

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 1 月 23 日(23.01.2014)

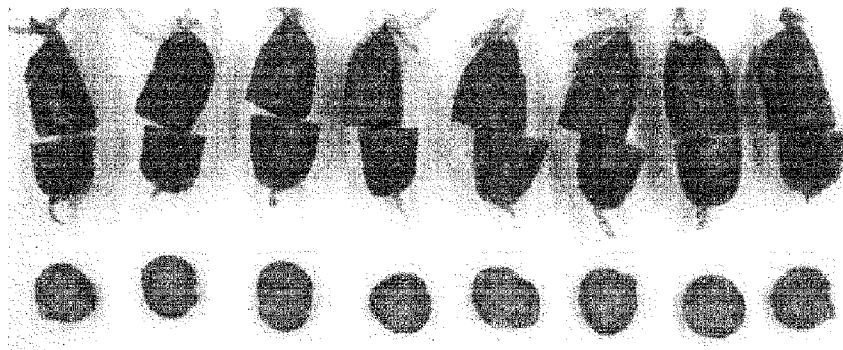


(10) 国際公開番号
WO 2014/013795 A1

- (51) 国際特許分類:
A23L 1/31 (2006.01) A23L 1/314 (2006.01)
A23L 1/272 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/064978
- (22) 国際出願日: 2013 年 5 月 30 日(30.05.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-159732 2012 年 7 月 18 日(18.07.2012) JP
- (71) 出願人: 天野エンザイム株式会社(AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦一丁目 2 番 7 号 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 奥田 啓太(OKUDA Keita); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ一丁目 6 番 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP). 山口庄太郎(YAMAGUCHI Shotaro); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ一丁目 6 番 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP).
- (74) 代理人: 萩野 幹治(HAGINO Mikiharu); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザ 1 丁目 1 番地 Gifu (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR IMPROVING COLOR TONE OF MEAT

(54) 発明の名称: 食肉の色調改善方法



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a novel means that is effective for improving the color tone of meat or a processed meat product. A method that comprises treating meat or a processed meat product with an imidazole ring-containing compound and metmyoglobin reductase.

(57) 要約: 食肉や食肉加工品の色調の改善に有効な新たな手段を提供することを課題とする。食肉又は食肉加工品をイミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素で処理する。

WO 2014/013795 A1

明 細 書

発明の名称：食肉の色調改善方法

技術分野

[0001] 本発明は色調改善方法に関する。詳しくは、食肉や食肉加工品の色調を改善する方法及び色調改善剤に関する。本出願は、2012年7月18日に出版された日本国特許出願第2012-159732号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

背景技術

[0002] 食肉の色は、消費者が肉質を評価するときの重要な因子である。鮮赤色であれば良質な食肉と判断され、褐色であれば古いと見なされるなど、肉色は消費者の食肉に対する購買意欲や評価に大きな影響を与える。

[0003] 食肉の褐色化を防止するため、ハム・ソーセージなど畜肉加工品では硝酸塩、亜硝酸塩の発色剤が一般的に用いられている。しかし、硝酸塩、亜硝酸塩はヒトにメトヘモグロビン血症を起こす急性毒性を有するので、残存亜硝酸根として70ppm以下になるように使用量が制限されている。また、亜硝酸が第二級アミンと反応して発ガン性物質であるニトロソアミンを形成する可能性が指摘されている。そのため、安全性の観点から、硝酸塩、亜硝酸塩の発色剤に代わる、発色効果のある物質や発色方法の探索が行われてきた。例えばラフィノースを添加することにより褐色化を防止する方法（特許文献1参照）、エノキタケ抽出物を添加することにより褐色化を防止する方法（特許文献2参照）、野菜類に含まれる成分を利用して発色させる方法（特許文献3参照）が見出されている。しかしながら、特許文献1の方法や特許文献2の方法では発色効果が十分でなく、また加熱によって発色効果が失われるという問題があり、特許文献3の方法では野菜類に含まれる硝酸塩を利用しており安全性に問題がある。

[0004] 一方、イミダゾール又はその関連化合物（例えばヒスチジン）を利用した食肉の発色方法が提案されている（特許文献4、5を参照）。しかしながら

、当該方法による効果は限定的であり、特に、褐色化が生じた食肉の色調改善には有効ではない。

[0005] 尚、本出願人は先の特許出願において、食肉又は食肉加工品の色調改善に効果的な方法として、バチルス属微生物由来の酵素を利用した方法を提案した（特許文献6）。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開2003-18976号公報
特許文献2：特開2008-228702号公報
特許文献3：特開2009-165445号公報
特許文献4：英国特許第1, 173, 446号
特許文献5：特開昭58-23766号公報
特許文献6：国際公開第2011/142300 A1号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、従来技術が内包する上記の如き問題点に鑑み、食肉や食肉加工品の色調の改善に有効な新たな手段を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、イミダゾールやヒスチジンによる食肉の発色効果が、ミオグロビンのヘム鉄(Fe^{2+})にイミダゾール環の窒素が配位することによるものであると推定される点に着目した。そして、アクセプターとなるヘム鉄を酵素（メトミオグロビン還元酵素）により供給して発色効果を高めるという戦略を立て、その有効性を検証した。その結果、予想を上回る優れた効果を認め、イミダゾール又はその関連化合物とメトミオグロビン還元酵素の併用が色調改善に極めて有効であることを明らかにした。この新たな手段によれば、イミダゾール又はその関連化合物単独での発色効果が不十分である点を補うことができ、高い発色効果が得られる。また、メトミオグロビン還元酵素の

