吸収されにくく、吸収率は一般に 20~30% と低い。同様に吸収されにくいミネラルとして鉄が挙げられるが、鉄のポルフィリン錯体であるヘム鉄は吸収率が無機鉄と比べて 5~10 倍優れている。このため、亜鉛のポルフィリン錯体である ZnPP も亜鉛の吸収率を高めているかも知れない。しかしながら、ZnPP の栄養学的特性についてはほとんど知られていない。一方で、製造中にヘムの減少が見られることから、ヘム鉄から置換によって ZnPP が形成された場合、鉄の吸収性の低下も懸念される。

## 2. 研究の目的

申請者らはパルマハムなどの発色剤を使用しない乾塩漬食肉製品に亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) が豊富に存在することを明らかにし、現在も基礎ならびに応用研究を行っている。本研究は ZnPP を用いて食肉

製品の色調改善効果と、色調以外の付加価値の可能性を検証することである。

具体的な研究項目は、ZnPPを高効率で製造できる条件を検討して、非加熱食肉製品の色調改善技術の開発をするとともに、栄養学的観点から、ZnPPがヘム鉄のように亜鉛の吸収促進効果をもたらすかどうか、ヘム鉄の分解等による鉄の利用性低下が起こっていないかについても明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) ZnPP形成最適条件の検討

我々が確立したモデル実験系を用いて、酸の種類やpH、微生物、筋原線維型などの影響を検討した。

#### (2) 非加熱食肉製品の色調改善への応用

ドライソーセージとしてサラミを製造し、ZnPPの形成能の違いや各種測色技法による色調改善効果について検討した。

#### (3) ZnPP形成機構解明のための形態学的アプローチ

ZnPPの形成機構解明として、共焦点レーザー顕微鏡を用いてZnPPの分布、ならびに関連成分との共有について間接蛍光抗体法により検討して、ZnPPの最適形成条件の有用情報を得る。

#### (4) ZnPPの亜鉛補給効果

亜鉛欠乏食に濃度を変えて各種亜鉛源を添加した亜鉛欠乏食をラット与え、増体や各種組織のミネラル含量、酵素活性を測定して、無機亜鉛に対するZnPPの亜鉛補給効果を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) ZnPP形成最適条件の検討

サラミ製造を念頭に、従来の胸最長筋を用いるモデル実験系から、ウデの棘下筋を用いたところ、至適pHが5.5から4.5付近と大きく異なった。この原因として、筋線維型が考えられたため、豚の全身から20種の筋肉について、至適pHと筋線維型の関係について検討した。ZnPPの至適pHは筋肉により異なり、4.75であるもの、5.5であるもの、その両方を持つものの3パターンに大別できた。pH 5.5におけるZnPPの形成量は筋線維型と相関が認められなかったが、pH 4.75におけるZnPPの形成量は、I型筋線維型の割合と正に、IIb型筋線維型と負に相関した。

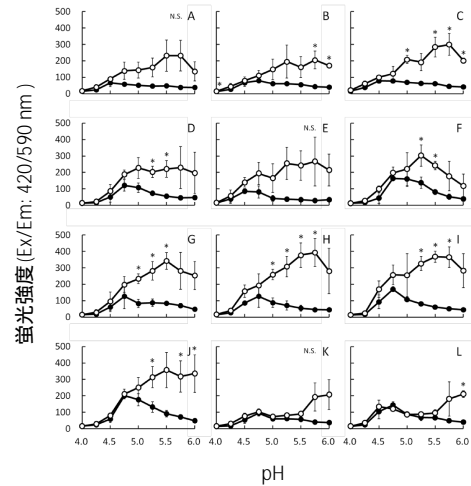
第2表 骨格筋の各pHにおけるZnPP形成量と筋線維型割合の相関係数

筋線維型割合	各pHにおけるZnPP蛍光強度				
	4.5	4.75	5.0	5.25	5.5
I型	0.3826**	0.4391**	0.2614*	0.1713	0.0390
IIa型	0.1704	0.1345	0.0049	-0.0372	-0.1133
IIb型	-0.3509**	-0.3574**	-0.1568	-0.0727	0.0615

