

氏名(本籍)	和賀正洋(青森県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第67号
学位授与年月日	平成29年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	塩漬食肉製品の色調安定性に係る諸因子の研究
論文審査委員	(主査)坂田亮一 (副査)猪股智夫 植竹勝治

論文内容の要旨

背景と目的

食品の外観は消費者にとって購買を決定付ける要素であり、退色等が起こった場合、製品価値は著しく低下する。塩漬食肉製品の色調は食肉色素であるミオグロビン(Mb)に対し一酸化窒素(NO)が配位したニトロシルミオグロビン(NOMb)が主要な色素であって、この色素を安定化させることで退色を防止することができる。この退色防止に対し、酸素の遮断が最も効果的かつ現実的な方法として知られており、一般的な塩漬食肉製品の色調安定性は包装材料の酸素バリア性に依存している。一方で、残存亜硝酸根が退色に対して抑制的に働くことや、酸素以外にもMbの配位安定性に影響する因子が複数知られていることから、これらについて明らかにすることでNOMbの安定化に対し包装材料以外の対策を見出す可能性がある。そこで本研究では亜硝酸根の挙動ならびにMbの配位結合安定性に係る諸因子について検討した。

材料と方法

1. 亜硝酸態窒素(NO₂)の還元分解反応

10 mMのアスコルビン酸Naと25 mMのNO₂を含む各種pHの緩衝液をNO₂還元分解モデル反応液とした。NO₂、硝酸態窒素(NO₃)および還元型アスコルビン酸Naの自己吸光から還元分解反応中のこれらの濃度をリアルタイムで評価した。また、反応中の酸素濃度は溶存酸素計で測定し、反応前後でpHを評価した。

2. Mbの配位結合安定性に及ぼす外的要因

pHの影響：試験に用いる牛肉は、Mbのメト化率を測定したものをを用いた。CO処理した牛肉から4℃、各種pH緩衝液でMbを抽出しカルボキシミオグロビン(COMb)濃度を測定した。なお本抽出では

酸素を制御せず、好気的な条件下で抽出を行った。また、抽出後の溶液は静置後に COMb 濃度を算出し、初期濃度との比較から COMb 安定性を評価した。

温度の影響：一酸化炭素 (CO) 処理牛肉から 0.1 M トリス緩衝液 (pH 8.5) を用いて 1、10、20 および 30°C で好気条件下において Mb を抽出し、COMb 抽出率を評価した。

酸素の影響：CO 処理牛肉から 1°C、pH 8.5、好気条件下で Mb を抽出した場合 (好気抽出) と、同様に 1°C、pH 8.5 で抽出環境を窒素パージした場合 (嫌気抽出) とで COMb 抽出率を評価した。

光の影響：CO 処理牛肉から嫌気抽出した溶液を氷温下で明所 (1,000 lx) と暗所でそれぞれ保管し、COMb 濃度の安定性を評価した。

波長特異性：塩漬食肉製品から抽出した NOMb に対し分光した光を照射し、照射前後の NOMb の吸光度からその残存率を算出し、照射光の波長が NO 解離へ与える影響を評価した。

3. 加熱が Mb の配位結合安定性に及ぼす影響

単離 Mb と食肉中 Mb との加熱安定性の評価：単離 Mb は、豚肉水溶性画分を硫酸分画 80-100% で粗精製した後、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) によって精製した。この単離 Mb の加熱安定性は、比較する豚肉と同等濃度の水溶液とした後、昇温速度 2 °C/min で加熱したときの凝集性で評価した。豚肉中の Mb の加熱安定性は、各温度で加熱した豚肉中の水溶性 Mb 濃度から評価した。

加熱に伴う構造変化の評価：単離 Mb について、トリプトファンを指標とした質量中心法で表面構造の変化が起こる温度を、示差走査熱量計で吸熱を伴う構造変化が起こる温度をそれぞれ評価した。

加熱 Mb の配位結合安定性：単離 Mb は 70°C で加熱あるいは加熱せずにハイドロサルファイト Na ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) で還元後 CO を通気し、HIC カラムで $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を洗い流し、酸化還元電位から $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ が残っていないことを確認したうえで COMb とした。このようにして得られた COMb の安定性を評価した。

結果と考察

1. 亜硝酸態窒素の還元分解反応

還元分解のモデル反応液において NO_2 の減少速度は pH に反比例した。また、亜硝酸対窒素の還元分解反応に伴い還元型アスコルビン酸は減少した。還元型アスコルビン酸が枯渇すると、 NO_2 の減少は観察できなくなった。この反応において、 NO_2 の減少速度は還元型アスコルビン酸が枯渇する直前まで一定であった。還元分解反応速度は非解離性の亜硝酸 (HNO_2) の濃度を反応基質とした 2 次反応の挙動を示したことから、 NO_2 の還元分解反応速度に対する pH の影響は、反応速度の HNO_2 濃度依存性を反映したものだと考えられた。

pH 5.5 程度で NO_2 の減少速度が小さい場合、反応初期に NO_2 の減少が見られなかったが、酸素濃度は反応開始直後から急激に減少した。このことから、反応速度が小さいときに見かけ上 NO_2 が減少しないように観察されるのは、反応によって生じた NO が液中の酸素と反応して NO_2 を生じることによると考えられた。このことは、 NO_2 の分解反応が系内を嫌氣的に保つ働きを有することを示唆して

