

# 亜鉛プロトポルフィリンIX による食肉製品の色調改善

若松 純一 [北海道大学農学研究院／助教]

## 背景・目的

パルマハムなどの伝統的乾塩漬長期熟成食肉製品では発色剤を一切使用していないにも関わらず、安定かつ鮮やかな赤色を呈している。我々は、ヘムの鉄分子が亜鉛分子に置換された形態である亜鉛プロトポルフィリンIX (ZPP) がパルマハム中に存在することを明らかにした。さらに、ZPP は食肉内在成分により、ヘムからではなく別の物質から新たに形成する可能性を示す報告も行ったが、未だ形成メカニズムは解明されていない。そこで本研究では、食肉製品の加工中に ZPP の形成を促進させて、発色剤を使用しないで、色調の望ましい食肉製品を開発するために、ZPP の形成機構を明らかにすることを目的とした。

## 内容・方法

1) プロトポルフィリノーゲンから PPIX 形成の実証とそれ以前の前駆物質の関与

ZPP 形成機構の解明には、我々が構築したモデル実験系を用いて検討した。具体的には、抗生物質により微生物を制御して、pH を調整した豚肉ホモジネートのみを嫌氣的に一定期間インキュベートした。また、ZPP を形成しないように、2価金属キレート剤(EDTA)を添加し、亜鉛をキレートして、PPIX を形成させた。このモデル実験系に亜硝酸塩、一酸化窒素発生剤、還元剤、酸化剤等を添加し、形成した PPIX および ZPP を定量することにより評価した。形成したポルフィリンは HPLC を用いて化学量論的に定量した。

2) 形成した ZPP の存在形態および状態

水可溶の ZPP 含有物はパルマハムから水で抽出したものを、分取用等電点電気泳動装置や各種クロマトグラフィーにより分離し、ZPP と結合しているタンパク質について同定を行う。タンパク質の同定は、電気泳動後にゲル内消化法を行い、ペプチドに分解した後に MALDI-TOF-MS により行った。ZPP とタンパク質との結合の確認は免疫沈降法を用いて調べた。

## 結果・成果

発色剤(亜硝酸塩・硝酸塩)を添加した食肉製品では ZPP が形成されないことから、発色剤の ZPP 形成阻害効果を ZPP 形成および PPIX 形成の両モデル実験系を用いて検討した。亜硝酸塩の添加は ZPP も PPIX も同様に形成を阻害した。亜硝酸塩ならびに硝酸塩は強い酸化作用があることから、酸化作用が PPIX ならびに ZPP 形成を阻害することが考えられる。別の酸化剤を添加して酸化させて酸化還元電位を著しく上昇させると、PPIX なら

びに ZPP の形成は阻害されたが、亜硝酸塩を添加した際の酸化還元電位は、PPIX ならびに ZPP の形成を阻害するほど高いものではなかった。PPIX はプロトポルフィリノーゲンからオキシダーゼにより酸化されて形成することと、モデル系において還元剤の添加は PPIX の形成を抑制したことから、ZPP はヘム生合成系で形成された PPIX から作られている仮説をつよく支持した。一方、発色剤は食肉中で分解されて一酸化窒素となってミオグロビンに配位することから、一酸化窒素の影響を検討した。一酸化窒素発生剤(SNAP、NONOate)をモデル系に添加したところ、いずれも濃度依存的に PPIX ならびに ZPP の形成を阻害したことから、発色剤による ZPP 形成阻害は、塩漬中に発生した一酸化窒素が PPIX を形成する以前の反応段階で阻害することが示唆された。ZPP 形成機構の解明において一酸化窒素が重要なキーワードとなった。

パルマハムから水抽出した ZPP は遠心式限外ろ過より、分子量100~300kDaに分画されたことから、タンパク質などと高分子物と複合体を形成しているものと考えられた。分取用等電点電気泳動を用いて、ZPP 複合体は等電点が6.0~6.5で1つのバンドに収束したことから限られた物質とのみ結合していると考えられた。さらに硫酸分画では70~90% 飽和分画で ZPP の大部分を回収することができた。しかしながら、その後のイオン交換クロマトグラフィーなどのクロマト分離では ZPP の挙動と一致するタンパク質は限定できなかった。挙動が一致することの多かったタンパク質を MALDI-TOF-MS でタンパク質を同定したところ、アルブミンであると同定されたが、水抽出物から抗アルブミン抗体を用いて免疫沈降法で確認したが、特異的に結合していなかった。

一方、硫酸分画後に遠心式限外ろ過に供したところ、30~50kDa に分画され、低分子化することから、パルマハム中では多量体を形成して存在している可能性が示された。また、2次元電気泳動に供したところ、2次元目に ZPP はマーカー先端付近に移動するが、一般的なタンパク質検出法では検出できず、MALDI-TOF-MS でもペプチドのピークも認められず、ZPP が解離している可能性も示されたが、泳動上部にもタンパク質らしきスポットが観察されなかったことから、ZPP と結合している物質について明らかにすることができなかった。

## 今後の展望

食肉製品への発色剤の使用は、色調改善だけでなく風味向上や、ボツリヌス菌などの有害微生物の生育抑止などの重要な役割を担っているが、発ガン性物質形成の懸念があることから、削減を望む消費者もいる。現時点ではその形成機構がほとんど解明されていないが、ZPP 形成機構の解明とそれを利用した色調改善技術の開発は、食肉製品だけでなくあらゆる食品の色調改善に寄与することができるであろう。