

論文

牛肉の軟化に及ぼすワインの影響

三橋 富子^{※1}・森下 円^{※2}・小嶋絵梨花^{※2}

The Effects of Wine on the Tenderness and Histological Structure of Cooked Meat

Tomiko MITSUHASHI^{※1}, Madoka MORISHITA^{※2}, and Erika KOJIMA^{※2}

ABSTRACT

Marinating in wine has been used as a mean of reducing toughness of cooked meat. So, the effects of wine on the tenderness and histological structure of cooked beef was examined using white and red wines compared with distilled water.

Physical properties measured by rheometer and penetrometer, suggested that cooked beef marinating in white wine was the most tender, and the next in red wine followed by in distilled water. The structures of endomysium and perimysium of cooked beef muscle marinating in white and red wine were looked thinner and more fragile compared with those in distilled water. The low pH values in marinating in white and red wines (pH 4.65 and 4.71 respectively) caused higher water holding capacity and solubilization ratio of collagen than in distilled water (pH 5.79). So, it is thought that these two factors have contributed to reducing toughness of cooked beef. And, the SDS-PAGE bands' patterns did not differ among three kinds of beef muscle so that hydrolysis of myofibrillar proteins could not be considered.

1. 目的

牛肉は加熱して食されることが多いが、肉タンパク質の熱変性により、生肉に比べ加熱肉のほうが硬くなる。食肉の硬さを決めているのは、筋線維とそれらを包んでいる各種の膜である結合組織ならびにそれらの膜中に存在する脂肪組織である。脂質は加熱すると溶け、また筋上膜は調理する前に除去されるので、実質的には筋線維を構成している筋原線維タンパク質および筋周膜と筋内膜を作っている肉基質タンパク質の量と質が硬さに影響する。肉タンパク質は加熱によりいずれも硬化するが、筋漿タンパク質は球状の水溶性タンパク質であるため影響は少なく、40~60°C加熱時の硬化は筋原線維タンパク質の熱変性によるものである。70~80°Cのさらなる硬化は肉基質タンパク質の熱変性によるもので、筋肉の収縮と脱水を伴うため影響が大きいことが知られ

ている。80°C以上での湿式長時間加熱では肉の軟化が見られるが、これは肉基質タンパク質のコラーゲン線維は60°C前後から変性が始まり、強い収縮を起こすが、収縮と同時にコラーゲン線維の可溶性（低分子化）が起きるため、筋線維を束ねている筋周膜や筋内膜の一部が溶け肉がほぐれやすくなるためであると考えられている。

肉を柔らかく調理する一番身近な方法は、筋線維を切断するように薄く切り分けたり、筋切りをしたり、あるいはひき肉にするなどの物理的（機械的）軟化方法である。肉を柔らかく調理できるとして近年広く行われるようになった真空調理は、1970年代後半にフランスでフォアグラのテリーヌのクッキンググロスを少なくするために開発された調理法であるが、肉類においては水分の損失が多くなる70°Cより低い温度で長時間加熱が行われるため、やわらかく

※1 日本大学短期大学部（三島校舎）教授 Junior College (Mishima Campus), Nihon University, Professor

※2 日本大学短期大学部専攻科食物栄養専攻・卒業生 Advanced Course of Food and Nutrition, Junior College (Mishima Campus), Nihon University, Former Student

ジューシーに仕上がるということが知られている。このほか肉の軟化に与える調味料の影響については、酢油に浸漬するマリネ肉の軟化機構が詳細に検討されているが、酢につけることによる酸性条件下で起こる保水性の回復、コラーゲンの溶解および筋肉内プロテアーゼの関与などがその要因と考えられている¹⁾²⁾。フランス料理のcock・オーヴァンやブッフ・ブルギニョンは、鶏肉や牛肉を赤ワインに一晩漬け込んでから煮込むことで、柔らかく風味豊かに仕上がるのであるが、このワインによる軟化も前述の酢油によるマリネとほぼ同様の機構と考えられている。しかしながら、赤ワインと白ワインの効果に関して相反する報告もなされている。Okudaら³⁾は、牛肉を用いてワインの調理効果を調べたところ、白ワインよりも赤ワインの方が肉の軟化に効果的に働いたことを報告している。これは、赤ワイン中のポリフェノールおそらくタンニンの効果であろうと報告している。また、Megaら⁴⁾は、Okudaらとは異なり、赤ワインのタンニンが筋線維を収縮しているため、赤ワインに比べ、白ワインの方が肉の軟化作用が大きいのではないかと報告している。

そこで、本研究ではワインの牛肉の軟化に及ぼす影響について赤、白ワインを用いてその効果について検討することを目的とした。

2. 方法

2.1 加熱肉の調製法

牛もも肉(乳用牛・国産)を試料肉とし、肉の筋線維の方向を確認して、3 cm×3 cm×3 cmの立方体に切り分け、各肉片の重量(W_0)を測定した。肉片5個をパックに入れ、蒸留水100mlを加えて脱気、密封し、4℃で20時間保持した。その後95℃の湯浴中で1時間加熱し、加熱後は密封パック中の浸漬液の体積と、各加熱肉の重量(W_1)を測定した。浸漬液は20分間冷却遠心分離(15000×g)して得た上澄みを凍結保存した。蒸留水と同様に赤ワイン(SUNTORY Delica Maison)および、白ワイン(SUNTORY Delica Maison)も各100mlを、各5個の肉片に加えて漬けこみおよび加熱を実施した。

