

機関番号：32669

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：H21～H22

課題番号：21780135

研究課題名 (和文) 低加圧二酸化炭素マイクロ・ナノバブル法の殺菌機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of microbicidal mechanism of carbon dioxide micro- and nano-bubbles at a lower pressure

研究代表者

小林 史幸 (KOBAYASHI FUMIYUKI)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部食品科学科・助教

研究者番号：50460001

研究成果の概要 (和文)：本研究では低加圧二酸化炭素マイクロ・ナノバブル(MNB-CO₂)法の殺菌機構の解析 (研究1) およびMNB-CO₂法による日本酒の殺菌および酵素失活 (研究2) の2つのテーマについて行った。研究1では、MNB-CO₂処理による酵母の細胞破裂のような現象は認められなかったが、細胞内基質の細胞外への漏出を確認した。研究2では、MNB-CO₂処理により生酒を処理したところ、日本酒中の火落菌は検出不可能となり、酵素についてもα-アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼを完全に失活した。

研究成果の概要 (英文)：Microbicidal mechanism of carbon dioxide micro- and nano-bubbles at a lower pressure (MNB-CO₂) were investigated and *Hiochi* bacteria and enzymes in unpasteurized sake were inactivated by the MNB-CO₂. There were no phenomena that *Sachharomyces cerevisiae* cells were burst by the MNB-CO₂, although the leakage of intracellular matrix was observed. *Hiochi* bacteria in unpasteurized sake could not be detected and α-amylase, glucoamylase and acid carboxypeptidase be completely inactivated by the MNB-CO₂.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	2,200,000	660,000	2,860,000
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：加圧二酸化炭素、食品、マイクロバブル、殺菌、酵素失活

1. 研究開始当初の背景

超臨界二酸化炭素を用いた常温食品殺菌(以下、SC-CO₂殺菌)に関する研究は加熱殺菌の代替法として広く行われてきたが、SC-CO₂自体が香气成分を抽出してしまい食品の香りを変性させることや、通常 25 MPa 以上の圧力が必要とされるため装置コストが高くなることなどからいまだに実用化されてい

ない。そこで、既製の部材が使用できる低加圧(2 MPa 以下)下で CO₂供給の発想を全く変え、通常の CO₂ガスを使用するとともに、新たにマイクロ・ナノバブル発生器を組み込んだ低加圧二酸化炭素マイクロ・ナノバブル(MNB-CO₂)法を構築し(Fig. 1)、これまでに数種の細菌に対する殺菌効果について確認した。一方、SC-CO₂殺菌は約 60 年前から研究

が行われているが、明確な殺菌機構については未だに明らかにされていない。その殺菌機構については、大きく分けて以下の2つの仮説が存在する。

1. SC-CO₂による微生物殺菌は加圧下でCO₂が微生物細胞内へ受動拡散的に浸透した後、大気圧まで減圧される際に浸透したCO₂が膨張することにより微生物細胞が破裂もしくは損傷することによる(Louka *et al.*, 1999; Bertoloni *et al.*, 2006)。
2. SC-CO₂による微生物殺菌は微生物細胞内に浸透したCO₂が細胞内pHを低下させ、細胞内タンパク質を変性させるなどの生理学的変化による(Daniels *et al.*, 1985; Haas *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 2005)。

これまでのSC-CO₂殺菌は超臨界状態の高圧CO₂が用いられているため処理圧力が高くなり、細胞に与える圧力の影響が大きく、明確な殺菌機構を提案することができなかった。しかしながら、MNB-CO₂法は処理圧力が2 MPa以下とSC-CO₂殺菌と比べて極めて低い圧力条件で殺菌可能であるため、今までもより明確な殺菌機構を提案することが期待できる。また、日本酒、ビール、ワインなどの酒類は酵母・火落菌の殺菌および酵素失活のために60~65°Cで火入れ(熱処理)が行われているが、その熱により生酒本来のフレッシュでフルーティーな香味が損なわれる。酒類の微生物による変敗は限外ろ過や精密ろ過により防止可能であるが、ろ過自体が味の変化を伴うことや品質劣化の原因となる酵素を除去できないことが問題となっている。

