

食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル

はじめに

近年、食肉の食味（美味しさ）について関心が高まっており、各公設試験場や大学などの研究機関では美味しさに関する様々な研究が進められ、生産・流通面においても、美味しさに着目して差別化を図るといった取り組みが行われているところです。

食肉の美味しさを家畜の育種改良などに利用するには、より客観的な方法で肉質を評価することが必要となってきます。その方法としては、機器により評価する理化学分析、もう一つは、人が食することによって評価する官能評価があります。

家畜改良センターでは、この理化学分析と官能評価の2つの手法を用いて食肉を評価し、両者の関係を分析することにより、美味しさに関与する食肉の成分を見出し、指標とすることに取り組んでいます。得られた指標については、家畜の改良や飼養管理の改善に利用することとしています。

本技術マニュアルでは、現在、家畜改良センターが行っている理化学分析と官能評価について、その方法を詳細に記載しています。

本技術マニュアルをお読みいただき、各関係機関での食肉の評価に役立てていただけると幸いです。

食肉の理化学分析および官能評価マニュアル

目 次

I. 理化学分析

1. サンプル採取	3
2. 食肉の性状	5
2-1 pH	5
2-2 肉色・脂肪色	6
3. 一般成分組成	7
3-1 水分含量	7
3-2 粗脂肪含量	8
3-3 粗蛋白質含量	10
4. 物理的性質	15
4-1 保水性（加圧・遠心）・圧搾肉汁率	15
4-2 加熱損失	18
4-3 剪断力価	19
4-4 破断応力	21
4-5 筋線維の特徴	25
4-6 コラーゲン量（可溶性・不溶性）	35
5. 脂肪の質	43
5-1 脂肪酸組成	43
5-2 脂肪融点	53
5-3 TBARS（チオバルビツール酸反応物質）分析	55
6. 香気成分	59
7. 呈味成分	66
7-1 遊離アミノ酸・ジペプチド量	66
7-2 核酸関連物質質量	74

II. 官能評価

1. 概要	77
2. 分析型官能評価	
2-1 サンプル採取	78
2-2 分析型パネルの選抜方法	78
2-3 分析型パネルの訓練方法	81
2-4 官能評価の実施方法	85
3. 消費者型官能評価	86

I. 理化学分析

1

サンプル採取

食肉を客観的に評価するには、評価部位、保存方法、熟成時間等の条件をそろえることで初めて適切な評価を行うことが可能である。牛肉において客観的評価（ここでは理化学分析）を行う部位は、一般に枝肉格付が行われている「第6-7胸椎間の胸最長筋」を利用する例が多い。また近年は、「うちもも」の評価も重視されており、その評価に取り組んでいる例もいくつか見られる。

当センターでは、第6-7胸椎部における皮下脂肪、筋間脂肪、胸最長筋（リブローズ）に加え、第10-11胸椎部位の胸最長筋（サーロイン）、半膜様筋（うちもも）、半腱様筋、大腰筋、広背筋、背半棘筋について理化学分析を実施しているが、その中でも重要な第6-7胸椎部位と半膜様筋（うちもも）のサンプル採取方法等について紹介する。

【牛肉】

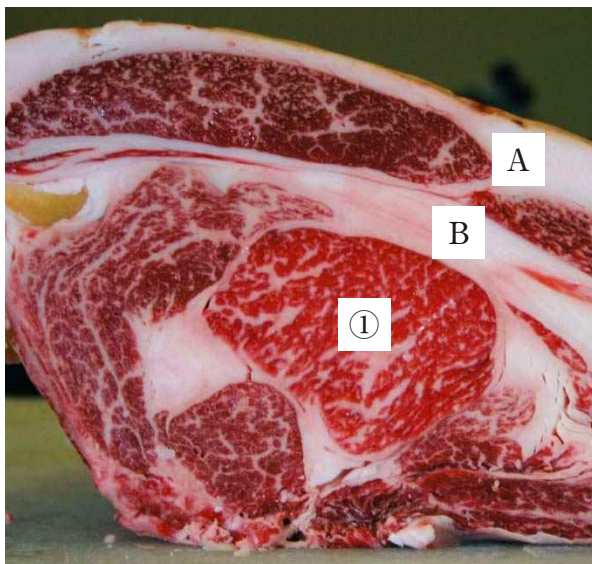


写真1 第6-7胸椎部位



写真2 半膜様筋（うちもも）

A：皮下脂肪

表皮から僧帽筋と広背筋の体表側の筋膜に接している脂肪を採取する。大きさは2×2×4cm程度（厚み×横幅×奥行）あれば、脂肪融点と脂肪酸組成分析に十分な量である。皮下脂肪を代表する平均化したデータが得られるように、表皮から筋膜に接している部分まで縦に薄く切り出したものを分析に供する。

B：筋間脂肪

僧帽筋と広背筋の体芯側の筋膜に接している部分から胸最長筋の体表側筋膜の脂肪を採取する。筋間脂肪も皮下脂肪と同様に体表に近い部位から体芯に近い部分の平均化したデータが得られるように切り出したものを分析に供する。

①：胸最長筋（リブロース）

経済的に重要な筋肉内脂肪の量や質は、同一筋肉内でも場所により異なることが一般に知られているので、当センターでは筋膜を除いた後に切断面を挽肉にし、均一化したものを分析に供している。なお、第6-7枝肉切開面部は、空気に触れ水分が蒸発している可能性が高いので、薄く除去することをお薦めする。

②：半膜様筋（うちもも）

半膜様筋は、同一筋肉内の筋肉内脂肪量のばらつきがとても大きい筋肉である。写真2の上部（枝肉内側から「ももぬけ」を確認する部分に近いところ）ほど筋肉内脂肪が多く、下部ほど少ない。当センターでは②とふだをつけている切断時の表面積が大きい部分を理化学分析に供することになっている。

サンプルの保存方法は、酸化などの変質を極力防ぐべく、次項以降に紹介する分析項目ごとにサンプルを小分けに真空包装し、 -30°C で冷凍保存することが望ましい。（生肉を使用して分析する一般成分組成、加熱損失、剪断力価を除く）

【豚肉】

豚肉についても胸最長筋は、重要な筋肉であり、当センターを含む多くの機関で客観的評価に供されている。豚肉は、牛肉と比べて胸最長筋切断面の筋肉面積が小さいので、多くの肉質分析を実施するとサンプルの確保は広範囲に及ぶ。当センターでは、評価項目等に応じて第12-13胸椎間～第4-5胸椎間で分析サンプルを採取している。なお、脂肪のサンプルは、可食部位である第12-13胸椎の第3脂肪層（C）としている。いずれにしても、サンプルの条件等について一定のルールを取り決めることが重要である。

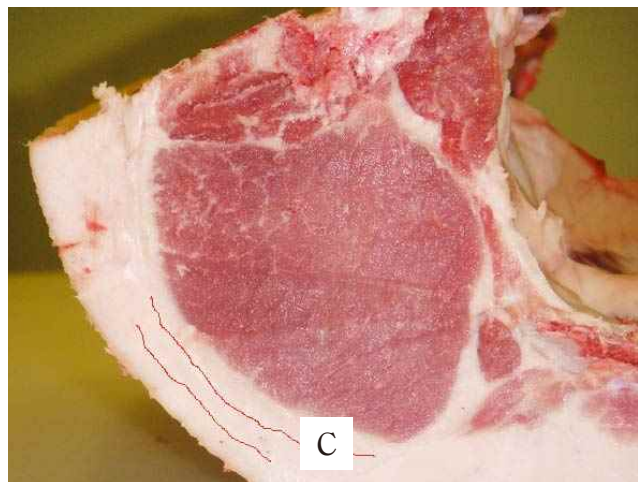


写真3 豚の脂肪層

2

食肉の性状

2-1 pH（ピーエイチ）

家畜はと畜されると呼吸停止するが、ナトリウムポンプ等は働き続けているため、無酸素下でエネルギーの供給が行われている。筋肉中のグリコーゲンの分解（解糖）により、エネルギー源であるATPが供給され、それと同時に分解産物である乳酸が蓄積される。この乳酸の蓄積により、筋肉のpHが徐々に低下していく。

と畜直前のグリコーゲン含量が少ない個体は、乳酸の蓄積が少なく、極限（最低）pHが6より高い肉が発生することや、と畜後の解糖が正常なものより著しく早く進行する肉が発生することがある。これらは、それぞれDFD肉、PSE肉と呼ばれており、その肉色や肉質が問題視されている異常肉である。pHと肉質に関する研究は、特に海外で盛んに行われている。

【pH 測定方法】

サンプルにpHメーター（IQ Scientific instruments IQ170）のプローブを突き刺して、数カ所測定する。測定値は、その場で画面に表示される。と畜後9日目の測定値は、5.7（牛肉）程度が通常であり、6.0を超えるものは異常と考えて良い。



写真1 pH測定

2-2 肉色・脂肪色

食肉の外観（肉色・脂肪色）は、消費者の購買意欲等に影響を及ぼす重要な評価項目の一つであり、枝肉格付において、牛・豚ともに、肉色と脂肪色について評価されている。機器分析における色の表現は、 $L^*a^*b^*$ （エルスター、エースター、ピースター）表色系が現在あらゆる分野で一般的に用いられている。この表色系は、1976年に国際照明委員会（CIE）で規格化され、日本でもJIS（JISZ8729）において採用されている。 $L^*a^*b^*$ 表色系では、明度を L^* （ L^* は白方向、 $-L^*$ は黒方向）、 a^* 、 b^* は色の方向を示しており、 a^* （ a^* は赤方向、 $-a^*$ は緑方向）、 b^* （ b^* は黄方向、 $-b^*$ は青方向）を表している。ここでは $L^*a^*b^*$ 表色系を用いた分光測色計（MINOLTA CM-2002）による肉色・脂肪色の測定方法を解説する。

【測定方法】

色を測定するサンプルは、約1 cm程度の厚みに切り出す。サンプルは、少なくとも透けないような厚みを持たせる必要がある。測定は3ヵ所程度行い、データはその平均値を用いることが望ましい。

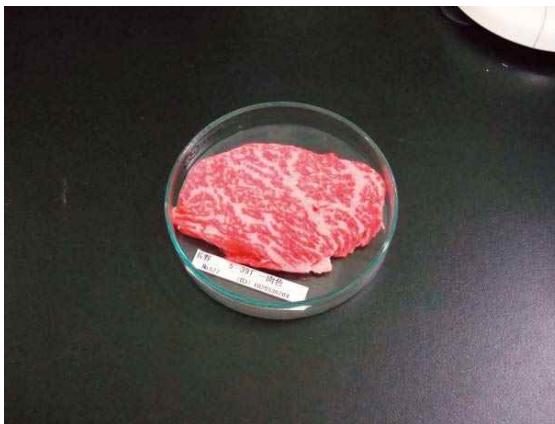


写真1 測定用サンプル



写真2 測定

黒毛和種等の筋肉内脂肪蓄積の優れる肉の色を測定する場合、測定値は筋肉内脂肪色と肉色を合わせた数値である。このような測定値は、肉の保存時間の経過と肉色（測定値）の変化との関係を判断する上で有効であるが、赤身の部分だけの色を反映しているわけではないので留意する。なお、色の経時的変化を測定する場合は、乾燥を防ぐため、ラップを用いる等、サンプルの保存条件に注意する必要がある。

