

凍り豆腐の固形部分におけるタンパク質凝集体生成過程の放射光 CT を用いた半定量的分析

Semi-quantitative analysis by synchrotron X-ray micro CT on the state changing of concentrated amorphous solid of “kori-tofu” during aging process under subzero temperature

小林 りか^a, 石黒 貴寛^b, 川井 清司^c, 尾関 亜海^d
Rika Kobayashi^a, Takahiro Ishiguro^b, Kiyoshi Kawai^c, Ami Ozeki^d

^a 日本大学生物資源科学部, ^b 旭松食品(株),
^c 広島大学大学院生物圏科学研究科, ^d 東京海洋大学海洋科学部
^a College of Bioresource Science, Nihon University, Japan, ^b Asahimatsu Foods Co., LTD.,
^c Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Japan,
^d Department of Food Science and Technology,
Tokyo University of Marine Science and Technology, Japan,

凍り豆腐の硬さ付与に不可欠な低温熟成工程で豆腐固形部に凝集体が形成される様子を、放射光単色 X 線 CT で得られる密度分解能の高い X 線線吸収係数のヒストグラムを利用して観察した。ヒストグラムに現れる豆腐固形部由来のピークは低密度側と高密度側の 2 つのピークから成り、低温熟成が進むと 2 つのピークの分離がより顕著となった。すなわち低温熟成過程では、固形部の中でより高密度な相と低密度な相に分離が進むことが半定量的に明らかとなった。

キーワード： 食品加工, 冷凍技術, エージング, テクスチャー, X 線 CT

背景と研究目的：

凍り豆腐の製造工程の一つである低温熟成工程は、凍り豆腐の硬さ発現に必要不可欠な工程であり、 -2°C の環境中で約 3 週間といった長い期間を要する。しかし、生産プロセスの高効率化のため、低温熟成中に進行する凍り豆腐の物性発現の詳細なメカニズムを解明、理解する必要がある。一般的に、豆腐を凍結解凍した場合、氷結晶が成長することで、タンパク質が主な構成成分である豆腐固形部分は脱水・濃縮され、更に、濃縮された固形部分は体積を増した氷結晶間に圧縮されることで、不可逆なネットワーク構造が形作られる。このように強固なネットワーク構造が形成される要因は、豆腐や豆乳に含まれる大豆タンパク質は凍結によってジスルフィド結合や疎水結合が形成されるためであると理解されている。[1, 2] しかし凍り豆腐の低温熟成過程では、豆腐中のジスルフィド結合量は大きく変化しないことがこれまでの実験結果より示唆されている。そこで我々は低温熟成期間における豆腐の硬さ発現は、氷結晶の再合一に伴う豆腐固形部分からの脱水濃縮によって、大豆タンパク質間に疎水結合や水素結合といった分子間相互作用による物理的な凝集が形成されることに起因するという仮説を立て、この凝集体の分布情報を含めた形成挙動を定量的に評価したいと考えた。

豆腐固形部の凝集体生成が進行してくると局所的な密度が上昇することから、X 線 CT 撮像から得られる X 線透過率の違いを利用して、凝集体形成挙動の観察および定量が可能であると考えた。しかしながら、X 線発生源に X 線管球を利用している CT 装置では、①連続光源(白色光源)を利用することによるアーティファクトが発生することから厳密な定量が難しいこと、また、② X 線の輝度が低く密度分解能も低いため、凝集体の形成進行による微小な電子密度の変化を捉えることが難しいことが課題となる。その一方、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、定量性が高くかつ密度分解能の高い X 線線吸収係数の分布像を得られ、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。[3] よって本課題では、放射光単色 X 線 CT 撮像手法を利用し、凍結状態の豆腐固形部分で凝集体が形成されてくる挙動の定量観察を試み、凍り豆腐低温熟成過程での物性発現に対し、凝集体の存在の寄与を考察することを目的とする。加えて我々はこれまでの研究において、低温熟成前の凍結条件によって、熟

成中の硬さ変化の挙動が異なる傾向を捉えている。この結果を踏まえ、本実験では、凍結速度を2種類(緩慢, 急速)変えた豆腐試料を低温熟成させ、固形部分で進行する凝集体の形成挙動に初期凍結条件がどのように影響を及ぼすかも併せて検討を行なった。

