

食肉製品由来乳酸菌培養液を用いた浸漬処理による豚肉の 物性と微生物への影響

誌名	日本畜産學會報 = The Japanese journal of zootechnical science
ISSN	1346907X
巻/号	894
掲載ページ	p. 451-458
発行年月	2018年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



食肉製品由来乳酸菌培養液を用いた浸漬処理による豚肉の物性と微生物への影響

竹田志郎^{1,2}・和賀正洋²・坂田亮一^{1,2}

¹麻布大学獣医学部動物応用科学科, 相模原市中央区 252-5201

²麻布大学大学院獣医学研究科, 相模原市中央区 252-5201

(2018. 1. 31 受付, 2018. 7. 5 受理)

要約 本研究では、生理活性を有する発酵食肉製品製造用スターターとして有用な乳酸菌株を使用し、それらの培養液浸漬による豚肉の物性と微生物への影響について調べた。豚肉を各供試乳酸菌株培養液に浸漬した結果、*Lactobacillus sakei* No. 23 株 (LS-23) 培養液に浸漬した豚肉の最大荷重は、未処理および標準菌株培養液で浸漬した豚肉と比べ、有意に低値であった ($P < 0.05$)。また LS-23 培養液に浸漬した豚肉は SDS-PAGE において分子量 100 kDa 以上のバンドの消失、著しい pH の低下、乳酸濃度の上昇が認められた。さらに LS-23 培養液浸漬により、豚肉由来の黄色ブドウ球菌と低温細菌生菌数の減少が確認された。以上より豚肉を LS-23 培養液に浸漬させることは、その最大荷重の低下による物性の向上、特に軟化効果と汚染菌の生菌数減少効果があると示唆され、食肉加工におけるマリネード液やバイオプリザベーションとしての応用が期待された。

日本畜産学会報 89 (4), 451-458, 2018

キーワード：バイオプリザベーション, 豚肉, 物性, マリネ, *Lactobacillus sakei*

食肉の嗜好性は様々な要因によって決定され、なかでもその物性は重要な要因のひとつであり、一般的に硬い食肉は消費者から低い評価を受ける傾向がある (Huffman ら 1996)。国内においては、高齢化社会を迎えており、高齢者の栄養状態を改善するには良質な動物性タンパク質、特に食肉類の摂取が重要と注目されている。しかし、高齢に伴う咀嚼力や消化管機能低下により高齢者は食肉の摂取量低下の傾向がある (厚生労働省 2015)。そのため、酵素処理など生化学的処理による食肉類の軟化方法についての研究が、国内外において行われている (Gerelt ら 2000; Pietrasik と Shand 2011; 手塚ら 2015, 2016)。また、食肉をマリネード液に浸漬することにより、物性を軟らかくすることも報告されており、風味や軟化作用を付加する調理方法の一つとして注目されている (Berge ら 2001; Burke と Monahan 2003)。

乳酸菌はプロバイオティクスといった保健機能を有する菌株が存在し、プロバイオティクス性などの表現形質の特徴は、同じ菌種に属する菌株同士においても異なる (Takeda ら 2011a; Shokryazdan ら 2017)。そのため、特有の機能を有する菌株を利用した付加価値製品の開発が、乳製品を中心に展開されている。一方、乳酸菌の食肉への応用研究も行われており、食塩、亜硝酸塩に対する耐性や 20℃での増殖性が乳酸菌株ごとに異なることから、それらの耐性と増殖性より選抜した菌株の発酵ソーセージ

への応用性などが報告されている (Arihara ら 1998; Sameshima ら 1998)。また Ruiz-Moyano ら (2009) は、バイオプリザベーションの観点から、食肉製品加工において、乳酸菌の利用による製品の品質向上効果を示した。大橋と根岸 (2011, 2012) は食肉を一般的な発酵乳用乳酸菌スターターへ浸漬することにより、食肉製品の軟化効果と大腸菌群の生育抑制効果を報告しており、乳酸菌接種による食肉製品の軟化作用や製品中の汚染細菌に対する生育抑制効果を示した。しかしながら、上述したように、乳酸菌は菌株ごとに各種特性が異なることがあるため、様々な乳酸菌株による食肉製品の物性や汚染細菌への影響について検討を行っていくことは重要であると考えられる。

過去の報告において、我々は食肉製品由来乳酸菌で食肉中のタンパク質分解能が高く、アンジオテンシン I 変換酵素阻害活性と抗酸化作用を有する製品の作製に有効な乳酸菌株を見出した (Takeda ら 2017)。そこで本研究では、それらの乳酸菌株を使用し、各種培養液浸漬による豚肉の物性と豚肉由来の微生物への影響について検討を行った。

材料および方法

1. 供試乳酸菌

供試乳酸菌として食肉製品より分離した *Lactobacillus* (L.) *sakei* No. 3 株 (LS-3), No. 23 株 (LS-23), *L. curvatus* No. 28 株 (LC-28) ならびに各標準菌株であ

連絡者：坂田亮一 (fax: 042-769-1704, e-mail: sakata@azabu-u.ac.jp)

る *L. sakei* JCM1157 (LS-JCM), *L. curvatus* NBRC15884 株 (LC-NBRC) を使用した (Takeda ら 2017). 各供試乳酸菌株は GYP 培地を用いて前培養と本培養を行った (Takeda ら 2011b). 前培養は白金耳によりコロニーを釣菌し, GYP 培地に植菌した. 本培養では, 前培養液を本培養液体積の 1% 量植菌した. その後, 各乳酸菌株培養液はそれぞれ 30°C で 24 時間一定の条件下, 静置培養し実験に用いた. 培養後の生菌数は滅菌生理食塩水を用いた段階希釈を行った後, GYP 培地による混濁培養により評価した.