作用によって、褐色の原因となるメトミオグロビン量を低減することができることから、褐色化が生じた場合においても色調の改善が期待できる。更には、メトミオグロビン還元酵素単独で作用させた場合と異なり、発色効果を加熱処理後も維持できる。

[0009] 発色効果の更なる向上を目指して検討を進めた結果、イミダゾール又はその関連化合物とメトミオグロビン還元酵素に加え、ミオグロビンのヘム基中の鉄を亜鉛に置換する作用を示す物質であるフェロケラターゼを併用すると、一層高い発色効果が得られ、且つ長期間にわたって発色効果が持続することが明らかとなった。

[0010] 以下の発明は、上記の成果及び知見に基づくものである。

[1] 食肉又は食肉加工品をイミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素で処理する工程を含む、色調改善方法。

[2] 食肉又は食肉加工品を、イミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素、及びミオグロビンのヘム基中の鉄を亜鉛に置換する作用を示す物質、で処理する工程を含む、色調改善方法。

[3] 前記物質がフェロケラターゼである、[2]に記載の色調改善方法。

[4] イミダゾール環含有化合物がヒスチジン又はイミダゾールペプチドである、[1]～[3]のいずれか一項に記載の色調改善方法。

[5] イミダゾールペプチドがイミダゾールジペプチドである、[4]に記載の色調改善方法。

[6] メトミオグロビン還元酵素がバチルス ズブチリス、バチルス アミロリケファシエンス、納豆菌、バチルス スリングエンシス又はバチルス ミコイデス由来のメトミオグロビン還元酵素である、[1]～[5]のいずれか一項に記載の色調改善方法。

[7] イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を組み合わせる色調改善剤。

[8] ミオグロビンのヘム基中の鉄を亜鉛に置換する作用を示す物質を更

に組み合わせてなる、〔 7 〕に記載の色調改善剤。

〔 9 〕 〔 1 〕 ～ 〔 6 〕 のいずれか一項に記載の色調改善方法によって、或いは〔 7 〕又は〔 8 〕に記載の色調改善剤の使用によって色調が改善した食肉又は食肉加工品。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]加熱処理後の各サンプル（ソーセージサンプル）の外観（上段）と断面の状態（下段）。左から順にサンプル 1（非添加）、サンプル 2（亜硝酸Na(5mg)0.05%を添加）、サンプル 3（L-ヒスチジン20mgを添加）、サンプル 4（L-ヒスチジン20mgとバチルス ズブチリス由来の精製メトミオグロビン還元酵素（精製YodC（Mbr）） 5mgを添加）、サンプル 5（L-ヒスチジン50mgを添加）、サンプル 6（L-ヒスチジン50mgと精製YodC（Mbr） 5mgを添加）、サンプル 7（L-ヒスチジン100mgを添加）、サンプル 8（L-ヒスチジン100mgと精製YodC（Mbr） 5mgを添加）。

[図2]加熱処理後の各サンプル（ソーセージサンプル）の断面の状態。左から順にサンプル 1（非添加）、サンプル 2（亜硝酸Na(5mg)0.05%を添加）、サンプル 3（L-ヒスチジン50mgを添加）、サンプル 4（カルノシン50mgを添加）、サンプル 5（カルノシン50mgと精製YodC（Mbr） 5mgを添加）、サンプル 6（イミダ 4 0（日本ハム株式会社） 50mgを添加）。

[図3]熱処理当日の発色度とZnMb（ヘム基中の鉄が亜鉛に置換されたミオグロビン）量。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の第 1 の局面は、加工時又は流通時などに色の変化（典型的には褐色化）が問題となる、食肉や食肉加工品の色調を改善する方法を提供する。本発明の色調改善方法は発色作用、発色促進作用及び／又は退色防止作用により、処理対象の色調を改善する。即ち、本発明の色調改善方法は食肉又は食肉加工品の発色、色調維持又は退色防止に利用される。「食肉の発色」とは食肉又は食肉加工品に特有の赤い色調が発現することをいう。

[0013] ミオグロビンを含む食肉又は食肉加工品全般に本発明を適用可能である。

具体的には、豚肉、牛肉、鶏肉等の畜肉又はこれらの加工品、その他の食肉（猪肉、鯨肉等）又はその加工品、或いはマグロ、カツオ、シャケ等の魚肉又はその加工品を処理対象にすることができる。但し、赤色を呈している食肉が好ましい処理対象といえる。処理対象の一つである食肉加工品は、食肉を原料として製造される食品であれば特に限定されない。食肉加工品として例えば生ハム、ベーコン、ソーセージ、ロースハム、サラミが挙げられる。魚肉加工品としては例えば魚肉ソーセージ、魚肉ハンバーグ、ネギトロが挙げられる。処理対象である食肉または食肉加工食品の形状についても特に制限はない。ブロック肉、ミンチ肉等、用途に合わせて適宜選択することができる。

