

冷凍生鮮果実・野菜の内部氷結晶組織の X 線 CT3 次元像観察による 最適凍結条件の開発

Development of a New Freezing Method through the 3D Observation of Ice Crystals in Frozen Fruit and Vegetable by Using X-ray CT

小林 りか^a, 佐藤 眞直^b, 鈴木 徹^a
Rika Kobayashi^a, Masugu Sato^b, Toru Suzuki^a

^a東京海洋大学大学院, ^b(公財)高輝度光科学研究センター
^aTokyo University of Marine Science and Technology, ^bJASRI

凍結農作物中の氷結晶観察は、組織の脆弱性から凍結置換法の適応が困難であり、他の食品と比較して農作物中の氷結晶形態に関する知見は圧倒的に少ない。本研究では、豆腐およびマグロ魚肉の氷結晶直接観察に成功した放射光を用いたイメージング技術を利用し、イチゴ果実およびリーフレタス中に生成した氷結晶を観察した。緩慢凍結を行ないイチゴ果実中で粗大化させた氷結晶は、屈折コントラストを利用することで観察できた。

キーワード： X線イメージング、食品凍結、氷結晶、農産物

背景と研究目的：

凍結装置の評価には、食品内氷結晶組織の可視化技術が不可欠である。従来技術としては、凍結された食品から凍結置換法と呼ばれる手法を用いて組織切片を作成し、局所的な氷結晶組織を光学顕微鏡で観察する間接的手法[1]が用いられるが、本手法は1か月以上も時間がかかるうえ、その期間の温度変動により初期状態を維持反映できているか疑問点が残っていた。特に、農産物の場合、細胞膜の水透過性が低いため、置換が困難であることが本手法の適用を妨げている。加えて、観察部位が局所的かつ2次元像でしかなく、食材中の氷結晶の全体的な分布状態を把握することが極めて困難な作業であった。このような観察技術の問題点より、特に生鮮果実野菜類中の氷結晶観察技術は極端に遅れており、農産物の凍結に関する既往の研究においては、凍結解凍後の組織を観察するという手法が主にとられてきた[2]。一部、真空凍結乾燥によって氷結晶部を空隙に置換したサンプルの観察を実験室レベルの X 線 CT によって行われているが、元来あった空隙との判別が難しく、また乾燥過程で損傷を受けることによるサンプルの変化の影響が取り除けないなど課題が多く存在する[3]。この状況に対し、SPring-8 の BL19B2 において共同実験者の JASRI 佐藤氏は、放射光を用いた X 線 CT による冷凍食品(凍結豆腐、冷凍マグロ)中の氷結晶観察を 2013B 期に検討し(課題番号 2013B1847)、その非破壊 3 次元観察に成功した[4]。従来、実験室レベルの X 線 CT 装置による観察では、冷凍食品中の氷と水との密度差が小さいため識別することができず、食品を凍結乾燥させ氷結晶部分を空隙と置き換える前処理が必要となるが[3]、前述の成果は、高輝度 X 線光源である放射光の、(i)単色 X 線利用による吸収コントラストの向上、および(ii)高平行光源による組織界面の屈折コントラスト効果、といったメリットを活用し、直接法による氷結晶の観察に成功している。この食材の内部の氷結晶組織の直接法、即ち、非破壊での 3 次元像の観察は世界でも例を見ない成果である。そこで、本申請課題では、先の手法を野菜果実に適用することを目的とし、果物代表としてイチゴ、野菜類代表としてリーフレタスを対象試料として、急速凍結法、および現在申請者研究室で開発している過冷却凍結法の 2 方法で凍結した試料内部の氷結晶組織 3D 観察を放射光 X 線 CT で行なった。その結果から、農産物に対する放射光 X 線 CT による氷結晶観察法の有用性と、凍結手法の違いがイチゴおよびリーフレタスに及ぼす影響について考察を行った。