2. 豚肉の浸漬処理

供試豚肉は神奈川県産の豚モモ肉または相模原市内の食肉専門店で購入した豚モモ肉を使用した. 豚モモ肉は脂肪や筋膜・結合組織部を可能な限り除き, 真空包装後 -30°C で冷凍保存した. 豚肉を実験に使用する際はハムスライサー (ワタナベフーマック, 名古屋) を用いて, 赤肉部分を 10 mm, または 3 mm にスライスし, 4°C 設定の冷蔵庫内で解凍し, 室温に戻して使用した.

各乳酸菌株培養液による豚肉の浸漬処理は根岸の報告 (2015) を基に行った. 浸漬液として各菌株の本培養液を用いた. 浸漬液に沈殿した菌体を均等に浮遊させるためよく攪拌し, スライス肉が均等に浸るよう浸漬し, 30°C でインキュベートした. インキュベート後, 豚肉を浸漬液から取り出し, ペーパーで水分を取り, 物性評価などの各試験に供試した. なお, 比較対照区として乳酸菌培養液の代わりに, pH7.4 滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を使用した.

3. 最大荷重値, 破断歪率および pH の測定

各種豚肉サンプルの最大荷重値と破断歪率をクリーブメーター (RE2-33005S; 山電, 東京) を用いた. 測定は室温で行い, くさび型プランジャー No. 49 (山電) により, 圧縮速度 10 mm/秒およびロードセル 20N とし, 各サンプルに対し 10 回測定した. クリーブメーターによる測定値はクリーブメーター自動解析ソフトウェア (BAS-3305; 山電) を使用し, 各サンプルの最大荷重値と破断歪率としてデータを得た. 培養液など液状サンプルの pH 測定は pH メータ D-52 (堀場製作所, 東京) を用い, 測定した. 豚肉サンプルの pH 測定は testo 205 pH 計 (テスト, 横浜) を用い, 電極プローブ先端を突き刺し, 直接測定した.

4. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

各種豚モモ肉サンプル 4g に対し Guba-Straub-Adenosine Triphosphate (GS-ATP) 溶液または蒸留水を 40 mL 添加し, 氷冷下, 15,000 rpm で 1 分間ホモジナイズし, 30 秒間静置した (Ahmed ら 2014). このホモジナイズ操作を 2 回繰り返し, 各ホモジネート液はろ紙 (No. 5A; 東洋濾紙, 東京) を用いてろ過し, ろ液を電気泳動用のサンプルとした. 電気泳動は Laemmli 法による SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った

(Laemmli 1970). ゲルはアクリルアミド濃度 10% のゲルまたは 4.9-20% のグラジエントゲルを用いてスラブ型電気泳動槽で行った (バイオ・ラッド ラボラトリーズ, 東京). 染色はクマシーブリリアントブルー R-250 (バイオ・ラッド ラボラトリーズ) を使用し, 脱色には 40% メタノールと 10% 酢酸の混合溶液を用いた.

5. 乳酸の分析

乳酸菌株浸漬液の分析では, 試料を遠心式限外ろ過し (Amicon Ultra Ultracel-10k; Millipore, Darmstadt, Germany), 得られたろ液をさらに孔径 0.45 μm のフィルターでろ過した溶液を調製した. また, 豚肉の分析ではサンプルを細切し, 5g を秤量した. 秤量後, 蒸留水 30 mL を加え, カップ式ホモジナイザーにより攪拌し, ホモジネート液をろ紙 (No. 5A; 東洋濾紙) を用いてろ過後, 蒸留水にて 50 mL に定容した. その後, 遠心式限外ろ過を行い (Amicon Ultra Ultracel-10k; Millipore), 得られたろ液をさらに孔径 0.45 μm のフィルターでろ過した溶液を調製した. 各調製溶液は HPLC アジレント・テクノロジー 1100 シリーズ (アジレント・テクノロジー, 東京) を用いた分析に供試した (カラム: Inertsil ODS-3 GL Sciences, 東京; カラム温度: 30°C; 移動相: 3.0 mmol/L 過塩素酸; 検出器: 紫外・可視検出器 210 nm). なお, 標準溶液として試薬特級 DL-乳酸 (和光純薬工業, 大阪) を用いて定性定量を行った.

6. 豚肉浸漬における LS-23 株培養液の各種調整

LS-23 株培養液を上記のとおり, GYP 培地を用いて 30°C で静置培養し調製した. その培養液を 10,000 × g で 5 分間遠心し, 乳酸菌体と培養上清を得た. 得られた菌体は PBS で洗浄し, 培養液と同量の PBS に再懸濁後, 菌体懸濁液を作製した. 菌体懸濁液の一部は, 100°C で 15 分間加熱し, 加熱菌体懸濁液とした. 培養上清は孔径 0.22 μm のフィルターでろ過し, その一部を 1 mol/L 塩酸を用いて pH 7.0 に調整した. 各調整培養液に豚モモ肉を浸漬させ, 30°C で 4 時間インキュベートした. 培養上清浸漬区においてはインキュベート温度を 4°C で 4 時間インキュベートした試験区も作製した. 各インキュベート後の豚モモ肉の最大荷重の評価は, 上記の方法で行った.

