

9749 高食塩難凍結性素材の凍結現象を利用した新しい食品の開発

助成研究者：渡辺 道子 (東京学芸大学 教育学部)

共同研究者：田辺 創一 (東京学芸大学 教育学部)

高食塩含量の食品は難凍結性であるが、氷核活性細菌の水懸濁液を透析チューブに入れて食品に挿入しておけば、過冷却を殆ど起こすことなく凍結させることができる。本研究は、氷核活性細菌を用いて醤油を効率よく凍結濃縮して旨味を高めるとともに、低温域での食塩と水の共晶形成現象を利用して減塩化された醤油を作製し、その性質を明かにすることを目的とした。

凍結温度を求めるために、醤油の融解過程での熱の収支をしらべたところ、 -18°C ～ -25°C で共晶が生成することが示唆されたので、フリーザーの温度制御をも考慮して醤油の凍結温度を -27°C に設定した。凍結させた醤油をメッシュの異なるふるいでろ過すると、いずれも1.6倍に濃縮されており、収率は85%であった。濃縮物の塩分はふるいの目の大きさによって大きく異なった。目の大きさが 0.71mm (22メッシュ) 以下の場合、ろ液の塩分は13%となり、目の大きさが 1.7mm (10メッシュ) および 2.0mm (8.6メッシュ) の場合には、塩分はそれぞれ、14%および16%となった。この結果は、共晶の長径が $1\sim 2\text{mm}$ であることを示唆している。このデータに基づいて、凍結醤油のろ過に22メッシュのふるいを用いることにした。揮発性成分はどれも1.6倍に濃縮されていた。アミノ酸は1.4～1.8倍に濃縮されていた。食塩濃度は、原料醤油で15%、凍結濃縮醤油で13%であった。凍結濃縮醤油では塩味が薄く、旨味が濃かった。

凍結濃縮醤油の塩味は同じ食塩濃度の原料醤油のそれよりも薄く感じられた。醤油を凍結して得られた氷を繰り返し 0°C の水で洗浄すると、氷には塩分が検出されなくなった。この事実は、氷には食塩が組み込まれないことを示唆するものである。共晶の融解に起因する熱の収支は $-25\sim -18^{\circ}\text{C}$ 以外には認められず、 -25°C では共晶の形成が終了しているはずである。しかしながら、凍結濃縮醤油には約1/2量の食塩が存在していた。これらの結果から、醤油には結合塩が存在し、旨味を和らげているという仮説を提案し、実験的に確かめた。醤油から非透析性画分を分離し、食塩水と混ぜると、食塩水単独のときよりも塩味が薄くなり、 ^{23}Na のNMRの線幅が大きくなった。酸性条件にすると、NMR線幅は小さくなった。この結果から、醤油の食塩の一部はイオン結合でメラノイジンなどと結合しており、穏和な味をかもし出していると結論した。

9749 高食塩難凍結性素材の凍結現象を利用した新しい食品の開発

助成研究者：渡辺 道子（東京学芸大学 教育学部）

共同研究者：田辺 創一（東京学芸大学 教育学部）

1. 研究目的

氷核活性細菌は、霜害の原因として知られており¹⁾、農業分野で細菌の氷核活性を低減化させることに多くの研究者が精力を傾けてきた。助成者らは、世界に先駆けて細菌の高い氷核活性を食品加工の分野で有効利用する試みを行い、食品の凍結濃縮、凍結乾燥、凍結組織化に応用できるという基礎データを報告してきた^{2,6)}。さらに、茶芽から新規の氷核活性細菌を単離し、その培養条件を明かにした^{7,8)}。本菌は5℃で300MPaで高圧処理すると殺菌され⁹⁾、この殺菌菌体は、1994年、厚生省によって食品添加物として認可された。

高食塩含量の食品は難凍結性である¹⁰⁾が、氷核活性細菌の水懸濁液を透析チューブに入れて食品に挿入しておけば、過冷却を殆ど起こすことなく凍結させることができる¹¹⁾。本研究は、氷核活性細菌を用いて醤油を効率よく凍結濃縮して旨味を高めるとともに、低温域での食塩と水の共晶形成現象を利用して減塩化された醤油を作製することを目的とした。

