

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06356

研究課題名(和文) ZnPP形成能の高い微生物を用いた食肉製品の色調改善技術開発

研究課題名(英文) Development of color improvement technique of meat products by using bacteria with high ZnPP-forming ability

研究代表者

若松 純一 (Wakamatsu, Jun-ichi)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：30344493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛プロトポルフィリンIX (ZnPP)は発色剤無添加生ハム等で無菌的に形成される鮮赤色素だが、微生物によっても産生される。食用グレードのZnPP形成微生物を探索したところ、多くの微生物は嫌気的条件下でのみZnPPを形成したが、好気的条件下でも多量のZnPPを産生する乳酸菌を見出した。ドライソーセージに接種したところ、色調改善効果に優れていることが確かめられた。形成機構を検討したところ、食肉中の酸素で阻害される段階をバイパス的に補う効果を有することが示唆されたが、食肉内では当該乳酸菌の生育中の代謝作用が必要であることと、迅速に生育させて優勢になるような製造条件が必要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発色剤はボツリヌス菌の生育抑制や風味の醸成、不快酸化臭の抑制など様々な効果があるが、酸性条件下でアミンやアミド類と反応してN-ニトロソ化合物などの発がん性物質を形成することから、発色剤を嫌う消費者が存在する。伝統的乾塩漬生ハムで特異的に形成される亜鉛プロトポルフィリンIX (ZnPP)は安定で鮮やかな赤色素であり、発色剤を使用しない無塩漬食肉製品の色調改善に期待でき、発色剤の危険性を危惧する消費者にも安心な食肉製品の提供を可能とする。

研究成果の概要(英文)：Zinc protoporphyrin IX (ZnPP) is a bright red pigment that is formed aseptically in nitrite/nitrate-free dry cured ham and some microorganisms can produce ZnPP. We searched for food-grade ZnPP-forming microorganisms from various sources and found lactic acid bacteria that produced large amounts of ZnPP even under aerobic conditions, although most microorganisms formed ZnPP only under anaerobic conditions. When inoculated into dry sausage, it was confirmed that it was excellent in improving the color. Examination of the ZnPP-forming mechanism suggested that it has the effect of bypassing the step inhibited by oxygen in meat, but that metabolic action during the growth of the lactic acid bacteria in meat is necessary, and that production conditions that allow rapid growth and dominance are necessary.

研究分野：食肉科学

キーワード：食肉製品 色 亜鉛プロトポルフィリンIX 微生物 細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イタリアのプロシュート・ディ・パルマ(パルマハム)などのある種の伝統的に長期熟成した乾塩漬食肉製品では、発色剤を一切使用していないにも関わらず、安定かつ鮮やかな赤色を呈しており、加熱しても褐色化せず、赤色を呈したままである。我々は、この色調は発色剤を用いた食肉製品に存在するニトロシルミオグロビンによるものではなく、亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) と呼ばれるヘムの鉄が亜鉛に置換したものが多量に形成されて、パルマハムの特徴的な色調に寄与していることを明らかにした。また、実験系を構築して食肉内での形成機構を明らかにしてきた。一方、その形成機構解明の一環で、食肉製品中での ZnPP の形成は微生物が関与していないことを明らかにしたが、混入した微生物の中には ZnPP の形成を著しく促進するものも見出した。しかし、それらの微生物は品質劣化に関与する有害細菌であり、食品への応用はできない。ZnPP 高産能を有する食用微生物を利用することによって、発色剤使用による発がん性のニトロソアミン形成の懸念を払拭し、かつ色調の良い食肉製品の開発が可能となるかもしれない。

### 2. 研究の目的

本研究では、様々なものから ZnPP 形成能を指標に細菌を幅広く探索し、得られた高 ZnPP 産生細菌を用いて、発色剤無添加でも色調の好ましい発酵乾燥食肉製品の製造法を開発する。ZnPP 形成促進効果を明らかにして、今後の選抜のための基礎的情報を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (ア) 高 ZnPP 産生能を有する可食細菌の探索