7. 微生物検査

各種豚肉サンプル 5g を滅菌済みホモジナイザーカップに取り, 0.85% の滅菌生理食塩水 45 mL を加え, 氷上にて 12,000 rpm で 5 分間, ホモジナイザー (エースホモジナイザー AM 型; 日本精機製作所) を用いて均一化した. 得られたホモジネート液をストマッカー袋 (フィルトレイトバック II; 栄研化学, 栃木) に移し, バックミキサー E-Mix (primo; アズワン, 大阪) を用いて 30 秒間混合し, 微生物検査用の試料液とした. 測定項目は一般生菌, 乳酸菌, ブドウ球菌, 低温細菌, 大腸菌群, 真菌類とし, それぞれ標準寒天培地 (栄研化学), BCP 加プレートカウントアガール (日水製薬, 東京), 5% 無菌卵黄溶液加マンニッ

ト食塩寒天培地 (栄研化学), CVT 寒天培地 (栄研化学), デソキシコレート寒天培地 (栄研化学) および 1% 酒石酸加ポテトデキストロース寒天培地 (栄研化学) を用い、定法に従って検査を行った (日本食品衛生協会 2015)。

8. 統計解析

統計解析には GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ソフトを使用した。各乳酸菌株溶液の生菌数, pH および乳酸濃度, 各乳酸菌株溶液で浸漬処理した後の豚肉の最大荷重, 破断歪率, 乳酸濃度および細菌数は一元配置分散分析後, 多重比較検定として Tukey 法により解析した。また, サンプルの最大荷重および pH の継時変化は二元配置分散分析後, 多重比較検定として Bonferroni 法を用いた。本研究における各試験結果の有意水準は, 危険率 5% 未満 ($P < 0.05$) とした。

結 果

1. 乳酸菌培養液浸漬と豚モモ肉の物性

各乳酸菌株培養液の生菌数, pH および乳酸濃度について表 1 に示した。各菌株間の生菌数に有意な違いは認められなかった。pH においては LS-23 株の値は最も低い値を示し, 標準菌株である LS-JCM 株よりも有意に低かった ($P < 0.05$)。また, LC-28 株においては標準菌株である LC-NBRC 株よりも有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。一方, 乳酸濃度については LS-23 株の値は最も高い値を示し, 標準菌株である LS-JCM 株よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。また, LC-28 株においては標準菌株である LC-NBRC 株よりも有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。

図 1 に, 各乳酸菌株培養液に浸漬した豚肉の物性に関する測定結果を示した。最大荷重は LS-23 株の培養液で浸漬したサンプルが最も低い値を示し, 未処理の豚肉と比較して有意に低くなることが認められた ($P < 0.05$)。また, *L. sakei* の標準菌株である LS-JCM の培養液で浸漬処理したサンプルの最大荷重値に比べ, LS-23 株の浸漬液で浸漬処理したサンプルは有意に低くなった。そのため, 本実験で使用した乳酸菌株中, LS-23 株の浸漬液は豚肉の最大荷重を最も低下させる効果を有していると推察された ($P < 0.05$) (図 1A)。また破断歪率においても LS-23 株の浸漬液処理サンプルが最も低値を示したが, 各試験区間での有意差は認められなかった (図 1B)。

2. 乳酸菌培養液浸漬と豚モモ肉の SDS-PAGE

各乳酸菌株培養液に浸漬した豚肉の GS-ATP 溶液抽出, および蒸留水抽出により得られたタンパク質の SDS-PAGE 電気泳動の結果を図 2 に示した。LS-3, LS-23 および LC-28 培養液浸漬試験区における GS-ATP 溶液抽出タンパク質では, 各標準菌株と比較して分子量 100 kDa 以上のバンドの消失が強く認められた (図 2A)。一方, 水抽出タンパク質では LS-23, LC-NBRC 培養液浸漬区に

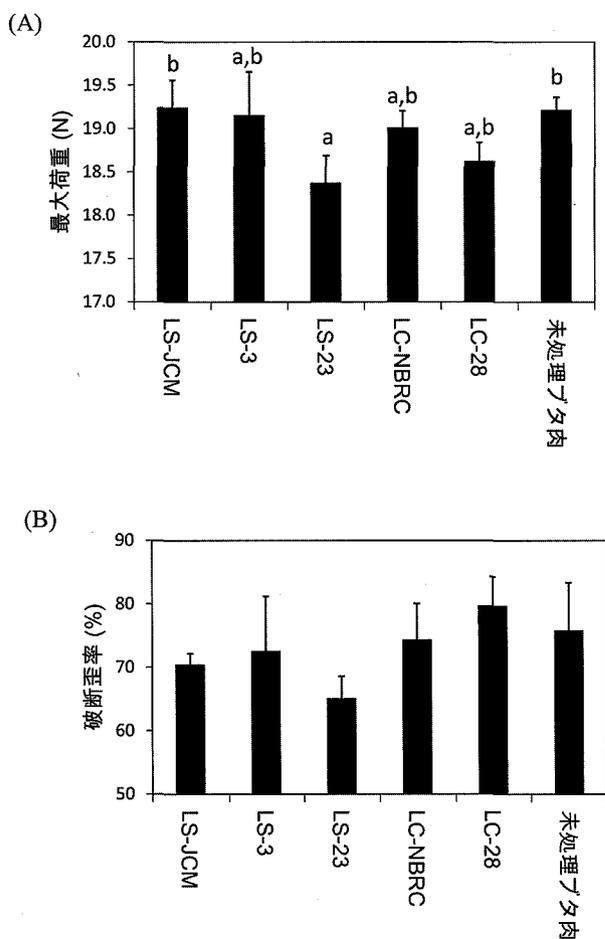


図 1 各種乳酸菌株培養液浸漬による豚肉の物性への影響。
(A) 豚モモ肉の最大荷重への影響。
(B) 豚モモ肉の破断歪率への影響。
データは 3 つの独立した試験の平均値であり, エラーバーは標準偏差を示す。a, b: 異なるアルファベット間にて $P < 0.05$ 。