2. 研究方法

1.1 材料

市販の醤油（やまさ、商品名：本醸造）を用いた。氷晶核として *Xanthomonas campestris* INXC-1 の静止期菌体を用いた。4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸を含むペプトン-イーストエキス培地を用いて25℃で60時間培養した^{7,8)}。

1.2 熱収支

醤油（60 mg）を銀セルに入れ、水を対照として示差走査熱量計（第二精工社 SSC5000）の試料室にセットし、液体窒素で-60℃にまで冷却後、2℃/分の速度で-5℃まで加温した。

1.3 濃縮度および収率

内部標準として醤油1リットルあたり1 gのチミジンを溶かした試料を凍結濃縮し、逆相クロマトグラフィーでチミジンを定量し、濃縮度を算出した。クロマトグラフィーの条件は、カラム：ODS（日本分光、Finepak SIL C18S）；溶媒、10%メタノールの0.1%トリフルオロ酢酸水溶液；カラム温度、20℃；検出、260nmとした。この条件でチミジンの溶出位置は7.8分であった。濃縮物のチミジン濃度に濃縮前後の体積比を乗じて収率とした。

1.4 塩分

試料を水で9培希釈して、塩分計(堀場 C-121)で測定した。

1.5 ガスクロマトグラフィー

試料(1 µl)を直接注入してクロマトグラフィーを行った。条件は、装置、島津 GC-14B) ; 検出、FID ; カラム、DB 624キャピラリー (0.53mm x 30m) ; カラム温度、60℃で3分間保持後、5℃/分の150℃までの昇温 ; 注入部および検出部の温度、150℃ ; キャリアーガス(ヘリウム)流速、15ml/分 ; スプリット比、1 : 4とした。

1.6 官能検査

6名の訓練されたパネルを用いた。

1.7 アミノ酸分析

原料と凍結濃縮醤油のアミノ酸をアミノ酸分析計(日立 835型)を用いて定量した。

1.8 ²³Na NMR

NMRスペクトロメータ(JEOL JNM-A500)を用いて試料に含まれる²³Naの線幅を20℃で測定した。

3. 研究結果および考察

低温で溶解度が低かったり、共晶を形成するような化合物は、凍結過程で沈殿となり、ろ過や遠心分離によって除くことができる。食塩は低温で共晶(H₂O · 2NaCl)を形成することが知られているので、醤油を凍結濃縮すれば旨味を強めるだけでなく、減塩することも可能となる。

一方、生活習慣病予防の観点から、食塩の過剰摂取が問題となっている。反面、醤油は嗜好性の高い調味料として日本人に古くから親しまれてきた。風味を損なわないで減塩醤油ができたという願望のもとに、凍結濃縮の手法を用いて食塩と水が共晶を作る性質を利用して、減塩醤油を作製した。まず、凍結温度を求めるために、醤油の融解過程での熱の収支をしらべた。Fig. 1に示すように、サーモグラムから-18℃~-25℃の温度範囲で共晶が生成することが示唆されたので、フリーザーの温度制御をも考慮して醤油の凍結温度を-27℃に設定した。

凍結させた醤油をメッシュの異なるふるいでろ過したところ、いずれも1.6倍に濃縮されており、収率は85%であった。濃縮物の塩分はふるいの目の大きさによって大きく異なった。目の大きさが0.71mm(22メッシュ)以下の場合、ろ液の塩分は13%となり、目の大きさが1.7mm(10メッシュ)および2.0mm(8.6メッシュ)の場合には、塩分はそれぞれ、14%および16%となった。この結果は、共晶の長径が1~2mmであることを示唆している。このデータに基づいて、凍結醤油のろ過に22メッシュのふるいを用いることにした。

