冷凍によるコールドチェーン用温度管理インディケータの簡易化

須藤あゆみ¹, 山本貴志¹, 一色賢司^{2*}

¹ 北海道大学大学院水産科学院

² 北海道大学大学院水産科学研究院

Simplification of an Indicator of Temperature Fluctuations during Cold Food Storage

Ayumi Suto¹, Takashi Yamamoto¹ and Kenji Isshiki^{2*}

¹ Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato-cho, Hakodate, Hokkaido 041-8611

² Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato-cho, Hakodate, Hokkaido 041-8611

The purpose of this study was to develop a user-friendly indicator of improper temperature fluctuations during cold food storage. A mixture of Food Blue No.2 and Food Red No.106 in aqueous glycerol solution, which changes color from blue to red under temperature abuse, was used. Moreover, the addition of citric acid induced decreases in the usage of glycerin. To exploit this property, aqueous solutions were packed into transparent plastic bags and frozen until use. Using the color change from blue to red as a reference, the indicator could warn of temperature increases up to 96 hours at 4°C. Furthermore, earlier warnings were given at higher temperatures. As a result, a new type of indicator was developed using Food Blue No.2 with freezing.

(Received Dec. 19, 2012; Accepted May 15, 2013)

Keywords : chilled food, indicator, food dye, temperature-control, warning

キーワード : 冷蔵食品, インディケータ, 食用色素, 温度管理, 警告

ライフスタイルの変化や食の嗜好の変化に伴い、低温で流通する食品は生鮮食品に限らず、チルド食品、非加熱喫食調理済み食品など多岐にわたり増加してきた。コールドチェーンの食品の安全性確保等への寄与はますます大きくなることが予想される。このコールドチェーンには、冷蔵装置の故障やヒューマンエラーによって冷蔵温度の予期せぬ上昇が起こる場合もある。また、1990年代から海外を中心に乳製品や食肉製品、調理済み食品などを原因とする^{1)~3)} リステリア症の集団発生事例が相次いで報告され、冷蔵温度でも増殖活性を示す *Listeria monocytogenes* (Lm) が食品媒介性感染の原因菌として注目されるようになった⁴⁾⁵⁾。2011年には米国で Lm を原因とした大規模な食中毒が発生した⁶⁾。食品衛生法では多くの冷蔵食品の保存基準が 10°C 以下に規定されているが、Codex 国際食品規格委員会では調理済み食品の保存および輸送時は製品温度が 6°C（できれば 2~4°C）を超えないこと⁷⁾、生食用の魚介類については 4°C 以下での保存を推奨している⁸⁾。このように冷蔵食品は一貫した厳密な温度管理が求められている。

食品の温度履歴を知るとは衛生的にも品質的にも重要

である⁹⁾¹⁰⁾。そのためコールドチェーンの各段階に温度履歴記録装置を設置して冷蔵温度の異常を検知し、食品の安全性や保蔵性をより確かなものにする取り組みが行われている¹¹⁾。物理的温度積算計は、正確に温度履歴を記録できる利点があるが、データ読み出し装置等を必要とするため判断の即時性に欠け、流通現場での実用的運用は難しい。これまで本研究室では、食用色素が一定の条件下で温度依存的に変色する作用を用いて、個々の食品に添付できる安価かつ普及が見込まれるインディケータ (Time-Temperature Integrator, TTI) の試作品の作製に成功した¹²⁾。本インディケータは温度積算機能を有し、簡易・迅速に温度履歴の推定が可能なことをこれまでに報告したが、大量生産するためには新たに専用の装置を開発する必要があったため、実用化には不向きであった。

そこで本研究では、低コストで大量生産が可能なインディケータの改良を試みた。

実 験 方 法

1. 供試材料および機器

(1) 食品添加物

食用色素青色 2 号および赤色 106 号 (三栄源エフ・エフ・アイ製)、グリセリンおよびクエン酸 (和光純薬製、特級)。

¹ 〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

² 〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

* 連絡先 (Corresponding author), isschiki@fish.hokudai.ac.jp

(2) 包材 (酸素透過度)

PE (3020 ml/m²・24h・MPa), PET¹²/XA-S⁵⁰ (1050 ml/m²・24h・MPa), NY/XA-SD (222 ml/m²・24h・MPa), PET¹²/NY¹⁵/PE⁴⁰ (40 ml/m²・24h・MPa) (大成ラミック製)。

(3) 色差計

CR-10 (コニカミノルタ製)。

2. インディケータの作製と色調変化観察

(1) インディケータ溶液の調製

20, 30, 40, 50, 60% (w/w, 終濃度) グリセリン, 0, 0.01, 0.1, 1, 10 mM (終濃度) クエン酸の混合溶液を調製した。全 25 種の混合溶液それぞれに, 青色 2 号は 0.01% (w/w, 終濃度), 赤色 106 号は 0.001% (w/w, 終濃度) となるように溶解した。

