

サロン

## 高圧食品開発物語 (その4)

— 高圧処理による低菌化緑色野菜の開発 —

Story of Development of High-Pressure Processed Foods, Part 4

- A method of developing germ-free green vegetables -

山崎 彬

Yamazaki, Akira

杵淵美倭子

Kinefuchi, Miwako

Green vegetables are a very important nutritional source for maintaining our health. However, because the chlorophyll converts to pheophytin with the fading of its green color when subjected to heat sterilization, it has long been a dream to store green vegetables for long periods of time. In our method, sterilization and inactivation of enzymes are carried out by a combination of high pressure and heat in an effort to develop green vegetables with superior storage characteristics. As a result, we have succeeded in reducing the micro-organism content in spinach, field peas and broccoli to an acceptable level in the practical use by the application of high pressure of 400 MPa at 55°C for 10 min.

[*high-pressure processed foods, chlorophyll, germ-free green vegetables, sterilization*]

### 1. はじめに

微生物に高圧力を加えて、殺菌、損傷、増殖の抑制などを行なったのは 100年程前からです。そして、その多くが C. E. ZoBell や A. M. Zimmerman らによって纏められています[1]。結果は微生物の種類で異なるために一律ではありませんが、ほとんどの微生物が、圧力による影響を受け、殺菌できると判断されます。殺菌のメカニズムは複雑で、その後、多くの研究者によって解明されつつありますが、概ね次のように要約することができます。大腸菌などの微生物に圧力を加えていくと 100-200 MPa の比較的低い圧力で、細胞分裂に関わる酵素の活性が低下し、増殖活動の低下や分裂の停止が始まります。200 MPa以上になると、生体を構成しているタンパク質の変性と共に細胞膜が損傷を受け、まず低分子物質が外部に漏出します。300 MPa以上では組織が破壊されて高分子の

細胞内液が漏出しますが、これは核酸物質やRNA様物質を測定することで確認できます[2]。この不可逆的損傷に至る圧力は、生物の種類や性質、増殖形態、および代謝環境によって大きく異なります。一般に、ウイルスやグラム陰性菌および酵母などは圧力耐性が弱く、糸状菌、乳酸菌および球菌などは、菌種によって差が大きく、耐熱性の細菌ほど耐圧性にも優れていることが確認されています[3]。しかし、これらの細菌も栄養型の場合には、55°C、400-600 MPa、10 minの処理で殺菌が可能です。最も耐圧性に優れているのは *Bacillus* 属の芽胞ですが、処理温度、乳化剤、pHなどを調整することにより、実用的なレベルまでの殺菌が可能となります[4]。

一方、野菜をはじめ肉や魚介類などの流通は、地球規模で活発化し、諸外国からの輸入も急増しています。海外からの食品を通しての感染症や食中毒事故も多く、食品工場では、食材の選択や製

〒947-01 新潟県小千谷市高梨町 1003-1 越後製菓(株)総合研究所

Research Institute, Echigo Seika Co., Ltd., 1003-1, Takanashi-machi, Ojiya, Niigata 947-01

造工程での細菌管理（HACCP方式による管理など）が本来の加工と同様に重要視されています。当然家庭でも、「口に入るものは必ず火を通す習慣をつける」など、永い歴史の中で多くの汚染を乗り越えてきた諸外国の調理方法に学ぶことがあると思います。しかし日本の食習慣は「生」に拘って「素材を生かした調理法」に支えられている部分が多く、結局は鮮度の高い、微生物的にきれいな食材が要求されています。

このような環境の中で、高圧を用いた殺菌方法は、新しい「生の味」を提供し、レトルト食品とは異なった分野で、その価値が認められていくものと考えられます。

この物語(その1)では、既に「蓬(よもぎ)入り餅」の開発に関連して、蓬に生息する各種微生物の殺菌について述べました。したがって、重複を避けるために今回は、熱で退色し易いクロロフィル(葉緑素)を含んだ野菜の中から、ホウレンソウ(*Spinacia oleracea* L.)、サヤエンドウ(*Pisum sativum* L.)、ブロッコリー(*Brassica oleracea* L. var. *botrys* L.)について、無菌化を条件として、熱と圧力によるクロロフィルの変化を定量的に比較してみました。サロンでは紙面に限りもありますので、詳細については機会をみて論文の形で発表したいと思います。

