シリーズ—研究小集会（第32回）水部会

解 説

凍結を利用して食品機能を制御・創出する試み

中 川 究 也

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻

An Attempt to Control Food Functionality by Using Freezing Process

Kyuya Nakagawa

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Oiwake-cho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8502

Bioencapsulation of food additives or functional ingredients aims to protect sensitive core materials during storage and consumption, transport them to designated positions in the gastrointestinal tract, and release them at appropriate rates to maximize bioavailability. Bioencapsulation systems need to be designed with GRAS (generally recognized as safe) materials, and the physicochemical processes involved in matrix formation are crucial for realizing expected functionality. From an engineering perspective, it is important to develop a processing method for obtaining products with desirable features. The author has previously reported that a freezing step represents an interesting processing tool for controlling the properties of an encapsulation system. During freezing, the growth of ice crystals in an aqueous solution results in a cryoconcentrated (freeze-concentrated) phase that is controlled by phase equilibrium. The author's idea is to control matrix formation in the cryoconcentrated phase for optimizing encapsulation systems. This review summarizes this concept and future scope. (Accepted Dec. 14, 2016)

Keywords : freezing, freeze concentration, food functionality, microencapsulation

キーワード : 凍結, 凍結濃縮, 食品機能, マイクロカプセル

平成 27 年度より機能性表示食品制度がはじまり、消費者・生産者ともにあらためて食品の「機能」という言葉に触れる機会が増えたのではないかと。一般に食品機能とは 1 次, 2 次, 3 次機能として、それぞれ栄養機能, 嗜好性, 生体調節とする明確な定義がある。同制度は科学的な根拠に基づいてこれらの機能を有すると認められる成分を含有する食品に対し、その機能を明示することができると、新しい製品アピールとして強く期待できる。今後、機能性をうたう食品の消費は大きく伸びることであろう。筆者はこのような制度が食品の機能や特性と関わる品質を高めるための技術を育む契機になることを期待している。そして将来、真に高度な食品製造を実現するためには、機能という言葉の解釈を大きく拡大し、加工と強く関わる高次な機能を制御することが重要になると考える。換言すれば生理機能の期待される化学物質を体内に輸送するにあたり、その乗り物たる食品の品質設計ができることの重要性である。この場で食品の高次機能に適切な定義を与えるのは拙速かもしれないが、挙げるとすれば、第一に貯蔵性・ハンドリング性と関わる機能、第二に制御されたテクスチャーや嗜好性に関わる機能、第三に化学物質の送達能・生体吸

収性に関わる機能であろうか。これらはいずれも多かれ少なかれ食品加工技術開発の中で取り組まれている（きた）ことである。しかしこれらを食品の高次機能として認識し直すことは食品加工技術のレベルを自ら測ることとなり、ひいては関連技術のレベルアップに繋がると考える。

本稿ではこのような考えを頭の片隅に置きながら、筆者の研究事例を紹介させていただく。凍結を利用して食品マイクロカプセルの特性を制御する試みと、その着想の元となった凍結を利用してテクスチャー制御を試みた研究について次節より概説する。食品工業において凍結は、主として食品の保存性を高める操作として実施される。凍結過程で起こる現象は食品中の水分の凝固がメインであろうが、凍結濃縮や凍結濃縮相の固化までも含めると、そこで生じる物理化学現象は単純ではない。凍結濃縮とは固液共存状態にある二成分以上を含む系において、ある成分の固化に伴って液相内に他成分が濃縮される現象である。食品を凍結した場合、まず水が氷となり、未凍結の水と溶質成分が凍結濃縮相を形成する。凍結濃縮相が結晶化する点を共晶点、もし共晶点で結晶が析出しないとなればガラス転移点にてガラス化する。氷晶の形成によって濃縮されるのは

溶液だけではなく、懸濁成分も氷晶によって排斥され得る。これは氷晶と懸濁成分が出会う界面において、表面自由エネルギーを減少させるために局所的な融解層が形成するためと考えられる。いずれにせよ凍結濃縮とは固液相平衡関係と固体間の界面相互作用に支配されている。筆者がここで紹介したいのは、凍結濃縮相内に生起する現象を食品の機能をつくるための技術として利用したいというコンセプトである。

