

「おきなわブランド」ドライエイジングビーフ生産技術の確立

(5) カビ熟成によるドライエイジングビーフの特徴

花ヶ崎敬資、安里直和*、豊川哲也

カビ熟成によるドライエイジングビーフ製造技術を確立するため、低温肉熟成に適したカビの選定、同定、当該カビの生育至適水分活性値、カビ熟成中の肉表面の水分活性値、菌叢の変化、カビ熟成前後のアミノ酸含量、硬さ、匂い成分を解析した。当該菌株は *Mucor flavus* に同定され生育に必要な水分活性値は2℃の場合で0.94以上であった。また、カビを生育させ熟成した場合で他の細菌類への生育阻害効果は認められなかったが、熟成後アミノ酸含量は増加し、カビ熟成特有の揮発性成分が検出された。

1 緒言

ドライエイジングビーフは具体的な製造法による定義はなく、ルール化もされていない¹⁾。一般には、肉を真空パックせず、通気性のある状態で数日間熟成させる方法^{2) 6)}であるが、本場と言われるニューヨーク³⁾では自然に生育してくるカビにより熟成させるのが主流となっているようである。そして、カビ熟成によりナッツのようなまろやかな熟成香が付与される^{4) 5) 6)}ことなどが知られている。この独特の香り、風味は、他のウェットエイジングビーフとの明らかな違いにより別の食コンテンツとしての差別化が可能である。昨今の沖縄への韓国、台湾、香港などからのアジア観光客急増⁷⁾、これら地域でのドライエイジングビーフのレストランメニューの拡がり⁸⁾から県外はもとよりアジア地域への販路拡大は充分可能と考えられる。

現在までに知られる肉熟成に関与する菌として *Thamnidium* (エダケカビ) 属、*Rhizopus* (クモノスカビ) 属、*Mucor* (ケカビ) 属などがある⁸⁾。筆者らは、2℃などの低温でも肉にきちんと生育し、ナッツやフライドポテトのような香ばしい香りを放つ菌株の単離に成功した。本研究ではこのカビ菌種の同定、生育特性や、肉熟成中の菌叢の変化、アミノ酸類の変化、匂い成分を解析したので報告する。

2 実験方法

2-1 センター保有株のカビ菌種同定

2℃の冷蔵庫内でも肉表面にきちんと生育し、芳醇な香りを放つ菌株を選定、その株の菌種同定を株式会社テクノスルガ・ラボに委託した。コロニー性状および形態観察並びに ITS-5.8SrDNA 塩基配列解析により行った。

2-2 センター保有株至適水分活性値

クロラムフェニコール (和光純薬工業株式会社) を

100mg/L 加えたポテト・デキストロース寒天培地 (メルク株式会社) にグルコース、マルトース、ソルビトール、塩化ナトリウムをそれぞれ段階的に濃度を高くした培地にて15℃と2℃でそれぞれ14日間培養し、生育状況を調べた。

2-3 熟成用肉

熟成に用いた輸入肉は、ニュージーランド産アングス種、ヘレフォード種の交雑放牧牛。経産牛は沖縄県畜産研究センター飼養の黒毛和種成雌牛である。

2-4 熟成庫

水分活性、微生物菌叢測定した輸入牛リブ部位のみ RZ-5 冷蔵庫 (昭和電工株式会社)、その他全て CZ-1 チルド加工室 (昭和電工株式会社) でどちらも設定温度2℃にした。

2-5 湿度、温度の測定

湿度、温度の測定はデータロガー DL171 (アズワン株式会社) を用いて計測した。

2-6 水分活性、微生物菌叢測定用肉熟成環境

リブ部位はドライボックス内湿度約75%でファンを使わず、モモ部位、サーロイン部位はドライボックス内にパソコン用のファン (San Ace 120, MODEL109S085, 山洋電気株式会社) を当てて湿度約89%、約77%で熟成した。

