

博士論文

凍結食品内に形成される氷結晶の新規計測法に基づく
凍結保存条件の最適化に関する研究

河野 晋治

目次

第1章 緒論	1
1.1 食品凍結の現状と課題	1
1.1.1 凍結技術の食品利用	
1.1.2 食品の凍結保存	
1.1.3 冷凍食品市場の動向	
1.1.4 食品凍結における品質劣化の要因と課題	
1.2 凍結食品中に形成される氷結晶	7
1.2.1 食品凍結プロセスにおける氷結晶形成現象	
1.2.2 食品凍結保存における氷の再結晶化	
1.2.3 凍結食品の氷結晶計測法と問題点	
1.3 氷結晶が食品に及ぼす影響	11
1.4 研究の背景と課題	12
1.5 研究の目的	14
1.6 本論文の構成	15
1.7 要約	17
第2章 低温粘着フィルムを利用した迅速氷結晶計測法の検討	19
2.1 研究の目的	19
2.2 低温粘着フィルムの特性	20
2.3 実験材料および方法	20
2.3.1 実験材料	
2.3.2 試料の調製法	
2.3.3 低温粘着フィルムを用いた組織標本作製法	
2.3.4 凍結置換法による組織標本作製法	
2.3.5 氷結晶形状の計測法	
2.4 実験結果および考察	29
2.4.1 化学固定に用いる組織固定・置換液の検討	
2.4.2 低温粘着フィルム法と凍結置換法の氷結晶形状の比較	
2.4.3 凍結水産物における氷結晶形状	
2.4.4 凍結固定による氷結晶観察	
2.4.5 氷結晶3次元像の再構築	
2.5 要約	41

第 3 章 凍結サーモンフィレの表面色変化の解明	43
3.1 研究の目的	43
3.2 実験材料および方法	44
3.2.1 ゼラチン試料の調製法	
3.2.2 サーモン試料の調製法	
3.2.3 Computer vision system を用いた表面色計測法	
3.2.4 色彩データ処理法	
3.2.5 氷結晶計測法	
3.2.6 カロテノイド測定法	
3.2.7 統計解析法	
3.3 実験結果および考察	50
3.3.1 調整 CVS の評価	
3.3.2 凍結ゼラチンの氷結晶サイズと表面色の関係	
3.3.3 サーモンフィレの凍結履歴	
3.3.4 凍結プロセスにおけるサーモンフィレの色彩変化とカロテノイド量	
3.3.5 サーモンの凍結速度と表面色の関係	
3.3.6 サーモンフィレ垂直断面における色彩変化	
3.3.7 サーモン表層面における氷結晶形状の解析	
3.4 要約	67
 第 4 章 凍結保存条件が冷凍米飯の氷結晶サイズ、粘弾性および官能評価スコアに及ぼす 影響	69
4.1 はじめに	69
4.2 研究の目的	69
4.3 実験材料および方法	70
4.3.1 実験材料	
4.3.2 試料の調製法	
4.3.3 氷結晶計測法	
4.3.4 粘弾性計測装置および計測法	
4.3.5 官能評価法	
4.3.6 統計解析法	
4.4 実験結果および考察	76
4.4.1 各プロセスにおける米飯の温度履歴	
4.4.2 凍結保存操作条件に伴う氷結晶サイズの変化	
4.4.3 凍結保存操作条件に伴う粘弾性の変化	

4.4.4	凍結保存操作条件に伴う官能評価スコアの変化	
4.4.5	氷結晶サイズと官能評価スコアの関係	
4.4.6	粘弾性パラメーターを用いた官能評価スコア予測モデル	
4.5	要約	101
第5章	冷凍米飯内氷結晶サイズおよびフラクタル次元を用いた最適凍結保存条件探索	
	モデルの構築	103
5.1	研究の目的	103
5.2	フラクタル解析について	104
5.3	Quality by design とデザインスペース	104
5.4	実験材料および方法	104
	5.4.1 実験材料	
	5.4.2 試料の調整法	
	5.4.3 米飯内部組織の顕微鏡観察法	
	5.4.4 氷結晶計測法	
	5.4.5 統計解析法	
5.5	実験結果および考察	108
	5.5.1 凍結および保存操作条件に伴う温度履歴	
	5.5.2 米飯内部組織の観察画像	
	5.5.3 凍結および保存条件操作に伴う氷結晶サイズの変化	
	5.5.4 氷結晶形状に基づくデザインスペースの推算	
	5.5.5 凍結および保存操作条件に伴うフラクタル次元の変化	
	5.5.6 再結晶化抑制条件の探索モデル	
5.6	要約	124
第6章	総括および今後の展望	125
	文献	132
	研究業績	146
	謝辞	149

第 1 章 緒 論

1.1 食品凍結の現状と課題

1.1.1 凍結技術の食品利用

食品の凍結保存法は、安全性を確保する基盤技術を増強しながら栄養価や品質を維持し、消費者の食生活に利便性を提供する方法として周知されている(Berry et al., 2009).

現在、食品を凍結する目的は多様化しているが、主に鮮度および品質の維持、加工および加工補助、生食肉類の安全対策に大別される(鈴木, 2013). 鮮度や品質の保持については、主に貯蔵や輸送を目的とし、低温による分子運動の低下および水分子の相転移に起因する水分活性の低下により、化学・生化学反応速度の低下と微生物の増殖を遅延もしくは抑制し、食品の品質変化を防ぐことにある(Archer, 2004; Nesvadba, 2009). そこで、食品の品質劣化を抑制し、シェルフライフを延長させる目的として、食品凍結法は生鮮食品や調理済み食品などの分野において産業的に幅広く利用されている。また、これらを達成するために、生産地における収穫から家庭における消費に至るまでの一貫した流通・保存プロセスにおいて、コールドチェーンが用いられている(渡辺, 2017).

上述した加工および加工補助とは、食品製造において部分的に凍結操作が用いられているプロセスであり、凍結濃縮法(Goff, 1994; Miyawaki et al., 2016),凍結乾燥法(Sagara, 2001), 凍結粉砕法(羽倉, 2009)または凍結含浸法(柴田, 2017)などが挙げられる。このような加工を目的にした操作では、凍結による食品へのダメージを避けるためではなく、それを積極的に利用して付加価値を高める技術として位置付けられている。

また、生食肉類の安全対策としては、主に有害寄生虫などの死滅を目的として凍結が用いられており(竹内ら, 2015), ルイベなどを対象とした安全性確保のための伝統的適用操作もこれに相当する。

1.1.2 食品の凍結保存

食品を凍結して保存する方法の歴史を遡ると、アラスカなどにおい

て生活していたイヌイットが、その生活環境を生かし、狩猟により得た魚類や海獣類の食肉を保存するために活用していた。19世紀後半に機械化された冷凍装置が開発されたことが契機となり、その後、人工的な温度条件制御により食品を凍結できるようになった。1940年頃のアメリカでは、スーパーマーケットとしての店舗形態が急激に成長し、1946年には冷凍品を含むコールドチェーンが確立されたと言われている。その後、冷凍食品の利用が増大するに伴い、保存条件が悪く品質の劣化した粗悪品が横行するという問題を改善するために、1950年代に様々な保存温度条件とシェルフライフの関係を調べる大規模な調査研究が行われた。この研究結果を社会実装する方法として、米国農務省農業研究局西部農産物利用研究開発部が T-TT (Time-Temperature-Tolerance of frozen food) コンセプトを公表した。これによって、多くの食材を長期保存する目安となる温度として -18°C が設定された。この温度設定は、現在に至るまで、コールドチェーン整備計画における基準温度となった。

日本における食品の凍結は、1919年に魚類の冷凍加工のための冷凍工場が北海道に建設され、また、1923年には漁船に冷凍装置が導入されたことにより、主に水産業の分野において発展してきた。戦後になると、食料需要の増大や経済成長に影響されて、保存性の高い冷凍食品への需要が高まるようになり、1959年には食品衛生法に基づき具体化された冷凍食品の規格基準について厚生省告示が公布され、 -15°C 以下での保存が義務付けられた。1964年に開催された東京オリンピックの選手村において、国籍の異なる選手たちの多様な食嗜好を満足させるために、安全で大量の食材を調理することができる冷凍食品を用いたことがきっかけとなり、冷凍食品が急激な躍進を遂げた。その後1965年には科学技術資源調査会がコールドチェーン勧告を行い、また1971年には現在の冷凍食品流通過程における保存温度条件を -18°C 以下とする取り扱い基準が策定された。さらに、1978年に日本農林規格(JAS規格)により、調理冷凍食品の品温は -18°C 以下であることが定義されたが、同規格は積極的に利用されず、利用率の改善等が見込まれない事態となり、2013年に廃止された。

他方、食品凍結技術については、1930年にアメリカの Clarence

Birdseye により塩化カルシウム溶液を用いたコンタクトフリーザーが開発され、急速凍結法が確立された。以降、1960年にトンネル式連続凍結装置が開発され、個食用冷凍食品の品質向上と量産化に寄与した(杉本, 2017)。現在では、食品凍結装置には冷却媒体と食品との伝熱方式、さらにはその中での搬送方式によりいくつかの種類に分類され、食品の種類や用途により使い分けされている。

1.1.3 冷凍食品市場の動向

2016年度の日本国内における冷凍食品生産量は約155万トン、工場出荷額は6,871億円に達している(日本冷凍食品協会, 2017)。2016年度の冷凍食品生産量を種類別に見ると、凍結農産物は対前年比で77%と大幅な減少となっており、これは原料となる農作物が不作であったためと考えられる。反対に、冷凍米飯や冷凍餃子などの家庭用調理品の販売が好調であったため、調理冷凍食品の生産量は対前年比で104%となっている。過去20年間の冷凍食品国内生産量の推移をみると(Fig.1-1)、近年の新商品・コラボ商品の開発やブランド化戦略などにより、ここ数年の生産量は微増となっているが、1998年以降の伸び率は低い。

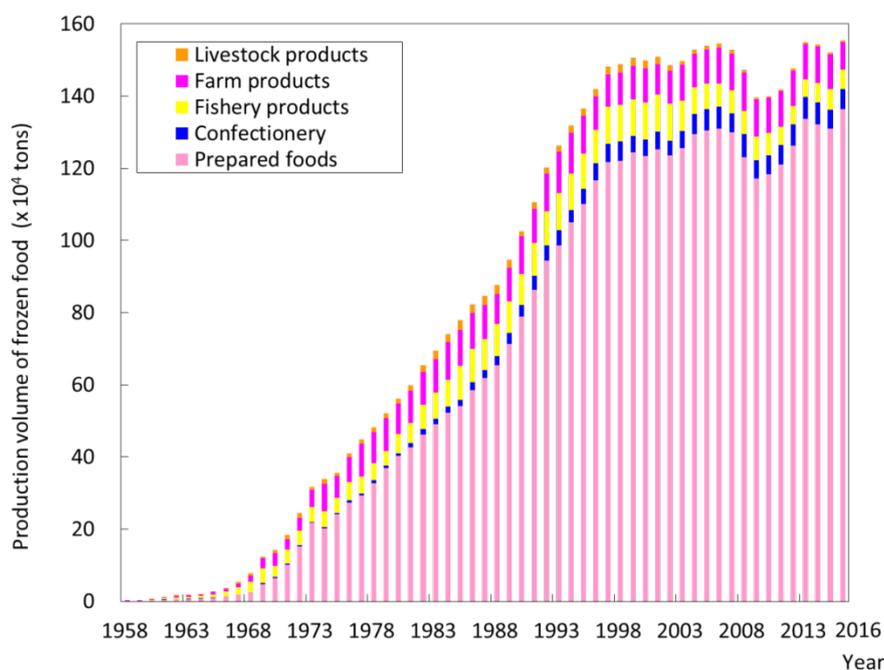


Fig.1-1 Production volume of frozen food in Japan
(日本冷凍食品協会, 2017)

このような現状にあって、冷凍食品業界ではブランド化および差別化商品だけでなく、冷凍食品の品質向上に対する取り組みが求められている。

近年の調理冷凍食品に関する統計において、生産量上位 20 品目のうちピラフ類、炒飯およびおにぎりが入っており、冷凍米飯は調理冷凍食品の代表的品目の一つとして周知されている。冷凍米飯の市場が大きく広がった背景には、高齢化や個食化、女性の社会進出といった社会環境の変遷だけでなく、冷凍技術の進歩による品質向上も要因に挙げられる。ピラフ類や炒飯など米粒が一つ一つばらけた状態の食感が好まれる商品では、凍結工程にてバラ凍結が用いられる。このバラ凍結技術は 1972 年に国内メーカーよって冷凍米飯用の技術として開発され、冷凍米飯の品質を格段に向上させることができただけでなく、その後改良が加えられ、現在ではさまざまな食品の凍結にも利用されている。他方、塊状にて成型された米飯、例えばおにぎり、あるいは容器に盛り付けられた米飯やにぎり寿司などの凍結は、ブロック凍結と称される手法が用いられており、これらについてもいくつかの技術開発が行われてきたが、バラ凍結ほどの品質向上は達成されていない。冷凍食品の既存市場の拡大や新規市場の開拓のためには、米飯ブロック凍結のような完成度があまり高くない凍結技術について、学術的な研究に加えて、市場動向に対応するような実用的な研究も進めることが必要であろうと考えられる。

1.1.4 食品凍結における品質劣化の要因と課題

食品凍結保存の利点は、基本的に添加物を使わず保存が可能であり、また缶詰や乾燥、塩蔵など他の長期食品保存法に比べて食品に与える変化が少ないことが挙げられる。このような利点を生かして、現在では多くの食産業にて活用されており、またこの技術の発展は、国際的な食料および食品の物流において大きな役割を果たすとともに、将来的な食品ロス削減にも貢献すると考えられている。

しかし、推奨されている凍結プロセスの操作法や凍結保存条件を適用しても、これらの連続した操作に伴う食品の物理・化学的変性を完全に防止することは不可能である (Nesvadba, 2009; 白井・吉川,

1999). Table 1-1 に凍結および凍結保存中における食品の品質変化とその防止策について示す. この Table より, 品質変化を大別すると, 食品表面の乾燥とそれに起因する品質変化および食品内部の氷結晶とその変化に伴う組織における各種反応に分類することができる. これらの品質変化において, 食品中に形成される氷結晶は食品組織にダメージを与え, 結果的にその品質に顕著に関与することもあるため (Chevalier et al., 2000; Tironi et al., 2007; Ullah et al., 2014; Ban et al., 2016), 凍結保存操作に伴う氷結晶形状の変動と食品品質の関係を定量的に明らかにすることは, 食品凍結における核心的課題の一つとされている.

Table 1-1 Quality change during freezing and frozen storage
(不二山, 1982)

変化	対象となる食品	原因	防止策
乾燥	すべての冷凍食品	水分の蒸発 氷の昇華	包装, グレーズ -25°C以下で温度変化の少ない保存
冷凍やけ	すべての冷凍食品 特に魚肉, 畜肉	氷の昇華 脂肪酸の酸化, 分解	同上
油やけ	脂肪分の多い魚肉, 卵黄, 乳製品	同上	同上
変色	畜肉, 魚, 果実, 蔬菜	酵素的, 化学的な色素 の酸化, 分解 乾燥(氷の昇華) 氷による色素の破壊	包装, グレーズ, -25°C以下で 温度変化の少ない保存, ブラン チング, シュガリング
タンパク変性	畜肉, 魚肉, 牛乳, 卵などタンパク質 成分	氷による破壊, 不凍部分の濃縮による 塩析	急速凍結, -25°C以下で温度変 化の少ない保存, シュガリン グ, 糖類または食品添加後の 凍結
肉質, ゲル 状態, 組織の破壊	魚肉, 畜肉, 果実, ゲル食品(かまぼこ, 茶碗蒸しなど)	氷結晶生成による破壊	急速凍結 -25°C以下で温度変化の少ない 保存 シュガリング
成分分解	調理食品ほか 全ての食品	酵素的化学的な成分 の分解 凍結による成分変化	ブランチング 急速凍結 -25°C以下で温度変化の少ない 保存
デンプン の老化	デンプン系食品	α デンプンの β 化	急速凍結, -25°C以下の保存
ドリップ発生	魚肉, 食肉	氷による肉質の損傷と 塩濃縮による 塩析結合水の分解	急速凍結 -25°C以下で温度変化の少ない 保存

氷結晶形成による食品の損傷を軽減させるために、氷結晶サイズを小さくするための操作を探求する方法が用いられており、その代表的な方法が急速凍結法である。この方法は、凍結プロセスにおいて、氷結晶サイズを制御する効果的な方法として産業的にも幅広く活用されている。しかしながら、「どの程度まで氷結晶を小さくすると、品質低下をどの程度抑制できるのか」といった定量的な指標は明確にされていない現状にある。

また、凍結保存中のさまざまな変化を一括して抑制する方法としては、保存温度を低下させることが最も効果的であり、これによって氷の再結晶化を抑制するだけでなく、乾燥、変色および各種反応の抑制も可能である。保存温度条件の重要性は古くから認識されており、前項にて示した T-TT や国際冷凍協会の実験データである PSL (Practical Storage Life; 実用貯蔵期間) により、指標とされる温度が示されている。しかしながら、T-TT および PSL の基準となる品質評価は最終的に官能評価を基に決定されており(加藤, 1966a; IIR, 1986)、食品中において品質が変化した物理・化学的要因を把握することは困難視されている。また、T-TT が発表され既に 50 年以上経過しており、その間に食品の種類や品目も大幅に増加し、当然ながら凍結保存に対して適正な温度が不明となっている品目も大幅に増加している。

このように、食品の品質変化を抑制するための要因や防止策は大まかには示されているものの、食品ごとの詳細な指針や維持すべき保存温度の根拠が明確に示されていない現状にある。食品の凍結保存は、品質維持の観点からすると、できるだけ急速に凍結させ、かつ、できるだけ低温にて保存しておくことにより、品質変化などの問題は生じにくくなることは知られている。しかし、経済的かつ省エネルギーの観点からすると、これらの方法にも限界がある。高品質な凍結食品を創出するためには、凍結保存における品質劣化とその要因となる食品組織中の物理・化学的变化を把握することが前提となり、食品凍結分野において早急に解決すべき課題の一つとなっている。

1.2 凍結食品中に形成される氷結晶

1.2.1 食品凍結プロセスにおける氷結晶形成現象

食品の凍結操作に伴い形成される氷結晶生成は、氷核生成と結晶成長の2段階のプロセスにて進行することが知られている(Miyawaki, 2001). 食品中に生成する氷核は、不均質核生成となることが多く、これは食品成分にて構成される多様な組織固体表面において核が生成するためである。また、氷結晶の成長は、主に微小な氷核の界面において伸展する。結晶成長プロセスにおいて、多数の氷結晶が同じ環境下に存在する場合には、オストワルド・ライプニング効果、すなわち、小さな氷結晶が大きな氷結晶と融合しながら吸収され、氷結晶は徐々に成長していく。これらの氷結晶生成速度と結晶成長速度については、Fig.1-2の概念図に示すように、最大速度を与える温度はそれぞれ異なっている(高井, 1996).

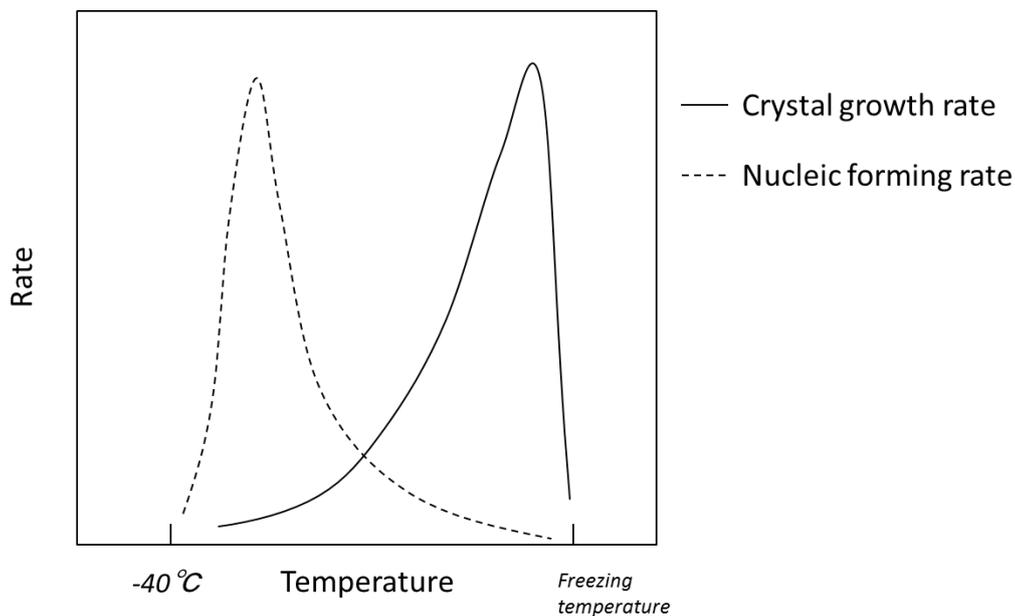


Fig.1-2 Dependence of nucleic and crystallization rate of ice crystals on temperature (高井, 1996)

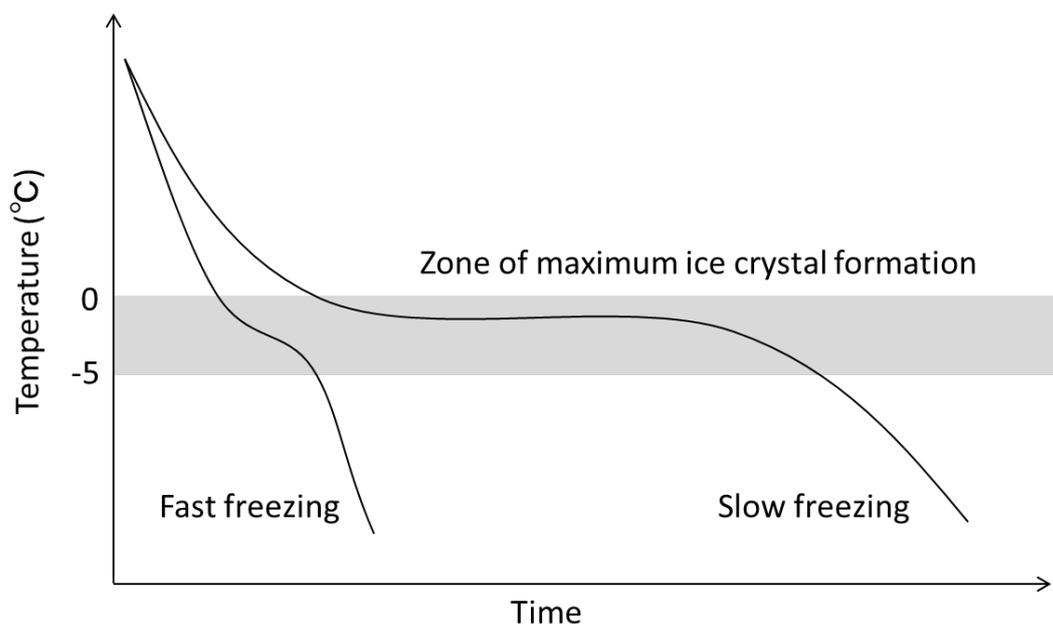


Fig.1-3 Two types of freezing curves depending on freezing rate

緩やかに温度を低下させると氷結開始温度（Freezing Temperature）近傍に長時間滞留することになるため、核生成速度は小さく、また氷結晶成長のための氷核は数少ない。したがって、結晶成長速度が極大を取るため、大きな氷結晶が生成されやすくなる。

食品においては、この氷結晶成長速度の大きな温度域は 0～-5 °C 付近となることが多く、この温度域は最大氷結晶生成帯（Fig.1-3）と称されている（加藤，1966b）。一般に、食品凍結時において、最大氷結晶生成帯通過時にその大部分の水が氷結することが知られている（熊谷，1999；Miyawaki，2001）。さらに、この温度帯は変色やタンパク質の変性などの化学的変化が生じやすい温度帯でもある。したがって、凍結操作に際し、凍結曲線がこの温度帯を速やかに通過する急速凍結などによって、食品の品質に及ぼす変化を最小限に留めることが必要となる（高井，1997）。

近年に至ると、純粹の水を対象にした相変化に関する物理化学の理論が適用されるようになり、食品材料内の氷結晶の挙動を現象論的に解明する研究が進展するようになった（Do et al., 2004；Ueno et

al., 2004; 宮脇, 2009). これらの研究成果は, ガラス転移が生じる物理的環境条件を制御しながら凍結・融解挙動を操作する実用技術としても利用されるようになっている.

1.2.2 食品凍結保存における氷の再結晶化

凍結保存中に, 食品中の氷結晶形状は再結晶化によって緩慢に変化し, 凍結時に形成された氷結晶の数, 大きさ, 形状および配置を変化させ, 急速凍結による利点を低下させることもある(Fennema, 1973). その理由は, サイズが小さく, 比表面積が大きい氷結晶表面においては, 自由エネルギーが大きくなり, 熱力学的に不安定となるためである. この表面エネルギー格差に起因して, 結晶同士が融合し, 比較的小さい氷結晶は消失し, 大きな氷結晶が徐々に成長する再結晶化が進展する. その結果, 氷結晶数が減少する共に平均サイズは増大する(Sutton et al., 1996). また, 凍結保存温度が高くなるにつれて, 再結晶化速度は大きくなることが知られている(MacKenzie and Luyet, 1967).

凍結食品中にて生じる再結晶化は Fig.1-4 に示すように, 大きく 3 つのタイプに分類される(Fennema, 1973; Zaritzky, 2009; Hartel, 2013).

(1) **Surface Iso-mass Recrystallization**: 局所的に半径が小さな部分に存在する水分子は, 高エネルギー状態を解消するために半径の大きな部分や凹部に移動する. その結果, 氷結晶の凹凸部が消失し, 時間経過とともに表面が滑らかになる.

(2) **Migratory Recrystallization**: オストワルド・ライプニング効果により, 小さな氷結晶は表面より徐々に融解し, 融解した水分子は凍結濃縮相を通過する過程において, より大きな氷結晶表面へ移動し, 組み込まれる. その結果, 小さな氷結晶は消失し, 大きな氷結晶が成長することによって, 氷結晶平均サイズの増大と氷結晶数の減少が生じる.

(3) **Accretive Recrystallization**: 互いに接触しあった複数の氷結晶は, 表面積を減少させる方向へと水分子が移動するため, 氷結晶間の接触面積が増大し融合する.

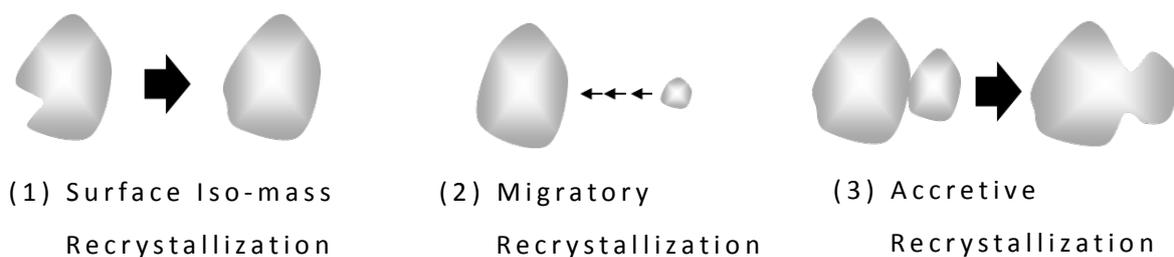


Fig.1-4 Typical mechanism of recrystallization

1.2.3 凍結食品の氷結晶計測法と問題点

産業レベルでの凍結過程において凍結食品内に形成される氷結晶は、通常の光学顕微鏡にて観察可能なサイズになることが多いため、これまでに数多くの観察および計測法が提案されている。氷結晶観察法の歴史を遡ると、1920年代には凍結置換法の先駆けとも言える手法(Kallert, 1923)や冷凍室内に設置された顕微鏡(Hardy, 1926)が利用されている。これ以降、凍結試料を低温条件下にて親水性有機溶媒に浸漬させ、氷と溶剤を置換させる凍結置換法(Bevilacqua et al., 1979; 高井ら, 1997; Hagiwara et al., 2003)や凍結・乾燥プロセスを経て氷を昇華させる凍結乾燥法(Koonz and Ramsbottom, 1939; Love, 1962)といった食品内の氷結晶を観察または計測するための前処理方法が用いられてきた。凍結置換法と凍結乾燥法はいずれも前処理により組織形状を維持したまま氷を除去することで、氷の痕跡を観察する方法である。凍結置換法は、明瞭な氷結晶観察が可能となるが、標本作製に時間を要するなどの問題点を有しており、また凍結乾燥法は昇華プロセス前後において試料内に構造変化が生じる可能性が指摘されている(Faydi et al., 2001)。

他方、氷結晶を直接計測する方法としては、冷却ステージ付き光学顕微鏡(Donhowe et al., 1991)、共焦点レーザー顕微鏡(Evans et al., 1996; Ishiguro and Horimizu, 2008)、低温走査型電子顕微鏡(Cryo-SEM)(Goff et al., 1995)などが利用されており、これらはいずれも低温条件下にて試料を計測することができる。近年では、氷結晶三次元構造の計測法として、マイクロスライサ・スペクトル・イメージングシステム(Do et al., 2004)やX線CTを用いた定量的

特性抽出法の提唱(Mousavi et al., 2007), さらには非破壊観察手法として放射光 X 線 CT(佐藤ら, 2016)や核磁気共鳴画像装置の利用(Kerr et al., 1998)も検討されている.

このように, 氷結晶を可視化するためには, 材料の前処理, 観察機器の選定, 組織画像から氷結晶を鮮明に抽出する方法など, 対象材料に特化した多様な計測技術が必要とされてきた.しかし, これらの中には氷結晶の形状変化速度に対応不可能と考えられる長時間の前処理および観察, 高精度で高価な測定機器, さらに熟練を要する画像処理技術などを必要とする計測法も含まれている.これらの難点を短時間に簡便・安価で汎用性などに優れている手法に改善して, 目的に沿った合理的計測技術体系として整理し, 実用的な利用にも簡便に適用可能な汎用性の高い計測技術へ変革することが所望されている.

1.3 氷結晶が食品に及ぼす影響

氷結晶形成が食品に及ぼす影響は大きく 2 つに分類される. 一つは氷結晶構造が食品組織に与える物理的損傷であり, もう一つは凍結濃縮による化学・生化学的反応の促進やタンパク質の変性・不溶化である(Dyer and Hiltz, 1974).

氷結晶形成による食品の物理的損傷は, 畜肉や魚肉などの筋肉組織において, 凍結速度と筋肉組織内に形成する氷結晶サイズの関係, さらに氷結晶が筋肉組織へ及ぼす影響などに関する研究が数多く報告されている(Bevilacqua et al., 1979; 福田, 1986; Martino and Zaritzky, 1988; 都ら, 2002.; 橋本ら, 2016). また, 筋肉組織の観察においては, 細胞内外における溶液濃度差に起因して, 凍結速度の相違によって氷核形成部位が異なるという説が提唱されている(田中, 1976), 近年では, この説が拡大解釈され, 細胞内凍結はダメージが少なく, 細胞外凍結は大きなダメージを与え品質を劣化させる, という情報が広まっており, “氷結晶サイズが凍結食品の品質を支配する主要因である” という偏った情報となって一般化されつつあるが, これらに関して科学的エビデンスとして報告されている事例は数少ない現状にある. 氷結晶形成は解凍後のドリップ発生を

引き起こすとされており (Chevalier et al., 2000; Chevalier et al., 2002; Tironi et al., 2007; Jibu et al., 2009; 小林ら, 2014), これによって食品中に含まれるタンパク質, 塩類およびビタミン類などの水溶性成分の流出も引き起こす. また, 氷結晶形成に起因する凍結濃縮はタンパク質の変性・不溶化だけでなく, 脂質酸化, 色素変性なども生じさせる要因ともなっている.

これらの研究の過程においては, 先ず, 凍結操作前の食品材料を対象にして, その品質特性を機器計測データおよび官能評価スコアをデータベースとする評価基準法を設定しておく必要がある. 次に, 凍結プロセスにおいて材料内に形成される氷結晶の変化を短時間に計測し, 前述した評価基準法と同様な方法を適用して得られた評価結果との差異を比較して, 氷結晶の形成と形態変化に起因する品質変化の特性を定量的に評価することが重要である.

1.4 研究の背景と課題

氷結晶形成が食品の品質に及ぼす影響の一つとして, 外観色の変化がある. 食品の外観色は消費者の購買意欲に直接影響するため, 凍結サーモンの市場取引においてはフィレの外観色が伝統的に評価基準とされ, 濃い赤色肉色を保有するサーモンは高価格にて取引されている (Skrede et al., 1990). 他方, 急速凍結した高品質魚類の食肉には一時的な表面色消失現象, すなわち白色化が観察されるので, これらの相反する視覚による色彩観察結果は, 凍結速度の差異に起因する氷結晶サイズに影響されていると推察されている (Ottestad et al., 2011). このため, 氷結晶サイズと外観色の関係を, 精度よく計測する客観的な品質評価法を実現する技術の開発が望まれていた. このように, 氷結晶形状と外観色の関係を明らかにすることは, 目的とする外観品質を得るための凍結操作条件を探索することや, 市場取引における品質評価法の技術開発による客観的価格形成にも貢献すると考えられる.

このような事例に示されるように, 氷結晶の形状が食品材料の組織の変形や破壊を引き起こし, 消費者が知覚する食感や美味しさに影響を及ぼすことは経験的によく知られている. しかし, 氷結晶サイ

ズと官能評価スコアの関係を経科学的エビデンスとして報告されている事例は数少ない現状にある(Russell et al., 1999). たとえば, 冷凍米飯については, 冷却速度が凍結保存中のデンプン老化に及ぼす影響(Yu et al., 2010a; Zhang and Sun, 2006), さらに保存温度(Ma and Sun, 2009; Perdon et al., 1999)とガラス転移温度(Hsu and Heldman, 2005)の関係などについては詳細に報告されているものの, 品質劣化の主要因と想定されている氷結晶の形態計測に基づき, 美味しさとの関係について定量的に解明した研究事例は列挙できない現状にある.

このような現状から, 高品質な凍結食品を創出するためには, 氷結晶形状と品質の関係を明らかにすること, また, 氷結晶形状という観点から凍結と保存のプロセスを把握することが必要となる. さらに氷結晶形状の変化をモデル化し, 数値シミュレーションにて最適な凍結保存操作条件を探索することは, 凍結食品の温度管理を設計・運用する上で重要となるが, このような観点からの報告も数少ない現状にある.

1.5 研究の目的

本研究の目的は、凍結食品の氷結晶サイズと形状および外観色を計測・解析する方法、さらにはこれらの機器計測データと官能評価スコアをデータベースとした解析およびモデルを構築すること。また、得られたモデルを用いて、実用的に運用可能な最適条件を合理的に探索する手順を確立することにある。

具体的には、まず、

- 1) 凍結プロセスの操作条件により食品材料内に形成される氷結晶のサイズと形状を精度良く短時間に計測出来るよう改善した技術を開発すること
- 2) これらを適用して氷結晶の計測法を基盤とするデータ解析法および品質評価法を提唱すること
- 3) さらに、効率的かつ効果的な実用操作を開発する視点から、最適な凍結プロセスや保存温度条件などを探索する手法、例えばニューラルネットワーク（ANN）を利用した数値シミュレーションによるモデリング手法や操作条件を「デザインスペース」の考え方を導入して絞り込む方法を確立する。

ことにある。

1.6 本論文の構成

本論文は 6 章より構成され，その内容は大きく分けて，氷結晶のサイズと形状を短時間に計測するための方法の開発と氷結晶の計測法を基盤とするデータ解析法・品質評価法，さらには氷結晶解析結果に基づく凍結保存条件の最適化手法にて構成されている．

本論文の構成を Fig.1-5 に示す．まず，第 1 章では，凍結食品内に形成される氷結晶計測法や氷結晶が食品品質に及ぼす影響について既往の研究を概説し，その問題点を述べた．

第 2 章では，低温粘着フィルムを用いた迅速氷結晶計測法を開発した．本章では特に，従来手法である凍結置換法の欠点を抽出し，これらを補うための新たな提案について述べた．

第 3 章では，氷結晶形状が食品の外観色に及ぼす影響，特に凍結サーモンの一時的な色消失現象について明らかにするため，デジタルカメラなどを利用して外観色を定量化できる Computer Vision System (CVS) を導入した技術を開発し，その有効性を実証した．また，これらによって，凍結速度に依存する氷結晶サイズが食品の外観色に及ぼす影響を定量的に明らかにした．

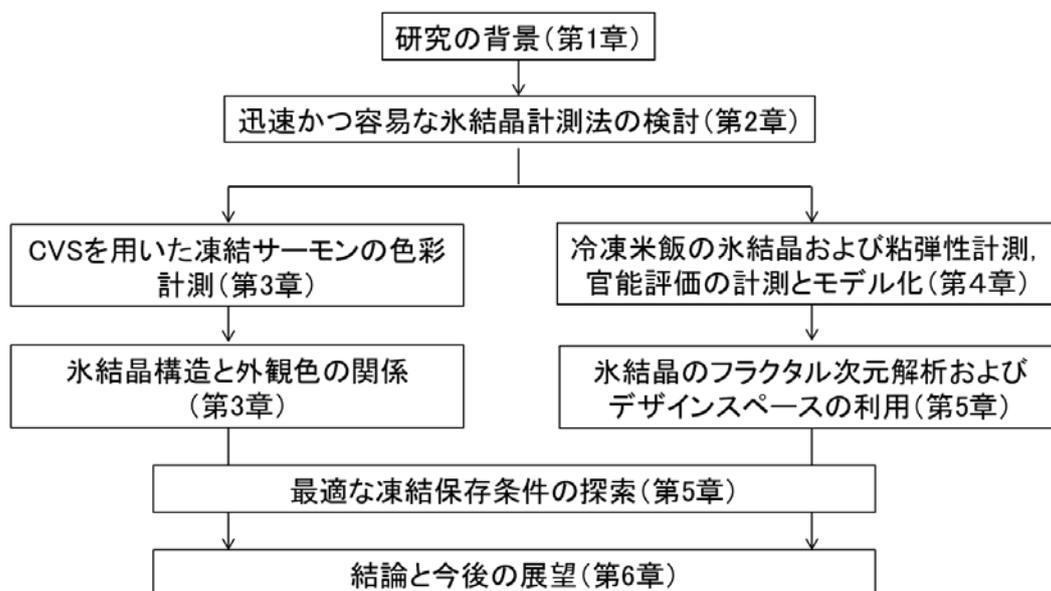


Fig.1-5 Organization of this thesis

第 4 章では、食品中の氷結晶が食品の品質に及ぼす影響について、さらに詳細に調べるために、主食である炊飯米を典型的な研究対象として、異なる凍結操作条件における氷結晶サイズ、粘弾性計測および官能評価スコアの関係について解析し、またこれらの関係に基づいて品質評価モデルを構築した。

第 5 章では、効率的かつ効果的な実用凍結操作を開発する視点から、最適な凍結プロセスや保存条件などを探索する手法、ここでは氷結晶形状に基づいた ANN モデルによる数値シミュレーションや操作条件を「デザインスペース」の考え方を導入して絞り込む方法を提唱した。

第 6 章では、結論と今後の展望を述べた。

1.7 要約

食品を長期に保存する目的において、推奨されている凍結プロセスの操作法や凍結保存条件を適用しても、これらの連続した操作に伴う食品の物理・化学的変性を完全に防止することは不可能である。特に、食品中に形成される氷結晶はその品質に顕著に関与することもあり、凍結保存操作に伴う氷結晶サイズおよび形状の変動と食品品質の関係を定量的に明らかにすることは、食品凍結技術における核心的課題の一つとされている。

凍結食品内に形成された氷結晶を可視化するためには、材料の前処理、観察機器の選定、組織画像から氷結晶を鮮明に抽出する方法など、対象材料に特化した多様な計測技術が必要とされてきた。しかし、これらの中には氷結晶の形状変化速度に対応不可能と考えられる長時間にわたる前処理および観察、高精度で高価な測定機器、さらに熟練を要する画像処理技術などを必要とする計測法も含まれている。これらの難点を短時間に簡便・安価で汎用性などに優れている手法に改善して、目的に沿った合理的計測技術体系として整理し、実用的な利用にも簡便に適用可能な汎用性の高い計測技術へ変革することが所望されている。

他方、氷結晶が食品材料の組織と品質変化に及ぼす影響などの研究の過程では、先ず、凍結操作前の食品材料を対象にして、その品質特性を機器計測データと官能評価スコアをデータベースとする評価基準法を設定しておく必要がある。次に、凍結プロセスにおいて材料内に形成される氷結晶の経時変化を短時間に計測し、前述した評価基準法と同様な方法を適用して得られた評価結果との差異を比較して、氷結晶の形成と形態変化に起因する品質変化の特性を定量的に評価することが重要となる。

氷結晶形状が食品の品質に及ぼす影響の一つとして、外観色の変化がある。食品の外観色は消費者の購買意欲に直接影響するため、市場取引において外観色が評価基準とされている食品がある。また、氷結晶形状が食品の食感や美味しさに影響を及ぼすことについては、経験的な知見はあるものの、氷結晶サイズと官能評価スコアの関係性を科学的エビデンスとして報告している事例は数少ない現状にある。

このような現状から，高品質な凍結食品を創出するためには，氷結晶形状と品質の関係を明らかにすること，また，氷結晶形状という観点から凍結と保存のプロセスを把握することが必要となる．さらに氷結晶形状の変化をモデル化し，数値シミュレーションにて最適な凍結保存操作条件を探索することは，凍結食品の温度管理を設計・運用する上で重要と考えられる．

第 2 章 低温粘着フィルムを利用した迅速氷結晶計測法の検討

2.1 研究の目的

凍結食品中に形成される氷結晶は、その形成位置やサイズによっては食品の内部組織に大きな影響を及ぼし、これらに起因して食品の品質が低下することが経験的に知られている。しかしながら、これらの定量的な関係について、科学的エビデンスとして報告されている事例は数少ないため、考究の伸展を妨げている現状にある。1.2.3 で述べたように、凍結食品中に形成される氷結晶について観察および計測するための方法はこれまで数多く提案されているが、いずれの方法も何らかの欠点を有しているために、十分に活用されているとは言い難い。これらの欠点を、短時間に簡便・安価かつ汎用性などに優れている手法に改善して、実用的な利用にも簡便に適用可能な汎用性の高い計測技術へ変革することが所望されている。また、このような現状が、氷結晶サイズと食品の品質に関わる特性の関係解明に関する研究の進展を阻んでいる原因の一つであると推察される。

氷結晶の観察法および計測法が数多く提案されている中でも、最も古くから利用されている手法の一つである凍結置換法は、明瞭な氷結晶の観察が可能であることや、高価な測定機器を利用しないという利点もあり、さまざまな改良が加えながら、現在でも数多くの研究に用いられている。この凍結置換法は供試材料を低温条件下、例えば凍結または保存中に用いられる温度と同程度に冷却した有機溶剤中に浸漬させ、組織の化学固定と同時に氷と有機溶剤を置換する。このため、有機溶剤の試料浸透速度が遅く、組織固定・置換が終了するまでに、魚肉筋肉組織では通常 2~4 週間、場合によっては 1 ヶ月以上要することもあり(鈴木, 2008)、本手法の大きな欠点とされている。そこで本章では、この欠点を補うため、医学病理学分野において川本フィルムと称されている低温においても粘着性を有する光学顕微鏡観察用のフィルムを応用することにより、迅速かつ容易に氷結晶を計測する手法を開発することを目的とした。

2.2 低温粘着フィルムの特性

医学病理学分野において、組織観察技術は古くから利用されており、数多くの手法が提案されている。それらの中でも、歯や骨に代表される硬組織の組織標本は作製が困難であるため、解決すべき課題の一つとして挙げられてきた。この問題を解決する手法として、川本は Ullberg のテープ薄切法を改良し、迅速かつ容易に硬組織の顕微鏡標本を作製することができる方法を提唱した (Kawamoto, 1990)。その後、この方法は硬組織だけでなく様々な生体組織の切片取得法として多用されるようになってきている (Kawamoto, 2003; Kawamoto and Shimizu, 2000)。川本が開発した低温粘着フィルムは、マイナス温度下においても粘着性を有し、かつ一般に用いられる染色液に影響を受けない材料を用いているため (非公表)、新鮮凍結切片に利用できる特徴を有している。

この低温粘着フィルムは魚肉や畜肉の筋肉などのタンパク質が主成分となる組織に対しては付着性が良好であり、その後の組織固定、染色および洗浄などによる操作においても、これらの組織切片をフィルム上にて形状を維持することが可能である。しかし、植物やデンプン質が主成分となる組織、さらに寒天やゼラチンなどゲル状食品に対しては付着性が悪く、溶液を用いる組織固定 (化学固定)、染色および洗浄などの溶液に浸漬させる操作において、組織変形やフィルムから組織切片が遊離することもある。

2.3 実験材料および方法

2.3.1 実験材料

供試材料として、 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて 1 年以上保管した鹿児島産の凍結メバチ (*Thunnus obesus*) 筋肉組織および銚子産の生メバチの筋肉組織を用いた。また、チリ産養殖ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*)、新潟産ホッコクアカエビ (*Pandalus eous*)、紋別産ホタテガイ (*Mizuhopecten yessoensis*) は市販品を用いた。これらの試料は有機溶剤を用いて化学固定し、顕微鏡標本を作製した。

他方、化学固定を行わない凍結固定による顕微鏡観察・計測の試

料としてゼラチンおよび米飯として市販の魚沼産こしひかりを用いた。

2.3.2 試料の調製法

凍結メバチ筋肉組織は、 -20°C 以下の環境温度にて -20°C 程度に冷却したナイフを用い $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ の大きさに切り出した後、2つに切り分け、低温粘着フィルム法および凍結置換法により顕微鏡標本をそれぞれ作製した (Fig. 2-1)。

また、生メバチ筋肉組織を室温下にて $40\text{ mm} \times 40\text{ mm} \times 20\text{ mm}$ の大きさに切り出した後、試料全体が均一温度となるように 4°C に設定された冷蔵庫内にて1時間静置した。その後、庫内温度 -45°C 、風速 17.0 m/s に設定した産業用の連続衝突噴流式フリーザー (TJ Freezer, Mayekawa) を用いて急速に凍結した。

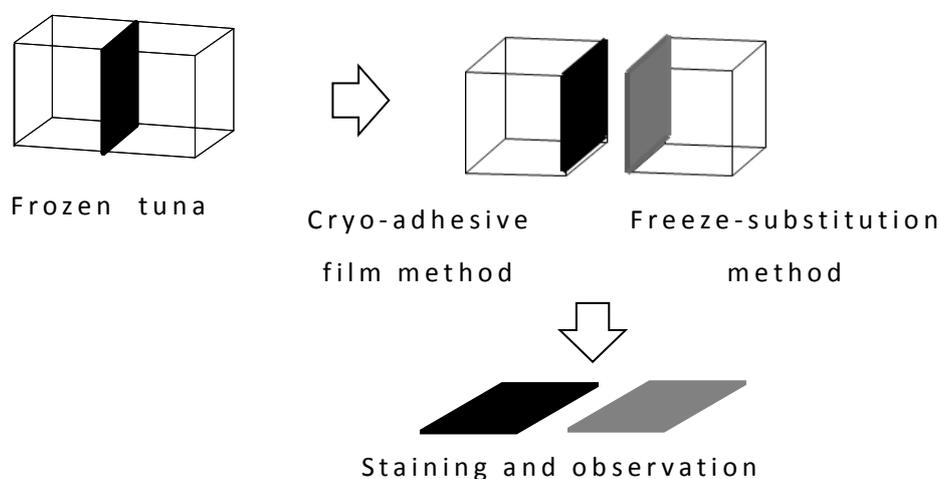


Fig. 2-1 Treatment of frozen tuna for samples

The frozen tuna was divided into two pieces. Each piece was treated both by the cryo-adhesive film method and by the freeze-substitution method.

