

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15010

研究課題名(和文) 脱水を前処理とした革新的青果物保存技術の創出

研究課題名(英文) Development of innovative preservation technology of vegetables and fruit by dehydration pretreatment

研究代表者

小出 章二 (Koide, Shoji)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：70292175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脱水を前処理とすることでカット青果物を生きたまま氷点下保存できることを着想した。これを検証するため、青果物組織の生存性の評価法の確立、青果物組織の生存性を確保する脱水・復水方法の検討、脱水後青果物の氷点下保存の測定を行った。その結果、電気インピーダンス計測法およびTTC還元法により試料の生存性を評価できること、脱水後保存し復水した試料に生存性があること、前処理の有無によらず、試料は生存性を保ったまま過冷却状態で氷点下保存されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カット青果物の生存性を何らかの指標で表現できれば、冷凍・解凍後の青果物や食品の品質・鮮度の評価に資する知見を与える。本研究は、カット青果物の脱水処理後および氷点下保存後の生存性を電気的かつ生理学的に定量的に評価する手法を確立できた点に実用性がある。また、本研究は青果物試料を生きたまま過冷却状態で氷点下保存できることが可能であることを科学的に示したもので、これは先駆的な研究を含めてはじめてのことであり学術的意義は大きい。また本研究は生鮮青果物を氷点下で長期保存できる可能性を示唆するものであり、今後の革新的青果物保存の実現が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We considered a hypothesis that fresh-cut vegetable or fruit (FVF), which was pretreated by dehydration, can be capable to preserve long-time with keeping aliveness under subzero temperature. In order to verify above hypothesis, the following measurements were performed: establishment of evaluation method on survivability of FVF, consideration of dehydration method and rehydration method of FVF for keeping its aliveness, experiment of survivability of dehydrated FVF subjected to subzero temperature. Results showed that survivability of FVF could be evaluated by both electric impedance spectroscopy and TTC reduction, and there was a survivability of FVF which was subjected to dehydration, preservation, and rehydration. It was also found that FVF with or without dehydration can be cryopreserved as supercooling state, with keeping its survivability.

研究分野：農産物保蔵学

キーワード：脱水 氷点下保存 過冷却 電気インピーダンス 細胞活性 復水

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、氷点以下での動物細胞・臓器等の低温保存は一部実用化されているが、青果物を氷点下で保存できる技術は確立されていない。これに対し近年、過冷却状態を保ったまま青果物を保存させる過冷却保存の研究が進められている。過冷却は生物の重要な凍結回避機構の一つとして考えられているが、生鮮食品や青果物における過冷却状態は不安定なものとされ、振動などの物理的なショックで容易に解消される。しかし、過冷却状態の安定化が可能となれば、過冷却保存は氷点以上の保存と比較して青果物をより低温で、潜熱の影響を受けずに、長期に亘り保存することが可能となる。

そこで著者は、脱水が植物細胞の凍結傷害を軽減するとの報告を参考に、「脱水を前処理とすることで、青果物組織を生きたまま氷点下で保存できる(仮説)」ことを着想した。本研究はこの仮説の検証をするために、以下に記した3つの研究小課題を順次に遂行する測定計画を立て、それを実行することとした。

### 2. 研究の目的

3つの研究小課題、すなわち 青果物組織の生存性の評価法の確立、青果物組織の生存性を確保する脱水・復水方法の検討、脱水後青果物の青果物氷点下保存の測定および検討を行い、仮説を検証することを本研究の目的とした。

具体的には、では青果物組織の電気インピーダンス計測法により得られるインピーダンス値の周波数依存性や Cole-Cole プロットの円弧の有無、更に TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 還元法により得られる細胞活性といった生理学的指標を用いて試料の生存性を評価することを目指した。では得られた生存性の評価法をベースに、脱水方法や保存方法、復水方法について検討し、では得られた知見をもとに、試料の氷点下保存の可能性について測定・検討することを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 青果物組織の生存率の測定法の開発

