

食品凍結時の過冷却現象が氷結晶の形態および  
ドリップロスに及ぼす影響

小林 りか\* 兼坂 尚宏\* 渡辺 学\*† 鈴木 徹

\* 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科食機能保全科学専攻 (108-8477 東京都港区港南  
4-5-7)

## 要約

食品冷凍において、氷結晶の形態は食品の最終品質に大きく影響を与える。既往研究において、凍結過程で偶発的に顕著な過冷却が生じる場合、微細かつ均質な構造を持った、特徴的な氷結晶が生成したとの報告がある。この凍結過程を本編では過冷却凍結と呼ぶが、本研究では、緩慢な冷却によって、意図的に豆腐試料の過冷却凍結を実現し、その過程での過冷却解消温度を変え、解凍後の復元性、氷結晶の形態およびドリップロスに及ぼす影響を調べた。その結果、過冷却解消温度が低いほど氷結晶は微細になり、解凍復元性が良くドリップロスも抑制された。これらの結果は、過冷却が深くなるほど氷核生成頻度が上がることに関連すると考えられる。

キーワード: 過冷却, 氷結晶, 氷核生成, 過冷却解消温度, ドリップ, 食品冷凍

## 1. 緒言

冷凍保存は、優れた食品保存技術の一つであり、今日の私たちの生活に欠かせないものとなっている。冷凍保存の優れている点は、シェルフライフを飛躍的に延長できる点である。しかしながら、凍結耐性の低い食品も存在し、凍結やそれに引き続く冷凍貯蔵による品質劣化が少なからず生じる。具体的には色調やテクスチャーの劣化や保水力の低下、表面の乾燥などが挙げられる。これらの品質劣化のメカニズムは物理的または生化学的な要因が複雑に作用し、理解が難しいが、その大きな一要因として、凍結過程における氷結晶の生成と付随して起こる凍結濃縮が挙げられる。そのため、食品によっては、凍結解凍後の品質は、氷結晶のサイズおよび、その大きさ分布や空間的配置に大きく影響を受ける。さらに、その氷結晶のサイズは凍結速度に依存し、凍結開始温度すなわちその食品

の平衡凝固点から凍結終了温度まで温度が低下する時間が迅速であるほど微細な氷が生成することから<sup>1)</sup>、産業の現場では高品質な冷凍食品を生産するために、急速凍結が重要であるとされてきた。

一方で、食品の凍結時に大きな過冷却を経て氷結晶生成がおこる場合、氷結晶の生成挙動は特異的なものであることが報告されている。Miyawakiら<sup>2)</sup>は、同一の冷却条件下で大豆タンパク質ゲルの凍結を行った際に、偶発的に過冷却を伴ったサンプル群が存在し、それらに生成した氷結晶は、過冷却を伴わない場合と比較して、微細なものが生成したと報告している。また、Shimoyamada<sup>3)</sup>らは、凍結過程の過冷却の有無によって、氷の大きさだけでなく形状が異なることを報告している。彼らは、豆乳の凍結ゲル化に与える予備冷却の影響を調べることを目的として実験を行ったが、その中で、 $-5^{\circ}\text{C}$ の予備冷却を経たゲルに生成した氷が微細で、均質なハニカム状の球形を示したと報告している。

†Fax:+81-3-5463-0585 E-mail:mwat@kaiyodai.ac.jp

また彼らは、この原因が予備冷却によって凍結過程に過冷却が生じたためであると考察している。このように過冷却を伴う凍結は、以下過冷却凍結と呼ぶが、特異的な氷の形状を示す点で、食品凍結の高品質化に役立つ可能性を持っていると考えられる。