### ★ 健康に役立つ葉緑素

昔から「緑の野菜は身体にいい!」といわれています。実は、私たちの血液組成であるヘモグロビンの構造は、この葉緑素と瓜二つです。ピロール環の中心にあるマグネシウムが鉄に置換されると、植物の緑が哺乳動物の血液になるのは驚きです。そして生体内での働きも酸素や炭酸ガスを出し入れする点では全く同じです。昆虫や軟体動物の血液では銅に置換されて青色のヘモシアニンとなり、これも同じ役割ですから「瓜三つ」になります。人間が遠い昔、植物から進化したことを思い出せば、ごく当然なことなのでしょう。

葉緑素は私たちの血液を造るのに有益だけでなく、肝臓機能の維持、傷の治癒、細菌阻止、免疫活性、発癌防止、解毒、老化防止などの各種に効果があり、これこそが不老長寿の媚薬といっても過言ではないでしょう。健康は、まず緑の菜葉(ナッパ)を食べることから始めましょう。

## 2. 試料の選定

家庭で「青もの野菜」として利用されている中から、ホウレンソウ(あかざ科) [千葉県産]、サヤエンドウ(まめ科) [中国産]、ブロッコリー(あぶらな科) [カリフォルニア産]、の平均的なものを選出しました。実験に先立って、産地や品種の違いによるクロロフィルの安定性を確認しました。ホウレンソウの場合、京都府(亀岡)と徳島県産のものが、高知県や宮城県(仙台)産のものに比べて優れていました。また、中国産の冷凍輸入品では、繊維が硬く葉の厚いものが安定性に優れていることが判り、これは触感や視覚の判断と一致し、成育条件や収穫時期に依存すると考えられました。結局、触感と視覚に従って平均的な前記の試料を選定しました。ここでは割愛しますが、露地栽培とハウス栽培の比較では、後者のクロロフィルが最初から2割程度減少していました。ビタミンやミネラルなどの含有量は、ハウス栽培でも肥料や土壌の調整で加減できますが、光が必要なクロロフィルには日射量が必要なことが解りました。

## 3. 殺菌処理条件の選定

加熱殺菌では缶詰などの場合、121℃、4 minの処理が、完全殺菌の条件として食品衛生法で義務づけられています。高圧処理でこの殺菌効果を得るには、耐圧性の芽胞細菌が存在するために他の条件を組合せる必要があります。この条件で最も有力なのが熱との併用効果です。さらに、菌種と食品の種類によって、塩類、シュガーエステル、酸、アルカリ、アミノ酸類などの組合せも効果が認められています。また、無菌化の達成には、殺菌することも大切ですが、前処理による除菌技術も重要だと考えられます。初発の菌数は最後まで影響するからです。ここでは、前処理として熱水によるブランシング(湯通し)を選択し、最近の健康志向を配慮して薬剤を使用せず、圧力に熱を併用するだけの基本的な殺菌条件を選択しました。併用した熱は、野菜の組織やクロロフィルをできるだけ変化させない、「生の食感」が残る範囲の55℃とし、組合せた圧力処理の条件は、0、200、400、600 MPaとし、保持時間を10 minとしました。

#### 4. クロロフィルの変化率を測定する

クロロフィルは、植物体中でタンパク質と弱い結合状態で存在していますが、加熱されたり極度に加圧されると、タンパク質との結合が切断されて、植物体中に存在する有機酸によってフェオフィチンに変化してしまいます。したがって、フェオフィチンへの転換率を光学濃度（吸光度）で測定すれば、クロロフィルの変化率を測定することができます[5]。Fig.1 にクロロフィルのシュウ酸によるフェオフィチンへの変化を示しました。

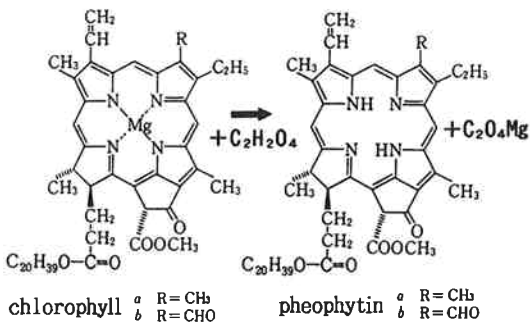


Fig.1. Conversion of chlorophyll to pheophytin by oxalic acid.

