

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06727

研究課題名（和文）先駆的ナノ・マイクロ構造解析による冷凍野菜の食感劣化機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of texture deterioration mechanism of frozen vegetables by pioneering nano and micro structural analysis

研究代表者

今泉 鉄平（Imaizumi, Teppei）

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：30806352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では冷凍野菜の食感変化メカニズムをナノ・マイクロレベルでの構造解析によって解明することを目的とする。加工による青果物の細胞・組織状態について定量的な変化として捉えることができた。加えて、加工操作を経た青果物から抽出した各種ペクチンの状態を組成分析や原子間力顕微鏡により定量把握を試みた。また、本研究では、低温ブランチングによってペクチンの脱メチル化を促したニンジン試料に対して高温加熱を加え、その際の軟化傾向について速度論的な解析を行なった。この時、低温ブランチング条件によって軟化傾向に差が生じ、ペクチン状態による寄与が伺えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冷凍野菜の食感の悪さは多くの消費者が感じており、積極的な購買を妨げている。本研究では冷凍野菜製造工程のうち、特にブランチング工程における構造変化と食感変化の関係性を明らかにし、最適な加工条件構築に向けた知見を得た。また、本研究が対象としているブランチングを含む冷凍加工工程には、調理や他の加工操作と共通する部分も多い。したがって、本研究で得られる知見の多くは、広く食品分野全般に寄与することが出来る。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the texture change mechanism of frozen vegetables by several structural analysis. The tissue condition of processed vegetables could be regarded as quantitative changes such as cell membrane volume, extracellular resistance and intracellular resistance. In addition, water-soluble, chelate-soluble, and diluted alkali-soluble pectins were sequentially extracted from the processed materials, and quantitative analysis of changes in pectin state was attempted by composition analysis and observation with an atomic force microscope. Moreover, in this study, high temperature heating was added to carrot samples that promoted demethylation of pectin by low temperature blanching, and kinetic analysis was performed on the softening tendency at that time. At this time, the softening tendency was different depending on the low temperature blanching conditions, and the contribution from the pectin state was obtained.

研究分野：食品工学

キーワード：ブランチング 冷凍野菜 インピーダンス ペクチン 軟化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

冷凍野菜は安定的な食料供給を支える重要な役割を担っており、生鮮青果物の生育不良など不測の事態に際して特に注目される。また、生鮮青果物から、長期にわたり品質を維持できる冷凍野菜へと需要の転換が進めばポストハーベストロスの削減に至ると期待される。しかしながら、冷凍野菜の「食感」は依然として改善の余地が大きく、「美味しさ」という点では消費者が満足するレベルには至っていない。

冷凍野菜の製造は一般的に「材料調整→ブランチング(予備加熱)→凍結」といった工程で行われ、この中で材料野菜の構造がドラスティックに変化し、最終的な食感に寄与する。以前より冷凍野菜の品質向上を目的とした研究は国内外で活発に行われており、マイクロ波やアクアガスを利用したブランチング法やデハイドロフリージング技術などが考案されてきた。しかしながら、既存の工程においても食感が変化するメカニズムについて十分な説明がなされていないため、工程の改良に明確な指針を立てられていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、加工技術の高度化への指針を立てるため、食感変化メカニズムの解明を目的とする。細胞・分子レベルの構造および物性に及ぼす冷凍加工の影響を先駆的構造解析により調査し、さらにナノ～マクロスケールにおける構造、物性の関係性を明らかにする。具体的には、細胞壁を構成する多糖類、細胞膜の構造についてブランチング処理、凍結処理による変化を原子間力顕微鏡やインピーダンス解析を駆使して収集するとともに、細胞レベルでの構造・物性と、組織や個体レベルでの食感との関係性解明を目指すこととする。

3. 研究の方法

種々の加工条件、特にブランチング下での青果物の組織構造変化を解析し、食感との関連性を調査した。

(1) インピーダンス解析による細胞・組織構造評価

加工操作を行なった試料に対して針状ステンレス電極を10 mm 間隔で2本挿入し、LCRメーターにより50 Hz から5 MHz 程度におけるインピーダンス測定を行なった。得られた周波数特性に対してCPEモデルを複素非線形最小二乗法により当てはめ、細胞内抵抗、細胞外抵抗、細胞膜容量を決定した。

(2) 軟化現象の速度論的解析

試料の硬さはクリープメータにより計測した。ブランチング中の硬さの変化に対して反応速度式を当てはめ速度定数を決定した。また、加熱温度と軟化速度の関係をArrhenius式で表し、加熱中の軟化における活性化エネルギーなどのパラメータを得た。

