蒸葉の電気インピーダンス解析

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 野菜茶業研究所*

水上裕造・深山大介・澤井祐典・山口優一

(平成17年6月3日受理)

Electrical Impedance Analysis of Tea Leaves in the Steaming Process

Yuzo Mizukami, Daisuke Miyama, Yusuke Sawai and Yuichi Yamaguchi

National Institute of Vegetable and Tea Science

National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

Summary

Frequency-dependent electrical impedance spectroscopy has been used to characterize the intracellular and extracellular resistances as well as the capacitance of the cell wall and cell membranes of tea leaves in the steaming process. The intracellular resistance of the steamed leaves decreased by approximately 90% as compared to that of fresh leaves. Water in the cytoplasm was transformed into mobile water by the steaming treatment. This is the main factor that causes the decrease in the intracellular resistance. However, when the treatment duration exceeded 20 s, there was a negligible influence on the change in the resistance. Therefore, this organized behavior was considered to occur within 20 s. On the other hand, since the indissoluble pectin that constitutes the cell wall became water soluble by the steaming treatment, positive ions accumulated on the cell wall at the beginning of the treatment. Therefore, the capacitance increased temporarily due to the treatment. In addition, when the steaming treatment was prolonged, the capacitance and extracellular resistance decreased due to deterioration and shrinkage of cellular tissues.

Electrochemical impedance analysis can be employed to investigate the organized behaviors that occur in tea leaves in the steaming treatment. Therefore, a numerical method to evaluate the steaming treatment can be established using electrochemical impedance analysis.

Key words : steaming process, electrical impedance, resistance, capacitance

* 〒428-8501 静岡県島田市金谷2769

1 緒 言

緑茶製造において、蒸熱は茶葉中の酵素活性を止めると同時に茶葉を柔軟にし、製造を容易にする最も重要な工程である。茶葉の蒸熱程度は蒸葉の表裏の色合い、茎・葉の硬軟度および香気の発揚具合を中心に官能的に総合評価されている¹⁾。ただし、蒸熱程度の判定は非常に難しく、原料生葉に適した条件設定を行うために、熟練者の経験と勘に頼っているのが現状である。

蒸熱度判定の数値化に関する研究は、1980年代の後半に蒸気量¹⁾や蒸熱時間²⁾と蒸葉色の関係について、また応力測定器を用いた剝離法による蒸葉の粘着性³⁾について検討されたが、それ以後の報告はほとんどない。製茶技術において蒸熱程度の判定法の確立は茶業界にとって重要な項目の一つであり、そのためにはその状態を的確に検出することと、基礎的な研究の蓄積が必要である。そこで本報では、電気インピーダンス計測による蒸熱度判定法の確立を目指し、蒸葉の電気特性を明らかにすることを目的とした。

植物は細胞レベルにおいて、抵抗と電気容量の著しく大きな細胞膜・壁とイオン伝導性を持つ抵抗の小さい細胞液から構成されている。低周波領域の交流電界を植物に印加すると、細胞膜・壁の絶縁性により電流は細胞間隙を流れる。一方で、印加周波数を増加させると細胞膜・壁の絶縁性は低下し、細胞内部に電流が流れ始め、高周波領域では細胞内外に電流が流れる。この現象は数百Hzから数百kHzにおいて見受けられ、Maxwell Wagner 効果と呼ばれている⁴⁾。したがって幅広い周波数の掃引により、細胞内外の電解質濃度や細胞膜・壁の状態を調べることができる。このような性質を利用して、果実の追熟過程における細胞内外の抵抗と細胞膜・壁の静電容量の変化は、キウイフルーツについて杉山ら⁵⁾およびBauchotら⁶⁾が、桃についてはHarkerら⁷⁾が明らかにしている。これらの報告をまとめると、追熟にともない細胞組織が軟化することで細胞膜・壁の静電容量は増加し、細胞内

