

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780146

研究課題名（和文） 二酸化炭素マイクロ・ナノバブルによる食品殺菌に関する基礎的研究

研究課題名（英文） A study of food pasteurization by carbon dioxide microbubbles

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）：低加圧二酸化炭素マイクロ・ナノバブル(MNB-CO₂)の芽胞失活効果はほとんど認められなかったが、芽胞をMNB-CO₂処理後に加熱処理を行うことで加熱処理のみよりもD値が短縮した。MNB-CO₂によるビール酵母の殺菌は細胞膜等の損傷ではなく、細胞内に浸透したCO₂による細胞内の酸性化もしくは細胞内基質の変性によることが示唆された。MNB-CO₂により過前のビール内の酵母を完全に殺菌可能であり、各ビールの香気分量は未処理、MNB-CO₂および加熱ビールで大きな違いはなかったが、官能評価によりMNB-CO₂ビールは未処理ビールに近く、加熱ビールよりも良い結果となった。

研究成果の概要（英文）：Bacterial spore could not be almost inactivated by low pressure carbon dioxide microbubbles (MNB-CO₂), although D value in heating after the spores were treated by MNB-CO₂ was shorter than that in only heating. It was suggested that inactivation of beer yeast by MNB-CO₂ was caused by not so much injury of cell membrane as intracellular acidification or denaturation of cellular matrix. The yeast in non-filtration beer could be completely inactivated by MNB-CO₂. Flavor components in non-pasteurized, heat-treated and MNB-CO₂- treated beers were almost same, although taste and flavor of MNB-CO₂-treated beer was similar to those of non-pasteurized beer and better than those of heat-treated beer by sensory evaluation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：マイクロ・ナノバブル、二酸化炭素、細菌、食品、酵素

1. 研究開始当初の背景

SC-CO₂を用いた常温食品殺菌に関する研究は、加熱殺菌の代替法として日本、イタリア、韓国などの国内外の多くの研究者によって盛んに行われてきた(Shimoda *et al.*, 1998; Garcia-Gonzales *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2010)。しかしながら、SC-CO₂自体が香気成分を抽出してしまい食品の香りを変性させること(Gillian *et al.*, 2006; Tanimoto *et al.*, 2007)や、高い殺菌効果を得るために、通常 25 MPa 以上の圧力を必要とするため装置コス

トが高くなることなどから未だに実用化されていない。また、熱や薬剤などに非常に高い抵抗性を示す芽胞に対する SC-CO₂ の殺菌効果についてはいくつかの報告があるが、長い処理時間や高い処理温度・圧力を必要とする(Ballestra *et al.*, 1998; Spilimbergo *et al.*, 2002)。SC-CO₂殺菌の殺菌機構については、「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する(Louka *et al.*, 1999;

Bertoloni *et al.*, 2006)」という物理的変化と「微生物細胞内に浸透した CO₂ が細胞内 pH を低下させ、細胞内タンパク質などを変性させる (Daniels *et al.*, 1985; Haas *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 2005)」という生理的変化の大きく分けて 2 つの仮説が唱えられているが、未だに明らかにはなっていない。

我々は SC-CO₂ 殺菌に関する研究の中で、殺菌効果は溶存 CO₂ 濃度に依存することを報告した (Kobayashi *et al.*, 2007)。そこで、装置コストの低減化を図るため、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 (特願 2007-198650; PCT/JP2008/063156)、数種類の細菌に対する殺菌効果について確認した (Kobayashi *et al.*, 2009; 2010)。さらに、実用化に向けて殺菌効果を高めるため、装置をこれまでのバッチ式から連続的に改良す

