

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4543233号  
(P4543233)

(45) 発行日 平成22年9月15日(2010.9.15)

(24) 登録日 平成22年7月9日(2010.7.9)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/12	(2006.01)	GO 1 N 33/12	
GO 1 N 21/77	(2006.01)	GO 1 N 21/77	Z
GO 1 N 21/78	(2006.01)	GO 1 N 21/78	Z

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2004-249922 (P2004-249922)	(73) 特許権者	501203344
(22) 出願日	平成16年8月30日(2004.8.30)		独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(65) 公開番号	特開2006-64630 (P2006-64630A)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(43) 公開日	平成18年3月9日(2006.3.9)	(74) 代理人	100086221
審査請求日	平成19年7月18日(2007.7.18)		弁理士 矢野 裕也
特許法第30条第1項適用	2004年3月20日 社団法人日本畜産学会発行の「日本畜産学会 第103回大会 講演要旨」に発表	(72) 発明者	松本 和典
			島根県大田市川合町吉永60 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター 畜産草地部内
		(72) 発明者	村元 隆行
			岩手県盛岡市下厨川字赤平4 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 東北農業研究センター 総合研究部内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗酸化能測定による牛肉の肉色保持日数の予測方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗酸化能測定キットを用いて、試料牛肉から採取した筋肉のミンチ中の抗酸化物質の含有量(x)を求め、これを下記の回帰式に代入して、店頭における通常の展示条件下における試料牛肉の変色時期(y)を予測することを特徴とする抗酸化能測定による牛肉の肉色保持日数の予測方法。

$$y = 11.393 x + 0.6363$$

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、牛肉の変色時期の予測方法に関し、詳しくは取引段階で牛肉の日持ちの良さを判断するための、牛肉の変色(褐変)を早期に予測する技術に関する。

【背景技術】

【0002】

牛肉において肉の色が小売段階でいかに重要であるかを調べた報告がある。それによると、日本の消費者の約6割が牛肉の購入に際して肉の色を最も重視すると答えている。

牛肉の色を決定する因子はいくつかあるが、ほとんどミオグロビンによって決定されると考えてよい。ミオグロビンは、筋肉内で酸素を貯蔵する役割をもつ色素タンパクである。枝肉の新鮮な切り口や肉塊の中は暗赤色の還元型ミオグロビンであり、この還元型ミオグロビンは、空気中の酸素と容易に結びついて、15~30分ほどで鮮紅色のオキシミオ

グロビンになる。

この色が店頭で見られる、消費者に最も好まれる肉の色であるが、オキシミオグロビンは自動酸化によって褐色のメトミオグロビンに変わる。ミオグロビンのうち30～40%以上がメトミオグロビンに酸化されると、肉の変色が目に見えて分かり、消費者の購買意欲がなくなると言われている。

【0003】

このオキシミオグロビンからメトミオグロビンへの酸化は、(1)筋肉部位、(2)屠殺月齢、(3)飼養条件、(4)抗酸化物質(ビタミンEなど)の含有量などによって速さが大きく異なる。

しかしながら、牛肉が新鮮な段階で肉色安定性を判断することは難しいため、例えばビタミンEを給与して肥育した「日持ちがよい」という牛肉の付加価値は、枝肉格付けや牛肉の取引段階では評価されにくい。

したがって、取引段階で牛肉の日持ちの良さを判断するためには、牛肉の変色(褐変)を早期に予測する技術の開発が必要であるが、これまでにかかる技術開発に関する報告はない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、牛肉の変色を、新鮮な段階で早期に予測する技術を開発することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、上記目的を達成するため、検討を重ねた結果、牛肉中の抗酸化物質の量と肉色を決定するミオグロビンの酸化の速さとの間に負の相関があること、またこれによって牛肉の変色を予測できることを見出し、本発明に到達した。

【0006】

請求項1に記載の本発明は、抗酸化能測定キットを用いて、試料牛肉から採取した筋肉のミンチ中の抗酸化物質の含有量(x)を求め、これを下記の回帰式に代入して、店頭における通常の展示条件下における試料牛肉の変色時期(y)を予測することを特徴とする抗酸化能測定による牛肉の肉色保持日数の予測方法である。

$$y = 11.393 x + 0.6363$$

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、牛肉の変色(褐変)を新鮮な段階で早期に予測することができるため、取引段階で牛肉の日持ちの良さを的確に判断することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明が適用される牛肉には制限がなく、例えば黒毛和種、交雑種、ホルスタイン種、褐毛和種などに由来し、市場に供給されるものが挙げられる。また、牛肉の部位、屠殺月齢、牛の飼養条件などについても限定されない。

