

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05901

研究課題名（和文）ドライ熟成肉の香りや味わいの生成に関わるカビ類の特定とその作用機構の解明

研究課題名（英文）Identification of fungal species involved in the production of aroma and flavor compounds in dry-aged beef and elucidation of the mechanism for their production

研究代表者

三上 奈々（MIKAMI, Nana）

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：80700278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ドライ熟成肉は、低温庫内で肉塊を空気に晒し数週間寝かせた肉である。肉表面のクラストには真菌類が生育し、これらの酵素が独特の熟成香や味わいをもたらすと言われるが、根拠はない。代表者らは、クラストから2種の接合菌 *Mucor flavus*・*Helicostylum pulchrum* を分離・同定した。同じ接合菌である *Mortierella* 属菌が活発に脂質を代謝することから、2つの接合菌が脂質から香りや味わいを生成すると予測したが、脂質よりもアミノ酸やペプチド等のタンパク質源を資化し、プロテアーゼの産生も認められた。これらより、接合菌による香りや味わいの増強はタンパク質成分に由来する可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドライ熟成肉は昨今外食産業などで注目される一方、国内外で製造基準や規格基準が整備されていない状況である。そのため、製造業者によって肉質や安全性のばらつきが大きく、多様な製品が出回っている。ドライ熟成肉の最も重要な特徴である香りや味わいを突き詰め、これまで漠然としか評価されて来なかった美味しさを科学的に解明することで、安全性や美味しさの制御が可能になると考える。また、当該研究課題の推進をきっかけとしてデータを積み重ねていくことができれば、これらの科学的根拠は将来的なドライ熟成肉の製造・規格基準策定の骨子となりうる。

研究成果の概要（英文）：Dry-aged beef (DAB) is a meat block stored in a refrigerated chamber without vacuum packaging for several weeks. Fungal flora is formed on a crust, the surface of DAB, and the enzymes from these fungi are thought to give the DAB a unique aged aroma and flavor. However, there is no scientific evidence to support this hypothesis.

We isolated and identified two species of zygomycetes, *Mucor flavus* and *Helicostylum pulchrum*, from the crust. As the same zygomycete, *Mortierella* genus, actively metabolizes lipids, it was predicted that the two zygomycetes would generate aroma and flavor from lipids. However, it is found that these two species assimilate protein sources such as amino acids and peptides rather than lipids, and also produced proteases. These results suggest that the enhancement of aroma and flavor by the zygomycetes may be due to protein components.

研究分野：食品科学

キーワード：ドライ熟成肉 接合菌 香気成分

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドライ熟成肉 (Dry-aged beef : DAB) は、温度・湿度を一定に保った低温熟成庫内で肉表面に風を当て数週間貯蔵した牛肉である。肉自身が持つ酵素に加え、乾燥した肉の表面 (クラスト) に生育する真菌類の酵素によってもタンパク質や脂質が分解され、それらの代謝物が独特の熟成香 (ナッツ香) や味わいをもたらすと考えられている。しかし、その詳細は不明である。

研究代表者らは近年食肉会社 (研究協力者: 北一ミート (株)) の熟成庫に住む蔵付カビを肉表面に積極的に付けることで、DAB 上のカビを飛躍的に増加させることを見出した。また、形成されたクラストから 3 種類の真菌類 (接合菌: *Mucor flavus*、*Helicostylum pulchrum*、子囊菌: *Penicillium series Camembertiorum*) を単離・同定した (Mikami, Toyotome et al, *Food Res Int*, 2021)。この DAB から農産物に検出されるような代表的なカビ毒は検出されなかったため、これらの真菌類が安全である可能性も示唆されている。

さらに、これらの真菌類を接種した DAB ではナッツ香を呈する 1-ヘキサノール (Ma et al, *J. Agric. Food Chem*, 2017) の増加や牛肉の味わいに関わるオレイン酸の割合の上昇が見られた。これらの知見から、3 種類の真菌類の存在が DAB の香りや味わいの形成に強く影響することが示唆された。