2.2 pHの測定

加熱前後の浸漬液のpHはガラス電極pHメーター((株)堀場製作所 カスタニーLAB)にて測定した。

2.3 加熱肉の物性の測定

2.3.1 レオメーターによる硬さの測定

加熱肉の上下を筋線維に平行に薄く切りとって形を整えてから、径2 cmの円筒型になるように切断し、レオメーター(FUDOH NRM-2010J-CW)の破断試験を用いて測定した。測定条件は、プランジャー：進入弾性丸棒φ5を用い、レンジ：10kg、テスト速度：6 cm/minで、筋線維の方向に対して直角に圧縮して測定を行った。サンプルは各溶液につき5個ずつ測定し、平均値を求めた。

2.3.2 針入度計による硬さの測定

針入度計(針入管重量=50.036g)で、加熱肉の筋線維に直角に針を落として測定した。肉表面の筋でないところを選定して、その直上に針をおき、5秒間の針入度を測定した。1個体につき5ヶ所測定し平均値を求めた。

2.4 保水性の測定

浸漬前の肉重量を W_0 、加熱後の肉重量を W_1 とし、下記の計算式より加熱後の肉重量の変化率を算出して保水性の指標とした。加熱後の肉重量が多いほど放水が少なく、保水性が高いものと考えた。

$$\text{保水性} = W_1 / W_0 \times 100 (\%)$$

2.5 可溶化したコラーゲンの定量

冷却遠心分離(15000×g)して不溶物を除去した加熱終了後の浸漬液中のヒドロキシプロリン量をWossener法⁵⁾を用いて測定した。検量線は、L-ヒドロキシプロリン溶液0~0.5μg/mlを用いた。定量したヒドロキシプロリン量は下記の式にて、肉1gから浸漬液に溶出したコラーゲン量とした。

$$\text{コラーゲン} (\mu\text{g/g}) = \text{ヒドロキシプロリン量} (\mu\text{g/ml}) \times 10\text{ml} / 0.5\text{ml} (\text{希釈倍率}) \times \text{浸漬液} (\text{ml}) \times 8.72$$

なお、8.72はOkuyamaらの報文⁶⁾の牛肉のヒドロキシプロリン含量からコラーゲン量への換算係数である。

2.6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

2.6.1 泳動サンプルの調製法

加熱肉0.2gをホモジナイザーカップに入れ、可溶化液(5%SDS,0.1%-2-メルカプトエタノール,20mM-リン酸buffer-pH7.0)を5.8ml加えホモジズした。ビーカーに移し変え一晩室温で攪拌を続け、可溶化した。遠心分離して不溶物を除き、上澄み液0.4mlに蒸留水0.6ml加えて希釈したサンプル溶液に、トラッキ

ングダイ (30mM Tris-HCl-pH8.0、0.3mM EDTA、3% SDS、30%グリセロール、0.001%ピロニンY) を0.5ml、2-メトキシエタノール0.1mlを加え、60°Cで20分加熱した。サンプルは使用時まで凍結保存(-85°C)した。使用時に60°Cで20分間加熱して用いた。

2.6.2 電気泳動方法

電気泳動はMini-PROTEANcell (日本バイオラッドラボラトリー株) を用い12.5%分離ゲルで行った。サンプルロード量は20 μ lで、ミニスラブゲル1枚当たり10mAで5時間行った。染色液 (0.1%コージーブリリアントブルー、40%エタノール、7%酢酸) で一昼夜染色し、脱色液 (40%エタノール、7%酢酸) で脱色した。

2.7 組織観察

生および加熱肉片を10%中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した後薄切した。スライド標本は、脱パラフィン後にシリウスレッドを用いたエラスチカワンギーソン染色法⁷⁾で染色を行った。

2.8 実験結果の検定方法

実験結果の差の検定はt検定および、一元配置の分散分析で行い、多重比較はTukey HSD検定 (統計用ソフト SPSS使用) で行った。

3. 実験結果および考察

3.1 pHの変化

赤ワインと白ワインは図1に示したように、ほぼpHの等しいワインを選定したため、浸漬前のpHは各々3.21、3.1であった。各浸漬液は加熱前の100mlに比べ、40ml前後の増加を示しており、加熱肉からの肉汁の放出による増加と考えられた。20時間の浸漬、およびそれに続く95°Cで1時間加熱後のpHは、赤ワイン4.71、白ワイン4.65で両者とも1.5程度の上昇を示した。肉汁の放出によりpHが上昇したものと考えられる。蒸留水はもとのpHが5.6とほぼ肉の極限pHと同程度であったものが、pH5.79とわずかに上昇した。加熱肉は熟成後の牛肉であるため、肉汁のpHは極限pHにより少し回復し、上昇しているものと考えられた。

3.2 保水性

重量変化率を図2に示した。浸漬加熱後の肉重量は加熱前の蒸留水58.9%、赤ワイン63.2%、白ワイン63.9%であった。標準偏差が大きいため有意差は認められなかったが、蒸留水の重量変化率が一番大

