

加熱による野菜のテクスチャー変化に及ぼす金属イオンの影響

お茶の水女子大学 基幹研究院 自然科学系
佐藤 瑤子

1. 研究の目的と背景

野菜のテクスチャーは調理品の品質に大きく影響する。特に加熱による変化は大きいため、加熱による野菜のテクスチャーの変化に影響する要因を明らかにすることは重要である。要因の一つとして金属イオンの影響が知られており、これまでにカルシウムイオンを添加することで細胞壁多糖類間の架橋結合を形成し、軟化を抑制することが報告されている (Fuchigami *et al.* 1993; Kasai *et al.* 2000; Ni *et al.* 2005)。一方、同じ多価金属イオンでもマグネシウムイオンはダイコンの軟化を促進することが報告されている (Fuchigami *et al.* 1993) もの、カルシウムイオンに比べて報告は非常に少ない。

さらに、野菜にはカルシウムイオンやマグネシウムイオンが他の多価金属イオンに比べて多く含まれている (文部科学省 2021)。これまでにダイコンをキレート処理することで硬さやペクチンの形態が変化することが報告されているもの (Kasai *et al.* 1998)、これ以外には内在性の金属イオンが硬さに及ぼす影響を検証した報告はみられない。

さらに、内在性、外因性イオンが硬さに及ぼす影響について、微細構造や分子量分布の観点から同時に検討した報告はみられない。

以上のことから、本研究では内在性と外因性の金属イオンの中でもカルシウムイオンとマグネシウムイオンに着目し、それぞれ野菜のテクスチャーに及ぼす影響をキレート処理または塩化物の添加により検証した。試料は年中入手可能なダイコンを用いた。

2. 研究の方法

2-1. 試料

青首ダイコンを用いた。

2-2. キレート処理

1 cm 角ダイコンを沸騰 RO 水中で 1 分間加熱して細胞膜機能を低下させたのち、 1.25×10^{-3} 、 2.5×10^{-3} 、 1.5×10^{-2} M の EGTA (グリコールエーテルジアミン四酢酸) または EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 水溶液に 4°C で 20 時間浸漬し、浸漬試料とした。比較のために RO 水浸漬も行なった。さらに浸漬試料を沸騰 RO 水中で 10 分

間加熱し、加熱試料を得た。 1.5×10^{-2} M EDTA 浸漬の条件については加熱中に試料が崩壊して回収できなかったため、浸漬試料のみ分析に供した。

2-3. 塩溶液処理

1 cm 角ダイコンを沸騰 RO 水中で 1 分間加熱し、細胞膜機能を低下させたのち、0.001、0.01、0.05、0.1、0.5 M の CaCl_2 または MgCl_2 水溶液に 4°C で 20 時間浸漬し、浸漬試料とした。比較のために RO 水浸漬も行った。さらに浸漬試料を沸騰 RO 水中で 10 分間加熱し、加熱試料を得た。

2-4. 硬さの測定

キレート処理または塩溶液処理した浸漬試料および加熱試料の硬さを測定した。テクスチャーアナライザー (TA, XT plus, Stable Micro Systems) を用い、ロードセルは 30 kg、プローブは直径 3 mm の円柱型とした。貫入速度 1 mm/sec、圧縮率 80% で測定し、最大荷重を硬さとした。

2-5. 金属イオンの定量

キレート処理した浸漬試料の金属イオン含量を定量した。3% HCl または RO 水を用いて抽出し、前者を総イオン、後者を遊離型イオンとして定量した。さらにその差から結合型イオン含量を算出した。

2-6. 走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM) 観察

(1) キレートおよび塩溶液処理とその後の加熱

ダイコンを 0.5 cm × 0.5 cm × 1 cm に成型し、沸騰 RO 水中で 1 分間加熱し、細胞膜機能を低下させたのち、RO 水、 1.25×10^{-3} 、 1.5×10^{-2} M の EGTA または、0.5 M の CaCl_2 または MgCl_2 水溶液に 4°C で 20 時間浸漬した。その後、沸騰 RO 水中で 10 分間加熱した。ただし、 1.25×10^{-3} M EDTA 水溶液浸漬試料は 10 分間の加熱では組織が崩壊してしまったため、加熱時間を 3 分間とした。また 1.5×10^{-2} M EDTA 水溶液浸漬試料は沸騰加熱中に組織が崩壊したため加熱前のみ観察した。