通常凍結試料は， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定した冷凍庫（Medical Freezer MDF-U536D，SANYO）内に試料を一晩静置して凍結した．凍結終了後に， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ の環境下において $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ の大きさに切り出し，氷結晶観察および計測用の試料とした．

ギンザケは背側筋肉より筋肉組織を $30\text{ mm}\times 30\text{ mm}\times 20\text{ mm}$ の大きさに切り出し，またホタテガイは貝柱を取り出して凍結試料とした．ホッコクアカエビは頭部，尾部および殻つきのまま凍結試料とした．凍結試料は，試料全体が均一温度となるように $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定された冷蔵庫内にて 1 時間静置した．その後，庫内温度 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，風速 15.0 m/s に設定した産業用の連続衝突噴流式フリーザーを用いて凍結した．

ゼラチンおよび米飯内に形成される氷結晶観察および計測には蛍光染色法を用いた（橋本ら，2003）．ゼラチンは，蒸留水にゼラチン粉末（和光純薬工業）と Rhodamine B（和光純薬工業，励起波長 $510\text{ nm}\sim 550\text{ nm}$ ，蛍光波長 590 nm ）をそれぞれ最終濃度 $10\text{ wt}\%$ および $0.001\text{ wt}\%$ となるように加え， $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて 1 時間攪拌した．Rhodamine B にて染色されたゼラチン溶液をプラスチックシャーレ（高さ $20\text{ mm}\times$ 直径 90 mm ）に注ぎ入れ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定した冷蔵庫内にてゲル化させた．

米飯の調製は，まず水道水にて洗った白米 450 g に $0.01\text{ wt}\%$ Rhodamine B 溶液 635 ml 加え，1 時間浸漬させ，家庭用炊飯器（ND-HP10，Mitsubishi Electric）に入れ，普通炊きコースにて炊飯した．炊飯終了後直ちに，炊飯釜壁面に接触している炊飯米を避け，市販の炊飯米用シート（直径 200 mm ，Komoda Paper）上に 200 g ずつ取り分け，高さ 10 mm となるように成形した．この試料を $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ になるまで放冷した後，塩化ビニル樹脂製食品包装用ラップフィルムにて包装した．

染色したゼラチンおよび炊飯米は，庫内温度 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，および庫内風速 0.5 m/s に設定した恒温槽（EC-43MHP，HITACHI）を用いて凍結した．

これらの試料とその調製法については Table 2-1 に示す．

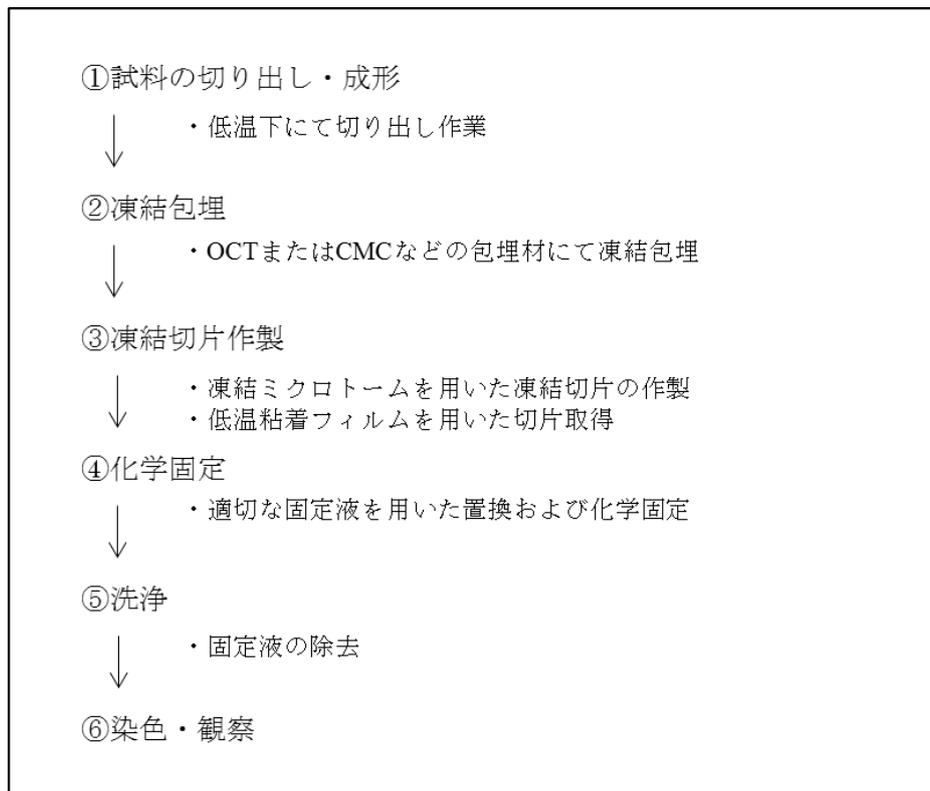
Table 2-1 Preparation of specimens for each sample

Sample	Freezing method	Microscopic specimen method	Fixation Method	Staining
Frozen tuna	—	Cryo-adhesive Film Freeze-substitution	Chemical	H·E
Raw tuna	Fast Normal	Cryo-adhesive Film	Chemical	H·E
Raw coho salmon	Fast	Cryo-adhesive Film	Chemical	H·E
Raw deep-water shrimp	Fast	Cryo-adhesive Film	Chemical	H·E
Raw scallop	Fast	Cryo-adhesive Film	Chemical	H·E
Stained gelatin	Normal	Cryo-adhesive Film	Freeze	Rhodamine
Stained cooked rice	Normal	Cryo-adhesive Film	Freeze	Rhodamine

H·E: Hematoxylin-Eosin Y staining

2.3.3 低温粘着フィルムを用いた組織標本作製法

低温粘着フィルムには光学的に透明な基材と粘着材を組み合わせている市販品（Cryofilm type IIC (10), Leica Microsystems）を用いた。低温粘着フィルムを用いた標本作製手順のうち，化学固定による顕微鏡標本作製法を Fig.2-2 に示す。凍結試料はドライアイス－ヘキサン混合溶液を用いて凍結組織包埋剤 Tissue-Tek O.C.T（SAKURA Finetek）にて凍結包埋した。これを $-25\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定した回転式凍結マイクロトーム（CM-1510, Leica Microsystems）にセットし，目的の組織部位が露出するまでトリミングした。試料温度を $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下に維持したまま，露出した試料表面に低温粘着フィルムを貼り付けた後， $7\text{ }\mu\text{m}$ の厚さにて凍結試料を薄切した（Fig.2-3）。その後，低温粘着フィルムに薄切試料を付着させた状態にて，置換・固定液に2分間浸漬し静置した。置換・固定後の試料をヘマトキシリン染色した後，水洗分別，さらにエオシン Y にて染色後，水洗し，顕微鏡標本とした。



CMC : carboxymethyl cellulose

Fig.2-2 Procedure of microtomy using cryo-adhesive film with chemical fixation

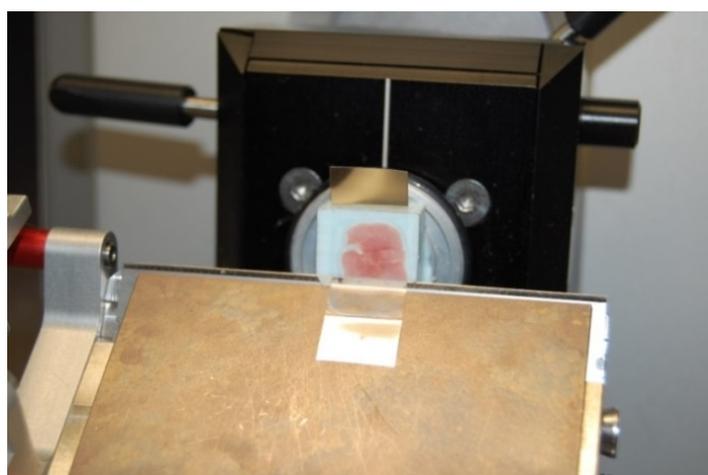


Fig.2-3 Image of cryo-adhesive film

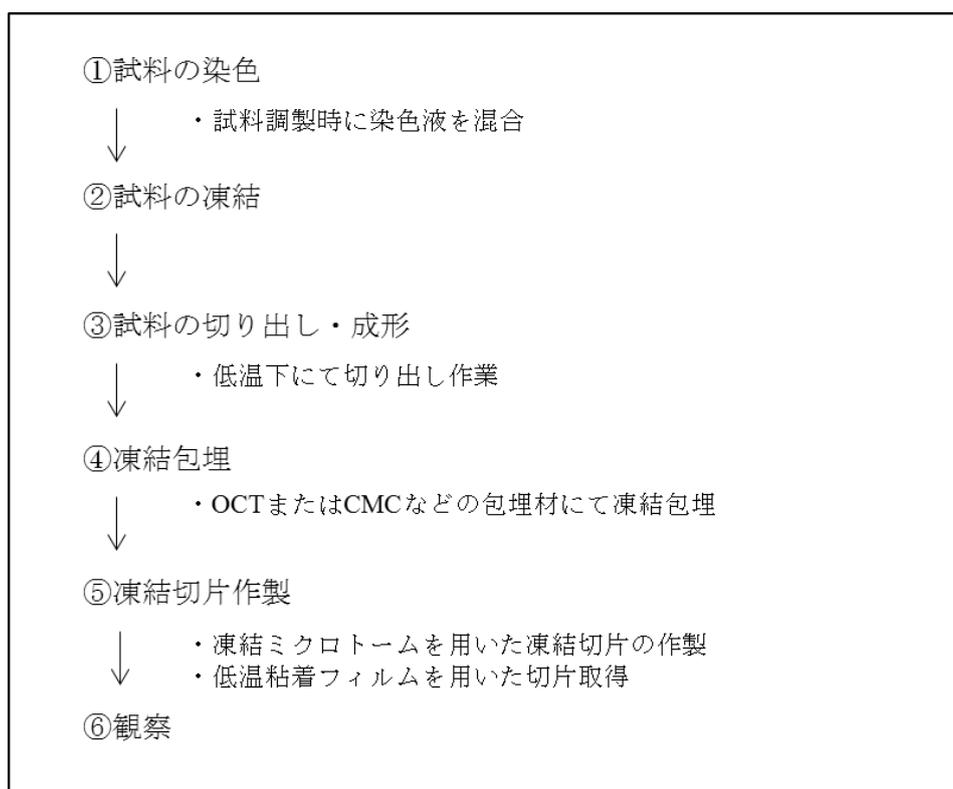


Fig.2-4 Procedure of microtomy using cryo-adhesive film with freeze fixation

次に，低温粘着フィルムを用いた標本作製手順のうち，凍結固定による顕微鏡標本作製法を Fig.2-3 に示す．染色された凍結試料はドライアイス－ヘキサン混合溶液を用いて凍結組織包埋剤 Tissue-Tek O.C.T にて凍結包埋した．これを $-25\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定した回転式凍結マイクロトームにセットし，目的の組織部位が露出するまでトリミングした．試料温度を $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下に維持したまま，露出した試料表面に低温粘着フィルムを貼り付けた後， $3\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ の厚さにて凍結試料を薄切した．取得した薄切試料は低温粘着フィルムに付着させたまま顕微鏡観察標本とした

2.3.4 凍結置換法による組織標本作製法

低温粘着フィルムを用いた組織標本作製法を評価するために，Fig.2-5 に示す一般的によく利用される凍結魚肉組織観察のための凍結置換法（ゼラチン包埋法）を用いて，顕微鏡標本作製した（鈴木，2008）．

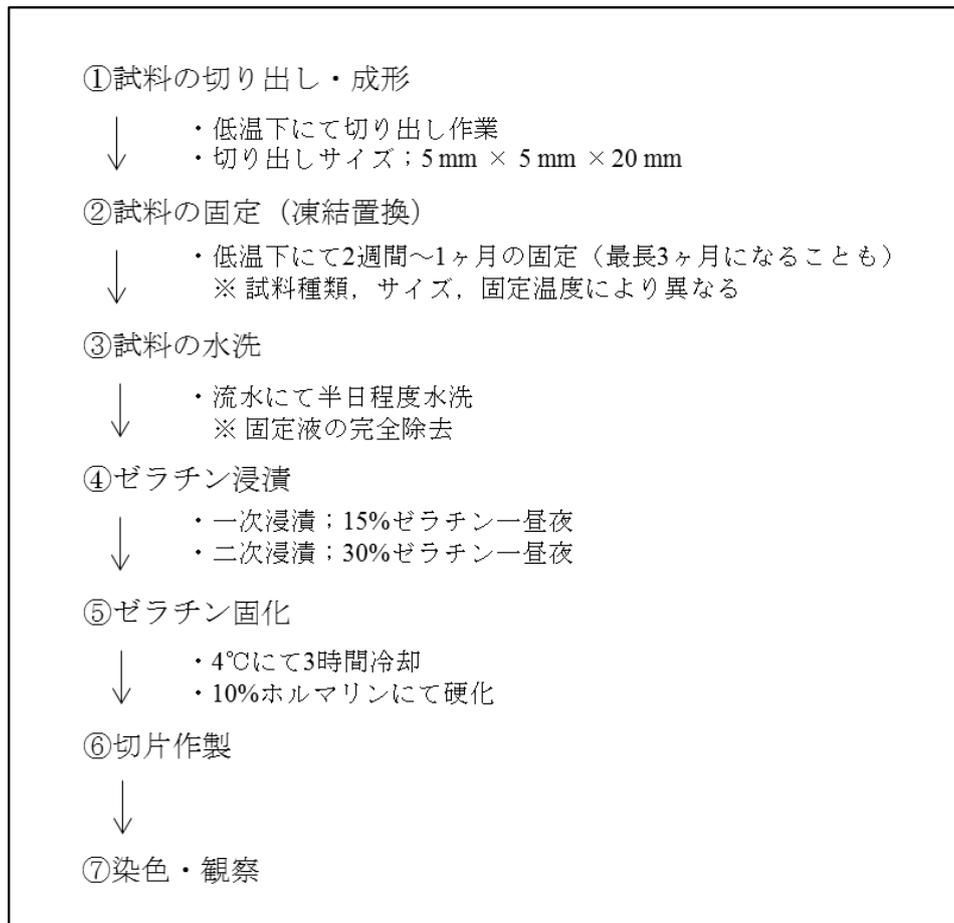


Fig. 2-5 Procedure of microtomy by freeze-substitution method

室温 -20°C 以下の環境下にて $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ の大きさに成形した凍結試料をホルマリン-エタノール（1:9）混合液に浸漬し、 -50°C 冷凍庫内にて約4週間置換及び固定した。凍結置換中は毎日1回以上、緩やかに攪拌するとともに、1週間に1回以上、固定・置換液を交換することによって、溶出した水分により固定・置換液の濃度が低下することを防止した。固定・置換終了後、試料をおよそ半日間流水にて洗浄し、固定・置換液を完全に除去した。次に、 37°C に加温した15%（w/v）ゼラチン溶液に1日浸漬し、その後、同様に加温した30%（w/v）ゼラチン溶液に1日浸漬した。浸漬後、冷蔵庫内にて冷却固化し、試料片を切り出した後、ゼラチン硬化のために10%ホルマリン溶液に入れ、冷蔵保存した。ホルマリン溶液から取り出した試料を蒸留水にて水洗し、庫内温度 $-25\sim -20^{\circ}\text{C}$ に設定した回転式凍結マイクロトームにセットし、目的の部位が露出す

るまでトリミングした。その後，目的部位を表面に露出させた後， $7\ \mu\text{m}$ の厚さにて薄切した。取得した薄切片をヘマトキシリン染色した後，水洗分別，さらにエオシン Y にて染色後，水洗し，顕微鏡標本とした。

2.3.5 氷結晶形状の計測法

化学固定した組織標本の氷結晶痕跡の観察には，顕微鏡用デジタルカメラ (DP-25, Olympus) を接続した正立型光学顕微鏡 (BX50, Olympus) を使用した。また，凍結切片の直接観察については，顕微鏡用冷却加熱装置 (LK-600PM, Lincam, UK) を用いて，冷却ステージを $-20\ ^\circ\text{C}$ 以下に設定し，顕微鏡標本を凍結状態にて観察および撮像した。他方，Rhodamine B により蛍光染色したゼラチンおよび米飯の氷結晶観察には，顕微鏡用冷却加熱装置 (LK-600PM, Lincam, UK) を搭載した蛍光顕微鏡 (BX-51, Olympus) を用いた。なお，この蛍光顕微鏡は水銀ランプを光源とし，励起フィルター (BP520-550, Olympus)，吸収フィルター (BA580IF, Olympus) およびダイクロイックミラー (DM565, Olympus) にて構成される WIG フィルターを利用した。薄切りされた凍結試料を $-20\ ^\circ\text{C}$ に設定した冷却加熱装置上に静置し，凍結状態を維持しながら横断面を観察した。また，蛍光画像の撮影には顕微鏡に接続されたデジタルカメラ (DP-80, Olympus) を用いた。

取得した画像は画像処理ソフトウェア WinROOF (Mitani Corporation) 及び Image J ver.1.46 (National Institute of Health, USA) を用いて，Fig.2-6 の手順により氷結晶形状を計測した。

具体的には，顕微鏡原画像 (Fig.2-6(a)) を色相抽出法により 2 値化し，微粒子除去などの画像修正後 (Fig.2-6(b))，色相反転後に個々の氷結晶を識別 (Fig. 2-6(c)) した後，氷結晶面積 (S)，長径 (ML)，短径 (MW)，長短径比 (ML/MW) を算出した (Fig. 2-7)。

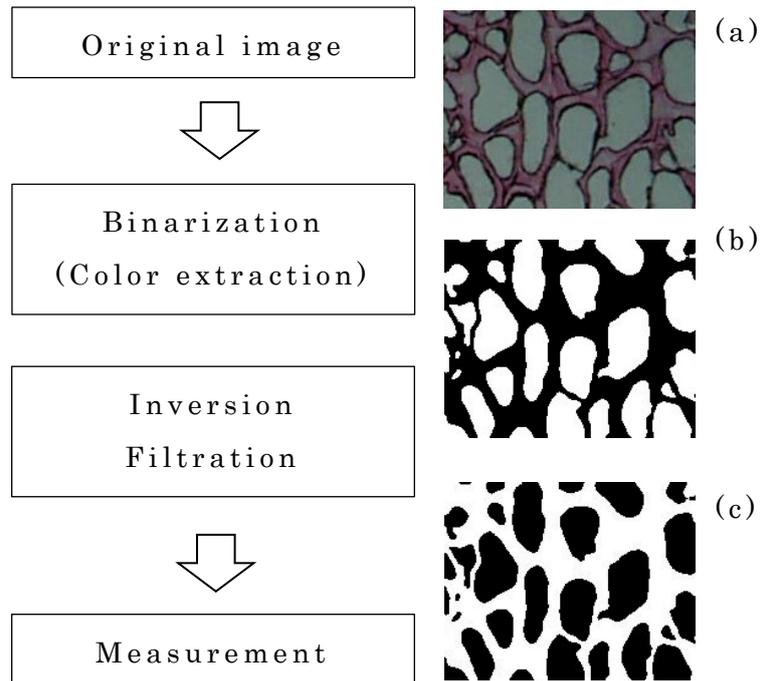


Fig. 2-6 Flow diagram of image analysis

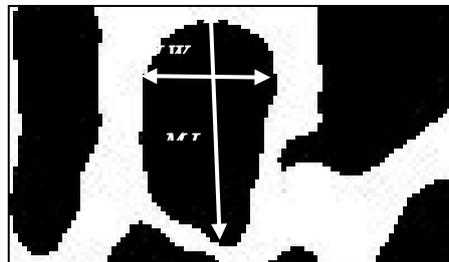


Fig.2-7 Major length ML and minor width MW of ice crystal

また，氷結晶 1 個の面積 S に相当する円の直径を等価円直径 d とし，次式 (2-1) にて与えられる．

$$d = \sqrt{\frac{4S}{\pi}} \quad (2-1)$$

各氷結晶周囲上において最大長となるものを長径 ML とし，その長径に平行な 2 直線間で氷結晶を挟んだ際の最短距離を短径 MW とした．長短径比 ML/MW の値が 1 であれば氷結晶は円もしくはは正方形

を示し、1から増減するほど楕円もしくは長方形の形状を示す。

組織固定・置換前の薄切片の氷結晶面積を S_a と定義し、組織固定・置換後に変化した氷結晶面積を S_b として、組織固定に伴う氷結晶面積変化率 S_c を算出した(2-2)

$$S_c (\%) = \frac{S_b - S_a}{S_a} \times 100 \quad (2-2)$$

なお、 S_c の値がプラスを示すときには、組織固定により氷結晶痕が広がっていることを表し、マイナスの値を示すときには、収縮していることを表している。

また、連続切片画像による氷結晶3次元構造の再構築には3次元構築ソフトウェア Delta Viwer2.1(奈良女子大学 和田ら)を用いた。

2.4 実験結果および考察

2.4.1 化学固定に用いる組織固定・置換液の検討

通常の新鮮凍結切片法を用いた顕微鏡観察用標本の作製過程においては、標本作製前処理における凍結時にて氷結晶が形成され、観察対象の組織に損傷を与える。これらを極力抑制または回避するために、試料サイズを小さくする、液体窒素や $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 程度に冷却した溶媒にて浸漬凍結する、さらに凍結薄切後に適切に解凍するなどの工夫が必要となる。他方、食品組織中に形成される氷結晶を観察・計測するためには、標本作製中に氷結晶またはその痕跡の形状を維持することが重要であり、この点が通常組織観察と大きく異なっている。氷結晶観察・計測のための標本作製する場合、処理中に氷が融解することや細胞が復水することにより氷結晶またはその痕跡が変形し、結果的にアーティファクトが生じる可能性がある。特に、低温粘着フィルムを氷結晶観察・計測に適用する際、薄切した後には化学固定・置換するため、組織が変形を受けやすくなり、氷結晶の融解速度と組織固定速度のバランスが崩れると、容易に氷結晶痕が拡大もしくは収縮すると推察された。

そこで、低温粘着フィルムを凍結食品の標本作製に利用するにあ

たり，化学固定・置換中におけるアーティファクトを最小限に抑える目的で，アルコール系固定液およびアルデヒド系固定液による氷結晶面積の変化を計測および評価し，固定液の種類および最適濃度を検討した．また，化学固定しない凍結切片の直接観察および計測結果を基準値として用いた．この方法は化学固定のための溶液浸漬を行わないため，氷結晶が変形するリスクは少ないが，氷結晶と食品組織の境界面が判断しにくいいため，氷結晶の位置や形状を一つずつ目視にて識別する必要があるが，少ない数の氷結晶を計測することは可能であるが，数多くの氷結晶を計測するためには多くの労力を要するだけでなく，全体像が把握しにくいという欠点がある．したがって，汎用的な氷結晶計測のためには，化学固定および組織染色を用いる手法が必要となる．

まず，低温粘着フィルムを用いて凍結メバチの薄切片を取得し，ステージ温度 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定した顕微鏡用冷却加熱装置を設置した光学顕微鏡にて凍結切片の画像を取得した (Fig. 2-8 (a))．次に，得られた画像から任意の氷結晶について面積を算出し，この平均値を基準とした．この基準とする薄切組織と隣接する薄切片を連続的に取得し，それぞれ 70 %，80%，95 %エタノール溶液，10 %等張ホルマリン溶液，冷アセトン溶液，ホルマリン-エタノール溶液 (1:9) および Carnoy 溶液 (100 %エタノール：クロロホルム：氷酢酸=6:3:1) を用いて，組織固定・置換させた後，再度顕微鏡下にて画像を取得した (Fig. 2-8 (b,c,d))．

Fig. 2-8 の顕微鏡画像より氷結晶面積を計測し，式 2-2 より算出した氷結晶面積変化率を Table 2-2 に示す．これらの結果，10 %等張ホルマリンを用いた固定は変化率 -34.0% となり，氷結晶の面積が小さくなっていることが示された．これは，アルデヒド系固定液の組織固定力は強い反面，その固定速度は遅く，また脱水力も低いいため，融解した水や固定液中の水が筋肉組織へ吸収されたことによると推察され，この固定液では氷結晶を正確に計測できないことが明らかとなった．冷アセトンを用いた組織固定は変化率 -15.6% となり，等張ホルマリンと同様に組織への復水が観察された．また，Carnoy 溶液は，クロロホルムの影響により低温粘着フィルムが収縮変形したため，氷結晶を計測することができなかった．

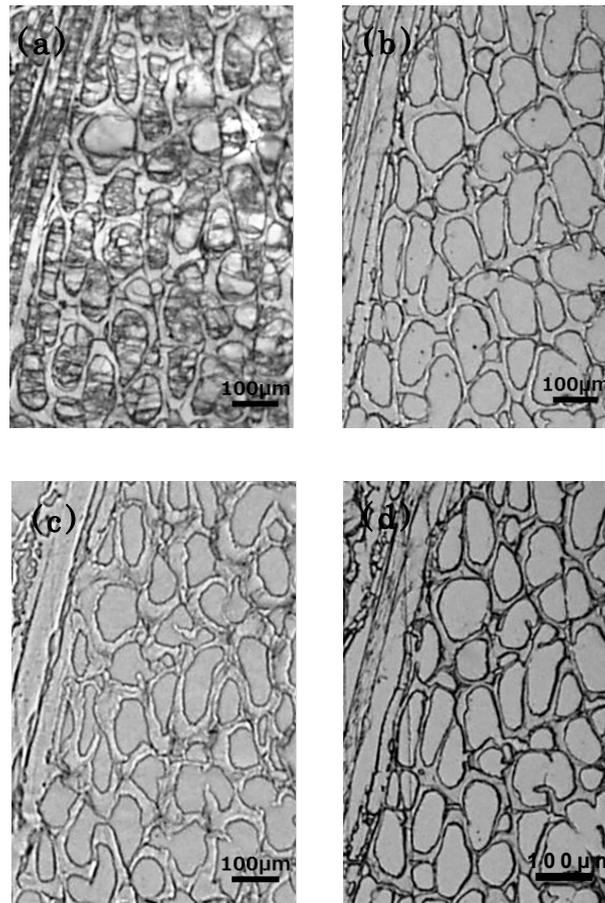


Fig. 2-8 Microscopic images by different fixative solutions (a)unfixed, (b) 10 % Isotonic formalin, (c)70 % Ethanol, (d)95 % Ethanol

Table 2-2 Area change rate of the ice crystal by different fixative solutions

Fixative solution	Average area change rate of ice crystal (%)
70 % Ethanol	0.7
80 % Ethanol	2.3
95 % Ethanol	7.7
10% Isotonic formalin	-34.0
Cold acetone	-15.6
Formalin-ethanol (1:9)	-2.3
Carnoy	—

Replications: $n=10$

他方，アルコール系固定液は強力な脱水作用を有するため，固定後の氷結晶面積が大きくなることが分かった．95 %エタノール溶液を用いた組織固定は，変化率 7.7 %となり組織固定速度より脱水速度が大きかったためと推察された．経験的に，エタノール濃度が高くなると細胞や組織に対する固定力が弱くなり，70～80 %程度の濃度のほうが固定力は強く，収縮が少ないと言われている．80 %および 70 %のエタノール溶液による組織固定は，変化率はそれぞれ 2.3 %および 0.7 %となり，組織固定速度と脱水速度のバランスが優れていることが明らかとなった．特に，70 %エタノール溶液を用いた組織固定は，氷結晶痕が未固定切片の氷結晶とほぼ同等の形状を示し，平均面積変化率もほとんど変化しないことが分かった．すなわち，凍結メバチ筋肉組織の化学固定には 70 %エタノールが適することが明らかとなった．

2.4.2 低温粘着フィルム法と凍結置換法の氷結晶形状の比較

低温粘着フィルム法と従来法である凍結置換法による氷結晶形状を比較するため，Fig. 2-1 に示すように凍結メバチからそれぞれ氷結晶計測用の組織標本を作製した．Fig.2-9 にそれぞれの方法を用いて作製した氷結晶計測組織標本の顕微鏡画像を示す．いずれの方法も氷結晶を有機溶媒により溶出させ，筋肉組織をヘマトキシリンおよびエオシン Y にて染色するため，氷結晶は痕跡として観察され，顕微鏡画像上においては白く抜けた部分がそれに相当する．この結果から，染色性に若干の差異が見られたが，氷結晶痕の形状やサイズについては大きな違いは観察されなかった．次に，それぞれの方法から取得した顕微鏡観察像より氷結晶形状を計測した結果を Table2-3 に示す．これらの結果より，氷結晶の平均面積はわずかに凍結置換法のほうが大きいことが分かった．凍結置換法は，ホルマリン-エタノール混合液に長時間浸漬するため，細胞や組織の脱水収縮が生じ，結果的に氷結晶サイズが大きくなった可能性が示唆された．しかし，長径，短径さらに長短径比の違いはほとんど見られず，標本作製手法の違いによる形状的な差異は小さいことが分かった．これらの結果より，低温粘着フィルム法は，凍結置換法とほぼ同等な氷結晶計測が可能であることが明らかとなった．

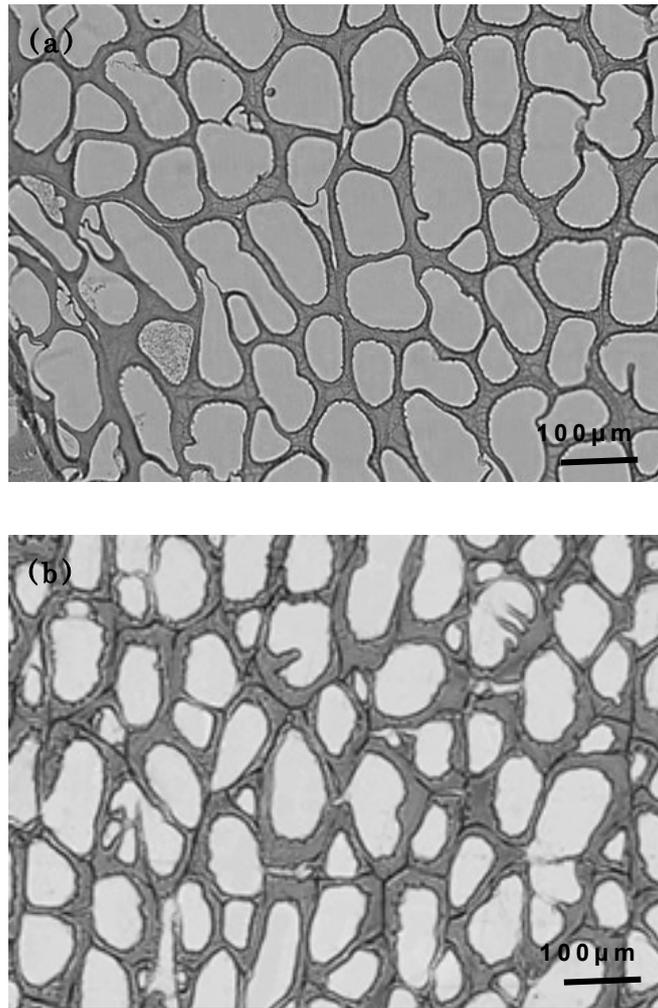


Fig. 2-9 Images of ice crystal morphology by two methods (a): Cryo-adhesive film method (b): Freeze-substitution method.

Table 2-3 Morphological properties of ice crystals with two methods.

	S [μm^2]		d [μm]		ML [μm]		MW [μm]		ML/MW	
	Average	S.D.	Average	S.D.	Average	S.D.	Average	S.D.	Average	S.D.
Cryo-adhesive film method	4024.9	2624.8	71.6	57.8	98.0	38.5	61.3	24.0	1.69	0.49
Substitution method	4217.6	2675.0	73.3	58.4	97.5	48.7	57.6	27.9	1.74	0.52

低温粘着フィルムは凍結点以下においても粘着性を有するため、凍結ミクロトームによる薄切時に支持体として利用できる。このことによって、凍結置換法の標本作製手順を入れ替えることが可能となり、組織固定・置換液への浸漬時間が大幅に短縮され、結果的に従来の凍結置換法の欠点を補うこととなった。これらの結果より、従来法の凍結置換法においては、顕微鏡観察用の標本作製時間が20～30日間要していたのに対し、新手法では20～30分程度にまで短縮することができた。

2.4.3 凍結水産物における氷結晶形状

低温粘着フィルム法を用いて、異なる速度にて凍結させたメバチ筋肉組織の氷結晶を観察した結果を Fig. 2-10 に示す。

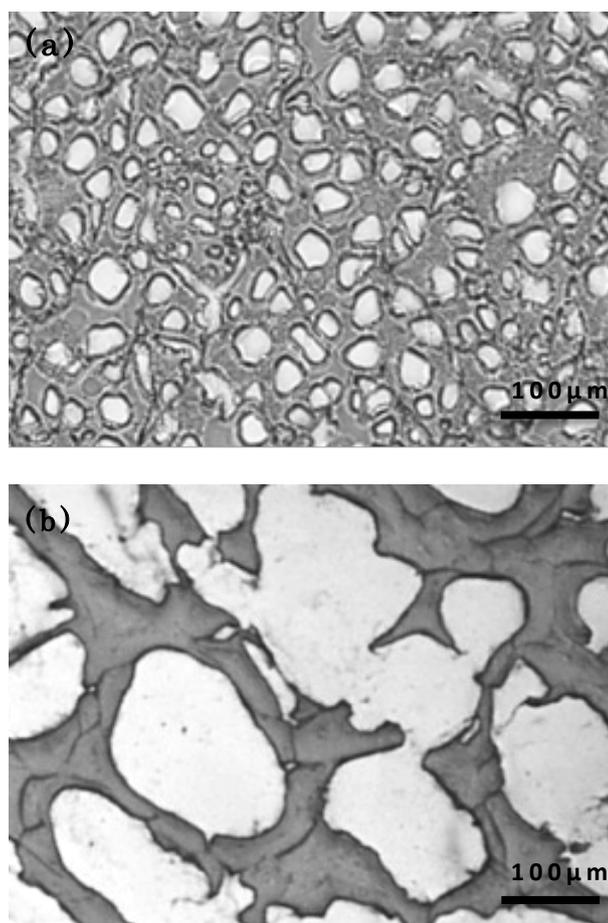


Fig. 2-10 Images of ice crystal morphology by cryo-adhesive film method,
(a): fast frozen tuna meat (b): normal frozen tuna meat.

