

発表番号 42

食品腐敗のリアルタイム・デジタル測定による、塩類の防腐効果の定量的解析

Quantitative analysis of the antiputrefactive effect of salts on the basis of the real-time and digital observation of food putrefaction.

田中晶善¹⁾、妹尾啓史²⁾、深田はるみ³⁾、三宅英雄¹⁾

1) 三重大学生物資源学部、2) 東京大学大学院生命農学研究科、3) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

本研究では、食品の腐敗を対象として、腐敗過程をリアルタイムで非破壊デジタル測定することができるシステムを作成し、そのシステムを用いて、腐敗に対する食塩の防腐効果を定量的に測定・評価することを試みた。

様々な食品（5 g）について、種々の濃度の食塩を加えた後オートクレーブし、腐敗菌を植菌した後、微少熱量測定装置によって腐敗（微生物増殖）に伴う発熱量を測定した。アサリについて得られた結果（塩濃度0～5.8重量%）を下図に示す（25℃で測定）。腐敗に伴う発熱の様子と、食塩による腐敗の遅れをデジタルデータとして、また可視的に測定することができた。この結果の解析から、下図の例については、腐敗速度定数 μ が 0.28 h^{-1} 、また腐敗活性の時間遅れを指標としたときの、腐敗を50%抑止するための塩濃度 K が3.4%、また腐敗を抑制するための最小濃度MICが7.0%と求められた。このほかに、豆乳、エビ、メンマなど、様々な食品について、 μ 、 K 、およびMICを求めることができた。

これらの結果は、食品の腐敗予測や腐敗制御についての基本的なデータを提供するものと考えられる。

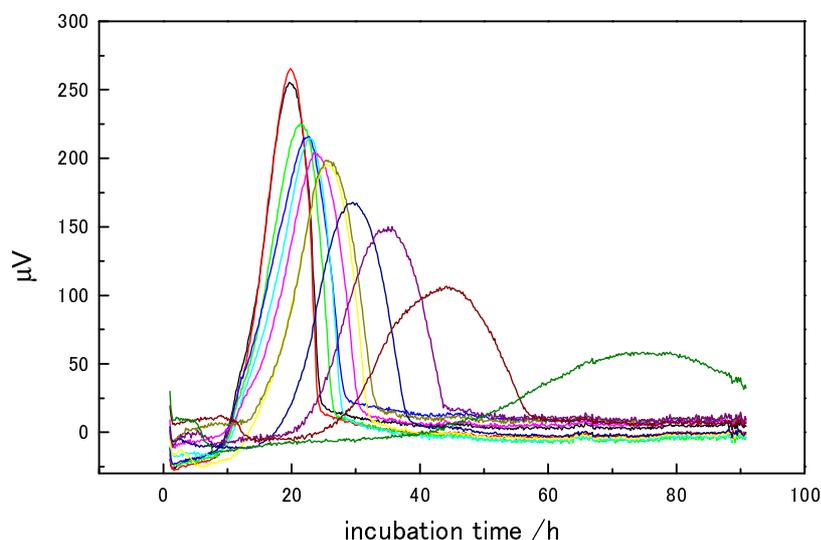


図 アサリの腐敗過程と、食塩による防腐効果の測定

腐敗に伴う微生物の代謝熱を指標として測定した。塩濃度は左より右へ0～5.8%と増加している。25℃で測定。試料量はいずれも5 g。

14

助成番号 0442

食品腐敗のリアルタイム・デジタル測定による、塩類の防腐効果の定量的解析

助成研究者 田中 晶善 (三重大学生物資源学部生物圏生命科学科)

共同研究者 妹尾 啓史 (東京大学大学院生命農学研究科応用生命化学専攻)

深田はるみ (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

応用生命科学専攻)

三宅 英雄 (三重大学生物資源学部生物圏生命科学科)

