

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660202

研究課題名(和文) ナノバブルによる水の物性変化と農作物の代謝促進への適用

研究課題名(英文) Change in characteristics of water by nanobubble and its application to metabolic stimulation of agricultural produce

研究代表者

大下 誠一(Oshita, Seiichi)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：00115693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ナノバブルによる活性酸素種(ROS)の発生と種子発芽に及ぼす影響について検討した。蛍光試薬APFによりナノバブル水でROSの発生が確認され、その量はナノバブルの数密度に正比例した。APFによる蛍光強度は、0-1 mMの範囲で過酸化水素濃度とも比例した。これを用いて酸素ナノバブル水及び空気・窒素混合ナノバブル水の酸化能は、それぞれ、0.5及び0.3 mMの過酸化水素水に匹敵すると推察された。一定の浸漬時間におけるオオムギ種子の発芽率及び内生のROS濃度は、空気・窒素混合ナノバブル水と0.3 mMの過酸化水素水の場合、蒸留水よりも高くなった。

以上、種子発芽促進のメカニズムの1つが提示された。

研究成果の概要(英文)：The production of ROS by nanobubbles (NBs) and its effect on seed germinations were investigated. The fluorescence response of APF to NB water indicated that NBs could produce ROS and the amount of ROS had a positive correlation with the NB number density. The fluorescence intensity of APF increases linearly with the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the range of 0-1 mM. The oxidative capacities represented by amount of ROS of oxygen NB water and gas-mixture (air + nitrogen) NB water were estimated to be equivalent to 0.5 and 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectively.

The germination rate at each observation times of barley seeds submerged in gas-mixture NB water and 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions were both higher than those submerged in distilled water. The amounts of superoxide radicals in the seeds submerged in gas-mixture NB water and in 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution were similar and significantly higher than those in the distilled water. These results indicated one of mechanisms for acceleration of seed germination.

研究分野：生物プロセス工学

キーワード：ナノバブル 活性酸素 種子発芽 バルク水の流動性 プロトン緩和時間

1. 研究開始当初の背景

マイクロバブルやナノバブルを含む水は、廃水の浄化、水質改善、殺菌、脱色、洗浄、さらには生物の生理活性の促進効果などが報告され、様々な分野において注目を集めている。その特徴には、(1)比表面積が大きいことによる気液界面での化学反応の促進、(2)バブル表面に正/負の電位(ゼータ電位)を有すること、(3)気体の溶解促進効果、(4)・OHラジカルの生成、(5)生理活性効果を有することなどがあり、オゾンバブルを利用した廃水の浄化や繊維の脱色など、実用化されている技術もある (Takahashi et al., 2003; 大成, 2005; 芹澤, 2007)。しかし、生理活性効果については、種子の発芽と根の成長促進 (Nakao et al., 2008)、ウコンの活性促進 (Hashimoto et al., 2011)、藻類の成長促進 (Zimmerman et al., 2011)などの報告があるが、その理由は明らかでない。これが解明されれば、生物生産に大きなインパクトを与える技術の確立が期待される。

2. 研究の目的

ナノバブルはサブミクロンオーダーの気泡で、マイクロバブルと共に微細な気泡を構成する。これを含有する水(ナノバブル水)が生物活性を促進することが指摘されてきた(Ago et al., 2005)。申請者らも、ナノバブル水において、植物細胞の原形質流動速度が増大し、種子の発芽率も向上する実験結果を確認した(大下ら, 2011; 大塚ら, 2012)。この代謝促進の理由が解明できれば、農業生産に画期的な貢献が期待される。

生理活性に関連して、発芽や幼根の伸長時には活性酸素種(ROS: ヒドロキシルラジカル(・OH) やスーパーオキシドアニオンラジカル(O<sub>2</sub><sup>・-</sup>