2-7 水分活性、微生物菌叢用試料

肉表面厚さ約1mmを0.5~1.0gで採取した。1つの測定につき3試料をなるべく脂肪部位を避け適当な間隔で無作為に選択した。

*沖縄県畜産研究センター

2-8 水分活性

水分活性計、型式 CX-2（日本ゼネラル株式会社）を用いて計測した。

2-9 微生物菌叢測定

平板培養法にて計測した⁴⁾。採取した肉表面試料（0.5～1.0g）と 9 倍量（4.5～9.0mL）の滅菌水をユニパック B4-STγ 滅菌済（アズワン株式会社）に入れよく混濁した。適宜、10 倍ごとの希釈系列を作成した。これら適当な希釈系列を下記の各プレート寒天培地に 100μL 接種した。一般細菌は普通寒天培地（日水製薬株式会社）、大腸菌群はブルーライト培地（日水製薬株式会社）を使用し 30℃、1 日間好気条件で培養した。糸状菌と酵母はクロラムフェニコール（和光純薬工業株式会社）を 100mg/L 加えたポテト・デキストロース寒天培地（メルク株式会社）を使用して 30℃、2 日間好気条件で培養した。サルモネラと黄色ブドウ球菌はサニ太くん SA（JNC 株式会社）にて計測した。サニ太くん SA の培養シート部に適当な希釈系列を 1mL 接種し 35℃1 日間好気条件で培養した。なお、各微生物の菌数は肉表面試料 1g 当たりのコロニー形成数（log colony-forming unit/g）で表示した。

2-10 アミノ酸類、物理的特性測定など用肉熟成環境

輸入牛サーロイン部位、モモ部位はドライボックス内にパソコン用のファン（San Ace 120, MODEL109S085, 山洋電気株式会社）を当ててそれぞれ湿度約 77%、約 89%で熟成した。経産牛サーロイン部位、モモ部位も同様の方法でいずれも湿度約 73%で熟成した。

2-11 アミノ酸類測定

アミノ酸類の測定については、トリミング後の試料をホモジナイズ後、アセトニトリルおよび過塩素酸で除タンパク、ヘキサンで脱脂し、0.2μm のフィルターを通した検液を用いた。分析は LC/QTOF（Agilent, 6530/5975MSD）、カラムは Intrada Amino Acid（100×3mm, Imtakt）を用いて、サンプル注入量 5μL、流速 0.6mL/min で分析した。

アミノ酸類はうま味、甘味、風味・苦味、機能性の 4 つに分けており、うま味はアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン、甘味はグリシン、アラニン、スレオニン、セリン、プロリン、風味・苦味はメチオニン、リジン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ヒスチジン、アルギニン、シスチン、機能性はカルノシン、アンセリン、オルニチン、タウリン、ギャバのそれぞれを定量した。また、熟

成後各サンプルにつき、熟成前に比べ水分含量が減少した場合のみ濃縮率で除した値に換算した。

2-12 ドリップロス、クッキングロスの測定

ドリップロスについては、まず、凍結保存した肉サンプルを直方体に切り出し常温で解凍した。その際、肉表面にしみ出た水分をペーパータオルで除去した後、重量を測定し解凍前後の差から算出した。クッキングロスについては、ドリップロスで使用したサンプルをナイロンバックに入れ、ウォーターバスで 75℃、60 分間浸漬し、冷水で放冷後、肉表面の水分を除去した後、重量を測定し前後の重量差から算出した⁹⁾。

2-13 物理的特性（破断応力など）の測定

理化学的特性の測定は 200N ロードセルを装着した株式会社山電社製のクリーブメーター（RE-3305S）を用いた。クッキングロスに用いたサンプル⁹⁾を、破断用ブランジャー（No.5）を用いて分析した。各分析とも 3 回以上測定し、その平均を分析値として用いた。各分析における測定速度は 1mm/sec とし、破断応力などの解析は機器内蔵の自動解析ソフトウェアを用いて行った。有意差は Excel 等分散 t 検定により判定した。

2-14 GC-MS による揮発性成分分析及び簡易同定

装置は GCMS-QP2010Ultra（島津製作所）を使用した。分析に用いたカラムは、InertCap PureWAX（ジーエルサイエンス、内径 0.25mm、膜厚 0.25μm、長さ 30m）で、サンプルの濃縮および注入は SPME Fiver（65μm PDMS/DVB, SUPELCO 社製）を使用した。分析条件として、サンプル加温時間は 60℃、10 分、SPME へのサンプル吸着時間は 60℃、10 分、サンプル脱着時間および注入時間は 2 分とした。ガスクロマトグラフィーの分析条件は、カラム流量 1.23mL/分、線速度 40cm/秒、スピリットレス、気化室 230℃、イオン源 230℃、インターフェイス 240℃、カラムオープン温度 40℃（2 分）→230℃（5℃/分）→230℃（5 分）、EI によるイオン化、測定モードをスキャン（20-600m/z）とした。TIC においてピークのマススペクトルを NIST11 ライブラリ及び FFNSC2 香料ライブラリに対してマッチングを行い、最も類似度の高い成分を当該ピークの成分として簡易的に同定した。同定の結果、Si を含む成分については試料外由来の成分として除外した。

