

博士論文

氷及びガスハイドレートを利用した生鮮野菜の  
長期保存法に関する基礎研究

2010年1月

東京大学大学院農学生命科学研究科

生物・環境工学専攻生物プロセス工学研究室

安藤 寛子

# 目次

第1章 序論 .....	1
第2章 研究背景と目的.....	4
2. 1. 野菜の劣化と保存の意義.....	4
2. 2. 氷と凍結.....	6
2. 2. 1. 氷の構造.....	6
2. 2. 2. 水および食品の凍結 .....	7
2. 2. 3. 農産物の凍結保存に関する研究の歴史 .....	9
2. 2. 4. 凍結・解凍処理後の野菜組織の軟化メカニズムの仮説 .....	15
2. 3. ガスハイドレートとガスハイドレートの形成 .....	17
2. 3. 1. ガスハイドレートの構造 .....	17
2. 3. 2. ガスハイドレートの形成 .....	19
2. 3. 3. ガスハイドレートを用いた保存法及び類似研究の歴史 .....	22
2. 4. 本研究の目的.....	24
2. 5. 試料の選定 .....	26
第3章 凍結・解凍処理後の組織テクスチャーの変化の評価法 .....	29
3. 1. 緒言.....	29
3. 3. NMR を用いた細胞膜の水透過性の変化の検討.....	32
3. 3. 1. NMR の概念.....	32
3. 3. 2. 拡散と制限拡散現象.....	33
3. 3. 3. NMR を用いた植物組織の水透過性の測定.....	34
3. 3. 4. 実験方法 .....	35
3. 3. 5. 結果.....	37
3. 3. 6. 考察.....	42
3. 4. テクスチャーの変化の測定 .....	45
3. 4. 1. 実験方法 .....	45
Fig.3-12 Example of stress-strain curve measured by rheometer. ....	46
3. 4. 2. 結果と考察.....	47
3. 5. 考察.....	50
3. 6. 結論.....	52

第4章 浸透圧脱水凍結法による組織テクスチャーの保持効果 .....	53
4. 1. 緒言 .....	53
4. 2. 試料の調製 .....	54
4. 3. 実験方法 .....	55
4. 4. 結果 .....	60
4. 5. 考察 .....	73
4. 6. 結論 .....	77
第5章 組織におけるガスハイドレートの形成 .....	78
5. 1. 緒言 .....	78
5. 2. X線回折法を用いたXeハイドレート形成の確認とNMRを用いたXeハイドレート形成割合の評価 .....	80
5. 2. 1. 試料の調製 .....	80
5. 2. 2. 実験方法 .....	81
5. 2. 3. 結果と考察 .....	83
5. 3. NMR-Imaging法を用いた組織内部におけるXeハイドレート形成・成長の観察 .....	89
5. 3. 1. 試料の調製 .....	89
5. 3. 2. 実験方法 .....	89
5. 3. 3. 結果と考察 .....	91
5. 4. 考察 .....	95
5. 5. 結論 .....	97
第6章 ガスハイドレートを利用した野菜の保存 .....	98
6. 1. 緒言 .....	98
6. 2. Xe分圧に依存したXeハイドレートの形成割合 .....	99
6. 2. 1. 試料の調製 .....	99
6. 2. 2. 実験方法 .....	99
6. 2. 3. 結果と考察 .....	99
6. 3. Xeハイドレート形成・解離処理後のテクスチャーの変化 .....	104
6. 3. 1. 試料の調製 .....	104
6. 3. 2. 実験方法 .....	104
6. 3. 3. 結果と考察 .....	105
6. 4. ガスハイドレートを利用した保存法の効果の検討 .....	110
6. 4. 1. 試料の調製 .....	110

6. 4. 2. 実験方法 .....	110
6. 4. 3. 結果と考察.....	112
6. 5. 結論.....	116
第7章 結論 .....	117
7. 1. 各章のまとめと本論の結論 .....	117
7. 2. 氷及びガスハイドレートの形成と保存後の食感変化の仮説 .....	120
7. 3. 本論の意義と長期保存法の実用化への課題.....	123
参考文献.....	125
謝辞.....	133

## 第1章 序論

生鮮野菜の鮮度低下や劣化の早さは、食品の多量廃棄(農林水産省大臣官房統計部, 2009)や消費量の低下を引起す深刻な問題である(津志田, 2003). これらの解決策として、生鮮野菜の長期保存技術の開発が期待されている. すでに低温保存は、野菜自身の生理活性や表面付着微生物の増殖の抑制を可能とする一般的な保存法として、利用されている. しかし、その保存期間は数週間程度である.

生鮮野菜の鮮度低下や劣化は、組織内に多量に含まれる「水」の状態と関係する(津志田, 2003). 食品保存においても、水中の水素結合の状態に依存した水の状態は、その保存期間を決定する重要な因子である. 第2章で詳しく述べるが、温度の低下に伴って液体の水中の水素結合は発達し、凝固点(0°C)以下の温度に達すると、水は「氷」に状態を変化させる. その過程に伴い、水分子の運動性は徐々に低下していく. そのため、低温保存を行うと、水の状態と密接な関係を持つ生命活動が抑制され、保存期間が延長されるのである.

相対的な温度低下を意味する低温とは異なり、水の凝固点以下の温度を利用した凍結保存法は、食品の品質保持期間を飛躍的に延長できる保存法である. すでにマグロなどの生鮮動物性食材の保存法として一般的に使用されている. しかし、その成分や構造が複雑な食材において、適切な方法が理解されているわけではなく、その保存法は経験を基にしている場合が多い. 生鮮野菜の場合、凍結・解凍処理後の著しい組織軟化を抑制する方法は、科学的にも経験的にも見出されておらず、現状、物理的変化を伴わずに生野菜として凍結保存することは不可能である. この凍結保存に伴う組織軟化は、氷の形成による細胞構造の物理的損傷が原因と考えられ、長きに渡って検討されてきた. しかし、植物組織に特有な細胞壁、さらに動物とは明らかに異なる細胞膜の性質が、生鮮野菜の“組織”としての軟化現象の理解を困難にしてきた(Fennema *et al.*, 1973). この様な組織軟化の理解の遅れが、生鮮野菜に適切な凍結保存条件、ひいては、より適切な長期保存技術の確立の妨げとなっていると考えられる.

水は、0°C以上の温度においても疎水性ガスの溶解によって固化する。この氷様結晶は「ガスハイドレート」と呼ばれ、その構造特性から氷と比較して説明されることが多い(Salon and Koh, 2007)。この結晶は、Pauling (1961) によって麻酔メカニズムとの関連が示唆されるなど、生物との関係についても検討されている。また、食品保存法への利用のコンセプトも提案されている。しかし、ガスハイドレートの形成に際して圧力を要することや、生物組織の非破壊測定技術の不備など機械的問題から、ほとんど検討されない状態で 1971 年を最後に研究報告が途絶えてしまっている(Huang *et al.*, 1965; Fennema and Thompson, 1971)。しかし、ガスハイドレート結晶物性に関する基礎研究の進展や生物組織の非破壊測定技術が発達した今日において、この機器的な問題はクリア可能と考えられる。そして、その形成・成長に関する特性を熟知し利用することで、凍結保存法の問題点である組織軟化を抑制した、新しい生鮮野菜の長期保存技術となることが期待される。

これらの背景を受けて、本研究の目的は、生鮮野菜の長期保存技術の提案とした。まず、一般的に称されている食品の長期保存法である凍結保存法に関して検討した。特に、生鮮野菜の凍結保存において問題点とされる組織“軟化”の観点から検討を行うこととした。その後、得られた知見を基に、新しい長期保存技術として、ガスハイドレートを用いた保存法について検討した。

本論は第7章から構成し、第1章は序論を記した。第2章では、凍結保存法およびガスハイドレートを利用した保存法に関する既往の研究を概説した。そして、既往の研究における問題点の抽出と本研究の目的を記した。第3章では、凍結・解凍処理後の組織軟化の評価手法を提案した。そのために、NMR (Nuclear Magnetic Resonance)を用いた水分子の拡散係数測定から得られる組織のダメージに関する結果と、テクスチャーの変化の対応関係を検討した。第4章では、提案した組織軟化の程度の評価手法を用いて、浸透圧脱水凍結法の組織軟化抑制の効果について検討した。

得られた知見を基に、第5章・6章では、ガスハイドレートを用いた生鮮野菜の長期保存法

について検討した。まず、ガスハイドレートを利用した野菜の保存法を検討する基礎として、第 5 章で野菜組織内におけるガスハイドレートの形成について検討した。組織におけるガスハイドレートの形成の確認を、粉末 X 線回折測定と NMR を用いた組織内の水の固液状態変化の測定より行った。併せて、その形成箇所・成長プロセスを観察するため、NMR イメージング法を用いた組織内部の切像断面の観察を行った。そして、第 6 章でガスハイドレートを利用した保存に関して検討した。凍結保存法において問題とされた組織軟化の観点より、ガスハイドレートの形成の影響を、第 3 章で示したテクスチャー評価手法を用いて検討した。併せて、一般生菌数の増加を測定し、食品としての品質保持期間の延長の程度を示した。そして、第 7 章で得られた結果を総括し、今後の課題を述べることとした。

## 第2章 研究背景と目的

### 2. 1. 野菜の劣化と保存の意義

野菜は、ビタミン・ミネラルなどの供給源であり、また生活習慣病予防のため、我々の食生活に欠かすことのできない食品の1つである。しかし、その消費量は、減少の一途を辿っている。また野菜は、生鮮食品素材(野菜類, 果実類, 魚介類, 肉類)の廃棄量の約60%を占める。地球規模の深刻な食糧問題をかかえる現在において、その低減は解決すべき課題の1つとされている(農林水産省大臣官房統計部, 2009)。このような問題を生む原因は、野菜の鮮度低下・劣化の早さによると言われ、その解決策として、生鮮野菜に適切な長期保存技術の確立が期待されている(津志田, 2003)。

野菜の鮮度は、色調・光沢などの外観要素、香りの香味要素、ハリ・かたさなどの組織要素から評価される(今堀, 2002)。野菜は、収穫後も一個の独立した植物体として呼吸・蒸散作用などの生命活動を行うため、その生理活性の高低に関して鮮度の変化も異なる。そのため、適切な条件での取り扱いを欠くと、早期の鮮度低下、さらには変質・腐敗までもを招き、食品としての品質を著しく損なう。野菜の鮮度保持に関わる環境要因は、主に温度・湿度・環境ガス組成に分別できる。特に、温度は、野菜の生理活性に影響を及ぼす重要な要因と言われ、“低温”を用いた保存法が良く使用される(今堀, 2002)。温度(絶対温度)と諸成分の化学反応がアレニウス式に従うことより、低温すなわち“温度を下げる”ことで、組織内の諸成分の化学反応速度は抑制されることがわかる(上平・逢坂, 1991)。従って、低温保存法は、食材自体の代謝や表面付着微生物の繁殖による劣化を抑制できるのである。

低温保存といっても、チルドや冷蔵といった水の固化温度以上の温度を利用した保存法と、凍結といった水の固化温度以下の温度を利用した保存法がある。チルド・冷蔵保存は、凍結保存より保存期間は短いものの、呼吸等の代謝抑制効果によって生の状態のまま保存期間を

延長できる(今堀, 2002)。一方, 凍結保存は, 生物としては死滅してしまうものの, 組織中の水の固化により, 飛躍的に長期間の品質保持が可能となる。しかし, “生鮮”野菜の場合, 凍結・解凍処理後の組織軟化が著しく, 凍結保存において生食用の生鮮野菜を保存することはできないとされている(加藤, 1974)。

従って, 現状, 生鮮野菜に適した長期保存法はないと考えられた。しかし, 組織内の“水”の状態に着目し, 保存法を検討していくことで, 新しい長期保存技術を見出す手がかりになると考えられる。こういった研究を行うことは, 消費量の低下や多量廃棄量の問題解決, また食材廃棄による経済損失の低減にも繋がるだろう。従って, 生鮮野菜の長期保存法の検討は, 様々な利益をもたらし, 我々のより良い未来を築くために必要な研究課題の1つと言える。

## 2. 2. 氷と凍結

### 2. 2. 1. 氷の構造

氷には安定な結晶形が 8 つあるが (Hobbs, 1974), 生物や食品の保存に関係する氷は, 安定な結晶系である氷  $I_h$  と準安定な結晶系である氷  $I_c$  である. Fig.2-1 に氷  $I_h$  と氷  $I_c$  の構造を示す. 氷は任意の水分子の酸素原子を中心にして, 正四面体の頂点方向に隣接水分子の酸素原子が位置する構造を成している. 氷  $I_c$  と比較して, 氷  $I_h$  の結晶格子は, 非常に隙間が多い. しかし, 結晶構造の中には溶質は取り込まれにくいことが知られている (上平・逢坂, 1991).

Fig.2-1(A)に示す氷  $I_h$  は, いわゆる“通常”の氷である. 酸素原子 O は規則的な六方晶系格子を形成し, O-O 軸上には1個の水素原子が位置し, 各酸素原子は正四面体の頂点に位置する他の4個の酸素原子と水素結合によって結ばれている. 生物組織内の希薄な水溶液を凍結した場合, ほとんど氷  $I_h$  が形成される (フランクス, 1989). 一方, Fig2-1(B)に示す立方晶系格子の氷  $I_c$  は, 液体の水からも他の安定な氷の結晶形からも直接得ることができない, いわゆる“非晶質”の氷 (ガラス化した氷) の形成に際して得ることのできる氷である. そのため, 氷  $I_c$  は生体凍結保存を成功させるための鍵といえるが, 現状, その存在はゲルやスクロース溶液などで形成することが報告されるのみである (Dubochet *et al.*, 1991; Kohl *et al.*, 2000; Thanatuksorn *et al.*, 2008). この氷  $I_c$  は,  $-120^{\circ}\text{C}$  以上に温めると安定な氷  $I_h$  となる (上平・逢坂, 1991).

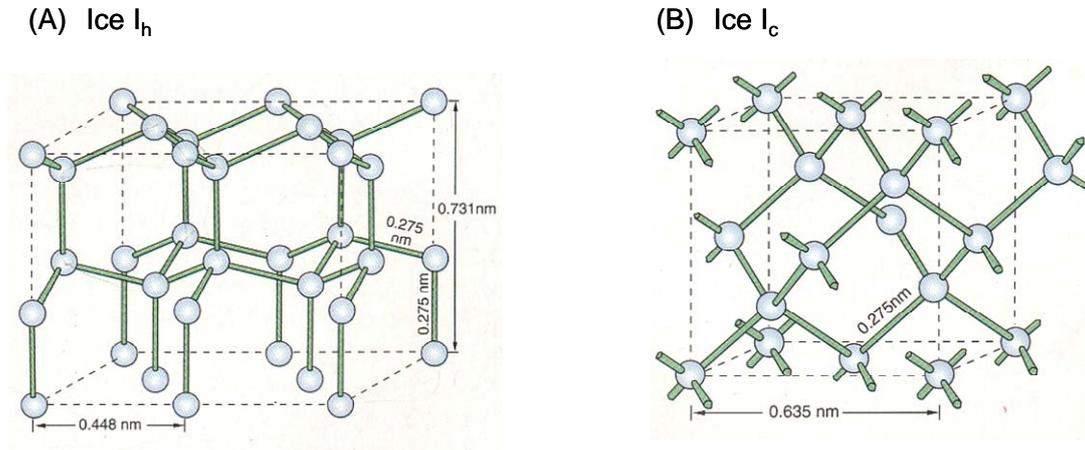


Fig.2-1 Structure of ordinary (A) hexagonal ice I<sub>h</sub>, and (B) cubic ice I<sub>c</sub>, showing oxygen atoms only. (Markham, 1997)

### 2. 2. 2. 水および食品の凍結

水の平衡凝固点は0°Cであるが、この温度は液体の水と氷が共存する温度であり、実際にはもう少し低温で凍る。この現象は過冷却とよばれる(Fig.2-2 A)。液体の水から氷が形成するためには、分子が凝集するための“核”の形成が必要である。有効な核とは、ある分子集団が動き回っている他の分子によって、固相の構造と類似していると“認識される”様な集合のことである。この様な分子集合(クラスター)は、液体中の無秩序密度揺動によって自発的に発生するが、分子の自己拡散速度に依存する有限な寿命を持っており、結局は消滅してしまう。こうして、クラスターが結晶化のための有効核となる確率は、クラスターのサイズと寿命に依存し、それは温度の関数で示される。凝縮の確率がほとんど1となる温度は、均質核生成温度と呼ばれている。この様な、無秩序密度揺動による核生成を均質核生成と呼ぶ。しかし、液体の水には、チリ粒子やゴミのような異物質を含んでいることが多く、この異物質粒子の表面に水分子が吸着することによって核形成がなされることが多い。この様な現象によって核の形成が成される場合、そのプロセスは不均質核生成と呼ばれる。食品などの様々な溶質が混在した系においては、含まれる異物質によって、不均質核生成が起こる場合が多い(フランス, 1989)。

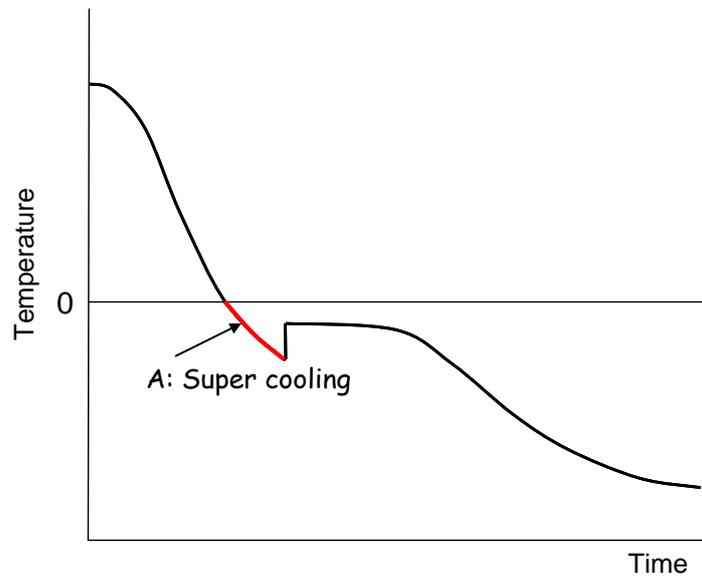


Fig.2-2 Typical cooling and freezing curve in food. (鈴木, 2009)

野菜の様な食品は、簡単に言えば細かなコンパートメント(細胞)に仕切られた内部と外部に水が存在する系である。細胞内部と外部にある水溶液の溶質濃度を比較すると、細胞外部で溶質濃度は薄くなっているといわれている(鈴木, 2009)。従って、水溶液の濃度に依存する凍結点の降下の度合いは、細胞外よりも細胞内で大きい。そのため、細胞外の溶液がより高い温度で凍り始める。冷却を緩慢に行った場合、凍結点に初めに達するのは細胞外であり、この部分にまず氷核が形成し、氷結晶が成長する。さらに細胞外の氷は隣接する細胞内の水を結晶素材として成長するため、細胞は脱水かつ押しつぶされ、物理的な障害が引起される。このような過程を細胞外凍結と呼ぶ。一方、冷却速度が速い場合、温度は急速に下がり、細胞内外を問わず両者の凍結点以下の温度にすばやく到達するため、氷が細胞内部と外部でほぼ均一に起こる。この様に、細胞内外で同時に氷が形成することにより、細胞膜等が受ける物理的障害は、緩慢凍結した場合よりも少ない(鈴木, 2009)。マグロ筋肉組織における細胞外凍結と細胞内凍結の例を Fig.2-3 に示す。

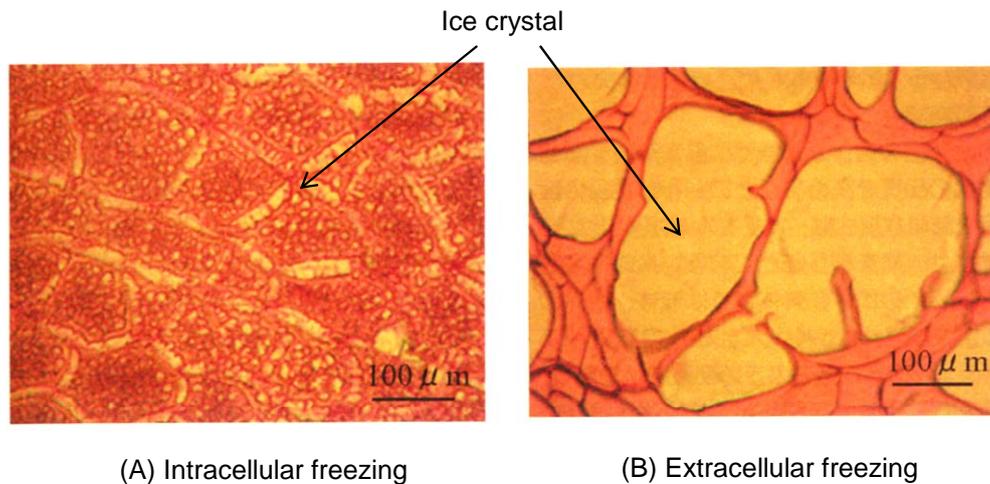


Fig.2-3 Ice crystal formation by (A) intracellular and (B) extracellular freezing in tuna muscle tissue. (鈴木, 2009)

### 2. 2. 3. 農産物の凍結保存に関する研究の歴史

凍結保存技術は、1914年に勃発した第1次世界大戦を期に、アメリカ・ヨーロッパにおいて積極的に研究され始めた(Morris, 1968)。日本でも1930年、商業目的でイチゴの冷凍食品が製造されたことが始まりと言われている。現在では、 $-60^{\circ}\text{C}$ で保存する超低温保存も可能となり、マグロなどの動物性の生鮮食品素材においては、半永久的に近い保存が可能であるとされている(加藤, 1974)。しかし、生鮮野菜の様な植物性の食材の場合、凍結・解凍処理後の組織の物理的劣化、すなわち“軟化”が著しい。Fennemaらの研究グループは、1973年に出版された著書“*low-temperature preservation of food and living matter*”の中で、凍結・解凍処理による農産物組織の軟化に関する報告をまとめた。そして、“*General agreement among food scientists has not been reached as to the effect of freezing rate on the textural quality of vegetable*”と述べている(Fennema *et al.*, 1973)。現在(2009年)においても、生鮮野菜の凍結保存における組織軟化は、大きな問題とされ、その原因理解のために検討が続けられている。

Sachs (1882)は、野菜などの植物組織における凍結・解凍処理によるダメージを実験的に初めて示した研究者と言われている(Morris,1968)。彼は、ホウレンソウなどの水分の多い野菜組織を用いて、凍結に伴う組織・細胞の形体の変化について観察した。そして、 $-5\sim-10^{\circ}\text{C}$ の凍結庫で野菜をゆっくり凍結すると、表皮組織と柔組織、柔組織と維管束など細胞間壁に薄い氷膜が形成し、凍結することを報告した。この結果を受けて、彼は、野菜組織の凍結・解凍処理によるダメージの原因を予測した(Sachs, 1882)。すなわち、

“凍結速度が非常に遅い場合、組織はその細胞壁部分より凍結を起こす。この細胞壁部分に形成した氷は、細胞壁間の水溶液濃度を上昇させるため、細胞内の水は細胞壁部分(細胞外)へ引き寄せられ凍結する。そのため仮に、凍結中に、細胞に何の損傷も起こらないとすれば、細胞壁部分へ引き寄せられた水を元の場所に戻す操作、例えば、非常にゆっくりとした解凍処理を行うことで、野菜組織は復元するだろう。しかし、組織内の水分が多い組織では、凍結に伴う細胞内・外の水溶液濃度変化は著しく、組織は致命的なダメージを受け、解凍処理後の復元は不可能となる。”

彼の仮説は、細胞外より凍結が始まる「細胞外凍結」、さらに細胞内外の水移動に関する「凍結濃縮」の理論を取り入れた仮説であったと考えられる。

20世紀になると、凍結速度と組織構造の劣化を題材とした研究が、盛んに行われ始めた。Woodroof(1938)は、イチゴ、ラズベリー、モモ組織の細胞構造に対する凍結・解凍処理後のダメージ程度を、凍結速度の観点から検討した。その結果、凍結速度が速い(急速凍結)場合、それが遅い(緩慢凍結)場合と比較すると、細胞構造の破壊が抑制されることを、光学顕微鏡観察の結果より報告している。その後、凍結速度と細胞構造の破壊程度の関係は、形成する氷のサイズに依存することが報告された(Fennema *et al.*, 1973)。すなわち、急速凍結処理は、形成する氷のサイズを小さくできることを示した。

20世紀後半には、凍結速度に依存して形成する氷のサイズと組織の物理的ダメージの関係が、組織軟化の観点から議論されるようになった。(Guadagni, 1969)。Brown(1967)は、官

能試験において、液体窒素(-198℃)と-20℃雰囲気内で凍結処理したグリーンピースの解凍処理後の軟化の程度について検討した。その結果、液体窒素を用いた急速凍結・解凍処理後の組織は、未凍結の組織と近いテクスチャーが保たれていることを報告した。同様の報告は、Gutschmidt(1968)においてもされている。しかし、これらの研究の凍結保存期間は1日と短く、より長い凍結保存期間では組織軟化が起こることも示されている(Fennema *et al*, 1973)。更に、Leeら(1946)は、同様の研究を洋ナシとグリーンピースを用いて行った。その結果、急速凍結は、緩慢凍結よりも組織を軟化させることを報告した。彼らは、その理由を、液体窒素を用いて急速凍結することで凍結中に組織にひび割れが生じたためと報告している。また、Lee and Johannesson (1951)は、凍結・解凍処理後の組織軟化を防止する方法としてシロップ液や液体亜酸化窒素に浸漬・凍結処理する方法を提案した。このような方法を用いて組織を凍結保存すれば、6ヶ月間凍結保存しても解凍後の組織軟化が抑制されることを報告した。

これらの結果を受けて、Fennemaら(1973)は、凍結速度の観点から凍結・解凍処理後の野菜組織の軟化の原因を次の様に記した。

“緩慢凍結処理による細胞外での氷結晶の肥大化は、組織の物理的特性を保っている細胞壁(セルロース・ペクチン)の構造にダメージを与え、細胞構造の破壊・細胞壁間の剥離を引起す。この大きなサイズの氷の形成による組織構造の破壊は、解凍後の組織軟化の程度とよく相関しており、これが組織軟化の原因である”

組織軟化の仮説が細胞壁に関する構造の破壊より説明されていた20世紀後半に、Mohr and Stein(1969)は、細胞膜の観点から凍結・解凍処理後の組織軟化を考察した。彼らは、植物細胞には細胞膜とその中に閉じ込められた多量の水によって膨圧が生じていることに着目した。凍結・解凍処理によって細胞膜が損傷し、その半透性を消失することで組織軟化が起こると示唆した。

1970年代以降、凍結・解凍処理後の組織軟化メカニズムの解明はされないまま、食品科学における凍結保存研究は沈静化した。一方、植物生理学の分野において、現在提案されてい

る生鮮野菜の凍結保存法の基礎となる2つの報告がなされた。その1つは、植物細胞分離体プロトプラストを用いた細胞膜に対する凍結・解凍処理のダメージに関する研究である。Morris and Clarke(1981)は、一般的な生物細胞において、細胞膜は、細胞内外での物質やエネルギーの交換については基本的なレベルでの浸透平衡を保つ仲介者の様な役割を持つ重要な部位であるとし、この細胞膜の損傷が凍結損傷の第一原因であると述べた。その後、Steponkus ら(1983)は、ライムギのプロトプラストを用いて凍結・解凍処理に伴う細胞膜ダメージについて報告した。また、酒井ら(1990)によって報告された植物茎頂の超低温保存法は、植物生理学における一大革命とも評され、後に植物ジーンバンク設立に大いに貢献した。いわゆる“ガラス化”を利用した植物の保存法は、解凍後の細胞から組織の再生を可能とした。ジメチルスルホキシド(DMSO)などの凍結保護物質を含んだガラス化溶液を、0.1%のスクロース水溶液で希釈した60%ガラス化水溶液内に細胞を浸漬し、 $-198^{\circ}\text{C}$ の液体窒素を用いた凍結を行うという凍結保存法方である(ガラス化法)(酒井, 2006)。しかし、細胞サイズの大きな柔組織に対して適切な凍結保存条件を見出すには至っていない。

これら植物生理学分野の報告に影響を受けて、1990年以降、現在(2009年)に至るまで、野菜の組織軟化の原因は、細胞壁と細胞膜の2つの観点より考察されるようになった。Ishikawa ら(1997)は、植物細胞と動物細胞の細胞膜の水透過性の差に着目することで、凍結・解凍処理後の植物組織の軟化メカニズムの仮説を示した。彼らは誘電率測定において、コメとブドウのプロトプラストの細胞膜の水透過性が、動物細胞の細胞膜のそれよりオーダー的に低いことを明らかにした。この結果を受けて、Fig.2-4 に示すように、生鮮植物は、凍結に伴う水分移動が起こりにくいため、凍結過程に生ずる水分移動で、細胞膜は破裂してしまうと考察した(宮脇, 1998)。その後、彼らの研究グループは、リード共振法による農産物の粘弾性測定より、組織軟化と細胞膜の水透過性の増大に関係があることを示した(大西と宮脇, 2000)。しかし、凍結・解凍処理後の細胞膜の水透過性の変化は、組織を分離した細胞においてのみしか検討されておらず、細胞膜の水透過性と“組織”の軟化の関係を証明するには至っていない。一方、

細胞壁の観点から、Fuchigami ら(1995A)は、細胞壁成分であるペクチンと破断強度の関係について検討した。その結果、凍結・解凍処理後のニンジン組織は、破断強度の低下と共に、水溶性のペクチンの量が減少することを示した。また、細胞間の剥離が、非常に緩慢な条件で冷却・凍結させた時にのみ生ずることも報告した(Fuchigami *et al.*, 1995B; Roy *et al.*, 2001)。

1990年代以降にも、上述のような組織軟化の原因理解のため、研究報告はなされている。しかし、その進展はほとんどなく、基礎的な研究と比較して実用的な凍結保存法に関する研究が盛んとなった。そして、植物生理学において提案されたガラス化法の影響を受けた“浸透圧脱水凍結法”に関する研究が多く検討されるようになった(Biswal *et. at.*, 1991; Spiazzi *et al.*,1998; Garrote and Robbers *et.al.*, 1997; Moyano *et.al.*, 2002; Ohnishi and Miyawaki, 2005)。浸透圧脱水凍結法は、凍結前処理として、高濃度のスクロース水溶液などを用いて組織内の水を脱水すると、形成する氷の量が減するため、氷の形成によって生じるダメージを軽減できるとされている。この方法を用いて凍結保存することで、ニンジンやブロッコリーなどの野菜組織の凍結・解凍処理後の組織軟化を抑制できることが報告されている(Ohnishi and Miyawaki, 2005)。しかし、ジャガイモなどの組織ではその効果は観察できないこと、また組織軟化を完全に抑制できるわけではない(Ohnishi and Miyawaki, 2005)。従って、現在においても、生鮮野菜の凍結保存は困難であると言え、更なる検討が必要と考えられる。

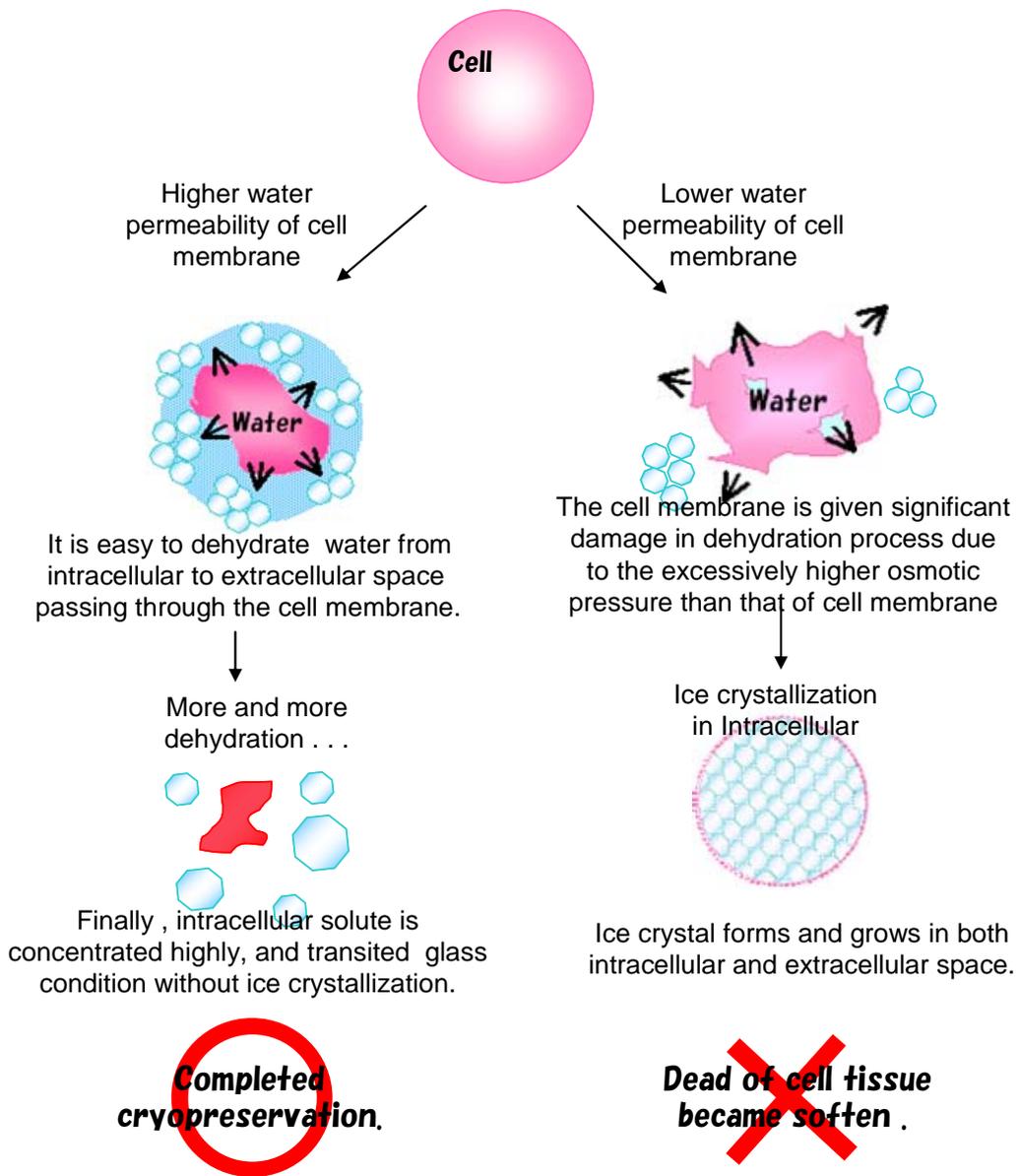


Fig.2-4 Hypothesis of freezing process and succeeding damage mechanisms in a cell after freezing and thawing.

## 2. 2. 4. 凍結・解凍処理後の野菜組織の軟化メカニズムの仮説

現在、凍結保存における生鮮野菜の組織軟化メカニズムの仮説は、下記の様な「細胞壁」と「細胞膜」の観点より、それぞれ説明されている(宮脇, 1998).

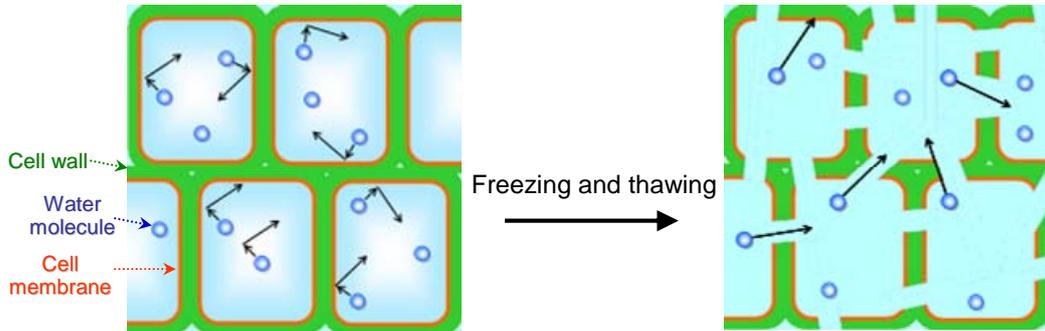
### 1. 細胞壁の変化による組織軟化説

生鮮野菜の細胞壁はかたくしっかりとした構造である。そして、この細胞壁の“かたさ”が、野菜の独特な食感を生み出す原因である。しかし、組織が凍結すると、細胞内・外に氷結晶が生じ、細胞壁の構造は激しく破壊される。従って、組織に“かたさ”をもたらしていた細部壁の構造が破壊されることで、組織が軟化する(Fig.2-5(A)).

### 2. 細胞膜の変化による組織軟化

生鮮野菜の“かたさ”や“張り”といった独特の食感は、細胞の膨圧によって生じている。すなわち、細胞壁は、元々、水をよく透過させるネット状の構造である。しかし、細胞膜の水透過性が非常に低いため、細胞に膨圧が生じ、その“かたい”構造を保っている。凍結よって氷結晶が形成すると、細胞内から外に水分移動が生じる。この課程で、元々、水透過性の低い野菜の細胞膜は破壊され、膨圧が失われる。従って、膨圧によって膨らんだボールの様に“かたさ”を保っていた組織は、軟化してしまう(Fig.2-5(B)).

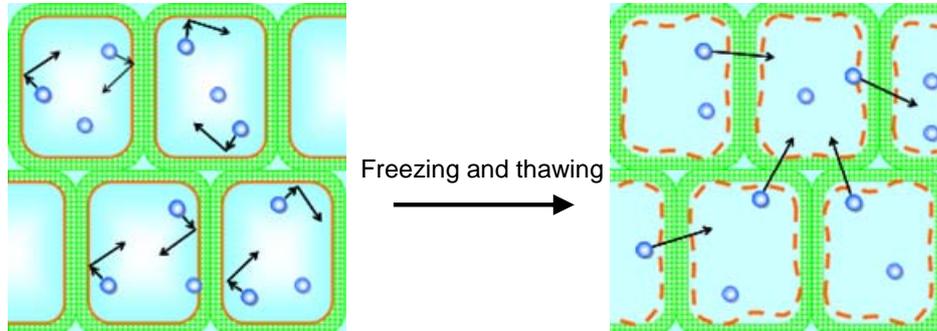
(A) Destroy of cell structure related to cell wall after freezing and thawing



Texture of fresh vegetable such as firmness and crispy is given by characteristics of cell wall structure which is strong and hard.

Cell wall structure is dramatically destroyed in freezing and thawing process. As a result, texture of the vegetable softens after thawing.

(B) Change in water permeability of cell membrane after freezing and thawing



Specific texture in fresh vegetable is given by turgor pressure of cells caused by both lower water permeability of cell membrane and strong structure of cell wall.

Turgor pressure in vegetable decreases with increasing of water permeability of cell membrane due to rapid transfer of water in freezing and thawing process. As a result, texture of the vegetable softens after thawing.

Fig.2-5 Hypotheses of the softening mechanism in fresh vegetable tissue by freezing and thawing.