(2) SEM 観察

浸漬試料および加熱試料を 2% グルタルアルデヒドで固

定し、50～99.5%エタノール溶液で段階的に脱水した。さらに臨界点乾燥装置 (JCPD-5, 日本電子) を用いて臨界点乾燥を行った。その後イオンスパッタコーター (JSM-6510, 日本電子) を用いて金蒸着を行ない、SEM (JSM-6510, 日本電子) にて組織観察をおこなった。

2-7. 分子量分布の測定

(1) AIS (Alcohol Insoluble Solid) の調製

浸漬液を 2-2 および 2-3 のうち、RO 水、 1.25×10^{-3} 、 1.5×10^{-2} M の EGTA 水溶液、 1.25×10^{-3} M EDTA 水溶液、0.5 M の CaCl_2 または MgCl_2 水溶液とした。ここで、EDTA 浸漬試料は加熱後に崩壊したため、加熱前後の比較が行える 1.25×10^{-3} M のみ、分子量分布の測定を行なった。また、 CaCl_2 水溶液および MgCl_2 水溶液浸漬については、加熱前の浸漬試料は RO 水と硬さが同程度であったことから、加熱後試料のみ分析した。

浸漬および加熱試料にエタノールを加え、10,000 rpm で 5 分間ホモジナイズし、ガラスフィルターにて吸引濾過を行った。これを 2 回繰り返した。残渣を 70% エタノール中で振盪し、吸引濾過を行った。これをフェノール硫酸法 (Dubois *et al.* 1956) による糖反応がなくなるまで繰り返した。残渣を 99.5% エタノール、アセトン中で順次振盪および吸引濾過を行い、残渣を風乾して AIS とした。

(2) WSP (Water Soluble Pectin) 画分の抽出

得られた AIS に RO 水を加えて振盪抽出したものを WSP として、次の分子量分布の測定に供した。

(3) 分子量分布の測定

分子サイズ排除クロマトグラフィー (high-performance size exclusion chromatography: HPSEC) により、WSP 画分に抽出されたペクチンの分子量分布を測定した。カラムは Shodex OHpak SB-806M HQ を使い、溶離液を 0.1 M NaNO_3 水溶液、流速を 1.0 mL/min、カラム温度 40°C で RI 検出器 (RI-4030, 日本分光) により測定した。

3. 研究内容

ダイコン中に最も多く含まれている多価金属イオンはカルシウムイオン (23 mg/100 g) であり、次いでマグネシウムイオン (10 mg/100 g) が多量に存在する。その次に多い鉄イオン (0.2 mg/100 g) に比べ、カルシウムイオンとマグネシウムイオン含量が非常に多いことから、本研究ではキレート処理によって観察される結果は内在性のカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンを除去した影響として考察することとした。なお、本研究では、キレート剤は EGTA および EDTA を用いた。前者はカルシウムイオンとマグネシウムイオンの共存下でカルシウム

イオンを選択的にキレートし、後者はカルシウムイオンとマグネシウムイオンの両者をキレートすることから、EGTA 処理はカルシウムイオンの影響、EDTA 処理と EGTA 処理の差は主にマグネシウムイオンの影響であると考えられる。

また、外因性金属イオンの影響の評価についてはカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの塩化物を用いた。

最初に金属イオンがどの程度キレートできているかを確認するために、キレート処理試料の金属イオンの残存量を定量した。次に、キレート処理または塩溶液処理した試料の硬さを測定し、金属イオンが硬さに及ぼす影響を把握した。その上で、それぞれの浸漬試料および加熱試料の顕微鏡観察を行ない、細胞壁多糖類の分子量分布を測定した。これらの結果を総合的に考察し、内在性および外因性の金属イオンが硬さに及ぼす影響について考察した。

