

塩漬食肉製品の色調安定性に係る諸因子の研究

A study on the factors affecting color stability of  
cured meat products

2017年3月

麻布大学大学院 獣医学研究科  
動物応用科学専攻 博士後期課程  
食品科学

DA1401 和賀 正洋

## 要 約

塩漬食肉製品の色調安定性は市場価値に大きく影響する性質であり、大筋については理解されつつある一方で、ミオグロビン (Mb) 自体の配位結合安定性ならびにその影響因子、発色剤の挙動について不明瞭な点が残されていた。そこで本研究では、包装された塩漬食肉製品における一酸化窒素 (NO) の蓄積に関わる諸反応の経路ならびに Mb の配位結合安定性に関わる諸因子について明らかにすることで塩漬食肉製品の色調安定化に資することを目的とした。

第一章では、ニトロシルミオグロビン (NOMb) の安定性において、Mb の配位子である NO の挙動が極めて重要と考え、この蓄積に関わる諸反応について検討した。塩漬食肉製品における NO の蓄積挙動を推定する上で、亜硝酸態窒素 (NO<sub>2</sub>) ならびに硝酸態窒素 (NO<sub>3</sub>) の挙動を観察する手段が必要だった。そこでまず、その評価方法として NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub> および還元型アスコルビン酸 (AsA) の吸光特性を用いた自己吸光法を確立した。自己吸光法では従来法 (Griess 法) や DAN 法とは異なり、定量阻害などの問題を生じず、NO<sub>2</sub> は亜硝酸 (HNO<sub>2</sub>) と亜硝酸根 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) の等吸収率点である 324 nm、NO<sub>3</sub> はピークの 302 nm、AsA は 266 nm の吸光度でそれぞれ定量可能であった。また、本方法では試料溶液に対し試薬等を加えることなく吸光度を測定することから、反応中の NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub> および AsA の挙動をリアルタイムで観察可能で、NO 生成モデル試験の実施に好適な手法といえた。次に、市販品の食肉製品ヘッドスペース中に NO が蓄積していることを明らかにした上で、酸素が NO の蓄積に大きく影響することを示した。NO<sub>2</sub> 還元分解モデル反応溶液において、比較的低い反応速度では反応開始直後から酸素が減少するのに対し NO<sub>2</sub> の減少が起こるまでにタイムラグがあること、さらに、同モデル反応溶液ヘッドスペースの圧力挙動においても圧力増加開始までは液中の NO<sub>2</sub> 減少開始時間よりもさらに時間を要したことから、NO が液体中および気体中の酸素と反応することが示唆された。これらのことは、NO<sub>2</sub> が製造過程で食肉内部に侵入した酸素を除去し、さらに保存中においては包装内部に侵入する酸素を除去する役割があると考えられた。当初、NOMb は Mb に NO が配位結合した誘導体であることから、リガンドである NO 濃度の増大は Mb の配位子としての安定性にも寄与するものであって、その競合分子には酸素も含まれるものと推定していたものの、酸素との反応性から鑑みて NO の実際的な競合分子は酸素ではなく OH<sup>-</sup> や H<sub>2</sub>O で

あろうと推察される。ただし酸素は、NO を消費することから、食肉製品の色調安定化を考えるうえで忌避すべき分子種であることに変わりはないと考えられた。

NO は還元基の有無によって異なる経路で生成されることから、還元分解経路と自己分解経路について、それぞれ反応収支と律速因子について検証した。還元基が存在する場合の NO<sub>2</sub> の還元分解反応経路は、従来の報告通りの反応収支だったが、NO<sub>2</sub> の分解反応は HNO<sub>2</sub> を反応基質とした 2 次反応だった。反応速度が AsA 濃度依存性的とする従来の仮説とは異なる結果であり、今回用いた定量方法が AsA に阻害されない自己吸光法を用いたこと、反応中の濃度をリアルタイムで評価したことによって得られた成果であると考えられた。次に、NO<sub>2</sub> の自己分解反応は全酸中の HNO<sub>3</sub> の構成比に影響を受けることから、可逆的な反応であることを確認した。今回の結果は加熱塩漬食肉製品において硝酸塩が自己分解を穏やかにする可能性を示唆するものであった。一方で、還元分解進行時にはその影響は見られなかった。これは自己分解反応の速度は還元分解反応の速度と比較して低いためと考えられた。食肉にも SH 基などの還元基が存在することから、加熱塩漬食肉製品において硝酸塩が化学平衡によって NO<sub>2</sub> の分解を抑制するのは非常に限定的であろうと推察された。

第一章の検討によって、包装された塩漬食肉製品の系内において窒素酸化物は NO の生成や NO<sub>2</sub> への酸化を繰り返す循環が起こっており、時間の経過に伴い pH の増加によって還元分解反応速度の低下が、引き続いては還元基の減少・枯渇によって自己分解反応に移行すると推察された。

第二章では、Mb の配位結合の安定性は結合するリガンドの濃度だけでなく、外的要件や Mb 自体の配位結合力によって影響を受けると考えられたことから、塩漬食肉製品の色調本体である NOMb における NO-Mb 結合安定性に及ぼす外的要因の影響を Mb の配位結合安定性という観点から評価することを目的とした。Mb 誘導体の安定性に対する外的要因を評価するために、酸化と関連せず単純に脱着し、かつ交換率を評価可能であることから、CO をモデル分子として用い、酸素、pH、温度および光がそれぞれ配位結合安定性を損なう因子であることを確認した。酸素および pH は競合分子濃度が、温度上昇に対応した安定性の低下は分子運動が、光はエネルギーの吸収が関与しているものと推察した。光感受性は NOMb に特徴的な性質としてよく知られているものの、カルボキシミオグロビン (COMb) やオキシミオグロビン (OxyMb) でも同様の性質が見られたことから、退色の特

異的に誘導する波長があると推察し、**NOMb** を用いて各波長に対する感光性を評価した。この結果、吸収を持つ波長の光の照射によって **NOMb** の安定性が特異的に低下することが明らかになった。食肉製品の製造過程を鑑みた時、**Mb** 自体の配位結合力は加熱によって変化すると推察されたことから、加熱に伴う **Mb** の配位結合力の変化についても検討した。過去の研究で、加熱に伴う **Mb** の配位座の構造変化が食肉の加熱後の色調安定性低下の要因として推定されていたことから、本研究では食肉中の **Mb** と単離した **Mb** を比較検討することとした。そこでまず、より簡易に **Mb** を分離精製する方法として **HIC** クロマトグラフィーを用いた方法について、また、食肉中の **Mb**、ヘモグロビン (**Hb**) およびシトクロム **c** (**Cyt c**) を分光光学的に分離定量する方法についてそれぞれ確立した。次に、これらの方法を用いて **Mb** の配位結合安定性に及ぼす加熱の影響を、単離 **Mb** と食肉中の **Mb** でそれぞれ確認した。加熱に対する **Mb** の挙動は食肉中と単独の状態では異なり、**Mb** 単独では食肉中にあるよりも加熱安定性が高いことが示された。この原因は、食肉中で **Mb** が水溶性を失う温度と **Mb** 単独で表面のトリプトファンを指標とした値に変化が認められた温度が一致することから、**Mb** 表面の構造変化が関与していることが示唆された。**CO** をモデル分子として加熱 **Mb** の配位結合安定性を評価したとき、加熱によって配位結合安定性が低下することはなかった。

第二章では、**Mb** とリガンドとの配位結合安定性に関与する因子として、競合分子の存在と温度、光の影響を示した。特に **Mb** 誘導体の光感受性については光エネルギーの受容が関与しており、吸収波長の照射で明らかにその安定性が低下することを示した。また、これまで加熱に伴う **Mb** 誘導体の安定性の低下は配位座付近の構造変化が原因とされてきたものの、今回の研究では **Mb** それ自体の熱安定性は高く、共沈殿を起こすタンパク質や、**Mb** 還元酵素など他の因子が影響していることが示唆された。

本研究では塩漬食肉製品の色調安定性に係る諸因子として、**NO<sub>2</sub>** の分解ならびに **NO** の蓄積挙動、**Mb** に結合する配位子の安定性に対する **pH**、温度、競合分子ならびに光の影響、**70 °C** の加熱によって **Mb** の配位結合力は損なわれないことを明らかにし、塩漬食肉製品の色調安定化に対する新しいアプローチの可能性が示された。これらの知見の市場製品に対する技術応用については今後の研究が必要といえる。なお、本研究の遂行にあたり確立した、自己吸光法による発色剤の反応をリアルタイムに分析する方法、**COMb** の定量方法、**HIC** カラムを用いた **Mb**

のハイスループットな単離精製方法、ならびに食肉中ヘム色素の簡易分離定量方法は、今後食肉製品の色調安定性を研究していく上で重要な手段となりうると期待される。

## Abstract

The color stability has a major impact on the market value of the cooked cured meat products. While the mechanisms of color development and the color preservation of meat have been understood basically, it have not been clear about the factor affecting coordination bond stability of myoglobin (Mb) or the accumulation behavior of nitric monoxide (NO) in meat. The purpose of this study is to uncover the reactions related to NO-accumulation and the factor affecting coordination bond stability of Mb.

The behavior of NO was thought to be important for the color stability of cured meat products because it is the ligand forming nitrosyl-myoglobin (NOMb) which is a responsible pigment for the cured meat color. Therefore, the reactions related to NO accumulation was investigated in chapter 1. To estimate the reactions, it was essential to establish the method for observation of nitrite nitrogen ( $\text{NO}_2$ ) and nitrate nitrogen ( $\text{NO}_3$ ). At first, the observation method using the self-absorptions for  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$  and reduced ascorbic acid (AsA) was improved. In contrast to the Griess reaction method or the fluorescent method using 2,3- diaminonaphthalene, determination inhibition by AsA did not occur in the method using the self-absorptions. The concentration of  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$  and AsA was determined using an absorption at 324, 302 and 266 nm, respectively. In this method, the concentration of  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$  and AsA could be observed in real time *in vitro* model system because the observation conducted without addition of any reagents.

NO accumulation in the head space of commercial cooked cured meat products was showed, and the  $\text{O}_2$  dependence of NO accumulation was demonstrated. In the model solution of  $\text{NO}_2$  reductive degradation reaction, there was some time lag until  $\text{NO}_2$  breakdown occurs while  $\text{O}_2$  decrement was observed immediately. The time until increasing the pressure in headspace of the model solution was longer than the time that elapses before  $\text{NO}_2$  decrement occurs in the model solution. Therefore, NO could be accumulate in the absence of  $\text{O}_2$  in the liquid/gas phase.

These results suggested that the NO serves as a scavenger of  $\text{O}_2$  which trapped during processing or penetrate into packages during storage. It was expected that NO concentration should promote NOMb stability to competitive molecules as with the other Mb derivatives. Based on the reactions of NO and  $\text{O}_2$ , the actual competitive molecules

could not be  $O_2$ , but  $OH^-$  or  $H_2O$ , and these molecules have a far lower affinity to Mb than that of NO. As ever,  $O_2$  thought to be undesirable molecules since  $O_2$  consumptions NO or react with NO in Mb to form Mb-ONOO.

NO is formed via 2 different pathways depending on the presence of reductants. The reaction balance and the rate-limiting factor of  $NO_2$  auto-decomposition reaction and  $NO_2$  reductive decomposition reaction were investigated respectively. The reaction balance of  $NO_2$  reductive decomposition pathway was agreed with known findings. However, the reaction pathway was second-order reaction, and the reactive substrate was nitrous acid ( $HNO_2$ ). Contrary to an earlier theory, the results suggested that  $NO_2$  decomposition reaction rate was independent from the concentration of AsA. The observation was achieved by the method free from AsA-inhibition, and real time observability.

The reaction of  $NO_2$  auto-decomposition was affected by  $HNO_3$  composition rate to total acid, and this, the reaction should be reversible. This result suggested that the added nitrate could be inhibit the  $NO_2$  decrement in cooked cured meat. However, the effect of nitrate was not observed in presence of AsA. It thought to be due to the reaction rate which is higher in reductive pathway than that of auto-decomposition pathway. Since a meat has reducing group such as  $-SH$  group, it should be expect only a limited effect of nitrate as a  $NO_2$  decomposition inhibitor in cooked cured meat products.

These results of chapter 1 suggests that  $NO_x$  are circulating in a cooked cured meat package due to the  $O_2$ . Additionally, the  $NO_2$  reductive decomposition reaction would keep the rate until the reductant deplete unless a pH changing. However, the pH in unbuffered solution was increased as the  $NO_2$  decomposition reaction proceeded. Thus the reaction rate would decrease with time in meat products despite the presence of reductant. In the next phase, following reductant depletion,  $NO_2$  decomposition pathway would change to auto-decomposition pathway.

The stability of the ligand coordinated with Mb could not be affected only by the concentration of ligand but also by the external factor or the Mb itself. Therefore, the effects of external factor on the stability of coordinated ligands and the thermal denaturation of Mb with the object of stability of coordination bond ability were investigated in chapter 2. To evaluate the effects of external factor on the stability of Mb derivatives, CO was used as model ligand because of the property which have no involvement in oxidation reactions,

and which could be evaluate the binding rate. O<sub>2</sub>, pH, temperature and light were investigated as the external factor. The presence of O<sub>2</sub> and pH decrement induced carbonmonoxy-myoglobin (COMb) decomposition which would be by the increment in concentration of competitive molecules. CO dissociation rate was increased with temperature rising and exposure of light which would be due to the molecule excitation. While light sensibility have been well known as the characteristics of NOMb, the character was also observed in COMb or OxyMb. These results suggests the presence of the wavelength of light which decompose Mb derivatives specifically. Therefore, the stability of NOMb with the each wavelength of light was investigated. It was revealed that NOMb become unstable with the light which absorbed by NOMb.

It was thought that the Mb coordination bond ability could be affected by thermal denaturation. Therefore, the thermal stability of Mb in terms of the coordination ability was investigated. The decrement of stability in ligand coordination stability of Mb have been estimated by the denaturation of the coordination position. Thus, in this study, the thermal properties of purified Mb and Mb in meat were compared.

At first, the rapid purification method for Mb and the method for simultaneously determining Mb, hemoglobin (Hb) and Cytochrome c (Cyt c) in meat were improved. Next, the thermal effects on the purified Mb and the Mb in meat was evaluated with the improved methods. The thermal kinetics of Mb was different between the purified Mb and the Mb in meat. The purified Mb was more stable than the Mb in meat. The reason of this trait would be due to the thermal denaturation of surface of Mb since the temperature that Mb lost the water solubility and the temperature that the thermal change was occur in surface of Mb which evaluated with tryptophan as an indicator was same.

The coordination bond stability of Mb with CO as a model did not decrease with following the heat treatment. This result suggested that thermal decrement in the stability of Mb derivatives was occurred not by thermal denaturation of Mb itself but by co-denaturation of Mb and the other proteins such as coprecipitation.

The presence of competitive molecules, temperature and light exposure were demonstrated as the external factor which effect on the stability in ligand coordination stability of Mb in chapter 2. Especially, the light sensibility of Mb derivatives were related with the absorptions. Contrary to an earlier theory, the results suggested that the decrement



in the stability of Mb derivatives was occurred not by thermal denaturation of Mb itself. The proteins which coprecipitation with Mb and/or the thermal deactivation of Mb reductase was/were thought to be related.

In conclusion, the kinetics of NO<sub>2</sub> decomposition and NO accumulation, the effects of pH, temperature and presence of competitive molecules on the stability of Mb derivatives, and thermal stability of coordination ability in Mb were investigated as the factors affecting color stability of cured meat products in this study. While these results could be provide a novel approach for stabilizing the color of meat or meat products, further research must be necessary to apply these perceptions to practical situations.

Besides, following methods improved in this study would be valuable tool for some time to come to study the color stability of meat or meat products: The determination method for NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> and AsA using their self-absorptions; the determination methods for COMb; high throughput method for Mb purification using HIC; method for simultaneously determining Mb, Hb and Cyt c in meat.

## 目 次

緒 論 .....	1
1. 色調研究の重要性 .....	1
1.1. 色調が食欲に及ぼす影響 .....	1
1.2. 市場において問題となる食肉ならびに食肉製品の変色 .....	1
1.3. 市場における課題 .....	4
2. 食肉中の色素 .....	4
2.1. 食肉中に含まれるヘム色素 .....	4
2.2. ヘム色素の基本構造と種間差異 .....	7
2.3. 各種の誘導体とその光学的性質 .....	10
3. 発色剤と発色機構 .....	13
3.1. 発色剤からみた塩漬食肉製品の歴史 .....	13
3.2. 発色剤の功罪 .....	17
3.3. 発色に至るまでの発色剤の食肉中での挙動 .....	22
4. 発色色素の安定性に影響する要因 .....	28
5. 本研究の目的 .....	29
第一章 NO の生成速度の制御に関する基礎的研究 .....	31
序 論 .....	31
第一節 発色剤挙動モデル試験の評価系確立 .....	32
材料と方法 .....	32
結果と考察 .....	33
小 括 .....	39
第二節 塩漬食肉製品における NO の蓄積 .....	40
材料と方法 .....	40
結果と考察 .....	41
小 括 .....	45
第三節 NO <sub>2</sub> の還元分解反応を律速する因子について .....	47
材料と方法 .....	47
結果と考察 .....	48
小 括 .....	53

第四節 NO <sub>2</sub> の自己分解反応を律速する因子について .....	54
材料と方法 .....	54
結果と考察 .....	55
小 括 .....	58
第二章 Mb リガンド結合安定性に影響する各種因子に関する研究 .....	59
序 論 .....	59
第一節 リガンド結合安定性に係る外的要因について .....	61
材料と方法 .....	61
結果と考察 .....	63
小 括 .....	67
第二節 ニトロシルミオグロビンの光学的安定性について .....	69
材料と方法 .....	69
結果と考察 .....	70
小 括 .....	76
第三節 ミオグロビンの熱安定性について .....	77
材料と方法 .....	77
結果と考察 .....	80
小 括 .....	101
謝 辞 .....	103
引用文献 .....	105

## 緒 論

### 1. 色調研究の重要性

#### 1.1. 色調が食欲に及ぼす影響

2013年に日本料理（和食）がユネスコの無形文化遺産に登録された背景の一つは日本料理の美しさであり、一般的に日本人の食に対する美意識は高いとされている。以下に引用する通り、谷崎潤一郎は著書「陰翳礼讃」において日本人がいかに食品の色調あるいは質感に情愛をもって親しんでいるか紹介している—陶器では中にある汁の身や色合いが皆見えてしまう。漆器の椀のいいことは、まずその蓋を取って、口に持っていくまでの間、暗い奥深い底のように、容器の色とほとんど変わらない液体が音もなく淀んでいるのを眺めた瞬間の気持ちである—日本の料理は食うものではなくて見るものだといわれる—(谷崎 1939)。このように、食品の色、形、大きさ、盛り付けなどの視覚から入る情報は、美味しさを確信し満足感を生み出すために重要な役割を担っており、視覚で判断する色、光沢、形などは味や香りと密接に関わり相互に影響を与えている (加藤と大竹 2012, 増田と木村 2011, 大谷 1999)。食品から得られる視覚情報の中でも特に、色調は食品の印象を左右することが知られており、食品そのものの色と食欲との関係についての報告 (奥田ら 2002, 森重ら 1981, 村上 2012, 中川ら 2013) や、器やテーブルウェア、インテリアを含めた色調と食欲との関係についての報告 (坂田 1979, 川嶋と数野 2009, 長橋 2010, 富田ら 2009) がある。さらに視覚が味覚に与える典型的な例として、Morrot ら (2001) は、ワインを飲みなれた醸造学科の学生であっても赤く着色した白ワインを赤ワインと誤認してしまうことを示している。

食品の外観、パッケージ、価格といった特性は商品への期待や認識、食習慣に強く影響することが知られており (Plassmann ら 2008)、テーブルに並ぶ料理だけではなく、購買シーンにおいても色調は重要な役割を果たす。精肉の色調が消費者の購買選択に与える影響について調べた実験では、赤色度の高い商品で購買意欲が高まることが分かっている (Greibitus ら 2010, Greibitus ら 2013)。消費者は精肉の鮮度を色調で判断しており、色調が鮮やかさを失い、暗くなると商品価値は著しく低下し廃棄の原因となる (Greene ら 1971)。

#### 1.2. 市場において問題となる食肉ならびに食肉製品の変色

視覚情報、特に色調は味覚の一つの構成要素であり、提示された食品の色調が

期待される色調と異なる場合にその食品の商品価値は著しく低下する。牛肉表面の色調は一般的に図 1 に示すように徐々に赤色を減じていく。これは精肉の赤色素が酸化して褐色の色素を生じるために起こる。この酸化速度を減じるためのパッケージや処理は広く研究され、実際に応用されている国もある。これらの技術や日本での対応については 1.3 項に詳述する。FAO (食料農業機関) の調べによれば、世界中で生産された食料の約 1/3 は廃棄されており、農林水産省によれば、日本の食品ロス年間発生量は 1,916 万トンで、うち食品卸売業が 22 万トン、食品小売業が 122 万トンとされている。このような食品ロスのうち、色調の劣化に起因するものはアメリカ市場でおよそ 10 億ドルの損失と試算されている (Suman ら 2014b)。したがって、食肉または食肉製品の色調を安定化させることは、色調を理由に廃棄される食品の量を減らすことにつながるといえる。

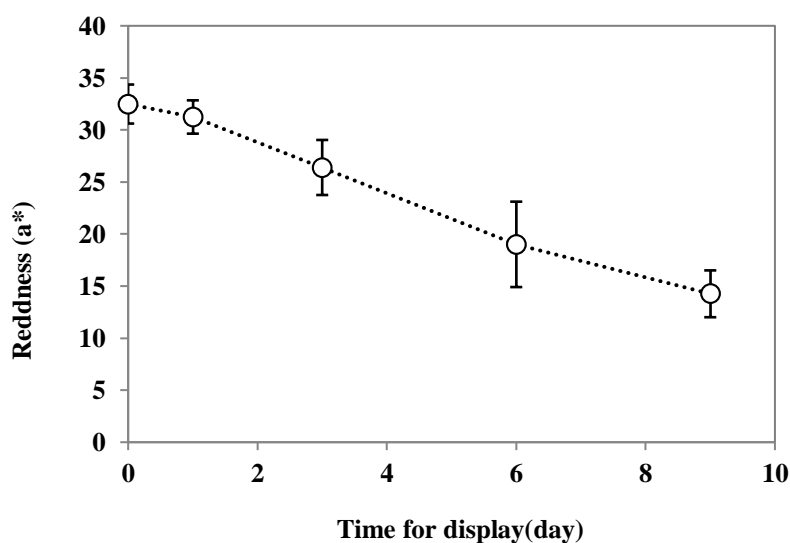


図 1. 牛精肉の一般的な退色挙動。

小売店で陳列される条件 (高酸素透過パッケージ, 1 °C, 2,000 lx) での牛精肉表面の赤色度 (a\*) の推移。図は King ら (2010) が示した 14 種類の牛肉部位のデータを元に平均値と標準偏差を計算して作成。

調理の程度についても色調で判断されるのが一般的であり、消費者もそのような価値基準を持っている (Hunt と Zenger 2002)。そのため、加熱食肉製品においては、加熱程度に応じた色調であることが求められる。豚肉の加熱による色調の一般的な変化の例を図 2 に示す。加熱食肉製品において問題となるのは、十分に加熱しているにもかかわらず、赤色が残存するピンキング (pinking) あるいは、不慮

の赤色化 (red color defect) と称する現象と、不十分な加熱で褐変が起こる早期褐変 (premature browning) と称する現象があげられる。

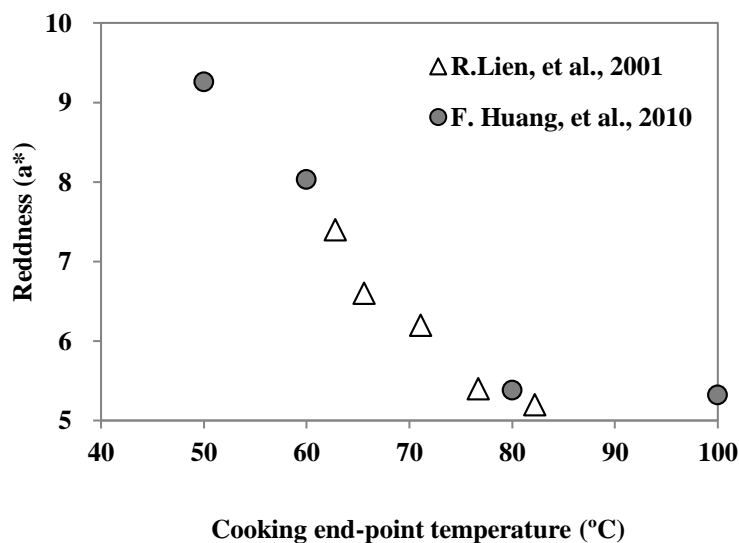


図 2. 豚肉の加熱による赤色度の低下.

40 °C 以上の加熱を加えると食肉の赤色度は加熱温度に依存して赤色度が減少し続け、ヘム色素が完全に変性するとやがて変化しなくなる (80 °C 以上). 赤色度は加熱の程度の指標ともなるため赤色が残ると未加熱を疑われる原因となる. 図はLienら (2002) ならびにHuangら (2011) の豚ミンチ肉を用いた実験データを元に作成.

塩漬食肉製品においては退色が問題となる。加熱塩漬食肉製品のスライス断面に光を当てると速やかに桃赤色から茶褐色ないし灰褐色へと変化する (退色)。このような退色は光と酸素の存在下で顕著であり、いずれかの遮断によって大部分を防ぐことが出来る。日本では一般的に商品を視認できるような透明性の高い包材が選択されるため、光を遮断することは難しく、光誘導退色に対しては酸素遮断性の高い包材を選択することによって対策されている。この光誘導退色は、塩漬食肉製品の色素であるニトロシルミオグロビン (NOMb) が分解・酸化することによって起こる。本現象については第 4 項にて詳述する。

さらに乾燥食肉製品などの比較的長期間の賞味期限を有する製品については、メイラード反応による褐変が問題となる。経時変化による褐変は、店頭に並んだ製造日が異なる製品同士の色調が異なるという問題を起こす。

以上が市場において特に問題視される食肉ならびに食肉製品の変色・退色であり、これらの問題が生じると微生物的あるいは化学的に安全であっても消費者か

ら敬遠され製品としての寿命を終える。

### 1.3. 市場における課題

加工食肉製品については、適切な加工処理が行われている場合、精肉と比較して安全に食することのできる期間が長い。このことから、加工食肉製品は特に色調を安定に保つことが望まれる製品群といえるだろう。大部分の塩漬食肉製品の色調は包装材料の進歩によって既に十分な安定性を得ている。一方、これまでは退色制御がシビアだった製品の色調安定性の向上や、包材のコストダウン、包装形態の多様化を実現するためには、製品そのものの色調安定性の向上や退色原因を明らかにすることが必要となる。

## 2. 食肉中の色素

### 2.1. 食肉中に含まれるヘム色素

食肉の色調はその色素の持つ色によって形成される。食肉に含まれる色素にはミオグロビン (myoglobin, Mb)、ヘモグロビン (hemoglobin, Hb)、シトクロム (cytochrome, Cyt) 類、カタラーゼ、カロチン、キサントフィル、リボフラビンなどがある。これらのうち、ヘムを含む色素は Mb、Hb、Cyt 類、カタラーゼであり、色調を支配している。

ヘム色素は生体内においてそれぞれ役割があり、その生理的性質がヘム色素ひいては食肉の色調制御に深く関わっている。Hb は血液の赤血球に存在し、酸素を呼吸器官から各組織へ運搬する働きを有している。Mb は筋肉組織の筋漿中にあり、Hb よりも酸素親和性が高いため (図 3)、Hb から解離した酸素を受け取って貯蔵し組織中でミトコンドリアへ供給する役割を担っている。このように Hb や Mb は酸素の授受に関わることから、酸化しやすく、酸化した Hb や Mb は酸素との結合能を失う。これに対し、生体内で NADH-Cyt b<sub>5</sub>還元酵素系が Hb および Mb の還元系として重要な役割を果たしている (Arihara ら 1995)。Cyt はミトコンドリア内膜に弱く結合している 12,000 Da 程度の電子伝達系に關与するタンパク質であり、酸化還元能を持つが酸素分子と結合しない。カタラーゼは生体組織中で産生される傷害性の高い過酸化水素を不均化して酸素と水に分解する反応を触媒する酵素タンパク質である (山本ら 2003)。Mb や Hb は酸素の着脱の際に過酸化水素を放出することが指摘されており (Faustman ら 2010)、また、過酸化水素は Mb や Hb の構造を傷害することから、カタラーゼは色素の酸化にとって重要な酵

素であると考えられる。

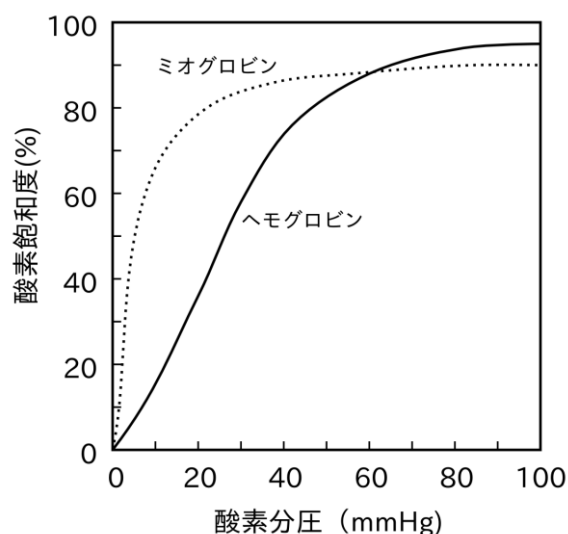


図 3. Hb と Mb の酸素解離曲線.

生体内での酸素分圧は一般的に末梢組織で 20 mmHg, 毛細血管で 40 mmHg, 肺に近い動脈血で 100 mmHg 程度と言われる。なお大気圧 760 mmHg, 酸素濃度は約 21% とすると大気の酸素分圧は約 160 mmHg である。

以上に挙げたヘム色素のうち、その量の多さから Mb が食肉の色調に特に重要な働きを持つと言われる (表 1)。Hb も相当量あるが、Mb の 4 量体であり反応性が似通っているため Mb を代表として論述するのが通例となっている。ただし厳密には Hb の存在を無視できない場合もある。

表 1. 畜種別の骨格筋 (*Longissimus dorsi*) 中の全ヘム色素に占める Mb の割合

畜種	Mb (%)	引用
ウシ	96.2	Fleming ら (1960)
	79.0	安井 (1957)
ブタ	65.3	安井 (1957)
ウマ	80.0	安井 (1957)
ヒツジ	62.5	安井 (1957)

食肉の色調の濃淡は主にヘム色素の濃度によって支配され、その濃度に最も影響を与える因子は動物種であるとされている (表 2)。例えばクジラなどの水棲哺乳類の Mb 濃度は 5~8% に達し (Lawrie 1985)、後述する陸上哺乳類の例と比較し



てわかる通り、これらの水棲哺乳類の Mb 濃度は非常に高いといえる。このような動物種間で観察される Mb 含量の差は、運動の種類に左右されると考えられている (中谷 1988)。持久運動に適した筋肉は Mb を多量に含み、濃赤色を呈す (赤筋、ただしクジラ肉などはほとんど黒色に近い赤色を呈す)。色調から赤筋や白筋という呼称が用いられる通り、同一個体内でも筋肉の種類によってヘム色素濃度や Mb の濃度、ヘム色素に占める Mb の割合には差異がある。

表 2. 畜種・筋肉・品種による全ヘム色素量の差異

畜種 (品種)	部位	全ヘム (%)	引用	
ウシ	ストリップロイン	0.42	King ら (2012)	
	<i>Longissimus dorsi</i>	0.50	Lawrie (1985)	
	<i>Longissimus dorsi</i>	0.37	King ら (2011)	
	<i>Semimembranosus</i>	0.44	King ら (2011)	
	<i>Biceps femoris</i>	0.46	King ら (2011)	
	<i>Gluteus medius</i>	0.49	King ら (2011)	
	<i>Triceps brachii</i>	0.52	King ら (2011)	
	シャンク (スネ)	0.33	Fleming ら (1960)	
	リブアイ (ロース)	0.37	Fleming ら (1960)	
	シンタマ	0.31	Fleming ら (1960)	
	ハツ	0.35	Fleming ら (1960)	
	(アンガス)	リブアイ	0.31	King ら (2010)
	(シャロレー)	リブアイ	0.28	King ら (2010)
	(ゲルブフィー)	リブアイ	0.36	King ら (2010)
(ヘレフォード)	リブアイ	0.33	King ら (2010)	
(リムーザン)	リブアイ	0.27	King ら (2010)	
(レッドアンガス)	リブアイ	0.34	King ら (2010)	
(シンメンタール)	リブアイ	0.37	King ら (2010)	
ブタ	ロース	0.09	Lien ら (2002)	
	<i>Longissimus dorsi</i>	0.04	Lawrie (1985)	
		0.06	Lawry (1985)	
	<i>Psoas major</i>	0.08	Lawry (1985)	
	<i>Rectus femoris</i>	0.09	Lawry (1985)	
	<i>Triceps</i>	0.09	Lawry (1985)	
	<i>Extensor carpi radialis</i>	0.10	Lawry (1985)	
ウサギ	<i>Longissimus dorsi</i>	0.02	Lawry (1985)	
ヒツジ	<i>Longissimus dorsi</i>	0.25	Lawry (1985)	
クジラ	<i>Longissimus dorsi</i>	0.91	Lawry (1985)	

King ら (2011) はウシの *Longissimus lumborum*, *Semimembranosus*, *Biceps femoris*, *Gluteus medius*, *Triceps brachii* の 5 筋肉種について Hb と Mb の合計濃度を調査し

ている。Lawrie (1985) はブタ Mb の濃度として、*L. dorsi* で 0.044%、*Psoas major* で 0.082%、*Rectus femoris* で 0.086%、*Triceps* で 0.089%、*Extensor carpi radialis* で 0.099% と報告している。Fleming ら (1960) は全ヘム色素に占める Mb の割合を調査し、Shank で 71.4% (97.6%)、Rib eye で 68.9% (96.2%)、Sirloin trip で 63.6% (96.1%)、Heart で 58.5% (68.8%) が Mb であることを報告している (2 種の定量方法を用いて算出: Shenk ら (1934) の方法、カッコ内が Poel (1949) の方法で求めた算出値)。

さらに、筋肉中の Mb 含量は発育に応じて増加する。発育初期の段階で筋中の Mb 含量は急激な増加を示すことが知られており、ウシでは 12 日齢の Mb 濃度は 0.07% だが、3 年齢では 0.46% まで増加する。ブタでも 5、6 および 7 月齢の Mb 濃度はそれぞれ 0.030%、0.038% および 0.044% であり、加齢とともに増加していく。この発育に伴う Mb の増加速度は 2 つのフェーズにわかれており、ウマの場合、0~2 年目までは 42.8% ずつ増加していき、2~12 年目ではその増加率は 2.1% 程度となる。この高速度の増加傾向が認められる期間は種間で異なり、豚で 1 年、ウマで 2 年、ウシで 3 年である。一方、性差や系統差は Mb 濃度に影響しないことが知られている (中谷 1988)。

Cyt c の食肉中含量は少なく、精肉の色調の大勢にはほとんど影響しないが、熱安定性が高いことから (山本ら 2003)、ピンキングの原因色素として推定されている (Girard ら 1990, Holownia ら 2003)。しかしながら全体のヘム色素含量から Cyt c を分別定量するのが煩雑であるため Cyt c の定量の例は少ない。

実際に色調に大きな影響を与えるのはヘム色素の構成割合よりも、ヘム色素の誘導体割合である。これは食肉中に含まれるヘム色素のうち大部分 (98~99%) を占める Mb と Hb が互いに光学的に似た特徴を持つためである。ヘム色素はそのヘム中心の鉄分子の電荷状態や、酸素結合する部位に様々なリガンド (配位子) が結合することで、種々の誘導体を生じ色調が変化する。Karamucki ら (2013) が報告している通り、食肉中で生じる Mb 誘導体の割合は食肉の色調へ大きく影響する。ヘム色素の分子構造については 2.2 項に、ヘム色素誘導体の光学的特性については 2.3 項にそれぞれ詳述する。

## 2.2. ヘム色素の基本構造と種間差異

ヘムはポルフィリンの鉄錯体の慣用名で、狭義には鉄 (II) 錯体を指す (区別す

るときは ferroheme、鉄 (III) 錯体の場合は hematin)。ポルフィリンは 4 つのピロールがメチン基 ( $-\text{CH}=\text{}$ ) で結合した環状化合物である (図 4)。フェロヘムは電荷を持たないが、ヘマチンは +1 電荷をもつため、陰イオンと塩を作る。特に塩化物 ( $\text{Cl}^-$ ) との塩をヘミン (hemin) と呼ぶ。生体内ではヘムはほとんどタンパク質との複合体を形成しているが、これはタンパク質のヒスチジンやシステイン残基が鉄の第 5 座 (あるいはさらに第 6 座) に結合しているからである。このような 5 または 6 配位結合錯体の構造を取ったヘムを総称して、ヘモクロモゲン (hemochromogen) あるいはヘモクロム (hemochrome) という。ポルフィリンは最終的にはヘム錯体の形で生体機能を発現している。Mb は 1 つのヘムと 1 つのグロビンから成るタンパク質であり (図 5)、分子量は約 17,000 Da である (表 3)。ヒト Mb の場合、グロビンは 154 個のアミノ酸からなるポリペプチドで、アミノ酸の 75% 以上は 8 本の  $\alpha$ -ヘリックス構造を持ち、短いランダムコイルでつながった形状を取っている。ブタ Mb の場合は  $\alpha$ -ヘリックス構造は 9 本であり、動物種によってグロビンの構造はわずかに異なる。Suman ら (2014a) はこれらの差異が熱に対する安定性に影響することを指摘している。ヘム鉄は 6 個の配位座を持っており、そのうちの 4 個は平面上のポルフィリン環にあるピロール核の窒素に配位し、第 5 の配位座は近位の His (F8 の His) と結合している。したがって酸素分子などのリガンドは図 5 に示したようにヘム鉄の第 6 の配位座と結合すると、64 番目の His (遠位 His) との間に水素結合が形成される。前述したとおり、動物種間で Mb の構造はわずかに異なり、その構造的差異が Mb のリガンド結合特性に影響を与えることが指摘されている。Suman ら (2009) は Mb の His 残基数を調べ、ヤギ、ヒツジ、シカで 12 残基、ウシ、ヤク、バッファローで 13 残基であることを示し 152 番目のアミノ酸である His が酸化速度に影響すると報告している。次に Hb は、ヘムを含む 4 つのサブユニットからなる複合タンパク質であり、2 つの  $\alpha$  サブユニットと 2 つの  $\beta$  サブユニットからなる。それぞれのサブユニットの分子量は約 16,000 Da であり、全体で約 64,000 Da (ヒト: 64,458 Da) である。また、Cyt c は前述の通り分子量約 12,000 Da (ウマ心臓由来: 11,702 Da) の分子である。Cyt は結合するヘム (heme) の種類によって Cyt a (フォミルポルフィリン鉄と結合)、Cyt b (プロトポルフィリン鉄 "ヘム b" と結合)、Cyt c (メソポルフィリン誘導体鉄 "ヘム c" と結合) および Cyt d (ジヒドロポルフィリン鉄と結合) がある。なお、P450 と呼称されるものはモノオキシゲナーゼであり、Cyt ではない。Cyt c

は水溶性で構造はブタ、ウシ、ヒツジで同じ、ニワトリとシチメンチョウで同じである。ウマやクジラはそれぞれ異なる。一般的に市販されている Cyt c はウシ心筋由来である。

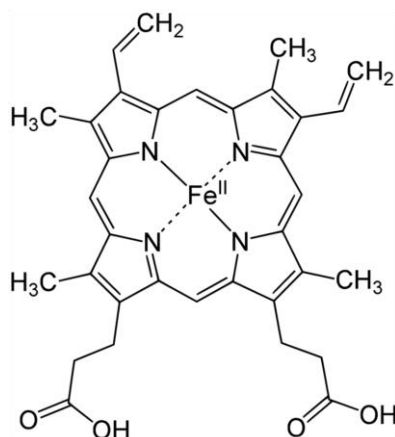


図 4. Mb や Hb に見られるポルフィリン環の構造.

