

# 野菜汁液による肉製品の発色に関する研究

## I. 発色機構ならびに関連物質について

加香 芳孝・中嶋 茂\*・小島 正秋

(昭和 49 年 8 月 31 日受理)

### Studies on the Color-Development of Meat Products by Some Vegetable Juices

#### I. On the Mechanism of Color-Development and Substances Relating to It

Yoshitaka KAKO, Shigeru NAKAJIMA\* and Masaaki KOJIMA

(Animal Products Processing Research Laboratory)

## 緒 言

従来肉製品製造上重要な発色剤と考えられ広く使用されてきた亜硝酸塩は、最近、第2または第3級アミンと共存するとき、比較的容易に反応して発癌性を有するといわれるN-ニトロサミン類を、しかも生体内(胃)でより容易に生成<sup>1,2,3)</sup>することが知られてくるにおよび、世界的に重大な問題として論議をよぶに至っている。しかしながら、さらに亜硝酸塩には中毒性芽胞生成菌である Clostridium botulinum の発芽抑制効果<sup>4)</sup>や、Cooked cured meat flavor の形成<sup>5,6)</sup>など有用な効果も多いので亜硝酸塩の使用を直ちに全廃することは甚だ困難な状況であり、現在では各国とも使用量を減じ、肉製品中での残留量を低減させる方向にあるようである。しかし、あくまでも亜硝酸塩を一切使用せず、危険のない他の物質による発色もしくは肉色の固定が可能であればより望ましいので、この面でも種々検討がなされており、すでにニコチン酸誘導体<sup>7)</sup>や、ベタレイン色素<sup>8)</sup>などについての若干の応用研究例が公表されているが、まだ広く一般に使用されるに至っていない。

一方、生肉と野菜とを一緒に調理すると、生肉はそれ自身の色とはやや異った、独特の桃色に発色することをわれわれも日時折目撃するが、この時の色調は生肉のみを加熱した場合のものとは明らかに違っている。この点に着目して滅菌野菜汁液を肉製品の製造に

適用し、塩漬用ピクルに添加して肉塊を塩漬しハム、ベーコンを調製したり、直接ひき肉に混合して発色させたソーセージを製造した例がわが国にある。これは非常に興味深い方法であるが、このような例は諸外国にはみられず、研究例もほとんどないようである。

そこで今回、われわれはまず、各種野菜汁液を用いて肉製品の発色効果を確認するとともに、一部について発色のメカニズムならびに発色関連物質について追究したのでその結果を報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 各種野菜汁液の調製

#### (1) 新鮮汁液

野菜の種類としては、大根、キャベツ、ホーレン草、人参、玉ネギを選び、市販のものを購入して使用した。各野菜はよく水洗した後、ジューサーにかけて汁液のみを取出し、一たんガーゼでろ過後、ろ液を 9,780×g で 10 分間遠心分離して得られる上澄液を新鮮汁液とした。

#### (2) 煮沸汁液

新鮮汁液を 100°C で 10 分間煮沸し、冷却後蒸発水分量を補い、東洋ろ紙 No. 6 でろ過して得られるろ液を煮沸汁液とした。

#### (3) 加圧蒸煮汁液

新鮮汁液を 120°C、30 分間オートクレーブし、冷却後蒸発水量分量を補い、煮沸汁液と同様ろ過して得られるろ液を加圧蒸煮汁液とした。

なお、大根の新鮮汁液と煮沸汁液はとくに大量に調製し、一部を残して大部分を凍結乾燥し -20°C に保存して必要に応じて使用した。

\* 厚生省環境衛生局食品衛生課,  
Food Sanitation Division,  
Environmental Health Bureau,  
Ministry of Health and Welfare.

## 2. ソーセージの調製

市販の新鮮な豚肩肉（と殺後一夜冷蔵したもの）を購入し、結合組織および脂肪組織をできるだけ除いてから 2~3 cm 角に切り、肉量の 2.5% の食塩を加えてミートミキサー中でよく混和する。ついで肉ひき器（2 mm の孔のあいたプレート使用）を通してミンチとしてから、適当に分割し、各実験区に定められた野菜汁液、硝酸カリウム（ $\text{KNO}_3$ ）等を添加し、十分に混和後、塩化ビニリデンケーシングに充てんして直径 2 cm、長さ 10 cm 程度のもとする。

これらを直ちに 5°C の冷蔵庫に移し塩漬を開始するが、塩漬を終了したものは直ちに 80°C、60 分間湯煮し、その後流水で 60 分間冷却、以後は 5°C の冷蔵庫に貯蔵した。

## 3. CCMC (Cooked cured meat color) の測定

調製したソーセージの発色度を比較するため Horsey<sup>9)</sup> の原法を改良した Gantner<sup>10)</sup> の方法によって形成されたニトロソヘモクロモゲン抽出し、540 nm の吸光度を測定した。なお、以上の操作はできるだけ冷暗所で行なった。

## 4. 野菜汁液およびソーセージ中の硝酸根 ( $\text{NO}_3$ ) 亜硝酸根 ( $\text{NO}_2$ ) の定量

野菜汁液およびソーセージ中の  $\text{NO}_3$ 、 $\text{NO}_2$  の定量は、各種ある方法のうちもっとも精度が高いといわれている Follet & Ratcliff<sup>11)</sup> のカドミウム還元法によって定量した。

## 5. ニトロソミオグロビン、メトミオグロビン、大根汁液成分によるミオグロビン誘導体の調製

馬結晶ミオグロビン（シグマ社）(Mb) を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し 0.1% 溶液とする。これに酸素ガスを通気すると黄褐色に変色するが、これがメトミオグロビン (Met-Mb) 溶液である。また、0.1% Mb 溶液に  $\ell$ -アスコルビン酸を 0.1% 加えて還元型 Mb 溶液としたものと、0.1% 亜硝酸ナトリウム溶液に  $\ell$ -アスコルビン酸を 0.2% 加えた溶液とを、4 : 1 の割合で褐色のツンベルグ管にとり、十分脱気してから両液を混合し、その後室温に 10 分間以上放置すると紫褐色のニトロソミオグロビン (NO-Mb) 溶液が得られる。

大根汁液成分による Mb 誘導体を調製する場合は、まずツンベルグ管に 0.1% Mb 溶液を一定量とり、これに新鮮または煮沸大根汁液の凍結乾燥物を 0.1, 0.5, 1.0% となるように添加しよく混合溶解後、管内を十分脱気して室温に置き、所定時間経過後可視部領域の吸光曲線を 450~650 nm の範囲で、目立自記

分光光度計 (EPS-3T 型) を用いて記録させ追跡した。なお対照として大根煮沸汁液凍結乾燥物を 0.5% 添加した場合と同量の  $\text{NO}_3$  を含むよう硝酸カリウムを 0.045% 添加した Mb 溶液を上述のとおり処理して用いた。

## 6. 還元力の測定

大根の新鮮、煮沸、加圧蒸煮汁液ならびにソーセージの原料として用いた新鮮豚肉の還元力を測定したが、これは Kajita<sup>12)</sup> の方法に準拠した Ando ら<sup>13)</sup> の変法により行ない、システイン mg% として表わした。

## 7. クロマトグラフィー

大根汁液中に存在する遊離アミノ酸やペプチドを分離固定するため、ペーパー、薄層クロマトグラフィーを、また見出された主要ペプチドの分画精製を行なうため Dowex 50×4 によるイオン交換クロマトグラフィーを行なった。さらに補集精製されたペプチドのアミノ酸組成を知るため、アミノ酸自動分析機により分析した。