1. 研究目的

1.1 目的

「食の安全・安心」は、現代社会において最も強く要求されている問題であり、様々な視点から様々な方法を用いた取り組みがなされている。

本研究では食の安全・安心に資するための基礎研究の一つとして、食品の腐敗を対象として、腐敗過程をリアルタイムで非破壊デジタル測定することができるシステムを作成し、そのシステムを用いて、腐敗に対する塩の防腐効果を定量的に測定・評価することを試みた。

1.2 研究の背景

腐敗は、食品中の微生物の増殖に伴う、食品の品質の劣化であると考えられる。食品の腐敗と菌数には相関があるので、腐敗過程の測定は通常、生菌数を数える方法によって行われている。腐敗の原因となる微生物の種類は多様であるため、この方法では、食品の性質や輸送・貯蔵形態を考慮して優勢と考えられる微生物を選定し、それに適した培地・培養条件を設定して測定しなければならない。これには経験や熟練を要することが多い。また、適切な系を設定したとしても、生菌数計測によって一連の腐敗過程を測定するにはかなり膨大な「シャーレの山」との格闘が必要である。

また、化学的分析に基づく測定の場合、測定過程の一定時間ごとにサンプルを採取し、何らかの形で破壊し、特定の成分に着目してその定量分析を行うことになる。このような方法ではやはり手数がかかると共に、リアルタイム測定ではないという問題もある。

他方、微生物の代謝熱はかなり大きく、質量あたりで比較するとヒトの100倍ほどの発熱があるので、発熱速度を高感度熱測定すれば、腐敗に伴う微生物増殖過程を上記のような面倒な方法によらず、非破壊・リアルタイムで、簡便に測定できると予想される。現在の微少熱測定法(マイクロカロリーメーター)では、1 μW の発熱を測定することは必ずしも困難ではないが、この値は酵母ではおよそ100個体の代謝熱に相当する。10g程度の食品

の腐敗に關与する微生物数はこれとは桁が異なることから、腐敗測定に必要な熱測定装置の感度は必ずしも高いものである必要はない。

熱測定に基づくこの方法は、豊富な経験や知識・技術を必要とする従来法とは測定原理を基本的に異にする、「非破壊丸ごと測定」であって、通常では培養が困難な微生物が關与しても何ら問題なく、熟練を要することなく、半ば機械的に、定量的に測定できることが期待できる。

筆者等は予備的な実験を行うことによって微生物の代謝熱測定が可能であることを確かめ、この方法を食品の腐敗過程の測定、および塩類の防腐効果の測定に適用することとした。

2. 研究方法

2.1 測定装置

腐敗過程の測定には、Fig. 1 に示すような外観の熱測定装置を作成して用いた。この装置は、大阪府立大学 高橋克忠名誉教授のデザインに基づくものである。図の中央が熱測定部であるが、発泡スチロール等何重もの断熱材で覆われているため、本体の大きさは、外観の数分の1程度である。

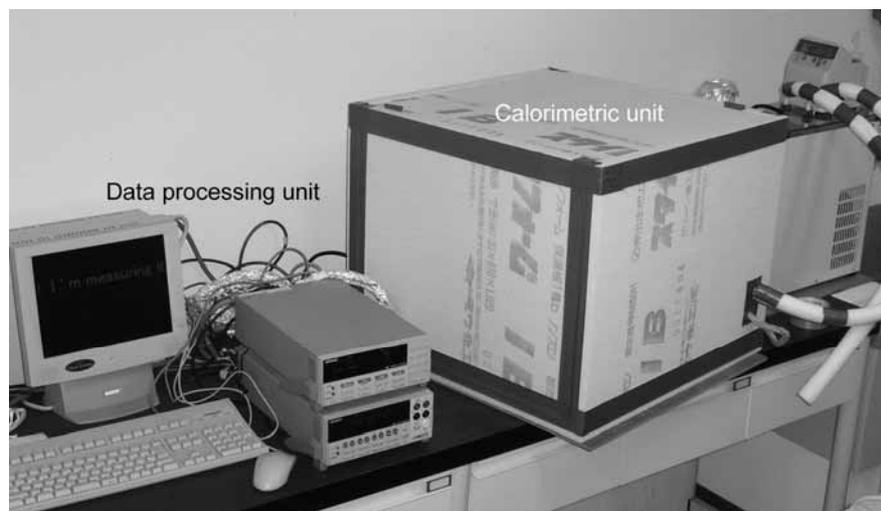


Fig. 1 Outlook of the microcalorimeter used for the measurement of observation of food putrefaction.