4つのピロールが環状に結合した構造を持つ。図はヘム b である。中心金属が鉄のポルフィリン錯体をヘム (アメリカ英語では heme、イギリス英語では haem と記載) と呼ぶ。図は Wikipedia より引用。

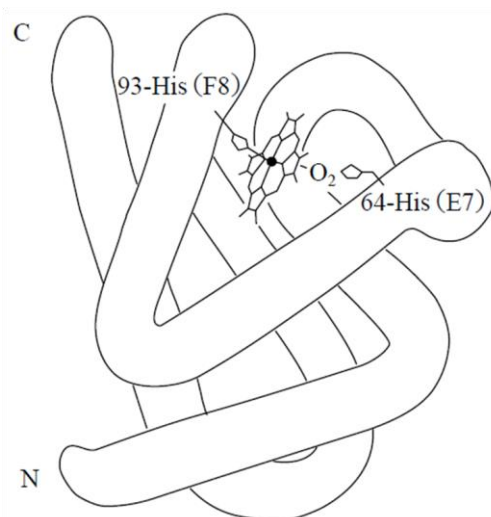


図 5. Mb の三次元構造.

リボン状に示されているのがグロビンタンパク部分であり、中心部の環状物質がヘムである。酸素分子は遠位 (distal) の His に挟み込まれるように配位結合しており、この部分がヘムポケットと呼ばれる疎水領域。図は四釜ら (2001) より引用。

表 3. 食肉資源となる各動物の Mb の分子量

動物種	分子量 (Da)	引用
シチメンチョウ	17,290	Yin ら (2011)
	17,295	Joseph ら (2010)
ニワトリ	17,291	Joseph ら (2010)
カルガモ	17,266	Joseph ら (2010)
ブタ	16,952	Suman ら (2014a)
	16,953	Joseph ら (2010)
ウシ	16,946	Joseph ら (2010)
スイギュウ	17,034	Joseph ら (2010)
ウマ	16,952	Joseph ら (2010)
ヒツジ	16,923	Joseph ら (2010)
アカシカ	16,922	Joseph ら (2010)
ヤク	16,946	Joseph ら (2010)
カンガルー	17,297	Joseph ら (2010)

ヘム色素に結合するリガンド分子によって光学的特性が変化することは既に述べたが、これはヘムの電子的構造的変化に起因するものである。各リガンドが結合する時に安定化する構造はそれぞれ異なる (図 6)。

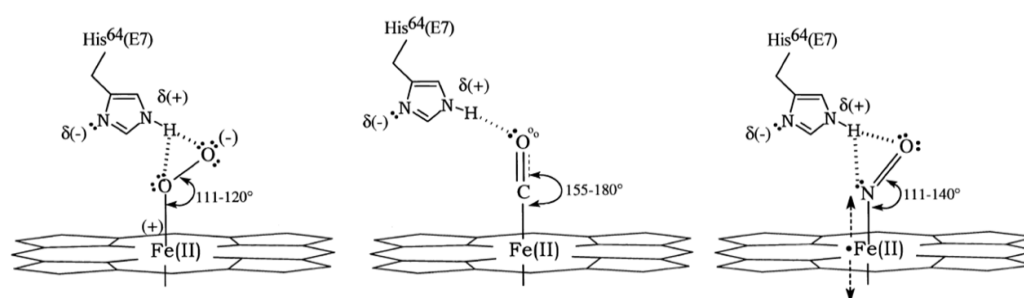


図 6. Mb 誘導体の配位構造.

リガンドはヘム鉄の第 6 配位結合座と遠位 His に挟み込まれるように安定化する。図中には表現されていないがポルフィリン環は下側に凹んだ形状をしている。図は Olson と Phillips Jr (1997) より引用。

### 2.3. 各種の誘導体とその光学的性質

ヘム色素に結合するリガンド分子によって変化した光学的性質は吸光スペクトルとして観察することが出来る。水系の溶媒に溶解させた時の各種誘導体の吸光

特性を表 4 に、ヘム色素の代表として Mb の代表的な誘導体の吸光スペクトルを図 7 に示す。これらの誘導体同士はランベルトベール則に基づいた挙動を示すとされるため、この特徴を用いて定量することが出来る場合がある。例えば特別な処理がされていない食肉サンプルの水抽出液には酸素と結合したオキシミオグロビン (OxyMb) と酸化型 Mb (MetMb) の 2 種類しか存在しないため (ホモジナイズされた抽出溶液の酸素は飽和状態であり脱酸素型 Mb (DeoMb) は 100% がオキシ化する、図 3 を参照のこと)、524 nm に観察される等吸収率点を基準に計算によって求めることが出来る (Krzywicki 1982)。なお、これらのピーク波長は溶媒によって変化する。

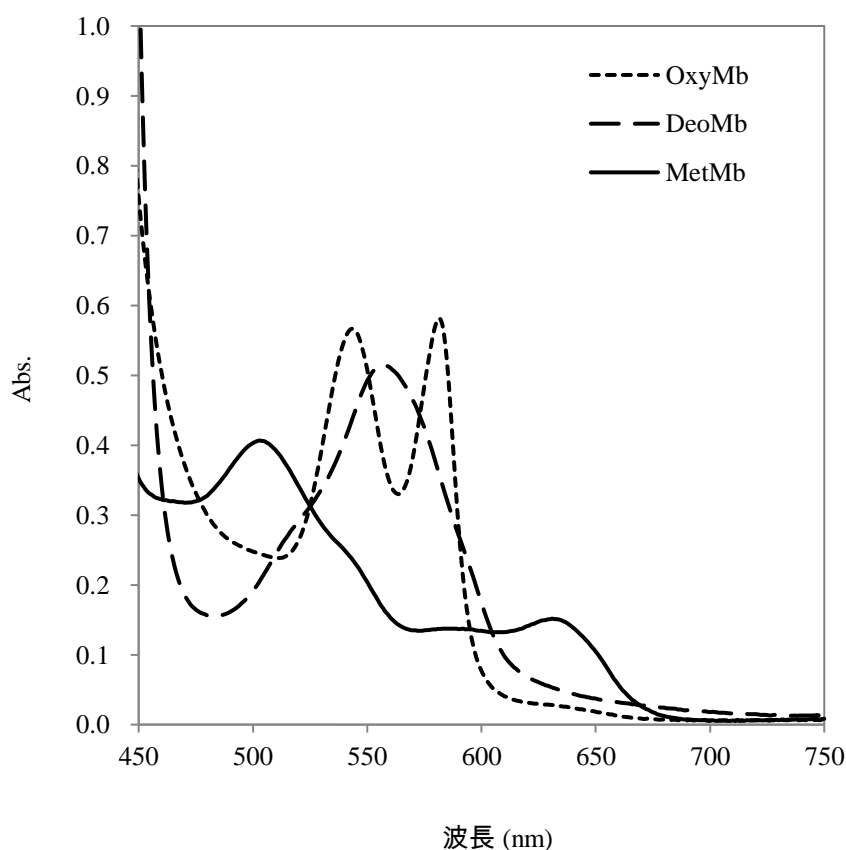


図 7. Mb の各種誘導体の吸収スペクトル。

表 4. 水溶液中のヘム色素誘導体の吸光ピーク

ヘム色素	Fe	リガンド	略称	ピーク (nm)			引用
				Soret	$\beta$	$\alpha$	
Mb	2 <sup>+</sup>	(H <sub>2</sub> O)	DeoMb	434	N.D.	—	Droghetti ら (2013)
				N.D.	557	—	Tang ら (2004)
				435	560	—	Antonini と Brunori (1971)
Mb	2 <sup>+</sup>	O <sub>2</sub>	OxyMb	415	N.D.	N.D.	Droghetti ら (2013)
				N.D.	N.D.	582	Tang ら (2004)
				418	N.D.	581	Gotoh と Shikama (1974)
				N.D.	543	581	永田と坂田 (1989)
Mb	2 <sup>+</sup>	NO	NOMb	421	548	578	Kamarei と Karel (1982)
				N.D.	547	578	永田と坂田 (1989)
				N.D.	542	577	Andersen と Skibsted (1992)
Mb	2 <sup>+</sup>	CO	COMb	423	N.D.	N.D.	Droghetti ら (2013)
				N.D.	540	577	安井 (1957)
Mb	3 <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O <sup>**3</sup>	MetMb	409	N.D.	N.D.	Droghetti ら (2013)
				N.D.	503	N.D.	Tang ら (2004)
				408	502	N.D.	Antonini と Brunori (1971)
				N.D.	503	631	永田と坂田 (1989)
Hb	2 <sup>+</sup>	(H <sub>2</sub> O)	DeoHb	430	555	—	岡崎 (1987)
Hb	2 <sup>+</sup>	O <sub>2</sub>	OxyHb	415	541	577	岡崎 (1987)
				N.D.	542	577	永田と坂田 (1993)
Hb	2 <sup>+</sup>	NO	NOHb	N.D.	545	575	岡崎 (1987)
Hb	2 <sup>+</sup>	CO	COHb	419	540	569	岡崎 (1987)
Hb	3 <sup>+</sup>	OH <sup>**1</sup>	MetHb	410	540	575	岡崎 (1987)
Hb	3 <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O <sup>**2</sup>	MetHb	405	500	631	岡崎 (1987)
Cyt c	2 <sup>+</sup>	—	Cyt c	415	520	550	和賀ら (2016)
カタラーゼ	2 <sup>+</sup>	—	—	N.D.	567	—	Purwar ら (2011)
カタラーゼ	2 <sup>+</sup>	NO	—	N.D.	540	578	Purwar ら (2011)

\*<sup>1</sup>アルカリ型 Met~, hydroxide-met~ (pKa = 8.3, equine Hb)

\*<sup>2</sup>酸性型 Met~, aqua-met~ (pKa = 8.3, equine Hb)

pH による配位分子の変化は周辺分子の量だけではなく、構造的変化も関係している可能性がある。Yang と Phillips Jr (1996) は pH 依存的にマッコウクジラ MetMb の構造が変化することを報告している。

524~525 nm に 3 種の誘導体の等吸収率点がある。この波長の吸光度は誘導体の形成割合に左右されず、Mb 濃度に支配される。Hb の場合このような等吸収率点は 603 nm 付近に観察される。

このような誘導体の色調の変化は食肉の色調を直接的に特徴づける大きな要因となる。Mb 誘導体の反応経路と色調について、図 8 に示す。これらの誘導体によって食肉ならびに食肉製品の色調が形成される。

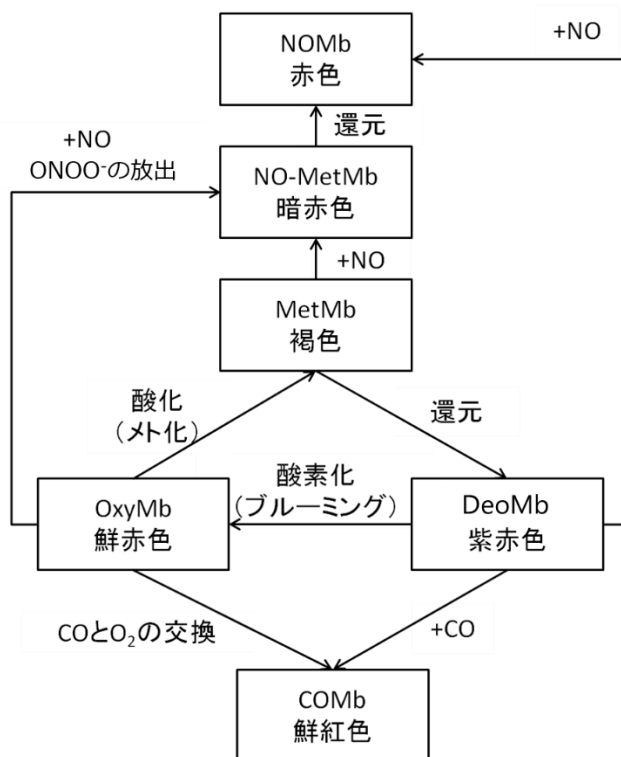


図 8. Mb 誘導体の反応相関図.

図中に示した全ての反応は可逆的である。これに対し加熱塩漬食肉製品ではグロビン部分が変性するため色素は不可逆的变化をする。一般的な食肉では MetMb、OxyMb、DeoMb の 3 つの誘導体が色調を形成している。NO-MetMb の正確な分子状態については意見が分かれている。

### 3. 発色剤と発色機構

#### 3.1. 発色剤からみた塩漬食肉製品の歴史

発色とは食肉中 Mb に対して NO が配位結合する現象であり、発色剤とは食肉中に NO を供与する化合物である。発色剤には発色効果の他にもボツリヌス毒を産生する *Clostridium botulinum* やリステリア症を引き起こす *Listeria monocytogenes* といった食中毒菌の発育抑制、フレーバーの改善や脂質の酸化抑制といった多岐にわたる効果があり (Mancini と Hunt 2005)、食肉の保蔵技術の中でも特に重要な役割を占めている。



食肉加工は、B.C. 3,000 年頃メソポタミアで肉や魚の保存に食塩が使用されたことが知られており (Binkerd と Kolari 1975)、乾燥・塩蔵した食肉や魚が彼らの食卓を彩っていたと考えられている。自然の恵みに依存して生活を送る民族についての調査 (Lee と DeVore 1968) では、緯度が上がるほど (寒冷な気候になるほど) 狩猟への依存度が高くなり、逆に赤道に近づくほど採集に依存する生活を送るようになる (図 9)。これらのことから、寒冷な気候は人類に食肉の摂取を促した要因の一つであろうと推察されている。

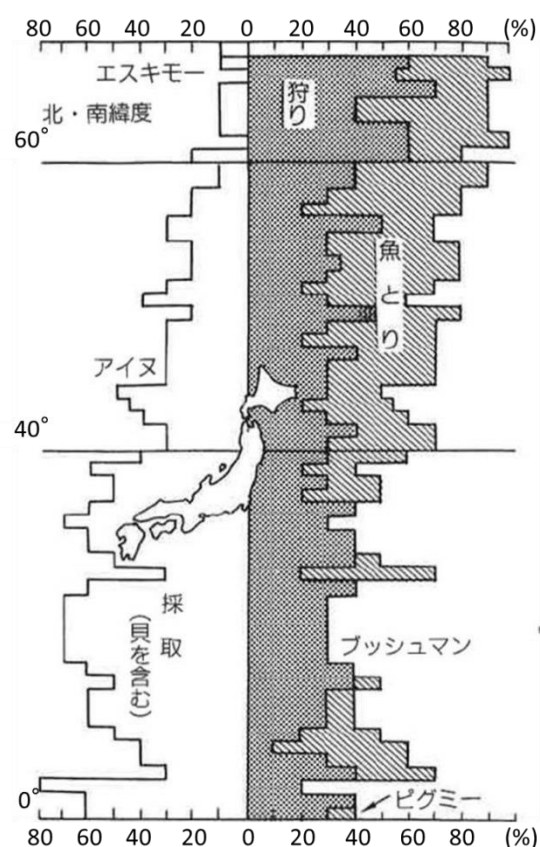


図 9. 食料採集民の食料の調達方法。

寒冷な地域ほど狩猟への依存性が高くなる。温暖湿潤な地域では狩猟の必要性がない。図は 佐原 (1990) より一部表記ズレを修正して引用。

塩漬食肉製品のルーツは、硝酸塩を不純物として含む特定地域の岩塩を使用した結果、食肉に特有の色と風味が生じることが認識されるようになったこととされている。そして食肉の塩漬による保存の起源は中央アジアの塩砂漠や、海に隣接した地域が発祥地であったと推定されている (Binkerd と Kolari 1975)。

岩塩の大半は Gondwana 大陸が分裂する前のペルム紀 (約 2 億 9000 万年前から約 2 億 5100 万年前) にでき、海水に含まれている塩分の約 10% が岩塩になったとされている (橋本 2009)。現在、世界中で年間約 1 億 8000 万トンの塩が生産されているが、海水から作られる塩はそのうち約 1/4 で、その他は岩塩や塩湖などの資源が利用されている。地下に岩塩層を持つ地域は図 10 のとおりである。

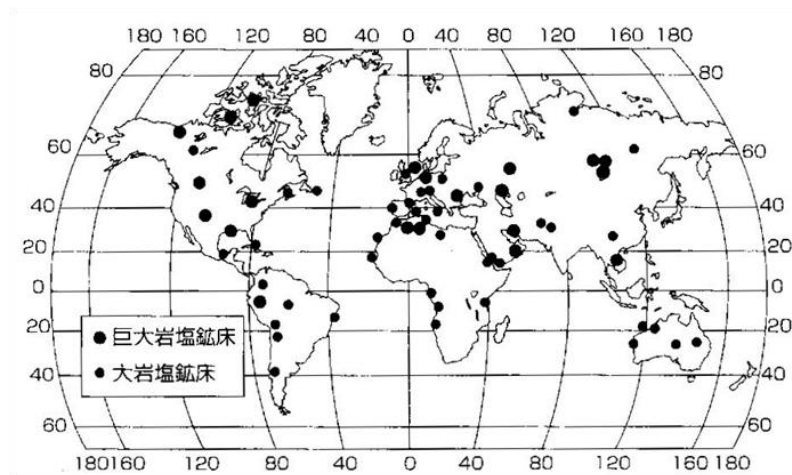


図 10. 世界の岩塩鉱床の分布.

食肉製品は岩塩の豊富な地域で発祥したと推定されている。ただし  $\text{NO}_2$  を含む岩塩は希少であり、 $\text{NO}_3$  が重要な役割を果たしたと考えられる。また、パルマハムのような  $\text{NO}$  に依らない製品が製造されていた可能性も否定できない。図は橋本 (2009) より引用。

一般的に海水中に溶存する無機態ならびに有機態の窒素化合物は非常に少ない。主な無機態窒素の供給源は海洋中の生物遺体などの有機物が各種の微生物によってアンモニア態窒素の形にまで分解され、硝化細菌によって亜硝酸態窒素を経て、硝酸態窒素にまで酸化されたものであり、またこれらが嫌気条件下で窒素ガスや  $\text{N}_2\text{O}$  などの形に分解されたものである (門田と多賀 1985)。したがって、一般的な岩塩に亜硝酸塩および硝酸塩の含有量は少なく、それらを不純物として内包する岩塩の産出地は限定的だったと考えられる。各地の岩塩について発色作用を調べた研究では、単独で発色効果を持つ (亜硝酸塩・硝酸塩を含む) 岩塩はわずかに 1 例 (モンゴル産の黄色塩) だけだったという (奥田ら 2013, 坂田ら 2012)。このことから、食肉の塩漬はかなり限定的な地域から始まったと考えられる。その後、ローマ時代後期以降には、石灰質の土壌で窒素を含んだ有機物が硝化細菌によって分解されるときに形成されるノルウェー硝石 ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、硝酸カルシウム) が食肉加工の場で硝酸源として利用され始めたとされている。

以上の通り、食肉加工の歴史は発色剤と共に考察されることが多いものの、Wakamatsu ら (2004) は、海塩のみで製造されるイタリアの伝統的な生ハム (Prosciutto di Parma) に見られる赤色の本体は、亜硝酸塩添加によって得られる  $\text{NOMb}$  によるものではなく、Mb のヘム鉄が亜鉛に置換した亜鉛プロトポルフィリン IX によるものと主張しており、必ずしも全ての食肉製品のルーツが岩塩に

含まれる不純物としての亜硝酸塩や硝酸塩に求められるものではない。

いずれにせよ、これらの時代までは食肉加工は経験的に蓄積された技術体系であって、科学的な論述がなされるようになったのは 19 世紀後半からとなる。すなわち、1891 年に Polenske によって塩漬液中から亜硝酸根 ( $\text{NO}_2^-$ ) が発見され、1899 年には Lehman や Kisskalt によって発色をもたらす物質が硝酸根 ( $\text{NO}_3^-$ ) ではなく  $\text{NO}_2^-$  であることが解明された。また  $\text{NO}_3^-$  は肉や塩漬液中に存在する微生物の作用により一定期間を経て  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}$  に還元され、これらが肉色の固定に直接的に関与していることが明らかになった。ただし、これらの科学的知見があったにもかかわらず、1930 年代までは硝酸塩で塩漬するのが主流であり、亜硝酸塩の直接添加への移行は漸次的だった (Sindelar と Milkowski 2011)。

塩漬技術の背景が科学的に解明されるに至り、硝酸塩を添加するよりも亜硝酸塩を添加した方が効率的であることがわかった現代においても、硝酸塩は発色剤としてなおも使用されている。例えば Nuñez De González ら (2012) はアメリカ市場での調査で、加熱製品でも硝酸塩を添加していると考えられる製品が多く見受けられることを報告している (加熱製品の  $\text{NO}_3^-$ : 塩漬ソーセージで 541 ppm、発酵酸性ソーセージで 320 ppm、湿塩漬の肉塊製品で 108 ppm、いずれも最大値)。亜硝酸根単独で塩漬した場合も酸性下での亜硝酸 ( $\text{HNO}_2$ ) の自己分解あるいはヘム色素を触媒として  $\text{NO}$  から  $\text{NO}_3^-$  を生じるが (3.3 項を参照のこと)、検出量からこれらの調査対象となった製品群には意図的に硝酸塩が添加されていると考えられた。また、消費者が持つ添加物 (発色剤) への負のイメージから、近年欧米では “Natural” や “Organic” と謳った製品が登場している。これらの製品は野菜由来の  $\text{NO}_3^-$  を加え、硝酸還元菌で還元させることで発色効果を得ているものであり、発色剤によって塩漬された一般的な食肉製品と本質的に変わらない。非加熱塩漬乾燥ソーセージ、加熱塩漬ソーセージ、加熱発酵ソーセージ、非加熱湿塩漬肉塊製品、加熱湿塩漬肉塊製品、非加熱乾塩漬肉塊製品の 6 品目について、シカゴ、ダラス、ロサンゼルス、ニューヨーク、ローリーの 5 地点で  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NO}_3^-$  の残存量を比較したところ、“Natural” または “Organic” と謳った製品の 85% と、一般的な製品との間に有意な差は認められなかったという調査結果がある (Nuñez De González ら 2012)。この問題に関して Sebranek と Bacus (2007) は、表記を改めるなど、消費者に誤解を与えない工夫が必要だと警鐘を鳴らしている。

### 3.2. 発色剤の功罪

1998年のノーベル医学・生理学賞は Furchgott 米ニューヨーク州立大名誉教授、Ignarro 米カリフォルニア大ロサンゼルス校教授、Murad 米テキサス大教授の薬理学者3氏に授与された。その授賞理由は「循環器系における信号伝達分子としてのNOの発見」であった。この研究を発端として、NOが人体の生理機能に及ぼす影響は強い関心と共に研究が進み (Hezel と Weitzberg 2015)、ひいては食肉中でのNOのメタボリズムについても理解が深まりつつあるところである。Hezel と Weitzberg (2015) はヒトが摂取する硝酸態あるいは亜硝酸態窒素の約80%は野菜由来であることを示していると同時に、発色剤として亜硝酸塩や硝酸塩が用いられている塩漬食肉製品も酸化窒素物の摂取源の1つとみなしている (表5)。

表5. 成人の1日あたりの硝酸根、亜硝酸根、一酸化窒素の摂取量と生体合成量 (Sindelar と Milkowski 2011).

摂取源	硝酸根 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mg/kg)	亜硝酸根 (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , mg/kg)	一酸化窒素 (NO, mg/kg)
食事 <sup>a</sup>	50~220	0~0.7	—
塩漬食肉製品 <sup>b</sup>	1.5~6	0.05~0.6	—
飲料水 <sup>c</sup>	0~132	0~10	—
唾液	30~1,000	5.2~8.6	—
生体内合成	—	—	70 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> 塩漬食肉製品を除く。

<sup>b</sup> 1日当たり75g(ソーセージ4本程度)を摂取するとして計算。

<sup>c</sup> 日本の水道法では亜硝酸態窒素と硝酸態窒素の合計が10ppmかつ亜硝酸態窒素が0.05ppm未満に定められている

<sup>d</sup> 体重1kgあたり1mg程度合成されている。

発色剤は食肉に対して安定な色調を付与するだけではなく、フレーバーの改善、脂質酸化、微生物学的安全性に対して有益な効果をもたらすことが知られている。特に、致死性の高い毒素を産生することで知られるグラム陽性の桿菌 *C. botulinum* の生育阻害作用は食肉産業にとって重要な効果の1つである。*C. botulinum* は主に土壌中に芽胞の状態が存在するため、ジビエ等、適切な施設で処理されない肉については特に注意する必要がある (Midura ら 1972)。*C. botulinum* の生育はpHや塩濃度、鉄の含量などに影響を受けるが (Sebranek と Bacus 2007)、亜硝酸Na (NaNO<sub>2</sub>) を100ppm以上添加することでソーセージ中のボツリヌス毒

素の産生を抑制することが出来る (Hustad ら 1973)。ただし、一般的な食肉製品 (pH 5.5~5.7) では 40 ppm 程度の  $\text{NaNO}_2$  で黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の生育抑制効果が認められるのに対し、Buchanan と Solberg (1972) はこの制菌作用は pH 6.3 以上では *S. aureus* の生育阻害に 500 ppm もの  $\text{NaNO}_2$  を要したことを報告している。このように  $\text{HNO}_2$  や  $\text{NO}$  が生成されない場合には亜硝酸塩の食中毒菌に対する制菌作用は著しく減少すると考えられた。また、塩漬中または加熱によって食肉中に残存する  $\text{NO}_2$  は著しく減少するため、加熱後の製品において残存する  $\text{NO}_2$  に制菌作用はほとんど期待できないと考えてよい (Sebranek と Bacus 2007)。

亜硝酸塩による脂質酸化の抑制については現在でも活発に研究されている。Mb と脂質の酸化は密接な関係にあることが知られており (Faustman ら 2010)、例えば、脂質酸化によって生じる一次生成物や二次生成物は Mb の酸化に関与することが報告されている他 (Monahan ら 2005)、Mb における脂質酸化生成物に対する官能基についての報告 (Joseph ら 2010, Suman ら 2009) やその種特異性 (Suman ら 2014a) について報告されている。また、リン脂質が Mb の酸化を効果的に早めることが知られている (Postnikova と Shekhovtsova 2013)。このようにして脂質酸化と Mb 酸化が相互に影響し合っただけでなく、加速度的に酸化が進行する。これに対し亜硝酸塩を加えることによって明らかに遊離鉄の増加が抑制される (Bergamaschi と Pizza 2011)。Mb は酸化される時に  $\text{O}_2$  を放出し、 $\text{O}_2$  は  $\text{H}_2\text{O}_2$  へ不均化する。この  $\text{H}_2\text{O}_2$  はポルフィリン環の構造に働きかけ、鉄の放出に関与する (Thiansilakul ら 2011)。これらのことから、 $\text{NO}$  が Mb を 2 価で固定することでヘムが保護され、鉄が遊離するのを防いでいるものと考えられている (図 11)。

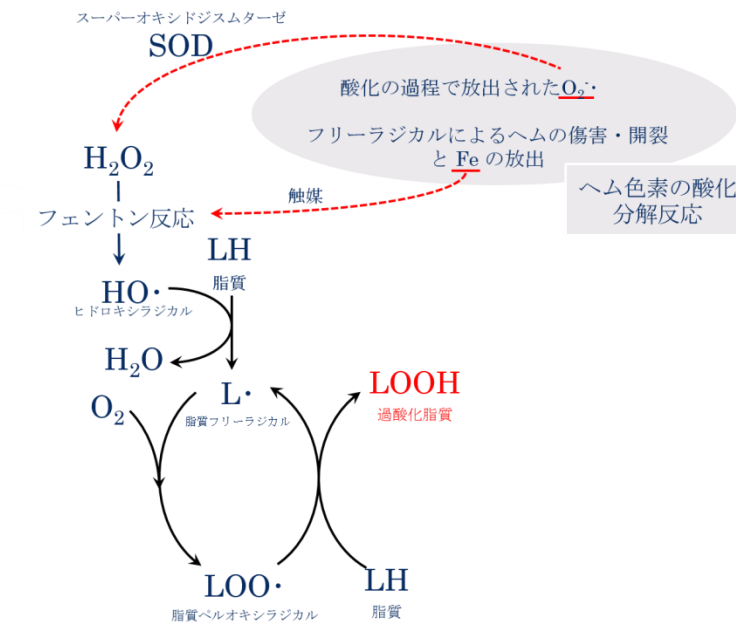


図 11. 脂質酸化反応の概観.

Mb の酸化と脂質酸化は密接に関与している. Mb の酸化は脂質酸化の開始を早め, かつ強力に促進する.

亜硝酸塩の添加による脂質酸化抑制効果は、図 11 に示したフェントン反応に寄与する基質物質の増加抑制によるものとされている。一方、遊離鉄よりも MetMb や MetHb はその存在自体が脂質酸化を助長すること (Monahan ら 1993) や、 $\text{HNO}_2$  の分解生成物である  $\text{N}_2\text{O}_3$  と反応させた不飽和脂質が形成するニトロソ化合物は肉中脂質を安定化することも報告されており (Freybler ら 1993)、亜硝酸塩による脂質酸化の抑制効果は単純な系ではない。

亜硝酸塩による脂質酸化抑制効果は、フレーバーの改善に寄与する。亜硝酸塩を用いた塩漬はウォームドオーバーフレーバー (再加熱時の劣化臭) の生成に関与する極性脂質のリン脂質の酸化を抑制することが知られ、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、n-ノナ-3,6-ジエノール、オクタン-2,3-ジオン、マロンジアルデヒドなどの生成を抑制する (Gray と Monahan 1992)。亜硝酸塩を用いた塩漬によって変化する揮発性成分の変化を図 12 に示す。塩漬食肉製品では悪臭の原因となる揮発性成分が減少することがわかっているものの、塩漬食肉製品に特有の風味を与える決定的な物質についてはまだ明確になっていない。

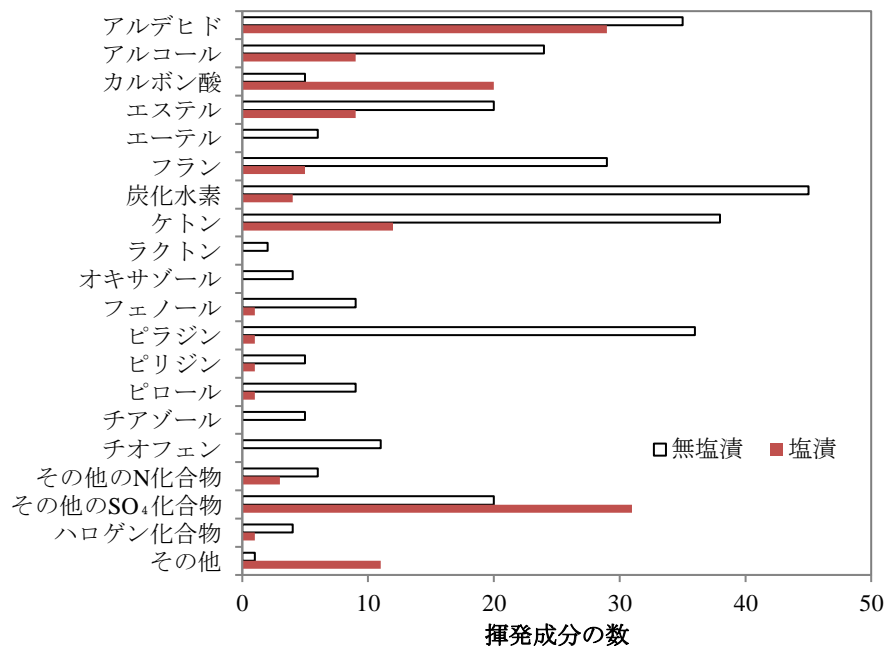


図 12. 塩漬によって変化する揮発性成分の種類と数.

塩漬した食肉製品ではカルボン酸や硫黄化合物などは増加しているものの、異臭を発するアルデヒド類やケトン類の数が著しく少ない。図は Shahidi (2012) の表を基に作成。

発色剤は塩漬食肉製品の安全上または品質上欠かせない添加物である一方で、適切に使用しなければ健康上のリスクがあるため、使用基準が設けられている。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>は口腔中の微生物によってNO<sub>2</sub><sup>-</sup>へと還元され、胃液中の低pHでHNO<sub>2</sub>を生じ、自己分解してNOを放出する。NOやHNO<sub>2</sub>はHbやMbに対し強い酸化力があるので、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>やNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を大量に摂取すると血液中のHbを酸化させチアノーゼ症状を引き起こすことが知られている(メトヘモグロビン血症)。メトヘモグロビン血症は特に乳幼児に罹患例が多く(HezelとWeitzberg 2015)、日本では井戸水などを原因として発症例がある(田中 1996)。新生児や乳幼児に罹患例が多いのはカタラーゼ活性などのヘモグロビンの酸化に対する防御活性が十分に発達していないためと考えられている。ただし、塩漬食肉製品(食塩1.5~2.0%、NaNO<sub>2</sub>が0.01%:NO<sub>2</sub><sup>-</sup>として基準値の70ppmで計算)の場合、NaNO<sub>2</sub>のLD<sub>50</sub>は77~150mg/kg(ラット)、塩化ナトリウム(食塩)のLD<sub>50</sub>は3,000mg/kg(ラット)であることから考えると、メトヘモグロビン血症の急性毒性で死亡する(体重60kgの場合、塩漬食肉製品を46.2kg摂取)より前に食塩で死亡する(体重60kgの場合、同12kgを

摂取) 確率の方が高いうえに現実的な摂取量ではないことから、重大な製造上のミスが生じない限り、食肉製品の摂取によってメトヘモグロビン血症を発症することはないと考えられる。発色剤の使用基準が設定されるに至ったのは、発色剤が発がん性の高い N-ニトロソアミンの生成に関与することが明らかになったためである (図 13)。N-ニトロソアミンが着目されるに至った端緒は 1954 年ジメチルニトロソアミン (DMNA) を研究していた英国の 4 人の研究者が肝硬変になり、うち 1 人が死亡する事態が起こり、1956 年に Magee と Burnes が彼らの扱った DMNA に強いがん原性を認めたことによる (岡部 1977)。次いで 1957 年、ノルウェーにおいてミンクなどの家畜の餌に使用された魚粉が原因で大量死する事件が相次いで起こった。魚粉は  $\text{NaNO}_2$  (20,000 ppm) を添加したニシンを高温で加熱して製造された。Ender と Harve (1964) は、家畜の大量死の原因がニシンに含まれるジメチルアミンが  $\text{HNO}_2$  と反応し生成した DMNA によるものであることを明らかにした。この段階では不適切な量の亜硝酸塩の添加が問題となるだけであったが、 $\text{HNO}_2$  と 2 級アミンが反応して発がん性の高いニトロソアミンが生体内で生成され得る事が明らかになり (Sander ら 1968)、亜硝酸塩の使用に規制がかかる契機となった。

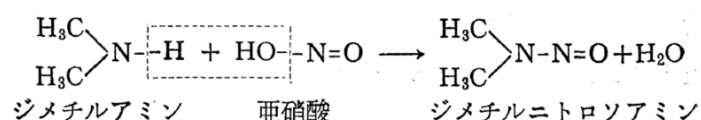


図 13. N-ニトロソアミンの生成反応経路.

