

低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], Vol. 52, No. 1, 1~5, 2006

[原著論文]

## NMR を用いた生鮮植物組織の凍結・解凍における水透過性変化の評価

<sup>1</sup>東京海洋大学海洋科学技術研究科, <sup>2</sup>石川県立大学生物資源環境学科  
安藤 寛子<sup>1</sup>, 福岡 美香<sup>1</sup>, 宮脇 長人<sup>2</sup>, 鈴木 徹<sup>1</sup>

### Self-diffusion of Water Molecules in Vegetable Tissues before and after Freeze-thawing

Hiroko ANDOU<sup>1</sup>, Mika FUKUOKA<sup>1</sup>, Osato MIYAWAKI<sup>2</sup> and Toru SUZUKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science  
and Technology, Minato-ku, Tokyo, 4-5-7, Japan*

<sup>2</sup>*Department of Food Science, Isikawa Prefectural University, Nonosimatimatumura,  
Isikawa-gun, Isikawa, 1-308, Japan*

When fresh vegetable tissues are subjected by freeze-thaw treatment, the texture dramatically changes softening. However, the mechanism has been still ambiguous. In this study, the restricted diffusion of water molecules in the onion tissues before and after freezing was measured using NMR (Nuclear magnetic resonance) technique. Further, the onion tissues were subjected by chloroform treatment to destroy cell membrane. From the NMR data and the cell size information observed by optical microscopic method, the water permeability inter cells for the fresh, freeze-thawed, and chloroform treatment tissues samples were calculated and compared. The results showed that the water permeability for fresh onion tissue is significantly lower, but the permeability for freeze-thawed and chloroform samples become higher considerably. On the other hand, the microscopic observation result did not show any damage in their tissue structures. From these results, it is suggested that texture changes for onion tissue after freeze-thawing would be caused by increasing in the cell membrane permeability of water, rather than in the cell wall. (Received Oct. 17, 2005; Accepted Jan. 26, 2006)

#### 緒 言

近年では凍結による組織軟化は細胞膜変化が主要な原因の1つであるとする説が提唱されている<sup>1)</sup>。すなわち、植物組織は細胞膜の水透過性が低いため

[Key words: NMR, Optical microscopy, Freeze-thawing, Water permeability, Onion tissue; NMR, 光学顕微鏡, 凍結・解凍, 水透過性, タマネギ]

細胞内に水分を保ちその構造を保っているものの、凍結・解凍後細胞膜の水透過性が増大し、組織のいわゆる“はり”がなくなると考えられてきた。植物細胞膜の水透過性測定については、分離体プロトプラストを用いた誘電率測定<sup>2)</sup>などが用いられてきた。しかし、植物組織体としての水透過性変化については詳細に検討されておらず、組織体として凍結・解凍後の水透過性の変化が直接細胞膜の変化に対応しているかは不明確である。本研究では組織を非破

(2)

壊で使用できる NMR の利用を試みた。

本研究で用いる NMR 手法は水分子の拡散情報から構造の把握を行う手法であり、細胞などの閉鎖系では、細胞サイズに応じて水分子の自己拡散が制限される制限拡散が観測されるため、いわゆる細胞の構造変化を把握できる。このような手法は植物においては植物熟成過程における水分子の組織内、細胞間の透過性に対する評価<sup>3)</sup>や凍結・解凍後組織の水分子拡散挙動の把握などにも用いられてきた<sup>4)</sup>。しかし、凍結・解凍前後での組織の水透過性変化に関しては詳細な適用例は少ない。

本研究では特に、NMR 測定と光学顕微鏡観察を組み合わせることで、凍結・解凍における組織の水透過性変化を比較検討した。また、クロロホルムを用いた細胞膜除去処理組織を同時に測定することで凍結・解凍における組織変化の原因部位の特定も試みた。

## 材料および方法

### 1. 試料

試料には北海道産タマネギ *Allium cepa* L., 約 300g を使用した。タマネギは鱗葉が幾重にも重なった構造をしているため、本研究では最も中心部の鱗葉を試料とした。

