

Application Note

No. 86

食品

UV-Vis、GC-MS、マイクロ波乾燥式水分計、 食肉脂質測定装置による和牛ブランド指標探索

西村 雅美¹、海野 結実²、中川 裕貴²、松本 恵子²、引地 恭平³、馬場 将希⁴



Food

■ 要旨

鳥取和牛61頭の牛肉をガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ™8040 NX）、紫外可視分光光度計（UV-1280）、食肉脂質測定装置、マイクロ波乾燥式水分計、目視評価を行い多角的に評価し、ブランド指標となりえる成分を探索しました。検出された603の項目を基にeMSTAT Solution™によりU検定、ANOVA、PLS-DA、SVM、ランダムフォレストを用いて統合解析を行いました。本稿では、血統別や農家別で差異のある検査項目を検出した事例についてご紹介します。

1. はじめに

和牛とは日本国内で生産された国産牛のなかでも、黒毛和種、褐毛和種、無角和種、日本短角種の4種類に限定されており、純血個体であることが定められています。同じ在来種でも黒毛和種は小柄で脂肪が多い霜降り状の肉、褐毛和種は程よい脂肪交雑と赤身のバランスがとれた健康志向の牛肉、無角和種は噛み応えがある牛肉、日本短角種は赤身が多く脂肪が少ない高蛋白な牛肉など品種間で肉質に差異があることが知られ、嗜好や調理法に合わせ販売されています。

和牛は国内で消費されるだけでなく、高級食材として海外でも人気が高く、過去10年で輸出数量は約9倍に増加し今後も増加傾向が継続することが予測されます（図1）。

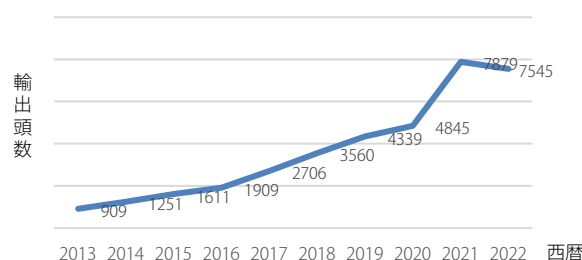


図1 和牛輸出数量実績（出典：財務省「貿易統計」¹⁾）

しかし和牛は各国で定義が異なり、例えば最大輸出先の米国では和牛の定義が純血個体ではなく和牛由来の遺伝子が50%以上ある牛を和牛として販売することが可能です。米国和牛協会の調べによると、現在、テキサス州、ニューメキシコ州、オレゴン州、アイダホ州など全米でおよそ4万頭の和牛由来の牛が飼育されていますが、アンガス牛などとの交雑が進んでいるため純血種はそのうち5千頭未満とされています²⁾。純血種が単価の低い交雑種と海外市場で競合するためには「日本産和牛」と一括りにするのではなく、県や産地、血統別のブランドを構築することが対策のひとつと考えられます。

産地別ブランドを品評するため5年に一度開催される和牛の全国大会「第11回全国和牛能力共進会」では黒毛和種である鳥取和牛が第7区の肉牛群において全国1位を獲得しました。鳥取和牛は不飽和脂肪酸のオレイン酸を多く含み脂の融点が低くくちどけが良いことで知られており、1966年度に開催された第1回目の共進会においても肉牛区で初代1等賞を獲得しています。