1-ヘキサノール等のアルコール類は、脂質からはリパーゼによるトリグリセリド等の加水分解、リポキシゲナーゼによる不飽和脂肪酸 (リノール酸等) の分解を経て生成される。また、オレイン酸 (C18:1n-9) は牛肉の主要脂肪酸であるが、ウシ生体内ではステアリン酸 (C18:0) が 9 デサチュラーゼによって不飽和化されることで生成される。一方で、一部の真菌にも同様の酵素を作用させ、脂質代謝を活発に行う種が報告されている。そのため、真菌由来の酵素が DAB の脂質成分を基質とし香気成分や脂肪酸を生成しているのではないかと推測した。

2. 研究の目的

M. flavus、*H. pulchrum*、*P. series Camembertiorum* のうち、どの真菌が DAB の 1-ヘキサノールやオレイン酸の生成に関わっているかを明らかにする。特に真菌の脂質代謝酵素に焦点を当て、その活性や代謝物の変化から生成機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 蔵付カビを接種した DAB におけるクラスト真菌組成の分析と表面・内部の脂肪酸分析

研究開始当初の背景でも述べたように、クラストからは *M. flavus*、*H. pulchrum*、*P. series Camembertiorum* の 3 種類の真菌が分離・同定が、これらがどのくらいの割合で生育しているかは不明であった。各菌株の脂質代謝能に加え、クラストにおける各菌株の組成を把握することは代謝物生成への寄与を理解する上で重要であると判断した。そのため、5 週間の熟成期間中 DAB のクラストを経時的にサンプリングし、得られた懸濁液より DNA を抽出し、ITS2 領域を用いたシーケンス解析によって組成を求めた。

また、クラスト上には真菌類が豊富に存在し、内部には侵入しないことを確認しているため、クラストに近い肉表面と内部でオレイン酸を比較することにより、クラスト菌叢が DAB の味わいに影響するか確認した。

(2) 単一菌を接種した DAB の製造

(1) で *M. flavus*、*H. pulchrum* が優占種であることがわかったため、単一菌の胞子を接種して DAB を接種し、5 週間小型冷蔵庫内又は大型熟成庫内でドライ熟成を行った。肉質指標や GC-MS による香気成分分析などを通して、*M. flavus*、*H. pulchrum* が牛肉の肉質に与える影響を評価した。

(3) 3 種の真菌類による脂質源・タンパク質源の資化作用の検討

3 種の菌に対して脂質源 (トリブチリン、トリオレイン) の寒天培地で培養することで、脂質による生育状況やリパーゼによるトリグリセリドの脂質分解能を観察した。脂質に加えて、タンパク質も DAB に豊富に含まれることから肉エキスやペプトン等を、比較対照のためにグルコースを用いた条件でも同様に培養した。形成されるコロニーやクリアゾーンの大きさを経時的に測定し、評価した。

4. 研究成果

(1) DAB におけるクラスト真菌の組成と表面・内部の違い

クラストの真菌叢を調べてみるとは *M. flavus*、*H. pulchrum*、*P. series Camembertiorum* の 3 菌株

に加え、*Debryomyces* 属菌やその他の菌も認められた。全体に対する割合としては、熟成期間を通して *M. flavus* が 30～35%、*H. pulchrum* が 40～45% であり、この 2 菌種が優占種であることがわかった。それに対し *P. series Camembertiorum* は熟成初期は 10% 程度の占有率であったが、それ以後熟成終了に向かって 5% 以下に減少した。これらの結果より、DAB のクラストでは 2 つの接合菌が主要な役割を果たし、*P. series Camembertiorum* の作用は補助的である可能性が示唆された。