表 1 各乳酸菌株浸漬液の生菌数, pH および乳酸濃度

	LS-JCM	LS-3	LS-23	LC-NBRC	LC-28
生菌数 ($\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$)	8.2 ± 0.1^a	7.9 ± 0.1^a	8.2 ± 0.2^a	8.1 ± 0.2^a	7.9 ± 0.1^a
pH	4.04 ± 0.03^b	3.79 ± 0.0^c	3.76 ± 0.03^c	3.68 ± 0.04^c	4.29 ± 0.09^a
乳酸濃度 (mmol/L)	70.2 ± 1.7^d	102.5 ± 3.2^e	143.3 ± 4.3^a	125.9 ± 9.5^b	80.9 ± 8.7^d

データは 3 つの独立した試験の平均値 \pm 標準偏差を示す。
a, b, c, d: 異なるアルファベット間にて $P < 0.05$ 。

において 25 kDa 以下のバンドの消失が認められた (図 2B).

3. LS-23 株培養液浸漬時間と豚モモ肉の最大荷重と pH の変化および各浸漬豚肉の乳酸濃度

LS-23 株培養液による浸漬時間と豚肉の最大荷重について検討したところ、対照区 (PBS 処理区) に比べ LS-23 培養液浸漬区では浸漬後 4 時間、6 時間において、豚モモ

肉の最大荷重が有意に低下した ($P < 0.05$) (図 3A)。また、LS-23 培養液浸漬時間と豚モモ肉の pH 変化について検討した。図 3B に示すように、LS-23 培養液浸漬区では浸漬開始後より pH が低下し、浸漬 4 時間以降は pH 4.3 付近で安定した。また、対照群との比較を行ったところ、浸漬 4 時間以降において、LS-23 培養液浸漬による有意な pH の低下が認められた ($P < 0.05$)。

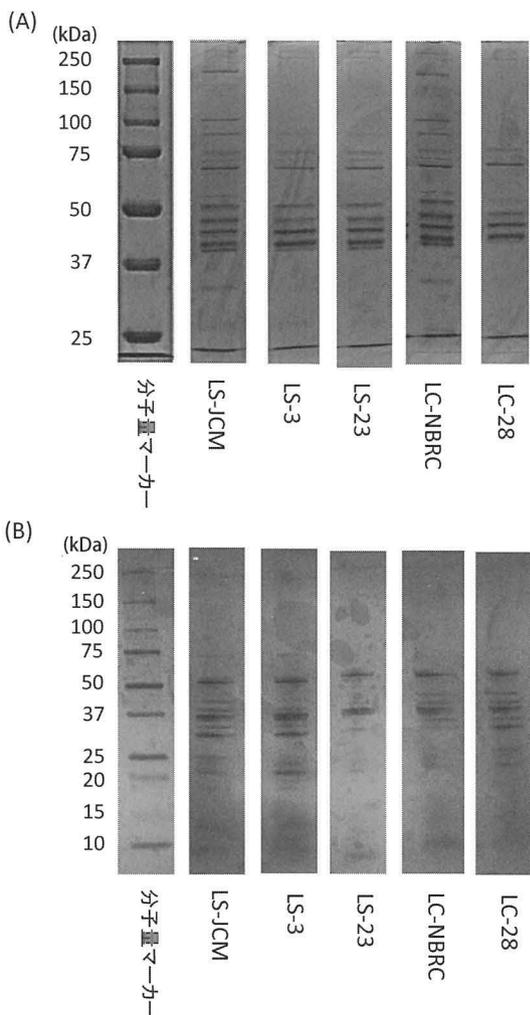


図 2 各種乳酸菌培養液浸漬後の豚肉由来タンパク質の電気泳動。
(A) GS-ATP 溶液抽出タンパク質。アクリルアミド 10% ゲル使用。
(B) 蒸留水抽出タンパク質。アクリルアミド 4.0-20% グラジエントゲル使用。

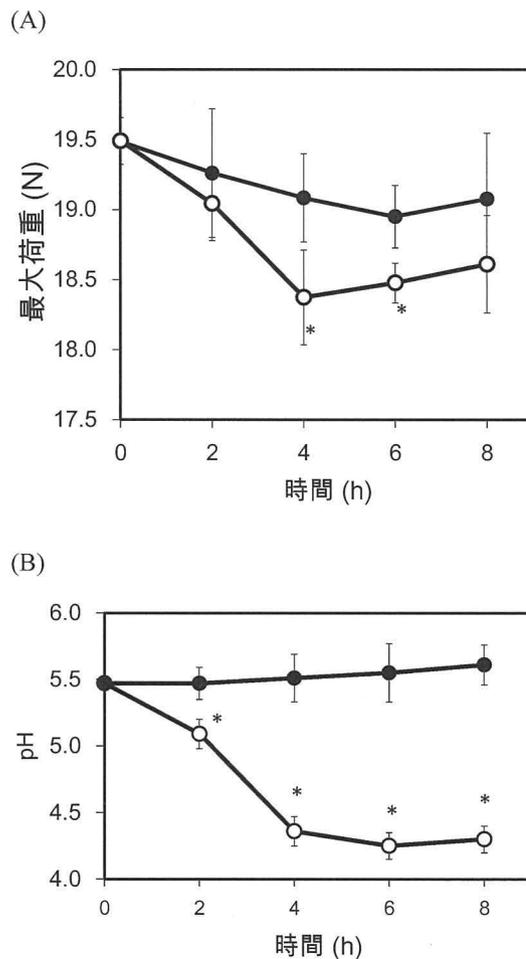


図 3 LS-23 株培養液浸漬による豚肉の最大荷重および pH への影響。
(A) LS-23 株培養液浸漬による豚肉の最大荷重の継時変化。
(B) LS-23 株培養液浸漬による豚肉の pH の継時変化。
データは 3 つの独立した試験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。●対照区 (PBS 浸漬)、○LS-23 培養液区 * : 対照区に対して $P < 0.05$ 。