[0014] 本発明の色調改善方法では処理対象をイミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素で処理する工程を行う。理論に拘泥する訳ではないが、本発明の色調改善方法を適用すると、イミダゾール環含有化合物のイミダゾール環の窒素原子がミオグロビンのヘム鉄 (Fe^{2+}) と配位することで発色効果をもたらされる。一方、メトミオグロビン還元酵素の作用によって、アクセプターとなるヘム鉄 (Fe^{2+}) が供給され、イミダゾール環含有化合物の発色効果が高められる。また、メトミオグロビン還元酵素の作用によって、メトミオグロビンが還元され、還元型ミオグロビンが生成する。還元型ミオグロビンは酸素化によって鮮赤色の色調を示すオキシミオグロビンに変換される。従って、本発明の色調改善方法を適用すると、食肉又は食肉加工品中のメトミオグロビン量が低減し、併せてオキシミオグロビンが生成する結果、色調が改善する。また、還元型ミオグロビンまたはオキシミオグロビンの酸化が防止され、その結果として食肉の退色を防止できるという効果も期待できる。このように、発色のみならず色調維持、つまり退色防止の効果も発揮され得る。

[0015] 上記の作用効果を発揮できる限りにおいてイミダゾール環含有化合物は特に限定されず、例えば、イミダゾール又はその誘導体、ヒスチジン、イミダゾールペプチドを用いることができる。イミダゾールペプチドの例はイミダ

ゾールジペプチド（カルノシン（ β -alanyl-L-histidine）、アンセリン（ β -alanyl-1-dehydro-3-methyl-L-histidine）、バレニン（ β -alanyl-1-methyl-L-histidine）等）である。二種類以上のイミダゾール環含有化合物を併用することにしてもよい。併用の一例として、ヒスチジンとイミダゾールジペプチドの併用を挙げることができる。

[0016] 本明細書において「メトミオグロビン還元酵素」とは、ミオグロビン誘導体であるメトミオグロビンを還元する活性を示すタンパク質のことをいう。当該活性の強さ（程度）は特に限定されない。従って、他の酵素活性の方が優位であっても、メトミオグロビンに対する還元活性を示す限り、本明細書における「メトミオグロビン還元酵素」に該当する。メトミオグロビン還元酵素として、ニトロレダクターゼ（例えばバチルス ズブチリス由来yodC遺伝子産物）、デヒドロリポイルデヒドロゲナーゼ（例えばバチルス ズブチリス由来pdhD遺伝子産物）、NADH-チトクロムb5還元酵素（例えばサッカロミセス セレビジエ由来CBR1, MCR1遺伝子産物）、NADPH-フラビン還元酵素（例えばバチルス ズブチリス由来nfrA1遺伝子産物）等を用いることができる。好ましいメトミオグロビン還元酵素の一例として、上掲の特許文献6に記載された、バチルス属が産生するヘム還元酵素を挙げることができる。当該酵素は、バチルス ズブチリス（*Bacillus subtilis*）、バチルス アミロリケファシエンス（*Bacillus amiloliquefaciens*）、納豆菌（*Bacillus natto*）、バチルス スリングイエンス（*Bacillus thuringiensis*）又はバチルス ミコイデス（*Bacillus mycoides*）によって産生される。これらの微生物は例えば公共の保存機関（NBRC（独立行政法人製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源部門）、JCM（理化学研究所バイオリソースセンター）、ATCC（American Type Culture Collection）等）から入手することができる。納豆菌については市販されており、容易に入手可能である。また宮城野納豆菌製造所から入手することも可能である。尚、イミダゾール環含有化合物の場合と同様に、二種類以上のメトミオグロビン還元酵素を併用することにしてもよい。

[0017] 本発明ではイミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を同時

に又は別々に処理対象に作用させる。好ましくは、操作の簡便性の点やミオグロビンの酸化への不安定性の点から、イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を同時に作用させる。イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を別々に作用させる場合の順序は任意であるが、作用機序の点からメトミオグロビン還元酵素を作用させた後、イミダゾール環含有化合物を作用させるとよい。本発明における処理条件は、原則、イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素が良好に作用する条件（好ましくは至適条件）とすればよい。好ましい処理条件は、処理対象の食肉又は食肉加工品を用いた予備実験によって容易に特定ないし設定可能である。以下、処理方法の具体例を示す。まず、イミダゾール環含有化合物と酵素液（精製酵素の溶液、メトミオグロビン還元酵素を産生する微生物の菌体破砕液など）を用意する。これらを食肉又は食肉加工品に接触させる。イミダゾール環含有化合物の使用量は、これに限定されるものではないが、処理対象物1g当たり例えば0.1mg～100mg、好ましくは1mg～50mgである。また、メトミオグロビン還元酵素の使用量は、これに限定されるものではないが、処理対象物1g当たり例えば1 U～100U、好ましくは10U～50Uである。メトミオグロビン還元酵素の活性は以下の通り測定する。まず、酵素溶液を用意する（乾燥体の酵素の場合、例えば水で10mg/mLに溶解する）。続いて0.1Mリン酸バッファ（pH 5.5）200 μ Lに0.1% (w/v) ミオグロビン100 μ Lと酵素溶液150 μ Lを添加し、30℃、5分間ブレインキュベートする。そして1mM NADH 50 μ Lを添加して、波長406nmにおける吸光度の変化を5分間測定する。活性はユニット(U)で示される。本条件下で1分間に1 μ M相当のメトミオグロビンを還元させる酵素量を1 Uとする。