これらの画像より，急速に凍結された筋肉組織は細胞内に小さな氷が形成されること，さらに，緩慢に凍結されると大きな氷結晶が形成され，細胞や組織に構造的な影響を及ぼし，変形させていることが観察された．この結果より，低温粘着フィルム法は，氷結晶サイズに関わらず，魚肉筋肉組織内に形成される氷結晶を観察・評価する手法として有用であることが示された．

Fig.2-11 に凍結ギンザケの背部筋肉組織，凍結アマエビの腹部筋肉組織および凍結ホタテ貝柱の筋肉組織の氷結晶観察像をそれぞれ示す．エビ類の腹部筋肉構造は複雑に絡み合っていることが報告されており(竹内・高橋，2013)，凍結アマエビ腹部に形成される氷結晶はこの複雑な筋繊維に沿うように形成されていることが明らかとなった (Fig.2-11b)．通常，凍結時の熱の移動方向すなわち冷却方向に沿って氷が成長するのに対し，この結果は，筋肉組織の凍結では冷却方向に関係なく，氷結晶は筋繊維に沿うように形成されることが示された．このように，低温粘着フィルムを用いた標本作製法は，組織内に形成される氷結晶の大きさや形状を計測できるだけでなく，複雑な筋肉組織に対する氷の形成位置や形成方向の観察も可能であった．また，ホタテ貝柱の氷結晶観察においては，筋肉細胞サイズに対して非常に大きな氷が形成されることが分かった (Fig.2-11c)．

このように，低温粘着フィルムを用いた顕微鏡標本作製法は，氷の痕跡を観察および計測することができるだけでなく，組織染色が可能であるため細胞に対する氷の形成位置やサイズ，また細胞や組織への影響も明確に確認できることが明らかとなった．これは従来手法である凍結置換法の特徴そのものであり，食品や生体組織における氷結晶観察の歴史の中で凍結置換法が多用されてきた理由の一つである．したがって，本手法は凍結置換法の特徴を活かしつつ，試料処理速度を向上させた迅速な標本作製手法であるといえる．

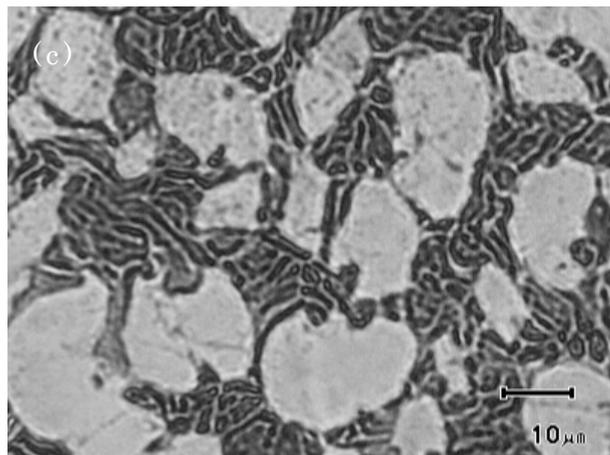
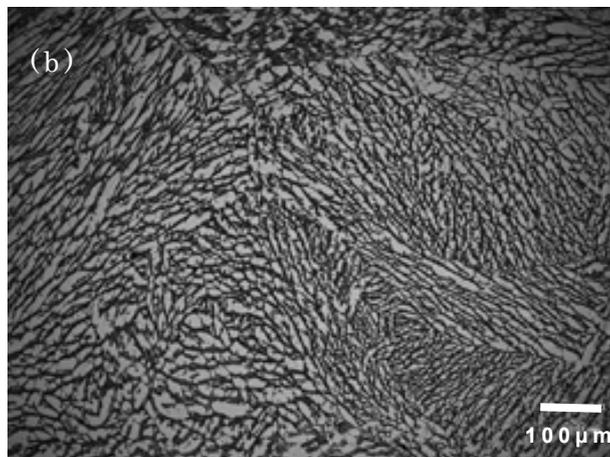
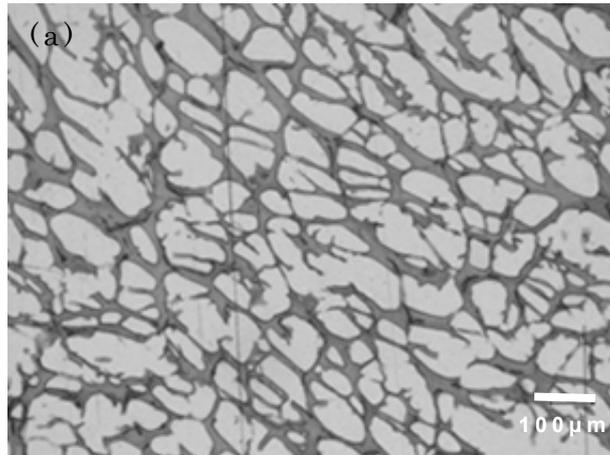


Fig. 2-11 Images of ice crystal morphology by cryo-adhesive film method. (a): Coho salmon (b): Alaskan pink shrimp (c): Scallop adductor

2.4.4 凍結固定による氷結晶観察

低温粘着フィルムと付着性の相性が悪い試料は、化学固定または染色、洗浄の操作段階にて組織変形や薄切片の遊離が生じることもあり、正確な氷結晶計測ができない。そこで、これらの欠点を補うため、凍結状態のまま観察する凍結固定について検討した。

食品材料の凍結時において、氷結晶は溶質または不純物を排除する形にて形成されるため、食品の主要構成要素を染色することによって非染色部を氷とみなすことができ、結果として、氷結晶を観察することが可能となる。したがって、蛍光観察画像内において、氷結晶は低明度部分、すなわち黒色部として示される。凍結ゼラチン内に形成された典型的な氷結晶の顕微鏡観察像を Fig.2-12 に示す。この結果より、蛍光染色、低温粘着フィルムによる薄切片の取得および顕微鏡用冷却装置を利用することによって、ゼラチン内に形成された氷結晶の観察およびサイズ計測が可能となることが明らかとなった。

次に、冷凍米飯内に形成された氷結晶の顕微鏡画像を Fig.2-13 に示す。冷凍米飯内の氷結晶も凍結ゼラチンと同様に、黒色部として示される。この結果より、冷凍米飯内の氷結晶の形状についても、事前の蛍光染色および低温粘着フィルム法により観察および計測が可能となることが示された。

凍結固定による氷結晶観察および計測では、途中の手順にて化学固定をしないため、組織が変形するリスクが少なく、より正確な氷の形状計測が可能になると推察される。凍結固定による手法において、組織を蛍光染色しない状態にて顕微鏡観察することは可能であるが、2.4.1 の Fig.2-8(a) に示すように、氷結晶と食品組織の濃淡差が少なく、氷結晶の位置を一つ一つ目視で識別する必要があるため、数多くの氷結晶を計測するためには多くの労力を要する。したがって、凍結固定により顕微鏡観察および蛍光画像を撮影し、これらから氷結晶を容易に識別するためには、組織染色が必要となる。しかしながら、凍結状態にて染色することは困難であるため、凍結固定による氷結晶観察においては、凍結前に組織染色することが必須となる。魚肉や畜肉の筋肉組織などを事前に染色するためには、これらの組織を染色液に浸漬させることが必要であるが、これによって

組織の水分含量が変化し，結果として氷結晶形状が異なる可能性がある．したがって，凍結固定による氷結晶の観察は，試料調製時に蛍光染色試薬を均等に混ぜ込むことが可能な食品に適すると推察された．

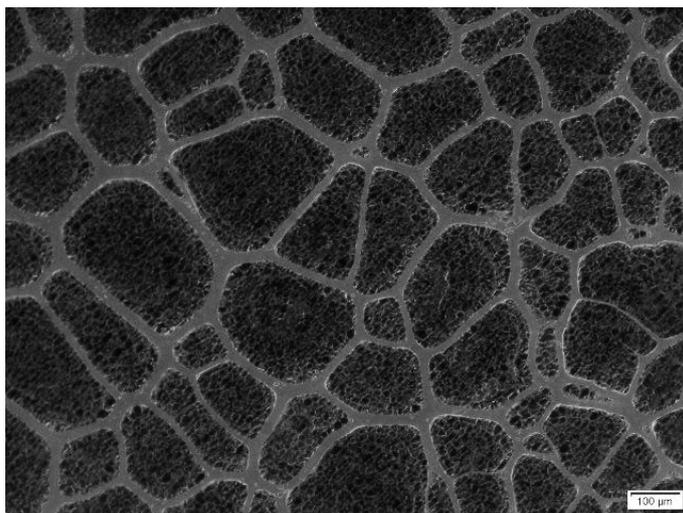


Fig.2-12 Cross sectional image of ice crystal in frozen gelatin

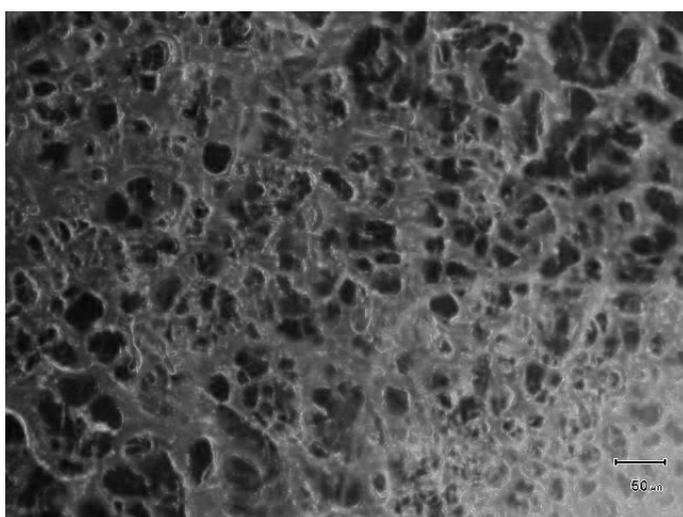


Fig.2-13 Cross sectional image of ice crystal in frozen cooked rice

2.4.5 氷結晶 3次元像の再構築

従来の凍結置換法は、ゼラチン、パラフィンまたは樹脂などを用いて包埋し、試料に硬度を持たせることにより、薄切することが可能となる。しかし、薄切時に試料の破損やロールなどが生じやすいため、氷結晶および組織観察・計測用の薄切片を取得するのは容易でない。他方、低温粘着フィルム法は、フィルムが薄切時の支持体となるため、試料破損やロールが生じにくく、切片の取得が容易となる。したがって、従来の凍結置換法では困難であった連続切片の取得が可能となる。

急速凍結および通常凍結したメバチマグロの凍結組織を用いて、それぞれ連続した100枚の氷結晶観察用の薄切片を低温粘着フィルム法により取得した。次に、それぞれの組織片をヘマトキシリンとエオシンYにて多重染色し、連続組織片の顕微鏡画像を撮影した後、3次元構築ソフトウェア上にて氷結晶3次元再構築像を作成した。Fig.2-14(a)および(c)は連続切片画像から氷結晶部分のみを抽出し、再構築した3次元像である。また、Fig.2-14(b)および(d)の断面像はそれぞれの再構築した3次元像の最上部に相当する組織観察画像である。

再構築された氷結晶3次元像（Fig.2-14(a), (c)）より、急速凍結により形成された氷結晶の形状は筋繊維方向に対し平行な氷柱となることが示された。他方、通常凍結により形成された氷結晶も、急速凍結と同様に筋繊維方向に対して平行な氷柱となるが、氷結晶が大きく成長しているため、細胞を圧迫変形させ、押しつけるような状態となっていることが分かった。この結果が示すように、これまで魚肉筋繊維に対して横断面または縦断面のみにて観察していた氷結晶構造や組織状態を、高精度で高価な測定機器を使用することなく、3次元的に観察することが可能となった。

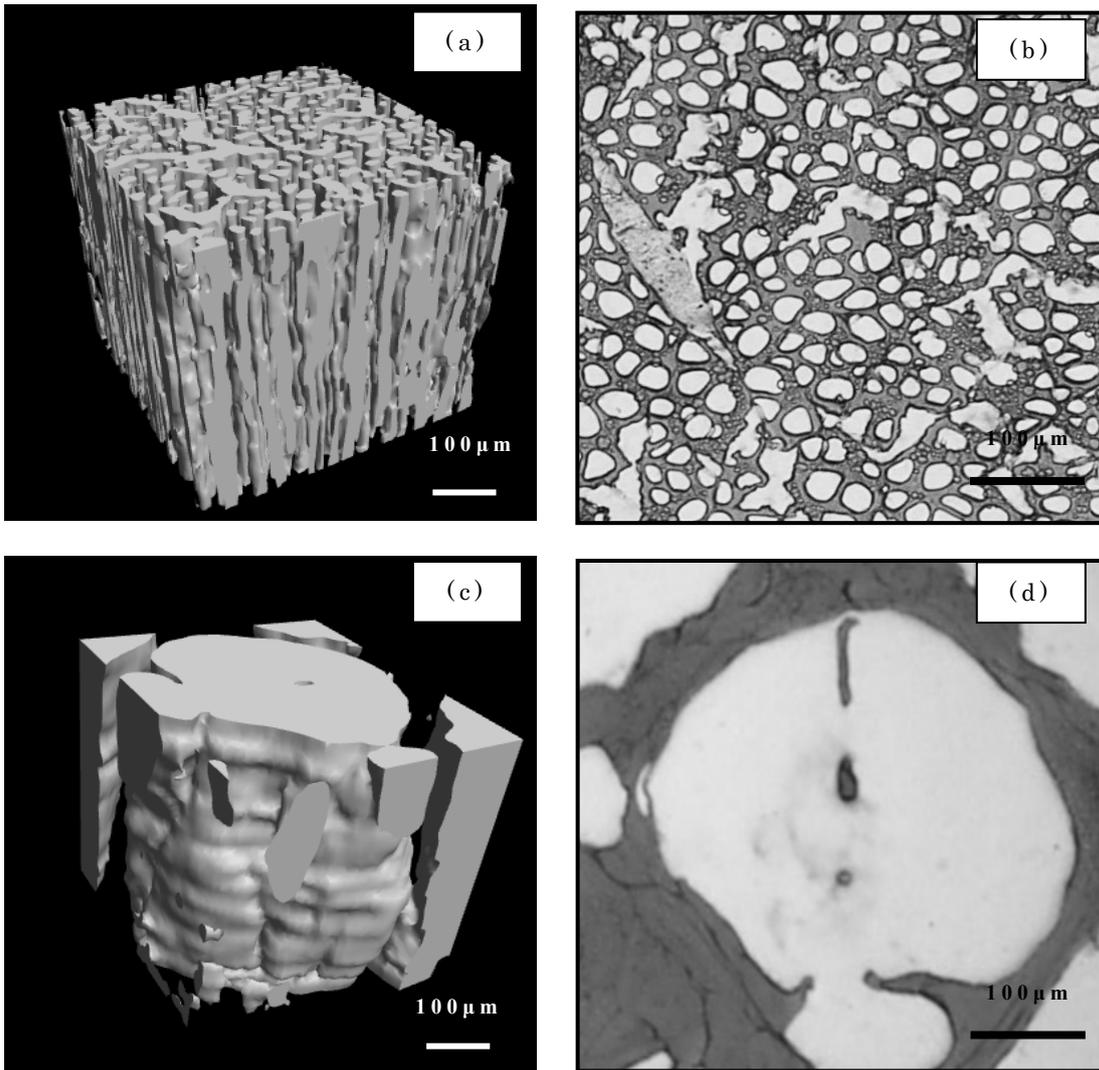


Fig. 2-14 Observation of ice crystals morphology

(a): Reconstructed 3-D of ice crystal in quick-frozen tuna meat, (b): Cross-section of quick-frozen tuna meat, (c): Reconstructed 3-D of ice crystal in normal-frozen tuna meat, (d): Cross-section of normal-frozen tuna meat

2.5 要約

氷結晶観察および計測のための標本作製手法の一つである凍結置換法は、その汎用性の高さや低コストであるという利点から、現在でも多くの研究に用いられている。しかしながら、従来の凍結置換法では標本作製に20～30日間も時間を要するという欠点も持ち合わせている。そこで、従来の凍結置換法の欠点を補うため、医学病理学分野において利用されている低温粘着フィルムを応用することにより、迅速かつ簡易な氷結晶計測のための標本作製法を提唱し、この方法により試料作製時間が20～30分に短縮された。

具体的には、低温粘着フィルムを用いて取得した薄切片を化学固定または凍結固定する手法の2つについて検討した。化学固定する方法として、供試材料として凍結メバチ筋肉組織を用い、氷結晶サイズを基準とし計測に適する組織固定・置換液の種類を検討した。また、低温粘着フィルムを用いることにより標本作製の手順を入れ替えることが可能となり、組織固定・置換液浸漬時間が大幅に短縮され、結果的に凍結置換法の欠点を補うことになった。さらに、低温粘着フィルム法と凍結置換法のそれぞれから得られる氷結晶形状を比較するため、同一個体の筋肉組織から採取した試料を用いて、それぞれの手法にて計測用の標本作製した。これらの顕微鏡画像から得られた氷結晶に関するデータを比較した結果、氷結晶の大きさや形状については顕著な相違は観察されず、本手法は従来手法とほぼ同等の氷結晶計測用標本作製することが可能であることを確認した。

次に、凍結固定する方法として、調製時に蛍光染色物質を均一に混合させた試料、ここではゼラチンと米飯を用いて氷結晶を蛍光観察した。この方法は化学的に固定しないため、低温粘着フィルムと付着性の良くない組織の氷結晶観察に適しており、さらに、組織が変形するリスクが低く、より正確な氷の形状計測が可能となると示唆された。しかしながら、試料調製時に染色することが必要であるため、凍結固定法は、魚肉や畜肉、植物などの組織、すなわち生鮮品などの試料には適さないと考えられた。

低温粘着フィルムを用いることによって、物理的な固定が可能で

あるため，化学固定を行うことなく薄切が可能となる．薄切後の試料を有機溶媒などによって化学的に固定するのか，または凍結状態を維持したまま観察する凍結固定を採用するは，その種類や調製方法，さらに観察目的に応じて選択する必要がある．

また，氷結晶 3 次元像も容易に再構築することができ，魚肉筋肉の凍結組織中においては筋繊維方向に対して平行な氷柱が形成されることを 3 次元的に可視化することができた．これらのことより，低温粘着フィルムを用いた氷結晶計測法は，従来手法と比較し，標本作製時間を大幅に削減することができる新たな手法となることが分かった．

第 3 章 凍結サーモンフィレの表面色変化の解明

3.1 研究の目的

凍結食品中に形成される氷結晶は、食品の内部組織破壊に起因するテクスチャー変化やドリップ流出などによる成分変化だけでなく、その外観色、すなわち見た目にも影響を及ぼすことがある。食品の外観色は消費者の購買意欲に直接関係するものであるため、市場取引においても評価基準の一つとしている食品があり、その典型的な代表例がサーモンの取引市場である。世界におけるサーモンの消費量は年々増加しており、2015年には生産量が約434万トンにまで増加している(FAO, 2015)。凍結サーモンの市場取引などにおいては、フィレ切断面の外観色が伝統的に評価基準とされ、濃い赤色の肉色を保有するサーモンは高価格にて取引されている。そのため、市場取引で用いるために、その魚肉色の主成分であるアスタキサンチン量を指標とした等級選別用のカラーカード(Fig.3-1)が作成されている(Skrede et al., 1990)。



Fig.3-1 SalmoFan™ (Roshe)

他方,急速凍結された高品質サーモンのフィレは一時的な表面色彩消失現象,すなわち白色化が観察され,この現象は長期凍結保存により生じる冷凍ヤケ(Arroyo Mora et al., 2007)やプロテオリシス現象(Akino et al., 2010)と混同されることも相まって,一般的にサーモン取引市場においては好まれないとされている.これらの視覚による色彩観察結果,すなわち白色化は,アスタキサンチン量の変化ではなく,凍結速度の差異に起因する氷結晶サイズに影響されていると推察されている(Ottestad et al., 2011).このため,氷結晶サイズと外観色の関係を精度よく計測する客観的な品質評価法を実現する技術の開発が望まれている.このように氷結晶形状と外観色の関係を明らかにすることは,目的とする外観品質を得るための凍結条件を探索することや,市場取引における品質評価法の技術開発による客観的価格形成にも貢献すると考えられる.

そこで本章では,まず,外観色を定量化できる **Computer Vision System** を導入した手法を開発し,また,第2章にて開発した低恩粘着フィルムを用いる氷結晶計測法を用い,モデル食品としてゼラチン内に形成される氷結晶サイズが外観色に及ぼす影響について評価し,最終的に,凍結サーモンフィレ表面の色彩変化と凍結速度および氷結晶サイズの関係について定量的に明らかにすることを目的とした.

3.2 実験材料および方法

3.2.1 ゼラチン試料の調製法

氷結晶計測に用いたゼラチンは第2章の2.3.2に述べた試料調整法と同様の方法にて調製した.

また,凍結装置内における衝突噴流の影響を避けながらゼラチンサンプルの表層面の温度を計測するために,T型熱電対を試料の底面より挿入し,表面より1mmの深さにて計測した(Fig. 3-2).

試料の凍結は,連続衝突噴流式コンベヤフリーザー(TJ Freezer, Mayekawa)(Fig.3-3)およびMedical Freezer(MFD-U536, SANYO)を用い,設定温度 $-25\sim-35\text{ }^{\circ}\text{C}$,庫内風速 $0.0\sim 15.0\text{ m/s}$ の範囲にて試験した.

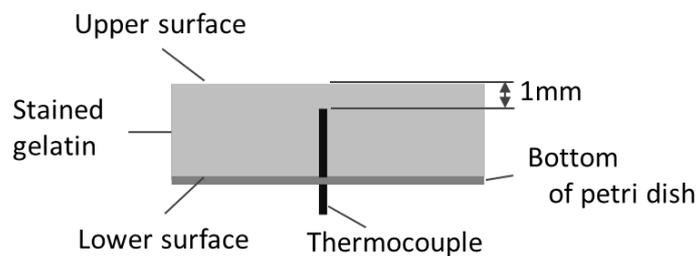


Fig. 3-2 Thermocouple arrangements in the gelatin

凍結速度は式（3-1）に示すように，最大氷結晶生成帯の温度領域すなわち $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ から $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ を通過する時間を凍結時間（min）とし，この温度域における凍結曲線の傾きを速度（ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ）とした．

$$\text{凍結速度 } (^{\circ}\text{C}/\text{min}) = \frac{T_2 - T_1}{t_2 - t_1} \quad (3-1)$$

ここで， $T_1: 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $T_2: -5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $(t_2 - t_1): 0 \sim -5\text{ }^{\circ}\text{C}$ の通過時間（min）を示す．



Fig.3-3 Image of impingement freezer

3.2.2 サーモン試料の調製法

HG (head and gut removed) 凍結されたチリ産養殖ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*) を供試試料とした。室温にて試料を解凍後、フィレ状態となるように背骨に沿って裁割した。裁割された皮付きフィレ (0.9~1.0 kg, 厚さ 28~32 mm) を、6%の塩分濃度の調製液に一昼夜浸漬させ (定塩法)、流通形態と同様の状態とした。浸漬後、ポリエチレンバッグに試料を入れ、真空包装した後、4°C に設定した冷蔵庫にて保管した。

真空包装サーモンフィレは、水産物の凍結において一般的に利用されている -25°C ~ -35°C の温度範囲にて凍結した。急速凍結には、庫内温度 -35°C, 風速 15.0 m/s に設定した連続衝突噴流式コンベヤフリーザーを用いた。また、通常凍結には -25°C, 風速 0.0 m/s に設定した Medical Freezer を用いた。急速凍結にて用いた連続衝突噴流式フリーザーは、コンベヤベルトおよび衝突噴流式ノズルを有するトンネル式凍結システムにて構成されており、試料はメッシュコンベヤベルト上にて、上下から断続的に噴出される冷却空気によって凍結される。試料の中心温度は T 型熱電対を用いて計測および記録され、-20°C に到達した時点において試料の凍結終了とした。凍結後の試料は -25°C に設定した冷凍庫にて保管され、また試料の解凍はポリエチレンバッグに入れたまま、4°C に設定された冷蔵庫内にて 8 時間静置した。

氷結晶計測用の試料は、解凍サーモンフィレ背側筋肉より直径 23 mm のコルクボーラーにて円柱状に抜き取り、30 mm の高さに成形した後、Fig.3-4 に示すテフロン製の試料ホルダに詰めた。

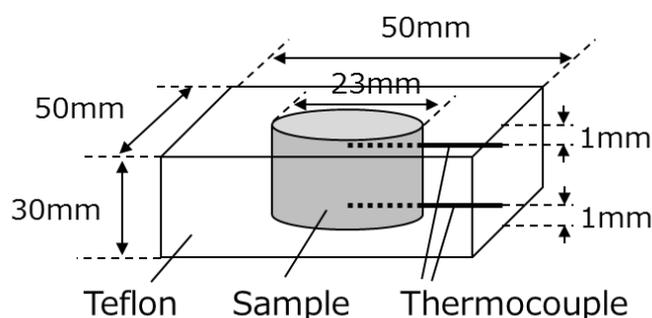


Fig. 3-4 Schematic diagram of the salmon muscle for freezing test.

この試料ホルダは中央部に直径 23 mm の貫通穴が開いており、この貫通穴に充填した魚肉の上面と下面をそれぞれホルダ上面と下面に対して同一平面となるように整形した。魚肉を充填したホルダを厚さ 0.08 mm の高密度ポリエチレンバッグに入れ、密閉脱気包装した。脱気状態を維持したまま試料ホルダ側面から T 型シース熱電対を差し込み、試料中央部表面下 1.0 mm の位置にて試料温度を計測した。また、試料の凍結は前述したゼラチン凍結試験と同条件とした。

3.2.3 Computer vision system を用いた表面色計測法

ゼラチンおよびサーモン試料の色彩計測には Computer vision system (CVS) (Kong et al., 2007; Sun, 2004; Yam and Papadakis, 2004)を用いた。具体的には、Fig.3-5 に示した撮影装置内にてデジタルカメラ (DP-40, NIKON) を用いて撮影、その後、取得した画像を画像解析ソフト上にて色変換した。デジタルカメラから被写体までの距離を 200 mm とし、光源は昼白色蛍光灯 (FL-10N 10W, 色温度 5500K, MITSUBISHI) を用い、計測時には被写体照度をおよそ 1500 lux となるように調整した。光源と試料、デジタルカメラの位置関係は、試料面の法線に対して光源位置が 45° 、受光器すなわちデジタルカメラは試料面の法線に対し 0° となるように設置した。

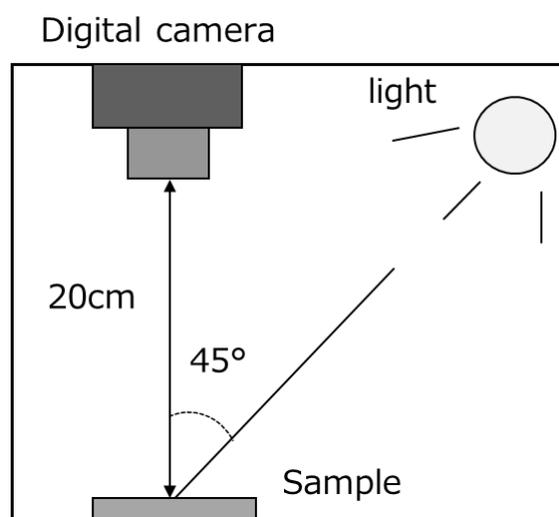


Fig.3-5 Schematic diagram of photographic condition for sRGB value measurement by digital camera.

撮影用デジタルカメラに単焦点レンズ（AF-S DX NIKKOR 35 mm f/1.8G, NIKON）を装着させ、シャッター速度 1/30, 絞り値 F 14.0 に固定し、撮影直前にグレーカード（GIN-ICHI）にてホワイトバランスを調整した。また、カメラ記録方式は TIFF 非圧縮にて 3002 × 2000 ピクセルの解像度として撮影した。

凍結サーモンの深さ方向、すなわち垂直断面に対する色計測については、試料表面に対し垂直方向に割断し、熱流方向に沿って割断面の表面を撮影した。取得した画像より表面から深さ 0.3 mm ずつ長方形に領域を切り出し、それぞれの領域において色彩を計測した。また、全ての実験は 5 回以上繰り返し、それらの平均値にて示した。

3.2.4 色彩データ処理法

得られたデジタル画像より画像処理ソフト Image J ver.1.46 (National Institutes of Health, USA) (Schneider et al., 2012) を用いて、試料の R , G , B 平均値を算出した。さらに算出した R , G , B 値を (3-2~4) に示す式 (Shimizu, 2006; Yam and Papadakis, 2004) にて CIE XYZ (X , Y , Z 値) に変換した。

$$X = 100 \left\{ 0.3933 \left(\frac{R}{255} \right)^{2.2} + 0.3651 \left(\frac{G}{255} \right)^{2.2} + 0.1903 \left(\frac{B}{255} \right)^{2.2} \right\} \quad (3-2)$$

$$Y = 100 \left\{ 0.2123 \left(\frac{R}{255} \right)^{2.2} + 0.7010 \left(\frac{G}{255} \right)^{2.2} + 0.0858 \left(\frac{B}{255} \right)^{2.2} \right\} \quad (3-3)$$

$$Z = 100 \left\{ 0.0182 \left(\frac{R}{255} \right)^{2.2} + 0.1117 \left(\frac{G}{255} \right)^{2.2} + 0.9570 \left(\frac{B}{255} \right)^{2.2} \right\} \quad (3-4)$$

ここで、ディスプレイのガンマ補正值として 2.2 を使用した。次に (3-5~7) にて示す式 (Shimizu, 2006) により、 X , Y , Z 値から、CIE LAB 表色系 (L^* , a^* , b^* 値) へ変換した。

$$L^* = 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16 \quad (3-5)$$

$$a^* = 500 \left\{ \left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right\} \quad (3-6)$$

$$b^* = 200 \left\{ \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right\} \quad (3-7)$$

ここで、D65 標準光下への変換として $X_n=95.043$, $Y_n=100.000$, $Z_n=108.879$ を用いた (Shimizu, 2006). 算出された $L^*a^*b^*$ 値のカラー画像への再変換は、色だし名人 Pro(Color Dream Net, 2013) を用いて再構成した。

3.2.5 氷結晶計測法

氷結晶計測のための凍結ゼラチン試料は、 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ に冷却したナイフを用いて、凍結時の熱流方向に沿って表面から垂直方向に切り出した。切り出された試料について、ヘキサノードライアイス溶液下にて凍結組織包埋剤 Tissue-Tek O.C.T (SAKURA Finetek) を用いて凍結包埋した。

凍結ゼラチン内の氷結晶計測に用いた顕微鏡標本は、第 2 章 2.3.3 に述べた凍結固定による方法と同じ手順にて作製した。また、これらからの氷結晶画像取得については、第 2 章 2.3.5 と同様の方法にて蛍光観察および画像を取得した。

他方、サーモン試料の氷結晶計測には、第 2 章 2.3.3 にて記述した低温粘着フィルムを用いた化学固定による顕微鏡標本作製法を用いた。凍結サーモンは、 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ に冷却したナイフを用いて、凍結用ホルダの上面または下面から表面に対して垂直方向に切り出し、氷結晶計測の試料とした。次に、ゼラチン試料と同様の方法にて薄切片を作製したが、サーモン試料はゼラチン試料と異なり、表面から垂直方向に対する断面における顕微鏡観察を行った。取得した薄切片は 70%エタノールに 2 分間浸漬させ化学固定と置換した後、ヘマトキシリンおよびエオシン Y にて組織染色した。デジタルカメラが接続された光学顕微鏡 (BX-51, Olympus) にて薄切片の顕微鏡画像を

取得した後，Image J ver.1.46にて解析した．

取得した画像からの氷結晶計測については第2章2.3.5と同様な方法を用い，氷結晶1個の面積に相当する円の直径を等価円直径とし，第2章2.3.5に示す式(2-1)にて算出した．また，氷結晶面積比は任意の面積中における氷結晶面積を百分率にて示した．

3.2.6 カロテノイド測定法

粉碎試料5gにアセトン20mlを加え，ホモジナイズ後，遠心分離(1400×g, 10分間)し，これを上澄み液が着色しなくなるまで繰り返した．集めた上澄み液の溶媒を除去後，ジエチルエーテルにて溶解し，これに水を加えて分配・水洗を数回繰り返した．水洗後，ジエチルエーテル部分を除去し，アセトンにて定溶した後に477nmの吸光度を測定した．カロテノイド量は，吸光度にアスタキサンチン吸光係数 $E^{1\%}_{1cm}=2,200$ を用いて算出した(佃, 1974)．

3.2.7 統計解析法

FigureおよびTable中の値は平均値±標準偏差にて示した．また，平均値の差の検定は，JMP 11.0 software (SAS Inst., Inc., Cary, N. C., USA)を用いて，Tukey HSD多重比較検定にて解析し，有意水準5%を有意差ありと判定した．

3.3 実験結果および考察

3.3.1 調整CVSの評価

筋肉組織やゼラチンのような半透明物質の色彩計測において，市販の接触式カラーリーダーを使用すると，色彩計測値は物質内の拡散反射(エッジロスエラー)による影響を受ける(Osumi and Sano, 2011)．したがって，この現象を避けるために，本研究ではデジタルカメラを用いた非接触計測法を採用した．デジタルカメラを用いて，染色されたゼラチンおよびサーモンの色彩に近い標準色票(3YR, 日本色彩研究所)を撮影し，得られた $L^*a^*b^*$ 値と標準色票に対応する標準データを比較し，CVSの調整および評価した．

ここで、CVS の調整は主にデジタルカメラのシャッター速度と絞り値を調整した。Fig.3-6 に示すように、調整 CVS により得られた $L^*a^*b^*$ 値は標準色票の標準データとの間に高い相関が示されたことより、試料表面色を正確に計測できるツールとなることが分かった。

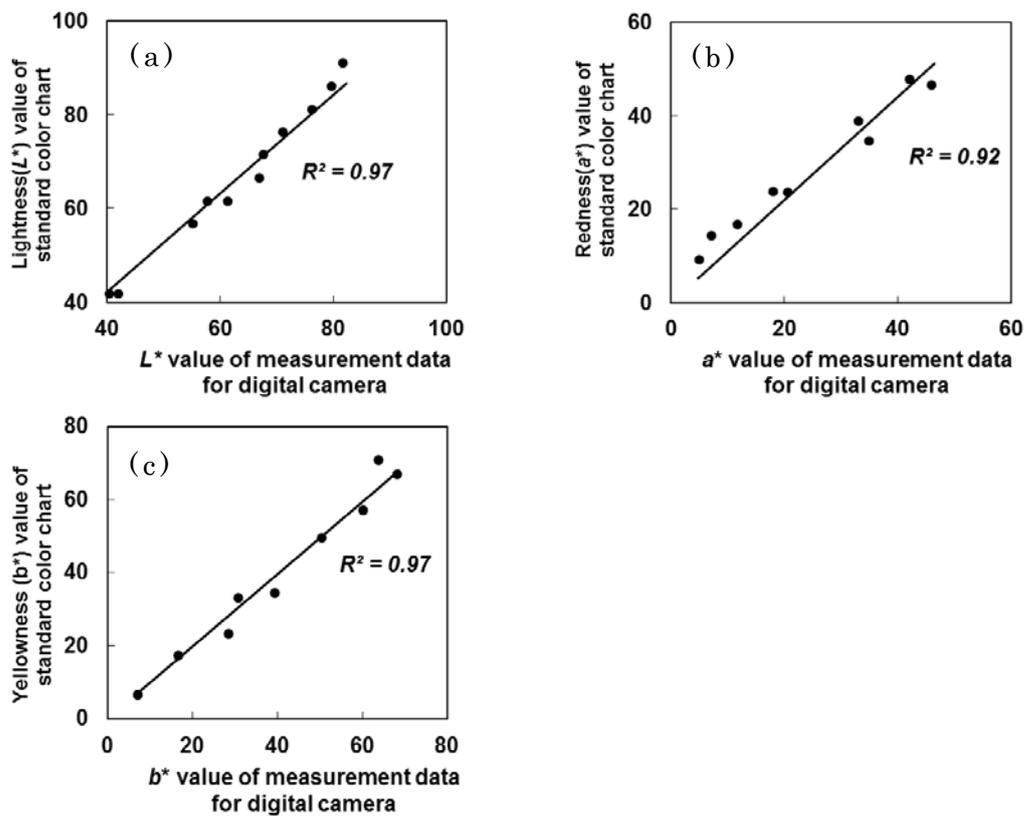


Fig.3-6 Calibration accuracy between the value of standard color chart and measured data with digital camera.

(a) L^* value, (b) a^* value, (c) b^* value

Table 3-1 Comparison for measured and retranslated to color image and $L^*a^*b^*$ values of gelatin between CVS and contact color reader

Condition	Image of gelatin	Measured and retranslated to color image and CIE $L^*a^*b^*$ value	
		CVS	Contact color reader
Before freezing			
		$L^*=40.8$	$L^*=20.9$
		$a^*=11.7$ $b^*=6.1$	$a^*=24.1$ $b^*=9.7$
After Fast freezing			
		$L^*=75.5$	$L^*=72.6$
		$a^*=36.3$ $b^*=2.2$	$a^*=37.2$ $b^*=-0.2$
After Normal freezing			
		$L^*=52.6$	$L^*=44.4$
		$a^*=61.5$ $b^*=34.3$	$a^*=13.0$ $b^*=5.9$

次に，凍結前，急速凍結および通常凍結後のゼラチンを調整 CVS と接触式カラーリーダー（CR-13, Konica Minolta）を用いてそれぞれ計測し，得られたデータについて色変換ソフトを用いてカラー画像へ再変換した結果を Table 3-1 に示す。

急速凍結したゼラチンは，凍結前および通常凍結後のゼラチンより明らかに色彩が薄く，くすんでいることが示された。また，急速凍結したゼラチンの色彩は，CVS および接触式カラーリーダーともに似通った外観色に再変換された。これは，急速凍結ゼラチンの表面は光反射率が大きいため，接触式カラーリーダーを用いても比較的正確な計測が可能であると推察された。他方，凍結前および通常凍結のゼラチンでは，エッジロスエラーが生じているため，接触式

の色彩計測機器を用いると発した光がゼラチン内部において拡散されたため，計測器の受光部に戻ってくる光が少なく，結果として実際の色彩より暗い色として計測された．この結果より，接触式カラーリーダーによる色計測では，正確な値が計測できないことが明らかとなった．

3.3.2 凍結ゼラチンの氷結晶サイズと表面色の関係

Fig.3-7(a)は Medical Freezer を用いた典型的な通常凍結ゼラチンの氷結晶観察像であり，大きな氷結晶および明確な凍結濃縮相が観察された．他方，Fig.3-7(b)に示されるように，衝突噴流式コンベヤフリーザーを用いて急速に凍結したゼラチンは，微小な氷結晶が数多く形成されていることが観察された．

次に，さまざまな条件において凍結させたゼラチンの顕微鏡画像から氷結晶を計測し，等価円直径と凍結速度の逆数との関係を両対数プロットにて Fig.3-8 に示したところ，凍結速度が増加するにつれて等価円直径は減少することが明らかとなり，凍結速度 $0.011 \sim 0.757 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ すなわちその逆数では $1.31 \sim 90.0 \text{ min}/^{\circ}\text{C}$ の範囲においては，等価円直径は $20 \sim 450 \text{ }\mu\text{m}$ の範囲となることが明らかとなった．

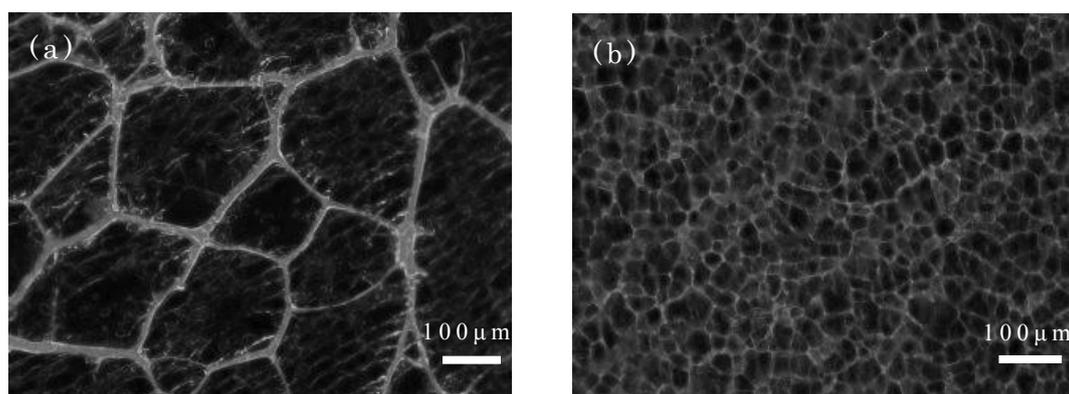


Fig.3-7 Cross sectional images of ice crystal in frozen gelatin. (a) normal frozen (freezing rate = $0.026^{\circ}\text{C}/\text{min}$), (b) fast frozen (freezing rate = $0.757^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

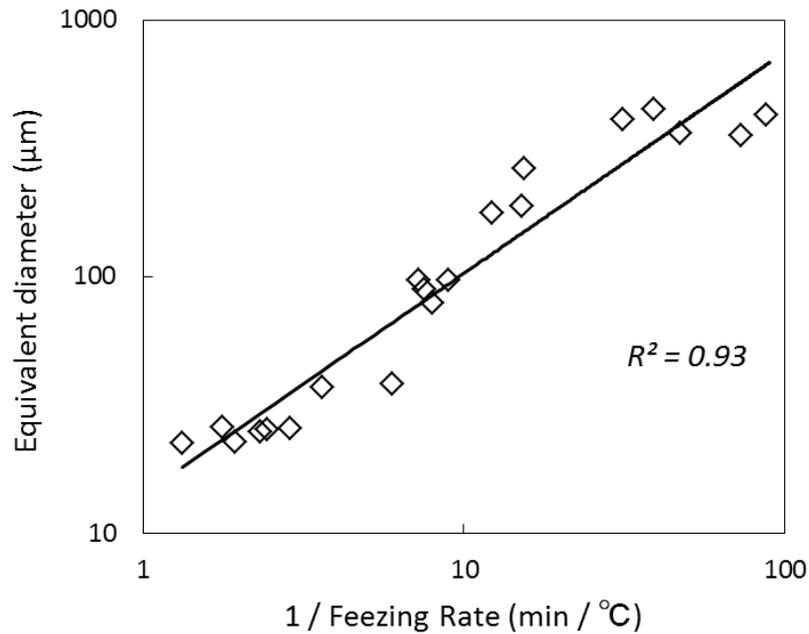


Fig.3-8 Ice crystal diameter against freezing rate

また，平均等価円直径と氷結晶面積比率の関係について，片対数プロットにて Fig.3-9 に示した．この結果より，等価円直径が大きくなると，氷結晶面積比も大きくなることが分かった．ゼラチンが凍結する際に，ゼラチンの組織内に保持されていた水分子が氷の界面に集まり氷結晶が成長するが，凍結速度が速いと，水分子が十分移動できない状態で温度が低下し凝固するため，小さな氷が形成されるとともに，ゼラチンの組織内から移動できない水分子も多く存在していると考えられた．すなわち，光学顕微鏡では観察できないほど微小な氷がゼラチンの組織内に形成されていると推察された．反対に，凍結速度が遅いと，水分子がゼラチン組織内から移動できる時間が十分にあるため，数多くの水分子が集まり，ゼラチン組織を変形させるほどの大きな氷が形成されるだけでなく，見かけ上の氷結晶面積比も大きくなったと推察された．すなわち，凍結速度の違いは，ゼラチン組織内からの水分子の移動速度，結果として氷結晶に集合した水分子の量の違いとなって観察・計測された．また，等価円直径 20~450 μm の範囲においては，氷結晶面積比は 61~89 % の範囲となった．

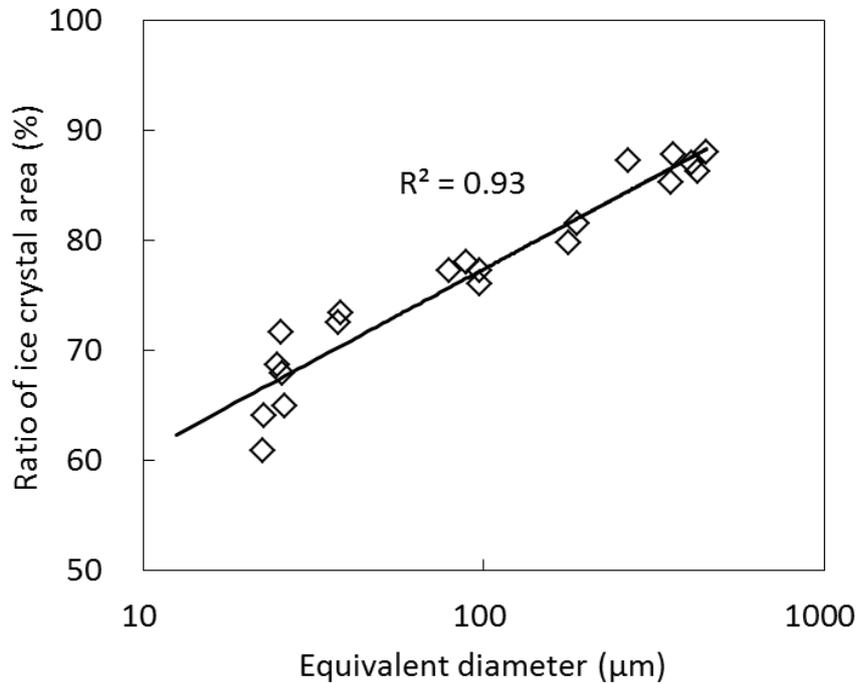


Fig.3-9 Relationship between equivalent diameter and ratio of ice crystal area

さらに、等価円直径と色彩計測値 (L^* , a^* , b^*) についてのそれぞれの関係を Fig.3-10 に示した。なお、ここでは等価円直径を対数とした片対数グラフにて示している。 L^* および a^* 値と等価円直径の関係については、それぞれ対数近似曲線において高い決定係数が示された。加えて、 b^* 値と等価円直径の関係では二次関数の曲線にて近似された。等価円直径が減少するにつれてゼラチン表面は L^* 値が増加し、 a^* および b^* 値が減少する、すなわち外観上白濁することが示された。この現象は、急速凍結によりゼラチン表層に形成された微小かつ多数の氷結晶が表面および表層面における光乱反射を引き起こしているためであると推察された。食品モデルとして用いたゼラチン試料から得られた結果より、凍結速度、氷結晶サイズおよび表面色の関係を定量的に示すことが可能となった。

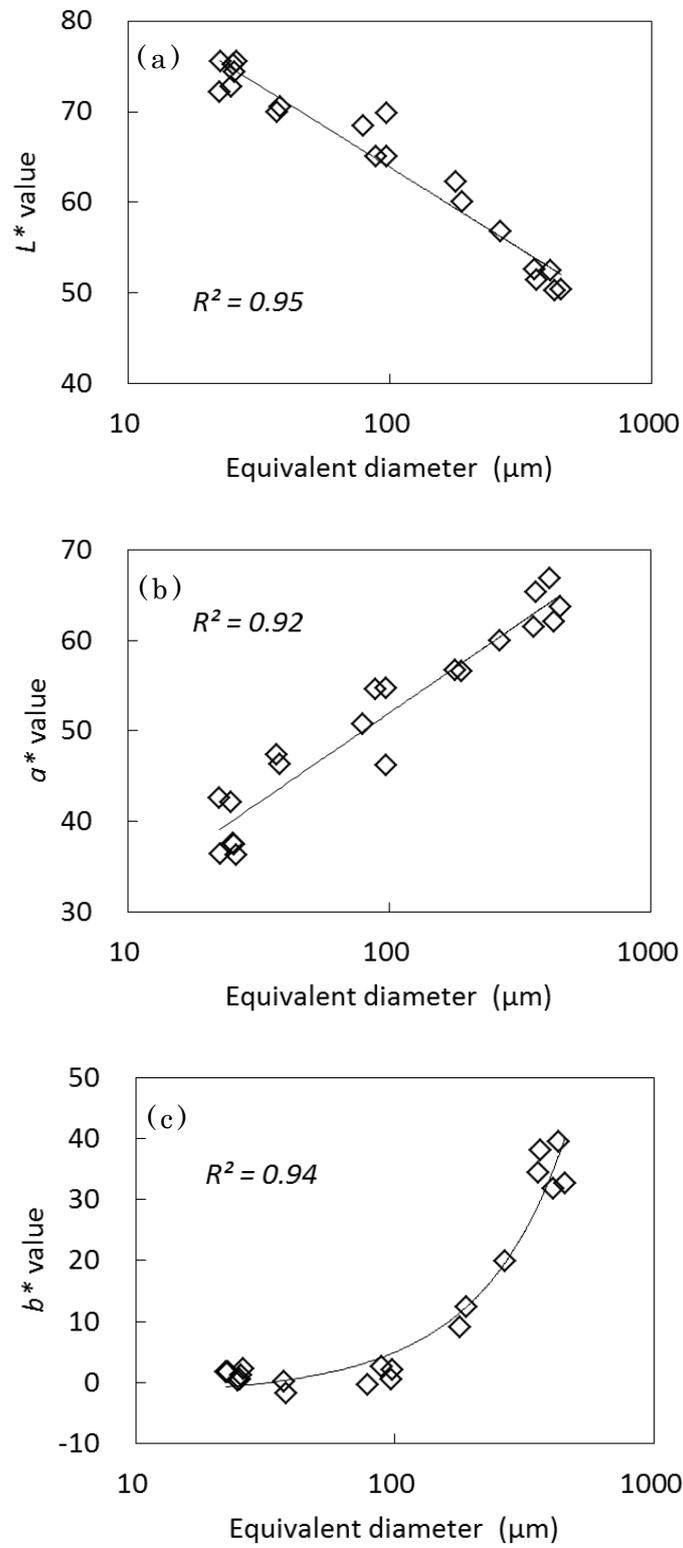


Fig.3-10 Relationships between equivalent diameter and color coordinate system. (a) L^* value, (b) a^* value, (c) b^* value

3.3.3 サーモンフィレの凍結履歴

急速凍結および通常凍結したサーモンフィレの代表的な中心温度履歴を Fig.3-11 に示す。初期温度はおよそ 4 °C であり，凍結開始から -20 °C に到達するまでの時間は急速凍結区分においてはおよそ 20 分，通常凍結区分ではおよそ 205 分となった。

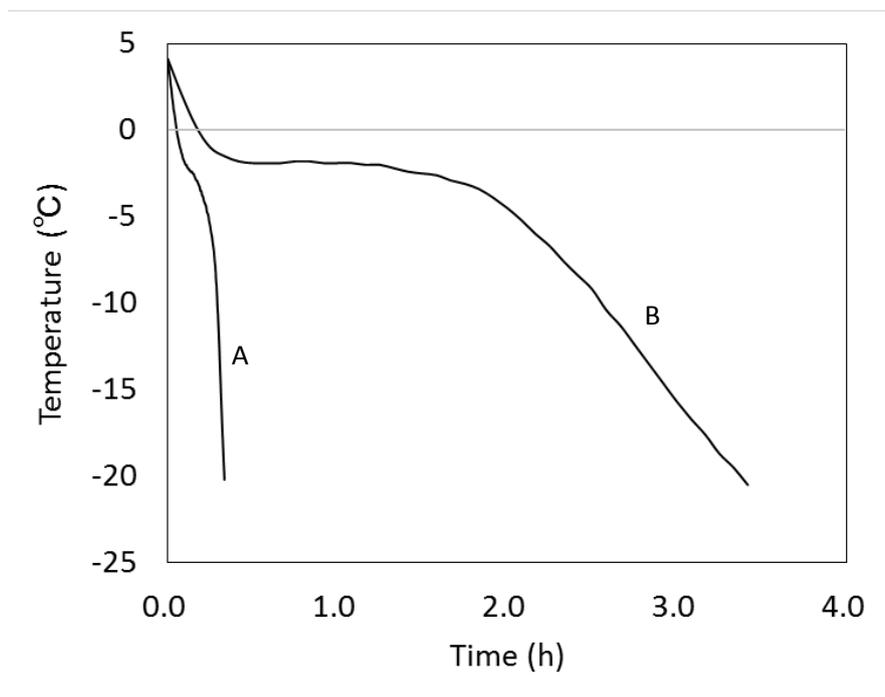


Fig.3-11 Freezing curves of salmon fillet.

