

ISSN 1345-5974
2018-NO.63

平成 30 年度・第 63 号

研 究 報 告

Report of
Miyazaki Prefectural Industrial Technology Center &
Miyazaki Prefectural Food R&D Center
FY 2018



宮崎県工業技術センター

宮崎県食品開発センター

目 次

工業技術センター

○報告

焼酎粕を用いた油糧微生物ラビリンチュラの培養による DHA 生産	小玉 誠・森谷 亜希 高橋 克嘉・林 雅弘	1
----------------------------------	--------------------------	---

鶏ふん燃焼におけるクリンカの生成に関する研究	溝口 進一・下池 正彦 小玉 誠・高橋 克嘉 清水 正高	7
------------------------	------------------------------------	---

クリスチャンセン効果を内在した多孔質ガラス有機複合体	清水 正高・轟木 博	11
----------------------------	------------	----

膜透過法により生成した微細 W/O エマルションを経由する サブミクロン球状シリカゲル粒子の合成	清水 正高・山本 建次	17
---	-------------	----

試料の表面粗さが蛍光 X 線分析結果に及ぼす影響	河野 拓人・野口 大介 山本 建次	25
--------------------------	----------------------	----

甘藷の長期生貯蔵を実現する空気調和技術の開発	野口 大介・小野 貴哉 陰山 翼・長友 良行	31
------------------------	---------------------------	----

食肉加工施設を対象とした結露防止システムの開発	小野 貴哉・野口 大介 陰山 翼・平 栄蔵	37
-------------------------	--------------------------	----

○技術レポート

EMC 評価環境の高効率化への取り組み ～放射 EMS 試験省力化のための電界均一性特性測定～	早水 昭二	41
--	-------	----

食品開発センター

○報告

ライチ加工品の保存性に及ぼす処理条件の影響	松井 愛・野上 麻美子 三輪 華織	47
-----------------------	----------------------	----

新しい加工用米（宮崎 52 号）を用いた芋焼酎試験醸造……………	山本 英樹・山田 和史 水谷 政美・祝園 秀樹 福良 奈津子・藤田 依里 喜田 珠光……………	53
----------------------------------	--	----

麴から抽出される核酸関連物質について ……………	祝園 秀樹・水谷 政美 山本 英樹・喜田 珠光 ……	61
--------------------------	-------------------------------	----

MALDI-TOF MS を用いた 県オリジナルの微生物データベースの構築(第 2 報)……………	喜田 珠光・高山 清子 水谷 政美・山本 英樹 藤田 依里・山田 和史 ……	65
--	--	----

再録

高ショ糖食摂取ラットの肝臓脂質濃度に及ぼすブルーベリー葉 および茎抽出物の影響……………	松浦 靖・榊原 啓之 川口 真帆・村山 絵美 横山 大悟・柚木崎千鶴子 國武 久登・窄野 昌信 ……	69
---	---	----

Contents

Miyazaki Prefectural Industrial Technology Center

○Paper

DHA Production by Cultivation of Oleaginous Microorganisms, *Thraustochytrid* using *Shochu* Distillation Remnants

Makoto KODAMA, Aki MORITANI, Katsuyoshi TAKAHASHI and Masahiro HAYASHI1

Study on the formation of clinker in chicken feces combustion

Shinichi MIZOGUCHI, Masahiko SHIMOIKE, Makoto KODAMA, Katsuyoshi TAKAHASHI and Masataka SHIMIZU7

Organic Complex Based on Porous Glass which Derives Christiansen Effect

Masataka SHIMIZU and Hiroshi TODOROKI11

Synthesis of Submicron Silica Gel Being Spherical Particles via Fine W/O Emulsion Produced by the Membrane Permeation Method

Masataka SHIMIZU and Kenji YAMAMOTO 17

Effect of Surface Roughness on Fluorescent X-ray Analysis Results

Takuto KAWANO, Daisuke NOGUCHI, and Kenji YAMAMOTO.....25

Development of Air-Conditioning Technology for Long-Term Non-Frozen Storage of Sweet Potato

Daisuke NOGUCHI, Takaya ONO, Tsubasa KAGEYAMA and Yoshiyuki NAGATOMO.....31

Development of Anti-Condensation System for Meat Processing Plant

Takaya ONO, Daisuke NOGUCHI, Tsubasa KAGEYAMA and Eizo HIRA37

○Report

Efforts to Improve the Efficiency of the EMC Evaluation Environment

～Electrolytic Uniformity Characteristics Measurement for Radiation EMS Test Labor Saving～

Shoji HAYAMIZU41

Miyazaki Prefectural Food Reserch and Development Center

○Paper

Effects of processing conditions on storage stability of Litchi products

Ai MATSUI, Mamiko NOGAMI and Kaori MIWA.....47

The Examination Brewing of Sweet Potato *Shochu* Using New Processing Rice "Miyazaki 52"

Hideki YAMAMOTO, Kazufumi YAMADA, Masami MIZUTANI, Hideki IWAIZONO,
Natsuko FUKURA, Eri FUJITA and Tamami KIDA.....53

Nucleic Acid-related Compounds Extracted from *Koji*

Hideki IWAIZONO, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO, and Tamami KIDA61

Constraction of Miyazaki prefecture original microbial database using MALDI-TOF MS

(2nd report)

Tamami KIDA, Kiyoko TAKAYAMA, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO, Eri FUJITA and
Kazufumi YAMADA65

Reprints

Effects of blueberry leaf and stem extracts on hepatic lipid levels in rats consuming a high-sucrose diet

Yasushi Matsuura^{1,2}, Hiroyuki Sakakibara^{1,3}, Maho Kawaguchi³, Emi Murayama³, Daigo Yokoyama¹,
Chizuko Yukizaki², Hisato Kunitake^{1,3}, and Masanobu Sakono69

焼酎粕を用いた油糧微生物ラビリンチュラの培養による DHA 生産

小玉 誠^{*1}・森谷 亜希^{*1}・高橋 克嘉^{*2}・林 雅弘^{*3}

DHA Production by Cultivation of Oleaginous Microorganisms, Thraustochytrid using *Shochu* Distillation Remnants

Makoto KODAMA, Aki MORITANI, Katsuyoshi TAKAHASHI and Masahiro HAYASHI

従属栄養性であるラビリンチュラ類の DHA 高産生株 mh1913 株を用いて、栄養源として焼酎粕を最大限利用することによる低コスト DHA 高含有油脂生産手法について検討した。培養条件を検討することで、焼酎粕清澄液は窒素源及び微量元素源として利用可能であり、希釈等により C/N 比を適切に調整することで、従来の GY31 培地を用いる場合よりも高い脂質生産量とすることができた。また、ジャーファーメンターによる培養では、流加培養により乾燥菌体量を 100 g/L 以上とする高密度培養を達成することができた。本試験結果に基づき、実生産規模で培養した場合を想定すると、DHA 含有率 30%以上の粗油生産コストは 197 円/kg と試算でき、すでに市場に流通している DHA 含有率 23%程度の魚油と同程度となる可能性を示した。

1 はじめに

本県の本格焼酎出荷量は12.9万kL／年（2018酒造年度）であり、5年連続の日本一を達成している。一方、焼酎製造時には蒸留残渣として焼酎粕が発生し、県内の発生量は約30万t／年にも及ぶ。各酒造メーカーは飼肥料やメタン発酵によるガス化など、様々な手法により焼酎粕の活用を図っているが、より高付加価値な用途開発が望まれている。

焼酎粕は、糖質・窒素・無機塩のほか、様々な発酵代謝産物を含有している。これまでに我々は、焼酎粕が乳酸菌や麹菌の培地として優れた性質を有することを見いだしており、焼酎粕というバイオマスを原料とした微生物発酵による高付加価値成分生産の可能性について検討している。

ラビリンチュラ類は従属栄養性の海洋性真核微生物で、優れた増殖性・脂質蓄積性を持つほか、DHA や EPA などの多価不飽和脂肪酸を高生産する株が存在することから、実用化研究が進められている¹⁾。ただし、従属栄養性であることから、培養には多量

の栄養素が必要であることがコスト面での課題であった。

DHAは中性脂肪の低下や動脈硬化のリスク低減のほか、脳機能の改善などの効果が報告されており^{2,3)}、サプリメント原料としてのニーズが高まっている高機能性素材である。現在のところ、その供給源の多くは魚由来であるが、世界的な漁獲量の減少を背景として、魚由来以外の持続可能な生産技術の開発が求められている。

今回は、ラビリンチュラ類のうちDHA高産生株を用いて、焼酎粕を栄養源として最大限利用した低コスト培養手法を検討し、DHA高含有粗油生産の事業可能性を評価したので報告する。

2 実験方法

2-1 焼酎粕によるラビリンチュラの培養

芋・麦・米・ソバを原料とした焼酎の焼酎粕を県内酒造メーカーから採取し、固液分離することにより、それぞれの焼酎粕清澄液(CL)を得た。培養には、CLにグルコースと人工海水成分を添加し、pH 6.8としたのちに、加圧滅菌することで調製したGS培地(表1)を用いた。ラビリンチュラは宮崎大学から供与されたDHA高産生株で

*1 資源環境部

*2 資源環境部（現 食品開発センター 食品開発部）

*3 宮崎大学農学部

ある mh1913 株 (*Aurantiochytrium* sp.) を用いた。上記株を GY31 液体培地 (表 2) により前培養し、それを GS 培地に添加し、28℃ でフラスコにより 72 h 振とう培養を行った。

ジャーファーメンターによる通気攪拌培養では、芋 CL を無希釈で用いた GS 培地を用い、2 L・ジャーファーメンターに対し 1.2 L を仕込み、通気量 1000 mL/min、回転数 400-450 rpm で培養を行った。消泡剤として Antifoam PE-M 0.1%(w/v) を添加した。培地中のグルコース残量が低下した時点で、30% グルコース溶液を添加することで流加培養を実施した。培養中の pH は塩酸及び水酸化ナトリウム溶液により pH 6.0

表 1 GS 培地

Glucose	30 g
NaCl	15 g
KCl	0.35 g
MgCl ₂ ・6H ₂ O	5.4 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	2.7 g
CaCl ₂ ・H ₂ O	0.5 g
pH	6.8

/L-CL

表 2 GY31 液体培地

Glucose	30 g
Yeast Extract	10 g
Vitamin mix	1.0 ml
Element mix	2.0 ml
pH	6.8

/L-50% ASW

表 3 50% ASW (artificial seawater)

NaCl	15 g
KCl	0.35 g
MgCl ₂ ・6H ₂ O	5.4 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	2.7 g
CaCl ₂ ・H ₂ O	0.5 g

/L-DW

表 4 Vitamin mix

Vitamin B ₁	2 g
Vitamin B ₂	0.01 g
Vitamin B ₁₂	0.01 g

/L-DW

表 5 Element mix

EDTA di-sodium	30 g
FeCl ₃ ・6H ₂ O	1.45 g
H ₂ BO ₃	34.2 g
MnCl ₂ ・4H ₂ O	4.30 g
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	1.34 g
CoCl ₂ ・6H ₂ O	130 mg
NiSO ₄ ・6H ₂ O	260 mg
CuSO ₄ ・5H ₂ O	10 mg
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	25 mg

/L-DW

となるように調整した。なお、流加前に培養液量が初発量を超える場合は、総量 1.2 L を維持するように培養液を抜き取った。

2-2 菌体収量及び脂質生産量の測定

培養液を固液分離し、沈殿物を乾燥することで乾燥菌体重量とした。また、凍結乾燥した乾燥菌体をクロロホルム/メタノール溶液により脂質を抽出し、蒸留乾固することで脂質生産量とした。さらに、10% メタノール性塩酸を添加し、80℃ で 3 時間反応させることにより脂肪酸メチルエステル化したものを GC で分析し、脂肪酸生産量を求めた。

3 結果および考察

3-1 焼酎粕の成分

各焼酎粕原液はペースト状であることから、そのまま菌体培養に用いることは困難と考えられたため、固液分離により芋・麦・米・ソバの各焼酎粕清澄液 (CL) を調整し、それを液体培地に利用することとした。各 CL の成分分析の結果を表 6 に示す。窒素量は最も低い芋 CL においても、GY31 培地に含まれる窒素量と同等程度であり、最も高い米 CL では芋 CL の 6 倍量であった。糖質も認められたが、遊離糖を HPLC で確認したところ、mh1913 株が資化可能であるグルコースはほとんど含まれていなかった。

表 6 CL の成分

	(wt.%)	
	窒素量	全糖量
芋	0.09	0.73
麦	0.57	1.86
ソバ	0.19	0.88
米	0.60	1.11

3-2 液体培地組成の検討

ラビリンチュラ類は海洋性真核微生物であり、また、従属栄養性であることから、培養には人工海水成分や十分な栄養源が必要と考えられ、従来は GY31 培地で培養が行われていた。ラビリンチュラ類培養に対する焼酎粕の特性を評価するために、GY31 培地を基礎として、表 7 に示す培地組成により mh1913 株を培養し、乾燥菌体重量及び脂質生産量を測定した。その結果、芋 CL を添加した場合は、Yeast Extract や Vitamin mix, Element mix を無添加でも、GY31 培地と同等程度に培養できることが明らかになった。また、pH が 4 程度で

表7 培地成分の検討

	GY31	type1	type2	type3	type4	type5	type6	type7	type8	type9
Glucose	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Yeast Extract	✓	✓	✓	✓	✓			✓		
芋CL(焼酎粕清澄液)		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓
50% ASW	✓	✓	✓	✓		✓	✓			
Vitamin mix	✓	✓								
Element mix	✓	✓								
pH	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	4.1	4.1	4.1	4.1
増殖・脂質生産状況	○	○	○	○	×	○	○	×	×	×

“✓”が付いている成分を混合した液体培地でmh1913株を培養した結果、菌体収量がGY31培地で培養した場合と同等もしくはそれ以上であった場合に“○”を、明らかに低下した場合は“×”を付した。

ある焼酎粕を pH 調整しないまま培養した場合でも菌体増殖や脂質生産への影響は低いことが分かった。ただし、50% ASW (artificial seawater) を添加しない場合は、菌体量、脂質生産量ともに低下した。以上のことから、焼酎粕はラビリンチュラ類培養において、窒素源及び微量成分源となりえることが分かった。

次に、人工海水成分のうち、必要な塩分について検討した。長野らの研究によれば mh1913 株と同属である *Aurantiochytrium* sp. mh0186 株が硫酸マグネシウムのみ要求性を示したことが報告されている⁴⁾。そこで、表 7 に示す type3, type5, type8 及び type10 に硫酸マグネシウム 2.7 g/L を添加した組成 (type10) において mh1913 株を培養した。このときの乾燥菌体重量及び脂質生産量の結果を図 1, 2 に示す。この結果、窒素源として芋 CL を添加した type5, 10 において菌体量及び脂質生産量ともに向上し、type5 と 10 では大きな差はなかった。塩分を添加していない type8 では菌体量は最も低かったものの、type3 と同等程度の脂質生産量が得られたが type5, 10 よりも低かった。このことからラビリンチュラ培養において焼酎粕を窒素源として用いた場合でも、要求される塩分は硫酸マグネシウムのみであることが示唆された。ただし、長期的な試験の安定性を考慮して本研究の以後の試験においては、type5 すなわち表 1 の GS 培地組成により培養を行うこととした。

3-3 各種焼酎粕による培養

各原料の CL を用いて GS 培地組成により培養したところ、菌体収量及び脂質含有率に大きな差が生じ、窒素量が多いほど菌体収量が高く、脂質含有率が低い傾向であることが分かった (図 3)。ラビリ

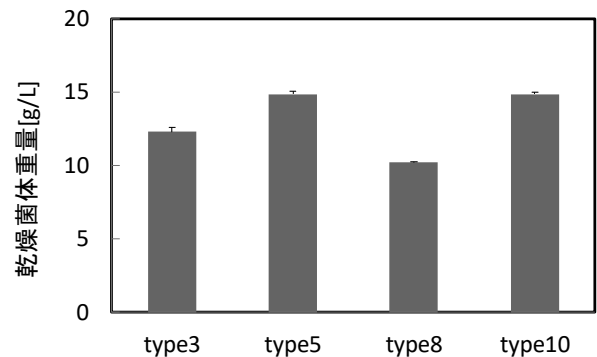


図 1 菌体重量に対する塩分添加の影響

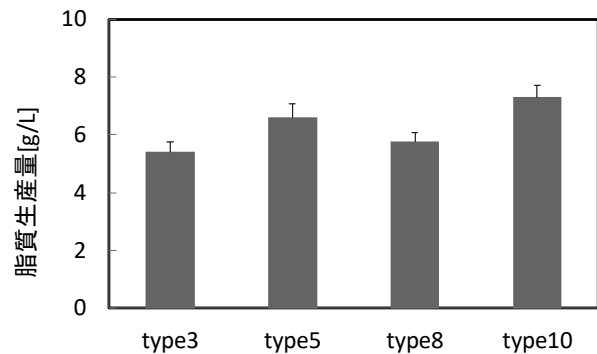


図 2 脂質生産量に対する塩分添加の影響

ンチュラ類を含む多くの微生物において、培養液中の窒素を制限することで細胞内に多量の脂質が蓄積されることが知られている^{5,6)}。そこで、窒素量が高い麦 CL を蒸留水で希釈し、希釈率を変化させ培養に最適な濃度を検討した。この結果、C/N 比が 16.1 の時に最も脂質生産量が高くなった (図 4)。この時の窒素濃度は未希釈の芋 CL と同じ窒素濃度であった。他の原料 CL についても同様の試験を実施したところ、いずれの CL においても C/N 比が約 16 の時に脂質生産量が最大となった (データ未掲載)。

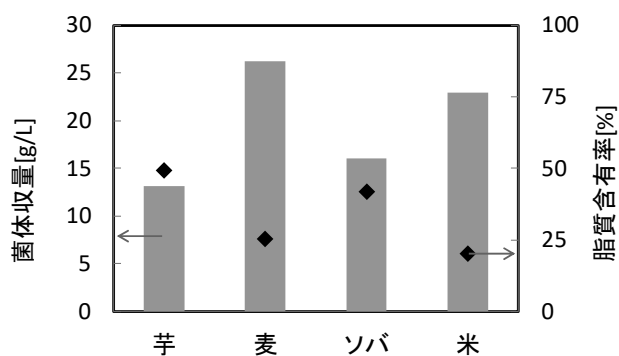


図3 各 CL 培養時の菌体量及び脂質含有率

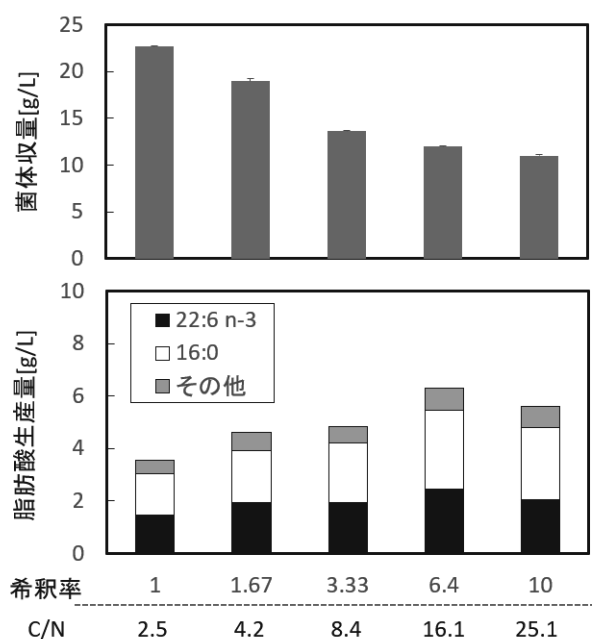


図4 麦 CL の希釈率の影響

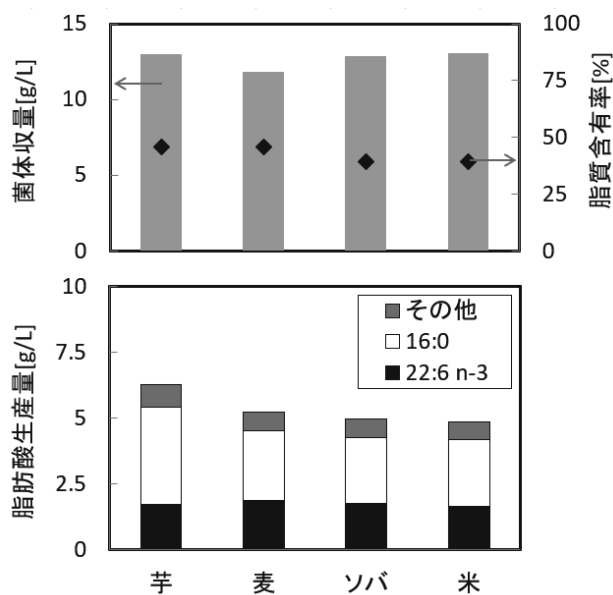


図5 C/N比=16に調整した各 CL による GS 培地培養時の菌体量及び脂肪酸生産量

各 CL を GS 培地組成としたときに C/N 比が 16 となるように適宜希釈し培養を行った。この時の各 CL の希釈率は、芋・麦・ソバ・米がそれぞれ $1 \cdot 6.4 \cdot 2.2 \cdot 6.7$ であった。その結果、いずれの CL においても菌体収量は約 12 g/L と同程度であった。脂質生産量は希釈前よりも増加し、GY31 培地で培養した場合よりも多くなった。特に、芋 CL が他の CL と比較して 2 割程度高かった。ただし、脂肪酸生産量の増加分の多くはパルミチン酸 (16:0) であり、DHA (22:6 n-3) 生産量に大きな差は無かった (図 5)。

3-4 ジャーファーマンターによる培養

焼酎粕を栄養源としたラビリンチュラ類の大量培養を目的として、前項までの至適培養条件を踏まえてジャーファーマンターによる流加培養を行った。培養期間中のグルコース濃度及び菌体重量を図 6 に示す。糖を適宜添加することにより安定した増殖が可能であり、160 時間後に乾燥菌体重量は 55.7 g/L に達した。この時の脂質生産量は 30 g/L であり、そのうち DHA が 50% を占めていた。また、攪拌速度を 800rpm とした培養を行ったところ、144 時間後に約 130g/L の菌体重量を得ることができた。攪拌速度の増加により培養液の DO が高まり、それに伴い増殖速度が向上したためと考えられる。

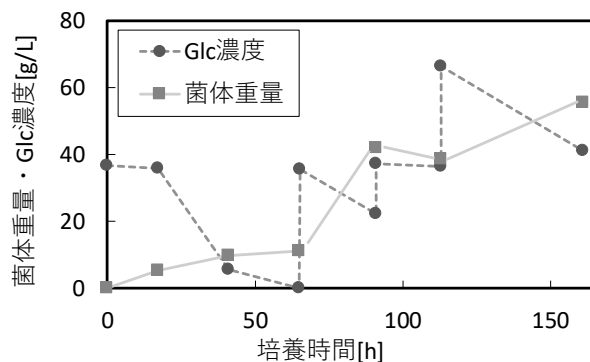


図6 芋 CL を用いたジャーファーマンターによる流加培養 (攪拌速度: 450rpm)

3-5 コスト計算

前項までの培養結果をもとに、粗油生産までのコスト試算を実施した。試算に用いた主な設定値は表 8 に示すとおりである。この結果、従来のラビリンチュラ類培養に用いていた GY31 培地を GS 培地に変更することで、培地コストは 340 円/L・broth から 20 円/L・broth に大幅に低減することができた。

さらに、流加培養による高密度培養の結果等を導入することで、DHAを30%以上と高含有する粗油の生産にかかるコストは197円/kgと試算することができた。DHAを23%程度含有する魚油は約200円/kgで流通しているとの調査結果があり、これと同レベルのコストで生産できることが示唆された。

表8 コスト試算に用いた主な設定値

培養槽スケール	100t×5基
培養日数	6日間
菌体回収量	100 dry-g/L
菌体中の油脂含有率	70%
粗油抽出率	90%
培養槽設置費	5億円
菌体回収・粗油抽出設備設置費	4億円
減価償却年数	15年
保守点検費	9000万円/年
人件費	7400万円/年

4 まとめ

芋・麦・ソバ・米を原料とした焼酎粕の清澄液は、ラビリンチュラ類培養において窒素源及び微量元素源として十分な成分を含有し、希釈などによりC/N比を適切に調整することで、従来のGY31培地を用いる場合よりも高い脂質生産性を示すことを明らかにした。各種の焼酎粕を利用できることから、原料は通年で確保できる。また、塩酸添加によりpHを2に低下させることで腐敗を抑制させ、中和したのちに培養に用いる手法も確立しており（データ未掲

載）、焼酎粕の品質保持や安定供給についても一定の課題をクリアすることができたと考える。

ジャーファーマンターによる培養では、高密度培養の可能性を示唆したが、実用化に向けては糖消費速度や増殖速度を詳細に解析する等により効率的な培養方法の確立が必須である。

本試験結果に基づいて、魚油では生産が困難なDHAを30%以上含有する粗油を市場競争力のあるコストで生産できることを試算したが、より現実的な数字とするために、効率的な脂質抽出技術の開発や、さらに大容量で簡易的な培養設備による培養手法等について検討していくこととしている。

5 参考文献

- 1) 林雅弘:生物工学会誌, **93**-7, 426-429(2015)
- 2) R. Uauy, D.R. Hoffman, *et al.*, *Lipids*, **36**, 885-895(2001)
- 3) S.M. Innis, *J. Nutr.* **137**, 855-859(2007)
- 4) N. Nagano, Y. Taoka, *et al.*, *J. Oleo Scie.*, **58**-12, 623-628(2009)
- 5) A. Gupta, D. Singh, *et al.*, *Biotech. J.*, **11**-3, 345-355(2015)
- 6) N. R. Boyle, M. D. Page, *et al.*, *J. Bio. Chem.*, **287**-19, 15811-15825(2012)

鶏ふん燃焼におけるクリンカの生成に関する研究

溝口 進一^{*1}・下池 正彦^{*2}・小玉 誠^{*1}・高橋 克嘉^{*3}・清水 正高^{*2}

Study on the formation of clinker in chicken feces combustion

Shinichi MIZOGUCHI, Masahiko SHIMOIKE, Makoto KODAMA,
Katsuyoshi TAKAHASHI and Masataka SHIMIZU

鶏ふんボイラー内で発生する灰の塊(クリンカ)の形成を防止することを目的として、クリンカのほか、フライアッシュ、ボトムアッシュについて組成分析、結晶相の同定、加熱試験等を行い、クリンカの生成について調べた。その結果、クリンカとフライアッシュの組成比は近似していたが結晶構造は異なっていたことから、クリンカはフライアッシュが変化して生成していることが示唆された。また、クリンカの元素分布を見ると硫黄が多い部分と塩素が多い部分が交互に現れ縞模様を形成していた。これは熱交換器表面から段階的にフライアッシュが固着し熱等の影響を受けながら、クリンカが生成したためと考えられた。

1 はじめに

本県は牛、豚、鶏の飼育が盛んであり、全国でも有数の畜産県である。その中で、鶏についてはブロイラーの出荷数が日本一であり、毎年一億羽以上が出荷されている。飼育時には約30万tもの鶏ふんが発生し、以前は堆肥化して土壌還元が行われていたが、農地に対し発生する鶏ふんが過剰であり、処理しきれないという問題があった。

現在は、大型の鶏ふんボイラー及び鶏ふん発電所が設置され、県内で発生するブロイラー由来の鶏ふんのほぼ全量を燃料として利用している。しかし、鶏ふんは燃焼させると炉壁や熱交換器にクリンカと呼ばれる灰の塊が付着する。そのまま燃焼を続けると熱交換効率が低下するだけでなく、安定的な運転の妨げになるため、定期的に運転を停止し取り除く必要がある。清掃作業は危険な作業であることに加え、ボイラー停止中は蒸気や電気を得ることができないため、経済的な損失も大きい。

そこで本研究では、鶏ふんボイラーにおけるクリンカの生成防止を目的として、鶏ふん燃焼灰のフライアッシュ、ボトムアッシュ及びクリンカについて分析を行ったので報告する。

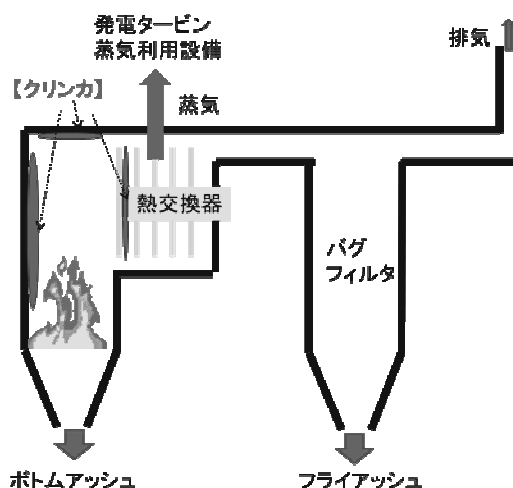


図1 鶏ふんボイラーの概念図

2 実験方法

2-1 元素組成分析

みやざきバイオマスリサイクル(株)よりご提供頂いたフライアッシュ、ボトムアッシュ、クリンカを実験に供した。

蛍光X線分析装置((株)リガク製、ZSX100e)を用いてファンダメンタルパラメーター(FP)法により、サンプルの化学分析を行った。

*1 資源環境部

*2 資源環境部(現 材料開発部)

*3 資源環境部(現 食品開発センター)

2-2 結晶相同定

X線回折測定装置（(株)リガク製，RINT-TTR）を用いて，燃焼灰及びクリンカ中の結晶相の同定を行った．分析の条件は，管電圧 40 kV，管電流 60 mA，走査速度 2 deg/min とし，回折角 2θ は 3～60 deg の範囲に設定した．

2-3 クリンカの元素分布分析

X線分析顕微鏡（(株)堀場製作所製：XGT-7200V）によりクリンカの元素組成分布を調べた．

2-4 燃焼灰の電気炉による加熱試験

フライアッシュとボトムアッシュを燃焼ボートに入れて，電気炉（ADVANTEC(株)，FUH622PA）で加熱し，2 h 保持したときにクリンカが生成するかを目視で確認した．

3 結果および考察

3-1 燃焼灰とクリンカの化学組成と結晶相

燃焼灰及びクリンカの化学組成と結晶構造を図 2 に示す．ボトムアッシュはフライアッシュと検出される元素は似ているものの，組成比がかなり異なり Ca が多く，K が少なかった．また，クリンカはフライアッシュの組成比と近かった．

結晶については，フライアッシュは塩化カリウム (KCl)，リン酸マグネシウムカリウム ($K_2Mg(PO_3)_4$)，硫酸カリウム (K_2SO_4) と K を含む結晶が多かったのに対し，ボトムアッシュは炭酸カルシウム

($CaCO_3$)，酸化カルシウム (CaO)，石英 (SiO_2)，ケイ酸カルシウム ($CaSiO_4$) と Ca を含む結晶が多かった．クリンカは KCl，ヒドロキシアパタイト ($Ca(PO_4)(OH)_4$)，ケイ酸アルミニウムカルシウム ($CaAl_2SiO_6$) と K を含む結晶と Ca を含む結晶の両方が存在していたが，ボトムアッシュで確認された Ca を含む結晶とは異なるものであった．

フライアッシュにおける Ca のように，多く含まれているにもかかわらず，結晶相としては検出されない元素も存在するため，これらの試料では結晶と非晶質が混在していると考えられた．

また，クリンカとフライアッシュの組成比はかなり近いが結晶構造は異なっていたことから，クリンカはフライアッシュが変化して生成していることが示唆された．

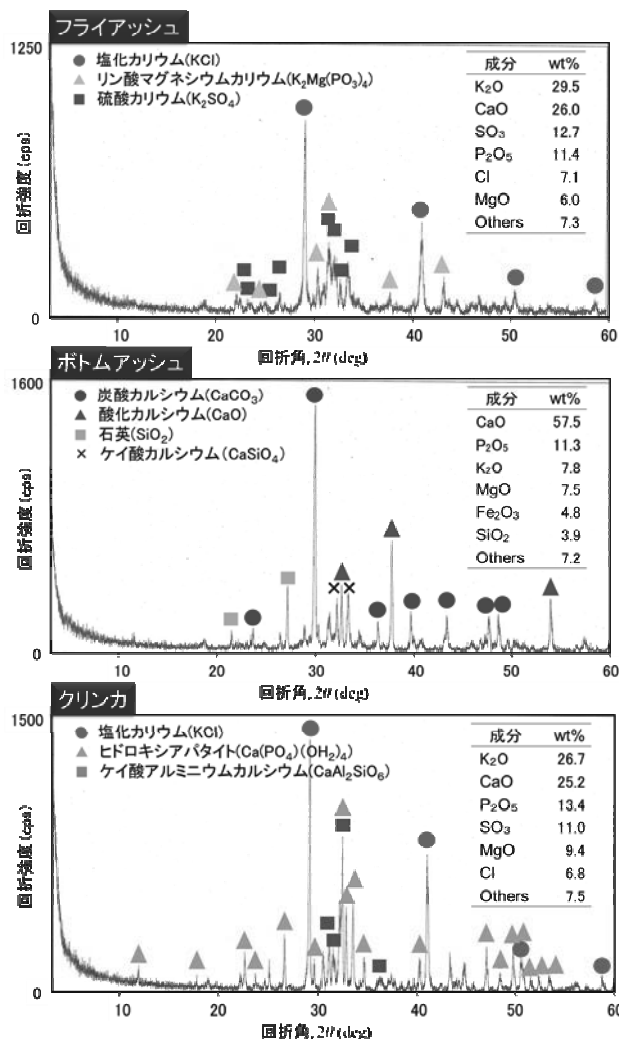


図 2 燃焼灰の化学組成と結晶相

3-2 クリンカの元素分布

熱交換器に付着していたクリンカの元素分布を調べた．

クリンカの断面を観察したところ比較的黒い部分と白い部分があり，縞模様になっていた．元素分布を見ると S は黒い部分に多く分布しており，逆に Cl は白い部分に多く分布していた．また，K は全体的にむら無く分布しており，その他の元素ははっきりとした違いは見られなかった．

