

氷温を利用した豚肉の長期熟成処理が 一般生菌数および呈味成分濃度に及ぼす影響

細見亮太*, 岸本友里恵*, 福田雄一*, 中村潤平*, 福間康文**, 吉田宗弘*, 福永健治*
(*関西大学 化学生命工学部, **株式会社氷温研究所)

Effect of Superchilling (Hyo-On) Aging on the Total Bacterial Count and Concentration of Taste Components of Pork Loin

Ryota Hosomi*, Yurie Kishimoto*, Yuichi Fukuda*, Junpei Nakamura*, Yasufumi Fukuma**,
Munehiro Yoshida*, Kenji Fukunaga*

(*Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University, **Hyo-On Laboratories Inc.)

要約

氷温を利用した肉類の長期熟成処理の有用性を評価するために、従来の熟成処理温度である4℃および氷温である-1℃で豚ロース肉の熟成処理を行い、一般生菌数、イノシン酸および遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響を評価した。-1℃熟成処理の一般生菌数は、4℃熟成処理と比較して、熟成処理7、14および21日で有意に低下した。さらに-1℃熟成処理42日後でも、肉類が腐敗したと判断する一般生菌数である10⁸コロニー形成単位/gには達していなかった。一方、-1℃熟成処理のイノシン酸濃度は、4℃熟成処理と比較して、緩やかな減少がみられた。腐敗の指標の1つである一般生菌数が同等であった4℃熟成処理14日および-1℃熟成処理42日について遊離アミノ酸濃度の測定および官能評価を実施した。その結果、豚ロース肉の-1℃熟成処理42日は、4℃熟成処理14日と比較して、うま味に関わるグルタミン酸濃度の有意な上昇と嗜好型官能評価において総合的に好ましいと評価された。これらの結果より豚ロース肉の-1℃熟成処理は、4℃熟成処理よりも、一般生菌数の増殖抑制と食味性を向上させることで付加価値の向上に寄与できると考えられる。

Summary

To evaluate the effects of long-term meat aging at superchilling, the total bacterial count, concentration of taste components, and palatability of pork loin were compared for samples aged at 4 °C and -1 °C. At 7, 14, and 21 days of aging, the total bacterial count of pork aged at -1 °C had significantly decreased compared to that of the sample aged at 4 °C. Even after aging pork at -1 °C for 42 days, the total bacterial count did not reach 10⁸ colony forming unit/g, which is generally considered to be the spoilage of meat. The concentration of inosinic acid in the pork loin aged at -1 °C was decreased more slowly than that of the sample aged at 4 °C. Free amino acid analysis and sensory evaluation were performed on the samples aged at 4 °C for 14 days and at -1 °C for 42 days, in which the total bacterial count was almost equivalent. Further, the glutamic acid concentration and overall palatability of pork loin samples aged at -1 °C for 42 days were significantly increased as compared to those of samples aged at 4 °C for 14 days. From these results, it was concluded that aging at -1 °C increased the added value of pork by suppressing the growth of bacteria and improving its palatability over that achieved from samples aged at 4 °C.

Keywords: superchilling (“Hyo-On”), aging, total bacterial count, taste, pork.

緒言

肉類の加工プロセスにおいて、熟成処理は食味の観点より非常に重要な工程である。通常、肉類の熟成処理はチルド (0°C~4°C) で行い、うま味に関わる遊離アミノ酸およびペプチドを増やし、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°Cから食品が凍り始める温度(氷結点)までの未凍結温度帯である氷温を利用した肉類の熟成処理が注目を集めている¹⁾。肉類の氷温での熟成(氷温熟成)処理は、チルドでの熟成(チルド熟成)処理には見られない成分変化を示すことが報告されている²⁻⁵⁾。牛肉において、108日間という長期間の氷温熟成処理をおこなっても、一般生菌数や過酸化物質といった衛生指標に異常が見られないことが報告されている²⁾。これまでに我々は、氷温熟成処理した豚ロース肉皮下脂肪の脂肪融点が最大 4.0°C低下する現象を報告している³⁻⁵⁾。さらに豚ロース肉の氷温熟成処理は、従来のチルド熟成処理より長期間熟成処理を行なえ、呈味成分である総遊離アミノ酸濃度が増大することを報告している⁵⁾。これは氷温が豚ロース肉熟成中の遊離アミノ酸生成に関わる酵素の活性を抑制する以上に、一般生菌数の増殖を抑制したために起きた現象と考えている。しかし、氷温を利用した長期間の熟成処理による豚ロース肉の一般生菌数、イノシン酸および遊離アミノ酸濃度の変化は明らかになっていない。これまでに著者らは、豚ロース肉胸最長筋の氷結点は-1.1°Cであり、氷温域は0°C~-1.1°Cであることを報告している⁶⁾。そのため本研究では、従来法および氷温での熟成処理温度である 4°Cおよび-1°Cで豚ロース肉を長期間熟成処理し、その期間の一般生菌数およびイノシン酸濃度の変化を評価した。さらに、腐敗の指標である一般生菌数が同等であった 4°C熟成処理 14 日および-1°C熟成処理 42 日の豚ロース肉について、遊離アミノ酸濃度の測定および官能評価を行った。