1 鳥取県畜産試験場
2 株式会社島津製作所
3 CEM Japan株式会社
4 株式会社相馬光学

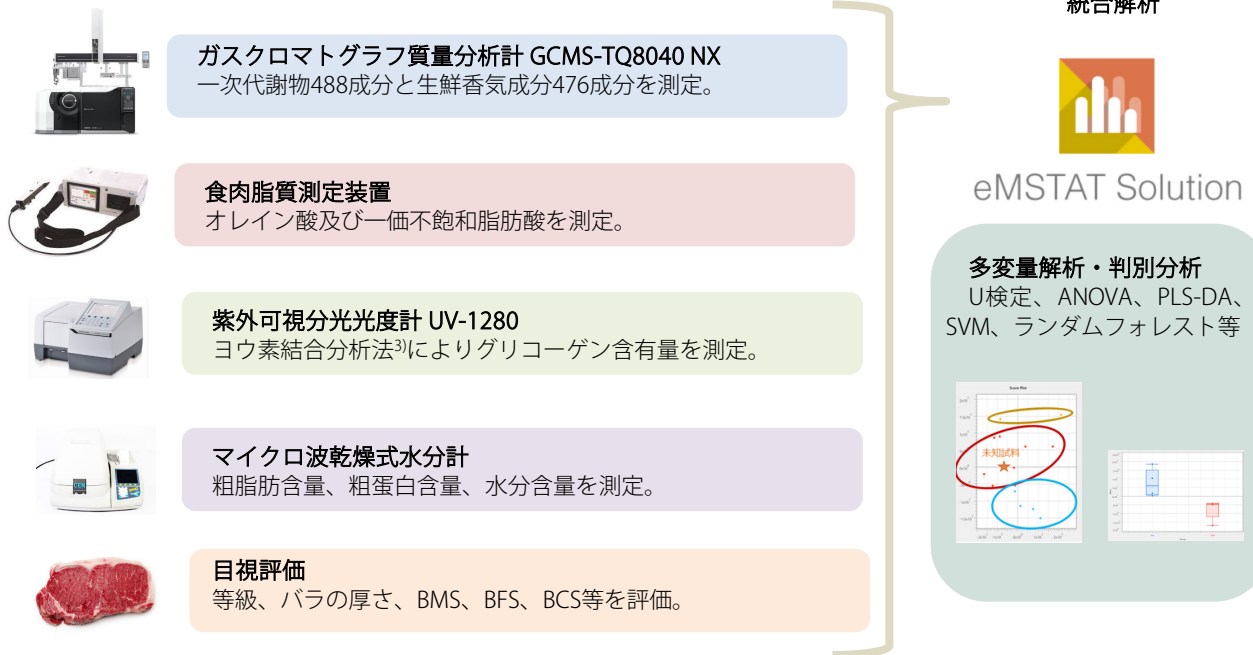


図2 多角的評価に使用した装置と手法

そこで本アプリケーションでは、年間1900頭前後（全国の0.7%）のみ出荷される非常に希少価値の高い鳥取和牛61頭の牛肉をガス کروマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ8040 NX）、紫外可視分光光度計（UV-1280）、食肉脂質測定装置（株式会社相馬光学）、マイクロ波乾燥式水分計（CEM Japan株式会社）を用いて多角的に評価し、（公社）日本食肉格付協会の格付員による牛枝肉格付情報（目視評価）を併せて、eMSTAT Solutionにより農家別や血統別でブランド指標となりえる成分を探索しました（図2）。

2. 測定方法

牛肉を多角的に評価するために、以下に示す5つの装置や手法を用いて合計603の説明変数を得ました。

- 1) GCMS-TQ8040 NXとSmart Metabolites Database™ Ver.2を用いて有機酸、糖、核酸、脂肪酸、アミノ酸などの一次代謝物488成分を測定しました。またSmart Aroma Database™を用いてSPME Arrow[®]により40℃での生鮮香気成分476成分を測定しました。399成分の一次代謝物と170成分の生鮮香気成分が検出されました。
- 2) 食肉脂質測定装置によりオレイン酸と一価不飽和脂肪酸を測定しました。測定部位は（公社）日本食肉格付協会の牛枝肉取引規格の適用条件である枝肉の第6から7肋骨間切断面の筋間脂肪を測定しました。オレイン酸は鳥取和牛のブランド指標として採用されており、オレイン酸含有量が55%以上、かつブランド条件を満たした鳥取和牛は「鳥取和牛オレイン55」として認定されています。
- 3) UV-1280を用いて、ヨウ素結合分析法³⁾によりグリコーゲン含有量を測定しました。グリコーゲンは動物でんぷんの一つで無味無臭ですが、熟成過程で糖類などに分解され和牛のうまみの強さに関与する成分することが知られており、官能評価試験で「うまみの強さ」と高い相関関係が確認されています⁴⁾。
- 4) マイクロ波乾燥式水分計を用いて粗脂肪含量、粗蛋白含量、水分含量を測定しました。粗脂肪含量は水分含量実測値からの予測値ですが、従来法との高い精度が確認された数値です。水分含量は水分補正後グリコーゲン値を補正する数値として使用されます。