3

一般成分組成

3-1 水分含量

水分に栄養価値はほとんどないが、栄養素や代謝産物等を血管を通じて運搬する触媒としての働きがある¹⁾。水分は動物の筋肉中でもっとも多い成分である。Hamm²⁾は新鮮肉の水分は70%が筋線維中に、20%が筋漿中に、10%が結合組織中にあることを明らかにしている。

水分の分析は、各実施場所で使用サンプル重量、器具、乾燥時間が多少異なっており、例えば、サンプル3gを用いる手法、容器にアルミ製カップを用いる手法、乾燥温度が135℃で2時間行う手法等がある。

ここでは、家畜改良センターで行っている分析方法について、以下に述べる。

①事前準備

(1)ビーカーにガラス棒および海砂を約2g入れる。1 サンプルについて、最低2個用意する。

注) 海砂を用いない場合、サンプルが固まり中心部が十分に乾燥せず、誤差を生じる可能性があるので注意する。

(2)ビーカーを135℃の恒温乾燥器に入れ、2時間乾燥する。

(3)乾燥後、るつぼはさみを用いて素早くデシケーターに移し、30分放冷する。

(4)放冷後、秤量する。(データⅠ)

②サンプルの乾燥および秤量

・手の脂や汚れがビーカーに付かないように手は清拭するか手袋等をする。

(1)秤量済みのビーカーに、サンプル（ミンチ肉）を約2g入れ、正確にサンプル重量（データⅡ）を量る。

(2)ガラス棒を用いて、ビーカー内の海砂がサンプルと十分に混ざるように静かに混合する。

(3)サンプルの入ったビーカーを105℃の恒温乾燥器に入れ、24時間乾燥する。

(4)乾燥後、るつぼはさみを用いて素早くデシケーターに移し、30分放冷する。

(5)放冷後、秤量する。(データⅢ)



海砂 サンプルと混合後



乾燥後



恒温乾燥器



デシケーター

③水分含量の算出

$$\text{水分含量 (\%)} = \{ (I + II) - III \} / II \times 100$$

引用文献

1) 細野明義、鈴木敦士、畜産加工、朝倉書店：38-69、1989

2) Hamm,R、Fleischwirts 18：856、1966

3-2 粗脂肪含量

動物の体構成成分のうちで、脂肪は変動が大きく、その質や量は動物の品種¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾、年齢、飼養条件⁶⁾等によって異なる。動物の枝肉中の脂肪は皮下脂肪、筋間脂肪、腎臓周囲脂肪、腹腔内脂肪、筋肉内脂肪に分類される。筋肉の二次筋束周囲の結合組織に沈着する脂肪が筋間脂肪であり、一次筋束の周囲の結合組織に沈着するのが筋肉内脂肪、すなわち脂肪交雑である。ここで示す粗脂肪含量とは筋肉内脂肪の割合のことである。

以下に述べる手法は、水分測定後のサンプルを用いることから、使用可能なサンプル量が限られている場合に最適であると思われる。

①事前準備

- (1)ソックスレー抽出ピンを135℃の恒温乾燥機に入れ、2時間乾燥する。1サンプルについて、2個用意する。
- (2)乾燥後、るつぼはさみを用いて素早くデシケーターに移し、30分放冷する。
- (3)放冷後、秤量する。(データⅠ)

②抽出および秤量

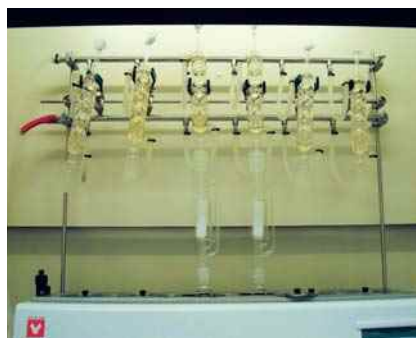
- ・抽出作業は、有機溶媒であるエーテルを使用するためドラフト内で行う。
 - ・手の脂や汚れが付かないように手は清拭するか手袋等をする。
- (1)ソックスレー抽出器のサイフォン部に上部を約5mm切った円筒濾紙を入れる。
 - (2)抽出ピンをサイフォン部にセットし、ロート等を用いてサイフォン上部から水分含量を測定したサンプルを円筒濾紙内に入れる。
注) 円筒濾紙に入れる前にサンプルは固まりがないように混ぜておく。
 - (3)サンプルが入っていたピーカー内にエーテルを約30ml注ぎ入れ、ガラス棒でピーカー壁についているサンプル片をそぎ取りながら、ロート等を用いてサイフォン上部からエーテルとともに注ぎ入れる。この操作を3回以上行い、サイフォン内のエーテルがオーバーフローし、抽出ピンに移ったのを確認する。
 - (4)ロート壁を洗い流すように、エーテルを円筒濾紙内に注ぎ入れ、脱脂綿で円筒濾紙に栓をする。
 - (5)サンプルの入った抽出器を55℃程度の温湯が入ったソックスレー抽出用ウォーターバスにセットし、16時間以上還流する。
注) エーテルが揮発し、還流しなくなったら、ロート等を用いて冷却管上部からエーテルを注ぎ入れ、再び還流させる。この場合は、還流停止時間を考慮し、還流時間をやや長めにする。
 - (6)還流終了後、抽出ピンを外し、ドラフト室内でエーテル臭が無くなるまで放置する。
 - (7)抽出ピンを105℃の恒温乾燥機に入れ、2時間乾燥する。
 - (8)乾燥後、るつぼはさみを用いて素早くデシケーターに移し、30分放冷する。
 - (9)放冷後、秤量する。(データⅡ)



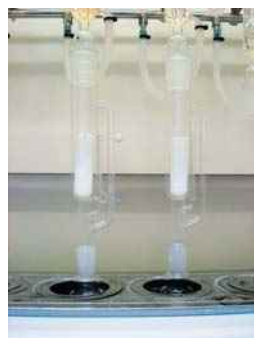
抽出ビン



ソックスレー抽出器



ソックスレー抽出用ウォーターバス



③粗脂肪含量の算出

$$\text{粗脂肪含量 (\%)} = (\text{II} - \text{I}) / \text{水分含量測定時のサンプル重量} \times 100$$

引用文献

- 1) Xie, Y.R ら Meat Sci.43 : 167-177、1996
- 2) Zembayashi, M ら Meat Sci.43 : 83-92、1996
- 3) May, S.G ら J.Anim.Sci.72 : 3110-3117、1994
- 4) Zembayashi, M ら J.Anim.Sci.73 : 3325-3332、1995
- 5) Enser, M ら Meat Sci.42 : 443-456、1996
- 6) 道後泰治、鳥飼善郎、兵庫中央技研報 28 : 7、1992

3-3 粗蛋白質含量

蛋白質は動物筋肉において筋線維や結合組織を構成しており、生体の維持や生理機能を遂行するために必要な成分である。

蛋白質の定量法として一般にケルダール法が行なわれており、これは食品中の窒素量を定量し蛋白質に換算する方法である。蛋白質は、約16%窒素（N₂）を含んでおり、その窒素はアミノ基（NH₂）に由来している。そのアミノ基に含まれる窒素を以下の方法で滴定して窒素量を定量する。得られた窒素量は蛋白質中の窒素だけではなく、無機質のアンモニア態窒素も含まれているため粗蛋白質と呼び、滴定した窒素量に16%の逆数の6.25を乗じて粗蛋白質含量とする。

①原理

(1)加熱分解

サンプル肉に硫酸（H₂SO₄）と分解促進剤（硫酸銅CuSO₄、硫酸カリウムK₂SO₄）を入れて加熱分解する。有機物が分解すると透明だが、分解促進剤の銅イオンが青いので、実際には青透明となる。この分解物は、安定性が高い。なお、促進剤がないと分解ができず、茶褐色となることから、促進剤は触媒としての役割がある。加熱の際にでる刺激臭をとまなう物質は、硫酸ミスト（硫酸は完全には気化しない）であるので取り扱いには十分注意する。

反応式：サンプル肉＋硫酸H₂SO₄ → 硫酸アンモニウム（NH₄）₂SO₄＋硫酸ミスト

(2)蒸留

加熱分解物（硫酸アンモニウム）は、強アルカリ性下で加熱蒸留することにより、アンモニアガス（NH₃）が流出する。このガスをホウ酸水溶液中に溶解する。まず、分解物に蒸留水を加え、後の中和アルカリ反応時の突沸を防ぐ。蒸留水を加えたら、水酸化ナトリウム水溶液（NaOH）で中和し、さらにアルカリ化して、アンモニアガスを流出させる。

反応式：硫酸アンモニウム（NH₄）₂SO₄＋蒸留水＋水酸化ナトリウム2NaOH → アンモニアガス2NH₃＋水2H₂O＋硫酸ナトリウムNa₂SO₄

流出したアンモニアガスをホウ酸水溶液（HBO₃）に吸着させて、NH₃-HBO₃にする。アンモニアガスは冷やされると液体になり、ホウ酸水溶液にふれると水溶液中に溶解される。

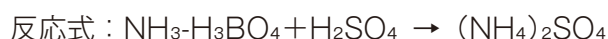
反応式：アンモニアガスNH₃＋ホウ酸HBO₃ → NH₃-HBO₃

注）ホウ酸水溶液にはあらかじめ指示薬としてメチルレッドとブロムクレゾールグリーンを混ぜて作成する。この指示薬は色によりpHの判定に用いる（アルカリ → 酸：メチルレッド；黄 → 赤、ブロムクレゾールグリーン；青 → 黄）。指示薬の判定には、pHを計測する機器と比色判定の2通りあるが、家畜改良センターで使用している機器は比色法である。

(3)滴定

滴定量の算出は、ホウ酸水溶液中に溶解したアンモニアガスを正確な濃度、量の判明している硫酸（0.1 規定など）を用いて、中和させ（中和点では赤紫色指示薬）、その時の中和に用いた硫酸の量を滴定量とする。この滴定量に対する窒素量等を乗じて、全窒素量（%）算