第 2 級アミン類と低 pH で生じる非解離性の亜硝酸 ( $\text{pKa}$  3.2~3.3) と脱水結合して N-ニトロソアミンが形成される。胃酸の pH は約 2 であるから、摂取された亜硝酸塩の大部分が  $\text{HNO}_2$  となっていると考えられる。一般的に 2 級アミンはタンパク質を含む食品に多いとされる。図は岡部 (1977) より引用。

以上の通り発色剤の使用によって発がん性の高い物質が生成される危険性が指摘されているものの、この疫学的調査はほとんど行われておらず (Santarelli ら 2010)、また、野菜の  $\text{NO}_3^-$  が口腔内で還元されることによって  $\text{NO}_2^-$  を日常的に摂取していることを考慮して (表 5)、食肉製品に用いられる量でのリスクは低いとする意見もある (Sindelar と Milkowski 2011)。Santarelli ら (2010) は、これまでに N-ニトロソアミンの生成と関係が示唆されてきたヘム色素量、加熱温度、亜硝酸塩添加の有無、包装方法の 4 項目の組み合わせ 16 通りの試料を用いてラット糞



便中の N-ニトロソアミンの検出量を比較した結果、ヘム含量が高く (Mb として 0.06~0.11% に対して 0.45~0.51%)、酸化し (マロンジアルデヒド 0.5 mg/100 g に対して 1.8 mg/100 g)、加熱 (50 °C に対して 70 °C) した塩漬 (NaNO<sub>2</sub> 120 ppm) 食肉製品 (豚肉) でのみラット排便中のニトロソ化合物量の生成指標物質が有意に上昇したことを報告している。ただし、原料や塩漬加熱条件は一般的な食肉製品に見られるレベルであるものの、Gray と Pearson (1987) によれば酸化臭の検出限界はマロンジアルデヒド 0.05 mg/100 g であるので、Santarelli ら (2010) の調製した飼料はいずれも酸化の進行が顕著と言え、さらに、飼料の pH が 6.0 を超えていたこと、アスコルビン酸 Na を添加していなかったことから、添加された亜硝酸塩はほとんど分解されていなかったのではないかと予想され (NO<sub>2</sub> の残存量についてのデータは示されていない)、市場で販売される一般的な食肉製品と比べると劣悪な飼料での実験であったことに注意すべきである。

以上に述べた通り、発色剤には酸化防止効果、フレーバー改善効果、食中毒菌の発育抑制効果、発色効果など多岐にわたる有益な効果が認められる一方で、健康上のリスクがあることを完全に否定することはできない。日本では KNO<sub>3</sub>、NaNO<sub>2</sub> および KNO<sub>2</sub> が発色剤として使用が認められており、食肉中に残存する亜硝酸根 (NO<sub>2</sub>) 残存量が 70 ppm 以下になるよう定められている (食品、添加物等の規格基準「食肉製品」原文：食肉製品は、その 1 kg につき 0.070 g を超える量の亜硝酸根を含有するものであってはならない)。

### 3.3. 発色に至るまでの発色剤の食肉中での挙動

発色剤として添加される硝酸塩や亜硝酸塩は NO を生成する過程で様々な窒素酸化化合物を生じる。これらの副次的に生成される窒素酸化物の中には非常に反応性が高いものがあり、ヘムタンパク以外の食肉中タンパク質と反応するため添加された発色剤の全てが発色色素の形成に関与するわけではない。NOMb の形成に関与する亜硝酸塩は、重窒素 (<sup>15</sup>N) を用いて追跡した研究において、1 週間の塩漬で発色に関与した窒素酸化物は添加量の約 4~6% であったことが報告されている (Emi-Miwa ら 1976)。この研究では実際の食肉製品の製造条件と差異があると考えられるため、結果の解釈には注意を要する。例えばアスコルビン酸 Na (NaAsA) の添加量と共に硝酸態窒素 (NO<sub>3</sub>) が増加する傾向にあるが、本項で後述する通り、NaAsA を介して還元分解される場合には NO<sub>3</sub> を生じない。すなわち、

NaAsA の添加量と比例して蓄積量が増大した NO<sub>3</sub> は NOMb と酸素の反応によって生じたのであり、酸素が豊富な実験条件であったと推察される。このように、発色剤の食肉中における反応は多様性に富み、またその反応量を左右する因子が多岐にわたることなどから、現在のところ一部の主要な反応経路が明らかになっているのみであり、発色剤の反応経路の全容は解明されていない。

発色剤を添加してから NO を生じるまでの経路の概略を図 14 に、pKa を 3.3 とした時の亜硝酸の酸解離曲線を図 15 に、食肉中で生じた NO の反応経路を図 16 に示す。

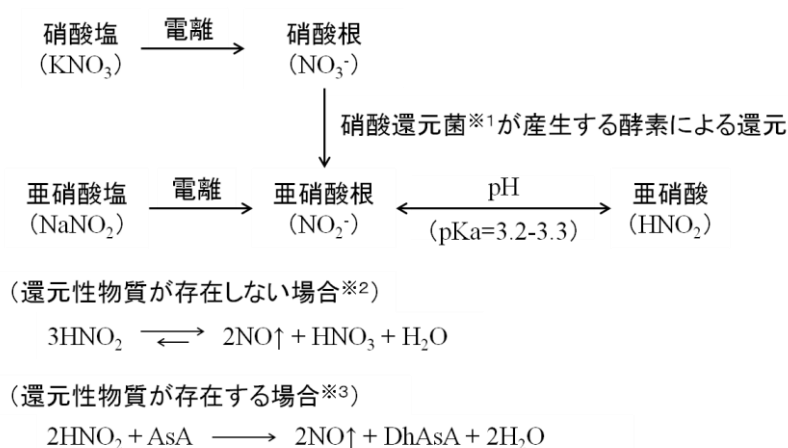


図 124. 食肉中での NO 生成経路の概略。

NO を生じる反応の基質となる物質は亜硝酸根 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ではなく、亜硝酸 (HNO<sub>2</sub>) である。pH が異なる場合、亜硝酸塩の添加量が同一であっても反応基質である HNO<sub>2</sub> の濃度は異なる (図 15 を参照)。

<sup>※1</sup>硝酸還元能を持ち、かつ塩漬液内で生残、細菌叢を形成する種類は実際の製品から数多く同定されている。これらの菌は嫌気条件下で亜硝酸根を放出する。

<sup>※2</sup>自己分解反応と称する。pKa = -4 の酸解離反応 (Skibsted 2011) とは異なる。図中に示したのは全反応であり、実際には複数の素反応の組み合わせによって表される。

<sup>※3</sup>還元分解反応と称する。図中 DhAsA はデヒドロアスコルビン酸 (酸化型 AsA) の略。AsA は 2 つの還元基を持つため、AsA 1 分子で 2 分子の HNO<sub>2</sub> を還元する。GSH やシステインの SH 基は 2 分子で 1 分子の還元がされるため、効率の面では AsA の 1/4 と言える。

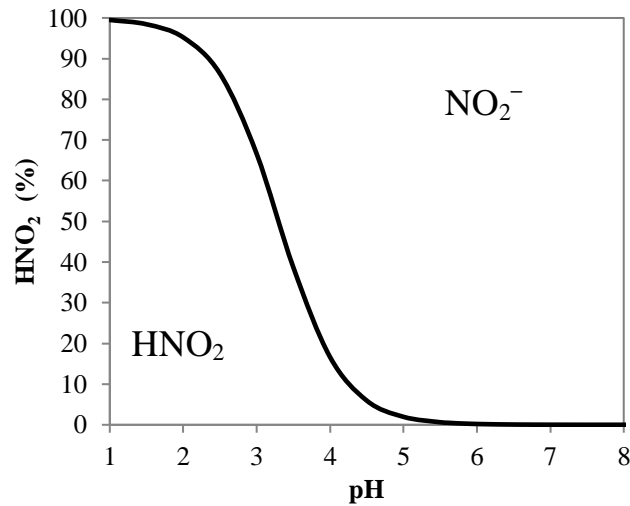


図 15. 亜硝酸の酸解離曲線.

pKa = 3.3 として計算した曲線. 解離定数には諸説ある. 一般的な食肉の pH は 5.5 前後であることから, 添加された亜硝酸塩は約 99.4%が亜硝酸根 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) として存在し, 残りの約 0.6%が亜硝酸 (HNO<sub>2</sub>) として存在していることとなる.

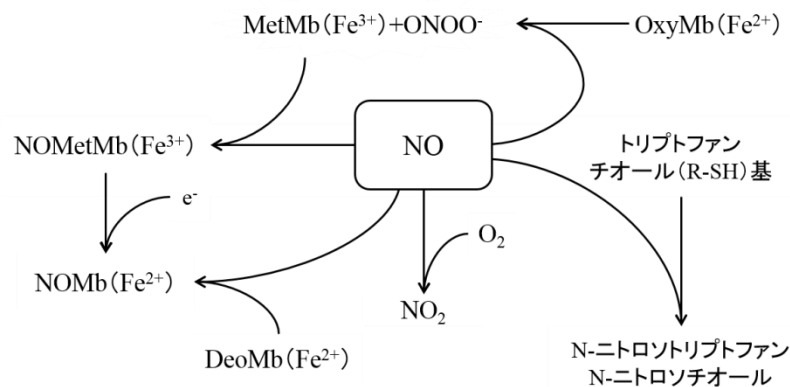


図 16. 食肉中での NO の反応経路.

N-ニトロソチオールは NO 供与体としても働く. 図は Skibsted (2011) の報告を元に一部改変して作成. Skibsted (2011) は NO の酸素による酸化の生成物を NO<sub>3</sub> としているが, NO<sub>3</sub> は生成されず NO<sub>2</sub> が酸化生成物であるとする説が一般的に受け入れられているので (Ignarro ら 1993, Kharitonov ら 1994, Pfeiffer ら 1997, Pires ら 1994), この点を改変した.

食肉に添加された硝酸塩は各種の硝酸還元菌の嫌気呼吸に利用され亜硝酸根を生ずる. 硝酸塩は古来より塩漬剤として使用されてきたが (3.1 項を参照), 亜硝酸塩へと還元されない限り NO の生成経路へ関与することはない (Hammes 2012). 一方, 硝酸根は NADH および還元型グルタチオン (GSH) などの食肉中の還元性

物質や、発色助剤として加えられる NaAsA では還元されず、酵素的に還元される必要がある。したがって、硝酸塩単独で塩漬する場合には塩漬肉に硝酸還元酵素を産生する微生物叢の発達を待つ必要がある。硝酸還元菌については実際の塩漬食肉製品から多くの菌が分離されている: *Lactbacillus pentosus*、*L. plantrum* (Wolf と Hammes 1988)、*Stapylococcus xylosus*、*S. sciuri*、*S. carnosus* (Schleifer と Fischer 1982)。硝酸塩の初期添加量にもよるが (新村 1981)、これらの菌叢が定着し硝酸還元ならびに発色へ寄与するためには 2 週間程度かかるのが一般的である (Bozkurt と Erkmen 2004, 新村 1981, 木村 1988)。樽などで塩漬されていた時代には、硝酸還元菌叢が定着し硝酸塩を使用した場合にも塩漬肉色の発現は早かったと予想されるが (吉川 2011)、現代の工業的生産の場では非現実的であり、硝酸還元菌を含む製造用スターターが一般に販売、使用されている。この場合、1 日程度の比較的早い段階で  $\text{NO}_2$  が生成され始める (吉川 2011)。硝酸塩から生じた  $\text{NO}_2^-$ 、あるいは直接的に添加された亜硝酸塩 (現在は直接亜硝酸塩が添加されるのが一般的である) から電離によって生じた  $\text{NO}_2^-$  は、食肉中の pH に応じて定量的に  $\text{HNO}_2$  を生じる ( $\text{pKa}$  3.2~3.3)。この  $\text{HNO}_2$  が NO 生成経路の出発物質として推定されていることから、NO 生成あるいは  $\text{NO}_2^-$  消失の速度論的検討を行う場合には NO 生成反応の基質物質であるこの非解離性の  $\text{HNO}_2$  濃度に注目すべきである。Fox ら (1994) は pH によって  $\text{NO}_2^-$  生成量が増加することを報告している。 $\text{HNO}_2$  から NO を生じる経路は食肉中では 2 つの経路が考えられている。まず、自己分解反応は 3 分子の  $\text{HNO}_2$  から 2 分子の NO が生じる反応である。この際、 $\text{NO}_3^-$  を 1 分子生ずる。この  $\text{NO}_3^-$  は前述したとおり硝酸還元菌が発達していなければ塩漬食肉製品中に蓄積し続ける。次に還元性物質の共存下で起こる還元分解反応では、1 分子の  $\text{HNO}_2$  に対して 1 分子の NO を生じる。この際、還元性物質の還元基を 1 つ消費する。塩漬食肉製品中でこのような還元反応に寄与する物質には食肉中に含まれる NADH、NADPH や、GSH ならびにシステイン残基などの筋肉タンパク中の SH 基、呼吸系酵素や発色助剤として添加される NaAsA やその異性体が一般的に知られる他、これらの電子供与に関連する各種の添加物あるいは異種タンパク原料群も関与しているものと考えられる。Forrest ら (1975) は還元分解反応が塩漬食肉製品中の発色反応に重要であり、自己分解反応による NO 生成の寄与率は低いと予想している。ただし、塩漬食肉製品中でこれらの NO 生成反応がそれぞれの程度寄与しているのか、あるいは、経路同士が相互に影響を及ぼすのか、

といった知見は乏しい。なお、発酵食肉製品では一般的に pH が低いため (pH 4.0~4.5)、 $\text{HNO}_2$  が  $\text{NO}_2$  に占める割合は比較的高いと予想される。そのため NO は自己分解によって十分に生成される可能性はある。一方、一般的な食肉製品では pH 5.5~6.0 程度であり、残存量が同じであっても  $\text{HNO}_2$  濃度は約 10 分の 1 (亜硝酸の pKa を 3.3、発酵食肉製品の pH を 4.5、一般的な食肉製品の pH を 5.5 と仮定して計算、図 15 を参照) なので、自己分解経路だけでは NO の生成は遅く、発色を促進するために発色助剤 (還元性物質) を加えることが重要となる。

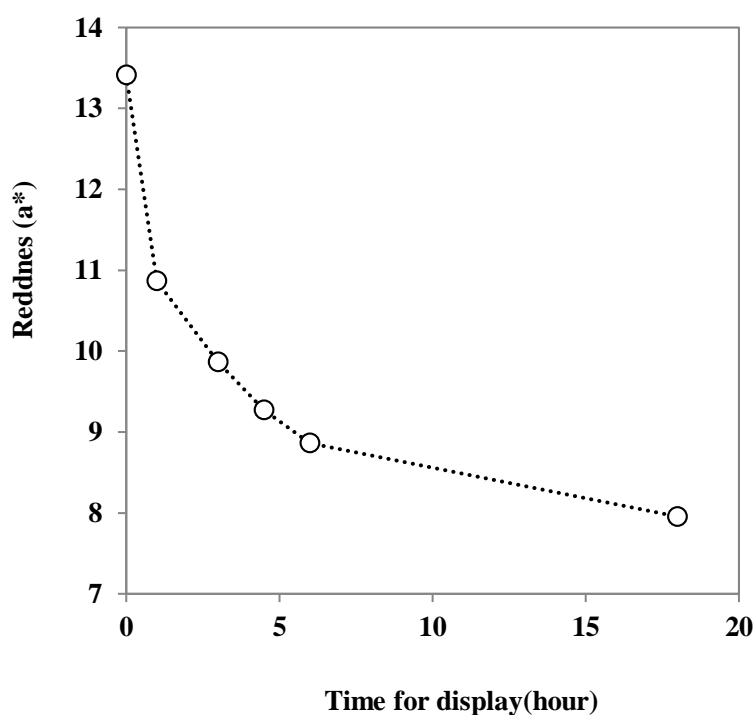


図 17. 酸素存在下での光誘導退色による赤色度の変化。

酸素が存在すると光照射によって発色色素は容易に分解し退色する。この光誘導退色は酸素濃度や光の強度に強く影響を受けることが知られている。図は Shahidi と Pegg (1991) から引用。

NO は酸素との反応性が高いことが知られる。 $\text{NO}_2$  を生じるという場合 (Pfeiffer ら 1997, Pires ら 1994) と、NO がオキシ型のヘム色素と会合することによって、NO はヘムに結合していた酸素と結合し  $\text{ONOO}^-$  となり、ヘムから電子を奪ってヘム色素をメト態へと酸化させ、 $\text{NO}_3^-$  として蓄積する場合 (Arnold と Bohle 1996, Kharitonov ら 1994) がそれぞれ報告されている。前者は系に Mb を含まない単純

溶液での試験、後者は Mb 存在下での試験であることから、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の蓄積は Mb の触媒効果によるものと推察されるが、これらを比較検討した例は知られていない。MetMb には NO が配位することが ESR での観察結果からわかっており、NO-MetMb とそのラジカル状態が報告されている (Skibsted 2011)。NO-MetMb とそのラジカル種はさらに還元されて NOMb へと変化する。なお、NOMb 形成時の NO-MetMb の生成は確認例が複数あるものの、退色時に NO-MetMb が形成されるかどうかについては現在もわかっていない。以上のように NO-MetMb を経由する発色経路はオキシ型のヘム色素が存在する挽き肉製品で見られる。この現象は挽き肉へ発色剤を添加した直後の褐色化ならびにその塩漬肉を真空包装などで嫌気条件に置いた後の赤色発現として観察される。また、カッターキュアリングのように塩漬期間を置かない場合は加熱直前まで発色による赤色化は観察されず、加熱時に赤色化が進行する。これは加熱時にタンパク質の変性時に SH 基がタンパク質構造の表面に出てくることで食肉中の還元作用が一時的に高まるからであろうと言われているが、詳細については良く知られていない。また、加熱時に発色する場合に Mb の変性と NO の配位との時間的順序について、Sakata と Nagata (1991) は変性後に NO が配位するという説を提唱している。単一肉塊製品の場合には肉中に酸素がないため、DeoMb 溶液に NO ガスを通気すると NOMb を形成することが一般的に知られていることから、DeoMb に NO が直接配位するという説が濃厚だと考えられる。

NO<sub>2</sub>はその高い反応性から異種タンパク質との反応やヘッドスペースへの放散によって、添加された NO<sub>2</sub>は徐々に発色に寄与できる状態ではなくなるか、もしくは NO<sub>2</sub>そのものの含量が徐々に減少していく。食肉製品の保存中、光誘導退色に伴って NO<sub>2</sub>が減少することが知られている (Carballo ら 1991, Møller ら 2000, Perlo ら 1995)。このような現象に対し、非加熱の食肉製品においては、Alley ら (1992) は硝酸根を添加することによってソーセージの店頭での色調の安定剤として働くことを示唆している。これは硝酸根が亜硝酸根のリザーバーとして働いているために起こると推察されている。加熱食肉製品においては硝酸還元菌が加熱によって死滅していると考えられ、2 次汚染がない限り非加熱食肉製品に見られる NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の NO<sub>2</sub>補填効果は期待できないと考えられている (Price と Schweigert 1987)。実際の食肉製品に近い系で硝酸塩添加の意義を検証した例では、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>は色調の安定性や残存亜硝酸根の減少割合になんら影響を及ぼさないとする報告例が

多い (Marco ら 2006, Perez-Rodriguez ら 1996, 木村 1988)。一方で Cassens ら (1979) は硝酸塩の添加量が製品中の  $\text{NO}_2^-$  の減少速度に影響を与えることを示している他、Ockerman と Kuo (1982) は加熱塩漬食肉製品における  $\text{NO}_3^-$  の影響を調べ、亜硝酸塩と共に硝酸塩を添加した試験区で亜硝酸塩単独で塩漬した試験区よりも  $\text{NO}_2^-$  の残存量の減少が抑えられたことを観察している。これらの異なる結論を与えた 2 つの試験系の違いは NaAsA の添加の有無だった。また、3.1 項で述べた通り、現在でも“非効率的で無意味”なはずの硝酸塩を添加した製品が市場に存在する。硝酸塩を加えるのは昔ながらの伝統的手法に則っているのか、それとも合理的理由があるのかは不明である。

#### 4. 発色色素の安定性に影響する要因

発色色素とは、Mb あるいは Hb に酸素の代わりに NO が配位した NOMb あるいは NOHb を指す (図 6)。この未変性状態では NO が 1 分子配位している状態だが、加熱塩漬食肉製品ではグロビンタンパク部分が変性し、ヘムが単独で解離しているという見方が主流であり、ヘムの片側あるいは両側に NO が結合している状態が想定されているが、現在のところ加熱変性後の遊離ヘムに対する NO の配位構造に結論が出ていない。なお、加熱変性後のニトロシルヘム色素に対して通例としてニトロソヘモクロムあるいはニトロシルヘモクロムという呼称が用いられているが、ヘモクロムとは配位子が両側に配位している構造を指し、構造を限定する呼称である。

未変性ミオグロビンに対して NO は酸素の 300 万倍の親和性を持って結合する (Arnold と Bohle 1996)。この強力な親和性によって、NO は加熱後もヘムから解離することなく安定な赤色を保ち続ける。未変性状態の色調を塩漬肉色 (cured meat color; CMC、赤色)、加熱後の色調を加熱塩漬肉色 (cooked cured meat color; CCMC、桃赤色) と呼ぶ。これらの赤色は冷暗所でかつ酸素を遮断すると数年間安定に保たれる場合があるが、酸素に曝露した条件で光を照射すると 1 時間程度で退色してしまう。これに対し、一般的に精肉の場合は酸素や光によって退色が著しく促進されるということはない。光退色の一般例として、Shahidi と Pegg (1991) が酸素バリア性のない包材で包装した加熱塩漬食肉製品の  $a^*$  (赤色度) の推移を図 17 に示した。酸素や光は加熱変性 NOMb の安定性を著しく下げ、NO が Mb から解離して退色に至る。これらの要素は両方が揃って初めて劇的な退色促進効果を呈

する。例えば酸素を遮断して光照射を行った場合、あるいは光を遮断して酸素に曝露した場合には退色はわずかに進行するのみである。

製品系における酸素濃度は包材の酸素透過度に依存しているため、包材の酸素透過度に注目した研究は数多く行われており、酸素透過度の増大と比例して退色が進行することは多くの研究者が報告している通りである (Acton ら 1986, Andersen ら 1988, Li ら 2012, Møller ら 2002, Møller ら 2000, 里見ら 1988)。光の有無による退色の進行の差は歴然であり、その強度依存的に退色が進行することは論をまたない。一方、退色を特異的に誘引する波長については種々の説があり決着はついていないが、一般的に紫外線に弱いと言われている。以上の通り、発色色素に係る因子として、光と酸素がよく知られている一方、Mb の NO 誘導体としての安定性については検討例が極めて少ない。

NOMb を Mb の NO 誘導体としてみた時、Mb の配位結合安定性は NOMb の安定性を左右する重要な要因だと考えられた。OxyMb は、その配位子である酸素の交換頻度に応じて酸化が進むことが知られており、四釜ら (2001) は Mb の自動酸化速度が pH の影響を受けることを報告している。また、酸化速度の増大という観点では、Mb の配位子安定性は温度にも影響を受ける (Gutzke と Trout 2002)。

なお、このように配位子が酸素の場合は配位子が解離した場合に自動酸化という現象として観察できる一方で、CO や NO は交換しても見かけ上の変化はない。このような配位子では、他の競合分子との置換という形でのみ観察される。この競合分子による配位子の置換は、その濃度が高いほど起こりやすくなることは自明だが Mb の NO 誘導体としての安定性に関する知見は見られない。これは NOMb 中の NO が酸素と結合するなど反応が単純ではないためだと考えられる。以上より、Mb の配位子安定性の指標は、モデル溶液など還元力を加味する必要がない場合は自動酸化速度で、肉中 Mb など還元力を加味する必要がある場合は NO 以外のモデル分子を用いるのが望ましいと考えられる。

## 5. 本研究の目的

塩漬食肉製品の色調安定性は市場価値に大きく影響する性質であり、大筋については理解されつつある一方で、その影響因子や制御方法については不明瞭な点も数多く残されていることを示してきた。塩漬食肉製品における発色は換言すれば NOMb の形成であって、その色調安定性は NOMb の安定性といえる。そこで



本研究ではリガンドである NO の生成と、Mb の配位結合安定性に焦点を当て、これまで明確になっていなかった以下の点について検討の必要があると考えた。

第一章では、塩漬食肉製品における NO の蓄積を確認したうえで、その蓄積に影響する因子について検討した。この検討にあたっては、蓄積された NO が酸素と反応する可能性があることから、残存する NO<sub>2</sub> や NO<sub>3</sub> の評価は反応終了後よりも反応中のリアルタイムの観察が出来ることが望ましかった。そこで、本検討に先立ってアスコルビン酸 Na (NaAsA)、NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub> をリアルタイムで観察しうる反応モデル系を検討した。さらに、NO が蓄積する量や推移を推定するためには、系内に流入する酸素量とその速度に加えて NO の供給量とその速度を考慮する必要があるが、NO 生成反応の律速因子についてはよく知られていない。NO の生成は還元基の有無によって異なる経路で生成されることが知られるため、還元分解経路と自己分解経路についてそれぞれその反応物質収支と律速因子、平衡の有無について検証することとした。

第二章では、塩漬食肉製品の色調本体である NOMb における NO-Mb 結合安定性に及ぼす外的要因の影響を Mb の配位結合安定性という観点から評価した。配位結合安定性を評価するにあたり、NO の反応性を考慮すると、酸素との反応性を有しないモデル分子を用いる必要があったことから、本研究では CO をモデル分子として外的条件が Mb の配位結合安定性に与える影響を評価した。また、NOMb に特徴的な性質として、光による不安定化が知られているものの、具体的にどのような波長の光が影響しているかはまだ明確にはなっていない。そこで、各波長の光に対する NOMb の安定性を評価した。また、加熱食肉製品においては、Mb 自体のリガンド結合力の熱安定性についても考慮する必要があると考えられた。そこで、Mb の加熱に伴う構造変化とリガンドとの結合安定性の変化について検討した。

以上の通り本研究は色調安定性に関与する要因として、NO の生成経路と蓄積条件、配位結合安定性に及ぼす外的要因、加熱が Mb の配位結合安定性に及ぼす影響について検討し、塩漬食肉製品の色調安定化に資することを目的とした。

## 第一章 NO の生成速度の制御に関する基礎的研究

### 序 論

食肉の色調安定性は、色調の中心的役割を担うヘム色素であるミオグロビン誘導体 (Mb 誘導体) の安定性によって決定する。Mb 誘導体の安定性は換言すれば Mb とリガンド分子との結合安定性であるため、リガンド分子の濃度を高めることで結合安定性が増すと考えられる。塩漬食肉製品の場合、Mb 誘導体はニトロシルミオグロビン (NOMb) であって、リガンド分子である一酸化窒素 (NO) は亜硝酸 Na ( $\text{NaNO}_2$ ) などのいわゆる発色剤が分解して生じる。一方、この NO 分子の製品系内での挙動については未だよく知られていない。そこで、塩漬食肉製品における NO の蓄積を確認したうえで、その蓄積に係る諸反応について検討することとした。本検討にあたっては蓄積された NO が酸素と反応する可能性があることから、残存する亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2$ ) や硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3$ ) の分解中の挙動はリアルタイムで観察出来ることが望ましかった。そこで、第一節でアスコルビン酸 Na ( $\text{NaAsA}$ )、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NO}_3$  をリアルタイムで観察しうる反応モデル系の確立を検討した。次に、第二節では NO の蓄積挙動を確認した。また、NO が蓄積する量や推移を推定するためには、系内に流入する酸素量とその速度に加えて NO の供給量とその速度を考慮する必要があるが、NO 生成反応の律速因子についてはよく知られていない。そこで、還元分解経路と自己分解経路についてそれぞれその反応物質収支と律速因子、平衡の有無について検証した。第三節では還元分解の反応収支と、これまでに律速因子としてその可能性を指摘されている  $\text{pH} \cdot \text{NaAsA}$  の経路速度に与える影響を、第四節では自己分解経路の反応収支と平衡の有無についてそれぞれ検討した。

## 第一節 発色剤挙動モデル試験の評価系確立

### 材料と方法

#### 1. Griess 法による $\text{NO}_2^-$ の定量

Sakata と Nagata (1991) の方法に従った。

##### NaAsA による Griess 法の定量阻害

NaAsA 1 mM を最大として定量用溶液中 NaAsA 濃度を順次 2 倍希釈して 512 倍希釈まで調整して NaAsA 共存下での定量値の変化を観察した。

ナフチルエチレンジアミン添加前、同添加後、スルファニルアミド添加後にそれぞれ NaAsA を加えた 3 試験区と、NaAsA を加えない対照区で  $\text{NO}_2^-$  を定量、比較した。

#### 2. 2,3-ジアミノナフタレン (DAN) 蛍光法による $\text{NO}_2^-$ の定量

向日ら (1991) の方法に従い、DAN 試薬、NaOH 添加後に蛍光分光光度計を用いて励起波長 380 nm で蛍光波長 407 nm を測定した。

0、2、4、6、8、10、20 および 40  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$  溶液で検量線を作成した。

##### NaAsA による DAN 蛍光法の定量阻害

DAN 試薬添加前、同添加後、NaOH 添加後にそれぞれ NaAsA を加えた 3 試験区と、NaAsA を加えない対照区で  $\text{NO}_2^-$  を定量、比較した。

#### 3. 自己吸光法による $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、AsA の定量

##### $\text{NO}_2^-$ の定量

pH 2.5、3.0、3.5 (クエン酸緩衝液)、4.0、4.5、5.0、5.5 (酢酸緩衝液) および 7.0 (MES 緩衝液) の緩衝液に  $\text{NaNO}_2$  を 33 mM となるよう加え、250~450 nm の吸光スペクトルを紫外可視分光光度計で観察した。

検量線は 0、2、4、6、8、10、20、40、60、80 および 100 mM の  $\text{NaNO}_2$  溶液の 325 nm における吸光度を測定して算定した。

##### $\text{NO}_3^-$ の定量

$\text{KNO}_3$  は吸湿しやすいことから、70 °C で 2 時間以上乾燥した後に用いた。

検量線は 0、20、40、60、80 および 100 mM の  $\text{KNO}_3$  溶液の 302 nm における吸光度を測定して算定した。

##### AsA の定量

0、10、20、30、40、50、100、150、200 および 250  $\mu\text{M}$  の NaAsA 溶液の 266

nm における吸光度を測定して検量線を作成した。

#### Lanbert-Beer 則適用の確認

100 mM NaNO<sub>2</sub>、100 mM KNO<sub>3</sub> および 0.25 mM NaAsA の混合溶液の吸光スペクトルと、個々の溶液の吸光スペクトルを合算して得られる計算上の吸光スペクトルが合致するか確認した。

#### 4. 統計処理

すべての試験は n=3 で 2 回以上繰り返し実施し、同等の傾向が得られたことから代表として 1 回のテスト結果を示した。

多群間の比較は Sheffe 法を用いた多重比較検定で実施した。また、 $P < 0.05$  を有意とみなした。

#### 結果と考察

Griess 法による定量法は NaAsA 濃度依存的に NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の定量が阻害されることが明らかになった。モデル試験では定量溶液中に NaAsA が 3 ppm 存在すると定量値が有意に減少した ( $P < 0.05$ ) (図 1. 1. 1)。

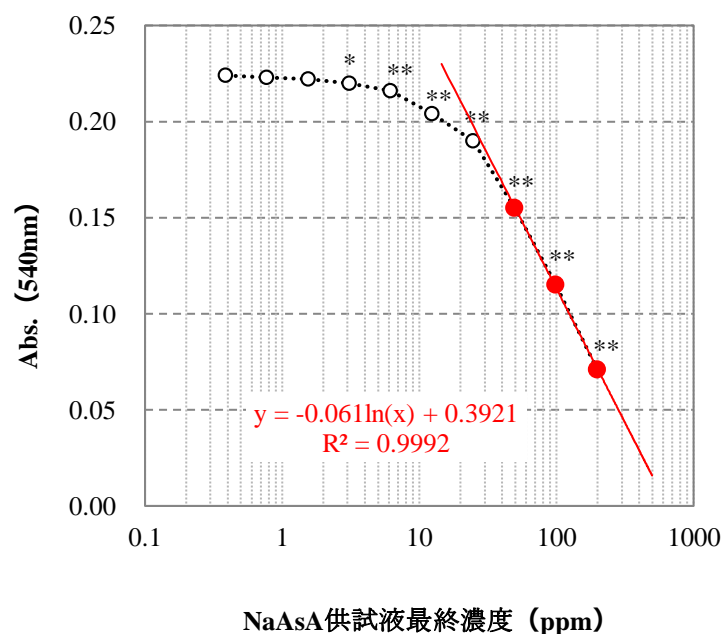


図 1. 1. 1. Griess 法による NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の定量値に与える NaAsA の影響。

NaAsA による定量誤差は試料中 3 ppm から見られた ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ). さらに NaAsA 濃度が 50 ppm を超えると指数関数的にアゾ色素の形成阻害が観察された (図中実線).

このような定量阻害は供試溶液中の NaAsA 濃度が 50 ppm 以上では NaAsA 濃度に対して指数関数的に見られた。一般的に、塩漬食肉製品に添加される NaAsA は 300~500 ppm 程度である。公定法では抽出時に 40 倍希釈されること、食肉製品中では同時に添加される NaNO<sub>2</sub> や食肉中の成分との反応、抽出過程での酸化などで還元状態の AsA 量はわずかであり、AsA による食肉製品中の NO<sub>2</sub> の定量阻害は考慮に値しないと考えられた。また、Mirna と Shütz の方法では 100 倍希釈であり、その影響はさらに限定的だと考えられた。しかしながら、本研究ではモデルでの高濃度の NaAsA も想定していることから、このような定量阻害が起こらないことが望ましかった。また、この定量阻害は、スルファニルアミド溶液添加前でもナフチレチレンジアミン溶液添加前でも起こるのに対し、ナフチルエチレンジアミン添加後には起こらなかったことから、ジアゾニウム塩の形成阻害ではなくジアゾカップリングの阻害、つまりアゾ色素の形成阻害によるものであると推察された (データ省略)。

DAN 蛍光法は主に生体内での NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の定量に用いられる方法である (向日ら 1991)。Griess 法で良好に定量できるのは約 0.1 ppm であるのに対し、0.0138 ppm でも良好な直線を引くことができ、Griess 法に比べて非常に感度が高かった (図 1. 1. 2)。

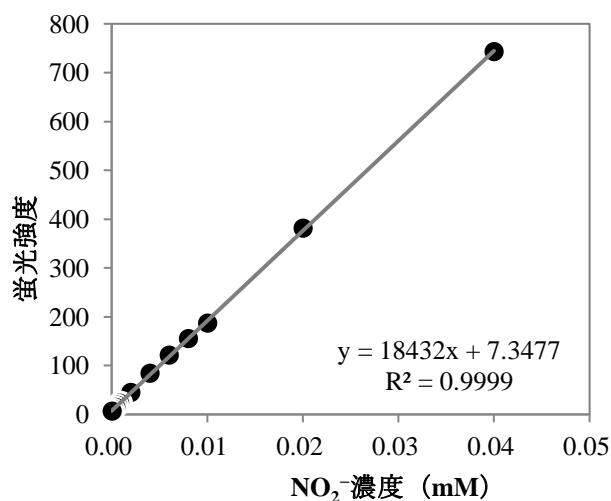


図 1. 1. 2. DAN 蛍光法での NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の検量線.

一方、DAN 蛍光法においても NaAsA の存在によって NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の定量値が減少し、NaAsA が定量阻害を起こすことが示された。DAN 試薬添加後から NaOH 添加前までの間に NaAsA を添加しても定量阻害を起こさなかったことから ( $P < 0.05$ ) (図 1.

1. 3)、(1) NaAsA が  $\text{NO}_2^-$  を分解している、(2) NaAsA によって DAN と  $\text{NO}_2^-$  の結合が阻害されているという仮説が立てられるが、このうち NaAsA による定量直前の  $\text{NO}_2^-$  の減少は Griess 法の検証時に否定されていることから、後者の理由によって定量阻害されている可能性が高いと考えられた。

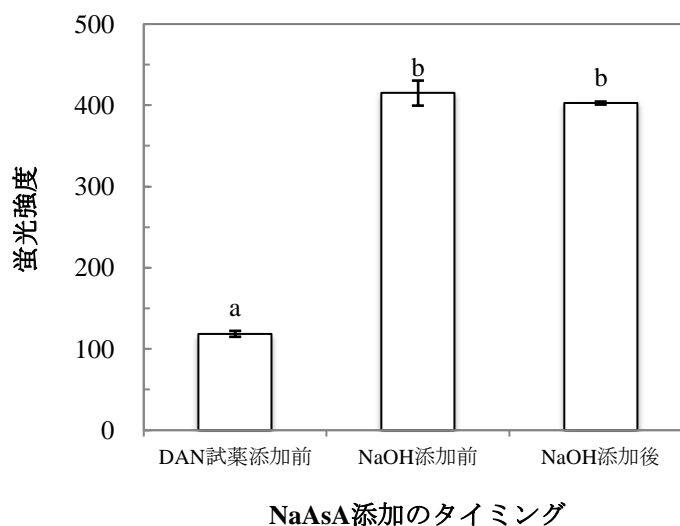


図 1. 1. 3. DAN 蛍光法による  $\text{NO}_2^-$  定量に与える NaAsA の影響.

異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ ).

$\text{NaNO}_2$ 、 $\text{KNO}_3$  および NaAsA のそれぞれの溶液は、吸光係数は高くないものの吸光特性を持っており (図 1. 1. 4)、その光学的性質は相互に干渉しないことから、発色剤の挙動を観察するモデル試験に適した観察方法と考えられた。 $\text{NaNO}_2$  は pH によって異なるスペクトルパターンを有し (図 1. 1. 5)、等電点よりも酸性側では非解離型の亜硝酸 ( $\text{HNO}_2$ ) の構成割合が、アルカリ側では解離型の亜硝酸根 ( $\text{NO}_2^-$ ) の構成割合がそれぞれ増加する。したがって本実験で観察された pH に伴うスペクトルパターンの変化は、 $\text{HNO}_2$  と  $\text{NO}_2^-$  が異なる吸光スペクトルを有し、pH に伴いその構成割合が変化したためと考えられた。このようなスペクトルの変化は谷垣ら (1989b) の報告と酷似していた。また、これらのスペクトルの等吸収率点は 325 nm に見られた。このことは  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{HNO}_2$  が互いに光学的に干渉せずランベルトベール則に従うことと、325 nm の吸光度を測定することでいかなる pH においても  $\text{HNO}_2$  と  $\text{NO}_2^-$  の合算の濃度 ( $\text{NO}_2^-$  の濃度) を算出可能であることを示している。このことは  $\text{NO}_2^-$  の分解速度を考察する上で都合が良かった。 $\text{KNO}_3$  は 302 nm に吸光を有し、かつ  $\text{HNO}_3$  でも同様のスペクトルを有することから  $\text{NO}_3^-$  の吸光特性と考えられた。

NaAsA はピークを 266 nm に有し、後述する通り還元型のみ吸光特性を有していたため、 $\text{NO}_2$  の分解に伴う濃度変化を観察する手段として好適だと考えられた。

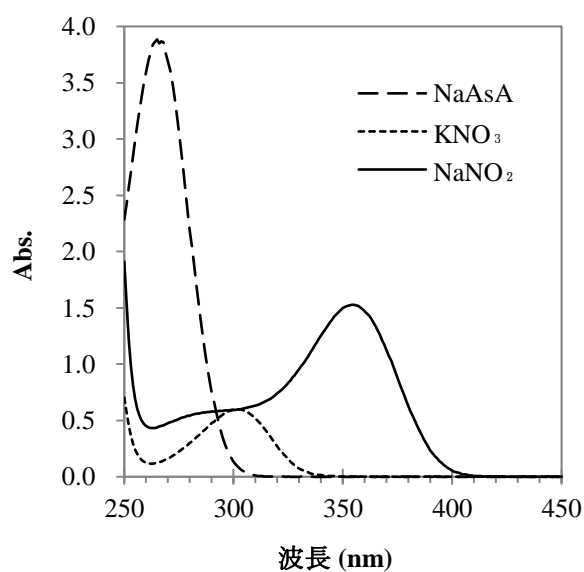


図 1. 1. 4.  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{NaAsA}$  の自己吸光.

$\text{NaNO}_2$  は  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{HNO}_2$  の等吸収率点である 325 nm,  $\text{KNO}_3$  は 302 nm,  $\text{NaAsA}$  は 266 nm の吸光度をそれぞれ定量に用いた。

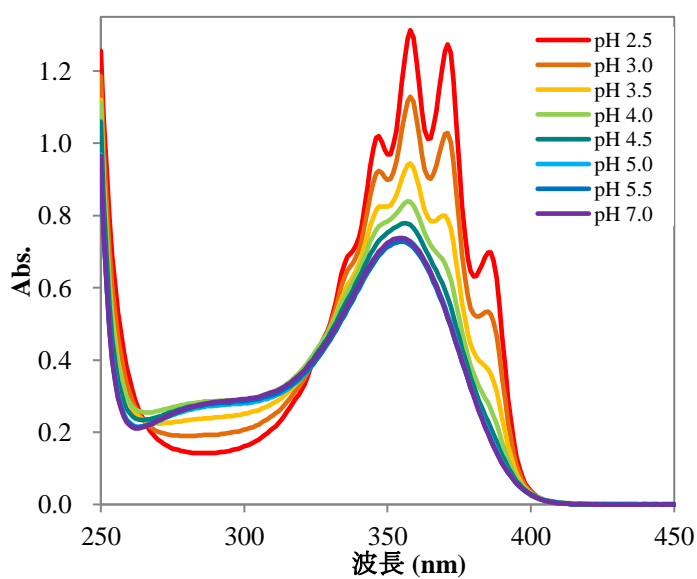


図 1. 1. 5. pH による  $\text{NaNO}_2$  のスペクトルパターンの変化.

