

平成23年度

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 30

公益財団法人

伊藤記念財団



## 「伊藤記念財団」設立趣意書

私、伊藤傳三は、昭和3年食肉加工業を創業して以来五十有余年の永きにわたり食肉加工品の製造販売に従事して参ったところであります。

この間、昭和47年からは日本ハム・ソーセージ工業協同組合理事長、社団法人日本食肉加工協会理事長、加えて、ハンバーグ・ハンバーガー協会理事長等の重責を担わせていただく等、業界団体の役員を勤めさせていただいてきたところあります。

こうした中で昭和55年、はからずも勲二等瑞宝章受章という身にあまる榮譽に浴したのでありますが、受章に際し私自身の過ぎ来し方を振り返り、食肉及び食肉加工業界の行く末に思いを致し、2つの事柄を決意致しました。

第1は、食肉加工団体の指導体制の若返りであり、

第2は、食肉加工業の基礎的研究の充実であります。

諸情勢が激しく変わりつつある中で食肉加工業界をさらに大きく発展させるには、新しいリーダーの登場が望ましいことは論をまちません。また、食肉加工品については、これまでも日本独自の技術開発は行われてきましたものの、いずれも企業内技術であると言っても過言でなく、大学等における基礎的研究の不足が将来の日本の食肉加工業の発展を遅らせるおそれがあり、この現状を打破する必要があると考えたところあります。

以上のような基本的考えの下に私は、食肉関係団体等の役員を辞すると共に、食肉及び食肉加工に関する基礎的かつ広汎な研究を行い、あるいは助長するための財団の設立を発起するものであります。

昭和56年6月

設立発起人 伊 藤 傳 三

## Philosophy Behind the Establishment of the Ito Foundation

Approximately half of a century has passed since I established a meat packing corporation for commercial products in 1928. While involved in this business, I have had occasion to serve as chairman of the boards of trustees of several organizations related to the meat industry, such as the Ham-Sausage Industrial Association of Japan in 1972, the Meat Packing Industrial Association of Japan, and the Hamburg-Hamburger Association of Japan.

In 1980, unexpectedly, I was highly honored to receive the Order of the Sacred Treasure, Gold and Silver Star from the emperor in acknowledgment of my contributions to the meat industry and improved human nutrition during my career. This illustrious award provided a strong impetus for me to act on my long-standing concern for the future of meat packing industries.

My commitment to the establishment of a new research foundation for the promotion of meat science was based on two fundamental philosophies : first, leadership of the Association of the Meat Packing Industry should be transferred to people with novel ideas and, second, an advanced system for basic research should be established in meat industries. Clearly, fresh leadership is needed in changing situations for intensive development in the meat packing industry. Although some technical product developments have been achieved in certain individual corporations, the lack of basic research in meat science at universities and other research organizations certainly will impede future development of Japanese meat packing industries. It is urgent to end the stagnation in the meat industry through research support.

On the basis of these philosophies, I myself will resign from any official positions in meat-related associations and will establish a new research foundation to support and promote basic and applied research in meat science.

Denzo Ito, Founder  
June 1981

## 事業のあらまし

### (目的)

本財団は、食肉に関する研究及び調査を行い、もって畜産業及び食品産業の振興と国民食生活の安定に資することを目的とする。

### (事業)

本財団は、上述の目的を達成するため、次の事業を行う。

- (1) 食肉の生産、処理、加工等に関する基礎的研究及び調査。
- (2) 食肉の生産、処理、加工等に関する研究又は調査を行う大学等の研究機関に対する助成。
- (3) 食肉の生産、処理、加工等に関する情報の普及及び広報。

### (事業実績)

回	年度	研究調査助成		研究調査委託	
第1回	昭和57年度	48件	60,000千円	5件	18,097千円
2	58	52	54,400	4	12,064
3	59	60	49,800	7	17,000
4	60	62	48,000	9	18,100
5	61	70	53,000	8	11,681
6	62	79	58,900	2	5,151
7	63	95	70,500	2	2,764
8	平成元年度	86	74,250	3	1,900
9	2	79	60,000	1	500
10	3	70	50,000	1	2,000
11	4	86	60,000	2	5,000
12	5	81	60,000	2	4,000
13	6	81	60,000	3	4,000
14	7	82	65,000	2	2,500
15	8	81	69,100	4	7,000
16	9	78	59,000	3	5,500
17	10	82	60,000	3	6,500
18	11	67	47,000	2	5,000
19	12	57	41,000	2	16,000
20	13	53	37,000	1	9,720
21	14	58	40,000	0	
22	15	55	41,000	0	
23	16	55	48,000	0	
24	17	56	48,000	0	
25	18	11	10,000	0	
26	19	12	10,000	0	
27	20	15	16,900	0	
28	21	11	10,000	0	
29	22	11	10,400	0	
30	23	12	12,000	0	

## ご 挨拶

当伊藤記念財団は、伊藤ハム株式会社の創業者故伊藤傳三による巻頭の「設立趣意書」に掲げた趣意をもって、昭和56年7月3日に財団法人として農林水産大臣から設立を許可され、本年4月1日に公益財団法人伊藤記念財団に移行登記したものであり、事業の内容は、「事業のあらまし」にあるとおりであります。

おかげ様で当財団は、本年度からは公益財団法人として活動することとなり、その活動は本年度で31年となります。この間、当財団の研究調査助成事業の存在が畜産関係の方々の中に浸透いたし、事業内容も逐次充実して参りつつあります。

これは、ひとえに関係各位のご指導ご鞭撻の賜と深く感謝申し上げるとともに、今後とも、食肉加工等の基礎的研究の充実を希う創設者の意志にそって、益々食肉産業ひいては畜産業の振興及び国民食生活の安定のために役立つべく、更に努力を重ねて参りたいと存じております。

本書は、第30回（平成23年度）助成事業における12件の研究調査助成対象研究者の皆様からいただいた研究成果報告をとりまとめたものでありますが、以上の目的にしたがって、食肉産業の基礎的研究等に携わる諸氏の研究の一助ともなれば幸甚でございます。

平成24年11月

理事長 伊 藤 功 一

Dear Sir :

I am very pleased to send you and your organization a complimentary copy of the research reports of the Ito Foundation. This research foundation was founded by the late Mr.Denzo Ito to advance research in meat science. The research reports are published annually. Unfortunately, the articles are largely in Japanese ; however, in the future we hope to contribute to the international development of meat science. Any constructive suggestions or critiques from others involved in meat-related research would be accepted gratefully.

You will find out philosophy behind the establishment of the Ito Foundation described by Mr.Denzo Ito, in the research report of the Ito Foundation, Vol.30 enclosed here. We appreciate any interest you may have in our research efforts.

It is my great pleasure to publish this report as the chief director.

Sincerely yours,  
Nov. 2012  
Koichi Ito  
The chief director  
The Ito Foundation



## 目 次

亜鉛欠乏予防効果を持つ食肉成分の探索とその効果についての食品科学的研究 ..... 神戸 大朋（京都大学大学院生命科学研究所）.....	1
食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討についての研究（Ⅲ） ..... 六車 三治男・久保田 大樹・河原 聡 （名城大学農学部）.....	7
畜産副生物由来（ヘム鉄）摂取によるスポーツ栄養への効果についての研究 一栄養摂取状況の観察による貧血改善の試み一 ..... 松本 恵・鈴木 淳也・勝又 美紀*・長谷川 強*・野口 智博 （日本大学文理学部体育学科，*ILS株式会社）.....	19
低温乳酸発酵による食肉タンパク質の組織構造と加熱ゲル物性に関する研究 ..... 芳賀 聖一・林 利哉 （名城大学農学部）.....	28
糖修飾 LEA タンパク質の利用を基盤とする食肉の新しい凍害防御技術の確立 ..... 本城 賢一・井倉 則之・野間 誠司 （九州大学大学院農学研究院）.....	35
粉末茶による食肉および食肉製品中の糞便系大腸菌群の制御についての研究 ..... 岡崎 貴世（四国大学生生活科学部）.....	42
新規発光デバイスを用いた食肉の質を落とさない殺菌法の開発 ..... 高橋 章・芥川 正武・馬渡 一論・下畑 隆明 （徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）.....	48
食肉製品の調理中に起こるメイラード反応の消長と安全性の検討 ..... 大塚 譲 <sup>1</sup> ・山口 敬子 <sup>2</sup> ・能見 祐理 <sup>1</sup> （ <sup>1</sup> お茶の水女子大学生生活環境教育研究センター， <sup>2</sup> 日本女子大学家政学部食物学科）.....	54
試食パネルによる黒毛和種牛肉の脂肪酸組成，香气成分，呈味成分と食味性との関連に関する研究 ..... 鈴木 啓一 <sup>1</sup> ・横田 祥子 <sup>1</sup> ・塩浦 宏陽 <sup>1</sup> ・飯田 文子 <sup>2</sup> ・ 山田 信一 <sup>3</sup> ・佐久間 弘典 <sup>3</sup> （ <sup>1</sup> 東北大学大学院農学研究科， <sup>2</sup> 日本女子大学， <sup>3</sup> 家畜改良センター）.....	61

牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸についての研究 ..... 山之上 稔・矢野 恵子・上田 修司・井原 一高・豊田 浄彦 (神戸大学大学院農学研究科) .....	68
食肉のきめに対する迅速かつ客観的な評価手法の研究 ..... 入江 正和 (宮崎大学農学部) .....	76
最高級豚肉を目指した生産方式の解明 ..... 戸澤 あきつ・佐藤 衆介 (東北大学大学院農学研究科) .....	83



# CONTENTS

<b>Prevention against zinc deficiency by the use of meat component(s) increasing zinc absorption in the intestinal epithelial cells</b>	
Taiho Kambe (Graduate School of Biostudies, Kyoto University) .....	1
<b>Functional components sourced from bovine, porcine and poultry : Comparative study on bioactive peptides. (Ⅲ)</b>	
Michio Muguruma, Daiki Kubota and Satoshi Kawahara (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....	7
<b>Effect of sports-nutrition-supports by intake of heme-iron on women athlete.</b>	
<b>—Trial of the anemia improvement by the observation of the nutrition consumption—</b>	
Megumi Matsumoto, Junya Suzuki, Miki Katsumata <sup>*</sup> , Tsuyoshi Hasegawa <sup>*</sup> , Tomohiro Noguchi (Nihon University, College of Human and Sciences, <sup>*</sup> ILS Inc.) .....	19
<b>Changes in the heat-induced gel structure and physical properties of muscle protein fermented with psychrotropic lactic acid bacteria</b>	
Seiichi Haga and Toshiya Hayashi (Faculty of Agriculture, Meijo University) .....	28
<b>Establishment of novel cryoprotective method for meats using glycated LEA protein</b>	
Ken-ichi Honjoh, Noriyuki Igura and Seiji Noma (Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University) .....	35
<b>The use of powder tea leaf to control the fecal coliforms in meat and meat products</b>	
Kiyo Okazaki (Faculty of Human Life Science, Shikoku University) .....	42
<b>Development of a sterilization system, which keeps the quality of meat, by using a new light-emitting device</b>	
Akira Takahashi, Masatake Akutagawa, Kazuaki Mawatari, Takaaki Shimohata. (Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School) .....	48
<b>Morbidity and safety for the maillard reaction occurred during cooking of meat products</b>	
Yuzuru Otsuka <sup>1</sup> , Keiko Yamaguchi <sup>2</sup> , and Yuri Nomi <sup>1</sup> ( <sup>1</sup> Institute of Environmental Science for Human Life, Ochanomizu University, <sup>2</sup> Department of Food and Nutrition, Japan Women's University) .....	54

**Study on the relation between fatty acid composition, flavor, taste component of Japanese black beef meat and eating quality by tasting panel**

Keiichi Suzuki<sup>1</sup>, Shoko Yokota<sup>1</sup>, Shioura Hiroaki<sup>1</sup>, Fumiko Iida<sup>2</sup>, Shinichi Yamada<sup>3</sup>,  
Hironori Sakuma<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University <sup>2</sup>Japan Women's University,

<sup>3</sup>National Livestock Breeding Center) ..... 61

**Intramuscular free fatty acids related to beef eating quality**

Minoru Yamanoue, Keiko Yano, Syuji Ueda, Ikko Ihara and Kiyohiko Toyoda

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) ..... 68

**A rapid objective method for evaluating meat grain**

Masakazu Irie

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ..... 76

**Interpreting the production system for high quality pork**

Akitsu Tozawa and Shusuke Sato

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) ..... 83

# 亜鉛欠乏予防効果を持つ食肉成分の探索とその効果についての食品科学的研究

Prevention against zinc deficiency by the use of meat component(s)  
increasing zinc absorption in the intestinal epithelial cells

神戸大 朋

(京都大学大学院生命科学研究科)

Taiho Kambe

(Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

Zinc deficiency is world-wide health problem and recent reports have estimates that more than 25% of the world population is at risk of zinc deficiency. Hence a strategy enabling efficient zinc absorption is of importance. In the intestinal epithelial cells, the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) plays an essential function for zinc absorption. *ZIP4* gene is mutated in humans with the rare, autosomal recessive genetic disease acrodermatitis enteropathica, which is known as the only severe zinc deficiency. Exogenous expression of ZIP4 results in increases of zinc contents in the cells, suggesting that a food factor increasing ZIP4 expression should be a potential enhancer of zinc absorption in the intestinal epithelial cells. In this study, we examined the efficacy of meat component(s) to increase ZIP4 expression by the use of the rapid screening system using mouse Hepa cells. We prepared over 50 extracts from various meats (beef, pork, chicken) using an aqueous acid or alkaline solution, methanol or ethyl acetate, and examined their effects on ZIP4 expression. However, we did not find the significant activity of increasing ZIP4 expression in any meat(s) extracts. We will continue to screen more extracts after re-examining extraction methods.

Meanwhile, we established a novel system to judge the activity of meat component(s) on expression of human ZIP4 using MDCK FLp-InTMT-Rex cells. The MDCK cells are the first ones, in which we can investigate the efficacy of food component(s) on expression of human ZIP4 because it has been difficult to establish the cells stably expressing human ZIP4. After finding the meat extracts in the rapid screening system using Hepa cells, we will evaluate their efficacies using the MDCK system.

## 1. 目 的

亜鉛は、味覚・免疫機能・創傷治癒力等に重要な役割を果たす必須微量栄養素である<sup>1)</sup>。その欠乏は、途上国においてのみ問題となると考えられ

がちであるが、近年、先進国においても、高齢者を中心にして亜鉛欠乏患者が増加しており、欧米科学誌において“much ignored global health problem”として警鐘が鳴らされる機会も増えてきた<sup>2)</sup>。最新のデータでは途上国を中心に全世界人口の約

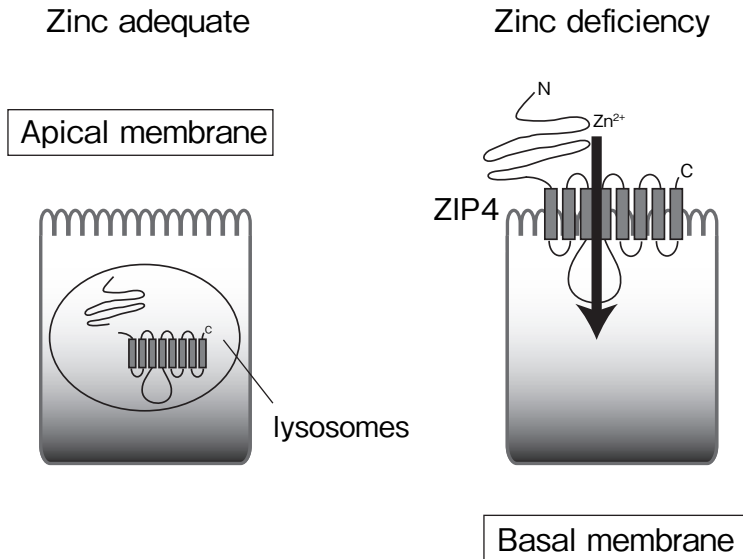


図1 Cartoon of the regulation of ZIP4 expression by zinc status in the enterocytes. Left: when zinc is adequate, ZIP4 protein is not detected on the apical membrane but is degraded in the lysosomes. Right: when zinc becomes deficient, ZIP4 protein accumulates on the apical membrane.

25%が亜鉛欠乏傾向にあると試算されており、健康な社会生活を送る上で亜鉛欠乏を予防することは極めて重要となっている。

飽食の時代にある我が国においても亜鉛欠乏は大いに懸念される栄養問題の一つであり、国民の2～3割が亜鉛欠乏傾向にあるとの試算も出されている。特に、高齢者、女性においてその傾向が強いことも報告されており<sup>3)</sup>、来るべき超高齢社会を迎えるにあたり、亜鉛欠乏を予防する効果的な手法の確立が望まれている。亜鉛は、日々の食事から摂取され、消化管（十二指腸・空腸）から吸収される。従って、亜鉛を充足させるには、亜鉛含量の高い食材を摂取することが重要となるが、消化管からの亜鉛吸収効率は30%程度と低く、摂取した亜鉛が効率良く吸収されている訳ではない。この事実を考慮すると、体内への亜鉛吸収量を増加させるためには、亜鉛含量の高い食品を摂取することに加え、消化管からの亜鉛吸収率を高めることが肝要となる。そのため、亜鉛の

吸収を促進する食品因子が同定できれば、亜鉛欠乏の予防に大きく貢献することが可能となるのは明らかである。

亜鉛の吸収は、小腸上皮細胞に発現する亜鉛トランスポーターZIP4を介して行われる。ZIP4は先天性亜鉛欠乏症の原因ともなる亜鉛吸収における必須分子である<sup>4,5)</sup> (図1)。そのため、ZIP4の発現を促進する食品因子は、亜鉛欠乏の予防に特に効果的であると考えられ、事実、ZIP4を過剰に発現させた細胞内の亜鉛量は増加することが知られる<sup>6,7)</sup>。我々は、食品中に含まれる亜鉛吸収促進活性を有する因子はZIP4の発現を促進するとの仮説に従い、ZIP4発現促進因子の探索に適したスクリーニング系を構築した。本スクリーニング系は、腸管上皮細胞に匹敵する鋭敏な感度で、ZIP4の発現を増加させる食品因子を簡単に探索できる系となっている。本研究は、このスクリーニング系を用いてZIP4の発現を促進する食肉成分を探索・同定し、亜鉛欠乏の予防に役

立てることを目的に実施した。

## 2. 方法

### 2.1 ZIP 4 発現促進活性を持つ食肉サンプルのスクリーニング

市販の食肉（牛、豚、鶏）をリン酸緩衝液に懸濁した後、加熱（100℃、5分）・非加熱処理を施し、各2種類のサンプルとして調製した。それらを終濃度0.1%でスクリーニング用細胞の培養液に添加して24~36時間培養した後、細胞から全細胞タンパク質を回収してタンパク質を定量し、各20 μgをimmunoblot解析に用いた。1次抗体には抗ZIP 4モノクローナル抗体を500倍希釈したものを使用し、2次抗体にはHRP標識抗マウスIgG抗体を3000倍に希釈して使用した。これまでに大豆抽出物において、最も強いZIP 4発現促進活性を見出しているため、本課題ではその抽出物の活性を基準に、より強力な活性を持つ因子を探索した。なお、本スクリーニングで使用する抗ZIP 4モノクローナル抗体は、マウスZIP 4のアミノ末端領域（シグナル配列を除くアミノ末端から第一膜貫通領域の直前まで、28~328aa）を抗原として作成し、マウス腹水より調製したものである。

### 2.2 ヒトZIP 4を指標とした食肉由来因子の評価系の構築

イリノイ大学のJack Kaplan教授より分与して頂いたMDCK FLp-In<sup>TM</sup>T-Rex細胞株にヒトZIP 4遺伝子を導入した。導入にはpcDNA5/FRT/TOベクターを使用し、ハイグロマイシンによる耐性を指標にヒトZIP 4安定発現株を選別した。ヒトZIP 4のカルボキシル末端にはHA tagを挿入し、MDCK細胞膜上での発現部位を解析できるように考慮した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 ZIP 4発現促進活性を持つ食肉サンプルのスクリーニング

加熱（100℃、5分）・非加熱処理を施した食肉サンプル（牛、豚、鶏）、また、脂溶性因子の溶出を意図して、メタノール、酢酸エチルにより食肉サンプル抽出画分を得た。これら抽出画分を、スクリーニング細胞であるマウスHepa細胞培養液に加え、24~36時間培養することでスクリーニングを実施した。同時に、細胞内亜鉛量の増加の目安となるメタロチオネインプロモーターを利用したSEAPレポーターアッセイを実施した（メタロチオネインは、5つのmetal response elementを有しているため、亜鉛量の増加に極めて鋭敏に反応し、転写を活性化させる）。同一サンプルにおいて数回解析し、幾つかのロットを作成してその再現性を確認したが、現段階では、これまでに大豆抽出物で見出しているZIP 4発現促進活性よりも強力にZIP 4の発現を促進させる、あるいは、SEAP活性を有意に増加させる活性を有する因子を認めることができなかった（**図2**）。また、熱により活性が変化することを期待し、熱処理したサンプルについても解析を行ったが、活性を増強させる効果は観察されなかった。今回用いたサンプル調製条件が適当でない可能性も残されているため、今後、サンプル抽出方法に改良を加え、さらに多くの食肉を用いた解析を実施していく。

### 3.2 ヒトZIP 4を指標とした食肉由来因子の評価系の構築

上述のスクリーニングはマウス細胞を用いて実施しており、また食肉サンプルの*in vivo*での効果もラットを用いた個体レベルでの亜鉛吸収率の評価系で実施することを計画している。従って、上記スクリーニング系においてマウスZIP 4に対し認められた食肉サンプルの活性が、ヒトZIP 4

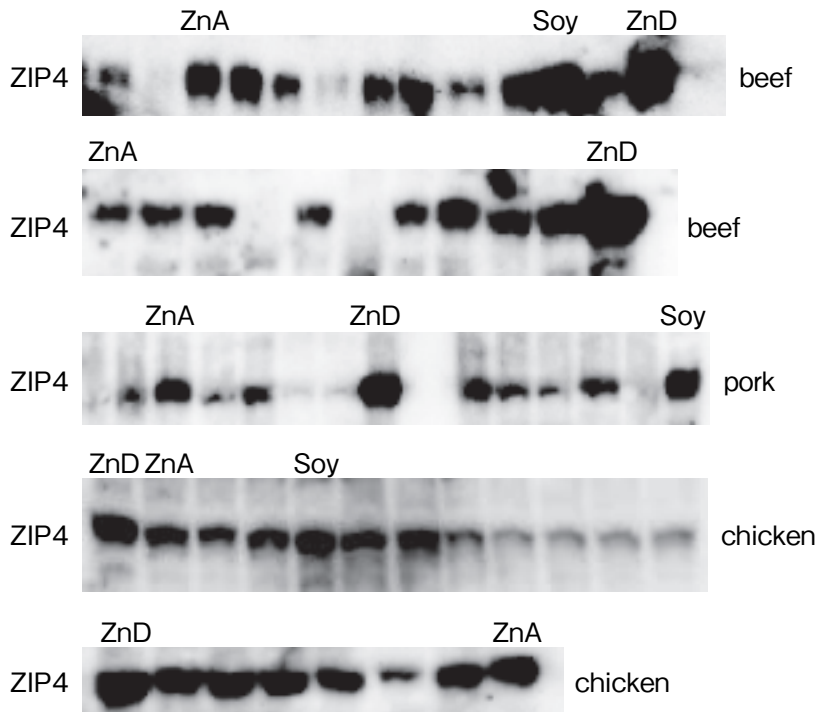
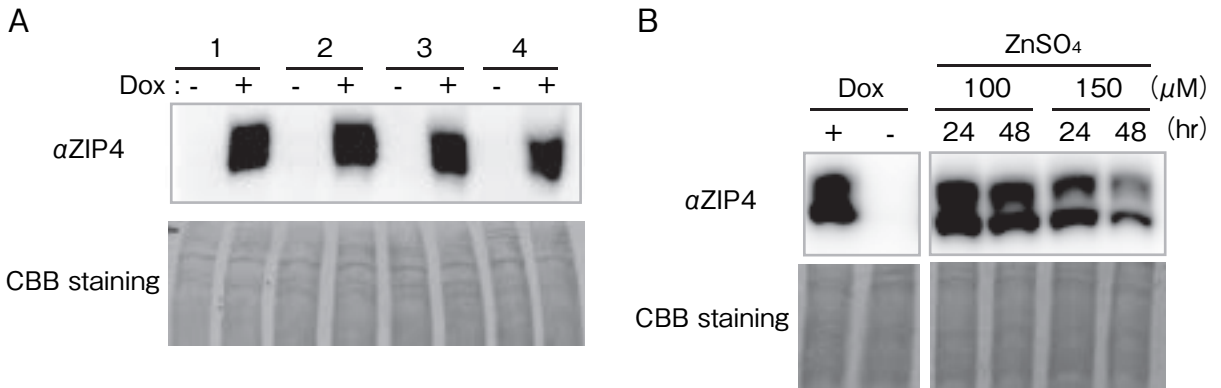


図2 Screening of the efficacy of meat component (s) to increase ZIP4 expression. Mouse Hepa cells were cultured in the presence of the extracts prepared from meat (beef, pork, chicken) components for 24 h. ZnA; zinc adequate, ZnD; zinc deficient, Soy; soybean extracts. Total cellular proteins (20  $\mu$ g) prepared from Hepa cells cultured in the indicated conditions were subjected to immunoblot analysis.

に対しても同様の効果を発揮するかどうか検証することは極めて重要となる。すなわちスクリーニング・動物実験での*in vivo*での評価、ヒトZIP4に対する細胞レベルでの解析を組み合わせることで、亜鉛吸収に及ぼす食品因子の探索を高い精度で実施できる体制を整えることができる。そこで、ヒトZIP4を発現する細胞株を用いた評価系を構築することを目的に、腸管上皮細胞と同様に極性細胞であるCaCO2細胞やMDCK細胞にZIP4を過剰発現させる細胞株の樹立を試みた。これまでの知見により、ZIP4を過剰発現させた株を樹立することは困難であることが知られており、実際にCaCO2細胞やMDCK細胞を用いて過剰発現株は樹立できなかった。そこで、イリノイ大学

のJack Kaplan教授より分与して頂いたMDCK FLP-In<sup>TM</sup>T-Rex細胞にヒトZIP4遺伝子を導入した。本株を用いる利点は、通常時にはZIP4の発現を非常に低レベルに維持するが、タモキシフェンの添加により発現を誘導することができる点にある。本株を用いた結果、これまで困難とされていたヒトZIP4過剰発現株の樹立に成功した(図3)。発現させたヒトZIP4がアピカル膜上に安定に発現することも確認できているため、本株を使用することで、ヒトZIP4の効果を詳細に解析することが可能となる。上記スクリーニングでZIP4発現促進活性を持つ食肉サンプルを認めた場合には、本株を用いて、ヒトZIP4に対する効果も評価する予定である。



**図3** Establishment of MDCK cells expressing human ZIP4 to evaluate the activity of meat component (s) on the expression of human ZIP4. A, MDCK FLP-InTMT-Rex cells stably expressing human ZIP4-HA were established. ZIP4 expression is under control of a tetracycline-inducible promoter, and therefore the MDCK cells increase human ZIP4 expression when cultured in the presence of doxycycline (dox). B, Expression of human ZIP4 is regulated by zinc status. The MDCK cells (clone No. 1 in A) cells were cultured in medium containing dox for 24 h to induce human ZIP4 expression, and then the cells were cultured in the presence of the indicated concentrations of ZnSO<sub>4</sub> without dox for 24 or 48 h. Expression level of human ZIP4 decreases in the presence of higher zinc concentrations.

亜鉛を効率良く吸収させる食品因子は、亜鉛欠乏症の予防のために最も安全で有効な手段である。食生活の簡便化が進む先進諸国においては、潜在型の亜鉛欠乏患者数は今後ますます増加することが予想されており、人々の健康増進のため、亜鉛吸収促進因子を同定する意義は極めて大きい。現在、食肉サンプルから、強いZIP4発現促進活性を有するものは見出せていないが、今後、さらに解析を進めて行き、活性因子の同定に結びつけたいと考えている。ZIP4発現促進活性を持つものについては、①構造決定、および構造活性相関、②その作用メカニズムの解明、③動物実験による*in vivo*での効能評価、を実施する計画を立てている。

#### 4. 要 約

ZIP4は、消化管からの亜鉛吸収に必須の役割を果たす亜鉛トランスポーターである。体内亜鉛吸収量をコントロールする鍵分子として機能しており、その発現を増加させる因子は、亜鉛吸収効

率を高める因子として機能することが予想される。食肉より抽出したサンプルのZIP4発現促進効果や細胞内の亜鉛取り込み活性についてスクリーニングを実施したが、現在までのところ、それほど強力な活性を持つ因子を見出すことはできなかった。今後、抽出方法などを再検討し、さらに解析を進める予定である。一方、活性因子を見出した後、ヒトZIP4に対する効能を評価する系を構築することを目的に、極性細胞であるMDCK細胞を用いた評価系を確立した。本細胞の樹立によって、食肉由来因子のヒトZIP4に対する効能を評価することが可能となるため、本成果は、今後の研究の進展に大きく貢献するものになると考えている。

#### 文 献

- 1) Hambidge M. : Human zinc deficiency, *J Nutr* 130, 1344 S ~ 1349 S, 2000.
- 2) Haase H, Mocchegiani E and Rink L. : Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology*, 7, 421 ~ 428, 2006.



- 3) Kogirima M, Kurasawa R, Kubori S, Sarukura N, Nakamori M, Okada S, Kamioka H and Yamamoto S. : Ratio of low serum zinc levels in elderly Japanese people living in the central part of Japan. *Eur J Clin Nutr*, **61**, 375~381, 2007.
- 4) Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J and Gitschier J. : A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet*, **71**, 66~73, 2002.
- 5) Küry S, Dréno B, Bézieau S, Giraudet S, Kharfi M, Kamoun R and Moisan JP. : Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat. Genet*, **31**, 239~240, 2002.
- 6) Kambe T and Andrews GK. : Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations. *Mol Cell Biol*, **29**, 129~139, 2009.
- 7) Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T and Andrews GK. : Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol Chem*, **388**, 1301~1312, 2007.



## 食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討について の研究 (Ⅲ)

Functional components sourced from bovine, porcine and poultry :  
Comparative study on bioactive peptides. III

六車三治男・久保田大樹・河原 聡  
(宮崎大学農学部)

Michio Muguruma, Daiki Kubota and Satoshi Kawahara  
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

This research aimed to compare the biological and functional properties as well as physiological effects of beef, pork and chicken protein hydrolysates. The year before last, we examined the antihypertensive effects by determining the IC<sub>50</sub> value of the three mentioned species. Last year, we evaluated the antioxidative activities of hydrolysates of biceps femoris muscles from beef, pork and chicken.

In the current study, the muscles hydrolyzed with pepsin, trypsin and pancreatin, and then determined their antioxidative efficiency. The antioxidative activity of the hydrolysates was determined by the DPPH radical scavenging assay and the ORAC antioxidant assay. Meat hydrolysates showed the high antioxidant activity by the DPPH radical scavenging assay and the ORAC antioxidant assay. However, there are differences in the other factors for giving the antioxidative activity including amino acid sequence of those hydrolysates. For instance, Cys shows strong antioxidant activity that is considered to be specific for electron transfer reaction. On the other hand, though Trp also has been showing a strong activity, as it indicates only for transferring atom of hydrogen during its reactions. Beef and pork peptides may show antioxidant activity in specific manner that are influenced by His and Trp. Antioxidant activity of chicken peptides are small and far from other meat peptides especially when compared to beef and pork. In ORAC evaluation, Trp pattern similar to Trp in chicken one, in which we hypothesize that Trp may be very important amino acid. The results showed that the meat hydrolysate was composed with moderate amount of hydrophobic amino acids which might contribute to the high antioxidant activity. The fraction with molecular weight lower than 1 kDa exhibited the high antioxidative activity.

We conclude that meat in the three species contain peptides that may serve several purposes. Based on its remarkable ACE inhibitory activity and antioxidative activity, we suggest that the functional peptides from meat hydrolysates may have potential applications as functional food, which could be used as sources of nutraceutical compounds.

## 1. 目 的

畜産食品の消費量は約半世紀の間に急増したが、これは我が国が長寿国になった要因の一つとも考えられる。一方、日本人のライフスタイルの変化に伴い、生活習慣病の患者が増加しており、国民の健康への関心は極めて高くなっている。食肉は良質なタンパク質を豊富に含み、近年、筆者らも含めて血圧降下作用などの保健的機能性についての研究が進められている<sup>1-8)</sup>。しかし、各種食肉の生理活性を詳細に比較検討した研究はあまり報告されていない。

そこで、初年度は我が国の死亡原因の2~3位を占める心疾患、脳血管疾患の原因と深くかかわっている高血圧症の予防に及ぼす各種食肉を消化酵素により分解して生じたペプチド混合物のアンギオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害による高血圧予防効果について比較検討した<sup>9)</sup>。その結果、市販の牛肉、豚肉および鶏肉を用いて、それらを加熱後、消化酵素のペプシンおよびトリプシンで処理すると鶏肉、豚肉、牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。

さらに昨年度は、日本人の死因第一位になり、その増加が続いているがん発症危険因子の中でも、特に活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) と呼ばれる悪性の酸素ROSを消去する能力を発現する抗酸化活性に及ぼす各種食肉酵素分解ペプチドの効果をDPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) 法とORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法により比較検討した<sup>10)</sup>。

DPPH法にて調査した結果、各種食肉間ではタンパク質濃度1.0mg/mlでおよそ40  $\mu$ M トロロックス相当量の抗酸化活性を示した。また、食肉酵素分解物の添加濃度依存的に抗酸化活性は増加した。畜種間の活性に有意差は認められなかった。既知の抗酸化物質のカルノシンは痕跡程度の活性

しか示さず、グルタチオンはDPPHの紫色が確認できないほど強力な抗酸化活性を示した。これはグルタチオンが電子供与反応に基づく抗酸化力を有している証拠であると考えられた。また食肉ペプチドがカルノシンよりも高い活性を示した理由としては、食肉に含有される様々なペプチドによる相乗効果であると推測された。

一方、ORAC法にて測定した結果、各種食肉共に非常に高い抗酸化活性を有することが確認された。各種食肉間でそれらの値に有意差は認められなかったが、同濃度のカルノシンと近似した値が得られた。このように単純に活性値を比較しただけでは各種食肉間に有意差は認められなかったが、食肉を構成するアミノ酸に注目し、ORAC法による抗酸化活性の経時変化を見ると、牛肉および豚肉と鶏肉では抗酸化活性の性質が異なることが明らかになった。特に重要なアミノ酸は高い電子供与活性を示すCys、高い水素供与活性を示すTrpであることが示唆された。

そこで本年度の研究では、食肉のペプチドを構成するアミノ酸やペプチドの極性に着目しながらラジカル消去活性の発現に重要なペプチドの条件を調査した。すなわちDPPH法およびORAC法を用い、アミノ酸を抗酸化活性機序に基づいて分類した。またその分類結果を基に、食肉タンパク質酵素分解物のようなペプチド混合物においても抗酸化活性機序の推定が可能であるのか調査した。さらに食肉を構成するアミノ酸を分析し、分析結果通りにアミノ酸を混合して食肉様アミノ酸混合物を調製した。これら食肉様アミノ酸混合物と食肉ペプチド混合物の抗酸化活性を比較することで、アミノ酸組成から抗酸化活性機序の推定が可能であるのか調査し、アミノ酸組成が抗酸化活性機序の決定にどれだけ影響を与えているのか検討した。これらアミノ酸組成だけでなくペプチドの極性もラジカル消去反応に関係があると考えられ

ることから、本年度の研究では疎水性の差を利用して低疎水性ペプチド混合物および高疎水性ペプチド混合物を調製し、ペプチドの極性と抗酸化活性との関係についても検討を加えた。

このように本研究の目的は、どのようなアミノ酸を含有したペプチドが、あるいはどのような立体構造のペプチドがROSの消去に有効なのかを明らかにすることにより、食肉タンパク質酵素分解物の抗酸化活性機序の推定を行い、ペプチドが抗酸化活性を発現するために必要な条件を解明し、食肉の価値の向上に貢献していくことである。

## 2. 方 法

### 2.1 実験材料

市販の宮崎県産の各種食肉（牛肉・豚肉・鶏肉いずれもモモ肉）を酵素分解用実験材料として用いた。

### 2.2 食肉タンパク質酵素分解物（MPs : Meat Peptides）の調製

食肉由来タンパク質分解ペプチドの調製は以下のとおりである。

各種食肉のミンチ肉50 gに蒸留水100mlを添加してフードプロセッサー（Panasonic MK-K48）を用いて30秒間、2回ホモジナイズして均質化した。70℃で30分間インキュベート後、このホモジェネートをHClでpH1.8に調整し、胃粘膜由来ペプシン（1 : 10000）（和光純薬工業株式会社）を0.01 g添加して攪拌しながら37℃で2時間インキュベートした。NaOHを用いてpH6.8に調整し、10分間煮沸した後、試料の温度を40℃まで低下させた。さらにトリプシン（和光純薬工業株式会社）およびパンクレアチン（同会社）をそれぞれ0.01 g添加し、再び攪拌しながら37℃で2時間インキュベートした。最後に10分間煮沸した試料を食肉タンパク質酵素分解物（MPs）とした。

### 2.3 タンパク質の定量

酵素未処理の食肉タンパク質の定量はBiuret法<sup>11)</sup>により行った。すなわち、タンパク質溶液に対し、4倍量のBiuret試薬を加えて常温で30分間反応させた。反応液を島津UV-VIS Spectrophotometer 2450型分光光度計（吸光度：540nm）にて測定した。また分解物であるペプチドについてはUV法<sup>12)</sup>を適用し、測定を行った。すなわちタンパク質溶液の215nmの吸光度から225nmでの吸光度を差し引き、144倍した時の数値をタンパク質濃度とした。測定には上記と同じ分光光度計を使用した。

### 2.4 アミノ酸分析

#### (1) 標準アミノ酸溶液の調製

標準アミノ酸混合液ANⅡ型（和光純薬工業株式会社）、標準アミノ酸混合液B型（和光純薬工業株式会社）、1.25mMアスパラギン溶液、2.5mMグルタミン溶液、2.5mMトリプトファン溶液それぞれ1 mlを混合し、0.2Mクエン酸緩衝液（pH2.2）で全量を25mlとした。

クエン酸緩衝液は0.2Mクエン酸一水和物（和光純薬工業株式会社）200mlに0.2Mクエン酸三ナトリウム二水和物（和光純薬工業株式会社）3 mlを加え、pH2.2とした。

#### (2) 遊離アミノ酸分析

各種MPs溶液に3%スルホサリチル酸（和光純薬工業株式会社）を加え、冷蔵庫で1時間静置してタンパク質を沈殿させた。その後、3000rpmで15分間遠心分離を行った。上清を0.45 μmセルロースアセテートメンブレンフィルタ（アドバンティック東洋）でろ過し分析試料とした。これを全自動アミノ酸分析機（JIC-500, 日本電子株式会社）で分析した。

