

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14554

研究課題名（和文）冷凍生鮮野菜の実現に向けた細胞膜の水透過性と電気物性評価による組織軟化挙動の解明

研究課題名（英文）Clarification of tissue softening behavior of frozen vegetables by analyses of water permeability and electrical characteristics of cell membrane

研究代表者

安藤 泰雅（Ando, Yasumasa）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・主任研究員

研究者番号：30736781

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本課題では、凍結時における細胞膜の状態変化が野菜組織の軟化挙動に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、冷凍野菜の細胞膜の構造変化と水透過性の変化について検討を行った。アスパラガス組織を用いた実験では細胞膜の損傷が凍結速度や氷結晶の形状に関わらず生じることが示され、冷凍野菜の組織軟化は細胞膜の損傷に伴う膨圧の低下が大きな要因であることが示唆された。また、コマツナの凍結温度域（ -2°C ）における貯蔵試験では電気的特性の変化が見られ氷結晶の生成前に細胞膜の構造的な変化を生じていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品の中でも野菜類は凍結・解凍後の組織軟化が著しく、現在の技術ではその改善が困難である。この理由から現状では生食用の冷凍野菜は流通していない。野菜類の凍結時に生じる細胞膜の損傷は、膨圧低下の原因となり、生鮮野菜の持つハリやシャキシャキとした食感が失われる大きな要因の一つと考えられている。本課題で得られた組織軟化の要因に関する知見は、食品の中でも冷凍適性が低いとされる冷凍野菜の品質改善に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this project was to clarify the effect of changes in the state of cell membranes during freezing on the softening behavior of vegetable tissues, and the structural changes in the cell membranes and water permeability of frozen vegetables were investigated. Experiments using asparagus tissue showed that damage to the cell membrane occurs regardless of the freezing rate and ice crystal size, suggesting that the decrease in turgor pressure associated with cell membrane damage is a major factor in tissue softening in frozen vegetables. In addition, storage tests of komatsuna leaves in the sub-zero temperature (-2°C) showed changes in electrical properties, suggesting that structural changes in the cell membrane occur prior to the formation of ice crystals.

研究分野：ポストハーベスト工学

キーワード：冷凍 野菜 細胞膜 電気インピーダンス解析 水透過性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品の中でも野菜類は凍結・解凍後の組織軟化が著しく、現在の技術ではその改善が困難である。この理由から現状では生食用の冷凍野菜は流通していない。野菜類の凍結時に生じる細胞膜の損傷は、膨圧低下の原因となり、生鮮野菜の持つハリやシャキシャキとした食感が失われる大きな要因の一つと考えられている。凍結時における細胞膜の損傷機構には諸説あり、氷結晶による物理的な損傷や、凍結濃縮に伴う脱水ストレス等が原因であるとされている。しかしながら、膨圧低下・組織軟化の要因と考えられている細胞膜の損傷が、どのような状態を指し、どのような機能の喪失が生じているのか、詳細なメカニズムについては明らかにされておらず、具体的な現象解明には至っていない。

2. 研究の目的

本申請課題では、凍結時における野菜組織の軟化に影響を与える要因として、細胞膜の構造変化と水透過性に着目する。凍結後における野菜組織の電気インピーダンス(交流電流に対する電気抵抗)解析による二重膜構造の健全性評価を行う。また、野菜組織から抽出したプロトプラスト(植物細胞の細胞壁を酵素処理により除去したもの)に対し二層流法を用いた水透過性評価を行い、細胞膜機能の変化を明らかにするとともに、組織軟化現象との比較を行う。また、品種の異なる野菜組織について上記の検討を行い、凍結に対する耐性の評価を行う。それらの結果より、凍結時における細胞膜機能の変化が野菜組織の軟化挙動に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 電気インピーダンス解析による細胞膜の構造評価

電気インピーダンス解析は、計測対象に電極を介して交流電圧を印加し、得られたインピーダンスの周波数特性から対象の状態を推定する手法である。計測対象が細胞構造を持つ生体組織である場合、その細胞膜の状態を推定することができる。電気インピーダンス測定には、インピーダンスアナライザ(E4990A, キーサイト・テクノロジー)およびステンレス製の針状電極を用いた。針電極を試料に挿入し測定を行った。測定時における電極間距離は10 mmであった。電極は同軸ケーブルを介し、4端子対法に基づき装置に接続した。測定電圧は1 V、測定周波数は50 Hz~5 MHzとした。測定する周波数範囲において、81点の対数掃引測定を行い、インピーダンスの絶対値 $|Z|$ および位相差 θ を測定した。各試料において複数回の測定を行い、その平均値を実験値とした。測定したインピーダンスの周波数特性に対し、電気的等価回路を用いた解析を行った。細胞の等価回路として提案されているモデル(Ando *et al.*, 2014)を用い、モデル中のパラメータである細胞膜容量 C_m (F)、細胞外液抵抗 R_e (Ω)、細胞内液抵抗 R_i (Ω)の値を算出した。

