

## マイクロバブル化した加圧二酸化炭素を用いた食品の殺菌・酵素失活に関する研究

小林 史 幸

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・食品科学科・食品工学教室

日獣生大研報 62, 64-67, 2013.

### はじめに

今回筆者が平成24年度梅野信吉賞を受賞した研究テーマである「マイクロバブル化した加圧二酸化炭素を用いた食品の殺菌・酵素失活に関する研究」は、食品製造における永遠のテーマである非加熱での殺菌・酵素失活の実現を目指したものである。通常、消費者のもとに届く食品は、加熱による殺菌・酵素失活処理を施すことで安全性や保存中の品質が保たれているが、少なからず熱による品質低下は否めない。食品の殺菌・酵素失活の理想としては、いかに品質低下を招かずに安全性を確保することができるかであり、世界中の多くの研究者がその理想を追究するために様々な方法を探索しており、筆者もその理想を追究している。

そこで本稿では、近年筆者らが非加熱での殺菌・酵素失活法として開発した低加圧二酸化炭素マイクロバブル(MB-CO<sub>2</sub>)の概要、MB-CO<sub>2</sub>を用いた清酒の殺菌・酵素失活に関する研究ならびにMB-CO<sub>2</sub>の殺菌メカニズム解析に関する研究の現状について紹介する。

### 低加圧二酸化炭素マイクロバブル

超臨界二酸化炭素(SC-CO<sub>2</sub>)を含む加圧CO<sub>2</sub>を利用した非加熱殺菌・酵素失活技術は、加熱処理のように食品中の有効成分の変性を起こさないことから、加熱処理に替わる新たな食品の殺菌・酵素失活法として国内外の多くの研究者によって盛んに研究されている<sup>1-4)</sup>。しかしながら、SC-CO<sub>2</sub>は高い殺菌・酵素失活効果を維持するために高圧(20 MPa程度)を保持する必要がある、装置コストが高くなることや、SC-CO<sub>2</sub>は元来、有機化合物の抽出溶媒として使用されてきた技術であり、食品に使用する際に食品中の香气成分を抽出してしまい、食品の香气を変性させるなどの問題点がある。筆者らは数年にわたりSC-CO<sub>2</sub>による殺菌および香气成分抽出に関する研究を行い、SC-CO<sub>2</sub>の殺菌効果および香气成分抽出効果が溶存CO<sub>2</sub>濃度および処理圧力にそれぞれ依存していることを明らかにした<sup>5,6)</sup>。

そのため、超臨界状態よりも極めて低い圧力でCO<sub>2</sub>ガスによる殺菌・酵素失活が可能となれば、低装置コストで、しかも香气を損なわない新たな食品の殺菌・酵素失活法が開発できるものと考えた。

そこで筆者らは、マイクロバブル(MB)と呼ばれる50 μm以下の微細気泡に着目した。MBは通常の気泡に比べて上昇速度が遅く、水中で収縮して溶解・消滅するため気体の溶解性が極めて高く、さらに圧壊やヒドロキシラジカル(OH<sup>•</sup>)の発生などの特徴を有することが指摘されており、その利用に関する研究が盛んに行われている。現在までに、MBの利用に関する研究については、オゾンMBによる排水処理<sup>7)</sup>、青果物からの農薬除去<sup>8-10)</sup>や養液栽培における培養液の殺菌<sup>11-14)</sup>ならびに空気MBを利用した養液栽培におけるレタスの生育促進などが報告されている<sup>15,16)</sup>。著者らは2 MPa以下のSC-CO<sub>2</sub>よりも著しく低い圧力でCO<sub>2</sub>ガスをMB化することで高い殺菌・酵素失活効果が得られる低加圧二酸化炭素マイクロバブル(MB-CO<sub>2</sub>)を開発し<sup>17)</sup>、*Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae*および*Lactobacillus fructivorans*に対する殺菌効果について報告するとともに<sup>18-21)</sup>、MB-CO<sub>2</sub>により殺菌処理した清酒は、処理前の生酒とほぼ同等の品質を保持可能であることを明らかにした<sup>20)</sup>。さらに、MB-CO<sub>2</sub>の殺菌効果が溶存CO<sub>2</sub>濃度、処理温度、処理圧力およびエタノール濃度の上昇に伴い高まることを確認した。