#### (3) 加水分解アミノ酸分析（MPsの加水分解によって得られるアミノ酸の分析）

R.J. Simpsonらの方法<sup>13)</sup>に準じ、4 Mメタンス

ルホン酸加水分解を行った。80%エタノールで抽出されたMPsを遠心濃縮機 (CVE-200, 東京理科学器株式会社) で粉末化した。この粉末試料10mgを試験管に秤量し, 4 Mメタンスルホン酸 (和光純薬工業株式会社) 1 mlを加えた。またアスピレーター (WP-15, ヤマト科学株式会社) および超音波脱気装置 (MUS-10, 東京理科学器株式会社) を用い, 試験管内を真空状態にし, 封管した。ヒートブロック (DTU-1 C, タイテック株式会社) を用い, 110°Cで24時間加水分解を行い, 3.5M NaOH 1 mlを添加, 中和し, 0.2Mクエン酸緩衝液 (pH 2.2) 8 mlを加え, サンプルとした。0.45  $\mu$ mセルロースアセテートメンブレンフィルターにてろ過し, 分析試料とした。これを全自動アミノ酸分析機で分析した。

#### (4) トリプトファン (Trp) の定量

M.K. Gaitondeらの方法<sup>14)</sup>に従い, 各種食肉のTrp含有量を測定した。試験管にMPs (ペプチド濃度20mg/ml) (酵素処理後, 0.45  $\mu$ mセルロースアセテートメンブレンフィルターでろ過したもの) 0.5ml, 試薬A (ニンヒドリン250mgに (酢酸:0.6Mリン酸 = 3:2) 溶液10mlを加えたもの) または試薬B (ニンヒドリン250mgに (ギ酸:塩酸 = 3:2) 溶液10mlを加えたもの) 0.5mlを加え, 10分間煮沸し, さらに3mlのエタノールを加え, 冷却した。分光光度計にて試薬Aを含む溶液は385nm, 試薬Bを含む溶液は390nmで吸光度を測定した。

なおTrp含有量 ( $\mu$ M) は次の式で算出した。

$$\text{Trp含有量} (\mu\text{M}) = (\text{Eb} - 1.6\text{Ea}) / 3.95 + \text{Ea}$$

Ea: 試薬Aを用いて測定した吸光度の値

Eb: 試薬Bを用いて測定した吸光度の値

#### 2.5 食肉様アミノ酸混合物 (再構成MPs) の調製

MPsの遊離アミノ酸分析および加水分解アミノ酸分析により算出されたデータを基に食肉様ア

ミノ酸混合物 (再構成MPs) を調製した。

遊離アミノ酸分析データを基にした場合, 20種類のL-アミノ酸およびカルノシン (Car), アンセリン (Ans) の総量を100%として混合し, 溶媒には80%エタノールを用いた。また加水分解アミノ酸分析データを基にした場合, 20種類のL-アミノ酸量を100%として混合し, 溶媒には80%エタノールを用いた。

#### 2.6 DPPHラジカル消去活性の測定

DPPHラジカル消去活性の測定は, DPPH分光測定法に準じて行った<sup>15)</sup>。すなわち, 400  $\mu$ M DPPH, MES(2-morpholino-ethanesulphonic acid) buffer, 20%エタノールを同量ずつ加え, 混液を作製した。混液を0.9ml分注し, 80%エタノールを240  $\mu$ lとサンプルを60  $\mu$ l加え, 20分間反応させた。その後, サンプルを加えた順に前述の分光光度計にて吸光度520nmで測定した。また, サンプルの代わりに, 0.2mM Trolox (Sigma社) を使って標準として測定し, 検量線からサンプルのTrolox相当量を算出した。MES BufferはMESを蒸留水に溶解し, NaOHでpH 6に調製したものを使用した。

#### 2.7 ORAC法による抗酸化活性の測定

(独) 農研機構九州沖縄農業研究センターの報告をもとに改良して測定した<sup>16~19)</sup>。すなわち96wellマイクロプレートに81.6nMフルオレセインを200  $\mu$ l, サンプル20  $\mu$ lを添加し, マイクロプレートリーダー (TECAN GENios Multifunction Fluorescence Virginia, USA) にて37°Cで励起波長485nm, 蛍光波長520nmにおける蛍光強度を測定した。10分後200mM AAPH75  $\mu$ lを添加し, 同条件にて2分間隔で45回測定した。またORAC値はNet AUC (Area Under Curve) = AUC sample - AUC blankを用いて算出した。検量線作成にはTrolox (125, 250, 500, 1000  $\mu$ M) を使用した。

#### 2.8 ペプチド混合物の逆相カラムによる分画



高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により 5 C<sub>18</sub>-AR-II (4.6×250mm) (ナカライテクス株式会社) の逆相カラムを用いて、豚肉MPsを極性の違いに基づいて分画した。溶離液には0.1% TFA含有アセトニトリル溶液を用いた。分析中は溶離液を脱気装置 (DGU-14A, 島津社) に通し、LC-10AD送液ポンプを用い、流速0.5ml/min, 注入量100 μlで行った。ペプチドの検出には、コンピュータで制御された検出器 (SPD-10AVP, 島津社) を用い、検出波長は215nmで行った。

### 2.9 各フラクションのゲルろ過高速液体クロマトグラフィーによる分子量分布の分析

逆相カラムで分画した各フラクションの分子量分布を TSKgelG2000SWXL (7.8 mm I.D. x 30 cm) (東ソー株式会社) のゲルろ過カラムを用いて分画した。溶離液には0.1% TFA含有45%アセトニトリル溶液を用い、流速0.8ml/min, 注入量20 μlで行った。

## 3. 結果と考察

まず、MPsに含まれるアミノ酸が抗酸化活性機序の決定にどれだけ影響を与えているのか調査した。すなわちMPsのアミノ酸分析を行い、分析結果に基づいてアミノ酸を混合し、食肉様アミノ酸混合物 (再構成MPs) を調製した。さらにこれら再構成MPsの抗酸化活性を評価した。

前報において牛および豚肉MPsは主にHis, 鶏肉MPsは主にTrp由来の抗酸化活性を発現する可能性を認めた<sup>10)</sup>。そこで抗酸化活性の測定に用いたMPsの遊離アミノ酸およびMPsを加水分解して生じるアミノ酸 (mg/100 g) を分析した結果、食肉間で含有アミノ酸の違いが確認された。遊離アミノ酸分析において特に大きな違いはHisおよびHis含有ペプチドであるカルノシン, アンセリン含有量であった。His, カルノシン, アンセリンの合計量は牛肉, 豚肉, 鶏肉MPsの順にそれぞれ

**Table 1** The amounts of antioxidant amino acids in hydrolysates of beef, pork and chicken.

Antioxidant amino acids	Unit (mg/100g)		
	Beef	Pork	Chicken
Cys	0.72	0.29	0.36
Met	7.43	4.63	5.33
Tyr	9.13	5.40	5.82
His	17.16	12.86	6.92
Trp	1.84	1.30	2.04

260.31, 277.42, 172.34mg/100 gであり、これまでの報告<sup>20)</sup> のとおり牛および豚肉にはカルノシンが豊富に含まれ、鶏肉にはアンセリンが豊富に含まれていた。さらにTrpはわずかに鶏肉MPsが牛および豚肉MPsよりも多く含まれていた。また加水分解によって生じたアミノ酸を分析した結果でも鶏肉MPsは他の食肉と比較してHis含量が低く、Trpを多く含む傾向があった (Table 1)。M.K. Gaitondeらの方法で食肉中のTrp含量を調査した際にも有意な差は見られなかったが、これまでの報告と一致して鶏肉は他の食肉と比較してTrpを多く含有している傾向があることを確認した<sup>21)</sup>。

前報において、アミノ酸の抗酸化持続能をORAC法にて解析すると、抗酸化力には電子供与 (ET) 型と水素供与 (HAT) 型に大きく分類されることを示した<sup>10)</sup>。ET型とはここではCys, グルタチオン, トロロックスのようにDPPHラジカル消去活性が高く、一定時間フルオレセインの分解を100%阻害し、ある時点から急激に活性が低下するパターンを持つ物質のことを言う。HAT型とはHis, Met, Tyr, Trp, カルノシンなどを指し、経時的にフルオレセインが分解されていくパターンを持つ物質のことである。

昨年度の研究で報告したように、TrpはHAT活性に最も重要なアミノ酸であり、微量でも大きな活性を示すことが示唆された<sup>10)</sup>。MPsの両アミ

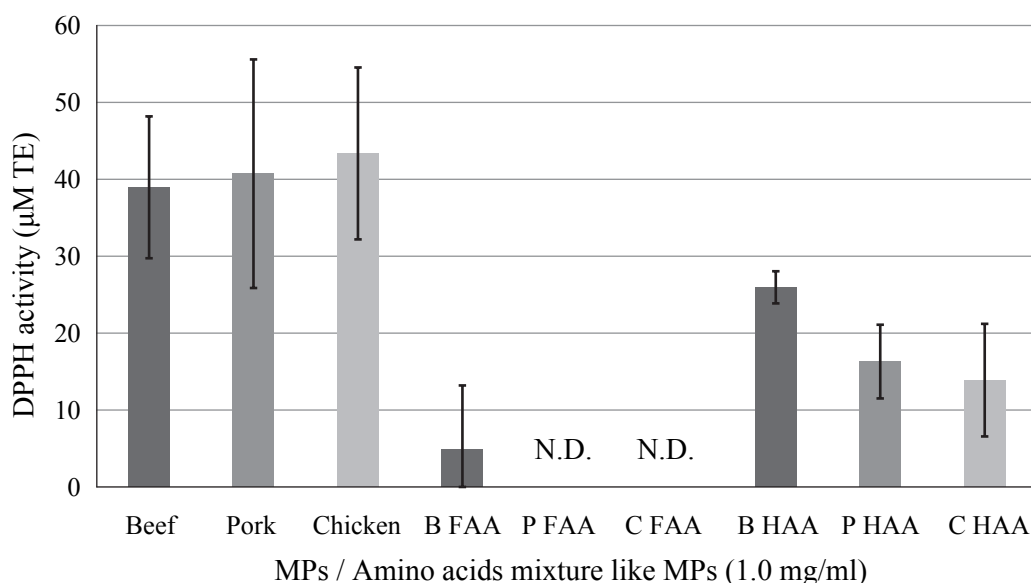


Fig.1 DPPH radical scavenging activity of beef, pork, chicken and amino acids mixtures reconstituted according to the analyzed data. B:Beef; P: Pork, C:Chicken, FAA: meat like amino acids mixtures reconstituted according to the data based on free amino acids, HAA: meat like amino acids mixtures reconstituted according to the data based on total amino acids. TE: Trolox Equivalent.

ノ酸分析結果とともにHis含量が少なく、Trp含量が多いことが示されたことから、鶏肉MPsはTrpの影響を大きく受けた抗酸化活性を示した可能性が考えられた。

このようにMPsのようなペプチド混合物の抗酸化活性機序の決定には各種ペプチドのアミノ酸組成が重要である可能性がある。そこで各種MPsの遊離アミノ酸および加水分解アミノ酸を分析し、さらにその結果に基づいて各種アミノ酸を混合し、MPsを再構成した。次に、これら各種再構成MPsがET活性およびHAT活性いずれの抗酸化活性機序を示すのか調査した。

DPPH法を用いた場合、再構成MPs遊離アミノ酸混合物(以下“FAA”と略す(BFAA, PFAA, CFAAはそれぞれ牛・豚・鶏肉様アミノ酸混合物))はBFAAが痕跡程度の活性を示した以外、全て活性は検出されなかった (Fig. 1)。また再構成MPs加水分解アミノ酸混合物 (以下“HAA”と略す (BHAA, PHAA, CHAAはそれぞれ牛・

豚・鶏肉様アミノ酸混合物))は10~25 μM TEの活性を示したが、これはもとのMPsよりも低い活性であった。“FAA”がET活性を示さなかった理由としては“FAA”は“HAA”と比較して強力なET活性を示すCysの含量が少なかったこと (“FAA”にはおよそ0.05%，“HAA”にはおよそ0.2%のCysが含まれていた) が考えられた。またMPsの方が“HAA”よりも高いET活性を発現した理由はペプチド特有の立体構造に起因する活性、またペプチド同士による相乗効果が働いた可能性が考えられた。

さらに“HAA”のET活性がCysだけに由来するものだったのか調査するためにCys溶液、すなわちBHAA, PHAA, CHAAの平均Cys濃度(0.0215mg/ml)を調製し、ET活性を評価した。データには示していないが、この溶液は“HAA”よりも高いET活性(およそ80 μM TE)を示した。従って“HAA”のET活性がCys溶液より低い値を示した理由はアミノ酸の混合操作ミスや

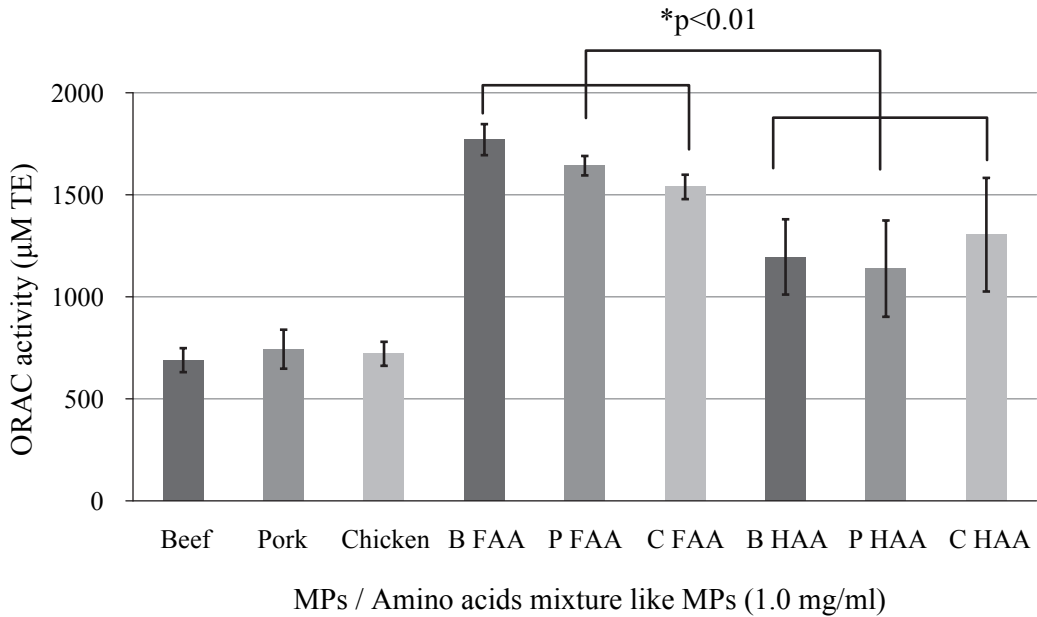


Fig.2 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of beef, pork, chicken and amino acids mixtures reconstituted according to the analyzed data. B:Beef, P: Pork, C:Chicken, FAA: meat like amino acids mixtures reconstituted according to the data based on free amino acids, HAA: meat like amino acids mixtures reconstituted according to the data based on total amino acids. TE: Trolox Equivalent.

種々のアミノ酸間での活性相殺効果などに由来する可能性も考えられた。つまり“HAA”が示したET活性の大部分はCys由来であると示唆された。

またORAC法を用いた場合 (Fig. 2), “FAA”および“HAA”はMPsよりも有意に高い活性を示し、活性値の高い順に“FAA”, “HAA”, MPsとなった。さらに抗酸化活性の経時的変化を調査すると“FAA”および“HAA”は主にHis系統の抗酸化活性を示した可能性が高いと推測された。これは含有抗酸化アミノ酸のうち、Hisが最も多く含まれていたことに起因すると考えられる。再構成MPsはもとのMPsと類似したHis由来の活性、つまり高いHAT活性を示した。しかしながら単にアミノ酸を混合しただけでは本来のMPsと同じ活性を示すことはなかった。また特に“HAA”は“FAA”の結果と比較すると、よりMPsに近い抗酸化活性を示した。

さらにMPsと再構成MPsの抗酸化活性を比較するとDPPHラジカルにはペプチドの状態、AAPH由来ペルオキシラジカルの場合にはアミノ酸の状態がラジカルの消去に有利な傾向にあることが示唆された。DPPHラジカルには1種類、AAPH由来のペルオキシラジカルには5種類のアミノ酸がラジカル消去に関与するが、この数の違いが再構成MPsの各種実験系における抗酸化活性の差である可能性が高いと考えられた。

以上の結果からペプチド混合物のアミノ酸組成は抗酸化活性機序の決定に大きな影響を与えていることが確認できた。また加水分解アミノ酸分析はタンパク質酵素分解物の抗酸化活性機序の推定に利用できる分析法であると考えられた。しかしながらアミノ酸組成だけがペプチドの抗酸化活性機序を決定する要因ではない。もしアミノ酸組成だけが抗酸化活性機序の決定に関与するのなら、Cysを多く含まない限りET活性を発現しないと

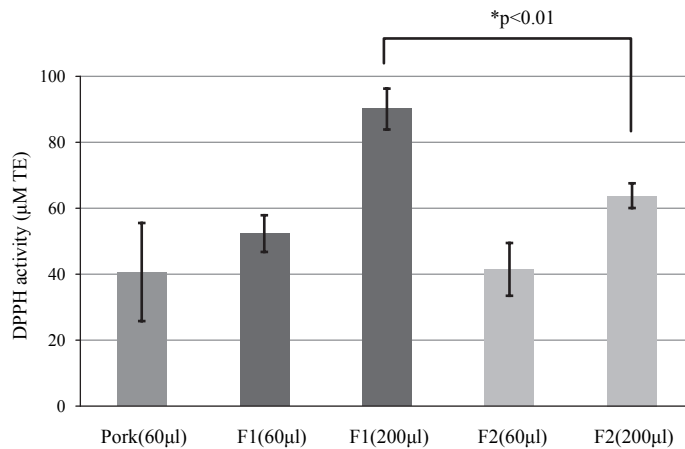


Fig. 3 DPPH radical scavenging activity of pork, fraction 1 and fraction 2. F1: fraction 1; F2: fraction 2, TE: Trolox Equivalent.

考えられるからである。

現在、DPPH法を用いて様々なET活性を有する抗酸化ペプチドが単離・精製されている。例えばカゼイン由来のLeu-Val-Tyr-Pro, Pro-Ile-His, Pro-Val-Leu, Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu<sup>22)</sup>, マグロ煮汁由来のPro-Ser-His-Asp-Ala-His-Pro-Glu, Pro-Lys-Ala-Val-His-Glu, Pro-Ala-Gly-Tyr, Val-Asp-Tyr-Pro<sup>23)</sup>, などが報告されている。このようにET活性発現に重要なアミノ酸であると考えられるCys含有のペプチドはあまり報告されていない。これら抗酸化ペプチドのアミノ酸配列の特徴はN末端にVal, Leu, Proなどの疎水性アミノ酸を有し, C末端にPro, Gluを有しているものが多い<sup>24)</sup>。つまりペプチドがET活性を示すさらなる要因の一つとしてペプチドの極性が関与している可能性がある。特にDPPHラジカルは疎水性のラジカルであり, 極性はペプチドとDPPHラジカルとの親和性に寄与しているかもしれない<sup>25)</sup>。

一方ORAC法で精製された抗酸化ペプチドはあまり報告されていないが, N末端がTrp-Tyrで始まるペプチドが数種発見されており, 本研究で示したとおりORAC法で高い活性を示すTrpやTyrを含むペプチドが高いHAT活性を示す可能性が

高い。例えば牛乳ホエータンパク質由来のTrp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile, Trp-Tyr-Ser, Trp-Tyr-Ser-Leu, Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala<sup>26, 27)</sup> などが報告されている。

次に, ペプチドが抗酸化活性を発現するために重要な要素であると考えられるペプチドの極性とラジカル消去反応との関係について調査した。極性はペプチドが抗酸化活性を発現するために重要な要素であることが示唆された。そこでペプチドとラジカルとの相互作用に関与する極性に着目し, ペプチドの極性と抗酸化活性との関係について調査した。抗酸化物質とラジカルとの反応には極性が関与している可能性が高い。しかしながらペプチドの極性と抗酸化活性との関係を研究した例はほとんどない。そこで, HPLCを用いて疎水性の低いフラクション1および疎水性の高いフラクション2のペプチド混合物を調製して各フラクションの抗酸化活性を測定した。

DPPH法を用いた場合 (Fig. 3), サンプルを60 μl添加した時は両フラクション間に活性の有意差は見られなかったが, 200 μl添加するとフラクション1は2と比較して有意に高い活性を示した。また豚肉MPsに占めるフラクション1および



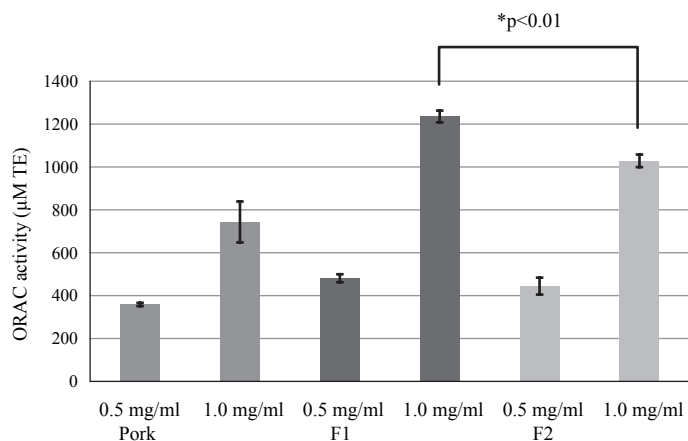


Fig. 4 ORAC activity of pork, fraction 1 and fraction 2. F1: fraction 1; F2: fraction 2, TE: Trolox Equivalent.

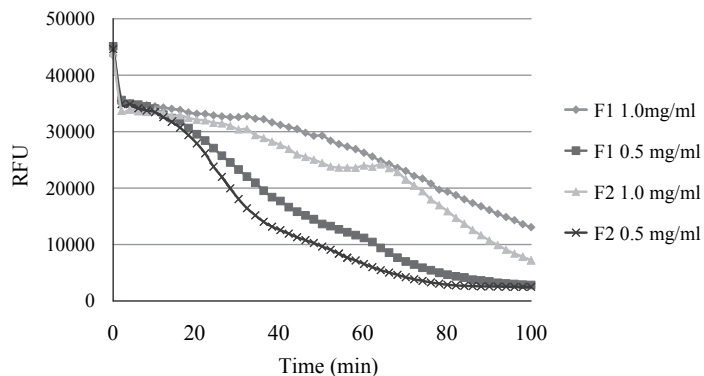


Fig. 5 Fluorescence decay curves of fluorescein induced by AAPH in the presence of Fraction 1 and fraction 2. RFU: relative fluorescence unit; AAPH: 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. F1: fraction 1; F2: fraction 2.

2の構成比はそれぞれ21.2%および78.8%でありMPsは比較的疎水性の高いペプチドを多く含んでいたことが判明した。DPPH法にて、MPsとフラクション2(添加量60μl)の活性を比較するとほぼ等しいことから、MPsは主にフラクション2由来の抗酸化活性を発現している可能性が示唆された。

一方、ORAC法を用いて抗酸化活性を測定したところ(Fig. 4)、0.5mg/mlでの比較では各フラクション間で大きな差は見られなかったが、1.0mg/

mlの比較ではDPPH法を用いた時と同様にフラクション1の方がより高い活性を示した。さらに抗酸化活性の経時の変化を調査すると(Fig. 5)、若干だがフラクション1(1.0mg/ml)はET型に近いパターンを発現している可能性が示唆された。これはフラクション1が比較的高いET活性を示したことが原因だと推測された。またフラクション2(1.0mg/ml)は牛および豚肉MPs同様にHis由来のHAT型抗酸化活性機序を有している可能性が示唆された。

各フラクションに存在するペプチドの分子サイズも抗酸化活性に影響を与えた可能性がある。そこで各フラクションの分子量分布を分析すると、フラクション1 (1,000Da~100Da) はフラクション2 (分子量7,500Da~700Da) よりも分子量の小さなペプチドが多く存在した。従って極性の差だけでなく、ペプチドの分子サイズもラジカルとの相互作用に影響を及ぼした可能性がある。最近、エビ製品の加工工程の副産物として生成される加水分解物のアミノ酸組成と分子量分布について検討し、分子量1,000以下の成分で40.4%の疎水性アミノ酸を含む画分に高い抗酸化活性を認め、100℃以上の加熱でも安定であると報告されている<sup>28)</sup>。本研究で得られた結果も分子的には一致していた。

様々な溶媒を用いて焼き栗から抽出してきた成分の抗酸化活性 (DPPH法) を測定するとメタノール抽出液の活性が最も高く、次いで水、そして最も低い活性を示したのがアセトンなどの疎水性の高い溶媒であるという報告<sup>29)</sup> もあり、さらに他の食品においても低疎水性溶媒で抽出した画分の抗酸化活性が高い傾向にあるという研究結果が多数報告されている。以上の結果からペプチドと各種ラジカルとの反応には疎水性に起因する親和性が関与し、疎水性の比較的低いペプチドがラジカルの消去に有効である可能性が高いと考えられた。

一連の本研究で得られた成果から、牛肉、豚肉および鶏肉を用いて、それらを加熱後、消化酵素のペプシン、トリプシンやパンクレアチンで処理すると鶏肉、豚肉、牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。また、抗酸化活性も、有意差は認められないものの各食肉加水分解物は高い抗酸化活性を示した。また、我々は豚肉の消化酵素分解物を自然発症高血圧ラットおよび自然発症糖尿病ラットを用いた持続投与実験を行った

結果、連続的に酵素処理肉を投与した自然発症高血圧ラットおよび自然発症糖尿病ラットにおいて血圧降下作用を示すと共に、血糖値を低下する傾向を認めた<sup>30, 31)</sup>。

これらの結果を総合的に判断すると、生活習慣病予防につながる効果を食肉に期待できるのではないかと考えられ、食肉全体の価値を高めることにつながる結果であり、食肉消費の拡大に貢献していくことが期待される。

#### 4. 要 約

本研究はアミノ酸および食肉タンパク質酵素分解物 (MPs) に関してMPsの抗酸化活性機序を推定するとともに、ペプチドが抗酸化活性を発現するために重要な条件を調査した。

DPPH法およびORAC法のデータからアミノ酸を抗酸化活性機序に基づいて分類すると、ET型はCys, HAT型はHis, Met, Tyr, Trpとなった。特にCysおよびTrpは微量でも高い抗酸化活性を示すことから、ペプチドの抗酸化活性発現に重要なアミノ酸だと考えられた。次に食肉タンパク質酵素分解物の抗酸化活性機序の推定を試みた結果、MPsの抗酸化活性機序は主にHAT型であり、牛および豚肉MPsはカルノシンやアンセリンなどHis由来の活性、また鶏肉MPsはTrp由来の抗酸化活性を発現している可能性が示唆された。

そこで含有アミノ酸と抗酸化活性機序との関係を詳細に調査するために、MPsを再構成した。加水分解アミノ酸分析の結果を反映した再構成MPsはよりもとのMPsに近い活性を示し、His由来の抗酸化活性を発現した可能性が示唆された。DPPH法を用いた場合、再構成MPsはもとのMPsより低い活性を示し、ORAC法を用いた場合、再構成MPsはもとのMPsより高い活性を示した。各種ラジカルを消去できる抗酸化アミノ酸の種類が異なることを考慮すると、特にDPPHラジカルの

消去にはペプチド特有の立体構造も重要な要素になると考えられた。

さらにペプチドとラジカルとの相互作用に関わる要素, 特に極性に着目し, 豚肉MPs由来の低疎水性ペプチド混合物および高疎水性ペプチド混合物の抗酸化活性を測定した。各種ラジカルの消去には低疎水性のペプチドが有効である可能性が考えられ, ペプチドと各種ラジカルとの反応には疎水性度に起因する親和性が関与することが示唆された。

アミノ酸組成は抗酸化ペプチドに重要な要素である。しかしアミノ酸配列もまた抗酸化活性発現に重要な要素である。アミノ酸残基が適正に配列されて初めて抗酸化活性が増強される。ペプチドの抗酸化活性の発現について, 様々な機構が提案されているが未知の部分が多い。従って今後はアミノ酸配列の抗酸化活性への影響および, 抗酸化ペプチドの作用機構についてより詳細に研究していく必要がある。

本研究で得られた成果から, 各種食肉を加熱後, 消化酵素のペプシン, トリプシンやパンクレアチンで処理すると鶏肉, 豚肉, 牛肉の順にACE阻害活性が増加することが認められた。また, 抗酸化活性も, 有意差は認められないものの各食肉加水分解物は高い抗酸化活性を示した。これらの結果から, いずれの食肉を摂取しても生活習慣病予防につながる効果を食肉に期待できることが示唆された。

## 文 献

- 1) 在原圭三: 最新畜産物利用学, 斉藤忠夫, 西村敏英, 松田幹編集, 朝倉書店, 122~124, 2007.
- 2) Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *Asian-Aust. Anim. Sci. J.*, **16**, 417~424, 2003.
- 3) Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *Anim. Sci. J.*, **74**, 53~58, 2003.
- 4) Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Muguruma, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 771~775, 2004.
- 5) Katayama, K., Jamhari, Mori, T., Kawahara, S., Miake, K., Kodama, Y., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Nakayama, M., Maruyama, M., Muguruma, M.: *J. Food Sci.*, **72**, S702~S706, 2007.
- 6) Katayama, K., Anggraeni, H.E., Mori, T., Ahhmed, A.M., Kawahara, S., Sugiyama, M., Nakashima, T., Mayuyama, M., Muguruma, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 355~360, 2008.
- 7) Muguruma, M., Ahhmed, A.M., Katayama, K., Kawahara, S., Maruyama, M., Nakamura, T.: *Food Chem.*, **114**, 516~522, 2009.
- 8) Ahhmed, A. M., Muguruma, M.: *Meat Sci.*, **86**, 110~118, 2010.
- 9) 久保田大樹, アブドラティフアーメド, 河原聡, 六車三治男: 平成21年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, (財)伊藤記念財団, **28**, 1~9, 2010.
- 10) 久保田大樹, 河原聡, 六車三治男: 平成22年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, (財)伊藤記念財団, **29**, 29~39, 2010.
- 11) 奥村宣明: タンパク質実験ノート抽出と分離精製, 岡田雅人・宮崎香編集, 羊土社, 27~31, 1996.
- 12) Murphy J.B., Kies, M.W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 382~384, 1960.
- 13) Simpson R.J., Neuberger M.R., Liu, T.Y.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 1936~1940, 1976.
- 14) Gaitonde, M.K., Dovey, T.: *Biochem. J.*, **117**, 907~911, 1970.
- 15) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一: 食品機能研究法, 株式会社光琳, 218~220, 2000.
- 16) 沖智之, 竹林純, 山崎光司: 食品機能マニュアル集第Ⅱ集, (社)日本食品科学工学会, 79~86, 2008.
- 17) Huang, D., Ou, B., Hmpsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L.: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4437~4444, 2002.
- 18) Garcia-Macias, P., Ordidge, M., Vysini, E., Waroonphan, S., Battey, N.H., Gordon, M.H., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J.A., Wagstaffe, A.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 10168~10172, 2007.
- 19) Bao, L., Yao, X-S., Tsi, D., Yau, C-C., Chia, C-S., Nagai, H., Kurihara, H.: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 420~425, 2008.
- 20) 近藤君夫, 戸井田仁一, 蟻川幸彦, 小原忠彦: 長野県産の食肉の遊離アミノ酸, 長野県工業技術総合センター食品技術部門研究報告, **3**, 36~44, 2010.
- 21) 五訂増補日本食品標準成分表, 文部科学省報告書, 2005.
- 22) 大前允人: *Lactococcus lactis* と *Streptococcus thermophilus* で製造した新規発酵乳の機能特性に関する研究, **74**, 2008.

- 23) Jao, C.L., Ko, W.C. : *Fish. Sci.*, **68**, 430, 2002.
- 24) Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., Kim, S.K. : *J. Nutri. Biochem.*, **16**, 562~569, 2005.
- 25) Serpen, A., Gokmen, V., Fogliano, V. : *Meat Sci.*, **90**, 60~65, 2012.
- 26) Hernandez-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B., Amigo, L. : *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 588 ~ 593, 2005.
- 27) Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Recio, I., Bartolome, B. : *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 3392~3397, 2007.
- 28) Zhao, J., Huang, G.R., Zhang, M.N., Cjen, W.W., Jiang, J.X. : *Am. J. Food Tech.*, **6**, 904~913, 2011.
- 29) 沖智之, 佐藤麻紀, 白土英樹, 工藤康文, 須田郁夫: 焼き栗の殻に含まれる抗酸化成分, 九州農業研究発表会専門部会発表要旨集, 72, 45, 2009.
- 30) 六車三治男, 難波靖, 丸山眞杉, 中村豊郎: 平成19年度食肉に関する成分等の調査研究事業委託研究報告書, (財)日本食肉消費総合センター, 15~35, 2008.
- 31) 六車三治男, 難波靖, 丸山眞杉, 中村豊郎: 平成20年度食肉に関する成分等の調査研究事業委託研究報告書, (財)日本食肉消費総合センター, 35~52, 2009.

# 畜産副生物由来（ヘム鉄）摂取によるスポーツ栄養への効果についての研究

## —栄養摂取状況の観察による貧血改善の試み—

Effect of sports-nutrition-supports by intake of heme-iron on women athlete.

—Trial of the anemia improvement by the observation of the nutrition consumption—

松本 恵・鈴木 淳也・勝又 美紀\*・長谷川 強\*・野口 智博

(日本大学文理学部体育学科, \*ILS株式会社)

Megumi Matsumoto, Junya Suzuki, Miki Katsumata\*, Tsuyoshi Hasegawa\*, Tomohiro Noguchi

(Nihon University, College of Human and Sciences, \*ILS Inc.)

Athletes frequently undergo anemia due to rigorous training, reducing food intake for weight control and destruction of erythrocyte by repeated sole impulse. In addition, menses make it difficult for females to improve anemia. In this study, to investigate effect of combination with supplementation and nutritional counselling, intervention trial for female athletes appealing anemia symptoms was performed. Capsules containing heme-iron were used as supplement (14mg/day of Fe). Nutritional counselling was based on iron status (blood hemoglobin (Hb), serum ferritin (Fer), soluble transferrin), nutrient status and energy expenditure (records of food intake, activity logs and training load). Thirty female subjects ( $20.2 \pm 1.3$  years old, Hb :  $12.4 \pm 0.7$  mg/dL, Fer :  $17.8 \pm 13.7$  ng/mL) from the fencing, the running long jump, the handball and the volleyball players took test capsules every day for 2 months without nutritional counselling. Subjects whom initial values of Hb and Fer were respectively above 11.5 mg/dL and 10 ng/mL ( $n=20$ ) improved their iron status, but not remained subjects ( $n=10$ ). Next, these 10 subjects who trained excessively and showed low Hb and Fer level took test capsules for further 2 months with nutritional counselling. Supplementation of heme-iron with increasing of food-derived mineral and protein intake by nutritional counselling significantly increased blood iron levels. Furthermore this combination decreased "negative moods", increased "vigor" without constipation. In conclusion, the supplementation of heme-iron is available for sports anemia of female athletes. Combination with long-term supplementation of heme-iron and nutritional counselling could enhance effect of improving sport anemia of the highly-trained athletes.

### 1. 目的

貧血症状は女性スポーツの現場において頻発す

る健康障害であり、パフォーマンスを著しく低下させる要因でもある<sup>1)</sup>。スポーツ貧血の原因の多くは運動量の増加に伴って増加する鉄の必要量に



見合う食事からの鉄摂取量が充足できないことによると考えられる<sup>1)</sup>。そのため、貧血症状を予防または改善するためには、鉄が供給できる食品を積極的に摂取できるような食事指導が行われたり、症状が重篤な場合は医師による鉄剤の投薬治療が施されている<sup>2)</sup>。しかし、貧血症状を呈することの多い女性アスリートの場合、新体操などの審美系の競技者でプロポーションの維持のため、日常的に食事を制限していたり、陸上長距離選手のように激しい運動量で消費される鉄を食事のみで補うことが非常に難しいという例が多く、食事指導の効果を発揮することが難しい。また、鉄剤の投薬治療は通院が必要であるため、重篤な症状で無い限りは治療に踏み切らない選手も多く、また、選手によっては、鉄剤の使用により、便秘を誘発することがあり、治療に対して消極的にならざるをえない。そこで、貧血症状の予防や軽度の症状の改善のためには、鉄剤の投与治療よりも負担の少ない方法が期待される。

これまでに我々は鉄補給サプリメントとして、畜産副生物由来のヘム鉄を用い、中・高校生競泳選手の鉄栄養状態の改善が、競泳パフォーマンスにおよぼす影響を調べてきた。その結果、ヘム鉄の摂取は、鉄栄養状態を改善し、トレーニングの効果を向上させ、パフォーマンスを改善することや、高強度のトレーニングによる心理的なストレスを軽減する働きがあることを明らかにしてきた。しかし、その鉄栄養状態の改善効果は選手によって個人差が大きく、とくに女性の被験者で顕著であった。貧血症状の改善には鉄の摂取量を増加させ、体内鉄プールを増加させることが重要であるが、体内鉄プールを増加させるためにはその他の栄養成分の摂取状況の改善も重要であることが考えられる。とくにタンパク質の摂取は鉄輸送タンパク質の確保のためにも十分に摂取することが望ましい。貧血症状の改善効果の差には被験者

個人の栄養摂取状況が大きく関与していることが懸念される<sup>3,4)</sup>。

本研究では、ヘム鉄の摂取による鉄栄養状態の改善効果とその効果におよぼす他の栄養成分の摂取状況の個人差について明らかにすることを目的とし、貧血症状の自覚症状を持ち、鉄栄養状態が不良な女性スポーツアスリートにヘム鉄を継続的に摂取してもらい、その間の栄養摂取状況を観察する。この研究成果が、より効果的な鉄補給サプリメントの使用法とその食事指導方法の発展の一助となることを目指す。

## 2. 方法

### 2.1 被験者

被験者は、N大学に在籍する競技スポーツを行う女子大学生で本人に貧血症状の自覚症状があることを条件に募集し、血液中のヘモグロビン値(Hb)が13.4g/dL以下、10.0g/dL以上、フェリチン値(Fer)が40ng/mL以下、2.8ng/mL以上の軽度～中程度スポーツ貧血と考えられ、重篤で医師による治療が緊急を要しない平均 $20.2 \pm 1.3$ 歳の30名を選出した。各被験者の競技種目はバレーボール、バスケットボール、ハンドボール、陸上短距離・幅跳び、トライアスロン、水泳、ライフセービング、バトミントンで、競技歴は平均 $9.1 \pm 1.8$ 年であった。被験者には試験方法や考えられる不利益等について事前に十分に説明し、同意を得られる場合のみ試験に参加して頂いた。なお、本研究は日本大学文理学部倫理委員会の承認を得て実施された。

### 2.2 介入方法

試験開始前の血液検査により、被験者をHbが12.0g/dL、Ferが10ng/mL以上の20名を軽度貧血グループ、以下の10名を中度貧血グループに分け、それぞれのグループにヘム鉄カプセル(ILS株式会社、ヘムロン2Hi)を毎日朝と夕食時に

700mg (鉄として7mg), 1日に合計1,400mg (鉄として14mg)を2か月間継続的に摂取していただいた。1回目の介入期間では、食事や生活活動に特別な制限は設けなかったが、中度貧血グループのみ1回目の介入に引き続き、さらに2か月間、ヘム鉄カプセルを摂取してもらい、さらに、2週間に1度、栄養面談を行い、サプリメントと栄養指導を併用した。試験の前後で、血液検査、食事摂取頻度調査、体組成測定、体調聞き取り、心理テスト(POMS)を行い、鉄栄養状態の改善状況を確認した。

### 2.3 測定項目

血液検査は、血液中のアルブミン(Alb)、赤血球数(RBC)、Hb、ヘマトクリット(Ht)、MCV、MCH、MCHC、血清鉄(Fe)、総鉄結合能(TIBC)、不飽和鉄結合能(UIBC)フェリチン(Fer)、亜鉛(Zn)について測定した。体組成はインピーダンス法(BOIOSPACE, InBody520)を用いて、体重、体脂肪率、筋量を測定した。食事調査は1週間の思い出し方式による食事摂取頻度調査(建帛社、エクセル栄養君Ver6.0アドインソフトFFQgVer3.5)を用いて、総摂取カロリー、炭水化物、タンパク質、脂質、鉄、亜鉛などの各栄養成分摂取量、穀類、肉類、野菜類、嗜好飲料などの食品群別摂取量の比較を行った。体調の聞き取りシートを作成し、日常的な貧血の自覚症状として、“身体のだるさ”、“めまい”、“頭痛”、“吐き気”、“起床時の気分の悪さ”、“胃のむかつき”等、トレーニング中の感覚として、“息切れ”、“だるさ”、“頭痛”、“筋肉痛”などの項目についてその症状の出現頻度を“全くない”から“いつもある”の5段階選択式の回答方法を用いて評価した。便秘や下痢についても鉄分の摂取の影響を確認するために、質問項目に加えた。また、試験期間中のトレーニング量に関して、ゲームや競技の技術を向上させることを目的とし

た技術系トレーニングと、心肺機能の向上を目指した持久系トレーニングと、筋力や筋量の増加を目指した筋力トレーニングのそれぞれ1週間中の総量を聞き取りによって調査した。貧血症状の状態が心理状態におよぼす影響については、気分プロフィール検査(金子書房、日本語版POMS短縮版)を用いて評価した。

### 2.4 栄養面談

栄養面談は、中度貧血グループの10名のみ、1回目の介入の終了後、1回30分程度で2週間に1度、血液検査の結果と食事調査や体調聞き取り、トレーニング内容を基に栄養指導を行った。指導は、食事摂取基準2010を基準に、個々に指導計画を作成した。朝食の欠食の改善、タンパク質摂取量の増加、鉄分を多く含む野菜や肉類の摂取増加、タンニンを多く含むコーヒー、紅茶、緑茶の摂取量の制限を中心に、個人の生活状況(寮や一人暮らし、家族との同居等)やトレーニング内容、便秘や下痢の状況に合わせて行った。

### 2.5 統計処理

得られたデータはすべて、統計処理ソフト(SAS Institute Japan, JMP 8)を用いて平均値と標準誤差を算出した。各グループ間と各グループのPreとPostの測定値の比較はTukey-KramerのHSD検定を使用して確認した。各グループの介入前後の測定値の変化はStudent-t検定を使用して比較した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 血液検査結果

被験者30名の平均値はHbが $12.4 \pm 0.7$ g/dL、Ferが $17.8 \pm 13.7$ ng/mLであった。1回目の介入試験後の血液検査では、貧血の指標のMCV、MCH、Hb、TIBC、UIBC、Ht値はヘム鉄カプセルを摂取することによって改善傾向が見られたが、有意な変化は見られなかった(Table 1)。

**Table 1** The concentrations of blood iron status in light anemia group and middle anemia group to oral feeding heme-iron at Pre and Post.

