

伝熱解析に基づく畜肉加熱調理における品質変化の予測

| | |
|--------|---|
| 著者 | 石渡 奈緒美 |
| 学位授与機関 | 東京海洋大学 |
| 学位授与年度 | 2010 |
| URL | http://id.nii.ac.jp/1342/00000931/ |

修士学位論文

伝熱解析に基づく畜肉加熱調理における
品質変化の予測

平成 22 年度
(2011 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
食機能保全科学専攻

石渡 奈緒美

修士学位論文内容要旨
Abstract

| | | | |
|---------------|---------------------------|------------|--------|
| 専攻 Major | 食機能保全科学 | 氏名 Name | 石渡 奈緒美 |
| 論文題目 Title | 伝熱解析に基づく畜肉加熱調理における品質変化の予測 | | |

【背景および目的】

畜肉を食すために行う加熱調理は、テクスチャーや旨味等に大きな影響を与える。加熱調理時の畜肉品質変化に関する研究は数多くあるが、畜肉全体の温度分布を予測したうえでの考察はなされていない。そこで本研究は非定常三次元熱伝導解析による、畜肉全体を対象とした伝熱解析、および品質変化の予測計算を行うことで、食品産業の安全性および品質向上を目指した。

【実験および解析内容】

辻学園調理製菓専門学校（以後、辻学園）にて真空低温調理法（*sous-vide* 調理）に従いローストビーフを調理してもらい、調理工程中の伝熱データ（試料中心・表面温度、環境温度、加熱前後の重量・形状測定）を取得した。さらに、加熱前の形状をもとに有限要素モデル作成ソフト FEMAP で解析モデルを作成し、非定常三次元熱伝導解析を行った。畜肉は加熱に伴い主要構成成分であるタンパク質が加熱変性する。伝熱進行に伴う畜肉タンパク質加熱変性の進行を計算するために必要な反応速度定数およびその温度依存性は、非等温速度解析法である DSC-Dynamic 法により実測した。畜肉の主要旨味成分であるイノシン酸（以後、IMP）は畜肉中に存在する酵素により分解される。そこで等温加熱実験を行った試料に残存する IMP 量を HPLC 法で実測し、分解反応の温度依存性を調べ、IMP 分解反応速度および IMP 分解酵素活性低下速度を推算した。

【結果および考察】

DSC 測定では全ての昇温速度で 55℃、73℃付近の 2 箇所吸熱ピークを観測でき、これらのピークは既存の研究より、前者はミオシン、後者はアクチンの加熱変性由来と確認できた。IMP は加熱処理温度 40℃以上の試料では、IMP 分解酵素の酵素活性低下により、IMP 残存量低下が抑制されると判明した。解析モデル中心部位の伝熱解析結果と辻学園で取得した試料中心における温度履歴を比較したところ、良好に一致した。そこで、伝熱解析結果と品質変化（タンパク質変性、IMP 残存量）の速度パラメーターを組み合わせ、加熱調理中の変化を計算した。タンパク質変性においては、調理終了時ミオシンは全て変性終了しているのに対し、アクチンは試料表面部のみ変性終了することが判明した。また、IMP 残存量においては、表面部の IMP 量は初期量と同等なのに対し、中心部は初期量の約半分であった。

目次

第1章 序論

| | | |
|-------|---|----|
| 1.1 | 研究背景および目的 | 1 |
| 1.2 | 本論文の構成 | 1 |
| 1.3 | 畜肉の成分およびタンパク質 | 2 |
| 1.4 | 畜肉タンパク質の加熱処理による変化 | |
| 1.4.1 | 色調の変化 | 6 |
| 1.4.2 | 重量, 体積変化および硬化 | 7 |
| 1.5 | <i>sous-vide</i> 調理 (真空低温調理) によるローストビーフ調理実験 | |
| 1.5.1 | はじめに | 8 |
| 1.5.2 | 辻学園調理専門学校での調理実験 | 10 |
| 1.5.3 | 研究室での調理実験 | 14 |
| 1.6 | 第1章の引用文献 | 16 |

第2章 タンパク質加熱変性速度論

| | | |
|-------|------------------------|----|
| 2.1 | はじめに | 18 |
| 2.2 | DSC 測定によるタンパク質変性温度帯の特定 | |
| 2.2.1 | 試料の調製と測定方法 | 18 |
| 2.2.2 | 結果および考察 | 18 |
| 2.3 | タンパク質加熱変性速度定数の解析 | 21 |
| 2.4 | 第2章の引用文献 | 26 |

第3章 イノシン酸 (IMP) 分解反応速度論

| | | |
|-------|--------------------------------|----|
| 3.1 | はじめに | 27 |
| 3.2 | 畜肉中のイノシン酸 (IMP) 量に及ぼす加熱処理温度の影響 | |
| 3.2.1 | HPLC 法によるイノシン酸 (IMP) の定量 | 28 |
| 3.2.2 | 結果および考察 | 30 |
| 3.3 | イノシン酸 (IMP) 分解反応速度論 | |
| 3.3.1 | 酵素活性一定温度帯における IMP 分解反応速度論 | 32 |
| 3.3.2 | 酵素活性低下温度帯における IMP 分解反応速度論 | 35 |
| 3.4 | 第3章のまとめ | 39 |
| 3.5 | 第3章の引用文献 | 40 |
| 追補 | 加熱処理時のグルタミン酸残存量変化 | 41 |

| | | |
|------------|--|----|
| 第4章 | 伝熱解析に基づく畜肉品質変化の予測 | |
| 4.1 | はじめに | 46 |
| 4.2 | 三次元熱伝導解析 | |
| 4.2.1 | 三次元熱伝導解析および有限要素解析 | 46 |
| 4.2.2 | 解析モデル | 48 |
| 4.2.3 | 結果および考察 | 50 |
| 4.3 | <i>sous-vide</i> 調理過程におけるタンパク質変性率分布 | 52 |
| 4.4 | <i>sous-vide</i> 調理過程におけるイノシン酸 (IMP) 残存率分布 | |
| 4.4.1 | 解析結果 | 55 |
| 4.4.2 | 実験値と解析値の比較 | 58 |
| 4.5 | タンパク質加熱変性が及ぼす弾性率への影響 | |
| 4.5.1 | 応力緩和測定原理 | 61 |
| 4.5.2 | 試料の調製と測定方法 | 63 |
| 4.5.3 | 結果および考察 | 63 |
| 4.6 | タンパク質加熱変性が及ぼす重量変化率への影響 | |
| 4.6.1 | 畜肉の保水力 (重量変化率) 測定 | 65 |
| 4.6.2 | 試料の調製と測定方法 | 65 |
| 4.6.3 | 結果および考察 | 65 |
| 4.7 | 第4章のまとめ | 69 |
| 4.8 | 第4章の引用文献 | 70 |
| 追補 | 三次元モデル (1.5×2.0×2.0 cm) における温度および変性分布の予測計算 | 71 |
| 追補 | 容器詰め食品を想定した伝熱解析 | 76 |
| | | |
| 第5章 | MRI 法による畜肉内部の水分測定 | |
| 5.1 | はじめに | 80 |
| 5.2 | MRI 測定原理 | 80 |
| 5.3 | 一次元モデルにおける ¹ H NMR 画像の測定 | |
| 5.3.1 | T ₂ からタンパク質変性率への変換および MRI 測定条件 | 83 |
| 5.3.2 | 試料の調製 | 85 |
| 5.3.3 | 結果および考察 | 85 |
| 5.4 | 三次元モデルにおける ¹ H NMR 画像の測定 | |
| 5.4.1 | MRI 測定条件 | 88 |
| 5.4.2 | 試料の調製 | 88 |
| 5.4.3 | 結果および考察 | 89 |
| 5.5 | 第5章のまとめ | 94 |

| | | |
|-------------------------------------|--|-----|
| 5.6 | 第5章の引用文献 | 95 |
| 第6章 <i>sous-vide</i>調理と微生物危害 | | |
| 6.1 | はじめに | 96 |
| 6.2 | <i>sous-vide</i> 調理過程における微生物減少数と殺菌値 | |
| 6.2.1 | はじめに | 97 |
| 6.2.2 | <i>sous-vide</i> 調理過程における微生物減少数解析 | |
| 6.2.2.1 | 解析方法 | 97 |
| 6.2.2.2 | 結果および考察 | 98 |
| 6.2.3 | <i>sous-vide</i> 調理過程における殺菌値解析 | |
| 6.2.3.1 | 解析方法 | 101 |
| 6.2.3.2 | 結果および考察 | 101 |
| 6.3 | 貯蔵中における微生物増殖数解析 | |
| 6.3.1 | はじめに | 103 |
| 6.3.2 | 解析方法 | 103 |
| 6.3.3 | 結果および考察 | 104 |
| 6.4 | <i>Listeria monocytogenes</i> と他の病原性菌の低温貯蔵中の増殖速度比較 | 106 |
| 6.5 | 第6章のまとめ | 108 |
| 6.6 | 第6章の引用文献 | 109 |
| 第7章 総括 | | |
| | | 111 |
| 謝辞 | | |
| | | 114 |

第1章 序論

1.1 研究背景および目的

畜肉を加熱処理し食べることは、長い歴史において世界中で行われてきた。加熱処理は、畜肉を食べやすく、消化しやすくすると同時に、畜肉内に常在する微生物に対する殺菌効果、すなわち安全性をもたらす¹⁾。また、畜肉を加熱処理することで、色、重量およびテクスチャーといった様々な変化が生じるが、これらの変化は畜肉を構成するタンパク質の物理的変化である熱変性が最も関与していると言われている²⁾。つまり、タンパク質の熱変性は様々な畜肉の品質にも影響を与えるため、過度な加熱処理（オーバークッキング）は、食品そのものの美味しさを半減させる危険性がある。そのため、最適な畜肉加熱処理条件を探索すべく、多くの研究者により加熱処理がもたらす畜肉品質への影響について考察されており、Klettnerらは、畜肉を加熱した際の重量損失と pH は相関が高く、pH が高いほど重量損失が低いことを明らかにした³⁾。また Astruc らは、加熱処理条件の違いと牛肉の筋原線維の構造変化との相関を確認している⁴⁾。ところで現在、畜肉を対象とした実験は、畜肉を構成するタンパク質の分子レベルにて考察する微視的（マイクロ）な視点、加熱処理する大きさのまま考察する巨視的（マクロ）な視点の2種類に分けられる。それぞれ利点を有するが、実際の調理に則した現象を考察するには、巨視的視点での実験が有効である。しかし既存の研究では、畜肉を加熱処理した際に生じる温度分布やそれに伴い生じる品質分布まで考慮されていないのが現状である。そこで本研究は、より具体的な畜肉加熱調理時の変化を考察すべく、非定常三次元熱伝導解析を行い、さらに伝熱進行に伴う畜肉全体を対象とした品質変化の予測を行うことで、食品産業における畜肉加工品の品質向上を目指した。

1.2 本論文の構成

本論文は以下の7章により、構成される。

第1章では、本研究を行う背景および目的を明示すると同時に、畜肉品質変化に最も関与し、かつ畜肉を構成する主成分であるタンパク質について述べた。また、本研究の解析対象として採用した真空低温調理法（*sous-vide* 調理）の説明と、辻学園調理製菓専門学校（以後、辻学園）で行った *sous-vide* 法によるローストビーフ調理手法および調理工程中の伝熱データについて述べた。また、研究室で行ったローストビーフ調理実験結果について述べた。

第2章では、畜肉タンパク質加熱変性の進行を計算するために必要となる変性速度定数の温度依存性を示差走査分析法（Differential Scanning Calorimetry : DSC）により実測した結果を述べた。

第3章では、畜肉の主要な旨味成分であるイノシン酸（以後、IMP）に着目した。IMP

は畜肉中に存在する酵素により分解されることから、等温加熱実験を行った試料に残存する IMP 量を HPLC 法 (High Performance Liquid : HPLC) により実測し、IMP 分解反応の温度依存性を調べた。また、この実験結果をもとに推算した IMP 分解反応速度と IMP 分解酵素の酵素活性低下反応速度について述べた。

第 4 章では、*sous-vide* 法によるローストビーフ調理を例として、加熱調理の進行に伴って食材内部に形成される温度分布変化の予測を行うため、非定常三次元伝熱方程式を基本とした伝熱解析を行った。さらに、得られた解析値と第 2 章および第 3 章で算出した速度パラメーターを組み合わせ算出した *sous-vide* 調理過程におけるタンパク質変性および IMP 残存量の予測計算結果について述べた。また、タンパク質加熱変性が及ぼす品質への影響を検証するため、予測計算をもとにタンパク質変性率が判明している畜肉試料の弾性率および重量変化率測定結果について述べた。

第 5 章では、第 4 章で述べたタンパク質変性率の妥当性を検証するため、MRI 法 (Magnetic Resonance Imaging : MRI) を用い、畜肉タンパク質が保持している水の ^1H 画像の測定結果より横緩和時間 T_2 を算出し、さらにタンパク質変性率と T_2 の相関を検証した。また、温度分布および変性分布が生じるようなブロック状試料を MRI 測定し、 T_2 より算出した変性率と予測計算より算出した変性率の比較結果について述べた。

第 6 章では、*sous-vide* 調理で危惧されている微生物問題に着目し、*Escherichia coli* O-157:H7 を対象とした加熱調理時の微生物減少数、殺菌値および *Listeria monocytogenes* を対象とした貯蔵時における微生物増殖数の予測計算について述べた。

第 7 章では、本研究の研究結果を総括したものを示した。

1.3 畜肉の成分およびタンパク質

畜肉の化学的 성분は、家畜の種類、年齢、性別、筋肉部位によって異なるが、70%が水分、18%がタンパク質、3.5%が可溶性非タンパク質、3%が脂肪とされる^{5) 6)}。また、三大栄養素のひとつである炭水化物含量は低い、カルシウム、リンなど多くのミネラルやビタミン類を有していることから、きわめて栄養価の高い食品である。さらには、畜肉は動物体組織そのものであるため、構成成分はヒトにとって有害な物質はないため、安全性に富む食品ともいえる。肉類 100 g 中に含まれる栄養素について、Table 1-1 に示した。

Table 1-1 肉類 100g あたりに含まれる栄養素 (g) ⁶⁾

| 食品名 | 水分 | タンパク質 | 脂質 | 炭水化物 | 灰分 |
|------------------|------|-------|------|------|-----|
| 和牛モモ (皮下脂肪なし, 生) | 64.4 | 19.8 | 14.2 | 0.6 | 1.0 |
| 豚ロース (皮下脂肪なし, 生) | 65.7 | 21.1 | 11.9 | 0.3 | 1.0 |
| 若鶏モモ肉 (皮なし, 生) * | 76.3 | 18.8 | 3.9 | 0 | 1.0 |

*脂肪はほとんどが皮下脂肪として存在し、肉の部分には少ない。

(科学技術庁資源調査会編：五訂日本食品標準成分表)

畜肉は多種多様なタンパク質で構成されているが、存在様式に基づいて筋線維タンパク質と結合組織タンパク質に大別される。筋線維タンパク質はさらに、解糖系の酵素群やミオグロビンなど細胞液に溶在する筋漿タンパク質、ミトコンドリアや筋小胞体などの細胞小器官を構成するタンパク質、および筋肉の構造と機能を兼ね備えた筋原線維タンパク質に分類される⁷⁾⁹⁾。

各タンパク質画分と、食肉の品質を決定する五大要因との関係を Table 1-2 に示した。これより、畜肉の軟らかさに直接的に関与するのは、物理的衝撃に対して比較的堅固な構造を組んでいる筋原線維タンパク質と結合組織タンパク質であり、両者の状態によって畜肉の物性が決定される。

Table 1-2 タンパク質の存在様式と肉質の関係 ⁶⁾

| 存在様式 | 含量 (%) | 代表的タンパク質の名称 | 肉質との関係 |
|-----------------|--------|-------------|-----------|
| 筋線維タンパク質 | 30 | ミオグロビン | 色調 |
| 筋漿タンパク質 | | | |
| 細胞小器官を構成するタンパク質 | | | |
| 筋原線維タンパク質 | 60 | ミオシン, アクチン | 軟らかさ, 多汁性 |
| 結合組織タンパク質 | 5 | コラーゲン | 軟らかさ |

畜肉の色調は、色素タンパク質ミオグロビンの状態で決定し、加熱処理時にどれほど多くの水を内部に保持可能かを意味する保水性（多汁性）は、筋原線維タンパク質であるミオシンとアクチンに依存する。また、畜肉タンパク質は全て無味・無臭であるため、味と香りは細胞液中に存在するアミノ酸やペプチド、ヌクレオチド、あるいは揮発性成分などのタンパク質以外の微量成分および脂肪の性状に依存する。

筋原線維タンパク質の微細構造は、Fig. 1-1 であらわされる。光学顕微鏡で観察を行うと、直径 1 μm で長い糸状の構造の中に、明暗の縞が交互に規則正しく連続した横紋が確認される。このうち、顕微鏡下で明るく見える部分は I 帯、暗く見える部分は A 帯であり、A 帯の中央には H 帯と呼ばれるやや明るい部分が存在する。I 帯の中央にある Z 線から次の Z 線までが筋原線維の構造単位である^{6) 8)}。

筋原線維タンパク質の約 55% を占めるミオシンは、太いフィラメントを構成するタンパク質である。ミオシン分子は、洋梨型の 2 つの頭部と棒状の尾部で構成される、分子量が約 45 万の線織状タンパク質である。ミオシンは筋肉の収縮と密接に関与するタンパク質であり、①核酸関連物質である ATP を ADP と無機リン酸に加水分解する ATP 分解酵素、②アクチンと結合し、アクトミオシンとよばれる複合体を形成する、③生理的塩濃度において、約 400 分子が集合して太いフィラメントを形成する、3 つの生物学的機能を持つ。これらの機能のうち、①と②はミオシン分子の頭部に、③は尾部に存在する^{6) 8)}。

筋原線維タンパク質のうちミオシンの次に高い割合である 20% を占めるのが、細いフィラメントを構成するアクチンである。アクチン分子は、直径 5.5 nm の球状タンパク質であるが、生理的塩濃度においては多数が集合した二重らせん構造を形成した状態で存在する。アクチンの二重らせん構造間のくぼみに棒状のトロポミオシンが横たわり、その上にトロポニンが一定の間隔で結合している。細いフィラメントに存在するアクチン、トロポミオシン、トロポニンのモル比は 7 : 1 : 1 である⁶⁾。

結合組織タンパク質は、細胞および細胞外に形成された線維と、それらを浸漬している無定形基質で形成される。しかしこの中で、筋肉組織を一定の状態に保持する役割を果たしているのは細胞外に形成された線維である。また、筋内膜、筋周膜および筋状膜などの筋肉組織内に存在する結合組織の線維は、コラーゲン線維である。このコラーゲン線維は多数のコラーゲン分子が規則的集合し形成されており、さらにこのコラーゲン分子は 3 本のポリペプチド鎖が捻じれあった 3 本鎖構造をしている。コラーゲンは組織からの抽出性の違いによって、中世塩可溶性、酸可溶性および不溶性の 3 種類に分けられ、この中でも不溶性コラーゲンの量が畜肉の軟らかさに関与するといわれる。

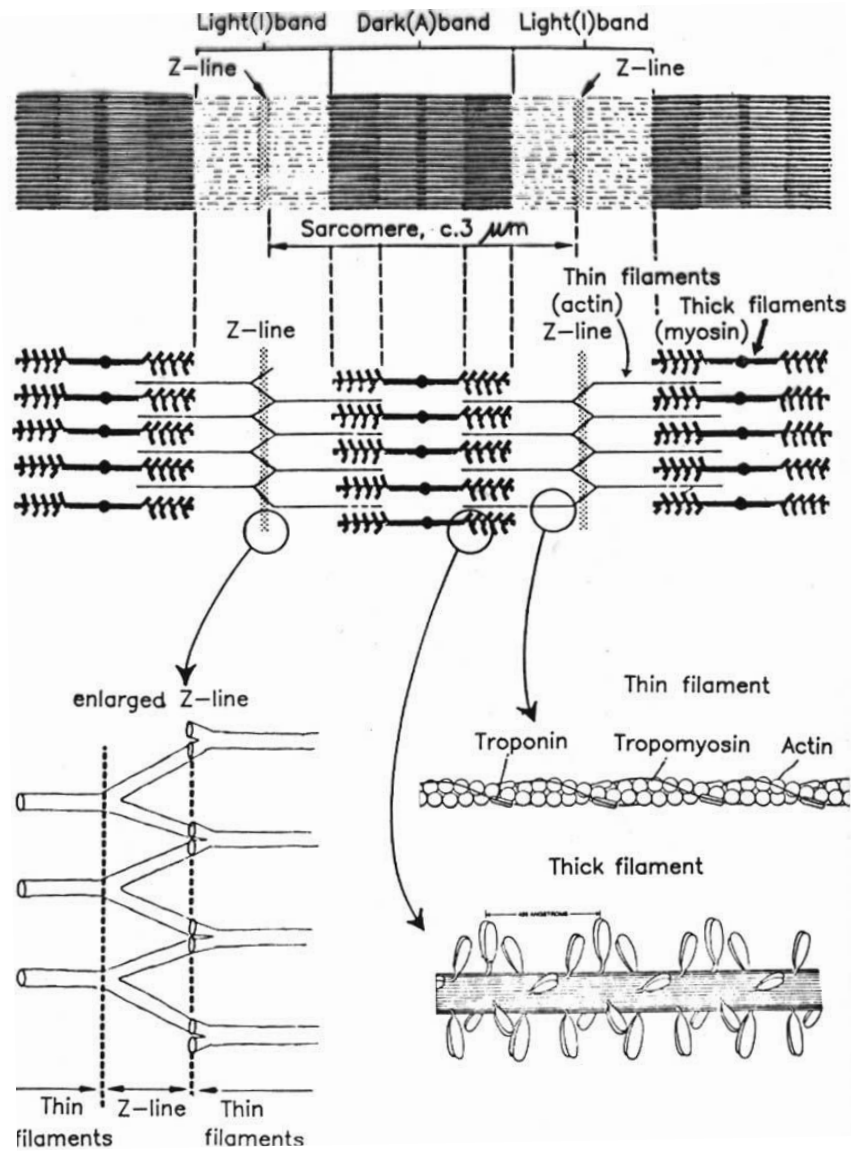


Fig. 1-1 The structural build-up of the sarcomere, the thin and thick filaments⁹⁾

1.4 畜肉タンパク質の加熱処理による変化

畜肉を加熱処理することで生じるタンパク質の熱変性により、色調の変化、筋線維の変化に伴う重量・体積変化および硬化が生じる。以下にその原因となるタンパク質とその機構について述べる¹⁰⁾。

1.4.1 色調の変化^{2) 6) 11)}

畜肉を加熱すると、40℃付近で畜肉のもつ透明感が失われてくる。50℃付近から色調の変化が著しくなり、一度より明るい色になった後、温度上昇に従って褐色から灰色に変化する。この色調は、色素タンパク質であるミオグロビンの状態で決定される。ミオグロビンは鉄原子を含むヘムが、グロビンというタンパク質と結合したものである。ミオグロビンは様々な誘導体を形成し、それぞれ固有の色調を示すが、ヘム中の鉄が還元型 (Fe^{2+}) であるか、酸化型 (Fe^{3+}) であるかにより、誘導体が異なる。ミオグロビンの色の変化について、Fig. 1-2 に示した。還元型 (Fe^{2+}) 場合、還元型ミオグロビン (Mb) は暗赤色を呈し、酸素が結合した酸素化ミオグロビン (MbO_2) は鮮赤色となる。これに対し、酸化型 (Fe^{3+}) はメトミオグロビン (metMb) と呼ばれ、色調は灰褐色となる。畜肉を空气中に放置した際や、加熱処理した際灰褐色に変化するのは、鉄原子が酸化され metMb が形成されることに起因する。また、ミオグロビンの各種誘導体の色調は、Fig. 1-3 に示したように、分光学的な吸収スペクトルから知ることができる。

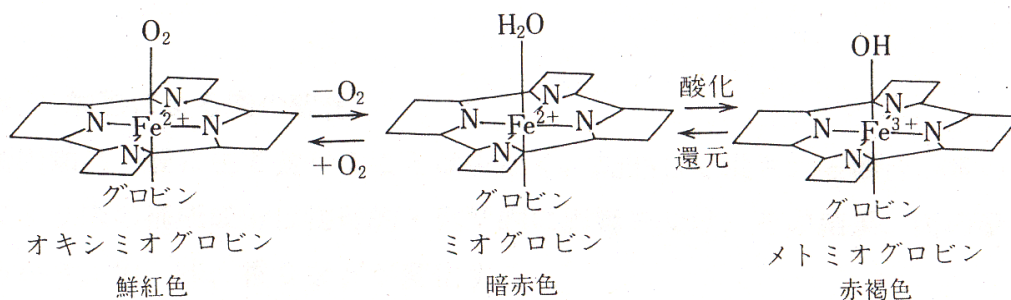


Fig. 1-2 ミオグロビンの色の変化²⁾

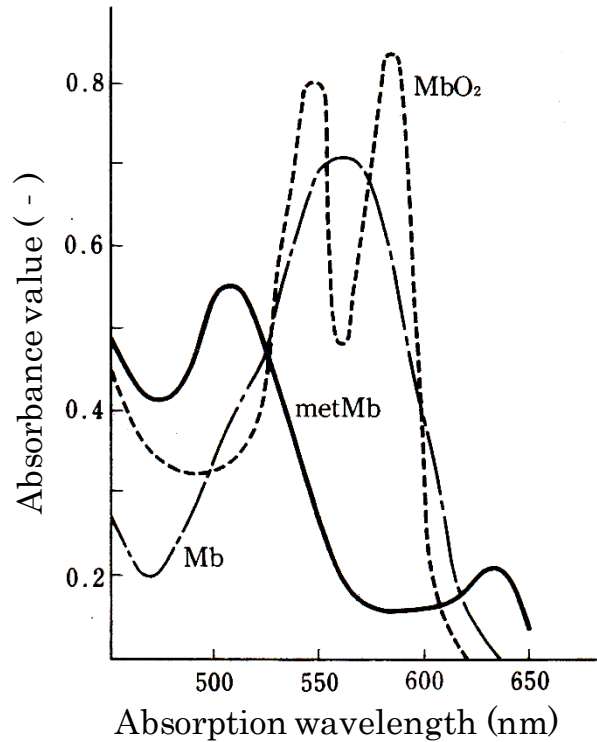


Fig. 1-3 ミオグロビン誘導体の吸光スペクトル⁶⁾

1.4.2 重量, 体積変化および硬化

畜肉タンパク質は多数のアミノ酸がペプチド結合により結合した高分子化合物であり, その分子内にイオン結合, 水素結合および S-S 結合をもち, 複雑な高次構造をとる. このような構造をもつタンパク質を加熱した際, Fig. 1-4 に示したようにまず側鎖が切れて高次構造が切れる. しかしその後さらに加熱を続けると, ペプチド分子間に新たに強固な結合が形成され分子が集合し, その結果凝集・凝固してゲル化する²⁾¹²⁾.

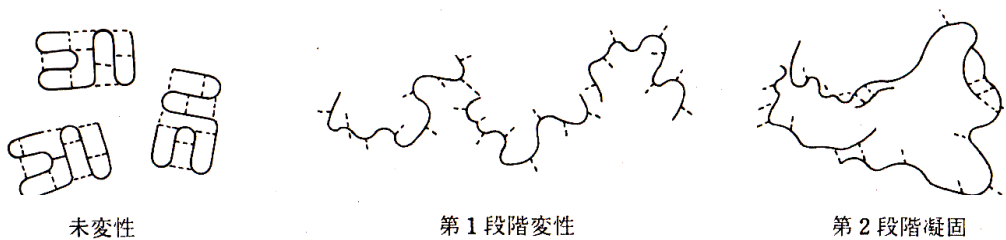


Fig. 1-4 タンパク質の熱凝固の模式図¹²⁾

筋原線維タンパク質の主要成分であるミオシンは 55°C, アクチンは 70~80°C で凝固すると言われており, 筋繊維全体は 65°C 付近から収縮するため, 体積が小さくなる^{13) 14)}. 70°C 以上で加熱処理した場合, ミオシンやアクチン, ミオシンとアクチンが結合して形成

するアクトミオシンの網状構造の間に保持されていた水が収縮により押し出され、保水性の低下をもたらし、その結果、畜肉は初期重量に対して 20～40%の重量減少と硬化が生じる。また、加熱温度が 80℃付近に到達後、筋原線維タンパク質の熱変性は完了するが、結合組織タンパク質の収縮が始まるため、畜肉はさらに硬くなる。しかし、90℃以上で長時間加熱することで、結合組織タンパク質の主であるコラーゲン線維のゼラチン化が生じ、筋繊維がほぐればらばらとなるため、畜肉の軟化が生じる。

1.5 *sous-vide* 調理（真空低温調理）によるローストビーフ調理実験

1.5.1 はじめに

畜肉の加熱調理方法は、従来から頻繁に用いられているゆで加熱やフライパン焼成に加え、IH ヒーター、スチームを利用したオーブンなどの新しい加熱機器の登場により、数多く存在する¹⁵⁾。そのため、加熱調理の予測計算を行うにあたり、対象とする調理法を定め、かつ加熱調理法に即した解析条件を設定する必要がある。そこで本研究では、真空低温調理法（以後、*sous-vide* 調理）を例として、加熱調理過程における畜肉品質変化の予測計算を行う。

1970 年代にフランスのシェフ、ジョルジュ・プラリュによって提案された *sous-vide* 調理は、現在世界中のレストランやホテル、さらにはセントラルキッチンを有する各種施設において多用されている。*sous-vide* 調理とは、「鮮度管理された食材を生のまま、あるいはあらかじめ熱処理した状態で調味料等と共に真空包装し、温度と時間管理を正確に行うことができる加熱機器で袋ごと低温調理する調理法」と定義されている¹⁶⁾。この調理法のポイントは TT 管理（Temperature & Time）である。TT 管理により高品質かつ均質に集中大量調理することが可能となると同時に、食材を真空包装するため、保存中の二次汚染の防止や保存時の利便性および運搬性の向上をもたらした¹⁷⁾。*sous-vide* 調理と従来の調理法（以後、クックサーブ）の比較を Fig. 1-5 に示した。クックサーブは、配膳当日に仕込みから加熱処理まで行い、冷却せずそのまま提供する方法であり、適温で保存した場合においても 2 時間以内に提供する必要がある。これに対し *sous-vide* 調理は、食材にあらかじめ味をつけ、プラスチックフィルムに詰めて真空包装後、食材の適温にて加熱する。加熱終了後は食材を急速冷却後、チルド保存し（3℃以下）、再加熱して提供する調理方法である。また調理後の保存期間は約 7 日とされる。畜肉を食材とする場合、微生物の増殖は懸念材料のひとつであるが、*sous-vide* 調理は微生物が最も繁殖しやすい温度帯である 10～63℃を急速冷却により素早く通過させることで、微生物の繁殖を予防している¹⁶⁾。

sous-vide 調理の対象食材は畜肉や野菜と多岐にわたり、Keller をはじめ、多くのシェフにより様々なレシピが提案されている¹⁸⁾¹⁹⁾。しかし、食材を真空包装機でプラスチックバックの中に密閉後、恒温湯槽やスチームコンベクションオーブンで食材に適した温度下

で加熱を行う基本操作は共通である。また一般的に、畜肉・魚などのタンパク質が主体となるものは 60~80℃の低温度、野菜類など食物繊維が主体となるものは 92~98℃の高温度で加熱処理を行う¹⁶⁾。加熱処理後の食材の特徴として、畜肉の場合、一般的な焼成調理に比べ、肉がジューシーかつ柔らかく仕上がる、重量損失が少なく、閉じた系内で加熱するため、油や水、さらには水溶性成分の溶出が少ないといった利点が挙げられる^{20) 21)}。

また Szarman らにより *sous-vide* 調理の利点が科学的に検証されているように、*sous-vide* 調理は料理人のみならず、調理工学という側面からも非常に興味深い分野でもある²²⁾⁻²⁵⁾。そこでまず、実際のキッチンで行われている *sous-vide* 調理を知るため、辻学園調理製菓専門学校（以後、辻学園）に出向き、シェフに *sous-vide* 法に従ってローストビーフを調理していただいた。この際、調理中の温度履歴、および加熱前後の重量、形状測定を行った結果と、研究室で行った *sous-vide* 法によるローストビーフ調理実験結果について述べる。

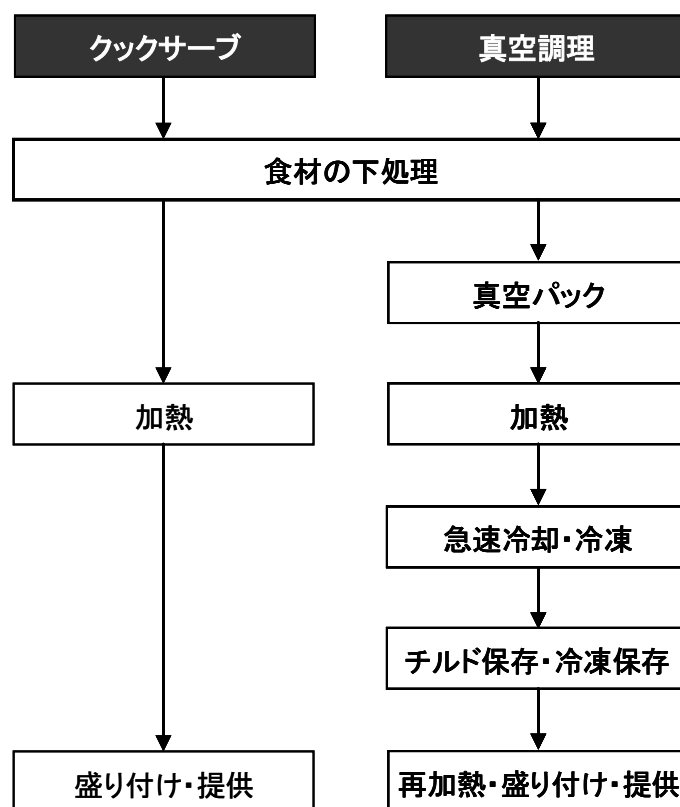


Fig. 1-5 Comparison between cook serve cooking and *sous-vide* cooking¹⁶⁾

1.5.2 辻学園調理専門学校での調理実験

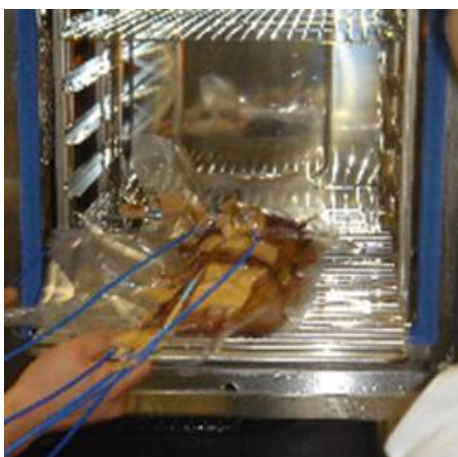
【材料および実験方法】



試料には市販牛ランプ肉（7.10×10.7×5.95 cm, 398 g）を用いた。表面に付着している微生物を殺菌するため、まず試料の各面をフライパンで焼成した。



試料温度が 10℃以下になるまで冷蔵庫で冷却した。冷却終了後、試料をプラスチックフィルムに入れ真空包装機（TOSEI V-380G）で脱気密閉した。この際、試料中心温度および表面温度を測定する熱電対温度計（K 型、φ1mm）を挿入・固定した。



熱電対温度計を挿入・固定した試料を 80℃に設定したスチームコンベクションオーブン（NICNIWA SCOS-RS）で加熱処理した。試料中心温度が 58℃に到達後、直ちに 2℃に設定したチラー（NISHIWA RR-13TS-CN）に投入し、冷却した。冷却工程は中心温度が 3℃になるまで行い、この状態を調理終了とした。

また、調理工程中に以下のデータを取得した。

- ① 中心温度：密閉状態が保たれるよう、試料中心に熱電対温度計（K型，φ1mm）を挿入・固定した。
- ② 表面温度：フィルム表面に熱電対温度計（K型，φ1mm）を固定した。
- ③ 環境温度：オープンおよびチラー内に熱電対温度計（K型，φ1mm）を固定した。
- ④ 重量変化：調理前後の試料重量を電子天秤で測定した。
- ⑤ 形状変化：調理前後の試料の長さ，幅，高さをノギスで測定した。

【結果および考察】

スチームコンベクションオープンによる加熱工程から，チラーによる冷却工程を含めた温度履歴を Fig. 1-6 に示した。加熱開始から 41 分後，中心温度が目標である 58℃に到達した。58℃到達後，直ちにオープンから取り出しチラーに移したが，中心温度はすぐに下がらず 62℃まで上昇し，その後ゆるやかに下降した。中心温度が 3℃に到達するまで，加熱開始から合計約 190 分（冷却開始から約 150 分）要した。また，試料表面温度は加熱とほぼ同時に環境温度である 80℃に到達し，冷却時も同様に冷却開始とほぼ同時に環境温度である 2℃に到達した。次に今回測定に用いた試料の調理前後の重量，形状（長さ，幅，高さ）および変化率を Table 1-3 に示した。また，形状の呼称として畜肉の筋繊維に対して平行方向を長さ（Length），垂直方向を高さ（Height）と定義した。この概略図を Fig. 1-7 に示した。

Table 1-3 Size and weight of meat sample before and after cooking

| | Length (cm) | Width (cm) | Height (cm) | Weight (g) |
|---------------------|-------------|------------|-------------|------------|
| Before cooking | 10.7 | 7.10 | 5.95 | 398 |
| After cooking | 9.00 | 7.15 | 6.10 | 339 |
| Change of ratio (%) | 15.9 | 0.01 | 2.52 | 14.8 |

Table 1-3 より，調理終了時点で長さ方向のみ収縮が確認できたが，幅と高さは変化が確認できなかった。肉の収縮は加熱温度によって異なることが知られており，牛モモ肉の場合，40℃では繊維方向の長さはわずかに短くなるが，容積はほとんど変わらず，60℃以上になると繊維方向の長さの両方に収縮があらわれ，高さは試料の内部温度が十分に上がるまで膨張するといわれている。つまり今回の試料中心最高温度が 62℃であったことが，長さ方向のみ収縮した原因だと考えられる。また重量変化は，通常の調理では重量損失は 20%以上といわれているのに対し，今回行った *sous-vide* 調理では重量損失が 15%程度と低い値になった。Tornberg は，肉の保水性は加熱によって減少することを明らかに

