

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00818

研究課題名(和文) 二酸化炭素の加圧溶解による一時的酸性化を利用した新規中性食品加工技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel processing method for pH-neutral food by temporal acidification with pressurized dissolving of carbon dioxide

研究代表者

野間 誠司(Noma, Seiji)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：40392071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：食品の酸性化は、殺菌や酵素失活処理の容易化、抽出・加工特性の改良等の利点をもたらす。しかし中性食品においては、酸性化により本来の風味を損失する上に、添加した酸の除去・中和工程とコストが生じる。そこでCO₂の溶解を利用すれば「一時的な酸性化」が可能であり、中性食品においても酸性化の利点を享受できると考えた。

上記着想に基づいて検討を行った結果、加圧CO₂下では乳化剤との併用によって細菌孢子の効率的な殺菌が可能であった。また、温州ミカンから従来法とは異なる特性を有するペクチンを抽出できた。さらに、品質が顕著に向上した減塩イワシ魚醤を製造することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸性条件は品質安定性や加工・抽出特性の向上に有利であるが、従来技術の範囲内では酸性条件を中性食品に適用する発想は全くなされて来なかった。食品分野において、CO₂は、炭酸飲料の製造やコーヒーからの脱カフェインなどに利用されているが、これらはいずれも一時的酸性化作用の利用を志向してはいない。本研究では、加圧CO₂の適用により、細菌孢子の効率的な殺菌、従来法とは異なる特性を有するペクチンの抽出、高品質な減塩イワシ魚醤の製造が可能であることを示した。本成果は今後、より多彩な用途開発や高付加価値食品の創生を可能とする新技術として、食品加工・製造分野へ顕著な波及効果をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：The acidification of foods provides advantages such as enhanced inactivation of microorganisms and enzymes, and altered extract characteristics. However, in the case of neutral foods, acidification complicates the processing steps, increases the cost, and affects the food flavor. In an attempt to solve these problems, we focused on temporarily acidifying neutral foods through the dissolution of CO₂ in this study. As a result, we observed the efficient inactivation of bacterial spores following pressurized CO₂ treatment in combination with the emulsifier monoglycerol-caprate. Using this treatment, we extracted pectin molecules from the Satsuma mandarin orange with characteristics different from those obtained from the conventional methods of extraction. Additionally, we produced salt-reduced sardine fish sauce with significantly improved quality.

研究分野：食品製造工学

キーワード：加圧二酸化炭素 食品加工 殺菌 抽出 魚醤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品の品質安定性や加工において、酸性化は多くの利点を生じさせる。例えば、pH 4 以下では、微生物の増殖や内在性酵素の反応が抑制される。また、殺菌や酵素失活も容易になる。さらに、抽出や加工特性も中性とは異なる。しかし、酸性化を中性食品に適用する場合、酸の添加とその除去・中和が必要となり、コストと手間が生じる。

CO₂ を液体食品に溶解するとH⁺が生じる(下反応式)。特に 1 MPa (約10気圧) 以上の加圧下



では pH が 3.2 程度まで低下する (Meyssami et al., 1992)。しかもこの pH 低下は、単なる圧力の解放や穏和な加熱によって容易に解除できる。そこで、CO₂ の加圧溶解のみによって「一時的な酸性化」が実現可能であり、中性食品においても簡便・安価に酸性化の利点を享受できると考えた。既に、本着想に基づく研究を3つ展開してきた。

(1) 細菌孢子制御技術の開発

高い耐熱性を有する *Bacillus* 属細菌孢子は、中性食品中で発芽、増殖して腐敗を招く。しかしその耐熱性は酸性条件下で低下する。したがって、加熱殺菌処理の間のみ加圧 CO₂ により酸性化すれば、現行のオートクレーブ (120°C、90 min) よりも穏和な条件を設定できる可能性がある。加圧 CO₂ 処理 (5 MPa) とグリセリン脂肪酸エステルを併用した結果、80°C・30 min の加熱により各種 *Bacillus* 属細菌孢子を約 1/10⁴ まで低下できた。また、本処理後に生残した *B. subtilis* 孢子の耐熱性が低下、すなわち発芽していることを見出した。

