

2016. 2. 26

第16回 SPring-8 ヘルスケア研究会

高分子ゲルの凍結・融解過程の 理解と冷凍食品への適用

東京電機大学 村勢則郎

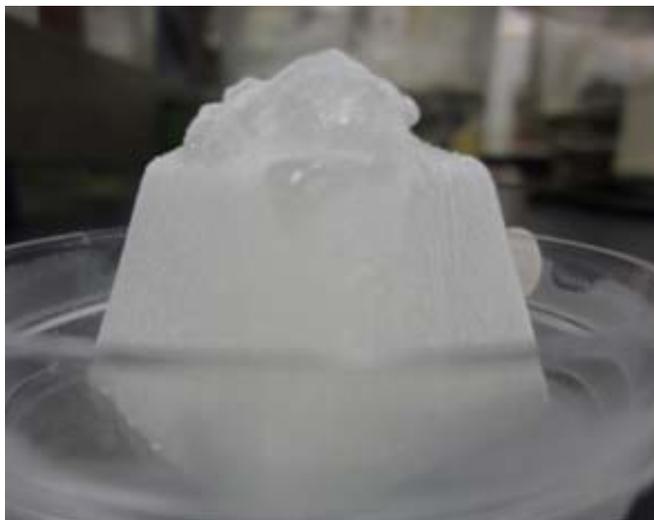
内容

- (1) はじめに
- (2) ゲル状食品の凍結・融解と高分子網目構造
- (3) 高分子ゲルの凍結挙動の架橋密度依存性
- (4) セファデックスG25ゲルで観測される昇温結晶化の詳細
- (5) X線CTによるセファデックスゲル・ビーズ中に形成される氷晶の形状解析
- (6) まとめ

(1) はじめに

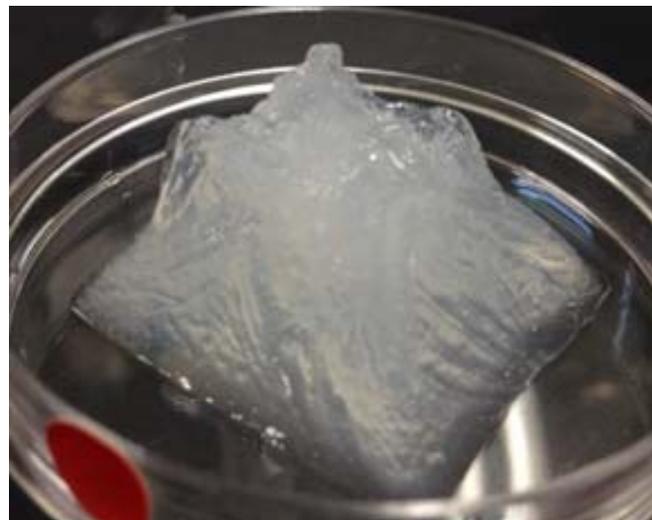
- 食品はゲル状態をとることが多い。
したがって、冷凍食品の開発や適切な保存のためにはゲル網目構造の特徴を理解しておく必要がある。
- 高分子ゲルを食品のモデルとみなして、ゲル中の水の凍結挙動、生成する氷晶の形状と高分子網目構造の関係について考察したい。

(2) ゲル状食品の凍結・融解と 高分子網目構造



無添加

凍結



解凍後



0.5% AFGP 添加

凍結



解凍後

1% 寒天ゲル

((株)ニチレイ提供)

1wt% 寒天の破断強度 ($\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$) (測定例)

	未凍結	凍結解凍後
無添加	6.5×10^3	2.3×10^2
0.5%AFGP	6.0×10^3	1.0×10^3

(25°C)

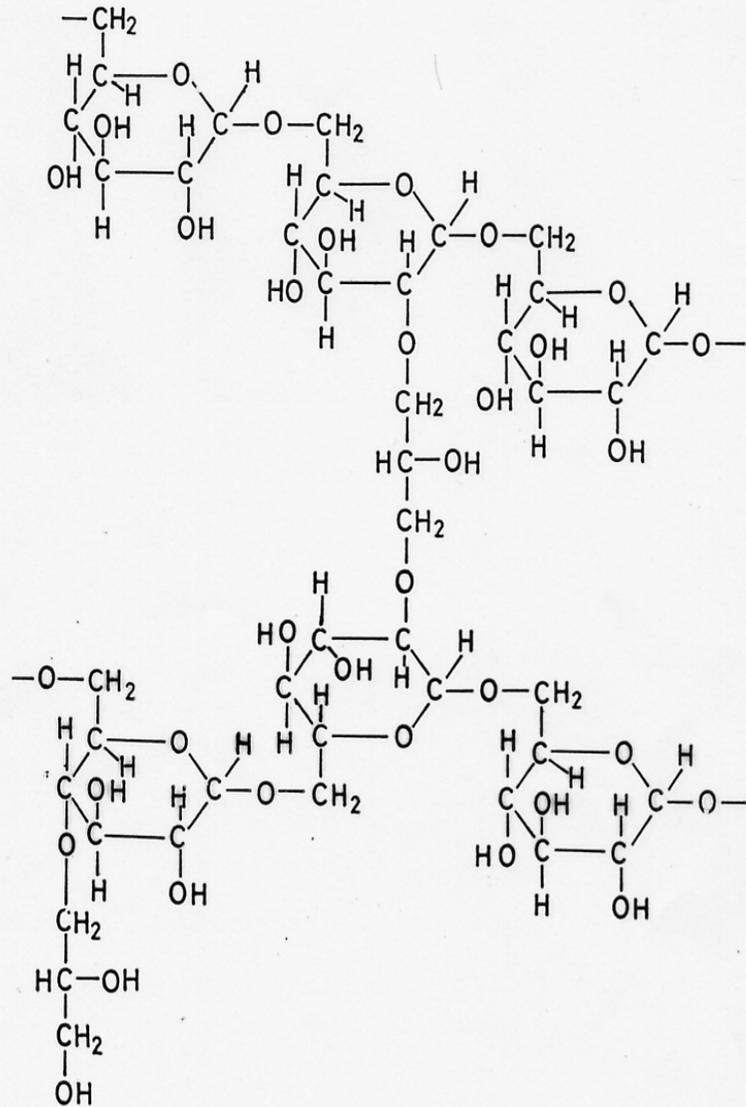


凍結・乾燥 寒天

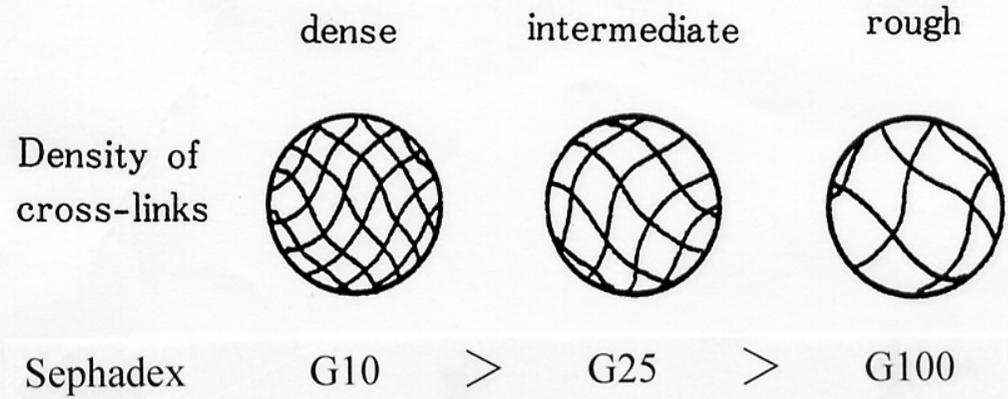
- ゲル状食品では高分子網目構造が発達している。
- 網目構造は凍結によって損傷を受ける。
- 凍結・融解は冷凍食品のテクスチャーに影響を及ぼすことになる。

(3) 高分子ゲルの凍結挙動の 架橋密度依存性

Gel chromatography



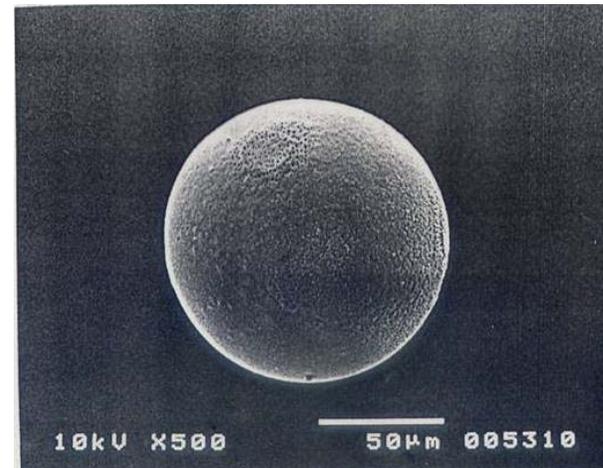
Partial Structure of Sephadex
(Crosslinked dextran)



Bead size : 50 -150 μm

Exclusion limit for G-25 : ~ 5,000 Da

→ Pore size : 2 - 2.5 nm in diameter



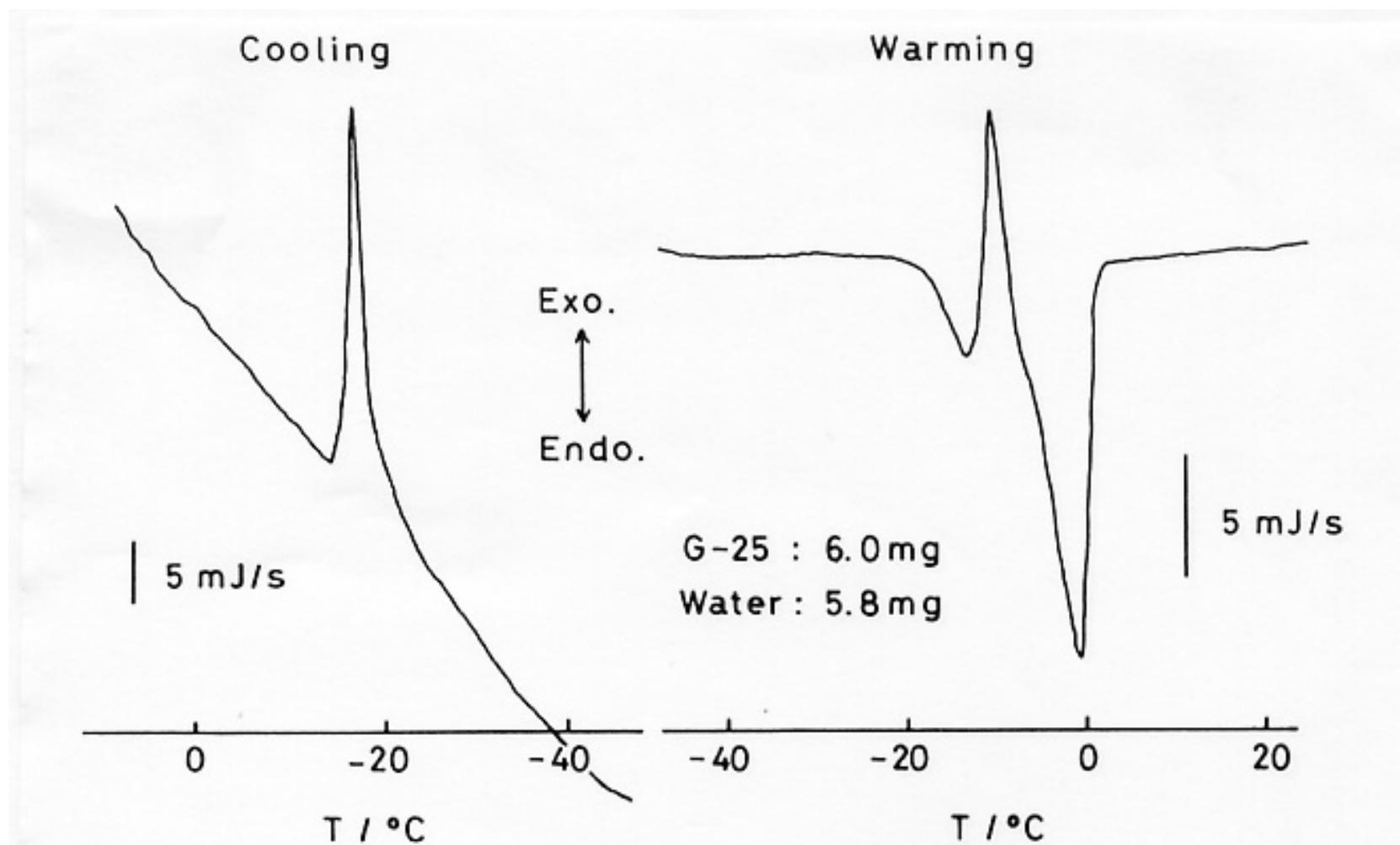
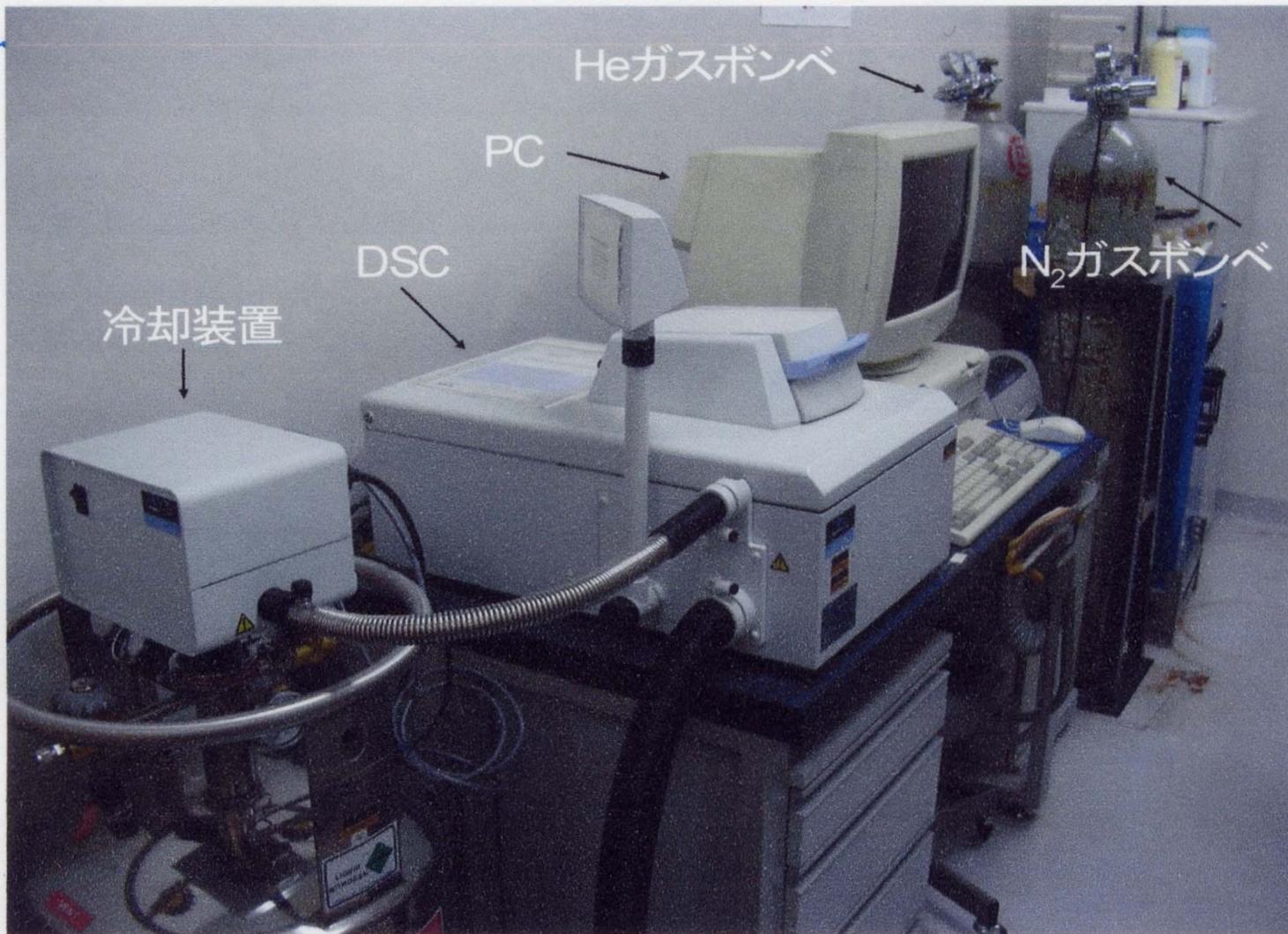
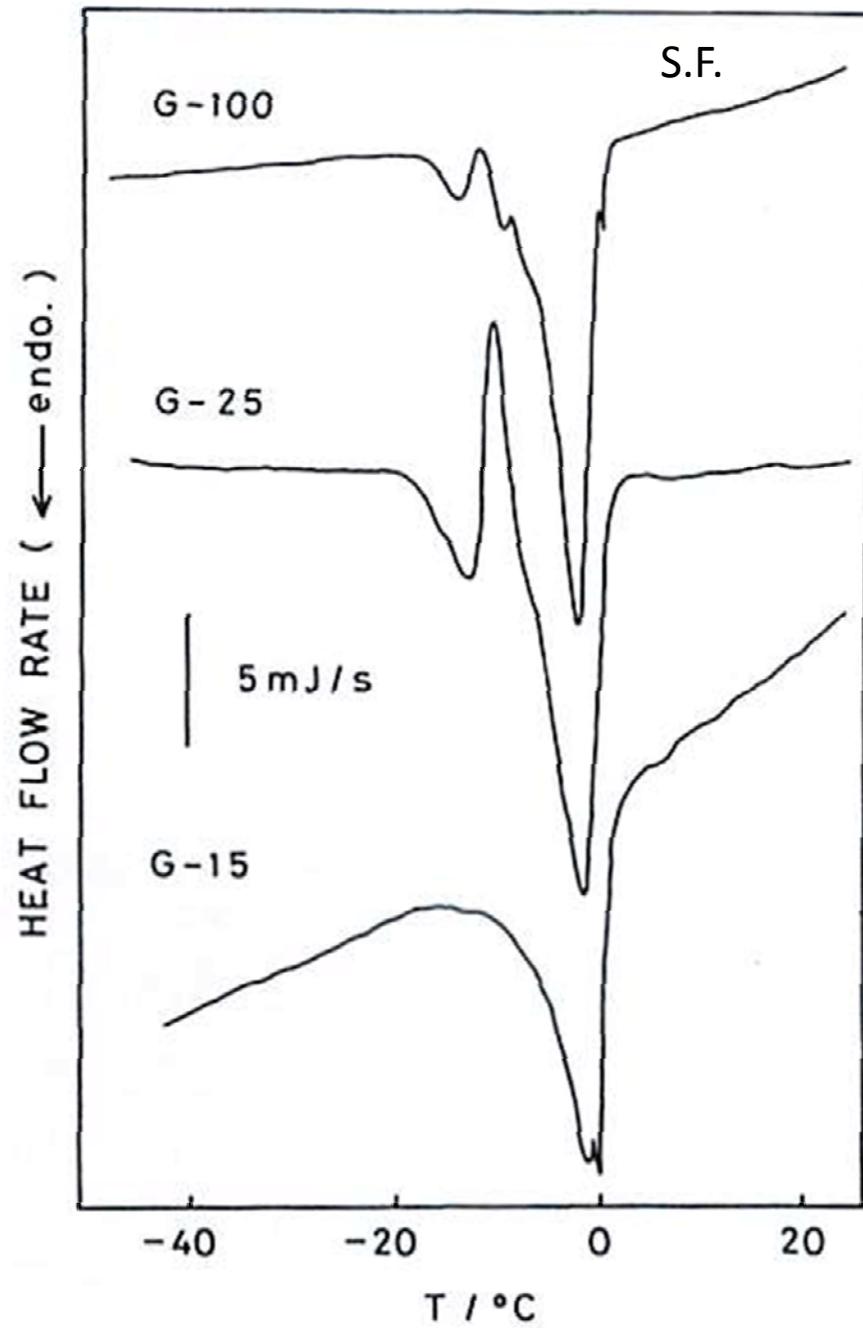