3 実験結果

3-1 センター保有株カビ菌種同定

センター保有株の PDA 平板培地上の巨視的観察像を図 1 に、微視的観察像を図 2 に示した。黄色～白色、羊毛状のコロニーを形成し(図 1)、単生または分岐した胞子嚢柄の先端に多胞子性の胞子嚢を形成する(図 2)など接合菌類の中でも *Mucor* 属の特徴が観察された。また、ITS-5.8SrDNA 塩基配列解析により帰属が推定された *Mucor flavus* (図 3) の特徴にほぼ一致していた。以上の結果から当該株を *Mucor flavus* に同定した。

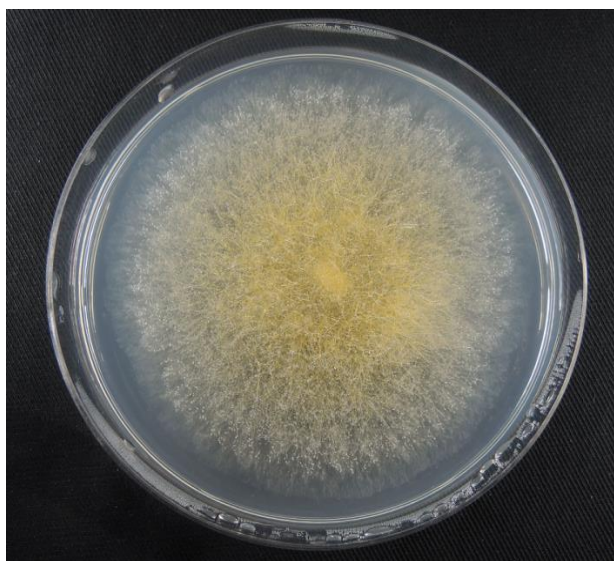


図 1 センター保有株の PDA 平板培地上の巨視的観察像 (15°C・1 週間培養)

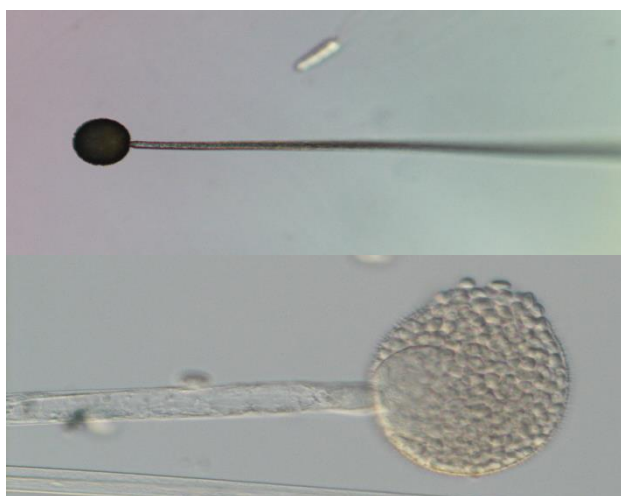


図 2 センター保有株の微視的観察像

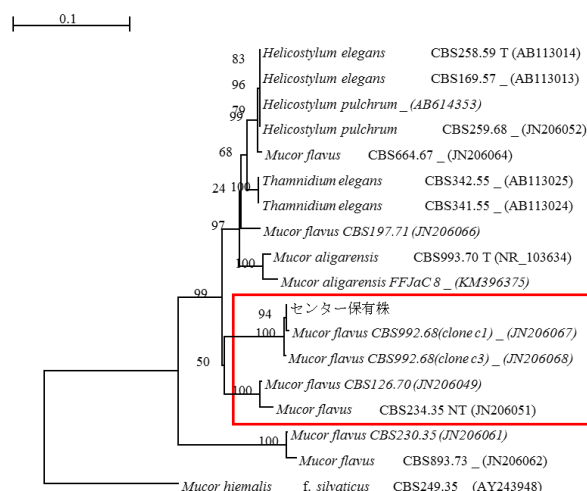


図 3 センター保有株の ITS-5.8S rDNA 塩基配列に基づく簡易分子系統樹

3-2 センター保有株至適水分活性値

各グルコース添加培地の水分活性、その培地での生育状況を○、×で示した(図 4)。0.94 未満の培地では増殖が見られなかった。マルトース、ソルビトール、塩化ナトリウムで水分活性を変化させた場合でも同様に 0.94 未満の培地では増殖が見られなかった。

