

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22580311

研究課題名（和文）

高機能発酵食肉製品の開発研究

研究課題名（英文）

Development of Functional Fermented Meat Products

研究代表者

六車 三治男（MUGURUMA MICHIO）

宮崎大学・産学・地域連携センター・研究員

研究者番号：50091369

研究成果の概要（和文）：機能性を有し日本人に受け入れられる発酵食肉製品はあまり開発されていない。そこで、欧州の発酵ソーセージ類から乳酸菌の選別を試み、亜硝酸および食塩耐性を有する菌株を見出した。さらに、それら菌株の種を同定し、高い食肉タンパク質分解能をもつ乳酸菌を用いて高機能発酵食肉製品の製造を試みた。その結果、食塩・亜硝酸耐性が見られた全 60 菌株中、発酵食肉製造に有望な *Lactobacillus (L.) sakei*、*L. curvatus* 種は、*L. sakei* が 2 株 (No.3、No.23)、*L. curvatus* が 1 株 (No.28) 存在した。これら 3 株のうち、*L. sakei* No. 23 と *L. curvatus* No.28 に高い筋肉タンパク質ミオシン B の分解性が見られた。この 2 株をそれぞれ用いて製造した製品は、コントロールに比べ、乳酸菌の増殖や pH 低下が見られ、大腸菌群などの汚染も抑制された。これらの製品は、筋原線維タンパク質の分解に伴う機能性ペプチドや遊離アミノ酸の増加、高い抗酸化活性と血圧上昇抑制作用も認められ、官能評価でも高い評価をうけた。

研究成果の概要（英文）：We screened suitable lactic acid bacteria (LAB) strains for use in functional fermented meat products by analyzing European fermented sausages with 60 probiotic LAB strains. *Lactobacillus (L.) sakei* strain No. 23 and *L. curvatus* strain No.28 were selected because of their effects on pH, lactic acid production and degradation of myosin B after fermentation of meat protein. They were salt and nitrite-resistant strains which are indispensable for manufacture of meat products. Then, we prepared fermented sausages by utilizing *L. sakei* strain No. 23 or *L. curvatus* strain No.28. Analyses of fermented sausages revealed that lactic acid numbers increased and production of coliform bacillus repressed. SDS-PAGE results suggest that meat protein in fermented sausages has been hydrolyzed. Many bioactive peptides and amino acids were generated from fermented sausages. These fermented sausages showed the high antioxidant and antihypertensive activity, and acceptable sensory quality characteristic.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：食肉、発酵、乳酸菌、機能性、血圧上昇抑制、抗酸化活性、嗜好性

1. 研究開始当初の背景

畜産食品の消費量は、ここ半世紀の間に急増したが、これは、我が国が世界まれな長寿国となった理由の一つと考えられている。一方、日本社会のライフスタイルの変化に伴い、生活習慣病が増加し、国民の健康への関心は極めて高くなっている。このような国民の健康志向に合わせて、現在、多くの機能性食品が開発されている。特に、乳を用いた機能性乳製品が多く開発されているが、食肉を用いた食品に関しては機能性を有する製品が開発されていないのが現状である。しかし、食肉は良質なタンパク質を多く含んでおり健康や長寿には不可欠な食品であり、最近食肉にも健康に寄与する機能が存在することが明らかになってきた。既に我々は、食肉に含まれるペプチドに ACE 阻害活性があり、動物実験において血圧降下作用や II 型糖尿病予防作用を示す結果を得ている。このような背景から、これからの高齢化社会に向けて、健康維持に寄与する機能性を強化した高品質・高機能食肉製品を開発することは極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究は先の背景をもとに、良質なタンパク質等を多く含む食肉を発酵させることにより、高い機能性を有し、日本人の食味性にも合う発酵食肉製品の開発を行うことが、本研究の目的である。そこで、欧州の発酵ソーセージ類から乳酸菌の選別を試み、食塩・亜硝酸耐性を有する菌株を見出し、それら菌株の種を同定し、高い食肉タンパク質分解能をもつ乳酸菌株を用いて、高機能発酵食肉製品の製造を試みた。