(3) ペクチン状態の解析

加工後の青果物から、水溶性ペクチン、キレート可溶性ペクチン、希アルカリ可溶性ペクチンを順次抽出した。各抽出液に含有されるガラクトシロン酸含有量はカルバゾール硫酸法により定量した。また、各抽出液は適宜希釈後、Mica基板上に滴下し、原子間力顕微鏡によりナノ構造の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 冷凍加工時における組織構造変化と硬さの関係

図1はニンジン試料において、Fresh試料、40 min 加熱を行った試料、生で凍結解凍を行った試料、40 min 加熱後凍結解凍を行った試料のCole-Coleプロットを示している。Fresh試料と比較すると、加熱を行った試料に関してはCole-Cole円弧が縮小しており、また凍結処理を行った試料はCole-Cole円弧の消失が見られる。損傷や腐敗による細胞膜の劣化や損傷によってCole-Cole円弧の縮小が観察されていることから、加熱によって細胞膜に損傷などの異常が起こり、凍結処理によって細胞膜破壊が起こっていることが示唆された。続いて、図2はニンジン試料において、各加熱時間におけるCole-Coleプロットを示している。Fresh試料と比較すると、10 min、20 minの加熱を行った試料は円弧の形状が大きい傾向があり、40 min、60 minの加熱を行った試料は円弧が縮小ないしは消失に近い状態となる傾向がある。これより、40 min以上の加熱を行った試料に関しては細胞膜の損傷もしくは破

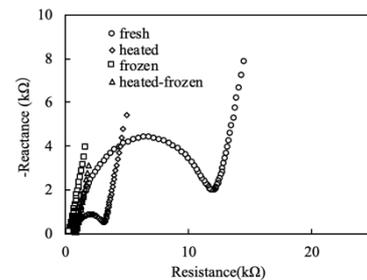


図1 50°C加熱・凍結処理後のニンジンにおけるCole-Coleプロット

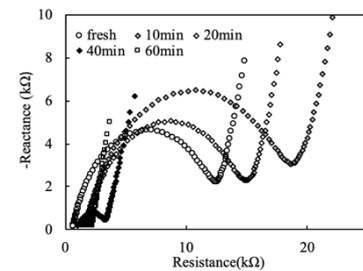


図2 50°Cの加熱時間ごとのニンジンにおけるCole-Coleプロット

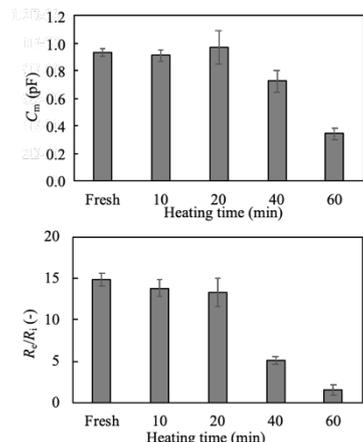


図3 ニンジン試料の各加熱時間における等価回路解析結果

壊が起こっていることが示唆された。また、円弧形状が大きくなった試料に関しては Fresh 試料が室温で放置してから測定を行ったのに対して、熱湯加熱試料は水冷後すぐに測定を行ったため、温度差のためにインピーダンス値が大きくなることから円弧が大きくなったといったことが推測された。

Cole-Cole プロットの結果より、凍結処理を行ったサンプルは Cole-Cole プロットに円弧がほぼ現れないことが確認されたため、非凍結試料のみ等価回路解析を行った。50 °C で加熱した際の各加熱時間におけるニンジン試料に対し、CPE モデルを適用した等価回路解析の結果を図 3 に示した。今回重要視した C_m と R_e/R_i に関して示されているが、 C_m に関しては加熱時間 20 min 以下と比較すると 40 min では低下傾向にあり、60 min 加熱すると有意に低下した。一方で、 R_e/R_i に関しては加熱時間 20 min 以下と 40 min 以上との間には有意な差があることがわかった。 R_e/R_i の減少に関しては、 R_e の低下、 R_i の上昇といった理由が挙げられる。この現象は細胞膜の選択的透過性が低下し、イオンの流入が容易になることからこのような結果になったとされる。以上より、40 min 以上の加熱によって細胞膜が損傷していることが示唆された。

