

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07248

研究課題名(和文)放射光イメージングを利用した食品冷凍貯蔵時に進行するタンパク質凝集形成機構の解明

研究課題名(英文)The study using synchrotron X-ray CT about protein aggregation behavior in frozen food gels during storage under subzero temperature

研究代表者

小林 りか(KOBAYASHI, Rika)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：50780326

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文):冷凍食品の解凍復元性を向上させるためには、元来注目されてきた氷結晶の状態だけではなく、凍結濃縮相に含まれる成分の低温下での変化の理解が必要であり、そのためには凍結濃縮相の in-situ 評価が求められる。本研究では凍結濃縮相の濃縮度の差を非破壊で評価するため、放射光施設で得られる高輝度単色X線によるCTによって評価することを試みた。その結果、凍結濃縮相の濃縮度分布評価を、放射光X線CTで得られるX線線吸収係数を用いて行えること、また、貯蔵過程で凍結濃縮相内の密度が変化していること、凍結の遅速による凍結濃縮相の濃縮進行度の違いが生ずる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):It is necessarily to understand the changing behavior of some components such as protein, lipid, or carbohydrate in frozen-concentrated phase of frozen food, in order to improve the quality of frozen-thawed food. In this study, in-situ observation of the frozen-concentrated phase in frozen storage protein gels were performed by synchrotron X-ray Computed Tomography, since Synchrotron-generated high-brightness X-rays have the potential to reflect imperceptible differences in electron density between ice crystals and the other components in a material, i.e. frozen-concentrated phase. As a result, it was succeeded to observe the degree of freeze-concentration in frozen food from the frequency distribution of X-ray linear absorption coefficient gained from the CT tomograms. Furthermore, it was identified that the degree of freeze-concentration in frozen egg albumen gels were depending on freezing rate.

研究分野：食品工学

キーワード：食品冷凍 低温貯蔵 凍結濃縮 放射光X線CT

1. 研究開始当初の背景

(1) 冷凍食品の解凍復元性を向上させるためには、元来注目されてきた氷結晶の状態だけではなく、凍結濃縮相に含まれる成分の低温下での変化の理解が必要である。冷凍食品のうち、タンパク質を多く含む食品の解凍復元性を左右する要因として、凍結、低温貯蔵、解凍の3要素から構成される冷凍操作でのタンパク質の変性および凝集が挙げられる。冷凍操作を通じてタンパク質が変性することによって、食品の保水力は低下し、テクスチャーが変化するという品質劣化が生じ、凍結前の性状とは異なった食品となる。

経験的また実験的に、冷凍食品の凍結速度が遅いほど、また凍結過程の後の貯蔵過程が長くなるほど冷凍食品の品質劣化はより激しくなると理解されている。これらの現象は、古くから食品中での氷結晶の生成、成長挙動によって説明されてきた。すなわち凍結速度が緩慢であるほど氷核生成頻度は低く、なおかつ氷が成長しやすい温度帯に長く滞在するため氷結晶が粗大化しやすく、また貯蔵期間が長くなるほど再結晶化によって氷結晶が粗大化するため、物理的に食品組織にダメージを与えるという考え方である。

(2) しかしながら、冷凍食品の品質劣化について、氷結晶の及ぼす物理的ダメージだけでは説明できない現象が多々存在する。冷凍食品の解凍復元性を悪化させるタンパク質凝集構造の形成は、凍結濃縮によってタンパク質周辺の環境が変化することで変性し、会合が進むためと理解されている。またこれらは貯蔵前の凍結速度や貯蔵期間に依存して変化することが報告されている。しかし、一般的に食品を凍結した場合の凍結濃縮相の濃度は、凍結到達温度にのみ影響を受け、凍結速度や貯蔵期間には影響を受けず、一定であると考えられている。すなわち現状、タンパク質の凝集体形成挙動に対する凍結速度や貯蔵期間の影響を十分に説明できない状態にある。

このような中、課題実施者らは凍結速度の違いによって、豆腐の濃縮相の局所的な濃縮度とその場所分布が異なる傾向にあることを、実験室レベルの X 線 Computed Tomography によって、X 線透過係数の違いから定性的に捉えている。食品の凍結速度が非常に速く、かつ食品の粘度が高い場合、非平衡的に水から氷への相変化が進むため、一部の氷が結晶化せずガラス状態を取り、凍結濃縮相部で十分に濃縮が進まないまま系全体が凍結される。その結果、局所的に固形部分の濃縮度が低い状態が出来ると予想される。すなわち凍結速度や貯蔵期間によって、タンパク質の凝集体形成挙動が変化してくる現象は、凍結が非平衡に進行し、凍結速度に依存して凍結濃縮相の濃縮率が変化することが要因となるのでは