の水分が細胞外へ浸出することで細胞外の抵抗は小さくなることが明らかとなっている。Harkerら⁸⁾は炭酸ガス処理によるイチゴ果実の細胞内外の抵抗変化を調べたところ、細胞内抵抗は変化せず、細胞外抵抗は小さくなることを明らかにした。これは炭酸ガス処理により炭酸イオンと水素イオンが細胞外液に溶解した結果であることから、細胞外抵抗の変化を正規化することで、その制御が可能であると結論している。竹内ら⁹⁾は炊飯過程において、糊化の進行にともない細胞外抵抗は減少し、細胞内抵抗が増加することをつきとめ、電気インピーダンス計測で炊飯過程のモニタリングが可能であることを示した。近年では、電気インピーダンスは粉ミルクに含まれるバクテリア数を計測する方法としても注目されている¹⁰⁾。このように電気インピーダンスは現在、あらゆる分野で応用されつつある。

今回、摘採日の異なる茶葉を材料として用い、蒸熱時間を変えて蒸葉の細胞内外の抵抗と細胞膜・壁の静電容量を電気インピーダンス計測により求めたところ、新たな知見が得られたので報告する。

2 実験方法

2005年の一番茶期に野菜茶業研究所試験圃場（金谷）で機械摘みした品種‘やぶきた’を材料として用いた。摘採日は5月1日、6日、9日および14日であり、その原葉特性を表1に示した。用いた蒸熱機は送带式蒸機（SD-500、寺田製作所）であり、蒸熱時間は20秒、30秒、40秒、50秒、60秒、70秒、115秒および230秒とした。1回の蒸熱操作で用いた茶葉は

表1 材料の原葉特性

試験区	摘採日	百芽重 (g)	含水率 (%d.b)	出開き度 (%)
a	5月1日	42.1	367	55
b	5月6日	68.4	364	71
c	5月9日	81.7	336	79
d	5月14日	84.6	366	95

図1 電気インピーダンス計測システム

約500gであり、茶葉温度が20℃から26℃に低下するまで室内で冷却後、蒸葉10gの電気インピーダンスを計測した。なお計測は3回繰返した。

2.1 電気インピーダンス計測方法

電気インピーダンスは交流4端子法により計測した。図1に示したように、ガラス皿に茶葉をのせ、その上から幅3mm、厚さ1mm、長さ32mmのステンレス製の電極を取付けた円形状のゴム板を押し当て、インピーダンスメータ(3532-80, HIOKI)で50mVの電圧を茶葉に印加し、500Hzから500kHzの周波数において25点の電気インピーダンス Z と位相角 θ を計測した。なお、ガラス皿にアルミ板を接触させ、インピーダンスメータのガード端子と接続することでノイズの影響を防いだ。電極部および測定ケーブルの残留インピーダンスは計測値に影響を及ぼすため、ショートとオープンとの二つの状態において電気インピーダンスを計測し、実測値から差し引くことで計測値を補正した。

2.2 等価回路とその解析方法

細胞組織に起因する構造分散の定量的評価には、電気インピーダンスの周波数特性に対応した電氣的に等価な回路を仮定し、その素子の定数を求める方法が用いられている^{5)~11)}。測定した電気インピーダンスの周波数応答と細胞組織の周波数特性との関係を調べるため、

図2aに示したHayden¹¹⁾モデルを簡略化したモデルを採用した(図2b)。

計測された電気インピーダンス Z と位相角 θ から抵抗 R は $R=|Z|\cos\theta$ の式で、またリアクタンス X は $X=|Z|\sin\theta$ の式で算出できる。このモデルのように容量成分を含む回路では、周波数軌跡は円弧の一部となる。

通常、細胞膜・壁の抵抗 R_m は非常に高いので、簡略化されたモデルでは図2bのように R_m を省略する。細胞内膜器官の影響を考慮し、膜要素を細胞内抵抗に含んだdouble shell model¹¹⁾が提唱されているが、数百kHz以下の計測ではこれらの分散は起こらず、より要素の少ないHaydenモデルが十分成立するとされている。図2cには蒸葉の電気インピーダンス

図2 Haydenモデルと電気インピーダンスの周波数軌跡

- R_e : 細胞外抵抗
- R_i : 細胞内抵抗
- C_m : 細胞膜・壁容量
- R_m : 細胞膜・壁抵抗
- ω : 角周波数
- ϕ : 円弧の中心角
- β : $2\phi/\pi$