[0018] 接触方法としては、一般的に、ブロック肉では懸濁液を注射してタンブリングする或いは浸漬液に浸す、ミンチ肉では懸濁液を混合する等の方法がある。適した接触方法を行うことによって、懸濁液が食肉全体に浸透する。接触させる際の温度条件は例えば4℃～40℃であり、好ましくは4℃～30℃であり、より好ましくは4℃～25℃であり、最も好ましくは4℃～20℃である。ま

た、接触時間は例えば1時間～3日であり、好ましくは3時間～2日であり、より好ましくは6時間～2日である。但し、後の加工工程中においても接触状態が維持されるのであれば、注射や混合等の操作の後、直ちに次の加工工程に進むことにしてもよい。接触操作の後、ケーシング、加熱処理、燻製、成形など、必要な加工処理を施す。

[0019] ところで、メトミオグロビン還元酵素のみを使用した場合、一般に、加熱により発色が低下する。これに対して、イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を併用した本願発明によれば、加熱処理による発色の低下が少なく、加熱処理後も発色を維持できる。従って、本願発明の色調改善方法は、製造工程中に加熱処理が行われる製品の色調改善に対して特に有効である。

[0020] ここで、後述の実施例に示す通り、メトミオグロビン還元酵素を併用した場合の効果には劣るものの、イミダゾール環含有化合物（実施例ではヒスチジン、カルノシン、チキン由来のイミダペプチドを使用）を単独で使った場合においても比較的高い色調改善効果を認めた。この結果に基づき、本発明の変形例の一つとして、食肉又は食肉加工品をイミダゾール環含有化合物で処理する工程を含む、色調改善方法が提供される。好ましくは、イミダゾールジペプチドを用いる。

[0021] 本発明の一態様では、イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素に加え、ミオグロビンのヘム基中の鉄を亜鉛に置換する作用を示す物質（以下、「鉄・亜鉛置換物質」と呼ぶ）を使用する。即ち、この態様の色調改善方法では処理対象を、イミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素、及び鉄・亜鉛置換物質で処理する工程を行う。この態様によれば、イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素による上記の作用効果に加え、鉄・亜鉛置換物質を併用したことによる複合的な効果により色調が一層改善される。特に、良好な色調の維持・退色防止の効果を期待できる。鉄・亜鉛置換物質として例えばフェロケラターゼを用いることができる（詳しくは特開2006-61016号公報を参照）。フェロケラターゼは動

物組織（特に内蔵）、植物組織（キノコ類、モヤシ、エンドウ豆等）、酵母（パン酵母、ビール酵母、清酒酵母、ワイン酵母、焼酎酵母等）、細菌等に存在している。これらの天然物から抽出したフェロケラターゼを用いることができる。また、ミトコンドリア画分にはフェロケラターゼが多く含まれていることから、特にミトコンドリア画分を用いるとよい。鉄・亜鉛置換物質としてサッカロミセス属酵母（ビール酵母、パン酵母、清酒酵母、焼酎酵母など）を用いることもできる（詳しくは特開2005-87058号公報を参照）。

[0022] イミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素、及び鉄・亜鉛置換物質の処理対象への作用のさせ方は、イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を使用する態様に準ずる。即ち、これら3物質を同時に又は別々に処理対象に作用させる。好ましくは、操作の簡便性の点やミオグロビンの酸化への不安定性の点、及び相乗的な効果の点から、これら3物質を同時に作用させる。好ましい処理条件は、処理対象の食肉又は食肉加工品を用いた予備実験によって容易に特定ないし設定可能である。以下、処理方法の具体例を示す。まず、イミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素液、鉄・亜鉛置換物質溶液（例えば精製フェロケラターゼの溶液、ミトコンドリア画分溶液）を用意する。これらを食肉又は食肉加工品に接触させる。イミダゾール環含有化合物の使用量及びメトミオグロビン還元酵素の使用量は、上記態様に準ずる。一方、鉄・亜鉛置換物質の使用量は、フェロケラターゼを例にとれば、処理対象物1g当たり例えば0.1U~100U、好ましくは1U~20Uである。

[0023] 本発明の第2の局面は、本発明の色調改善方法に使用される色調改善剤に関する。本発明の色調改善剤の特徴の一つは、イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を組み合わせることで用いることである。本明細書において「イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を組み合わせる」又は「イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を組み合わせる」とは、イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還

元酵素が併用されることをいう。典型的には、イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素とを混合した配合剤として本発明の色調改善剤が提供されることになる。一方、例えば、イミダゾール環含有化合物を含有する第1剤（第1構成要素）と、メトミオグロビン還元酵素を含有する第2剤（第2構成要素）とからなるキットの形態で本発明の色調改善剤を提供することもできる。この場合、典型的には、これら二つの剤は同時に使用される。即ち、食肉又は食肉加工品の製造過程の一部として、これら二つの剤を同時に使用する処理工程が設けられる。これとは異なり、第1剤による処理工程と第2剤による処理工程を設けることにしてもよい。