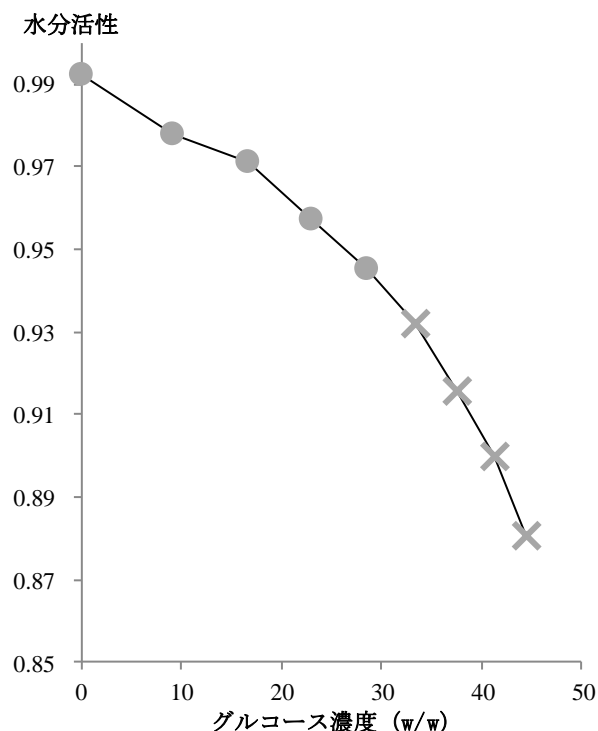


図 4 各グルコース添加培地の水分活性とセンター保有株の生育

3-3 センター保有株有無熟成後の様子

輸入牛リブ、モモ、サーロイン部位をそれぞれカビ有無で熟成させた熟成後の様子を図5、6、7に示す。



図5 リブ部位センター保有株有無熟成後の様子



図6 モモ部位センター保有株有無熟成後の様子



図7 サーロイン部位センター保有株有無熟成後の様子

3-4 センター保有株熟成期間中肉表面の水分活性と菌叢

輸入牛リブ、モモ、サーロイン部位をそれぞれカビ有無で熟成させた肉表面のそれぞれ水分活性、一般生菌、大腸菌群、酵母数の菌叢の変化を図8、9、10に示す。全ての熟成において経過に伴って水分活性は低下した。リブ、モモ部位で一般生菌数、大腸菌群数、酵母数は経過に伴って増加していった。また、全ての試験区、プレート培地において、カビ菌種は存在しなかった（目視）。