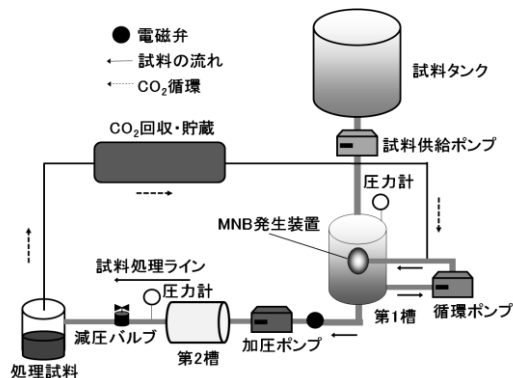


Fig. 1. 連続式 MB-CO₂ 処理装置の概略図。

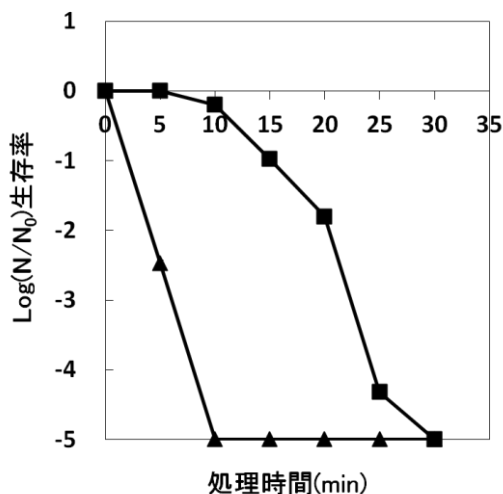


Fig. 2. バッチ式および連続式 MB-CO₂ 処理装置による酵母の殺菌。処理条件：40℃、2 MPa。■バッチ式、▲連続式。

る際に、第 1 槽で MNB-CO₂ を低温条件で混合し、第 2 槽で加温して殺菌する 2 槽方式にすることで D 値 (一定温度で生菌数を 1/10 減少させるのに要する時間) が 1/5 に短縮し、殺菌効果を著しく向上させることに成功した (Fig. 1、2) (特願 2010-159812)。

2. 研究の目的

本研究では、(1) MNB-CO₂ の芽胞に対する殺菌効果を確認し、(2) MNB-CO₂ 処理が微生物細胞に与える影響を明らかにすることで新たな仮説を提唱し、(3) MNB-CO₂ の食品に対する適応性を判断するため、MNB-CO₂ の食品品質への影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) MNB-CO₂ による芽胞の失活

MNB-CO₂ 処理の *Bacillus subtilis* 孢子に対する失活効果を検討した。さらに、SC-CO₂ 処理による芽胞の殺菌において、SC-CO₂ 処理の芽胞に対する発芽誘発効果が報告されていることから (Furukawa *et al.*, 2004)、MNB-CO₂ 処理により芽胞を発芽させた後、比較的温和な温度 (100℃ 以下) で殺菌する方法を検討した。

(2) MNB-CO₂ 処理が微生物細胞に与える影響

① 細胞外 pH の影響

MNB-CO₂ 処理中の加圧下での溶液の pH を測定し、細胞外 pH が微生物に与える影響を検討する。

② 形態観察

MNB-CO₂ 処理後の酵母細胞を走査型 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。

③ 細胞内基質の測定

MNB-CO₂ 処理後の酵母細胞からの DNA およびタンパク質の漏出量を測定した。

MNB-CO₂ 処理後の酵母細胞を死細胞染色薬 Propidium Iodide (PI) により蛍光染色し、蛍光分光光度計により測定した。

MNB-CO₂ 処理後の酵母細胞内の酵素活性を APIZYM キットにより測定した。

(3) MNB-CO₂ が食品品質に与える影響

試料として無ろ過の生ビールを用い、MNB-CO₂ および加熱により殺菌処理し、MNB-CO₂ 処理および加熱処理後のビール中の香気成分量を Gas chromatography-Mass Spectrometry により測定し、官能評価を行った。

4. 研究成果

(1) MNB-CO₂ による芽胞の失活

40、45℃ および 50℃、2 MPa での MNB-CO₂ 処理では *B. subtilis* 孢子の失活効果はほとんど得られなかったが、同条件での MNB-CO₂ 処理後に加熱処理を行うことで、加熱処理の

みよりも D 値が短縮した。

(2) MNB-CO₂ 処理が微生物細胞に与える影響

①細胞外 pH の影響

MB-CO₂ 処理中の生理食塩水の pH 低下率は圧力上昇に伴い高まったが、温度の影響をほとんど受けず、エタノール濃度の上昇に伴い低くなった。さらに、MB-CO₂ 処理中の 0.2 mol/L リン酸水素二ナトリウム—0.1 mol/L クエン酸緩衝液(pH 4)の pH 低下率は緩衝液の初発 pH の低下およびエタノール濃度の上昇により抑制される傾向がうかがえた。これらの結果から、MB-CO₂ による細胞外 pH の低下は殺菌効果にあまり影響を及ぼさないことが示唆された。

②形態観察

SEM 観察において、6 オーダーの殺菌効果が得られた 50°C で 5 分間 MB-CO₂ 処理 (MB50) した酵母の表面に多数のしわを観察した。また、MB-CO₂ と同温度の 50°C で熱処理 (H50) した酵母の表面にはしわのみが、6 オーダーの殺菌効果が得られた 80°C で 5 分間熱処理 (H80) した酵母は、MB50 より多数の出芽痕への膜損傷を示した。TEM 観察では、MB50 の酵母の細胞膜への影響は観察されなかったが、細胞内器官への直接的な影響が確認された。H50 の酵母では細胞内部と細胞膜の間に間隙が存在し、H80 の酵母では間隙の存在に加えて、細胞内器官への影響を確認した。