[0024] 一態様では、イミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素、及び鉄・亜鉛置換物質を組合せて用いる。即ち、イミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素、及び鉄・亜鉛置換物質を併用する。この態様では、典型的には、イミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素及び鉄・亜鉛置換物質を混合した配合剤として本発明の色調改善剤が提供されることになる。一方、例えば、イミダゾール環含有化合物を含有する第1剤（第1構成要素）と、メトミオグロビン還元酵素を含有する第2剤（第2構成要素）と、鉄・亜鉛置換物質を含有する第3剤（第3構成要素）からなるキットの形態で本発明の色調改善剤を提供することもできる。この場合、典型的には、これら三つの剤は同時に使用される。即ち、食肉又は食肉加工品の製造過程の一部として、これら三つの剤を同時に使用する処理工程が設けられる。これとは異なり、第1剤による処理工程、第2剤による処理工程、及び第3剤による処理工程を設けることにしてもよい。二つの剤を同時に作用させ、その後、残りの一つを作用させることにしてもよい。この場合において同時に作用させる二つの剤の組合せは特に問わない。

[0025] 本発明の色調改善剤は、有効成分（イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素、或いはイミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素及び鉄・亜鉛置換物質）の他、賦形剤、緩衝剤、懸濁剤、安定剤、pH調整剤、保存剤、防腐剤、香料、増粘剤、油脂、光沢剤、結着剤、結着補強

剤、乳化安定剤、生理食塩水などを含有していてもよい。賦形剤としてはデンプン、デキストリン、マルトース、トレハロース、乳糖、D-グルコース、ソルビトール、D-マンニトール、白糖、グリセロール等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。pH調製剤としてはイタコン酸、コハク酸、酒石酸、フマル酸、クエン酸、リンゴ酸、アジピン酸、グルコン酸、ピロリン酸、酢酸、乳酸、 α -ケトグルタル酸、フィチン酸等の有機酸又は有機酸塩；炭酸等の無機酸又は無機酸塩；アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸；アルギニン、リジン、ヒスチジン等の塩基性アミノ酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としてはエタノール、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。香料としてはジャコウ、シベット、カストリウム、アンバーgris等の動物性香料；アニス精油、アンゲリカ精油、イランイラン精油、イリス精油、ウイキョウ精油、オレンジ精油、カナンガ精油、カラウエー精油、カルダモン精油、グアヤクウッド精油、クミン精油、黒文字精油、ケイ皮精油、シナモン精油、ゲラニウム精油、コパイババルサム精油、コリアンデル精油、シソ精油、シダーウッド精油、シトロネラ精油、ジャスミン精油、ジンジャーグラス精油、杉精油、スペアミント精油、西洋ハッカ精油、大茴香精油、チュベローズ精油、丁字精油、橙花精油、冬緑精油、トルーバルサム精油、バチュリー精油、バラ精油、パルマローザ精油、桧精油、ヒバ精油、白檀精油、プチグレン精油、ベイ精油、ベチバ精油、ベルガモット精油、ペルーバルサム精油、ボアドローズ精油、芳樟精油、マンダリン精油、ユーカリ精油、ライム精油、ラベンダー精油、リナロエ精油、レモングラス精油、レモン精油、ローズマリー精油、和種ハッカ精油等の植物性香料；その他合成香料等を用いることができる。増粘剤としては、天然高分子またはデンプン系もしくはセルロース系天然高分子誘導体等を用いることがで

きる。天然高分子としては、例えば、フコイダン、カラギーナン等の海藻抽出物、グァーガム等の種子粘出物、アラビアガム等の樹脂様粘着物、またはキサンタンガム等の微生物産生粘着物質等を挙げることができる。デンプン系もしくはセルロース系天然高分子誘導体としては、例えば、リン酸デンプン等のデンプン系またはメチルセルロースなどのセルロース系の天然高分子誘導体が挙げられる。油脂としては、例えば、アボガド油、アマニ油、アーモンド油、ウイキョウ油、エゴマ油、オリーブ油、オレンジ油、オレンジラファ油、カカオ脂、カミツレ油、カロット油、キューカンバー油、ココナッツ油、ゴマ油、コメ油、サフラワー油、シア脂、液状シア脂、大豆油、ツバキ油、トウモロコシ油、ナタネ油、パーシク油、ヒマシ油、ヒマワリ油、葡萄種子油、綿実油、落花生油、タートル油、ミンク油、卵黄油、パーム油、パーム核油、モクロウ、ヤシ油、牛脂、豚脂等を用いることができる。また、これらの油脂に水素添加、分別、エステル交換等の処理をして改質された油脂も利用できる。光沢剤として、ミツロウ、カルナバロウ、鯨ロウ、ラノリン、液状ラノリン、還元ラノリン、硬質ラノリン、カンデリラロウ、モンタンロウ、セラックロウ、ライスワックス、スクワレン、スクワラン、プリスタン等のロウ類（植物性、動物性を問わない。）；流動パラフィン、ワセリン、パラフィン、オゾケライド、セレシン、マイクロクリスタンワックス等の鉱物油を用いることができる。結着剤としては大豆蛋白質、卵蛋白質、乳蛋白質、血液蛋白質、カゼイン、デンプン、トランスグルタミナーゼ等を用いることができる。結着補強剤としては重合リン酸塩等を用いることができる。乳化安定剤としてはカゼインナトリウム等を用いることができる。その他添加物として、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、1,2-ヒドロキシステアリン酸、ウンデシレン酸、トール油、ラノリン脂肪酸等の天然脂肪酸；イソノナン酸、カプロン酸、2-エチルブタン酸、イソペンタン酸、2-メチルペンタン酸、2-エチルヘキサ酸、イソペンタン酸等の合成脂肪酸等の脂肪酸を含有しても良い。