A: fast freezing, B: normal freezing

3.3.4 凍結プロセスにおけるサーモンフィレの色彩変化とカロテノイド量

急速凍結および通常凍結後，さらにこれらを解凍したサーモンフィレ，および未凍結サーモンフィレのそれぞれの表面色について計測した結果を Table 3-2 に示す。未凍結試料と比較し，急速凍結試料は L^* 値が著しく増加し， a^* および b^* 値はそれぞれ減少した。他方，通常凍結試料については L^* 値はほとんど変化せず， a^* および b^* 値はそれぞれ増加した。このことより，急速凍結試料は明度の増加および彩度の減少に伴い，外観上も明確に白濁化することが分かった。一方，通常凍結試料は彩度の増加に伴い，わずかながら鮮や

Table 3-2 Changes in $L^*a^*b^*$ values of freezing and thawing in coho salmon muscles

Freezing condition	Condition Digital image	L^*	a^*	b^*
Raw	Unfrozen 	$47.9^c \pm 2.6$	$33.7^b \pm 2.1$	$40.2^b \pm 3.4$
	Frozen 	$58.1^a \pm 1.7$	$23.6^c \pm 2.9$	$33.3^c \pm 4.2$
Fast freezing	Frozen-thawed 	$51.3^b \pm 1.2$	$32.3^b \pm 3.9$	$42.9^{ab} \pm 4.6$
	Frozen 	$49.0^{bc} \pm 1.7$	$38.7^a \pm 2.4$	$46.9^a \pm 2.7$
Normal freezing	Frozen-thawed 	$51.6^b \pm 3.1$	$34.8^b \pm 3.0$	$41.5^{ab} \pm 4.1$

Values are means \pm S.D., Replications: $n=9$

Means in the same column followed by the same superscript letters are not different ($p>0.05$)

かな色に変化したことが観察された。解凍後のいずれの試料も外観上、未凍結試料とほとんど差異はみられず、 $L^*a^*b^*$ 値のいずれもほぼ同等の値となったことより、解凍後の凍結サーモンフィレは凍結前の外観色に復元されることが明らかとなった。また、凍結・解凍前後のカロテノイド量の変化を Fig.3-12 に示す。これらの結果より、凍結方法の違いによるカロテノイド量の変化は認められなかった。すなわち、凍結時に生じる外観上の色調変化は生化学的な変化ではなく、筋肉組織表面にて起こる光学的性質の変化が関与すると考えられた。この結果は既往の報告 (Ottestad et al., 2011) と一致する結果となった。

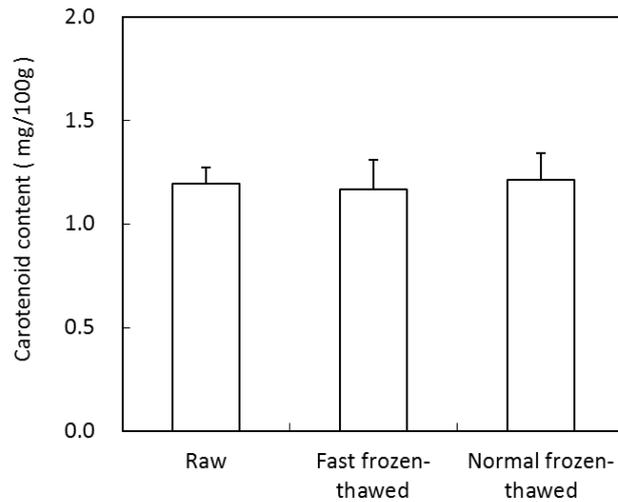


Fig.3-12 Carotenoid content of frozen-thawed coho salmon muscles. Values are means \pm S.D., Replications: $n=3$

3.3.5 サーモンの凍結速度と表面色の関係

凍結用試料ホルダに詰められたサーモン筋肉の試料をさまざまな温度および風速条件の下にて凍結した後、凍結速度と表面色の関係を調べるために表面の $L^*a^*b^*$ 値を計測した。凍結速度と L^* 値の関係を片対数プロットにて Fig.3-13 に示す。この結果より、凍結速度が増加するにつれて L^* 値は高い値を示すことから、凍結速度が表面の明度に大きな影響を及ぼすことが分かった。

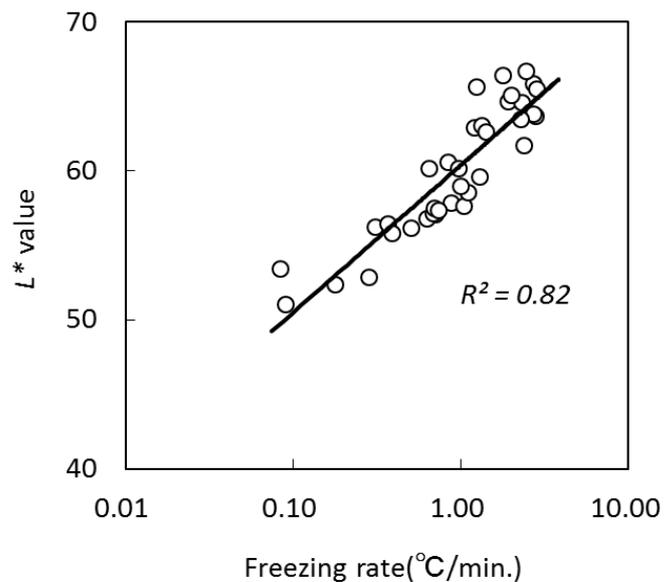


Fig.3-13 Relationship between freezing rate and L^* value

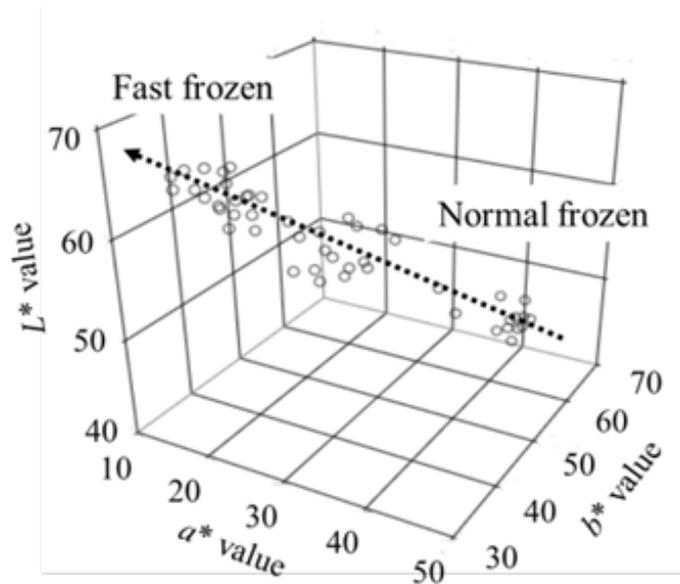


Fig.3-14 Relationship among $L^*a^*b^*$ values in 3-dimentional coordinate space

次に，さまざまな温度および風速条件の下にて凍結させた試料の表面色 $L^*a^*b^*$ 値を 3 次元空間にプロットした結果を Fig.3-14 に示す．低い L^* 値と高い a^* および b^* 値は赤みが強く鮮やかな色を表し，反対に高い L^* 値と低い a^* および b^* 値は白くくすんだ色を表す．3 次元グラフ中の近似曲線は，凍結速度が増加するにつれて明度が増加すると同時に彩度が減少しており，これは外観上，色が薄く，くすむこと，すなわち白濁することを示している．これらの結果より，凍結速度はサーモン筋肉の表面色に強く影響を及ぼしていることが明らかとなった．

3.3.6 サーマンフィレ垂直断面における色彩変化

急速凍結試料(表面色平均値 $L^*=60.3\pm 1.9$, $a^*=20.9\pm 2.1$, $b^*=32.0\pm 1.9$) および通常凍結試料(表面色平均値 $L^*=46.7\pm 3.2$, $a^*=36.0\pm 3.0$, $b^*=42.8\pm 1.0$) を用い，試料表面に対し垂直方向に割断し，表面から深さ 3.0 mm までの垂直断面における色彩変化を計測した．急速凍結試料の結果を Fig.3-15, に，通常凍結試料の結果を Fig.3-16 にそれぞれ示す．

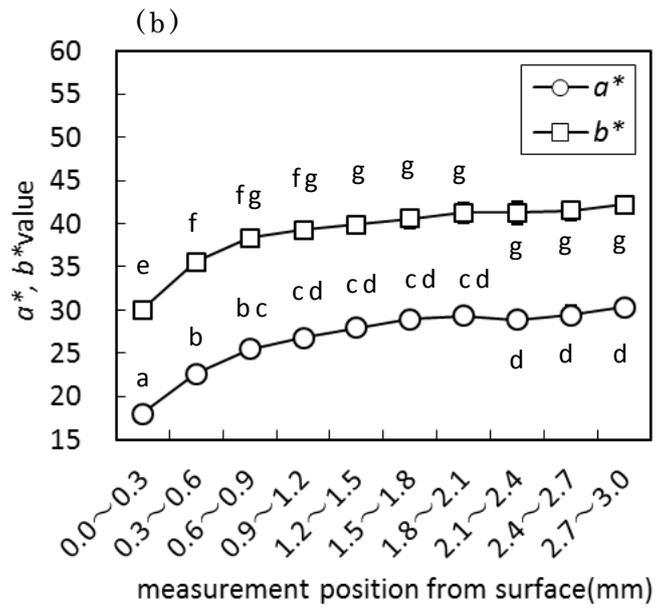
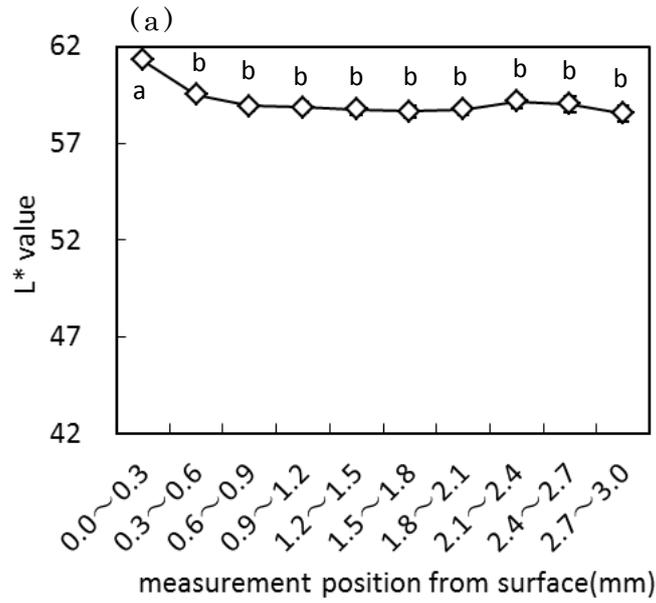


Fig.3-15 Change of CIE LAB values from the surface in fast frozen sample measuring location from the surface

(a) lightness index (L^* value) , (b) chromaticness index (a^* , b^* value)

Values are means \pm S.E., $n=5$

Means followed by the same superscript letters are not different ($p>0.05$)

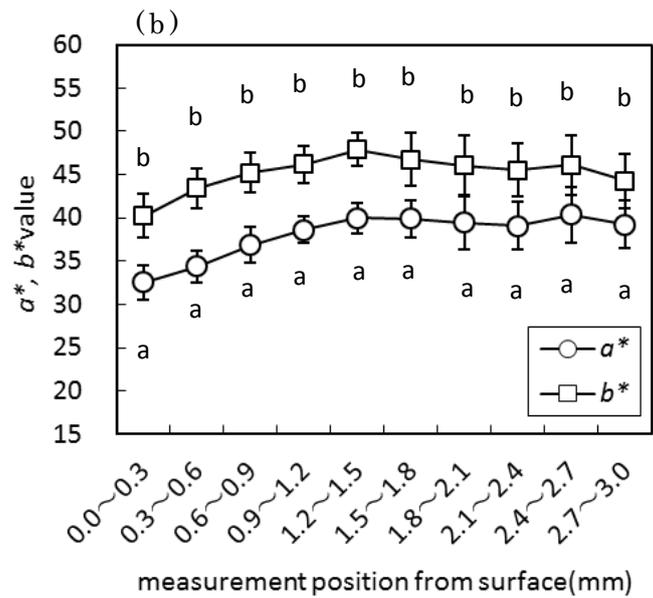
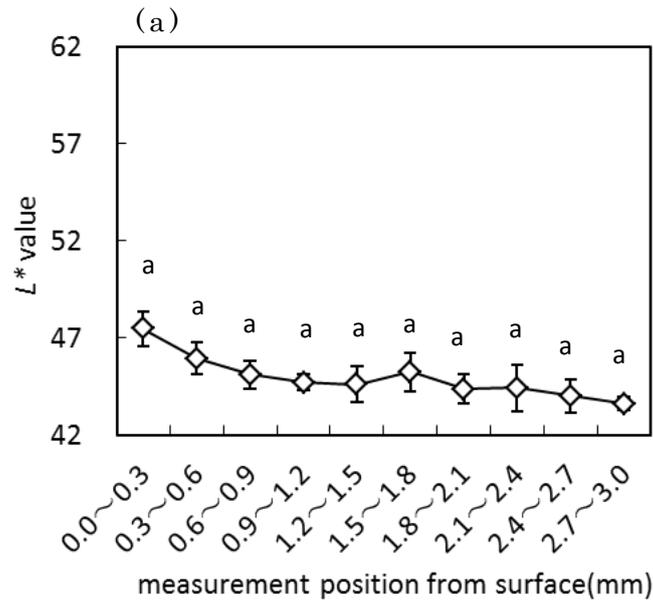


Fig.3-16 Change of CIE LAB values from the surface in normal frozen sample measuring location from the surface

(a) lightness index (L^* value), (b) chromaticness index (a^* , b^* value)

Values are means \pm S.E., $n=5$

Means followed by the same superscript letters are not different ($p>0.05$)

Fig.3-15(a)に示されるように，急速凍結試料の L^* は計測領域内においては全体的に高い値となり，表層から 0.3 mm までの深さにおいて特に高い値となった．加えて， a^* および b^* の値は表層から 0.9 mm までの深さにおいて著しく増加しており，その後，深さ 3.0 mm まで緩やかに増加していた (Fig.3-15(b))．急速凍結は試料の表層と内部に大きな温度差を与えるため，凍結時において，試料内部と比較し，表層は大きな色変化を生じることが示された．Fig.3-15 および Fig.3-16 に示されるように，急速凍結試料と比較し，通常凍結試料の L^* は低く，反対に a^* および b^* は高い値となり，さらにこれらの表層と内部の色差は小さいことが示された．急速凍結および通常凍結試料の色変化プロファイルは比較的類似しているが，表面より 0.3 mm までの深さにおける挙動は異なっていた．これらの結果，急速凍結はサーモン筋肉表層部 0.3 mm までの深さにおいて，表層部の色を変化させるほどの大きな影響を与えていることが分かった．サーモンフィレの色消失の現象は，急速凍結中にその表層部のみにおいて極端に生じており，内部においては表層と同様な色変化は生じていないことが明らかとなった．

3.3.7 サーモン表層面における氷結晶形状の解析

急速凍結および通常凍結試料の表層面における典型的な氷結晶顕微鏡観察像を Fig.3-17 に示す．画像中の試料表面より下部，すなわち筋肉組織側の白い部分は氷結晶領域に相当する．Fig.3-17(a)に示すように，急速凍結試料では全体的に小さな氷結晶が形成されており，表層付近では特に小さな氷結晶構造が観察された．一方で，通常凍結試料では，表層から内部にかけて，比較的大きな氷結晶が形成されており，そのサイズに顕著な差はみられなかった (Fig.3-17(b))．ここで，サーモン筋肉組織内に形成された氷結晶は隣接する結晶同士にて融合しているため，単一の氷結晶として区別することは困難である．したがって，ここでは表層から 0.3 mm までの領域において氷結晶面積比を計測した．

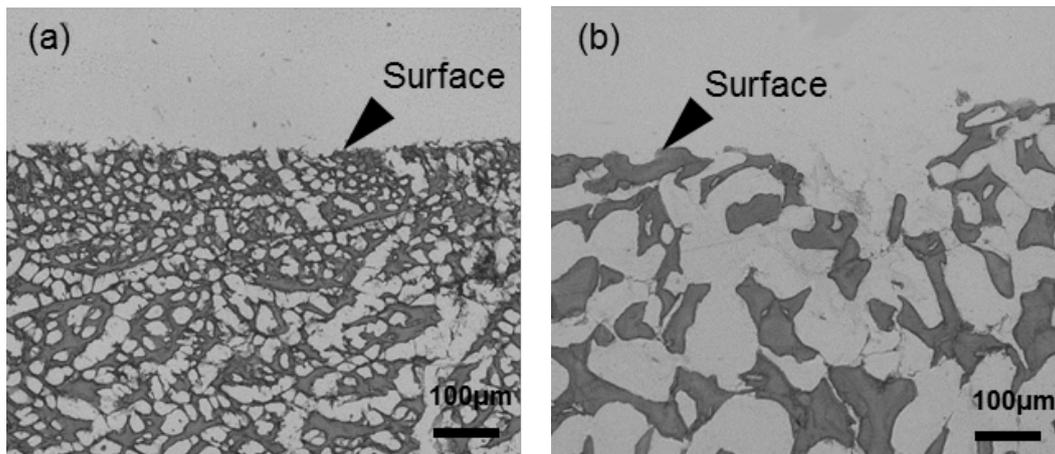


Fig.3-17 Cross section of ice crystals around the surface in frozen salmon

(a) fast frozen salmon muscle ($L^* = 64.9$, $a^* = 20.4$, $b^* = 32.9$)

(b) normal frozen salmon muscle ($L^* = 49.7$, $a^* = 36.3$, $b^* = 45.2$)

試料表層部の凍結速度と氷結晶面積比の関係を片対数プロットにて示したところ、高い相関が示され、凍結速度が増加すると氷結晶面積比は減少することが分かった (Fig.3-18). すなわち、急速凍結試料の表層部は低い氷結晶面積比となり、反対に通常凍結試料の表層部は、大きな氷結晶面積比となった。試料表層部は外部環境に影響を受けやすく、凍結時には先に氷結晶が形成されるため、凍結条件の違いにより形成される氷結晶の形状だけでなく氷結晶面積比も異なることが明らかとなった。凍結速度が速いと、水分子が十分に移動する前に凝固し、氷となるため、細胞内あるいは筋繊維内に水分子が留まり、光学顕微鏡では観察できないほどの微小な氷も数多く形成されるため、氷結晶面積比としては小さく算出されると推察された。反対に、凍結速度が遅いと、水分子が筋肉細胞内から細胞外に移動すると同時に細胞の脱水も生じる。この水分子の移動によって氷結晶面積比が大きくなり、結果的に、細胞間において隣接する氷同士が結合する状態になるまで大きな氷が形成されることになったと推察される。さらに、Fig.3-15 および Fig.3-16 に示されるように、表層部近傍では内部と比較して色の変化が大きいことより、凍結中における水分子の挙動が表面色に影響を及ぼしていると考えられた。

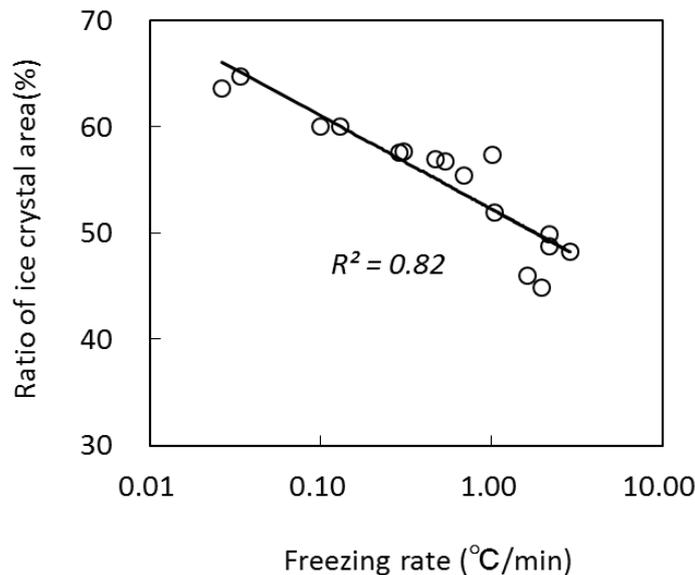


Fig.3-18 Relationship between freezing rate and ratio of ice crystal area

これらの関係を明らかにするために、試料表層の氷結晶面積比と表面の色計測値の関係を Fig.3-19 に示す。氷結晶面積比が減少すると、 L^* 値が増加し、同時に a^* および b^* 値が減少することが明らかとなった。それらの結果より、サーモンフィレ表層部の凍結速度、氷結晶サイズおよび表面色の定量的な関係が明らかとなった。

サーモン市場の取引において、白色化したサーモンフィレは好まれない傾向にあるが、凍結時における一時的な色消失は急速凍結の証拠となることが示された。他方、強い赤みを示す凍結フィレは通常凍結または緩慢凍結により大きな氷が形成されている可能性があるかと推察された。本研究によって氷結晶サイズと表面色の関係を定量的に解析したことにより、フィレ肉色に依存する品質を定量化することが可能となることを明らかにした。また、これらの関係を用いることにより、目的とする外観品質を得るための凍結条件を探索することも可能となった。したがって、本研究により示した氷結晶形状を基盤とする解析および評価手法は、従来行われてきた市場取引の評価における品質および価格評価の改善に貢献するツールとして有用であると考えられる。

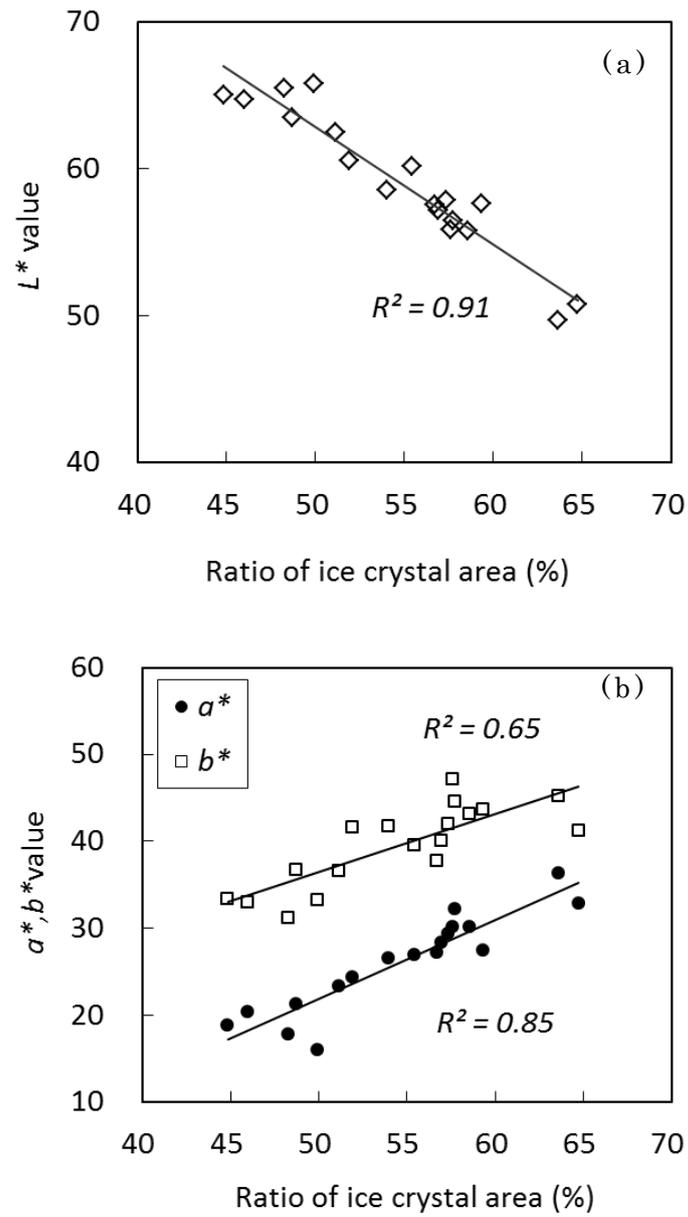


Fig.3-19 Relationship between ratio of ice crystal area and CIE LAB values. (a) lightness index (L^* value) , (b) chromaticness index (a^* and b^* value)

3.4 要約

急速凍結された高品質サーモンのフィレは一時的な表面色彩消失現象が観察され、市場評価に影響を及ぼしていることが知られており、この現象は、凍結速度の差異に起因する氷結晶サイズに影響されていると推察されていた。そこで、凍結速度に依存する氷結晶サイズが食品の外観色に及ぼす影響を定量的に明らかにするため、ゼラチンおよびサーモンフィレを用いて、それぞれの表層面における凍結速度、氷結晶サイズおよび表面色の関係を定量的に評価した。具体的には、まず凍結食品の表面色を正確に定量化するために、CVSを導入した手法を開発した。次に、氷結晶サイズ計測とCVSによる外観色の関係を求めたところ、凍結ゼラチン表層面の氷結晶サイズが小さいと、 L^* 値が増加、 a^* および b^* 値が減少することが示された。すなわち、多数の小さな氷結晶が形成された凍結ゼラチンは色消失した印象を与えることが明らかとなった。この結果より、凍結速度、氷結晶サイズおよび表面色の関係を定量的に示すことが可能となった。

凍結サーモンフィレの表面色は凍結速度に依存して変化し、急速に凍結した試料の表層面は極端に白濁していた。また、急速凍結試料と通常凍結試料の表層付近の色分布の挙動は大きく異なっており、この結果より、凍結速度はサーモン表面に大きく影響することが示された。急速に凍結したフィレの表層近傍においては、微細な氷結晶が形成されるが、そのサイズは深さ方向に伴って大きくなることが観察された。色彩変化については、表面から深さ方向0.3 mmまでの領域において、 L^* 値が極端に低下し、反対に a^* 、 b^* 値も同じ領域において大きく増加していたが、これより深い領域ではほとんど変化しなかった。次に、顕微鏡画像において単位面積当たりに氷結晶が占める割合を氷結晶面積率と定義し、深さ0.3 mmまでのこの値と表面色の関係を求めた結果、氷結晶サイズが小さくなり、また、その面積率が小さくなるにつれて、 L^* 値が増加し、同時に a^* 、 b^* 値はそれぞれ減少することが明らかになり、急速凍結時にフィレ表面が白く変化する現象は、氷結晶の微細構造とその分布に起因することが分かった。これらの結果は、氷結晶形状は食品の外観品質、

すなわち人の視覚にも影響を及ぼすことを明らかにするとともに、目的とする外観品質を得るための凍結条件を探索することや市場の取引における品質および価格評価の改善に貢献する可能性について述べた。

第 4 章 凍結保存条件が冷凍米飯の氷結晶サイズ、粘弾性および官能評価スコアに及ぼす影響

4.1 はじめに

氷結晶形状が凍結食品の品質に与える影響のうち、前章では凍結ゼラチンおよび凍結サーモンを用いて、その形成部位や大きさが外観色に及ぼす影響および変化特性について明らかにした。これは、形成された氷結晶が食品の組織に対して物理的な変化を与えることを示している。氷結晶の形状が食品材料の組織の変形や破壊を引き起こし、消費者が知覚する食感や美味しさに影響を及ぼすことは一般によく知られている。しかしながら、氷結晶サイズと官能評価スコアの関係性を科学的エビデンスとして報告した事例は数少ない現状にある (Russell et al., 1999)。そこで、主食である炊飯米を典型的な研究対象として、異なる凍結操作条件により形成される氷結晶が食感および美味しさ評価に及ぼす影響を総合的に評価した。

4.2 研究の目的

高齢化が進む日本社会において、炊飯米は健康的な食生活を支える主食であり、宅配食や介護施設における給食などには欠かすことはできない。しかし、多様化する食生活の中で、主食としての米飯摂取量は減少の一途をたどっており (農林水産省大臣官房政策課食料安全保障室, 2016)、食事のたびに少量ずつ炊飯する面倒さや不経済さがあることは否めない事実である。これらを象徴するかのようになり、冷凍米飯の生産量は 2009 年以降増加傾向にある (農林水産省大臣官房政策課食料安全保障室, 2017)。炊飯米の食感は美味しさに寄与する主要因であり (加藤, 1979)、これを維持する保存方法として凍結操作が最も適しているとされている。炊飯米の主成分はデンプンであるため、その品質は凍結操作プロセスの冷却および凍結過程におけるデンプンの老化進行と共に氷結晶形成メカニズムの影響を受けることになる。炊飯米の冷却および凍結時において、デンプン老化と冷却速度 (Zhang and Sun, 2006; Yu et al., 2010b)、保

存温度(Perdon et al., 1999; Ma and Sun, 2009)およびガラス転移温度(Hsu and Heldman, 2005)の関係についてはそれぞれ詳細に報告されている一方で, 自然解凍された米飯塊のデンプン老化は冷凍米飯の品質劣化の主要因ではないという報告もされている(矢内ら, 2001). 冷凍米飯の凍結保存中における品質低下については, 米飯内に形成される氷結晶が影響している可能性が示唆されているが(矢内ら, 2001; 相良, 2009), これらに関して定量的に解明した報告は列挙できない現状にある.

他方, 炊飯米の粘弾性特性に関しては数多くの研究が報告されており, 品種, アミロース含量, ゲル化温度や加工方法など様々な要因が影響している(Perez and Juliano, 1979, 1981; Juliano and Perez, 1983; Mundo et al., 1989; Chrastil, 1990; Rousset et al., 1995). 米飯の粘弾性パラメーターの計測として, Ottawa texture measuring system やテクスチャーアナライザーなど様々な機器が広く用いられてきた(Juliano et al., 1981; Champagne et al., 1998; Meullenet et al., 1998; Meullenet et al., 1999). また, いくつかの報告においては, 応力ひずみ曲線の破断点や多重バイト計測, 動的粘弾性の計測曲線などから得られるシングルパラメーターを用いて官能特性を決定する試みがなされてきた(乙部ら, 1995; 中谷・辻, 1998). しかしながら, 食感に関する官能評価スコアとこれらの機器による計測結果は必ずしも一致しないことが知られている. 他方, 応力ひずみ曲線の解析データと Artificial neural network (ANN) を組み合わせた解析により, 米飯の食感に関する官能評価スコアの予測に成功した報告もある(Sitakalin and Meullenet, 2001).

そこで本研究は, 凍結保存操作が冷凍米飯に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし, 冷凍米飯中に形成される氷結晶サイズの計測, 解凍後の粘弾性計測および官能評価を行った. さらに, これらの結果に基づいて, 官能評価スコアを予測するモデルを構築した.

4.3 実験材料および方法

4.3.1 実験材料

供試材料として, 市販の新潟県魚沼産コシヒカリの新米を用いた.

試料の精米歩合は 90 %とし，得られた精白米は実験直前まで 4 °C の保冷庫にて保存した．

4.3.2 試料の調製法

精白米 450 g を水道水にて水洗した後，水道水 635 ml を加え，室温にて 1 時間浸漬した．浸漬後の白米を家庭用炊飯器（ND-HP10，Mitsubishi Electric）に入れ，普通炊きコースにて炊飯した．炊飯時における炊飯釜の底面および試料層中心部の温度は，データロガーに接続した T 型熱電対を用いて計測および記録した（Fig.4-1）．炊飯終了後直ちに，炊飯釜壁面に接触している炊飯米を避け，市販の炊飯米用シート（直径 200mm，Komoda Paper）上に 200 g ずつ取り分けた．なお，この炊飯米用シートは不織布，パルプ，ポリエチレンフィルムおよびポリプロピレンフィルムの 4 層構造から成り，炊飯米の水分を維持することができる機能を有している．炊飯米を厚さ 10 mm となるようにシート上に広げ，米飯の中心温度が室温 25 °C になるまで放冷した後，塩化ビニル樹脂製食品包装用ラップフィルムにて包装した（Fig.4-2）．なお，試料の温度は 0.5 mm 径の T 型シース熱電対を用いて，積層した米飯中央部の 1 粒内の中心温度を測定した．

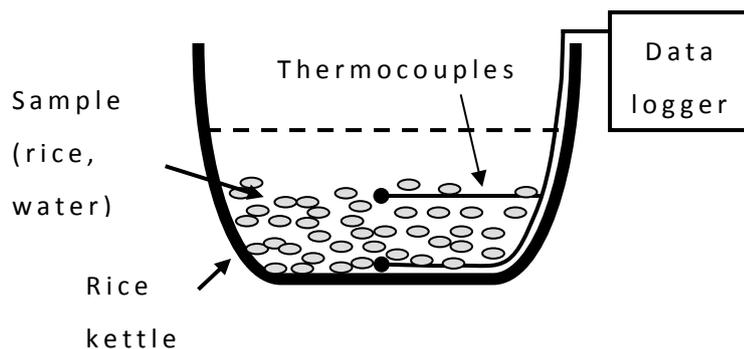


Fig.4-1 Measuring locations of rice cooking temperatures.

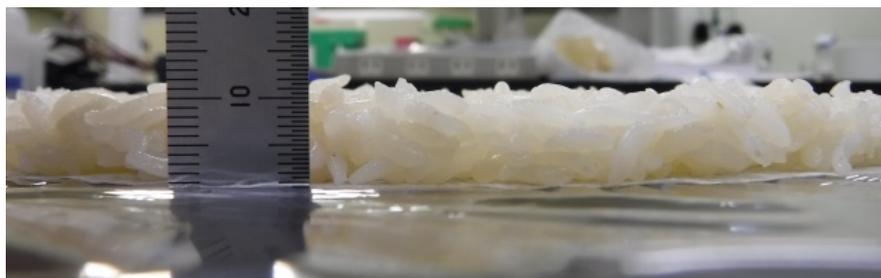


Fig.4-2 Image of cooked rice

ラップフィルムにて包装した直径 200 mm × 高さ 10 mm の凍結試料は、それぞれ庫内温度 -5 、 -15 、 -30 、 -45 °C、および庫内風速 0.5 m/s に設定した恒温槽 (EC-43MHP, HITACHI) を用いた。また、凍結時の表面熱伝達係数は Amarante et al. (2003) の方法を用いて算出した。試料中心温度が恒温槽設定温度に到達した時点をも凍結終了とし、それぞれの試料を庫内温度 -5 、 -15 、 -30 °C および -45 °C に設定した Medical Freezer (MDF-U536U および MDF-192AT, SANYO) にて保存した。なお、保存期間は 0、5、10、30 および 90 日間とし、それぞれの日数にてサンプリングし、氷結晶サイズ計測、粘弾性計測および官能評価を行なった。凍結試料は、室温 (25 °C) 下における静置または家庭用電子レンジ (RE-GT10, SHARP) を用いたマイクロ波加熱によりそれぞれ解凍し、解凍後の試料を粘弾性計測および官能評価に用いた。マイクロ波加熱解凍では、電子レンジ内にて試料を 80~120 秒間加熱し、試料温度を 90 °C 以上とした後、試料表面からの水蒸気の放出を避けるため、ラップフィルムにて包装したまま試料温度が室温となるまで放冷した。

凍結および室温解凍の速度は式 (4-1) に示すように、最大氷結晶生成温度帯の領域すなわち 0 ~ -5 °C を通過する時間を凍結時間 (min) とし、また、最終解凍温度 (25 °C) に達するまでに要した時間を解凍時間 (min) とし、この温度域における凍結または解凍曲線の傾きを、それぞれ凍結および解凍速度 (°C / min) とした。

$$\text{凍結または解凍速度 (°C/min)} = \frac{T_2 - T_1}{t_2 - t_1} \quad (4-1)$$

ここで、凍結速度においては、 $T_1: 0.0\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $T_2: -5.0\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $(t_2 - t_1): 0.0 \sim -5.0\text{ }^\circ\text{C}$ の通過時間 (min) を示す。また、解凍速度は、 T_1 : 解凍開始温度、 T_2 : 解凍終了温度 ($25\text{ }^\circ\text{C}$)、 $(t_2 - t_1): 0.0 \sim -5.0\text{ }^\circ\text{C}$ の通過時間 (min) を示す。

4.3.3 氷結晶計測法

氷結晶計測に用いた炊飯米は第2章の2.3.2に述べた試料調整法と同様の方法にて調製した。その後、染色された白米を4.3.2にて記載した方法にて炊飯、凍結および保存した。凍結保存後、試料の中心部から氷結晶計測用の試料を採取し、第2章2.3.3に述べた凍結固定による顕微鏡標本作製法と同じ手順にて作製した。また、これらからの氷結晶画像取得については、第2章2.3.5と同様の方法にて蛍光観察および画像取得し、氷結晶1個の面積に相当する円の直径を等価円直径として算出した。

4.3.4 粘弾性計測装置および計測法

炊飯米の粘弾性については、テンシプレッサー (My Boy System, タケトモ電機) の2×3バイトモードを用いて計測した。テンシプレッサーの圧縮セクションは、定速稼働ステージおよびロードセルに接続されたプランジャーにより試料を圧縮する機能を有している (Fig.4-3)。

試料となる米飯 10.0 g を常温下にてステンレス製の容器 (直径 40 mm x 深さ 14 mm) に入れ、専用プランジャーにて試料厚さを 10.0 mm となるように 10 秒間荷重したのち、2 分間放置した。その後、テンシプレッサーに容器ごと設置し、直径 18 mm の円柱プランジャーを用いて粘弾性を計測した。また、クロスヘッド速度は圧縮時に 2.0 mm/s, 引張時に 1.0 mm/s の条件とした。圧縮試験においては、試料厚みは自動的に計測され、その後、計測された厚みに対して 23%, 46% および 92% の圧縮をそれぞれ連続的に 2 回ずつ行った。

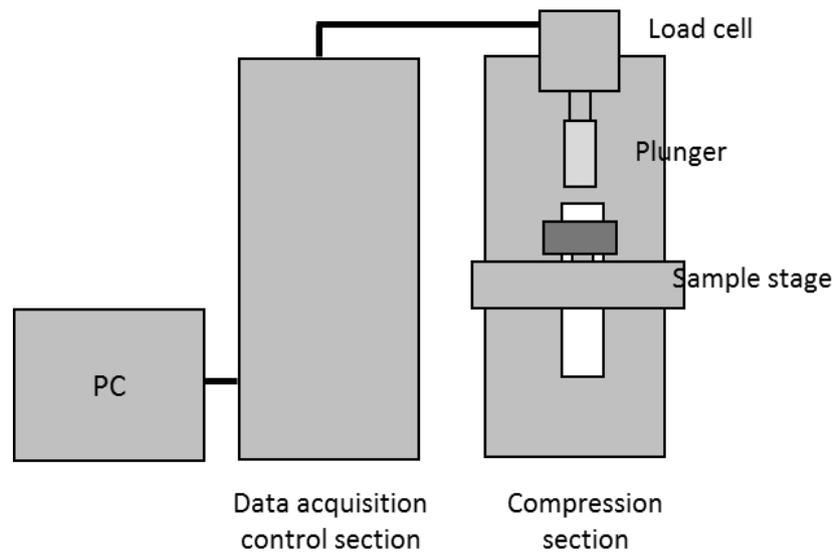


Fig.4-3 Schematic diagram of the measurement system

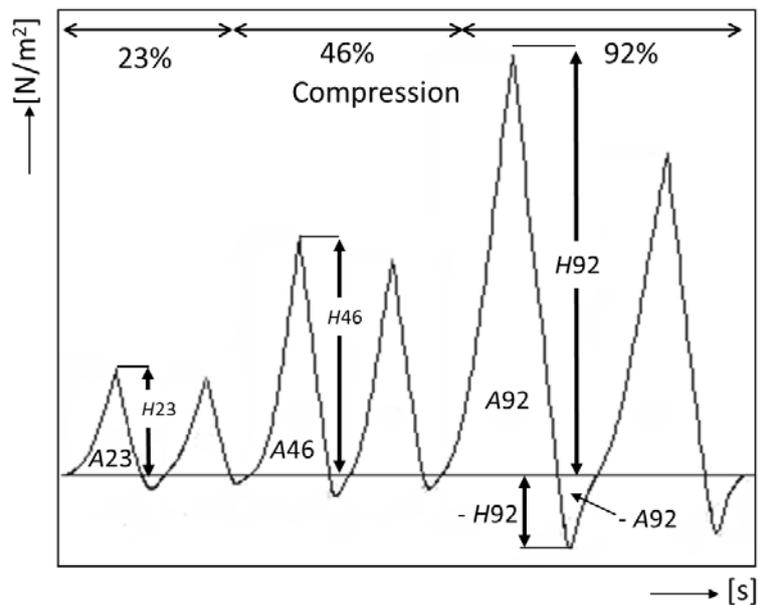


Fig.4-4 Typical force-deformation curve for six bites compression test

Compression ratios for a sample were 23 %, 46 % and 92 %. Instrumental parameters extracted: maximum load recorded during each compression and adhesion (H_{23} , H_{46} , H_{92} and $-H_{23}$, $-H_{46}$, $-H_{92}$), area under the curve during each compression and adhesion (A_{23} , A_{46} , A_{92} and $-A_{23}$, $-A_{46}$, $-A_{92}$)

典型的な 2×3 バイトモードの Force-deformation 曲線を Fig.4-4 に示す。米飯の粘弾性計測において、圧縮に要した力を H (N), 仕事量を A (N・m), 反対に引き離しに要した力を $-H$ (N), $-A$ (N・m) として表記している。例えば、低、中および高圧縮試験における最大荷重は、それぞれ $H23$, $H46$ および $H92$ と示される。粘弾性計測は 5 回繰り返し、その平均値を算出して用いた。

4.3.5 官能評価法

氷結晶サイズの計測に用いた試料と同一条件の冷凍米飯を用い、室温解凍試料および加熱解凍試料を対象とし、一般成人のべ 690 名 (1 サンプルあたり約 30 名)、平均年齢 40 歳、男女比 3 : 1 を一般消費者パネルとして官能評価をそれぞれ実施した。官能評価試験には旧食糧庁により定義された標準的な用語および咀嚼動作に基づいて分類された用語を用いた(相良, 2009)。すなわち、「硬さ」、「こし」、「付着感」、「粘り」と総合評価である「美味しさ」を評価用語とし、1 から 7 点をカテゴリ尺度とする 7 段階尺度法により評価した。また、食感に関わるそれぞれの評価用語を以下に定義した。

- ・硬さ：ご飯を噛むときの力とする
- ・こし：ご飯の噛み応えとし、割れや切れが少ないものほどこしが強い
- ・付着：摂食時の歯への付着具合
- ・粘り：ご飯の粘りとし、伸びが大きいほど粘りも大きい

4.3.6 統計解析法

統計解析は市販の統計解析ソフト JMP11.0 (SAS Inst., co., Cary, N.C., U.S.A) を用いて、t 検定、Tukey HSD 多重比較検定、主成分分析 (PCA) および ANN モデリングを行った。主成分分析では、粘弾性パラメーターおよび官能評価スコアのデータセットを対象として、カイザー基準の固有値が 1.0 以上を示す主成分についてヴァリマックス回転を適用し、データセットが顕著に分類される主成分数を求めた。

ANN モデルは 3 層の知覚ネットワークから成る構造を用い (Fig.4-5), 入力層と出力層およびその間の中間層により構成した。

このモデルの入力層に保存条件または粘弾性パラメーターを，出力層には官能評価スコアの平均値を適用した．中間層のノード数はモデル精度の向上が認められなくなる最小値を採用した．構築したモデルは，最大学習回数およびそのツアー数をそれぞれ 500 および 10 回と設定した．また，学習モデルに過剰フィットすることを防止するために，オーバーフィットペナルティおよび収束基準をそれぞれ 0.001 および 0.00001 に設定し，5 分割交差検証法を用いた．構築モデルの予測精度を評価する指標として決定係数 (R^2) および二乗平均平方根誤差 ($RMSE$) を用いた．

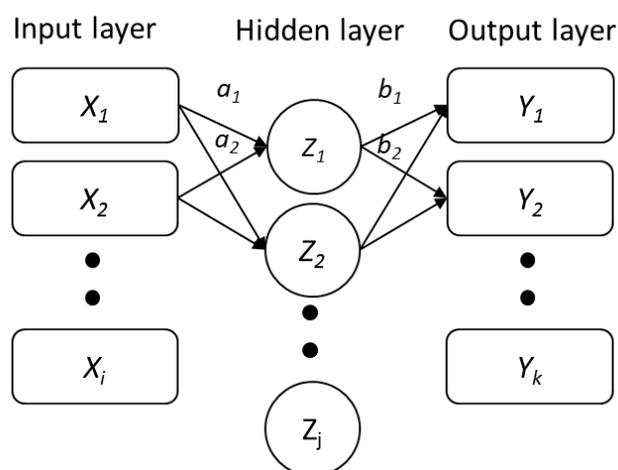


Fig.4-5 An example of a 3-layer artificial neural network. Symbols X, Y and Z are the values of the units in the input, output and hidden layers, respectively; and a and b are the weight coefficients of input-hidden and hidden-output layers, respectively.