している²⁶⁾。また、Sman は、畜肉の保水性と加熱処理温度の関係を明確にしており、30℃以下ではほとんど変化がないが、40℃以上になると急激に減少し、55℃以上ではさらに減少すると述べている²⁷⁾。すなわち、最も重量損失の減少が大きくなる 55℃以上の温度帯にさらされる時間が通常の調理より短いことが、重量損失の抑制につながったと考えられる。

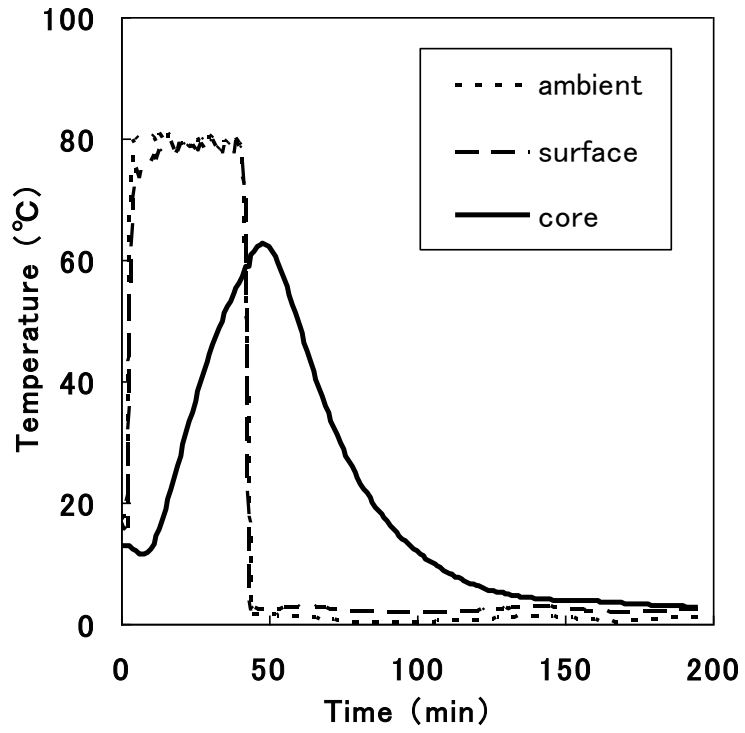


Fig. 1-6 Temperature history of during *sous-vide* cooking (in Tsuji Academy)

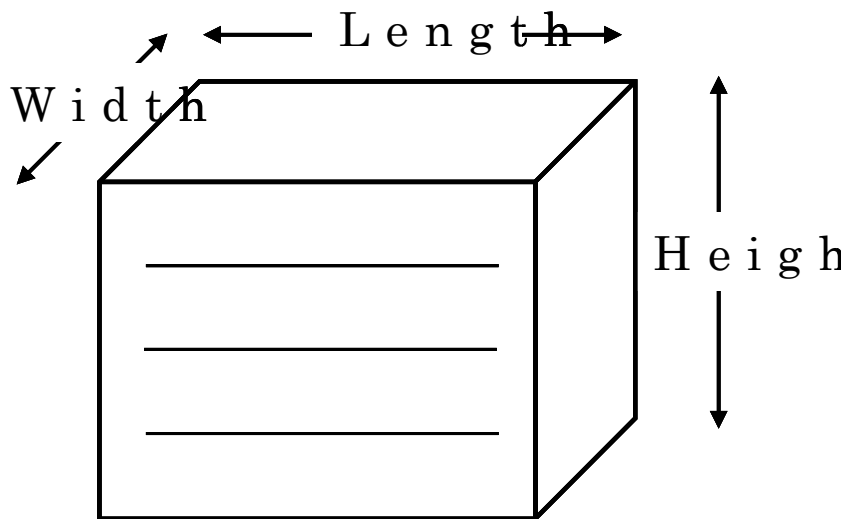


Fig. 1-7 Definition of name about the meat shape

1.5.3 研究室での調理実験

【材料および実験方法】

研究室で、辻学園で行った同様な方法に従いローストビーフを調理した。しかし、本研究室にスチームコンベクションオーブンとチラーがないため、代わりに恒温湯槽 (As One, Thermal Robo TR-4) と冷却恒温湯槽 (Eyela, Cool Ace CA-1200) を用い、調理を行なった。試料には市販牛モモ肉 (9.02 × 6.40 × 8.62 cm, 460 g) を用いた。

【結果および考察】

恒温湯槽による加熱から冷却工程を含めた温度履歴を Fig. 1-8 に示した。加熱開始から 41 分後、中心温度が目標である 58°C に到達した。58°C 到達後、直ちにオーブンから取り出しチラーに移したが、中心温度はすぐに下がらず 62.7 °C まで上昇し、その後下降した。中心温度が 3 °C に到達するまで、加熱開始から約 180 分 (冷却開始から約 140 分) 要し、辻学園で調理した際の温度履歴と同程度の時間を要した。

次に、今回測定に用いた試料の調理前後の重量、形状 (長さ、幅、高さ) および変化率を Table 1-4 に示した。

Table 1-4 Size and weight of meat sample before and after cooking

| | Length (cm) | Width (cm) | Height (cm) | Weight (g) |
|---------------------|-------------|------------|-------------|------------|
| Before cooking | 9.02 | 6.40 | 8.62 | 460 |
| After cooking | 7.81 | 6.26 | 8.90 | 400 |
| Change of ratio (%) | 15.5 | 2.23 | 3.14 | 15.0 |

重量変化率および長さ方向の収縮率は辻学園で調理した試料と同程度だったが、幅と高さの変化率は大きくなった。しかし、長さ方向の収縮率と比較すると、幅と高さの変化率は約 3 % と低い数値であり、大きな収縮は生じていないと考えられ、60°C 以下の温度帯で調理した際の特徴を再現できたといえる。

このように、試料中心温度と調理時の温度を的確に管理する、すなわち TT 管理を行うことで、シェフと同様な試料の作成 (調理) が可能なことが確認できた。

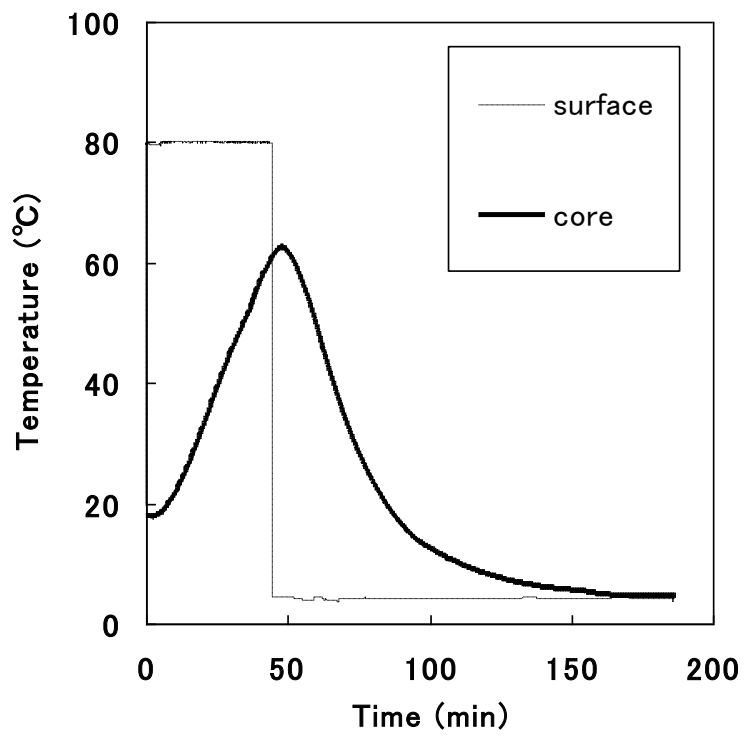


Fig. 1-8 Temperature history of during *sous-vide* cooking (in a laboratory)

1.6 第1章の引用文献

- 1) 畑江敬子, 加熱による味の変化, 香料, 227, 117-122 (2005)
- 2) 下村道子, 橋本慶子, 動物性食品, 朝倉書店 (1993)
- 3) Klettner P. G., Ott G., Boehm H., 豚肉, 牛肉および七面鳥肉の硬さ測定法, *Fleischwirtschaft*, 83(9), 132-135 (2003)
- 4) Astruc T., Gatellier P., Labas R., Lhoutellier V. S., Marinova P. Microstructural changes in m. recuts abdominis bovine muscle after heating. *Meat Sci.*, 85 (4), 743-751 (2010)
- 5) 沖谷明紘, 肉の科学, 朝倉書店 (1996)
- 6) 鈴木敦士, 渡部終五, 中川弘毅, タンパク質の科学, 朝倉書店 (1998)
- 7) Lawrie R. A., 森田重広 (訳), 内田和夫 (訳), 肉の科学, 株式会社学窓社 (1971)
- 8) 森田重廣, 食肉・肉製品の科学, 株式会社学窓社 (1992)
- 9) Tornberg E. Effect of heat on meat proteins-implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, 496-508 (2005)
- 10) 望月英男, 食品の調理科学, 医師薬出版株式会社 (1968)
- 11) 鬼頭誠, 佐々木隆造, 食品科学, 文英堂書店 (1992)
- 12) 岡田実, 食肉加工のユニットプロセス, 光琳 (1963)
- 13) Cheng C. S., F. C. Parrish Jr., Heat-induced changes in, myofibrillar proteins of bovine longissimus muscle, *J. Food Sci*, 44, 22- 24 (1979)
- 14) 武恒子, 木寺博子, 右田節子, 石川寛子, 食と調理学, 弘学書院 (1984)
- 15) 渋川祥子, 調理における加熱の基本, 日本食生活学会誌, 17, 2 (2006)
- 16) 谷孝之, 真空調理の全技法, 柴田書店 (1989)
- 17) 新調理システム推進協会編, 新調理システムのすべて, 日経 BP 社 (2003)
- 18) 生野世方子, 野菜の真空調理について, 食品加工技術, 15, 3 (1995)
- 19) Keller T., Benno J., Lee C., Rouxel S. Under Pressure Cooking Sous Vide. *Artisan* (2008)
- 20) 高橋節子, 内藤文子, 佐藤之紀, 内藤博, 田中直義, 野口俊, 真空調理法が鶏ささみ肉の物性および食味特性に及ぼす影響, 日本家政学会誌, 45, 2, 123-130 (1994)
- 21) 西念幸江, 柴田圭子, 安原安代, 鶏肉の真空調理に関する研究 (第1報) 真空調理と茹で加熱した鶏肉の物性および食味, 日本家政学会誌, 54, 7, 591-600 (2003)
- 22) Schellekens M. New research issues in sous-vide coking. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 256-262 (1996)
- 23) Vansagna S. R., Sanchez G., Neira M. S., Insani E. M., Picallo A. B., Gallinger M. M., Lasta J. A. Sous vide cooked beef muscles: effects of low temperature-ling time

- (LT-LT) treatments on their quality characteristics and storage stability. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 425-441 (2002)
- 24) Garcia-Fernandez M. C. Microbiological safety and sensory characteristics of salmon slices processed by the sous vide method. *Food Control* 16, 77-85 (2005)
- 25) Szerman N., Gonzalez C.B., Sancho A.M., Grigioni G., Carduza F., Vaudagna S.R. Optimization of whey protein concentrate and sodium chloride concentrations and cooking temperature of sous vide cooked whole-muscle beef from Argentina. *Meat Science* 79, 557-567 (2008)
- 26) Tornberg E. Effect of heat on meat proteins-implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, 496-508 (2005)
- 27) Van der Sman R.G.M. Moisture transport during cooking of meat: An analysis based on Flory-Rehner theory. *Meat Science*, 76, 730-738 (2007)

第2章 タンパク質加熱変性速度論

2.1 はじめに

第1章では、畜肉を加熱処理することにより生じる色、重量およびテクスチャーといった様々な品質変化は、畜肉を構成するタンパク質の物理的変化である熱変性が最も関与していることを述べた。すなわち、畜肉タンパク質の加熱変性状況を予測し、かつ制御することで、さらなる畜肉加工品の向上が見込まれる。そこで本章では、畜肉タンパク質変性状況の予測計算を行うに当たり必要となる加熱変性速度定数の取得を目的とし、加熱変性速度の温度依存性を示差走査熱分析法 (Differential Scanning Calorimetry : DSC) により実測した。

畜肉タンパク質の熱変性は、一般的に温度依存性があることで知られるため、加熱処理時間に応じて、タンパク質変性状況が異なることが予想される。さらには、畜肉の塊を加熱処理した際、温度分布が生じると同時に、タンパク質分布も生じると予想される。ところで、Tonberg は畜肉タンパク質の熱変性はテクスチャーおよび重量変化に与えること、Sman は 40°C以上の加熱処理は保水性が低下することを明らかにしているが、どの種のタンパク質がどの程度変性したかについて言及していない¹⁾²⁾。本章でタンパク質加熱変性速度を取得することで、加熱処理条件をもとにタンパク質変性状況の算出が可能となるため、タンパク質変性状況とテクスチャー、重量変化等の品質との相関について考察可能となることが期待される。

2.2 DSC 測定によるタンパク質変性温度帯の特定

2.2.1 試料の調製と測定方法

市販スライス状国産牛モモ肉を試料とし、採取した約 15 mg を耐圧性アルミニウム容器 (KIT NO,0219-0041, 15 μ l) に封入し、DSC 装置 (Perkin Elmer Pyris1) を用いて 25 ~90°Cを 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 °C \cdot min⁻¹の異なる昇温速度で測定した。リファレンスには何も充填していない空の容器を用いた。測定終了後は容器に穴を空け、103 °Cに設定した恒温槽で 24 時間乾燥させ試料の乾物重量を測定した。得られた DSC 曲線上に検出されたピークについて面積を積分し、試料の乾物重量で割ることで、タンパク質の熱変性に要したエンタルピー ΔH (J \cdot g⁻¹) を求めた。

2.2.2 結果および考察

昇温速度 10°C \cdot min⁻¹で測定した際の DSC 曲線を Fig. 2-1 に示した。Fig. 2-1 では 56.3 °C, 73.2 °Cの 2 箇所吸熱ピーク温度 T_{max} を観測することができた。また、他の昇温速度で測定した際も同様に 2 箇所吸熱ピーク温度を観測したと同時に、昇温速度が上がるにつれピークが高温側にシフトする傾向を示した。

1970 年代後半に行われた Martens ら、Wright らおよび Stabursvik らによる研究によ

り、54~58℃にみられる吸熱ピーク T_{max} はミオシン由来、65~67℃にみられる吸熱ピーク T_{max} はコラーゲンと筋基質タンパク質由来、80~83℃にみられる吸熱ピーク T_{max} はアクチン由来であることが判明している³⁾⁻⁵⁾。Wagner らが牛肉を試料とし行った同様な測定においても、57.8℃、63.9℃、74.2℃付近で吸熱ピークが観測されている⁶⁾。また、山口らが牛肉を試料とし行った測定では62℃、77℃付近の2箇所吸熱ピークが観測されており、それぞれをミオシン、アクチン由来であることが判明している⁷⁾。本研究では56.3℃、73.2℃付近の2箇所吸熱ピークが観測されたが、山口らと同様、コラーゲンおよび筋基質タンパク質由来のピークを観測できなかった。この要因として、試料充填量とpHの違いが考えられる。Wagner らはpH5.4~6.2に調整した試料を12~24mg充填し測定を行った。この際、pHが低い試料では3箇所の吸熱ピークが観測されたが、pHが高くなるにつれ第1ピークと第2ピークが近づき、pH6.2ではひとつのピークとして観測されている。また、試料充填量が少量になるにつれ、はっきりと観測されるピーク数が少なくなる傾向となっている。Wagner らと本研究および山口らの試料充填量を比較すると、山口らは約4mgと非常に少なく、また本研究では約15mgではあるが、Wagner らと比較すると少ない量に該当する。また、本研究および山口らの測定では試料の初期pHの測定を行っていないため、使用した試料のpHが高かった可能性が考えられる。しかし、今回観測されたピークは既存の研究で述べられているミオシンとアクチンの吸熱ピーク温度とほぼ同じ温度帯であることから、第1ピークをミオシン、第2ピークをアクチン由来であると判断した。それぞれのピークの立ち上がり温度、ピーク温度、ピーク終了温度およびエンタルピーをTable 2-1に示した。

Table 2-1 Experiment values of onset, peak, end temperature and enthalpy ($10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$)

| | onset ($^{\circ}\text{C}$) | peak ($^{\circ}\text{C}$) | end ($^{\circ}\text{C}$) | ΔH ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$) |
|--------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|
| myosin | 45.2 \pm 1.46 | 56.3 \pm 0.28 | 63.4 \pm 0.61 | 0.25 \pm 0.02 |
| actin | 68.2 \pm 0.22 | 73.2 \pm 0.12 | 75.7 \pm 0.19 | 0.09 \pm 0.002 |

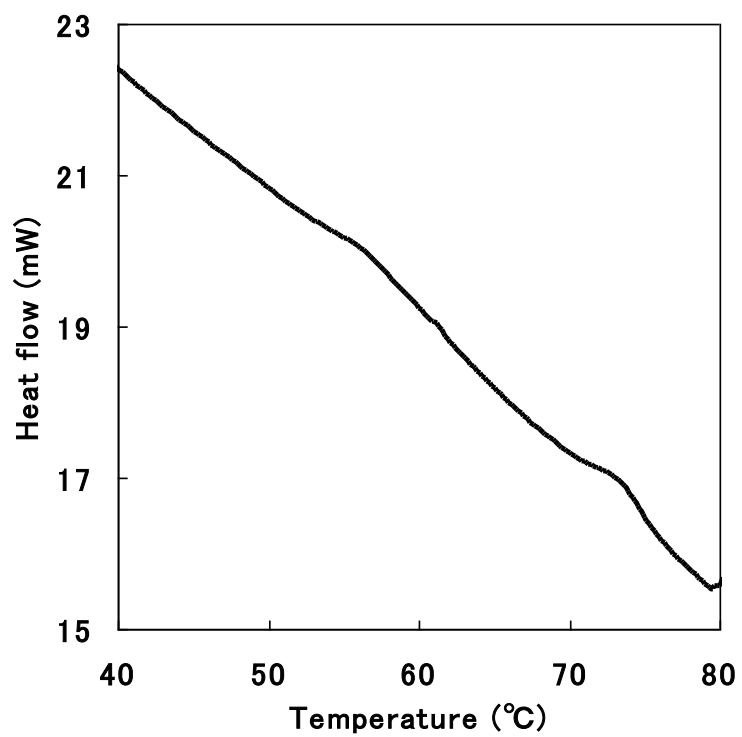


Fig. 2-1 DSC thermograms of sliced round beef meat with heating rate of $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$

2.2 タンパク質加熱変性速度定数の解析

タンパク質変性速度は未変性のタンパク質濃度 C ($\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{meat}}$) に比例すると仮定すると、速度式は (2-1) 式の一次反応であらわされる。さらに、未変性濃度を無次元化したもの (以後、未変性率) を X とすると、温度一定の条件下では時間 t (min) のとき、未変性濃度は(2-2)式であらわされる。ここで i はタンパク質の種類をあらわしている。

$$\frac{dC_i}{dt} = -kC_i \quad (2-1)$$

$$\ln\left(\frac{C_i}{C_{i0}}\right) = \ln X_i = -kt \quad (2-2)$$

ここで C_{i0} はタンパク質初期濃度 ($\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{meat}}$) を示す。畜肉は加熱とともに複数のタンパク質の変性が生じるが、本研究では DSC 測定よりミオシン、アクチンの順に変性することが判明している。また k (min^{-1}) はタンパク質の加熱変性速度定数であり、その温度依存性はアレニウスの式に従うとすると、(2-3)式であらわされる。

$$k = Ze^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (2-3)$$

ここで E_a は活性化エネルギー ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)、 R は気体定数 ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)、 T は温度 (K)、 Z は頻度因子 (min^{-1}) を示す。

タンパク質未変性率の時間変化を算出するには、活性化エネルギー E_a と頻度因子 Z を求める必要がある。速度パラメーターの算出には、非等温速度解析法である DSC-Dynamic 法⁸⁾を用いた。実験対象である畜肉試料は、測定試料の個体差が懸念されるため、出来る限りひとつの試料から多くの情報を得る必要がある。そこで、実験回数を多く要する等温実験と比較し、1回の測定で多くの情報を得ることが可能である DSC-Dynamic 法を用いた。

昇温速度 β ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) と DSC 測定で観測された吸熱ピーク温度 T_{max} の関係は(2-4)式であらわされる。

$$\ln\left(\frac{\beta}{T_{\text{max}}^2}\right) = \ln\left(\frac{ZR}{E_a}\right) - \left(\frac{E_a}{RT_{\text{max}}}\right) \quad (2-4)$$

横軸をピーク温度の逆数、縦軸は昇温速度をピーク温度の二乗で割った対数値とし、(2-4)式に従いプロットした図 (OZAWA プロット) を Fig.2-3 に示した⁸⁾。

Fig.2-3 で示した OZAWA プロットは一次関数と見なすことができる。そこで一次関数としてひいた直線の傾きから、各タンパク質の活性化エネルギーを、切片から頻度因子を算出した。算出した値を Table 2-2 に示した。

Table 2-2 Calculation of the activation energy (E_a) and the pre-exponential factor (Z) for thermal denaturation of meat proteins

| | $E_a \pm \sigma$ (kJ · mol ⁻¹) | Z (min ⁻¹) |
|--------|--|--------------------------|
| myosin | 240.9±7.66 | 4.69×10 ³⁶ |
| actin | 380.3±27.5 | 8.17×10 ⁵⁵ |

活性化エネルギーと頻度因子が明らかになったことから、任意の温度における各タンパク質の加熱変性速度定数を(2-3)式に従うことで算出可能となった。試料の初期温度を 25°C とし、昇温速度 10°C · min⁻¹ で加熱した際の未変性率変化を Fig. 2-3 に示した。この際、未変性率が 0.999 になった時を変性開始温度、0.001 になった時を変性終了温度とした。これらの定義により算出した各タンパク質の変性開始温度と終了温度、さらには DSC 測定で得られた変性開始温度と終了温度について Table 2-3 にまとめた。また速度定数の妥当性の検証として、Fig. 2-3 で示した各タンパク質の変性率増加率を単位時間 t (sec) で微分した値、すなわち dC/dt を算出し、これを昇温速度 10°C · min⁻¹ 時の温度に対してプロットした図を Fig. 2-4 に示した。この際、最も変性量が多い温度を吸熱ピーク温度とみなし、DSC 測定で得られた吸熱ピーク温度と比較した。

Table 2-3 Comparison between experiment values and calculated values of onset and end temperature

| | myosin | | actin | |
|------------|--------|-----------|-------|-----------|
| | cal. | exp. | cal. | exp. |
| onset (°C) | 33.41 | 45.2±1.46 | 56.58 | 68.2±0.22 |
| end (°C) | 64.00 | 63.4±0.61 | 78.66 | 75.7±0.19 |
| peak (°C) | 56.75 | 56.3±0.28 | 73.58 | 73.2±0.12 |

Table 2-3 より、変性終了温度はミオシン、アクチンともにほぼ同等だが、変性開始温度は解析値の温度が実験値と比較し、低い値を示した。解析値の変性開始温度付近では加熱変性速度は小さく、変性量は少量であることから、変性開始時に要したエンタルピーを DSC 装置で感知できなかった可能性があげられる。Fig. 2-4 より、ミオシン、アクチンともに温度が高くなるに従い加熱変性量が増加し、その後減少する傾向が明らかとなり、ミオシンは 56.75°C で、アクチンは 73.58°C で最大値となった。また、この値は実験値と同等であった。

ところで、畜肉タンパク質の熱変性を予測する速度論は今回用いた手法の他に、Chen ら、Ikeuchi らにより畜肉の抽出液を用いたアクチンの変性速度の算出が行われている⁹⁾¹⁰⁾。Chen らの算出した牛肉のアクチンの活性化エネルギーは 484 kJ · mol⁻¹ と本研究で得られ

た値と同等であった。また本研究と同様、畜肉の塊を試料とした系では、Wagner らは牛肉を、Kajitani らは豚肉を測定試料とし DSC-Dynamic 法による畜肉タンパク質の加熱変性速度パラメーターの取得を行っている⁶⁾¹¹⁾。これら既存の研究で算出しているミオシン、アクチンの活性化エネルギーおよび頻度因子と今回の実験で得られた数値を比較したところ、大きな相違がないことから、取得した速度パラメーターは妥当であると判断した。この他、Fig. 2-3 に示した結果よりミオシンの変性の終了とほぼ同時期に、アクチンの変性が開始している。すなわち、アクチンの変性開始時にはミオシンの変性は終了していることがわかる。ミオシンは 50°C 付近の低温度、アクチンは 70°C 付近の高温度で変性することが明らかとなり、同じ筋原線維タンパク質であっても、タンパク質の種類により変性温度が異なることが判明した。そこで、本実験における試料（牛肉）に対する加熱処理温度は、ミオシンの変性を対象とした際は 50°C、アクチンの変性を対象とした際は 70°C と設定し、以後の実験を行った。

一方、実際の筋肉細胞は複数のタンパク質が複合して筋肉全体の構造を形成しているため、畜肉の機能や特性は全体の構造変化に起因するものと推察される。つまり、畜肉加工品の品質設計を行うにあたり、各タンパク質の変性状況のみならず、複数のタンパク質によって構成される畜肉筋細胞としての加熱による変性率の算出が必要となる。本研究では多々あるタンパク質のうち、DSC 測定よりミオシンとアクチン 2 つの吸熱ピークを確認できたことから、今回はこの 2 つを主要タンパク質とみなし、畜肉タンパク質全体の未変性状況 X_t （以後、total 未変性率）の算出を行った。しかながらこの際、各タンパク質の変性率から total 未変性率に変換する式が必要となる。畜肉を構成する全タンパク質のうち、ミオシンは 55%、アクチンは 22% を占めるが、各タンパク質の存在割合が筋肉全体の構造変化に比例するとは限らない¹³⁾。そこで本研究では、DSC 測定時に得られる吸熱ピーク面積（エンタルピー）を変性に要するエネルギー量と考え、この結果をもと得た(2-5)式に従い、total 未変性率の算出を行った。

$$X_t = 0.691X_1 + 0.391X_2 \quad (2-5)$$

X_1 はミオシンの未変性率、 X_2 はアクチンの未変性率である。係数は全タンパク質を熱変性させるのに必要な熱量を 1 とした場合、各タンパク質のみを全て熱変性させるのに要する熱量にあたる。この数値は、DSC 測定から得られた各吸熱ピーク面積を吸熱ピーク面積の総和で割り算出した。(2-5)式を用いて算出した total 未変性率変化を Fig. 2-3 に示した。

total 未変性率は、35°C から 62°C 付近まで著しく減少し、少し緩やかな減少となった後、65°C 以降から再度著しい減少が開始している。これは前者の減少はミオシン、後者はアクチン由来、緩やかな減少はミオシンとアクチンの両方に起因していることがわかる。

このように、各タンパク質の速度パラメーターを得たことで、畜肉加熱時の温度履歴をもとに各タンパク質の未変性率、さらには畜肉タンパク質全体の未変性率の予測計算が可能となった。

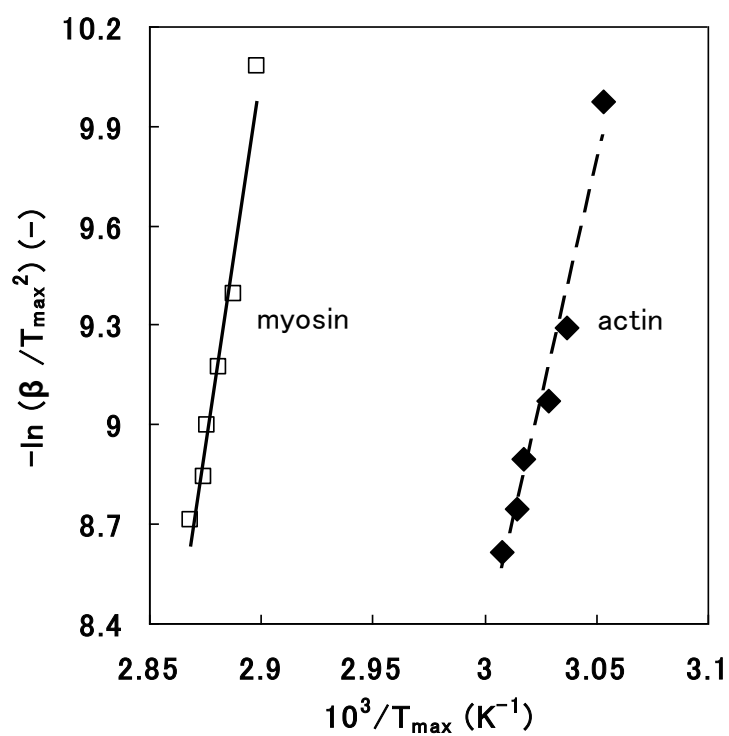


Fig. 2-2 Calculation of the activation energies (E_a) and the pre-exponential factor (Z) for thermal denaturation of each protein (myosin; $r=0.970$, actin; $r=0.970$)

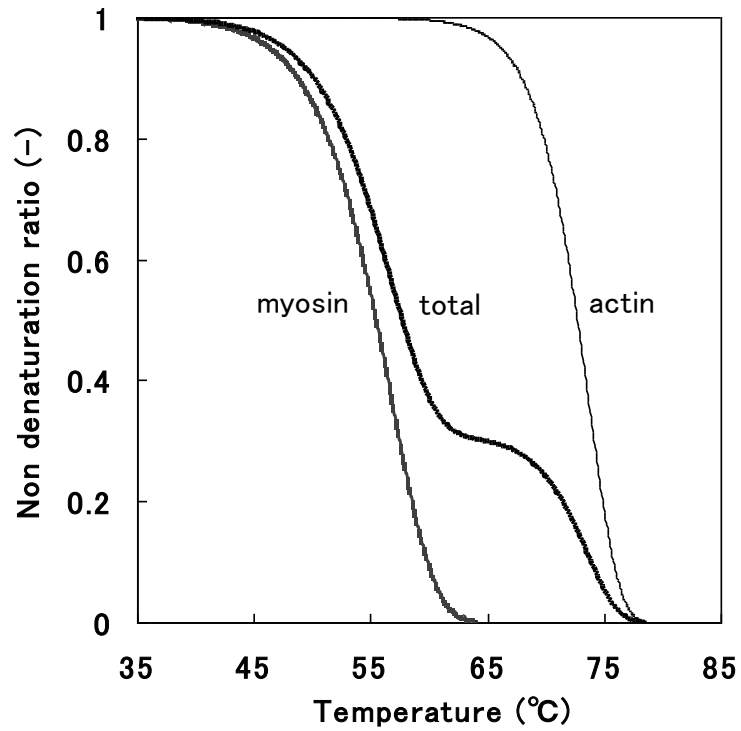


Fig. 2-3 Calculation of non denaturation ratio of each protein during heating from 25°C to 85°C with heating rate of 10°C · min⁻¹

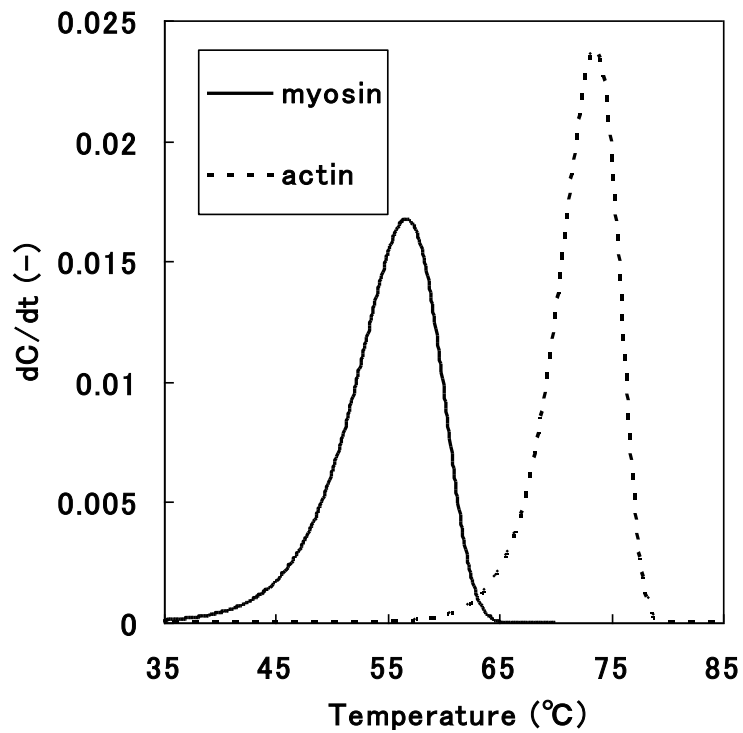


Fig. 2-4 Time course of protein denaturation was differentiated with time, inflection point which corresponds to the peak temperature T_{max} in DSC measurement could be obtained.