出し、これに6.25を乗じること粗蛋白質含量(%)とする。



注) ホウ酸にアンモニアを吸着させる以外の滴定方法として、ホウ酸の代わりに正確な濃度、量の硫酸に吸着させて、水酸化ナトリウムで滴定する方法がある。

②自動分析装置の操作方法

家畜改良センターで使用している窒素滴定装置(ケルテックオート2400/2460サンプラーシステム:FOSS)および窒素分解装置(ダイジェスター 2520Auto:FOSS)を用いた操作方法について、以下に述べる。

(1)試薬の調製

ア 窒素分解装置用試薬

(ア) 酸性ガス交換溶液(20%水酸化ナトリウム溶液)

2LビーカーにDW1.4Lと水酸化ナトリウム240gを入れ、すべて解けたら1.6Lまでメスアップする。溶液が透明になったらブロムチモールブルー溶液を8ml加えよく混和する。

注) 水酸化ナトリウムは、水と反応して熱とガスを発生する。一度に反応させると熱はかなりの温度になるため、多量の水に少しずつ水酸化ナトリウムを加える。また、ガスは有害なため作業はドラフト内で行う。

(イ) ブロムチモールブルー溶液

ブロムチモールブルー 0.1gをエタノール20mlで溶かし、DW 100mlでメスアップする。

イ 窒素蒸留滴定装置用試薬

(ア) Receiver Solution(2%ホウ酸溶液)

三角フラスコにDW1.2Lとホウ酸40gを入れ、ホットスターラーで加温溶解し、溶解したら2時間ほど冷却させる。冷却後、ブロムクレゾールグリーン溶液20mlとメチルレッド溶液14ml入れ、DWで2Lとする。

(イ) ブロムクレゾールグリーン溶液

ブロムクレゾールグリーン0.25gをエタノール250mlでメスアップする。

(ウ) メチルレッド溶液

メチルレッド 0.25gをエタノール 250mlでメスアップする。

(エ) Alkali Solution(40%水酸化ナトリウム溶液)

5LビーカーにDW2.8Lを入れ、ドラフト内で水酸化ナトリウム1500gを1回250gずつ溶解させる。溶解後、DWで3.6Lまでメスアップする。

(2)分析手順

ア ケルダールチューブに薬包紙で包んだサンプル1gと、分解促進剤1錠を入れる。また、Blank用として薬包紙と分解促進剤を入れた2本も作成する。

イ サンプル数が少なくてもケルダールチューブラックには、ケルダールチューブを20本セットする。

注) チューブがないところからガスが漏れるのを防ぐため。

ウ ケルダールチューブに濃硫酸を15ml加える。

エ 窒素分解装置の酸性ガス交換溶液が青色であることを確認する。この溶液は、アルカリ性（青色）、中性（緑色）、酸性（黄色）となるよう調製してある。黄色の場合は、分解前に新しい溶液と交換する。同時に水が混濁していないことを確認する（水道水使用）。

オ ケルダールチューブラックごと窒素分解装置にセットする。

カ 分解のメソッドは、400℃で1時間行うようにセットしてある。そのため、400℃までの時間と分解後の冷却時間を考慮すると、1時間30分前後要する。



サンプルと分解促進剤



濃硫酸の添加



酸性ガス交換溶液



分解装置にセット

キ 窒素分解を行っている間に、窒素蒸留滴定装置用試薬（2種類：②（1）イ（イ）（ウ）参照）の作成と、窒素蒸留滴定装置のウォーミングアップを行う。

ク 窒素蒸留滴定装置に備品（ケルダールチューブ進入口トレイ、飛散防止カバー、上部ゴムパッキン、金属の固定枠、吸引チューブ連結パイプ、スライドドア）を取り付ける。

ケ 上部ゴムパッキンを取り付ける際には、パッキン全体をDWでよく濡らすこと。

また、上部ゴムパッキン及び金属の固定枠の取り付けが不十分だと、液漏れを起こすため十分に注意する。

注）パッキンは濡らすことにより締め付けが強くなる。

コ プリンターの電源と窒素蒸留滴定装置の主電源を入れ、冷却水栓を開き、装置本体裏側にあるSteam Generator用排水栓を閉じる。

サ 装置の下にあるDWタンクのDW量を確認し補充を行う。

シ 吸引チューブ連結パイプ等を洗浄するため、ケルダールチューブラックにケルダールチューブを4本立て、Wing Aにセットする。

ス Manual キーを押し、Tube 1 を滴定位置にセットする。（セット後、本体のボイラーに水が満たされて稼働できる状態になるまで約5分要する。）

セ Add Receiver を選択し、Enter を3回押して滴定ベッセルを洗浄する。

注）滴定が比色法のため、ベッセルの汚れとチューブに残っているホウ酸を取り除くための洗浄。

ソ 0.1N硫酸溶液が入ったBuretteのエア抜きをEmpty BuretteとFill Buretteを選択して行う。エア抜きは、チューブを指で弾きながらEmpty Buretteを2回、Fill Buretteを2回行う。エアが抜けきれない時はもう一度行う。硫酸の量を確認し補充を行う。補充の際には、同じFactor値の硫酸を使用する。

注）滴定を正確に行うため、エア抜きをする。

タ Add Waterを選択してDWをケルダールチューブに充填させ、Steamを約 5 分間行う。

この行程を残りの 3 本も同様に行う。

チ Tube 4のSteamが終了したらケルダールチューブラックを取り出す。

ツ Registrationキーを押して、空いているBatchを選択しサンプル量を入力する。通常は、Blankを 4 回測定してからサンプル測定に入る。そのため、Tube 1 ~ 4 は [Blank] とする。また、測定条件は [PROGRAM 1] (下表) とし、Tube 1、2 は空、Tube 3、4 は薬包紙と分解促進剤を入れて分解したものとする。

テ Blankの設定が終了したら、Tube番号が [5] であることを確認し、Resultを [% protein] に合わせ、サンプル量を入力する。また、サンプルの後に洗浄用として 2 本を用いて [PROGRAM 3] (下表) [Blank] とする。

	[PROGRAM 1]	[PROGRAM 3]
RECEIVER	30 ml	30 ml
WATER	40 ml	70 ml
ALKALI	70 ml	0 ml
MODE	DERAY	DERAY
TIME	5s	5s
DISSTALLATION	VOLUME	VOLUME
TUBE DRAIN	No	No

ト すべての入力終了したら、Analyseキーを押す。

ナ 二つのWingを[Wing A]、Batchを[選んだBatch番号]、Tubeを[Tube 1]に設定する。

ニ サンプルの窒素分解が終了したら、ケルダールチューブを分析する順に並び替えて、ラックごと窒素蒸留滴定装置にセットする。セットしたら、Start Analyseを選択して分析を開始する。



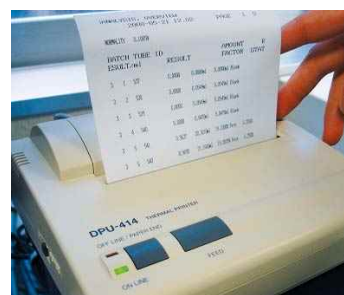
窒素分解の終了



窒素蒸留滴定装置



滴定中



滴定量の結果

ヌ 分析中に窒素分解装置用の酸性ガス交換溶液を作成する（作成してある場合は省略）。

ネ 最後の分析が終了すると、自動的にCleaningが 2 回（または 3 回）行われる。

この洗浄だけでは不十分なため、2回Steamを行う。

ノ Tube 2のSteamが終了しTube Downを行う前に、ケルダールチューブを支えている棒をキムワイプできれいに拭き、キムワイプにオイルを染みこませて、棒全体にまんべんなくオイルを塗る。

ハ 全ての行程が終了したら、プリンター及び装置本体のメイン電源を切り、冷却水栓を閉じ、装置本体裏側にあるSteam Generator用排水栓を開く。

ヒ 滴定装置の備品を全てはずし、ぬるま湯とスポンジで洗う。飛散防止カバーと上部ゴムパッキンを取り外す時、センサーを曲げないように気をつける。洗い終わったらかごに入れて自然乾燥させる。

フ 本体の汚れた部分は、水拭きとカラ拭きをしてきれいにする。

ヘ 窒素分解中に作成した窒素蒸留滴定装置用試薬（2種類：②（1）イ（イ）（ウ）参照）とDWを本体下のタンクに補充する。

ホ 滴定ベッセルにDWを満たす。目安は、三本目のセンサーが浸る程度。

マ 分解装置のスクラバー内の水を新しく交換して終了。

(3)結果

プリントアウトされた紙の「AMOUNT FACTOR」の列に記載してある数字（例「10.0022% Prot」）が粗蛋白質含量となる。

4

物理的性質

4-1 保水性（加圧・遠心）・圧搾肉汁率

食肉の機器分析における物理的特性項目のうち、肉が水分を保持する性質を保水性、加圧したときの食肉に占める肉汁の割合を圧搾肉汁率という。保水性は、肉をろ紙で挟んで加圧した時に広がる肉汁面積と肉片面積から算出する加圧保水性と、肉を遠心分離した時に分離される肉片と肉汁の重量から算出する遠心保水性がある。これらの項目は、食肉中の脂肪含量や官能特性（ジューシーさ）等との関係が報告されており、食肉を評価する上で重要な項目である。

① 加圧保水性

(1) 【サンプル調製】 サンプルを $0.5\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 程度の立方体にピンセット等を用いて切り出し、秤量する（サンプル重量をメモすること）。秤量したサンプルをろ紙の中央部に置く。1 サンプルにつき3 セット作成する。

※サンプル部位は、端の部分ではなく、その筋肉を代表する場所のものを用いること。



サンプルの切り出し



サンプルの秤量と設置

(2) 【加圧】 サンプルを置いたろ紙をアクリル板で挟み、加圧計で $35\text{kg}/\text{cm}^2$ で1 分間加圧する。加圧後、肉片の輪郭を鉛筆等でなぞり、ろ紙を破かないようにアクリル板からはがす。



加圧器



肉片の輪郭のトレース

(3) 【測定】 トレースした肉片面積と肉汁面積を画像解析装置等で計測し、得た数値を以下の式に代入し、保水性を算出する。数値が高い方が保水性の高い肉であることを意味する。脂肪含量が40%を超えるような肉の場合は、脂肪との広がり肉汁の広がりを部分的に超えることもあるが、赤色の肉汁面積をデータに用いることとする。

$$\text{加圧保水性} = \{1 - \{(\text{肉汁面積} - \text{肉片面積}) \times 9.47 / \text{肉の水分含量 (mg)}\}\} \times 100$$