実験方法

(1) 熟成処理および調査方法

試料はランドレースおよび大ヨークシャー系(母豚)×デュロック(雄豚)の三元交配した種(商

品名:神戸ポーク)のロースブロック肉を山晃食品株式会社(神戸)より購入した。一頭の豚から得たロースブロック肉 2 本をそれぞれ 1 本ずつ 4°C熟成および-1°C熟成処理用とした。豚ロースブロック肉を厚さ 1 cm にカットし、真空包装した(BH-951P、パナソニック株式会社、門真)。これらを 4°Cおよび-1°Cに設定したインキュベーター(MIR-154-PJ、PHC ホールディングス株式会社、東京)内で熟成処理を開始した。4°C熟成処理は 0、7、14 および 21 日後、-1°C熟成処理は 0、7、14、21、28、35 および 42 日後、豚ロース肉を回収した。次に胸最長筋を切り出し、一般生菌数およびイノシン酸分析に供した。一方、4°C熟成処理 14 日および-1°C熟成処理 42 日の試料は、これらの分析に加えて遊離アミノ酸濃度の測定および官能評価を行った。なお、官能評価に用いる豚ロース肉は、分析まで-35°Cで保管した。本実験で使用した豚ロースブロック肉は、試験を開始した時点だと畜後 7 日であった。

(2) 一般生菌数

豚胸最長筋を切り出し、滅菌生理食塩水と共にストマッカー(MiniMix、Interscience、France)で乳状化し、これを試料原液とした。クリーンベンチ内で試料原液を滅菌生理食塩水で希釈を行い、希釈した試料原液をそれぞれ滅菌シャーレに加えた。そこにオートクレーブ後 50°Cで保温していた標準寒天培地(日水製薬株式会社、東京)を加え、静かに回転して混合した後、冷却凝固させた。培地が完全に凝固したシャーレを倒置して、好気および嫌気条件で培養を行った。嫌気条件は嫌気培養キット(アネロパック、三菱ガス化学株式会社、東京)を用いた。培養は 37°Cに設定したインキュベーター(MIR-154-PJ)内で 48 時間行った。その後、シャーレ内の発育コロニー数を計測し、好気および嫌気条件それぞれの一般生菌数を求めた⁷⁾。

(3) イノシン酸

豚胸最長筋を 10%過塩素酸溶液でホモジナイズし、遠心分離をおこなった。上清を炭酸カリウム溶液で中和し、ろ過(No. 1、ADVANTEC、東京)し

た。次に既報⁸⁾に従い、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いてイノシン酸 (IMP) 濃度の分析をおこなった。

(4) 遊離アミノ酸

遊離アミノ酸分析は、(3) で得られた抽出液を用いて既報⁹⁾に従い HPLC を用いて分析をおこなった。

(5) 官能評価

4℃熟成処理 14 日および-1℃熟成処理 42 日の豚ロース肉について、嗜好型官能評価を行った。パネルは、大学生 (22-24 歳) 24 名 (男 12 人、女 12 人) とした。冷凍保管していた豚ロース肉を、-1℃で一晩かけて解凍した。解凍した各試験品のロース芯と芯上の脂肪を合わせて切り出した。220℃に加熱したホットプレートで表面 60 秒、裏面 90 秒間加熱した。加熱後ただちに試料を提供した。2 点嗜好試験法では総合評価の好ましさを評価した。