- 5) （公社）日本食肉格付協会の格付員が目視で牛肉の色（BCS：Beef Color Standard）、脂肪交雑の度合い（BMS：Beef Marbling Standard）、肉の脂肪色（BFS：Beef Fat Standard）を評価し、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪の厚さ、歩留等級、肉質等級などについても評価しました。

3. ANOVAによる肥育農家5軒の差異評価

同じ産地でも肥育農家により素牛選定能力（血統、資質）、飼育密度、飼料の質量や給餌方法などの肥育技術に違いがあり、生産される牛肉の特徴が異なることが知られています⁵⁾。肉質が非常に良い鳥取和牛のなかで検出された肥育農家間の差異（特徴のある成分）は、オレイン酸のように将来のブランド指標成分になる可能性があります。

肥育農家5軒の差異を検出するために、eMSTAT Solutionに搭載されているANOVA（分散分析）を実施しました。2群比較で用いられるt検定とは異なり、ANOVAは3群以上の平均値の有意差を検出することができます。ANOVAのp値が小さいほど統計的に有意な差があると考えられます。

ここでは、保有している血統や性別の違いに関係なく肥育農家5軒で生産された牛肉を比較しました。ここで比較した牛肉は同じ産地であることから603検査項目中492（例：グリコーゲン水分補正值）は統計的に差が無く、残り111項目（約18%）は統計的に有意な差があることが確認されました。（図3、図4）。

UV-1280とマイクロ波乾燥式水分計：
グリコーゲン水分補正（p値 40%）

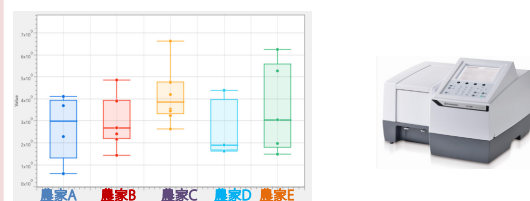


図3 統計的に有意な差異がない検査項目（箱ひげ図）

統計的に有意な差異が確認された検査項目の例を図5に示します。アミノ酸のグルタミン酸は食品中のうまみ成分として知られていますが、エネルギー源としても重要な役割を果たします。またオレイン酸はくちどけの良さに関与する成分として知られています。肥育農家Cは他の肥育農家と比べ、グルタミン酸やオレイン酸の含有量の高い牛肉を生産していることが分かります。また生鮮香り成分として重要な役割を持つ成分Linaloolは肥育農家B、D、Eで高く検出されました。バラの厚さでは農家Aが最も高い結果になりました。このようにそれぞれの農家で特徴的な項目を検出することができました。

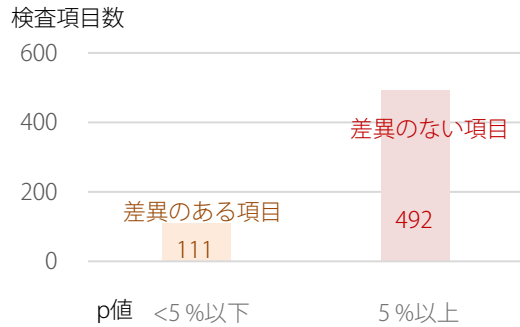
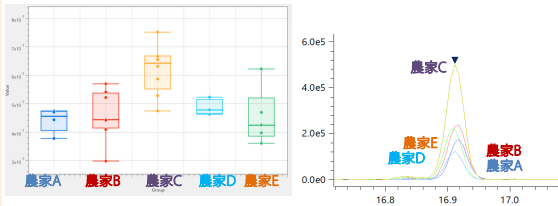
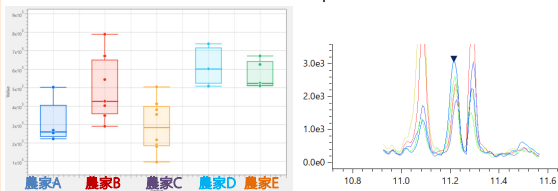