【0010】

本発明は、牛の筋肉中に存在するミオグロビンの酸化を抑制する抗酸化物質の働きに着目して牛肉の変色を予測する方法である。そのため、試料牛肉から筋肉を採取する。屠殺した牛を解体して得た牛肉から採取した筋肉は、ミンチにして真空包装し、実験に供するまで(通常は数日～2,3週間)冷凍保存する。

筋肉の種類としては、例えば半腱様筋、半膜様筋、中殿筋、胸最長筋、腰最長筋、大腰筋などがあり、検査すべき試料牛肉から必要な筋肉部位を採取する。

枝肉の新鮮な切り口は、還元型ミオグロビンに起因する暗赤色を呈しているが、空気中の酸素と反応して15～30分ほどで鮮紅色のオキシミオグロビンに変化する。これが、

10

20

30

40

50

ブルーミングと称される反応である。しかし、消費者に最も好まれるこの色がそのまま保持されるわけではなく、経時的にさらに酸化されて褐色のメトミオグロビンに変化する。

#### 【0011】

店頭における通常の展示条件である蛍光灯照射下に4で牛肉を保持した場合、ミオグロビンの30～40%がメトミオグロビンに酸化されると、肉の変色が目立つようになり、消費者の購買意欲がなくなると言われている。

そこで、本発明者らは、可及的速やかにミオグロビンの30～40%がメトミオグロビンに酸化される条件について検討した結果、牛肉から筋肉部位を採取し、該筋肉中の抗酸化物質の量が、ミオグロビンの酸化の速さに影響を及ぼすことから、牛肉の変色を予測できることを見出した。これにより、筋肉の抗酸化能を迅速に求め、この値から取引段階での牛肉の日持ちの良さを的確に判断することが可能である。

10

#### 【0012】

以下に、本発明の方法について説明する。

屠殺し、解体した牛から採取した牛肉に由来する筋肉を直ちに試料として実験に供することもできるが、好ましくは該牛肉を真空包装して3～5、好ましくは4にて保存する。約1週間後に真空包装から取り出した牛肉を、厚さ1cm、直径3cmの円柱状のサンプルを作成する。これを、プラスチック製の皿に載せ、4の冷蔵庫に30分間入れる(ブルーミングのため)。

次いで、該サンプルを酸素透過性のラップで包み、各筋肉部位を通常の展示条件である蛍光灯照射下に4で保持して、0～9日目における牛肉表面のメトミオグロビン割合(筋肉の変色割合)を毎日測定する。

20

#### 【0013】

ミオグロビンのメトミオグロビンへの酸化割合(Met(%))は、Stewartらの方法(J. Food Sci., 30, p464-469, 1964)にしたがい、以下のように求めることができる。

すなわち、試料の520、530、570および580nmにおける各スペクトル反射率(CL( )、単位は%)を測定し、下記のようにしてCL(525)およびCL(572)を近似的に算出する。次に、CL(525)とCL(572)を100で割って反射率R( )に換算し、この値をもとにKS( )を以下の計算式により求める。

$$CL(525) = CL(520) - \{ CL(520) - CL(530) \} \times 1/2$$

$$CL(572) = CL(570) - \{ CL(570) - CL(580) \} \times 1/5$$

$$R(525) = CL(525) / 100$$

$$R(572) = CL(572) / 100$$

30

#### 【0014】

なお、KS( )はkubelka-Munk関数といい、光学濃度を表す。物体の反射率は濃度に比例しないため、ある種の関数に変換して濃度に比例するような値に修正しなければならず、その場合、一般にこのkubelka-Munk関数が広く使われる。

ここで、 $KS(572)/KS(525)$ とすると、 $Met(\%)$ との関係は一次式になるので、図1のグラフから $Met(\%)$ の値を算出することができる。

#### 【0015】

$$KS( ) = \{ [1 - R( )]^2 \} / \{ 2 \times R( ) \}$$

$$= KS(572) / KS(525)$$

$$Met(\%) = -10000 \times / 84 + 1000 / 6$$

40

#### 【0016】

このようにして、通常の展示条件下において試料牛肉のメトミオグロビン割合が30%に達する日数(肉色保持日数、あるいは変色日数)を測定することができる。

一方、試料牛肉から採取したすべての部位の筋肉については、前記のように冷凍したミンチを解凍した後、抗酸化能測定キットを用いて、以下のようにして筋肉中の抗酸化物質の含有量(x)を求める。