3. 研究の方法

(1) 発酵食肉製品製造のための有用微生物の検索と大量培養

実験材料として、イタリアから調達したガローニプロシュート、ビラーニサンダニエレプロシュート、スモークパンチェッタ、ミラノサラミ、ナポリサラミと、スペインから調達したコッパエスプーニアハモンセラーを使用した。

① 微生物の分離と同定

試料を細切し、滅菌生理食塩水を加えホモジナイズした溶液を MRS 寒天培地、M17 寒天培地にそれぞれ塗抹した。30℃で培養後、炭酸カルシウムの溶解に伴うハロを形成したコロニーを新しい寒天培地に画線し、培養

を行ない純化した。さらに、グラム染色、カタラーゼ・オキシダーゼ試験や糖資化試験を行い、既存のデータベースを用いて解析し、微生物の菌種の同定を行なった。

② 食塩耐性・亜硝酸耐性の測定

分離・同定を行なった微生物の、食塩・亜硝酸耐性を 2%NaCl 入り培地および 0.03% 亜硝酸 Na 入り培地を用いて測定した。供試乳酸菌を MRS もしくは M-17 液体培地で、30℃で 72 時間培養した。その間、経時的に培地から無菌的に菌液を取り濁度 (A660nm) を測定した。

生存率は以下の式に当てはめて算出した。

生存率(%)=(試験培地の吸光度) / (対照培地の吸光度)×100

③ 16s リボソーム DNA をターゲットにした分離乳酸菌種の同定

24 時間培養した菌液をビーズ入りチューブに移しビーズ破碎を行なった。破碎後の菌液から定法に従い DNA を抽出した。PCR 終了後電気泳動を行い、500 base pair 付近に DNA のバンドができていることを確認後、PCR により増幅された DNA を精製し、シーケンス反応を行なった。シーケンス反応終了後、ABI PRISM 310 genetic analyzer により塩基配列を読み取った。得られた塩基配列の相同性を MicroSeq ID analysis software version 2.0 を用いて解析した。

④ ミオシン B の乳酸菌による分解能の測定

ミオシン B に乳酸菌を添加し、30℃で 5 時間反応後、TCA を添加してタンパク質を変性させ、遠心分離によりそれを沈殿させて上清をローリ法(A660nm)により測定した。

⑤ *L.sakei* と *L.curvatus* の大量凍結乾燥粉末の作製

スターターカルチャーとして用いるために選抜した乳酸菌を MRS 液体培養液に 1% 添加し、30℃で 48 時間培養を行なった。培養液を遠心分離後、沈殿画分を集め PBS 溶液により 3 回洗浄後、ステンレス製のバットに移し、-80℃で凍結後、凍結乾燥した。

(2) 有用乳酸菌を用いた発酵サラミソーセージの調製と生理機能解析

① 発酵サラミソーセージの製造

原料として牛モモ肉(65%)、豚モモ肉(31%)、豚脂肪(4%)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、乳酸菌を原料肉に対して 10⁶cfu/g 以上になるように添加した。なお、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。

恒温恒温乾燥器を用いて、3 日間は 20℃湿度 98~100%で、3 日~12 日までは 18℃湿度 90%で、12 日~21 日までは 18℃湿度 80%の条件で、乾燥および発酵を行った。

② SDS-PAGE による発酵食肉製品中のタンパク質分子種の変化

乳酸菌による発酵食肉製品中のタンパク質成分の分解の程度を調べるため、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を Laemmli の方法で行った。アクリルアミド濃度 10~20%のグラジエントゲルを用いてスラブ型の電気泳動装置で行った。