1. 豆乳エマルジョンゲルのテクスチャー制御

筆者が豆乳チーズというアイデアを梅澤糧穀株式会社様からお聞きしたのは平成 23 年のことで、豆乳と塩、米粉、植物油をホモジナイズし、適量の食酢を添加して冷蔵庫にて固めるというレシピを教えていただいた。これをピザやトーストにのせて焼き上げて食べるととても食味食感ともチーズ様であり、とても美味であったのだが、本物のチーズのように焼きあげる過程でとろけさせたいというご相談を頂いた。大豆タンパク質は酸や加熱による変性によってゲル形成をするため、焼成によってとろけさせるとは興味深いチャレンジである。筆者らはレシピに大きな変更は加えずに、冷蔵工程を冷凍工程へと変更し、試作品作製を行った。結果として、この変更によって試作品は加熱する過程でいったん形状が崩れ(とろけ)、その後徐々に弾力のある加熱ゲルへと変化した。実験では一旦 -40°C 程度の低温で冷凍した後に、 -20°C ～ -5°C の範囲でエージング処理を施すことで、焼成時の溶け広がりをエージング条件の変更によって調節できることを見出した。検討の詳細は筆者報文を参考にされたい¹⁾²⁾。

何故、一旦凍結させることでこの様なことができたのか。まず、二成分以上を含む系において、ある成分の固化に伴って液相内に他成分が濃縮される現象を凍結濃縮と呼ぶ。食品を凍結した場合、まず水が氷となり、未凍結の水と溶質成分が凍結濃縮相を形成する。ただし、氷晶と凍結濃縮相が形成するミクロ構造は、固化の進行過程によって動的に決まる。凍結濃縮相が結晶化する点を共晶点、もし共晶点で結晶が析出しないとなればガラス転移点にてガラス化する。氷晶の形成によって濃縮されるのは溶液だけではなく、懸濁成分も氷晶によって排斥され得る。これは氷晶と懸濁成分が出会う界面において、表面自由エネルギーを減少させるために局所的な融解層が形成するためと考えられており、氷晶と濃縮懸濁相が形成するミクロ構造は固化の進行過程と懸濁成分の粒子サイズによって動的に決まる。いずれにせよ凍結濃縮とは固液相平衡関係と固体間の界面相互作用に支配されて誘起する現象であり、分子種を問わず必ず起こる物理化学現象である。

さて、先の豆乳エマルジョンを凍結させた場合、種々の成分は一樣に凍結濃縮相内に濃縮される。濃縮相内部における現象の動力学は未知の部分が多いが、濃度上昇による

ゲル化等の現象が促進される効果と、低温かつモビリティが制限された空間のために種々の現象進行が抑制される効果が予測される。エージング条件の変更によって試料物性(粘弾性)が変化した結果より、一定の速度にて変化(ゲル化)が進行したことが分かる。それでは凍結を経たゲル化によって何故焼成時に溶け広がったか。これは恐らく、ゲル化の進行が氷晶間隙の凍結濃縮相内に制限されていたため、溶液全体にわたる組織構造形成が起こらなかったからと考えられる。すなわち、エージングによって局所的なゲル化を進行させているため、融解後も一定の形状は保っているものの全体としては弱い構造物となっており、加熱時の水分の溶出によって崩壊してしまう。ただし、崩壊後に再び加熱ゲル形成を進行させ、最終的には一定形状の構造物となっているのであろう。このメカニズムのイメージは図 1 に示すとおりである。

2. 凍結によって食品マイクロカプセルの特性を制御できるか

食品分野におけるマイクロカプセル化とは、従来は噴霧乾燥による粉末油脂製造プロセスの呼称であった。これは乳液を賦形剤と共に噴霧乾燥させることにより、微粒油滴が賦形剤内部に格納された乾燥粉末を作製するプロセスである。粉末化による油脂のハンドリング性向上や、酸化防止などを目的としている。近年、マイクロカプセル化とはさらに広義に捉えられており、環構造分子に有用物質が包接させる形態、ミセル内部に有用物質が格納する形態、ゲルや凝集物構造に有用物質固体分散させる形態などもマイクロカプセルである。形態に応じて様々な分類が提唱されており、粒子サイズに応じてナノ粒子、マイクロ粒子と呼称することも広く一般的である。種々の有用物質の安定化を目的とするのみならず、使用環境中での有用物質のバイオアベイラビリティ向上、放出速度制御などの実現が期待されており、食品機能性物質のデリバリーという観点の学術研究が盛んである^{3)~7)}。