4.4 実験結果および考察

4.4.1 各プロセスにおける米飯の温度履歴

炊飯工程は吸水，炊飯および蒸らしの 3 つのプロセスに大きく分けられ，その典型的な温度履歴を Fig.4-6 に示す．この結果より，吸水プロセスにおける水温はおよそ 40 °C であり，およそ 10 分間続いた．その後温度上昇とともに炊飯プロセスとなり，約 10 分間

かけて水温は 100 °C まで上昇した。また、蒸らしプロセスは、炊飯開始より少なくとも約 45 分間まで続くことが明らかとなった。

また、恒温槽内部の試料凍結位置における表面熱伝達係数を計測した結果を Table 4-1 に示す。この結果、異なる設定温度であっても、同一の恒温槽内かつ同一の位置にて試料を凍結すれば、表面熱伝達係数はほぼ同等となることが明らかとなった。

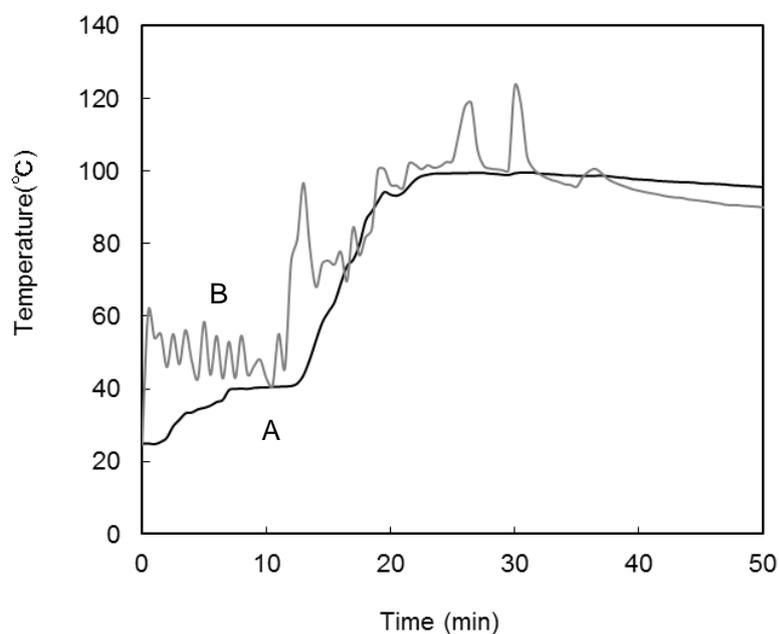


Fig. 4-6 Temperature changes during cooking of rice.
A: Center of rice layer, B: Bottom surface of rice kettle.

Table 4-1 Surface heat transfer coefficient h at various temperatures

Temperature (°C)	h (W/(m ² · K))
-5	33.6
-15	34.4
-30	34.2
-45	35.7

炊飯後の試料を様々な温度条件下にて凍結した結果を Fig.4-7 に示す。この結果より、凍結温度が -5 、 -15 、 -30 および -45 $^{\circ}\text{C}$ のときの最大氷結晶生成帯通過時間は、それぞれ 250、98、46 および 27 分となり、凍結速度は $0.017\sim 0.193$ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の範囲となった。他方、室温解凍時間はおよそ 3 時間、解凍速度は $0.112\sim 0.370$ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の範囲となった。室温解凍において、初期温度が異なっているにも関わらず、全ての凍結試料はおおよそ同程度の所要時間にて室温に到達した (Fig.4-8)。

これは、低い温度に凍結保存され、解凍初期温度が低い試料であっても、解凍時に試料温度と室温の温度差が大きくなるため、解凍プロセス初期段階の温度上昇が大きいことに起因すると推察された。

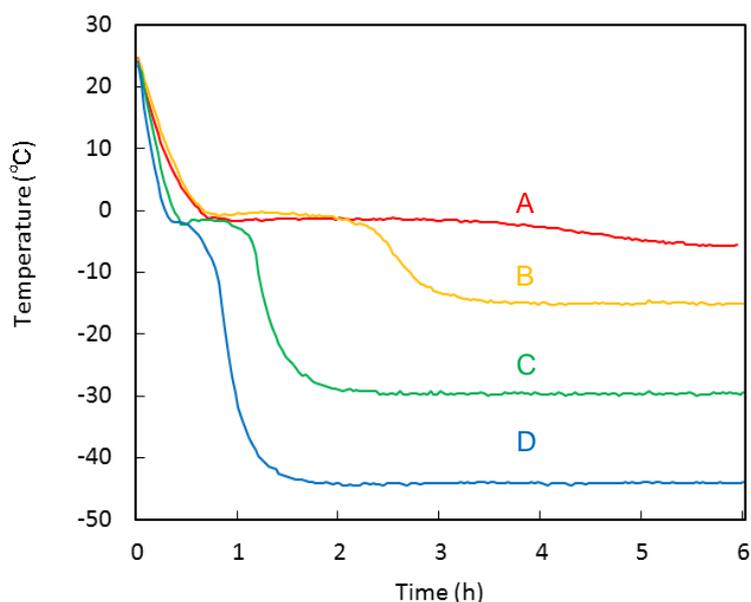


Fig. 4-7 Freezing curves of cooked rice at various temperature conditions during freezing

Freezing at -5°C (A), -15°C (B), -30°C (C), -45°C (D)

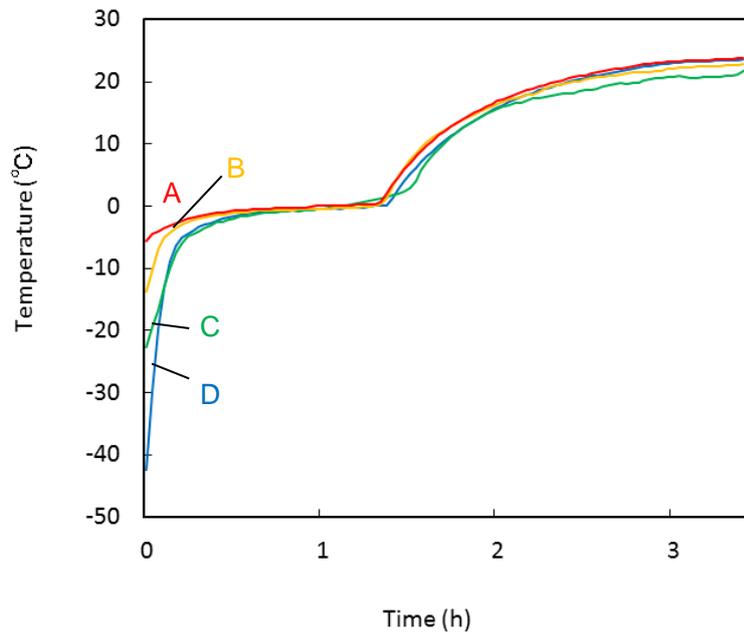


Fig. 4-8 Thawing curves of frozen cooked rice at various storage conditions during freezing
Storage at -5°C (A), -15°C (B), -30°C (C), -45°C (D)

4.4.2 凍結保存操作条件に伴う氷結晶サイズの変化

凍結時に試料バルク内の位置により、米飯粒内の氷結晶サイズが異なる可能性が推察された。そこで、空気温度 -15°C にて凍結した試料をラップフィルムで包装したバルク試料の中心部と表層部の米飯粒を採取し、それぞれの氷結晶サイズを計測した。その結果、Fig.4-9 に示すように、試料の中心部と表層部の米飯粒内の氷結晶サイズに有意差はみられなかった。これは、包装に用いたラップフィルムにより、米飯粒に直接冷風が当たることを防いだため、表層から内部にかけての温度勾配が小さくなったためと推察された。また、ラップフィルムにて包まれたバルク試料内部の空隙率も比較的大きく、米飯粒間の空隙が先に冷却され、空隙内での自然対流により全体が比較的均一に冷却されたことも要因の一つと推察された。

凍結試料中心部付近の典型的な氷結晶の顕微鏡観察像を Fig.4-10 に示す。この結果より、蛍光染色、低温粘着フィルムおよび顕微鏡用加熱冷却装置を利用することによって冷凍米飯中の氷結晶を観

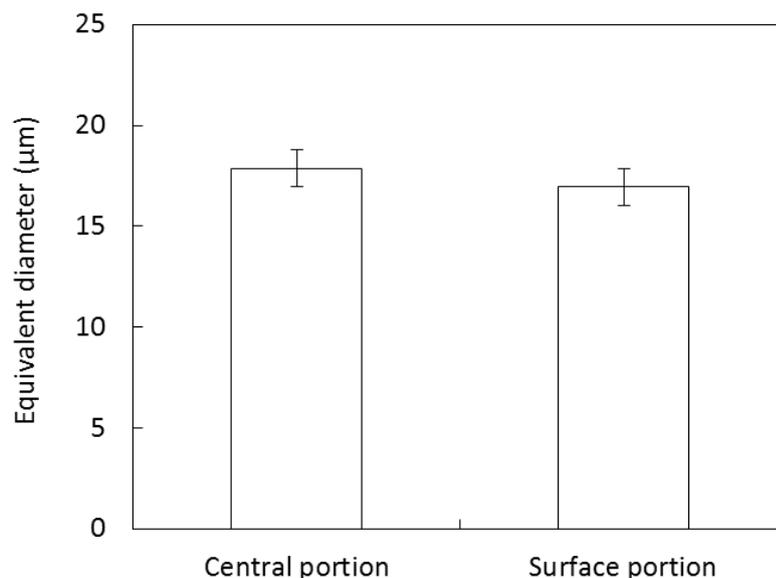


Fig.4-9 Comparison of ice crystal size between central portion and surface in bulk sample

Values are means \pm S.D.

できること，さらに，取得した画像より氷結晶サイズを計測できることが分かった．

食品材料の凍結において，材料内氷結晶は溶質または不純物を排除する形にて形成されるため，米飯の主要構成成分であるデンプンおよびタンパク質を染色することにより，非染色部位を氷結晶として観察できる．したがって，これらの蛍光観察画像中において，氷結晶は黒色部位として示される．

Fig.4-10(a)および(b)に示されるように，凍結温度 -45°C の試料と比較して，凍結温度 -5°C の試料のほうが大きな氷結晶が形成されていた．これは，Fig.4-7に示したように，凍結温度 -5°C の試料は最大氷結晶生成帯の通過時間が長く，大きな氷が形成されやすく，反対に，凍結温度 -45°C の試料は最大氷結晶生成帯の通過時間が短いため，小さな氷結晶が数多く形成されるためである．また，Fig.4-10の結果より，本研究にて用いた顕微鏡標本作製および観察方法によって，冷凍米飯内の氷結晶サイズが凍結速度に依存して変化することを，明瞭に観察できることを示している．また， -5°C にて90日間保存すると氷結晶は大きく成長し，その形状は丸みを

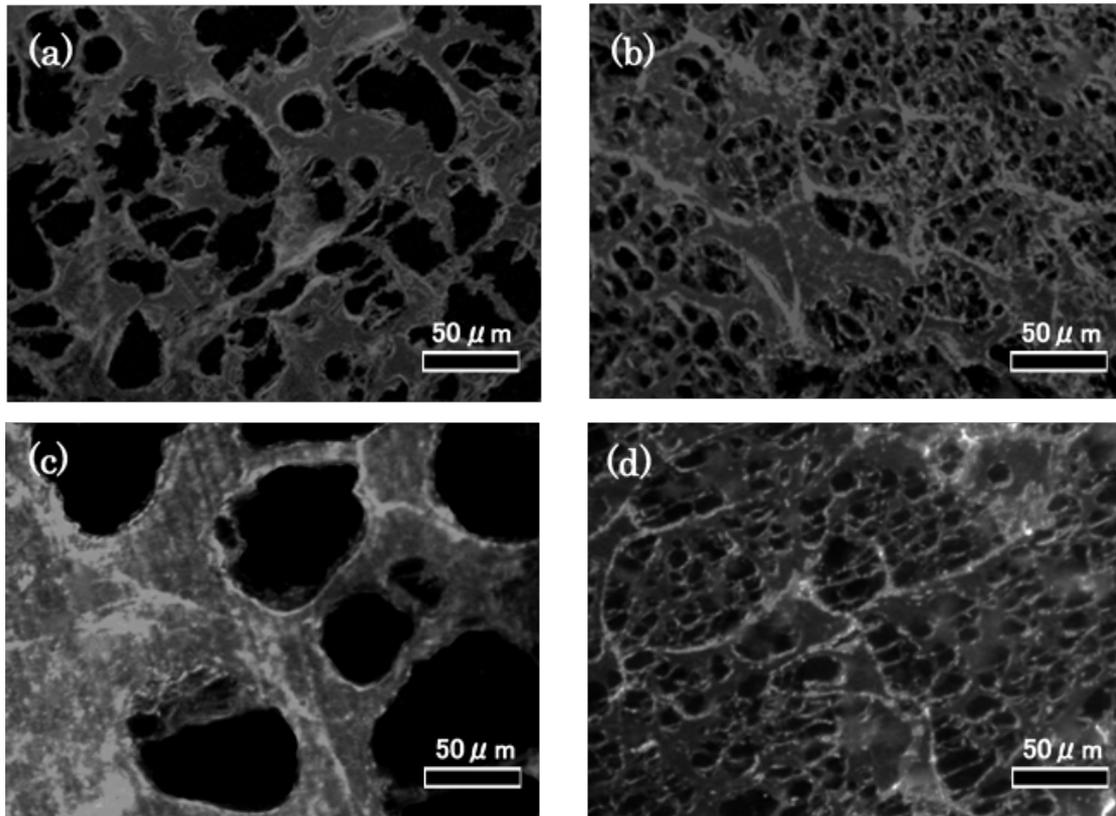


Fig. 4-10 Cross-section of ice crystals in frozen cooked rice.

(a) $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 d, (b) $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 d, (c) $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 d,
 (d) $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 d.

帯びているため、平滑化が進んでいることが観察されたが、 $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて同じ期間保存しても氷結晶の成長および形状的な変化は観察されなかった。

さまざまな保存温度条件下で凍結および保存した試料中の氷結晶面積を計測し、得られた結果から算出した等価円直径の経時変化を Fig. 4-11 に示す。この結果より、凍結時の温度が低くなるほど等価円直径は小さくなり、保存期間が長くなるほど等価円直径は大きくなることが分かった。また、凍結保存温度 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ の試料の等価円直径は保存 30 日まで急激に大きくなることが示された。これは、凍結保存中の温度に依存して水分子の移動速度は大きくなるため、高い保存温度においては、氷の再結晶化速度が速くなったためであると推察された。しかしながら、保存 30 日以降は大きくなっておらず、この条件下における氷結晶の平均等価円直径はおよそ $120\text{ }\mu\text{m}$

より大きく成長しないことが示された。これは、再結晶化が進むことによって、氷結晶の表面状態および形状が安定化すると、水分子を移動させる駆動力が低下するため、見かけ上の氷結晶サイズの変化がほとんど見られなくなった結果であると考察された。

凍結保存温度 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ の試料は、保存期間が長くなるにつれて氷結晶は大きくなっているが、凍結保存温度 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ の試料の氷結晶はわずかにしか成長しなかった。また、 $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて90日間保存した試料については、その内部の氷結晶成長はほとんど観察されなかった。これは、 $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ のような低温に保存することによって、水分子の移動速度が極端に遅くなり、保存90日間に計測される氷結晶サイズにほとんど変化が見られなかったためであると考えられた。これらの結果より、凍結保存中の氷結晶成長は保存温度に依存することが明らかとなった。また、凍結プロセスおよび保存中において、冷凍米飯内に形成される氷結晶の等価円直径はそれぞれ $11.4\sim 55.5\text{ }\mu\text{m}$ および $12.7\sim 118.0\text{ }\mu\text{m}$ の範囲となった。

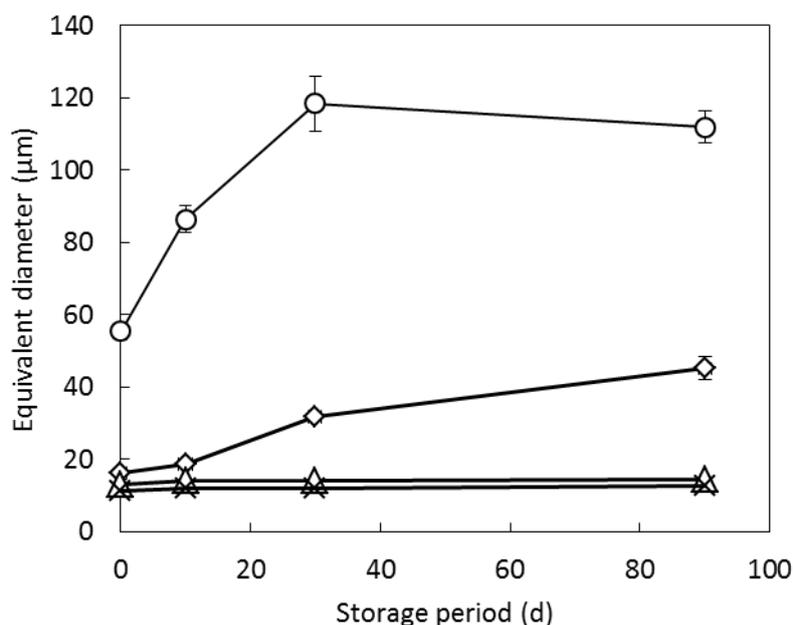


Fig.4-11 Mean equivalent diameter of frozen cooked rice against storage period at various freezing and storage conditions
Freezing and storage temperature; \circ - $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, \diamond - $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, \triangle - $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, \times - $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Each symbol is represented as the mean \pm S.E.

4.4.3 凍結保存操作条件に伴う粘弾性の変化

さまざまな温度および期間にて凍結保存した冷凍米飯を，室温またはマイクロ波加熱により解凍した後，粘弾性を計測した．これらの結果のうち，硬さに関する計測データ *H23* および *H92* を Fig.4-12 および Fig.4-13 に示す．*H23* と *H92* はそれぞれ 23% および 92% 圧縮における最大荷重 (N) であり，これはバルク試料表面および全体の硬さを表している．室温解凍の試料について，保存温度 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ および $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ と比較し，保存温度 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ の試料の表面硬さ (*H23*) および全体硬さ (*H92*) は保存初期にて急激に増加しており，保存期間が長くなるにつれてわずかながら増加傾向が示された．他方，マイクロ波による加熱解凍試料においては同様の傾向は認められず， $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ に保存した試料の *H23* は保存期間が長くなっても，その値は大きくならなかつたが，*H92* の値は保存日数が進むにつれて徐々に増加した．このことより，マイクロ波は保存中に劣化した米飯の表層部を強く加熱することにより，粘弾性を回復させると推察され，凍結保存温度 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ の試料の表層硬さが回復したと考えられた．

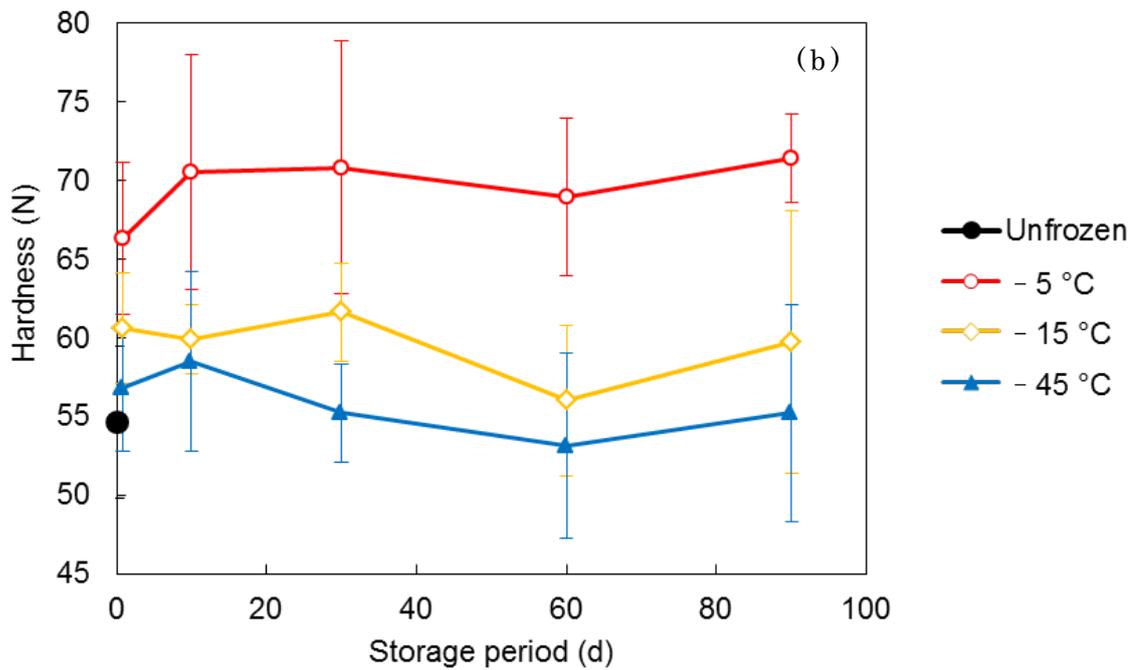
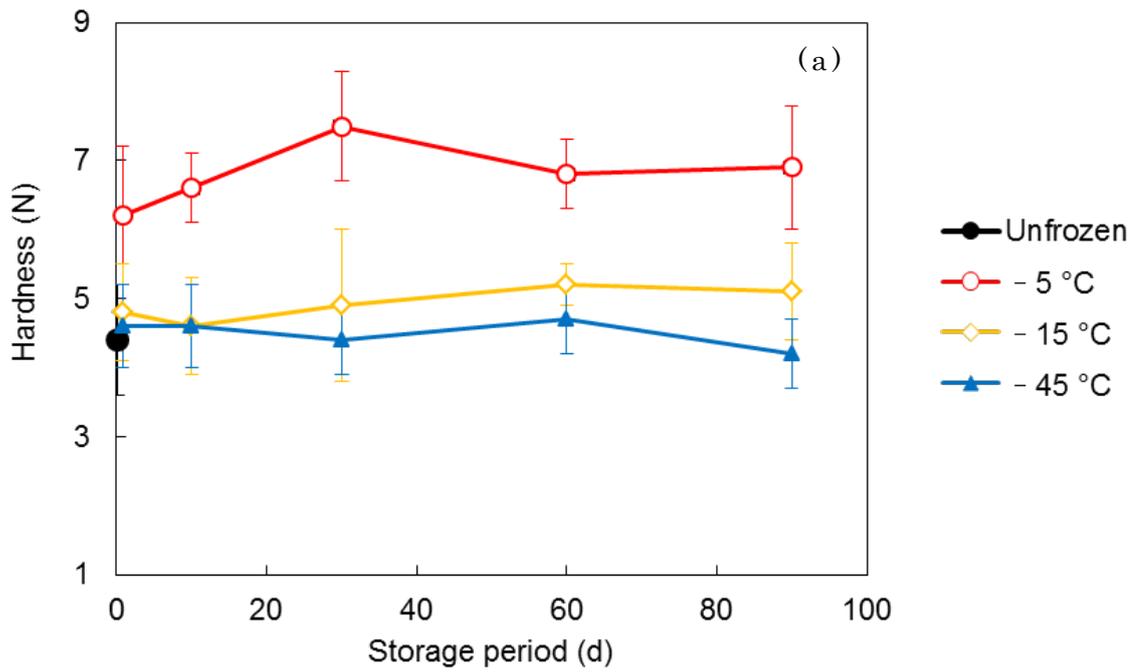


Fig.4-12 Hardness of cooked rice thawed by air at various storage temperatures and periods. (a) *H23*, (b) *H92*. Each symbol is represented as the mean \pm S.D.

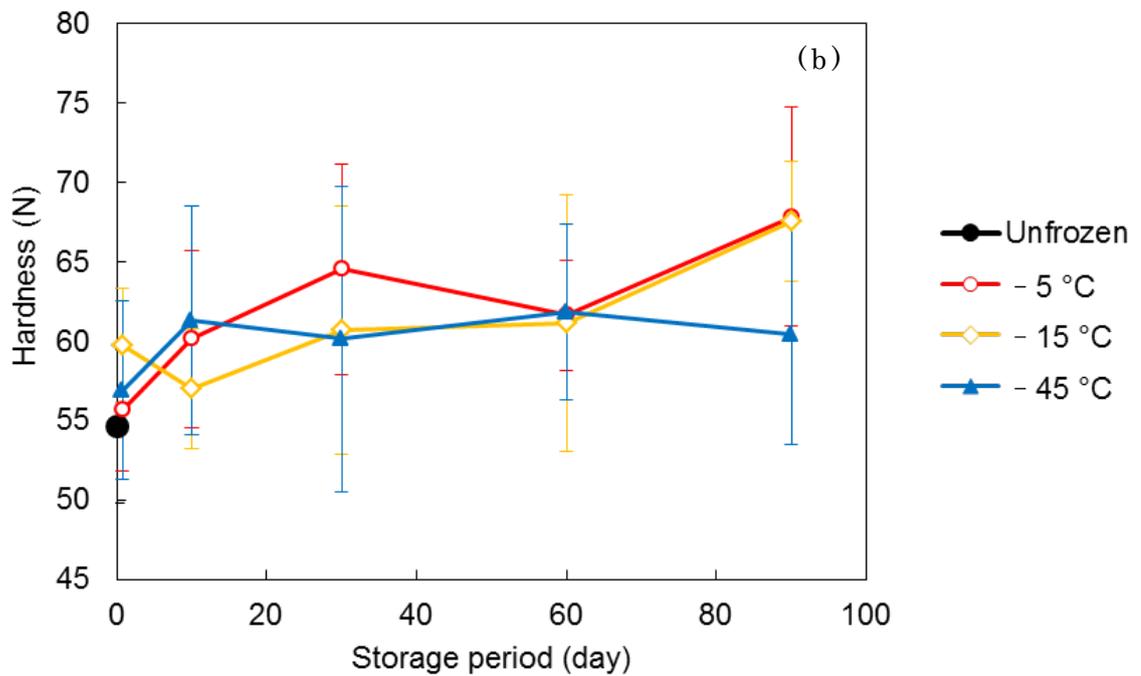
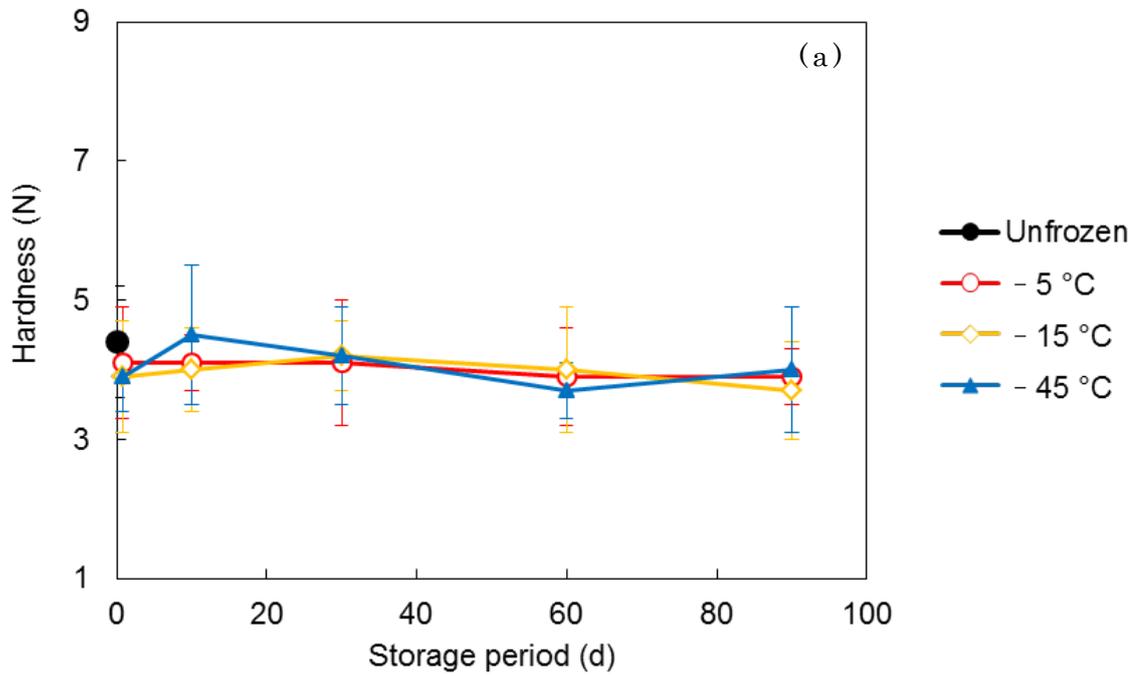


Fig.4-13 Hardness of cooked rice thawed by microwave heating at various storage temperatures and periods. (a) *H23*, (b) *H92*. Each symbol is represented as the mean \pm S.D.

次に、付着性に関する計測データ，すなわち-A23 および-A92 の結果を Fig.4-14 および Fig.4-15 に示す．なお，-A23 と-A92 はそれぞれ 23 %および 92 %圧縮後の引き離しに要した仕事量（-A）であり，バルク試料の表面付着性および全体付着性をそれぞれ表している．室温解凍の試料において，凍結温度 -5°C の試料の-A23 および-A92 の値は凍結プロセスにて大きく減少し，保存期間が長くなるにつれ，さらに減少した．また，凍結温度 -15°C の試料も保存期間が長くなるに伴い，-A23 および-A92 のいずれも減少する傾向が見られた．他方，加熱解凍は -5°C に凍結保存した試料の-A23 および-A92 の値を大きく回復することができたが，-A23 の値を未凍結試料すなわち凍結前の値まで回復させることはできなかった．

これらの結果より，凍結保存温度 -5°C の試料は解凍方法に関わらず粘弾性の維持は困難であることが明らかとなった．その理由として， -5°C における冷却，凍結および保存中にて，デンプンの老化，固化および凝集が進行することが疑われた．これは，他の保存条件と比較して，凍結温度 -5°C の試料は冷却及び凍結時間が長く，また，凍結率も高いことに起因すると推察された．一般的に，米デンプンの糊化は $50\sim 90^{\circ}\text{C}$ の範囲であることが知られている一方で，その老化はおよそ 20°C 以下において進行し，マイナス温度においても非凍結状態であれば老化は進行するとされている(鈴木，1989)．凍結温度が高い場合，冷却と凍結プロセス中に試料内のデンプンが老化を促進する温度帯に長時間曝されることに加えて，室温解凍の試料はそれらの温度を比較的長い時間かけて通過することにより，すべてのプロセスにおいて粘弾性の劣化が引き起こされていると推定される．他方，マイクロ波による解凍は試料温度が少なくとも 90°C 以上に加熱されるため，試料内においてデンプンの糊化および分散化が進行し，結果的に室温解凍試料と比べて良好な粘弾性を示すと考えられた．

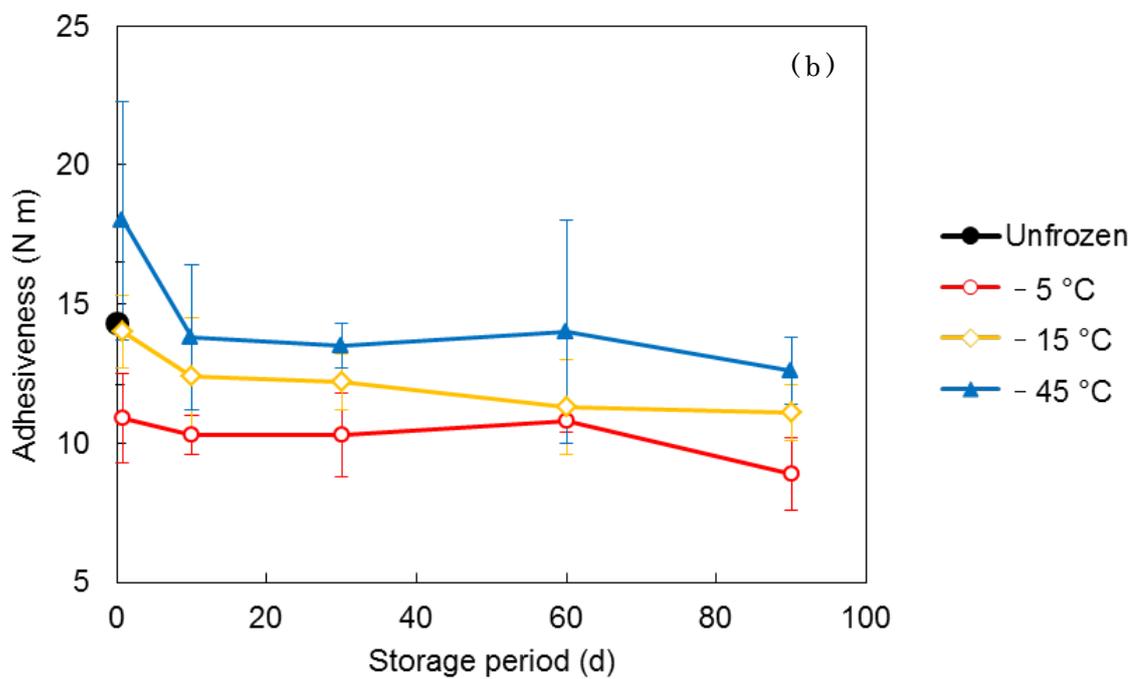
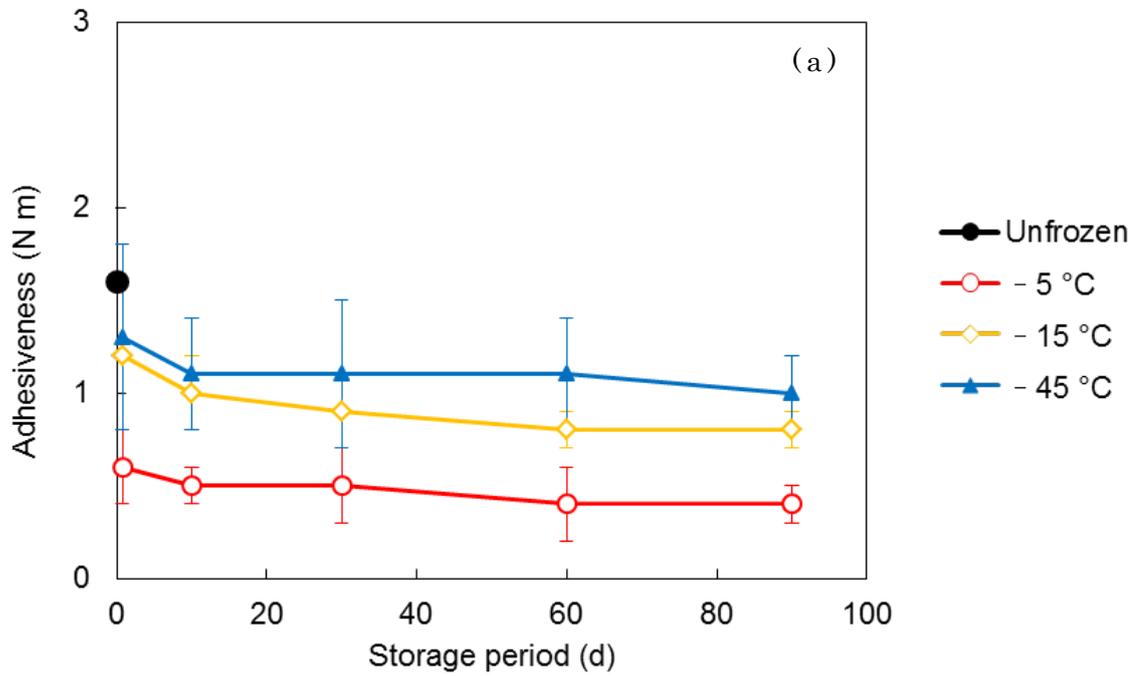


Fig.4-14 Adhesiveness of cooked rice thawed by air at various storage temperatures and periods. (a) -A23, (b) -A92
Each symbol is represented as the mean \pm S.D.

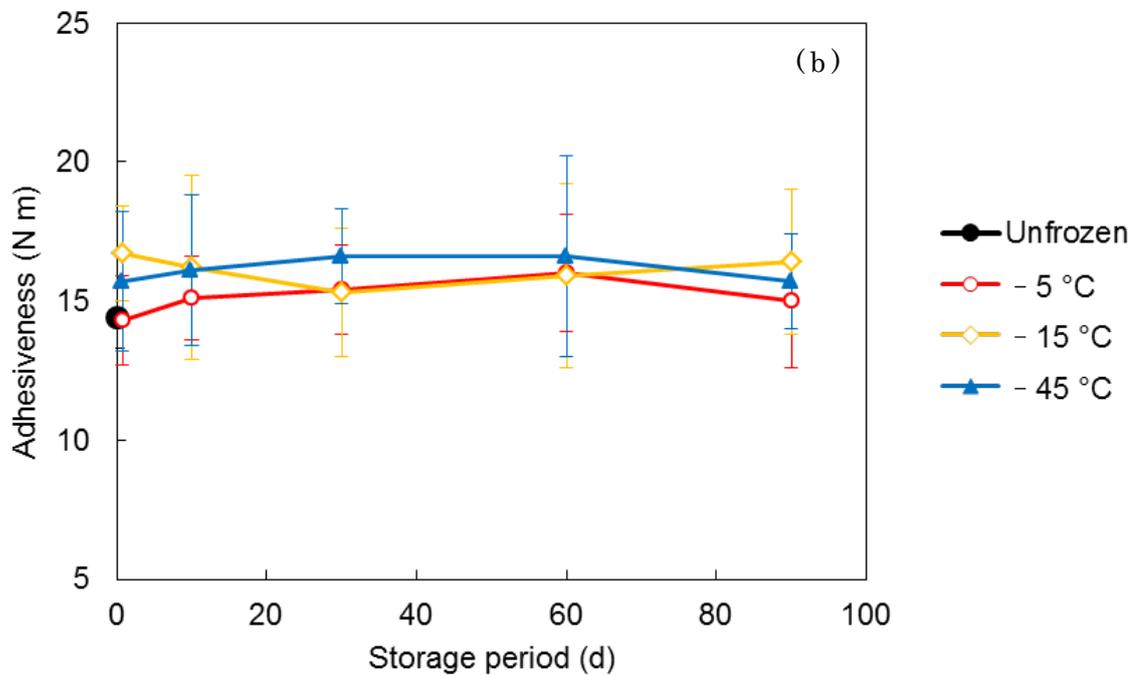
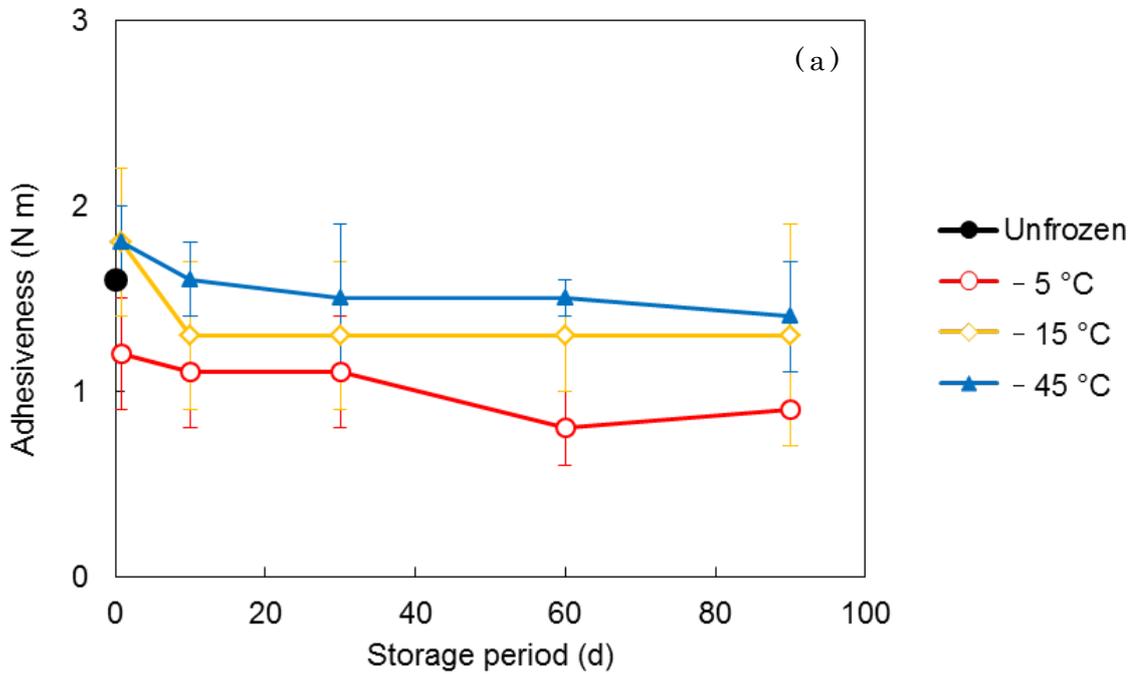


Fig.4-15 Adhesiveness of cooked rice thawed by microwave heating at various storage temperatures and periods. (a) – A23, (b) – A92, Each symbol is represented as the mean \pm S.D.