実験：

東京海洋大学で 2 方法(従来急速凍結、過冷却凍結手法)にて凍結したイチゴ粒、およびリーフレタス葉を、雰囲気温度 -20°C の低温チャンバー中で $5\times 5\times 15\text{ mm}^3$ 程度の凍結切片に切り出し、ドラ

アイスを用いて凍結状態に保ち実験試料とした。この試料を、ドライアイスで冷却された試料ホルダーにセットした。本実験はビームライン BL19B2 にて実施した。実験ハッチ内に設置された X 線 CT 用の回転試料ステージに、上記冷却試料ホルダー設置用のマウントと、試料を冷却するための液体窒素蒸気吹き付け装置をセットし、試料ステージ下流側には 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(2013B 期の実験で検討済み)に設定し、高調波除去のため X 線ミラーをミラー角 4 mrad に設定した。液体窒素蒸気吹き付けで約-30°C 程度に冷却した回転試料ステージ上に、冷却試料ホルダーごと試料をセットし、2.2 °/s で回転させながら試料の X 線透過画像の撮像を行った。この際、試料から X 線 CCD カメラまでのカメラ長については 120 mm と、屈折コントラストを利用するための 500 mm の 2 条件に定め、より明確な氷組織画像が得られるカメラ長を検討した。得られた 256 枚の透過像から 2 次元画像を再構成し、解析に供した。得られた画像から、各食材について凍結法の違いによる氷結晶組織の相違、すなわち氷結晶粒の大きさ分布とその空間分布、また形状の比較検討を行った。

結果および考察：

まずカメラ長を 120 mm, また屈折コントラストを利用するための 500 mm の 2 条件に変化させ、同一のイチゴ緩慢凍結試料の撮像を行ない、より明確に氷結晶および内部構造を撮像出来る条件の検討を行った。その際に、空間分解能も妥当であるかどうか検討した。得られたイチゴ凍結試料の断面像を Fig.1 に載せた。Fig.1-a が通常のコントラスト(カメラ長 120 mm)、Fig.1-b が屈折コントラスト(カメラ長 500 mm)によって撮像されたイチゴ内部写真である。両写真においてイチゴ内の空隙およびイチゴの細胞は観察されたが、Fig.1-b でのみ、イチゴの細胞中に細長い氷結晶と思われる像が見られた。この測定結果を踏まえて、強いコントラストにより氷結晶と推定される画像が得られた 500 mm のカメラ長を、以後の測定で採用した。

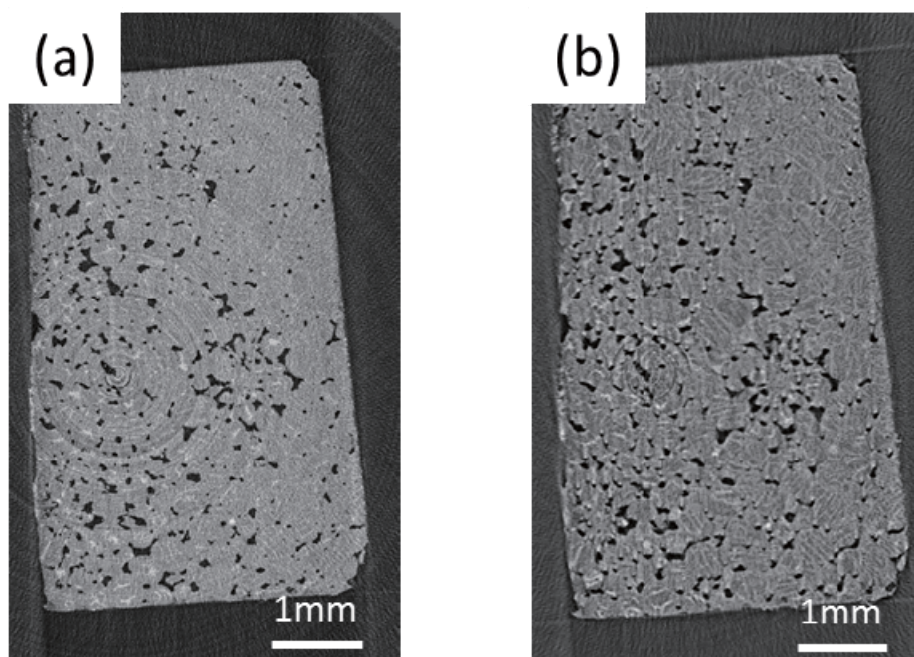


Fig.1. Cross-section images of strawberry tissues: (a) distance of sample to CCD camera was 120mm. (b) it was 500 mm.