4. 研究の実施経過

4-1. キレート処理後の結合型金属イオンの残存量

1.25×10^{-3} ~ 1.5×10^{-2} M の EGTA または EDTA 水溶液に浸漬した後のカルシウムおよびマグネシウムイオン含量を定量し、RO 水浸漬試料に対するキレート処理試料の結合型イオンの残存割合を求めた。その結果、EGTA 水溶液に浸漬した場合、結合型カルシウムは濃度依存的にキレートされているのに対し、結合型マグネシウムは 1.25×10^{-3} 、 2.5×10^{-3} M では残存割合が 100% に近く、 1.5×10^{-2} M では残存割合が約 80% であった。EDTA 処理の場合、 1.25×10^{-3} 、 2.5×10^{-3} M で結合型カルシウムの残存割合が約 60%、結合型マグネシウムの残存割合はそれぞれ 97%、88% であった。 1.5×10^{-2} M ではカルシウム、マグネシウムのほぼ全てが除去されていた。本研究では EGTA はマグネシウムイオンの共存下でカルシウムイオンを選択的にキレートするとされていることから 2 種のキレート剤を用いた。低濃度の EGTA 処理では結合型マグネシウムはほぼ全て残存しており、高濃度でも結合型カルシウムに比べて残存割合が高かったことから、主にカルシウムイオンがキレートされていることを確認した。しかし、EDTA も低濃度ではカルシウムイオンに比べてマグネシウムイオンの結合型の残存割合が高かった。EDTA のカルシウムイオン、マグネシウムイオンの安定度定数 (20°C) はそれぞれ $\log 10.70$ 、 $\log 8.69$ であり (化学大辞典編集委員会 1963)、カルシウムの方が大きいためであると考えられる。しかし、同濃度の EGTA に比べると結合型カルシウムと結合型マグネシウムの残存割合の差は小さかったことから、EGTA では主にカルシウムがキレートされているのに対し、EDTA ではマグネシウムイオンもキレートされており、EGTA と EDTA の差はマグネシウムイオンの影響であると考えて、これ以降の実験の考察を行った。

4-2. キレート処理または塩溶液処理およびその後の加熱がダイコンの硬さに及ぼす影響

(1) キレート処理が硬さに及ぼす影響

1.25×10^{-3} M の EGTA 浸漬試料は加熱により約 25% 軟らかくなったのに対し、RO 水浸漬試料は加熱により約 40% 軟らかくなった。すなわち、低濃度の EGTA 浸漬は RO 水浸漬よりも加熱による軟化を抑制した。一方、 1.5×10^{-2} M EGTA 浸漬試料は加熱前後のいずれも RO 水浸漬よりも軟らかく、特に加熱後の硬さの低下が大きかった。

$1.25 \times 10^{-3} \sim 1.5 \times 10^{-2}$ M の EDTA 浸漬試料は、加熱前後のいずれも濃度依存的に硬さが低下し、いずれの条件においても RO 水浸漬試料に比べて軟らかかった。また、 1.5×10^{-2} M EDTA 浸漬試料は著しい組織強度の低下により、沸騰水加熱中に崩壊し、硬さの測定はできなかった。 1.5×10^{-2} M EDTA 浸漬試料はカルシウムイオン、マグネシウムイオンのいずれもほぼ全て除去された条件であり、内在性の金属イオンをほぼ全て除去すると、加熱に耐えられないほどに組織強度が低下することを確認した。

(2) 塩溶液処理が硬さに及ぼす影響

0.001 ~ 0.5 M の CaCl_2 、 MgCl_2 水溶液に浸漬したところ、浸漬後の硬さはいずれの濃度、塩溶液においても RO 水浸漬試料の硬さとほぼ同じであった。一方、加熱後試料は塩溶液の種類による違いが認められ、 CaCl_2 浸漬試料の加熱後の硬さはいずれの濃度においても RO 水浸漬試料と同程度の硬さであったのに対し、 MgCl_2 浸漬試料は RO 水浸漬試料よりも軟らかく、濃度依存的に軟化した。本研究においても先行研究 (Fuchigami *et al.* 1993) と同様にマグネシウムイオンはダイコンの軟化を促進することを確認した。一方でカルシウムイオンは軟化抑制の明らかな効果は認められなかった。

4-3. 浸漬試料および加熱試料の組織観察

(1) キレート処理試料の組織観察

1.25×10^{-3} M EGTA 処理の加熱試料は RO 水浸漬後の加熱試料よりも細胞分離が抑制されている様子が観察できた。これは結合型カルシウムが約 3% 除去されている条件であり、カルシウムイオンをわずかに除去することで、加熱による細胞分離が抑制されることを明らかにした。一方、 1.5×10^{-2} M EGTA 処理試料は加熱前の段階で細胞接着が弱まっている様子が観察された。これらの結果から、内在性のカルシウムイオンは細胞接着を保持する影響の方が大きいものの、細胞分離の促進にも関与していると考えられた。EDTA 処理試料については 1.25×10^{-3} M および 1.5×10^{-2} M のいずれも加熱前から細胞接着が弱まっている様子が観察された。特に 1.5×10^{-2} M EDTA 浸漬の加熱前試料は細胞壁に亀裂が観察され、組織が脆弱