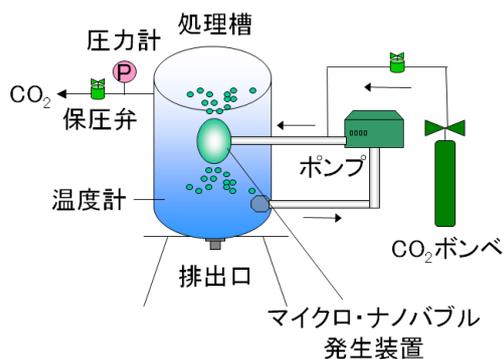


Fig. 1 MNB-CO₂ 処理装置の概略図

2. 研究の目的

本研究はMNB-CO₂法の殺菌機構の解析(研究1)およびMNB-CO₂法による日本酒の殺菌および酵素失活(研究2)の2つのテーマについて行う。研究1では上記に述べた2つの殺菌機構の仮説についてより明確に解析し、研

究2ではバッチ処理での基礎的な実験を行うことで、実用化に向けた連続処理のための基礎データを得る。

3. 研究の方法

研究1 MNB-CO₂法の殺菌機構の解析

(1)形態観察および細胞損傷の確認

供試試料: 供試菌株として、SC-CO₂殺菌において多数の報告がある*S. cerevisiae*を用い、生理食塩水中に1.0×10⁵ CFU/mlとなるように懸濁したモデル溶液を使用した。

MNB-CO₂処理装置および処理条件: MNB-CO₂処理はFig.2に示す2槽方式MNB-CO₂処理装置を使用して行った。内容量15 lの低温混合槽に挿入した12 lの試料を各処理温度まで冷却し、バルブIIから低温混合槽のヘッドスペース部分にCO₂を各処理圧力に達するまで供給した。MNB化したCO₂は循環ポンプ(帝国電機製作所製)により試料を15 l/minで循環させ、バルブIIIを開き、CO₂を循環ポンプの出口付近から供給し、試料とCO₂の混合流体をMNB発生装置BT-50(バブルタンク社製)に通過させることにより発生させた。試料中のMNB量が飽和に至るまで発生させた後(約5 min)、バルブIVを開き、試料を加圧ポンプ(日本精密科学製)で加温処理コイル(内容量170 ml)に連続的に供給した。滞留時間は加圧ポンプの流速を変更することによって設定した。低温混合槽の処理条件は温度が10°Cおよび20°C、圧力が1.0 MPa、CO₂供給量が2.0 l/minで行った。加温処理コイルの処理条件は温度が40°C、圧力が2.0 MPaで行った。

形態観察: MNB-CO₂処理前後の*S. cerevisiae*細胞を用い、走査型電子顕微鏡により観察した。

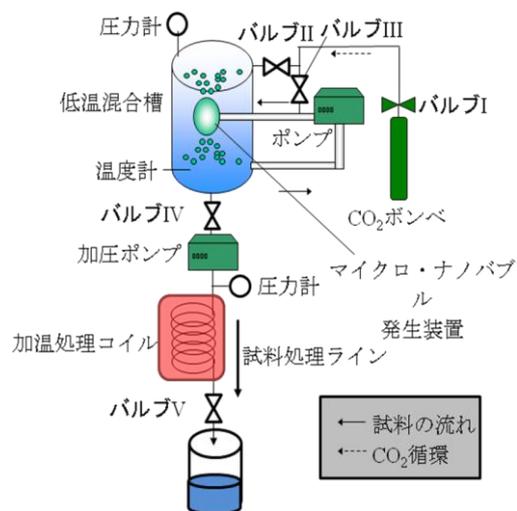


Fig. 2 2槽方式 MNB-CO₂ 処理装置の概略図

(2)細胞内から流出した成分の分析
 供試試料：(1)と同様のモデル溶液を用いた。
 MNB-CO₂ 処理装置および処理条件：(1)と同様の装置を使用した。低温混合槽の処理条件は温度が 20℃、圧力が 1.0 MPa、CO₂ 供給量が 2.0 l/min で行った。加温処理コイルの処理条件は温度が 40℃、圧力が 2.0 MPa で行った。
 漏出物質の測定：MNB-CO₂ 処理前後の *S. cerevisiae* をろ過し、上清の吸光度を 260nm および 280nm で測定した。