おり、食肉製品の保存性を高めていると考えられる。さらに、系内に酸素がある場合には NO₂ 分解反応が起り続けることが示唆された。また、NO₂ の分解が進行するとともに、液中の pH は増加した。このことは、NO₂ の分解自体が NO₂ の分解速度を低下させるようフィードバックすることを示している。すなわち、系内に一定速度で酸素が流入する場合には NO₂ 分解反応が繰り返されて pH が上がるために NO₂ の分解速度が低下し、やがて NO が蓄積しなくなることを示している。塩漬食肉製品を発色させるためには、工程中に食肉を嫌氣的に保つことが必須であり、酸素に曝露された面では発色は起らない。本知見はこのような現象としての発色を裏付けるものであり、塩漬食肉製品の保存中の NO 蓄積ならびに色調保持においても同様の機序が働いていると考えられた。以上のことから、食肉製品中の発色剤は酸素によって NO と NO₂ の形で循環し、この循環によって発色効果を失っていくことが示唆された。

2. Mb の配位結合安定性に及ぼす外的要因

COMb の抽出率に pH 依存性はなかったものの、pH が高いほど COMb の安定性は高まった。一般的に、Mb ヘムポケット中の NO の解離は NO 分子と酸素との反応が関係しているが、CO は酸素などの競合分子と反応しない。このことから、CO はその解離度が Mb の配位結合安定性を示す指標となると考えられた。したがって、COMb の安定性が pH による影響を受けたことは、pH が Mb の配位結合安定性に影響する可能性を示したといえる。次に、COMb 抽出率は温度と反比例し、温度の上昇に伴う分子運動の活発化が CO の解離を誘起することが示唆された。また、COMb は酸素存在下では抽出率が低下したことから、CO と酸素の分圧差が大きくなると酸素と比較して 3 万倍の Mb 親和性を持つ CO であっても酸素に置換されると考えられた。最後に、抽出された COMb は光の曝露によって安定性が低下したことから、COMb が吸収した光エネルギーによって励起、格子緩和が起こって Mb の配位結合安定性が損なわれることが示唆された。

CO をモデル分子とした以上の検討から、Mb の配位安定性を低下させる要因として、pH、温度、競合リガンドおよび光が影響することが示唆された。『NOMb を用いた検討によって、近年報告されているとおり NOMb の光に対する安定性には波長特異性があり、可視光域の光源によっても退色が促進されることが示唆された。光による NO 解離の機序は CO と同様と考えられる一方、NOMb は CO 誘導体や酸素誘導体と比較して光感受性が極めて高く、NO の解離に際して ONOO の形成など別の要因が関与していると考えられた。』

3. 加熱が Mb の配位結合安定性に及ぼす影響について

加熱凝集性を確認した結果、単離 Mb は 76°C まで沈殿が起らなかったのに対し、食肉中の Mb は 43°C 以上で徐々に水溶性を失った。すなわち、Mb は食肉中で熱安定性が低かった。単離した Mb では吸熱を伴う構造変化は 73°C 付近で、表面のトリプトファンを指標とした場合の変性は 43°C 程度から 70°C にかけて起こったことから、表面の変性が食肉中の Mb の変性と、吸熱を伴う構造変化が Mb の変性と、それぞれ相互関係があると推定された。食肉中の Mb が単離した Mb よりも低い温度で沈殿した原因は、Mb 以外の低温で加熱凝集する水溶性タンパク質との共沈殿によると考えられる。70°C で

加熱した Mb の CO の配位結合安定性は非加熱の Mb のものと変わらなかったことから、加熱は CO の配位安定性に影響しないと考えられた。また、変性過程の食肉から Mb を抽出した結果、酸化状態である 3 価鉄の Mb から順次水溶性を失うことが示唆された。

以上の結果から、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、NO₂ 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競合分子ならびに光の影響、表面の変性が起こる温度でも Mb の配位結合力は損なわれないことを明らかにした。

今後これらの基礎知見は、塩漬食肉製品の色調安定性の向上を検討する上で有用な足がかりになるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

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、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る。これらの解明によって退色制御に対し新たなアプローチが可能になると期待される。

塩漬食肉製品の色調本体はミオグロビン-酸化窒素 (NO) 誘導体のニトロシルミオグロビン (NOMb) であって、塩漬食肉製品の色調安定性は NOMb の安定性と換言できる。NOMb に限らず、Mb 誘導体の安定性は Mb とリガンド分子との結合安定性であって、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と言える。塩漬食肉製品の場合、リガンドとなる NO の濃度を高めることによって、その色調安定性を高めることができると考えられた。一方で、NO は亜硝酸 Na (NaNO₂) などのいわゆる発色剤が分解して生じるが、この NO 分子が製品系内での蓄積挙動については未だよく知られていない。