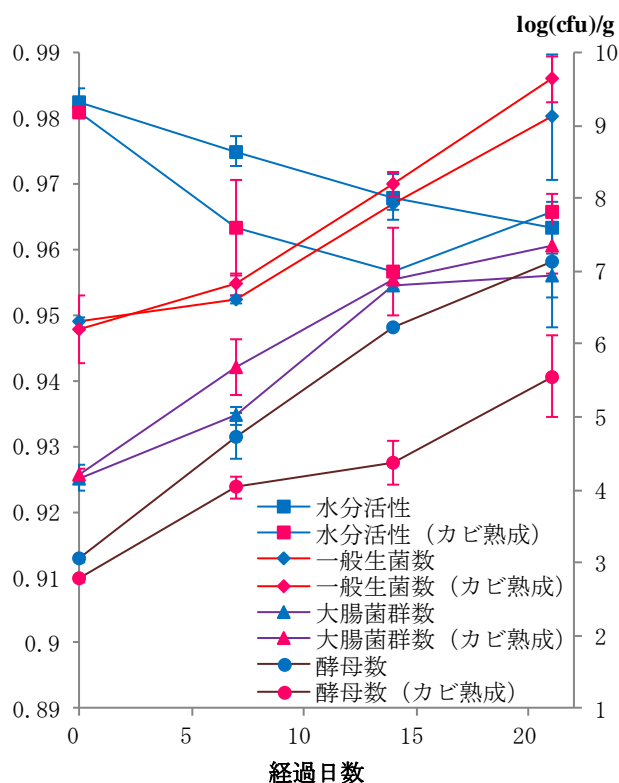


図8 リブ部位センター保有株有無熟成（湿度約75%）中の肉表面の水分活性と菌叢（mean±SE, n=3）

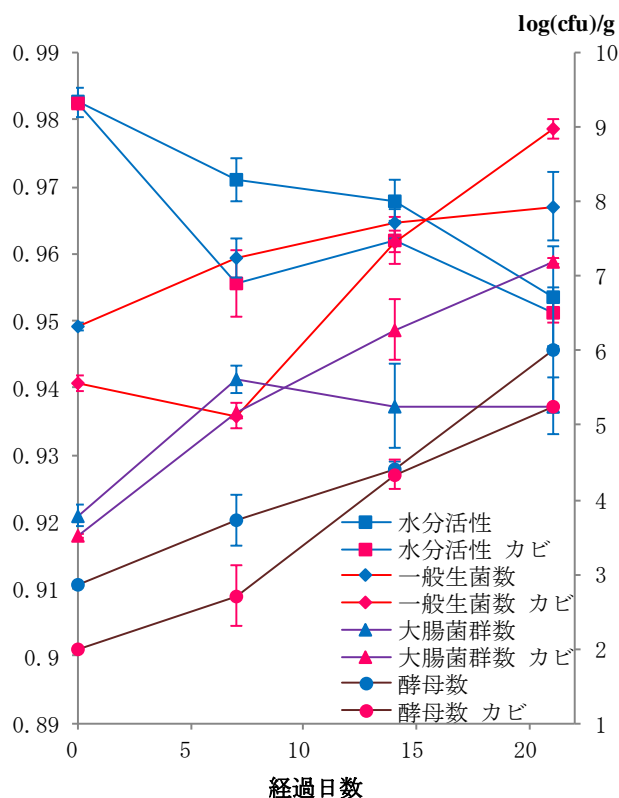


図9 モモ部位センター保有株有無熟成（湿度約89%）中の肉表面の水分活性と菌叢（mean±SE, n=3）

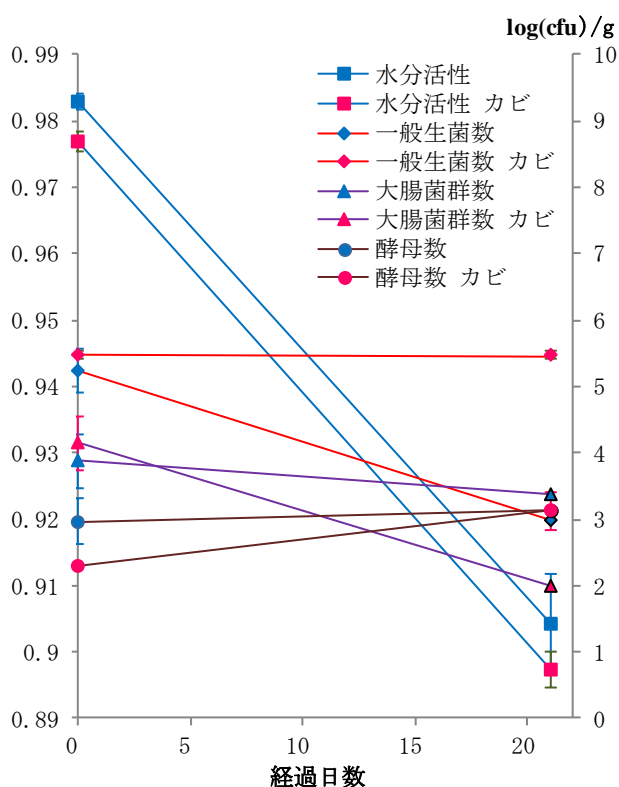


図10 サーロイン部位センター保有株有無熟成（湿度約77%、気流有）中の肉表面の水分活性と菌叢 (mean±SE, n=3)