##### 4.1 抽出法と基準スペクトル

試料 5g に90%アセトン 50 mlを加えて 5分間ホモゲナイズし、更に90%アセトン 30 mlを加えながら30分間振盪し、また90%アセトン 20 mlを加えながら濾過し、完全に色素(クロロフィル)を抽出しました。最終的に90%アセトンでメスアップして100 mlとし、吸光度の測定は、この溶液 25 mlに、再度90%アセトン0.25 mlを加えて試料液としました。Dietrichの測定法に従い、534 nm および 556 nm の吸光度を測定しました。

ブランチング直後のものをクロロフィル 100%の基準溶液としました。また、クロロフィル 0% (フェオフィチン 100%) の基準溶液は、このクロロフィル100%の基準溶液を調製する過程で100 mlにメスアップして得られた溶液を25 ml採取し、0.25 mlのアセトンの代わりに同容量のシュウ酸飽和溶液を加えて完全に酸化させ、24時間静置して作製しました。Fig.2 にホウレンソウを試料とした、クロロフィル 100%およびフェオフィチン 100%の基準吸収スペクトルを示しました。

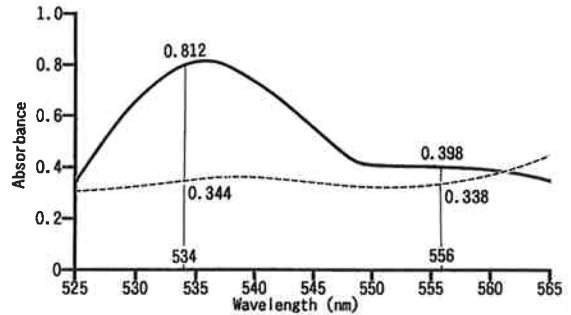


Fig.2. Absorption spectrum of 100% chlorophyll solution and 100% pheophytin solution. ---, Reference solution of 100% chlorophyll extracted from spinach; —, Reference solution of 100% pheophytin prepared by converting the chlorophyll solution by use of oxalic acid.

##### 4.2 クロロフィルの変化率

各試料のクロロフィルの変化率を  $P_c$  (Per cent conversion) とし、次式が与えられています[6]。  

$$P_c = [(R_x - R_0) / (R_{100} - R_0)] \times 100 (\%)$$

$R_0$ : 基準としたクロロフィル 100%溶液の吸光度比 (534 nmの吸光度/556 nmの吸光度)

$R_{100}$ : 基準としたフェオフィチン 100%溶液の吸光度比 (534 nmの吸光度/556 nmの吸光度)

$R_x$ : 測定しようとしている検体の溶液の吸光度比 (534 nmの吸光度/556 nmの吸光度)

##### ☆変化率の算出例

Fig.3にホウレンソウの400 MPa、55°C、10 min 処理後の吸収スペクトルを示しました。上式によりクロロフィルの変化率( $P_c$ )を計算してみます。

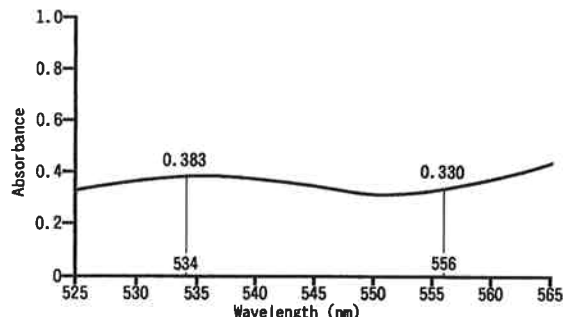


Fig.3. Absorption spectrum of chlorophyll extracted from spinach after high pressure and heat treatment of 400 MPa and 55°C for 10 min.