Figure 1. DSC cooling and warming curves observed with a Sephadex G-25 gel: water content, 5.8 mg of water for 6.0 mg of G-25; cooling and warming rate, 5 °C/min.

文献1 N Murase *et al.*, J. Phys. Chem. 90, 5420-5426 (1986).



DSC 装置 Pyris 1 (パーキン・エルマー社)



水の結晶化

文献1

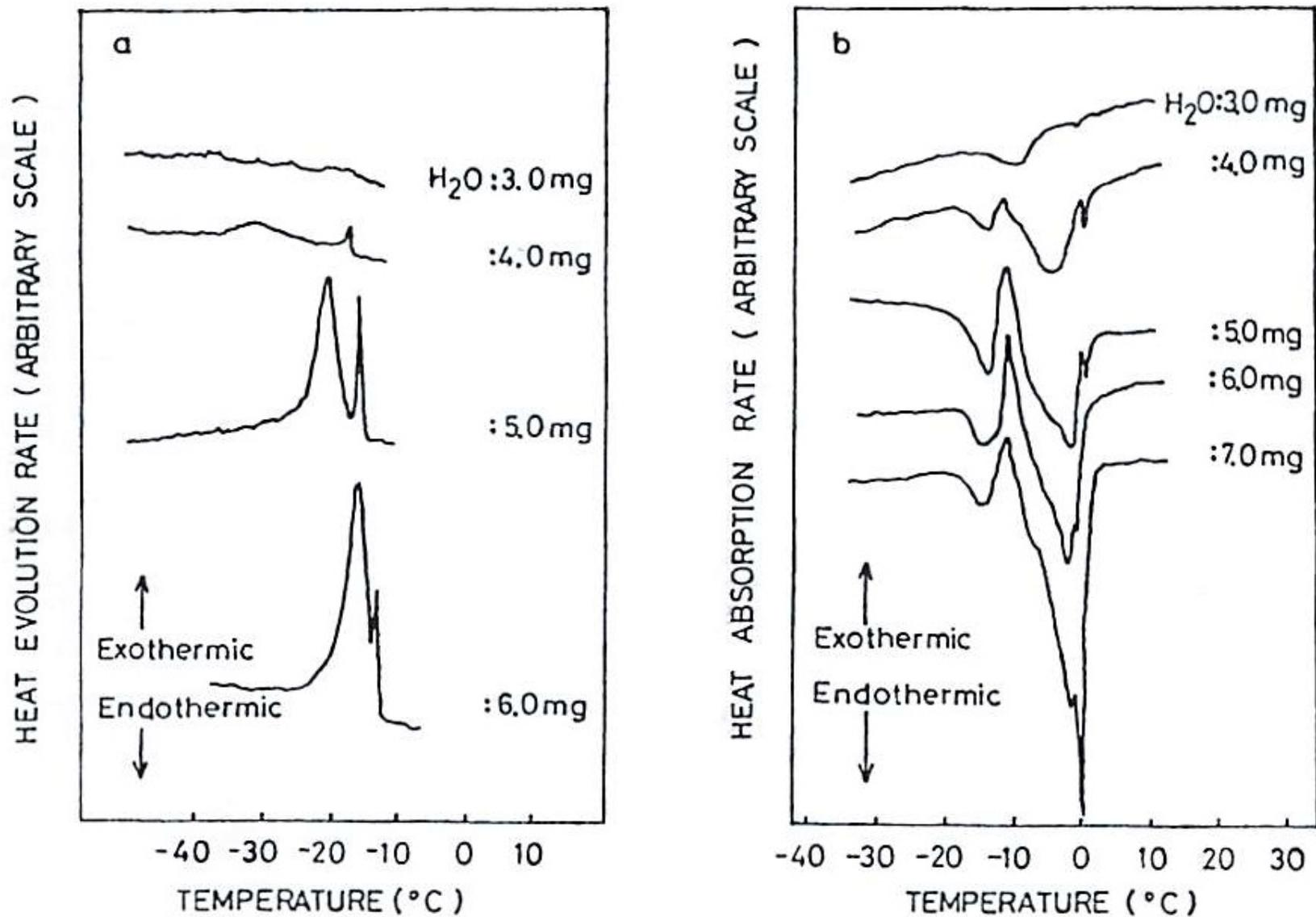


Fig. 1 DSC thermograms of Sephadex G-25-water system.
 (a) Cooling process, (b) Warming process. Amount of G-25 is 6.0 mg. Cooling and warming rates are 5 °C/min.

文献2 N Murase *et al.*, *CryoLetters* 3, 251-254 (1982)

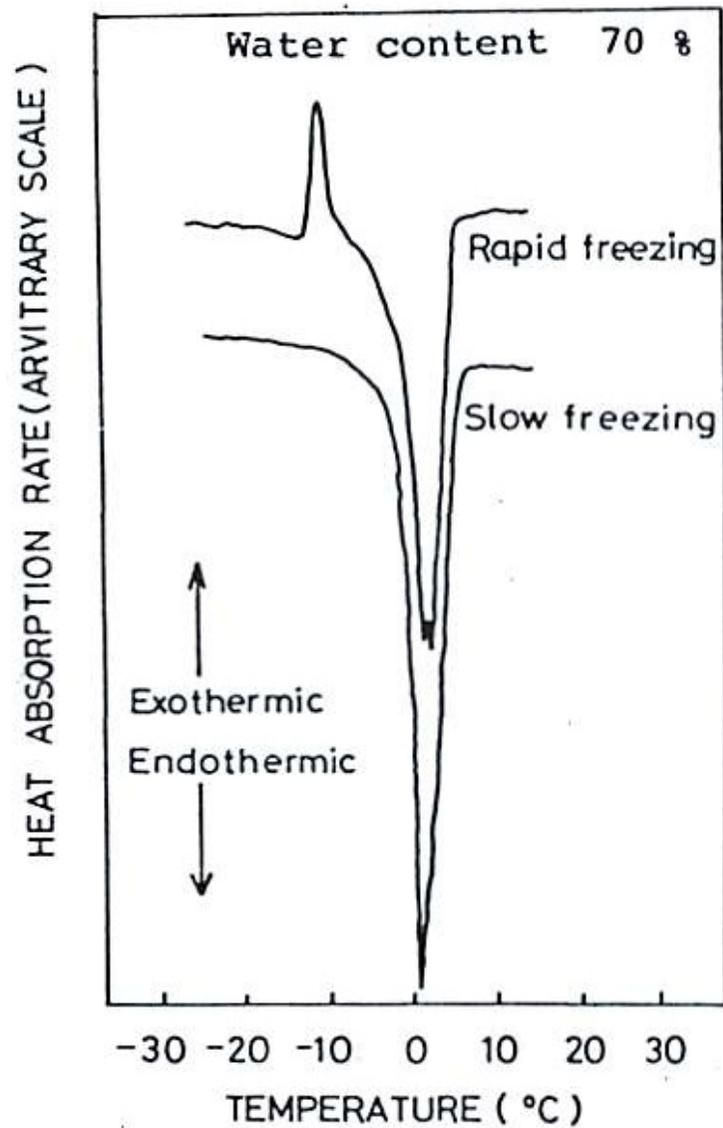
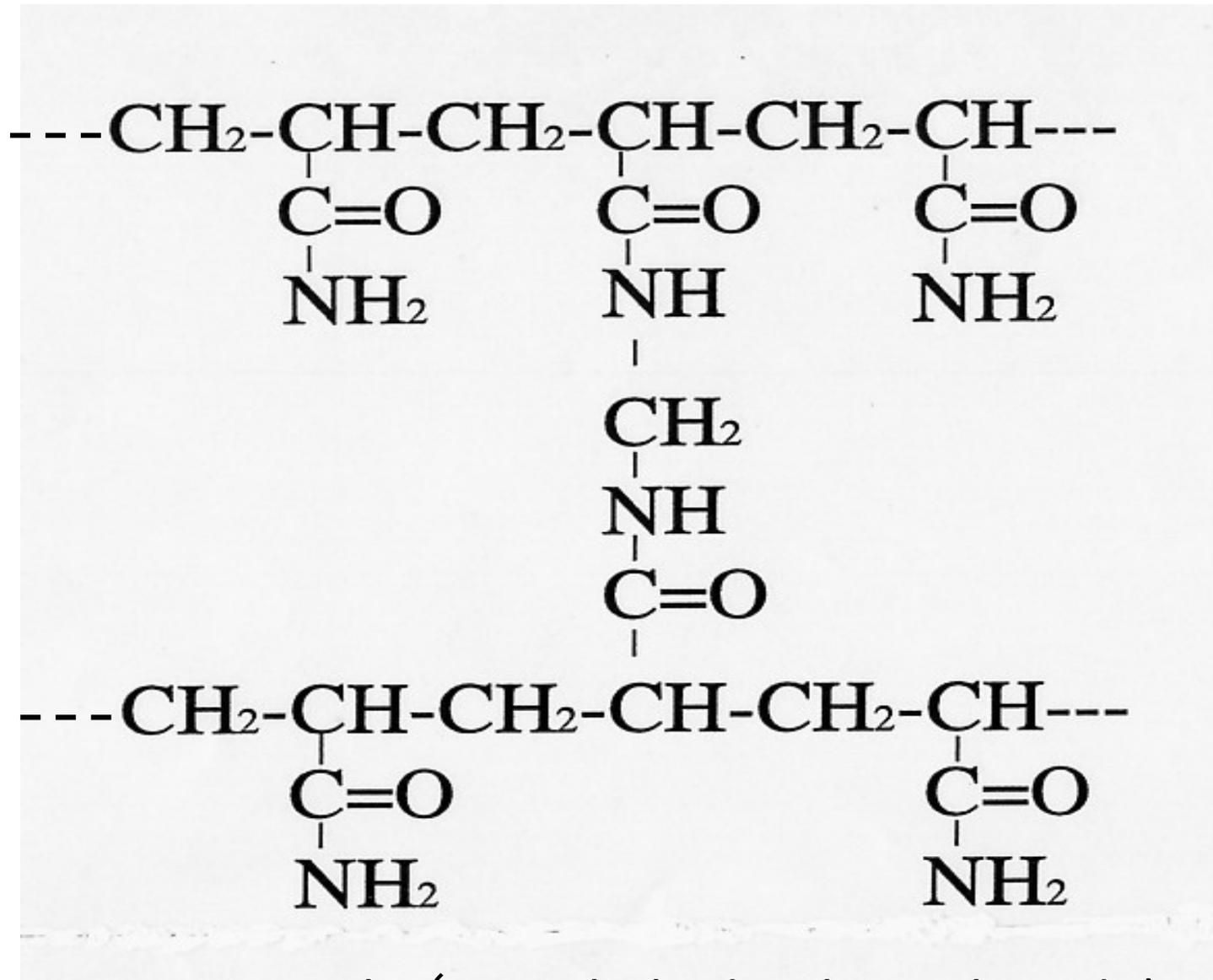
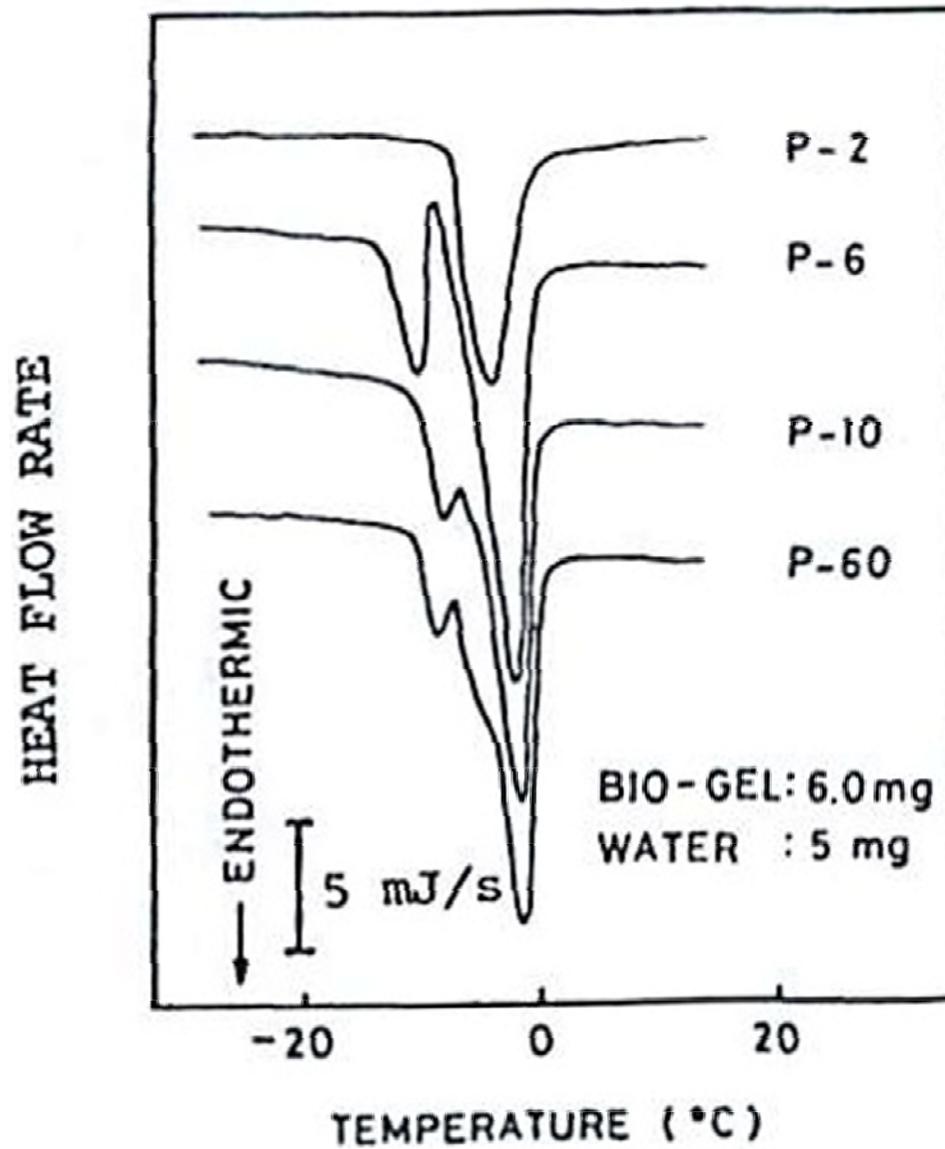


Fig. 3 DSC thawing thermograms of G-25 swollen up with water. Rapid freezing:dipped directly into liq N₂, Slow freezing: cooling rate of 5 °C/min.