※肉の水分含量は、(1)で秤量したサンプル重量に前出の水分分析で得た水分（％）を乗じて、単位をmgに換算したもの。

②遠心保水性

(1) 【分析準備】 冷却遠心器の電源を入れて、4℃に予冷しておく。遠沈管を分析サンプルあたり2本準備し、その中に6分目程度ガラスビーズを入れておく。

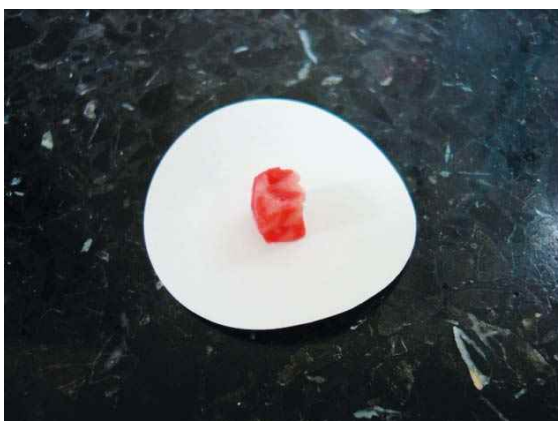


遠沈管



冷却遠心器

(2) 【サンプル調製】 サンプルを0.5g±0.05g程度の立方体にピンセット等を用いて切り出し、秤量する（サンプル重量をメモすること）。秤量したサンプルをメンブレンフィルター（ADVANTEC, 10μm 47mm）の中央部に置き、肉がはみ出ないように包んでホッチキスでとめる。1 サンプルにつき2 セット作成する。



サンプル



包まれたサンプル

(3) 【測定】 ホッチキスでとめたサンプルを予め準備した遠沈管に入れ、フタをし、4℃、2200×gで30min遠心分離を行った後、ホッチキスを外して取り出したサンプルを秤量する。以下の式に遠心分離の前後のサンプル重量を代入し、遠心保水性を算出する。

$$\text{遠心保水性 (\%)} = 100 \times (\text{遠心分離後のサンプル重量} / \text{遠心分離前のサンプル重量})$$

③ 圧搾肉汁率

(1) 【分析準備】 保水性分析に用いたろ紙、メンブレンフィルター、脱脂綿およびガーゼ（写真 7）の準備をする。（あらかじめ、脱脂綿をガーゼに挟んだセットを作成しておくとし便利）

(2) 【サンプル調製】 サンプルを保水性と同様に0.5g±0.05g程度の立方体にピンセット等を用いて切り出し、秤量する（サンプル重量をメモすること）。秤量したサンプルをメンブレンフィルターの中央部に置く。サンプルを中心にメンブレンフィルター、脱脂綿を挟んだガーゼ、ろ紙の順に挟んだサンプルセットを 1 サンプルにつき 2 セット作成する。



写真 7 分析準備

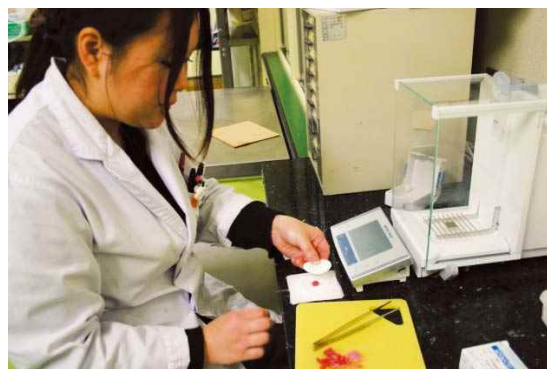


写真 8 サンプルセット作成

(3) 【加圧・測定】 サンプルセットを加圧保水性と同様にアクリル板で挟み、加圧計で35kg/cm²で1分間加圧する。加圧後、メンブレンフィルターに張り付いたサンプル肉をスパチュラ等ではがし、秤量する。秤量した重量を以下の式に代入し、圧搾肉汁率を算出する。



写真 9 加圧中のサンプル

$$\text{圧搾肉汁率 (\%)} = 100 \times (\text{加圧前のサンプル重量} - \text{加圧後のサンプル重量}) / \text{加圧前のサンプル重量}$$

4-2 加熱損失

肉は加熱すると肉汁が排出される。この理由の一つには肉中の水分子の動きが活発となり、蒸発や滲出を起こす。もう一つは加熱により筋線維や結合組織等の蛋白質が変性し、保水力を低下させる。肉は加熱により「縮み」といった三次元構造の変化やフィラメント等の微細構造の変性が起こり、筋線維間や結合組織間に保持されていた水が排出される。

食肉を熱水で抽出した溶液は、蛋白質、脂質、色素等の高分子化合物と非蛋白態窒素化合物、有機酸、ヌクレオチド、糖等の肉エキスから成っている¹⁾。

一般に、加熱損失と粗脂肪含量は負の関係にあり、粗脂肪含量が少ないと多汁性の評価も下がる傾向にある。

家畜改良センターで行っている分析方法について、以下に述べる。

①分析方法

- (1) サンプル約50gを筋線維が明確になるように、立方体に切り出し、サンプルの重量（データⅠ）を量り、ビニール袋に形が崩れないように入れる。また、水が入らないように袋をしぼり、結び目の両脇を2カ所テープでとめる。
- (2) 70℃の温湯が入ったウォーターバスに入れ、1時間加温する。
- (3) 加温後、流水で30分間冷却する。
- (4) サンプルをビニール袋から出し、表面の肉汁の固まり等を流水で落とし、キムタオル等で表面の水分を軽く取り除く。
- (5) サンプルの重量を量る。（データⅡ）



加熱前のサンプル



ウォーターバス



流水による冷却



加熱後のサンプル

②加熱損失の算出

$$\text{加熱損失 (\%)} = \{(I - II) / I\} \times 100$$

引用文献

- 1) 細野明義、鈴木敦士、畜産加工、朝倉書店：38-69、1989

4-3 剪断力価

食肉のテクスチャーとしてやわらかさは重要とされており、機器によるテクスチャーの表現として最もよく用いられている方法が、Warner-Blatzler法である。この方法は、鋭利な刃物で切断するのではなく、肉片をちぎる（剪断する）というものであり、その値は剪断力価とよばれる。官能評価を併用した多くのテスト結果から、剪断力価はやわらかさと相関があることが認められ、食肉のやわらかさを示す指標として国際的に汎用されている。剪断力価測定において、調理やサンプリングのプロセスの違い、また機器によってもデータに違いがあることに留意しなければならない¹⁾。

剪断力価測定機器としては、従来型のWarner-Blatzler剪断力価計もあるが、ここではインストロン（Model5542）を用いた測定方法について、以下に述べる。

① サンプルの調製

- (1)加熱損失測定後のサンプルを用いる。
- (2)筋線維に対して平行に1 cmの厚さにし、垂直断面が1 × 1 cmとなるように切り出す。
- (3)6サンプル以上作製する。

注) 12回測定し、最小値と最大値を除いて平均値を算出し、剪断力価値としている。



写真1 サンプルの切り出し



写真2 サンプル

② インストロンの設定

- ・ Warner-Bratzler測定用アタッチメント（ブレード、ドリフトレー等）の取り付け
- ・ 剪断速度：200mm/min

③ 測定方法

- (1)電源を入れる。コントローラーの表示「2」となれば、正常に稼働する。
 - (2)「Bluehill2」を立ち上げる。
 - (3)本体のコントロールパネルのジョグ・アップ（ダウン）ボタンを操作し、アタッチメントをセットする。
- 注) ソフトを立ち上げないと本体は駆動しない。
- (4)クロスヘッド下の黒いバー（Limit switch actuator）を42cm（黄色の帯の下）にあわせ、サポートフレームに固定する。
 - (5)GLリセットを押す（「GL位置」に緑色ランプが点灯）。

注) 「変位」を「0.000mm」に設定し、ジョグ・アップ（ダウン）しても、リターンを押せば元に戻るようにする。

(6)パソコン画面の逆さハットマーク（「ロードセル設定ダイアログを開く」）を押す。

(7)「トランスデューサの設定」をする。

はじめに、「荷重」を校正する（「荷重」→「校正する」→（ロードセルから荷重を除去します）→「OK」→完了）。次に、「リミット」を設定する（「最小リミット」→「値」:「kgf」を選択、「-40」を入力、「アクション」→「荷重除去」、「有効」をチェック→終了）。

(8)サンプルの測定を行う。

「試験」をクリック→「メソッド名」ダブルクリック→「新規サンプルを作成」画面→「サンプルファイル名」を入力→「次へ」→サンプルをセット→「次へ」→「開始」

(9)「次へ」→「開始」（またはEnter を2回押す）を全てのサンプルについて繰り返す。

注）測定後、クロスヘッドは設定位置（42cm）に戻る。

(10)平均値（最小値と最大値を除外）を算出する。

サンプルの測定終了→「結果」の最小値を右クリックで選択（セルは青色）→「試験片を除く」をクリック（最大値も同様に行う）

(11)結果を印刷する。

左側のグラフ上のタイトル名をダブルクリック→タイトルの入力（「サンプルファイル名」と同じ名前）→「印刷」を選択→「プリンターの設定」→OK→印刷プレビュー→「印刷」→「試験結果レポート」のプリントアウト

(12)「保存」→OK→「終了」、「サンプルの終了」→（同じ試験パラメーターを使って別の新規サンプルを開始しますか?）「はい」または「いいえ」（連続で分析する場合）→「新規サンプルを作成」画面→左上の「Bluehill」（「ホーム画面に戻る」）をクリック

(13)アタッチメントをはずし、電源を切る。

④結果

「試験結果レポート」に記載された「最大荷重」の平均値を剪断力価値とする。



写真 3 サンプルの測定

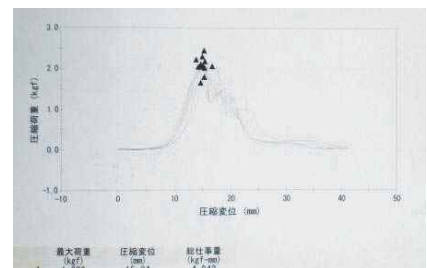


写真 4 試験結果レポート

引用文献

1) 家畜改良センター編、食肉の官能評価ガイドライン、日本食肉消費総合センター：142-145、2005

4-4 破断応力

前稿で紹介したWarner-Bratzler法による剪断力価測定は、一方向への1回加歪による破断測定（静的粘弾性測定）である。これは、人が前歯で噛み切る時の動きを模しており、噛み切った時の最大荷重を食肉の硬さとしている。一方、本稿で紹介するテンシプレッサー測定は、試料の粘弾性を考慮に入れて、交互に逆方向に、すなわち振動しながら力を加えていく破断測定（動的粘弾性測定）である。これは、人が奥歯で咀嚼する時の動きを模しており、少しずつ試料を変形させていき破断が起こった時の測定値から、食肉の柔らかさ、柔軟性、噛みごたえ、脆さ等を解析している。