熱測定概念図をブロックダイアグラムで Fig. 2 に示す。本装置は、腐敗(微生物増殖)に伴う発熱によって生じる温度差を、熱電対をセンサーとして用い、発熱速度を起電力として測定するものである。装置は十分な断熱状態にあるわけではないので、発生した熱量は外部に逃げる。そのため、時間 t において測定されるシグナル $g(t)$ がそのまま発熱量を表すわけではないが、次式のような簡単な補正によって系を仮想的な断熱状態においた

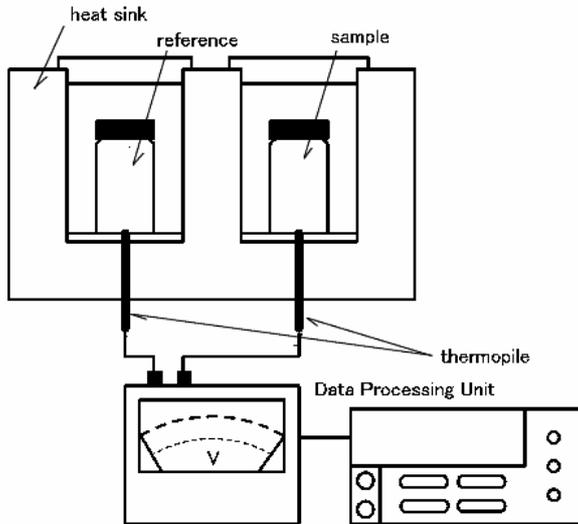


Fig. 2 Block diagram of the calorimetric system for the observation of putrefaction.

ときの生成熱の経時変化 $f(t)$ を得ることができる^{1,2)}。

$$f(t) = g(t) + K \int g(t)dt \quad (1)$$

ここで K は装置固有の熱伝導定数である。

なお、おおまかには、この装置の発熱速度シグナルの $100 \mu\text{V}$ が 1.7 mW に相当していた。

この装置には 25 チャンネルがあるが、うち一つは参照用(ブランクセル)であり、測定可能なサンプル数は 24 である。

2.2 測定方法

測定対象とするサンプルを、固体試料の場合は 5 g を、また液体では 5 mL をとって、それぞれ容積 30 mL のバイアルに入れ、 120°C で 20 分間オートクレーブした後、必要に応じて種々の濃度の食塩を加え、さらに植菌を行い、ただちに熱測定装置の測定部に入れ(Fig. 3) 測定を開始した。参照用として、バイアルに 5 mL の水を入れたものを用いた。測定は 25°C で行い、データのサンプリング時間は 10 分毎とした。



Fig. 3 Loading a sample to the calorimeter.