これまでの研究によると、溶液の系では過冷却の度合いが氷核生成の駆動力であり、過冷却が深くなることによって、核生成の頻度が増える<sup>4)</sup>。この説に従えば、一般的な食材でも、過冷却解消温度が低くなるほど生成する氷の数は多く、結果として微細化すると予想される。一部、Chevalierら<sup>5)</sup>やZhuら<sup>6)</sup>はゼラチンゲルを、Fernandezら<sup>7)</sup>はキサンタンガムなどの高分子ゲルを用いて、圧力移動式凍結研究の中で、過冷却度と氷結晶の形態の関係について言及しており、過冷却度が大きくなるほど、生成する氷結晶は小さくなる現象を報告している。圧力移動式凍結では、食材をマイナス温度下で高圧状態から急激、すなわち断熱的に圧力解放する。これに伴って平衡凝固点温度が上昇するため、食材中の水は瞬間的に過冷却状態となり、すぐに過冷却解消が起こり、氷結晶を生ずる<sup>8)</sup>。しかしながら、通常の緩慢凍結によって起こりうる過冷却凍結に関して、過冷却の解消温度と氷結晶の形状および食品の品質について調べられた研究例は少ない。そのため、これまで緩慢凍結の過程で偶発的に起きてきた過冷却現象は大きく認識されず、凍結速度が食品品質に与える影響を議論する際に混乱をもたらしてきたと考えられる。Sanguansriら<sup>9)</sup>は、緩慢凍結によって生ずる過冷却凍結が、米粉デンプンゲル中に生成する氷結晶サイズおよび解凍後のゲル品質に及ぼす影響を検証したが、生成した氷結晶痕は大小混じった不均質な構造となることを報告しており、従来研究の報告<sup>2)3)</sup>とは異なった見解を示した。しかし、彼らは考察において過冷却凍結中、特に緩慢冷却過程で米粉ゲルが老化した可能性を指摘している。すなわち、食品の種類や構造の違いが、過冷却凍結で生成する氷結晶形態に影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで本研究では、過冷却凍結によって氷が微細化することがMiyawaki<sup>2)</sup>らによって確認されている豆腐をサンプルとして、常圧下での緩

慢な冷却で生じる過冷却を経て氷結晶が生成した場合の過冷却解消温度が氷結晶形状に及ぼす影響について、詳細な検証を行った。併せて、過冷却解消温度が解凍後のドロップロスに及ぼす影響についても調べた。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験試料

市販の充填絹豆腐 (QUEEN'S ISETAN 製, GREEN Q) を 30×30×20 mm に切り出し、水気を拭き取った後、表面の乾燥を防ぐためポリエチレンフィルムで包んだ。また、温度計測のため、サンプルの熱中心にφ 0.076mm の T 型熱電対を挿入し、実験に供した。

### 2.2 実験方法

予備実験にて、豆腐全体が過冷却状態になりやすかった雰囲気温度 -9 °C (±2.3°C) に設定した恒温機 (福島工業株式会社製 : FMU-0531) にサンプルを静置し、全体を過冷却状態に保持した。この際に試料の温度履歴を取得しながら冷却を行い、任意の温度に到達した時点で、液体窒素で冷やした針を接触させて氷核を発生させることで、過冷却状態を解消させた。過冷却解消後直ちに、-80°C 雰囲気のストッカー内 (三洋電機株式会社製 : MDF-C8V1) に移し、凍結を完了させた。Fig.1 に過冷却解消までの凍結曲線を示した。

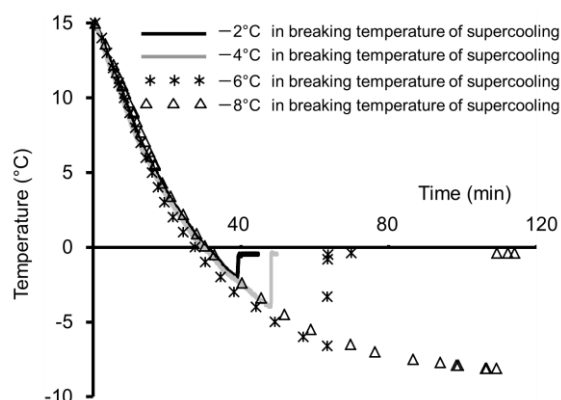


Fig.1 Freezing curve of soy bean gels frozen with various breaking temperatures of supercooling