### 2 槽式MB-CO<sub>2</sub>を用いた殺菌・酵素失活

ここまでの研究により、MB-CO<sub>2</sub>は高い殺菌・酵素失活効果を発揮することを明らかにしたが、MB-CO<sub>2</sub>を実用化させるためには、さらなる殺菌・酵素失活効果および処理効率の向上が望まれた。そこで、処理効率を高めるためMB-CO<sub>2</sub>処理装置をこれまでのバッチ式から連続式に改良する際に、低温でMB-CO<sub>2</sub>を発生させた後に加温することで殺菌・酵素失活を行う2槽方式に変更することで殺菌・酵素失活効果を飛躍的に高めることに成功した<sup>22)</sup>。

2 槽式MB-CO<sub>2</sub>処理の酵素失活効果を検討するため、ポ

リフェノールオキシダーゼ (PPO) のモデル溶液を用いて試験を行った。PPOは様々な食品中に存在し、食品中のPPを退化させてしまうため、食品製造工程中で失活させる必要がある。中でも、ワイン中のPPOの失活には食品添加物として亜硫酸塩が用いられているが、昨今の健康志向の高まりから亜硫酸塩無添加ワインが製造・販売されている。しかしながら、亜硫酸塩無添加ワインはPPOが失活しておらず、熟成期間中にPPが酸化重合するため、長期間熟成させることができない。そこで、2槽式MB-CO<sub>2</sub>処理によるPPOの失活効果について速度論的解析を行ったところ、2槽式MB-CO<sub>2</sub>処理のPPO失活効果は加熱処理よりも非常に高く、使用する熱エネルギーの低減が期待でき、さらに、2槽式MB-CO<sub>2</sub>処理は熱に感受性の高い食品中のPPOの効果的な失活に有用であることが示唆された<sup>23)</sup>。

さらに、2槽式MB-CO<sub>2</sub>処理の生酒中の火落菌の殺菌および酵素失活効果を検討し、2槽式MB-CO<sub>2</sub>により処理した清酒の官能評価および香氣成分分析を行った。清酒は火落菌の殺菌・酵素失活のために、通常、約65°Cで3 min程度の加熱処理(火入れ)が行われているが、その熱由来の独特の香味を生じ、生酒が持つ新鮮感が損なわれる。しかしながら、45°Cでの2槽式MB-CO<sub>2</sub>処理により、滞留時間10 minで生酒中の火落菌は検出不可能となり、加えて、効率的な酵素失活が可能であったことから、2槽式MB-CO<sub>2</sub>処理は生酒中の火落菌の殺菌・酵素失活が45°Cと比較的温和な温度においても短時間で可能であった。さらに、2槽式MB-CO<sub>2</sub>処理後の清酒を急速に冷却することで香氣成分の損失防止が可能であり、しかも、官能的には2槽式MB-CO<sub>2</sub>により処理した清酒は、生酒および通常の火入れ清酒よりも好まれたことから、2槽式MB-CO<sub>2</sub>処理は生酒および火入れ清酒よりも非常に飲みやすい清酒の製造を可能にすることが示唆された<sup>24)</sup>。

## 2 槽式MB-CO<sub>2</sub>処理の清酒処理法としての実用化研究

上述したように、2槽式MB-CO<sub>2</sub>により殺菌・酵素失活処理した清酒は、生酒および通常の火入れ清酒よりも官能的に良好な評価が得られていたが、この評価は学生パネルにより得られたものであり、酒蔵の清酒製造者からは「熱による清酒の風味の変化はないが何か物足りない。違和感がある。」と酷評された。そこで、2槽式MB-CO<sub>2</sub>の処理条件を再度見直すとともに、清酒中の各種成分を測定したところ、清酒処理に最適な2槽式MB-CO<sub>2</sub>の処理条件を見出すことに成功し、これまで以上に良質な清酒の製造が可能となった<sup>25)</sup>。この処理条件により2槽式MB-CO<sub>2</sub>処理した清酒は、加熱による香氣の変化および清酒の味に負の影響を与えるアミノ酸の増加がないことに加え、旨味成分の1つであるコハク酸および旨味を増強することが指摘されているピログルタミン酸を増加することが示唆され、現在、その増加メカニズムの解析を行っている。