ないかと考えられる。

(3) 上記の仮説を検証するためには、食品の凍結濃縮相そのものの評価が必要となる。しかしながら、常温常圧での測定では、一旦凍結した食品を解凍する必要があり、濃縮相から分離されていた水分は再水和してしまい、濃縮相の状態は崩れてしまう。すなわち凍結状態のままでの評価が必要である。更に、凍結濃縮相の状態は、同一条件下で凍結や貯蔵されたとしても、熱流速の分布が生ずるために食品内の場所によって分布を持つことが予想される。そのため比較的広範囲で、濃縮度の分布を測定することが求められる。X 線 Computed Tomography は物質の 1 ボクセルあたりの X 線の透過しやすさ (X 線線吸収係数) の分布から画像を再構成していることから、この係数を利用して、物質の局所的密度を広範囲かつ非破壊で観察できると考えられる。しかしながら、卓上の X 線 CT は白色 X 線源を利用していることが多く、また X 線の輝度が低いことから、微少な密度差を X 線線吸収係数として捉えることが難しい。特に凍結状態での食品中の氷と濃縮相を分離し、また凍結濃縮相中の微少な密度の違いを捉えるには、高分解能での CT 測定が必要となる。その一方で、放射光施設で得られる高輝度単色光 X 線を用いた CT イメージングでは、断層画像は照射 X 線波長での X 線線吸収係数の多階調な空間分布として得られるため、密度分解能の高い X 線線吸収係数の度数分布図 (ヒストグラム) が得られ、食品内の微妙な密度変化を定量的に捉えるポテンシャルがあるとされる。

2. 研究の目的

本研究では、冷凍食品の品質劣化に対する凍結濃縮相での諸反応進行の機序機構を氷結晶との関係を含めて明らかにすることを最終的なモチベーションとし、以下の実験検討を行うことを目的とした。まず、タンパク質ゲルを食品モデルに用い、凍結速度や凍結濃縮相の濃縮度変化と、タンパク質の凝集体形成の進行挙動を放射光単色 X 線 CT によって直接的に定量することを試みる。更に食品タンパク質ゲルのび糖や塩といった添加物が解凍後の品質に及ぼす影響を、氷結晶の存在状態も含めて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 豆腐をモデルタンパク質食品として用いた放射光 X 線 CT による凍結濃縮相の観察手法の検討

急速凍結および緩慢凍結を行い、-2°C で貯蔵を行った豆腐を撮像試料とした。凍結状態のままと、棚温度を約 -40°C に制御した凍結乾燥装置で凍結乾燥させたものを測定試料とした。X 線 CT 測定は BL19B2 ラインで行ない、X 線源のエネルギーは

12.4 keV に設定した。実験ハッチ内には液体窒素蒸気を吹き付けて低温での温調を可能とした X 線 CT 用の回転試料ステージと、高調波除去のため 0.23° で X 線ミラーを設置し、ステージ下流側に X 線 CCD カメラを設置した。凍結および乾燥試料の中心部から、測定直前に約  $1.5 \times 1.5 \times 10 \text{ mm}^3$  の直方体試料片を切り出し、これを回転試料ステージに設置し撮像した。空間分解能は  $2.91 \mu\text{m}/\text{pixel}$  および  $2.94 \mu\text{m}/\text{pixel}$  であった。試料の撮像は 1 ステップあたり  $0.5^\circ$  で  $180^\circ$  まで回転させ撮像を行うステップスキャンを用い、なるべくノイズの少ない画像を取得することを狙った。その後さらに SN 比向上を狙い多重露光で行った。すなわち試料を 1 ステップあたり  $0.5^\circ$  で  $180^\circ$  まで回転させ撮像を行う過程で、1 ステップにつき 5 枚の透過像を連続で得て積算した。この際の 1 枚当たりの露光時間は 0.25 s とした。