3. 研究の方法

試料にはオオムギ種子(コビンカタギ, 2012年収穫)を用いた。蒸留水をコントロールとし、ナノバブル(NBs)は、マイクロバブル発生装置(OM4-MDG-020, オーラテック株)に純空気と窒素の混合ガスを導入して、蒸留水と同じ溶存酸素濃度(DO)に調節しながら60分稼働させた後、一定時間経過してマイクロバブルが消滅した後のNBs水を用いた。オオムギ種子50粒をコントロール水とNBs水に浸漬し、12時間後の発芽率を比較した。さらに、発芽後の種子をNBT染色し、ROS(O<sub>2</sub><sup>・-</sup>)で還元されて生じた不溶性のフォルマザンの吸光度を顕微分光装置(MSV-5000, JASCO Co. Ltd.)で測定した。また、リン酸緩衝液(0.1 M, PH 7.4)を調

製し、これにNBsを発生させ、ROS検出用の蛍光試薬APF(5mM, 積水メディカル株)をリン酸緩衝液で5000倍に希釈してNBs水に加え、・OHの発生量に対応する蛍光強度を測定した。測定には分光蛍光光度計(株)日立ハイテクノロジーズ, F-7000)を用いた。

4. 研究成果

4.1 種子の発芽率と幼根

Fig. 1に浸漬後12時間におけるオオムギ種子の発芽率を示す。3反復のいずれもナノバブル水(NB水)に浸漬した種子の発芽率が顕著に高く、平均値61%に対し、コントロールは43%であった。

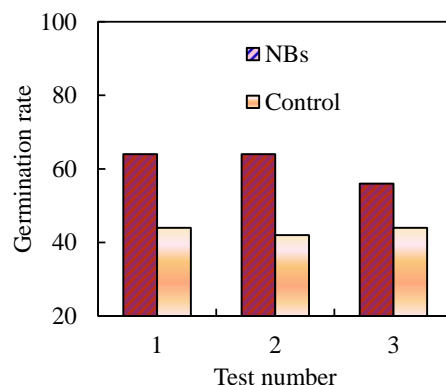


Fig. 1 Germination of barley seeds at 20°C in the dark. The DO concentration of NB water and distilled water (Control) was same as 8.2 mg/L.

同様の実験を、発芽促進効果が既知の過酸化水素水を加えて実施した結果をTable 1に示す。浸漬後17時間では、過酸化水素水と同様の発芽促進効果がNB水において認められ、コントロールの2倍の発芽率となった。

Table 1. Germination of barley seeds at 20°C in the dark. The DO concentrations of NBs water were adjusted to be the same as those of the distilled water. Data are means of three replicates ± SD. P<0.05

Water type	Germination rate (%)	
	17h	37h
Distilled water	28 ± 0.9 <sup>a</sup>	98 ± 0.4 <sup>a</sup>
0.1mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	48 ± 4.0 <sup>b</sup>	98 ± 0.4 <sup>a</sup>
0.3mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	58 ± 4.0 <sup>c</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
0.5mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	54 ± 4.0 <sup>c</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
NBs	58 ± 3.8 <sup>c</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>

4.2 ナノバブルによる活性酸素の発生

0.1Mのリン酸緩衝液(pH=7.4)に過酸化水素(活性酸素: ROS)を加えて数種の異なる濃度の過酸化水素水を調製し、これに1μMのAPFを加えて蛍光強度を求めた。その結果

