

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20380139

研究課題名（和文）疎水性水和を利用した凍結時の氷結晶サイズ制御による農産物の長期保存法

研究課題名（英文）Long term preservation of agricultural products by the control of ice crystal size in terms of hydrophobic hydration

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

研究成果の概要（和文）：水中におけるキセノン水和物のサイズ分布を検討した結果、圧力が高く温度が低いほどキセノン水和物のサイズが小さくなり、与えた条件下では、最小サイズの水和物が形成されるのは1℃、キセノンガス圧力1.0MPaであることが示された。またオオムギ子葉鞘細胞において、1℃、1.0MPaを適用したキセノン保存区では-20℃の凍結保存区より顕著に高い生存率が維持され、細胞に与えるダメージが少ないことが示された。

研究成果の概要（英文）：The crystal size distribution of xenon hydrate in water indicated that the smaller crystal was formed at the lower temperature and the higher xenon gas pressure. The best combination of temperature and xenon pressure was 1℃ and 1.0MPa under the examined conditions. The barley coleoptile cells preserved at the combination of 1℃ and 1.0MPa showed significantly higher viable ratio than those preserved under -20 degree C. This meant the preservation by generation of xenon hydrate could do damage control.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：ポストハーベスト工学

1. 研究開始当初の背景

食品としての農産物には高品質であることが求められる。生きた農産物の鮮度を保つために種々の技術が開発されているが、保存期間は、葉菜では長くても1週間を超えない。一方、凍結保存法は長期保存に適した方法として実用に供されているが、解凍後にドリップが生じること、テクスチャーが劣ることなど、解決されるべき課題が残されている。

一方、細胞や生体組織の凍結保存法に関し

ては、従来、様々な研究がなされている。例えば、凍結発生頻度や細胞内凍結が細胞膜近傍から発生することが、上村(2004)により報告されている。また、凍害防御物質と凍結した植物組織の生存率との関係については、鈴木ら(2002)の報告がある。海外での研究も活発であり、Li and Sun (2002)により食品の急速凍結・解凍法に関するレビューがなされ、超音波と組み合わせたジャガイモ組織の凍結法に関する報告(Sun and Li, 2003)などが

ある。さらに、高圧下での凍結がジャガイモの細胞膜やテクスチャー及び色に与える影響に関する Luscher ら(2005) の報告など、多数の研究例がある。

こうした研究にも拘わらず、大きな細胞や組織の凍結保存では成功例が少ない。問題は、氷結晶の形成による細胞膜や細胞諸器官の損傷にある。これを避けるために、凍害防御剤の導入や急速冷却によるガラス化が試みられている。凍結速度が氷結晶の形成とサイズに影響することは知られているが、冷却する際に試料内の熱伝導が冷却速度の律速になるため(Sloan, 1998)、大きな試料ではガラス化する以前に氷核が形成されてしまう。このため、細胞外凍結に伴う脱水や細胞内凍結に伴う細胞膜の損傷などの問題が、未解決のまま残されている。このような背景から、これらの問題点を解決できる農産物の長期保存法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

申請者らはキセノンガスの溶解に伴う水の構造化により、植物細胞や農産物の代謝抑制が可能であることを示した (Oshita et al. (1999), 大下ら(1996, 1997))。これは、疎水性水和による水分子間の水素結合が発達した状態を利用したものである。ここで得た知見と凍結プロセスにおける問題点を考え合わせ、本研究では、以下に記すように、氷結晶サイズ制御による長期保存法を提案する。

3. 研究の方法

凍結点より高い温度で試料内に疎水性水和を生じさせ、試料の全域にわたって疎水性水和した領域が分散的に出現する条件を与える。さらに、その後凍結点以下まで冷却することにより、疎水性水和した領域の周辺に小さな多数の氷結晶を形成させる技術の開発を目指す。

疎水性水和とは、無極性ガス分子(本研究ではキセノンガス)の溶解に伴い、水分子が水素結合して無極性ガス分子の周囲に配向する現象である。疎水性水和の程度、すなわち、水素結合する水分子数の多少は無極性ガスの溶解量(濃度)に依存し、これは試料の温度およびガス分圧で決定される。疎水性水和の程度が高度に発達すると、すべての水分子が水素結合で結ばれて結晶(気体水和物)を生じる。この現象を利用して、(1)凍結点より高い温度で試料の各所に疎水性水和が生じ、かつ気体水和物の結晶形成には至らない状態を実現する。(2)その後、試料温度を凍結点以下まで低下させる。疎水性水和した領域では氷結晶が成長しにくく、液状水のさらなる構造化を伴いながら、小さな氷結晶が細胞内外に形成されると期待される。これ

により、大きな氷結晶の形成を抑制できる。

これを実現するために、(1)については、溶解させるガス分圧と温度制御が必要であり、その条件を水を用いて実験的に明らかにする。(2)については、葉菜の凍結保存を念頭に、保存後の植物細胞の細胞膜の損傷の有無を指標として、保存性の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 水中の水和物のサイズ分布