さて、カプセルに高度な機能性という品質を付与するにあたり、素材の選択も重要であるが、製造手法に品質のチューニングが可能な因子を有していることが実生産を実現するための重要な課題と筆者は考える。これは、生産現場において製品品質をチューニングする方法は原料組成の変更ではなく、操作因子の微調整によることが実際的であるということと、製品に求められる機能性が高いほど、品質を高度に保証する必要性が生じるためである。そこで筆者は、凍結プロセスの導入によってマイクロカプセル微粒子の特性を組成の変更によらずに実現する技術を提唱し研究している。手法の詳細については筆者報文を参考にされたい^{8)~18)}。基本的なコンセプトはいずれも変わらず、凍結濃縮相内の濃度上昇を利用して微粒子形成を誘起させることとしている。例えば、酸性領域(例えば $\text{pH}=3$)のゲル

図 1 凍結下におけるエージング過程で進行する変化 (制限空間における構造形成)

化・複合体形成などを微粒子形成に利用する作製手法に対し、溶液の pH 設定を 5~6 付近に設定し、凍結濃縮相内で pH を 3 付近まで下げることが期待する手法である。これまで、高濃度環境下におけるハイドロゲル形成を利用するケース、pH の低下による高分子の複合体形成 (複合コアセルベーションなど) を利用するケース、pH の低下によるタンパク質凝集を利用した微粒子形成について検討実績

がある。これまでの検討の結果、いずれのケースについても、凍結の適用によってカプセルの特性に変化をもたらすことが分かった。油滴表面をゲルでコーティングしたタイプのカプセルを作製する場合、ゲルの特性に応じて油滴内に溶解している成分の溶出速度は異なり (ゲル内の成分の拡散抵抗が異なることにより)、この制御された溶出速度は製品特性のひとつと成り得る。先の検討の結果、異なる

凍結条件の適用により、この溶出速度を変化させられることを確認しており、適切な凍結条件の設定で成分溶出を大きく遅延させられる可能性を示している。ただし、凍結は油滴合一などの一因ともなり、カプセル化の効率を必ずしも高めないことも確認している。メリット、デメリットを含め、今後の検討課題である。

3. 凍結によるカゼインナトリウム凝集体の構造制御

カゼインナトリウムの溶液は、pH 6.0 より低い領域にて視認可能な自己凝集体（白濁）が形成し、pH 4.0 以下で沈殿が形成する。この自己凝集体は、約 100-300 nm 程度の粒子径を持つナノ粒子であり、脂溶性物質を疎水性相互作用によって吸着させることができるため、ナノカプセル微粒子としての利用が期待できる。ここでは、カゼインナトリウムの凝集体形成を利用した微粒子作成に、凍結を適用した場合の構造変化について検討した結果を紹介する^{9) 12) 19) ~ 21)}。

カゼインナトリウム水溶液にβカロテンを溶解させ（水中にβカロテンは溶解しないが、カゼイン共存下で可溶化する。微量のアセトンにβカロテンを溶解させ、カゼインナトリウム水溶液に混合させる）、pH を 5.5、6.0、7.0 に調整した。この溶液を−40℃にて一旦凍結させたのち、−20℃まで加温、一定時間のエージングを適用、その後すみやかに凍結乾燥させた。対象としてエージングを経していない試料も作製した。得られた乾燥試料のβカロテンの包含状態、疎水性度を評価した。その結果、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ることが確認できた。凍結を経ることで微粒子表面に暴露されるβカロテン量は増加し、疎水性機能物質を粒子内部に格納したいという思惑とは逆の現象が進行した。しかし、この乾燥試料を水中に再分散させて得た試料の疎水性度を評価すると、エージングを経た試料の方がより低い疎水性度を示した。これは再水和する際に不利な疎水的表面を粒子同士が凝集することでキャンセルさせたためと考察している。これら観測事実を受けいれるならば、脂溶性物質を固体分散させた乾燥試料を作製するにあたり、凍結エージングを経ることはこれらの物質を微粒子表面に暴露しまうために貯蔵性の向上には不利であろう。しかし、食品として経口摂取される過程においては脂溶性物質を粒子内部に格納するようになるため、消化過程における物質の放出、もしくは生体取り込み能が変化している可能性がある。

先と同様に pH 調整したカゼインナトリウム水溶液を凍結・エージングを経た後に融解し、放射光を用いた小角 X 線散乱によって凝集微粒子のナノ構造解析を行った。カゼインナトリウムの自己凝集体はフラクタル構造を持つクラスターと考えられ、数十 nm の一次凝集体が複数凝集し、数 μm に及ぶ凝集構造を有していることが小角 X 線散乱