図4 ANOVA解析によるp値結果概要

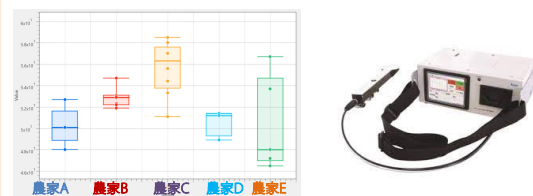
GC/MS 液体注入：
うまみ成分 グルタミン酸 (p値 0.4%)



GC/MS SPME：
フローラル調の香り Linalool (p値 0.3%)



食肉脂質測定装置：
くちどけの良さ オレイン酸 (p値 0.3%)



目視評価：
バラの厚み (p値 0.3%)

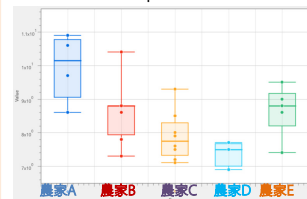


図5 統計的に有意な差異がある (p値5%以下) 検査項目 (箱ひげ図)

4. U検定によるグリコーゲン由来成分評価

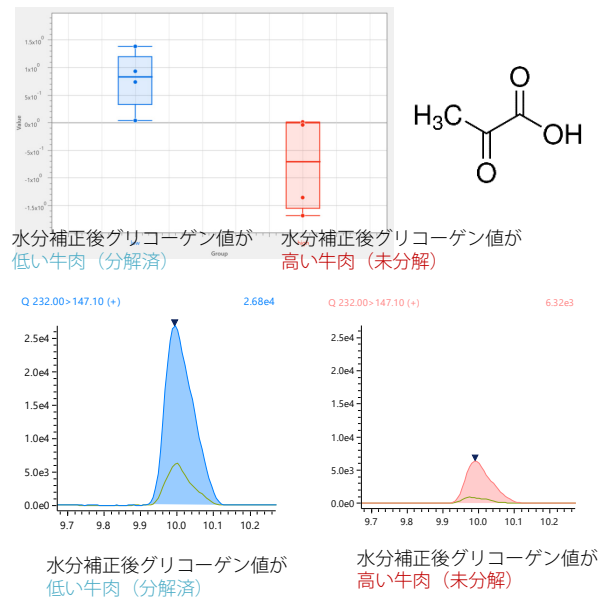
グリコーゲンとは、多数のα-D-グルコース分子がグリコシド結合によって重合した高分子で動物でんぷんとも呼ばれます。牛肉に含まれるグリコーゲンは屠畜後嫌気的な代謝により分解されて乳酸となり牛肉のpHを低下させます。グリコーゲンが分解されpHが低下した牛肉は保水性が低いため硬い触感になります。

水分補正後グリコーゲン含有量と一次代謝物や生鮮香り成分の関係を調べるために、水分補正後グリコーゲン含有量の高い (6.5以上) 牛肉 (n=4) と低い (1.5以下) 牛肉 (n=4) をU検定により2群比較しました。

U検定はt検定と同じように2群の試料間差異を検出するための統計手法ですが、t検定は母集団が正規分布の場合使用され、U検定は母集団が正規分布しているか不明の場合に使用されます。水分補正されたグリコーゲン含有量が母集団で正規分布しているか不明なので、U検定を採用しました。