\*\*\*: 蛍光強度と筋線維型割合に相関関係あり (\*\*: P<0.01, \*: P<0.05)

棘下筋を用いたモデル実験系により、pH調整のための酸を12種類検討したところ、

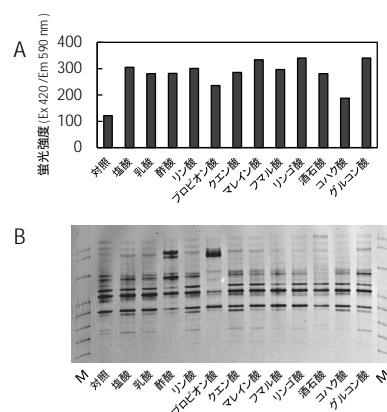
微生物の有無にかかわらずZnPPの形成量はいった酸の種類により異なり、ZnPP形成を促す酸と抑制する酸の存在が示され、また、抗生物質を用いずに、微生物が存在する条件下では形成量は顕著に表れ、至適pH(4.5付近)はより高いpH(5.5付近)にシフトし、ZnPP形成量は著しく増加した。



酸の種類、pHおよび微生物がZnPP形成に及ぼす影響

抗生物質を添加(●)または添加しない(○)10%豚棘下筋ホモジネートを、各種の酸(A:塩酸、B:乳酸、C:リン酸、D:クエン酸、E:フマル酸、F:コハク酸、G:マレイン酸、H:リゾ酸、I:酒石酸、J:グルコン酸、K:酢酸、L:プロピオン酸)を用いてpH 4.0~6.0に調整し、25℃の暗所で嫌氣的に5日間インキュベートした。75%アセトン法で抽出し、励起波長420nmにおける蛍光波長590nmの蛍光強度をZnPP相当量とした。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。\*: 抗生物質を添加した区に対して有意差あり(p<0.05)、N.S.:有意差なし。

さらに、用いた酸の種類やpHにより、モデル溶液中の菌叢が変化することをPCR-DGGE法によって明らかにし、ZnPP形成量と正に相関するバンドの存在も明らかになった。モデル溶液から分離できた微生物から、ZnPPの形成を促進する細菌を2種同定した。

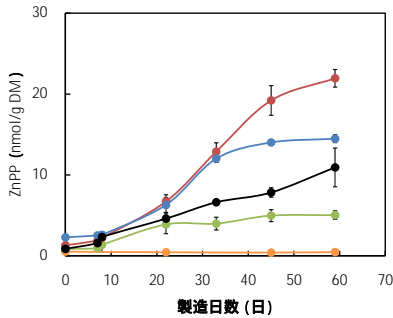


ZnPP形成に及ぼす酸の影響ならびに菌叢のPCR-DGGE像

#### (2) 非加熱食肉製品の色調改善への応用

上記でZnPP形成を促進した微生物は食経験が乏しいため、安全性を配慮して、pHと酸がサラミの色調に及ぼす影響について検討した。乳酸を用いて、pHを5.0、5.5および6.0に調節してサラミを製造したところ、

pH 5.5 のサラミにおいて ZnPP が最も多く形成され、色彩色差計での色の評価 (a\*: 赤色度) においても、発色剤添加区と同等であった。次に、ZnPP 形成能が高かったグルコン酸を用いた場合、添加量に応じて ZnPP の形成は促進された。また、グルコン酸を添加することにより、サラミの菌叢 (PCR-DGGE) が変化したことから、酸と微生物の相乗効果により、ZnPP の形成が促進されたのかもしれない。以上のように、製法的大幅な変更をしないでも、ZnPP の形成を促進して、非加熱食肉製品の色調改善ができる可能性を示すことができた。



サラミ製造に伴う ZnPP 濃度の推移

pHを調整しない対照区 (●)、乳酸でpH 5.0、5.5、6.0となるように調整した5.0区 (○)、5.5区 (▲)、6.0区 (◆)、乳酸でpH 5.5となるように調整した発色剤添加区 (◆) のサラミを製造して、HPLCを用いて経時的にZnPP濃度を測定した。濃度は水分含量で補正し、乾物重量当たりの濃度として算出した。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