### 2.3 氷結晶観察方法

約 $-20^{\circ}\text{C}$ 雰囲気内で試料を切り出し、凍結状態の試料表面付近と中心付近から、約 $5\text{mm}$ 角程度の試料片を得た。この試料片から、河野ら<sup>10)</sup>の氷結晶迅速観察法を用いて氷結晶標本作製した。作製した標本は光学顕微鏡(BX51TF, OLYMPUS 製)を使用して観察を行った。この状態を CCD カメラ(DFK31AU03, The Imaging Source 社製)を用いて、カメラ分解能  $1.66\mu\text{m}/\text{pixel}$  で撮像を行い、1枚あたり  $1280\text{pixel}\times 960\text{pixel}$  の画像を取得した。得られた画像について、画像解析ソフトウェア(WinROOF ver.6.5, 三谷商事社製)を用いて、8bitのグレースケール写真に変換した後、一定輝度(本研究の場合 120)で2値化を行った。このうち、白色部分を氷結晶とみなし、氷結晶の円相当径ならびに画像上の  $1\text{mm}^2$  あたりの個数について解析を行なった。

### 2.4 ドリップ測定方法

ドリップ測定は以下の手順で行った。凍結サンプルをフリーザーバッグに入れ、フリーザーバッグごと庫内温度  $20^{\circ}\text{C}$  の恒温機内(福島工業株式会社製: FMU-0531)にぶら下げ、3時間半解凍を行った。この解凍の過程において、サンプルの自重により袋下部に流出した水分をドリップとみなした。解凍終了後、サンプルを袋から取り出し、その重量  $W$  (g)を求め、先に測定しておいた解凍前の初期質量  $W_0$  とあわせて、以下の式からドリップ率 (%)を算出した。最終的に同様の操作を3回繰り返しその平均を求めた。

$$\text{Drip loss (\%)} = (W_0 - W)/W_0 \times 100$$

## 3. 結果

### 3.1 解凍後の外観および氷結晶形状の観察

Fig.2に異なる氷結晶生成温度で過冷却凍結を行った豆腐の解凍後断面全体の外観写真を示す。 $-2^{\circ}\text{C}$ で氷結晶生成が起きた試料は、粗雑なスポンジ状組織となり、復元性が悪かった。

一方、 $-4^{\circ}\text{C}$ と $-6^{\circ}\text{C}$ で氷結晶が生じた試料は外観上では、未凍結試料に近く大きな違いは見られなかった。Fig.3に試料表面部付近の氷結晶標本写真を、Fig.4に試料中心部付近の氷結晶標本写真をそれぞれ示す。これらの写真では、白色部が氷結晶部に相当する。その結果、過冷却の解消温度が低い(c)や(d)の写真からは、表面部でも中心部でも相対的に微細な氷結晶が生成している様子がみられた。特に中心部では、過冷却解消温度が低くなるほど、氷結晶の形が円形に近づいていく傾向も見られた。また、Fig.5, 6にこれら氷結晶の断面写真から算出した氷結晶の円相当径および生成した氷結晶の個数を示す。ただし、氷結晶数は画像上の  $1\text{mm}^2$  あたりの氷結晶の数を示す。