(6) 統計解析

得られた実験データは、平均±標準誤差で示した。一般生菌数および IMP 濃度は、Student's *t*-test を用いて差を検出した。一般生菌数の増殖速度は、線形回帰分析を行った。遊離アミノ酸濃度は、一元配置分散分析を用いて検定し、各試験区の差について Tukey's multiple comparison test で検出した。官能評価は、2 項検定により有意差を検定した。なお、*p* 値が 0.05 以下を有意差ありとした。これらの統計解析は、GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., USA) および Microsoft Excel for Mac 2011 を用いて行った。

結果および考察

(1) 一般生菌数

Fig. 1 に豚ロース肉の熟成処理期間中の好気および嫌気条件で培養した場合の一般生菌数の変化を示した。熟成処理期間が長くなるにつれて、好気および嫌気条件ともに一般生菌数の増大がみられた。

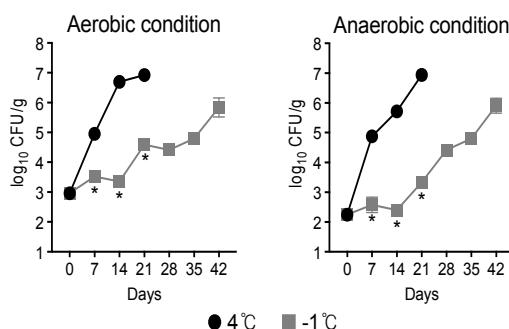


Fig. 1 Changes in the total bacterial count under aerobic and anaerobic conditions of pork meat during aging at 4°C and -1°C

Each value represents the mean ± SEM (n=4). * *p* < 0.05
CFU: colony-forming units.

4℃熟成処理は-1℃熟成処理と比較して、熟成処理 7、14 および 21 日は好気および嫌気条件ともに一般生菌数の有意な増大がみられた。一方、食品中の微生物が増殖を始めると、初期は緩やかな増加であるが、次第にその速度は増していき、世代時間が一定となり、対数的に増殖する¹⁰⁾。Fig. 1 に示したように一般生菌数を片対数グラフにプロットすると、好気および嫌気条件のどちらにおいても、4℃および-1℃熟成処理ともに直線的な増殖が確認できた (すべて *p* < 0.05)。この 4℃および-1℃熟成処理の回帰係数を熟成処理に伴う 1 日当たりの一般生菌数の増殖速度とすると、一般生菌数の増殖速度は、好気条件でそれぞれ 0.194 と 0.062 (log₁₀ colony forming unit (CFU)/g·day)、嫌気条件でそれぞれ 0.213 と 0.088 (log₁₀ CFU/g·day) あった。これまでに、0、5、10 および 20℃で貯蔵した食肉表面の微生物叢の増殖速度は、温度が 5℃低下すると半減し、温度が 10℃低下すると 1/4 になることが報告されている¹¹⁾。-1℃熟成処理は 4℃熟成処理と比べ熟成処理温度が 5℃の差があるが、-1℃熟成処理は 4℃熟成処理と比べ好気および嫌気条件の一般生菌数の増殖速度をそれぞれ 68.0% と 58.9%抑制する結果であった。この結果は、これまでの報告¹¹⁾よりも微生物叢の増殖速度を強く抑制することが示された。冷蔵における一般生菌数

の増殖は、主に低温細菌が関与している。この低温細菌も低温になればなるほど増殖は緩慢になり、特に $-1^{\circ}\text{C}\sim-3^{\circ}\text{C}$ では、増殖速度が著しく低下することが報告されている¹²⁾。 -1°C 熟成処理は 0°C よりも低い温度を利用しており、肉表面に存在している微生物叢の増殖を強く抑制したため、これまでの報告¹¹⁾よりも一般生菌数の増殖速度の抑制が強く見られたと考えられる。