Bio-Gel (crosslinked polyacrylamide)



Pore size: BioGel P6 ~ Sephadex G25

文献3 N Murase *et al.*, *CryoLetters*, 4, 19-22 (1983)

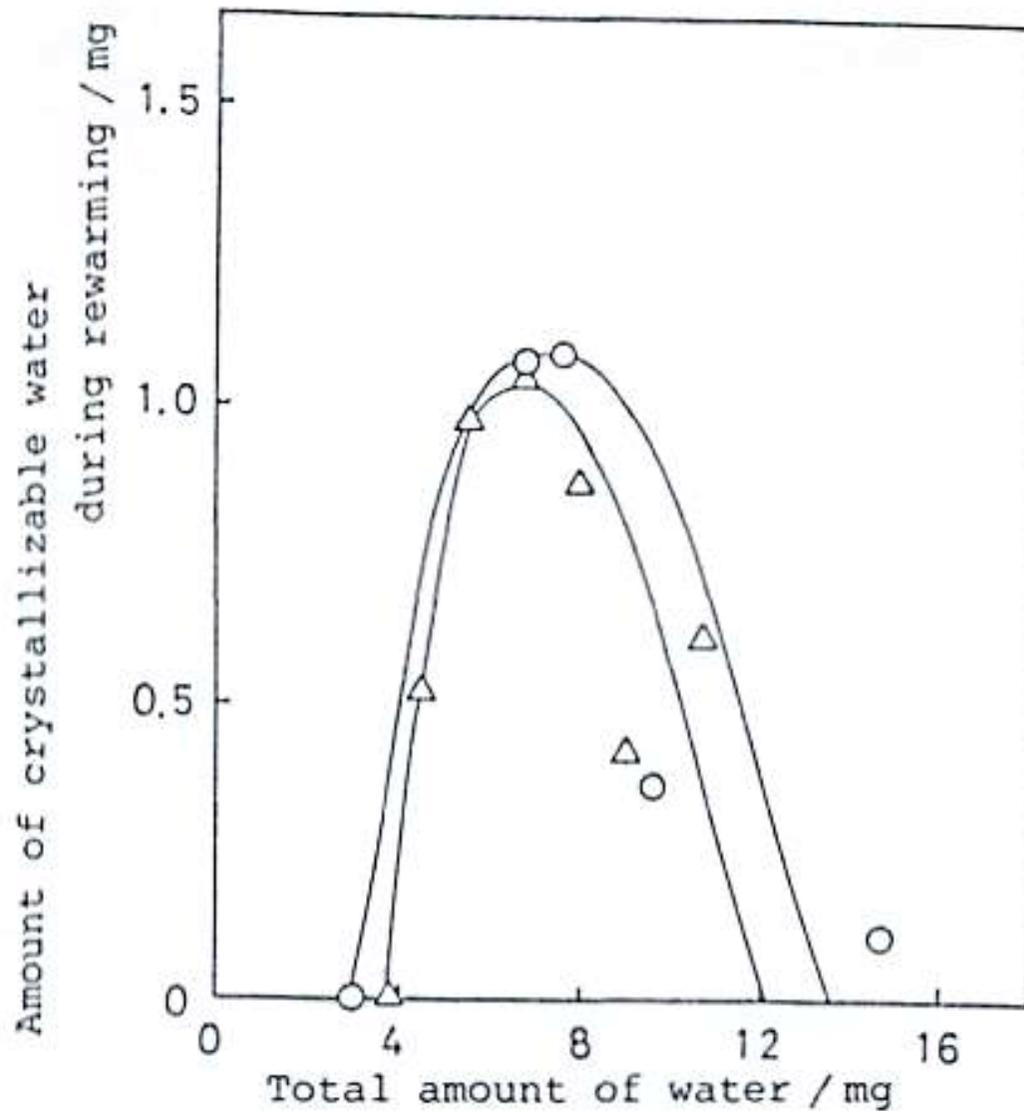
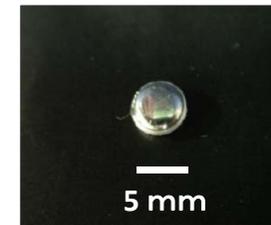


Fig. 2 Amount of crystallizable water during rewarming. O: Sephadex G-25, Δ: Bio-Gel P-6. Sample dry weight: 6.0 mg.

文献4

N Murase and T Watanabe, Phys. & Chem. Ice, Hokkaido University Press, pp. 249 - 253 (1992).

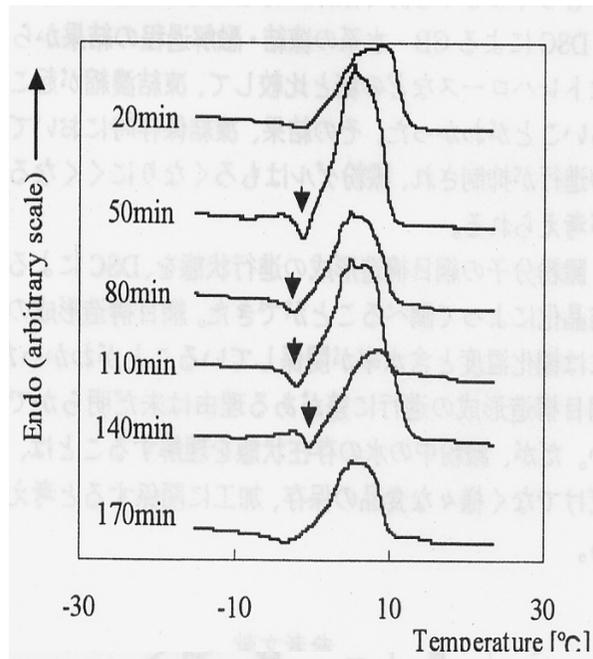


熱処理前(左) 熱処理後(右)

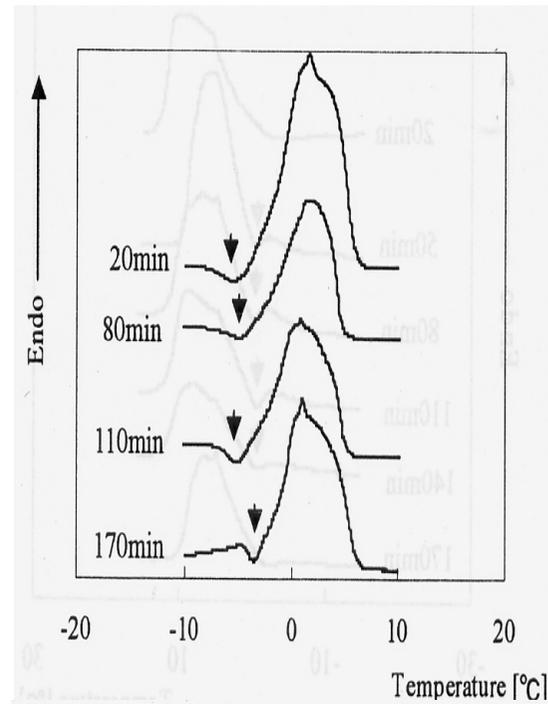
ポテト澱粉ゲル

含水率: 50 ~ 55 wt%; 熱処理: 110 ~ 120°C 約20分)

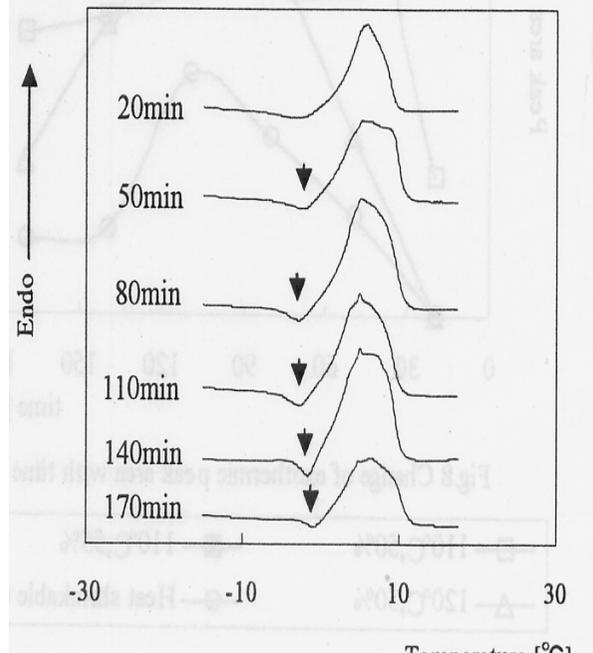
110 °C
50wt%



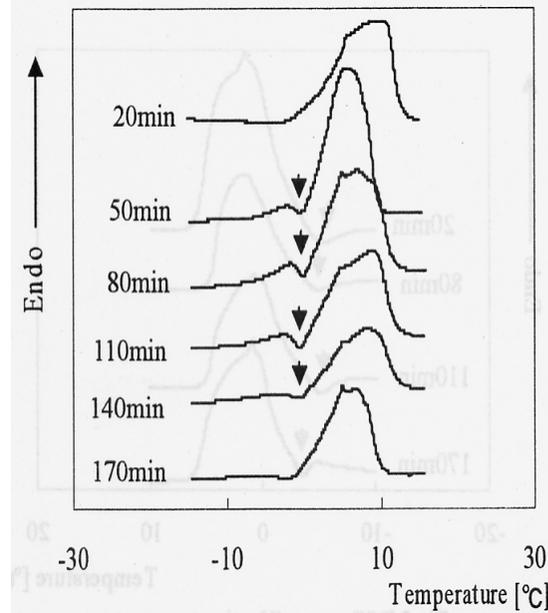
110 °C
55wt%



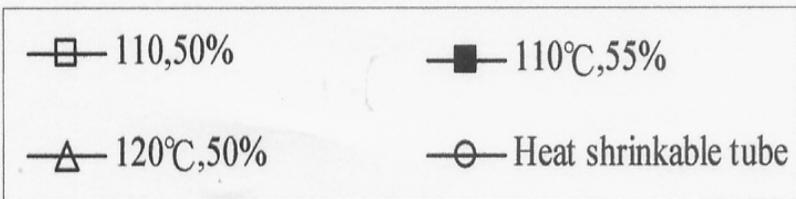
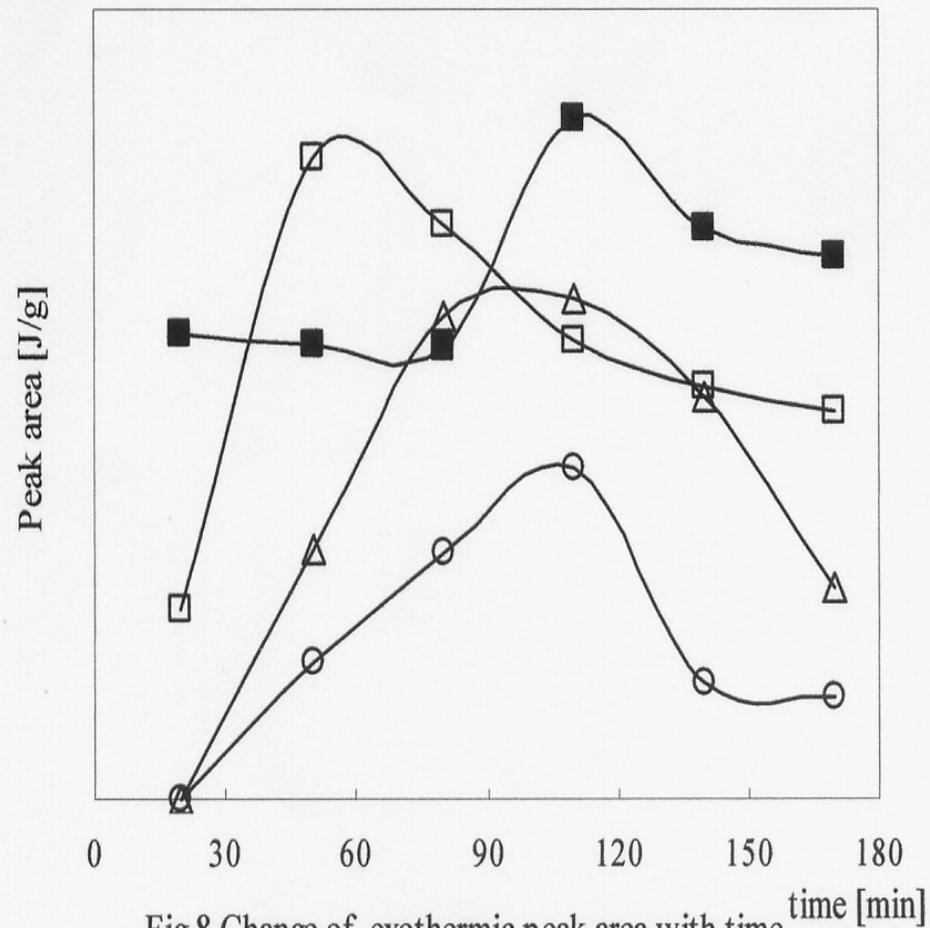
120 °C
50wt%



110 °C
50wt%
HST



文献5 N Murase *et al.*, "Water properties in food, health, pharmaceutical and biological systems : ISOPOW 10", edited by David S. Reid *et al.*, Wiley-Blackwell, pp.373-383 (2010).