の周波数軌跡の一例を示した。図中に示した R_e は細胞外抵抗, R_i は細胞内抵抗であり, C_m は細胞壁・膜の容量成分である。角周波数 ω_m が図中に示されているが, この点は $X = |Z| \sin \theta$ が最大の時の角周波数であり, C_m と R_i および R_e による簡単な式で表せる。

電気インピーダンスの周波数軌跡が円弧となることを確認後, 円の方程式 $(x-a)^2 + (y-b)^2 = r^2$ を前提に, 求められた25点の R と X をコンピューターに入力し, 重み付き回帰分析により円弧の半径 r , 係数 a および b を求めた。さらに求められた円の方程式から図2cに示した R_i , R_e および円弧の中心角 ϕ を計算した。

周波数軌跡が円弧の一部となることの確認と細胞膜・壁の静電容量 C_m の計算は杉山ら⁵⁾の方法を参考にした。すなわち図2cにおいて, 円弧の中心角 ϕ を慣例により $\phi = \beta\pi/2$ とおく。さらに図2cにおいて U と V の長さの比を考えると, 周波数 f を変数として, $\log|V/U| = \alpha \log f + \alpha \log(2\pi/\omega_m)$ の式が導かれ, $\log f$ の直線の傾きより α が求まる。この時, $\alpha = \beta$ となれば周波数軌跡は円弧となり, これはよく知られたCole-Cole分散系のインピーダンス表現式となる。式の傾き α と切片 $\alpha \log(2\pi/\omega_m)$ から ω_m が算出され, C_m を求めることができる。

以上の解析を行うにあたり, Microsoft Excelのマクロを用いた。

2.3 解析精度の検証方法

解析精度を検証するため, 許容差1%以下の抵抗器と許容差5%以下のコンデンサを用いて, R_e が1.2k Ω から1.8M Ω , R_i が0.39k Ω から33k Ω , C_m が1.5nFおよび7.0nFとなるよう図2bの等価回路を10種類作成し, 電気インピーダンスの周波数軌跡を解析した。なお, 計測は20°Cから26°C下, 31%RHから65%RH下の環境下で行い, いずれも3回繰返した。

3 実験結果

3.1 解析精度

R_e , R_i および C_m の計測誤差は, 20°Cから26°C下, 31%RHから65%RHの環境下におい

て抵抗器およびコンデンサの許容差内であった。繰返し計測による誤差はいずれも0.01%以内の変動係数であった。

一般に1000kHz以上の交流電界において, 空気の状態量の中でも温湿度は計測された抵抗や静電容量に影響を及ぼすが⁴⁾, 500kHz以下の周波数では今回計測した環境下において, 温湿度の影響を受けなかった。したがって, 茶葉の電気的特性を計測する際には, 20°Cから26°C下, 31%RHから65%RHの環境下で計測することにした。図2bに示した等価回路の抵抗値および静電容量値と解析により求められた値はほぼ同程度であったことから, 茶葉の電気インピーダンスの周波数軌跡が円弧の一部となれば, 茶葉の細胞内外抵抗と細胞膜・壁の静電容量を精度よく計測できることがわかった。

3.2 生葉と蒸葉の周波数特性

今回計測した原料生葉と蒸葉の α および β は0.54から0.95の範囲でほぼ同程度であり, $\log|U/V|$ と $\log f$ は相関係数0.998以上の線形関係であった。したがって, 今回実験に用いた原料生葉と蒸葉の電気インピーダンスの周波数軌跡は円弧の一部となることがわかった。

3.3 細胞内外の抵抗

図3に蒸熱時間と細胞内外抵抗の関係を示した。図中のaは5月1日, bは6日, cは9日, dは14日に摘採した生葉を材料としている。

原料生葉の細胞内抵抗は5月1日で8k Ω , 6日で12k Ω , 9日で14k Ω , また14日で16k Ω と摘採日が進むにつれ増加した。ただし, 蒸熱後, いずれも約90%程度減少した。さらに細胞内抵抗は, 20秒以上の蒸熱において摘採日と蒸熱時間の影響を受けず, ほぼ一定の値であった。