ガスクロマトグラフィーの結果、醤油の揮発性成分はどれも1.6倍に濃縮されてい

た (Fig. 2) が、もともとの香りが強いために、官能評価では違わないと判定された。香りと異なって味は濃縮醤油と原料の醤油で違うと評価された。凍結濃縮醤油では塩味が薄く、旨味が濃かった。Fig. 3にアミノ酸組成を示す。チロシンは低温での溶解度が低いために、濃縮醤油での濃度は原料醤油の0.9倍であったが、その他のアミノ酸は1.4~1.8倍に濃縮されていた。食塩濃度は、原料醤油で15%、凍結濃縮醤油で13%であった。

浜野¹²⁾ は醤油に大量の結合水 (不凍水および水和水) が存在すると述べている。本研究で-27℃で凍結した醤油に氷と共晶のほかに大量の液体が存在していたことから、浜野の説が支持された。さらに、凍結濃縮醤油の塩味は同じ食塩濃度の原料醤油のそれよりも薄く感じられた。醤油を凍結して得られた氷を繰り返し0℃の水で洗浄すると、氷には塩分が検出されなくなった。この事実は、氷には食塩が組み込まれないことを示唆するものである。共晶の融解に起因する熱の収支は-25~-18℃以外には認められず、-25℃では共晶の形成が終了しているはずである。

しかしながら、凍結濃縮醤油には約1/2量の食塩が存在していた。これらの結果から、醤油には結合塩が存在し、呈味を和らげているという仮説を提案し、実験的に確かめた。醤油から非透析性画分を分離し、食塩水と混ぜると、食塩水単独のときよりも塩味が薄くなり、²³NaのNMRの線幅が大きくなった (Fig. 4)。酸性条件にすると、NMR線幅は小さくなった。この結果から、醤油の食塩の一部はイオン結合でメラノイジンなどと結合しており、穏和な味をかもし出していると結論した。発酵食品の熟成は呈味成分や香り成分と結合できるような化合物を生成させる過程なのかも知れない。

4. 文献

- 1) S.E. Lindow, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 21, 363-384 (1983).
- 2) S. Arai and M. Watanabe, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 169-175 (1986).
- 3) M. Watanabe and S. Arai, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 557-563 (1987).
- 4) M. Watanabe, J. Watanabe, K. Kumeno, N. Nakahama, and S. Arai, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2731-2735 (1989).
- 5) M. Watanabe, K. Kumeno, N. Nakahama, and S. Arai, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2055-2059 (1990).
- 6) K. Kumeno, K. Kurimoto, N. Nakahama, and M. Watanabe, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 447-450 (1994).
- 7) M. Watanabe, J. Watanabe, T. Makino, K. Honma, K. Kumeno, and S. Arai, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 994-995 (1993).
- 8) M. Watanabe and J. Watanabe, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 64-66 (1994).

- 9) K. Honma, T. Makino, K. Kumeno, and M. Watanabe, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1091-1094 (1993).
- 10) N. Nagashima and E. Suzuki, in "Properties of Water in Foods", ed. by D. Simatos and M.L. Multon, NATO ASI Series E, Applied Science, 90, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 555-571 (1985).
- 11) M. Watanabe and S. Arai, *J. Food Eng.*, 22, 453-473 (1994).
- 12) M. Hamano, in "Developments in Food Engineering", ed. by T. Yano, R. Matsuno, and K. Nakamura, Academic and Profesional Pub., Glasgow, pp. 179-181 (1994).

