

氏 名(本籍) ね 根 ぎし 岸 はる 晴 お 夫

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 5 3 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 7 年 11 月 9 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 食 肉 の 貯 蔵 中 に お け る 理 化 学 的 変 化 と 肉
質 管 理 の 指 標 成 分 に 関 す る 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 伊 藤 敏 敏
教 授 秋 葉 征 夫
教 授 鈴 木 惇

論文内容要旨

第1章 緒論

家畜の筋肉はと殺直後は軟らかいが、硬直期を迎えると硬くて風味に乏しい食味となる。これを貯蔵し熟成すると、解硬して軟らかくなり風味も向上する。解硬に要する時間は牛、豚、鶏の順に長く、消費されるまでの期間もこれに対応する。一般に牛肉で熟成処理が慣行され、その状態を適切に管理することが品質的に大切である。しかし牛肉自由化後、輸入牛肉が増え、国内市場には国産牛肉も含め種々の熟成状態の牛肉が流通し、品質の多様化の一因となっている。それに対して、鶏肉は死後変化が速いことが経験的に知られているため、他の食肉に比べチルド輸送が徹底し、生鮮であることが品質評価の重要な要素になっている。豚肉は鶏肉よりも死後変化は遅いが、牛肉でみられるような積極的熟成処理は少なく、鮮度重視の傾向にある。一方、食肉産業の現場では牛肉の熟成状態(以下、熟度と略)や鶏・豚肉の品質は、と殺後日数や外観の色調、匂い、感触などの官能的性質で判断されているため、的確さに欠ける場合がある。このような管理に客観的評価方法を加え熟度や肉質の判定を行えば、さらに現場での肉質管理が適切になると考えられる。

本研究では、先ず輸入牛肉の品質の実情を検討した。第2に牛肉の死後の物理化学的性質の変化を追跡し、輸入牛肉を対象に熟度の指標成分について検討した。その結果、死後変化過程で出現する30,000ダルトン(30kDa)成分が熟度指標として好ましいことを提案した。第3に鶏及び豚肉の品質管理に対する本成分の有効性についても検討を加えた。最後に30kDa成分の化学的、免疫学的性質を検討し、その由来を明らかにした。

第2章 冷凍牛肉の食味性とその向上法

第1節 輸入牛肉の食味性と冷凍牛肉の解凍後の貯蔵中の変化

輸入牛肉の形態は流通温度からチルドとフローズンの2タイプに分かれ、食味性は冷蔵輸送期間の長いチルドビーフの方が軟らかく良好であった。ステーキ等の原料肉として輸入されている豪州・米国産冷凍ロース肉の食味性の実情調査の結果、せん断力価(SFV)が2,000g以上の硬い

肉の存在が認められた。このような冷凍肉を解凍後に貯蔵すると SFV が徐々に低下し、肉の軟化が進行することが分かった (Fig.1)。そこで、次の節で凍結前未熟成牛肉の解凍後の追加熟成効果について検討した。

第2節 凍結処理牛肉に対する解凍後の追加熟成効果

ホルスタイン種去勢牛のロイン部(背最長筋)を死後4日後と15日間熟成後、 -35°C で1カ月間凍結貯蔵した。解凍直後の SFV は凍結前未熟成牛肉が $3,515 \pm 749\text{g}$ と硬い肉質であるのに対して、凍結前熟成牛肉では $1,639 \pm 516\text{g}$ となり、凍結前の熟成で十分に軟化していた。一方、未熟成牛肉の SFV も解凍後冷蔵6日目には急激に低下し($1,459 \pm 735\text{g}$)、熟成牛肉の SFV のレベルに達した (Fig.2)。このように未熟成冷凍牛肉も解凍後の貯蔵によって硬さが低下し、追加熟成効果が得られることが判明した。食味性も冷蔵6日目に最も向上し、その状態は16日目まで維持された。以上から、熟成不足の冷凍牛肉に対して適度の追加熟成処置を施すことにより、食味性の改善が図れることが明らかになった。次に、原料牛肉の熟度が適正か否かを判断するための熟度指標について検討した。

第3章 牛肉の熟度指標

第1節 牛ロース肉熟成中の物理化学的性質の変化

牛肉の熟度指標を求めるために、と殺後4日のホルスタイン種去勢牛のロイン部(胸最長筋)を 0°C で31日間貯蔵した。食味性は貯蔵11日目(死後15日)頃から軟らかく香味が良好となり、熟成効果が認められた。貯蔵中の諸性質の変化として、SFV の低下、筋原線維の小片化率(MFI)の上昇、30kDa 成分の出現とその濃度の増加 (Fig.3)、イノシン酸 (IMP) の減少、ヒポキサンチン (Hx) とキサンチン (X) の増加、及び ATP 関連化合物の変化から算出した K 値と新たに提案した修正 K (mK) 値の増加が認められた (Fig.4)。しかし貯蔵14日目以降の SFV の変化は横這いとなり、食味評価の結果と一致しなかった。それに対し、K 値、mK 値、MFI 及び 30kDa 成分は熟成後半も漸増傾向を示したことから、牛肉の熟度を幅広い期間に渡って推定するための指標として、SFV よりも好ましいと予想された。