③細胞内基質の測定

H80 の酵母からのタンパク質および核酸の細胞外漏出量は、MB50 および H50 よりも大幅に多くなった (Fig. 3 上)。この結果から、熱処理によるビール酵母の殺菌は細胞膜の膜透過性を増加させ、細胞内容物を漏出させるのに対し、MB-CO₂ 処理は細胞膜へ影響よりも、細胞内部へ直接影響を及ぼすことで高い殺菌効果を得ていることが示唆された。

蛍光染色による膜透過性測定では、PI 強度は処理温度 40、45 および 50°C の MB-CO₂ 処理 (MB40、45 および 50) において処理温度 35°C の MB-CO₂ 処理 (MB35)、H50 および H80 よりも有意に多くなったことから、熱処理による核酸およびタンパク質の漏出がうかがえた (Fig. 3 下)。

APIZYM を用いたビール酵母細胞内の酵素活性の測定により、MB50 は H80 と同等の酵素失活効果を示し、熱処理による酵素の熱変性とは異なる酵素失活作用を持つことが示唆された (Table 1)。

これらの結果から、MB50 は H80 と同等の殺菌効果を持つにもかかわらず、核酸およびタンパク質の漏出量が少なく、MB50 のビール酵母内部の酵素に対する失活効果は H80 と同等であったことから、MB-CO₂ 処理の殺菌機構は MB 化した CO₂ が細胞膜を通過し、細胞内に侵入することで細胞内 pH の低下、酵素失活や

核酸などの細胞内器官の構造的変化などを引き起こすことによることが推察された。

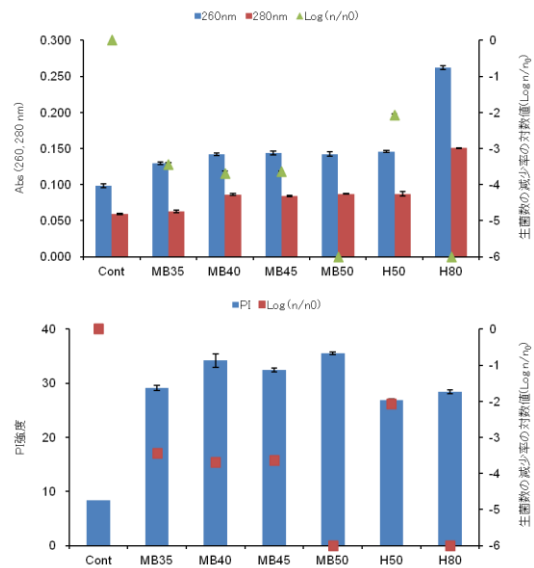


Fig. 3. MB-CO₂ 処理および熱処理したビール酵母からの核酸・タンパク質の漏出量 (上) および PI 強度 (下)。

Cont: 未処理、MB35-MB50: 35-50°C での MB-CO₂ 処理、H50 および H80: 50°C および 80°C での熱処理。

Table 1 MB-CO₂ 処理および熱処理によるビール酵母の酵素失活。

酵素	Cont	MB50	H50	H80
エステラーゼ	1	0	0	0
エステラーゼリパーゼ	1	0	1	0
ロイシンアリアルアミダーゼ	5	0	3	0
バリンアリアルアミダーゼ	1	0	1	0
酸性フォスファターゼ	5	0	5	0
ナフトール AS-BI フォスフォヒドラーゼ	2	1	1	1
α-マンノシダーゼ	2	0	1	0

(3) MNB-CO₂ が食品品質に与える影響

MB50 および H80 による無ろ過ビール中の酵母の殺菌について、H80 では処理時間 5 分までに十分な殺菌効果を得ることができなかったが、MB50 では処理時間 5 分において、5 オーダーの殺菌を達成した (Fig. 4)。

香気成分分析において、処理前 (Cont)、MB50 および H80 で処理したビール間で各香気成分量の違いはほとんど認められなかった。

官能評価により、Cont、MB50 および H80 の各ビールの香りに大きな違いはなかったが、官能評価のコメントから、H80 のビールからは発酵臭のような熱独特の香味が生じていることが認められた。また、味の評価については、評価した 3 種のビールで有意差はないが、官能評価のコメントから、MB50 のビールは苦味および酸味が弱く、クセがなくマイルドな風味になったことが示唆された (Table