様々な発酵食品や、様々な環境中の常在微生物などから細菌を分離、または微生物株の分譲機関などから入手した細菌について、我々の構築した無菌豚肉 ZnPP 形成モデルを用いて ZnPP 産生能を評価した。細菌分離については、ソーセージなどの食肉製品での加工を考慮して、加塩(食塩 3%)して pH 5.5 に調整した標準寒天培地に播種して、嫌氣的・好氣的条件下で増殖する細菌から選抜した。増殖したコロニーはニュートリエント培地で増殖したものを、標準寒天培地に播種してコロニーの均一性を確認した。分離した候補乳酸菌株または分譲菌株を、細菌のコンタミネーションがないように無菌下で調製した非加熱肉の懸濁液に播種して、嫌氣的にインキュベートした後、形成した ZnPP を 75%アセトンで抽出して蛍光強度で評価した。さらに、分離細菌が食肉の色調に及ぼす影響を調べるために、塩を含む無菌豚挽き肉に接種してインキュベートし、乳酸菌による ZnPP 形成能を評価した。高い ZnPP 形成能を有する分離細菌においては、16S rRNA を PCR で増幅後、遺伝子シーケンシング(外部受託)による全長配列から菌種を同定した。食歴がない細菌については候補から除外し、食歴が確認された乳酸菌のみを選抜した。

#### (イ) 高 ZnPP 産生細菌を用いた発酵乾燥食肉製品の開発

選抜した乳酸菌の色調改善能を検証するために、無菌加塩豚挽き肉に接種して真空包装し、インキュベート後の色調を評価して絞り込みを行った。その後、赤肉と食塩のみからなるシンプルなドライソーセージを用いて、絞り込まれた高 ZnPP 形成で色調改善効果を有する乳酸菌を接種して製造し、発色剤添加区を対照として製品の色調を中心に評価した。一般的なイタリアのサラミソーセージの製法を基本とし、様々な乾燥熟成を行い、ZnPP 形成に違いが見られるか検討した。

#### (ウ) 選抜乳酸菌の高 ZnPP 産生能のメカニズム解明

選抜した乳酸菌の中に、製品全体を著しく色調改善させる菌株を見出した。予備試験より、選抜した ZnPP 形成乳酸菌は好氣的に ZnPP を形成させ、食肉中の何らかの成分が不可欠であることが示唆された。そこで、食肉成分を様々な方法で分画したもの、およびそれらを組み合わせたものを、高 ZnPP 形成乳酸菌とともに又は添加しないで培養して、微生物による ZnPP 形成に必要な成分とその形成メカニズムを検討する。分画した画分は加熱やブランチング(酵素活性失活)を行い、形成メカニズムの解明を行った。また、ドライソーセージにおいて、製造条件により、ZnPP 形成による色調改善効果が見られないことがあるため、その原因についても検討した。

### 4. 研究成果

様々な食品および環境からのサンプルから、食塩を 3% 添加して pH 5.5 に調整した培地を用いて、好氣的・嫌氣性条件下で培養してスクリーニングを行った。分離した 450 コロニーから、亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) 形成能を指標として、69 株の ZnPP 形成細菌を得た。さらに、36 株が酸産生菌であり、16S rRNA シーケンシングにより 25 株が乳酸菌であることが確認された。重複した種を排除した 13 株を高 ZnPP 形成乳酸菌として以降の実験に供した。高 ZnPP 形成乳酸菌が食肉の色調に及ぼす影響を調べるために、塩を含む無菌豚挽き肉に接種してインキュベートし、乳酸菌による ZnPP 形成能を評価したところ、全ての乳酸菌が ZnPP を形成した。

しかし、分離・選抜した5株(略称とする:LC、LLC、LL、LP、EF)ではZnPPの自家蛍光が強く、明るい赤色を呈したため、食肉製品の色を改善するための有望な候補として選抜した。次に、5つの高ZnPP形成乳酸菌を用いて、亜硝酸塩を含まないドライソーセージを製造し、ZnPP形成との関係を検討した。乳酸菌接種ソーセージでは、対照群と比較して乳酸菌数と酸度が有意に増加して色調を改善した。LCとLPを接種したソーセージでは内部は赤色を示したが、表層部は茶色を示した。しかし、LLCとLLを接種したソーセージでは内部だけでなく表層部も鮮赤色を示し、LLCを接種したソーセージの色調は、亜硝酸塩添加群の色調に近かった。さらに、表層部の明るい赤色は、LLCによるZnPPの好氣的形成のために改善された。本研究でスクリーニングされたLLCは、嫌氣的だけでなく好氣的にもZnPPを形成することが示され、LLCを使用することにより乾塩漬食肉製品の製品全体の色調を改善できることが示唆された。