テンシプレッサー分析後に得られる各測定項目について、Tendernessは、破断応力（やわらかさ）を表しており、値が大きいほど固い。Pliabilityは、柔軟性（しなやかさ）を表しており、値が大きいほど噛み切り難い。Toughnessは、総仕事量（噛みごたえ）を表しており、値が大きいほど噛みごたえがある。Brittlenessは、脆さを表しており、値が大きいほど脆い。これらの測定項目についての説明は、中井ら（中井ら，1994）が報告しているため参照されたい。

テンシプレッサーと官能検査との関係について、焼いた肉および煮た肉ともに官能検査のやわらかさと強い相関関係がある（中井ら，1994）ことと、焼いた肉と官能検査のやわらかさと相関（ $r=0.755$; $p<0.01$ ）がある（柳原ら，1995）ことが報告されている。

① 機器準備

- (1) プレッサー本体にプランジャーとテーブルをセットする。



<テンシプレッサー>

- (2) パソコン本体から電源を入れ、パソコンが立ち上がり次第、テンシプレッサー本体の電源を入れる。
- (3) 「多重積算バイト2」プログラムを起動。
- (4) start up画面の「ファイルを開く」から、使用するファイルを選択する。新しくファイルを作成する時は「新規作成」を選択する。
- (5) Main画面が開いたら「S.NAME」（F3）を押して、試料名・測定メモ・測定日付・試料番号を入力する。**入力終了後ESCキーを押す（重要）。**



(6)「COND.」(F4) を押して測定条件を確認する。すでに作成してあるファイルを使用する場合は、以前分析した測定条件に設定されているため特に変更する必要はない。(入力終了後ESCキー)

No	CONDITION	ITEM	DATA
1	ModeCheck		1
2	Selector		3
3	TimeSample	[sec]	0.000
4	Distance	[mm]	30.000
5	Clearance	[mm]	0.100
6	Thickness1	[mm]	15.000
7	Thickness2	[mm]	15.000
8	Static Time	[sec]	0.0
9	BiteSpeed	[mm/sec]	2.00
10	SecondSpeed	[mm/sec]	2.00
11	Multiply		1
12	Magnificant		1
13	Baseline		1.0
14	Deformation	[%]	0.0
15	Deformation	[mm]	0.000
16	Deformation	[kg]	0.000
17	IntervalPoint	[%]	0.0
18	IntervalPoint	[mm]	0.000
19	NegaGain		1
20	LoadCell		10
21	Plansure Area	[cm ²]	0.041
22	CycleSec	[sec]	0.0

<条件設定 1>

No	CONDITION	ITEM	DATA
18	IntervalPoint	[mm]	0.000
19	NegaGain		1
20	LoadCell		10
21	Plansure Area	[cm ²]	0.041
22	CycleSec	[sec]	0.0
23	Amplitude	[mm]	0.000
24	MonitorSwich		ON
25	HighSence		OFF
26	RepeatTime		200
27	MultiRepeat		1
28	AddValue	[mm]	0.100
29	SecondStatic	[sec]	0.0
30	2ndDistance	[mm]	0.500
31	2ndClearance	[mm]	0.000
32	2ndDeformation	[%]	0.0
33	2ndDeformation	[mm]	0.0
34	2ndDeformation	[kg]	0.000
35	2ndMultiply		1
36	2ndMagnificant		1
37	2ndNegaGain		1
38	FirstStatic	[sec]	0.000

<条件設定 2>

- (7)試料名等の入力、測定条件の確認後、「MEASURE」(F2) を押してMeasure画面にする。
 (8)Measure画面が開いたら「BASE」(F3) を押して、黒い線がBaseLine設定値の目盛り付近に表示されていることを確認する。黒い線が表示されていない時は、パソコンとテンシブレッサ本体との接続に異常があるため再起動する。黒い線が表示されたら「ESC」(F4) を押す。

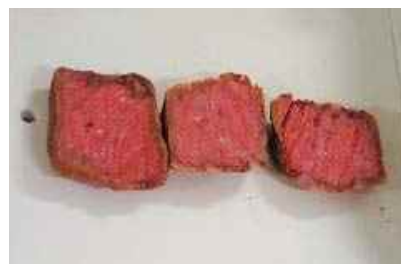


< BaseLine >

- (9)テーブルに何も載せていない状態で「DOWN」(F8) を押して、キャリブレーションを行う。
 (10)上記(8)(9)の行程は、「Main画面を閉じない」か「ほかのファイルを開かない」限り一度行うだけでよい。

②サンプル切り出し

加熱損失分析後のサンプルから、筋線維に対して平行に 1cm 厚に切り出す。実際に分析する際には、筋線維に対して垂直方向からプランジャーが当たることになる。



<筋線維に対して平行に 1cm 厚で切り出す>

③測定

(1)サンプルをテーブルに載せて「MEASURE」(F2) を押して測定を開始する。



＜筋線維に対して垂直方向にプランジャーを当てる＞

(2)測定終了後、「SAVE」(F5) を押して測定データを保存する。

(3)上記(1)(2)の行程を 1 サンプルにつき 4 カ所、測定場所を変えて行う。

(4)次のサンプルに移る時は、「QUIT」(F12) を押してMeasure画面を閉じ、Main画面の「S.NAME」(F3) で試料名などを変更した後に、テーブルをアル綿で軽く拭きサンプルを載せる。

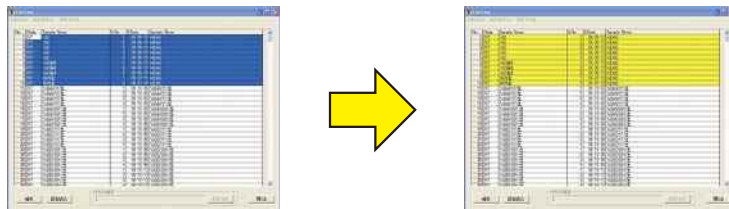
(5)上記(1)～(4)を全てのサンプルについて行う。

(6)全ての分析が終了したら、分析結果をエクセルファイルで保存する。

④エクセルファイル保存および終了

(1)Main画面の「FILE」(F5) を押し、FileDisp画面を開く。

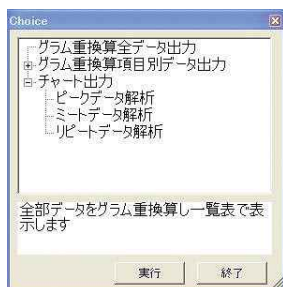
(2)保存したいファイルを選択しエンターキーを押して、バーを青色から黄色に変更する。一括してファイルを選択するには、ファイル全てをドラッグしてエンターキーを押す。



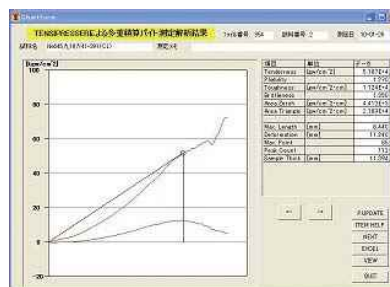
＜選択バーを青色から黄色へ＞

(3)保存したいファイルを黄色にしたら、「解析」を選択しChoice画面を表示する。

(4)Choice画面の「チャート出力」「ミートデータ解析」を選択し「実行」すると、解析結果画面が表示される。

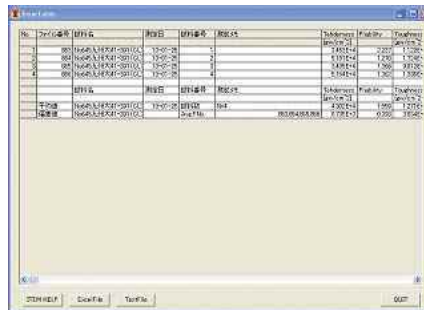


＜「チャート出力」、「ミート解析データ」を選択＞



＜解析結果＞

- (5) ミートデータ項目別出力画面の「ExcelFile」を選択して、ファイル名と保存場所を入力する。入力後、エクセルファイルが一瞬立ち上がりすぐ閉じる。これでエクセルファイルへの保存は終了となる。保存場所は、一時保管場所としてデスクトップに保存する。



No.	File Name	Save Date	Save Path	Save Method
1	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile
2	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile
3	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile
4	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile
5	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile
6	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile
7	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile
8	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile
9	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile
10	meat_data_20110101.xls	2011/01/01	C:\Users\Administrator\Desktop\meat_data_20110101.xls	ExcelFile

＜この解析結果データをエクセルファイルで保存＞

- (6) エクセルファイルの保存が終了したら、「QUIT」でプログラムを終了し、電源を落とす。
電源を落とす順番は、パソコン、テンシプレス本体どちらからでも良い。
- (7) プランジャー及びテーブルは、洗剤をつけた柔らかいスポンジで洗った後、乾燥機へ入れて乾かす。

⑤解析

テンシプレス測定値は、測定した4カ所の平均値を用いる。

【参考：使用機器】

テンシプレス ： TENSIPRESSER TTP-50BX II（タケトモ電機）
プランジャー ： 外径5.5mm、内径5.0mm、面積0.041cm²の中空丸型

【参考文献】

- 1) 中井博康・柳原一美・田邊亮一・西澤光輝．1994．テンシプレスによる牛肉の物性測定 - 焼いた肉と煮た肉の比較 - ．食肉の科学，35：162-167．
- 2) 柳原一美・矢野幸夫・中村豊郎・中井博康・田邊亮一．1995．牛肉の長期熟成中における官能評価、物性および化学成分の変化．日本畜産学会報，66：160-166．

4-5 筋線維の特徴

筋線維の特徴は肉質の物理的特性などを解明するため古くから研究されてきた。これまで品種の特徴、性差、飼養管理、成長等と筋線維との関係について研究され、それぞれの筋線維の特徴（筋線維型）が多数報告されてきた。筋線維型の分類手法としては、以前はsuccinate dehydrogenase（コハク酸脱水素酵素、以下SDHと表記）活性を利用する手法が用いられていた。しかし、この方法には、筋線維型の分類に重要なミオシンの違いがわからない、筋線維型の異なるものでも同程度のSDH活性を示すことがある、などの欠点があるため、現在は単独で用いられることは少ない。

ここでは、ミオシン重鎖抗体を用いた免疫組織化学的染色法とSDH活性を用いた染色法を組み合わせた筋線維型分類手法を紹介する。筋線維は、ミオシン重鎖抗体によって、ミオシン重鎖のタイプ別にⅠ型筋線維とⅡ型筋線維に分けることができる。Ⅰ型筋線維は収縮が遅く、疲れにくいといった特徴を持っている。Ⅱ型筋線維は、さらにSDH活性を調べることで、ⅡA型筋線維とⅡB型筋線維に分類できる。ⅡA型筋線維は収縮が速く、疲れにくいといった特徴を持っており、ⅡB型筋線維は収縮が速く、疲れやすいといった特徴を持っている。

