

不凍タンパク質の氷結晶再結晶化抑制能に及ぼす添加塩の影響

萩原 知明

東京海洋大学海洋生命科学部食品生産科学科

概要 凍結保存中の食品内部の氷結晶は、時間経過とともに周囲の水分子を取り込んで成長と粗大化を繰り返し、そのサイズが際限なく大きくなる。これを、再結晶化と呼ぶ。この現象が進行することで、食品の組織が破壊され、品質低下が生じる。氷結晶の再結晶化を効果的に抑制する物質として、不凍タンパク質(Antifreeze protein; 以下 AFP と略記)が近年注目されている。AFP は寒冷地に生息している特定の生物に含まれるタンパク質である。AFP は氷結晶表面に結合し、再結晶化を強く抑制する。AFP を食品に添加することで、再結晶化が抑制され、長期間にわたって品質保持が可能な凍結保存技術が実現できると期待されている。

多くの冷凍食品では味付けや、保存性向上のため、塩が添加されている。本研究では AFP の氷結晶の再結晶化抑制挙動に及ぼす塩添加の影響を明らかにすることを目的とした。

40%スクロースに所定の濃度の AFP を含む溶液を AFP 含有モデル食品とし、ここに濃度 3%となるよう塩を添加した。そして、2 μ L を 2 枚の直径 16 mm の円形カバーガラスの間に挟み込み、温度制御装置付き光学顕微鏡にセットし、-10°C における氷結晶の再結晶化挙動を観察し、顕微鏡デジタルカメラで氷結晶画像を撮影した。撮影した画像から画像解析により、氷結晶の平均半径を求め、その時間依存性をオストワルド式で解析することで、再結晶化の進行の速さを反映した再結晶化速度定数を求めた。AFP は、AFP type I, AFGP, AFP type III の 3 種について検討を行った。

AFP が含まれていないとき、3%の塩添加により、再結晶化速度定数は 3.4 倍となった。このことは、塩添加により再結晶化の進行が促進されたことを意味している。また、塩が含まれていないとき、10 mg/mL AFP type I, 20 mg/mL AFP type III, 0.1 mg/mL AFGP の条件で、再結晶化速度定数は AFP 無添加試料と比べて、それぞれ 83%減, 84%減, 88%減となった。3%塩を加えても、上記の AFP の種類、濃度条件で氷結晶の再結晶化は効果的に抑制され、塩が含まれていない AFP 含有試料より再結晶化速度定数は小さな値となった。このことは、3%塩の添加でも上記の AFP の再結晶化抑制能は失われず、むしろ向上することを示しているものと考えられた。

1. 研究目的

冷凍食品は、生鮮食品のみならず、レストラン等の業務用食材としても欠かせない存在となっている。しかしながら、凍結保存中の食品内部の氷結晶は、時間経過とともに周囲の水分子を取り込んで成長と粗大化を繰り返し、そのサイズが際限なく大きくなることが知られている^(1,2)。これを、再結晶化(recrystallization)^(1,2)と呼ぶ。この現象が進行することで、食品の組織が破壊され、品質低下が生じる。再結晶化を実用上問題ない程度まで抑制するためには、一

般的な冷凍庫(-18°C)では不十分であり、現状はディープフリーザー(-80°C)や液体窒素(-196°C)等のエネルギー消費量の大きい技術を使わざるを得ない。

この現状を一変させる手法として、不凍タンパク質(Antifreeze protein; 以下 AFP と略記)の利用が近年注目されている。AFP は寒冷地に生息している特定の生物に凍結保護物質として含まれるタンパク質であり、1969 年に DeVries らによって南極の魚から最初の AFP が発見された⁽³⁾。AFP は氷結晶表面に結合し、その再結晶化を強く

抑制する⁽⁴⁾。しかもこの抑制効果は、0°C近傍のマイナス温度域でも十分発揮され、ディープフリーザーや液体窒素を必要としない。このため、AFP を食品に添加することで、再結晶化が抑制され、長期間にわたって品質保持が可能な食品凍結保存技術が省エネルギーで実現できると期待されている⁽⁴⁾。