(2) インディケータの作製

食品包装用フィルムとして一般に用いられる PET¹²/XA-S⁵⁰を包材として使用した。内寸 30mm×30mm の透明小袋を作製し, 各濃度の溶液 2ml をヒートシールで封入した。−50℃で 24 時間凍結させた後, 4℃の暗所に静置して色調変化を観察した。さらに, インディケータの性能に与える包材の影響を観察するため, PE, PET¹²/XA-S⁵⁰, NY/XA-SD, PET¹²/NY¹⁵/PE⁴⁰の酸素透過性の異なる 4 種の包材に充填し, 4℃の暗所に静置し, 目視および色差計にて色調変化を観察した。

(3) 色調測定方法

色差計の測定モードは, L*a*b*表色系測定モードとした。暗所にてインディケータを白色板 (コニカミノルタ製) の上に置き, 色差計をインディケータに対して垂直に立てるようにしながら, 測定部をインディケータに密着させて測定を行った。測定は 3 回繰り返し, 平均した値を測定値とした。L*値は明度, a*値は赤み, b*値は黄みを表す値である。なお, インディケータは時間と共に赤色に変色するため, 赤みを表す a*値をインディケータの指標とした。

3. 作製インディケータの性能評価試験

(1) 恒温および変温条件におけるインディケータの色調変化の経時観察

試作したインディケータを−50℃で 24 時間凍結後, 冷凍庫から出し, 恒温 (4, 5, 8, 12, 20℃) で最大 144 時間, 変温 (5℃ 18 時間および 20℃ 6 時間) で 96 時間, 暗所にて使用し, 目視および色差計にて色調変化を観察した。

(2) 光が及ぼすインディケータ性能劣化の検討

上記のように作製したインディケータを−50℃で 24 時間冷凍保存した後, 光の影響を観察するために 4℃の明所あるいは暗所に静置し, 経時的に目視および色差計による色調測定を行った。なお, 明所とはインキュベータ (MIR-153, SANYO 製) の照明を常時点けている環境で, 明るさは 135lux であった。

(3) 冷凍条件および冷凍保存温度がインディケータ性能に与える影響の検討

表 1 各インディケータの警告時間 (h) に及ぼすグリセリンおよびクエン酸の濃度

	クエン酸濃度 (mM)				
	0	0.01	0.1	1	10
グリセリン濃度 (%)	20	168	120	108	120
	30	144	108	96	108
	40	132	96	84	96
	50	120	84	72	84
	60	96	60	48	72

冷凍条件がインディケータの色調に及ぼす影響について検討した。インディケータをドライアイスで 1 時間急速冷凍後, 4℃の暗所にて経時的に目視および色差計による色調測定を行った。また, 冷凍保存温度がインディケータの色調に及ぼす影響について検討するため, −20, −50 または −80℃でそれぞれ 24 時間, 1, 2, 3, 4 週間保存した。その後, 4℃の暗所にて経時的に目視および色差計による色調測定を行い, 性能が維持可能な保存期間を求めた。

実 験 結 果

1. 食用色素を利用したインディケータの改良

(1) 警告色および警告時間の定義

試作したインディケータは, 最終的に青色から赤色に不可逆的に変色した¹²⁾。色差計の測定において, 赤みを表す a*値が 35.0 (初期平均値 8.2) に達した時を警告色と定義し, 警告色に変色するまでに必要な時間を警告時間と定義した。

(2) グリセリンおよびクエン酸による警告時間の調節

Lm は 4℃, 96 時間において 1log 増殖する (初発菌数から 10 倍の菌数になる)¹²⁾ ことから, 開発するインディケータは 4℃, 96 時間以内での警告を目標とした。そこで, グリセリンおよびクエン酸濃度を変化させることで警告時間を調節した結果を表 1 に示す。

インディケータは, いずれの組み合わせにおいても, グリセリンの濃度依存的に警告時間が短くなり, クエン酸は濃度が 0.1mM のときに最も変色に要する時間が短くなった (表 1)。4℃における警告時間が 96 時間となり, Lm が 1log 増殖する¹²⁾ 前に変色したのは 30% グリセリンおよび 0.1mM クエン酸, 40% グリセリンおよび 0.01mM クエン酸, 40% グリセリンおよび 1mM クエン酸, 50% グリセリンおよび 10mM クエン酸, 60% グリセリンおよび 0mM クエン酸の 5 つの実験区であった。以降, 最も低濃度かつ低コストで作製可能な 30% グリセリンおよび 0.1mM クエン酸での組成を採用し, 以降の実験に用いた。

(3) 包材による警告時間の変化

酸素透過性が異なる包材を使用し, これまでと同様にインディケータを作製した結果, 包材により警告時間の変化が見られた (図 1)。酸素透過性が高い包材ほど, a*値が早

図1 4°Cにおける異なる包材を用いた場合の色調変化
◆, PE; △, PET¹²/XA-S⁵⁰; ●, NY/XA-SD; □, PET¹²/NY¹⁵/PE⁴⁰; 破線, $a^*=35$.