今回分析したクリンカは 2 種類の層は熱交換器接触面側から外側に向かって交互に見られることから，熱交換器側から段階的にクリンカが形成されたと考えられた．

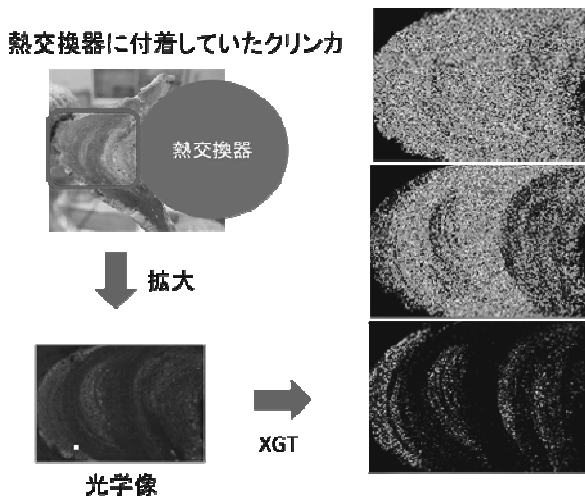


図3 クリンカの元素分布

3-3 燃焼灰の電気炉加熱結果

フライアッシュとボトムアッシュを燃焼ボートに入れて加熱した結果、いずれも 1,200℃までは灰が塊状化しなかったが、1,300℃を超えると灰が塊状化した。

鶏ふんボイラーの炉内温度が 1,200℃を超えることは考えにくい。このため、燃焼ボート上での加熱試験では実際のボイラーのように灰が燃焼室から熱交換器に移動し、クリンカが生成する複雑な機構が再現できていないと思われた。今後、クリンカ生成防止の試験を行うためには灰が移動して熱交換器にクリンカが生成する様子を再現できる装置を設計する必要がある。

4 まとめ

鶏ふん燃焼灰、クリンカについてさまざまな分析を行った。その結果、次のことが明らかになった。

- (1) フライアッシュとクリンカは組成比がかなり似ているが結晶は異なっていた。このことから、クリンカはフライアッシュの結晶が変化して生成すると考えられた。
- (2) クリンカの元素分布を調べたところ S が多いところと Cl が多いところが交互に現れて縞模様になっており、熱交換器から段階的にクリンカが生成していったと考えられた。
- (3) 灰を燃焼ボート上で加熱したところ実際のボイラー炉内温度よりもかなり高温にならないと塊状化しなかったため、クリンカの生成防止試験を行うためには、実際のボイラーの構造に近い実験装置による検証が必要であると考えられた。

鶏ふんは他のバイオマス燃料と特性が大きく異なることから¹⁾、クリンカ生成機構も異なる可能性がある。クリンカ生成防止のためには鶏ふん燃料に特化した防止法が必要であると考えられた。

5 参考文献

- 1) 溝口進一, 竹田智和, 落合克紀, 嶋貫祐次, 久木崎雅人: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 60, 5-8(2015)

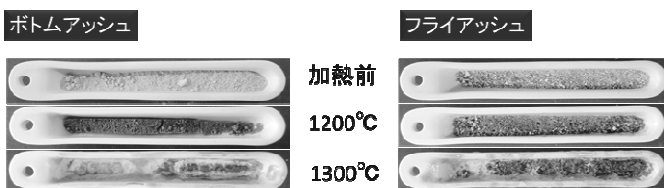


図4 加熱した鶏ふん燃焼灰

クリスチャンセン効果を内在した多孔質ガラス有機複合体

清水正高*1・轟木博*2

Organic Complex Based on Porous Glass which Derives Christiansen Effect

Masataka SHIMIZU and Hiroshi TODOROKI

ガラスに近い屈折率を持つ有機溶媒に多孔質ガラスの成形体を浸漬した場合、「クリスチャンセン Christiansen 効果」に基づく特徴的な光学現象が現れた。多孔質ガラスの規則正しい細孔構造が同効果をより明瞭に導いたと考えられる。そこで、本研究では、Christiansen 効果のファクターとなる細孔径、有機溶媒の屈折率、温度などが光の多重散乱に及ぼす影響を調べ、その全貌把握に努めた。測定試験の結果、各ファクターの影響下で透過率と光波長の関係が整然と変化し、過去に報告されたことのない新しいデータが得られた。一方、透過率に対して鋭敏な温度応答性があることも判明し、これを利用した超高感度温度センサーなどの用途が想像された。

1 はじめに

素材製造および様々な応用製品の事業化に成功した本県オリジナルの機能材料にシラス多孔質ガラス（以下、SPG）^{1,2)}がある。著者らは、有機溶媒を使ってパイプや板状の SPG 成形体を浸漬洗浄している最中に、特徴ある光学現象が現れることを偶然見出した。例えば、細孔を完全に有機溶媒で満たした SPG（以下、有機溶媒含浸 SPG）の透過光が青色～橙色に呈色し、側光では角度によって色合いが異なった。いずれも、屈折率が骨格ガラスに近い有機溶媒を使用した場合に限って見られる現象であった。

この発生メカニズムを明らかにするため、過去の研究事例を探索した。その結果、緻密充填したガラス微細粉に屈折率の近い有機溶媒を浸漬した場合に見られる、1884年に発表されたクリスチャンセン Christiansen 効果³⁾であることが明らかになった。この発見当初、光学フィルターへの応用が注目されたが、しかし、多重散乱の再現性に欠けるため実用研究が進まず、理論解明にとどまった。同効果の概念を図1に示す。

本報では、緻密充填したガラス微細粉部が SPG

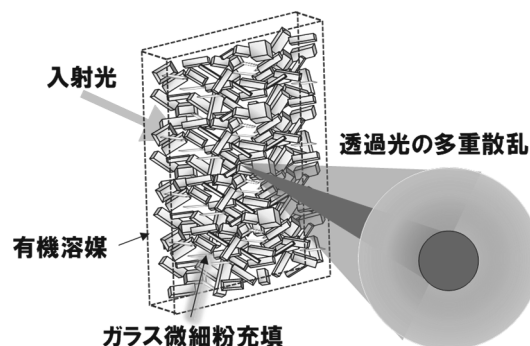


図1 Christiansen 効果の概念

成形体に置き換わることになる。SPGの骨格ガラスと有機溶媒に満たされた細孔は規則正しい固定構造をしており、Christiansen効果が明瞭に現れると予想された。そこで、SPGの細孔径、有機溶媒の屈折率、温度などをパラメータに、平板状SPGに対して可視光を照射し、透過率と光波長の関係（以下、透過率曲線）を調べたので報告する。

2 方法

2-1 シラス多孔質ガラスの特徴

SPGは、スピノーダル分解に基づく相分離を経由して製造される。骨格ガラスは均一な絡み合い型構造であり、空隙率は50～60%、細孔径は50nm～20μm間で自由に設定できる。3種類のSPG断面構造を図2に例示する。細孔構造は相似形で

*1 材料開発部

*2 三和ニューテック株式会社（現 宮崎県発明協会）

ある。

一方、細孔径が異なると骨格ガラス組成が変わり⁴⁾、屈折率も若干変化する。

2-2 Christiansen 効果

Christiansen 効果は、ガラス微細粉と分散媒体の間で起こる光透過・多重散乱に由来する特異な光学特性である。

1960年代までに、Raman ら⁵⁻⁷⁾によって、光の波長と分散粒子の大きさが近い

場合の Mie 散乱理論⁸⁾に基づき、ほぼ下記のように解析された。

角度 θ の Mie 散乱強度 I_θ は、

$$I_\theta = I_0 \cdot \lambda^2 (i_1 + i_2) / (8 \pi^2 R^2) \quad (1)$$

ここで、(1)式の i_1 と i_2 は、

$$i_1 = |\Sigma(2v+1)(v(v+1))\{a_v(1/\sin\theta)P_v^1(\cos\theta) + b_v dP_v^1(\cos\theta)/d\theta\}|^2 \quad (2)$$

$$i_2 = |\Sigma(2v+1)(v(v+1))\{b_v(1/\sin\theta)P_v^1(\cos\theta) + a_v dP_v^1(\cos\theta)/d\theta\}|^2 \quad (3)$$

なお、 I_0 は入射光強度、 λ は光波長、 R は距離、 $P_v^1(\cos\theta)$ は Legendre 多項式、 a_v と b_v は複素振幅係数で Riccati・Bessel 関数である。

(1)、(2)および(3)式から Christiansen 効果は次式のように簡略化できる。

$$I = I_0 \exp[-K^2 \pi^2 \Delta(n_1 - n_2)^2 Z / \lambda^2] \quad (4)$$

I は透過光強度、 K は粒子径分布と粒子形状に依存する係数、 Δ は屈折の有効単一粒子層厚み、 n_1 はガラス屈折率、 n_2 は液体の屈折率、 Z はセル粒子層厚み (= SPG 厚み) である。(4)式から、本研究の主要パラメータとしては、細孔径、屈折率、光波長、屈折率変化を導く温度が挙げられる。

有機溶媒含浸ガラス微細粉と SPG 成形体に対する光多重散乱の様子を概念的に図3に示す。SPG の骨格と細孔は絡み合い型構造をしているが、ポジとネガの関係で類似の形状であるため、統計的に均一な固定構造体を光が多重散乱することになる。一方、ガラス微細粉は、粉と空隙の形状が不均一なため、再現性のよい明瞭な多重散乱

とならないことが報告⁹⁾されている。

2-3 透過率と光波長の測定方法

紫外可視フォトダイオードアレイ分光光度計(島津製作所, MultiSpec-1500)を用い、石英ガ

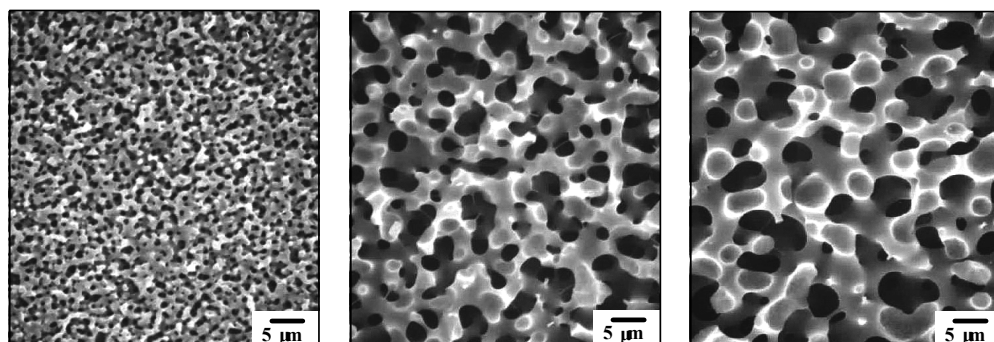


図2 シラス多孔質ガラス SPG の骨格構造が分かる電子顕微鏡写真

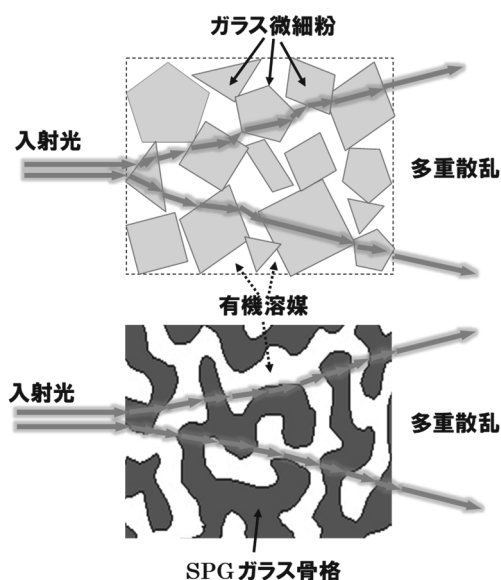


図3 ガラス微細粉と SPG 細孔骨格の多重散乱例

ラスセルに有機溶媒含浸板状 SPG を静置し、精密に制御した温度下で透過率曲線を測定した。下記の印画紙による散乱光リング観察では、自記分光光度計(島津製作所, UV-250)を改造し、暗室内で使用した。また、本報の有機溶媒には、全て和光純薬工業の特級品を使用した。

2-4 印画紙による散乱光リングの観察

上記機種で測定できるのは透過率のみである。そこで、実際に Christiansen 効果を確認するため、トルエン含浸板状 SPG に対してスリットを通過した波長 500 nm の可視光を照射し、透過光側に固定した印画紙に焼き付けを行って散乱光リングを観察した。光照射時間(露光時間)は 1~3 sec

である。

2-5 SPG 骨格ガラスの屈折率

細孔径 D_m が $0.28\mu\text{m}$ の板状 SPG を 800°C に加熱し、細孔を消失させてガラス板を製作した。これを研磨した後、アッペ屈折計（アタゴ IT, D 線）を用いて屈折率 n_1 を測定した。骨格ガラスは $n_1 = 1.51$ であった。しかし、2-1 に記したように、細孔径が異なる骨格ガラスの n_1 はこれと若干異なる可能性が高いと考えられたため、屈折率と光波長の関係（以下、分散曲線）が既知の有機溶媒を複数用いて、骨格ガラスの n_1 を推定することにした。

一方、これよりも D_m が大きな SPG を加熱によって透明なガラス板にすることは困難であった。

3 結果と考察

3-1 散乱光リングによる Christiansen 効果の確認

印画紙に焼き付けた散乱光リングの写真を図 4 に示す。板状 SPG の細孔径 D_m が $0.40\mu\text{m}$ の場合は、波長 500nm の入射光の多くが直進し、一部が散乱光リングとなった。一方、 $16.0\mu\text{m}$ では、ほとんどの入射光が散乱していると判断された。この結果は、図 5 に示した $D_m = 0.40\mu\text{m}$ と $16.0\mu\text{m}$ の光波長 500nm における透過率と一致した。

3-2 透過率曲線に及ぼす細孔径の影響

D_m が $0.4, 0.7, 1.5, 8.0$ および $16\mu\text{m}$ のトルエン含浸板状 SPG（厚み 1mm 、温度 22°C ）に対する透過率曲線を調べた。その結果を図 5 に示す。細孔径が大きくなるほど透過率のピークは短波長側へシフトし、長波長の光は散乱して Mie 散乱理論に従った。すなわち、 D_m が小さな $0.4\mu\text{m}$ 程度以下の有機溶媒含浸 SPG では、透過光は透明な青になり、側光は黄から赤の半透明となる。 D_m が大きく $16\mu\text{m}$ 程度近くになると、透過光は半透明な青、側光は橙に呈色するが不透明となり、観察事実を裏付けた。

3-3 骨格ガラス屈折率の推定と光波長との関係

分散曲線が既知のトルエン：エタノール

EtOH=9:1、トルエン：EtOH=24:1、トルエン、 α -キシレンおよびトルエン：ベンズニトリル=1:1 に対して細孔径 $0.4, 1.5, 8.0$ および $16\mu\text{m}$ の SPG 成形体から得られる透過率曲線を描き、それぞれのピーク波長を求めた。ここで骨格ガラスと有機溶媒の屈折率が一致しており、有機溶媒の分散曲線上にプロットしたものが図 6 である。

細孔径別のプロットを結んだ実線は、骨格ガラスの分散曲線に相当すると考えられる。光波長が長くなるに従って屈折率は小さくなり、既知のガラス分散曲線に類似した。一方、 D_m が大きくなると屈折率も相対的に大きくなり、2-1 記載の“細孔径が異なると骨格ガラス組成が変わり、屈折率も若干変化する”を裏付けた。

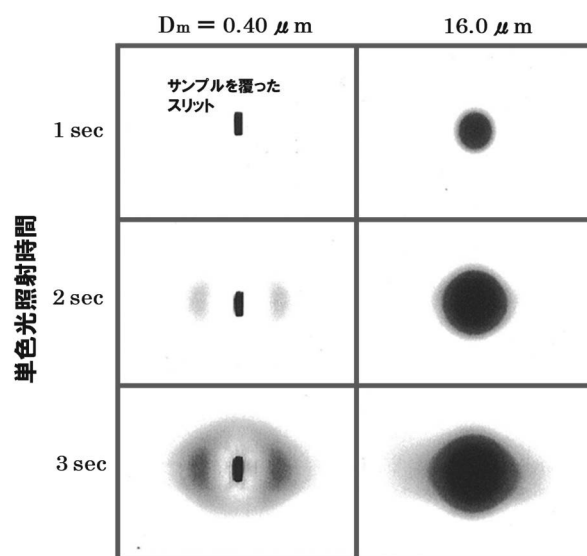


図4 可視光 500nm の散乱光リング

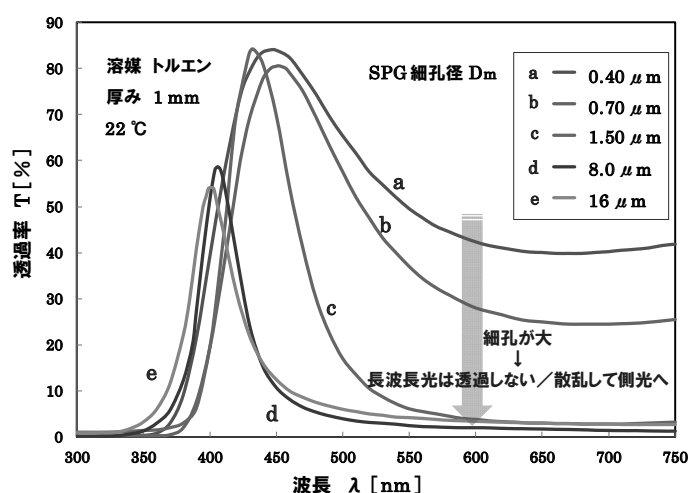


図5 透過率曲線に及ぼす細孔径の影響

有機溶媒と骨格ガラスの分散曲線は必ずクロスする関係にあり、Christiansen 効果を生み出す要因となっている。物理的には固体と液体の差による。仮に、SPG を高分子樹脂などに埋め込んだ場合には、固体-固体で両分散曲線が似た形となり、典型的な Christiansen 効果は出現しないことになる。

3-4 透過率曲線に及ぼす有機溶媒屈折率の影響

屈折率が既知の様々な有機溶媒、あるいは、混合溶媒を使って、 D_m が $0.75 \mu\text{m}$ の SPG 骨格に対する透過率曲線を求めた。その結果を図 7 に示す。

屈折率が小さい場合には長波長が散乱・吸収され、ピーク位置は紫外領域近くに達した。一方、大きな屈折率では短波長が散乱され、長波長が透過した。仮に照射光を赤外線領域まで延長した場合でも、Christiansen 効果は発現することが予想される。

3-5 透過率曲線に及ぼす温度の影響

温度を $17.1 \sim 30.0^\circ\text{C}$ の範囲で精密に制御しながら測定したトルエン浸漬板状 SPG の透過率曲線を図 8 に示す。温度が上がると長波長領域の透過率は劇的に低下し、ピークは短波長側へシフトした。

これは、有機溶媒屈折率の温度依存性が非常に大きいことに由来する。温度が上がると比重が低下し、屈折率は小さくなる。骨格ガラスの方は固体であるため温度依存性が小さい。具体的には、 10°C の温度変化で長波長の透過率が最大 50% 変化し、紫外可視フォトダイオードアレイ分光光度計の透過率測定感度から逆算した場合、温度分解能は 0.004°C に達すると考えられた。

4 まとめ

有機溶媒含浸板状 SPG は、骨格ガラスと有機溶媒に満たされた細孔が規則正しい固定構造をしており、Christiansen 効果が明瞭に現れた。細孔径、有機溶媒の屈折率、温度の各パラメータによ

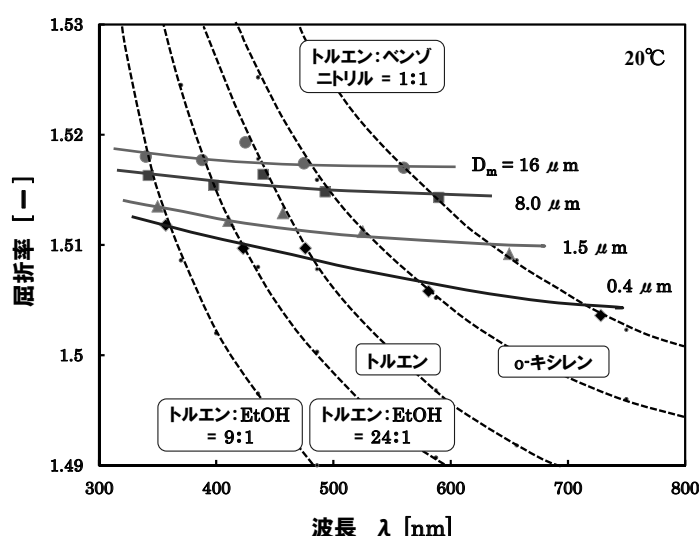


図6 SPG 骨格ガラスと有機溶媒の分散曲線の関係

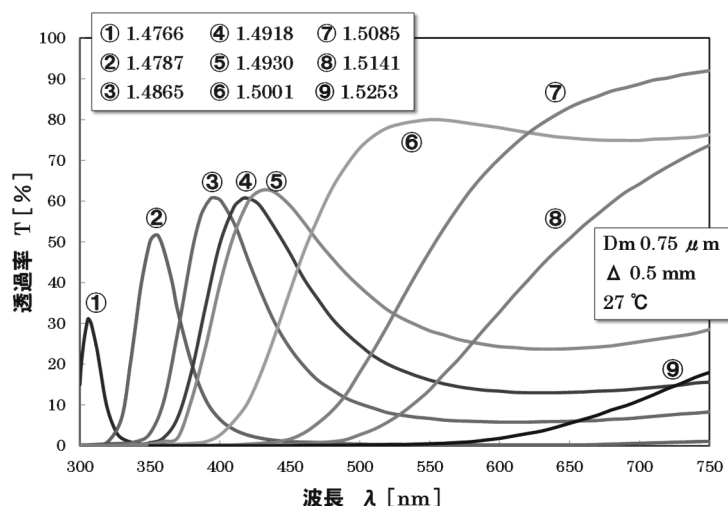


図7 透過率曲線に及ぼす有機溶媒屈折率の影響

って透過率曲線は大きく変化し、過去に例のない測定データが得られた。いずれも Raman らによる Christiansen 効果の理論解析から予想される変化であった。

特に、同効果は温度に鋭敏であり、超高感度温度センサーや気温自然対応型透明建材などへの応用が想像された。例えば、超高感度温度センサーは光ファイバーとの一体型が想像される。気温自然対応型透明建材は、夏に赤色熱線を散乱させ、冬には透過させて自然に室内温度を制御することができる。

一方、さらなる進展を図るには、有機溶媒から固定可能な有機材料へ転換する必要がある。SPG も成形体から粉末充填材へ挑戦することが現実的であると考えられる。

5 参考文献

- 1) 中島忠夫, 清水正高, セラミックス, **21**, 408-412 (1986)
- 2) Nakashima T. and Shimizu M., *J. Ceram. Soc. Japan*, **101**, 528-533 (1993)
- 3) Christiansen C., *Ann.Phys.Chem.*, **23**, 10, 298-306 (1884)
- 4) 中島忠夫, 黒木裕一, 日本化学会誌, **1981**(8), 1231-1238 (1981)
- 5) C.V.Raman, *Proc.Ind.Acad.Sci.*, **A29**,381-390 (1949)
- 6) Rayleigh Lord, *Nature*, **60**, 64 (1899)
- 7) V.J.Shelyubskii, *Glass and Ceramics*, 412 (1960)
- 8) Callos R.Hense, *Glastech.Ber.*, **60**, Nr3, 89-111 (1987)
- 9) 轟木博, 安藤律男, 清水正高, 中島忠夫, 平成 7 年 SPG 応用技術研究会研究発表会, 26-29 (1995)

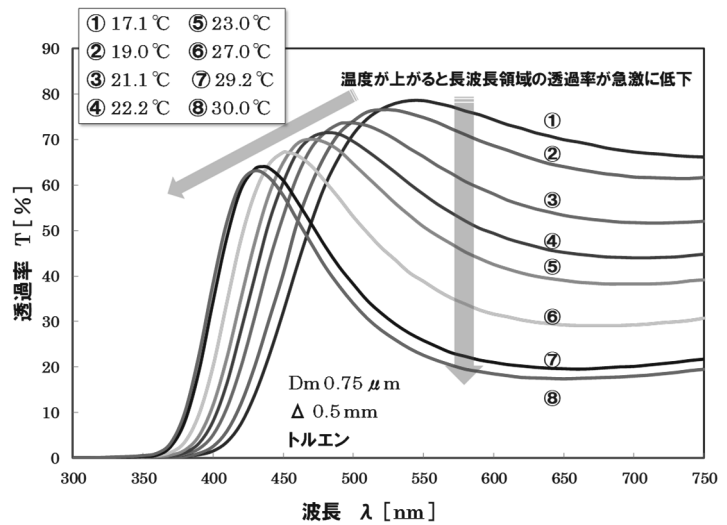


図8 透過率曲線に及ぼす温度の影響

膜透過法により生成した微細 W/O エマルションを経由する

サブミクロン球状シリカゲル粒子の合成

清水正高*¹・山本建次*¹

Synthesis of Submicron Silica Gel Being Spherical Particles via
Fine W/O Emulsion Produced by the Membrane Permeation Method

Masataka SHIMIZU and Kenji YAMAMOTO

シリカゲル粒子は、生体安全性、吸着機能、大きな細孔容積などから、カプセル基材もしくは担体に適した素材であることが知られている。最近、より高度な用途を想定し、粒径が 100 nm～1 μm の範囲で制御されたサブミクロン単分散球状シリカゲル粒子を求める声がある。そこで、本研究では、ケイ酸ナトリウム水溶液を出発物質に、その微細水滴が連続油相に分散した W/O エマルションを膜乳化法によって調製し、出発物質と反応物質の陽イオン交換によって水滴自体をゲル化した。その結果、サブミクロン単分散球状シリカゲル粒子を直接生成することに成功した。また、適切な膜透過条件、粒子の粒径制御範囲、細孔径分布とゲル化条件の関係などを明らかにした。

1 はじめに

シリカゲル粒子は、その特異な多孔構造、表面処理のフレキシビリティ、優れた粉体分散性、あるいは生体に安全な材質のため、様々な業界において数多くの商品が上市されている。例えば、医薬品、ヘルスケア、塗料・顔料・インク、高分子化学、芳香剤、接着剤、分析化学、触媒、食品・飲料添加剤など極めて多岐にわたる。

製造方法にも多くの種類^{1~4)}があるが、ケイ酸ナトリウム水溶液をゲル化して合成⁵⁾したシリカゲルのバルクを粉砕分級し、所定粒径範囲にそろ揃える方法が安価で最も一般的である。

特殊な製法として、ケイ酸ナトリウム水溶液と連続油相の W/O エマルションをあらかじめ調製し、そこに分散する水滴を界面反応法⁶⁾によりゲル化してシリカゲル粒子に合成する方法がある。これは水滴がそのまま粒子に移行することになるため、膜乳化法の1つである「直接乳化法」⁷⁾によって均一な水滴径の単分散 W/O エマルションが調製できたならば、単分散シリカゲル粒子を合

成することができる。粒径は数μm から 50 μm の範囲で制御⁸⁾されるが、生産性が低い欠点がある。

一方、粒子の大きさから俯瞰した場合、サブミクロン領域は製造の空白地帯である。すなわち、1 μm 程度以上のシリカゲル球状粒子は、上記手法によって造られる。逆に 100 nm 以下のシリカ粒子（シリカゾル）も古くから市販されている。

しかし、粒径が 100 nm～1 μm のサブミクロンであり、球状でシリカゲル特有の多孔構造を有する粒子を実用的スケールで製造した例はほとんどない。特に、最近では微細な機能性素材が求められる時代になりつつあり、サブミクロンオーダーのものを分級なしで生成できるならば、そのインパクトは極めて大きい。また、一般に、微細な粉体は流動性に乏しくハンドリングが困難であることから、粒径が揃った単分散の球状粒子に成形できることが理想である。

そこで本研究では、サブミクロン単分散球状シリカゲル粒子を実用規模の生産性で製造する新たなプロセスを検討した。まず、ケイ酸ナトリウムの微細水滴からなる単分散 W/O エマルションを多孔質ガラス SPG 膜⁹⁾を用いた「膜透過法」¹⁰⁾に

*1 材料開発部

よって造り，反応物質との陽イオン交換ゲル化反応を経て水滴内に球状シリカゲル粒子を生成した．本報では，成功した新たなプロセスの一例を紹介し，併せて，膜透過の要件，陽イオン交換の方法とゲル化速度，粒子回収手順，シリカゲルの細孔径分布に及ぼすファクターなどについて明らかにしたので報告する．

2 方法

2-1 基本製造プロセス

本研究で検討した製造プロセス例を図1に示す．あらかじめ，ケイ酸ナトリウム水溶液を分散水滴W，油剤に油性界面活性剤を溶解した連続油相Oとする粗大なW/Oエマルション（以下，透過前W/Oエマルション）を調製し，これをSPG膜に膜透過して，細孔径と同程度か小さな水滴径のW/Oエマルション（以下，透過後W/Oエマルション）を得る．

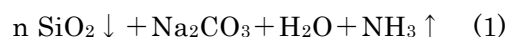
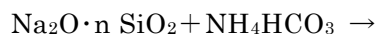
次に，透過後W/Oエマルションのケイ酸ナトリウム微細水滴を，ゲル化反応物質水溶液の水滴からなるW/Oエマルション（以下，反応側W/Oエマルション）と混合させ，陽イオン交換によるケイ酸のゲル化反応を起こして，微細水滴内にシリカゲル球状粒子を生成する．

ここでは，反応物質水滴，有機相，シリカゲル粒子が混在した状態であり，分離，乾燥を経てサブミクロン球状シリカゲル球状粒子が回収される．

2-2 ゲル化反応と原材料

出発原料には，3号水ガラス（ $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ ，富士化学(株)）を SiO_2 が4 mol/lになるよう希釈した浸透圧 $\Pi = 4.6$ MPaの水溶液を分散水滴とした．

ゲル化反応物質には，一般に H_2SO_4 などの酸が使われるが，本報では空隙率の大きな多孔構造が得られる重炭酸アンモニウム NH_4HCO_3 （富士フィルム和光純薬(株)）を選んだ． NH_4HCO_3 を1.2 mol/l（ $\Pi = 4.6$ MPa）に調整した水溶液を分散水滴とする反応側W/Oエマルションを準備した．ゲル化反応は次式のとおりであり，副生成物として Na_2CO_3 と NH_3 ガスが生まれる．



油性界面活性剤には3つの機能・性質が必要と考えられる．①ケイ酸ナトリウム水溶液は強いアルカリを呈することから，アルカリ分解しない性質であること．②安定なW/Oエマルションを形成し，膜透過によって微細水滴が得られる強力な界面活性性能を有すること．そして，③陽イオン交換のキャリアとなること．そこで，テトラグリセリン縮合リシノレイン酸エステルTGCR（阪本薬品工業(株)，CR-310），ヘキサグリセリン縮合リシノレイン酸エステルHGCR（阪本薬品工業(株)，CR-500），ソルビタンモノラウレートSpan 20（富士フィルム和光純薬(株)），ソルビタンモノオレートSpan 80（富士フィルム和光純薬(株)），ポリオキシエチレン(20)ソルビタントリオレートTween 85（富士フィルム和光純薬(株)），ショ糖エルカ酸エステル（三菱化学フーズ(株)，ER-290），ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（日光ケミカルズ(株)，HCO-40）を選んで検討した．

油剤としては，トルエン，*n*-ヘキサン，灯油，大豆油を検討した．以下，特別な記載がない限り，本報の原材料や試薬類は富士フィルム和光純薬(株)製である．

2-3 透過前W/Oエマルションの調製

透過前W/Oエマルションと反応側W/Oエマルションは，ホモミキサー（IKA，ULTRA-TURRAX）を用いて調製した．油性界面活性剤濃度は連続油相に対して5～20 wt%，水相体積は両エマルションとも20 vol%，

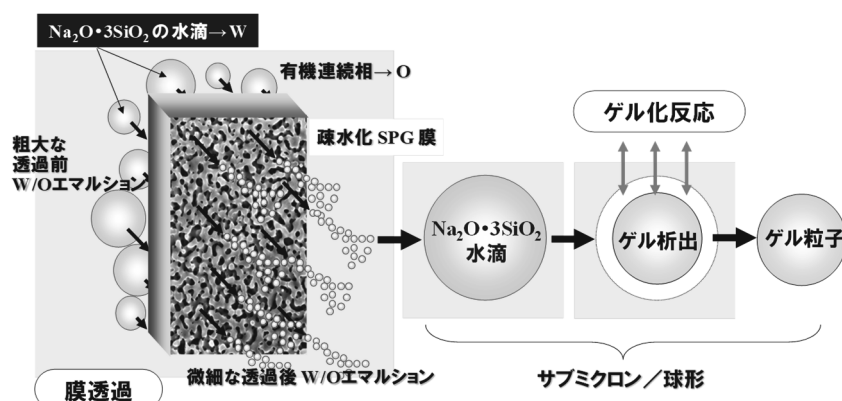


図1 基本的な製造プロセス例

乳化条件は 13,500～24,000 rpm, 3 min であった。

$\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ の濃度 4 mol- SiO_2 /l と NH_4HCO_3 の 1.2 mol/l は、浸透圧計（ローベリング社、オスモメーター）によると等張の浸透圧 $\Pi = 4.6$ MPa であった。

2-4 シラス多孔質ガラス SPG 膜と疎水化

SPG は市販品（エス・ピー・ジーテクノ(株)）を使用した。外形 10 mm, 内径 8.5 mm のパイプ状であり、細孔径 D_m は 0.6, 0.7, 0.8, 1.0, 2.9, 10 μm の 6 種類、空隙率はいずれも 50～60% である。

SPG は本来親水性であるため、その骨格ガラス表面を疎水化処理した。試みた疎水化剤と処理液は以下 5 種類である。①シリコーンレジン（東レ・ダウコーニング(株), SR-2410）を 10 wt% 溶解したトルエン溶液、②フッ素シリコーンコーティング剤（信越化学工業(株), KP-801M）、③水溶性の有機シリコーンレジン（信越化学工業(株), KP-18C）の 10 wt% 水溶液、④シリコーンレジン（東レ・ダウコーニング, SR-2405）を 5 wt% 溶解したヘキサン溶液、⑤オクタデシルクロロシラン TMS（信越化学工業(株)）処理用 10 wt% トルエン溶液。これらに $D_m = 0.8 \mu\text{m}$ のパイプ状 SPG を浸漬し、12 h 脱気した後に取り出して溶媒を十分拭き取り、110℃で 24 h 乾燥した。①～④はレジコーティング処理、⑤は通常の ODS+TMS シランカップリング処理である。その外、⑥何も処理しない場合を比較対象とした。

2-5 膜透過による微細 W/O エマルション生成

出発原料が $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 、油剤がトルエン、油性界面活性剤が TGCR である基本組成の透過前 W/O エマルションを所定の細孔径を持つ疎水性 SPG 膜に膜透過し、透過後の微細水滴の W/O エマルションを得た。圧力は 0.7～3.5 MPa であった。

本報では、膜透過を 1 回実施した結果を主に示した。しかし、必要に応じて複数回実施しても良い。例えば、細孔径が大きな疎水性 SPG 膜から順に細孔径の小さな膜に透過した場合は、水滴の微細化が容易になる。

膜透過では、透過前 W/O エマルションを完全透過するために最低限必要な臨界圧が存在する。

この臨界圧以下では透過前 W/O エマルションの水滴が SPG 膜によって阻止され、連続油相のみが多孔質膜体を通過する過程が起こり、やがて膜面上に堆積した水滴によって細孔が閉塞する。また、局所的に水滴の数濃度が高い部分が存在した場合には、そこで水滴の圧入に要する圧力が増大し、臨界圧以下の場合と同様に閉塞する。従って、できるだけ W/O エマルションの水滴が均一に分散した状態で速やかに膜透過させることが望ましい。本研究では、透過前 W/O エマルションの貯蔵容器にかくはん機能を附属し、水滴の沈降を抑制する方法を採用した。

2-6 陽イオン交換反応の手順

ゲル化反応物質 NH_4HCO_3 を濃度 1.2 mol/l に調整した水溶液の分散水滴からなる反応側 W/O エマルションを準備した。油剤と油性界面活性剤の種類と濃度は透過前 W/O エマルションと同じである。 $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ と NH_4HCO_3 の W/O エマルションを図 2 (a) のように混合かくはんした。分散水滴の NH_4HCO_3 / $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 体積比 m は 2.5～15 とした。

陽イオン交換を検証する実験 I では、 $D_m = 10 \mu\text{m}$ の疎水性 SPG 膜を使い、直接乳化法で調製し

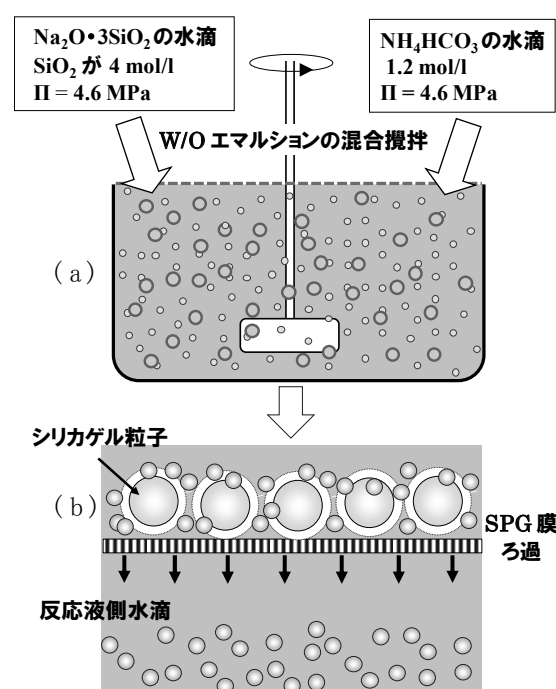


図2 陽イオン交換検証手順

た $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水滴径 D_w が $30 \mu\text{m}$ の単分散 W/O エマルションを用いた. 同様に NH_4HCO_3 水滴径 $D_w = 30 \mu\text{m}$ の単分散 W/O エマルションを準備し, 両者を混合かくはんしながらゲル化の様子を光学顕微鏡で観察した. 両水滴径を同じにしたのは, 顕微鏡の焦点距離を一致させるためであった.

