

大気圧低温プラズマによる大豆表層の改変と 大豆加工品製造における活用

京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科
井沢 真吾

プラズマは、気体、液体、固体に次ぐ物質の第四の状態であり、電離してイオン化した気体として定義される。大気圧低温プラズマ (cold atmospheric pressure plasma, CAP) は、大気圧かつ常温で発生させることができるプラズマであり、その発生にはコロナ放電や誘電体バリア放電などを用いるのが一般的である。発生したプラズマは反応性が高いため、周囲の窒素や酸素、空気中の水蒸気などと反応し、高エネルギーの活性種（活性酸素種：ROS や活性窒素種：RNS など）が発生する (Šimončicová *et al.*, 2019)。CAP による処理は、これらの高エネルギーの活性種が生体や細胞に作用することで様々な効果をもたらす。また、用いるガス種によって生成される活性種は異なり、CAP 処理においてどのようなガスを用いるかは重要な要素の一つである。CAP は物質表面をナノメートルレベルで削るエッティング効果と親水基を増加させる効果を持つため、これまで主として半導体製造などをはじめとする工業分野で利用してきた。

近年、農業分野や食品加工分野においても CAP が注目されている。例えば、微生物の殺菌・静菌 (Niedzwiedź *et al.*, 2019) や食品の保存 (Starek-Wójcicka *et al.*, 2022) などへの応用研究が活発となっている。当研究室でも、真菌類に対する殺菌効果や、残留農薬の分解について、CAP 処理の効果を報告している (Itooka *et al.*, 2016; Itooka *et al.*, 2018; Fukuda *et al.*, 2019; Fukuda *et al.*, 2023)。CAP は発生装置も比較的小規模であり、少ないエネルギーとコストでプラズマを発生させることが出来るほか、熱変性を起こさないという利点を持つ。また、CAP による作用は、短寿命の活性種によって引き起こされるため、残留農薬に代表されるような有害物質が残留する問題も起こりにくい (Misra *et al.*, 2019)。これらの性質から、CAP 処理は農業・食品加工分野において、魅力的な技術であると言える。

一例として、環境への影響が少ない野菜や果物の種子消毒方法として、CAP 処理による殺菌方法が提案されている。植物病原菌は主に種皮に存在し苗に病気を引き起こすことから、殺菌剤や消毒剤などによる種子の化学的消毒処理が一般的に行われているが、使用する薬剤によっては環境に対して大きな影響を与えうる。これに代わる方法として、CAP 照射によって種子表面の病原菌を殺菌・静菌することが導入されている (Misra *et al.*, 2019)。さらに、CAP 照射は種子の吸水性を高め、発芽までの日数を短縮し、最終的な収量を増加する効果があることが報告されている。種子の発芽率の向上は、それ以降の植物生産効率を左右するものであり、発芽率の低い植物種子の発芽率改善手段としても CAP が注目を集めている。これまでに、コムギ、レンズ豆、ダイコン、トマト、ピーマン、朝鮮人参などの種子において、CAP 照射による発芽・発根率改善効果が報告されている (Bormashenko *et al.*, 2012; Sivachandiran *et al.*, 2017; Billah *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2021)。しかし、CAP 照射による発芽促進の詳しい作用機序は十分に解明されていないのが現状であり、発芽率が低下したという報告も存在する (Lee *et al.*, 2021; Priatama *et al.*, 2022)。

他にも、CAP の高い反応性を生かすことで、難分解性の有害物質や残留農薬を分解

することが可能である。マイコトキシンは加熱処理では分解できないものが多いが、CAP 処理による効率的な分解が報告されている。他にも、残留農薬である有機リン系殺虫剤であるダイアノジンやクロルピリホスは、CAP 処理によってほぼ完全に分解される (Mousavi *et al.*, 2017)。また、柑橘類のポストハーベスト農薬として広く用いられているチアベンダゾールも CAP 処理によって分解される (Fukuda *et al.*, 2023)。これらの分解効果とは対照的に、果実や野菜の糖度、水分含有量、食感、外観は CAP 処理の影響をほとんど受けない (Henselová *et al.*, 2012; Fukuda *et al.*, 2023)。

これらの背景を踏まえ、本研究では CAP による大豆の親水性・吸水効率向上のメカニズム解明に取り組むとともに、調理・加工工程などへの影響を検討し、大豆加工品製造における CAP の新たな有用性を検証した。