乳酸のU検定値は0.69と算出され、統計的な差異は確認できませんでしたが、同じくグリコーゲンの分解物であるピルビン酸は統計的に有意な差が確認されました (図6)。

一次代謝物：ピルビン酸 (U検定値 0.029)



生鮮香り成分：2-アセチルピリジン (U検定値 0.029)

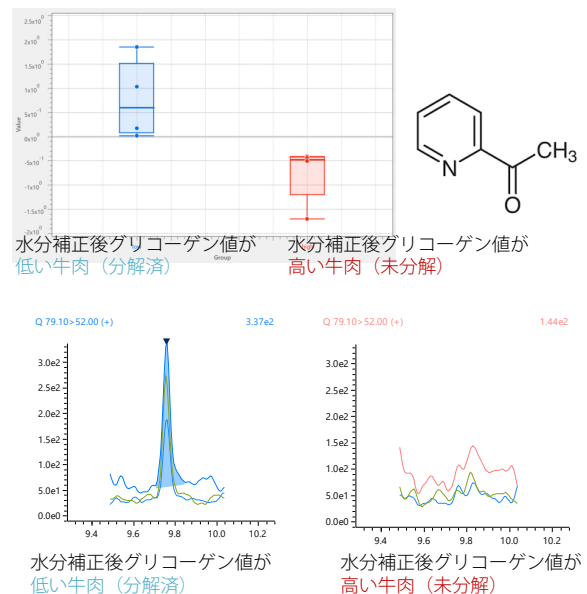


図6 グリコーゲン由来成分のU検定結果 (箱ひげ図、MRMクロマトグラム)

また、プロリンとグリコーゲンの分解物であるグルコースにより生成される香気成分2-アセチルピリジンで統計的に有意な差が確認されました(図6)。

ピルビン酸と2-アセチルピリジンのどちらもグリコーゲン含有量が低い牛肉で高く検出されており、グリコーゲンの分解が進んだ、または元のグリコーゲン含量が低かった可能性が示唆されました。

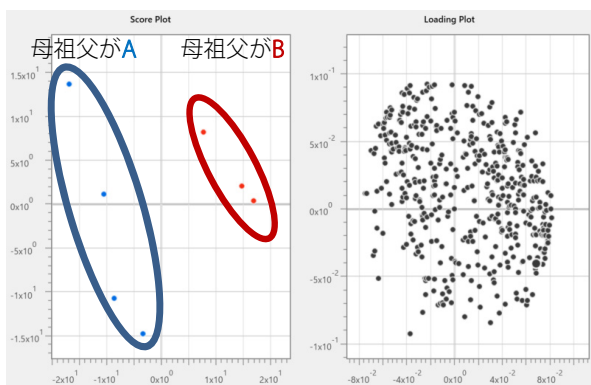
5. PLS-DAによる血統2種の特性評価

日本の和牛は分娩届により個体識別番号が付与され、登記検査(書類確認、鼻紋による個体確認等)のうえ個体識別番号で登記されることにより血統情報等が保管されています。血統と代謝物の関係性を示す例として、1966年に開催された第1回全国和牛能力共進会の肉牛区で一等賞を獲得した鳥取和牛「気高号」の血統が強いほどオレイン酸含有量が高くなる傾向があり口溶けが良いとされています。

そこで、父が同じで母の父が異なる試料2群(n=4とn=3)をPLS-DAで解析しました(図7)。PLS-DAは多重共線性が生じる場合やデータにノイズが含まれる際に利用され、2群比較を行う統計手法です。PCAではデータの分散のみが最大化されますが、PLS-DAでは目的変数とデータの関連度が最大化されるため、PCAで分離できない試料群でも2群に限り分離できる可能性があります。