	Light anemia group		1st Middle anemia group		2st Middle anemia group
	Pre	Post	Pre	Post	Post
Alb, g/dL	4.7±0.06	4.6±0.1	4.6±0.06	4.5±0.1	4.7±0.07
RBC, 10 <sup>4</sup> /μL	439.5±4.6	453.0±3.1	442.9±15.5	451.4±15.7	452.0±15.3
MCV, fL	90.1±0.9ab	91.6±0.7 a	84.4±1.9 b	84.9±1.9ab	86.0±1.7ab
MCH, Pg	29.8±0.3 a	30.0±0.2 a	27.0±0.9ab	26.8±0.8 b	27.1±0.7ab
MCHC, %	33.2±0.1	32.7±0.2	31.9±0.4	31.5±0.3	31.5±0.3
Ht, 10 <sup>4</sup> /μL	39.5±0.4ab	41.5±0.3 a	37.1±0.6 b	37.5±1.1ab	40.9±1.5ab
Reti, %	11.0±0.5	11.2±0.9	8.3±0.6	8.7±0.6	8.3±0.5
Hb g/dL	13.1±0.1ab	13.7±0.1 a	11.6±0.2 c	12.1±0.4bc	12.6±0.3abc
Fe, mg/dL	93.5±9.7bc	151.3±11.4 a	49.2±7.0 c	72.1±12.5bc	108.5±18.1ab
TIBC, μg/dL	322.6±9.3 b	321.4±12.4 b	405.8±19.4 a	409.5±19.2 a	417.1±24.6 a
UIBC, μg/dL	210.6±18.3 b	197.8±16.9 b	356.6±22.3 a	337.4±20.3 a	308.6±24 a
Fer, ng/mL	31.4±1.9 b	41.9±3.1 a	6.3±0.9 c	9.6±2.9 c	11.7±1.5 c
Zn, μg/dL	89.9±7.7	84.5±4.6	85.8±2.5	82.4±5.0	92.9±2.2

Values are represented as means±SEM (n=20 or 10). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance. A p-value≤0.05 by a Tukey-Kramer test among the five groups was considered to indicate statistical significance. Values for the one-way ANOVA test are indicated as significant with different letters.

RBC, MCHC, Alb, Znは介入前後で有意な変化はなかった。Fe, Ferは軽度貧血グループで、介入前 (Pre) と比較して介入後 (Post), 有意に増加したが、中程度貧血グループでは増加傾向に留まった。中程度貧血グループのみ継続した、2回目の介入試験では、血清鉄が1回目のPreと比較して2回目のPostで有意に増加した。中度貧血グループの2回目のFe, Hb, Ferの変化値は1回目の変化値と比較して有意に高値を示し、軽度貧血グループの変化値に迫る値であった (Fig. 1)。これらの結果より、ヘム鉄カプセルの2か月間の継続摂取は、血液検査から評価される貧血指標を軽度の貧血は改善したが、貧血症状が重い場合はその効果が低いことが考えられた。しかし、食事指導と併用し、ヘム鉄摂取をさらに2か月間継続摂取することによって、血液の鉄状態を改善することが示唆された。

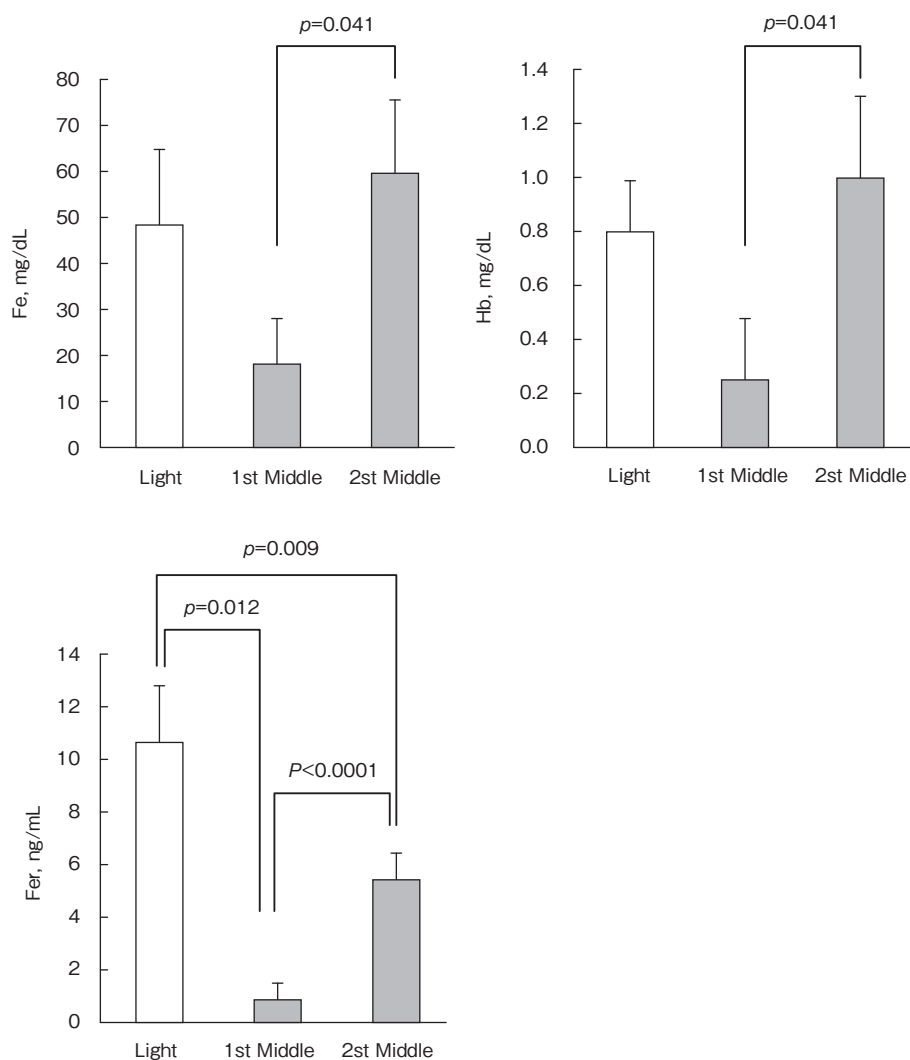
### 3.2 体組成の変化

体重, 体脂肪量, 筋肉量に介入前後の全期間を通して、大きな変化は見られなかった (Table 2)。介入期間は平成23年10月から3月までであったが、本研究での被験者の競技種目ではほとんどの競技で試合期間が終了し、介入期間中に大きなトレーニング内容の変化が無かったことや筋力トレーニングを積極的に取り入れている被験者が少なかったことなどから、筋肉量や体脂肪量の変化が見られなかったのかもしれない。

### 3.3 食事調査の結果

食事摂取頻度からの推定エネルギー摂取量やタンパク質摂取量, 鉄摂取量, 亜鉛摂取量は、中度貧血グループの食事指導を行った2回目の介入後で増加傾向が見られたが有意な変化は見られなかった (Table 3)。食品群では、タンパク質やカルシウムの供給源の魚や小魚類, 乳製品, 鉄分の





**Fig. 1** Changes in Blood Fe, Hb and Fer between Pre and Post in light anemia group and middle anemia group to oral feeding heme-iron. Values are represented as means  $\pm$  SEM (n=20 or 10). A p-value by a Student-t test each groups was considered to indicate statistical significance.

**Table 2** Body weight and Body fat, Muscle mass in light anemia group and middle anemia group to oral feeding heme-iron at Pre and Post.

	Light anemia group		1st Middle anemia group		2st Middle anemia group
	Pre	Post	Pre	Post	Post
Weight, kg	56.5 $\pm$ 2.3	57.2 $\pm$ 2.5	53.4 $\pm$ 1.3	53.9 $\pm$ 1.3	54.7 $\pm$ 1.4
Body fat, %	22.8 $\pm$ 1.1	22.8 $\pm$ 1.2	23.1 $\pm$ 1.7	22.8 $\pm$ 1.8	23.2 $\pm$ 2.3
Muscle mass, kg	23.5 $\pm$ 1.0	23.8 $\pm$ 1.0	22.1 $\pm$ 0.9	22.2 $\pm$ 1.0	22.6 $\pm$ 1.5

Values are represented as means  $\pm$  SEM (n=20 or 10). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance. A p-value  $\leq$  0.05 by a Tukey-Kramer test among the five groups was considered to indicate statistical significance. Values for the one-way ANOVA test are indicated as significant with different letters.

**Table 3** Food intake and nutrients in light anemia group and middle anemia group to oral feeding heme-iron at Pre and Post.

	Light anemia group		1st Middle anemia group		2st Middle anemia group
	Pre	Post	Pre	Post	Post
Total energy, kcal	2381 ± 252	2253 ± 176	2090 ± 120	1964 ± 112	2111 ± 176
Protein, g	75.4 ± 9.4	75.2 ± 5.2	66.5 ± 6.0	67.7 ± 5.8	72.3 ± 5.0
Carbohydrate, g	314.7 ± 28.4	290.4 ± 25.1	263.9 ± 17.0	254.0 ± 12.8	307.9 ± 21.2
Fat, g	81.6 ± 10.2	80.3 ± 5.8	66.2 ± 4.9	68.8 ± 5.8	75.7 ± 7.2
Fe, mg	8.2 ± 0.9	7.9 ± 0.8	7.2 ± 0.8	6.6 ± 0.6	8.3 ± 0.8
Zn, mg	9.5 ± 1.3	9.2 ± 0.7	7.9 ± 0.8	7.9 ± 0.7	8.7 ± 0.6
Brightly colored vegetables, g	78.1 ± 22.1ab	74.0 ± 21.2ab	38.7 ± 7.6 b	61.5 ± 15.4ab	101.8 ± 12.6 a
hypochromic vegetable, g	147.9 ± 28.9	149.7 ± 35.5	78.4 ± 18.3	102.9 ± 19.5	132.4 ± 22.1
Seafood, g	43.6 ± 14.5	38.0 ± 6.9	35.0 ± 7.7	42.0 ± 12.0	54.7 ± 11.2
Meat, g	143.6 ± 25.8	144.0 ± 18.5	106.9 ± 22.7	106.9 ± 16.9	97.7 ± 17.2
Egg, g	35.8 ± 5.6	29.6 ± 4.3	23.0 ± 5.9	29.0 ± 11.0	41.6 ± 11.7
Dairy products, g	180.8 ± 33.0	157.8 ± 35.1	134.3 ± 23.8	179.1 ± 47.1	227.9 ± 55.7
Small fish, g	2.8 ± 1.6	2.7 ± 1.2	2.0 ± 0.9	2.4 ± 1.2	3.8 ± 1.2

Values are represented as means ± SEM (n=20 or 10). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance. A p-value ≤ 0.05 by a Tukey-Kramer test among the five groups was considered to indicate statistical significance. Values for the one-way ANOVA test are indicated as significant with different letters.

**Table 4** Athletic career and training in light anemia group and middle anemia.

	Light anemia group	Middle anemia group
Athletic career, years	9.1 ± 1.8	9.1 ± 1.6
Start athletic years age	9.1 ± 1.2	10.8 ± 1.1
Technical training h/week	7.3 ± 2.3	9.5 ± 1.9
Endurance training h/week	4.7 ± 1.6	4.8 ± 2.0
Strength training h/week	2.8 ± 1.2	1.9 ± 0.7

Values are represented as means ± SEM (n=20 or 10). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance. A p-value ≤ 0.05 by a Tukey-Kramer test among the five groups was considered to indicate statistical significance. Values for the one-way ANOVA test are indicated as significant with different letters.

供給源である緑黄色野菜の摂取頻度が中度貧血グループで2回目の介入後増加する傾向が見られた。軽度貧血グループの1回目の介入前後では栄養摂取状況に変化は見られなかった。

### 3.4 体調の聞き取りとトレーニング量

軽度貧血グループと中度貧血グループを比較して、技術系トレーニング量で中度貧血グループのトレーニング量が高値、筋力トレーニングで定値を示す傾向が見られた (Table 4)。日常的な体調の聞き取りでは、個々のアンケート結果からヘム

**Table 5** Chronic physical condition and physical condition in training in light anemia group and middle anemia group to oral feeding heme-iron at Pre and Post.

	Light anemia group		1st Middle anemia group		2st Middle anemia group	
	Pre	Post	Pre	Post	Post	
Chronic physical condition	Feel languid	3.5±0.3	3.1±0.1	2.8±0.2	2.8±0.3	2.9±0.2
	Hardships of morning	3.7±0.4	3.8±0.2	3.1±0.2	2.9±0.3	2.6±0.3
	Head feels heavy	2.9±0.5	2.8±0.5	2.5±0.3	2.1±0.4	2.1±0.2
	Headache	2.8±0.4	2.6±0.4	2.3±0.3	2.2±0.4	1.9±0.3
	Giddiness	3.3±0.5	2.6±0.2	3.2±0.3	2.9±0.3	2.4±1.5
	Nausea	1.6±0.3	1.3±0.2	1.7±0.2	1.6±0.3	1.5±0.3
	Shortness of breath	2.6±0.3	2.4±0.3	3.3±0.3	2.7±0.3	2.5±0.15
Physical condition in training	Tired feeling	3.1±0.4	2.3±0.4	2.8±0.2	2.5±0.3	2.5±1.9
	Muscular fatigue	2.8±0.5	2.8±0.3	2.7±0.2	2.0±0.3	1.9±0.3
	Headache due to lack of oxygen	2.6±0.4	2.5±0.4	1.9±0.3	1.7±0.2	1.6±0.3

Values are represented as means±SEM (n=20 or 10). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance. A p-value≤0.05 by a Tukey-Kramer test among the five groups was considered to indicate statistical significance. Values for the one-way ANOVA test are indicated as significant with different letters.

**Table 6** Profile of Mood States in training in light anemia group and middle anemia group to oral feeding heme-iron at Pre and Post.

	Light anemia group		1st Middle anemia group		2st Middle anemia group
	Pre	Post	Pre	Post	Post
Tension-Anxiety	13.0±1.4ab	8.5±1.5ab	12.7±1.5 a	12.9±1.4 a	7.6±0.9 b
Depression-Dejection	10.6±2.1ab	9.5±2.3 b	16.0±1.3 a	13.8±1.4 a	5.8±1.5 b
Anger-Hostility	11.5±2.2 a	8.8±2.6ab	16.0±1.8 a	15.0±1.4 a	4.4±0.9 b
Vigor	10.6±1.5ab	10.4±1.4ab	8.2±0.9 b	9.8±1.2ab	13.1±0.9 a
Fatigue	9.7±0.6	7.9±1.8	12.5±1.9	9.7±1.2	8.9±0.7
Confusion	12.6±1.4ab	9.3±1.7bc	14.9±0.6 a	9.9±1.7bc	6.5±0.9 b

Values are represented as means±SEM (n=20 or 10). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance. A p-value≤0.05 by a Tukey-Kramer test among the five groups was considered to indicate statistical significance. Values for the one-way ANOVA test are indicated as significant with different letters.

鉄を摂取して，“だるさがなくなった”，“朝，起きるのがつらくなかった”などの自覚症状の改善を挙げる被験者がいたが，貧血症状の出現頻度の回答では大きな変化は見られなかった（Table 5）。これはそれぞれの自覚症状に個人差が大きく，統計的な傾向を掴むことが難しかったことが

考えられる。トレーニング中の感覚では筋肉疲労やトレーニング後の頭痛の出現が2回目の中度貧血グループのPostで1回目のPreと比較して改善傾向が見られた。このことは，ヘム鉄カプセルの長期継続的摂取と栄養指導の併用がトレーニング時の疲労感も改善する可能性があることが考えら

れた。なお、全介入試験期間を通して、両グループともに便秘や胃痛を訴える被験者は無かった。

### 3.5 心理状態の変化

1回目の介入前後を比較して、軽度、中度貧血の両グループとも大きな変化は見られなかったが、中度貧血グループの2回目の介入試験では“緊張—不安”，“抑うつ—落ち込み”，“怒り—敵意”，“混乱”の項目で有意に低下した (Table 6)。“活気”の項目は有意に増加した。このことから、中度の貧血症状のスポーツ選手にヘム鉄のサプリメントと栄養指導を併用すると、気分や感情の状態が改善され、「生き生きする」などのポジティブな感情が上昇することが明らかとなった。

### 3.6 総合考察

ヘム鉄カプセルを2か月間継続的に摂取することによって、食事の改善や生活の改善指導がなくても、軽度の貧血症状の女性スポーツ選手であれば、血液検査から評価される貧血症状の指標が改善されることが明らかとなった。本試験での軽度貧血グループの被験者の血液検査結果は、一般の貧血改善治療を必要とする指標と比較すると、すべて正常の範囲内にあるが、アスリートが高いパフォーマンスを発揮することを目指す、トップアスリートのHb値は14g/dL以上が望まれるため<sup>5-7)</sup>、ヘム鉄カプセル摂取による貧血指標の改善効果は、競技成績の向上に効果があることが期待される。しかし、心理状態や体調の自覚症状には顕著な改善効果は見られなかったことから、栄養指導や生活改善指導のための面談を通じたカウンセリングが無かったことが関係していると考えられた。このことは、ヘム鉄カプセルの摂取のみでは、顕著な貧血改善効果が見られなかった中度貧血グループの被験者が栄養指導を併用することによって、貧血指標の血液検査結果が改善し、心理状態やトレーニング時の体調に改善効果が見られたことによっても栄養指導を含めたカウンセリ

ングが重要であると言えるだろう。しかし、本研究での栄養指導だけでは、有意に被験者のタンパク質摂取を増加させることができず、血液検査のAlb値も上昇しなかった。また、スポーツ選手にとって重要な筋量の増加や体脂肪の低下などを達成することができず、食事の改善だけではタンパク質の栄養状態を改善することが難しいことが考えられた。貧血症状をもつスポーツ選手は酸素運搬能力の低下や血流の低下などからタンパク質代謝にも影響があり、筋量の増量効率が低い可能性が考えられる<sup>5-7)</sup>。今後は、ヘム鉄カプセルとともにタンパク質源の補給方法を工夫し、トレーニング内容のモニタリングや改善指導も併用した栄養サポートを検討する必要がある、その方法が確立されることがスポーツ選手にとって大変有用な情報になるであろう。

## 4. 要 約

女性スポーツアスリートにとって貧血はパフォーマンスを著しく低下させる病状の一つで、将来にわたっても健康被害が懸念される。スポーツ選手は運動量の増加や食事摂取量の減少、反復される足裏の衝撃による赤血球の破壊などが原因で貧血を頻発しやすい。とくに女性は月経の影響もあり、貧血症状の改善が困難である。本研究では、栄養指導による食事内容の改善と、ヘム鉄サプリメントの併用による女性アスリートの貧血症状の改善効果を明らかにするために、貧血症状を訴える女性アスリートにヘム鉄サプリメント (Fe, 14mg/day) を長期間摂取してもらい、さらに血液検査、食事調査に基づく栄養面談を併用して行った。

被験者は20.2±1.3歳の女性30名で、試験開始前の血液中Hb値は12.4mg/dL、Fer値は17.8ng/mLであった。2か月間のヘム鉄サプリメント摂取のみで食事指導を行わなかった場合、試験開始と終了

後を比較して、Hb, Fer値の正常に近いグループはこれらの有意な増加が見られたが、11.5mg/dL, 10ng/mL以下のグループでは貧血症状に有意な変化は見られなかった。そこで、顕著な改善効果が見られなかった、陸上幅跳び、ハンドボール、バレーボールなどのスポーツ貧血が疑われる、Hb, Fer値が低い10名の被験者に対して継続して2か月間、ヘム鉄カプセルの摂取とともに、食事指導を行い、食事からのミネラル、タンパク質の摂取を増加させたところ、有意に血清鉄値が上昇した。試験期間中は鉄剤に見られる便秘症状などは見られず、心理調査の結果も疲労感が減少し、「活気」が増加した。

以上の結果より、女性のスポーツ貧血の改善にはヘム鉄カプセルの摂取が有効であるが、貧血症状が強く、運動量の多い選手には、食事指導をともなった長期間のサポートがその効果をより向上させることが示唆された。

## 文 献

- 1) 目崎 登：女子スポーツ選手の貧血, *The journal of clinical sports medicine*, **12** (2), 164, 1995.
- 2) 溝口 秀昭：貧血の病態と治療, 最近の進歩, *日本内科学会雑誌*, **93** (9), 1729~1738, 2004.
- 3) 西山 宗六, 中村 俊郎, 井本 岳秋：女子長距離ランナーの貧血に対する亜鉛の治療効果, *The journal of clinical sports medicine*, **12**(10), 1192~1195, 1995.
- 4) 川野 因：スポーツ貧血発現における食事の役割 (特集/スポーツ栄養に関する最近の話題), *食品と開発*, **41** (8), 8~10, 2006.
- 5) Pelliccia A, Di Nucci GB. : Anemia in swimmers, fact or fiction? Study of hematologic and iron status in male and female top-level swimmers. *Int J Sports Med*, **8**, 227~230, 1987.
- 6) Rietjens GJ, Kuipers H, Hartgens F, Keizer HA. : Red blood cell profile of elite olympic distance triathletes. A three-year follow-up. *Int J Sports Med*, **23**, 391~396, 2002.
- 7) *J Athl Train.* : The International Olympic Committee (IOC) consensus statement on periodic health evaluation of elite athletes, *March*2009. **44**, 538~557, 2009.

# 低温乳酸発酵による食肉タンパク質の組織構造と加熱ゲル物性に関する研究

Changes in the heat-induced gel structure and physical properties of muscle protein fermented with psychrotropic lactic acid bacteria

芳賀 聖一・林 利哉

(名城大学農学部)

Seiichi Haga and Toshiya Hayashi

(Faculty of Agriculture, Meijo University)

The aim of this study is to investigate the heat-induced gel formation ability of muscle protein fermented with lactic acid bacteria in cold temperature. We prepared and used myofibrillar protein having key-role for water-holding and binding properties in meat products as a gelation model system. The myofibrillar protein were fermented with 2 strains of psychrotropic lactic acid bacteria, *Lactobacillus sakei* D-1001 (commercial strain) and *Lactobacillus sakei* No. 4 (in-house strain: not fully identified) at 4°C, respectively. After heat treatment at 70°C for 30 min, physical properties and microstructure of resulting gels were analyzed.

Although fermentation profiles between 2 kinds of strain were not always same, both myofibrillar protein gels fermented with these lactic acid bacteria showed higher gel strength and syneresis rate when compared with non-fermented gels. However, there was no distinct difference in protein distribution between fermented and non-fermented samples. The results of differential scanning calorimetry analysis showed that lactic acid fermentation had strong effect on thermal stability of myofibrillar protein. The gel microstructure of each fermented gel appeared to have more fine and strand-type structure compared with that of non-fermented gel. This was strongly supported by the results of image analysis on microstructure of the gels.

Although the changes in microstructure and physical properties of fermented gels could be due to inter-and intra-molecular reactions caused by lactic acid fermentation, further detailed examination will be needed.

## 1. 目 的

発酵処理を施した食肉製品は防腐・保存効果の増大、発酵風味の付与等の発酵食肉製品特有の品質が付与される。しかし、通常行われる発酵処理では有害微生物による汚染リスク、嗜好面での難

点が存在するため、多くの課題を解決する必要がある。当研究室では、低温（5℃前後）で増殖可能な乳酸菌をスターターカルチャーとして利用した発酵食肉製品の開発に関する基礎的研究を進めている。低温発酵処理を施した筋原線維タンパク質はZ帯崩壊による小片化が促進されるが、小片



化とpH低下の推移からpH5.5付近に変曲点のあることを見出した。

そこで本研究では、pH低下に伴う筋原線維タンパク質の小片化率の推移曲線における変曲点付近を発酵の終点とし、発酵処理を行った後の筋原線維試料の加熱ゲル化特性について検討した。

## 2. 方法

### 2.1 実験材料

#### (1) 乳酸菌スターターの調製

筋原線維タンパク質に接種する乳酸菌スターターとして、サンエイ糖化株式会社より譲渡された未同定の低温増殖性乳酸菌株 *Lactobacillus sakei* 属<sup>1)</sup> の菌株No.4 (以下No.4と略す) および、*Lactobacillus sakei* D-1001 (以下D1001と略す) を用いた。

冷凍保存した乳酸菌を流水中で解凍し、前培養後、更新処理後、遠心分離 [(株)久保田製作所6930ローターRA-3] (8,000×g, 10分, 4℃) し、0.85%滅菌生理食塩水で洗浄を繰り返したものを乳酸菌スターターとした。

#### (2) 筋原線維タンパク質の調製

市販豚ロース肉から脂肪と結合組織をできるだけ取り除き、約5cm角のブロック肉に切り、フードプロセッサーにかけて(30秒間)ミンチ状にした。試料からの筋原線維調製はPerryら<sup>2)</sup>、Etlingerら<sup>3)</sup>の方法を一部改変し実施した。得られた筋原線維タンパク質を0.6M-NaClを用いて一晚透析し、終濃度が15mg/mlとなるように0.6M-NaClで希釈した。また、グルコースを筋原線維タンパク質の質量2%となるように、乳酸菌スターターを筋原線維タンパク質の質量3%となるように接種し、4℃の条件下で発酵処理を行った。pHメーター (HORIBA pH METER F-12) を用いて1~2時間ごとにpHを測定し、D1001およびNo.4の乳酸菌スターターを接種した筋原

線維タンパク質のpHが5.3~5.4付近に達するまで発酵処理を行った。その後、これらの試料を、70℃に設定したプロサーモバス (東京理化器械株式会社, NTB-221型) を用いて30分加熱した。

### 2.2 実験方法

#### (1) 乳酸菌数の測定

調製した非発酵試料の10~10<sup>5</sup>倍希釈液と発酵試料の10<sup>5</sup>~10<sup>9</sup>倍希釈液をMRS培地にて30℃、48時間培養し、乳酸菌数 (log CFU/ml試料) を算出した。

#### (2) 物性、離水率、溶解度の測定

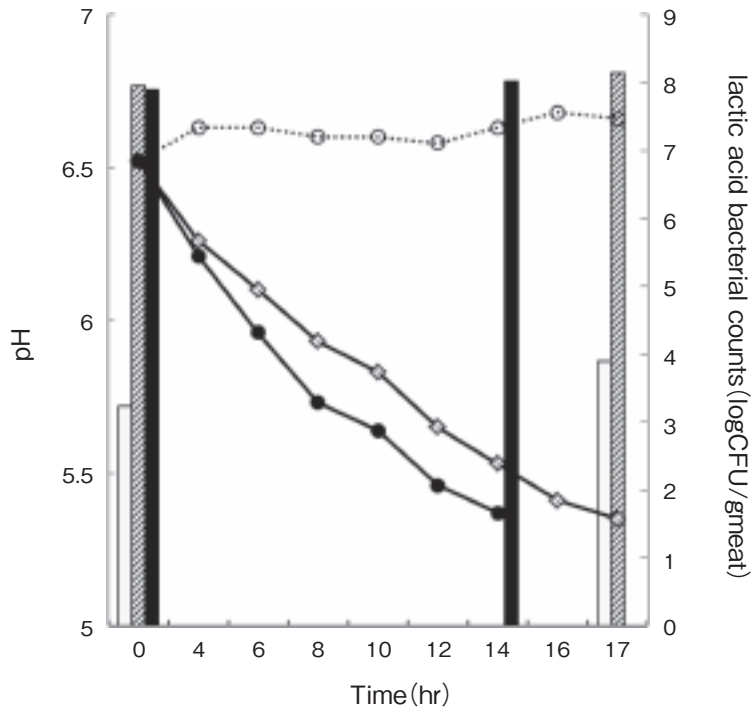
調製された非発酵・発酵の加熱ゲル試料をレオナー (株式会社 山電, RE2-33005 S) と解析ソフトウェア (山電株式会社, 破断強度解析 Ver1.0) を用いて物性測定を行った。離水率は藤田ら<sup>4)</sup>の測定法に基づいて算出した。また、溶解度の測定は各加熱ゲル試料を遠心分離 (35,000×g, 15分, 4℃, 日立工業株式会社, CP70G型) し、その後、上澄み液をろ過して、上澄み画分と沈殿画分に分離した。得られた上澄み画分のタンパク質濃度の加熱前タンパク質濃度に対する相対比率を算出して溶解度とした。

#### (3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下、SDS-PAGEと略す)

(2)で得られた各上澄み画分、沈殿画分、筋原線維タンパク質未加熱試料および離水液のタンパク質分布をSDS-PAGE (アクリルアミド濃度7.5%~20%) により調べた。なお、沈殿画分はSDS添加のもと、ハンドホモゲナイザーで溶液状態になるまで完全にすりつぶして供試した。

#### (4) 示差走査熱量測定 (以下、DSCと略す)

試料として約60mg秤量した未加熱試料と、リファレンスとして試料と同等量の蒸留水をそれぞれ銀密閉型容器に封入したものを用意し、この二つを超高感度型示差走査熱量計 (セイコーインスツルメンツ株式会社, DSC6100) にセットして示



**Fig. 1** Changes in lactic acid bacterial counts and pH during lactic acid fermentation of myofibrillar protein at 4 °C. bacterial count (bar charts) : open bar, non-fermentation; striped bar, D1001; solid bar, No. 4 pH (line charts) : ○, non-fermentation ; □, D1001 ; ●, No. 4

差走査熱量測定を行った。測定温度は9～150℃の範囲で、昇温速度は1.0℃/minとした。

(5) 走査型電子顕微鏡 (以下, SEMと略す) による微細構造の観察

2×3×3 mm程度にトリミングした各種加熱ゲル化試料を、固定、洗浄、脱水置換し、臨界点乾燥機 (HCP-2型, 日立工業株式会社) により試料を乾燥させた。乾燥試料に、イオンスパッタリング装置 (日立工業株式会社, E-101) を用いて、厚さが約300 Åになるように白金を蒸着した。この試料を、走査型電子顕微鏡 [S-3000H型] を用いて観察した。SEM画像により得られた画像は客観的に解析するため二値化処理<sup>5)</sup>を行い、数値化して物性との相関性について検討した。

### 3. 結果と考察

(1) 発酵終点における乳酸菌数とpHの変化

非発酵区, D1001およびNo. 4のスターターを接種した発酵区を変曲点付近に達するまで、低温下 (約4℃) で保存し, pHの変化と乳酸菌数を測定した。D1001およびNo. 4の変曲点はそれぞれpH5.26, pH5.35であるためpH5.4付近を発酵終点とした。

Fig. 1に示すように乳酸菌数は, 非発酵区では発酵区における発酵終点時で $10^3$ レベルを維持しており, 大きな変化は認められなかった。一方, D1001, No. 4を接種した発酵区では, ともに $10^7$ ～ $10^8$ レベルを推移した。pHに関しては, D1001を接種した筋原線維タンパク質は約17時間で, No. 4のそれは約14時間で変曲点付近に達した。



**Table 1** Comparison in the physical properties of heat-induced gels with or without fermentation

	non-fermentation	D1001	No. 4
Breaking energy (J/m <sup>3</sup> )	316.9±206.4 a	2352.4±1803.9 b	2068.3±1648.7 b
Modulus of breaking elasticity (N/m <sup>2</sup> )	104.2±56.6 a	1145.6±565.6 b	1013.5±500.0 c
Syneresis rate (%)	73.29±1.62 a	76.69±2.19 b	75.88±1.43 b
Protein solubility (%)	6.60±0.04 a	2.62±0.42 b	3.06±0.28 b

Values in same row with the same letters are not significantly different ( $P>0.05$ ).