2.4 第2章の引用文献

- 1) Tornberg E. Effect of heat on meat proteins-implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci*, 70, 496-508 (2006)
- 2) Van der Sman R.G.M. Moisture transport during cooking of meat: An analysis based on Flory-Rehner theory. *Meat Science*, 76, 730-738 (2007)
- 3) Wright D. J., Leach I.B., Wilding P. Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. *J. Sci. Food Agric.* 28, 557-564 (1978)
- 4) Martens H., Vold E. DSC studies of muscle protein denaturation. 22nd Eur. Meat Res. Work., Malmö, Sweden (1977)
- 5) Stabursvik E, Martens H. Thermal denaturation of proteins in post rigor muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. *J. Sci. Food Agric.* 31, 1034-1042 (1980)
- 6) Wargner J. R., Anon M. C. Deaturation kinetics of myfibrillar proteins in bovine muscle. *J. Food Sci.* 50, 6, 1547-1550 (1986)
- 7) 山口達彦, 赤崎哲也, 中村文雄, 示差走査熱量分析計 (DSC) による肉たんぱく質の熱変性の測定, 関税中央分析所報, 第43号 (2004)
- 8) T. Ozawa, Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis. *J. Thermal Anal.* 2(4), 301-324 (1970)
- 9) Chen F., Kilonzo-nthenge A., Peggy H. Y.-H., Bridgman R. C. kinetics of tropomyosin denaturation as a predictive model for verifying thermal processing of beef products. *Journal of Food Prot.*, 69, 247-253(2007)
- 10) Y. Ikeuchi., T. Ito, T.Fukazawa, A kinetic analysis of thermal denaturation of F-actin. *J. Sci. Food Agric.*, 13, 1065-1069 (1981)
- 11) S. Kajitani, M. Fukuoka., N. Sakai., Kinetics of thermal denaturation of protein in cured pork meat. *Japan Food of Journal Eng.* 現在掲載待ち
- 12) 鈴木敦士, 渡部終五, 中川弘毅, タンパク質の科学, 朝倉書店(1999)

第3章 イノシン酸 (IMP) 分解反応速度論

3.1 はじめに

ヒトは調理を行う際、食材が美味しくなるよう無意識に心がけている。また約半世紀も前から、食品産業や研究機関にて官能評価が用いられており、多くの研究者が「おいしい食べ物とはなにか」について突き詰めていることから、品質設計を行うにあたり、美味しさについて考慮することは必要不可欠だと思われる^{1) 2)}。食材の種類により、美味しさに寄与する要素は異なるが、畜肉の食味を決定付けている主要素は、食感、味、香りである³⁾。本研究はなかでも「味」に着目した。

畜肉の主な味は、旨味、こく、まろやかさの3種類存在する。旨味が強く、こく、まろやかさが十分にあれば、ヒトは食肉を美味しく感じると言われている⁴⁾。このうち、旨味は酸性アミノ酸であるグルタミン酸にナトリウムが結合したグルタミン酸ナトリウムとイノシン酸 (以後、IMP)、ペプチド由来とされる。なかでもグルタミン酸とIMPの相乗効果についてよく知られている。

IMPは貯蔵 (熟成) 中および調理過程中的変化について数多くの研究が行われている。IMPは核酸関連物質であることから、動物の死後過程 (熟成) でATPはATPアーゼの作用で脱リン酸されAMPとなり、さらにデアミナーゼの作用を受けてIMPとなる。その後、IMPも5'-ヌクレチダーゼによりイノシン (HxR)、さらにはヒポキサンチン (Hx) に分解されるが、IMPの分解は比較的遅いため、一時的に畜肉組織内に蓄積される⁵⁾。そのためIMPはと殺後の畜肉にほとんど存在しないが、熟成に伴い増加することで知られる。また、この蓄積されたIMPは肉の旨味に寄与するといわれているが、坂口らは熟成中のIMPの増加・減少量の変化は畜肉の風味へも非常に寄与していることを明らかにした^{4) 6)}。また、Vaniらにより加熱処理温度および畜肉試料のpHの違いが、どれほど調理終了時のIMP量に影響を与えるかについて検討されている⁹⁾。しかし、伝熱解析といった工学的な側面から巨視的な系である対象物内のIMP残存量の経時変化やIMP残存量分布に関する報告はこれまでにない。さらには富岡らによりIMPの分解はIMP分解酵素活性に大きく依存し、調理時の昇温速度の影響を大きく受けることが明らかになっているが、IMP分解速度パラメーターの取得にまで至っていない¹⁰⁾。そこで本研究は、加熱温度の違いがIMP残存量へ及ぼす影響を実験的に調べ、また、IMP残存量の予測計算を行うために必要なIMP分解反応速度の速度パラメーターの取得を試みた。

畜肉中に存在するIMP量の定量は、分析機器のひとつである高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) を用いた。

3.2 畜肉中のイノシン酸 (IMP) 量に及ぼす加熱処理温度の影響

3.2.1 HPLC 法によるイノシン酸 (IMP) の定量

市販スライス状国産牛モモ肉を試料とし、プラスチックフィルムに充填したのち、脱気密閉した。その後、30、32、35、38、40、42、45、50、55、60°Cの異なる 10 種類の温度に設定した恒温湯槽 (As One, Thermal Robo TR-4) で等温加熱処理し、加熱終了後は恒温湯槽から試料を取り出し、氷水で試料温度が 10°Cになるまで冷却した。抽出方法を Fig. 3-1 に示した。またこの方法は永峰らの方法に改変を加えたものである¹¹⁾。加熱試料 2 g を 10%過塩素酸溶液 5 ml に加えホモジナイズ後、14,000×g で温度を 4 °C に保った状態で 10 分間遠心分離 (日立工機, 日立微量高速遠心機 CF15R 型) した。上澄み液を採取し、残渣には再度過塩素酸溶液を加え、同様に処理して得た上澄み液を合一し 25 ml に定容した。これを試料抽出液とした。抽出液 1 ml を分取し、10 mol・L⁻¹-KOH と 1 mol・L⁻¹-KOH で pH7.0 に中和後、16,000×g で温度を 5 °C に保った状態で 2 分間遠心分離した。上澄み液を 10 倍希釈し、メンブランフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過した後、HPLC 分析に供した。HPLC 分析は、検液 20 μl を 30°C に設定したカラム (昭和電気株式会社, Shodex Asahipak GS-320HQ) に注入し、0.2 M リン酸二水素ナトリウム緩衝液 (pH 2.9) の移動相で流速 0.6 ml・min⁻¹ で分離溶出させ、紫外可視検出器 (JASCO, 875-UV) を用いて検出波長 260 nm において IMP を検出した。

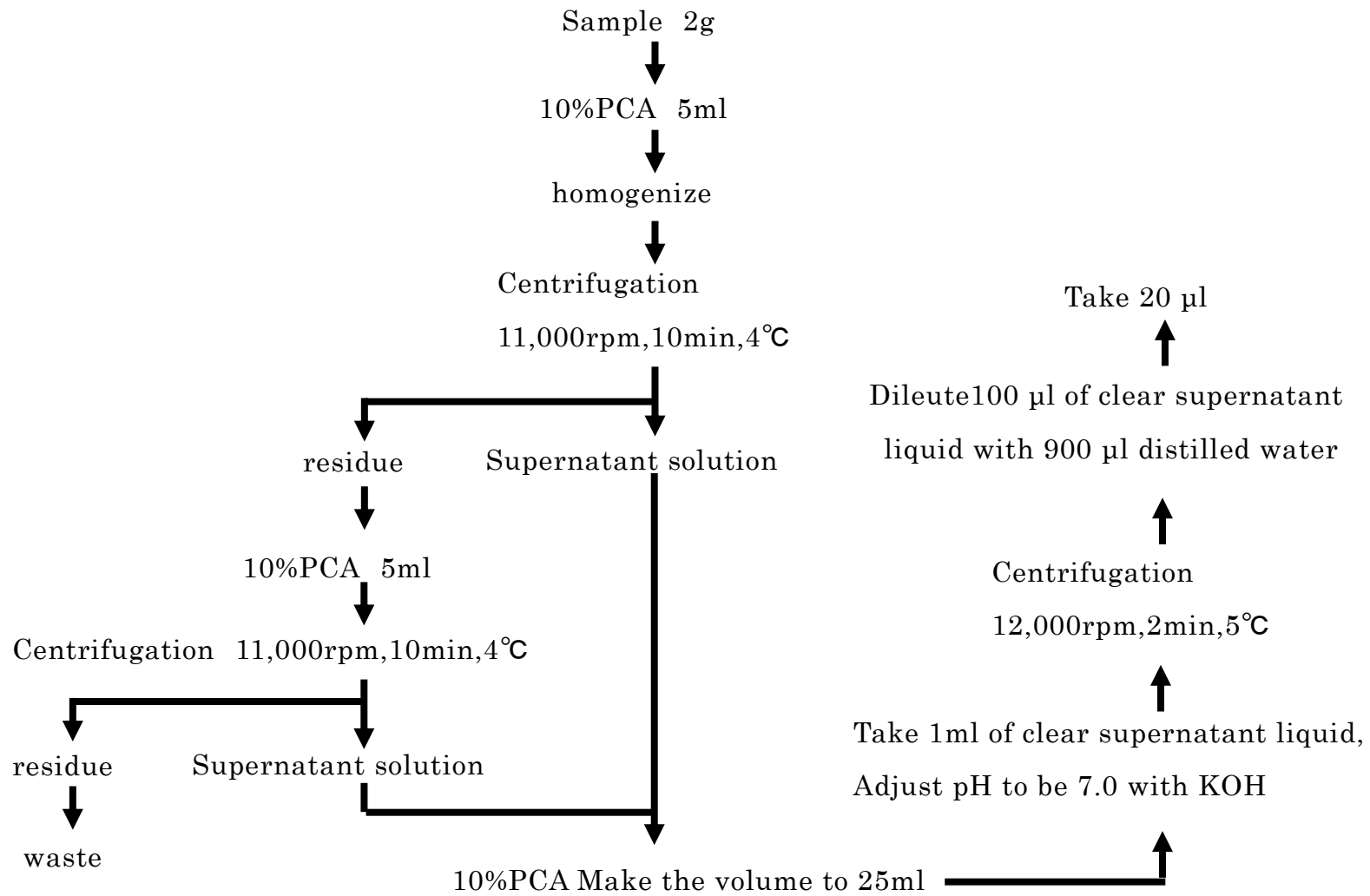


Fig.3-1 Method for making the extraction liquid from meat sample

3.2.2 結果および考察

試料を等温加熱処理した際の、加熱時間に対する加熱処理温度 30, 40, 50°Cのみの IMP 残存率変化結果を Fig. 3-2 に示した. IMP は試料によって初期含量が異なるため IMP 量 C_I ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{meat}}$) を評価するにあたり、未加熱試料の IMP 量の測定を行い、未加熱試料中の IMP 量を IMP 初期含量 C_0 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{meat}}$) と定義した. (3-1) 式を用いることで IMP 量を無次元化し、IMP 量 C_I を IMP 残存率 X_I (—) として取り扱った.

$$X_I = \frac{C_I}{C_0} \quad (3-1)$$

Fig. 3-2 より、どの加熱温度においても、加熱時間の進行とともに IMP 残存率が低下すると確認できた. さらに、30, 40, 50°C 試料における加熱時間進行に伴う残存率の挙動を比べると、40°C 試料の IMP 残存率低下が著しく速いことが示された. また 50°C 試料は 30, 40°C 試料と比較し、全ての加熱時間において IMP 残存率の低下が抑制されたように、40°C より高い温度で加熱処理した試料は全て、40°C 以下で加熱処理した試料と比べ、残存率の低下が抑制された. 富岡らにより、pH6.0 では牛肉中に既存する IMP を分解する IMP 分解酵素の酵素活性は、50~54°C の温度帯で 50% 以下となることが判明している¹⁰⁾. すなわち、IMP 分解酵素の酵素活性は IMP 残存率に影響を与えると考えられ、さらに酵素は温度依存性があるため、加熱処理温度は酵素活性低下に影響を与えると予想される. そこで、IMP 分解酵素の失活温度を検証するため、全ての加熱処理温度における加熱時間 60 分の IMP 残存率を Fig. 3-3 にまとめた. その結果、加熱温度 30°C から 40°C までは加熱温度上昇とともに IMP 残存率が低下するが、その後加熱温度上昇とともに、徐々に IMP 残存率は高くなり、加熱処理温度 55, 60°C では著しく数値が増加した. すなわち、55~60°C では IMP 分解酵素の失活が著しいことを示唆した. また、Fig. 3-3 に示した 55°C 試料の IMP 残存率は約 0.5 であり、富岡らの結果 (IMP 分解酵素の酵素活性は、50~54°C の温度帯で 50% 以下) と一致した.

そこで本研究では、IMP 残存率が最小値となった加熱処理温度 40°C 付近は IMP 分解酵素の至適温度帯と考え、40°C までは IMP 分解酵素活性は低下せず一定とみなし、40°C より高い温度で加熱処理した場合のみ IMP 分解酵素活性が低下すると考えた. また、IMP 分解反応の速度式を構築するには、IMP 分解反応速度と、IMP を分解する酵素の酵素活性低下反応速度の 2 種類を考慮する必要があると判断した.

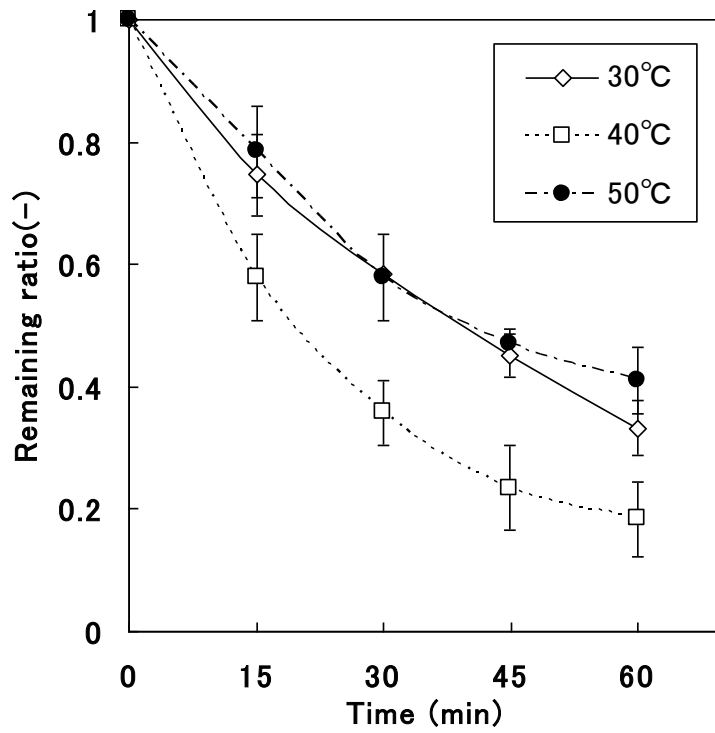


Fig. 3-2 Changes in the remaining IMP ratio during heating

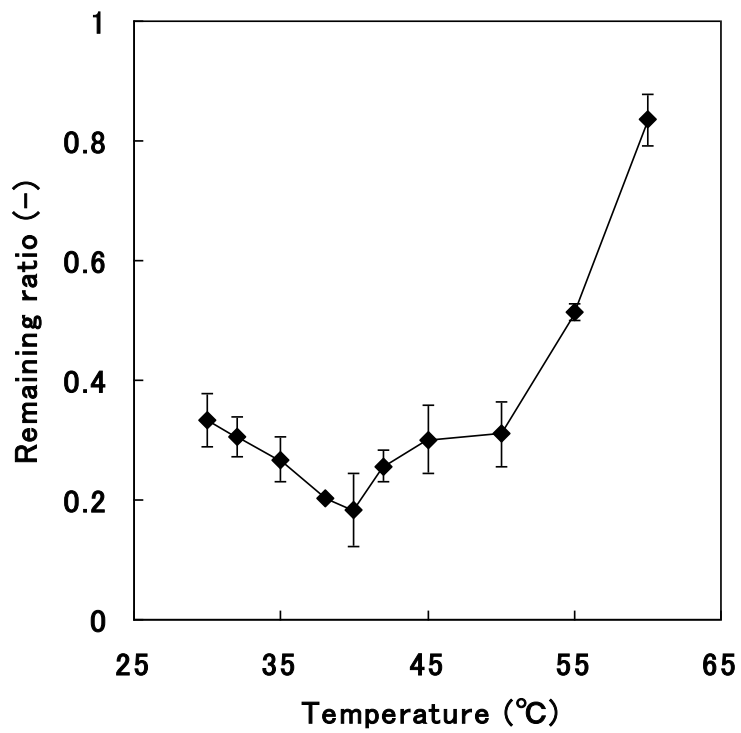


Fig. 3-3 Relationship between heating temperature and the remaining IMP ratio at the heating time for 60 minutes

3.3 イノシン酸 (IMP) 分解反応速度論

3.3.1 酵素活性一定温度帯における IMP 分解反応速度論

IMP 分解反応速度を残留している IMP 量 C_I ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{meat}$) と酵素活性 A_E (—) に比例すると仮定すると、速度式は (3-2) 式であらわされる。

$$\frac{dC_I}{dt} = -k_t C_I A_E \quad (3-2)$$

このうち、 40°C 以下の加熱では酵素活性は低下せず、一定 ($A_E=1.0$) とみなせることから、(3-2) 式は (3-3) 式であらわされる。そこで本項目では (3-3) 式に従い、IMP 分解反応の速度パラメーターの取得を行う。

$$\text{Temp.} \leq 40, A_E = 1.0$$

$$\frac{dC_I}{dt} = -k_t C_I \quad (3-3)$$

(3-1) 式を用いて無次元化した IMP 残存率 X_I は、温度一定下では時間 t (min) のとき、(3-4) 式であらわされる。ここでの k_t (min^{-1}) は、酵素活性低下速度も考慮した IMP 分解反応速度定数を示す。

$$\ln \frac{C_I}{C_0} = \ln X_I = -k_t t \quad (3-4)$$

(3-4) 式に従い HPLC 分析で定量した IMP 残存率の実験値を用いて、等温処理温度ごとに一次反応プロットをした図を Fig. 3-4 に示した。Fig. 3-4 より、各直線は一次関数とみなせると判断し (相関係数 r , $0.976 \leq r \leq 0.999$)、一次関数の傾きから、各温度における IMP 分解反応速度定数 k_t (min^{-1}) を算出した。さらに、算出した IMP 分解反応速度定数 k_t (min^{-1}) をアレニウスプロットした図を Fig. 3-5 に示した。Fig. 3-5 の直線も一次関数とみなせると判断し、直線の傾きより IMP 分解反応の活性化エネルギー E_t ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)、切片より頻度因子 Z_t (min^{-1}) を算出した。

算出した IMP 分解反応の活性化エネルギー E_t ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$) と、頻度因子 Z_t (min^{-1}) を用いて、 30 , 40°C の等温加熱時における IMP 残存率解析値と実験値の比較を Fig. 3-6 に示した。加熱時間の進行に伴い、解析値および実験値両方の IMP 残存率が低下していることがわかる。ところが、 30°C 試料ではどの加熱時間においても解析値と実験値が良好に一致したのに対し、 40°C 試料は加熱初期では実験値の減衰が速くなった。しかし、IMP 残存率低下の傾向は一致しており、加熱後期の数値は良好に一致していることから、算出した IMP 分解反応の活性化エネルギー E_t ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$) と、頻度因子 Z_t (min^{-1}) は妥当であると判断した。

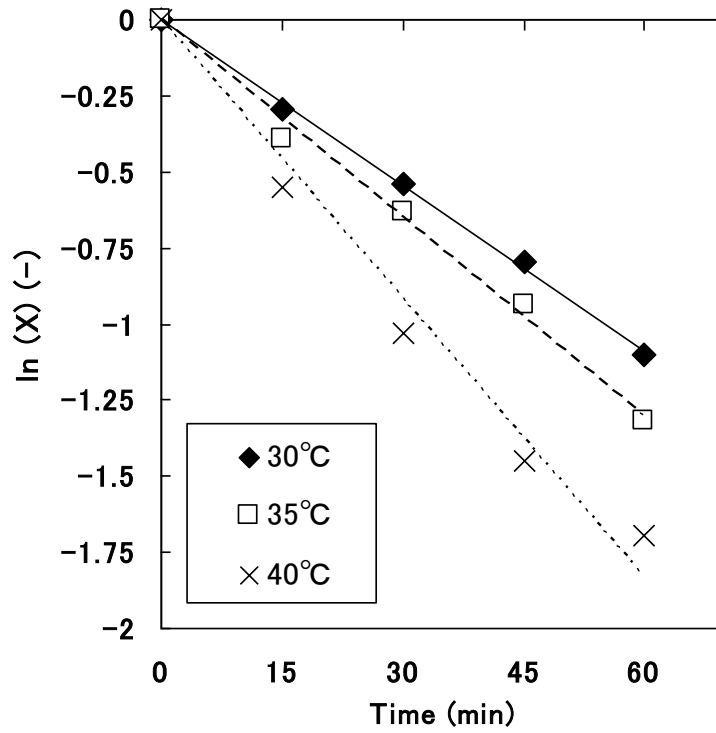


Fig. 3-4 Decomposition curves of heating at various temperatures

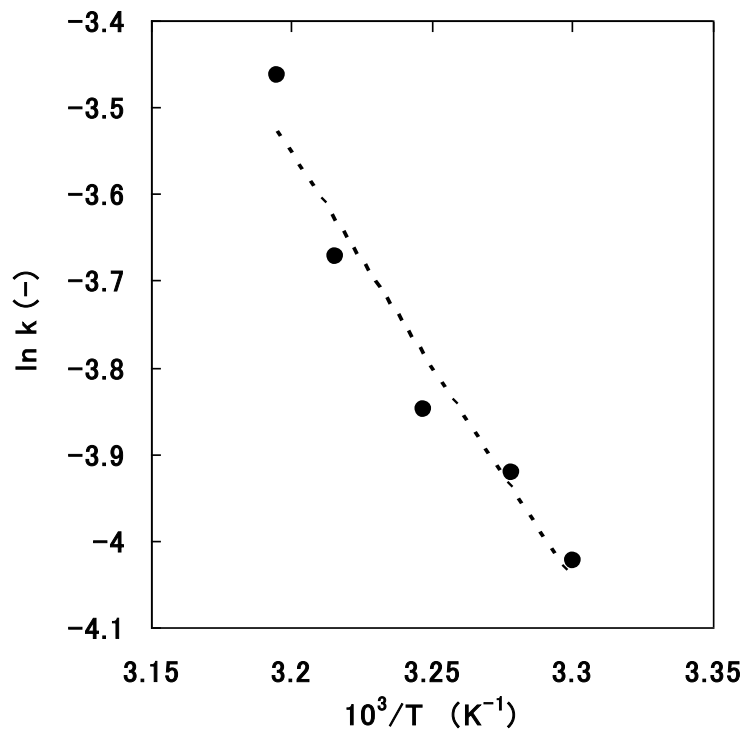


Fig. 3-5 Relationship between decomposition rate constant and temperature in heating (r=0.943)

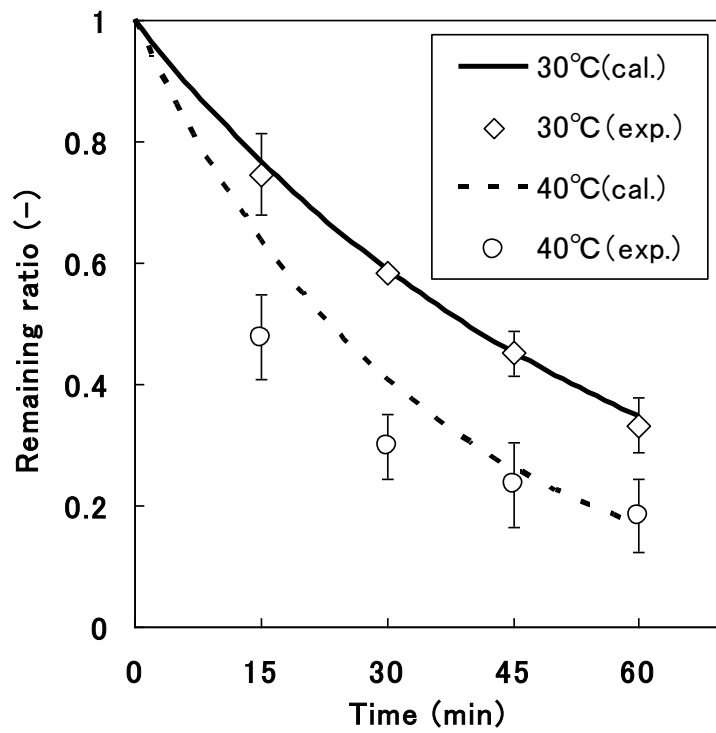


Fig. 3-6 Comparison between measured and calculated IMP remaining ratio at 30°C and 40°C

3.3.2 酵素活性低下温度帯における IMP 分解反応速度論

試料を 40℃より高い温度で等温加熱処理した際の、加熱時間に対する IMP 残存率変化を Fig. 3-7 に示した。どの加熱温度においても、Fig. 3-2 と同様に加熱時間の進行とともに IMP 残存率が低下すると確認できた。しかし、Fig. 3-2 では加熱処理温度が高くなるに従い、残存率が低下したのに対し、Fig. 3-7 では加熱処理温度が高くなるに従い、数値の低下が抑制されていることがわかる。これは前述したように、加熱処理温度が高くなるに伴い、IMP 分解酵素が失活する温度帯に該当し、酵素活性が低下していることを示唆する。そこで本項目では 40℃より高い温度では酵素活性が低下することを利用し、4.3.1 で算出した IMP 分解反応の活性化エネルギー E_t ($J \cdot mol^{-1}$) と、頻度因子 Z_t (min^{-1}) および、HPLC 法で定量した IMP 残存率を用いて、酵素活性低下反応の速度パラメーターの取得を行う。

4.3.1 で算出した IMP 分解反応の速度パラメーターを用いて、50℃等温加熱時における IMP 残存率の時間変化と実験値を比較した結果を Fig. 3-8 に示した。Fig. 3-8 より加熱時間の進行に伴い、解析値および実験値両方の IMP 残存率が低下していることがわかる。しかし、解析値は実験値よりも数値低下が著しく、加熱時間 60 分では実験値の IMP 残存率は 0.5 であるのに対し、解析値は 0.1 以下となった。これは加熱温度 50℃では IMP 分解酵素の酵素活性が低下していると想定しているにもかかわらず、酵素活性が低下しない ($A_E=1.0$) と仮定して解析を行ったことに起因する。そこで、酵素活性低下反応の速度を以下の手法を用いて推算した。(※ $T_X=42, 45, 50, 55, 60^\circ C$)

Step1 (3-2) 式に従い、IMP 分解反応の活性化エネルギー E_t ($J \cdot mol^{-1}$) と、頻度因子 Z_t (min^{-1}) を用いて、 T_X ($^\circ C$) で等温加熱した際の IMP 残存率を算出する。この際、酵素活性低下反応速度 k_E (min^{-1}) は、残存している酵素活性に比例すると仮定すると、速度式は (3-5) 式であらわされる。

$$Temp. \geq 40, A_E \neq 1.0$$

$$\frac{dA_E}{dt} = -k_E A_E \quad (3-5)$$

ここでの k_E (min^{-1}) は酵素活性低下反応速度定数を示す。

※ この時点では、まだ T_X ($^\circ C$) における酵素活性低下速度 k_E (min^{-1}) は決定していないため、酵素活性低下反応速度 k_E (min^{-1}) をランダムに設定し、IMP 残存率時間変化を多数算出する。

Step2 HPLC 分析で定量した T_X ($^\circ C$) 加熱処理試料の IMP 残存率 (実験値) と、Step1 で解析した IMP 残存率変化を比較し、多数算出した IMP 残存率時間変化のうち、実験値に最も近い IMP 残存率時間変化を黄金分割法により算出する。そし

て、その際用いた k_E (min^{-1}) を、 T_X ($^{\circ}\text{C}$) における酵素活性低下反応速度 k_E (min^{-1}) に決定する。

Step3 酵素活性低下速度 k_E (min^{-1}) は一次反応と仮定していることから、一次反応プロットは一次関数とみなせる。そこで、この一次関数の傾きから、 T_X ($^{\circ}\text{C}$) における酵素活性低下速度定数 k_E (min^{-1}) を算出する。

Step4 Step1 から Step3 の工程を全ての T_X ($^{\circ}\text{C}$) において行い、各温度における酵素活性低下速度定数 k_E (min^{-1}) を算出する。

Step4 で算出した各温度の活性低下速度定数 k_E (min^{-1}) をアレニウスプロットした図を Fig. 3-9 に示した。Fig. 3-9 も Fig. 3-5 と同様、プロットの直線を一次関数とみなせることから、前述した方法と同様に活性酵素低下反応の活性化エネルギー E_E ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$) と頻度因子 Z_E (min^{-1}) を算出した。

IMP 分解反応と、今回新たに算出した酵素活性低下反応の速度パラメーターを用い、(3-2) 式に従って加熱処理温度 50°C における IMP 残存率を算出した。解析結果を Fig. 3-8 に示した。酵素活性低下反応速度を考慮せず IMP 残存率を算出した値と比較すると、解析値は実験値に近い値となった。しかし、実験値は加熱直後緩やかに IMP 残存率が減少し、徐々に平衡値に到達するのに対し、解析値は加熱直後の減衰が著しい傾向となった。酵素活性低下速度定数は、実験値に最も近づけさせるよう黄金分割法を用いて推算している。しかし、実験値は 4 点のみであり、データ数として十分とはいえない。また、IMP 分解酵素の至適温度や酵素活性の温度依存性は実測値ではなく、予測値であるため、今後、検証する必要がある。

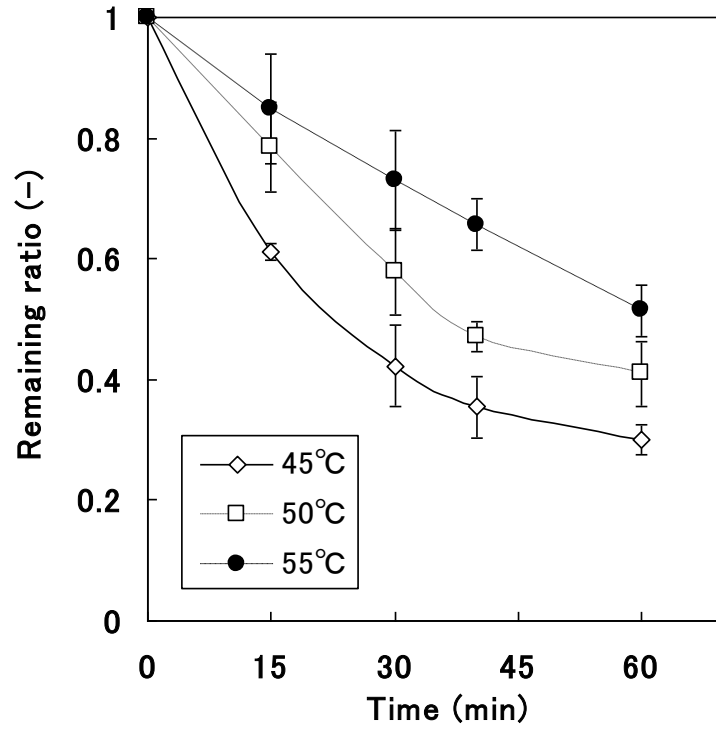


Fig. 3-7 Changes in the remaining IMP ratio during heating. Heating temperature is above 40°C.

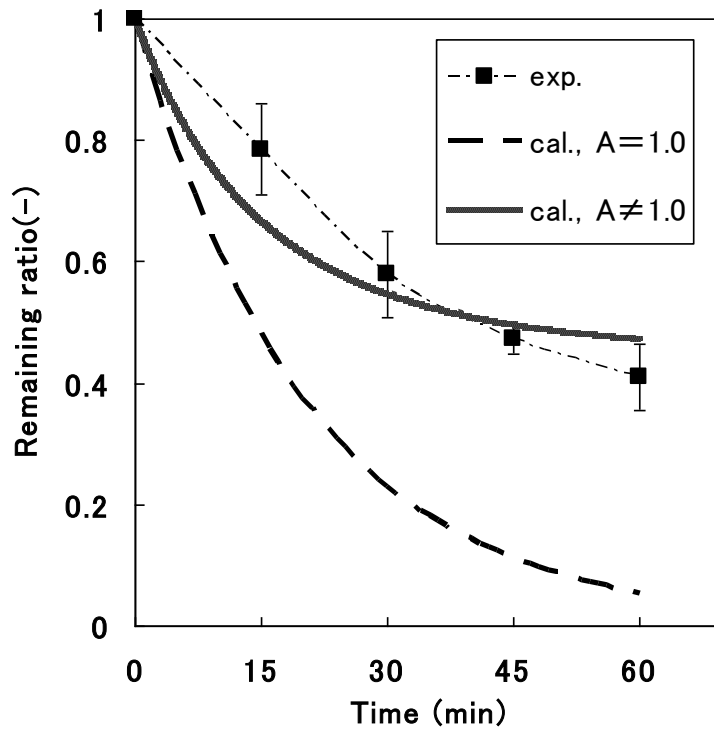


Fig. 3-8 Comparison between measured and calculated the remaining IMP ratio at 50°C

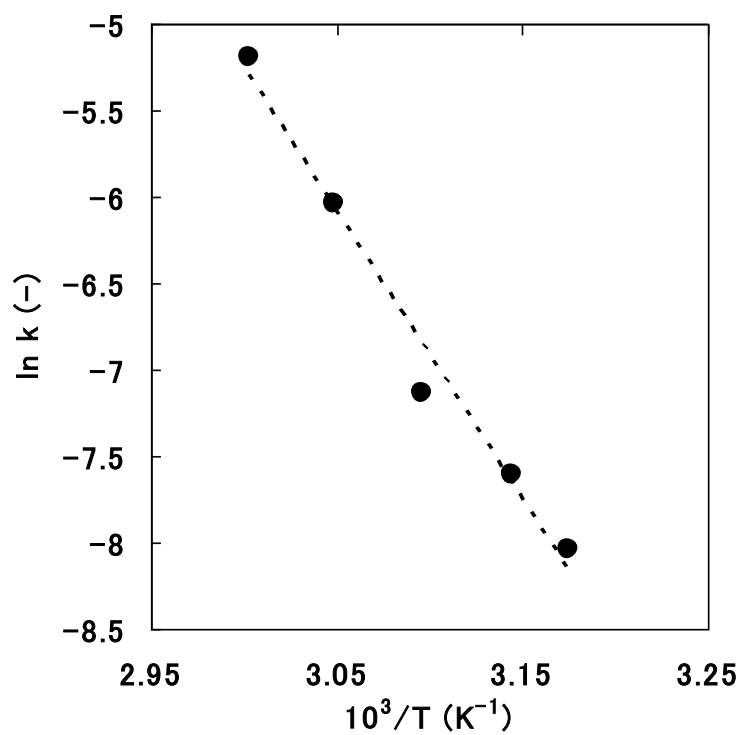


Fig. 3-9 Relationship between decomposition rate constant and temperature in heating (r=0.978)

3.4 第3章のまとめ

本章では、畜肉の主要旨味成分であるイノシン酸（以後、IMP）に着目した。IMPは畜肉中に存在する酵素により分解されることから、HPLC法（High Performance Liquid : HPLC）により実測した加熱処理後、畜肉中に残存するIMP量を定量した。その結果、全ての加熱処理温度において加熱時間の進行とともにIMP残存率が低下すると確認できたが、中でも40℃試料のIMP残存率低下が著しく速く、40℃より高い温度で加熱処理した試料は残存率の低下が抑制された。後者の原因はIMPを分解する酵素の酵素活性が低下したことに起因すると判断し、速度の構築を行い、HPLC分析で得られた実験値をもとにIMP分解反応速度と、IMPを分解する酵素の酵素活性低下反応速度算出に要する速度パラメーターを推算した。算出した速度パラメーターの値をTable3-1に示した。

Table3-1 Calculated the activation energy (E) and the pre-exponential factor (Z)

| | IMP decomposition reaction | Enzyme activity depression reaction |
|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| E (J · mol ⁻¹) | 4.10×10 ⁴ | 1.38×10 ⁵ |
| Z (min ⁻¹) | 2.03×10 ⁵ | 2.41×10 ¹⁹ |

Table 3-1 に示した数値と (3-2) 式および (3-5) 式を用いることで、IMP 残存率の予測計算が可能となった。

$$\frac{dC_I}{dt} = -k_I C_I A_E \quad (3-2)$$

$$\frac{dA_E}{dt} = -k_E A_E \quad (3-5)$$

しかし、酵素活性低下反応速度を考慮しIMP残存率を算出する温度帯では、解析値と実験値に差が生じており、加熱初期において40℃試料は実験値の減衰が速く、50℃試料では解析値の減衰が速くなった。この原因として、IMP分解酵素の至適温度や酵素活性の温度依存性は実測値ではなく、予測値であるため、今後、検証する必要があると示唆された。

3.5 第3章の引用文献

- 1) 柳本正勝, 食べ物のおいしさに対する各感覚特性の貢献度, 日本調理科学会誌, 35 (1), 32-36 (2002)
- 2) 山口静子, 官能評価の信用性に関する一考察, 日本調理科学会誌, 42 (1), 1-8 (2009)
- 3) 沖谷明紘, 肉の食味, 日本食生活学会, 17 (2), 94-99 (2006)
- 4) 西村敏英, 食べ物の美味しさー味 食肉の美味しさに関わる呈味成分とその生成機構, *Foods & Food Ingred J. Jpn.*, 213, 4, 336-344 (2008)
- 5) 大羽和子, 調理科学と酵素, 日本調理科学会誌, 30, 1, 71-75 (1997)
- 6) 西村敏英, 加藤博通, 食肉の呈味形成における熟成の役割, 肉の科学, 29, 1, 1-13 (1988)
- 7) 畑江敬子, 加熱による味の変化, 香料, 227, 117-122 (2005)
- 8) 坂口守彦, 豊原治彦, 村田道代, 畜肉の貯蔵中におけるイノシン酸の蓄積と風味形成に対する役割, 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 10, 245-249 (1991)
- 9) N. D. Vani, V. K. Modi, S. Kavitha, N. M. Sachindra, N. S. Mahendrakar, Degradation of inosin-5'-monophosphate (IMP) in aqueous and in layering chicken muscle fibre systems: Effect of pH and temperature. *Elsevier*, 39, 627-632 (2006)
- 10) 富岡和子, 梁善雅, 遠藤金次, 加熱調理過程における獣鳥肉および魚肉中のイノシン酸分解, 日本家政学会誌, 44, 1, 11-16 (1993)
- 11) 永峰文洋, 福田裕, 高速液体クロマトグラフィーによる魚介類の鮮度指標『K値』の測定, *Asahipak Technical Bulletin*3 (1986)

追補 加熱処理時のグルタミン酸残存量変化

1. グルタミン酸について

グルタミン酸（以後、Glu）はイノシン酸と同様、畜肉の旨味に大きな影響を及ぼす。そこで本項目では、加熱処理後畜肉内に残存する Glu と、ドリップに流出する Glu を定量し、加熱処理が及ぼす影響について検証した。

アミノ酸の一種である Glu は存在方法が 2 種類に分けられ、1 つはタンパク質の構成物質として存在するものと、単体で存在する遊離グルタミン酸があり、味への影響は遊離アミノ酸由来とされる¹⁾。沖谷は牛肉、豚肉、鶏肉それぞれから作成したスープの呈味成分を分析した²⁾。その際、遊離アミノ酸組成は似ていたにもかかわらず、旨味に関する嗜好試験では鶏肉が最も高く、牛肉は最も低かった結果に対し、牛肉では Glu と IMP が少ないことを原因として挙げている。しかしながら、このように畜肉調理における呈味の研究では Glu と IMP が非常に着目されているにも関わらず、Glu に関する既存の研究ではスープ調理を想定した Glu の定量が主であり、畜肉に残存する Glu 量に関する知見は乏しいのが現状である^{3) 4)}。すなわち、加熱処理が及ぼす Glu 量の挙動を把握し、予測計算を可能とすることで、畜肉加工品の更なる品質向上が見込まれる。

2. 測定原理

グルタミン酸の測定には「ヤマサ L-グルタミン酸測定キット II (YAMASA L-Glutamate Assay Kit II)」を用いた。測定時に生じる反応機構について Fig. 1 に示した。

検体試料中に L-グルタミン酸が存在した場合、L-グルタミン酸オキシダーゼの酸化反応により、L-グルタミン酸より過酸化水素水が生成される。これに、4-アミノアンチピリンおよび DAOS を加え、さらにパーオキシダーゼを反応させることで、青色色素が生成されることから、この色素濃度の比色定量（吸光度測定）を行う。また検体試料とは別に、既知の Glu 濃度を検体試料とした吸光度測定を行い、吸光度から Glu 濃度に変換する較正曲線を作成する。この較正曲線を用いることで、検体中試料中の Glu の定量が可能となる。測定キットに含まれる発色試薬は、L-グルタミン酸オキシダーゼの酸化反応、4-アミノアンチピリン、DAOS、パーオキシダーゼ反応の役割を担う。

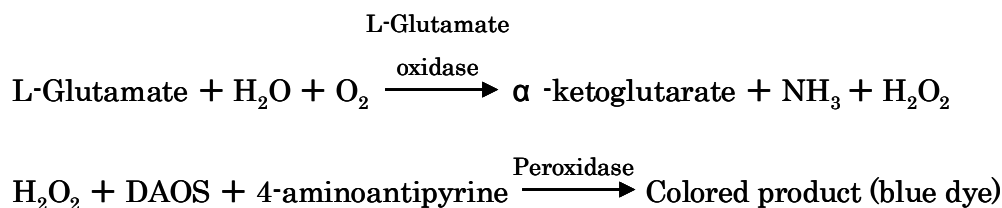


Fig.1 Chemical reaction when Glutamic acid is measured

3. 試料の調整と測定方法ならびに解析方法

本研究では、畜肉中に存在する Glu と、加熱調理時にドリップに流出する Glu 両方の定量を行った。

市販スライス状国産牛モモ肉を試料とし、プラスチックフィルムに真空包装後、30, 40, 50, 60, 70, 80°Cの異なる温度に設定した恒温湯槽 (As One, Thermal Robo TR-4) で 15 分等温加熱処理した。加熱終了後は恒温湯槽から試料を取り出し、氷水で試料温度が 20°Cになるまで冷却した。プラスチックフィルムから試料を取り出し、このうち試料 10 g を採取し、精製水 10 ml を加えた。その後、竹串を用いてホモジナイズ後、14,000×g で温度を 4 °Cに保った状態で 10 分間遠心分離 (TOMY, 微量高速遠心機 MX-305) した。上澄み液を採取し、これを加熱処理後畜肉中に存在する Glu の検体試料とした。また、加熱処理時に生じるドリップに流出する Glu の定量は、プラスチックフィルムに流出したドリップを採取し、2,000×g で 15 分間、常温下で遠心分離 (Hitachi Koki Co., Chibitan-R) 後、上澄み液を 2 倍希釈したものを検体試料とした。

検液 60 µl に発色試薬 600 µl 加え、常温で 20 分間放置後、分光光度計 (Shimazu, UV-240) で波長 600 nm における吸光度を測定した。吸光度測定値と校正曲線より検体中に含まれる Glu 量を算出した。

また、加熱前後の試料重量測定を行い、(1) 式に従って重量変化率を算出すると同時に、加熱後の重量 W_{after} (g) より、加熱後の畜肉 1.0 g に対する Glu 量 G_{after} ($mg \cdot g^{-1}_{meat}$) を算出した。また、(1) 式より加熱処理によって生じたドリップ量が判明することから、ドリップ 1 ml に対する Glu 量 G_{drip} ($mg \cdot L^{-1}_{drip}$) を算出した。さらに (2) 式を用い、加熱前の畜肉 1.0 g に対する Glu 量 G_{before} ($mg \cdot g^{-1}_{meat}$) を算出した。