### (1) ペーパークロマトグラフィー

東洋ろ紙 No. 51 (25 × 35 cm) に試料をスポットし、*n*-ブタノール-酢酸-水 (4 : 2 : 1, v/v) を展開溶媒として一次元上昇法で約 20 cm 展開、呈色液としてはコリジン 5% (v/v) を含むエタノールに、ニンヒドリンを終濃度 0.1% となるよう溶解したもの<sup>14)</sup> を用いた。この呈色液を用いるとアミノ酸の種類により呈色を異にするので同定が容易になる利点がある。また特にシステイン、システインの呈色のためには塩化白金試薬<sup>15)</sup> を用いた。

### (2) 薄層クロマトグラフィー

シリカゲル G (メルク社) を 250  $\mu$  の薄層とし、110°C で 15 分間活性化後、試料をスポットして展開した。展開溶媒としては *n*-ブタノール-酢酸-水 (60 : 20 : 20, w/w) を用い、水平法で約 12 cm 展開した。呈色液としては 0.2% ニンヒドリン-エタノール溶液 50 ml に酢酸 10 ml、コリジン 2 ml を混合したものを、100°C で加温発色させた。

### (3) イオン交換クロマトグラフィー

ペーパーおよび薄層クロマトグラフィーの結果、ある種のペプチドが大根汁液中に存在することが見出されたので、これを分画するために最初セファデックス G-10 によるゲルろ過法を試みたが良好な結果が得られなかった。そこでペプチドの分画により適当する方法と思われるイオン交換樹脂 Dowex 50×4 を用いて種々検討した結果、第 9-A 図に示した揮発性緩衝液を用いて濃度こう配分離を行なうと、かなり良好

な、目的とするペプチドの単離が可能であった。なお、溶離曲線は Moore ら<sup>16)</sup> の方法によりニンヒドリン-ヒドリンダンチン溶液を各フラクションの一部に加えて、沸騰水中で 15 分間加熱発色させ、570 nm での吸光度を測定し作製した。

単離されたペプチドの純度については薄層クロマトグラフィーで確認した。

また同時にこの方法で分画されるフラクションのうち、いずれかに NO<sub>3</sub> が局在していないかどうかを検するため、Hartley ら<sup>17)</sup> の方法にしたがい、スルファニル酸-キシレノール法で各フラクションの比色量を行ない、溶出位置の確認を行なった。

#### (4) アミノ酸自動分析

大根汁液中のペプチド画分については常法にしが、6 N 塩酸を加え減圧封管とし、110°C で 2, 4, 6 時間加水分解後減圧乾固したものについて、柳本 LC-5 S 型アミノ酸自動分析機により分析した。なお、シスチンおよびシスチンについては、Schram ら<sup>18)</sup> の過ギ酸酸化法により処理しシスチン酸として分析した。

### 結果ならびに考察

#### 1. 各種野菜汁液によるソーセージの発色効果

大根、キャベツ、ホーレン草、人参、玉ネギの新鮮

汁液を添加し、野菜の種類、添加量、塩漬時間と発色度との関係を明らかにするために調製したソーセージについて CCMC を測定した結果を第 1 図に示した。どの野菜の汁液を用いても大なり小なり発色することがわかるが、特に大根汁液の効果は他に比べて著しく、これについてキャベツ、ホーレン草、人参の汁液が発色し、玉ネギの汁液は最も発色効果が小さいようである。また一般にどの野菜汁液の場合も塩漬時間が長い程発色度が大となる傾向を示しているが、この発色に要する時間を普通肉製品製造の際に行なわれる時間、すなわち、原料肉中に含まれるヘムの全量をニトロソヘムに転換させるに十分な量の NO<sub>2</sub> を添加して行なわれる乾塩法の場合に要する時間は 48 時間程度で十分であるといわれているが、これと比較すると著しく長く、10 日近くの塩漬日数を要するようである。また汁液の添加量が多い程発色度が大となる傾向があるが、官能的に検すると、6% 添加区ではソーセージを口に含んだ時野菜臭が感じられるので、添加量としては、3% 程度に留めた方が、発色もこれで十分であるし、異臭も感じられないのでよいのではないかと思われる。

#### 2. 各種野菜汁液中の NO<sub>3</sub>、NO<sub>2</sub> の存在量

野菜汁液による肉製品の発色効果は第 1 図に示した結果から現実にあることが実証されたが、形成された

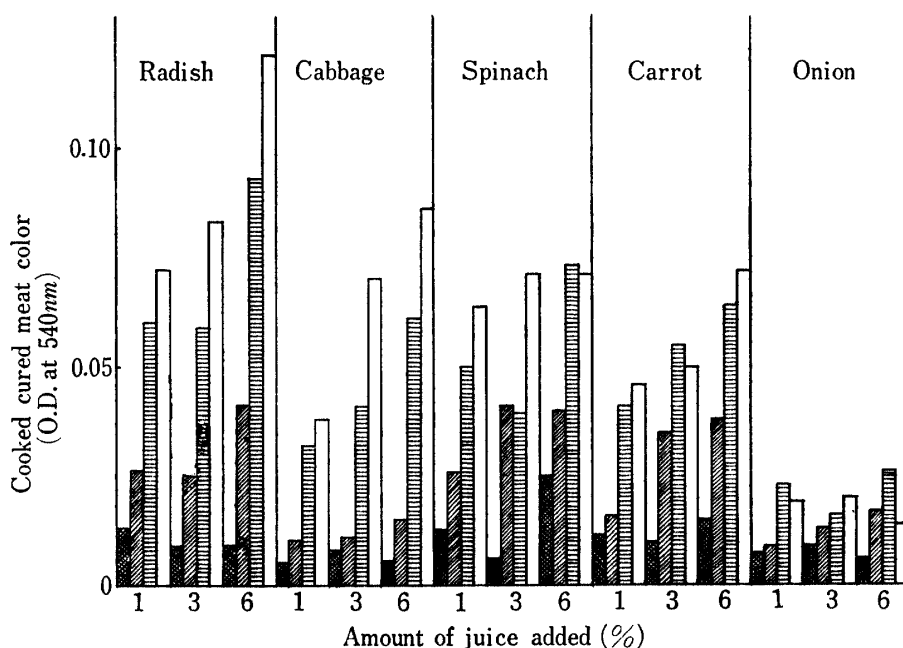


Fig. 1. Comparison of the cooked cured meat color developed with the addition of four kinds of vegetable juices to minced pork at the four steps of curing period (5, 7, 9 and 11 days) at 5°C.

■; 5 days curing, ▨; 7 days curing, ▩; 9 days curing, □; 11 days curing.