自己吸光法において NO<sub>2</sub> はよく相関する検量線が得られた (図 1.1.6)。等吸収率点における NO<sub>2</sub> の検量線を以下に示す。この検量線は pH 2.5~10.0 で使用可能だった。

$$[\text{NO}_2 \text{ (mM)}] = 82.616 \times A_{324 \text{ nm}}$$

モデル溶液中では NO<sub>3</sub><sup>-</sup> と光学的に分離定量するため、302 nm における検量線が必要となる。pH 4.5 の時、NO<sub>2</sub> の 302 nm における検量線は以下の通りであった。

$$[\text{NO}_2 \text{ (mM)}] = 112.3 \times A_{302 \text{ nm (pH 4.5)}}$$

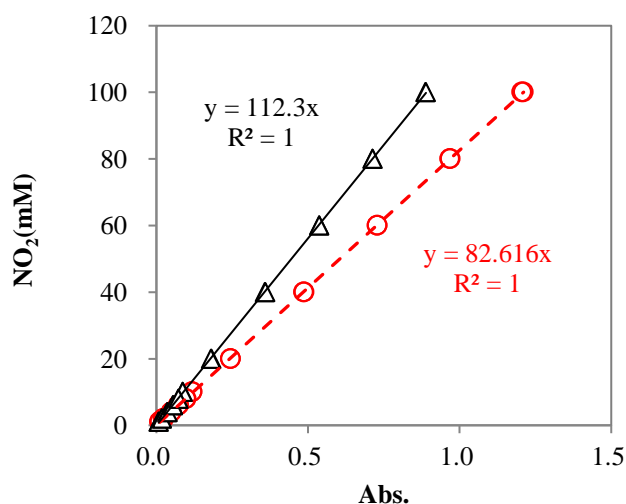


図 1.1.6. 自己吸光法による NO<sub>2</sub> の検量線.

○: 324 nm での算出結果; △: 302 nm での算出結果 (pH 4.5).

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の自己吸光法による 302 nm および 324 nm における検量線を以下に示す (図 1.1.7)。NO<sub>3</sub><sup>-</sup> は少なくとも pH 2.5~10.0 の範囲では吸光スペクトルに変化はなかった。検量線の相関係数は高かったものの、NO<sub>3</sub> の分子吸光係数は低く、定量法としては誤差が出やすいことが懸念される。

$$[\text{NO}_3 \text{ (mM)}] = 140.52 \times A_{302 \text{ nm}}$$

$$[\text{NO}_3 \text{ (mM)}] = 486.42 \times A_{324 \text{ nm}}$$



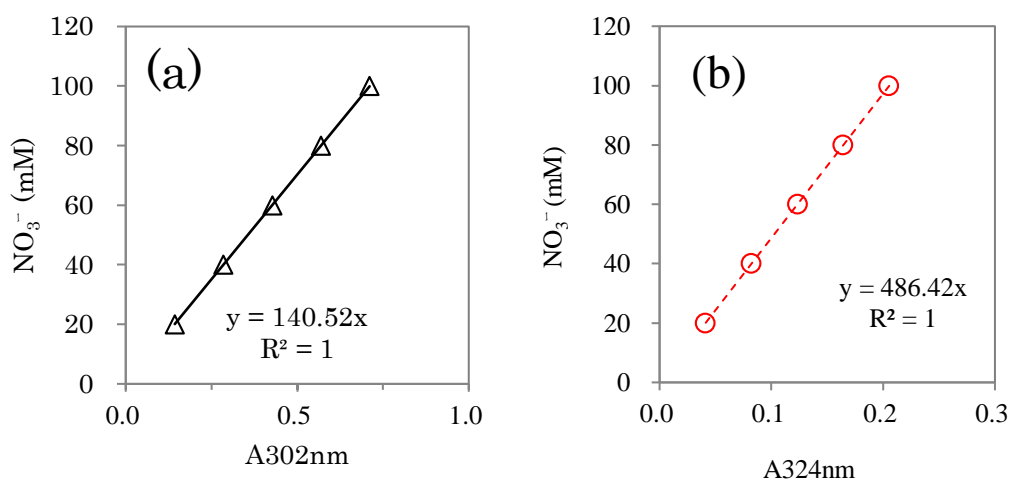


図 1.1.7. 自己吸光法による  $\text{NO}_3^-$  の検量線 (a) ならびに 324 nm の吸光度 (b).

NaAsA の検量線を以下に示す。NaAsA 溶液を酸化的条件に置くと吸光が消失したことから、吸光特性は還元型の AsA によるものと考えられた。したがって検量線は AsA で以下の通り示されると考えられた。

$$[\text{AsA (mM)}] = 0.069 \times A_{266 \text{ nm}}$$

AsA は  $\text{NO}_2$  や  $\text{NO}_3^-$  と比べると分子吸光係数が高く、反応速度が速い場合にその変化を捉えるのが困難になる可能性が考えられた。

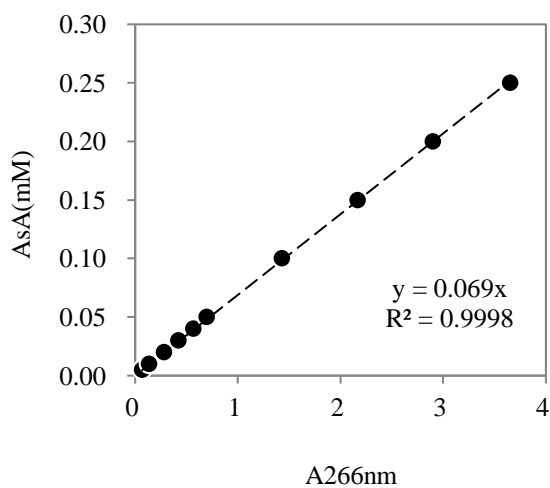


図 1.1.8. 自己吸光法による AsA の検量線.

## 小 括

NO<sub>2</sub> 分解反応モデル溶液中の NO<sub>2</sub> および NO<sub>3</sub> を評価する方法として、Griess 法、DAN 蛍光法は AsA による定量阻害が起こることから不適であると考えられた。これに対し、自己吸光を用いた定量方法は NO<sub>2</sub> ならびに NO<sub>3</sub><sup>-</sup>に加えて AsA も定量的に評価することが可能であった。すなわち、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>ならびに AsA は吸光ピークを持つ 302 nm ならびに 266 nm で、NO<sub>2</sub> は HNO<sub>2</sub> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の等吸収率点である 324 nm が定量に適していることを示した。これらの吸光は互いに干渉せず、ランベルトベール則に従った。これにより、反応中の濃度をリアルタイムに評価できることから、NO<sub>2</sub> 分解反応モデル溶液の NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、AsA の挙動を観察する手法として好適であると考えられた。

## 第二節 塩漬食肉製品における NO の蓄積

### 材料と方法

#### 1. ヘッドスペース中の NO 濃度測定

ウィンナー、ロースハム、ラックスハムについて市場製品を購入し、ヘッドスペースの NO 濃度をガステック検知管 (No. 10) を用いて測定した。測定に際しては、必要に応じて窒素ガスを用いて 100 倍希釈した。

#### 2. ガス発生の定性的評価

ツンベルグ管 2 本を微差圧計を介して接続し、30°C のウォーターバスで 30 分温度平衡させた後、30 °C 下で反応させた。この反応中のヘッドスペースの差圧を反応開始直後から 360 分まで記録してガス発生の有無を定性的に評価した。反応試験側のツンベルグ管の主室には 2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 4 mL と 10 mM NaNO<sub>2</sub> 0.5 mL を、副室に 1 M NaAsA 0.5 mL をそれぞれ配し、対照側のツンベルグ管の主室には 2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) と蒸留水 0.5 mL を、副室には 1 M NaAsA 0.5 mL をそれぞれ配した。

#### 3. NO の酸化における NO<sub>2</sub>、酸素、アスコルビン酸 Na の挙動観察

2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 2 容に対して 10 mM NaNO<sub>2</sub> を 1 容と、0、10、20、30、40 あるいは 100 mM NaAsA 溶液を 1 容加えたものを反応モデル溶液として、混合直後から AsA、NO<sub>2</sub> (HNO<sub>2</sub> と NO<sub>2</sub> の合算)、酸素のそれぞれの濃度を経時的に観察した。AsA と NO<sub>2</sub> 濃度は分光光度計にセットした 4 mL 容量のセル内で反応させて、それぞれ 265 nm および 324 nm の吸光度から濃度変化を評価した。反応溶液中の酸素濃度は反応モデル溶液の総量を 200 mL とし、溶存酸素濃度計を用いて評価した。

#### 4. 好気/嫌気条件での NO<sub>2</sub> の減少度の差異

反応モデル溶液に用いる酢酸緩衝液を室温で 30 分間窒素パージしてから反応開始したものを嫌気条件モデル溶液、酢酸緩衝液を窒素パージせずに室温に 60 分間放置してから反応開始したものを好気条件モデル溶液とした。反応モデル溶液の構成は 2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 2 容に対して 10 mM NaNO<sub>2</sub> を 1 容、1 M NaAsA 溶液を 1 容加えたものとした。これらは室温、解放条件で反応させ、反応開始から 10 分後の NO<sub>2</sub> 残存率を観察した。

## 5. 統計処理

酸素条件が  $\text{NO}_2$  の残存率に及ぼす影響は  $n=3$  で 2 回繰り返し実施し、試験は 2 回以上繰り返し実施し、同等の傾向が得られたことから代表として 1 回のテスト結果を平均値±標準偏差で示した。2 郡間の比較は Student の t 検定で解析した。また、 $P<0.05$  を有意とみなした。

それ以外の試験は 3 回以上繰り返して同等の結果が得られたことから代表となるデータを示した。

## 結果と考察

市販の塩漬食肉製品（加熱挽肉製品、加熱単味製品および非加熱単味製品）のヘッドスペース中  $\text{NO}$  濃度を測定した結果、いずれも 8,000 ppm 以上の濃度であり、 $\text{NO}_2$  の分解によって生じた  $\text{NO}$  がヘッドスペースに蓄積したものと考えられた。このようなヘッドスペースへの  $\text{NO}$  の蓄積は Emi-Miwa ら (1976) が  $^{15}\text{N}$  を用いた試験で確認しており、一致するものであった。

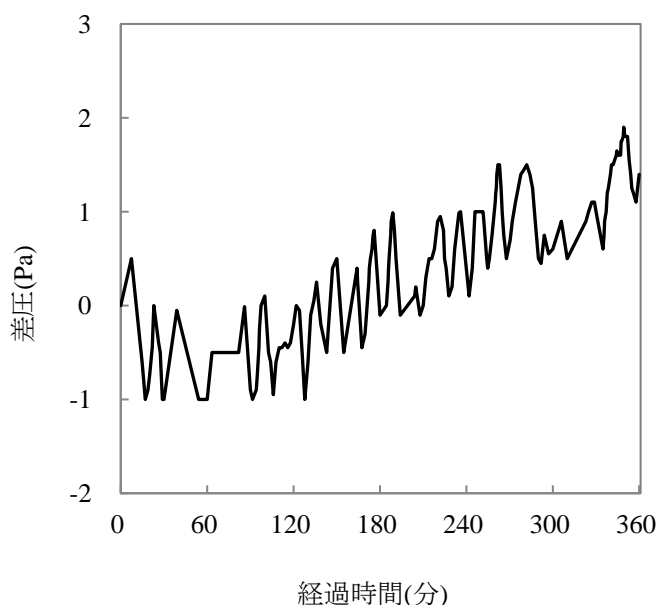


図 1. 2. 1. 還元分解モデル溶液ヘッドスペース中のガス圧の挙動.

図 1. 2. 1 に  $\text{NO}_2$  還元分解モデル反応溶液ヘッドスペースの圧力変化を示した。120 から 180 分後にかけて圧力の増加が開始した。この圧力変動は  $\text{NO}$  分圧増加によるものと考えられた。この圧力上昇が認められるまでに時間を要すること、ならびに圧力上昇が起こるまでに圧力低下が起こっていることは、以下の仮説によって

説明できる。つまり、反応によって生成される NO は液中の酸素を消費することによって (Çarkcioğlu ら 2013)、反応モデル溶液とヘッドスペースとの間に酸素圧力の平衡が崩れ、ヘッドスペース中酸素が液中に溶解しヘッドスペース中の圧力減少が起こると考えられた。次にヘッドスペース中の酸素が消費され尽くすと、ヘッドスペース中に NO が蓄積し、圧力の増加が観察されるようになるものと考えられた。

NO<sub>2</sub>還元分解モデル反応溶液では AsA が枯渇すると還元分解反応が停止する様子が認められた (図 1.2.2)。

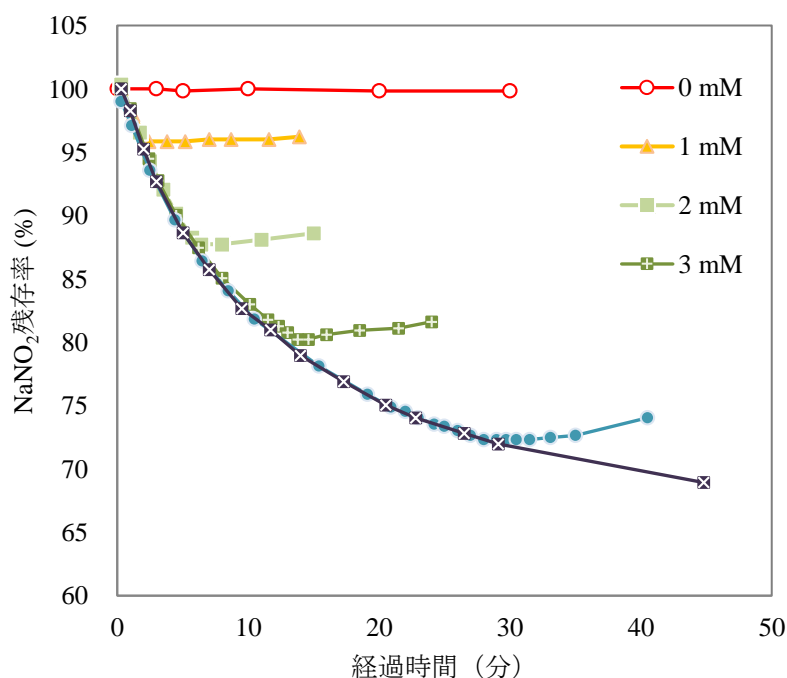


図 1.2.2. 還元分解モデル反応溶液中の NO<sub>2</sub> の挙動.

このとき AsA が枯渇するまでは反応速度が変化しなかった。また、反応停止後の NO<sub>2</sub> が増加していく様子が見られることは、液中酸素と反応して NO<sub>2</sub> を生じている可能性 (Kharitonov ら 1994, Pires ら 1994, 谷垣ら 1989a) を支持するものであって、従来のように食肉製品中の NO<sub>2</sub> の動態を Griess 法などで分析しても実際に即した NO<sub>2</sub> の挙動を評価できていないことを示唆している。従来、塩漬食肉製品において還元剤が介在して NO<sub>2</sub> が分解するとき、その反応速度に還元剤の濃度依存性があることが指摘されているが (Fox ら 1994)、これは NaAsA によって分解された量を評価したものと考えられた。このモデル反応溶液の観察においては開放系で実施したものの、酸素との反応を加味する必要があるため、反応速度を算出するに

あたっては閉鎖系で嫌氣的に実験する必要がある。また、この結果は酸素が流入する系内においては、酸素流入速度を NO 生成速度が上回らない限り、NO の蓄積は起こり得ないことを示している。

モデル反応溶液中の酸素はヘッドスペースの圧力上昇にタイムラグがあったのとは対照的に、反応開始直後から減少を見せた。図 1.2.3 に示す通り、酸素の挙動は NO<sub>2</sub> の挙動とよく相関していたが、推定される NO 分子の発生量と酸素の減少量は一致していなかった。NO と酸素との反応速度は本実験条件下での NO 生成速度と比較して速いものではない (Kharitonov ら 1994)、ヘッドスペースから酸素が溶け入るために遅く見える、酸素濃度計で NO を拾う (測定阻害する)、あるいはいずれかの仮説が組み合わさってこのような挙動を示したのではないかと考えられた。いずれにせよ、酸素濃度が反応直後から減少を示したことは還元分解によって生じる分子によって酸素が消費されていることを示すものであって、谷垣ら (1989b) が観察した通り NO<sub>2</sub> の還元分解によって生じる分子は NO と考えられた。

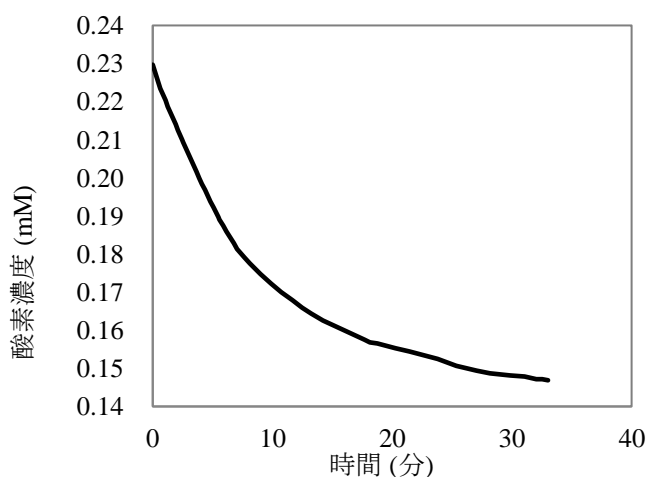


図 1.2.3. 還元分解モデル反応溶液中の酸素濃度の挙動。

Fox ら (1994) が指摘する通り、pH が低いほど反応速度は増加する様子が確認された (図 1.2.4)。pH の低下に伴う HNO<sub>2</sub> 割合の増加が関与していると考えられたが、この段階では不明瞭であった。pH 5.0 では減少が起こるまでにタイムラグがあり、これは前述の通り酸素の影響と考えられた。つまり、液中酸素を消費するまでは見かけ上の NO<sub>2</sub> 濃度の減少は観察できないことを示している。食肉の pH は通常 5.5~6.0 程度であり、好氣的条件下では還元剤が存在したとしても NO の蓄積は起こらないと考えられた。Çarkcioğlu ら (2013) が指摘する通り、塩漬食肉製品のうち

ソーセージなどの挽き肉製品では NO<sub>2</sub> の分解と共に塩漬肉中の酸素が消費され嫌氣的になったのちに NO の蓄積が起こるものと推定された。

反応の初期速度に注目すると、pH 4.5 以下では酸素の減少速度を NO<sub>2</sub> の減少速度が上回ったものの、pH 5.0 ではこれらの速度は同程度だった (図 1.2.5)。pH 5.5 では減少は鈍化し、NO<sub>2</sub> の減少は直線的な挙動を示さなかった (図 1.2.5 a)。pH 5.0 では液中の酸素の減少速度と NO<sub>2</sub> の減少速度が同程度だったが、pH 4.5 では酸素の減少速度は上がっているものの、その減少速度は NO<sub>2</sub> の約 1/3 であって (図 1.2.5. b)、短期的にみると NO と酸素が共存している蓋然性が高いと言える。つまり系内において、 $2\text{NO} + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NO}_2$  の反応速度を  $2\text{HNO}_2 + \text{AsA} \longrightarrow 2\text{NO} + \text{デヒドロAsA} + 2\text{H}_2\text{O}$  の反応速度が上回っている事に起因すると考えられた。pH 5.5 では逆に NO の発生速度が NO の酸化速度を下回ったために減少が見られなかったものと考えられた。したがって pH 5.0 では NO の生成速度が酸素の減少速度と釣り合ったものの、NO の酸化によって NO<sub>2</sub> ではなく NO<sub>3</sub> が生じている証拠とは言えないと考えられた。以上のことは、酸素が消費されるまでは NO の蓄積が起こらないという仮説を裏付けるものである。

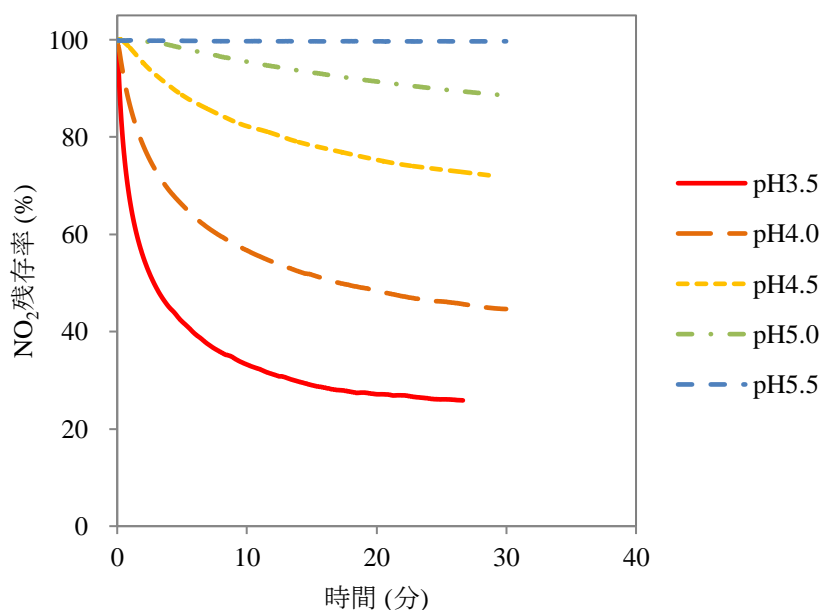


図 1.2.4. 還元分解反応速度と pH の関係。

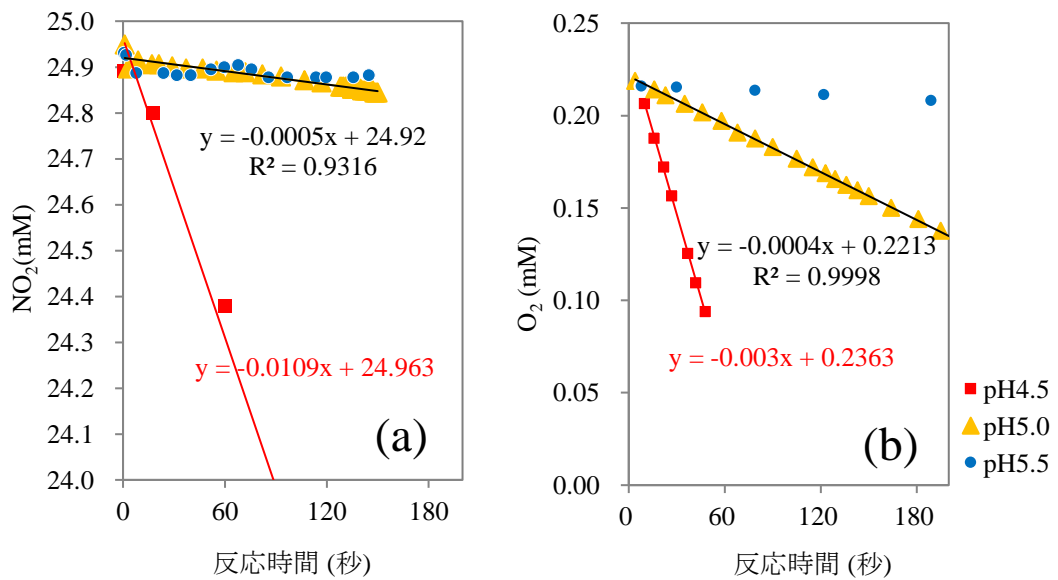


図 1.2.5. 還元分解反応初期の  $\text{NO}_2$  (a) ならびに酸素 (b) の減少速度.

さらに、図 1.2.6 に示す通り、好気条件下では嫌気条件下と比較して  $\text{NO}_2$  の減少が有意に抑制した ( $P < 0.05$ )。このことは嫌気条件下で  $\text{NO}$  の蓄積が起りやすいことを示している。

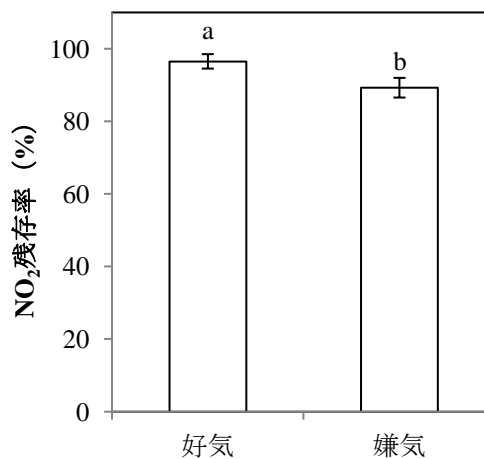


図 1.2.6. 酸素条件が  $\text{NO}_2$  の残存率に与える影響.

異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ ).

## 小 括

食肉製品ヘッドスペース中で  $\text{NO}$  が蓄積していることを明らかにした。 $\text{NO}$  の蓄積の前に酸素が減少することが示された。 $\text{NO}_2$  の減少速度が低下すると反応



初期に  $\text{NO}_2$  の減少が見られないフェーズが観察されたこと、反応直後から液中酸素濃度の低下が見られたこと、還元分解反応終了後に  $\text{NO}_2$  が増加する傾向があることから、 $\text{NO}_2$  分解によって生成された  $\text{NO}$  は液中の酸素と反応して  $\text{NO}_2$  が生成される可能性がある。ヘッドスペースでの  $\text{NO}$  の蓄積にはさらに長い時間が必要であったことから、 $\text{NO}$  は気体中の酸素とも反応性を有していると考えられた。ただし、食肉製品ヘッドスペース中では  $\text{NO}_2$  ガスの蓄積を認めなかったことから、気体中では液中と異なる窒素酸化物を生成していると推察された。以上のことから、食肉製品において、 $\text{NO}_2$  は  $\text{NO}$  を生じることによって製品系内を嫌氣的に保つ効果があることが示唆された。また、 $\text{NOMb}$  は  $\text{Mb}$  に  $\text{NO}$  が配位結合した誘導体であることから、リガンドである  $\text{NO}$  濃度の増大は  $\text{Mb}$  の配位子としての安定性にも寄与するものと考えられたが、酸素との反応性の高さから、実際的な競合分子は酸素ではなく  $\text{OH}^-$  や  $\text{H}_2\text{O}$  であろうと推察された。

### 第三節 NO<sub>2</sub>の還元分解反応を律速する因子について

#### 材料と方法

##### 1. pH と反応速度の関係について

pH 3.5 (0.1 M クエン酸緩衝液)、4.0、4.5、5.0、5.5 (0.1 M 酢酸緩衝液) の pH 緩衝液 1.8 mL に 100 mM NaAsA 溶液 0.9 mL、100 mM NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.9 mL を加え 324 nm における吸光度から NO<sub>2</sub> の残存率を評価した。なお、10 mM NaNO<sub>2</sub> 溶液の吸光度を残存率 100% として計算した。

##### 2. 反応中の pH の変化

pH 1.8 の塩酸溶液ならびに 1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中で NO<sub>2</sub> の還元分解反応が進行した場合の pH の変化に与える影響を評価した。酸溶液、NaAsA 溶液、NaNO<sub>2</sub> 溶液それぞれ単独の経時変化と、混合した場合の pH の変化を pH 計で評価した。

##### 3. アスコルビン酸 Na の反応量の推定

2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 1.8 mL に対して 10 mM NaNO<sub>2</sub> を 0.9 mL、0、10、20、30、40 あるいは 100 mM NaAsA 溶液を 0.9 mL 加えたものを反応モデル溶液として、混合直後から還元型 AsA、NO<sub>2</sub> (HNO<sub>2</sub> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の合算) を経時的に観察した。

##### 4. HNO<sub>2</sub> 割合の評価方法～理論値との比較

###### 分光光学的に求める場合

HNO<sub>2</sub> 率は以下の通り算出した。

$$\text{HNO}_2 (\%) = \frac{\text{サンプルの } \frac{A_{388 \text{ nm}}}{A_{325 \text{ nm}}} - \text{HNO}_2 \text{ 0\% の時の } \frac{A_{388 \text{ nm}}}{A_{325 \text{ nm}}}}{\text{HNO}_2 \text{ 100\% の時の } \frac{A_{388 \text{ nm}}}{A_{325 \text{ nm}}} - \text{HNO}_2 \text{ 0\% の時の } \frac{A_{388 \text{ nm}}}{A_{325 \text{ nm}}}} \times 100$$

###### 理論値

$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} \frac{[A^-]}{[AH]}$  より、 $\text{HNO}_2 (\%) = \frac{1}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pKa})}}$  であり、pKa は 3.38 として求めた。

##### 5. 還元分解時の反応速度の比較

反応モデル溶液の pH を 2 M 酢酸緩衝液によって 4.5 および 5.5 として、反

応速度を算出した。反応には 100 mM NaNO<sub>2</sub> 0.9 mL、40 mM NaAsA 0.9 mL を用い、緩衝液を 1.8 mL 加えてからスペクトルの変化を観察した。

反応速度は二次反応として算出した。

## 結果と考察

NO<sub>2</sub> 減少速度の pH 依存性に関して、第一章第二節に示した図 1.2.4 と同じ結果を観察した。つまり、pH が低いほど反応速度は増加した。これは全 NO<sub>2</sub> に占める HNO<sub>2</sub> 割合の増加、あるいは AsA の活性化などが関与していると考えられた。このことは、反応の進行に伴って pH が変化する場合、NO<sub>2</sub> の分解速度の評価が困難になることを示している。

これに対し HCl 溶液 (pH 1.8) 中では、反応の進行に伴う pH の増大が認められた (図 1.3.1 a)。これは以下に示す反応式の通り、反応溶液中で HNO<sub>2</sub> を供給するために H<sup>+</sup> を消費することに起因していると考えられた。なお、HNO<sub>2</sub> は AsA と反応して NO と H<sub>2</sub>O を生じる。



このことは、塩漬食肉製品中で NO<sub>2</sub> の消費に伴い pH が増加することが示唆された。食肉には pH 緩衝能があることから、反応モデル溶液でも pH 緩衝能が求められた。また、前述したとおり pH によって反応速度が変わることから、反応速度を割り出すにあたっては pH の変動が起こらないことは絶対条件であり pH 緩衝液を用いるべきだと考えられた。図 1.3.1 (b) に示す通り 1 M の pH 緩衝液 (pH 4.0) 中ではモデル反応液中の pH の経時変化が抑えられ、良好な結果が得られることが示された。1 M の緩衝液であれば pH 4.0 以上の反応速度では 90 分間は観察可能と考えられた。

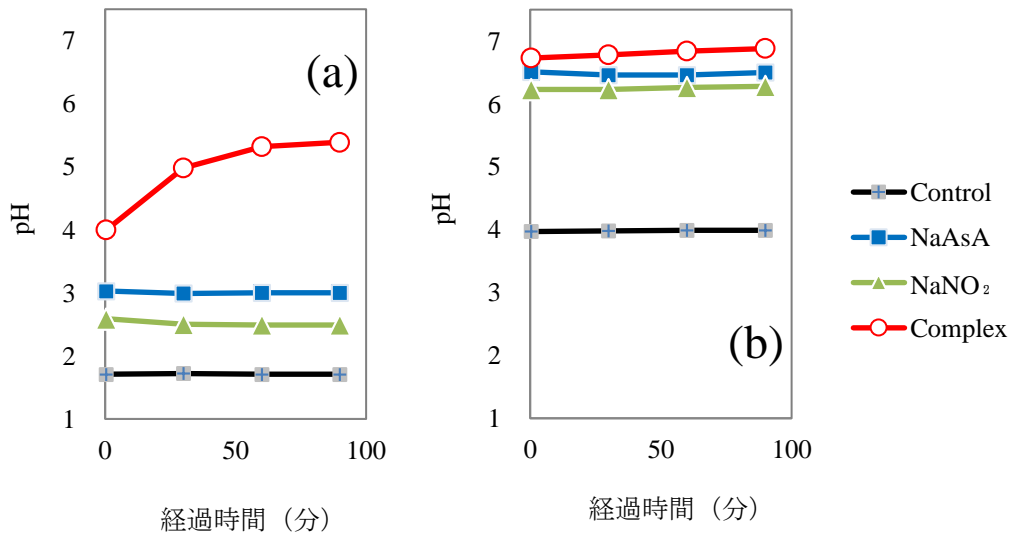


図 1.3.1. 反応の進行に伴う pH の増加.

反応溶媒はそれぞれ (a) HCl (pH 1.8), (b) 1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0).

NO<sub>2</sub>還元分解モデル反応溶液中の NO<sub>2</sub>ならびに AsA の挙動を図 1.3.2 に示した。AsA の減少速度は NO<sub>2</sub> の減少速度の約 1/2 倍であった。

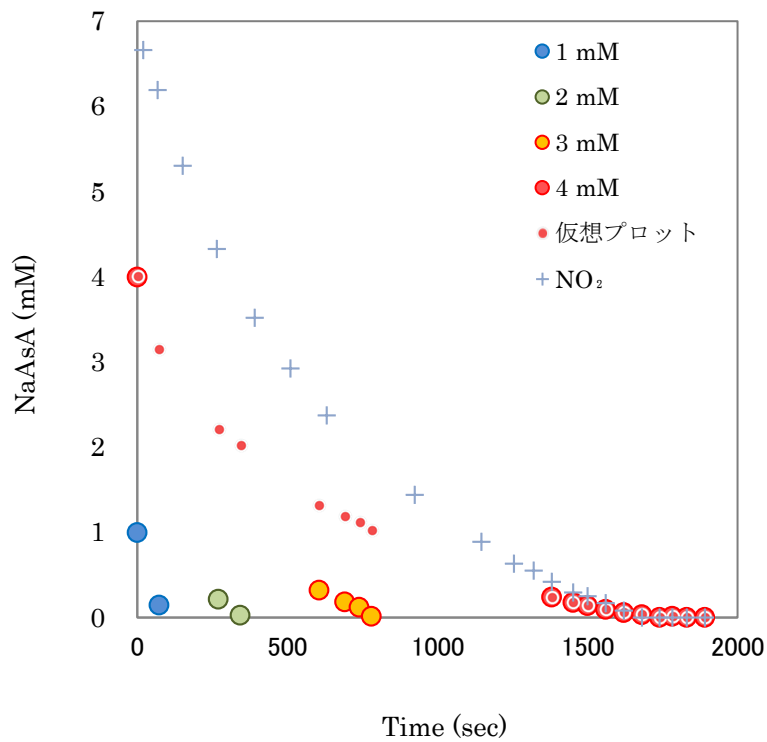


図 1.3.2. 還元分解モデル反応溶液中 AsA と NO<sub>2</sub> の挙動.

図 1. 2. 2 に示した通り、AsA がどのような濃度であっても NO<sub>2</sub> の減少速度が変わらず、このことは AsA もまたどのような濃度であっても反応時間に応じた濃度変化を示すと考えられた。この仮説に基づき、AsA 濃度 1、2 および 3 mM の各試験で得られた AsA の挙動を 4 mM の残存 NO<sub>2</sub> 濃度に対応させてプロットしたのが仮想プロットであり、NO<sub>2</sub> の減少曲線の 1/2 の場所にプロットされることが分かる。以上のことから、NO<sub>2</sub> が 2 分子減少する間に AsA は 1 分子減少していることが示された。このことは従来の説 (Fox と Nicholas 1974) を裏付けるものだった。

pH によって NO<sub>2</sub> の還元分解反応速度が異なる一因として HNO<sub>2</sub> 濃度が推定された。HNO<sub>2</sub> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が異なる吸光スペクトル形状を持つことから、分光光学的にそれらの割合を算出する方法として、吸光度に変化のない部分と変化が大きい部分に着目することで精度よく HNO<sub>2</sub> 率を算出可能と考えられた。この結果 388 nm で変化率 580.8% と最も高く、等吸収率点である 325 nm で変化率は 0.3% となった (図 1. 3. 3)。HNO<sub>2</sub> 率は次の式によって導かれると考えられた：

$$\text{HNO}_2 (\%) = \frac{\text{サンプルの} \frac{A_{388 \text{ nm}}}{A_{325 \text{ nm}}} - 0.3635}{2.0268} \times 100$$

本算出式に従って、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と HNO<sub>2</sub> 比を算出したのが図 1. 3. 4 である。pH をアルカリから酸性に振った場合でも、酸性からアルカリに振った場合でも、最終 pH に対応する波形が得られた (結果省略)。このことから、HNO<sub>2</sub> の生成は可逆的かつ瞬間的に平衡する反応であって、吸光度から pKa を導くことができると考えられた。亜硝酸の pKa は報告者によって異なるが、今回吸光度から算出された pKa は約 2.8 であり、既報の pKa 3.3 (Pires ら 1994) とは異なる値を示した。なお、pH を極端に下げると自己分解が進むことから (谷垣ら 1989b)、溶液調製から観察までの数秒間にも吸光度は変化したものと考えられた。

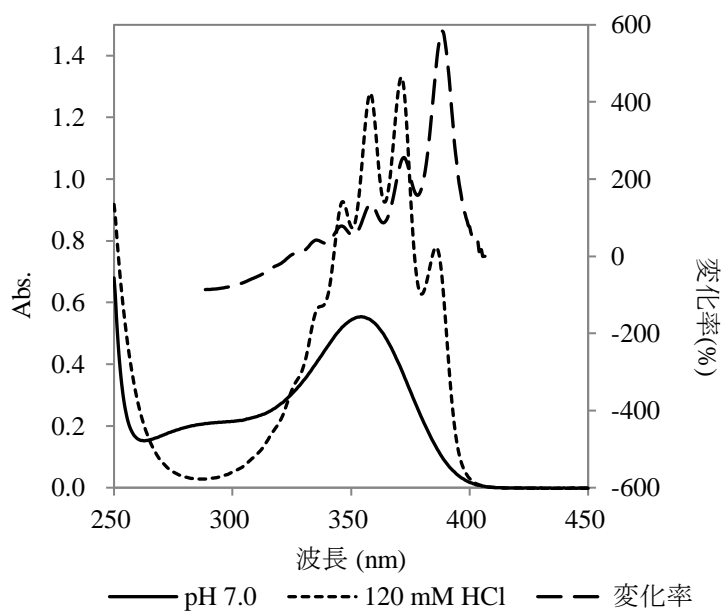


図 1. 3. 3.  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{HNO}_2$  のスペクトルの差異.

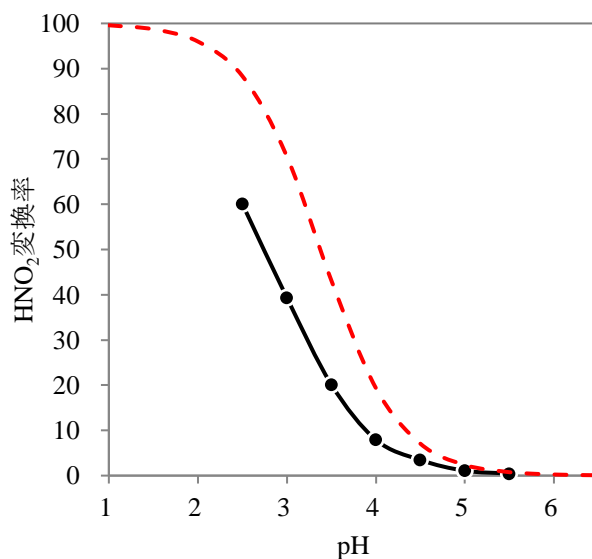


図 1. 3. 4.  $\text{HNO}_2$  率理論値と吸光スペクトルから算出した  $\text{HNO}_2$  率.