③ DPPH ラジカル消去活性の測定

細切した試料を、80%エタノールで希釈し、ホモジナイザーを用いて均質化後、遠心分離した上清を分析試料とした。その試料を用いて DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 分光測定法により、抗酸化活性を求めた。検量線は 0.2 mM Trolox 溶液を用いて作成し、発酵食肉製品の抗酸化作用を概知の抗酸化物質である Trolox 相当に換算した。

④ アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性の測定

各試料に超純水を添加し、均質化後遠心分離した上清を試料とした。ACE 阻害活性は、Cushman らの方法に準じて、ACE、HHL を用いて、228 nm の吸光度を測定した。阻害率はサンプルを加えた吸光度を S、サンプルの代わりに超純水を加えた時の吸光度を C、あらかじめ ACE を失活させてから反応させた時の吸光度を B として次式より求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (C-S) / (C-B) \times 100$$

⑤ 遊離アミノ酸含量の測定

遊離アミノ酸含量は、2%スルホサリチル酸にて発酵ソーセージから抽出し、遠心分離後の上清をフィルターろ過した試料をアミノ酸自動分析機 (JLC-500) にて測定した。

4. 研究成果

(1) 発酵食肉製品製造のための有用微生物の検索

まず、ヨーロッパから調達した製品 7 種類の製品の生理活性機能の調査を行なった。いずれの製品も豚肉を原料とし、水分活性が 0.95 未満の製品である。生理活性機能の指標

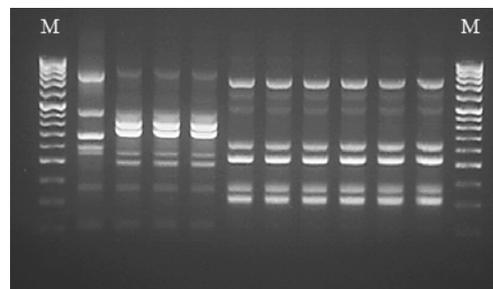
として抗酸化活性および ACE 阻害活性を求めたところ、7 種類の製品はいずれも高い抗酸化活性および ACE 阻害活性を保持していた。特に、スモークパンチェッタには非常に優れた抗酸化活性が認められた。

これらの製品から微生物 77 菌株を分離し、それらの中で食塩および亜硝酸存在下での生存率 50%以上の耐性をもつ微生物を 60 菌株選抜した。その結果、特にスモークパンチェッタから 33 菌株が分離できた。

次に、食塩・亜硝酸耐性が見られた 60 菌株を 16srDNA の配列から同定した。その結果、*Staphylococcus (S) epidermidis* が最も多く(47%)、ついで *Enterococcus (E) faecalis* が多く(34%)検出された。また、*S. hominis* がわずかに(2%)検出された。*Lactobacillus (L)* 属の菌種として *L. sakei* および *L. curvatus* がそれぞれ 7%および 10%検出された。これらの菌種は発酵食肉製品の製造で良く使われる菌種である。そこで、*L. sakei* または *L. curvatus* と同定された菌株を以降の実験に供した。*L. sakei*、*L. curvatus* 種に属する菌株は、すべてスモークパンチェッタから分離された。

