3版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　２６　日現在

機関番号：２３３０３
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６３５００９８

研究課題名（和文）細胞中の水の制限拡散による野菜の加熱・凍結における細胞破壊の評価

研究課題名（英文）Evaluation of the cell damage in heating and freezing of vegetables by the restricted diffusion of water in a cell

研究代表者
石田　信昭（ISHIDA, Nobuaki）

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：２０３４３８１６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：野菜の加熱・凍結における細胞や組織の破壊をNMRによる細胞内の水の拡散測定により調べる方法を開発し、それを用いてジャガイモなどの根菜類において細胞破壊と軟化の関係を検討した。加熱や凍結により細胞破壊が進むとそれに応じて水の拡散が制限拡散から自由拡散に移行し、破壊の程度を評価することができた。解凍後の軟化を防ぐ凍結法として過冷却を用いた凍結法を検討し、ジャガイモやサツマイモで大きな効果があることが示された。

研究成果の概要（英文）：I developed a method to determine the damage of a cell and the tissues of vegetables in heating and freezing by diffusion measurement of the intracellular water by NMR and examined relations of cell damage and the softening in the root crops such as potatoes using it. When cell damage progressed by heating and freezing, diffusion of the water changed from restricted diffusion to free diffusion accordingly and it must be good method to evaluate degree of cell damage. I examined the freezing method using the supercooling of cell water to prevent softening after freezing, and it was shown that there was a big effect with a potato and a sweet potato.

研究分野：食品科学

キーワード：冷凍　野菜　NMR　制限拡散　細胞　水　過冷却　拡散係数

１．研究開始当初の背景

今日、多くの食品が冷凍食品として利用されている中で、野菜やいも類は食品素材の保存法として、冷凍技術を使うことができていない。それは冷凍後の解凍による軟化が大きく、生鮮品に比べて品質が大きく低下してしまうため、冷凍ができず、冷凍を用いた長期保存ができていないのが現状である。特に、ジャガイモは食品素材として多くの食品に使われているにもかかわらず、冷凍による障害が大きく効果的な冷凍技術が見いだされていないため、効果的な冷凍技術が求められている。

冷凍による生体組織の細胞破壊、組織破壊は組織や細胞の顕微鏡観察、物性測定、電気的性質などの物理的測定のほか、生体内の水の状態の NMR 緩和時間などで調べられてきているが、細胞破壊の効果的な評価法はまだ十分ではない。そのような中で、NMR を用いた生体中の水の拡散測定をもととした制限拡散測定は、近年、水が存在する場所の周辺構造と拡散係数の拡散時間依存性の関係の理論的解釈が発達し、生体組織(細胞)の構造やその破壊に応用できると期待されている。また、従来は NMR に特殊な付属装置(磁場勾配発生装置とそのコントローラー)を装着しなければ測定できなかった拡散係数測定も、近年の装置では２D,3D－NMR 測定に磁場勾配を利用するため、ほぼ NMR には標準装備となってきているため、NMR 装置があれば拡散測定ができるようになってきている。このような状況の下で、細胞の構造を調べることができる NMR による水の拡散測定を用いた細胞破壊の評価法は、凍結障害をはじめとしたさまざまな場面で食品評価に利用できる期待されるが、その研究はまだ始まったばかりである。

２．研究の目的

本研究においては、野菜の加熱および凍結による組織軟化について、NMR を用いた水の拡散測定を基に解析し、NMR を用いた食品品質の新しい評価法を開発する。生体組織中の水は、細胞質や液胞あるいは細胞間隙のような小さな領域に閉じ込められているため、自由に移動できる範囲が制限され、NMR 測定により得られる拡散係数が拡散時間とともに減少する、制限拡散と呼ばれる拡散様式をとる。NMR の制限拡散測定は、医療分野では MRI 技術と組み合わせることにより、脳梗塞などにおける脳内の細胞破壊や膜透過性変化、拡散の異方性をとらえて、神経細胞の走り具合を可視化する方法として用いられている。この方法を野菜などの食品組織に応用し、加熱や凍結による細胞のダメージをもとに食品品質を計測する新しい方法を開発し、野菜品質との関連を調べ、高品質の冷凍品を作るための技術を開発する基礎とすることを目的とする。

３．研究の方法

(1)試料及び加熱、凍結処理：澱粉を含む根菜類のジャガイモ、サツマイモと澱粉を含まないダイコン、ヤーコンを試料として用いた。試料は 3cmx3cmx1cm に切り出した後、60℃から 100℃の各温度に設定した恒温槽で 10 分間加熱処理を行った。生及び加熱した試料は－30℃の冷凍庫、およびプログラム低温恒温槽により凍結を行った。凍結試料は 22℃のインキュベーターにより解凍し、硬さ及び NMR 拡散測定を行った。