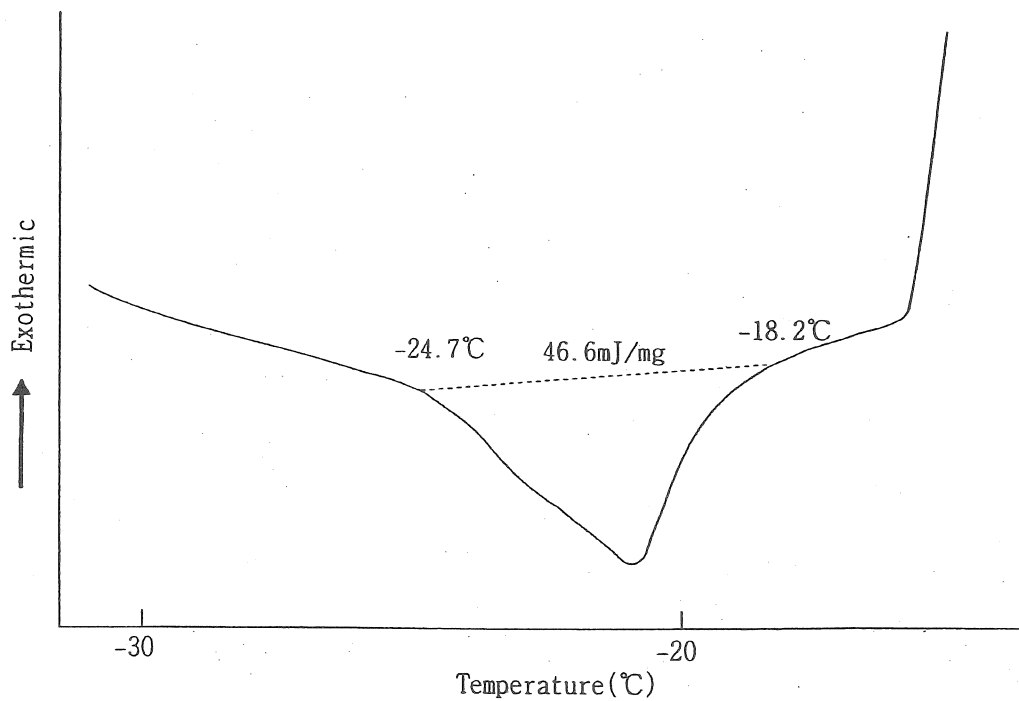


Fig. 1. Thermogram for Soy Sauce.
The length of the vertical arrow is 10mW.