抗酸化能測定キットとしては、市販品を用いることができ、例えばアッセイキット(商品名: Total Antioxidant Status、RANDOX社製)がある。

50

本キットは、食品の抗酸化能力の評価方法であるA B T S (RANDOX社の登録商標、以下同じ)法により牛肉の抗酸化力を測定する。このA B T S法による抗酸化力の測定原理は以下のとおりである。すなわち、強力な酸化作用を有する過酸化水素はメトミオグロビンを酸化し、酸素と結合したフェリルミオグロビンに変える。A B T S (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate])は前記フェリルミオグロビンの作用によって酸化され、有色の酸化型A B T S (青緑色を呈し、最大吸光帯は600nm)になる。このため、一定量の過酸化水素とメトミオグロビン、A B T Sを反応させると、酸化型A B T Sが一定量生成され、生成された酸化型A B T Sの量は吸光度を測定することによって定量することができる。そして、前記過酸化水素とメトミオグロビン、A B T Sの溶液に試料を加えて反応させた場合、その試料中に抗酸化物質があれば、過酸化水素を消化してしまうのでフェリルミオグロビンの生成量が減少し、酸化型A B T Sの生成量も低下する。従って、前記反応物中の酸化型A B T Sの生成量を吸光度により測定することによって、試料中の抗酸化物質を測定することができる。以上がA B T S法の測定原理である。

10

## 【0017】

本キットには、以下のものが含まれている。

- ・緩衝液：PBS (Phosphate Buffer Saline)
- ・色原体 (Chromogen)：メトミオグロビン 6.1 μmol/l、ABTS 610 μmol/l
- ・基質：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250 μmol/l
- ・標準液：6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (濃度はキットのロット番号によって異なる)

20

## 【0018】

本キットによる測定方法の1例を示すと、次の通りである。

まず、上記のようにミンチにした試料は真空包装して冷凍、好ましくは-80の低温下で保存し、分析時に解凍して用いる。試料を約2gチューブにとり、純水を加えvortexにかけて混和した後、遠心分離を行って上澄みを採取し、これをサンプルとする。ブランク(純水)、標準液、上記サンプルの各20μlに対しChromogen 1mlの割合で加えた後、600nmの吸光度を測定(A1)する。

次に、基質を200μl加え、加温する。加温は、例えば35~40、好ましくは37のウォーターバスに入れて行う。所定時間(通常は3分間)後、再び600nmの吸光度を測定(A2)する。このようにして得られたA1とA2の測定値の差を求め、酸化型A B T Sの生成量および試料中の抗酸化物質量を計算する。

30

抗酸化物質含有量を求めるための計算式は以下のとおりである。

$$A2 - A1 = A$$

$$\text{Factor} = \text{標準液の濃度} / [A(\text{ブランク}) - A(\text{標準液})]$$

$$\text{抗酸化物質含有量 (mmol/l)} = \text{Factor} \times [A(\text{ブランク}) - A(\text{サンプル})]$$

## 【0019】

最後に、このようにして得られた各筋肉部位ごとの抗酸化物質含有量と変色日数を、excelで散布図にプロットし、両者の関係から最小自乗法による線形近似式(回帰式)を作成する。

$$y = 11.393x + 0.6363$$

40

## 【0020】

この式に、上記の方法で測定した抗酸化物質含有量(x)を代入することにより、試料牛肉の変色時期(y)を予測することができる。この方法によれば、前記の通常の見せ条件下での肉色保持日数、すなわち変色日数を、枝肉を解体して部分肉にしたその日に予測することができ、また理論上は枝肉の段階でも予測できる。

## 【実施例】

## 【0021】

以下に、実施例を示して本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

## 【0022】

50

### 実施例 1 (メトミオグロビン割合の測定)

#### [材料および方法]

近畿中国四国農業研究センターにおいて肥育し、28ヵ月齢で屠殺した黒毛和種去勢肥育牛から半腱様筋(そともも)、半膜様筋(うちもも)、中殿筋(らんいち)、胸最長筋(リブローズ)、腰最長筋(サーロイン)、大腰筋(ヒレ)を採取した。

採取した筋肉は、真空包装して試験に供するまで4℃で保存し、一部をミンチにして-80℃で保存した。

屠殺から分析試験に至る一般的スケジュールは以下の通りである。

#### 【0023】

月曜日：屠殺 枝肉(0℃で冷蔵)

火曜日：格付け(市場と同じ方法)

水曜日：解体 部分肉(真空パック、4℃で保存、ミンチは-80℃で保存)