第2節 輸入冷凍牛肉における熟度指標成分の測定

豪州・米国産の冷凍牛ロース肉(胸最長筋)(N=100)を対象に官能的“軟らかさ”を熟度の基準として、“軟らかさ”と前節のSFV、K値、mK値、MFI及び30kDa成分との関係を求めた。“軟らかさ”はSFV($r=-0.759$) (Fig.5-a)、30kDa成分($r=0.558$)及びMFI($r=0.481$)と高い相関性を示した。さらにSFVと他特性との相関は、30kDa($r=-0.706$)>MFI($r=-0.573$)>mK値($r=-0.300$)>K値($r=-0.189$)となり、特に30kDa成分との相関性が顕著に高まった(Fig.5-c,d)。しかし、ATP関連化合物の変化から算出したmK値やK値との相関性は低かった(Fig.5-b)。これはSFVが約2,500~4,000gの硬い肉で、mK値のバラツキが大きいことによると考えられた。以上から、凍結前の熟成期間が比較的短いと予想される輸入冷凍牛ロース肉の熟度指標としては、mK値やK値に比べSFV、30kDa成分及びMFIの方が有効であると考えられた。

第3節 牛肉の熟度指標に及ぼす筋肉部位の影響

ロース肉に比べて肉質が硬い屠殺後3日の牛ウデ肉から、4種の筋肉(上腕三頭筋(TB)、棘上筋(SS)、上腕二頭筋(BB)、上腕筋(BA))を採取した。これを0℃で28日間貯蔵し、熟度指標に及ぼす筋肉部位の影響を検討した。全コラーゲン量はBA>BB>SS>TB筋の順に多く含まれた。何れの筋肉も貯蔵日数の進行と共にSFVが低下し軟化したが、その程度はコラーゲン量の多いBA筋で少なかった。貯蔵中の筋原線維の小片化速度もコラーゲン量が多い筋肉(BB、BA)で遅い傾向にあった(Fig.6)。特に30kDa成分の変化はコラーゲン量の順位と極めて良く一致し、その含量が少ない筋肉ほど貯蔵中の30kDa成分の増加が大きかった(Fig.7)。しかしながら、貯蔵中のATP関連化合物の分解パターンは何れの筋肉でも殆ど同じで(Fig.8-A~D)、K値とmK値は死後の軟化速度とは無関係に一定の傾向で上昇するため死後経過を示す鮮度指標とはなり得るが、熟度指標としては有効でなかった。以上から、貯蔵中の30kDa成分の変化はMFIよりも筋肉の軟化速度に対応し、長期熟成中も上昇することから、熟度指標として最も有効であると考えられた。

第4章 他の食肉における熟度指標成分の変化

第1節 と殺後の鶏胸肉の物理化学的性質の変化

鶏肉工場で処理中の鶏肉(浅胸筋)の死後変化を測定した。死後3~4時間後に、SDS-PAGE上に30kDaと32kDaと推測される2つのバンドの出現を認めた。鶏肉のSFVとMFIは出荷時の死後3~4時間で最も大きく変化し、24時間後の変化は少ないことから、出荷時には十分な軟らかさに達していることが分かった(Fig.9)。ATP含量が死後48分で急速に減少したのに対して、IMP含量は増加し死後24時間後もほぼ同水準を維持した。K値は死後3~4時間後より上昇し始め、30kDa成分の出現時期と一致した。以上より鶏肉においても肉質の変化が顕著に起こる死後3~4時間に30kDa成分の出現が見られ、その時期に食味性の向上も顕著になると推定された。

第2節 鶏肉貯蔵中に出現する30kDa成分とK値との関係

鶏肉の食味性は処理当日の夕方から翌日には適期を迎えると推定できるため、その後の鮮度管理が重要である。鮮度指標としてのK値と32kDa、30kDa成分との関係を検討した。死後5°Cに貯蔵中の鶏肉では、32kDa成分の出現量は30kDa成分よりも少なく、死後5日目には殆ど消失した。それに対して、30kDa成分の濃度は死後4日目迄は上昇したが、5日目でやや減少し、その後7日目迄はほぼ一定であった。一方、鮮度指標としてのK値は7日間貯蔵中、直線的に増加した(Fig.10)。死後4日迄の鶏肉81羽を統計的に解析した結果、30kDa成分はHxR($p < 0.01, r = 0.663$)やK値($p < 0.01, r = 0.642$)と高い相関関係にあり、鶏肉の場合も30kDa成分の測定は肉質や鮮度等の品質管理のための有効な指標になると考えられた。

第3節 豚肉貯蔵中の物理化学的変化

死後5日目の豚ロース肉(胸最長筋)と腿肉(内側広筋)を0°Cに貯蔵した。両者の肉でSDS-PAGE上に30kと32kDa成分が認められた。32kDa成分の方が貯蔵中の濃度の増加が大きく、ロース肉で顕著な増加が認められた(Fig.11)。このことから、本成分を従来から議論されている30kDa成分と断定した。SFVは何れの肉も貯蔵中に低下し、その程度はロース肉で大きかった(Fig.11)。このように腿肉はロース肉よりも熟度の進行

が遅く、この傾向は貯蔵中の32kDa 成分の濃度変化とも一致した。K 値は貯蔵中に増加した。豚肉の場合も、貯蔵中の32kDa 成分の変化は肉質の変化と良く対応するため、品質管理の指標成分として有効と考えられた。