## 2. 3. ガスハイドレートとガスハイドレートの形成

### 2. 3. 1. ガスハイドレートの構造

ガスハイドレートは、水分子によって形成された籠状構造の中心に、ゲスト分子として疎水性のガス分子などが包摂された氷様結晶である。包摂するゲスト分子類によって、形成に必要な圧力・温度の条件が異なる。ガスハイドレート形成能を持つゲスト分子およびその構造・形成条件を Table.2-1 に記す。

Table.2-1 List of simple structure I and structure II hydrate formers, hydrate structure and properties. (Salon and Koh, 2007)

Guest Molecule	Structure	T, °C at 0.1MPa	Year first reported
Ar	II	-124	1896
Kr	II	-49.8	1923
Xe	I	-10.4	1925
H <sub>2</sub>	II	-	1999
N <sub>2</sub>	II	-	1960
O <sub>2</sub>	II	-	1960
Cl <sub>2</sub>	I	9.7	1811
BrCl	I	18	1828
CO <sub>2</sub>	I	-55	1882
N <sub>2</sub> O	I	-	1888
H <sub>2</sub> S	I	0.4	1840
H <sub>2</sub> Se	I	8	1882
SO <sub>2</sub>	I	6.8	1829
CH <sub>4</sub>	I	-78.7	1888
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	I	-40.2	1878
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	I	-36.9	1888
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	I	-32	1888

ガス分子をゲストとしたガスハイドレートは、ゲスト分子となるガスのファンデルワールス半径の大きさに従い、Fig.2-6 に示す様なI型とII型の構造をなす。I型の構造は、12面体 $5^{12}$ を対軸立方格子の各点に配置し、間隙を14面体 $5^{12}$ 、 $6^2$ で埋めた構造をしており、結晶構造を成すそれぞれの構成比は1:3である。II型の構造は、16面体 $5^{12}$ 、 $6^4$ をダイヤモンド格子の各点に配置し、間隙を12面体 $5^{12}$ で埋めた構造をしており、その構成比は2:1である。ガスハイドレートの構造を測定できる方法として、X線回折測定、中性子散乱測定、ラマン分光測定、NMR測定がある。その中でも古典的な方法であるX線回折測定は、多岐に渡るガスハイドレートの構造に関する情報の取得に使用されてきた(Sloan and Koh, 2007)。

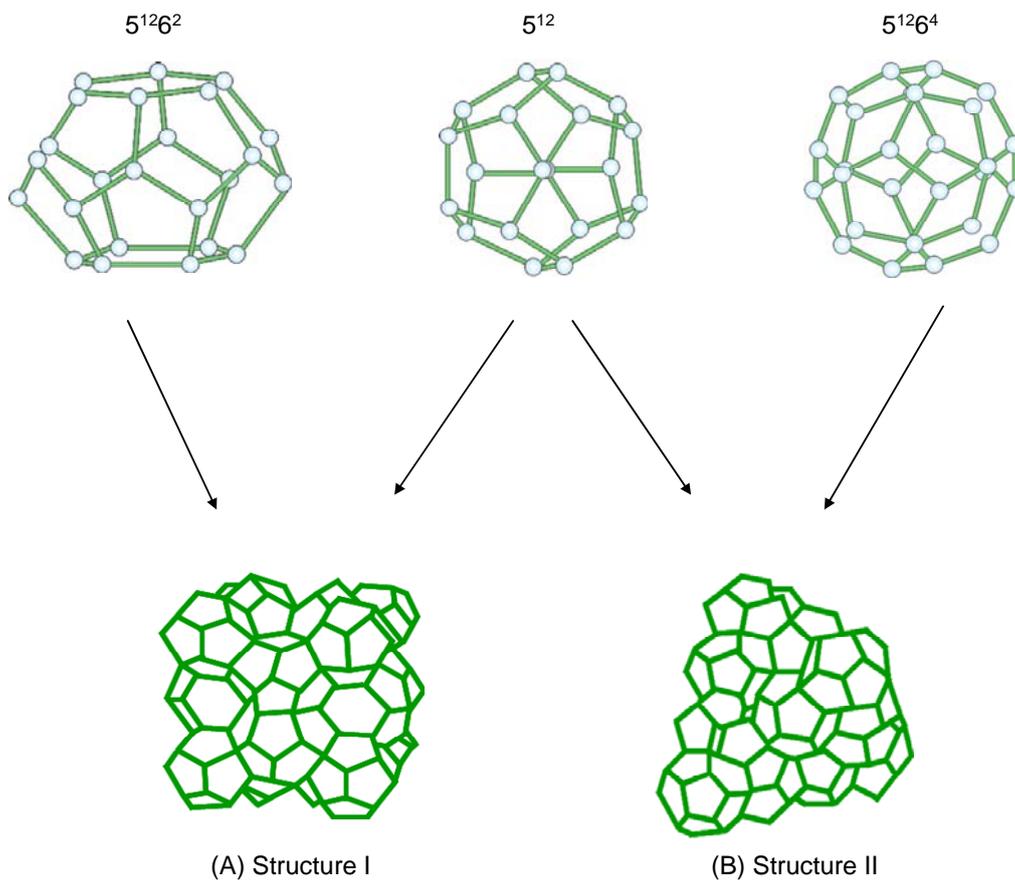


Fig.2-6 Gas hydrate structure, structure I and structure II showing oxygen atoms only. (Sloan and Koh, 2007)

### 2. 3. 2. ガスハイドレートの形成

ガスハイドレートの形成メカニズムは、氷の形成や疎水性ガスの溶解に関する事項、またこれらの現象のコンピューターシミュレーションの結果より説明されている。その形成は、塩水溶液から塩が析出するような現象であるといわれているものの、凍結現象において得られる過冷却水の様な、高度に水素結合ネットワークが発達した水が必要と考えられている。Fig.2-7 に、その形成プロセスのモデル図を示す。水は常温においても、水素結合によって水分子同士が結合し、五角形や六角形の不安定なクラスターを成している(A)。この水を疎水性ガス雰囲気下に静置すると、水-ガス界面に存在するクラスターにガス分子が吸着し、より積極的にガス分子の周りにクラスターが形成し始める(B)。この様な水素結合ネットワークが発達した水は「構造化した水」と呼ばれ、過冷却水と類似の構造をとっていると考えられている (Matsumoto *et al.*, 2002)。近年、この様な水素結合ネットワークによってある種の構造を持った水が、ガスハイドレート形成過程に存在することが中性子散乱測定によって報告された (山室と菊地, 2009)。その後、吸着されたガスの周りに完全なケージができ(C)、不安定なクラスターが結合・成長することでガスハイドレートが形成される(D)。ガス分子の濃度は、水-ガス界面において高いため、一般的に水におけるガスハイドレートの形成はガス-水の界面より生じる (Long and Sloan, 1996)。そして、ガスハイドレートは、水-ガス界面において、フィルム状の形成・成長をすることが知られている ((Huo *et al.*, 2001; Østergaard *et al.*, 2001; Taylor, 2007)。ただし、その形成は偶発的であり、水の凍結時にみられる、いわゆる均質核生成温度は示されていない。

生物組織を使用したガスハイドレートの形成過程に関する一般論は提案されていないが、ニンジン組織や牛筋肉組織において酸化エチレン (EO) 水溶液を用いたハイドレートの形成・成長の観察が行われている (Hulle and Fennema, 1971A, B)。この報告によれば、ハイドレートは細胞の周囲に形成・成長するとされている。この過程は、凍結において説明されるいわゆる緩慢凍結時に起こる氷の形成過程と類似していることが示唆されている。しかし、生体組織におけるガス分子をゲストとしたハイドレートの形成過程の観察は報告されていた。一方、メタンガスハイ

ドレートの形成過程は、イソペンタン中に浮遊した液滴（エマルジョン系）において、NMR-Imaging (MRI) 測定より検討されている (Moudrakovski *et al.*, 2004). その結果、水が直接メタンガスと接しないエマルジョン系においても、ガスハイドレートは液滴表面より形成し始め、表面より内側に徐々に形成していくことを報告した。しかし、より液滴形の小さい場合は、偶発的に液滴の中心部よりハイドレートが形成することも確認され、液滴のサイズによって、異なる形成プロセスを示すことが示唆されている。ただし、液滴サイズについては記載されていないため不明である。

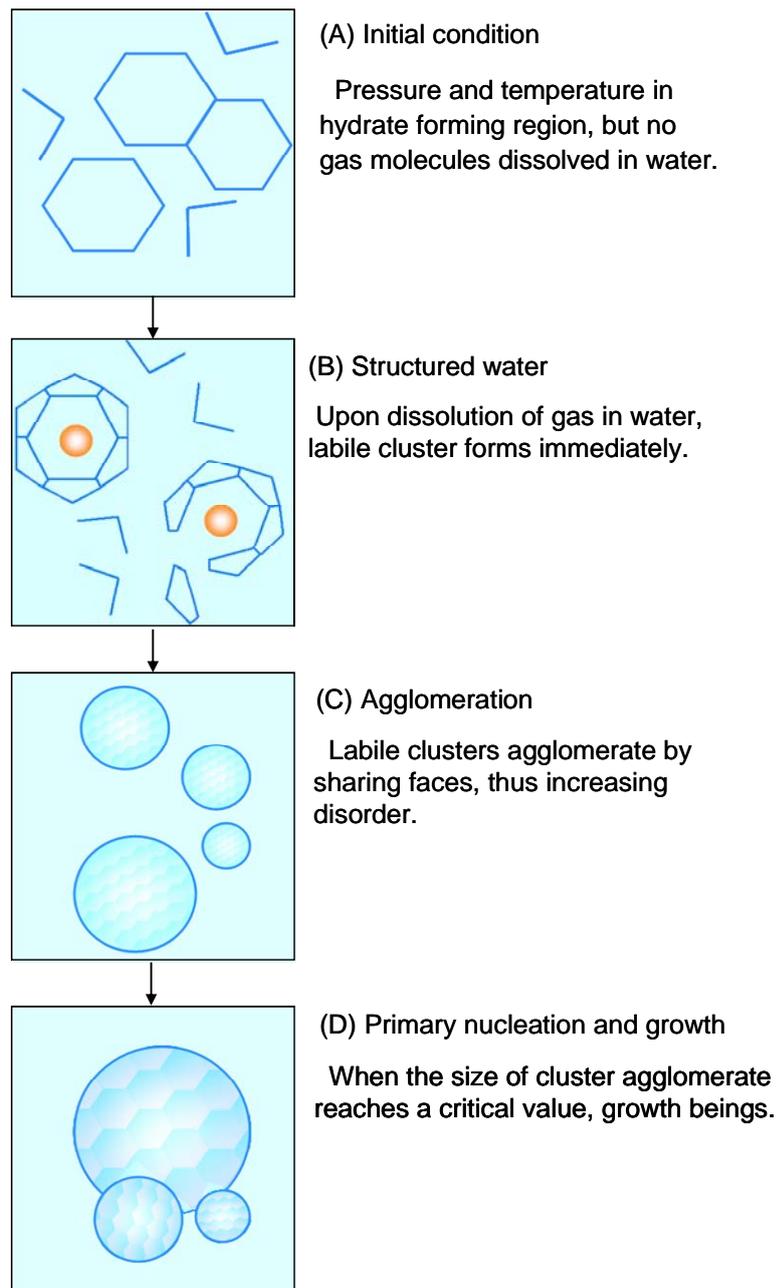


Fig.2-7 Schematic model of gas hydrate formation from water and gas. (Sloan and Koh, 2007)

### 2. 3. 3. ガスハイドレートを用いた保存法及び類似研究の歴史

生物学においてガスハイドレートが注目されるのは、1961年、Pauling がサイエンス誌でガスハイドレート微細結晶と動物の全身麻酔の関係を示唆した事に始まる。彼は、麻酔性のガスとして利用されているXeなどが水に溶けること事で形成するガスハイドレートに着目した。そして、ガスハイドレートの微細結晶がたんぱく質等の結合部位や脳内の水溶液中のイオンに結合することで、それらが発信する電気信号のネットワークに制限を与えると予測した(Pauling, 1961)。また、同年、Miller(1961)も、全身麻酔メカニズムとして、Xe などの麻酔性ガス分子の周りで高度に構造化した水が形成し、脳の活動電位や細胞膜の流動性の低下を起すことを示唆した。Xeの同位体<sup>129</sup>Xe核のNMRによる可視化技術によって(Raftery, 2006)、Xeとタンパク質等の生体物質との結合に関する報告はなされたものの(Cherubini and Bifone, 2003)、未だ、組織内におけるガスハイドレートやいわゆる構造化した水の形成は証明されていない。

食品科学分野においても、1965年、Fennemaらの研究グループが食品素材を用いたハイドレートの形成に関する検討を始めた(Huang *et al.*, 1965)。ただし彼らは、ジクロロジフルオロメタン(CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>)や酸化エチレン(EO)、テトラヒドロフラン(THF)などより形成されたハイドレートに関しての検討である。このハイドレートと氷の形成過程を比較しながら、ニンジン組織・牛筋肉組織の細胞構造への影響を、光学顕微鏡を用いて観察した。その結果、細胞間において、ガスハイドレートが形成すること、ニンジン組織ではガスハイドレートの形成・成長に伴い細胞が破壊されることを示した。また、CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>ハイドレートのアスコルビン酸への影響を報告し、ハイドレートが形成することでアスコルビン酸の酸化を1%程度抑制できることを示している(Fennema and Thompson, 1971)。ただし、彼ら自身、その論文中に、EOなどの含酸素化合物は、生体物質と化学反応を起こすため、食品保存への応用に際しては、異なるゲスト分子の使用を行うべきと述べている。その後、彼らの研究グループにおいても、他の食品科学分野においても、ガスハイドレートを用いた食品保存法の検討がされることはなかった。

ガスハイドレートの利用には至っていないものの、1990年代に入ると、構造化した水を用い

た生鮮農産物の保存法が、橋本と大下(1996)によって提案された。雰囲気温度 6°C, 0.6MPa の Xe 分圧内でモヤシを保存すると、変色や表面付着微生物の増殖を抑制できることを示し、その鮮度期間を延長できること示した。そして、鮮度保持期間を延長できる理由として、ガスハイドレートの形成直前の過程に存在する構造化した水による生物の代謝の抑制を示唆した(大下ら, 1996; Oshita *et al.*, 1996; 大下ら, 1997; 松島ら, 1999; Oshita *et al.*, 1999; Yoshino *et al.*, 1999; 松島ら, 2000A; 松島ら, 2000B)。その後、同研究グループの Makino ら(2006)によって、雰囲気温度 15°C の Xe 雰囲気下において、カットキャベツの呼吸速度が抑制されることが報告されている。また、Zhang ら(2008)は、常温で 1.1MPa の Xe・Ar 混合ガス中に生鮮アスパラガスを 24 時間静置し、その後、大気条件下、雰囲気温度 4°C において保存実験を行った。その結果、総重量や色の変化、クロロフィル量の減少を抑制する効果があることを示した。しかし、これらの保存法は、その保存期間を数日程度延長するに留まった。また、動物における麻酔メカニズムの研究同様、組織内部におけるガスハイドレートの形成、組織内の水の構造化を直接証明する結果は示されていない。

## 2. 4. 本研究の目的

研究の背景より、現状、生鮮野菜の「生」の食感を保ったまま、長期保存できる技術が提案されていないことが確認された。一般的に食品の長期保存法として使用される凍結保存において、生鮮野菜組織は、凍結・解凍処理後に著しい組織軟化が生じる。この組織軟化は、組織を構成する2つ部位、細胞壁と細胞膜のそれぞれの変化に着目した組織軟化の仮説より説明されていた。しかし、細胞壁と細胞膜の両方を含む“組織”として、軟化を説明するには至っていなかった。特に、細胞膜の変化は、プロトプラストなど組織を分離した系でしか検討されておらず、実験的に組織軟化との関係は示されていない。そのため、細胞壁と細胞膜の2つの部位と組織軟化を関係付けて評価できていないと考えられた。こういった組織軟化の評価法の確立の遅れこそ、生鮮野菜に適切な凍結保存条件の提示や、凍結保存法に代わる新しい長期保存技術の検討・提案の妨げとなっていると考えられた。

凍結保存法とは別に、氷様結晶であるガスハイドレートを利用した食品の保存法が提案されていた。しかし、ガスハイドレート形成・解離処理後の組織軟化という観点から検討されないまま、ゲスト分子の安全性の問題から、1971年を最後に研究報告が途絶えていた。一方、この保存法と類似の研究報告として、ガスハイドレートの形成過程に存在する構造化した水を利用した保存法が検討されていた。これらの研究では、ガスハイドレート形成能を持つXeを利用しており、ガスハイドレートの形成を利用せずとも生鮮農産物の鮮度保持期間を延長できることが示されていた。しかし、その品質保持期間は数日程度延長できるに留まっており、凍結保存法と比較すると短いと考えられた。そのため、品質保持期間をより延長させるためには、構造化した水のみならず、ガスハイドレート自体も利用する必要があると考えられた。また、ガスハイドレートおよび構造化した水を利用した保存法に関する既往の研究において、ガスハイドレートや構造化した水が、“組織”内において形成していることを明確に示すには至っていないこともわかった。従って、これらの事象を利用した保存法を検討するにあたり、基礎事項として、ガ

スハイドレートまたは構造化した水の形成を確認する必要があると考えられた。そして得られた知見を活かし、ガスハイドレート・構造化した水の両事象を組み併せて使用し、凍結保存法の問題点である組織軟化の観点より検討する必要があると考えられた。こういった検討を行うことで、凍結保存法に代わる新しい鮮野菜の長期保存技術を提案が期待できると考えられた。

これらの背景を受けて、本論文では、生鮮野菜の長期保存技術の提案を目的とした。この目的を達成するため、1)凍結保存と2)ガスハイドレートを利用した保存の2つの保存技術に着目し、検討を行うこととした。特に、凍結保存法の問題点である、凍結・解凍処理後の組織軟化の観点より検討を行うこととした。まず、凍結保存法において組織軟化の程度の評価手法を示し、その後、得られた知見を基にガスハイドレートを用いた保存法を提案・検討することとした。

## 2. 5. 試料の選定

試料には、タマネギの葉基部の柔組織 (Fig.2-8(A)) を使用した。また、凍結保存に関する研究では、ニンジン柔組織 (Fig.2-8(B)) を使用した。これらの野菜を試料に選定した最大の理由は、すでに凍結保存に関する多くの研究に供されているからである。

食感に関係した研究は少ないものの、タマネギ組織は細胞膜に関する研究が多く検討されている。Chambers and Hale (1932) は、タマネギ組織切片における細胞の光学顕微鏡観察より、タマネギ細胞は、細胞ごとに1つ1つ凍結していくことを報告した。すなわち、1つの細胞が凍結すると、隣の細胞が凍結するという連鎖が起こることを示した。さらに、解凍後、細胞膜が破壊されているにもかかわらず、液胞の破壊が起こらないことを示し、凍結は原形質溶液より始まることを示唆した。また、Paltaら(1977A)は、2.5cm角に切り出したタマネギ鱗茎組織を $-4^{\circ}\text{C}$ と $-11^{\circ}\text{C}$ の雰囲気温度内にて12日間保存・凍結し、解凍後、細胞に生じるダメージを、浸透圧差を利用した細胞の水透過性の測定と電気伝導度測定による $\text{K}^{+}$ と $\text{Ca}^{+}$ のイオン流出の測定より評価した。その結果、細胞の水透過性の変化に関しては観察できなかったものの、細胞外へ多くの $\text{K}^{+}$ が流出し電気伝導度が変化することが確認された。また、彼らは、凍結・解凍処理後のタマネギ鱗茎組織の表皮細胞において興味深い結果を残している。すなわち、 $-20^{\circ}\text{C}$ の温度で12日間凍結保存しても、解凍後、タマネギ鱗茎の表皮細胞のほとんどが生きていることを示した。これらの結果から、凍結・解凍処理は細胞膜の半透性へ影響を与えず、イオンや糖などの細胞膜を介した移動に対して影響を与えることを示唆した (Palta *et al.*, 1977B,C)。一方、ニンジン組織は、凍結保存後の組織軟化に関する研究によく使用される。Fuchigamiら(1995A)は、凍結・解凍処理後の細胞壁の変化についてその構成成分であるセルロースやペクチン含量の測定より検討している。その結果、ニンジン組織は凍結・解凍処理後、水溶性ペクチンの量が少量ではあるが減少することを示し、これが組織軟化の原因とした。また、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた観察より、非常に緩慢な条件で冷却・凍結させた時、ニンジン組

織の細胞間に隙間が見られることが報告されている。この細胞壁の薄利も組織軟化の原因の1つと言われている (Fuchigami *et al.*, 1995B; Roy *et al.*, 2001)。

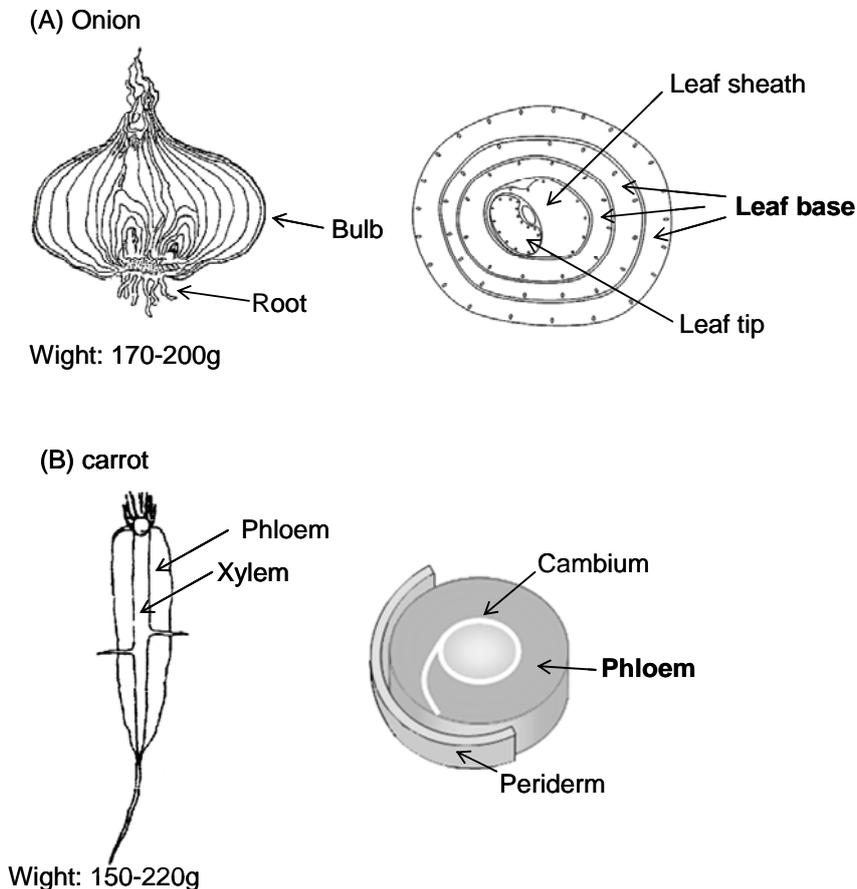


Fig.2-8 Description of (A) onion and (B) carrot tissues. Bold type shows the tissue sample part which was used in this study. ( A: 市川, 1966; B: Galindo, 2004.)

2 つ目の理由として、 $0^{\circ}\text{C}$ 以上の低温において、組織の腐敗・変質の速度が遅いことがあげられる (Liu and Li, 2006)。これらの野菜は、貯蔵期間やその種類によって著しく食感が異なることはなく (Coolong, 2008)、凍結保存法のような劇的な変化を検討する場合、収穫からの期間や種類による差はほとんど無視できると考えられる。従って、結晶以外の因子による軟化を考慮せず、氷やガスハイドレートの形成による影響を観察できる。また、生化学分野において、栄養学的・生理学的な研究にも使用されているため (Longe, 1981; Lanzotti, 2006)、本論で検

討した知見を、今後、他の分野の研究にも活かすことができると考えられる。

また、第5章と第6章で検討するガスハイドレートを用いた実験では、疎水性ガスとして Xe を用いた。その最大の理由は、基礎研究を行うに当たって、利用が簡便であることがあげられる。Xe ハイドレートの詳しい平衡解離圧は第 5 章で示すが、0°C以上の温度においても 1MPa 以下の圧力で、ガスハイドレートを形成させることができる。また、Xe は、常温域で生細胞内の化学反応に寄与しないとされ、野菜の保存に対しての適用例があるのみならず、医学・薬学分野では麻酔薬として実験に使用されることもある(後藤ら, 1999)。そのため、未知の事象である野菜組織におけるガスハイドレートの形成、またそのテクスチャーへの影響の確認を行う本研究では、最善のガスと考えられる。

## 第3章 凍結・解凍処理後の組織テクスチャーの変化の評価法

### 3. 1. 緒言

生鮮野菜は凍結・解凍処理後、著しい組織軟化を起こす。この組織軟化は、凍結保存法の問題点とされ、その原因理解のため長きに渡り研究が行われている。そして、凍結・解凍処理後の生鮮野菜の組織軟化の2つの仮説、1. 細胞壁の変化と、2. 細胞膜の変化による組織軟化の仮説が提案された(第2章参照)。しかし、凍結・解凍処理後の組織軟化を、細胞壁と細胞膜の双方の変化と関係付けて、“組織”として捉えるにはいたっていない。この様に、組織軟化を評価する方法が提案されてこなかったことは、凍結保存に関する研究の進展や野菜に適した長期保存技術の開発の妨げとなってきたと考えられた。

そこで本章では、凍結保存法の問題点、凍結・解凍処理による生鮮野菜の組織軟化の原因を理解するために、その評価手法を確立することを目的とした。既に提案されている2つの仮説に着目し、まず、“組織”内に含まれた状態の細胞膜の水透過性の変化を、NMRを用いた拡散係数の測定より検討した。その後、テクスチャー測定より、すでに“組織”内に含まれた状態の細胞壁に関する組織軟化の程度の指標として使用されている破断強度を評価した。併せて、このテクスチャー測定の結果より、生鮮植物細胞の膨圧との関連が示されている初期弾性率(Falk *et al.* 1958)を測定した。その結果を、NMRによって評価された細胞膜水透過性の変化の程度と比較し、細胞膜に関するテクスチャー変化の指標として初期弾性率が利用できることを確認した。

### 3. 2. 試料の調製

北海道産のタマネギ (*Allium cepa* L.) を購入後、直ちに Fig.3-1 (A) に示す様な 4mm×4mm×10mm の組織片に切り出し、生鮮組織試料とした。この生鮮組織試料を、-18℃の雰囲気内で1週間凍結、室温 (25℃) で解凍し、凍結・解凍組織試料とした。また、凍結・解凍処理によって変化する部位を確認するため、下記に示す細胞膜機能除去処理を行った。そして、この組織を、細胞膜機能除去組織試料とした。ただし、光学顕微鏡観察には、それぞれの調製の後、各組織試料を Fig.3-1(B) に示すような厚さ 0.5mm の組織薄片に切り出し使用した。

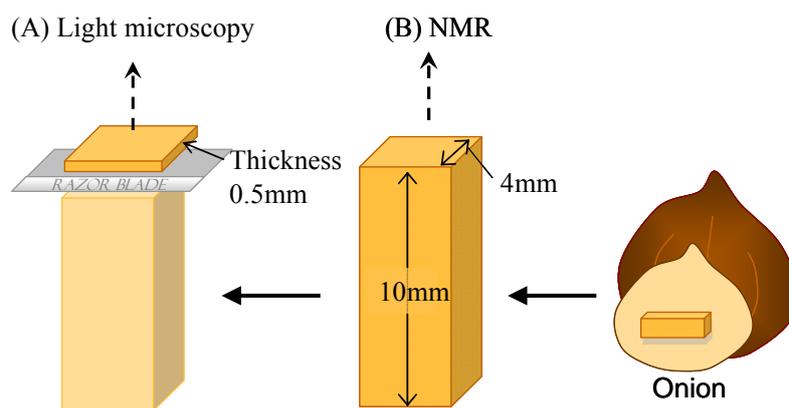


Fig.3-1 Preparation procedure of tissue sample from onion for NMR, texture and light microscopic measurements.

#### 細胞膜機能除去処理

Fig.3-2 に示すように、クロロホルム 30ml、蒸留水 30ml がそれぞれ入った2つのビーカーを、密閉可能な容器の中に静置した。密閉後、25℃雰囲気内にこの容器を24時間放置し、容器内にクロロホルム蒸気を満たした。その後、4mm×4mm×10mm に切り出した生鮮組織試料を容器内に置き、再び密閉の後、3時間放置し、細胞膜機能除去処理組織を調製した。

クロロホルムはリン脂質から成る細胞膜の構造を選択的に破壊し、その機能を損失させる

(Ohnishi *et al.*, 2003). クロロホルムなどの脂溶性有機溶媒による細胞膜破壊法は、動物細胞の細胞内成分の分析の際に使用されている(Rabergh *et al.*, 1997). また、植物組織においても、ニンジン組織内の細胞膜の機能を低下させるため使用されている(Ohnishi *et al.*, 2003).

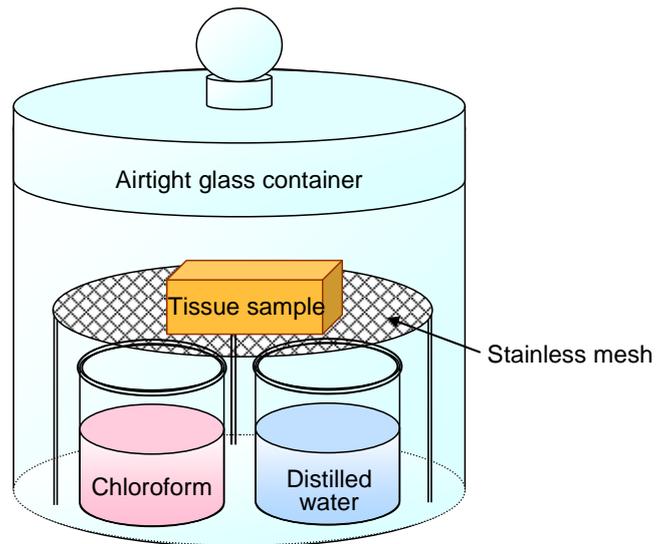


Fig.3-2 Schematic image of removal of cell membrane method in tissue by using chloroform-vapour.

### 3. 3. NMR を用いた細胞膜の水透過性の変化の検討

#### 3. 3. 1. NMR の概念

元素の中には核磁気ベクトルを持っている核「磁性核」がある。この様な元素は、コマの様に回転する性質を持つ。核磁気共鳴法(NMR)とは、この様な性質を持つ原子核が外部から与えられた外部磁場  $B_0$  と、どの様な相互作用を示すのかを頼りにして行う研究方法である。

磁性核の核ベクトルは外部磁場が存在しない場合、ランダムな向きを向いている(Fig.3-3(A))。このランダムな配向は、外部磁場の存在により核磁気モーメントの向きが揃えられる(Fig.3-3(B))。この時、核磁気ベクトルは外部磁場と平行な状態、すなわちエネルギーが低い状態と外部磁場と逆平行な状態、すなわちエネルギーが高い状態のどちらかの状態を取る。核の2つのエネルギーギャップ( $\Delta E$ )は、ボーアの関係式によって電磁波の周波数と結びつけることができる。この時、 $\Delta E$  に相当する周波数を照射してやると原子核と電磁波との相互関係を観察することができる。すなわち、低いエネルギーレベルの核は電磁波を吸収し励起し、高いエネルギーレベルの核はエネルギーを放出し低いエネルギーレベルに移る。この様な原子核間でのエネルギー状態の移動を遷移といい、エネルギー分裂の大きさと入射する電磁波の周波数が一致したときにはじめて起こる(共鳴)。NMR は、この原子核のエネルギーレベルの分裂と共鳴による電磁波の吸収・放出を利用した研究方法である(ファーラー・ベッカー, 1976)。

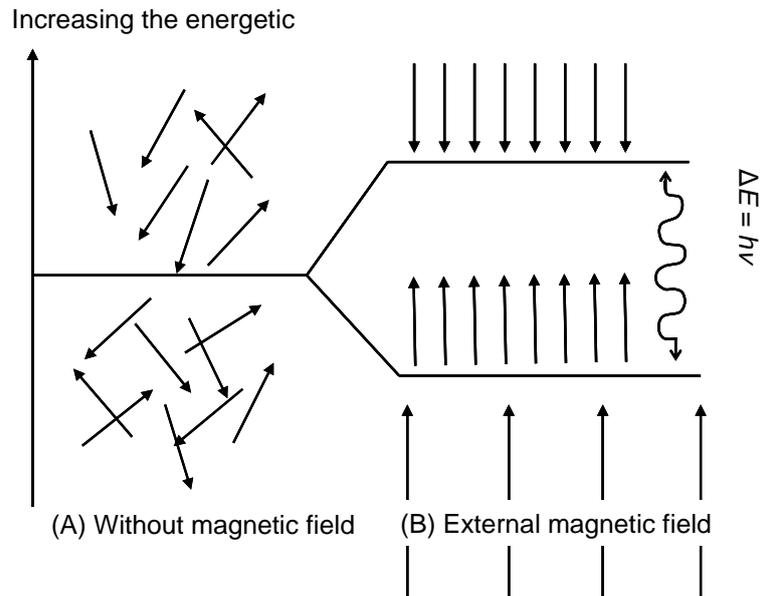


Fig.3-3 Spins of nuclear in external magnetic field. If a nucleus is placed in a magnetic field, the nucleus has two possible magnetic moments in external magnetic field. The resultant magnetic moments no longer have the same energy with an external field and are lower in energy and the other opposes the external field and is higher in energy. This causes a population bias toward the lower energy states. NMR measurements were this energetic gap ( $\Delta E$ ).

### 3. 3. 2. 拡散と制限拡散現象

拡散現象とは、分子のランダムなミクロブラウン運動によって、位置を変えていくプロセスである。濃度の勾配があるときには分子はミクロブラウン運動をしながら、高い濃度の分布から低い濃度の分布へと移動する確立が高くなる。多数の分子集団を考えた時、その系を拡散するのに必要な時間よりも十分に短い所定の時間  $t$  秒後、その分子集団の移動距離の二乗平均を  $a^2$  とすると式(3-1)で示される。

$$a^2 = 2D t \quad (3-1)$$

物質が拡散する場となる媒体は自由な空間を考える事が多いが、媒体が仕切りで区切られている細胞などの場合、分子の拡散は制限を受ける。すなわち、式(3-1)は、拡散が制限され

ると $t$ の増加に対して無制限に成立するわけではなく、ある時間の経過後に距離は一定値に収束する(Fig.3-4 赤線). このとき、みかけ上の拡散係数は時間とともに小さくなる. このような制限された拡散を制限拡散という. 植物細胞などの細胞構造を持った系の場合、細胞内の水の拡散は細部膜あるいは細胞壁によって制限されるため、制限拡散が観測される(Woessner, 1961; Woessner and Gutowsky, 1963; Tanner and Stejskal, 1968). しかし、細胞が何らかの力によって破壊され、その構造を保てなくなった場合、水の拡散は制限されなくなり、自由空間における拡散と近い拡散挙動を示すようになる(Fig.3-4 青線). 従って、凍結・解凍処理後の野菜組織では、制限拡散が消失すると予測される.

### 3. 3. 3. NMR を用いた植物組織の水透過性の測定

NMR を用いた植物組織の細胞膜の水透過性は、生鮮植物のプロトプラストを用いた緩和時間( $T_2$ )の測定より検討されている (Sotome *et al.*, 2004). しかし、凍結・解凍処理によってプロトプラストは形状を大きく歪めてしまうため、細胞膜の水透過性の変化を正確に評価できないと考えられる. さらに、多数の細胞から構成される“組織”に対する凍結・解凍処理の影響も検討できない.

一方で、NMR の応用的利用法として、上述したような水の拡散測定がある. この拡散情報から、試料の構造を把握する試みが行われてきた. こういった NMR 測定法を用いて水の拡散を観察した場合、細胞などの閉鎖的系を持った試料において、水分子の拡散が制限される現象すなわち「制限拡散」が観察されることが知られている(Fig.3-4) (Becker, 1976; Tanner, 1978; Meerwall and Ferguson, 1981). そして、この制限拡散を観測することで、細胞の構造状態変化を数マイクロメートルのスケールで把握できる. 凍結・解凍処理後の組織試料への利用は検討されていないものの、こういった手法は植物や動物組織の水分子の透過性の評価法として報告されている(Anisimov *et al.*, 1998; Clark and Bihan, 2000; Kinsey *et al.*, 1999).

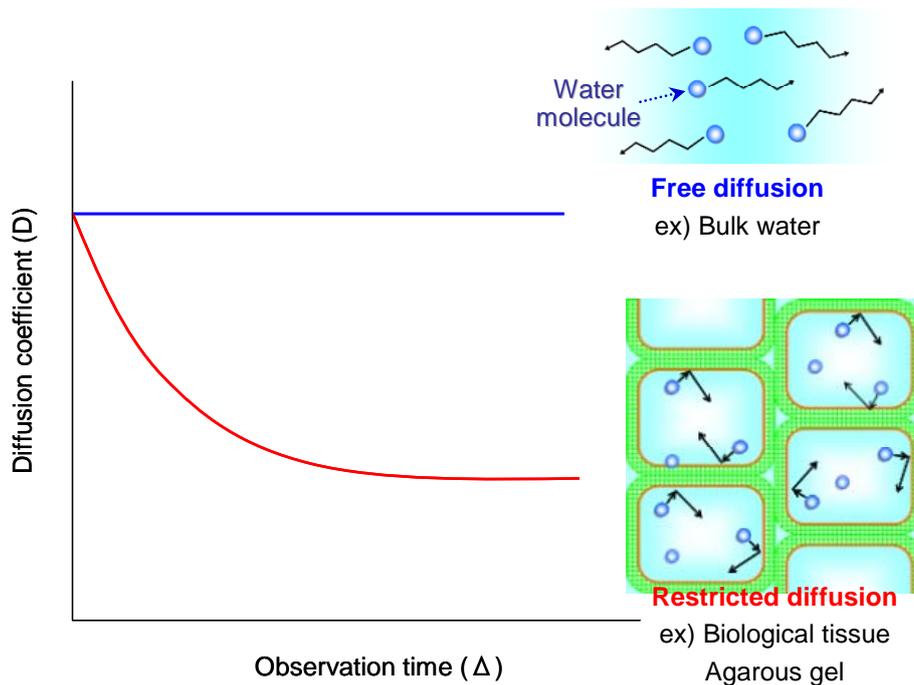


Fig.3-4 Image of the restricted diffusion. When there are water molecules in free space, the diffusion coefficients of water molecules is constant and there is no relation with the observed time ( $\Delta$ ). On the other hand, when there are water molecules in the limited space, diffusion coefficients is not constant, decreasing with the observed time.

### 3. 3. 4. 実験方法

#### 光学顕微鏡を用いた観察

生鮮組織、凍結・解凍組織と細胞膜機能除去組織について、光学顕微鏡 (BX51, オリンパス株式会社) を用いて、組織内の細胞コンパートメントの有無を確認した。ただし、細胞コンパートメントの観察を簡便にするため、各組織試料はそれぞれ1.0 %サフラニン水溶液で染色した。

#### NMR を用いた拡散係数の測定

NMR 装置はパルス磁場勾配アクセサリを装着した Bruker 製の AM200WB (4.7Tesla) を使用した。パルスシーケンスは、Fig.3-5 に示した通り、3 つの  $90^\circ$  RF パルスを組み合わせたステイミュレティッドエコー法を用いた。一回目の  $90^\circ$  パルスの直後と3回目の  $90^\circ$  パルスの

直後にそれぞれ磁場勾配強度  $g$  [Gauss  $\text{cm}^{-1}$ ], パルス幅  $\delta$  [ms]の磁場勾配パルスを挿入した. 2つの磁場勾配パルスの間隔  $\Delta$  [ms]が, 拡散観測時間である.  $\Delta$ と  $\delta$ を一定に保ちながら磁場勾配強度  $g$  [Gauss/cm]を変化させ, シグナルを観察すると, シグナル強度  $R$  は式(3-2)に従って減衰する.

$$\ln(R) = \ln(R_0) - D (\gamma g \delta)^2 (\Delta - \delta/3) \quad (3-2)$$

ここで  $\gamma$  は $^1\text{H}$ の磁気回転比で  $4258\text{Hz Gauss}^{-1}$ である.  $(\gamma \delta g)^2 (\Delta - \delta/3)$ に対して  $\ln(R)$ をプロットして得られる直線の傾きから拡散観測時間( $\Delta$ )における見かけの拡散係数  $D$  [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]を求めた. 本研究では, 拡散観測時間( $\Delta$ )を  $10\sim 1200$  ms の範囲とし, 磁場勾配強度( $g$ )を  $3.0\sim 37.8$  Gauss  $\text{cm}^{-1}$ , 約  $20^\circ\text{C}$ で測定を行った.