色素はどのようなものであるかがつきに問われてくる。これに対しては普通に肉製品の発色を検する場合に用いられる CCMC を測定した結果、色素の形成が確かめられたのであるから、肉の中の Mb の一構成成分である鉄-ポーフリン、すなわちヘムの誘導体の一種、ことにニトロソ誘導体であろうことは一応推定されるのであるが、もしそうであるとすれば、この誘導体を形成するのに必要な酸化窒素 (NO) の供給源を普通の肉製品の発色機構から考えるならば、 $\text{NO}_2$  または  $\text{NO}_3$  が供給されなければならないはずである。この実験の場合、これらが供給されるとすれば野菜汁液中中に存在している以外、他に供給源は考えられない。一方植物体内には硝酸塩、亜硝酸塩がとり込まれることは周知の事実であり、したがって野菜汁液中に  $\text{NO}_3$ 、 $\text{NO}_2$  の存在は予想されるので定量を試みた。その結果は第 1 表に示したとおりであり、 $\text{NO}_3$  は大根汁液に最も多く、玉ネギが最も少なく、他はその中間であることが見出されたが、第 1 図の発色効果についての結果と照合してみると、 $\text{NO}_3$  含量の多いもの程発色効果が大きいことが見出される。この点は非常に興味深い。

Table 1. Nitrate and nitrite contents in various vegetable juices

Kind of vegetable	$\text{NO}_3$ (ppm)	$\text{NO}_2$
Radish	2147.7	0
Cabbage	1047.2	0
Spinach	1575.3	14.5
Carrot	617.1	0.3
Onion	142.5	0

$\text{NO}_2$  は一般に非常に少なく、ホーレン草と人参にわずかに存在していたが、原田ら<sup>19)</sup>によればホーレン草の場合、貯蔵中に細菌によって硝酸塩は亜硝酸塩に還元されるということであるので、恐らくこの  $\text{NO}_2$  は  $\text{NO}_3$  に由来したものであろうと考えられる。

このように野菜汁液中には硝酸塩の形で大部分が含まれていることがわかったので、これを用いた場合の発色機構は、丁度原料に硝酸塩のみを添加して塩漬を行なった場合に似ているものと思われる。すなわち、原料肉に硝酸塩と食塩のみを加えて塩漬すると、原料肉自身のもつ還元力と、肉中に存在する硝酸還元菌の作用により非常にゆっくりと硝酸塩は亜硝酸塩に還元され、一部はさらに酸化窒素にまで還元されてミオグロビンと反応し、 $\text{NO-Mb}$  が形成されてくる。塩漬後湯煮する段階で、筋原繊維蛋白質をはじめ Mb も

加熱変性するが、その時出現する多数の SH 基の示す強い還元力により、かなりの亜硝酸塩は酸化窒素となり、ヘムと結合してニトロソヘモクロモゲン (すなわち肉製品の発色色素) となる。もちろん、すでに形成されていた  $\text{NO-Mb}$  からミオグロビンのみが変性して離れ、この色素は生じてくる。以上のべた機構について本研究では細菌学的側面からはまったく追究しなかったが、この面でも一応納得のゆくものであると考えられる。

### 3. 大根汁液添加ソーセージの発色度と残存 $\text{NO}_3$ および $\text{NO}_2$

以上の結果から新鮮大根汁液を用いると、それ自身に硝酸塩が多く含まれていて、そのためにソーセージの発色度も大になることが明らかにされたので、この大根汁液を主にとりあげ、これによる発色効果の機構をより深く追究するために、つぎに現在広く一般に使用されている硝酸カリウムを対照として、大根の新鮮汁液、煮沸汁液、加圧蒸煮汁液を用い、 $\text{NO}_3$  含有量が 115 ppm となるように (大根汁液 3% 添加に相当) そろえて添加したソーセージを調製し、13 日間にわ

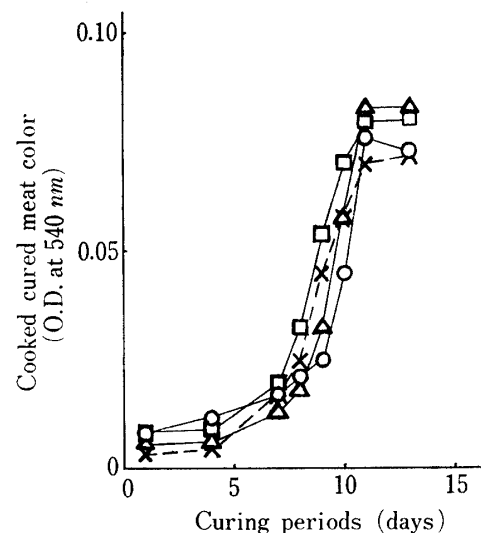


Fig. 2. Changes of cooked cured meat color in sausages during curing for, at maximum, 13 days at 5°C, produced with the addition of fresh, boiled and autoclaved radish juices and  $\text{KNO}_3$  as a control.

The ingredients used in this experiment were added at the level of 115 ppm as  $\text{KNO}_3$  based on the data previously determined.

- ; Fresh radish juice,
- △— ; Boiled radish juice,
- ; Autoclaved radish juice,
- ×— ;  $\text{KNO}_3$ .

Table 2. Changes of nitrate and nitrite contents during curing in the sausage produced by the addition of radish juices treated under various conditions and potassium nitrate

Curing period (day)		NO <sub>3</sub>			NO <sub>2</sub>		
		(ppm)					
		0	1	13	0	1	13
Radish juice	Fresh	115	115	42	0	6.0	3.3
	Boiled	115	92	39	0	3.3	2.0
	Autoclaved	115	98	40	0	3.3	4.0
KNO <sub>3</sub>		115	113	45	0	3.3	2.0

たって塩漬した。その間ほぼ毎日一部をとって湯煮したソーセージについて、その発色度を測定すると共に、塩漬1日目と13日目の湯煮ソーセージについて残存 NO<sub>3</sub>、NO<sub>2</sub> を定量した。得られた結果は第2図、第2表に示した。すなわち、発色度については、10日目でほぼ最大に達するようで、これ以上の塩漬は、理由は不明ながら無意味であることがわかる。また大根汁を添加したものは3種とも硝酸カリウムを用いたものよりも最終的にわずかながら高い発色度を示している。これは13日目に定量した NO<sub>3</sub> の残存量の多少とほぼ一致しており、硝酸カリウムを添加したものが大根汁液を添加したものよりも多く残っている。この事実は大根汁液成分中に何らかの硝酸塩を還元する物質が存在することを推定させ興味深い。さらに煮沸、加圧蒸煮汁液を添加したソーセージでは新鮮汁液と硝酸カリウムを添加したものよりも、塩漬1日目における NO<sub>3</sub> の減少が急激である点、塩漬13日目に残存量が少ない点に気づかれる。これらの点から、同じ大根汁液でも新鮮汁液と加熱汁液とでは硝酸塩還元力に若干の差があるようで、後述するニトロソメトミオグロビン (NO-Met-Mb) 形成速度との関連において興味ある点である。NO<sub>2</sub> 残存量については、一定した傾向はみとめられず、常時進行する化学反応にともない消長する経過を示すにすぎないものと思われ、少なくとも特に貯留される可能性はないようで、残留量はわずかであり、この点のみからみると、大根汁液を3%程度添加してソーセージを調製すれば、塩漬に長時間を要する欠点はあるが一応の発色をさせ得るし、しかも残留 NO<sub>2</sub> のきわめて少ないものが調製できることは、この方法の利点といえるかも知れない。

#### 4. ミオグロビンモデル系中での大根汁液成分によるニトロソメトミオグロビンの形成

以上までの結果からほぼ野菜汁液による肉製品の発

色は、野菜汁液中に含まれていた硝酸塩とごく少量の亜硝酸塩が還元されることにより生成する酸化窒素とヘムとが結合してニトロソヘム誘導体が形成されるといふ発色の機構が推定されるのであるが、しかし、この点についての直接の証明はまだない。そこでつぎに純粋な結晶ミオグロビンの溶液を用いたモデル系内で、はたして野菜汁液はニトロソヘム誘導体を形成し得るかどうかについて分光光学的に検討を加えた。

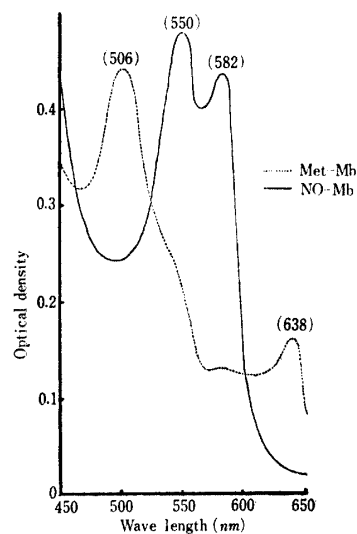


Fig. 3. The absorption spectra of metmyoglobin (Met-Mb) and nitrosomyoglobin (NO-Mb) solution.