(2) マイクロ X 線 CT による氷結晶構造の評価

X 線 CT は物体内部の密度の異なる部位を可視化する技術であるが、凍結した食品内部の氷と組織の密度差は小さいため、氷結晶部分のみを直接観察することは困難である。そのため、前処理として凍結乾燥することで氷結晶部分を昇華させ、生じた空隙を氷結晶痕として観察した(Mousavi *et al.*, 2014)。氷部分を急激に昇華させると試料変形を起こす恐れがあるため、 -40°C から 15°C まで1週間かけて徐々に温度を上昇させ氷結晶を昇華させた。観察にはマイクロ X 線 CT (SMX-100CT, 島津製作所)を用いた。X 線の管電圧および管電流はそれぞれ 45 kV および 100 μA とした。得られた断層画像のピクセルサイズは $20.7 \times 20.7 \mu\text{m}^2$ であった。

(3) 二層流法による細胞膜の水透過性の評価

細胞膜の水透過性評価には五月女ら(2003)によって提案された二層流法を用いた。この方法はマイクロ流路に濃度の異なる2種の溶液を流すと、各溶液が混合せずに流路内を流れる現象を利用している。流路中に野菜組織から抽出したプロトプラストを固定し、各溶液の流量比を調節することで、プロトプラストは瞬時に濃度の異なる液に移される。このときに細胞内外に生じる浸透圧差による体積変化速度から水透過係数を算出した。野菜組織からのプロトプラストの作製には Kuroki *et al.* (2022) の方法を一部変更した方法を用いた。表皮をはく離した試料葉片を酵素液(0.5 M マンニトール溶液、5 mM MES、1% セルラーゼオノヅカ RS、0.2% マセロザイム、0.1% ペクトリアーゼ Y-23)に浸漬し、得られた懸濁液から密度勾配遠心分離を用いた方法によりプロトプラストを分画した。

4. 研究成果

(1) 冷凍野菜の組織軟化における細胞膜の構造破壊の影響

凍結時における細胞膜損傷の現象と氷結晶の生成との関係を明らかにするため、異なる条件で凍結した野菜組織の凍結前後における評価を行った。アスパラガス茎部を実験試料とし、凍結前に沸騰水中で60秒のブラッシング後、氷水中で冷却した。凍結方法は、緩慢凍結として -30°C のフリーザー内での凍結(SL)、急速凍結として -40°C のエアブラスト凍結(AB)または -60°C の液体窒素噴霧凍結(LNS)を行った。

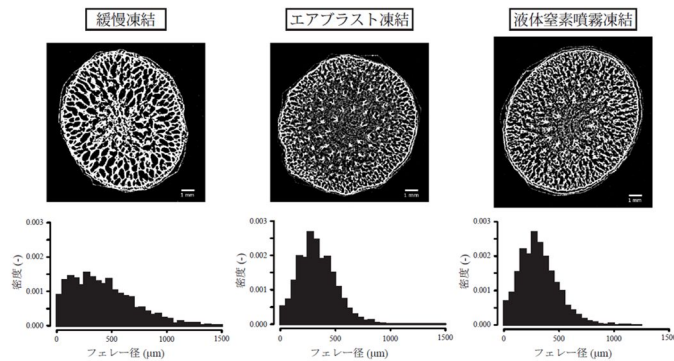


図1 異なる方法で凍結したアスパラガス茎部における氷結晶観察画像
フェレー径：外周上の2点間距離の最大値

図1に、X線CTで撮影された、異なる方法で凍結されたアスパラガス茎部の間接観察画像を示す。画像下のヒストグラムは画像処理によって得られた氷結晶痕の径の分布を示したものである。緩慢に凍結された試料では組織内部に比較的大きな空隙が生じており、粗大な氷結晶が生じていることが分かる。また、ヒストグラムの形状より、氷結晶のサイズにばらつきがあることが分かる。一方、急速凍結法であるABおよびLNSの凍結では、氷結晶痕が微細化されており、ヒストグラムは比較的鋭いピークのある形状であることから、均質な氷結晶が生じていることが推察できる。

