

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07813

研究課題名（和文）凍結濃縮相内で構造化を制御する食品機能性カプセルの創製と開発

研究課題名（英文）Development of structurization technique for food microcapsules by using the freeze-concentrated phase

研究代表者

中川 究也（Nakagawa, Kyuya）

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90433325

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質から作製できる凝集微粒子は、食品栄養素や機能性物質を体内へ適切に送達・放出する担体として利用できる。様々な特性を有する微粒子の設計にあたり、その特性を制御できることが重要だが、そのためには粒子のナノ構造制御が重要である。本研究では凍結を利用してその特性制御を目指して研究を進めてきた。カゼインナトリウムと卵タンパク質にターゲットを絞り、凍結に伴って進行する凝集の過程を詳細に検討し、それに伴って生じる物性の変化について検討した。凍結に伴う凝集体サイズの変化、凝集物密度の変化、凝集体の表面特性の変化が、凍結環境下でどのようなメカニズムで進行するかを解明してきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究がターゲットとする凍結を利用した微粒子製造技術は、凍結濃縮相というマイクロスペースを物質生産の「場」として利用するものであり、新しいプロセス工学的発想を具現化する試みである。本成果は、組成の変更によらずに特性（生体内における粒子の挙動やバイオアベイラビリティ）の異なる機能性微粒子作製を可能とする可能性を秘めている。研究成果は食品製造プロセス（冷凍食品製造、フリーズドライ食品製造など）へと直接的に応用できると想定され、食品に栄養物質の送達能といった高度な機能性を付加する新しい食品加工プロセス技術を産業界に提供しうると期待される。

研究成果の概要（英文）：Aggregated protein microparticles can be used as a carrier for delivering and releasing food nutrients and functional substances into the body. In order to design microparticles having various functional properties, it is important to be able to control the properties, especially, control of the nanostructure of the particles. In this research project, freezing process has been focused as a mean to control the formation and characteristics of the aggregated particles. Sodium caseinate and egg proteins were selected for the investigation, and the detailed changes in physical properties of the aggregated matters under freezing process were examined. The mechanism could be clarified by which changes in aggregate size, changes in aggregate density, and changes in surface properties of aggregates due to the progress of freezing and the freezing environment.

研究分野：食品工学

キーワード：凍結濃縮 ナノ粒子 タンパク質凝集 マイクロカプセル

## 様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ナノ・マイクロ微粒子をキャリアとして薬剤を特定の生体器官へと運搬・放出させるドラッグデリバリー技術は、抗がん剤のような毒性の高い薬剤の利用を強いモチベーションとして医薬工分野にて広く研究されている。近年、これら技術を食品分野へも応用するべく、食品栄養素や機能性物質を微粒子中にカプセル化し、送達を試みる研究が広く実施されるようになってきた。食品用途としてのカプセル作成は、医薬用途とは異なるいくつかの難しい技術課題が生じる。

経口摂取されることを前提としたカプセルの設計、原料は食品として認可された物質に限定、製品の貯蔵安定性が医薬品よりも長期であること（乾燥粉末であることが望ましい）、生産プロセスが安価かつ簡易であること、などが挙げられる。

従って研究課題の重点は、口・胃・腸という消化経路内で物質送達キャリアとしての機能を持つ構造物を、食品利用できる限られた原料からいかに造るかということに置かれる。ここで、期待する機能を実現する粒子構造の理解、限られた物質から様々な構造体を創り出す方法論が必須となるが、そのためにプロセス工学的なアプローチの果たす役割は大きい。すなわち、微粒子に機能を与える構造を、任意に創製・制御することのできるプロセス開発がなされるべきである。近年、ナノ粒子を構成する分子種と生理機能との関わりを明らかにする報告は多いものの、粒子の物理構造と生理機能との関連は明らかになっていない。これはナノスケールの構造の解析の難しさと、同一組成の原料から異なる構造を持つ試料を作製する手法の不備による。

