



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the color improvement of meat products using LAB that form ZnPP aerobically and the formation mechanism [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Alam, Md. Kauser-UI
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14370号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81080
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Md_Kauser_UI_Alam_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 Md. Kauser-Ul-Alam

学 位 論 文 題 名

Studies on the color improvement of meat products using LAB that form ZnPP aerobically and the formation mechanism

（好氣的に ZnPP を形成する乳酸菌を用いた食肉製品の色調改善技術と
そのメカニズムに関する研究）

亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) は、発色剤を含まない非加熱食肉製品で形成される鮮赤色素である。これまでの *in vitro* 実験系の結果から、食肉製品中の ZnPP の形成は微生物ではなく、食肉固有の機構が関与すると報告されている。一方、食肉中の ZnPP 形成を促進する細菌の存在も報告されたが、分離・同定された細菌は食用には適さなかった。そこで本研究では、食経験が豊富な乳酸菌の中に、食肉製品中に大量の ZnPP を形成し、色調改善に役立つ可能性があるという仮説を立て、様々なものから ZnPP 形成能の高い乳酸菌の単離を行い、発色剤の代替として食肉製品の色調改善効果を検討した。さらに、ZnPP 形成能を有する乳酸菌の ZnPP 形成は、食肉中の ZnPP 形成機構を促進して食肉製品の色調を改善するとの仮説を立て、食肉中の ZnPP 形成に関与する様々な外部・内部要因の影響を調べ、分離・同定された高 ZnPP 形成乳酸菌が食肉中で ZnPP 形成を促進する機構の解明を試みた。

様々な食品および環境からのサンプルから、食肉製品への利用を考慮し、食塩を 3% 添加して pH 5.5 に調整した、改変 MRS 寒天培地および改変 M17 寒天培地を用いて、嫌気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、形態学的形状ならびに、無菌肉モデル実験システムにおける ZnPP 形成能を指標として、69 株の ZnPP 形成細菌を得た。さらに、酸生成能に基づき 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。食歴のある 23 株の特性を評価したところ、ほとんどの菌株は、3% 塩を含む 30℃ の嫌気条件下で最大の増殖を示し、pH 5.5 および 6.5 でも良好に増殖した。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 *Enterococcus faecium* MP-1 (EF)、*Lactobacillus curvatus* FC(A)-1 (LC)、*Lactobacillus plantarum* FS4-2 (LP)、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* GB(A)-1 (LLC)、および *Leuconostoc lactis* SS(A)-1 (LL) の 5 株では 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乾塩漬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、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。

食肉内在性機構や多くの細菌では、嫌氣的条件下でしか ZnPP は形成されないのに対し、本研究で分離・同定された LLC は好氣的条件下でも ZnPP を形成した。そこで、LLC による好氣的な ZnPP 形成機構を解明することを目的に、*in vitro* 実験系を用いて検討した。嫌氣的のみである

が高い ZnPP 形成能が示された LLC を比較対照とした。まず、ZnPP 形成に及ぼす温度、pH、添加物などの外部要因の影響を調べた。LLC による好氣的な ZnPP 形成様相は、37°C と pH 5.5 で最も高かったが、嫌氣的条件下での ZnPP 形成よりも低かった。アスコルビン酸ナトリウムとグルコース添加は ZnPP 形成にあまり影響を及ぼさなかった。また、食塩の添加はわずかに減少したが、ポリリン酸塩では著しく、亜硝酸ナトリウムでは完全に好氣的な ZnPP の形成を抑制した。しかし、いずれも嫌氣的な ZnPP 形成量よりは低く、LC では好氣的条件下では形成しなかった。次に、LLC 自身が好氣的条件下で ZnPP を形成するかどうかを調べるために、ZnPP の重要な前駆体と考えられるヘモグロビン (Hb) とミオグロビン (Mb) を添加した、pH 5.5 に調整した液体培地で検討したが、pH、および外因性の Hb や Mb の存在とは関係なく、ZnPP を形成しなかった。次に、LLC による好氣的 ZnPP 形成に不可欠な食肉成分を絞り込むために、加熱肉ホモジネートを用いた *in vitro* 実験系で検討したが、ZnPP の形成はみられず、未加熱の Hb と Mb を添加しても同様に ZnPP の形成はみられなかった。食肉中の酵素の影響を検討するため、酵素のみを失活させたブランシング処理した食肉を用いたところ、LLC および LC を接種しないと嫌氣的な ZnPP 形成が完全に抑制されたが、LLC による好氣的な ZnPP 形成は維持された。このため、食肉中のブランシング処理で失活する酵素を LLC が補うが、LC のように酸素によって阻害はされないことが示唆された。嫌氣的条件下における ZnPP 形成には、食肉由来ならびに細菌由来のフェロケラターゼ (FECH) の関与が報告されているが、好氣的条件の LLC でも FECH 阻害剤による ZnPP の形成抑制がみられた。食肉を分画して ZnPP 形成に寄与する画分を調べたところ、オルガネラなどを含む不溶性画分は、好氣的条件下での LLC による ZnPP 形成に必須であるが、水溶性 > 10 kDa 画分の存在は ZnPP の形成を増加させた。豚肝臓ミトコンドリアを内膜、外膜およびマトリックスに分画したものを食肉の水溶性画分に加えて、好氣的な ZnPP 形成を検討したところ、LLC を接種したものではミトコンドリア内膜と外膜画分で ZnPP 形成が観察され、両画分ともに FECH の存在が確認された。以上の結果は、FECH を含むミトコンドリアの膜画分が、LLC の好氣的な ZnPP 形成に不可欠であることが示唆された。一方、LLC による好氣的 ZnPP 形成は生菌だけでなく、LLC を除いた培養液の添加によっても増加し、LLC の代謝分泌物に効果がみられた。培養液中の有効成分を検討したところ、限外濾過による低分子量のものや加熱したものでも効果がみられたが、凍結乾燥したものでは好氣的な ZnPP 形成効果が消失した。したがって、LLC の代謝分泌物中の揮発性で熱安定な低分子量化合物が ZnPP 形成の促進効果を有することが示唆された。LLC に由来する FECH と低分子代謝分泌物の両方が、好氣的 ZnPP 形成を支援し、食肉固有の ZnPP 形成機構を促進することが明らかになった。

本研究より、分離した LLC GB(A)-1 株は、酸素の存在下または非存在下の両方で ZnPP を形成し、乾塩漬食肉製品全体の鮮赤色を呈したため、高 ZnPP 形成能を有する LLC は色調改善のための亜硝酸塩/硝酸塩の代替となり得ること、ならびに、LLC 由来の揮発性の低分子代謝分泌物が ZnPP 形成の促進効果を有することが示唆され、微生物が存在しなくても色調改善できる可能性が示された。