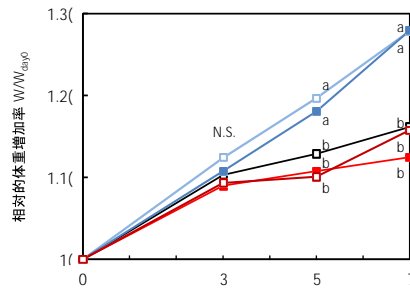
### (3) ZnPP 形成機構解明のための形態学的アプローチ

検出波長を調節できる共焦点レーザー顕微鏡を用いて、選択的に ZnPP の分布を観察する手法を確立した。これによりパルマハムにおける ZnPP 分布を観察すると、筋線維や脂肪組織、筋周膜において ZnPP が存在しており、特に筋線維で強く観察された。筋線維によっても ZnPP 自家蛍光の強さが異なり、遅筋型筋線維では ZnPP が豊富に存在していた。これは、ZnPP が豊富に存在するミトコンドリアが、遅筋型筋線維には多く存在するためであった。

ロモで ZnPP の形成推移を観察すると、ZnPP 自家蛍光はミトコンドリアから観察され始め、徐々に他の部分へと蛍光が広がっていく様子が観察され、ZnPP はミトコンドリアで形成された後に拡散する可能性が示された。ミトコンドリアにおける FECH の存在がパルマハムにおいても示されたため、FECH が機能し、ZnPP 形成に関与していることが示唆された。また、ZnPP 自家蛍光が顕著に強い構造体が筋線維の内部や膜直下に存在し、TEM 観察によってミトコンドリアの集合体であることが示された。この集合体では ZnPP のみならず、PPIX の存在も示唆され、高い ZnPP 形成能があるのかもしれない。本研究の結果から、ZnPP 形成においてミトコンドリアが大きな役割を担っていることが明らかとなった。

### (4) ZnPP の亜鉛補給効果

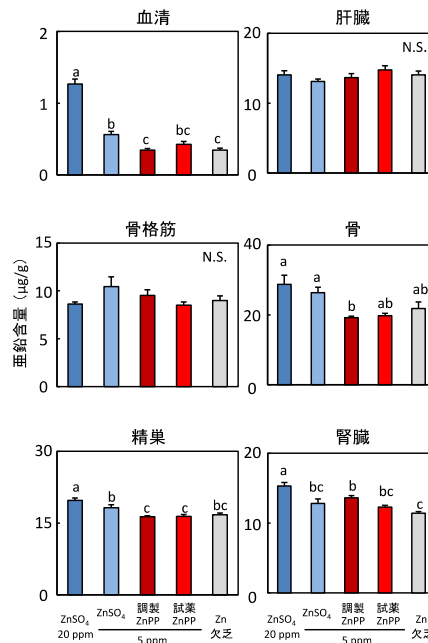
ZnPP の亜鉛補給効果を検討するために、低亜鉛飼料に亜鉛源および亜鉛濃度の異なる5群を設定して、増体、血清および組織亜鉛含量ならびに血清アルカリホスファターゼ活性を測定した。また、血清および組織は5つのミネラル (Mg、Ca、Mn、Fe、Cu) 含量を測定し、亜鉛以外のミネラルに及ぼす影響についても検討を行った。試験飼料給餌開始から5日目より、亜鉛含量がやや欠乏状態になるように (5 ppm) 肝臓から調製した ZnPP 添加群 (調製 ZnPP 群) ならびに試薬 ZnPP を添加した群 (試薬 ZnPP 群) の体重増加率は、同じ亜鉛濃度の無機亜鉛添加群よりも有意に低くなり、Zn 欠乏群と同程度であった。