本研究は、タンパク質からなる凝集微粒子の構造を凍結によって制御することを試みるものである。凍結時に形成する氷晶は、溶質成分や分散質を排斥し、凍結濃縮相と呼ばれる高濃度液相を形成する。この凍結濃縮相内部における濃度上昇を利用し、pH やイオン強度の変化に起因するナノ粒子形成を引き起こさせるという着想が本技術である。この手法によれば、凍結条件の変更によって、粒子の構造形成を制御できる。粒子の機能性や特性が粒子構造と強く関わっているならば、凍結条件の調整によって粒子の機能性や特性を制御できることとなる。また、特性の異なる粒子を組成の変更によらず作製できる。筆者はこれまでに、タンパク質凝集形成、タンパク質+多糖複合体形成、多糖複合ゲル形成などが凍結を経て形成しうることを確認してきた。それらがカプセル作製に利用でき、凍結条件の変更によって特性の異なるカプセルを作製できること、凍結プロセスの適用は凝集タンパク質微粒子の疎水性度と関わる特性が制御でき、消化過程における粒子構造を変化させられる可能性を見出してきた。カプセル化への応用のためには種々のタンパク質を対象とした知見が足りないことと、凍結に伴う凝集の機序が十分に解明できていないことが研究開発当初の課題として挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、凍結下におけるタンパク質凝集体の構造変化の過程を追跡し、構造変化の機序を究明することを目的とした。微粒子の構造特性の制御を組成の変更によらず実現可能と期待される手法を開発し、食品に機能性を付加する新しいプロセス技術へと応用させることを目指し研究を実施した。具体的な実施項目は以下の通りである。

- タンパク質（カゼインナトリウム、卵白、全卵）の凍結過程において形成した凝集体の解析（凝集体サイズ、懸濁濃度、表面特性、可溶・不溶画分量など）
- タンパク質と多糖複合体の凍結過程におけるナノ構造の解析（SAXS の利用）
- 乳酸菌をカプセル化させた微粒子の作製（生菌保持数の向上）

### 3. 研究の方法

凍結によって形成した凝集体を、抵抗パルスセンシング法（TRPS）を使用して得た計測データをメインの分析対象とした。本技術は、粒子が電極に接続されたナノポアを通過させ、通過の際に得られる電気パルスを利用することで、粒子径、粒子濃度、粒子表面特性などの物性値を推定する手法である。細菌/細胞、ウイルス、細胞小胞、DNA、タンパク質などの分析にすでに広く使用されている。また、小角X線散乱（SAXS）を用いて、凝集体に内在するナノ構造の変化についても解析を行った。

一定量のタンパク質試料（カゼインナトリウム、卵白、全卵）をNaCl バッファー（0.01 Mまたは0.1 M）に分散させ、その後、溶液のpHを1.67 M酢酸で5.5または8.0に調整し、コロイド懸濁液を得た。卵白の懸濁液を一晩攪拌し、2 mLを分注し遠心分離した（1,000G, 10分間）。この懸濁液を-35℃で1時間凍結し、次に-5℃、-20℃、-35℃で2日と5日間エージングさせた。その後、試料を25℃で解凍した後、再び遠心分離した（1,000G, 10分間）。上清中の粒子を分析に供した。

TRPS（qNano, IZON Co. Ltd）を使用した。マイクロポア（NP4000, 2-10 μm）を約45 mmまで伸調し、ナノポアサイズを約4 μmとして分析を行った。カルボキシル化ポリスチレン粒子懸濁液（CPC4000E, IZON Co. Ltd, ニュージーランド）をキャリアレーションに使用した。35 μLのサンプルまたはキャリアレーションの懸濁液をアナライザーに追加し、5 barの空気圧を適用し微細孔を通過させた。計測中の印加電圧は0.04 Vであり、電流曲線のベースラインは約100 nAを維持させた。粒子径と粒子数は、電流パルスの強度と数により、粒子表面の特性は、各粒子がマイクロポアを通過する経過時間によって推算した。

タンパク質凝集体の内部構造は、放射光施設におけるSAXSおよびUSAXS測定によって実施した（SPRING-8, BL19B2）。調整した試料を2 mLマイクロチューブに入れ、一定の条件にて-35℃