【実験方法】

CAP 発生装置

CAP 発生装置として電源 (PRAG-01PW)、ガス流量調節機 (PRAG-01GR)、ステンレス平行棒電極 (PRAG-PRE02、外径 4.0 mm、長さ 30.0 mm) からなる誠南工業製 PRAG システムを用いた。電極間に石英ガラス管 (外径 4.0 mm、内径 2.0 mm、長さ 85 mm) を挟み、8.0 kV の電圧を 16 kHz で印加してバリア放電を発生させた。供給ガスには窒素ガスまたは空気を用い、0.5 標準リットル/分 (slm) の流量で石英ガラス管に導入した。噴射口の先端と被照射物の表面までの距離は 1.0 cm とした。

プラズマ活性化水 (plasma activated water, PAW) は、9 cm 径シャーレに滅菌蒸留水を 12 mL ずつ加え、CAP を 20 分間照射して作製した。

材料

大豆は 2022 年度、2023 年度北海道産ダイズを大和雑穀株式会社より購入し使用した。大豆を CAP 処理後、6 時間蒸留水に浸漬後、圧力釜で煮沸し、納豆菌を噴霧して 37°C でインキュベートして納豆製造を行った。納豆菌は、市販の納豆から単離した研究室保存のものを用いた。PAW の過酸化水素濃度と硝酸態窒素濃度は WAK-H2O2 と WAK-NO3 (いずれも共立理化学研究所製) をそれぞれ用いて測定した。

電子顕微鏡観察

分析走査型電子顕微鏡 JSM-6510A (日本電子株式会社製) を用いて、コントロール群と CAP 処理群の大さわぎ表面および外皮を観察した。

発芽・発根誘導条件

CAP 照射後の大豆および種子をキムワップで包み、9 cm 径シャーレ内で 12 mL の蒸留水または PAW を注いで吸水を開始した。28°C でインキュベートし、24 時間おきに発

芽率・発根率を測定・算出をした。

【実験結果及び考察】

大豆の吸水に対する CAP 照射の影響

植物種子に対する CAP 照射は、エッティング効果により種子表面に変化を引き起こし、吸水率と発芽率の向上をもたらすことが知られている。そこで、大豆粒に CAP を照射した場合の影響を検討した。

照射距離 1 cm で大豆粒に 10 分間 CAP 照射を行ったところ、大豆表面の親水性(撥水性)に大きな変化が生じた。CAP 照射前の大豆粒は撥水性が高く、表面に蒸留水を乗せた場合も水滴の形状を維持したが、CAP 照射後は撥水性が低下し、乗せた水は水滴を維持することなく大豆表面に拡散した(図 1)。半導体用基板の表面処理と同様に、大豆粒表面の親水性が向上したと考えられた。親水性基としてカルボキシル基および水酸基の定量を化学分析で試みたが、大豆表層に限定した分析が困難であり信頼性に欠けた結果しか得られなかった。現在、所属機関研究者の協力のもと、赤外分光光度計での解析を準備中である。また、CAP 処理によって生じた大豆表面構造の変化を、走査型電子顕微鏡で検討した(図 2)。CAP 照射によって大豆の外皮および大豆粒表面に凹凸や割れ目・穿孔などが生じ、表面のキメが粗くなる構造変化が認められた。

次に、大豆表面の親水性の向上が、吸水率にも影響するか検証を行った。蒸留水への浸漬開始後の初期段階(～60 分間)で、吸水効率に CAP 照射の有無による大きな違いを確認することができた(図 3)。しかし、数時間後には CAP 照射の有無による差はほとんどなくなり、豆腐・納豆などの実際の製造過程における浸漬処理時間の短縮効果やメリットを確認することはできなかった。

また、大豆 50 g を 200 mL の蒸留水に 6 時間浸漬した際の浸漬液の色は、CAP 照射の有無による有意な違いが見られた(図 4)。それぞれの濁度(OD_{600})は、CAP 照射なしの大豆浸漬液が 0.92 ± 0.08 だったのでに対し、CAP 照射後の大豆浸漬液は 1.64 ± 0.25 ($n=3$) であった。加えて、CAP 照射を行った大豆の浸漬液には、糖およびアミノ酸・タンパク質が高いレベルで含まれていることが、フェノール硫酸法およびニンヒ