塩を加えた場合の濃度は、固体資料の場合は重量% (塩質量 / 試料質量) で表した。

植菌用試料(腐敗菌)としては、おかゆを一週間、室内に放置して腐敗させ、破碎後、

ガーゼで漉したものを原液とし、蒸留水で1,000倍に希釈したものを50 μ l 測定用試料に加えた。

測定対象としては、アサリ、エビ、ハマグリ、牛乳、豆乳、GP培地、ナメコ、トマト、および、メロンなどを用いた。

3. 研究結果

3.1 腐敗に伴う微生物増殖サーモグラム

様々な食品を対象として測定した結果の腐敗サーモグラム ($g(t)$ 曲線) を Fig. 4 に示す。

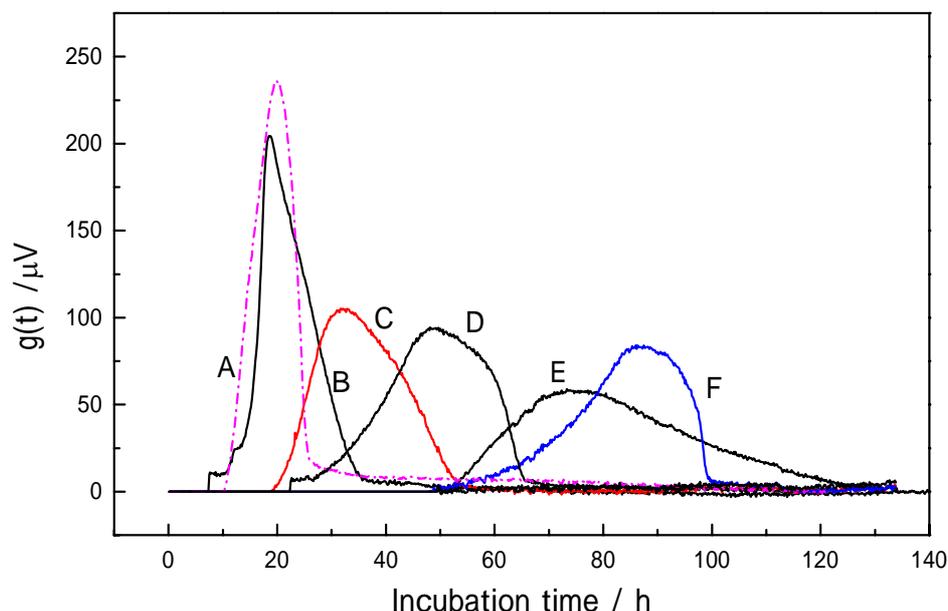


Fig. 4 Putrefaction thermogram of clam(A), soymilk (B), *nameko* mushroom (C), shrimp (D), tomato (E), and melon (F). Observed at 25°C. No salt added. Samples were autoclaved at 120°C for 20 min, then inoculated before starting the observation.

豆乳の場合 (Fig. 4-B) では、およそ10時間後から微生物増殖が顕著となって発熱が観測されはじめ、約18時間後にピークに達し、およそ25時間で発熱が終了している。これに対してエビの場合 (Fig. 4-D) は、ピークに達する時間がおよそ45時間となっている。このようにきわめて簡便に、しかも直接視覚に訴える形で、微生物増殖としての腐敗のしやすさや腐敗過程を測定できることができる。この結果の解析については、次節で述べる。

3.2 アサリの増殖サーモグラムと塩による防腐効果の解析

アサリを対象として、種々の食塩の共存系で測定した結果の増殖サーモグラムを Fig. 5 に示す。同一量の試料について、塩濃度がゼロ (左端の曲線) から5.8% (右端の曲線) までの範囲で測定した結果である。塩が共存すると、塩濃度の増大に伴って腐敗開始時間や