原料生葉の細胞外抵抗は5月1日で80k Ω , 6日で99k Ω , 14日で249k Ω , また14日で300k Ω と, 細胞内抵抗と同じく摘採日が進むにつれ増加した。5月1日に摘採した生葉を材料とした場合(図3a), 本条件において, 蒸

図3 蒸熱時間が細胞内外の抵抗に及ぼす影響
(a: 5月1日, b: 5月6日, c: 5月9日, d: 5月14日)

図4 蒸熱時間が細胞膜・壁の静電容量に及ぼす影響
(a: 5月1日, b: 5月6日, c: 5月9日, d: 5月14日)

葉の細胞外抵抗は蒸熱時間の影響を受けず、ほぼ一定の値であり、2 k Ω から3 k Ω であった。摘採日が進むにつれ、20秒の蒸熱時間における細胞外抵抗は高く、また蒸熱時間が長くなるにつれその値は減少した。ただし、いずれにおいても70秒から230秒の蒸熱時間では、細胞外抵抗はほぼ同程度の値であった。

3.4 細胞膜・壁の静電容量

図4に蒸熱時間と静電容量の関係を示した。図中のaは5月1日、bは6日、cは9日、dは14日に摘採した生葉を材料としている。

5月1日に摘採した生葉の静電容量は3 nF、6日は1 nF、9日と14日は5 nFであったが、いずれも蒸熱により増加した。5月1日に摘採した生葉を材料とした場合(図4a)、20秒から230秒の蒸熱時間において、その値はほぼ同程度であった。蒸熱時間が長くなるにつれ、若干減少しているように見えるが、有意な差は認められなかった($P > 0.05$)。5月6日に摘採した生葉を材料とした場合では(図4b)、20秒の蒸熱時間で20 nF程度であったが、蒸熱時間が長くなるにつれ減少し、230秒の蒸熱時間では約9 nFであった。摘採日が進み5月9日(図4c)および14日(図4d)の生葉を材料とした場合では、30秒の蒸熱で静電容量のピークを迎え、それぞれ約38 nFおよび36 nFであった。いずれも30秒より蒸熱時間を長くすると静電容量は減少し、70秒を超えてからは一定した。

4 考 察

本結果を見ると、茶葉の熟度に関係なく、20秒より長い蒸熱は細胞内抵抗に影響を及ぼさなかった。このことは、20秒より長い蒸熱は細胞内の電解質濃度に影響を及ぼさなかったと解釈できる。ただし、生葉の細胞内抵抗8 k Ω から16 k Ω に比べ、蒸葉の細胞内抵抗はその約10%程度まで減少した。向井ら¹²⁾は蒸葉と生葉の水のプロトン緩和時間から水の存在状態を調べ、生葉は動きやすい水と細胞質内に存在する動きにくい水が存在するが、蒸葉は細胞質内の水と細胞間隙に存在する水の分離

が消失して、動きやすい水が一様な状態で存在すると報告している。蒸熱により細胞質内の水が動きやすい水となることで、電解質の流動性が高まり、結果として細胞内抵抗が減少したものと理解できる。本結果より、この現象は茶葉の熟度に関係なく、20秒以内の蒸熱で起こることがわかる。

一方、細胞外抵抗が蒸熱により減少した原因は以下のようなことが考えられる。植物の細胞壁は外側から中間ラメラ、第一細胞壁、第二細胞壁に分かれ、中間ラメラは主としてペクチンより構成されリグニンも含む。第一細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチン、リグニンよりなり、最も内側にある第二細胞壁は主としてセルロースから構成されている¹³⁾。細胞壁でペクチンはカルシウム、マグネシウムなどの陽イオンにより不溶性を増し、そのために植物は形を維持している¹⁴⁾。一般に加熱処理によって不溶性ペクチンがトランスエリミネーションによって分解されることで細胞間の結合力が失われることが知られており¹⁴⁾、これが蒸熱による軟化の原因の一つであると考えられる。また蒸熱時間を長くしても全ペクチン含量は変わらないが、水溶性ペクチンが増加する¹⁵⁾ことが知られている。さらに加熱によってペクチンから陽イオンが放出されることで、水溶性ペクチンとなることも知られている¹⁴⁾。これらの報告を踏まえると、蒸熱時間を長くすると細胞外抵抗が減少する要因は、細胞を覆っている不溶性ペクチンが蒸熱により水溶性ペクチンとなることで陽イオンが溶出し、細胞間隙に存在する水の電解質濃度が高まったためであると考えられる。ただし、熟度が進んだ茶葉において70秒以上の蒸熱は細胞外抵抗に影響を及ぼさなかった。高柳ら¹⁵⁾は蒸熱時間が30秒、60秒、150秒と長くなるにつれ、水溶性ペクチンの増加を認めているが、これは細胞外抵抗に影響を及ぼさない程度で不溶性ペクチンが水溶性となったことが考えられる。細胞外抵抗が減少した理由として、ペクチンの水溶性化による細胞間隙の電解質濃度の増加以外にも以下のことが考えられる。Harkerら¹⁶⁾は、細胞膜・壁の劣