The number in each bracket on graph shows the wave length where the typical peaks appeared.

まず Met-Mb と NO-Mb の可視部吸収曲線を第3図に示したが、これは既報の文献にみられる典型的な吸収曲線とまったく一致しており、Met-Mb では波長 506 nm と 638 nm に吸収極大があり、一方 NO-Mb には 550 nm と 582 nm に吸収極大があることはよく知られているとおりで本実験でも同様の特性を示した。

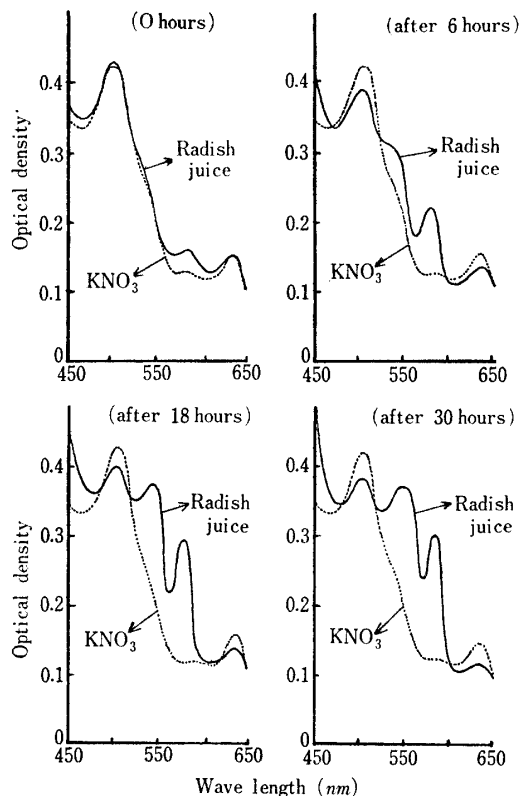


Fig. 4. Changes of absorption spectra of myoglobin solutions with the addition of 0.045%  $\text{KNO}_3$  or 0.5% boiled radish juice (freeze dried), during standing at room temperature.

ついでこの系に、最大の発色効果をもたらす大根の煮沸汁液の凍結乾燥物を0.1%添加したのについて、チモールの小片を加えて細菌の増殖を抑制しつつ室温に放置し、30時間まで経時的に吸収曲線の変化を追跡したが、吸収曲線はMet-Mbのそれとほぼ同一であり、30時間後でさえも540 nm, 575 nm付近にかすかな変化が認められるのみであった。そこで濃度を5倍に高め、0.5%添加して実験した結果は第4図に示したとおりで、この場合対照として硝酸カリウムを0.045%添加した(大根汁液0.5%添加した場合に含まれる $\text{NO}_3$ に相当)Mb溶液についても同時に行なった。図より明らかなとおり対照の吸収曲線は30時間経過後もまったく無変化で典型的なMet-Mbのそれと同一であった。それに対し、大根煮沸汁液凍結乾燥物を0.5%添加したMb溶液では緩慢ながら変化を生じてきた。まず6時間経過後、540 nm付近にショルダーが、575 nm付近にピークが現れてくる。この変化についてFoxら<sup>20,21)</sup>は、Met-Mbと亜硝酸塩を共存させた場合、530~540 nmと570~580 nmの部分に吸光度の増大が起ってくることを報告してお

り、それとよく一致している。このような変化は亜硝酸メトミオグロビン( $\text{NO}_2$ -Met-Mb)の形成によるもので、 $\text{NO}_2$ とMet-Mbが単にイオン結合したものであると考えられている。さらに18時間を経過すると、Met-Mbの極大吸収のある506 nmと638 nm付近の吸光度が低下し、これにかわって545 nmと575 nm付近の吸光度は増大してピークとなってくる。このような吸光曲線を示す物質はFoxら<sup>20,21)</sup>によれば酸化窒素(NO)とMet-Mbが結合したニトロソメトミオグロビン( $\text{NO}$ -Met-Mb)で、これは還元状態におくと直接 $\text{NO}$ -Mbを生成するものであるという。

さらに30時間経過後には506 nmと638 nmのピークはさらに低下し、545 nmと575 nmにあったピークはさらに増大し、同時にピークの頂点の波長は547 nmと580 nmへと移行し、第3図に示した $\text{NO}$ -Mbの2つの極大吸収の波長位置へ近づいていくことから、ここでより強い還元状態が環境として与えられれば $\text{NO}$ -Mbが形成されるであろうことは容易に推定される。

この実験は単純なMb溶液について加熱操作を加えずに行なったものにすぎないが、これを実際の肉製品製造の場合について考えてみると、これらの反応は“肉”という環境の中で進行するわけであり、 $\text{NO}$ -Met-Mbが形成された状態で全体が加熱されると、肉中に豊富に存在する筋原繊維蛋白質や、Mb自身についても蛋白質部分であるグロビンが変性して、2次、3次構造が破壊されるとともに、多くのSH基が出現し強い還元状態が生ずる結果として、容易にニトロソヘモクロモゲンが生成することは、ここでより確実に推論されよう。著者らの1人は、以前、牛肉を用いて、普通の肉製品製造条件に従い、食塩、亜硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、アスコルビン酸ナトリウムなどを添加し、48時間塩漬後調製したソーセージについて形成された色素を抽出し、可視部の吸収曲線を検討している<sup>22)</sup>が、その場合もほぼ、本実験の大根汁液凍結乾燥成分を1%添加した場合と同様な吸収曲線を得ている。さらにまた、Mb溶液に硝酸カリウムのみを添加した系では、Met-Mbの特性を示す吸光曲線のみを与え、その他の変化はほとんど現われなかったのに対し、大根汁液成分を0.5%添加すると、 $\text{NO}_2$ -Met-Mb $\rightleftharpoons$  $\text{NO}$ -Met-Mbの変化が生じる事実は、大根汁液成分中にはとくに $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}$ という一連の還元反応を起させる還元性物質が含まれていることを示さしているものと思われる。

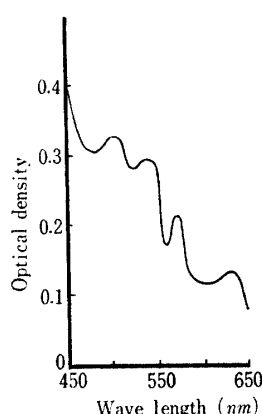


Fig. 5. Absorption spectrum of myoglobin solution with the addition of 0.045 %  $\text{KNO}_3$  and 0.5 % *l*-ascorbic acid, after standing for 18 hours at room temperature.