ピークに遅れが見られ、この場合も防腐効果が、定量的であるだけでなく、視覚的にも理解されやすく測定できた。

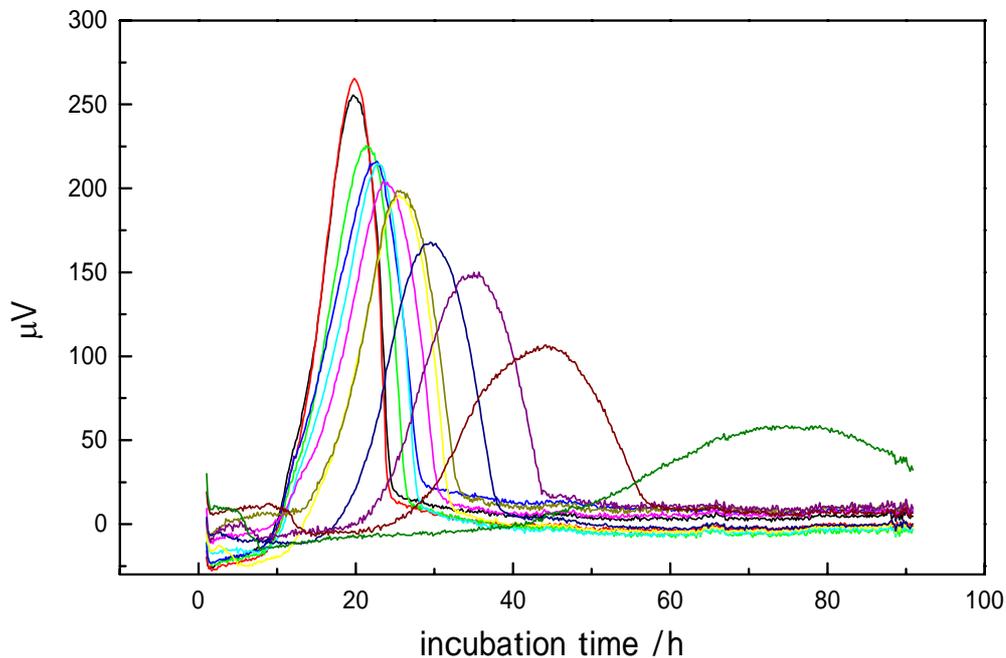


Fig. 5 Putrefaction thermogram of *asari* clam in the presence of various concentration of salt. Salt concentration increased from 0 to 5.8 % from left to right. Observed at 25°C.

Fig. 6 は、それぞれの増殖サーモグラムについて、(1)式に基づいて描いた腐敗曲線($f(t)$ 曲線)である。この曲線は生成熱の経時変化を表しており、微生物数の経時変化に対応する。

微生物の対数増殖期においては、 $f(t)$ は、次式で表される。

$$f(t) = AN_0 \exp(\mu t) + BN_0 \quad (2)$$

ここで A と B は定数、 N_0 は初菌数、 μ は腐敗速度定数(増殖速度定数)である。

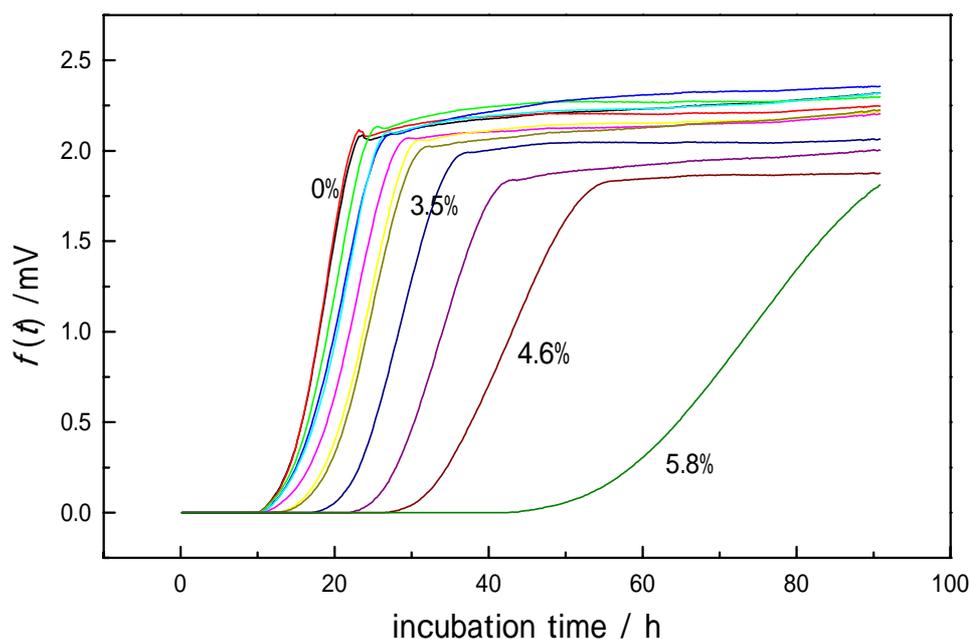


Fig. 6 Putrefaction curve of *asari* clam in the presence of various concentration of salt drawn from Fig. 5 using equation 1 (see text).