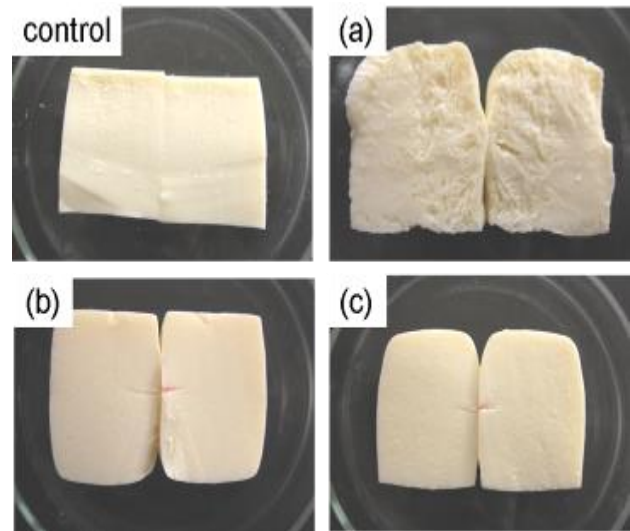


Fig.2 Photographs of frozen-thawed soy bean gels frozen by supercooled freezing method with (a)  $-2^{\circ}\text{C}$ , (b)  $-4^{\circ}\text{C}$ , (c)  $-6^{\circ}\text{C}$  in breaking temperature of supercooling; control denotes a non-frozen sample.

試料の中心部、表面部どちらにおいても、過冷却解消温度が低くなるほど、すなわち氷核の発生温度が低くなるほど、サイズの小さい氷結晶が数多く生成していることが定量的にも確認できた。また、過冷却解消温度が低くなるほど、表面部と中心部の結晶サイズの差が小さくなっていった。このことより、過冷却解消温度が低くなるほど、氷結晶はサンプル全体で均質な構造をとることが示唆された。緒言で述べたよう

に一般的に溶融液体からの氷核生成論においては、過冷却度が大きいほど核発生頻度が高くなることが知られている<sup>4)</sup>。本研究では表面温度、中心温度の差を小さくする均温冷却を行った結果、温度差が表面と中心で 2.0℃以内の近い値

を取りながら過冷却状態に達し、核発生が起こった。すなわち、試料の表面部、中心部ともほぼ同等かつ高い核生成頻度で氷が生成したと考えられる。

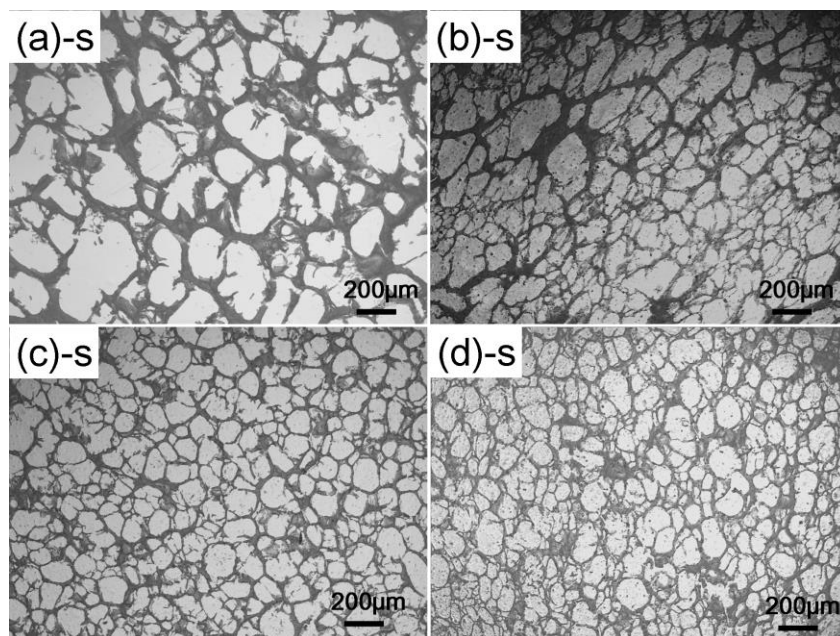


Fig.3 Effect of breaking temperature of supercooling on ice characteristics on the surface of frozen soy bean gels; (a) -2℃, (b) -4℃, (c) -6℃, (d)-8℃