次に、*L. sakei* および *L. curvatus* と同定された菌株の菌種の同定を RAPD 解析により行った。

まず、プライマー1 を用いた解析データを下図に示した。

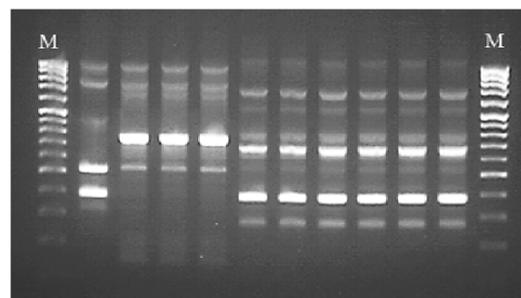


ID 3 4 10 23 7 8 14 25 27 28

L. sakei

L. curvatus

さらに、プライマー2 を用いた結果を下図に示した。



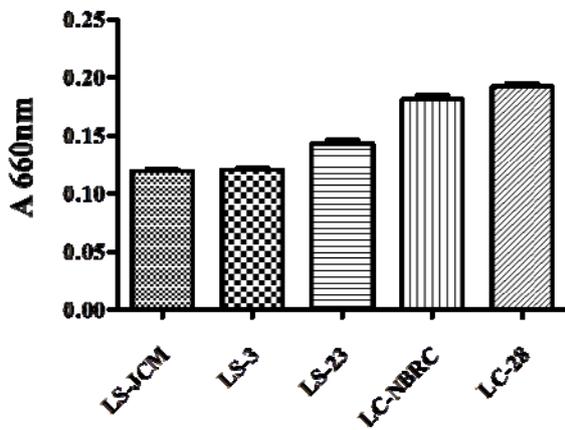
ID 3 4 10 23 7 8 14 25 27 28

L. sakei

L. curvatus

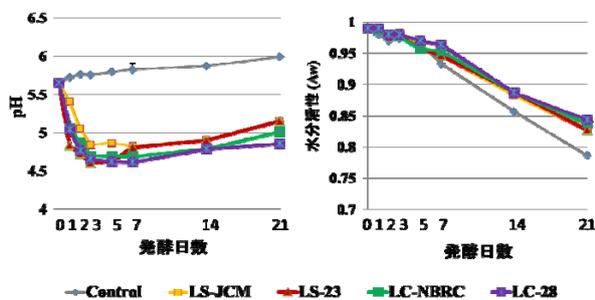
その結果、*L. sakei* のでは 2 種類のプライマーで Lane 3 の DNA パターンは Lane 4~23 と異なった。一方、*L. curvatus* では 2 種類のプライマーで、すべて同じ DNA パターンを示した。このことより、*L. sakei* グループでは 2 種類の菌株が存在し、*L. curvatus* グループではすべて同じ菌株であることが示唆された。そこで、*L. sakei* からは赤の数字で示した No.3 と No.23 を *L. curvatus* からは No.28 の菌株を筋肉タンパク質の分解実験に供することにした。なお、標準株として *L. sakei* JCM 株と *L. curvatus* NBRC 株を選択し、合計 5 種類の菌株を筋肉タンパク質ミオシン B の分解に用いた。

食肉の筋肉構造タンパク質を液状化したミオシン B のこれらの乳酸菌による分解性を測定して得られた結果を下図に示した。



これらの結果から、各種乳酸菌株が有するタンパク質分解酵素により分解されて遊離したペプチドやアミノ酸の程度を推測できる。今回分離した菌株では *L. sakei* NO.23 (LS-23) と *L. curvatus* No.28 (LC-28) が高いミオシン B 分解活性を示した。そこで、これら 2 つの乳酸菌を標準株の LS-JCM と LC-NBRC と共に、発酵ソーセージ製造に使用する乳酸菌として選別した。