#### (2) 糖添加した場合の卵白ゲル凍結濃縮相の in-situ 性状観察

乾燥卵白を 14% の濃度となるよう蒸留水に溶かし、 $80^\circ\text{C}$  の湯槽中で 30 分加熱して卵白ゲルを作成した。またこの際に、2.5% スクロースを添加した。卵白ゲルを、極急速に凍結した試料 ( $-80^\circ\text{C}$  凍結) と通常の緩慢凍結 ( $-30^\circ\text{C}$  凍結) した試料を、凍結状態のまま放射光 X 線 CT によって in-situ 測定を行った。今回は、大型放射光施設 SPring-8 の BL14B2 ランで CT 撮像実験を行い、その際、SN 比向上を狙い 1 ステップにつき 10 枚の多重露光を行なって CT を撮像した。他の測定条件は (1) と同様に行った。

#### (3) 卵白ゲルを用いた低温貯蔵中のタンパク質の変化への添加物による影響評価

乾燥卵白を 14% の濃度となるよう蒸留水に溶かし、 $80^\circ\text{C}$  の湯槽中で 30 分加熱して卵白ゲルを作成した。またこの際に、糖及び、塩添加の影響を検討するためスクロースを 1% から 5%、NaCl、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{CaCl}_2$  を 0.15% 添加しゲルを調整した。調整したゲルを  $-80^\circ\text{C}$  で冷凍して、その後 1 日から 20 日間、 $-5^\circ\text{C}$  で低温貯蔵した。タンパク質の変性指標として、ゲルの硬さを測定した。任意の期間で試料を解凍し、テクスチャーアナライザーで、平板プランジャーを用いた圧縮試験を行った。硬さの指標として、最大応力を用いた。またその際のゲルの組織観察を行うために、解凍した卵白ゲルをホルマリンで固定し、エタノールで脱水したものを、薄切し、光学顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 豆腐をモデルタンパク質食品として用いた放射光 X 線 CT による凍結濃縮相の観察手法の検討

緩慢凍結させ、低温貯蔵させていない試料の凍結試料と乾燥試料の CT 撮像によって得た豆腐断層像とその際の X 線吸収係数の分布を示す (図 1.1)。凍結試料では、氷と豆腐固形部分の密度差が小さく、X 線吸収係数の分布を解析できるほどには明白なデータが得られなかった。一方、乾燥物試料では X 線吸収係数の分布は 0 付近を中心とした空隙部由来の大きなピークと、3~5 付近の豆腐固形部分由来の小さなピークが見られた。より密度分解能を上げるため、1 ステップ当たり 5 回の多重露光した際の凍結状態の豆腐試料の貯蔵 0 日と 14 日の CT 断層像 (X 線線吸収係数の断層面内分布) と、これらの画像の豆腐部分から得た X 線線吸収係数の度数分布を示す (図 1.2)。凍結試料では、最も暗く映った部分が空隙、暗い灰色に映った部分が氷結晶、明るい灰色に映った部分が豆腐固形部を示す。エージングを経るほど、断層像上では固形部分と氷部分コントラストが大きくなり、固形部分の構造がよりはっきりと観察できた。X 線線吸収係数の実測値の分布 (図中黒実線) は  $2.4\text{--}2.5 \text{ cm}^{-1}$  付近を中心とした一つのピークを持つ形状であった。すなわちこれは、今回得られた X 線線吸収係数の度数分布は、氷部分由来の大きなピークと豆腐固形部のピークから成り、実測値とフィッティングした計算値との差に、豆腐固形部分由来の X 線線吸収係数の寄与が表れていると考えられる。しかしながら絶対値としての差は僅かであり、ピーク分離を行って詳細検討するに十分な情報量ではなかった。