実施例

[0026] 1. イミダゾール環含有化合物による食肉の発色効果

イミダゾールやヒスチジンによる食肉の発色効果は、ミオグロビンのヘム鉄(Fe^{2+})にイミダゾール環の窒素が配位することによるものであると推定される。当該発色効果を高めるため、アクセプターとなるヘム鉄をメトミオグロビン還元酵素により供給することで発色効果が高められるとの期待の下、イミダゾール環含有化合物としてヒスチジン（和光純薬工業株式会社）を用い、メトミオグロビン還元酵素としてバチルス ズブチリス(*Bacillus subtilis* JCM1465株（＝ATCC6051株、IAM12118株、IF013719株））由来の精製酵素YodC（9.94U/mg。上掲の特許文献6を参照）を用い、以下の実験を行った。

[0027] 市販豚ミンチ肉10gに食塩150mg、L-アスコルビン酸10mg、0.5M リン酸カリウムバッファー（pH5.5）180 μ L、40mg/mL ミオグロビン溶液 180 μ Lを添加し、混合した。このように調製した溶液に対して、以下の表1の通り、各添加物を更に加え、混合した。混合後の豚ミンチ肉サンプル1～8は氷上に静置した。

[表1]

サンプル
1. 非添加
2. 亜硝酸 Na (5mg) 0.05%
3. L-ヒスチジン 20mg
4. L-ヒスチジン 20mg + 精製 YodC (Mbr) 5mg
5. L-ヒスチジン 50mg
6. L-ヒスチジン 50mg + 精製 YodC (Mbr) 5mg
7. L-ヒスチジン 100mg
8. L-ヒスチジン 100mg + 精製 YodC (Mbr) 5mg

[0028] 次に、各サンプルを天然羊腸にケーシングした後、37℃で2日間放置した。

75℃40分間の加熱処理を行った後、急冷させ、各サンプルの断面の赤色度を画像解析した。画像解析にはImageJソフトウェア（オープンソース）を用いた。

[0029] 加熱処理後のサンプルの断面の色調を図1に示す。また、解析結果を以下の表2（加熱処理後の断面のL*a*b*値）に示す。尚、各数値は断面の平均値である。

[表2]

サンプル	L*	a*	b*	h
1	50.1	18.6	14.1	37.2
2	54.5	27.2	11.2	22.4
3	51.4	19.7	18.6	43.3
4	52.0	22.4	15.6	34.9
5	55.7	23.0	16.6	35.8
6	54.0	24.1	17.0	35.2
7	54.9	25.3	16.5	33.0
8	50.8	28.0	19.4	34.6

[0030] 発色度（赤味）を表すa*値に注目すると、ヒスチジン単独よりもヒスチジンとメトミオグロビン還元酵素を併用した方が高い発色度が得られている。また、ヒスチジンの使用量を増やすと発色度が高まり、本試験での最大使用量のサンプルでは亜硝酸Na（0.05%）を使用した場合と同等以上の発色効果を認めた。

[0031] 以上通り、ヒスチジンとメトミオグロビン還元酵素を併用すれば、優れた発色効果が得られることが明らかとなった。また、当該発色効果は加熱処理後も維持されることが確認された。尚、メトミオグロビン還元酵素を併用した場合の効果には劣るものの、ヒスチジン単独で使用的場合においても、比較的高い色調改善効果が認められた。特に、使用量の多いサンプル（20mg

、50mg)では、ヒスチジンを使用しない場合(非添加)に比して格段に高いa*値を示し、高い発色効果が得られている。

[0032] 2. イミダゾールジペプチドによる食肉の発色効果

イミダゾール環含有化合物であるイミダゾールジペプチドによる食肉の発色効果を検討した。実験方法は、添加物を変更したこと以外、1. と同一とした。本実験での各サンプルの添加物を以下の表3に示す。尚、イミダ40(日本ハム株式会社)はチキン由来のイミダゾールジペプチド(アンセリンとカルノシン)を含有する。

[表3]

サンプル
1. 非添加
2. 亜硝酸 Na (5mg) 0.05%
3. L-ヒスチジン 50mg
4. カルノシン 50mg
5. カルノシン 50mg + 精製 YodC (Mbr) 5mg
6. イミダ40 50mg

[0033] 加熱処理後のサンプルの断面の色調を図2に示す。また、解析結果を以下の表4(加熱処理後の断面のL*a*b*値)に示す。尚、各数値は断面の平均値である。

[表4]

サンプル	L*	a*	b*	h
1	48.6	15.6	15.5	44.8
2	52.3	26.2	15.0	29.8
3	48.7	21.8	16.6	37.3
4	52.1	22.6	19.1	40.1
5	52.8	24.2	20.9	40.8
6	54.1	19.0	18.0	43.4

[0034] a*値に注目すると、カルノシン単独（サンプル4）に比べ、カルノシンとメトミオグロビン還元酵素を併用した方（サンプル5）が高い発色度が得られている。この結果は、イミダゾールジペプチドを使用した場合においても、発色効果の増大にメトミオグロビン還元酵素の併用が有効であることを示す。一方、サンプル4、6の結果より、イミダゾールジペプチド単独の使用であっても色調改善効果が得られることが判明した。また、サンプル3の発色度とサンプル4の発色度を比較すれば、イミダゾールジペプチドの発色効果は高いと評価できる。尚、サンプル5の発色度に比べてサンプル6の発色度が低いのは、イミダ40におけるイミダゾールジペプチドの含有量が少ないためと考察される。