第5章 牛肉熟成中に出現する30kDa 成分の由来

これまでの検討で死後筋肉の解硬・軟化過程で出現する30k、又は32kDa 成分は食肉の肉質の変化と対応するため、牛、豚肉の熟度や鶏肉の鮮度などの品質管理指標として有効であることを明らかにした。さらに本章では、牛肉を対象に30kDa 成分の由来について検討した。

第1節 牛肉のトロポニン3成分の分離調製法とアミノ酸組成

従来、30kDa 成分の由来はトロポニンTと推定されている。本節では先ず、トロポニンTを含むトロポニン3成分の調製法を検討し、夫々の分子量とアミノ酸組成を初めて明らかにした。牛腿肉から抽出した粗トロポニンをDEAE-Toyopearlカラムクロマトグラフィーで精製後(Fig.12-a)、CM-ToyopearlカラムクロマトグラフィーでトロポニンC、I、Tに分離した(Fig.12-b)。トロポニン3成分の分子量はSDS-PAGEにより、トロポニンC 19,500、トロポニンI 23,300、及びトロポニンT 40,400と決定した。牛骨格筋のトロポニン3成分のアミノ酸組成の相同性は兎と鶏の骨格筋との間で高く、筋肉型が異なる牛心筋との間で低かった。

第2節 牛肉熟成中に出現する30kDa 成分の由来

死後、0℃で31日間貯蔵中の牛腿肉の筋原線維のSDS-PAGEで、推定分子量32kDa成分の濃度が熟成の進行と共に顕著に増加したので、本成分(SDS-32kDa成分と呼称)が既述の30kDa相当の成分と考えられた(Fig.13-A)。粗トロポニンでは、トロポニンTと34kDa成分の漸減に対応して、32kDa成分の濃度が漸増した(Fig.13-B)。32kDa成分は死後17日目の牛肉の粗トロポニンから前節同様、陰及び陽イオンクロマトグラフィーを組合わせ分離できた(調製物をNative-32kDa成分と呼称)。Native-32kDa成分のSDS-PAGE上の移動度はSDS-32kDa成分と一致し、しかもSDS-32kDa、Native-32kDa及び34kDa成分は全てトロポ

ニン T のポリクローナル抗体と交差反応をした。牛肉熟成中の筋原線維 (Fig.14) とトロポニン (Fig.15) のイムノプロットからも、熟成中のトロポニン T の減少、34kDa 及び32kDa 成分の増加が認められた。さらに Native-32kDa と34kDa 成分のアミノ酸組成のパターンはトロポニン T とよく似ていた (Fig.16)。以上より両成分ともトロポニン T の分解ポリペプチドと考えられ、牛肉熟成中に筋原線維の SDS-PAGE 上に出現する SDS-32kDa には、トロポニン T の分解フラグメントが含まれていることが明らかになった。

第 6 章 総 括

食肉貯蔵中の物理化学的性質の変化と肉質管理の指標成分について検討した結果、以下のことが明らかになった。

1. 輸入冷凍牛肉が硬いと評価される理由の一つは、凍結前の熟成不足にあった。原料肉の熟度を予め検査し、熟成不足の場合には解凍後の追加熟成処理により硬さが改善されることを明らかにした。
2. 牛肉の熟度指標の候補として、SFV、ATP 関連化合物の変化に基づく K 値と修正 K (mK) 値、MFI、及び30kDa 成分を選択した。
3. SFV は牛肉の硬さを評価するための有効な手段であったが、長期熟成中の肉質の変化までは検出できなかった。
4. K 値と mK 値は SFV との相関性が最も低く、熟成中の筋肉間の軟化速度の差異を反映せず、熟度指標として好ましくないことを明らかにした。
5. MFI と30kDa 成分は長期熟成中の牛肉で漸増傾向を示し、肉の“軟らかさ”との相関性も高く、熟度指標として有効であった。しかも貯蔵中の筋肉間の軟化速度の差異に良く対応して変化した。この傾向は特に30kDa 成分で顕著であることから、30kDa 成分は MFI よりも熟度指標として優れていることを明らかにした。
6. 鶏肉も肉質の変化が顕著に起こる死後 3～4 時間後に30kDa 成分が出現し、30kDa 成分の変化は SFV、MFI、及び K 値の変化と対応することから、肉質や鮮度等の品質管理の指標として有効であることを明らかにした。

7. 豚肉では牛肉同様に推定分子量32kDa 成分の死後変化が顕著であった。32kDa 成分の貯蔵中の変化は SFV、K 値の変化と良く対応することから、品質管理の指標成分として有効であることが示唆された。
8. 牛肉を対象に30kDa 成分の由来を検討した。本成分の分子量は SDS-PAGE で32kDa と推定した。本成分と34kDa 成分がトロポニン T の減少に対応して出現し、何れもトロポニン T のポリクローナル抗体と交差反応した。32kD と34kDa 成分のアミノ酸組成はトロポニン T と良く一致した。牛肉熟成中に筋原線維の SDS-PAGE 上に出現する30 kDa 成分には、トロポニン T の分解フラグメントが含まれていることを明らかにした。
9. 牛肉のトロポニン C、I、T を初めて分離し、夫々の SDS-PAGE による分子量とアミノ酸組成を明らかにした。