一方で、DAB の口どけや味わいに関わる脂肪酸とされるオレイン酸の割合を、クラストに近い肉の表層とクラストから離れた内部で比較すると、接合菌の影響が強いと考えられる表層において内部よりもオレイン酸の割合が高かった。これらのことより、接合菌が脂肪酸に不飽和化などの作用をすることで脂肪酸組成を変化させる可能性が示唆された。接合菌自体は肉内部には侵入しないことを形態学的に確認したが、接合菌が菌体外に産生する何らかの化合物がこれらの脂肪酸の代謝に影響する可能性を示唆した。

(2) *M. flavus*, *H. pulchrum* が香気成分に与える影響

接合菌を接種し小型熟成庫で 5 週間熟成を行った結果、図 1 のような外観になった。菌が全体を覆って良好な生育が確認でき、主観的ではあるが接合菌接種によってナッツ香と呼ばれるような DAB 特有の香りも感じられた。大型熟成庫で製造した接合菌接種 DAB も同様に接種菌が優占してナッツ香を感じるものであったが、GC-MS 分析ではナッツ香のターゲットとしていた 1-ヘキサノール(過去の報告で、nutty と表現されるに由来)が一定の類似度の範囲内ではライブラリ検索ができず、DAB 試料から明確に化合物を同定できなかった。このことから、ナッツ香の正体は 1-ヘキサノールではなく、他の化合物であるか又は複数の成分が複合されたものである可能性が示唆された。

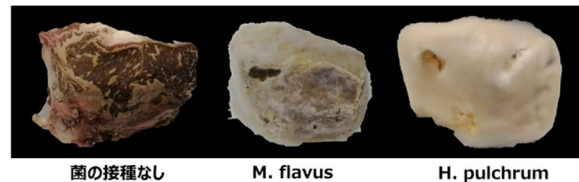


図 1 . 単一菌を接種したドライ熟成肉

また、単一の接合菌を肉ブロックに生育させた際、脂肪部分よりも赤身(筋肉)部分に分布する様子が確認できた。そのため、脂肪よりもタンパク質を利用しやすい可能性が示唆された。

(3) 3 種の真菌類の脂質・タンパク質の資化能

M. flavus, *H. pulchrum*, *P. series Camembertiorum* の 3 菌株において、ドライ熟成庫と同じ冷蔵(4°C)条件下での培養後の生育状況を比較した。下の図 2 は *M. flavus* のコロニー径であるが、トリグリセリド骨格を持つトリブチリンやトリオレインはグルコースよりも生育が遅く、トリブチリンに関してはほとんど生育が認められなかった(図 2 左)。トリオレインに関しても、15 日間培養してもコロニー径は 30 mm 程度であり、トリグリセリドに対する積極的な資化作用や顕著なリパーゼ活性は認められなかった。一方で、タンパク質源を添加した培地では、ゼラチンを除いた肉エキスやペプトンといった肉成分や、乳成分のスキムミルクにおいてグルコースよりも生育スピードが速かった(図 2 右)。さらに、スキムミルク培地に形成されるクリアゾーンによって、3 種の菌からプロテアーゼが産生されることも確認できた。当初は対象とする真菌類が脂質を代謝して香気成分を生成していると仮説を立てたが、これらのデータから脂質よりも遊離アミノ酸やペプチドといったタンパク質源に由来する可能性が高いと推察された。また、*P. series Camembertiorum* よりも *M. flavus*, *H. pulchrum* の 2 つの接合菌の冷蔵条件下の生育やプロテアーゼ活性が高く、DAB のクラスト菌叢の代謝の主要な役割を果たすことが考えられた。