破線:  $\text{pKa}$  3.3 としたときの理論値, 実線黒丸: 吸光スペクトルから算出した  $\text{HNO}_2$  率.

既に図 1. 2. 2. で示唆している通り、NO<sub>2</sub> の還元分解は AsA の濃度に依存せずに進行することが示唆されていたことから、反応は以下の通り 2 次反応として扱うことが出来ると推察された。



2 次反応と考えた時、反応速度係数  $k$  は以下によって導くことが出来る。

$$v = -\frac{1}{2} \cdot \frac{\Delta[\text{HNO}_2]}{\Delta t} = k[\text{HNO}_2]^2$$

$$[\text{HNO}_2]^{-2} d[\text{HNO}_2] = -2k dt$$

両辺を積分し、これを解くと

$$\int \left[ -\frac{1}{[\text{HNO}_2]^2} \right] d[\text{HNO}_2] = -2k \int dt$$

$$\frac{1}{[\text{HNO}_2]} - \frac{1}{[\text{HNO}_2]_0} = 2kt$$

つまり、以下の通り反応時間に対して残存 HNO<sub>2</sub> 濃度をプロットすることで反応速度定数  $k$  を導くことが出来る。

$$\frac{1}{[\text{HNO}_2]} = \frac{1}{[\text{HNO}_2]_0} + 2kt$$

NO<sub>2</sub> 還元分解モデル反応溶液では pH によって HNO<sub>2</sub> 減少速度は異なるが (図 1. 3. 5 a)、NO<sub>2</sub> の分解は 2 次反応として進行していることが示され、かつ反応速度係数  $k$  がほぼ同等の値を示したことから (図 1. 3. 5 b)、NO<sub>2</sub> 還元分解反応の律速因子は pH ではなく、HNO<sub>2</sub> 濃度であることが示された。

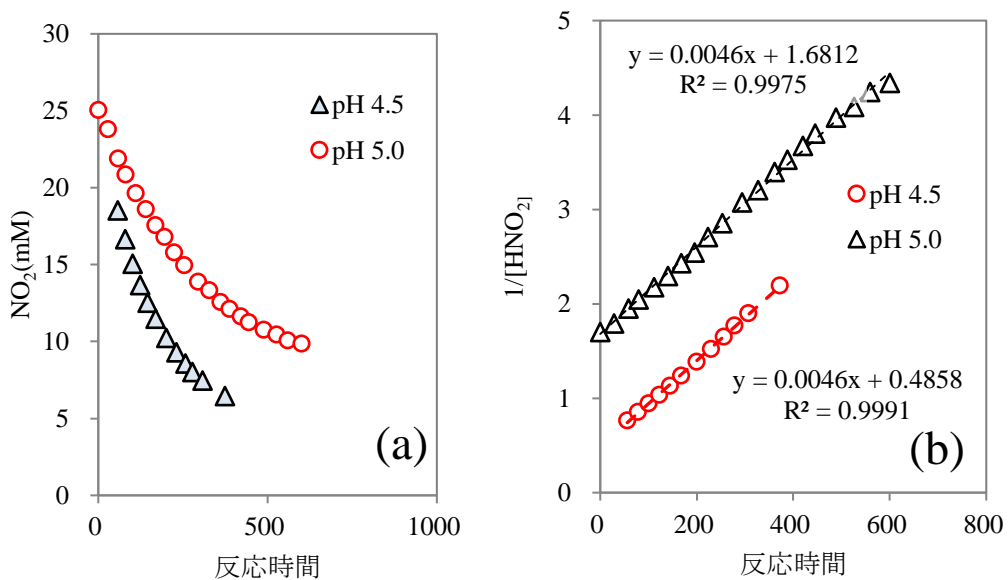


図 1.3.5. NO<sub>2</sub>還元分解の反応速度.

#### 小 括

NO<sub>2</sub> の還元分解は従来<sup>1)</sup>の報告と同様の反応収支であったが、AsA の濃度依存性がないことが明らかになった。また、従来<sup>1)</sup>の報告通り反応速度には pH 依存性が認められたが、この反応速度は HNO<sub>2</sub> 濃度に依存するものであり、pH そのものが反応を加速しないと考えられた。NO<sub>2</sub> の分解反応は HNO<sub>2</sub> を反応基質とした 2 次反応の挙動を示し、反応係数  $k$  は 0.0046 であった ( $t = \text{sec}$ )。



## 第四節 NO<sub>2</sub>の自己分解反応を律速する因子について

### 材料と方法

#### 1. 自己分解反応の進行に伴うスペクトル形状の変化

10 mM HCl と 100 mM NaNO<sub>2</sub> を含む溶液について、調製直後と 30 分後に 250~450 nm 領域での吸光スペクトルを測定した。

#### 2. 自己分解反応時の NO<sub>3</sub> の蓄積量の評価

##### 反応前後の差スペクトルから蓄積量と NO<sub>2</sub> の減少量を評価する方法

0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 2.7 mL に対し 0.9 mL の 100 mM NaNO<sub>2</sub> を加え、302 nm の吸光度と 324 nm の吸光度から、ランベルトベール則により、NO<sub>2</sub> の減少量と NO<sub>3</sub> の増加量を算出した。302 nm における NO<sub>2</sub> の分子吸光係数は  $\epsilon = 0.0089$ 、NO<sub>3</sub> の分子吸光係数は  $\epsilon = 0.0071$  として、324 nm における NO<sub>2</sub> の分子吸光係数は  $\epsilon = 0.0121$ 、NO<sub>3</sub> の分子吸光係数は  $\epsilon = 0.0021$  として計算した。なお、本分子吸光係数は本章第一節の測定結果に基づくものである。

##### 反応中の吸光度の変化から反応速度比を評価する方法

1 M HCl と 25 mM NaNO<sub>2</sub> を含む反応モデル溶液を  $22.5 \pm 0.5$  °C で反応させ、A<sub>324 nm</sub> と A<sub>302 nm</sub> を経時的に測定した。

NO<sub>2</sub> と NO<sub>3</sub> の検量線の傾きから、ある時間 T<sub>1</sub> では、

$$T_1 \left( \frac{A_{324 \text{ nm}}}{A_{302 \text{ nm}}} \right) = \frac{0.0121 \times [\text{NO}_2] + 0.0021 \times [\text{NO}_3^-]}{0.0089 \times [\text{NO}_2] + 0.0071 \times [\text{NO}_3^-]}$$

と表され、NO<sub>2</sub> 濃度について整理すると、

$$[\text{NO}_2] = \frac{0.0021 - 0.0071 \times T_1 \left( \frac{A_{324 \text{ nm}}}{A_{302 \text{ nm}}} \right)}{0.0089 \times T_1 \left( \frac{A_{324 \text{ nm}}}{A_{302 \text{ nm}}} \right) - 0.0121} \times [\text{NO}_3^-]$$

となる。ここで右辺の  $\frac{0.0021 - 0.0071 \times T_1 \left( \frac{A_{324 \text{ nm}}}{A_{302 \text{ nm}}} \right)}{0.0089 \times T_1 \left( \frac{A_{324 \text{ nm}}}{A_{302 \text{ nm}}} \right) - 0.0121}$  を K と置くと、K は時間 (t) を変

数とする一次方程式に帰着するため、Kt を t に対してプロットして、その傾きから反応速度比を求めた。

### 3. HNO<sub>3</sub> が NO<sub>2</sub> 分解速度に与える影響

1 M HNO<sub>3</sub> 溶液と 1 M HCl 溶液を混合して (全酸濃度 1 M)、その溶液の pH を測定した。混合比率は HCl 0、20、40、60、80 および 100% とした。次に、全酸濃度 1 M の溶液で HNO<sub>3</sub> 存在比を 0、0.25、2.5 および 25% として、NO<sub>2</sub> の挙動を 371 nm の挙動から観察した。

### 4. 還元剤存在下における HNO<sub>3</sub> が NO<sub>2</sub> 分解速度に与える影響

20 mM NaNO<sub>2</sub>、50 mM NaAsA、1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)、0、10、20 および 30 mM の KNO<sub>3</sub> 存在下で 324 nm の吸光度の変化から NO<sub>2</sub> の減少量を評価した。

## 結果と考察

自己分解反応前後の吸光度の変化を表 1.4.1 に示す。この結果から、HNO<sub>2</sub> の自己分解反応において NO<sub>2</sub> は 1.57 mM 減少するときに NO<sub>3</sub> は 1.04 mM 増加していると算出された。さらに図 1.4.1 に示す通り、NO<sub>2</sub> の減少速度と NO<sub>3</sub> の増加速度の反応速度比は -1.4919 であり、およそ -1.5 となった。つまり、収支量の結果と同様に、3 分子の NO<sub>2</sub> 消失に伴い、2 分子の NO<sub>3</sub> が生成されることが示唆された。これらの結果は NO<sub>2</sub> と NO<sub>3</sub> の反応収支は 2:3 であって、以下の反応式で示される従来の想定 (Fox と Nicholas 1974, Honikel 2008) とは異なると考えられた。



表 1.4.1. 自己分解反応の反応前後の吸光度比較

	反応前	反応後	差分 1 <sup>※1</sup>	予測 <sup>※2</sup>	差分 2 <sup>※3</sup>
A302 nm	0.205	0.200	—	0.193	0.007
A324 nm	0.306	0.287	0.019	—	—

※1 差分 1 …反応前吸光度-反応後吸光度の算出値。

※2 予測 …NO<sub>2</sub> 単独の場合の 302 nm の予想吸光度を 324 nm 吸光度から算出。

※3 差分 2 …反応後 302 nm 吸光度-予測 302 nm 吸光度の算出値

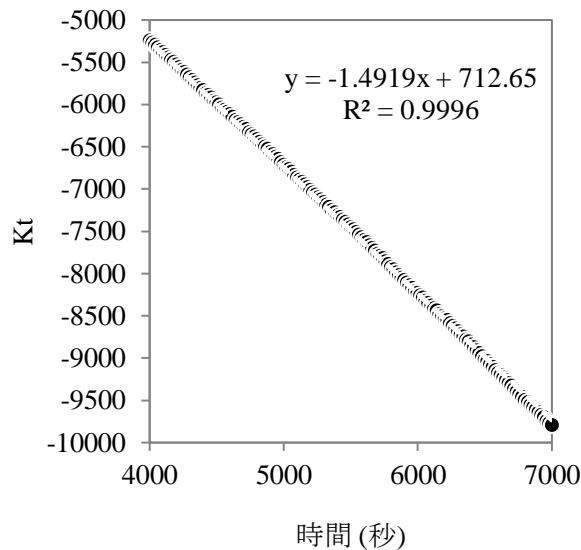


図 1.4.1. 自己分解の反応速度比.

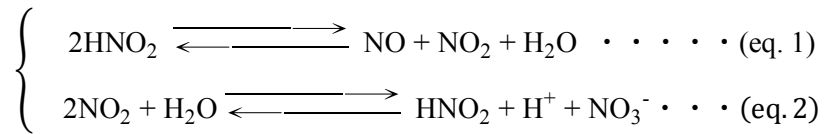
$\text{NO}_3^-$ が  $\text{NO}_2$  の自己分解反応速度に与える影響を評価する目的で全酸濃度を一定とした溶液における pH ならびに  $\text{HNO}_2$  率を pKa 2.8 で算出した (表 1.4.2)。予想  $\text{HNO}_2$  率は  $\text{HNO}_3$  率の高い溶液でやや低くなる傾向があったが、ほぼ同等であった。また、谷垣ら (1989b) も同様の試験において、pH が十分に低いとき pH の影響は無視できることを確かめている。これらのことから、全酸濃度に対する  $\text{NO}_3^-$  の全構成割合領域において  $\text{NO}_2$  の減少速度を比較可能であると考えられた。

表 1.4.2. 全酸濃度一定とした時の試験溶液の pH

$\text{HNO}_3$	HCl	pH	$\text{HNO}_2$ 率 (%) <sup>※1</sup>
100	0	0.04	99.83
80	20	0.00	99.84
60	40	-0.03	99.85
40	60	-0.05	99.86
20	80	-0.07	99.87
0	100	-0.09	99.87

※1 予想  $\text{HNO}_2$  率…pKa 2.8 で算出

全酸濃度一定下で、 $\text{HNO}_3$  の構成割合が高くなるほど自己分解反応が抑制されることが示された (図 1.4.2)。このことは  $\text{HNO}_2$  の自己分解が平衡を持つ反応であることを示しており、Denbigh と Prince (1947) や谷垣ら (1989b) が説明する通り、



を素反応として持つ以下の経路をとっていると考えられ、素反応のうち eq. 2 が律速反応と考えられた。

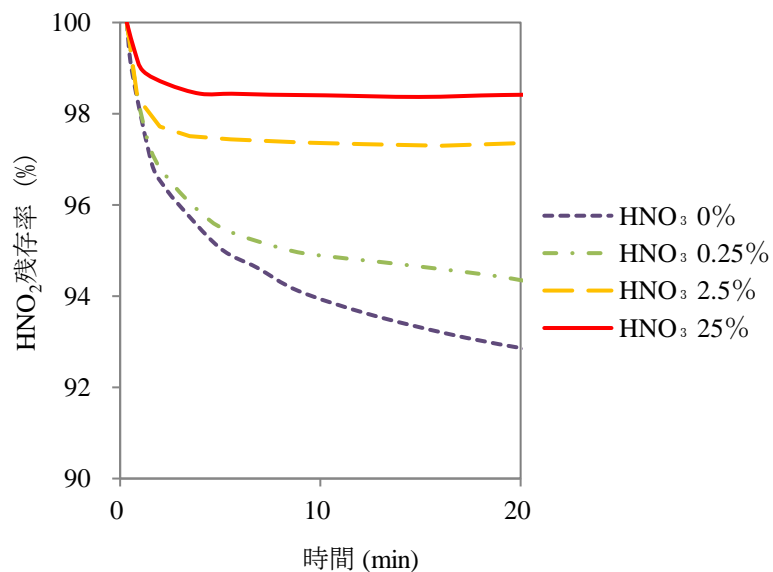
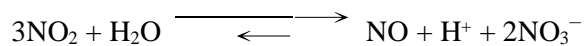


図 1.4.2. 自己分解反応速度に及ぼす NO<sub>3</sub> の影響.

このような NO<sub>3</sub> による NO<sub>2</sub> の分解抑制的な働きは、還元剤存在下では確認できなかった (図 1.4.3)。これは還元分解の方が自己分解に比べて反応速度が圧倒的に高いため、NO<sub>3</sub> が NO<sub>2</sub> の減少速度を律速する効果を観察出来なくなるものと考えられた。このことは食肉製品であっても同様と考えられ、NaAsA が添加されていないモデル試験では NO<sub>3</sub> の効果について報告例 (Ockerman と Kuo 1982) がある一方で、NaAsA が添加されたモデル試験で NO<sub>3</sub> が NO<sub>2</sub> の分解に影響したという報告がないことと一致する。

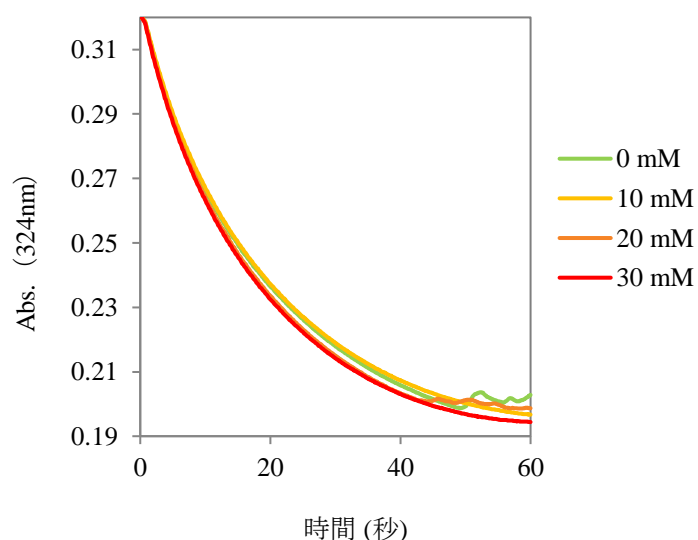


図 1.4.3. 還元剤存在下での  $\text{NO}_2$  分解に与える  $\text{NO}_3^-$  の影響.

#### 小 括

全酸中の  $\text{HNO}_3$  の構成比に影響を受けることから、 $\text{NO}_2$  の自己分解反応は可逆的に進行することを確認した。塩漬食肉製品に硝酸塩を加える場合があるが、一般的に硝酸塩は硝酸還元菌による還元を受けない限り発色に寄与することがないため、加熱塩漬食肉製品においては添加意義が不明瞭であった。今回の結果は加熱塩漬食肉製品において硝酸塩が自己分解反応を抑制する可能性を示唆したが、自己分解は還元分解の反応速度と比較してはるかに遅いため、還元剤を入れることによって硝酸塩を添加することによる  $\text{NO}_2$  の分解抑制効果はほぼ観察できなくなった。食肉にも  $\text{SH}$  基などの還元基が存在することから、加熱塩漬食肉製品において硝酸塩が化学平衡によって  $\text{NO}_2$  の分解を抑制するのは極めて限定的だと推察された。

## 第二章 リガンド結合安定性に影響する各種因子に関する研究 序 論

第一章では、塩漬食肉製品の色調本体であるニトロシルミオグロビン (NOMb) がヘム色素誘導体であることに着目し、リガンドである NO の挙動を示した。第二章ではリガンド結合安定性を高める条件として、外的条件と、ミオグロビン (Mb) 分子自体の性質に注目した。

Mb の配位結合の安定性は結合するリガンドの濃度だけでなく、外的要件によって影響を受ける。一方、それらの影響を食肉の色調安定性という観点から Mb 分子に注目して論じられた、つまり、NO-Mb 結合安定性に及ぼす外的要因の影響を Mb の配位結合安定性という観点から評価された例は少ない。このような報告例がない背景として、NOMb 中の NO が酸素と結合するなど反応が単純ではないことが挙げられる。Mb の配位結合安定性に影響する因子を NOMb を用いて直接的に評価するためには、NO と反応性を持たない CO などの競合分子を用いて検証する必要があるが、嫌気的な実験条件を揃えること、溶液中 CO 濃度をモニタリングできることなど多くのハードルがあり試験は極めて困難である。そのため、Mb 配位安定性を評価するためには NO 以外のモデル分子を用いて評価する必要があると考えられる。そこで第一節では、酸化と関連せず単純に脱着し、かつ交換率を評価可能であることから、CO をモデル分子として外的条件が Mb の配位結合安定性に与える影響を評価した。

NOMb に特徴的な性質として、光と酸素によってその安定性が著しく損なわれることが知られている。酸素透過度の低い包材の選択や脱酸素剤の同梱によって塩漬食肉製品の色調に対する酸素の影響は抑えられる一方で、光に対しては具体的にどのような波長の光が影響しているかはまだ明確にはなっていない。この退色を誘導する光の波長を特定できれば、その波長の光の透過を阻害することで塩漬食肉製品の退色を防ぐことができると期待される。そこで第二節では、各波長の光に対する NOMb の挙動から、NOMb 感光性の波長依存性を評価した。

これまで Mb に配位結合するリガンドの濃度やそのリガンドと Mb との配位結合を阻害する要因について触れてきたが、Mb とリガンドとの結合安定性を検討する上で、Mb 自体のリガンド結合力についても考慮する必要がある。特に、塩漬や熱変性に伴う Mb のリガンド結合力の変化を検証することは、加工条件の制御によって製品の性質を修飾できる可能性があることから重要と考えられる。この

うち、加熱によって食肉の色調安定性が低下することは明確であって、その一因は Mb 分子の変性にあると推定されている。一方、Mb が加熱変性したときの配位結合安定性についてはよくわかっていない。以上の通り、加熱工程が Mb の性質に与える影響を明らかにするためには、Mb がどのように熱変性し、それがどのような影響を持つか検証する必要がある。そこで第三節では、Mb の加熱に伴う変化を食肉中ならびに単離した状態で比較することで、加熱に伴う色調安定性の低下について Mb の熱変性に伴う構造変化に着目して説明を与えることを試みた。

## 第一節 リガンド結合安定性に係る外的要因について

### 材料と方法

#### 1. 一酸化炭素ガス (CO) の調製

ギ酸 5 mL を濃硫酸 15 mL で脱水して得られる気体を水上置換で捕集して用いた。捕集した気体は酸素濃度系で酸素が 0.01% 未満であることを確認してから用いた。

#### 2. CO 処理肉の調製

プレート目 3 mm で二度挽きした牛アウトサイドフラットを真空包装後、袋内で 5 mm 程度に薄く伸ばし、ゴム板を張り付けた場所から CO ガスを袋内に注入し、30 分間 4 °C の冷蔵庫で静置した。

#### 3. pH に対する影響

##### 抽出率に与える影響

ホモジナイザーカップに CO 処理肉 5 g とあらかじめ 4 °C に冷却した 15 mL の緩衝液を加え、10,000 rpm で 2 分間ホモジナイズした。ホモジネートは遠沈管に移し入れて、10,000 ×g で 10 分間遠心分離したのち、上清を No. 6 のろ紙でろ過した。この抽出液 5 mL に対し、ヒドロサルファイト Na (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) を約 10 mg 加え、0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過後 350~750 nm の吸光スペクトルを測定した。抽出に用いた緩衝液は、pH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 および 10.5 に調製した。

抽出率は食肉中に含まれる 2 価の Mb に対するカルボキシ Mb (COMb) の抽出量で評価した。すなわち、以下の式にしたがって算出した。

$$\text{COMb 抽出率 (\%)} = \frac{\text{抽出液中 COMb (\%)}}{1 - \text{MetMb (\%)}}$$

COMb の濃度は、COMb のスペクトルから、カルボキシヘモグロビンの算出方法に従い、以下の通り算出した。

$$\text{COMb (\%)} = \frac{A_x (538 \text{ nm}/555 \text{ nm}) - A_0 (538 \text{ nm}/555 \text{ nm})}{A_{100} (538 \text{ nm}/555 \text{ nm}) - A_0 (538 \text{ nm}/555 \text{ nm})} \times 100$$



MetMb 率は Krzywicki (1982) の方法にしたがって CO 処理前の食肉の抽出液の吸光度から算出した。

$$\text{MetMb (\%)} = \left( 1.395 - \frac{A_{572 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}}}{A_{525 \text{ nm}} - A_{730 \text{ nm}}} \right) \times 100$$

#### COMb 溶液の安定性に与える影響

それぞれの pH で抽出された COMb 抽出溶液を還元剤の添加前または添加後に、室温で 60 分間保持し、COMb の残存率を確認した。

#### 4. 抽出温度が抽出率に与える影響

1、10、20 および 30 °C に保持した 0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.5) を用いて COMb を抽出後、抽出率を評価した。実験は 4 °C に保った冷蔵庫内で実施した。

#### 5. 抽出時の酸素条件が抽出率に与える影響

1 °C に保持した 0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.5) を 30 分間窒素パージし、またはしないで COMb の抽出に用いた。抽出された溶液は COMb の濃度を測定して抽出率を評価した。

#### 6. COMb 抽出液の光安定性について

1 °C に保持しながら 30 分以上窒素パージした 0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 8.5) を用い、COMb を抽出したのち、1 °C で暗所あるいは明所 (実験室内の照明: 1,000 lx) で保持し、COMb の保持率を経時的に評価した。

#### 7. 統計処理

すべての試験は 2 回以上繰り返し実施し、同等の傾向が得られたことから代表として 1 回のテスト結果を示した。各試験は n=3 以上で実施し、それらのデータは平均値±標準偏差で示した。

2 郡間の比較は Student の t 検定で、多郡間の比較は Sheffe 法を用いた多重比較検定で、それぞれ解析した。また、いずれの場合も  $P < 0.05$  を有意とみなした。

## 結果と考察

抽出溶媒の pH が COMb の抽出時の安定性に与える影響を図 2. 1. 1 に示した。COMb 抽出に用いる溶液の pH は 9.0 までは CO の解離を助長しないと考えられた一方で、pH 9.5 以上の緩衝液では CO の解離があり、定量的な抽出に用いるのには不向きであろうと考えられた。しかしながら、pH が高いほど溶液中の競合分子が減ることによってリガンド結合安定性が高まることが示唆されているため、高 pH で CO が解離したのは競合分子数とは別の原因がある可能性があった。

抽出時の安定性に対し、COMb 溶液の安定性は pH の増大に伴い増加した (図 2. 1. 2)。このことは四釜ら (2001) の報告を支持するものであり、pH が高くなるほど競合分子数が減少して COMb が安定化したものと考えられた。すなわち、配位子の安定性は pH と比例関係にあると考えられた。

なお、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  が添加された状態ではアルカリ域で不安定になることがわかった。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  はアルカリ域で安定であり、強力な還元力を発揮する ( $\text{H}^+$ を供与)。アルカリ域で Mb 試薬に  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  を加えると、DeoMb を生じたのちに吸光度が低下していくことから、Mb 自体が分解していることが考えられ、このことが COMb の安定性にも影響を及ぼしていると考えられた。COMb の定量的な抽出には COMb の安定性を高める観点からできるだけ高い pH の方が好ましいが、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  の作用を鑑みるとその pH は 8.0~9.0 が好ましいと考えられた。

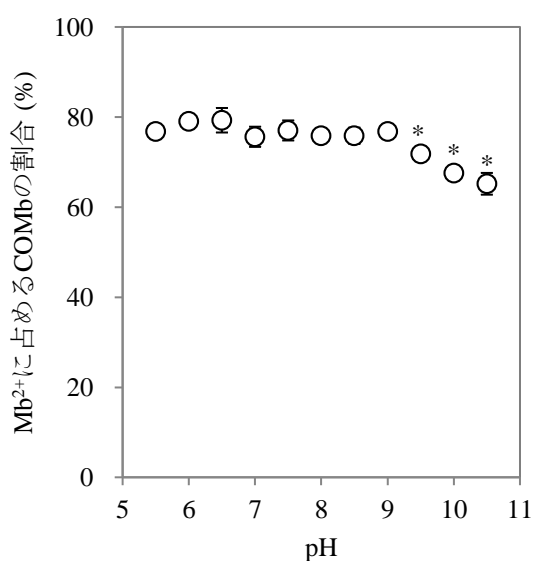


図 2. 1. 1. 抽出溶媒の pH が COMb 抽出時の CO 解離に与える影響.

\*有意差あり ( $P < 0.05$ )

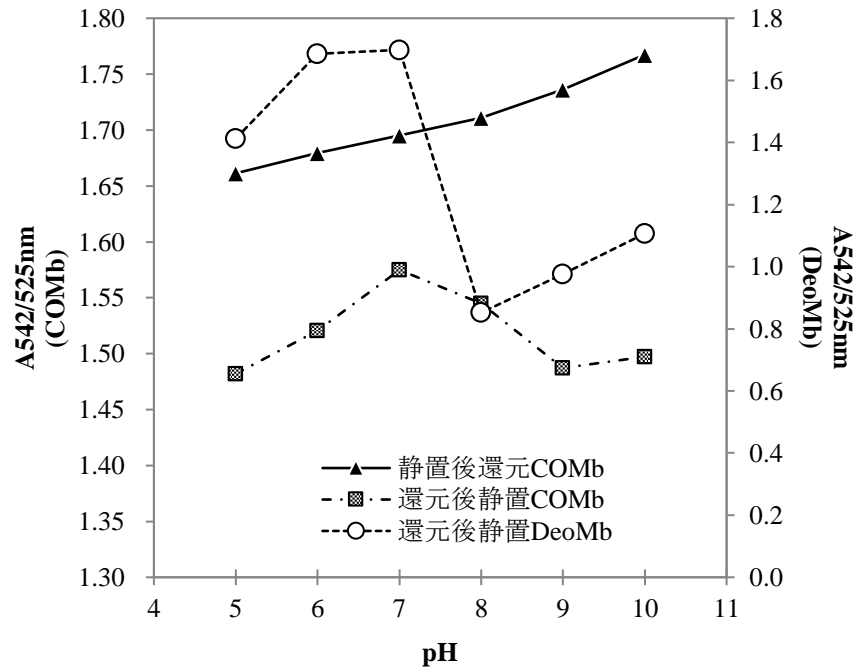


図 2. 1. 2. COMb 安定性に与える pH の影響.

抽出温度の上昇に伴い COMb の抽出率は有意に低下した ( $P<0.05$ ) (図 2. 1. 3)。温度の上昇に伴い分子運動が活発になるため、配位座にある CO が不安定になるとともに競合分子の運動も活発になることで競合分子の影響を強く受けるようになったのと推察された。これらのことから、低温であるほど Mb の配位結合安定性が増すことが示された。

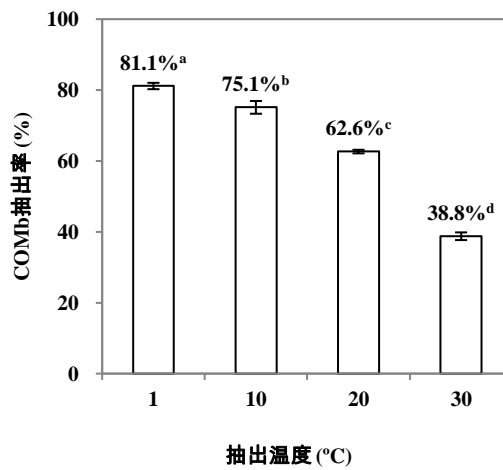


図 2. 1. 3. 抽出温度が COMb 抽出率に与える影響.

異符号間に有意差あり ( $P<0.05$ ).

また、抽出時に酸素があることによって、COMb の抽出率は有意に低下した ( $P<0.05$ ) (図 2.1.4)。このような酸素による抽出阻害は Chow と Chu (2004) の報告と一致した。このことから、競合分子を減らすことで、配位子は安定化するということが示された。

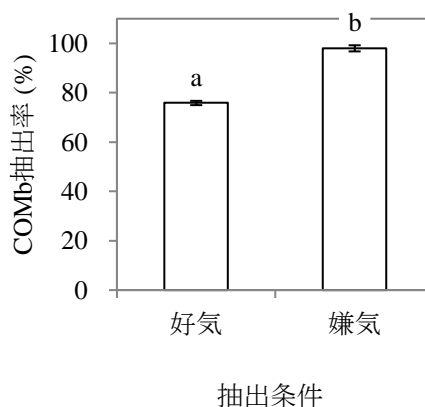


図 2.1.4. 抽出時の酸素の除去が COMb の抽出率に与える影響.

異符号間に有意差あり ( $P<0.05$ ).

光存在下では COMb は有意に低下し ( $P<0.05$ )、光によって不安定化することが示唆された (図 2.1.5)。このことは、COMb が光エネルギーを受け取ることで励起して不安定化することに起因するものと考えられた (Iizuka ら 1974)。さらに、自動酸化についても光によって促進されることが明らかになった (図 2.1.6)。自動酸化は酸素分子の交換頻度と相関して起こることが推定されていることから (四釜ら 2001)、COMb の場合と同様に、OxyMb が光エネルギーによって励起することに起因するものと考えられた。これらのことは光照射が Mb 誘導体の配位子安定性にとって重要な因子であることを示唆している。また、一般的には NOMb 以外の Mb 誘導体では光感受性が極めて弱いとされてきたが、配位子の安定性という観点ではいずれの Mb 誘導体であっても光の照射によってそのエネルギーを受け取ることで不安定化する可能性が示唆された。

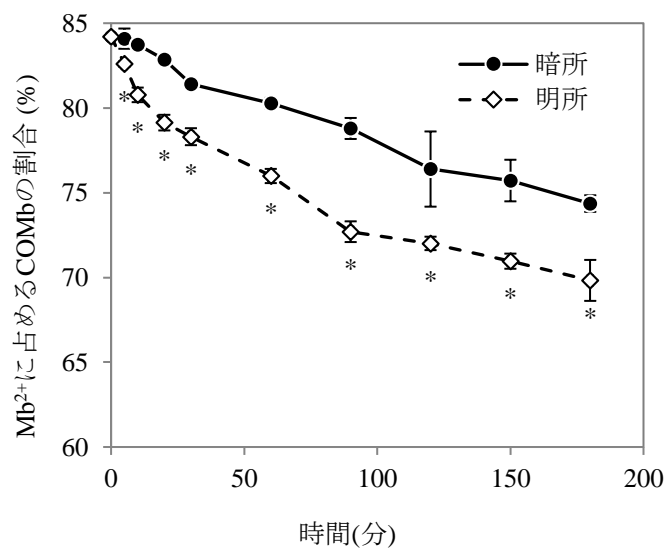


図 2. 1. 5. COMb の光感受性.

\*同一時間での群間比較において有意差あり ( $P < 0.05$ ).

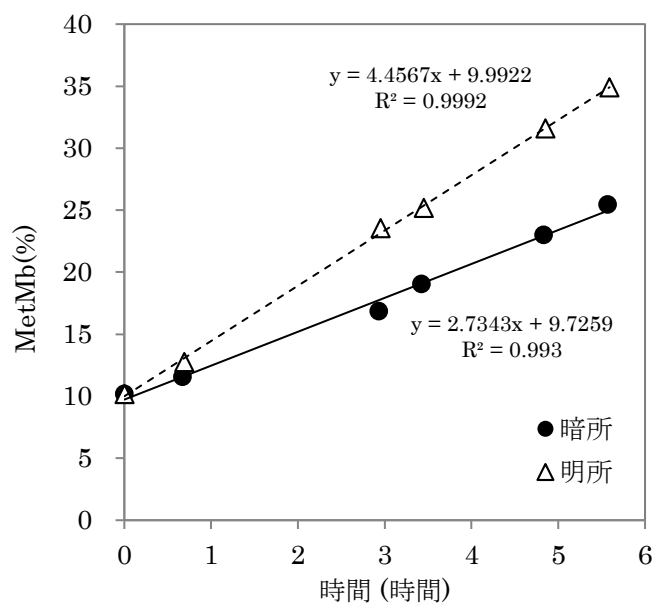


図 2. 1. 6. OxyMb の光感受性.

今回の研究結果より、食肉から COMb を定量的に抽出する方法が示された。すなわち、低温下で抽出溶媒の pH を 8.0~9.0 とし、嫌気的な条件で抽出し、抽出液は暗所に保管の上、20 分以内に測定することで COMb を定量評価可能である。

## 小 括

CO をモデル分子として、酸素、pH、温度、ならびに光が配位子の結合安定性に影響することを確認した。好氣的条件下では嫌氣的条件下よりも COMb の安定性に欠くのは、酸素が Mb の第六配位座に対する CO の競合分子であることに起因すると考えられた。pH に対する COMb 安定性の変化は、OH<sup>-</sup>あるいは H<sup>+</sup>が反応速度に関与することから、本質的には pH を競合分子濃度の支配因子として捉えるべきだと推察した。温度上昇に対応した安定性の低下は分子運動の程度の違いによるものと考えられた。光による安定性の低下についても、吸光波長でより高い感受性が観察されたことから、エネルギーの吸収に伴うものである可能性が示された。

また、本研究結果より、COMb の定量的な抽出が可能となった。以下の通り、食肉については本来の性質を変化させてはならないことから、違法あるいはそれに準ずる処理を検査する方法を検討することが求められている。例えば厚生労働省が定める CO の使用の有無の検査法（食安監発 0404 第 3 号平成 25 年 4 月 4 日）は鮮魚を対象としているため、食肉を対象とした検査方法も検討する必要がある。これに対し COMb の定量は、より直接的に色調本体を評価することから、CO 処理肉の検査方法として適切だと考えられる。

CO は、そもそも食品添加物に含まれないことから法改正がない限り食品に対して使用できない。また、以下に示す酸素の例のとおり、たとえ CO が食品添加物として認可されたとしても消費者の目を欺く可能性がある以上、食肉に対して使用することは法的にも倫理的にも問題が生じることは明白である。

酸素の例：酸素は食品添加物に含まれるガスであり、使用自体には問題がないが、消費者の目を欺く恐れがあるとして厚生労働省の指導対象となっている。以下に厚生労働省への疑義の記録を紹介する。

**疑義** 食品（生鮮食品を含む）を包装する際に、品質保持のために二酸化炭素・窒素・酸素を充填することについては、食品添加物のガスであり、かつ規格を満たしていれば、着色目的ではなく、消費者の判断を誤らせるものではないと解し、使用してもさしつかえないか。

**回答** 生鮮野菜等に対する食品添加物の使用に関しては、昭和 61 年 6 月 5 日付け及び平成 3 年 6 月 21 日付け当職通知等により、その食品の特性、本質又は

品質を変化させ、品質、鮮度などに関し消費者の判断を誤らせるおそれのあるものについては、食品添加物本来の目的に違反するものとして、従来よりそのようなことのないよう指導方お願いしてきたところであるが、本品を品質保持のためと称して貴紹介の食品に対して使用することは、食品の鮮度等について消費者の判断を誤らせるおそれがあるものと考えられるので、このような使用がなされないよう指導することが望ましい（平 12・8・23 衛化 48）

## 第二節 ニトロシルミオグロビンの光学的安定性について

### 材料と方法

#### 1. NOMb の抽出

75%アセトン法で抽出した (Sakata と Nagata 1991)。

#### 2. 光照射が与える影響

明所あるいは暗所において、吸光スペクトルの経時変化ならびに NOMb 残存率を観察した。

#### 3. NOMb 安定性に影響する波長の評価

キャップ付きのセルに NOMb アセトン抽出液を入れ、蛍光分光光度計の照射波長幅を 10 nm として、任意の波長の光を 10 分間分光照射した。分光照射処理後、紫外可視分光光度計で 395 nm の吸光度を測定し、NOMb の残存率を評価した。

#### 4. 透過阻害剤による NOMb 保護効果の評価

395 nm の透過阻害剤として、燻液を用いた。燻液の透過スペクトルを測定するとともに、適宜希釈して 395 nm における透過度の異なる燻液を調製した。各種の濃度に調製した燻液は光路長 10 mm のセルに入れて蛍光分光光度計の光照射窓とセル座の間に照射路を遮るように配置した。キャップ付きのセルに封入して蛍光分光光度計にセットした NOMb 抽出液は、10 分間 395 nm の光を照射されたのち 395 nm の吸光度から NOMb の残存率を評価した。

#### 5. 透過阻害剤による塩漬食肉製品の色調保持効果の評価

100 ppm  $\text{NaNO}_2$ 、300 ppm  $\text{NaAsA}$  で 1 週間塩漬したのち中心温度  $75^\circ\text{C}$  となるまで加熱した豚ロース肉をモデルハムとした。このモデルハムを 5 mm 以下にスライスし、酸素透過度  $57 \text{ cc} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$  のフィルムで真空包装したのち、5 mm 燻液、アルミホイルを積層し、 $10^\circ\text{C}$ 、2,000 lx で保管した。保管中の赤色度を分光測色計で測定し、赤色保持率を評価した。なお、5 mm 燻液を積層するにあたってはシャーレに液体を 5 mm の厚さになるよう加えてハムの上部に設置した。



## 6. 統計処理

すべての試験は 3 回以上繰り返し実施し、同等の傾向が得られたことから代表として 1 回のテスト結果を示した。

多郡間の比較は Sheffe 法を用いた多重比較検定で解析した。また、 $P < 0.05$  を有意とみなした。

## 結果と考察

NOMb の分解に伴う吸光スペクトルの変化を確認した結果、長波長へのピークシフトと共にピーク吸光度の低下が観察された (図 2. 2. 1)。

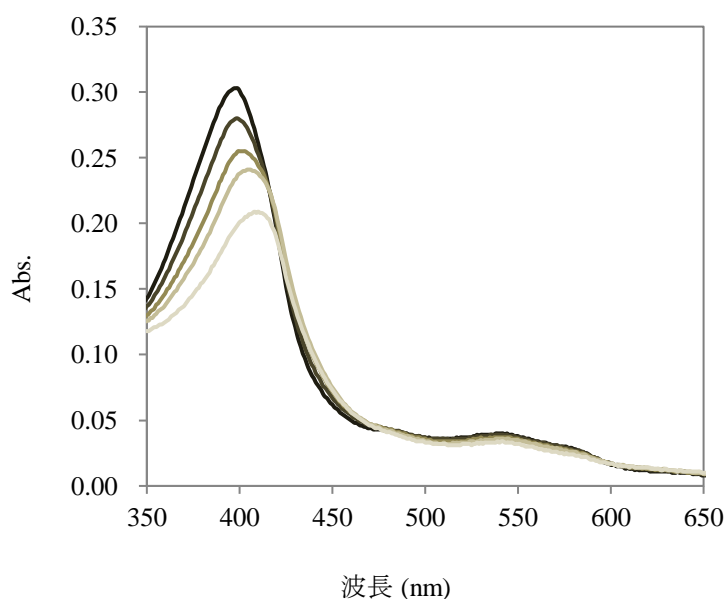


図 2. 2. 1. NOMb の光分解中の吸光スペクトルの変化.

このとき、等吸収率点が観察されていることから、Mb 分子自体が分解しているのではなく、NOMb 以外の Mb 誘導体が形成されていると考えられた。ESR の観察で NO の解離には酸化が伴うことが報告されていることから (Møller ら 2003)、MetMb が形成されているものと考えられた。

NOMb の光感受性を図 2. 2. 2 に示した。従来の報告 (Andersen ら 1988) 通り、COMb (図 2. 1. 5) や OxyMb (図 2. 1. 6) と比較すると光感受性が極めて高く、光安定性が高い順から、OxyMb > COMb > NOMb だった。NOMb では NO の放出時に高確率で Mb の酸化が伴う (Arnold と Bohle 1996) ことが COMb や OxyMb とは異なる点である。つまり、COMb や OxyMb で考慮すべきなのは配位分子と競合

分子の数的な比ならびに Mb との親和力の差なのに対し、Mb に配位している NO と酸素が ONOO を形成しながら Mb を酸化させる点が NOMb に特異的である。このような性質が NO の解離後に NO が Mb に再び配位結合することを妨げるため (Honikel 2008)、NOMb の光感受性がほかの誘導体と比較して強く見える要因と考えられた。

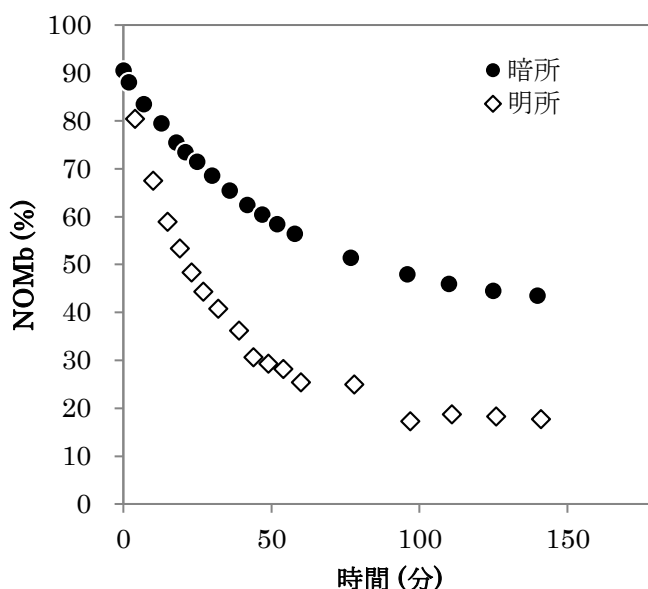


図 2.2.2, NOMb の安定性に与える光の影響.

アセトン溶媒中の NOMb は 395 nm に吸収ピークがあり、この点で最も不安定化した (図 2.2.3)。一般的に光退色は (i) 光が触媒になり NO が Mb から分離し、(ii) NO と Mb が酸素によって酸化されるという機構で進行しているとするのが主流だった (Forrest ら 1975)。一方、現在では配位状態の NO に酸素が結合することが確認されており、光触媒作用がどのように作用しているのか不明瞭となっている。例えば Sun ら (2009) は、NO は光酸化中に脱着しないが共役構造は変化すると主張しているが、Munk ら (2010) はスピントラップ法を用いて NOMb が光分解される際にラジカルが検出されないこと、閃光照射によって Mb と NO の分離とそれに続く迅速な再結合を観察したことを報告している。また、Munk ら (2010) は酸素存在下では光誘導退色時に ONOO ラジカルの形成を観察しているが Mb 中に存在しているかどうかは不明瞭であったことを報告している。本実験からは NO が解離する際の NO の状態については明らかにならなかったが、光による NOMb の不安定化

は吸収がある波長で起こることが示唆され、光エネルギーの吸収に伴う分子の不安定化という仮説が裏付けられた。

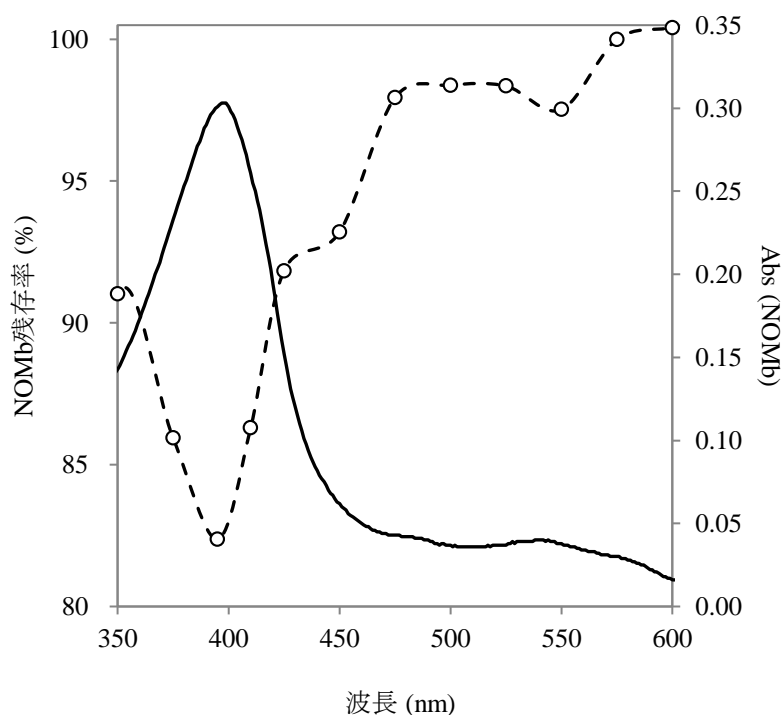


図 2.2.3. NOMb の安定性に与える光の波長の影響.

ポルフィリンは  $26\pi$  電子共役系における  $\pi$  電子の遷移に基づいて紫外～可視波長領域に強い吸収スペクトルを持つ。 $\pi$ - $\pi^*$ 遷移 (HOMO→LUMO 第一遷移に相当) に起因する紫外領域 400 nm の極めて強い吸収帯 (分子吸光係数  $\epsilon$  で  $3\sim 6\times 10^5$ ) は Soret 帯と呼ばれる。また、480~650 nm を中心とした可視領域に禁制遷移であるがかなり強い ( $\epsilon$  で数万) 吸収帯を持っており、これは Q 帯と呼ばれる。Q 帯は分子構造の振動に共役した遷移で、振動状態の変化の量子数に対応して 4 つのピークを持っており、これらは長波長側より I~IV と呼ばれる (I: 500 nm 付近、II: 530 nm 付近、III: 570 nm 付近、IV: 620 nm 付近)。この吸収はポルフィリン環の置換基に鋭敏であり、金属ポルフィリンでは分子構造の対称性が良く、Q 帯の分裂は 2 本である。今回最も強い影響が見られたのは Soret 帯に対する光照射だったが、Q 帯に対する照射でも NOMb は不安定化した。里見ら (1988) はカラーフィルムで光の透過を選択的に阻害し、退色に及ぼす影響を確認し、500~600 nm の波長光の阻害が有効としたが、これは Q 帯の吸光波長の光を阻害した結果と考えられた。Acton ら (1986) は褐色フィルムと透明フィルムで試験して褐色フィルムが退色防止に有効である

ことを示唆している。一般的に褐色フィルムは 450 nm より短波長の光の透過を阻害することから、Acton ら (1986) の報告は Soret 帯の透過阻害によるものと考えられた。さらに、Böhner ら (2013) は青系光 (450~500 nm) が赤系光 (600~650 nm) や緑系光 (480~530 nm) と比較して退色促進効果が高いことを示しており、今回の結果と合致する。

395 nm の透過率が低いほど NOMb の安定性が高まること示された (図 2. 2. 4)。光の露出量に伴う NOMb の消失は一次比例せず、NOMb の光に対する感受性が高いことが改めて示された。退色を誘導する光を遮ることによって退色抑制効果が得られることが期待された。

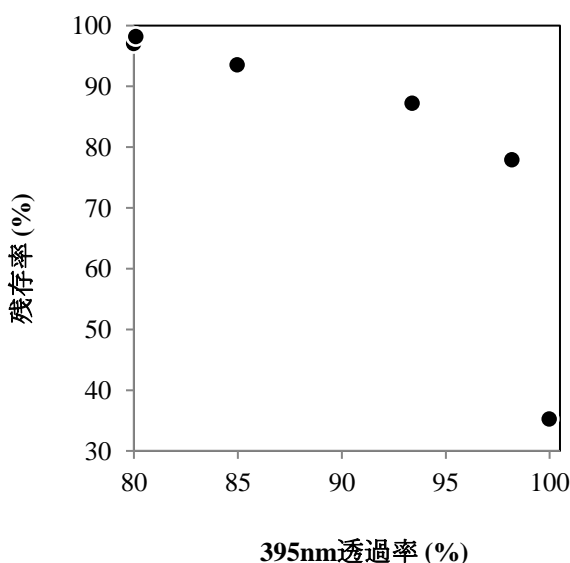


図 2. 2. 4. 光の強度と NOMb の安定性の相互関係。

退色テストに用いた通常フィルムと燻液の透過波長は異なった (図 2. 2. 5)。透過率 50%となるのは、通常フィルムで 315 nm、燻液で 469 nm であった。これらの包材を用いた退色試験の結果は図 2. 2. 6 に示す。標準フィルムでは 14 日目に赤色保持率が 37%まで低下したのに対し、暗所 (アルミで遮光) では 71%保持された。暗所でも退色が見られたのは包材の酸素透過度が高かった ( $57 \text{ cc} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) ためと考えられた。これらに対し、燻液を積層した試験区では赤色保持率は 59%であり、標準フィルムと比較して有意に高く保たれた ( $P < 0.05$ )。燻液の積層により 469 nm 以下の光は 50%以上透過阻害されており、この波長領域の光が退色に影響していることを示す結果だった。

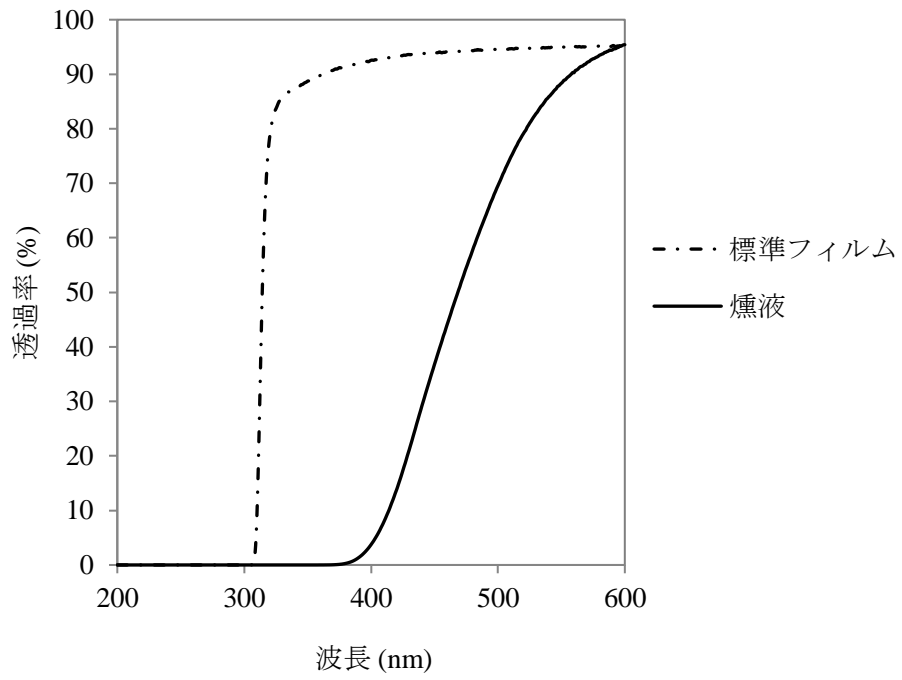


図 2.2.5. 透過阻害素材の透過スペクトル.

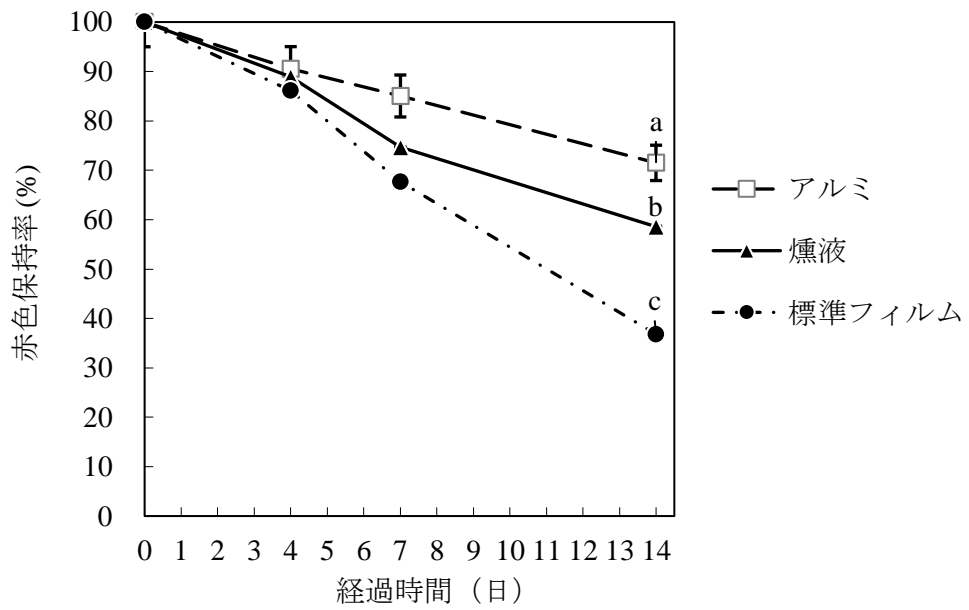


図 2.2.6. 透過阻害素材が色調安定性に与える影響.

異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ ).

製品が陳列される際に照明として使用される蛍光灯には退色を誘導する波長が含まれていると考えられる (図 2.2.7)。一方、現在急速に普及率が上がっている LED には短波長があまり含まれておらず、蛍光灯と比較すると塩漬食肉製品の退色に関しては優位だと考えられた (図.2.2.8)。今後、光の透過阻害を NOMb の安定性向上という観点から検討する場合には、LED の分光分布図を考慮する必要がある。

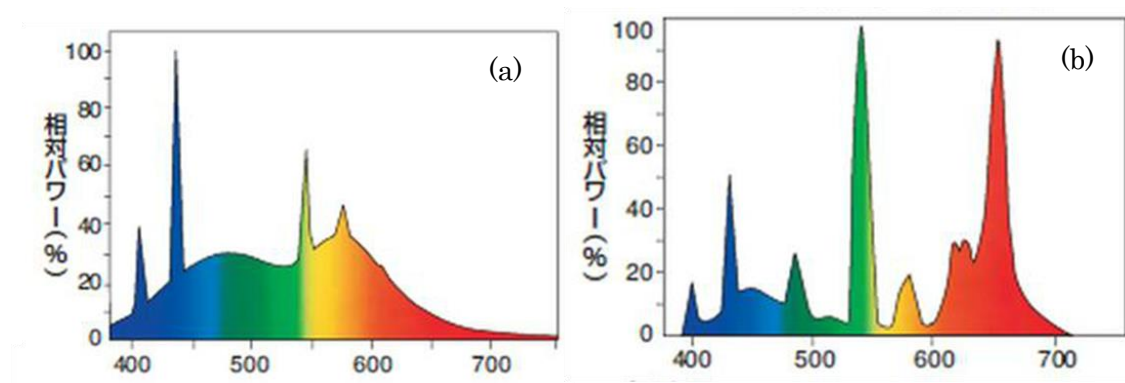


図 2.2.7. 一般蛍光灯 (a) と生鮮品展示用蛍光灯 (b) の分光分布図.

一般蛍光灯と比較すると赤色に対応する 600~700 nm の波長光をより多く照射出来るよう設計されているのが分かる. このような光源下では食肉はより鮮やかな赤色に見える. 分光分布図は NEC のカタログ (2012) より引用.

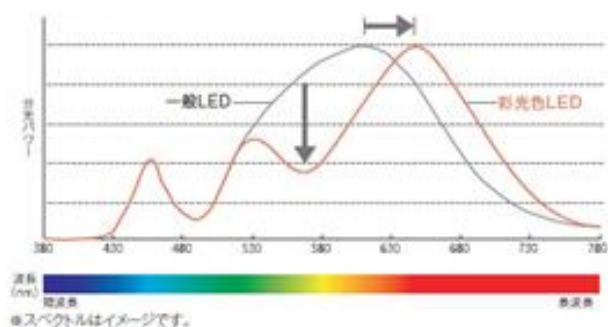


図 2.2.8. LED 照明の分光分布図.

蛍光灯と比べると 400 nm 以下の照射が少ない. 分光分布図は Panasonic のカタログ (2015) より引用.

## 小 括

光誘導性のリガンド解離は CO と比較すると NO の方が早い傾向にあること、ならびに第二章第一節で示唆された通り、NOMb が吸光を持つ波長の光で安定性を失う傾向が確認された。また、燻煙成分によって NOMb の Soret 帯の波長の光の透過が阻害され、退色が抑制されることが示された。一方で、当該成分を含む褐色のフィルムで覆ってしまっは商品価値が低くなることは必至といえた。

### 第三節 ミオグロビンの熱安定性について

#### 材料と方法

##### 1. Mb の分離方法

###### 粗精製方法の検討

牛トップサイド肉、豚モモ肉を使用して、それぞれの肉試料と4倍量の蒸留水のホモジネートを得た。このホモジネートを遠心分離後得られた上清について、飽和酢酸鉛によるMb以外のタンパク質の沈澱除去後、各種濃度の硫酸で分画しMbの粗精製度を評価した。すなわち、硫酸飽和度を0、10、20、30、40、50、60、70、80、90および100%として一晩攪拌したのち上清を採取して水溶性のタンパク量と全ヘム色素量を評価した。上清は電気泳動(15%パジェル)でも粗精製度を確認した。

水溶性のタンパク量はLowry法に基づく定量キット(Protein Assay Kit, BioRad)を用いて定量した。全ヘム色素量は塩酸アセトン法を用いて定量した(坂田ら2012)。

###### 疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)カラムを用いた精製方法

Mb粗精製液について、HICカラムによるMbの単離精製について検討した。ブチルカラム(HiTrap 1ml Butyl-S FF)、オクチルカラム(HiTrap 1ml Octyl FF)、フェニルカラム(HiTrap 1ml Phenyl HP)について、それぞれの分離度をグラジエント溶出で評価したのち、溶出プログラムの最適化を図ることとした。すなわち、ステップワイズ法で溶出したピークをそれぞれ分取してMbが溶出する緩衝液濃度を確認後、プロトコルを組み立てた。

Aバッファを0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)、Bバッファを飽和硫酸とした。グラジエント溶出では[A0%、B100%]から[A100%、B0%]へ、15カラムボリューム(CV)で入れ替わるプロトコルとし、流速は1 mL/分とした。ステップワイズ溶出ではBバッファを50、40、30、20、10および0%となるようそれぞれ4 CVかけて段階的に入れ替えるプロトコルとし、流速は1 mL/分とした。完成したプロトコルはウシ、シカ、ブタおよびクマの肉を用いてそれぞれ確認し、Mbの分離性を評価した。

##### 2. 食肉抽出液中のヘム色素の分離定量方法

蒸留水で抽出したヘム色素溶液5 mLに対し、10 mgのヒドロサルファイト



Na (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) を加え 0.45 μm のメンブレンフィルター (DISMIC 25CS045AN, 東洋ろ紙, 東京) でろ過した後に吸光度を計測した。

次にヘム色素抽出液あるいはヘム色素溶液 (Mb、Hb および Cyt c) を還元した後、CO ガス約 10 mL を通気し密栓して転倒混和後 5 分間静置した (CO 処理)。各種濃度に希釈したヘム色素溶液を CO 処理した後、分光光度計 (UV-2700, 島津製作所) で 350~750 nm の吸光スペクトルを測定し各波長における吸光度と測定溶液の濃度 (w/v) から濃度あたりの吸光係数を得た。測定には光路長 10 mm の石英ガラスセルを用い、常温で実施した。

既知濃度のヘム色素溶液を混合したものをテスト溶液とし、CO 処理後の吸光特性から任意に選択した 3 波長からランベルトベール則に基づいてその濃度を算出し、実際の濃度と算出濃度を比較して精度の高い算出結果が得られる波長の組み合わせをスクリーニングした。次に、豚肉より得られた抽出液 (濃度未知の試料) での算出の正確さからヘム色素分離定量にふさわしい波長の組み合わせを評価した。すなわち、まず CO 処理したヘム色素抽出液の吸光度から各ヘム色素の濃度を算出した。次に、算出された濃度から既に求められている各波長の吸光係数を用いてスペクトルを予測した。最後に予測スペクトルと実測スペクトルとの 450~700 nm における差スペクトルの面積値を出し、スペクトル形状を含めて総合的に算出値の正確度を評価した。

### 3. 加熱に伴う水溶性ヘム色素と水溶性タンパクの変化の評価

#### 食肉サンプルの調製

3 mm で 2 度挽きした豚モモ肉を 15 袋に小分けして真空包装後、ウォーターバスで中心温度が 37 °C から 76 °C となるまで 3 °C ごとに 1 袋ずつサンプリングし、それぞれの色調、ヘム色素変性率、水溶性タンパク変性率について評価した。変性率については、未加熱のものと比較した数値とした。

#### 色差

加熱サンプルは冷却後、乳鉢ですりつぶして均質化したのちに表面の色調を分光測色計で計測した。

#### ヘム色素構成割合、Lowry 法、メト化率、

水抽出液の吸光度から、ヘム色素構成割合は以下の式を用いて評価した。

$$\begin{cases} \text{Mb\% (w/v)} = 0.0125 \times A_{538 \text{ nm}} - 0.3544 \times A_{568 \text{ nm}} + 0.4913 \times A_{578 \text{ nm}} \\ \text{Hb\% (w/v)} = -0.0418 \times A_{538 \text{ nm}} + 0.4756 \times A_{568 \text{ nm}} - 0.3744 \times A_{578 \text{ nm}} \\ \text{Hb\% (w/v)} = 0.1863 \times A_{538 \text{ nm}} - 0.1141 \times A_{568 \text{ nm}} - 0.1083 \times A_{578 \text{ nm}} \end{cases}$$

#### タンパク質含量

Lowry 法を用いた。

#### メト化率

抽出した溶液の pH を 6.8 に調整後、(Krzywicki 1982) の式で算出した。

### 4. 単離 Mb の加熱特性

#### 示唆走査熱量計 (DSC)

単離 Mb を約 50 mg/mL となるよう調整し、20  $\mu$ L をアプライして試験。昇温速度は 2  $^{\circ}$ C/分でセットし、吸熱ピークが観察される温度を調べた。

#### 表面蛍光 (質量中心法)

鈴木ら (2008) の方法にしたがって評価した。20  $^{\circ}$ C から 75  $^{\circ}$ C まで 5  $^{\circ}$ C 加温するごとに励起波長 280 nm での 280 から 450 nm における蛍光スペクトルを観察し、以下の式に従って質量中心を評価した。

$$\text{質量中心 (v)} = \frac{\sum \left( \frac{\text{蛍光強度}}{\text{蛍光波長}} \right)}{\sum (\text{蛍光波長})}$$

#### 加熱凝集性

2  $^{\circ}$ C/分で 20  $^{\circ}$ C から 90  $^{\circ}$ C まで加熱し、525、572 および 730 nm の吸光度を経時的に計測した。

### 5. 加熱 Mb の配位結合安定性の評価

#### COMb

70  $^{\circ}$ C で加熱、あるいは未加熱のウシ単離 Mb を Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> で還元後に HIC カラムを通して還元剤を除去し、CO 通気後に 4  $^{\circ}$ C で 60 分間保持したときの COMb の安定性を確認した。

#### 自動酸化速度

70  $^{\circ}$ C で加熱、あるいは未加熱のウシ単離 Mb を Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> で還元後に HIC カ

ラムを通して還元剤を除去し 40 °C で 30 分間保持したときの Mb の酸化安定性を確認した。

## 結果と考察

### Mb の精製方法の確立

Lowry 法と全ヘム色素量から導かれた全タンパク質に占めるウシ Mb の割合を図 2.3.1 (a) に、電気泳動像を同図 (b) に示す。硫安飽和度 70%で Mb の精製度が高まるが、硫安飽和度 80%では Mb も沈澱して収量が低下することから、ウシ Mb の粗精製として、70~100%分画で回収するのが望ましいと考えられた。

同様に、全タンパク質に占めるブタ Mb の割合を図 2.3.2 (a) に、電気泳動像を同図 (b) に示す。硫安飽和度 40%以上 80%までは Mb 以外のタンパク質の構成割合は低下していくが、ウシとは異なり、硫安分画で精製度を高めることは困難だった。ブタ Mb の収量を確保でき、かつ最も精製度が高い 70~100%分画で回収するのが望ましいと考えられた。この条件はウシ Mb と同等であり、従来の条件 (Trout と Gutzke 1996)とも一致した。

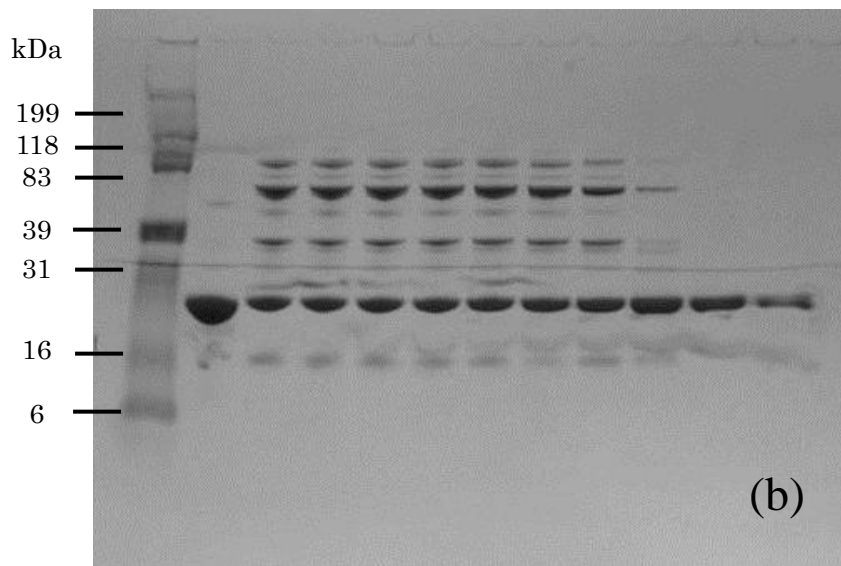
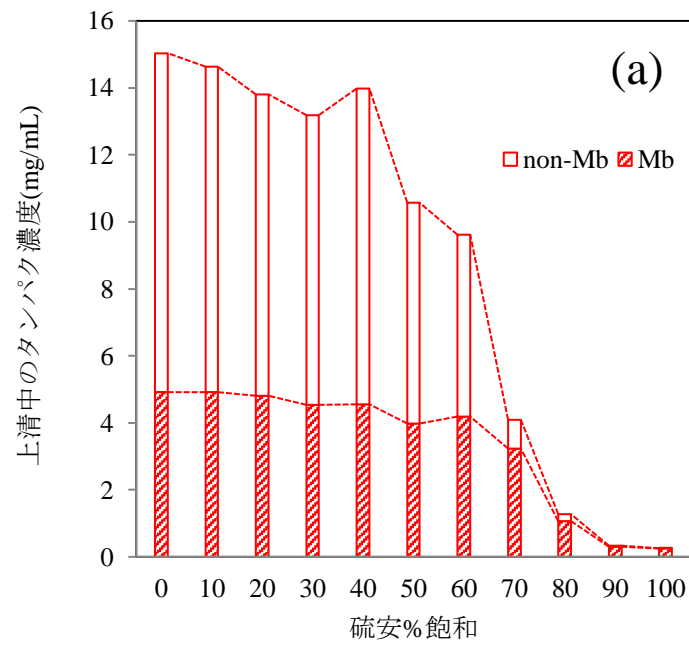


図 2.3.1. 硫安によるウシ Mb の粗分画.

(a) 硫安分画ごとの Mb とそれ以外のタンパクの積算グラフ. (b) SDS-PAGE 像で, 左列から分子量マーカー, 標準 Mb (ウマ), 硫安分画 10~100%.

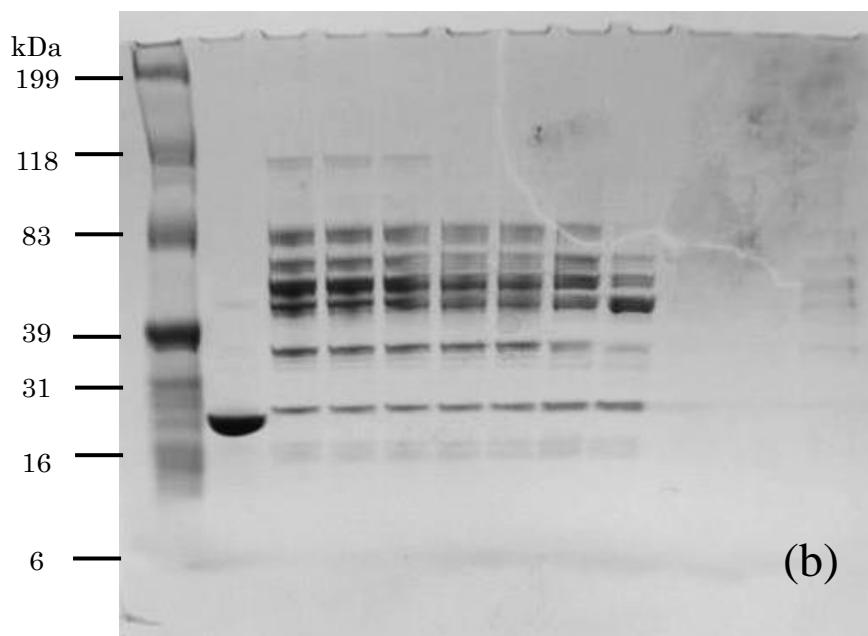
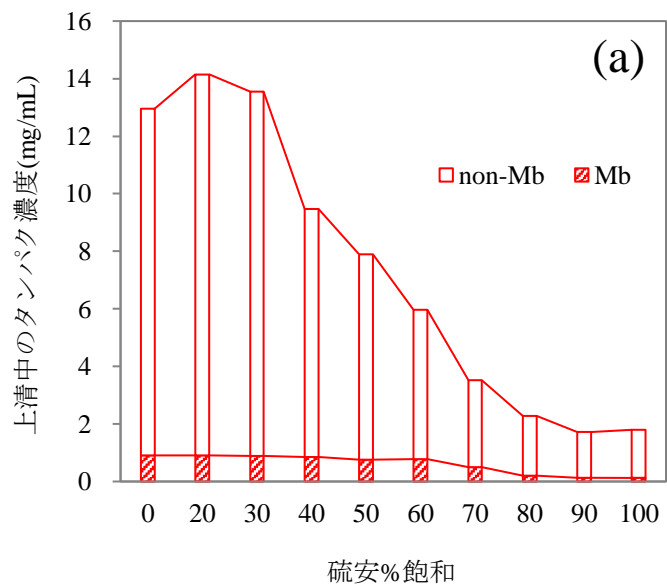


図 2.3.2. 硫安によるブタ Mb の粗分画.

(a) 硫安分画ごとの Mb とそれ以外のタンパクの積算グラフ. (b) SDS-PAGE 像で, 左列から分子量マーカー, 標準 Mb (ウマ), 硫安分画 10~100%. 硫安 80%飽和以上は見えないがアプライしている.

オクチルカラムでグラジエント溶出したときのウシ Mb の溶出スペクトルを図 2.3.3(a) に、得られたフラクション (Fr.) の電気泳動像を同図 (b) に示す。泳動像は左列から、標準 (カレイドスコープ)、ウマ試薬 Mb、粗抽出液、Fr. 11~21 である。Fr. 13 および 14 で Mb とみられる分子量のタンパク質が高濃度に見られたことから HIC カラムで Mb を分離できる可能性が示されたものの、ピークとして分離されなかったことから、より強い疎水性相互作用を持つカラムで分離する必要性が示唆された。

次に、フェニルカラムでグラジエント溶出したときのウシ Mb の溶出スペクトルを図 2.3.4(a) に、得られた Fr. の電気泳動像を同図 (b) に示す。泳動像は左列から、標準 (カレイドスコープ)、ウマ試薬 Mb、粗抽出液、Fr. 13~22 である。ピークとして得られた Fr. 15 および 16 で Mb と同サイズの分子の単一のバンドが得られた。回収された Fr. 15 および 16 の溶液は 350~750 nm の吸光像から Mb であることが確かめられた (Ochiai 2011)。

さらに、フェニルカラムを用いたウシ Mb のステップワイズ法による溶出スペクトルを図 2.3.5(a) に、得られた Fr. の電気泳動像を同図 (b) に示す。泳動像は左列から、標準 (カレイドスコープ)、ウマ試薬 Mb、Fr. 1~10、粗抽出液である。B バッファー (飽和硫酸) が 50% (導電率 211 mS/cm) から 40% (183 mS/cm) に移行する際に単独で溶出するピーク (Fr. 1) で Mb が得られた。

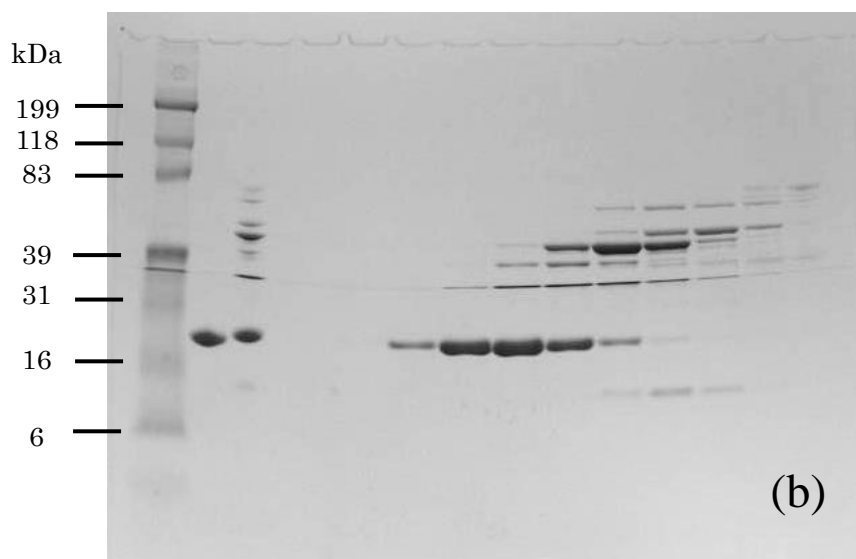
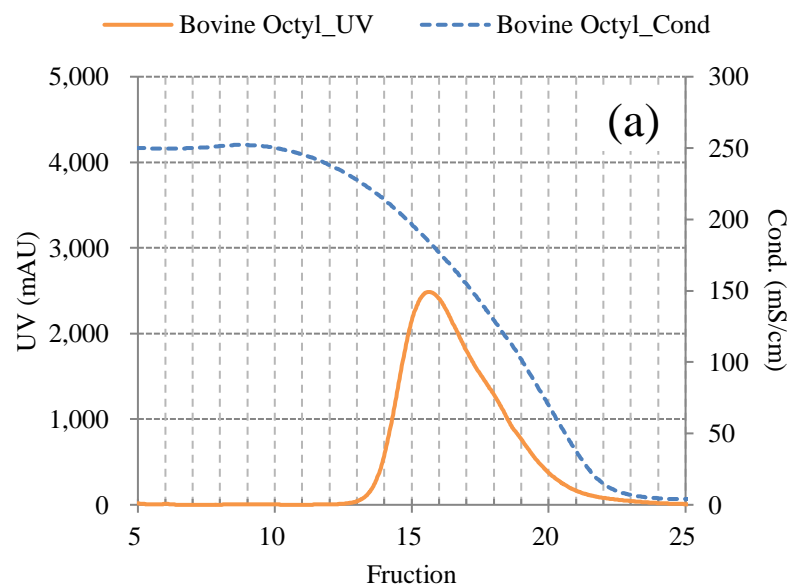


図 2.3.3. オクチルカラムでグラジエント溶出したときのウシ Mb の溶出挙動。  
 (a) オクチルカラムを用いたときの溶出曲線。(b) SDS-PAGE 像で、左列から分子量マーカー、標準 Mb (ウマ)、粗精製 Mb, Fr. 11~21. Fr. 11, 12 の泳動像は得られなかった。

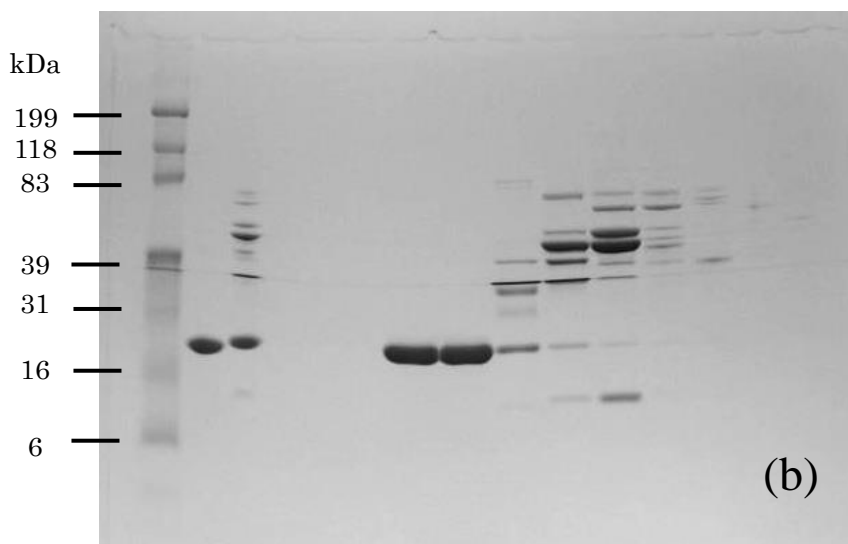
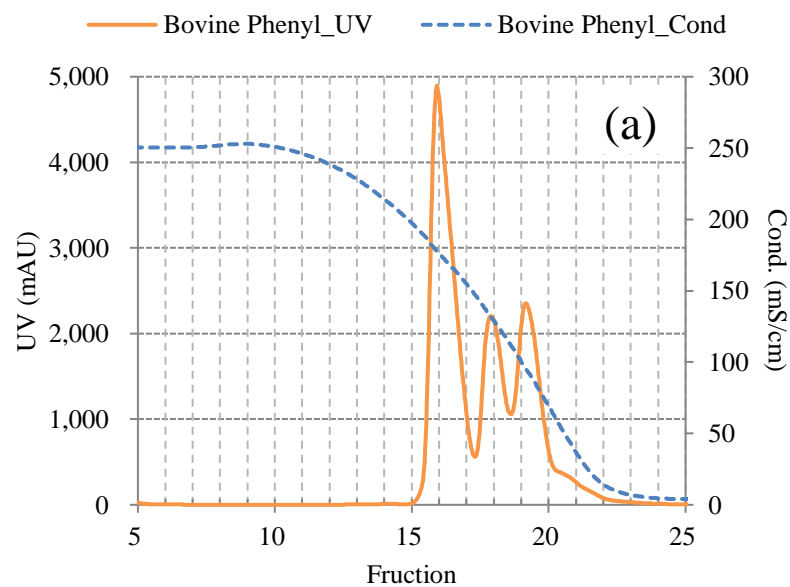


図 2.3.4. フェニルカラムでグラジエント溶出したときのウシ Mb の溶出挙動。  
 (a) フェニルカラムを用いたときの溶出曲線. (b) SDS-PAGE 像で、左列から分子量マーカー、標準 Mb (ウマ)、粗精製 Mb, Fr. 13~23. Fr. 13, 14 の泳動像は得られなかった.



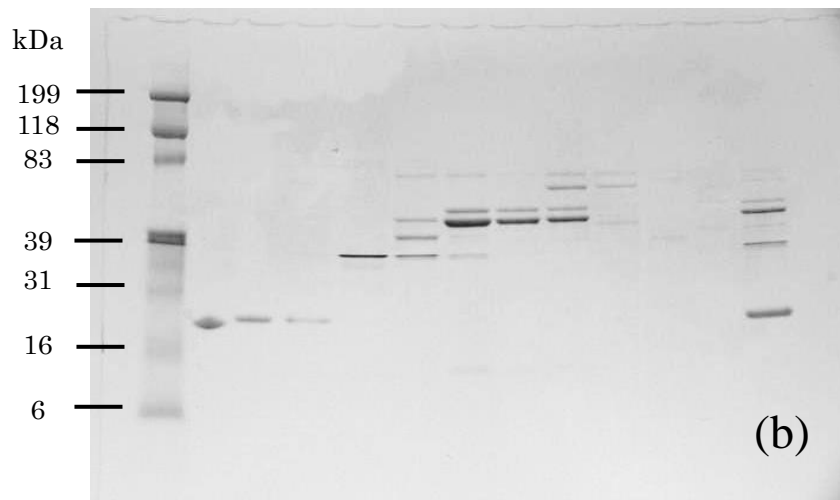
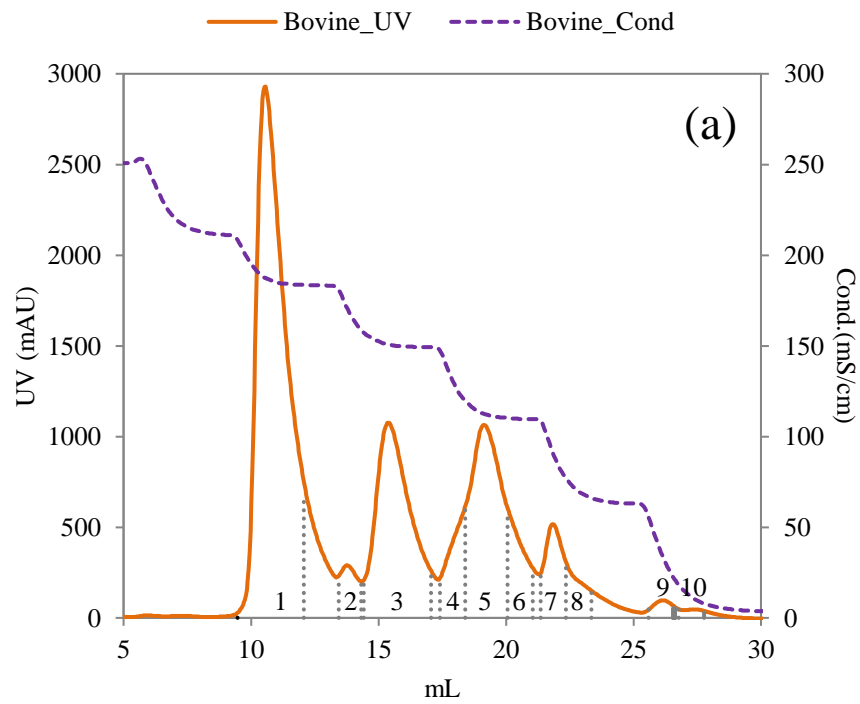


図 2.3.5. ステップワイズ法によるウシ Mb 粗抽出液の Fr. (a) と電気泳動図 (b).  
 (a) フェニルカラムでステップワイズ溶出したときの溶出曲線. (b) SDS-PAGE 像で, 左列から分子量マーカー, 標準 Mb (ウマ), Fr. 1~10.

オクチルカラムでグラジエント溶出したときのブタ Mb の溶出スペクトルを図 2.3.6 (a) に、得られた Fr. の電気泳動像を同図 (b) に示す。泳動像は左列から、標準 (カレイドスコープ)、ウマ試薬 Mb、粗抽出液、Fr. 13~21 である。ウシとは異なりブタでは Mb と同一のサイズのバンドが単独で見られる Fr. はなかった。これは Mb の粗精製率が低いことに起因していると考えられた。ウシと同様、より強い疎水性相互作用を持つカラムでの確認が必要と考えられた。

次に、フェニルカラムでグラジエント溶出したときのブタ Mb の溶出スペクトルを図 2.3.7 (a) に、得られた Fr. の電気泳動像を同図 (b) に示す。泳動像は左列から、標準 (カレイドスコープ)、ウマ試薬 Mb、粗抽出液、Fr. 13~23 である。ピークとして得られた Fr. 16 で Mb と同サイズの分子の単一のバンドが得られた。回収された Fr. 16 の溶液は 350~750 nm の吸光像から Mb であることが確かめられた (Ochiai 2011)。

さらに、フェニルカラムを用いたステップワイズ法によるブタ Mb の溶出スペクトルを図 2.3.8 (a) に、得られた Fr. の電気泳動像を同図 (b) に示す。泳動像は左列から、標準 (カレイドスコープ)、ウマ試薬 Mb、Fr. 1~9、粗抽出液である。ウシと同様に、B バッファー (飽和硫酸) が 50% (導電率 211 mS/cm) から 40% (183 mS/cm) に移行する際に単独で溶出するピーク (Fr. 1) で Mb が得られた。

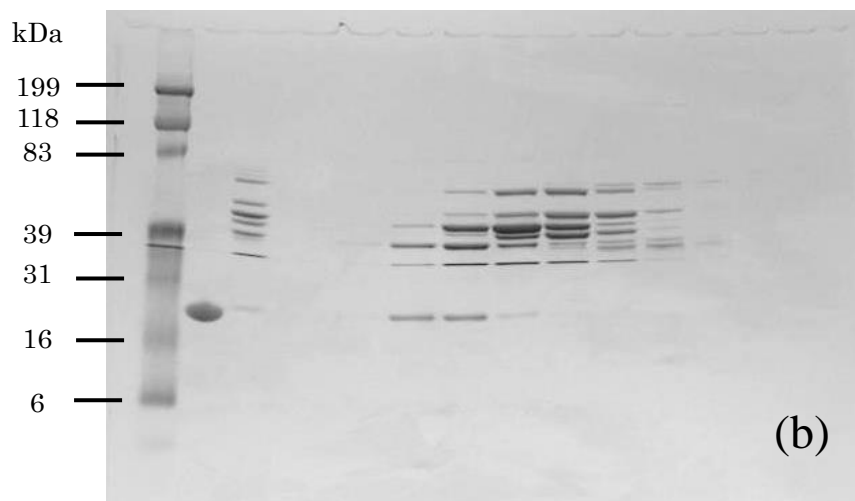
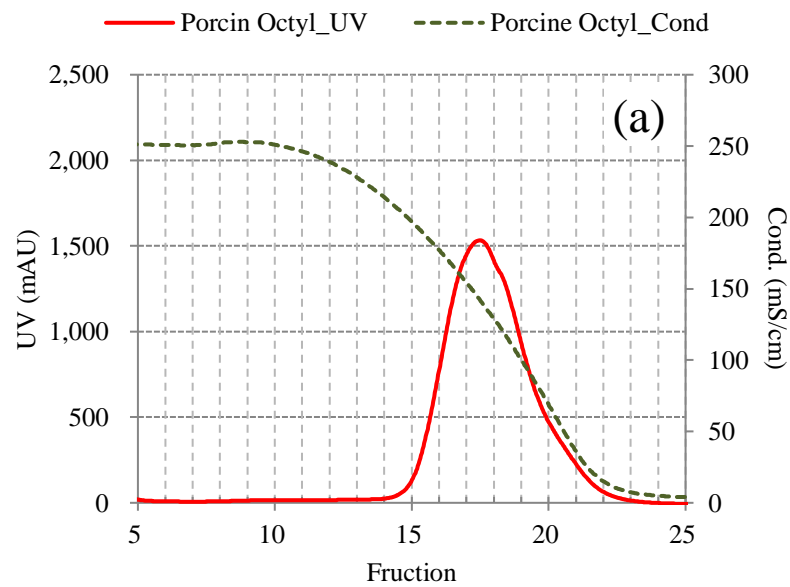


図 2.3.6. オクチルカラムでグラジエント溶出したときのブタ Mb の溶出挙動.  
 (a) オクチルカラムを用いたときの溶出曲線. (b) SDS-PAGE 像で、左列から分子量マーカー、標準 Mb (ウマ)、粗精製 Mb, Fr. 13~23. Fr. 13, 14 の泳動像は得られなかった.

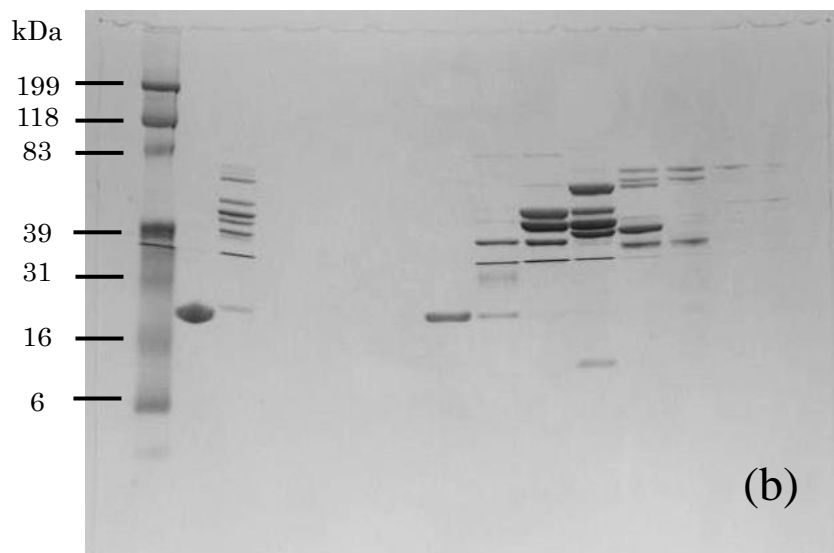
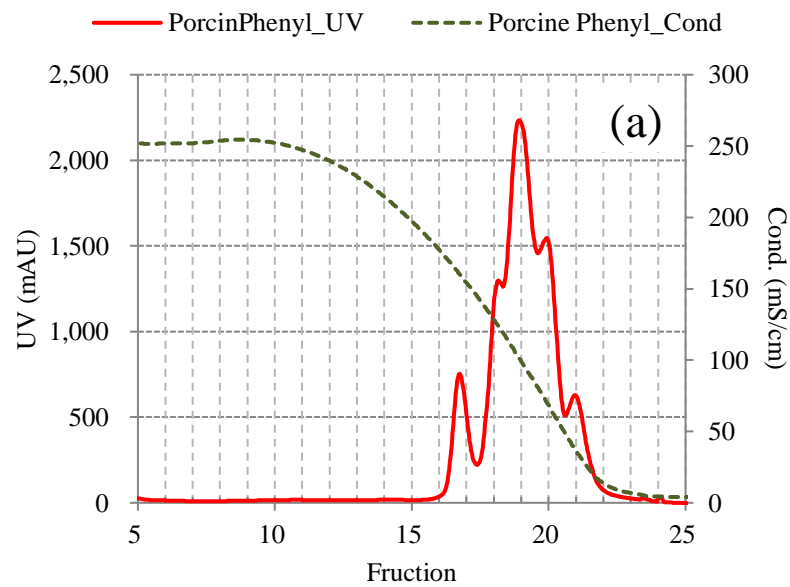


図 2.3.7. フェニルカラムでグラジエント溶出したときのブタ Mb の溶出挙動.

(a) フェニルカラムを用いたときの溶出曲線. (b) SDS-PAGE 像で、左列から分子量マーカー、標準 Mb (ウマ)、粗精製 Mb, Fr. 13~23. Fr. 13~ 15 の泳動像は得られなかった.

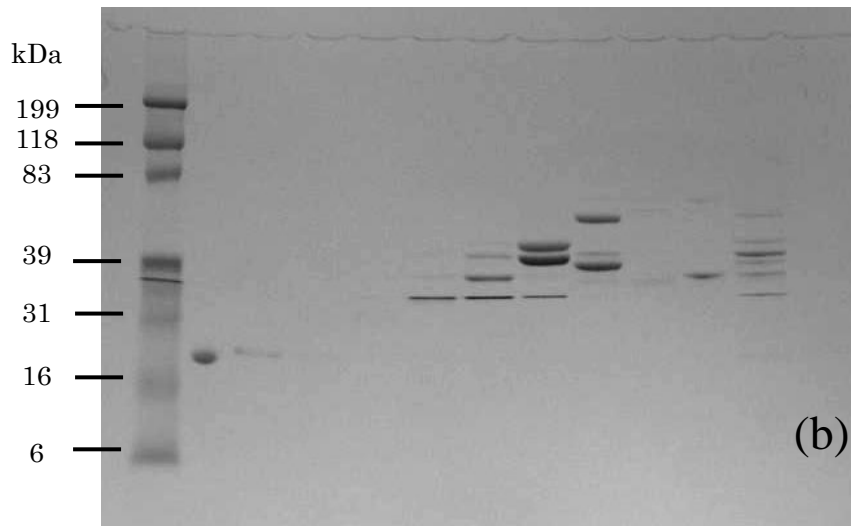
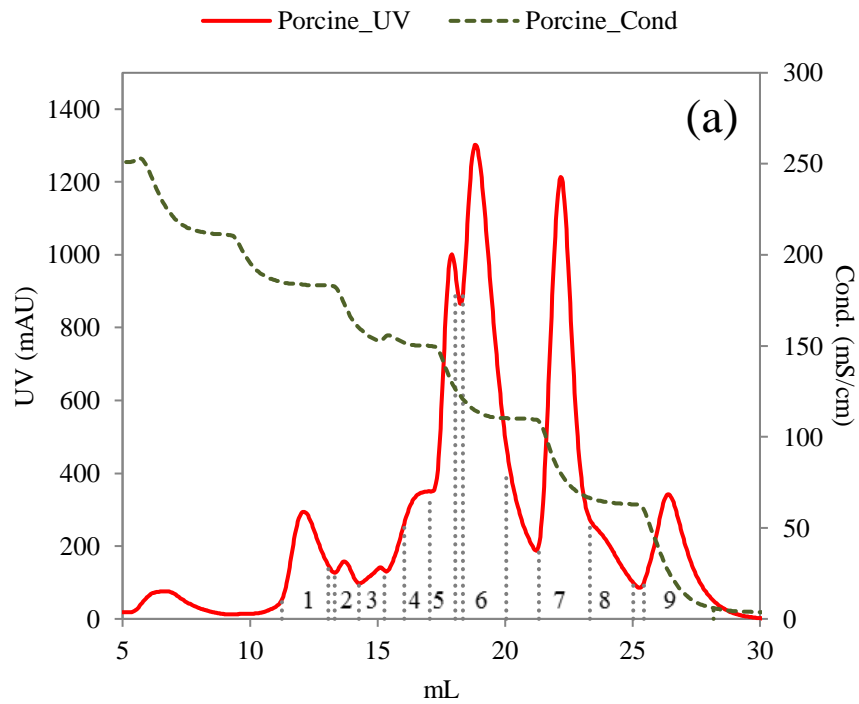


図 2.3.8. ステップワイズ法によるブタ Mb 粗抽出液の Fr. (a) と電気泳動図 (b).  
 (a) フェニルカラムでステップワイズ溶出したときの溶出曲線. (b) SDS-PAGE 像で, 左列から分子量マーカー, 標準 Mb (ウマ), Fr. 1~9.

以上の結果から、50%で吸着しなかったタンパク質を洗い、40%で Mb を回収して残余のタンパク質を 0%で洗い流すというプロトコルが好ましいと考えられた。

本プロトコルでクマおよびシカの Mb を分離した結果、動物種によらず、Mb を単離回収可能であることを確認した (図 2.3.9)。HIC カラムでは表面疎水性が低いほど早く溶出することから動物種によって Mb の表面疎水性が異なる可能性が示唆されたが、Mb とそれ以外のタンパク質との比率や、Mb の濃度が異なることから単純な比較はできないと考えられた。

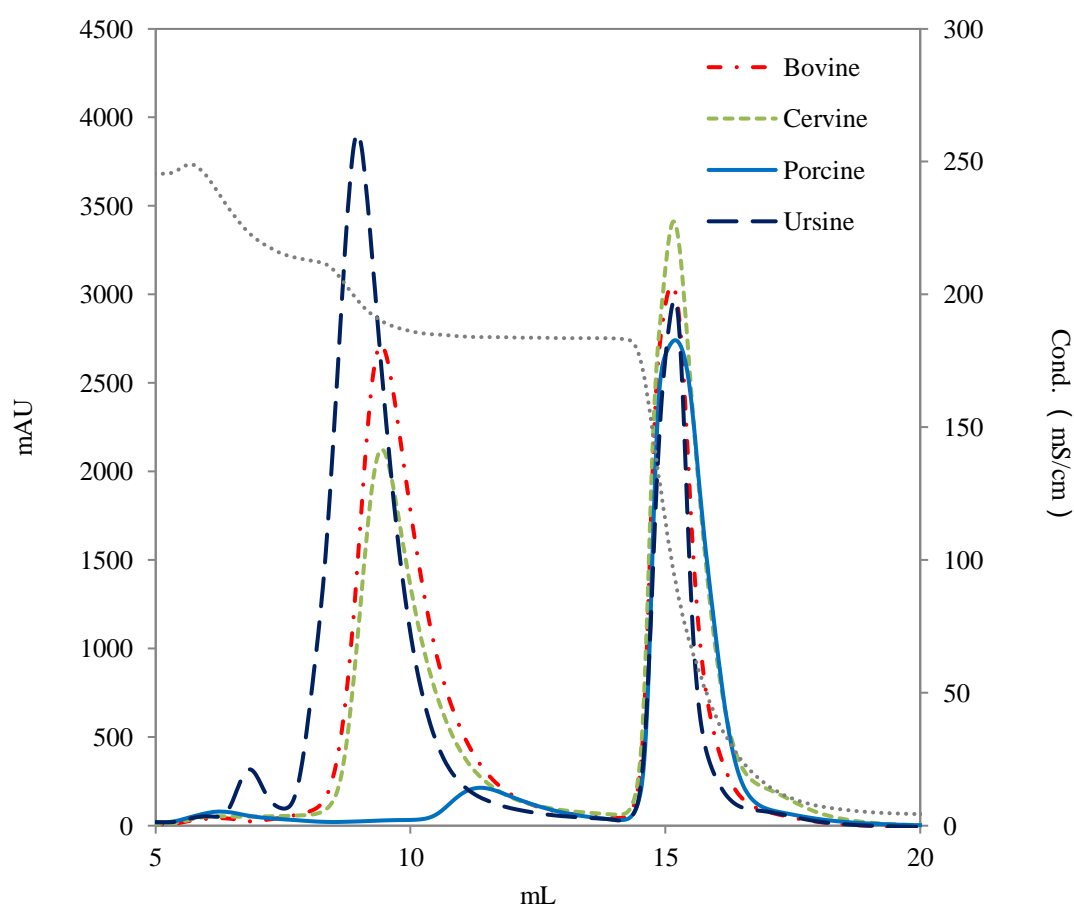


図 2.3.9. 設定プロトコルによるウシ、ブタ、シカおよびクマ Mb の溶出状況.

現在、ゲームミートあるいはジビエと呼ばれる獣肉を食肉として利用する試みが日本各地で進められており(高井ら 2013)、これまで日本で一般的ではなかった原料について、その生化学的特性ならびに加工特性を検討していく必要が生じると考えられた。これに対し HIC カラムによる Mb の精製はイオンクロマト法

(Satterlee と Zachariah IV 1972) で必要な脱塩作業が不要なことから時間短縮 (本プロトコルではカラムにアプライして 30 分以内に Mb を回収可能) となり、研究推進に寄与するものと期待される。

#### ヘム色素構成割合の評価方法の確立

食肉中に主に含まれるヘム色素として、Mb、Hb 以外に Cyt c があることを差スペクトル法 (Girard ら 1990) で確認した (データ省略)。これらのヘム色素の簡易な分離定量方法を確立する目的で分光光学的性質に着目し脱酸素型誘導体と CO 誘導体についてそれぞれの吸光スペクトルを確認した。なお O<sub>2</sub> 誘導体は調製に時間がかかること、生成する過程で酸化型誘導体を生じる可能性を否定できないことから考慮に含めなかった。また、NO 誘導体も実験上は安定性に欠けることから CO 誘導体の方が好ましいと考えられた (Fleming ら 1960)。

脱酸素型誘導体ならびに CO 誘導体でそのスペクトルの差を確認した結果、脱酸素型誘導体では Mb と Hb の間に特徴的な差が見られなかったのに対し、CO 誘導体では Mb、Hb および Cyt c がそれぞれ異なるスペクトルを示した (図 2.3.10)。このことから、CO 誘導体とすることで分光光学的にスペクトルを単離可能と考えられた。

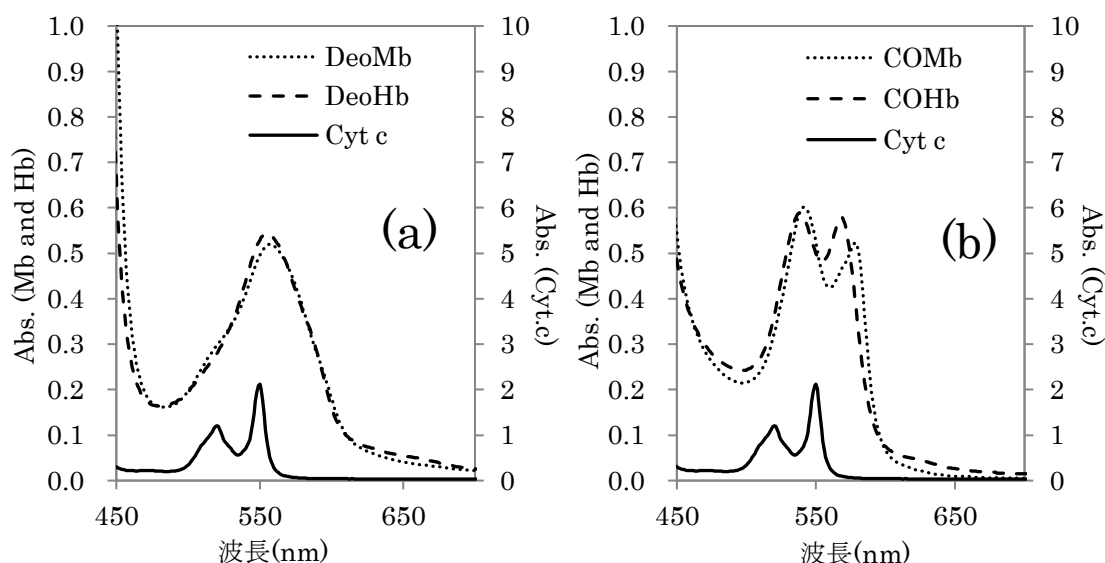


図 2.3.10. Mb、Hb および Cyt c の Deo 誘導体 (a) および CO 誘導体 (b)

分光光学的性質の中でも、吸光ピークの波長あるいは2~3分子間の等吸収率点は重要であり、分光光学的な定量で一般的に用いられる (Krzywicki 1982)。等吸収率点は2分子間の単位当たりの吸光係数が同一の点であり、単位濃度の和が一定の時にそれぞれの濃度比が変化しても吸光度は一定となる特徴を持つため、濃度計算をする場合に重要な役割を果たす。各ヘム色素のCO誘導体の吸光ピークを表2.3.1に示した。COMbとCOHbの重量当たりの等吸収率点は461、538、552、574および597 nmに観察された。なお、Cyt cの吸光係数は非常に高く、算出精度を低下させることが容易に予想できたため、COMbやCOHbとの等吸収率点は考慮しなかった。また、各波長における重量当たりの吸光係数を各誘導体の吸光スペクトルから算出した。ヘム色素の吸光度はそれぞれ加成性が確認できたので、それぞれの吸光係数からランベルトベール則に基づいて濃度算出が可能と考えられた。吸光ピークが見られる波長COMbとCOHbの等吸収率点が観察された合計11の波長から3波長を選択し、それぞれの重量濃度当たりの吸光係数をもとに3次の連立方程式を用意して濃度既知のヘム色素混合溶液の各ヘム色素の濃度を算出して算出精度が高かった波長の組み合わせを表2.3.2に示す。

表 2.3.1. 各ヘム色素のCO誘導体の吸収特性

Pigment	Peak (nm)		
	Soret	$\beta$	$\alpha$
Mb	423	541	578
Hb	420	538	568
Cyt c	415	520	550

表 2.3.2. 算出ヘム色素濃度から予測したスペクトルと実測スペクトルの相違

Combination of wavelength (nm)	Pork sample			
	A	B	C	D
538, 568, 578	0.215	0.256	0.330	1.037
541, 568, 578	0.206	0.322	0.317	1.120
520, 541, 578	0.253	0.260	0.400 <sup>†</sup>	1.683 <sup>†</sup>
520, 541, 550	0.192	0.272	0.335	0.948 <sup>†</sup>
520, 538, 568	0.202	0.588	0.313	0.949 <sup>†</sup>
520, 538, 578	0.215	0.295	0.325 <sup>†</sup>	1.278 <sup>†</sup>

<sup>†</sup> スペクトル形状の不一致が見られた。



表 2.3.1 に示した波長を任意に組み合わせることでその算出精度をよってスクリーニングした結果、表 2.3.2 に示す波長の組み合わせが選出された。さらに、スペクトル形状の差分を面積値として算出した結果、スペクトルの一致性が高かったのは 538、568 および 578 nm の組み合わせであり、Mb、Hb および Cyt c の濃度を算出可能であると考えられた。

各波長における吸光係数を明示する目的で以下に行列を示す。なお、本節の材料と方法に示す連立方程式は本行列を整理したものである。

$$\begin{pmatrix} 5.876 & 5.889 & 6.297 \\ 4.632 & 5.792 & 0.990 \\ 5.227 & 4.028 & 0.554 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \text{Mb (\%, w/v)} \\ \text{Hb (\%, w/v)} \\ \text{Cyt c (\%, w/v)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \text{A}_{538 \text{ nm}} \\ \text{A}_{568 \text{ nm}} \\ \text{A}_{578 \text{ nm}} \end{pmatrix}$$

### Mb の熱安定性

加熱した際の色調を写真 2.3.1 に、反射スペクトルを図 2.3.11 に示す。



写真 2.3.1. 加熱による豚肉色調の変化。

左から達温 43 °C から 76 °C まで 3 °C 毎. 70 °C で十分に加熱されたといえる色調に変化している。

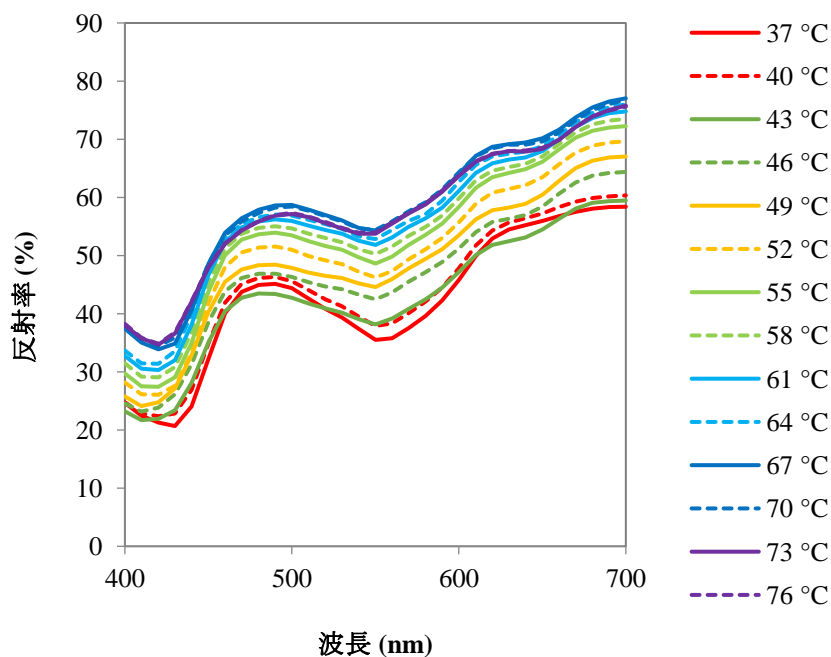


図 2.3.11. 加熱に伴う反射スペクトルの変化。

反射スペクトルは光の反射を波長ごとに捉えることができるのが利点であり、肉試料の表面だけではなく、光が届く深度まではヘム色素誘導体を推定できる。Karamucki ら (2013) は MetMb と OxyMb の割合が赤色度に大きく影響を持つこと、黄色度は DeoMb と MetMb の割合に影響を受けること、色相は Mb 誘導体の割合に支配されているのに対し、彩度は光に対して反応しうる色素の量に影響を受けていたことなどを報告している。定量的な評価はできないものの、反射スペクトルの形状から、40℃までは Deo 型誘導体がメインであるのに対し、43℃でわずかに酸化が起こったのちは 70℃までほとんど酸化は進まず、73℃で少し進んで 76℃までは変化なし、という結果が読み取れる。全体として反射率のベースラインが上がっているのは吸収される光が減少していることを示しており、食肉の中心部まで光が届かなくなっていることに起因する。Karamucki ら (2013) は Mb 誘導体割合と色調の関係について調べ、明るさ (L\*) に対して Mb 誘導体割合は小さな影響しか持たないと報告しているとおおり、今回の結果もヘム色素の変性によるものではなく、肉試料のタンパク質の変性に伴う白濁がこのベースライン増加に対応していると考えられた。

加熱温度の上昇に伴うヘム色素の構成割合ならびに水溶性タンパク量の変化を図 2.3.12 に示す。

水溶性タンパクの量は 43℃から 64℃まで低下し、反射スペクトルの結果と関係があることが示された。特に 61℃での変化量が顕著であった。これに対しヘム色素量は 52℃から減少し始め、最も変化量が大きかったのは 67℃であった。73℃以降はほとんど変化しなかった。Hb では 52℃から変性が始まったのに対し、Mb では 55℃から変性が開始したことから、Hbの方が Mb と比べて加熱安定性は低いと推定された。これに対し、Cyt c は 76℃までその量がほとんど変化しなかったことから、Cyt c は非常に高い加熱安定性があることが示唆された。この Cyt c の高い加熱安定性は Cyt c の構造が単純であることに起因していることが山本ら (2003) によって指摘されている。Cyt c は酸化状態でオレンジ色を、還元状態でピンク色を有し、非常に還元されやすい性質を持つことから鶏肉のピンキングの原因の一つとして推定されている (Holownia ら 2003)。ピンキングは消費者に未加熱と誤認される原因となる。この現象は家禽肉で多く報告されており、pH、Cyt c の存在、骨髓に含まれる酵素、NO、CO など原因とみられる要因が複数指摘されているものの具体的な対策は見つかっていない。本研究で抽出された Cyt c は還元型であ

りピンク色を有していた。ただし、加熱後の豚肉の色調は写真 2.3.1 に示す通りピンク色を呈してはおらず、Cyt c はピンキングの原因色素とはいえなかった。

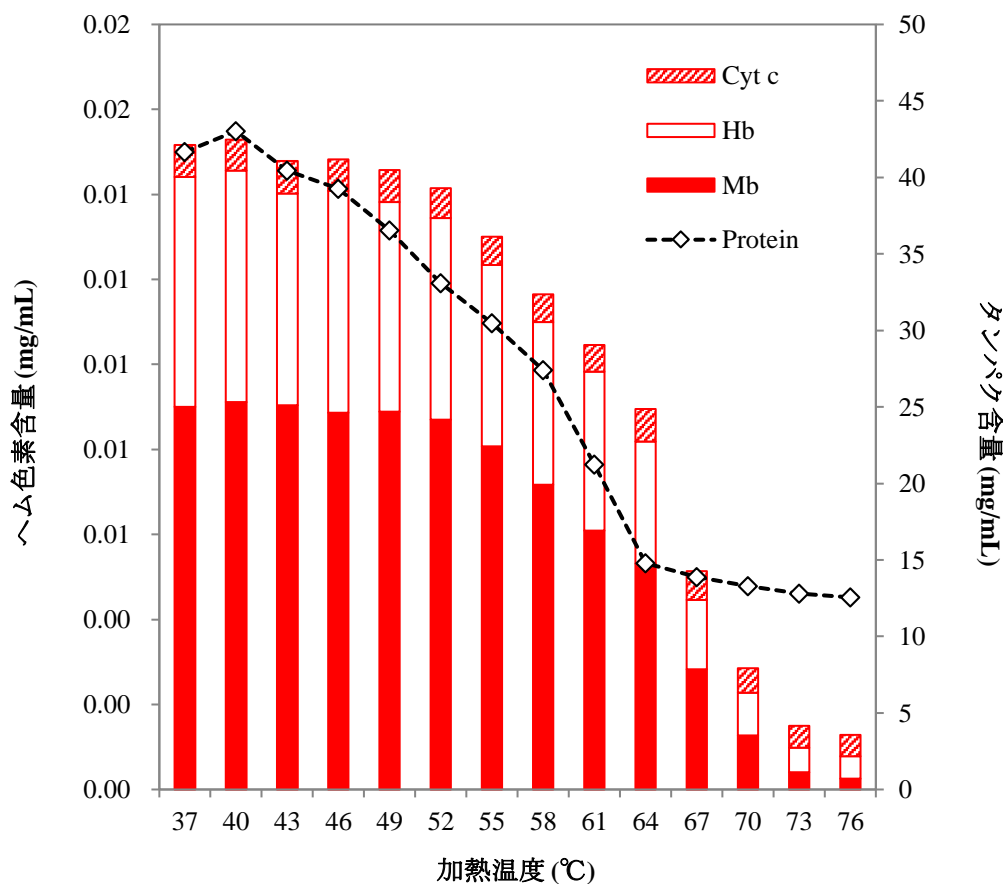


図 2.3.12. 加熱に伴う水溶性タンパクおよび水溶性ヘム色素の挙動.

Mb 誘導体の荷電状態で熱安定性が異なることが Lien ら (2002) によって報告されており、本研究でもそのような性質が認められた。すなわち、MetMb は OxyMb や DeoMb といった二価の誘導体と比較して低い温度で水溶性を失うことが示唆された (図 2.3.13)。ただし、この挙動からは二価の Mb の加熱安定性が高いのか、Mb の水溶性の喪失に先立って Mb の酸化が起こるのかは明らかにならなかった。

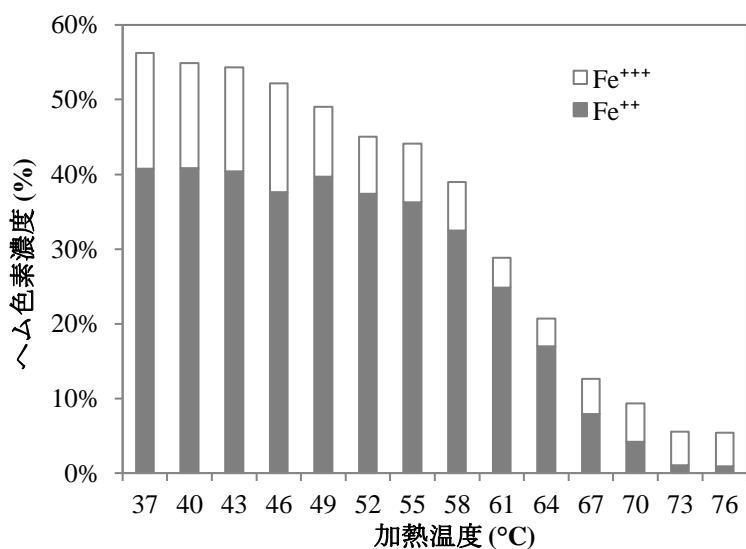


図 2.3.13. 加熱に伴う水溶性 Mb の酸化挙動.