この曲線と(2)式に基づき、腐敗速度定数(増殖速度定数)が、塩非存在系では 0.28 h^{-1} 、また 3.5%共存系においては 0.21 h^{-1} などと評価された。

なお、Fig. 4の結果については、それぞれの腐敗速度定数が、0.28(ハマグリ)、0.32(豆乳)、0.16(ナメコ)、0.11(エビ)、0.060(トマト)、および 0.084 h^{-1} (メロン)と評価された。

塩による腐敗抑制効果の評価法については様々な方法が考えられる。 $f(t)$ 曲線は熱生成の経時変化を表しており、この時間微分はいわば「腐敗活性」(微生物の増殖活性)を表すことになる。そこで、その腐敗活性が一定値 α に達するまでの時間が塩によって遅れることを指標とする方法が考えられる。(これは、反応速度を速度定数で表す方法と、半減期で表す方法との関連と同様である。)

そこで、塩が存在しない場合に増殖活性が α に達するまでの時間を $t(0)$ 、また塩濃度 i におけるそれを $t(i)$ とすると、その比、 $t(0)/t(i)$ は腐敗の遅れから見た比増殖活性を表すことになる。

Fig. 6に基づく解析の結果を Fig. 7 に示す。この結果から、腐敗の 50%抑制に必要な塩濃度は 3.4%、また最小生育阻止濃度 MIC は 7.0%と求められた。

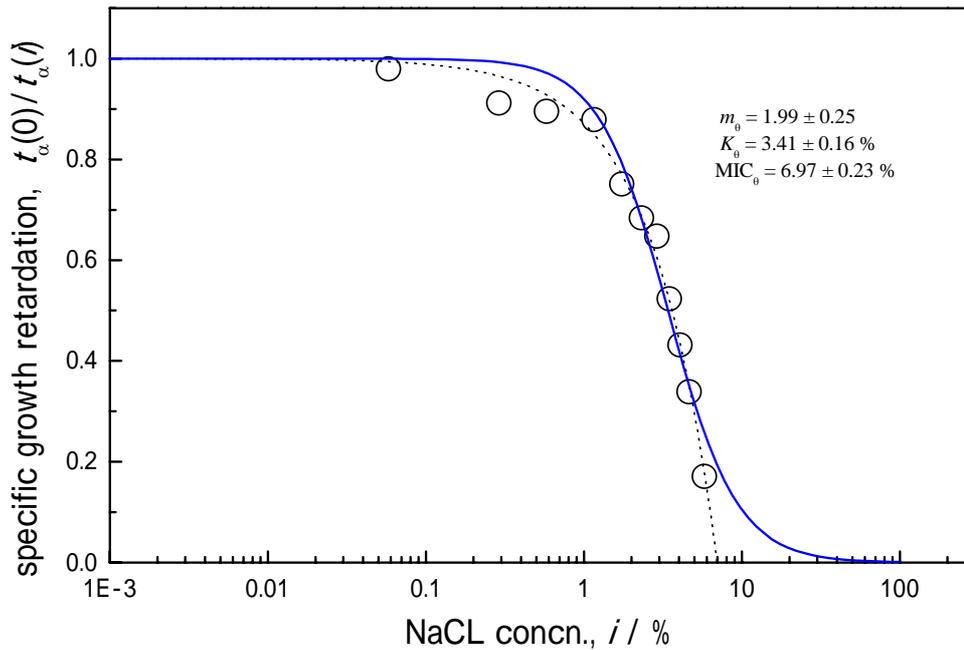


Fig. 7 Analysis of the antiputrefactive effect of salt.