図2 恒温条件におけるインディケータの色調変化 (a^* 値)
◇, 4°C; ■, 8°C; △, 12°C; ●, 20°C; 破線, $a^*=35$.

期に増加する傾向がみられた。

2. 作製インディケータの性能評価

(1) 恒温および変温条件におけるインディケータの性能評価

作製したインディケータは、4°Cでは96時間、8°Cで84時間、12°Cで60時間、20°Cでは48時間で警告色に変色した(図2)。本インディケータは温度上昇に伴う警告時間の短縮が確認された。5°Cの恒温条件と変温条件にて使用したインディケータの色調変化を観察したところ、変温条件において20°Cで a^* 値の増加がより大きくなり、約66時間で警告色となった(図3)。このことから変温条件においても、温度積算値を示した。

(2) インディケータの性能に与える光の影響

使用時の反応が明所だった場合、暗所で使用した場合よりも a^* 値の変化が早くなり、警告時間が短くなった(図4)。4°Cの試験区において、警告時間に12時間の差異があった。また、測定時に暴露される時間は誤差範囲であった(データ示さず)。

(3) 急速冷凍による色調への影響

急速冷凍による警告時間は-50°Cで24時間冷凍した場合と同じであった(図5)。よって、インディケータを異なった方法で冷凍しても、インディケータの性能に影響を

図3 変温条件におけるインディケータの色調変化
■, 5°C恒温; ○, 5°C 18時間と20°C 6時間の繰り返し; 実線(細線), 温度履歴; 破線, $a^*=35$.

図4 4°Cにおける明所および暗所でのインディケータの色調変化
◇, 明所; ■, 暗所; 破線, $a^*=35$.

図5 冷凍方法がインディケータの色調変化に与える影響
●, 急速冷凍; △, -50°C, 24時間冷凍; 破線, $a^*=35$.

及ぼさないことが示唆された。

(4) 保存温度が色調変化に及ぼす影響

-50および-80°Cで4週間保存した場合でも4°C, 96時間で色調変化を確認でき、インディケータの性能を保持した。しかしながら-20°Cで2週間以上保存した場合には、色調変化が保存中に進んでおり、警告時間も短くなる傾向がみられ、性能の劣化が確認された(図6)。

図 6 -20°C 、 -50°C および -80°C における保存期間がインディケータの色調変化に与える影響

●, 24 時間保存; △, 1 週間保存; ◆, 2 週間保存; □, 3 週間保存; ▲, 4 週間保存.

考 察

本実験により、食用色素を利用した温度管理インディケータの改良を行うことができた。前報¹²⁾のインディケータと比較すると、液体充填により低コストでの大量生産が可能になった点、冷凍庫から取り出してすぐに使用できるため起動に手間がかからないという点で優れていた。また、内溶液の組成については、食用色素青色 2 号、赤色 106 号およびグリセリンに加えて、新たにクエン酸を添加した。クエン酸は、青色 2 号の退色速度を調節する効果があった。クエン酸は青色 2 号の主成分であるインディゴカルミンの構造変化に何らかの影響を及ぼすと考えられるが、その詳しい作用機構は不明である。

食品によって保存温度や対象となる微生物の種類、増殖速度も異なるため、目的に応じて警告時間も異なってくる¹⁰⁾。冷蔵温度で増殖活性を示す Lm は 4°C 、96 時間にお

いて 1 log 増殖するため、 4°C 、96 時間を警告の基準とした。 4°C 、96 時間の警告基準を満たす内溶液の組成には、2 種の食用色素の他に 30% グリセリンおよび 0.1 mM クエン酸を用いた。この濃度の組み合わせが今回検討した中で最も低コストであり、最適であった。

作製したインディケータは、恒温条件下では温度依存的に警告時間が短縮した。そのため本インディケータは冷蔵食品用インディケータとして利用できる可能性が示唆された。さらに変温条件下でも温度上昇を蓄積し警告色に変化したことから、予期しない温度上昇にも対応した警告が可能であると推察された。