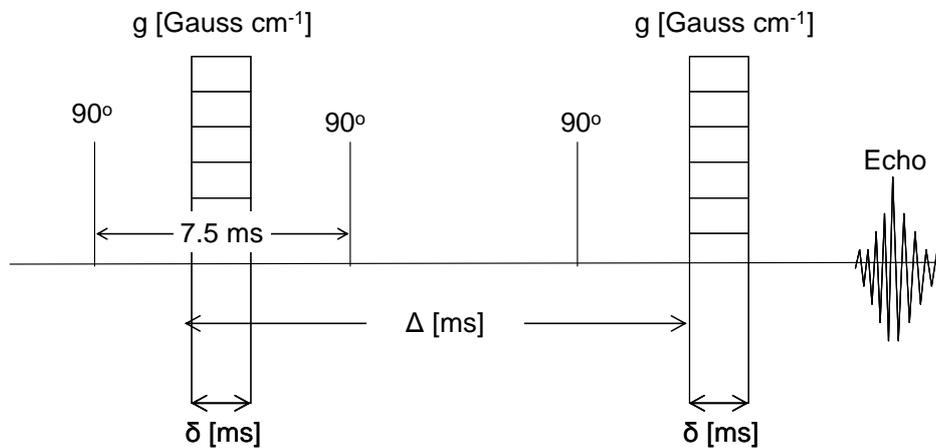


Fig.3-5 Stimulated echo pulse sequence in NMR measurement.

### 3. 3. 5. 結果

#### 凍結・解凍処理による細胞コンパートメントの変化

光学顕微鏡にて観察されたタマネギ組織内の細胞コンパートメントの様子を Fig.3-6 に示す。生鮮組織(Fig.3-6(A))と細胞膜機能除去組織(Fig.3-6(C))において、細胞コンパートメントの消失や破れなど、大きな変化は観察されなかった。しかし、サフラニン水溶液で染色することで、細胞膜機能除去処理による影響が観察された。すなわち、細胞膜機能除去組織は、Fig.3-6 (C)に矢印で示す様に、細胞内に存在する核が染色されていた。使用したサフラニン水溶液は細胞内の核をよく染色することが知られているが、生鮮組織では脂質である細胞膜によってサフラニン水溶液が十分に細胞内部まで浸透しなかったと考えられる。そして、凍結・解凍組織(Fig.3-6(B))は、細胞内の核の染色 (Fig 3-6(B) 矢印)とともに、細胞輪郭に“しわ”がよる (Fig.3-6 (B) 青矢印)ことが観察された。細胞膜機能除去組織に輪郭の変化は観測されなかったことから、凍結・解凍処理は、さらに激しいダメージを組織に与えていると予測された。しかし、光学顕微鏡観察において、凍結・解凍処理後においても細胞コンパートメントの破壊や消失・破れなどは観察されなかった。

Roy ら(2001)は、光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いた細胞構造の観察において、ニンジン組織を $-0.19^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ で冷却・凍結処理すると細胞壁間に亀裂が生じることを示した。しかし、 $-4.5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ では、細胞壁間の亀裂は観察されず、細胞構造に変化が見られないことを報告している。この様な冷却速度の差と細胞構造の破壊に関する研究は、他の野菜組織においても観察されている(Brown, 1697)。これらの研究を参考に、本研究でも熱電対を使用した冷却速度の測定の結果、 $-4.9^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ の冷却速度であることが確認された(Fig.3-7)。従って、本研究の冷却条件において、細胞コンパートメントの著しい変化が観測されなかったことは妥当であったと考えられる。

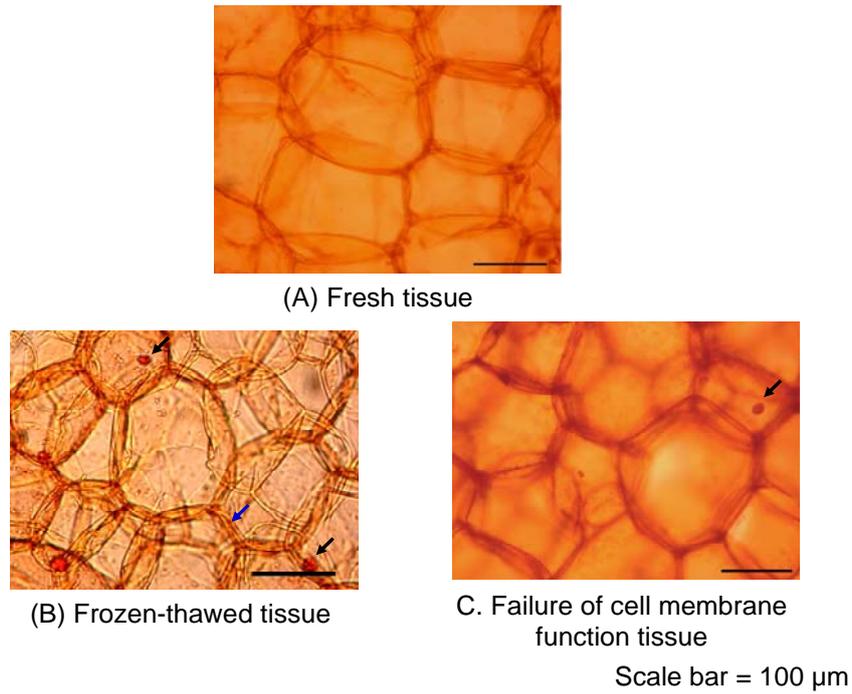


Fig.3-6 Light microscope images of onion tissue samples before and after freezing and thawing or chloroform-vapour treatments. These tissues were dyed by Safranin 1.0 % solution.

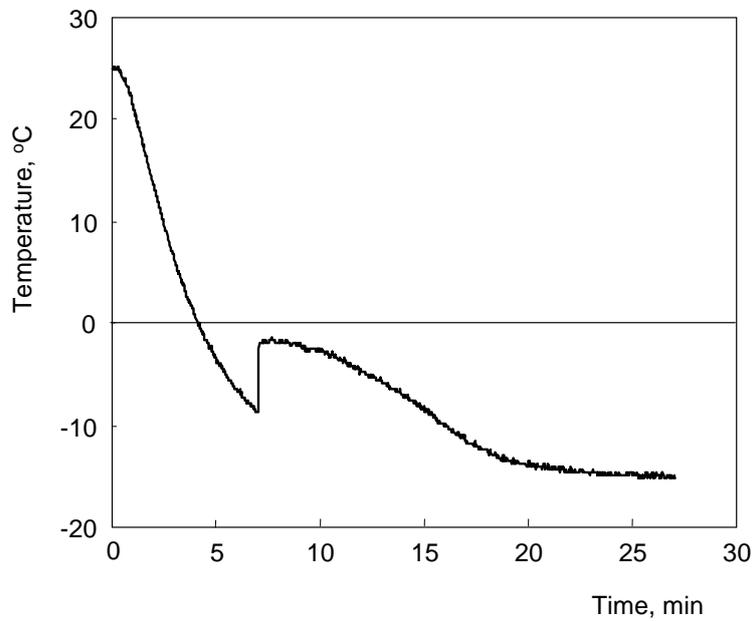


Fig.3-7 Time - temperature profile during freezing of fresh onion tissue.

### タマネギ組織内の水分子の拡散挙動の変化

Fig.3-8 に、生鮮組織の拡散観測時間  $\Delta = 30\text{ms}$  の時の NMR 測定で得られたシグナル強度  $\ln(R)$  vs.  $(\gamma g \delta)^2 (\Delta - \delta / 3)$  のプロットを示す。タマネギ組織中の水の拡散係数  $D$  は、この直線の傾きである。本研究において、この様な  $\ln(R)$  vs.  $(\gamma g \delta)^2 (\Delta - \delta / 3)$  プロットの直線関係はすべての拡散観測時間で観測された。

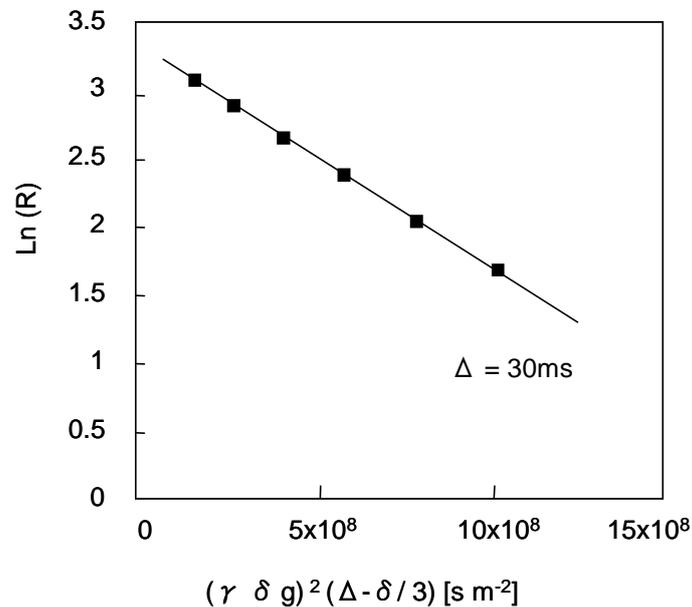


Fig.3-8 Relationship between  $\ln(R)$  vs.  $(\gamma \delta g)^2 (\Delta - \delta / 3)$  in fresh onion tissue at diffusion time  $\Delta = 30\text{ms}$ .

得られた  $D$  と  $\Delta$  の関係を Fig.3-9 に示す。ただし、図中のバーは誤差範囲であり、得られた値の最大値と最小値を示す。NMR を用いた拡散係数の測定において、細胞など水分子の自由な拡散が制限される系では  $\Delta$  の増加に伴って、見かけの拡散係数が減少し、やがて一定値となる制限拡散現象が観察される。植物や動物組織において、細胞内に水分子の拡散が制限されている場合、この制限拡散現象が観測されることが知られている(Anisimov *et al.*, 1998; Clark and Bihan, 2000; Kinsey *et al.*, 1999)。

本研究においても、生鮮組織では、 $\Delta$  の増加と共にDが減少することが示された。すなわち、 $\Delta = 10\text{ms}$ の時、Dは、 $1.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ であったが、 $\Delta = 1000\text{ms}$ 以降で一定となり始め  $\Delta = 1200 \text{ ms}$  で D は  $6.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ となり、一定の値に推移することが示された。従って、典型的な制限拡散現象を確認することができた。しかし、水分子の拡散状態は、溶質の状態と関係することが知られている。すなわち、ゲル状態の水溶液では制限拡散が観測される(Ohtsuka *et al.*, 1994)。細胞内液は、オルガネラなどの異物質が浮遊・溶解している。そのため、これらの拡散挙動に対する影響を知るため、タマネギ組織の搾汁液についても拡散係数の測定をおこなった。その結果、搾汁液は、 $\Delta$ に寄らず一定の  $D = 1.9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ を示すことが確認された。従って、生鮮組織における制限拡散は、細胞構造に由来していることが示された。

一方、細胞膜機能除去組織では、制限拡散が明確に観測されなくなった。 $\Delta = 800\text{ms}$ 前後からDは一定値に収束し始め、 $\Delta = 1200\text{ms}$ で  $1.2 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ となった。制限拡散の程度が弱まった原因は、組織内の水分子の拡散を制限する障壁の空間が広がる、又は、障壁の水透過性が高まったためと考えられる。しかし、Fig.3-6に示す光学顕微鏡観察より、細胞膜機能除去組織内の細胞コンパートメントは、破壊や拡張されることはなかった。また、細胞膜機能除去組織は、クロロホルム蒸気を用いて特異的に細胞膜の機能を低下させている組織であることを考慮すれば、制限拡散の程度が弱まった原因は、細胞膜の機能が低下したことに由来すると考えられる。従って、細胞膜の機能低下によって、組織の水透過性が増大したことが示されたと考えられる。また、細胞膜機能除去組織と同様に、凍結・解凍組織においても、光学顕微鏡観察で細胞コンパートメント自体の破壊は観測されなかった。しかし、制限拡散程度が弱まること示された。すなわち、 $\Delta = 800\text{ms}$ 前後からDは一定値に収束し始め、 $\Delta = 1200\text{ms}$ では  $1.1 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ となった。従って、凍結・解凍処理によって組織内の細胞膜が著しいダメージを受け、その機能を低下させ、組織の水透過性が増大することが示された。

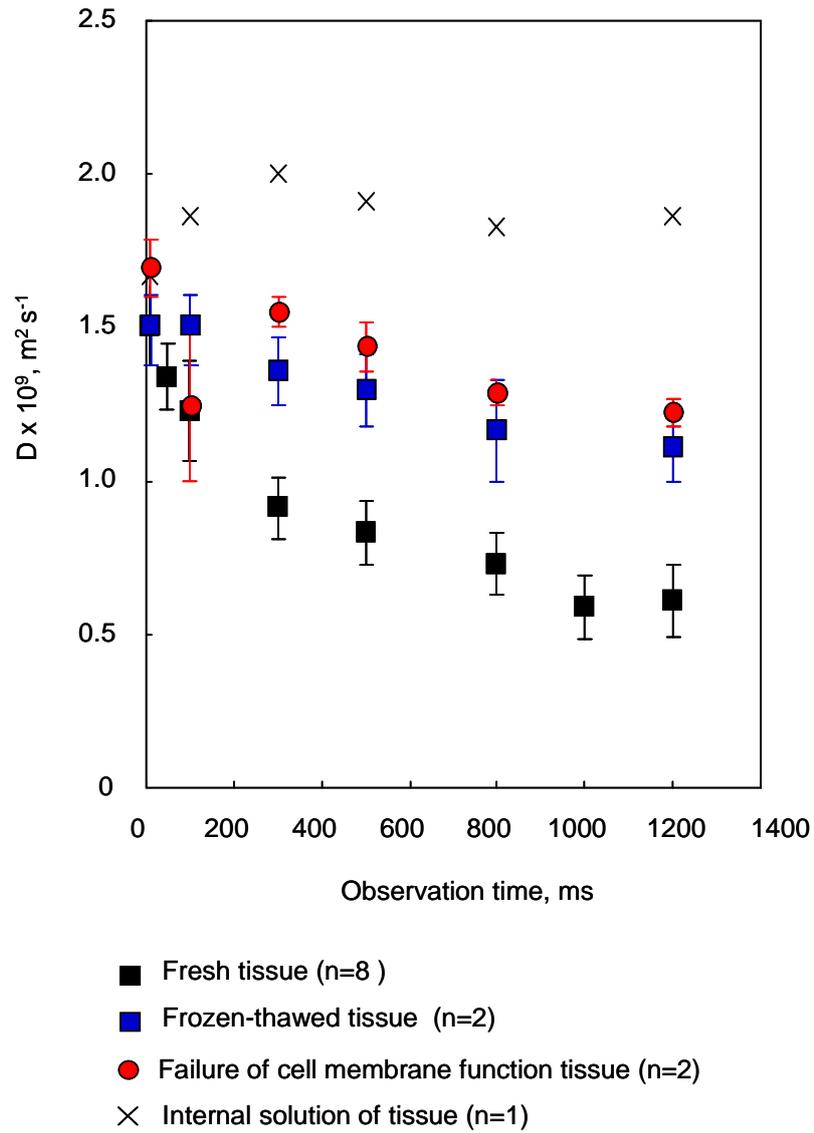


Fig.3-9 Comparison of restricted diffusion degree of water molecules in onion tissue before and after freezing and thawing or chloroform-vapour treatments by using NMR. Error bars show the maximum and minimum values.

### 3. 3. 6. 考察

細胞構造を持つ組織において、その水透過係数は  $D$  vs.  $\Delta$  において、制限拡散がはっきりと観察される場合、算出できる。既往の研究において、すでに生体組織の水透過係数は報告されている(Anisimov *et al.*, 1998; Clark and Bihan, 2000; Kinsey *et al.*, 1999)。報告されている 1 次元モデルにおいて、拡散が最も制限された時、すなわち、 $\Delta$  が十分長い時の拡散係数  $D_{\infty}$  は、

$$D_{\infty}^{-1} = D_0^{-1} + (P \times a)^{-1} \quad (3-3)$$

ここで、 $D_0$  は  $\Delta$  がもっとも短い時の拡散係数、すなわち、溶液の自己拡散係数を意味し、 $P$  が障壁の水透過係数、 $a$  が障壁間距離を示す。既往の研究では、水透過係数と障壁間距離の両者を未知数として、NMR 測定で得られたデータから推定している。そのため、凍結・解凍組織のように制限拡散が観測されにくくなると、細胞サイズを正確に推定できなくなる。そのため、凍結・解凍処理後のような組織において適用されてこなかった。しかし、細胞サイズは NMR 測定で得られたデータからでなく、光学顕微鏡観察によって得ることができる。すなわち、Fig.3-6 に示す様に、光学顕微鏡観察の結果、タマネギ組織の細胞サイズの平均は  $150 \mu\text{m}$  であった。この値は既往の研究におけるタマネギ細胞のサイズ  $90\text{--}200 \mu\text{m}$  と同程度であった(Chaw, 1985)。従って、細胞サイズ  $a$  を  $150 \mu\text{m}$  に固定し、水透過係数  $P$  の算出を行うことで、凍結・解凍組織においても水透過性の増大の程度を定量的に推察できる。ただし、本研究において  $P$  の計算には、測定データの精度を考慮して  $\Delta$  がゼロ最近傍、 $\Delta = 10 \text{ms}$  で得られた  $D_0$  を用いた。

Fig. 3-10 に、水透過係数  $P$  の計算の結果を示す。ただし、図中のバーは誤差範囲であり、得られた値の最大値と最小値を示す。NMR 測定より得られた  $D_{\infty} = 5.9 \times 10^{-10} \text{m}^2\text{s}^{-1}$ 、 $D_0 = 1.6 \times 10^{-9} \text{m}^2\text{s}^{-1}$  を式(3-3)に代入し、 $P = 7.0 \times 10^{-6} \text{m s}^{-1}$  が得られた。既往の研究で報告されて

いる NMR 測定で得られたデータのみを用いた植物組織の P は、約  $10^{-5} \text{ m s}^{-1}$  と報告されている ((Anisimov *et al.*, 1998). また、組織薄片の原形質分離の観察より算出されたタマネギ柔組織の細胞膜の P は、測定温度  $20^{\circ}\text{C}$  の時、 $10^{-5} \sim 10^{-6} \text{ ms}^{-1}$  オーダーであることが報告されている (Kamiya and Tazawa, 1956).

凍結・解凍組織に関しても同様に計算を行った. その結果、凍結・解凍後組織の水透過係数 P は  $2.9 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$  ( $D_{\infty} = 1.1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $D_0 = 1.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) であることが示された. 試料による誤差は観察されたが、その誤差を考慮しても、生鮮組織と凍結・解凍後組織の間には、明らかな差が確認された. また、細胞膜機能除去組織の P は、 $2.6 \times 10^{-5} \text{ ms}^{-1}$  ( $D_{\infty} = 1.2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $D_0 = 1.7 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) となり、凍結・解凍組織の水透過係数とほぼ等しいことが示された. 従って、凍結・解凍処理後、組織内に含まれた状態の細胞膜は、その水透過性に関する機能を低下させ、生鮮組織と比較して、約 10 倍も水透過性を増大させることが確認された.

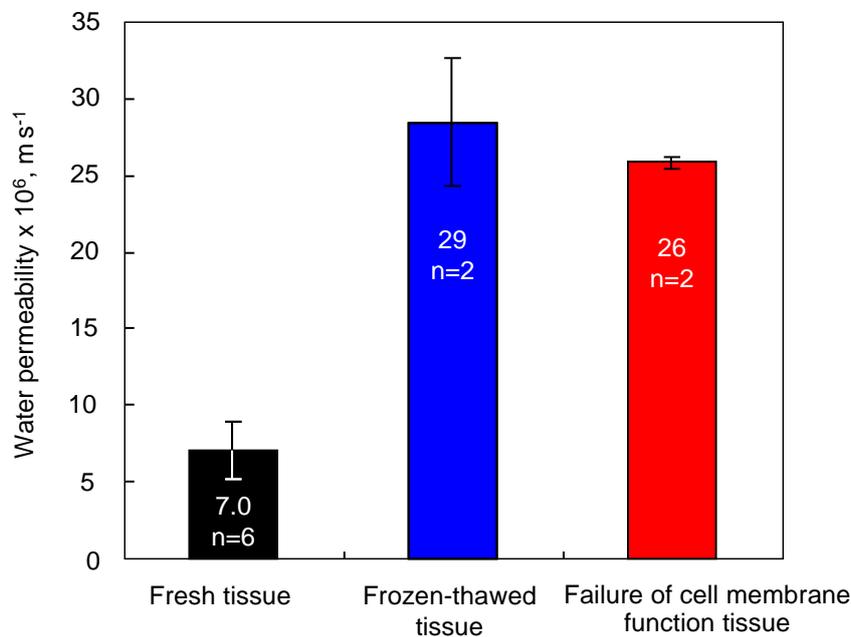


Fig.3-10 Comparison of water permeability of onion tissue before and after freezing and thawing or chloroform-vapour treatments. Error bars show the maximum and minimum values.

凍結・解凍処理後の植物組織の細胞膜の変化は、浮遊細胞を用いた誘電率の測定より確認されている(Yamada *et al.*, 2002; Ishikawa *et al.*, 1997). しかし、“組織”として確認するには至っていない. しかし, NMRを用いた拡散係数の測定より, 凍結・解凍処理後に“組織”に含まれた状態においても, 細胞膜はその水透過性に関する機能を低下させることが確認された. さらに, 光学顕微鏡を用いて細胞のサイズを予め決定することで, NMR 測定データより, 細胞膜の水透過係数として, その変化を比較可能な値として評価できることが示された. 従って, ここで示した細胞膜の水透過性の変化の程度の評価法を用いることで, 凍結・解凍処理後の“組織”としての細胞膜に関するダメージの程度を評価できると考えられる.

### 3. 4. テクスチャーの変化の測定

#### 3. 4. 1. 実験方法

##### レオメーターを用いたテクスチャー測定

レオメーター(RE-3305, 株式会社山電)を用い, 試料に一定変形を与えたときの応力の時間変化を記録計(DR1100, 株式会社山電)のチャート紙に記録させた. 試料と接触面が  $2 \times 4 \text{ mm}^2$  と成るクサビ形プランジャー (Fig.3-11)を用い, 感受電圧  $50\text{mV} \sim 2000\text{mV}$ , 変形量を最大  $50\%$ , プランジャー押し込み速度は  $1\text{mm sec}^{-1}$  の条件で測定を行った. また, 測定は室温にて行った. 式(3-4)と式(3-5)より, 試料面積あたりの応力  $F$  [ $\text{Nmm}^{-2}$ ]と時間を歪み  $\varepsilon$  [-]に変換し, Fig.3-12 に示すような応力 vs. 歪み曲線を作成した.

$$F[\text{N m}^{-2}] = \frac{\text{Pressure}[\text{N}]}{\text{Sample area}[\text{mm}^2]} \quad (3-4)$$

$$\varepsilon[-] = \frac{\text{Chart speed}[\text{sec}] \times \text{Press speed}[\text{mm sec}^{-1}]}{\text{Sample height}[\text{mm}]} \quad (3-5)$$

得られた応力 vs.歪み曲線より,  $F$  の最大値の破断強度 (Fig.3-12 赤線)を求めた. また, 同時に, 歪みが限りなくゼロに近い時, すなわち, プランジャーとの接触領域が弾性的に変形し, 残留変形がなく完全に回復するまでの変形を初期弾性率 [ $\text{Nm}^{-2}$ ] (Fig.3-12 青線)を求めた (岡, 1976). ただし, 本研究では, 初期弾性率の算出に歪み  $10\%$ 未満のデータを使用した.

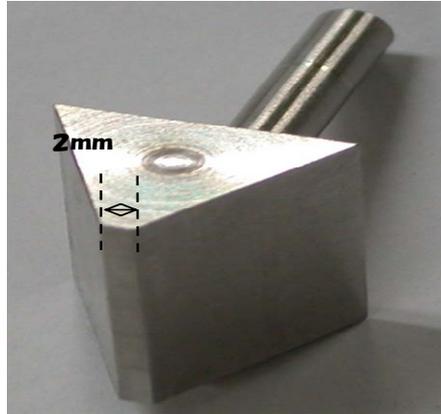


Fig.3-11 Plunger used in this study.

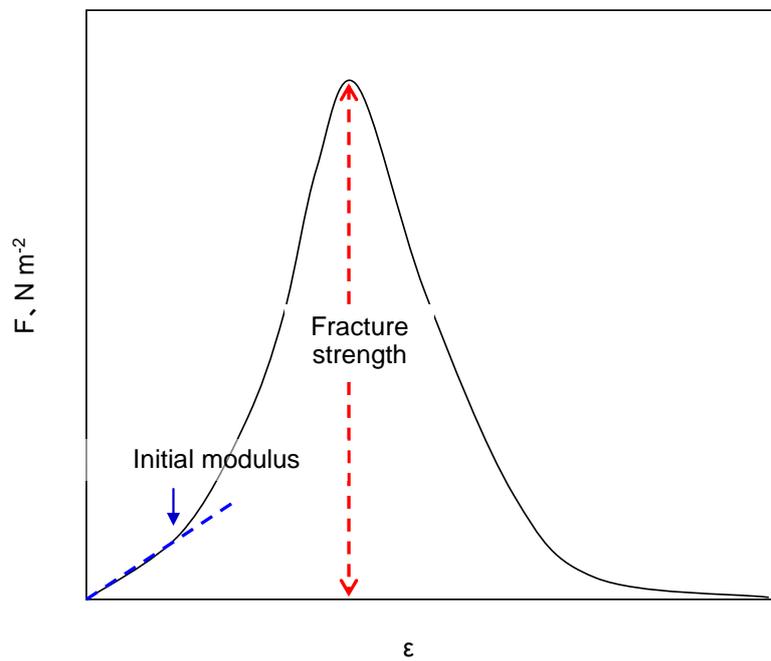


Fig.3-12 Example of stress-strain curve measured by rheometer.

### 3. 4. 2. 結果と考察

テクスチャー測定の結果得られた応力-歪み曲線の 1 例を Fig.3-13 に示す. 生鮮組織において, 最初のピークがプランジャーを 50%押し込む前, すなわち,  $\epsilon$  が 0.5 より前に観測された. 従って, 組織のテクスチャー測定が正確に行われたと考えられた. 同様に, 凍結・解凍組織と細胞膜機能除去組織においても,  $\epsilon$  が 0.5 より前に応力のピークが確認された.

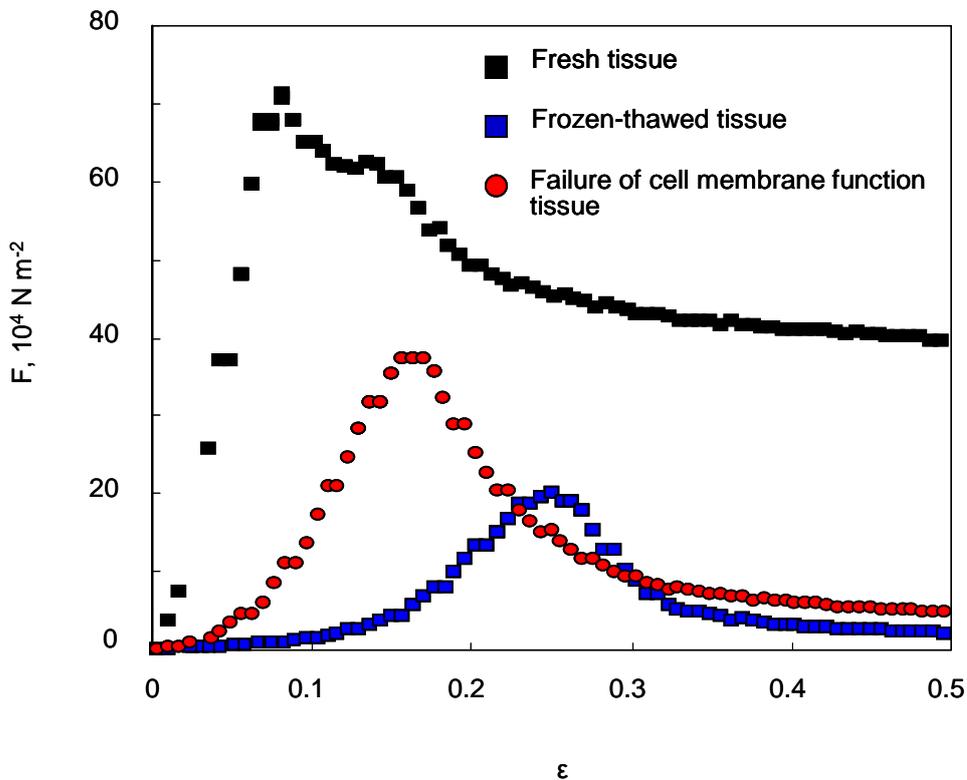


Fig.3-13 Typical stress-strain curves of onion tissue samples.

Fig.3-13 の曲線より得られた破断強度を Fig.3-14(A)に示す. ただし, 図中のバーは誤差範囲であり, 得られた値の最大値と最小値を示す. 生鮮組織の破断強度は,  $9.1 \times 10^5 \text{ N m}^{-2}$ であった. 既往の研究より, 生鮮タマネギ組織の破断強度は, 種類や貯蔵期間によって異なるものの, 約  $10^6 \text{ N m}^{-2}$ オーダーであることが示されている (Coolong *et al.*, 2008). クロロホルム蒸気によって細胞膜のみを特異的に変質させた細胞膜機能除去組織の破断強度は,  $5.4 \times 10^5 \text{ N}$

$\text{m}^{-2}$ であった。従って、クロロホルム蒸気によって細胞膜の機能を低下させると、組織の破断強度が低下することが示された。また、凍結・解凍組織の破断強度は  $2.4 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$  であり、さらに低下した。

次に、Fig.3-13 の曲線より、初期弾性率の計算を行った。その結果を Fig.3-14(B)に示す。生鮮組織の初期弾性率は、 $1.4 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$ であった。しかし、細胞膜機能除去組織では  $1.2 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ 、凍結・解凍組織では  $3.7 \times 10^4 \text{ Nm}^{-2}$ と、大きく低下することが確認された。測定誤差を考慮すると、細胞膜機能除去組織と凍結・解凍組織の初期弾性率は、等しいと考えられる。

本研究で使用した細胞膜機能除去組織、すなわち細胞膜の水透過性に関する機能を低下させた組織においても、若干ではあるが破断強度の低下は確認された。従って、破断強度の低下には、細胞壁のみならず細胞膜の変化も関係していると考えられた。しかし、細胞膜機能除去組織と凍結・解凍組織を比較すると、初期弾性率の変化の程度は同等であるが、破断強度の低下は凍結・解凍組織の方が著しかった。従って、凍結・解凍処理によって破断強度が著しく低下する理由は、細胞膜以外の要因、すなわち細胞壁の変化によって引き起されたと考えられる。この様な凍結・解凍処理後の破断強度の著しい低下と細胞壁の構造変化に関する考察は既に報告されている (Fuchigami *et al.*, 1995A; Fuchigami *et al.*, 1995B; Roy *et al.*, 2001)。そのため、本研究においても、破断強度より、細胞壁に関する組織のテクスチャーの変化を評価できたと考えられる。そして、細胞膜に関するテクスチャーの変化を評価する指標として、初期弾性率が使用できる可能性が示されたと考えられる。この点については、次節で更に考察していくこととする。

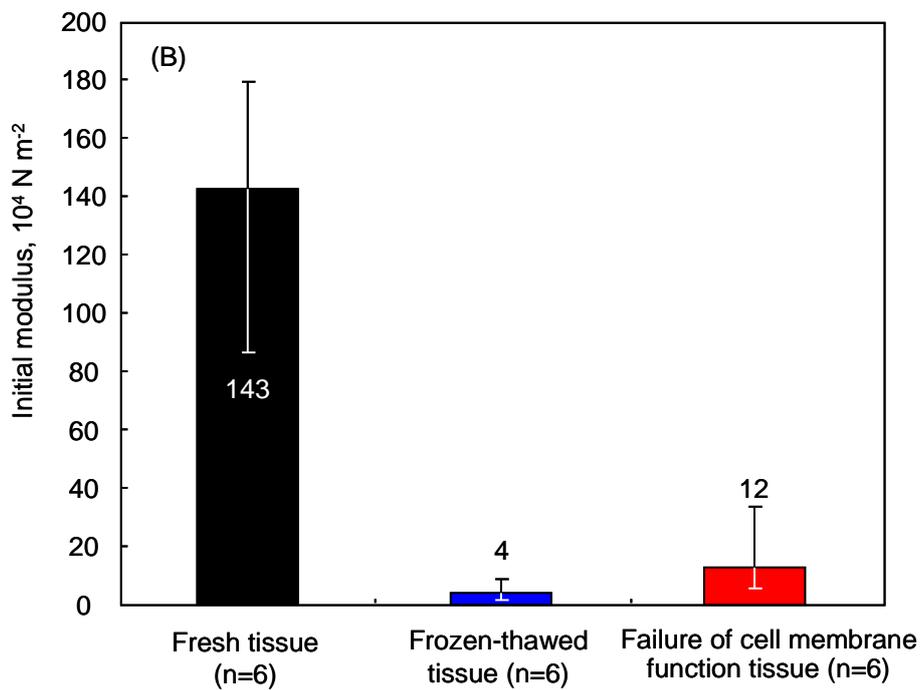
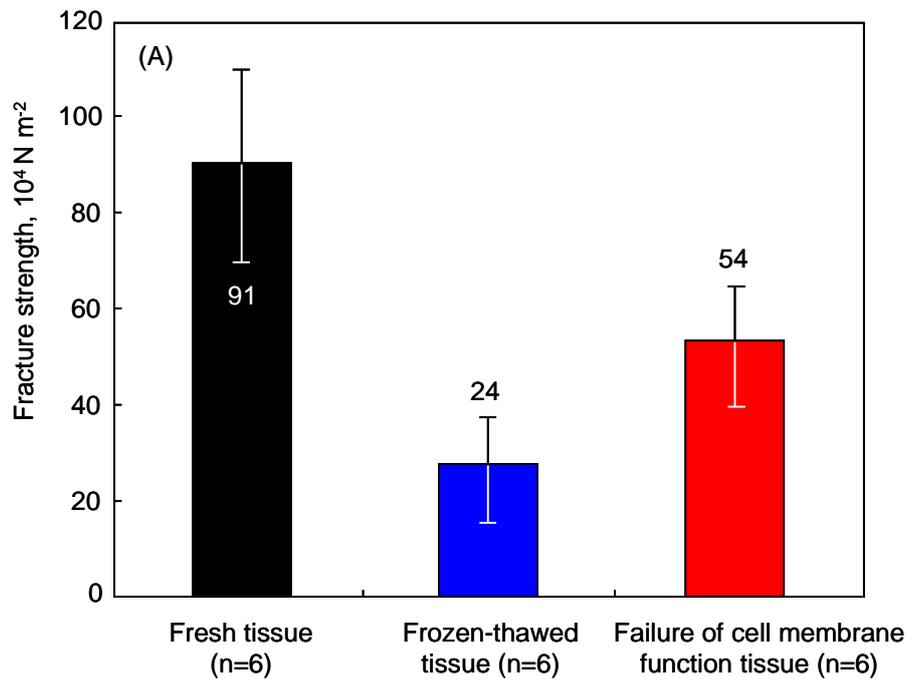


Fig.3-14 Index of texture, (A) fracture strength and (B) initial modulus, of onion tissue sample before and after freezing and thawing or chloroform -vapour treatments. Error bars show the maximum and minimum values.