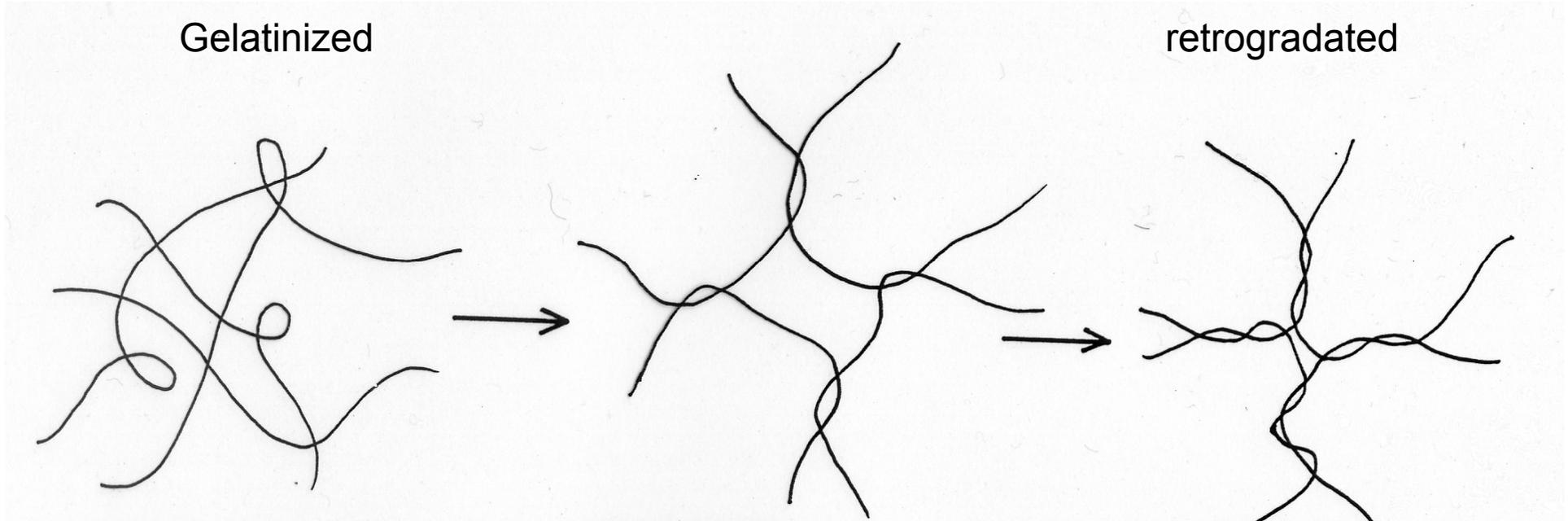
バラつきの原因：
 試料部の加熱温度ムラ
 含水率のバラつき

糊化

Gelatinized

老化

retrogradated

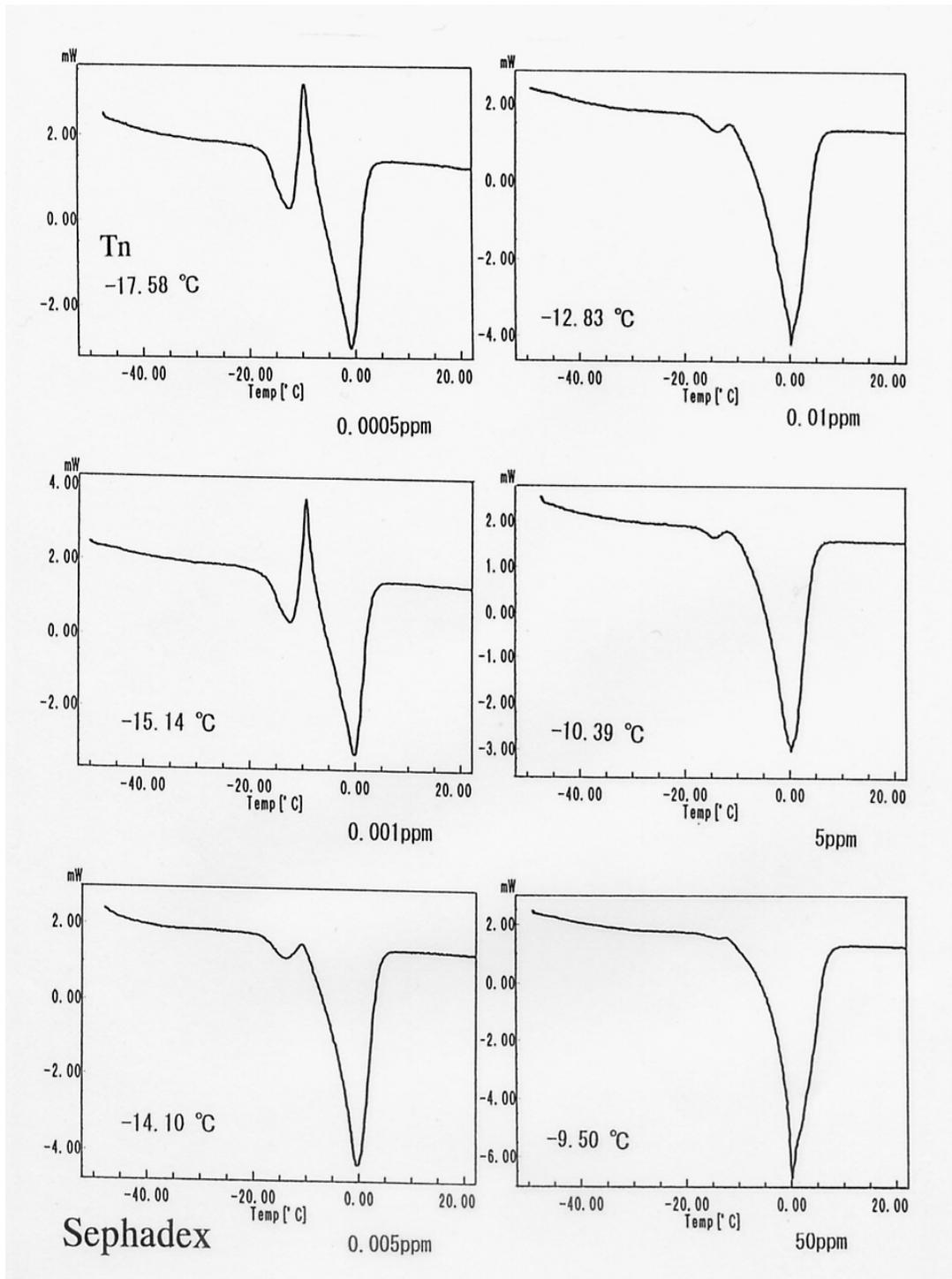


Progress of entanglement of polymers after gelatinization

適度な架橋密度によって区画化された水は
昇温過程で結晶化する場合がある。

* 区画化された水 : compartmentalized water
無機物質(シリカなど)の細孔内の水とは違う

(4) セファデックスG25ゲルで観測される昇温結晶化の詳細

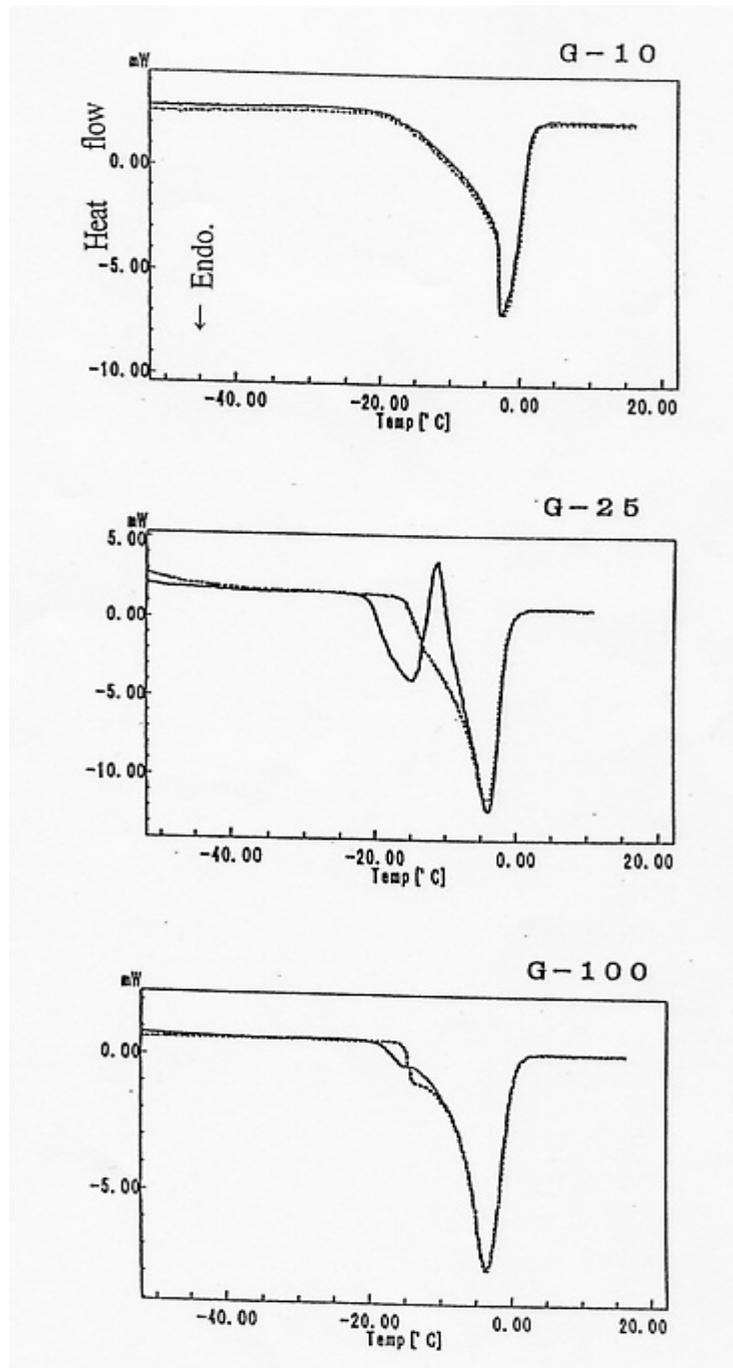


氷核物質の量を増やして凍結
温度を上昇させると、昇温結晶
化のピークはなくなる

Ice-nucleated by *P.syringae*

氷核活性細菌

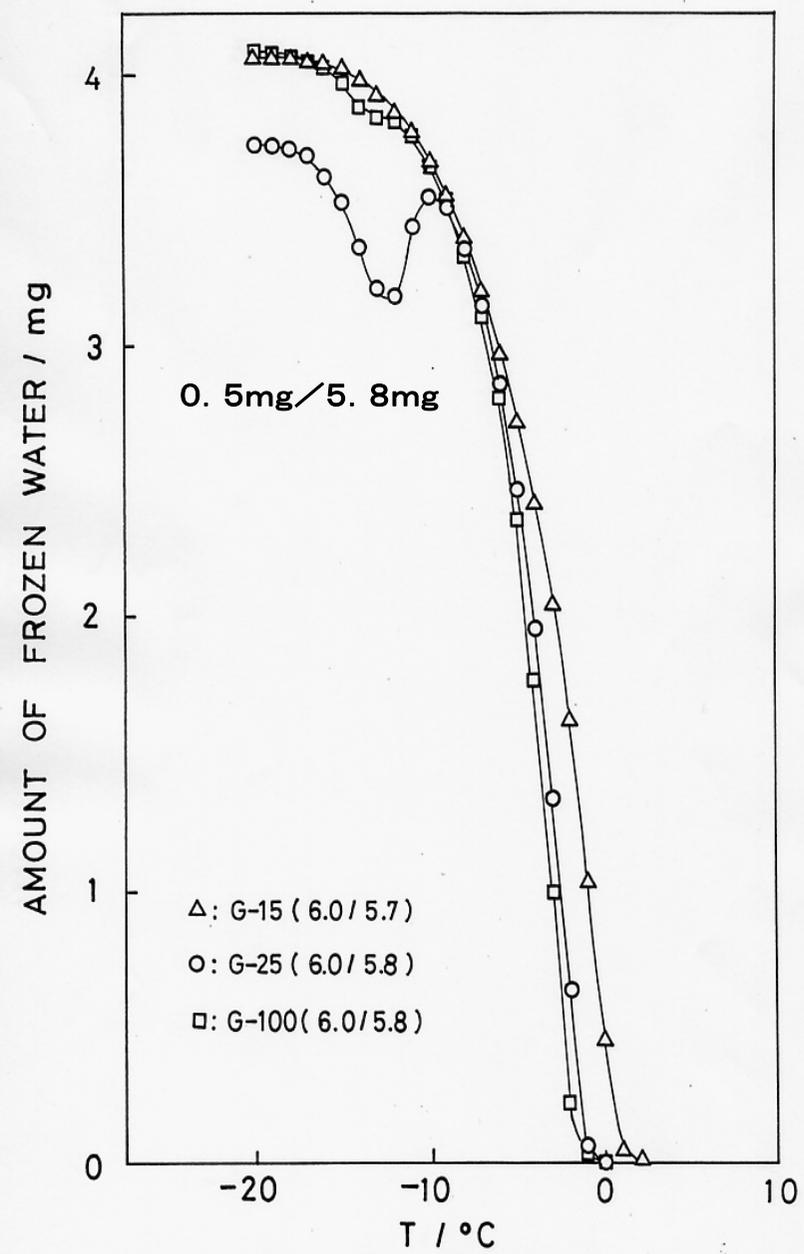
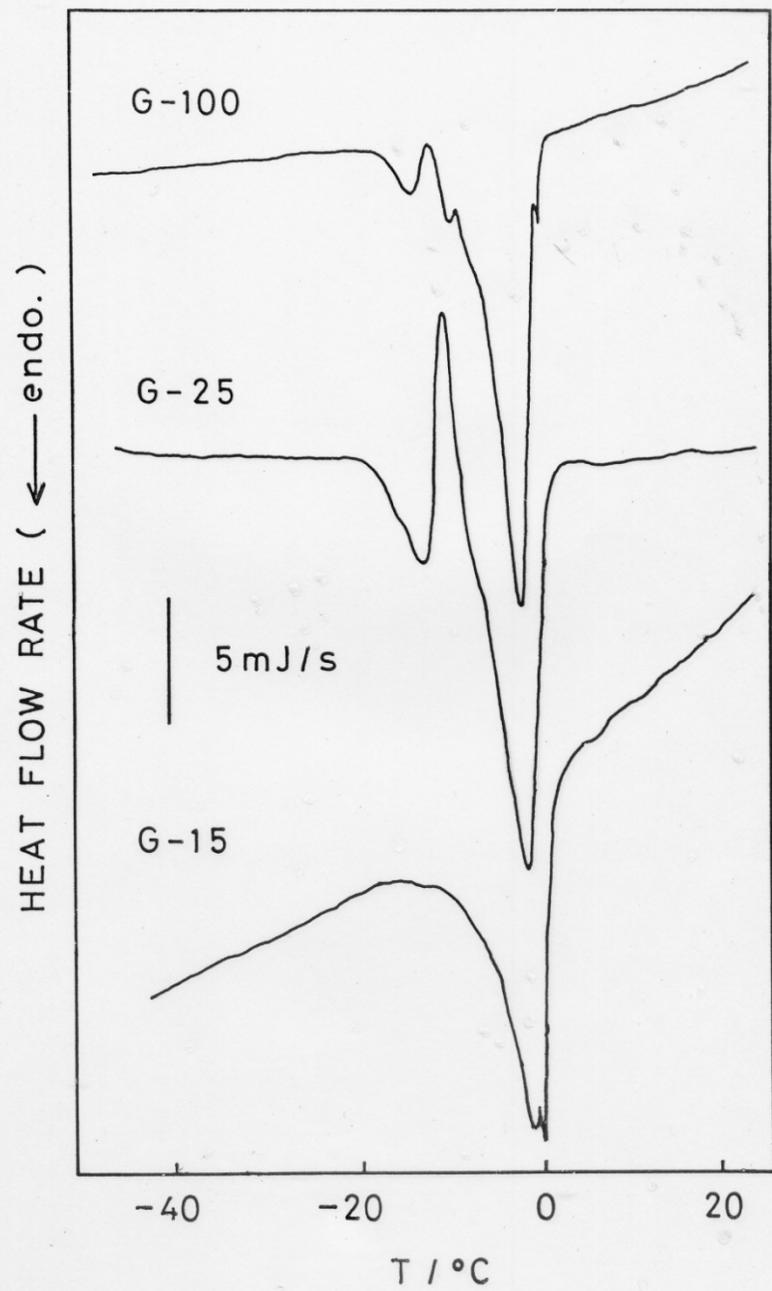
文献6 N Murase *et al.*,
CryoLetters, 18, 157-164 (1997)