に冷却し凍結させた後、設定温度（ $-35^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-5^{\circ}\text{C}$ ）にて一定期間保持した（エージング：1 h, 1 day~5 days）。これらの試料を測定直前に解凍し、速やかに 0.4%NaCl 溶液にて 100 倍希釈した。ここで NaCl 溶液を用いるのはイオン強度変化に伴うタンパク質凝集を防ぐためであり、ネイティブの液卵試料のイオン強度が変化しないように設定している。試料溶液を注入した 2 mm 径キャピラリーチューブを試料ステージに設置させることで測定を行った。使用エネルギーは 18 keV、カメラ長は 40000 mm の USAXS モードと 3000 mm の nSAXS モードの二通りの設定にて実験を実施した。露光時間は USAXS, nSAXS モードについてそれぞれ 300 秒と 180 秒に設定した。検出器は PILATUS3 2M(Dectris Ltd.)を使用した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1 卵白の凍結による凝集体形成（凍結前後の比較）

設定 pH および NaCl 濃度の異なる 4 種の懸濁液をエージング温度（ $-5$ 、 $-20$ 、および  $-35$ ）で 5 日間凍結させた。室温で解凍した後の、4 つの懸濁液の TRPS による平均直径、平均粒子数濃度、平均 FWHM 時間に基づいて比較した結果を Fig. 1 に示す。NaCl 濃度と pH のこれらの因子に強く関連していることを示している。一方、エージング温度の影響は、NaCl 濃度または pH の影響よりも小さかった。

0.01 M または 0.1 M NaCl のコロイド懸濁液では、平均粒子径の値が異なる。この違いは電気二重層の影響によるものと推測された。卵白凝集体の表面は負に帯電しており、 $\text{Na}^+$ イオンがこの表面に引き寄せられて正に帯電した層を形成すると考えられる。正に帯電した層は、 $\text{Cl}^-$ イオンを引き付け、さらに負に帯電した層を形成する。これらの電気層の厚さは、イオン間の引力の増加により、イオン強度の増加に伴って減少する（DLVO 理論）。したがって、0.1 M NaCl 懸濁液の凝集体は電気二重層が薄くなる。電気二重層が薄い粒子は反発効果が低く、凝集しやすいため、本研究における 0.1 M NaCl 懸濁液中の卵白凝集体は、0.01 M NaCl 懸濁液中のものよりも大きいと説明できる。

HCl は卵白コロイド懸濁液の pH を調整するために使用したが、懸濁液に  $\text{Cl}^-$ イオンを供給することとなる。したがって、HCl の量は卵白凝集体の電気二重層サイズに関係しているはずである。pH を 5.5 と調整した試料中にはより多くの  $\text{Cl}^-$ イオンが含有されているため、これは電気二重層の集合体の厚さを減少させ、すなわち凝集体同士の反発効果を減少させたと考えられる。この結果、凝集体の直径が大きくなったと説明できる。

Fig. 1 に示すように、凍結していない 0.1 M NaCl-pH 8.0 の懸濁液中の平均粒子濃度は、4 つのコロイド懸濁液の中で最低だった。卵白タンパク質の等電点は約 4.1~6.1 であるため、pH が 8.0 の場合、タンパク質分子の溶解性が向上するため、凝集体を構成する不溶画分が減少するためである。一方、0.1 M NaCl-pH 5.5 の未凍結懸濁液中の平均粒子濃度は最も高かった。これは、高い NaCl と HCl 濃度によって説明できる。イオン強度が高いことにより、タンパク質のアソールディングとタンパク質凝集が促進されるためと考えて妥当である。