次に，粘弾性計測試験により得られた粘弾性パラメーター12項目を，それらの類似性によって分類するためにPCAを適用した．その結果，Table4-2に示すように，これらのパラメーターは主に2つの主成分（PC）に分類され，その累積寄与率は78.69%となった．第1主成分（PC1）は *H23*，*A23*，*H46*，*A46* および *A92*，すなわち粘弾性計測における圧縮プロセスにて計測されるパラメーターが区分され，その寄与率は49.1%となった．第2主成分（PC2）には引張りプロセスである *-H23*，*-A23*，*-H46*，*-A46* および *-A92* が区分され，寄与率は29.6%となった．

Table 4-2 Factor loading for instrumental values of frozen sample

Term	PC1	PC2
<i>H23</i>	0.88	-0.04
<i>-H23</i>	-0.45	0.75
<i>A23</i>	0.95	-0.13
<i>-A23</i>	-0.62	0.67
<i>H46</i>	0.96	-0.26
<i>-H46</i>	0.09	0.87
<i>A46</i>	0.96	-0.28
<i>-A46</i>	-0.47	0.85
<i>H92</i>	0.69	-0.10
<i>-H92</i>	0.05	0.53
<i>A92</i>	0.88	-0.15
<i>-A92</i>	-0.54	0.75
Proportion (%)	49.09	29.60
Variance	5.89	3.55
Cumulative Proportion (%)	49.09	78.69

さまざまな保存温度，期間および解凍方法における平均 PC スコアを 2 次元プロットした結果を Fig.4-16 に示す．室温解凍試料においては，保存温度が高いほど未凍結試料から離れた位置にプロットされ，試験区分中の保存温度が最も低い $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ の短期間保存が未凍結試料に近い位置にプロットされた．この結果より，凍結における劣化は，PC1 スコアの増加かつ PC2 スコアの減少，すなわち硬さの増加と付着性の減少であることが明らかとなった．他方，加熱解凍試料については， $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ の長期間保存以外は未凍結試料に近い位置にプロットされた．これは，マイクロ波加熱により硬さと付着性の値を凍結前の値まで，ある程度回復させることが可能であるが， $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ の長期間保存試料のプロット位置が示すように，劣化が過剰に進行した試料は回復できないことが明らかとなった．

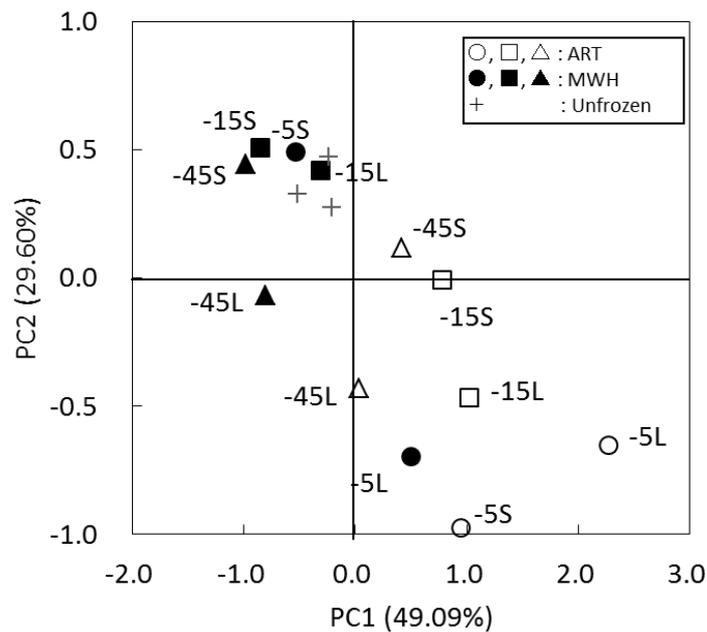


Fig.4-16 Two-dimensional plots of average PC scores using viscoelastic parameters with different storage temperatures (-5 , -15 and $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$), periods (S: 0–5 d, L: 90 d) and thawing methods (ART: air thawing; MWH: microwave heating).

4.4.4 凍結保存操作条件に伴う官能評価スコアの変化

官能評価スコアの相関分析結果を Table 4-3 に示す。総合評価である「美味しさスコア」は，こし，粘りおよび付着性スコアと高い正の相関が示され，反対に硬さスコアと負の相関を示した。また，硬さスコアは他の食感に関連する官能評価スコアとも負の相関を示した。これらの結果より，炊飯米の柔軟性や粘着性といった特徴は好まれ，反対に硬くなった炊飯米は消費者の嗜好に合わないことが明らかとなった。

Table 4-3 Correlation coefficients (*r*) between sensory attributes

Sensory term	Palatability	Hardness	Chewiness	Stickiness	Viscosity
Palatability	1.00				
Hardness	-0.73 ***	1.00			
Chewiness	0.84 ***	-0.47 **	1.00		
Stickiness	0.90 ***	-0.54 ***	0.91 ***	1.00	
Viscosity	0.92 ***	-0.54 ***	0.92 ***	0.97 ***	1.00

*, ** and ***: significant difference at $p < 0.05$, < 0.01 and < 0.001 level, respectively

Table 4-4 Factor loading for textural sensory descriptors of frozen cooked rice

Term	PC1	PC2
Hardness	-0.36	0.77
Chewiness	0.88	-0.37
Stickiness	0.89	-0.43
Viscosity	0.86	-0.49
Proportion (%)	60.82	28.77
Variance	2.43	1.15
Cumulative Proportion (%)	60.82	89.59

次に、主成分分析にて食感に関連する官能評価スコアを解析した結果、Table 4-4 に示すように、2つの主成分に分類され、その累積寄与率は 89.6%となった。PC1にはこし、付着性および粘りが区分され、硬さはPC2に区分され、それぞれの寄与率は 60.82%と 28.77%となった。

さまざまな保存温度、期間および解凍方法における平均 PC スコアについて 2次元プロットした結果を Fig.4-17 に示す。室温解凍試料は保存温度が高く、また保存期間が長くなるにつれ未凍結試料から離れた位置にプロットされた。室温解凍試料の-5S、-5L および-15L のプロットが示すように、保存温度が高くかつ保存期間が長くなるにつれて、PC1スコアが低下、すなわち付着性および粘りが低下していた。さらに、未凍結試料と比較し、すべての試料のPC2スコアが大きな値を示しており、これは硬さが増加していることを示している。これらの結果より、冷凍米飯の劣化は保存期間中に生じる付着性と粘りの減少および硬さの増加であることが分かった。これは、Fig.4-16 にて示した粘弾性計測と同等の結果となり、粘弾性計測結果と官能評価が比較的高い関係を持つ可能性が示唆された。

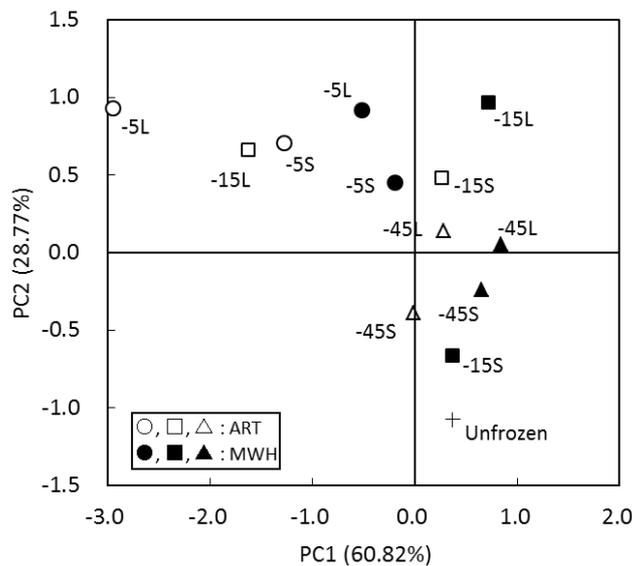


Fig.4-17 Two-dimensional plots of average PC scores using textural sensory score with different storage temperatures (-5, -15 and -45°C), periods (S: 0-5 d, L: 90 d) and thawing methods (ART: air thawing; MWH: microwave heating).

他方，マイクロ波加熱による解凍した試料の PC1 スコアは，同じ凍結保存条件の室温解凍試料と比較し，高いスコアを示した．また， -45°C にて凍結保存した試料は，保存期間および解凍方法に関わらず PC2 は低いスコアを示した．これらの結果より，90 日間を超える長期保存において，解凍後の食感を維持するためには，より低温における保存，たとえば -45°C の保存温度が必要となることが明らかとなった．

次に，凍結保存操作条件から官能評価スコア，特に嗜好度である美味しさスコアを予測し，さらに，凍結保存条件が美味しさスコアに及ぼす影響を明らかにするために，ANNモデルによりこれらの関係を近似させた．解凍方法ごとに保存温度・期間および美味しさスコアをデータセットとし，それぞれのANNモデルを構築した結果を Table 4-5 に示す．どちらの解凍方法もANNモデルの中間ノード数を3に設定し，モデルを構築した結果，室温解凍試料と加熱解凍試料の予測精度はそれぞれ $R^2 c=0.92$ ， $R^2 v=0.75$ と $R^2 c=0.97$ ， $R^2 v=0.86$ を達成することができた．

Table4-5 Architecture of ANN models and prediction accuracies

ANN models	Architecture			Prediction accuracy			
	Input (X)	Hidden (Z)	Output (Y)	$R^2 c^a$	$RMSEc^b$	$R^2 v^c$	$RMSEv^d$
	Air thawing	2	3	1	0.92	0.24	0.75
Microwave heating	2	3	1	0.97	0.14	0.86	0.20

^a Determination coefficient of calibration

^b Root mean square error of calibration

^c Determination coefficient of cross validation

^d Root mean square error of cross validation

ANNモデルから得られた結果について、保存温度と保存期間に基づいた美味しさスコアの応答曲面を Fig 4-18 に示す。室温解凍試料の美味しさスコアは保存温度が高くなるにつれて、かつ保存期間が長くなるにつれて低下することが見られた (Fig.4-18(a))。他方、マイクロ波加熱解凍試料の美味しさスコアは、室温解凍試料と比較して高くなることが分かった。マイクロ波加熱解凍は、凍結プロセスと保存中にて低下した美味しさスコアを回復する機能を有しているが、 -10°C より高い温度にて長期間保存した試料については、美味しさスコアを改善することは困難であることが明らかとなった。Fig.4-18(a)および(b)に示すように、例えば、7段階尺度法における美味しさスコアの中央値 4.0 点を 40 日間以上維持するためには、室温解凍においては -20°C 以下、加熱解凍においては -15°C 以下の保存温度が必要となる。このように、ANNを用いてモデル化することにより、美味しさスコアを維持するための凍結保存条件を解凍方法に応じて探索することが可能となった。

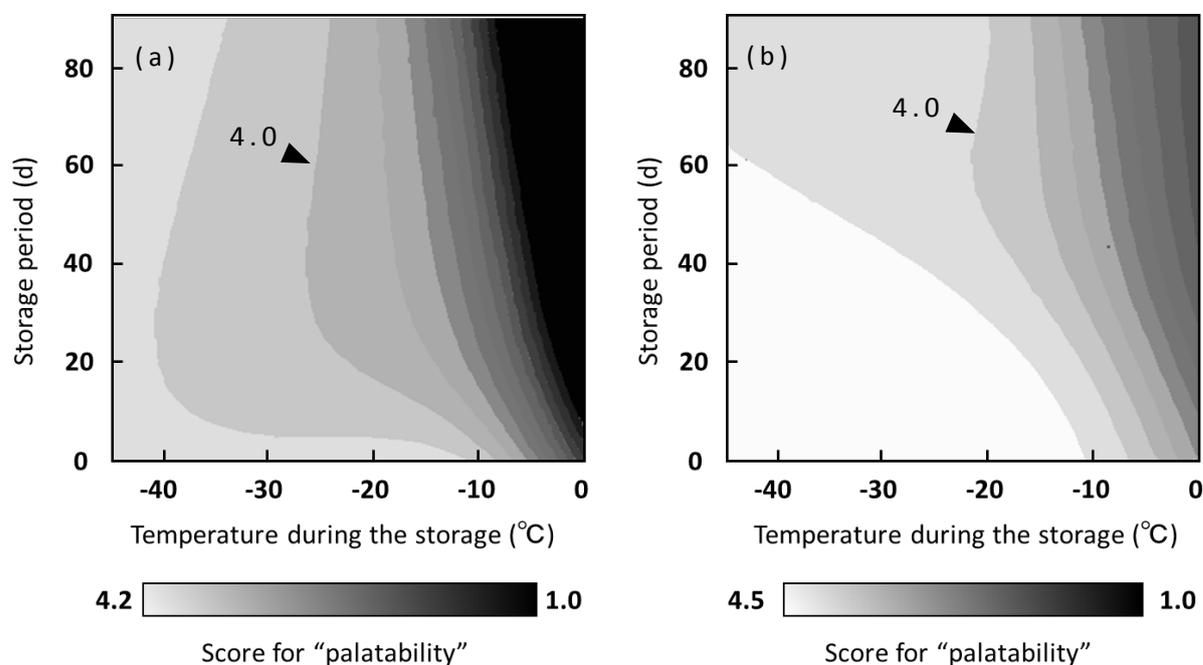


Fig.4-18 Counter curves of the palatability for temperature during the storage and storage period.
(a) air thawing (b) microwave heating

4.4.5 氷結晶サイズと官能評価スコアの関係

氷結晶面積より算出した平均等価円直径と美味しさスコアの関係を図4-19およびTable 4-6に示す。Fig.4-19において、氷結晶サイズ 0.0 μm は未凍結試料を示しており、その美味しさスコアは5.0~5.4の範囲となった。また、凍結試料については、氷結晶サイズが大きくなるにつれて美味しさスコアは低下することが明らかとなり、加熱解凍試料はそのスコアが2.5点まで、室温解凍試料は1.0点までそれぞれ低下した。同じ氷結晶サイズであっても、室温解凍試料と比べてマイクロ波加熱解凍試料は高いスコアとなったことより、解凍方法が官能評価スコアに大きく影響を及ぼすことが示された。

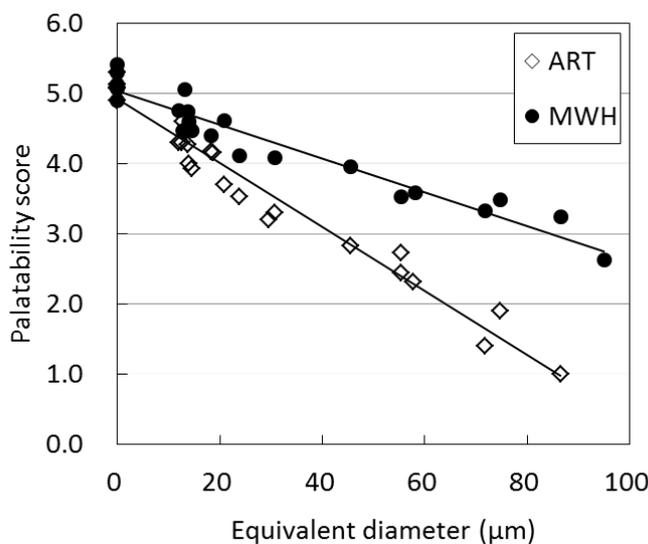


Fig.4-19 Relationship between equivalent diameter and palatability score. (ART: air thawing; MWH: microwave heating)

Table 4-6 Relationship between equivalent diameter and palatability.

	Sensory attribute	Thawing method	R^2	$RMSE$
Equivalent diameter	Palatability	ART	0.96	0.25
		MWH	0.93	0.21

(ART: air thawing; MWH: microwave heating).

このことより，凍結プロセスと保存中において美味しさスコアが低下した試料は，加熱解凍によりある程度回復することが分かった。しかし，大きな氷結晶が形成し，品質が大きく低下した試料については，加熱解凍でも十分に回復できないことも示された。美味しさスコアは7段階尺度法にて評価したため，その中央値は4.0点となる。例えば，美味しさスコア4.0点以上を維持するためには，室温解凍試料では等価円直径20 μm 以下を，加熱解凍試料では40 μm 以下に維持しなければならないことが明らかとなった。

次に，平均等価円直径と食感評価スコアの関係性を Fig.4-20 および Table 4-7 に示す。

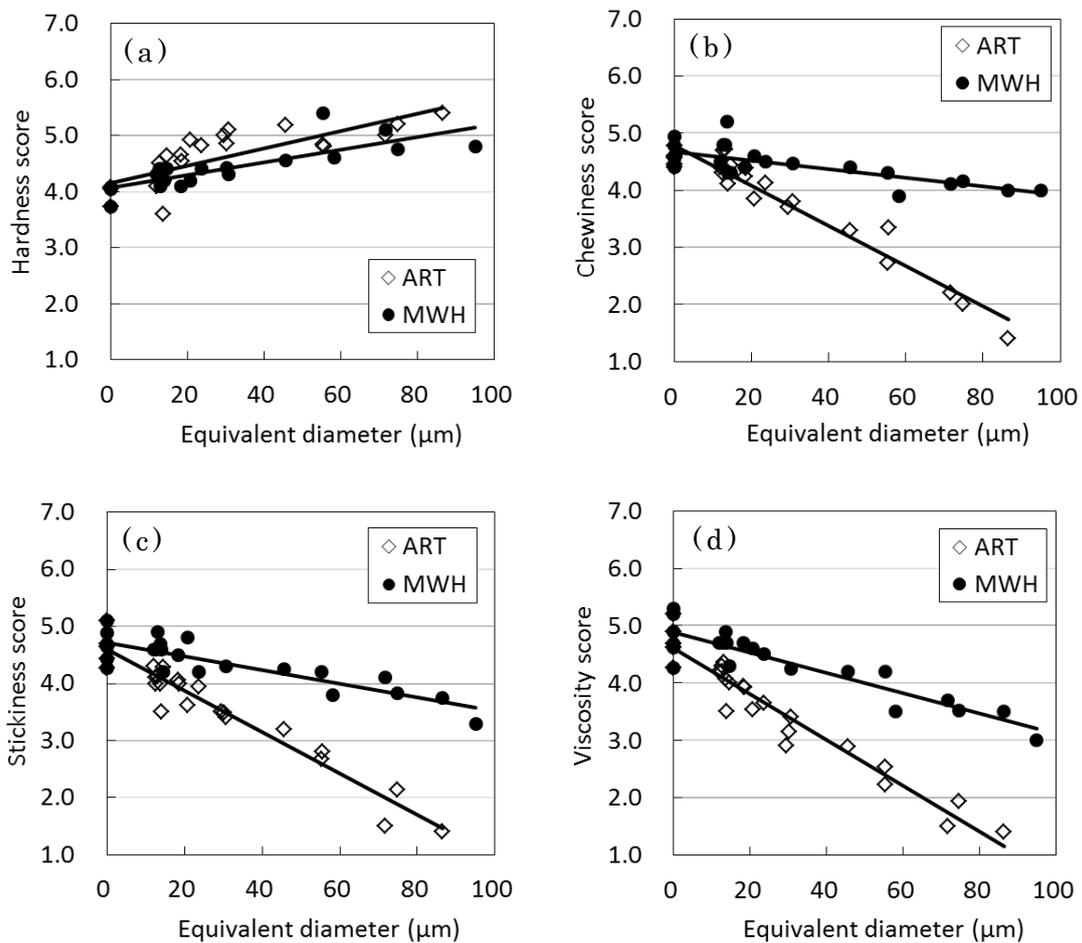


Fig. 4-20 Relationships between equivalent diameter and texture-related sensory evaluation score. (ART: air thawing; MWH: microwave heating).

(a) hardness, (b)chewiness, (c) stickiness, (d) viscosity.

Table 4-7 Relationship between equivalent diameter and texture-related sensory attributes.

	Sensory attribute	Thawing method	R^2	$RMSE$
Equivalent diameter	Hardness	ART	0.61	0.30
		MWH	0.64	0.23
	Chewiness	ART	0.94	0.24
		MWH	0.52	0.22
	Stickiness	ART	0.93	0.25
		MWH	0.72	0.23
	Viscosity	ART	0.92	0.30
		MWH	0.82	0.25

(ART: air thawing; MWH: microwave heating).

これらの結果より，氷結晶サイズが大きくなるにつれて，こし，付着性，粘りスコアは低下する一方で，硬さスコアは増加する傾向が示された．また，硬さに関する決定係数は室温解凍および加熱解凍ともに比較的低い値となった．室温解凍試料の硬さスコアは，等価円直径が 30 μm までの範囲においては増加傾向にあるが，30 μm を超えた付近から硬さはほとんど変化しないことが分かった．また，加熱解凍試料における硬さスコアの近似曲線の傾きは，他の食感評価スコアと比較して小さく，室温解凍試料と加熱解凍試料の間においては，ほとんど差がなかった．これは，硬さスコアには凍結保存中の氷結晶形成・成長だけでなく，デンプンの老化など，他の要因が関与していることが推察された．他方，室温解凍試料のこし，付着性，粘りのスコアは，等価円直径に対して高い相関が認められた．氷結晶サイズが大きくなるにつれて，こし，付着性，粘りのスコアは減少し，その傾きも大きいことが分かった．すなわち，室温解凍試料における氷結晶サイズは，こし，付着性，粘りのスコアに大きな影響を及ぼすことが示された．また，加熱解凍試料の付着性，粘りのスコアも氷結晶サイズと比較的高い相関を示したが，加熱によってこれらのスコアはある程度回復されたため，近似曲線の傾きは

室温解凍より小さくなった。加熱解凍はこしのスコアを大きく回復する機能を有するため、そのスコアと氷結晶サイズの関係は他の食感と比較して低い決定係数かつ近似曲線は小さな傾きとなった。

これらの結果より、加熱解凍は付着性と粘りのスコアをそれぞれ回復することができ、これは米飯粒表面の粘着性が回復されたことを示している。しかし、こしは米飯粒の表面と全体の弾力バランスに基づいていると推察されている(高橋ら, 2000)。加熱解凍は米飯粒の表層の硬さを低下させると同時に、内部の硬さを増加させており、結果として氷結晶サイズに関係なく、こしのスコアを回復させていると示唆された。これらのことより、冷凍米飯中に形成される氷結晶は、食感評価スコアに直接影響を及ぼし、結果的に総合評価である美味しさスコアを低下させると推察された。

4.4.6 粘弾性パラメーターを用いた官能評価スコア予測モデル

粘弾性計測データから官能評価スコアを予測するために、テンシプレッサーによる 12 項目の計測データを説明変数に、食感および美味しさに関する 4 項目の官能評価スコアを目的変数とし、中間ノード数を 3 に設定した ANN モデルにより近似した結果を Table 4-8 に示す。この結果より、構築したモデルは食感に関する官能評価スコアを比較的高い精度にて近似できることが明らかとなった。

Table 4-8 Prediction accuracies for sensory scores from viscoelastic parameters

Sensory attributes	$R^2 c^a$	$RMSE c^b$	$R^2 v^c$	$RMSE v^d$
Hardness	0.74	0.21	0.90	0.19
Chewiness	0.86	0.21	0.92	0.35
Stickiness	0.94	0.17	0.93	0.32
Viscosity	0.93	0.21	0.93	0.34

^a Determination coefficient of calibration

^b Root mean square error of calibration

^c Determination coefficient of cross validation

^d Root mean square error of cross validation

Fig.4-21 に示すように、粘りの官能評価スコアと粘弾性計測データから予測したスコアの関係は $R^2 c=0.93$, $R^2 v=0.93$ と高い精度となった。また、Fig.4-22 に美味しさスコアと粘弾性計測データから予測したスコアの関係を示す。美味しさに関するANNモデルも、食感に関する予測モデルと同様に、 $R^2 c=0.95$, $R^2 v=0.97$ と高い精度にて構築することができた。これらの結果より、ANNモデルは粘弾性パラメーターから食感および美味しさ評価スコアを比較的高い精度にて予測できることが明らかとなった。

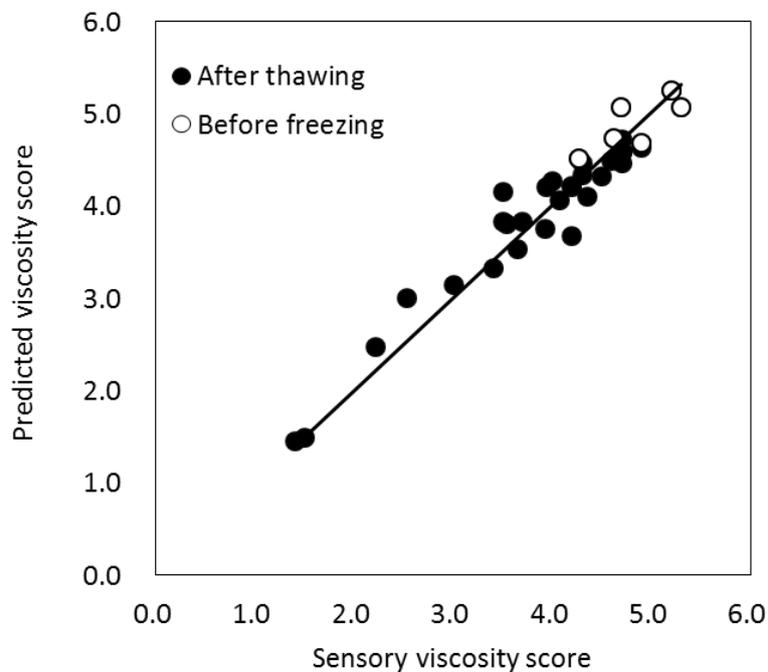


Fig.4-21 Sensory viscosity and predicted scores from viscoelastic parameters

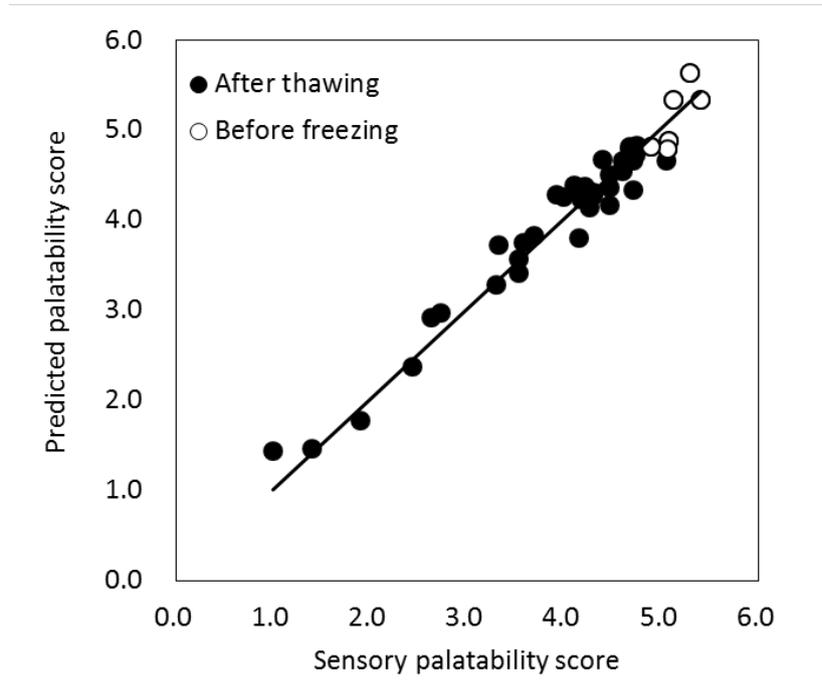


Fig.4-22 Sensory palatability and predicted scores from viscoelastic parameters

4.5 要約

食品中の氷結晶が食品の品質に及ぼす影響について、詳細に調べるために、主食である炊飯米を典型的な研究対象として、異なる凍結操作条件により形成される氷結晶が食感および美味しさ評価に及ぼす影響を総合的に評価した。具体的には、凍結保存操作が冷凍米飯に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、さまざまな条件にて凍結させた米飯中に形成される氷結晶サイズの計測、解凍後の粘弾性計測および一般消費者をパネルとした官能評価を実施した。蛍光染色、低温粘着フィルムおよび冷却ステージを用いることにより、これまで凍結置換法にて観察することができなかった冷凍米飯中に形成される氷結晶を観察、さらには定量的に計測することが可能となった。次に、冷凍米飯の劣化特性を明らかにするため、粘弾性計測データおよび官能評価スコアに基づき、それぞれ主成分分析を適用した。室温解凍試料については、保存温度が高くなると、硬さが増加し、また保存期間に依存して付着感・粘着感が低下することが明らかとなった。他方、加熱解凍試料の付着感・粘着感の低下は顕著に見られなかった。これらの結果より、加熱解凍は劣化した冷凍米飯の粘弾性特性をある程度回復することが可能であったが、高い温度にて凍結保存した米飯については十分に回復できないことが分かった。

次に、ANN を用いて凍結保存操作条件と美味しさスコアの関係モデル化した結果、例えば、美味しさスコア 4.0 点以上を 40 日間以上維持するためには、室温解凍では $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下、加熱解凍では $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下の保存温度が必要となるという予測が可能となり、美味しさスコアを維持するための凍結保存条件を解凍方法に応じて探索することができた。

また、氷結晶サイズと官能評価から得られた食感および美味しさスコアとの関係より、両者の間には高い負の相関関係が認められ、さらに、解凍条件によって官能評価スコアに与える影響が異なることを明らかにした。また、粘弾性計測データを説明変数に、食感に関連する官能評価スコアを目的変数として ANN モデルを構築したところ、比較的高い精度にて予測可能となることが示された。この結

果より、テンシプレッサーは食感スコアを予測するための有用なツールとなることが分かった。

これらの結果から、凍結保存条件、すなわち温度と期間は冷凍米飯内の氷結晶サイズへ影響を及ぼすだけでなく、解凍後の粘弾性データや官能評価スコアにも影響を与えることが明らかとなった。また、ANNモデルを構築することにより、数値シミュレーションによって品質評価や凍結保存条件を合理的に探索することが可能となった。

第 5 章 冷凍米飯内氷結晶サイズおよびフラクタル次元を用いた最適凍結保存条件探索モデルの構築

5.1 研究の目的

第 4 章では凍結保存操作が冷凍米飯に及ぼす影響について、氷結晶サイズの計測、粘弾性計測および官能評価を実施し、これらの関係を明らかにした。凍結保存条件によって、冷凍米飯内の氷結晶サイズは大きく変化することが明らかとなり、また氷結晶サイズと美味しさや食感に関わる官能評価スコアの間にはそれぞれ高い相関が示されたことより、氷結晶サイズが冷凍米飯の品質指標となることが分かった。

凍結食品中の氷結晶は、凍結プロセスにおける結晶成長プロセスおよび保存中における再結晶化によってサイズおよび形状が変化することは周知されている。したがって、これらのプロセスにおいて氷結晶形状が変化する挙動を把握することは、凍結食品の品質維持のための温度条件を設定するための重要な情報となる。凍結食品中の氷結晶サイズを制御するためには、操作因子である凍結温度と保存温度の範囲を決定し、その領域内（デザインスペース）にて操作する必要がある。このアプローチは **Quality by design** と呼ばれており、主に製薬分野にて積極的に導入されつつある概念であり、近年では食品製造プロセス、特に凍結乾燥プロセスへの利用も試みられている (Goshima et al., 2016; 中川・落合, 2017)。他方、氷の再結晶化は、氷結晶サイズの増加のほかに、表面の平滑化が観察される。この形状変化を評価する方法として、表面形状の複雑さを指標とするフラクタル次元の解析法が提案されている (Hagiwara et al., 2002; Hagiwara et al., 2003)。

本章では、効率的かつ効果的な実用操作を開発する視点から、最適な凍結および保存操作条件を探索する手法を確立する目的で、氷結晶サイズに基づいたデザインスペースから美味しさを維持するための凍結保存条件の探索を、さらに氷結晶の形状変化予測モデルから再結晶化抑制温度の探索をそれぞれ行った。

5.2 フラクタル解析について

フラクタル解析は，複雑かつ不規則な形状を定量的に評価する方法であり，粉体の表面構造やタンパク質凝集などの形状解析にも用いられている (Bremer et al., 1989; Nagai and Yano, 1990; Suzuki and Yano, 1990). フラクタル次元 d_p は氷結晶面積とその輪郭線の長さの関係をもとに算出され，正方形や球形などの単純な形状は $d_p=1$ を示すが，輪郭線の形状が複雑かつ自己相似性をとる場合には d_p は 1 から 2 の間の非整数値の値を示す．また，一般的に d_p の値が大きくなるほど輪郭は複雑な形状になり，氷の再結晶化が進むと表面の起伏形状が平滑化するため， d_p の値は次第に小さい値を示ようになる．このようにフラクタル次元を用いることにより，氷結晶の形状変化を定量的に評価することが可能となる．

5.3 Quality by design とデザインスペースについて

Quality by design (QbD) とは，主に製薬分野において医薬品開発および製造に導入されつつある概念であり，品質リスクマネジメントに基づく体系的な開発アプローチを指している．具体的には，最終製品が満たすべき品質を，最終製品に対する試験によって保証する Quality by test と称される方法ではなく，品質を確保できる製造プロセスの設計によって保証するという考え方である．これらを具現化するためのプロセスの操作領域をデザインスペースと称し，品質を確保することが立証されている入力変数と工程パラメーターの多元的な組み合わせ範囲を表している．

5.4 実験材料および方法

5.4.1 実験材料

供試材料として，市販の新潟県魚沼産コシヒカリの新米を用いた．試料の精米歩合は 90 %とし，得られた精白米は実験直前まで 4 °C の保冷庫にて保存した．

5.4.2 試料の調製法

氷結晶計測に用いた炊飯米は第2章の2.3.2に述べた試料調整法と同様の方法にて調製した。その後、染色された白米を4.3.2にて記載した方法にて炊飯および包装した。これらの試料の凍結には、それぞれ庫内温度 -5 、 -10 、 -15 、 -30 、 -45 °C、および庫内風速 0.5m/s に設定した恒温槽（EC-43MHP, HITACHI）を用いた。試料中心温度が恒温槽設定温度に到達した時点を凍結終了とし、それぞれの試料を庫内温度 -5 、 -10 、 -15 、 -30 °C および -45 °C に設定した Medical Freezer(MDF-U536U および MDF-192AT, SANYO)にて保存した。保存期間は 0 、 10 、 30 、 60 および 90 日間とし、それぞれの日数にてサンプリングし、氷結晶形状を観察および計測した。これらの試料の凍結温度と保存温度、保存期間の組み合わせを Table 5-1 に示す。

また、試料の凍結速度は第3章 3.2.1 に示した式(3-1)により算出した。

Table 5-1 Freezing and storage conditions of frozen cooked rice

Freezing temperature (°C)	Storage temperature (°C)	Storage period (d)
-5	-5 , -15 , -45	
-10	-5 , -10 , -30	
-15	-5 , -15 , -45	0 , 10 , 30 , 60 , 90
-30	-5 , -10 , -30	
-45	-5 , -15 , -45	

5.4.3 米飯内部組織の顕微鏡観察法

米飯 1 粒内の組織を観察するために、自家蛍光観察方法を用いた (Fulcher, 1982; Ogawa et al., 2003). 凍結保存後、ラップフィルムに包まれたバルク試料の中心部から氷結晶計測用の米飯 1 粒を採取し、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定したクリオスタット内にて凍結組織包埋剤 Tissue-Tek O.C.T (Sakura Finetec) を用いて凍結包埋した。包埋された試料を回転式凍結ミクロトーム (CM1510, Leica Microsystems) にセットし、目的の観察部位が露出するまでトリミングした後、低温粘着フィルム (Cryofilm type IIC (10), Leica Microsystems) を支持体として試料に貼り付け、厚さ $3\text{ }\mu\text{m}$ となるように薄切した。自家蛍光観察には、顕微鏡用冷却加熱装置 (LK-600PM, Lincam) を搭載した蛍光顕微鏡 (BX-51, Olympus) を用いた。また、この蛍光顕微鏡は水銀ランプを光源とし WU フィルターキューブを利用した。観察用の凍結試料薄切片を $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ に設定した冷却加熱装置上に静置し、凍結状態を維持しながら横断面を観察した。

また、冷凍米飯内に形成された氷結晶の計測は、第 2 章 2.3.3 に記載した凍結固定による顕微鏡標本作製法と同じ手順にて作製した。また、これらからの氷結晶画像については、第 2 章 2.3.5 と同様の方法にて蛍光観察および画像を取得した。

5.4.4 氷結晶計測法

取得した画像から、第 2 章 2.3.5 と同様の方法にて氷結晶の面積および等価円直径などの形状を算出した。

氷結晶のフラクタル解析には、Area-perimeter法を採用し、フラクタル次元を計測した (Mandelbrot, 1982; Suzuki et al., 1997; Hagiwara et al., 2002). まず、個々に識別された氷結晶の面積 S_p とそれに対応する輪郭線の長さ (周囲長) L_p を計測し (Fig. 5-2), (5-2) に示した関係式より、フラクタル次元 d_p を算出した。

$$S_p \propto L_p^{2/d_p} \quad (5-2)$$

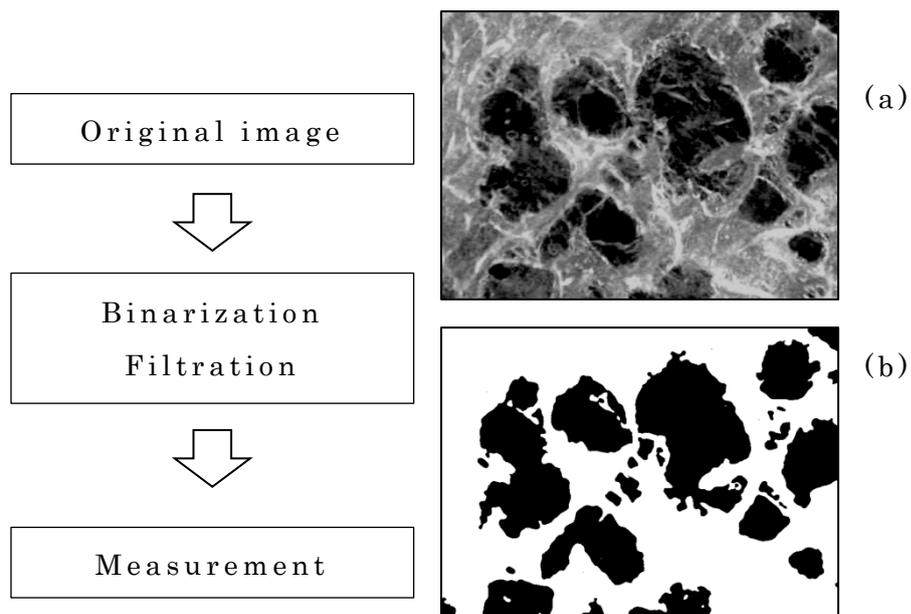


Fig. 5-1 Flow diagram of image analysis

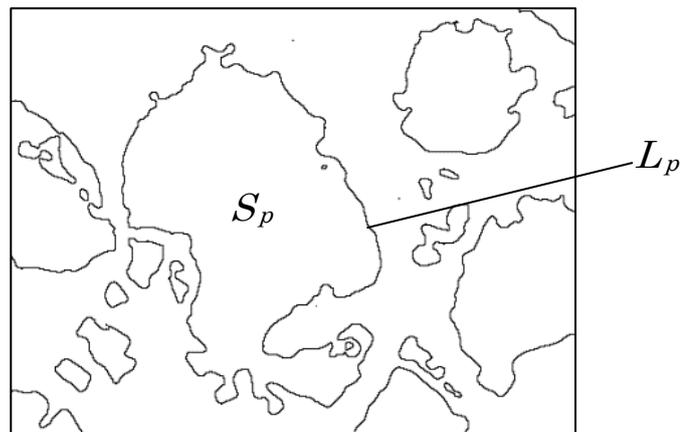


Fig.5-2 Perimeter length L_p and area S_p of ice crystal

5.4.5 統計解析法

統計解析は JMP11.0 (SAS Inst., co., Cary, N.C., U.S.A) を用いて, Tukey HSD 多重比較検定, および ANN モデリングを行った. ANN モデルは第 4 章 4.3.6 の Fig.4-5 に示した構造と同様のものを用いた. このモデルの入力層に凍結保存条件を, 出力層には氷結晶サイズまたはフラクタル次元の平均値をそれぞれ適用した. 中間層のノード数はモデル精度の向上が認められなくなる最小値を採用

した。構築したモデルは，最大学習回数およびそのツアー数をそれぞれ 500 および 10 回と設定した。また，学習モデルに過剰フィットすることを防止するために，オーバーフィットペナルティおよび収束基準をそれぞれ 0.001 および 0.00001 に設定し，5 分割交差検証法を用いた。

5.5 実験結果および考察

5.5.1 凍結および保存操作条件に伴う温度履歴

さまざまな温度条件下にて凍結させた炊飯米の典型的な凍結曲線を Fig. 5-3 に，これらの凍結速度を Table 5-2 にそれぞれ示す。炊飯米の凍結時間および速度はそれぞれ 27.6～249.6 分間および 0.02～0.18 °C/min の範囲となった。また，凍結保存中における米飯 1 粒の中心温度はそれぞれ -5 ± 0.4 ， -10 ± 0.6 ， -15 ± 0.3 ， -30 ± 0.6 および -45 ± 0.8 °C にて制御された。

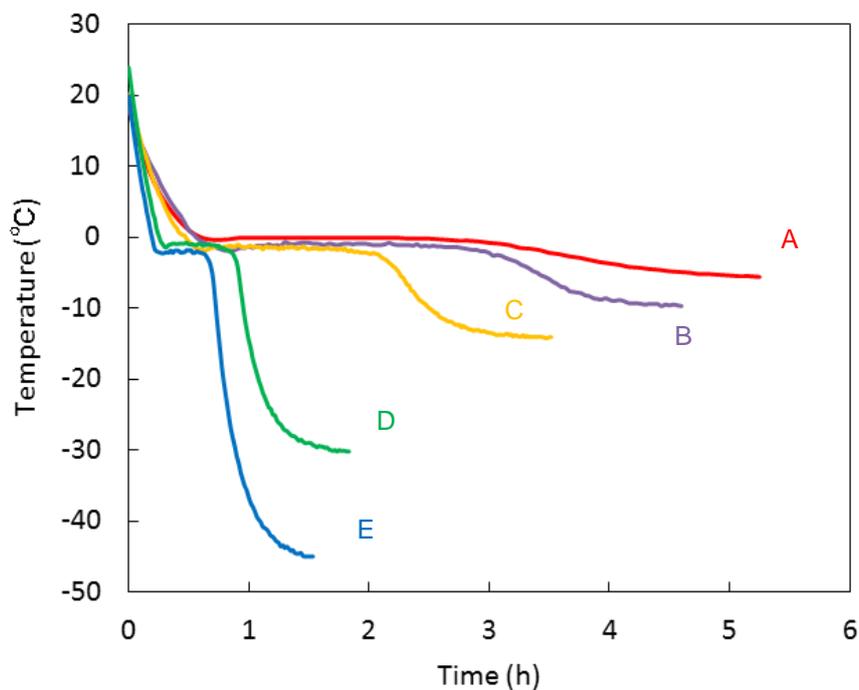


Fig.5-3 Freezing curve of cooked rice at various freezing conditions. Freezing at -5 °C (A), -10 °C (B), -15 °C (C), -30 °C (D), -45 °C (E)

Table 5-2 Freezing time and rate for cooked rice at various freezing conditions

Freezing conditions	Freezing time (min)	Freezing rate (°C/min)
-5 °C	249.6 ±15.0 ^a	0.020 ±0.001 ^a
-10 °C	136.2 ±15.0 ^b	0.037 ±0.004 ^{a,b}
-15 °C	106.2 ± 1.2 ^c	0.047 ±0.001 ^b
-30 °C	48.0 ± 5.4 ^d	0.105 ±0.014 ^c
-45 °C	27.6 ± 3.6 ^e	0.182 ±0.027 ^d

Replications: $n=3$

^{a,b,c,d,e} Means in the same column followed by the same lowercase superscript letters are not different ($p>0.05$)

5.5.2 米飯内部組織の観察画像

植物細胞の細胞壁に存在するフェノール化合物は、365nm 付近の紫外光により励起されると自家蛍光を発することが知られている。したがって、これらの自家蛍光の特徴を利用することによって、凍結プロセスにおける氷結晶形成に依存した細胞壁の破壊を観察することが可能となる。

未凍結、-5 °C および -45 °C にて凍結した炊飯米粒内部における自家蛍光顕微鏡像を Fig.5-4 に示す。

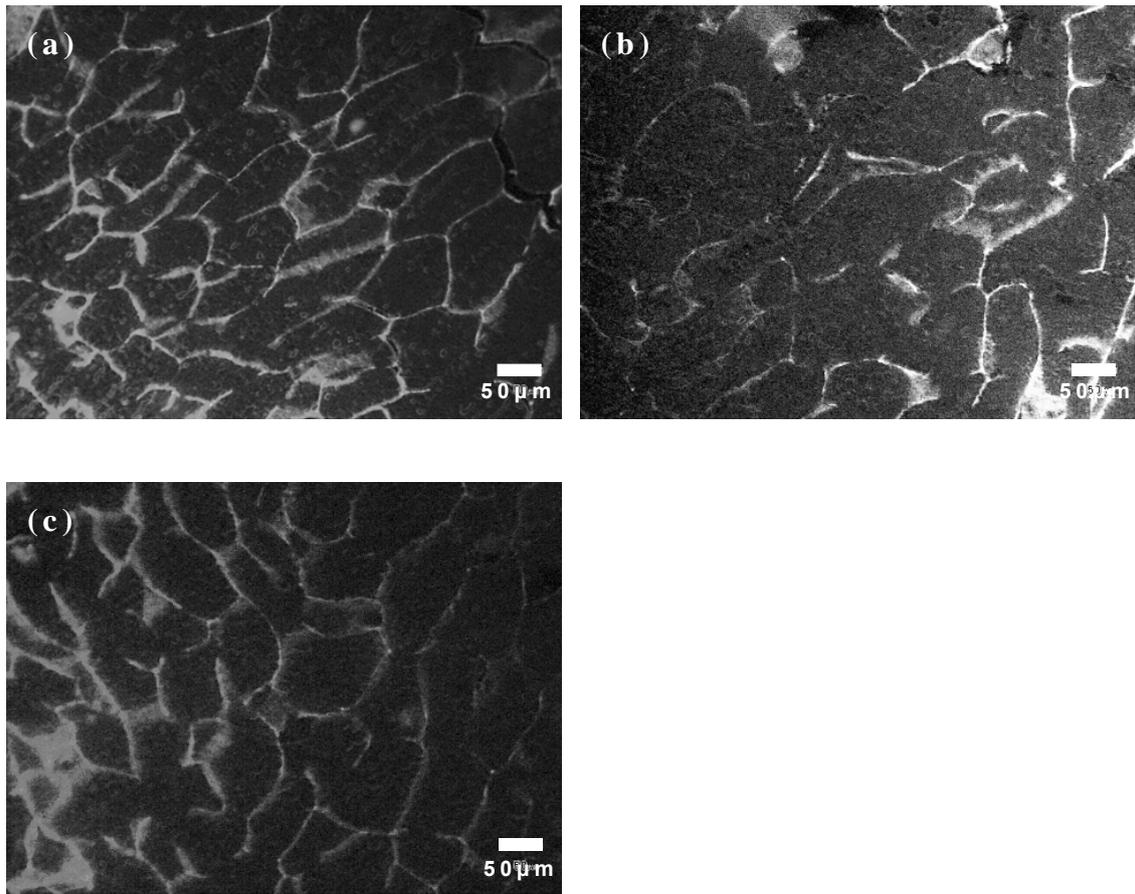


Fig.5-4 Autofluorescence images of cross section in cooked rice. (a) cooked grain without freezing, (b) freezing at -5°C , (c) freezing at -45°C .