各種乳酸菌を用いて製造した製品の pH および水分活性の経時変化を下図に示した。

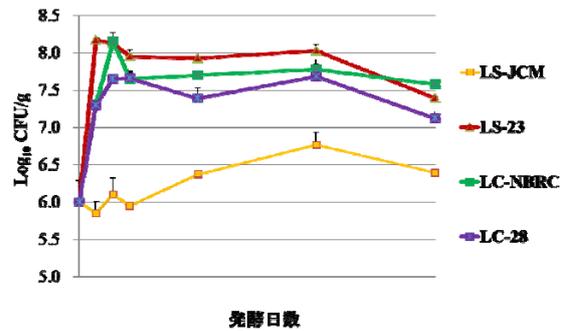


乳酸菌無添加のコントロールの pH 低下は認められなかったが、それぞれの乳酸菌を添

加して発酵させると急速な pH の低下が生じた。特に、LS-23、LC-NBRC および LC-28 を用いた製品は良好な pH 低下を示した。

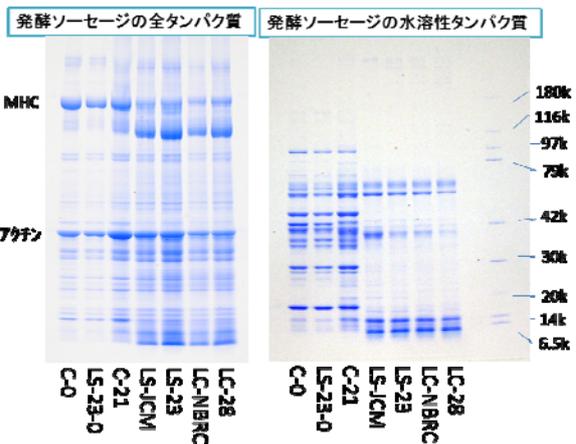
水分活性は、微生物的安全性の点からできる限り速やかに 0.93 以下に低下させることが望ましいとされている。今回の熟成条件では、水分活性は 10 日後には 0.91 以下に 14 日後には 0.85 未満にまで低下し、微生物的安全性は十分に確保された。

各製品の乳酸菌数の経時変化を下図に示した。



pH のデータにも対応するように発酵開始後 LS-23 および LC-28 を用いた製品は乳酸菌数が良好に増殖した。製造工程でも $10^7 \sim 10^8/\text{g}$ レベルの菌数が維持されていた。また、大腸菌群の成育も完全に抑制された。これらのことより、LS-23 および LC-28 を用いた製品では、製品中で乳酸菌が急速に増殖し、その後生菌数を維持することが確認された。

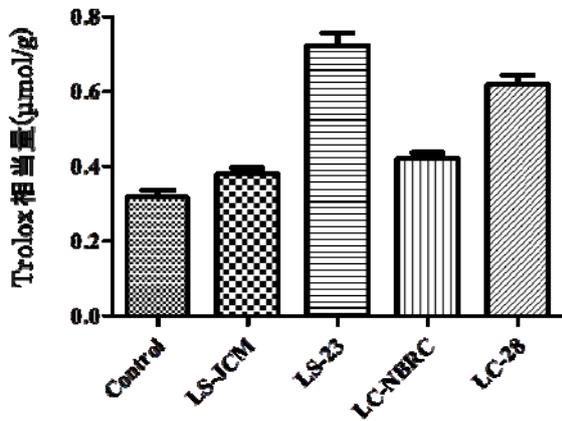
各発酵ソーセージ中の筋肉タンパク質の分子種の変化を下図に示した。



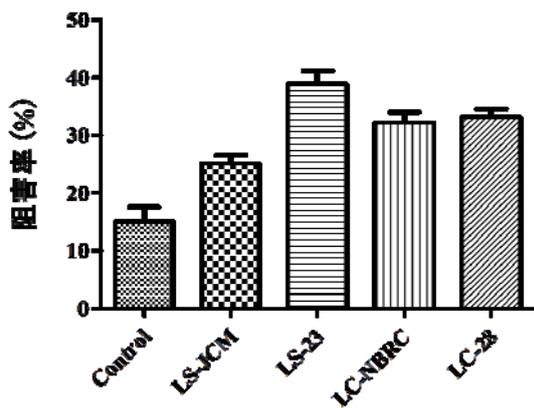
発酵前の乳酸菌無添加 (C-0) および乳酸菌添加直後のサンプル (LS-23-0) では筋肉構造タンパク質 (全タンパク質) および水溶性タンパク質に変化は認められなかった。しかし、21 日間熟成すると、乳酸菌無添加 (C-21) の製品ではほとんどそれらのバンドの変化は認められなかったが、乳酸菌を添加して乾燥・発酵をさせると (LS-JCM, LS-23, LC-NBRC, LC-28)、ミオシン重鎖 (MHC) の