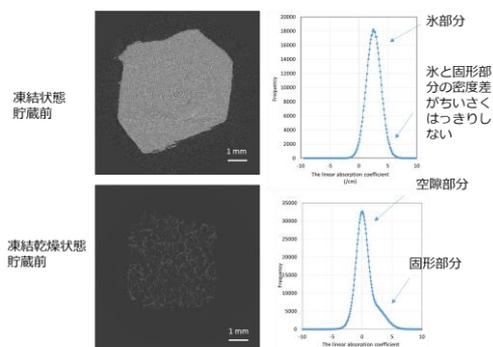


図 1.1 豆腐凍結物と凍結乾燥物の CT 画像および X 線線吸収係数の頻度分布

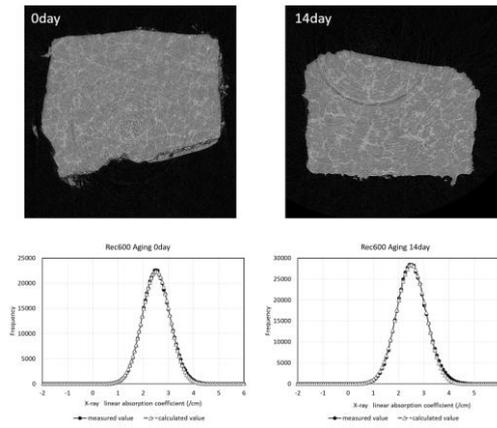


図 1.2 多重露光によって撮像した凍結豆腐の CT 画像および X 線線吸収係数の頻度分布

そこで、乾燥物の断層像をより詳しく見ていった。豆腐凍結乾燥物の断層像から得られた X 線線吸収係数の度数分布変化を示す (図 1.3)。ピーク中心を  $0 \text{ cm}^{-1}$  とした空隙部分とピーク中心を  $0.6 \text{ cm}^{-1}$  としたノイズの分布をまず X 線線吸収係数の度数分布のマイナス領域でフィットさせ、決定した後、固形部分由来のピークフィッティングを行った。どの豆腐試料においても、固形部分の度数分布は  $1.7 \text{ cm}^{-1}$  付近を中心とする低密度側ピークと  $2.8 \text{ cm}^{-1}$  付近を中心とする高密度側ピークの 2 つに分かれた。X 線線吸収係数の絶対値から考えると、低密度側は脂質由来、高密度側はタンパク質由来でないかと考えられた。すなわち、試料を凍結乾燥物とした場合は、1 ステップにつき 5 回の多重露光を行うことで、ピークのシフトから凍結濃縮相の性状を評価できることが分かった。しかしながら今回の CT 測定条件では凍結状態のまま凍結濃縮相の性状を評価することが難しいことも分かった。

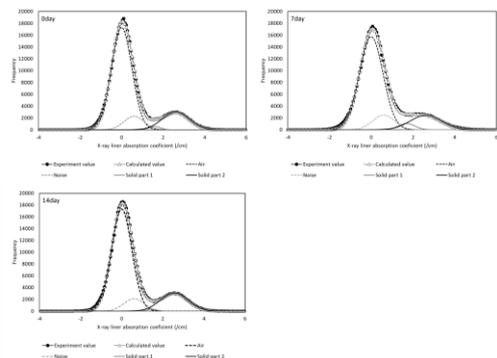


図 1.3 貯蔵過程における豆腐凍結乾燥物の X 線線吸収係数の頻度分布変化

## (2) 糖添加した場合の卵白ゲル凍結濃縮相の in-situ 性状観察

豆腐よりも油脂を含まず、構成成分が単純である卵白ゲルを用いて、放射光 X 線 CT による凍結濃縮相観察を行った。またゲル自体をガラス化しやすくし、濃縮相の分布が凍結速度によって変化することを狙い、糖を添加した。得られた緩慢凍結卵白ゲルの断層像では、氷部分とマトリクス部分のコントラストが大きく、マトリクスをはっきりと区別することが出来る画像を得た。その一方で、極急速凍結した卵白ゲルの断層像では氷晶部とマトリクス部のコントラストが弱く、はっきりとしなかった (図 2.1)。更に断層像から得た X 線線吸収係数の頻度分布を氷晶部とマトリクス部の 2 つのピークに分離した。その結果緩慢凍結試料のマトリクス部のピークトップは、極急速凍結試料のものと比較して、より高密度側に存在していた (図 2.2)。以上より、極急速凍結試料では相分離が十分に進む前に凍結が完了している可能性が考えられる。