一方, 検証実験Ⅱでは, 図 2 (b)に示すようにイオン交換している NH_4HCO_3 水滴のみを回収するため, $D_w = 1.5 \mu\text{m}$ の反応側 W/O エマルションをホモミキサーで調製した. 混合かくはん途中で経時的にろ過採取した NH_4HCO_3 水滴を分析し, 移動した Na^+ の濃度を測定した. ろ過には $D_m = 10 \mu\text{m}$ の SPG 膜を使用し, シリカゲル片のリークがないことを確認した.

2-7 シリカゲル粒子の回収

シリカゲル粒子は, 図 2 (a)の油相, 水相, シリカゲル粒子が混在している状態から回収しなければならない. そこで, ろ紙 5C による油相の吸引ろ過後, ヘキサン, 次いでエタノールによるデカンテーションとろ過を行った. 最後は, ロータリーエバポレーターの吸引口に乾燥粒子より小さな孔径のフィルターを装着し, さらに回転フラスコに超音波を照射する機能を付属することによって, 粒子分散を保持したまま減圧乾燥・回収を行った.

2-8 粒径および細孔径分布の測定

W/O エマルションの水滴径 D_w やシリカゲル粒子の粒径 D_p は, レーザー回折散乱式粒度分布測定装置 ((株)島津製作所, SALD-2000) によって計測した値であり, 特にことわりがなければ積算 50%の平均径を指す. 測定のための希釈分散媒には灯油を用いた.

シリカゲル粒子の細孔特性は, 窒素ガス吸着式細孔分布測定装置 (ファイソonz, ソープトマチック 1990) による Barrett-Joyner-Hallenda 法で解析した細孔径分布, 細孔容積, BET 比表面積で評価した.

3 結果と考察

3-1 膜透過における疎水化の効果

SPG 膜の疎水化手段が W/O エマルションの膜透過に及ぼす影響について検討した. 細孔径 D_m

は $0.8 \mu\text{m}$, 透過前の水滴径 D_w は $1.8 \mu\text{m}$ であり, 圧力 3.5 MPa で膜透過を行った. その結果を表 1 に示す.

①～④のコーティング疎水化処理では水滴が微細化し, D_w は透過前より小さくなった. 一方, 親水性の⑥では水滴の解乳化が起こり, ⑤では ODS + TMS が膜透過途中で剥がれ落ちて効果がなくなると判断された. 骨格ガラス表面に親水性部分が局所的に存在するか, 疎水化処理が剥がれ落ちた場合, 透過後 W/O エマルションの D_w は解乳化によって透過前のそれより大きくなる. さらに細孔を閉塞して膜透過が起こらない¹¹⁾ こともある.

表1 疎水化方法による W/O エマルションの膜透過に及ぼす影響を調べた結果

疎水化処理方法	膜透過後 D_w	成否
①シリコンレジン SR-2410	$0.99 \mu\text{m}$	○
②フッ素シリコンコーティング剤 KP-801M	$0.97 \mu\text{m}$	○
③水溶性有機シリコンレジン KP-18C	$1.06 \mu\text{m}$	○
④シリコンレジン SR-2405	$0.98 \mu\text{m}$	○
⑤オクタデシルクロロシラン+トリメチルクロロシラン	$18 \mu\text{m}$	×
⑥親水性(無処理)	数 $100 \mu\text{m}$	×

3-2 微細水滴を有する単分散 W/O エマルションの生成

SiO_2 が 4 mol/l になるように溶解した $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 分散水相と TGCR 20 wt%を溶解したトルエン連続油相を用意し, ホモミキサーを用いて図 3 ① $D_w = 3.0 \mu\text{m}$, 水相体積 20 vol%の透過前 W/O エマルションを調製した. 次に, KP-18C で疎水化処理した図 3 ② $D_m = 2.9 \mu\text{m}$ の SPG 膜に対して ①W/O エマルションを 0.7 MPa の圧力で膜透過し, $D_w = 1.8 \mu\text{m}$ の透過後 W/O エマルションを得た. さらに図 3 ③ $D_m = 0.8 \mu\text{m}$ の疎水性 SPG 膜に 1.0 MPa の圧力で②を膜透過し, $D_w = 1.1 \mu\text{m}$ の透過後 W/O エマルションを得た. この③から合成されたシリカゲル球状粒子は $D_p = 0.55 \mu\text{m}$ で

あり、膜透過によって水滴を微細化でき、比較的単分散になることが判明した。

さらに D_w を微細化したい場合は、 D_m がより小さな疎水性 SPG を使用する必要がある。例えば、 $D_m = 0.7 \mu\text{m}$ と $0.6 \mu\text{m}$ の疎水性 SPG 膜を用意し、図 3 ③の W/O エマルジョンに圧力 3.5 MPa を加えて膜透過を 5 回繰り返した。その結果、 $D_w = 0.89 \mu\text{m}$ および $0.75 \mu\text{m}$ の透過後 W/O エマルジョンが得られ、球状シリカゲル粒子は $D_p = 0.49 \mu\text{m}$ および $0.43 \mu\text{m}$ であった。微細化には繰り返し膜透過が有効であった。

また、 SiO_2 が 0.4 mol/l になるように溶解した $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水溶液と 0.12 mol/l の NH_4HCO_3 水溶液、すなわち、標準の $1/10$ 濃度で浸透圧が $\Pi = 0.46 \text{ MPa}$ の分散水滴を使って上記と同じ方法で球状シリカゲル粒子を合成した。その結果、同粒子の D_p は $0.22 \mu\text{m}$ および $0.18 \mu\text{m}$ であった。出発原料の濃度を下げれば粒径は小さくなるが、しかし、収率が悪くなる欠点が生まれる。

油剤の種類が膜透過へ及ぼす影響を表 2 に示す。疎水性 SPG 膜の D_m は $1.0 \mu\text{m}$ 、TGCR 20 wt%、水相体積 20 vol% の条件であった。油剤の種類によって透過前 W/O エマルジョンの D_w は大きく変化した。油剤の粘度が高い順に D_w は小さい。一方、膜透過後の D_w に大きな差はなかった。また、表 4 の④大豆油などは、シリカゲル粒子回収時の溶剤によるデカンテーションに難があり、本研究には適さないと考えられた。

次に、表 2 と同じ条件で、油剤にトルエンを用い、油性界面活性剤の種類が膜透過へ及ぼす影響について調べた結果を表 3 に示す。同濃度は水滴の凝集を低減させるため 5 wt% とした。表 3 の①と②のポリグリセリン縮合リシノレイン酸エステルは膜透過が容易であったが、③～⑦は水滴の凝集力が強く、ろ過されるか膜透過に高压が必要であった。さらに、後述する陽イオン交換能は①と②が顕著であり、③～⑦はほとんど交換能が観測できなかった。

3-3 陽イオン交換反応の検証 I

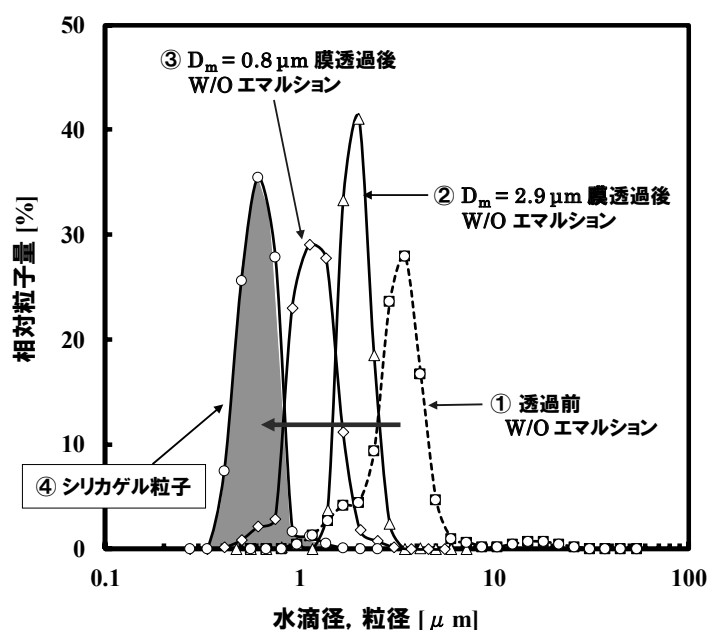


図3 膜透過による水滴の微細化とシリカゲル粒径との比較

表2 油剤の種類が膜透過に及ぼす影響

油 剤	透過前 D_w	膜透過後 D_w
① トルエン	$3.0 \mu\text{m}$	$1.1 \mu\text{m}$
② n-ヘキサン	$3.8 \mu\text{m}$	$1.6 \mu\text{m}$
③ 灯 油	$2.7 \mu\text{m}$	$1.2 \mu\text{m}$
④ 大豆油	$1.0 \mu\text{m}$	$0.99 \mu\text{m}$

表3 油性界面活性剤が膜透過に及ぼす影響

界面活性剤	透過前 D_w	膜透過後 D_w
① TGCR	$3.0 \mu\text{m}$	$1.1 \mu\text{m}$
② HGCR	$2.5 \mu\text{m}$	$0.94 \mu\text{m}$
③ Span 20	$4.1 \mu\text{m}$	$1.9 \mu\text{m}$
④ Span 80	$3.9 \mu\text{m}$	$1.7 \mu\text{m}$
⑤ Tween 85	$4.5 \mu\text{m}$	$1.7 \mu\text{m}$
⑥ ER-290	$3.4 \mu\text{m}$	$1.4 \mu\text{m}$
⑦ HCO-40	$3.3 \mu\text{m}$	$1.6 \mu\text{m}$

$\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水滴と NH_4HCO_3 水滴が共存した場合、連続油相に溶解する TGCR がキャリアとなって $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水滴から Na^+ , NH_4HCO_3 水滴から NH_4^+ を運び、連続油相を介して等価の陽イオン交換を起こした。正しくは濃度拡散であるが、等価を維持しているため陽イオン交換に見えていられると考えられる。その結果、 $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水滴は $\text{SiO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3$ の水滴に変化し、析出物である球状シリカゲル SiO_2 粒子が水滴中に生成する。また、水滴は界面張力によって球形を保つため、その中に浮かぶ不定形のシリカゲル粒子も球形になる。一方、 NH_4HCO_3 水滴は Na_2CO_3 の水滴に変化し残存することになる。

油相を介した陽イオン交換によってゲル化が

1つの集合体に成長して SiO_2 ゲル粒子になるメカニズムが考えられる。本研究で単核カプセルを観察したことはなかった。

3-4 陽イオン交換反応の検証Ⅱ

2-6 検証Ⅱにおいて陽イオン交換の実証試験を行った。 $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ の水滴径 D_w が $30 \mu\text{m}$ と $60 \mu\text{m}$ の単分散 W/O エマルション 2 種を準備し、それぞれ NH_4HCO_3 水滴 $D_w = 1.5 \mu\text{m}$ の反応側 W/O エマルションと $m = 2.5$ の比で混合かくはんした。経時的にろ過採取した NH_4HCO_3 水滴中の Na 量を原子吸光分析装置 ((株)島津製作所, AA-660) により測定し、水分量はカールフィッシャー水分計 (京都電子工業(株), MKA-610) を使って求めた。

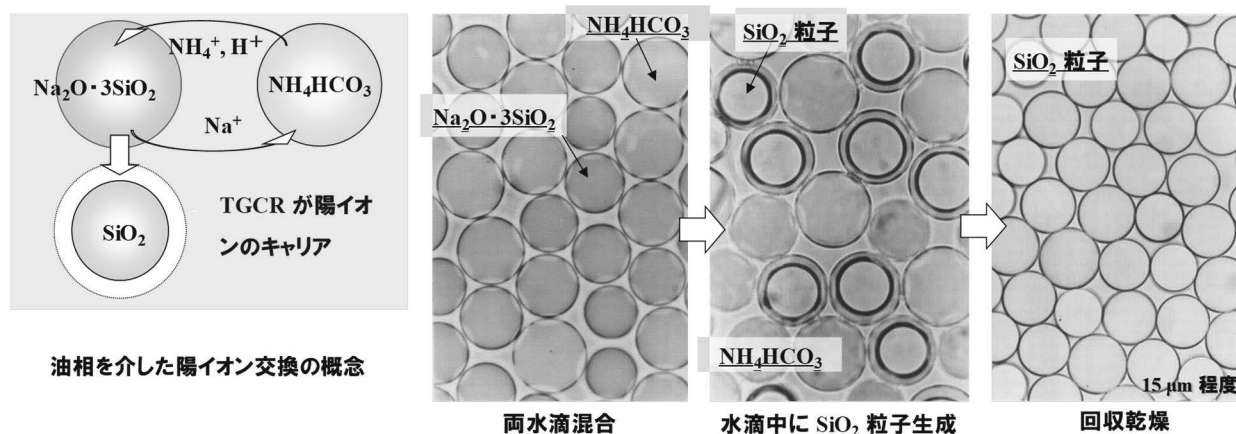


図4 油相を介した陽イオン交換によってゲル化が起こる概念および検証実験Ⅰの光学顕微鏡観察写真

起こる概念および検証実験Ⅰの光学顕微鏡観察写真を図4に示す。両水滴径は約 $30 \mu\text{m}$ であり、混合した場合に見分けがつかない。しかし、陽イオン交換が進むと $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水滴内に SiO_2 ゲル粒子が生成し、そのままの大きさと乾燥粒子が回収されている。

W/O エマルションを経由して SiO_2 ゲル粒子を造る他の研究では、界面反応法に代表されるように界面を起点に SiO_2 殻が形成され、内部に向かってゲル化が進むと主張している報告が多い。すなわち、単核カプセル状の粒子が造れるはずである。しかし、図4の光学顕微鏡写真から、ゾル生成からゲル化に進む反応は水滴内で均一に起こり、

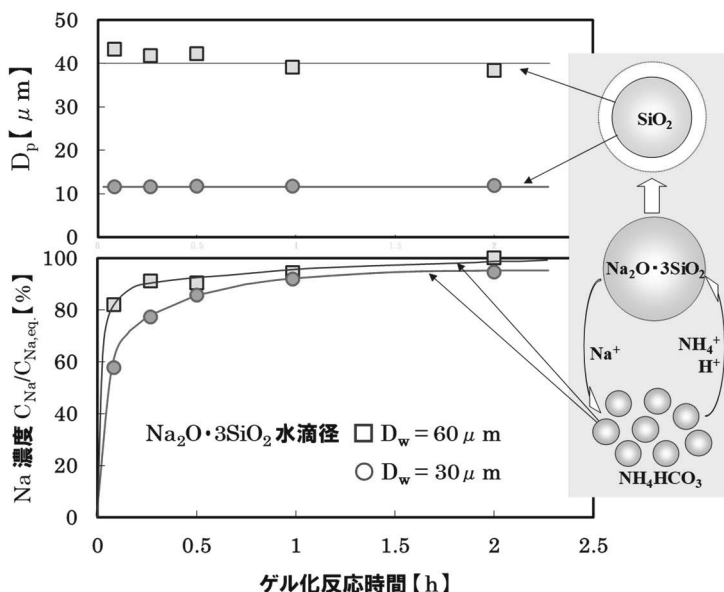


図5 陽イオン交換による Na の移動とシリカゲル粒子の形成速度

NH_4HCO_3 水滴内の Na 濃度 C_{Na} は、図2のろ液に含まれる Na 総量を原子吸光分析装置を使って直接測定し、カールフィッシャー水分計で求めた水分総量で除して算出した。両水滴内の Na 濃度 C_{Na} が最終的に等しい濃度になると仮定した平衡濃度 $C_{\text{Na,eq}}$ に対する比、すなわち、 $C_{\text{Na}}/C_{\text{Na,eq}}$ を経時的

に図5に示す。併せてろ過回収したシリカゲル粒子の D_p をプロットした。約5minで $C_{\text{Na}}/C_{\text{Na,eq}}$ は60~80%に達しており、陽イオン交換速度はかなり速いことが明らかになった。シリカゲル粒子も約5minの時点でゲル化が完成している。詳細は次報に譲るが、総界面積が少ない水滴の方が陽イオン交換とゲル化反応速度を支配する。本研究では、 $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水滴の総界面積は NH_4HCO_3 水滴より小さいため、厳密には、 $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水滴の粒径や濃度が速度に影響していると予想される。

3-5 サブミクロン単分散球状シリカゲル粒子と細孔特性

膜透過によって調製した① $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水滴の W/O エマルション、これに② 反応側 W/O エマルションの NH_4HCO_3 水滴を添加し陽イオン交換反応が進んでいる状態の光学顕微鏡、ならびに、回収したシリカゲル粒子の電子顕微鏡 SEM 写真を図6に示す。全てのシリカゲル粒子が球状であり、 $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 水滴の均一な D_w に由来してシリカゲル粒子も単分散であり、SEM 写真からは粒子同士の合体や接着は見られなかった。

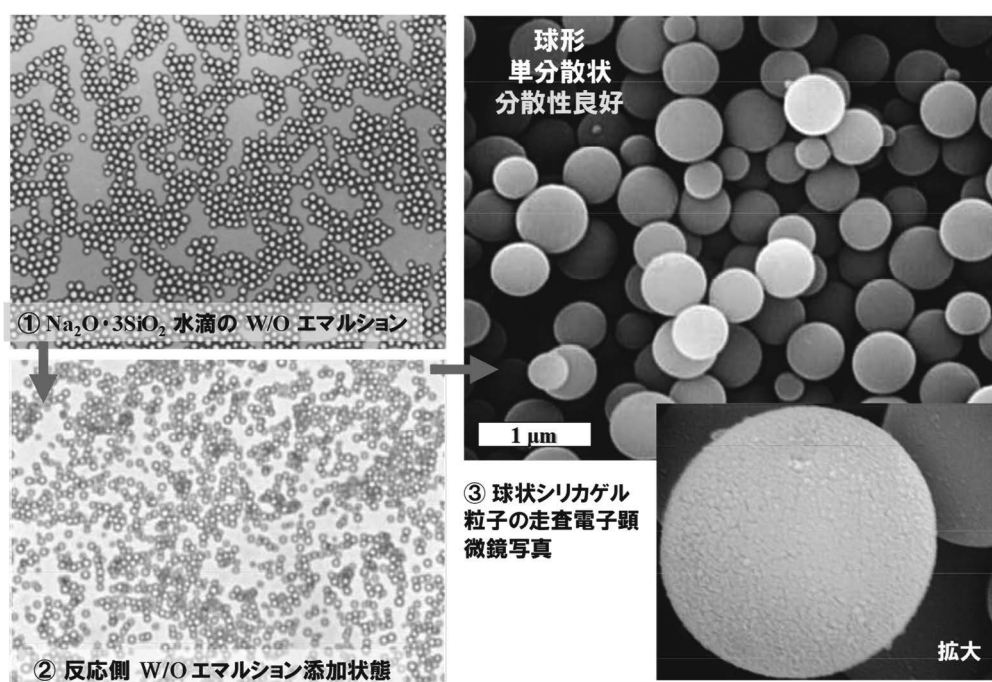


図6 W/O エマルション状態が分かる光学顕微鏡写真とシリカゲル粒子の電子顕微鏡写真

回収したシリカゲル粒子の細孔径分布、BET 比表面積、細孔容積を図7に示す。先述したようにゲル化反応は陽イオン交換によって進行する。同時にシリカゲルはゲル構造の再編が経時的に生じるため、ゲル化条件によって細孔構造が大きく変化する可能性がある。特に、 $\text{Na}_2\text{O} \cdot 3\text{SiO}_2$ 濃度と浸透圧 Π 、 NH_4HCO_3 の濃度と Π 、濃度比、混合比 m などに大きく影響されと考えられる。

等張条件で m を変えた結果も図7に示した。本

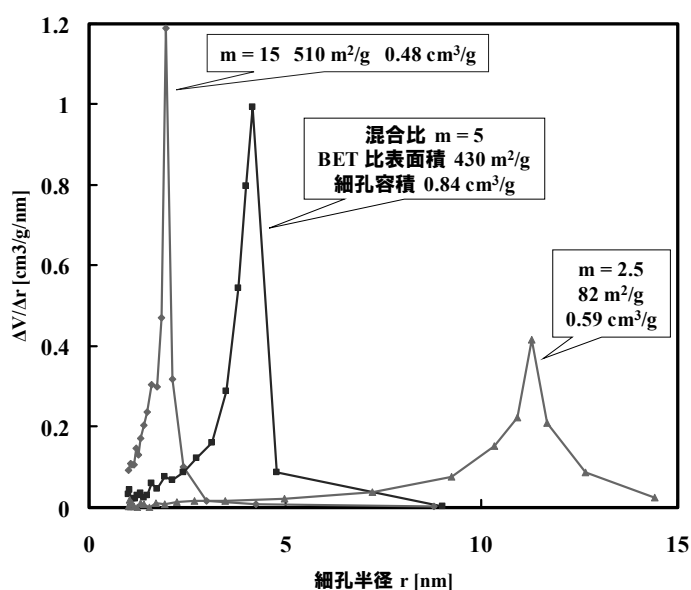


図7 シリカゲル粒子の細孔特性と混合比の影響

研究の標準である $m = 2.5$ のシリカゲル細孔径は 22 nm, BET 比表面積は 82 m²/g であり, 比較的ルーズな細孔構造になっていた. $m = 5$ にした場合には 8 nm と 430 m²/g, $m = 15$ では 4 nm と 510 m²/g になり, 添加した NH₄HCO₃ 水滴の体積が大きくなるに従って細孔構造は微細化してい

った. ゲル化反応速度の変化によるものか, ゲル構造再編によるものか不明であるが, 少なくとも m によって細孔特性をある程度制御できることが判明した.

サブミクロン球状単分散シリカゲル粒子を回収した時の様子を図 8 に示す. 一般に有機無機を問わずサブミクロン粒子を乾燥すると粒子同士の凝固や強い凝集が問題になる. しかし, 本報の製造技術に基づいて生成されたシリカゲル粒子は十分な乾燥分散性を確保できた. 単分散のシリカゲル粒子ではあるが, 油中で粒子合成を行い, そのまま回収する操作も乾燥分散性確保に寄与していると考えられる.

4 まとめ

本法の特徴を以下に整理する. ①サブミクロンの単分散シリカゲル粒子が得られる. ②粒子は球状であり, 生産性が高い. ③油相中で生成するため乾燥分散性に富む. ④反応が均一に起こる W/O エマルションの混合反応である. また, 反応条件によってシリカゲルの多孔構造を制御できる可能性がある. 以上のことから, 医薬品, ヘルスケア, 分析化学など多くのニーズに対応できる機能性素材を手に入れることができたと考えられる.

一方, 学術的および実用的な観点から詳細な議論がまだまだ不十分であるとも言える. 最も大きな課題は, 図 5 で明らかなように, Na⁺と NH₄⁺ の陽イオン交換が平衡で止まり, シリカゲル内に副生成物 NaOH が残留してしまう点である. 応用製



図8 得られたサブミクロン球状単分散シリカゲル粒子

品を検討する際にはぜひ解決しておく必要がある.

出発原料が別物でも同じように粒子を造れるのか, ゲル化反応に関連する油性界面活性剤濃度や浸透圧の影響など未解明な項目も多い. 今後の研究に委ねたい.

5 参考文献

- 1) 森康維, 福本友祐: 粉体工学会誌, **38**, 90 (2001)
- 2) 矢嶋尊, 村上伸吾, 三宅新一: 日本酸素技報, No17, 43 (1998)
- 3) 小菅勝典, 佐藤哲: 特許 4478766
- 4) 内田邦夫, 川合章子: 特許 2590428
- 5) Ralph K. Iler: The Chemistry of Silica; Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica, John Wiley and Sons (1979) New York
- 6) 中原桂子, 本橋和則, 田中裕子, 宮田謙一: 色材, **51**, 521-527 (1978)
- 7) 清水正高, 久木崎雅人, 中島忠夫: 化学工学論文集, **28**, 3, 310-319 (2002)
- 8) 中原桂子, 清水正高, 水口正昭ほか: 特許 2555475
- 9) 中島忠夫, 清水正高: セラミックス, **21**, 408-412 (1986)
- 10) 清水正高: FOODS & FOOD INGREDIENTS JOURNAL OF JAPAN, **209**, 931-937 (2004)
- 11) 佃智基, 清水正高, 久木崎雅人, 中島忠夫: 宮崎県工業試験場・宮崎県食品加工研究開発センター研究報告, **41**, 29 (1996)

試料の表面粗さが蛍光 X 線分析結果に及ぼす影響*

河野 拓人*1・野口 大介*2・山本 建次*1

Effect of Surface Roughness on Fluorescent X-ray Analysis Results

Takuto KAWANO, Daisuke NOGUCHI, and Kenji YAMAMOTO

前報¹⁾において、粉体試料の粒度が蛍光 X 線分析結果に及ぼす影響について調査した結果、粉体の粒度の変化が蛍光 X 線強度に影響し、分析値を変動させることが明らかになった。本報では、さらにバルク試料の表面粗さと蛍光 X 線分析結果の相関を明らかにするため、合金材料を例に調査を行った。その結果、バルク試料の表面粗さによって蛍光 X 線強度が変化することを確認した。変化は分析する元素により異なり、表面粗さの増大により蛍光 X 線強度が低減する元素がある一方、逆に増大する元素も見られた。以上の結果から、表面粗さによる蛍光 X 線強度の変化は複雑であり、表面粗さを可能な限り低減させること、および複数の試料の分析結果を比較する場合は、各試料の表面粗さを一定に保つことが重要であることを確認した。

1 はじめに

蛍光 X 線分析装置は、鉄鋼材料に含まれる元素のスクリーニングや、セラミック粉体の元素組成の確認など、その材料を構成する元素の種類や量を特定する重要な手法として、工業分野や試験研究分野など様々な分野で活用されている。一般に、粉体のプレス試料や、平滑であればバルク状態の試料の分析も可能であり、試料調製が簡便なため、スクリーニング分析などにおいて有効な手段となっている。

また、通常、目的試料に含まれる元素の定量分析を行う場合、その試料と同様の元素組成で目的元素の含有率が異なる試料を複数用いて検量線を作成し、定量結果を算出する必要があるが、ファンダメンタルパラメーター法（FP 法）を用いると、目的試料 1 つで、簡易的にある程度の正確性を持った定量分析結果を得ることができる。FP 法では、分析によって判明した目的試料 1 つの元素組成を使って、測定条件とファンダメンタルパラメーター（物理定数）を元に理論的に X 線強度を計算し、実際に測定された X 線強度との相関から各元素の定量を行う。

一方、蛍光 X 線分析に当たって十分に注意しなければならない点も存在し、特に分析試料の平滑さが分析結果に大きく影響を及ぼすことが知られている

2-3)。前報では、粉体の粒度を変化させた試料を作製し、そのプレス体を蛍光 X 線分析することで、FP 法における粉体の粒度とその分析値の相関を定量的に確認した。その結果、粉体の粒度が大きい試料ほどその蛍光 X 線強度が低下し、最終的な分析値にも大きく影響を及ぼすことが確かめられた。

一方で、鉄鋼材料などの分析においてはバルク状態での分析が行われるが、バルクにおいても、その分析面が粗い場合は、試料研磨機等により平滑に加工する必要がある。しかしながら、分析面をどこまで平滑にすれば良いか具体的に示した報告例は少ない。

そこで本研究では、バルクの合金材料を使用して表面粗さの異なる試料を作製し、その蛍光 X 線分析を行うことで、それぞれの試料表面粗さが蛍光 X 線強度および分析値に及ぼす影響について調べた。

2 実験方法

2-1 分析試料の作製

分析試料として、市販のニッケル合金であるインコネル 601（㈱ニラコ製、Ni：58～63 wt%，Cr：21～25 wt%，Al：1～1.7 wt%，Mn：<1 wt%，Fe：バランス）を用意した。そこから 3 つの円柱試料（直径 30 mm，厚さ 10 mm）を切り出し、切断面を研磨することで分析面の表面粗さを制御した。ま

* 粉体試料の粒度が蛍光 X 線分析結果に及ぼす影響（第 2 報）

*1 材料開発部

*2 機械電子部

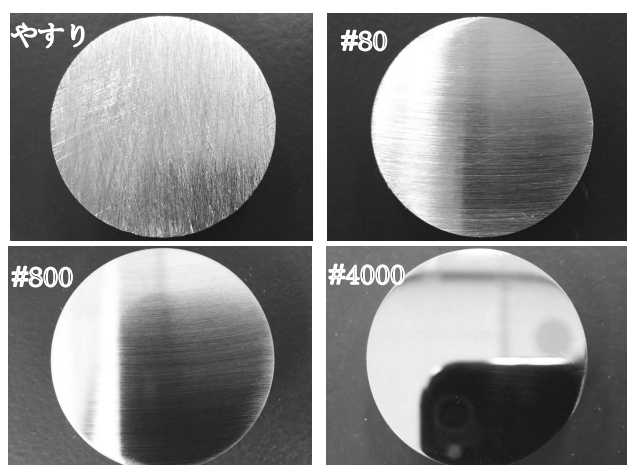


図1 研磨後の試料表面の様子

ず、試料3つすべてを研磨番手#4000のSiC研磨紙で処理し、その後、#800、#80のSiC研磨紙、やすりの順で行うことで、表面粗さの異なる4水準の試料を3つずつ得た。それぞれの水準の試料外観を図1に示す。

2-2 表面粗さ測定

表面粗さを定量的に評価するために、2-1で作製した各試料の表面粗さを測定した。図2の表面粗さ・輪郭形状測定機（株式会社ミツトヨ製，SV-C634）を用いて、規格JIS B 0601:2001を参考に、基準長さ $l_r = 2.5 \text{ mm}$ の条件で5区間の測定を行い、算術平均粗さ R_a および最大高さ粗さ R_z を算出した。 R_a は(1)式で表され、また、その概要を図3に示す。式中の l_r は基準長さを、 $|Z(x)|$ は各「山高さ」および「谷深さ」の絶対値をそれぞれ表す。すなわち、 R_a は基準長さにおけるそれぞれの山の高さおよび谷の深さの値の平均値である。また、 R_z は「山高さ」および「谷深さ」それぞれの最大値の和で表される。