3-5 センター保有株熟成前後のアミノ酸含量

経産牛、輸入牛のサーロイン、モモ部位のセンター保有株熟成による熟成前後のアミノ酸類含量の結果を図11に示す。経産牛、輸入牛のそれぞれサーロイン、モモ部位において熟成後アミノ酸類の含量は増加した。

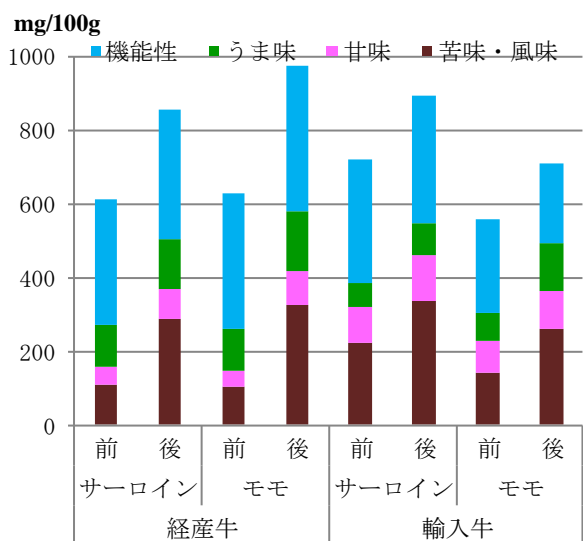


図11 各牛、各部位のカビ熟成前後のアミノ酸類含量

3-6 カビ熟成による熟成前後のドリップロス、クッキングロス

カビ熟成による熟成前後のドリップロス、クッキングロス、その合計値を図12に示す。ドリップロスはクッキングロスに比べ少量であるが、経産牛サーロイン以外で熟成後減少した。クッキングロスは全てで熟成後減少するとともに合計値においても減少した。

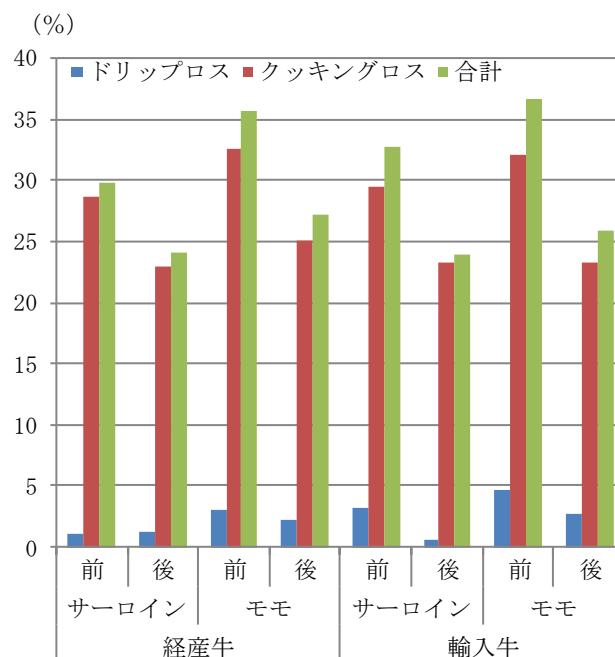


図12 カビ熟成前後のドリップロス、クッキングロス

3-7 センター保有株熟成による熟成前後の硬さ変化

センター保有株熟成による熟成前後の経産牛、輸入牛モモ部位を突刺試験した時の応力、歪率の変化を図13に示す。また、これらの破断応力の平均値などを表1に示す。破断応力はそれぞれ熟成前後で有意に低下した。