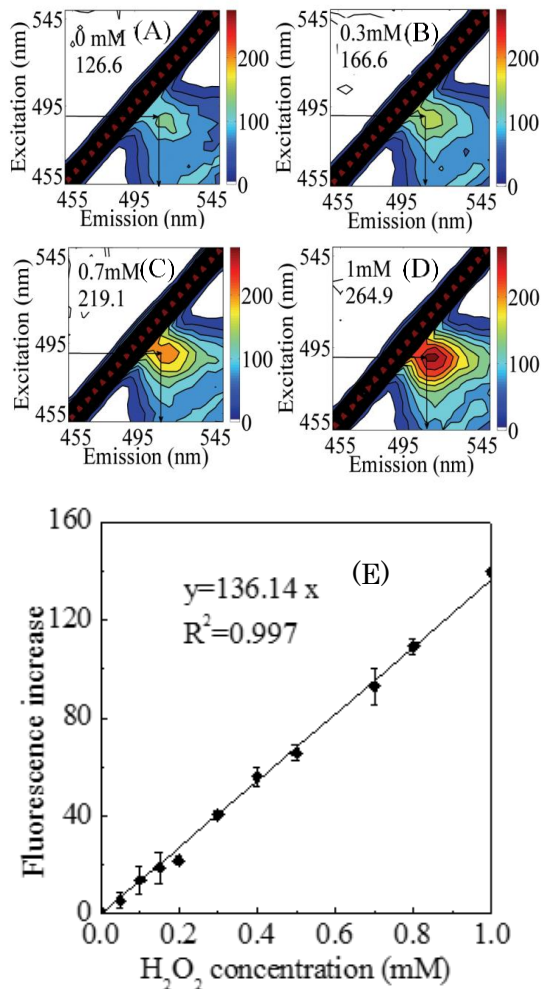


Figure 2 (A-D) Fluorescence response of 1  $\mu$ M APF to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. EEM spectra were acquired in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 (the fluorescence intensities were determined at 515 nm with excitation at 490 nm, slit width 5nm). (E) A linear correlation between fluorescence increase and concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. The error bars show the standard errors of 3 parallel samples.

が Fig. 2 である。Fig. 2 (A)-(D) の縦軸は励起波長、横軸は蛍光波長である。平面上の各画素が蛍光強度の情報を有しており、これを濃淡で表現した。励起波長 490nm, 蛍光波長 515nm に現れた蛍光ピークの強度と ROS 濃度は Fig. 2 (E) に示す直線関係にあった。

一方、酸素ナノバブル水に 1  $\mu$ M の APF を加えた場合の蛍光強度は約 60 であり、発生した ROS ( $\cdot$ OH) 濃度は、上述の回帰式から 0.5mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水に相当することが示された。また、DO を 8 mg/L 程度に調整した空気・窒素混合ナノバブル水は 0.3mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 相当であり、ナノバブルにより ROS が発生することが確認された。

#### 4.3 内生の活性酸素

種子内で発生する、すなわち、内生の ROS 濃度に対応するフォルマザンの吸光度を、空気・窒素混合ナノバブル水 (NBs)、0.3mM の

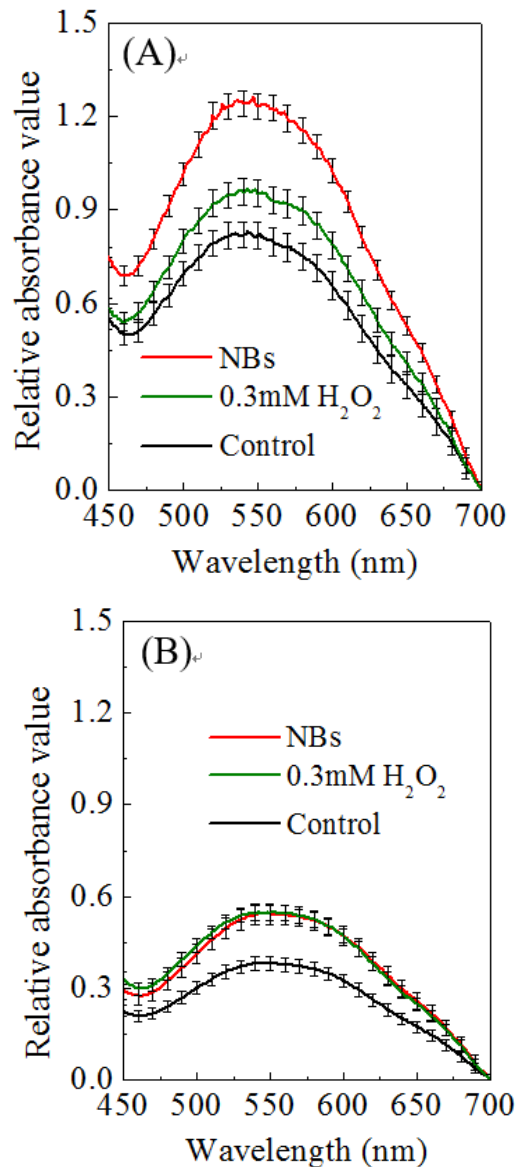


Figure 3. Spectra of formazan produced as a result of superoxide radical production in the sprouting region of germinated barley seeds immersed in distilled water, NB water, and 0.3mM hydrogen peroxide solution. Five seeds of each group were measured. Each curve represents the mean value of more than 120 microscopic sample dots (dot diameter = 10  $\mu$ m) at 17 h (A) and 37 h (B) of submerging time.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水およびコントロール (蒸留水) に浸漬した種子について、Fig. 3 に示した。縦軸は相対吸光度であり、この値が大きいほど O<sub>2</sub><sup>-</sup> の濃度が高いことを示す。(A) は浸漬 17 時間、(B) は 37 時間における吸光度である。この結果、560nm 付近において、ナノバブル水に浸漬した種子の相対吸光度が蒸留水に浸漬した種子より顕著に高い、すなわち、O<sub>2</sub><sup>-</sup> が高いことが示された。