現在、多くの冷凍食品では食品の味付けや、保存性向上を目的として塩が添加されている。しかしながら、塩が存在している状態での AFP の氷結晶の再結晶化抑制挙動を調べた研究は少なく、塩添加が AFP の再結晶化抑制挙動におよぼす影響は定かでない。一般に塩の存在は静電的相互作用等を通じて、タンパク質に影響を与える可能性がある。特に、凍結状態では凍結濃縮効果により、上記の影響が顕著となる。塩添加は、AFP の再結晶化抑制能に影響を及ぼす可能性がある。

助成研究者は、これまで、食品およびモデル食品中の氷結晶の再結晶化挙動に関する研究を行ってきており、氷結晶の観察手法ならびに再結晶化の進行の速さを定量的に評価する手法を確立してきた⁽⁵⁻⁷⁾。本研究では、申請者がこれまでに確立してきた手法を用いて、AFP の氷結晶の再結晶化抑制挙動に及ぼす塩添加の影響を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2.1 実験試薬等

本研究では、40%スクロース溶液をモデル食品とし、これにAFPならびに塩(塩化ナトリウム)を添加した試料を実験に用いることで、AFP の氷結晶再結晶化抑制能に及ぼす添加塩の影響を検討した。

スクロースおよび塩化ナトリウムは和光純薬工業(株)の試薬特級品を用いた。AFPとして、AFP type I, AFP type III, AFGPの異なる3種のAFP(いずれも(株)ニチレイ製)を用いた。溶液調製用の水は超純水(Merck KGaA 社)を用いた。

2.2 氷結晶再結晶化観察用試料溶液の調製

スクロース粉末を超純水に溶解して作成した 40%スクロース溶液に、下記 **Table 1** の AFP 濃度ならびに塩化ナトリウム濃度となるよう、AFP 粉末ならびに塩化ナトリウムを添加溶解して調製した。

Table 1 Sample for ice recrystallization observation.

Sample solution
40 % sucrose
40 % sucrose + 3 % NaCl
40 % sucrose + 10 µg/mL AFP type I
40 % sucrose + 20 µg/mL AFP type III
40 % sucrose + 0.1 µg/mL AFGP
40 % sucrose + 10 µg/mL AFP type I + 3 % NaCl
40 % sucrose + 20 µg/mL AFP type III + 3 % NaCl
40 % sucrose + 0.1 µg/mL AFGP + 3 % NaCl

2.3 氷結晶の再結晶化挙動の観察(Fig.1)

2.2 の試料溶液 2 mL を 2 枚の円形の顕微鏡観察用カバーガラス(直径 16 mm)の間に空気が入らないように挟み込み、温度制御が可能なコールドステージ(Linkam LK600, リンカム社)にセットした。最初に 30°C 10min 保持した後、90°C/min で-30°Cまで冷却し、そのまま 10 min 保持して試料溶液を凍結させた。その後、10°C/min で-10°Cまで昇温し、-10°Cに到達したらそのまま温度を保ったまま、氷結晶の画像を光学顕微鏡(BX53, オリンパス社)で観察し、所定の時間間隔で観察画像を顕微鏡デジタルカメラ(Nikon DS-5M-L1, ニコン社)で記録した

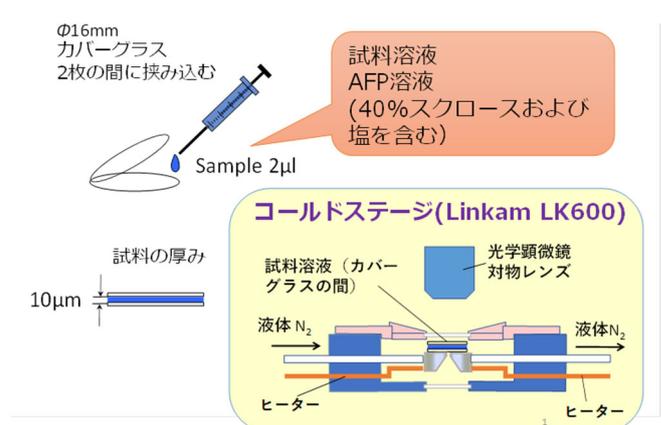


Fig. 1 Schematic illustration of equipment for ice recrystallization observation.

