

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656154

研究課題名（和文）液体メニスカスを用いた魚卵の凍結保存への挑戦

研究課題名（英文）A CHALLENGE FOR CRYOPRESERVATION OF FISH EGGS WITH LIQUID MENISCUS

研究代表者

鶴田 隆治 (TSURUTA TAKAHARU)

九州工業大学・工学研究院・教授

研究者番号：30172068

研究成果の概要（和文）：魚卵の冷凍保存を実現することを目標に、外部氷晶形成時の卵膜への機械的ストレスを低減するために液体メニスカスを用いる全く新しい方法を提案した。サイズの大きな魚卵に対してもメニスカスホルダーを開発し、魚卵全体をトレハロース水溶液で覆うことを可能にした。さらに、常温脱水を事前に施すことにより、内部氷晶生成時の体積膨張による損傷を低減することが可能となった。その結果、解凍後の魚卵形状保存率に格段の改善がみられ、本手法が有効であることが示された。

研究成果の概要（英文）：In order to reduce mechanical stress induced by external ice formation in a freezing of fish egg, we suggest a new method using liquid meniscus. We have developed the meniscus holder that holds the liquid-meniscus up to the top of the fish egg. The membrane of the fish egg is coated by the thin film of trehalose aqueous and can be protected from the external ice formation. Also, we used the dehydro-freezing in order to reduce the rupture due to the internal ice formation. The experimental results show that the fish eggs with meniscus holder have a high shape-preservation rate after the thawing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：熱工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：凍結保存，魚卵，液体メニスカス，脱水冷凍，メニスカスホルダー

1. 研究開始当初の背景

(1) 家畜やヒトを始めとする哺乳動物の場合、卵は径が 0.1mm 程度であり、凍害防御剤と冷却条件との組合せによる凍結保存技術が既に確立されつつある。これに対し、魚卵はサイズが大きく、サケやマスでは 7mm 程度にも及ぶ。さらに、卵膜も厚く、透過型の凍害防御剤の使用が期待できないこともあり、適切な冷凍法は見出されておらず、近い将来に実現できる可能性も少ないと言われている。そのため、魚種の冷凍保存に関する研究は、精子の保存が主である。また、異なる魚種（代理親種）を使った、いわゆる借腹によ

る保存技術が開発されつつある。しかしながら、養殖・水産業界からは、当該種の卵子そのものの保存が切望されており、そのためには、ある程度の大きさを有する魚卵の凍結保存を実現するための技術が必要である。

(2) 魚卵などのサイズの大きい卵の凍結保存に関しては、従来は、魚卵を溶液中に懸濁させて溶液ごと凍結する方法が行われていた。この方法では、溶液が凍結するときに成長する氷晶が、魚卵を圧迫して機械的ストレスを与え、卵が破壊されるという問題がある。即ち、魚卵を含む溶液を凍結した場合には、外

部溶液凍結時の体積膨張や、魚卵内部の水分凍結時の体積膨張により、組織に機械的ストレスを与えてしまう。

(3) このため、緩慢冷却と急速冷却を組み合わせた二段階凍結法も提案されている。例えば、懸濁液中の細胞に、まず緩慢冷却を行って適度に脱水させ、細胞内の水分量を減らす。その後、急速冷却により凍結させることにより、卵内部凍結時の体積膨張による機械的ストレスを抑える方法である。しかしながら、この二段階凍結法でも成功率は約40%程度であり、決して高くはない。細胞を懸濁液中で凍結させるため、細胞外部の溶液の氷晶成長により圧迫されることや、脱水を目的とした緩慢冷却では、細胞を低温状況下に長くさらすため、低温傷害を引き起こすことが理由である。

(4) 研究代表者は、高品位な冷凍食品を目指す凍結保存技術の開発過程で、脱水冷凍と細胞膜の関係の重要性を認識し、細胞又は組織の優れた凍結保存法について既に提案している。そして、そこでの知見を、魚卵の冷凍保存に応用し適用するための研究に着手した。その結果、脱水冷凍に加え、氷晶による損傷から細胞膜を保護する目的で、凍害防御剤を含む液体メニスカスによって魚卵を包み、その凍結制御を行って、先ず膜を粥状凍結層によって保護し、外的な氷晶による機械的ストレス及び内外の過大な浸透圧によるストレスを低減することが重要であると考え、本研究を開始することになった。