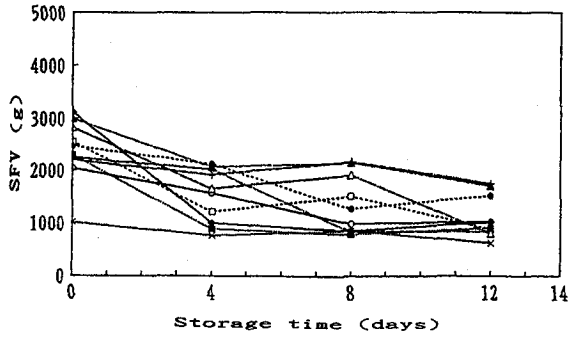


Fig . 1. Changes in SFV of imported frozen beef during storage for 12 days at 0-2°C (N =10).

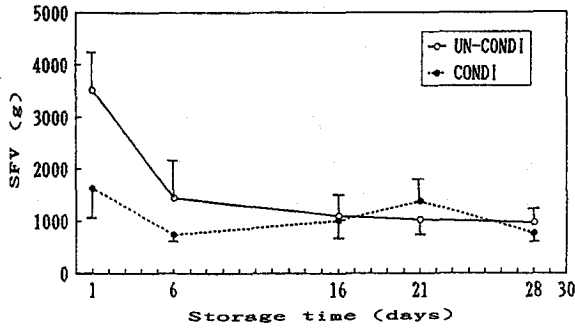


Fig . 2. Changes in SFV of both the unconditioned- and the conditioned-frozen beef loins during storage for 28 days at 0-2°C.

The unconditioned- and the conditioned-frozen beef loins were frozen at -35°C after 4 days and 15 days post-mortem, respectively, and then stored for 1 month at the same temperature.

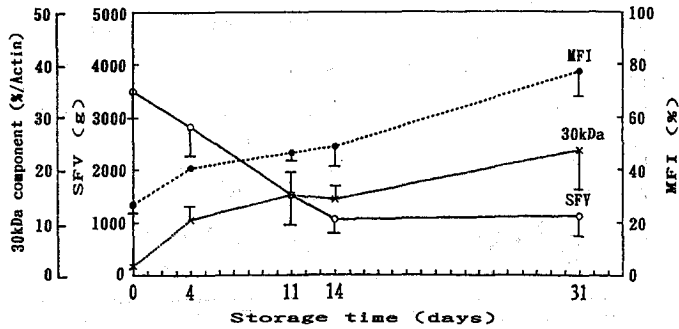


Fig . 3. Changes in SFV, myofibrillar fragmentation index (MFI) and 30kDa components of beef loins during storage for 31 days at 0°C.

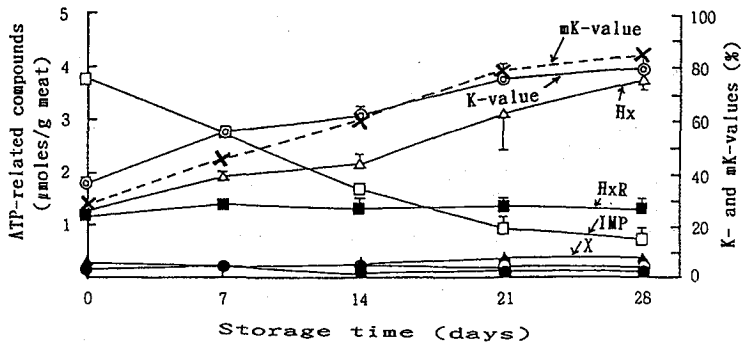


Fig . 4. Changes in ATP related compounds of beef loins during storage for 28 days at 0°C.

The loins were removed from 3 carcasses of Holstein steers of 4 days post-mortem. ATP was not detected in all loins through storage.

$$K\text{-value}(\%) = (HxR + Hx) \times 100 / (ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx).$$

$$mK\text{-value}(\%) = (HxR + Hx) \times 100 / (IMP + HxR + Hx).$$

ADP(○), AMP(●), IMP(inosine monophosphate)(□), HxR(inosine)(■),

Hx(hypoxanthine)(△), X(xanthine)(▲), K-value(⊙), mK-value(×).

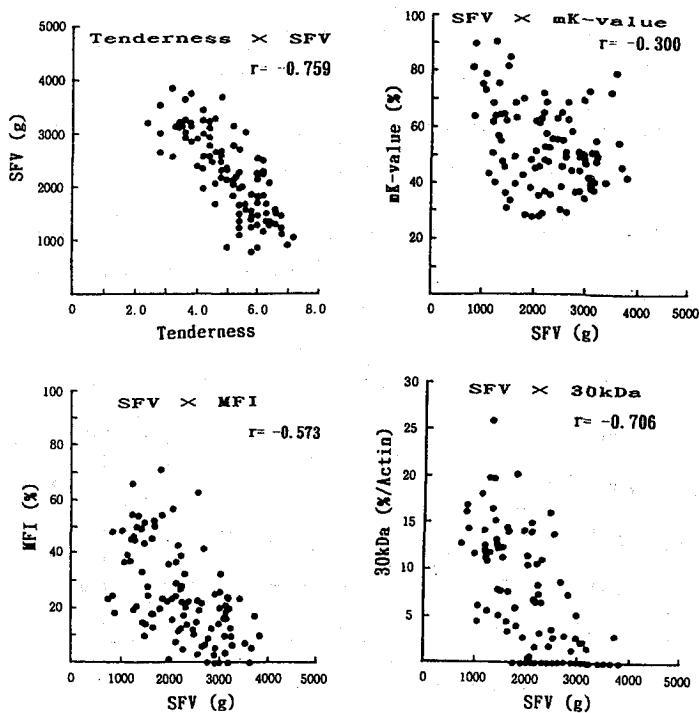


Fig . 5. The correlations between SFV and Tenderness, mK-values, MFI and 30kDa components of imported frozen beef loins(N=100).