2. 4 再結晶化速度定数の算出

得られた観察画像を画像解析ソフトウェア (PopImaging, Digital being Kids Corp, Image J) で解析し、氷結晶の平均粒径を算出した。そして、平均粒径の経時変化のデータを以下の Ostwald 式^(8,9) (式(1)) で解析し、氷結晶の再結晶化の進行速度を表す再結晶化速度定数 k を求めた。

$$r^3 = r_0^3 + kt \quad (1)$$

r : 氷結晶の平均粒径 (mm)

t : 時間, -10°C に到達してからの経過時間 (min)

r_0 : $t=0$ の時の氷結晶の平均粒径 (mm)

k : 再結晶化速度定数 (mm^3/min)

3. 研究結果

Fig.2 に各試料の 40 min 後(左), 80 min 後(中), 120 min 後(右)の氷結晶画像の例を示す。いずれの試料も、時間経過とともに氷結晶の数が減りかつ氷結晶が大きく成長している様子が見て取れる。このことから、120 min の観察の間に氷結晶の再結晶化が進行していることが分かった。

AFP を含んでいない 40%スクロース溶液(a)に 3%塩化ナトリウムを添加すると(b), 氷結晶の粒径が大きくなる傾向が見られた。AFP 添加により、何れの AFP 種でも、氷結晶の粒径は小さくなる傾向があった。そして、AFP と塩化ナトリウムを添加すると、氷結晶の大きさは、AFGP 以外は、AFP のみを添加した試料のものよりさらに小さくなる傾向がみられた。

Fig. 3 に、氷結晶の平均粒径の 3 乗 (r^3) を時間 t に対してプロットした図の例を示す。いずれの試料もプロットは直線とみなせ、式(1)を用いて、再結晶化速度定数 k を求めることができた。

Table 2 に各試料の再結晶化速度定数 k の値 (3 回の実験の平均値 ± 標準偏差), ならびに 40%スクロース溶液の再結晶化速度定数の値を 1 としたときの相対値を示す。40%スクロース溶液に塩のみを添加すると、再結晶化速度定数は約 3.4 倍に増加した。このことから、40%スクロース溶液に塩を単独添加したとき、塩は氷結晶の再結晶化の進行を促進する作用があることが分かった。40%スクロース溶液に AFP を単独添加すると、すべての試料溶液の再結晶化速度定数は小さくなり、氷結晶の再結晶化の進行