凍結温度が凝集体形成に与える影響をしてみる。0.1 M NaCl-pH 5.5 の懸濁液の場合、 $-5$  で 5 日間エージングしたサンプルは、 $-20$  または  $-35$  のサンプルと比較して、平均直径が高く、平均粒子数濃度が低かった。0.01 M NaCl-pH 5.5 と 0.01 M NaCl-pH 8.0 の懸濁液においては、 $-5$  で凍結したサンプルの平均粒子数濃度が最も高く、 $-35$  で凍結したサンプルの平均粒子数濃度が最も低かった。エージング温度の違いは一定の影響があることが分かるが、その影響は NaCl 濃度または pH の影響よりもはるかに小さいものであった。凍結濃縮相内における凝集の進行に際し、 $-35$  という共晶点温度よりも低い温度において凝集体が構造改変を進めるだけのモビリティがあるということは、いささか意外な発見であった。

##### 4-2 凍結過程における凝集体形成の進行

ここでは凍結下における凝集体構造の変化を検出するために、卵白コロイド懸濁液を  $-35$  で 1 時間、2 日、または 5 日間凍結した試料の比較を行う（Fig. 2）。すべての試料において、凍結下におけるエージングの過程における粒子径に大きな変化が見られなかった。一方、粒子濃度については顕著な変化が見られた。例えば 0.01 M NaCl-pH 5.5 においては、平均粒子濃度に 55% の増加がみられた。0.1 M NaCl-pH 8.0 の平均粒子濃度は、1 時間凍結した後 49% 減少している。これらの変化は、2 日または 5 日経過した試料においても確認できた。0.1 M NaCl-pH 5.5 と 0.01 M NaCl-pH 8.0 の平均粒子径は 2 日かけて増加し、5 日にかけて減少する傾向が見られた。一方、0.1 M NaCl-pH 8.0 と 0.01 M NaCl-pH 5.5 の平均粒子径は 2 日かけて減少し、5 日にかけて増加した。すべての試料において、平均粒子濃度は 5 日間のエージング期間において減少傾向が見られた。

凍結濃縮による凝集が進行する機序に加えて、氷結晶の表面における変性は、タンパク質凝集体の特性に重要な影響を及ぼしていると考えられる。タンパク質は疎水基の存在により、疎水的な氷の表面に吸着しやすい傾向があり、これが凝集体の構造を変える機序のひとつの因子となり得る。TRPS 測定におけるパルスの FWHM（半値幅）の変化は、粒子の表面特性の変化を反映するため、これの比較を行った。FWHM 値は、2 日間の凍結後に増加したが、5 日間の凍結後に減少する傾向が見られた。0.1 M NaCl-pH 5.5 と 0.01 M NaCl-pH 8.0 の平均 FWHM 期間は 0.1 M NaCl-pH 8.0 と 0.01 M NaCl-pH 5.5 よりも大きく、イオン強度が高いほど、表面の電気強度も高くなることを示唆している。これは前節での議論とも合致する結果である。

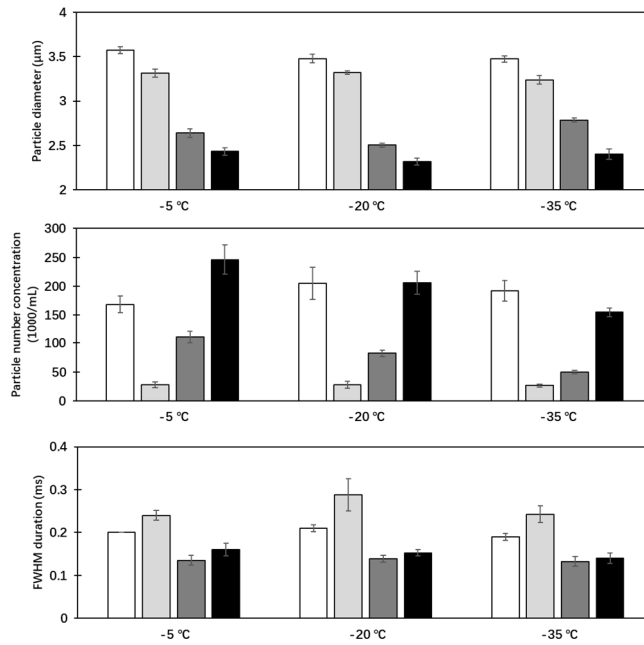


Fig. 1. Particle diameter, particle number concentration, and FWHM duration in four suspensions (白: 0.1 M NaCl-pH 5.5, 薄灰: 0.1 M NaCl-pH 8.0, 濃灰: 0.01 M NaCl-pH 5.5, 黒: 0.01 M NaCl-pH 8.0) after freezing treatment at  $-5$ ,  $-20$ , and  $-35$  °C for five days.