(2)硬さ測定：硬さはレオメーター（CR-500DX-SⅡ、株式会社サン科学製）により径 5 mmのプランジャーを用いて、5 mmまたは 2 mm挿入したときの応力として求めた。

(3)NMR 拡散測定：400MHz 高分解能 NMR（JEOL ECX-400、日本電子）を用いて、試料中の水の拡散係数を拡散時間を変えて測定を行った。測定はバイポーラーパルスを用いたパルスグラディエントスティミュレイテドエコー法を用い、拡散時間 50ms から 1000ms における拡散係数を測定した。

(4)顕微鏡観察：加熱及び凍結した試料をマイクロスラーサーで厚さ約 100μm にスライスし、トルイジンブルー、サフラニン、ヨウ素液により染色後、光学顕微鏡観察を行った。
(5)MRI 測定：0.2T（テスラ）永久磁石を用いた小型 MRI（エム・アール・テクノロジー製）を用いて、試料の内部構造の測定を行った。測定は３D スピンエコー法（エコー時間 7ms）により行った。

４．研究成果

(1)ジャガイモ、サツマイモ、ダイコン、ヤーコンいずれにおいても、生の試料では制限拡散が認められ、細胞中の水が膜に囲まれた小さなコンパートメントに存在することが分かった。制限拡散の大きさは試料により異なっており、澱粉を含み水分含量も他の二つと比べて低いジャガイモ、サツマイモでは、より大きな制限拡散現象が認められた。これらの試料では、顕微鏡観察により細胞内に多くの澱粉粒が蓄積されていることがわかる。この澱粉粒が水分子の拡散の障害となることが、比較的大きな制限拡散を示す原因と考えられた。加熱をした試料では、60℃を超えると制限拡散は徐々に自由拡散に近づき、70℃以上では制限拡散を少し残した状態でほとんど変化がなくなった。細胞膜の破壊は、60℃まではあまり生じず、70℃を超えると破壊が生じて細胞内の水が外部に溶出することがわかった。
ジャガイモでは 60℃処理において生より大きな制限拡散が認められた。

試料の硬さは 60℃では生に比べ同じか若干固くなるが、それ以上の温度では温度が高くなるにつれて徐々に硬度を下げていった。

制限拡散では 70℃以上ではあまり変化が認められなかったが、硬さは温度とともに低下していくことから、細胞膜は70℃を超えると損傷しているが、硬さの低下はさらに細胞壁の軟化が大きく作用していることが分かった。

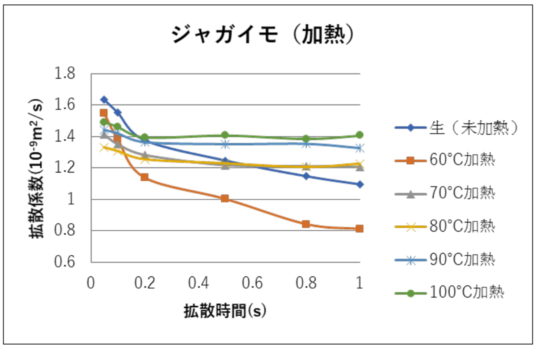

図 1　加熱による細胞内の水の拡散係数の変化：　ジャガイモ

(2)凍結後はすべての試料で自由拡散に非常に近くなり、凍結による細胞破壊は加熱によるものより激しく生じていることが分かった。凍結後の硬さは、生、加熱いずれも大きく低下して軟化が激しく生じていたが、生と加熱試料では、あまり大きな硬さの変化はなく、加熱処理したものは凍結後も生より硬さを保っている傾向を示した。これは、加熱処理により細胞間の水移動が容易になるとともに細胞壁の軟化が生じて、凍結時の氷晶生成による細胞及び組織構造へのダメージが少なるためと考えられた。顕微鏡観察では、生の組織は凍結解凍後に細胞が変形するとともに組織中に大きな間隙が生じ、組織破壊が進んでいることが確認された。