実験：

旭松食品(株)社の凍り豆腐製造用原料豆腐を、緩慢凍結法(-9°C エアースラスト凍結, 以下緩慢凍結とする)と急速凍結法(-40°C エアースラスト凍結)で凍結した後、 -2°C 空气中で最大 14 日間低温熟成させ、熟成 0, 3, 7, 14 日と経時的にサンプリングを行なった。これらの豆腐を、ドライアイスによって凍結状態を保ったままビームラインに持ち込んだ凍結試料と、真空凍結乾燥させた乾燥物試料の両方を CT 測定用に供した。CT 測定は BL19B2 で行った。実験ハッチ内には、X 線 CT 用の回転試料ステージと、試料ステージ下流側に X 線 CCD カメラを設置した。X 線 CT に使用する X 線源のエネルギーは、12.4 keV に設定し、高調波除去のため X 線ミラーをミラー角 0.23° に設定した。空間分解能は $2.97\ \mu\text{m}/\text{pixel}$ であった。凍結試料を測定する際には、これに液体窒素蒸気を吹きかけて温調を行う温調装置を取り付け、 -30°C 程度に保ち、凍結状態のまま撮像を行った。回転試料ステージ上に、約 $1.5 \times 1.5 \times 10\ \text{mm}^3$ の直方体に切り出した乾燥試料を設置し、1 ステップあたり 0.98° で回転させながら、1 ステップ露光時間 250 ms で撮像し、1 試料当たり 362 枚の透過像を得た。得られた 362 枚の透過像から画像再構成を行い、回転軸に直交した断層における X 線線吸収係数の 2 次元分布を取得し、ヒストグラム解析に供した。

結果および考察：

まず通常凍結させ、低温熟成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 線線吸収係数のヒストグラムを Fig.1 に示す。凍結試料では、氷と豆腐固形部分の密度差が小さく、X 線線吸収係数のヒストグラム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 線線吸収係数のヒストグラムは 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。