低分子化や水溶性タンパク質の分解も認められ、機能性ペプチドの発現が予想された。

DPPH 分光測定法を用いた抗酸化活性の測定結果を下図に示した。その結果、LC-23 および LC-28 を用いた製品が非常に高い抗酸化活性が認められた。



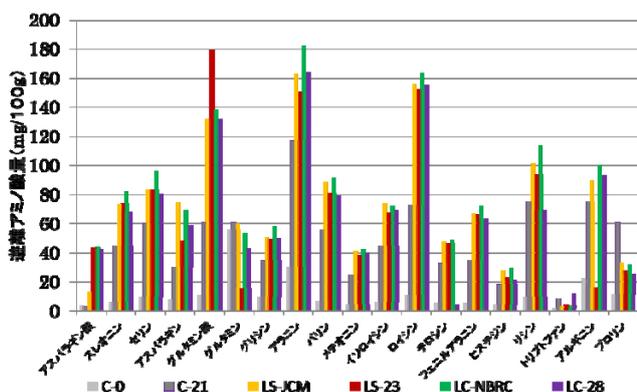
一方、ACE 阻害活性は下図のようになり、LC-23、LC-NBRC、LC-28 を用いた製品が高い ACE 阻害活性を示した。



これらの結果から、LS-23 および LC-28 の乳酸菌を使用して調製した製品は高い抗酸化活性と血圧上昇抑制効果を有する発酵食肉製品であると考えられた。

各発酵ソーセージ中の遊離アミノ酸量を下図に示した。

乳酸菌無添加の製品(C-0)は 21 日間熟成させても(C-21)、遊離アミノ酸量は極めて少ないが、乳酸菌を添加すると、21 日間の発



酵・熟成により遊離アミノ酸が顕著に増加した。LS-23 を添加した製品では、うま味を呈するグルタミン酸が顕著に増加し、グリシンやアラニンなどの呈味性アミノ酸も増加した。さらに、バリン、イソロイシン、ロイシンなどの分岐鎖アミノ酸の増加も観察された。一方、LC-28 を添加した製品では、同様に呈味性アミノ酸も増加し、他の製品に比較して、苦みを呈するアミノ酸のリシンが少ない傾向が認められた。

発酵ソーセージの官能評価では、LS-23 を用いた製品は酸味の強さが特に強調された製品であり、LC-28 を用いた製品は、香りや酸味が好ましく、良好な食感からも高い総合評価を受けた。両製品ともに、呈味性の遊離アミノ酸の量比が官能評価に強く影響したものと考えられた。

以上の結果から、これら 2 株の乳酸菌を併用して製造すると、抗酸化活性や血圧上昇抑制効果と嗜好性をさらに高めた製品の製造が可能であると考えられる。

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 16 件)

①A.M. Ahhmed, M. Muguruma: A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat Sci.*, 86(1), 110-118, (2010). (査読有り)

②K. Saito, N. Hamada-Sato, A.M. Ahhmed, S. Kawahara, M. Muguruma: Effects of osmotic dehydration sheets on freshness parameters of thunnus thynnus stored at cold temperatures. *J. Food Process. Preserv.*, 34(6), 1103-1120, (2010). (査読有り)

③S. Takeda, Y. Yamasaki, M. Takeshita, Y. Kikuchi, C. Tsend-Ayush, B. Dashnyam, A.M. Ahhmed, S. Kawahara, M. Muguruma: The investigation of probiotic acid bacteria isolated from traditional Mongolian dairy products. *Anim. Sci. J.*, 82(4), 571-579 (2011). (査読有り)

④S. Takeda, M. Takeshita, Y. Kikuchi, B. Dashnyam, S. Kawahara, H. Yoshida, W. Watanabe, M. Muguruma, M. Kurokawa: Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products against influenza infection in mice: Alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity.