(2) イノシン酸

Fig. 2 に豚ロース肉の熟成処理期間中の IMP 濃度の変化を示した。熟成処理期間が長くなるにつれて、 4°C および -1°C 熟成処理ともに IMP 濃度の減少がみられた。また、 4°C 熟成処理は -1°C 熟成処理と比較して、熟成処理 7、14 および 21 日において IMP 濃度の有意な減少がみられた。IMP は、と畜後にアデノシン三リン酸 (ATP) が分解して生成される。まず、ATP がエネルギーを放出してアデノシン二リン酸 (ADP) となり、次に ADP 分子にミオキナーゼがはたらき 1 分子の ATP が再生されて 1 分子のアデノシン一リン酸 (AMP) が生じる。そして、AMP が AMP デアミナーゼのはたらきを受けて IMP となり、この IMP は 5'-ヌクレオチダーゼのはたらきでイノシンとなる。そして、イノシン (HxR) は最終的にヒポキサンチン (Hx) に変換される。IMP に作用する 5'-ヌクレオチダーゼの作用が、AMP デアミナーゼの作用よりもかなり弱いため、IMP が蓄積し、うま味に寄与している。IMP 濃度の減少は、と畜直後の総 ATP 濃度や 5'-ヌクレオチダーゼをはじめとする分解酵素の活性、さらに温度および pH によっても変化することが報告されている^{13,14)}。また山中らは、各種食肉を 5°C 、 0°C および -1°C で貯蔵したときの ATP 関連物質含量の推移を求め、特に -1°C での貯蔵は IMP 分解速度が低くなることを報告している¹⁵⁾。さらに福岡らは、マアジの粗酵素液を用いて各温度における 5'-ヌクレオチダーゼ活性を評価し、氷温でもっとも活性が低値を示すことを報告している¹⁶⁾。本研究においても、 -1°C 熟成処理は 4°C 熟成処理よりも 5'-ヌクレオチダーゼの至適温度か

ら離れており、この活性は低いと考えられる。そのため、豚ロース肉の -1°C 熟成処理は IMP 分解が緩やかであったと考えられる。

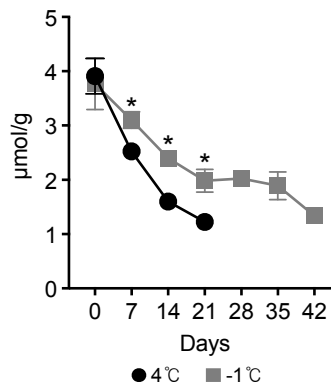


Fig. 2 Changes in the inosine monophosphate concentration of pork meat during aging at 4°C and -1°C

Each value represents the mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$

(3) 遊離アミノ酸および官能評価

食品の腐敗には微生物の作用が大きく関与する。そのため、食肉の期限表示のための試験方法の 1 つとして、一般生菌数の測定が行われている¹⁷⁾。このガイドラインにおいて、一般生菌数が 10^8 CFU/g 以上の場合は異常と判断すると示されている¹⁷⁾。本研究ではウェットエイジングを行っているため、嫌気条件での一般生菌数が腐敗の指標とするに望ましいと考えられる。嫌気条件での一般生菌数において、 4°C 熟成処理 14 日および -1°C 熟成処理 42 日でそれぞれ 5.72 ± 0.06 および 5.91 ± 0.26 (\log_{10} CFU/g) であり、これらはほぼ同程度の腐敗状況であると判断できる。そのため、腐敗状況が同程度であるこれらの検体について、遊離アミノ酸濃度の測定および嗜好型官能評価を実施した。

Table 1 に豚ロース肉の熟成処理前、 4°C 熟成処理 14 日および -1°C 熟成処理 42 日の遊離アミノ酸濃度を示した。

Table 1. Amino acid and total amino acid contents of pork meat prepared by aging at 4 °C for 14 days and -1 °C for 42 days