#### 1-1. 顕微鏡観察用試料の調製

タマネギ組織を Fig. 1 のように厚さ 0.5mm に切り出し、生鮮試料とした。凍結・解凍後の試料及び細胞膜除去処理試料については生鮮試料観察後、後に述べるそれぞれの処理を施した。

#### 1-2. NMR 用試料の調製

##### a) 生鮮及び凍結・解凍後試料

タマネギ組織を Fig. 1 のように 3.0mm 四方、長さ 1.0cm に切り出し、これを生鮮組織とした。成型した生鮮試料を -18°C 凍結庫内で 1 週間凍結、室温で解凍したものを凍結・解凍後試料とした。

##### b) ドリップ試料

凍結・解凍後試料を遠心管(10ml, Diam 15mm, L 80mm)に入れ、遠心器(RS-18G1 トミー精工)にて遠心分離を行った(0°C, 30 分, 100443×g<sup>5)</sup>。この操作によって得られた溶液をドリップ試料とした。

##### c) 細胞膜除去処理試料の調製<sup>6)</sup>

Fig. 2 の様に密閉容器にクロロホルム及び蒸留水

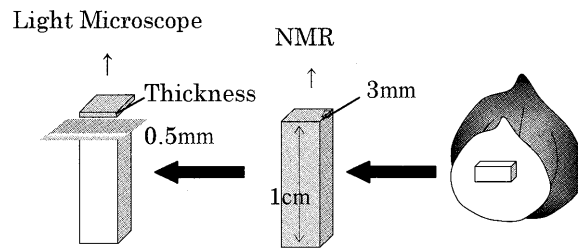


Fig. 1. Preparation of the test piece for light microscope and NMR experiments.

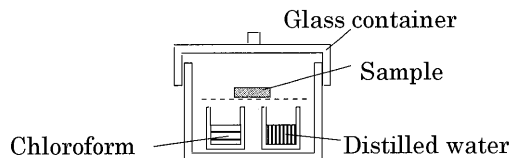


Fig. 2. The apparatus for chloroform treatment.

をそれぞれ 30ml ずつ 50ml ビーカーに入れ 25°C のウォーターバスに 1 日間放置した。このようにしてクロロホルム蒸気で満たされた容器の中に、成型した試料を入れ 3 時間放置した。

### 2. 方法

#### 2-1. 光学顕微鏡観察

生鮮と凍結・解凍後組織の観察については、光学顕微鏡 (BX51 OLYMPUS) に低温ステージ (LK-600PMS, L-600A ジャパンハイテック) を取り付け、ステージ内で生鮮組織を観察撮影後、同組織を -5°C/min で -18°C まで凍結し、5°C/min で解凍し、再び観察撮影を行った。

細胞膜除去処理組織の観察には、細胞膜除去処理を施した後、1% サフラン水溶液で数秒間染色し観察撮影を行った。

#### 2-2. NMR を用いた拡散係数の測定<sup>7)</sup>

制限拡散の測定は NMR (Bruker 社 AM200WB) を用いたスティミュレティッドエコー法で行った。スティミュレティッドエコー法のパルスシーケンスを Fig. 3 に示す。

磁場勾配が与えられた場合および、与えられない場合に得られるエコー強度の比  $R$  は、次式(1)で表せる。

$$\ln(R) = -D(\gamma\delta G)^2(\Delta\delta/3) \quad (1)$$

( $R$ :エコー強度比,  $D$ :拡散係数[cm<sup>2</sup>/s],  $\gamma$ :磁気回

転比[Hz/Gauss],  $\delta$ :磁場勾配パルス幅[ms],  $\Delta$ :二つの磁場勾配パルスの間隔(拡散時間に相当),  $G$ :磁場勾配の大きさ[Gauss/cm]

拡散を観察している水の緩和時間が1成分であることを確認後, 拡散時間 $\Delta$ を一定として磁場勾配の大きさ $G$ を変化させた測定を行い,  $(\gamma\delta G)^2(\Delta-\delta/3)$ 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時間 $\Delta$ における見かけの拡散係数  $D[\text{cm}^2/\text{s}]$ を求めた。ただし, 拡散時間( $\Delta$ ), 磁場勾配( $G$ )はそれぞれ, 19.5~1210.0[ms], 3.0~37.8[Gauss/cm]の範囲で測定を行った。また, 測定時の温度は約 20°Cで,  $\gamma$ は 1 H の磁気回転比で 4258[Hz/Gauss]とした。