同時間でのD1001とNo.4のpH推移を見ると、D1001よりNo.4の方が常に低いpHを示し、同一菌種でも菌株間での差異が認められた (Fig. 1)。

#### (2) 非発酵および発酵後の筋原線維加熱ゲルの物性、離水率、溶解度の変化

非発酵および発酵試料の加熱ゲル物性、離水率および溶解度を測定した。その結果、Table 1に示すように、両物性値とも発酵区において有意に ( $P<0.01$ ) 高い値を示した。また、菌株間で比較すると、破断エネルギーでは両者間に有意差が確認されなかったが、破断弾性率ではD1001よりNo.4の値の方が有意に ( $P<0.01$ ) 低い値を示した。以上のように、発酵による物性値増大が明らかとなり、菌株によりその影響が異なることが示唆された。

次に、加熱ゲルの離水率を求めた (Table 1)。有意差は認められなかったものの発酵によって離水量が増大する傾向にあることが示された。

続いて、加熱前タンパク質量に対し、ゲル形成に関与しなかったタンパク質量の比率を表すものとして溶解度を測定した。その結果、非発酵区に対し発酵区は有意に ( $p<0.05$ ) 低い値を示し、発酵に伴ってゲル形成に関与するタンパク質量が相対的に増加したことを示すもので、物性値の変化とよく対応していた。

#### (3) タンパク質成分の分布変化

先の結果より、発酵処理による物性値の上昇が認められたが、ゲル形成に関与するタンパク質の

成分分布をSDS-PAGEで検討した。その結果、Fig. 2に示すように、非発酵と発酵の未加熱試料には、筋原線維タンパク質の主要なバンドが明瞭に観察され、15時間前後の発酵処理では構成タンパク質成分に特記される差異は認められなかった。また、加熱ゲルにおいても同様で、ミオシンヘビーチェーン (MHC) とアクチン (Actin) を主とするタンパク質がゲル形成の実質を担っていることが明らかとなった。また、菌株間でも大きな差異が確認できなかったことから、D1001とNo.4では同一のタンパク質成分がゲル形成に関与していることが判明した。

これまで当研究室では、加熱前に様々な処理 (発酵、凍結、レトルト処理) を施した食肉から調製した筋原線維タンパク質において、Z帯の構造に関わる $\alpha$ -アクチニンの離脱に伴う筋原線維の脆弱化を示唆しているが、本研究で行った15時間前後の発酵処理では未加熱ゲル試料と加熱ゲル試料においては発酵の有無による大きな差異が確認できず、今後さらなる検討を行うことにする。

#### (4) 示差走査熱量測定

続いて、発酵処理を施した筋原線維タンパク質の熱力学的特性をDSCにより調べた。本実験では非発酵およびD1001添加の発酵試料について、変性開始温度 ( $T_1$ )、変性ピーク温度 ( $T_2$ ) および変性エンタルピー ( $\Delta H$ ) を求めた。

その結果、非発酵区では、 $T_1 = 26.1^\circ\text{C}$ 、 $T_2 = 38.9^\circ\text{C}$ 、 $\Delta H = 1.497\text{mJ}/\text{mg}$ 、発酵区では  $T_1 =$

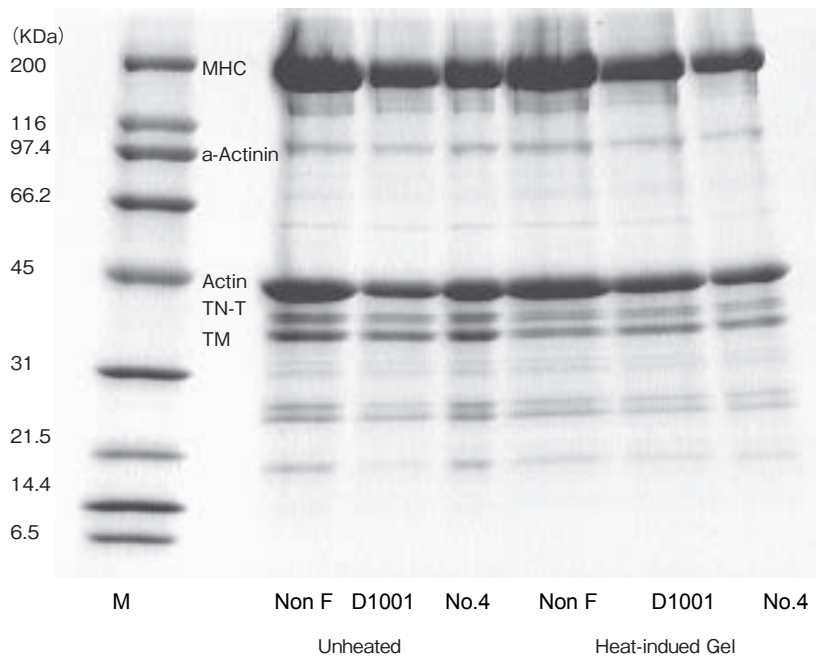


Fig.2 Changes in the SDS-PAGE patterns of myofibrillar protein during lactic acid fermentation. Non-F : non fermentation  
M: marker MHC: myosin heavy chain TN-T: troponin-T TM: tropomyosin

25.2°C,  $T_2 = 37.8^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H = 0.696\text{mJ/mg}$ となった。すなわち、発酵を施すことにより熱感受性が若干高まり、かつ低い熱エネルギーによってゲル形成がなされていることが明らかとなった。

#### (5) 走査型電子顕微鏡による微細構造の観察

以上のように、発酵の有無は筋原線維の加熱ゲル物性に有意な差異をもたらした。これまで当研究室では食肉製品やそのタンパク質ゲルの物理学的特性は、その緻密な組織構造と密接な関係にあることを明らかにしてきた。そこで非発酵および発酵加熱ゲルの微細構造をSEMによって観察した。その結果、Fig. 3に示すように発酵の有無はゲルの微細構造に明らかな差異をもたらした。すなわち、D1001およびNo.4の発酵加熱ゲルでは、ネットワークが繊維状の構造物 (strand-type) に近いものとなり、非発酵に見られる凝集体が数珠状に連なるものとは明らかに異なっていた。

このような組織構造の違いがいわゆるゲル状食

品の食感に強く反映されることについては、当研究室において、あらゆるタンパク質ゲルを試料として明らかにされつつあり、それが食品の食感、さらには栄養価を含めた食品の嗜好性の多くを決定するものとして鋭意検討を重ねている。

前述したように、食肉製品の品質やその実質的役割を果たす筋原線維タンパク質ゲルの物理的性質はその組織構造に支配されていると言っても過言ではない。それを客観的に証明する手法として、先のSEM画像を数値化し、統計手法により画像と機器測定値との関係を検討することは有益な情報を得るために必要と考える。データとしては示さないが、発酵区は非発酵区に比べて緻密なネットワーク構造を形成しており、小さな空洞領域が数多く存在するというSEM画像の視覚情報と同様の結果が得られ、さらに、これら数値情報は他の機器測定値と相関性のあることを認めている。

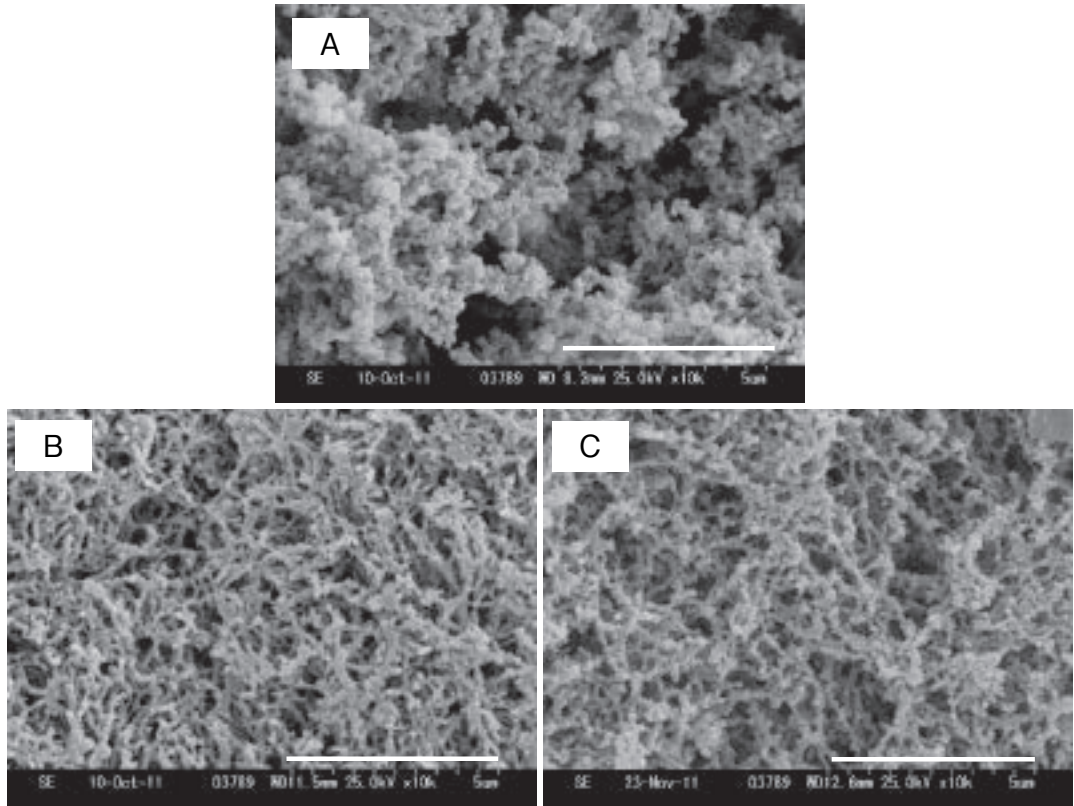


Fig. 3 Comparison of the microstructures of the heat-induced gels with or without fermentation.  
 A: non-fermented gel B: fermented gel (D1001) C: fermented gel (No. 4)  
 Scale bar in each image is 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4. 要 約

食肉製品の食感を初め、製品の品質の良否を決定する筋原線維タンパク質を試料として、市販の低温増殖性乳酸菌 (*Lactobacillus sakei* D-1001) と当研究室が保有する同種の未同定の低温増殖性乳酸菌 (*Lactobacillus sakei* No. 4) を用いて発酵加熱ゲルを作製した。非発酵と発酵試料について、その加熱ゲルの物性測定、ゲル関与タンパク質成分、DSC測定、SEMによる構造観察を行った。

その結果、2種の菌株による発酵過程の推移は異なっていたが、いずれの発酵区も非発酵区に比べ高い物性値を示し、離水率が高いことが示された。しかし、SDS-PAGEの結果より発酵試料の

タンパク質成分分布に大差のないことが判明した。次に、DSC測定により、タンパク質変性の転移温度の若干のシフト、また、エンタルピーの低下は加熱ゲル形成において、発酵処理が強く影響を及ぼしていることを裏付ける結果となった。さらに、SEMによる組織構造解析では、発酵区において繊維状の細かいネットワークが緻密な微細構造を結果として形成し、それは画像解析によってさらに客観的に証明できた。以上のように発酵処理による筋原線維加熱ゲルの物性変化や組織構造の差異は発酵処理によるタンパク質成分の分子内および分子間の相互作用に影響されたものと推察されるが、今後、さらなる検討を行い組織構造変化とゲル物性の関係を明らかにしていく予定で

ある。

#### 文 献

- 1) 寺本華奈江, 佐藤浩昭, 孫麗偉, 島村政基, 田尾博明, 和栗伸伍, 林利哉, 芳賀聖一: マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による低温増殖性乳酸菌の迅速同定及び分類, *分析化学*, **56** (12), 1063~1070, 2007.
- 2) S. V. Perry and T. C. Grey : *Biochem.J.*, **64**, 184, 1956.
- 3) J. F. Etlinger and D. A. Fiscman : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 516, 1972.
- 4) 藤田利宗, 林利哉, 芳賀聖一: レトルト加熱によるアクトミオシゲルの物性変化に関する研究, *食科工*, **53**, (8) 423~429, 2006.
- 5) 芳賀聖一, 岩切鉄矢, 水野達也: 食肉タンパク質ゲル微細構造の画像解析とゲル物性に関する研究, 名城大学農学部学術報告, **37**, 89~94, 2001.

## 糖修飾LEAタンパク質の利用を基盤とする食肉の新しい凍害防御技術の確立

Establishment of novel cryoprotective method for meats using glycated  
LEA protein

本 城 賢 一・井 倉 則 之・野 間 誠 司

(九州大学大学院農学研究院)

Ken-ichi Honjoh, Noriyuki Igura and Seiji Noma

(Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University)

Effect of glycation through Maillard reaction on cryoprotective activity of late embryogenesis abundant (LEA) protein was investigated. LEA and sugars including glucose, maltose and dextrin were simultaneously solubilized in water, and those were then lyophilized. The resultant powders were heated at 80°C for glycation of LEA through Maillard reaction. Cryoprotective activity of glycated LEA was determined by measuring residual activity of cryo-sensitive enzyme, lactose dehydrogenase (LDH), after a freeze-thaw treatment in the presence of the glycated LEA. Cryoprotective activity of LEA on LDH was concentration-dependently increased at concentrations ranging from 1 to 10  $\mu$ M. Therefore, the concentration for comparing cryoprotective activity of LEA and glycated LEA on LDH was set at 1  $\mu$ M. The LDH residual activity was increased to 118% in the presence of LEA glycated with glucose through heating for 1h comparing to unglycated LEA. The LDH residual activity was increased to 124% in the presence of LEA glycated with maltose through heating for 3h. Each increased cryoprotective activity was estimated to be 2.43  $\mu$ M and 3.01  $\mu$ M concentration of unglycated LEA, respectively. Glycation of LEA by dextrin decreased cryoprotective activity of LEA. MALDI-TOF-MS analysis suggested that the LEA with the increased cryoprotective activity was glycated with one molecule of glucose or maltose. Reversed phase chromatography analysis showed that the increase in the hydrophilicity mediated by the glycation of LEA with one glucose or maltose molecule was not pronounced. Drip from the minced beef after freeze-thaw treatment was reduced by the addition of BSA glycated with dextrin.

### 1. 目 的

食肉の食肉的価値の保持には低温、特に冷凍温度域での保存が望ましい。これは食肉内での化学反応および微生物増殖の速度を低下させることに起因する。しかし、冷凍速度が遅ければ、凍害、

すなわち氷結晶の成長に伴う細胞膜の損傷やタンパク質の変性が起こり、解凍時の多量のドリップ生成につながる。

我々はこれまでの研究で、低温処理により耐凍性を獲得する *Chlorella vulgaris* C-27 から、強い凍害防御作用を示す late embryogenesis



abundantタンパク質 (LEA) を得た<sup>1)</sup>。本タンパク質は、塩基性アミノ酸を含む親水性アミノ酸に富んでおり、高い親水性を示す。LEAはこの高い親水性によって水分子を補足し、氷結晶の構造ならびに成長速度に影響を及ぼすことによって凍害防御作用を示すと考えられている。一方、タンパク質の親水性は、メイラード反応による糖付加により増強可能であることが分かっている。本反応はタンパク質においては塩基性アミノ酸の側鎖アミノ基に対して起こる特徴がある。

以上の背景を踏まえ、LEA中の塩基性アミノ酸に糖を付加することによって親水性を増強すれば凍害防御作用の強化につながり、これを低濃度で食肉に添加すれば、凍結速度に依存せずに、また風味に影響を及ぼすことなく食肉の凍害を防止できると考えた。

LEAのような凍害防御タンパク質の生理的意義については多くの研究があり、凍害、乾燥などのストレス耐性を増加させることが明らかになっている<sup>2)</sup>。一方で、植物の葉に含まれる凍害防御タンパク質を粗抽出物として食品に添加することで凍害防御を試みる研究もある。しかし、凍害防御タンパク質の作用増強を試みた例はない。メイラード反応による糖付加をタンパク質の熱安定性の向上やアレルゲン性の低下に利用する研究は国内外でよく行われている<sup>3~5)</sup>。しかし親水性の増強を積極的に活用した研究は皆無に等しい。したがって糖付加技術に基づくLEAの凍害防御作用の増強とその利用は新しい試みである。

本研究では、糖付加したLEAの利用を基盤とする新しい凍害防御技術の確立を目指す。そのためまず、LEAの凍害防御機能を増強する糖付加条件を明らかにし、生成した糖付加LEAの特性を調べる。また、食肉の品質に及ぼす影響を検討することを目的とする。

## 2. 方 法

### 2.1 LEAの発現と精製

既報<sup>1)</sup>にしたがい、大腸菌を用いて発現させた後、精製した。

### 2.2 糖付加LEAの調製

LEAとGlucose, Maltose, Dextrinをそれぞれモル濃度比で1 : 10, 1 : 10, 1 : 1で水に混合溶解した。Dextrinについては平均分子量3,500を代表値として濃度計算に用いた。また、メイラード反応の効率を考慮し、LEAとdextrinを混合溶解後、NaOHを添加することでpHを8以上とした。これらをそれぞれ凍結乾燥した後、気流式乾燥器(Constant temperature oven DN-4L, Yamato)を用いて80℃で加熱したものを糖付加LEAとした。比較対象としてウシ血清アルブミン (BSA)を用いた。BSAと糖類を水に混合溶解後、pH調整を行わずに凍結乾燥した。その後、LEAと同様に80℃で加熱することにより糖付加を行った。

### 2.3 糖付加LEAの凍害防御活性の評価

糖付加LEAの凍害防御活性は、lactate dehydrogenase (LDH, ウサギ筋肉由来)の凍結に伴う活性低下を抑制する作用を指標にして評価した。糖付加LEAをLDH溶液に添加し、エタノールバスを用いて-20℃で一晩凍結させた。4℃で解凍した後、既報<sup>1)</sup>に従い残存LDH活性を測定した。また比較として、糖未付加のLEAタンパク質、糖付加BSA、糖類 (glucose, maltose, sucrose, trehalose, dextrin)のLDHに対する凍害防御活性を同様に調べた。

### 2.4 糖付加LEAの特性解析

糖付加LEAの質量はMALDI-TOF-MS (AXIMA-CFR Plus, Shimadzu)を用いて評価した。マトリックスにはシナピン酸の50%アセトニトリル飽和溶液を用いた。親水性は逆相クロマト

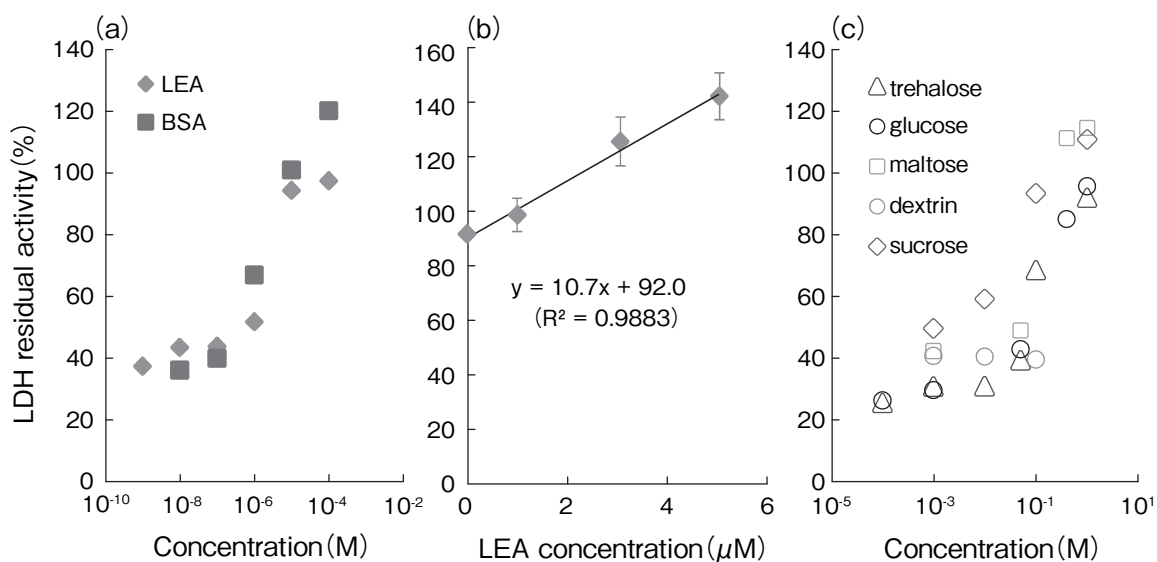


Fig. 1 LDH residual activity after freeze-thaw treatment in the presence of LEA and BSA (a). Calibration curve between LEA concentration and LDH residual activity (b). LDH residual activity after freeze-thaw treatment in the presence of sugars (c).

グラフィーにおける溶出時間によって評価した。使用した条件は以下のとおりである。溶離液：0.1%TFA (A液) および0.1%TFA含有アセトニトリル (B液), グラジエント：0分 (B液30%) → 10分 (B液40%), 流速：0.2ml, カラム：Atlantis T 3, 50×2.1mm, 3 μm (Waters), カラム温度：30℃, 検出波長：220nm。

## 2.5 食肉に対する添加と品質評価

糖付加が食肉の凍害防御作用に及ぼす影響を調べるために、先の実験において糖付加により最も高い凍害防御活性を示したdextrin付加BSAを用いて、牛ひき肉のドリップ変化を検討した。Dextrin付加BSAを脱イオン水に溶解し、牛ひき肉に混合した後、4 cm φ × 2 cmの円柱状に成形し、-20℃の冷凍庫中で2日間凍結した。4℃で解凍した時に生じるドリップ量を、ろ紙の上に置いたときに生じる濡れ円の面積を測定することで評価した。コントロールとしてdextrinとBSAの非加熱混合物の水溶液および同量の脱イオン水を添加した牛ひき肉についても検討し、各々3回の

結果の平均値を求めた。さらに、冷凍やけの有無を視認した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 LEA, BSA, 糖類の凍害防御活性の濃度依存性

糖付加がLEAの凍害防御活性に及ぼす影響を調べるための予備検討として、糖未付加LEAおよびBSAの凍害防御活性の濃度依存性を調べた (Fig. 1-a)。LDH残存活性は未凍結のLDH活性を100%として表した。LEAおよびBSAは1 μM以上でLDHの活性低下を抑制したため、1 μM以上で凍害防御活性を示すと考えられた。特に、1 μMから10 μMの濃度域では凍害防御活性が顕著に増加したことから、この濃度域内で糖付加がLEAおよびBSAの凍害防御活性に及ぼす影響を調べるのが適当であると考えられた。そこで次に、LEA濃度と凍害防御活性の関係をより詳細に調べた (Fig. 1-b)。結果は1 μMにおける凍害防御活性を100%として示した。0から5 μMの



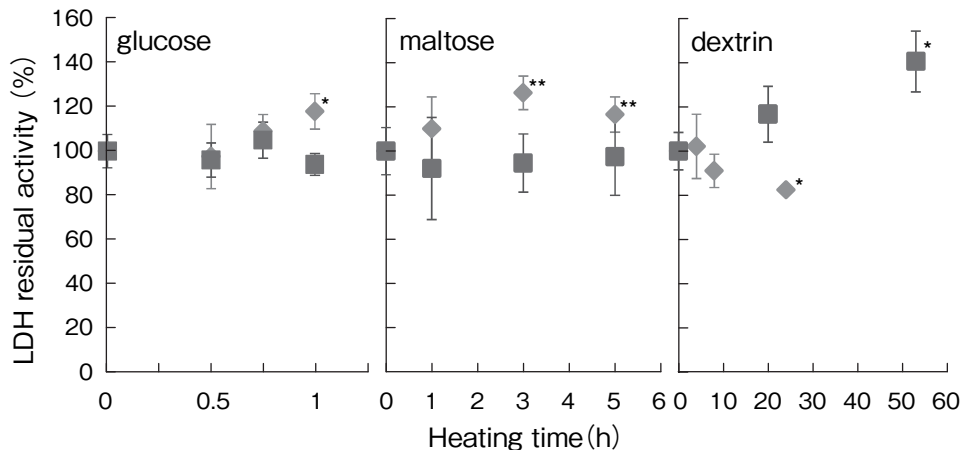


Fig.2 LDH residual activity after freeze-thaw treatment in the presence of LEA (rhombus) and BSA (square) glycosylated with glucose, maltose and dextrin with heating at 80°C for various periods. Symbols “\*\*\*” and “\*\*” show significant difference versus 0h heating at  $p < 0.01$  and  $0.05$ , respectively.

濃度範囲において、LEA濃度と凍害防御活性は良好な直線関係を示し、一次回帰式  $y = 10.7x + 92.0$  ( $R^2 = 0.988$ ) が得られた。

同様に、各種糖類の凍害防御活性の濃度依存性を調べた (Fig. 1-c)。LDH残存活性は、未凍結のLDHの活性を100%として表した。その結果、糖類はおおむね10mM以上で凍害防御活性を示した。dextrinは凍害防御活性を示さなかったが、これは凍結の際にdextrinが析出して濃度が低下することが原因であると考えられた。

### 3.2 糖付加がLEAおよびBSAの凍害防御活性に及ぼす影響

LEAとglucose, maltose, dextrinの混合物を様々な時間加熱することでLEAに糖を付加させた。これに水を加えて糖付加LEAの濃度を  $2 \mu\text{M}$  に調整し、LDH溶液と体積比 1 : 1 で混合したものを  $-20^\circ\text{C}$  で凍結させた。  $4^\circ\text{C}$  で解凍後、LDH活性を測定した。なお、このサンプル中にはLEAに付加していないglucose, maltose, dextrin分子もそれぞれ  $10 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  以下の濃度で含まれるが、Fig. 1-cの結果から凍害防御活性はまったく示さないと考えられる。結果

は加熱を行っていない上記LEA-糖混合物の凍害防御活性を100%として表した (Fig. 2)。BSAについても同様の操作を行った。

LEA-glucose混合物においては、加熱0.5時間以降は時間依存的に凍害防御活性の増加が認められ、1時間では凍害防御活性が加熱0時間、すなわちglucose未付加LEAの118%になった。一方でBSAでは加熱時間0から1時間で有意な凍害防御活性の変化は認められなかった。

LEA-maltose混合物においては、加熱1時間から凍害防御活性が増加する傾向が認められ、3時間では最大の124%に達した。しかし5時間では117%になった。一方、BSAでは加熱時間0から5時間で有意な凍害防御活性の変化は認められなかった。

LEA-dextrin混合物においては、加熱24時間後、LDH活性がdextrin未付加LEAの83%に低下した。一方BSAでは20時間で約117%、53時間で141%に増加した。

凍害防御活性が118%に増加したLEA-glucose 1時間加熱、124%に増加したLEA-maltose 3時間加熱と同等の凍害防御作用を示すために必要な

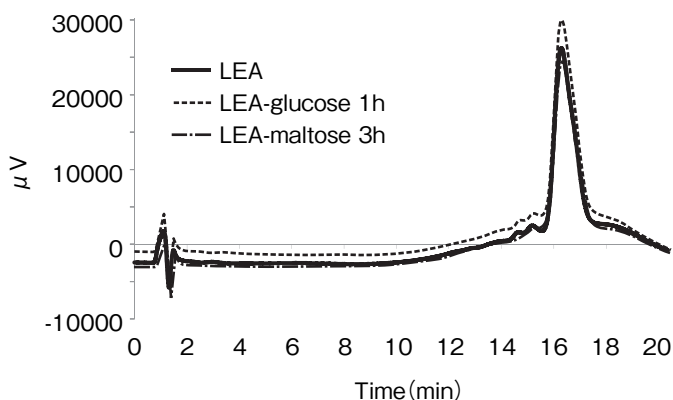


Fig. 3 Reversed phase chromatograms of LEA and glycosylated LEA.

LEA濃度をFig. 1-bで得た一次回帰直線式から算出した。その結果、それぞれ2.43, 3.01  $\mu\text{M}$ となった。

以上の結果から、単糖類や二糖類のglucoseやmaltoseを付加することによってLEAの凍害防御活性が増加することが明らかとなった。またmaltoseの結果から、凍害防御活性の増加には適した付加率があることが示唆された。一方でBSAでは多糖類であるdextrinを付加することによって凍害防御活性の増加が認められ、タンパク質によって凍害防御活性を増加させる糖の種類は異なることが示唆された。

### 3.3 糖付加LEAの特性解析

Glucoseやmaltoseを付加したLEAの質量をMALDI-TOF-MSで分析した。LEA-glucose 1時間加熱、LEA-maltose 3時間加熱ともに、LEA分子すべてではないものの、glucoseまたはmaltoseが1分子付加していた。また、LEAに糖が2分子以上付加している場合は活性の増加が認められなかった。したがって、糖が1分子のみ付加するように加熱条件を最適化することによって、活性がより顕著に増加する可能性が考えられた。

糖付加がLEAの親水性に及ぼす影響を、逆相HPLCにおける溶出時間により評価した。結果を

Fig. 3に示す。LEA-glucose 1時間加熱およびLEA-maltose 3時間加熱の溶出時間は糖未付加LEAと同等であった。質量分析の結果から、糖は1分子付加しているのみであるため、溶出時間に影響を及ぼすほど親水性は増加していないと考えられた。なお、maltoseが2分子以上付加したLEAにおいては溶出時間の短縮が認められた。したがって、LEAにおいては、凍害防御活性の増加は単純に親水性の増加にのみ依存するわけではない可能性が考えられた。

Maillard反応によるglucoseの付加によってリゾチームの立体構造が変化することがシミュレーションされている<sup>6)</sup>。一方でLEAの凍害防御活性には特定の構造が必要であることが明らかになっている。凍害防御活性の増加機構を明らかにするためには、LEAを付加した糖の数ごとに分取してそれぞれの凍害防御活性を調べることによって、付加する糖の分子数と凍害防御活性の関係を明らかにすること、糖の付加がLEAの $\alpha$ -ヘリックス構造に及ぼす影響を明らかにすることが必要であると考えられる。

### 3.4 食肉に対する添加と品質評価

肉は凍結解凍することにより、ドリップが生じる。これは凍結中に生成する氷結晶により組織が

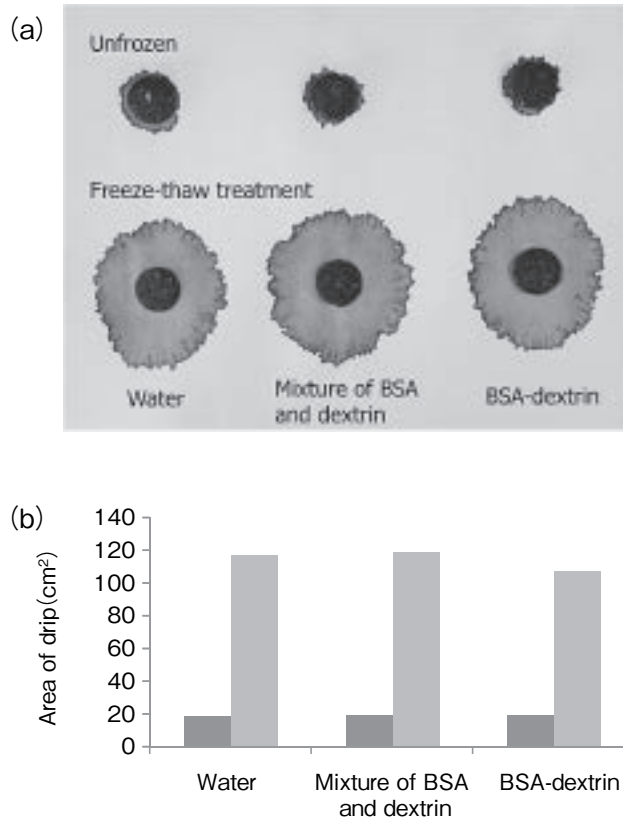


Fig. 4 Drip from the minced beef after freeze-thaw treatment (a). The minced beef was formed into cylindrical shape (4cm  $\phi$  x 2cm) after mixing with mixture of BSA and dextrin solution, BSA glycosylated with dextrin (BSA-dextrin) solution, or corresponded water. The area of drip was measured from the pictures (b).

損傷したことによると考えられる。今回の検討ではドリップが出やすい4℃における緩慢解凍を用いたため、未凍結区と比較すると、凍結解凍区では明らかにドリップの増加が認められた (Fig. 4)。しかし、dextrin付加BSA添加区ではコントロール (水添加区) と比較してわずかにドリップ量の減少が認められた。dextrin付加BSAの水溶液は、dextrinとBSAの混合物の水溶液と比較して、明らかな粘性の増加が認められたことから、dextrin付加BSAは肉中の保水性を上昇させ、その結果として凍結解凍に伴う氷結晶の増大を抑制したと考えられた。なお、冷凍やけについては今回の条件ではいずれの試験区でも認められなかった。

#### 4. 要 約

本研究では、糖付加したLEAの利用を基盤とする新しい凍害防御技術の確立を目指し、まずLEAの凍害防御活性を増加させる糖付加条件を調べた。その結果、80℃で1時間加熱してglucoseを付加させた場合、または80℃で3時間加熱してmaltoseを付加させた場合に凍害防御活性が増加した。このとき、glucoseおよびmaltose分子はそれぞれ1分子付加していたが、この糖付加に伴う顕著な親水性の増加は認められなかった。凍害防御活性が増加したdextrin付加BSAを牛ひき肉に添加すると、わずかながらドリップの減少が認められた。

## 文 献

- 1) Honjoh, K., Matsumoto, H., Shimizu, H., Ooyama, K., Tanaka, K., Oda, Y., Takata, R., Joh, T., Suga, K., Miyamoto, T., Iio, M., and Hatano, S. : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64**, 1656~1663, 2000.
- 2) Goyal, K., Walton, L.J. and Tunnacliffe, A. : *Biochemical Journal*, **388**, 151~157, 2005.
- 3) Aoki, T., Hiidome, Y., Kitahara, K., Sugimoto, Y., Ibrahim, H.R. and Kato, Y. : *Food Research International*, **32**, 129~133, 1999.
- 4) Aminlari, M., Ramezani, R. and Jadidi, F. : *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 2617~2624, 2005.
- 5) Lagemaat, J., Silván, J.M., Moreno, F.J., Olano, A. and del Castillo, M.D. : *Food Research International*, **40**, 153~160, 2007.
- 6) Yeboah, F.K., Alli, I., Yaylayan, V.A., Konishi, Y., Chowdhury, S.F. and Purisima, E.O. : *Bioconjugate Chemistry*, **15**, 27~34, 2004.

## 粉末茶による食肉および食肉製品中の糞便系大腸菌群の制御 についての研究

The use of powder tea leaf to control the fecal coliforms in meat and meat products

岡崎 貴世  
(四国大学生生活科学部)

Kiyo Okazaki  
(Faculty of Human Life Science, Shikoku University)

The inhibitory effect of powder tea leaf containing catechins on growth of *Escherichia coli* was investigated. The powder tea leaf is produced in the final step of manufacturing process and has good characteristics, such as a rapid and large extraction of catechins from tea leaf. The extract of powder tea leaf (tea extract) exhibited growth inhibition of *E. coli* at low concentration of initial cell ( $8.2 \times 10^2$  cfu/ml), however its activity decreased with an increase in the initial cell concentration. Higher activity was recognized in an aqueous solution of freeze-dried tea extract (tea solution), which contained more catechins. Each tea extract, tea solution and powder tea leaf was added to commercial minced meat which inoculated with *E. coli* cell suspension ( $8.2 \times 10^2$  cfu/g meat). After each meat was frozen for 24h and defrosted at room temperature for 1h, the survival cell number in meat was measured. Tea solution showed a strong inhibitory effect against *E. coli*, but the effect was not enough to control the bacteria in minced meat. In the presence of chelate compounds, the effect of catechins in tea solution increased. Survival cell (%) of *E. coli* in meats treated with a mixture of tea solution and 45 ppm EDTA or 300 ppm sodium citrate was 46.2% and 65.9%, respectively. These data supports the possibility that an aqueous solution of freeze-dried powder tea extract is useful to control *E. coli*, the fecal coliforms, in meat and meat products.

### 1. 目 的

平成23年4月、生肉ユッケを原因食品とする腸管出血性大腸菌O111による集団食中毒が発生し、死者4名を含む多くの重症患者を出したことは記憶に新しい。食肉の衛生的な取り扱いが食品の製造・加工に携わるものにとって最優先されるべき事項であり、食による健康被害は決して起こしてはならない。

そこで、食肉および食肉製品を汚染する食中毒微生物、特に糞便系大腸菌群の制御を行うことを目的に、粉末茶利用の可能性の検討を行った。粉末茶とは茶の製造過程（仕上げ切断操作）で生じる細かい粉末状の茶葉で、通常飲用に利用される茶葉同様、多くの緑茶カテキンを含有しているが、形状が粉末であるためカテキンの溶出速度が速く、また溶出量も多いという特徴を有する。そのため、より一層効果的なカテキンの細菌増殖抑

制作用が期待できると考えられる。

カテキンの抗菌作用に関しては、黄色ブドウ球菌やグラム陰性桿菌<sup>1)</sup>、病原性大腸菌<sup>2)</sup>、ヘリコバクター・ピロリ菌<sup>3)</sup>やコレラ菌<sup>4)</sup>など多種類の微生物に対して増殖阻害作用を示すことが報告され、さらにグラム陰性菌よりもグラム陽性菌に対して高い活性を示す<sup>1)</sup>こと、カテキン類の中ではガロイル基を持つエピガロカテキンガレート (EGCg) が高い抗菌活性を示す<sup>5)</sup>ことなどが報告されている。カテキンの作用機構についても多くの報告があり、その詳細に関してはまだ未解明なところもあるが、細胞膜へのカテキンの吸着による膜の損傷作用<sup>6)</sup>や過酸化水素発生による死滅作用<sup>7)</sup>であると考えられている。これらの知見をもとに本研究では、細菌汚染を受けやすいミンチ肉が長期間保存されることを想定して、凍結・解凍されるミンチ肉中に混在する大腸菌に対する粉末茶カテキンの増殖抑制作用を測定した。

## 2. 方法

### 2.1 粉末茶の抽出液および凍結乾燥茶液の調製

粉末茶は、2011年春、徳島県三好市山城町で生産された一番茶から生じたものを使用した。

粉末茶50gに85℃に加温した滅菌水150mlを加えた浸出液から茶葉を取り除いて茶抽出液（原液）とした。茶抽出液は必要に応じて滅菌水で希釈して使用した。また、粉末茶50gに85℃に加温した滅菌水450mlを加えた浸出液を凍結乾燥し、得られた乾燥粉末を滅菌水で再溶解したものを凍結乾燥茶液として試験に用いた。

### 2.2 カテキン類の定量分析

茶中のカテキン類として、(-)-エピガロカテキン (EGC)、(+)-カテキン (C)、(-)-エピガロカテキンガレート (EGCg)、(-)-エピカテキン (EC)、(-)-エピカテキンガレート

(ECg)、(-)-カテキンガレート (Cg) およびカフェイン (CF) の7種類を測定した。分析は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により行った。茶抽出液および凍結乾燥茶液は移動相溶液で希釈または溶解したあとフィルター (0.20 μm) を通してHPLC試料とした。分析条件は以下のとおりである。

分析カラム：CAPCELL PAK C<sub>18</sub>UG120

S3：4.6mm i.d.×100mm

移動相：0.5%リン酸：メタノール=82：18

流速：0.8ml/分

カラム温度：40℃

検出波長：215nm

### 2.3 供試菌および培養

糞便系大腸菌として、大腸菌 (*Escherichia coli* K12 W3110) を用いた。大腸菌は、L-broth (1.0%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) に接種し、35℃で18時間前培養後、菌懸濁液濁度がOD<sub>660</sub>=0.1 (菌濃度：約1×10<sup>7</sup> cfu/ml) となるように滅菌水で調製し、必要に応じて滅菌水または液体培地で希釈して使用した。

### 2.4 茶抽出液および凍結乾燥茶液の増殖抑制効果の測定

茶抽出液原液をNutrient Broth (BD社、以後NB培地と略す) で2倍、2.5倍、3.125倍希釈した液0.5mlと、NB培地でOD<sub>660</sub>=0.0001または0.00001に調製した大腸菌懸濁液0.5mlを試験管内で混合し (茶抽出液の最終希釈度は4倍、5倍、6.25倍となる)、この混合液を35℃で24時間培養を行った。培養後の混合液をペプトン加生理食塩水 (日水製薬株式会社) で段階希釈を行い、XM-G寒天培地 (日水製薬株式会社) の平板上に塗抹して形成されたコロニー数を計測し、菌数を算出した。凍結乾燥茶液の増殖抑制効果は10w/v%溶液のNB培地希釈液を用いて同様に測定を行った (凍結乾燥茶液の最終濃度は2.5, 2.0, 1.0w/v%となる)。



**Table 1** Catechin components in tea extract and 10w/v% aqueous solution of freeze-dried tea extract (tea solution).

	Contents (mg/ml)	
	tea extract	tea solution
Epigallocatechin (EGC)	33.5	38.1
Catechin (C)	0	0
Epigallocatechin gallate (EGCg)	7.35	10.3
Epicatechin (EC)	3.45	4.26
Epicatechin gallate (ECg)	1.60	2.24
Catechin gallate (Cg)	0.692	0.842
Caffeine (CF)	7.71	9.00

### 2.5 ミンチ中の大腸菌に対する茶抽出液および凍結乾燥茶液の効果測定

密閉できるビニル袋に市販の国産牛ミンチ50 gとOD<sub>660</sub> = 0.01に滅菌水で調製した大腸菌液50  $\mu$  lを加えてよく混和したあと、茶抽出液（原液または2倍希釈液）0.5mlを添加してよく揉み、24時間冷凍を行った。室温で解冻1時間後、ペプトン加生理食塩水100mlを加えミンチとよく混和し、ろ過後、段階希釈し、XM-G寒天平板を用いてコロニー数を計測した。大腸菌に対する増殖抑制効果は、茶抽出液の代わりに滅菌水0.5mlを添加した牛ミンチ中の菌数に対する残菌率（%）で評価した。凍結乾燥茶液（1.0, 5.0, 10w/v%）についても同様の操作で測定を行った。さらに、粉末茶（1.0 gまたは0.5 g）の効果も測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 カテキン類含有量

茶抽出液および10%凍結乾燥茶液に含まれるカテキン類のHPLC定量結果をTable 1に示す。カフェインを含むカテキン類含有量の合計値は、茶抽出液が54.3mg/mlで、凍結乾燥茶液が64.7mg/mlであった。カテキン類の中で高い抗菌活性を示すEGCgの含有量は、それぞれ7.35mg/ml, 10.3mg/mlであった。

### 3.2 茶抽出液および凍結乾燥茶液の増殖抑制効果

食肉に茶抽出液等を添加する試験に先立ち、本研究で調製した茶抽出液および凍結乾燥茶液の細菌増殖抑制効果を把握するため、液体培地中における効果を測定した。また、一般に抗菌性物質の増殖抑制効果は菌濃度の影響を受ける<sup>8)</sup>ことから、菌濃度の異なる大腸菌懸濁液を用いて測定を行った。その結果、Fig. 1 -aに見られるように、菌濃度が $8.2 \times 10^2$  cfu/mlのとき茶抽出液（希釈度4倍）は、高い増殖抑制効果を示すことがわかった。しかし、菌濃度が高いとき（ $8.2 \times 10^3$  cfu/ml）や希釈度が5倍になるとその効果は著しく低下した。またデータは示さないが希釈度が6.25倍を超えた薄い茶抽出液を用いた場合はコントロールの菌数以上に大腸菌が増殖をしていた。これは、茶抽出液と菌液の混合溶液の培養温度が35℃であったため大腸菌が増殖しやすい温度であったことや茶抽出液に含まれる栄養成分により大腸菌が増殖したことが理由と考えられた。

茶抽出液では大腸菌に対して十分な増殖抑制効果を示すことができないと考えられたため、抽出液を凍結乾燥させてカテキン濃度を高めた凍結乾燥茶液の効果を検討した。Fig. 1 -bに見られるように、菌濃度が低い場合、凍結乾燥茶液は非常に



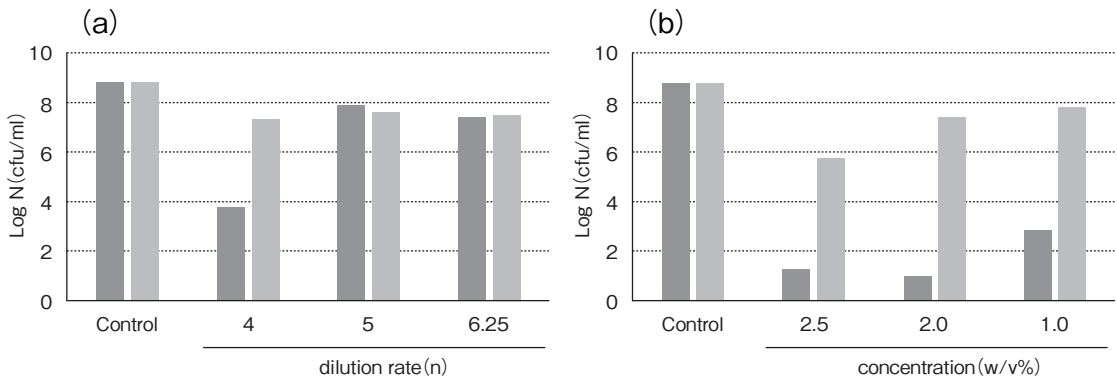


Fig. 1 Growth inhibition effects of tea extract (a) and a solution of freeze-dried tea extract (tea solution) (b) against *Escherichia coli*. Tea extract was diluted stepwise with nutrient broth (NB) and tea solution prepared with NB ranging in concentration from 1.0 to 2.5 w/v%. A mixture of tea extract or tea solution and cell suspension was incubated at 35°C for 24h. Initial cell concentration : ■, 8.2 × 10<sup>2</sup> cfu/ml : □, 8.2 × 10<sup>3</sup> cfu/ml.