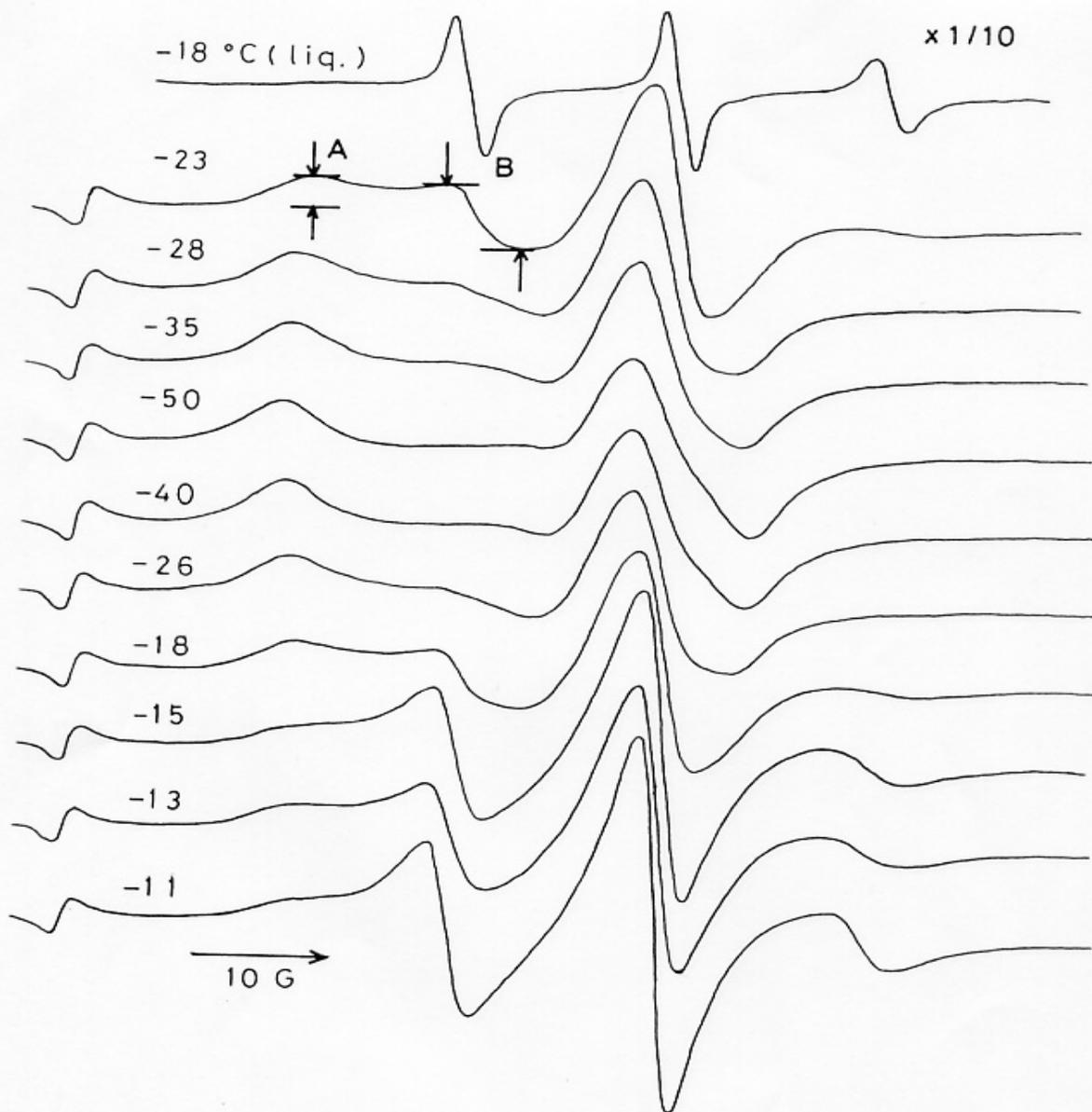


発熱ピークに先行する吸熱側への移行は小さな氷の融解によるものと考えられる

文献6

Equilibrium and non-equilibrium freezing

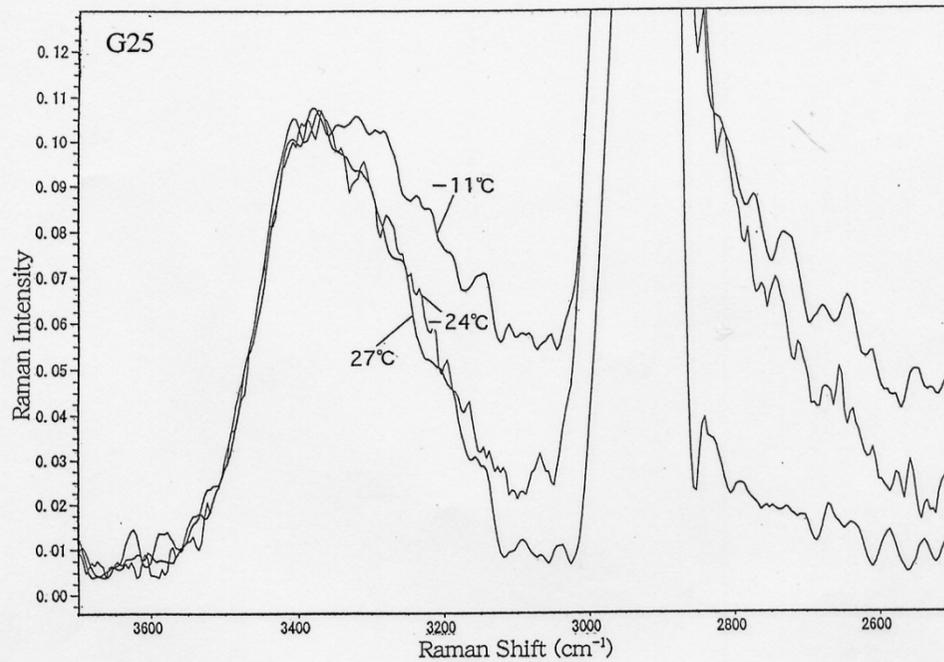




Spin probe: Tempone

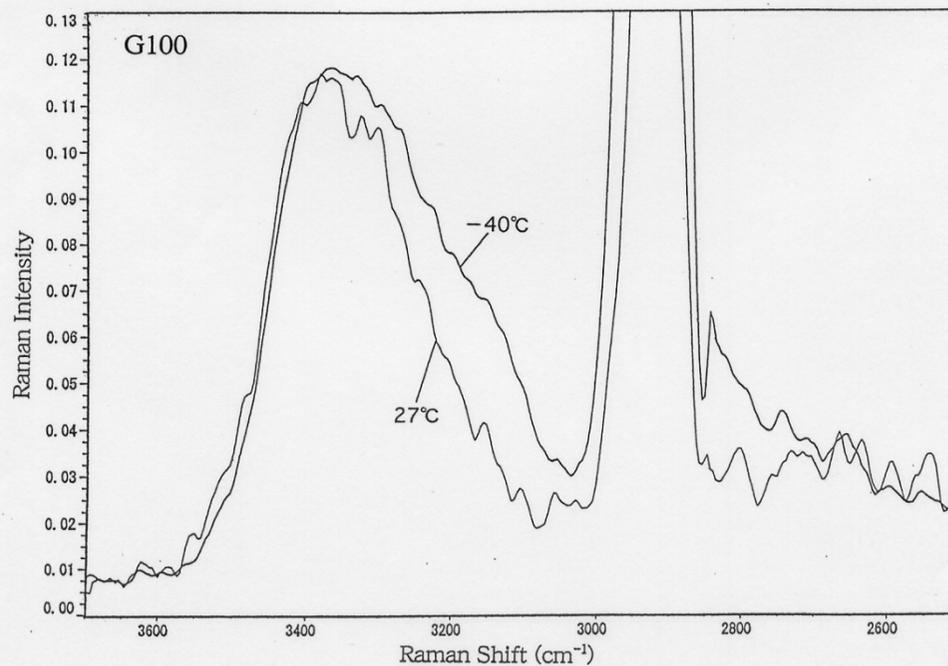
Figure 4. Temperature dependence of ESR spectra obtained with a Sephadex G-25 gel. Water content: 50 wt %. The signal in the lowest magnetic field of each spectrum is due to Mn^{2+} used as an external standard. Intensity of a spectrum obtained at $-18\text{ }^{\circ}C$ is reduced to 1/10.

文献1



Raman spectra due to
the OH stretching band
($\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$)

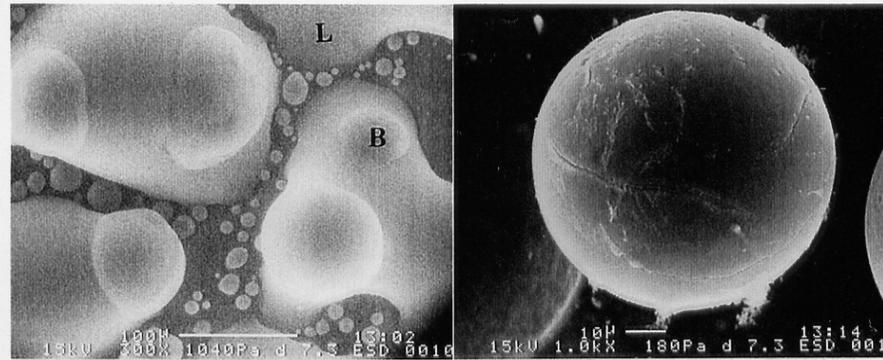
→ indicating the existence
of vitrified water



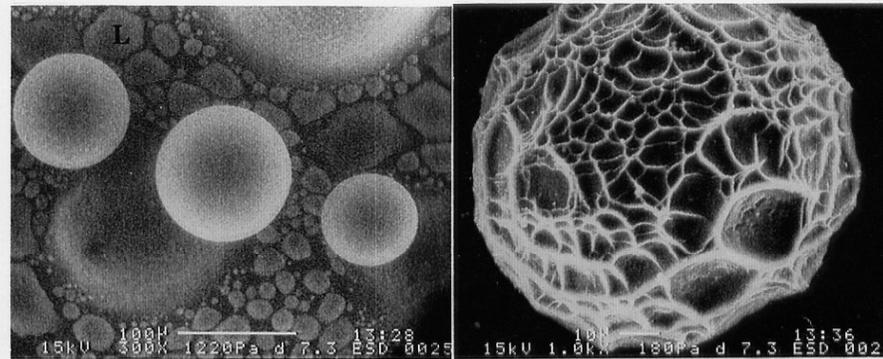
文献7

N Murase *et al.*, Amorphous food and
pharmaceutical systems., Roy. Soc.
Chem., pp. 339-346 (2002).

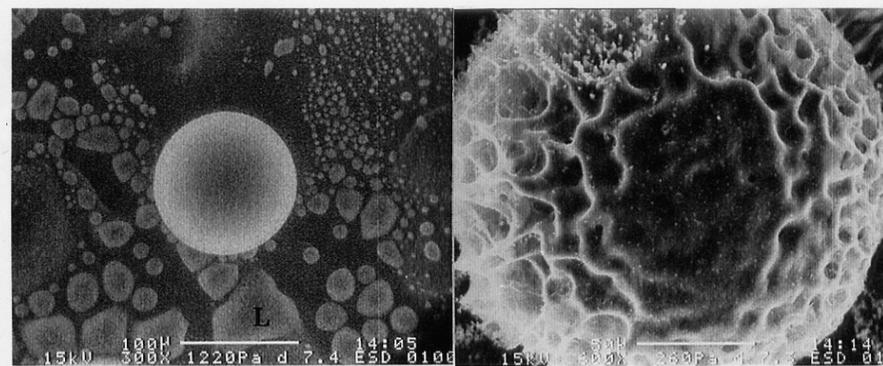
L: liquid water
B: bead



G-10



G-25

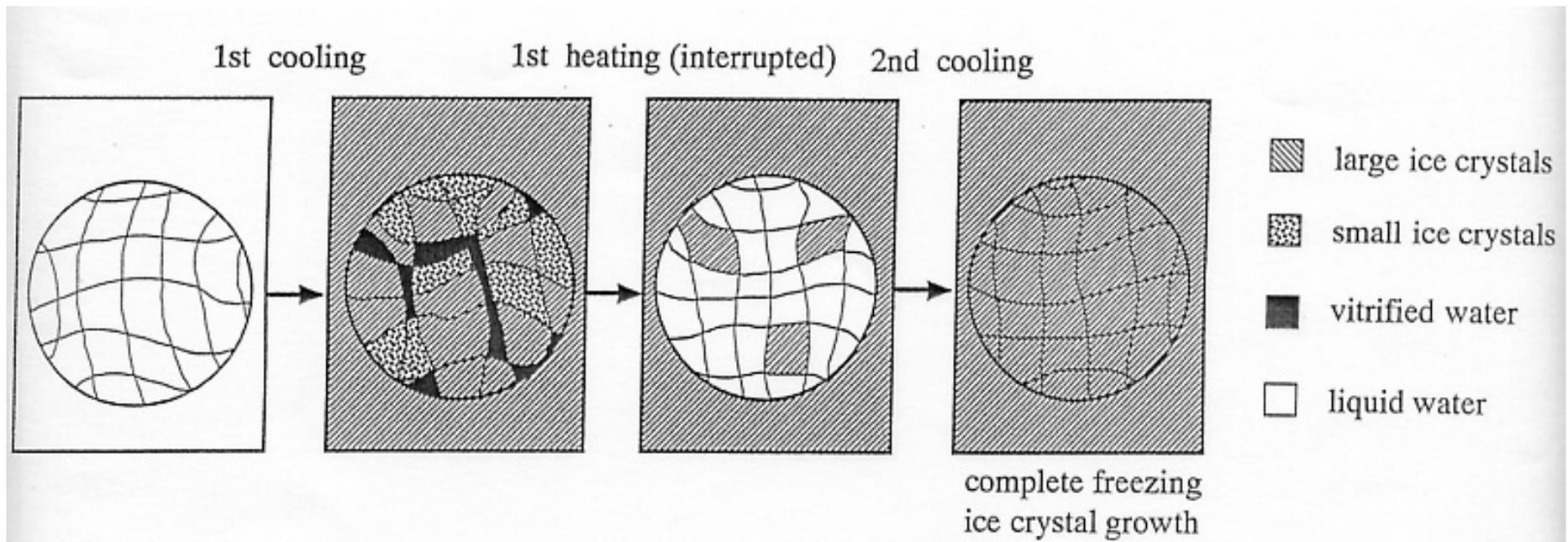


G-100

VP: 260 Pa

文献8
M Ruike *et al.*, *Cryo-Letters*, 20,
61-68 (1999).

Slowly frozen Sephadex beads observed in an ESEM.
Left: before freezing; right: after freeze-drying.