(2) 式にはドリップの密度が必要となるが、この数値は、別途測定した $1.0 \text{ (cm}^3 \cdot \text{g}^{-1})$ を用いた。また、ドリップの密度は全ての加熱処理温度において等しかった。

$$drip \text{ (g)} = W_{before} - W_{after} \quad (1)$$

$$G_{before} \text{ (mg} \cdot \text{g}^{-1}_{meat}) = G_{drip} \text{ (mg} \cdot \text{L}^{-1}_{drip}) \times 2 \times 1.0 \text{ (L} \cdot \text{kg}^{-1}) \times \frac{1}{1000} \text{ (kg} \cdot \text{g}^{-1}) \times \frac{W_{before}}{W_{before} - W_{after}} \quad (2)$$

4. 結果および考察

加熱前の Glu 量 G_{before} を基準とし、加熱処理の温度の違いによる試料内に残存する Glu とドリップに流出する Glu の存在割合について、Fig.2 に示した。加熱処理温度 30, 40°C ではドリップがほとんど生じず、測定に十分なドリップの採取が困難であったため、 G_{after} のみを定量した。Fig. 2 の縦軸は、加熱前の Glu 量にあたる G_{before} ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{meat}}$) に対する割合であり、(3) 式より算出した。

$$\text{Ratio } (-) = \frac{G_{\text{after}}}{G_{\text{before}}} + \frac{G_{\text{drip}}}{G_{\text{before}}} \quad (3)$$

Fig. 2 より、畜肉中に含まれる Glu は、加熱処理温度 50°C までは増加するが、それ以降は減少し、ドリップ中に含まれる量は、加熱処理温度帯が上昇するにつれ増加する傾向を示した。Nishimura らにより、畜肉は加熱調理中、アミノペプチダーゼの影響により多少ではあるが遊離グルタミン酸が増加すると確認されており、今回畜肉中の Glu 増加はアミノペプチダーゼに起因すると考察できる⁵⁾。しかし、畜肉中とドリップ中に含まれる Glu 量の総和はほとんど変化せず、一定とみなせることから、今回行った加熱処理温度帯では Glu 自体の分解は生じないと判断した。また加熱処理温度が上昇するにつれ、ドリップ中の Glu の割合が高くなることから、ドリップ量を抑制する調理法を行うことで、畜肉中に残存する Glu の割合が高くなると考えられ、旨味低下の軽減が可能だと示唆された。すなわち、*sous-vide* 調理は重量損失が低い調理法であることから、*sous-vide* 法により調理した試料には、Glu は多く含まれていると考えられる。しかし、今回測定に用いた試料は加熱時間 15 分のみであり、加熱時間を変更することで Fig. 2 と異なる傾向を示す可能性も考えられる。すなわち本実験のみで加熱調理時の Glu の挙動を解明できたとは言い難い。そのため今後は他の加熱時間における同様な実験が必要である。そして今後の目標として、加熱処理時、畜肉内に残存する Glu 量変化の速度パラメーターを取得し、Glu 残存量の予測計算を可能とすると同時に、IMP と組み合わせた総合的な畜肉旨味の予測計算を行うことが挙げられる。

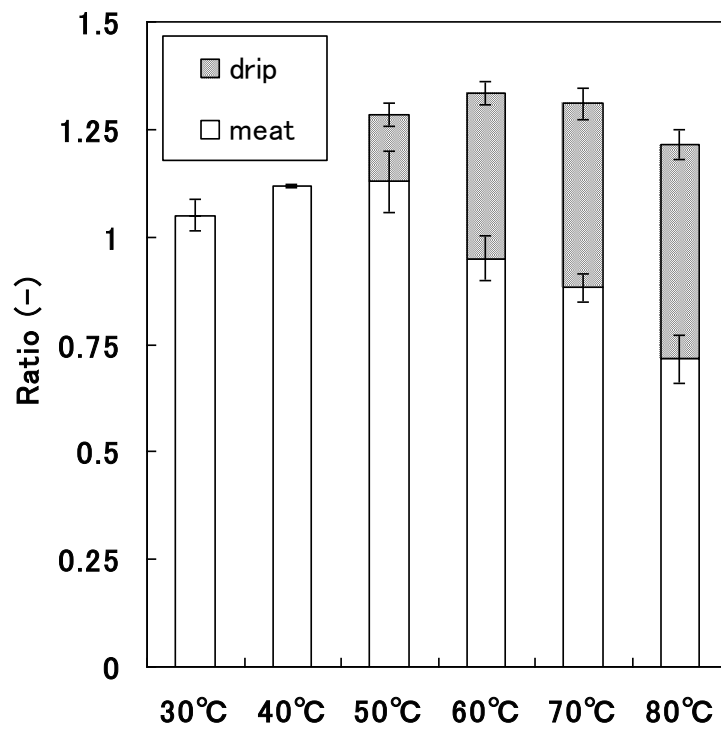


Fig. 2 Changes the amount of Glutamic acid by heat-treatment temperature

5. 追補の引用文献

- 1) 関澤春仁, 鶏肉に含まれる遊離グルタミン酸の簡易測定法, 養鶏の友, 543, 43-46 (2007)
- 2) 沖谷明紘, 肉の食味, 日本食生活学会, 17 (2), 94-99 (2006)
- 3) Seuss I., Martin M., Honikel K. O. the influence of various factors during preparation on the composition and the sensory properties of beef broth. 1. Effect of heating temperature and degree of comminution of the meat. Fleischwirtschaft, 70(8),913-920 (1990)
- 4) Sinesio F., Comendador F., Peperario M, Moneta E. Taste perception of Umami-rich dishes in Italian culinary tradition. J Sens Stud, 24(4), 554-580 (2009)
- 5) Nishimura T, Rhyu M. R., Kato H., Okitani A., Survey of neutral aminopeptidases in bovine, porcine, and chicken skeletal muscles. Agric Biol Chem, 54 (11) , 2769-2772 (1990)

第4章 伝熱解析に基づく畜肉品質変化の予測

4.1 はじめに

本章では、第1章で述べた *sous-vide* 法によるローストビーフ調理を例として、加熱調理の進行に伴って食材（畜肉）内部に形成される温度分布の変化を予測するために、非定常三次元熱伝導方程式を基本とした伝熱解析を行った。さらに、伝熱解析結果と第2章および第3章で実測した畜肉品質を左右する因子の速度パラメーター（タンパク質加熱変性速度、IMP分解反応速度およびIMP分解酵素活性低下速度）を組み合わせ、*sous-vide* 調理過程における品質変化の予測計算を行った。

また、タンパク質の熱変性はテクスチャーや重量に影響を与えることが判明しているにも関わらず、既存の研究では加熱処理温度と時間をもとに畜肉品質変化への影響を考察しており、タンパク質変性状況を考慮した考察は行われていない¹⁾⁵⁾。本研究では第2章でタンパク質加熱変性速度の速度パラメーターを実測していることから、等温実験を行った試料の各タンパク質変性率の時間変化をあらかじめ予測計算し、その結果をもとに加熱時間（加熱処理条件）を決定することで、タンパク質変性状況の観点から畜肉品質変化の考察を行った。畜肉の品質評価項目は多々あるが、本研究ではテクスチャーの指標となる弾性率と重量変化率に着目した。

4.2 三次元熱伝導解析

4.2.1 三次元伝熱解析および有限要素解析

本研究では非定常三次元熱伝導方程式を基本として、伝熱解析を行った。まず解析に用いた式を以下に示す。

非定常熱伝導の基礎方程式は(4-1)式であらわされる。

$$\kappa \cdot \nabla^2 T - \rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} = 0 \quad (4-1)$$

ここでの T は温度 (K)、 t は時間 (sec)、 κ は熱伝導率 ($\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)、 ρ は密度 ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)、 c_p は定圧比熱 ($\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) である。本研究では、試料調製時に用いた熱媒体が主に水であることから、熱伝達率は非常に大きいとみなし、加熱直後に試料表面が規定温度 T_c (°C)、すなわち環境温度に到達するとした境界条件を採用した。これを(4-2)式に示す。

$$T = T_c \quad (4-2)$$

また初期条件は、試料温度には不均一な温度分布は生じていないとみなし、かつ初期温度は解析値と比較する実験値の加熱開始時の温度と等しくした。

次に、(4-1) 式および境界条件、初期条件にもとづき解くための手段について述べる。本研究では、数値解を得るためのひとつの手法として、有限要素法を用いた。

構造物を要素に分割し、ある要素の温度分布を (4-3) 式に示す。

$$T(x, y, z : t) = \sum_{i=1}^n N_i(x, y, z) \phi_i(t) \quad (4-3)$$

ここでの $N_i(x, y, z)$ は節点温度と要素内部温度を結びつける内挿関数である。 $\phi_i(t)$ は時刻 t における節点 i の温度、 n は 1 要素当たりの節点数である。本解析では 1 要素当たり 8 節点とした。これを定式化すると、(4-4) 式であらわされる有限要素式が得られる。

$$[C_{mn}] \{\dot{\phi}_n\} + [K_{mn}] \{\phi_n\} = \{S_m\} \quad (4-4)$$

ここで、 $\dot{\phi}_n$ は時間微分をあらわす。また、

$$C_{mn} = \int_V \rho c N_m N_n dV$$

$$K_{mn} = \int_V \kappa \left(\frac{\partial N_m}{\partial x} \frac{\partial N_n}{\partial x} + \frac{\partial N_m}{\partial y} \frac{\partial N_n}{\partial y} + \frac{\partial N_m}{\partial z} \frac{\partial N_n}{\partial z} \right) dV + \int_{S_t} \alpha N_m N_n dS + \int_{S_t} \sigma \varepsilon F (T + T_\infty) N_m N_n dS$$

$$S_m = - \int_{S_t} q N_m dS + \int_{S_t} \alpha T_0 N_m dS + \int_{S_t} \sigma \varepsilon F T_\infty (T + T_\infty) (T^2 + T_\infty^2) N_m dS$$

上式 K_{mn} 、 S_m において T は前ステップの当該温度を用いればよい。

(4-3) 式について、時間 t に関する 1 階の微分方程式をクランク・ニコルソン差分で解くと、 dt を時間増分として (4-5) 式であらわされる。

$$\left(\frac{1}{\Delta t} [C_{mn}] + \frac{1}{2} [K_{mn}] \right) \{\phi_n\}_{t+\Delta t} = \left(\frac{1}{\Delta t} [C_{mn}] - \frac{1}{2} [K_{mn}] \right) \{\phi_n\}_t + \{S_m\} \quad (4-5)$$

(4-5) 式にもとづき、非定常熱伝導問題を時間方向に繰り返し計算することで、温度分布の時間変化が得られる。

4.2.2 解析モデル

解析のためのモデル作成には、有限要素プリプロセッサである FEMAP Version10.2 (UGS Corporation 製) を用いた。作成したモデルの節点、要素、伝熱面などの条件を基礎データとし、FORTRAN 原語で書かれたプログラムを用いて有限要素解析を行った。また、解析結果の可視化も FEMAP を用いて行った。

伝熱解析の対象は、第 1 章で述べた *sous-vide* 法によるローストビーフの調理である。解析モデルは辻学園で調理していただいた試料と、研究室で調理した 2 種類作成した。ところで、*sous-vide* 法は加熱前にあらかじめプラスチックフィルムに入れて試料を真空包装机で脱気密閉するため、真空包装時に試料の高さ方向が圧縮され、その分幅が大きくなり、加熱および冷却工程時の試料の形は真空包装前の形状 (直方体) とは異なった。しかしながら忠実な予測計算を行うには、解析モデルを実際の試料に近い形状にする必要がある。そこでモデル作成には Fig. 4-2 の手法を用いた。また、実際に作成した解析モデルを Fig. 4-1 に示した。(ここでの試料形状の呼称は、第 1 章と同じ定義である。(Fig. 1-7 参照))

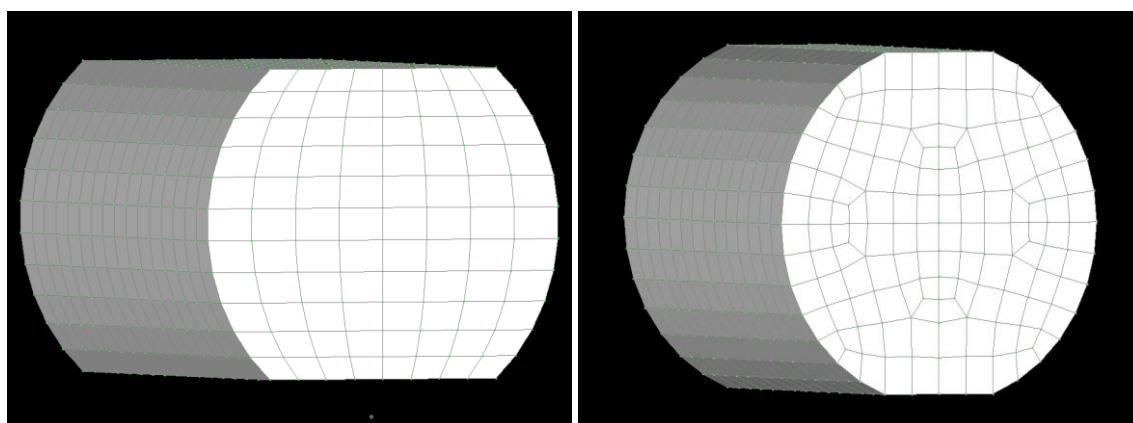
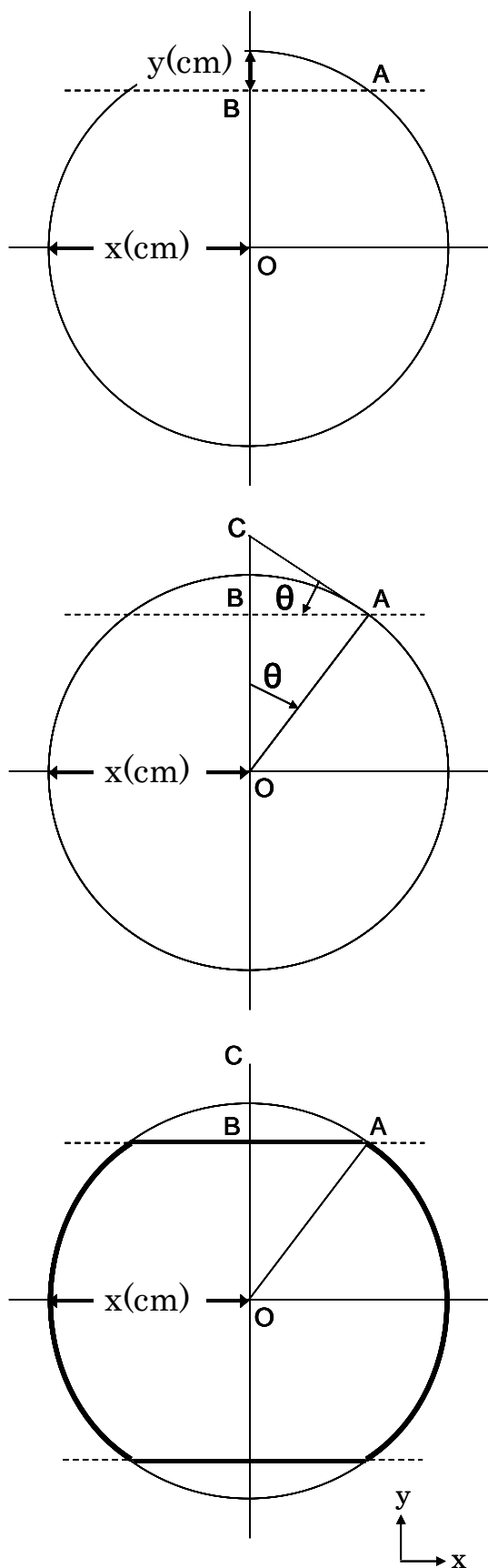


Fig. 4-1 Both are three dimensional element models for calculation. The left side is the Tsuji Academy model, the right side is the laboratory model.



① 試料を真空包装する際、長さ方向への圧縮は小さいことから、モデルの長さは実際の調理に用いた加熱前の試料と等しくした。また、高さで構成される断面積を、調理に用いた試料の高さ幅で構成される断面積 S (cm^2) と等しくした。調理に用いた試料は、真空包装前は直方体であることから、断面積 S (cm^2) = 高さ (cm) \times 幅 (cm) で算出できる。

② 真空包装後の幅を $2x$ (cm) とし、半径 x (cm) の円を断面積の基準とする。また圧縮により短くなった高さを y (cm)、 x 軸に対して平行に引いた直線と弧の交点を点 A とする。

③ 点 A から引いた接線と、 y 軸との交点を点 C とする。 $\angle CAB = \theta$ とすると、 $\triangle ABC$ と $\triangle OAC$ は相似関係であることから、 $\angle COA = \angle CAB = \theta$ となる。

④ 解析モデルにおいて、高さで構成される断面積は黒線で囲まれた部分に該当する。この面積を算出するには、 $\triangle OAB$ の面積と半径 x (cm)、角度が $90^\circ - \theta$ の扇形の面積を足し合わせ、4倍した面積と等しい。すなわちこの関係は (4-6) 式であらわされる。

$$\frac{1}{4} \pi \cdot x^2 - \frac{\theta}{360} \pi \cdot x^2 + \frac{\cos \theta \sin \theta}{2} \cdot x^2 = S \quad (4-6)$$

⑤ (4-6) 式に真空包装後の高さに近くなるような θ を代入し、半径 x (cm) を算出する。

Fig. 4-2 Method for making the three dimensional element model

4.2.3 結果および考察

4.2.1 に従い、FORTRAN 原語で書かれたプログラムを用いて、*sous-vide* 調理における加熱工程から冷却工程までの試料温度変化について解析を行った。加熱工程時の規定温度は加熱時の環境温度である 80°C、冷却工程の規定温度は冷却温度の環境温度である 2°C とした。またモデル中心位置の節点が 58°C 到達した際、規定温度を 80°C から 2°C に変更することで、実際の調理と同様な環境温度になるよう模擬した。第 1 章で示した辻学園で調理した試料と研究室で調理した試料の中心位置における実験値と、解析値の比較を Fig. 4-3 と Fig. 4-4 に示した。

Fig. 4-3, Fig. 4-4 とともに、解析値の中心温度は目標温度である 58°C 到達後すぐに冷却工程を開始していても関わらず、温度は下がらず温度が約 62°C まで上昇し、その後降下する実験値と同様な傾向となった。しかし、両方の結果において解析値の方が実験値よりも温度の立ち上がりが早く、また立ち上がり時の温度差は Fig. 4-3 の方が大きくなった。Fig. 4-3 の解析モデルは辻学園で調理していただいた際の実験をもとに作成している。辻学園では調理の際、スチームコンベクションオーブンを使用しており、熱媒体は気体である。しかし、本解析において熱伝達率を非常に大きいとみなし、境界条件を (4-2) 式に従うとしており、そのため差実験値と解析値に差が生じた原因と考えられる。しかしながら、最高到達温度の差は 2°C であり、実際に測定した場所が中心位置から多少ずれている可能性も考慮できることから、この温度差は大きな差とは言い難く、さらに、恒温湯槽で調理した研究室での実験値と解析値は良好に一致していることから、両方の解析結果は妥当であると判断した。

また、Fig. 4-3 と Fig. 4-4 の解析モデルの体積を比較すると、Fig. 4-4 の方が大きいにも関わらず (Table 1-3 および Table 1-4 参照)、中心温度が 58°C に到達するまでに要する時間に差がないことから、Fig. 4-4 の中心温度の上昇が速いことがわかる。これは、熱伝導率の高い熱媒体である液体を用いて調理した (恒温湯槽で調理した) ことがあげられる。このように、伝熱の進行は調理時に用いる調理器具によって異なり、さらにスチームコンベクションオーブンの性能によっても熱伝達係数は異なることが予想される。本研究では最も単純な境界条件を採用し伝熱解析を行ったが、今後より実際の加熱調理に則した解析を行うには、調理時に用いる熱媒体の影響や、*sous-vide* 調理の場合はフィルムで包装しているため、フィルムの熱抵抗値を考慮する必要があると示唆された。

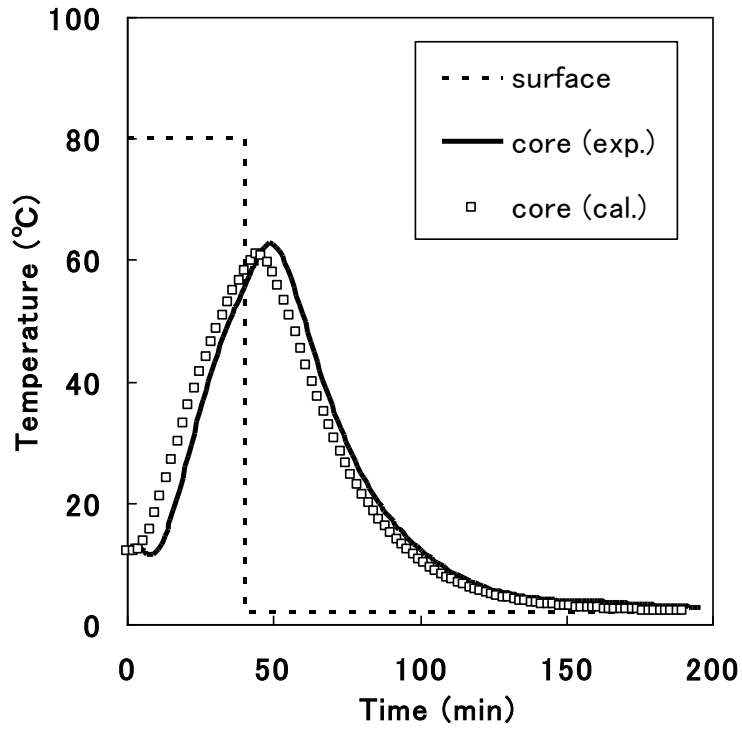


Fig. 4-3 Comparison between measured and calculated temperature history of meat during *sous-vide* cooking in the Tsuji Academy

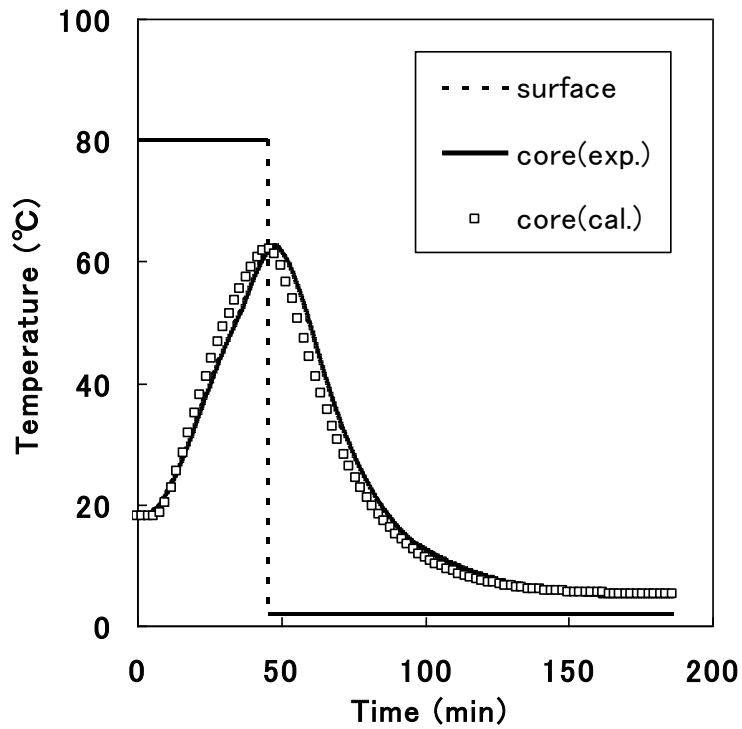


Fig. 4-4 Comparison between measured and calculated temperature history of meat during *sous-vide* cooking in the laboratory

4.3 *sous-vide* 調理過程におけるタンパク質変性率分布

非定常三次元熱伝導解析の解析値と実験値が良好に一致したことから、解析から得られた温度履歴と、第2章で述べた各タンパク質（ミオシンおよびアクチン）の活性化エネルギーと頻度因子より加熱変性速度を算出し、各タンパク質の未変性率および両タンパク質によって構築される畜肉筋細胞としての加熱による未変性率を推算した。解析モデル Fig. 4-1（辻学園で調理した試料）の中心位置における温度履歴および未変性率の時間変化を Fig. 4-5 に示した。Fig. 4-5 より、ミオシンとアクチンの未変性率の時間変化の様子が異なることがわかる。ミオシンは60°C以下の温度帯で変性可能なため、中心温度履歴が上昇するに従い徐々に変性が進行し、加熱工程途中の温度上昇区間ですでに未変性率が0に到達し、変性が終了する。これに対しアクチンは、最高温度である62°Cにおいても加熱変性速度は小さいためほとんど変性が進行せず、調理終了時でも未変性率が0.8にとどまることが明確になった。

さらに、試料中心断面位置にあたる長さ5.35 cmの温度および変性分布の時間変化を Fig. 4-6 にまとめた。Fig. 4-6 では、調理開始から5, 15, 30分後、冷却開始時間である43分後、冷却工程中である調理開始から90, 190分後の様子を抽出し、示した。Fig. 4-6 より、調理開始から試料表面から伝熱が進行し、加熱開始43分後に中心温度が目的である58°Cに到達後、冷却工程が開始していることがわかる。また、この温度上昇に伴い、各タンパク質および畜肉タンパク質全体の熱変性は伝熱の進行と同様、表面から進行していることがわかる。さらには、加熱開始43分の温度分布から表面は冷却により温度低下しているが、内部は余熱により温度上昇している様子が読み取れる。また、Fig. 4-6 から Fig. 4-5 と同様に、ミオシンは加熱工程途中の段階で試料表面から内部にわたり全て変性終了しているのに対し、アクチンは環境温度に到達している表面部分に変性終了しているが、内部はほとんど変性していないことがわかる。両タンパク質によって構築される畜肉筋細胞としての加熱による未変性率においても、アクチンの変性状況と同様に、表面部分に変性終了しているが、内部は変性終了していない。しかし、total 未変性率の算出に用いる(2-5)式は、アクチンの未変性率よりもミオシンの未変性率に大きく寄与していることから、アクチンのみの未変性率分布に比べ、内部でも変性が進行することが判明した。

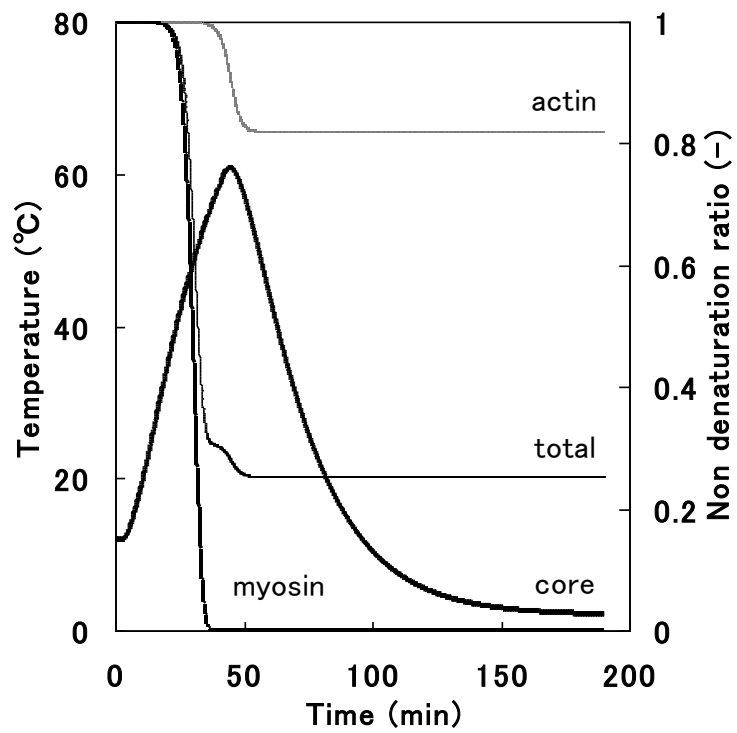
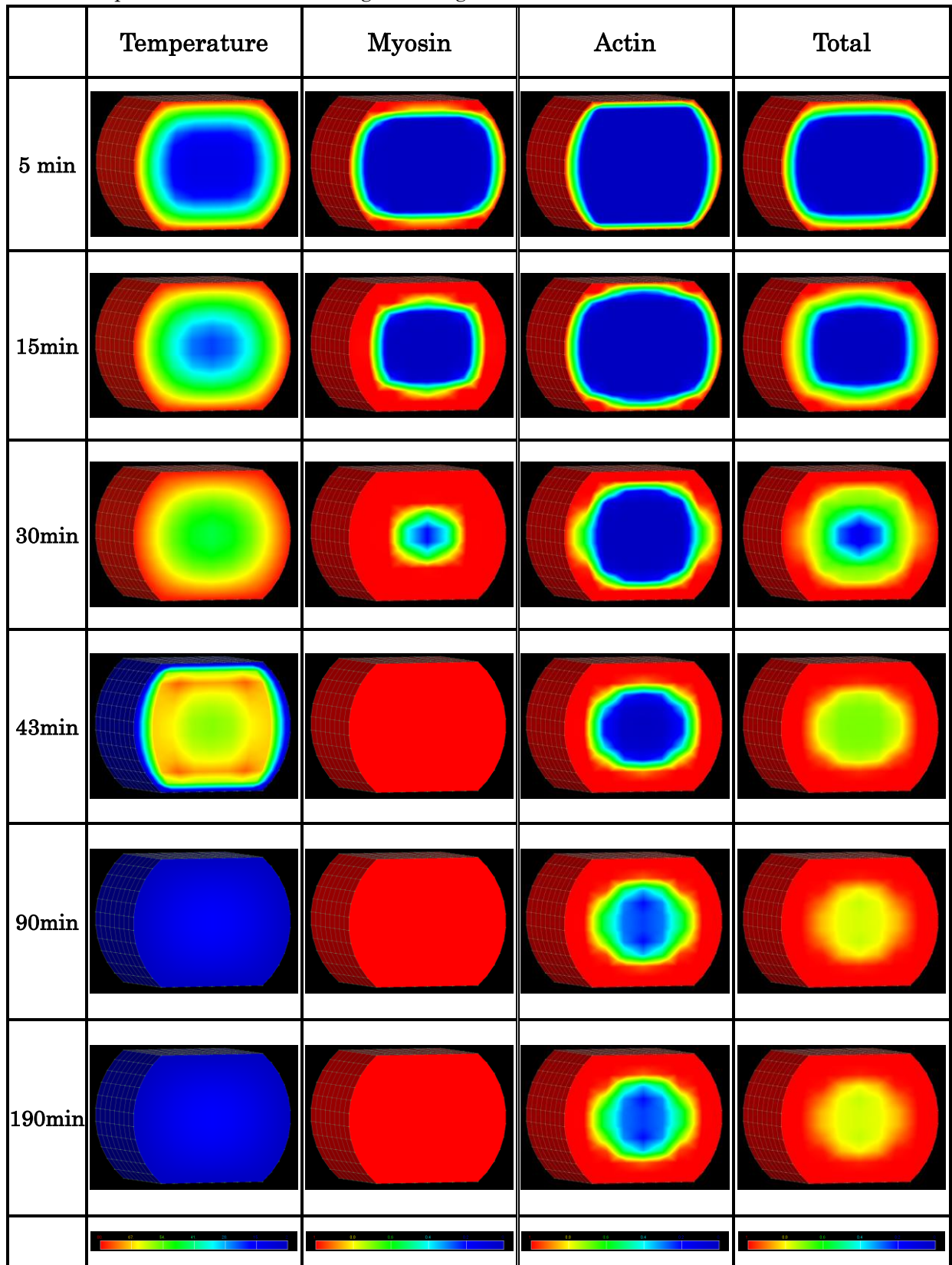


Fig. 4-5 The changes of the nondenaturation ratio of each meat protein and the total nondenaturation ratio were simulated based on calculated temperature history at the core

Fig. 4-6 Simulated distribution of temperature and denaturation in the central section at end point of *sous-vide* cooking (the length is 5.35 cm)



4.4 *sous-vide* 調理過程におけるイノシン酸 (IMP) 残存率分布

4.4.1 解析結果

非定常三次元熱伝導解析の解析値と実験値が良好に一致したことから、解析から得られた温度履歴と、第3章で述べたイノシン酸 (IMP) 分解反応と酵素活性低下反応の活性化エネルギーと頻度因子より IMP 分解反応速度および酵素活性低下反応速度を算出することで、IMP 残存率を推算した。解析モデル Fig. 4-1 (研究室で調理した試料) の中心位置における温度履歴および IMP 残存率と酵素活性の時間変化を Fig. 4-7 に示した。Fig. 4-7 より、酵素活性は中心温度が至適温度付近である 40°C 以下では低下しないため、初期値 ($A=1.0$) を保つが、中心温度が 40°C 付近に到達すると IMP 分解酵素の失活温度に該当するため急激に減少し、加熱開始 45 分後には酵素活性は 0 となった。そのため、酵素活性が高い温度帯では IMP が分解され残存率の低下し、IMP 分解酵素の至適温度付近では急激に残存率が低下した。しかし、酵素活性の低下に伴い IMP の分解は抑制され、残存率の低下は緩やかとなり、酵素活性がなくなった後の IMP 残存率は平衡値となった。

さらに、試料中心断面位置にあたる長さ 4.51 cm の温度分布、IMP 残存率分布および酵素活性分布の時間変化を Fig. 4-8 にまとめた。Fig. 4-8 では、調理開始から 5, 15, 25, 30 分後、冷却開始時間である 41 分後、冷却工程中である調理開始から 180 分後の様子を抽出し、示した。Fig. 4-8 より、調理開始から試料表面から伝熱が進行し、加熱開始 41 分後に中心温度が目的である 58°C に到達後、冷却工程が開始していることがわかる。

酵素活性は、加熱工程時の環境温度である 80°C では失活温度に値するため、調理開始直後から酵素活性は 0 となる。さらに、表面から内部へ温度が上昇するに従い、試料内部の酵素活性が低下する様子が読み取れる。IMP 残存率は、加熱開始直後に酵素活性が著しく低下している試料表面は、調理終了時においても IMP 初期含量と同等なのに対し、酵素活性が徐々に低下する試料内部は IMP 残存率が低下する様子が読み取れる。ところで、加熱開始 15 分から 30 分までの IMP 残存率分布は、表面と中心位置は IMP 残存率が高いが、その中間位置の数値は低いという、特徴的な分布となった。これは、試料表面から伝熱が進行し、表面と内部で温度差、すなわち不均一な温度分布が生じことに起因する。加熱開始直後の試料中心位置は酵素活性が低下する温度帯ではないが、IMP 分解反応速度が遅い温度帯でもあるため、IMP 分解反応は生じず、その結果、一時的に中心位置も表面と同様に高い IMP 残存率を保つと判明した。

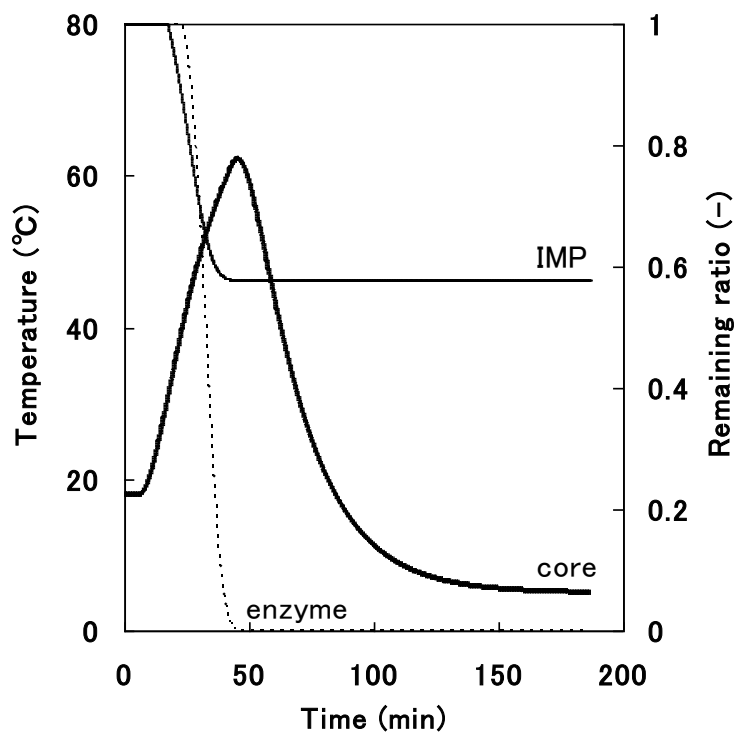
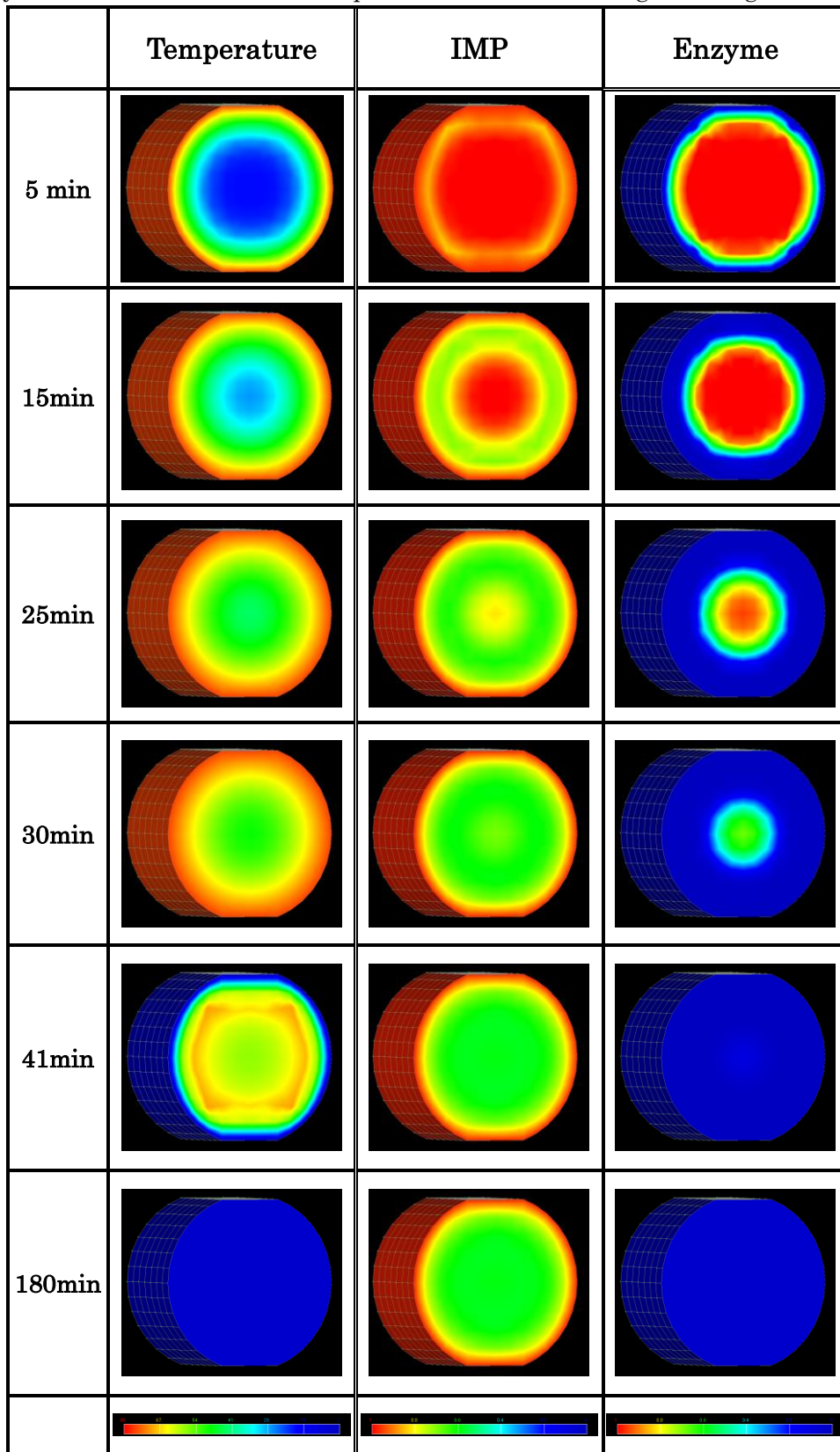


