

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K02264

研究課題名（和文）氷温域を利用した食肉の長期熟成過程中的生菌数およびタンパク質成分の変化

研究課題名（英文）Changes in the number of viable bacteria and protein components of pork loin during the long-term aging under superchilling

研究代表者

細見 亮太（HOSOMI, Ryota）

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：20620090

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：0 以下から食品の氷結点までの温度帯である氷温を用いた豚肉の熟成は、0 以上のチルド帯（4 ）での熟成と比較し、熟成期間中の一般生菌数の増殖を強く抑制した。一方、熟成期間中の総遊離アミノ酸濃度の増加はあまり抑制しなかった。加えて、氷温での長期熟成は豚肉の食感が柔らかくなることを理化学的評価および官能評価で明らかにした。そのため、氷温での豚肉の長期熟成は総遊離アミノ酸の増加およびテクスチャーの向上が望める方法であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

氷温域を利用した食肉の熟成は生菌数の増殖を強く抑制することから、従来の0 以上のチルド帯を用いた熟成方法よりも長期熟成が可能である。さらに氷温で長期熟成により総遊離アミノ酸の増加および食感が柔らかくなることを確認した。そのため、氷温を用いた豚肉の長期熟成は食肉の付加価値を向上しうる技術として期待される。

研究成果の概要（英文）：Compared with the chilling aging (+4), the superchilling (Hyo-on) aging, which means reducing the temperature of food uniformly to slightly above the freezing point, strongly suppressed the growth rate of viable bacteria, and could be aging for a long time. Superchilling aging of pork did not inhibit the increase in total free amino acid concentration much, so long-term aging under superchilling is expected to increase the total free amino acid concentration. In addition, physiochemical and sensory evaluations showed that superchilling aging of pork resulted in a softer texture.

研究分野：食品化学

キーワード：熟成 氷温 一般生菌数 プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

世界の食肉市場で主要な豚肉をはじめとして、鶏肉や牛肉などの加工プロセスにおいて、熟成は食味の観点より非常に重要な工程である。通常、食肉の熟成は 0 以上のチルド帯 (0~4) で 5-10 日間熟成を行い、うま味に関わる遊離アミノ酸やペプチドを増やし、さらにタンパク質からなる結合組織の分解によって肉質を柔らかくする。近年、0 から食品の氷結点までの未凍結温度である氷温で食肉を熟成処理する「氷温熟成」が注目を集めつつある¹⁾。

私たちは食肉の氷温熟成に着目して研究を行っている。これまでに私たちは、氷温熟成した豚肉では、従来の 0 以上のチルド熟成より長期間熟成でき、呈味成分の 1 つである総遊離アミノ酸量が増大する結果を得ている²⁾。この食肉熟成の遊離アミノ酸の生成において、タンパク質からペプチドの分解にはカテプシン L、B および H、ペプチドから遊離アミノ酸の分解にはアミノペプチダーゼ C および H が関与している³⁾。一般的にプロテアーゼなどの酵素活性は温度に影響を受けるが、氷温での酵素活性についての報告はない。このように食肉の氷温熟成は従来の方法とは熟成の進行が異なることが予測されるが、熟成中に起きる遊離アミノ酸の生成、タンパク質で構成された結合組織の分解に関してほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

これまでに食肉の 0 以上のチルド帯を利用した熟成中の一般生菌数、呈味成分、テクスチャーに関わる結合組織の変化に関する知見はあるが、氷温熟成中での報告はない。そのため、氷温で長期熟成した食肉に特徴的に見られる遊離アミノ酸の生成、タンパク質分解に及ぼす影響を評価することは、学問的価値だけではなく、食肉の食味を向上させる新たな方法として非常に意義深いと考えられる。そこで氷温での食肉の熟成処理による一般生菌数の増殖速度、遊離アミノ酸の増加速度および生成に関与するプロテアーゼの科学的性質、さらに結合組織の分解を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 氷結点の測定