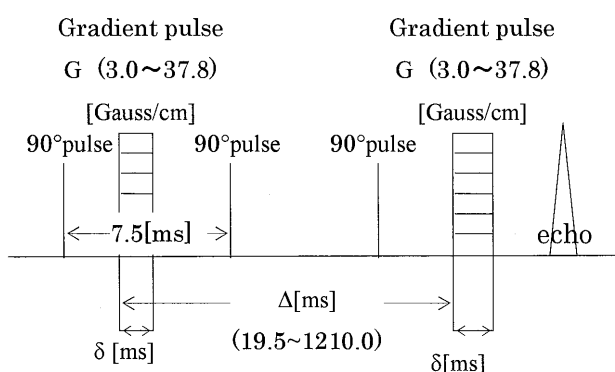


Fig. 3. Stimulated echo pulse sequence.

## 結果および考察

### 1. 顕微鏡観察

#### 1-1. 生鮮及び凍結・解凍後組織

Fig. 4 に示すように凍結・解凍後組織では若干ではあるが細胞壁・細胞膜の辺りが厚くなるという変化が観察された。しかし, 従来言われているような細胞破壊や細胞膜の変化<sup>9)</sup>は観測されなかった。細胞サイズにも変化は見られず, 約 150 $\mu\text{m}$ であった。

このように光学顕微鏡観察において, 細胞に大きな変化が見られないことは光学顕微鏡の解像度の問題と考えられる。電子顕微鏡観察によっては凍結・解凍による膜融合<sup>9)</sup>などの変化が報告されており, さらに小さなスケールで細胞は変化しているとも考えられる。しかし, 電子顕微鏡観察においても凍結・解凍が組織のどの部分に, どのように影響を与えるかを明確にするには至っていない。

#### 1-2. 細胞膜除去処理組織

細胞膜除去処理組織についても細胞に大きな変化は観察されなかった(Fig. 5)。本研究では細胞壁を赤く染色するサフラニン染色液で細胞壁を染色してあるため, 処理後も細胞壁が残っていることが確認された。

クロロホルムは細胞膜リン脂質に作用し細胞膜を変化・除去させる手法として, 主に動物細胞に用いられてきた<sup>10)</sup>。近年, この方法は植物組織の細胞膜除去にも使われており, 細胞膜除去後の組織のレオロジー的な変化が観測されている<sup>6)</sup>。また, 細胞壁は高分子をも浸透させる構造であると言われており<sup>11)</sup>, 本研究において処理後, 細胞内の核が処理前に比べて強く染色されていることから細胞膜が除去処理されサフラニン液が内部に浸透したと考えられる。

以上からクロロホルム処理では, 細胞膜が除去されたにも関わらず細胞サイズ(約 150 $\mu\text{m}$ )や見かけ上閉鎖的な構造は変化のない状態であると言える。

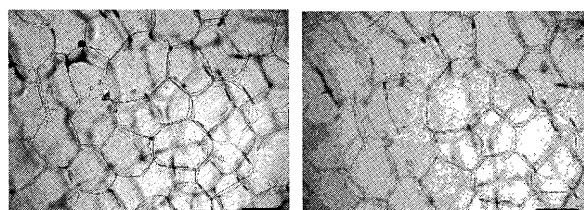


Fig. 4. Microscopy image of fresh and freeze-thawing onion tissues. Scale bar=100 $\mu\text{m}$

(a) Fresh (b) Freeze-thawed

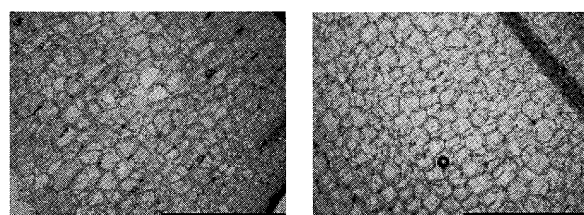


Fig. 5. Microscopy image of after chloroform treatment onion tissues. Scale bar=500 $\mu\text{m}$