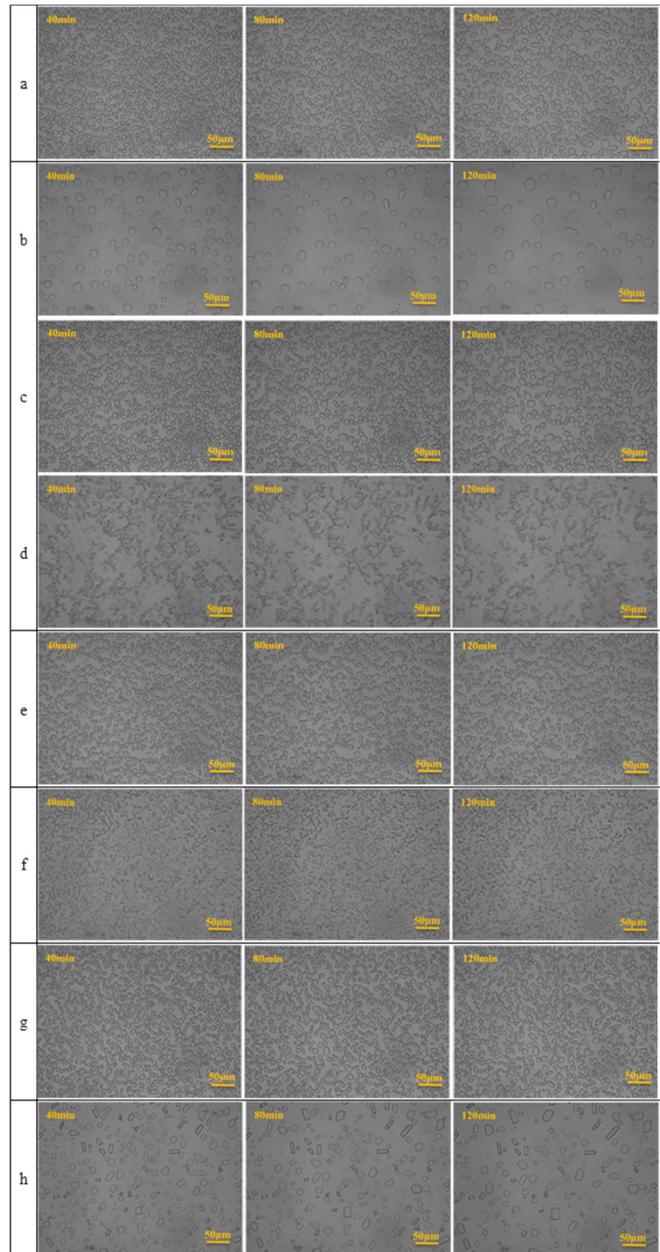


Fig. 2 Typical photo images of ice crystals.

(a) 40% sucrose solution, (b) 40% sucrose solution+3 % NaCl,

(c) 40% sucrose solution+10 µg/ml AFP type I

(d) 40% sucrose solution+10 µg/ml+3% NaCl

(e) 40% sucrose solution+20 µg/ml AFP type III

(f) 40% sucrose solution+20 µg/ml AFP type III + 3% NaCl

(g) 40% sucrose solution+ 0.1 µg/ml AFGP

(h) 40% sucrose solution+ 0.1 µg/ml AFGP+ 3% NaCl.

が抑制されたことが分かった。特に AFGP は 0.1 mg/mL という極めて低濃度でも抑制効果が見られた。塩が含まれているスクロース溶液に AFP を添加した場合、何れの AFP も氷結晶の再結晶化速度定数は小さくなった。このこ

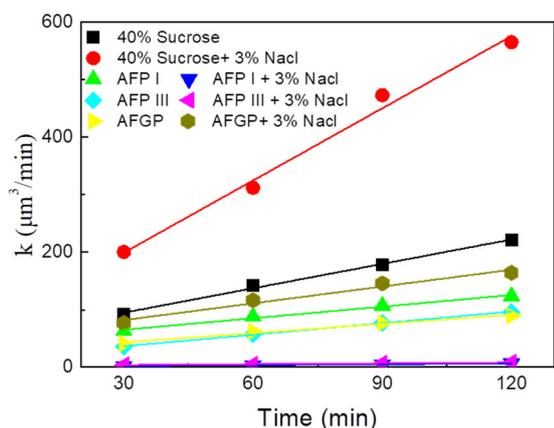


Fig. 3 The typical plots between cube of average radius of ice crystals and time in the presence of different AF(G)Ps samples with 3 % NaCl at -10 °C.

とから、今回用いたすべての APF は塩存在下でも氷結晶の再結晶化を抑制することが分かった。また、AFP type I および AFP type III を含む試料溶液は塩が存在すると、再結晶化速度定数が小さくなった。

4. 考察

40%スクロース溶液に塩を添加すると、氷結晶の再結晶化は促進された。塩を添加することで、凝固点降下により、同一温度(今回は-10°C)における氷結晶の生成量は減少する。氷結晶の生成量減少自体は、氷結晶の再結晶化を抑える方向に作用する。なぜなら、氷結晶の数が減ること

で、異なる氷結晶同士が接触融合して成長すること⁽²⁾が生じにくくなるためである。しかしながら、結果は逆であった。氷結晶生成量減少による再結晶化抑制効果を上回る促進効果をもたらされたことを意味している。考えられるのが凍結濃縮相の水の移動度の増加である。氷結晶の再結晶化においては、異なる氷結晶間で凍結濃縮相を通じた水分子の移動が必ず伴う⁽²⁾。そして、凍結濃縮相の水の移動しやすさが氷結晶の再結晶化の進行速度に影響する因子であることが、既往の研究^(5,6)で示されている。今後 NMR^(6,10)や誘電緩和⁽¹¹⁻¹³⁾等の手法を用いて、40%スクロース溶液に 3%の塩を添加した際の水の移動度の変化を調べる必要がある。

40%スクロース溶液に AFP 添加することで、何れの AFP も氷結晶の再結晶化を抑制した。注目すべきは濃度である。市販のアイスクリームには、氷結晶の再結晶化を抑制するために 0.1 ~1 %程度(≒ $10^3 \sim 10^4$ mg/mL)の多糖類が添加されている⁽¹⁴⁾。既往の研究によれば、多糖類添加により再結晶化速度定数は数十%程度減少する⁽¹⁵⁾。本研究では、それと同様の抑制が極めて低い濃度(0.1 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL)で実現できている。きわめて低い濃度のため、食品に添加した際、味や力学物性(粘弾性)に目立った影響を及ぼすことはないと予想される。

Table 2 Summary of recrystallization rate constant.