測定した電気インピーダンス特性より算出した細胞膜容量 C_m 、細胞外液抵抗 R_c 、細胞内液抵抗 R_i の値(表1)の変化より、いずれの凍結・解凍試料においても細胞膜損傷が確認されたことから、細胞膜の構造破壊は凍結速度や氷結晶の大きさに依存せず生じると推察される。力学物性を評価するため試料の圧縮試験を行い、弾性的な性質を表す指標として圧縮歪 0.1 までの傾きを算出した(表2)。その結果、SL 試料と比べ急速凍結のABおよびLNS 試料においてやや改善が見られたが、凍結前(ブランチング後)試料と比較するといずれの凍結試料でも大幅に低下しており、急速凍結による組織軟化の改善は限定的であることが分かる。野菜の凍結時における組織軟化には、氷結晶の形態とは独立に生じる細胞膜の構造破壊が大きく関与していると考えられ、これに伴う水あるいはイオンの透過性変化による膨圧低下が組織軟化に大きく影響するものと推察された。

次に、凍結時における細胞膜の構造変化に対する品種間の差異を明らかにするために、コマツナ8品種を対象とし凍結前後の細胞膜の構造変化を調査するためインピーダンス解析を行った。その結果、細胞膜の著しい損傷はいずれの品種でも生じており、コマツナ試料において細胞膜の損傷の程度に品種間の違いは見られなかった。また、この細胞膜損傷に起因すると推察される弾性率の大幅な低下がみとめられた。一方で、最大荷重には、中生・晩生品種は早生品種に対し1.5倍程度高くなる傾向が見られたが、これは細胞壁等の元の組織構造に起因する差異であると考えられる。

(2) 凍結温度域で貯蔵した際の野菜組織における細胞膜の状態変化

凍結温度域における野菜の細胞膜の構造的・機能的な変化について調査するため、試料としてコマツナを用い、凍結温度域(-2°C)における保存試験を実施した。 -2°C に設定したフリーザー(SC-DF25K, 日本フリーザー)内に24h保存した試料について電気インピーダンス解析による細胞膜の構造評価および2層流法を用いた細胞膜水透過性の評価を行い、生鮮試料および完全凍結(-40°C)状態で保存した試料と比較した。図2に生鮮、 -2°C 貯蔵および -40°C 貯蔵後のコマツナ試料の外観と各試料から作製したプロトプラストの顕微鏡観察画像を示した。 -40°C で貯蔵した試料は葉が著しく萎凋しており、凍結時に生じる氷結晶による影響であると考えられる。またプロトプラストの抽出を試みたものの健全な個体は見当たらず、細胞膜の構造は完全に破壊されたものと思われた。一方で -2°C で貯蔵した試料の外観は生鮮時と変わらず良好な状

表1 凍結前後のアスパラガス組織の電気特性パラメータ

処理条件	C_m (pF)	R_c (Ω)	R_i (Ω)
未処理(生試料)	1550 ^a	5460 ^a	540 ^a
ブランチング後	355 ^b	970 ^b	880 ^b
ブランチング+凍結・解凍後			
緩慢凍結	18.6 ^c	587 ^c	2190 ^c
エアブラスト凍結	16.2 ^c	585 ^c	2140 ^c
液体窒素噴霧凍結	18.4 ^c	581 ^c	2250 ^c

C_m : 細胞膜容量、 R_c : 細胞外液抵抗、 R_i : 細胞内液抵抗、各値は11-12回の反復における平均値を示す。異なる添字はTukeyの多重範囲検定において有意差があることを示す($p<0.05$)。

表2 凍結前後のアスパラガス組織の力学物性パラメータ

処理条件	圧縮歪 0.1 までの傾き (N)
ブランチング後	6.2 ^a ± 1.2
ブランチング+凍結・解凍後	
緩慢凍結(SL)	1.4 ^c ± 0.2
エアブラスト凍結(AB)	1.8 ^b ± 0.3
液体窒素噴霧凍結(LNS)	2.0 ^b ± 0.4