(a) Fresh (b) Chloroform treatment

### 2. NMR による拡散係数の測定

NMR による拡散係数の測定において細胞などの閉鎖的系では拡散観測時間( $\Delta$ )の増加に伴って見か

(4)

けの拡散係数が減少する制限拡散現象が観察される。

本研究においても Fig. 6 に見られるように生鮮組織では  $\Delta$  の増加とともに拡散係数が減少し、約 1000[ms] の拡散時間で一定 ( $0.73 \times 10^{-5} [\text{cm}^2/\text{s}]$ ) となる典型的制限拡散が観察された。これに対して、凍結・解凍後組織では拡散係数の減少はゆるやかになり、水分子に対する制限が弱くなった事を示していた。また、細胞膜除去処理組織においても凍結・解凍後組織とほぼ同様、弱い制限拡散を示すことがわかった。さらにドリップ試料については、時間に寄らず常に一定の拡散係数となっており、制限拡散は組織液の性質によるものではなく細胞構造に由来していることが推察される。

以上のことより、凍結・解凍後及び細胞膜除去処理組織においては細胞膜の機能が消失するため、細胞内の水分子は組織内を自由に拡散できるようになったと考えられる。一方、顕微鏡観察においては細胞膜除去処理後も細胞壁が存在していることが明らかであり、凍結・解凍後及び細胞膜除去処理組織がドリップ試料と比較して、若干ではあるが制限拡散が見られるのは細胞壁の影響があると考えられる。

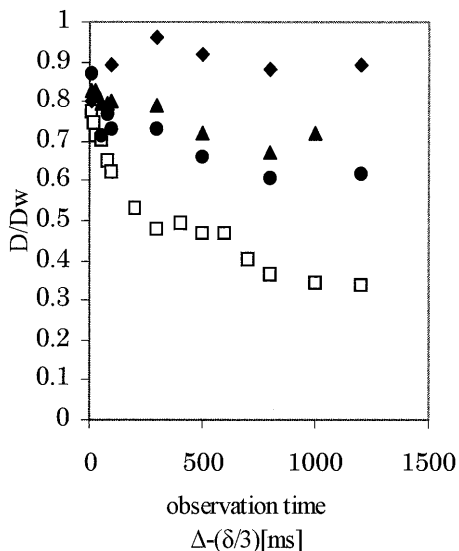


Fig. 6. The diffusion coefficient of water in fresh and some treatment onion tissues.

□: Fresh tissue, ●: Chloroform treatment,  
▲: Freeze-thawed treatment, ◆: Drip

### 3. 水透過係数の算出

植物組織の水透過係数を前述(拡散係数- $\Delta$ )のデ

ータから求めることができる。生鮮植物組織についてはこれまでも報告がある<sup>3,4)</sup>。その多くは、水透過係数と細胞サイズの両者を未知数として NMR データから推定している。このため、凍結・解凍後試料のように制限拡散が弱くなると、細胞サイズを正確に測定できなくなる可能性が高い。しかし、光学顕微鏡観察結果を組み合わせることで、生鮮組織においても、凍結・解凍後の組織においても水透過係数を正確に求められると考えられる。そこで、本研究では光学顕微鏡観察と NMR 測定を組み合わせることで水透過係数の評価を行った。

今、組織構造がある程度浸透しうる障壁で仕切られた閉鎖的構造であると仮定し、 $\Delta$  を無限大とした場合における拡散係数  $D_t$  は式(2)によって表せられる<sup>12)</sup>。

$$1/D_t = 1/D_0 + 1/(p \cdot a) \quad (2)$$

( $D_t$ :  $\Delta$  が無限大である場合の拡散係数 [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ],  $D_0$ :  $\Delta$  が非常に短い場合の拡散係数 [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ],  $p$ : 水透過係数 [ $\text{cm}/\text{s}$ ],  $a$ : 障壁間距離 [ $\text{cm}$ ])