きく、ついで赤ワイン、白ワインであることを示していた。つまり放出肉汁量がこの順に多いことを意味している。このことは図1の浸漬液の変化からも示唆されている。pHの変化において、もし仮に浸漬加熱後の浸漬液のpHが肉中のpHと平衡に達していると考えれば、赤ワイン、白ワインの4.65~4.71に比べ、蒸留水は5.79と筋原線維タンパク質の半量以上を占めるミオシンの等電点5.4に近いので保水性が低いと考えられる。このことから、ワインで漬け込んだ方が保水性が高い傾向にあることがわかった。

3.3 物性の測定

3.3.1 レオメーターによる破断強度の測定

蒸留水に浸漬した加熱肉は、明確な破断曲線のパターンを示すものが多かったが、ワイン浸漬加熱肉は明瞭な破断点が判別しにくかった。そのため破断曲線の変形と応力が比例関係にある最大の変形の時(10mm)の応力で比較してみた。その結果を図3に示した。肉の個体差が大きかったため、有意差は認められなかったが、蒸留水2055g、赤ワイン1737g、ついで白ワイン1593gの順に軟らかい傾向にあることがわかった。また、典型的な破断曲線のパターンを図4 (横軸はプランジャーの侵入距離cm、縦軸は応力g) で示しておいたが、この図からわかるように、蒸留水は明瞭な破断パターンを示し、もろさもはっきりとでていたが、赤ワイン、白ワインはブスブス…とプランジャーがガタガタしながら圧縮しており、明らかに物性が異なっていることが示唆されていた。

3.3.2 針入度

針入度についても有意差は示されなかったが、蒸留水4.5mm、赤ワイン5.2mm、白ワイン5.6mmの順に針入度が大きくなっており、この順に軟らかくなる傾向にあることがわかった。(図5)

3.4 コラーゲンの可溶化

結果を図6に示した。可溶化したコラーゲン量は、肉1g当たり蒸留水2195 μ g、赤ワイン3107 μ g、白ワイン3410 μ gであった。標準偏差が大きいため有意差は認められなかったが、蒸留水、赤ワイン、白ワインの順にコラーゲンの可溶化が多い傾向にあることがわかった。筋線維を包み束ねているコラーゲンが可溶化されたため、この順で肉がほぐれやすく、軟らかくなっていることが示唆された。

3.5 加熱肉の電気泳動

加熱肉を可溶化した全筋のタンパク質パターンを図7に示した。図から明らかなように三者のタンパク質泳動パターンに差はみられず、すべてのタンパク質が同一であることがわかった。つまり、各タンパク質の加水分解等による差異は認められなかった。マリネ肉においては妻鹿らの報告¹⁾にあるように、低pH域 (pH4.0程度) におくことで筋肉内カテプシン群 (プロテアーゼ) の活性化により、筋原線維タンパク質のミオシン主鎖の分解がおこり150,000dalton成分が生じていることも肉の軟化につながっていることが明らかにされている。しかしながら、ワイン浸漬による低pH下、つまりpH4.6~4.7程度では、筋原線維タンパク質の分解は生じていないことがわかった。

3.6 組織観察

組織観察で得られた結果を表1、写真を写真1~写真8に示した。未加熱肉 (写真1、2) の筋内膜および筋周膜 (赤く染色された部分) は細く、ネット状にはりめぐらされていた。筋内膜と細胞実質部の間や、筋周膜のまわりに明瞭な空間がみられた。蒸留水浸漬加熱肉 (写真3、4) は、筋周膜が膨潤して膨らんでおり、はっきりと染色されていた。また筋内膜も未加熱肉に比べて膨潤して太く明瞭に染色されていた。赤ワイン浸漬加熱肉 (写真5、6) は、筋周膜は一部剥離が生じており、蒸留水浸漬加熱肉に比べて細くもろい印象を与えていた。また、筋細胞はところどころに亀裂が生じていた。白ワイン浸漬加熱肉 (写真7、8) は、赤ワインよりもさらに筋周膜の剥離と消失が多く認められ、矢印部 (→) のような筋周膜の染まり部位の減少がみられた。しかしながら、筋細胞の亀裂は赤ワインに比べて少なかった。

これらのことから組織観察からも蒸留水、赤ワイン、白ワインの順に組織が脆弱にほどけている様子が推察された。また、筋細胞の亀裂が白ワインより赤ワインの方が多くみられたのは、Megaら⁴⁾の報告にある赤ワインの成分 (タンニン) による筋線維の収縮と関連があるのではないかと考えられた。

以上の結果から有意差は認められなかったものの、保水性、レオメーターによる物性測定、針入度測定、コラーゲンの可溶化において、蒸留水、赤ワイン、白ワイン浸漬加熱肉の順に肉の軟化が大きいことが示唆されており、組織観察からもそのことが裏付け

られていると考えられる。その軟化の要因としては、電気泳動結果より筋原線維タンパク質の加水分解は考えられず、低pH域での保水性の増大と肉基質タンパク質、コラーゲンの可溶化の寄与が大きいものと考えられた。

4. まとめ

牛肉は加熱して食されることが多いが、生肉と比べ加熱肉のほうが硬くなるので、軟らかく調理する方法が工夫されている。牛肉を加熱するときワインを添加すると、肉が柔らかくなったり風味が向上したりするといわれている。そこで、ワインの牛肉の軟化に及ぼす影響について赤、白ワインを用いてその効果を検討した。