研究 2 MNB-CO₂ 法による日本酒の殺菌および酵素失活

(1)火落菌に対する殺菌効果および酵素失活効果の検討

供試生酒：熊澤酒造株式会社より購入した生酒(品名：湘南しぼりたて生原酒)に殺菌効果実験と同様に培養した火落菌(*Lactobacillus fructivorans* s36)を 1.0×10⁵ CFU/ml となるように添加した。

MNB-CO₂ 処理装置および処理条件：MNB-CO₂ 処理は Fig.2 に示す装置を若干変更して行った。すなわち、加温処理コイル通過後の生酒からの香气成分の揮散を防ぐため、加温処理コイルの後に冷却コイル(内容量 170ml、温度 0℃±1℃)を設けた(Fig. 3)。低温混合槽の処理条件は温度が 10℃、圧力が 2.0 MPa、CO₂ 供給量が 2.0 l/min で行った。加温処理コイルの処理条件は温度が 45℃および 50℃、圧力が 4.0 MPa で行った。

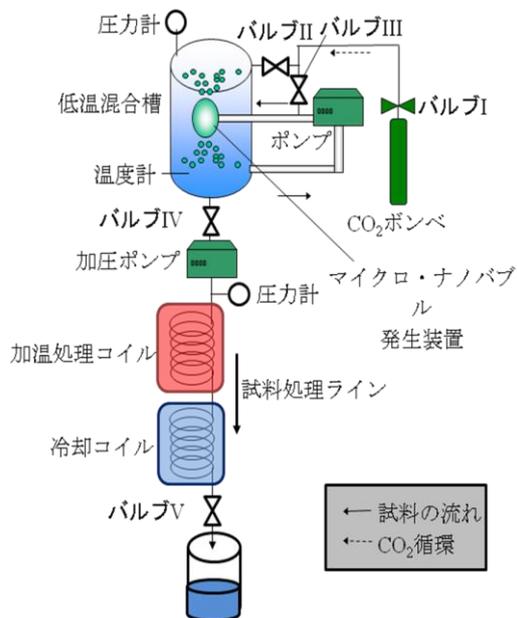


Fig. 3 生酒処理用に変更した 2 槽方式 MNB-CO₂ 処理装置の概略図

生菌数の測定：処理前後の生酒中の火落菌の生菌数は滅菌シャーレ内で溶解した SI 寒天培地(日本醸造協会)と 1 ml の希釈生酒を混合し、30℃で 10 日間培養後に形成したコロニー数を測定することによって行った。

残存酵素活性の測定：処理前後の生酒中のグルコアミラーゼおよび α-グルコシダーゼの残存活性は糖化力測定キット(キッコーマン株式会社製)を使用して行った。また、酸性カルボキシペプチダーゼおよび α-アミラーゼの残存活性は酸性カルボキシペプチダーゼ活性測定キットおよび α-アミラーゼ活性測定キット(いずれもキッコーマン株式会社製)を使用して測定した。酵素の残存活性は未処理酵素の活性に対する相対活性として百分率(%)で表示した。

実験は全て 3 反復行い、データは 3 反復の平均値と標準誤差である。

(2)酒類の品質(味、香りなど)への影響

香气成分の分析：生酒中の香气成分の抽出は Porapak Q カラム濃縮法を用いて行った。すなわち、処理前後の 30 ml の試料水を 20 ml の Porapak Q (polydivinylbenzene, 50-80 mesh, Waters Co., Ltd., Milford, MA)が充填されたガラスカラム(2 cm×10 cm)に流して Porapak Q に香气成分を吸着させた後、100 ml の蒸留水でカラム内を洗浄し、次いで香气成分を 100 ml のジエチルエーテル(和光純薬工業株式会社)で溶出させた。その溶出液に内部標準物質として 100 μl の 100 ppm シクロヘキサノール溶液(片山化学工業株式会社)を添加し、無水硫酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社)で一晩脱水後、窒素ガスを用いて約 4 ml まで濃縮し、ガスクロマトグラフィー質量分析計(Shimadzu GC-2010、島津製作所)により定量した。結果は未処理生酒を 100%として示した。