t検定で5%以下である検査項目では、母の父がAの血統で特徴的な6項目(例:ヒポタウリン)と母の父がBで特徴的な32項目(例:2-エチルフラン)が検出されました。

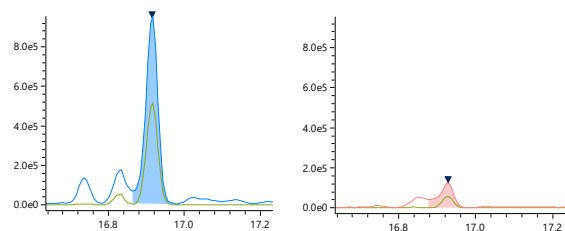
父親は同じ



母祖父がAで含有量の高い成分例

うまみ成分に影響を及ぼすヒポタウリン⁶⁾

Q 188.10>73.00 (+) 9.55e5 Q 188.10>73.00 (+) 1.23e5



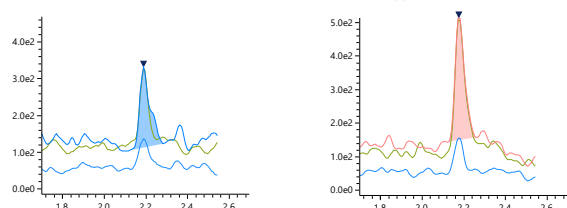
母祖父がA

母祖父がB

母祖父がBで含有量の高い成分例

甘い匂いの2-エチルフラン

Q 96.10>81.00 (+) 3.31e2 Q 96.10>81.00 (+) 5.14e2



母祖父がA

母祖父がB

図7 PLS-DAによる血統特性解析

6. SVMによる肉質等級判別モデル

牛肉は歩留(ぶどまり)等級と肉質等級により格付けされます。歩留等級はA、B、Cの3等級に分かれており歩留基準値(ロース芯面積、ばらの厚さ等から算出される値)が大きいほど等級が高く(A>B>C)なります。また肉質等級は脂肪交雑(霜降の度合い)、肉の色沢、肉の締まり、および、きめなどを目視で判定したもので5段階に区分されます。

歩留等級Aに格付けされた56試料を肉質等級が5等級の45試料と4等級の11試料に分け、サポートベクトルマシン(SVM)により回帰モデルを作成しました。判別モデル作成時に使用されていないA4とA5の未知試料を判別した際、スコア100で判別ができました(図8)。

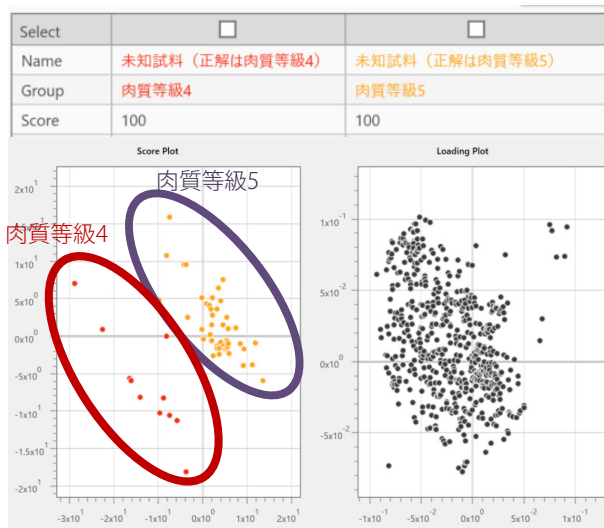


図8 SVM回帰モデルによる未知試料の肉質等級判別結果

7. ランダムフォレストによる農家判別モデル

A5等級の牛肉を生産する肥育農家3軒の13試料を用いてランダムフォレスト(RF)により判別モデルを作成しました。

SVMが2群判別で用いられることに対し、ランダムフォレストは2群以上の判別が可能な統計手法です。ランダムフォレストは説明変数(検査項目数)が多い本実験のような際でも過学習を避け、堅牢な学習や評価ができる手法です。作成した判別モデルを用いて未知試料(正解は農家2)を判別したところ、「農家2」であることを高いスコア(70)で判別できました(図10)。判別分析は以下のリノール酸のように、p値の小さい化合物が活用されました(図9、11)。