図2 表面粗さ・輪郭形状測定機

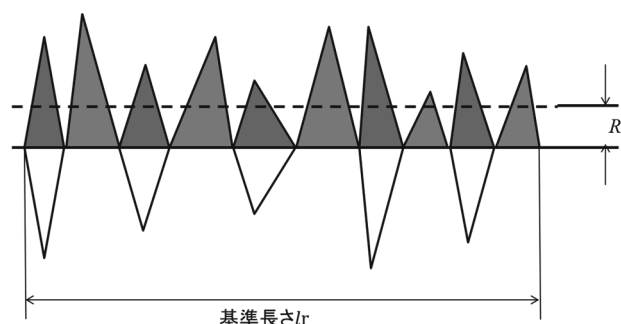


図3 算術平均粗さ（ R_a ）の説明

$$R_a = \frac{1}{l_r} \int_0^{l_r} |Z(x)| dx \quad \dots (1)$$

2-3 電子顕微鏡観察

各試料の表面状態の差異を確認するため、電界放出形走査電子顕微鏡（株式会社日立ハイテクノロジーズ製，S-4800）を用いて観察を行った。

2-4 蛍光X線分析

図4の波長分散型蛍光X線分析装置（理学電機工業株式会社製，ZSX-100e）を用いて蛍光X線分析を行った。各試料について、分析径を $\phi 20 \text{ mm}$ に設定し、分析元素範囲を原子番号9番のFから92番のUまでとして分析を行い、各元素の蛍光X線強度を得た。また、FP法を用いて、蛍光X線強度から各元素の含有量の割合である分析値を算出し、分析値が0.2 wt%以上となった元素を評価対象とした。ただし、SiC研磨紙の主成分であるSiは除いた。それぞれの3回平均値を算出し、 R_a が最も小さい試料の分析結果を基準100%とし、ほかの試料の値と比較した。



図4 蛍光X線分析装置

3 結果および考察

3-1 表面粗さ測定結果

各試料の表面粗さを測定した結果、表面粗さの指標とする R_a および R_z は、やすり、SiC 研磨紙#80、#800、#4000 の順に小さくなり、 R_a がそれぞれ 1.512 μm 、0.181 μm 、0.027 μm 、0.018 μm 、 R_z がそれぞれ 16.755 μm 、2.060 μm 、0.765 μm 、0.497 μm と算出された。

3-2 電子顕微鏡観察結果

各試料の電子顕微鏡観察結果を図 5 に示す。やすり、SiC 研磨紙#80、#800、#4000 の順に表面状態が滑らかになっていくことが確認され、これは表面

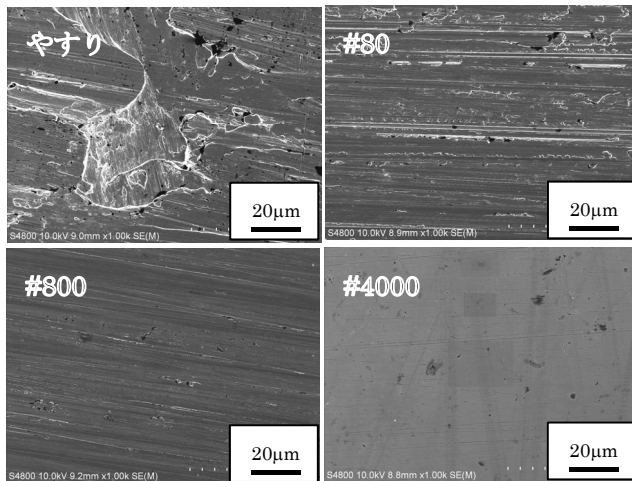


図 5 電子顕微鏡観察画像

粗さ測定結果とも合致している。以上の結果から、目的どおり表面粗さの異なる試料を作製できたことを確認した。

3-3 表面粗さが蛍光X線強度等へ及ぼす影響

各試料の主要な検出元素の分析線とその蛍光X線強度、および SiC 研磨紙#4000 で処理し、表面粗さを最も低減させた試料における各元素の蛍光X線強度を基準 100%とした場合の各試料の相対値を表 1 に、また、各試料の主要な検出元素の成分名その分析値、および SiC 研磨紙#4000 で処理した試料における各元素の分析値を基準 100%とした場合の各試料の相対値を表 2 にそれぞれ示す。

表 1 から、 R_a が増大し、表面粗さが大きくなるほど、どの分析線も強度の変化が大きくなることが分かった。この要因の 1 つとして、表面粗さの増大によって、試料自身に吸収される蛍光X線が増加したことが考えられる。試料表面が粗く (R_a が大きく) になると、図 6 に示すとおり、発生した蛍光X線が試料自身によって遮蔽されやすくなる。ここで、入射X線の強度を I_0 、物質を透過した後のX線の強度を I とすると、 I は(2)式で表される³⁾。

$$I = I_0 e^{-\frac{\mu}{\rho} \rho t} \quad \dots (2)$$

ここで、 μ/ρ は質量吸収係数、 ρ は物質の密度、 t は

表 1 分析線および蛍光X線強度

研磨番手 R_a (μm)	分析線					
	Al-K α	Ti-K α	Cr-K α	Mn-K α	Fe-K α	Ni-K β 1
#4000 0.018	7.161 (100.0)	1.824 (100.0)	392.8 (100.0)	9.355 (100.0)	296.5 (100.0)	245.8 (100.0)
#800 0.027	7.156 (99.93)	1.779 (97.52)	393.4 (100.1)	9.443 (100.9)	296.9 (100.1)	245.9 (100.0)
#80 0.181	7.184 (100.3)	1.783 (97.73)	393.8 (100.2)	9.590 (102.5)	297.1 (100.2)	245.4 (99.82)
やすり 1.512	6.934 (96.84)	1.730 (94.83)	389.3 (99.09)	9.304 (99.45)	293.6 (99.01)	244.1 (99.29)

上段：蛍光X線強度（単位：kcps）

下段（）内： $R_a = 0.018 \mu\text{m}$ の蛍光X線強度に対する相対値

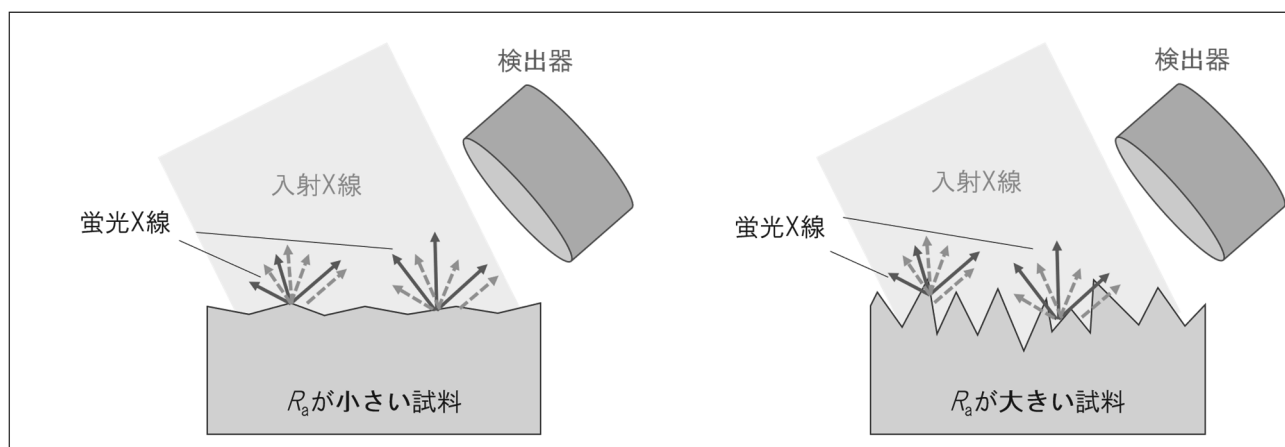


図 6 表面粗さと蛍光 X 線強度の相関に関する推察

透過する物質の厚さを表す。この式から分かるとおり、入射した X 線が透過する距離が長くなるほど X 線は吸収され、強度が低下する。表面粗さが増大すると、図 6 の右図のように、発生した蛍光 X 線が物質を透過する距離が長くなり、(2)式に従って強度が低減すると考えられ、このことが今回の蛍光 X 線強度の変動につながったものと思われる。

また、強度変化の割合は分析線によって異なり、主成分である Ni, Cr, Fe では 0.99%以内の変動にとどまっている一方、表 2 において分析値が 1%未

満である微量成分の Ti や Mn、および原子番号が比較的小さい軽元素である Al の蛍光 X 線強度は変動が大きく、特に Ti は最大で 5.2%変動した。また、蛍光 X 線強度の変動にともなって分析値も変化し、蛍光 X 線強度の変動が最大の Ti は、やすりで処理した $R_a = 1.512 \mu\text{m}$ の時、4.4%の変動を示した。微量元素や軽元素は表面粗さの影響を大きく受けてしまうため、これらの元素を厳密に分析する必要がある場合は、分析面の粗さを低減し、かつ、一定の粗さに制御する必要があることが分かった。

表 2 成分名および分析値

研磨番手 $R_a (\mu\text{m})$	元素					
	Al	Ti	Cr	Mn	Fe	Ni
#4000	1.118	0.2096	23.11	0.3583	13.38	61.27
0.018	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)
#800	1.117	0.2044	23.16	0.3622	13.41	61.34
0.027	(99.92)	(97.55)	(100.2)	(101.1)	(100.2)	(100.1)
#80	1.121	0.2046	23.16	0.3680	13.42	61.19
0.181	(100.3)	(97.65)	(100.2)	(102.7)	(100.3)	(99.87)
やすり	1.092	0.2004	23.09	0.3590	13.35	61.33
1.512	(97.72)	(95.63)	(99.90)	(100.2)	(99.78)	(100.1)

上段：分析値（単位：wt%）

下段（）内： $R_a = 0.018 \mu\text{m}$ の分析値に対する相対値

4 まとめ

試料の表面粗さが分析結果に及ぼす影響について調べた結果、試料の表面粗さが増大するに従い、蛍光 X 線強度が変化し、それに伴って分析値も変動した。また、元素によって変動の大きさに差が見られ、軽元素や微量元素ほど大きく変動することが分かった。

これらの結果から、微量成分の分析を可能な限り高い精度で行う場合には、表面粗さをできるだけ小さくすることが必要と考えられる。また、表面粗さが蛍光 X 線強度に及ぼす影響の大きさは元素ごとに

異なるなど複雑なため、複数の試料の分析結果を比較する場合は、各試料の表面粗さを一定に保つことが重要である。

5 参考文献

- 1) 山本建次, 濱山真吾: 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, 61, 21-24(2016)
- 2) 榊リガク: 蛍光 X 線分析の手引 (第五版) (2015)
- 3) 榊リガク: 蛍光 X 線分析実習テキスト (四訂初版) (1997)

甘藷の長期生貯蔵を実現する空気調和技術の開発

野口 大介*1・小野 貴哉*1・陰山 翼*2・長友 良行*3

Development of Air-Conditioning Technology for Long-Term Non-Frozen Storage of Sweet Potato

Daisuke NOGUCHI, Takaya ONO, Tsubasa KAGEYAMA and Yoshiyuki NAGATOMO

現在、焼酎醸造用甘藷は、一度蒸した後冷凍貯蔵されており、醸造の際には、再び蒸して解凍したものが用いられている。冷凍せずに生のままの状態でも長期間貯蔵すること（以下、長期生貯蔵）が可能となれば、大幅なコスト削減が期待でき、風味の良い焼酎を造ることが出来る。一方、温度 14℃、相対湿度 95%が甘藷の貯蔵に適しているが、既存の貯蔵設備では、この条件のもとで環境を安定させることは困難である。そのため、本研究では、14℃の貯蔵設備内にて、貯蔵空間の空気を、食品添加物として使用され、湿度調整機能を有するプロピレングリコール水溶液（以下、調湿液）中にバブリング（気泡発生）することで高湿度に保ち、甘藷の最適貯蔵条件を実現する装置を開発した。焼酎醸造用甘藷の貯蔵試験結果から、既存の貯蔵設備に対する開発装置の優位性が明らかになった。

1 はじめに

焼酎醸造用甘藷（コガネセンガン）は 9～11 月が収穫時期であり、通年の焼酎製造のためには、貯蔵が必要である。長期生貯蔵が可能となれば、冷凍に必要な電力や、専用倉庫への運搬が不要となり、大幅なコスト削減が期待できる。また、生甘藷の特性を生かした風味の良い焼酎を造ることが可能となり、新たな付加価値創出につながる。このことから、長期生貯蔵技術は酒造メーカーおよび甘藷を取り扱う農業法人などからの大きなニーズとなっている。

農研機構などの報告¹⁾²⁾によると、温度 14℃、相対湿度 95%の高湿度が甘藷の貯蔵に適しているとされている（表 1）。

すなわち、生貯蔵に影響を及ぼす主たる要因は温度と相対湿度であり、貯蔵空間内の温湿度を精度良く制御することが、甘藷の長期生貯蔵を行う上で好ましい。

表 1 甘藷の最適貯蔵条件

温度	14℃
相対湿度	95%
CO ₂ 濃度	3% 以下
その他	空気の流れが少ない (かくはんされていない) 雰囲気

例えば、既存の貯蔵設備では、貯蔵空間内の相対湿度が大きく変動するため、図 1 に示すような乾燥による腐敗（以下、乾腐）が生じ、長期生貯蔵できない。



図 1 乾腐が生じた甘藷例
(14℃貯蔵設備にて貯蔵)

*1 機械電子部

*2 機械電子部（現 宮崎県県土整備部営繕課設備室）

*3 前 機械電子部

従来、相対湿度を制御する技術として、温度管理された貯蔵設備内に、微粒子状の水を噴霧する加湿機能をもたせた機器がある。しかしながら、この機器では相対湿度 95% という高い湿度環境を高精度に制御することが困難であり、貯蔵空間内に発生した結露が貯蔵物等に付着することで、腐敗やカビなどの原因となっていた。

こうした中、当センターでは、本研究開発より以前に調湿液の不凍性、濃度に応じた相対湿度調節作用（図 2）に着目することで、庫内気温 0～10℃ の低温貯蔵空間内を高湿度 85～95% に保持できる低温調湿庫を開発し、平ら³⁾により報告した。この低温調湿庫は、貯蔵空間内の空気を調湿液の液膜に通過させて調湿し、温度調節を短時間、かつ高精度に保持できる。しかしながら、送風機を用いているため空気の流れが生じ、この風の影響で貯蔵空間内に局所的な乾燥が発生するという課題があった。

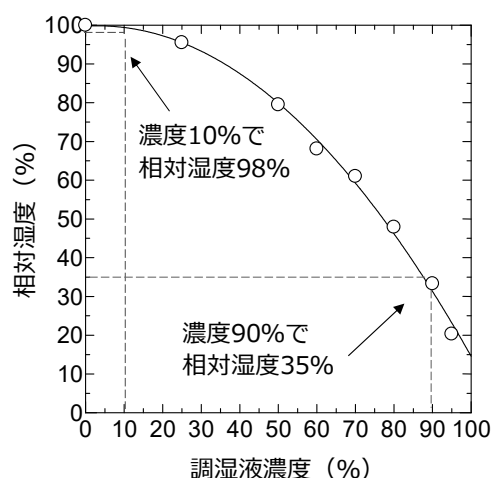


図2 調湿液濃度と相対湿度（温度 10℃ のとき）

そこで、本研究では、調湿液と空気の接触方法を見直し、空気の流れの少ないバブリング調湿装置として新たに改良し、甘藷の長期生貯蔵を目的に開発した装置概要および貯蔵実験について報告する。

2 開発概要

甘藷の長期生貯蔵において重要な要素は、温度 14℃ および相対湿度 95% を高精度に制御す

ることである。本研究では、図 3 に示すようなシステムを考案した⁴⁾。

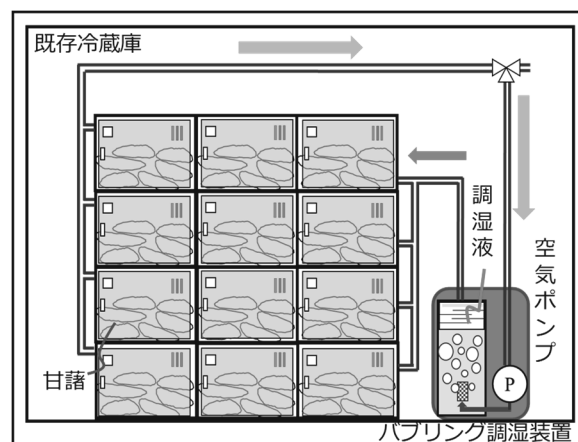


図3 甘藷の長期生貯蔵システム

温度制御については、既存の貯蔵設備（エスベック製，HRF-22）を活用し、湿度制御については、後述するバブリング調湿装置を開発し、貯蔵設備内に設置することで甘藷の最適貯蔵条件を満たす環境の実現を狙った。

バブリング調湿装置は、空気と調湿液を液中で気泡として接触させることで、調湿液の濃度に応じて相対湿度が制御された空気を貯蔵空間へ提供できる。

以下、バブリング調湿装置の特長、従来装置との比較、相対湿度制御能力試験結果について記す。

2-1 バブリング調湿装置の特長

本研究で設計したバブリング調湿装置（図 4）は、下記の特長を有する。

- 1) 貯蔵空間の空気かくはんが小さく、局所乾燥が起こりにくい。
- 2) 調湿機能にのみ注目しユニットの小型化が可能。
- 3) 調湿液の濃度に応じた相対湿度を提供可能。
- 4) 既存の貯蔵設備に湿度制御装置として後付け可能。

貯蔵空間の空気はポンプで圧送され、散気管を通して調湿液中へ放出される。空気が気泡の状態で調湿液と接触することで調湿され、大きな送風

機構を要すことなく、貯蔵空間へ相対湿度を制御した空気を送ることができる。

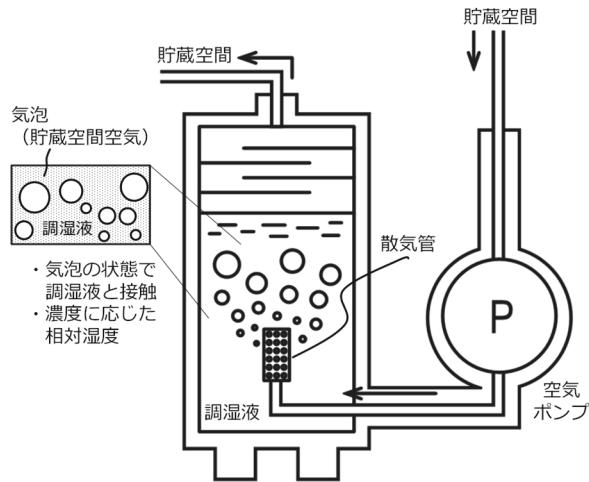


図4 バブリング調湿装置

2-2 既存のシステムとの比較

開発した甘藷の長期生貯蔵システムと既存システムとの比較について表2に示す。開発システムは、甘藷の長期生貯蔵における課題であった、高精度な湿度制御、結露発生の抑止、送風による乾燥の回避が可能となった。加えて、開発システムで用いるバブリング調湿装置は既存の貯蔵設備内に後付けが可能である。

表2 開発した甘藷の長期生貯蔵システムと既存システムとの比較

区分	湿度制御	結露発生	送風乾燥
		抑止	回避
既存貯蔵設備	×	×	×
加湿機能付き貯蔵設備	△	×	×
低温調湿庫（平ら ³⁾ 開発）	○	○	×
開発システム（バブリング調湿装置）	○	○	○

2-3 開発したバブリング調湿装置

開発したバブリング調湿装置の写真を図5に示す。

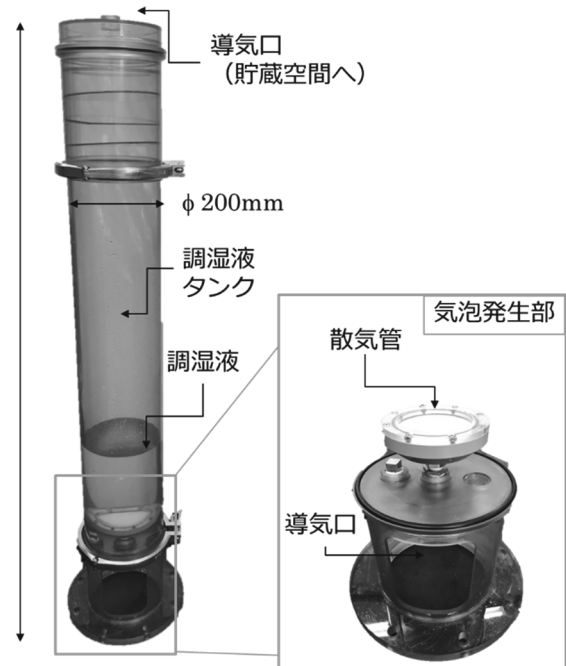


図5 左：バブリング調湿装置 右：気泡発生部

装置構成の詳細を表3に示す。空気ポンプ（アネスト岩田株式会社製、FIT13032）で圧送された空気は散気管（萩ガラス工房製、φ100-22μm）を通じて調湿液中に放出され気泡となる。このとき、装置が取り込んだ空気は調湿液の濃度に応じた相対湿度となり、貯蔵空間へ供給される。ポンプ流量はインバータ制御により、調整できるようにした。

表3 バブリング調湿装置の構成

構成要素	能力
空気ポンプ	流量 10～30L/min
	最大圧力 0.7Mpa
散気管	材質 アルミナ
	孔径 φ100-22μm
電源	AC 単相100V
	インバータ周波数制御
調湿液タンク	塩化ビニル製
調湿液	プロピレングリコール
	水溶液

2-4 バブリング調湿装置の湿度制御試験

図6に、バブリング調湿装置に用いる調湿液の濃度を10%、25%、40%、及び0%（H₂O）に

変化させた場合と既存の貯蔵設備における貯蔵空間（100L）の相対湿度の時間変化を示す。貯蔵空間の温度は、14℃で制御し貯蔵物は何も入れずに試験を行った。

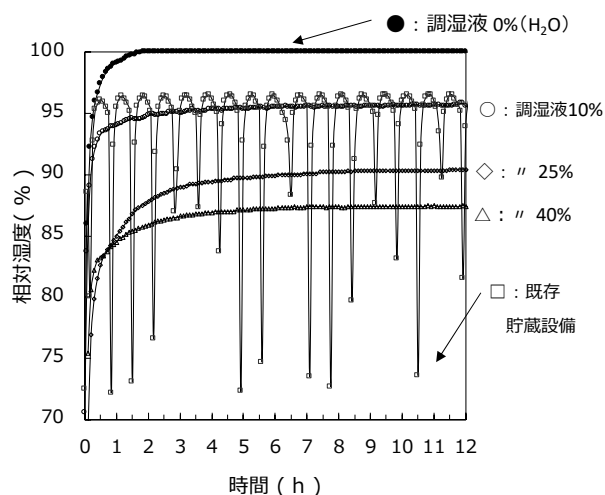


図6 開発システムにて調湿液の濃度を变化させたときの相対湿度制御能力試験（温度 14℃）

既存の貯蔵設備は相対湿度が 70～96%の間で大きく変動していることが確認できる。一方、バブリング調湿装置を用いた試験結果は、調湿液の濃度に応じて、一定の湿度環境を安定して供給できていることが確認できる。例えば、調湿液濃度が 10%の試験結果では、貯蔵空間の相対湿度 95%にて一定に保たれていることが確認できる。

3 実験方法

バブリング調湿装置を用いた開発システムを用いることで、貯蔵空間内の温湿度を精度良く制御することが確認でき、特に調湿液 10%において、システムが提供する環境が、甘藷の最適貯蔵条件を満たすことから、この環境のもと焼酎醸造用甘藷の貯蔵試験を行った。

貯蔵試験は、図 7 に示すように、バブリング調湿装置を用いた開発システムと、既存の貯蔵設備とで対照試験を行った。

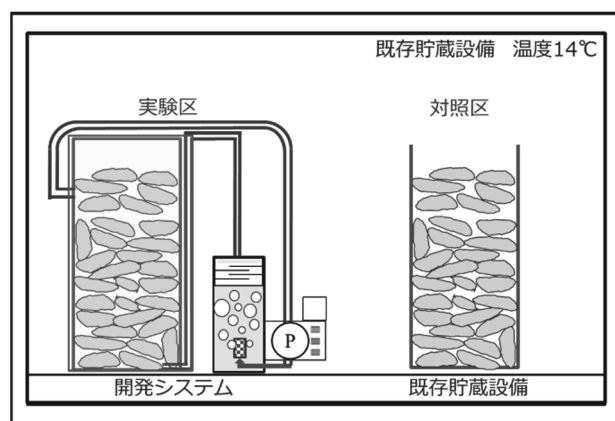


図 7 上：甘藷貯蔵試験概要図
左：貯蔵時の甘藷の様子

試験に用いた甘藷は、焼酎醸造用甘藷であるコガネセンガンを用い、それぞれの試験区にて貯蔵開始時に 50kg ずつを、貯蔵空間内へ入れた。一定期間ごとに貯蔵甘藷について、①歩留まり（良品率）、②デンプン価率、③X 線 CT による内部観察（4 か月後のみ）の 3 つの項目で試験を行った（表 4）。

表 4 貯蔵試験方法

項目	詳細
品種	コガネセンガン
貯蔵量	それぞれの試験区 50kg ずつ
試験項目	①歩留まり（良品率） ②デンプン価率 ③X線CTによる内部観察

①については、以下に示す式にて、貯蔵甘藷の歩留まりを定義した。

$$\text{歩留まり} = \frac{\text{試験月重量} - \text{腐敗重量}}{\text{貯蔵開始時重量(50kg)}}$$

②については、食品開発センター応用微生物部で、塩酸加水分解法にて甘藷のデンプン価率を求めた。

4 結果および考察

① 歩留まり試験について

図8に歩留まりの試験結果を示す。

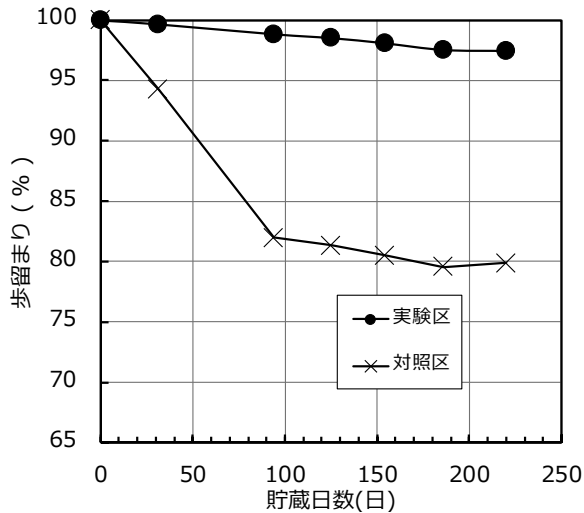


図8 歩留まり試験結果

対照区では200日経過すると、歩留まりが80%を下回るが、実験区では95%以上の歩留まりを保つことができた。開発システムによって甘藷の最適貯蔵条件を満たす環境を提供できていることが、乾腐による重量減少および、蒸散などによる水分の流出を防ぎ、歩留まりを向上させたのではないかと推察される。

② デンプン価率試験について

図9にデンプン価率の試験結果を示す。

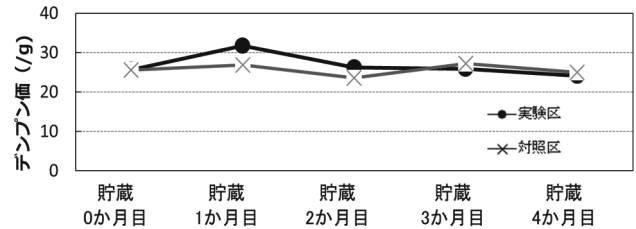


図9 デンプン価率試験結果

デンプン価率は単位重量当たりのデンプン量を示す値で、大きいほど多くのアルコールを生み出す。コガネセンガンなどの焼酎醸造用甘藷は、このデンプン価率が高い。開発システムを用いて貯蔵した結果、デンプン価率は大きく変化せず、成分が保持されていることが確認できた。

③ X線CTによる内部観察試験について

図10に4か月貯蔵試験後の甘藷について、X線CTによる内部観察写真を示す。

対照区の貯蔵甘藷には、密度が小さくなっている部分を確認された。これは、乾腐が生じているため起きる現象である。

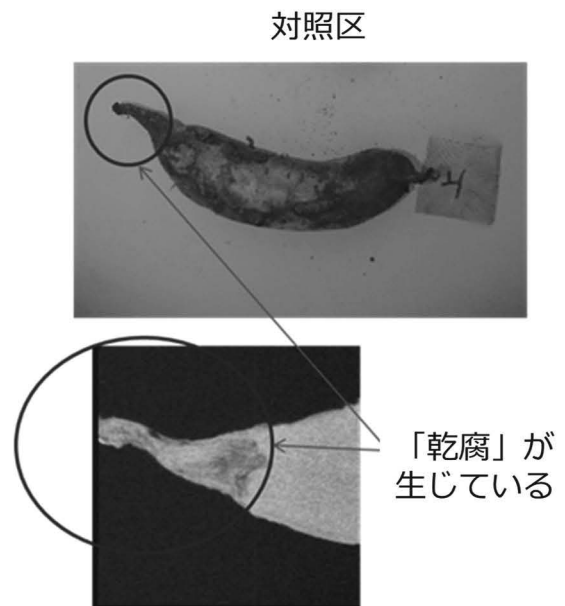
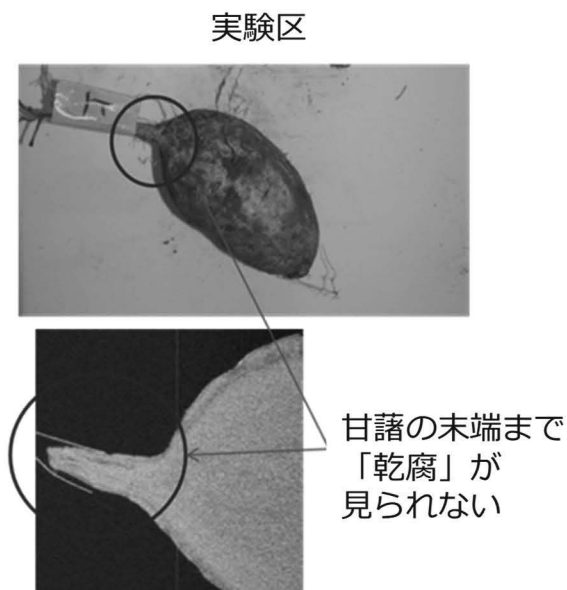


図10 X線CTによる貯蔵甘藷の内部観察

一方、実験区の貯蔵甘藷については、一様に同じ濃度で撮影され、密度が小さくなっている部分は確認されなかった。このことから、開発システムが貯蔵空間の安定した高湿度環境を実現し、貯蔵甘藷の乾燥を抑制していることが、乾腐防止につながったのではないかと推察される。

5 まとめ

本研究では、バブリング調湿装置を用いた甘藷の長期生貯蔵システムを開発し、焼酎醸造用甘藷について、①歩留まり（良品率）、②デンプン価率、③X線CTによる内部観察の3つの項目にて貯蔵試験を行った。その結果、既存貯蔵設備に比べて、開発システムは甘藷の貯蔵状態が良好であることが明らかになった。

本報で紹介した、バブリング調湿装置を用いた開発システムは、既存の貯蔵設備に後付け可能なため拡張性が高く、高い精度で相対湿度をコ

ントロールできる調湿装置として県内の広い分野で応用展開が期待できる。

今後は、実用化に向け関係機関と連携し、継続して研究に取り組む予定である。

6 参考文献

- 1) 野菜の最適貯蔵条件一覧表, 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構） 食品研究部門 食品加工流通研究領域 食品流通システムユニット 著
- 2) さつまいもの貯蔵について, 鹿児島県 農産物加工研究指導センター 著
- 3) 平栄蔵, 野口大介, 陰山翼: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 62, 21-27 (2017)
- 4) 野口大介, 長友良行, 陰山翼, 山本英樹, 藤田依里: 公開特許公報 2018-36457

食肉加工施設を対象とした結露防止システムの開発

小野 貴哉*¹・野口 大介*¹・陰山 翼*²・平 栄蔵*³

Development of Anti-Condensation System for Meat Processing Plant

Takaya ONO, Daisuke NOGUCHI, Tsubasa KAGEYAMA and Eizo HIRA

食肉加工施設内では、食肉加工等の際に多量の水蒸気が発生し、天井面に結露水滴として付着することが知られており、この結露水滴の落下が食品衛生上の課題となっている。また、食肉加工施設内は低温管理されているため、一般的な除湿機では除湿することが困難である。本研究では、食品添加物として使用され、湿度調整機能を有するプロピレングリコール水溶液（以下、調湿液）を用いた結露防止システムを開発し、天井面に発生する結露水滴を消失させる実験を行った。結果、結露水滴の消失が確認され、開発した結露防止システムが低温環境における結露水滴消失に効果があることが明らかになった。

1 はじめに

本県は、肉用牛や豚、鶏などの畜産業が盛んな県であり、多くの食肉加工施設がある。食肉加工施設内は、食肉加工時や清掃時に熱湯を使用するため、多量の水蒸気が発生し、天井面に結露水滴が付着する。ここで発生する結露水滴が落下し、保管された貯蔵物や枝肉等に付着する可能性があり、さらに、カビや錆の原因となるため、解決すべき課題となっている。また、食肉加工施設内は、0～10℃程度で低温管理されており、一般的に使用されている除湿機では、空気中の水蒸気を冷却し、水へ凝縮させるという機能が十分に発揮できないため、除湿することが困難である。

当センターでは、長年、調湿液の不凍性・調湿性等に着目した研究¹⁾に取り組んできた。調湿液は、空気中の湿度が高い場合、水蒸気を吸収し、逆に湿度が低い場合、調湿液中の水分を水蒸気として発生させる湿度調整機能を有している。また、調湿液の濃度により、任意の相対湿度を保つことができ、空気中の温度が変化しても、相対湿度が大きく変化しないという機能を有している（図1、図2）。

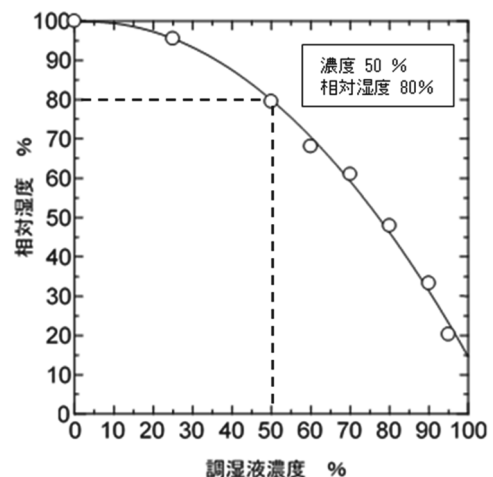


図1 調湿液濃度と相対湿度
(温度 10℃のとき)