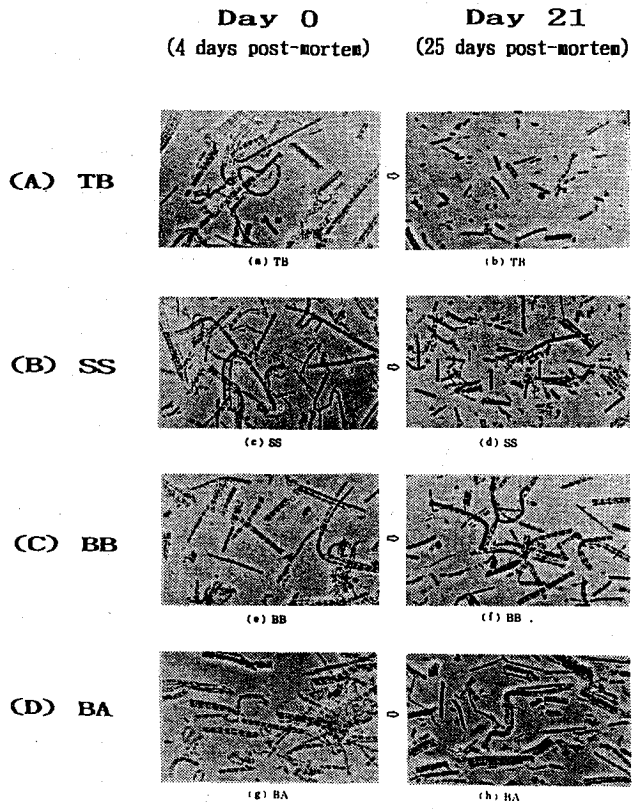


Fig . 6. Phase-contrast micrographs of myofibrils prepared from beef shoulder clods immediately and at 21 days after storage at 0°C. Day 0 and 21 represent 4 and 25 days post-mortem, respectively.

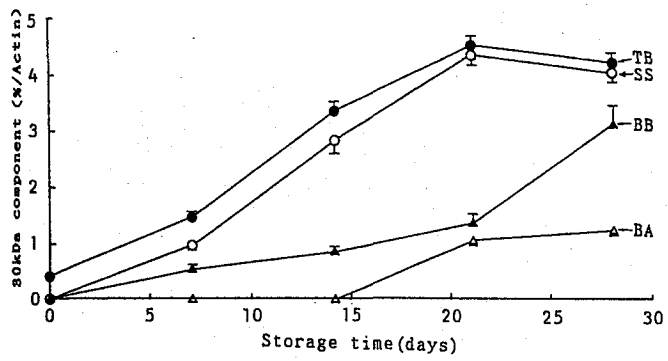


Fig . 7. Changes in 30kDa components of myofibrils prepared from beef shoulder clods during storage for 28 days at 0°C.

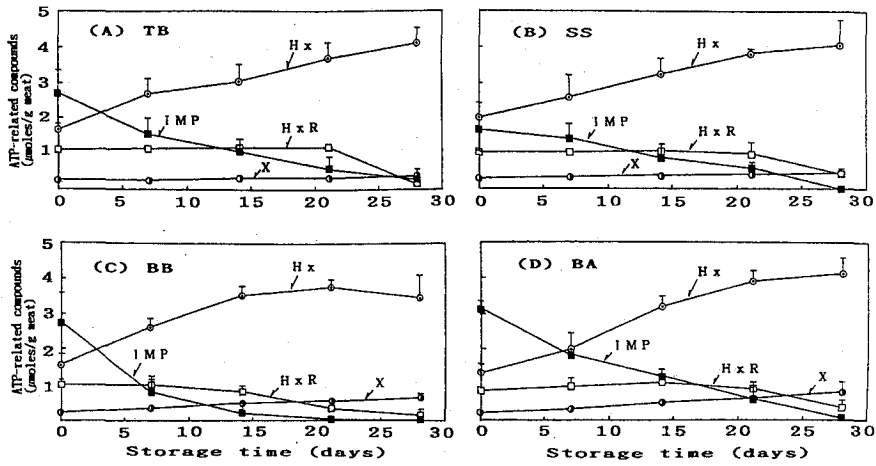


Fig. 8. Changes in ATP-related compounds of beef shoulder clods during storage for 28 days at 0°C.
 IMP (■), HxR(□), Hx(○), X(○)