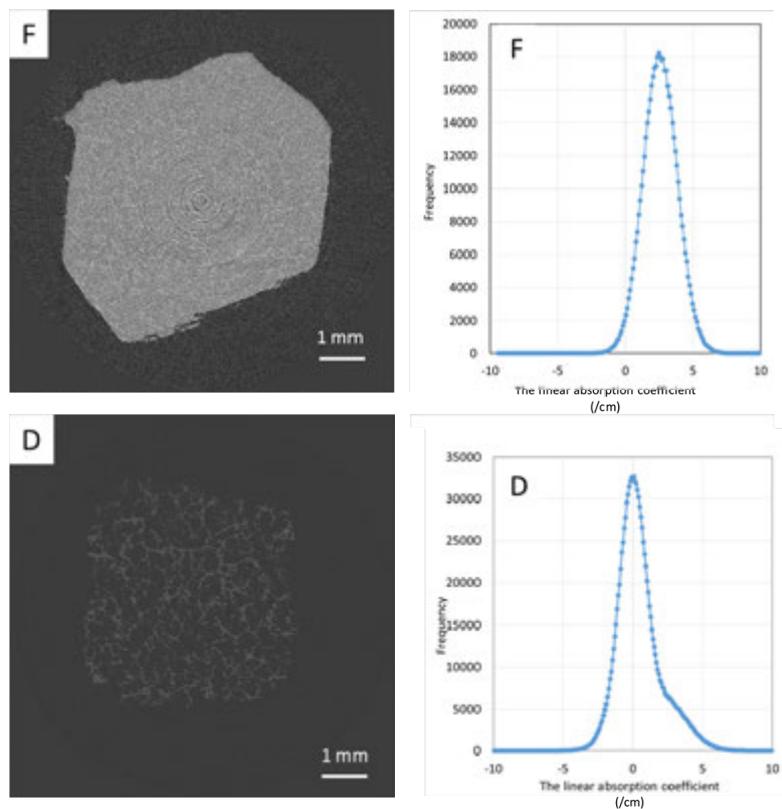


Fig.1. 凍結試料と乾燥試料の断層像および X 線線吸収係数のヒストグラム, F: 凍結試料, D: 凍結乾燥試料

そこで、乾燥物の断層像をより詳しく見ていった。Fig.2 に豆腐凍結乾燥物の断層像を示す。暗色部分が空隙構造、明色部分が固形構造を表している。凍結速度が遅い通常凍結試料のほうが、氷結晶痕である一つ一つの独立した孔が大きく、また熟成を経ることで独立した孔同士が焼結している様子が見られた。また熟成を経ると、氷結晶の再結晶化が進み独立していた孔同士の連通が進むが、凍結の段階で凍結速度によって決定された氷結晶分布の形状は大きく崩れていなかった。断層像から得た X 線線吸収係数のヒストグラムのうち、3-5 付近を中心とする固形部分のピークに着目すると、低温熟成を経ることによってより顕著になっており、またこの傾向は特に通常凍結(緩慢凍結)試料で強くみられた。(データ非表示) そこで、ヒストグラムの空隙部分と固形部分をガウス関数に従うとして、ピーク分離を行った結果を Fig.3 に示す。どの豆腐試料においても、固形部分は低密度側と高密度側の 2 つのピークに分かれ、低温熟成過程を経ると、2 つのピークの中心がより低密度側とより高密度側に離れる傾向にあった。これはすなわち、低温熟成によって高密度を示す凝集体の形成が進行していること、また、豆腐固形部の中で、より高密度な相とより低密度な相に、分離が進むことを定量的に示していると考えられる。また、凍結手法が異なる試料間では、通常(緩慢)凍結試料では、低温熟成によって固形部分の 2 つのピーク位置が顕著に離れる一方で、急速凍結試料では、ピーク位置の変化が小さく、凝集体の形成が大きく進んでいないことを示していると考えられる。今回捉えた X 線線吸収係数変化の傾向、すなわち固形部分の密度変化の傾向は、低温熟成期間における豆腐破断強度の増大と同様の傾向を示し、固形部分で生ずる凝集体の形成が凍り豆腐の硬さを作る主要因である証拠を半定量的に得ることが出来たと言える。

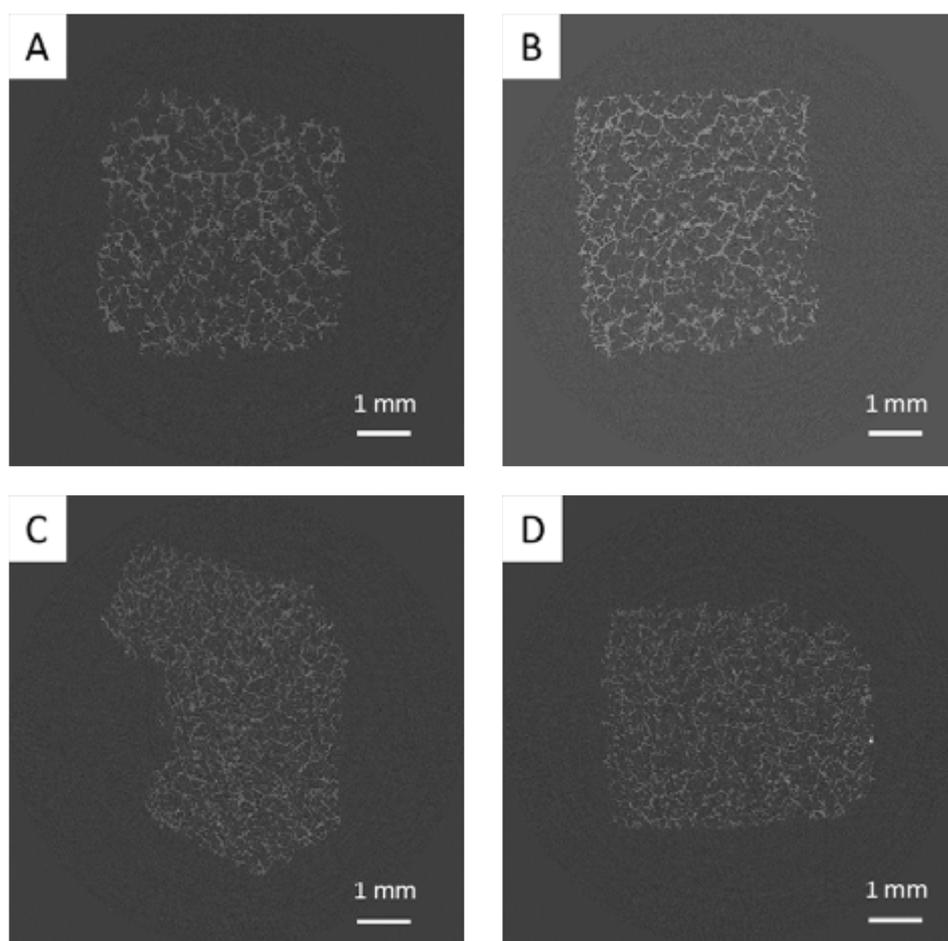


Fig.2. 熟成過程下の凍り豆腐の断層像, A: 緩慢凍結, 熟成なし, B: 緩慢凍結, 熟成 14 日, C: 急速凍結, 熟成なし, D: 急速凍結, 熟成 14 日