Fig. 4-7 The changes of IMP remaining ratio and enzyme activity were simulated based on calculated temperature history at the core

Fig. 4-8 Simulated distribution of temperature, IMP remaining ratio and the enzyme activity in the central section at end point of *sous-vide* cooking (the length is 4.51cm)



4.4.2 実験値と解析値の比較

畜肉全体を対象とした IMP 残存率の予測計算の有効性を確認するため、実験値と解析値の IMP 残存率を比較した。実験値は、第 1 章で述べた研究室で調理した試料から一部採取し抽出後、HPLC 分析に供し実測した。Fig. 4-8 より、試料内部には IMP 残存率分布が生じると判明しているため、比較するにあたり試料の座標位置を決定する必要がある。そこで本研究では試料中心断面における表面 (surface)、中心 (center)、そしてその中間 (middle) を基準とし、実験値と解析値との比較を行った。

調理した試料から HPLC 分析に供するため採取した位置について、Fig. 4-9 に示した。まず、長さ (厚さ) 1.0 cm の断面を採取した。調理終了時の試料の長さは 7.81 cm (Fig. 4-1) であるため、中心の長さは 3.905 cm にあたる。そこで、この中心 (長さ 3.905 cm) が、採取する厚さ 1.0 cm に含まれるようにし、その後、断面の中心、中間、表面をそれぞれ採取した。HPLC 分析による IMP 定量方法は、4.2.1 と同様に行った。

比較に用いた解析値の位置について、Fig. 4-10 に示した。Fig. 4-10 の断面図は、Fig. 4-8 と同じ位置にあたる。しかし、IMP 残存率算出に用いた解析モデルは、調理前の試料サイズをもとに作成しているため、中心断面は長さ 4.51 cm である。Fig. 4-10 の断面図を構成する節点のうち、実験値測定と同等な座標位置を抽出し、その節点における IMP 残存率の平均値を算出した。

上記方法に従い、算出した実験値と解析値を比較した結果を Fig. 4-11 に示した。実験値も解析値と同様、試料表面は、調理終了時においても IMP 分解はほとんど生じず、初期含量と同等なのに対し、試料内部に位置するに従い残存率は低下した。すなわち、解析値と同様な傾向となったことから、予測計算の有効性を確認することができた。しかし数値を比較すると、表面では解析値と実験値はほぼ同等だが、その他の 2 点では解析値は実験値よりも大きい値を示した。この要因として、実験に用いた試料重量の不足があげられる。通常、抽出液を作成する際には 2 g の試料を用いる。表面部位は、十分な 2 g 以上の試料採取が可能であったが、その他の位置の試料重量は 2 g に至らなかった。これは、位置によって IMP 残存率が異なると予測計算より判明しているため、広範囲で試料を採取した場合、IMP 残存率のばらつきが大きくなることを懸念し、採取する範囲を狭める、すなわち試料重量を少なくすることで、ばらつきの抑制を試みた。しかしこの対策により IMP 量の位置によるばらつきは小さくならなかったが、試料重量が少なかつたため抽出液中の IMP 量が少量となり、HPLC 分析で感知出来なかつた可能性が考えられる。さらに、試料内部における実験値と解析値の差が大きいことから、IMP 分解酵素の至適温度付近 (40°C) での IMP 分解反応および酵素活性低下反応の挙動が適正にあらわされていないことを示唆している。すなわち今後、実験値および解析値両方において改善が必要だと判断した。

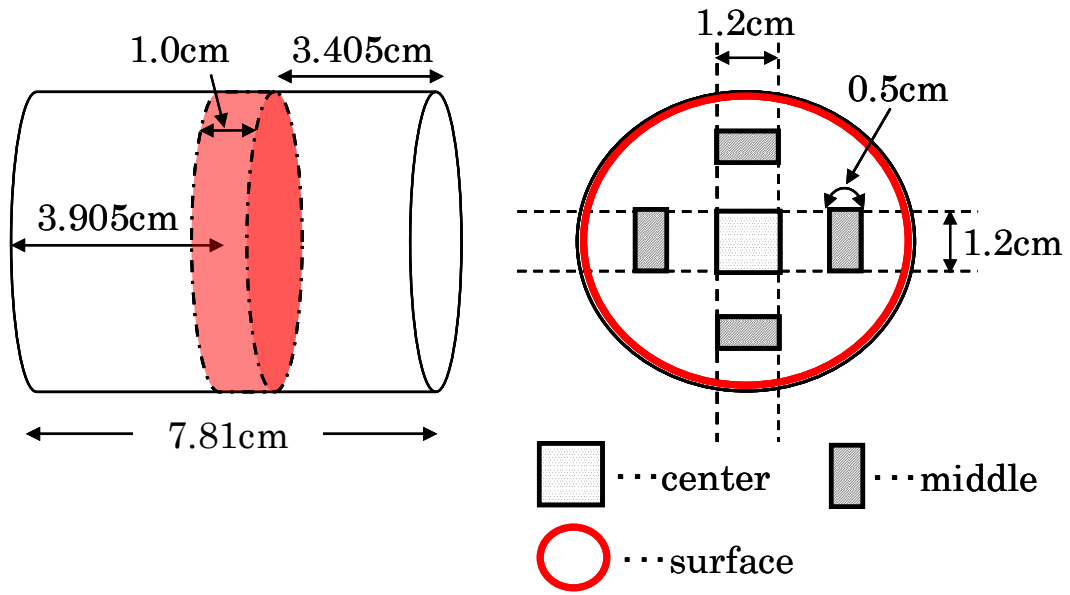


Fig. 4-9 Diagrammatic illustration at position sampled to measure IMP remaining ratio

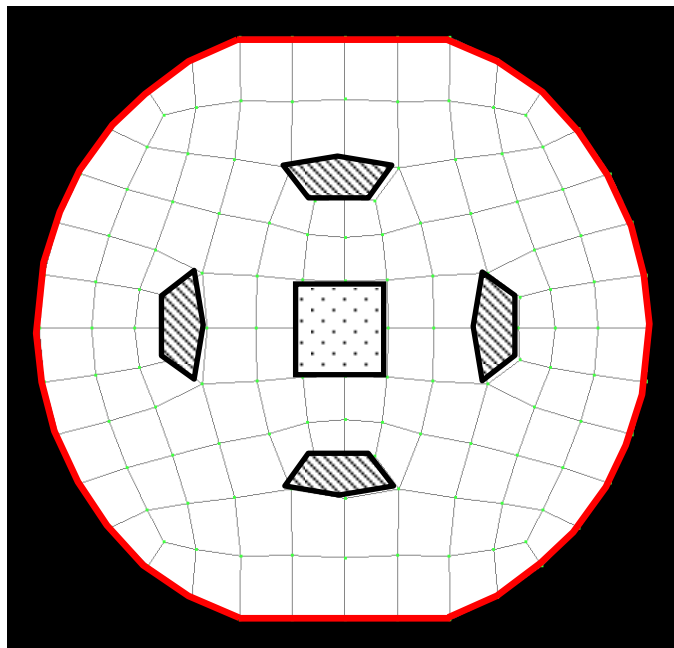
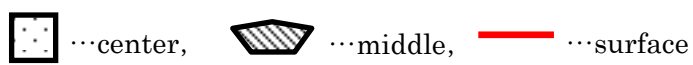


Fig. 4-10 Position of analytical model compared with measured IMP remaining ratio



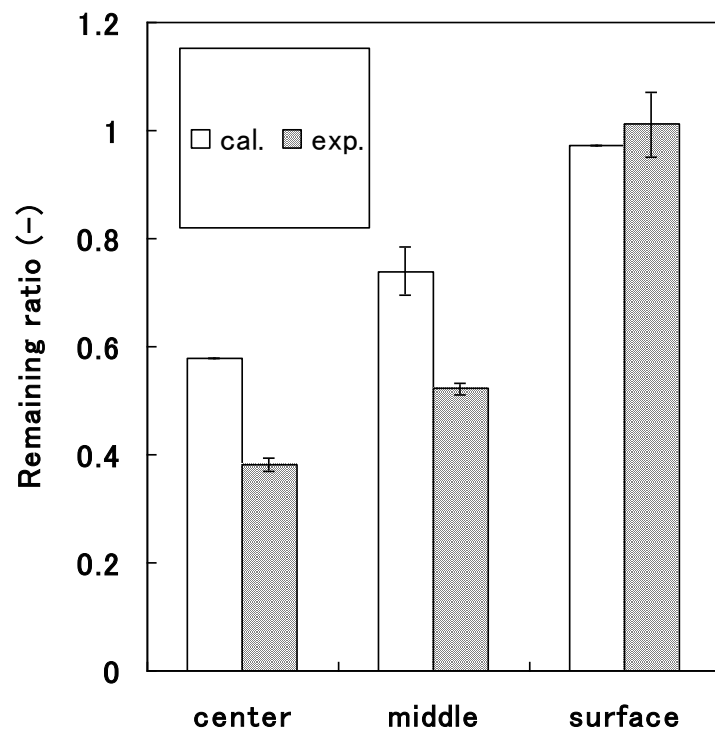


Fig. 4-11 Comparison between measured and calculated values at the end point of *sous-vide* cooking. (n=4)

4.5 タンパク質加熱変性が及ぼす弾性率への影響

4.5.1 応力緩和測定原理⁸⁾⁹⁾

物体を変形させ、その変形を保っておくと時間とともに応力が減少する現象を応力緩和(stress relaxation)という。応力緩和の現象は、スプリングとダッシュポットを直列に組み合わせ合わせたマックスウェル模型を並列に組み合わせることであらわされる。これらの模型を Fig. 4-12 に示した。応力緩和曲線を逐次近似法解析することで、測定した試料の弾性率を算出することができる。

応力緩和測定で得られたデータを用いて、応力の対数値 $\ln P(t)$ を時間に対してプロットした図が Fig. 4-13 である。Fig. 4-13 より、時間の大きいところでは直線となるのに対し、時間の小さいところでは曲線となることがわかる。また、最も大きい緩和時間をもつ要素の弾性率を E_1 とすると、この直線の時間 0 での切片は eE_1 となり、ここでの e は測定条件である圧縮変形であるため、 E_1 を算出することができる。

$$E(t) = \frac{P}{e} = \sum_{i=1}^n E_i \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (4-7)$$

また、残りの応力は算出した要素を引いた残りと考えることができることから、(4-8) 式の左辺の対数値を時間に対してプロットが直線になるまで同様の操作を行うことで、緩和時間の小さい要素における弾性率の算出が可能となる。

$$P - eE_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) = e \sum_{i=2}^n E_i \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (4-8)$$

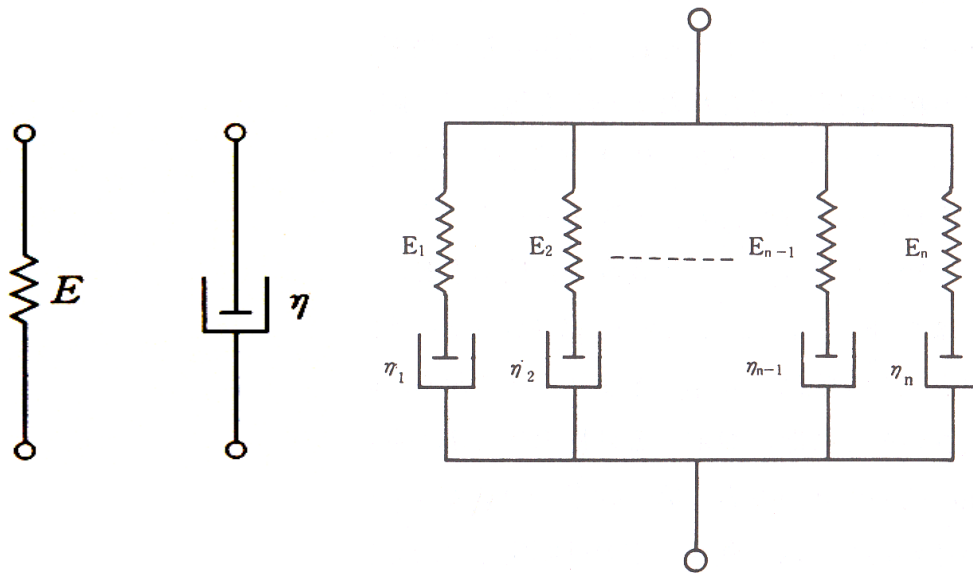


Fig. 4-12 スプリング，ダッシュポットおよび一般化されたマックスウェル模型⁹⁾

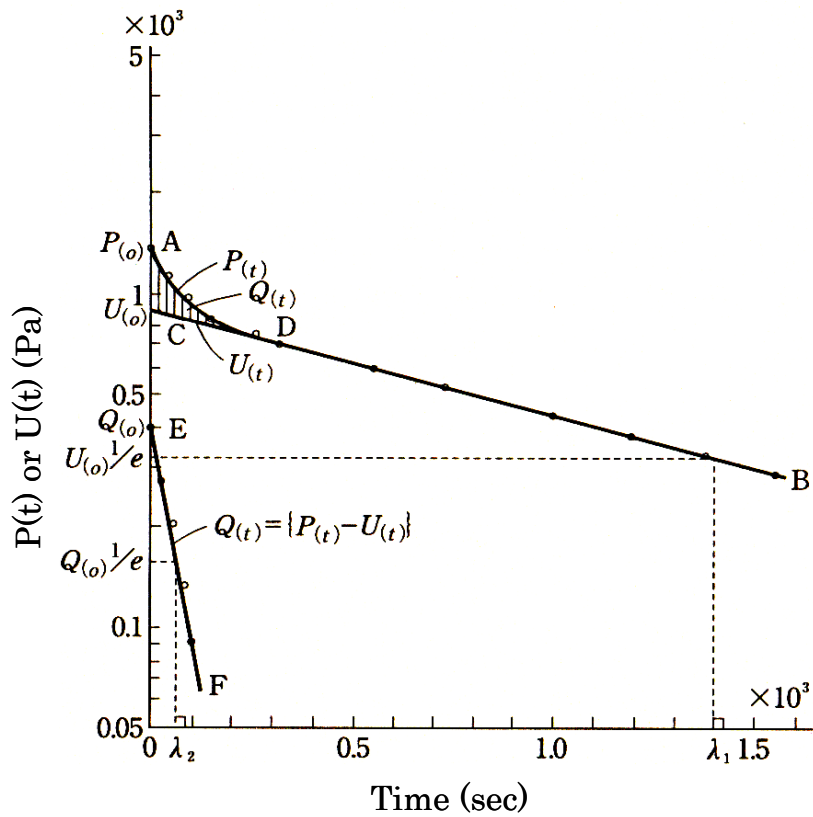


Fig. 4-13 弾性率算出に用いる逐次近似法の例⁸⁾

4.5.2 試料の調製と測定方法

応力緩和測定を行い、テクスチャーの指標となる弾性率を算出した。市販ブロック状国産牛モモ肉を試料とし、1.5×2.0×2.0 cm に成形後、恒温湯槽 (As One, Thermal Robo TR-4) で加熱処理を行なった。一定時間目的の温度で加熱後、恒温湯槽から試料を取り出し、氷水で試料温度が 20℃ になるまで冷却した。加熱処理を行なった試料を、レオメータ (YAMADEN 製, RE-3305S) を用いて応力緩和測定を行った。プランジャーは直径 40 mm の円筒形、圧縮速度は 5 mm・sec⁻¹、圧縮変形は 0.3、一定歪の保持時間は 3 分間、荷重をかける断面積は 1.5×2.0 cm とした。

加熱温度および時間は、成形した試料 (1.5×2.0×2.0 cm) に対して、第 2 章で求めたタンパク質の加熱変性速度定数を利用し、目的とするタンパク質変性率を推算し、目的の変性率になる加熱処理条件を探した。しかし、試料形態はブロック状であることから、温度分布および変性率分布が存在する。そこで今回は試料中心位置 (0.75×1.0×1.0 cm) を基準とし、目的の変性率になるような加熱処理条件を探した。加熱処理条件として採用した加熱温度、時間および推算した試料中心における未変性率を Table 4-1 に示した。

Table 4-1 Heat-treatment conditions (temperature and time) and calculated values of the non denaturation ratio of proteins and total non denaturation ratio at core

| Heating temp. | time (min) | myosin | actin | total |
|---------------|------------|--------|-------|-------|
| 50℃ | 5.750 | 0.500 | 1.000 | 0.654 |
| 50℃ | 20.00 | 0.000 | 0.996 | 0.308 |
| 70℃ | 5.533 | 0.000 | 0.500 | 0.154 |
| 70℃ | 12.88 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

4.5.3 結果および考察

多くの食品は複数の要素から成り立っている。今回、未加熱・加熱処理を行った畜肉の応力緩和測定より弾性率を算出したところ、2~4 の要素で構成されていることが確認された。試料により要素数が異なることから、最も大きい緩和時間をもつ第一要素の弾性率を比較した。未加熱試料に加え、変性状況の異なる 4 種類の加熱試料における弾性率を Fig. 4-14 に示した。Fig. 4-14 より変性が進行するに従い、弾性率が上昇することがわかる。また、未加熱試料からミオシンの変性が終了する試料までの数値の差は比較的小さいが、アクチンの変性が開始するに従い飛躍的に数値が上昇する様子が読み取れる。Bertola らにより、アクチンが変性すると畜肉の硬さは著しく増大すると判明しており、本研究でも同様な結果が得られたといえる²⁾。

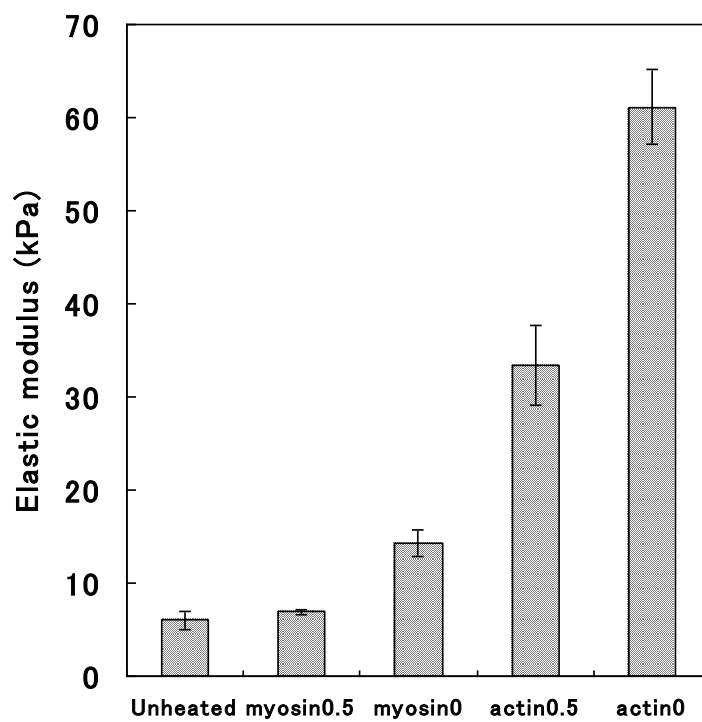


Fig. 4-14 Effect of heating temperature on elastic modulus of meat

4.6 タンパク質加熱変性が及ぼす重量変化率への影響

4.6.1 畜肉の保水力（重量変化率）測定

保水力とは畜肉が細切り，混合，加熱等の物理的処理を受けている間に畜肉自身がもともと持っている水，あるいは添加された水をどれほど保持可能か示す能力であり，畜肉の質評価のうえで，保水力は重要な要素とされている^{10) 11)}．保水力の測定法には，試料に圧力を加え，進出する肉汁量（以後，ドリップ）から算出する加圧ろ紙法と，試料を遠心分離し，得られたドリップから求める遠心法の2種類存在する．しかし，これらの測定法は圧力の大小，加圧時間，温度，湿度および遠心回転数等が測定値に大きな影響を及ぼすため，容易に測定することは困難である．また，この測定に用いる試料はひき肉を用いることが多いことから，本研究で対象としている温度分布および変性分布が生じるブロック状試料において同様の測定法を用いることは不適であると考えた．そこで今回 Pan ら保水力測定の代替手法として採用した重量変化率を参考にし，実験を行った¹²⁾．

4.6.2 試料の調製と測定方法

市販国産牛モモ肉を試料とした．試料は加熱直後に試料全体が加熱温度に到達する一次元平板モデルと想定したものと，温度分布が生じるような三次元モデル（ブロック状試料）の2種類用意した．一次元平板モデル試料は，スライス状態で市販されている試料を用い，4.0×4.0 cm に，三次元モデル試料はブロック状態で市販されている試料を 1.5×2.0×2.0 cm に成形した．両方の試料とも成形後，恒温湯槽（As One, Thermal Robo TR-4）で加熱処理を行なった．一定時間目的の温度で加熱後，恒温湯槽から試料を取り出し，氷水で試料温度が室温になるまで冷却した．加熱前後の試料重量を測定し，加熱前の重量を W_{before} (g)，加熱後の重量を W_{after} (g) とし，これを (4-9) 式に代入することで，重量変化率を算出した．

一次元平板モデル試料は厚さが約 1 mm と非常に薄いため，高さ方向に温度分布および変性率分布は生じないと考えタンパク質変性率を推算した．また，三次元モデルは Table 4-1 と同一条件とした．一次元平板モデルにおける加熱時間と試料表面における未変性率との関係を Table 4-2 に示す．

$$\text{Weight change ratio (-)} = \frac{W_{before} - W_{after}}{W_{before}} \quad (4-9)$$

4.6.3 結果および考察

まず一次元平板モデルの結果を Fig. 4-15 に示した．Fig. 4-15 において，**A** はミオシンが変性している領域，**B** はミオシンの変性が終了し，アクチンが変性している領域，**C** はミオシンとアクチン共に変性が終了した過加熱領域にあたる．**C** 領域では，どのプロット

においても total 未変性率は 0 となるが、加熱時間が異なるため別途未変性率を定義する必要がある。そこで、加熱処理温度 70°C で 10 分間加熱した試料の未変性率を-0.1、12 分間加熱した試料の未変性率を-0.2 とした。Fig. 4-15 より、変性が進行するに従い保持されていた水溶性タンパク質を含む水分や融解した脂肪などの油分、すなわちドリップの流出により重量減少し、ミオシンとアクチン両方のタンパク質変性が終了すると、重量変化率は平衡値になることが明らかとなった。また、Fig. 4-16 で示した三次元モデルにおいても、変性が進行するに従い重量減少する傾向となり、さらにアクチンの変性が始まると、飛躍的に数値が変化（低下）する弾性率と同様な傾向を示した。

ところで、第 2 章で述べた *sous-vide* 調理で調理した試料の重量損失は 15% と、通常の調理法と比較すると低い数値である。重量損失 15% にあたる重量変化率 0.85 付近は、Fig. 4-15 ではミオシンの変性完了時（ミオシンの未変性率 0、アクチンの未変性率 1.0）、Fig. 4-16 では試料中心位置におけるアクチンの未変性率が 0.5 に該当する。また 4.3 より、*sous-vide* 調理の終了時は、畜肉表面は全ての畜肉タンパク質が変性終了しているが、内部のアクチンはほとんど変性していないことが予測計算で明らかとなっている。つまり、*sous-vide* 法により調理した試料の重量損失が低い理由として、アクチンの変性が全て終了していないことがあげられる。

また、アクチンの変性が始まると弾性率および重量変化率の数値が飛躍的に変化したことから、2 種類ある主要タンパク質のうち、アクチンが変性すると畜肉タンパク質の構造は大きく変化し、その結果、テクスチャーや重量変化といった品質に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

Table 4-2 Heat-treatment conditions (temperature and time) and calculated values of the non denaturation ratio of proteins and total non denaturation ratio

| Heating temp. | time (min) | non denaturation ratio (-) | | |
|---------------|------------|----------------------------|-------|-------|
| | | myosin | actin | total |
| 50°C | 0.50 | 0.20 | 0.00 | 0.14 |
| | 0.80 | 0.30 | 0.00 | 0.21 |
| | 1.15 | 0.40 | 0.00 | 0.28 |
| | 1.55 | 0.50 | 0.00 | 0.35 |
| | 2.05 | 0.60 | 0.00 | 0.41 |
| | 2.70 | 0.70 | 0.00 | 0.48 |
| | 3.60 | 0.80 | 0.00 | 0.55 |
| | 5.15 | 0.90 | 0.00 | 0.62 |
| | 15.00 | 1.00 | 0.00 | 0.69 |
| 65°C | 1.57 | 1.00 | 0.20 | 0.75 |
| 70°C | 0.50 | 1.00 | 0.40 | 0.88 |
| | 0.90 | 1.00 | 0.60 | 0.94 |
| | 1.58 | 1.00 | 0.80 | 1.00 |
| | 7.45 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| | 10.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| | 12.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |

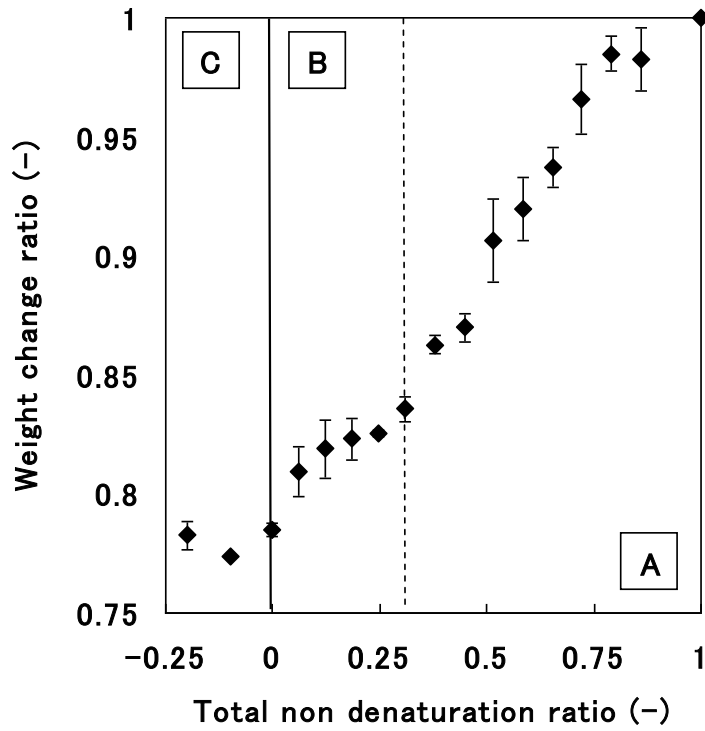


Fig. 4-15 Changes in weight change ratio during heating. The model doesn't have the temperature distribution against thickness.

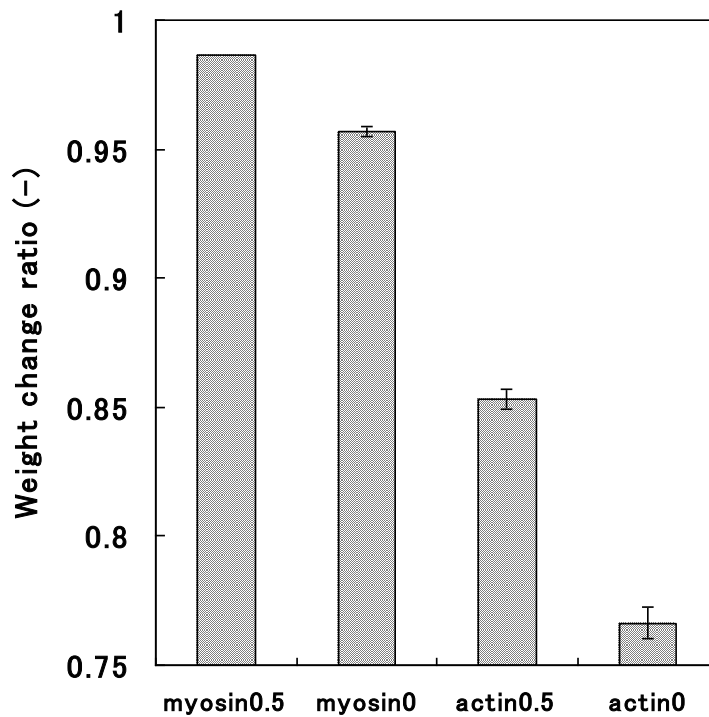


Fig. 4-16 Effect of heating temperature on weight-loss ratio of meat

4.7 第4章のまとめ

本章では、*sous-vide* 法によるローストビーフ調理を例として、加熱調理の進行に伴って食材（畜肉）内部に形成される温度分布の変化を予測するために、非定常三次元熱伝導方程式を基本とした伝熱解析を行った。辻学園および研究室で *sous-vide* 調理した際取得した伝熱データと解析値を比較したところ、中心温度履歴は良好に一致した。そこで、得られた解析値と、第2章、第3章で算出した畜肉品質を左右する因子の速度パラメーターを組み合わせ、*sous-vide* 調理過程における、タンパク質変性およびIMP残存量の予測計算を行った。タンパク質変性は、試料表面は2種類の主要タンパク質（ミオシン、アクチン）の両方の変性が終了しているが、内部ではタンパク質により変性状況が異なり、ミオシンは変性終了しているのに対し、70℃付近の高温で変性するアクチンはほとんど変性していないことが明らかとなった。IMP残存率は、加熱開始直後に酵素活性が著しく低下している試料表面は、調理終了時においてもIMP初期含量と同等なのに対し、酵素活性が徐々に低下する試料内部のIMP残存率は初期量の約半分まで低下することが判明した。また、実験値と解析値を比較したところ、数値に差はあったが、試料位置に応じた数値の減少傾向は同様であったが、試料内部における実験値と解析値の差が大きいことから、IMP分解酵素の至適温度付近（40℃）でのIMP分解反応および酵素活性低下反応の挙動が適正にあらわされていないことを示唆した。さらに、予測計算をもとにタンパク質変性率が判明している試料を用いて、テクスチャーの指標となる弾性率、重量変化率の測定を行い、タンパク質変性状況の観点から、畜肉品質変化の考察を行った。その結果、2種類ある主要タンパク質のうち、70℃付近の温度で変性するアクチンが変性すると、弾性率および重量変化率の数値が急激に変化したことから、アクチンの変性は畜肉の品質に大きな影響を及ぼすと判明した。さらには、*sous-vide* 法により調理した試料の重量損失が低い要因は、アクチンが変性していないことに由来すると明らかとなった。

4.8 第4章の引用文献

- 1) Tornberg E. Effect of heat on meat proteins-implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70, 496-508 (2005)
- 2) Bertola N. C., Bevilacqua A. E., Zaritzky N. E. Heat treatment effect on texture changes and thermal denaturation of proteins in beef muscle. *J Food Process Preserv*, 18(1), 31-46 (1994)
- 3) Matheven E., Mioche L., Culioli J. texture analysis of beef cooked at various temperatures by mechanical measurements, sensory assessments and electromyography. *J Texture Stud*, 26(2), 175-192 (1995)
- 4) 貝田さおり, 渋川祥子, 玉川雅章, 牛肉の鉄板焼き調理における最適加熱条件, *日本家政学会誌*, 50 (2) , 147-154 (1999)
- 5) 畑江敬子, 牛肉の加熱調理に伴う変化, *食肉の科学*, 43 (2) , 121-129 (2002)
- 6) 沖谷明紘, 肉の食味, *日本食生活学会*, 17 (2), 94-99 (2006)
- 7) 西村敏英, 食べ物の美味しさー味 食肉の美味しさに関わる呈味成分とその生成機構, *Foods & Food Ingred J. Jpn.*, 213, 4, 336-344 (2008)
- 8) 磯直道, 水野治夫, 小川廣男, 食品のレオロジーー食の物性評価ー, 成山堂書店, p53, 63, 64 (1998)
- 9) 中濱信子, 大越ひろ, 森高初恵, おいしさのレオロジー, 弘学出版, p46-49(1997)
- 10) 池田敏雄, 斎藤不二男, 安藤四郎, 畜肉の保水力に関する研究 I. 保水力の測定方法について, *畜産試験場研究報告*, 18, 15-20 (1968)
- 11) 沼田正寛, 食肉製品の加工技術に関する最近の研究傾向, *調理科学*, 26 (4) , 349-358 (1993)
- 12) Pan Z., Singh R. P., Physical and thermal properties of ground beef during cooking. *Lebensm Wiss Technol*, 34(7), 437-444 (2001)

追補 三次元モデル (1.5×2.0×2.0 cm) における温度および変性分布の予測計算

1. はじめに

弾性率および重量変化率の実験は、あらかじめタンパク質変性率の時間変化の予測計算を行い、その結果をもとに加熱処理条件を決定した。本項ではその際行った解析条件について説明するとともに、解析結果の考察を述べる。

2. 解析条件

解析のためのモデル作成は、5.2.2 と同様、有限要素プリプロセッサである FEMAP Version10.2 (UGS Corporation 製) を用い、FORTRAN を用いて非定常三次元熱伝導解析を行った。解析モデルは実験試料と同じ 1.5×2.0×2.0 cm とした。

境界条件は、試料を加熱処理した際、プラスチックフィルムによる包装を行わず、かつ試料調製時に用いた熱媒体が水であることから熱伝達率は非常に大きいとみなし、(4-2) 式に従うとした。すなわち、規定温度 T_c は環境温度と等しくし、またミオシンの変性を対象とした解析では 50°C、アクチンの変性を対象とした解析では 70°C を用いた。また初期条件は、試料温度には不均一な温度分布は生じていないとみなし、かつ初期温度はすべて 15°C とした。

$$T = T_c \quad (4-2)$$

さらに伝熱解析結果と第 2 章で実測したタンパク質加熱変性速度の速度パラメーターを用い、各タンパク質および畜肉タンパク質全体の未変性率を算出した。

3. 結果および考察

試料中心位置 (0.75×1.0×1.0 cm) における温度履歴と各タンパク質および畜肉全体のタンパク質未変性率の時間変化を Fig. 1, Fig. 2 に、試料中心断面位置にあたる温度および total 未変性分布の時間変化を Fig. 3, Fig. 4 に示す。(※Fig. 1, Fig. 3 は規定温度を 50°C, Fig. 2, Fig. 4 は規定温度を 70°C と設定し解析した結果である。)

Fig.1, Fig.2 の両方において、中心温度は約 10 分後に環境温度に到達することがわかる。Fig.1 では、ミオシンは加熱開始から変性が開始し、中心温度が環境温度に到達後は著しく変性が進行した後、加熱開始 20 分後に変性終了する様子が読み取れる。これに対し、50°C ではアクチンの加熱変性速度定数は小さいため、アクチンの変性は進行せず、20 分後においても未変性率は 1.0 に近い値であった。しかし、70°C で加熱した場合、アクチンの変性速度は大きいため変性が進行し、加熱開始 13 分後にアクチンの未変性率が 0 に到達した。またこの際、total 未変性率も 0 となることが Fig. 2 より明らかとなった。

Fig. 3, Fig. 4 の両方において、試料表面から内部に向け伝熱が進行し、その後伝熱進

行に伴い、タンパク質の変性が進行する様子や、加熱開始 5 分後では不均一な変性分布が生じている様子がわかる。加熱開始 15 分後の不均一な変性分布は、Fig. 3 , Fig. 4 ともに存在しないが、この原因は異なる。Fig. 4 は全ての位置においてアクチンを含むタンパク質が変性完了しているため、未変性率は 0 である。しかし、Fig. 3 では、Fig. 1 の解析結果と同様に、アクチンの変性が進行しない温度帯であるため、アクチンの未変性率は 1.0 を保ち、その結果ミオシンの変性終了後の total 未変性率は平衡値となる。このように、加熱処理温度の違いによりタンパク質の変性進行状況や、分布状況が異なることが明確となった。

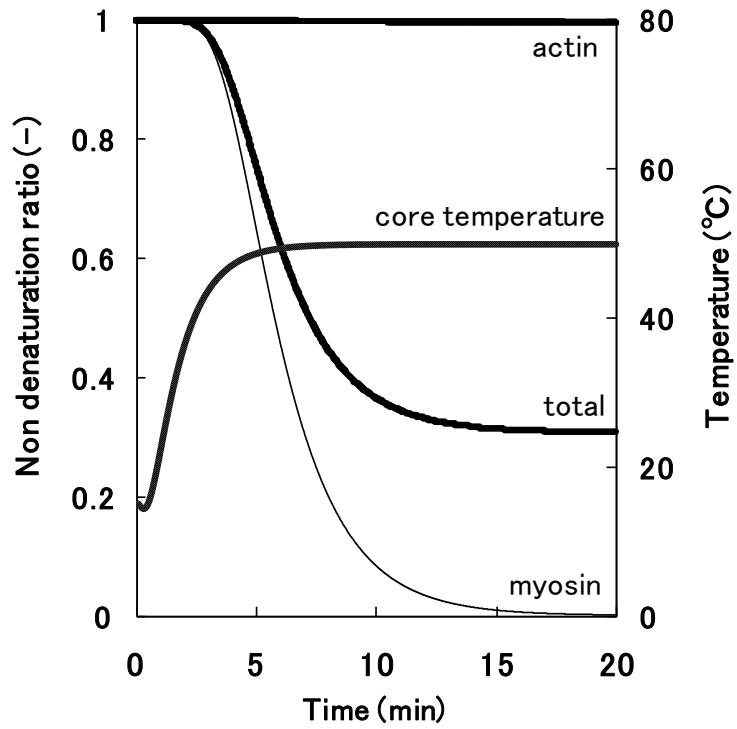


Fig. 1 The changes of the nondenaturation ratio of meat protein were simulated based on calculated temperature history at the core. The ambient temperature was 50°C.