浸漬前のpHは赤ワイン3.21、白ワイン3.1であった。加熱後のpHは、赤ワイン4.71、白ワイン4.65で両者とも1.5程度の上昇を示した。蒸留水はもとのpHが5.6とほぼ肉の極限pHと同程度であったものが、加熱肉は熟成後の牛肉であるため、肉汁の放出によりpH5.79とわずかに上昇したものと思われる。

保水性は浸漬加熱後の肉重量は加熱前の蒸留水58.9%、赤ワイン63.2%、白ワイン63.9%となり、ワインで漬けた方が保水性が高い傾向にあることがわかった。

レオメーターの破断応力は、蒸留水2055g、赤ワイン1737g、ついで白ワイン1593gの順に軟らかい傾向にあることがわかった。また、蒸留水は明瞭な破断パターンを示し、もろさもはっきりとでていたが、赤ワイン、白ワインはプランジャーがガタガタしながら圧縮しており、明らかに物性が異なっていることが示唆されていた。針入度についても蒸留水4.5mm、赤ワイン5.2mm、白ワイン5.6mmの順に軟らかくなる傾向にあることがわかった。

可溶化したコラーゲン量は、肉1g当たり蒸留水2195 μ g、赤ワイン3107 μ g、白ワイン3410 μ gであった。筋線維を包み束ねているコラーゲンが可溶化されたため、この順で肉がほぐれやすく、軟らかくなっていることが示唆された。

電気泳動については、三者の泳動パターンに差はみられず、ワイン浸漬による低pH域程度では、筋原線維タンパク質の分解が生じていないことがわかった。

組織観察では、未加熱肉の筋内膜および、筋周膜は細かった。蒸留水浸漬加熱肉は、筋周膜、筋内膜とも膨潤して膨らんでおり、赤ワイン、白ワイン浸漬加熱肉は、筋周膜は一部剥離しており、蒸留水に

比べて細くもろい印象を与えていた。

以上の結果から蒸留水、赤ワイン、白ワイン浸漬加熱肉の順に肉の軟化が大きいことが示唆されており、その軟化の要因としては、電気泳動結果より筋原線維タンパク質の加水分解は考えられず、低pH域での保水性の増大と肉基質タンパク質、コラーゲンの可溶化の寄与が大きいものと考えられた。

5. 参考文献

- 1) 妻鹿 絢子、藤木 澄子、細見 博子：食肉のマリネに関する研究－筋原線維蛋白質の分解を中心として－調理科学13（3） pp.197-202 (1980)
- 2) 妻鹿 絢子：食肉コラーゲンに及ぼすマリネ処理の影響 山梨大学教育学部研究報告 33 pp.161-164 (1982)
- 3) Kazuko Okuda, Ryuzo Ueda : Comparison of the Effects of White and Red Wines on Beef Round Texture J.Home Econ.Jpn.Vol.44 No.12 pp.1007-1020 (1993)
- 4) Ayako Mega, Tomiko Mitsuhashi, Mariko Tajima : The Influence of Wine components on the tenderness and histological Structure of cooked meat 50th ICoMST proceeding p.208 (2004)
- 5) Woessner J. F., Jr.:The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of This Imino Acid ARCHIVES of BIOCHEMISTRY and BIOPHYSICS 93, pp.400-447 (1961)
- 6) Okuyama N., Akabori S., Kaneko T., and Narita K.: Measurement method of each amino acid in chemistry of protein 1. Amino acid and peptide 共立出版Tokyo, pp.310-313 (1969)
- 7) 佐野 豊：組織学研究法 理論と術式 南山堂 pp.161-206 (1965)