	Before aging	Aging at 4 °C for 14 days	Aging at -1 °C for 42 days
	mg/100g		
Asp	3.0 ± 0.8 ^a	5.5 ± 0.3 ^b	6.9 ± 0.4 ^b
Thr	15.9 ± 1.1 ^a	32.3 ± 2.0 ^b	37.3 ± 1.2 ^b
Ser	6.8 ± 0.4 ^a	16.3 ± 0.6 ^b	22.9 ± 0.5 ^c
Glu	14.8 ± 0.6 ^a	32.9 ± 1.3 ^b	39.9 ± 0.8 ^c
Pro	4.0 ± 0.2 ^a	6.8 ± 0.2 ^b	8.5 ± 0.3 ^c
Gly	10.1 ± 0.4 ^a	14.0 ± 0.6 ^b	17.4 ± 0.3 ^c
Ala	14.6 ± 0.9 ^a	31.0 ± 3.0 ^b	37.2 ± 3.4 ^b
Val	5.7 ± 0.1 ^a	12.3 ± 0.5 ^b	17.9 ± 0.9 ^c
Met	4.3 ± 0.3 ^a	9.0 ± 0.5 ^b	16.8 ± 0.8 ^c
Ile	4.4 ± 0.2 ^a	9.3 ± 0.4 ^b	14.7 ± 0.5 ^c
Leu	8.1 ± 0.5 ^a	19.3 ± 0.8 ^b	32.6 ± 1.3 ^c
Tyr	5.6 ± 0.4 ^a	12.0 ± 0.7 ^b	14.8 ± 1.7 ^b
Phe	4.8 ± 0.3 ^a	11.3 ± 0.7 ^b	18.0 ± 1.2 ^c
Lys	7.1 ± 0.3 ^a	13.1 ± 0.4 ^b	17.3 ± 0.5 ^c
Arg	13.2 ± 0.4 ^a	16.9 ± 0.6 ^{ab}	20.8 ± 2.3 ^b
Total amino acids*	122.3 ± 3.5 ^a	241.9 ± 10.5 ^b	323.1 ± 10.1 ^c

Each value represents the mean ± SEM (n = 4).

Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different at $p < 0.05$, using Tukey's multiple comparison test.

* Total amino acids = Asp + Thr + Ser + Glu + Pro + Gly + Ala + Val + Met + Ile + Leu + Tyr + Phe + Lys + Arg.

熟成処理前と比較して、4°Cおよび-1°C熟成処理ともに遊離アミノ酸および総遊離アミノ酸濃度の有意な上昇がみられた。一方、遊離アルギニン濃度は熟成処理前と比較して、-1°C熟成処理42日でのみ有意な上昇がみられた。これは熟成処理中に働くエンドペプチダーゼおよびアミノペプチダーゼの作用によって遊離アミノ酸が生成したためである。4°C熟成処理14日および-1°C熟成処理42日を比べると、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、バリン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、リジンおよび総遊離アミノ酸濃度の有意な増加がみられた。肉類の熟成過程中的アミノ酸生成にはアミノペプチダーゼCおよびHの関与が大きいことが報告されている¹⁸⁾。そのため、豚ロース肉の-1°C熟成処理は4°C熟成処理と比較して、腐敗に関わる一般生菌数および低温細菌数の増殖を強く抑制するが、遊離アミノ酸生成に関与するアミノペプチダーゼCおよびH活性をあまり抑制しないと考えられる。今後、4°Cおよび-1°Cでの豚肉のアミノペプチダーゼCおよびH

活性の違いについて明らかにする必要がある。一方、うま味成分であるグルタミン酸はIMPと相乗効果を示すため、これらのバランスは重要であり、グルタミン酸およびIMP濃度から肉中のうまみ強度を計算することができる¹⁹⁾。4°C熟成処理14日および-1°C熟成処理42日のうま味強度はそれぞれ64.6±6.2および68.6±3.8であり、統計的な有意差はみられなかった。

Table 2に豚ロース肉の4°C熟成処理14日および-1°C熟成処理42日の嗜好型官能評価の結果を示した。

Table 2. Paired preference test on pork meat prepared by aging at 4°C for 14 days and -1°C for 42 days

	Aging at 4 °C for 14 days	Aging at -1 °C for 42 days
Overall judgement	7	17*

n = 24

*Significantly different from 4 °C aging for 14 days ($p < 0.05$)

-1°C熟成処理42日は、4°C熟成処理14日と比較して、有意に総合評価が好ましいと評価された。本研究では、官能評価に熟練したパネルを揃えることが困難であったため、総合評価の好ましさのみを嗜好型官能評価で検討した。そのため、どの要因によって-1°C熟成処理が好ましいと判断されたかは明らかではない。今後、官能評価に熟練したパネルを揃えて分析型官能評価を実施し、-1°C熟成処理の特性を明らかにしていく必要がある。

以上のように、氷温を利用した-1°C熟成処理は、従来法である4°C熟成処理と比較し、一般生菌数の増殖とIMPの分解を抑制することが観察された。また、腐敗の指標の1つである一般生菌数(嫌気条件)が同等であった4°C熟成処理14日および-1°C熟成処理42日について遊離アミノ酸濃度の測定および嗜好型官能評価を実施した。その結果、-1°C熟成処理42日は4°C熟成処理14日と比較して、うま味に関わるグルタミン酸濃度の有意な上昇と官能評価において総合的に好ましいことが示された。以上のことより、豚ロース肉の-1°C熟成処理は、4°C熟成処理よりも、一般生菌数の増殖抑制