この点をより明確にするため、Mb 溶液に硝酸カリウムを 0.045 % 添加した系に肉製品製造の際、従来発色促進剤として広く使用されている *l*-アスコルビン酸を 0.5 % 添加したものについて検討した。その結果は第 5 図に示したとおりで、18 時間経過後、丁度大根煮沸汁液添加と同様な吸収曲線を示し、NO-Met-Mb の存在を示している。この事実は大根汁液成分中には、アスコルビン酸にほぼ匹敵する程度の還元性を有する物質が含まれていることを立証しているものと思う。ここで使用した大根汁液成分は新鮮汁液を  $100^\circ\text{C}$  で 10 分間煮沸した後凍結乾燥したものであるから、新鮮汁液中にアスコルビン酸が存在していたとしても十分失活しているはずであり、以上の大根汁液成分の還元性効果はアスコルビン酸によるものでないことはいうまでもあるまい。

最後に Mb 溶液に大根の新鮮汁液および煮沸汁液の凍結乾燥物をそれぞれ 1 % 添加し、反応させて経時的に吸収曲線をとって比較した。その結果は第 6 図に示したとおりである。まず第 4 図と比較すると、煮沸汁液凍結乾燥物を 1 % 添加した場合、0.5 % 添加した場合よりも  $\text{NO}_2$ -Met-Mb, NO-Met-Mb などの Mb 誘導体の生成が明らかに速く、添加後 30 時間目ではかなりの差が認められる。しかし、一方第 6 図中に示した新鮮汁液凍結乾燥物を 1 % 添加した系では煮沸汁液凍結乾燥物添加系に比べて各 Mb 誘導体の生成速度が遅れている。この点は 2. のソーセージ発色試験の結果の中でも、わずかな差としてであるが認められた、新鮮汁液と加熱汁液との発色度の差異を説明しているものと思われる。しかし、この理由は今後究明す

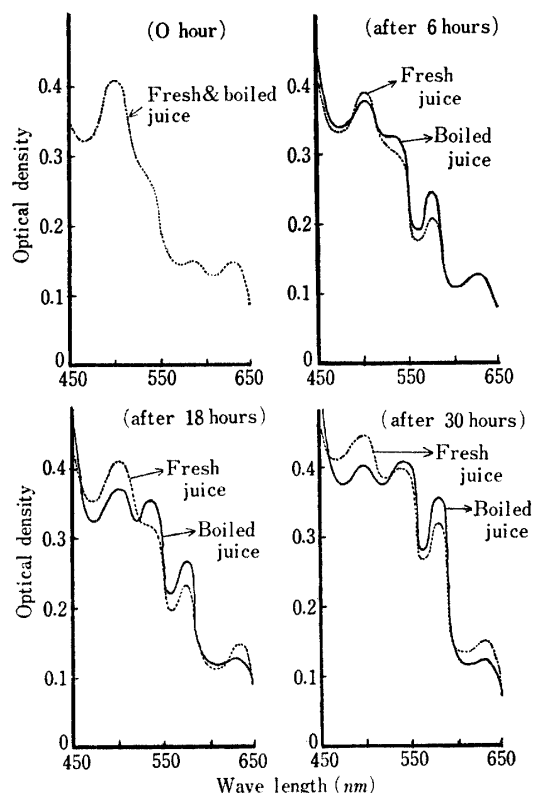


Fig. 6. Changes of absorption spectra of myoglobin solutions with the addition of fresh or boiled juice (freeze dried) at the level of 1 %, during standing at room temperature.

べき問題である。

##### 5. 大根汁液および豚肉の還元力

大根汁液成分中にはかなり強力な還元性物質が存在していることが、以上の結果から明らかにされたので、つぎに汁液自体はどの程度の還元力をもっているのかを知るため、豚の新鮮生肉と比較して定量を試みたのでその結果を第 3 表に示した。表より明らかとなり、大根汁液自体が示す還元力は、煮沸したり加圧蒸煮しても新鮮なものとあまり変化はなく、赤血塩を還元する能力をシステイン量として表わすと、ほぼ  $30\sim 34\text{ mg \%}$  程度のものであった。一方豚生肉の還元力は  $100\sim 110\text{ mg \%}$  程度で大根汁液の約 3 倍であった。しかし、大根汁液中の固型分量はわずか約 4 % であり、豚肉の約 40 % に比べると  $1/10$  程度であることを考慮すると、むしろ大根汁液中の還元性物質のもつ還元力は豚生肉の 3 倍強となるわけで、決して無視できないものであらうと思われる。このような還元性を示す物質として植物体内成分として直ちに考えられるアスコルビン酸またはその塩については、本来熱に不安定なものであるから、大根汁液は加熱後還元力に変

Table 3. Reducing capacity of radish juice treated under various conditions and meat

Sample		(mg % of cysteine)			ave.
		1	2	3	
Radish juice	Fresh	34.2	35.9	33.7	34.6
	Boiled	29.3	33.7	33.1	32.0
	Autoclaved	31.3	32.4	31.5	31.7
Meat (fresh pork)		112.2	99.3	107.3	106.5

These data were obtained from the determinations which were carried out separately, three times.

化がないという事実からまず否定されるし、汁液中に存在する糖類やアミノ酸類の加熱縮合物による可能性もまた逆の関係から否定されるように思われる。したがって著者らは、この還元性を示す本体として、大根汁液中に存在する、熱安定性の高いある種のペプチドか、あるいは特定のアミノ酸類が相乗的に作用するものではないかという想定のもとに以下の実験を進めた。後者の例として、安井ら<sup>23)</sup>もすでに一例を報告しており、ソーセージにわずかに 10 ppm 程度の少量の亜硝酸塩と、リジンとアルギニンの等量混合物を同時に添加して塩漬した場合、十分な発色が得られたという。

## 6. 大根汁液中の遊離アミノ酸およびペプチドの検索

### (1) ペーパークロマトグラフィー

アミノ酸、ペプチドのうち、広く生体内に存在し、強い還元性を示すものといえば、アミノ酸ではシスチン (Cys)、システイン (CySH) が、ペプチドではグルタチオンなどが直ちに考えられるので、大根汁液中にもこれらが存在していないか、まずペーパークロマトグラフィーにより検討した。

まず、大根の新鮮汁液、煮沸汁液、加圧蒸煮汁液をそのままスポットして展開すると、第7図中のRのような分離を示し、3者ともほぼ同様なパターンを示し

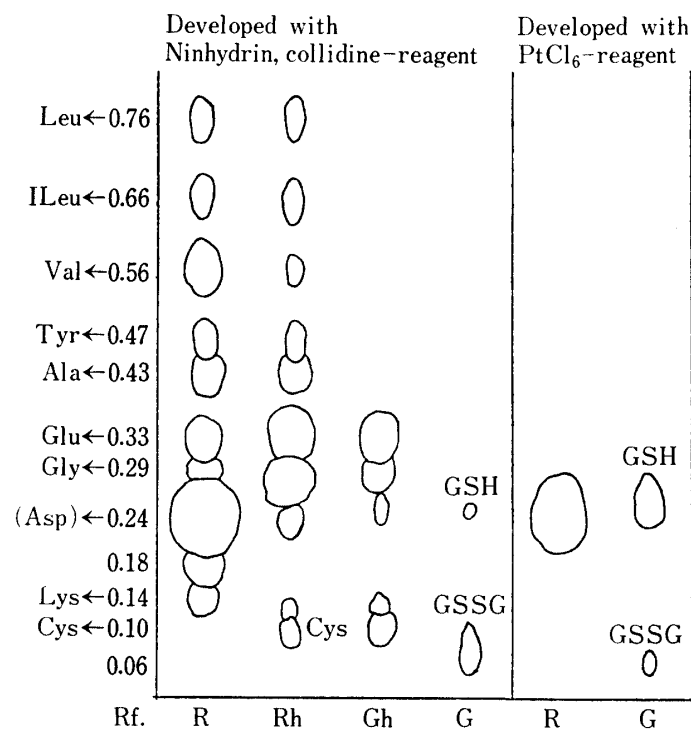


Fig. 7. Paper chromatograms of radish juice and glutathiones  
Chromatographic runs were done with BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4: 2: 1) on Toyo No. 51 filter paper at room temperature.  
R; Fresh radish juice, Rh; Hydrolyzed R (6N HCl, 110°C, 24hrs), G; Glutathione, GSH; Reduced form of G, GSSG; Oxidized form of G, Gh; Hydrolyzed G (6N HCl, 110°C, 24 hrs).