凍結前のブランチングは、酵素失活だけでなく硬さの維持にも効果があることが分かった。

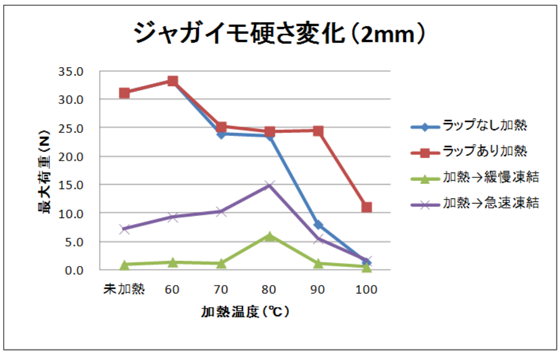

図 2　加熱、凍結によるジャガイモの硬さの変化　ラップあり：ラップにくるんで加熱

(3)澱粉を含むジャガイモ、サツマイモと含まないダイコン、ヤーコンを比べると、制限拡散に違いが認められた。生の試料ではジャガイモ、サツマイモはかなり大きな制限拡散を示したのに対し、ダイコン、ヤーコンではあまり大きな制限拡散を示さなかった。これは澱粉を含む組織では澱粉粒が水の移動の妨げとなるため、制限拡散効果が大きく出たものと考えられた。また、制限拡散は水の真の拡散係数と細胞の大きさに依存して減衰パターンが変化すると考えられるが、今回使用した試料では細胞の大きさは平均するとそれほど極端に異なるものでなく、あまり大きな影響を与えているとは考えられなかった。

今回設定した拡散測定の条件では、拡散時間が 50ms から 1000ms とした。拡散時間 50ms における拡散係数は1.8から1.0ｘ10^{-9}cm^2/s 程度であり、拡散時間 1000ms での移動距離は、50μm 程度である。試料の細胞の大きさは 10 から 50μm 程度であるので、この拡散時間の間で細胞 1 個から 2 個分の距離を水が移動し、その間、細胞膜や障害物の影響を受けて拡散係数が下降していくことになる。より長い距離の移動を計測すれば、影響をもっと詳細に検討することが可能と思われるが、これ以上拡散時間を延長するとシグナルが極端に小さくなり、ノイズに埋もれて正確な計測ができなくなるので、このような試料の測定には、本研究で検討した条件が標準的な条件になるものと考えられる。

凍結による細胞破壊は、細胞膜の破壊と同時に細胞組織の破壊が生じ、組織内に空洞ができることが多く、今回の実験でも顕微鏡観察でそのような空洞が観察された。この空洞は細胞の大きさに比べかなり大きなものができるため、そのような水では、本測定条件ではほとんど制限拡散が認められなくなる。ダイコンやヤーコンでは凍結後ほとんど制限拡散が認められなくなったが、顕微鏡観察でもこのような状況が観察され、それが反映していると考えられた。一方、ジャガイモやサツマイモでは凍結後も生に比べると小さいものの制限拡散が認められ、組織自体の強さに加えて、澱粉粒による障害物効果が影響していると考えられた。

加熱のみよる制限拡散の変化は凍結に比べると小さく、かなり自由拡散に近づくものの、制限拡散を若干残していた。しかし、ダイコンでは 70℃以上ではほとんど制限拡散がなくなり、細胞破壊が進んでいることが示された。ジャガイモなどでは、60℃加熱による組織の硬化が認められ、そこでは制限拡散も大きくなっていることが明らかとなった。これは細胞壁が強固になるためと考えられているが、Ca 添加によりさらに増強され、その効果は制限拡散測定でも認められた。水のバリアとしては細胞膜が第 1 に考えられ、加熱による細胞膜の破壊が細胞内液の外部への流出となり、それを制限拡散の変化としてとらえることができたが、これだけでなく、通常水のバリアとしてあまり考えなくてもよい細胞の変化も、制限拡散でとらえられることが示唆され今後の検討が必要と思われた。

(4)凍結温度と過冷却凍結の効果：凍結法改

良の試み
凍結法の改良について、組織中の氷晶生成のコントロールが必要である。その方法として、過冷却を利用した凍結の検討を行った。図 3、4 は細い熱電対を試料にさして冷凍中の試料の温度変化を見たものである。