2. 研究の目的

(1) 魚卵の凍結保存の成功例はなく、食品として冷凍保存したとしても、かなり品位が劣化するという問題がある。原因は、魚卵は他の卵に比べて大きく、ガラス化のための超急速冷却が困難であり、浸透圧脱水やの目的で行う溶液浸漬では、溶液の凍結によって卵が機械的に圧迫され、かつ、損傷するためである。本研究の究極の目標は、従来よりも優れた凍結保存方法を提供することにある。

(2) そのための具体的目的として、溶液の表面張力を利用した液体メニスカス、即ち、溶液を液膜状にして魚卵を包み、粥状に凍結して外部氷晶による機械的圧迫損傷を抑制すること、また、魚卵の凍結時の体積膨張を低減するため、凍結前に真空脱水などの脱水操作を行うことによって、従来の問題点を解決できるということを検証することがある。

(3) 技術的には、液体メニスカスによって魚卵全体を覆うためのメニスカスホルダーを工夫・開発するとともに、事前に行う脱水量

の最適値を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 液体メニスカスの形成：魚卵の周りを外部溶液で薄くコーティングするために、卵膜の親水性を利用した液体メニスカスを活用する。表面張力によるラプラス長さ $\sqrt{2\sigma/\rho_1g}$ を0°Cの水で評価すれば3.9mmとなる。これより、サイズの小さな魚卵（例えばタラコ：直径約1mm）の場合、卵のすべてをメニスカスで覆うことができる。しかし、サイズの大きな魚卵（イクラ：直径約7.5mm）の場合には、魚卵全体をメニスカスで覆うことができない。そこで、メニスカスの形成を容易にするために金属板に魚卵下部が入るほどの溝（直径7.5mm、深さ3mm）を開け、魚卵を入れ固定する。メニスカスが形成されない魚卵上部は、メニスカスホルダーを工夫することで対応する。

(2) メニスカスホルダー：メニスカスホルダーは、線径0.3mmの金属性ワイヤーを使用した。イクラの直径と表面張力によるラプラス長さを参考にし、ホルダーのピッチ、直径及び高さをそれぞれ決め、イクラの上部を覆う形状にした。このホルダーを用いることで、メニスカスを魚卵の上部まで保持できていることがわかる(Fig. 1)。またホルダーは、メニスカスの形成が容易、かつ細胞外溶液の氷晶成長による機械的ストレスを最小限に抑えるため、魚卵の周囲を拘束しないようら旋状構造とした。

(3) メニスカス溶液：魚卵の周りを覆う外部溶液には、精製水と5%食塩水、そしてトレハロース水溶液(TS: 5%, 10%, 25%)を用いた。

メニスカスホルダーを必要としないタラコによる実験では、魚卵膜を覆う外部溶液の凝固速度に及ぼす冷却速度、外部溶液量、そして溶液種類の影響を調べた。顕微鏡観察のためにガラスプレート上に置き、十分に卵を覆う $1\mu\text{l}$ の溶液および卵と同程度の体積であって卵を覆うことのできる $0.4\mu\text{l}$ の溶液を滴下してサンプルとした。これを顕微鏡用

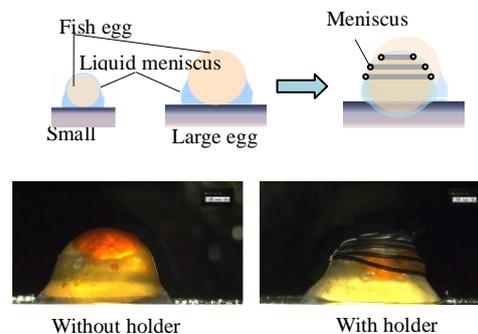


Fig. 1 Liquid meniscus

真空冷却加熱ステージに設置し、外部溶液の凍結速度を観察した。

また、イクラの実験では実際に解凍状態の比較を行い、形状の保存効果について評価している。凍害防御剤として機能するトレハロース水溶液(TS)を用意した。タラコの実験結果より、氷晶成長速度が小さく、膜への衝撃が少ない濃度として25%を採用している。

(4) 実験装置：実験装置の概略図をFig. 2に示す。冷却は液体窒素素容器を用い、魚卵を液体窒素素の雰囲気中に曝すことにより冷却した。アクチュエータにより駆動量・移動速度を制御し、液体窒素素液面からの距離による雰囲気温度変化を利用して冷却速度を制御した。