(2) ペクチン抽出技術の開発

植物由来の多糖類であるペクチンは、増粘安定剤やゲル化剤として広く利用される。また分岐鎖を含むペクチンやペクチンオリゴ糖が多様な機能性を示す。柑橘類からペクチンを抽出する場合、酸性化、加熱、Ca²⁺キレート作用が収量や分子特性(鎖長、分岐鎖含有率、メトキシル度)に大きな影響を及ぼす。加圧 CO₂ 処理では、加熱温度と圧力の選択のみで処理中の pH を制御できる。また、CO₂ の溶解により Ca²⁺ を CaCO₃ として補足できる。したがって、加圧 CO₂ 処理では、処理後の中和処理無しに多様な特性を有するペクチンを抽出できると期待される。

(3) 減塩魚醤製造技術の開発

魚醤は、魚を室温に放置し、内在性の酵素で自己分解させて製造する調味料であり、濃厚なうま味を特徴とする。製造過程では雑菌の増殖抑制が必要なため、塩を 20% 以上添加するが、この高い塩濃度が近年の健康志向に反する。また、酸敗臭が一般消費者への訴求を低下させている。加圧 CO₂ 下で生じる酸性および嫌気条件は、雑菌の増殖や酸敗臭の生成を抑制すると期待される。減塩下でも腐敗は生じず、官能的にも優れた魚醤を製造できることが示唆された。

2. 研究の目的

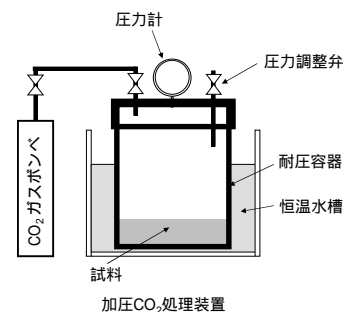
本研究では背景に記載した研究 (1) - (3) を更に発展させるべく、以下の検討を行うことを目的とした。

- (1) 更なる殺菌処理の効率化を図るために、添加する物質や処理条件を検討する。
- (2) ペクチンを抽出し、その特性を明らかにする。
- (3) 品質のより詳細な解析や高品質の魚醤を製造できた要因を調べる。

3. 研究の方法

加圧 CO₂ 処理

ウォーターバスもしくはインキュベーター中で温度制御した耐圧容器に試料を入れ、所定時間経過後に圧力調整弁から CO₂ ガスを抜くことにより処理を行った(右図)。



(1) 細菌孢子制御技術の開発

耐圧容器に、普通ブイヨン培地に懸濁した孢子を入れて加圧 CO₂ 処理した。発芽の程度は濁度 (630 nm) 測定により、殺菌効果は普通寒天培地を用いたプレーティング法により評価した。

(2) ペクチン抽出技術の開発

粉碎したミカン果皮を水、塩酸 (pH 1.5)、2%ヘキサメタリン酸ナトリウム (pH 2.5) に懸濁し、CO₂ 処理した。エステル化度は Saeed (1975) の方法で評価し、分子量は粘度測定の結果に基づいて推算した (Kar and Arslan, 1999)。構成糖は、トリフルオロ酢酸存在下で加熱することで部分分解し、糖分析システム (ICS-5000+; Thermo Fisher Scientific) により調べた。

(3) 減塩魚醤製造技術の開発

細菌(一般生菌、大腸菌群、乳酸菌、クロストリジウム属菌)数はプレーティング法、混釈法、キットを使用して評価した。腐敗性のアミン類含量はダンシルクロリドによる誘導体化後、逆相 HPLC 分析により、有機酸含量は有機酸分析システム (Nexera XR HPLC organic acid analysis system; Shimadzu) により、アミノ酸含量は、イソシアン酸フェニル誘導体化後に逆相 HPLC 分析により評価した。官能検査はトレーニングを行っていないパネル 8 名により、魚醤のにおいについて行った。