Sample solution	Recrystallization rate constant ($\mu\text{m}^3/\text{min}$)	Relative value
40 % sucrose	1.2609±0.1520	1
40 % sucrose + 3 % NaCl	4.2972±0.3083	3.4079±0.2445
40 % sucrose + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFP type I	0.7215±0.1055	0.5722±0.0837
40 % sucrose + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFP type III	0.6835±0.1489	0.5421±0.1181
40 % sucrose + 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFGP	0.5305±0.1069	0.4072±0.0848
40 % sucrose + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFP type I + 3 % NaCl	0.04404±0.01277	0.03492±0.01013
40 % sucrose + 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFP type III + 3 % NaCl	0.05502±0.01446	0.04363±0.01147
40 % sucrose + 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFGP + 3 % NaCl	1.02886±0.16604	0.8160±0.1317

塩が含まれているスクロース溶液に AFP を添加した場合、何れの AFP も氷結晶の再結晶化速度定数は小さくなった。このことから、今回用いたすべての APF は塩存在下でも氷結晶の再結晶化を抑制することが分かった。タンパク質の中には凍結に伴い、凍結濃縮効果による共存物質の濃度上昇により、変性するものがあることが知られている⁽¹⁶⁾。今回の試料においても凍結により塩は氷結晶に取り込まれることなく、凍結濃縮する。その一方で AFP の氷結晶の再結晶化抑制能は失われなかったことから、塩が AFP の高次構造に及ぼす影響は大きくないと考えられた。

AFP type I および AFP type III を含む試料溶液は塩が存在すると、再結晶化速度定数が小さくなった。すなわち、塩が存在することにより、これらの AFP の氷結晶再結晶化抑制能が向上したことを示している。AFP の氷結晶再結晶化抑制能は、AFP が氷結晶の表面に吸着することによってとされている⁽⁴⁾。この説に従えば、塩を添加することで、AFP が氷結晶表面に吸着しやすくなったことが考えられる。AFP の氷結晶表面に吸着する機構ならびに寄与する相互作用については、現在のところまだ確定したものがない。次々に新しい説が提唱されている状態である。そのため、塩添加により AFP が吸着しやすくなる機構についても現段階では考察は難しい。AFP の氷結晶表面への吸着機構の解明と共に塩添加によるタンパク質の表面状態の変化を詳細に調べることで、塩添加による氷結晶再結晶化抑制能の向上機構の解明につながると考えられる。また、AFGP では塩添加による抑制能向上は見られなかった。AFP type I, AFP type III, AFGP の 3 種を用いて検討を行うことも、抑制能向上の機構を解明する上で一助となろう。

5. 今後の課題

AFP に対する添加塩の影響機構を明らかにするうえで、塩が AFP に及ぼす様々な影響を調べることが必要である。具体的には以下の通りである。

- ・塩が AFP の高次構造に及ぼす影響の把握
- ・塩が AFP の水和特性に及ぼす影響の把握

これらを検討するため、赤外分光法 (AFP の二次構造把握)、分子動力学シミュレーション (AFP の高次構造把握、AFP の水和特性把握)、誘電緩和測定 (AFP の水和特性把握) 等の手法を用いることが考えられる。