図 4 にはニンジン試料の各条件における細胞膜の状態を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察した画像を示す。Fresh 試料の画像と比較すると、加熱時間 20 min 以上の試料は断片化した細胞膜が多く観察でき、40 min 以上では繋がった膜の観察が困難となった。また、凍結解凍試料に関しては全ての試料において細胞膜の断片化が観察できた。この結果は、前述の Cole-Cole 円弧の縮小や等価回路パラメータの変化と一致しておりインピーダンス測定による細胞膜構造の評価の有効性が示された。

(2) 前処理操作による軟化抑制効果

前処理として用いられる低温ブランチングがその後の工程における軟化現象に及ぼす影響を明らかにした。ニンジンに対する低温ブランチングとしては 60°C、60min の処理がその後の高温加熱工程において最も軟化抑制効果が高かった。インピーダンス解析の結果より、この条件においては細胞膜損傷が引き起こされていると考えられ、液胞中のカルシウムイオンが細胞壁領域まで供給されたことで架橋結合形成が促された可能性が示唆された。図 5 では前処理を行わなかった試料と 60°C60min で処理した試料の、高温加熱時の軟化傾向を示す。これらの変化に対しては一次反応速度式を当てはめることができた。さらに、得られた反応速度定数を Arrhenius 式でフィッティングすることで活性化エネルギーおよび頻度因子を算出した (図 6)。いずれも低温ブランチング処理によって大きく増加し、このことは細胞間結着物質であるペクチンが架橋結合を形成し分解されにくくなることによるものと推察された。さらに、本研究ではこれらの工程における酵素活性変化についても調査を行なった。青果物中の酵素は冷凍加工時に残存すると貯蔵中、解凍後に活性化し品質の著しい低下をもたらすことが知られている。60°C60min の低温ブランチングでは、残存酵素を完全に失活することはできず、高温処理を組み合わせる必要性が示された。

(3) ペクチン状態の解析

各乾燥条件で乾燥させた柿試料より調製した AIS 1 g に含まれる水溶性ペクチン (WSP)、キレート可溶性ペクチン (CSP)、希アルカリ可溶性ペクチン (DASP) の量を図 7 に示す。ブランチング処理を行った試料は、無処理の試料と比較して WSP の割合は低く、CSP の割合は高い結果となった。青果物に対して高温での加熱を行なった場合にはペクチンの β 脱離が進むことが知られている。植物由来の食品の熱処理によるペクチンの溶解度の変化はペクチンの β 脱離に関連し、加熱するにつれて水溶性ペクチンが増加するとされる。 β 脱離は一般的に 80 °C