3.3 様々な食品の腐敗測定

上記と同様にして、2.2節に述べたような種々の食品の腐敗と、塩の腐敗抑制効果を測定・解析した。その一例として、ハマグリを対象としたときの腐敗サーモグラムを Fig. 8 に、また腐敗曲線を Fig. 9 に示す。

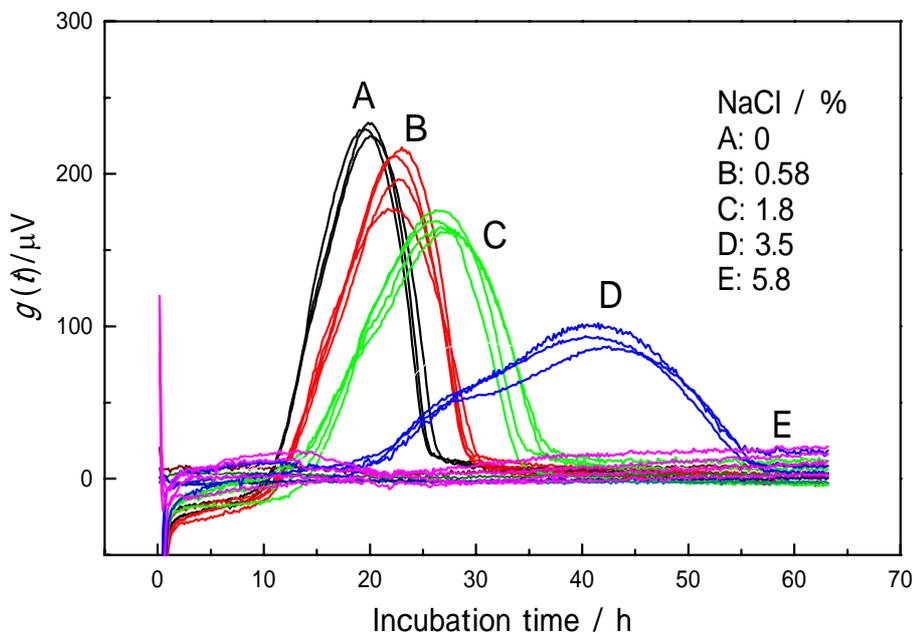


Fig. 8 Putrefaction thermogram of clam (*hamaguri*) in the presence of various concentration of salt. Salt concentration is shown in the figure. Observed at 25°C.

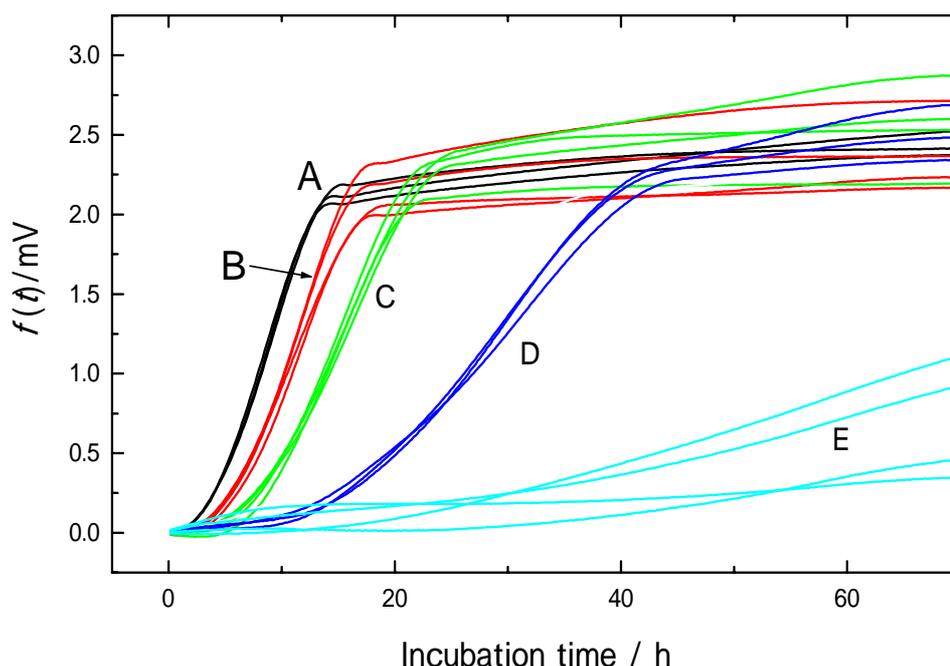


Fig. 9 Putrefaction curve of shrimp in the presence of various concentration of salt.