および食味性を向上させることで豚肉の付加価値の向上に寄与できることが示唆された。

謝辞

本研究の一部は、2020年度関西大学若手研究者育成経費（個人研究）において、研究課題「熟成処理温度の違いが食肉の呈味成分の生成に関与するアミノペプチダーゼ活性に及ぼす影響」として研究費を受け、その成果を公表するものである。

参考文献

- 1) 西村敏英 (2013) ゼロから理解する 食肉の基本, pp.50-51, 誠文堂新光社, 東京.
- 2) 中村 好徳・福間 康文・金子真・小林良次 (2017) 熟成処理の違いがホルスタイン種去勢雄牛モモ肉の肉質に及ぼす影響, 日暖畜報, 60(1), p. 51-55.
- 3) 細見亮太・福間康文・仲勇樹・中澤知奈美・吉田宗弘・福永健治 (2016) 氷温熟成による豚ロース皮下脂肪部の遊離脂肪酸生成およびトリグリセリド分解の及ぼす影響, 氷温科学, 18, 7-12.
- 4) 細見亮太・吉田宗弘・福永健治 (2016) 氷温域を利用した食品の加工・保存技術, 調理食品と技術, 22(1), 9-18.
- 5) 細見亮太・福間康文・戸田裕子・山本夏徳・大塚錬・吉田宗弘・福永健治 (2015) 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.
- 6) 細見亮太・福間康文・大塚錬・吉田宗弘・福永健治 (2013) 氷温熟成が豚ロース皮下脂肪部の脂質性状に与える影響, 氷温科学, 15, 1-6.
- 7) 公益社団法人日本食品衛生協会 (2015) 食品衛生検査指針 微生物編, pp.150-156, 大和総合印刷株式会社, 東京.
- 8) 福間康文・三島睦夫・山根昭彦 (2011) 氷温処理による生カキの高品質化に関する研究. 氷温科学, 13, 11-17.
- 9) 福間康文・福間香苗・三島睦夫・山根昭彦 (2012) 氷温処理による畜肉類の高品質化に関する研究, 氷温科学, 14, 1-6.
- 10) 小西正朗・堀内淳一 (2015) 続・生物工学基礎講座 バイオよもやま話細胞の増殖を捉える: 計測法から比速度算出まで, 生物工学会誌, 93, 149-152.
- 11) Brown, M. H (1987) 食肉微生物学, pp. 238-239, 建帛社, 東京.
- 12) 食品冷凍技術改訂委員会 (2009) 新版・食品冷凍技術, p. 64, 社団法人日本冷凍空調学会, 東京.
- 13) 富岡和子・遠藤金次 (1984) 各種魚肉の K 値変化速度とイノシン酸分解酵素活性, 日水誌, 50(5), 889-892.
- 14) D.W.marseno, K Hori, K Miyazawa (1993) Purification and properties of membrane-bound 5'-nucleotidase from black rockfish (*Sebastes inermis*) muscle J Agric Food Chem, 41, 863-869.
- 15) 山中英明 (1989) 食肉貯蔵中における ATP 関連化合物および乳酸の消長, 食肉に関する助成研究調査成果報告書, (財)伊藤記念財団編, 9, 222-228.
- 16) 福間康文・綾木義和・三島睦夫・山根昭彦 (2004) 氷温処理による鮮魚(マアジ)の高品質化(第3報), 7, 23-28.
- 17) (一社)日本食肉加工協会 (2006) 期限表示のための試験方法ガイドライン〔食肉(食肉加工品(半製品)を含む。)〕, pp.7-12, 中央畜産会, 東京.
- 18) 松石昌典・西邑隆徳・山本克博 (2015) 肉の機能と科学. pp. 80-82, 朝倉書店, 東京.
- 19) S Yamaguchi, T Yoshikawa, S Ikeda, T Ninomiya (1971) Measurement of the relative taste intensity of some L- α -amino acids and 5'-nucleotides. J. Food. Sci, 36, 846-849.