なお、ミオシン重鎖抗体を用いた免疫組織化学的染色法は、東北大学大学院の山口高弘教授、渡邊康一助教よりご教授いただいた手法をもとにしている。

【作業上の注意点】

ここで紹介する手法において使用する薬品のうち、取り扱いに注意を要する薬品について示す。

①ホルマリン（37%ホルムアルデヒド）

劇物。特定化学物質の第2類に指定されており、作業にあたってはドラフトの使用が必要である。

②メタノール

劇物。危険物。有機溶剤。作業はドラフト内で行う。

③DABタブレット

発癌性が疑われている物質が含まれている。試薬に直接触れないように作業を行う。

④30%過酸化水素水

劇物。皮膚傷害性あり。

【サンプル採取及び保存】

サンプルは筋肉の一定の場所を決めて、1×1×2cm程度を切り出す。

このとき筋線維が垂直となるように切り出すと凍結切片の作製がしやすくなる。

これを液体窒素で十分に冷却したイソペンタンに浸し、30秒十分に攪拌する。

切片作製時まで－70度以下の冷凍庫で保管する。

【切片作成から一次抗体反応まで（1日目）】

分析準備

- ①分析するサンプルをクリオスタット内に30分程度置き、温度平衡させる。
- ②ウォーターバスに水を張り、38℃に設定する。
- ③基質反応液と10%ホルマリン液と封入剤を作成する。

(1)基質反応液の作成

ア. ニトロソブルーテトラゾリウム100mgを蒸留水25mlに溶解する。

イ. 以下のものを混合し基質反応液を作成する。

コハク酸（Ⅱ）ナトリウム	0.083 g
ニトロソブルーテトラゾリウム溶液	25ml
リン酸緩衝液（0.2M pH7.4）	17ml
蒸留水	42ml

(2)10%ホルマリン液の作成

以下のものを混合し 10%ホルマリン液を作成する。

ホルマリン（37%ホルムアルデヒド）	10ml
蒸留水	90ml

基質反応液と10%ホルマリン液は作成したら染色バットに移す。基質反応液は37～40℃のウォーターバスにつけておく。10%ホルマリン液はドラフト内に置く（室温）。



写真 1. 基質反応液



写真 2. 10%ホルマリン液

(3)封入剤の作成

以下のものを加温しながら混合する。

ゼラチン	7 g
蒸留水	42ml
グリセリン	50 g
結晶石炭酸（フェノール）	0.5 g

（作成した封入剤は4℃で保存が可能。40～50℃のウォーターバスで加温して使用する。）

分析手順

- ①-15℃のクリオスタット内で、MASコート付スライドガラス上に厚さ10 μ mの筋切片を作製する。筋切片を作製する時は、顕微鏡で筋線維がほぼ垂直に切れていることを確認する。



写真 3. 筋線維切片作成風景



写真 4. クリオスタット内部

1 サンプルにつき、以下の 4 枚を作成する。

1. SDH用
2. slow型ミオシン重鎖（以下slowと表記）用
3. fast型ミオシン重鎖（以下fastと表記）用
4. control用

SDH用→slow用→fast用→control用の順に作成する。

スライドガラスには区別できるように記号・印などを付けておく。

（例：slowならS、fastならF、controlならCなど）

- ② slow 用、fast 用、control 用の 3 枚については、スライドガラス上のサンプルの周囲をリキッドブロッカーで囲み、軽く風乾する。

風乾したら、ほこりが付かないように乾いた染色バットに入れておく。

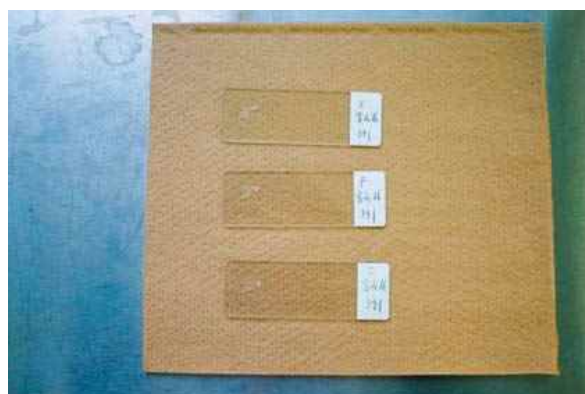


写真 5. 風乾中の筋線維切片

- ③SDH用のスライドガラスを37～40℃のウォーターバスにつけてある基質反応液に30～40分つける。
- ④SDH用のスライドガラスを取り出し、蒸留水の入った染色バットで反応液をすすぎ、軽くふきとってから10%ホルマリン液に5～10分つける。



写真 6. 基質反応液による染色



写真 7. 10%ホルマリン液による固定

⑤SDH用のスライドグラスを取り出し、流水（水道水）で5分間洗浄しホルマリンを洗い落す〔または、染色バット内に水道水を入れ、スライドグラスをつけた後水道水を捨てる。これを5回繰り返す〕。蒸留水ですすいだ後、ウォーターバスで加温しておいた封入剤をサンプル部分に一滴落とし、ホットプレート（40℃）上で加温しながらカバーガラスで封入する。



写真 8. 封入後の筋線維切片

⑥②のスライドグラスを0.01mol/l リン酸緩衝生理食塩溶液 pH7.2-7.4（以下PBSと表記）の入った染色バットにつける。

⑦30%過酸化水素水10mlに対しメタノール90mlを加え、新しい染色バットに入れる（ドラフト内で行う）。

⑧⑥のスライドグラスを⑦の染色バットに5分間つける（ドラフト内で行う）。

若干気泡が出るので振り落としてやる。



写真 9. 過酸化水素水・メタノール溶液中の筋線維切片

⑨別の染色バットにPBSを入れたのち⑧のスライドグラスを5分間つける。

⑩染色バット内のPBSを捨てて、新たにPBSを注いで5分間つける。

これを2回繰り返す。(計3回)

⑪サポニン100mgをPBS100mlに溶解させ、染色バットに入れる。

⑫⑩のスライドグラスを⑪の染色バットに20分間つける。

⑬⑨⑩と同様にしてPBSに5分間3回つける。

⑭Serum, Goat, Normal (正常ヤギ血清) 150 μ lを5mlのPBSで希釈する。

⑮ウェットボックスを以下の要領で準備する。

密閉できる容器に水道水で湿らせた布等を敷き、その上からスライドグラスが並べられるように金網等をのせる。

ウェットボックスが準備できたら⑬のスライドグラスを並べる。



写真10. ウェットボックス



写真11. スライドグラスを並べた状態

⑯スライドグラス上のサンプル部分に⑭で希釈した正常ヤギ血清を300 μ l程度滴下し、ウェットボックスを密閉した後、室温で30分反応させる。



写真12. 正常ヤギ血清を滴下した状態



写真13. 反応風景

⑰(氷上で行う) マウス一次抗体をPBSで200倍に希釈する。

用いるマウス一次抗体は以下の通り。

slow用……………抗slow型ミオシン重鎖抗体

fast用……………抗fast型ミオシン重鎖抗体

(一次抗体は冷凍して保存するが、凍結融解を繰り返すと抗体が破壊されるので、事前に分注しておくなどして凍結融解の回数を最小限にした方がよい。)

⑱スライドグラス上の液をウェットボックス内に捨て、⑰で希釈した一次抗体を300 μ l程度それぞれのサンプルに滴下する。control用にはPBSを300 μ l程度滴下する。その後、ウェットボックスを密閉した後、4℃で一晩反応させる。



写真14. 一次抗体による反応

【一次抗体反応終了後から封入まで（2日目）】

- ①スライドグラス上の液をウェットボックス内に捨て、PBSの入った染色バットに5分間つける。
- ②染色バット内のPBSを捨てて、新たにPBSを注いで5分間つける。
これを2回繰り返す。（計3回）
- ③ウェットボックス内にスライドグラスを並べ、スライドグラス上のサンプル部分にマウス抗体用ヤギ二次抗体をサンプルが隠れる程度滴下し、ウェットボックスを密閉した後、室温で1時間反応させる。



写真15. マウス抗体用ヤギ二次抗体による反応

- ④①②と同様の方法で、PBSで5分×3回洗浄する。
- ⑤50ml チューブにDABタブレットを1錠、直接手で触れないよう入れ、蒸留水9mlと0.1mol/l イミダゾール1mlを加え、ボルテックスミキサーで溶解させる。溶解したら、⑥の操作に移る直前に、5%過酸化水素水を30μl加える。
(0.1mol/l イミダゾール：イミダゾール0.034gを蒸留水5mlに溶解する。)
(5%過酸化水素水：30%過酸化水素水10μlを蒸留水50μlで希釈する。)



写真16. DABタブレット



写真17. ボルテックスミキサーによる溶解

- ⑥スライドグラス上のサンプル部分に⑤で用意した液を300 μ l程度加え、4分程度反応させる。
時間をかけすぎないように注意する。



写真18. DAB溶液による反応

- ⑦染色バット内に水道水を入れ、スライドグラスをつけた後水道水を捨てる。これを5回繰り返す。



写真19. 水道水中の筋線維切片

- ⑧染色バットの水道水を捨て、蒸留水を入れる。
⑨ウォーターバスで加温しておいた封入剤をサンプル部分に加え、カバーガラスで封入する。
封入後は、大きめのろ紙等でスライドグラスをはさみ、カバーガラスの4辺を軽くなでて、余計な水や封入剤を吸い取る。



写真20. ろ紙による水、封入剤の除去



写真21. 封入後の筋線維切片

【筋組織画像の判定・計測】

- ①顕微鏡の倍率を10×10倍とし、顕微鏡CCDカメラおよびパソコンを接続させる。



写真22. 顕微鏡、CCDカメラ、パソコン

- ②顕微鏡を見ながらSDH切片の組織画像を画像データとして保存する。画像は何画面保存してもよいが、計測する筋線維の本数が合計200本以上になるようにする。



写真23. 画像保存風景（SDH切片）

- ③保存したSDH切片の画像を印刷する。
④SDH切片印刷画像を見ながら、slow切片、fast切片の画像を同様に保存する。
保存する時はSDH切片画像と同じ場所の画像を保存するようにする。



写真24. 画像保存風景 (slow切片、fast切片)