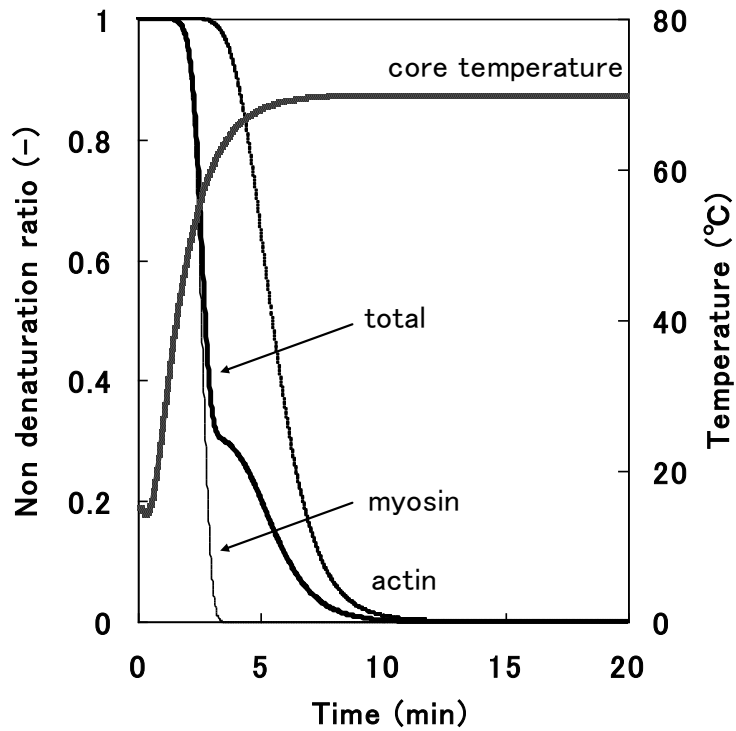


Fig. 2 The changes of the nondenaturation ratio of meat protein were simulated based on calculated temperature history at the core. The ambient temperature was 70°C.

Fig. 3 Simulated distribution of temperature and denaturation in the central section. The ambient temperature was 50°C.

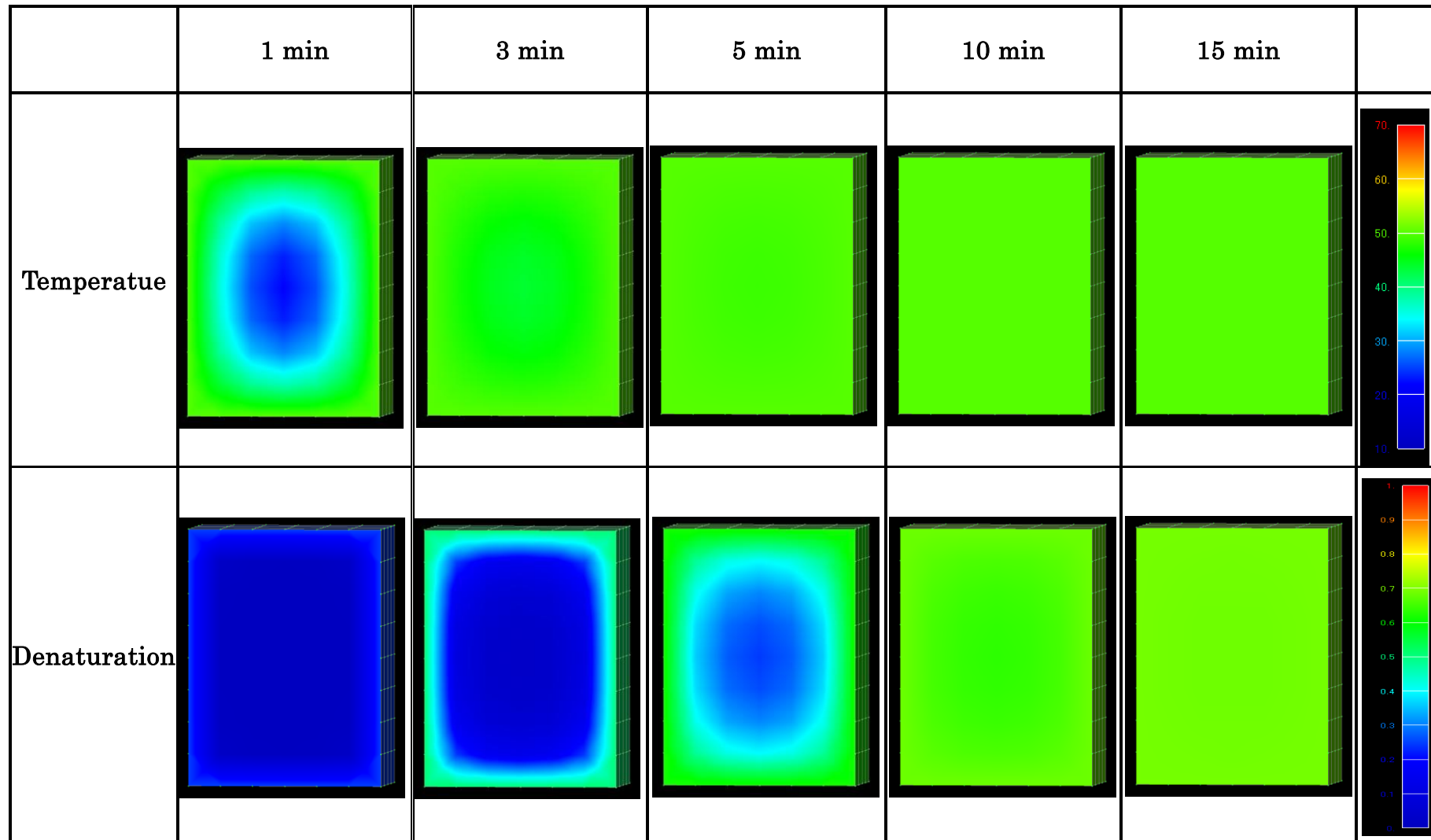
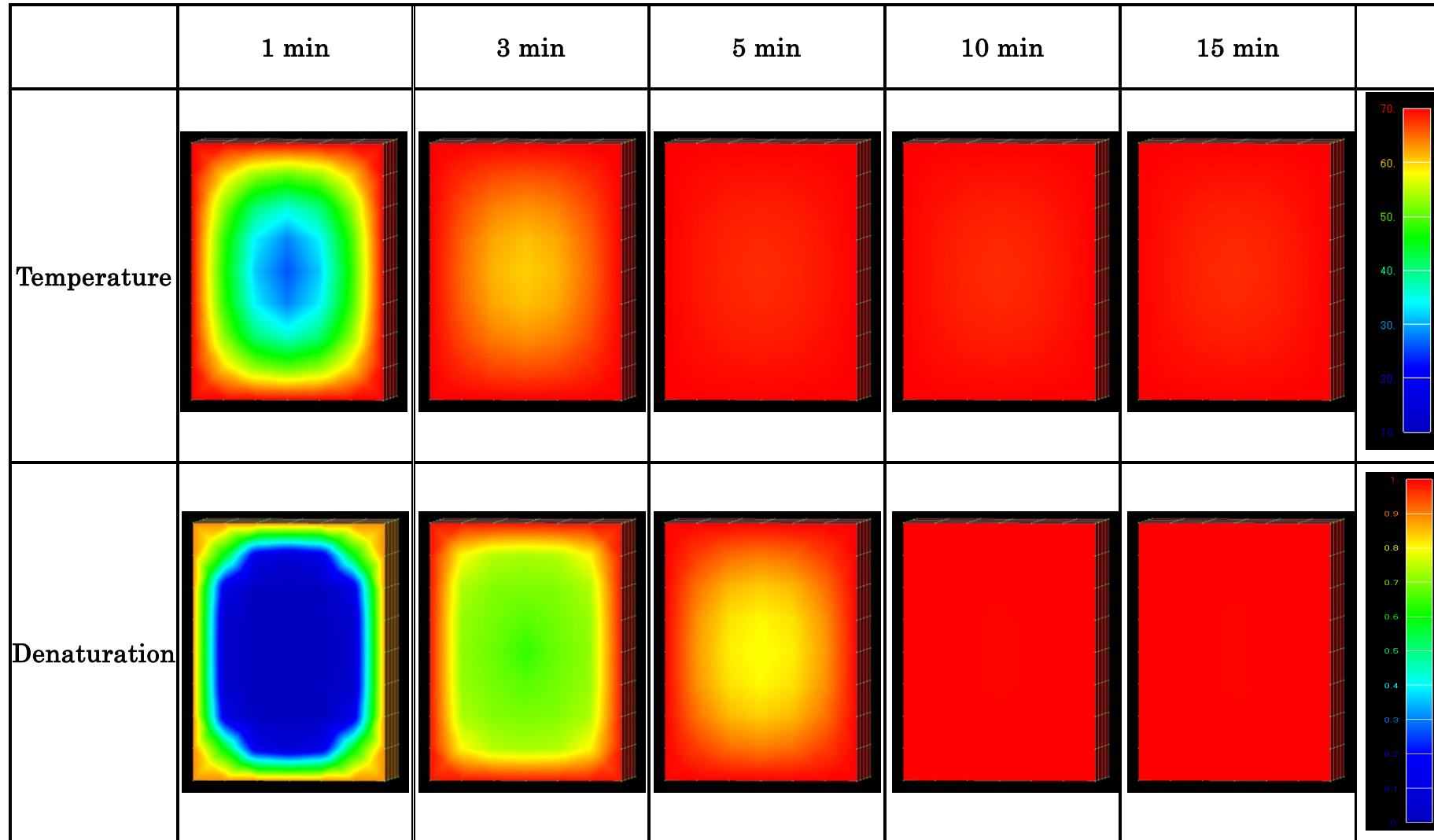


Fig. 4 Simulated distribution of temperature and denaturation in the central section. The ambient temperature was 70°C.



追補 容器詰め食品を想定した伝熱解析

1. はじめに

家庭やレストラン等で実際に調理を行う際、単一食品のみを調理する場合は少なく、多数の食材を同時に加熱調理することが多い。前述した伝熱解析は畜肉のみの加熱を想定したものであり、最も単純な解析モデルといえる。そこで、次のステップとして容器詰め食品を想定した伝熱解析を行った。

2. 実験方法

本実験を行うにあたり、容器底面の中央に高さ 6.0 cm の熱電対を固定した内径 5.0 cm、高さ 12 cm の円柱容器を作成した。これに、HEINZ 製デミグラスソース（以後、溶媒）のみを充填した場合と、溶媒と 3.0×3.0×3.0 cm³ に成形した畜肉と、その他の空間を溶媒で充填した場合の 2 通りの温度履歴測定を行った。後者については、熱電対の先に成形した畜肉の中心が位置するようにした。80℃に設定した恒温湯槽（As One, Thermal Robo TR-4）で加熱処理をし、この際、円柱容器の上下を熱伝導度の非常に低いコルクで覆うことで、上下面からの伝熱を断熱した。作成した円柱容器の概要図および、畜肉試料を充填した概要図を Fig. 1 に示した。

3. 解析条件

解析モデル作成は、4.2.2 と同様、有限要素プリプロセッサである FEMAP Version10.2（UGS Corporation 製）を用い、FORTRAN を用いて非定常三次元熱伝導解析を行った。実験に用いた容器の熱伝導度は非常に大きいと考え、モデルに容器は設定せず、溶媒に規定温度 T_c （環境温度にあたる 80℃）を設定した。境界条件は加熱処理時に用いた熱媒体が水であることから熱伝達率は非常に大きいとみなし、(4-2) 式に従うとした。また初期条件は、試料温度には不均一な温度分布は生じていないとみなし、かつ初期温度は解析値と比較する実験値の加熱開始時の温度と等しくした。

$$T = T_c \quad (4-2)$$

また、容器の解析に要する時間の短縮のため、円柱容器全体ではなく 4 分割したモデルにて解析を行った。作成したモデルを Fig. 2 に示した。

4. 結果および考察

容器に溶媒のみを充填した際の実験温度履歴と、解析値の比較を Fig. 3 に示した。実験値、解析値ともに、加熱直後は緩やかに温度上昇をし、加熱開始約 50 分後、環境温度である 80℃に到達した。また、上記条件で算出した解析値と実験値が良好に一致したことから、実験に用いた円柱容器の上下は断熱状態になっており、境界条件に問題はないと確認

できた。次に、溶媒と畜肉を充填した際の畜肉中心位置の温度履歴と、解析値の比較を Fig. 4 に示した。Fig. 3 に比べ実験値と解析値に差が生じているものの、最大 3°C の温度差であり、また、実際に測定した場所が中心位置から多少ずれている可能性も考慮できることから、この温度差は大きな差とは言い難く、実験値と解析値は良好に一致しているといえる。このように、容器詰め食品を想定したモデルにおいても、解析条件を実際の調理に近づけることで、的確な伝熱予測計算を行うことができると判明した。

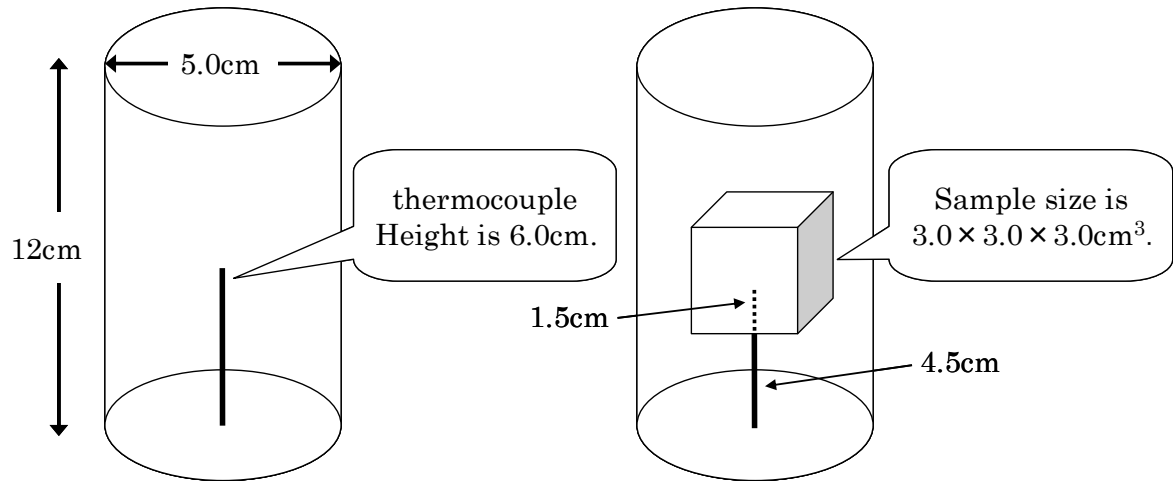


Fig. 1 Diagrammatic illustration of container used to experiment. Moreover, explanation of position of the meat sample.

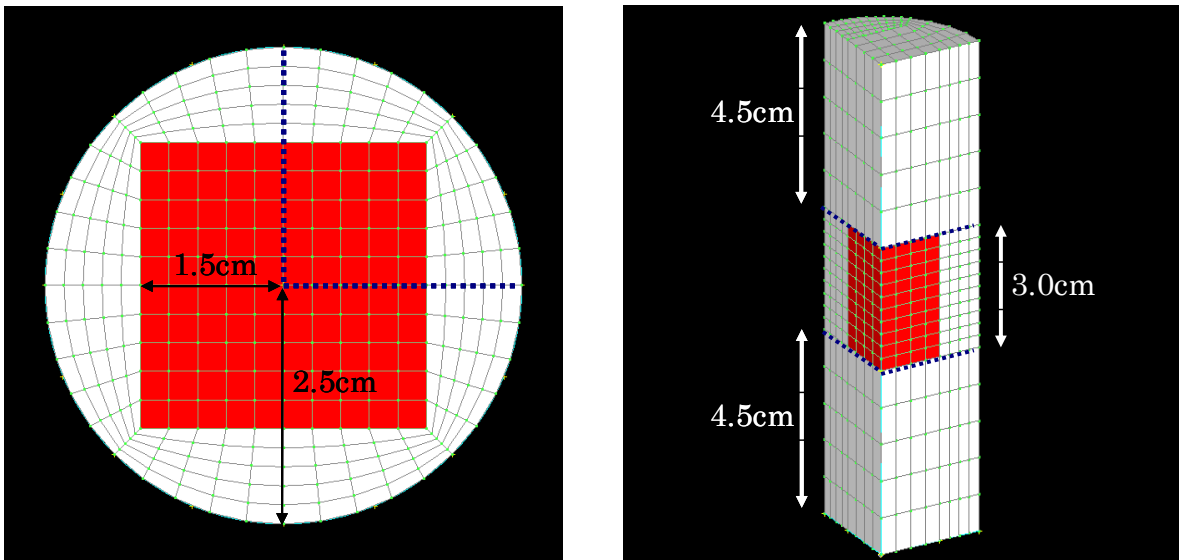


Fig. 2 These are the three dimensional element models for calculation. The left is an overhead view. Red shows the position of the meat sample.

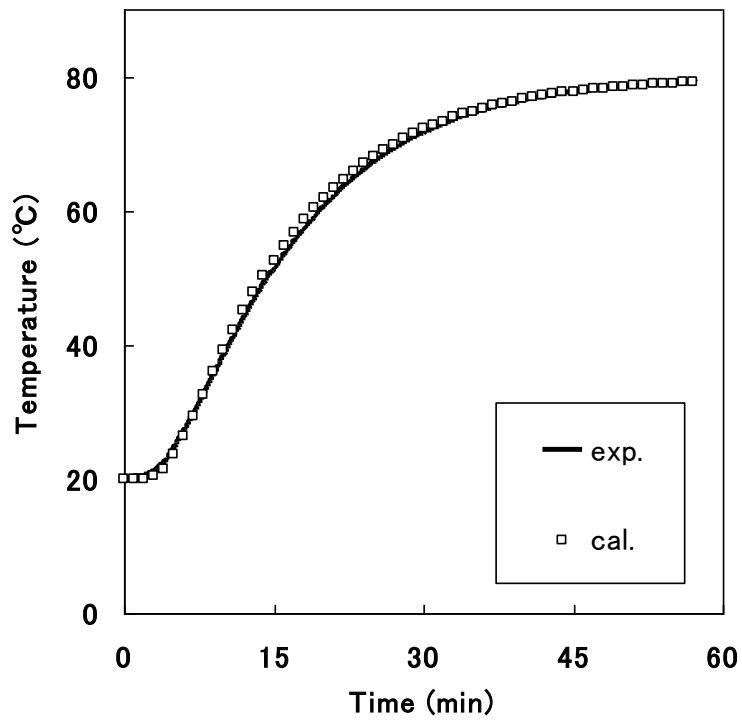


Fig. 3 Comparison between measured and calculated temperature history of demiglace sauce at the core

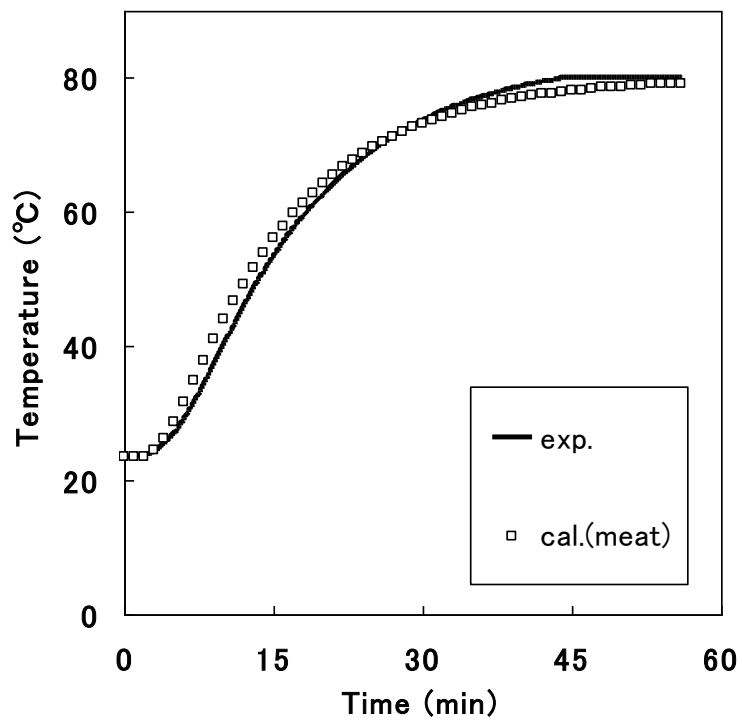


Fig. 4 Comparison between measured and calculated temperature history of meat at the core

第5章 MRI法による畜肉内部の水分測定

5.1 はじめに

第4章で、*sous-vide*法によるローストビーフ調理を例として、加熱調理の進行に伴って食材内部に形成される温度分布の変化の予測を行い、さらに、得られた伝熱解析結果と第2章で述べたタンパク質加熱変性速度を組み合わせることで、*sous-vide*調理過程における畜肉タンパク質変性率の予測計算を行った。しかし、この得られたタンパク質変性率（解析値）が実際に生じている変性状況と一致しているのか検証する必要がある。第4章で畜肉タンパク質の変性に伴いドリップが生じるため、重量減少することが明らかとなっていることから、本章では、筋細胞の構造内に保持していた水を離水する現象に着眼し、磁気共鳴イメージング（Magnetic Resonance Imaging : MRI）法を用いて、畜肉タンパク質が保持している水の横緩和時間 T_2 を測定した。さらに、 T_2 とタンパク質変性状況の相関式を得ることで、変性分布を定量的に分析し、解析値の妥当性を検証した。

MRI法は非破壊で試料内部の水分分布測定が可能であることから、畜肉やデンプン系をはじめとする様々な食品分析に利用されている。中村は異なる調理器具を用いて調理したローストビーフを試料とし、水の ^1H 画像結果より得た T_2 より、試料内に含まれる自由水の割合を定量した¹⁾。またBertramらは豚肉を試料とし、水の ^1H 画像結果より得た T_2 より様々な考察を行っている²⁾⁻⁵⁾。まず、と殺時間の異なる豚肉を試料とし、 T_2 と保水性の相関を確認すると同時に、筋原繊維から細胞外への水の移動の指標として T_2 値を用いることの有効性について述べている。また加熱処理した試料の T_2 測定も行っており、 T_2 値は試料の水分分布を反映することを明らかにしている。さらには、MRI測定した試料と同様に加熱処理した試料を用いて、官能評価（項目：ジューシーさ、硬さ）を行い、 T_2 値との相関関係を得ている。近年では、MRI法とDSC法を同時に組み合わせることで、畜肉タンパク質の加熱変性状況と T_2 値の関係を明らかにし、アクチンの変性は水分減少（重量減少）を招くと考察している。すなわち、MRI法を用いた畜肉試料の測定は、本章の目的とするタンパク質変性分布の定量化および解析値の妥当性検証に非常に有効であると考え、実験方法として採用した。

5.2 MRI測定原理

本章では、畜肉中の水分分布を磁気共鳴イメージング（Magnetic Resonance Imaging : MRI）法を用いて測定する。この測定法の利点として、非破壊で試料内部の水分分布を測れることが挙げられる。

水を構成する水素原子の原子核（プロトン）は電荷を有し、それに伴い自転しているためコイルに電流が流れると同時に磁場が発生する。すなわち、プロトンは小さな磁場とみなすことができる。これを強い静磁場 B_0 の中におくと、プロトンが棒磁石の場合ほどの

磁石も B_0 方向に配向するが、プロトンは回転しているため、 B_0 方向（軸）のまわりを首振り運動（歳差運動）する。このプロトンの首振り運動の周波数 ω は、静磁石の強度 B_0 に比例し、比例定数 γ は原子核に固有な値をとる。

静磁場 B_0 を直角座標系の z 軸とすると、試料中に存在するプロトンはほぼ同じ周波数、すなわち共鳴周波数 ($\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$ (Hz)) で z 軸の周りを首振り運動する。また、熱平衡状態時の首振り運動の位相はランダムになるため、試料中に存在するプロトン磁石のベクトルをたしあわせたもの（巨視的磁化）は、 x 軸、 y 軸方向では打ち消し合い、 z 軸方向の成分のみが残る。すなわち、多数のプロトン磁石は、 z 軸を回転軸として周波数 ν_0 で回転する、ひとつの巨視的磁石 M とみなすことができる。この時、巨視的磁石 M と同じ周波数で z 軸のまわりを回転しながら、同時に z 軸に垂直な一定方向に磁場 B_1 (RF 磁場) を印加すると、巨視的磁石 M は z 軸の周りを回転しつつ、 ν_0 で回転している RF 磁場の軸のまわりを首振り運動するようになる。

このような回転系での動きは、回転座標系を用いて考えると分かりやすい。また、Fig. 5-1 の図を用いて、以後説明する。

まず、 Z 軸のまわりを周波数 ν_0 で回転する直角座標 x' , y' , z' を考える（この際、 z' は z 軸に等しい）。静磁場 B_0 におかれた巨視的磁石 M は z 軸のまわりを周波数 ν_0 で回転しているが、それを周波数 ν_0 で回転している回転座標からみれば、静止しているようにみえる。さらに、 x 軸方向に RF 磁場 B_1 をかけると、 B_1 は回転座標系 x' では静磁場のようにはみえるため、巨視的磁石 M は RF 磁場 B_1 の軸 (x') のまわりを首振り運動する。この RF 磁場による首振り運動の周波数は、RF 磁場強度 B_1 に比例し、RF 磁場をパルス状に短時間 t_p だけ印加すると、RF 磁場による巨視的磁石 M の首振り運動は $\theta = \gamma B_1 t_p$ だけ回転して終わる。 t_p を $\theta = \pi/2$ になるように選択すると、巨視的磁石 M は 90° だけ回転して、 $x'y'$ 平面に倒れ静止する (a)。このような磁場パルスを 90° パルスと呼び、この際、 y 軸にレシーバーコイルを設置すると、巨視的磁石の y' 成分が受信される。しかし、静磁場 B_0 は場所によって不均一であるため、巨視的磁石を構成している各プロトンは B_0 中に置かれた位置により、若干異なる磁場強度 ($B_0 \pm \Delta B_0$) を受ける。そのため、首振り運動の周波数も異なり、その結果、位相を失いばらけるとともに、信号強度は減衰していく (b)。このように、位相がずれて y 軸方向の信号強度が減少していった後、時刻 τ (ms オーダー) で再度 RF 磁場を x 軸にそって、巨視的磁石が 180° 反転するように印加する (c)。これを 180° パルスと呼ぶ。 180° パルスは位相の遅れていたプロトンの位相を遅れていた分だけ進んだ位相に、位相の進んでいたプロトンの位相を進んでいた分だけ遅れた位相に反転させる (d)。各プロトンの静磁場 B_0 内における位置は変わらないので、 180° パルスの照射後も照射前と同じ周波数で進むため、時刻 2τ において全てのプロトンの位相が一致し、レシーバーにシグナルが検出される (e)。また、このシグナルはエコーシグナルと呼

ばれる。

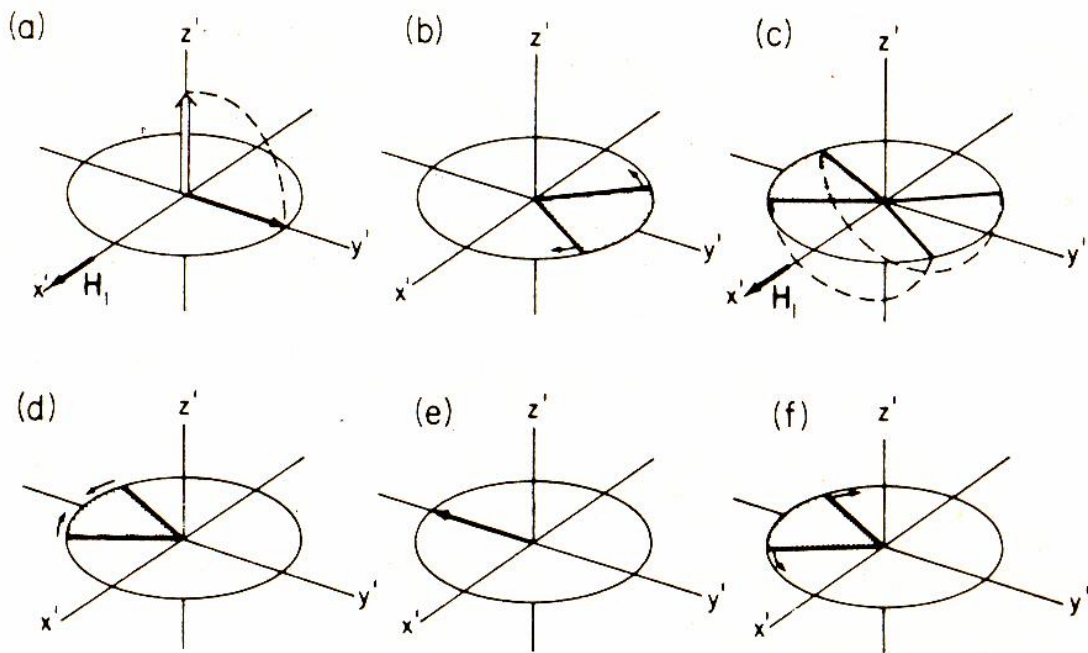


Fig.5-1 スピンエコー発生の原理⁶⁾

しかし、上記の NMR 法では静磁場 B_0 が試料内部で場所によらずほぼ均一であることから、試料内部のプロトンの位置情報を得ることができない。そこで NMR イメージング装置では、傾斜磁場用コイルを用いて、静磁場 B_0 の上に B_0 の 1 % 程度の傾斜磁場を重ね合わせ、試料の置かれた空間内の磁場強度を中心からの距離に比例して直線的に変化させる。この傾斜磁場は静磁場であるが、ms オーダーの短い時間だけパルス状に印加され、これを磁場勾配パルスという。磁場勾配パルス G が印加されている間は、試料空間の中心から距離 x に比例した $B_0 + xG$ の強度が各場所にかかっているため、各場所における首振り運動の周波数は $\gamma (B_0 + xG)$ となる。これは γB_0 で回転する回転座標系においての周波数は γGx となり、そのプロトンの試料空間内における位置情報 x は回転座標系からみた周波数で検出されることになる。

位置情報を周波数に変換する手法は、1次元 NMR イメージングを例にとると理解しやすい。90° - 180° スピンエコーと x 軸に沿った磁場勾配パルス G を組み合わせた 1次元 NMR イメージングを例に挙げる。90° パルスによって x' , y' 平面に倒れた巨視的磁石の y' 成分は、第 1 回目の磁場勾配パルスによってそれぞれの位置に固有の周波数で位相を崩す。そして、180° パルスによりスピンエコーが形成される第 2 の磁場勾配パルスをかけることで検出されるエコー信号は、位置に固有の周波数で首振り運動している微小磁石による振動磁場の波により合成されたものであるため、エコー信号をフーリエ変換すれば、位置情報を反映した周波数分布が得られ、これが試料中のプロトン密度を表す画像になる。

しかし、1次元 NMR イメージングは単一方向の画像取得となるため、対象物の断面のピクセル情報は得られない。この問題を解決する手法が、2次元 NMR イメージングである。2次元 NMR イメージングは磁場勾配パルスと選択励起 RF パルス（狭い周波数幅を持つ振動磁場）を組み合わせることでスピネコーを形成させ、これにより検出されるエコー信号を2次元フーリエ変換し、画像を取得する。2次元 NMR イメージングは1次元 NMR イメージングと比較すると、測定時間を要する欠点がある。しかし本研究ではスピネコー法をもとに90°パルスを印加後、180°パルスを次々と印加することで、一回の撮像でエコー時間の異なった複数の画像取得が可能であるマルチエコー法を用いることで、この問題を解決した。

5.3 一次元モデルにおける¹H NMR 画像の測定

5.3.1 T₂からタンパク質変性率への変換およびMRI測定条件

通常、測定された¹H密度（¹H信号強度）は分子の自由度を反映した縦緩和時間（T₁）と横緩和時間（T₂）の影響を受けるため、真の¹H密度を示さない。すなわち、得られた画像を取り扱うには画像に何らかの校正を施し、画像を真の水分分布へ変換する必要がある。

本研究の測定法として採用したマルチエコー法は、スピネコー法をもとにしている。スピネコー法では、エコー時間（echo time, TE）を短くし（T₂ >> TE）、繰り返し時間（repetition time, TR）を対象物のT₁付近に設定すると、T₂の影響の少ないT₁強調画像を得られ、逆に繰り返し時間を長くし（TR >> T₁）、エコー時間を対象物のT₂付近に設定すると、T₁の影響の少ないT₂強調画像を得られる⁷⁾⁸⁾。ところで、スピネコーの定式に従えば、TE << TR のとき(5-1)式が成り立つ。Iは測定時の¹H密度（緩和の影響を受けている¹H密度）、I₀は緩和の影響を受けていない¹H密度を示している。

$$I = I_0 \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \right\} \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (5-1)$$

また(5-1)式から、T₁強調画像なら(5-2)式、T₂強調画像なら(5-3)式を導くことができる。

$$I_i = I_0 \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{TR(i)}{T_1}\right) \right\} \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (5-2)$$

$$I_i = I_0 \exp\left(-\frac{TE(i)}{T_2}\right) \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (5-3)$$

すなわち、TRの異なるn個の画像を測定すると、(5-2)式から試料のT₁（T₁分布）、TEの異なるn個の画像を測定すると、(5-3)式から試料のT₂（T₂分布）を求めることができる。

本実験は加熱処理した畜肉を試料とし、2次元 ^1H スピンエコーイメージングを行った。NMR装置は、ブルカー・バイオスピン（株）製 AVANCE400 (^1H 共鳴周波数 400 MHz) ワイドボアタイプ・マイクロイメージングアクセサリ付を使用した。直径 30 mm の RF コイル中央に、試料を入れた試験管（外径 30 mm）をセットした。マルチエコー法に従い測定を行い、厚さ 1 mm に仮想的にスライスした面の ^1H 画像を得た。測定条件は、積算回数を 2 回、繰り返し時間を 1.5 sec、最小エコー時間を 3 msec、マトリックスサイズを 256×256 とした。また空間分解能は $0.129 \times 0.129 \times 1.000 \text{ mm}^3$ である。この測定条件は、 $\text{TR} \gg T_1$ かつエコー時間は対象物の T_2 付近に設定しているため、 T_1 の影響の少ない T_2 強調画像を得ることができる。さらに、エコー時間の異なる一連の画像から (5-3) 式に従うとして、各ピクセルの T_2 を算出した。 T_2 算出にあたり用いた減衰曲線の典型例を Fig. 5-1 に示した。

また、得られた T_2 画像より、以下の二つの方法から画像を真の水分分布へ較正することが出来る。

- ① T_2 が含水率に大きく依存することから、あらかじめ T_2 と含水率の関係を示す較正曲線を作成し、これを用いて試料の T_2 (T_2 分布) を含水率 (含水率分布) へ変換する方法 (手法①)
- ② (5-3) 式から、I 値と T_2 値を用いて I_0 値を外挿し、横緩和の影響を受けていない ^1H 密度 (^1H 密度分布) を推測する方法 (手法②)

本研究では手法①に改変を加え、あらかじめ加熱処理条件からタンパク質未変性率を推算することで、 T_2 とタンパク質未変性率の関係を示す較正曲線を作成した。

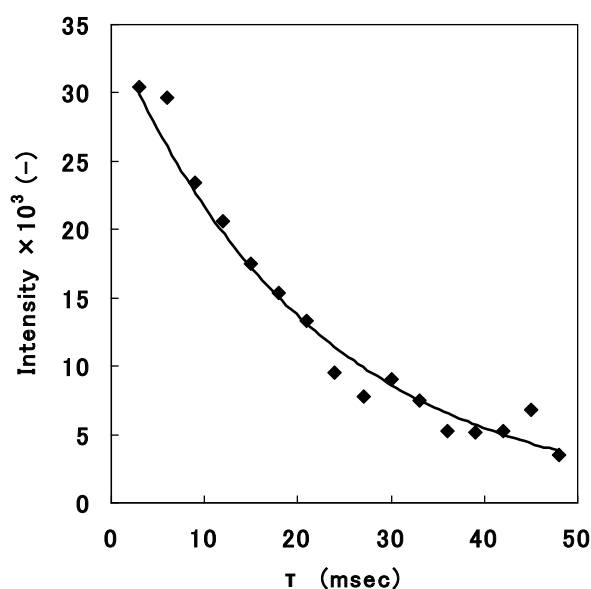


Fig. 5-1 エコー時間の増加に伴う信号強度の減衰曲線

5.3.2 試料の調製

市販スライス状国産牛モモ肉を試料とし、4.0×4.0 cm に整形後、恒温湯槽（As One, Thermal Robo TR-4）で加熱処理を行った。一定時間目的の温度で加熱後、恒温湯槽から試料を取り出し、氷水で試料温度が 20℃になるまで冷却した。測定時は、試料表面の水分の乾燥を防ぐため、プラスチックフィルムで包装した状態で行った。また、タンパク質変性率の推算は、スライス状の試料の厚さは約 1 mm と非常に薄いため、厚み方向に加熱処理による温度分布は生じないと考えた。この際の加熱処理条件および推算したタンパク質変性率について Table 5-1 に示した。