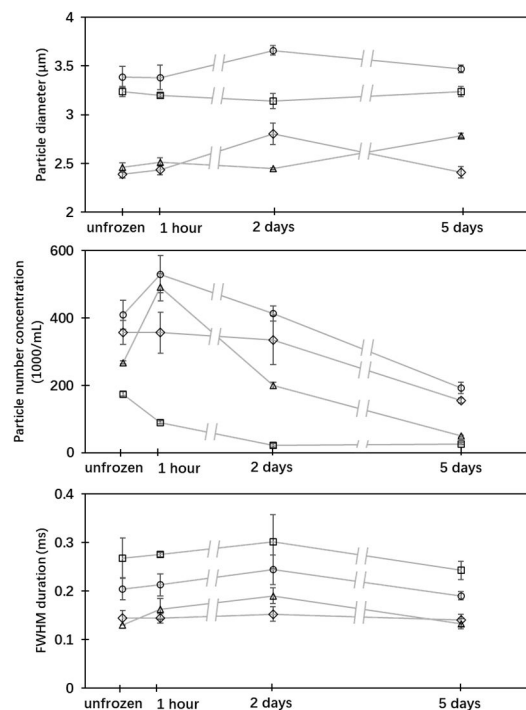


Fig. 2. Particle diameter, particle number concentration and FWHM duration of (○: 0.1 M NaCl-pH 5.5, □: 0.1 M NaCl-pH 8.0, △: 0.01 M NaCl-pH 5.5, ◇: 0.01 M NaCl-pH 8.0) before and after freezing treatment at  $-35$  °C for one hour, two days, and five days. Error bar is the standard deviation of three replicates.

#### 4 - 3 SAXS による凝集体のナノ構造分析

卵白分散液から得た小角散乱プロファイルを Fig. 3 に比較する。ここに示すのは USAXS と nSAXS モードの双方から得たプロファイルをマージしたものである。まずこれらのプロファイルから卵白試料溶液の凍結の適用に依存した構造の差異であり、これはエージングの適用時間に依存した凝集構造の違いを示唆している。未凍結試料, 1 時間凍結試料, 5 日間凍結試料を比較すると、散乱プロファイルが若干異なるものの、その変化は非常に小さい。データはここに示し

ていないが、全卵試料を用いた同様の検討においてはより顕著な差異が確認され、凍結とその期間に依存した構造変化が進行したことが伺えた。

これらの散乱プロファイルの詳細に比較するために、微粒子凝集に適用できる下記の散乱モデルを適用してフィッティングパラメータを得た。

$$I(q) = \frac{I(0)}{\{1+(q-q_0)\xi\}^m p} \quad (1)$$

ここで  $\xi$  は相関長さ ([nm]) であり、一次凝集体がさらに凝集して形成した高次凝集体の内部構造(おそらく一次凝集体サイズ)を反映すると筆者らは考えている。抵抗性パルスセンシング (TRPS) を用いた実験(筆者らが別途実施[7])にて今回の測定対象としている全卵由来の凝集体の粒子サイズはおおよそ 2~3  $\mu\text{m}$  に分布していることが分かっており、このサイズがエージングの適用によって変化するケースと大きく変化しないケースがあることが分かっている。また、 $I(0)$ は散乱体(凝集体)の質量や体積を反映した数値を示す。散乱実験へのフィッティングにより得たパラメータを表 1 にまとめる。この分析結果より、凝集体は 200nm 程度の相関長さを有しており、溶液の希釈度と凝集体のサイズと比して考えて高次凝集体の内部構造を代表すると考えて妥当と考える。凍結の過程で  $I(0)$  と  $\xi$  の値に目立った変化はなく、前節までに解説してきたような凝集体の構造進行によって、内部構造に顕著な変化がないことを示唆している。