カットキャベツを供試材料とした例を記す。市販のキャベツの4枚目から6枚目の葉を取り出した後、大きな葉脈を除いて円形状試料を作成し測定用試料とした。成形直後の生鮮試料(以下、F)をコントロールとし、-80 で凍結後解凍した試料(以下、DS)をネガティブコントロールとして、それらの電気的特性と生理学的特性を計測した。

電気的特性は、電気インピーダンス計測法により行った。ここでは LCR メータに接続した針状電極を用いて 42 Hz ~ 5 MHz の範囲における周波数で掃引測定を行い、レジスタンスとリアクタンスを算出し、Cole-Cole プロットを作成した。生理学的特性は、電気インピーダンス計測に用いた直後の試料を TTC 還元法により吸光度を定量し、細胞活性を評価した。

#### (2) 青果物組織の生存率を保つ脱水・復水方法の検討

カットキャベツを円形状に成型した試料を用いて、温度(5、15、25)、脱水率(10%、20%、30%)、復水温度(5、15、25:復水はペーパータオルを用いた)のもとで、脱水直後および脱水・復水直後の試料の電気的特性および生理学的特性を計測し生存性の有無を評価した。

つぎに脱水・復水温度を 25、脱水率を 30%として、保存期間を設けて生存性の評価を行った。ここに、脱水した試料はフィルム内で密閉して 5 のインキュベータ内で 5 日間保存した後、復水した(以下、実験区)。この試料と脱水・復水を行わずにインキュベータ内で保存した試料(以下、Control 区)の電気的特性および生理学的特性を計測し、これらを F および DS の値と比較した。更に官能試験も行った。

#### (3) 脱水を前処理とした青果物組織の氷点下保存

申請時に設けた仮説「脱水を前処理とすることで、青果物組織を生きたまま氷点下で保存できる」の検証を行った。具体的には、成形したカットキャベツを 25 で脱水したものを測定試料として、氷点下まで冷却し一定時間保存した。脱水率は 0% (脱水前処理なし)、10%、および 30%とした。氷点下保存した試料を室温に戻した後、試料の電気的特性と生理学的特性を計測した。

供試材料の氷結点は、試料をホモジナイズした後遠心し、その上澄み液をオズモメータで計測して得られた質量モル濃度から算出した。過冷却点は DSC (differential scanning calorimetry) により得られた DSC 冷却曲線より求めた。

#### (4) カット青果物の氷点下保存

測定を進めるに伴い、前処理として脱水をしなくても青果物組織を生きたまま氷点下で保存できることが明らかとなった。そこでキャベツ以外に他のカット青果物も供試材料に加え、その氷点下保存の可能性を検討した。

具体的には、上記した(3)の測定方法と同様に、氷点下保存したカット青果物の電気的特性および生理学的特性を計測し、これらを F および DS の値と比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 青果物組織の生存率の測定法の開発

FおよびDSのインピーダンスの周波数依存性を示す(図1)。Fのインピーダンスは低周波数域において高い値を呈したが、およそ1 kHz 近辺から急激に減少した。一方、DSは全周波数域で小さい値となった。つぎに試料のCole-Coleプロットを示す(図2)。FはCole-Coleプロットに明確な円弧を有するがDSは円弧が消失した。Cole-Coleプロットで見られる円弧の収縮は青果物の細胞膜状態を示す指標として用いられており、特に凍結及び解凍を経た青果物試料は細胞膜構造が壊滅的に破壊されるためインピーダンスの値は生鮮試料と比べ激減し、円弧は消失することが報告されている。本研究で用いたDSは、供試する青果物の品目を変えても全てインピーダンスの周波数依存性が見られず、Cole-Coleプロットの円弧が消失したことから、電気インピーダンス計測法は、凍結及び解凍を伴う試料の生存性の評価に適していることが示唆された。

つぎにTTC還元法により得られた試料の細胞活性の一例を記す(図3)。ここに、縦軸は図2で見られるような試料のCole-Coleプロットの円弧の最大リアクタンス値(周波数およそ1 kHz 近辺)をFの平均値で除して無次元化した値であり、横軸はTTC還元法により得られた細胞活性をFの平均値で除して無次元化したものである。なおCole-Coleプロットの円弧が認められなかった試料は5 MHzにおけるリアクタンス値を用いてプロットした。TTC還元法は、植物生理学において凍結・解凍後の生存率を、得られる吸光度から定量する指標として用いられており、図3をみると細胞活性値が高い全ての試料はCole-Coleプロットにおいて明確な円弧を有していることがわかる。このことから、青果物組織の生存性の評価法として、電気インピーダンス計測法は有効な手法であることが示唆された。