### 3. 5. 考察

生鮮植物組織の力学的な性質は、細胞壁と細胞膜の性質によって成されていると考えられている。細胞壁は、セルロースなどのマイクロファイバーと、組織をなすために細胞と細胞を接着する役割を果たすペクチンの 2 つの観点から研究が行われている。Fry (1995) は、植物組織の強度が、セルロースなどのマイクロファイバーと関係していること示した。また、ペクチンを除いた細胞壁の組織の力学的性質に与える影響を理解するために、トマト組織の浮遊細胞を用いて 1 つの細胞における初期弾性率の測定が、Thomas らの研究グループによって行われた (Blewett *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006)。その結果から、変形率 20% の範囲において、細胞壁の力学的特性を初期弾性率より評価できると考えられた。しかし、彼らは、細胞膜に関する考察で、たゞ 1 つの細胞では細胞壁と比較すると非常に薄い要素であるとし、測定範囲において細胞膜の影響を無視している。一方、細胞膜に関する力学的な変化は、1958 年に Virgin らが検討している。彼らは、ポテト組織を用いた初期弾性率の測定結果と膨圧に、非常に良い相関があることを示している。従って、Thomas らの実験においても、細胞の膨圧に着目することで、細胞壁だけではなく、細胞膜に関する力学的な性質と初期弾性率の相関が示されると考えられる。

本研究で使用したタマネギ組織において、凍結・解凍組織では、初期弾性率と破断強度の両パラメータとも、生鮮組織のそれと比較して著しく低下した。細胞膜機能除去組織においては、初期弾性率は、凍結・解凍組織と同様、著しく低下することが確認された。しかし、破断強度は、凍結・解凍組織の様な著しい低下は確認されず、生鮮組織の破断強度の約 60% の値を保っていた。先に述べた様に Virgin ら (1958) の研究より、主に、破断強度は細胞壁、初期弾性率は細胞膜に関係する力学的な変化を示していると予測された。従って、細胞膜機能除去組織では細胞膜に関する組織の力学的特性、凍結・解凍組織では細胞膜のみならず細胞壁に関係する組織の力学的特性の両方が低下したと考えられる。本研究において観察された

細胞膜に関する機能の低下は、NMR を用いた水透過係数の結果からも確認された。凍結・解凍組織と細胞膜機能除去組織は共に、生鮮組織の水透過係数と比較して約 10 倍も水透過性を増大させた。Virgin ら(1958)が報告した初期弾性率と膨圧の関係が、本研究で示した NMR 測定の結果と必ずしも一致するとは言えないが、NMR 測定で得られた細胞膜の水透過性の増大と初期弾性率の低下は変化の傾向として一致していたと言える。従って、NMR 測定の結果は、細胞膜に関係した組織の力学的な変化の原因を示す理由の 1 つとなる考えられる。

実は、力学的な性質を示すパラメータとして破断強度と初期弾性率の 2 つを使用した研究は、既に凍結・解凍処理後のリンゴ柔組織のテクスチャーの変化の測定に使用されている (Chassagne-Berces *et al.*, 2009)。彼らは、凍結速度の異なる凍結・解凍処理後の組織において、テクスチャーを評価した。そして、いかなる凍結速度においても、凍結・解凍処理後には 2 つのテクスチャーの指標 (破断強度と初期弾性率) が大きく低下することを示している。しかし、彼らは、その低下の理由として、他の多くの研究と同じ様に、細胞壁に関する細胞構造の変化を示唆するに留まった。一方、本研究では、凍結・解凍処理後のテクスチャーの変化を細胞膜の観点からも検討し、NMR を用いた細胞膜水透過係数の測定と併せて検討することで、初期弾性率の変化が、細胞膜の機能の低下に関係することを示すことができた。

以上のことより、2 つのパラメータ、破断強度と初期弾性をテクスチャー測定より評価することで、凍結・解凍処理後の生鮮野菜の組織軟化の程度を、より詳細に評価できることが示された。この評価法を使用することで、凍結保存法における生鮮野菜の組織軟化をより詳細に評価できると考えられる。また、これまで提案されてきた浸透圧脱水凍結法など、凍結・解凍処理後の組織軟化の程度が抑制されるといった凍結保存法の効果の詳細や問題点を明確できると考えられる。さらに、本研究において、組織の力学的な変化の測定に併せて、“組織”として細胞膜の水透過性の増大の観察を行ったことで、これまで仮説に過ぎなかった“細胞膜の水透過性の増大と組織軟化”の関係を確認できたと考えられる。従って、本章で提案した組織軟化の評価手法は、新しい長期保存法を確立するための有力な手段となることが期待できる。

### 3. 6. 結論

凍結・解凍処理後の生鮮野菜の組織軟化程度の詳細な評価法を確立するために、タマネギ組織を使用して、細胞壁と細胞膜の双方の変化より、凍結・解凍後の組織軟化を検討した。まず、“組織”内に含まれた状態の細胞膜の水透過係数の算出を行った。その結果、凍結・解凍処理によって“組織”内に含まれた状態においても細胞膜の水透過性が増大することを確認した。次に、組織の力学的な変化を、テクスチャー測定より検討した。特に、従来、凍結・解凍処理後の組織軟化の評価に使用されてきた細胞壁に関するテクスチャーの変化のパラメータ「破断強度」と共に、「初期弾性率」の算出を行った。その結果、凍結・解凍処理後の組織では、破断強度のみならず初期弾性率も大きく低下することが確認された。そして、この初期弾性率の変化の程度は、細胞膜の水透過性に関する機能の低下と関係することを確認した。従って、初期弾性率を測定することで細胞膜に関するテクスチャーの変化を組織として評価できることが示された。以上のことより、テクスチャー測定より、破断強度と初期弾性率の2つの力学的パラメータを評価することで、凍結・解凍処理後の生鮮野菜の組織軟化の程度を、細胞壁と細胞膜に関係した組織軟化として、詳細に理解できることが示された。

## 第4章 浸透圧脱水凍結法による組織テクスチャーの保持効果

### 4. 1. 緒言

浸透圧脱水凍結法は、凍結前に野菜内に多量に含まれる水分を脱水し、凍結に伴って形成する氷を減らすことで、組織に対する氷形成のダメージを軽減できると言われている。近年、この凍結保存法を使用することで、凍結・解凍処理後、ニンジン組織などの生鮮野菜の組織軟化を抑制できることが報告された(Onishi and Miyawaki, 2005)。しかし、すべての生鮮野菜に対して、組織軟化を抑制する効果が得られるわけではない。また、この保存法において、効果が得られる原因についても、明確には示されていない。

そこで本章では、浸透圧脱水凍結法において報告されている、凍結・解凍処理後の組織軟化を抑制する効果を検討することを目的とした。第3章で検討したテクスチャーの評価法を用いて、その効果の詳細を確認することとした。試料には、タマネギ組織と共に、すでに浸透圧脱水凍結法において組織軟化の抑制が報告されているニンジン組織を用いた。また、機械的なテクスチャーの評価に併せて、食感に対する効果も検討するため官能試験を行った。

## 4. 2. 試料の調製

北海道産のタマネギ(*Allium cepa* L.) とニンジン(*Daucus carota* L.)を購入後、タマネギは5mm 幅のスライス、ニンジンは約 10mm角に切り出し、生鮮組織試料とした。この生鮮組織は浸透圧脱水凍結法を用いて保存され、浸透圧脱水凍結組織試料とした。浸透圧脱水凍結法は、Ohnishi and Miyawaki (2005)が報告した方法を参考とし、その手順は Fig.4-1 に示す。すなわち、50% (w/w)スクロース水溶液に5時間浸漬・脱水し、脱水後、0.9%(w/w) NaCl 水溶液で、スクロースを洗い流した。これを、-18℃雰囲気での凍結庫内で1週間凍結させた。その後、組織を室温(25℃)で1時間解凍させ、0.9%(w/w)NaCl 水溶液に5時間浸漬し、復水した。ただし、脱水及び復水は約 10℃で、攪拌・振動させながら行った。また、浸透圧脱水凍結法の組織軟化の抑制の効果を理解するため、組織に対する浸透圧脱水処理(未凍結)の影響を検討することとした。50%(w/w)スクロース水溶液で脱水し、その後、直ちに 0.9% (w/w)NaCl 水溶液で復水処理した組織(凍結保存はしていない)を調製し、脱水・復水組織試料とした。そして、生鮮組織を、-18℃雰囲気内で1週間凍結し、室温(25℃)で解凍した組織も調製し、凍結・解凍組織試料とした。

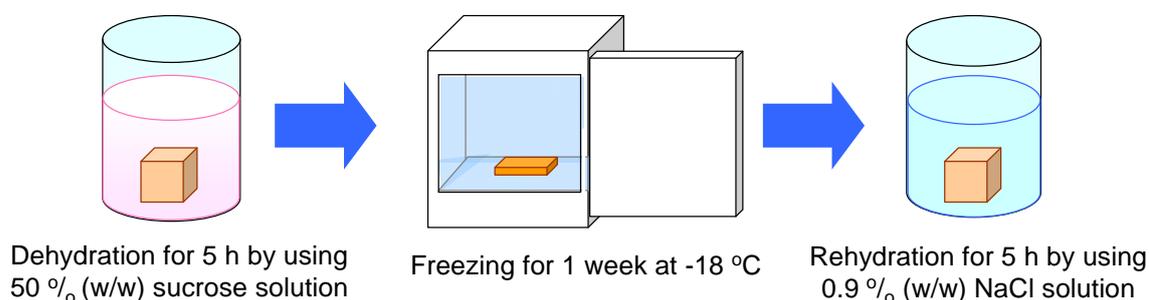


Fig.4-1 Schematic image of dehydrofreezing method for vegetable.  
(Ohnishi and Miyawaki, 2005)

### 4. 3. 実験方法

#### レオメーターによるテクスチャーの測定

第3章に示す方法と同様の方法を用いて評価した。

#### 水分含量の測定

105°Cに調節したオープンに秤量瓶をいれ 1~2 時間加熱・乾燥させ、シリカゲルの入ったデシケーターに入れ秤量瓶の温度が室温に戻るまで放冷した(約 45 分)。その後、これを 0.01 mgまで秤量し、恒量( $w_0$ )とした。

恒量を測定した秤量瓶に試料を入れ蓋をし、秤量した( $w_1$ )。その後、ふたを開け 105°Cのオープンに入れ 24 時間乾燥させ、室温に戻るまでデシケーター内で放冷した。その後、秤量した( $w_2$ )。

この様に、秤量した $w_0$ ,  $w_1$ ,  $w_2$ を下記の式(4-1)に代入し、試料の水分含量を計算した。

$$\text{WaterContent}[\%] = \frac{w_1 - w_2}{w_1 - w_0} \times 100 \quad (4-1)$$

#### ドリップ量の測定

測定は遠心法で行った。遠心前の試料の質量を、水分含量の測定同様に、秤量瓶を用いて測定した。その後、試料を遠心管に入れ代え、遠心分離機 (CAPSULE HF-120, トミー工業株式会社)を用いて、雰囲気温度 25°C, 2000×g で 30 分間、遠心分離を行った。遠心後、組織を遠心管より取り出し、組織表面に付着した水分を軽くキムワイプを用いてふき取った。この試料を再び秤量瓶に戻し、質量  $w_3$ を計測した。その後、式(4-2)より、組織内から流失したドリップの割合を計算した。

$$\text{Drip} [\%] = \frac{w_3 - w_1}{w_1 - w_0} \times 100 \quad (4-2)$$

## 官能試験

20 歳前後の男女 12 人をパネラーとした 2 グループ(グループ1とグループ 2)に対し、Fig.4-3 の官能試験シートを用いて評点法より食感を評価した(大越ら, 2009)。グループ1とグループ 2 は、それぞれ異なるタマネギより調製した試料を用いて官能試験を行った。尺度は 5 段階とし、標準として生鮮組織試料を与え、これと凍結・解凍組織試料および浸透圧脱水凍結組織試料の差を評価した。尺度のカテゴリーは、生鮮組織試料と比較して良い、同じ、劣るの 3 つを定義した。また、食感語彙として Table.4-1 に示す 445 語の日本語テクスチャー用語リストより、一般の消費者においても判別可能と判断された語彙(早川ら, 2005; 早川ら, 2006))である「かたさ」、「やわらかさ」、「歯ごたえ」を選択した。ここでは試験の主なる目的が、食感にあることを伏せるため、味と外観についても試験項目に入れた。併せて、試験項目として定義した語彙意外に感じる食感を調査するため、それぞれの組織試料の官能試験の後、食感・味・見た目に関する感想を自由に表記させた。

Table.4-1. Texture words in Japanese which was used for sensory test by food science researchers.

In the table, \* shows texture word which can detect by general consumers.

用語	用語	用語	用語	用語
あ 厚い	ぎとっ	ごつごつ	*しなっ	だらだら
*脂っこい	*きめ細かい	*こってり	*しなびた	たらっ
*油っこい	吸湿性がある	*粉状の	しなやか	だらっ
*脂っばい	球状の	*粉っばい	*洪い	たらし
*油っばい	吸水性がある	*粉をふいた	しまりがある	だらし
粗い	強靱な	細かい	湿った	*弾力がある
泡状の	切れやすい	ゴムのような	*霜降り状の	ち ちぎれやすい
泡の立つ	均一な	*コリコリ	*シャーベット状の	ちぢれた
い いがいが	く くしゃくしゃ	ゴリゴリ	*シャキシャキ	ちゆるちゆる
*糸を引く	ぐしゃぐしゃ	*コリッ	*シャキッ	ちゆるっ
う*薄い	くしゃっ	ゴリッ	シャクシャク	ちりちり
うろこ状の	ぐしゃっ	ころころ	しゃっきり	ちりっ
え 液状の	ぐずぐず	ごろごろ	*シャリシャリ	つ*粒状の
液のしたたる	*くずれやすい	ころっ	*ジャリジャリ	*つぶつぶ
お 重い	くたくた	ごろっ	*シャリッ	*つぶれやすい
か かくばった	くだけやすい	ころり	ジャリッ	つまった
かさかさ	くたっ	ころり	*ジュシー	*つるっ
がさがさ	*口あたりがよい	こわい(強い)	柔軟な	*つるつる
かさつく	*口ざわりがよい	ごわごわ	収れん性の	*つるり
かすかす	*口どけがよい	ごわっ	じゅくじゅく	*つるん
*かたい	くちゃくちゃ	こわれやすい	じゅるじゅる	て でこぼこ
*硬い	*ぐちゃぐちゃ	さ*サクサク	じゅるっ	と とげとげ
*堅い	くちゃっ	ザクザク	シュワシュワ	どっしり
*固い	ぐちゃっ	*サクッ	ジュワジュワ	*とろける
塊状の	くちゅくちゅ	ザクッ	シュワッ	*とろっ
かちかち	ぐちよぐちよ	裂けやすい	*ジュワッ	*どろっ
がちがち	ぐちよっ	*ざっくり	ショリショリ	*とろとろ
*かちんかちん	くつつく	ざっくり	ショリッ	*どろどろ
かちんこちん	くにくにく	さらさら	*汁が多い	*とろみがある
がっしり	ぐにゃぐにゃ	ざらざら	*芯がある	*とろり
かどばった	ぐにゃっ	*さらっ	*しんなり	*どろり
*かみ切れない	ぐにゃっ	ざらっ	す すかすか	な*なめらか
*かみごたえがある	ぐにゃり	ざらつく	すかっ	に にちゃっ
*かゆ状の	ぐにゃり	ざらり	*すじっばい	にちゃにちゃ
からから	ぐにゅぐにゅ	ざらり	ずっしり	乳状の
*からっ	ぐにゅぐにゅ	サンドイッチ状の	砂状の	*にゆるっ
からみつく	ぐにゅっ	し しけた	砂っばい	*にゆるにゆる
からり	ぐによくによ	*しけた	すべすべ	にゆるり
*カリカリ	ぐによくによ	*しこしこ	すべる	ぬ ぬたっ
ガリガリ	ぐによっ	しこっ	スポンジ状の	ぬちゃっ
*カリッ	*クリーミー	*舌ざわりがよい	するする	ぬちゃぬちゃ
ガリッ	*クリーム状の	*舌に残る	ズルズル	ぬとっ
顆粒状の	け 結晶状の	しっかり	するっ	ぬめっ
軽い	こ コキコキ	しっけた	ズルッ	ぬめぬめ
乾いた	*こくがある	*しっとり	するり	*ぬめりがある
皮ばった	固形の	じっとり	ずるり	ぬらっ
き キシキシ	*こしがある	じとじと	せ*ゼリー状の	ぬらぬら
ギシギシ	こちこち	しとっ	繊維状の	ぬらり
ぎっしり	こちっ	じとっ	そ 層状の	*ぬるっ
ぎとぎと	こちんこちん	しなしな	た たらたら	*ぬるぬる

早川ら<sup>11,12)</sup>より。アンケートおよび文献調査により収集整理した日本語テクスチャー用語 445語。\*は消費者対象のアンケート結果より消費者の語彙と判定された用語。

用語	用語	用語	用語
ぬるり	*バリバリ	ぶわぶわ	ポリッ
ね ねたっ	ひ*ひからびた	ふわり	ポリッ
ねたねた	びちゃっ	分離した	ポリポリ
ねちっ	びちゃびちゃ	ふんわか	*ポリポリ
ねちねち	びちゃびちゃ	*ふんわり	ほろっ
*ねちゃっ	ふ つかっ	へ べたっ	ほろっ
*ねちゃねちゃ	ふかふか	べたっ	ほろっ
ねちょっ	ぶちっ	べたつく	ほろほろ
ねちょねちょ	ぶちっ	*べたべた	ほろほろ
ねっちり	ぶちぶち	べたべた	ほろほろ
*ねっとり	ぶちぶち	*べちゃっ	ほろり
*ねとっ	ぶちゅ	べちゃっ	ほろり
ねとつく	ぶちゅ	*べちゃべちゃ	ほろり
*ねとねと	*ふっくら	べちゃり	ほわっ
ねばい	ふっくり	べちゃり	ほわほわ
*ねばっ	ぶっくり	べちょっ	ま 膜状の
*ねばつく	ぶつっ	*べちょべちょ	ま 膜状の
*ねばっこい	ぶつっ	べったり	ま 膜状の
*ねばねば	ぶつぶつ	べったり	ま 膜状の
*ねばりがある	ぶつぶつ	べったり	ま 膜状の
の *濃厚な	ぶにぶに	べったり	ま 膜状の
*のどごしがよい	ふにやっ	べとっ	ま 膜状の
*のびた	ふにやふにや	べとっ	ま 膜状の
のびる	ふにやり	*べとつく	ま 膜状の
糊状の	ぶにゅぶにゅ	*べとべと	ま 膜状の
は バキッ	ふによふによ	べとべと	ま 膜状の
バキッ	ぶによぶによ	へなっ	ま 膜状の
バキバキ	ぶによぶによ	へなへな	ま 膜状の
バキバキ	*ふやけた	べらべら	ま 膜状の
歯切れがよい	ぶよっ	べろべろ	ま 膜状の
薄片状の	ぶよぶよ	ほ ポキッ	ま 膜状の
*歯ごたえがある	ぶよぶよ	ほ ポキッ	ま 膜状の
ばさっ	ぶりっ	ほ ポキボキ	ま 膜状の
*ばさっ	*ぶりっ	ほ ポキボキ	ま 膜状の
*ばさつく	ぶりぶり	*ほくほく	ま 膜状の
ばさばさ	*ぶりぶり	ほくほく	ま 膜状の
*ばさばさ	ぶりん	*ほぐれやすい	ま 膜状の
*歯ざわりがよい	ぶりん	ほこほこ	ま 膜状の
はじける	ぶりんぶりん	ほそっ	ま 膜状の
パチパチ	*ぶりんぶりん	ほそっ	ま 膜状の
バフ状の	ふるふる	ほそほそ	ま 膜状の
ばらっ	ぶるぶる	ほそほそ	ま 膜状の
ばらっ	*ぶるぶる	ほっくり	ま 膜状の
ばらばら	ぶるん	ほっくり	ま 膜状の
ばらばら	*ぶるん	ほっこり	ま 膜状の
ばらり	ぶるんぶるん	ほっこり	ま 膜状の
ばらり	*ぶるんぶるん	ほってり	ま 膜状の
バリッ	*ふわっ	ほってり	ま 膜状の
*バリッ	*ふわふわ	ほてっ	ま 膜状の
*バリバリ	ぶわぶわ	ほてっ	ま 膜状の
		ほてほて	ま 膜状の

## 官能検査シート

官能検査とは耳、眼、鼻、舌、皮膚などの五感によって行う検査のことです。従って、正しい解答はありません。自分の好み等の五感に従い、周りの人とは相談せずに検査に取り組みてください。

\*官能検査シートは提出してもらいます。しっかりと取り組みましょう。

学籍番号

名前

方法

五段階評価を行います。

対象となる試料と指定された試料の比較をしてください。対象となる試料に対して比較する試料が同じと感じたならば3に丸をしてください。劣ると思ったときは1、良いと思ったときは5に丸をしてください。最後に、対象となる試料に比べ比較する試料が好きか嫌いかを答えてください。

例：

対象となる試料

比較する試料

生鮮組織(L)と比較して、Aは？

1. 固さ                    ①   2   3   4   5

1. 生鮮組織(L)と比較して、

1-1. Aは？

1) 見た目は？

1. 色	1	2	3	4	5
2. 張り	1	2	3	4	5
3. 鮮度	1	2	3	4	5
4. 水々しさ	1	2	3	4	5
5. 水っぽさ	1	2	3	4	5

コメント

2) 食感は？

1. 固さ	1	2	3	4	5
2. やわらかさ	1	2	3	4	5
3. 歯ごたえ	1	2	3	4	5

コメント

3) 味は？

1. 甘味	1	2	3	4	5
2. 塩味	1	2	3	4	5
3. 酸味	1	2	3	4	5
4. 苦味	1	2	3	4	5
5. 水っぽさ	1	2	3	4	5

コメント

3) 生鮮組織と比べて

好き or 嫌い

4) 総評

Fig.4-2 Question and answer sheet of sensory test.

## 4. 4. 結果

### 組織の外観とドリップ量に対する効果

Fig.4-3 に凍結・解凍処理後のタマネギ組織とニンジン組織の外観の写真を示す。凍結・解凍組織では、組織の表面に水分が染み出していた。一方、浸透圧脱水凍結組織では、組織表面への水分流出は見られなかった。官能試の見た目に関する評価の結果、タマネギ・ニンジン組織共に、浸透圧脱水凍結組織でも変色などネガティブな変化が確認されることが示された。しかし、タマネギ組織において、浸透圧脱水凍結組織の外観(見た目)は、凍結・解凍組織より「良い」「生に近い」という感想も示されており、タマネギ組織では浸透圧脱水凍結法を用いることで、凍結・解凍処理による外観の変化を抑制できることが確認された。

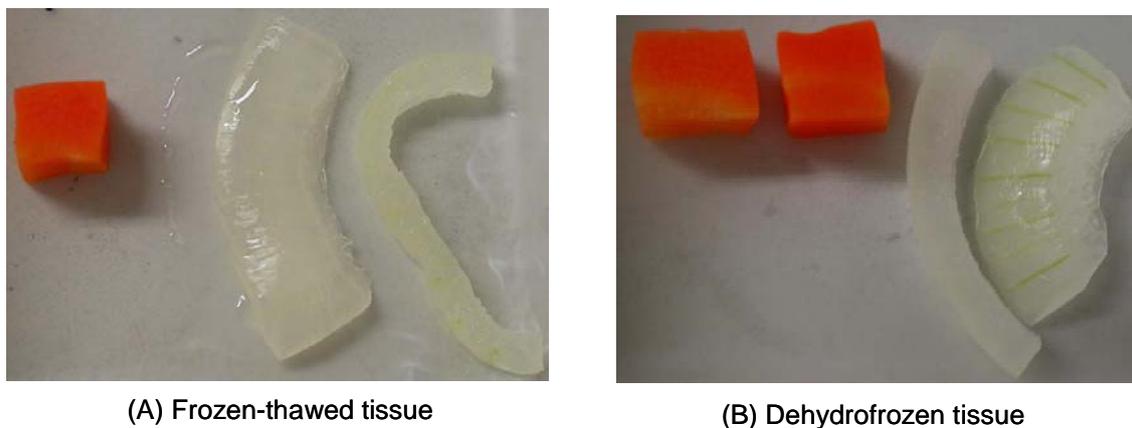


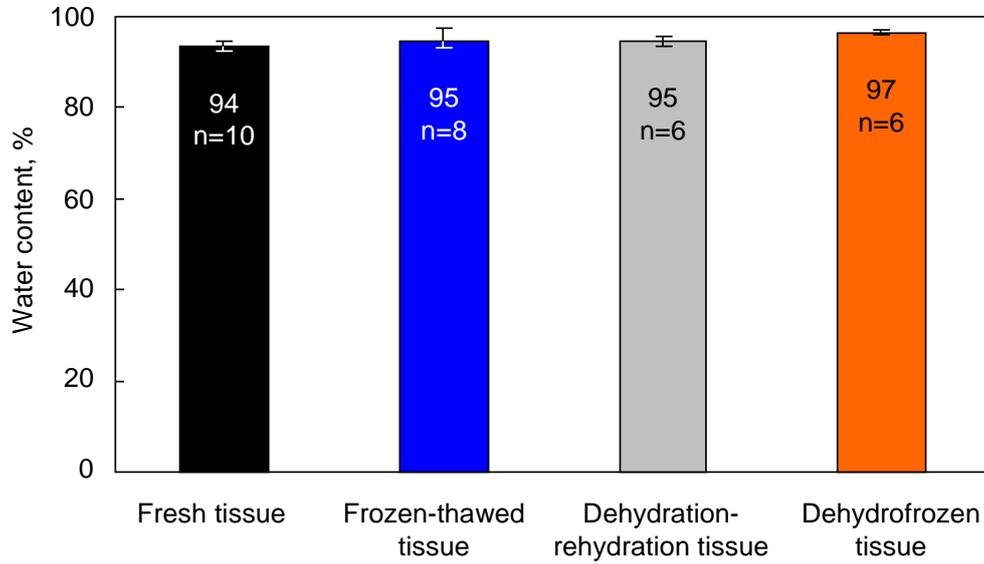
Fig.4-3 Visible change of onion and carrot tissues before freezing and thawing.

外観より観察された組織表面への水分の流出の原因を探るため、組織の水分含量とドリップ量の測定を行った。まず、各処理後の組織の水分含量の測定の結果を Fig.4-4 に示す。ただし、図中のバーは誤差範囲であり、得られた値の最大値と最小値を示す。Fig.4-4(A)に示すタマネギ組織の結果で、生鮮組織の水分含量は 93.5%，無処理で凍結・解凍処理した組織の水分含量は 94.5%と変化はなかった。一方、浸透圧脱水凍結法を用いて凍結・解凍処

理を行った組織の水分含量は 96.5%と、生鮮組織と凍結・解凍組織より、少し水分含量が高かった。同様の傾向は、ニンジン組織でも確認された。Fig.4-4(B)に示すニンジン組織の水分含量は、生鮮組織は 91.2%、凍結・解凍組織は 91.2%であった。一方、浸透圧脱水凍結法を用いて凍結・解凍処理を行った組織の水分含量は 93.9%と、若干高い水分含量であった。測定誤差を考慮すると、水分含量に大きな変化はないと考えられるが、タマネギ・ニンジン組織共に浸透圧脱水凍結法を行うことで、解凍後の水分含量が 2%程度増加することが示された。

次に、ドリップ量の測定結果を Fig.4-5 に示す。ただし、図中のバーは誤差範囲であり、得られた値の最大値と最小値を示す。Fig.4-5 (A) に示すタマネギ組織において、生鮮組織のドリップ量は 5.1%であった。一方、凍結・解凍組織のドリップ量は 29.8%に増加した。また、浸透圧脱水凍結組織のドリップ量は 34.7%であった。Fig.4-5 (B) に示すニンジン組織のドリップ量においても、タマネギ組織のドリップ量と同様の変化の傾向を示した。すなわち、生鮮組織では 3.4%であったドリップ量が、凍結・解凍組織では 14.9%まで増加した。そして、浸透圧脱水凍結組織のドリップ量は 16.1%と、凍結・解凍後の組織と同程度であることが示された。既往の研究において、浸透圧脱水凍結法を用いると凍結・解凍処理後のドリップ量を軽減できると言われているものの、生鮮組織と比較して大きく増加することが示されている (Moyano *et al.*, 2002; Ohnishi and Miyawaki, 2005)。既往の研究結果と本研究の結果を併せて考察すれば、浸透圧脱水凍結法においてドリップの流出を抑制する効果は期待できないと考えられた。

以上のことより、外観において観察された、組織表面の水分の付着と組織内に水分を保つ機能の変化に関係がないことが確認された。浸透圧脱水凍結後組織で組織表面に水分の付着がみられなかった理由は、浸透圧脱水凍結法の手順、すなわち解凍・復水後に組織表面に付着した NaCl 水溶液をふき取るといった操作にあると考えられる。



(B) Carrot tissue

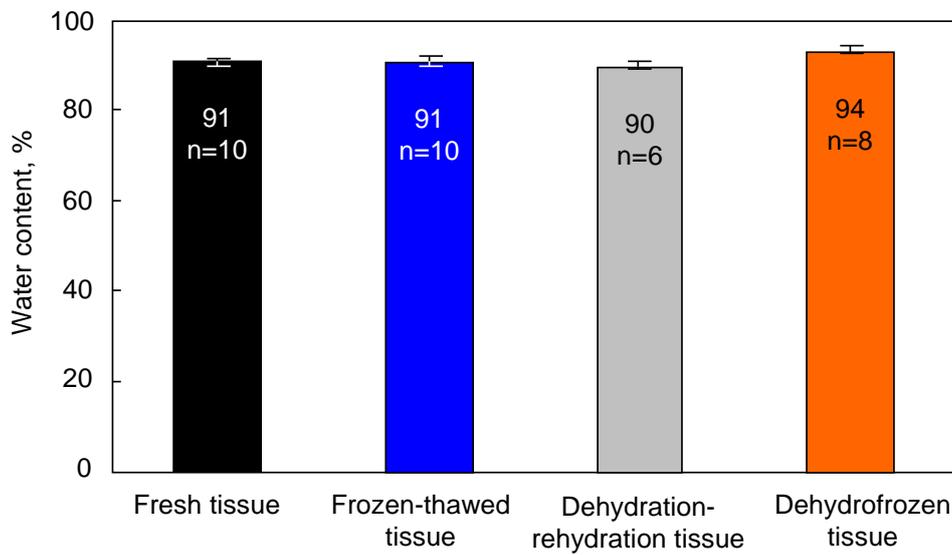
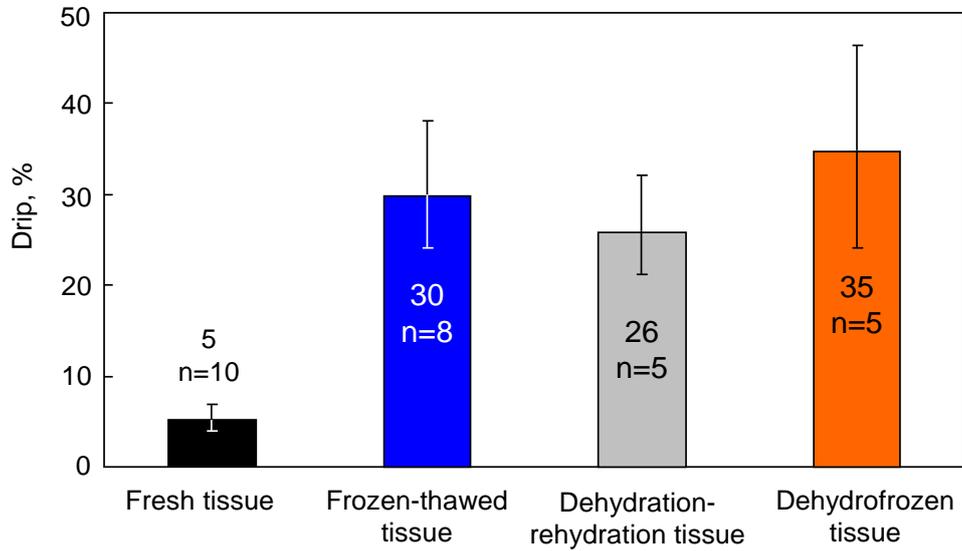


Fig.4-4 Indices of water content of (A) onion tissue and (B) carrot tissue before and after freezing and thawing. Error bars show the maximum and minimum values.

(A) Onion tissue



(B) Carrot tissue

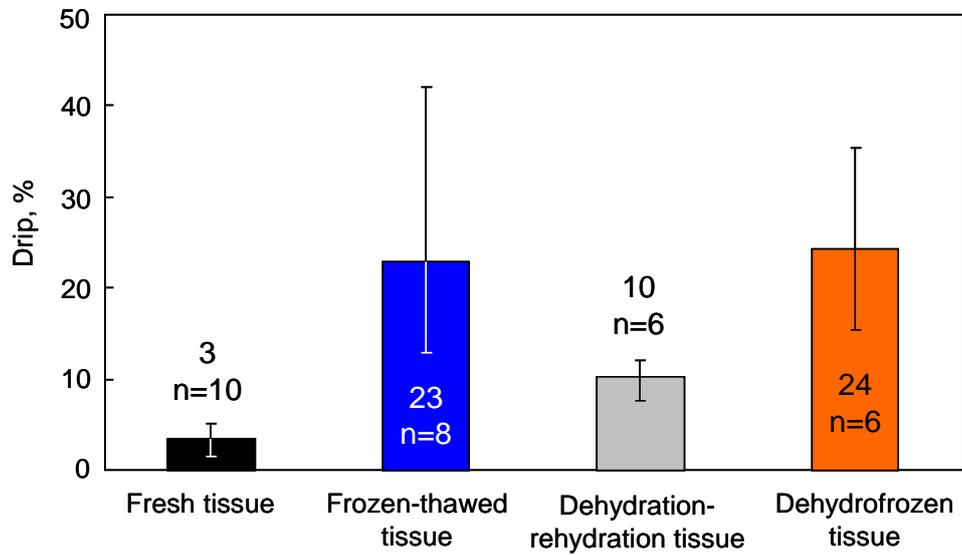


Fig.4-5 Indices of drip ratio of (A) onion tissue and (B) carrot tissue before and after freezing and thawing. Error bars show the maximum and minimum values.

### 組織テクスチャーに対する効果

Fig.4-6 に凍結・解凍処理後のタマネギ組織のテクスチャー測定の結果を示す。図中のバーは誤差範囲であり、得られた値の最大値と最小値を示す。Fig.4-6(A)に示す破断強度の測定の結果、生鮮組織の破断強度は、 $1.2 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$ であった。しかし、無処理で凍結・解凍処理した組織の破断強度は、 $2.0 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ まで低下することが示された。このような凍結・解凍処理後の著しい低下は、第3章において使用した試料のサイズが小さい場合の変化と同等であった。従って、本研究で使用した凍結保存条件において、試料のサイズによらず、凍結・解凍処理によって破断強度は著しく低下することが確認された。一方、浸透圧脱水凍結法によって凍結・解凍処理された浸透圧脱水凍結組織の破断強度は、 $7.4 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であった。従って、浸透圧脱水凍結法を用いることで、生鮮組織の破断強度に近い値が保たれることが示された。浸透圧脱水凍結法において、凍結・解凍処理を施さなかった組織、すなわち浸透圧脱水・復水処理のみ行った浸透圧脱水・復水組織の破断強度は、 $9.4 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であった。測定誤差を考慮すると、浸透圧脱水凍結組織の破断強度と同等と考えられた。従って、浸透圧脱水凍結において、若干、破断強度が低下した原因は、凍結・解凍処理よりも脱水・復水操作にあることが示された。

Fig.4-6(B)にタマネギ組織の初期弾性率の測定結果を示す。初期弾性率は、浸透圧脱水凍結組織も、凍結・解凍組織と同程度まで低下した。生鮮組織の初期弾性率は、 $4.4 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$ であったのに対し、凍結・解凍組織の初期弾性率は $1.5 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ と著しく低下した。この変化は、破断強度の変化と同様、第3章においても観察された変化である。また、浸透圧脱水凍結組織の初期弾性率は $3.0 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であった。初期弾性率の低下は、凍結処理は行っていない浸透圧脱水・復水組織においても観察され、 $6.1 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ に低下することが示された。

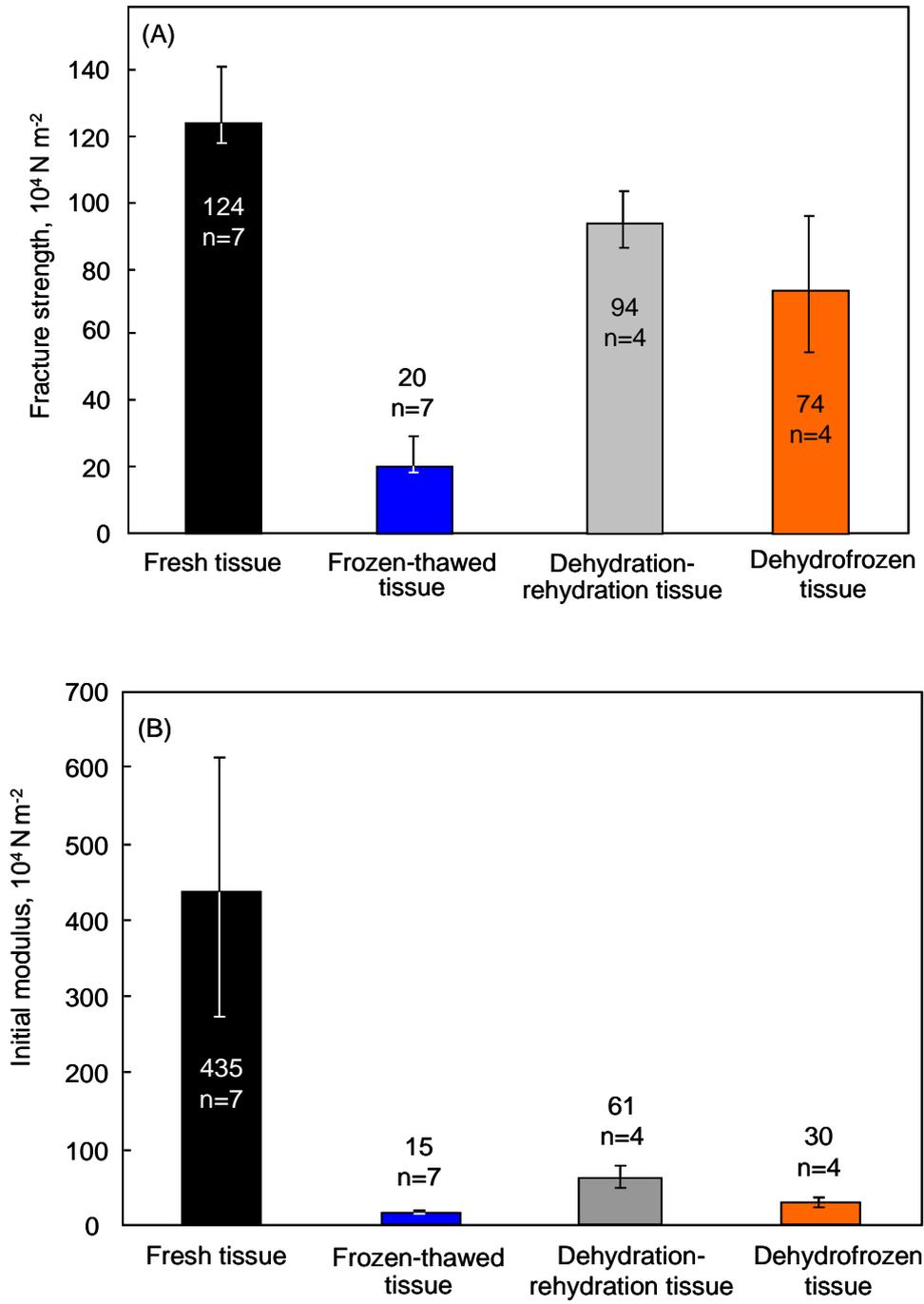


Fig.4-6 Indices of onion tissue texture, (A) fracture strength and (B) initial modulus, before and after freezing and thawing. Error bars show the maximum and minimum values.

同様のテクスチャーの変化は、ニンジン組織でも観察された。その結果を Fig.4-7 に示す。Fig4-7(A)に示す破断強度において、生鮮組織では  $9.0 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$  であったが、凍結・解凍組織は  $3.1 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$  となることが確認された。そして、浸透圧脱水凍結組織の破断強度は  $9.0 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$  と、生鮮組織のそれと変わらない値を保っていることが示された。既往の研究において、生鮮ニンジン組織の破断強度は、約  $10^6 \text{ Nm}^{-2}$  オーダーであること、無処理で凍結・解凍処理を行うと、破断強度は、生鮮組織のそれと比較して約半分の値にまで低下することが示されている(Fuchgami *et al.*, 1995A)。一方、Fig.4-7(B)に示す初期弾性率の変化を見てみると、生鮮組織では  $1.1 \times 10^7 \text{ Nm}^{-2}$  であったのに対し、凍結・解凍組織では  $2.5 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$ 、浸透圧脱水凍結組織でも  $8.6 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$  まで低下することが示された。また、初期弾性率の低下は、浸透圧脱水・復水組織でも確認された ( $4.4 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$ )。

既往の研究において、ニンジン組織は、浸透圧脱水凍結法を用いることで、凍結・解凍後においても生鮮組織のテクスチャーを維持できると報告されている。本研究においても、確かに、浸透圧脱水凍結法を用いることで、凍結・解凍処理後の組織の破断強度は生鮮組織と同程度の値を維持できることが確認された。しかし、初期弾性率に関して、その低下を防ぐことはできなかった。また、浸透圧脱水・復水を施した組織(未凍結)においても、初期弾性率は低下することが確認された。従って、“非常に緩やかな脱水”と言われ使用されてきた浸透圧脱水処理においても、組織に対して影響を与えることが示された。また、第 3 章で得られた結果を考慮すると、浸透圧脱水凍結法は、細胞壁に関するテクスチャーの保持は可能であるが、細胞膜に関するテクスチャーの保持の効果はほとんどないと考えられる。

以上のことより、浸透圧脱水凍結法は、凍結・解凍処理後の組織のテクスチャーを、無処理で凍結保存した場合と比較すれば、生鮮組織に近い状態に保つことはできることが示された。しかし、その変化を完全に保持できるわけではないことが確認されたと考えられる。

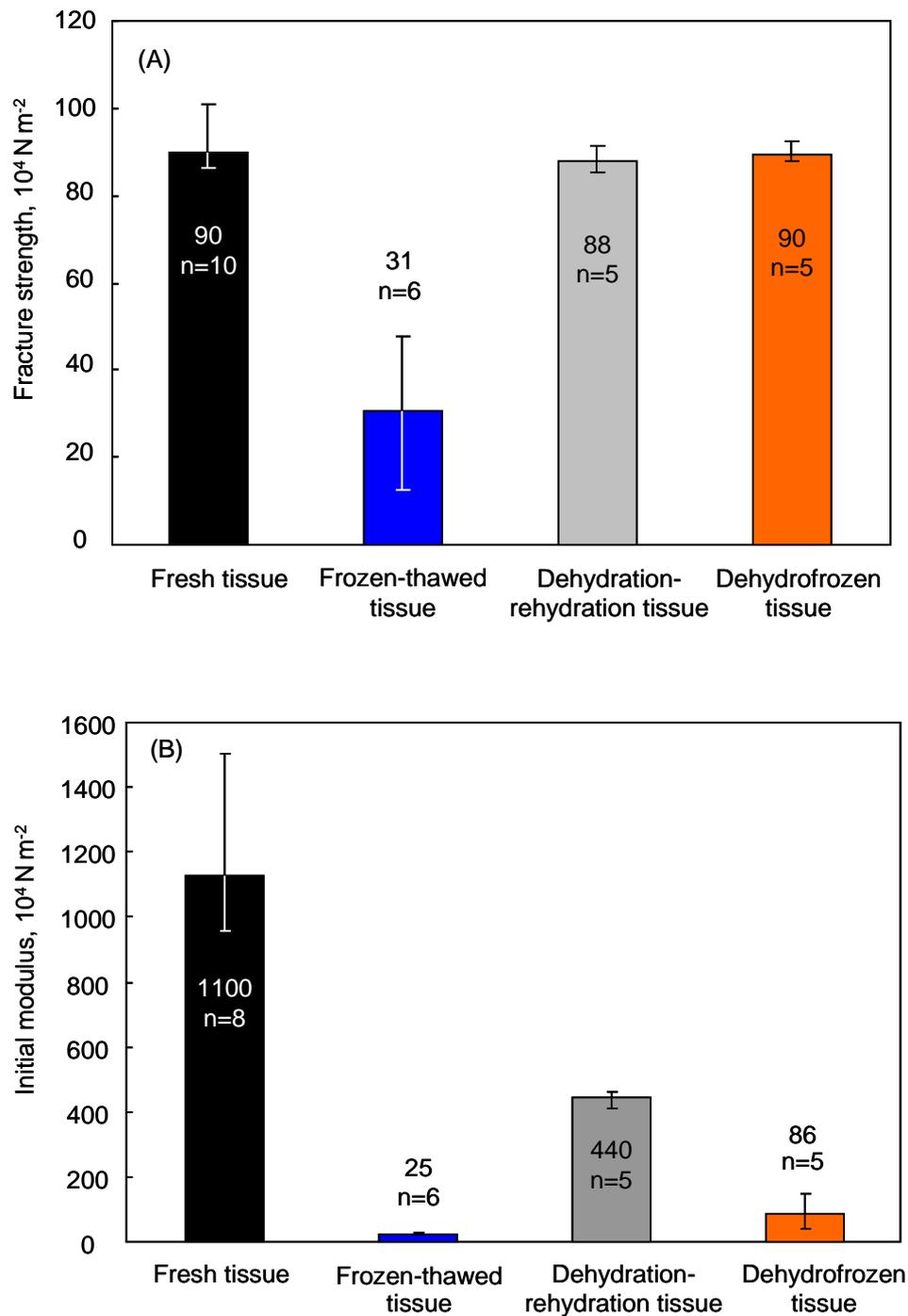


Fig.4-7 Indices of carrot tissue texture, (A) fracture strength and (B) initial modulus, before and after freezing and thawing. Error bars show the maximum and minimum values.