実験結果 2. (2) より、インディケータを明所で使用した場合、警告時間が短くなった。これは、蛍光灯の光があたるような場所で使用した場合、使用環境が 4°C 下にも関わらず、変色が促進され警告時間が速まってしまう可能性があることを示唆していた。このことから、照度が高い明所や、明所と暗所を繰り返した場合の警告時間も今後検討する必要がある。

冷凍保存条件がインディケータの色調変化に及ぼす影響を観察したところ、 -20°C で保存した場合において色調変化が進行した。このことから、本インディケータは -50°C 以下での保存が望ましいと示唆された。他方、 -50°C 以下では色調が変化せず、 -20°C での保存では温度と時間を積算するという新たに判明した性質から、冷凍食品向けインディケータとして応用できる可能性が推察された。

食用色素、グリセリンおよびクエン酸は食品添加物として認可されており、誤飲されても健康被害はないと考えられるため、食品向けのインディケータとして適していた。インディケータ作製後、冷凍することにより保冷剤としての特性も今後付与される可能性が期待できることから、フードチェーンにおける使い勝手も良いと考えられる。大量生産には、醤油等の小袋充填機によるインディケータの製造とドライアイスまたはトンネルフリーザーによる冷凍で対応可能であった。

要 約

食品の安全性や品質の確保に広く用いられているコールドチェーンにおける温度上昇を警告する手法の簡易化を試みた。食用色素青色 2 号および赤色 106 号を混合すると、グリセリン水溶液中で温度上昇により青色から赤色に変色した。クエン酸を添加することにより、グリセリンの使用量を減少させることができた。この現象を利用して、色素のグリセリン水溶液をプラスチックフィルム製の透明小袋に充填し、凍結後、保存した。解凍後のインディケータは、Lm の増殖を警告する指標である 4°C 、96 時間で徐々に青色から赤色に変色し、温度上昇を警告することが可能であった。環境温度が高くなるとインディケータの警告時間も短くなった。 -50°C で 24 時間冷凍させる工程を導入す

ることによって、食用色素を利用した温度管理用インディケータ作製を簡易化することが可能となった。

本研究は農林水産省プロジェクト研究「生産・流通・加工工程における体系的危害分析の特性解明とリスク低減技術の開発」(DI-7306)によって実施し、第59回日本食品科学工学会大会において発表した。

文 献

- 1) 菅原直子, 佐々木ひとえ, 加藤浩之, 小林妙子, 渡邊 節, 山田わか, 谷津壽郎, 斎藤紀行, *Listeria monocytogenes* による ready-to-eat 食品の汚染実態, 宮城県保健環境センター年報, **25**, 45-48 (2007).
- 2) Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Kokubo, Y., Maruyama, T., Saito, A., Yoshida, T., Terao, M., Yamamoto, S. and Kumagai, S., Prevalance and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. *Int. J. Food Microbiol.*, **59**, 73-77 (2000).
- 3) Aaron R. Uesugi and Carmen, I. Moraru, Reduction of *Listeria* on ready-to-eat sausages after exposure to a combination of pulsed light and nisin. *J. Food Prot.*, **72**, 347-353 (2009).
- 4) Walker, S. J., Archer, P. and Banks, J.G., Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Microbiol.*, **68**, 157-162 (1990).
- 5) 中村寛海, 西川禎一, 水産食品のリステリア汚染, 生活衛生, **50**, 175-184 (2006).
- 6) 窪田邦宏, 天沼 宏, 春日文子, 米国で2011年に発生した生鮮果物関連の大規模食中毒アウトブレイク, 食品衛生研究, **62**, 7-16 (2012).
- 7) Codex Alimentarius Commission, "Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control *Listeria monocytogenes* in foods". CAC/GC 61, FAO/WHO (2007).
- 8) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“食品衛生法施行規則および食品, 添加物等の規格基準の一部改正について”平成13年6月7日, 食発第170号 (2001).
- 9) 藤川 浩, 微生物および品質管理のための温度積算計 Time-Temperature Integrator の開発, 防菌防黴, **37**, 113-116 (2009).
- 10) 福澤 朋, 太田水生, 小暮秀則, 酒井奈美, 一色賢司, 冷凍食品の温度上昇を警告するインディケータの開発, 日本食品化学学会誌, **16**, 143-146 (2009).
- 11) 太田水生, 山崎浩司, 川合祐史, 小暮秀則, 二瀬克則, 一色賢司, コールドチェーンの温度上昇を警告するインディケータの開発, 日本食品化学学会誌, **15**, 18-22 (2008).
- 12) 村上喜恵美, 一色賢司, 食用色素を利用した冷蔵食品向けの温度上昇警告インディケータの開発, 日本食品化学学会誌, **18**, 12-17 (2011).

(平成24年12月19日受付, 平成25年5月15日受理)