好氣的条件下でも亜鉛プロトポルフィリンIX(ZnPP)を形成でき、表層部を含む発酵ドライソーセージ全体の色調を改善できる乳酸菌LLCについて、実用化に向けた各種要因、並びに好氣的条件下での形成機構を検討した。低温での乾燥を行わず高温熟成を行ったドライソーセージでは、LLC添加区では無添加区に比べてZnPP量が増加し、最終製品の断面全体は鮮やかな色調となった。ZnPP量は初めの1週間で最も上昇し、その後はほぼ一定の値となった。同様に、前駆物質であるプロトポルフィリンIX(PPIX)量の上昇も見られた。一方で、低温熟成で製造を行った場合、無添加区とLLC添加区間でZnPP自家蛍光強度および色調に差はなく、乳酸菌添加による効果は見られなかった。表面のネットや雑菌の増殖を防止する目的で予め低温乾燥を7日間行ったところ、高温熟成を経ても断面全体もしくは外側部分でZnPP形成が促進されなかった。以上より、乳酸菌LLC発酵ドライソーセージにおいてZnPP形成促進による色調改善を行うためには熟成初期の温度と菌の状態が重要であることが示唆された。LLCの好氣的条件下でのZnPP形成機構については、ヘムから脱鉄して亜鉛を挿入するという経路が同じであったことと、肉中の関与する酵素によって阻害されること、嫌氣的条件下ではより一層産生することから、LLCは肉中の好氣的ではZnPP形成できないプロセスをバイパス的に補うことにより、ZnPPを酵素の影響に関係なくZnPPを産生させることが示唆された。

実用化に向けた各種要因の調査、ならびにLLCによる好氣的条件下での形成機構を検討した。上述のように、熟成初期に低温乾燥を行った後に熟成を開始するとLLCを添加したドライソーセージでもZnPPの形成は促進されなかったが、無菌豚棘下筋ホモジネート中では低温静置によってLLC添加によるZnPP形成促進は阻害されなかったことから、ドライソーセージ中では低温乾燥中に他の菌が優勢になったためにLLCが生育しにくくなっていることが原因であると考えられた。ドライソーセージ中でのLLCによるZnPP形成促進要因について、内側部分では、LLCの酸の産生によってpHが低下し、ミオグロビンの分解が促進されたことがZnPPの形成に大きく関与していることが示された。さらに、LLCは嫌氣的条件下で複数のZnPP形成促進機構を持ち、菌体沈澱画分やLLCの分泌物もZnPP形成促進が可能であることが示唆された。好氣的条件である外側部分では、LLCの生育中の代謝作用によって、ZnPP形成が促進されることが明らかになった。以上より、LLCはZnPP形成能に優れて色調改善効果が期待されるが、ドライソーセージ中でZnPP形成を促進するためにはLLCによる酸の産生と生育中の代謝作用が重要であり、LLCがドライソーセージ中で優勢になるような製造条件を検討する必要があることが明らかになった。

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 Kausar-Ul-Alam Md., Hayakawa Toru, Kumura Haruto, Wakamatsu Jun-ichi	4. 巻 176
2. 論文標題 High ZnPP-forming food-grade lactic acid bacteria as a potential substitute for nitrite/nitrate to improve the color of meat products	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Meat Science	6. 最初と最後の頁 108467 ~ 108467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.meatsci.2021.108467	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 Kausar-Ul-Alam Md., Toba Yu, Hioki Shoji, Hayakawa Toru, Kumura Haruto, Wakamatsu Jun-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Lactococcus lactis subsp. cremoris Produces Zinc Protoporphyrin IX Both Aerobically and Anaerobically and Improves the Bright Red Color of Fermented Meat Products	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 1583 ~ 1583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods9111583	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 1件）

1. 発表者名 山之内海映、早川徹、玖村朗人、若松純一
2. 発表標題 乳酸菌発酵ドライソーセージにおける亜鉛プロトポルフィリンIX形成と色調に及ぼす各種要因の影響
3. 学会等名 日本食肉科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Yamanouchi, H. Masumo, Y. Toba, T. Hayakawa, H. Kumura, J. Wakamatsu
2. 発表標題 Effects of manufacturing conditions on zinc protoporphyrin IX formation in fermented dry sausage with Lactococcus lactis subsp. cremoris GB(A)-1
3. 学会等名 68th International Congress of Meat Science and Technology（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 乳酸菌を含有する亜鉛プロトポルフィリンIX形成剤、並びにこれを用いた加工食品の色調改善方法及び製造方法	発明者 若松純一 他	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2022-028150	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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