木曜日～日曜日：サンプル保存期間

月曜日：メトミオグロビン割合の測定開始日(都合により1日ずれる場合あり)

#### 【0024】

4℃で保存した真空パックのサンプルは、屠殺から1週間後に真空パックから出して、厚さ1cm、直径3cmの円柱状サンプルを作成し、プラスチック皿に載せ、4℃で30分冷蔵庫に入れた(ブルーミングのため。還元型ミオグロビンが残っていると、スペクトル反射率のデータが不正確になるので、測定開始時にはすべてオキシ型にしておく必要がある)。

これを酸素透過性のラップで包み、4℃にて蛍光灯下で展示(通常展示)し、0～9日目における牛肉表面のメトミオグロビン割合(筋肉の変色割合)を毎日測定した。

#### 【0025】

メトミオグロビン割合の測定は、前記Stewartの方法(反射吸光分析法)によって非破壊的に求めた。すなわち、分光式色差計(日本電色工業製：SE2000)を用いて、580,570,530および520nmの各スペクトル反射率(CL( ),単位は%)を非破壊に測定する。このデータからCL(572),CL(525)を計算する。CL(525)とCL(572)を100で割って得た反射率R( )をもとにKS( )、 を前出の式により求める。さらに、 の値をもとに図1からMet(%)の値を求める。このようにして得られた通常展示条件下におけるメトミオグロビン割合の経時的变化を各筋肉部位ごとに図2に示す。この図から、通常の展示条件下においてメトミオグロビン割合が30%に達する日数(肉色保持日数)を近似的に求めた。

#### 【0026】

### 実施例 2 (抗酸化物質含量の測定)

実施例1において、水曜日に解体した後の部分肉から採取した各筋肉部位をミンチにして真空包装して-80℃で保存したこと以外は、実施例1と同様にし、試験開始時に解凍して得たサンプルについて、アッセイキット(商品名：Total Antioxidant Status、RANDOX社製)を用いて抗酸化物質含量を測定した。当該キットの測定原理・内容は既に述べたとおりであるが、以下に手法を示す。

#### 【0027】

#### [試薬の準備]

- ・緩衝液(PBS)：そのまま使用する。使用期限まで保存可(冷蔵)。
- ・色原体(Chromogen)：1バイヤルを10mlの緩衝液で希釈して用いる。冷蔵で2日、室温で8時間保存可。
- ・基質：1mlの基質を1.5mlの緩衝液で希釈して用いる。冷蔵で24時間保存可。
- ・標準液：1バイヤルを1mlの純水で希釈して使用する。冷蔵で2日保存可。冷凍で1ヶ月保存可。

#### 【0028】

#### [測定の手順]

- (1)ミンチ状のサンプルを通常の方法で解凍する。
- (2)15mlチューブにサンプルを約2g量り取る。(重量を記録する。)

10

20

30

40

50

- (3) 純水4mlを添加し、約1分間voltexにかけて混和する。  
 (4) さらに純水4mlを追加し、約1分間voltexにかけて混和する。  
 (5) 3000rpm、15min、4 で遠心分離を行う。  
 (6) 脂肪を取らないようにして、パストゥールピペットで上澄みを4~5ml採取し、4 で保存する。  
 (7) ブランク(純水)、標準液および(6)のサンプルの各20 $\mu$ lに、Chromogenを1mlずつ加える。  
 (8) 分光光度計(HITACHI、U-1500)により600nmで吸光度を測定する(A1)。  
 (9) 基質を200 $\mu$ l加え、直ちに37 のウォーターバスに入れ、極めて正確に3分間反応させる。3分後に上記(8)と同様にして吸光度を測定する(A2)。秒単位で測定結果が変動するので注意が必要である。  
 (10) A1とA2の測定値と標準液の濃度をもとに、以下のように抗酸化物質濃度を求める。

$$A2 - A1 = A \text{ とする。}$$

$$\text{Factor} = \text{標準液の濃度} / [A(\text{ブランク}) - A(\text{標準液})] \text{ とする。}$$

$$\text{抗酸化物質含有量 (mmol/l)} = \text{Factor} \times [A(\text{ブランク}) - A(\text{サンプル})]$$

結果を表1に示す。

【0029】

【表1】

筋肉部位	サンプルNo.	抗酸化物質濃度 (mM/l)
大腰筋	387	0.086
	388	0.127
	395	0.361
中殿筋	387	0.081
	388	0.147
	395	0.240
半膜様筋	387	0.273
	388	0.354
	395	0.185
半腱様筋	387	0.223
	388	0.243
	395	0.466
胸最長筋	387	0.425
	388	0.369
	395	0.741
腰最長筋	387	0.339
	388	0.385
	395	0.381