## MB-CO<sub>2</sub>の殺菌メカニズム

SC-CO<sub>2</sub>の殺菌メカニズムはこれまでに次のような6つの仮説が述べられている<sup>4)</sup>：(1) CO<sub>2</sub>の溶解による細胞外pHの低下、(2) 細胞膜の変性、(3) 細胞内pHの低下、(4) 細胞内pHの低下およびCO<sub>2</sub>分子による酵素失活・代謝抑制、(5) 細胞内電解質平衡への障害、(6) 細胞内・細胞膜からの必須成分の漏出。そこで、MB-CO<sub>2</sub>の殺菌メカニズムの解析をビール酵母を用いて行った。まず、透過型電子顕微鏡により50°CのMB-CO<sub>2</sub>により完全に殺菌処理したビール酵母を形態的に観察すると、細胞膜(壁)の損傷は確認できず、処理前のビール酵母で確認することができた各細胞内器官が消失していた。さらに、MB-CO<sub>2</sub>処理したビール酵母から漏出した核酸およびタンパク質量は、80°Cの熱処理により完全に殺菌したビール酵母よりもその漏出量が少ないことから、細胞膜の損傷もしくは膜透過性の上昇による細胞内容物の漏出が殺菌効果に影響を及ぼした可能性は少ないと考えられる。しかし、MB-CO<sub>2</sub>処理のビール酵母内の代謝に関わる酵素に対する失活効果は80°Cの熱処理と同等であった。よって、MB-CO<sub>2</sub>処理によるビール酵母の殺菌は、MB化したCO<sub>2</sub>が微生物の細胞膜を通過し、細胞内に侵入することで細胞内pHの低下、酵素失活や核酸の構造的変化などを引き起こすことによることが示唆された。しかしながら、現在までの研究成果ではMB-CO<sub>2</sub>の殺菌メカニズムの核心についておらず、今後の更なる研究が必要である。

## おわりに

MB-CO<sub>2</sub>技術は熱による食品の風味の変化がないことから、食品の安全性確保と品質保持を両立させることが期待できる。さらに、MB-CO<sub>2</sub>技術は熱エネルギーの利用が少ない省エネ技術であることから、食品はもとより、様々な分野での応用展開が望める。現在は、MB-CO<sub>2</sub>技術をビール、ワイン、清酒などの嗜好性の高いアルコール飲料の殺菌・酵素失活技術とするための実用化研究ならびにMB-CO<sub>2</sub>の殺菌メカニズムを解明するための基礎的研究を進めている。MB-CO<sub>2</sub>技術はまだ実用化には至っていないが、近い将来、広く食品産業分野で利用されることを目指し、日々研究活動を行っている。

## 謝 辞

本賞にご推薦くださいました西村敏英前食品科学科長ならびに受賞選考委員会の先生方に深く感謝申し上げます。また、受賞にあたり、本研究についてご指導・ご助言賜りました私の学生時代の指導教官である九州大学 故篠島豊名誉教授(元九州女子大学学長)、県立広島大学 武藤徳男副学長ならびに明治大学 故早田保義教授に感謝申し上げます。最後になりますが、私の研究についてご指導・ご協力いただきました本学食品工学教室小竹佐知子准教授をはじめ、関係各位に厚く御礼申し上げますとともに、私に研