化により細胞内から細胞外へイオン漏出と水の漏出が同時に起こり、細胞外抵抗は減少することを報告している。蒸熱によりこれらの挙動が起こったことも十分に考えられる。これらを踏まえると、5月1日に摘採した生葉を蒸熱した場合、細胞外抵抗は20秒より蒸熱時間を長くしてもその値は変わらなかったことから、これらの挙動は20秒以内に終了しているものと考えられる。ただし、5月9日および5月14日に摘採したような熟度が進んだ茶葉を蒸熱した場合、これらの挙動は70秒以内に行われたと理解できる。

静電容量は電荷を蓄える容量であり、 $C = \epsilon \times S / d$ で表すことができる。ここで ϵ は比誘電率であり、 S は表面積、 d は厚さである。本結果のように、蒸熱処理により静電容量が一時的に増加したことは、細胞膜・壁の ϵ と S の増加か、あるいは d の減少か、もしくはそれらが同時に起こった結果であると考えられる。桑原ら¹⁷⁾は蒸熱により原形質分離が起こることを報告しており、それにより、極わずかであるが細胞膜の d が小さくなったために静電容量が増加したとも考えられる。しかし、今回計測した500Hzから500kHzの周波数においては、細胞膜と壁の総静電容量を計測しているため、静電容量の増加は原形質分離の挙動を表していないと理解するのが自然である。前述したように、細胞壁のペクチンが水溶性ペクチンとなることで、細胞壁内に陽イオンが蓄積し、細胞壁の比誘電率 ϵ が高まったために静電容量が増加したと考えられる。ただし、蒸熱時間が長くなるにつれ静電容量は減少した。これは桑原ら¹⁷⁾が報告したように、細胞が収縮することで表面積 S が減少したことと、蒸熱により細胞壁・膜が劣化することで細胞膜・壁に存在するイオンが漏出し¹⁸⁾、比誘電率 ϵ も小さくなったことが原因であると考えられる。本結果をみると、5月1日に摘採したような熟度が若い茶葉では、これらの挙動は20秒以内の蒸熱で終了するが、5月9日および5月14日のような熟度が進んだ茶葉では70秒以内の蒸熱で終了するものと考えられる。

以上の考察をまとめると、蒸熱初期におい

て、細胞内の水が動きやすい水となることで細胞内抵抗は減少した。一方で、蒸熱により細胞壁を構成する不溶性ペクチンが水溶性となることで、陽イオンが細胞壁に蓄積され、一時的に静電容量は増加し、それと同時に細胞外へ陽イオンの溶出も起り、細胞外抵抗は減少した。また、蒸熱時間を長くすると、細胞膜・壁の劣化と収縮が起こるため、細胞外抵抗と静電容量は減少した。ただし、これらの挙動の進行具合には原料茶葉の熟度による違いが見られた。

電気インピーダンス計測により蒸葉の解析を行い、蒸熱工程における茶葉の細胞内外抵抗と静電容量を求め、新たな知見が得られた。これらの指標を正規化することにより、電気インピーダンスは新たな蒸熱程度の計測方法として利用できる可能性がある。