Freezing after substantial
undercooling

Freezing without
undercooling

A conceivable scheme of ice crystallization in a Sephadex G25 gel

適度な架橋密度によって区画化された水は冷却過程で凍らずに高分子鎖と一緒にガラス化し、昇温過程で結晶化する。ガラス化しなくても小さな氷が生成する。

(5) X線CTによるセファデックスゲル・ビーズ中に形成される氷晶の形状解析

$$\Delta T_f = \frac{2V_m T_f^0 \sigma_{il} \cos \theta}{\Delta H_f r}$$

(Derived from Laplace-Young and Gibbs-Duhem equations)

ΔT_f : Depression of freezing point
(melting temperature)

V_m : Molecular volume of ice

T_f^0 : Freezing point of bulk water

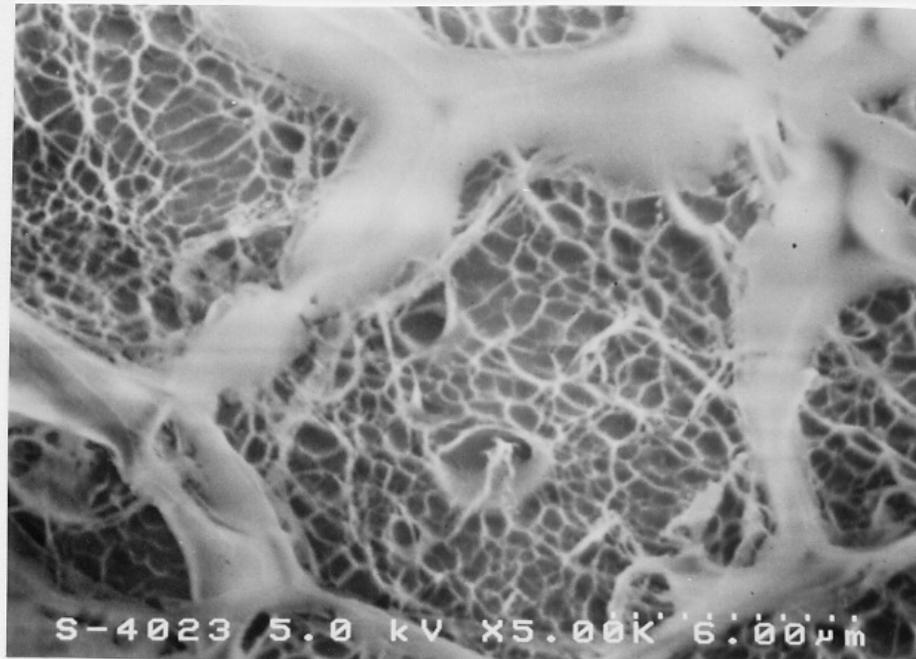
σ_{il} : Ice-water interfacial energy
($\sim 30 \times 10^{-3} \text{ Jm}^{-2}$)

θ : Contact angle (assumed to be 0)

ΔH_f : Enthalpy of fusion of ice

r : Radius of pore

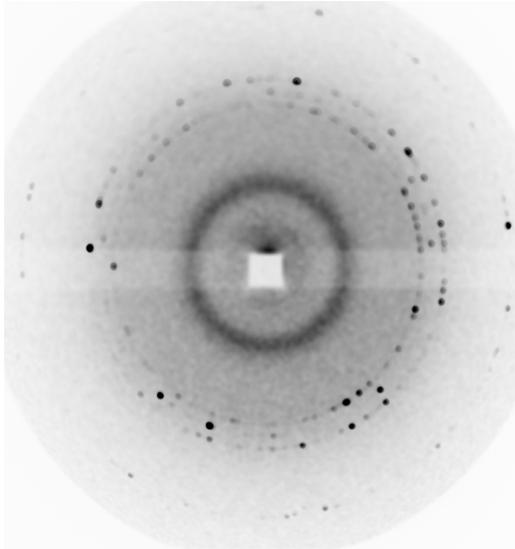
$\Delta T_f = 20 \text{ K} \longrightarrow r \sim 2.5 \text{ nm}$; but $\sigma_{i/hw}$ ($> \sigma_{il}$) should be used



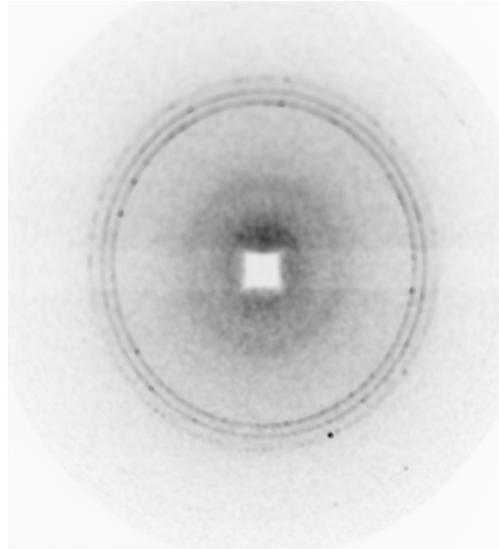
Freeze-dried G25 beads
observed by Cryo-SEM

Water : 80~90 wt%,
quenched by liq. N₂.

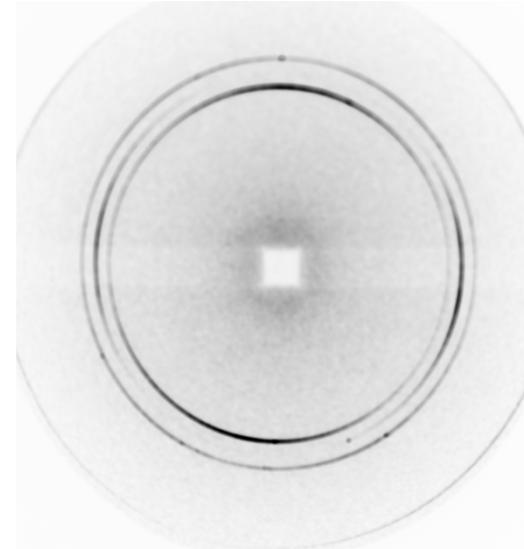
文献9
村勢則郎他 低温生物工学会誌,
Vol. 42, No. 2, 139-142 (1996)



G10



G25



G100

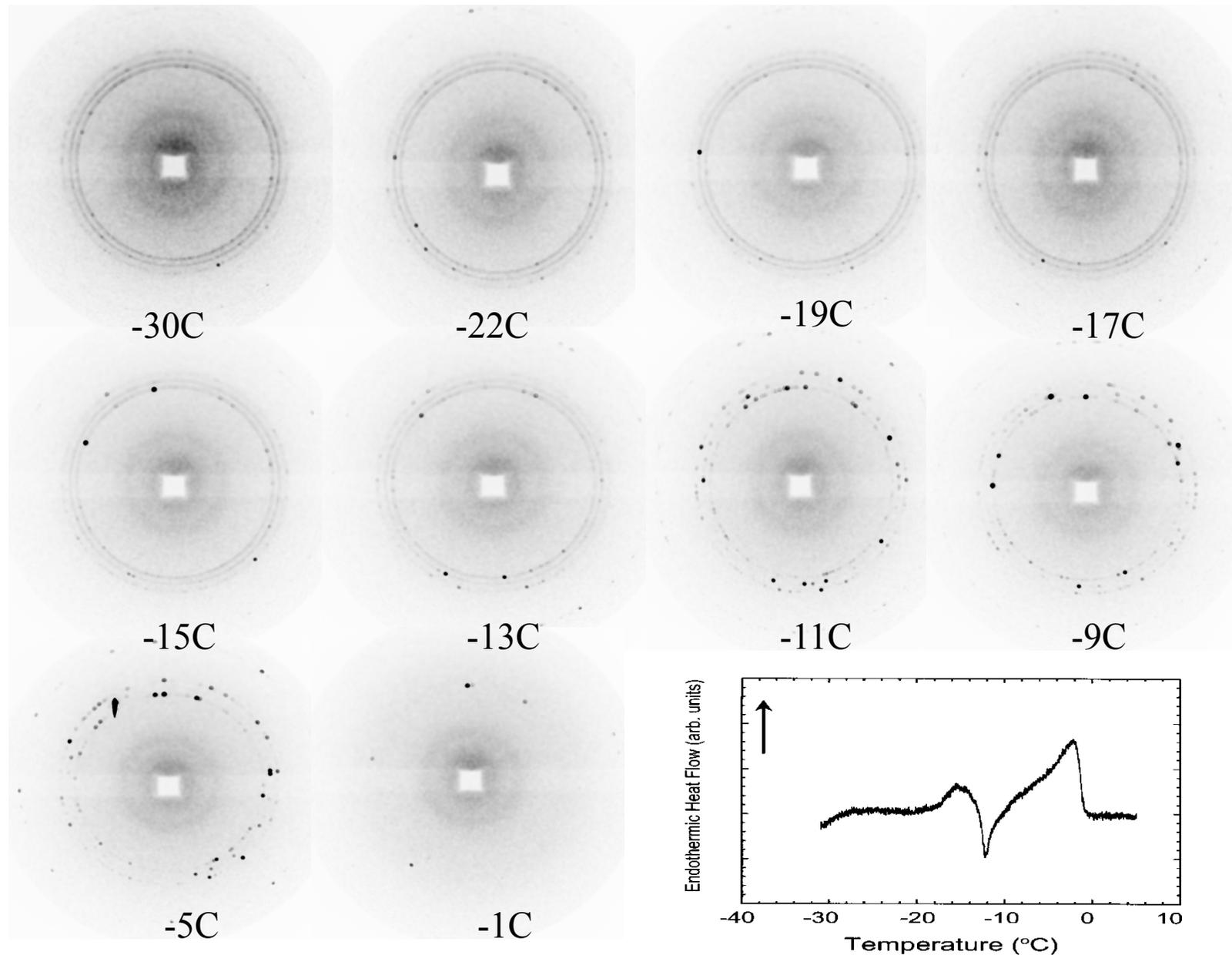
Two-dimensional XRD images observed with frozen Sephadex gels at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

PF 18C (Tsukuba), wave length: 0.07 nm, slit width of collimator: 100 μm

Powder pattern for G25 \rightarrow crystal size : $< \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ in diameter

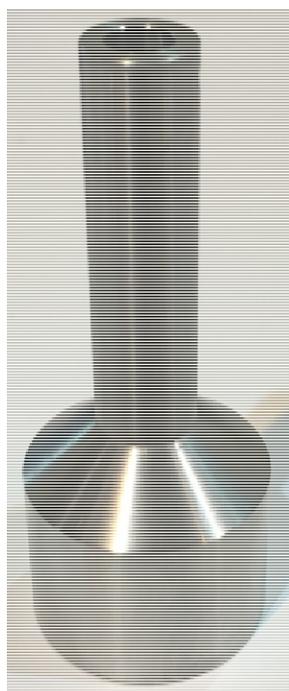
Spotty pattern for G10 \rightarrow larger ice crystal ?

文献10 N Murase *et al.*, *CryoLetters* 25, 227-234 (2004).

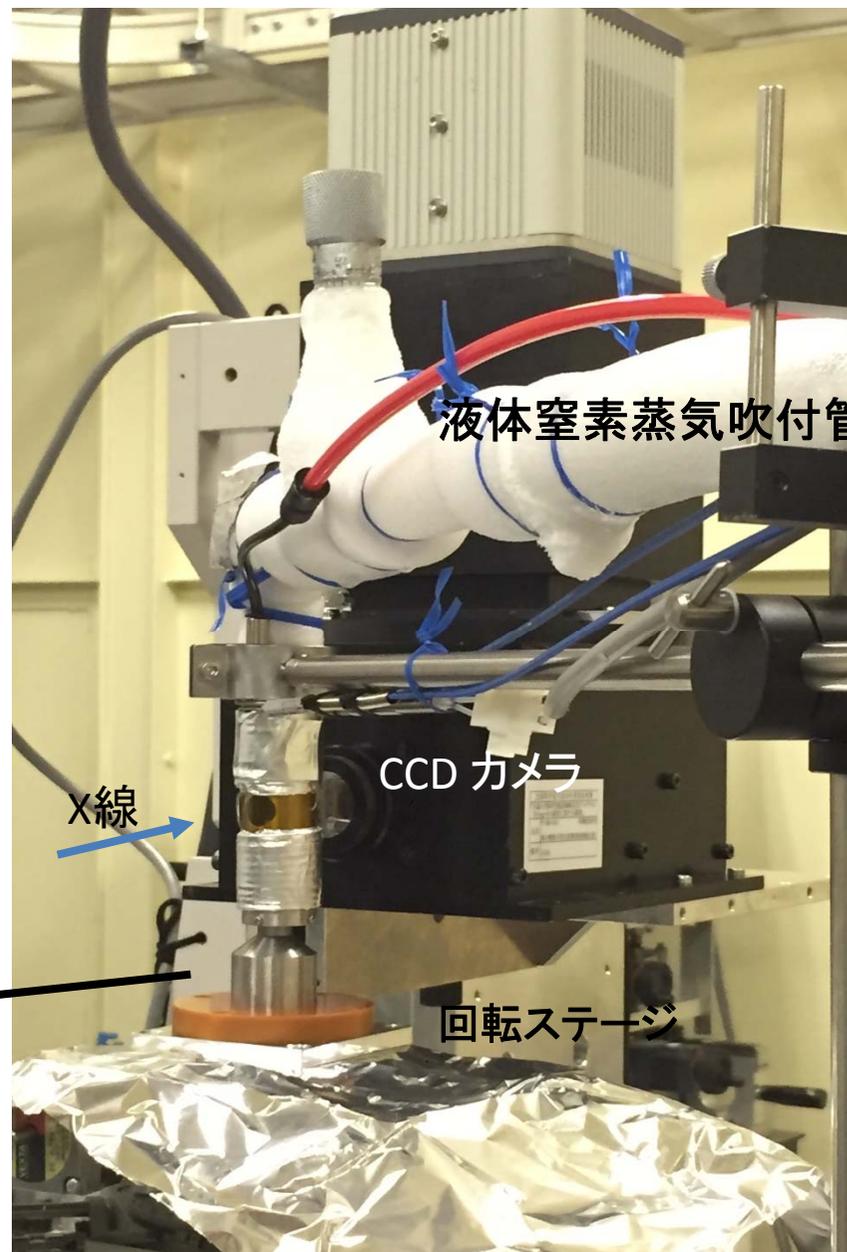


Two-dimensional XRD images obtained for a G25 gel during rewarming (water: 50 %)

SPring-8 BL46XU



試料台

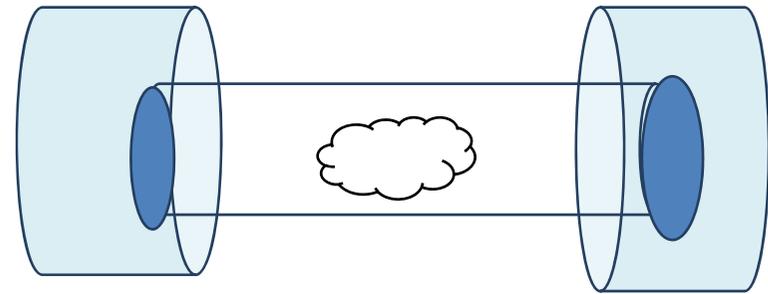


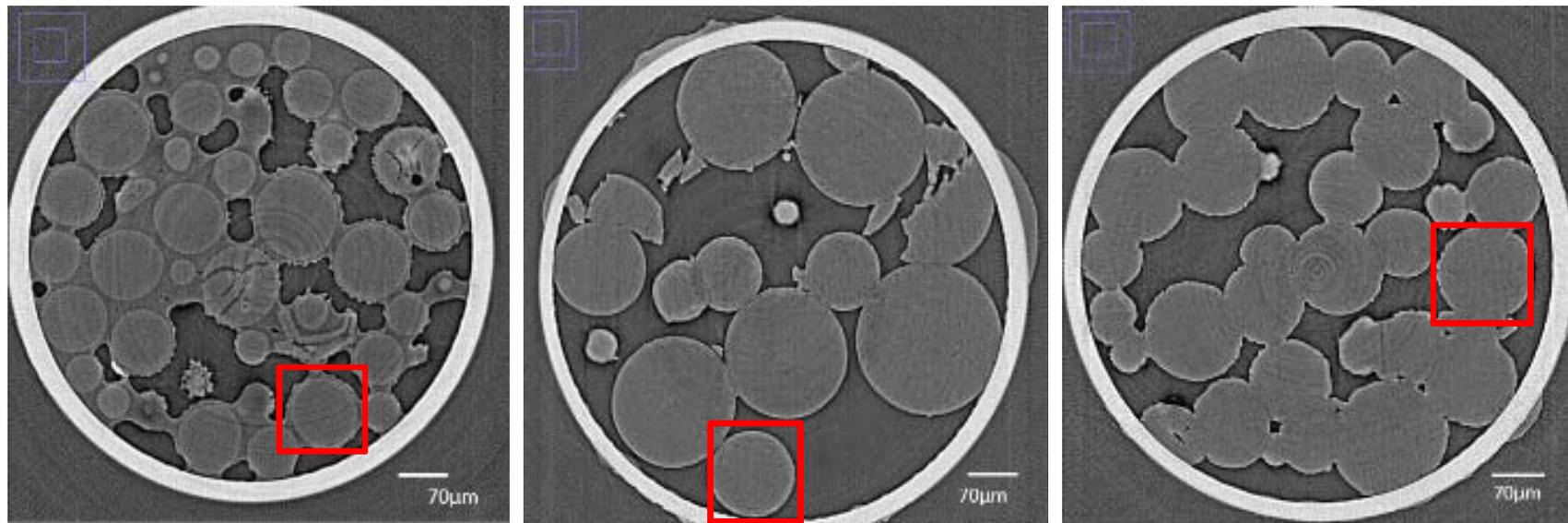
X線CT測定系

- SPring-8 ビームライン BL46XU を使用
- 入射X線エネルギー: 12.4 keV
- ミラー角: 4 mrad (高調波除去のため)
- ビームサイズ: 1.0 mm x 1.0 mm
- ステージ下流側にCCDカメラを設置
- 試料からカメラまでの距離: 10 cm
- 試料の回転(180度)
 - step scan : 0.5° 間隔
 - continuous scan : 1.2° / s
- 画素サイズ: 0.37 μm