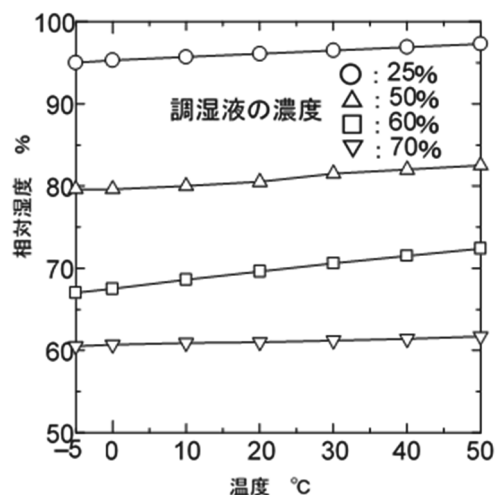


図2 調湿液濃度による温度と相対湿度

* 1 機械電子部
* 2 機械電子部（現 宮崎県県土整備部営繕課設備室）
* 3 前 機械電子部

そこで、本研究では、結露防止システムにより、低湿度の空気を製造し、天井付近に送風することで、天井面に発生する結露水滴を消失させることを目的として実験を行った。以下、実験方法ならびに実験結果について、報告する。

2 実験方法

2-1 実験前の現地調査

食肉加工施設食品貯蔵庫内（以下、実験区）で実験を行った。実験前の実験区天井面の結露状況および実験区の室温と相対湿度を図3、4に示す。天井面には、結露水滴が付着しており、室温は、深夜から早朝にかけて10℃程度であり、操業中は $4 \pm 1^\circ\text{C}$ で変動していた。また、相対湿度は、90%程度であった。結露水滴を消失させるために、相対湿度80%程度になるよう調整された調湿液（濃度50%程度）を使用して実験を行った（図1）。



図3 実験区の結露状況

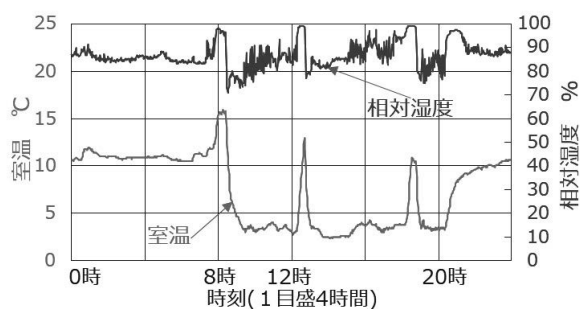


図4 実験区の室温と相対湿度

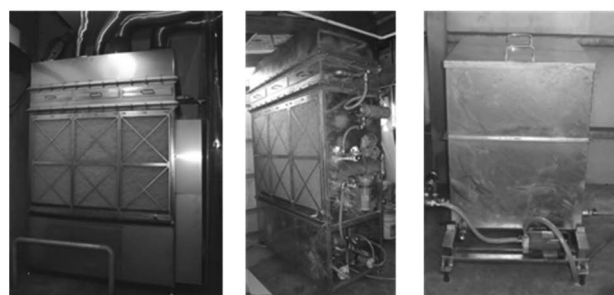
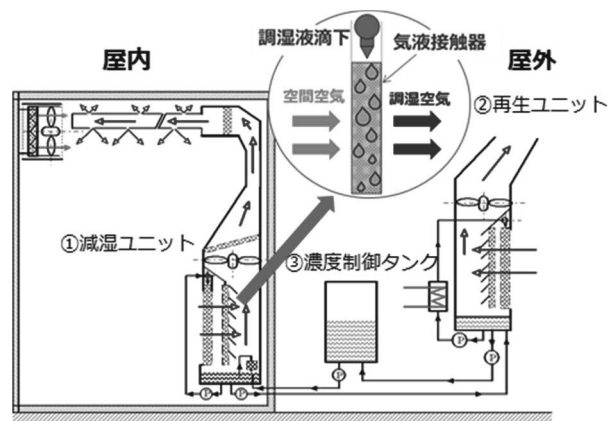
2-2 結露防止システムの概要

結露防止システムの概要図を図5に示す。

結露防止システムは、室内に設置した減湿ユニット、屋外に設置した再生ユニットおよび濃度制御タンクで構成されている²⁾。

減湿ユニットは、気液接触器に空気を通過させることで調湿された空気を発生させる。具体的には、繊維を絡み合わせた立体的な構造の気液接触器に、濃度50%程度の調湿液を滴下することで、気液接触器の表面上に調湿液の液膜ができ、接触面積を拡大しながら自然流下する。そこに空気が通過することで、自然流下する調湿液の液膜と接触して、空気から水蒸気を吸収し、相対湿度80%程度に調整された空気を天井付近に送風する。

屋内に設置した減湿ユニットにおいて、空気から水蒸気を吸収して濃度が低下した調湿液は、屋外に設置した再生ユニットへ輸送される。再生ユニットは、減湿ユニット同様に気液接触器が備わっており、濃度が低下した調湿液の液膜を屋外空気と接触させ、調湿液中の水分を水蒸気として外部に放出することで濃度を再生することができる。



①減湿ユニット ②再生ユニット ③濃度制御タンク

図5 結露防止システムの概要

2-3 結露水滴消失および再付着防止実験

結露防止システムを使用し、実験区の二つの天井面を対象に結露水滴消失および再付着防止実験を行った。まずは、結露水滴が付着した天井面の結露水滴消失経過を確認した。次に、実験前に結露水滴を拭き取った天井面の経過状況を確認した。実験は、

開始時, 24 時間後, 48 時間後, 72 時間後に観察および記録を行った。

2-4 相対湿度の測定

実験区の天井面から 0.2, 0.5, 1.5, 2.0m 下方に温湿度計 (エスベック社, RS-14H) を設置し, 相対湿度を測定した。

3 結果および考察

3-1 結露水滴の消失および再付着

結露水滴が付着した天井面の結露水滴消失経過を図 6 に示す。結露水滴が付着した天井面は, 時間が経過するにつれ, 徐々に結露水滴が消失し, 48 時間後にはほとんどの結露水滴が消失した。これは, 結露防止システムの減湿ユニットから送風された相対湿度 80% 程度の空気が天井付近に漂い, 天井付近に低湿度の空気シールド層を形成し, 天井付近の高湿度空気を打ち消したためと推測される。

実験前に結露水滴を拭き取った天井面の経過状況を図 7 に示す。結露水滴を拭き取った天井面は, 水滴の再付着は確認されなかった。これは, 天井付近に形成された低湿度の空気シールド層が, 床から天井方向に上昇してくる高湿度空気を防いだためと推測される。

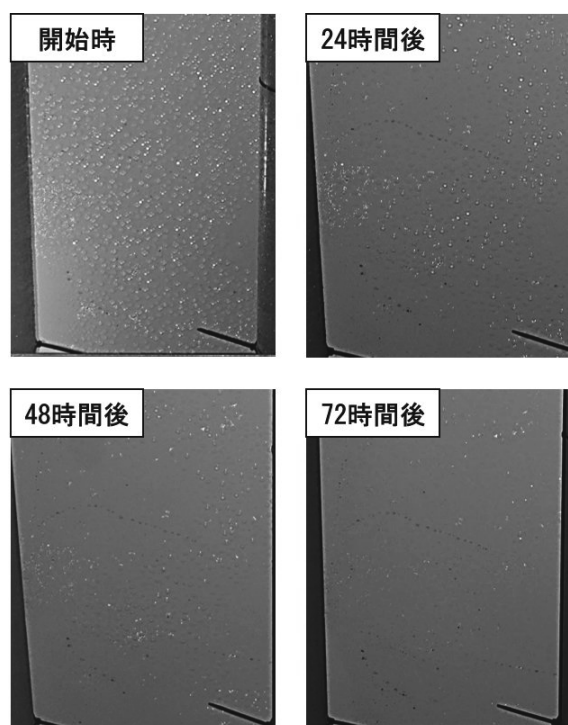


図 6 天井面の結露水滴消失経過

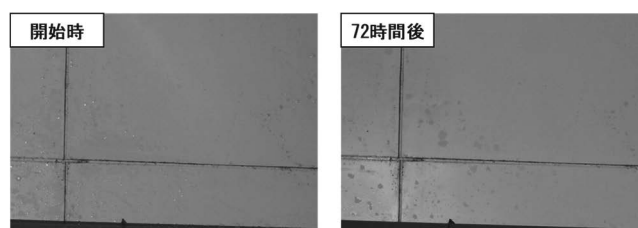


図 7 天井面の経過状況

3-2 実験区内の相対湿度

実験区内の相対湿度を図 8 に示す。天井空気冷却装置を停止させると, 実験区内の相対湿度は急増し, 空気冷却装置停止後 8 分で天井面下方 0.2m の相対湿度は, 95% 程度に達した。

そこで, 結露防止システムを稼働すると, 相対湿度は, 75% 程度まで下がった。また, そのほかの温湿度計設置箇所も, 稼働開始から 20 分後には相対湿度 80% 程度となった。これは, 結露防止システムの減湿ユニットの気液接触作用により, 調湿液の湿度調整機能が働き, 相対湿度を 80% 程度に保持した結果と考えられる。

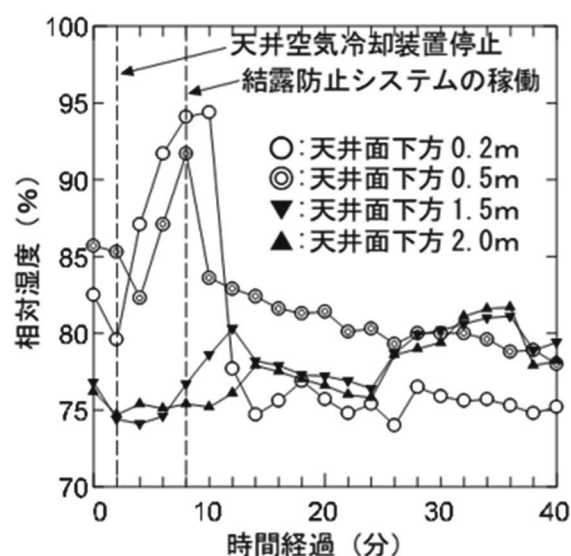


図 8 実験区内の相対湿度

4 まとめ

本報では, 食肉加工施設内天井面に発生する結露水滴を消失させることを目的として, 調湿液を用いた結露防止システムの開発および結露水滴消失実験を行った。結果として, 結露防止システムを使用することで天井面の結露水滴は消失し, 天井付近の相対湿度を 95% から 75% 程度まで下げることができたため, 結露防止システムが食肉加

工施設等の低温環境の天井面に発生する結露水滴消失に効果があることが明らかになった。

今後は、様々な場所に対応できるよう、結露防止システムのコンパクト化を図るなど、実用化を視野に入れ、製造業や食肉加工企業等と連携し、継続して実験に取り組む予定である。

5 謝辞

本研究の一部は、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）の研究成果展開事業マッチングプランナープログラムの支援を得て行われた。記して謝意を表す。

6 参考文献

- 1) 平栄蔵, 位田晴久: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **57**, 13-17 (2012)
- 2) 平栄蔵, 野口大介, 陰山翼: 公開特許公報 2019-48250

EMC 評価環境の高効率化への取り組み ～放射 EMS 試験省力化のための電界均一性特性測定～

早水 昭二*¹

Efforts to Improve the Efficiency of the EMC Evaluation Environment
～Electrolytic Uniformity Characteristics Measurement for Radiation EMS Test Labor Saving～

Shoji HAYAMIZU

放射無線周波電磁界イミュニティ試験（IEC61000-4-3，以下，放射 EMS 試験）は，電気・電子機器への無線周波電磁界の電磁妨害に対する耐性評価を目的とした試験である。

当センターの電波暗室では，この試験を実施する際，壁面の電波吸収体を①1GHz 以下の試験時：設置しない（図 1），②1GHz 超の試験時：設置する（図 2）こととして運用してきた。この ①と②の切り替えにおいては，非常に重量のある電波吸収体の別室から電波暗室内への搬入・搬出を行う必要があり，利用者および職員に大きな負担となっていた。そこで，切り替え作業時の負担を軽減し，利用者の試験時の効率化を図るため，省力化した電波吸収体の配置方法について検討を行ったので紹介する。

1 はじめに

平成 30 年 4 月から新しい電波暗室等（電磁環境試験棟）が供用開始となり，旧電波暗室も含めた効率的な運用を目的として，放射・伝導エミッション（EMI）試験は新電波暗室で，放射・伝導イミュニティ（EMS）試験は旧電波暗室で行う運用としている。このような運用とすることで，旧電波暗室での試験において，放射 EMS 試験時に追加で設置し，試験終了後に撤去する必要があった追加設置用の床置き電波吸収体を設置したままとすることが出来るようになった（図 1）。



図 1 1GHz 以下の配置



図 2 1GHz 超の配置

この追加設置する床置き電波吸収体は 25 個あり，1 個あたりの重量も重く，かなりの重労働となっていたため，設置および撤去の作業が無くなったことは，大きな省力化となった。また同時に，設置および撤去に要する時間も削減できた。

加えて，旧電波暗室では 1GHz 超の試験を行う際には，電波暗室の側面および背面に，さらに追加の壁面用電波吸収体を設置して試験を行う必要があった（図 2）。約 20 年前に建てられた旧電波暗室は，1GHz 以下の周波数帯の試験用として作られており，1GHz 超の試験も実施可能とするために，追加設置用の壁面用電波吸収体を導入している。

1GHz 超の試験時は，電波暗室の左右両方の側面に各 2 台ずつ，背面に 3 台，合計 7 台の壁面用電波吸収体を，保管してある別室から運び込んで設置し，試験終了後には撤去し移動させて，再び別室に保管する必要があった。この作業を出来るだけ軽減するために，今回電波吸収体の配置変更を計画し，検討する新しい配置において電界均一面が設定可能か否かを確認するために「電界均一性特性測定」を実施した。

*1 機械電子部

2 電界均一性特性測定

2-1 放射EMS試験との関係

放射EMS試験では電界が均一となるように調整された仮想的な垂直面（電界均一面）付近に供試体を置き、アンテナから電磁界（妨害信号）を発生させて機器が誤動作するか否かを確認する（図3）。

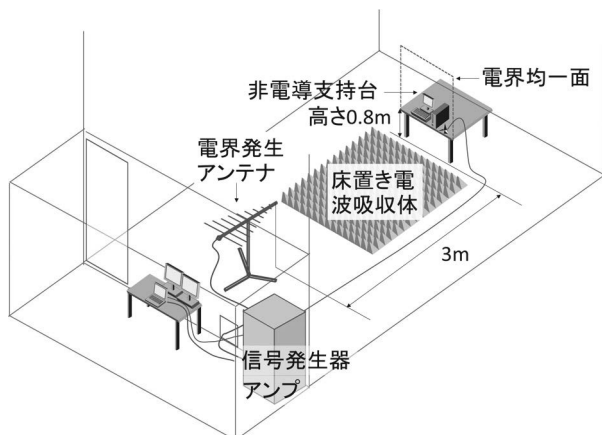


図3 放射EMS試験

電界均一面は、床面から0.8mの高さを下端として縦1.5m×横1.5mの大きさと規定されており、電波吸収体の配置方法を変更しようとする場合、そのたびに電界均一性特性測定を行い、電界均一面が設定可能であることを確認する必要がある（図4）。

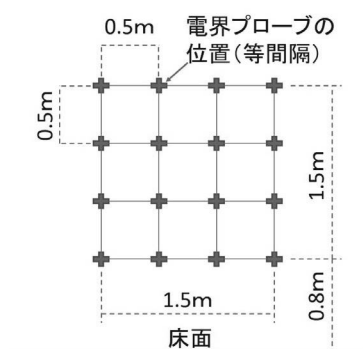


図4 電界均一面

2-2 電界均一性特性測定の手順

2-2-1 一点キャリブレーション

まず、電界均一面を0.5m間隔の格子（16点）に分割し、16点中の1点について、規定の電界強度18V/mを得るためのアンテナ出力を80～1000MHzの各周波数で求める（一点キャリブレーション）。電界強度は電界プローブを用いて確認する（図5）。

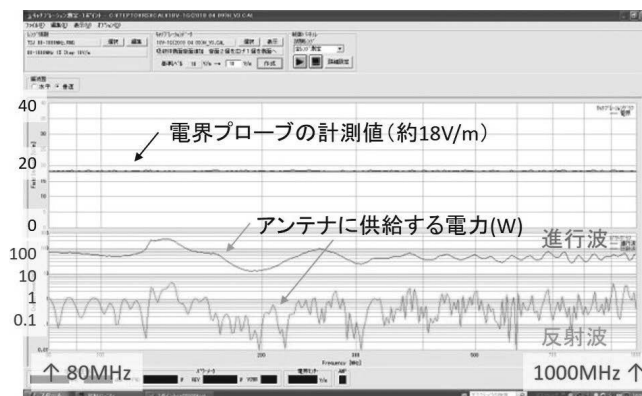


図5 一点キャリブレーショングラフ

2-2-2 均一性チェック

次に一点キャリブレーションで求めたアンテナ出力を用いて電界発生アンテナから電界を発生させ、他の15点における80～1000MHzの各周波数の電界強度を電界プローブを用いて測定する（均一性データの取得：図6）。

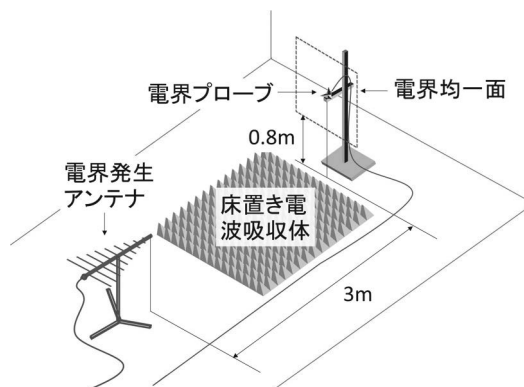
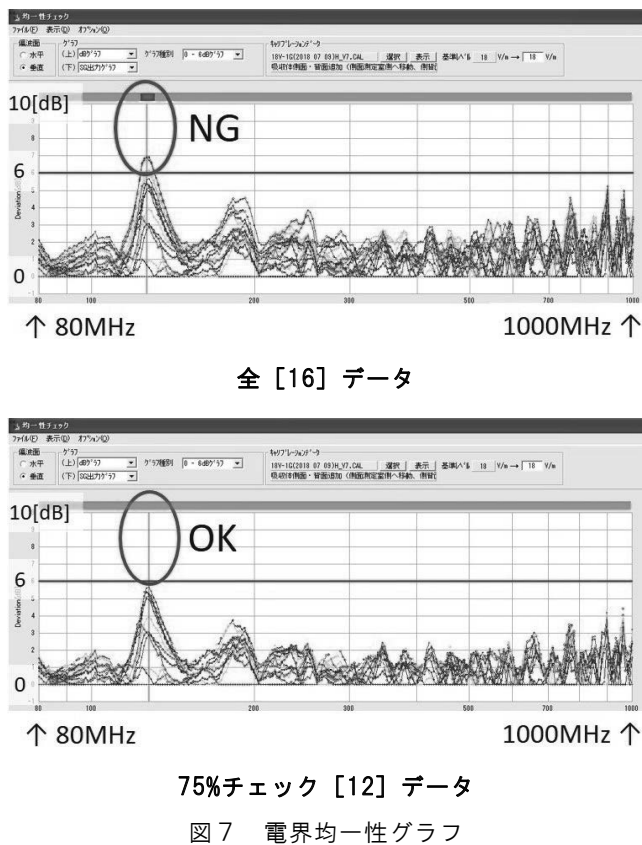


図6 電界均一性特性測定

測定したデータが、各周波数について、全ての測定点（16点）の75%（12点）以上の点において、電界強度が公称値の0dB～+6dBの範囲内にある場合、電界は均一であるとみなされる（IEC61000-4-3）。このとき、各周波数で75%に含まれる測定点が異なっても良い。

この電界が均一であることを確認する作業のことを均一性チェックと言い、電界が均一であるとみなされた均一性データを用いて、放射EMS試験用のアンテナ出力データが作成される。

図7は、全ての測定点（16点）では0dB～+6dBの範囲内に収まらなかったが、75%（12点）以上の点においては収まった例である。



3 最適な電波吸収体配置の検討

できる限り省力化した電波吸収体の配置方法を再検討するために、電波吸収体の配置を変えながら電界均一性特性測定を実施した。測定の際には、一点キャリブレーションの途中で出力不足のエラーが発生し、均一性チェックに入らなかった事例もあり、試行錯誤しながらの測定となった。測定に使用した機器類は表1のとおり。

追加設置用の壁面用電波吸収体は背が高く、電波暗室への搬入・搬出が可能なように上部が折り曲がるように作られている。この上部を伸ばした状態と折り曲げた状態の違いも含めて、合計10とおりの配置について均一性チェックを行った。

表1 測定に使用した機器類の型番

信号発生器	Agilent 製 N5183A
アンプ	PRANA 製 AP32MT225
電界プローブ	ETS 製 HI-6005
送信アンテナ	Schwarzbeck 製 VULP9118E

検討した追加設置用の壁面用電波吸収体の配置を検討順に記す(図8)。

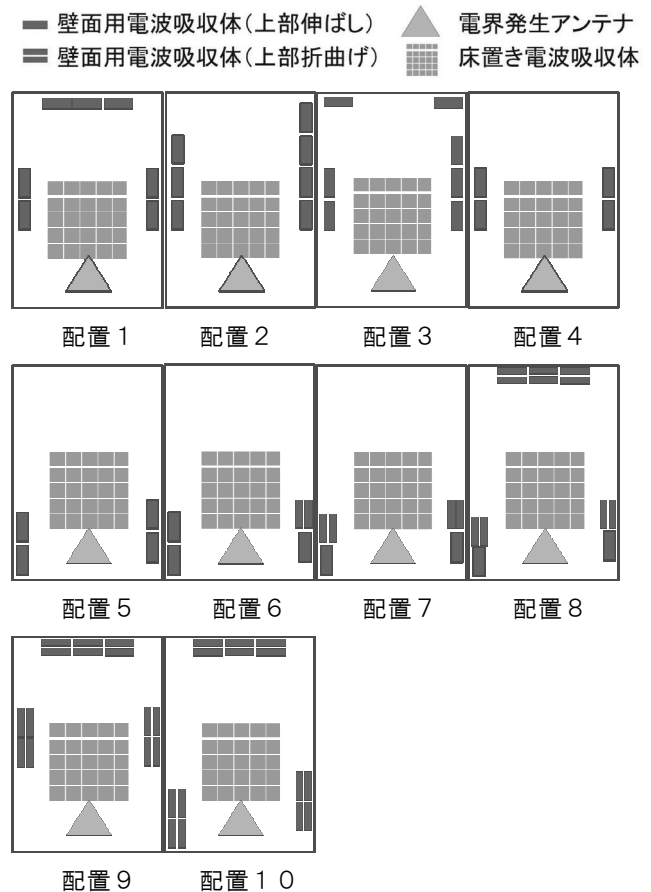
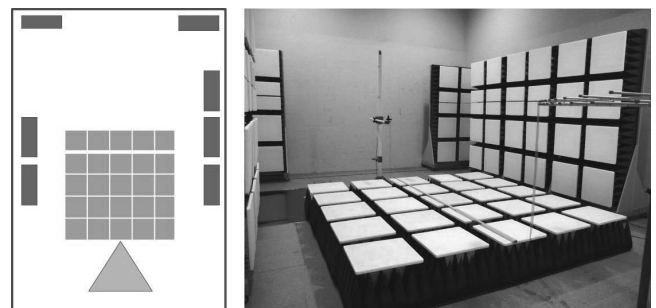


図8 検討した電波吸収体の配置(検討順)

3-1 電界均一性特性 測定事例紹介

電界均一性特性測定を実施した際の、代表的な事例について3件紹介する。

(1) 一点キャリブレーションが取れなかった事例
※ 出力の設定限度値をオーバーしたというエラーが発生し、次に進むことが出来ず、この設置状況での可否を判断する測定を実施することが出来なかった。



電波吸収体の配置(図8の配置3)



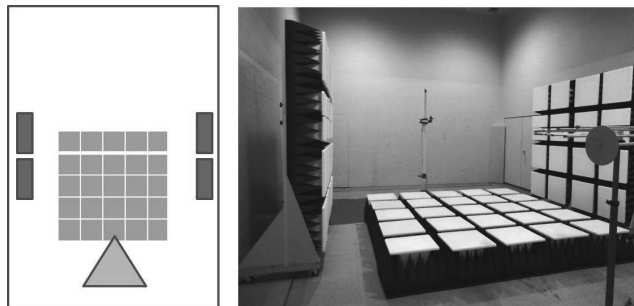
一点キャリブレーショングラフ



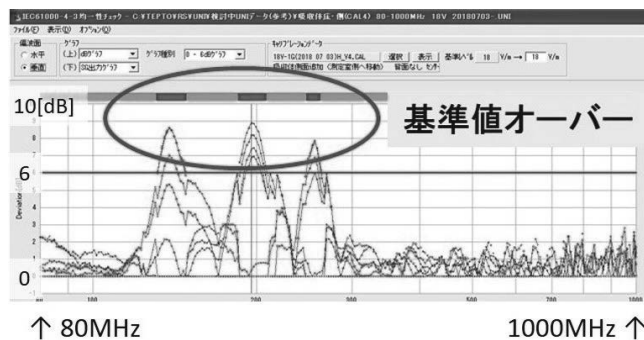
エラー画面表示

図9 事例(1)

(2) 一点キャリブレーションは取れたが均一性
チェックで不合格となった事例



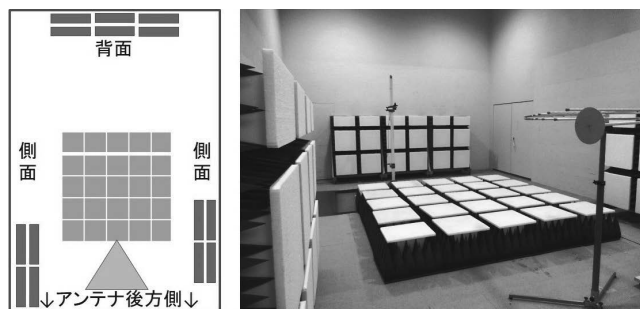
電波吸収体の配置(図8の配置4)



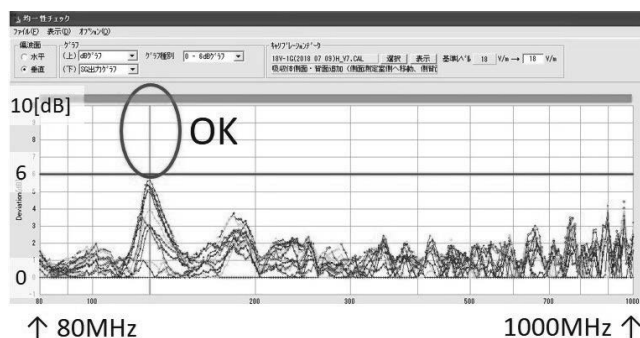
電界均一性グラフ(不合格)

図10 事例(2)

(3) 均一性チェックが合格となった事例(最適な
配置)



電波吸収体の配置(図8の配置10)



電界均一性グラフ(合格)

図11 事例(3)

追加設置用の壁面用電波吸収体の位置は1GHz超の試験時と極力変わらない方が良いものとして検討を進めた。最終的にこの配置が最適と判断した理由は次のとおり。

測定を繰り返す中で、側面に設置された壁面用電波吸収体の配置の影響は大きく、均一性チェックが不可となる要因となっていることがわかったため、電界プローブ(電界均一面)から遠く影響が小さいと思われる、アンテナ後方側に極力移動させた位置とした。

一方背面に追加設置された壁面用電波吸収体の影響は比較的小さいことがわかったため、背面の電波吸収体の設置位置は1GHz超の試験時と同じとした。

追加設置用の壁面用電波吸収体は、上部を伸ばした状態では不安定であり、地震等の際に転倒する危険性を考慮して、全7台の壁面用電波吸収体について、上部を折り曲げた状態で試験可能な方が良いと判断した。

3-2 電波吸収体の配置の検討結果

電波暗室内で壁面用電波吸収体の配置を変えて、この電界均一性特性測定を繰り返し行った。この結果、電界均一面を確保した上で、切り替え時の作業負担の少ない最適な配置方法を見出した（図11）。これにより、1GHz以下の試験時でも電波吸収体を暗室内に仮置きした状態で試験ができるようになり、

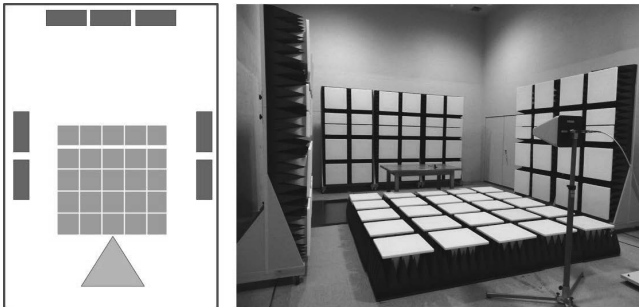


図12 1GHz超 試験時の電波吸収体の配置（参考）

暗室内への吸収体の出し入れ作業が不要となった。

参考に1GHz超の試験時の電波吸収体の配置について図12に記す。

4 まとめ

今回の電界均一性特性測定の結果、1GHz以下と1GHz超の試験の切り替えを行う際に、壁面用電波吸収体を搬入・搬出する手間と時間を削減できるようになった。また、大型搬入扉の頻繁な開閉は電波暗室のシールド性能の劣化につながるが、この開閉回数を削減できるようになり、シールド性能を維持する効果も得られた。

以上により、放射EMS試験における作業効率性、電波暗室シールド性能の保全効果を向上させることができた。

ライチ加工品の保存性に及ぼす処理条件の影響

松井 愛^{*1}・野上 麻美子^{*2}・三輪 華織^{*1}

Effects of processing conditions on storage stability of Litchi products

Ai MATSUI, Mamiko NOGAMI and Kaori MIWA

当県で生産されるライチについて、今後の生産量の拡大に伴い、加工品の需要が高まる可能性があることから、ライチの加工品としてシロップ漬の試験を行った。その結果、種がある場合は約 20 日、種がない場合は約 11 日で果実とシロップが平衡となることが分かった。またライチは果肉の褐変が著しいことから酸化防止剤である L-アスコルビン酸を添加したところ、試験開始から 5 ヶ月経過後の時点において、L-アスコルビン酸を加えない区と比較し、褐変が抑えられた。その濃度は 0.5% が適しており、官能評価についてもブランチングを行った区の次に評価が高かった。

1 はじめに

当県では、マンゴーに次ぐブランド品目としてライチの生産振興が図られており、生産面積 3.6 ha、生産量 6.9 t（平成 29 年度）から 20 ha、100 t にまで生産が拡大されていく予定である。今後の生産量の拡大に伴って、規格外ライチも増加し、加工品開発に対する要望も高まることが予想される。そこで本研究ではライチを用いた加工品としてシロップ漬の試験を行い、調製条件の違いによるシロップ漬の保存性への影響を調査した。

2 実験方法

2-1 原料及び原料の処理方法

ライチは県内の生産農家から果実を購入し、平成 29 年度はクエイメイピンク、平成 30 年度はチャカパットを使用した。果実は洗浄後、試験使用時まで -18℃ で冷凍保存した。

冷凍保存していたライチを袋に入れた状態で流水解凍し、種を残す場合（有核）はそのまま剥皮して試験に用いた。除核は、手作業又は種取り器（工房緑林舎製、梅エ門）を用いて行った。手作業の場合は、剥皮後に除核し、種取り器を使用した場合は、除核後に剥皮して試験に用いた。

2-2 ライチシロップ漬調製方法

今回使用したライチの糖度、pH を測定したところ表 1 のとおりであった。シロップ漬の最終糖度が 20%、pH が 4.0 未満となるよう水、グラニュー糖、クエン酸（食品添加物、富士フィルム和光純薬株式会社）を用いてシロップ液を調製し、シロップ液とライチの重量比が 1 : 1、総重量が 150~200g となるように真空包装袋へ入れた。その後シロップ漬の中心温度が 65℃ 10 分以上になることを目標に湯温 68℃ 25 分で加熱殺菌を行った。

表 1 ライチの糖度（%）と pH

品種	糖度（%）	pH
クエイメイピンク	10~13	3.6~4.9
チャカパット	10~13	4.7~4.9

2-3 平衡日数に及ぼす除核の影響

果実をシロップ漬にした場合、果実がシロップ液に「なじむ」のに一定の時間が必要となることが一般的に知られている。そこで果実とシロップ液の糖度及び pH が平衡となった時点を「なじむ」と判断することとして、それぞれの糖度及び pH の経時変化を測定した。糖度はポケット糖度計（（株）アタゴ、PAL-J）、pH は pH メーター（堀場製作所、D-51 型）で測定した。

*1 食品開発部

*2 食品開発部（現 宮崎県総合農業試験場）

ライチは有核のものと除核のものを用意し、それぞれシロップ漬にした。クエイメイピンクは有核試験に使用し、チャカパットは除核（種取り器）試験に使用した。調製したシロップ漬は 4℃の冷蔵庫で保存し、数日おきにライチとシロップ液の糖度及び pH を測定して、平衡日数に及ぼす除核の影響を確認した。

殺菌の効果を確認するため、公定法¹⁾に基づき試験開始 1 ヶ月後、3 ヶ月後に一般生菌数及び大腸菌群を測定した。

2-4 褐変防止方法の検討

2-4-1 L-アスコルビン酸とクエン酸の効果

ライチのシロップ漬が褐変することが報告されている²⁾ことから、酸化防止剤である L-アスコルビン酸（食品添加物、林純薬工業株式会社）を用いて褐変防止効果を確認した。シロップ液の調製割合については、表 2 のとおりとした。pH の変化や種の影響を考慮し、有核で L-アスコルビン酸無添加の区を対照として、クエン酸の有無と除核の区を設定した。除核は手作業により実施した。褐変防止効果の確認はビジュアルアナライザー（アルファモスジャパン（株）、ビジュアルアナライザー IRIS）を用いて試験開始直後～5 ヶ月目までの経時変化を 1 ヶ月おきに確認した。

表 2 シロップ液調製割合

試験区	種の 有無	シロップ液		
		グラニュー糖 (%)	クエン酸 (%)	L-アスコルビン酸 (%)
対照区	有	27.5	0.1	—
A 区	有	27.5	0.1	0.5
B 区	有	27.5	—	0.5
C 区	無	27.5	0.1	—