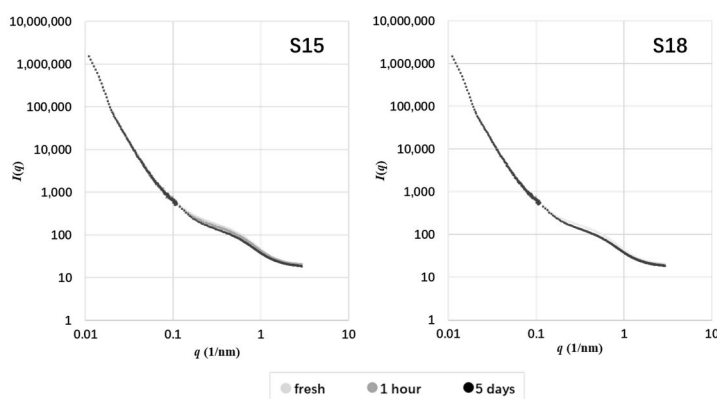


Fig. 3. SAXS profiles of 0.1 M NaCl-pH 5.5 (S15) and 0.1 M NaCl-pH 8.0 (S18).

Table. 1. Diameter and of submicelles ( $\xi$ ) and weight of aggregates ( $I(0)$ ) in frozen-thawed egg white suspensions.

		FRESH	1 HOUR	5 DAYS
S15	$\xi$ (nm)	202	199	195
	$I(0)$ ( $\times 1000$ )	247	244	240
S18	$\xi$ (nm)	201	204	198
	$I(0)$ ( $\times 1000$ )	242	235	240

#### 4-4 まとめ

本研究では、凍結に伴って進行する凝集の過程を詳細に検討し、それに伴って生起する物性の変化について検討した。本報告書には卵白を試料として用いた場合についてのデータを示した。卵白コロイド懸濁液を凍結環境下 (-5, -20, および -35 ) における 5 日間の変化を追跡したところ、懸濁液中の NaCl 濃度と pH が凝集体の粒子サイズ、粒子数濃度、および粒子表面特性に大きな影響を与えた。温度はタンパク質凝集体に顕著な影響を与えなかった。懸濁液中の凝集体濃度は、-35 で 2 日間または 5 日間の凍結中に減少するが、平均粒子サイズと表面特性は、この過程で顕著な変化をみせなかった。ただしこれは、pH と NaCl 濃度に依存してその変化の傾向に差異は見られた。これらの結果は、凍結条件と溶液のイオン強度の組み合わせを適切に選ぶことによって、粒子特性の制御を容易に実現できることを示唆している。各タンパク質凝集体の内部構造は、凍結期間中に顕著な変化をせず、凝集体を構成している粒子の内部構造は溶液のイオン強度によって変化するものの、凍結に対しては安定していることを示している。凝集体微粒子の特性変化は、凝集体の比較的マクロな構造変化に依拠して引き起こされていることが分かった。本報告書に掲載しきれなかったカゼインナトリウム、全卵を用いた場合の結果、および乳酸菌のカプセル化へと本手法を適用した場合の成果については、今後順次公表していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Bowen Fang, Kyuya Nakagawa	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Modification of casein aggregate microstructures under frozen conditions: a study using tunable resistive pulse sensing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Hydrocolloid	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105259">https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105259</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中川 究也
2. 発表標題 MODIFICATION OF SODIUM CASEINATE PARTICLES UNDER FROZEN CONDITIONS: APPLICATION TO DESIGN MICROENCAPSULATED SYSTEM
3. 学会等名 21st International Symposium on Microencapsulation (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bowen Fang, Kyuya Nakagawa
2. 発表標題 Influence of freezing process on the microstructure of casein aggregate
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 方 博文, 中川 究也
2. 発表標題 Modification of characteristic of protein aggregates by freezing process
3. 学会等名 化学工学会 姫路大会2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----