豚ロース筋肉部の氷結点は、温度センサーにより凍結曲線を作成し求めた。凍結曲線の結果より氷結点が -1.3 となったため、氷温熟成の温度を -1.0 と決定した。

(2) 熟成処理

試料は真空パックした豚ロース肉を使用した。チルド熟成は +4、氷温熟成は -1 に設定したクールインキュベーターを用いた。熟成期間はチルドが 28 日間、氷温が 49 日間とした。熟成期間中、1 週間毎に試料を採取した。

(3) 一般生菌数の測定

一般生菌数はコロニーカウンティング法で測定した。熟成後の豚ロース肉の胸最長筋を切り出し、ストマッカーでホモジナイズした。その後標準寒天培地に試料溶液を加え、37 の好気および嫌気条件下で 2 日間培養後、コロニー数を計測し求めた。

(4) 総遊離アミノ酸濃度およびアミノ酸組成の測定

総遊離アミノ酸濃度は、ピクリルスルホン酸を用いる発色法、またアミノ酸組成は高速液体クロマトグラフで分析した。試料溶液の調製は次のように行った。熟成後の豚ロース肉の胸最長筋を切り出し、4%過塩素酸溶液を加えて、ホモジナイズした。次に、これを遠心分離後、上層を採取した。この上層を 1 M 水酸化カリウム水溶液および 0.1 M 炭酸カリウム水溶液を用いて中和し、濾過後メスアップを行った。

(5) 粗酵素液の調製

熟成後の豚ロース肉の胸最長筋を包丁で細切りし、冷 0.4 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を加えて、ホモジナイズした。これを遠心分離後、中層を採取した。この採取した中層を粗酵素液として、以下のカテプシンおよびアミノペプチダーゼ活性の測定に使用した。タンパク質濃度は、粗酵素液を適時希釈し、Lowry 法を用いて測定した。

(6) カテプシン活性

カテプシン L、B および H 活性測定の基質として、それぞれ Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (MCA)、Z-Arg-Arg-MCA および L-Arg-MCA を用いた。粗酵素液と基質を加えた反応液を、+4°C および -1 のクールインキュベーターでそれぞれ静置した。反応 0、1、2 および 3 日後に反応液を回収し、0.1 M モノクロロ酢酸含有 0.1 M 酢酸緩衝液を加えて反応を停止し、遊離した MCA の蛍光強度を測定した。

(7) アミノペプチダーゼ活性

アミノペプチダーゼ C および H の活性測定の基質として、それぞれ Glu-ナフチルアミド (NA) と Leu-NA を用いた。粗酵素液と基質を加えた反応液を +4°C および -1 で静置し、その後遊離した NA を発色し活性を求めた。

(8) タンパク質分子量

熟成後の豚ロース肉の胸最長筋をホモジナイズし、遠心後の上層を回収し、筋形質を抽出した。

また、沈殿を 8 M 尿素で溶解し、再度遠心後、溶液の上層を回収し、筋原線維を抽出した。その後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、筋形質および筋原線維タンパク質の分子量を分析した。

(9) 小片化率

熟成後の豚ロース肉の胸最長筋をホモジナイズ後、遠心処理を行い、生じた沈殿を緩衝液で溶解した。次に溶液をろ過後、適宜同緩衝液で希釈し位相差顕微鏡で筋原線維の形態を観察した。全筋原線維における 1~4 個のサルコメアで構成する筋原線維の割合を求め、小片化率とした。

(10) 官能評価

腐敗の指標の 1 つである一般生菌数が同等であった豚ロース肉のチルド熟成 4 日および氷温熟成 7 日について官能評価を実施した。

4. 研究成果

(1) 一般生菌数および総遊離

アミノ酸濃度

豚ロース肉をチルド (4) および氷温 (-1) での熟成処理の 2 区に分けて試験を行った。熟成開始から 1 週間毎にそれぞれの豚肉を回収し、一般生菌数 (好気および嫌気条件) を測定した (図 1)。チルド熟成と比べて、氷温熟成の一般細菌数の増殖は、好気および嫌気条件ともに抑制されており、この増殖抑制率は約 50~60%であった。