4. 研究成果

(1) 細菌孢子制御技術の開発

発芽に伴い孢子の耐性は低下するため、殺菌効果を向上させるためには発芽率の向上が必要となる。過去に、加圧 CO₂ 処理が孢子の発芽を誘引することを明らかにした (Noma et al., 2011)。このとき、孢子の染色性が増加したことから、孢子への物質吸着が増加したと推察される。そこで、アミノ酸や糖、塩類などの発芽誘起剤存在下での加圧 CO₂ 処理を考えた。まず大気圧下において、発芽誘起剤が *Bacillus subtilis* 孢子の発芽に及ぼす影響を調べた。その結果、アラニンおよび AGFK (アスパラギン、グルコース、フルクトース、KCl) の発芽誘導率が他よりも高かった。そこでこれらの存在下で加圧 CO₂ 処理 (5 MPa, 40-80°C, 15 min)、インキュベーション (30°C, 0-24 h)、加熱処理 (HT; 90°C, 5 min) を連続的に行った。しかし、発芽誘起剤の添加は殺菌効果の向上にあまり寄与しなかった。

次に各種静菌剤 (乳化剤、グリシン、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム) 存在下で加圧 CO₂ 処理 (5 MPa, 80°C, 30 min) を行った結果、乳化剤 (モノグリセリンカプリン酸エステル; MC10) 存在下で最も高い殺菌効果が得られた。同時に、孢子の発芽促進が認められた。そこで、MC10 存在下で加圧 CO₂ 処理 (5 MPa, 80°C) 後に HT (90°C) を行った。その結果、合計 15 分間で約 3.6 桁の殺菌効果が得られ、より短時間での殺菌が可能になることが分かった。

以上の結果から、乳化剤を併用した CO₂ 殺菌により、*B. subtilis* 孢子の効率的な殺菌が可能であることが示された。本成果は、CO₂ を利用した殺菌法の実用化の可能性を拓くものである。

(2) ペクチン抽出技術の開発

新鮮な温州ミカンとそれを成熟させたものから、加圧 CO₂ 処理 (1, 2, 3 MPa) によりペクチンを抽出した。比較として従来法である塩酸 (HCl; pH 1.5)、2% ヘキサメタリン酸ナトリウム (SHMP; pH 2.5) による抽出も行った。いずれも 90°C、90 分間処理とした。その結果、加圧 CO₂ 処理の収率は HCl や SHMP に及ばなかった。しかし、加圧 CO₂ 処理により、メトキシル度や分子量が大きいペクチン分子を抽出できることが明らかとなった。

各方法で抽出したペクチンの糖組成をガラクトuron酸 (GlcUA)、アラビノース (Ara)、グルコース (Glc)、ガラクトース (Gal)、マンノース (Man)、ラムノース (Rha)、キシロース (Xyl)、フコース (Fuc) について調べた。その結果、HCl および SHMP 抽出ではミカンの成熟度に依存せず GlcUA、Ara、および Gal が多く、全体の 84% 以上を占めた。特に GlcUA の含量が多かった。一方、加圧 CO₂ 処理による抽出では、新鮮なミカンにおいて、GlcUA の含有率の顕著な減少と、Ara、Glc、Gal、Man、および Xyl の含有率増加が認められた。成熟したミカンにおいては、1 MPa と 2 MPa では HCl と SHMP の糖組成と類似していたが、3 MPa では Glc 含量が多かった。加圧 CO₂ 処理では新鮮なミカンにおいて、GlcUA 含量に対する Ara+Gal+Rha 含量が顕著に高かったことから、分岐鎖を多く含む構造部分が抽出されたと推察された。

以上の結果より、加圧 CO₂ 処理は従来法に収率で及ばないものの、高メトキシル度で分子構造の異なるペクチン抽出を可能にすると考えられた。これまでに分岐鎖を含むペクチンオリゴ糖が多様な機能性を有することが見出されている。加圧 CO₂ 処理は、分岐鎖を含むペクチンオリゴ糖の新たな調製法になり得ると期待される。