(5) 実験方法：実験の目的は、魚卵を懸濁液に浸漬させて凍結保存する方法と、魚卵の周りを液体メニスカスにより薄くコーティングして凍結保存する方法を比較し、形状保存の効果を評価することである。まず、金属板の溝に外部溶液を満し、その後魚卵を入れる。これにより、魚卵下部を外部溶液で覆うことができる。次に、魚卵にメニスカスホルダーを被せ、外部溶液を滴下することで魚卵上部のメニスカスの形成は完了する。今回、メニスカス形成に要した外部溶液の量は約0.07ml(平均膜厚0.017mm)であった。凍結方法は、魚卵を液体窒素素の雰囲気中にさらし、まず魚卵表面にそってメニスカス部を凍結させ、卵膜の保護層を形成する。その後、内部を微小な氷晶によって凍結させる。冷却速度は、37.4°C/minで行った。

今回、サイズの大きな魚卵を微量な外部溶

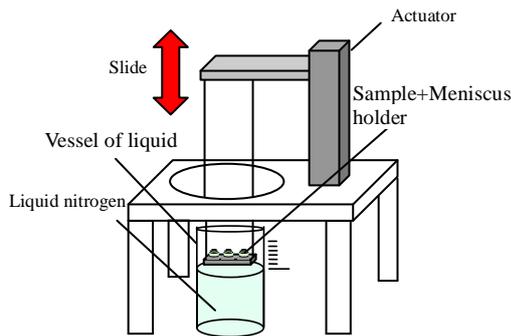


Fig.2 Experimental apparatus

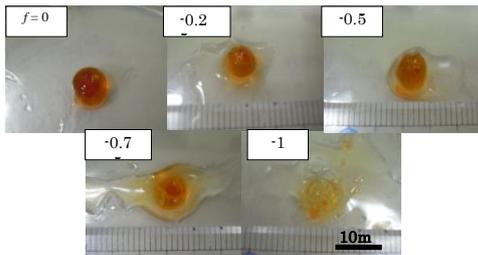


Fig.3 Evaluation points of shape after thawing

液で覆っており、浸透圧差による脱水が見込まないため、減圧下による常温脱水を事前に施した。先行研究により、凍結時の体積膨張による内部からのストレスを軽減するために、約15%の脱水を施し、冷却した。

解凍条件は、急激な水分の再吸収による細胞膜への影響を抑えるために、空气中(5°C)で緩慢解凍することにした。

(6) 評価方法：凍結・解凍後の魚卵の形状保存効果を評価するため、損傷状態を形状評価指数 f を用いて分類した。Fig. 3 に示すように、原形を留めて特段の損傷が見られない場合を $f=0$ 、膜が完全に損傷して内容物のほとんどが流出する場合を $f=-1$ とし、中間状態を内容物の流出状態に応じて3つに分け、全5段階評価を行った。サンプル数を N とした場合の評価値を次式で与え、これを形状保存割合 η と定義した。今回、実験したサンプル数は20個である。

$$\eta = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (1 + f_i)$$

4. 研究成果

(1) 外部溶液(メニスカス溶液)の影響

メニスカスホルダーの影響を検討する前に、メニスカス溶液の種類による液膜の凍結速度を評価した。魚卵には、メニスカスホルダーを必要としないタラコを使用した。

Fig. 4 にメニスカス溶液の凍結伝播速度を示す。純水の場合には、液量が少なく、冷却速度の遅い方が氷晶伝播は小さくなるが、25%トレハロースを用いれば伝播速度が大きく低下するとともに、液量・冷却速度による差が小さく、条件の選択範囲が広がるのがわかった。これにより、魚卵を外部よりメニスカス溶液の凍結によって保護するためには、凍結伝播速度の小さい25%トレハロース水溶液を用いることが有効と判断した。

(2) イクラの形状保存効果に及ぼす脱水量と解凍速度の影響

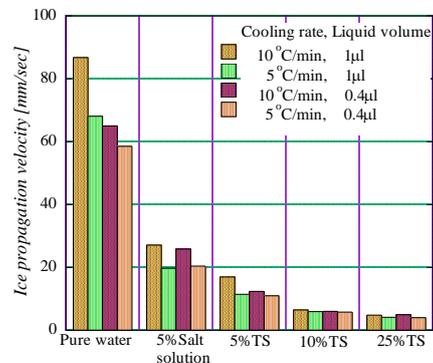


Fig.4 Effects of external solution and cooling rate on ice propagation velocity in meniscus