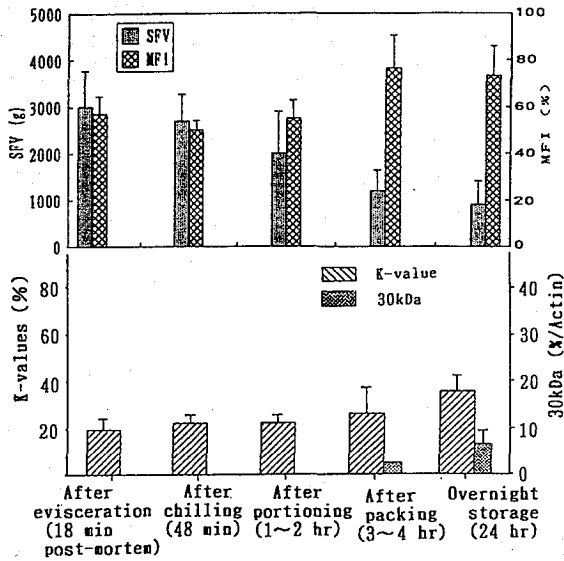


Fig. 9. Changes in SFV, MFI, K-values and 30kDa components of breast meat during the commercial processing of broiler carcasses.

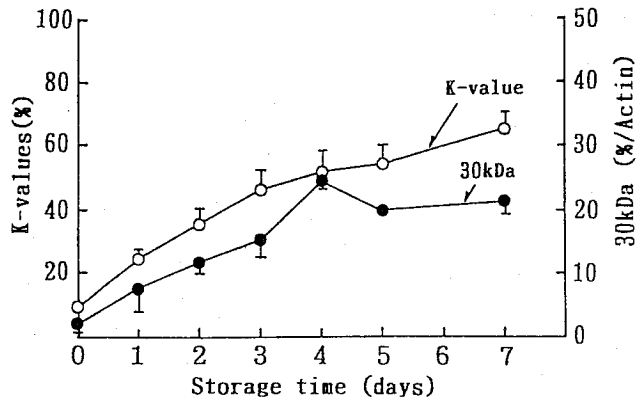


Fig. 10. Changes in K-values and 30kDa components of breast meat of broiler during storage for 7 days at 5°C.

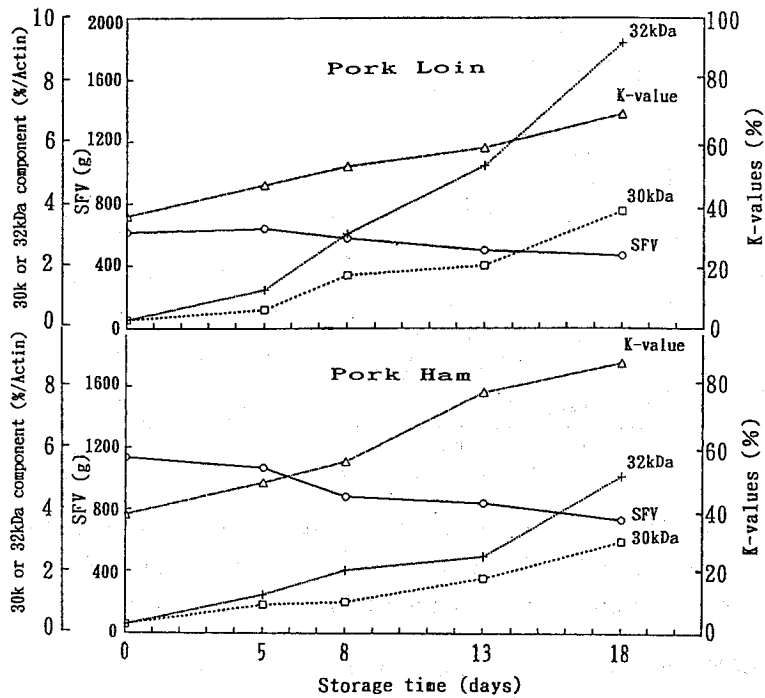


Fig. 11. Changes in SFV, K-values and 30kDa components of pork during storage for 18 days at 0°C.