- ⑤slow切片とfast切片の画像を印刷し、両者を見比べ、中間型の筋線維（両方で染色されている）を調べ、SDH切片の印刷画像にペンなどでマークする。

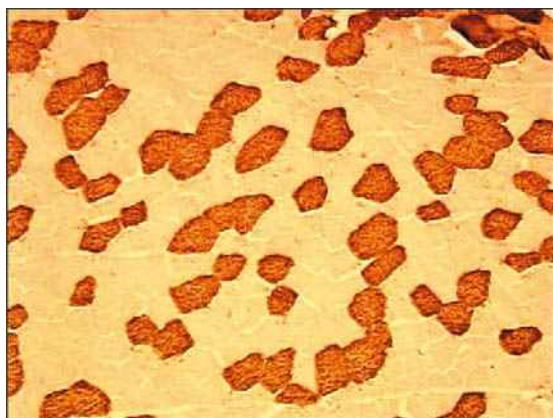


写真25. slow切片画像

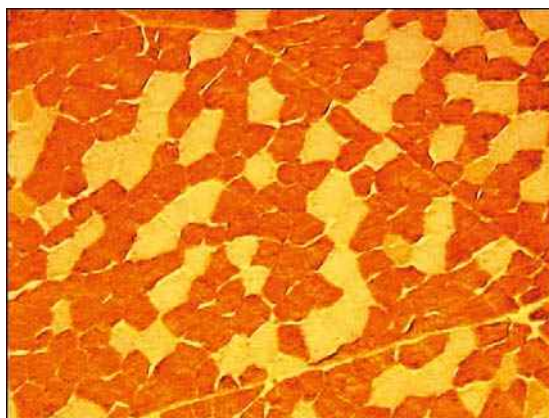


写真26. fast切片画像

- ⑥slow切片とSDH切片の印刷画像を比較して、I型の筋線維（slow切片で染色されている）を調べ、SDH切片の印刷画像にペンなどでマークする。



写真27. SDH切片画像

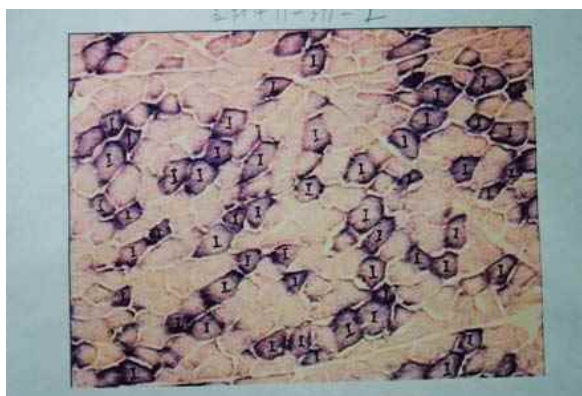


写真28. I型についてマークしたSDH切片印刷画像

- ⑦ I型および中間型の筋線維についてマークしたSDH切片の印刷画像を手元におき、パソコン上で保存していたSDH切片画像を開く。パソコン画面上で、I型、II A型（slow切片で染色されておらず、SDH切片で部分的に染色されている）、II B型（slow切片で染色されておらず、SDH切片でも染色されていない）、中間型筋線維についてマークする。マークしたらその画像を保存する。

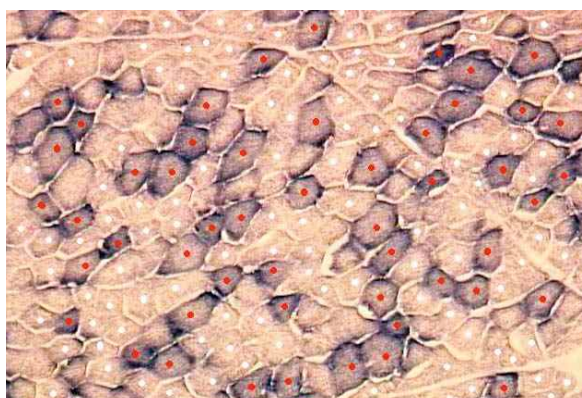


写真29. パソコン画面上でマークしたSDH切片画像

- ⑧保存した画像を画像解析ソフト（Winroof等）で解析する。解析にあたっては、筋線維型別に行う。また、それぞれの筋線維の短径値をその筋線維の太さとする。

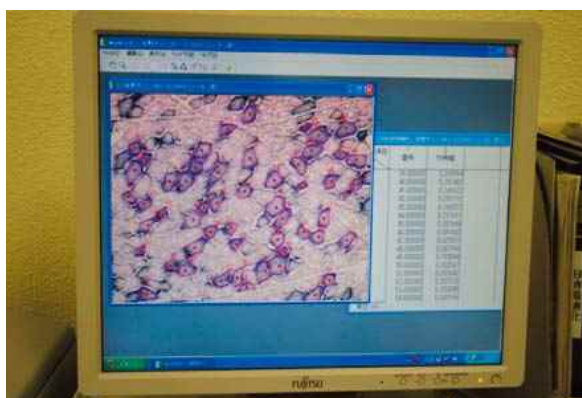


写真30. 画像解析ソフトによる解析風景

4-6 コラーゲン量（可溶性、不溶性）分析

食肉の硬さに関与している筋線維と結合組織のうち、筋肉組織を構成する結合組織には、膠原線維であるコラーゲンの他に、微量の弾性線維であるエラスチン等が存在している。その中でもコラーゲンは、腱や筋膜の主要成分であるだけでなく、筋線維同士の接着、あるいは線維状の構造を作り細胞を保持する役割も兼ねている。

コラーゲンが食肉の硬さに影響するのは、単純なコラーゲンの量ではなく、コラーゲンの質とその分布が影響しているとされ（鈴木，2000）、畜肉の加齢に伴い食肉が硬くなるのは、コラーゲン分子が分子内あるいは分子間に架橋を形成し、安定化、強固になるためと考えられている（鈴木ら，1998）。

コラーゲンの分析方法としては、組織化学的方法や生化学的方法があるが、肉質評価においては、生化学的方法を用いた、熱可溶性コラーゲンと不溶性コラーゲンに分離する方法が一般的である。本稿では、（独）東北農業研究センターの柴 伸弥氏が行っている方法を参考に家畜改良センターにて実施している、熱可溶性コラーゲン量と総コラーゲン量をそれぞれ分析し、それらの差から不溶性コラーゲン量を求める方法を紹介する。

なお、コラーゲンの定量には、コラーゲンには特異的にアミノ酸のヒドロキシプロリンが含まれていることから、このヒドロキシプロリンを呈色反応させた後、分光光度計を用いて測定することでそれぞれのコラーゲン量を算出している。

① サンプルの前処理

（サンプル調整・可溶性コラーゲン分離：Hill J.Food Sci.1966 Vol.31）

※以下、可溶性：可溶性コラーゲン、total：全コラーゲン（可溶性＋不溶性）と略す。

【試薬準備】

○ 1/4 の濃度のリンゲル液（3ヵ月間冷蔵保存可能）

NaCl 2.15g

KCl 0.075g

CaCl₂ 0.129g

上記試薬を 1 L メスフラスコに入れて、超純水でメスアップする。褐色ビンにて 3 ヶ月間冷蔵保存可能。

○ 濃塩酸（市販品の塩酸36%：試薬第一級）

○ 6N HCl

褐色ビンに超純水500mlと濃塩酸（約12N）500mlを入れてよく混和する。

注）濃塩酸に超純水を加えると発熱するため、超純水に濃塩酸を加えること。

【前処理手順】

<共通>

- (1)ウォーターバスを77℃にセットする。
- (2)冷凍サンプルを包丁でミンチする。
- (3)Totalとして、サンプル5 g±0.5gを50mlオートクレーブ用遠沈管に秤量する。…… (A)
- (4)可溶性として、サンプル4 g±0.5gを50mlプラスチック製遠沈管に秤量する。…… (B)



<可溶性、totalサンプルの準備>

<total>

- (1) (A) に6N HClを20ml加え、蓋をする。…… (C)



<totalに6NHClを20ml加える>

<可溶性>

- (1) (B) に1/4濃度リンゲル液を10ml加え、蓋をして77℃のウォーターバスで70分間加熱する。



<可溶性に1/4濃度リンゲル液を10ml加える>



<77℃で70分間加熱>

(2)加温後、流水で10分間冷却する。



<10分間冷却>

(3)25,000rpmで数秒間ホモジナイズし、10分間遠心分離（4℃×6,000g）を行う。



<25,000rpmで数秒間ホモジナイズ>

(4)上澄み液を50mlオートクレーブ用遠沈管に濾過し、この濾液に濃塩酸を10ml 加え、蓋をする。
…… (D1)



<上澄み液を濾過>



<濾液に濃塩酸を10ml加える>

(5)濾過して残った沈殿物に 1 / 4 濃度リンゲル液を10ml加えてよく攪拌し、再度10分間遠心分離（4℃×6,000g）を行う。

(6)上澄みを別の50mlオートクレーブ用遠沈管に濾過する。

(7)この上澄み液に濃塩酸を10ml加え、蓋をする。…… (D2)

<共通>

(1). (C) と (D1,2) を新聞紙で巻いた後、アルミバックに入れて密封し、オートクレーブ（121℃ × 1.2kg / cm²）にて11時間加熱処理する。



注）遠沈管に新聞紙等を巻くことで、遠沈管同士の接着を防ぐことができ、かつ、万一塩酸が漏れた場合でも新聞紙等による吸収が可能である。

<新聞紙を巻いた遠沈管をアルミバックへ入れて密封し、11時間加熱処理する>

- (2) サンプル名とサンプル量をコラーゲン計算原紙に記入する。
- (3) オートクレーブ処理が終了し、オートクレーブが十分冷えたら、まず、total (C) を100mlメスフラスコに5Aの濾紙で濾過し、超純水10ml程度で遠沈管を共洗いする。



<100mlメスフラスコに濾過し、メスアップ>

- (4) 共洗いを2～3回行った後、超純水で100mlにメスアップする。
- (5) 可溶性の2本 (B1,2) を一つの100mlメスフラスコに5Aの濾紙で濾過し、totalと同じように共洗いした後、超純水で100mlにメスアップする。total、可溶性共にメスアップしたものは、1週間常温保存可能。



<可溶性の2本を一つのメスフラスコに濾過し、メスアップ>

- (6) totalは0.5ml、可溶性は4mlをそれぞれ10ml試験管に取り、遠心エバポレーター (45℃ × 1000rpm) で7時間減圧乾固する。乾固が足りない場合は、さらに1～2時間減圧乾固する。



<total 0.5ml、可溶性4mlを採取>



<遠心エバポレーター式>

注) 乾固しきれず塩酸が残留していると、結果に悪影響を及ぼすため注意。

- (7) 完全に乾固したものを前処理済サンプルとする。乾固したサンプルは、1晩放置可能。ただし、周りの物品を酸化させるのでドラフト内に置くこと。



<前処理済サンプル>

②前処理サンプルの定量

(Hydroxyprorin の定量 : Bergman and Loxley Anal.Chem.1963 Vol.35) (改)

【試薬準備】

※以下の試薬量は、1 回の分析を16サンプル (32本) + STD 5本とした時の量。

○Oxidant溶液

(a) 7%クロラミン T 溶液 (用事調製)

トルエンスルホンクロロアミドナトリウム	0.07g
(クロラミン T)	
超純水	1 ml

上記試薬を10ml蓋付試験管に加えてよく攪拌する。

(b) 酢酸・クエン酸緩衝液 (pH 6.0) (3 ヶ月間常温保存可能)