[0035] 3. イミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素及び鉄・亜鉛置換物質の併用効果

ヒスチジンとメトミオグロビン還元酵素に加えて、ミオグロビンのヘム基中の鉄を亜鉛に置換する作用を示す物質であるフェロケラターゼを併用した場合の発色効果を検討した。

[0036] 市販豚ミンチ肉10gに食塩150mg、L-アスコルビン酸10mg、10mM NADH 180 μ L、100mg/mL グルコン酸Zn 50 μ L、0.5M リン酸カリウムバッファー（pH5.5）180 μ L、40mg/mL ミオグロビン溶液 180 μ Lを添加し、混合した。このよ

うに調製した溶液に対して、以下の表5の通り、各添加物を更に加え、混合した。混合後の豚ミンチ肉サンプル1～6は氷上に静置した。

[表5]

		添加量(mg)				計
		亜硝酸Na	FECH溶菌ppt(428u/g)	Mbr(変異菌0.6u/g)	ヒスチジン	
1	コントロール	—	—	—	—	100
2	亜硝酸Na	10	—	—	—	90
3	FeCH	—	30	—	—	70
4	His	—	—	—	20	80
5	FeCH + His	—	30	—	20	50
6	FeCH + His + Mbr	—	30	5	20	45

[0037] 次に、各サンプルを天然羊腸にケーシングした後、37℃で2日間放置した。75℃40分間の加熱処理を行った後、急冷させ、各サンプルの断面の赤色度を画像解析した。また、酢酸エチル・酢酸処理によって得られたる液中のZnMbを定量した。定量法は、蛍光光度計を利用し、Ex/Em=420nm/590nmの値から算出した。

[0038] 各サンプルの発色度（a*）赤色度の解析結果を以下の表6に示す。尚、各数値は断面の平均値である。

[表6]

	0	2	5	9
コントロール	19.8	14.1	13.0	10.7
亜硝酸Na	29.0	24.5	21.4	17.2
FeCH	29.2	23.5	19.6	17.2
His	24.7	16.2	15.5	11.0
FeCH + His	30.0	24.4	20.6	18.2
FeCH + His + Mbr	30.6	25.6	21.6	20.2

[0039] 熱処理当日(0日)の発色度は、コントロールよりもHis（ヒスチジン）を使用した場合の方が高い。FeCH（フェロケラターゼ）単独、FeCHとHisの併用、或いはFeCHとHisとMbr（メトミオグロビン還元酵素）の併用では更に発色度が高い。また、FeCH単独よりもHis単独やHisとMbr併用の方が高い発色度を示し

た。但し、2日目にはHis単独の発色度は大きく後退した。9日目の発色度はHis単独よりもFeCH単独の方が高い（亜硝酸と同等）。FeCHとHisを併用すると発色度は更に高まり、FeCHとHisとMbrを併用した場合に最も高い発色度を示した。

[0040] 一方、ZnMb生成量は、亜硝酸、His単独、コントロール、FeCH単独、FeCHとHisの併用、FeCHとHisとMbrの併用の順で高くなる結果であった（図3）。亜硝酸、His単独、コントロールでZnMb生成量が少ないことは予想通りであり、FeCHとHisとMbrの併用でFeCH単独よりもZnMb生成量が多いのは、Mbrの作用によって Fe^{2+} が増加したためと考えられる。

[0041] 以上の通り、FeCHとHisとMbrの併用によって高い発色効果及び安定した発色効果が得られることが明らかとなった。ZnMb生成量の測定結果から、フェロケラターゼの鉄・亜鉛置換作用が発色効果に寄与したことが裏付けられた。また、この結果を踏まえると、鉄・亜鉛置換作用を示す物質であれば、フェロケラターゼ以外でも同様の効果が得られるといえる。

産業上の利用可能性

[0042] 本発明の色調改善方法によれば、亜硝酸塩等の発色剤を使用することなく食肉を発色させることができることから、商品価値の高い食肉や食肉加工食品を提供することが可能となる。本発明の色調改善方法は、退色や褐色化などの色調の変化が問題となる様々な食肉製品に適用可能である。