た。この中で Rf 0.24 付近にかなり大きなスポットが現われるのが特徴で、そのほかに遊離アミノ酸と思われる小さなスポットが多数現われ、標品で同定した結果、ロイシン (Leu), イソロイシン (ILeu), バリン (Val), チロシン (Tyr), アラニン (Ala), グルタミン酸 (Glu), グリシン (Gly), リジン (Lys) などであることがわかった。しかし、還元性を示す Cys, CySH は検出されなかった。また参考までにグルタチオンの標品をスポットして展開すると、G のようになり、酸化型 (GSSG) と還元型 (GSH) に別れ、それぞれ 0.06, 0.24 の Rf 値を示した。

つぎに、各汁液を塩酸加水分解 (6N HCl, 110°C, 24 時間) してから展開してみると第 7 図中の Rh のように分離した。すなわち、Rf 0.24 付近のスポットがいちじるしく減少し、Glu と Gly に相当するスポットが増大した。さらに Rf 0.10 の Cys に相当する新たなスポットが出現してきた。また、GSH についても汁液同様の条件で塩酸加水分解し展開してみると、第 7 図の Gh のような結果を得た。グルタチオンは Glu, Gly, CySH の 3 種のアミノ酸よりなるトリペプチドであるが、加水分解中に CySH は Cys に酸化されて Rf 0.10 の位置に現われているものと思われる。

つぎに塩化白金試薬を用いて CySH および Cys の検出を行なったところ、Rf 0.24 付近のスポットが呈色し、このスポットに CySH または Cys が存在することが推定された。以上の結果より、大根汁液中の Rf 0.24 の位置に分離されるものは一応還元型グルタチオン様のペプチドではないかと推定させた。

## (2) 薄層クロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーによる検討の結果還元型グルタチオン様のペプチドの存在が見出されたので、つぎにこの事実を再確認するとともに、その内容をより深く究明するために薄層クロマトグラフィーによる大根汁液の分析を行なった。この場合、新鮮汁液、煮沸汁液、加圧蒸煮汁液の間にはほとんど差がないことがすでに知られているので、今回は煮沸汁液のみについて行なった。得られた結果は第 8 図に示したとおりで、Rf 0.26 の位置に最大のスポットが現われた。つぎに煮沸汁液を塩酸加水分解してから展開してみると図中 Rbh に示したように、この最大のスポットのほとんどが消失し、代りに Glu のスポットがいちじるしく増大するとともに Gly のそれも多少増大するほか、CySH および Cys のスポットが現れてきた。

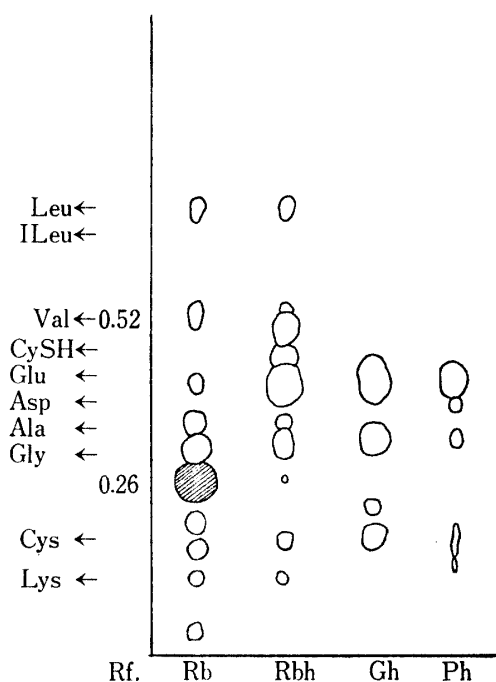


Fig. 8. Thin layer chromatograms of the boiled radish juice and glutathione.

Chromatographic runs were done with BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (60:20:20) on Silica-gel G layer (250 $\mu$ ) and developed with ninhydrin-collidine reagent.

Rb; Boiled radish juice, Rbh; Hydrolyzed Rb (2N HCl, 110°C, 3hrs), Gh; Hydrolyzed glutathione, Ph; Peptide, hydrolyzed (2N HCl, 110°C, 3hrs), which was extracted from the spot, shadowed in the figure.

以上の結果はペーパークロマトグラフィーの結果と大差ないものであるので、つぎに Rf 0.26 のスポットの部分を取り、水で抽出した後、塩酸加水分解 (2N HCl, 110°C, 3 時間) してスポットし展開してみたところ、第 8 図中、Ph に示したような結果が得られた。すなわち、Glu がいちじるしく多く、ついで Asp (アスパラギン酸)、Gly が認められ、Cys も痕跡程度ではあるが検出された。以上の結果から、Rf 0.26 の位置のスポットは、Glu, Asp, Gly, Cys または CySH の 4 種のアミノ酸から成立っているペプチドで、このうち Glu がかなり多く含まれているものと推定された。

## (3) イオン交換クロマトグラフィー

ペーパーおよび薄層クロマトグラフィーによる大根汁液中の還元物質についての検討結果から、CySH または Cys を含む 4 種のアミノ酸から成るところの、かなり高分子のペプチドの存在が推定された。

そこでつぎにこのペプチドを純粋に分離し、その組成をまず明らかにしたいと考え、大根汁液の凍結乾燥

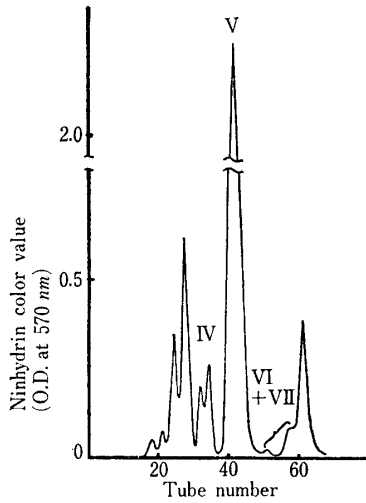


Fig. 9-A. Ion-exchange column chromatogram of the freeze-dried radish juice.

One ml of 1% aqueous sample solution was applied on a column (Dowex 50×4, 1×50cm) and eluted with a cation concentration gradient buffer system (Pyridine-Formic acid (*pH* 3.1), 0.1-0.2M) at 35°C. Each 2 ml of eluates was fractionated at the flow rate of 15 ml/hour, and then, the ninhydrin color values were estimated according to Moore and Stein<sup>16)</sup>.