ラットの体重増加率

試験期間中のラット体重 (W) を測定し、試験飼料 (ZnSO<sub>4</sub> 20 ppm 群 (■)、ZnSO<sub>4</sub> 5 ppm 群 (□)、調製 ZnPP 群 (▲)、試薬 ZnPP 群 (◆)、Zn 欠乏群 (○)) (以上 n=6)、調製 ZnPP 群 (□) (n=8) を給餌させる直前の体重 (W<sub>day0</sub>) を1とした増加率を示す。( N.S.: 同一日内で群間に有意差がないことを示す。( a, b: 同一日内で異なる文字間に有意差があることを示す (P<0.05)。(

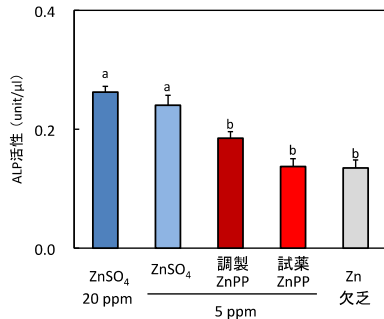
肝臓、胸腺、骨格筋および毛では、亜鉛含量は群間で有意な差はみられなかった。一方、血清、精巣、腎臓、骨および皮では、調製 ZnPP と試薬 ZnPP との間の亜鉛含量に有意差はみられなかったが、調製ならびに試薬 ZnPP 群は、ZnSO<sub>4</sub> 5 ppm 群よりも同程度あるいは有意に低いことが示された。



血清および各組織の亜鉛含量

試験期間終了後、各組織を採取したものを、湿式分解法により組織を灰化させ、2%硝酸でメスアップした後、ICP-MSを用いて亜鉛含量を測定した。バーは標準誤差を示す(調製ZnPP群(n=8)、それ以外(n=6))。N.S.: 群間に有意差がないことを示す。a, b: 異なる文字間に有意差があることを示す(P<0.05)。

また、活性中心に亜鉛を有する血清アルカリホスファターゼ活性でも、調製ならびに試薬 ZnPP 群は、ZnSO<sub>4</sub> 5 ppm 群よりも有意に低く、Zn 欠乏群と同程度であった。



血清のアルカリホスファターゼ活性

試験飼料を1週間給餌させた後、血清を採取し、ラボアッセイ™ ALP (和光純薬工業)にてALP活性を測定した。バーは標準誤差を示す(調製ZnPP群(n=8)、それ以外(n=6))。a, b: 異なる文字間に有意差があることを示す(P<0.05)。

血清および組織のマンガン含量は、調製 ZnPP 群と試薬 ZnPP 群との間に有意差がみられたが、他のミネラル(Mg, Ca, Fe, Cu)含量では、ZnPP および亜鉛含量により影響を受けなかった。以上のことから、ZnPP は無機亜鉛よりも亜鉛補給効果が高くないのかもしれないことが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

若松純二、発色剤無添加食肉性であるパルマハム中の新規色素、亜鉛プロトポルフィリン IX について、日本畜産学会創立 90 周年記念講演、つくば国際会議場(つくば)、2014 年 3 月 28 日

下田啓介、西邑隆徳、若松純二、亜鉛プロトポルフィリン IX 形成に及ぼす筋線維型の影響、第 117 回日本畜産学会大会、新潟大学(新潟)、2013 年 9 月 10 日

奥村好未、若松純二、西邑隆徳、発色剤無添加食肉製品で形成された水溶性 ZnPP 複合体は製造過程を通して変化しない。北海道畜産草地学会第 1 回大会、北海道大学(札幌)、2012 年 12 月 15 日

Kawazoe, H., Shiraiishi, A., Parolari, G., Nishimura, T. and Wakamatsu, J. Effects of acidifiers, pH and microorganisms on the formation of

zinc protoporphyrin IX in pork homogenate. 58<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, Montreal (Canada), Aug 14 2012

川添穂高、白石阿紀子、若松純二、西邑隆徳、酸の種類、pH および微生物が亜鉛プロトポルフィリン IX 形成に及ぼす影響。日本畜産学会第 115 回大会、名古屋大学(名古屋)、2012 年 3 月 28 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若松 純一 (WAKAMATSU, JUN-ICHI)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：3 0 3 4 4 4 9 3