酢酸ナトリウム三水和物	11.4g
クエン酸三ナトリウム二水和物	7.5g
クエン酸一水和物	1.1g
イソプロパノール	77ml

上記試薬を200mlメスフラスコに加えた後、超純水でメスアップする。

使用直前に (a) : (b) = 1 : 4 の割合で10ml蓋付試験管に混和し、Oxidant溶液を作製する。

(a) 7%クロラミン T 溶液	1 ml
(b) 酢酸・クエン酸緩衝液	4 ml

○ Ehrlich' s 試験溶液

(c) ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 (用事調製)

ジメチルアミノベンズアルデヒド	14g
60%過塩素酸	21ml

上記試薬を100mlビーカーで混和する。

(d) イソプロパノール

使用直前に (c) : (d) = 3 : 13 の割合で100ml褐色三角ビンに混和し、Ehrlich' s 試験溶液を作製する。

(c) ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液	12ml
(d) イソプロパノール	52ml

○ヒドロキシプロリン標準溶液

(e) 1000ppm ヒドロキシプロリン溶液 (3 ヶ月冷蔵保存可能) (褐色メスフラスコ使用)

ヒドロキシプロリン 0.1g

0.1N HCl 100ml

上記試薬を100ml褐色メスフラスコに加えてメスアップする。

(e) を以下のように調製してスタンダード (STD0 ~ STD4) を作製する。

		STD4	STD3	STD2	STD1	STD0 (ブランク)
ヒドロキシプロリン	1000ppm 1 ml	100ppm 4 ml	80ppm 3 ml	60ppm 2 ml	40ppm 1 ml	
超純水	9 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
合計	100ppm 10ml	80ppm 5 ml	60ppm 4 ml	40ppm 3 ml	20ppm 2 ml	0ppm 1 ml

【定量手順】

- (1)ウォーターバスを60℃にセットする。
- (2)Oxidant 溶液、Ehrrich's 試験溶液を作製。
- (3)前処理済サンプルに超純水を 1 ml加えよく撹拌する。



注) total:0.5ml、可溶性:
4 mlを減圧乾固して、1
mlの超純水で溶解してい
るため、total: 2倍希釈、
可溶性: 4倍濃縮となる。

<超純水を1ml入れ、よく撹拌する>

- (4)10ml蓋付き褐色試験管に各STD、サンプルを0.1mlずつ分注する。



<STD、サンプル共に0.1mlずつ分注>

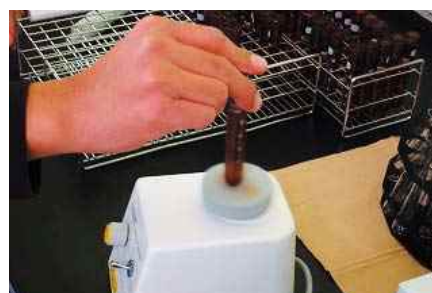
- (5)すべての試験管にイソプロパノールを0.2ml加え、ボルテックスでよく撹拌する。

- (6)Oxidant 溶液を0.1ml加えてボルテックスで攪拌し、室温で 4 分間保持する。すべての試験管にOxidant溶液を入れたあと一斉に攪拌するのではなく、1 本ずつ溶液を入れて攪拌するまでを通して行う。



<Oxidant溶液を0.1ml加え攪拌する>

- (7)Ehrich' s 試験溶液を1.3ml加え、ボルテックスで攪拌する。この行程も(6)と同じく、1 本ずつ溶液を入れて攪拌するまでを通して行う。



<Ehrich' s試験溶液を1.3ml加え攪拌する>

- (8)すべての試験管に蓋をして、60℃のウォーターバスにて25分間加熱する。



<60℃で25分間加熱する>

- (9)加温後、3 分間流水で冷却する。



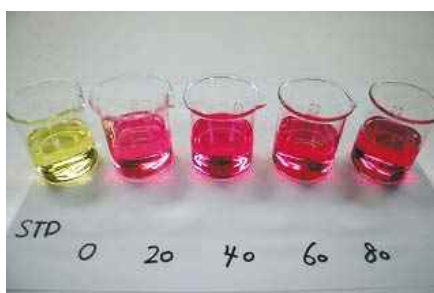
<流水で3分間冷却する>

- (10)すべての試験管にイソプロパノールを3.3mlずつ加え、ボルテックスでよく攪拌する。

(1) 4 時間以内に分光光度計（吸光度560nm）で測定する。



<分光光度計による測定>



<参考：STDの比色>

【データ解析】

解析について、5つのSTD（STD0含む）の吸光度を用いて検量線を作成し、サンプルの吸光度からHydroxyproline濃度を求め、下記の計算式からそれぞれのコラーゲン量を算出する。

コラーゲン量計算式（Cross et al. J. Food Sci.1973 Vol.38）

$\text{soluble collagen} = \text{Hydroxyproline} \times 7.52$

$\text{total collagen} = \text{Hydroxyproline} \times 7.25$

【参考文献】

鈴木 惇 . 2000. 筋肉の構造と肉質との関連 . 東畜会報 , 49 : 1-8

鈴木敦士・渡辺終五・中川弘毅編 . 1998. 食品成分シリーズ - タンパク質の科学 . 朝倉書店 .

Hill, F. 1966. The Solubility of Intramuscular Collagen in Meat Animals of Various Ages. Journal of Food Science, 31: 161-166.

Bergman, I., and Loxley, R. 1963. Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline. Analytical Chemistry, 35 : 1961-1965.

Cross, H. R., Carpenter, Z. L., and Smith, G. C. 1973. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. Journal of Food Science, 38 : 998-1003.

5

脂肪の質

5-1 脂肪酸組成

食肉の筋肉内脂肪は、経済性だけでなく、食味の観点からも重要な形質である。脂肪の量だけでなく、その質についても、食味への影響が予想されることから、近年多くの機関で脂肪の質を示す項目の一つである脂肪酸組成の分析に取り組んでいる。

脂肪酸組成の分析手法は様々であるが、ここではFolchらの方法で脂質の抽出を行い、ケン化により脂肪酸とグリセリンとに分離し、最終的に脂肪酸をメチルエステル化したものを、ガスクロマトグラフィーで分析する手法を紹介する。

①分析準備

(1)ウォーターバスに水を張り、95℃に設定する。

(2)真空エバポレーター用ウォーターバスに水を入れ52℃程度に設定する。



写真1 ウォーターバス



写真2 真空エバポレーター

(3)実験器具を準備する。

洗浄用のクロメタ液20mL程度を遠沈管に、0.85%生理食塩水（生食）10mLを分液ロートに入れておく。また、共栓付き試験管を1サンプルにつき3本用意する。



写真3 サンプル調製セット

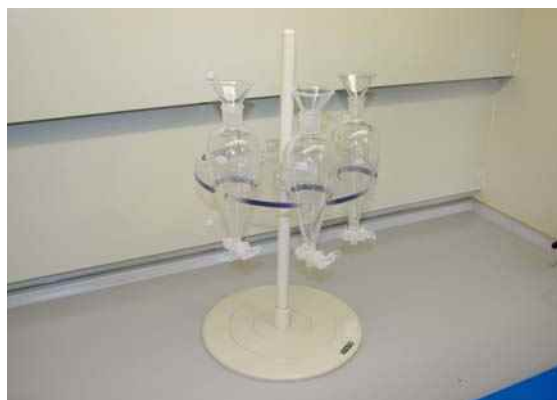


写真4 分液ロートセット



写真5 共栓付き試験管等のセット

④分析手順

(1) 【サンプリング】

分析サンプルは、真空保存していない場合、脂質酸化の可能性の高い外気との接触部分を除いた残りの部分から1g程度（脂肪サンプルについては、0.5g程度）を筋繊維に薄く、2～3枚にカットし、細断する。細断したサンプルを遠沈管に入れる。



写真6 サンプル調製

(2) 【脂質のクロメタ層への抽出】

サンプルの入った遠沈管にクロメタ液を20mL入れ、20秒程度ホモジナイザーを用いてホモジナイズすることで脂質をクロメタ液に抽出し、あらかじめ生理的食塩水が準備された分液ロートに移す。この操作を再度実施する。この操作はサンプルごとに実施する。（異なるサンプルを分析する際には、キッチンペーパーやピンセットを用いて、ホモジナイザー先端に付着した線維等を取り除く。さらに、洗浄用クロメタ液20mLでホモジナイザー先端を洗浄する。）



写真7 ホモジナイズ風景



写真8 分液ロート

(3) 【水溶性物質の生理的食塩水への移行】

ホモジナイズしたサンプル、生理的食塩水10mLおよびメタクロ液20mL×2回分が入った分液ロートの上下の栓をしっかりと押さえながら数回攪拌し、栓を外しガスを抜く（プシュと音がする）操作を数回繰り返す。その後、分液ロートをシェーカーに取り付ける。分液ロート内の液が波立つ程度に、5分程度振とうする。



写真9 分液ロートの攪拌



写真10 シェーカーでの攪拌

(4) 【脂質の抽出】

ドラフト内で分液ロートのガスを抜き、静置し、空気が分液ロートに入るように共栓を空気孔にあわせる。



写真11 静置した分液ロート



写真12 分液ロートの空気孔

梨型フラスコにロートをセットし、ろ紙に硫酸ナトリウム（無水）を適量（7分目程度）セットする。分液ロートの液体は2層に分かれており、上層は生理的食塩水とそれにとけ込んだ水溶性物質、下層は脂質が溶けたクロメタ液からなる。脂肪のとけ込んだ下層について、分液ロートの分液口をクロメタ液がポタポタ落ちる程度に調製し、無水硫酸ナトリウムに通しながら、梨型フラスコに移す（写真14）。



写真13 無水硫酸ナトリウムのセット



写真14 分液ロートによる下層の採取

分液により得たクロメタ液を真空エバポレーターを用いて、蒸発させて脂質分のみとする。



写真15 クロメタ液の蒸発

(5) 【ケン化】

脂質だけを抽出した梨型フラスコに1 N 水酸化カリウムエタノール溶液5 mLを入れ、すぐウォーターバスの冷却管に取り付け（約95℃の温湯中で約1時間；多少長いのは良いが短いのは良くない）、反応させる（ケン化）。ただし、この水酸化カリウムエタノール溶液の添加から冷却管への取り付けはサンプルごとの連続操作とする。



写真16 ケン化反応風景

(6) 【不ケン化物の除去】

反応させた梨型フラスコを数十秒間（管壁に白い輪が出来る程度まで）、真空エバポレーターを用いてエタノールを蒸発させる。これに蒸留水5 mLを加え、共栓付き試験管（25mL）に移す（色は褐色透明）。同じ作業を2度行い、総量で10mLとする。