チルド熟成と氷温熟成で一般生菌数が同等であったチルド

熟成 14 日目と氷温熟成 42 日目について総遊離アミノ酸濃度の測定をおこなった。その結果、氷温熟成では豚肉の総遊離アミノ酸濃度がチルド熟成と比較して有意に高かった (表 1)。また、肉様の旨味への寄与が大きいグルタミン酸について比較すると、氷温熟成でグルタミン酸含量が有意に高かった。また、甘味を呈するアミノ酸であるアラニン、グリシン、セリン、スレオニンについて比較すると、氷温熟成でグリシンおよびセリン含量が有意に高かった。一方、苦味を呈するアミノ酸であるバリンおよびロイシンを比較すると、氷温熟成でバリンおよびロイシン含量は有意に高かった。

表 1. 総遊離アミノ酸濃度

	Before aging		4°C aging during 14 days		-1°C aging during 42 days	
	mg/100g					
Total free amino acids	122.3	± 3.5 a	241.9	± 10.5 b	323.1	± 10.1 c

(2) プロテアーゼ活性

豚肉の氷温熟成は、チルド熟成よりも一般生菌数の増殖を抑制するが、遊離アミノ酸濃度の増加はあまり抑制しないことを見出している。そこで、食肉の熟成中に働くプロテアーゼであるカテプシン L、B および H、アミノペプチダーゼ C および H について、氷温およびチルドでの活性の相違について評価した。

氷温区でのカテプシン L、B および H の活性 (pH 5.5) は、チルド区と比較して、それぞれ 81%、77% および 73% になった。一方、氷温区でのアミノペプチダーゼ C および H の活性 (pH 5.5) は、チルド区と比較して、それぞれ 31% および 24% となった。豚肉の氷温熟成において総遊離アミノ酸の増加をあまり抑制しないことを理由として、アミノペプチダーゼ活性が氷温とチルドで大きく変化がないことを予想していたが、氷温でのアミノペプチダーゼ C および H 活性はチルドと比べ著しく低下していた。これらの結果から、氷温熟成中の遊離アミノ酸量の生成は、熟成温度の違いによるアミノペプチダーゼ C および H 活性の相違から説明することはできなかった。今後、これら酵素の組み替え体を取得し、より詳細に氷温およびチルドでの活性の相違について検討していく必要があると考えられる。

(3) タンパク質分子量および小片化率

筋原線維タンパク質において、一般的に食肉の軟化に密接に関連するとの報告がある 30 kDa のバンドは両試験区で 14 日目以降に出現した。氷温熟成ではチルド熟成と比較し 30 kDa のバンドの増加が緩やかであった。また約 22 kDa および 33 kDa のバンドはチルド熟成では熟成日

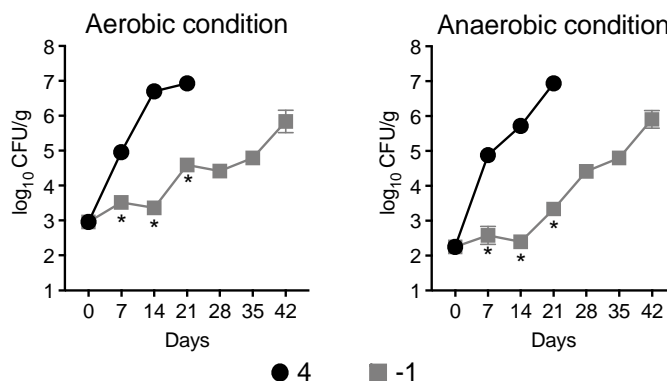


図 1 一般生菌数の変化
平均値 ± 標準誤差 . * $p < 0.05$

数とともに薄くなるのに対して、氷温熟成では長く維持されていた。一方、筋形質タンパク質において、氷温熟成はチルド熟成では見られない高分子と約 37 kDa のバンドが消失する特徴的な変化があった。