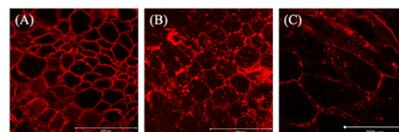


図 4 ニンジン細胞膜の CLSM 画像
A: Fresh, B: 60min 加熱, C: 凍結解凍後

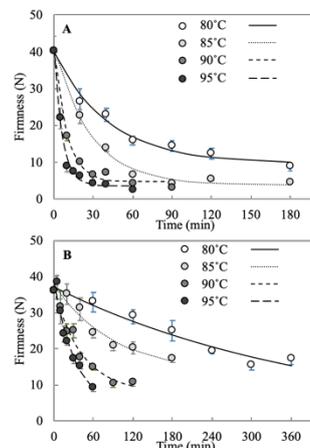


図 5 ニンジン試料の各加熱時間における等価回路解析結果

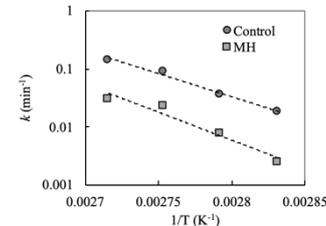


図 6 無処理および低温ブランチング (MH) した試料の高温加熱過程における軟化速度定数の Arrhenius プロット

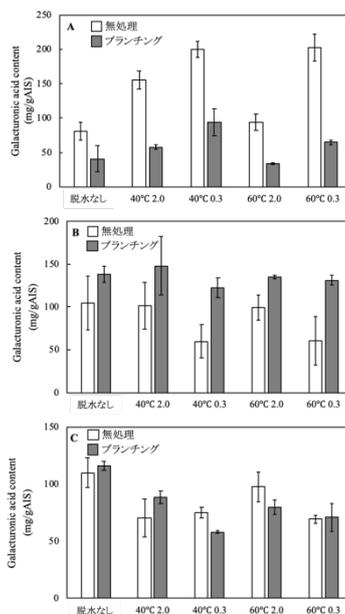


図 7 柿の脱水過程におけるペクチン組成の変化 A: WSP, B: CSP, C: DASP

以上・pH4.5以上の条件下で起きるが、柿の場合には一般的に成熟過程でpHが低下し、完熟果では4.0程度の値を示す。また、加熱後のβ脱離による水溶性ペクチンの増加はアルカリ可溶性ペクチンの減少と平行するが、今回の結果ではブランチング処理によりWSPは減少し、DASPはほとんど変化しなかった。したがって、本実験条件ではβ脱離の条件を満たす95℃設定での加熱ではあるが、試料内部の温度上昇は緩やかであったため、β脱離が進行する条件ではなく、β脱離は起きなかったと考えられる。他方で、加熱によって細胞壁に障害が起き、細胞内のカリウムイオンが溶出してペクチンメチルエステラーゼを活性化すると、ペクチンのメチルエステルがけん化されてカルボキシル基が増加し、カルシウムイオンやマグネシウムイオンと結合する。したがって、熱湯加熱処理によりペクチンメチルエステラーゼの活性化や、細胞損傷に伴う細胞内カルシウムの細胞壁領域への供給により架橋結合形成が促されたことがCSPの増大した原因として挙げられる。

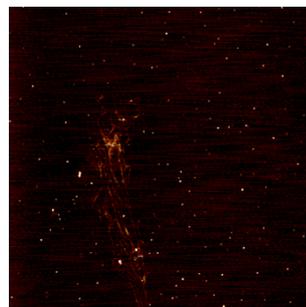


図8 柿WSPのAFM画像

ブランチング処理を行った試料と無処理の試料のいずれにおいても、脱水に伴ってWSPは増加し、DASPは減少していく傾向が見られた。CSPは無処理の試料では減少したが、ブランチング処理を行った試料では変化が見られなかった。ペクチンの分解機構としては主に、ペクテートリアーゼやポリガラクトツロナーゼといった酵素によるものと、酸性加水分解によるものが挙げられる。ブランチング処理は多くの酵素を失活するため、酵素による作用はブランチング処理を行っていない無処理の試料でより大きく現れる。CSPの量において、無処理の試料では含水率0.3において初期値の60%程度まで落ち込むのに対して、ブランチング処理を行った試料ではほとんど変化しなかった。この結果は酵素の特性を特に反映しており、CSPの変化はペクテートリアーゼやポリガラクトツロナーゼといった酵素によるものと言える。一方、DASPにおいては、熱湯加熱処理を行った試料のガラクトツロン酸含有量は無処理の試料と比べて脱水過程の進行により同等かそれ以上の低下を示した。ブランチング処理により失活されなかった残存酵素の作用も考えられるが、脱水に伴い酸性加水分解が大きく働いた可能性がある。ペクチンの酸性加水分解は通常pH3.0以下の条件下で生じる。脱水処理による濃縮効果で試料中の水素イオン濃度の低下はpHの低下と同義であり、すなわち乾燥試料では酸性加水分解が起こりうる状態であると推察される。特に熱湯加熱処理を行った試料においては、前述の通りペクチンメチルエステラーゼの活性化が生じた可能性が示唆されており、メトキシル化度(DM)は無処理の試料と比べて低くなっている可能性がある。酸性加水分解は低DMにおいてより生じやすいことから、本実験におけるDASPのような結果が導かれたと考える。図8に柿から抽出したWSPの原子間力顕微鏡(AFM)画像を示す。図のようにWSPは小形の粒子状物質が多数観察できた。今後は、他の条件においても同様に観察を進めるとともに、解析ソフトによるモルフォロジー特性把握を行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. Teppei Imaizumi, Fumihiko Tanaka, Toshitaka Uchino: Effects of mild heating treatment on texture degradation and peroxidase inactivation of carrot under pasteurization conditions, Journal of Food Engineering, 2019, 19-25. (査読あり)
2. Teppei Imaizumi, Fumihiko Tanaka, Toshitaka Uchino: Kinetic evaluation of effects of low-temperature blanching on mechanical properties of carrot, Proceedings of ISMAB 2018, 2018. (査読なし)

[学会発表] (計1件)

1. Teppei Imaizumi, Fumihiko Tanaka, Toshitaka Uchino: Kinetic evaluation of effects of low-temperature blanching on mechanical properties of carrot, International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering (ISMAB 2018), Jeju, Korea, May 28th, 2018.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。