表 2 各乳酸菌培養液浸漬後の豚肉由来乳酸濃度

	対照区 (PBS 浸漬)	LS-JCM 浸漬区	LS-3 浸漬区	LS-23 浸漬区	LC-NBRC 浸漬区	LC-28 浸漬区
乳酸濃度 (mmol/L)	8.2 ± 0.5 ^a	49.6 ± 3.7 ^b	61.4 ± 6.5 ^c	64.9 ± 3.1 ^c	50.3 ± 6.3 ^b	57.3 ± 1.5 ^{bc}

データは 3 つの独立した試験の平均値 ± 標準偏差を示す。
a, b, c : 異なるアルファベット間にて $P < 0.05$ 。

表2に各供試乳酸菌株の培養液浸漬後の豚肉中に含まれる乳酸濃度を示した。LS-3およびLS-23株培養液に浸漬した豚肉に含まれる乳酸濃度は他の試験区と比べ、有意に高いことが認められた ($P < 0.05$)。

4. LS-23株培養液浸漬による豚モモ肉の最大荷重低下に及ぼす要因の検討

豚肉をLS-23培養液に浸漬する際の条件を変え、LS-23培養液に浸漬による豚肉の最大荷重低下の要因について検討を行った。図4に示すように、LS-23株培養液に浸漬した試験区、LS-23培養上清を用い、温度を4℃および30℃に設定した条件で浸漬した豚肉の最大荷重は未処理の豚肉よりも有意に低下した ($P < 0.05$)。一方、pHを7.0に調整した培養上清へ浸漬した豚肉の最大荷重の低下は認められなかった。また、LS-23株菌体懸濁液およびその加熱菌体懸濁液に浸漬した豚肉の最大荷重は未処理豚肉に比べ、有意差は認められなかったが、低下する傾向を示した。

5. LS-23株培養液浸漬による豚モモ肉由来微生物の生菌数への影響

LS-23培養液浸漬後の豚モモ肉由来の各微生物の生菌数について、表3に示した。LS-23株培養液浸漬区では一般生菌および乳酸菌数が対照区 (PBS浸漬) およびGYP培地浸漬区よりも有意に増加した ($P < 0.05$)。一方、LS-23株培養液浸漬区のブドウ球菌、その卵黄反応陽性および陰生菌においては、対照区 (PBS浸漬) およびGYP培地浸漬区よりも生菌数の有意な減少が認められた ($P < 0.05$)。また低温細菌においては対照区であるPBS処理区では $2.7 \log_{10} \text{CFU/g}$ の菌数が認められたが、LS-23培養液処理区では検出されず、著しい生菌数の低下が認められた。

考 察

本研究では、生理活性を有する発酵食肉製品作製に有望な乳酸菌株を用い、各菌株の培養液浸漬による豚肉の物性

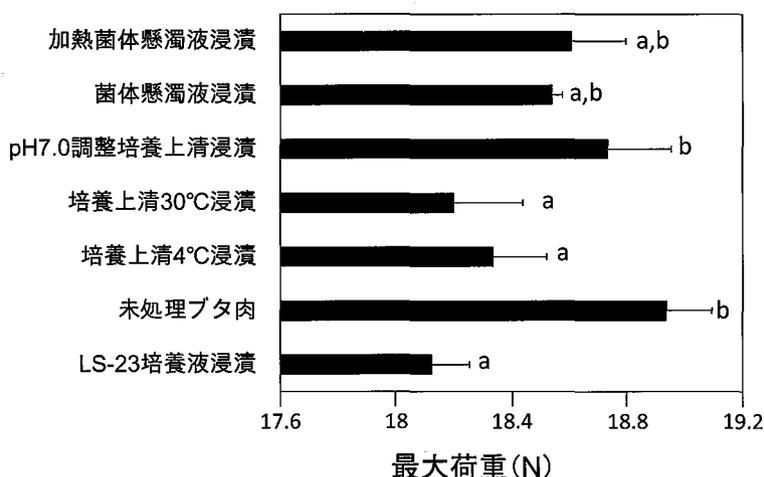


図4 LS-23株培養液浸漬時の各条件による豚肉の最大荷重への影響。データは3つの独立した試験の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。a, b: 異なるアルファベット間にて $P < 0.05$ 。

表3 LS-23培養液浸漬後の豚肉由来微生物の生菌数

	生菌数 ($\log_{10} \text{CFU/g}$)		
	対照区 (PBS浸漬)	GYP培地浸漬区	LS-23培養液浸漬区
一般生菌	3.6 ± 0.5^a	3.5 ± 0.2^a	6.7 ± 0.1^b
乳酸菌	3.4 ± 0.4^a	3.4 ± 0.4^a	6.7 ± 0.1^b
ブドウ球菌	2.8 ± 0.4^a	3.0 ± 0.7^a	1.7 ± 0.4^b
卵黄反応 陽性	2.3 ± 0.7^a	2.7 ± 0.6^a	1.1 ± 0.3^b
卵黄反応 陰性	2.6 ± 0.4^a	2.6 ± 0.8^a	1.8 ± 0.3^b
低温細菌	2.7 ± 1.1^a	3.2 ± 0.1^a	ND
大腸菌群	ND	ND	ND
真菌類	ND	1.8 ± 0.4	ND