未凍結炊飯米内部の細胞壁は部分的に欠損していることが観察され、これは炊飯時における破損が原因であると推察された (Fig.5-4(a)). この顕微鏡画像より、炊飯後の胚乳細胞サイズは長径 $80\sim 200\ \mu\text{m}$ 、短径 $40\sim 90\ \mu\text{m}$ の範囲となることが測定された。凍結試料の観察結果より、凍結温度 -5°C の試料における胚乳細胞は氷結晶形成により破壊されているため、細胞壁の形状が維持されていないだけでなく、多くの部位にて欠損していた (Fig.5-4(b)). 他方、凍結温度 -45°C の試料では、未凍結試料とほぼ同等の組織が観察され、凍結による細胞壁の破壊がほとんど生じていないことが示された (Fig.5-4(c)). これらの結果より、速い速度にて凍結された試料は細胞構造を維持できることが明らかとなった。

5.5.3 凍結および保存操作条件に伴う氷結晶サイズの変化

さまざまな温度条件にて凍結および保存した試料の典型的な氷結晶像を Fig. 5-5 に示す。凍結温度が低くなるにつれて、微小な氷結晶が数多く形成されていた (Fig. 5-5(a),(b),(c))。食品中の氷の結晶化速度は熱移動速度および細胞から細胞間隙への水拡散速度が大きく関係している。凍結速度が遅いとき、すなわち本実験においては凍結温度 -5°C の試料の場合、細胞間隙に大きな氷が形成され (Fig. 5-4(a))、他方、凍結速度の速い -45°C の試料内部においては、細胞の内部と細胞間隙の両方に小さな氷が数多く形成された (Fig. 5-4(c))。保存 10 日目においては、凍結温度に関わらず、保存温度 -5°C の試料内部の氷結晶は大きく成長しており、またその数も少なくなっていた (Fig. 5-5(d),(e),(f))。他方、保存温度 -45°C の試料の氷結晶については、構造的な変化はほとんど観察されなかった (Fig. 5-5(g),(h),(i))。これらの結果より、高い保存温度は 10 日間の保存であっても、試料内の氷結晶のサイズや数に影響を及ぼすことが明らかとなった。

さらに、試料の凍結温度に関わらず、 -5°C にて 90 日間保存した試料内部の氷結晶は凍結初期と比較して大きく成長し、またその数も減少していた。長期間保存した氷結晶のサイズは凍結時における凍結速度に依存するため (Fig. 5-5 (j)-(o))、凍結時の氷結晶サイズは保存中の再結晶化にとって重要な要因となることが分かった。加えて、 -5°C にて 90 日間保存した試料内部の大きな氷結晶は、冷凍米飯の内部組織を破壊していたことが観察された (Fig. 5-5(j))。また、凍結温度と保存温度に大きな差がある場合、氷結晶の成長を引き起こすことが示された (Fig. 5-5(K),(l))。低い凍結温度によって形成された小さな氷結晶は、高い温度にて保存されている間に形状的な変化が進行し、大きな氷が再構築された。他方、凍結時の氷結晶サイズや保存期間に関わらず、保存温度 45°C の試料の氷結晶サイズおよび形状の変化はほとんど観察されなかった (Fig. 5-5(g),(h),(i),(m),(n),(o))。凍結温度 -5°C のように高い温度にて凍結した試料には大きな氷結晶が形成されたが、低い温度における保存では、氷結晶のさらなる成長は抑制されることが明らかとなった。氷の再結晶化進行速度は試料の保存温度、保存期間そして

温度変動に大きく影響を受けることは良く知られている。しかしながら、本研究では比較的安定な保存温度にて試験したため、保存中における氷結晶の変化を短期間にて捉えるためには大きな温度変動範囲が必要となる。

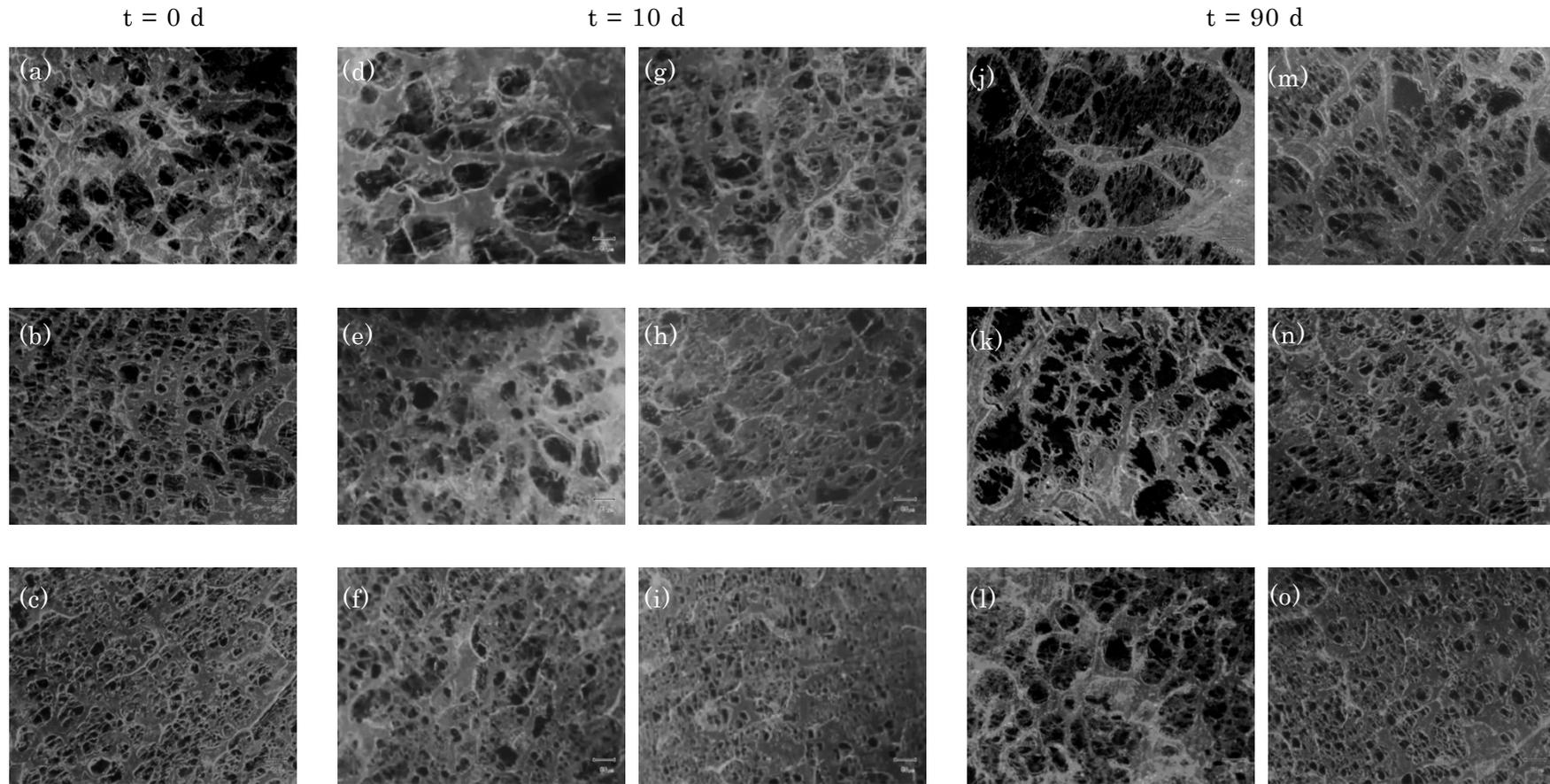


Fig.5-5 Microscopic images of frozen cooked rice under various temperature conditions and storage periods. Freezing temperatures, frozen storage temperatures, and periods for the above images are as follows: Block of 3 ((a) – (c): $t = 0$ d) and then 6 ((d) – (i): $t = 10$ d) and 6 ((j) – (o): $t = 90$ d). Blocks of 3 and 6 arranged as 3 rows (freezing temperature; -5 °C, -15 °C, -45 °C), and blocks of 6 arranged as 2 columns (storage temperature; -5 °C, -45 °C). Scale bar: 50 μ m.

さまざまな凍結温度と保存温度の組み合わせにおける氷結晶の平均等価円直径の経時変化を Fig.5-6 に示す。凍結時における平均等価円直径の範囲は 10~60 μm であり、90 日間保存すると 12~120 μm の範囲になると推算された。低い凍結温度は等価円直径を小さくし、長い保存期間はそれを増加させることが示され、さらに低温での保存はサイズの増加を抑制することが分かった。凍結温度 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ と $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ の米飯を $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ にてそれぞれ保存した際に、保存 30 日以上で氷結晶のサイズはほとんど変化しなくなった (Fig.5-6(a))。他方、保存温度 $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ の試料は、凍結温度、初期の氷結晶サイズや保存期間に関わらず、氷結晶サイズの成長は観察されなかった (Fig.5-6(e))。また、凍結温度 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ と保存温度 $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ の組み合わせのように、凍結と保存の温度差が大きい場合において、凍結時に形成される大きな氷結晶は低温保存中ではほとんど影響を受けていない。この結果は、氷結晶の成長は凍結温度より保存温度が高い場合に観察され、凍結温度より保存温度が低い場合には観察されないことが明らかとなった。具体的には、凍結温度 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ の試料の氷結晶は $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ の保存においてはほとんど成長しないが、反対に凍結温度 $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ の試料の氷結晶は $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ の保存においては徐々に成長することが観察された (Fig.5-6(c),(e))。凍結食品の凍結率は保存温度によって異なることは知られており (Nesvadba, 2009)、このことは食品内における水分子の移動速度に影響を及ぼす。保存温度が高いと凍結率が低く、液体すなわち移動しやすい状態で存在している水分子が多く存在しているため、氷表面の不安定状態を解消する方向に移動する。したがって、再結晶化の速度が速く、氷のサイズや形状が変化していく。このことより、保存温度 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ においても、小さな氷結晶の融解や再結晶化が生じることが示唆された。反対に、保存温度が $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ のように低いと凍結率が高くなり、移動しやすい状態の水分子が少なく、かつ移動速度も遅くなるため、氷結晶のサイズや形状の変化が小さくなる。

これらの結果より、氷結晶サイズは凍結と保存操作条件の関係によって影響を受けることが示された。

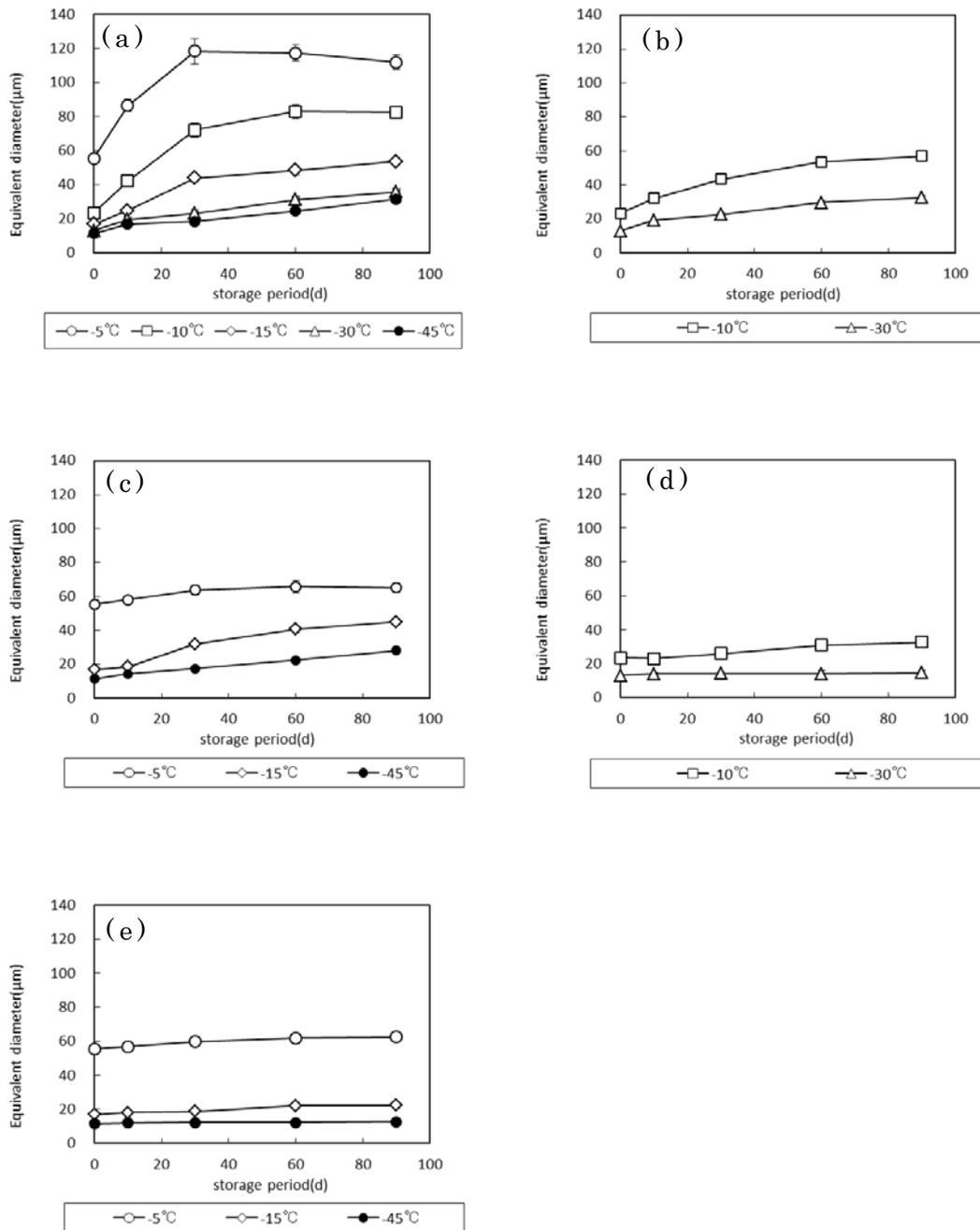


Fig.5-6 Mean equivalent diameter of frozen cooked rice against storage period at various freezing and storage temperatures. Storage temperature;(a) -5 °C, (b) -10 °C, (c) -15 °C, (d) -30 °C, (e) -45 °C. Freezing temperature;○-5 °C, □-10 °C, ◇-15 °C, Δ-30 °C,●-45 °C, Each symbol is represented as the mean ±S.E.

5.5.4 氷結晶形状に基づくデザインスペースの推算

凍結保存条件の変化に起因して冷凍米飯内に形成される氷結晶のサイズを予測するために、ANNモデルを構築した。ANNの入力層には凍結温度、保存温度および保存期間を、出力層には等価円直径をそれぞれ適用し、中間ノード数を3に設定してモデルを構築した結果、 $R^2c=0.96$ 、 $RMSEc=4.59$ および $R^2c=0.93$ 、 $RMSEc=7.10$ となり、高い予測精度を達成することができた。ANNモデルから得られた結果について、凍結温度、保存温度および保存期間に基づいた等価円直径の予測値の応答曲面をFig.5-7に示す。Fig.5-7(a)より、凍結直後の等価円直径は凍結温度 -15°C 付近まで小さくなるが、それ以下の凍結温度になると顕著な変化は見られなかった。また、保存温度が高いほど、保存日数が長くなるに伴い等価円直径は増加し、特に -10°C 以上の保存温度においては、顕著な増加が示された。次に、第4章4.4.5のFig.4-14より、たとえば室温解凍した冷凍米飯の美味しさスコアの中央値4.0以上を指標とする場合、氷結晶サイズは $20\ \mu\text{m}$ 以下にする必要がある。Fig.5-7の等高線上に、ここで得られた $20\ \mu\text{m}$ を示すと、グラフ中の実線により領域を描くことができる。それぞれのグラフにおいて、この実線より左側の領域が氷結晶サイズ $20\ \mu\text{m}$ 以下となり、この領域内の凍結温度と保存温度の組み合わせを選択することにより、目的とする美味しさスコア4.0以上を維持することが可能となる。この領域がデザインスペースであり、保存日数が長くなるにつれてデザインスペースの範囲が狭くなること、すなわち長期保存においては品質維持のための条件が狭まることが示した。

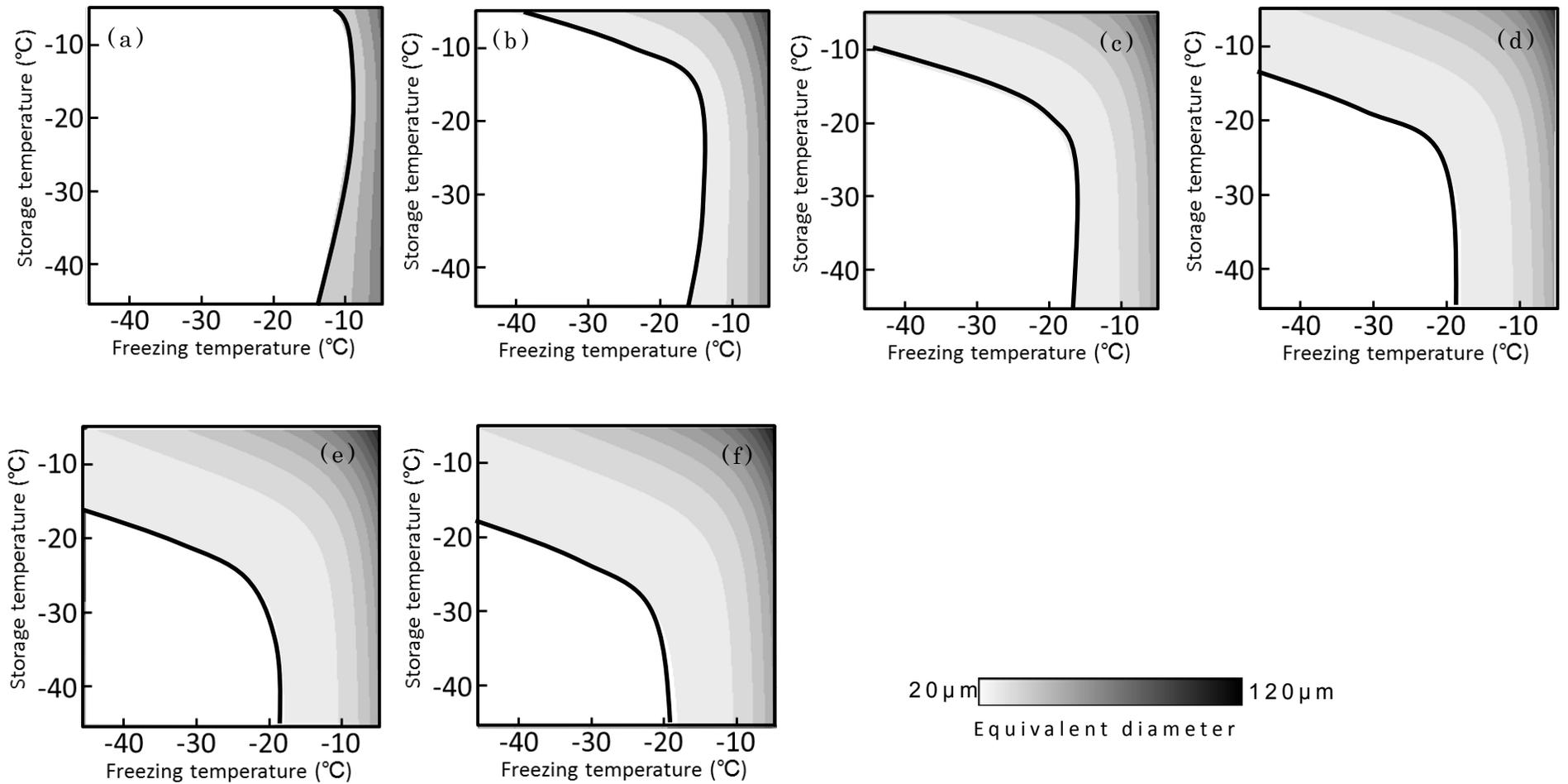


Fig.5-7 Predictive equivalent diameters based on relationship between freezing and storage temperature on the various storage periods. Storage period ;(a) 0 d , (b) 15 d, (c) 30 d, (d) 45 d, (e) 60 d, (f) 90 d

5.5.5 凍結および保存条件に伴うフラクタル次元の変化

凍結食品中に形成される氷結晶粒は、複雑かつ不規則な形状をしていることが多いため、これらを定量的に評価する手法として、フラクタル解析が用いられている。凍結および保存条件に対する典型的な $\log S_p$ と $\log L_p$ の関係を Fig.5-8 に示す。 $-5\text{ }^\circ\text{C}$ にて保存した試料のプロットは、 $-45\text{ }^\circ\text{C}$ にて保存した試料より比較的高い決定係数を示した。 $-5\text{ }^\circ\text{C}$ にて保存した試料の $\log L_p$ に対する $\log S_p$ の傾きは、保存日数が長くなると増加した一方で、 $-45\text{ }^\circ\text{C}$ にて保存した試料の傾きはほとんど変化しなかった。加えて、 $-5\text{ }^\circ\text{C}$ にて保存した試料の $\log L_p$ と $\log S_p$ の両方の値は、保存中にそれぞれ増加した (Fig.5-8(a),(b))。

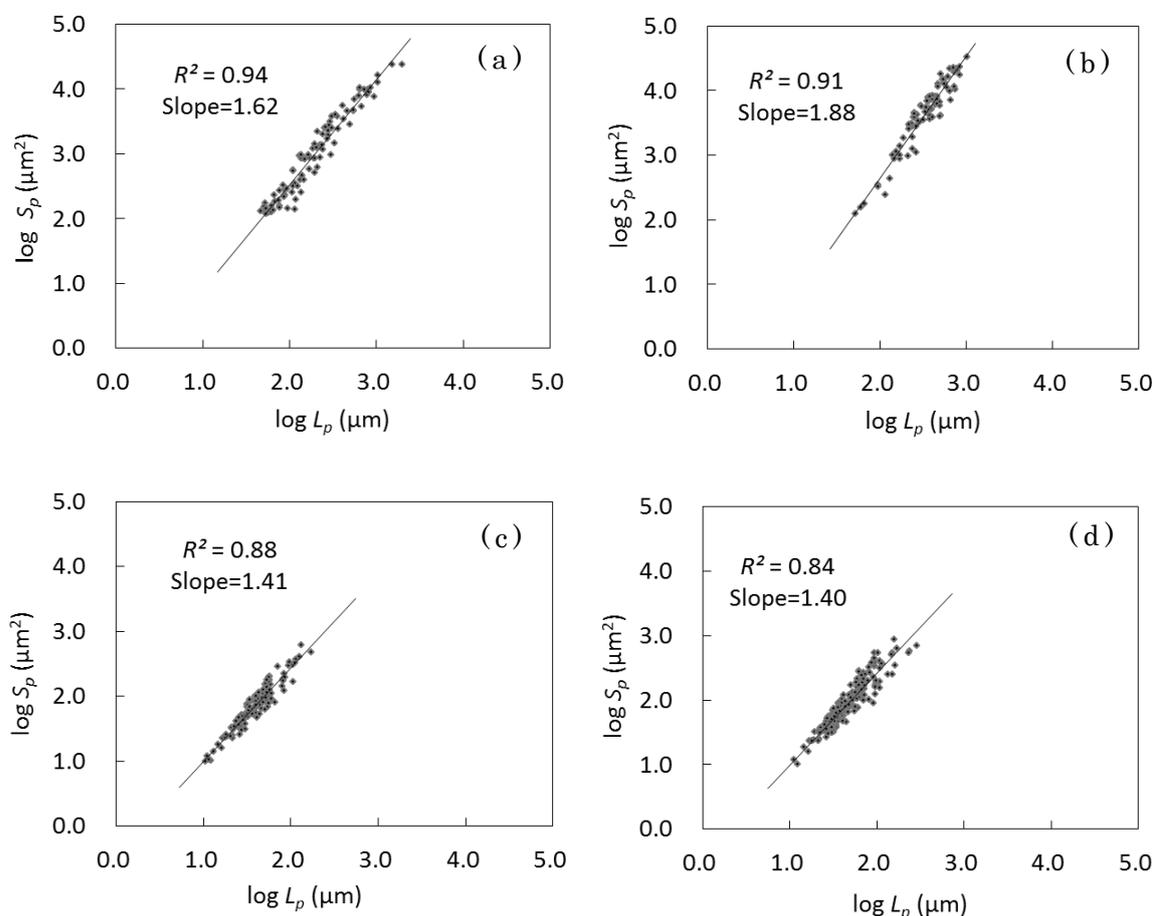


Fig.5-8 Plots of $\log S_p$ vs $\log L_p$ for different temperature and period. (a) freezing at $-5\text{ }^\circ\text{C}$, 0 d, (b) freezing at $-5\text{ }^\circ\text{C}$ and storage at $-5\text{ }^\circ\text{C}$, 90 d, (c) freezing at $-45\text{ }^\circ\text{C}$, 0 d, (d) freezing at $-45\text{ }^\circ\text{C}$ and storage at $-45\text{ }^\circ\text{C}$, 90 d.

さまざまな温度にて凍結保存した試料の L_p と S_p の関係に基づいて計算された傾きの値について、保存 90 日までの経時変化を Fig.5-9 に示す。高い保存温度にて長期間保存すると、初期の傾きと比較して増加する傾向が示されたが、反対に、低い温度にて保存した場合は、初期の傾きに関係なく、傾きの変化はほとんど見られなかった。これらの結果は、再結晶化を抑制する上で、凍結温度より保存温度を低くする条件のほうが効果的であることが明らかとなった。

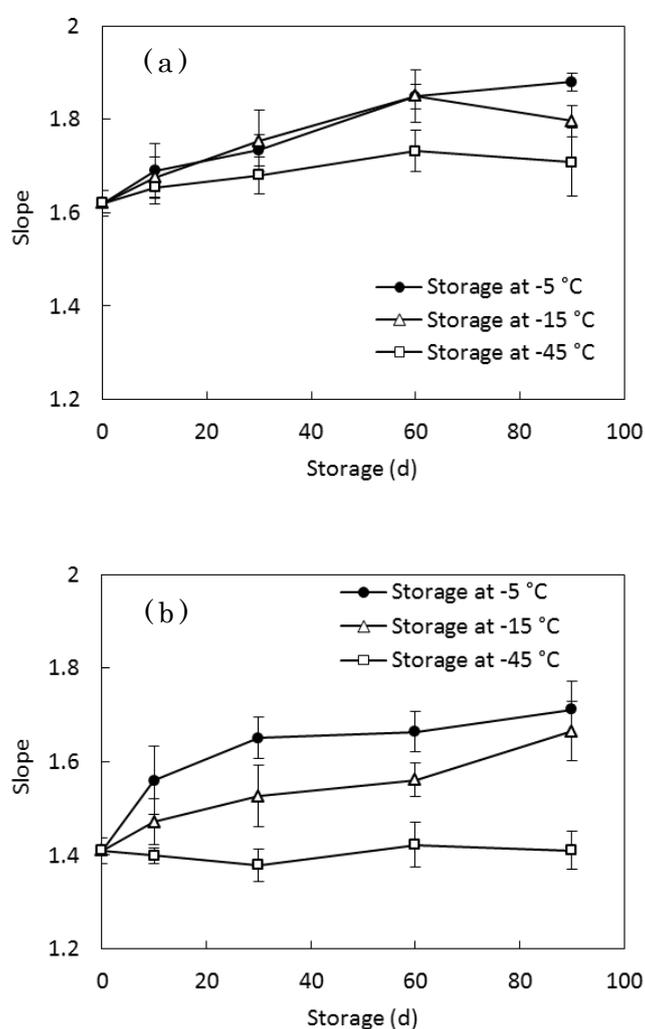


Fig.5-9 Typical variations of slope values for different freezing and storage temperature during storage period. Freezing temperature;(a) -5 °C, (b) -45 °C Each symbol is represented as the mean \pm S.E.

さまざまな凍結温度, 保存温度および期間にて保存した試料のフラクタル次元 d_p の値は 5.4.4 にて記した式 5-2 にしたがって計算された (Fig.5-10, 5-11). 全ての試料のフラクタル次元の値は 1.0 ~ 2.0 の範囲内となったことより, 冷凍米飯中に形成される氷結晶粒の輪郭は自己相似性を有する形状であることが明らかとなった (Mandelbrot, 1982). また, フラクタル次元は凍結温度が低いほど大きな値を示すことより, 凍結速度が速いと氷結晶の表面形状が複雑に形成されることがわかり (Fig.5-10), その範囲は 1.17 ~ 1.41 の範囲となった. Fig.5-11 に示すように, 高い温度にて長期間保存すると, 凍結時のフラクタル次元よりその値が小さくなり, 反対に低い温度にて保存すると, 初期のフラクタル次元の値に関係なく, その値はほとんど変化しないことが分かった. これらの結果は, 高い温度における保存, 長い凍結時間, 遅い凍結速度そして長期間の保存は氷結晶表面の起伏構造の平滑化が進行していることを示している. フラクタル解析の結果より, 凍結と保存条件の両方が氷結晶形状に影響を及ぼしていることを定量的に示すことができた.

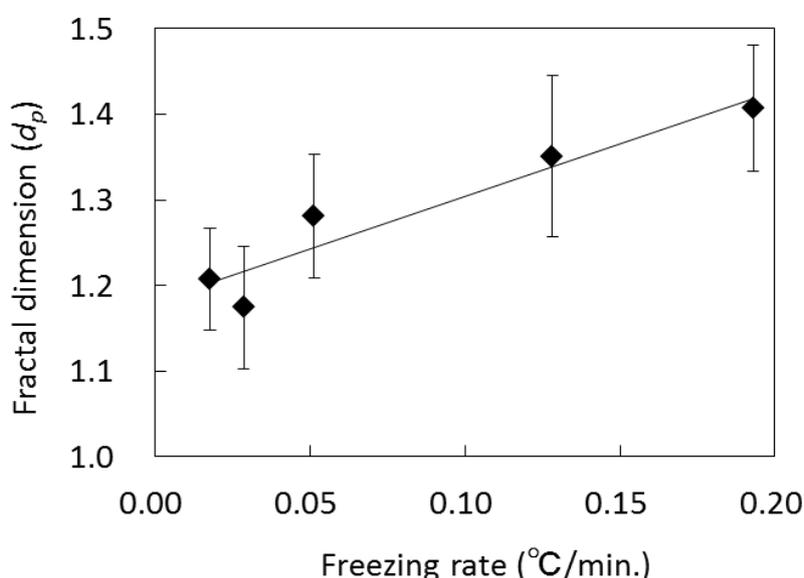


Fig.5-10 Relationship between freezing rate and fractal dimension

Values are means \pm S.E.

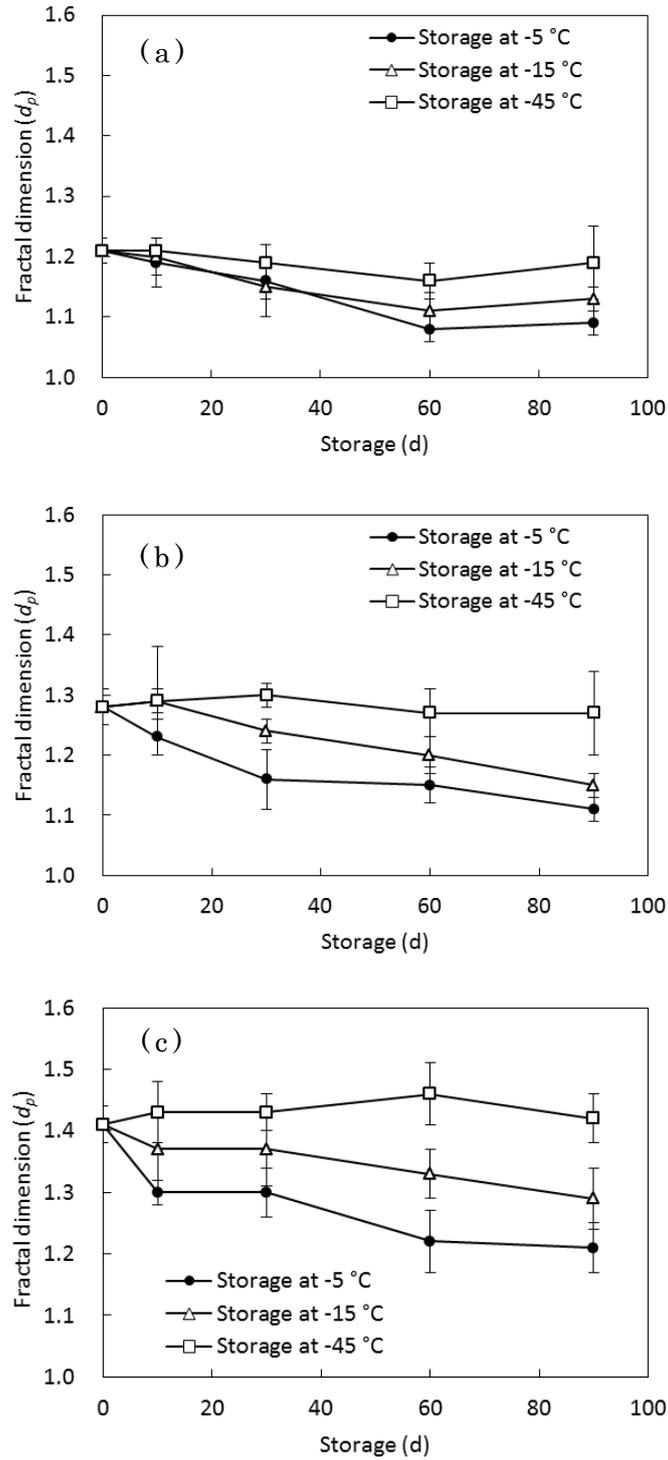


Fig.5-11 Dependence of fractal dimension d_p at various freezing and storage temperatures during storage period. Freezing temperature; (a) -5 °C, (b) -15 °C, (c) -45 °C. Each symbol is represented as the mean \pm S.E.

5.5.6 再結晶化抑制条件の探索モデル

冷凍米飯の凍結および保存中における氷結晶のフラクタル次元の解析結果を用いて、形状変化に基づく再結晶化の進行予測モデルを構築した。具体的には、ANNの入力層に凍結温度、保存温度および保存期間を、出力層にはフラクタル次元をそれぞれ適用し、中間ノード数を3に設定し、モデルを構築した結果、 $R^2c=0.89$, $RMSEc=0.03$ および $R^2c=0.86$, $RMSEc=0.04$ となり、比較的高い予測精度のモデルとなった。ANNモデルから得られた結果について、凍結温度、保存温度および保存期間に基づいたフラクタル次元の予測値の応答曲面をFig.5-12に示す。この結果から、フラクタル次元の変化は、凍結温度より、保存温度と保存期間に大きく依存することが明らかとなった。次に、Fig.5-12に示されたフラクタル次元予測モデルより、フラクタル次元を維持することができる保存温度を推測した。具体的には、各保存期間における等高線の変曲点を抽出し、これらを直線近似させることにより、フラクタル次元を維持できる上限保存温度を示すことができた。すなわち、この直線より低い保存温度範囲は、凍結時のフラクタル次元を維持することができる温度範囲を示しており、保存中の水分子の動きを抑制し、再結晶化による氷結晶変動を抑制することができる条件を示している。たとえば、Fig.5-12(f)に示すように、凍結温度 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ の冷凍米飯内の氷結晶の形状を90日間維持するためには、およそ $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下の保存温度が必要となることがわかり、これが上限保存温度となる。このように、本モデルを用いることによって、氷の再結晶化を抑制する温度を推測できることが可能となった。氷の再結晶化を抑制するためには、保存温度を下げる効果が効果的であることは周知されているが、このような操作は凍結保存装置のエネルギーコスト増大を招くことになるため、食品凍結産業においてはできるだけ高い温度域にて保管することが望まれている。したがって、本章により提唱した氷の再結晶化を抑制するための上限温度を予測する手法は、エネルギーコストと品質保持の両方を視野に入れた合理的な凍結保存条件を提案できる実用的なツールとして産業の場において利用可能になると考えられる。

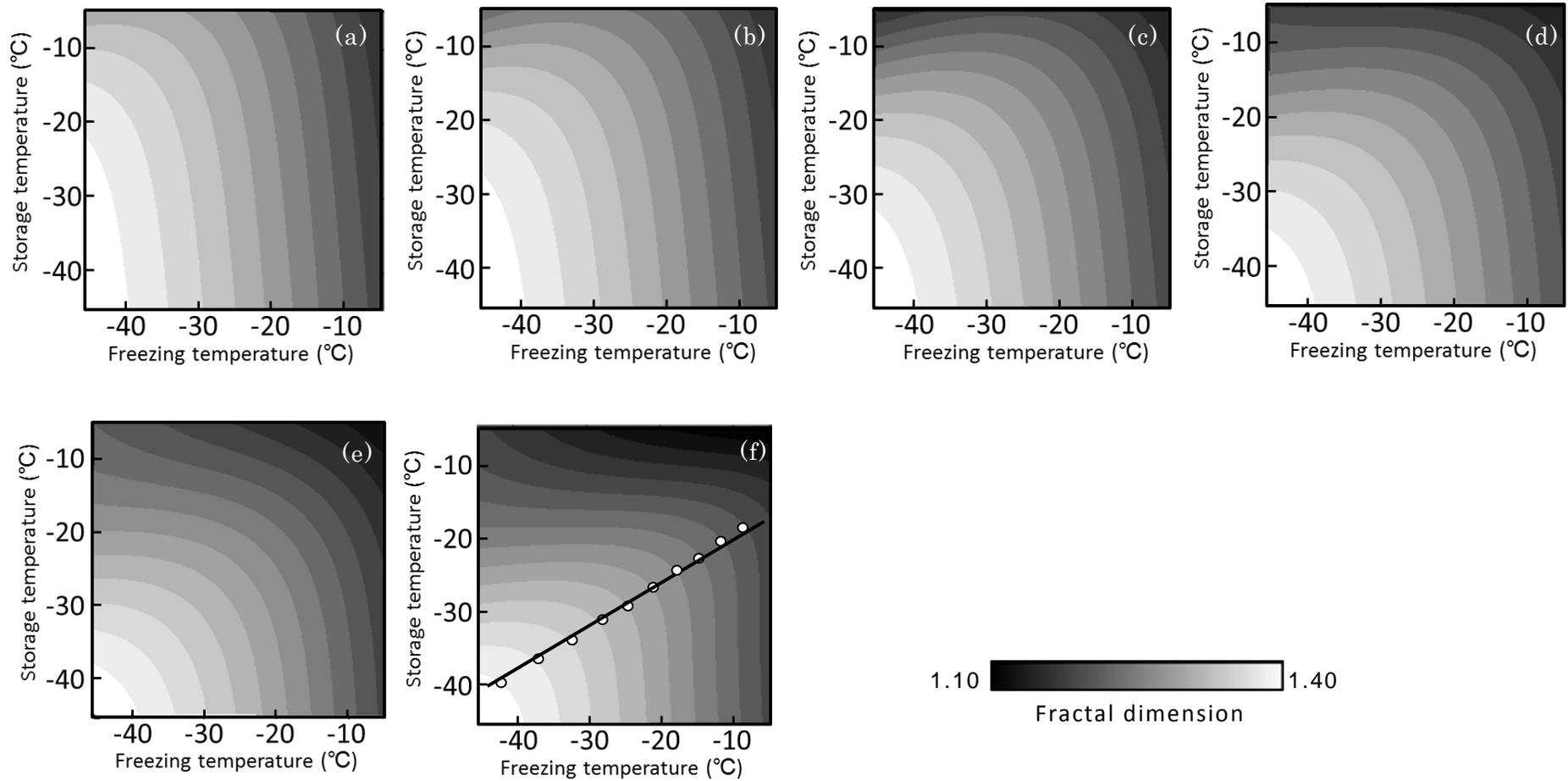


Fig.5-12 Predictive fractal dimensions based on relationship between freezing and storage temperature on the various storage periods. Storage period ;(a) 0 d , (b) 15 d, (c) 30 d, (d) 45 d, (e) 60 d, (f) 90 d

5.6 要約

効率的かつ効果的な実用操作を開発する視点から，最適な凍結保存操作条件を探索するために，氷結晶サイズに基づくデザインスペースから美味しさを維持するための操作条件の探索を，さらに氷結晶形状変化予測モデルから再結晶化抑制温度の探索を行った．まず，凍結・保存条件の変化に起因して冷凍米飯中に形成される氷結晶サイズを計測した結果，これらは凍結温度と保存温度，さらに保存期間に大きな影響を受けることが明らかとなった．次に，凍結保存条件と氷結晶サイズの関係について ANN を用いて予測モデルを構築した．4章の結果より，例えば室温解凍した冷凍米飯の美味しさスコアの中央値 4.0 以上を維持する場合，氷結晶サイズは 20 μm 以下にする必要がある．この値を構築した ANN モデルと組み合わせることによって，凍結温度と保存温度の領域を描くことができる．この領域はデザインスペースと称され，目的とする品質を維持することができる操作条件を示している．この領域は保存日数が長くなるにつれて狭くなること，すなわち長期保存においては品質維持のための操作条件の範囲が狭くなることを示した．次に，冷凍米飯の凍結および保存プロセスにおける氷結晶のフラクタル次元を解析し，形状変化に基づく再結晶化の進行予測モデルを構築した．フラクタル次元の解析結果より，冷凍米飯中に形成される氷結晶粒の輪郭は自己相似性を有する形状であることが明らかとなった．また，高い温度における保存，長い凍結時間，遅い凍結速度そして長期間の保存は氷結晶表面の起伏構造の平滑化を進行させることが分かった．次に，氷の再結晶化を抑制するための凍結保存条件を探索する ANN モデルを構築した．このモデルより，各凍結温度に対してフラクタル次元を維持することができる温度範囲，すなわち氷結晶変動を抑制することができる上限保存温度範囲を予測することができた．例えば $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて凍結した冷凍米飯内の氷結晶を 90 日間維持するためには，上限保存温度としておよそ $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ が必要となることが分かった．このように，構築したモデルを用いることにより，氷の再結晶化を抑制する上限温度条件を予測することが可能となった．