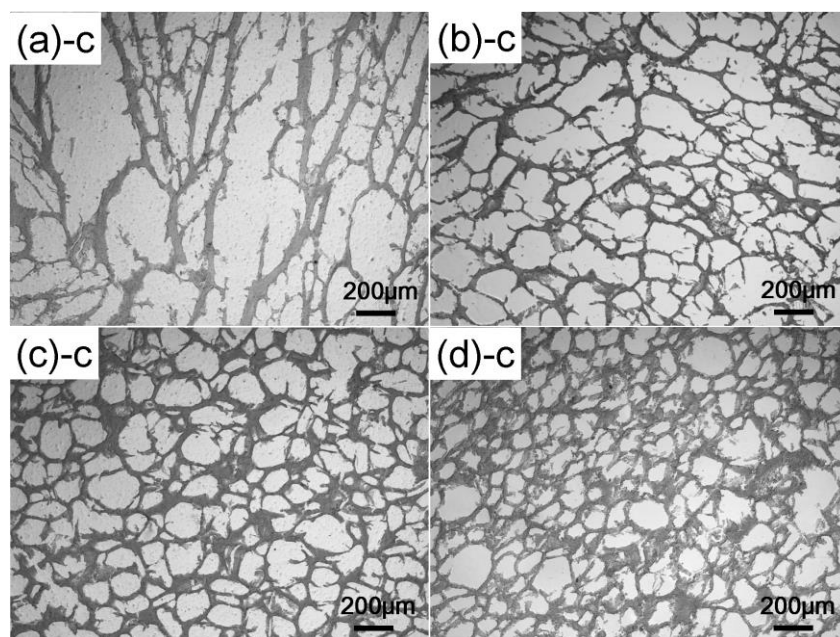


Fig.4 Effect of breaking temperature of supercooling on ice characteristics on the center of frozen soy bean gels; (a) -2℃, (b) -4℃, (c) -6℃, (d)-8℃

またこの際の核生成はごく短時間に起こったと考えられる。数多くの氷核が短時間のうちに生成することで、核発生の後に続く氷結晶の成長や合一は場所の制限を受け、抑制される。結果的にサイズが小さい氷結晶が数多く生成した形態になったと考えられる。

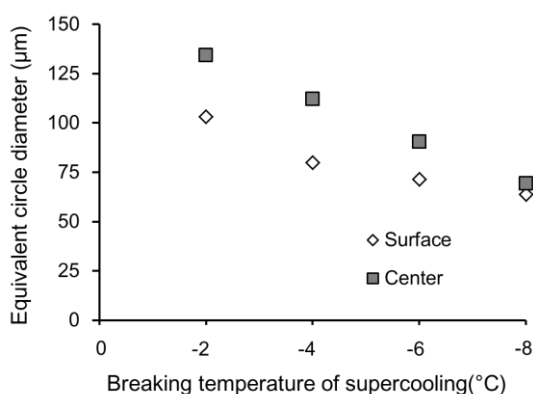


Fig.4 Effect of breaking temperatures of supercooling on the size of ice crystals

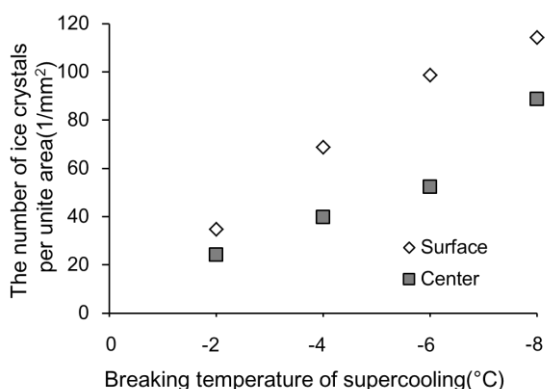


Fig.5 Effect of breaking temperatures of supercooling on the number of ice crystals