データは5つの独立した試験の平均値 ± 標準偏差を示す。a, b: 異なるアルファベット間にて $P < 0.05$ 。

と豚肉に由来する生菌数への影響について調べた。

まず、豚肉の浸漬処理に用いる各乳酸菌培養液の生菌数、pH および乳酸濃度について調べた。その結果、各菌株において生菌数の有意差は認められなかったが、pH の低下ならびに乳酸濃度の上昇について有意な違いが認められた。すなわち、各菌株において成長による生菌数と乳酸産生ならびにそれに伴う pH の低下は一致しなかったため、各菌株間で、乳酸産生能力は異なることが示唆された。本研究では、LS-23 株に強い乳酸産生力があることが示唆された。

各供試乳酸菌株で調製した培養液に豚肉を浸漬し、インキュベート後の物性についてクリープメーターを用いて評価した。その結果、LS-23 株培養液で処理した豚肉の最大荷重は未処理豚肉および対照区である LS-JCM 処理区よりも有意に低値を示した ($P < 0.05$)。大橋と根岸 (2012) は豚肉を発酵乳スターター用乳酸菌カルチャーに浸漬後、発酵乾燥食肉製品を作製し、その製品のせん断力価の低下について報告している。そのメカニズムの一つとして乳酸菌の接種による筋原線維タンパク質のプロテオリシスを挙げている。食肉中の筋原線維タンパク質や筋漿タンパク質などの分解がその軟らかさの向上に反映されることは報告されている (Asghar と Yeates 1978)。図 2A に示すように、本研究の SDS-PAGE の結果から、LS-23 培養液浸漬後の豚肉は、LS-JCM 培養液処理区と比較して、ミオシン重鎖と考えられる分子量 200 kDa 付近のバンドの消失が確認できた。またこれまでの報告において、供試した *L. sakei* に属する菌株の中で LS-23 株はブタの粗ミオシンタンパク質に対し、強いタンパク質分解能を持つことを示した (Takeda ら 2017)。したがって、大橋と根岸 (2012) の報告のように、本研究における LS-23 株培養液浸漬による最大荷重の低下の機序の一つとして、筋原線維タンパク質の分解が考えられた。*L. sakei* に属する菌株の中には、筋漿タンパク質を強く分解する特徴を有することが報告されている (Ammor と Mayo 2007)。また図 2B に示すように、各乳酸菌培養液に浸漬し、水抽出したタンパク質の SDS-PAGE において、LS-23 株培養液浸漬処理したバンドの数は他の *L. sakei* に属する菌株の培養液浸漬処理したバンドの数より少なかった。そのため、LS-23 株は筋漿タンパク質の分解作用が他の供試菌株よりも強い可能性が考えられた。一方、LS-23 ほど顕著でないが、*L. curvatus* に属する菌株の培養液においても、豚肉を浸漬することによる最大荷重の低下が認められた (図 1A)。豚肉の乳酸菌培養液浸漬による物性の変化は、乳酸菌の菌株や菌種の培養液の違いにより異なっていることが示唆された。

過去の報告によると、食肉の軟化作用には浸漬するマリネード溶液の酸の関与が挙げられるため (Burke と Monahan 2003 ; Goli ら 2012)、LS-23 株培養液浸漬による豚肉の最大荷重と pH の継時変化について調べた。

LS-23 株培養液に浸漬した豚モモ肉の最大荷重と pH の低下はインキュベート 4 時間まで認められ、それ以降は安定しており、両者の継時変化はおおよそ一致した (図 3A, 3B)。また、各乳酸菌培養液へ 4 時間浸漬後の豚肉中の乳酸濃度について分析したところ、LS-23 培養液浸漬した豚肉由来の値は最も高く、LS-3 培養液浸漬区を除く、すべての試験区と比べ有意差も認められた ($P < 0.05$) (表 2)。各乳酸菌培養液間において、生菌数の著しい違いは認められなかったため、本研究で観察された最大荷重の低下は、上述した LS-23 株による豚肉タンパク質のプロテオリシスによるものだけでなく、LS-23 株が産生した乳酸による効果も考えられた。

図 4 に各々 LS-23 培養液条件を変えて浸漬した豚モモ肉の最大荷重値を示した。培養液上清を 30℃ と 4℃ でインキュベートした試験区において、LS-23 株培養液で浸漬した試験区と同等の最大荷重値を示した。一方、培養上清の pH を 7.0 に調整し、浸漬した試験区の最大荷重値は LS-23 株培養液で浸漬した値と比べ、有意に高いことが認められた ($P < 0.05$)。さらに、LS-23 株菌体懸濁液とその加熱殺菌懸濁液に浸漬した値は、未処理の豚肉の値よりも低下傾向を示したが、LS-23 株培養液で処理した値ほどの低下は認められなかった。したがって、本試験における LS-23 株培養液による豚肉の最大荷重の低下は、LS-23 株が産生した乳酸による影響が大きいと考えられた。Berge ら (2001) は牛肉において乳酸を注入することで筋肉中のカテプシンの活性が向上し、タンパク質が分解し、牛肉の軟化作用が起こることを示した。また Burke と Monahan (2003) は、牛肉のまえずねにおいて、乳酸を含む有機酸をマリネード溶液として用いることにより、pH の低下、軟らかさとジューシー感の向上を示し、その作用機序の可能性として、筋肉中に存在するカテプシン活性の向上を挙げている。食肉において、カテプシン群中のカテプシン D は至適 pH を 4.0 とし、5℃ においても筋原線維タンパク質に作用することが示されている (三橋ら 1981)。したがって、本研究においても LS-23 培養液浸漬による豚肉の最大荷重の低下は、LS-23 株が産生した乳酸により、カテプシン D を含む筋肉内プロテアーゼが活性化し、豚モモ肉のタンパク質の分解が促進され、最大荷重の低下に反映された可能性も推察された。