ここで、生鮮タマネギ組織の場合、光学顕微鏡観察の結果から  $a = 150 [\mu\text{m}]$ , NMR 測定結果から得られた  $D_t = 0.73 \times 10^{-5} [\text{cm}^2/\text{s}]$ ,  $D_0 = 1.67 \times 10^{-5} [\text{cm}^2/\text{s}]$  を式(2)代入し、水透過係数  $8.70 \times 10^{-4} [\text{cm}/\text{s}]$  が得られた。NMR 測定による他の生鮮植物組織の水透過係数、約  $10^{-3} [\text{cm}/\text{s}]$ <sup>3)</sup> であることから本方法で求められた値は妥当であると考えられる。

凍結・解凍後組織についても同様に水透過係数を求めたところ、 $1.20 \times 10^{-2} [\text{cm}/\text{s}]$  ( $D_t = 1.76 \times 10^{-5} [\text{cm}^2/\text{s}]$ ,  $D_0 = 1.60 \times 10^{-5} [\text{cm}^2/\text{s}]$ ) を得られ、凍結・解凍後の水透過係数の増大が定量的に捉えられた。

## 結 論

本研究では、NMR を用いた拡散係数の測定から凍結・解凍後にタマネギ組織内の水分子の拡散制限が弱まることわかった。また、細胞膜除去処理を行った組織において組織内の水分子の拡散挙動が凍結・解凍後組織とほぼ一致することから、凍結・解凍における組織変化の原因が細胞膜の水透過性の変化にあることが明らかとなった。さらに、細胞間水透過係数を算出することによって定量的に評価可能となり、凍結・解凍後組織では生鮮組織と比べて約 1 桁の増加が確認された。

以上から、タマネギ組織を凍結・解凍することで細胞膜に変化が起き、細胞内に留まっていた水分が細胞外へ容易に流出できるようになり、生鮮組織の“張り”が失われ、軟化した状態になるとする説の妥当性が裏付けられたものと考えられる。

## 文 献

- 1) 宮脇長人：凍結食品における氷結晶状態制御とその応用, 低温生物工学会, **44**, 43-50 (1998)
- 2) Ishikawa, E., Bae, S. K., Miyawaki, O., Nakamura, K., Shiinoki, Y. and Ito, K.: Freezing injury of cultured rice cells analyzed by dielectric measurement, *J. Food Engng.*, **83**, 222-226 (1997)
- 3) Anisimov, A. V., Sorokina, N. Y. and Dautova, N.R.: Water Diffusion in Biological porous systems ; a NMR approach, *Magnetic Resonance Imaging*, **16**, 565-568 (1998)
- 4) 上田直康, 田尻明日香, 椎木靖彦：冷解凍処理によるニンジン微細構造特性の変化, 日本食品科学工学会大会講演集, **46**, 153 (1999)
- 5) Inoue, C. and Ishikawa, M.: Glass transition of tunaflesh at low temperature and effects of salt and moisture, *J. Food Sci.*, **62**, 496-499 (1997)
- 6) Ohnishi, S., Fujii, T. and Miyawaki, O.: Freezing injury and rheological properties of agricultural products, *Food Sci. Tech. Res.*, **9**, 367-371 (2003)
- 7) 大章宏：NMRによる多糖類ゲルの構造及び内部の水の運動性に関する研究, 東京水産大学大学院水産学研究科博士論文 (1994)
- 8) 上村松生, 富永陽子, 鎌田崇, 中川原千早, 河村幸男, 小島研一：細胞の凍結適応, 低温生物工学会, **50**, 15-20 (2004)
- 9) Yamada, T., Kuroda, K., Jituyama, Y., Takezawa, D., Arakawa, K. and Fujikawa, S.: Role of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing, *Planta*, **215**, 770-778 (2002)
- 10) Råbergh, C. M. I. and Lipsky, M. M.: Toxicity of chloroform and carbon tetrachloride in primary cultures of rainbow trout hepatocytes, *Aquatic Toxicol.*, **37**, 169-182 (1997)
- 11) Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D. and Delmer, D. P.: Determination of the pore size of cell walls of living plant cells, *Science*, **205**, 1465-1467 (1979)
- 12) Tanner, J. E.: Transient diffusion in a system partitioned by permeable barrier, Application to NMR measurements with a pulsed field gradient, *J. Chem. Phys.*, **69**, 1748-1754 (1979)