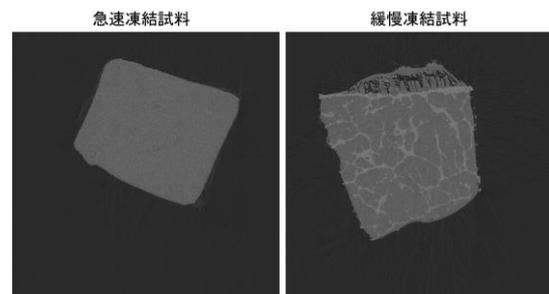


図 2.1 糖添加卵白ゲルの放射光 CT 断層像

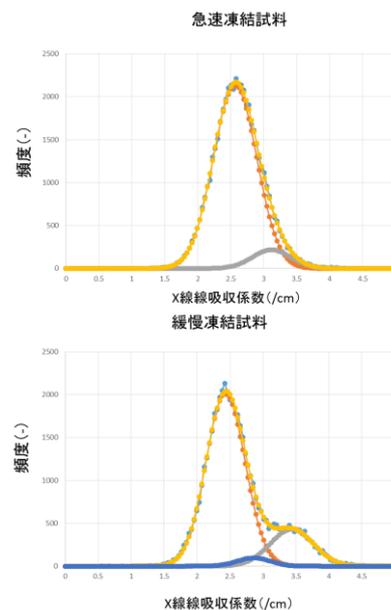


図 2.2 糖添加卵白ゲルの X 線線吸収係数の頻度分布

急速凍結試料では、マトリクスの構造が微細なものとなっているため空間分解能の影響も考慮する必要があるが、本測定によって、凍結の遅速による凍結濃縮相の濃縮進行度の違いを評価できる可能性が示唆されたと考えられる。

### (3) 卵白ゲルを用いた低温貯蔵中のタンパク質の変化への添加物による影響評価

貯蔵によって、豆腐と同様にどの卵白ゲルでも硬さが増していった。糖添加ゲルでは5%の糖添加によって最も硬化抑制効果が見られた。2.5%の糖添加では貯蔵初期において硬化抑制効果があったが、貯蔵が進むにつれ無添加ゲルの値に近くなった。また1%の糖添加ではほぼ効果が見られなかった(図3.1)。解冻したゲルの組織を観察してみると、貯蔵に伴ってゲルの組織は細くなっていったが、糖の添加によってその進行速度は抑制されていた。しかし貯蔵12日目には糖濃度に関わらずどのゲルも同様な組織構造を示した(図3.2)。

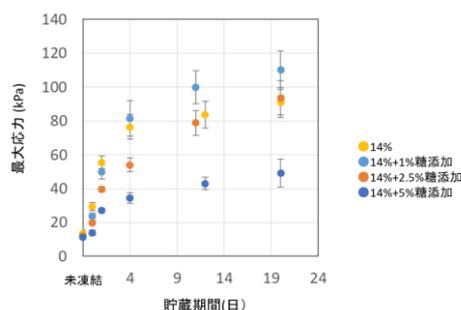


図 3.1 貯蔵過程における糖添加ゲルの硬さ変化

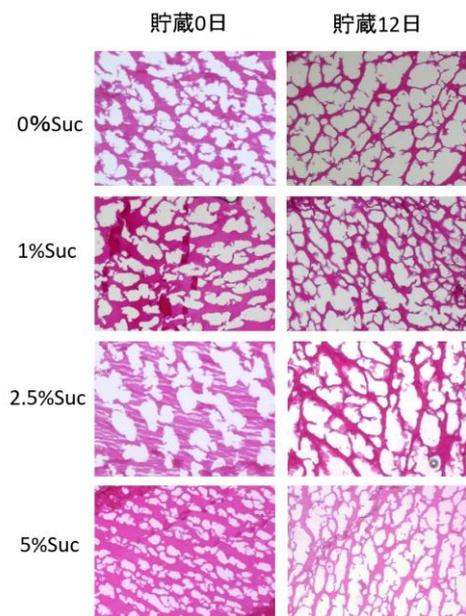


図 3.2 貯蔵過程における糖添加ゲルの組織変化

以上のことより貯蔵初期には、氷結晶の分布状態がゲルの硬さに関係しており、貯蔵日数が増えるにつれ、ゲルの組織部分が硬さ増大に寄与していると考えられた。

#### (4) 総括

本研究の結果、凍結濃縮相の濃縮度分布評価を、放射光 X 線 CT で得られる X 線線吸収係数を用いて行えること、また、貯蔵過程で凍結濃縮相内の密度が変化していること、凍結の遅速による凍結濃縮相の濃縮進行度の違いが生じている可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 小林りか、冷凍貯蔵過程におけるゲル状食品のテクスチャー変化に寄与する緒因子の検討、日本冷凍空調学会、2018 (発表予定)
- ② 小林りか、低温エージング過程で凍り豆腐の固形部に生ずる密度変化の放射光 CT を利用した観察、低温生物工学会、2017
- ③ 小林りか、食品ゲルの凍結エージングに関する研究、第 44 回食品の物性に関するシンポジウム、2017 (招待講演)

[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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 りか (KOBAYASHI, Rika)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：50327326

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

鈴木 徹 (SUZUKI, Toru)

佐藤 眞直 (SATO, Masugu)

石黒 貴寛 (ISHIGURO, Takahiro)