### 食感に対する効果

Fig.4-8 にタマネギ組織, Fig4-9 にニンジン組織の官能試験で得た結果を示す. ただし, 図中のバーは標準偏差(SD)とする. また, 得られた微妙な変化を評価するため, 食品の官能試験の手順に従い(大越ら, 2009), グループ1とグループ2毎に, 凍結・解凍組織と浸透圧脱水凍結組織の2組の組織間の差を評価するため, t 検定を行った. 検定は, それぞれのグループ内の2組(凍結・解凍組織と浸透圧脱水凍結組織)の分散が等しいか等しくないことを確認した後, 有意水準 5%で行った. 検定の結果, 差があると判断された項目には, Fig.4-8, 4-9 中に\*を付けた.

タマネギ組織の官能検査の結果 Fig4-8 において, グループ1とグループ2の結果に差があった. グループ1 Fig.4-8(A)において, 凍結・解凍組織と浸透圧脱水凍結組織は, 「かたさ」・「歯ごたえ」・「やわらかさ」のすべての項目で, 有意水準 5%の範囲内の差はなかった. 評点の平均値は, 凍結・解凍組織のかたさは1.6, 歯ごたえは1.9, やわらかさは4.3であった. 浸透圧脱水凍結組織のかたさは1.9, 歯ごたえは2.4, やわらかさは4.2であった. そのため, 2つの組織の食感に差はないと考えられる(本研究では評点3を「生鮮組織と同じ」とするように尺度を与えている). 一方, グループ2の官能試験の結果 Fig.4-8 (B)において, 凍結・解凍組織と浸透圧脱水凍結組織の「かたさ」・「歯ごたえ」・「やわらかさ」には, すべての項目で有意水準 5%の差が確認された. その評点の平均値は, 凍結・解凍組織のかたさは 1.7, 歯ごたえは 2.1, やわらかさは 4.2 であった. そして浸透圧脱水凍結後組織のかたさは 3.4, 歯ごたえは 3.4, やわらかさは 2.7 であった. グループ1と異なり, 凍結・解凍後組織と比較して浸透圧脱水後組織は生鮮組織に近い食感であることが確認された.

ニンジン組織の結果(Fig.4-9)においても, タマネギ組織のグループ1とグループ2で観察されたグループ間の差が確認された. グループ1のニンジン組織の官能検査の結果 Fig.4-9 (A)では, 凍結・解凍組織と浸透圧脱水凍結組織の間に, かたさ・歯ごたえ・やわらかさの食感に関して差はないと判断された. 一方, グループ2のニンジン組織の官能試験の結果 Fig.4-9

(B)では、かたさや柔らかさにおいて差があると判断された。そして、評点の平均値は、グループ1では凍結・解凍組織のかたさは2.1、歯ごたえは2.5、柔らかさは4.3であり、浸透圧脱水凍結組織のかたさは2.1、歯ごたえは2.5、柔らかさは3.7であった。グループ2では、凍結・解凍組織のかたさは1.5、歯ごたえは1.9、柔らかさは4.6であり、浸透圧脱水凍結組織のかたさは2.2、歯ごたえは2.3、柔らかさは3.9であった。

従って、浸透圧脱水凍結法の食感の保持の効果は観察される場合と観察されない場合があることが示された。しかし、その評点の傾向として、タマネギ組織とニンジン組織共に浸透圧脱水凍結後組織のほうが、生鮮組織に近い食感であることがわかった。グループ1とグループ2の結果に差が見られた原因として、一般消費者をパネルとして利用したことが考えられる。そのため、パネルの食感検知の能力に差があったと考えられる。より感度よく検知するためには専門家パネルを使用する必要があると考えられるが、本研究では“わずかな差”を検知することを目的としていない。従って、浸透圧脱水凍結法を用いて、一般消費者にも判断できる様な明瞭な効果を得るのは、難しいと考えられた。

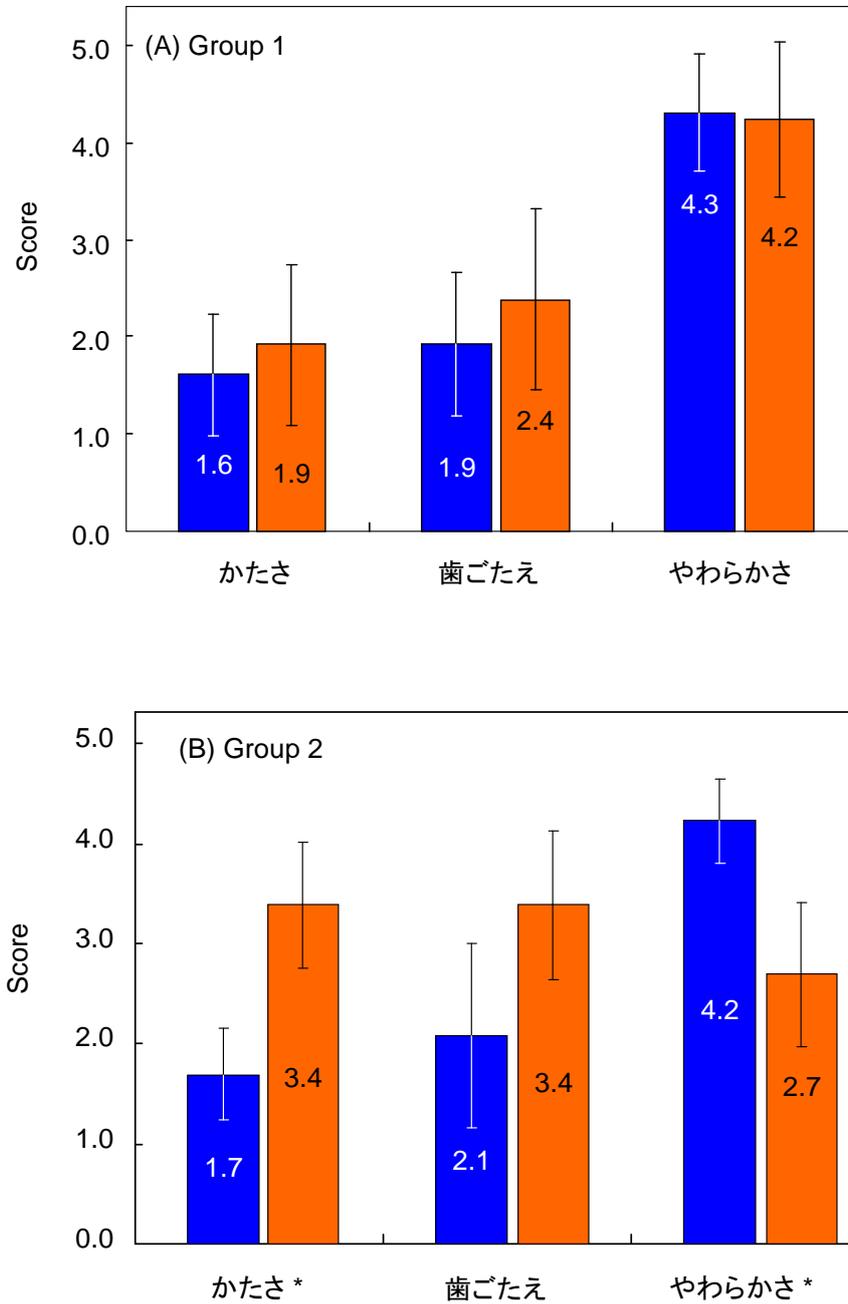


Fig.4-8 Results of sensory test obtained from two different groups, (A) group 1 and (B) group 2. The differences of onion tissue texture between frozen-thawed tissue and dehydrofrozen tissue. Error bars show SD (n=12).

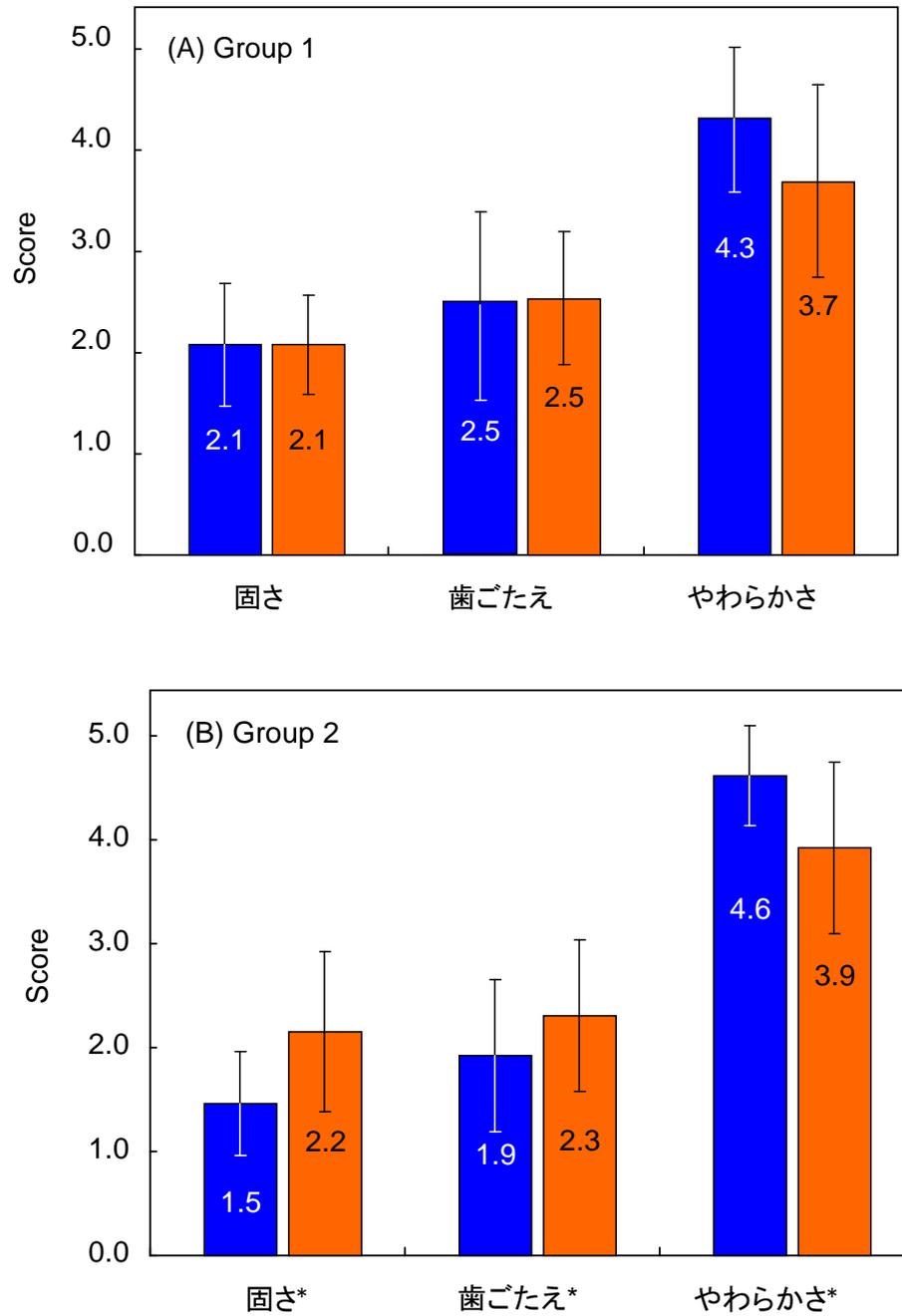


Fig.4-9 Results of sensory test obtained from two different groups, (A) group 1 and (B) group 2. The differences of carrot tissue texture between frozen-thawed tissue and dehydrofrozen tissue. Error bars show SD (n=12).

評点法で項目とした「かたさ」・「歯ごたえ」・「やわらかさ」以外の食感に関する組織の特徴を調べた。各項目の試験後に任意で表記させた食感に関する感想から、日本語テクスチャー用語 445 語で一般消費者が識別可能と判断されているテクスチャーに関する用語のみを抜き出した。その結果、グループ 1・2 およびタマネギ組織・ニンジン組織の別に関わらず、共通に感じる食感の特徴として「水っぽい」ことが確認された。

得られた食感に関する検査結果を総評すると、浸透圧脱水凍結後組織は、かたさ・歯ごたえ・やわらかさに関して、凍結・解凍組織より生鮮組織の食感と近いことがわかった。しかし、その差は、若干あるといった程度と考えられた。さらに、定義した項目以外にも、浸透圧脱水凍結組織は、凍結・解凍組織と同じほど「水っぽい」食感に変化してしまうことが確認された。官能検査で得られた感想を借りて、浸透圧脱水凍結処理後の組織の食感を表現すれば、かたさはあるが噛むと水分が流出してくる「漬物」のような食感であったことがわかった。従って、浸透圧脱水凍結法は凍結・解凍処理後の組織よりは、生鮮組織に近い食感を保つことができるが、その変化を完全に食い止めることはできないことが確認された。

## 4. 5. 考察

タマネギ組織とニンジン組織の野菜種を問わず、浸透圧脱水凍結法を用いることで凍結・解凍処理後の組織軟化の程度を、ある程度抑制できることが確認された。初期弾性率・官能検査に対する効果はほとんどなかったが、破断強度の保持に関しては効果を発揮することが示された。特に、ニンジン組織の破断強度は、浸透圧凍結法を用いることで、凍結・解凍処理後にも、生鮮組織の破断強度とほとんど同じ値を保持できることが確認された (Fig.4-7)。ニンジン組織において、この様なはっきりした効果を観察できた理由は、組織に占める細胞壁の割合が高いためと考えられる。

Zdunek and Umeda (2005)は、細胞サイズの大きさと組織のかたさの関係の検討を行った。その結果、小さい細胞サイズが集合している箇所は、大きな細胞が集合している箇所より、かたいことを示している。ニンジン組織の細胞サイズは約  $50 \mu\text{m}$  であり (Zdunek and Umeda, 2005)、約  $150 \mu\text{m}$  のタマネギ組織の細胞サイズの半分以下のサイズである。従って、タマネギ組織より細胞サイズが小さいニンジン組織では、浸透圧脱水法による凍結・解凍処理後の破断強度、すなわち細胞壁に関するテクスチャー保持の効果がよく観察されたと推察される。既往の研究において、浸透圧脱水凍結法の効果が観測されなかったジャガイモ組織の細胞サイズは、約  $100 \mu\text{m}$  とニンジン組織のそれより大きい (星野ら, 1998)。従って、浸透圧脱水凍結法は、ニンジン組織の様な比較的小さな細胞から成り、組織を占める細胞壁の成分の割合が多い農産物において、凍結・解凍処理後の組織軟化の程度を抑制する効果を示すと考えられる。

次に、浸透圧脱水凍結法が、なぜ凍結・解凍処理後の野菜組織の破断強度のみに、顕著な保持の効果を示したか、について考察する。既往の研究において、浸透圧脱水凍結法によって組織軟化の程度が抑制される理由は、“凍結前に予め凍結可能な水分を減少させる”操作にあると言われてきた。すなわち、組織内で形成する氷の量を減少させ、水の氷への変化に伴う細胞構造の

破壊を抑制すると考えられてきた。しかし、本研究では、浸透圧脱水凍結法において、凍結前に行う浸透圧脱水処理によってすでに組織の初期弾性率、すなわち細胞膜の機能低下が生じていることが確認された。従って、この凍結法の脱水操作が、“組織内の水を減少させる”という従来の考察とは別に、“細胞膜の機能を低下させる”操作であることに着目して考察する必要があると考えられた。そこで、凍結前の水分量と、凍結前の細胞膜の機能低下の2つの点に着目し検討した。これを検討するため、第3章でも用いたクロロホルム蒸気を用いて細胞膜の水透過性に関する機能を低下させた組織(細胞膜機能所諸組織)を、凍結・解凍処理した細胞膜機能除去凍結組織を調製した。

浸透圧脱水凍結組織と細胞膜機能除去凍結組織の凍結前の水分量の変化を、生鮮組織と比較した割合として Fig.4-10 に示す。ただし、生鮮組織を1とした時の質量減少率で示す。その結果、(A)タマネギ組織、(B)ニンジン組織共に、浸透圧脱水凍結後組織は、細胞膜機能除去凍結組織と比較して、組織内の水分量が低下していることが確認された。従って、細胞膜機能除去凍結組織は、凍結に伴う氷の形成によるダメージが、生鮮組織と同程度であると考えられた。

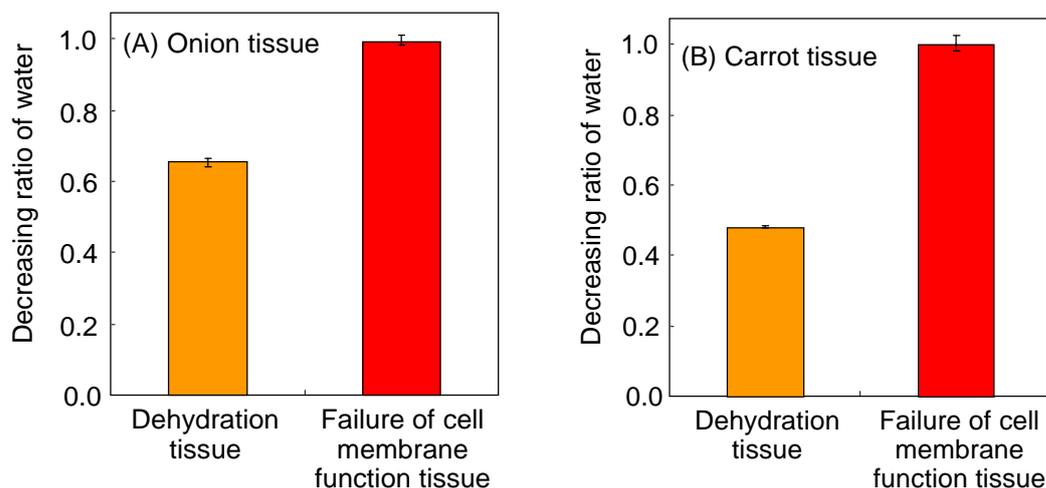


Fig. 4-10 Indices of decrease ratio of water in (A) onion and (B) carrot tissue before and freezing and thawing based on that of fresh tissue. Error bars show the maximum and minimum values (n=2).

しかし、Fig.4-11 に示す様に(A)タマネギ組織と(B)ニンジン組織の破断強度は、浸透圧脱水

凍結試料のみならず，細胞膜機能除去組織でも保持されることが確認された．従って，浸透圧脱水凍結法において，凍結・解凍処理後の組織の破断強度が保持された理由は，凍結前，浸透圧脱水処理によって組織内の水分量を減少させたことによらないと考えられた．そして，2つの組織に共通する事項，“凍結前に細胞膜の水透過性に関する機能を低下”させたことが，凍結・解凍処理後の組織の破断強度を保持できる理由であることが示されたと考えられる．

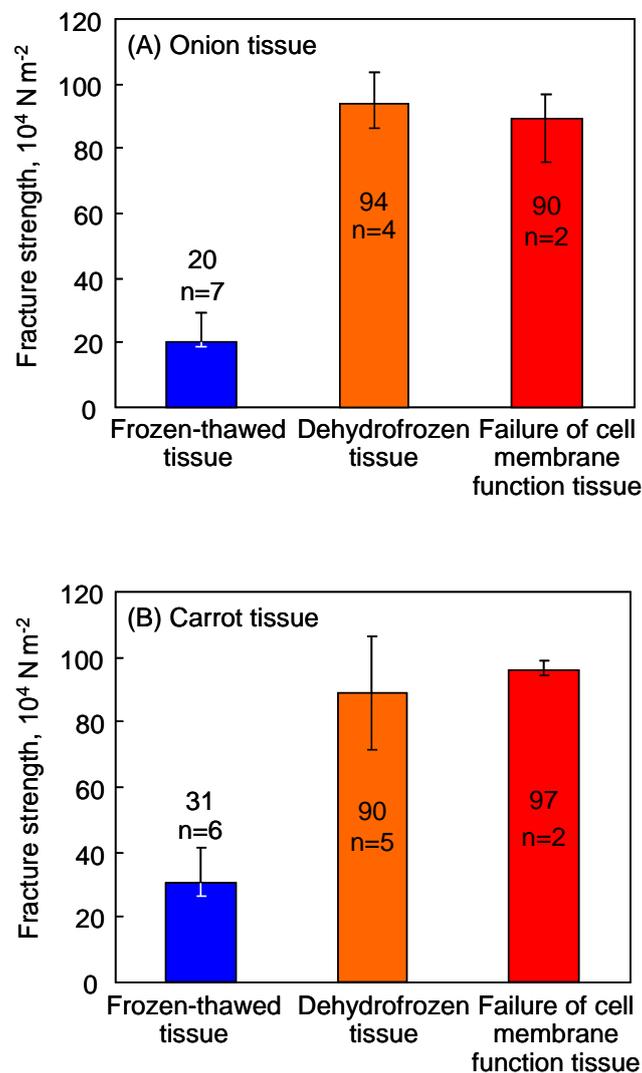


Fig.4-11 Effect of lower water permeability of cell membrane in order to keep the fracture strength in (A) onion tissue and (B) carrot tissue after freezing and thawing. Error bars show the maximum and minimum values.

一般的に凍結速度が速い場合、温度の低下に対して細胞内からの水分流出が間に合わず、細胞質は過冷却が進み、結局、細胞内凍結が生じるといわれている。そして、生体組織においては、細胞内に氷が形成され、細胞は死に至る(フランクス, 1989)。食品素材において生死は問題としないが、宮脇(1998)によって、動物細胞と比較して、植物細胞は細胞膜の水透過係数はオーダー的に見て小さいことが示されている。マグロなどの動物性食品素材においては、急速凍結することで組織の軟化なしに、生の食感を保ったまま凍結保存できることが知られている(鈴木, 2009)。従って、生鮮野菜においても、凍結前に細胞膜の機能を低下させることで、動物性食品素材の様に軟化を抑えられたと考えられた。この仮説を Fig.4-12 にイメージ図として示す。すなわち、(A)生鮮野菜にとって組織内の細胞膜の水透過性が増大することで、凍結に伴う細胞内外の水分移動はスムーズに行われる。そのため、凍結することで細胞内・細胞外といった部分的な氷の形成は起こらず、細胞壁によって保たれている細胞コンパートメント構造にはダメージを与えない。一方、(B)水透過性の低い細胞膜が存在する生鮮野菜は、凍結に伴う水分移動がうまく行われなばかりか、細胞膜の存在によって細胞内・細胞外にそれぞれ氷が形成してしまうため、細胞内に形成した氷によって細胞の体積膨張が起こり、細胞壁からなるコンパートメントの構造に対してもダメージを与えられとされる。

以上のことより、浸透圧脱水凍結法によって得られる凍結・解凍処理後の組織軟化の程度を抑制する効果は、細胞壁に関するテクスチャーの保持によく発揮されることが示された。そして、こういった効果が得られる理由は、凍結前に細胞膜の水透過性に関する機能を低下させたことによつて得られることが示された。浸透圧脱水凍結法において、その効果を得られた原因が細胞膜の機能を低下させたことであったことは、凍結法の限界を示していると考えられた。従って、凍結保存法の観点に限らず、生鮮野菜に適切な保存技術をみいだすには、細胞膜の変化に着目して検討する必要があると考えられる。

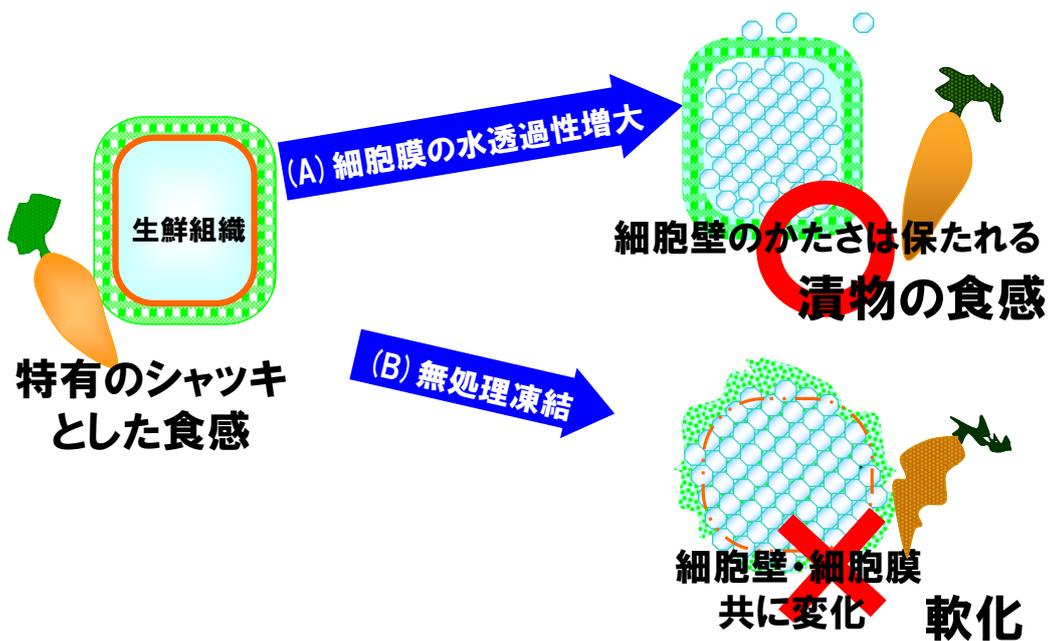


Fig.4-12 Schematic image of softening mechanism in fresh vegetable tissue after freezing and thawing .

#### 4. 6. 結論

浸透圧脱水凍結法は、凍結・解凍処理後の組織軟化の程度を抑制することが確認された。しかし、その効果は、細胞壁に関係したテクスチャーの保持に限られることが示された。従って、細胞壁の多い野菜に特に有効な凍結法であることが予測された。また、この効果を得られる理由は、凍結前に行う浸透圧脱水処理によって組織内の細胞膜の水透過性に関する機能を低下させたことによることが確認された。従って、細胞膜に関するテクスチャーの保持はできず、細胞壁に関するテクスチャーの保持をおこなうことが、浸透圧脱水凍結法の限界であることが確認された。

## 第5章 組織におけるガスハイドレートの形成

### 5. 1. 緒言

先の章において、凍結保存に関して検討を行ってきた。そして、凍結・解凍処理後の組織軟化の観点から、生鮮野菜の保存法として凍結保存法の利用には限界があることが確認された。そのため、組織軟化の程度をさらに抑制できる、凍結保存法に代わる新しい生鮮野菜の長期保存技術を提案する必要があると考えられた。そこで、本論文では新しいコンセプトとして、 $0^{\circ}\text{C}$ 以上の温度においても組織内の水を固化できる「ガスハイドレート」の利用を提案・検討することとした。本章では、長期保存法としての効果の検討に先立って、基礎的な事項である野菜組織内におけるガスハイドレートの形成および成長の挙動を確認することを目的とした。まず、野菜組織における Xe ハイドレートの形成を、水におけるガスハイドレートの構造特性の測定に使用される粉末 X 線回折測定 (PXRD) より行った。これと同様に、組織を破壊せずに測定に使用できる NMR 装置を用いて、組織内の水の固液状態変化を測定し、ガスハイドレートの形成割合の把握を試みた。その後、組織内部におけるガスハイドレートの形成・成長の様子、また形成による細胞構造の変化を検討するため、NMR マイクロイメージング測定 (MRI) を行うこととした。

ガスハイドレートは、水分子によって形成された籠状構造の中心にゲスト分子として疎水性のガス分子が包摂された氷様結晶である(第2章 Fig.2-6)。ゲスト分子として、Xeを用いることで、 $0^{\circ}\text{C}$ 以上の温度においても比較的低い圧力条件で形成できると考えられる。Fig.5-1 に水における Xe ハイドレートの解離圧と温度の関係を示す。ただし、ガスハイドレートの形成に必要な分圧は、解離圧より高い(Salon and Koh, 2007)。大気圧条件(0.1MPa)において  $0^{\circ}\text{C}$  で形成される氷結晶と比較すると、ガスハイドレートは形成しにくい結晶と考えられる。

Xe ハイドレートの解離圧は、温度の上昇と共に高くなる。これは Xe の水への溶解度と関係

している。従って、Table.5-1 に示すように水より血液や生体タンパク質(アルブミン)など生体成分に対して溶解度の高いXeは、それらの異物質を介して組織内部にまで溶解・浸透可能と考えられる。そのため、水と比較して野菜組織に対するXeの溶解度は高く、より緩慢な条件下においても組織の内部にXeハイドレートを形成させることが可能と考えられる。

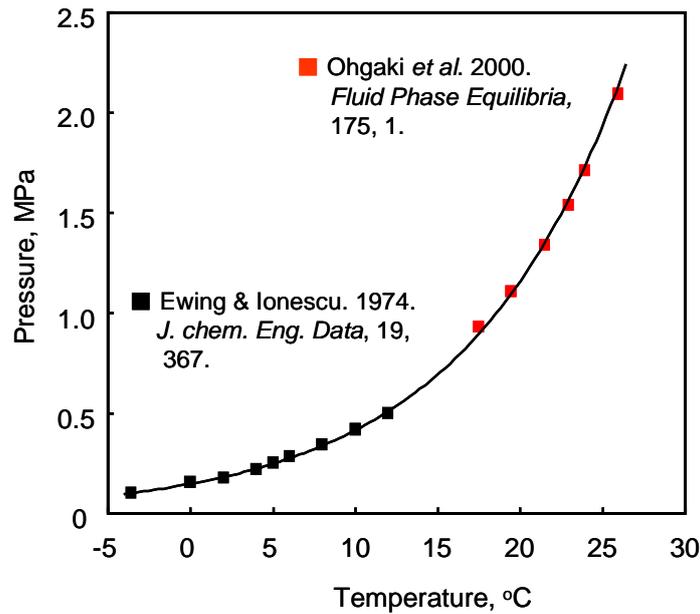


Fig.5-1 Relationship with pressure and temperature of Xe hydrate decomposition in water.

Table.5-1 Solubility of xenon gas in various compounds. The Ostwald solubility is defined as the ratio of the volume of the gas absorbed to the volume of the absorbing liquid, all measured at 37 °C and a pressured at 1 atm (101, 325Pa). (Cherubini and Bifone, 2003.)

	Ostwald solubility
Water	0.08
Saline	0.09
Plasma	0.1
Erythrocytes (98%)	0.2
Human albumin (100% extrapolated)	0.15
Blood	0.14
oil	1.9
Fat tissue	1.3
DMSO (dimethyl sulfoxide)	0.66
Intralipid ( 20%)	0.4
PFOB (perflubron)	1.2
PFOB ( 90% w/v, estimated)	0.62

## 5. 2. X 線回折法を用いた Xe ハイドレート形成の確認と NMR を用いた

### Xe ハイドレート形成割合の評価

#### 5. 2. 1. 試料の調製

北海道産のタマネギ (*Allium cepa* L.) を購入後、直ちに 4mm×4mm×10mm に切り出し、NMR 用耐圧試料管 (耐圧1MPa) に入れ、生鮮試料とした。 Fig.5-2 に示す圧力付加ユニットを通して、雰囲気温度 5°C にて、試料管内に 0.8MPa Xe (99.995 %, 岩谷産業株式会社) を封入・密閉した。

組織において Xe ハイドレートの形成に必要な Xe 分圧は示されていないが、水の場合、5°C では Xe ハイドレートの解離圧は、約 0.3MPa (Ewing and Ionescu, 1974) と報告されている。そこで、本章では 0.3MPa 以上の Xe 分圧かつ NMR 耐圧試料管を用いて安全に操作できると考えられる 0.8MPa の Xe 分圧を用いて実験を行うこととした。Xe を封入後、密閉された組織は、雰囲気温度 5°C において 3 時間、および 2 日、8 日、30 日間保存され、様々な Xe ハイドレートの形成割合となるように調製された。ただし、本研究では、保存時間に伴う Xe ハイドレートの形成割合に差が生じない様に、Xe 封入から 3 時間後に衝撃を与えて Xe ハイドレート微細結晶の形成を促す操作をした。水における Xe の拡散係数は、25°C で  $0.8 \sim 2.2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  と報告されている (Cherubini, 2002)。そのため、切り出した生鮮組織において、Xe 雰囲気中に 3 時間静置すれば十分に、組織中に Xe は拡散していると考えられる。また保存中、常に 0.8MPa の圧力となるよう、適宜、試料管内に Xe を封入した。

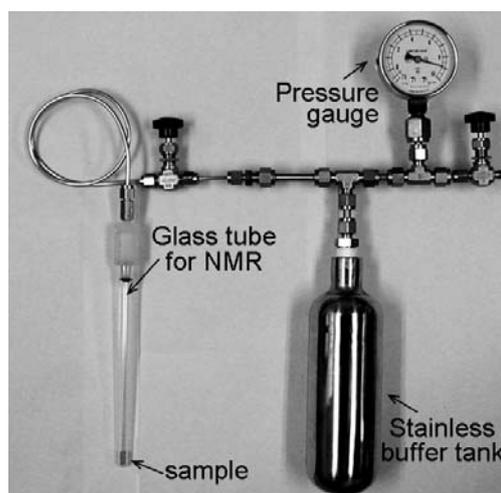


Fig.5-2 Pressure introduction unit for NMR sample tube.

## 5. 2. 2. 実験方法

### 粉末 X 線回折測定

粉末 X 線回折測定を行うため、調製された組織試料は、雰囲気温度 0°C で圧力を開放、NMR 用試料管から取り出すと同時に液体窒素 (-198°C) を用いて瞬間的に凍結処理された。これらの凍結組織は、それぞれ -180°C 以下で粉末化された。ただし、凍結粉砕された組織試料は、NMR 測定に使用した組織と同一であり、NMR 測定後に凍結・粉砕を行った。銅製の試料ホルダーに粉体試料を入れ、粉末 X 線回折測定 (PXRD) を行った。X 線回折装置には、RINT-Ultima III (株式会社リガク) を用い、試料ホルダーの温度が 93K を保つように液体窒素を用いて温度をコントロールした。管球に Cu を使用して、管電流 40mA、管電圧 40kV、ステップスキャン方式で 0.02° (2θ)、測定精度範囲 6° ~ 100° (2θ) でスキャンを行い、ピーク強度を測定した。

結晶構造の確認とガスハイドレートと氷の体積分率は、RINTAN-2000 プログラムを用いたリートベルト法より行った (Izumi *et al.*, 2000)。リートベルト法は、結晶構造パラメータの精密化を目的に一般的に使用される解析法である (日本化学会, 2006)。近似構造モデルに基づいて計算した回折パターンを、実際に測定した回折パターンに当てはめることで、重畳した回折パターンを、パターン解離によって分離しなくとも結晶構造のパラメータの精密化値を求めることができる。本研究では、I 型の結晶 Xe ハイドレートの有無を評価することを目的としているため、既知の Xe ハイドレートの回折パターンを用いて解析を行った。

また p 番目の相の質量分率  $W_p$  は式 (5-1) より求めた (日本化学会, 2006)。

$$W_p = \frac{s_p \times Z_p \times M_p \times V_p}{\sum_j s_j \times Z_j \times M_j \times V_j} \quad (5-1)$$

ここで、 $s$  は尺度因子、 $Z$  は単位胞中に含まれる化学式の数、 $M$  は化学式単位の質量、 $V$  は単

位胞の体積,  $j$ は相の番号を示す. 本研究では, 試料中に I 型のガスハイドレートと氷 ( $I_h$  と  $I_c$ ) が存在するとして計算を行った. ただし, 標準試料 LaB6(660a, NIST)のラインポジションとラインプロファイルを使用した.

#### パルス NMR 法を用いた水の固液状態変化の観察

25MHz のパルス NMR 装置 (JNM-MU25A, 日本電子株式会社)を用いて, タマネギ組織中の水のプロトンの横緩和時間 (スピンスピン緩和時間)  $T_2$  の測定を行った.  $T_2$  の測定には, ソリッドエコー法を用いた. ソリッドエコー法のパルスシーケンスを Fig.5-3 に示す. 繰り返し時間 (TR) は 30s, 積算回数は 16 回とした. 測定された信号強度 (R) より, 式 (5-2) を用いて試料中の固体相のプロトンの  $T_2$  を算出した (Zhang *et al.*, 2004).

$$R(t) = \sum_i F_i \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t}{T_2} \right)^{WI} \right] \quad (5-2)$$

ここで  $F_i$  は各成分体積分率, WI はワイブル係数を示す. ただし, これらの計算は MU25A system program (MU25A, 日本電子株式会社) を使用して行った.