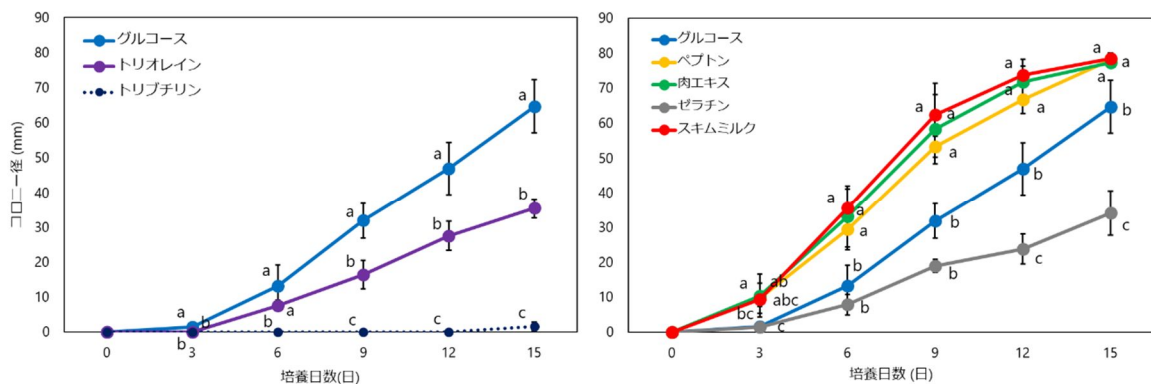


図 2 . *M. flavus* の脂質・タンパク質源による生育の様子

これらの結果より、DAB のクラストから分離された *M. flavus* や *H. pulchrum* の 2 種の接合菌が DAB のナッツ香や味わいに関与することが示唆された。一方で、ナッツ香の正体やその代謝経路について明らかにすることはできなかったが、接合菌の肉のタンパク質代謝を經由して産生されることが推察される。今後これらの詳細を丁寧に調べることで、DAB の発酵の全貌を解明していくことができると考える。

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 1件）

1. 著者名 Nana Mikami, Takahito Toyotome, Masahiro Takaya, Kenichi Tamura.	4. 巻 12
2. 論文標題 Direct Rub Inoculation of Fungal Flora Changes Fatty Acid Composition and Volatile Flavors in Dry-Aged Beef: A Preliminary Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 1391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani12111391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 細野未紗, 豊留孝仁, 福田健二, 田村健一, 三上奈々
2. 発表標題 ドライ熟成肉由来真菌株が有するタンパク質成分の資化性とプロテアーゼ活性の検討
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鳥丸 碧里, 豊留 孝仁, 細野 未紗, 庄司 陽織, 田村 健一, 三上 奈々
2. 発表標題 ドライ熟成肉のクラストにおける微生物叢の質的・量的な変化
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鳥丸碧里, 豊留孝仁, 山崎夢々, 山崎栄樹, 平田真樹, 森松文毅, 田村健一, 三上奈々
2. 発表標題 ドライ熟成肉に生育する細菌類のタンパク質・脂質分解活性の評価
3. 学会等名 2023年度 日本農芸化学会北海道支部 第2回学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nana Mikami, Takahito Toyotome, Masahiro Takaya, Kenichi Tamura
2. 発表標題 Microbiota identification and their effects on characteristics of dry-aged beef manufactured in Japan.
3. 学会等名 The 22nd IUNS-ICN (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細野未紗, 豊留孝仁, 栗田虎之介, 島田謙一郎, 田村健一, 三上奈々
2. 発表標題 ドライ熟成肉に生育する真菌類のプロテアーゼやリパーゼの生産性に関する検討
3. 学会等名 2021年度 日本農芸化学会北海道支部第2回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三上奈々, 豊留孝仁, 高谷政宏, 田村健一
2. 発表標題 擦過処理による積極的な真菌類の接種がドライ熟成肉の製造や品質に与える影響
3. 学会等名 2022年度 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ドライ熟成肉の製造方法及びこれに用いられる新規糸状菌株	発明者 三上奈々、豊留孝仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2022-177758	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分担者	豊留 孝仁 (TOYOTOME Takahito) (90422245)	帯広畜産大学・畜産学部・准教授 (10105)	

	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
研究 協力者	田村 健一 (TAMURA Kenichi)	北一ミート(株)・代表取締役社長	
研究 協力者	高谷 政宏 (TAKAYA Masahiro)	(公財)とかち財団・ものづくり支援部 食品技術グループ・ 研究主査	

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