パターンから予測できた。さて、フラクタルな凝集クラスターの形成メカニズムは、拡散律速凝集と反応律速凝集モデルによって説明される。凍結濃縮相内でクラスター形成が進行するとなれば、これら双方のメカニズムによるクラスター形成が同時に進行し、凍結条件に依存した異なる構造を有するクラスター形成を導くことが予測される。そこでまず、エージングを経たものと経ていない乾燥試料を作製し比較を行ったところ、凍結直後に融解させた試料では凝集体は一旦大きく凝集し、比較的粗な構造（慣性半径が小さく密度が低い構造）を有することが予測された。ここで一次凝集体の構造はさほど変化せず、数百 nm から数 μm の大きさの凝集構造に変化が生じていた。凍結下においてエージングを経ると、この粗な構造は継時的に密な構造へと変化していると考えられた。この時の凝集構造変化が凝集体の疎水性度の変化と関わっていると筆者は考察している。

引き続き、乾燥試料を模擬消化液中で加水分解反応を進行させ、消化反応の進行に伴う凝集構造の変化を追跡することとした。ちなみに加水分解の進行によってクラスターは複数に分かれるが、別れたクラスター同士が再度凝集することにより、クラスターはそのサイズと構造を複雑に変化させていくことが知られている。さて、今回のケースでは、凍結下においてエージングを経た試料、経ていない試料いずれについても、数十 nm の一次凝集体と考えられる構造体の大きさの増加が認められた。エージングを経た乾燥試料は、数 μm レベルの凝集体はさらにその大きさを増し、慣性半径の大きな粗な凝集体が形成することが確認された。一方、エージングを経ていない乾燥試料は、数 μm レベルの凝集体の大きさは逆に減少し、消化の過程でより密な凝集体が形成することが示唆された（図 2）。このように、消化性と関わる粒子の特性は、生体内における粒子の挙動やバイオアベイラビリティと強く関わりと期待できるため非常に興味深いと筆者は考えている。今後詳細な検証を行っていきたい。

4. おわりに

凍結・冷凍に関わる研究領域は基礎から応用に至るまで優れた成果がすでに多く得られているものの、未解明の領域がまだ多く残されているのも事実である。近い研究者同士の雑談でよく話にあがるのは、取り組み易い領域はすでに研究し尽くされ、取り組みにくい領域ばかりが残されているという、やるかたない思いである。凍結現象に関しても、氷晶が食品中のどこから発生し、どの様にマイクロ構造を形成するか。氷晶のマイクロ構造と同時に形成する凍結濃縮相内ではどのような現象が生起するか。これだけのことに未知の事象が非常に多い。これは観察の難しいナノスケールの構造との関わりが一因であろうか。また、形成したマイクロ構造（一見ランダムに見える入り組んだ複雑な構

図2 凍結エージングを経て作製したカゼインナトリウム自己凝集微粒子の模擬消化過程における構造変化

造)を定量的に扱う手法の開発,これを製品品質へと結びつける理論的な道筋,これもおおきな難題である。急速凍結では小さな氷ができ,緩慢凍結では大きな氷ができるため,品質保持には急速凍結が良いとは半世紀以上前から繰り返されてきた経験的観測であるが,対象を選ばず当てはまる事実とは言えない。しかし,学术界が未だにこれ以上の知見を産業界に提供できないとなれば忸怩たることと感ずる。凍結とは単純に液体成分を固体にする操作ではなく,系の濃度と固液組成を変化させ,ナノからミクロンスケールにわたる固体構造体の形成に関連した操作である。そしてそれを温度の制御によって実現できるのであるからきっと利用価値は高い。近年,添加物を多く含む食品がさほど消費者に歓迎されない反面,食品に高度な機能が求められるようになってきた。筆者はその機能を制御するエンジニアリングの重要性が向こう数十年の間に劇的に高くなると予見する。将来のスマートな食品加工技術を実現するキーテクノロジーのひとつとして,凍結が数えられるようになるかと期待している。