Inter. Immunopharmacol., 11, 1979-1983, (2011). (査読有り)

⑤ M. Muguruma, A.M. Ahmed, S. Kawahara, K. Kusumegi, T. Hishinuma, K. Ohya, T. Nakamura. : A combination of soybean and skimmed milk reduces osteoporosis in rats. *J. Funct. Foods*, 4(4), 810-818, (2012). (査読有り)

⑥井上尚典、浜崎敦子、日高修二、三浦直良、深堀勝博、丸山眞杉、河原 聡、太田良一、六車 三治男：ブタ肝臓水解物の成分分析と抗酸化活性およびアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性の検討. *薬学雑誌*, 133(1), 107-115, (2013). (査読有り)

⑦井上尚典、日高修二、三浦直良、山田 耕太郎、深堀勝博、丸山眞杉、河原 聡、太田良一、六車 三治男：メタボリックシンドロームモデルラット(SHR/NDmcr-cp)における肝臓水解物の血糖に及ぼす影響. *薬学雑誌*, 133(1), 177-123, (2013). (査読有り)

⑧S. Takeda, R. Fujimoto, S. Takenoyama, M. Takeshita, Y. Kikuchi, C. Tsend-Ayush, B. Dashnyam, M. Muguruma, S. Kawahara : Application of probiotics from Mongolian dairy products to fermented dairy products and its effects on human defecation. *Food Sci. Technol. Res.*, 19(2), 245-253 (2013). (査読有り)

その他査読有りの英文論文5編および和文論文3編

[学会発表] (計20件)

①M. Muguruma. A review of meat protein hydrolysates and hypertension. 56th International Congress of Meat Science and Technology. (招待講演) (Jeju, South Korea) 2010年8月20日

②松藤 久、秋吉亮佑、竹田志郎、河原 聡、六車 三治男 高機能発酵食肉製品製造のための乳酸菌の選別 第114回日本畜産学会大会 (北里大学十和田キャンパス) 2011年8月26日

③久保田 大樹、河原 聡、六車 三治男 アミノ酸および食肉タンパク質酵素分解物の抗酸化活性機序 第114回日本畜産学会大会 (北里大学十和田キャンパス) 2011年8月26日

④松藤 久、秋吉亮佑、竹田志郎、河原 聡、六車 三治男 高機能発酵食肉製の製造に関する研究 日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会 (宮崎大学) 2011年9月17日

⑤六車 三治男 竹田志郎、竹之山 慎一、河原 聡、中出浩二、沼田正寛、小齊喜一 嗜好性に富む高機能発酵食肉製品製造の試み 第116回日本畜産学会大会 (安田女子大学広島市) 2013年3月30日

[図書] (計2件)

①六車 三治男 「食肉用語事典 (新改訂版)」日本食肉研究会編 532頁 分担 全ページにわたる 食肉通信社 2010年3月

②六車 三治男 「新しい食品加工学 (食品の保存・加工・流通と栄養)」小川 正、的場輝佳編 212頁 分担「畜産物の加工 (食肉類) p72-78」南江堂 2011年1月

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称：高純度ヘパリンおよびその製造方法
発明者：六車 三治男、村田浩二
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2010-205310
出願年月日：2010年9月14日
国内外の別：国内

②名称：高純度ヘパリンおよびその製造方法
発明者：六車 三治男、村田浩二
権利者：同上
種類：特許 (国際出願)
番号：特願 PCT/JP2011/070851
出願年月日：2011年12月13日
国内外の別：国外

○取得状況 (計1件)

①名称：アンギオテンシン変換酵素阻害ペプチド
発明者：片山員典、府中英孝、杉山雅治、六車 三治男
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第 4429031 号
取得年月日：2010年3月10日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

六車 三治男 (MUGURUMA MICHIO)
宮崎大学・農学部・教授
(2012年3月まで)
宮崎大学・産学・地域連携センター・
産学官連携研究員(2012年4月から)
研究者番号：50091369

(2) 研究分担者

河原 聡 (KAWAHARA SATOSHI)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号：30284821