化している様子が認められた。このことが、加熱中に崩壊した要因であると考えられた。

(2) 塩溶液処理試料の組織観察

0.5 M CaCl_2 浸漬試料は加熱後も細胞接着が保持されている様子が観察でき、カルシウムイオンを添加することで細胞接着が強固になることを確認した。本研究における硬さの測定結果からはカルシウムイオン添加による有意な軟化の抑制は認められなかったものの、カルシウムイオン添加は細胞接着を強固にすることを組織観察により確認した。今後は硬さの測定方法の検証やジャガイモなど煮くずれしやすい食品の煮くずれ抑制効果などを検証する必要があるものと考えられる。

0.5 M MgCl_2 浸漬試料は加熱前は RO 水浸漬試料の組織の状態と同等であったが、加熱後は RO 水浸漬試料よりも細胞分離が進んでいる様子が観察された。よって、マグネシウムイオンを添加することで加熱中に細胞接着が弱まり、軟化が促進されると考えられた。

4-4. 浸漬試料および加熱試料から抽出した WSP の分子量分布

(1) キレート処理試料の分子量分布

細胞壁多糖類であるペクチンが β 脱離によって低分子化する (Albersheim *et al.* 1960) ことで野菜が軟化することが知られている。この β 脱離は主に WSP 画分の低分子化に反映されることが報告されている (Sila *et al.* 2006b) ことから、本研究では WSP 画分の分子量分布を測定した。

加熱前の 1.25×10^{-3} M EGTA 浸漬試料は RO 水浸漬試料に比べて HPSEC のピークが低分子側にシフトした。加熱試料については RO 水浸漬試料は Rt 10 ~ 11 分付近に溶出が認められたのに対し、 1.25×10^{-3} M EGTA 試料では溶出が認められず、それよりも短い Rt、すなわち高分子側のみに溶出した。多くの報告 (Fuchigami *et al.* 1993; Kasai *et al.* 2000; Ni *et al.* 2005) ではカルシウムイオンは加熱による野菜の軟化を抑制するとしているが、一方でカルシウムイオンはペクチンの β 脱離を促進するという報告 (Keijbets *et al.* 1974) がある。 1.25×10^{-3} M EGTA の結合型カルシウムの除去割合は約 3% であったことから、結合型カルシウムをわずかに除去することで、加熱による β 脱離が抑制され、その結果前述のように RO 水浸漬試料に比べて加熱による軟化が抑制されたと考えられる。よって、内在性のカルシウムイオンは加熱によるペクチンの β 脱離促進にわずかに関与していると考えられた。一方、結合型カルシウムが約 45% 除去された 1.5×10^{-2} M EGTA 浸漬試料は加熱前後のいずれも RO 水浸漬に比べて HPSEC のピークが低分子側にシフトした。カルシウムイオンを約半分除去したことでペクチン間の架橋結合が切断され、ペクチンがみかけ上低分子化した

と考えられる。その結果、浸漬試料および加熱試料のいずれも RO 水浸漬よりも軟らかくなったと考えられる。

1.25 × 10⁻³ M EDTA 浸漬試料は加熱前後のいずれも RO 水浸漬に比べて HPSEC のピークが低分子側にシフトした。この条件は結合型カルシウムは約 70% 除去、結合型マグネシウムはほぼ 100% 残存しており、結合型カルシウムの除去によりペクチンがみかけ上低分子化したことで、RO 水浸漬よりも軟らかくなったと考えられる。

(2) 塩溶液処理試料の分子量分布

0.5 M CaCl₂ 浸漬試料は RO 水浸漬に比べて加熱後の HPSEC のピークが大きかった。これは加熱に伴うペクチンの溶出が少なかったことに起因すると考えられるため、今後は加熱前の浸漬試料の分析を行う必要がある。0.5 M MgCl₂ 浸漬試料は RO 水浸漬試料に比べて加熱後の HPSEC の高分子側のピークが大きかった。これは前述の硬さの測定で MgCl₂ 浸漬試料の方が RO 水浸漬試料よりも軟らかかったことに反する結果であった。これについて、加熱したニンジンから調製した AIS を分画して分子量分布を測定した報告によると、加熱によってキレートやアルカリ可溶性の画分が低分子化して WSP のペクチンと共に抽出され、HPSEC の測定により高分子領域に溶出するとされている (Sila *et al.* 2006a)。そのため本研究においても、ヘミセルロースなど細胞壁強度に関与する多糖類が低分子化し、WSP に移行したことで、本実験において RO 水浸漬よりも高分子側に溶出した可能性が考えられる。