キセノンガス分圧を 1.0MPa に固定し、1°C および 5°C におけるキセノン水和物のサイズ分布を検討した。次に、温度を 1°C に固定し、0.7~1.0MPa のキセノンガス圧力の下で水和物のサイズを検討した。水和物形成後 1h を経た時点でのサイズ分布を図 1 に示す。

この結果、圧力が高いほど結晶サイズが小さくなる傾向が示された。また、5°C でも同様の傾向が認められ、1°C と 5°C では、より小さなサイズの水和物が生成される温度・圧力条件は 1°C, 1.0MPa であることが示された。

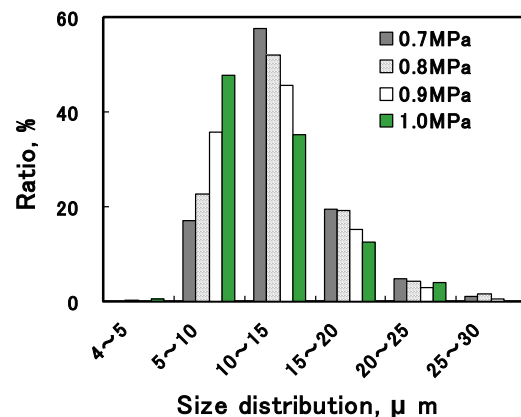


図1 各種キセノンガス圧力における水和物サイズ分布(1°C, 形成開始後 1 時間)

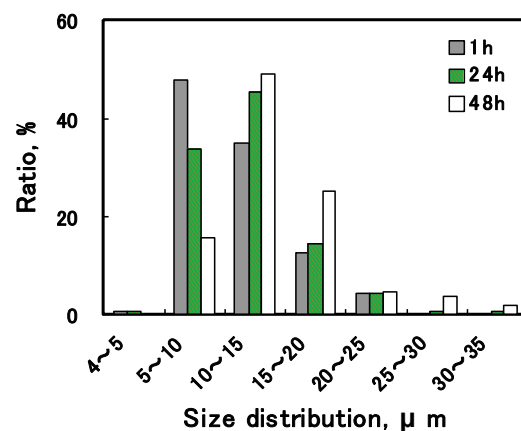


図2 キセノン水和物サイズの経時変化(1°C, 1MPa で形成開始後 1 時間の比較)

図2は、キセノン水和物形成後の経時的な水和物サイズの変化である。水和物形成開始後の時間経過に伴い小さな水和物の割合が減ると共に、大きな水和物の割合が増え、時間と共にキセノン水和物が成長することが示された。他の温度・圧力条件でも同様の傾向が認められた。

(2) 子葉鞘細胞内でのキセノン水和物形成と細胞の生存率

透過型光学顕微鏡による観察により、キセノンガスを圧入する前のオオムギ子葉鞘細胞では顆粒の活発な流動(原形質流動)が観測されたが、キセノンガスの圧入により、十数分後に細胞内の原形質流動が停止し、直後に視野が暗化すると共に、細胞内に微細な結晶様の物質が形成されることが確認された。観察温度が1°Cであることから、これはキセノン水和物であると考えられた。

図3は、1°C、1MPa でキセノン水和物を形成させ保存した細胞と急速凍結および緩慢凍結により、-20°Cで保存した細胞の生存率である。横軸は、いずれの保存条件も、水和物あるいは氷結晶の形成が認められた後の経過時間を示す。生存率は原形質流動の有無で評価した。原形質流動は、細胞が健全な状態であれば活発に観測され、細胞の死後は観測されなくなることが知られている。そこで、各保存時間経過後に、それぞれの試料温度を20°Cに戻し、その後、20°Cの蒸留水に浮かべ、30分後に顕微鏡を通して観察した。原形質流動が停止したままの細胞を「死細胞」と判断し、観察した全細胞数を基に生存率を算出した。

その結果、緩慢凍結(-0.34°C/min)および急速凍結(-5°C/min)保存した組織片では、氷結晶形成から1h後に細胞の生存率は30%~40%まで低下することが示された。一方、キセノン水和物を形成させた組織片では、9h後でも約40%の細胞が生存していることが確認された。この結果は次の2つの可能性を示している。(1)キセノン保存区では、細胞内の一部に水和物が形成されない領域がある。(2)水和物は細胞の全域で形成されるが、氷結晶よりは細胞に与えるダメージが少ない。本実験で用いた組織片は一層の細胞から構成されているので、キセノンガスは細胞内に容易に溶解すると考えられるが、細胞の全域における水和物の形成については、別途、実験的に確認する必要がある。また、(1)の可能性についても検討の要がある。安藤らの報告(2009, 2010)によれば、タマネギを5°C、0.8MPaの下でキセノン保存した結果、組織表面付近におけるキセノン水和物の形成と共に組織内部においても特定の部位でキセノン水和物が形成・成長したが、保存7日後でも、組織片全体の48%しかキセノン水和物が