そこで本研究では、塩漬食肉製品を想定した実験条件下で、亜硝酸根の挙動ならびに Mb の配位結合安定性に係る諸因子について検討を行った。得られた結果の概要は以下の通りである。

第一章では、NOMb の安定性について、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。この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 (NO₂) ならびに硝酸態窒素 (NO₃) の挙動を観察する手段が必要であったので、まずその評価方法として NO₂、NO₃ 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) とは異なり、定量阻害などの問題は生じず、NO₂ は亜硝酸 (HNO₂) と亜硝酸根 (NO₂⁻) の等吸収率点である 324 nm、NO₃ 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 NO₂、NO₃ および AsA の挙動を実際に反応が起こって

いるその時に観察可能で、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。NO₂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 NO₂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 NO₂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、NO₂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。

塩漬食肉製品の製造過程において、発色させるためには嫌氣的に保つことが必須であり、酸素に曝露された面では発色は起こらない。この章での知見から塩漬食肉製品の保存中の NO 蓄積ならびに色調保持においても同様の機序が働いていると考えられた。以上のことから、食肉製品中の発色剤は酸素によって NO と NO₂の形で循環し、この循環によって発色効果を失っていくことが示唆された。

第一章の検討によって、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、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することを目的とした。

Mb の配位結合安定性に及ぼす外的要因として、COMb の抽出率に pH 依存性はなかったものの、pH が高いほど COMb の安定性は高まった。一般的に、Mb ヘムポケット中の NO の解離は NO 分子と酸素との反応が関係しているが、CO は酸素などの競合分子と反応しない。このことから、CO はその解離度が Mb の配位結合安定性を示す指標となると考えられた。したがって、COMb の安定性が pH による影響を受けたことは、pH が Mb の配位結合安定性に影響する可能性を示したといえる。次に、COMb 抽出率は温度と反比例し、温度の上昇に伴う分子運動の活発化が CO の解離を誘起することが示唆された。また、COMb は酸素存在下では抽出率が低下したことから、CO と酸素の分圧差が大きくなると酸素と比較して 3 万倍の Mb 親和性を持つ CO であっても酸素に置換されると考えられた。最後に、抽出された COMb は光の曝露によって安定性が低下したことから、COMb が吸収した光エネルギーによって励起、格子緩和が起こって Mb の配位結合安定性が損なわれることが示唆された。

CO をモデル分子とした以上の検討から、Mb の配位安定性を低下させる要因として、pH、温度、競合リガンドおよび光が影響することが示唆された。これらの要因のうち、光については一般的に塩漬食肉製品の退色に対して遮蔽する以外の方法は知られていない。塩漬食肉製品から抽出された NOMb の安定性は NOMb が吸収を持つ波長の光によって安定性が低下することが明らかになった。また、吸光係数が高い波長の光ほど NOMb の安定性を低下させた。従来、紫外域の光が問題視されてきたが、塩漬食肉製品の反射スペクトルにおいて 420 nm 近傍に観察されるピークが NOMb に由来すると考えられたため、可視光域の光源（紫色光）によっても退色が加速すると考えられた。

次に、加熱が Mb の配位結合安定性に及ぼす影響について、加熱凝集性を確認した結果、単離 Mb は 76 °C まで沈殿が起こらなかったのに対し、食肉中の Mb は 43 °C 以上で徐々に水溶性を失った。すなわち、Mb は食肉中で熱安定性が低かった。単離したミオグロビンでは吸熱を伴う構造変化は 73 °C 付近で、表面のトリプトファンを指標とした場合の変性は 43 °C 程度から 70 °C にかけて起こったことから、表面の変性が食肉中の Mb の変性と、吸熱を伴う構造変化が Mb の変性とそれぞれ相互関係があると推定された。食肉中の Mb が単離した Mb よりも低い温度で沈殿した原因は、Mb 以外の低温で加熱凝集する水溶性タンパク質との共沈殿だと考えられる。70 °C で加熱した Mb の CO の配位結合安定性は非加熱の Mb のものと変わらなかったことから、加熱は CO の配位安定性に影響しないと考えられた。また、変性過程の食肉から Mb を抽出した結果、酸化状態である 3 価鉄の Mb から順次水溶性を失うことが示唆され、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。

本研究の成果は、酸素が NO の競合分子としてではなく、NO 循環サイクルを早める作用を持つ分子として大きな影響を持ち得ることを示した点、Mb 誘導体はその吸収波長光で不安定化することを示した点、加熱に伴う食肉色調の著しい不安定化は共沈殿を起こすタンパク質や Mb 還元酵素などの影響があることを示唆した点に要約される。これらの知見は、新しい見地から塩漬食肉製品の色調安定化にアプローチすることを可能にすると期待される。

また、本研究の遂行にあたり、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、ならびに食肉中へム色素の簡易分離定量方法を確立した。これらの研究手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ると期待される。

以上のとおり、本研究は十分な調査に基づいて研究仮説を設定し、計画的に進められたものである。また、研究手法を必要に応じ創意工夫することで、従来技術的に困難だった分野で新たな知見を数多く見出しており、斯界発展に寄与すること著しい。したがって、本研究は、学位を授与するにふさわしいものとする。