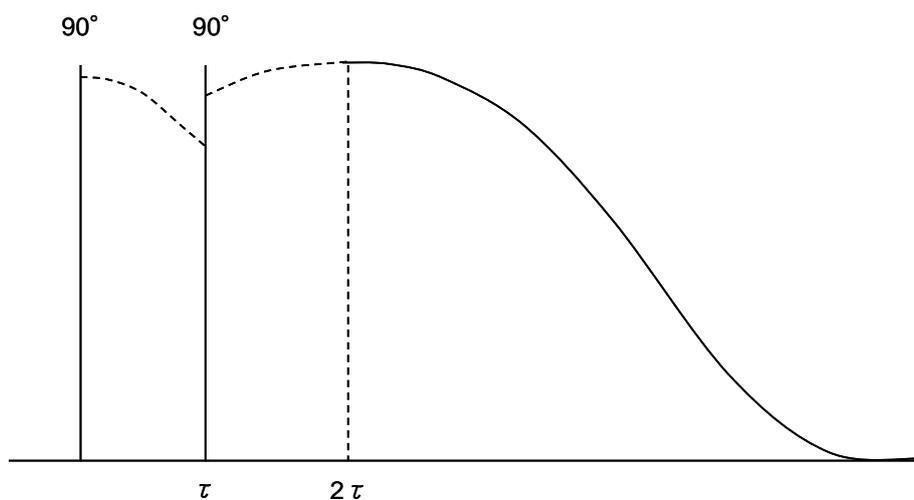


Fig.5-3 Solid echo pulse sequence

### 5. 2. 3. 結果と考察

#### 粉末 X 線回折測定による Xe ガスハイドレート形成の確認

Xe 封入・保存に伴うタマネギ組織の外観の変化を Fig.5-4 に示す. Xe 封入直後の組織 (Fig.5-4a)と比較して, Xe 封入後 3 時間の組織では組織の表面に固体様の物質が形成していることが観察された. この固体状の物質は, 一旦形成すると, 保存期間中に常に観察された.

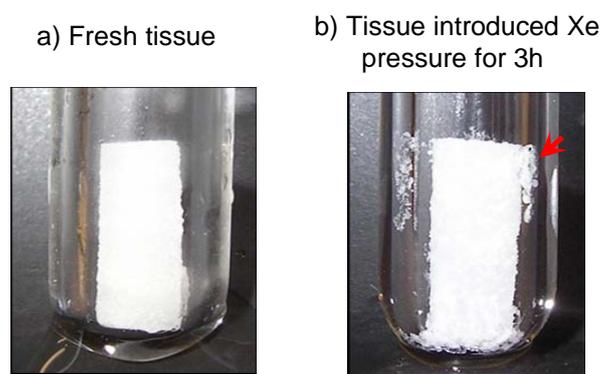


Fig.5-4 Visible change of onion tissue before and after introduction of 0.8 MPa Xe pressure for 3 h at 5 °C taken by digital camera.

Fig.5-5 に X 線回折パターンの測定結果を示す. Xe 封入前の生鮮試料 (Fig.5-5 (a)) では, 氷 ( $I_h$ ) の X 線回折パターンのみが観測された. また, Xe 封入直後の組織 (Fig.5-5 (b)) においても, 同様に氷 ( $I_h$ ) の X 線回折パターンのみが観察された. しかし, Xe 封入から 3 時間後の組織 (Fig.5-5(c)), すなわち組織表面に固体状の物質が形成した組織には, I 型のガスハイドレート (sI) に観察される (321) 面での回折が観察された (Fig.5-5 (c) 矢印). この回折パターンは, 保存 2 日, 8 日および 40 日後の組織でも観察された. Xe ハイドレートは, I 型の構造から成る結晶である (Salon and Koh, 2007). 従って, タマネギ組織において Xe ハイドレートが形成することが示された. また, 組織表面に固体状の物質が観察されたすべての組織 (Xe 封入から 3 時間後の組織と保存 2 日, 8 日, 30 日後の組織) では I 型の回折パターンが観察され, 固体状の物質が観察されない組織ではその回折パターンが観察されなかった. このことより, 目視に

において観察された固体状の物質がXeハイドレートであると考えられた。本研究において、ガスハイドレートが形成した試料において、解析には氷I<sub>c</sub>の情報を利用し、それに関するピークが観察される場合もあった。しかし、その形成は不確かであり、さらに検討が必要であるため本論では議論しない。

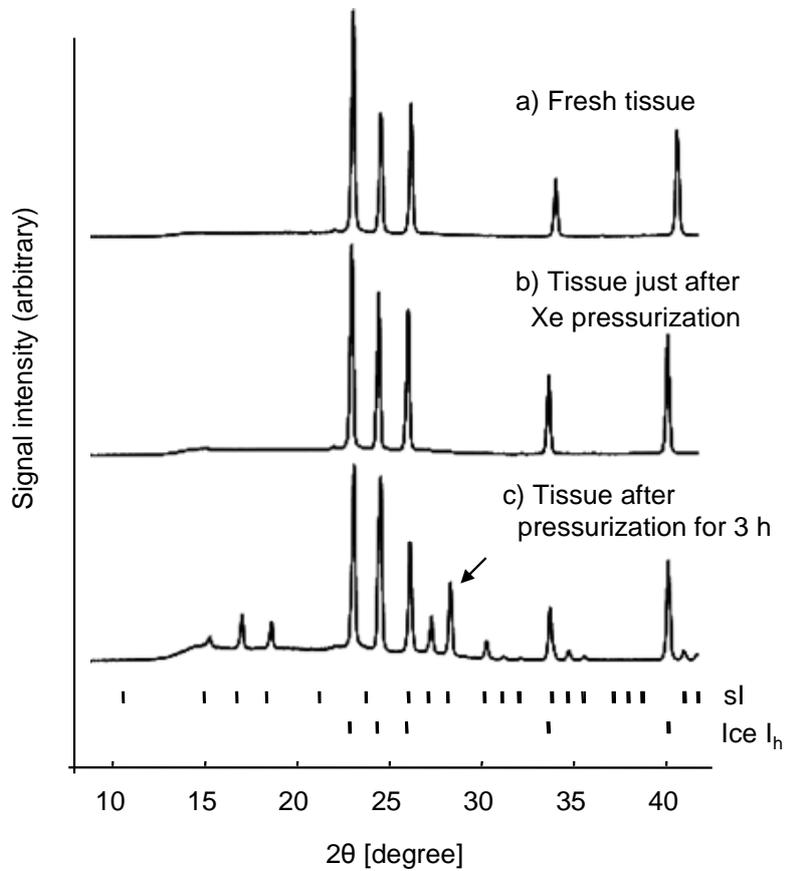


Fig.5-5 Change of X-ray diffraction pattern in onion tissue with time at 0.8 MPa, 5 °C measured by PXRD.

Xe ハイドレートの回折パターンが観察された組織について、その体積分率を計算した。Xe 封入後から3時間の組織では10%のXe ハイドレートが組織中に形成していた。その形成割合は、保存時間の増加に伴い増加した。すなわち、保存2日後の組織は33%、8日後の組織は44%、そして保存30日後の組織では42%のXe ハイドレートが組織に形成していることが示された。これらの測定で使用した組織は、それぞれ別の組織ではあるが、約40%の形成割合までXe ハイドレートが形成・成長すると考えられた。

以上のことより、雰囲気温度 5°C、Xe 分圧 0.8MPa の保存条件において、タマネギ組織にXe ハイドレートは確実に形成すること、1週間程度の時間を要しながら徐々にその量を増加させ約40%の形成割合と成ったときその成長が収束することが示された。

#### NMR を用いたガスハイドレート形成割合の評価

パルス NMR 装置を用いて測定された NMR 信号強度  $R$  と時間の関係を Fig.5-6 に示す。使用した NMR 装置の測定精度を考慮して、得られた NMR 信号強度において割合 10%未満の成分は、誤差と判断した。生鮮組織 (Fig.5-6(a)) および Xe 封入直後の組織 (Fig.5-6(b)) では、1つの傾きからなる直線が観察された。しかし、X線回折測定において、Xe ハイドレートの形成が確認された Xe 封入後から3時間後の組織 (Fig.5-6(c)) では、2つの傾きからなる直線が観察された。そして、この2つの傾きは、保存2日、8日、30日後の組織においても確認された。従って、これらの組織には、異なる2つの運動性を持ったプロトンが存在することが示された。急な傾きで示される運動性を持ったプロトンの  $T_2$  を計算した結果、 $7\mu s$  であった。測定に用いた NMR 装置は、 $90^\circ$  パルス照射後、NMR 信号が検出されるまで  $10\mu s$  の時間を要する(デットタイム)。そのため、得られた  $T_2$   $7\mu s$  が、正確な値とは言えない。しかし、 $10\mu s$  以下の  $T_2$  を持つ成分があることは確認されたと考えられる。この非常に短い  $T_2$  は、石中に含まれる水 (Collett *et al.*, 2006) や氷 (Overloop and Gerven, 1993) など固体試料において、観察される。また、既往の研究において報告されている I 型のメタンガスハイドレートのプロトンの  $T_2$  は、 $10\mu s$  以下であることが示されている (Ripmeester and Ratcliff, 1989; Kleinberg *et al.*, 2003)。従って、

パルスNMR測定において観察された試料中の短い $T_2$ を持つプロトンは、固体に由来していること、さらにXe ハイドレートを成すプロトンに由来している可能性が確認された。

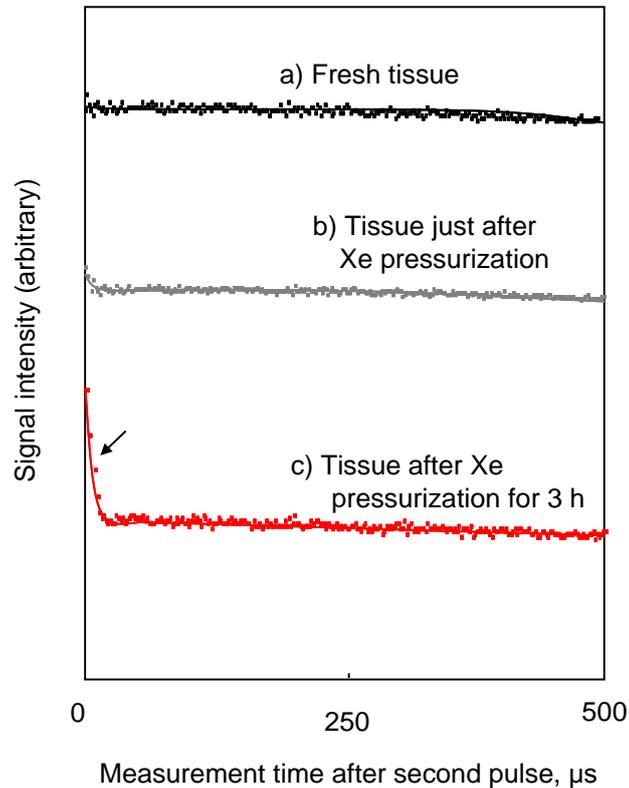


Fig.5-6 Change of NMR signal pattern in onion tissue with time after introduction of 0.8MPa Xe pressure at 5 °C measured by NMR.

測定された短い  $T_2$  から成る固体が、Xe ハイドレートを成すプロトンであるかを確認するため、NMR 信号強度より、試料中の固体相と液体相に存在するプロトンの割合の評価を試みた。パルスNMR測定では、高分解能NMRで得られるような化学種ごとの情報は失われるが、高次構造(不均質性)に対応した緩和現象を観察することができる。すなわち、 $T_2$  など各種の緩和時間の測定により、系の分子運動性と緩和時間に対応した信号の成分量を直接評価できる。

一定時間  $90^\circ$  パルスを照射した後、試料中のすべてのプロトンの磁化の和  $M$  は、指数関数的に自由誘導減衰(FID)を起こす。この磁化  $M$  の FID は、信号強度 ( $R$ ) として観測される。

従って、90° パルス照射直後の信号強度 S は、試料中のプロトンの総量を示すと言える。今、試料内に 2 つ異なる T<sub>2</sub> を持つプロトンが存在する場合、Fig.5-6(c)の様に ln(R) vs. 時間プロットは 2 つの異なる傾きを持つ直線を成す。従って、S と傾きの分岐点の信号強度 L より、式 (5-3) で示すように、試料中の 2 つの T<sub>2</sub> を持ったプロトンの割合が計算できる(Gribnau, 1992)。

$$\text{SolidContent, \%} = \frac{S-L}{S} \times 100 \quad (5-3)$$

既に、この方法は、チョコレートやマーガリンにおける油と脂の存在割合の把握に使用されている(Gribnau, 1992)。しかし、NMR 装置の特性上、90° パルス照射後から NMR 信号を検出が始まるまでには、一定の時間(デットタイム)がかかるため、T<sub>2</sub> の非常に短いプロトンが存在する時、試料中の真の 90° パルス照射直後の信号強度 S' を観察することはできない(Gribnau, 1992)。先に示したように観測されたタマネギ組織中の固体の T<sub>2</sub> は 7 μs であった。従って、デットタイム 10 μs の間に、固体に由来した NMR 信号の減衰が始まっていると考えられ、固体を含んだ試料では、試料中に含まれる真の信号強度は測定できないと予測される。そこで、本研究では、生鮮組織の NMR 信号強度を、真の信号強度 S' として固体の形成割合を計算した。

先に示した PXRD より得た Xe ハイドレートの形成割合と比較しながら、NMR 測定で得られた固体の割合を Fig.5-8 に示す。NMR 測定において、Xe 封入後から 3 時間後の組織では、固体の割合は 12 % であった。これは PXRD の結果より得られた Xe ハイドレートの体積分率 10 % と近い値である。また、NMR 測定において、保存 2 日後の組織には 29%、8 日後の組織には 47 %、そして 40 日後の組織には 41 % の形成割合で固体が存在していることが示された。これらの NMR 測定で得られた組織中の固体の割合は、PXRD で得られた Xe ハイドレートの体積分率とよく一致した(Fig.5-7)。従って、NMR で測定された固体は、Xe ハイドレートを示すことが確認されたと考えられる。以上のことより、パルス NMR 法を用いた組織内の水の固液状態

変化を測定することで、組織に形成する Xe ハイドレートを定量的に測定できることが示された。

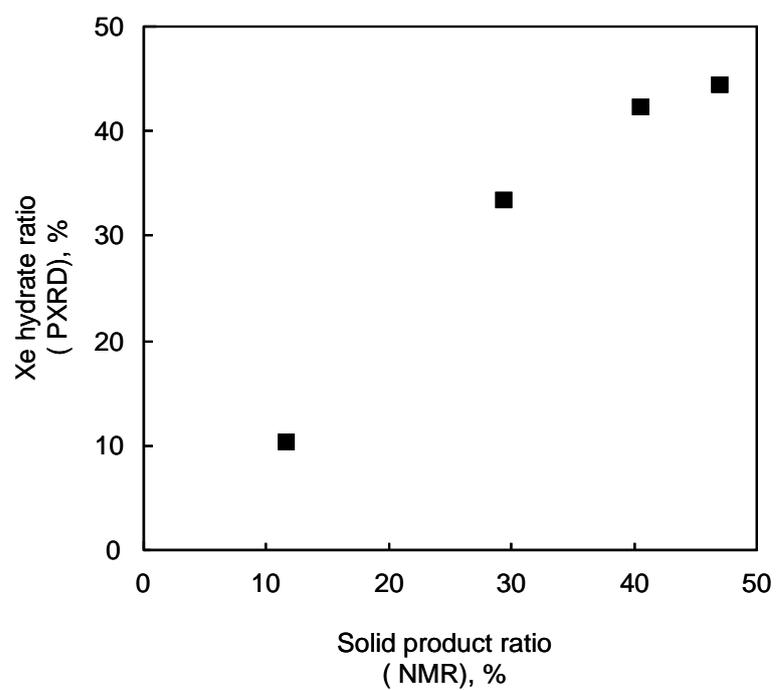


Fig.5-7 Xe hydrate ratio in onion tissue evaluated by using results of PXR or NMR.

## 5. 3. NMR—Imaging 法を用いた組織内部における Xe ハイドレート形成・

### 成長の観察

#### 5. 3. 1. 試料の調製

北海道産のタマネギ (*Allium cepa* L.) を購入後、直ちに 4mm×4mm×10mm に切り出し、NMR用耐圧試料管 (耐圧1MPa) に入れ、生鮮組織試料とした。圧力付加ユニットを通して、雰囲気温度 5°Cにて、試料管内に 0.8MPa Xe (99.995%, 岩谷産業株式会社) を封入・密閉した。保存時間に伴う Xe ハイドレートの形成割合に差が生じない様に、Xe 封入から 3 時間後に衝撃を与えて Xe ハイドレート微細結晶の形成を促す操作をした。試料は適当な保存時間の後に実験に使用され、最大7日まで保存された。また、物理的な圧力による影響を理解するため、0.8MPa の窒素ガス (N<sub>2</sub>) 雰囲気内にて保存した組織も調製した。

#### 5. 3. 2. 実験方法

##### パルス NMR を用いたガスハイドレート形成割合の測定

5.2 に示した NMR を用いたガスハイドレート形成割合の評価と同様の方法を用いて測定した。

##### マイクロイメージング NMR 測定 (MRI) による組織内部構造の観察

イメージング用プローブを付属した 400MHz の NMR スペクトルメーター (AV400WB, Bruker) を用い、マルチスライススピネコー (MSE) 法による組織内部の T<sub>2</sub> 強調画像の測定を行った。MSE 法のパルスシーケンスは Fig.5-8 に示す。測定核は、プロトンとした。測定中、ガスハイドレートの解離を防ぐため、液体窒素を用いて測定部の温度を 5°C に保った。Fig.5-9 に示す様に、試料の内部画像は、画像断面層の厚み 0.5 mm で、12 枚のスライス画像として測定された。また、画像は、待ち時間 (TR) 1500ms、繰り返し時間 (TE) 8ms、積算回数 8 回、画像マトリックス 128×128 の条件で測定した。

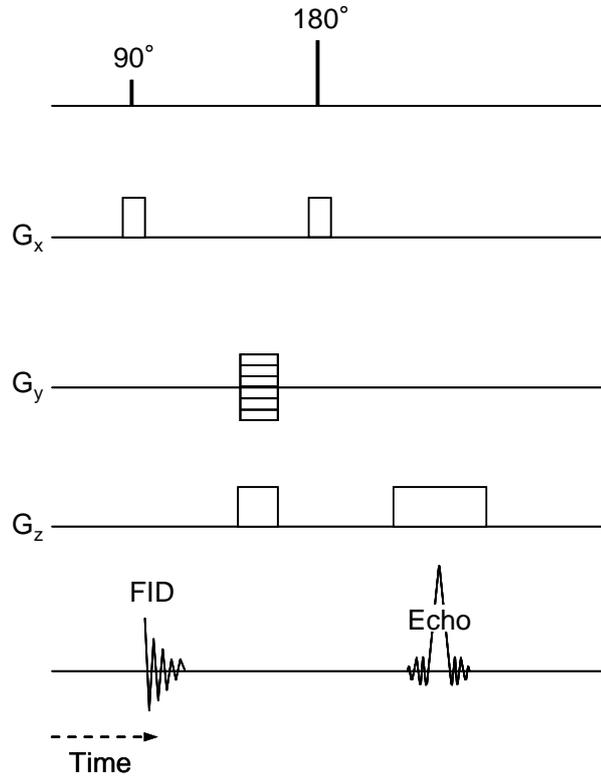


Fig. 5-8 Spin echo pulse sequence for measuring the  $T_2$  weight image by using MRI. G means pulse filed gradient and x, y, z were the directions of the gradient pulse.

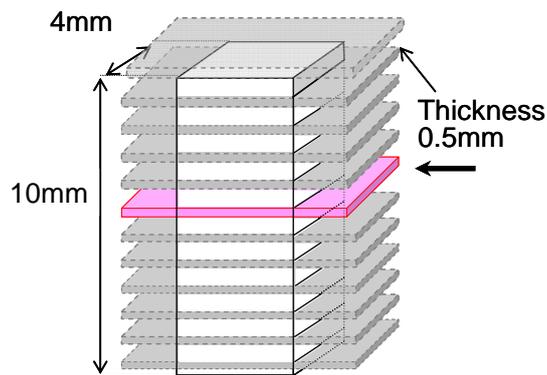


Fig.5-9 Image of slices locations in onion tissue for MRI.

### 5. 3. 3. 結果と考察

Fig.5-10 に保存時間の増加に伴うタマネギ組織内の Xe ハイドレート形成割合(A)と MRI 測定で得られた T<sub>2</sub>強調画像(B)の観察の結果を示す. ただし, MRI 測定で得た 11 枚の画像の変化の傾向同じであったため, ここでは Fig.5-9 に矢印で示す中心部の切像断面を示す. また, 保存時間の増加に伴うタマネギ組織内の Xe ハイドレート形成割合(A)に示す. ただし, 図中のバーは誤差範囲であり, 得られた値の最大値と最小値を示す. その結果, 初期に封入する Xe 分圧が 0.8MPa の時, Xe ハイドレート形成直後, すなわち Xe 封入後から 3 時間の組織には 19%の Xe ハイドレートが形成することが示された. この組織をそのまま保存すると, 保存1日後の組織には 30%まで形成割合が増加し, 保存 5 日後の組織に 46%の割合で組織内の水が Xe ハイドレートへ変化していることがわかった. その後, その形成割合の増加は徐々に収束し, 保存 7 日後にはその形成割合は 48%と成ることが示された.

Fig.5-10(B)に示す MRI 画像は, 液状の水が多い部分は白色, 少ない又は無い部分は黒色で示される. そのため, 固体状の水であるガスハイドレートが形成すると黒色で示されると考えられる. (a)に示す Xe 圧力付加前の生鮮タマネギ組織には, 組織内部の細胞構造に由来した構造が認められた. すなわち, 細胞コンパートメントに沿って水の少ない黒い箇所が観測された. MRI 画像において, 生鮮植物組織内の細胞コンパートメントが観察されることは既に示されている(Köckenberger, 2001). 本研究では, Xe 付加から形成までの短時間の変化を観察するため, 積算回数を 8 回とした. そのため, 鮮明な細胞コンパートメントを撮像することはできなかった. しかし, その存在は確認されたと考えられる. 細胞構造の存在によって生鮮組織の内部には白黒のムラが観察されるものの, おおよそ均一に水のプロトンが存在していることが確認された. 一方, 0.8MPa の Xe 付加から 2 時間後(Xe ハイドレート形成前)の組織では, 組織内部の細胞構造が観測されにくくなった(Fig.5-10 (B)の(b)). 既往の研究において, Xe は水よりも, 脂質に溶解しやすいことが報告されている(Cherubinia and Bifone, 2003). そのため, この変化は, Xe の細胞膜(リン脂質)への溶解と関係した変化と考えられる. この様な Xe 付加

に伴う画像の変化は、窒素を用いて 0.8MPa の圧力を付加した組織、すなわち物理的な圧力を付加したのみの組織では観察されなかった。従って、観察された変化は、Xe の溶解に由来した変化であると考えられた (Fig.5-11)。外観の観察より、Xe ハイドレートの形成が確認された直後、すなわち保存から 3 時間後の組織 (Fig.5-10(B)の(c))では、再び、細胞構造に似た構造が観測された。そして、Fig.5-10(B)の(d)に示す様に、Xe ハイドレート形成より1日後には、組織表面付近における Xe ハイドレートの形成と共に、組織内部においても特定の部位で Xe ハイドレートが形成・成長することが示された。この Xe ハイドレートの結晶は保存 7 日後に組織 (Fig.5-10(B)の(e))の特定の箇所で大きく成長してしまうことが確認された。

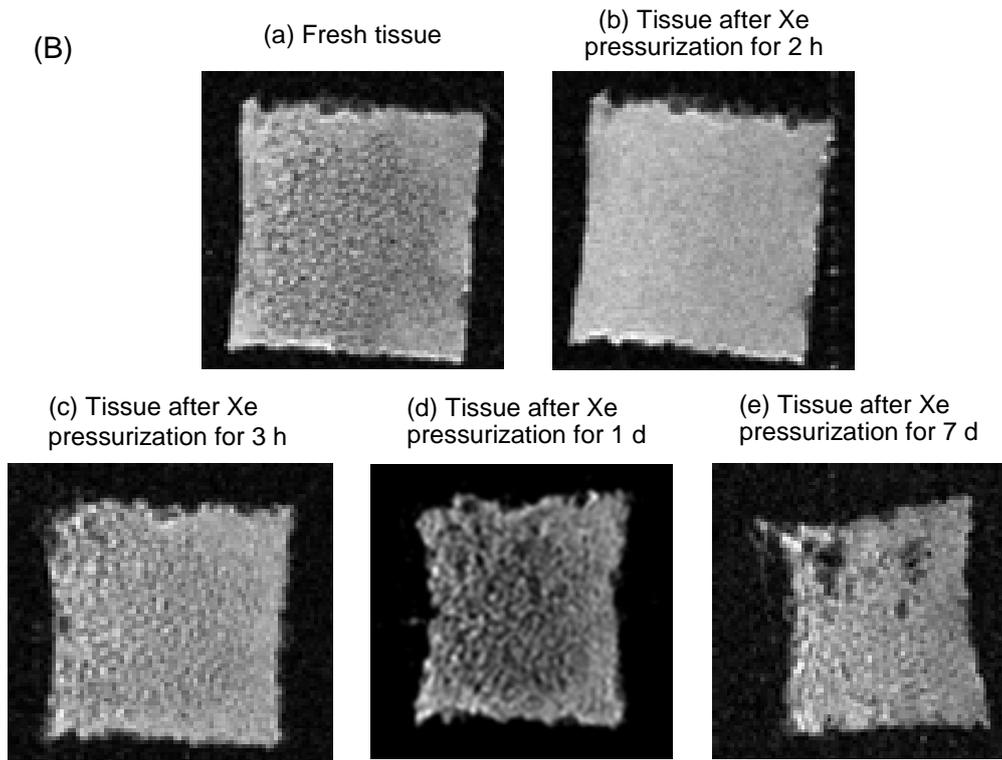
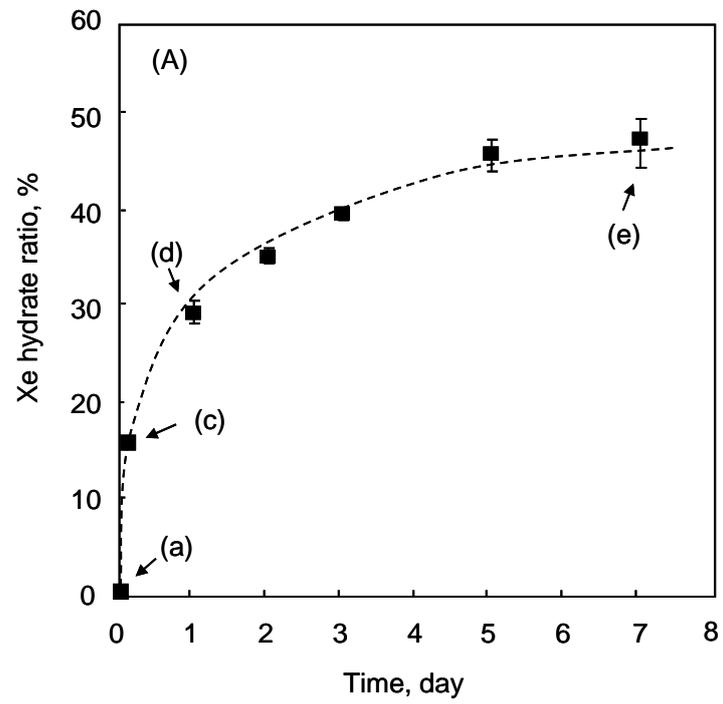


Fig.5-10 Xe hydrate formation and growth process in onion tissue with time after introduction of 0.8MPa Xe pressure at 5 °C measured by NMR and MRI. Error bars in (A) show the maximum and minimum values (n=3).

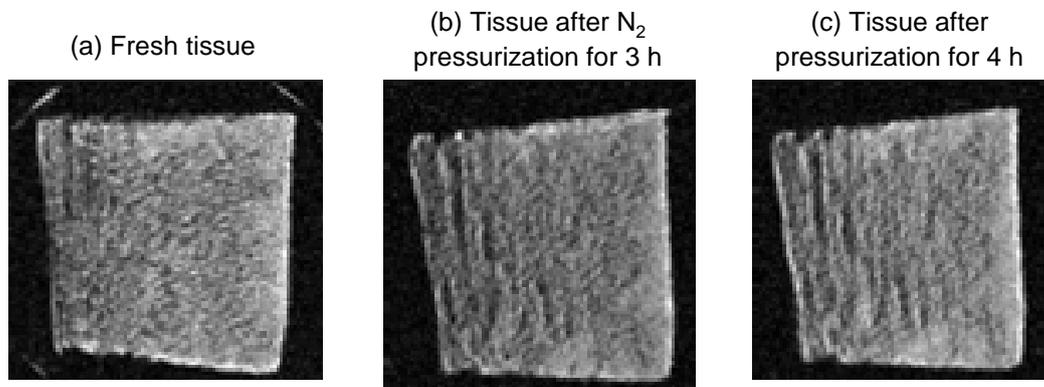


Fig.5-11 Effect of 0.8MPa N<sub>2</sub> pressure for internal structure in onion tissue at 5°C measured by MRI.

## 5. 4. 考察

Moudrakovski ら(2004)は, MRI 測定を用いてイソペンタン中の微小な水滴におけるメタンガスハイドレート形成過程について報告した. 彼らは, 水とガスが直接接触することのない系においても, ガスハイドレートは水滴表面より形成し始め, 表面より内側に徐々に形成していくことを示した. しかし, 液滴サイズが非常に小さい系では, 液滴内部より突然, ガスハイドレートが形成する場合もあるとしている. この様な W/O 型エマルションは, 細胞からなる組織モデルとして凍結保存に関する研究でも使用される形態である(フランクス, 1989). 一方, 酸化エチレン(EO)水溶液を用いたニンジン組織および牛筋肉組織における EO ハイドレートの形成・成長の観察の結果, ガスハイドレートは細胞の周囲に形成・成長することが示唆されている(Hulle and Fennema, 1971A, B). ニンジン組織において, その形成・成長の様子は明瞭に観察されないものの, ガスハイドレートの形成は緩慢凍結時に見られる細胞外凍結と同様に, 細胞外より結晶が形成されていることを示唆している. そして, ガスハイドレートが形成・成長することで細胞構造をゆがめることを示している.

本研究では, 振動による促進操作を行って, 組織に Xe ハイドレートを形成させている. また, タマネギ組織内の細胞のサイズが約  $150\ \mu\text{m}$  と大きい. 既往の研究の結果やこれらのことを考慮すると, 本研究で使用したタマネギ組織では, 細胞の内部にまで十分に Xe が溶解し, 自発的に細胞内部からガスハイドレートが形成される条件に至っていない可能性があると言える. そのため, 凍結において結晶形成が起こりやすいといわれる, 細胞外部などの細胞膜近傍より, Xeハイドレートの形成が起こったと考えられた. 従って, MRI測定において, Xeハイドレート形成直後の組織に, 生鮮組織で観察されたような細胞構造が再び観察された理由は, 組織内の細胞膜近傍に微細なハイドレートが形成したためと考えられる. 既往の研究は, 本研究で使用した試料やガスの条件と異なるため, その形成過程や細胞構造への影響を一概に同じとは考えることはできない. また, 本研究では, プロトンの測定のみを行っているため, Xe が細胞

のどの部分に局在化しているかといった情報に言及することはできない。しかし、本研究の結果を総合的に考えて、ガスハイドレートは、組織の表面のみならず、組織内部にも形成することは確認されたと考えられる。また、Xe ハイドレートの形成割合が、30%を上回ると組織内部で細胞のサイズ程度の結晶が形成し、さらに保存することでその形成割合は増し、細胞のサイズより明らかに大きな結晶が形成してしまうことが確認された。従って、組織の細胞構造にゆがみを与える可能性が確認されたと考えられる。

以上のことより、Xe 圧力内にタマネギ組織を静置すると、組織の内部にも Xe が浸透・溶解すること、また、Xe ハイドレートは組織の表面のみならず組織の内部にも形成できることが示された。また、タマネギ組織における、ガスハイドレートの形成は疎水性ガスである Xe が溶解しやすい細胞膜付近傍より起こることが示唆され、組織内部での形成・成長過程を観察することが出来たと考えられる。しかし、組織内に形成する Xe ハイドレートは、保存に伴いその形成割合とともにサイズをも増し、細胞構造にゆがみなどのダメージを与えている可能が示された。従って、今後、様々な圧力条件を用いて、細胞構造の破壊・変形を伴わない適切な保存条件を見出す必要があると考えられる。

## 5. 5. 結論

ガスハイドレートを用いた生鮮野菜の長期保存法検討に先立ち、基礎事項の検討として、野菜組織内におけるガスハイドレートの形成の確認を行った。その結果、組織内においてガスハイドレートは形成し、保存と共にその量を増していくことが PXRD より確認された。また、パルス NMR 測定よりガスハイドレートの形成割合は、組織を非破壊の状態でも把握できることが示された。これらの測定に併せて、MRI 測定における組織内部の細胞構造の観察を行った結果、ガスハイドレートは組織内部に一様に形成することが確認された。しかし、その形成割合が増すと、組織内に部分的に大きな結晶が成長することが確認され、組織の構造にゆがみなどのダメージを与えている可能性が示された。以上のことより、生鮮野菜の長期保存法へのガスハイドレートの利用は可能であると考えられた。しかし、その利用にあたって、組織内部の細胞構造にダメージを与えない保存条件を検討する必要があることが確認されたと考えられる。

## 第6章 ガスハイドレートを利用した野菜の保存

### 6. 1. 緒言

第 5 章において、生鮮野菜組織におけるガスハイドレート形成の確認を行った。その結果、組織内部においても、ガスハイドレートは形成可能であることが確認されたが、その形成割合の増加に伴い組織内の細胞構造に対してゆがみを与えている可能性が示された。

第 5 章で得られた結果を参考に、本章では、ガスハイドレート利用の効果を確認することを目的とした。まず、組織内でのガスハイドレートの形成割合と解離後の組織のテクスチャーの変化の程度を検討し、長期保存に適した保存条件を示すこととした。その後、食品微生物学的な評価を行うため、一般生菌数の測定を行った。

## 6. 2. Xe 分圧に依存した Xe ハイドレートの形成割合

### 6. 2. 1. 試料の調製

北海道産のタマネギ (*Allium cepa* L.) を購入後、直ちに 4mm×4mm×10mm に切り出し、NMR 用耐圧試料管 (耐圧1.0MPa) に入れ、生鮮組織試料とした。第 5 章に示した圧力付加ユニットを通して、雰囲気温度 5°C にて、試料管内に 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 および 0.7 MPa の Xe 分圧となるように、Xe をそれぞれ封入・密閉した。Xe ガス封入から 3 時間後、組織試料に刺激を与え、Xe ハイドレートの形成を促進させた。組織試料を、雰囲気温度 5°C にて 7 日間保存し、適宜、測定に供した。ただし、ここでは、実際の保存実験を考慮して、Xe の封入は保存開始時のみとし、保存中、試料管内に Xe を足す操作は行わなかった。保存後の各々の試料管中の Xe 分圧は、約 0.2MPa であった。

### 6. 2. 2. 実験方法

#### *Xe* ハイドレートの形成割合の評価

第 5 章で示した NMR を用いた組織内の固液状態変化の観察と同様に評価した。

### 6. 2. 3. 結果と考察

#### *Xe* 分圧と *Xe* ハイドレート形成・成長挙動の差

Fig.6-1 に Xe を封入してから、3 時間の後に測定した NMR 信号強度と時間の関係を示す。0.4~0.7 MPa の Xe 分圧を封入した組織において、第 5 章において確認された固体のプロトンに由来する信号を得た。従って、0.4~0.7 MPa の Xe 分圧で保存すれば、保存 3 時間で組織中に Xe ハイドレートを形成させることができることが確認された((a) 0.7MPa; (b) 0.6MPa; (c) 0.5MPa; (d) 0.4MPa in Fig.5-17)。しかし、0.3MPa と 0.2MPa の Xe 分圧内に保存された組織では、Xe 封入から 3 時間後、Xe ハイドレートの存在を示す信号強度の挙動の変化はみられな

かった( ( f ) 0.3MPa ; ( g ) 0.2 MPa in Fig.6-1) . 従って, 保存 3 時間後, Xe ハイドレートを手  
為的に形成させるためには, 0.4MPa 以上の Xe 分圧が必要であることが示された.

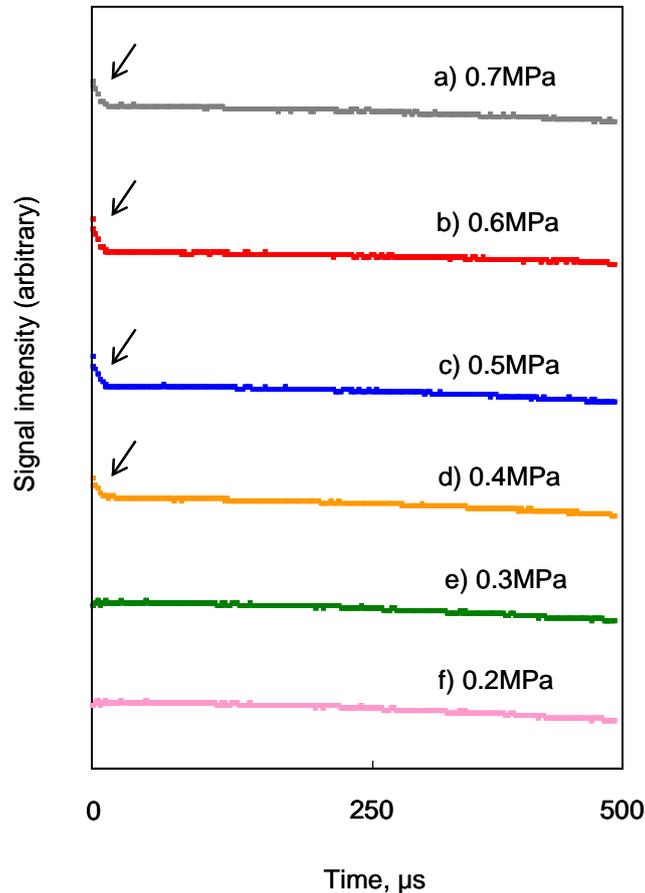


Fig.6-1 NMR signal decay in the onion tissue after 3 h from introduction of several Xe pressures, respectively, at 5 °C.

Xe 分圧 0.4~0.7 MPa において, 保存時間に伴う Xe ハイドレート形成割合の増加を観察した. その結果を Fig.6-2 に示す. ただし, 図中のバーは誤差範囲であり, 得られた値の最大値と最小値を示す. 第 5 章で得られた 0.8MPa の Xe 分圧において得られた結果も参考までに, プロットした. その結果, すべての Xe 分圧内で保存された組織で, Xe ハイドレートの形成割合は, 保存時間に伴い増加することが示された. しかし, 7 日間の保存後, 組織中に形成する Xe ハイドレートの割合は, 圧力に依存して変化することが示された. 0.7MPa の場合, Xe ハイドレ

ト形成直後の組織には13%のXeハイドレートが形成した。保存1日目には32%まで形成割合が増加し、その後、その形成割合の増加は徐々に収束し、保存7日後にはその形成割合は42%であった。0.6MPaの場合、Xeハイドレート形成直後の組織に、11%のXeハイドレートが形成した。保存1日目には、34%まで形成割合が増加し、その後、その形成割合の増加は徐々に収束し、保存7日後にはその形成割合は42%と成ることが示された。第5章で示した0.8MPaで7日間保存したタマネギ組織におけるXeハイドレートの形成割合は、48%と、0.6MPaと0.7MPaのXe分圧において得られた値より若干高かった。しかし、誤差を考慮すると、0.6MPa以上のXe分圧では、保存7日間で組織内に40~50%の割合のXeハイドレートが形成したといえる。ここで得られた形成割合は、第5章の分圧を一定に保った場合と比較して、誤差が大きかった(最大10%)。この原因は、第5章の様に試料管内のXe分圧を常に一定にできなかったためと考えられる。しかし、実際に生鮮野菜を保存・流通する場合、適宜、ガスを足す操作はできない。そのため、誤差の範囲は、最大10%であることを認識し、保存の検討を行う必要があると考えられる。また、第5章で測定した保存30日の結果を考慮すると、0.8MPaの時に得られ結果同様、本章の実験条件においても保存7日以降、Xeハイドレートの形成割合は、ほとんど変化しないと考えられる。

一方、0.5MPaと0.4MPaの時、保存時間に伴うXeハイドレートの形成割合は、0.8、0.7と0.6MPaの時のそれとは異なっていた。0.5MPaの時、Xeハイドレート形成直後の組織には、10%のXeハイドレートが形成していた。しかし、保存1日目に19%までしか形成割合が増加せず、保存7日後も、その形成割合は30%であった。0.4MPaの時にも、Xeハイドレート形成直後の組織には、9%のXeハイドレートが形成したが、保存1日目に14%までしか増加せず、その後、形成割合は一定値に収束した(保存7日後は19%)。従って、0.5MPa以下のXe分圧の場合、組織内の水はXe分圧に依存して、その形成割合が異なることが示された。

以上の結果より、初期のXe分圧0.8~0.4MPaではXeハイドレートの形成が可能であることが示された。また、Xe分圧とXeハイドレートの形成割合には、大まかではあるが関係があるこ

とが示された. すなわち, Fig.6-3 に示す様に, Xe 分圧が 0.4MPa の時は約 20%, 0.5MPa の時は約 30%, 0.6MPa 以上 (~0.8MPa まで) の時は約 45%の水が, Xe ハイドレートへと変化することが確認された. 従って, 保存開始時に封入する Xe の分圧を調製することで, 組織に形成する Xe ハイドレートの量をコントロールできることが示された.