発酵乳など乳酸菌を含む食品または溶液等に食肉を浸漬することにより、食肉由来の微生物の菌数増加の抑制効果を示し、バイオプリザベーションとしての利用性が報告されている (大橋と根岸 2011 ; Linares ら 2013)。本研究においても、豚モモ肉を LS-23 培養液に浸漬することにより低温細菌、ブドウ球菌、ブドウ球菌の卵黄反応陽性および陰生菌において、他の試験区に対し、生菌数の有意な減少が認められた ($P < 0.05$) (表 3)。食肉における汚染細菌には低温細菌が挙げられ、異臭やスライム発生の原因菌と言われており、その分布としては *Pseudomonas*

が主要と報告されている（三上ら 1983）。また食肉製品の汚染菌としては *Staphylococcus aureus* を含む黄色ブドウ球菌も挙げられ、その中にはエンテロトキシン毒素を産生する菌株も存在する（中ら 2006）。さらに *Pseudomonas* および *Staphylococcus aureus* に対して、乳酸は pH4.0-4.5 で強い抗菌作用を発現することが報告されている（山本ら 1984）。したがって、LS-23 培養液浸漬処理は、浸漬液の pH（pH4.3 前後）ならびにそれに含まれる高濃度の乳酸による作用のため、これらの細菌属または種の菌に対し、生菌数の減少効果を示したと考えられた。したがって LS-23 培養液浸漬処理には、食肉加工におけるバイオプリザベーションとして、豚肉の汚染細菌による品質の劣化を防ぐ効果が期待された。

本研究では、供試菌株中の LS-23 株培養液へ豚肉を浸漬させることにより、豚肉の pH やタンパク質が変化し、最大荷重が低下することが示唆され、豚肉を原料とする食肉製品の好適な物性変化につながることを期待された。また、豚肉に由来する汚染細菌の生菌数の減少効果も認められ、細菌による品質劣化の制御効果も見込めた。LS-23 株は生理活性物質を含む発酵食肉製品の製造に有望なスターター菌株である（Takeda ら 2017）。したがって、食肉加工において LS-23 株は有益なスターター菌株であることだけでなく、その培養液を用いた新しい利用の可能性を示すことができた。今後、より食品への応用の実現性を高めるため、LS-23 株培養用の完全食品ベース培養液の開発を行い、その培養液中での物性の変化や品質保持期間延長効果、さらには呈味性への影響について検討することが望まれる。

謝 辞

本研究は、元 麻布大学獣医学部 動物応用科学科 食品科学研究室所属 川口みゆき氏の協力を得て、遂行した。ここに記し感謝の意を表する。

文 献

- Ahhmed AM, Kaneko G, Ushio H, Karaman S, Inomata T, Sakata R, Yetim H. 2014. Proteins degradation value in cured meat product made from *M. Cutaneous-omo brachialis* muscle of bovine. *European Food Research and Technology* **238**, 387-396.
- Ammor MS, Mayo B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production : An update. *Meat Science* **76**, 138-146.
- Arihara K, Ota H, Itoh M, Kondo Y, Sameshima T, Yamanaka H, Akimoto M, Kanai S, Miki T. 1998. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science* **63**, 544-547.
- Asghar A, Yeates NT. 1978. The mechanism for the promotion of tenderness in meat during the post-mortem process : a review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **10**, 115-145.
- Berge P, Ertbjerg P, Larsen LM, Astruc T, Vignon X, Møller AJ. 2001. Tenderization of beef by lactic acid injected at different times post mortem. *Meat Science* **57**, 347-357.
- Burke RM, Monahan FJ. 2003. The tenderisation of shin beef using a citrus juice marinade. *Meat Science* **63**, 161-168.
- Gerelt B, Ikeuchi Y, Suzuki A. 2000. Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. *Meat Science* **56**, 311-318.
- Goli T, Bohuon P, Ricci J, Collignan A. 2012. Evolution of pH during immersion of meat protein matrices in acidic marinades. *Meat Science* **90**, 618-623.
- Huffman KL, Miller MF, Hoover LC, Wu CK, Brittin HC, Ramsey CB. 1996. Effect of beef tenderness on consumer satisfaction with steaks consumed in the home and restaurant. *Journal of Animal Science* **74**, 91-97.
- 厚生労働省. 2014. 日本人の食事摂取基準（2015年版）の概要. 厚生労働省健康局, 東京 ; [cited 28 March, 2014]. Available from URL : <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000041733.html>
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **15**, 680-685.
- Linares MB, Garrido MD, Martins C, Patarata L. 2013. Efficacies of garlic and *L. sakei* in wine-based marinades for controlling *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Chouriço de Vinho, a dry sausage made from wine-marinated pork. *Journal of Food Science* **78**, M719-M724.
- 三上正幸, 三浦弘之, 白幡彦郎. 1983. 低温細菌による肉タンパク質の変化. 日本畜産学会報 **54**, 671-678.
- 三橋富子, 妻鹿絢子, 田島真理子, 荒川信彦. 1981. マリネ条件下の筋原繊維たん白質におよぼすカテプシン D の効果. 家政学雑誌 **32**, 265-269.
- 中 峰松, 清水 晃, 河野潤一, 五十君静信. 2006. 市販ミンチ肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状. 日本食品微生物学会雑誌 **23**, 217-222.
- 根岸晴夫. 2015. 発酵乳用乳酸菌を利用した発酵食肉製品の特徴. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan* **220**, 247-254.
- 日本食品衛生協会. 2015. 食品衛生検査指針 微生物編, pp. 116-357. 日本食品衛生協会, 東京.
- 大橋勝太郎, 根岸晴夫. 2011. 乳酸菌カルチャーをスターターとして利用した非加熱乾燥食肉製品の大腸菌群への影響. 日本畜産学会報 **82**, 53-59.
- 大橋勝太郎, 根岸晴夫. 2012. 乳酸菌カルチャーを接種した発酵乾燥食肉製品の特徴. 日本食品科学工学会誌 **59**, 447-455.
- Pietrasik Z, Shand PJ. 2011. Effects of moisture enhancement, enzyme treatment, and blade tenderization on the processing characteristics and tenderness of beef semimembranosus steaks. *Meat Science* **88**, 8-13.
- Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Casquete R, Serradilla MJ, Córdoba Mde G. 2009. Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science* **83**, 460-467.
- Sameshima T, Magome C, Takeshita K, Arihara K, Itoh M, Kondo Y. 1998. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus*