また、実用への応用を考慮すると、実際の食品に近い試料ならびに異なる添加塩濃度を用いた検討も今後必要であろう。

6. 文献

- 1) Fennema, O.R. In: *Low-temperature Preservation of Foods and Living Matter*, edited by Fennema, O.R., Powrie, W. D. and Marth, E. H. (Marcel Dekker, New York, 1973).
- 2) Hartel, R.W. *Crystallization in Foods* (Aspen Publisher, Gaithersburg 2001).
- 3) DeVries, A. L., Wohlschlag, D. E. 1969, Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science* 1969, 163 (3871): 1073–1075.
- 4) 津田栄「不凍タンパク質の機能と応用」2018. シーエムシー出版, 東京.
- 5) Hagiwara, T., Hartel, R.W. and Matsukawa, S. Relationship between recrystallization rate of ice crystals in sugar solutions and water mobility in freeze-concentrated matrix. *Food Biophysics*, 2006, 1: 74–82.
- 6) Klinmalai, P., Shibata, M. and Hagiwara, T. Recrystallization of ice crystals in trehalose solution at isothermal condition. *Food Biophysics*, 2017, 12: 404–411.
- 7) Monalisa, K., Shibata, M. and Hagiwara, T. Ice recrystallization behavior of corn starch/sucrose solutions: effects of addition of corn starch and antifreeze protein III. *Food Biophysics*, 2021, 16: 229–236.
- 8) Lifshitz, M., Slyozov, V. V. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *J. Phys. Chem. Solids*, 1961, 19: 35–50.
- 9) Wagner, C., *Theorie der Alterung von Niederschlagen durch Umlosen (Ostwald-Reifung)*. *Z. Elektrochem.* 1961, 65: 581–591.
- 10) Ablett, S., Clarke, C.J., Izzard, M.J. and Martin, D.R. Relationship between ice recrystallisation rates and the glass transition in frozen sugar solutions. *J. Sci. Food Agric.*, 2002, 82: 1855–1859.

- 11) Sasaki, K., Panagopoulou, A., Kita, R., Shinyashiki, N., Yagihara, S., Kyritsis, A. and Pissis, P. Dynamics of uncrystallized water, ice, and hydrated protein in partially crystallized gelatin–water mixtures studied by broadband dielectric spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 2017, 121: 265-272.
- 12) Agranovich, D., Ishai, P. B., Katz, G., Bezman, D. and Feldman, Y. Dielectric spectroscopy study of water dynamics in frozen bovine milk, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 141: 390-396.
- 13) Yokoyama, A., Ishikawa, H., Shinohara, M., Shinyashiki, N., Yagihara, S. and Hayashi, Y. Broadband dielectric spectroscopy of albumin-water mixture in frozen state. *AIP Conference Proceedings*, 2006, 832: 163.
- 14) Goff, H. D., Hartel, R. W. *Ice Cream* (Springer, New York 2013).
- 15) Sutton, R.L., Lips, A., and Piccirillo, G. Recrystallization in aqueous fructose solutions as affected by locust bean gum. *J. Food Sci.* 1996, 61: 746-748.
- 16) 日本冷凍空調学会編, 「改定 食品冷凍技術」2020, 日本冷凍空調学会, 東京.

Effect of Salt Addition on the Inhibition of Ice Crystal Recrystallization of Antifreeze Protein

Tomoaki Hagiwara

Department of Food Science and Technology,
Tokyo University of Marine Science and Technology

Summary

During frozen storage, ice crystals in food grow and coarsen. This is called “recrystallization”. As the result, structure of food is destroyed, resulting in quality deterioration. Recently, antifreeze proteins (AFP) have been attracting attention as substances that effectively inhibit the ice recrystallization. AFP, a type of protein existing in certain organisms that live in cold regions, binds to the surface of ice crystals and strongly inhibits recrystallization. The addition of AFP to food is expected to be a promising method for inhibiting ice recrystallization.

In many frozen foods, salt is added for flavoring or shelf life extension. In this study, the effect of salt addition on the inhibition by AFP was investigated.

A 40 % sucrose solution containing a certain concentration of AFP was used as a model food containing AFP, and salt was added to it (final salt concentration; 3%). The ice recrystallization at -10°C was recorded by a microscope digital camera. The average radius of the ice crystals was determined by image analysis, and the recrystallization rate constant was obtained. Three types of AFPs were examined: AFP type I, AFGP, and AFP type III.

In the absence of AFP, the recrystallization rate constant increased by 3.4 times with the addition of 3% salt. This means that the salt accelerated the progress of ice recrystallization. In the absence of salt, under the conditions of 10 mg/mL AFP type I, 20 mg/mL AFP type III, and 0.1 mg/mL AFGP, the recrystallization rate constants were reduced by more than 80 %. With the addition of 3% salt to the solution containing AFP, the ice recrystallization was still suppressed. Furthermore, the recrystallization rate constant was smaller than that of the sample solution containing AFP without salt. These results indicated that the recrystallization inhibition ability by the AFPs was not lost but rather enhanced by the addition of 3% salt.