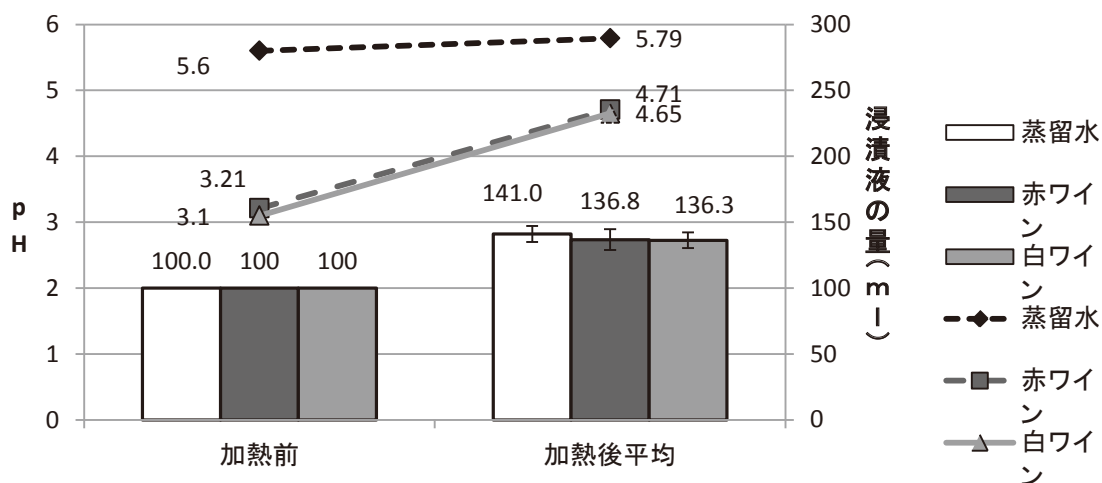


図1 phと浸漬液の変化

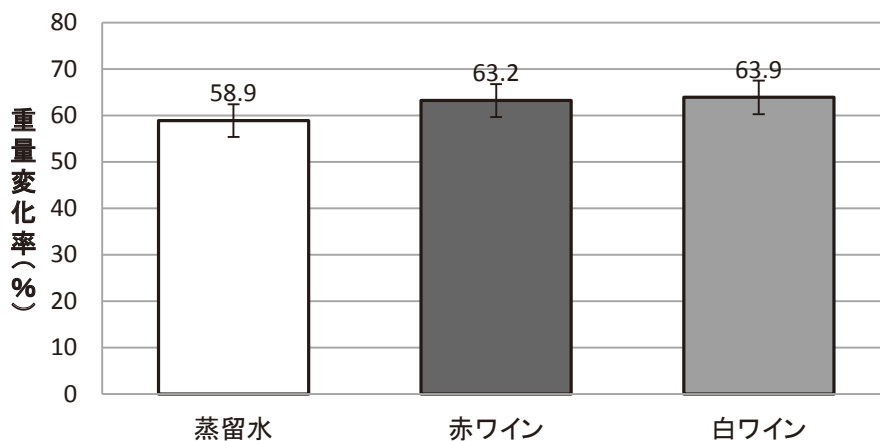


図2 重量変化率

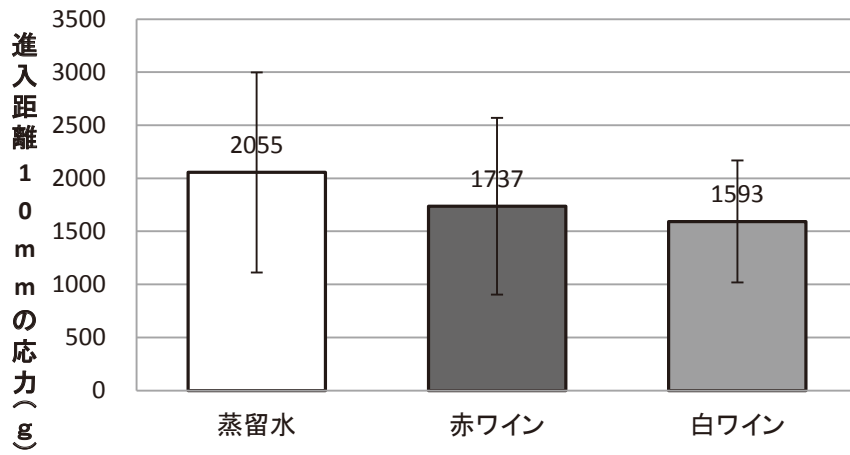


図3 レオメーターによる破断強度

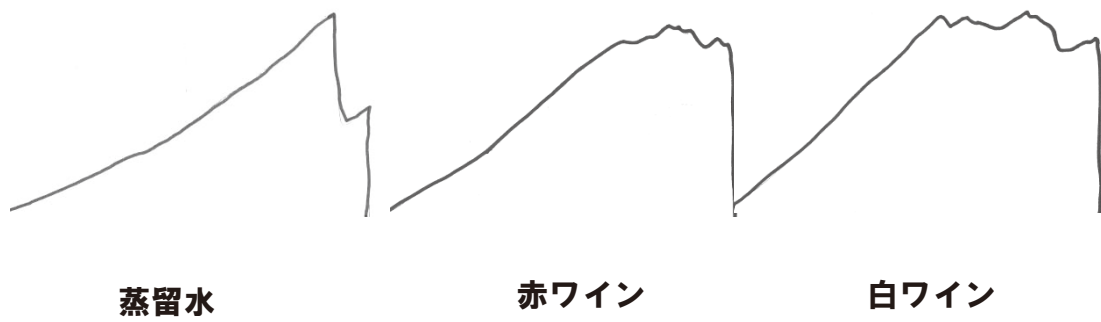


図4 レオメーターによる破断強度の曲線パターン

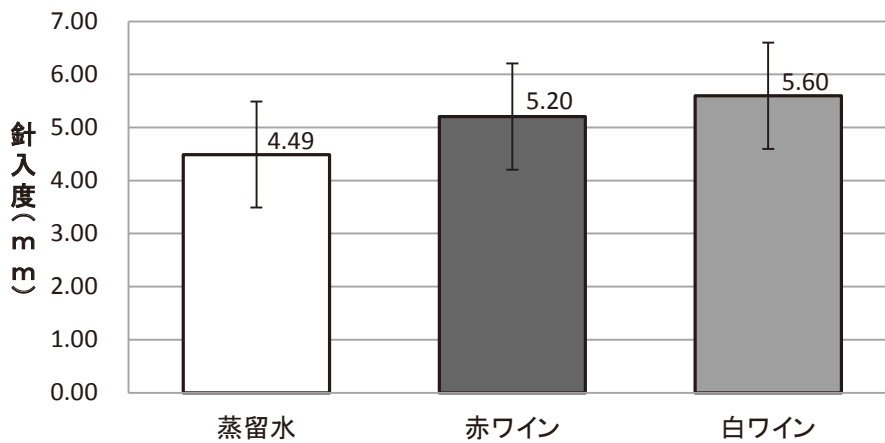


図5 針入度