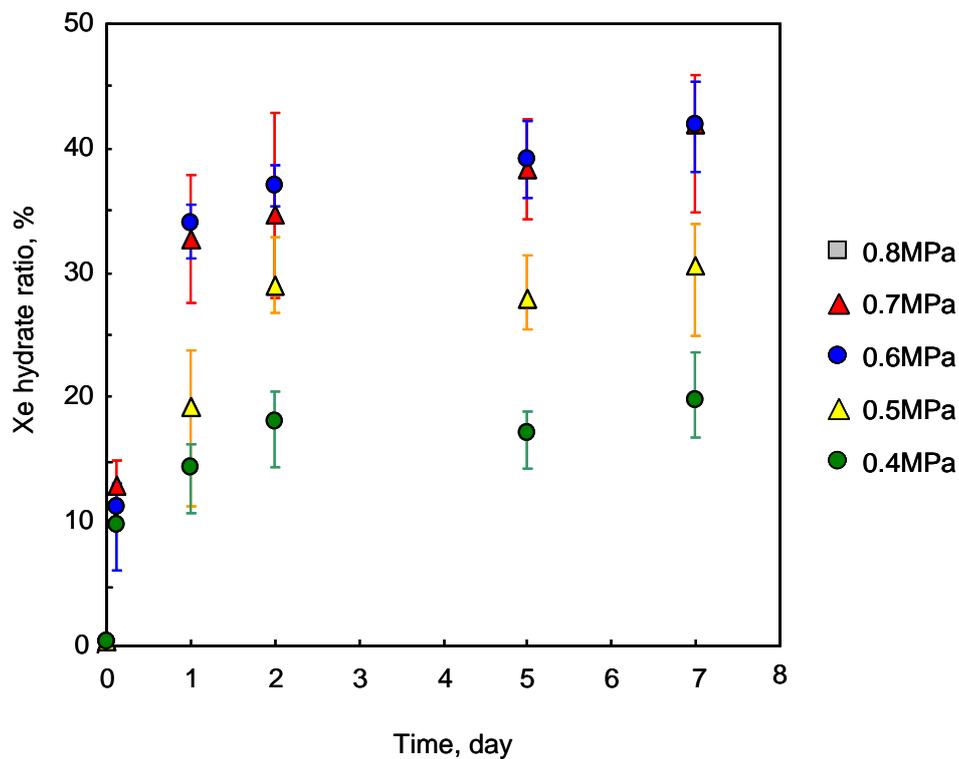


Fig.6-2 Xe hydrate formation behavior with time after introduction of several Xe pressures, respectively, at 5 °C. Error bars show the maximum and minimum values (n = 3).

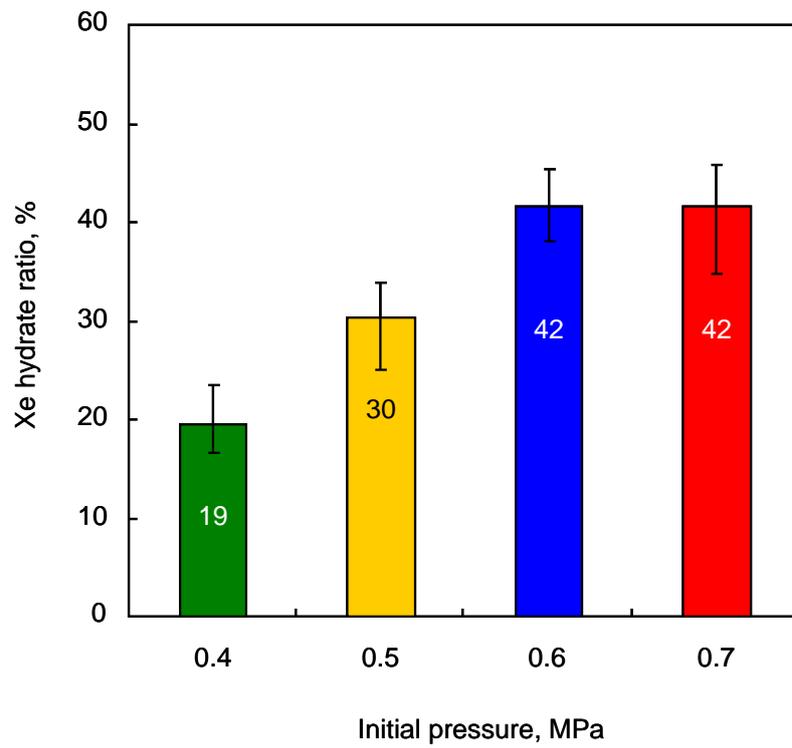


Fig.6-3 Xe hydrate ratio in the onion tissue after 7d at 5 °C. Error bars show the maximum and minimum values (n=3).

## 6. 3. Xe ハイドレート形成・解離処理後のテクスチャーの変化

### 6. 3. 1. 試料の調製

4mm×4mm×10mm の組織片に切り出した北海道産タマネギ(*Allium cepa* L.)を組織試料とし、NMR用耐圧試料管に入れた。雰囲気温度 5°Cにて 0.4~0.8MPa の Xe 分圧を封入した後、試料管を密閉した。Xe ガス封入後、7 日間、雰囲気温度 5°Cの冷蔵庫内に静置した。Xe ハイドレートが形成した組織は、パルス NMR 装置を用いた組織内の水の固液状態変化の観察より、Xe ハイドレートの形成割合を測定され、15~25%、26~35%、36~45%および 46~55%の割合で Xe ハイドレートが形成した組織に分類された。また、物理的な圧力の付加による組織テクスチャーに対する影響を理解するため、生鮮組織を大気圧下で 7 日間保存した組織(7d)と 0.8MPa の窒素ガス(N<sub>2</sub>) 雰囲気内にて 7 日間保存した組織(0.8MPa 7d)についても調製した。これらの組織は、保存後、雰囲気温度 20°Cで 1 時間静置され、Xe ハイドレートの完全な解離を確認した後、実験に供された。

### 6. 3. 2. 実験方法

#### *PGF-NMR を用いた制限拡散現象の観察*

傾斜磁場勾配パルス発生装置を付属した 25MHz の NMR 装置 (MU25A, JEOL)を用い、ステイミュレティッドエコー法による拡散係数の測定を行った。この測定法の詳細は、第3章と同様である。ただし、磁場勾配強度は 21.0~49.2 Gauss cm<sup>-1</sup>、拡散観測時間 Δ は 10~500ms とした。測定には、Xe ハイドレートの形成割合が、40%と 25%となった組織を用いた。

#### *レオメーターによるテクスチャーの測定*

第 3 章のテクスチャーの測定法と同様にして評価した。ただし、レオメーターは、RE2-33005S (株式会社山電)を用いた。

### 6. 3. 3. 結果と考察

#### 水透過性の変化

Fig.6-4 に、保存前後の組織の制限拡散の変化を示す。生鮮組織では、拡散観測時間( $\Delta$ )の増加に伴って、拡散係数が減少する制限拡散現象が観測された。すでに、第 3 章で述べたように、NMR による拡散係数の測定において、細胞など水分子の自由な拡散が制限される系では、拡散観測時間( $\Delta$ )の増加に伴って見かけの拡散係数が減少する、制限拡散現象が観察される。この制限拡散現象は、雰囲気温度 5°C の大気圧にて 7 日間保存された組織(7d)でも、同様に観察された。また、雰囲気温度 5°C、0.8MPa の N<sub>2</sub> 分圧内にて 7 日間静置された組織(0.8MPa N<sub>2</sub>)、すなわち、物理的に圧力を付加された環境で保存された組織においても観測された。本章で使用した装置は、照射可能な傾斜磁場勾配が小さいため、第 3 章で示したような制限拡散の下限の拡散係数( $\Delta = 1200\text{ms}$ )まで、拡散係数を観察することはできない。そのため、保存や物理的な圧力付加によって、制限拡散の程度を水透過係数として比較することはできないものの、これらの組織の細胞膜の水透過性に関する機能は保たれていると考えられる。また、25%の Xe ハイドレートが形成・解離した組織においても、制限拡散が観測された。しかし、45%の Xe ハイドレートが形成し解離した組織では、制限拡散はほとんど観測されなくなった。従って、組織内の水の 45%が、ガスハイドレートへと変化すると、組織の細胞膜にダメージを与え、その水透過性を増大させることが確認された。

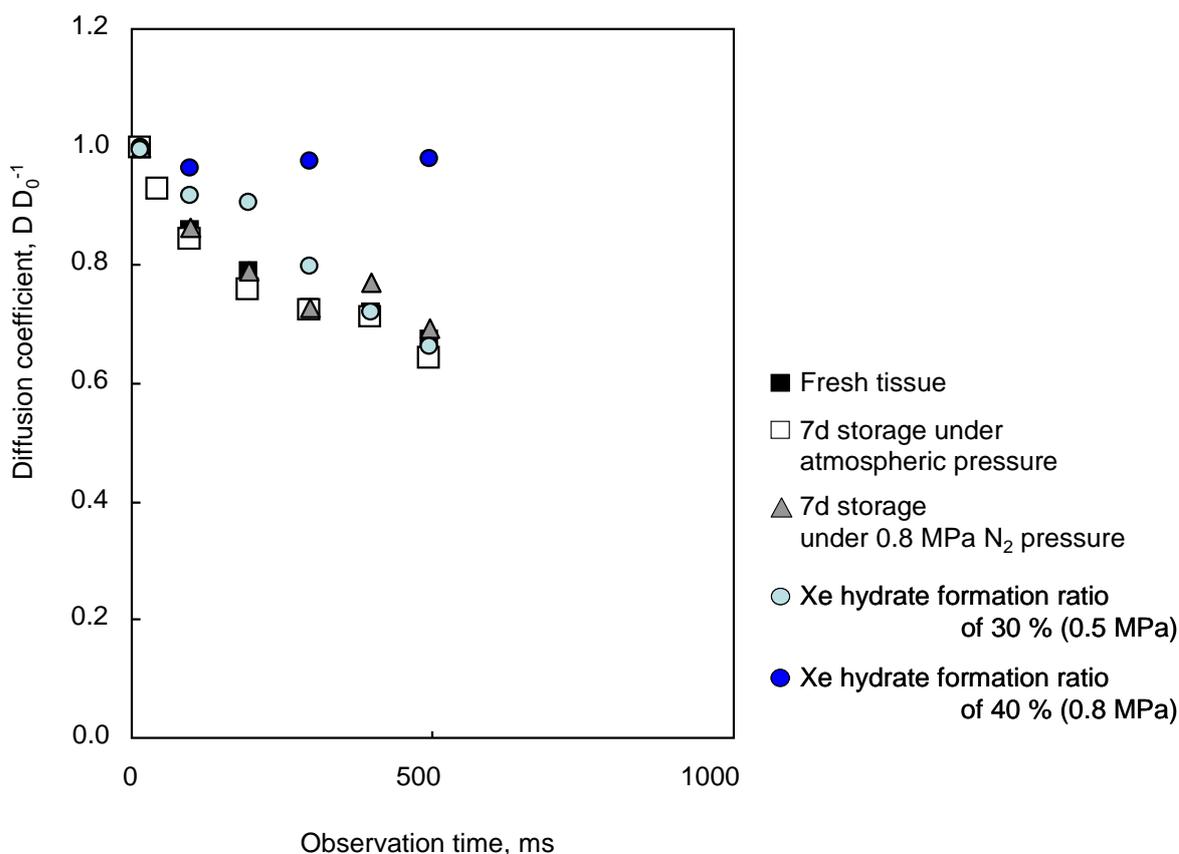


Fig.6-4 Comparison of restricted diffusion degree in water molecules in onion tissue before and after preservation, introduction of N<sub>2</sub> under pressure and formation-decomposition of Xe hydrate by using NMR.

#### テクスチャーの変化

Fig.6-5 (A)に破断強度の測定の結果を示す. ただし, 図中のバーは誤差範囲であり, 得られた値の最大値と最小値を示す. 生鮮組織の破断強度は,  $9.5 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であった. 大気圧の密閉容器で7日間保存した組織(7d)の破断強度は  $8.6 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であり, 生鮮組織の破断強度を保っていることが示された. また, 0.8MPaの窒素環境内で7日間保存された組織(0.8MPa N<sub>2</sub>)においても, その破断強度は  $7.6 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であり, 生鮮組織と同程度の値を保っていることが確認された. 生鮮組織, 大気圧下で7日間保存した組織, 0.8MPaの窒素環境内で7日間保存した組織と破断強度は, 低下傾向にあるが, 誤差を考慮すると7日という保存期間において, その差が明確に観察されるには至らなかった. 従って, 保存7日および物理的な

圧力による組織の破断強度への影響はほとんどないことが確認されたと考えられる。

次に Xe ハイドレート形成・解離処理後の組織の破断強度について記す。Xe ハイドレート形成割合が、15-25%の組織の破断強度は、 $5.5 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であった。形成割合が 26-35%の組織の破断強度は  $6.3 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ 、36-45%の組織では  $6.5 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ 、そして、46-55%以上の組織は  $6.0 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であった。従って、Xe ハイドレート形成・解離処理後の組織は、Xe ハイドレートの形成割合に関わらず、一定の破断強度を取ることが示された。生鮮組織、大気圧下で7日間保存した組織(7d)、0.8MPaの窒素環境内で7日間保存した組織(0.8MPa N<sub>2</sub>)と比較すると、Xe ハイドレート形成・解離処理後の組織の破断強度は、低下傾向にある。しかし、凍結・解凍処理後の組織の様な(第3,4章参照)、著しい低下は引起されないことが確認された。従って、Xe ハイドレートの形成・解離処理によって、破断強度すなわち細胞壁に係るテクスチャーを大きく低下させることはほとんどないと考えられた。

一方、Fig.6-5(B)に示す初期弾性率は、Xe ハイドレート形成・解離処理後、明らかに低下した。生鮮組織の初期弾性率は  $9.1 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であった。そして、大気圧下で7日間保存した組織(7d)の初期弾性率は  $1.2 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$ 、0.8MPaの窒素ガスを用いて物理的圧力を付加した組織(0.8MPa N<sub>2</sub>)では  $1.1 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$ であった。破断強度値と同様、誤差はあるものの、7日間の保存や物理的な圧力の付加によって、その値は低下しないことが確認された。しかし、Xe ハイドレート形成・解離処理後の組織の初期弾性率は、Xe ハイドレートの形成割合の増加に伴って低下することが確認された。すなわち、15~25%の形成割合の組織の初期弾性率は  $6.6 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ 、26~35%の形成割合の組織は  $7.2 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ 、36~45%の形成割合の組織では  $3.6 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ 、そして46~55%以上の形成割合の組織では  $2.7 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ であった。形成割合を10%の範囲と定めたため、誤差が大きく観察されたが、その誤差を考慮しても36%以上の水がXe ハイドレートへ変化した組織では、初期弾性率の著しい低下が観察された。しかし、35%以下の形成割合の場合、初期弾性率は、生鮮組織と近い値を保つことができることも確認された。この初期弾性率の変化の傾向は、NMRによって得られた水透過性の増大の傾向と

一致する。また、第5章において、細胞構造にゆがみを引起すXeハイドレートの形成割合として予測した、40%以上という値と同等である。従って、多量のXeハイドレートの形成によって、細胞膜の水透過性に関する機能が低下し、細胞膜に関するテクスチャーの指標である初期弾性率が大きく低下したと考えられる。

以上のことより、形成するガスハイドレートの割合を調製することで、Xeハイドレート形成・解離処理後の組織軟化の程度を、凍結保存法と比較して抑制できることが確認された。ただし、ガスハイドレートを利用する場合も凍結保存法で問題となった細胞膜に関するテクスチャーの低下がおこるため、その形成割合を35%以下に留める必要があることが確認された。

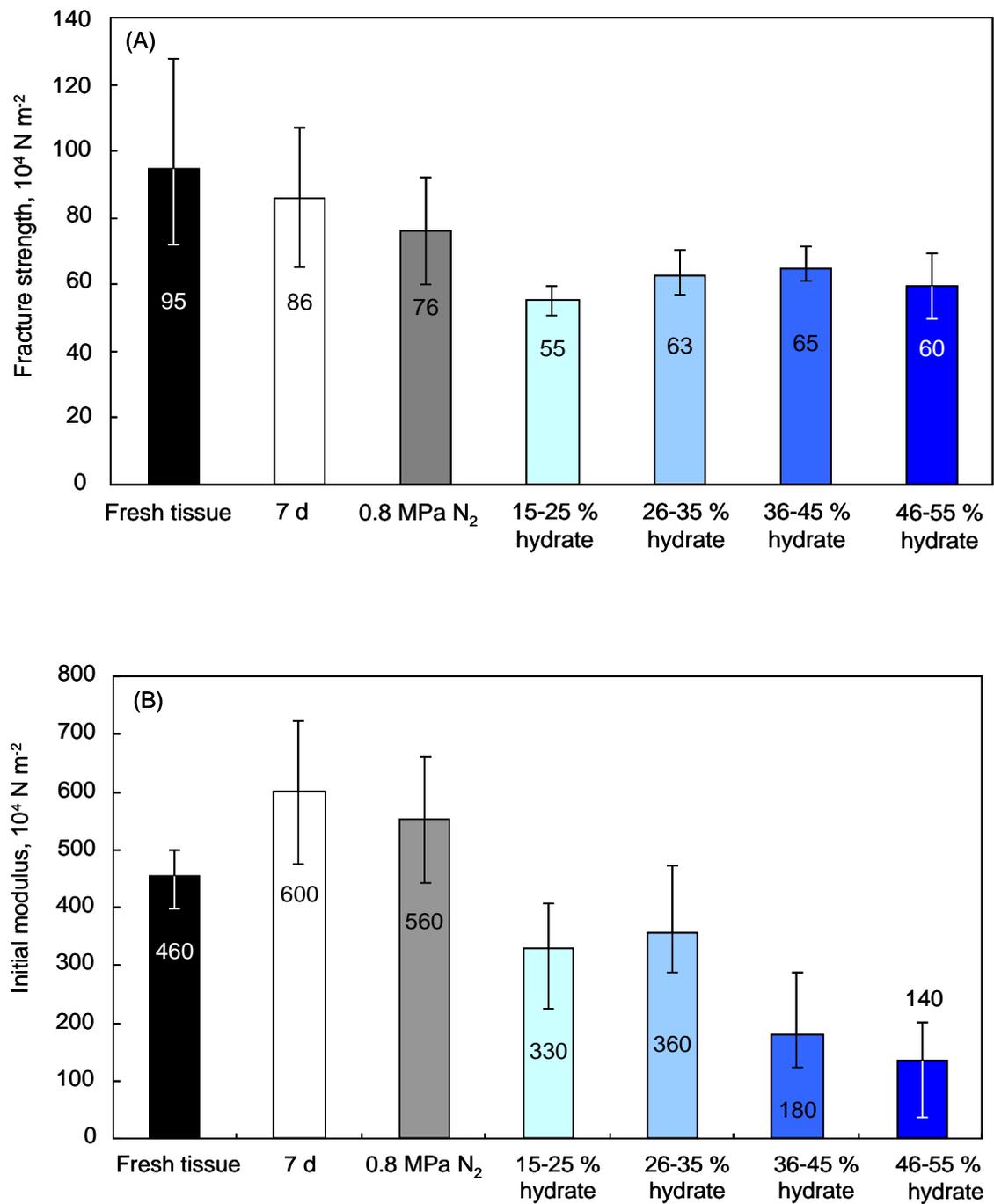


Fig.6-5 Indices of texture, (A) fracture strength and (B) initial modulus, in onion tissue before and after preservation for 7d at 5 °C. Those parameter values were measured by texture analyzer at 20 °C. Error bars show the maximum and minimum values (n=3).

## 6. 4. ガスハイドレートを利用した保存法の効果の検討

### 6. 4. 1. 試料の調製

上述の実験において、破断強度と初期弾性率ともに大きな変化が見られなかったのは、25～35%程度の Xe ハイドレートを形成させた組織であった。そのため、本節では、35%程度の Xe ハイドレートが形成されると予測される 0.5MPa の Xe 分圧を使用することとした。

5mm 幅に切り出したタマネギ組織は、20g ずつ滅菌済みのプラスチックシャーレに入れられた。その後、耐圧容器内に 2 つの試料を入れたプラスチックシャーレを置き、耐圧容器内が 0.5MPa の Xe 分圧となるように Xe を封入した。ただし、シャーレの蓋はしなかった。これを雰囲気温度 5°C の冷蔵庫で 3 時間保管した。この間、温度の低下に伴って、微量に変化する圧力をバッファータンクを用いて調製した。その後、圧力容器に振動を与え、ガスハイドレートの形成を促進する操作をした。その後、雰囲気温度 5°C の冷蔵庫で 2 週間保存した。保存後の Xe 分圧は、0.3MPa であった。また、コントロールとして、切り出した組織を滅菌済みプラスチックシャーレに入れ、パラフィルムを用いて密閉・保存した組織試料を調製した。

### 6. 4. 2. 実験方法

#### テクスチャーの測定

第 3 章に示したテクスチャーの測定法と同様の方法で評価した。

#### 一般生菌数の測定

一般生菌数の測定手順を Fig.6-6 に示す。保存した組織より 5g を取り出し検体とした。この検体を、滅菌フィルターバッグ(ホモジバック 012s, 日本細菌検査株式会社)に 45ml の滅菌リン酸緩衝液(デリューション P45cc, 日本細菌検査株式会社)をいれ、ホモジナイズした。この菌体  $10^1$  倍希釈液より、滅菌したリン酸緩衝液を使用して、10 倍の希釈溶液を段階的に調製した( $\sim 10^7$  希釈液まで)。菌体希釈液をよく攪拌した後、一般生菌測定専用培地(ペトリフィルム<sup>TM</sup> 培地 AC プレート、

住友スリーエム) 2枚にそれぞれ 1ml ずつ希釈液を滴下し, 雰囲気温度 35°Cで 48時間(±2時間) 培養させた. その後, 培地に増殖したコロニーをカウントし, 検体の生菌数を求めた.

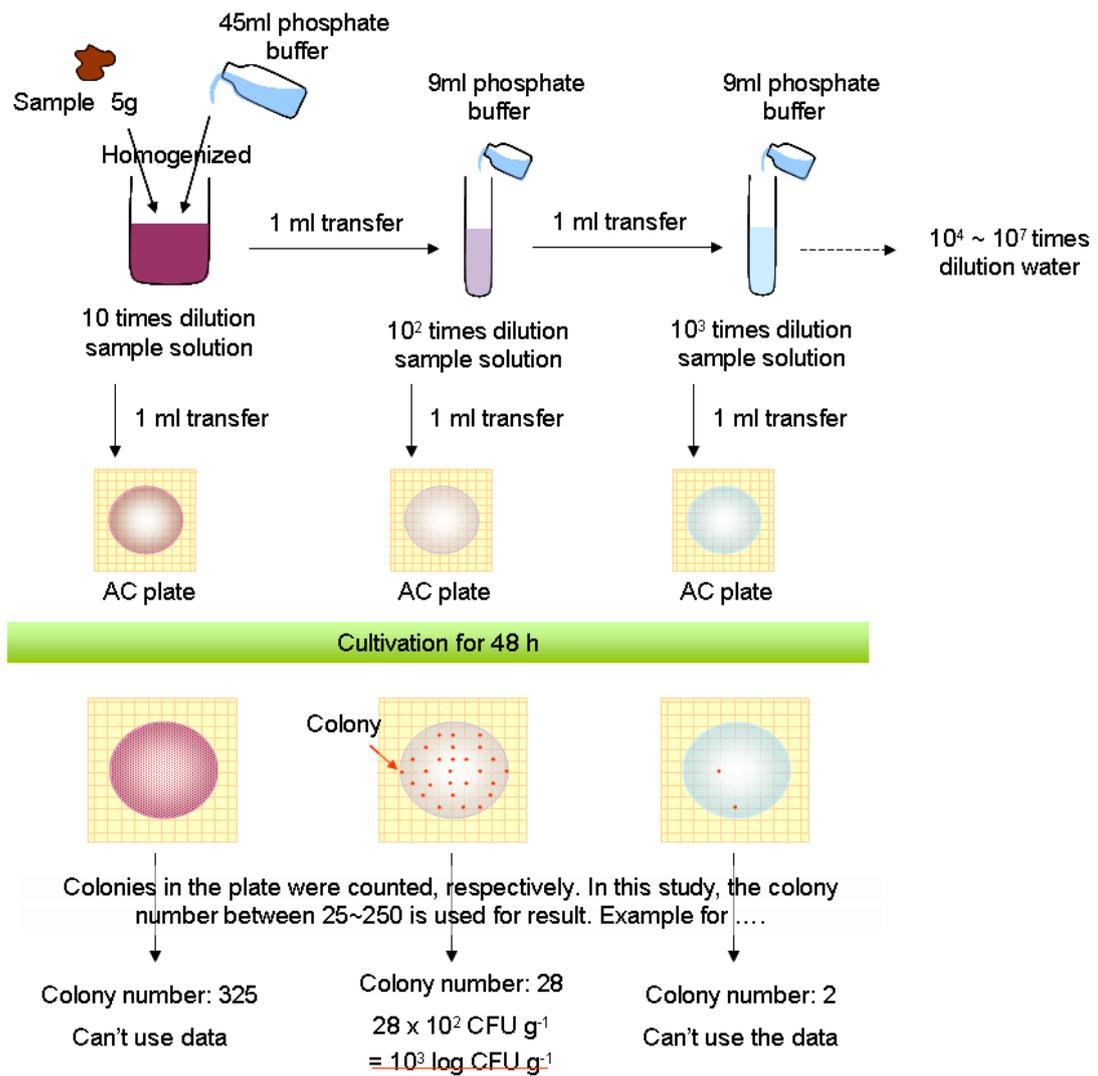


Fig.6-6 Flow chart for total psychrotrophic counts (log cfu g<sup>-1</sup>) measurement in sample tissue. (東京都立食品技術センター, 1998)

#### 6. 4. 3. 結果と考察

Fig.6-7 にテクスチャーの測定結果を示す. 生鮮組織の破断強度は  $1.2 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$  であった. 2 週間後, 大気圧下で保存された組織の破断強度は  $1.4 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$ , Xe ハイドレート形成・解離処理後の組織では  $1.3 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$  であり, その値はほとんど等しかった. 一方, 初期弾性率には明確な差が見られた. すなわち, 生鮮組織の初期弾性率は,  $7.6 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$  であったのに対し, 大気圧下で保存された組織の初期弾性率は,  $6.9 \times 10^4 \text{ Nm}^{-2}$  と著しく低下した. しかし, Xe ハイドレート形成・解離処理後の組織の初期弾性率は,  $5.4 \times 10^4 \text{ Nm}^{-2}$  であり, 低下はするものの, その程度が抑制されることが確認された.

一般生菌数の測定の結果を Fig.6-8 に示す. 本研究で使用した生鮮タマネギ組織の一般生菌数は  $3.7 \text{ logCFU g}^{-1}$  であった. これを  $5^\circ\text{C}$  の大気圧下で 2 週間保存すると,  $5.6 \text{ logCFU g}^{-1}$  まで増加した. 一般生菌数が  $7 \text{ logCFUg}^{-1}$  以上の場合, 食品は腐敗している(山中ら, 2007). そのため, 本研究で得られた  $5.6 \text{ logCFU g}^{-1}$  ( $n=2$ ) の一般生菌数を持つタマネギ組織は, 腐敗の手前の状態であったと考えられる. その兆候は, Fig.6-9 に示す外観にも, 色の褐変や粘性を持った液体の付着などとして観察された. この結果を考慮すると, Fig.6-9 で観察された, 大気圧条件で密閉保存された組織の初期弾性率の低下の原因の1つは, 一般生菌の増殖による腐敗である. 食品の腐敗を物理学的な指標で示すことはないとされているが(山中ら, 2007), 本研究の結果, 大気圧下で 2 週間保存された組織は, 微生物の増殖によって細胞膜に関するテクスチャーを低下させたと考えられた. 一方, Xe ハイドレート形成・解離処理後の組織は, 2 週間の保存後も一般生菌数を  $4.1 \text{ logCFUg}^{-1}$  に留めており, 概観においても腐敗の兆候は見られなかった. 従って, Xe ハイドレートを利用することで, 食品としての品質保持期間をも延長できることが確認された. 既往の研究において, Xe の様な疎水性のガス雰囲気内では, 微生物の増殖が抑制されることが報告されている(Buchheit et al., 1966). この様な効果は, Xe の溶解に伴う水の構造化に由来すると示唆され, 特に, 大腸菌などのグラム陰性菌に対して効果的であると示されている(橋本・大下, 1998). また, 野菜の保存に関する研究においても,

モヤシに付着した一般生菌数の増殖を抑制する効果があることが示されている。しかしこれらの研究では、Xe 雰囲気内での実験であるため、その品質保持期間は短い。一方、本研究の様に、水の構造化のみならず、ガスハイドレートをも使用することで、より効果的に微生物の増殖を抑制できたと考えられる。

従って、ガスハイドレートを用いた保存法は、生鮮野菜の保存期間を延長できることが示されたと考えられる。付加する Xe 分圧を調製して、組織に形成するガスハイドレートの割合を適当な量とすることで、凍結保存法において問題とされる組織軟化をも、ある程度防ぐことができることが示された。

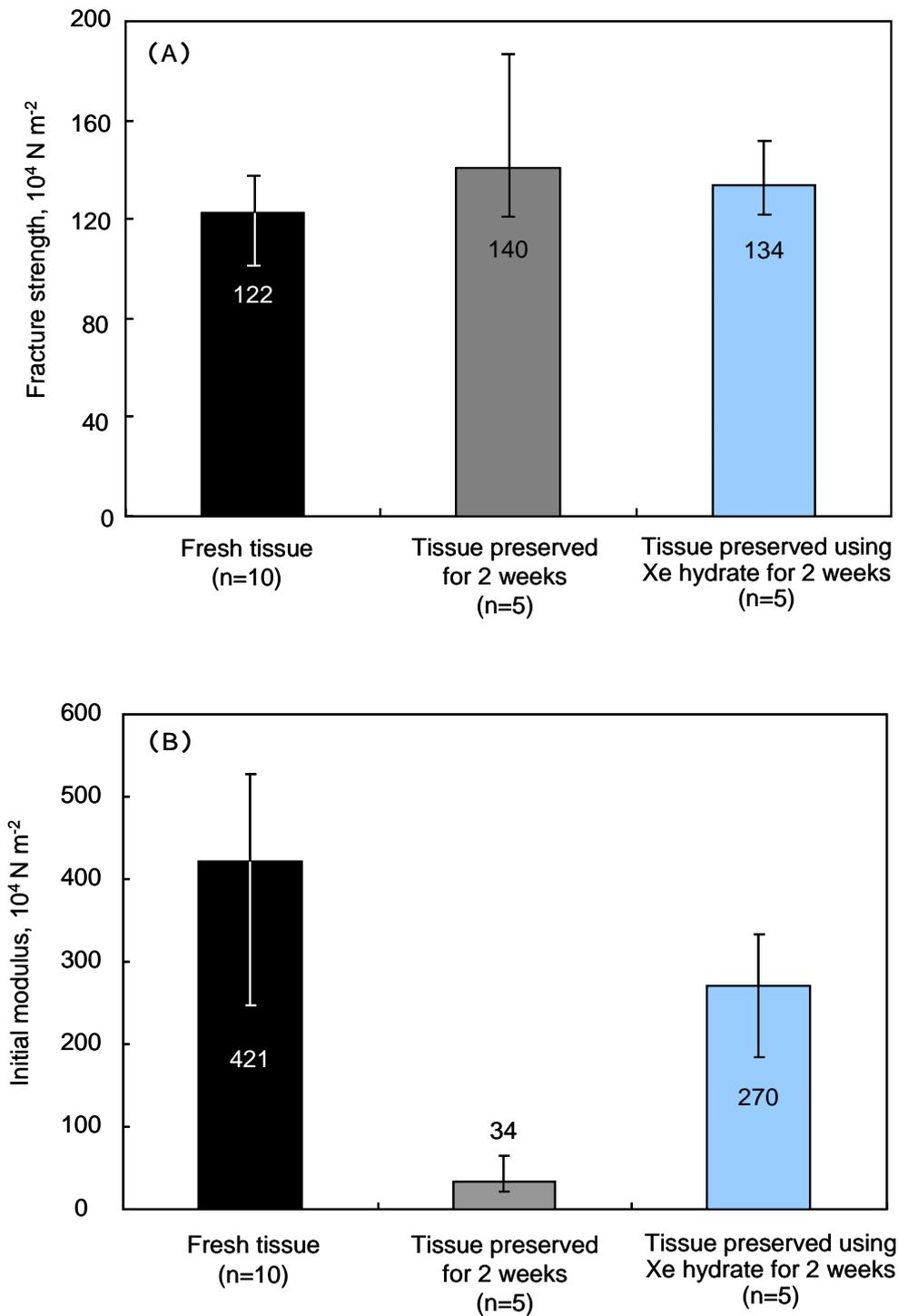


Fig.6-7 Indices of texture, (A) fracture strength and (B) initial modulus, in onion tissue before and after 2weeks. Onion tissues were preserved with and without Xe hydrate at 5 °C. Error bars show the maximum and minimum values.

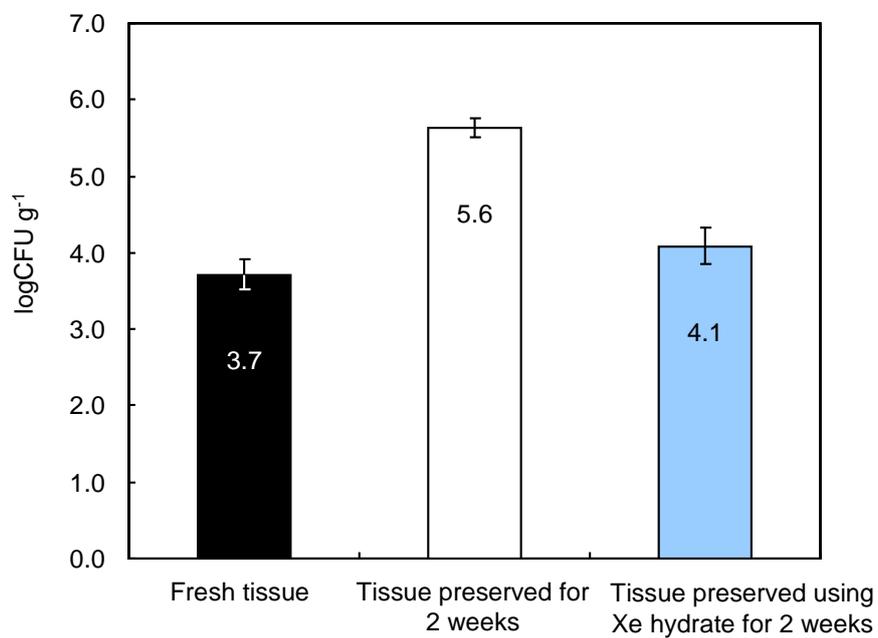


Fig. 6-8 Total psychrotrophic counts (logCFU g<sup>-1</sup>) from sliced onion stored with and without Xe hydrate for 2 weeks at 5°C. Error bars show the maximum and minimum values (n=3) .

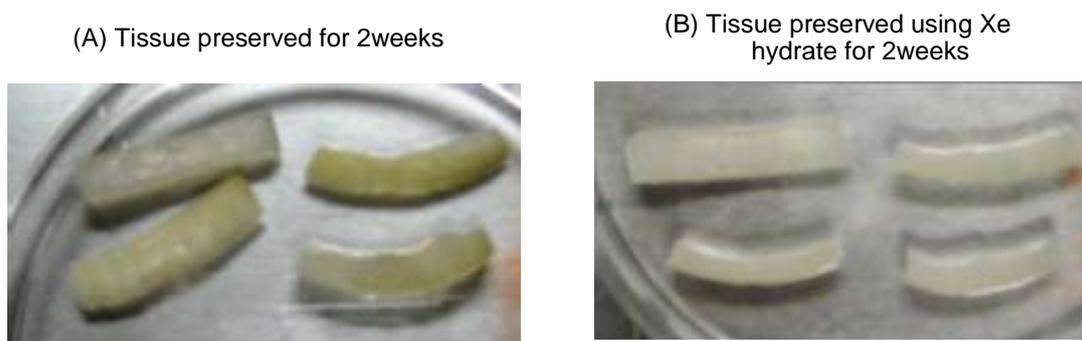


Fig.6-9 Visible change of onion tissue after preservation for 2 weeks with Xe hydrate or under atmospheric pressure at 5 °C.