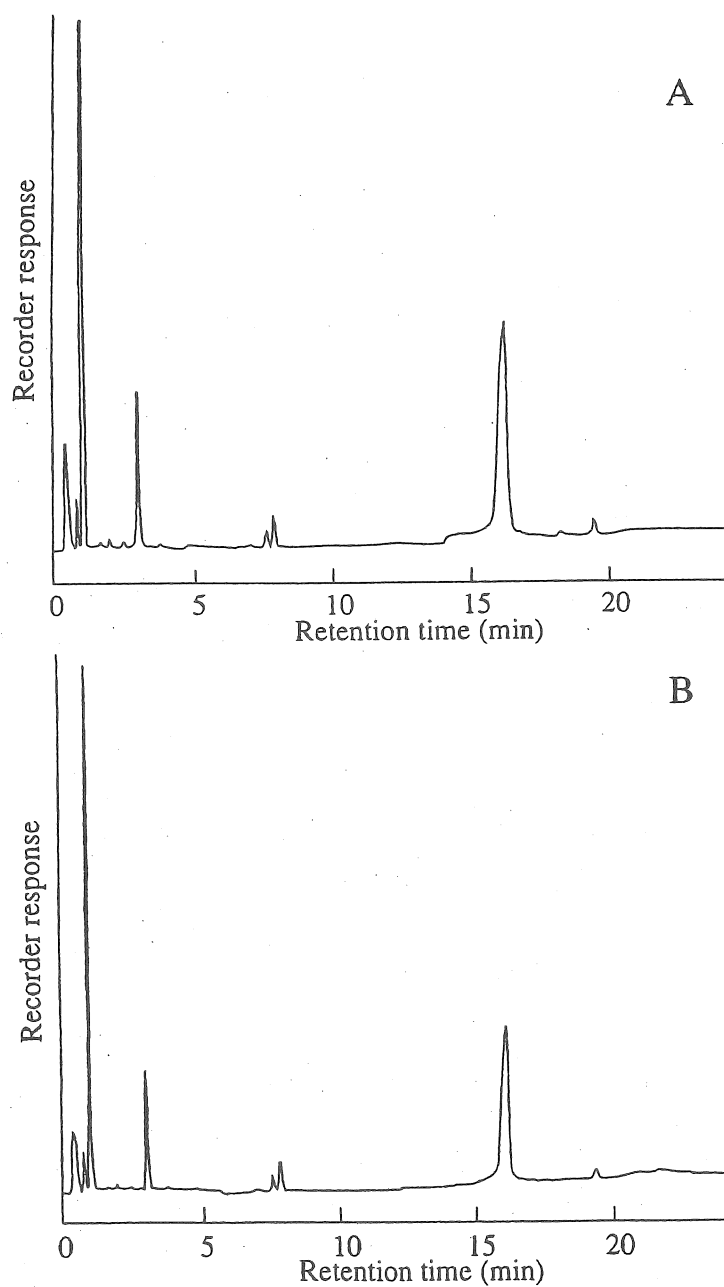


Fig. 2. Gas Chromatograms of the Freeze-concentrated Product (A) and the Original Soy Sauce (B).

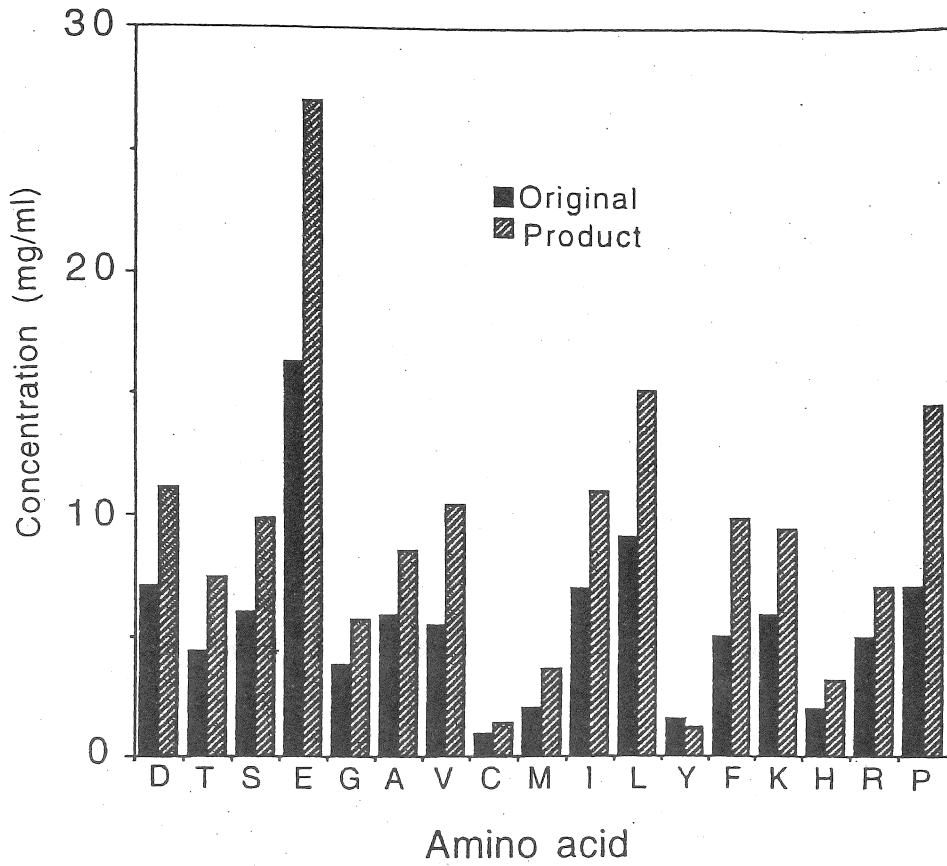


Fig. 3. Amino Acid Concentrations in the Freeze-concentrated Product (slant-lined column) and the Original Soy Sauce (solid column).