5. 研究から得た結論・考察

本研究では内在性および外因性金属イオンのダイコンの加熱による硬さの変化における役割を明らかにするために、キレート水溶液または塩溶液に浸漬し、結合型金属イオンの残存割合、硬さ、分子量分布の測定および組織観察を行なった。内在性のカルシウムイオンはペクチンのβ脱離促進による軟化の促進にも寄与しているものの、細胞接着の保持の影響の方が大きかった。外因性のカルシウムイオンは細胞分離を抑制することで軟化を抑制した。内在性のマグネシウムイオンは未加熱試料の組織強度保持に関与しているのに対し、外因性のマグネシウムイオンは生の状態では WSP に抽出されない細胞壁強度に関わる画分の低分子化により軟化を促進することが示唆された。

6. 残された問題、今後の課題

本研究では分子量分布の測定は主に細胞接着に関与すると考えられる WSP 画分に限定して行った。しかし、EDTA により金属イオンを除去した際には細胞壁が脆弱化している様子が観察され、マグネシウムイオンを添加し

た場合には細胞壁強度の保持に関与している多糖類の変化が示唆されたことから、細胞壁強度に関与する多糖類の変化を把握するために、WSP には抽出されない多糖類の分子量分布の測定やそれぞれの画分の構成糖の分析を行う必要がある。それらの結果を踏まえ、内在性および外因性金属イオンが加熱による野菜の細胞壁多糖類の変化に与える影響の詳細を明らかにしたいと考えている。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、(公財)東洋食品研究所からの援助を賜りました。厚く御礼申し上げます。

8. 参考文献

- Albersheim, P. *et al.*, 1960, Splitting of pectin chain molecules in neutral solution. *Arch. Biochem. Biophys.*, **90**(1), p.46-51. DOI: 10.1016/0003-9861(60)90609-3.
- Dubois, Michel. *et al.*, 1956, Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.*, **28**(3), p.350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017.
- Fuchigami, Michiko. *et al.*, 1993, Effects of Various Chlorides on the Softening of Cooked Japanese Radish Roots and on the Pectic Composition after Cooking. *J. Home Econ. Jpn.*, **44**, p.643-648. DOI: 10.11428/jhej1987.44.643.
- 化学大辞典編集委員会, 1963, 化学大辞典1, 縮刷版, 東京, 共立出版, p. 913, ISBN 4-320-04015-5.
- Kasai, Midori. *et al.*, 1998, Role of Calcium and Magnesium Ions in the Hardening of Pressure-Treated Root Vegetables. *Rev. High Pressure Sci. Technol.*, **7**, p.1283-1285. DOI: 10.4131/jshpreview.7.1283.
- Kasai, Midori. *et al.*, 2000, Effects of Mono and Divalent Metal Ions on the Hardening of Japanese Radish by Preheating. *J. Home Econ. Jpn.*, **51**(8), p.709-715. DOI: 10.11428/jhej1987.51.709.
- Keijbets, Martin J.H. *et al.*, 1974, β-Elimination of pectin in the presence of anions and cations. *Carbohydr. Res.*, **33**(2), p.359-362. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)82815-3.
- 文部科学省, 2021, “第2章 日本食品標準成分表”. 日本食品標準成分表 2020年版 (八訂), 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会, 東京, 全国官報販売協同協会, p.112, ISBN 978-4-904225-28-8.

- Ni, Li. *et al.*, 2005, Pectin methyl esterase catalyzed firming effects on low temperature blanched vegetables. *J. Food Eng.*, **70**, p.546-556. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.10.009.
- Sila, Daniel N. *et al.*, 2006a, Non-enzymatic depolymerization of carrot pectin: Toward a better understanding of carrot texture during thermal processing. *J. Food Sci.*, **71**(1), p.E1-E9. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb12391.x.
- Sila, Daniel N. *et al.*, 2006b, Pectin fraction interconversions: Insight into understanding texture evolution of thermally processed carrots. *J. Agric. Food Chem.*, **54**(22), p.8471-8479. DOI: 10.1021/jf0613379.