【0030】

次に、各サンプルについて、実施例1で求めた肉色保持日数(メトミオグロビン割合が30%に達するまでの日数)および上記で求めた抗酸化物質濃度の関係をプロットした散布図を図3に示す(N=18)。この散布図について線形回帰分析を行った。得られた近似式を以下に示す。Nはサンプル数を表す。

【0031】

$$y = 11.393 x + 0.6363$$

$$R = 0.746 \quad (p < 0.01)$$

10

20

30

40

50

( y は通常展示条件下でメトミオグロビン割合が 30% に達するまでの日数、すなわち肉色保持日数 ; x は抗酸化物質含量 ; R は相関係数を表す。 p < 0.01 は 1% 水準で有意であることを表す。 )

【 0 0 3 2 】

図 3 より明らかなように、抗酸化物質濃度と肉色保持日数との間には、明らかな相関関係が見られる。この式により、新鮮な牛肉に含まれる抗酸化物質濃度から、通常展示条件下における肉色保持日数を的確に予想することができる。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 3 3 】

本発明によれば、枝肉格付けや牛肉の取引段階で的確に肉色安定性を判断することが可能であるため、小売段階において非常に重要である肉色の変化を考慮した適切な取引を行うことができる。そのため、本発明は畜産業界・流通業界に貢献することができる。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 4 】

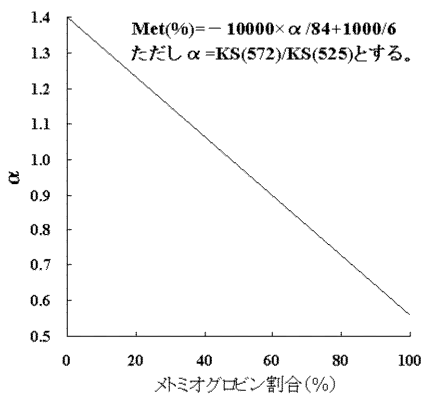
【 図 1 】 肉中のメトミオグロビン割合 (%) と、反射分光分析法によって求めた試料のKS値 (KS(572)/KS(525)) との関係を示す。

【 図 2 】 通常展示条件下 ( 4℃、蛍光灯下 ) での各筋肉部位におけるメトミオグロビン割合 (%) の経時的変化を示す。図中、LL は腰最長筋、LT は胸最長筋、ST は半腱様筋、SM は半膜様筋、PM は大腰筋、GM は中殿筋を示す。

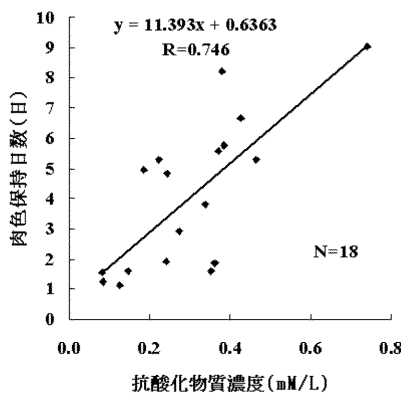
【 図 3 】 通常展示条件下における肉色保持日数 (メトミオグロビン割合が 30% に達するまでの日数) と、牛肉中の抗酸化物質含量との関係を示す。

20

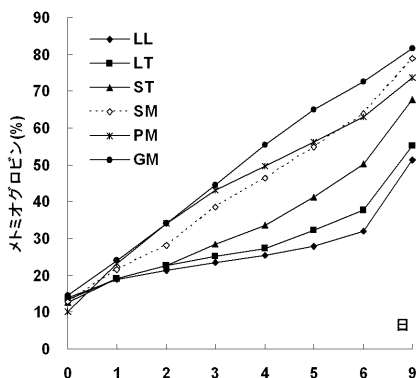
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 柴田 昌宏  
島根県大田市川合町吉永60 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター 畜産草地部内
- (72)発明者 相川 勝弘  
島根県大田市川合町吉永60 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター 畜産草地部内
- (72)発明者 安藤 貞  
島根県大田市川合町吉永60 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 近畿中国四国農業研究センター 畜産草地部内

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開2002-078455(JP,A)  
特開2001-175797(JP,A)  
特開2003-083883(JP,A)  
特開2003-121351(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/12  
G01N 33/48-33/98  
JSTPlus(JDreamII)