単離 Mb の加熱凝集安定性を図 2.3.14 に示す。60 °C 以降で酸化が進むことが確認できた (同図中 metMb% を参照)。酸化に伴い加熱安定性が低下することを前述したが、酸化が進むことによって変性が始まることはなかった。凝集が認められたのは 78 °C 近辺であり、食肉中の Mb と比べるとはるかに高い加熱安定性を有することが示された。このことによって、食肉中の Mb がそれ自体で凝集沈殿しているのではなく、食肉中の他のタンパク質と結合して共沈殿することで水溶性を失っていることが示唆された。

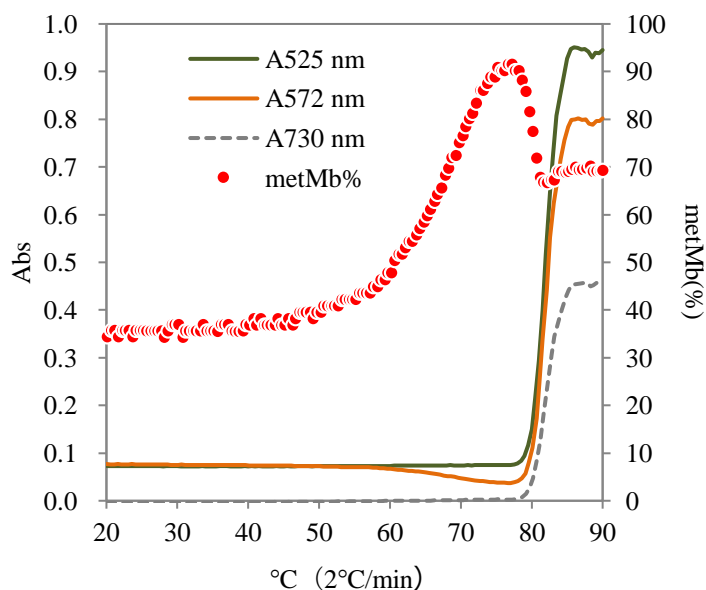


図 2.3.14. 単離ブタ Mb の加熱安定性.

DSC 測定の結果、ブタ Mb では 72.6 °C 付近に単一のピークが認められた (図 2. 3. 15)。DSC とは相転移や誘拐など熱の収支を伴う変化が起こった時の標準試料との熱量の差を検出するものであって、タンパク質の測定にあってはタンパク質の構造的変化が起こった場合にピークが得られることが一般的に知られている。Chanthai ら (1996) は、魚類では吸熱ピークが 2 つなのに対し哺乳類ではピークが 1 つであることを指摘しており、ヒツジで 67.5 °C、クジラで 72.5 °C にピークがあることを報告している。今回観察されたブタ Mb の吸熱ピークは単離 Mb が凝集沈殿を起こす 78 °C よりも低い温度で観察され、むしろ吸熱ピークの終わりの温度との間に相関があると考えられた。

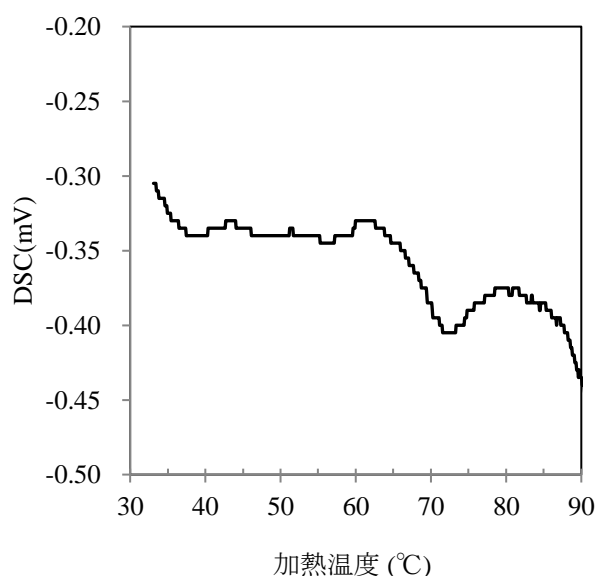


図 2. 3. 15. ブタ Mb の示差走査熱量計での測定結果.

質量中心法はタンパク質表面にあるトリプトファンなどの蛍光特性を持つアミノ酸を指標としてタンパク質の表面構造の変化の有無を推定する手法である。ブタ Mb では 55 °C 付近で質量中心の変化が起こり (図 2. 3. 16)、これらの値は常温で静置したのちも変化しなかった (データ示さず)。このことから、55 °C 付近でブタ Mb の表面構造は不可逆的な変化を起こすことが示唆された。この表面構造の変化が起こる温度と水溶性の喪失温度とに相関がみられることから、表面構造の変化が共沈殿を起こしやすくする原因の一つとなり得ると考えられた。

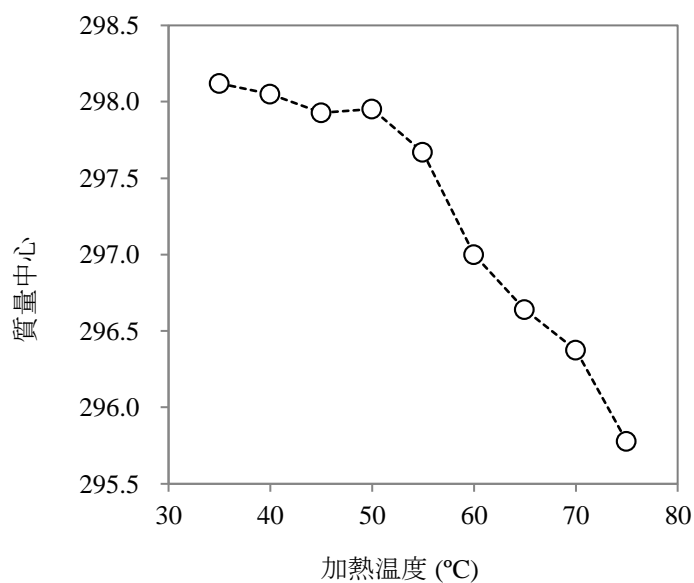


図 2.3.16. 加熱に伴うブタ Mb の質量中心の変化.

加熱処理がブタ Mb の CO 配位安定性に与える影響を図 2.3.17 (a) に、自動酸化速度に与える影響を同図 (b) に示した。70 °C の加熱は CO と Mb の配位結合安定性には影響しなかった。また、70 °C の加熱は Mb の自動酸化速度に変化は見られなかった。

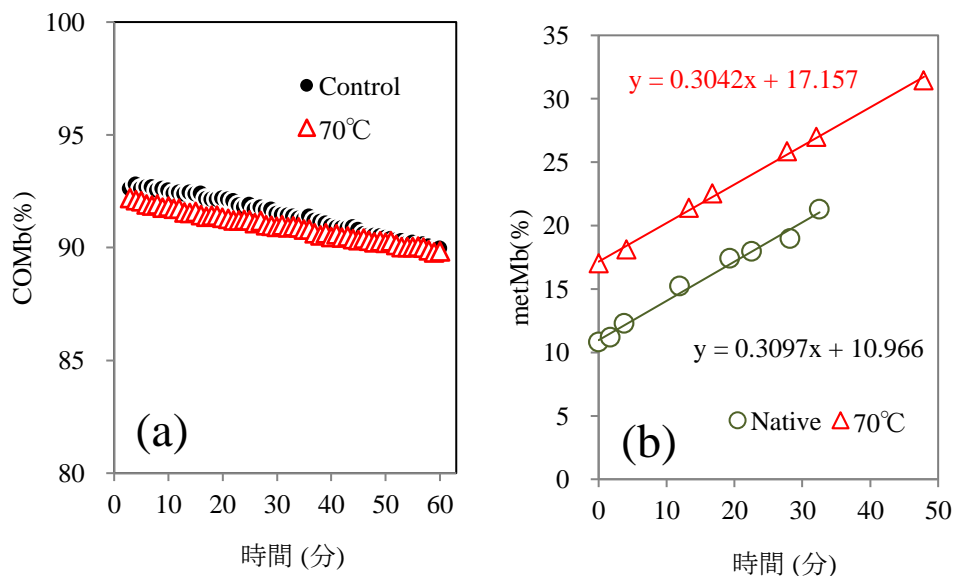


図 2.3.17. 加熱が Mb の CO 配位安定性 (a) と自動酸化速度 (b) に与える影響.

ヘムはEヘリックスとFヘリックスに挟み込まれた形で存在し、E7とF8の2つのHis残基に固定されている。ヘムの周囲にはバリンやフェニルアラニン等の非極性アミノ酸が存在するため、ヘムポケットは疎水性となっておりこれが酸化から守る構造となっている。外界から隔絶されたこのヘムポケットにガス分子がどのように収まるのか不明瞭であったが、富田ら(2009)はグロビン中をガス分子が通過する際に疎水性空洞が変形して経路となることを明らかにしている。ヘム単独では急速に酸化が進行するのに対し、グロビンと結合したMbやHbでは酸化の進行が遅いのはこの疎水性構造によるものとされていた。このように、加熱に伴うMbの構造の変化が配位子の結合安定性を減少させMbが容易に酸化するようになるという説明がなされてきたものの、少なくともMb単独でこのような変化が起こるとは考えられない結果だった。MbのHis残基はヘムポケット内に侵入してくる酸素分子や水分子、OH<sup>-</sup>などに対して一種のゲートとして作動する一方(Johnsonら1989, KarplusとMcCammon1986)、ヘム鉄の自動酸化反応に際しては触媒として働き、O<sub>2</sub>の生成を促進する。したがってMbの酸素分子交換頻度は分子構造依存的であって、還元力を一定にしたモデル溶液などの条件下では自動酸化速度から配位子の結合安定性を評価することができると考えられた。実際、E7Hisの位置(Renerreら1992)や総His残基数(Yinら2011)が自動酸化速度に影響することが示唆されていたものの、本実験では70℃の加熱によって自動酸化速度は変化しなかった。このことから、70℃の加熱ではこれらのHis残基の配置関係や数に影響はなかったと考えられた。当初、Mb分子構造の変化を二種類想定しており、一つはMb配位座の変性による配位結合力の変化であって、例えばJosephら(2010)はMbのアミノ酸配列の違いから、分子量の小さい(より単純な構造を持つ)Mbほど熱安定性が高いことを指摘している。もう一つはMbと他タンパクとの結合による性質の変化であって、Mbそれ自体の加熱安定性は高いにもかかわらず食肉中では比較的低温から変性することから、Mbが共沈殿する際にリガンド結合性を損なうことだった。今回の研究では前者のようなミオグロビン配位座あるいはそれを取り囲む疎水域の変性によるものではないことが示唆された。

早期褐変は微生物の制御上不十分な加熱条件にもかかわらず褐変することで消費者に十分な加熱がなされたとみなされる問題であり、原因にはpH、ヘム色素の酸化還元状態などが挙げられており、AMSA(American Meat Science Association、

アメリカ食肉科学協会) では加熱調理時に中心温度を測定することを推奨している。加熱に伴う褐変は Mb の酸化によるため (Karamucki ら 2013)、早期褐変は Mb の酸化が通常より低い温度で酸化するということが問題だといえる。今回、Mb 自体は 70 °C の加熱によって配位子との結合安定性に影響を受けないことが明らかになったことから、早期褐変では加熱によって Mb の還元力を損なう何らかの因子が影響していると推察された。

以上のとおり、70 °C の加熱によって Mb の構造に変化は起こるものの、配位子結合安定性には影響しないといえた。このことは CO をモデル分子とした場合と同様に、加熱に伴ってヘム色素が酸化しやすくなる原因は食肉中のタンパク質との結合による構造・機能の変化や、加熱に伴う Mb 還元酵素の失活の関与が示唆された。

## 小 括

まず、HIC クロマトグラフィーを用いてより簡易に Mb を分離精製できること、また、Mb、Hb および Cyt c を分光光学的に分離定量可能であることを確認した。

次に、これらの方法を用いて Mb の配位結合安定性に及ぼす加熱の影響を、単離 Mb と食肉中の Mb でそれぞれ確認した。加熱に対する Mb の挙動は食肉中と単独の状態では異なり、Mb 単独では食肉中にあるよりも加熱安定性が高いことが示された。この原因は、食肉中で Mb が水溶性を失う温度と Mb 単独で表面のトリプトファンを指標とした値に変化が認められた温度が一致することから、Mb 表面の構造変化が関与していることが示唆された。CO をモデル分子として加熱 Mb の配位結合安定性を評価したとき、加熱によって配位結合安定性が低下することはなかった。以上のことから、加熱に伴い食肉が色調安定性を失う原因の一つとして、食肉中のタンパク質と Mb が結合することによる構造・性質の変化、あるいは還元酵素の失活があると推察された。



本論文の一部は以下に公表した。

1. 和賀正洋, 押田敏雄, 坂田亮一: 豚肉中のミオグロビン, ヘモグロビンならびにシトクロム c の同時定量法の検討. 日豚会誌, 53 巻, 1 号, 10~15 頁, 2016 年

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、麻布大学獣医学部食品科学研究室教授坂田亮一先生にご指導を賜りました。先生には伊藤ハム株式会社中央研究所への就職を助けて頂き、さらには社会人ドクターとして本学再入学をお勧めいただきました。また、密なコミュニケーションを取れないことにご理解を頂きながら公私に渡る綿密なご指導ならびにご助力を賜りました。ここに深く御礼申し上げます。

副査を快諾いただき、ご指導を賜りました実験動物学研究室の猪股智夫先生におかれましては、機会あるごとに暖かい励ましのお言葉をいただきました。ここに御礼申し上げます。

同じく副査を快諾いただき、ご指導を賜りました動物行動管理学研究室の植竹勝治先生にここに御礼申し上げます。

日本獣医生命科学大学准教授時田昇臣先生は親切にもクマ肉ならびにシカ肉のサンプルを頂戴いたしました。ここに感謝いたします。

麻布大学への入学を応援、承認して頂きました伊藤ハム株式会社中央研究所土屋渉所長（当時）へここに深く御礼申し上げます。また、学生として研究生活を送ることを応援して下さった伊藤ハムの皆様にここにお礼申し上げます。

麻布大学食品科学研究室の諸氏におかれましては、同様の分野で研究し本研究の遂行にあたりヒントを与えてくださいました。修士課程時代に食肉中の発色剤の挙動を共に研究した吉川拓也様（2011 卒）、硝酸塩の分解反応について基礎試験を手伝っていただいた橋爪美帆様（2014 卒）、加熱に伴う Mb の配位力の変化について基礎試験を手伝っていただいた坂本るみ様（2015 卒）、色調が市場価値に及ぼす影響について基礎試験をして頂きました堀内俊二様（2015 卒）、アスコルビン酸 Na が持つ亜硝酸塩の定量阻害機構について実験して頂きました田中善久様（2014 卒）、退色時のヘム色素の動態について基礎試験をして頂きました石井江莉子様（2014 卒）に御礼申し上げます。さらに、麻布大学食品科学研究室の皆さまにはサンプルや参考文献の手配などでお手伝いを頂きました。ここにお礼申し上げます。

麻布大学食品科学研究室講師の竹田志郎先生におかれましては、学術のみならず私事にあっても良き相談相手となってくださいました。ここに御礼申し上げます。

食肉中の発色剤の挙動につきましては修士として研究した2年間の成果を土台

とするものであり、弘前の両親にはその課程卒業まで学業を支えて頂きました。  
また、研究活動を応援いただきました。ここに感謝いたします。

三島の両親には、学生生活を送ることに理解、ならびに生活面での支援を賜りましたこと、ここに御礼申し上げます。

就学中に誕生した長男紘人もきっと応援してくれていたことと思います。また、最後になりましたが、蓄えの少ない中3年間を学生として研究にささげることが快諾し、また陰になり日向になり応援してくれた妻、敦子に深く感謝を捧げます。

## 引用文献

- Acton J, Ferguson L, Dick R. 1986. Effect of oxygen transmission rate of packaging films on color stability of vacuum packaged chicken bologna. *Poultry science* **65**, 1124-1128.
- Alley G, Cours D, Demeyer D. 1992. Effect of nitrate, nitrite and ascorbate on colour and colour stability of dry, fermented sausage prepared using 'back slopping'. *Meat Science* **32**, 279-287.
- Andersen H, Bertelsen G, Boegh-Soerensen L, Shek C, Skibsted L. 1988. Effect of light and packaging conditions on the colour stability of sliced ham. *Meat Science* **22**, 283-292.
- Andersen HJ, Skibsted LH. 1992. Kinetics and mechanism of thermal oxidation and photooxidation of nitrosylmyoglobin in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1741-1750.
- Antonini E, Brunori M. 1971. Hemoglobin and myoglobin in their reaction with ligands. *Frontiers of Biology* **21**.
- Arihara K, Cassens RG, Greaser ML, Luchansky JB, Mozdziak PE. 1995. Localization of metmyoglobin-reducing enzyme (NADH-cytochrome b 5 reductase) system components in bovine skeletal muscle. *Meat Science* **39**, 205-213.
- Arnold EV, Bohle DS. 1996. Isolation and oxygenation reactions of nitrosylmyoglobins. *Methods in Enzymology* **269**, 41-55.
- Böhner N, Danzl W, Rieblinger K. 2013. Influence of LED-illumination on discoloration and oxygen uptake on cured boiled sausage. *59th International Congress of Meat Science and Technology*. Izmir, Turkey.
- Bergamaschi M, Pizza A. 2011. Effect of pork meat pH on iron release from heme molecule during cooking. *Journal of Life Science* **5**, 376-380.
- Binkerd E, Kolari O. 1975. The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. *Food and Cosmetics Toxicology* **13**, 655-661.
- Bozkurt H, Erkmen O. 2004. Effect of nitrate/nitrite on the quality of sausage (sucuk) during ripening and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**, 279-286.
- Buchanan RL, Solberg M. 1972. Interaction of sodium nitrate, oxygen and pH on growth

- of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science* **37**, 81-85.
- Carballo J, Cavestany M, Jiménez-Colmenero F. 1991. Effect of light on colour and reaction of nitrite in sliced pork bologna under different chilled storage temperatures. *Meat Science* **30**, 235-244.
- Çarkcioğlu E, Gültekinoglu E, Candoğan K. 2013. Residual nitrite content of sliced-pastirma as affected by oxygen scavengers and modified atmosphere packaging during refrigerated storage. *59th International Congress of Meat Science and Technology*. Izmir, Turkey.
- Cassens R, Greaser M, Ito T, Lee M. 1979. Reactions of nitrite in meat. *Food Technology (USA)*, 46-57.
- Chanthai S, Ogawa M, Tamiya T, Tsuchiya T. 1996. Studies on thermal denaturation of fish apomyoglobins using differential scanning calorimetry, circular dichroism, and fluorescence. *Fisheries Science* **62**, 933-937.
- Chow CJ, Chu YJ. 2004. Effect of heating on residual carbon monoxide content in co-treated tuna and myoglobin. *Journal of Food Biochemistry* **28**, 476-487.
- Denbigh K, Prince A. 1947. Kinetics of nitrous gas absorption in aqueous nitric acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **20**, 790-801.
- Droghetti E, Focardi C, Nocentini M, Smulevich G. 2013. A spectrophotometric method for the detection of carboxymyoglobin in beef drip. *International Journal of Food Science & Technology* **48**, 429-436.
- Emi-Miwa M, Okitani A, Fujimaki M. 1976. Comparison of the fate of nitrite added to whole meat, meat fractions and model systems. *Agricultural and Biological Chemistry* **40**, 1387-1392.
- Ender F, Harve G. 1964. Isolation and identification of a hepato-toxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Naturwissenschaften* **5**, 637.
- Faustman C, Sun Q, Mancini R, Suman SP. 2010. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science* **86**, 86-94.
- Fleming H, Blumer T, Craig H. 1960. Quantitative estimations of myoglobin and hemoglobin in beef muscle extracts. *Journal of Animal Science* **19**, 1164-1171.
- Forrest JC, Aberle ED, Hedrick HB, Judge MD, Merkel RA. 1975. Principles of meat

- processing. In: Schweigert B (ed.) *Principles of meat science*. WH Freeman and Co.,193-201. WH Freeman and Co., San Francisco.
- Fox JB, Nicholas RA. 1974. Nitrite in meat. Effect of various compounds on loss of nitrite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **22**, 302-306.
- Fox JB, Sebranek JG, Phillips JG. 1994. Kinetic analysis of the formation of nitrosylmyoglobin. *Journal of Muscle Foods* **5**, 15-25.
- Freybler L, Gray J, Asghar A, Booren A, Pearson A, Buckley D. 1993. Nitrite stabilization of lipids in cured pork. *Meat Science* **33**, 85-96.
- Girard B, Vanderstoep J, Richards J. 1990. Characterization of the residual pink color in cooked turkey breast and pork loin. *Journal of Food Science* **55**, 1249-1254.
- Gotoh T, Shikama K. 1974. Autoxidation of native oxymyoglobin from bovine heart muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **163**, 476-481.
- Gray J, Pearson A. 1987. Rancidity and warmed-over flavor. *Advances in Meat Research (USA)* **3**, 221.
- Gray JI, Monahan FJ. 1992. Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends in Food Science & Technology* **3**, 315-319.
- Grebitus C, Jensen HH, Roosen J. 2010. US and German consumer preferences for ground beef packaged under a modified atmosphere. *115th Joint EAAE/AAEA Seminar, September 15-17, 2010, Freising-Weihenstephan, Germany*. European Association of Agricultural Economists & Agricultural and Applied Economics Association.
- Grebitus C, Jensen HH, Roosen J, Sebranek JG. 2013. Fresh meat packaging: Consumer acceptance of modified atmosphere packaging including carbon monoxide. *Journal of Food Protection* **76**, 99-107.
- Greene BE, Hsin IM, Zipser MYW. 1971. Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *Journal of Food Science* **36**, 940-942.
- Hammes WP. 2012. Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology* **29**, 151-156.
- Hezel M, Weitzberg E. 2015. The oral microbiome and nitric oxide homeostasis. *Oral Diseases* **21**, 7-16.
- Holownia K, Chinnan M, Reynolds A. 2003. Pink color defect in poultry white meat as

- affected by endogenous conditions. *Journal of Food Science* **68**, 742-747.
- Honikel K-O. 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science* **78**, 68-76.
- Huang F, Huang M, Xu X, Zhou G. 2011. Influence of heat on protein degradation, ultrastructure and eating quality indicators of pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 443-448.
- Hunt M, Zenger B. 2002. Cooked color in pork. *FACTS National Pork Board* **1637**, 1-4.
- Hustad GO, Cerveny JG, Trenk H, Deibel RH, Kautter DA, Fazio T, Johnston RW, Kolari OE. 1973. Effect of sodium nitrite and sodium nitrate on botulinal toxin production and nitrosamine formation in wieners. *Applied Microbiology* **26**, 22-26.
- Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE. 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 8103-8107.
- Iizuka T, Yamamoto H, Kotani M, Yonetani T. 1974. Low temperature photodissociation of hemoproteins: carbon monoxide complex of myoglobin and hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* **371**, 126-139.
- Johnson KA, Olson JS, Phillips GN. 1989. Structure of myoglobin-ethyl isocyanide histidine as a swinging door for ligand entry. *Journal of Molecular Biology* **207**, 459-463.
- Joseph P, Suman S, Li S, Beach C, Claus J. 2010. Mass spectrometric characterization and thermostability of turkey myoglobin. *LWT-Food Science and Technology* **43**, 273-278.
- Kamarei AR, Karel M. 1982. An improved method for preparation of nitric oxide myoglobin. *Journal of Food Science* **47**, 682-683.
- Karamucki T, Jakubowska M, Rybarczyk A, Gardzielewska J. 2013. The influence of myoglobin on the colour of minced pork loin. *Meat Science* **94**, 234-238.
- Karplus M, McCammon JA. 1986. The dynamics of proteins. *Scientific American* **254**, 42.
- Kharitonov VG, Sundquist AR, Sharma VS. 1994. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 5881-5883.

- King D, Shackelford S, Kalchayanand N, Wheeler T. 2012. Sampling and aging effects on beef longissimus color stability measurements. *Journal of Animal Science* **90**, 3596-3605.
- King D, Shackelford S, Kuehn L, Kemp C, Rodríguez AB, Thallman R, Wheeler T. 2010. Contribution of genetic influences to animal-to-animal variation in myoglobin content and beef lean color stability. *Journal of Animal Science* **88**, 1160-1167.
- King D, Shackelford S, Wheeler T. 2011. Relative contributions of animal and muscle effects to variation in beef lean color stability. *Journal of Animal Science* **89**, 1434-1451.
- Krzywicki K. 1982. The determination of haem pigments in meat. *Meat Science* **7**, 29-36.
- Lawrie R. 1985. *Meat Science* (4th). De. Pergamon Press. Oxford.
- Lee RB, DeVore I. 1968. *Man the hunter*. Transaction Publishers, Piscataway Township.
- Li H, Li C, Xu X, Zhou G. 2012. Effects of illumination and packaging on non-heme iron and color attributes of sliced ham. *Meat Science* **91**, 521-526.
- Lien R, Hunt M, Anderson S, Kropf D, Loughin T, Dikeman M, Velazco J. 2002. Effects of endpoint temperature on the internal color of pork patties of different myoglobin form, initial cooking state, and quality. *Journal of Food Science* **67**, 1011-1015.
- Møller JK, Bertelsen G, Skibsted LH. 2002. Photooxidation of nitrosylmyoglobin at low oxygen pressure. Quantum yields and reaction stoichiometries. *Meat Science* **60**, 421-425.
- Møller JK, Jensen JS, Olsen MB, Skibsted LH, Bertelsen G. 2000. Effect of residual oxygen on colour stability during chill storage of sliced, pasteurised ham packaged in modified atmosphere. *Meat Science* **54**, 399-405.
- Møller JK, Jensen JS, Skibsted LH, Knöchel S. 2003. Microbial formation of nitrite-cured pigment, nitrosylmyoglobin, from metmyoglobin in model systems and smoked fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* strains and a commercial starter culture. *European Food Research and Technology* **216**, 463-469.
- Mancini R, Hunt M. 2005. Current research in meat color. *Meat science* **71**, 100-121.
- Marco A, Navarro JL, Flores M. 2006. The influence of nitrite and nitrate on microbial,



- chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science* **73**, 660-673.
- Midura T, Nygaard G, Wood R, Bodily H. 1972. Clostridium botulinum type F: isolation from venison jerky. *Applied microbiology* **24**, 165-167.
- Monahan F, Crackel R, Gray J, Buckley D, Morrissey P. 1993. Catalysis of lipid oxidation in muscle model systems by haem and inorganic iron. *Meat Science* **34**, 95-106.
- Monahan FJ, Skibsted LH, Andersen ML. 2005. Mechanism of oxymyoglobin oxidation in the presence of oxidizing lipids in bovine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 5734-5738.
- Morrot G, Brochet F, Dubourdieu D. 2001. The color of odors. *Brain and Language* **79**, 309-320.
- Munk MB, Huvaere K, Van Boclaer J, Skibsted LH. 2010. Mechanism of light-induced oxidation of nitrosylmyoglobin. *Food Chemistry* **121**, 472-479.
- Nuñez De González MT, Osburn WN, Hardin MD, Longnecker M, Garg HK, Bryan NS, Keeton JT. 2012. Survey of residual nitrite and nitrate in conventional and organic/natural/uncured/indirectly cured meats available at retail in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 3981-3990.
- Ochiai Y. 2011. Temperature dependent structural perturbation of tuna myoglobin. *WASET* **74**, 731-735.
- Ockerman H, Kuo J. 1982. Dried pork as influenced by nitrate, packaging method and storage. *Journal of Food Science* **47**, 1631-1661.
- Olson JS, Phillips Jr GN. 1997. Myoglobin discriminates between O<sub>2</sub>, NO, and CO by electrostatic interactions with the bound ligand. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2**, 544-552.
- Perez-Rodriguez ML, Bosch-Bosch N, García-Mata M. 1996. Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. *Meat Science* **44**, 65-73.
- Perlo F, Gago-Gago A, Rosmini M, Cervera-Perez R, Perez-Alvarez J, Pagan-Moreno M, Lopez-Santovenia F, Aranda-Catala V. 1995. Modification of physico-chemical and colour parameters during the marketing of 'paté'. *Meat Science* **41**, 325-333.
- Pfeiffer S, Gorren AC, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B. 1997.

- Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2: 1 stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 3465-3470.
- Pires M, Rossi MJ, Ross DS. 1994. Kinetic and mechanistic aspects of the NO oxidation by O<sub>2</sub> in aqueous phase. *International Journal of Chemical Kinetics* **26**, 1207-1227.
- Plassmann H, O'Doherty J, Shiv B, Rangel A. 2008. Marketing actions can modulate neural representations of experienced pleasantness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 1050-1054.
- Poel WE. 1949. Effect of anoxic anoxia on myoglobin concentration in striated muscle. *American Journal of Physiology--Legacy Content* **156**, 44-51.
- Postnikova G, Shekhovtsova E. 2013. Effect of artificial and natural phospholipid membranes on rate of sperm whale oxymyoglobin autooxidation. *Biochemistry (Moscow)* **78**, 267-272.
- Price J, Schweigert B. 1987. *The science of meat and meat products*. Food and Nutrition Press, Westport, CN.
- Purwar N, McGarry JM, Kostera J, Pacheco AA, Schmidt M. 2011. Interaction of nitric oxide with catalase: Structural and kinetic analysis. *Biochemistry* **50**, 4491-4503.
- Renner M, Anton M, Gatellier P. 1992. Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles. *Meat Science* **32**, 331-342.
- Sakata R, Nagata Y. 1991. Mechanism for the color formation of cooked cured pork by an endogenous factor. *Fleischwirtschaft* **71**, 1188-1190.
- Sander J, Schweinsberg F, Menz H. 1968. Studies on the origin of carcinogenic nitrosamines in the stomach. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **349**, 1691-1697.
- Santarelli RL, Vendevre J-L, Naud N, Taché S, Guéraud F, Viau M, Genot C, Corpet DE, Pierre FH. 2010. Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prevention Research* **3**, 852-864.
- Satterlee L, Zachariah IV Y. 1972. Porcine and ovine myoglobin: isolation, purification, characterization and stability. *Journal of Food Science* **37**, 909-912.

- Schleifer K, Fischer U. 1982. Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **32**, 153-156.
- Sebranek JG, Bacus JN. 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science* **77**, 136-147.
- Shahidi F. 2012. *Flavor of meat and meat products*. Springer Science & Business Media, New York.
- Shahidi F, Pegg RB. 1991. Novel synthesis of cooked cured - meat pigment. *Journal of Food Science* **56**, 1205-1208.
- Shenk JH, Hall JL, King H. 1934. Spectrophotometric characteristics of hemoglobins I. Beef blood and muscle hemoglobins. *Journal of Biological Chemistry* **105**, 741-752.
- Sindelar JJ, Milkowski AL. 2011. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curing and examining the risk/benefit of its use. *American Meat Science Association White Paper Series* **3**, 1-14.
- Skibsted LH. 2011. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. *Nitric Oxide* **24**, 176-183.
- Suman S, Joseph P, Li S, Steinke L, Fontaine M. 2009. Primary structure of goat myoglobin. *Meat Science* **82**, 456-460.
- Suman S, Rentfrow G, Nair M, Joseph P. 2014a. Proteomics of muscle-and species-specificity in meat color stability. *Journal of Animal Science* **92**, 875-882.
- Suman SP, Hunt MC, Nair MN, Rentfrow G. 2014b. Improving beef color stability: Practical strategies and underlying mechanisms. *Meat Science* **98**, 490-504.
- Sun W, Zhou G, Xu X, Peng Z. 2009. Studies on the structure and oxidation properties of extracted cooked cured meat pigment by four spectra. *Food Chemistry* **115**, 596-601.
- Tang J, Faustman C, Hoagland T. 2004. Krzywicki revisited: Equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extracts. *Journal of Food Science* **69**.
- Thiansilakul Y, Benjakul S, Richards MP. 2011. The effect of Fenton's reactants and aldehydes on the changes of myoglobin from Eastern little tuna (*Euthynnus*

- affinis) dark muscle. *European Food Research and Technology* **232**, 221-230.
- Trout GR, Gutzke DA. 1996. A simple, rapid preparative method for isolating and purifying oxymyoglobin. *Meat Science* **43**, 1-13.
- Wakamatsu J, Nishimura T, Hattori A. 2004. A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham. *Meat Science* **67**, 95-100.
- Wikipedia. へム [homepage on the Internet]. [cited 23 December 2014]. Available from: [https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%98%E3%83%A0#/media/File:Heme\\_b.svg](https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%98%E3%83%A0#/media/File:Heme_b.svg)
- Wolf G, Hammes WP. 1988. Effect of hematin on the activities of nitrite reductase and catalase in lactobacilli. *Archive of Microbiology* **149**, 220-224.
- Yang F, Phillips Jr GN. 1996. Crystal structures of CO-, deoxy- and Met-myoglobins at various pH values. *Journal of molecular biology* **256**, 762-774.
- Yin S, Faustman C, Tatiyaborworntham N, Ramanathan R, Maheswarappa NB, Mancini RA, Joseph P, Suman SP, Sun Q. 2011. Species-specific myoglobin oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 12198-12203.
- 安井勉. 1957. Myoglobin に関する研究. *日本畜産学会報* **27**, 325-328.
- 永田致治, 坂田亮一. 1989. 塩漬の過程で起こるミオグロビンの性状変化. *食肉に関する助成研究調査成果報告書* **7**, 343-348.
- 永田致治, 坂田亮一. 1993. 牛血液の有効利用: ニトロソヘモグロビンの調製と安定化. *食肉に関する助成研究調査成果報告書* **11**, 374-381.
- 奥田弘枝, 田坂美央, 由井明子, 川染節江. 2002. 食品の色彩と味覚の関係. *日本調理科学会誌* **35**, 2-9.
- 奥田泰士, 藤原正史, 谷宏, 金子美如, 押田敏雄, 坂田亮一. 2013. 岩塩添加による豚肉の赤色化要因. *日豚会誌* **50**, 62.
- 岡崎太郎. 1987. 血色素. In: 奥山隆 (ed.) *動物成分利用集成 陸産動物編. R&D プランニング. R&D プランニング*, 東京.
- 岡部昭二. 1977. 野菜および食品中の硝酸塩をめぐって. *化学と生物* **15**, 352-359.
- 加藤健二, 大竹恵子. 2012. 食物の視覚呈示のみでも感性満腹感は生じるのか? (2012 年度日本味と匂学会第 46 回大会). *日本味と匂学会誌* **19**, 405-408.
- 吉川拓也. 2011. 硝石を用いた塩漬食肉製品の試作とその理化学的評価. In: 麻布大学食品科学研究室 (ed.) *麻布大学食品科学研究室卒業論文集*.

- 橋本壽夫. 2009. *塩の事典*. 東京堂出版, 東京.
- 向日良夫, 原久子, 谷口寛一. 1991. 2, 3-ジアミノナフタレンを用いる亜硝酸及び亜硝酸アミルの蛍光定量. *分析化学* **40**, 105-107.
- 高井伸二, 門平睦代, 青木博史, 村田浩一, 前田健, 小野文子, 山本茂貴. 2013. 野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究. *日本野生動物医学会誌* **18**, 83-86.
- 佐原眞. 1990. 座談会 食肉業界および行政から見た食肉産業史証言. In: 本間建彦 (ed.) *日本食肉文化史*. 伊藤記念財団, 479-480. 伊藤記念財団, 東京.
- 坂田種男. 1979. 色彩と食物. *食品衛生研究* **29**, 897-907.
- 坂田亮一, 西橋 耕平, 下村 亜弥, 藤原 正史, 奥田 泰士. 2012. 岩塩添加による豚肉の赤色化増強. *日豚会誌* **49**, 52.
- 山本泰彦, 照井 教文, 長谷川 淳, 三本木 至宏, 内山 進, 小林 祐次, 五十嵐 泰夫. 2003. 電子伝達タンパク質シトクロム c の 熱安定性と機能調節の分子機構. *化学と生物* **41**, 190-197.
- 四釜慶治, 松岡有樹, 菅原芳明. 2001. ミオグロビン・ヘモグロビンの自動酸化反応. *生物物理* **41**, 74-79.
- 新村裕. 1981. ピックル注入法におけるハムの塩漬期間中の保水力, 亜硝酸根残存量, 発色率, 食塩拡散状態, 硝酸塩からの亜硝酸根生成量の変化 [マルチタイプピックルインジェクターによるハム類の製造法に関する研究-5-]. *日本食品工業学会誌* **28**, p554-561.
- 森重敏子, 青山よしの, 堀洋子, 金子小千枝. 1981. 食品の色彩的嗜好に関する研究 (第 1 報). *調理科学* **14**, 247-252.
- 川嶋比野, 数野千恵子. 2009. 皿色に占める青色の割合が心理的なおいしさに与える影響. *日本家政学会誌* **60**, 553-560.
- 増田知尋, 木村敦. 2011. 視覚による食の認知. In: 日下部裕子, 和田有史 (eds) *味わいの認知科学 舌の先から脳の向こうまで*. 頸草書房, 124-133. 頸草書房, 東京.
- 村上陽子. 2012. 練りきりの色彩と食嗜好イメージの関係: 大学生の場合. *静岡大学教育学部研究報告. 人文・社会・自然科学篇* **62**, 143-159.
- 大谷貴美子. 1999. 視覚による現代人の食のイメージと食嗜好性. *浦上財団研究報告書* **7**, 102-112.
- 谷垣昌敬, 武藤邦夫, 土屋博嗣. 1989a. 一酸化窒素の溶存酸素による液相酸化速度. *化学工学論文集* **15**, 1115-1119.

- 谷垣昌敬, 武藤邦夫, 土屋博嗣, 後藤英司, 佐藤俊樹. 1989b. 酸性水溶液中における亜硝酸の自己分解. *化学工学論文集* **15**, 1102-1108.
- 谷崎潤一郎. 1939. *陰翳礼讃*. 創元社, 大阪.
- 中川裕子, 青木 真由, 児島 希, 小泉 理恵. 2013. 色彩を添加したおやつに対する幼児嗜好性について. *山梨学院短期大学研究紀要* **33**, 128-131.
- 中谷昭. 1988. 加齢ならびに運動とマウス骨格筋, 心筋ミオグロビン含量の変動. *日本生理学雑誌* **50**, p709-718.
- 長橋雅人. 2010. ランチョンマットの色彩が食事の印象に与える影響: 中間色に着目して. *仙台大学紀要* **41**, 231-239.
- 田中淳子. 1996. 井戸水が原因で高度のメトヘモグロビン血症を呈した 1 新生児例. *小児科臨床* **49**, 1661-1665.
- 富田文菜, 足立伸一, 腰原伸也. 2009. 蛋白質の内部にある疎水性空洞の"深呼吸"をみる-時間分解 X 線構造解析法による蛋白質ダイナミクスの研究. *蛋白質核酸酵素* **54**, 1395-1401.
- 木村正弘. 1988. 多様化する食品加工における硝酸塩、亜硝酸塩の適性使用. *New Food Industry* **30**, 25-32.
- 門田元, 多賀信夫. 1985. *海洋微生物研究法*. 学会出版センター, 東京.
- 里見弘治, 佐々木明男, 横山理雄. 1988. 魚肉ソーセージの脂質酸化に及ぼす包装材料の影響. *日本水産学会誌* **54**, 517-521.
- 鈴木敦士, 荒川美穂, 山本州平, 西海理之. 2008. 超高压処理が筋弾性タンパク質-コネクチンの構造に及ぼす影響. *高压バイオサイエンスとバイオテクノロジー* **2**, 153-160.
- 和賀正洋, 押田敏雄, 坂田亮一. 2016. 豚肉中のミオグロビン, ヘモグロビンならびにシトクロム c の同時定量法の検討. *日豚会誌* **53**, 10-16.