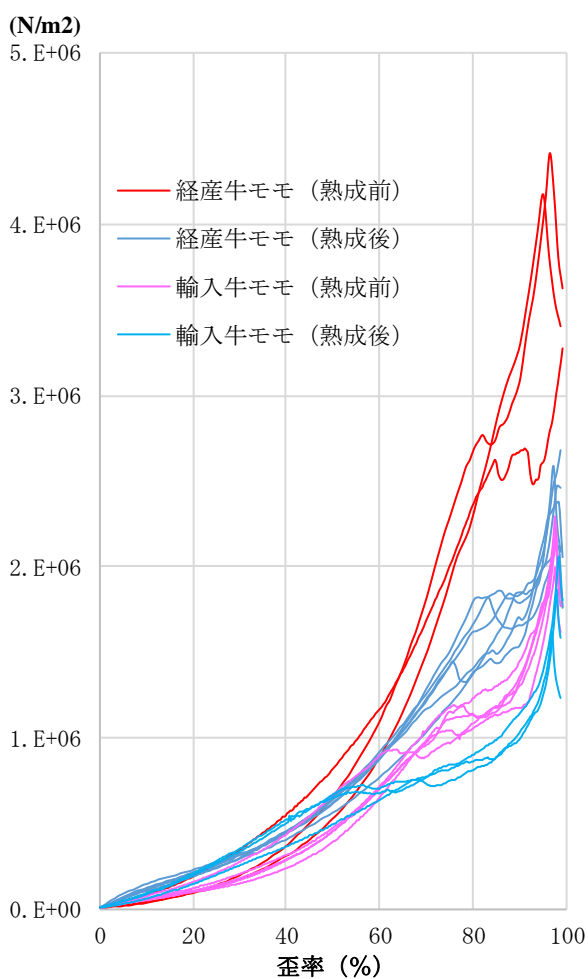


図 13 センター保有株熟成前後の突刺試験での応力-歪率変化

表 1 センター保有株熟成前後の突刺試験での破断応力

	経産牛モモ		輸入牛モモ	
	熟成前	熟成後	熟成前	熟成後
破断応力 (N/m ²)	3.19E+06	1.72E+06	1.09E+06	7.05E+05
標準偏差 (N/m ²)	4.93E+05	7.69E+04	5.90E+04	9.91E+04
有意差	p<0.05		p<0.01	

3-8 センター保有株熟成による匂い成分の簡易同定

センター保有株有無でそれぞれ熟成させたトリミング部位 (約 1g) を試料としてガスクロマトグラフィーによる匂い成分の解析を行った。検出成分のピーク面積値を縦軸にリテンションタイムを横軸に散布図で示した (図 14)。カビ有無それぞれで検出成分の特徴が異なった。いくつかのピークではカビ熟成の方がそのピーク面積値が高くなっており、分析のより後半でその傾向が見られた。これらの検出成分の中でカビ熟成にのみ検出された 20 成分の一覧を表 2 に示す。

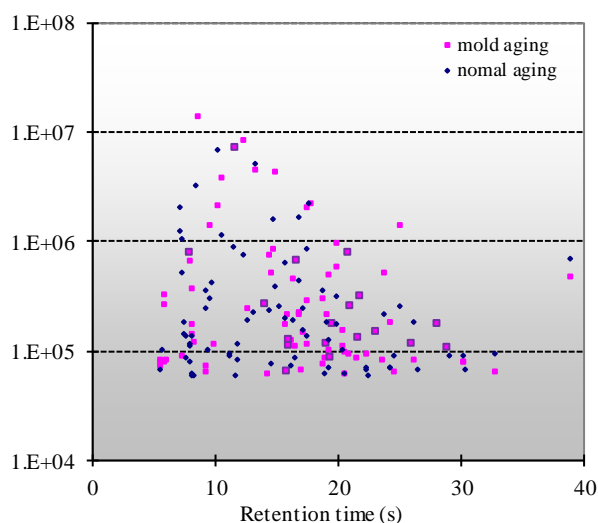


図 14 センター保有株有無での熟成後の GC-MS 検出成分ピーク面積値の散布図

表 2 センター保有株熟成後のみで検出された成分

類似度	化合物名	分子量	分子式
71	Heptanal	114	C7H14O
86	2-Acetyl-1-pyrroline	111	C6H9NO
94	2-Octenal, (E)-	126	C8H14O
81	Cyclohexene, 3-methyl-	96	C7H12
91	Decanal	156	C10H20O
93	cis-Hept-4-enol	114	C7H14O
96	2-Nonenal, (E)-	140	C9H16O
81	3-Octen-1-ol, acetate, (Z)-	170	C10H18O2
93	Decanoic acid, ethyl ester	200	C12H24O2
94	n-Caproic acid vinyl ester	142	C8H14O2
96	1-Propanol, 3-(methylthio)-	106	C4H10OS
96	2-Nonen-1-ol, (E)-	142	C9H18O
93	Thiazoline <2-acetyl->	129	C5H7NOS
95	2-Undecenal	168	C11H20O
84	2,9-Dimethyl-5-decyne	166	C12H22
94	Heptanoic acid	130	C7H14O2
88	Undecanoic acid	186	C11H22O2
85	Ethyl 9-hexadecenoate	282	C18H34O2