5.3.3 結果および考察

加熱処理条件をもとに算出した各タンパク質（ミオシンおよびアクチン）によって構成される畜肉筋細胞としての加熱による変性率（以後、total 未変性率）に対し、画像を構成する各ピクセルの T_2 を平均した値（以後、 T_2^* ）をプロットした結果を Fig. 5-2 に示した。ところで T_2^* 算出についてだが、畜肉は約 3% の脂肪を有しているため、全てのピクセルが水の ^1H 画像であると言いがたい。そこで本実験では、別途測定した脂肪の ^1H 画像結果をもとに、 T_2 が 40 ms 以上は脂肪の ^1H 画像と判断し、 T_2^* を算出する際の数値に含めず取り扱った。

Fig. 5-2 より、変性が進行するに従い T_2^* が短くなる、すなわち撮像におけるエコー時間を長くした場合 ^1H 信号が弱くなっていることがわかる。これは、第 4 章で示したタンパク質の加熱変性進行とともに、保持されていた水が離水しドリップとして流出するため、畜肉重量が減少する現象と一致しており、 T_2^* とタンパク質変性の相関を確認することが出来たといえる。また、 T_2^* と total 未変性率の間に良い直線関係が得られたことから、これらの関係を一次関数式である (5-4) 式で近似し、さらに較正曲線として採用した。

$$y = 6.802 \times 10^{-2} x - 1.461 \quad (5-4)$$

Table 5-1 Heat-treatment conditions (temperature and time) and calculated values of the non denaturation ratio of proteins and total non denaturation ratio

| Heating temp. | time (min) | non denaturation ratio | | |
|---------------|------------|------------------------|-------|-------|
| | | myosin | actin | total |
| 40°C | 5 | 0.88 | 1.00 | 0.920 |
| | 10 | 0.78 | 1.00 | 0.849 |
| | 15 | 0.69 | 1.00 | 0.786 |
| | 20 | 0.61 | 1.00 | 0.730 |
| | 25 | 0.54 | 1.00 | 0.681 |
| | 30 | 0.48 | 1.00 | 0.638 |
| | 40 | 0.37 | 1.00 | 0.566 |
| | 50 | 0.29 | 1.00 | 0.510 |
| | 60 | 0.23 | 1.00 | 0.466 |
| 45°C | 10 | 0.35 | 1.00 | 0.549 |
| | 12 | 0.28 | 1.00 | 0.504 |
| | 15 | 0.21 | 1.00 | 0.451 |
| | 20 | 0.12 | 1.00 | 0.393 |
| 50°C | 1 | 0.65 | 1.00 | 0.758 |
| | 5 | 0.12 | 1.00 | 0.389 |
| | 10 | 0.01 | 1.00 | 0.317 |
| | 20 | 0.00 | 0.99 | 0.308 |
| | 30 | 0.00 | 0.99 | 0.307 |
| 60°C | 3 | 0.00 | 0.95 | 0.293 |
| | 10 | 0.00 | 0.84 | 0.258 |
| | 20 | 0.00 | 0.70 | 0.216 |
| 65°C | 3 | 0.00 | 0.67 | 0.206 |
| | 10 | 0.00 | 0.26 | 0.079 |
| 70°C | 3 | 0.00 | 0.05 | 0.016 |
| | 5 | 0.00 | 0.01 | 0.002 |
| | 8 | 0.00 | 0.00 | 0.000 |

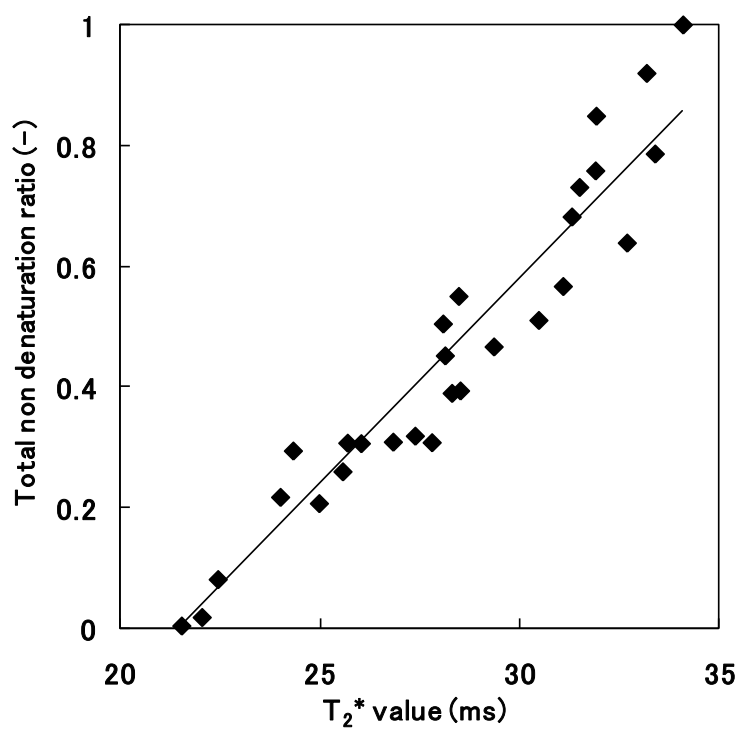


Fig. 5-2 Relationship between total nondenaturation ratio and T₂* value of meat sample (r=0.918)

5.4 三次元モデルにおける ^1H NMR 画像の測定

5.4.1 MRI 測定条件

5.3 と同様な手法で、試料の高さ 1.0 cm における、厚さ 0.5 mm に仮想的にスライスした面の 2 次元 ^1H スピンエコーイメージングを測定した。測定条件は、積算回数を 5 回、繰り返し時間を 1.5 sec, 最小エコー時間を 3 msec, マリックスサイズを 256×256 とし、空間分解能は $0.108 \times 0.108 \times 0.500 \text{ mm}^2$ である。各ピクセルの T_2 算出方法は、5.3.1 と同様である。

5.4.2 試料の調製

本実験に用いた NRM 装置は、長径 30 mm の RF コイル中央に試料をセットするため、測定する試料の大きさに制限が生じる。そこで、MRI 測定に用いる試料は第 4 章で述べた応力緩和測定を行った試料サイズと同一とし、加熱処理条件も同じである。(Table 4-1 参照)

市販ブロック状国産牛モモ肉を試料とし、 $1.5 \times 2.0 \times 2.0 \text{ cm}$ に成形後、恒温湯槽 (As One, Thermal Robo TR-4) で加熱処理を行なった。一定時間、目的の温度で加熱後、恒温湯槽から試料を取り出し、氷水で試料温度が 20°C になるまで冷却し、測定時は、試料表面の水分の乾燥を防ぐため、プラスチックフィルムで包装した状態で行った。さらに、加熱試料との比較として、未加熱試料 ($1.5 \times 2.0 \times 2.0 \text{ cm}$) の画像測定も行った。また、ブロック状試料の場合、座標位置によって変性状況が異なるため、高さ 1.0 cm における xy 平面の画像取得を行った。この際の模型図を Fig. 5-3 に示した。

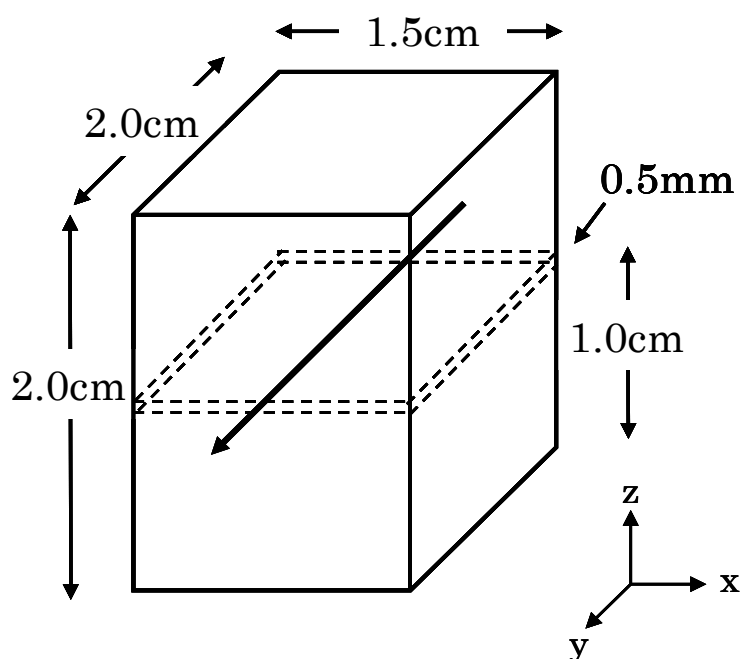


Fig. 5-3 Direction of MRI measurement to three-dimensional sample

5.4.3 結果および考察

今回測定した試料はブロック状試料のため、座標位置によって不均一な変性分布が生じる。5.3より、変性の進行に応じて T_2 が短くなることが明らかになっていることから、 T_2 値も座標位置によって数値が異なること予想される。そこで、測定したxy平面画像の ^1H 画像を構成する全てのピクセルの T_2 を用いてヒストグラムを作成することで、変性進行に伴う T_2 分布の検証を試みた。この結果をFig. 5-4に示した。またFig. 5-4はxy平面画像の ^1H 画像を構成する全てのピクセルをもとに作成しているため、脂肪の ^1H 画像も含まれている。

Fig. 5-4aは、未加熱試料と各タンパク質（ミオシン、アクチン）が変性終了した試料の結果である。未加熱試料は30～45 msの T_2 割合が多く、中でも35～40 msの T_2 存在割合は全体の約40%を占めた。これに対し、ミオシンが変性終了した試料（以後、myosin0）は30～35 msで、アクチンが変性終了した試料（以後、actin0）は25～30 msの T_2 が最も多いことから、変性の進行に伴い、ヒストグラムのピークが低 T_2 側へシフトし、試料で最も多く存在している T_2 値が低下した。Shaaraniらは鶏肉を試料としMRI測定を行ったところ、加熱時間の進行に伴い、最も多く存在する T_2 値が低くなっている⁹⁾。この結果は、本実験の測定結果より、加熱時間の進行に伴いタンパク質変性が生じたことで T_2 存在割合が変化すると予想される。

Fig. 5-4bは未加熱試料とミオシンの変性を対象とした試料、Fig. 5-4cは未加熱試料とアクチンの変性を対象とした結果である。Fig. 5-4bより、試料中心のミオシンが半分変性している試料（以後、myosin0.5）は30～35 ms、Fig. 5-4cより、試料中心のアクチンが半分変性している試料（以後、actin0.5）は25～30msで存在している T_2 が最も多く、これは各タンパク質が変性終了した際の存在割合が最も高い T_2 値の範囲と同じである。しかし、存在割合の数値を比較すると、変性終了時の存在割合はそれぞれ約55%なのに対し、半分のみ変性終了している試料での存在割合は約40%である。さらに、myosin0.5およびactin0.5では未加熱試料で存在割合の高い30～45 msにも多くの T_2 が存在していることがわかる。今回測定した試料はブロック状であるため、試料表面と中心で経験する温度履歴が異なり、それに伴いmyosin0.5やactin0.5の表面は完全に対象とするタンパク質の変性が終了しているが、内部は変性途中のため、未加熱試料に多く存在する T_2 値の割合が高いと考えられる。

次に、加熱媒体からの距離による（位置に伴う） T_2 値変化を検証すべく、測定したxy平面画像からさらに $x=0.75$ cmにおけるy方向の情報を一次元画像として取り出した。試料位置に対して T_2 をプロットした図をFig. 5-5に示した。この際、 T_2 が40 ms以上は脂肪の ^1H 画像と判断しているため、 T_2^* 値のみ（ T_2 40 ms 以下）を抽出した。

Fig. 5-5aはmyosin0.5, actin0.5, Fig. 5-5bはmyosin0, actin0をまとめた。Fig. 5-5a,

Fig. 5-5b の両方において、アクチンの変性を対象としている試料の方が、ミオシンの変性を対象としている試料に比べ、試料中心から同じ位置における T_2^* が低いことがわかる。また、myosin0.5, actin0.5, actin0 は中心から距離が遠くなるに従い、 T_2^* が低下する傾向であるのに対し、myosin0 はどの位置においてもほぼ同等な T_2^* 値を示している。この理由として myosin0 は、ミオシンが全ての位置において変性終了している試料であると同時に、myosin0 試料調整時に用いた加熱処理温度 50°C ではアクチンは変性しない温度であるため、不均一な変性分布が生じておらず、その結果、 T_2^* もほぼ同等な値を示したと考えられる。しかし、この論理では actin0 でも同様に当てはまるべきだが、actin0 では中心からの位置によって T_2^* 値に差が生じている。この考察については後で述べる。また、測定時の空間分解能 ($108 \mu\text{m}$) と中心から最も離れているピクセルの位置から、試料サイズの算出が可能である。そこで、全ての試料の $x=0.75 \text{ cm}$ における y 方向の長さを計算したところ、myosin0, myosin0.5 試料は未加熱試料とほぼ同等の 10.3 cm であったのに対し、actin0.5 は 9.68 cm 、actin0 は 8.8 cm であり、MRI 画像よりタンパク質の加熱変性による収縮変化（体積変化）を確認することができた。

最後に、5.3 で得た T_2^* とタンパク質変性の較正曲線である (5-4) 式を用いて、Fig. 5-5 の T_2^* 値を total 未変性率に変換した値（以後、実験値）と、同じ位置における伝熱解析およびタンパク質変性速度パラメーターを用いて算出した total 未変性率（以後、解析値）の比較した結果を Fig. 5-6 に示した。Fig. 5-6 の全てにおいて実験値のばらつきはあるものの、Fig. 5-6a は中心から距離が離れるに従い total 未変性率は低下しており、解析値の数値と同様な傾向を示した。また、Fig. 5-6b もばらつきはあるものの、解析値と等しい total 未変性率の近辺にプロットが集中していることから、傾向が一致していると言える。これに対し、Fig. 5-6c および Fig. 5-6d の実験値は中心から距離が離れるに従い total 未変性率は低下しているものの、解析値と数値を比較すると、中心付近における値に差が生じており、実験値の方が解析値よりも高い数値を示している。この原因として、解析値は水の移動性を考慮していないことが挙げられる。畜肉を加熱処理する際、タンパク質加熱変性ととも、ドリップが生じる。温度分布が生じるブロック状試料では、試料中心に位置するに従い、試料外に排出されるのに時間を要すると予想される。これは、Fig. 5-5b で示した actin0 の結果が中心からの位置によって T_2^* 値に差が生じていることから明らかである。しかし較正曲線作成時に使用した試料は、変性と同時に離水可能な水は試料外に排出される次元モデルをもとに作成しているため、 ^1H 画像をもとに算出した total 未変性率と比較するには、予測計算において水の物質移動解析を行う必要性が示唆される結果となった。

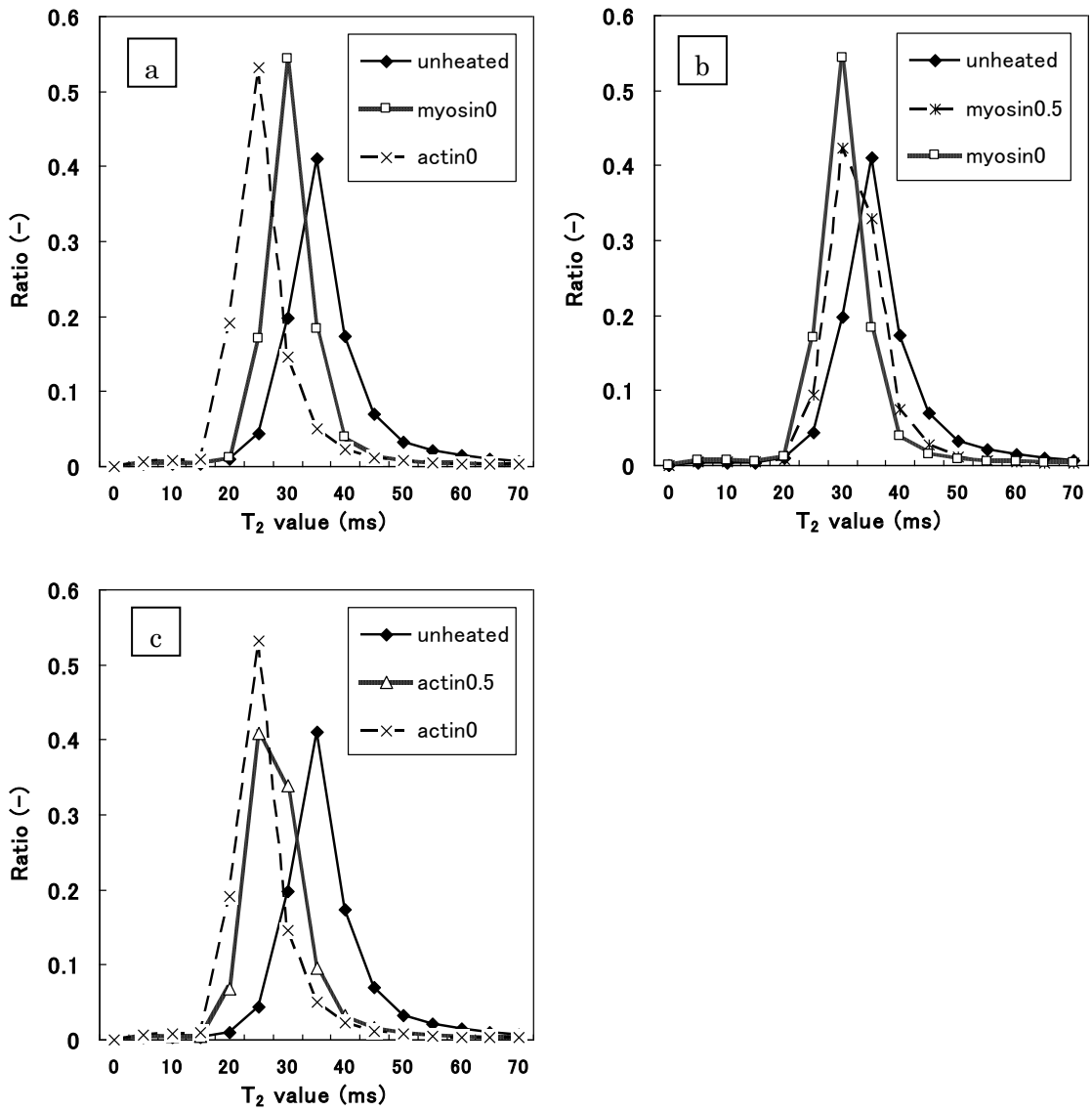


Fig. 5-4 The T₂ histograms from MRI data for the raw and after heated

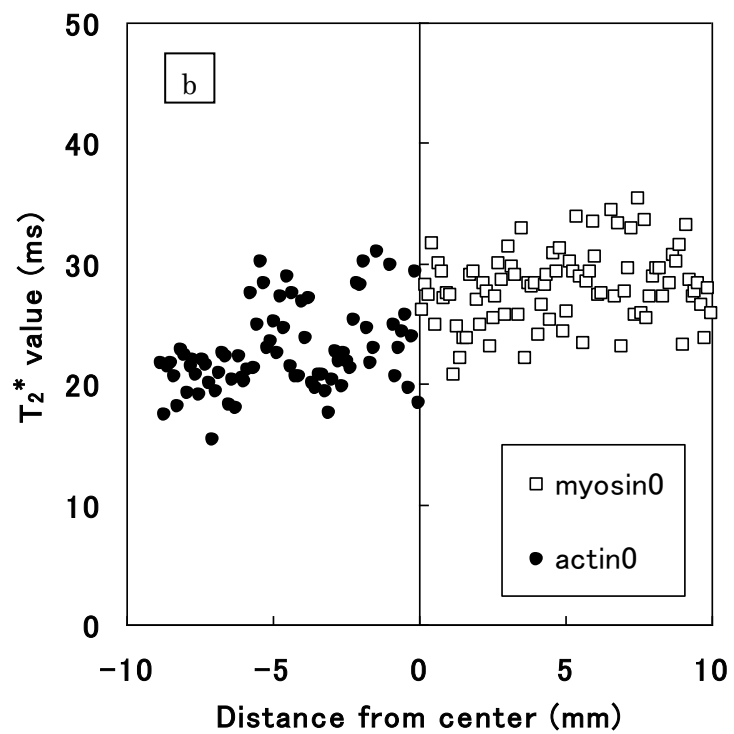
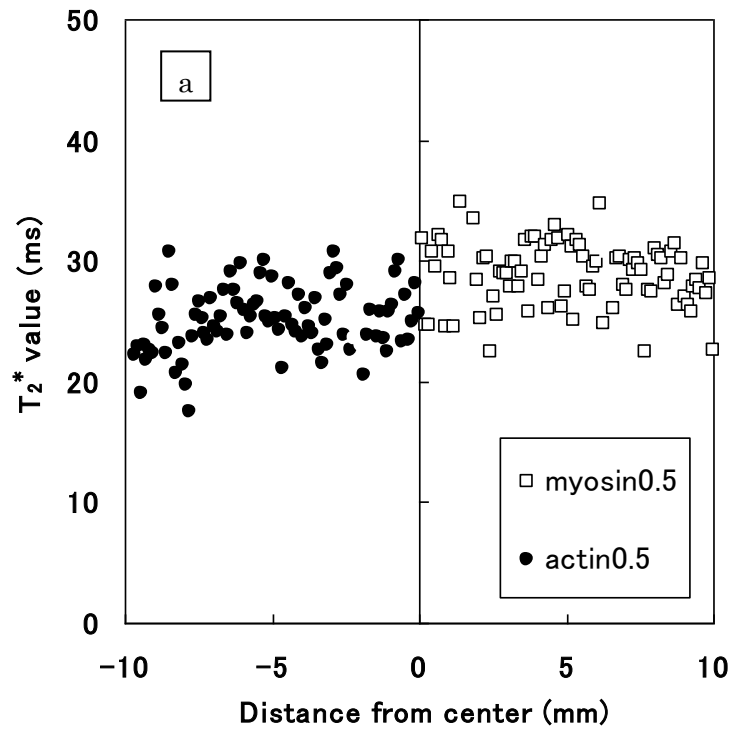


Fig. 5-5 Two-dimensional MRI across the meat slab. T_2^* value is plotted against the distance from center.

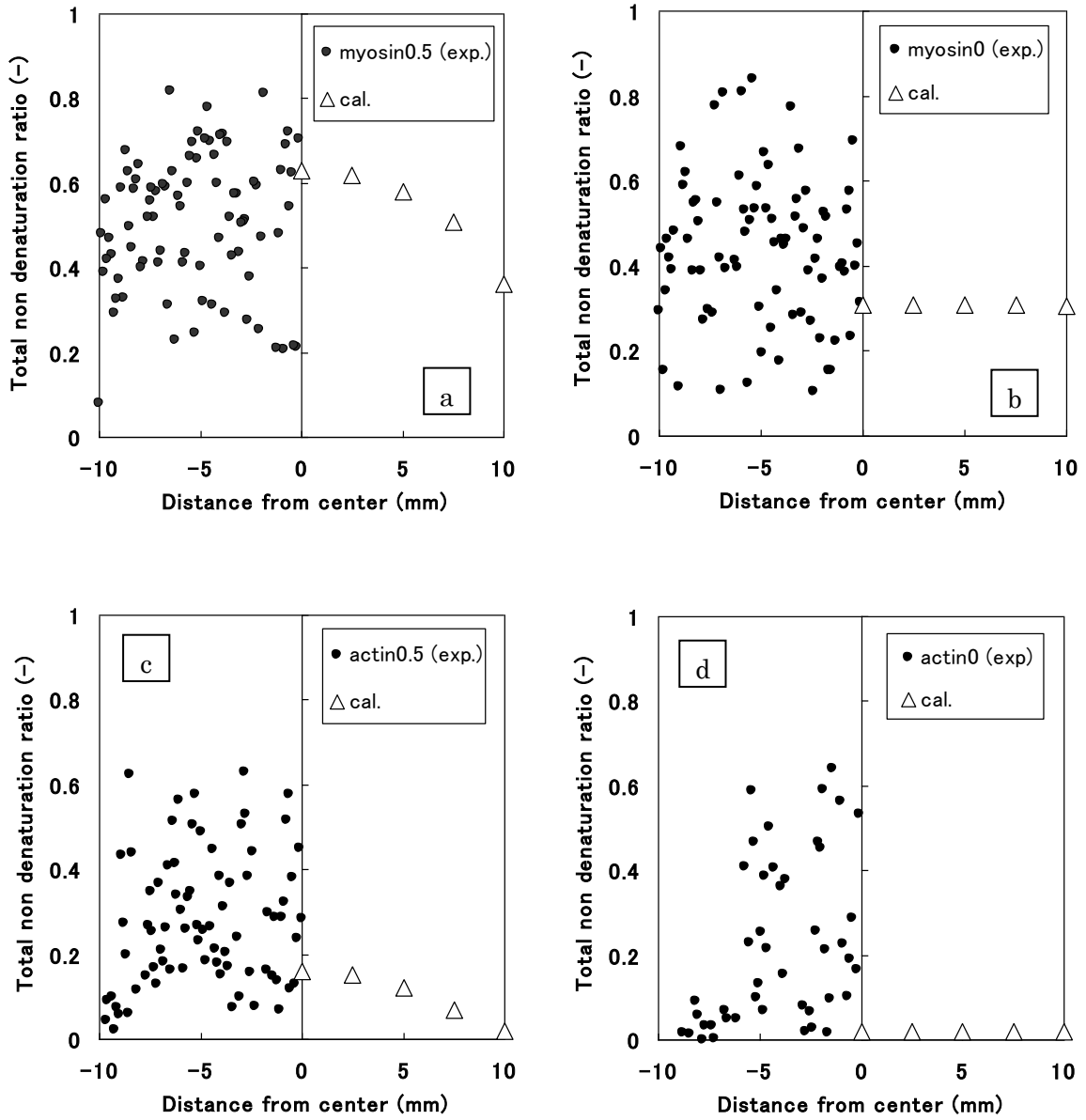


Fig. 5-6 Comparison between experiment value and calculated total non denaturation ratio. The experiment value was converted from T_2^* value to total non denaturation ratio by the calibration curve.

5.5 第5章のまとめ

本章では、第4章で述べたタンパク質変性率の妥当性を検証するため、MRI法を用い、畜肉に存在する水の ^1H 画像を測定し、これをもとに横緩和時間 T_2 を算出した。まず、タンパク質変性状況と T_2 の相関を検証したところ、変性の進行に従い T_2^* が短くなった。これは第4章で示したタンパク質の加熱変性進行とともに、保持されていた水がドリップとして離水し、畜肉重量が減少する現象と一致していることから、タンパク質変性率（total未変性率）と得られた T_2^* との相関式を較正曲線として採用した。次に、温度分布および変性分布が生じるようなブロック状の試料のMRI測定を行ったところ、変性が進行するに従い、短い T_2 値の割合が増加することが確認された。また、測定した xy 平面画像から、さらに $x=0.75\text{ cm}$ における y 方向の情報を一次元画像として取り出し T_2^* 値は、変性の進行が早い中心距離から離れるに従い、 T_2^* が低下しており、不均一な変性分布が生じていることが明らかとなった。最後に、較正曲線を用いて T_2^* から変換したtotal未変性率（実験値）と、予測計算をもとに算出したtotal未変性率（解析値）を比較したところ、ミオシンのみ変性している試料では実験値と解析値の傾向は一致したが、アクチンまで変性している試料では、中心において実験値の方が解析値よりも高い数値を示した。この原因として、ブロック状試料では試料中心に位置するに従い、試料外に離水可能となった水が排出されるのに時間を要するにも関わらず、解析値では水の移動性を考慮していないことが挙げられる。すなわち、今後ブロック状試料におけるタンパク質変性率の解析値の妥当性を検証するには、伝熱解析の際、水の物質移動解析を行う必要性が示唆された。

5.6 第5章の引用文献

- 1) 中村アツコ, NMR 分光法を利用した食品物性の研究 (II) パルス ^1H -NMR で見た, 加熱調理にともなう肉中の水の存在状態の変化, 東京家政大学院大学紀要, 30, 61-63 (1997)
- 2) Bertram H. C., Donstrup S., Karlsson A. H. Continuous distribution analysis of T_2 relaxation in meat. An approach in the determination of water-holding capacity. *Meat Sci*, 60(3), 279-285 (2002)
- 3) Bertram H. C., Andersen H. J., Purslow P. P. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: A low-field nuclear magnetic resonance study. *J Agric Food Chem*, 50(4), 824-829 (2002)
- 4) Bertram H. C., Andersen H. J., Aaslyng M. D., Elucidation of the relationship between cooking temperature, water distribution and sensory attributes of pork—a combined NMR and sensory study. *Meat Sci*, 70(1), 75-81 (2005)
- 5) Bertram H. C., Wu Z., Andersen H. J., Van den berg Frans, NMR relaxometry and differential scanning calorimetry during meat cooking. *Meat Sci*, 74(4), 684-689 (2006)
- 6) ファーラー・ベッカー, パルスおよびフーリエ変換 NMR—理論および方法への入門—, 吉岡書店 (1971)
- 7) 巨瀬勝美, コンパクト NMR, 共立出版 (2004)
- 8) T. D. W. クラリッジ, 有機化学のための高分解能 NMR テクニック, 講談社 (2004)
- 9) Sharifudin M. S., Kevin P. N., Laurance D. H., Combination of NMR and MRI quantitation of moisture and structure changes for convection cooking of fresh chicken meat. *Meat Sci*, 72(3), 398-403 (2006)
- 10) 巨瀬勝美, NMR イメージング, 共立出版 (2004)
- 11) 八幡淑子, 東京水産大学 修士学位論文 (2006)

第6章 *sous-vidé*調理と微生物危害

6.1 はじめに

ほとんどの食品は農産物、畜産物あるいは水産物をそのままか、もしくはこれらを原材料として加工されたものである。これら天然物は自然界に存在しているとき、既に微生物を付着・内蔵しており、無菌状態とは言い難い。さらに、これらの天然物を貯蔵・加工して加工食品にする場合、その工程中で微生物の混入、あるいは増殖により、食品の原材料は一般的に1gあたり $10^3\sim 10^7$ 個程度の微生物で汚染されている¹⁾。食品産業は、「食品の安全性」は企業存続をゆるがす重大項目のひとつであるため、微生物による食品の腐敗を防ぐ方法、すなわち殺菌方法を重要視している。

殺菌方法は、食品を加熱することにより存在する微生物を死滅させる加熱殺菌と、放射線や薬剤を用いて微生物を死滅させる冷殺菌に大別される²⁾。加熱殺菌の場合、加熱処理を行えば行うほど、多くの微生物を死滅させることが可能だが、加熱処理はテクスチャー、味、栄養等の品質にも影響を与えるため、食品としての価値を損ねる変化をきたすことを考え合わせ、殺菌の目的を達する最小限の加熱を目指す必要がある。このような背景から、微生物の死滅速度を定量的に表現する加熱殺菌速度論が生まれ、食品加熱処理時の伝熱やレオロジー的性質の知識と合わせることで、商業規模の殺菌工程の設計に用いられている²⁾。

*sous-vidé*調理は、食材を真空包装機でプラスチックバックの中に密閉後、恒温湯槽やスチームコンベクションオーブンで食材に適した温度下で加熱調理法である。この調理法については第1章で述べたとおり、調理製品の品質面において様々な利点を有する。しかしNayatiにより、*sous-vidé*調理製品は、貯蔵中の環境条件は微生物の増殖に影響を与えることが判明していることから、調理環境や貯蔵中の衛生管理は重要とされている³⁾⁶⁾。また、*sous-vidé*調理は加熱処理温度帯が低温であることから、流通を想定した加熱加工した食品の殺菌効果よりも低いと予想されるにも関わらず、*sous-vidé*調理の特徴である温度分布を考察したうえで、加熱殺菌の効果について議論されていない。そこで本章では、第4章で述べた非定常三次元熱伝導方程式を基本とした伝熱解析結果をもとに、*sous-vidé*調理過程における死滅による微生物減少数と殺菌値（Sterilizing value, 以後、F値）の算出を行った。さらに、調理終了後の貯蔵時における微生物増殖数の予測計算を行い、貯蔵中の環境条件（温度管理）の重要性について検証した。

6.2 *sous-vide* 調理過程における微生物減少数と殺菌値

6.2.1 はじめに

ローストビーフ調理を想定した加熱殺菌の予測計算は *Salmonella*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* 等の様々な菌が対象とされている⁷⁻⁹⁾。本研究では、なかでも *Escherichia coli* O157:H7 に着目した。*E. coli* はグラム陰性桿菌であり、ヒトや動物の腸管内に常在するため、糞便汚染の指標菌として用いられている。このうち、志賀毒素を生産する菌のひとつが O157:H7 である。米国では加熱不足のハンバーグが原因食品となり、O157:H7 による集団食中毒が発生している。日本では 1996 年の 5 月下旬から夏季にかけて、学校給食が原因で食中毒が 25 件発生し、死者 12 名に達した事件が記憶に新しい。*E. coli* O157:H7 の感染力は強く、普通の食中毒よりもヒトに対して $10^1 \sim 10^2$ 程度の非常に低い菌数で発症し、その後ヒトからヒトへ感染する。初期症状は風邪に似ているが、その後激しい腹痛と下痢となる。また、免疫低下しているヒトや乳・幼児が感染し、重症化すると溶血性尿毒症症候群、脳症などに移行し、最悪の場合死に至る危険がある。主な感染源はウシとされており、汚染菌の死滅対策としては 75°C 、1 分相当の加熱が必要とされる^{10) 11)}。

微生物は畜肉表面のみに付着する可能性が高いが、本研究では試料内部にも *E. coli* O157:H7 が付着したことを想定し、*sous-vide* 調理過程における微生物減少数および F 値を計算した。

6.2.2 *sous-vide* 調理過程における微生物減少数解析

6.2.2.1 解析方法

加熱による微生物減少数の算出は D 値と Z 値を用いて算出する方法と、微生物死滅速度を一次反応の式を用いて表現する方法の 2 つ存在する。一般的には D 値と Z 値を用いて生残菌数の算出を行うが、この方法では各温度における D 値が必要となるため、試料温度が時間の進行とともに変化する系では不適である。そこで本研究では、微生物死滅速度を一次反応の式であらわす方法を採用し、加熱調理中の微生物減少数を計算した。

一定温度における微生物死滅速度は、生残菌数に比例する一次反応と仮定すると、(6-1) 式であらわされる。

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (6-1)$$

N は生残菌数、k は微生物死滅速度定数 (min^{-1}) であり、その温度依存性はアレニウスの式であらわされる。これを (6-2) 式に示す。

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (6-2)$$

A は頻度因子 (min^{-1}), E_a は活性化エネルギー ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), R は気体定数 ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T は温度 (K) である. また, (6-1) 式と D 値の定義 (等温加熱下で, 生残菌数を一桁減少させるのに要する時間) を比較すると, (6-3) 式であらわすことができる.

$$k = \frac{\ln(10)}{D} = \frac{2.303}{D} \quad (6-3)$$

Juneja は脂肪の少ない牛挽肉 50 g に *E. coli* O157:H7 を含む 3 種病原菌を接種し, 真空包装後, 30°C で 48 時間培養させたものを試料とし, 真空包装した状態のまま恒温湯槽で等温加熱処理をした¹²⁾. 所定時間加熱後は直ちに取り出し, 氷水で冷却した. その後, 試料中の生残菌数を実測し, 各病原菌の D 値, Z 値を算出した. この実験より得られた, *E. coli* O157:H7 の D 値を Table 6-1 に示した.

Table 6-1 Heat resistance (expressed as D-values in min) for *E. coli* O157:H7 in ground beef at 55-60°C

| Temperature (°C) | D-value (min) |
|------------------|---------------|
| 55 | 20.89± 0.60 |
| 57.5 | 7.77 ± 0.22 |
| 60 | 3.39 ± 0.14 |

Table 6-1 の D 値を (6-3) 式に代入し, D 値に応じた微生物死滅速度定数 $k(\text{min}^{-1})$ を算出した. これをアレニウスプロットした図が Fig. 6-1 である. Fig. 6-1 の直線は一次関数とみなせることから, 直線の傾きより微生物死滅速度の活性化エネルギー $E_a(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$, y 切片より頻度因子 $A(\text{min}^{-1})$ を算出したところ, E_a は $3.30 \times 10^2(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$, A は $4.59 \times 10^{51}(\text{min}^{-1})$ を得た.

6.2.2.2 結果および考察

第 4 章で述べた, 解析モデル Fig. 4-1 (辻学園で調理した試料) における非定常三次元熱伝導解析の解析値と, 6.2.2.1 で算出した *E. coli* O157:H7 の微生物死滅速度の活性化エネルギーと頻度因子を用いて, 試料中心位置における *E. coli* O157:H7 の加熱による菌数減少を計算した結果を Fig. 6-2 に示した. またこの際, *E. coli* O157:H7 の増殖温度域は 7.0 ~ 45.6 °C, 最適温度は 37 °C であることから, 50°C より低い温度では殺菌微生物は死滅せず, 50°C 以上の温度帯で死滅 (菌数減少) すると仮定した¹⁰⁾.