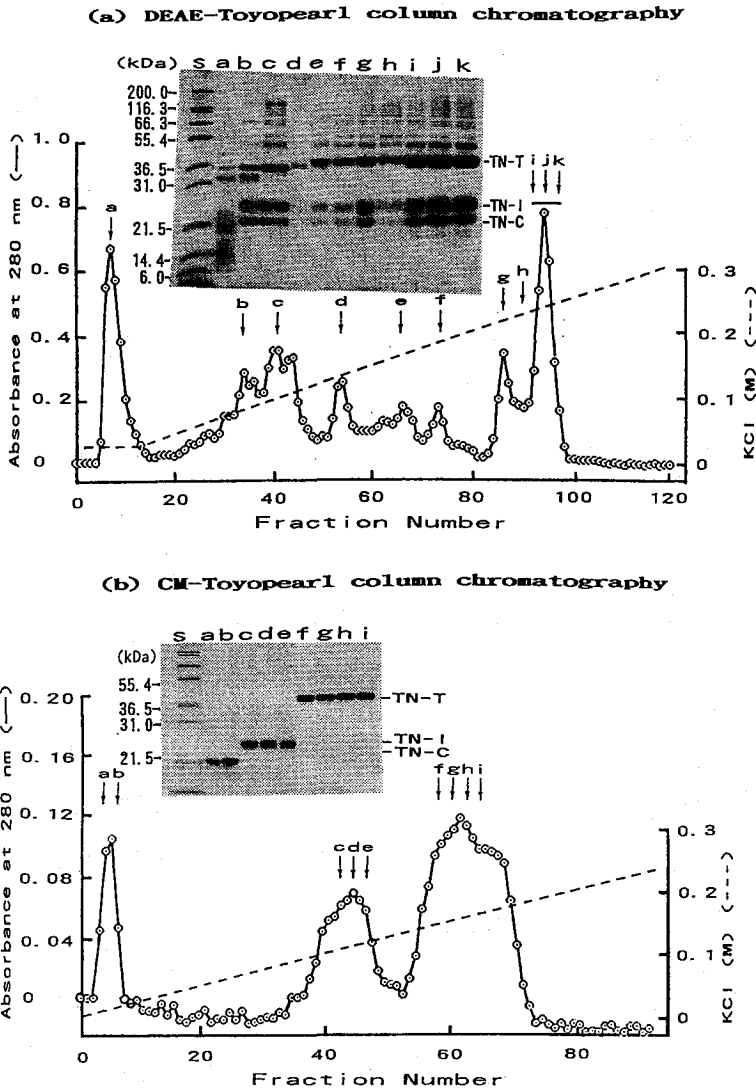


Fig. 12. (a) DEAE-Toyopearl column chromatography of bovine skeletal crude troponins and (b) CM-Toyopearl column chromatography of the purified troponin obtained by the DEAE-column chromatography.

The DEAE-Toyopearl column chromatography was performed with a linear gradient of 30-300 mM KCl in the buffer containing 1 M urea, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 5 mM 2-mercaptoethanol, and the CM-Toyopearl column chromatography performed with a gradient of 10-250 mM KCl in the buffer containing 6 M urea, 1 mM EDTA, 30 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 5 mM 2-mercaptoethanol.

TN-C, troponin C; TN-I troponin I; TN-T troponin T.

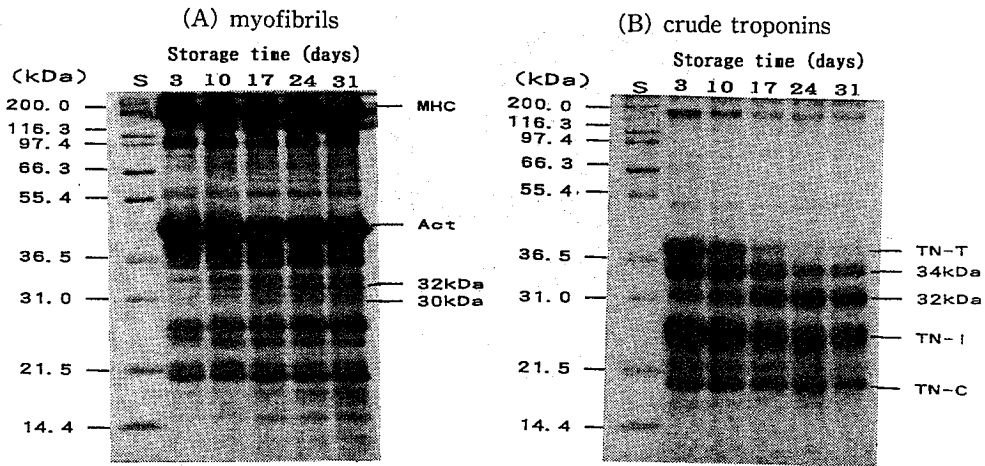


Fig. 13. SDS-PAGE patterns of myofibrils (A) and crude troponins (B) prepared from bovine vastus intermedius (VI) muscle during post-mortem aging at 0°C.

S : MW markers

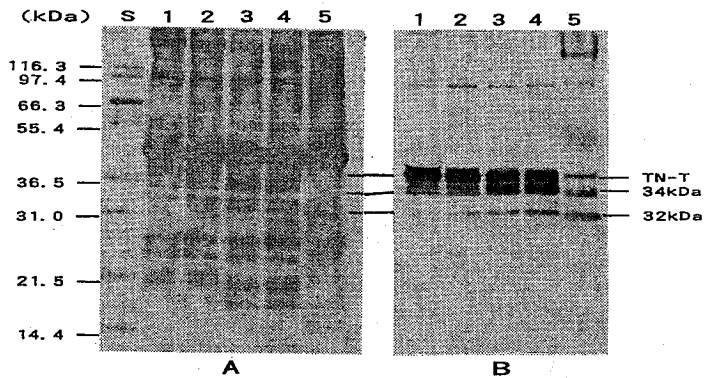


Fig. 14. Immunoblot analyses of myofibrils prepared from bovine VI muscle during post-mortem aging at 0°C.

(A), CBB; (B), Immunoblot. Lanes 1, 2, 3, 4 and 5 indicate 3, 10, 17, 24 and 31 days post-mortem, respectively.