なお、今回は脱水を前処理としたため、脱水や浸透圧変化に伴う力学的・物理化学的变化が電気的特性および生理学的特性に与える影響について詳細に検討する必要があるといえる。しかし本研究において、脱水処理した試料は、DSと比較してリアクタンス比と細胞活性値は優位に高い値を示した。よって本研究では、この電気インピーダンス計測法を用いて、脱水した試料の生存性を評価しても良いことが支持されたと考える。

##### (2) 青果物組織の生存率を保つ脱水・復水方法の検討

種々の脱水温度、脱水率、復水温度のもとで、脱水および復水時の含水率の経時変化を測定したところ、脱水時の見かけの水分拡散係数はアレニウス型の温度依存性を呈し、復水時は温度依存性を示さないことが明らかとなった。つぎに脱水温度と復水温度を25一定として、脱水直後および脱水・復水直後の電氣的、生理学的特性について測定した。その結果、全ての試料の脱水・復水直後のCole-Coleプロットは明確な円弧を有しており、細胞活性もFと比べ有意な差が見られなかったことから、測定に用いた全ての試料は生存性を有することが示唆された。

つぎにFを基準としたときの各試料の保存試験

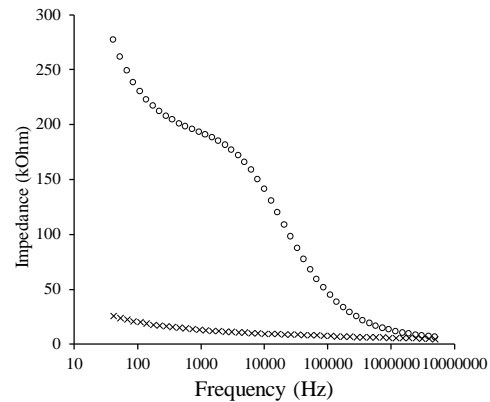


図1 生鮮試料および凍結・解凍後の試料のインピーダンスの周波数依存性。○生鮮試料, ×凍結・解凍後試料

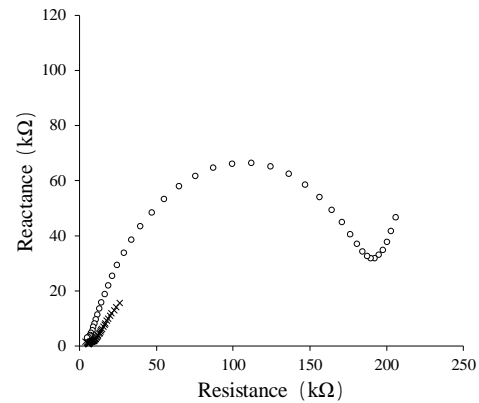


図2 生鮮試料および凍結・解凍後試料の Cole-Cole プロット。○生鮮試料, ×凍結・解凍後試料

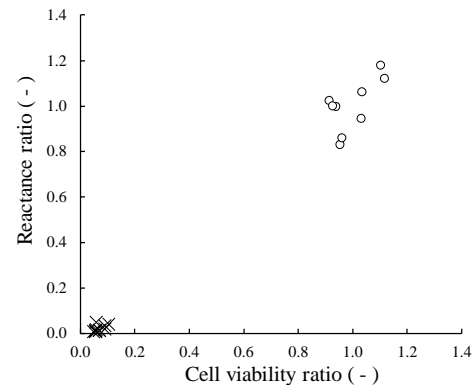


図3 生鮮試料および凍結・解凍後試料の細胞活性と最大リアクタンス値との関係。○生鮮試料, ×凍結・解凍後試料

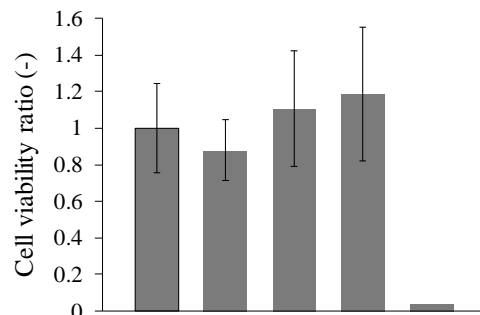


図4 脱水・保存・復水後の細胞活性。棒グラフは左よりF, 脱水直後, 脱水復水直後, Control, DSの値を示す。

後の細胞活性を示す(図4)。これより、脱水直後および脱水・復水直後の試料は生存性を有することが示唆された。図5には官能試験の結果を示す。Control区と実験区に有意差はなかったものの、好ましさと総合においては実験区のほうがFに近い結果となった。このことは脱水および復水温度を低温である25℃とすることで、脱水・保存・復水後の見た目の鮮度低下が抑制されたと考えられるが、今後は品質変化についての検討が望まれる。