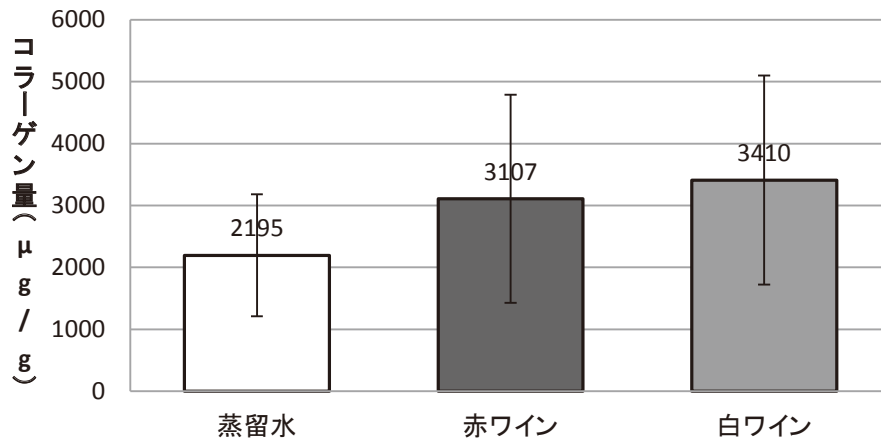


図6 可溶化したコラーゲン量

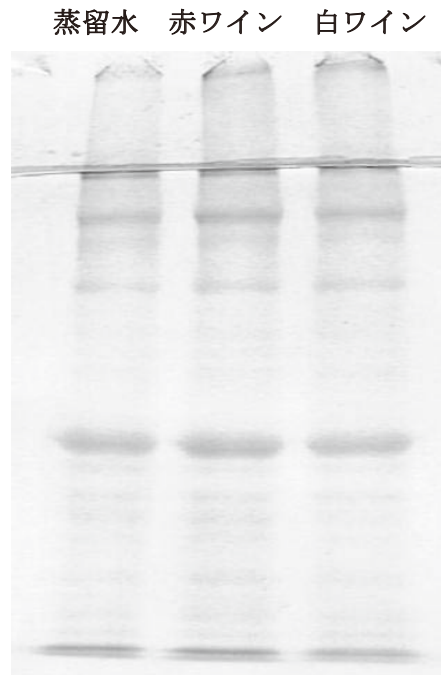


図7 SDS-ポリアクリルアミドによる電気泳動パターン

表1 組織観察について

	筋内膜			筋周膜		
蒸留水	赤ワイン	白ワイン	蒸留水	赤ワイン	白ワイン	
一部分離	一部剥離	一部剥離	一部分離	一部剥離	一部剥離	

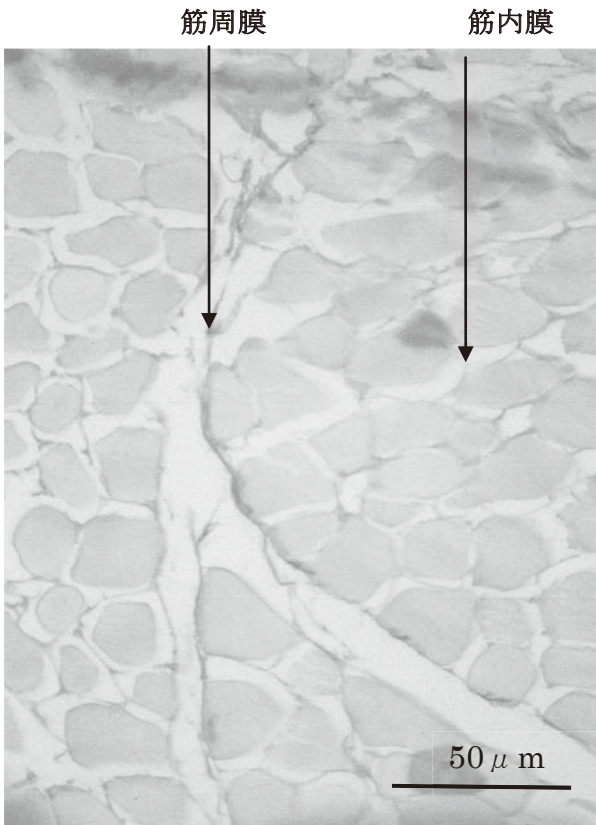


写真1 未加熱肉 (1)

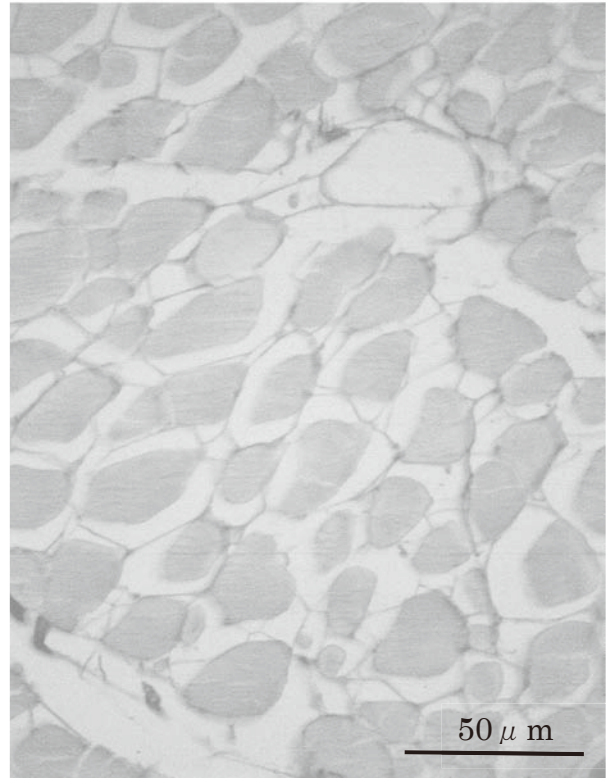


写真2 未加熱肉 (2)