官能評価：MNB-CO₂ および加熱処理(65℃)後酒ならびに生酒の香りおよび味について 5 段階の評価基準(4：非常に良い、3：良い、2：どちらともいえない、1：悪い、0：非常に悪い)に基づいて行った。パネルは明治大学農学部野菜園芸学研究室ならびにアグリサイエンス研究室的の大学院生および大学生 22 人。

4. 研究成果

研究 1 MNB-CO₂ 法の殺菌機構の解析

(1)形態観察および細胞損傷の確認

MNB-CO₂ 処理の *S. cerevisiae* に対する殺菌効果について Fig. 4 に示す。 *S. cerevisiae* は MNB-CO₂ 処理により 30 分後に検出限界以下まで減少した。そのため、MNB-CO₂ により 30 分処理した *S. cerevisiae* 細胞を走査型電子顕微鏡により観察したところ、破裂像のような細胞損傷は確認されなかった。

(2)細胞内から流出した成分の分析

MNB-CO₂ 処理した *S. cerevisiae* 細胞からの漏出物質について Fig. 5 に示す。吸光度 260 nm および 280 nm 共に処理時間 20 分まで直線的に上昇し、そのまま一定であった。細胞外漏出物量と殺菌効果(Fig. 4)を比較すると、MNB-CO₂ 処理 20 分において *S. cerevisiae* の生菌数は 4 オーダー以上減少しており、細胞外漏出物量との相関性が認められた。

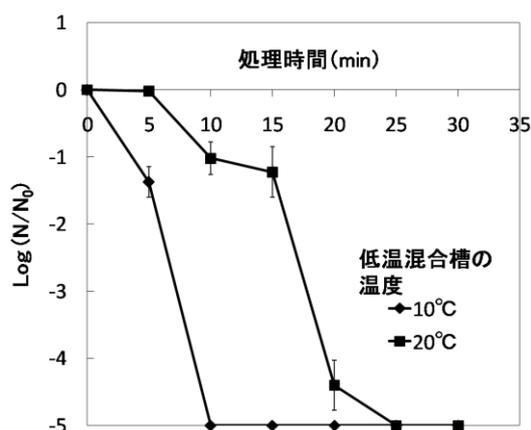


Fig. 4 MNB-CO₂ 処理による *S. cerevisiae* の殺菌における低温混合槽の温度の影響

MNB-CO₂ 処理条件

低温混合槽：温度 10 および 20°C、
圧力 1.0 MPa

加温処理コイル：温度 40°C、圧力 2.0 MPa

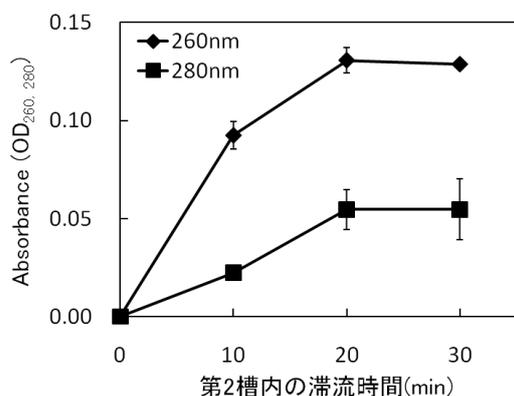


Fig. 5 MNB-CO₂ 処理した *S. cerevisiae* 細胞からの漏出物質

MNB-CO₂ 処理条件

低温混合槽：温度 20°C、圧力 1.0 MPa

加温処理コイル：温度 40°C、圧力 2.0 MPa

研究 2 MNB-CO₂ 法による日本酒の殺菌および酵素失活

(1)火落菌に対する殺菌効果および酵素失活効果の検討

MNB-CO₂ 処理による火落菌に対する殺菌効果を Table 1 に示す。加温処理コイルの温度 45°C および 50°C において、生酒中の生存火落菌数は処理時間 10 min で検出不可能となり、MNB-CO₂ 処理は生酒中の火落菌殺菌に対して極めて効果的であった。