[0043] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

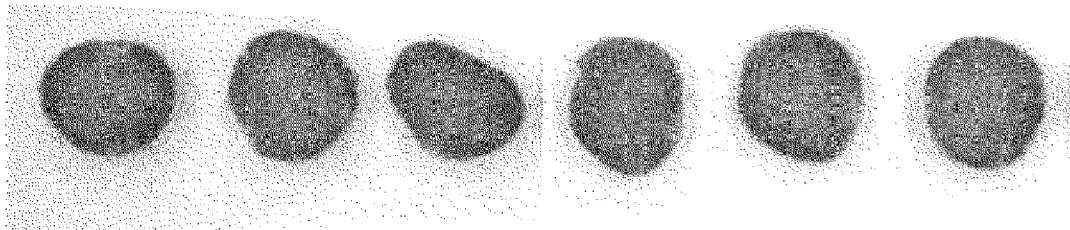
請求の範囲

- [請求項1] 食肉又は食肉加工品をイミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素で処理する工程を含む、色調改善方法。
- [請求項2] 食肉又は食肉加工品を、イミダゾール環含有化合物、メトミオグロビン還元酵素、及びミオグロビンのヘム基中の鉄を亜鉛に置換する作用を示す物質、で処理する工程を含む、色調改善方法。
- [請求項3] 前記物質がフェロケラターゼである、請求項2に記載の色調改善方法。
- [請求項4] イミダゾール環含有化合物がヒスチジン又はイミダゾールペプチドである、請求項1～3のいずれか一項に記載の色調改善方法。
- [請求項5] イミダゾールペプチドがイミダゾールジペプチドである、請求項4に記載の色調改善方法。
- [請求項6] メトミオグロビン還元酵素がバチルス ズブチリス、バチルス アミロリケファシエンス、納豆菌、バチルス スリングエンシス又はバチルス ミコイデス由来のメトミオグロビン還元酵素である、請求項1～5のいずれか一項に記載の色調改善方法。
- [請求項7] イミダゾール環含有化合物とメトミオグロビン還元酵素を組み合わせる色調改善剤。
- [請求項8] ミオグロビンのヘム基中の鉄を亜鉛に置換する作用を示す物質を更に組み合わせる色調改善剤。
- [請求項9] 請求項1～6のいずれか一項に記載の色調改善方法によって、或いは請求項7又は8に記載の色調改善剤の使用によって色調が改善した食肉又は食肉加工品。

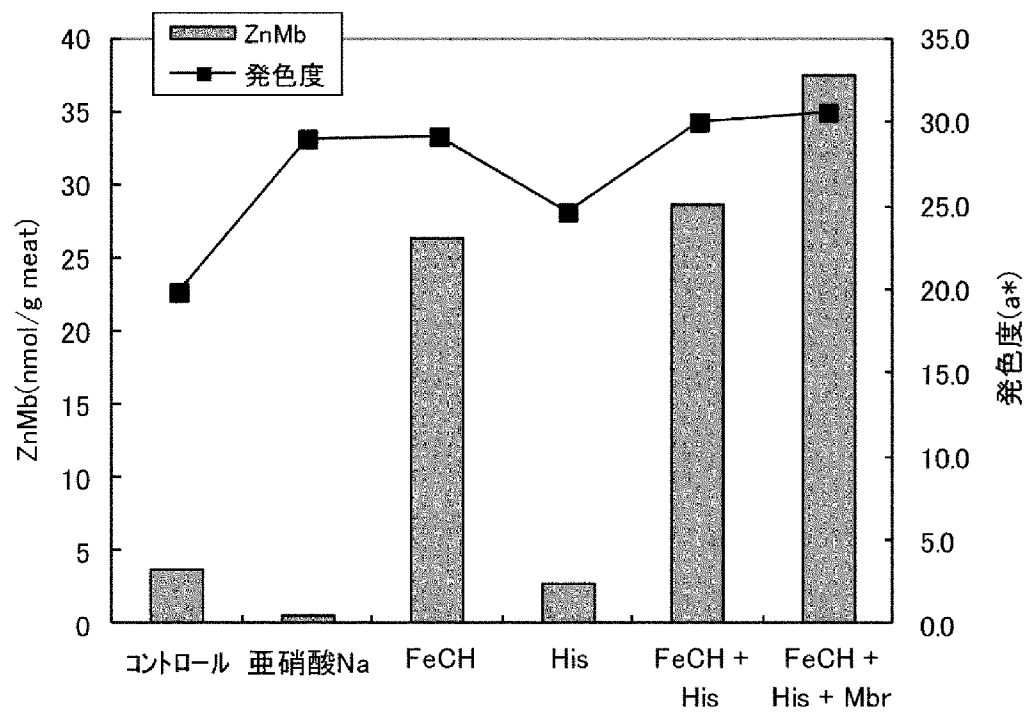
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064978

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L1/31(2006.01) i, A23L1/272(2006.01) i, A23L1/314(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L1/31, A23L1/272, A23L1/314

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2011/142300 A1 (Amano Enzyme Inc.), 17 November 2011 (17.11.2011), claims 1 to 15 & US 2013/0058911 A & EP 2570478 A & CN 102892882 A	9 1-8
Y	JP 58-23766 A (Hidehiro HARADA), 12 February 1983 (12.02.1983), entire text (Family: none)	1-8
Y	Ryoichi SAKATA et al., The Japanese journal of swine science, 1999.06, vol.36, no.2, pages 47 to 51	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 June, 2013 (18.06.13)

Date of mailing of the international search report
25 June, 2013 (25.06.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064978

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-61016 A (Itoham Foods Inc.) , 09 March 2006 (09.03.2006) , claims (Family: none)	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A23L1/31(2006.01)i, A23L1/272(2006.01)i, A23L1/314(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A23L1/31, A23L1/272, A23L1/314

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2011/142300 A1 (天野エンザイム株式会社) 2011.11.17, 請求項 1-15 & US 2013/0058911 A & EP 2570478 A & CN 102892882 A	9 1-8
Y	JP 58-23766 A (原田英宏) 1983.02.12, 全文 (ファミリーなし)	1-8
Y	坂田亮一他, 日本養豚学会誌, 1999.06, Vol.36, No.2, p47-51	1-8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 8 . 0 6 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

2 5 . 0 6 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

梶引 明佳

4 N

3 2 3 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2006-61016 A (伊藤ハム株式会社) 2006. 03. 09, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9