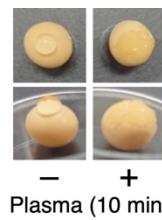


図1. CAP照射による大豆表面の親水性の向上

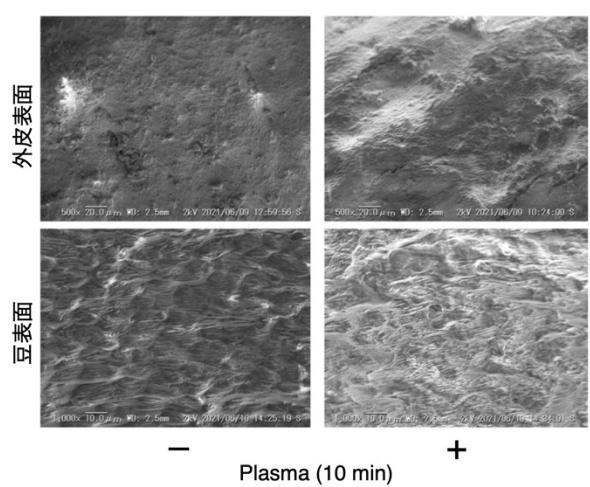


図2. CAP照射による大豆表面の変化

ドリン反応法で確認された。この結果は、CAP 照射後の大豆は吸水効率が高い一方で、内容成分の漏出も促進されることを示唆している。実際に、6 時間浸漬後の大豆を使って煮大豆および納豆を作成したところ、CAP 照射した大豆を使った煮大豆や納豆では「うまみに乏しい」「調味料の味が強くなる」などの悪影響が認められた。また、特に味付けをしない状態の煮大豆でも、CAP 照射の有無によって味の違いが認められた。以上の結果から、水で戻す工程を必要とする納豆などの大豆加工において、CAP 照射の有用性は認められなかった。

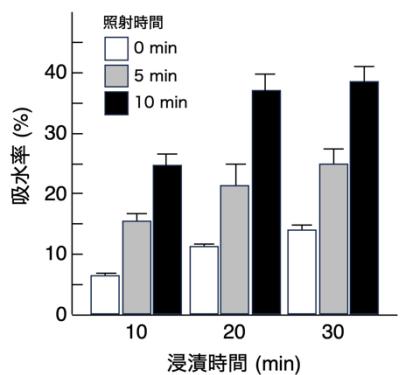


図3. CAP照射による吸水効率の向上

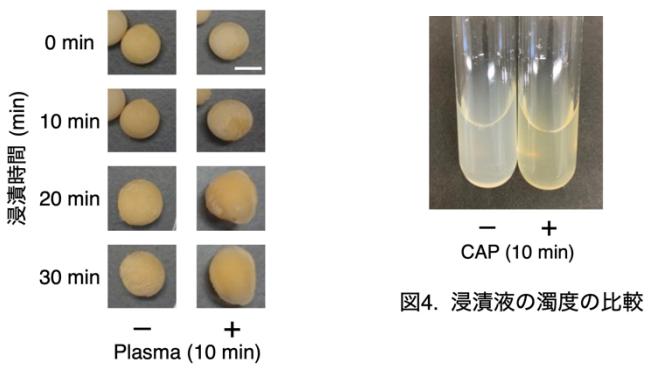


図4. 浸漬液の濁度の比較

CAP 照射および PAW による大豆発根率の改善

いくつかの種子は、CAP 照射によって発芽効率が改善することが報告されている (Bormashenko *et al.*, 2012; Sivachandiran *et al.*, 2017; Billah *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2021)。また、CAP を照射したプラズマ活性化水 (PAW) を発芽誘導条件に用いることも、発芽効率の改善に役立つことが確認されている (Sivachandiran *et al.*, 2017)。そこで、CAP 及び PAW によって大豆の発根効率は改善するか検討を行った。

作成した PAW は、 $\text{pH } 3.3 \pm 0.1$ 、硝酸イオン濃度 $82 \pm 1.4 \text{ ppm}$ 、硝酸態窒素濃度 $17.4 \pm 0.6 \text{ ppm}$ 、過酸化水素濃度 $37.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$ であり、蒸留水と比べて高い ROS・RNS 含有率を示した。なお、 28°C で放置した場合、PAW 中の過酸化水素は 24 時間後にはほぼ消失したが、pH および硝酸イオン・硝酸態窒素の濃度は少なくとも 1 ヶ月間維持された。

CAP を 5 分間照射後、蒸留水または PAW で吸水を行い、発根を誘導した。24 時間後の発根率を比較した結果、CAP と PAW をそれぞれ単独で処理した場合にも有意な発根率の改善が認められたが、両者を併用した際にはさらに大きな改善効果が認められた (図 5)。現在、CAP と PAW で処理した際に誘導される発根誘導関連因子の同定に取り組んでいる。分子生物学的手法で、アブシジン酸やジベレリン、抗酸化酵素などのレベルを制御する関連遺伝子の発現を転写レベルで解析とともに、誘導される未同定遺伝子のスクリーニングを継続中である。