MNB-CO₂ 処理による生酒中の各種酵素に対する影響について、加温処理コイルの温度 45°C および 50°C の結果を Table 2 および 3 にそれぞれ示す。加温処理コイルの温度 45°C および 50°C において、α-アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼは処理時間 10 min で完全に失活した。一方、α-グルコシダーゼ活性は処理時間 30 min において 45°C で 29.1%、50°C で 1.3% 程度残存した。しかしながら、通常生酒の火入れは 2 回行われていることから、加温処理コイルの温度 45°C においても MNB-CO₂ 処理を 2 回行うことにより (10 min 処理を 2 回)、相対残存活性は 13.4% まで低下した。

Table 1 MNB-CO₂ 処理前後の生酒中の火落菌数

処理時間 (min)	火落菌数 (CFU/ml)			
	0	10	20	30
45°C ^a	1.0×10 ⁵	0.0 ^b	0.0	0.0
50°C ^a	1.0×10 ⁵	0.0	0.0	0.0

^a 加温処理コイルの温度

^b 検出限界値 1.0 CFU/ml

MNB-CO₂ 処理条件

低温混合槽：温度 10°C、圧力 2.0 MPa

加温処理コイル：温度 45°C および 50°C、
圧力 4.0 MPa

Table 2 加温処理コイル 45°C における MNB-CO₂ 処理前後の生酒中の残存酵素活性

処理時間 (min)	相対残存活性 (%)			
	0	10	20	30
GA	100.0	0.0	0.0	0.0
AG (1 回目)	100.0	43.3	33.1	29.1
(2 回目) ^a	37.5	13.4		
AA	100.0	0.0	0.0	0.0
AC	100.0	0.0	0.0	0.0

GA：グルコアミラーゼ、AG：α-グルコシダーゼ、AA：α-アミラーゼ、AC：酸性カルボキシペプチダーゼ。

MNB-CO₂ 処理条件

低温混合槽：温度 10°C、圧力 2.0 MPa

加温処理コイル：温度 45°C、圧力 4.0 MPa

^a 1 回目の MNB-CO₂ 処理 (10 min) 後 1 週間 5°C で貯蔵した酒を処理した。

Table 3 加温処理コイル 50℃における MNB-CO₂ 処理前後の生酒中の残存酵素活性

処理時間(min)	相対残存活性(%)			
	0	10	20	30
GA	100.0	0.0	0.0	0.0
AG	100.0	11.1	1.1	0.8
AA	100.0	0.0	0.0	0.0
AC	100.0	0.0	0.0	0.0

Table 2 と同様。

MNB-CO₂ 処理条件

低温混合槽：温度 10℃、圧力 2.0 MPa

加温処理コイル：温度 45℃、圧力 4.0 MPa

(2)酒類の品質(味、香りなど)への影響

MNB-CO₂ 処理前後の生酒中の吟醸香の分量について Table 4 に示す。イソブチルアルコールおよびイソアミルアルコールは加温処理コイル通過後においてもほとんど減少しなかった。一方、50℃の加温処理コイル通過後の酢酸エチル、酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルの残存量はそれぞれ 79.0%、63.9%および 61.2%となったが、冷却コイルを通過させて回収することによって残存量はそれぞれ 90.1%、83.4%および 80.0%まで上昇し、生酒中の香气成分は加温処理後の生酒を冷却コイルに通過させることによって著しく損失を防止可能であった。

生酒、MNB-CO₂ 処理酒および加熱処理酒の官能評価結果について Fig. 6 に示す。生酒、MNB-CO₂ 処理酒および加熱処理酒の香りのスコアはそれぞれ 2.5、1.8 および 3.0、味のスコアはそれぞれ 2.2、1.6 および 3.0 となり、香り、味共に MNB-CO₂ 処理酒の評価は生酒および加熱処理酒よりも極めて良好な結果であった。MNB-CO₂ 処理酒については多くのパネルから非常に飲みやすいという評価が得られた。