4 考察

Mucor 属は肉製品、乳製品、味噌、腐乳さらにはアフリカの野菜類にまで広く利用されており¹⁰⁾、また、カビ毒生産の報告もない。つまり、食品発酵の効果が大きく期待され、安全性は非常に高い属菌であると考えられる。今回、これに属し、*Mucor flavus* と同定されたセンター保有株によるドライエイジング試験を経産牛、輸入牛の各部位にて行った。熟成中の各菌種数をカビ無ドライエイジングと比較すると、一般生菌、大腸菌群、酵母を特別に抑制するような効果は無かった。事実、S. G. CAMPANO らは *Mucor mucedo* などで肉熟成中、好気性菌、大腸菌群、連鎖球菌を抑制する効果はないと報告¹¹⁾しており、これと同様の結果であった。カビ熟成によ

るドライエイジングビーフを製造する際にも十分な衛生管理は必須である。また、今回、センター保有株の増殖に必要な水分活性値が 0.94 以上必要であることが分かり、多くの食中毒菌の生育最低水分活性値の 0.94 以上¹²⁾ と同等の値である。つまり、抑制したい食中毒菌と増殖させたいカビ菌との均衡を図らねばならず、ここをどう制御するかがポイントとなる。植菌する場合には、熟成に入る最初の段階でなるべく胞子を多く撒くなどの措置が有効と考えられる。

アミノ酸類の熟成前後における比較では、熟成後で増加、ドリップ、クッキングロスについては熟成後で低下し、カビ無熟成の場合（データなし）と同様の結果であった。

カビ熟成特有の揮発性成分としていくつかの化合物が検出されており、当該菌株の放つナッツやフライドポテトなどのような香ばしい香りと関与する可能性はある。

本研究は平成 29 年度沖縄県産業振興重点研究推進事業の研究課題「沖縄産経産牛を用いたドライエイジング加工技術の開発（2015 技 007）」として実施した。

5 謝辞

カビ菌種同定のため、DNA 解析、形態観察、これに関わる手法などの御指導、御鞭撻を含め、御尽力下さった株式会社テクノスルガ・ラボ喜友名朝彦様に感謝致します。

参考文献

- 1) 平成 27 年度 JAS 規格化委託事業 事業報告書 2016 年 3 月 18 日, デロイトトーマツコンサルティング合同会社
- 2) 折目愛, 小笠原英毅, 岡山和代, 2010. 放牧など粗飼料 100%で生産された赤身牛肉におけるドライエイジングの効果. 食肉に関する助成研究調査報告書. 29 : 68-74
- 3) 佐野佳治 NY メソッドドライエイジング加工技術, 食肉の科学 Vol.57 No1 (2016)
- 4) 読売新聞 2015 年 8 月 14 日
- 5) 日本経済新聞 2014 年 4 月 8 日
- 6) 米国のドライエイジングビーフ関連ガイド集, 米国食肉輸出連合会 (USMEF)
- 7) 平成 28 年度 沖縄県入域観光客統計概況 沖縄県文化観光スポーツ部観光政策課
- 8) Dashmaa Dashdorj, Vinay Kumar Tripathi, Soohyun Cho, Younghoon Kim, Inho Hwang, Dry aging of beef; Review, Journal of Animal Science and Technology (2016) 58:20

9) 村本隆行, 前野かおり, 岡田祐季, 手塚 咲, 鎌田丈弘, 日本短角種牛肉における剪断力価と軟らかさとの関係, 2014, 東北畜産学会報 64 (1) :7~12

10) Stephanie MORIN-SARDIN, Patrice NODET, Emmanuel COTON, Jean-Luc JANY, 2017. *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications, Fungal Biology Reviews, 31 (2017) 12-32

11) S. G. CAMPANO, A. W. KOTULA, D. M. KINSMAN, Antibacterial Nature of Molds Isolated from Aged Beef, Journal of Food Protection (August 1985) Vol. 48, No. 8, Pages 699-701

12) 愛産研食品工業技術センターニュース, 平成 23 年 12 月 16 日, 愛知県産業技術研究所食品工業技術センター