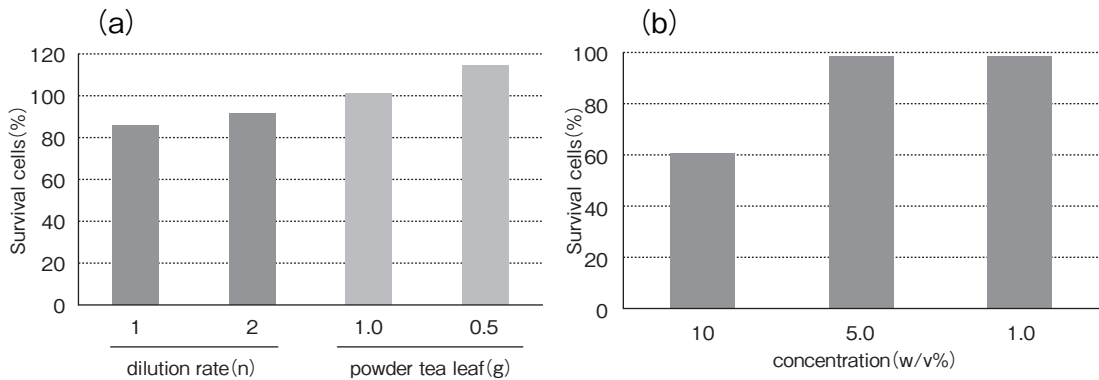


Fig. 2 Growth inhibition effects of tea extract and powder tea leaf (a), and an aqueous solution of freeze-dried tea extract (tea solution) (b) against *Escherichia coli* in minced meat. After tea extract and tea solution were diluted with sterilized water, 0.5ml of them were added to commercial minced meat (50g) which inoculated with *E. coli* cell suspension (8.2 × 10<sup>2</sup> cfu/g meat). Powder tea leaf was added directly. Each meat was frozen for 24h and defrosted for 1h, survival cells in meat was measured.

高い増殖抑制効果を示した。この効果は、凍結乾燥茶液の濃度が下がってもほとんど低下しなかった。また、茶抽出液と凍結乾燥茶液に含まれるカテキン含有量を比較してみると、1.0w/v%凍結乾燥茶液に含まれるEGCg量 (1.03mg) は、4倍希釈された茶抽出液に含まれるEGCg量 (1.84mg) よりも少ないにも関わらず、高い増殖抑制効果を示した。今回調製した茶抽出液には粘稠性があり、抽出液中でカテキン類が他の成分に吸着や結合をしていると考えられた。また培養中に沈殿が

見られるなど、有効カテキン量が減少し十分な抑制作用を示すことができなかつたと考えられた。

### 3.3 ミンチ中の菌に対する茶抽出液および凍結乾燥茶の効果

茶抽出液、粉末茶そのもの、および凍結乾燥茶液をミンチに添加し、ミンチ中の大腸菌に対する増殖抑制効果を測定した。Fig. 2-aに見られるように、希釈度1倍と2倍の茶抽出液はミンチ中の大腸菌の残菌率を低くし、増殖抑制効果を示すことがわかった。一方、粉末茶そのものを添加した

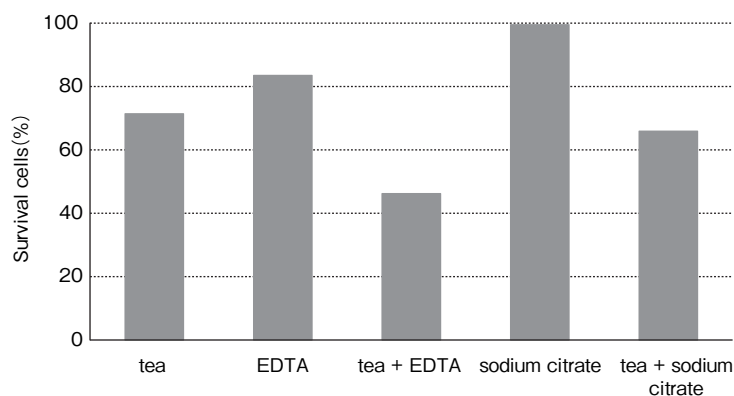


Fig. 3 Growth inhibition effects of an aqueous solution of freeze-dried tea extract (tea) in the presence of 45ppm EDTA or 300ppm sodium citrate against *Escherichia coli* in minced meat.

ミンチではカテキンの抑制効果は認められず、逆に菌数の増加が認められた。粉末茶は細かく裁断されているため断面から茶葉に含まれる栄養成分が漏洩しそれらを栄養分として菌が増殖したと考えられる。したがって粉末茶をそのままミンチに添加するのは微生物の抑制という点で逆効果になることがわかった。さらに粉末茶には多くの微生物が付着しており（粉末茶1gあたりの一般生菌数： $2.0 \times 10^3$  cfu, 真菌数： $7.7 \times 10^3$  cfu, 大腸菌群：陰性）、粉末茶の直接添加は食品衛生上好ましくないと考えられた。

凍結乾燥茶液は10w/v%溶液の添加で大腸菌に対して増殖抑制効果を示した (Fig. 2-b)。しかしながら、ミンチ中の大腸菌を減少させるには十分な効果とは言い難い。増殖抑制効果が低かった理由として、ミンチに凍結乾燥茶液を添加した直後に冷凍操作を行ったため、カテキンがミンチ中の菌に作用する時間が不足していたのではないかと考えられた。また今回の測定は、大腸菌の初発菌数をミンチ1gあたり $8.2 \times 10^3$  cfuで行ったため、菌濃度の影響を受けて増殖抑制効果が低下したと考えられる。今回は実験結果の精度を考慮し初発菌数を $10^4$  cfu程度に設定をしたが、本測定の10分の1程度の初発菌数のミンチであれば、Fig. 1の

結果から推定できるように、より高い増殖抑制効果が得られると考えられる。

#### 3.4 キレート剤との併用効果

凍結乾燥茶液単独では十分な増殖抑制効果が得られなかったことから、他の物質との組合せによる併用効果を検討した。EDTAなどのキレート作用のある化合物はカテキンとの併用効果が高いことが報告されている<sup>9)</sup>ことから、EDTAとクエン酸ナトリウムの併用を検討することとした。EDTAとクエン酸ナトリウムの大腸菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を液体培地希釈法<sup>10)</sup>で測定したところ、それぞれ64ppmと410ppmであった。そこでMIC値のおよそ4分の3にあたる45ppmEDTAと300ppmクエン酸ナトリウムと、10w/v%凍結乾燥茶液との併用効果を検討した。それぞれ単独または併用でミンチに添加し、冷凍・解凍後の残菌率を測定したところ、凍結乾燥茶液単独で71.4%、EDTA単独で83.5%、凍結乾燥茶液+EDTA併用で46.2%、クエン酸単独で99.5%、凍結乾燥茶液+クエン酸ナトリウム併用で65.9%になり、EDTAとクエン酸ナトリウムに併用効果が認められた (Fig. 3)。

カテキンの作用機構は、細菌細胞表面部の損傷作用<sup>6)</sup>や過酸化水素を発生させ細菌を死滅させる

作用<sup>7)</sup>であることが報告されている。一方EDTAは細菌表層部にある結合部位に作用し、細胞膜の強度を弱めて細菌の生育阻害を起こす<sup>11)</sup>ため、併用効果が得られたと考えられる。前項でも述べたように、初発菌濃度が高いこと、凍結操作のためカテキンが大腸菌に作用する時間が短いことなどから、今回の測定では十分な併用効果は得られていないが、条件を変えることでより高い効果が得られると考えられる。

#### 4. 要 約

茶の製造過程で生じる細かい粉末状の茶葉（粉末茶）を利用し、食肉を汚染する大腸菌の増殖抑制を試みた。粉末茶の抽出液を調製し、大腸菌に対する増殖抑制作用を測定したところ、初発菌濃度が $8.2 \times 10^2$  cfu/mlのとき茶抽出液は高い増殖抑制効果を示した。しかしその効果は菌濃度の影響を受けて著しく低下した。そこで抽出液を凍結乾燥して得られた凍結乾燥粉末の溶液（凍結乾燥茶液）を試験に用いたところ、茶抽出液よりも高い効果を示した。次に、大腸菌で試験的に汚染した市販牛ミンチに、茶抽出液、凍結乾燥茶液または粉末茶（茶葉）をそれぞれ添加し、凍結保存後解凍を行い、ミンチ中の大腸菌数を測定すると、粉末茶の直接添加では細菌増殖抑制効果は得られず、逆に茶葉に存在する菌（茶1gあたりの一般生菌数： $2.0 \times 10^3$  cfu、真菌数： $7.7 \times 10^3$  cfu、大腸菌群：陰性）でミンチを汚染する恐れがあることがわかった。ミンチ中の大腸菌に対する増殖抑制効果は凍結乾燥茶液で最も高いことがわかったが、その効果はミンチ中の大腸菌を減少させるには十分とは言えなかった。そこで凍結乾燥茶液とキレート剤との併用を検討したところ、EDTAやクエン酸ナトリウムに併用効果が認められた。今回の測定条件は、ミンチ中の大腸菌の初発菌濃度が高いこと、凍結操作のためカテキンが大腸菌に

作用する時間が短いことなどから、十分な併用効果は得られていないと考えられる。しかし条件を変えることでより高いカテキンの増殖抑制効果が得られると考えられる。

#### 文 献

- 1) Yoshiyuki Yoda, Zhi-Qing Hu, Wei-Hua Zhao : Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *J. Infect. Chemother.* **10**, 55~58, 2004.
- 2) 西川武志, 小林津美, 岡安多香子, 山田玲子, 磯貝恵美子, 磯貝浩, 山下利春 : 茶およびカテキン含有飲料の病原性大腸菌に対する増殖抑制効果の検討. *腸内細菌学雑誌*. **20**, 321~327, 2006.
- 3) Katsuhiko Mabe, Masaki Yoshida, Itaro Oguni, Tsuneo Takahashi : In Vitro and In Vivo Activities of Tea Catechins against *Helicobacter pylori*. *antimicrobial agents and chemotherapy*. **43**, 1788~1791, 1999.
- 4) Masako Toda, Sachie Okubo, H.Ikigai, T.Suzuki, Yumiko Suzuki, T.Shimamura : The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* O1. *Journal of Applied Bacteriology*. **70**, 109 ~ 112, 1991.
- 5) Hajime Ikigai, Taiji Nakae, Yukihiko Hara, Tadakatsu Shimamura : Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1147**, 132~136, 1993.
- 6) 熊澤茂則, 中山勉 : 茶カテキン類と脂質膜との相互作用. *化学と生物*. **49**, 243~249, 2011.
- 7) Hideaki Arakawa, Masako Maeda, Sachie Okubo, Tadakatsu Shimamura : Role of Hydrogen Peroxide in Bactericidal Action of Catechin. *Biol.Pharm. Bull.* **27**, 277~281, 2004.
- 8) Daxin Zhang, Takuya Maeda, Hideaki Nagamune and Hiroki Kourai : Bactericidal action of a bis-quaternary ammonium compound against vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis*. *Biocontrol Science*, **8**, 101~110, 2003.
- 9) 中山素一, 重宗尚文, 徳田一, 古田可葉子, 松下知世, 吉澤千尋, 宮本敏久 : 緑茶抽出物の抗菌活性に対する食品添加物の影響. *防菌防黴*. **36**, 569~578, 2008.
- 10) Kiyoko Okazaki, Takuya Maeda, Hideaki Nagamune, Hiroki Kourai : Antibacterial Characteristics of *N*-Alkyl-2-alkylthiopyridinium and *N*-Alkyl-4-alkylthiopyridinium Salts. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*. **43**, 251~260, 1997.
- 11) 木田中, 田口文章 : 細菌とキレート剤. *防菌防黴*. **35**, 567~581, 2007.

## 新規発光デバイスを用いた食肉の質を落とさない殺菌法の開発

Development of a sterilization system, which keeps the quality of meat,  
by a new light-emitting device

高橋 章・芥川 正武・馬渡 一論・下畑 隆明

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

Akira Takahashi, Masatake Akutagawa, Kazuaki Mawatari, Takaaki Shimohata.

(Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School)

Sterilization of food is the most basic method to ensure the food safety, and is one of the most important issues related to food hygiene. In recent years, the food poisoning induced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection became a major problem, and even confidence in the safety of the meat has been shaken. And we need excellent sterilization method which leaves no residue, has economically advantages, and maintains the quality of the meat.

We have been developing a disinfection system using light-emitting diode (LED) which radiated the near-ultraviolet radiation (UVA). In this system by using a UVA wavelength are unlikely to cause deterioration in the quality of food, and are different from "conventional ultraviolet disinfection". Because the system used the LED, there are many advantages for food processing, such as cheap and safety. In this study, we tried to develop the disinfection system for meat.

We irradiated the meat with UVA by UVA-LED irradiation system. This system was designed to maintain a constant humidity and temperature, and could sterilize *E. coli*, which was added on the surface of meat, without the change of color or smell of meat. However the sterilizing effect on the bacteria that had adhered to the meat originally was very weak.

All the above, by the method of sterilization of meat by UVA-LED, the surface sterilization only is effective and inside the meat is difficult to sterilize. It will be necessary to improve the irradiation method of UVA or combination with other sterilization method in the future.

### 1. 目的

我が国は先進諸国の一員となって久しいにも関わらず、未だに毎年のように食中毒の発生件数が1000件、患者数は2万人を超えている<sup>1)</sup>状況にあることから、「食の安全」は我が国の食品衛生に

おける最重要課題の一つである。「安全な食」を提供する上で、食品の殺菌は基本手段の一つである。今日までに食品に応じた様々な殺菌法が開発され、食品製造・加工分野に汎用されている。ところが、現行の殺菌法の中には問題点が指摘されるものも出てきている。例えば、カット野菜消毒

には安価で容易な次亜塩素酸ナトリウムが多用されているが、残留塩素による健康被害や臭いの問題が指摘されている。また、生鮮食品や食感や風味を重視する食品などへの殺菌には、従来から用いられている加熱等の殺菌法を適応しにくい場合も少なくない。特に安全性や品質などの要求が高まっている近年では、このような従来の殺菌法の問題点を解決する新しい殺菌法の開発が求められている。

現在、特に食肉の安全性に対する信頼が揺らいでいる。昨今、生食による腸管出血性大腸菌感染で大きな問題となったことから、現在では食肉の加工・流通過程における衛生管理の再確認と徹底が強く叫ばれている。食肉の衛生管理は表面に付着した菌の殺菌消毒とその維持が重要とされている。その殺菌消毒法の中にはアルコール処理、塩素処理、加熱、トリミングなど幾つか実用化されているものもあるが、薬品など残留物が残ることや食肉の品質低下などの問題が指摘されている。そこで、食肉の品質を低下させず残留物を残さない経済性に優れた殺菌法が求められている。

我々は近紫外線—発光ダイオード(UVA-LED)を用いた殺菌システムの開発を行ってきた。本システムは、これまで殺菌に用いられている紫外線(UVC)とは異なる波長の紫外線、UVAを用いることにより、食品の品質劣化を起しにくい。また、省電力であるLEDを用いることでランニングコストを軽減できる。さらに、長寿命であるLEDを用いることは、食品の加工機器等に求められる安全性と耐久性を高めることができるなど、多くの利点が生まれる。そこで、本研究ではUVA-LEDを用いた食肉の品質維持が可能な表面殺菌システムの開発を目指した。

本研究では、ショーケースを想定したUVA-LED殺菌システムの開発を目指して、食肉用ショーケース型UVA殺菌装置のプロトタイプを

開発した。本システムを用いて、UVA照射方法や温度、湿度等の最適化を行い、食肉へのUVA照射による殺菌効果を検討した。

## 2. 方法

### 2.1 UVA照射装置

表面実装型の高出力発光ダイオード(NC4U134A (T)、日亜化学工業株式会社)を使用し、定電流電源に接続した。本照射装置は出力光のピーク波長が385nmで250mW以上のUVA出力が可能である<sup>2)</sup>。照射UVAの強さ(照度)は電流を変化させることにより調節を行った。

### 2.2 食肉用ショーケース型UVA殺菌装置

食肉用ショーケース型の殺菌装置を開発した。本装置の天井部に12個のNC4U134A (T)を設置したLED基盤を取り付け、食肉へ上部から照射できるようにした。装置内には温度及び湿度計を設置し、UVA照射時の変動をモニタリングした。

### 2.3 食肉サンプルの準備

検体に用いた食肉(牛ばら薄切り肉)は徳島市内の精肉店から毎回100gずつ購入した。入手した食肉は実験に用いるまで4℃で冷蔵保存した。照射実験には1gに切り分けた肉の小片を用いた。

### 2.4 食肉の生菌数測定

1gに切り分けた食肉の小片を、1%NaCl含有Luria-Bertani (LB) 寒天培地プレートに表裏1度ずつ密着させ、食肉表面に付着している細菌を培地に塗布した。37℃で20時間培養した後、培地上に形成された細菌のコロニー数(colony forming unit, CFU)を計測した。

### 2.5 食肉に対するUVA照射

同じ精肉店から購入した食肉を照射用サンプル用(以下、サンプルまたはS)と未照射コントロール用(コントロールまたはC)に1gずつに切り分けた。切り分けた肉片はフタ付きの滅菌シャーレ内のアルミ箔の上に2片ずつセットした。



肉片の乾燥防止のため、アルミ箔の下には4mlの滅菌水で湿らせた紙を敷いた。また、UVA照射時には食肉の乾燥を防ぐ目的でポリ塩化ビニリテン（食品包装用ラップフィルム、旭化成ホームプロダクツ株式会社）を食肉の表面に貼り付けた。

UVA照射後、サンプル及びコントロールの肉片をアルミ箔上で細かく切り刻み、10ml Phosphate Buffered Saline (PBS) とよく混和した。PBSと混和した肉片の懸濁液1mlをPBSで段階希釈し、LB寒天培地プレートに塗布した。その培地プレートを37℃で20時間培養し、コロニー数を計測した。

### 2.6 塗布用大腸菌の調製

大腸菌、*Escherichia coli* DH5a, を1%NaCl含有LB液体培地で17時間振とう培養した。その後、菌液をPBSで3回洗浄した。PBSに再懸濁し、分光光度計を用いて吸光度600nmで $OD_{600} = 1.0$  (1mlあたり生菌数約 $10^8$ 個) に調整した。調整した大腸菌を肉片表面に100  $\mu$ lに塗布した後、肉片へのUVA照射を行った。

### 2.7 菌の生存比の計算

下記の計算式にLog生存率を求めた（下記の式、参照）。

Log生存率の検討では同様の実験を4回繰り返し行い、平均 $\pm$ 標準偏差で示した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 食肉の生菌数測定

食肉に付着している細菌の生菌数は、購入した精肉店によって大きく異なっていた（Fig. 1）。よって、食肉管理の衛生状態は精肉店の間に差があることが推測された。

### 3.2 食肉用ショーケース型UVA殺菌装置内温度と湿度

開発した食肉用ショーケース型UVA殺菌装置内の温度と湿度を測定した。UVAを照射しながら3時間以上測定を行ったが、装置内の温度は15℃から20℃の間でほぼ一定であった（Fig. 2A）。さらに、湿度は90~95%に維持することができた（Fig. 2B）。

### 3.3 食肉の色の変化

購入した食肉にUVA照射を行ったところ、食肉の色の変化はみられなかった（Fig. 3）。

### 3.4 食肉に付着させた大腸菌への殺菌効果

購入した牛肉の表面に大腸菌を塗布後、UVAを3時間照射した。大腸菌の生存率はUVA照射時間依存的に減少し（Fig. 4）、3時間のUVA照射ではLog生存率が $-2.2 \pm 0.3$  (n=4) であった。

### 3.5 購入時食肉に付着していた細菌への殺菌効果

購入時より食肉に付着していた細菌に対して、

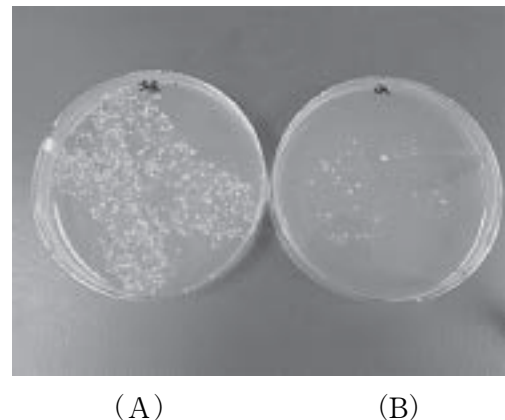
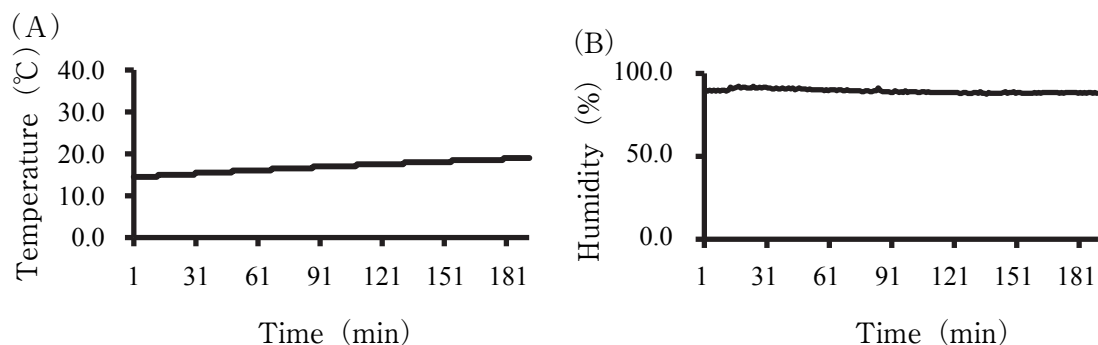
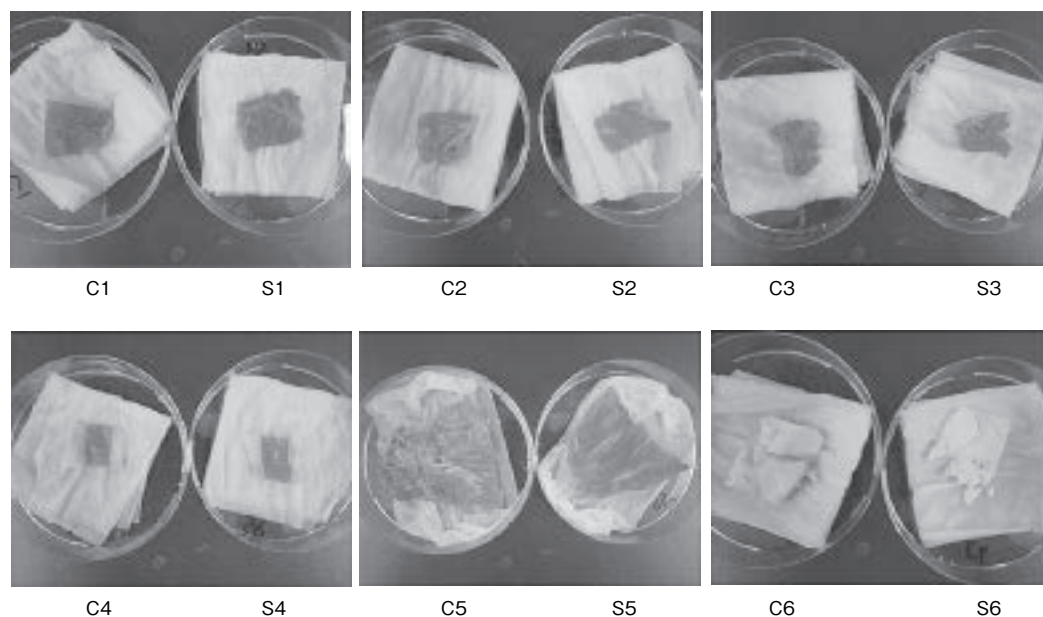


Fig. 1 Measurement of the number of bacteria which had adhered to the meat originally. The meats were purchased at different meat shops (A and B) in Tokushima City.

$$\text{Log生存率} = \text{Log} \left[ \frac{\text{UVA-LED照射群で形成された1gあたりのコロニー数}}{\text{コントロール群で形成された1gあたりのコロニー数}} \right]$$



**Fig. 2** Measurement of the temperature and humidity in the UVA sterilization system for the meat showcase. Temperature (A) and humidity (B) in the UVA sterilization system for the meat showcase with irradiation of the UVA were measured during the more than 3 hours. The air in the UVA sterilization equipment was stirred continuously by a fan.



**Fig. 3** Change in color of the meat.

The meat was irradiated with UVA irradiation for 3 hours (S), or without irradiation (C), in the UVA sterilization system for the meat showcase. The number of the image (1 to 6) indicated each of the different portions in the meat.

UVA照射による殺菌効果を検討した (Fig. 5)。3時間のUVA照射による殺菌効果はLog生存率が $-1.4 \pm 0.3$  ( $n=4$ )であった。

本研究開発では、食肉に対してUVA-LED照射システムを試作し食肉表面に付着した細菌に対する効果を検討した。このシステムは、我々がこれまで試作してきたLED-UVAを用いた水殺菌シス

テム<sup>3,4)</sup>や空気殺菌システム<sup>5)</sup>を基に開発し、本研究で食肉用に向けて最適化を行った。

今回試作したUVA-LED照射システムを用いて実際に食肉にUVAを照射したが、食肉の色や匂いには変化は認められなかった。この結果は、UVA照射は野菜の色や成分に影響を与えにくいという我々の報告結果<sup>6)</sup>と合致していることか



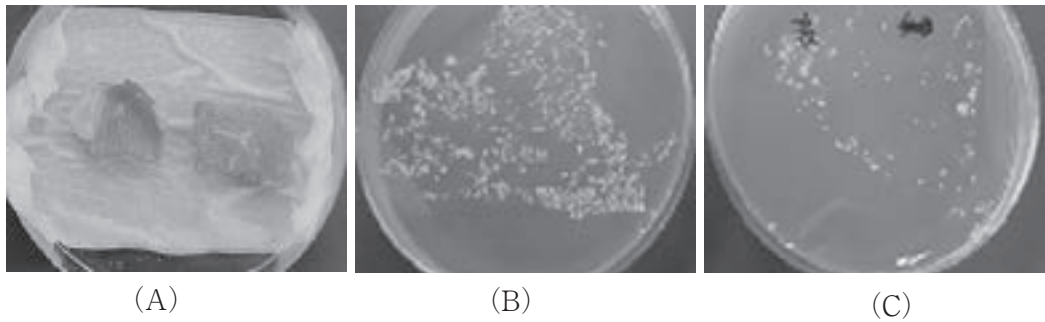


Fig. 4 Changes in the amount of bacteria adhering to the meat.

The meat was irradiated with UVA in the UVA sterilization system for the meat showcase. Each pieces of the meat was divided in one gram. Before irradiation with UVA, *E. coli* (107 colony forming units) were inoculated to the meat. (A) The meat after 3 hours irradiation with UVA. The colonies of *E. coli* on the LB broth plates were shown before (B) or after (C) irradiation with UVA.

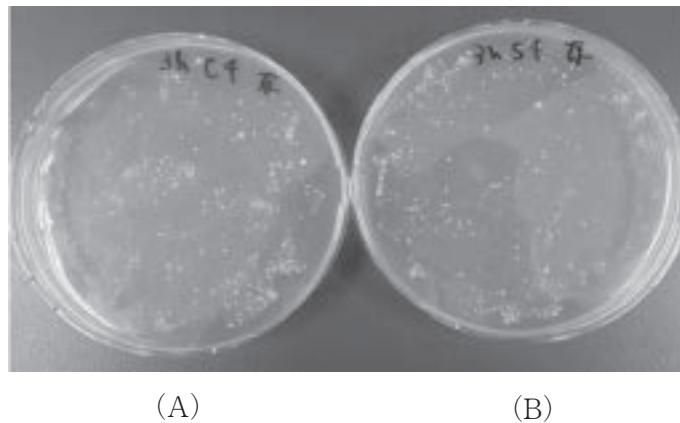


Fig. 5 Changes in the amount of bacteria were attached to the meat at the time of purchase.

Each pieces of the meat was divided in one gram. The bacteria, that had adhered to the meat originally, was irradiated with UVA for 3 hours (A) or without irradiation (B) in the UVA sterilization system for the meat showcase.

ら、食肉の品質にも影響しにくい可能性が考えられた。

本システムによるUVA照射は、食肉表面に塗布した大腸菌へ有意な殺菌効果がみとめられた。しかし、購入時点より食肉に付着している細菌に対する殺菌効果は非常に小さかった。我々はこれまでに腸管出血性大腸菌やサルモネラ、カンピロバクターなど食肉に混入する可能性のある病原細菌に対して、LEDを用いたUVA照射が十分な殺菌効果を有していることを報告している<sup>3)</sup>。以

上のことから、本研究では①食肉からしみ出た脂質やアミノ酸・たんぱく質がUVAを吸収した、または、②細菌が肉繊維の間に入り込んだ、ことにより購入時点より付着している細菌へUVAが到達しなかった可能性が考えられた。

以上より、UVA-LEDによる食肉の殺菌は表面へは有効であるが、内部や深部の殺菌は困難であると考えられた。よって、今後は他の殺菌方法との併用やUVA照射方法の更なる効率化や最適化の検討が必要であると考えられた。

#### 4. 要 約

食品の殺菌は「食の安全」の確保において最も基本手段であり、重要な課題の一つである。近年、食肉を介する腸管出血性大腸菌の食中毒が大きな問題となり、食肉の安全性に対する信頼が揺らいでいる。そこで食肉の品質を低下させず残留物を残さない経済性に優れた殺菌・維持法が求められている。

我々は近紫外線—発光ダイオード(UVA-LED)を用いた殺菌システムの開発を行ってきた。この殺菌システムは従来の殺菌線(UVC)とは異なる波長の近紫外線(UVA)を用いることにより、食品の品質劣化を起しにくい。また、LEDを用いることはランニングコストの軽減や安全性・耐久性の向上などの利点が生まれる。そこで、本研究では近紫外線—発光ダイオードを用いた食肉の表面殺菌・品質維持システムの開発を目指した。

まず、食肉用ショーケース型のUVA-LED照射システムを試作した。本システムは湿度と温度を一定に保てるように設計した。本システムを用いて実際に食肉にUVAを照射したが、食肉の色や匂いには変化はみられなかった。さらに、食肉表面に塗布した大腸菌に対して、UVA照射は有意な殺菌効果がみとめられた。しかし、購入時より食肉に付着している細菌に対しては、殺菌効果は

非常に小さかった。

以上より、本研究で開発したUVA-LED照射システムによる食肉へ殺菌効果は、表面へは有効であるが、内部や深部への殺菌効果は低いと考えられた。今後は他の殺菌方法との併用やUVA照射方法の更なる効率化や最適化の検討が必要であると考えられた。

#### 文 献

- 1) 社団法人日本食品衛生協会：全国食中毒事件録—厚生労働省食中毒統計資料より—, 2011.
- 2) 紫外発光LED標準仕様書, No. 120518, 日亜化学工業株式会社
- 3) Hamamoto A, Mori M, Takahashi A, Nakano M, Wakikawa N, Akutagawa M, Ikehara T, Nakaya Y, Kinouchi Y.: New water disinfection system using UVA-light emitting diodes. *J Appl Microbiol*, **103**, 2291~2298, 2007.
- 4) Mori M, Hamamoto A, Takahashi A, Nakano M, Wakikawa N, Tachibana A, Ikehara T, Nakaya Y, Akutagawa M, Kinouchi Y.: Development of a new water sterilization device with a 365nm UV-LED. *Med Biol Eng Comput*, **45**, 1237~1241, 2007.
- 5) Gadelmoula M, Lian X, Maeda M, Aihara M, Mawatari K, Hamamoto A, Harada Y, Yamato M, Akutagawa M, Nakaya Y, Kinouchi Y, and Takahashi A : Suitability of Ultraviolet (A)- Light Emitting Diode for Air Stream Disinfection. *J Med Invest*, **56**, 150~156, 2009.
- 6) Lian X, Maeda M, Yamato M, Mawatari K, Akutagawa M, Nakaya Y, Kinouchi Y, Takahashi A : New UVA-LED surface sterilization system for vegetables. *Proceeding of LED general forum 2010*, 83~84, 2010.

## 食肉製品の調理中に起こるメイラード反応の消長と安全性の検討

Morbidity and safety for the maillard reaction occurred during cooking of meat products

大塚 譲<sup>1</sup>・山口 敬子<sup>2</sup>・能見 祐理<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>お茶の水女子大学生生活環境教育研究センター, <sup>2</sup>日本女子大学家政学部食物学科)

Yuzuru Otsuka<sup>1</sup>, Keiko Yamaguchi<sup>2</sup>, and Yuri Nomi<sup>1</sup>

(Institute of Environmental Science for Human Life, Ochanomizu University<sup>1</sup>,

Department of Food and Nutrition, Japan Women's University<sup>2</sup>)

During food processing and cooking, various kinds of flavor compounds, colored substances and toxic substances are produced by the Maillard reaction. Thus, it is important to investigate the relationship between the Maillard reaction products and the cooking conditions. Therefore, we investigated effects of the seasonings and reaction conditions on the Maillard reaction of meat using furosine and fluorescent compounds.

The addition of 1% NaCl decreased the Maillard reaction rate measured by furosine in Glc-meat reaction. Furosine content was increased rapidly by pan-broiling and frying, but increased slowly at the beginning of gas oven baking. The fluorescence of broiled meat showed maximum at 333/425 nm (exc./em.) and are useful indicator of the Maillard reaction of meat sample. The rate of increasing fluorescence in gas oven baked meat was lower than that of the meat heated by other cooking conditions.

In the present living environment, we are exposed to various carcinogens. We have various diseases when exposed to these carcinogens. 4-Methylimidazole, produced by the Maillard reaction, is carcinogens in foods. But its effect on gene expression or metabolism mechanism remains to be unknown. Xenobiotic in the body is generally eliminated from the body by activated drug metabolic enzymes. Mainly drug metabolizing enzyme group cytochromeP450 (*CYP*) family is known as oxygenase, it might be induced oxidative stress by 4-Methylimidazole. In this study, we examined effects of 4-Methylimidazole on gene expression such as drug metabolic enzyme and antioxidative enzyme.

When Hep-G2 cells were added with 4-Methylimidazole, drug metabolic enzymes such as *CYP1A1*, *CYP1A2*, and *NQO1* and antioxidative enzymes gene expression such as *SOD1* and *GPX1* significantly increased. Many genes were significantly increased (up) or decreased (down) its gene expression when measured by microarray, so we need to confirm this data by real time PCR.

## 1. 目 的

食品の加工・調理・貯蔵の過程では成分間で様々な化学反応が起こり、食品の品質に影響を与えているが、その代表的な反応のひとつにメイラード反応がある。この反応はアミノ化合物とカルボニル化合物が共存すると起こる非酵素的褐変反応であり、糖やタンパク質などは食品や生体に普遍的に存在する基本構成成分であることから、その重要性は明らかである。

本研究では、実際の調理に即した条件下において、調味方法や調理条件が食肉中のメイラード反応に与える影響について明らかにすることにした。また、食肉の調理中に生成することが予想されるメイラード反応生成物4-Methylimidazoleの安全性について、薬物代謝酵素遺伝子であるcytochrome P450 (CYP) ファミリーやGST、さらにSODなどの抗酸化酵素等の遺伝子発現への影響を検討することにした。

## 2. 方 法

### 2.1 食肉中の調味・調理操作がメイラード反応の進行に与える影響について

まず、lysine-スクロース (or グルコース) モデル系におけるNaCl添加の影響を、470 nmにおける吸光度 (褐変度) およびフロシンの定量により検討した。

次に、食肉として牛挽き肉を用いて一般的な加熱調理 (フライパン焼き, 200℃) におけるNaCl, グルコースあるいはスクロース添加がメイラード反応の進行に与える影響について、370/440 nm (exc./em.) の蛍光強度測定およびフロシンの定量により検討した。

さらに、調味された牛挽き肉 (1.0% NaCl, 5.0% 上白糖) を用いて、フライパン焼き (200℃)、オープン焼き (170℃)、揚げ調理 (140℃) の調

理方法の違いがメイラード反応の進行に与える影響について、370/440 nm (exc./em.) の蛍光強度測定およびフロシンの定量により検討した。

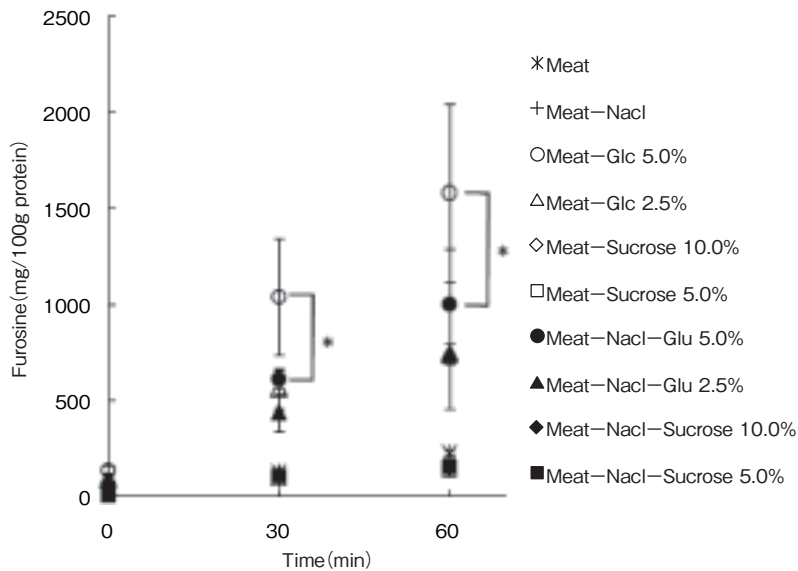
2.2 4-Methylimidazoleが薬物代謝酵素、抗酸化酵素遺伝子発現に与える影響について  
ヒト肝癌由来HepG 2細胞を用い、様々な濃度の4-Methylimidazoleを添加後、MTT assay法により細胞増殖曲線を作成し、細胞毒性について検討した。細胞毒性が見られなかった250 μM 4-MethylimidazoleをHepG 2に添加し、4, 8, 16, 24時間培養後RNA抽出を行い、それぞれ遺伝子発現の変化についてリアルタイムPCRやDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 食肉中の調味・調理操作がメイラード反応の進行に与える影響について

まず、lysineを用いたモデル反応系にて検討を行った。反応物である糖にスクロースを用いて、NaCl添加による影響を検討した結果、スクロースはグルコースに比べて反応性が低いため、褐変度、フロシン量ともに非常に低値を示し、NaCl添加による影響を判別できなかった。比較のために用いたグルコースでは、褐変度は加熱時間に伴い増加し、NaCl添加により有意に抑制された。この結果は、過去に我々が行った実験と同様であった<sup>1)</sup>。しかし、フロシン量は加熱1時間後に増大がピークになったのを境に減少し、NaCl添加による影響を確認できなかった。フロシンは反応中間体であるアマドリ化合物を反映した指標であるため、このような結果になったことが推察された。実際の調味ではスクロースを用いることから、褐変度、フロシン量はメイラード反応の進行を評価する上で適切でない可能性が考えられた。

次に、牛挽き肉をNaCl, スクロースあるいはグルコースで調味したパティを用いてフライパン



The reaction conditions are described in "Materials and Methods". The explanation of figure legends was shown in Table 2. Each value is the mean of three determinations. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test. Concentration of NaCl was 1.0%.