形成されなかった。この報告では、一層の細胞ではなく試料の塊を用いているため、本実験と直接の比較ができないが、細胞内の水和物形成が全域にわたるのか一部に限定されるのかについては、今後検討する必要がある。

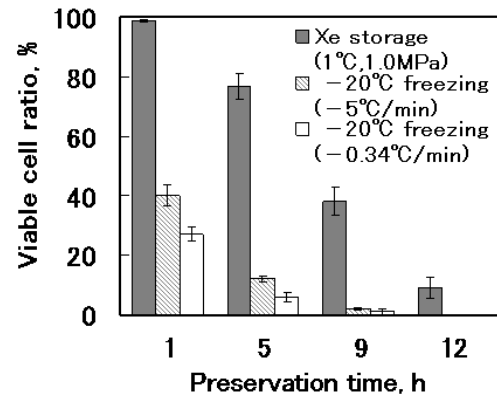


図3 -20°C凍結およびキセノン保存後のオオムギ子葉鞘細胞の生存率

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1件)

- ① 市原裕也、大下誠一、牧野義雄、川越義則、王蕾、蛍光画像を利用した水の構造化の程度の推定、低温生物工学会誌、57巻、2011、67-70 (査読無し)

[学会発表] (計12件)

- ①王蕾、川越義則、牧野義雄、大下誠一、キセノン水和物を利用した農産物の保存に関する研究、2010年度農業機械学会関東支部第46回年次大会、2010年8月5日、上越市春日謙信交流館
- ②安藤寛子、梶原一人、大下誠一、牧野義雄、川越義則、鈴木徹、ガスハイドレートを用いた生鮮野菜の保存法検討のための基礎的研究、日本食品工学会第11回(2010年度)年次大会、2010年8月5日、東京海洋大学
- ③市原裕也、大下誠一、牧野義雄、川越義則、王蕾、蛍光画像を利用した水の構造化の程度の推定、第55回低温生物工学会年会、2010年6月26日、東京工業大学
- ④王蕾、安藤寛子、川越義則、牧野義雄、大下誠一、オオムギ子葉鞘細胞におけるキセノン水和物の形成、日本食品工学会第10回(2009年度)年次大会、2009年8月2日、石川県立大学
- ⑤Hiroko Ando, Satoshi Takeya, Yoshinori Kawagoe, Yoshio Makino, Toru Suzuki,

Seiichi Oshita, In situ observation of xenon hydrate formation in onion tissue by using NMR and powder X-ray diffraction measurement, CRYO 2009 (46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology), 2009年9月20-23日, 北海道大学

⑥ L. Wang, H. Ando, Y. Kawagoe, Y. Makino, S. Oshita, Basic study on the storage of agricultural produce by using xenon hydrate, CRYO 2009 (46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology), 2009年9月20-23日, 北海道大学

⑦ 王蕾, 川越義則, 牧野義雄, 大下誠一、キセノン水和物を利用した農産物の保存に関する基礎研究、農業環境工学関連学会2009年合同大会、2009年9月17日、東京大学(駒場)

⑧ 安藤寛子、川越義則, 牧野義雄, 大下誠一、鈴木徹、キセノンガスによるガスハイドレート形成を利用した農産物の低温保存、農業環境工学関連学会2009年合同大会、2009年9月17日、東京大学(駒場)

⑨ Hiroko ANDO, Toru SUZUKI, Yoshinori KAWAGOE, Yoshio MAKINO, Seiichi OSHITA, Detection of Xenon Gas Hydrate Formation in Onion Tissue for the Application to Chilling Temperature Storage, 5th CIGR Section VI International Symposium, 2009年9月1日-2日, Mercure Hotel, Potsdam

⑩ 安藤寛子、松川真吾、川越義則, 牧野義雄、鈴木徹、大下誠一、タマネギ組織におけるキセノンガスハイドレート形成を利用した低温保存、日本食品工学会第10回(2009年度)年次大会、2009年8月2日、石川県立大学

⑪ 安藤寛子、川越義則、牧野義雄、鈴木徹、大下誠一、疎水性ガスによる水の構造化を用いた農産物保存法のメカニズムの検討、2008年度日本冷凍空調学会年次大会、平成20年10月20-23日、大阪市立大学

⑫ 王蕾、大下誠一、牧野義雄、川越義則、農産物の凍結保存に関する基礎的研究-温度・圧力条件とキセノン水和物のサイズ分布-、2008年度農業機械学会関東支部第44回年次大会、平成20年8月10日、富山県立大学

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

牧野 義雄 (MAKINO YOSHIO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：70376565

川越 義則 (KAWAGOE YOSHINORI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：80234053

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：