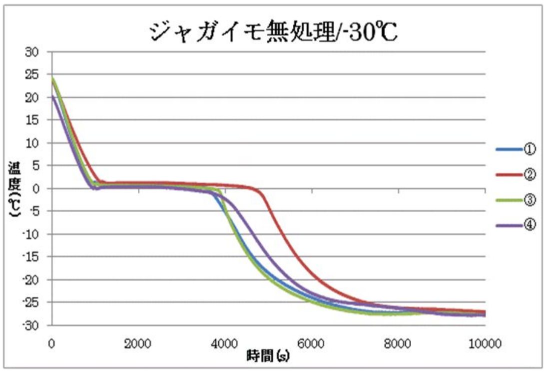

図 3　−30℃の冷凍庫で貯蔵したジャガイモの凍結曲線

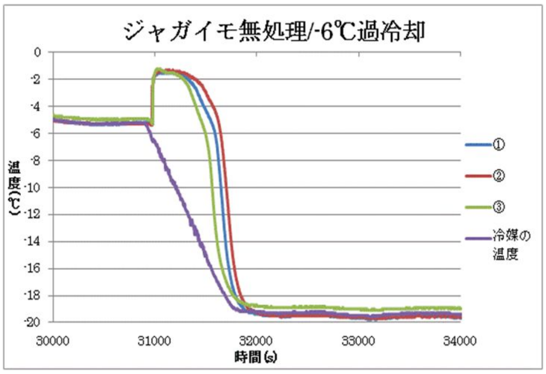

図 4　−6℃より急速に冷却したときのジャガイモの凍結曲線

冷凍庫での凍結は 0℃を下まわったところで生じ始め、完了するまでに長い時間を要するが、試料に過冷却を生じさせてそれを解消させると同時に一気に温度を下げて凍結させると、短時間で凍結させることができる。ジャガイモでは-6℃前後に凍結点があり、ここから一気に温度を下げることにより、-30℃冷凍庫で 60 分以上かかっていた凍結時間を 30 分以下に短縮することができた。この方法により凍結させた試料は、冷凍庫で凍結させた試料に比べ、硬さを保つことができた。
この時の細胞破壊の様子を制限拡散で見ると、生ほどではないが通常の冷凍に比べ制限拡散が大きい状態を保っており、細胞破壊が進んでいないと考えられた。
切り出した小さな組織だけでなく、ジャガイモ丸ごと 1 個の凍結を試みたところ硬さがかなり保たれており、過冷却凍結の効果が確認できた。ジャガイモ全体の組織構造を調べるために、小型 MRI を用いて、生と凍結試料の画像を比較すると、生の試料ではジャガイモの内部組織がはっきりと確認できるところ、通常の凍結試料ではそのような内部構造がなく均一の画像となり、組織破壊により細胞や組織の違いが不明確になっていることが分かった。過冷却凍結の試料では、生に比べると組織構造が不明瞭になっているが、少し構造が見えるところもあり、細胞破壊が抑えられていることが推察された。
MRI では小さな切片ではなく組織全体における構造変化を見ることが可能であり、評価法として有用な方法であると考えられた。しかし、今回使用できた MRI は磁場が 0.2T と低い装置であった。組織変化による画像コントラストは磁場が高いもので大きくなるため、より高い磁場の装置を用いた研究が望まれる。
また、今回ジャガイモ、サツマイモでは過冷却凍結の効果が大きく認められたが、ダイコンやヤーコンでは効果は認められたものの、ジャガイモやサツマイモほど顕著でなかった。凍結法や凍結条件のさらなる検討が必要であった。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　０件）

〔学会発表〕（計　５件）

① 春田直樹、石田信昭、ジャガイモの加熱・凍結処理における物性および構造変化、日本食品工学会第 15 回(2014 年度)年次大会、2014 年 8 月 9 日、つくば国際会議場(つくば).
② 倉　悠馬、春田直樹、石田信昭、ヤーコンの Ca 処理による加熱・凍結時の物性の変化、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学（岡山).
③ 倉　悠馬、春田直樹、石田信昭、ジャガイモおよび根菜の加熱・凍結処理における物性および構造変化の比較. 日本食品工学会第 16 回(2015 年度)年次大会、2015 年 8 月 11 日、広島市立大学(広島).
④ 池村沙耶、石田信昭、ジャガイモの物性を保持した凍結法の検討、日本食品工学会第 17 回(2016 年度)年次大会、2016 年 8 月 5 日、東京海洋大学(東京)
⑤ 池村咲耶, 石田信昭. サツマイモの品質を保つ凍結法の検討、日本食品科学工学会第 64 回大会、2016 年 8 月 27 日、名城大学（名古屋).

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０件）

○取得状況（計　０件）

〔その他〕

ホームページ等

６．研究組織

(1)研究代表者

石田　信昭（ISHIDA, Nobuaki）
石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号：20343816

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

春田　直樹（HARUTA, Naoki）
倉　悠馬（KURA, Yuma）
池村　咲耶（IKEMURA, Saya）
土田　なな子（TSUCHIDA, Nanako）