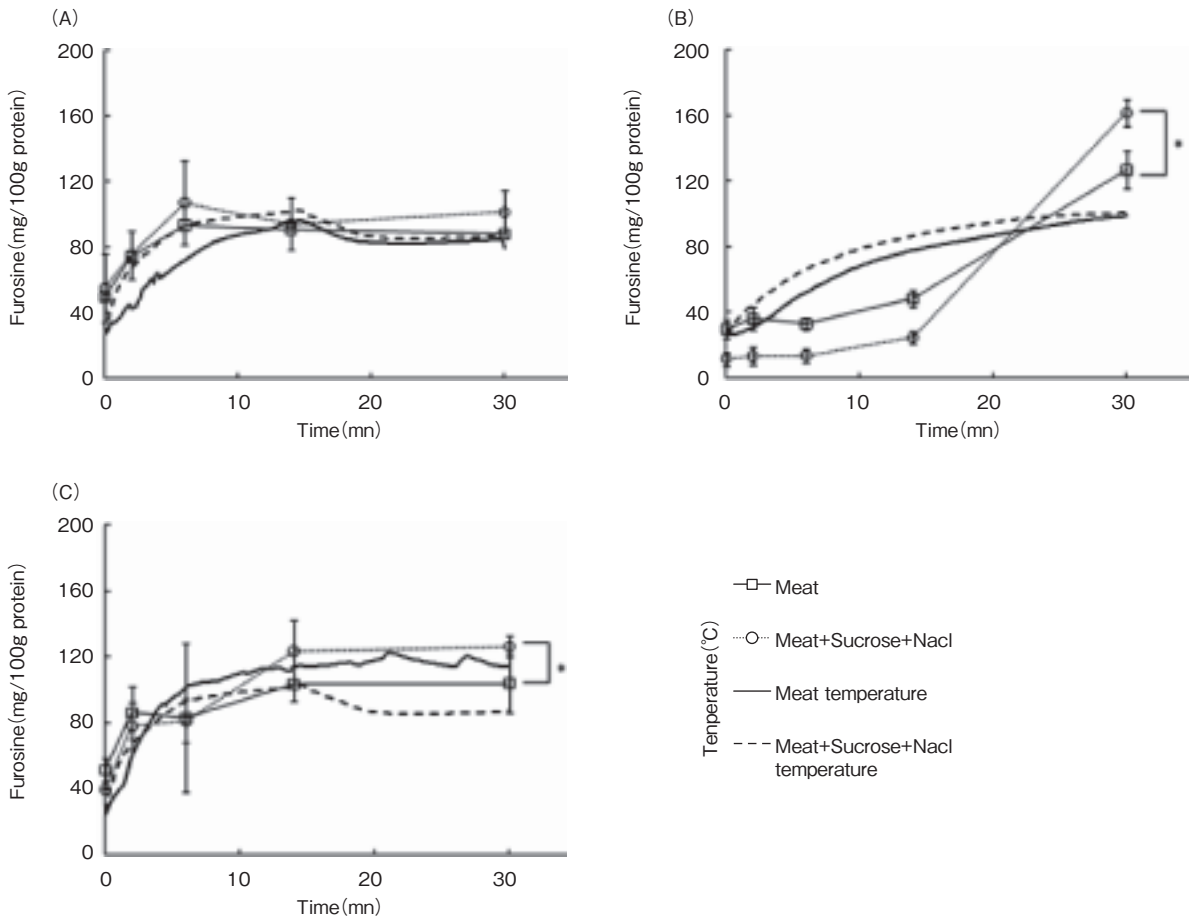
Fig. 1 Amounts of furosine of pan-broiled (at 200°C) meat samples containing saccharide and NaCl

焼き (200°C) におけるフロシン量を測定した (Fig. 1)。調味なし, NaClのみで調味したパティ中にも, 少ないながらもフロシンは存在していた。これは, 牛挽き肉の中に元来グルコースが含まれていたためだと考えられた。スクロースで調味したパティも同様にフロシン量は少なかった。反応性が高いグルコースで調味した場合, 添加量に伴いフロシン量は増加したが, NaCl添加により減少し, lysineを用いたモデル系と同様の結果が得られた。しかし, 実際にはスクロースで調味するため, フライパン焼きにおいてはスクロースとNaClによる調味はフロシン量にはあまり影響しないことが示唆された。

調理条件によるメイラード反応進行の違いを検討するため, 1.0% NaCl, 5.0% 上白糖で調味した牛挽き肉パティを各々フライパン焼き, オープン焼き, 揚げ調理して, 各サンプルのフロシン量, サンプル内部温度を測定した (Fig. 2)。フロシン量については, フライパン焼きと揚げ調理で加

熱後10分までに増大したが, 加熱10分後以降フロシン量の増加は見られなかった。それに対して, オープン焼きでは加熱後15分までは増加しなかったが, 15分過ぎに直線的に増加した。この理由として, オープン焼きでは他の2種類の調理条件と比較して, 加熱初期のサンプル内部の温度上昇が緩やかであったことが考えられた。オープン焼きと揚げ調理については, 調味したパティの方がフロシン量は有意に多かった。しかしながら, 各調理条件におけるフロシン量の差はほとんどなかった。したがって, これら3種の調理条件において, 調味によるフロシン量への影響は少ないことが示唆された。

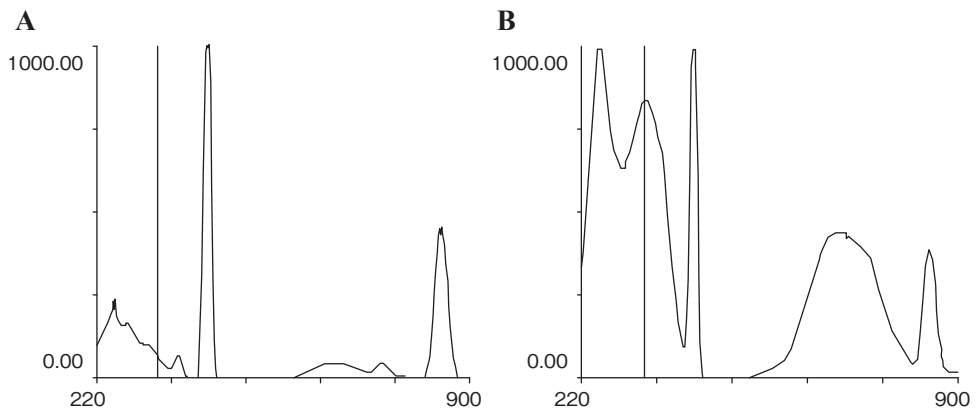
フロシン量ではメイラード反応の進行を正しく反映していない可能性が考えられたことから, 蛍光強度による評価を検討することにした。一般にメイラード反応由来の蛍光物質の測定には, 励起波長 (exc.) 340~370 nm, 発光波長 (em.) 420~470 nmがよく用いられている<sup>2)</sup>。また, *in vivo*



The reaction conditions are described in "Materials and Methods". Each value is the mean of three determinations.

\* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test. Meat was added with 5.0% white superior soft sugar and 1.0% NaCl.

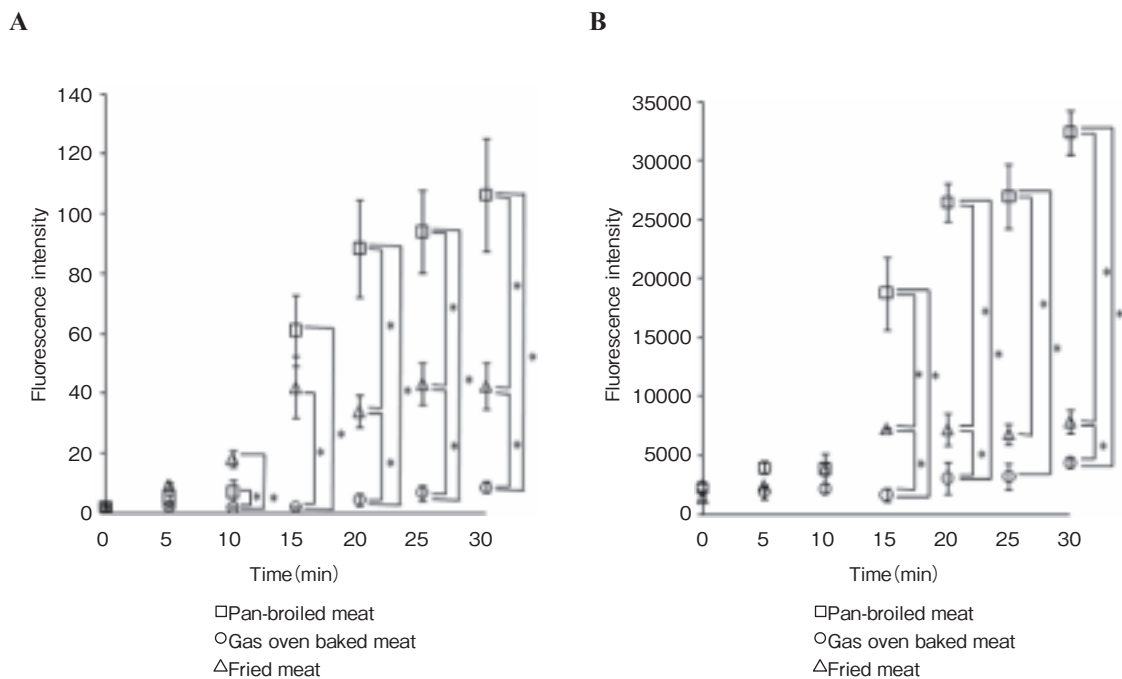
Fig. 2 Amounts of furosine of pan-broiled (A) and gas oven baked (B) and fried (C) meat samples containing Sucrose and NaCl



The emission wavelengths was fixed to 425 nm, and excitation wavelength was scanned from 220 to 900 nm.

Fig. 3 Fluorescence spectrums of raw meat sample (A) and meat sample pan-broiled at 200°C for 30 min (B).

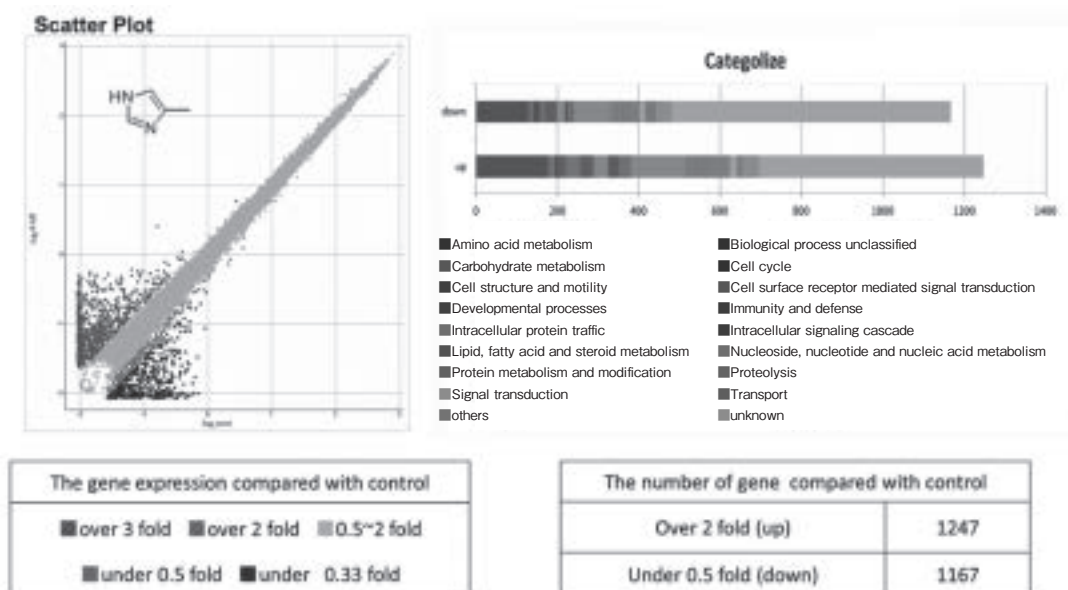




The reaction conditions are described in "Materials and Methods". Fluorescence was measured with 370/440 nm (A) and 333/425 nm (B) (exc./em.). Each value is the mean of three determinations.

\* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer post-hoc test.

Fig. 4 Comparison of fluorescence intensity of meat samples heated by three kinds of cooking methods.



250  $\mu$ M of 4-methylimidazole was added to HepG2 cell and RNA was extracted after 4 h. Then, microarray gene expression analysis was done.

Fig. 5 The result of microarray gene expression analysis



における蛍光物質測定には、370/440 nm (exc./em.)<sup>3)</sup> や、350/450 nm (exc./em.)<sup>4)</sup> が用いられている。本研究で用いている牛挽き肉パティについて励起波長、発光波長を検討した結果、333/425 nm (exc./em.) で最も感度よく測定できることが明らかとなった。発光波長を425 nmに設定し励起波長を220~900 nmでスキャンした結果、加熱牛挽き肉サンプルは励起波長333 nmにて極大ピークがみられ、未加熱の牛挽き肉サンプルにはこのような極大ピークはみられなかった (Fig. 3)。また、333/425 nm (exc./em.) で測定した蛍光強度は、過去に報告された370/440 nm (exc./em.) の測定と比べて300倍感度が良かった (Fig. 4)。各調理条件における牛挽き肉サンプル中の蛍光強度は加熱時間に伴い増加しており、本測定法が加熱牛肉のメイラード反応の進行を反映する指標として有効であることが示唆された。また、ほかの2種の調理条件と比べて、オープン焼きの蛍光強度増加速度が最も緩やかであった。

### 3.2 4-Methylimidazoleが薬物代謝酵素、抗酸化酵素遺伝子発現に与える影響について

まず、マイクロアレイを行う際の添加濃度を検討するため、4-Methylimidazoleの各濃度における細胞毒性をMTT assayにより評価した。また、*CYP1A1*、*CYP1A2*、*SOD1*、*GPX1*のリアルタイムPCRを行い、各遺伝子の発現が上昇する時間等を検討した結果、250  $\mu$ Mの添加濃度で培養し、4時間後にRNAを抽出することに決定した。

上記の添加濃度で培養後、4時間後にRNAを抽出し、マイクロアレイによる解析を行った。結果、シグナル伝達を媒介する細胞表面受容体に関連する遺伝子の発現の上昇傾向がみられた (Fig. 5)。しかしながら、機能が不明な遺伝子も多く存在することから、個々の遺伝子について、今後リアルタイムPCRでコンファームする必要がある。また、今回得られたマイクロアレイのデータ

を解析し、4-Methylimidazoleの遺伝子発現機構を明らかにしたい。

## 4. 要 約

本研究では、実際の調味方法や調理条件が食肉中のメイラード反応に与える影響について明らかにすることにした。また、食肉の調理中に生成することが予想されるメイラード反応生成物4-Methylimidazoleの安全性について、薬物代謝酵素遺伝子であるcytochrome P450 (CYP) ファミリーやGST、さらにSODなどの抗酸化酵素等の遺伝子発現への影響を検討した。

グルコースと牛挽き肉の反応においてフロシンの生成量でみると、1% NaCl添加によりメイラード反応の速度は減少したが、スクロースではあまり差はなかった。フロシンの生成はフライパン焼きと油による揚げ調理では急速に増加したが、オープン焼きでは緩やかに増加した。加熱した牛挽き肉の蛍光強度は333/425 nm (exc./em.) に最大値を有し、この波長は肉のメイラード反応の指標になることが示唆された。他の2つの調理方法に比べてオープンで加熱した肉製品の蛍光の増加速度は低かった。

また、Hep-G2細胞に250  $\mu$ M 4-Methylimidazoleを添加し4時間培養後のRNAを抽出しマイクロアレイ解析を行った結果、主にシグナル伝達を媒介する細胞表面受容体に関連する遺伝子の発現の上昇傾向がみられた。

## 文 献

- 1) Yamaguchi, K., Noumi, Y., Nakajima, K., Nagatsuka, C., Aizawa, H., Nakawaki, R., Mizude, E., Otsuka, Y., Homma, T., and Chuyen, N.V. : Effects of salt concentration on the reaction rate of Glc with amino acids, peptides, and proteins. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **73**, 2379~2383, 2009.
- 2) Matiacevich, S.B., Santagapita, P.R., and Buera, M.P. : Fluorescence from the maillard reaction and its potential applications in food science. *Crit Rev*

- Food SciNutr.*, 45, 483~495, 2005.
- 3) Forbes, J.M., Yee, L.T., Thallas, V., Lassila, M., Candido, R., Jandeleit-Dahm, K.A., Thomas, M.C., Burns, W.C., Deemer, E.K., Thorpe, S.R., Cooper, M.E., and Allen, T.J. : Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes*, 53, 1813~1823, 2004.
- 4) Ahmed, N. and Thornally, P.J. : Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes Obes. Metab.*, 9, 233~245, 2007.

## 試食パネルによる黒毛和種牛肉の脂肪酸組成, 香気成分, 呈味成分と食味性との関連に関する研究

Study on the relation between fatty acid composition, flavor, taste component of Japanese black beef meat and eating quality by tasting panel

鈴木 啓一<sup>1</sup>・横田 祥子<sup>1</sup>・塩浦 宏陽<sup>1</sup>・飯田 文子<sup>2</sup>・  
山田 信一<sup>3</sup>・佐久間弘典<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>東北大学大学院農学研究科, <sup>2</sup>日本女子大学, <sup>3</sup>家畜改良センター)

Keiichi Suzuki<sup>1</sup>, Shoko Yokota<sup>1</sup>, Shioura Hiroaki<sup>1</sup>, Fumiko Iida<sup>2</sup>,  
Shinichi Yamada<sup>3</sup>, Hironori Sakuma<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

<sup>2</sup>Japan Women's University, <sup>3</sup>National Livestock Breeding Center)

To produce an index of a delicious beef evaluation, relations among panel test items evaluated with the training panel, the fatty acid composition, the amino acid and peptide components, and the aroma components were examined using Japanese black cattle beef with known BMS No. and fatty acid composition. The most contributed item to the “Overall judgment” of the panel test item was “Desirable taste (56.9%)”. The respective contribution rates of “Good cattle aroma”, “Total texture” and “Strength of the flavor” to “Overall judgment” were 22.8%, 2.1% and 1.1%. Partial correlation of the panel test item and the chemical composition calculated by considering the BMS No. and sex showed significant negative correlation of C16:0 and saturated fatty acid (SFA) and significant positive correlation of mono-saturated fatty acid (MUFA) with “Strength of flavor”, which suggests that the MUFA is important for beef flavor. In the odor component, a significant, negative correlation was shown respectively between alcohol, unsaturated aliphatic aldehydes, and “Good cattle aroma”. Furthermore, although a significant positive relation of free amino acid and sugar to “Desirable taste” was expected, no significant correlation of these chemical compositions was found with “Desirable taste”. Comparison of brand beefs that had meat quality features is necessary to specify the index for evaluation of delicious beef.

### 1. 目 的

国内で生産されている黒毛和種牛肉の脂肪交雑などの肉質は育種改良と飼養管理技術の改善により劇的に変化してきている。このような変化の一

方で、新たな肉質評価基準が模索されており、より付加価値の高いおいしい牛肉の指標づくりが課題となってきている。牛肉の食味性に関しては、国産黒毛和牛に特異な香り成分（和牛香）や、最近ではオレイン酸などのモノ不飽和脂肪酸割合が

関連しているとの報告がある。しかし、肉のおいしさは、アミノ酸、脂肪酸組成などの他にも未解明の複合的な要素が加わったものと考えられる。

我々は、昨年度貴財団の助成を受け、「試食パネルによる黒毛和種牛肉の肉質等級、脂肪酸組成と食味性との関連に関する研究」により、45頭分のサーロイン牛肉についてBMSNo.、性を一定とした場合にモノ不飽和脂肪酸の割合の違い（高中低の平均がそれぞれ60.09%、56.74%、53.41%）がどの程度食味性に影響を及ぼすかを訓練パネルにより比較検討した。その結果、モノ不飽和脂肪酸の効果は、「線維感」と「総合的食感」で有意だが、モノ不飽和脂肪酸割合「高」が「中」や「低」より低い結果となった。また、「風味の強さ」と「総合判定」については、モノ不飽和脂肪酸が「高」「低」よりも「中」で評価の高い結果が得られた。さらに、「総合判定」に最も寄与する官能評価項目は、「好ましいうま味」（寄与率56.2%）であり、次いで「風味の強さ」（寄与率28.4%）だった。そして、「風味の強さ」と関連するのはモノ不飽和脂肪酸であることがわかった。これらの結果から、「好ましいうま味」に関与する理化学的成分の特定が極めて重要であることが明らかとなった。

本研究の目的は、おいしい牛肉評価の指標を作成するため黒毛和種牛肉の肉質等級と脂肪酸組成が既知の牛肉を使い、訓練パネルにより評価された「好ましいうま味」と最も関連する脂肪酸組成、アミノ酸とペプチド成分、香気成分の効果を検討し、黒毛和種牛肉の美味しさの指標を作成することである。

## 2. 方 法

### 2.1 サンプルの入手

食肉市場に出荷された枝肉を流通業者の協力により、BMSNo. 4, 7, 9の去勢と雌の牛肉1kgを

それぞれ10頭ずつ合計60頭分のロース肉を買い取り、以下の分析を行った。はじめに、入手した真空パック冷凍保存された牛肉ロース部分から脂肪酸組成分析のための脂肪を採材した。パネルテスト用、アミノ酸とジペプチド分析用、香気成分分析用に分割し再度真空パック冷凍保存し、以下の分析に使用した。

### 2.2 脂肪酸分析

採材した脂肪をn-ヘキサン(和光純薬)を1mL加え激しく振とうした後、10分以上室温に放置し、2N-NaOHメタノールを200 $\mu$ L添加し、約1分間振とうする。さらに、ウォーターバスにより50℃で20秒間加温し、約1分振とうした後室温に放置して冷却させ、塩酸メタノール試薬10(2N-HCLメタノール;東京化成)を600 $\mu$ L添加し、約1分間振とうした後、2層に分離した上層をキャピラリーガラスピペットを使って別の共詮試験管に分け取る。ブロックヒーターで50℃に加温し窒素を噴きつけながらn-ヘキサンを揮発させて濃縮し、その後一定量のn-ヘキサンで希釈してガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を分析する。この分析結果に基づき、モノ不飽和脂肪酸の高、中、低の3グループに分けた。

### 2.3 アミノ酸・ジペプチドの分析

サーロイン牛肉の一部200~250mgを粉碎してからホモジナイズし、ヘキサン5mLで脱脂してからヘキサンを吸引除去した。その後、アセトニトリル3.5mLを添加し、70%アセトニトリル(5mL)とした。0.45 $\mu$ mのフィルターを通したものの1mLを高速液体クロマトグラフィーで分析した。得られたクロマトグラムの各アミノ酸のピーク強度を標準アミノ酸のピーク強度と比較算出した。

### 2.4 香気成分の分析

香気成分は、サーロイン10gから抽出した脂肪0.2gを用いて、Dynamic-HeadspaceSPME法(Watanabeら2008)<sup>1)</sup>により捕集した後、GCMS

Table 1 Result of multiple regression analysis on panel test. N=54

Dependent variable	coefficient	Independent Variables		R <sup>2</sup>
Y (Overall judgment)	0.791	X 1	Favorable taste	56.9
	0.346	X 2	Good cattle aroma	22.8
	0.204	X 3	Total texture	2.1
	0.190	X 4	Strength of flavor	1.1
	-3.074	Intercept		

で測定した。香気成分の同定は、公表されているリテンションインデックスとNIST/EPA/NIHスペクトルデータベースのシミラリティーインデックス (SI%) を用いて行った。同定した成分は、ラクトン類, ケトン類, アルコール類, 飽和脂肪族アルデヒド類, 不飽和脂肪族アルデヒド類, 酸類およびジテルペノイド類の7種類に分類し, 統計分析に用いた。なお, 測定値は, 内部標準物質である1,2-ジクロロベンゼンに対する強度比とした。

### 2.5 パネルテスト

真空パック冷凍保存した牛肉を2℃の恒温槽中で24時間かけて解凍した牛肉を使い, 日本女子大学の訓練されたパネルにより, 肉質等級の異なる牛肉 (BMSNo. 4, 7, 9), 性, モノ不飽和脂肪酸割合 (高, 中, 低) の異なる牛肉について, 食味テストを行った。パネルテストの方法は, BMSNo. 4, 7, 9, 性の異なる牛肉毎に, モノ不飽和脂肪酸割合の低, 中, 高の肉を3点比較法により行った。パネルテスト項目は, 「やわらかさ (はじめの一噛み)」「やわらかさ (咀嚼時)」「線維感」「多汁性」「総合的食感」「良い牛くささ」「悪い牛くささ」「風味の強さ」「好ましいうま味」「総合評価」の10項目である。

### 2.6 統計解析

統計解析にはSASプログラムを使用した。BMSNo. (4, 7, 9), 性 (去勢と雌), モノ不飽和脂肪酸割合 (低, 中, 高) を要因とした分散分析とパネルテスト項目の「総合評価」を従属変

量, 他のパネルテスト項目を従属変量としたStepwise法による重回帰分析を行った。さらに, BMSNo.と性を考慮してパネルテスト項目と, 脂肪酸組成, アミノ酸・ジペプチド, 香気成分との偏相関係数をSASのMANOVAオプションにより計算した。

## 3. 結果と考察

BMSNo. (4, 7, 9) の性 (去勢と雌) およびモノ不飽和脂肪酸 (低, 中, 高) の牛肉54頭分について実施した10項目のパネルテスト項目について, 「総合評価」を従属変量, 残りの項目を独立変量として重回帰分析を行った結果をTable 1に示した。総合評価に最も寄与している項目は「好ましい味」であり, 56.9%の寄与率を示した。次いで, 「良い牛くささ」が22.8%の寄与率を示した。「総合的食感」が2.1%, 「風味の強さ」は1.1%の寄与率だった。以上の結果から, パネルテストの「総合評価」に最も影響している項目は「好ましい味」, 次いで「良い牛くささ」であることが分かった。

次に, 「好ましい味」を含む「総合的食感」, 「良い牛くささ」, 「悪い牛くささ」, 「風味の強さ」, 「総合評価」の6つのパネル項目と, 化学成分としての脂肪酸組成, 香気成分, アミノ酸と糖成分との相関を検討した。なお, 分散分析の結果, BMSNo. と性が分析項目に明らかに影響することが示されたので, BMSNo.と性を考慮して推定

**Table 2** Partial correlation coefficients from error between panel test and fatty acids composition

	Mean	SD	Texture	Good	Bad	Flav	Taste	Overall
c 140	2.59	0.44	<b>0.38</b>	0.12	0.04	-0.12	0.00	0.05
c 160	26.27	2.21	<b>0.50</b>	0.12	0.06	-0.34g	-0.10	-0.04
c 161	4.07	0.91	<b>0.02</b>	0.10	-0.01	0.25	0.15	0.15
c 180	11.65	1.96	<b>0.05</b>	0.00	0.06	-0.10	-0.07	-0.01
c 181	53.11	2.93	<b>-0.51</b>	-0.10	-0.06	0.28	0.12	0.02
c 182	2.31	0.6	<b>0.00</b>	-0.22	-0.11	0.00	-0.19	-0.18
SFA	40.51	3.38	<b>0.44</b>	0.11	0.08	-0.32g	-0.11	-0.03
MUFA	57.18	3.37	<b>-0.45</b>	-0.06	-0.06	0.32g	0.15	0.07
RATIO	1.43	0.2	<b>-0.44</b>	-0.07	-0.07	0.28g	0.11	0.04

Texture: Total texture, Good: Good cattle aroma, Bad: Bad cattle aroma, Flav: Strength of flavor, Taste : Favorable taste, Overall: Overall judgment. SFA: Saturated fatty acids, MUFA: Mono-unsaturated fatty acids , RATIO: MUFA/SFA, Bold figure shows significant coefficient of correlation at 5 % . DF = 48

した誤差の偏相関係数を計算して検討した。

脂肪酸組成については、C14：0、C16：0とSFAが「総合的食感」と0.35、0.50および0.44の有意な正の相関を示した一方で、C18：1とMUFAおよびRATIOは有意な負の相関を示した。一般に、飽和脂肪酸が多いと融点が高く、モノ不飽和脂肪酸が多いと融点が低くなることが予想されるが、融点が高い方が「総合的食感」には良い影響をもたらすことは意外な結果といえる。逆に脂肪の融点が低いと、脂肪が溶けることで線維感を生じることが食感には良くない結果になった可能性がある。また、「風味の強さ」は、C16：0、SFA（飽和脂肪酸）と負の有意な相関を、MUFA（モノ不飽和脂肪酸）は正の有意な相関（0.32）を示し、モノ不飽和脂肪酸が風味と関連することが示された。モノ不飽和脂肪酸が「風味の強さ」に正の効果をもたらすことは妥当な結果といえる。そのほかのパネルテスト項目とはほとんど関連がないことが示された（Table 2）。

香気成分は、22成分を同定し、それぞれラクトン類（4成分）、ケトン類（2成分）、アルコール類（1成分）、飽和脂肪酸アルデヒド類（6成分）、不飽和脂肪酸アルデヒド類（3成分）、酸類

（1成分）およびジテルペノイド類（5成分）に分類した。分類した香気成分と香りに関するパネルテスト項目との相関をTable 3に示した。アルコール類および不飽和脂肪酸アルデヒド類と「良い牛くささ」との間でそれぞれ有意な負の相関を示した。また、有意ではないが、ケトン類や飽和脂肪酸アルデヒド類と「良い牛くささ」との間でも負の相関を示した。和牛肉には、和牛香と呼ばれる脂っぽく甘い香りが存在しており<sup>2)</sup>、この和牛香の脂っぽい香りには、脂臭い香り（脂肪様香気）を有する一部のアルコール類やアルデヒド類などに加え、バター様の香りを有する一部のケトン類が寄与していることが報告されている（松石ら2004）<sup>3)</sup>。本研究において、これらの香気成分と「良い牛くささ」との間で負の相関を示したのは、これらの香気成分に由来する脂っぽい香りが、「良い牛くささ」と反していたことが一つの要因ではないかと考えられた。

最後に遊離アミノ酸、糖成分とパネルテスト項目との相関をTable 4に示した。遊離アミノ酸や糖成分は「好ましい味」との関連が期待されたが、「好ましい味」と有意な相関は検出されなかった。Cys 2が「総合的食感」と正の有意な相関



**Table 3** Partial correlation coefficients from error between panel test of aroma and volatile compounds.

	Mean	SD	Good	Bad	Flav
Lactones	27.4	15.2	0.08	-0.14	-0.29
Ketones	78.7	36.6	-0.19	-0.06	0.13
Alcohols	5.1	1.8	-0.34	-0.15	0.17
Aliphatic aldehydes (saturated)	318.8	125.2	-0.28	-0.06	0.10
Aliphatic aldehydes (unsaturated)	153.8	74.5	-0.34	-0.17	0.03
Acids	4.1	0.9	0.06	0.10	-0.04
Diterpenoids	60.0	22.0	0.17	0.30	0.18

Good : Good cattle aroma, Bad : Bad cattle aroma, Flav : Strength of flavor,

Bold figure shows significant coefficient of correlation at 5 % DF=42

を示した。また、「良い牛くささ」はTryptophanと正の相関を示した。糖成分のうち、Glycerolが「良い牛くささ」とGlycogenが「悪い牛くささ」と正の有意な相関を示した。

以上、本研究では、BMSNo., 性, 脂肪酸組成が明かな牛肉を分析型のパネルテストにより評価し、パネルテスト項目とそれらの牛肉の化学成分としての香気成分, アミノ酸や糖類などの分析値との関連を検討した。パネルテストの「総合評価」に最も寄与するパネル項目は「好ましい味」, 次いで「良い牛くささ」であり、「風味の強さ」は比較的寄与率が低かった。最も寄与する「好ましい味」と化学成分との関連を検討したがいずれの化学成分も関連が認められなかった。兵庫県畜産技術センターの報告では、但馬牛・神戸ビーフと一般の牛肉との官能評価試験により焼肉の総合評価は「やわらかさ」, 「風味」, 「うま味」と、煮肉の総合評価, 「風味」, 「うま味」と高い相関があること、モノ不飽和脂肪酸割合は中程度の総合評価の高いこと、食味評価とジペプチドとの関係ではアンセリンが多くなると総合評価が低くなることなどを報告<sup>4)</sup>している。本研究では、宮城県の食肉市場に出荷された牛肉を対照としたパネルテストと化学成分との関連を検討したが、今後

は、より味に特徴のある銘柄牛肉などを対象としたパネルテストや化学成分の比較検討を行うことがおいしい牛肉の指標作成のためには必要であると思われる。

#### 4. 要 約

おいしい牛肉評価の指標を作成するため、黒毛和種牛肉の肉質等級と脂肪酸組成が既知の牛肉を使い、訓練パネルにより評価されたパネル項目と脂肪酸組成, アミノ酸とペプチド成分, 香気成分との関連を検討した。パネルテスト項目の総合評価に最も寄与するパネル項目は、「好ましい味」であり、次いで「良い牛くささ」, 「総合的食感」, 「風味の強さ」の順だった。これらの項目とBMSNo., 性を考慮して化学成分との偏相関を算出した結果、「風味の強さ」は、C16:0, SFA(飽和脂肪酸)と負の有意な相関を、MUFA(モノ不飽和脂肪酸)は正の有意な相関を示し、モノ不飽和脂肪酸が風味と関連することが示された。香気成分では、アルコール類および不飽和脂肪族アルデヒド類と「良い牛くささ」との間でそれぞれ有意な負の相関が示された。さらに、遊離アミノ酸や糖成分は「好ましい味」との関連が期待されたが、「好ましい味」と有意な相関は検出されな

Table 4 Partial correlation coefficients from error between panel test and amino acids, sugar component.

		Mean	SD	Texture	Good	Bad	Flav	Taste	Overall
Free amino acid (nmol/gWW)	Aspartic acid	13.2	27.0	-0.18	-0.13	-0.25	0.02	-0.01	-0.25
	Glutamic acid	156.1	104.2	0.03	0.06	0.07	-0.17	0.20	0.12
	Asparate	44.9	61.2	0.00	-0.01	-0.01	0.04	0.23	0.16
	Serine	193.4	83.0	0.12	-0.07	-0.08	0.12	0.20	0.22
	Glutamine	3583.0	2088.0	-0.01	0.21	0.09	-0.12	-0.01	-0.06
	Glycine	3.6	18.8	0.16	0.11	0.26	0.11	0.04	0.03
	Histidine	402.9	134.8	-0.07	-0.12	-0.13	-0.03	0.15	0.07
	Threonine	89.8	96.1	0.07	-0.07	-0.07	0.03	0.13	0.09
	b-Alanine	19.1	40.9	0.15	0.12	0.08	0.26	0.00	0.03
	Arginine	142.7	48.6	0.10	0.03	0.02	-0.01	0.05	0.07
	Alanine	2249.0	610.8	-0.09	0.04	-0.05	-0.13	0.07	0.01
	Car + Tau	3981.0	1495.0	0.18	-0.06	0.00	0.14	-0.02	0.07
	Ans	467.8	320.2	0.12	-0.09	-0.01	0.12	0.12	0.16
	Tyrosine	170.1	80.0	0.15	0.05	0.14	0.12	0.07	0.22
	Cys 2	87.3	40.6	0.16	0.19	0.25	0.12	0.18	<b>0.35</b>
	Valine	190.4	98.4	0.12	0.02	0.11	-0.03	0.01	0.11
	Methionine	53.7	87.1	0.13	-0.08	0.14	0.03	0.06	0.12
	Tryptophan	79.4	48.9	0.12	<b>0.45</b>	0.21	-0.04	-0.01	0.13
	Phenylalanine	162.8	79.2	0.14	0.21	0.24	0.00	0.09	0.22
	Isoleucine	131.7	133.6	0.16	-0.05	0.04	0.07	-0.01	0.03
Leucine	345.1	166.2	0.18	0.08	0.17	0.01	0.06	0.21	
Lysine	69.5	55.0	0.11	-0.07	0.03	0.01	0.00	-0.10	
Proline	22.1	60.0	0.12	0.01	-0.04	0.00	0.13	-0.07	
Sugar ( $\mu$ g/gWW)	Glycerol	737.6	133.5	0.09	<b>0.30</b>	0.05	-0.11	-0.15	0.00
	Ribose	106.4	64.2	0.01	0.10	0.06	-0.21	0.09	0.08
	Fructose	189.2	110.2	0.11	-0.07	0.11	0.04	0.01	0.18
	Mannose	85.5	56.8	0.16	-0.01	0.12	0.02	0.09	0.22
	Glucose	504.2	225.1	-0.02	0.10	0.13	0.13	0.00	0.18
	Inositol	211.2	146.6	0.00	0.24	0.15	-0.11	0.04	0.09
	total	1834.0	463.9	0.06	0.21	0.17	-0.02	-0.01	0.19
	Glycogen	1.0	0.9	0.17	0.12	<b>0.29</b>	0.13	-0.04	0.14

Texture: Total texture, Good: Good cattle aroma, Bad: Bad cattle aroma, Flav: Strength of flavor, Taste: Favorable taste, Overall: Overall judgment. Significant level of coefficient of correlation at 05 % was 0.268. Bold figure shows significant coefficient of correlation at 5%. DF = 48.