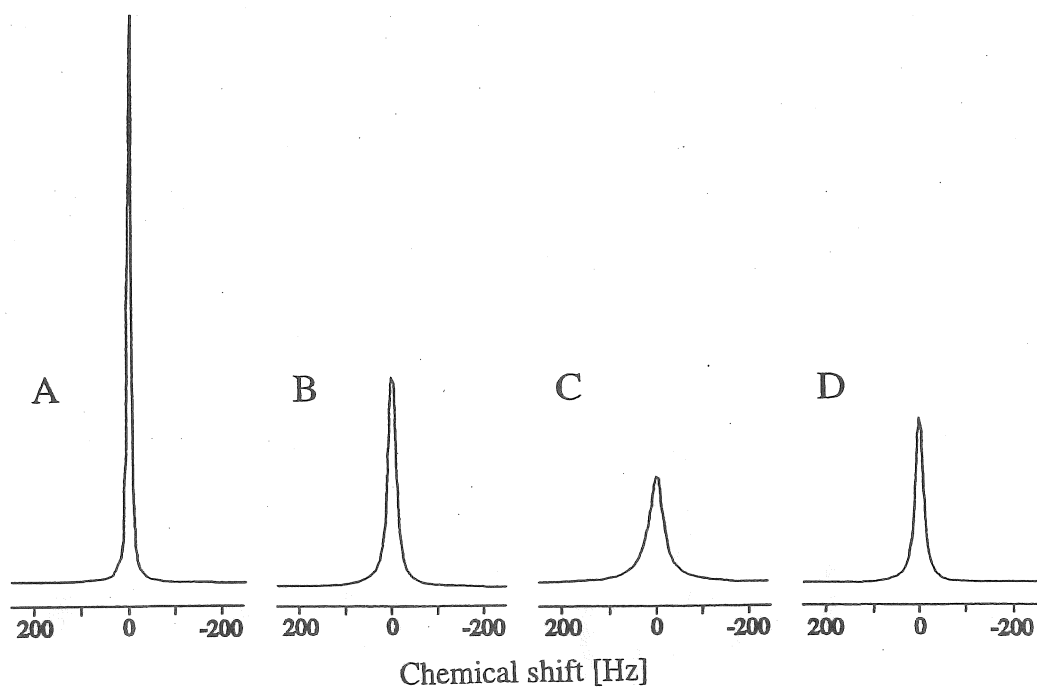


Fig. 4. High-resolution NMR Spectra of ^{23}Na in the Aqueous Solutions of NaCl at 10% in the Presence and Absence of the Non-diffusible Fraction.

A, absence of the non-diffusible fraction; B, presence of the non-diffusible fraction at 1%; C, presence of the non-diffusible fraction at 10%; and D, presence of the non-diffusible fraction at 10% immediately after acidification with HCl at 1N. Line widths of A, B, C and D were 7.74, 19.85, 37.27 and 19.36 Hz, respectively.

No. 9749 Development of a New Food from Difficultly Freezable Material, Soy Sauce

Michiko Watanabe and Soichi Tanabe

Faculty of Education, Tokyo Gakugei University

Soya sauce was frozen in the presence of ice nucleation-active bacterial cells at -25°C , and the resulting frozen soya sauce was filtered through a 22-mesh screen to obtain a freeze concentrated product. Salt formed in part eutectic crystals and eliminated from the product by filtration. The product retained well the original aroma and taste substances. A part of salt in soy sauce formed no eutectic $\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{NaCl}$ crystals at a subzero temperature and remained in a freeze concentrated product which tasted less salty than its material at the same NaCl concentration. In the high-resolution NMR spectrometry for ^{23}Na a broader line width was obtained in the concentrated soy sauce than in the material. A broader line width of ^{23}Na was also observed in an aqueous NaCl solution added with a non-diffusible soy sauce fraction. The line width became narrow by acidification. The data indicate that a part of the salt in soy sauce interacts with its non-diffusible fraction by ionic bonding and also that such a bound salt formed no eutectic crystals and caused a mild taste of the resulting product.