文 献

- Yoshimura, M., Eguchi, S., Toura, A., and Nakagawa, K. (2014). Gelation characteristics of oil in water emulsion stabilized by soy milk and rice powder mixture part 1: A study on gelation characteristics on addition of an acetic acid coagulant. *Japan Journal of Food Engineering (Nippon Shokuhin Kougaku Kaishi)*, **15**, 243-249 (吉村美紀, 江口智美, 東羅あかね, 中川究也, 豆乳・米粉・油脂混合エマルジョンのゲル化特性 (1): 酢酸による凝固の検討, 日本食品工学会誌)。
- Nakagawa, K., Fujii, Y., Eguchi, S., and Yoshimura, M. (2014). Gelation characteristics of oil in water emulsion stabilized by soy milk and rice powder mixture Part 2: A study on gelation characteristics under freezing temperature. *Japan Journal of Food Engineering (Nippon Shokuhin Kougaku Kaishi)*, **15**, 251-258 (中川究也, 藤井祐太, 江口智美, 吉村美紀, 豆乳・米粉・油脂混合エマルジョンのゲル化特性 (2): 凍結環境下における凝固特性の検討, 日本食品工学会誌)。
- Scholten, E., Moschakis, T., and Biliaderis, C.G. (2014). Biopolymer composites for engineering food structures to control product functionality. *Food Structure*, **1**, 39-54.
- Livney, Y.D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **15**, 73-83.
- Benshitrit, R.C., Levi, C.S., Tal, S.L., Shimoni, E., and Lesmes, U. (2012). Development of oral food-grade delivery systems: Current knowledge and future challenges. *Food & function*, **3**, 10-21.
- de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., and Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, **20**, 292-302.
- Fang, Z. and Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 510-523.
- Nakagawa, K. and Fujii, Y. (2015). Protein-based microencapsulation with freeze pretreatment: Spray-dried oil in water emulsion stabilized by the soy protein isolate-gum acacia complex. *Drying Technol.*, **33**, 1541-1549.
- Nakagawa, K., Jarunglumlert, T., and Adachi, S. (2014). Microencapsulation of β -Carotene by Self-Aggregated Caseinates. *Japan Journal of Food Engineering (Nippon Shokuhin Kougaku Kaishi)*, **15**, 51-57 (中川究也, Jarunglumlert, T., 安達修二, 自己凝集カゼイナーへの相互作用を利用した β カロテン噴霧乾燥マイクロカプセル, 日本食品工学会誌)。
- Sowasod, N., Nakagawa, K., Charinpanitkul, T., and Tanthapanichakoon, W. (2013). Encapsulation of curcumin loaded oil droplets with chitosan based cryogel: Influence of freezing condition on nanocapsule properties. *Food Science and Technology Research*, **19**, 633-640.
- Nakagawa, K., Sowasod, N., Tanthapanichakoon, W., and Charinpanitkul, T. (2013). Hydrogel based oil encapsulation for controlled release of curcumin by using a ternary system of chitosan, kappa-carrageenan, and carboxymethyl-cellulose sodium salt. *LWT - Food Science and Technology*, **54**, 600-605.

- 12) Jarunglumlert, T. and Nakagawa, K. (2013). Spray drying of casein aggregates loaded with β -carotene : Influences of acidic conditions and storage time on surface structure and encapsulation efficiencies. *Drying Technol.*, **31**, 1459-1465.
- 13) Sowasod, N., Nakagawa, K., Tanthapanichakoon, W., and Charinpanitkul, T. (2012). Development of encapsulation technique for curcumin loaded o/w emulsion using chitosan based cryotropic gelation. *Materials Science and Engineering: C*, **32**, 790-798.
- 14) Nakagawa, K., Nagao, H., Surassmo, S., Min, S.-G., and Choi, M.-J. (2012). Stabilization of microcapsules using a freeze-dried gelatin matrix : Aqueous redispersibility and the ingredient activity. *Drying Technol.*, **30**, 416-424.
- 15) Nakagawa, K. and Nagao, H. (2012). Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced gelatin-acacia complex coacervation. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, **411**, 129-139.
- 16) 中川究也 (2014). 凍結を利用したナノ・マイクロカプセル製造, 「マイクロ/ナノカプセルの調整, 徐放性制御と応用事例」, 技術情報協会, pp. 117-121.
- 17) K. Nakagawa (2014). Nano- and microencapsulation of flavors in food systems, In "Nano- and Microencapsulation for Foods", Edited by Dr. Hae-Soo Kwak, John Wiley & Sons, Ltd., pp. 249-272.
- 18) 中川究也 (2013). 凍結を利用してナノカプセル・ナノ粒子の特性を制御する技術, 「食品素材のナノ加工を支える技術, 監修: 安達修二・中嶋光孝・杉山 滋, シーエムシー出版, pp. 40-51.
- 19) Nakagawa, K., Jarunglumlert, T., and Adachi, S. (2016). Structural changes in casein aggregates under frozen conditions affect the entrapment of hydrophobic materials and the digestibility of aggregates. *Chemical Engineering Science*, **143**, 287-296.
- 20) Jarunglumlert, T., Nakagawa, K., and Adachi, S. (2015). Digestibility and structural parameters of spray-dried casein clusters under simulated gastric conditions. *Food Research International*, **75**, 166-173.
- 21) Nakagawa, K. and Kagemoto, M. (2013). Characterization of casein-based nanoparticles formed upon freezing by in situ saxs measurement. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, **103**, 366-374.

(平成 28 年 12 月 14 日受理)