かった。以上の結果から、おいしい牛肉評価につながるパネルテスト項目と関連する化学成分を検出するには、肉質に特徴のある銘柄牛間の比較が必要であると考えられた。

謝辞

本試験で分析に供した黒毛和種牛肉の入手について多大な協力を頂きました株式会社丸市に深甚の謝意を表します。

## 文 献

- 1) Watanabe A, Ueda Y, Higuchi M, Shiba N : Analysis of Volatile Compounds in Beef Fat by Dynamic-Headspace Solid-Phase Microextraction Combined with Gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of food science*. **73** : C420 ~ C425, 2008.
- 2) 沖谷明絢 : 食肉の風味形成に関する研究, 日本栄養, 食糧学会誌, 第**59**巻 (第1号), 39~50, 2006.
- 3) 松石昌典, 久米淳一, 伊藤友己, 高橋道長, 荒井正純, 永富宏, 渡邊佳奈, 早瀬文孝, 沖谷明絢 : 和牛肉と輸入牛肉の香気成分, *日本畜産学会報*, **75**, 409~415, 2004.
- 4) 岡章生, 岩本英治 : 黒毛和種去勢牛の枝肉性状および美味しさ成分と官能評価の関係, 平成22年度兵庫県畜産技術センター成果発表会, 2011.1.

# 牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸についての研究

Intramuscular free fatty acids related to beef eating quality

山之上 稔・矢野 恵子・上田 修司・井原 一高・豊田 浄彦

(神戸大学大学院農学研究科)

Minoru Yamanoue, Keiko Yano, Syuji Ueda, Ikko Ihara and Kiyohiko Toyoda

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

It has been known that marbling and fatty acid composition influence on quality of Japanese Black Wagyu beef. Beef with the most desirable flavour has lower percentages of saturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids and higher percentage of monounsaturated fatty acids in the intramuscular fat. However, changes in the amount and fatty acid composition of intramuscular fat when beef is provided as a food have not been cleared yet.

The aim of this study was to analyze the changes in intramuscular fat of Japanese Black Wagyu beef after postmortem aging and cooking. Sample meats were taken from carcass cross-section between the sixth and seventh ribs of Japanese Black Wagyu cattle and stored at 4°C antiseptically. At 7-, 14- and 28-days postmortem, total lipid was extracted with a mixture of chloroform and methanol according to the Folch method. Total lipid was separated to each lipid class such as triacylglycerol (TG), free fatty acids (FFA), cholesterol ester and others by silica column chromatography and the amounts of those lipids were measured. On the other hand, meat samples at 21-days postmortem were cooked to internal temperature of 65-70°C and supplied to above measurements. Separated lipids were esterified with BF<sub>3</sub>-MeOH and each fatty acid composition was determined by GC analysis.

As the results, postmortem aging had no effect on the amounts and the fatty acid composition of total lipid and TG of intramuscular fat. But the amount of FFA increased significantly during postmortem aging ( $P < 0.05$ ). Cooking caused no significant change in any amounts and fatty acid composition of total lipid, TG and FFA. Thus, increased amount of FFA in intramuscular fat during postmortem aging is possible to relate to eating quality of Japanese Black Wagyu beef.

## 1. 目 的

牛肉のおいしさには脂肪の関与も大きく、筋内脂肪が多いことや霜降りなどが重要視されている。一方で、近年では牛肉品質に与える脂肪酸組

成の影響が注目され、筋肉内の脂肪量だけでなく脂肪の質、すなわちトリアシルグリセロール (TG) の脂肪酸組成において飽和脂肪酸 (SFA) および不飽和脂肪酸 (PUFA) が少なく、一価不飽和脂肪酸 (MUFA) が多いほど牛肉は好まし

い風味を呈すると報告されている<sup>1-3)</sup>。しかしながら、これまで数多く報告されている牛肉生産時の筋内脂肪量や脂肪酸組成に関する知見が、牛肉賞味時の食味性を直接反映しているか否かは不明である。

通常、牛肉は長期間の熟成を経て加熱調理後に食されている。熟成の進行に伴い牛肉が酸化や酵素の影響を受けて筋内脂肪に経時的变化が起きている可能性が考えられるが、熟成による筋内脂肪の変化と牛肉のおいしさに関する報告は少ない。

また牛肉は生食することが少なく、焼く・煮るなどの加熱調理が行なわれる。加熱により香り、色、テクスチャー、味などが変化して食べやすくなり、食中毒の原因となる細菌が死滅し、安全になる。一方で加熱は牛肉の栄養価の減少や脂質の酸化を招き、条件によっては好ましくない匂いや味の原因になり得る。そのため加熱による脂肪の変化を明らかにすることは、牛肉のおいしさを向上させるうえで重要と考えられる。これまでに報告されている加熱による牛肉脂肪の加熱変化はいずれも総脂質を対象としており<sup>4)</sup>、総脂質中のTGや遊離脂肪酸(FFA)の加熱変化を調べた報告は見当たらない。これら脂質クラスの加熱中の変化に伴い、牛肉の筋内脂肪に変化が起ることが予想される<sup>4)</sup>。

本研究では、主要な肉牛である黒毛和種の牛肉を試料として、熟成および加熱に伴う筋肉内の脂肪量および遊離脂肪酸量と組成の変化を調べた。すなわち総脂質だけでなく、総脂質の大部分を占めるTGや、酸化の影響を最も受けやすく食味との関連が示唆されているFFAの脂質クラスについても定量および脂肪酸組成分析を行った。TGは味の認識において化学受容されることはなく、口中ではFFAの形で認識される<sup>5,6)</sup>と考えられるので、これらの結果から牛肉内の遊離脂肪酸に由来する牛肉のおいしさを明らかにすることを目的

とする。

## 2. 方法

### 2.1 試薬および牛肉試料

試薬は特に表記してあるものを除き、ナカライテスク社もしくは和光純薬工業株式会社の特級試薬を用いた。牛肉試料は、伊藤ハム(株)関西ミートセンターから購入した黒毛和種枝肉の第6～7胸椎間のロース部を用いた。

### 2.2 熟成および加熱処理

ロース部の牛肉を4℃で保存し、と畜後7日目、14日目、および28日目にロース芯から牛肉片を無作為に採取して熟成試料とした。一方、同様に21日間熟成したロース芯から無作為に試料を採取し、未加熱試料とした。残りのロース芯を4cm×5cmの大きさと厚さ1cmの肉片に整形し、120℃に加熱したホットプレートで内部温度が65～70℃になるように表裏を各130秒間加熱後に試料を採取し、加熱試料とした。

### 2.3 総脂質の抽出とトリアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸の分画

熟成および加熱した牛肉試料からコルクボーラーで無作為に1gを採取し(Fig. 1)、クロロホルム20mlとメタノール10mlの混液を加えFolch法<sup>7)</sup>で総脂質を抽出して、エバポレーターで濃縮後、定量した。10gのシリカゲル(WAKO GEL)をガラスカラム(φ20mm×300mm)に充てんし、1mlのヘキサンに溶解した100mgの総脂質を添加した。ヘキサン：t-ブチルメチルエーテル=100：1.5でコレステロールエステル画分を、ヘキサン：t-ブチルメチルエーテル=96：4でトリアシルグリセロール画分を、ヘキサン：t-ブチルメチルエーテル：酢酸=100：2：0.2で遊離脂肪酸画分を順次溶出後に定量した。抽出した総脂質と分画した脂質クラスを薄層クロマトグラフィ法で展開し、精製度を確認した。

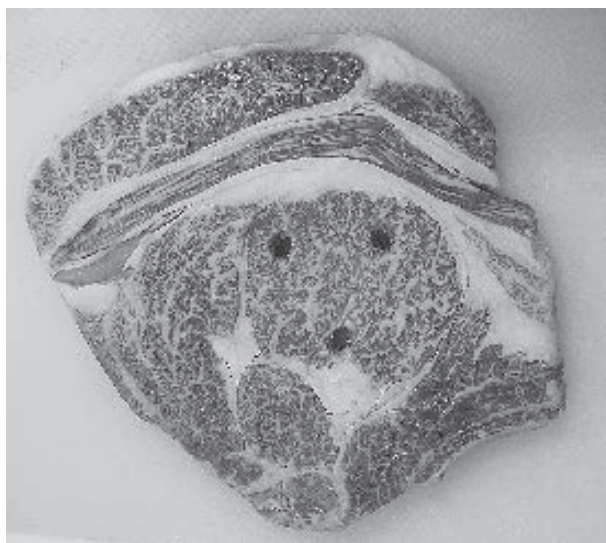


Fig. 1 Rib eye after taking sample pieces from carcass cross-section between the sixth and seventh ribs at 7-days postmortem.

#### 2.4 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLCプレート (Merc社) の下端にヘキサンに溶解した30mg/ml脂質試料を2  $\mu$ l添加した。展開溶媒はヘキサン：t-ブチルメチルエーテル：酢酸=80：20：1を用いた。展開後に50%硫酸溶液を噴霧し、130℃で8分間の炭化で脂質スポットを検出した。

#### 2.5 脂肪酸組成の測定

各脂質クラスから三フッ化ホウ素-メタノール法で脂肪酸メチルエステル (FAME) を調製した。30mg/mlになるようにFAMEをヘキサンに溶解し、ガスクロマトグラフ (GC) (島津GC-2014) で脂肪酸組成分析を行った。FAMEの分離はキャピラリーカラム (Omega Wax30m  $\times$  0.25mm) で行い、カラム温度は180℃の恒温条件で、スプリット比は100：1で行った。検出器は水素炎イオン化検出器 (FID) を用いた。各脂肪酸の同定および組成分析は脂肪酸メチルエステル標準品 (スベルコ社RM-6 および37FAME Mix) と比較して行った。

### 3. 結果と考察

抽出した総脂質をシリカゲルカラムに添加し、順次異なる組成の溶離液で溶出した。分画後回収した脂質クラスの薄層クロマトグラフィーの結果をFig. 2に示す。Fig. 2-aは分画に供する前の総脂質であり、図に示すように、TG, FFA, コレステロール (FC), およびジアシルグリセロール (DG) 他が含まれていた。Fig. 2-bとFig. 2-cはTG画分とFFA画分の薄層クロマトグラフィーの結果である。それぞれ単一のスポットが認められ、TGおよびFFAともに単離されていることを確認した。

と畜後の黒毛和種牛肉を4℃で熟成し、7日目、14日目および28日目に抽出した総脂質量を定量後、総脂質から分画したTGおよびFFAを定量した。その結果、黒毛和種牛肉の総脂質量は、7日目に100g牛肉当たり35gであったのが、14日目に37g、28日目に36gであり、有意な変化は認められなかった (Fig. 3)。TG量は、7日目に100g牛肉当たり33gであったのが、14日目に33



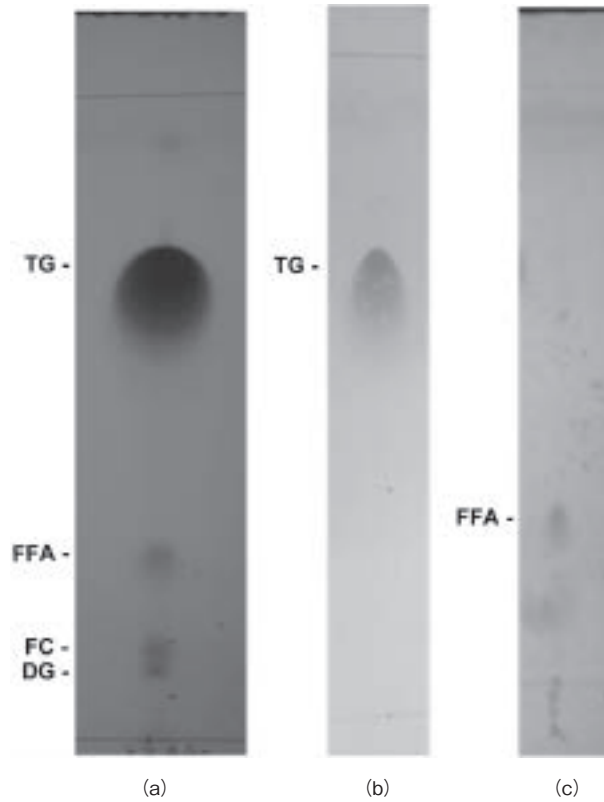


Fig. 2 TLC patterns of total lipid (a) , TG (b) and FFA (c) fractions separated by silica gel chromatography. TG, triacylglycerol; FFA, free fatty acid; FC, cholesterol; DG, diacylglycerol.

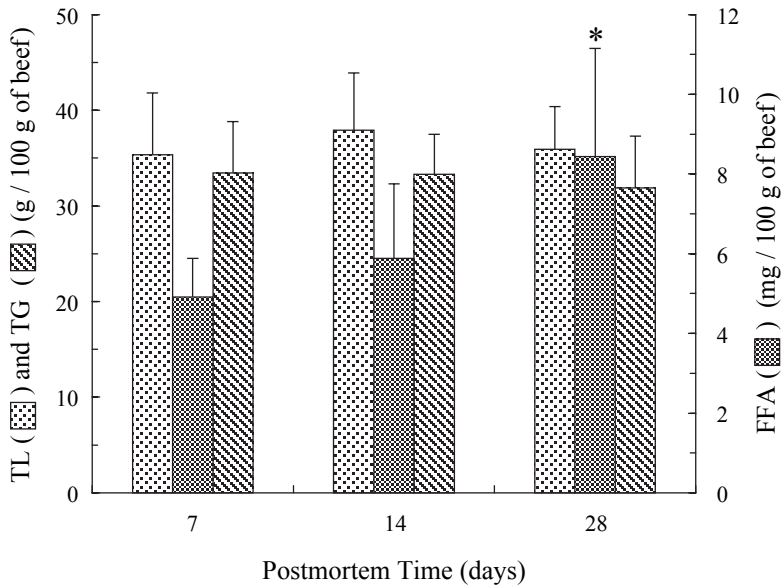


Fig. 3 Changes in the amounts of TL, TG and FFA during postmortem aging of Japanese Black Wagyu beef (n=10).

TL, total lipid; TG, triacylglycerol; FFA, free fatty acid.

\*, significant difference between 7- and 28-days postmortem ( $P < 0.05$ ).

**Table 1** Fatty acid composition (%) of intramuscular fat of Japanese Black Wagyu beef during Postmortem aging (n=10).

Fatty Acid	Postmortem Aging Time (days)								
	7			14			28		
	TL	TG	FFA	TL	TG	FFA	TL	TG	FFA
C 14 : 0	2.34±0.28	2.34±0.46	3.69±0.22	2.41±0.34	2.59±0.49	3.41±0.65	2.47±0.32	2.49±0.44	3.38±0.54
C 14 : 1	0.66±0.24	0.67±0.24	nd	0.63±0.16	0.74±0.27	nd	0.66±0.24	0.72±0.26	nd
C 15 : 0	0.31±0.05	0.31±0.05	nd	0.31±0.05	0.34±0.05	nd	0.36±0.11	0.33±0.05	nd
C 16 : 0	26.1±2.49	26.1±3.87	34.1±4.15	26.3±2.54	26.8±2.52	33.8±4.92	26.7±2.03	26.9±2.73	30.3±4.10
C 16 : 1	3.59±0.79	3.33±0.50	2.79±0.51	3.63±0.57	3.54±0.76	3.13±1.19	3.39±0.54	3.54±0.60	346±1.10
C 17 : 0	0.88±0.14	0.86±0.14	nd	0.89±0.16	0.91±0.16	nd	0.88±0.15	0.89±0.14	nd
C 18 : 0	11.5±1.96	11.0±1.98	16.4±2.56	11.6±1.67	11.2±2.22	15.1±2.73	11.6±2.29	11.1±1.97	13.4±3.55
C 18 : 1	48.8±1.90	47.7±3.16	37.5±6.13	48.4±2.50	47.8±3.03	40.1±4.59	48.1±2.32	47.8±3.03	41.2±7.82
C 18 : 2	2.64±0.81	2.33±0.76	4.96±2.48	2.58±0.83	2.60±0.80	6.66±3.66	2.50±0.77	2.54±0.77	5.93±2.08
SFA	41.1±2.63	41.9±2.99	53.7±6.91	41.5±3.50	41.8±3.52	51.6±5.85	42.0±2.79	41.6±3.59	47.1±6.68
MUFA	53.0±2.05	52.5±2.33	40.9±5.94	52.7±2.89	52.1±2.84	42.3±4.93	52.1±2.36	52.0±2.69	44.0±8.83
PUFA	2.38±0.81	2.33±0.76	6.06±1.96	2.46±0.83	2.60±0.80	6.66±3.66	2.38±0.81	2.54±0.77	5.93±2.08

TL, total lipid; TG, triacylglycerol; FFA, free fatty acid.

nd, no detection.

g, 28日目に32gであり、同様に有意な変化は認められず、TGは総脂質において多くの量を占めていた。これらの量はこれまで明らかになっている牛肉の脂質含量<sup>8)</sup>と一致した。総脂質量およびTG量における個体間のばらつきは、霜降りの程度の差によるものと考えられる。一方、FFA量は7日目に100g牛肉当たり4.9mgであったのが、14日目に5.9mgに、28日目には8.4mgへ有意に増加した ( $P < 0.05$ )。熟成中に増加したFFAの由来について現段階では不明である。TGからの遊離が考えられたが、牛肉中のTG量とFFA量の含量差は大きく、両脂質クラス量の変化に相関は確認できなかった。

4℃で熟成中の黒毛和種牛肉から経時的に抽出した総脂質および総脂質から分画したTGならびにFFAをメチルエステル化し、GCを用いて脂肪酸組成を分析した結果をTable. 1に示す。総脂質では熟成による脂肪酸組成の変化は認められなかった。総脂質に最も多く含まれているのはオレ

イン酸であり約48%を占めた。次に多く含まれるのはパルミチン酸であり、約26%を占めた。これらの値は過去の報告<sup>9)</sup>と一致した。TGでも熟成による脂肪酸組成の変化は認められなかった。最も多く含まれているのはオレイン酸で、次に多く含まれるのはパルミチン酸であり、総脂質とよく似た脂肪酸組成を示した。これは総脂質の大半がTGで構成されているためと考えられる。またオレイン酸をはじめとするモノ不飽和脂肪酸 (MUFA) の割合が、飽和脂肪酸 (SFA) よりも高く、黒毛和種牛肉に特徴的な風味の良さを示している<sup>1, 9)</sup>と推定された。牛肉試料から抽出した総脂質からカラムクロマトグラフィー法で分画したFFAをメチルエステル化しGCを用いて脂肪酸組成を分析した。FFAの脂肪酸組成もまた熟成による変化は認められなかった。総脂質およびTGの脂肪酸組成と比較したとき、FFAではオレイン酸割合が約39%と低く、パルミチン酸の割合が約36%と高かった。熟成に伴い黒毛和種牛肉内

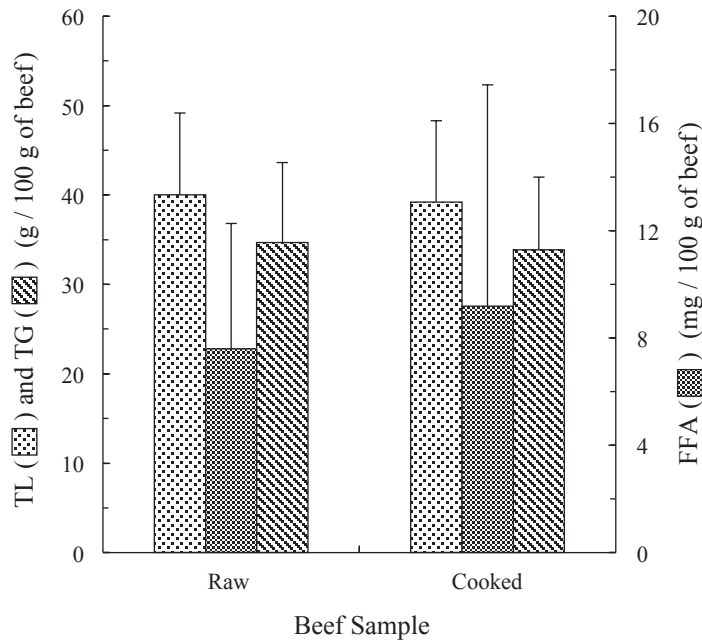


Fig. 4 Changes in the amounts of TL, TG and FFA by cooking of Japanese Black Wagyu beef at 21-days postmortem (n = 7).  
TL, total lipid; TG, triacylglycerol; FFA, free fatty acid.

のFFA量が増加しているため (Fig. 3), 筋肉内の各脂肪酸量も同様に増加していることが考えられる。近年の研究で、マウスとラットの舌上において長鎖脂肪酸を受容する受容体の存在が明らかになっており、その存在はヒトでも示唆されている<sup>5,6)</sup>。ヒトの舌上に脂肪酸受容体が存在するのであれば、熟成に伴うFFA量の増加は黒毛和種牛肉のおいしさに影響している可能性が考えられる。

と畜後の黒毛和種牛肉を4℃で21日間熟成後に肉片を加熱調理した。加熱前後の試料から抽出した総脂質および総脂質から分画したTGならびにFFAの量を定量した。その結果、総脂質量は未加熱試料で100g牛肉当たり40gであったが、加熱後も39gと有意な変化は認められなかった (Fig. 4)。TG量は未加熱試料で100g牛肉当たり35gであったが、加熱後も34gと有意な変化は認められず、TGが総脂質の多くを占めていた。

FFA量は未加熱試料で100g牛肉当たり7.5mgであったが、加熱後も9.9mgと有意な変化は認められなかった。一般に食品と食用油脂を同時に加熱するとき、食品中の水分で油脂の加水分解が生じ、FFAやモノアシルグリセロールなどの量が増加する<sup>10)</sup>。牛肉でも脂質と水分が混在するため食物として提供されるときに加熱により脂質に何らかの変化がおこることが予測されたが、有意な変化は認められなかった。加熱劣化が起こる温度は150℃から200℃程度とされており<sup>10)</sup>、今回の実験では120℃の低い温度で牛肉を加熱したため加熱による劣化や酸化が起こりにくかった可能性が考えられる。また油脂の熱劣化の場合、生成するFFAはすぐに二次酸化物へと変化するため加熱油脂中にはほとんどFFAは存在しないので、加熱により増加したFFAが二次酸化物へと変化した可能性が考えられるが、いずれも明確ではない。

4℃で21日間熟成後の未加熱および加熱牛肉試

**Table 2** Fatty acid composition (%) of intramuscular fat before (Raw) and after cooking (Cooked) of Japanese Black Wagyu beef (n=7).

Fatty Acid	Raw			Cooked		
	TL	TG	FFA	TL	TG	FFA
C 14 : 0	2.19±0.38	2.30±0.61	3.49±0.91	2.67±0.67	2.62±0.53	3.06±0.90
C 14 : 1	0.73±0.22	0.66±0.12	nd	0.85±0.17	0.82±0.23	nd
C 15 : 0	0.28±0.07	0.24±0.20	nd	0.31±0.05	0.29±0.07	nd
C 16 : 0	24.4±1.54	25.0±2.25	28.6±5.78	26.7±3.41	26.2±2.33	27.8±2.21
C 16 : 1	4.05±1.28	4.06±0.76	3.52±0.91	4.16±1.49	4.14±1.06	4.76±1.70
C 17 : 0	0.71±0.17	0.81±0.18	nd	0.83±0.12	0.84±0.16	nd
C 18 : 0	10.1±1.05	10.5±1.58	11.6±2.38	10.4±2.27	10.3±1.45	10.4±1.53
C 18 : 1	52.3±1.82	50.8±3.79	44.2±7.61	49.0±3.80	49.6±3.32	45.6±5.17
C 18 : 2	2.13±0.42	1.95±0.36	3.97±1.31	2.20±0.31	1.95±0.39	4.28±1.94
SFA	37.5±2.44	38.8±4.21	43.5±7.80	40.9±6.14	40.2±3.82	41.3±4.35
MUFA	57.1±2.17	55.5±3.75	47.7±8.10	55.9±4.92	54.5±3.67	50.3±4.35
PUFA	2.13±0.42	1.95±0.36	3.97±1.31	2.20±0.31	1.95±0.39	4.28±1.94

TL, total lipid; TG, triacylglycerol; FFA, free fatty acid.

nd, no detection.

料から抽出し分画した各脂質クラスの脂肪酸組成を分析した結果をTable. 2に示す。いずれの脂質クラスでも加熱による脂肪酸組成の有意な変化は認められなかった。牛肉の加熱後に総脂質に最も多く含まれているのはオレイン酸であり、約50%を占めた。次に多く含まれるのはパルミチン酸であり、約25%であった。また総脂質およびTGの両脂質クラスで、オレイン酸をはじめとするMUFAの占める割合が未加熱および加熱牛肉の両方で割合が高かった。一方、総脂質から分画したFFAでも加熱前後における脂肪酸組成の変化は認められなかった。総脂質およびTGの脂肪酸組成と比較すると、熟成後の牛肉試料と同様にFFAでは加熱後にオレイン酸が約45%と割合が低くなり、パルミチン酸の割合は約28%へ増加した。Sarriesら<sup>11)</sup>は、加熱調理は牛肉から抽出した総脂質の脂肪酸組成に影響を及ぼさないと報告している。しかしDucketら<sup>12)</sup>は加熱によってステアリン酸と飽和脂肪酸が増加し、多価不飽和脂肪酸が減少することを報告しており、一致してい

ない。牛肉中の脂質が加熱による酸化の影響を受けたのであれば、通常飽和脂肪酸より酸化を受けやすい不飽和脂肪酸が減少すると考えられる。それに反し、全飽和脂肪酸を炭素鎖の対応するモノ不飽和脂肪酸に変える $\Delta 9$ 不飽和化酵素は、反芻動物では加熱の影響で活性が失われることはない<sup>4)</sup>と報告されている<sup>4)</sup>。さらに本研究では牛肉を21日間熟成し、Sarriesら<sup>11)</sup>は12日間熟成しているのに対し、Ducketら<sup>12)</sup>はと畜後すぐに加熱を行っている。したがって、牛肉において脂質の加熱変化は、加熱方法や貯蔵方法で異なり、また加熱や貯蔵に伴う不飽和化酵素活性の変化に影響を受けると考えられる。

以上の結果、黒毛和種牛肉の熟成中の各脂質クラス量の変化を調べたとき、総脂質およびTGには変化が認められなかったが、総脂質中のFFA量は熟成に伴い増加することが示された。また加熱調理による各脂質クラスの量および脂肪酸組成への影響は認められなかった。熟成中のFFAの増加が何に起因するのかは現時点では不明である

が、これらの結果は、熟成後の牛肉中に増加したFFA量は食するときの加熱調理で変化しないことを示唆している。近年FFAが水溶液中でうま味を促進し、苦味や酸味などを抑制するといった報告や、ラットにおける長鎖脂肪酸受容体の存在を示唆する報告<sup>13)</sup>がある。したがって、黒毛和種牛肉の呈味に筋内脂肪が関与する可能性を考えると、FFAの量が重要であると推測され、今後の研究で牛肉のおいしさとFFAの関連性について検討を進める必要がある。

#### 4. 要 約

牛肉のおいしさでは軟らかさへの脂肪の影響は大きく、筋内脂肪量が重要視されている。一方で、近年では牛肉品質に与えるトリアシルグリセロールを構成する脂肪酸組成の影響が注目されている。しかしながら、これらの筋内脂肪量や脂肪酸組成に関する知見が、牛肉賞味時の食味性を直接反映しているか否かは不明である。本研究の目的は、牛肉のおいしさに関連する筋内脂肪が、熟成および加熱調理によりどのように変化するかを明らかにすることであった。

黒毛和種牛肉の第6～第7肋骨間ロース部を4℃で保存し、と畜後7, 14, および28日目にロース芯から筋肉片を採取した。Folch法に従って総脂質を抽出し、総脂質からシリカゲルカラムクロマトグラフィー法でトリアシルグリセロール(TG)および遊離脂肪酸(FFA)を分画し、それぞれ定量した。さらに各脂質クラスにおける脂肪酸組成の熟成による変化を分析した。一方、熟成21日目のロース芯を65～70℃で加熱調理後、加熱前後の試料から同様に各脂質クラスを分画・定

量し、脂肪酸組成を分析した。その結果、熟成後の牛肉中の総脂質量とTG量およびそれらの脂肪酸組成に変化は認められなかったが、遊離脂肪酸量が有意に増加した( $P < 0.05$ )。加熱前後の牛肉では各脂質クラスの量および脂肪酸組成に変化は認められなかった。これらの結果から、黒毛和種牛肉の脂肪由来のおいしさに、熟成中に増加し、加熱調理でも影響を受けない遊離脂肪酸が関与する可能性が考えられた。

#### 文 献

- 1) Westerling, D.B. and Hedrick, H. B. : *J. Anim. Sci.*, **48**, 1343～1348, 1978.
- 2) Melton, S.L., Amiri, M., Davis, G.W. and Backus, W. R. : *J. Anim. Sci.*, **55**, 77～87, 1982.
- 3) Mandell, I.B., Buchanan-Smith, J.G. and Cambel, C.P. : *J. Anim. Sci.*, **76**, 2619～2630, 1998.
- 4) Jiang, T., Busboom, J.R., Nelson, M.L., O'Fallon, J., Ringkob, T.P., Joos, D. and Piper, K. : *Meat Sci.*, **84**, 86～92, 2009.
- 5) 松村成暢・伏木亨 : 化学と生物, **48**, 114～120, 2010.
- 6) Pittman, D.W., Labban, C.E., Anderson, A.A. and O'Conner, H.E. : *Chem. Senses*, **31**, 835～843, 2006.
- 7) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H. S. : *J. Biol. Chem.*, **226**, 497～509, 1957.
- 8) Cameron, P.J., Zembayashi, M., Lunt, D.K., Mitsuhashi, T., Mitsumoto, M., Ozawa, S. and Smith, S.B. : *Meat Sci.*, **38**, 361～364, 1994.
- 9) Oka, A., Iwaki, F., Dohgo, T., Ohtagaki, S., Noda, M., Shiozaki, T., Endoh O. and Ozaki, M. : *J. Anim. Sci.*, **80**, 1005～1011, 2002.
- 10) 都築和歌子 : 平成20年度食肉に関する助成研究調査報告書, No.22, 99～108, 2009.
- 11) Sarries, M.V., Murray, B.E., Moloney, A.P., Troy, D. and Beriain, M.J. : *Meat Sci.*, **81**, 307～312, 2009.
- 12) Duckett, S.K., and Wagner, D.G. : *J. Food Compo. Anal.*, **11**, 357～362, 1998.
- 13) Matsumura, S., Mizushige, T., Yoneda, T., Iwanaga, T., Tsuzuki, S., Inoue, K. and Fushiki, T. : *Biomed. Res.*, **28**, 49～55, 2007.

# 食肉のきめに対する迅速かつ客観的な評価手法の研究

A rapid objective method for evaluating meat grain

入 江 正 和

(宮崎大学農学部)

Masakazu Irie

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

The meat grain (the first muscle bundle) is an important factor for the texture and the characteristics. The earlier evaluation methods for meat grain are time-consuming or subjective. Recent digital microscope developed by high technology may be used to evaluate meat grain. A new prompt and objective evaluation method for meat grain was studied using digital microscope, and applied to the difference between breeds. Longissimus thoracis muscles were sampled from the carcass of 54 crossbred pigs (LWD) and 29 Berkshire pigs. In the histological method, frozen sections were obtained from cubic samples and stained by Hematoxylin-Eosin. In the microscope method, the images were obtained from raw cubic samples and improved in high dynamic range (HDR). The images of first muscle bundle area, the major axis, the minor axis, and the perimeter were measured by the image analysis method. The new evaluation method with the microscope was able to obtain the image of the first muscle bundle promptly and clearly by the automatic focus and the picture processing. The measurements by the microscope method were strongly correlated with those by histological method ( $r=0.80\sim0.91$ ), showing the similar values. It was thought that the muscle bundle area was more appropriate for meat grain than the major axis, the minor axis, and the perimeter. The muscle bundle area, the major axis, the minor axis, and the perimeter from Berkshire pigs were significantly smaller than these from LWD cross breed pigs ( $p<0.01$ ). These results were shown that the digital microscope method for evaluation of meat grain was nondestructive, accurate, and prompt, and the applicability was high, as shown in fine meat grain of Berkshire pig.

## 1. 目 的

食肉において肉のきめは見栄えやテクスチャーといった食味性に重要な影響を与える要因であり、牛・豚の枝肉格付においても肉質の重要な評価項目にもなっている。肉のきめは科学的には筋繊維の第一次筋束の大きさと定義されている<sup>1)</sup>。

肉のきめが良い(細かい)場合、肉表面はピロードのような外観を呈し、見栄えがよいだけでなく、食感ではきめ細かさによる舌触りの良さを感じることができ、さらに細かな物理的構造では肉汁が保たれやすいため、多汁性にもプラスに影響するとされる。

きめは、このような重要な肉質項目であるにも



かかわらず、実際には客観的かつ迅速に評価する手法が無いため、ほとんど実際の検討対象となっていない。枝肉格付においては、人が外観によって評価しているが、その客観性が課題である。

理化学的調査法としては、一般的には組織切片（凍結切片）を作成し、第一次筋束の面積を測定して評価するが、多大な手間と時間を要するため、通常肉質試験においてほとんど計測されていないのが実情である。

もし、肉のきめが迅速かつ客観的に測定できるようになれば、食肉流通での評価手段として役立つだけでなく、肉のきめが細かいといわれる黒豚や但馬牛、あるいは和牛などの良さをPRする手段になり、さらには生産段階へフィードバックすることによって、現在の肉質レベルを知ることができ、品質向上への新たな可能性が生まれてくる。

一方、近年の光学手法の発達は著しく、著者らは肉質評価に対して光学的測定法（光ファイバ法、画像解析法など）を研究し<sup>2-5)</sup>、実用化してきた。最近、著者は、肉質評価の研究のため、マイクロ스코プという新型の研究装置を導入した。この装置の長所は、顕微鏡と違い、細部の観察においても焦点深度が深く、未固定のまま、すなわち生の組織のまま拡大観察できること、また画像処理ソフトが備わり、画像を明瞭化したり、さらには三次元処理ができたり（立体視で、いろいろな視点からの観察が可能）と、きめの評価法として期待できるものである。

そこで、本研究では、マイクロ스코プを利用して、経済性や食味性に関連した肉のきめを客観的かつ迅速に評価する方法を確立することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 供試試料

供試試料は、食肉市場において交雑種豚54頭

（LWD）と黒豚29頭の枝肉から、第5～6胸椎部から胸最長筋を採取した。試料は、用時まで-30℃で凍結保存した。

### 2.2 組織学的方法

豚肉の胸最長筋サンプルを冷蔵庫内で自然解凍し、無作為に筋繊維方向に沿って1cm角の組織切片を2～3個切り出した。筋繊維の垂直切断面と変形に注意しながら、ドライアイス-イソペンタン法で急速凍結した。

その後、クリオスタット（CM1850, LEICA社）を用いて5 μmの凍結切片を作成した。次に、切片をヘマトキシリン・エオジン法で染色した。さらに、筋繊維切断面の写真撮影を行った。

### 2.3 マイクロSCOPE法

組織学的方法で利用した同一試料ならびに別試料を解凍し、ろ紙で表面の水分を軽く除き、表面をマイクロSCOPE（本体：HVX-1000+超小型高性能ズームレンズ：VH-Z20R/VH-Z20W20～200倍、キーエンス社）で観察した（Fig. 1）。

マイクロSCOPEによる観察では、ステージに試料を置き、30倍で、オートフォーカス機能によって自動で焦点を合わせた。さらに、筋束を見やすくするため、ハイダイナミックレンジ（HDR）で原画像の画像改善を行い、最適な画像を得た。

### 2.4 筋束の画像計測

組織学的方法とマイクロSCOPE法により得られた同一部位の両画像をパソコンに取り込んだ。画像はカラープリントし、その後の画像処理が容易となるように第一次筋束の輪郭をマニュアルで囲んだ。その後、画像解析専用ソフト（Image-Pro Plus version4.0 for windows, (株)プラネトン社）を用いて、二値化し、第一次筋束の面積、長径、短径、周囲長を測定した。1画像につき、数十個の筋束を選び、一試料あたり数画像を計測した。



Fig. 1 Digital Microscope (Keyence Co. Ltd)

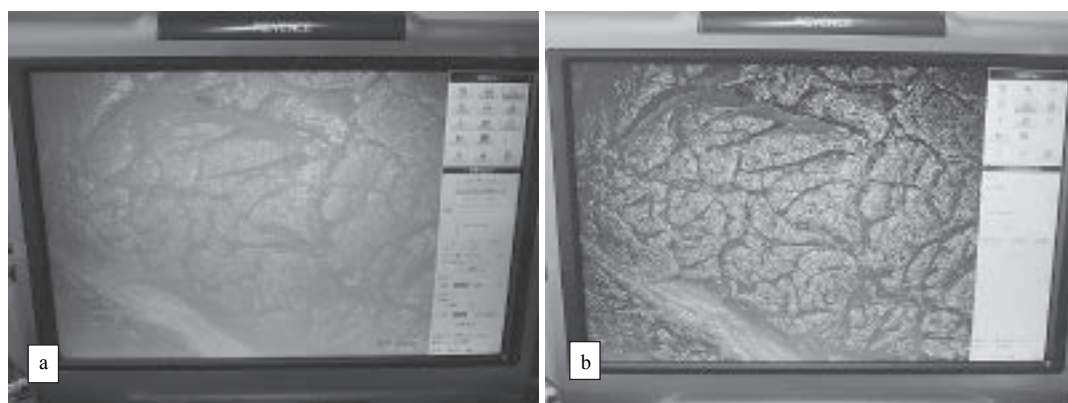


Fig. 2 Direct image (a) and processed image after high dynamic range procedure (b) by Microscope

## 2.5 統計処理

凍結切片による組織学的なきめ（第一次筋束面積）の測定値とマイクロスコープで計測した測定値の関係を単回帰分析から検討した。また、一般の交雑種豚と黒豚の数値を  $t$  検定で比較検討した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 マイクロスコープによる画像

マイクロスコープによる画像をFig. 2～3に示す。原画像でも第一次筋束は明瞭に観察できた

が、ハイダイナミックレンジ（HDR）で画像改善を行うと、より明瞭な画像にすることができた（Fig. 2）。これらの操作は、迅速で、手間もかからず、容易であった。

なお、マイクロスコープ装置は光源を内蔵しており、カメラ部が小さく、本体と光ファイバーでつながれ携帯型の可動式であり、様々な被写体に適用が可能である。さらに、マイクロスコープ装置は、顕微鏡や通常のカメラとは違い、焦点距離が大きく、レンズ部と試料とはある程度の距離を