同条件で測定したものについては、それぞれよく一致した結果が得られており、不均一で個体差も比較的大きいと考えられるサンプルであっても、本法によって定量的解析ができる程度に再現性よく腐敗過程が測定できることがわかる。またこの場合、 $K = 3.2\%$ 、 $MIC=6.5\%$ と求められた。

同様の方法で、豆乳については、 $K = 4.7\%$ 、 $MIC=5.7\%$ と求められた。

4. 考察

以上のように、本法によって食品の腐敗過程や、腐敗に対する塩の抑制効果を、「熱」を指標として、リアルタイムでデジタルデータとして測定可能であること、またその結果の解析から、それぞれの系についての腐敗速度、および塩による腐敗抑制の効果を定量的に評価できることがわかった。

腐敗サーモグラムは、数値処理に適しているだけでなく、腐敗過程が視覚的・直感的にも分かるという意味で優れた性質を持っている。

これらの結果は、腐敗の予測や制御に関する基礎的なデータとなるものであり、賞味期限、消費期限についての客観的な根拠の一つを提供するものであると考えられる。

5. 今後の課題

5.1 問題点と今後の展望

本法によって腐敗過程や防腐効果を定量的に解析できることがわかったが、解決すべき

点も多々残されている。たとえば同一のサンプルの形状は腐敗速度にどのように影響するのか、その場合、防腐剤の K や MIC にはどのように影響するのか(あるいは影響しないのか)などについて系統的に調べる必要がある。

また現在の方法の問題点の一つは、(本法では、生菌数と相関関係のある量を測定することができ、したがって増殖速度を評価することができるが)生菌数そのものを計測することはできない、という点である。この点については、熱測定法そのものの改良というよりはむしろ、個別食品の腐敗に関与する主要な微生物の同定、各種微生物の増殖速度や代謝熱の測定とデータベース化など、個別データの蓄積の上に解析方法を高精度化していくという方策が考えられる。今回の測定についても、植菌用に用いた試料に含まれる微生物の同定を行うことだけでも、より有用なデータになりうると思われる。

このような将来展望に基づき、特定の食品または培地、特定の微生物、腐敗抑制物質や温度などの特定の条件との組み合わせにおける腐敗速度などを体系的に測定し、これをデータベース化することを計画している。

文 献

- 1) 高橋克忠：細胞増殖、生物物理、35、32 - 35 1995

謝 辞

研究助成金を恵与いただいたソルト・サイエンス研究財団に深謝いたします。

測定および解析に便宜・指導を賜った高橋克忠大阪府立大学名誉教授に感謝いたします。実験に際しては、三重大学大学院生物資源学研究科2年生、坂宮智樹氏の協力を得ました。

Quantitative analysis of the antiputrefactive effect of salts on the basis of the real-time and digital observation of food putrefaction.

Akiyoshi Tanaka¹⁾, Keishi Senoo²⁾, Harumi Fukada³⁾, Hideo Miyake¹⁾

1) Faculty of Bioresources, Mie University, 2) Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, 3) Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

Summary

Putrefaction processes of foods were digitally observed in real time by a microcalorimetric method using the metabolic heat of microbes as a probe. Five gram of a foodstuff such as *asari* clam was autoclaved at 120°C for 20 min in the absence and presence of various concentration of salt, followed by inoculation.

The putrefactive thermograms were good measure for recognizing the putrefaction process visually and were useful for numerical analysis. For the case of *asari* clam, for example, the putrefactive rate constant μ in the absence of salt was evaluated to be 0.28 h⁻¹. Increased concentration of salt decreased the rate, and 50%-antiseptic concentration K and the minimum inhibition concentration MIC were evaluated to be 3.4% and 7.0%, respectively, at 25 °C. The values of these parameters were also evaluated for several foodstuffs such as clam (*hamaguri*), milk, soymilk, *nameko* mushroom, tomato, and melon. These kinds of data will enable us to predict the degree of putrefaction of foods. We plan to construct a data base that provides the values of the putrefactive parameters and to calculate the degree of putrefaction as a function of time and the concentration of antiseptic agent or seasoning.