Fig.3 から、 $R_x = 0.383 / 0.330 = 1.161$ 、Fig.2 から  $R_0 = 0.344 / 0.338 = 1.018$ 、同様に  $R_{100} = 0.812 / 0.398 = 2.040$ 、変化率は、 $P_c = [(1.161 - 1.018) / (2.040 - 1.018)] \times 100 = 14.0 (\%)$  となります。

## 5. ブランチング(湯通し)の重要性

野菜の変質は、微生物によるものだけではなく酵素に起因することも多いのです。ブランチング(Blanching)の効用は、除菌、殺菌の効果はもちろん、パーオキシダーゼやクロロフィラーゼなどの酵素によるビタミンCの破壊、クロロフィルの変化、また、カロチノイドの酸化、酵素的変色、異臭発生の防止、などのために行なう重要な前処理でもあるのです[7]。ブランチングは、蒸気と熱湯によるものとに分類されますが、クロロフィルの損失を防止するためには熱湯で行なうほうが良いようです。同じ酵素の失活条件でも、93-98℃の熱湯で1-2分間ブランチングを行なった場合のクロロフィルの損失は5%程度ですが、85-90℃の熱湯で4-5分間行なうと15%以上になってしまいます。多くの野菜は適性なブランチングにより鮮やかな緑色となり安定した保存が可能となります。今回は条件を一定にするため、95℃、1 minの処理とし、直後に10℃の水で冷却しました。これを各々の基準試料とし、Fig.4に示しました。また、クロロフィル100%の基準溶液はこれを用いて作製しました。

## 6. 各種殺菌条件による殺菌結果

各々の試料を各殺菌条件で処理した場合の菌数の変化をFigs.5-7に示しました。

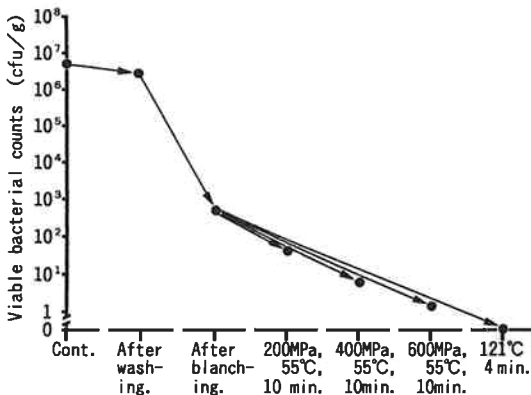


Fig. 5. Effects of sterilization on viable bacterial counts in spinach. Treatments were successively carried out in the direction of arrow. Cont., untreated sample of raw spinach.

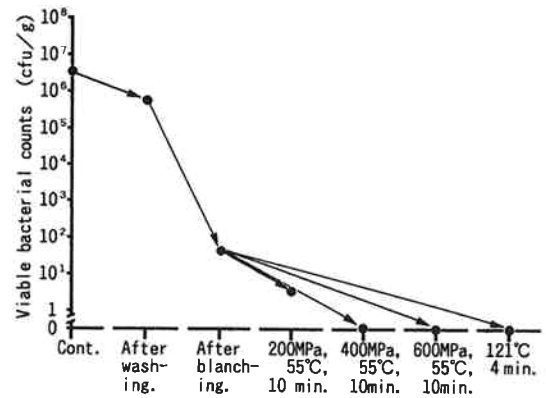


Fig. 6. Effects of sterilization on viable bacterial counts in field peas. Treatments were successively carried out in the direction of arrow. Cont., untreated sample of raw field peas.

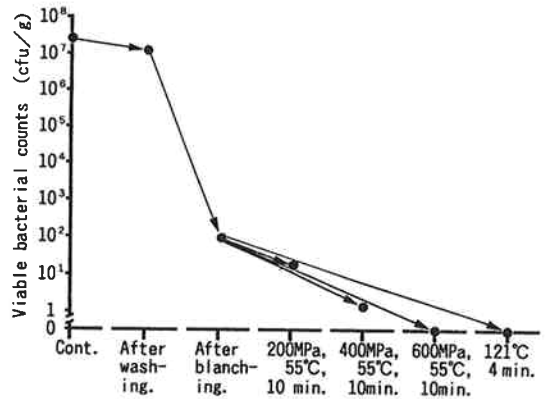


Fig. 7. Effects of sterilization on viable bacterial counts in broccoli. Treatments were successively carried out in the direction of arrow. Cont., untreated sample of raw broccoli.