試料調製

- 内径0.7 mm × 長さ 約15mmの石英キャピラリーに試料（含水率：50%セファデックス）を3mm程度の長さに詰め、グリースで両端を封じる。
- 予め試料を凍結させておく。
- 凍結状態のまま、試料入りキャピラリーを粘土で試料台に固定。
- 吹付ける液体窒素蒸気の量を制御して凍結状態を維持。
温度：-23 ~ -35°C





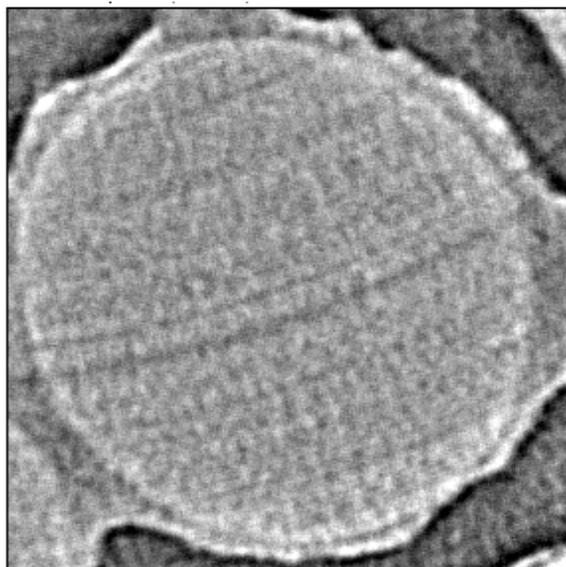
G10

G25

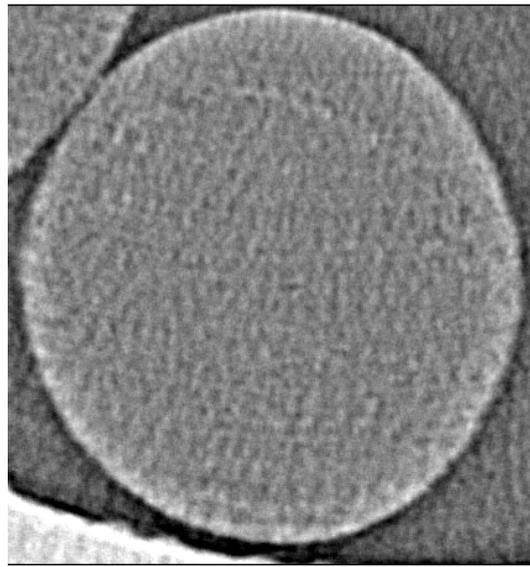
G50

急速凍結(冷却速度:約60°C/分); continuous scan

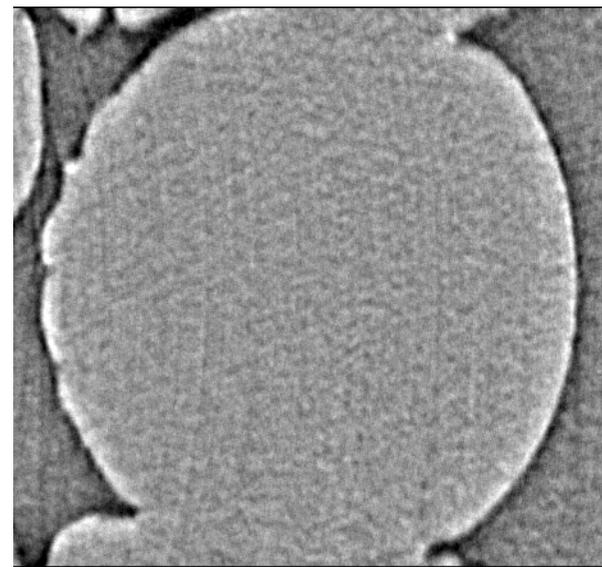
X線吸収係数の違いにより氷はゲルマトリックスより黒く見える



G10

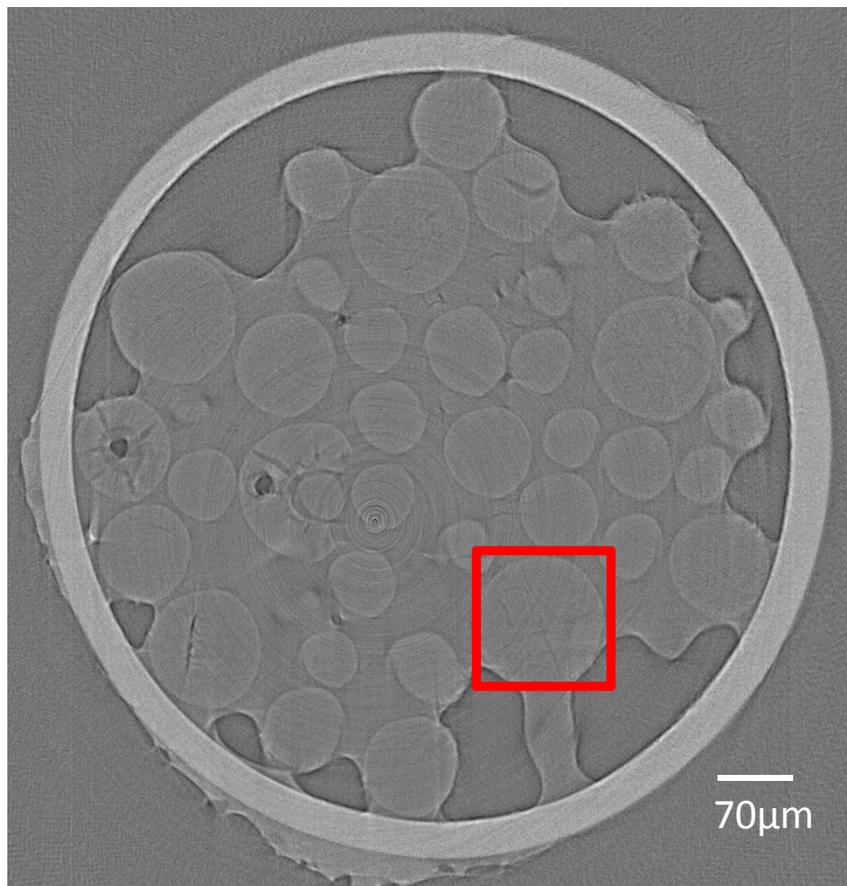


G25

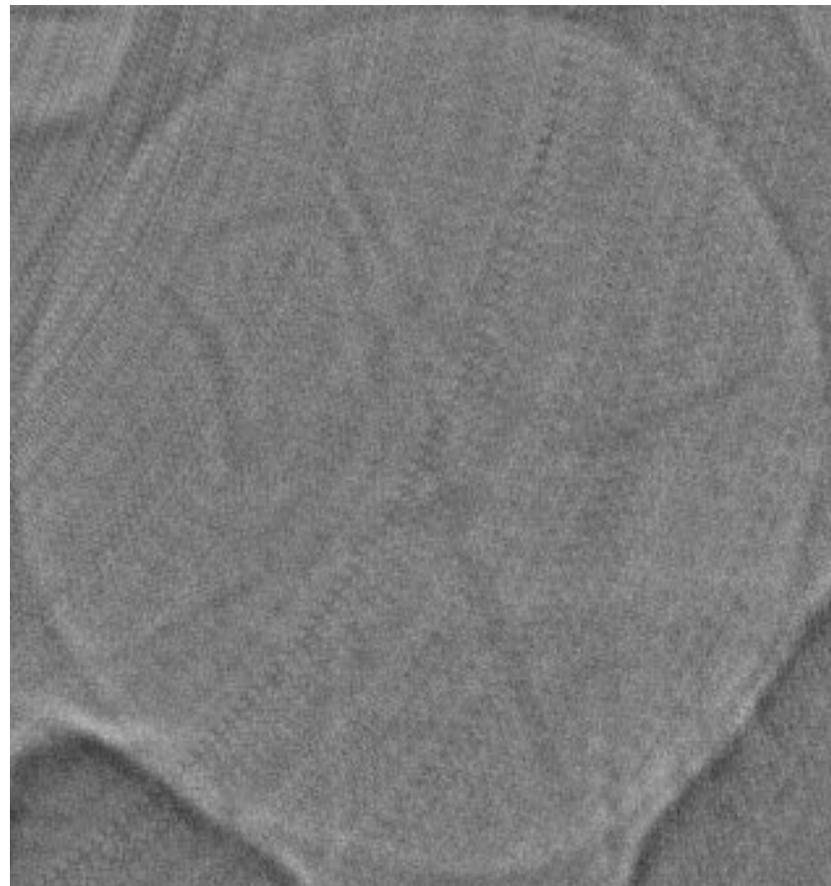


G50

急速凍結試料の拡大画像(□内)



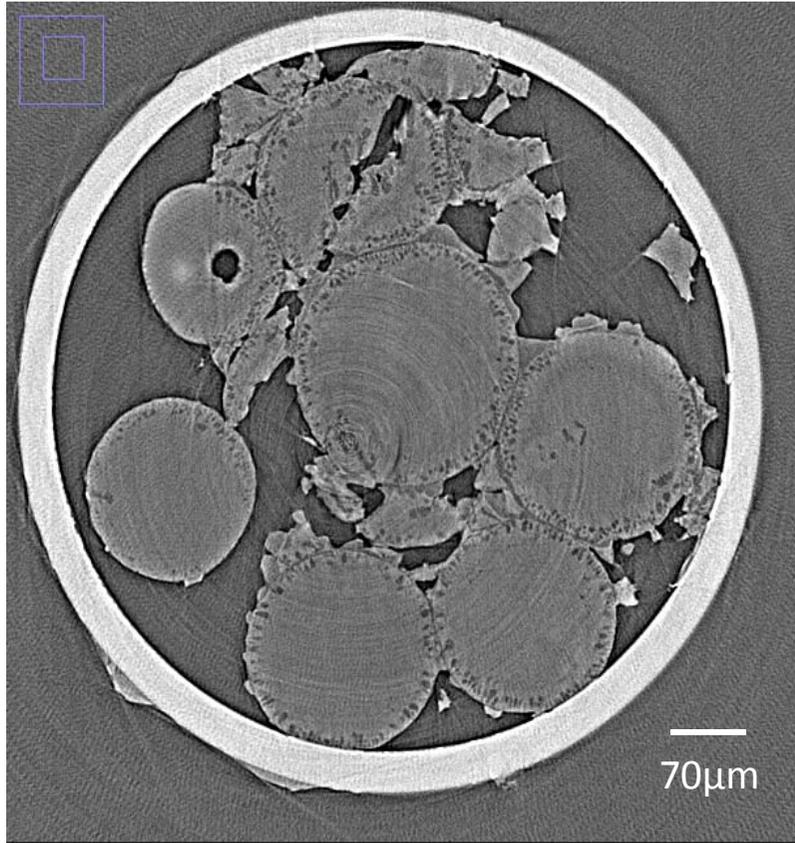
G10



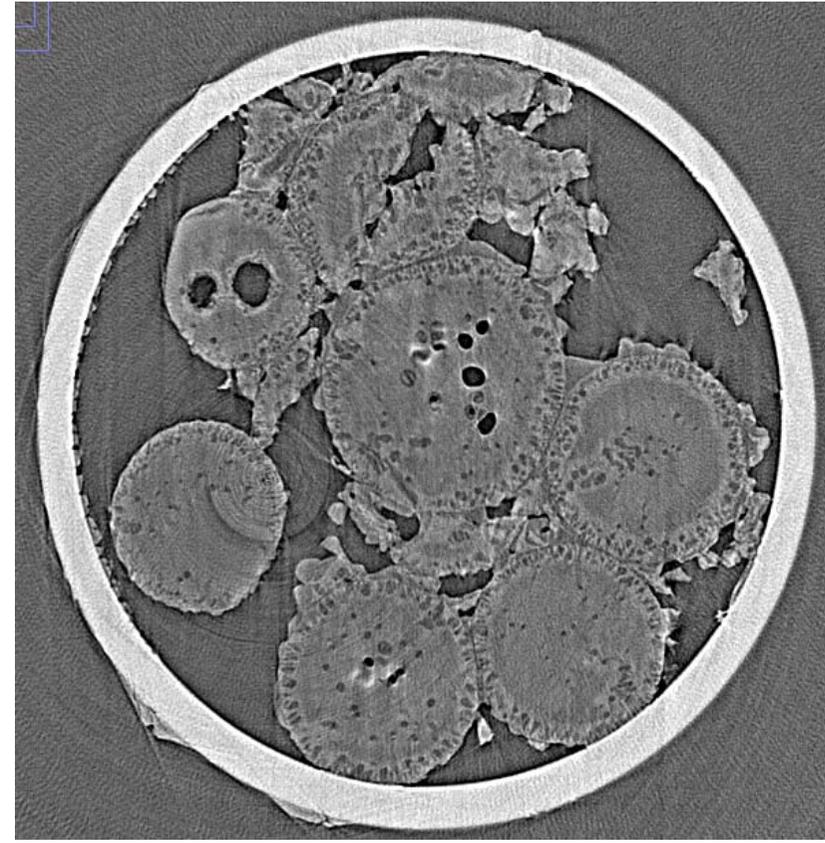
G10拡大

緩速凍結(冷却速度:約6°C/分); continuous scan

二次元XRDで見えていたスポットはビーズ外の氷晶によるもの？



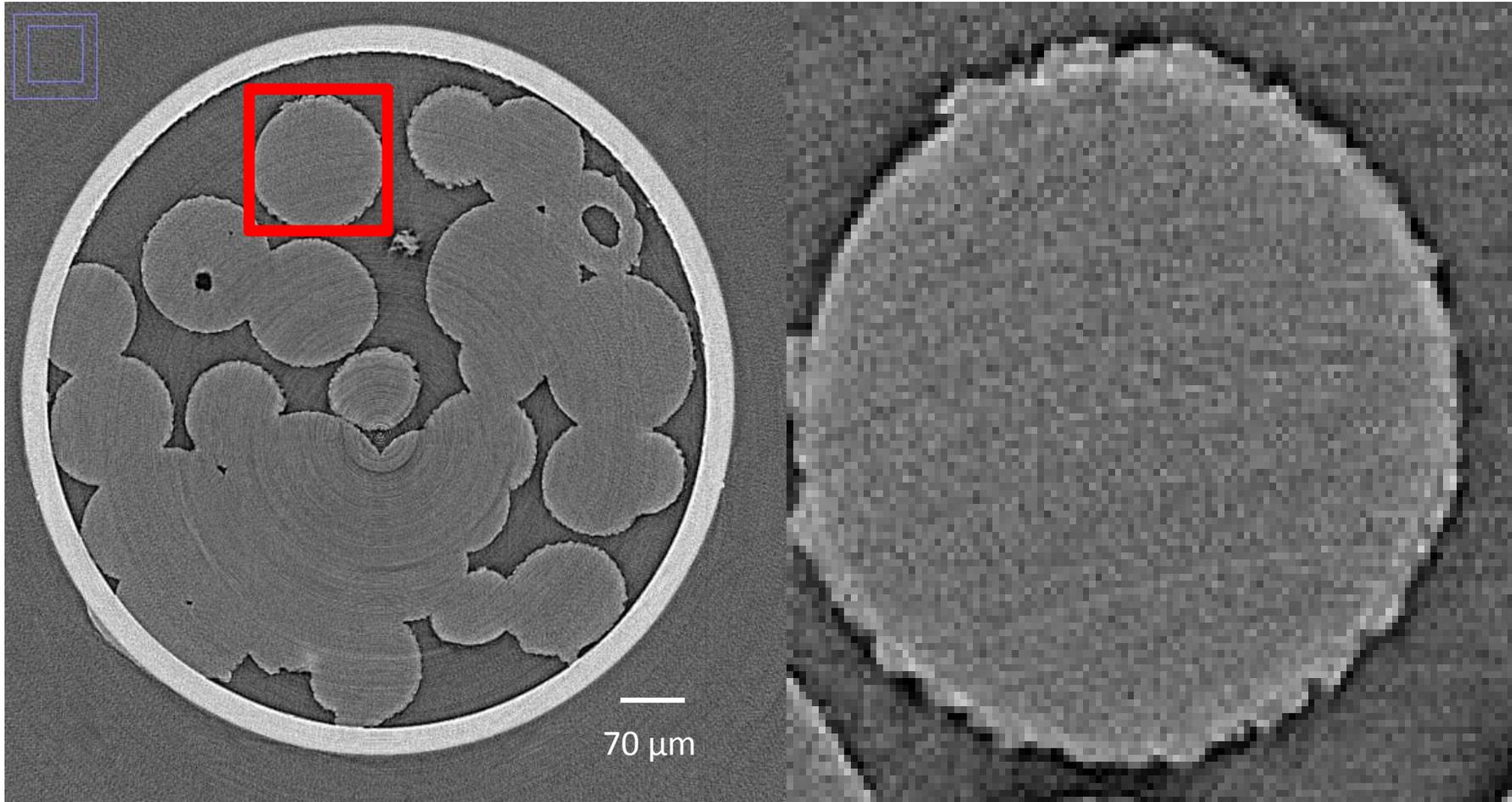
G25 緩速凍結



G25 緩速凍結後に昇温(約-8°C)