次に 2 種類の異なる凍結手法で準備されたイチゴおよびリーフレタス中の氷結晶観察を行った。

Fig.2 にイチゴの、Fig.3 にリーフレタスの断面像を載せた。Fig.2-a が緩慢凍結試料、Fig.2-b が過冷却凍結法試料である。イチゴの緩慢凍結試料では先の実験同様に氷結晶らしい像が観察出来たのに対し、氷結晶がより微細になっていると予想される過冷却凍結法試料では、分解能の限界か、氷粒が観察できなかった。またリーフレタスでは、緩慢凍結試料(Fig.3-a)および過冷却凍結試料(Fig.3-b)の双方で氷らしい像が観察できなかった。

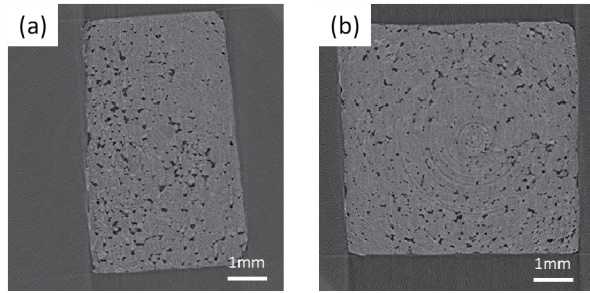


Fig.2. Cross-section images of strawberry tissues:
 (a) frozen by slow freezing method and
 (b) frozen by supercooled freezing method.

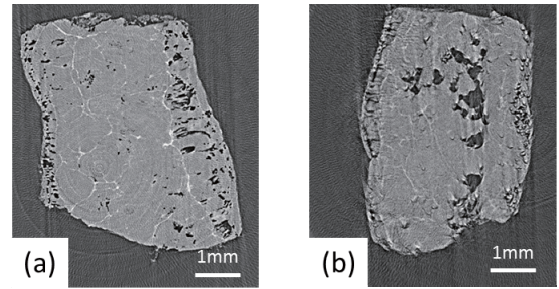


Fig.3. Cross-section images of lettuce (*Lactuca sativa*): (a) frozen by slow freezing method and (b) frozen by supercooled freezing method.

2013B 期に検討された(課題番号 2013B1847)豆腐およびマグロ魚肉内の氷結晶観察では未凍結部分と氷結晶部分にはっきりとしたコントラストが観察されたのに対して、今回得られたイチゴおよびレタスの画像は未凍結部と氷結晶部分のコントラストが弱かった。これは、豆腐やマグロ魚肉にはマグネシウムイオンや鉄イオンなど金属イオンが含まれるため、造影剤の役割を果たし明確なコントラストが得られた一方で、今回対象とした植物組織は水分含量が比較的多く、水に近い密度を持つ上、造影効果をもたらすような物質を含んでおらず、結果として得られた画像が低コントラストで、氷結晶の判断が難しい画像になったと考えられる。今後分解能を上げて観察を行うだけでなく、造影剤の利用、さらに動的観察も視野に入れて検討していきたい。

参考文献：

- [1] 鈴木徹、冷凍、**83**, 143-148 (2008).
- [2] S. Van Buggenhout et al., *Food Research International*, **40**, 1276-1285 (2007).
- [3] Reza Mousavi et al., *Journal of Food Science*, **42**, 714-727 (2007).
- [4] 佐藤真直、梶原堅太郎、平成 25 年度利用課題実験報告書(2013), 2013B1847.