2)。これらの結果から、MB-CO₂処理は熱処理のみよりも30℃低い温度において実際のビール中の酵母を殺菌可能であった。品質面では、香気成分分析および官能評価により、MB-CO₂処理は熱処理よりもビールに対して影響を及ぼさないことが認められたことから、MB-CO₂処理は実際のビール中の酵母の殺菌法としての実用可能性が示唆された。

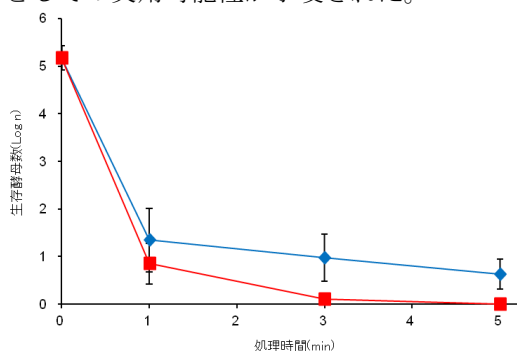


Fig. 4. MB-CO₂処理および熱処理によるビール中の酵母の殺菌。

◆ : 50℃での MB-CO₂処理、■ : 80℃熱処理。

Table 2 未処理 (Cont)、MB-CO₂処理 (MB50) および熱処理 (H80) ビールの官能評価

	Cont	MB50	H80
香り	3.2 ^{ns}	3.1 ^{ns}	2.8 ^{ns}
味	3.1 ^{ns}	3.0 ^{ns}	3.0 ^{ns}

官能評価はパネリスト 26 名 (男 : 女 = 1 : 1) により 5 段階評価 (5 : 非常に良い、4 : 良い、3 : どちらでもない、2 : 悪い、1 : 非常に悪い) で行った。

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 3 件)

1. Fumiyuki Kobayashi, Daisuke Sugawara, Tetsuya Takatomi, Hiromi Ikeura, Sachiko Odake, Shota Tanimoto and Yasuyoshi Hayata. Inactivation of *Lactobacillus fructivorans* in physiological saline and unpasteurized sake using CO₂ microbubbles at ambient temperature and low pressure. International Journal of Food Science and Technology, Vol. 47, No. 6, 1151-1157, 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02954.x>
2. Fumiyuki Kobayashi, Hiromi Ikeura, Sachiko Odake, Shota Tanimoto and Yasuyoshi Hayata. Inactivation of *Lactobacillus fructivorans* suspended in various buffer solutions by

low-pressure CO₂ microbubbles. LWT - Food Science and Technology, Vol. 48, No. 2, 330-333, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.011>

3. Fumiyuki Kobayashi, Hiromi Ikeura, Sachiko Odake and Yasuyoshi Hayata. Inactivation kinetics of polyphenol oxidase using a two-stage method with low pressurized carbon dioxide microbubbles. Journal of Food Engineering, Vol. 114, No. 2, 215-220, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.020>

[学会発表] (計 5 件)

1. 小林 史幸、Chonlada Pokhum、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バブルによるグルコアミラーゼおよび酸性プロテアーゼの失活。日本食品工学会第 12 回大会 2011/08/5-6 京都テルサ(京都)。
2. 小林 史幸、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・ナノバブルによる生酒の殺菌および酵素失活。日本食品科学工学会第 58 回大会 2011/9/9-11 東北大学(仙台)。
3. 小林 史幸、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バブルによるポリフェノールオキシダーゼの失活。日本食品工学会第 13 回大会 2012/08/9-10 北海道大学(札幌)。
4. 小林 史幸、池浦 博美、小竹 佐知子、谷本 昌太、早田 保義。低加圧二酸化炭素マイクロバブルによる緩衝液中の *Lactobacillus fructivorans* の殺菌について。日本食品科学工学会第 59 回大会 2012/08/29-31 藤女子大学(札幌)。
5. 小林 史幸、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バブル処理した清酒の香気成分について。日本食品科学工学会関東支部会 2013/03/09 東京農業大学(東京)。

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 液状物の処理方法

発明者 : 小林 史幸、桜井 博志

権利者 : 学校法人日本医科大学・旭酒造株式会社

種類 : 特許

番号 : 特願 2013-008455

出願年月日 : 2013/01/21

国内外の別 : 国内

○取得状況（計1件）

名称：食品の処理方法及び食品の処理装置

発明者：早田 保義、小林 史幸

権利者：学校法人日本医科大学

種類：特許

番号：特許第 5131625 号

取得年月日：2012/11/16

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 史幸 (FUMIYUKI KOBAYASHI)

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