Fig. 6-2 より, 加熱温度が 50°C に到達後, *E. coli* O157:H7 の菌数減少が始まり, 50°C 後半の温度帯では著しく菌数減少し, 調理終了時には初菌数に対して約 4 桁減少することが判明した. 食品流通を目的とした食品の場合, 加熱殺菌前の菌数に対して 5~10 桁程度

の菌数減少を目指す場合が多い²⁾。最も温度上昇が低い試料中心位置で、菌数が約4桁減少することが判明したことから、他の位置ではさらなる菌数減少が見込まれる。しかし、*E. coli* O157:H7はヒトに対して $10^1 \sim 10^2$ 程度の菌数で発症するため、原材料の畜肉中心に $10^6 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 以上付着していた場合、食中毒を発症する危険性がある。そのため、*sous-vide*調理では新鮮な食材を用いると同時に、調理時試料内部に微生物が混入・付着しないよう心がける必要性が示唆された。

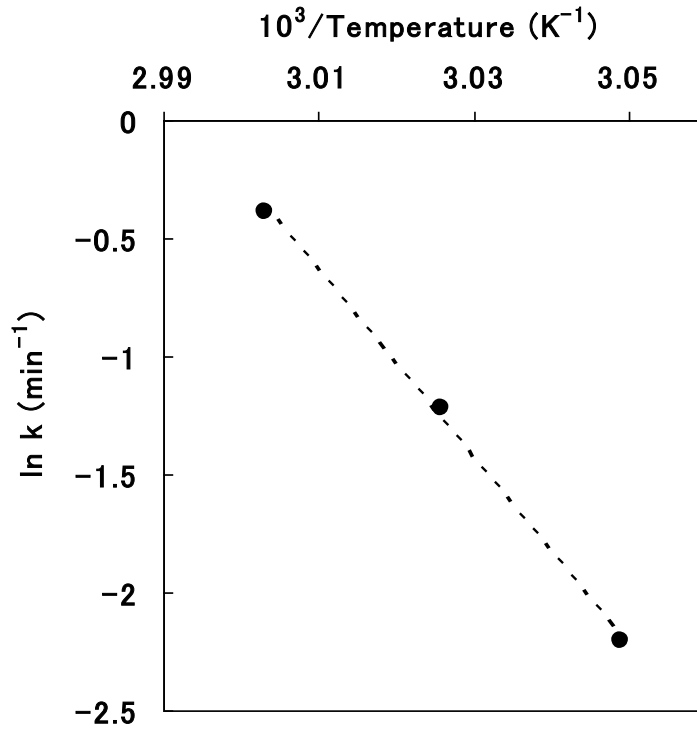


Fig. 6-1 Relationship between decreasing rate constant for *E. coli* O157:H7 and temperature in heating ($r=0.998$)

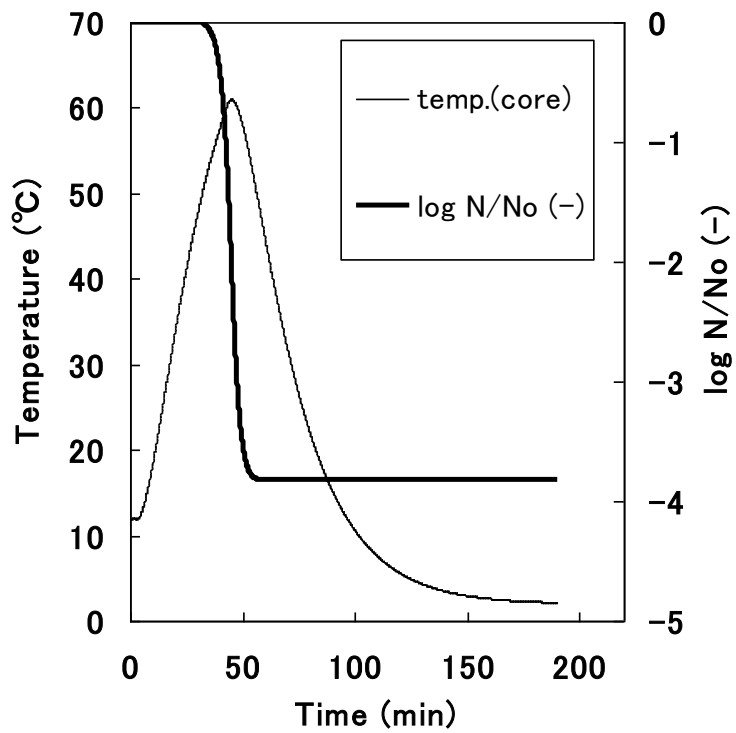


Fig. 6-2 Changes in remaining microbial count during *sous-vide* cooking at core

6.2.3 *sous-vide* 調理過程における殺菌値解析

6.2.3.1 解析方法

生残菌減少数とは別に、時間と共に変化する加熱温度の殺菌効果を評価する方法として F 値が用いられる。F 値は様々な温度で、ある時間加熱したときの熱死滅の効果を、一定の温度 T_r で加熱した場合の時間に換算した値のことである。F 値の算出は TDT 曲線 (Thermal Death Time Curve) と Z 値の定義 (生残菌を一桁減少させるのに要する加熱温度差) をもとに導出された (6-4) 式より、算出することができる。

$$F_p = \int_{t_1}^{t_2} 10^{\frac{T(t)-T_r}{Z}} dt \quad (6-4)$$

E. coli O157:H7 を加熱により死滅させるには、75°C、1分相当の加熱処理が必要である。また、*E. coli* O157:H7 の Z 値は Huang により 6.56 °C であると判明していることから、(6-4) 式の T_r (°C) に 75°C、Z 値に 6.56 °C、 $T(t)$ に非定常三次元熱伝導解析の解析値を代入し、F 値の算出を行った¹³⁾。

6.2.3.2 結果および考察

第 5 章で述べた解析モデル Fig. 4-1 (辻学園で調理した試料) における非定常三次元熱伝導解析の解析値を用い、(6-4) 式に従って試料中心位置における F 値を計算した結果を Fig. 6-3 に、試料中心断面位置にあたる長さ 5.35 cm の F 値分布を Fig. 6-4 に示した。Fig. 6-3 より、加熱温度が 50.8 °C に到達後、F 値の増加が始まるが、冷却工程が開始し加熱温度が 50°C 以下になると F 値は増加せず、平衡値となることがわかる。また、調理終了時の F 値は 0.06 分であり、中心位置は F_{75} 値 1 分に到達していないことが判明した。また Fig. 6-4 より、50°C 以上の温度を長時間経験する試料表面領域は F_{75} 値 1 分に到達しているが、中心領域 (Fig. 6-4 の太線内部) は目標値に到達していないことがわかる。つまり *sous-vide* 調理は全ての位置における *E. coli* O157:H7 を死滅させる十分な殺菌効果はないと確認できた。

ところで、第 4 章の Fig. 4-6 で示したアクチンの変性分布と Fig. 6-4 を比較したところ、 F_{75} 値 1 分を満たす領域と、調理終了時、アクチンが完全変性している領域がほぼ同じであった。つまり、畜肉タンパク質を全て熱変性させるのに要する熱量は、微生物を死滅させるのに要する熱量と同等であることが示唆された。

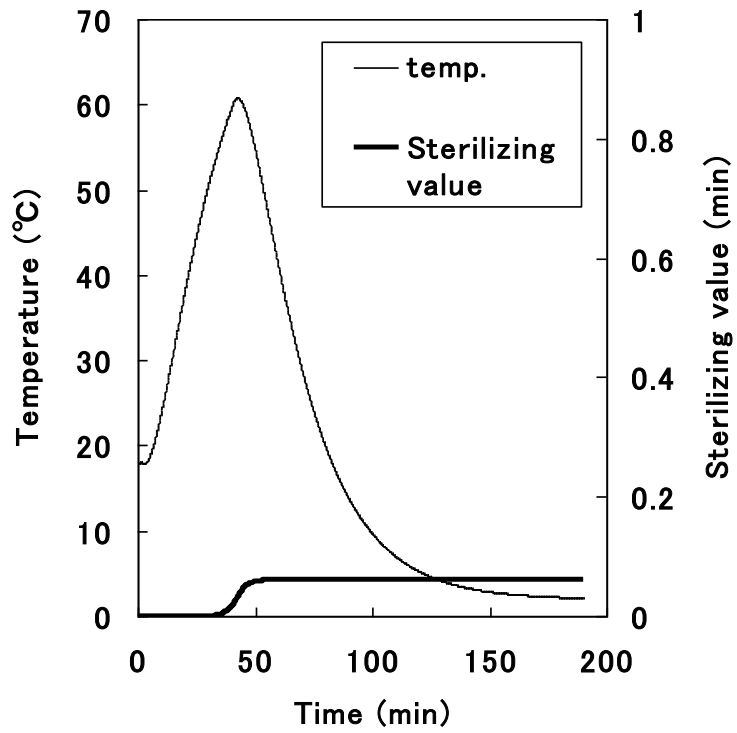


Fig. 6-3 Changes in sterilizing value during *sous-vide* cooking at core

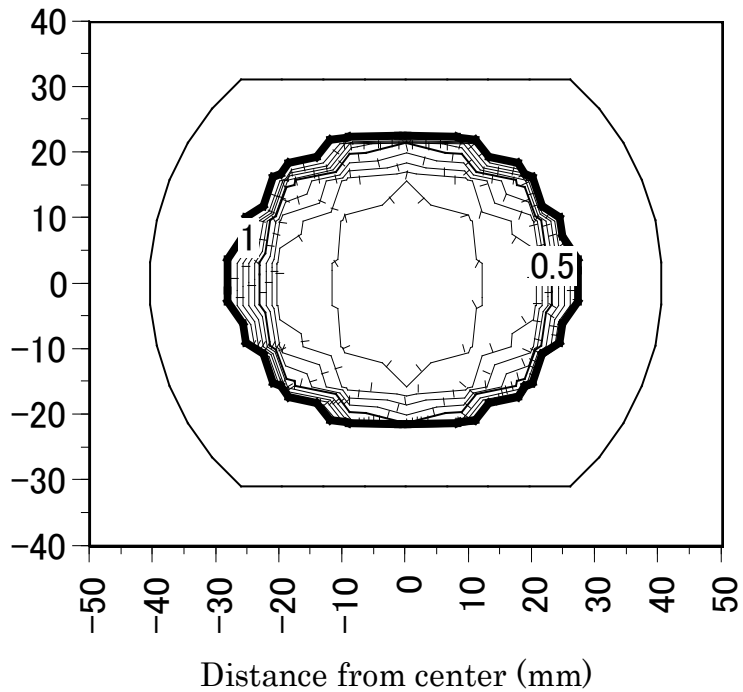


Fig. 6-4 Calculated distribution of sterilizing value in the central section at end point of cooking

6.3 貯蔵中における微生物増殖数解析

6.3.1 はじめに

6.2 で *E. coli* O157:H7 を対象とした *sous-vide* 調理の殺菌効果について検証したところ、50℃以上の温度を長時間経験する表面では十分な殺菌効果を確認できたが、試料中心に *E. coli* O157:H7 が混入もしくは付着していた場合、食中毒を発症する危険性があると判明した。ミンチ状態の畜肉ではなく、塊のまま調理するローストビーフの内部に微生物が混入・付着する可能性は低いですが、殺菌値が不十分である以上、*sous-vide* 調理製品の貯蔵中における衛生管理（温度管理）は、通常の加工品以上に重要だと考えられる。そこで、調理終了後の貯蔵時における微生物増殖数の予測計算を行った。貯蔵中における微生物増殖数解析の対象には、低温で増殖可能であり、ヒトに対して病原性のある リステリアを用いた。

Listeria とは、グラム陽性桿菌のリステリア属に属する細菌の総称であり、このうち基準種である *Listeria monocytogenes* はヒトに対する病原性をもつ。リステリアの特徴に、0～4℃の低温で徐々に増殖可能な点、他の菌以上に耐塩性を持つ点あげられる。また、リステリアは食品を介し経口的にヒトに感染することがあり、リステリア症と呼ばれる。リステリア症は細菌性食中毒にある典型的な急性胃腸炎症状は示さないことが多く、健康者が発病することは稀であるが、免疫低下しているヒトや妊婦が感染した場合、高熱や嘔吐、悪寒といった症状がおき、意識障害や痙攣をひきおこす危険性がある。既に100年ほど前に発見されていた菌にも関わらず、1980年代初期まであまり知られていなかったが、2008年8月、カナダで加工肉食品が原因でリステリア症が流行し3人が死亡した事例をはじめ、近年リステリアが原因となる重大食中毒事件が12件以上発生している¹⁴⁾。そのため、食品製造過程や貯蔵過程での増殖を阻害する条件について現在研究が盛んにおこなわれている菌のひとつである¹⁴⁾¹⁵⁾。

6.3.2 解析方法

微生物増殖速度は6.2.1に従い、生残菌数に比例する一次反応と仮定した。ただし今回は増殖速度であることから、(6-1)式は(6-5)式であらわされる。

$$\frac{dN}{dt} = kN \quad (6-5)$$

(6-3)式に代入するD値は、Jacobらの実験データを用いた¹⁶⁾。

Jacobらは、市販燻製牛肉製品約6.5g(3.5×2.5×0.3cm)の表面に*L. monocytogenes*を含む3種病原菌を接種し、真空包装後、4、10、21、30℃で最大28日間貯蔵した。所定期間貯蔵後、試料中の生残菌数を実測することで各病原菌のD値を算出した。この実験より得られた各病原菌のD値をTable 6-2に示した。

Table 6-2 D-value for *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* inoculated onto the surface of kippered beef

| Storage temp.(°C) | D-value (days) | | |
|-------------------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i> O157:H7 | <i>Salmonella</i> |
| 4 | 29.49 ± 17.25 | 41.06 ± 16.12 | 40.78 ± 21.57 |
| 10 | 14.13 ± 3.83 | 19.05 ± 3.44 | 24.14 ± 7.01 |
| 21 | 4.98 ± 0.47 | 7.30 ± 0.51 | 8.43 ± 0.88 |
| 30 | 4.30 ± 0.35 | 4.60 ± 0.20 | 5.43 ± 0.34 |

Table 6-2 の *L. monocytogenes* の D 値を (6-3) 式に代入し、D 値に応じた微生物増殖速度 (day⁻¹) を算出後、アレニウスプロットした図を Fig. 6-5 に示した。Fig. 6-5 の直線は一次関数とみなせることから、直線の傾き y 切片より、微生物増殖速度の活性化エネルギーと頻度因子を算出したところ、 E_a は 5.32×10^1 (kJ·mol⁻¹)、A は 4.02×10^7 (hour⁻¹) を得た。

6.3.3 結果および考察

6.3.2 で算出した微生物増殖速度の活性化エネルギーと頻度因子を用いて、3、10、15°C の等温度下で最大 10 日間貯蔵した際の菌数増殖数を計算した結果を Fig. 6-6 に示した。またこの際、試料に温度分布はなく、貯蔵開始時から試料温度は貯蔵温度に等しいと仮定した。Fig. 6-6 より、貯蔵温度が高くなるにつれ微生物増殖速度は速くなり、3 °C で貯蔵すれば、10 日間貯蔵しても菌数は 1 桁増殖しないのに対し、15°C で貯蔵すると約 1.5 桁増殖することが明らかとなった。

予測計算に用いた速度パラメーターは、流通可能な市販燻製牛肉製品、すなわち十分な加熱殺菌が行われた試料の菌数増殖数 (実験値) をもとに算出している。sous-vide 調理製品は 3°C 以下の貯蔵条件を満たせば最大 1 週間保存が許されているが、6.2 で前述したように、試料内部の加熱殺菌効果は十分でないため、sous-vide 調理製品における菌数増殖は Fig. 6-6 より高い可能性が考えられる¹⁷⁾。これより、予測計算結果の観点からも貯蔵時の温度管理の重要性が示唆された。

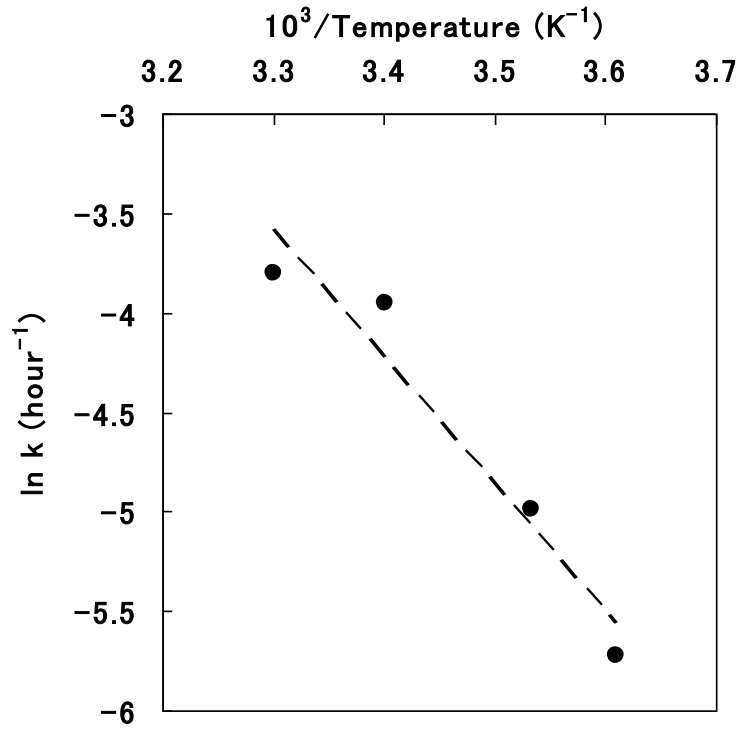


Fig. 6-5 Relationship between increasing rate constant for *L. monocytogenes* and temperature in heating ($r=0.936$)

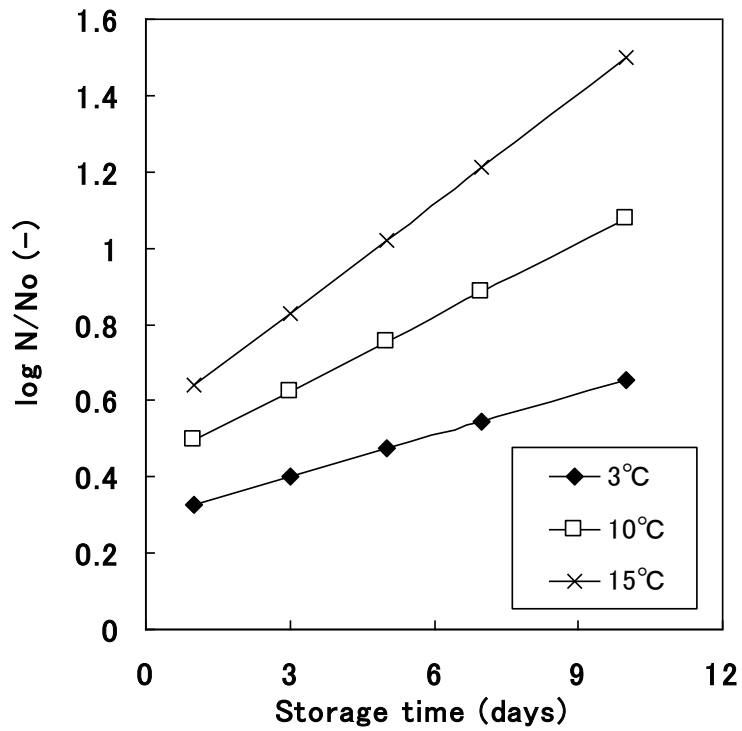


Fig. 6-6 Change in number of *L. monocytogenes* by difference storing temperature

6.4 *L. monocytogenes* と他の病原性菌の低温貯蔵中の増殖速度比較

微生物は種類によって増殖する温度範囲は異なるが、一般的に温度が上がるにつれ上昇し、至適温度を越すと急激に低下後、生育限界に到達する。増殖に適する温度範囲は、低温（0℃以下～25℃）、中温（25～40℃）、高温（40℃以上）の3つに分けられる。このうち、*E.coli* や *Salmonella* といった動物由来の菌は中温に属することが多く、低温貯蔵時は微生物の増殖を懸念する必要はないとされる¹⁸⁾。しかし、ヒトに対して病原性のある菌である以上、どの程度増殖するのかを把握する必要がある。そこで、Table 6-2 で示した Jacob らの D 値を用い、6.3.2 と同様な解析手法により、*E.coli* O157:H7 と *Salmonella* を 3℃の等温度下で最大 10 日間貯蔵した際の菌数増殖数を計算した。またこの解析結果と、低温で増殖可能である *L. monocytogenes* の菌数増殖数と比較した。

6.3.2 に従い、Table 6-2 の D 値を (6-3) 式に代入し、D 値に応じた微生物増殖速度を算出後、微生物ごとにアレニウスプロットした図を Fig.6-7 に示した。また、Fig. 6-7 より算出した微生物増殖速度の活性化エネルギーと頻度因子を、Table 6-3 にまとめた。

Table 6-3 D-value for *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium inoculated onto the surface of kippered beef

| | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i> O157:H7 | <i>Salmonella</i> |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|
| Ea (kJ·mol ⁻¹) | 5.31×10 ¹ | 5.86×10 ¹ | 5.61×10 ¹ |
| Z (day ⁻¹) | 4.02×10 ⁷ | 2.92×10 ⁸ | 9.35×10 ⁷ |

算出した微生物増殖速度の活性化エネルギーと頻度因子を用いて、微生物ごとに 3℃の等温度下で最大 10 日間貯蔵した際の菌数増加を計算した結果を Fig. 6-8 に示した。Fig. 6-8 より、すべての微生物において保存期間中の菌数増殖が確認され、増殖速度は、*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* の順に速いことが判明したが、*E. coli* と *Salmonella* の増殖速度はほぼ等しく、10 日間の貯蔵で約 0.4 桁増殖する結果となった。これより、十分な加熱殺菌が行われていれば、調理終了後の貯蔵時における微生物増殖を懸念する必要はないと判断した。また、*L. monocytogenes* は他の菌の約 2 倍にあたる 0.7 桁の増殖したことより、*L. monocytogenes* の低温増殖可能である特徴を確認することができた。

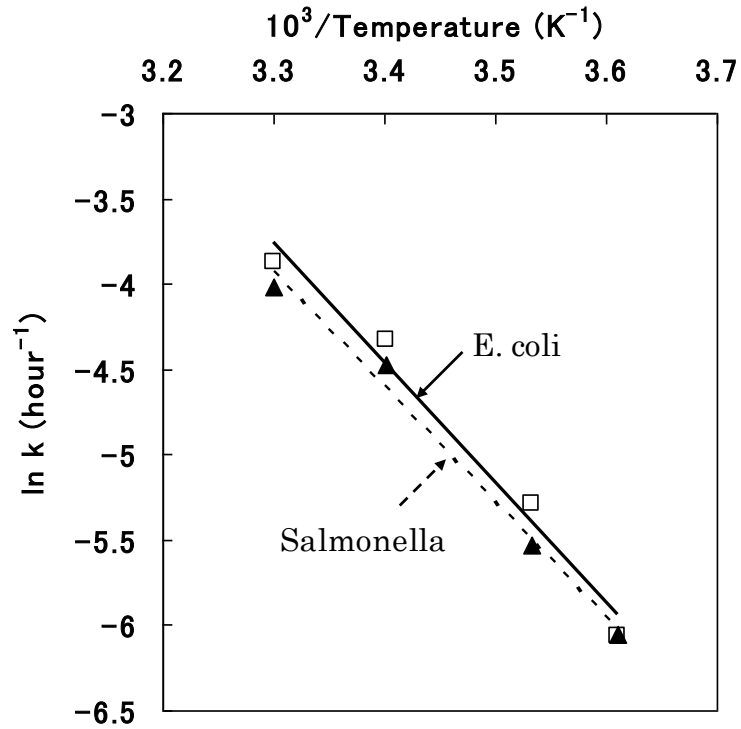


Fig. 6-7 Relationship between increasing rate constant for *E. coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* and temperature in heating (*E. coli* O157:H7; $r=0.980$, *Salmonella Typhimurium*; $r=0.989$)

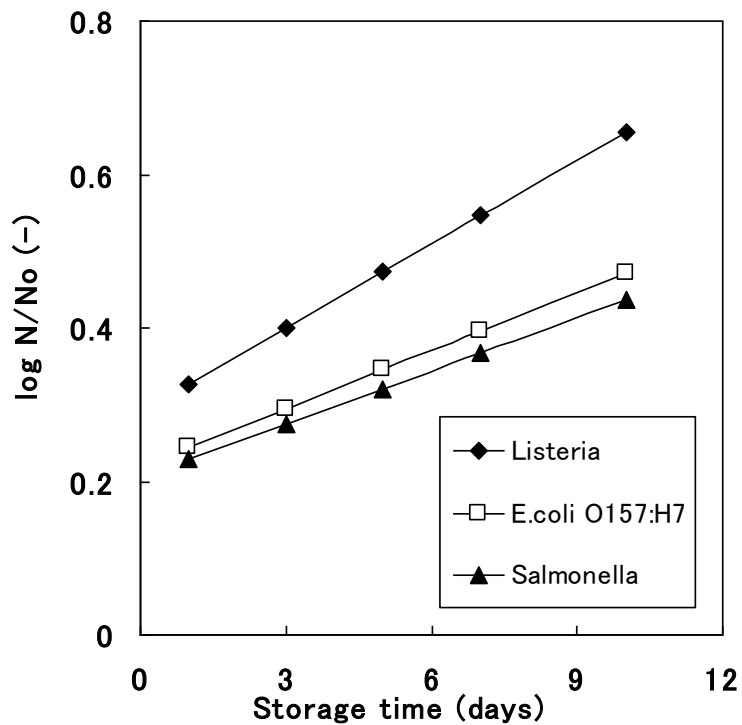


Fig. 6-8 Change in the number of increases is different depending on the kind of the microorganism.

6.5 第6章のまとめ

sous-vide 調理で危惧されている微生物問題に着目し、安全面における品質評価を行った。解析に要する速度パラメーターは、文献値より得た。*E. coli* O157:H7 を対象とし、*sous-vide* 調理過程における微生物減少数と F 値を予測計算したところ、50°C以上の温度を長時間経験する試料表面領域は、菌数減少、F 値の両方の側面において十分な殺菌効果が期待できるが、中心領域は殺菌不十分であることが明らかとなった。また *L.monocytogenes* を対象とし、貯蔵時における微生物増殖数を計算したところ、15°Cで貯蔵した場合は約 1.5 桁増殖、また 3°Cで貯蔵した場合でも *E. coli* O157:H7、*Salmonella* と比較し、約 2 倍の菌数増殖が確認された。これより、*sous-vide* 調理の際は、試料内部に微生物が混入・付着しないよう注意すること、貯蔵中は条件とされる 3°C以下を厳守する必要性および温度管理の重要性が示唆された。

6.6 第6章の引用文献

- 1) Jay J. M. *Modern food microbiology*. D. Van Nostrand Co. (1970)
- 2) 久保田清, 宇野順一, 小林猛, *食品工学基礎講座 ⑩食品反応工学*, 株式会社光琳(1990)
- 3) Nyati H. Survival characteristics and the applicability of predictive mathematical modeling to *Listeria monocytogenes* growth in sous vide products. *Int J Food Microbiol*, 56(2), 123-132 (2000)
- 4) Ghazala S., Ramaswamy H. S., Smith J. P., Simpson M. V. Thermal process simulations for sous vide processing of fish and meat food. *Food Research International* 28(2), 117-122 (1995)
- 5) Schellekens M. New research issues in sous-vide cooking. *Trends in Food Science & Technology* 7, 256-262 (1996)
- 6) Gonzalez-Fandos E., Villarino- Rodriguez A., Garcia-Linares M. C., Garcia-Arias M. T., Garcia-Fernandez M. C. Microbiological safety and sensory characteristics of salmon slices processed by the sous vide method. *Food Control* 16, 77-85 (2005)
- 7) Mann J. E., Brashears M. M., Contribution of humidity to the lethality of surface-attached salmonella during the thermal processing of cooked ready-to-eat roast beef. *J. Food. Prot.* 70(3), 762-765 (2007)
- 8) 船渡川圭次, 唐沢麗子, 加藤敏彦, 大島徹, 長則夫, 食肉中における腸管出血性大腸菌の挙動と殺菌方法の検証, *食品衛生研究*, 53(4), 63-67(2003)
- 9) 野原英夫, 荒木美穂, 鈴木美紀, 森岡豊, 沼田正寛, 大久保良子, 駒木勝, 松田典彦, ローストビーフのオープン加熱時におけるAおよびB型ボツリヌス菌芽胞の耐熱性, *日本食品微生物学会雑誌*, 13(1), 35-40 (1996)
- 10) 山中英明, 藤井建夫, 塩見一雄, *食品衛生学*, 恒星社厚生閣 (2007)
- 11) 藤井建夫, *食品微生物標準問題集*, 幸書房 (2002)
- 12) Juneja V. K. A comparative heat inactivation study of indigenous microflora in beef with that of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*, 37(4), 292-298 (2003)
- 13) Huang L. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Heidelberg, and *Escherichia coli* O157:H7 at elevated temperatures. *J Food Prot*, 67(8), 1666-1670 (2004)
- 14) *Listeria: The story so far*. *Food Eng. Ingrid. Special Issue*, 6-10 (2007)
- 15) Bolton D. J., McMahon C. M., Doherty A. M., Sheridan J. J., McDowell L. D. A., Blair I. S., Harrington D. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in minced beef under laboratory condition and in sous-vide

- prepared minced and solid beef cooked in commercial retort. *J Appl Microbiol*, 88(4), 626-632 (2000)
- 16) Jacob R., Porto-fitt A. C., Call J. E., Luchansky J. B. Fate of surface-inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *salmonella typhimurium* on kippered beef during extended storage at refrigeration and abusive temperatures. *J Food Prot*, 72(2), 403-407 (2009)
- 17) 谷孝之, 金谷節子, 長田銑司, 川平秀一, 真空調理ってなに?, 柴田書店 (2002)
- 18) 別府輝彦, バイオテクノロジーテキストシリーズ 新・微生物学, 有限会社I.B.S.出版 (2004)

第7章 総括

本研究は、食品産業の安全性および品質向上を目指すべく、畜肉全体を対象とした三次元非定常熱伝導解析を行い、さらに伝熱進行に伴う畜肉品質変化の予測計算を行った。

第1章では、本研究を行う背景および目的を明示すると同時に、畜肉品質変化に最も関与し、畜肉を構成する主成分であるタンパク質について述べた。また、本研究の解析対象として採用した真空低温調理法 (*sous-vide* 調理) について説明し、辻学園で行った *sous-vide* 法によるローストビーフ調理手法を習得し、研究室で同様な手法でローストビーフ調理を行った。辻学園および研究室の調理工程中の伝熱データを比較したところ、温度履歴、重量変化率、体積変化率の全てにおいて同様な傾向となった。また、*sous-vide* 調理は、重量損失の減少が大きくなる 15°C以上の温度帯にさらされる時間が短いため、両方の試料において、通常の焼成調理よりも低い 15%の重量損失となった。

第2章では、テクスチャー、重量変化をはじめとする品質変化に大きな影響を与える畜肉タンパク質の加熱変性に着目をした。タンパク質加熱変性状況を制御することで、さらなる畜肉加工品の向上が見込まれることから、変性速度定数の温度依存性を、示差走査分析法 (Differential Scanning Calorimetry : DSC) により実測した。DSC 測定より、全ての昇温速度において 50°C付近、70°C付近で吸熱ピークを観測でき、また既存の研究より、前者を筋原線維タンパク質のミオシン、後者をアクチンの変性由来であると判断した。さらにこの結果と DSC-Dynamic 法により、加熱変性速度算出に要する速度パラメーターを算出したところ、ミオシンは E_a (kJ · mol⁻¹) = 2.41 × 10², Z (min⁻¹) = 4.69 × 10³⁶, アクチンは E_a (kJ · mol⁻¹) = 3.80 × 10², Z (min⁻¹) = 8.17 × 10⁵⁵ を得た。

第3章では、畜肉の主要旨味成分であるイノシン酸 (以後、IMP) に着目した。IMP は畜肉中に存在する酵素により分解されることから、HPLC 法 (High Performance Liquid : HPLC) により実測した加熱処理後、畜肉中に残存する IMP 量を定量した。その結果、全ての加熱処理温度において加熱時間の進行とともに IMP 残存率が低下すると確認できたが、中でも 40°C試料の IMP 残存率低下が著しく速く、40°Cより高い温度で加熱処理した試料は残存率の低下が抑制された。後者の原因は IMP を分解する酵素の酵素活性が低下したことに起因すると判断し、速度の構築を行い、HPLC 分析で得られた実験値をもとに IMP 分解反応速度と、IMP を分解する酵素の酵素活性低下反応速度算出に要する速度パラメーターを推算した。その結果、IMP 分解反応速度は E_a (J · mol⁻¹) = 4.10 × 10⁴, Z (min⁻¹) = 1.38 × 10⁵, 酵素活性低下反応は E_a (J · mol⁻¹) = 1.38 × 10⁵, Z (min⁻¹) = 2.41 × 10¹⁹ を得た。しかし、酵素活性低下速度を考慮し、IMP 残存率を算出する温度帯では、解析値と実験値に差が生じており、加熱初期において 40°C試料は実験値の減衰が速く、50°C試料では解析値の減衰が速くなった。この原因として、IMP 分解酵素の至適温度や酵素活性の温度依存性は実測値ではなく、推算値であるため、今後、検証する必要があると示唆された。

第4章では、*sous-vide* 法によるローストビーフ調理を例として、加熱調理の進行に伴

って食材（畜肉）内部に形成される温度分布の変化を予測するために、非定常三次元熱伝導方程式を基本とした伝熱解析を行った。辻学園および研究室で *sous-vidé* 調理した際取得した伝熱データと解析値を比較したところ、中心温度履歴は良好に一致した。そこで、得られた解析値と、第 2 章、第 3 章で算出した畜肉品質を左右する因子の速度パラメータを組み合わせ、*sous-vidé* 調理過程における、タンパク質変性および IMP 残存量の予測計算を行った。タンパク質変性は、試料表面は 2 種類の主要タンパク質（ミオシン、アクチン）の両方の変性が終了しているが、内部ではタンパク質により変性状況が異なり、ミオシンは変性終了しているのに対し、70°C 付近の高温度で変性するアクチンはほとんど変性していないことが明らかとなった。IMP 残存率は、加熱開始直後に酵素活性が著しく低下している試料表面は、調理終了時においても IMP 初期含量と同等なのに対し、酵素活性が徐々に低下する試料内部の IMP 残存率は初期量の約半分まで低下することが判明した。また、実験値と解析値を比較したところ、数値に差はあったが、試料位置に応じた数値の減少傾向は同様であったが、試料内部における実験値と解析値の差が大きいことから、IMP 分解酵素の至適温度付近（40°C）での IMP 分解反応および酵素活性低下反応の挙動が適正にあらわされていないことを示唆した。さらに、予測計算をもとにタンパク質変性率が判明している試料を用いて、テクスチャーの指標となる弾性率、重量変化率の測定を行い、タンパク質変性状況の観点から、畜肉品質変化の考察を行った。その結果、2 種類ある主要タンパク質のうち、70°C 付近の温度で変性するアクチンが変性すると、弾性率および重量変化率の数値が急激に変化したことから、アクチンの変性は畜肉の品質に大きな影響を及ぼすと判明した。さらには、*sous-vidé* 法により調理した試料の重量損失が低い要因は、アクチンが変性していないことに由来すると明らかとなった。

第 5 章では、第 4 章で述べたタンパク質変性率の妥当性を検証するため、MRI 法を用い、畜肉に存在する水の ^1H 画像を測定し、これをもとに横緩和時間 T_2 を算出した。まず、タンパク質変性状況と T_2 の相関を検証したところ、変性の進行に従い T_2^* が短くなった。これは第 4 章で示したタンパク質の加熱変性進行とともに、保持されていた水がドリップとして離水し、畜肉重量が減少する現象と一致していることから、タンパク質変性率（total 未変性率）と得られた T_2^* との相関式を較正曲線として採用した。次に、温度分布および変性分布が生じるようなブロック状の試料の MRI 測定を行ったところ、変性が進行するに従い、短い T_2 値の割合が増加することが確認された。また、測定した xy 平面画像から、さらに $x=0.75$ cm における y 方向の情報を一次元画像として取り出し T_2^* 値は、変性の進行が速い中心距離から離れるに従い、 T_2^* が低下しており、不均一な変性分布が生じていることが明らかとなった。最後に、較正曲線を用いて T_2^* から変換した total 未変性率（実験値）と、予測計算をもとに算出した total 未変性率（解析値）を比較したところ、ミオシンのみ変性している試料では実験値と解析値の傾向は一致したが、アクチンまで変性している試料では、中心において実験値の方が解析値よりも高い数値を示した。この原因

として、ブロック状試料では試料中心に位置するに依り、試料外に離水可能となった水が排出されるのに時間を要するにも関わらず、解析値では水の移動性を考慮していないことが挙げられる。すなわち、今後ブロック状試料におけるタンパク質変性率の解析値の妥当性を検証するには、伝熱解析の際、水の物質移動解析を行う必要性が示唆された。

第 6 章では、*sous-vide* 調理で危惧されている微生物問題に着目し、安全面における品質評価を行った。解析に要する速度パラメーターは、文献値より得た。*E. coli* O157 : H7 を対象とし、*sous-vide* 調理過程における微生物減少数と F 値を予測計算したところ、50℃以上の温度を長時間経験する試料表面領域は、菌数減少、F 値の両方の側面において十分な殺菌効果が期待できるが、中心領域は殺菌不十分であることが明らかとなった。また *L.monocytogenes* を対象とし、貯蔵時における微生物増殖数を計算したところ、15℃で貯蔵した場合は約 1.5 桁増殖、また 3℃で貯蔵した場合でも *E. coli* O157 : H7、*Salmonella* と比較し、約 2 倍の菌数増殖が確認された。これより、*sous-vide* 調理の際は、試料内部に微生物が混入・付着しないよう注意すること、貯蔵中は条件とされる 3℃以下を厳守する必要性および温度管理の重要性が示唆された。

以上述べたとおり、本研究の具体的な成果として、調理する試料全体を対象とした伝熱解析および品質変化の予測計算を行うことで、品質ごとの特徴的な分布について考察することが可能となった。しかしながら、IMP 残存率の予測計算においては、IMP 分解酵素の至適温度付近（40℃）での IMP 分解反応および酵素活性低下反応の挙動が適正にあらわされていないことを示唆しており、今後検証が必要である。また、タンパク質変性率の妥当性を検証するため行った MRI 測定においても、現在の解析値は水の物質移動解析を考慮していないため、ブロック状試料における実験値と解析値に差が生じている。畜肉を加熱処理する際にはタンパク質加熱変性に伴い、水溶性タンパク質を含む水分や融解した脂肪などの油分が流出する物質移動現象が生じることから、今後は物質移動解析を行い、より実際の加熱調理時の現象に近づけた解析を行う必要がある。しかし、本研究は加熱調理時の畜肉品質変化を評価する際に用いる、予測計算の基盤を構築できたといえる。

謝辞

本研究は、東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科 食機能保全科学専攻 食品熱操作工学研究室において、2009年4月より2011年3月にわたり行ったものです。この間、甚大なる御協力と親身な御指導を賜りました、東京海洋大学 酒井昇教授、福岡美香准教授に厚く御礼申し上げます。また、食品流通安全管理専攻 濱田奈保子教授に御高閲賜りましたことをここに、深く感謝申し上げます。さらに、共に切磋琢磨し、支えてくれた同級生をはじめとする同研究室の皆様から種々の有益なるご助言賜りましたこと、厚く御礼申し上げます。

最後に、ここでお名前を挙げることのできなかつた方へお詫びするとともに、私を支えてくださった皆様に改めて感謝の意をあらわし、今後とも相変りませぬ御指導、御鞭撻の程、お願い申し上げます。