5 摘 要

蒸葉の電気インピーダンスを解析し、知見が得られた。蒸葉の細胞内抵抗は生葉に比べると約90%程度減少した。これは細胞内の水が動きやすい水となったことが主要因であり、これらの挙動は蒸熱初期に起こると考えられた。一方で、蒸熱により細胞壁を構成する不溶性ペクチンが水溶性となることで、陽イオンが細胞壁に蓄積され、一時的に静電容量は増加し、それと同時に細胞外へ陽イオンの溶出も起り、細胞外抵抗は減少したと考えられた。また、蒸熱時間を長くすると細胞組織の劣化や収縮により静電容量と細胞外抵抗は減少することが理解できた。

電気インピーダンスは、細胞内外の抵抗や細胞膜・壁の状態を調べる上で有効な方法であり、新たな蒸熱程度の判定法として利用可能である。

6 謝 辞

本実験を遂行するにあたりご協力頂きました入江隼之介さん、尾上雄也さんに感謝申し上げます。

7 引用文献

- 1) 大森薫・中村晋一郎・渡辺敏郎 (1986) : 蒸熱条件の違いによる茶葉色の変化 (第1報). 茶研報, 63, 24-29.
- 2) 大森薫・中村晋一郎・渡辺敏郎 (1986) : 蒸熱条件の違いによる茶葉色の変化 (第2報). 茶研報, 63, 30-34.
- 3) 上辻久利 (1988) : 蒸し葉の物理測定による判定法. 京都府立茶業研究所研究報告, 20, 16-21.
- 4) 豊田浄彦 (2003) : 電気的特性の利用. 河野澄夫編, 食品の非破壊計測ハンドブック, サイエンスフォーラム, 東京, pp. 84-91.
- 5) 杉山純一・林徹・堀内久弥 (1987) : キウイフルーツのインピーダンス特性. 食工誌, 34, 725-730.
- 6) Bauchot A. D., Harker F. R. and Arnold W. M. (2000) : The use of electrical impedance spectroscopy to assess the physiological condition of kiwi-fruit. Post. Bio. Tech., 18, 9-18.
- 7) Harker F. R. and Dunlop J. (1994) : Electrical impedance studies of nectarines during coolstorage and fruit ripening. Post. Bio. Tech., 4, 125-134.
- 8) Harker F. R., Elgar H. J., Watkins C. B., Jackson P. J. and Hallett I. C. (2000) : Physical and mechanical changes in strawberry fruit after high carbon dioxide treatments. Post. Bio. Tech., 19, 139-146.
- 9) 竹内龍三・豊田浄彦 (2000) : 電気インピーダンスによる炊飯過程のキャラクタライゼーション. 岐阜女子大学紀要, 29, 155-159.
- 10) Walker K., Ripandelli N. and Steve Flint S. (2005) : Rapid enumeration of *Bifidobacterium Lactis* in milk powders using impedance. International Dairy Journal, 15, 183-188.
- 11) Zhang M. I. N., Stout D. G. and Wilison J. H. M. (1990) : Electrical impedance analysis in plant tissues : symplasmic resistance and membrane capacitance in the Hayden model. J. Exp. Bot., 41 (224), 371-380.
- 12) 向井俊博・堀江秀樹・深津修一・袴田勝彦・後藤哲久 (1992) : 製茶工程中の水の存在状態のNMRによる解析. 茶研報, 75, 23-27.
- 13) E. E. Conn., P.K. Stumpf., G. Bruening and R.H. Doi. (1988), 8.1.2植物細胞壁, 東京化学同人, コーンスタンプ生化学 (第5版), 田宮信夫・八木達彦訳, 東京, pp. 257-258.
- 14) 渕上倫子 (1983) : 野菜の軟化に及ぼす加熱時のpHの影響. 日栄食誌, 36 (4), 219-224.
- 15) 高柳博次・阿南豊正・池ヶ谷賢次郎 (1987) : 蒸し度の差異による製茶の理化学性の変化, 茶研報, 65, 81-85.
- 16) Harker F. R. and J. H. Maindonald (1994) : Ripening of Nectarine Fruit. Plant Physiol, 106, 165-171.
- 17) 桑原穆夫・中山仰 (1949) : 茶葉組織の製茶操作による変化 (第1報). 茶研報, 2, 29-34.