step scan

G50



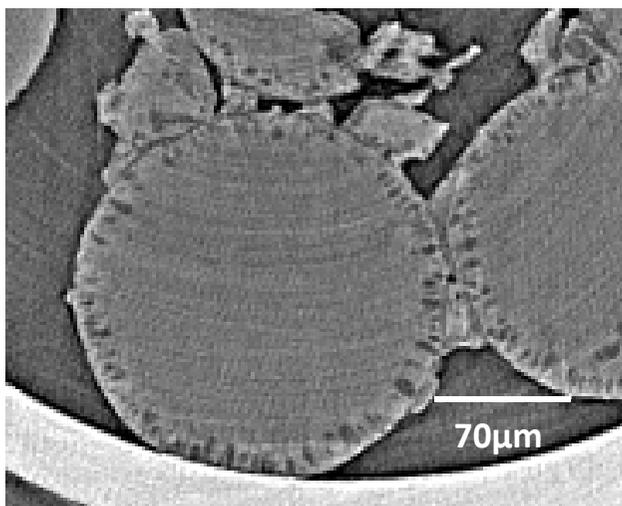
緩速凍結後に昇温(約-8°C)

□ 内を拡大

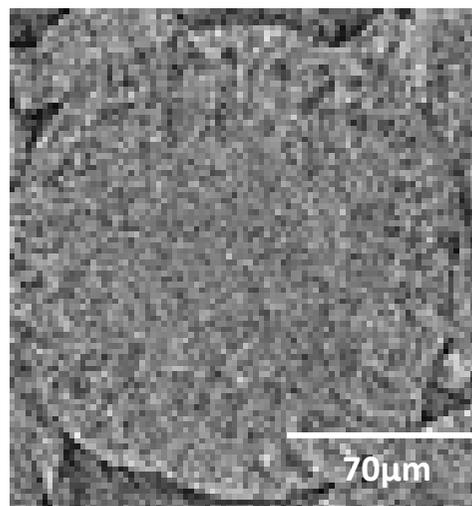
step scan

水が見えてもよいはず？

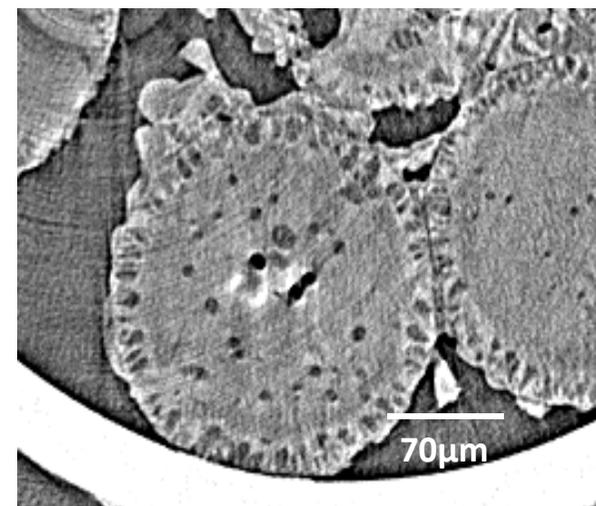
G25 緩速凍結試料



緩速凍結



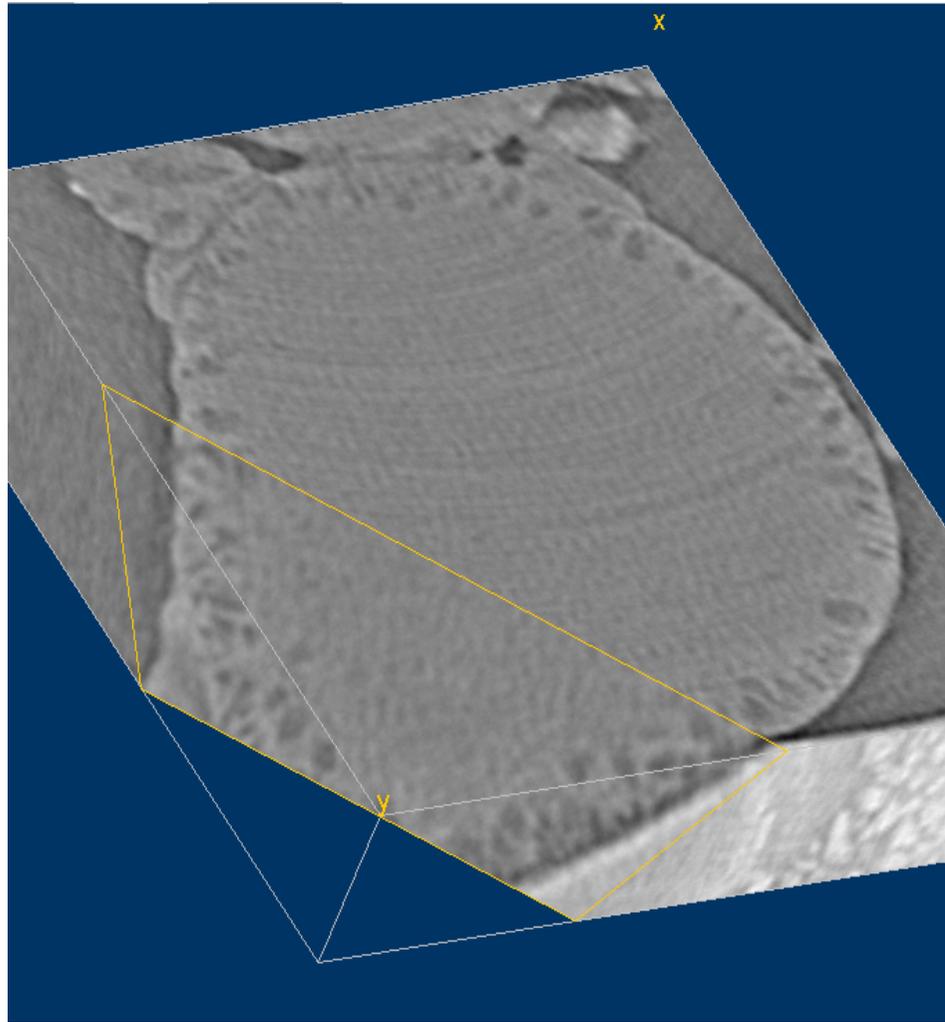
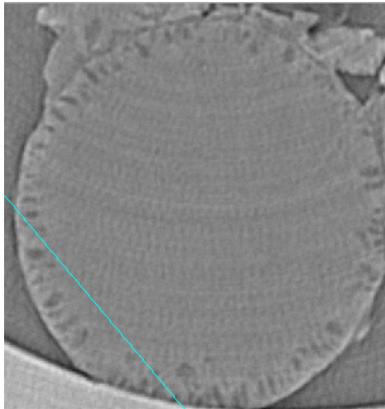
昇温結晶化完了温度
まで昇温後に再凍結



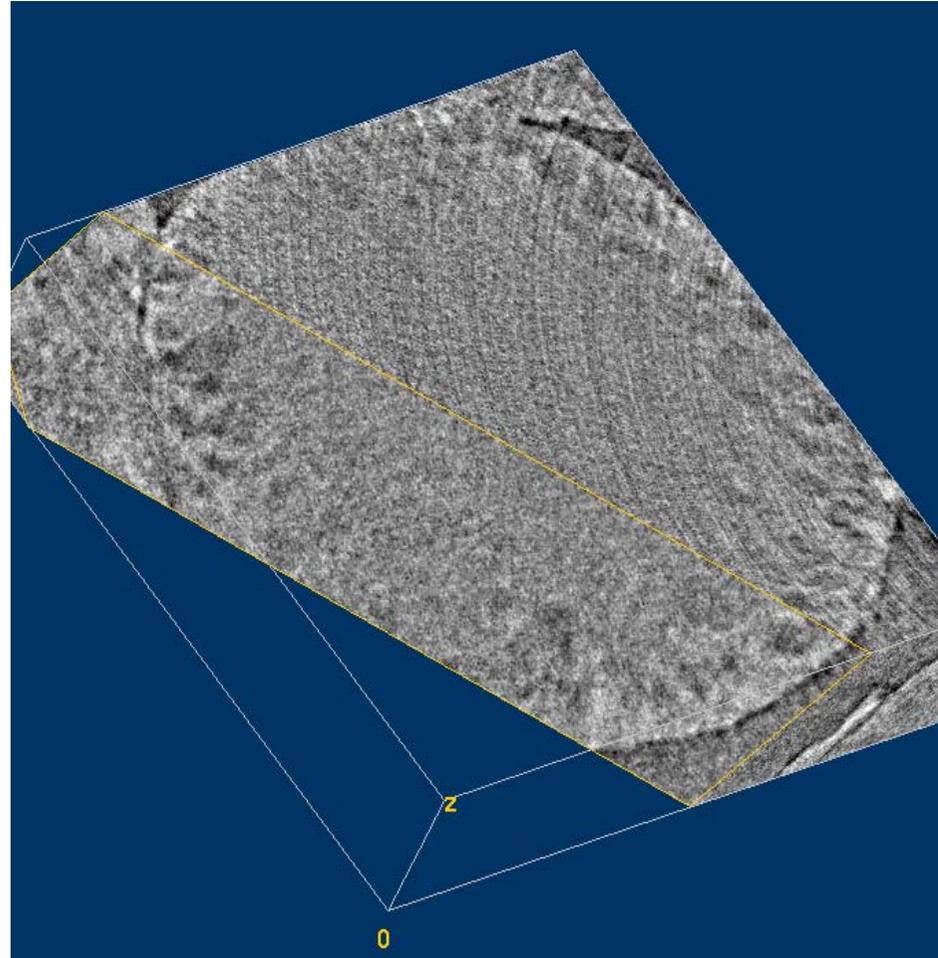
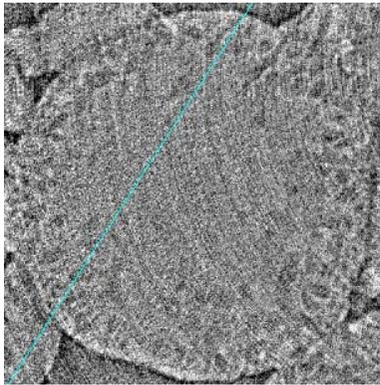
凍結試料を試料台上
で昇温(約-8°C)

step scan

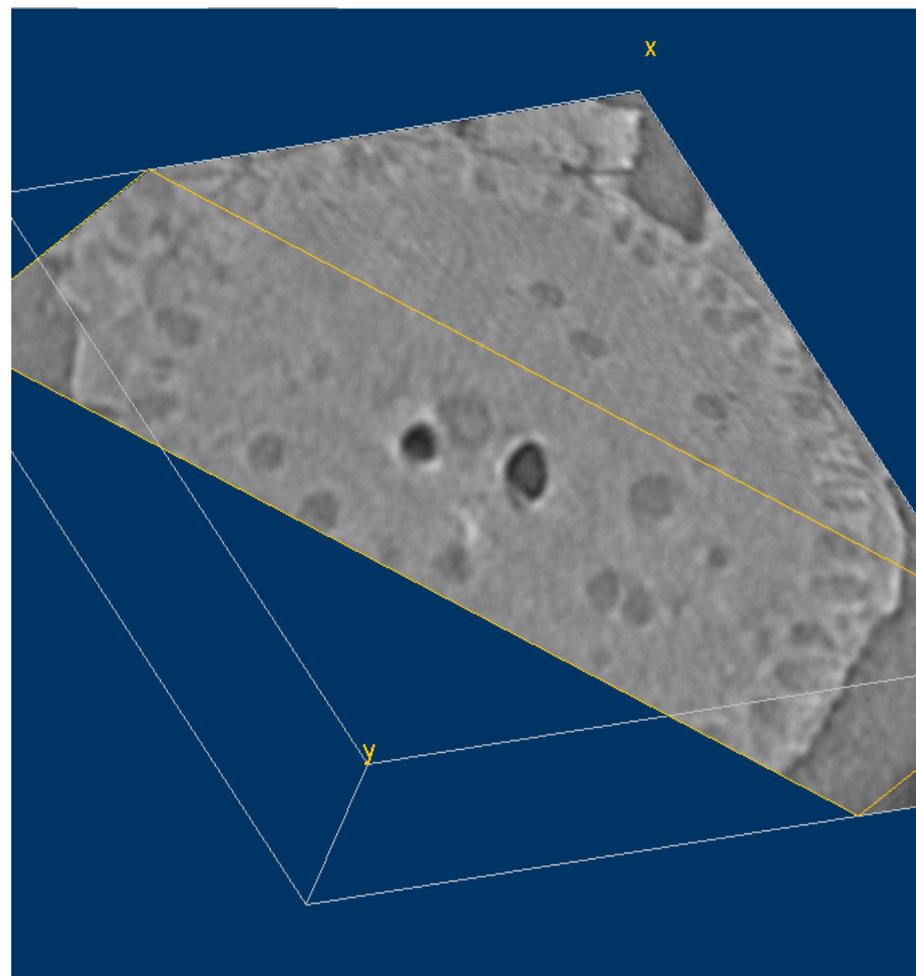
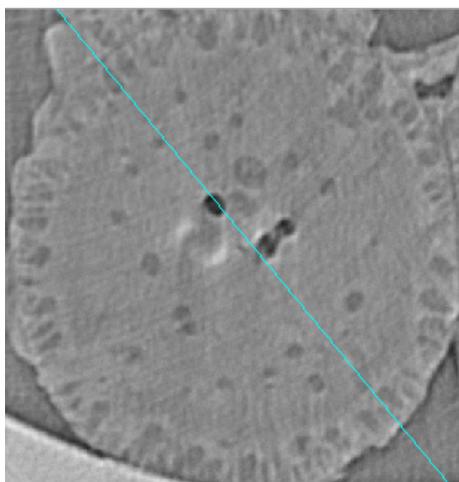
ビーズ内に昇温結晶化した氷晶が見えている？ → 二次元XRDの結果と対応



G25緩速凍結 三次元画像 (stacking:730-829)



G25再凍結 三次元画像 (stacking:713-812)



G25 昇温三次元画像 (stacking: 681-780)

X線CTにより試料中の氷晶の形状・位置・
分布をみることができる。

(⇔ 二次元XRD)

(6) まとめ

- 高分子ゲル中の水は高分子網目構造によって区画化されており、水分子の拡散運動は制限されている。凍結も拡散運動を伴い、網目構造の影響を受ける。
- 網目構造の特性に依存して凍結時に生成する氷晶の形状は変化する。
- 高分子網目構造と氷晶形状に関する基礎的理解は冷凍食品の開発、保存において重要な知見をもたらすと思われる。
- 放射光を使用したX線CTはゲル状食品中に生成する氷晶の形状、分布、位置の解析において有力な実験手段になると期待される。