食肉の軟化の指標となる小片化率は両試験区で熟成期間の進行とともに増大し、熟成温度の違いによる大きな違いは見られなかった。これは熟成とともに Z 線が脆弱化し、ホモジナイズに対する耐性が失われ、断片化が進んだ結果を示している。官能評価を実施した結果、チルド区と比較して、氷温区では食感が有意に柔らかかった。

以上のことから、氷温を利用した食肉の長期熟成は総遊離アミノ酸の増加および食感が柔らかくなるため、食肉の付加価値を向上させる技術となりうることが示唆された。

参考文献

- 1) 西村敏英, ゼロから理解する 食肉の基本 -家畜の飼育・病気と安全・流通ビジネス-, 誠文堂新光社, 2013.
- 2) 細見亮太, 福間康文, 戸田裕子, 山本夏穂, 大塚錬, 吉田宗弘, 福永健治. 氷温熟成過程での豚ロース筋肉部の遊離アミノ酸および呈味成分の変化, 氷温科学, 17, 1-6, 2015.
- 3) 西村敏英, 食肉の熟成による呈味向上のメカニズム, 日本味と匂学会誌 4(2), 185-192, 1997.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 細見亮太, 中村潤平, 福田雄一, 船山敦子, 福岡康文, 吉田宗弘, 福永健治.	4. 巻 46
2. 論文標題 家庭用冷蔵庫のチルドルームを用いた牛および豚ロース肉の熟成処理が一般生菌数, 呈味成分濃度および食味性に及ぼす影響.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本食品保蔵学会誌	6. 最初と最後の頁 99-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂本竜也, 中村潤平, 細見亮太, 吉田宗弘, 福永健治.
2. 発表標題 0 以下の未凍結温度を用いた熟成が豚肉のタンパク質分解に及ぼす影響.
3. 学会等名 第九回低温・氷温研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村潤平, 細見亮太, 福岡康文, 吉田宗弘, 福永健治.
2. 発表標題 熟成処理温度の相違が豚肉の生菌数および呈味成分に及ぼす影響.
3. 学会等名 第九回低温・氷温研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細見亮太, 中村潤平, 北野淳志, 坂本竜也, 吉田宗弘, 福永健治.
2. 発表標題 異なる熟成処理温度が豚ロース肉の一般生菌数および呈味成分濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 第35回氷温研究全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村潤平, 細見亮太, 船山敦子, 福間康文, 吉田宗弘, 福永健治.
2. 発表標題 家庭用冷蔵庫のチルドルームおよび冷蔵室を用いた熟成処理が牛肉の一般生菌数および食味性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本食品保蔵科学会第69回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村潤平, 細見亮太, 吉田宗弘, 福永健治
2. 発表標題 食肉の熟成に関わるプロテアーゼ類の-1 および+4 での活性の違い
3. 学会等名 第八回低温・氷温研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅林雄斗, 中村潤平, 細見亮太, 吉田宗弘, 福永健治
2. 発表標題 異なる熟成温度が豚肉の一般生菌数および呈味成分に及ぼす影響
3. 学会等名 第八回低温・氷温研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細見亮太, 福田雄一, 福間康文, 吉田宗弘, 福永健治
2. 発表標題 氷温域での熟成処理が食肉の食味成分に及ぼす影響
3. 学会等名 第34回氷温研究全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水栄人, 細見亮太, 福間康文, 吉田宗弘, 福永健治
2. 発表標題 氷温域における熟成処理が食肉の一般生菌数および呈味成分の増加速度に及ぼす影響
3. 学会等名 第七回低温・氷温研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本光輝, 細見亮太, 福間康文, 吉田宗弘, 福永健治
2. 発表標題 長期熟成牛肉中の脂質過酸化指標の変化
3. 学会等名 第七回低温・氷温研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関