究の場や様々な支援をご提供くださっている日本獣医生命科学大学に深謝申し上げます。

### 参 考 文 献

- 1) SHIMODA, M., YAMAMOTO, Y., COCUNIBO-CASTELLANOS, J., TONOIKE, H., KAWANO, T., ISHIKAWA, H. and OSAJIMA, Y. (1998). Antimicrobial effects of pressured carbon dioxide in a continuous flow system. *J. Food Sci.*, **63**, 709-712.
- 2) DAMAR, S. and BALABAN, M.O. (2006). Review of dense phase CO<sub>2</sub> technology : microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *J. Food Sci.*, **71**, R1-11.
- 3) SPILIMBERGO, S. and BERTUCCO, A. (2003). Non-thermal bacteria inactivation with dense CO<sub>2</sub>. *Biotechnol. Bioeng.*, **84**, 627-639.
- 4) GARCIA-GONZALEZ, L., GEERAERD, A.H., SPILIMBERGO, S., ELST, K., VAN GINNEKEN, L., DEBEVERE, J., VAN IMPE, J.F. and DEVLIEGHERE, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganism in foods : The past, the present and the future. *Int. J. Food Microbiol.*, **117**, 1-28.
- 5) KOBAYASHI, F., HAYATA, Y., KOHARA, K., MUTO, N., MIYAKE, M. and OSAJIMA, Y. (2006). Application of supercritical CO<sub>2</sub> bubbling for deodorizing drinking water. *Food Sci. Technol. Res.*, **12**, 119-124.
- 6) KOBAYASHI, F., HAYATA, Y., KOHARA, K., MUTO, N. and OSAJIMA, Y. (2007). Application of supercritical CO<sub>2</sub> bubbling to inactivate *E. coli* and coliform bacteria in drinking water. *Food Sci. Technol. Res.*, **13**, 20-22.
- 7) SUMIKURA, M., HIDAKA, M., MURAKAMI, H., NOBUMOTO, Y. and MURAKAMI, T. (2007). Ozone micro-bubble disinfection method for waste reuse system. *Water Sci. Technol.*, **56**, 53-61.
- 8) IKEURA, H., KOBAYASHI, F. and TAMAKI, M. (2011). Removal of residual pesticide, fenitrothion, in vegetables by using ozone microbubbles generated by different methods. *J. Food Eng.*, **103**, 345-349.
- 9) IKEURA, H., KOBAYASHI, F. and TAMAKI, M. (2011). Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. *J. Hazardous Materials*, **186**, 956-959.
- 10) IKEURA, H., KOBAYASHI, F. and TAMAKI, M. (2013). Ozone microbubble treatment at various water temperatures for the removal of residual pesticides with negligible effects on the physical properties of lettuce and cherry tomatoes. *J. Food Sci.*, **78**, T350-T355.
- 11) KOBAYASHI, F., IKEURA, H., OHSATO, S., GOTO, T. and TAMAKI, M. (2011). Disinfection using ozone microbubbles to inactivate *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Crop Prot.*, **30**, 1514-1518.
- 12) KOBAYASHI, F., IKEURA, H., OHSATO, S. and TAMAKI, M. (2011). Microbicidal effect of microbubbles with ozone, oxygen, and carbon dioxide against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *J. Jpn. Soc. Agric. Technol. Management*, **18**, 123-128.
- 13) KOBAYASHI, F., IKEURA, H., OHSATO, S. and TAMAKI, M. (2011). Microbicidal effect of ozone microbubbles generated by different methods on *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *J. Jpn. Soc. Agric. Technol. Management*, **18**, 129-134.
- 14) KOBAYASHI, F., IKEURA, H., OHSATO, S., GOTO, T. and TAMAKI, M. (2012). Ozone microbubbles as a disinfection in nutrient solution, and their effects on the composition of fertilizer and the growth of cultivated plants. *Biol. Eng. Trans.*, **5**, 137-146.
- 15) PARK, J.S. and KURATA, K. (2009). Application of microbubbles to hydroponics solution promotes lettuce growth. *HortTechnology*, **19**, 212-215.
- 16) PARK, J.S., OHASHI, K., KURATA, K. and LEE, J.W. (2010). Promotion of lettuce growth by application of microbubbles in nutrient solution using different rates of electrical conductivity and under periodic intermittent generation in a deep flow technique culture system. *Euro. J. Hortic. Sci.*, **75**, 198-203.
- 17) 早田保義・小林史幸。食品の処理方法及び食品の処理装置。特許第5131625号。
- 18) KOBAYASHI, F., HAYATA, Y., IKEURA, H., TAMAKI, M., MUTO, N. and OSAJIMA, Y. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* by CO<sub>2</sub> microbubbles at a lower pressure and near room temperature. *Trans. ASABE*, **52**, 1621-1626.
- 19) KOBAYASHI, F., HAYATA, Y., IKEURA, H., MUTO, N. and OSAJIMA, Y. (2010). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by CO<sub>2</sub> microbubbles at a lower pressure and near ambient temperature. *Trans. ASABE*, **53**, 1217-1222.
- 20) KOBAYASHI, F., SUGAWARA, S., TAKATOMI, T., IKEURA, H., ODAKE, S., TANIMOTO, S. and HAYATA, Y. (2012). Inactivation of *Lactobacillus fructivorans* in physiological saline and unpasteurized sake using CO<sub>2</sub> microbubbles at ambient temperature and low pressure. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **47**, 1151-1157.
- 21) KOBAYASHI, F., IKEURA, H., ODAKE, S., TANIMOTO, S. and HAYATA, Y. (2012). Inactivation of *Lactobacillus fructivorans* suspended in various buffer solutions by low-pressure CO<sub>2</sub> microbubbles. *LWT* -

- 
- Food Sci. Technol., **48**, 330-333.
- 22) 早田保義・小林史幸。処理方法および処理装置。特願2010-159812。
- 23) KOBAYASHI, F., IKEURA, H., ODAKE, S. and HAYATA, Y. (2013). Inactivation kinetics of polyphenol oxidase using a two-stage method with low pressurized carbon dioxide microbubbles. J. Food Eng., **114**, 215-220.
- 24) KOBAYASHI, F., IKEURA, H., ODAKE, S. and HAYATA, Y. (2013). Inactivation of enzymes and *Lactobacillus fructivorans* in unpasteurized sake by a two-stage method with low-pressure CO<sub>2</sub> microbubbles and quality of the treated sake. Innovative Food Sci. Emerging Technol., **18**, 108-114.
- 25) 小林史幸・桜井博志。液状物の処理方法。特願2013-008455。
-