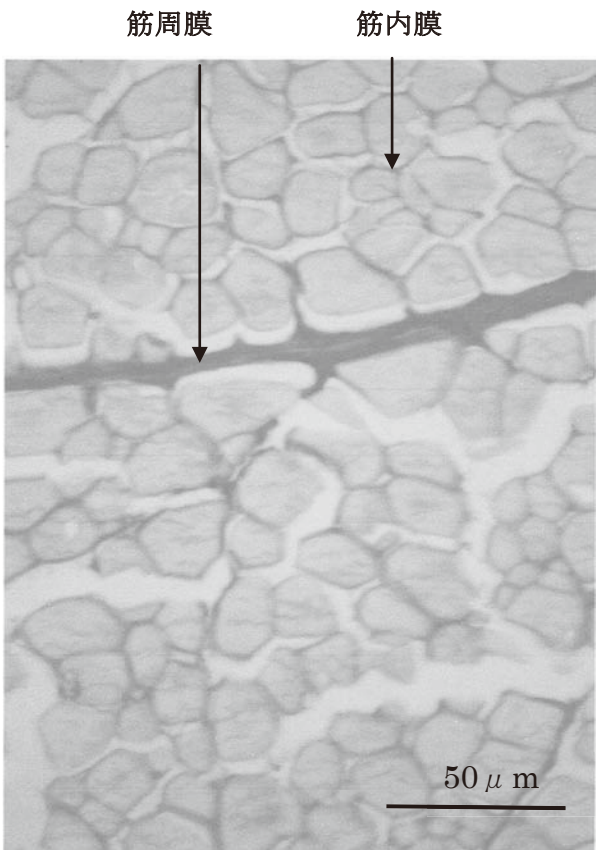


写真3 蒸留水 (1)

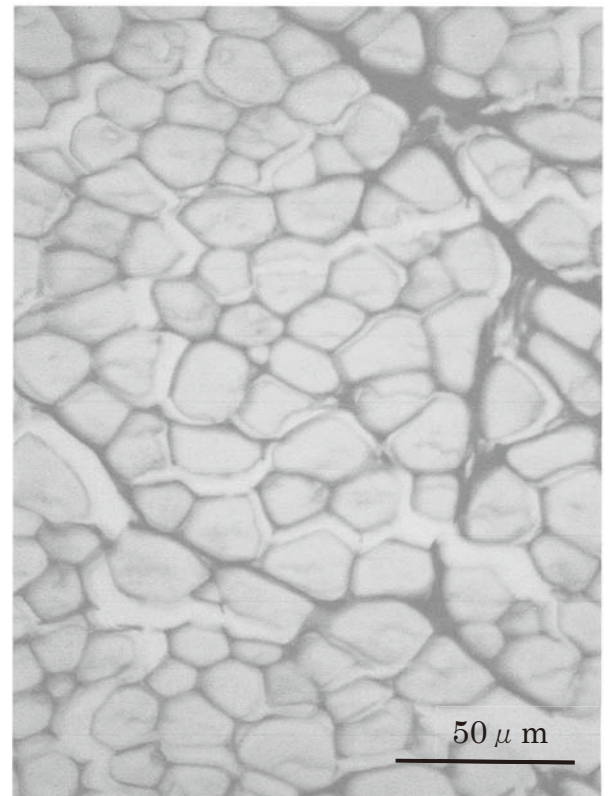


写真4 蒸留水 (2)

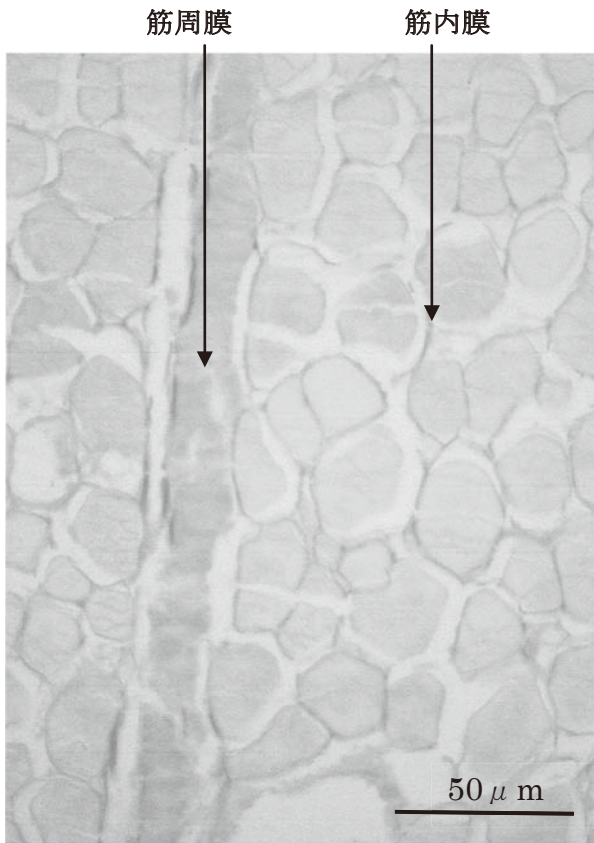


写真5 赤ワイン (1)