同様の実験をほうれん草、ニンジン、春菊の種子に対しても行ったところ、ほうれん草と

ニンジンについては、顕著な発芽率向上効果が確認された。ほうれん草やニンジンの種子は発芽率が低く、効率的な栽培の障害となっており、これらの種子に対しては実際の栽培においても有用性が認められた(論文投稿準備中)。

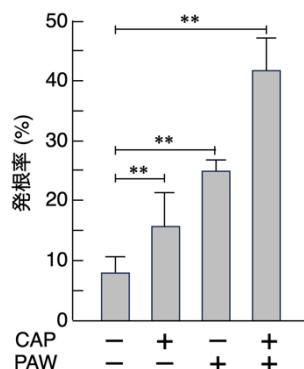


図5. CAPおよびPAWによる大豆発根率の向上

【要約】

1. CAP 照射により大豆表面構造の変化が認められ、吸水処理の初期段階には吸水効率の有意な向上が認められた。
2. CAP 照射は大豆の吸水率向上とともに、大豆内部の成分が浸漬水へと漏出する効率も上昇することが観察された。そのため、CAP 処理を行った大豆を用いた納豆や煮豆では味の劣化が認められた。
3. CAP 照射や PAW により、大豆や発芽率の低い野菜種子の発芽・発根率が向上することが明らかとなった。

【謝辞】

本研究遂行にあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 タカノ農芸化学研究助成財団に厚く御礼申し上げます。

【文献】

- Billah M, Sajib SA, Roy NC, Rashid MM, Reza MA, Hasan MM, and Talukder MR. Effects of DBD air plasma treatment on the enhancement of black gram (*Vigna mungo* l.) seed germination and growth. *Arch Biochem Biophys.* **681**:108253 (2020).
- Bormashenko E, Grynyov R, Bormashenko Y, and Drori E. Cold radiofrequency plasma treatment modifies wettability and germination speed of plant seeds. *Sci Rep.* **2**:741 (2012).
- Fukuda S, Kawasaki Y, and Izawa S. Ferrous chloride and ferrous sulfate improve the fungicidal efficacy of cold atmospheric argon plasma on melanized *Aureobasidium pullulans*. *J Biosci Bioeng.* **128**:28–32 (2019).
- Fukuda S, Sakurai Y, and Izawa S. Detoxification of the post-harvest antifungal pesticide thiabendazole by cold atmospheric plasma. *J Biosci Bioeng.* **136**:123–128 (2023).
- Henselová M, Slováková L, Martinka M, and Zahoranová A. Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. *Biologia.* **67**:490e7 (2012).

- Itooka K, Takahashi K, and Izawa S. Fluorescence microscopic analysis of antifungal effects of cold atmospheric pressure plasma in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **100**:9295–9304 (2016).
- Itooka K, Takahashi K, Kimata Y, and Izawa S. Cold atmospheric pressure plasma causes protein denaturation and endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **102**:2279–2288 (2018).
- Lee Y, Lee YY, Kim YS, Balaraju K, Mok YS, Yoo SJ, and Jeon Y. Enhancement of seed germination and microbial disinfection on ginseng by cold plasma treatment. *J Ginseng Res.* **45**:519–526 (2021).
- Misra NN, Yadav B, Roopesh MS, and Jo C. Cold plasma for effective fungal and mycotoxin control in foods: mechanisms, inactivation effects, and applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **18**:106–120 (2019).
- Mousavi S M, Imani S, Dorranian D, Larijani K, and Shojaee M. Effect of cold plasma on degradation of organophosphorus pesticides used on some agricultural products. *J Plant Protect Res.* **57**:26–35 (2017).
- Niedźwiedź I, Waśko A, Pawłat J, and Polak-Berecka M. The state of research on antimicrobial activity of cold plasma. *Pol J Microbiol.* **68**:153–164 (2019).
- Priyatama RA, Pervitasari AN, Park S, Park SJ, and Lee YK. Current advancements in the molecular mechanism of plasma treatment for seed germination and plant growth. *Int J Mol Sci.* **23**:4609 (2022).
- Šimončíková J, Kryštofová S, Medvecká V, Ďurišová K, and Kaliňáková B. Technical applications of plasma treatments: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* **103**:5117–5129 (2019).
- Sivachandiran L and Khacef A. Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. *RSC Adv* **7**:1822–1832 (2017).
- Starek-Wójcicka A, Różyło R, Niedźwiedź I, Kwiatkowski M, Terebun P, Polak-Berecka M, and Pawłat J. Pilot study on the use of cold atmospheric plasma for preservation of bread. *Sci Rep.* **12**:22003 (2022).