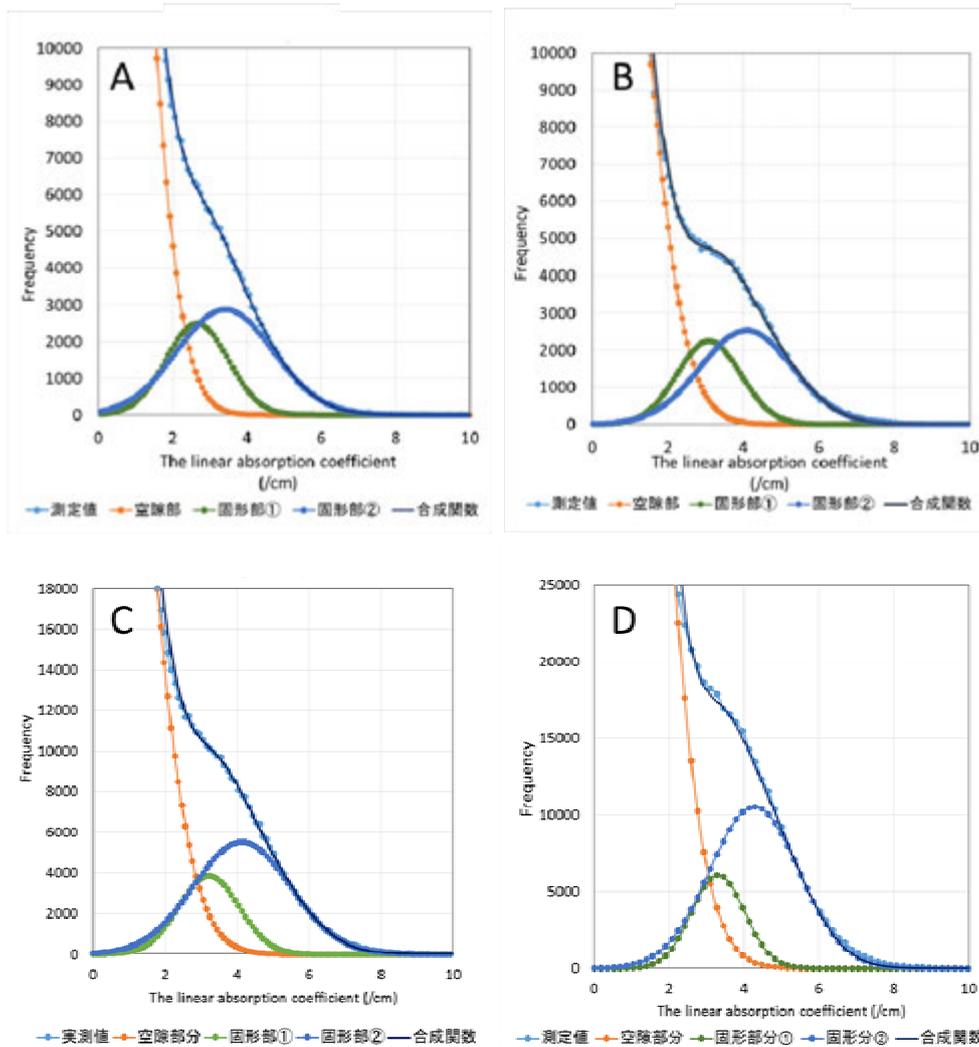


Fig.3. X線吸収係数ヒストグラムの豆腐固形部分を示すピークの分離結果 A: 緩慢凍結，熟成なし，B: 緩慢凍結，熟成14日，C: 急速凍結，熟成なし，D: 急速凍結，熟成14日

参考文献：

- [1] 橋詰和宗他, 日本食品工業学会誌, **21**(4), 146–150 (1974).
- [2] K. Morita, and M. Shimoyamada, *Food Chemistry*, **140**(1–2), 39–43 (2013).
- [3] M. Sato, et al, *Japan Journal of Food Engineering*, **17**(3), 83–88 (2016).