## 7. 各種殺菌条件でのクロロフィルの変化率

各種条件でのクロロフィルの変化率をFig.8に示しました。また色彩の判断のために、ホウレンソウの場合のクロロフィルのアセトン抽出溶液の写真をFig.9に示しました。サヤエンドウ、ブロッコリーについても同様でしたので、割愛しました。Fig.10に121℃、4 minで殺菌した各試料の写真を示しました。比較のために、Fig.11に400 MPa、55℃、10 minの処理の各試料の写真を示しました。121℃、4 minの加熱処理では、400 MPa、10 minの圧力処理に比べて明らかに退色していることが判ります。



Spinach      Field peas      Broccoli

Fig.4. Vegetable samples after blanching with hot water of 95°C for 1 min.

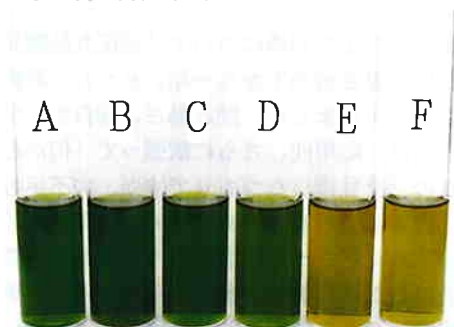


Fig.9. Difference in color of 90% acetone solution of chlorophyll extracted from spinach depending on the kind of sterilization process. A, after blanching; B, after pressurization at 200 MPa and 55°C for 10 min; C, after pressurization at 400 MPa and 55°C for 10 min; D, after pressurization at 600 MPa and 55°C for 10 min; E, after heat treatment of 121°C for 4 min; F, after completely converting chlorophyll to pheophytin by use of oxalic acid.

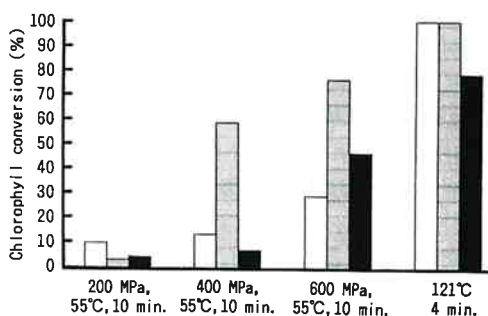


Fig.8. Effects of high pressure and heat treatment on conversion of chlorophyll to pheophytin. □ : Spinach, ▨ : Field peas, ■ : Broccoli.

### 7.1 色彩色差計で緑色を測定する

色差計で  $L^*$   $a^*$   $b^*$  表色系に従い、色相、明度、彩度を測定しましたが、ここではクロロフィルの特色としての緑色 ( $-a^*$ ) の色度の減少率について考察しました。試料によって、クロロフィルの初期色度が異なるため、ブランチング直後の緑色の



Spinach      Field peas      Broccoli

Fig.10. Vegetable samples after heat sterilization at 121°C for 4 min.



Spinach      Field peas      Broccoli

Fig.11. Vegetable samples after pressurization at 400 MPa and 55°C for 10 min.

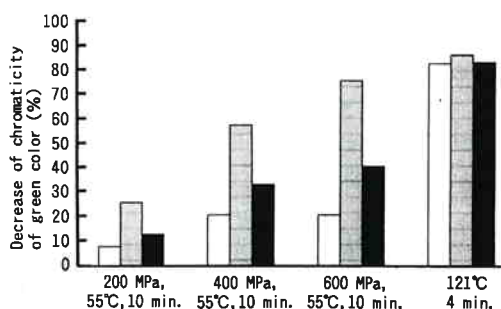


Fig.12. Effects of high pressure and heat treatment on decrease of chromaticity of green color ( $-a^*$  value).

□ : Spinach, ▨ : Field peas, ■ : Broccoli.

色度 ( $-a^*$ ) 値を基準値とし、その後の各処理による色度の変化分を測定し、基準値との割合をグラフにすると、Fig.12のようになりました。この色度の変化は、肉眼での感覚とよく一致していました。変化し易い順位は、サヤエンドウ、ブロッコリー、ホウレンソウの順で、これもFig.8のクロロフィルの変化率の順とほぼ一致していました。

### 8. 製品化の可能性

試料別にみると、ホウレンソウは 600 MPa 処理でも退色が少なく、製品化が可能に思われました

が 400 MPa の処理で無菌化できたら更に素晴らしい色の商品になると判断されました。無菌になり難いのは、ハウレンソウが土に近い位置で育成するために耐熱性の枯草菌が多くブランチングで減少し難いためだと思います。