2-4-2 L-アスコルビン酸濃度及びブランチングの影響

ライチはすべて種取り器により除核したものを使用した。シロップ液は糖度を 30.1%，クエン酸 0.5 %とし、L-アスコルビン酸無添加区を対照として、0.1, 0.3, 0.5%で濃度を検討した。また、L-アスコル

ビン酸を添加せずに酵素を失活させて褐変を防止するブランチング法を実施した区も設定した。ブランチング条件は S.Chakraborty らの報告²⁾を参考に予備試験を行い、80℃30 秒に設定した。褐変防止効果はビジュアルアナライザーを用いて試験開始から 5 ヶ月目までの経時変化を 1 ヶ月おきに確認した。

2-5 官能評価

調製後 2 ヶ月半のシロップ漬を用いて味、外観、香り、食感について官能評価を行った。味については「甘みが強いー甘みが弱い」「酸味が強いー酸味が弱い」「甘みと酸味のバランスが好ましいー甘みと酸味のバランスが好ましくない」、外観については「色がいいー色が悪い」、香りについては「素材の香りがあるー素材の香りがない」、食感については「硬いー柔らかすぎる」の 6 項目とし、-2～2 の数字で評価した。数字が高いほど味が強く、外観がよく、香りが強く、硬いということを示す。そこで得られた評価点を集計し、平均点を算出した。また総合評価として 5 つの試験区の中で最も好ましいものを選択してもらった。評価については当センター職員 8 名で行った。

3 結果および考察

3-1 殺菌条件

ライチのシロップ漬の殺菌条件は、清涼飲料水の規格基準を準用すると、pH4.6 以下であれば中心温度 85℃30 分以上、pH4.0 以下であれば、中心温度 65℃10 分以上の殺菌が必要となる。予備試験を行ったところ 85℃30 分間殺菌したライチ果実は、果肉が軟化しすぎる傾向が見られた。そのため、殺菌条件はクエン酸を用いて最終 pH を 4.0 以下になるよう調製した上で、中心温度 65℃10 分が望ましいと考えられた。

3-2 ライチシロップ漬平衡日数の確認

有核のライチのシロップ漬における糖度及び pH の経時変化を図 1 に、除核したライチのシロップ漬を図 2 に示す。有核の場合は約 20 日、除核した場合は約 11 日で糖度及び pH が平衡となった。除核した場合は果実の外側だけでなく、種を抜いた中心部からもシロップ液が浸透し、平衡日数が早くなった

と考えられた．試験開始から1ヶ月後、3ヶ月後に有核のライチの細菌検査を行ったところ、一般生菌数 300 CFU/mL 未満、大腸菌群は陰性となり、殺菌が十分であることを確認した。

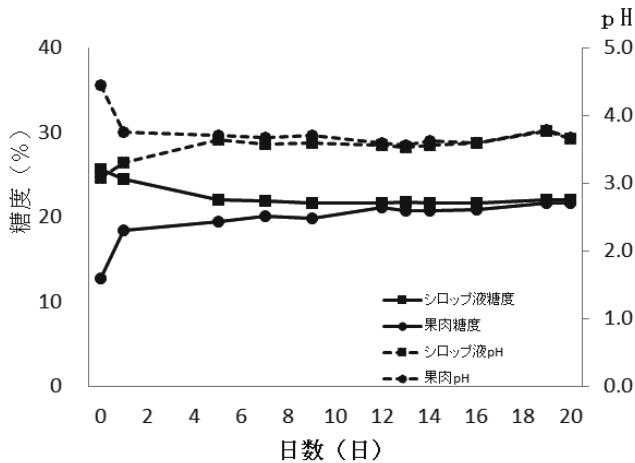


図1 シロップ液と果肉の糖度及び pH の経時変化(有核)

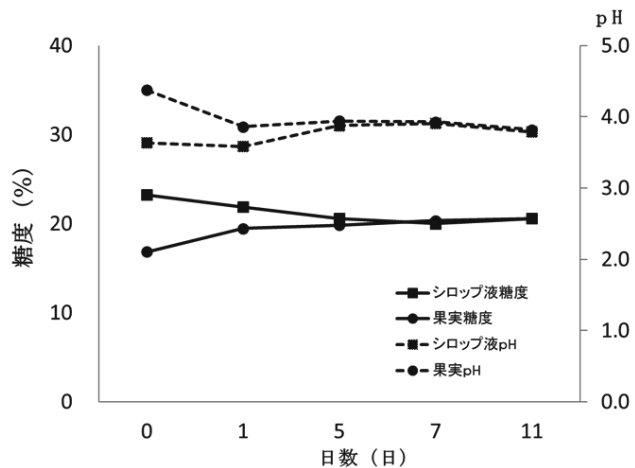


図2 シロップ液と果肉の糖度及び pH の経時変化(除核)

3-3 褐変防止方法の検討

3-3-1 L-アスコルビン酸とクエン酸の効果

試験区ごとの色の経時変化は、ビジュアルアナライザーを用いて撮影した画像を、ドットごとに 4096 色に分解した。その結果、97 色に分解されたが、類似する色を階層的にクラスター解析を行い、5 色に集約して比較を行った。そのうち R=216, G=120, B=88 を赤色と見なした。対照区では4ヶ月後から赤色が見られ、時間の経過に伴い赤色割合は高くなる傾向が見られた(図3)。C区では、3ヶ月後から赤色が見られ、その割合は4ヶ月後から急激に高まった。A及びB区では、クエン酸の有無にかか

わらず5ヶ月経過しても変色が見られなかった(図4)。5ヶ月経過した全試験区について、主成分分析した結果を図5に示す。5ヶ月経過時点では対照及びC区で変色が見られ、A及びB区では、クエン酸の有無に関わらず同等の色味であった。このことから、ライチシロップ漬の褐変防止にL-アスコルビン酸が有効であることが示唆された。

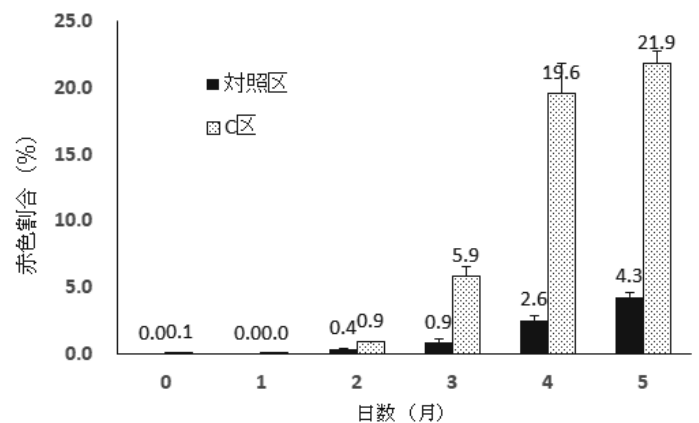


図3 果肉色の経時変化に及ぼす除核の影響

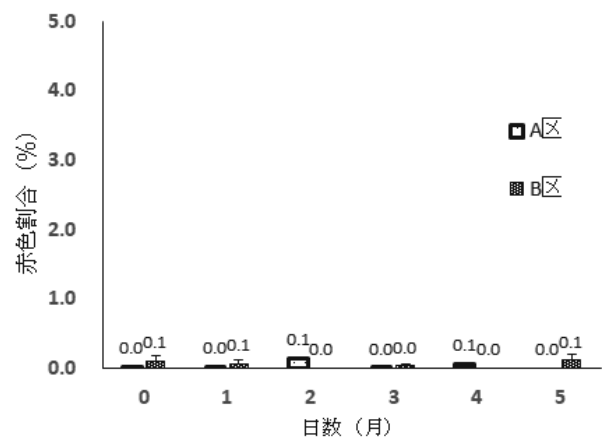


図4 果肉色の経時変化に及ぼすクエン酸の影響

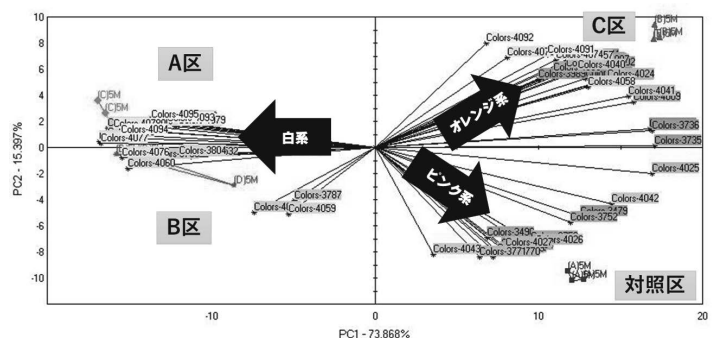


図5 試験開始から5ヶ月経過後の外観のポジショニング

3-3-2 L-アスコルビン酸濃度及びブランチングの影響確認

各試験区の色を経時変化について、ビジュアルアナライザーにより画像を分解した結果、51色に分解され、類似する色を階層的にクラスター解析を行い、4色に集約して比較を行った。そのうち、R=104, G=72, B=72を赤色と見なした。その結果を図6に示す。3ヶ月時点ではL-アスコルビン酸を加えた全ての試験区で、変色が抑えられていたが、5ヶ月時点ではL-アスコルビン酸0.1%, 0.3%添加区でも変色が見られた。L-アスコルビン酸0.5%添加区では、5ヶ月時点でやや変色が見られたが、他の区と比べ変色が抑制されていた。ブランチング区では対照区と比較して変色を抑える効果が見られなかった。

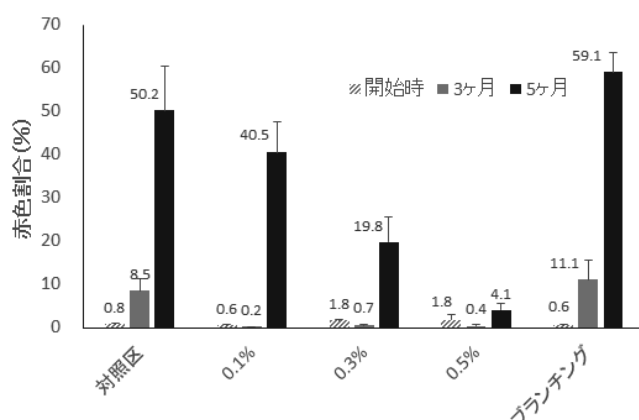


図6 L-アスコルビン酸濃度及びブランチングによる果肉色の経時変化

3-4 官能評価

L-アスコルビン酸添加及びブランチングによる官能評価への影響を確認した(表3)。色については、対照が最も評価が低くL-アスコルビン酸0.5%区が最も高い評価となった。これは調製から約2ヶ月半たったため、対照区で若干の変色が見られていたためと考えられる。甘みについてはL-アスコルビン酸添加区やブランチング区でやや甘みを強く感じる傾向にあった。甘みと酸味のバランスについてはL-アスコルビン酸濃度が高いほど評価が高く、ブランチング区で最も評価が高いという結果となった。香りについては対照区での評価が最も低く、ブランチング区で最も高い評価であった。食感についてはブランチング区が最も硬いという評価であった。5つの試験区の中で最も好ましい区を調査した結果、

ブランチング区が50%と最も高く、次いでL-アスコルビン酸0.5%, 0.3%の順となった(図7)。

これらのことより、今回の研究ではブランチング区で総合評価は高かったものの、褐変防止効果が見られないことから、褐変防止の効果が高く総合評価もブランチングの次に高いL-アスコルビン酸0.5%が最適条件であると考えられた。しかし、ブランチングについて総合評価が最も高かったことから、ブランチングとL-アスコルビン酸0.5%の処理を組み合わせる方法についても検討する必要があると思われる。

表3 官能評価の平均値

	対照区	L-アスコルビン酸			ブランチング
		0.1%	0.3%	0.5%	
色	-1.30	0.38	0.25	1.00	0.00
甘み	-0.13	0.00	0.25	0.00	0.50
酸味	-0.63	-0.25	0.71	0.63	-0.13
甘みと酸味のバランス	-0.63	-0.38	0.38	0.50	0.57
香り	-0.88	0.00	0.38	0.00	0.75
食感	-0.38	-0.88	-0.38	-0.13	0.13

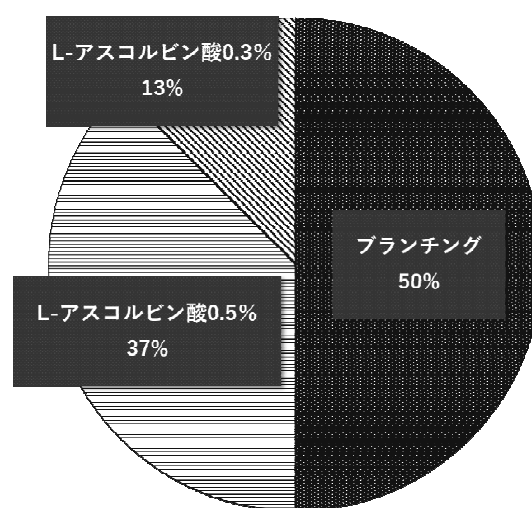


図7 最も好ましいライチシロップ漬

4 まとめ

ライチシロップ漬の試験を行ったところ、有核の場合は約20日、除核の場合は約11日で果実とシロップ液の糖度及びpHが平衡となることが分かった。

また褐変防止に及ぼす調製条件の影響を確認したところ、L-アスコルビン酸を添加することで褐変が抑えられ、濃度は0.5%が最も適していると考えられた。しかし、総合評価においてはブランチング区が最も評価が高かったことから、今後ブランチングとL-アスコルビン酸添加を組み合わせることも検討する必要があると思われる。

5 参考文献

- 1) 日本薬学会編, 衛生試験法・注解, 金原出版, 55・60, 75・76
- 2) S. Chakraborty, R. Rodriguez, S. R. Sampathu and N. K. Saha, *Journal of food science and technology*, Vol.11 No6, 266-268(1974)

新しい加工用米（宮崎 52 号）を用いた芋焼酎試験醸造

山本 英樹*1・山田 和史*1・水谷 政美*1・祝園 秀樹*1
福良 奈津子*1・藤田 依里*2・喜田 珠光*1

The Examination Brewing of Sweet Potato *Shochu* Using New Processing Rice "Miyazaki 52"

Hideki YAMAMOTO, Kazufumi YAMADA, Masami MIZUTANI, Hideki IWAIZONO,
Natsuko FUKURA, Eri FUJITA and Tamami KIDA

早期加工用米宮崎 52 号の焼酎用麹米としての適性を把握するために、2 酒造場における芋焼酎の工場規模試験醸造、試験醸造焼酎の成分分析および官能評価を行った。製麹においては、蒸し上がりに大きな塊が多く、さばけがやや悪く、浸漬や水切り条件を調整する必要があるものの、出麹ではハゼ廻りおよびハゼ込みも良好で、優良な麹を製造できた。芋焼酎製造における一次および二次もろみの発酵経過も順調であった。芋焼酎の一般成分（pH、酸度、紫外外部吸収）も良好で、主要香氣成分（アルコール類、エステル類）および特徴香微量成分（モノテルペンアルコール、 β -ダマセノン）も十分量含有していた。宮崎 52 号製芋焼酎は、官能検査において評価は概ね良好で、「原料特性がある」、「甘味がある」、「香ばしい」、「旨みがある」、「なめらかである」等のコメントが得られ品質は高かったことから、焼酎用麹米としての醸造適性を有すると認められた。

1 はじめに

宮崎県には 37 の本格焼酎メーカーがあり、平成 28 年焼酎出荷金額は 1,080 億円に達し、焼酎産業は本県屈指の主要産業である。宮崎の本格焼酎には芋、麦、米、そば等の多様な原料が用いられ個性豊かである。しかし、近年は消費者の嗜好性の変化に伴い、本県の焼酎全体における芋焼酎の出荷割合が 82% を超えている。

芋焼酎の製造では主に麹原料として米を使用している。麹に含まれる酵素やクエン酸がもろみに供給されることで良好なアルコール発酵および様々な香味成分の生成が促進され、麹の品質が焼酎の酒質や生産量に大きく影響する。よって、麹米の品質および数量の確保は焼酎メーカーにとって大変重要である。

しかしながら、近年の担い手不足や天候不順による麹米不足や価格高騰、国による米の生産調整（いわゆる減反）の廃止等の厳しい状況の中、本県の加

工用米需要に対応するために、関係機関、焼酎メーカー、生産者および団体等で構成された「宮崎県加工用米等生産・利用拡大推進協議会」が、新しい加工用米系 358 の栽培試験、焼酎試験醸造^{1・3)}および普及に取り組んできた。系 358 は県総合農業試験場が育種した普通期栽培の収量の高い加工用米である。ただし、普通期栽培の加工用米の収穫時期はおおよそ 10 月下旬であり、新米が芋焼酎製造の最盛期に間に合わないことが課題である。さらに、主要な早期栽培の加工用米である夏の笑みが、平成 27 年にいもち病の多発により大幅な減収となったため、新しい早期水稻向け専用品種の普及が喫緊の課題となり、夏の笑みと収量が同等以上でいもち病に強い品種である宮崎 52 号の実用化への取り組みが開始された。

本報では、宮崎 52 号を用いた芋焼酎の工場規模試験醸造を 2 酒造場で行い、焼酎用麹米としての醸造適性評価を行ったので報告する。

*1 応用微生物部

*2 応用微生物部（現 宮崎県小林保健所）

2 実験方法

2-1 供試米

県内で栽培された加工用米宮崎 52 号の新米を麴米として使用し、柳田酒造合名会社（以下、柳田酒造）および株式会社宮田本店（以下、宮田本店）において芋焼酎の工場規模試験醸造を実施した。

2-2 芋焼酎工場規模試験醸造

柳田酒造において、製麴に宮崎 52 号の精白した新米 400 kg を用いた。対照として、み系 358 を使用した。浸漬は 75 分間、水切りは 30 分間行い、その後蒸しを行った。種麴は河内源一郎商店製黒麴 NK 菌 (*Aspergillus luchuensis*) を使用し、ドラム製麴機および通風制御床麴室で 42 時間かけて製麴を行った。一次もろみでは鹿児島 2 号酵母 (K-2) を使用して 5 日間発酵させた。さらに、主原料のコガネセンガン を 2,000 kg ずつ蒸して、それぞれの一次もろみに加えて二次もろみとし 8 日間発酵させた。熟成二次もろみを常圧蒸留し芋焼酎の原酒を得た。

また、宮田本店において、製麴に宮崎 52 号の精白した新米 270 kg を用いた。対照として、内地米を使用した。浸漬は 50 分間、水切りは 60 分間行い、その後蒸しを行った。種麴は河内白麴菌 (*Aspergillus kawachii*) を使用し、通風制御床麴室で 46 時間かけて製麴を行った。一次もろみでは平成宮崎酵母 (MF062) を使用して 7 日間発酵させた。さらに、主原料の紅はるか を 1,350 kg ずつ蒸して、それぞれの一次もろみに加えて二次もろみとし 9 日間発酵させた。熟成二次もろみを常圧蒸留し芋焼酎の原酒を得た。

2-3 芋焼酎の成分分析

分析に供した芋焼酎は、原酒を 25% (v/v) に和して調製した。芋焼酎の pH、酸度、紫外吸収、アルコール分の分析は、国税庁所定分析法⁴⁾に従った。芋焼酎熟成二次もろみのアルコール分は、もろみを 3,000 rpm で遠心分離した上清について簡易アルコール分析器(理研計器製アルコメイト AL-2)で測定した。芋焼酎の一般香気成分の分析はガスクロマトグラフ(島津製作所製 GC2010 Plus)を用いてヘッドスペース法にて、モノテルペンアルコールおよびβ-ダマセノンについてはガスクロマトグラフ質量分析計(島津製作所製 GCMS-QP2010 Plus)を用いて行った。なお、芋焼酎のモノテルペンアルコールおよびβ-ダマセノン測定試料の調製は、ヘッ

ドスペース固相マイクロ抽出 (Solid Phase Micro Extraction : SPME) 法⁵⁻⁸⁾で行った。芋焼酎 5 mL および内部標準溶液 (1-ペンタノール 250 mg/L) 0.1 mL を 20 mL 容ガラスバイアルに入れて密栓し、島津製作所製 AOC-5000 オートインジェクターを用いて 40℃, 500 rpm で攪拌しながら 5 分加温した後、SPME ファイバー (SUPELCO 85 μm ポリアクリレート) を露出して 30 分間攪拌しながら抽出を行った。脱離は SPME ファイバーを分析装置の注入口内で 5 分間露出して行った。

2-4 芋焼酎の官能評価

焼酎官能評価経験者 6 名をパネリストとして 4 点法 (1 : 秀, 2 : 優, 3 : 良, 4 : 可) により芋焼酎の官能評価を行った。

3 結果および考察

3-1 芋焼酎工場規模試験醸造

柳田酒造において、県産加工用米宮崎 52 号を麴米として使用し、製麴を行った。表 1 に製麴に関する製造者の所見を示した。蒸し上がりで大きな塊が多く、製麴時のさばけがやや悪かったので、浸漬や水切り条件を調整することによる改善が必要であると考えられた。出麴は、ハゼ廻りに問題なく、ハゼ込みも良好で、香りも問題なかったので、優良な麴を製造できたと判断された。

図 1 に宮崎 52 号製および対照のみ系 358 製の外観を示した。これらの麴の酸度は、宮崎 52 号製 (黒麴) が 6.1、み系 358 製 (黒麴) が 7.5 で適正值であった。

表 2 に芋焼酎の仕込み歩合を示した。宮崎 52 号製およびみ系 358 製のいずれも、一次もろみ、二次もろみの発酵および蒸留は順調に行われた。

芋焼酎製造の発酵管理に関する値を表 3 に示した。麴米の種類によるアルコール発酵および蒸留に差異は認められなかった。

また、宮田本店において、宮崎 52 号を麴米として使用し、製麴を行った。表 4 に製麴に関する製造者の所見を示した。蒸し上がりで塊が多く、製麴時前半にさばけがやや悪かった。作業性を向上するために、浸漬および水切り条件を調整する必要があると考えられた。出麴はハゼ廻り、ハゼ込みが良好であった。

表 1 製麴に関する製造者の所見

項目	所見
蒸しの状況	大きな塊が多い、やや粘りがある 蒸米水分は 32.3%であった
製麴のし易さ	さばけはやや悪い 力を要するが手でほぐせるレベル 温度推移は良好（立ち上がりがやや遅い）
出麴の状況	香りは問題ない ハゼ廻りは問題ないが、わずかに完全にハゼ 落ちしたものもあった。しかし、み系 358 の場 合よりも少ない ハゼ込みは良い
総合評価	出麴酸度が当蔵としては平均より若干低め であったが、製麴後、焼酎もろみの発酵は順調 で香りも良好であった



宮崎 52 号の米麴（黒麴）



み系 358 の米麴（黒麴）

図 1 米麴の外観

表 2 芋焼酎の仕込み歩合

原料	一次	二次	計
麴米(kg)	400	—	400
コガネセンガン(kg)	—	2,000	2,000
汲水(L)	480	1,080	1,560

麴歩合 20%，汲水歩合 65%.

表 3 芋焼酎の発酵管理に関する値

	宮崎 52 号製 (黒麴)	み系 358 製 (黒麴)
熟成二次もろみ アルコール分 (%)	14.2	14.5
焼酎原酒 アルコール分 (%)	38.4	38.0
純アルコール 収得量 (L / t)	202	201
蒸留歩合 (%)	95.3	95.3

表 4 製麴に関する製造者の所見

項目	所見
蒸しの状況	甑で蒸しているが、蒸し方が違うので通常よ り早く蒸し上がった。崩す際にスコップが通り づらく多少苦労した。
製麴のし易さ	種付けの時は粘り気が強く、崩して混ぜるの に苦労した。翌朝の手入れの時に一つの大きな 硬い塊になっていた。それ以降は崩れ易く作業 も容易で、最終的にさばけの良い麴が出来上が った。
出麴の状況	麴の香りは通常のタイ米と変わらず、ハゼ廻 り、ハゼ込みはタイ米よりも良かった。酸度も 自社の平均値より高かった。さばけの良い麴だ ったので、もろみが溶けやすかった。
総合評価	製麴時の種付けと、翌朝の手入れが非常に困 難であったが、それ以降はさばけが良くなり、 良質の麴が出来上がった。

図 2 に宮崎 52 号製米麴（白麴）の外観を示し
た。麴の酸度は 6.5 で適正值であった。

表 5 に芋焼酎の仕込み歩合を、表 6 に芋焼酎製
造の発酵管理に関する値を示した。一次もろみ、
二次もろみのアルコール発酵および蒸留は順調で
あった。



図2 宮崎52号の米麴（白麴）の外観

表5 芋焼酎の仕込み歩合

原料	一次	二次	計
麴米(kg)	270	—	270
紅はるか(kg)	—	1,350	1,350
汲水(L)	306	744	1,050

麴歩合 20%, 汲水歩合 65%.

表6 芋焼酎の発酵管理に関する値

熟成二次もろみアルコール分 (%)	14.9
焼酎原酒アルコール分 (%)	37.7
純アルコール収得量 (L / t)	196
蒸留歩合 (%)	93.0

3-2 芋焼酎の成分分析

表7に柳田酒造の芋焼酎の一般成分を示した。いずれも麴米の種類による大きな差異は認められず、もろみの発酵および性状について問題はないと推察された。

表8に芋焼酎に含まれる主要香気成分のアルコール類およびエステル類の濃度等を示した。それぞれの成分について大きな違いは見られず、宮崎52号製芋焼酎は主要な香気成分を十分含有することが分かった。

表9に芋焼酎のモノテルペンアルコールおよび β -ダマセノン濃度を示した。これらについて、宮崎52号を用いた芋焼酎は対照と同等に十分に含有することが分かった。モノテルペンアルコールについては、成分ごとに閾値が大きく異なる。宮

崎52号製芋焼酎は対照に比較して α -テルピネオールの含有量が多かったが、閾値は1,000mg/Lであり⁹⁾、焼酎の香味への影響は少ないと推察された。

表7 芋焼酎25度の一般成分

	pH	焼酎酸度	紫外部 吸収
宮崎52号製（黒麴）	4.4	2.4	0.577
み系358製（黒麴）	4.5	2.0	0.356

表8 芋焼酎25度の主要な香気成分濃度および高級アルコール比

	(mg/L)	
	宮崎52号製 (黒麴)	み系358製 (黒麴)
酢酸エチル	77	86
ジアセチル	0	0
n-プロピルアルコール	92	98
i-ブチルアルコール	135	125
酢酸 i-アミル	1.4	2.3
i-アミルアルコール	318	300
カプロン酸エチル	0.1	0.1
アセトイン	3.8	2.9
カプリル酸エチル	0.8	0.8
カプリン酸エチル	1.6	1.9
酢酸 β -フェネチル	0.5	1.3
β -フェネチルアルコール	64	91
A/P	3.4	3.1
A/B	2.4	2.4
B/P	1.5	1.3
A/(P+B)	1.4	1.3

注) P : n-プロピルアルコール, B : i-ブチルアルコール,
A : i-アミルアルコール

表 10 に宮田本店の芋焼酎の一般成分を示した。pH、焼酎酸度および紫外外部吸収ともに通常の値であり、もろみの発酵および性状について問題はないと推察された。

表 11 に芋焼酎に含まれる主要香気成分のアルコール類およびエステル類の濃度等を示した。宮崎 52 号製芋焼酎は主要な香気成分を十分含有することが分かった。柳田酒造で製造した芋焼酎と比較して香気成分濃度が異なるのは、麹菌および酵母の醸造微生物、製造設備および条件等の違いによるものであると考えられた。

表 9 芋焼酎 25 度のモノテルペンアルコール
および β -ダマセノン濃度

	(μg/L)	
	宮崎 52 号製 (黒麹)	み系 358 製 (黒麹)
リナロール	63	43
α -テルピネオール	80	30
シトロネロール	32	30
ネロール	29	26
ゲラニオール	52	52
β -ダマセノン	20	18

表 10 芋焼酎 25 度の一般成分

	pH	焼酎酸度	紫外外部 吸収
宮崎 52 号製 (白麹)	4.5	0.9	0.434
内地米製 (白麹)	4.5	0.8	0.368

表 12 に芋焼酎のモノテルペンアルコールおよび β -ダマセノン濃度を示した。これらについても、宮崎 52 号を用いた芋焼酎は十分に含有することが分かった。

モノテルペンアルコールは芋焼酎の特徴香成分であると報告されている。甘藷中には糖が結合したモノテルペン配糖体が存在し、もろみ中で麹由来の β -

グルコシダーゼで加水分解され、ゲラニオールとネロールが遊離する。一部は、蒸留工程の熱ともろみ中の酸でリナロールや α -テルピネオールに変換され、また、酵母によりシトロネロールに変換される^{10,11)}。また、 β -ダマセノンは芋焼酎に含まれる温かみのある甘い香りの特徴香成分であり、芋焼酎の風味に寄与する¹²⁾。

もろみの発酵が良好であり、焼酎に十分な香気成分が含有されていたことから、宮崎 52 号を用いた場合も麹菌の酵素およびクエン酸生成等について問題ないと推察された。

表 11 芋焼酎 25 度の主要な香気成分濃度および
高級アルコール比

	(mg/L)	
	宮崎 52 号製 (白麹)	内地米製 (白麹)
酢酸エチル	159	110
ジアセチル	0.9	0.5
n-プロピルアルコール	124	128
i-ブチルアルコール	240	204
酢酸 i-アミル	12.0	5.8
i-アミルアルコール	458	416
カプロン酸エチル	0.4	0.3
アセトイン	13.4	0.6
カプリル酸エチル	2.1	1.7
カプリン酸エチル	3.2	2.0
酢酸 β -フェネチル	2.8	1.9
β -フェネチルアルコール	74	113
A/P	3.7	3.3
A/B	1.9	2.0
B/P	1.9	1.6
A/(P+B)	1.3	1.3

注) P : n-プロピルアルコール, B : i-ブチルアルコール,
A : i-アミルアルコール

表 12 芋焼酎 25 度のモノテルペンアルコール
および β -ダマセノン濃度

	(μg/L)	
	宮崎 52 号製 (白麴)	内地米製 (白麴)
リナロール	211	194
α -テルピネオール	121	121
シトロネロール	46	37
ネロール	54	44
ゲラニオール	63	58
β -ダマセノン	53	44

3-3 芋焼酎の官能評価

表 13 に柳田酒造の芋焼酎の官能検査結果を示した。宮崎 52 号製芋焼酎の平均点は 2.0 であり、対照のみ系 358 の 1.7 と比較して評価がやや低かったものの、良好な評価であった。「原料特性がある」、「甘味がある」、「香ばしい」、「旨みがある」等

のコメントが得られ、焼酎の品質が高いことが分かった。

表 14 に宮田本店の芋焼酎の官能検査結果を示した。宮崎 52 号製芋焼酎の平均点は 2.0 であり、「原料特性がある」、「旨みがある」、「香ばしい」、「甘味がある」、「なめらかである」等の良好なコメントが得られ、焼酎の品質は高かった。内地米製と比較して評価が低かったのは、宮崎 52 号は蒸留仕立てであったことが原因で、十分に熟成することで酒質は向上すると推測された。

4 まとめ

1. 宮崎 52 号は製麹時において、蒸し上がりに大きな塊が多く、さばけがやや悪かったので、浸漬や水切り条件を調整することにより改善が必要であると考えられた。出麹では、ハゼ廻りおよびハゼ込みも良好で、優良な麹を製造できた。
2. 宮崎 52 号を用いた芋焼酎の熟成二次もろみアルコール分および純アルコール収得量について、対照との差異は認められなかった。

表 13 芋焼酎 25 度の官能検査結果

※4 点法 (1 : 秀, 2 : 優, 3 : 良, 4 : 可)		
製品	平均	コメント
宮崎 52 号製 (黒麴)	2.0	原料特性(4), 甘い(4), 香ばしい(2), 旨みある(2), おだやか, なめらか, 辛い(3), ガス臭, 油臭, 渋味, 苦味
み系 358 製 (黒麴)	1.7	原料特性(5), 甘い(4), 香ばしい(2), おだやか, 旨みある, 渋味(3), 辛い(2), うすい, 苦味

※ 6 名の焼酎官能評価経験者で検査を行った。

表 14 芋焼酎 25 度の官能検査結果

※4 点法 (1 : 秀, 2 : 優, 3 : 良, 4 : 可)		
製品	平均	コメント
宮崎 52 号製 (白麴) 紅はるか H31.3 製造	2.0	原料特性(4), 旨みある(4), 香ばしい(2), 甘い(2), なめらか(2), 焼き芋様香, 辛い(2), ガス臭, ジアセチル臭, 油臭, 渋味
内地米製 (白麴) 紅はるか H30.3 製造	1.5	甘い(5), 原料特性(4), 旨みある(4), おだやか(2), なめらか(2), エステル香, ガス臭, 辛い, 荒い

※ 6 名の焼酎官能評価経験者で検査を行った。

3. 宮崎 52 号製芋焼酎は、み系 358 製と比較して香気成分に顕著な差は認められず、十分量含有していることが分かった。
4. 宮崎 52 号製芋焼酎は、官能検査において概ね良好な評価であった。「原料特性がある」、「甘味がある」、「香ばしい」、「旨みがある」、「なめらかである」等のコメントが得られ、焼酎の品質が高いことが分かった。

以上より、新しい加工用米宮崎 52 号は焼酎用麹米としての醸造適性を有する可能性が認められた。今後、工場規模試験醸造を継続して実施し、焼酎醸造適性について確認していく。

5 参考文献

- 1) 山本英樹，水谷政美，山田和史，祝園秀樹，高山清子：宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告・平成 26 年度< 59 号>，53-58 (2014)
- 2) 山本英樹，水谷政美，祝園秀樹，高山清子，藤田依里：宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告・平成 27 年度< 60 号>，51-55 (2015)
- 3) 山本英樹，水谷政美，祝園秀樹，高山清子，藤田依里，喜田珠光：宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告・平成 28 年度< 61 号>，69-75 (2016)
- 4) 注解編集委員会編：第四回改正国税庁所定分析法注解（公益財団法人日本醸造協会，東京），34-49 (2000)
- 5) 宇都宮仁：醸協，**94-3**，252-257 (1999)
- 6) 宇都宮仁，木田 信，牧 則光，磯谷敦子，岩田博，西谷尚道：醸協，**101-6**，446-457 (2006)
- 7) 福田 央，小林 健，坂本和俊，水谷 治，金井宗良，平松順一：酒類総合研究所報告，**183**，16-25 (2011)
- 8) 下田満哉：ぶんせき，**No.2**，75-79 (2002)
- 9) 神渡巧，瀬戸口眞治，高峯和則，緒方新一郎：醸協，**100-7**，520-526 (2005)
- 10) 太田剛雄：醸協，**86-4**，250-254 (1991)
- 11) 高峯和則，吉崎由美子，島田翔吾，高屋総一郎，玉置尚徳，伊藤 清，鮫島吉廣：醸協，**106-1**，50-57 (2011)
- 12) 神渡巧，瀬戸口眞治，上田次郎，瀬戸口智子，緒方新一郎：醸協，**101-6**，437-445 (2006)

6 おわりに

本研究における芋焼酎の工場規模試験醸造は、柳田酒造合名会社および株式会社宮田本店の協力により行われた。また、本試験は、宮崎県加工用米等生産・利用拡大推進協議会の支援の下、企画、実施した。

麴から抽出される核酸関連物質について

祝園 秀樹^{*1}・水谷 政美^{*1}・山本 英樹^{*1}・喜田 珠光^{*1}

Nucleic Acid-related Compounds Extracted from *Koji*

Hideki IWAIZONO, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO, and Tamami KIDA

21 種類の市販種麴菌を用い、米麴および麦麴を製麴した。まず、冷水で抽出することにより、どの核酸関連物質が多く溶出されるかを調べた。次に核酸分解関連酵素の影響を調べるために 50℃にて抽出を行った。また、製麴時間による核酸関連物質抽出量への影響、甘酒製造時間との関連について調べた。麴の原料（米、麦）の違いでは、麦の方がやや抽出量が多かった。黄麴菌と焼酎麴菌を比較すると、抽出されやすい核酸関連物質の種類が異なっていた。また、製麴方法および甘酒の製造方法の違いにより、抽出される核酸関連物質が異なることが分かった。菌株および製麴方法等を改良することにより、市販の甘酒よりも多くの核酸関連物質が溶出されることが確認され、核酸関連物質を多く含む甘酒を製造できると考えられた。

1 はじめに

麴菌は、古くから味噌・醤油等の発酵食品に広く使用されており、食品製造用微生物として安全性が確認されている。また、麴菌は、麴菌体から分泌する各種酵素により原料を分解し、それら分解物を代謝することにより様々な機能性物質を生産することが知られている¹⁾。核酸の必要摂取量は、年齢などにより異なり、加齢とともに核酸を合成する能力は衰えていく。核酸が不足すると新陳代謝に支障をきたし、免疫力や記憶力の低下などの原因となるおそれがある。乳児用ミルクにも腸内ビフィズス菌の増殖促進や抗アレルギー作用等が期待され、ヌクレオチド（RNA）が配合されている²⁾。清酒麴と核酸関連物質の関連については報告³⁻⁷⁾があるが、焼酎麴については、十分には把握されていない。今回、製麴したさまざまな麴から核酸関連物質の抽出を行い、LC/MS/MS を用いて定量解析を行ったので報告する。

2 実験方法

2-1 麴原料および供試種麴菌

麴原料は、市販の精白米および大麦（精麦度 65）を用いた。麴菌は、種麴メーカー5社（（株）河内

源一郎商店、（株）樋口松之助商店、（株）菱六、（株）ビオック、（株）秋田今野商店）より入手した焼酎用麴菌 10 株（*A. kawachii* ①～⑥、*A. luchuensis* ①～④）、黄麴菌 11 株（*A. oryzae* ①～⑨、*A. sojae* ①～②）の計 21 株を使用した。

2-2 製麴

蒸した麴原料を放冷し、適量の種麴を接種後、恒温恒湿器（エスベック製、プラチナス PR-3KP）内で製麴した。製麴温度は 33～38℃、湿度は 70～98% で製麴条件を設定した。製麴した麴は、分析に供するまで冷凍保存した。

2-3 核酸関連物質の測定

測定対象は、核酸塩基として 7 種（Adenine, Guanine, Cytosine, Thymine, Uracil, Xanthine, Hypoxanthine）、ヌクレオシドとして 7 種（Adenosine, Guanosine, Cytidine, Thymidine, Uridine, Xanthosine, Inosine）、ヌクレオチドとして 19 種（AMP, GMP, CMP, dTMP, UMP, XMP, IMP, ADP, GDP, CDP, UDP, XDP, IDP, ATP, GTP, CTP, dTTP, UTP, ITP）の計 33 種とした。

2-4 核酸関連物質の抽出

氷水抽出においては、冷凍保存しておいた麴 2g をそれぞれ秤取り、冷水 4 ml を加え、氷水中で 1h 抽出した。50℃抽出は、冷凍保存しておいた麴を解

*1 応用微生物部

凍後 2 g それぞれ秤取り, 50℃の水 4 ml を加え, 50℃の恒温水槽にて 1 h 抽出した.