物を使用して種々検討した。最初セファデックスG-10によるゲルろ過法で分離を試みたが、このペプチドのみの純粋な単離は困難であったので、つぎにペプチドの分離に、より有効と思われるイオン交換樹脂Dowex 50×4を用いることとし、溶離法を種々検討した結果、第9-A図に記したように、ピリジン-ギ酸緩衝液を用いて濃度こう配溶離法により、ほぼ目的とするペプチドの単離が可能となった。第9-A図中のピークVがそれを示している。なお、このピークには少量ながらAlaを含有していたが(第9-B図)、これは同一条件でリクロマトすることにより、ほぼ除かれた。

このようにしてイオン交換樹脂によるクロマトグラフィから大根汁液中に含まれるペプチドは、ほぼ純粋に取り出すことができたが、この検討を行なっている際に、同時に大根汁液中に含まれているNO<sub>3</sub>のクロマトグラム上における挙動も合わせて検討した。その結果は第10図に示したとおりであり、まったく予想外であったが、単離を目的としていたペプチドのピークとまったく同一の位置に溶出することが見出された。この事実は大変興味深いものであり、もし単離されるペプチドにNO<sub>3</sub>が結合しているのであれば、大

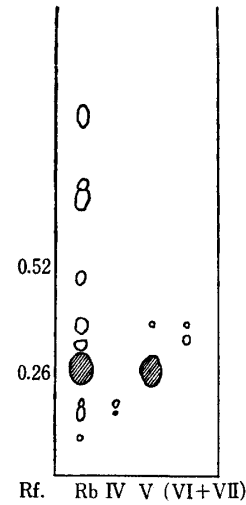


Fig. 9-B. Thin layer chromatograms of the fractions separated by the column chromatography shown in Fig. 9-A.

Procedures used in this experiment were same as described in Fig. 8. The spot shadowed shows the peptide.

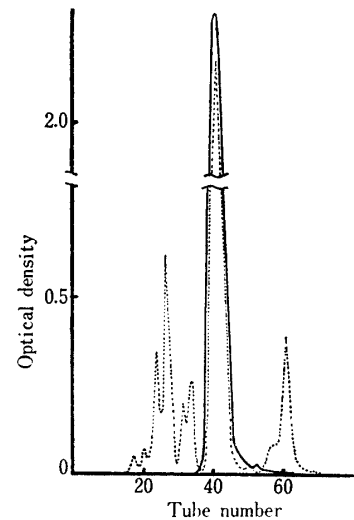


Fig. 10. Behavior of nitrate in radish juice on the ion-exchange column chromatography.

Chromatographic procedure was same as described in Fig. 9-A. Dotted line shows ninhydrin color value measured at 570 nm and solid line shows nitrate color value measured at 335 nm according to Hartley's method.<sup>17)</sup>

根汁液のもつ肉製品発色効果の原因はすべてこのペプチドに帰らせられることとなる。それらに関しては今後検討を要する問題である。

#### (4) アミノ酸組成分析

イオン交換クロマトグラフィにより一応純粋に大

根汁液中の還元性ペプチドは単離されたので、つぎにこのペプチドのアミノ酸組成を自動分析機により分析した。なお Cys および CySH は過硫酸酸化法によりシステイン酸として定量した。

ただしこの場合、調製されたペプチドが非常に少なかったため分析が1回しか行えなかったことと、濃度が低いために十分な結果が得られなかったが、分析値は第4表に示したとおりである。表の数値からも明らかとなり、Glu がやはり多量に含まれていて、10モルと算出され、ついで Asp が1モル、Gly は痕跡程度であった。Cys および CySH についてはややピークがずれ確認し難かったけれども、わずかに存在するものと思われる。

以上の結果から大根汁液中に含まれている還元性ペプチドは、結局定性的にしか判断しえなかったが、Glu を非常に多く含み、その他 Asp, Gly, Cys または CySH を含むものであろうと考えられる。

なお、この還元性ペプチドのアミノ酸組成や構造、性質などについては今後さらに研究を継続する予定である。

Table 4. Molar ratio of amino acids constituting the peptide found in radish juice

Kind of amino acid	Molar ratio
Glutamic acid	10
Aspartic acid	1
Glycine	trace
Cystine or Cysteine	trace

## 要 約

本研究では、わが国において野菜汁液を用いて肉製品を発色させる方法が実用化された例があるが、これは興味ある事実であるので実験的にこの事実を調査し、野菜汁液による肉製品発色の可能性を確認するとともに、発色色素自体を追究する過程で発色の機構を論究し、合せて発色に関連する物質についても検討した。

1. まず市販の大根、キャベツ、ホーレン草、人参、玉ネギを購入し、新鮮汁液を調製して豚肩肉ミンチに食塩と共に添加混合し(1~6%)、ケーシングにつめてソーセージとしたものを、5°Cで塩漬(最大11日間まで)した後湯煮し、それらの発色度をCC-MCを測定して比較したところ、大根が最も高い発色を示し、玉ネギが最低で、他はこれらの中間であった。またさらに、塩漬時間は11日間の範囲で長い程、

汁液添加量は多い程高い発色度をいずれも示した。

同時に汁液中のNO<sub>3</sub>およびNO<sub>2</sub>含量を定量したが、NO<sub>3</sub>は大根で最多で、(2,147.7 ppm)玉ネギで最少(142.5 ppm)、他はこれらの中間であったことから、発色度とNO<sub>3</sub>量との間に密接な関係のあることが認められた。これからまた、野菜汁液による発色はNO<sub>3</sub>が還元されNO<sub>2</sub>を経てNOとなり、結局肉中のミオグロビンのヘムと結合し、加熱後はニトロソヘモクロモゲンが形成されるという、普通の肉製品の発色機構によることが推定された。NO<sub>2</sub>の野菜汁液中に含まれる量は一般に少なく、ソーセージ中の残留量もわずか(2~4 ppm)であった。

2. 発色色素の形成される過程を追跡し、色素自体をより確認する意味でミオグロビン溶液から成るモデル系に大根汁液の凍結乾燥物を0.5%添加して放置し、可視部吸光曲線の変化を観察したところ、室温で30時間後にニトロソメトミオグロビンが生成することが認められ、この事実から肉中で加熱すれば容易にニトロソミオクロモゲンが形成されることが推察された。これに対し、対照として硝酸カリウムのみを添加したのではメトミオグロビンのみが生成し、まったく無変化であったことから、大根汁液中には比較的強力な、ある種の還元性物質の存在が考えられた。そこで還元力を測定してみると、加熱汁液の方がむしろ新鮮汁液よりもわずかではあるが大であるのでアスコルビン酸によるものではありえず、還元力の原因はある種のペプチドか、あるいは遊離アミノ酸の相乗の効果ではないかと考えられた。

したがってペーパーおよび薄層クロマトグラフィーで検討してみたところ、かなり高分子と思われる顕著なペプチドが存在することと、その他にLeu, ILeu, Val, Tyr, Ala, Glu, Gly, Lysなどが遊離アミノ酸として存在していたが、還元性を示すCys, CySHは検出されなかった。

大根汁液を塩酸加水分解するとペプチドは消失しクロマトグラム上、Glu, Glyのスポットが大きくなり、新たにAsp, Cysのスポットが現われたことから、このペプチドは、Glu, Asp, Gly, CysまたはCySHからなるグルタチオン様ペプチドではないかと考えられた。

つぎにイオン交換クロマトグラフィーでこのペプチドを単離することに成功したが、この時NO<sub>3</sub>の挙動についても検討したところ、クロマトグラム上、このペプチドとまったく同一位置に溶出されていることがわかり非常に興味深い事実が見出された。