### 3.2 ドリップ流出

解凍後のドリップ流出は Fig.6 に示すように氷結晶生成温度に依存しており、生成温度が低くなるほど、流出量が少なくなる傾向を示した。

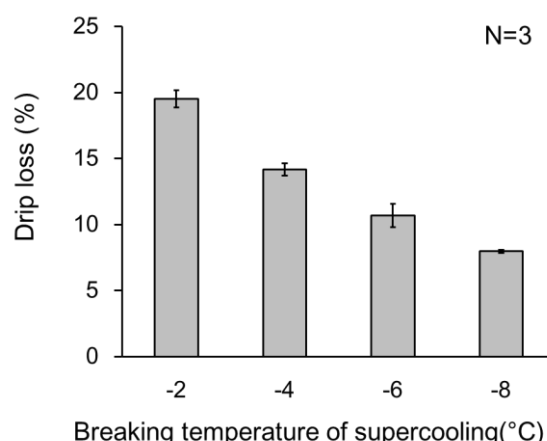


Fig.6 Drip loss of frozen-thawed soy bean gels frozen by supercooled freezing method with various breaking temperatures of supercooling

このドリップ流出の結果と、3.1 で述べた氷結晶組織の観察結果とを合わせて考えると、生成した氷が小さく、均質であるほど、ドリップ流出は抑制されることが裏付けられた。豆腐すなわち大豆タンパク質ゲルが凍結されると、氷結晶部分とそれ以外の固形部分に分離され、その過程において、固形部分では凍結濃縮が起こり、結果として大豆タンパク質は新たな S-S 結合を形成することは知られている<sup>11)</sup>。すなわち、凍結された豆腐からのドリップ流出の微視的メカニズムは以下のように推察される。新たな S-S 結合が形成されることで凍結前の微細なゲル構造は失われ、新たなネットワーク構造が形作られると考えられる。新たなネットワーク構造は、凍結前のゲル構造と比較して、大きい網目を持つ。そのため、大豆タンパク質ゲルは保水能力を失い、解凍された水分は、自重あるいは外力によってゲルから流出することとなる。この際、流出するドリップの量や速度に影響を及ぼすのは、凍結によって生じたネットワーク構造の保水能力、すなわち孔の形状である。氷結晶の生成によって生じた孔または経路が微細であれば、その遊離水の流出抵抗が大きくなり、最終的なドリップ流出量も減少すると考えられる。過冷却解消温度が低く、生成した氷結晶が小さい試料ほど、ドリップ流出量が少なくなる傾向を示した本研究結果は、上記の推論に合致

する。

一般的に、凍結解凍後のドリップ流出機構は複雑であり、詳細については不明な点が多い。今回実験に用いた豆腐は、構造・成分とも比較的単純であるため、簡単な推論で傾向が説明できたが、細胞構造を有する系、あるいは凍結濃縮による影響が異なる不凍タンパク質や糖などの凍結保護剤を含む系では、必ずしも上記の推論が適用できるとは限らない。ともあれ、少なくとも単純な系においては、過冷却現象を利用することで氷結晶を微細化し、ドリップ流出量を低減できることを定量的に示すことができた。これは、何らかの方法で過冷却を制御することでドリップ流出量を制御出来る可能性を示唆するものである。

#### 4. 総括

本実験の結果より、過冷却凍結法においては、食品試料全体の過冷却解消温度をなるべく低く保つことが出来れば、試料全体で均質かつ微細な氷が生成し、氷結晶サイズが直接的に品質に影響を及ぼすような対象物に対しては、高品質な凍結を行える可能性があることが分かった。これは、大きなサイズの試料では特に有効であると考えられる。これまで産業的に用いられてきたエアブラスト凍結などにおいても大きな試料や熱伝導率の低い試料の場合、表面近傍の急速凍結は可能であっても、中心部での急速凍結は困難であり、試料内氷結晶のサイズの分布が生ずるのを避けることができなかった。過冷却凍結法はこの問題を解消できる可能性を持つものである。しかし過冷却凍結法を実用化するにあたっては、過冷却解消温度や解消後の冷却速度などの条件のより詳細な検討とともに、過冷却状態を維持する再現性の高い手法の確立、すなわち過冷却の制御法についての検討も必要である。また、得られる品質の官能スコアとの相関性も併せて検討するなど、多くの課題が存在する。以上のように、高品質凍結を実現できる可能性を持った過冷却凍結については、未知