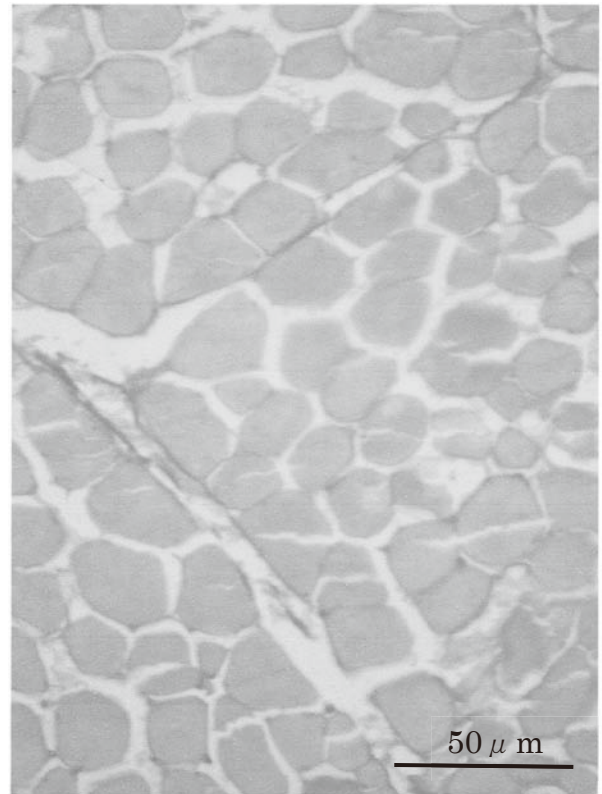


写真6 赤ワイン (2)

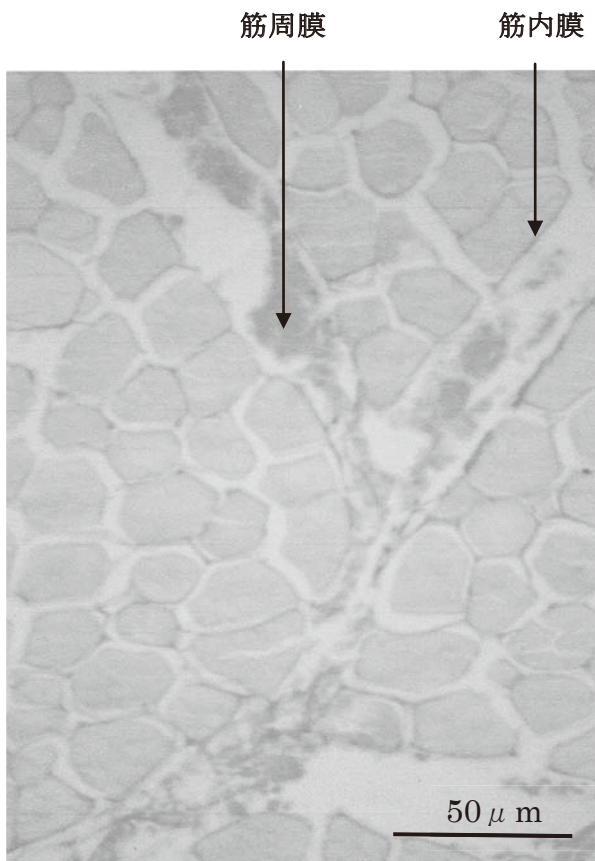


写真7 白ワイン (1)

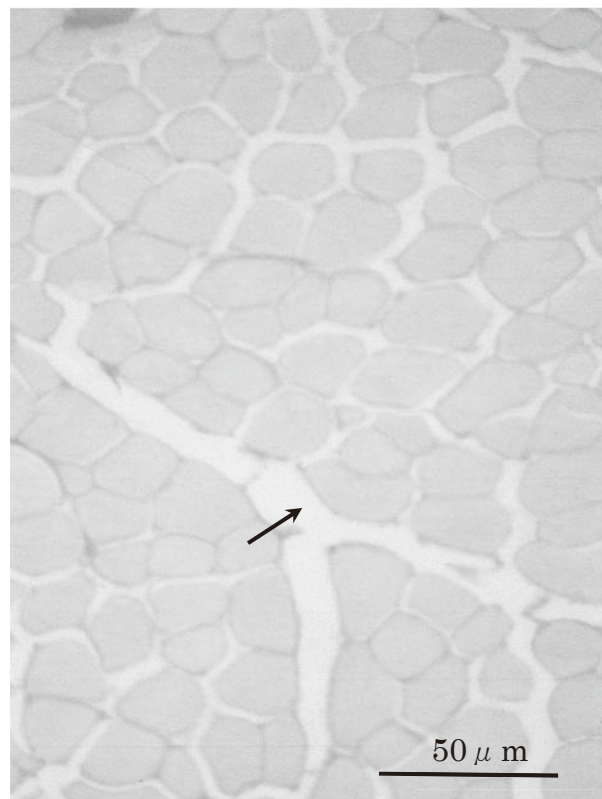


写真8 白ワイン (2)