Table 4 MNB-CO₂ 処理前後の生酒中の吟醸香成分

	処理前	相対量(%)		
		45℃	50℃	冷却
EAc	100.0	86.3	78.9	89.0
IBA	100.0	97.4	102.1	100.6
IAAc	100.0	65.0	83.4	83.4
IAA	100.0	92.7	94.5	94.5
EH	100.0	62.2	79.7	79.7

EAc：酢酸エチル、IBA：イソブチルアルコール、IAAc：酢酸イソアミル、IAA：イソアミルアルコール、EH：カプロン酸エチル。

冷却：加温処理コイルを通過した試料を 0℃、4.0 MPa の冷却コイルに通した後、回収した。

MNB-CO₂ 処理条件

低温混合槽：温度 10℃、圧力 2.0 MPa

加温処理コイル：温度 45℃および 50℃、
圧力 4.0 MPa

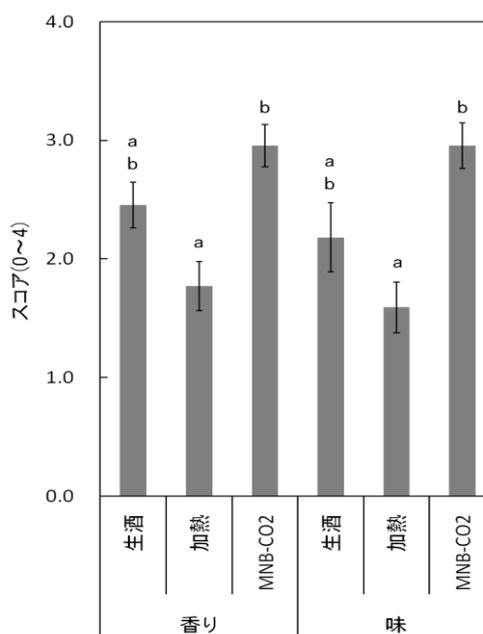


Fig. 6 生酒、MNB-CO₂ 処理酒および加熱処理酒の官能評価

異なる文字は 1%水準において有意差有り

以上の結果から、MNB-CO₂ 処理により効率的な生酒中の火落菌殺菌および酵素失活が可能であった。さらに、冷却コイルを使用して加温処理コイル通過後の生酒を急速に冷却することで香气成分の損失防止が可能であった。しかも、官能的には MNB-CO₂ 処理によって殺菌および酵素失活した酒は生酒および加熱処理酒よりも好まれたことから、MNB-CO₂ 処理は生酒および加熱処理酒よりも非常に飲みやすい酒の製造が可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Fumiyuki Kobayashi, Yasuyoshi Hayata, Hiromi Ikeura, Norio Muto and Yutaka Osajima, Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by CO₂ microbubbles at a lower pressure and near ambient temperature. Transactions of American society of agricultural and biological engineers Vol. 53 • No. 4 • 1217-1222 • 2010.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 小林 史幸、新宮 良治、櫻井 大輝、池浦 博美、小竹 佐知子、早田 保義、低加圧二酸化炭素マイクロ・ナノバブル

法による *Saccharomyces cerevisiae* の殺菌について。日本食品科学工学会第 57 回大会、2010/09/03。

- ② 小林 史幸、早田 保義、菅原 大輔、高富 哲也、松長 正見、谷本 昌太、武藤 徳男、箄島 豊、低加圧二酸化炭素マイクロ・ナノバブル法を用いた生酒中の *Lactobacillus fructivorans* の殺菌について。日本食品科学工学会第 56 回大会、2009/09/11。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：処理方法および処理装置

発明者：早田 保義、小林 史幸

権利者：明治大学

種類：特許

番号：特願 2010-159812

出願年月日：2010/07/14

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 史幸 (KOBAYASHI FUMIYUKI)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部食品科学科・助教

研究者番号：50460001