アミノ酸自動分析機でこのペプチドのアミノ酸組成を分析したところ、少くとも Glu と Asp の比は 10:1 であることが見出された。

終りにのぞみ、本研究の遂行にあたり、種々御助言、御便宜を頂いた家畜栄養学講座の山田晃教授、富田裕一郎助教授、畜産化学講座の古賀克己教授、福永隆生助教授に謝意を表す。

本研究は西南開発株式会社の委嘱によるもので、研究費の一部を援助された。

### 引用文献

- 1) Sander, J., F. Schiveinsberg u. Hans-Peter Menz: *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **349**, 1691-1697 (1968).
- 2) Sen, N. P. and D. C. Smith: *Food Cosmet. Toxicol.*, **7**, 301-307 (1969).
- 3) Magee, P. N. and J. M. Barnes: *Brit. J. Cancer*, **10**, 114-122 (1956).
- 4) Perigo, J. A. and T. A. Roberts: *J. Food Technol.*, **3**, 91-94 (1968).
- 5) Cho, I. C. and L. J. Bratzler: *J. Food Sci.*, **35**, 668-670 (1970).
- 6) Cross, C. K. and P. Ziegler: *J. Food Sci.*, **30**, 610-614 (1965).
- 7) Brown, W. D.: *Proc. Meat Ind. Res. Conf.*, 21-27 AMIF (1973).
- 8) Von Elbe, J. H., J. T. Klement, C. H. Amundson, R. G. Cassens and R. C. Lindsay: *J. Food Sci.*, **39**, 128-132 (1974).
- 9) Hornsey, H. C.: *J. Sci. Food Agr.*, **7**, 534-540 (1956).
- 10) Gantner, G.: *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.*, **111**, 277-281 (1960).
- 11) Follet, M. J. and R. W. Ratcliff: *J. Sci. Food Agr.*, **14**, 138-144 (1963).
- 12) Kajita, A.: *J. Japanese Biochem. Soc.*, **26**, 547 (1954).
- 13) Ando, N., Y. Kako, Y. Nagata, T. Ohashi, Y. Hirakata, N. Suematsu and E. Katamoto: *Bull. Meat and Meat Prods.*, **2**, 1-6 (1963).
- 14) Levy, A. L. and D. Chung: *Anal. Chem.*, **25**, 396-399 (1953).
- 15) Toennies, G. and J. J. Kolb: *Anal. Chem.*, **23**, 823-826 (1951).
- 16) Moore, S. and W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, **211**, 907-913 (1954).
- 17) Hartley, A. M. and R. I. Asai: *Anal. Chem.*, **35**, 1207-1213 (1963).
- 18) Schram, E., S. Moore and E. J. Bigwood: *Biochem. J.* **54**, 33-37 (1954).
- 19) 原田基夫, 中村洋子, 谷村顕雄: 食衛誌, **13**, 36-40 (1972).
- 20) Fox, J. B. and S. A. Ackerman: *J. Food Sci.*, **33**, 364-370 (1968).
- 21) Fox, J. B. and J. S. Tompson: *Biochem.*, **2**, 465-470 (1963).
- 22) Ando, N., Y. Kako and Y. Nagata: *Bull. Meat and Meat Prods.*, **1**, 1-8 (1961).
- 23) 安井 勉, 深沢利行, 太田恵敏: 日本食肉研究会第13回大会講演要旨, 5-6 (1972).

### Summary

It is a very interesting fact that, in Japan, a method for color-developing the meat product by the use of some vegetable juices has been practically employed in the actual meat-products-manufacturing. So, first, whether this fact could be clarified scientifically or not, was investigated, and then the possibility of color-development in meat-product with the use of some vegetable juices was surveyed. At the same time, the mechanism of color-development was investigated in the course of searching the essential quality of pigment formed and the substances relating to color formation in those vegetable juices.

1. Five kinds of vegetable, radish, cabbage, spinach, carrot and onion, were purchased at the market near the university campus, brought to laboratory and the respective fresh juices were prepared with the use of juice mixer, while fresh pork (shoulder) was also purchased from a butcher and minced through a meat chopper. The minced pork was mixed well together with salt and juices (1 to 6% of meat), stuffed into casing, cured in the cold room at 5°C for, at maximum, 11 days. After that, they were boiled, cooled and estimated to ascertain the degree of color development through determining the "cooked cured meat color" (CCMC) by Gantner's method.

The results obtained showed that the radish juice gave the maximal color development, onion juice, the minimum, and the others, the intermediate. And the longer the curing period as well as the larger the amount of juice added, the higher was the color development.

The amounts of nitrate in those juices were determined with the following results ascertained; the radish juice contained the maximum amount (2,147.7 ppm), onion juice, the min-

imum (142.5 ppm), and the others, the intermediate. Therefore, it was clearly confirmed that the degree of color development was closely correlated with the amount of nitrate existed in each juice. At the same time, the mechanism of color development of meat product, when the vegetable juice was used, was inferred to be in accordance with the ordinary, well-known one; the mechanism in which nitrate is to be reduced to nitric oxide *via* nitrite by some reducing agent, and then, nitric oxide is brought to combine with heme in the myoglobin in meat to form nitrosomyoglobin. If boiled at that time in meat, nitrosohemochromogen were to be formed. The amount of nitrite was, however, very little in any juice or sausage.

2. For the purpose of tracing the course of pigment-formation and for making the pigment itself clearer, the myoglobin solution as a model system on meat, to which the lyophilized radish juice was added to 0.5%, was made stand at room temperature, with the absorbance curves watched in the visual zone for, at maximum, 30 hours. After 30 hours, in the system was found the formation of nitrosometmyoglobin which can easily be changed into either nitrosomyoglobin, when some reducing agent exists; or nitrosohemochromogen, when heated in meat.

On the contrary, myoglobin solution, to which potassium nitrate was added, showed only metmyoglobin throughout the whole standing period of 30 hours with no change, at all. The difference between those two phenomena is to be attributed to the reducing capacity surrounding myoglobin in the solution. So, some relatively active reducing agent was assumed to be in the radish juice. Heated radish juice showed the reducing capacity a little higher than fresh juice when chemically determined; therefore, the source of this reducing capacity was assumed to be derived not from ascorbic acid but from some peptide or from the synergistic effect of some of the free amino acids in juice.

3. At the next step of this study, paper and thin layer chromatographic technics were applied in the search of those substances. On the chromatograms, were found out a remarkable peptide spot of seemingly high molecule and eight spots of free amino acids, i. e., leucine, isoleucine, valine, tyrosine, alanine, glutamic acid, glycine and lysine, but were found out no spot of reducing amino acid, i. e., cystine or cysteine. Further, a few chromatographic runs were tried on the HCl-hydrolysate of radish juice. On the chromatograms, the spot of that peptide vanished clearly; on the other hand the spot-area of glutamic acid and glycine became wider with the appearance of the spots of aspartic acid and cystine.

The fact observed above seemed to suggest that the peptide found in the radish juice was composed of four kinds of amino acid, i. e., glutamic acid, aspartic acid, glycine and cystine or cysteine, though with the respective molar ratio, unascertained.

4. In the following step of this research, isolation of the peptide from radish juice, according to ion-exchange resin (Dowex 50×4) chromatography was attempted and fortunately succeeded.

By the way, the chromatographic behavior of nitrate was also surveyed with the peptide isolation. This attempt presented a very interesting result that nitrate contained in the radish juice behaved just together with the peptide.

The amino acid composition of the peptide above mentioned was determined with the use of autoanalyzer, but the result could only show the ratio of glutamic acid to aspartic acid to be 10 to 1, with failure.