- in fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 1-7.
- Shokryazdan P, Faseleh Jahromi M, Liang JB, Ho YW. 2017. Probiotics : From isolation to application. *Journal of the American College of Nutrition* **36**, 666-676.
- Takeda S, Matsufuji H, Nakade K, Takenoyama SI, Ahhmed A, Sakata R, Kawahara S, Muguruma M. 2017. Investigation of lactic acid bacterial strains for meat fermentation and the product's antioxidant and angiotensin-I-converting-enzyme inhibitory activities. *Animal Science Journal* **88**, 507-516.
- Takeda S, Takeshita M, Kikuchi Y, Dashnyam B, Kawahara S, Yoshida H, Watanabe W, Muguruma M, Kurokawa M. 2011a. Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products against influenza infection in mice: alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity. *International Immunopharmacology* **11**, 1976-1983.
- Takeda S, Yamasaki K, Takeshita M, Kikuchi Y, Tsend-Ayush C, Dashnyam B, Ahhmed AM, Kawahara S, Muguruma M. 2011b. The investigation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Mongolian dairy products. *Animal Science Journal* **82**, 571-579.
- 手塚 咲, 山形健登, 片山寛則, 渡邊 学, 村元隆行. 2015. 浸漬液および浸漬時間の違いが日本短角種牛肉の理化学特性に及ぼす影響. 日本畜産学会報 **86**, 37-43.
- 手塚 咲, 片山寛則, 渡邊 学, 村元 隆. 2016. 異なる品種のイワテヤマナシ果汁に浸漬させた日本短角種牛肉の理化学的特性. 日本畜産学会報 **87**, 149-155.
- 山本 泰, 東和 男, 好井久雄. 1984. 有機酸類の抗菌性. 日本食品工業学会誌 **31**, 525-530.

Effects of immersing culture of lactic acid bacteria from meat products on the tenderness and microbes in pork

Shiro TAKEDA^{1,2}, Masahiro WAGA² and Ryoichi SAKATA^{1,2}

¹ Department of Animal Science and Biotechnology, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara, Kanagawa 252-5201, Japan

² Graduate School of Veterinary Science, Azabu University, Sagamihara, Kanagawa 252-5201, Japan

Corresponding : Ryoichi SAKATA (fax : +81 (0) 42-769-1704, e-mail : sakata@azabu-u.ac.jp)

The texture of meat often affects its palatability and tender meat tends to be more acceptable to the consumers. We investigated the effects of immersing pork into various lactic acid bacterial strain cultures that are used as starter for the fermented bioactive-meat products, on the texture and microbes in pork. According to the results, after immersing pork into the tested each lactic acid bacterial culture in our study, the maximum load value of pork immersed into *Lactobacillus sakei* strain 23 (LS-23) culture was significantly lower than that of untreated pork and that immersed into *L. sakei* JCM1157 (type strain) culture ($P < 0.05$). In addition, the disappearance of protein (> 100 kDa) bands in SDS-PAGE, reduction in pH, and increase in lactic acid concentration were observed in pork immersed in LS-23 culture compared to those in untreated pork and pork immersed in *L. sakei* type strain culture. Further, to identify the factor that led to a decrease in maximum load of pork immersed in LS-23 culture, we prepared the modified cultures (the supernatants at 4°C and 30°C, pH neutralized supernatant, LS-23 cell, and heat killed LS-23 cell suspensions) and immersed the pork into these cultures. As the results, the maximum load of pork immersed in pH neutralized culture was significantly elevated compared to that in LS-23 culture. In this study, the low maximum load value of pork is believed to be mostly due to the decrease in pH and elevation in lactic acid concentration in pork immersed into LS-23 culture. Moreover, the bacterial numbers of *Staphylococci* and psychrophiles in pork were significantly decreased by its immersion into LS-23 culture compared to those in untreated pork ($P < 0.05$). Therefore, the immersion of pork into LS-23 culture is suggested to decrease the maximum load and to suppress the bacterial contamination of pork. Hence, the immersion of meat into LS-23 culture is expected to be useful as a marinade solution and bio-preservative applicable in the meat processing. Further studies are needed to establish LS-23 culture as a bio-preservative of various foods or food stuffs for its effective application in food processing.

Nihon Chikusan Gakkaiho 89 (4), 451-458, 2018

Key words : biopreservation, *Lactobacillus sakei*, marinade, pork, texture.