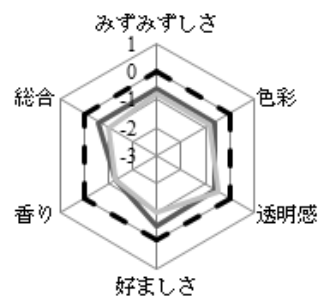


図5 脱水・保存・復水後の試料の官能試験の結果。破線は生鮮試料、実線は実験区、グレイの線はControl区を示す。

(3) 脱水を前処理とした青果物組織の氷点下保存  
氷点下保存(-5℃、保存時間12時間)した試料の細胞活性比とCole-Coleプロットの円弧の最大リアクタンス値(周波数およそ1kHz近辺)との関係を示す(図6)。ここにCole-Coleプロットの円弧が全く認められなかった試料は5MHzのリアクタンス値を用いて算出した。これより氷点下保存した試料は生存性を有することが示唆された。また0%脱水試料(脱水前処理なし)の試料の細胞活性は、脱水試料と比べて高い結果を示した。つぎに、-10℃で氷点下保存(保存時間12時間)を行った結果を記す。氷点下保存した試料のうち生存性を有する試料は0%脱水試料(脱水前処理なし)で36.7%、脱水率10%で27.6%、脱水率30%で46.9%となり、各実験区間に有意な差は見られなかった。また0%脱水試料(脱水前処理なし)の細胞活性値は、脱水試料のものとは比べて優位ではないものの高い結果を示した。一方で、前処理をしなくても、青果物組織を生きたまま氷点下で保存できることが示された。

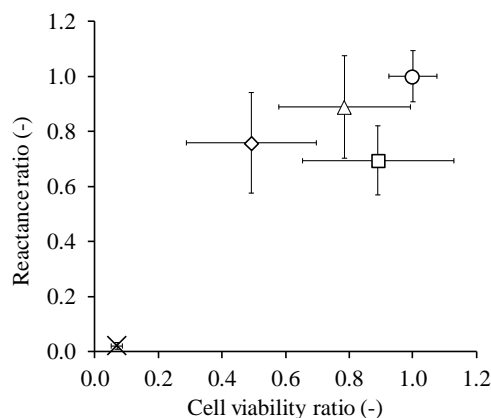


図6 氷点下保存(-5℃, 12時間)した試料の細胞活性比と

Cole-Coleプロットの円弧の最大リアクタンス値。  
生鮮試料, 0%脱水試料(脱水前処理なし),  
10%脱水試料, 30%脱水試料, (n=25-32).

本研究では、試料が氷点下保存で生存する作用機序についても測定・検討した。具体的には、試料の質量モル濃度の計測値から凍結点を求めるとともに、DSCを用いた冷却・融解曲線により過冷却点を算出した。あわせて得られたエンタルピーから細胞外凍結の有無について検討した。その結果、マクロな観点からではあるが、試料は細胞外凍結がみられず、氷結点以下で過冷却状態が保持されていたことが示された。このことは、試料に熱電対を挿入し、氷点下保存時の温度を計測したところ、潜熱放出をすることなく、すなわち過冷却が解消されず、所定の氷点下温度(-5℃)を保ったことから支持されると考える。