(3) 減塩魚醤製造技術の開発

イワシを原料とし、加圧 CO₂ (1, 3, 5 MPa, 30°C, 塩濃度 10%) と従来法 (大気圧, 30 塩濃度 10, 15, 20%) で 6 か月間魚醤を作製した。その結果、従来法では腐敗防止に 20% の塩濃度を要した。しかし、3 および 5 MPa の二酸化炭素下では塩濃度を 10% に低下させても腐敗がなく、5 MPa では酸化も抑制された官能的にも優れた魚醤を作製可能であった。そこで、作製したイワシ魚醤のより詳細な品質分析を行った。

従来法では一般生菌が検出されたが、加圧 CO₂ 法では検出されなかった。また、腐敗性のアミン類 (ヒスタミン、チラミン、スベルミジン、プトレシン) の生成は、加圧 CO₂ 法 (3, 5 MPa) では完全に抑制されていた。魚醤の pH は従来法で 5.5、加圧 CO₂ 法では 6.3 程度であった。また、刺激性有機酸は従来法の魚醤でより多く生成していた。一方、総アミノ酸含量は加圧 CO₂ 下で従来法の約 2.8 倍生成していた。官能検査により、従来法の魚醤は刺激臭、腐敗臭、酸敗臭が強く、加圧 CO₂ 法の魚醤は出汁様の香りが強いと評価された。以上より、イワシ魚醤の作製過程に加圧 CO₂ を適用することで、安全性向上、腐敗抑制、酸化低減、アミノ酸含量増加、官能特性

向上など優れた特徴を有する魚醬を作製することができることを明らかになった。

<引用文献>

- Meysami B., Balaban MO., and Texeira AA. 1992.** Prediction of pH in model systems pressurized with CO₂. *Biotechnology Progress* **8**: 149–54. <https://doi.org/10.1021/bp00014a009>
- Noma S., Yamashita N., Klangpetch W., Igura N., and Shimoda M. 2011.** Effects of carbonation with heating on germination of *Bacillus subtilis* spores. *Food Science and Technology Research* **17**: 523–527. <https://doi.org/10.3136/fstr.17.523>
- Saeed AR. 1975.** Characterization of pectic substances in mango marc. *Journal of Food Science* **40**: 205–206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb03774.x>
- Kar F. and Arslan N. 1999.** Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers* **40**: 277–284. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00062-4)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Seiji Noma, Lisa Koyanagi, Shuhei Kawano and Nobuyuki Hayashi | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Application of pressurized carbon dioxide during salt-reduced sardine fish sauce Production | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Food Science and Technology Research | 6. 最初と最後の頁 195-204 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.26.195 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 野間誠司 | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 二酸化炭素を用いた食品の微生物制御に関する研究 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 日本食品化学工学会誌 | 6. 最初と最後の頁 85-91 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/nskkk.67.85 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yukiko Tominaga, Seiji Noma, Noriyuki Igura, Mitsuya Shimoda and Nobuyuki Hayashi | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Control of Bacillus subtilis spores by intermittent treatment using heating after carbonation in the presence of germinants and bacteriostatic agents | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Food Science and Technology Research | 6. 最初と最後の頁 403-411 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.24.403 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 小柳理紗、野間誠司、林信行 |
| 2. 発表標題 減塩イワシ魚醤の作製における加圧二酸化炭素の適用 |
| 3. 学会等名 2019年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 野間誠司 |
| 2. 発表標題 二酸化炭素を用いた食品の微生物制御に関する研究 |
| 3. 学会等名 日本食品化学工学会第66回大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yukiko Tominaga, Seiji Noma, Noriyuki Igura, Mitsuya Shimoda, Nobuyuki Hayashi |
| 2. 発表標題 Control of Bacillus subtilis spores by carbonation in the presence of monoglycerol monocaprates |
| 3. 学会等名 2nd Innovations in food packaging, shelf life and food safety conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Rina Hirokado, Seiji Noma, Noriyuki Igura, Mitsuya Shimoda, and Nobuyuki Hayashi |
| 2. 発表標題 Investigation into the inactivation mechanism of Bacillus subtilis spores by carbonation in the presence of glycerin fatty acid esters |
| 3. 学会等名 2nd Innovations in food packaging, shelf life and food safety conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|