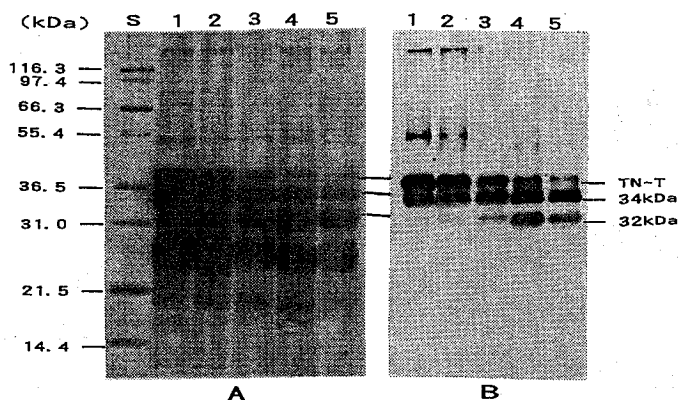


Fig. 15. Immunoblot analyses of the crude troponins prepared from bovine VI muscle during post-mortem aging at 0°C. (A), CBB; (B), Immunoblot. Lanes 1, 2, 3, 4 and 5 indicate 3, 10, 17, 24 and 31 days post-mortem, respectively.

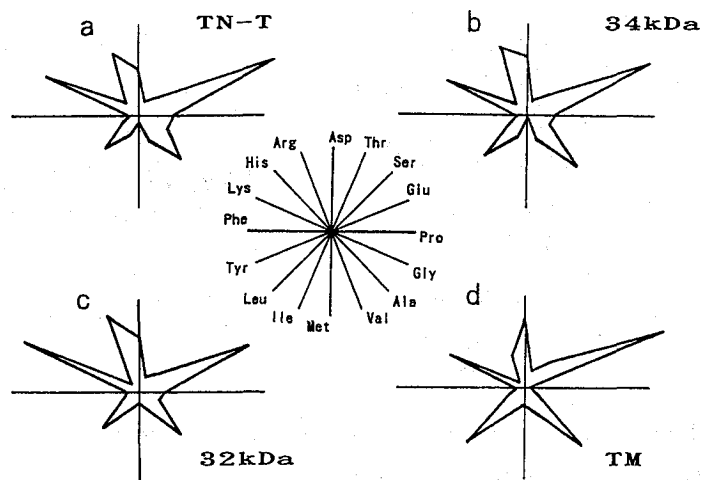


Fig. 16. Star diagrams of amino acid composition of troponin T, 34kDa component, 32kDa component and tropomyosin. TN-T, troponin T; TM, tropomyosin.

論文審査の要旨

食肉産業の現場では、牛肉の熟成状態や鶏・豚肉の品質はと殺後日数や外観の色調、匂い、感触などの官能的性質によって判断されているため、的確さに欠ける場合がある。本研究は食肉貯蔵中の理化学的変化を分析し、肉質との関係を検討することにより、食肉の品質管理に有効な指標成分を決定することを目的に行ったものである。

先ず輸入牛肉の実情を調べ、冷凍牛肉の食味性が悪いのは凍結前の熟成不足に原因があり、解凍後の追加熟成により食味性が改善されることを明らかにした（第2章）。次に牛肉の熟度を管理するための指標成分を検討した結果、せん断力価（SFV）は牛肉の硬さを評価するための有効な手段であったが、長期熟成中の肉質の変化までは検出できなかった。ATP関連化合物の変化に基づくK値はSFVとの相関性が悪く、熟成中の筋肉間の軟化速度の差異を反映せず、熟度指標として好ましくなかった。筋原線維の小片化率（MFI）と30kDa成分は長期熟成中の牛肉で漸増傾向を示し、肉の“軟らかさ”との相関性も高いことから、熟度指標として有効であった。しかも筋肉間の軟化速度の差異に良く対応して変化した。この傾向は特に30kDa成分で顕著であることより、30kDa成分はMFIよりも熟度指標として優れていることが明らかとなった（第3章）。鶏肉と豚肉についても30kDa成分を中心に死後の物理化学的性質の変化を調べた。その結果、鶏肉では30kDa成分の検出が、豚肉では32kDa成分の検出が品質管理の指標として利用可能であることが明らかとなった（第4章）。

最後に牛肉を対象に30kDa成分の由来を検討した。本成分の分子量は豚肉と同様32kDaと推定された。牛肉熟成中に32kDa成分と34kDa成分がトロポニンTの減少に対応して出現し、何れもトロポニンTのポリクローナル抗体と交差反応し、しかも両成分のアミノ酸組成はトロポニンTと良く一致した。その結果、両成分ともトロポニンTの分解フラグメントであることが明らかとなった。熟成中にSDS-PAGE上に出現する34kDa成分はトロポミオシンの移動度と接近していたため、従来その存在が知られていなかった。本研究で初めて熟成中に出現することが明らかにされた。また本研究で牛肉のトロポニンC、I、Tが初めて分離され、夫々の分子量とアミノ酸組成が明らかにされた（第5章）。

このように、熟成中の牛肉筋原線維のSDS-PAGE上に出現する32kDa成分にはトロポニンT由来の分解ポリペプチドが含まれていることが明らかとなった。これらの知見は食肉の死後の脆弱化に対するトロポニン成分の関与を示唆しており、熟成に伴う食肉の軟化機構の解明に対しても重要な基礎的知見を提供し、食肉の科学に大きく貢献するものと考えられる。よって博士（農学）の学位を授与されるに十分な資格があるものと判定された。