## 6. 5. 結論

ガスハイドレートを用いた生鮮野菜の長期保存法の効果を検討することを目的に、まず、Xe ハイドレート形成・解離処理後の野菜組織の軟化の程度の検討を行った。第 3 章において、凍結保存法における組織軟化の程度を理解するために提案したテクスチャーの評価手法、すなわち破断強度と初期弾性率の評価より検討した。その結果、組織の細胞壁に関するテクスチャーである破断強度は、Xe ハイドレート形成・解離処理後も大きく低下しないこと、またその形成割合の増加に関わらず、一定の値を保つことが示された。一方、細胞膜に関するテクスチャー、初期弾性率は、Xe ハイドレート形成割合が 36%以上となると低下してしまうことが確認された。得られた最適な保存条件、35%以下の Xe ハイドレートの形成割合を調製・保存したタマネギ組織において、2 週間の保存を行った。その結果、細胞壁のみならず細胞膜に関する軟化の程度の抑制のみならず、食品として腐敗に達する期間をも延長できることが確認された。従って、生鮮野菜の保存法として、ガスハイドレートの利用が有効であることが示されたと考えられる。

## 第7章 結論

### 7. 1. 各章のまとめと本論の結論

本研究では生鮮野菜の長期保存法の提案を目的に、まず1)凍結保存法の問題点である組織軟化に関して検討した。その後、新しい保存技術として、2)ガスハイドレートを用いた生鮮野菜の長期保存法について検討した。

第1章は序論、第2章で既往の研究における問題点の抽出と本研究の目的を記した。そして、第3章では、凍結・解凍処理後の組織テクスチャーの変化の評価法を検討した。このため、既に凍結・解凍処理後の細胞壁に関するテクスチャーの変化の評価に使用されている「破断強度」の測定に併せて、生鮮植物細胞の膨圧の変化と関係することが報告されている「初期弾性率」の測定を行った。また、初期弾性率の変化と細胞膜の水透過性に関する機能低下との関係を明らかにするため、NMRを用いた細胞膜水透過係数の測定を行った。以上の検討より、凍結・解凍処理後の組織軟化は、細胞壁と細胞膜の両方に関係したテクスチャーの低下より、引起されていることを明らかにした。そして、凍結保存法における組織軟化の程度を詳細に理解するためには、破断強度と共に、初期弾性率を測定する必要があることを示した。

第4章は、浸透圧脱水凍結法による組織テクスチャーの保持効果について検討した。この凍結法は、生鮮農産物の凍結・解凍処理後の組織軟化の程度を抑えるといわれている。その効果の評価する方法として、第3章で提案したテクスチャーの評価法を用いた。また併せて官能試験を行うことで、浸透圧脱水凍結法において、食感として感知できるほどの効果が得られるかについても検討した。その結果、凍結・解凍処理後の生鮮野菜のテクスチャーの保持に関する浸透圧脱水凍結法の効果は、細胞壁に関するテクスチャーの低下を抑える効果を意味していることを確認した。しかし、細胞膜に関するテクスチャーの変化を抑制する効果はないことを示した。また食感においても、その効果は、はっきりと感じることはできないことを

確認した。従って、浸透圧脱水凍結法を用いても、やはり、凍結・解凍処理後、生鮮組織の状態のテクスチャーは保持できないことを確認した。

これらの凍結保存に関する結果を受けて、第 5 章と第 6 章では、ガスハイドレートを用いた生鮮野菜の長期保存法に関する検討を行った。

まず第 5 章では、ガスハイドレートを利用した生鮮野菜の保存の検討に先立って、疎水性のガスである Xe を用いて、野菜組織におけるガスハイドレートの形成の確認を行った。その結果を、粉末 X 線回折測定 (PXRD) より検証した。また併せて、非破壊の組織内でのガスハイドレートの形成割合を把握できる方法として、NMR による水の固液状態変化の測定についても検討した。さらに、NMR マイクロメージング測定 (MRI) を用いることで、ガスハイドレート形成・成長に伴う組織内の細胞構造の変化についても検討した。その結果、PXRD より、野菜組織においてガスハイドレートが形成可能であることを示した。また、NMR 測定による組織内の水の固液状態変化を測定することで、組織を破壊しなくとも、ガスハイドレートの形成割合を推定できることを確認した。併せて、MRI 測定により、組織内においても一様に、ガスハイドレートの微細な結晶が形成されることを確認した。しかし、組織内の水がガスハイドレートへ多量に変化すると、組織内の構造にゆがみを与えてしまう可能性があることを確認した。従って、ガスハイドレートを利用した保存法を検討するにあたり、組織内に形成するガスハイドレートの量を調節する必要があると考えられた。

次の第 6 章で、ガスハイドレートを利用した生鮮野菜の保存法の効果を検討した。付加する圧力を調節することで、ガスハイドレートの形成割合を調製した組織を用い、ガスハイドレート形成・解離処理後の組織のテクスチャーの変化を評価した。テクスチャーの変化の評価には、第 3 章で提案した方法を用いた。併せて、食品の品質低下の指標の 1 つ「腐敗」を、一般生菌数の測定より検討した。その結果、ガスハイドレートを用いた生鮮野菜の保存法は、組織内に形成するガスハイドレートの割合を 35% 以下に留めることで、細胞壁さらには細胞膜に関係するテクスチャーの低下を抑制できることを示した。また、保存温度 5℃において、腐敗に至るま

での期間を延長できることを確認した。従って、凍結保存法にかわる新しい生鮮野菜の長期保存法として利用できる可能性が示されたと考えられる。

そして第7章において、本論文で得られた知見を結論としてまとめた。また、凍結保存における生鮮野菜組織の組織軟化メカニズムおよび、生鮮野菜組織内におけるガスハイドレートの形成過程と組織軟化メカニズムについて考察した。

以上、結論として、まず凍結保存に関する研究では、

1. 凍結・解凍処理後に生じる組織軟化が、細胞膜と細胞壁の両方に関係したテクスチャーの低下によって引起される
2. 浸透圧脱水凍結法を利用しても組織軟化を完全に抑制できるわけではない

ことが示された。

そして、次に検討したガスハイドレートの利用した保存法に関する研究では、

3. ガスハイドレートは、野菜組織内において形成・成長できる
4. 組織内におけるガスハイドレートの形成量を調節することで、凍結保存法と比較して、保存後の細胞膜と細胞壁に関係したテクスチャーの低下を抑制できる
5. ガスハイドレートの形成を利用することで、食品としての品質保持期間を延長できる

ことが示された。従って、本論において、凍結保存法の問題点である組織軟化に関する検討より、その原因の1部を理解することで、「ガスハイドレートを用いた保存法」が組織軟化を抑えた新しい生鮮野菜の長期保存法として利用可能であることを確認した。

## 7. 2. 氷及びガスハイドレートの形成と保存後の食感変化の仮説

本論を通して得られた知見を元に、生鮮野菜組織の凍結保存及びガスハイドレートを利用した保存に関して、組織軟化が起こる原因について考察し、仮説を提案する。

### *凍結・解凍処理後の生鮮野菜の組織軟化*

生鮮野菜の組織軟化メカニズムの新たな仮説を Fig.7-1 に示す。凍結・解凍処理後の生鮮野菜の組織軟化は、細胞膜の水透過性の低さに由来する。この細胞膜の水透過性の低さは、凍結に伴う細胞内外での水分移動がうまく行われないうまま、細胞内に氷結晶が形成してその体積を増加させる。そのため、細胞膜が存在する組織を凍結した場合、細胞膜はもちろん細胞壁も大きくダメージを受けてしまう。この現象は、密閉容器内の水を凍結した時に起こる容器の破裂と類似した現象と推察される。一方、細胞膜の機能が低下した組織を凍結処理すると、凍結に伴う細胞内外での水分移動は円滑に行われる。この組織では、細胞内の水の氷結晶への変化に伴う体積膨張は抑制され、細胞壁構造に対して生じるダメージを軽減できる。そのため、凍結・解凍処理後も生鮮野菜のもつかたさを保つことができる。この現象は、大量に水を含んだスポンジは、凍結・解凍後もそのスポンジ構造を保つ様な現象といえる。

### *組織内におけるガスハイドレートの形成・成長と解離後の生鮮野菜の組織軟化*

生鮮野菜組織内でのガスハイドレート形成・成長プロセスと、その形成・解離処理後の組織軟化に関する仮説を Fig.7-2 に示す。低温で、生鮮野菜組織をガス分圧中に静置すると、ガス分子は組織内を拡散し、溶解度の高い細胞膜に多量に溶解を始める。その後、この細胞膜に溶けたガス分子から細胞内の水へ溶解を始めると共に、ガス分子の溶解によって組織内の水は構造化を始める。ここで振動などの外的刺激が加わると、凍結過程で観察される過冷却解消に似た現象が起こるため、ガス濃度の勾配に従って、細胞内でガスハイドレートの形成が起こる(不均質ガスハイドレート核形成プロセス)。この過程では、ガス濃度の勾配に従って、細胞膜と細胞内溶液界面付近にガスハイドレートが形成されるため、ガスハイドレート形成量の

増加に伴い、細胞膜に対するダメージは増す。従って、ガスハイドレート形成割合を調製・制御することで組織テクスチャーの低下が抑制される。

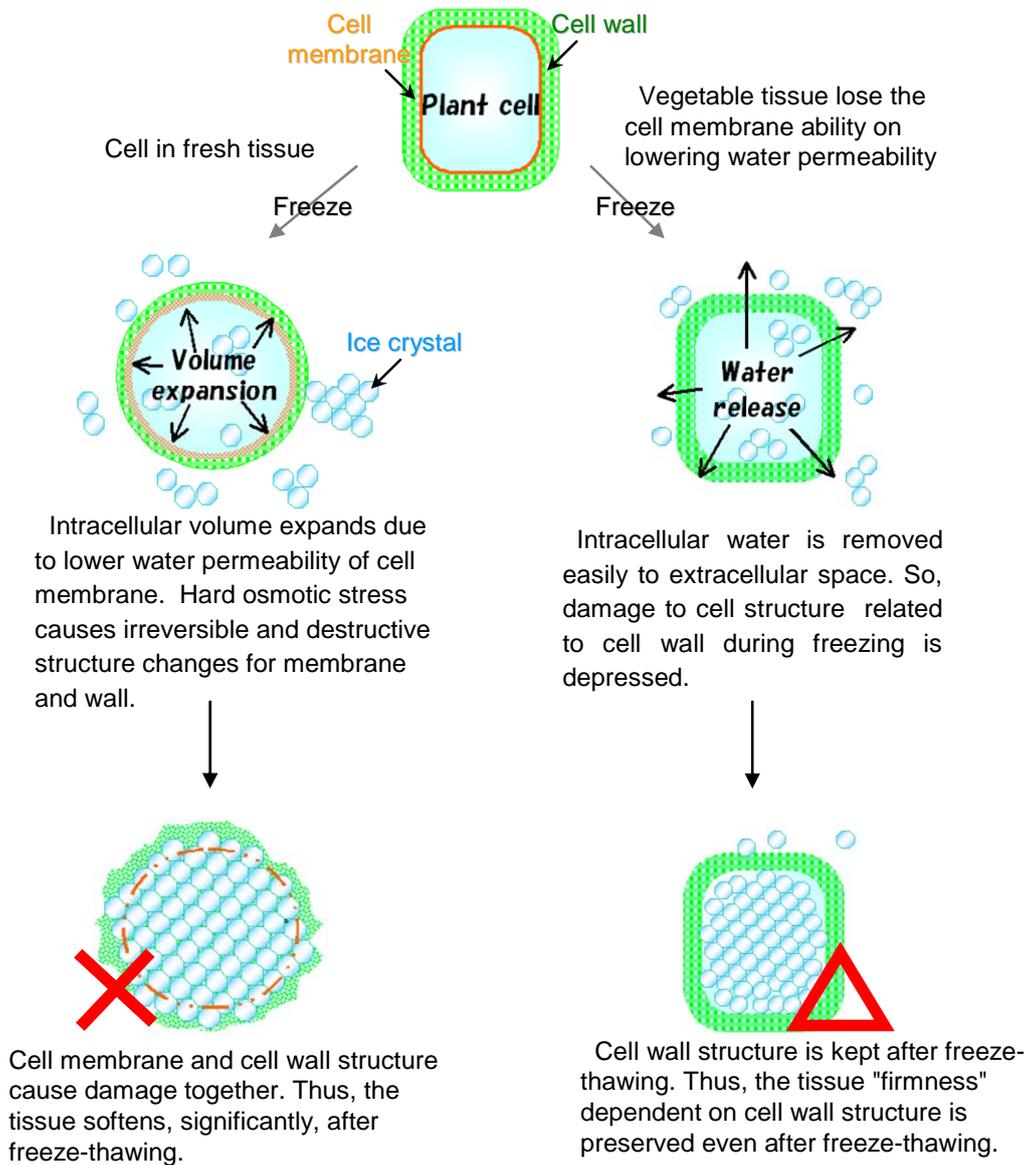


Fig. 7-1 Hypothesis about mechanism of softening in fresh vegetable tissue after freeze-thawing suggested by the results in this study.

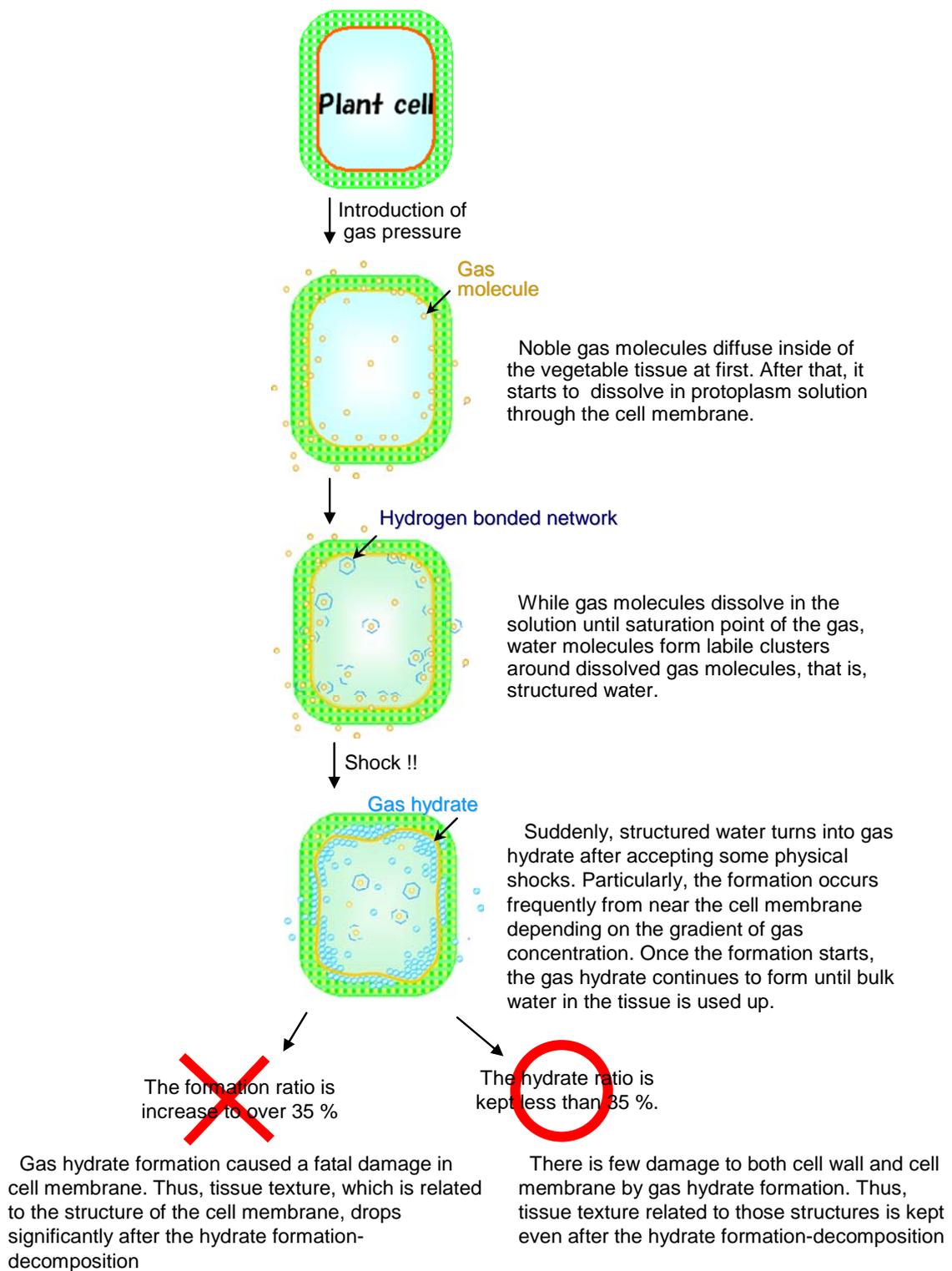


Fig.7-2 Hypothesis about mechanism of gas hydrate formation in fresh vegetable and its softening after gas hydrate formation- decomposition suggested by the results in this study.

### 7. 3. 本論の意義と長期保存法の実用化への課題

本研究では、生鮮野菜の長期保存法として、氷及びガスハイドレートの利用に関して検討を行った。得られた知見を考察することで、1)凍結保存法における凍結・解凍処理後の組織軟化メカニズムの新たな仮説を提案することができた。この仮説を提案するにあたり検討した、凍結・解凍処理後の組織軟化の程度の評価手法は、本論で検討した浸透圧脱水凍結法だけでなく、その他の凍結法や加工処理後の野菜のテクスチャーの変化の理解にも使用できるだろう。また、2)ガスハイドレートを利用した長期保存法を提案し、その効果についても示すことができた。このコンセプト自体は、古くから提案されているものの、本論において初めて、野菜組織内での明確なガスハイドレートの形成を示した。さらに、食品保存法としての効果についても言及することができた。これらのガスハイドレートと生体組織に関する結果は、食品保存の観点のみならず、物理化学・医学分野においても利用可能な知見を与えたと考えられる。

提案してきたガスハイドレートを利用した長期保存法の実用化への課題として、使用するガスの選択が必要と考えられる。本論で使用した Xe は高価なガスであり、基礎的研究を終えた今、Xe 以外のガスの使用を検討する必要がある。例えば、クリプトン(ガスハイドレート形成は  $-0.1^{\circ}\text{C}$ ,  $01.4\text{MPa}$ )や二酸化炭素( $0^{\circ}\text{C}$ ,  $1.2\text{MPa}$ )の使用を検討することで、実用化の道を模索できるだろう。また、近年、形成したメタンガスハイドレートを、メタンガスの代わりにクリプトンや窒素ガス分圧内で保持する研究が行われている。そして、メタンガス環境内で保持したときと同様、解離を防ぐことが報告されている(Lu *et al.*, 2007)。従って、本研究で使用した Xe ハイドレートにおいても、保存・流通に際して、代替ガスの利用を念頭に検討を行う必要があるのも良いと考えられる。また基礎研究として、ガスハイドレートの形成方法の検討も行う必要がある。本研究では、保存期間を調節するため、ガスハイドレート形成を氷における不均質核生成に類似した現象を通して行った。従って、自発的にガスハイドレートが形成する均質核生成に類似の過程についても検討することで、野菜組織内でのガスハイドレートの形成・成長メカニズム

をより詳細に提案できるだろう。

以上、本論で得た知見が、食品の長期保存技術を新しいステージへと導く切掛けとなればよいと考える。さらに、長きに渡り検討され続けてきた、生態と水の固体“氷及びガスハイドレート”の関係を理解するための、一研究として利用されることを願う。

## 参考文献

- Anisimov A. V., Sorokina N. Y. and Dautova N.R. 1998. Water diffusion in biological porous systems: a NMR approach, *Magn. Res. Imaging*, **16**, 565–568.
- Blewett J., Burrows K., and Thomas C. 2000. A micromanipulation method to measure the mechanical properties of single tomato suspension cells, *Biotechnol. Lett.*, **22**, 1877–1883.
- Brown M. S. 1967. Texture of frozen vegetables: effect of freezing rate on green beans, *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 77–81.
- Buchheit R. G., Schreiner H. R. and Doebbler G. F. 1966. Growth responses of *Neurospora crassa* to increased partial pressures of the noble gases and nitrogen, *J. Bacteriol.*, **91**, 622–627.
- Chaw M. W. and Bubinsky B. 1985. Cryomicroscopic observations on directional solidification in onion cells, *Cryobiology*, **22**, 392–399.
- Chambers R. and Hale H. P. 1932. The formation of ice in protoplasm. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **110**, 336–352.
- Chassagne-Berces S., Poirier C., Devaux M., Fonseca F., Lahaye M., Pigorini G., Girault C., Marin M. and Guillon F. 2009. Changes in texture cellular structure and cell wall composition in apple tissue as a result of freezing, *Food Research International*, **42**, 788–797.
- Cherubini A. and Bifone A. 2003. Hyperpolarised xenon in biology, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **42**, 1–30.
- Clark C. A. and Bihan D. L. 2000. Water diffusion compartmentation and anisotropy at high b values in the human brain, *Magnetic Resonance in Medicine*, **44**, 852–859.
- Collett T. S., Lee M. W., Goldberg D. S., Rack F. R. and Williams T. 2006. Data Report: nuclear magnetic resonance logging while drilling, ODP Leg 204, “*Proceedings of the ocean drilling program, Scientific results volume 204* (Eds. by Tréhu A. M., Bohrmann G., Torres M. E. and Colwell F. S.)”, pp.1–22, ODP, Texas.
- Coolong T. W., Randle W. M. and Wicker L. 2008. Structural and chemical differences in the cell wall regions in relation to scale firmness of three onion (*Allium cepa* L.) selections at harvest and during storage, *J. Sci. Food Agric.*, **88**, 1277–1286.
- Dubochet J., Richter K., Roy H. V. and McDowall A. W. 1991. Freezing: facts and hypothesis, *Scanning Microsc. Suppl.*, **5**, S11–S16.
- Ewing G. J. and Ionescu L. G. 1974. Dissociation pressure and other thermodynamic properties of xenon–water clathrate. *J. chem. Eng. Data*, **19**, 367–369.

- Falk S., Hertz C. H. and Virgin H. I. 1958. On the relation between turgor pressure and tissue rigidity. I. Experiments on resonance frequency and tissue rigidity, *Physiologia Plantarum*, **11**, 802–837.
- Fennema O., Powrie W. D. and Marth E. L. 1973. *Low-temperature preservation of food and living matter*, 598pp, Marcel dekker INC, New York.
- Fennema O. and Thompson L. U. 1971. Inhibition of L-ascorbic acid oxidation by type II gas hydrates, *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 232–235.
- Fry S. C. 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**, 497–520.
- Fuchigami M., Hyakumoto N. and Miyazaki K. 1995A. Programmed freezing affects texture, pectin composition and electron microscopic structures of carrots, *J. Food Sci.*, **60**, 137–141.
- Fuchigami F., Miyazaki K. and Hyakumoto N. 1995B. Frozen carrots texture and pectic components as affected by low-temperature-blanching and quick freezing, *J. Food Sci.*, **60**, 132–136.
- Galindo F. G. 2004. *Physiological and biochemical aspects of vegetable processing a case study on carrots*, Doctor Thesis, Lund University.
- Gribnau M. C. M. 1992. Determination of solid/liquid ratios of fats and oils by low-resolution pulsed NMR, *Trend in Food Science and Technology*, **31**, 186–190.
- Gutschmidt J. 1968. Principles of freezing and low temperature storage, with particular reference to fruit and vegetables, "*Low temperature biology of food stuffs*" (Eds by Jawthorn J. and Rolfe E.) ", pp.299–318, Pregamon, Oxford.
- Hobbs P. V. 1974. *Ice Physics*, Oxford University Press, Oxford.
- Huang C. P., Fennema O. and Powrie W. D. 1965. Gas hydrates in aqueous-organic systems. I. Preliminary studies, *Cryobiology*, **2**, 109–115.
- Hulle G. V. and Fennema O. 1971A. Gas hydrates in aqueous-organic systems. V. Effects of ethylene oxide and ethylene oxide hydrate in animal tissue, *Cryobiology*, **7**, 4–6.
- Hulle G. and Fennema O. 1971B. Gas hydrates in aqueous-organic systems. VI. Effects of hydrate formers and hydrate crystals in carrot tissue, *Cryobiology*, **8**, 91–103.
- Huo Z., Feer E., Lamar M., Sannigrahi B., Knauss D.M. and Sloan E. D. 2001. Hydrate plug prevention by anti-agglomeration, *Chem. Eng. Sci.*, **56**, 4979–4991.
- Ishikawa E., Miyawaki O. and Nakamura K. 1997. Water permeability of plasma membranes of cultured rice, grape, and CH27 cells measured dielectrically, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**,

- 1826–1830.
- Izumi F. and Ikeda T. 2000. A Rietveld-analysis program RIETAN-98 and its application to zeolites, *Mater. Sci. Forum Vols.*, 321–323.
- Kamiya N. and Tazawa M. 1956. Studies on water permeability of a single plant cell by means of transcellular osmosis, *Protoplasma*, **46**, 394–423.
- Kinsey S.T., Locke B. R., Penke B. and Moerland T. S. 1999. Diffusional anisotropy is induced by subcellular barriers in skeletal muscle, *NMR in Biomedicine*, **12**, 1–7.
- Kleinberg R. L., Flaum C., Straley C., Brewer P. G., Malby G. E., Peltzer E. T., Friederich G. and Yesinowski J. P. 2003. Seafloor nuclear magnetic resonance assay of methane hydrate in sediment and rock, *J. Geophys. Res.*, **108**, 1–13.
- Köckenberger W. 2001. Nuclear magnetic resonance micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 641–652.
- Kohl I., Mayer E. and Hallbrucker A. 2000. The glassy water – cubic ice system: a comparative study by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry, *PCCP*, **2**, 1579–1586.
- Lanzotti V. 2006. The analysis of onion and garlic, *J. Chromatogr. A*, **1112**, 3–22.
- Lee F. A., Gortner W. A. and Whitcombe J. 1946. Effect of freezing rate on vegetables, *Ind. Eng. Chem.*, **38**, 341–346.
- Lee F. A. and Johannesen G. A. 1951. An objective method for measuring the effect of freezing rate on asparagus, *Food technol.*, **5**, 263–265.
- Liu F. and Li Y. 2006. Storage characteristics and relationships between microbial growth parameters and shelf life of MAP sliced onions, *Postharvest Biology and Technology*, **40**, 262–268.
- Long J. P. and Sloan E. D. 1996. Hydrates in the ocean and evidence for the location of hydrate formation, *Int. J. Thermophysics*, **17**, 1–13.
- Longe O. G. 1981. Effect of boiling on the carbohydrate constituents of some non-leafy vegetables, *Food Chem.*, **6**, 1–6.
- Lu H., Tsuji Y. and Ripmeester J. A. 2007. Stabilization of methane hydrate by pressurization with He or N<sub>2</sub> gas, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 14163–14168.
- Makino Y., Kawahashi M., Kuroki S., Shinmura T., Kawagoe Y. and Oshita S. 2006. Respiratory depression of shredded cabbage using xenon at atmospheric pressure, *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*, **8**, 1–11 (Manuscript FP05018).
- Meerwall E. V. and Ferguson R. D. 1981. Interpreting pulsed-gradient spin-echo diffusion

- experiments with permeable membrane, *J. Chem. Phys.*, **74**, 6956–6959.
- Miller S. 1961. A theory of gaseous anesthetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1515–1524.
- Miyawaki O., Abe T. and Yano T. 1992. Freezing and ice structure formed in protein gels, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 953–957.
- Mohr W. P. and Stein M. 1969. Effect of different freeze–thaw regimes on ice formation and ultrastructural changes in tomato fruit parenchyma tissue, *Cryobiology*, **6**, 15–31.
- Morris T. N. 1968. The freezing of fruits and vegetables historical and general, “*Low temperature biology of food stuffs* (Eds by Jawthorn J. and Rolfe E.)”, pp.285–298, Pergamon, Oxford.
- Morris G. J. and Clarke A. (Eds) 1981. Effect of low temperatures on biological membranes, Academic Press, London.
- Moudrakovski I. L., McLaurin G. E., Ratcliffe C. I. and Ripmeester J. A. 2004. Methane and carbon dioxide hydrate formation in water droplets: Spatially resolved measurements from magnetic resonance microimaging, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 17591–17595.
- Moyano P. C., Vega R. E., Bungler A., Garreton J. and Osorio F. A. 2002. Effect of combined processes of osmotic dehydration and freezing on papaya preservation. *Food Sci. Technol. Int.*, **8**, 295–301.
- Ohgaki K., Sugahara T., Suzuki M. and Jindai H. 2000. Phase Behavior of Xenon Hydrate System, *Fluid Phase Equilibria*, **175**, 1–6.
- Ohnishi S. and Miyawaki O. 2005. Osmotic dehydrofreezing for protection of rheological properties of agricultural products from freezing injury, *Food Sci. Technol. Res.*, **11**, 52–58.
- Ohnishi S., Fujii T. and Miyawaki O. 2003. Freezing injury and rheological properties of agricultural products, *Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 367– 371.
- Ohtsuka A., Watanabe T. and Suzuki T. 1994. Gel structure and water diffusion phenomena in starch gels studied by pulsed field gradient stimulated echo NMR, *Carbohydrate Polymers*, **25**, 95–100.
- Østergaard K. K., Tohidi B., Burgass R. W., Danesh A., Todd A.C. 2001. , Hydrate Equilibrium Data of Multi-Component Systems in the Presence of Structure-II and Structure-H Heavy Hydrate Formers, *J. Chem. Eng. Data*, **46**, 703–708.
- Oshita S., Seo Y., Kawagoe Y., Koreeda K. and Nakamura K. 1996. Extension of vase-life of cut carnations by structured water, *Acta Horticulturae*, **440**, 657–662.
- Oshita S., Seo Y. and Kawagoe Y. 1999. Relaxation time of protons in intracellular water of broccoli, *The Electronic Journal of CIGR*, **1**, October .

- Overloop K. and Gerven L. V. 1993. Freezing phenomena in adsorbed water as studied by NMR, *J. Magn. Res. Series A*, **101**, 179–187.
- Palta J. P., Levitt J. and Stadelmann E. J. 1977A. Freezing injury in onion bulb cells. I. Evaluation of the conductivity method and analysis of ion and sugar efflux from injured cells. *Plant physiol.*, **60**, 393–397.
- Palta J. P., Levitt J. and Stadelmann E. J. 1977B. Freezing injury in onion bulb cells. II. Post-thawing injury or recovery, *Plant physiol.*, **60**, 398–401.
- Palta J. P., Levitt J. and Stadelmann E. J. 1977C. Freezing tolerance of onion bulbs and significance of freeze-induced tissue infiltration, *Cryobiology*, **14**, 614–619.
- Pauling L. 1961. A molecular theory of general anesthesia, *Science*, **124**, 15–21.
- Rabergh, C. M. I. and Lipsky, M. M. 1997. Toxicity of chloroform and carbon tetrachloride in primary cultures of rainbow trout hepatocytes, *Aquatic Toxicol*, **37**, 169–182.
- Raftery D. 2006. Xenon NMR Spectroscopy, *Ann. Rep. NMR Spec.*, **57**, 207–270.
- Ripmeester J. A. and Ratcliffe C. I. N. 1989. Solid-state NMR studies of inclusion compounds, *Res. Counc. Can.*, NRCC, 1181–1189.
- Roy S. S., Taylor T.A. and Kramer H. L. 2001. Textural and ultrastructural changes in carrot tissue as affected by blanching and freezing, *J. Food Sic.*, **66**, 176–180.
- Sachas J. 1888. *Text book of Botany. Morphological and Physiological. Second Edition*, 998pp, Oxford University Press, London.
- Sakai A., Kobayashi S. and Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification, *Plant Cell Rep.*, **9**, 30–33.
- Salon E. D. and Koh C. A. (Eds). 2007. *Clathrate hydrate of natural gases 3rd*, 720pp, CRC press, New York.
- Sotome I., Oshita S., Kawagoe Y., Torii T. and Seo Y. 2004. Measurement of membrane hydraulic conductivity by a newly development method, *Transaction of the ASAE*, **47**, 1208–1213.
- Steponkus P. L., Dowgert M. F. and Gordon-Kamm W. J. 1983. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: The influence of cold acclimation. *Cryobiology*, **20**, 448–465.
- Tanner J. E. and Stejskal E. O. 1968. Restricted Self-Diffusion of Protons in Colloidal Systems by the Pulsed-Gradient, Spin-Echo Method, *J. Phys. Chem.*, **49**, 1768–1777.
- Tanner J. E. 1978. Transient diffusion in a system partitioned by permeable barriers. Application to NMR measurements with a pulsed field gradient. *J. Chem. Phys.*, **69**, 1748–1754.

- Taylor C. J., Millera K. T., Koha C. A. and Sloan E. D. 2007. Macroscopic investigation of hydrate film growth at the hydrocarbon/water interface, *Chem. Eng. Sci.*, **62**, 6524–6533.
- Thanatuksorn P., Kajiwaru K., Murase N. and Franks F. 2008. Freeze-thaw behavior of aqueous glucose solutions – the crystallization of cubic ice, *PCCP*, **10**, 5452–5458.
- Wang C. X., Pritchard J. and Thomas C.R. 2006. Investigation of the mechanics of single tomato fruit cells. *Journal of Texture Studies*, **37**, 597–606.
- Wang. C. X., Wang. L. and Thomas C. R. 2004. Modeling the mechanical properties of single suspension-cultured tomato cells. *Annals of Botany*, **93**, 443–453.
- Woessner D. E. and Gutowsky H. S. 1963. Nuclear Pure quadruple relaxation and its temperature dependence in solids, *J. Chem Phys.*, **39**, 440–456.
- Woessner D. E. 1961. Effects of diffusion in nuclear magnetic resonance spin-echo experiments, *J. Chem. Phys.*, **34**, 2057–2061.
- Woodroof J. G. 1938. Microscopic studies of frozen fruits and vegetables, *Georgia Agr. Expt. Sta. Bull.*, **201**, 3–46.
- Yoshino T., Sotome I., Ohtani T., Isobe S., Oshita S. and Maekawa T. 2000. Observations of xenon gas-treated barley cells in solution by atomic force microscopy, *Journal of Electron Microscopy*, **49**, 483–486.
- Zdunek A. and Umeda M. 2005. Influence of cell size and cell wall volume fraction on failure properties of potato and carrot tissue, *Journal of Texture Studies*, **36**, 25–34.
- Zhang M., Zhan Z. G., Wang S. J., and Tang J. M. 2008. Extending the shelf-life of asparagus spears with a compressed mix of argon and xenon gases, *LWT*, **41**, 686–691.
- Zhang Q., Matukawa S. and Watanabe T. 2004. Theoretical analysis of water  $^1\text{H T}_2$  based on chemical exchange and polysaccharide mobility during gelatin, *Food Hydrocolloids*, **18**, 441–449.
- 今堀義洋. 2002. 第3部各種食品に見る鮮度・品質創製の実際, “食品鮮度・食べ頃辞典(太田英夫・椎名武夫・佐々木敬卓 編)”, pp. 259–267, 株式会社サイエンスフォーラム, 東京.
- 市川収. 1966. 食品組織学-組織化学的食品構造論, 355pp, 光生館, 東京.
- 上平恒・逢坂昭 . 1991. 生体系の水, 208pp, 講談社, 東京.
- 大下誠一・橋本篤・瀬尾康久. 1996. 水の構造化による農産物の貯蔵(第1報), *農業機械学会誌*, **58**, 31–38.
- 大下誠一・M. A. ラハマン・川越義則・瀬尾康久・橋本篤. 1997. 水の構造化による農産物の貯蔵(第2報), *農業機械学会誌*, **59**, 29–35.

- 大西茂彦・宮脇長人. 2000. 農産物の凍結障害と力学物性および電気的物性, *低温生物工学会誌*, **46**, 99-102.
- 大越ひろ・神宮英夫. 2009. *食の官能評価入門*, 131pp, 光生館, 東京.
- 岡 小天. 1976. 物理化学選書7 レオロジー. 生物レオロジー, 76pp, 裳華房, 東京.
- 加藤舜郎・藤卷正生・田所吉忠. 1974. *冷凍食品ハンドブック*, 681pp, 光琳, 東京.
- 後藤隆久・松川隆・上園晶一・石黒芳紀・尾崎真・森田茂穂. 1999. キセノンは, 低体温性血管収縮反応の起さる閾値中枢温を, 亜酸化窒素やインフルランより低下させる, *日本麻酔学会第46回大会*, PD-0123, 札幌.
- 酒井昭. 2006. 植物細胞・組織・遺伝資源の超低温保存, “*植物超低温保存マニュアル* (新野考男・平井泰・松本敏一・田中大介 編)”, pp.1-16, 農業生物資源研究所, 茨城
- 鈴木徹. 2009. 第 1 章食品冷凍総論, *新版食品冷凍技術* (食品冷凍技術編集委員会 編), pp.1-17, 社団法人日本冷凍空調学会, 東京.
- 津志田藤二郎. 2003. *食品と劣化*, p.300, 光琳, 東京.
- 日本化学会編. 2006. 4章粉末回折, “*第5版実験化学講座11物質の構造 III回折*”, pp.175-226, 丸善, 東京.
- 農林水産省大臣官房統計部. 2009. *食品ロス統計調査報告(平成 19 年度)*, 236pp, 農林統計協会, 東京.
- 橋本篤・大下誠一. 1998. 疎水性ガス圧力下における食品モデル中の細菌の増殖抑制効果, *農業機械学会誌*, **60**, 83-88.
- 橋本篤・大下誠一. 1996. 水の構造化を利用した野菜の貯蔵, *農業機械学会誌*, **58**, 35-41.
- 松嶋卯月・大下誠一・瀬尾康久・川越義則・中村謙治. 1999. 切り花の呼吸速度および水収支の計測, *農業機械学会誌*, **61**, 49-55.
- 松嶋卯月・大下誠一・中西友子・松林政仁・瀬尾康久・川越義則. 2000A. カーネーション切り花内の水に対する無極性ガスの影響, *農業機械学会誌*, **62**, 70-78.
- 松嶋卯月・大下誠一・瀬尾康久・川越義則. 2000B. 無極性ガスを利用したカーネーション切り花の保存, *農業機械学会誌*, **62**, 73-80.
- 早川文代・井奥加奈・阿久澤さゆり・米田千恵・風見由香利・西成勝義・馬場康維・神谷かおる. 2006. 質問紙法による消費者のテクスチャー語彙調査, *日本食品科学工学会誌*, **53**, 327-336.
- 早川文代・井奥加奈・阿久澤さゆり・齋藤昌義・西成勝義・山野善正・神谷かおる. 2005. 日本語テクスチャー用語の収集, *日本食品科学工学会誌*, **52**, 337-346.
- 東京都立食品技術センター. 1998. *食品の微生物検査法 テクニカルガイド 3*, 70pp, 東京都立

- 食品技術センター発行, 東京.
- ファーラー T. C. ・ ベッカー E. D. (赤坂一久・元敏明 訳). 1976. *パルスおよびフリーエ変換 NMR*, 215 pp, 吉岡書店, 京都.
- フランク F. (村瀬則郎, 片桐千仞 訳). 1989. *低温の生物物理と生化学*, 253pp, 北海道大学図書刊行会, 北海道.
- 宮脇長人. 1998. 凍結食品における氷結晶の状態制御とその応用, *低温生物工学会誌*, **44**, 43-50.
- 山中英明・藤井建夫・塩見一雄. 2007. *食品衛生学第二版*, 270pp, 恒星社厚生閣, 東京.
- 山室修・菊地龍弥. 2009. クラスレート・ハイドレート生成に関わる水の局所構造とダイナミクス, *表面科学*, **30**, 168-173.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、多くの方々からご指導、ご助言、激励を頂きました。ここに心より感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻の大下誠一教授には、指導教官として、本研究を行う機会を与えて頂き、適切にご指導・ご助言を頂きました。

東京海洋大学海洋部学科食品生産学科の鈴木徹教授には、学部・修士から東京大学大学院への移籍後の長きに渡って、親身にご指導・ご助言頂きました。

石川県立大学生物資源環境学部の宮脇長人教授には、学会などの活動を通じて適切にご指導・ご助言を頂きました。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻の牧野義雄准教授ならびに川越義則助教には、常に身近な立場から適切にご指導・ご助言を頂きました。また、同専攻の横山伸也教授ならびに塩沢昌教授には、本論文の内容に関して多大なご教授を頂きました。

東京海洋大学海洋科学部食品生産学科の福岡美香准教授ならびに松川真吾准教授には、NMR に関する研究を行うにあたり、適切にご指導・ご助言を頂きました。また、同学科の渡邊学准教授にも、適切にご指導・ご助言を頂きました。

北海道大学大学院工学研究科応用物理学専攻の内田努准教授には、ガスハイドレートに関する研究を行うに当たり、様々な観点より適切にご指導・ご助言を頂きました。

産業総合研究所の竹谷敏研究員には、突然の申し入れにもかかわらず、粉末 X 線回折測定にご協力頂き、適切にご助言を頂きました。また、横浜市立大学総合理学研究科の横山晴彦教授には、X 線回折測定を行うに当たり、多大なる時間を割き、その原理や実験方法に関して適切に指導・ご助言を頂きました。

東京大学大学院 農学生命科学研究科 生物・環境工学専攻生物プロセス工学研究室の秘書目時美穂子氏には、研究活動を円滑に行うための様々なフォローをして頂きました。また、東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻生物プロセス工学研究室ならびに東京海洋大学海洋科学部食品生産学科の工学系の研究室に所属されておりました、諸先生・先輩・後輩の方々には、様々な場面でご指導・ご助言をおしみなくして頂きました。最後に、私事で恐縮ですが、研究活動を行うにあたり、金銭的な援助をしてくれた家族やつまらない愚痴を聞いてくれた友人たちにも感謝の意を表します。

ここに書ききれない多くの人々の支えによって、本論文は完成するに至りました。重ねて心からお礼申し上げます。

平成 22 年 1 月 安藤寛子