判別分析に用いた一次代謝物の面積値はIS補正されたものを使用しましたので、クロマトグラムで得られた面積値をIS補正された数値が箱ひげ図に示されています(図11)。

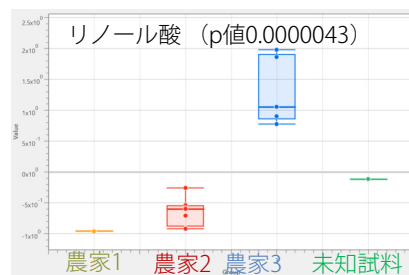


図9 RF回帰モデルに使用した化合物例

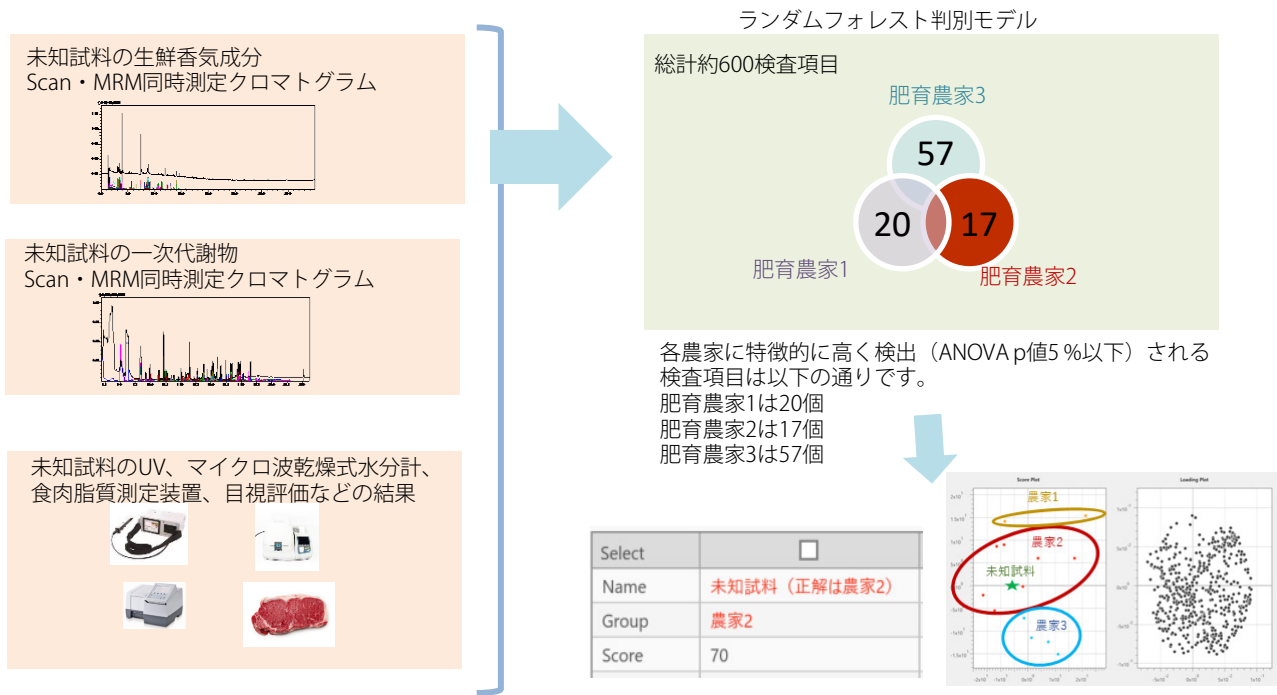


図10 RF回帰モデルによる未知試料の農家判別結果

一次代謝物
コレステロールを下げるリノール酸 (p値0.0000043)