タラコの実験から 25%トレハロース水溶液を用い、 -5°C まで $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 -25°C まで $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、その後液体窒素中で急冷する3段階冷凍を行った。その際、凍結前に真空脱水を施して脱水量の影響、さらには解凍速度の影響も評価した。解凍は、外気温 15°C 下、および 5°C の冷蔵庫内での自然解凍の2種類で比較した。Fig.5 にその結果を示すが、16%の予備脱水と緩慢解凍を行った場合に、およそ8割の形状保存効果がみられた。

(3) メニスカスホルダーの改善効果

魚卵を懸濁液中に浸したのも、何も処置せず空气中に暴露しているもの、脱水処理を施した後に液体メニスカスで覆ったものについて、凍結・解凍後の形状評価結果を Fig.6 に示す。Fig.5 で示したメニスカスホルダーでの結果も載せている。これより、魚卵をメニスカスで覆うことにより、形状保存割合が高くなるのがわかる。魚卵の周りをメニスカスで覆うことにより、細胞外部の氷晶成長による機械的ストレスを減らすとともに、メニスカス部が凍結することにより卵膜の保護層が形成されたことが大きな要因だと考える。また、先行研究で用いたホルダーと比較すると、100%近い形状保存効果がみられた。先行のホルダーは外部溶液の滴下量が 0.2ml であるのに対し、ホルダー形状の改善により滴下量は 0.07ml と減った。滴下量の減少により、細胞外部に形成される液体メニスカスの厚さも減少し、外部溶液凍結時の体積膨張による機械的ストレスが低減した。そのため、外部溶液の氷晶成長によるストレスが魚卵側ではなく、表面フリーな大気側に働くことで細胞に加わるダメージを減少でき、形状保存に改善がみられると推察する。

以上より、脱水処理と液体メニスカスの組み合わせが効果的であることがわかった。今後は生体機能の保存効果の検証が望まれる。

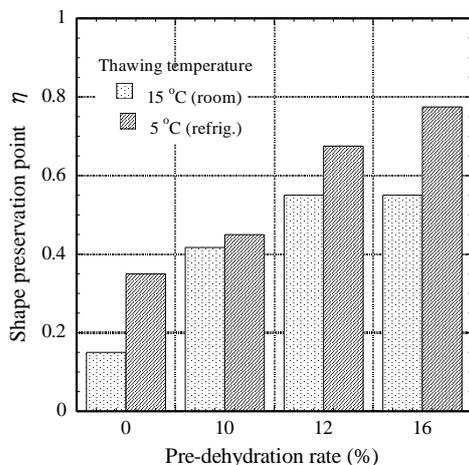


Fig.5 Effects of pre-dehydration and thawing rate on evaluation point of salmon egg

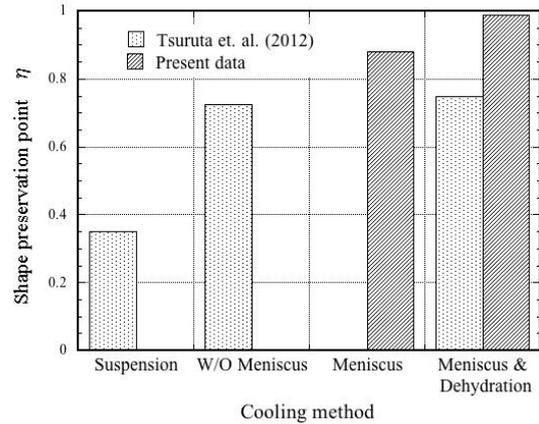


Fig.6 Effects of pre-dehydration and thawing rate on evaluation point of salmon egg

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 木戸賢幸, 液体メニスカスを用いた魚卵の冷凍保存の改善効果, 第50回日本伝熱シンポジウム, 2013年5月30日, 仙台市
- ② 鶴田隆治, 液体メニスカスを用いた魚卵の冷凍保存, 2012年度日本冷凍空調学会年次大会, 2012年9月12日, 札幌市

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 魚卵の凍結保存法

発明者: 鶴田隆治

権利者: 国立大学法人九州工業大学

種類: 特許

番号: 特願2012-123244

出願年月日: 2012年5月30日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴田 隆治 (TSURUTA TAKAHARU)

九州工業大学・工学研究院・教授

研究者番号: 30172068