各値は52回の反復における平均値を示す。異なる添字はTukeyの多重範囲検定において試験区間に有意差があることを示す($p<0.05$)。

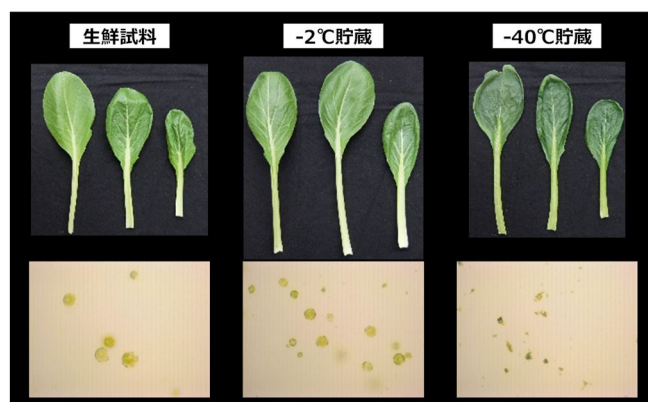


図2 貯蔵前後のコマツナ葉の外観と作製したプロトプラストの顕微鏡観察画像

態を維持しており、プロトプラストも生鮮試料と同様の状態で観察することができた。表3に各試料のインピーダンスパラメータの値を示した。 -40°C の貯蔵試料は生鮮試料と比較し細胞膜容量 C_m および細胞内液抵抗 R_i の上昇と細胞外液抵抗 R_e の低下が見られた。これは細胞膜の構造的な破壊とそれに伴う細胞内液の細胞外への流出を示唆している。一方で -40°C の貯蔵試料では R_e および R_i の変化は見られなかったものの C_m の値に有意な差が見られ、生鮮試料よりやや上昇する傾向であった。このことから -2°C の微凍結の条件で外観上は遜色のない状態が維持されるものの、細胞膜に構造的な変化を生じていることが示唆された。次に、細胞膜の水透過性を評価するために作製したプロトプラストに対して二層流法を用いた評価を行った。マイクロ流路内において異なる濃度の溶液に移し替えられた時の細胞の体積変化から水透過係数を算出したものの、生鮮試料と -2°C 貯蔵試料の間に有意な差は見られなかった。測定時のばらつきがやや見られたことから今後、正確な比較のためにプロトプラストの抽出部位や細胞径の統一などの条件検討が必要であると考えられる。

本課題を通じて、冷凍野菜の組織軟化に関わる要因として凍結温度帯における細胞膜の構造的・機能的な変化について検討し、解凍後の力学物性、氷結晶の生成および水移動速度との関係を明らかにするとともに、野菜の品種間の差異についても新たな知見を得た。これらの組織軟化に関わる要因の理解は、食品の中でも冷凍適性が低いとされる冷凍野菜の品質改善に向けた有意義な知見になると考えられる。

参考文献

- Ando, Y., Mizutani, K., and Wakatsuki, N. (2014). Electrical impedance analysis of potato tissues during drying. *J. Food Eng.*, **121**, 24–31.
- Mousavi, R., Miri, T., Cox, P.W., and Fryer, P.J. (2005). A novel technique for ice crystal visualization in frozen solids using X-ray micro-computed tomography. *J. Food Sci.*, **70**, E437–E442.
- Kuroki, S., Tanaka, M., Itoh, H., Nakano, K., and Sotome, I. (2022). Upgrading the measurement of membrane hydraulic conductivity and the osmotically inactive volume of protoplasts for evaluating the freshness of postharvest leafy vegetables. *J. ASABE*, **65**(1), 189–196.
- 五月女格, 大下誠一, 瀬尾康久, 川越義則, 鳥居徹, マイクロチャンネル内の二層流を利用した細胞膜水透過係数測定法の開発, *農業機械学会誌*, **65** (3), 86–92 (2003).

表3 貯蔵前後におけるコマツナ葉の電気特性値

	C_m (pF)	R_e (k Ω)	R_i (k Ω)
生鮮試料	8.2 ^a	438 ^a	7.6 ^a
-2 貯蔵	14.0 ^b	407 ^a	6.4 ^a
-40 貯蔵	343.0 ^c	12.6 ^b	11.2 ^b

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasumasa Ando, Tomoya Okunishi, Hiroshi Okadome	4. 巻 12
2. 論文標題 Influences of blanching and freezing pretreatments on moisture diffusivity and quality attributes of pumpkin slices during convective air-drying	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food and Bioprocess Technology	6. 最初と最後の頁 1821-1831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11947-019-02340-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ando Yasumasa, Hagiwara Shoji, Nabetani Hiroshi, Okunishi Tomoya, Okadome Hiroshi	4. 巻 256
2. 論文標題 Impact of ice crystal development on electrical impedance characteristics and mechanical property of green asparagus stems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Food Engineering	6. 最初と最後の頁 46 ~ 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jfoodeng.2019.03.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤泰雅
2. 発表標題 凍結に伴う野菜の品質特性の変化
3. 学会等名 2019年農業食料工学会・農業施設学会・国際農業工学会第6部会 合同国際大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤泰雅、五月女格、奥西智哉、岡留博司、萩原昌司、鍋谷浩志
2. 発表標題 電気インピーダンス解析を用いた凍結による生体細胞膜の損傷評価
3. 学会等名 2018年度日本冷凍空調学会年次大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------