2-5 LC/MS/MSの測定条件

核酸関連物質の測定には, LC/MS/MS (LC: 島津製作所製 LC-20AD, MS/MS: エービー・サイエックス製 API 3200) を使用した. カラムは, InertSustain C18 Metal-free 3 μ m, 150 x 2.1 mm ID (ジーエルサイエンス製), 移動相は, 10 mM Tributylamine + 15 mM CH₃COOH in H₂O と CH₃OH のグラジエント, 流速 0.2 mL/min, カラム温度 45℃, イオン化法は, エレクトロスプレーイオン化法 (ESI, Negative) で行った.

3 結果および考察

3-1 米麴の抽出試験

米麴を製麴し, 抽出試験を行った. 製麴条件は, 35℃, 湿度 98%, 製麴時間 42 h とした. まず, 麴が生産した核酸関連分解酵素の影響を受けないように米麴を冷水で抽出した. 焼酎麴菌では, Cytidine, Guanine, Adenine が多く抽出され, 黄麴菌では,

Xanthine, Hypoxanthine が多く抽出されていた (図 1). Uridine は, 両方で多く抽出されており, 麴菌により各核酸関連物質の濃度に違いがあることが明らかになった. 次に 50℃で同様に抽出試験を行ったところ, 抽出される核酸関連物質の種類は同じであるものの, 濃度は, 大きく増加することが分かった (図 2). 麴菌が生産する核酸関連分解酵素の多くは, 50℃程度が至適温度と考えられ⁵⁾, それらの酵素作用により, 濃度が上昇したと推察された. 検出された核酸関連物質は, 核酸塩基およびヌクレオシドが多く, ヌクレオチドは, 検出されていないか, わずかに検出された程度であった. ヌクレオチドは, 麴菌が生産したホスファターゼにより, リン酸基が外れ, ヌクレオシドや核酸塩基へ変化していくものと考えられた⁸⁾.

3-2 米麴と麦麴の比較

3-1 の米麴の抽出試験と同様に麦麴を製麴し, 抽出試験を行った. 焼酎麴菌と黄麴菌で抽出されやすい核酸関連物質は, 米麴の場合と同様であっ

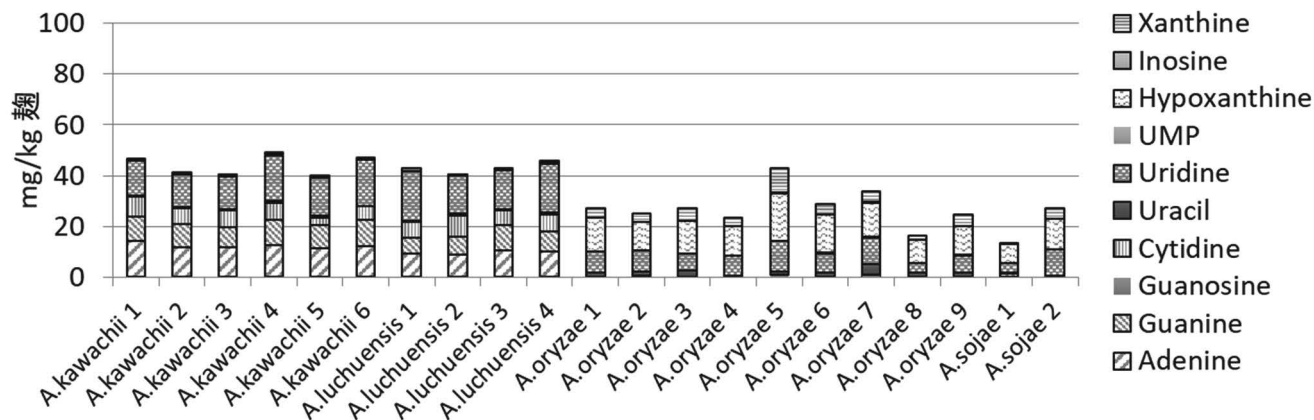


図 1. 米麴から抽出された核酸関連物質濃度 (冷水)

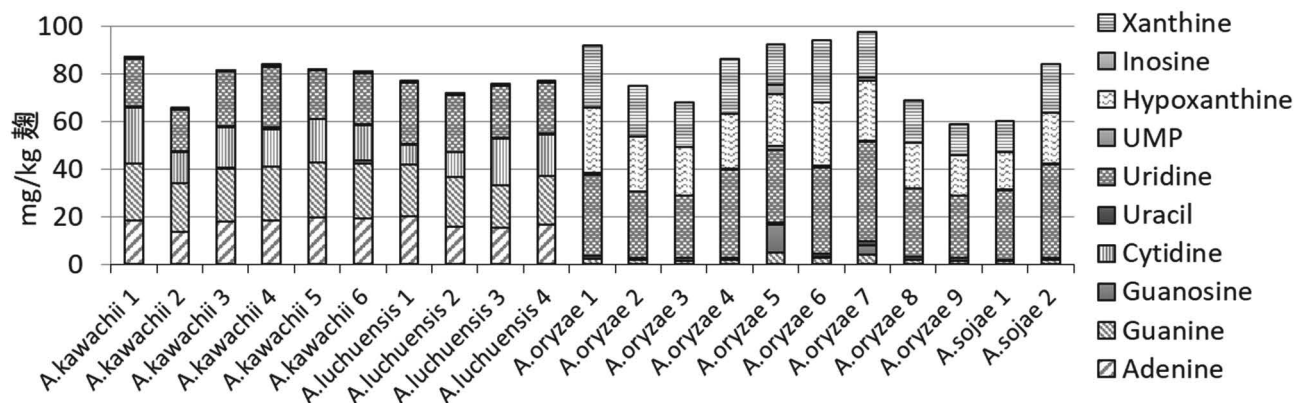


図 2. 米麴から抽出された核酸関連物質濃度 (50℃)

た．冷水時の各麴菌の核酸関連物質抽出総量は，焼酎麴菌では 11～71 mg/kg 麴（Ave.：麦麴 33 mg/kg 麴，米麴 44 mg/kg 麴），黄麴菌では 20～77 mg/kg 麴（Ave.：麦麴 40 mg/kg 麴，米麴 26 mg/kg 麴）であった．米麴に比べ，菌株間の違いが大きかった．また，50℃での各麴菌の核酸関連物質抽出総量は，焼酎麴菌では 73～128 mg/kg 麴（Ave.：麦麴 116 mg/kg 麴，米麴 78 mg/kg 麴），黄麴菌では 98～155 mg/kg 麴（Ave.：麦麴 116 mg/kg 麴，米麴 80 mg/kg 麴）であった．原料によって，デンプンやタンパク質の組成が異なるため，各種酵素生産量が異なること⁹⁾が知られており，麦麴の方が，米麴に比べて核酸関連分解酵素生成が多くなり，抽出量も多くなったと考えられた．

3-3 製麴時間と核酸関連物質抽出量

米麴を常法により製麴し，製麴時間と核酸関連物

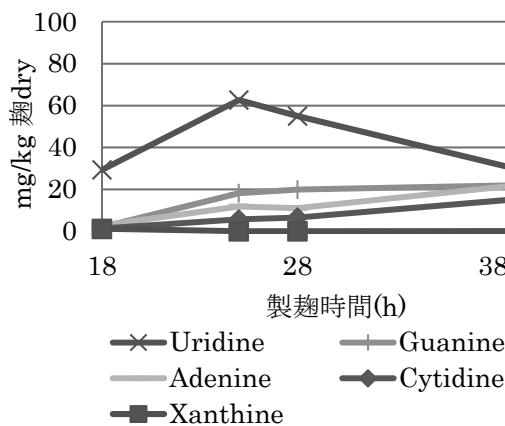


図 3．製麴時間と 50℃抽出時の核酸関連物質濃度 (*A. kawachii* ①)

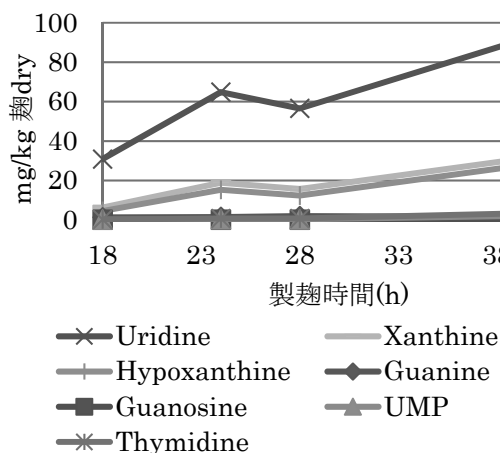


図 4．製麴時間と 50℃抽出時の核酸関連物質濃度 (*A. oryzae* ⑦)

質抽出量の関係を調べた．焼酎麴菌を用いた製麴条件（温度，湿度）は，38℃，98%（18 h）→35℃，90%（7 h）→33℃，80%（17 h），黄麴菌を用いた製麴条件は，30℃，98%（18 h）→33℃，90%（7 h）→35℃，80%（17 h）とした．50℃での抽出量が多かった焼酎麴菌 *A. kawachii* ①と黄麴菌 *A. oryzae* ⑦の抽出結果（50℃）を示した（図 3，4）．抽出量の多い Uridine は，焼酎麴菌では，製麴 25 時間程度で減少していたが，黄麴菌のピークは，42 時間以降にあることが分かった．焼酎麴では，製麴後半にクエン酸が生成され，pH が低くなっていることが，抽出量に影響した可能性があると考えられた．

3-4 甘酒の製造試験

黄麴菌（11 株）を用いて米麴を製麴し，甘酒製造試験を行った．製麴条件（温度，湿度）は，33℃，98%（18 h）→33℃，90%（7 h）→35℃，70%（16 h）→38℃，70%（2 h）とした．甘酒製造条件は，各麴 80g に 65℃に加温した水を加え，58℃の恒温水槽で糖化した．図 5 に甘酒の製造時間（糖化時間）と 11 種類の米麴の核酸関連物質濃度平均値および濃度範囲を示した．糖化開始 1 時間までに急増し，それ以降は，ほぼ変化がないことが分かった．核酸関連分解酵素は，熱に弱い¹⁰⁾ため，失活した可能性が考えられた．また，甘酒製造試験の核酸関連物質の最大濃度は 60 mg/L であった．市販甘酒の核酸関連物質濃度を測定したところ，11～48 mg/L（11 サンプル）であったことから，市販甘酒よりも核酸関連物質を多く含む甘酒が製造できることが確認できた．

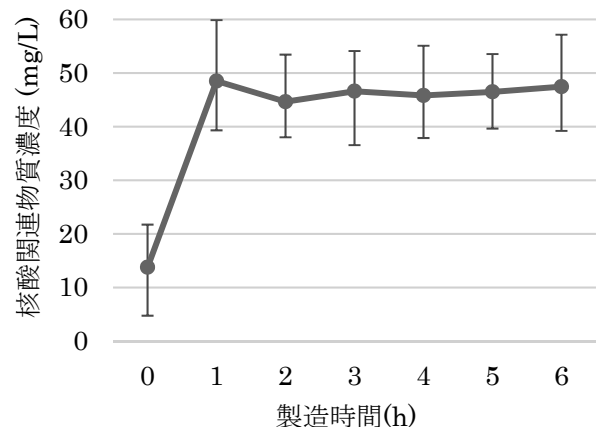


図 5．甘酒製造時間と核酸関連物質濃度

4 まとめ

市販麴菌 21 種類を用いて麴を製麴し、核酸関連物質の抽出試験を行ったところ、以下のことがわかった。

1. 抽出温度は、低温（氷水）よりも 50℃抽出の方が多く抽出された。
2. 焼酎麴菌と黄麴菌では、抽出時の各核酸関連物質濃度は異なることが分かった。
3. 核酸関連物質抽出量は、製麴時間に影響された。
4. 甘酒中（液体）の核酸関連物質量は、糖化 1 時間後までに急増し、以降変化が少なかった。
5. 甘酒中の核酸関連物質量は菌株により異なっていた。

以上より、菌株、製麴方法及び発酵条件を改良することにより、市販甘酒より多くの核酸関連物質を含む甘酒を製造できると考えられた。

5 参考文献

- 1) 村上英也：麴学，日本醸造協会，110-172 (1986)
- 2) 高橋毅：Milk Science 55-4 (2007)
- 3) 毛利威徳，足立有，柏原純：醸酵工誌，**46**-6, 185-195 (1968)
- 4) 毛利威徳，足立有，柏原純：醸酵工誌，**46**-15, 196-202 (1968)
- 5) 毛利威徳，足立有，柏原純：醸酵工誌，**46**-898, 203-214 (1968)
- 6) 毛利威徳，足立有，柏原純：醸酵工誌，**47**-416, 215-223 (1969)
- 7) 山中信介，川西祐成，奥井一義：醸協，**77**-11, 817-821 (1982)
- 8) 清水昌，堀之内末治：応用微生物学 第 2 版，文永堂出版，348-350 (1996)
- 9) 西谷尚道ら：本格焼酎製造技術，財団法人日本醸造協会，109-112 (1991)

MALDI-TOF MS を用いた県オリジナルの微生物データベースの構築 (第2報)

喜田 珠光^{*1}・高山 清子^{*2}・水谷 政美^{*1}
山本 英樹^{*1}・藤田 依里^{*3}・山田 和史^{*1}

Construction of Miyazaki Prefecture Original Microbial Database Using MALDI-TOF MS (2nd Report)

Tamami KIDA, Kiyoko TAKAYAMA, Masami MIZUTANI,
Hideki YAMAMOTO, Eri FUJITA and Kazufumi YAMADA

県内の食品製造に関与する微生物資源を有効活用するため、微生物データベースの構築に取り組んできた。まず、有用菌が豊富に存在することが期待される発酵食品等を微生物の分離源として収集し、酵母と乳酸菌を含む約 3,700 株の微生物を分離・保存した。収集した微生物のうち、醤油酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) と同定された菌株について醤油醸造適性を調べた。乳酸菌と同定された菌株については、機能性成分生成能と低 pH 環境での増殖性を調べた。その結果、醤油製造や機能性食品の製造に利用できる可能性のある菌株を複数見出すことができた。

1 はじめに

近年、微生物を利用した発酵食品は、機能性の研究が進められるとともに、健康志向の流れを受けて消費者からも注目されている。当県にも伝統的な発酵食品は数多く存在するが、これまで十分な調査がなされておらず、貴重な微生物資源が把握できていなかった。そこで、平成 28 年度から、県内の微生物資源について調査し、新規食品の開発に利用できる微生物のデータベースを構築することを目的として、県内の発酵食品等 263 サンプルから約 3,700 株の微生物を分離してきた¹⁾。これらの微生物を実用化するために、個々の菌株のいくつかの特性を調べたので報告する。

2 実験方法

2-1 MALDI-TOF MS による属種同定

前回報告時に同定不可だった約 1,000 株を、分離

時と同じ PDA 培地 (Difco Potato Dextrose Agar) や MRS 培地 (Difco Lactobacilli MRS Broth) で画線培養し、再度 MALDI-TOF MS (Bruker, microflex) で分析した。前処理ではターゲットプレートに滅菌したつまようじでコロニーを塗布し、80 %ギ酸、マトリクス試薬 (Bruker Matrix HCCA) の順に各 1 µl を滴下して乾燥させた。

2-2 醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の産膜性とエタノール生成能の確認

醤油醸造において、産膜酵母はイソ酪酸等の悪臭の原因物質を生成するため、使用する酵母は膜を形成せず、また適量のエタノールを生成することが望ましい。エタノールは醤油の保存性を高めるとともに、香味を向上させる効果がある²⁾³⁾。

県内の醤油もろみから分離した *Z.rouxii* 227 株を耐塩性酵母用培地 (グルコース 5%, 塩化ナトリウム 8.3%, 本醸造醤油 10%, pH5.3)⁴⁾に植菌し、30 °C で 3 日間培養した後、肉眼で培地液面の膜の有無を確認した。

*1 応用微生物部

*2 応用微生物部 (現 宮崎県衛生環境研究所)

*3 応用微生物部 (現 宮崎県小林保健所)

エタノール濃度は、培養後の培地上清を 5 倍希釈して 0.2 μm メンブランフィルターでろ過し、ガスクロマトグラフ (HEWLETT PACKARD, 6890 SERIES II, J&W DB-WAX; I.D. 0.53 mm $\times$ 30 m, Film 1 μm , 50 $\rightarrow$ 170 $^{\circ}\text{C}$ (4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), FID 検出器) で測定した。

2-3 乳酸菌の γ -アミノ酪酸 (GABA) 生成能と耐酸性

GABA はタンパク質を構成しないアミノ酸の 1 つで、血圧降下作用、リラックス効果などの薬理学的作用が報告されている。乳酸菌の中にはグルタミン酸脱炭酸酵素を持ち、グルタミン酸から GABA を生合成する菌種が存在することが知られており、そのような乳酸菌を用いて機能性食品を作る研究が進められている⁵⁾。センターで保有する乳酸菌にも GABA を生成する菌株が存在することが期待されたことから、300 株の乳酸菌に対して GABA 生成株のスクリーニングを行った。

MRS 培地に乳酸菌を植菌し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 2 日間培養した後、上清 0.5 μl を薄層クロマトグラフィー

(MERCK, TLC セルロース) の試料とした。展開溶媒は 1-ブタノール : アセトン : 酢酸 : 水 = 35 : 35 : 7 : 23 とし⁶⁾、発色剤はニンヒドリンスプレー (富士フイルム和光純薬、薄層クロマトグラム用) を用いた。

これらの乳酸菌を、乳酸菌実験マニュアル⁷⁾に従って、塩酸でおよそ pH 3, 3.5, 4 に調製した MRS 培地に植菌し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 2 日間培養した後の菌体増殖度を肉眼で確認した。

3 結果および考察

3-1 同定結果

平成 28~30 年度にセンターで分離し、MALDI-TOF MS で分析した 3,730 株の内訳を図 1 に示した。属種の内訳は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が 1,481 株、耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* が 298 株、耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* が 278 株、乳酸菌 (*Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属, *Leuconostoc*

属, *Enterococcus* 属, *Pediococcus* 属) が 838 株、その他が 252 株、同定不可の株が 583 株であった。

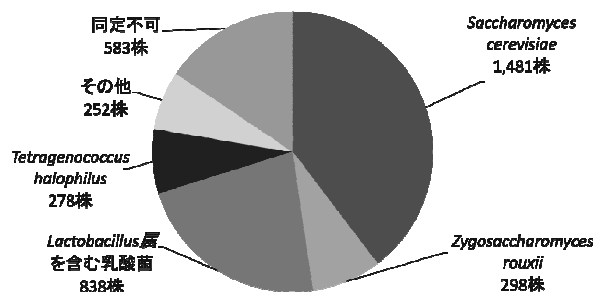


図 1 3,730 株の同定結果

3-2 醤油酵母 *Z.rouxii* の産膜性とエタノール生成能

Z.rouxii 227 株中 88 株が膜を形成し、139 株が膜を形成しなかった (図 2)。

培養後の培地のエタノール濃度は、膜を形成する酵母では 0.49%~2.68%, 膜を形成しない酵母では 0.70~2.40% に分布した。膜形成の有無とエタノール濃度を図 3 にまとめた。両者の間に相関は見られなかった。

膜を形成せず、エタノール濃度が 2% 以上となり、醤油製造において実用化の可能性のある酵母が 33 株見つかった。

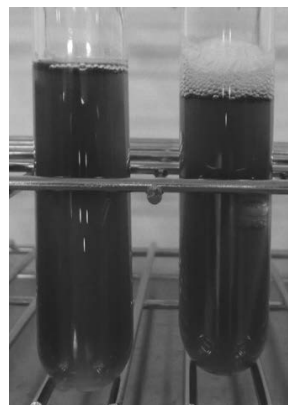


図 2 培養後の様子 (左: 膜無し, 右: 膜有り)

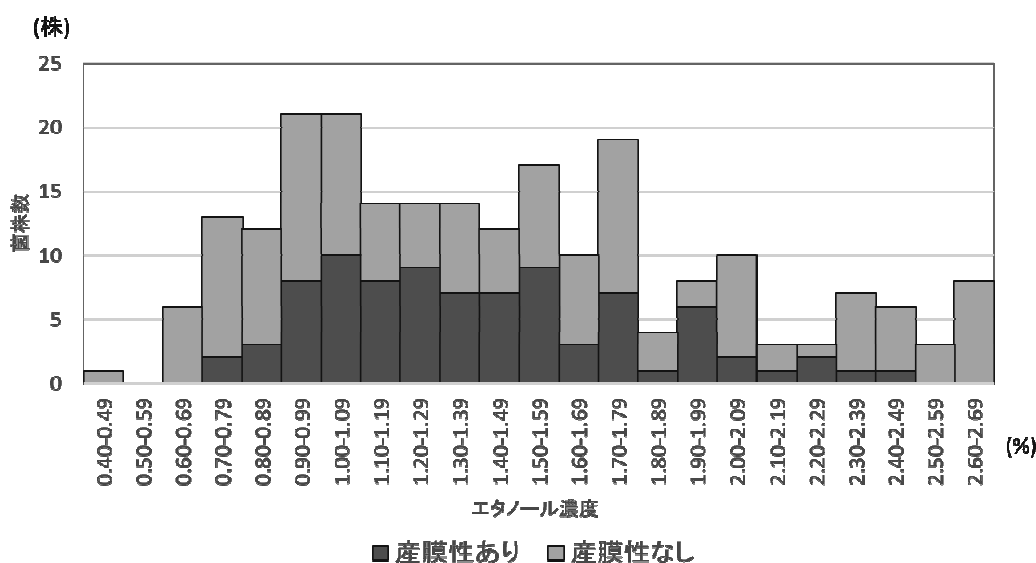


図3 産膜性の有無と培養後の培地のエタノール濃度

3-3 乳酸菌のGABA生成能と耐酸性

TLCを行った結果、300株中32株でGABAの標品と同じ位置にバンドが現れ、GABAの生成が確認された。表1の通り、GABA生成能は菌種によって大きく異なり、*Lb.brevis*から最も多くのGABA生成株が得られた。

表1 試験に用いた菌株の属種と数

MALDI-TOFMSで同定した属種	試験した株数	GABAを生成した株数
<i>Lb.paracasei</i>	113	0
<i>Lb.plantarum</i>	91	0
<i>Lb.brevis</i>	56	29
<i>Lb.satsumensis</i>	15	0
<i>Lb.parabuchneri</i>	10	0
<i>Lb.hilgardii</i>	8	2
<i>Lb.buchneri</i>	7	1

各pHでの増殖の有無、そこから推測される生育下限pHと、分類された菌株数を表2にまとめた。いずれの菌株も、培地のpHを下げていくと、通常のMRS培地(pH6.5±0.2)で培養した時に比べ、増殖性は悪くなっていた。pH4と3.5のMRS培地では増殖するが、pH3ではしない株が最も多く、これらの株の生育下限pHは3.0~3.4の間にあると考えら

れた。pH3でも増殖したのは*Lb.paracasei* 2株、*Lb.brevis* 4株、*Lb.satsumensis* 2株の計8株であった。

表2 低pH MRS 培地での増殖性

生育下限 pH	増殖性			菌株数
	pH4	pH3.5	pH3	
4 以上	-	-	-	9
3.5~4	+	-	-	81
3~3.4	+	+	-	202
3 未満	+	+	+	8

4 まとめ

県内の発酵食品等から約3,700株の微生物を分離し、約3,100株の属種を同定した。その中から食品に活用できる可能性のある酵母、乳酸菌が多数得られた。さらに、醤油酵母と乳酸菌についてそれぞれ2つの条件でスクリーニングを行い、より実用性の高い菌株を絞り込むことができた。

- 1) 産膜性がなく、エタノールを2%以上生成する醤油酵母 *Z.rouxii* 33株
- 2) GABAを生成する乳酸菌 *Lb.brevis* 29株、*Lb.hilgardii* 2株、*Lb.buchneri* 1株
- 3) pH3で増殖する耐酸性をもつ乳酸菌 *Lb.paracasei* 2株、*Lb.brevis* 4株、*Lb.satsumensis* 2株

今後はこれらの有用菌株を食品製造に活用していきたい。

5 参考文献

- 1) 喜田珠光, 高山清子, 水谷政美, 山本英樹, 祝園秀樹, 藤田依里: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **61**, 61-63(2016)
- 2) 中台忠信: 醤油の研究と技術, **35-4**, 294-309(2009)
- 3) 中台忠信: 醤油の研究と技術, **32-6**, 348-360(2006)
- 4) 全国味噌技術会: 味噌技術ハンドブック付基準みそ分析法, **62**(1995)
- 5) 日本乳酸菌学会 編: 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会, 340-343(2010)
- 6) 八十川大輔, 中川良二、能登裕子: 北海道立食品加工研究センター報告, **8**, 25-28(2009)
- 7) 小崎道雄、内村泰, 岡田早苗: 乳酸菌実験マニュアル, 朝倉書店, 52-54(1992)

Effects of blueberry leaf and stem extracts on hepatic lipid levels in rats consuming a high-sucrose diet

Yasushi Matsuura^{1,2}, Hiroyuki Sakakibara^{1,3}, Maho Kawaguchi³, Emi Murayama³,
Daigo Yokoyama¹, Chizuko Yukizaki², Hisato Kunitake^{1,3}, and Masanobu Sakono^{1,3}

¹Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, Gakuen Kibana-dai Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan; ²Miyazaki Prefectural Food Research and Development Center, 16500-2 Higashi-Kaminaka, Sadowara-cho, Miyazaki 880-0303, Japan; ³Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Gakuen Kibana-dai Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan.

Corresponding author: Masanobu Sakono, PhD, Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, Gakuen Kibana-dai Nishi, Miyazaki 889-2192, Japan.

Submission Date: July 30th, 2018, **Acceptance Date:** September 28th, 2018, **Publication Date:** September 30th, 2018

Citation: Matsuura Y., Sakakibara H., Kawaguchi M., Murayama E., Yokoyama D., Yukizaki C., Kunitake H., Sakono M.. Effects of blueberry leaf and stem extracts on hepatic lipid levels in rats consuming a high-sucrose diet. *Functional Foods in Health and Disease* 2018; 8(9): 447-461. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v8i9.538>

ABSTRACT

Background: Blueberry stems, a by-product of blueberry leaf tea production, are typically discarded. We evaluated the effects of hot-water extracts of rabbiteye blueberry (*Vaccinium virgatum* Aiton; RB species) leaves and stems on hepatic lipid levels in rats consuming a high-sucrose diet.

Methods: Male Sprague-Dawley rats were divided into groups that received a control high-sucrose diet alone or supplementation with 2.0% blueberry leaf extract or 0.5% or 2.0% blueberry stem extract. Blood and hepatic lipid levels, hepatic lipogenic enzyme activity, and hepatic quercetin metabolites were evaluated after 28 days of *ad libitum* consumption.

Results: Supplementation with the extracts did not affect body weight gain, food intake, liver and white adipose tissue weights, or serum lipid levels. Hepatic triglyceride and total cholesterol levels were reduced in the groups that received 2.0% supplementation of either extract. Hepatic malic enzyme activity was also reduced in those groups. Quercetin and its glycosides, the major polyphenols identified in the extracts, accumulated in the liver as quercetin aglycone and quercetin metabolites.

Conclusion: We demonstrated how daily consumption of blueberry leaf and stem extracts can decrease hepatic lipid levels, potentially downregulating malic enzyme activity. These effects were intensive in leaf extracts. The active compounds existed in both extracts may be quercetin and its glycosides. Therefore, blueberry stems and leaves may be an attractive candidate novel functional food.

Keywords: Blueberry leaf, blueberry stem, quercetin, hepatic lipid, rat, functional food

BACKGROUND

Evidence indicates that multiple beneficial ingredients exist in daily food items. Foods rich in beneficial ingredients are termed “functional foods.” Their daily consumption is believed to offer health-promotion and disease-prevention benefits. For example, the consumption of berry fruits may prevent carcinogenesis, liver damage, obesity, inflammation, and glaucoma, and improve eyesight [1-4]. Berries are rich in flavonoids, mainly anthocyanins and phenolic acids/esters such as chlorogenic acid [3, 5]. These ingredients are known to exert beneficial effects such as antioxidant activity [6].

However, the leaves of berry-bearing plants have typically been ignored and discarded, although they contain high quantities of bioactive ingredients such as phenolic acids/esters, flavonoids, and procyanidins [7] which exert anti-diabetic and anti-glycation effects [8,9]. Hot-water leaf extracts of blueberry have been reported to have hepatic lipid-lowering, anti-hepatitis C virus, and hypolipidemic effects to suppress the proliferation of adult T-cell leukemia cells and ameliorate insulin resistance [10-14]. These findings indicate that blueberry leaves may be a potential functional food. Moreover, blueberry leaf teas, are commercially available worldwide as hot-water extracts.

During the production of blueberry leaf tea, the plant stems are discarded as waste. If blueberry stems contain compounds with beneficial effects, the stems may offer a novel source of functional food. However, information on blueberry stems is limited. In this study, we focused on the stems of rabbiteye blueberry (*Vaccinium virgatum* Aiton; RB species), a major

blueberry species, and evaluated the effects of daily consumption of blueberry stems on hepatic lipid levels and hepatic lipogenic enzyme activity in rats consuming a high-sucrose diet.