第 6 章 総括および今後の展望

食品を長期に保存する目的として推奨されている凍結プロセスの操作法や凍結保存条件を適用しても，これらの連続した操作に伴う食品の物理・化学的変性を完全に防止することは不可能である．特に，食品中に形成される氷結晶はその品質に顕著に関与することもあるため，凍結保存操作に伴う氷結晶形状の変動と食品品質の関係を定量的に明らかにすることは，食品凍結技術における核心的課題の一つとされている．

凍結食品内に形成された氷結晶を可視化するためには，材料の前処理，観察機器の選定，組織画像から氷結晶を鮮明に抽出する方法など，対象材料に特化した多様な計測技術が必要とされてきた．しかし，これらの中には氷結晶の形態変化速度に対応不可能と考えられる長時間の前処理および観察，高精度で高価な測定機器，さらに熟練を要する画像処理技術などを必要とする計測法も含まれている．これらの難点を短時間に簡便・安価で汎用性などに優れている手法に改善して，目的に沿った合理的計測技術体系として整理し，実用的な利用にも簡便に適用可能な汎用性の高い計測技術へ変革することが所望されている．

他方，氷結晶が食品材料の組織と品質変化に及ぼす影響などの研究の過程では，先ず，凍結操作前の食品材料を対象にして，その品質特性を機器計測データと官能評価スコアをデータベースとする評価基準法を設定しておく必要がある．次に，凍結プロセスにおいて材料内に形成される氷結晶の経時変化を短時間に計測し，前述した評価基準法と同様な方法を適用して得られた評価結果との差異を比較して，氷結晶の形成と形態変化に起因する品質変化の特性を定量的に評価することが重要となる．

氷結晶形状が食品の品質に及ぼす影響の一つとして，外観色の変化がある．食品の外観色は消費者の購買意欲に直接影響するため，市場取引において外観色が評価基準とされている食品がある．また，氷結晶形状が食品の食感や美味しさに影響を及ぼすことについては，経験的な知見はあるものの，氷結晶サイズと官能評価スコアの関係性を科学的エビデンスとして報告されている事例は数少

ない現状にある。

このような現状から、高品質な凍結食品を創出するためには、氷結晶形状と品質の関係を明らかにすること、また、氷結晶形状という観点から凍結と保存のプロセスを把握することが必要となる。さらに氷結晶形状の変化をモデル化し、数値シミュレーションにて最適な凍結保存操作条件を探索することは、凍結食品の温度管理を設計・運用する上で重要と考えられる。

本研究では、凍結プロセスの操作条件により食品材料内に形成される氷結晶のサイズと形状を精度良く短時間に計測出来るよう改善した技術を開発し、次に、この氷結晶の計測方法を適用して、さまざまな凍結保存条件における凍結サーモンフィレおよび冷凍米飯の氷結晶の形態計測法を基盤とするデータ解析法・品質評価法を確立する。最終的には、効率的かつ効果的な実用操作を開発する視点から、ANNを利用した数値シミュレーションによるモデリング手法や操作条件を「デザインスペース」の考え方を導入して、最適な凍結プロセスや保存条件など絞り込む方法を確立した。

本論文では、まず、従来法の凍結置換法における顕微鏡標本作製には20～30日間も時間を要するという欠点があり、これを補うため、医学病理学分野において利用されている低温粘着フィルムを応用することにより、迅速かつ簡易な氷結晶計測標本作製法を提唱し、この方法により試料作製時間が20～30分に短縮した。具体的には、供試材料として凍結メバチなどの筋肉組織を用い、氷結晶サイズを基準とし計測に適する組織固定・置換液の種類を検討した。また、低温粘着フィルムを用いることによって、標本作製の手順を入れ替えることが可能となり、組織固定・置換液浸漬時間が大幅に短縮され、結果的に凍結置換法の欠点を補うことになった。さらに、低温粘着フィルム法と凍結置換法のそれぞれから得られる氷結晶サイズを比較するため、同一個体の筋肉組織から採取した試料を用いて、それぞれの手法にて計測標本作製した。これらの顕微鏡画像から得られた氷結晶に関するデータを比較した結果、氷結晶の大きさや形状については顕著な相違は観察されず、本手法は従来手法とほぼ同等の氷結晶計測用標本

を作製することが可能であることを確認した。また、低温粘着フィルムが付着性の低い試料の氷結晶観察のため、凍結固定を用いる方法について検討した。この結果、試料調整時にて蛍光染色物質を混ぜ入れることができる食品については、凍結状態を維持することによって氷結晶観察が可能であった。また、化学固定を用いないため、標本作製操作において、組織が変形するリスクが低く、より正確な氷結晶計測が可能となることが示唆された。

凍結サーモンの市場取引などにおいてはフィレの外観色が伝統的に評価基準とされ、濃い赤色肉色を保有するサーモンは高い市場評価が得られる。他方、急速凍結した高品質フィレは一時的な表面色彩消失現象、すなわち白色化が観察され、これらの相反する視覚による色彩観察結果は、凍結速度に起因する氷結晶サイズに影響されていると推察されていた。そこで、凍結速度に依存する氷結晶サイズが食品の外観色に及ぼす影響を定量的に明らかにするため、ゼラチンおよびサーモンフィレを用いて、それぞれの表層面における凍結速度、氷結晶サイズおよび表面色の関係を定量的に評価した。具体的には、まず凍結食品の表面色を正確に定量化するために、CVSを導入した技術を開発した。次に、氷結晶サイズ計測とCVSによる外観色の関係を求めたところ、凍結ゼラチン表層面の氷結晶サイズが小さいと、 L^* 値が増加、 a^* および b^* 値が減少することが示された。すなわち、多数の小さな氷結晶が形成された凍結ゼラチンは色消失した印象を与えることが明らかとなった。次に、フィレの凍結速度と外観色の関係を求めたところ、表層面の凍結速度に依存して外観色の L^* 値が増加することが明らかとなった。また、急速に凍結したサーモンフィレの表層近傍においては、微細な氷結晶が形成されるが、そのサイズは深さ方向に伴って大きくなることが観察された。色彩変化については、表面から深さ方向0.3 mmまでの領域において、 L^* 値が極端に低下し、反対に a^* 、 b^* 値も同じ領域において大きく増加していたが、これより深い領域ではほとんど変化しなかった。次に、顕微鏡画像において単位面積当たりに氷結晶が占める割合を氷結晶面積率と定義し、深さ0.3 mmまでのこの値と表面色の関係を求めた結果、氷結晶サイズが小さくなり、また、その面積率が小さくなる

につれて、 L^* 値が増加し、同時に a^* 、 b^* 値はそれぞれ減少することが明らかになり、凍結時にフィレ表面が白く変化する現象は氷結晶の微細構造とその分布に起因することが分かった。これらの結果は、氷結晶形状は食品の外観品質、すなわち人の視覚にも影響を及ぼすことを明らかにしただけでなく、目的とする外観品質を得るための凍結条件を探索することや市場取引における品質および価格評価の改善に貢献する可能性について示した。

さらに、食品中の氷結晶が食品の品質に及ぼす影響について詳細に検討するために、主食である炊飯米を典型的研究対象として、異なる凍結操作条件により形成される氷結晶が食感および美味しさ評価に及ぼす影響を総合的に評価した。具体的には、凍結保存操作が冷凍米飯に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、さまざまな条件にて凍結させた米飯中に形成される氷結晶サイズの計測、解凍後の粘弾性計測および一般消費者をパネルとした官能評価を行った。ここでは、蛍光染色、低温粘着フィルムおよび冷却ステージを用いることにより、従来の凍結置換法にて観察ができなかった冷凍米飯中に形成される氷結晶を観察、さらには定量的に計測することが可能となった。次に、冷凍米飯の劣化特性を明らかにするため、粘弾性計測データおよび官能評価スコアに基づき、それぞれ主成分分析を行なった。その結果、室温解凍サンプルについては、保存温度が高くなると、硬さが増加し、また保存期間に依存して付着感・粘着感が低下することが明らかとなった。他方、加熱解凍サンプルの付着感・粘着感の低下は顕著に見られなかった。これらの結果より、加熱解凍は劣化した冷凍米飯の粘弾性特性をある程度回復することが可能であったが、高い温度にて凍結保存した米飯については十分に回復できないことが分かった。ANN を用いて凍結保存操作条件と美味しさスコアの関係モデル化した結果、例えば、美味しさスコア 4.0 点以上を 40 日間以上維持するためには、室温解凍では -25°C 以下、加熱解凍では -15°C 以下の保存温度が必要となるという予測が可能となり、美味しさスコアを維持するための凍結保存条件を解凍方法に応じて探索することができた。氷結晶サイズと官能評価から得られた食感および美味しさスコアとの関係より、両者の間には高い

負の相関関係が認められ、さらに、解凍条件によって官能評価スコアに与える影響が異なることを明らかにした。また、粘弾性計測データを説明変数に、食感に関連する官能評価スコアを目的変数として ANN モデルを構築したところ、比較的高い精度にて予測可能となり、この結果より、テンシプレッサーは食感スコアを予測するための有用なツールとなることが分かった。これらの結果から、凍結保存操作条件、すなわち温度と期間は冷凍米飯内の氷結晶サイズへ影響を及ぼすだけでなく、解凍後の粘弾性データや官能評価スコアにも影響を与えることが明らかとなった。また、ANN モデルを構築することにより、数値シミュレーションによって品質評価や凍結保存条件を合理的に探索することが可能となった。

さらに、効率的かつ効果的な実用操作を開発する視点から、最適な凍結プロセスや保存条件を探索する手法を確立するため、氷結晶サイズおよびフラクタル次元に基づくモデルを構築した。また、凍結および保存操作条件に起因して変化する氷結晶について、フラクタル次元の解析を用いて形状変化を定量化した結果、冷凍米飯中の氷結晶粒の輪郭は自己相似性を有する形状であることが明らかとなった。また、フラクタル次元の解析結果に基づいて、再結晶化の進行予測モデルを構築した。このモデルより、各凍結温度に対してフラクタル次元を維持することができる温度範囲、すなわち氷結晶変動を抑制することができる上限保存温度範囲を予測することが可能となった。例えば -20°C で凍結した冷凍米飯内の氷結晶を 90 日間維持するためには、上限保存温度としておよそ -27°C が必要となることが分かった。このようなモデルの構築により、氷の再結晶化を抑制する上限温度条件を予測することが可能となった。

以上の研究成果により、食品内に形成される氷結晶形状を精度良く短時間に測定出来るよう改善した手法を提唱し、また、さまざまな凍結保存条件における凍結サーモンフィレおよび冷凍米飯の氷結晶の形状計測法を基盤とするデータ解析法・品質評価法を確立する事により、氷結晶が食品品質に及ぼす影響について明らかにした。さらに、効率的かつ効果的な実用操作条件を探索する

ために、氷結晶形状に基づいた ANN モデルによる数値シミュレーションを用いる方法を提唱した。

凍結食品の品質維持を目的として、氷結晶の成長を抑制するためには、凍結温度および保存温度を下げるのが効果的であることは周知されているが、このような操作では凍結保存装置のエネルギーコスト増大を招くだけでなく、温度域によっては設備更新が必要になるため、近年の食品凍結産業においては積極的に取り入れられていない。本研究により提唱した氷結晶計測に基づいたモデル化およびシミュレーションは、単純に温度を下げて品質を維持するのではなく、目的とする品質を保持できる限界領域を示すことによって、エネルギーコストと品質保持の両方を視野に入れた合理的な凍結保存条件を提案できる実用的なツールとして産業の場にて利用可能であると考えられる。

本研究の成果は、凍結食品における設計・運用に反映され、効率的かつ効果的な食品製造プロセス実現のための条件探索手法として有用であるだけでなく、今後さまざまな食品の凍結・保存・解凍における詳細な品質劣化のメカニズムの解明、さらには食品毎に適したより詳細な操作条件のデータベース化に寄与するものと考えられる。

本論文では、氷結晶が食品品質に及ぼす影響について明らかにすることができた。しかしながら、氷結晶が品質に及ぼす影響については、食品の種類ごとによって大きく異なると推察されているが、これらについては定量的な情報や研究成果を得る必要があると考えられた。しかし、近年、「氷結晶サイズが凍結食品の品質を支配する主要因である」という偏った情報が一般化されつつある。このような偏った情報を是正し、正しい情報を提供するためにも、凍結食品中の諸変化を正確に記述し、氷結晶による組織損傷を食品の種類ごとに把握するとともに、各食品の品質の客観的評価方法の確立と基準化が課題となる。また、高品質な凍結食品を創出するためには、プロセスの操作条件、人が感じる「美味しさ」や「食嗜好」と機器分析から得られる計測データの関連性を解析し、さらに、これらの関係をモデル化することが必要となる。この問題を解決するためにはデータ解析やモデル化について更な

る検討と新しい手法の開発が期待される。

他方、食品中の氷結晶の形成と成長は水分子の移動に伴う現象であり、例えば本研究においては冷凍米飯の再結晶化に伴う氷結晶の成長や形状変化は、凍結濃縮相における水分子の運動性が再結晶化速度に影響を及ぼすと推察される。過去の研究において、いくつかの食品やモデル食品に関して、保存温度と再結晶化速度の関係が報告されている。しかしながら、再結晶化速度の違いが生じたときの原因については合理的な説明はほとんどされていない。食品中の凍結濃縮相における水分子の運動性と氷の再結晶化速度の関係を説明することができれば、保存温度や食品種類の違いによる再結晶化速度の違いも明らかにできると推察される。シンプルなモデル溶液における凍結濃縮相の水分子の運動性に関する分子シミュレーションについては報告されているが、食品のように複雑な系における再結晶化プロセスや水分子の挙動の解明やモデル化については今後の基礎的な研究課題として残される。

文献

Akino, M., Takeda, T., Imamura, T., Takinami, K., Takahashi, K., (2010). Effect of Proteolysis on Salmon-Color of the Frozen-Thawed Chum Salmon Muscle. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 57(3), 100-106 (in Japanese).

Amarante, A., Lanoisellé, J.L., Ramirez, A., (2003). Direct Measurement of Heat Transfer Rates and Coefficients in Freezing Processes by the Use of Heat Flux Sensors. *Chemical Engineering Research and Design* 81(9), 1105-1112.

Archer, D.L., (2004). Freezing: an underutilized food safety technology? *International Journal of Food Microbiology* 90(2), 127-138.

Arroyo Mora, D., Hamada, Y., Okamoto, A., Tateishi, A., Tachibana, K., (2007). Characteristics of burnt meat in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Science* 73(3), 651-659.

Ban, C., Yoon, S., Han, J., Kim, S.O., Han, J.S., Lim, S., Choi, Y.J., (2016). Effects of freezing rate and terminal freezing temperature on frozen croissant dough quality. *LWT - Food Science and Technology* 73, 219-225.

Berry, M., Fletcher, J., McClure, P., Wilkinson, J., (2009). Effects of Freezing on Nutritional and Microbiological Properties of Foods, *Frozen Food Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd., pp. 26-50.

Bevilacqua, A., Zaritzky, N.E., Calvelo, A., (1979). Histological measurements of ice in frozen beef. *International Journal of Food Science & Technology* 14(3), 237-251.

Bremer, L.G.B., van Vliet, T., Walstra, P., (1989). Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of casein gels. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 85(10), 3359-3372.

Champagne, E.T., Lyon, B.G., Min, B.K., Vinyard, B.T., Bett, K.L., Barton, F.E., Webb, B.D., McClung, A.M., Moldenhauer, K.A., Linscombe, S., McKenzie, K.S., Kohlwey, D.E., (1998). Effects of Postharvest Processing on Texture Profile Analysis of Cooked Rice. *Cereal Chemistry Journal* 75(2), 181-186.

Chevalier, D., Le Bail, A., Sequeira-Munoz, A., Simpson, B.K., Ghoul, M., (2002). Pressure shift freezing of turbot (*Scophthalmus maximus*) and carp (*Cyprinus carpio*): effect on ice crystals and drip volumes, in: Hayashi, R. (Ed.), *Progress in Biotechnology*. Elsevier, pp. 577-582.

Chevalier, D., Sequeira-Munoz, A., Le Bail, A., Simpson, B.K., Ghoul, M., (2000). Effect of freezing conditions and storage on ice crystal and drip volume in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1(3), 193-201.

Chrastil, J., (1990). Chemical and physicochemical changes of rice during storage at different temperatures. *Journal of Cereal Science* 11(1), 71-85.

Color Dream Net, (2013). Irodasi Meijin Pro. Series. <http://www.colordream.net>

Do, G.-S., Sagara, Y., Tabata, M., Kudoh, K., Higuchi, T., (2004). Three-dimensional measurement of ice crystals in frozen beef with a micro-slicer image processing system. *International Journal of Refrigeration* 27(2), 184-190.

Donhowe, D.P., Hartel, R.W., Bradley, R.L., (1991). Determination of Ice Crystal Size Distributions in Frozen Desserts. *Journal of Dairy Science* 74(10), 3334-3344.

Dyer, W.J., Hiltz, D.F., (1974). Comparative Quality of Fresh and Frozen and Thawed Scallop Meats and Post-Thaw Keeping Quality During Storage at 5°C. *Nippon Suisan Gakkaishi* 40(2), 235-243.

Evans, J., Adler, J., Mitchell, J., Blanshard, J., Rodger, G., (1996). Use of Confocal Laser Scanning Microscope in Conjunction with a Conduction Heat Transfer Stage in Order to Observe Dynamically the Freeze-Thaw Cycle in an Autofluorescent Substance and to Measure Ice Crystal Size in Situ. *Cryobiology* 33(1), 27-33.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), (2015). FAO Global Fishery and Aquaculture Statistics. [Download database]

<http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>
(browsed on Jan. 27, 2016)

Faydi, E., Andrieu, J., Laurent, P., (2001). Experimental study and modelling of the ice crystal morphology of model standard ice cream. Part I: Direct characterization method and experimental data. *Journal of Food Engineering* 48(4), 283-291.

Fennema, O.R., (1973). Low-Temperature Preservation of Foods and Living Matter, in: Fennema, O.R., Powrie, W.D., Marth, E.H. (Eds.). Marcel Dekker, Inc, pp. 3-207.

Fulcher, R.G., (1982). Fluorescence microscopy of cereals. *Food Microstructure* 1, 167-175.

Goff, H.D., (1994). Measuring and interpreting the glass

transition in frozen foods and model systems. *Food Research International* 27(2), 187-189.

Goff, H.D., Freslon, B., Sahagian, M.E., Hauber, T.D., Stone, A.P., Stanley, D.W., (1995). STRUCTURAL DEVELOPMENT IN ICE CREAM—DYNAMIC RHEOLOGICAL MEASUREMENTS. *Journal of Texture Studies* 26(5), 517-536.

Goshima, H., Do, G., Nakagawa, K., (2016). Impact of Ice Morphology on Design Space of Pharmaceutical Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105(6), 1920-1933.

Hagiwara, T., Hayashi, R., Suzuki, T., Takai, R., (2003). Fractal Analysis of Ice Crystals in Frozen Fish Meat. *Ninon Shokuhin Kougakukaishi (Japan Journal of Food Engineering)* 4(1), 11-17 (in Japanese).

Hagiwara, T., Wang, H., Suzuki, T., Takai, R., (2002). Fractal Analysis of Ice Crystals in Frozen Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(11), 3085-3089.

Hardy, W.B., (1926). A Microscopic Study of the Freezing of Gel. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* 112(760), 47-61.

Hartel, R.W., (2013). Advances in Food Crystallization. *Annual Review of Food Science and Technology* 4(1), 277-292.

Hsu, C.-L., Heldman, D.R., (2005). INFLUENCE OF GLASS TRANSITION TEMPERATURE ON RATE OF RICE STARCH RETROGRADATION DURING LOW-TEMPERATURE STORAGE. *Journal of Food Process Engineering* 28(5), 506-525.

IIR, (1986). *Recommendations for the Processing and Handling of*

frozen foods (3rd ed). International institute of Refrigeration, Paris.

Ishiguro, H., Horimizu, T., (2008). Three-dimensional microscopic freezing and thawing behavior of biological tissues revealed by real-time imaging using confocal laser scanning microscopy. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 51(23), 5642-5649.

Jibu, Y., Yasukawa, K., Kuwada, H., Yokohata, N., Teramoto, A., Fuchigami, M., (2009). Structure and Texture of Pressure-shift-frozen Boiled Egg. *Journal of Cookery Science of Japan* 42(2), 86-92.

Juliano, B.O., Perez, C.M., (1983). MAJOR FACTORS AFFECTING COOKED MILLED RICE HARDNESS AND COOKING TIME. *Journal of Texture Studies* 14(3), 235-243.

Juliano, B.O., Perez, C.M., Barber, S., Blakeney, A.B., Iwasaki, T.A., Shibuya, N., Keneaster, K.K., Chung, S., Laignelet, B., Launay, B., Del Mundo, A.M., Suzuki, H., Shiki, J.I., Tsuji, S., Yama, J.T., Tatsumi, K., Webb, B.D., (1981). INTERNATIONAL COOPERATIVE COMPARISON OF INSTRUMENT METHODS FOR COOKED RICE TEXTURE. *Journal of Texture Studies* 12(1), 17-38.

Kallert, E., (1923). The behavior of the existing freeze meat in muscle tissue changes during thawing. *Journal of meat and milk hygiene* 34, 41-45

Kawamoto, T., (1990). Light microscopic autoradiography for study of early changes in the distribution of water-soluble materials. *J Histochem Cytochem* 38(12), 1805-1814.

Kawamoto, T., (2003). Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard

tissues, whole-animals, insects and plants. Archives of Histology and Cytology 66(2), 123-143.

Kawamoto, T., Shimizu, M., (2000). A method for preparing 2- to 50- μ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. Histochemistry and Cell Biology 113(5), 331-339.

Kerr, W.L., Kauten, R.J., McCarthy, M.J., Reid, D.S., (1998). Monitoring the Formation of Ice During Food Freezing by Magnetic Resonance Imaging. LWT - Food Science and Technology 31(3), 215-220.

Kong, F., Tang, J., Rasco, B., Crapo, C., Smiley, S., (2007). Quality Changes of Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) Muscle during Thermal Processing. Journal of Food Science 72(2), S103-S111.

Koonz, C.H., Ramsbottom, J.M., (1939). A METHOD FOR STUDYING THE HISTOLOGICAL STRUCTURE OF FROZEN PRODUCTS. I. POULTRY. Journal of Food Science 4(2), 117-128.

Love, R.M., (1962). New Factors Involved in the Denaturation of Frozen Cod Muscle Proteina. Journal of Food Science 27(6), 544-550.

Ma, Y., Sun, D.-W., (2009). HARDNESS OF COOKED RICE AS AFFECTED BY VARIETIES, COOLING METHODS AND CHILL STORAGE. Journal of Food Process Engineering 32(2), 161-176.

MacKenzie, A.P., Luyet, B.J., (1967). Electron microscope study of recrystallization in rapidly frozen gelatin gels. Biodynamica 10(205), 95-122.

Mandelbrot, B.B., (1982). *The Fractal Geometry of Nature*. W. H. Freeman and Company, San Fransisco, CA.

Martino, M.N., Zaritzky, N.E., (1988). Ice Crystal Size

Modifications during Frozen Beef Storage. *Journal of Food Science* 53(6), 1631-1637.

Meullenet, J.-F.C., Gross, J., Marks, B.P., Daniels, M., (1998). Sensory Descriptive Texture Analyses of Cooked Rice and Its Correlation to Instrumental Parameters Using an Extrusion Cell. *Cereal Chemistry Journal* 75(5), 714-720.

Meullenet, J.-F.C., Sitakalin, C., Marks, B.P., (1999). PREDICTION OF RICE TEXTURE BY SPECTRAL STRESS STRAIN ANALYSIS: A NOVEL TECHNIQUE FOR TREATING INSTRUMENTAL EXTRUSION DATA USED FOR PREDICTING SENSORY TEXTURE PROFILES. *Journal of Texture Studies* 30(4), 435-450.

Miyawaki, O., (2001). Analysis and Control of Ice Crystal Structure in Frozen Food and Their Application to Food Processing. *Food science and technology research* 7(1), 1-7.

Miyawaki, O., Gunathilake, M., Omote, C., Koyanagi, T., Sasaki, T., Take, H., Matsuda, A., Ishisaki, K., Miwa, S., Kitano, S., (2016). Progressive freeze-concentration of apple juice and its application to produce a new type apple wine. *Journal of Food Engineering* 171(Supplement C), 153-158.

Mousavi, R., Miri, T., Cox, P.W., Fryer, P.J., (2007). Imaging food freezing using X-ray microtomography. *International Journal of Food Science & Technology* 42(6), 714-727.

Mundo, A.M.D., Kosco, D.A., Juliano, B.O., Siscar, J.J.H., Perez, C.M., (1989). SENSORY AND INSTRUMENTAL EVALUATION OF TEXTURE OF COOKED AND RAW MILLED RICES WITH SIMILAR STARCH PROPERTIES. *Journal of Texture Studies* 20(1), 97-110.
Nagai, T., Yano, T., (1990). Fractal Structure of Deformed Potato Starch and Its Sorption Characteristics. *Journal of Food Science*

55(5), 1334-1337.

Nesvadba, P., (2009). Thermal Properties and Ice Crystal Development in Frozen Foods, *Frozen Food Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd., pp. 1-25.

Ogawa, Y., Glenn, G.M., Orts, W.J., Wood, D.F., (2003). Histological Structures of Cooked Rice Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(24), 7019-7023.

Osumi, M., Sano, K., (2011). Prastic you CCM no jissai, *Shikisai kagaku Handbook* 3rd ed. University of Tokyo Press, Tokyo, p. 698 (in Japanese).

Ottestad, S., Enersen, G., Wold, J.P., (2011). Effect of freezing temperature on the color of frozen salmon. *Journal of Food Science* 76(7), S423-427.

Perdon, A.A., Siebenmorgen, T.J., Buescher, R.W., Gbur, E.E., (1999). Starch Retrogradation and Texture of Cooked Milled Rice During Storage. *Journal of Food Science* 64(5), 828-832.

Perez, C.M., Juliano, B.O., (1979). Indicators of eating quality for non-waxy rices. *Food Chemistry* 4(3), 185-195.

Perez, C.M., Juliano, B.O., (1981). TEXTURE CHANGES AND STORAGE OF RICE. *Journal of Texture Studies* 12(3), 321-333.

Rousset, S., Pons, B., Pilandon, C., (1995). SENSORY TEXTURE PROFILE, GRAIN PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS AND INSTRUMENTAL MEASUREMENTS OF COOKED RICE. *Journal of Texture Studies* 26(2), 119-135.

Russell, A.B., Cheney, P.E., Wantling, S.D., (1999). Influence of freezing conditions on ice crystallisation in ice cream. *Journal of*

Food Engineering 39(2), 179-191.

Sagara, Y., (2001). STRUCTURAL MODELS RELATED TO TRANSPORT PROPERTIES FOR THE DRIED LAYER OF FOOD MATERIALS UNDERGOING FREEZE-DRYING. *Drying Technology* 19(2), 281-296.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7), 671-675.

Shimizu, M., (2006). Image generation model, *Digital Image Processing*. CG-ARTS society, Tokyo, pp. 62-63 (in Japanese).

Sitakalin, C., Meullenet, J.-F.C., (2001). Prediction of Cooked Rice Texture Using an Extrusion Test in Combination with Partial Least Squares Regression and Artificial Neural Networks. *Cereal Chemistry Journal* 78(4), 391-394.

Skrede, G., Risvik, E., Huber, M., Enersen, G., BlüMlein, L., (1990). Developing a Color Card for Raw Flesh of Astaxanthin-fed Salmon. *Journal of Food Science* 55(2), 361-363.

Sun, D.-W., (2004). Computer vision--an objective, rapid and non-contact quality evaluation tool for the food industry. *Journal of Food Engineering* 61(1), 1-2.

Sutton, R.L., Lips, A., Piccirillo, G., (1996). Recrystallization in Aqueous Fructose Solutions as Affected by Locust Bean Gum. *Journal of Food Science* 61(4), 746-748.

Suzuki, M., Yamada, S., Kada, H., Hirota, M., Oshima, T., (1997). The Fractal Dimension of a Particle's Projected Shape by the Area-perimeter Method. *Journal of the Society of Powder Technology, Japan* 34(1), 4-9 (in Japanese).

Suzuki, T., Yano, T., (1990). Fractal Structure Analysis of Some Food Materials. *Agricultural and Biological Chemistry* 54(12), 3131-3135.

Tironi, V., LeBail, A., De Lamballerie, M., (2007). Effects of Pressure-Shift Freezing and Pressure-Assisted Thawing on Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Quality. *Journal of Food Science* 72(7), C381-C387.

Ueno, S., Do, G.-S., Sagara, Y., Kudoh, K.-i., Higuchi, T., (2004). Three-dimensional measurement of ice crystals in frozen dilute solution. *International Journal of Refrigeration* 27(3), 302-308.

Ullah, J., Takhar, P.S., Sablani, S.S., (2014). Effect of temperature fluctuations on ice-crystal growth in frozen potatoes during storage. *LWT - Food Science and Technology* 59(2), 1186-1190.

Yam, K.L., Papadakis, S.E., (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering* 61(1), 137-142.

Yu, S., Ma, Y., Liu, T., Menager, L., Sun, D.-W., (2010a). Impact of cooling rates on the staling behavior of cooked rice during storage. *Journal of Food Engineering* 96(3), 416-420.

Yu, S., Ma, Y., Sun, D.-W., (2010b). Effects of freezing rates on starch retrogradation and textural properties of cooked rice during storage. *LWT - Food Science and Technology* 43(7), 1138-1143.

Zaritzky, N.E., (2009). Frozen Storage, *Frozen Food Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd., pp. 224-247.

Zhang, Z., Sun, D.-W., (2006). Effects of cooling methods on the

cooling efficiency and quality of cooked rice. *Journal of Food Engineering* 77(2), 269-274.

乙部 和紀, 内藤 成弘, 杉山 純一, 菊池 祐二, (1995). 米飯の動的粘弾性と官能評価. *日本食品科学工学会誌* 42(10), 748-755.

加藤 舜朗, (1966a). T.T.T.とコールドチェーン, 食品冷凍の理論と応用. 光琳書院, pp. 103-113.

加藤 舜朗, (1966b). 食品の氷結と凍結温度帯, 食品冷凍の理論と応用. 光琳書院, pp. 321-332.

加藤 寿美子, (1979). 米飯のレオロジ-に関する研究. *家政学雑誌* 30(2), p121-133.

熊谷 義光, (1999). 食品の冷凍・解凍技術の現状と今後. *冷凍* 74(855), 8-12.

小林 りか, 兼坂 尚宏, 渡辺 学, 鈴木 徹, (2014). 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. *日本冷凍空調学会論文集* 31(3), 297-303.

相良 泰行, (2009). 食嗜好評価に基づく冷凍米飯の最適保蔵温度条件: 高齢者の食嗜好と粘弾性特性の相関関係分析法. *日本食品科学工学会誌* 56(11), 558-572.

佐藤 眞直, 梶原 堅太郎, 佐野 則道, (2016). 放射光を用いた X線 CT による冷凍食品中の氷結晶組織 3次元非破壊観察. *日本食品工学会誌* 17(3), 83-88.

柴田 賢哉, (2017). 凍結含浸法による高齢者向け形状保持軟化食品の開発. *科学と工業*, 91(5), 120-128.

白井 義人, 吉川 智隆, (1999). 食品のための凍結・解凍における成分変化. *日本食品科学工学会誌* 46(7), 447-453.

杉本 昌明, (2017). 第 1 章 産業界における水産物冷凍の歴史と最新動向, 岡崎恵美子, 今野久仁彦, 鈴木徹 編, 水産物の先進的な冷凍流通技術と品質制御-高品質水産物のグローバル流通を可能に- 恒星社厚生閣, 東京, pp. 11-21.

鈴木 一成, (1989). 米飯の老化に及ぼす保存温度の影響. 日本家政学会誌 40(11), p983-985.

鈴木 徹, (2008). 凍結食品内氷結晶観察のための凍結置換法. 冷凍 83(965), 143-148.

鈴木 徹, (2013). 第 2 章 食品低温利用総論, 日本冷凍空調学会, 冷凍空調便覧 IV 巻 食品・生物編, 東京, pp. 25-27.

高井 陸雄, (1996). 夢の低温貯蔵 -氷結晶のない食品の凍結は可能か. 冷凍 71(828), 1094-1098.

高井 陸雄, (1997). 食品分野における低温の利用 (特集 食品と低温の世界(「フ・ド・フォ・ラム・つくば」より)). 食品と開発 32(1), 8-12.

高井 隆雄, 鈴木 徹, 佐藤 雄二, 山田 有紀子, (1997). 5. 凍結食品中の氷結晶の消長速度とガラス転移(平成 9 年度第 43 回低温生物工学会研究報告). 低温生物工学会誌 43(2), 118-123.

高橋 節子, 久野 三智子, 西澤 光輝, 貝沼 圭二, (2000). 米飯の食感を評価する新測定法と食味特性. *Journal of Applied Glycoscience* 47(3-4), 343-353.

竹内 萌, 松原 久, 高橋 匡, 小坂 善信, 工藤 謙一, 渡辺 学, 鈴木 徹, (2015). アニサキス亜科 L3 幼虫の生存に与える凍結の影響. 日本冷凍空調学会論文集 32(2), 199-206.

竹内 友里, 高橋 英史, (2013). X 線 CT 三次元イメージによるクルマエビの筋肉構造. 日本水産学会誌 79(1), 58-60.

田中 武夫, (1976). 冷凍品の解凍について, その 4. 冷凍魚の解凍. コールドチェーン研究 2(3), 109-116.

佃 信夫, (1974). 水産生物化学・食品学実験書. 恒星社厚生閣, 東京.

都 甲洙, 相良 泰行, 田畑 みづほ, 工藤 謙一, 樋口 俊郎, (2002). 生牛肉試料内 3次元氷結晶構造計測システムの開発. 日本冷凍空調学会論文集 19(4), 375-380.

中川 究也, 落合 隆晃, (2017). スープ食品凍結乾燥工程の数学的モデルに基づくデザインスペースの推算. 日本食品工学会誌 18(2), 115-123.

中谷 文子, 辻 昭二郎, (1998). 米飯粒の連続式微小変形多重バイト試験法による食味関連物性の検討. 日本食品科学工学会誌 45(8), 504-509.

日本冷凍食品協会, (2017). 国内消費量推移.

農林水産省大臣官房政策課食料安全保障室, (2016). 平成 28 年度食料需給表,

農林水産省大臣官房政策課食料安全保障室, (2017). 食品産業動態調査,

羽倉 義雄, (2009). 食品の凍結粉碎. 日本食品工学会誌 10(4), 199-206.

橋本 加奈子, 小林 正三, 山下 倫明, (2016). ゴマサバおよびマサバ筋肉の硬さと凍結時の氷結晶生成との関係. 日本冷凍空調学会論文集 33(1), 65-71.

橋本 理帆，石川 智佳代，池田 岳郎，都 甲洙，相良 泰行，(2003).
冷凍米飯の粘弾性特性，氷結晶性状および官能評価に基づく保存条件の最適化．低温生物工学会誌 49(2), 135-137.

福田 裕，(1986). 魚肉の品質に及ぼす冷凍条件の影響．冷凍 61(699), p18-29.

不二山 幸敏，(1982). 冷凍食品の知識．調理科学研究会．

宮脇 長人，(2009). 1.生物・食品と凍結(セミナー「低温と生物・食品」). 低温生物工学会誌 55(1-2), 23-27.

矢内 和博，三浦 靖，中村 良司，西ノ宮 武，原田 努，小林 昭一，(2001). 冷凍米飯の品質に及ぼす凍結，貯蔵および解凍条件の影響．日本食品科学工学会誌 48(10), 777-786.

渡辺 学，(2017). コールドチェーン概説：成り立ちと今後の展開(特集 食のサプライチェーンの動向とそれを支える技術). 冷凍 92(1079), 589-593.

研究業績

発表論文

1. 河野晋治, 高橋朋子, 篠崎 聰. 低温粘着フィルムを利用した凍結魚肉内氷結晶観察法. 日本冷凍空調学会論文集, Vol.29, No.1,53-58, 2012.
2. Shinji Kono, Izumi Kawamura, Shinichi Yamagami, Tetsuya Araki and Yasuyuki Sagara. Optimum storage temperature of frozen cooked rice predicted by ice crystal measurement, sensory evaluation and artificial neural network. *International Journal of Refrigeration*, 56, 165-172, 2015.
3. Shinji Kono, Izumi Kawamura, Tetsuya Araki and Yasuyuki Sagara. ANN modeling for optimum storage condition based on viscoelastic characteristics and sensory evaluation of frozen cooked rice. *International Journal of Refrigeration* 65, 218-227, 2016.
4. Shinji Kono, Yuta Tobari, Tetsuya Araki and Yasuyuki Sagara. Investigate the Ice Crystal Morphology in Frozen Cooked Rice Based on Size, Fractal Dimension and ANN Modeling. *International Journal of Refrigeration*, 84, 210-219, 2017.
5. Shinji Kono, Madoka Kon, Tetsuya Araki and Yasuyuki Sagara. Effects of relationships among freezing rate, ice crystal size and color on surface color of frozen salmon fillet. *Journal of Food Engineering*, 214, 158-165. 2017.
6. 河野晋治, 鍋谷浩志, 相良泰行. 食品の凍結・保存プロセスにおける氷結晶特性の評価法と実用操作への展開. 日本食品科学工学会誌 (in press).

特許・公開特許

1. 河野晋治, 高橋朋子, 比留間直也, 篠崎聰: 氷結晶観察用試料作製方法, 特許第 5363392
2. 河野晋治, 山上伸一: 凍結材料の氷結晶観察用試料作製方法, 特開 2013-29436
3. 河野晋治, 金まどか, 宇佐美早人, 大村利夫: 魚肉凍結品の製造

方法及び製造システム，並びに赤身魚肉の凍結品，特開
2015-65831（特許査定済み）

著書・解説記事など

1. 河野晋治，氷結晶組織による評価手法．第6版 冷凍空調便覧 IV 巻 食品・生物編．日本冷凍空調学会，pp.59-61，2013
2. 河野晋治，氷結晶性状に基づいた冷凍米飯の品質評価．冷凍，89，pp55-58，2014
3. 河野晋治，IV-1. 迅速かつ簡易的な氷結晶・組織観察法．日本水産学会誌，82，p.960，2016
4. 河野晋治，III-8 迅速かつ簡易的な氷結晶・組織観察法．水産学シリーズ水産物の先進的な冷凍流通技術と品質制御．恒星社厚生閣，pp.112-121，2017

国際会議および国内学会発表

1. Shinji Kono，Izumi Kawamura，Shinichi Yamagami and Yasuyuki Sagara. Development of integrated quality evaluation system to determine the optimum condition of storage temperature for maintaining the palatability of frozen-cooked rice, Proceedings of the 5th European Conference on Sensory and Consumer Research, Bern, Switzerland, 2012/9
2. 河野晋治，高橋朋子，比留間直也，篠崎 聰．凍結食品内氷結晶評価のための迅速観察法，2009年度日本冷凍空調学会講演論文集，pp603-604，中央大学，2009/10
3. 河野晋治，山上伸一，篠崎 聰．凍結処理が魚肉筋肉内結合組織に与える影響，2010年度日本冷凍空調学会講演論文集，pp245-246，金沢大学，2010/9
4. 河野晋治，川村いづみ，山上伸一，相良泰行．冷凍米飯の氷結晶性状および官能評価に基づく冷凍保存条件の最適化，日本食品工学会第12回年次大会講演要旨集，p28，京都，2011/8
5. 河野晋治，川村いづみ，山上伸一，相良泰行．冷凍米飯の氷結晶性状および官能評価に基づく保存条件の最適化，2011年度日本

- 冷凍空調学会講演論文集， pp245-246， 東京大学， 2011/9
6. 河野晋治， 川村いづみ， 山上伸一， 相良泰行． 冷凍米飯の氷結晶計測に基づく凍結・保存条件の最適化， 日本食品工学会第 13 回年次大会講演要旨集， p96， 北海道大学， 2012/8
 7. 河野晋治． 氷結晶の新たな観察方法とその形成制御， 日本食品工学会第 14 回年次大会講演要旨集， p12， 京都， 2013/8
 8. 河野晋治， 金まどか， 宇佐美早人． 凍結処理が低塩ギンザケフィレの色調に及ぼす影響， 2013 年日本冷凍空調学会年次大会講演論文集， pp221-222， 東海大学， 2013/10
 9. 河野晋治． 食品冷凍における氷結晶解析と品質評価， 2015 年化学工学会秋季大会研究発表講演要旨集， J216， 北海道大学， 2015/9
 10. 河野晋治． 水産物の品質評価法の進歩 IV - 1.迅速かつ簡易的な氷結晶・組織観察法， 平成 28 年日本水産学会(春季)大会講演要旨集， p276， 東京海洋大学， 2016/3

受賞

1. 平成 25 年 日本冷凍空調学会 学術賞受賞． 河野晋治， 高橋朋子， 篠崎 聡． 低温粘着フィルムを利用した凍結魚肉内氷結晶観察法

謝辞

博士論文を提出するにあたり、多くの方々の御指導とご助言をいただきました。

研究全般にわたり格別ならぬ御指導と御高配を賜りました一般社団法人食感性コミュニケーションズ理事長(東京大学名誉教授)相良泰行先生には厚くお礼を申し上げます。冷凍米飯に関する研究をスタートし、投稿論文および博士論文としてまとめることができたのは、相良先生が研究のやりがいと面白さを常に示して下さい、私の成長に辛抱強く付き合ってく下さったからに他なりません。また、研究活動や論文執筆だけに留まらず、相良先生のもとに集まる多くの人とも交流できる機会をいただき、今後の糧ともなる人脈・ネットワークを作ることができました。これまでを振り返ってみると、長い道のりを先生に先導していただき、また後押しをしていただき、ご同道いただいたと感じております。これまでのご指導に深く感謝申し上げます。

本論文の主査を引き受けていただきました東京大学大学院農学生命科学研究科准教授 荒木徹也先生には、研究指導、および博士論文のまとめから審査までの全般にわたり、懇切なるご指導とご校閲を賜りました。また、投稿論文については、論文の書き方、全体構成など詳細にご助言・ご指導いただきました。これまでのご指導に深くお礼申し上げます。

東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻の溝口勝教授、同農学生命科学研究科 農学国際専攻(独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品部門)の鍋谷浩志連携教授、同農学生命科学研究科 農学国際専攻の斎藤幸恵准教授、および日本大学 生物資源科学部 生物環境工学科の都甲洙教授には、大変お忙しい中、本論文の審査をお引き受けいただきました。また、本論文の作成・校正・修正にあたり、大変有益なご指導、ご助言およびご校閲を賜りました。審査をお引き受けいただいた先生方のご指導、ご助言により、本論文をより磨き上げることができたと感じております。謹んで感謝申し上げます。

株式会社前川製作所 町田明登執行役員、同 研究企画本部 服部一裕リーダーおよび同 技術研究所 神村岳所長には、本研究への取り組みの機会を与えていただき、また博士論文を纏めるに際し、

激励を頂きました。本研究に対するご理解と継続的かつ多大なるご支援をいただき、厚くお礼申し上げます。

本研究の共同研究者である、株式会社前川製作所の篠崎聰様（現・前川総合研究所 代表）、山上伸一様、金まどか様、高橋朋子様、荒井（川村）いづみ様、戸張雄太様には、研究の遂行から成果のまとめまで、多大なるご協力をいただきました。

本論文を構成する研究は、多くの方々のご支援、ご協力のもとに実施されたものであり、本論文はその研究成果を代表してまとめたものであることをここに記し、改めて関係者の方々に感謝いたします。

2018年4月 河野 晋治