サヤエンドウでは 200 MPa の処理が限度で、400 MPa の処理では変色率が 50% を超え、商品性が薄らぎました。しかし、400 MPa でほぼ無菌となりましたので、あと一歩の工夫で完成できそうです。

ブロッコリーは 200 MPa でも 400 MPa でも退色せずに商品性はあるのですが、無菌化できたのは 600 MPa からです。安全性を確保するためには、次の一手を考えなければなりません。また、ブロッコリーに含まれるビタミン C は 160 mg/g であり、多くの野菜の中でもトップクラスです。果物のイチゴ (80 mg/g)、レモン (90 mg/g)、ユズの果皮 (150 mg/g) をも凌ぎます。ここでは、ビタミン C の残留について述べませんが、圧力のみでは破壊されないことが知られています。ブロッコリーの圧力殺菌は今後面白いテーマとなりそうです。

#### ★ アチラが立てばコチラが立たぬ

殺菌がうまく行った、と思うと色が退色していてガッカリ!、「美味しそうにできた!」と思うと殺菌が不十分で恒温槽内では十日もすると腐ってしまう。人生と同じで、全てうまくは行かないものです。しかし、ものは考えようで「今より少しでも良くなる方法は?」と探れば、いろいろな道があるようです。完璧だけを望まず、実用的な範囲で少々の妥協が必要なのかもしれません。

### 9. 高圧食品に夢を託して

圧力処理はエネルギー的に有利で、周囲の環境を汚染することもなく、容器内は偏り無しに均一な処理が可能です。今回は野菜をテーマにしましたが、最近では肉や魚介類の輸入も急増し、多くの病原性食中毒が発生しています。これは無防備な日本の食習慣への警鐘だとも考えられます。食文化は安全性と共にあらねばなりません。幸い高圧を利用すると、生ものの性質を保ったままで多くの食品の微生物的な安全性が得られます。病原性大腸菌は 50℃、400 MPa で、アニサキスやトキソプラズマ症などの寄生虫は常温で 200 MPa、10 min

で、また殆どの栄養型の細菌は 55℃、400-600 MPa で殺菌が可能です。このように高圧力を利用することにより、和食はもちろん、世界中の生食を安全な食品として啓蒙できる可能性があるように思います。近い将来、広く世界の食材料から、香りや色、味や食感を生かした、新しい高圧食品や、高圧調理法が生まれることを期待しています。

### 10. おわりに

食品への高圧の利用について「高圧食品開発物語」として書き始めてから一年、とうとう最終回になってしまいました。読み易さ、面白さ、学術性、実用性、応用性、さらに欲張って「何か心に残るもの」を目指したつもりですが、力不足もあって「志半ば」の感は否めません。一年間にわたってお読みくださった読者の方々、原稿の査読、編集をいただいた編集委員の先生方、そして事務局の皆様から感謝いたします。この四回にわたった拙稿が、何かのお役に立てれば幸いです。

#### 参考文献

- [1] C.E. ZoBell: *High Pressure Effects on Cellular Processes*, ed. A.M. Zimmerman, Academic Press, pp. 85.
- [2] 山崎 彬, 青木隆之, 山之内さゆり, 山田明文: 用水と廃水, 37(7), 19-23(1995), “高圧利用による余剰活性汚泥の生物分解性の向上”
- [3] 滝妥恵, 粟生武良, 光浦暢洋, 高垣康雄: 「加工食品」, 林 力丸編, さんえい出版, 1990年, 第12章 “高圧処理による *Bacillus* 属芽胞の殺菌”
- [4] 山崎 彬, 笹川秋彦, 杵淵美倭子, 山田明文: 「高圧バイオサイエンス」, 林 力丸編, さんえい出版, 1994年, 第41章 “高圧処理を利用した餅の製造”
- [5] G. Mackinney, and C.A. Weast: *Ind. Eng. Chem.*, 32, 392(1940), “Color changes in green vegetables. Frozen-pack peas and string beans.”
- [6] W.C. Dietrich: *Food Technol.*, 12, 428(1958), “Determination of the conversion of chlorophyll to pheophytin”
- [7] 木村 進, 中林敏郎, 加藤博通: 「食品の変色の化学」, 光琳テクノブックス18, 光琳, 1995年.

[1997年12月25日受理]