#### (4) カット青果物の氷点下保存

供試材料としてカットホウレンソウを用いた例を記す。-5℃で氷点下保存(過冷却保存)した試料を室温に戻した後、試料の電気的特性および生理学的特性を計測し、それより生存率を計測した。その結果、ほとんどの試料において細胞膜の閉鎖性が保たれ細胞活性を有することが示された。すなわちほとんどの試料は生存性を有していたといえる。しかし、これらの試料は新鮮試料と比較して、細胞膜の状態に何らかの変化がみられ、細胞活性は低下あるいは抑制されることが示唆された。このことは図6で得られた結果と同様である。

生鮮青果物内の細胞膜はさまざまな生体分子から構成される多成分系であり、水・物質移動に大きく関わるものである。今後このような系での過冷却作用機序について、また氷点以下の温度が青果物の生体内反応に与える影響については慎重に検討する必要がある。

#### 主な参考文献

- James, C.ら, (2009). International Journal of Refrigeration, 32, 253-260.
- 宮脇長人, 四宮陽子, (2002). 低温生物工学会誌 48, 125-127.
- 日本冷凍空調学会 編, (2013). 「冷凍空調便覧 巻食品・生物編」, 日本冷凍空調学会.
- 酒井 昭 編, (1987). 「凍結保存 - 動物・植物・微生物」, 朝倉書店.
- Sisunandar ら, (2010). Cryobiology, 61, 289-296.
- Steponkus, P.L., Lanphear, F.O., (1967). Plant Physiology. 42, 1427-1426.
- 鈴木 徹ら, (2011). 日本冷凍空調学会論文集, 26, 371-386.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

小出章二, 大須賀玲, 折笠貴寛, 上村松生

過冷却保存されたカットホウレンソウの電氣的, 生理学的評価, 日本食品科学工学会, 査読有, 印刷中

Koide, S., Kumada, R., Hayakawa, K., Kawakami, I., Orikasa, T., Katahira, M., Uemura, M.

Survival of Cut Cabbage subjected to Subzero Temperatures, Acta Horticulturae, 査読有, in Press.

早川香寿美, 山崎未遊, 折笠貴寛, 小出章二

マイルドな脱水が青果物の保存および生存率に与える影響, 農業食料工学会東北支部報, 査読無, 64巻, 2017, 1-4.

<http://tohoku.j-sam.org/wordpress/wp-content/uploads/papers/No64.pdf>

### 〔学会発表〕(計5件)

小出章二, 折笠貴寛, 上村松生

青果物の氷点下保存に関する研究と今後の展望, 農業環境工学関連5学会2018年合同大会(愛媛大学)講演要旨集(CD-version), 2018

Koide, S., Kumada, R., Hayakawa, K., Kawakami, I., Orikasa, T., Katahira, M., Uemura, M.

Survival of Cut Cabbage subjected to Subzero Temperatures, VI International Conference Postharvest Unlimited, 17-20 October, Madrid, Spain., 2017

小出章二, 早川香寿美, 折笠貴寛, 川上 樹, 熊田りこ, 上村松生

カットキャベツの過冷却保存に関する研究, 第76回農業食料工学会年次大会(東京農業大学, 世田谷キャンパス)講演要旨集, pp. 170, 2017

早川香寿美, 小出章二, 折笠貴寛, 川上 樹, 熊田りこ, 上村松生

カットキャベツの過冷却保存に関する研究,

日本食品保蔵科学会第66回大会(高知大会)講演要旨集, pp. 93, 2017

早川香寿美, 山崎未遊, 折笠貴寛, 武田純一, 小出章二

マイルドな脱水が青果物の保存および生存率に与える影響, 平成28年度農業食料工学会東北支部大会(北里大学)講演要旨集, 22-23, 2016

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://postharvest2017.sicongresos.com/posters/23.jpg> (2019.5.21)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 上村 松生

ローマ字氏名:(UEMURA, Matsuo)

研究協力者氏名: 河村 幸男

ローマ字氏名:(KAWAMURA, Yukio)

研究協力者氏名: 折笠 貴寛

ローマ字氏名:(ORIKASA, Takahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。