の部分が多いため、実用化に向けて、今後より多くの詳細な研究が望まれる。

#### References

- 1) Chevalier, D., Le Bail, A., and Ghoul, M., Freezing and ice crystals formed in a cylindrical food model: part1. Freezing at atmospheric pressure, *Journal of Food Engineering*, 2000, **46**(4), pp. 277-285.
- 2) Miyawaki, O., Abe, T., and Yano, T., Freezing and Ice Structure Formed in Protein Gels, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1992, **56**(6), pp. 953-957.
- 3) Simoyamada, M., Tomatsu, K., and Watanabe, K., Effect of Precooling Step on Formation of Soymilk Freeze-Gel, *Food science and technology research*, 1999, **5** (3), pp. 284-288.
- 4) Fennema, O. "Low-temperature preservation foods and living matter", 1973, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 160-161.
- 5) Chevalier, D., Le Bail, A., and Ghoul, M., Freezing and ice crystals formed in a cylindrical food model: part2. Comparison between freezing at atmospheric pressure and pressure-shift freezing, *Journal of Food Engineering*, 2000, **46** (4), pp. 287-293.
- 6) Zhu, S., Ramaswamy, H.S., and Le Bail, A., Ice-crystal formation in gelatin gel during pressure shift versus conventional freezing, *Journal of Food Engineering*, 2005, **668**(1), pp. 69-76
- 7) Fernandez, P.P., Martino, M.N., Zaritzky, N.E., Guignon, B., and Sanz, P.D., Effect of locust bean, xanthan and guar gums on the ice crystals of a sucrose solution frozen at high pressure, *Food Hydrocolloids*, 2007, **21**(4), pp. 507-515.
- 8) Petzold, G., and Aguilera, J.M., Ice Morphology: Fundamentals and Technological Applications in Foods, *Food Biophysics*, 2009, **4**(4), pp. 378-396.
- 9) Sanguansri, C., and Nutsuda, P., Undercooling associated with slow freezing and its influence on the microstructure and properties of rice starch gels, *Journal of Food Engineering*, 2010, **100**(2), pp. 310-314.
- 10) Kono, S., Takahashi, T., Shinozaki, S., Observation Method for Ice Crystal Morphology in Frozen Fish Meat Using Cryo-adhesive Film, *Trans. of the JSRAE*, 2012, **29**(1), pp. 53-58 (in Japanese).
- 11) Hashizume, K., The Review of "Kohri-tofu"; Japanese traditional dried food (Kohri-tofu no hanashi), *Kagaku to Seibutsu*, 1977, **15**(5), pp. 301-308 (in Japanese).

## **Effect of the Breaking Temperature of Supercooling on Ice Characteristics and Drip Loss of Foods in Supercooled Freezing Method**

Rika KOBAYASHI\*

Naohiro KANESAKA\*

Manabu WATANABE\*\*

Toru SUZUKI\*

\* Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology (4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo, 108-8477)

### **Summary**

Since the quality of frozen food depends on the size of ice crystals, many studies have investigated the growth mechanisms of ice crystals in frozen foods. Recently, it was found that in the typical freezing process, the finer ice crystals formed in soybean gels with large-scaled supercooling incidentally occurred during the cooling process (we called it “supercooled freezing method”) as compared with that formed by freezing without supercooling at the same cooling rate. In order to qualify the mechanism of the ice crystal growth in supercooled freezing method, the effect of breaking temperature of supercooling on the ice characteristics of soy bean gels, including their effects on drip loss, was investigated. The results revealed that a lower breaking temperature of supercooling provided the finer ice crystals and a large number of ice crystals. Further, a lower breaking temperature of supercooling produced the lower volume of drip loss. It was suggested that these results were related to the higher degree of ice nucleation at low breaking temperature of supercooling.

**Keywords:** Freezing, Ice nucleation, Supercooling, Frozen food, Drip loss, Breaking temperature of supercooling