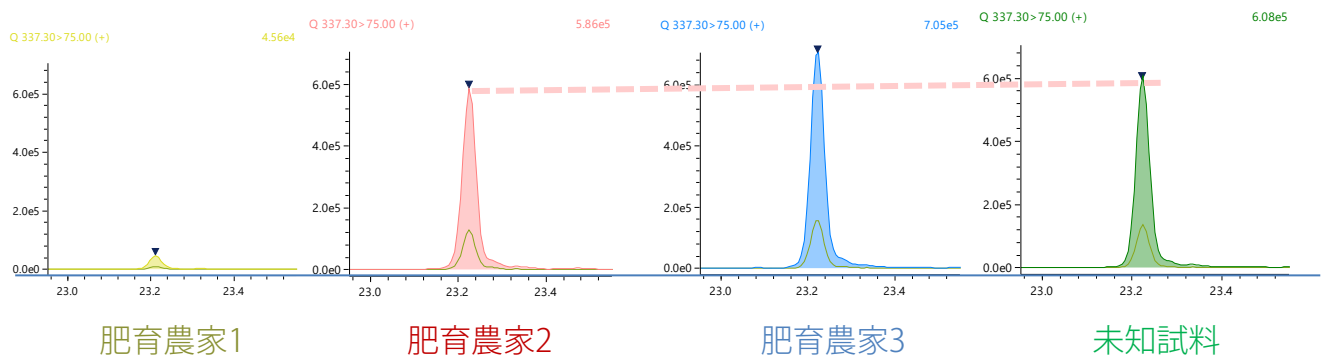
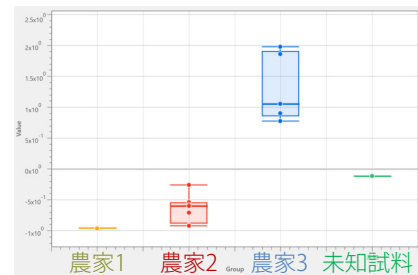
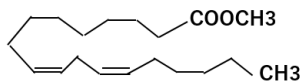


図11 RF回帰モデルによる未知試料判別であった有用な化合物例

8. まとめ

本報では、鳥取和牛61頭の牛肉をガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ8040 NX）、紫外可視分光光度計（UV-1280）、食肉脂質測定装置、マイクロ波乾燥式水分計、目視評価で多角的に評価し、ブランド指標となりえる成分を探索しました。検出された603の項目を基に、eMSTAT SolutionによりU検定、ANOVA、PLS-DA、SVM、ランダムフォレストを用いて統合解析を行いました。その結果、血統別や農家別で差異のある検査項目を検出することができました。

<参考文献>

- 1) 2023年5月の輸出実績（概要）、2023年7月18日アクセス、LiveStock Japan、<http://jlec-pr.jp/wp-content/uploads/2023/06/2305-Beef-Export-Data-4.pdf>
- 2) 和牛大国 米国で続く「和牛」人気、50年で独自進化？ すし・和食と違う「流行の秘訣」、2023年7月18日アクセス、<https://www.sbbt.jp/article/cont1/117799>
- 3) Dreiling CE, Brown DE, Casale L, Kelly L. 1987. Muscle glycogen : Comparison of iodine binding and enzyme digestion assays and application to meat samples. Meat Science 20, 167-177
- 4) 鳥取県和牛振興計画、2023年7月18日アクセス、<https://www.pref.tottori.lg.jp/secure/1248365/tottorikenwagyu-shinkoukeikaku.pdf>
- 5) 鳥取県水産部>とつとりの農業>畜産試験場>試験研究結果>肥育、2023年7月18日アクセス、<https://www.pref.tottori.lg.jp/72250.htm>
- 6) Sensory Properties and Main Differential Metabolites Influencing the Taste Quality of Dry-Cured Beef during Processing、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8870990/>

<関連アプリケーション>

1. Smart Metabolites Database™とSmart Aroma Database™を用いた代替食品開発に資する成分データ解析-
Application News No. 01-00401-JP
https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/applications/application_note/17491/an_01-00401-jp.pdf

GCMS-TQ、Smart Metabolites Database、Smart Aroma Database、eMSTAT Solutionは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2024年3月

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。
掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。