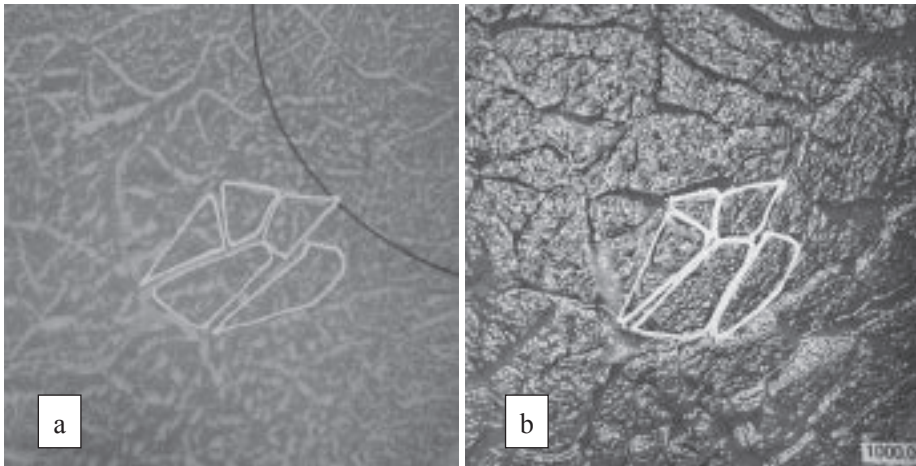


Fig. 3 Images of porcine longissimus muscle by histological method (a) and Microscope method (b)

置いて観察でき、さらに画像処理によって試料形状に凹凸があってもピントの合った画像を得ることができるという特徴を有している。このことは、専用の機器の開発が必要かもしれないが、流通ラインにおける枝肉などの肉のきめの実用的な評価も可能であることを意味している。

### 3.2 マイクロスコープ法と組織学的方法による画像の比較

同一サンプルの同一部位において、組織学的方法で得た画像をFig. 3-aに、マイクロスコープで得た画像をFig. 3-bに示した。白いマーカーで囲んでいる部分が同一の第一次筋束部分を示し、組織学的方法による画像よりも明らかにマイクロスコープによる画像の方がきめの観察が容易であった。組織学的方法による画像は、凍結解凍による筋繊維の収縮がみられ、結合組織も明瞭には観察できなかった。一方、マイクロスコープ法による画像では、凍結解凍操作後も第一次筋束や第二次筋束を明瞭に観察することができた。

次に、組織学的方法とマイクロスコープ法での測定値を比較するため、面積、長径、短径、周囲長における相関プロットをFig. 4に示した。両方法の測定値の相関はいずれにおいても強く（面積

$r = 0.91$ , 周囲長  $r = 0.87$ , 長径  $r = 0.86$ , 短径  $r = 0.80$ ), 個々の測定値もほぼ同じような値となった。なお、多少の違いが出るのは、組織の多少の変形によるところが大きいかもしれない。このことは、面積に比べ、長径や短径における若干の相関係数の低下からも示唆される。なお、従来は顕微鏡下でのマニュアル測定のため、操作の煩雑さから面積ではなく長径や短径が計測されていたが、形状の複雑さから面積の方がよりよいと思われる。画像解析法では迅速に面積を計測できるので、マイクロスコープ法によるきめの評価法としては面積の測定が推薦される。

### 3.3 マイクロスコープ法とその他の方法

国内外でも肉のきめは重視され、その研究が実施されてきた。国内の格付状況などは既に述べたところであるが、海外では、Purslow (2005)<sup>6)</sup>が筋肉内結合組織に関する総説、きめはgrainとして米国においても肉眼的に評価されているとし、その組織学的測定値は品種、月齢、性などによって変化し、肉の食感（テクスチャー）との関連性には様々な知見があるとしている。

きめの評価法の研究では、国内における農水省のサポートで、あるメーカーが、光反射を用いて

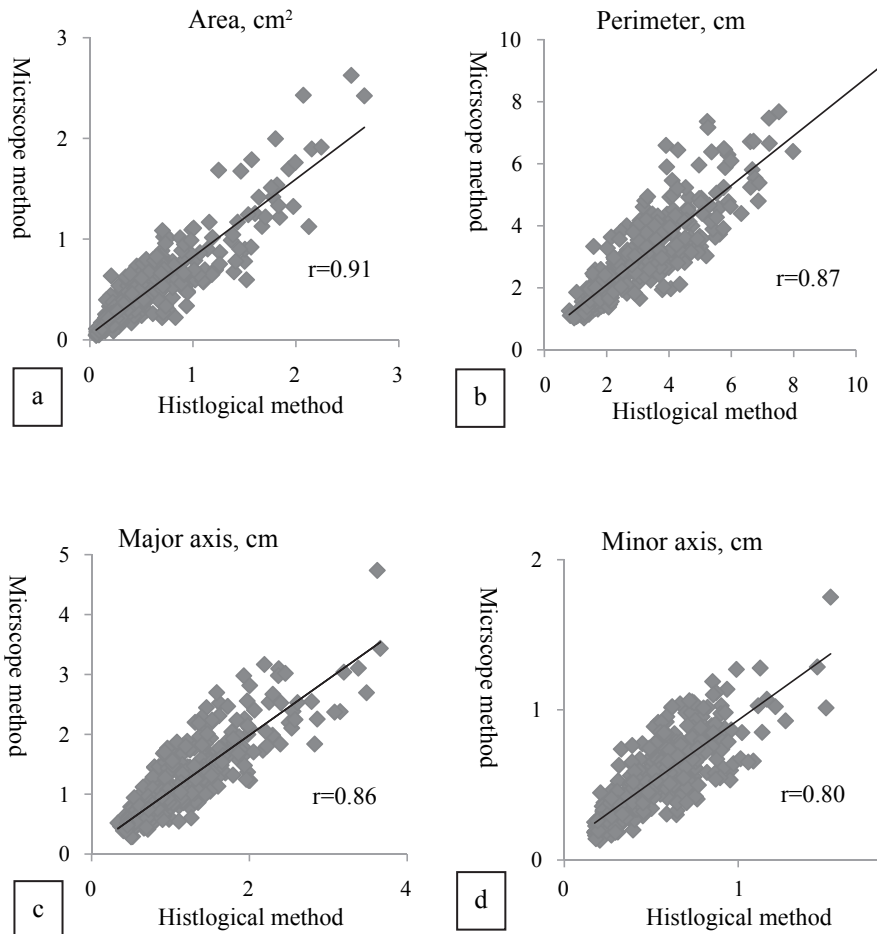


Fig.4 Relationships between histological method and digital microscope method for muscle bundle area (a), perimeter (b), major axis (c) and minor axis (d)

測定法を検討したことがあったが、うまく評価することができなかった<sup>7)</sup>。近年、Faroukら(2005)<sup>8)</sup>は、顕微鏡や高解像度CCDカメラを用いて、Fiber-bundle Alignmentの評価に利用し、牛肉外観の主観的評価のサポートシステムとして応用している。また、TanとShadatadal(2001)<sup>9)</sup>は通常のビデオカメラで撮影した牛生肉のマクロ画像を解析し、きめの評価ではないが、硬い肉のものや柔らかい肉では画像に違いがあることを明らかにしている。

本試験において、新しく開発したデジタル・マイクロSCOPE法による第一次筋束であるきめの

評価法は、従来の組織学的法に比べて優れており、従来法にとって代わる方法であると考えられた。

### 3.4 豚肉におけるきめの品種間比較

上記で開発したマイクロSCOPE法の応用性を検討するために、黒豚とLWD交雑種間で比較した第一次筋束の画像をFig.5に示した。LWD交雑種のきめは、黒豚のきめと比べて、明らかに大きいことがわかる。

次に、LWD交雑種と黒豚間における第一次筋束の面積、長径、短径、周囲長の比較をFig.6に示した。LWD交雑種に比較して黒豚の第一次筋

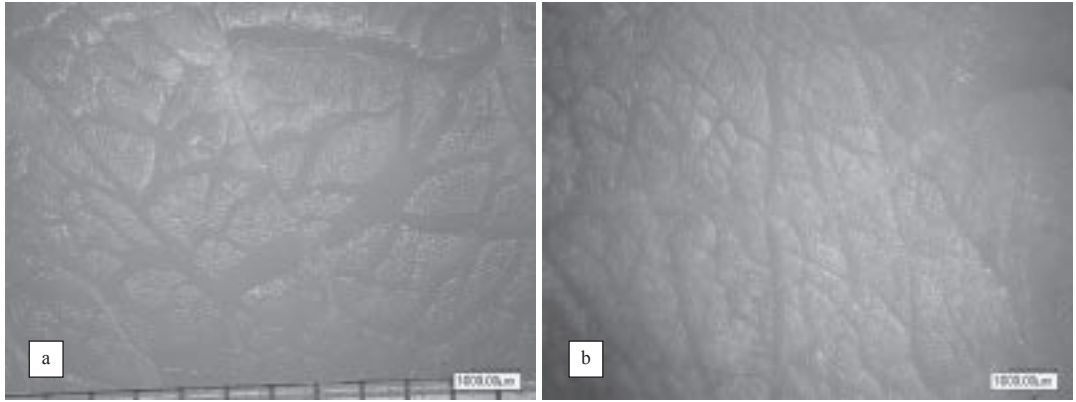


Fig. 5 Images of longissimus muscle from LWD cross breed (a) and Berkshire breed (b)

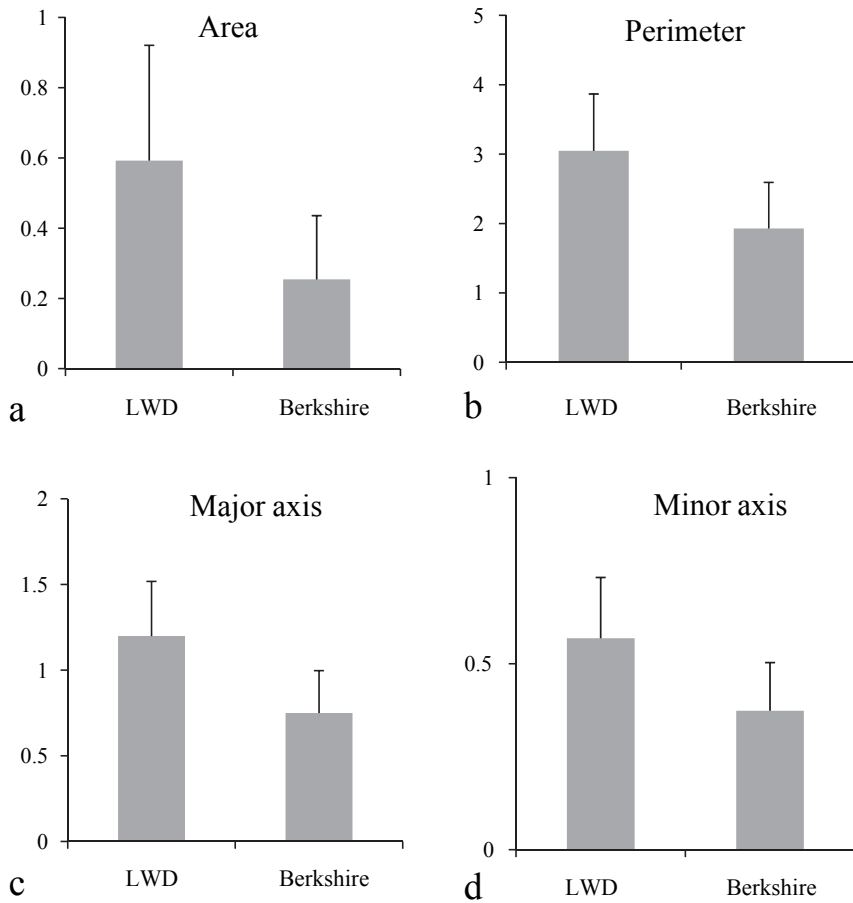


Fig. 6 Breed difference in meat grain by microscope method  
Muscle bundle area (a), perimeter (b), major axis (c) and minor axis (d)

束は、面積、長径、短径、周囲長ともに有意に低い値となった（面積：0.59 vs 0.26、長径：1.20

vs 0.75、短径：0.57 vs 0.37、周囲長：3.05 vs 1.93、 $p < 0.01$ ）。



以上の結果は、肉眼的に黒豚はきめが細かいといわれる従来の知見とも一致している。きめの細かさの理由は、黒豚が中型種であることに起因していると思われる。第一次筋束の筋繊維数は大体決まっており、黒豚は大型種と比べると筋繊維の直径が小さく<sup>10, 11)</sup>、筋繊維が細いと、必然的に第一次筋束も細くなると考えられる。

黒豚は他の大型種と比べ保水力やしまりが良いとされ、肉眼的なきめが細かく、筋繊維は細いが歯ごたえがあることが特徴とされている。本知見はきめが細かいという黒豚の特性だけでなく、保水力やしまり、歯ごたえの良さを説明するものかもしれない。なぜなら、テクスチャーや保水力はその組織学的構造に大きく影響されるからである<sup>12, 13)</sup>。

本法は、今後、他品種や性などの遺伝的条件、飼養管理などの条件の違いによってきめがどのように変化するかの有効な方法となるであろう。また本法は、単にきめの大きさを測定するだけでなく、筋周膜の結合組織量や厚さなどの測定にも応用できると考えられ、幅広く応用される方法になるだろう。

#### 4. 要 約

肉のきめ（第一次筋束）はテクスチャーと関係し、肉の特性を知る上で大切な要因である。従来のきめの評価法には客観性や手間に問題がある。最近、ハイテク技術を採り入れたマイクロスコープという装置が開発され、これが肉のきめに利用できる可能性がある。そこで、マイクロスコープを用い、肉のきめの迅速かつ客観的な新しい評価手法を検討し、さらに、豚の品種によるきめの違いが評価できるかどうかといった応用性を検討した。交雑種豚54頭（LWD）と黒豚（パークシャー種）29頭の枝肉から、胸最長筋を採取した。組織学的方法では、立方体状試料から凍結切

片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色した。マイクロスコープ法では、肉片生試料のまま画像を得、ハイダイナミックレンジ（HDR）で画像改善した。各画像は画像解析法によって第一次筋束の面積、長径、短径、周囲長を計測した。マイクロスコープによる評価法は、生肉の塊のまま、オートフォーカスと画像処理によって迅速かつ明確に第一次筋束の画像を得ることができ、その後の画像解析によってきめを容易に数値化することができた。マイクロスコープ法による測定値は、時間がかかる従来の組織学的方法の測定値との相関が高く（ $r = 0.80 \sim 0.91$ ）、類似した値を示した。また、解析の結果、きめを評価するには長径、短径、周囲長より面積のほうがより適切であると考えられた。黒豚の第一次筋束の面積、長径、短径、周囲長は、LWD交雑種のものよりも有意に小さかった（ $p < 0.01$ ）。以上より、マイクロスコープにおけるきめの評価法は、迅速かつ非破壊で正確であること、さらに黒豚のきめの細かさを実証できる応用性の高さが示された。

#### 文 献

- 1) 日本食肉研究会：食肉用語事典（新改訂版）. 食肉通信社. 2010.
- 2) 入江正和：日本食品工業学会誌 **40**, 747~754, 1993.
- 3) Irie, M.J.: *Anim. Sci.*, **77**, 2680~2683, 1999.
- 4) 入江正和：日本養豚学会誌 **39**, 221~254, 2002.
- 5) Irie, M., Oka, A., Iwaki, F.: *J. Sci. Food Agric.*, **83**, 483~486, 2003.
- 6) Purslow, P.P.: *Meat Sci.*, **70**, 435~447, 2005.
- 7) 東芝エンジニアリング：肉の締め及びきめの客観的評価方法に関する調査報告書, 1991.
- 8) Farouk, M.M., Zhang, S.X., Cummings, T.J.: *Muscle Foods*, **16**, 256~273, 2005.
- 9) Tan, J.L., Shatadal, P.: *Meat Sci.*, **57**, 341~346, 2001.
- 10) 岩元久雄・尾野喜孝・川井田博・高原斉：日本畜産学会報, **60**, 261~272, 1989.
- 11) Iwamoto, H., Kawaida, H., Ono, Y., Takahara, H.: *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **54**, 392~400, 1983.
- 12) 鈴木惇：畜産加工. 朝倉書店, 1989.
- 13) 入江正和：食肉の科学, **34**, 9~15, 1993.



# 最高級豚肉を目指した生産方式の解明

Interpreting the production system for high quality pork

戸澤あきつ・佐藤衆介

(東北大学大学院農学研究科)

Akitsu Tozawa and Shusuke Sato

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

It is thought that the disease control may be difficult of the pigs in the grazing system. The welfare level of pigs reared outside is assessed from the behavior, intestinal condition, and lung involvement. 44 pigs of LW were allocated to 3 groups; the grazing system with fermented TMR (Group 1 ; G-1, n=14), the grazing system with concentrates (Group 2 : G-2, n=15) and the housing system with concentrates (Group 3 ; G-3, n=15). The time budgets of feeding of ration, rooting, and feeding of grasses and soil were longer in pigs in both grazing systems than in the housing system. The pH of feces was higher in the order of G-1, G-2, and G-3 at the all of early, middle, latter stages, and  $6.6 \pm 0.2$ ,  $6.2 \pm 0.3$ , and  $5.6 \pm 0.2$ , respectively, were significantly different mutually ( $P < 0.05$ ). The numbers of all enterobacteria and Clostridium cluster from feces were significantly lower in the grazing systems than the housing system ( $p < 0.05$ ). It is concluded that the welfare level of pigs may be higher in the grazing system than in the housing system.

## 1. 目的

家畜の飼育管理は生産性に影響を与えるだけでなく、家畜自身の健康にも影響を与える。養豚においても、飼育方式が生産性や肉質に及ぼす影響<sup>1, 2, 4)</sup>や行動に及ぼす影響<sup>1, 3, 6)</sup>が、これまでも盛んに研究されてきている。しかし、放牧下での肥育豚の健康に関する研究は多くはなく、しかも損傷、疾病に関するものがほとんどである<sup>5)</sup>。

筆者ら<sup>7)</sup>は、農家における肥育豚の実態調査として、放牧飼育と5つの舎飼方式下での健康性に加え、健康性に影響すると考えられる腸内細菌叢について比較した。損傷、疾病に関する健康性の

結果は、従来の報告と類似のものであった。一方、放牧豚の放牧前・後の腸内細菌叢では、15種の選択培地のうち10種類で腸内細菌が減少し、そのうちの4種類の培地では有意に減少するという新発見が得られた。そこで本研究では、放牧飼育による最高級豚肉生産システムの開発につなげることを目的に、以下の調査を行った。

- (1) 正常行動の発現から、精神的健康性を評価した。
- (2) 腸内環境、特に病原微生物の発現から、健康性阻害の可能性について評価した。
- (3) 出荷時の肺病変の発現から、肥育豚の健康性を評価した。また、その技術を支える放牧

地の条件を明らかにする目的で、放牧地の植物被度の変化も調査した。

## 2. 方 法

### 2.1 供試豚と飼育方法

導入先が全て同じLW種の去勢雄44頭を用いた。それらを未利用飼料資源による発酵TMR飼料を給与した放牧区（以下、Group 1）14頭、配合飼料を給与した放牧区（以下、Group 2）15頭、配合飼料を給与した舎飼区（以下、Group 3）15頭に振り分けた。飼養面積はGroup 1で屋内面積：3.57 m<sup>2</sup>/頭、放牧地面積：82.7 m<sup>2</sup>/頭、Group 2で屋内面積：1.67 m<sup>2</sup>/頭、放牧地面積：49.3 m<sup>2</sup>/頭、Group 3で屋内面積：2.13 m<sup>2</sup>/頭であった。放牧区への導入はおよそ70日齢、放牧開始は約80日齢で行った。放牧期間は2011年7月から10月末であった。

### 2.2 行動調査

肥育豚の体重が約80kgの時期（およそ140日齢）に行動観察を行った。中間的な体重の個体を各Groupから6頭抽出し、9：30～16：30の計7時間、調査した。

放牧飼育のGroup 1, 2に関しては、目視により5分間隔のスキャンサンプリングで飼料の摂食、野草の摂食、土壌の摂食、rootingについて観察し、全観察時間に対するそれぞれの行動時間配分を算出した。土壌の摂食とrootingを合計した“土壌との接触”時間配分も算出した。ブタは嗅覚が優れており、強靱な鼻を利用して土を掘り起こすなど、周辺を探索し、可食物を掘り出すrootingという行動レパートリーを持つ。この行動は、ブタで内的に強く動機づけられている行動<sup>9, 10)</sup>であることから、適切に発現させるべき正常行動の指標として測定した。舎飼方式のGroup 3では、ビデオカメラを給餌器の上部に設置して録画し、後日再生映像において5分間隔のスキャ

ンサンプリングで摂食行動のみを観察した。

### 2.3 腸内環境調査 ①糞便pH

糞便pHは肥育豚の直腸から直接採糞し、測定した。採取した糞便を蒸留水で2倍に希釈攪拌し、pHメーターで直接測定した。採糞は、放牧前、放牧中（放牧後1ヵ月）、放牧後期（放牧後2ヵ月）の3回、全頭について行った。舎飼のGroup 3も同時期に採糞した。

### 2.4 腸内環境調査 ②糞便中の全細菌とClostridium属菌の定量

放牧後期に糞便pHを測定した際に採取した糞便の一部を-80℃で凍結保存し、その後糞便中の全細菌とClostridium属菌（Clostridium cluster I・II）を定量した。凍結保存していた糞便からDNAを抽出し、リアルタイムPCR法により検体1gあたりの標的遺伝子コピー数を算出し、これを全細菌数およびClostridium属菌の菌数とした。

### 2.5 出荷後の肺病変（マイコプラズマ性肺炎：MPS）評価

肥育豚出荷時にと体から肺を取り出し、目視により各個体のマイコプラズマ性肺炎病変の評価を行った。病変程度の判定はR. F. W. Goodwin<sup>8)</sup>の方法に基づき肺病変の表面積割合をスコア化して評価した。スコアが高いほど、肺の病変面積が広がったことを示す。

### 2.6 放牧地の植物被度の変化

放牧地の植物被度を、放牧開始後3週間は3日もしくは4日おきに、その後は2週間おきに測定した。放牧地全体の植物被度を反映できる間隔で1 m × 1 mのコドラートを置いて測定した（Group 1：放牧地面積1,240 m<sup>2</sup>に対して42カ所、Group 2：放牧地面積740 m<sup>2</sup>に対して18カ所）。被度はコドラートの面積（1 m<sup>2</sup>）を100%とし、植物が被覆している面積（%）を測定した。

### 2.7 統計処理

放牧飼育であるGroup 1もしくは2と舎飼であ

Table 1 The percentage of time spent on each behavioral category by pigs in Group 1 ~ 3

Behavioural category	Outdoor						Indoor	
	Group 1			Group 2			Group 3	
	Mean	s.e.	P-value	Mean	s.e.	P-value	Mean	s.e.
Feeding	12.1	1.1	0.09	16.5	3.0	0.3	8.6	1.5
Grazing (grass)	9.9	1.0	—	4.5	1.3	—	—	—
Grazing (soil)	6.6	1.5	—	5.6	0.5	—	—	—
Rooting	7.9	2.6	—	3.8	1.0	—	—	—
Total	36.5	4.2	—	30.4	3.7	—	—	—
Contact to soil	14.5	3.8	—	9.3	1.4	—	—	—

s.e. : standard error of the mean

P-value : comparing with Group 3

contact to soil : Grazing (soil) + Rooting

るGroup 3の間でKruskal-Wallis検定を行った。有意差水準は5%とした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 行動調査

飼料の摂食時間は、発酵TMRを給与していた放牧飼育のGroup 1で観察時間の $12.1 \pm 1.1\%$ 、配合飼料を給与していた放牧飼育のGroup 2では $16.5 \pm 3.0\%$ 、配合飼料を給与していた舎飼のGroup 3では $8.6 \pm 1.5\%$ であった (Table 1)。放牧飼育であったGroup 1および2では飼料の摂食の他に、野草と土壌の摂食がみられた。Group 1における野草の摂食時間配分は $9.9 \pm 1.0\%$ 、土壌の摂食時間配分は $6.6 \pm 1.5\%$ であった。Group 2における野草の摂食時間配分は $4.6 \pm 1.3\%$ 、土壌の摂食時間配分は $5.6 \pm 0.5\%$ であった。放牧飼育であるGroup 1および2のrooting時間配分はそれぞれ $7.9 \pm 2.6\%$ 、 $3.8 \pm 1.0\%$ であった。

自然状態下で飼育されたブタでは、摂食とrootingに日中の活動時間の約50%を費やすとされている<sup>11)</sup>。本研究においても、放牧飼育のGroup 1および2では摂食とrootingをあわせた行動時間配分が $36.5 \pm 4.2\%$ および $30.4 \pm 3.7\%$ であっ

た。観察時間が日中に限られていたため、値が低くなっているが、摂食とrootingという内的に強く動機づけられた行動が自然状態のブタと同じように発現していたということは、正常行動が適正に発現していたと評価できる。

土壌環境中に存在するといわれている*Clostridium*属菌の分析との関連で、放牧飼育のGroupに関しては土壌との接触状況についても調査を行った。土壌の摂食とrootingを合わせた土壌との接触時間配分は、Group 1で $14.5 \pm 3.8\%$ 、Group 2で $9.3 \pm 1.4\%$ であった。両Group共に土壌との接触が盛んに行われていた。

#### 3.2 腸内環境調査 糞便pH

糞便pHは、放牧前および放牧中では、放牧飼育で配合飼料を給与していたGroup 2と舎飼で配合飼料を給与していたGroup 3では同じような値を示したが、Group 2では放牧後期で上昇した ( $6.22 \pm 0.27$ ) (Table 2)。放牧前・中は、肥育豚が肥育前期の時期であったため、肥育前期飼料を給与していたが、放牧後期には肥育後期飼料に変更した。糞便pHは摂取飼料に大きく影響を受けるため<sup>12, 13)</sup>、飼料を変更した影響があったことも糞便pH変化の理由の1つとして考えられる。放

**Table 2** Fecal pH of pigs in each Group during rearing at pasture.  
(各Groupの糞便pHの経時的変化)

		Period					
		prior		middle		latter	
Outdoor	Group 1	7.06 ± 0.12	a	7.07 ± 0.17	a	6.63 ± 0.24	a
	Group 2	5.94 ± 0.32	c	5.86 ± 0.24	c	6.22 ± 0.27	b
Indoor	Group 3	5.75 ± 0.25	c	5.80 ± 0.23	c	5.61 ± 0.24	c

Mean ± S.D.

<sup>a, b, c</sup> Means within a row lacking a common superscript letter differ ( $p < 0.05$ )

**Table 3** Total bacterial and *Clostridium* cluster I, II 16S rDNA copies in pig feces  
(検体 1 g あたりの標的遺伝子のコピー数)

		Total bacterial 16S rDNA (copies/g feces)	<i>Clostridium</i> cluster I, II 16S rDNA (copies/g feces)	Abundance ratio (%)
Outdoor	Group 1	13.6 ± 1.0 × 10 <sup>11</sup> *	5.8 ± 5.2 × 10 <sup>10</sup> *	4.2 ± 3.8 †
	Group 2	16.2 ± 3.6 × 10 <sup>11</sup> *	2.4 ± 2.1 × 10 <sup>10</sup> *	1.8 ± 1.8 *
Indoor	Group 3	3.3 ± 1.0 × 10 <sup>12</sup>	4.1 ± 2.2 × 10 <sup>11</sup>	12.4 ± 6.4

Mean ± S.D.

Abundance ratio : *Clostridium* cluster I, II 16S rDNA/Total bacterial 16S rDNA

\* : Significantly different from Group 3 at  $P < 0.05$  as determined by Kruskal Wallis test

† : Significantly different from Group 3 at  $P < 0.1$  as determined by Kruskal Wallis test

牧飼育で発酵飼料を給与していたGroup 1 では、全期間を通して他の2つのGroupよりも高pHであった。これは上記したように、発酵飼料という摂取飼料による違いによる可能性も考えられる。

糞便pHは腸内環境を反映する。放牧という飼育環境および発酵飼料という飼料の違いが、腸内pHを中性化すると考えられた。

### 3.3 腸内環境調査 糞便中の全細菌と *Clostridium* 属菌の定量

全細菌の糞便 1 g あたりの標的遺伝子コピー数は、放牧飼育を行っていたGroup 1 で  $13.6 \pm 1.0 \times 10^{11}$ 、Group 2 で  $16.2 \pm 3.6 \times 10^{11}$  と舎飼であったGroup 3 の  $3.3 \pm 1.0 \times 10^{12}$  よりも有意に少ない値を示した ( $p < 0.05$ ) (Table 3)。これは放牧飼育を行うことで糞便中の細菌数が減少したことを示している。

*Clostridium* 属菌も同様に、Group 1 および2ではGroup 3 と比較して、糞便 1 g あたりの標的遺伝子コピー数が有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。

全細菌に対する *Clostridium* 属菌の割合はGroup 2 でGroup 3 よりも有意に低い値を示し ( $p < 0.05$ )、Group 1 でも低い傾向を示した ( $p < 0.1$ )。

今回分析を行った *Clostridium* cluster I・II は病原微生物である破傷風菌 (*C. tetani*) やボツリヌス菌 (*C. botulinum*)、ウェルシュ菌 (*C. perfringens*) などが含まれている。このような病原微生物および腸内有害菌を含む *Clostridium* 属菌の存在量が、飼料の相違に関わらず放牧飼育を行ったGroup 1, 2 で減少したということは、放牧という飼育環境が有害腸内細菌相の減少に寄与する可能性を示唆する。

### 3.4 出荷後の肺病変 (マイコプラズマ性肺炎 : MPS) 評価

マイコプラズマ性肺炎の病変をスコア評価の結果をTable 4 に示した。放牧飼育のGroup 1, 2 は舎飼のGroup 3 よりも低い値を示していたが、有意な差ではなかった。放牧飼育を行うと空気環境

Table 4 MPS score of each Group measured after slaughter  
(と畜後のMPSスコア)

	Outdoor		Indoor
	Group 1	Group 2	Group 3
MPS score	8.64 ± 9.73	14.81 ± 19.14	16.36 ± 24.11

No significant differences among groups

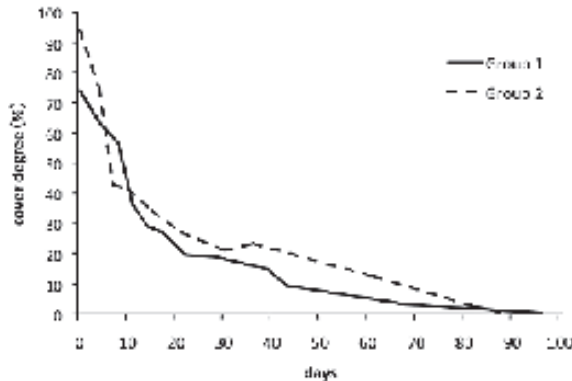


Fig. 1 Temporal change about coverage of grass at pasture.  
(肥育豚放牧後の放牧地の植物被度の経時的変化)

が改善するといわれている。今回の調査ではすべてのGroupで同じように肺病変が存在しており、違いがみられなかったことから、導入先でのマイコプラズマ性肺炎の感染率が高かった可能性が考えられた。

### 3.5 放牧地の植物被度の変化

Group 1の放牧地における植物被度は時間を追うごとに自然に減少していったのに対し、Group 2の放牧地における植物被度は初めの10日間で急激に減少し、その後は自然に減少した(Figure 1)。ブタは雑食動物であるため、自然環境下では野草および土壌の摂食を行う<sup>9)</sup>。植物に覆われている土地では積極的に植物を摂食する。Group 2の1頭あたりの放牧地面積はGroup 1と比較して6割程度であったため、1頭あたりに割り当てられる野草量が少なく、放牧初期の植物被度減少が著しかったと考えられる。この程度の面積においても放牧の効果がみられたことは、植物

摂食以外の効果、すなわち土壌摂取の効果等も示唆される。

放牧により糞便pHが中性化したことから、腸内環境が変化したことが示唆され、それは糞便中の腸内細菌の全細菌と*Clostridium*属菌の低下という形で明らかとなった。*Clostridium*属菌の主な生息場所は土壌および哺乳動物の消化管であるが、行動観察では放牧豚が土壌との接触を盛んに行っているにもかかわらず、腸内有害菌を含んでいる*Clostridium*属菌が減少した。本放牧方式では、餌と水は充足し、過酷な温熱環境から庇陰され、正常行動は適正に発現した。肺病変やヒトからの取扱いには差はなかったことから、放牧方式は舎飼方式に比較し、福祉性が高い飼育方式であることが確認された<sup>14)</sup>。

## 4. 要 約

放牧飼育は肥育豚にとって福祉性が高い飼育方



式だとされているが、健康管理が難しいといわれている。本研究では行動、腸内環境並びに出荷時の肺病変から、放牧飼育の福祉性を評価した。LW種去勢雄44頭を発酵TMR給与の放牧区 (Group 1 : G-1, n = 14), 配合飼料給与の放牧区 (Group 2 : G-2, n = 15), 配合飼料給与の舎飼区 (Group 3 : G-3, n = 15) にわけ、比較した。両放牧区で、舎飼区よりも飼料摂食並びに rooting や野草・土壌の摂食の時間配分が長かった。放牧前・中・後期の3回にわたって測定した糞便pHは、全期間を通じG-1, G-2, G-3の順に低く、放牧後期ではそれぞれ $6.6 \pm 0.2$ ,  $6.2 \pm 0.3$ ,  $5.6 \pm 0.2$ で、互いの差は有意であった ( $P < 0.05$ )。全細菌並びに*Clostridium*属菌の標的遺伝子コピー数は、舎飼に比べて放牧で有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。出荷後の肺病変調査には差が認められなかった。以上より、肥育豚の放牧方式は、舎飼方式に比べて、福祉性が高い飼育方式であることが確認された。

#### 文 献

- 1) P. Barton Gade : Effect of rearing system and mixing at loading on transport and lairage behaviour and meat quality : comparison of outdoor and conventionally raised pigs. *Animal*, **2**, 902~911, 2008.
- 2) J. Gentry, J. McGlone, M. Miller, and J. Blanton: Environmental effects on pig performance, meat quality, and muscle characteristics. *Journal of Animal Science*, **82**, 209~217, 2004.
- 3) J. H. Guy, P. Rowlinson, J.P. Chadwick, and A. Ellis : Behaviour of two genotypes of growing-finishing pig in three different housing systems. *Applied Animal Behaviour Science*, **75**, 193~206, 2002.
- 4) J. H. Guy, P. Rowlinson, J. P. Chadwick, and A. Ellis : Growth performance and carcass characteristics of two genotypes of growing-finishing pig in three different housing systems. *Animal Science*, **74**, 493~502, 2002.
- 5) J. H. Guy, P. Rowlinson, J.P. Chadwick, and A. Ellis: Health conditions of two genotypes of growing-finishing pig in three different housing systems: implications for welfare. *Livestock Production Science*, **75**, 233~243, 2002.
- 6) J. Dailey and J. McGlone : Pregnant gilt behavior in outdoor and indoor intensive pork production systems. *Applied Animal Behaviour Science*, **52**, 45~52, 1997.
- 7) 戸澤あきつ, 稲元民夫, 佐藤衆介 : 様々な飼育方式と比較した場合の放牧肥育豚の健康性の特徴. *Animal Behaviour and Management*, **47**, 63, 2011.
- 8) R. F. Goodwin and P. Whittlestone : Enzootic pneumonia of pigs: immunization attempts inoculating *Mycoplasma suis* pneumoniae antigen by various routes and with different adjuvants. *British Veterinary Journal*, **129**, 456~64, 1973.
- 9) E. S. E. Hafez, L. J. Sumption and J. S. Jakway : The Behaviour of Swine, in: The Behaviour of Domestic Animals (Ed. by E. S. E. Hafez), pp. 334~369, Bailliere Tindall, London, 1963.
- 10) M. Studnitz, M. Jensen, and L. Pedersen: Why do pigs root and in what will they root? A review on the exploratory behaviour of pigs in relation to environmental enrichment. *Applied Animal Behaviour Science*, **107**, 183~197, 2007.
- 11) A. Stolba and D. Wood-Gush : The behaviour of pigs in a semi-natural environment. *Animal Production*, **48**, 419~425, 1989.
- 12) R. van Winsen, B. Urlings, L. Lipman, J. Snijders, D. Keuzenkamp, J. Verheijden, and F. van Knapen: Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 3071~3076, 2001.
- 13) N. Canibe and B. Jensen: Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs : Effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *Journal of Animal Science*, **81**, 2019~2031, 2003.
- 14) L. Cox and J. Cooper: Observations on the pre- and post-weaning behaviour of piglets reared in commercial indoor and outdoor environments. *Animal Science*, **72**, 75~86, 2001.



## 平成23年度助成研究調査一覧

**本年度の対象とする研究または調査：**

食肉および食肉製品の食品的価値（機能的、栄養性、好味性、安全性など）及び加工技術の向上に関する研究又は調査

単位：千円

整理番号	研究調査のテーマ	継続年度	代表研究者		助成金額
			代表研究者名	所属機関	
研29	亜鉛欠乏予防効果を持つ食肉成分の探索とその効果についての食品科学研究		神戸 大朋	京都大学大学院生命科学研究科	800
研30	食肉由来機能的成分の畜種別差異の比較検討についての研究（Ⅲ）	H.21～	六車三治男	宮崎大学農学部	1,000
研21	畜産副生物由来（ヘム鉄）摂取によるスポーツ栄養への効果についての研究 —栄養摂取状況の観察による貧血改善の試み—	H.21～	松本 恵	日本大学文理学部体育学科	1,200
研 6	低温乳酸発酵による食肉タンパク質の組織構造と加熱ゲル物性に関する研究	H.22～	芳賀 聖一	名城大学農学部	800
研19	糖修飾LEAタンパク質の利用を基盤とする食肉の新しい凍害防御技術の確立		本城 賢一	九州大学大学院農学研究科	1,000
研22	粉末茶による食肉および食肉製品中の糞便系大腸菌群の制御についての研究		岡崎 貴世	四国大学生生活学部	1,000
研12	新規発光デバイスを用いた食肉の質を落とさない殺菌法の開発		高橋 章	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	1,200
研23	食肉製品の調理中に起こるメイラード反応の消長と安全性の検討		大塚 譲	お茶の水女子大学生生活環境教育研究センター	800
研15	試食パネルによる黒毛和種牛肉の脂肪酸組成、香气成分、呈味成分と食味性との関連に関する研究	H.22～	鈴木 啓一	東北大学大学院農学研究科	1,000
研28	牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸についての研究		山之上 稔	神戸大学大学院農学研究科	1,000
研10	食肉のきめに対する迅速かつ客観的な評価手法の研究		入江 正和	宮崎大学農学部	1,000
研16	最高級豚肉を目指した生産方式の解明		佐藤 衆介	東北大学大学院農学研究科	1,200
合		計	12件		12,000

## 食肉に関する助成研究調査成果報告書

〔Final Reports for Research Grants for Meat and Meat Products〕

平成23年度 (Vol. 30)

---

2012年11月 発行

編集・発行——公益財団法人伊藤記念財団

THE ITO FOUNDATION

東京都目黒区三田1丁目6番21号 アルト伊藤ビル

〒153-8587

Alt Ito Building, 1-6-21 Mita, Meguro-ku, TOKYO

153-8587 JAPAN

TEL : 03 (5720) 8611

FAX : 03 (5720) 8612

印刷・製本——恒心社出版株式会社

---

<非売品・無断禁転載>