METHODS

Chemicals

Cellulose, β -cornstarch, sucrose, vitamin mixture (AIN-76), and mineral mixture (AIN-76) were purchased from Oriental Yeast Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Casein, corn oil, DL-methionine, choline bitartrate, trans-cinnamic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid, ferulic acid, rutin (quercetin-3-*O*-rutinoside), cyanidin chloride, luteolin, apigenin, and kaempferol were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). P-coumaric acid was from MP Biomedicals, LLC (Santa Ana, CA, USA), chlorogenic acid was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), and quercetin was from ChromaDex (Irvine, CA, USA). β -glucuronidase/sulfatase from *Helix pomatia* (type H-5) and 3α -hydrosteroid dehydrogenase were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of the highest grade available.

Plant materials

Rabbiteye blueberry cultivar Kunisato No. 35 was cultivated in the Miyazaki area of Japan and taxonomically identified on the basis of morphological characteristics by author H.K. The fresh leaves and stems were separated in December 2012 (Figure 1). Then both leaves and stems were blanched, air-dried for 5 h (leaves) and 8 h (stems) using a hot-air dryer (FV-1000, ADVANTEC Ltd., Tokyo, Japan), and then powdered using an R-10 food processor (Robot Coupe Ltd., Vincennes, France). The blueberry leaf and stem powders were stored away from light at -20°C until extraction.

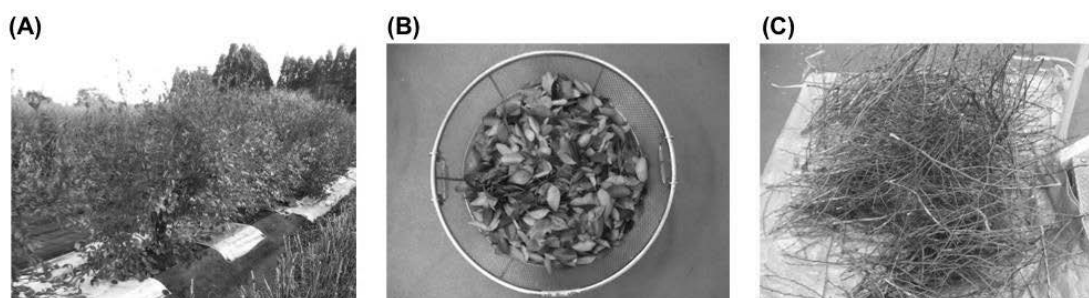


Figure 1. Rabbiteye blueberry (*Vaccinium virgatum* Aiton; RB species) used in the study. (A) General view of typical blueberry field. (B) Leaves. (C) Stems. Photographs by author Y.M.

Hot-water extraction

Blueberry leaf powder (0.5 kg) and stem powder (2.5 kg) were mixed with 50 L and 62.5 L of water respectively at 95°C . After agitation for 30 min, the filtrates were obtained via filtration

through 300-mesh nylon, and concentrated into approximately 1 L under reduced pressure using a rotary evaporator (CEP-lab, Okawara Mfg. Co. Ltd., Shizuoka, Japan). The concentrates were then lyophilized using a freeze dryer (Dura Dry MP, FTS Systems Inc., Stone Ridge, NY, USA). The leaf and stem yields were 49.4% and 12.0% respectively.

Institutional approval of the study protocol

All procedures for animal experiments were conducted according to the guidelines for the care and use of laboratory animals of the University of Miyazaki (Miyazaki, Japan). The experimental protocol was registered under the number 2010-013-3.

Animal experiments

Male Sprague-Dawley rats (4 weeks old) were obtained from Kyudo Co. Ltd. (Saga, Japan) and housed in an air-conditioned room (temperature: $23 \pm 1^\circ\text{C}$; humidity: $55 \pm 5\%$) under a 12-h dark/light cycle (light on between 9:00 and 21:00) with free access to deionized water and laboratory chow (Type CE-2, CLEA Japan, Tokyo, Japan). After a 1-week acclimatization, the animals were submitted to the study according to the following protocol.

Twenty-eight rats were randomly divided into four groups. The first group consumed AIN-76 control diets that contained 72.2% carbohydrate, 5.5% fat, and 22.2% protein as a percentage of the total energy (Table 1). The second group consumed AIN-76 diets containing 2.0% blueberry leaf extracts (BLEx). The third and fourth groups consumed 0.5% and 2.0% blueberry stem extract (BSEx). After 28 days, blood was drawn from the abdominal vein under anesthesia with sodium pentobarbital (30 mg/kg body weight) without fasting. After 30 min at room temperature, serum was separated by centrifugation at $1,000 \times g$ for 20 min. Livers and white adipose tissue were removed and weighed. Liver and serum samples were stored at -80°C for subsequent analysis, with the exception of liver samples analyzed for enzymatic activities.

Table 1. Composition of experimental high-sucrose diets (%).

Constituent	Control diet	BLEx-containing diet 2.0%	BSEx-containing diet	
			0.5%	2.0%
Sucrose	50.0	48.0	49.5	48.0
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
β -Cornstarch	15.0	15.0	15.0	15.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0
Corn oil	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Blueberry extract	—	2.0	0.5	2.0

BLEx, hot-water extract of blueberry leaves; BSEx, hot-water extract of blueberry stems.

Blood chemistry

Serum lipid parameters (triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein [HDL] cholesterol, phospholipids) were analyzed using test kits from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. All standards were used in accordance with the manufacturer's instructions.

Hepatic lipid analysis

Lipids from liver samples were extracted as described by Folch and colleagues [15]. The extracts were saponified to measure total cholesterol as described by Sperry and Webb [16]. Triglycerides and phospholipid quantities were analyzed using classical methods [17, 18].

Enzymatic activities

Cytosolic fractions were prepared from fresh liver samples using the modified method described by Graham [19]. Briefly, the liver samples were immediately placed in 10× ice-cold buffer (pH 7.4) containing 0.25 mol/L sucrose, 0.01 mol/L tris(hydroxymethyl) aminomethane-HCl, and 1 μmol/L ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt and then homogenized on ice. The homogenates were centrifuged at 700 ×g for 10 min at 4°C. The supernatants were further centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4°C. Finally, the cytosolic fractions were obtained by centrifugation at 126,000 × g for 60 min at 4°C. Enzymatic activities of fatty acid synthase (FAS), malic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), and carnitine palmitoyltransferase II (CPT2) were evaluated according to previous methods [20-23]. Protein contents in the cytosolic fractions were quantified using a Lowry method [24] with slight modifications.

Polyphenol analysis in blueberry leaf and stem extracts

Polyphenols in blueberry leaf and stem extracts were analyzed using our previous method [5]. Briefly, the stored powder (50 mg) was placed in a test tube and mixed with 4 mL of 62.5% aqueous methanol containing 0.5 mg/mL of *tert*-butylhydroquinone and 1 mL of 2N HCl. The test tube was heated at 90°C for 2 h and then the sample was extracted with two volumes of ethyl acetate. The extract was dried under nitrogen gas. The extract and another aliquot of the stored powder (50 mg) were dissolved in 500 μL of methanol containing 0.5% trifluoroacetic acid and filtered through a 0.2-μm membrane filter (SLLGH04NK, Millex-LG, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) prior to analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Extraction of quercetin metabolites from liver

One-gram aliquots of liver were mixed with 0.5 mL of ice-cold acetate buffer (pH 5.0) and

homogenized at 3,800 rpm for 2 min (Micro Smash MS-100, TOMY Seiko Co., Tokyo, Japan). The homogenate was transferred to another test tube and 4.5 mL of ice-cold acetate buffer (pH 5.9) were added. After mixing well, the supernatant was collected by centrifugation (3,000 rpm, 10 min, 4°C) and then incubated with and without β -glucuronidase/sulfatase (100 units) for 45 min at 37°C. Next, 5 mL of ethyl acetate were added and mixed well. After centrifugation at $1,500 \times g$ for 10 min at 4°C, a 2-mL aliquot of the supernatant was dried with a centrifugal concentrator (CC-105; TOMY Seiko Co.). The residues were dissolved in 100 μ L of methanol containing 0.5% trifluoroacetic acid and filtered through a 0.2- μ m membrane filter before HPLC analysis.

HPLC diode-array detection (DAD)

Polyphenols were analyzed by HPLC in combination with DAD as described in our previous report [5] with small modifications. The HPLC system used was a JASCO LC-NetII/ADC system control program (Tokyo, Japan) equipped with a ChromNAV chromatography data station, PU-2089 Plus pump, AS-2057 Plus autosampler, CO-2060 Plus column oven, and MD-2018 Plus DAD system to monitor all 200–600 nm wavelengths. The column, Capcell Pak UG120 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, 5 μ m, Shiseido Co. Ltd., Tokyo Japan), was used at 35°C under the following conditions.

Condition I for analysis of polyphenols in leaf and stem extracts: Gradient elution was performed with solution A, composed of 50 mM of sodium phosphate buffer (pH 3.3) and 10% methanol, and solution B, containing 70% methanol, delivered at a flow rate of 1.0 mL/min as follows: Initially 100% of solution A; for the next 15 min, 70% A; for another 30 min, 65% A; for the next 20 min, 60% A; then 5 min of 50% A, and then finally 0% A for 25 min.

Condition II for analysis of quercetin metabolites in liver samples: Isocratic elution was performed with 60% methanol containing 50 mM of sodium phosphate buffer (pH 3.3).

Statistical analysis

Data were analyzed using StatView for Windows (version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA) and one-way analysis of variance. The Dunnett method was applied for multiple comparisons between control and treatment groups. Results were considered significant if the probability of error was $<5\%$.

RESULTS

Food intake and body and organ weights

After 28 days, body weight, average weight gain, food intake, and liver and white adipose tissue weights did not differ between the control diet and treatment groups (Table 2).

Table 2. Effects of dietary blueberry leaf and stem extracts on biological parameters.

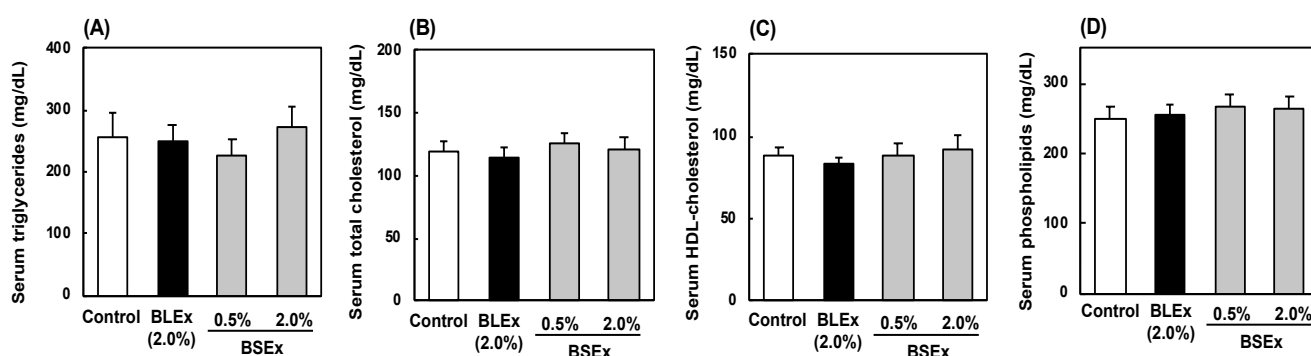
Parameter	Control diet	BLEx-containing diet 2.0%	BSEx-containing diet	
			0.5%	2.0%
Body weight (g)				
initial (day 0)	145 ± 3	145 ± 3	145 ± 3	145 ± 3
final (day 28)	372 ± 8	358 ± 11	364 ± 11	367 ± 10
average gain (g/day)	8.1 ± 0.3	7.6 ± 0.3	7.8 ± 0.3	7.9 ± 0.3
Food intake (g/rat/day)	20.2 ± 0.5	19.5 ± 0.7	20.2 ± 0.7	20.4 ± 0.4
Total quercetin consumption (μmol/rat/day) ^a	–	34.5 ± 1.2	1.4 ± 0.1	5.6 ± 0.1
Organ weight (g/100 g body weight)				
Liver	4.98 ± 0.12	4.74 ± 0.09	4.84 ± 0.07	4.86 ± 0.13
White adipose tissue				
epididymal	2.08 ± 0.16	2.09 ± 0.20	2.11 ± 0.17	2.20 ± 0.21
perirenal	1.68 ± 0.10	1.62 ± 0.12	2.00 ± 0.23	1.70 ± 0.12
mesentery	1.72 ± 0.13	1.54 ± 0.10	1.83 ± 0.16	1.66 ± 0.11

BLEx, hot-water extract of blueberry leaves; BSEx, hot-water extract of blueberry stems. Values indicate mean ± standard error (n = 7).

^aTotal amounts of quercetin glycosides + rutin + quercetin.

Serum lipid parameters

After 28 days, serum levels of triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, and phospholipids did not differ between the control and treatment groups (Figure 2).

**Figure 2.** Effects of dietary blueberry leaf and stem extracts on serum lipid levels.

(A) Serum triglycerides. (B) Serum total cholesterol. (C) Serum high-density lipoprotein (HDL) cholesterol. (D) Serum phospholipids. Values indicate mean ± standard error (n = 7). BLEx, blueberry leaf extract; BSEx, blueberry stem extract.

Hepatic lipid levels

We quantified major hepatic lipids such as triglycerides, total cholesterol, and phospholipids. Hepatic triglyceride levels decreased notably in rats fed 2.0% BLEx or 2.0% BSEx, but these decreases did not reach statistical significance (Figure 3A). Levels of total cholesterol

decreased in all treatment groups and rats fed 2.0% BLEx had significantly lower levels of total cholesterol than the controls (Figure 3B). Hepatic phospholipids did not differ between the control and treatment groups (Figure 3C).

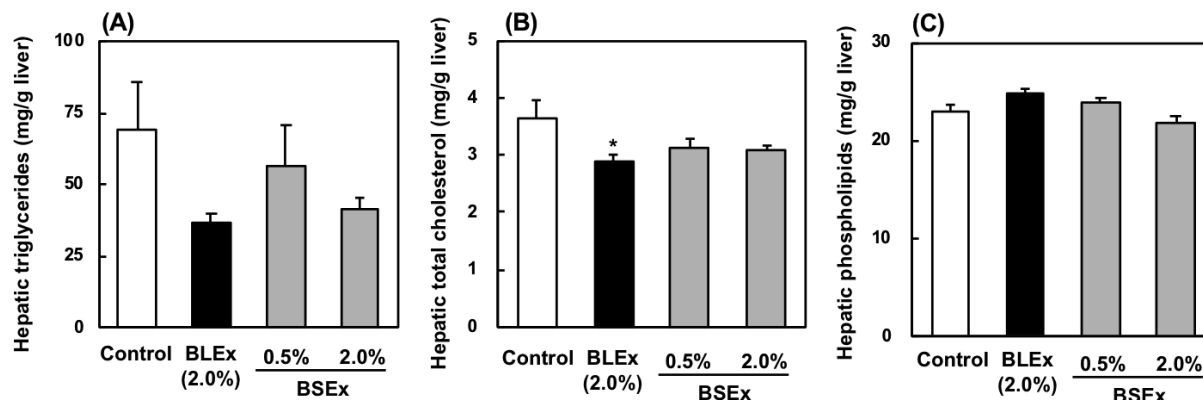


Figure 3. Effects of dietary blueberry leaf and stem extracts on hepatic lipid levels.

(A) Hepatic triglycerides. (B) Hepatic total cholesterol. (C) Hepatic phospholipids. Values indicate mean ± standard error (n = 7). * $p < 0.05$ vs. the control group (Dunnett's test). BLEx, blueberry leaf extract; BSEx, blueberry stem extract.

Enzymatic activities associated with hepatic lipid metabolism

Daily consumption of 2.0% BLEx or BSEx significantly inhibited hepatic malic enzyme activity (Figure 4A). The enzymatic activities of FAS, G6PDH, and CPT2 were not affected by supplementation with 2.0% BLEx or 0.5% or 2.0% BSEx (Figure 4B–D).

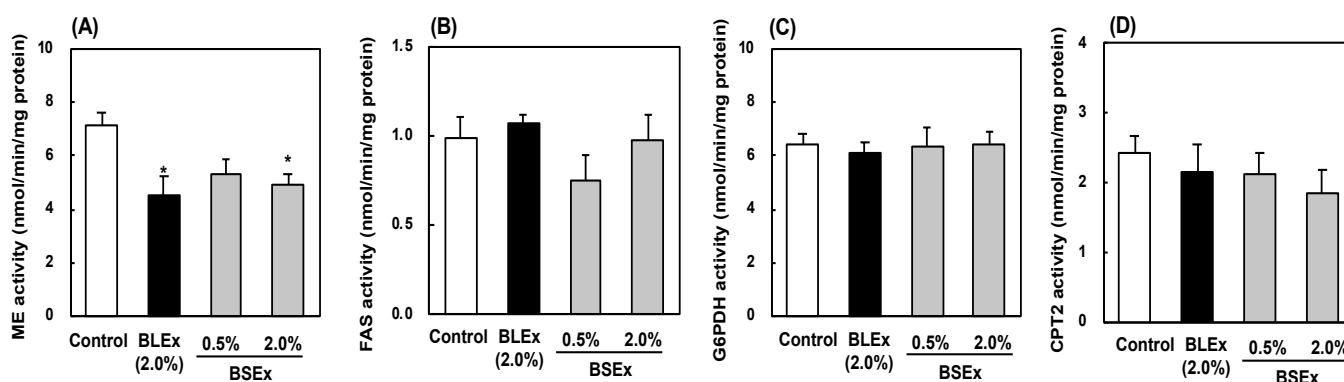


Figure 4. Effects of blueberry leaf and stem extracts on enzymatic activity related to hepatic lipid metabolism.

(A) malic enzyme (ME). (B) Fatty acid synthase (FAS). (C) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). (D) Carnitine palmitoyltransferase II (CPT2). Values indicate mean ± standard error (n = 7). * $p < 0.05$ vs. the control group (Dunnett's test). BLEx, blueberry leaf extract; BSEx, blueberry stem extract.

Polyphenols in blueberry leaves and stems

Analysis without hydrolysis identified more than 10 peaks at 370 nm. Two of these peaks were consistent with rutin (quercetin-3-*O*-rutinoside) and quercetin standards (Table 3). The other peaks did not correspond to any standard used in this study, but displayed a spectrum typical of cinnamic acid or quercetin. Therefore, we hydrolyzed and analyzed it again. Hydrolysis yielded a single peak, which corresponded to the quercetin standard in retention time and spectrum. This meant that the peaks indicated a spectrum similar to that of quercetin aglycone. Then we examined them as quercetin glycosides with the calibration curve of rutin. Additionally, the peaks that indicated a spectrum similar to that of cinnamic acid were calculated as cinnamic acids using the calibration curve of chlorogenic acid. Table 3 summarizes the quantities of phenolic compounds in hot-water BLEx and BSEx; quantities were higher in BLEx.

Table 3. Quantities of phenolic compounds in hot-water extracts from blueberry leaves and stems.

Compounds	BLEx	BSEx
	$\mu\text{mol/g extract}$	
Total cinnamic acids ^a	345.7	20.9
Total quercetin glycosides ^b	85.9	11.6
Rutin	11.1	2.1
Quercetin	1.5	0.1

^aAmounts of total cinnamic acids were calculated using chlorogenic acid.

^bAmounts of total quercetin glycosides (with the exception of rutin) were calculated using rutin.

BLEx, blueberry leaf extract; BSEx, blueberry stem extract.

Quercetin accumulation in liver

In rats that consumed diets containing 2.0% BLEx or 0.5% or 2.0% BSEx, the mean daily intake of total quercetin (quercetin + rutin + quercetin glycosides) was 34.5, 1.4, and 5.6 $\mu\text{mol/rat/day}$ respectively (Table 2). Quercetin was detected in liver samples from rats that consumed BSEx (Figure 5A). After hydrolysis, the peak identified as increased quercetin (Figure 5B). Table 4 lists the quercetin amounts measured in liver samples. No quercetin was detected in liver samples from rats that consumed the control diet. Total quercetin and quercetin glycoside amounts in the livers of rats that consumed BLEx were considerably higher than the amounts measured in livers from rats that consumed BSEx.

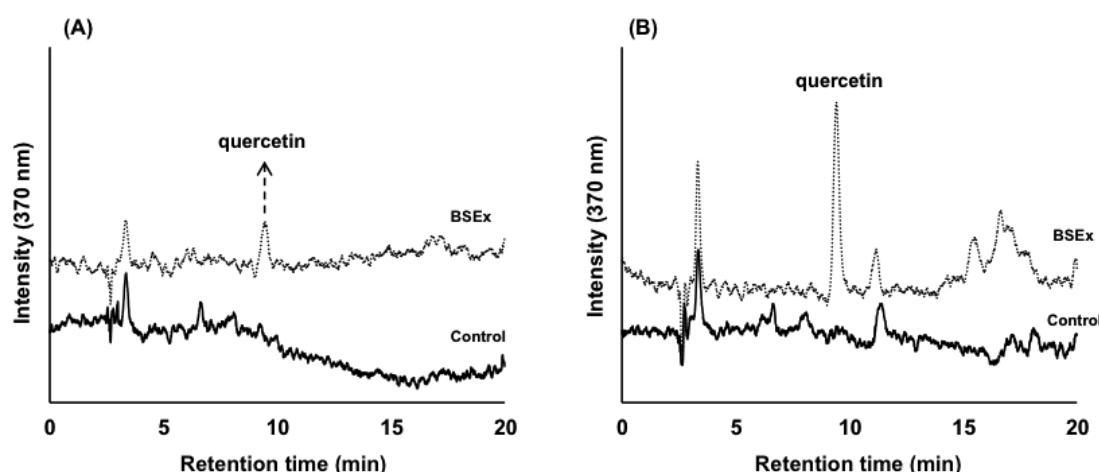


Figure 5. Typical high-performance liquid chromatography readouts at 370 nm of quercetin accumulation.

Quercetin accumulation in livers of rats consuming a control diet (solid line) and blueberry stem extract (BSEx, dotted line), and the accumulated quercetin levels before (A) and after (B) hydrolysis.

Table 4. Quercetin amounts in livers of rats fed blueberry leaf and stem extracts.

		BLEx-containing	BSEx-containing diet	
Control diet		diet 2.0%	0.5%	2.0%
pmol/g liver				
Aglycone	u.d.	46.1 (u.d.–155.6)	u.d.	17.9 (u.d.–46.3)
Metabolites	u.d.	146.2 (41.7–190.8)	18.0 (u.d.–48.2)	20.6 (6.4–29.7)
Total	u.d.	199.3 (150.6–251.7)	12.9 (u.d.–48.2)	38.5 (24.9–58.9)

Data indicate mean (minimum–maximum). BLEx, blueberry leaf extract; BSEx, blueberry stem extract; u.d., under the detection limit.

DISCUSSION

Blueberry leaves and fruit are potential functional food candidates. However, blueberry stems have been overlooked. In this study, we evaluated the effects of *ad libitum* consumption of hot-water extracts of blueberry stem and leaves on serum and hepatic lipid levels in rats. Rodent studies commonly use a purified diet, the American Institute of Nutrition AIN-93 formula [25] that substitutes cornstarch for the sucrose in the older AIN-76 diet. High dietary concentrations of sucrose have been associated with several metabolic complications, including dyslipidemia and fatty liver [26–28]. We used the sucrose-based AIN-76 diet so that our control rats would present mild dyslipidemia.

The addition of BLEx or BSEx to the AIN-76 diet in treatment groups did not affect body

weight, weight gain, food intake, or the weights of the liver and white adipose tissue. Triglyceride and total cholesterol levels in serum collected from control rats were much higher than those reported in fasted rats administered a normal diet (AIN-93) [29], confirming that the high-sucrose diet successfully induced mild dyslipidemia. Serum lipid levels in rats consuming BLEx did not differ from levels in the controls, although hepatic total cholesterol levels decreased significantly, in accordance with the findings of Yuji and colleagues for a different blueberry species [13]. In rats consuming 2.0% BSEx, serum lipid levels did not differ from levels in the controls, and while some hepatic lipid levels were reduced, the reduction did not reach statistical significance. We also evaluated hepatic lipogenic enzyme activity [30] and discovered that malic enzyme activity decreased in the rats that consumed a diet containing 2.0% BLEx or BSEx. These data indicate that consumption of 2.0% BSEx or BLEx may decrease hepatic lipid levels, perhaps by downregulating malic acid activity.

We screened the extracts to identify the ingredients responsible for the hepatic lipid-lowering effects. Vegetables, fruits, and teas rich in polyphenols have been recognized as providing beneficial effects [5]. Therefore, we quantified the polyphenolic compounds in BLEx and BSEx, and identified them as cinnamic acid, quercetin, and quercetin glycosides. The quantities of cinnamic acid and quercetin were much higher in BLEx than in BSEx. Quercetin has been reported to exhibit anti-obesity activity and to regulate lipid metabolism in diabetes mellitus [31-33]. We found quercetin aglycone in the liver of rats that consumed diets supplemented with 2.0% BLEx or BSEx, as well as quercetin metabolites. This indicates that ingested quercetin and its metabolites accumulate in the liver and may be a factor in reducing hepatic lipid levels. Metabolites such as quercetin 3,4'-di-O- β -glucoside, quercetin 3-O- β -glucoside, and quercetin 4'-O- β -glucoside are known to circulate in the bloodstream [34]. Ingested quercetin is known to be present as metabolites in the blood and organs in rats consuming a normal diet, although not in its aglycone form [35]. We demonstrated how quercetin and its glycosides in blueberry plant extracts could be absorbed and accumulated as the aglycone form and as hepatic metabolites. This apparent contrast can be explained: A high-carbohydrate diet stimulates an inflammatory response in rats [36] and β -glucuronidase released from the liver may hydrolyze quercetin conjugates to free quercetin aglycone at the site of inflammation [37]. Another possible candidate for reducing hepatic lipid levels might be metabolites involvement of glycoside parts and cleavage metabolites after absorption. These are our future study topics.

CONCLUSION

The present study demonstrated that daily consumption of hot-water extracts from rabbiteye

blueberry stems exerts decreasing tendency in hepatic lipid levels, perhaps by downregulating malic enzyme activity. These effects were intensive in daily consumption of leaf extracts. Additionally, the active candidates existed in both extracts may be quercetin and its glycosides, although their biological evidences remain unclear. Thus, blueberry stems and leaves may be an attractive candidate functional food for reducing hepatic lipid levels and ameliorating dyslipidemia. More detailed studies of the mechanism of action should be undertaken.

List of Abbreviations: BLEx, hot-water extracts of blueberry leaves; BSEx, hot-water extracts of blueberry stems; CPT, carnitine palmitoyltransferase; FAS, fatty acid synthase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; HDL, high-density lipoprotein; HPLC, high-performance liquid chromatography.

Competing Interests: There are no conflicts of interest to declare.

Authors' Contributions: M.S. and Y.M. designed the research. H.K. cultivated the blueberry leaves and stems. C.Y. and Y.M. prepared the blueberry leaf and stem extracts. Y.M., M.K., E.M., and H.S. conducted the research. D.Y. performed statistical analyses. Y.M., H.S., and M.S. wrote the manuscript. M.S. had primary responsibility for the final content. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments and Funding: We are deeply grateful to T. Yoshitake, T. Tsurusaki, Y. Hisatoyo, and Y. Ito (Laboratory of Nutritional Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) for their technical assistance with the animal study. The research was funded by Research and Development projects for application in promoting new policy of Agriculture, Forestry and Fisheries to C.Y., and JSPS KAKENHI grants 16H03040 and 17H00818 to H.S. We also thank Dean Meyer, PhD, ELS from Edanz Group (www.edanzediting.com/ac) for editing a draft of this manuscript.

REFERENCES

1. Bae M, Park YK, Lee JY: Food components with antifibrotic activity and implications in prevention of liver disease. *J Nutr Biochem* 2018, 55:1–11.
2. Davidson KT, Zhu Z, Balabanov D, Zhao L, Wakefield MR, Bai Q, Fang Y: Beyond conventional medicine - a Look at blueberry, a cancer-fighting superfruit. *Pathol Oncol Res* 2017, doi: 10.1007/s12253-017-0376-2.

3. Lee YM, Yoon Y, Yoon H, Park HM, Song S, Yeum KJ: Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. *Nutrients* 2017, 9:1089.
4. Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D: Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res* 2007, 51:675–683.
5. Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K: Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J Agric Food Chem* 2003, 51:571–581.
6. Sakakibara H, Ashida H, Kanazawa K: A novel method using 8-hydroperoxy-2'-deoxyguanosine formation for evaluating antioxidative potency. *Free Radic Res* 2002, 36:307–316.
7. Ferlemi AV, Lamari FN: Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants* 2016, 5:17.
8. Cignarella A, Nastasi M, Cavalli E, Puglisi L: Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: a comparison with ciprofibrate. *Thromb Res* 1996, 84:311–322.
9. McIntyre KL, Harris CS, Saleem A, Beaulieu LP, Ta CA, Haddad PS, Arnason JT: Seasonal phytochemical variation of anti-glycation principles in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*). *Planta Med* 2009, 75:286–292.
10. Inoue N, Nagao K, Nomura S, Shirouchi B, Inafuku M, Hirabaru H, Nakahara N, Nishizono S, Tanaka T, Yanagita T: Effect of *Vaccinium ashei* reade leaf extracts on lipid metabolism in obese OLETF rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011, 75:2304–2308.
11. Kai H, Fuse T, Kunitake H, Morishita K, Matsuno K: Comparison of cultivars and seasonal variation in blueberry (*Vaccinium* Species) leaf extract on adult T-cell leukemia cell line growth suppression. *Medicines (Basel)* 2014, 1:3–11.
12. Takeshita M, Ishida Y, Akamatsu E, Ohmori Y, Sudoh M, Uto H, Tsubouchi H, Kataoka H: Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA. *J Biol Chem* 2009, 284:21165–21176.
13. Yuji K, Sakaida H, Kai T, Fukuda N, Yukizaki C, Sakai M, Tsubouchi H, Kataoka H: Effect of dietary blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) leaves on serum and hepatic lipid levels in rats. *J Oleo Sci* 2013, 62:89–96.
14. Yamasaki M, Matsuyama Y, Hayasegawa R, Hamada K, Nishiyama K, Kai T, Kamenaga K, Arakawa T, Tari H, Shimizu Y, Matsuura Y, Yukizaki C: Blueberry

- (*Vaccinium virgatum* Aiton) leaf infusion ameliorates insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. Food Sci Tech Res 2015, 43:913–921.
15. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 1957, 226:497–509.
 16. Sperry WM, Webb M: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. J Biol Chem 1950, 187:97–106.
 17. Fletcher MJ: A colorimetric method for estimating serum triglycerides. Clin Chim Acta 1968, 22:393–397.
 18. Rouser G, Siakotos AN, Fleischer S: Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. Lipids 1966, 1:85–86.
 19. Graham J, Subcellular fractionation. In *A Practical Approach*, Graham, J.; Rickwood, D., Eds. Oxford University Press: Oxford, 1997: 1–29.
 20. Kelley DS, Kletzien RF: Ethanol modulation of the hormonal and nutritional regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in primary cultures of rat hepatocytes. Biochem J 1984, 217:543–549.
 21. Kelley DS, Nelson GJ, Hunt JE: Effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. Biochem J 1986, 235:87–90.
 22. Pearson D, Chase J, Tubbs P: The assay of (-)-carnitine and its o-acyl derivatives. Methods in Enzymology 1969, 14:622–625.
 23. Ochoa S: "Malic"-enzyme. Methods in Enzymology 1955, 1:739–753.
 24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951, 193:265–275.
 25. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr.: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr 1993, 123:1939–195.
 26. Gerber PA, Berneis K: Regulation of low-density lipoprotein subfractions by carbohydrates. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2012, 15:381–385.
 27. Reeves PG: Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J Nutr 1997, 127:838S–841S.
 28. Yokoyama D, Sakakibara H, Fukuno H, Kimura K, Hori A, Nara T, Kato K, Sakono M: Whey protein-hydrolyzed peptides diminish hepatic lipid levels in rats consuming high-sucrose diets. Food Sci Tech Res 2016, 22:631–638.
 29. Shrestha S, Ehlers SJ, Lee JY, Fernandez ML, Koo SI: Dietary green tea extract lowers plasma and hepatic triglycerides and decreases the expression of sterol regulatory

- element-binding protein-1c mRNA and its responsive genes in fructose-fed, ovariectomized rats. *J Nutr* 2009, 139:640–645.
30. Gammone MA, D'Orazio N: Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *Mar Drugs* 2015, 13:2196–2214.
31. Forney LA, Lenard NR, Stewart LK, Henagan TM: Dietary quercetin attenuates adipose tissue expansion and inflammation and alters adipocyte morphology in a tissue-specific manner. *Int J Mol Sci* 2018, 19:E895.
32. Peng J, Li Q, Li K, Zhu L, Lin X, Lin X, Shen Q, Li G, Xie X: Quercetin improves glucose and lipid metabolism of diabetic rats: involvement of Akt signaling and SIRT1. *J Diabetes Res* 2017, 2017:3417306.
33. Ting Y, Chang WT, Shiau DK, Chou PH, Wu MF, Hsu CL: Antiobesity efficacy of quercetin-rich supplement on diet-induced obese rats: effects on body composition, serum lipid profile, and gene expression. *J Agric Food Chem* 2018, 66:70–80.
34. Moon JH, Nakata R, Oshima S, Inakuma T, Terao J: Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, 279:R461–R467.
35. Yeh SL, Lin YC, Lin YL, Li CC, Chuang CH: Comparing the metabolism of quercetin in rats, mice and gerbils. *Eur J Nutr* 2016, 55:413–422.
36. Ajiboye TO, Aliyu H, Tanimu MA, Muhammad RM, Ibitoye OB: *Dioscoreophyllum cumminsii* (Stapf) Diels leaves halt high-fructose induced metabolic syndrome: Hyperglycemia, insulin resistance, inflammation and oxidative stress. *J Ethnopharmacol* 2016, 192:471–479.
37. Shimoi K, Nakayama T: Glucuronidase deconjugation in inflammation. *Methods Enzymol* 2005, 400:263–272.



平成30年度・第63号

宮崎県工業技術センター
宮崎県食品開発センター
研 究 報 告

令和元年11月1日発行

宮崎県工業技術センター／〒880-0303

宮崎県宮崎市佐土原町東上那珂16500-2

TEL 0985-74-4311

FAX 0985-74-4488

宮崎県食品開発センター／〒880-0303

宮崎県宮崎市佐土原町東上那珂16500-2

TEL 0985-74-2060

FAX 0985-74-4488