#### 4.4 発芽率向上のメカニズム

以上の結果、発芽率が向上するメカニズムとして、(1) NBsにより外生の ROS ( $\cdot\text{OH}$ ) が発生、(2) 外生の ROS がシグナル分子となり、内生の ROS ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) が発現(仮説)、(3) デンプン分解酵素が生成、(4) 種子の発芽・幼根の生長促進というプロセスが考えられた。

#### 参考文献

- Ago et al., J of Chem Engng Japan, 38(9), 757-762 (2005) Hashimoto et al., JSMF Annual Meeting 2011, 440-441 (2001) Nakao et al., J. Soc. Mech. Engng., 255-256 (2008) Takahashi et al., J. Phys. Chem. B, 107(10), 2171-2173 (2003) Zimmerman et al., Applied Energy, 88, 3357-3369 (2011) 大下ら, 第 32 回日本熱物性シンポジウム講演論文集, E312 (2011) 大塚ら, 平成 24 年度関東支部年次大会講演要旨集, (2012) 大成博文, 日本機械学会誌, 108, 694-695 (2005) 芹澤昭示, 化学工学, 71(3), 174-177 (2007)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Shu Liu, Seiichi Oshita, Saneyuki Kawabata, Yoshio Makino, Takahiko Yoshimoto: Identification of ROS produced by nanobubbles and their positive and negative effects on vegetable seed germination, Langmuir (accepted) (査読有)  
<http://pubs.acs.org/journal/langd5>
2. Shu Liu, Seiichi Oshita, Yoshio Makino, Qunhui Wang, Yoshinori Kawagoe, and Tsutomu Uchida: Oxidative Capacity of Nanobubbles and Its Effect on Seed Germination, ACS Sustainable Chem. Eng., 2016, 4 (3), pp 1347-1353 (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01368>

[学会発表] (計 4 件)

- ① Seiichi Oshita, Shu Liu, Yoshio Makino: Application of finebubbles to agriculture -Fundamental findings-, 第 5 回ファインバブル国際シンポジウム, 2014 年 12 月 17 日, 東京大学
- ② Shu Liu, Seiichi Oshita, Yurina Otsuka, Yoshio Makino: Influence of nano-bubbles on water mobility of barley seeds as studied by nuclear

magnetic resonance spectroscopy, Proceedings of the 8<sup>th</sup> CIGR Section VI international Technical Symposium, 2013 年 11 月 6 日, Guangzhou (China)

- ③ 大塚由里奈, Liu Shu, 牧野義雄, 大下誠二: ナノバブル含有水がオオムギ種子の生理活性に及ぼす影響, 第 72 回農業食料工学会年次大会講演要旨, 2013 年 9 月 11 日, 帯広畜産大学
- ④ Shu Liu, Yurina Otsuka, Yoshio Makino, Seiichi Oshita: The effect of nanobubbles on physical states of cell-associated water in germinating barley seeds observed by 1H NMR, 第 72 回農業食料工学会年次大会講演要旨, 2013 年 9 月 11 日, 帯広畜産大学

[図書] (計 1 件)

- ① 大下誠一: ナノバブルの特性と種子発芽促進メカニズム, JATAFF ジャーナル, 47-51, 2016 年 5 月 1 日, (公社) 農林水産・食品産業技術振興協会
- ② 大下誠一: 日本熱物性学会編, ナノ・マイクロスケール熱物性ハンドブック, 分担執筆 (ナノバブル含有水の熱物性), 424-434, 養賢堂, 2014 年 6 月

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大下誠一 (OSHITA Seiichi)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号: 00115693

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし