

高圧冷凍豆腐の物性と微細構造

浦上 倫子 (岡山県立大学保健福祉学部教授)

豆腐, こんにゃく, 寒天ゲル, 卵豆腐, 野菜, 果実等の水分含量の多い食品は凍結による損傷が大きく, 解凍後のテクスチャーが著しく悪くなる。通常の凍結は大気圧下で行なわれるため, 食品中の水分が体積膨張を起こし, これがゲルや組織破壊の原因となっている。高圧下では 0°C 以下でも凍らない不凍域(液相)が存在する。200 MPaで加圧後, -18°C まで冷却しこの不凍域に食品を保持した後急激に降圧すると, 急速凍結するため組織的に良好な豆腐ができ, これを圧力移動凍結法(Pressure-shift freezing method)と呼んでいる^{1),2)}。不凍域以外の高圧下で高圧冷凍したときどのような冷凍豆腐ができるのだろうか。 $-200\sim 80^{\circ}\text{C}$ で2400 MPaまで圧力を上げると, 数種類の結晶構造, 性質の異なる高圧氷が生成することが知られている^{3),4),5)}。氷Iは凍結時に体積膨張するが, 氷II~IXの高圧氷は体積膨張しない。我々が日常見る氷は氷Ihで, 隙間の多い構造をとっているため水に浮くが, その他の高圧氷の密度は水より大きいため水に沈む。氷II, III, Vは水素結合の長さや結合角が延びたり, 縮んだり, あるいはゆがんだりしており, 氷VIは2組の結晶構造がお互いの隙間に入り込んだ構造をしているため密度が大きい⁴⁾。これらの高圧氷の性質を利用すれば体積膨張が起こらずに凍結が完了し, 凍結損傷を防止できることが考えられる。氷I, III, V, VI, または液相に豆腐を保持した後急速に減圧し, -30°C で凍結保存後大気圧下で解凍したときゲルの損傷が起こるか否か, 解凍後の物性と微細構造の変化を調べ, 0°C 以下での高

圧処理がゲル状食品に与える影響について検討を行った。また, 減圧, 解凍時に氷VI→氷V→氷III→液相→氷Iへと相転移が起こる可能性がある。そこで, 高圧冷凍後圧力をかけたまま室温まで解凍したとき, いかなる氷結晶痕跡がみられるか検討を行った。

実験方法

1. 実験材料

塩化マグネシウムとグルコノデルタラクトンで凝固させた市販の充填絹豆腐(エイショク製)を1cm角(S試料とする), または $3\text{cm}\times 3\text{cm}\times 1.5\text{cm}$ (L試料とする)に切断し, 8個(S)または3個(L)を真空包装した。

2. 高圧冷凍方法

試料を真空包装後, 食品高圧処理装置(Dr. Chef, 神戸製鋼所製, 最高圧力: 700 MPa, 処理温度: $-20^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$)を用いて高圧冷凍した(Fig. 1)。すなわち, 循環式冷却装置により予め圧力容器(内径60 mm×高さ200 mm)を冷却し, 圧力容器内の不凍液が -20°C になってから試料を入れ, 直ちに100 MPa(氷I)または200 MPa(液相), 340 MPa(氷III), 400, 500, 600 MPa(氷V), 700 MPa(氷VI)で45分間(S), または90分間(L)加圧した(Fig. 2)。加圧に伴い圧力容器内温度が上昇するが上部, 下部とも $-18\sim -20^{\circ}\text{C}$ となるまでを加圧時間とした。

3. 解凍方法

常圧解凍: S, Lを高圧冷凍後1分以内で減圧

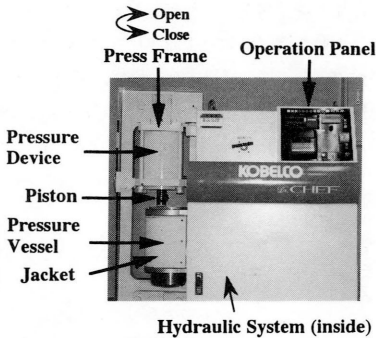


Fig. 1 High pressure food processor (Dr. Chef).

し、直ちに -30°C 冷凍庫で2日間冷凍保存した後、 20°C の低温恒温器で自然解凍した。これらを -20°C 、 -30°C 、 -80°C の冷凍庫中（大気圧下、 0.1MPa ）で冷凍後自然解凍したもの、および無処理、室温で高圧処理のみを行なったものと比較した（Fig. 2）。

高圧解凍：Lを高圧冷凍後圧力をかけたまま、 -35°C の循環式冷却装置で 60°C の循環式加温装置に切换え、圧力容器温度が 20°C になるまで

（70分間）解凍した（Fig. 2）。

4. 物性測定方法

クリープメータ（Rheoner RE-33005, 山電製）を用い破断強度解析を行った。サンプル厚さ計（HC-3305, 山電製）で予め試料の厚さを測定し、直径3mmの円柱型アクリル製プランジャーを用い、200gロードセル、圧縮速度1mm/秒で0.01mmまで圧縮したときの物性の変化を測定した。得られた応力-歪曲線から破断応力、破断歪（歪率）、破断エネルギーを求めた。

5. 微細構造の観察

試料の中心部（S, L）および外部（L）を $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 6\text{mm}$ に切りだし、20%、40%、50%エタノールで順次脱水後、液体窒素中で急速凍結し、高分解能クライオ-SEM（電界放射型走査型電子顕微鏡：日立S-4500）を用い1KVで観察した。氷結晶の痕跡を200倍、ゲルの微細構造を2万倍で観察した結果を示した。

6. 画像解析

クライオ-SEMで得た画像より氷結晶の大きさを画像解析（Mac Scope, 三谷商事）した。

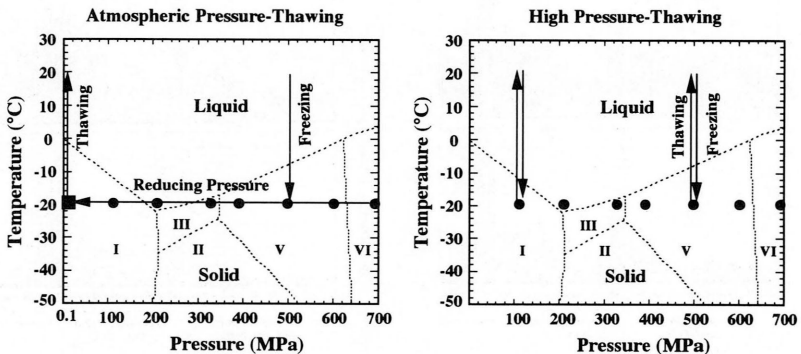


Fig. 2 Phase diagram of water and freezing-thawing methods.

● high-pressure-freezing points, ■ storage in a freezer at -30°C for 2 days.

結果と考察

1. 高压冷凍後，常圧解凍したときの豆腐の物性変化

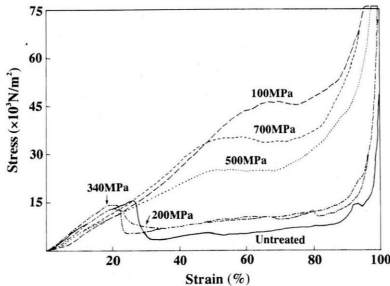


Fig. 3 Force-distance curves of tofu (S: small sample, 1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 1 cm) high pressure frozen then thawed at atmospheric pressure (0.1MPa).

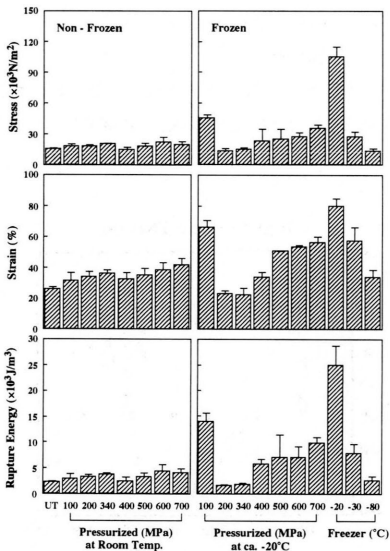


Fig. 5 Effects of pressurization and high pressure freezing (thawed at 0.1MPa) on the stress, strain and rupture energy of tofu (S: small sample).

高压冷凍豆腐を常圧解凍したときの代表的な破断強度解析図（応力－歪曲線）を Fig. 3 (S), Fig. 4 (L) に，室温で高压処理，高压冷凍，大気圧下の冷凍庫で冷凍した豆腐の破断応力，破断歪，破断エネルギーの平均値を Fig. 5 (S)，

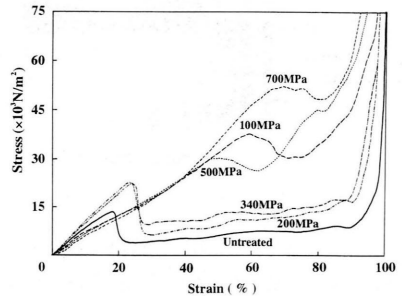


Fig. 4 Force-distance curves of tofu (L: large sample, 3 cm $\times$ 3 cm $\times$ 1.5 cm) high pressure frozen then thawed at atmospheric pressure (0.1MPa).

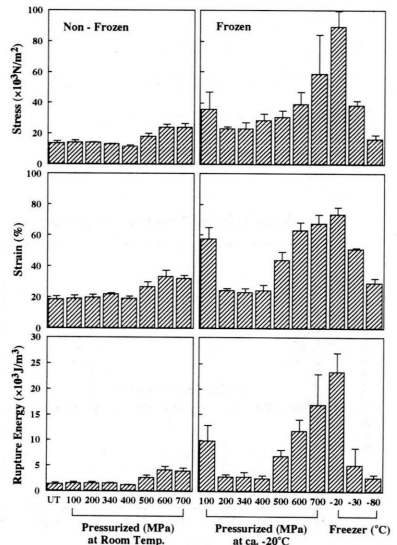


Fig. 6 Effects of pressurization and high pressure freezing (thawed at 0.1MPa) on the stress, strain and rupture energy of tofu (L: large sample).

Fig. 6 (L) に示した。

S を室温で45分間高压処理すると破断応力に大きな変化は見られなかったが、歪率がわずかに増加した。L を90分間高压処理すると400MPa までは物性値に変化がみられなかったが、500MPa 以上で加圧すると破断応力、歪率がわずかに増加した。豆腐ゲルのネットワーク形成にはタンパク分子間のS-S結合、水素結合、疎水結合やイオン結合が総合的に関与しているが、常法で製造する豆腐(加熱ゲル)はS-S結合が主な役割を果たしている。一方、大豆タンパク質は加熱しなくても500MPa以上の加圧で不可逆ゲルを形成し^{6),7)}、グルコノデルタラクトンを加えた加圧ゲルはS-S結合以外の水素結合、疎水結合、イオン結合などの非共有結合が中心のゲルであるとの報告がある⁸⁾。今回用いた豆腐は市販の加熱ゲルであるため、S-S結合等によりゲル化したものを更に加圧したことになる。500MPa以上で長時間加圧すると物性値に変化がみられたのは、加圧ゲルの特徴であるS-S結合以外の結合が促進されたことが考えられる。

豆腐を -18°C ～ -20°C で高压冷凍すると圧力の違いにより豆腐の物性が大きく異なることがわかった。すなわち、Sを200MPa(液相)と340MPa(氷III)で冷凍した豆腐の物性値は未処理の豆腐と大差なく、Lも破断応力が若干大きくなるものの、外観、舌触りは未処理の豆腐と大差なかった。Sは400MPa以上では圧力が上がるに従

って硬くなり、歪率、破断エネルギーが上昇した。Lは400MPaでは200～340MPaと同等で比較的良好であったが、500MPa以上では圧力が上がるに従って破断応力、歪率、破断エネルギーが上昇した。100MPaで高压冷凍すると凍結時体積膨張する氷Iが生成するため、Sでは高压冷凍豆腐の中では最も硬く、歪率も最も大きかった。Lでは加圧時間がSの2倍になるための圧力変性のためか、600MPa、700MPaで高压冷凍したもののほうが、100MPa高压冷凍品より破断応力、歪率、破断エネルギーが大であった。

大気圧下で冷凍した豆腐についてはS、Lとも、 -20°C の冷凍庫で冷凍したものが最も破断応力、歪率が大きく、冷凍温度が下がるに従って急速凍結するためテクスチャーが良くなり、 -80°C で冷凍したものはかなり良好であった。

2. 高压冷凍後、常圧解凍した豆腐の微細構造

今まで水分の多いゲル状食品の微細構造を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察することは困難であったが、電界放射型の高分解能走査型電子顕微鏡にクライオシステムを装着することによりゲル状食品のネットワークが観察可能となった。そこで、高压冷凍豆腐の微細構造をクライオSEMで観察した。

未処理の豆腐では $0.05\sim 0.1\mu\text{m}$ のタンパク粒子がネットワークを作っている状態が観察できた(Fig. 7)。グルコノデルタラクトンで凝固させた豆腐はなめらかな舌触りであるが、比較的隙間の

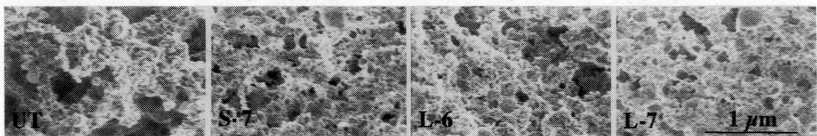


Fig. 7 Cryo-scanning micrographs of untreated tofu and tofu pressurized at room temperature.

UT: untreated tofu, S-7: small sample pressurized at 700MPa, L-6: large sample pressurized at 600MPa, L-7: large sample pressurized at 700MPa.

多いゲルの様相が観察された。Sを室温で45分高圧処理すると600MPa45分までは大きな変化はみられなかったが、700MPaで45分加圧すると微細構造にわずかに変化が見られた。Lを常圧で90分加圧すると600MPa以上の加圧で、ゲルネットワークが詰まってくるのが観察された。

高圧冷凍した豆腐（Sの中心部）のクライオ－SEM写真をFig. 8に示した。100MPaで高圧冷凍した豆腐では、細長く大きな氷結晶が観察された。Sを200MPa～340MPaで高圧冷凍すると非常に細かい氷結晶が生成した。400MPa以上加圧では氷結晶がわずかに大きくなり、700MPaでは不定形な相当大きな氷結晶となり、ゲルの部分が厚くなった。Lの外部（O）と中心部（C）の氷結晶痕跡を低倍で、ゲルの部分を高倍で観察した結果をFig. 9に示した。100MPaでは外部、中心部ともに氷IがSの場合より大きく成長していた。200MPa～400MPaの外部は急速凍結されるため、Sの中心部と同じサイズの細かい氷結晶であった。500MPa以上で徐々に氷結晶が大きくなり、700MPaでは相当大きくなった。Lの中心部の氷結晶は、圧力による影響は外部と同様の傾向であったが、外部に比べかなり大きな氷結晶が観察された。

高圧冷凍後のゲルの微細構造観察すると、隙間

の多い未処理の豆腐ゲルと比べ、冷凍後のゲルは網状構造がわずかに細密化した。テクスチャーのよい200MPa、340MPaのゲルは比較的粗い網状構造を維持していたが、700MPaのゲルは圧縮されていた。冷凍豆腐の破断応力にはゲルの厚さや圧縮状態、歪率にはすだち（氷結晶の痕跡）の大きさが関与していると思われる。

大気圧下で冷凍した豆腐のクライオ－SEM写真をFig. 10に示した。凍結温度により明らかに氷結晶の大きさが異なり、 -20°C の氷結晶は最も大きく、 -80°C の氷結晶は微細であった。凍結温度はきわめて重要な要素である。本実験は予め冷却したアルミ板上で片面より凍結したため、下部のほうが急速凍結されるため氷結晶が微細であった。本品はアルミ板を用いない通常の冷凍庫やエア－ブラスト法による冷凍品より急速に凍結されるため、テクスチャー、組織ともそれらより良好であったと思われる。

冷凍豆腐の氷結晶サイズを画像解析した結果をFig. 11に示した。小試料（S）は中心部まで急速凍結されるため、大試料（L）と比べ氷結晶が極めて小さかった。圧力は一瞬のうちに中心部まで到達するが、中心部まで凍結する時間は試料サイズにより異なる。200MPa～400MPa高圧冷凍品の氷結晶はS、Lとも微細であった。

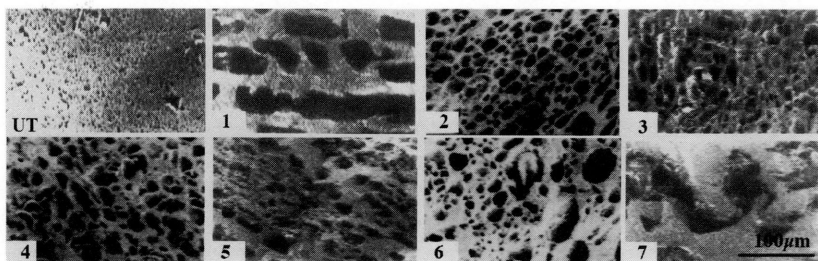


Fig. 8 Cryo-scanning micrographs of tofu (S: small sample) high pressure frozen then thawed at 0.1MPa. UT: untreated tofu, 1: pressurized at 100MPa, 2: 200MPa, 3: 340MPa, 4: 400MPa, 5: 500MPa, 6: 600MPa, 7: 700MPa at ca -20°C .

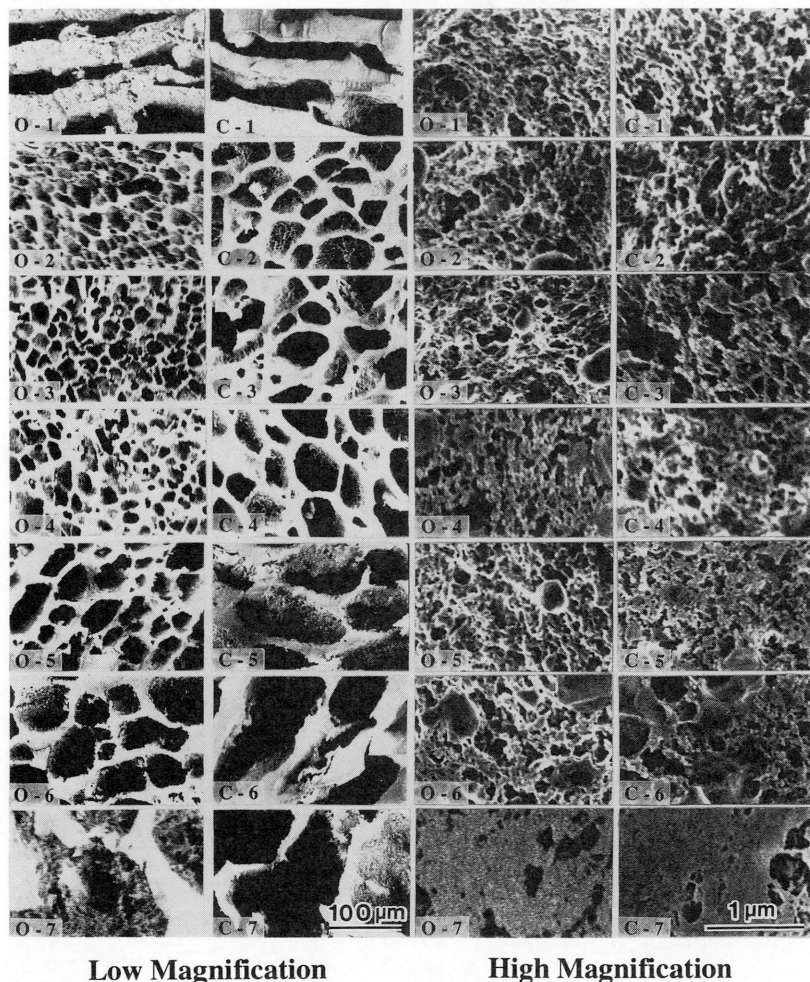
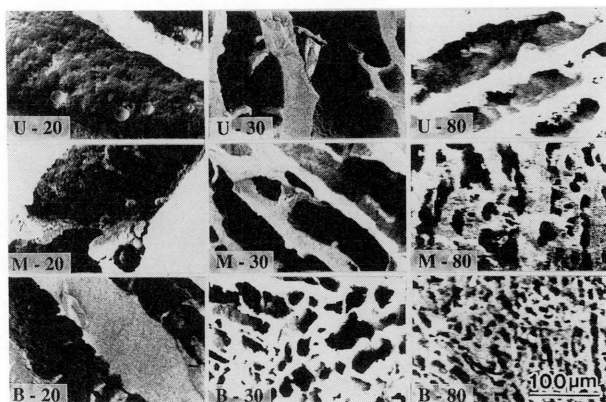


Fig. 9 Cryo-scanning micrographs of tofu (L: large sample) high pressure frozen then thawed at 0.1MPa. O: outer part; C: central part. 1-7: see Fig. 8.

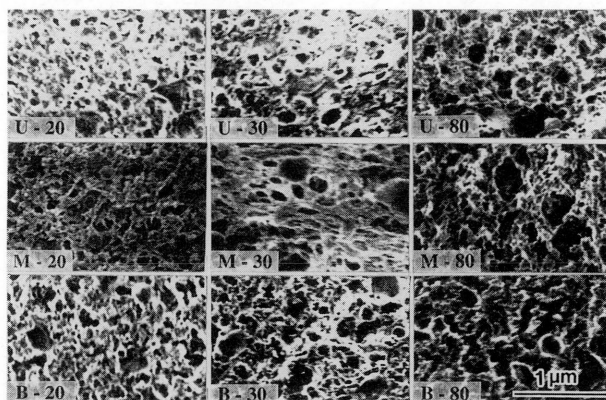
大気圧下および100MPa で冷凍した豆腐の水結晶 (水 Ih, 密度 0.92g/cm^3 , 六方晶系)⁴⁾は長く, 樹枝状に氷結晶が成長した痕跡がみられた。ゲルの隙間を満たしている水が体積膨張しながら大き

な氷結晶に成長するため, 豆腐ゲルのネットワークが圧縮され密になり, 破断応力が増し, テクチャーが悪くなったと考えられる。

200MPa 以上で高圧冷凍した豆腐の氷結晶は丸



Low Magnification



High Magnification

Fig. 10 Cryo-scanning micrographs of tofu (L: large sample) frozen in freezers at 0.1MPa.
U: upper part, M: middle part, B: bottom part. 20: frozen at -20°C , 30: -30°C , 80: -80°C .

い形状をしていた。 -20°C , 200MPa は液相 (密度 $1.0866\text{g}/\text{cm}^3$) であるためこのポイントに豆腐を保持している間は凍らず、過冷却状態を保っている。中心部が -20°C になった時急速に減圧すると、短時間で凍結する。200MPa で冷凍した豆腐が良かったのは、急速凍結のため氷結晶が微細になったためと思われる。

340MPa で高压冷凍すると氷 III (密度 $1.14\text{g}/\text{cm}^3$, 正方晶系) が生成する。100MPa と同程度の冷凍速度であるが、氷 I のように体積膨張を起こさないため、組織、テクスチャーとも良好で官能検査では未処理、200MPa と大差なかった。また、液相と固相の境界線が豆腐の場合と水 (Fig. 2) とでは異なることが予想される。豆腐は糖類

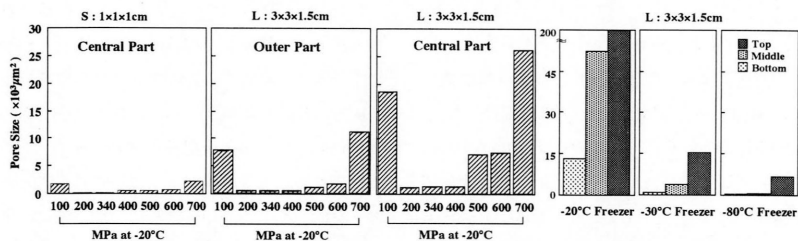


Fig. 11 Pore size of frozen tofu image-analyzed by a Mac-scope.

を含むため、水の場合より数°C凍結温度が低いことが考えられる。そのため、340MPa、 -18°C では凍らなかったことも考えられる。しかし、減圧後圧力容器から取り出したとき凍結していた。減圧時に瞬時に凍結したものと思われる。

400~600MPa で高圧冷凍すると氷 V (密度 $1.23\text{g}/\text{cm}^3$, 単斜晶系) が生成する。氷 III より重いため、氷結晶は細くなると予想したがそうではなかった。500MPa 以上では圧力が増すに従って特に大試料では舌ざわりが悪くなった。タンパク質の圧力変性が起こるためと思われる。

700MPa 高圧冷凍では氷 VI (密度 $1.31\text{g}/\text{cm}^3$, 正方晶系) が生成されるが外観も味も悪かった。

氷 III, V, VI と高圧になるに従って氷の密度は大きくなるが氷結晶も大きくなった。このことから減圧時あるいは冷凍保存時、解凍時に氷 VI→氷 V→氷 III→液相→氷 I へと相転移が起こり、最後に氷 I となるため、氷結晶が大きくなることが示唆された。そこで、高圧冷凍した後、圧力をかけたまま解凍し、完全に解凍した後減圧することによって、氷の相転移の影響を排除したときどのような豆腐ができるか検討した。

3. 高圧冷凍後、高圧解凍したときの豆腐の物性変化

高圧冷凍後、高圧解凍したときの豆腐の物性を常圧解凍したものと比較した (Fig. 12)。破断力は高圧解凍のほうが小さく未処理の値に近かつ

た。高圧解凍した豆腐の歪率と破断エネルギーは200~400MPa では常圧解凍と大差なかったが、100 MPa, 500 MPa, 600MPa では常圧解凍と比

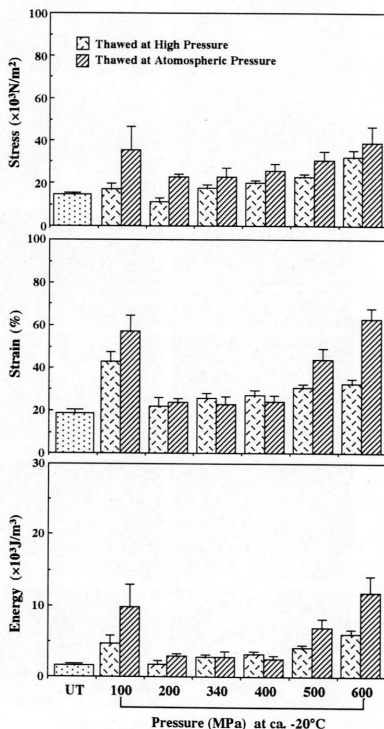


Fig. 12 Effect of high pressure thawing on the stress, strain and rupture energy of high pressure frozen tofu (L: large sample).

べ著しく低値となった。破断エネルギーも200~400MPaで良好であった。

4. 高压冷凍後、高压解冻した豆腐の微細構造
高压冷凍後、高压解冻したときの豆腐のクライオ-SEM写真をFig. 13に示した。100MPaと600MPaで高压冷凍後、高压解冻したものは氷結晶が大であった。しかし、200~500MPaで高压冷凍後、高压解冻した豆腐の氷結晶は外部、中心部ともに非常に微細で未処理に近く、常圧解冻した豆腐の様相と異なった。

200~500MPaで高压冷凍後、圧力をかけたまままで20°Cまで解冻した後減圧すると氷結晶が超微細であることから、これらの圧力で高压冷凍した高压氷は凍結時体積膨張しないため微細であることが判明した。高压冷凍後-20°Cで減圧し、冷凍保存後大気圧下で解冻すると、その間に氷V→氷III→液相→氷Iへと相転移が起こり、最後に氷Iとなるため、高压解冻したものと比べ氷結晶が大きくなったものと思われる。

高压解冻しても100MPaでは氷Iが生成するた

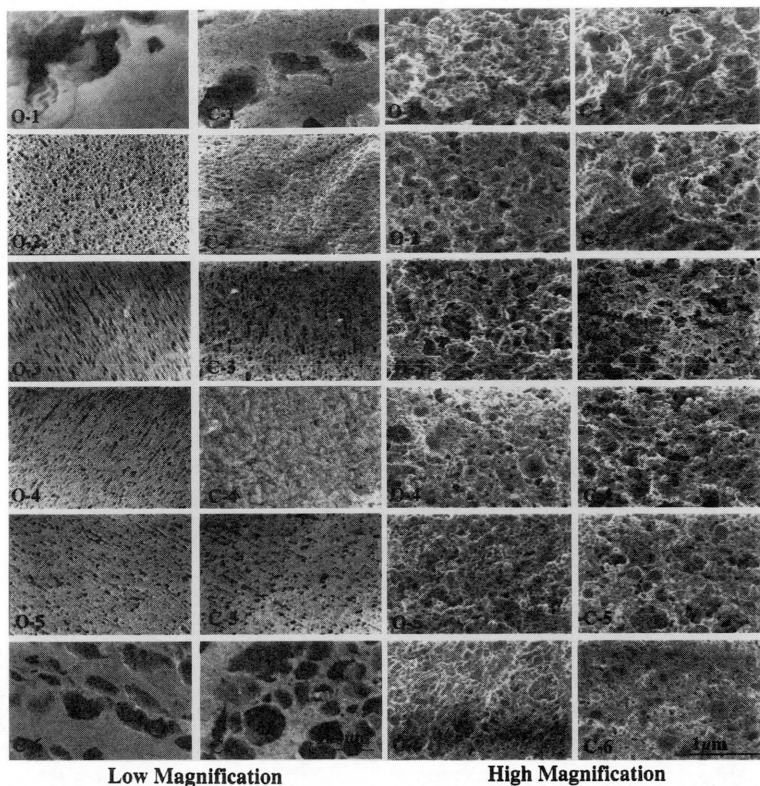


Fig. 13 Cryo-scanning micrographs of tofu (L: large sample) high pressure frozen then thawed at high pressure.

O: outer part; C: central part. 1-6: see Fig. 8.

め氷結晶が大きかったが、物性値は改善された。600MPaで氷結晶が大きかったのは160分高压処理（90分高压冷凍+70分高压解凍）したため、タンパク質の圧力変性が起こったことも原因の一つと考えられる。解凍時の温度が0°C以上になると、温度上昇とともに圧力も上昇し、圧力容器内温度が20°Cに達したとき660MPaとなった。本装置の最高圧力は700MPaであるため、700MPa（氷VI）での高压解凍の実験は行えなかった。

最も品質の良好な冷凍豆腐は200~500MPaで高压冷凍した後高压下で冷凍保存し、高压をかけたまま解凍したものであった。

おわりに

冷凍豆腐のテクスチャー改善のため-20°Cで高压冷凍後減圧し、凍結保存した後20°Cで自然解凍した結果、200MPa（液相）、340MPa（氷III）、400MPa（氷V）で冷凍したものが、氷結晶が細かく、外観、テクスチャーが良好であった。500MPa以上では圧力の上昇とともに氷結晶が大きくなりテクスチャーが悪化した。-20°Cの大気圧下や、100MPaで凍結したものは、凍結時体積膨張する氷Iを生成するため氷結晶が大きく、テクスチャーが非常に悪いが、200MPaで過冷却した豆腐を減圧すると瞬時に凍結されるため良好な製品ができた。

200~500MPaで高压冷凍後、高压下で20°Cまで解凍すると氷結晶痕跡は超微細で、破断強度解析結果も未処理と大差なかった。氷III（340

MPa）、氷V（400MPa~500MPa）の氷結晶は微細であることが判明した。高压冷凍後、高压下で解凍すると未処理と同様であるのに、-20°Cで減圧し直ちに凍結保存すると氷結晶が大きくなるのは、減圧~冷凍保存時に氷の相転移が起こり、最後に氷Iができるためと思われる。しかし、大気圧下で凍結したものとは比べ、200~400MPaで高压冷凍することにより冷凍豆腐のテクスチャーが著しく改善されることがわかった。木綿豆腐についても検討したが、ほぼ同様の結果が得られた。

終わりに、本研究に対して多大な研究助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心より感謝いたします。なお、本研究は岡山県立大学保健福祉学部寺本あい助手との共同で行なわれた。

文 献

- 1) 神田幸忠, 青木美千代, 小杉敏行: 日食工誌, 39 (7), 608-614 (1992)
- 2) 神田幸忠, 青木 (永井) 美千代: 「生物と食品の高压科学」(林力丸編) pp. 27-33, さんえい出版, 京都 (1993)
- 3) N. H. Fletcher (前野紀一 訳) 「水の化学物理」 pp. 20-63, 共立出版, 東京 (1974)
- 4) 前野紀一: 「氷の科学」北海道大学図書刊行会, pp. 163-186, 札幌 (1981)
- 5) F. Franks (村勢則郎, 片桐千保 訳): 「低温の生物物理と生化学」 pp. 25-43, 北海道大学図書刊行会, 札幌 (1989)
- 6) 月向邦彦: 「加圧食品-研究と開発」(林力丸編) pp. 23-35, さんえい出版, 京都 (1990)
- 7) 松本正, 林力丸: 同上, pp. 237-247.
- 8) 西村隆司, 廣塚元彦, 森弘之: 「生物と食品の高压科学」(林力丸編) pp. 192-196, さんえい出版, 京都 (1993)

Texture and Fine Structure of Tofu Frozen at High Pressure

Michiko Fuchigami (Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University)

The objective of this study was to research the effect of high pressure on the improvement in quality of frozen tofu. Texture and structure of kinu-tofu (soybean curd) frozen at 100MPa (ice I), 200MPa (liquid phase), 340MPa (ice III), 400, 500, 600MPa (ice V) or 700MPa (ice VI) at ca. -20°C were compared with tofu frozen in freezers (F: -20°C , -30°C or -80°C) at atmospheric pressure (0.1MPa).

The 8 pieces (S: $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 1\text{cm}$) or 3 pieces (L: $3\text{cm} \times 3\text{cm} \times 1.5\text{cm}$) of tofu were sealed, put into a pressure vessel ($6\text{cm } \phi \times 20\text{cm}$) kept at -20°C , immediately pressurized for either 45 min (S) or 90 min (L) at 100 ~ 700MPa, reduced pressure, stored in a freezer (-30°C), and then thawed at 20°C . When tofu was frozen at 0.1MPa or 100MPa, ice I formed, and stress and strain of thawed tofu were greatest to least: $-20^{\circ}\text{C} > 100\text{MPa} > -30^{\circ}\text{C} > -80^{\circ}\text{C}$, respectively. Texture of tofu frozen in -20°C was the worst among frozen tofu. This was due to an increase in the volume of water during freezing at 0.1MPa. However, stress and strain of tofu frozen at 200MPa or 340MPa were almost the same as untreated tofu. When pressure was reduced after pressurizing at 200MPa at -20°C (liquid phase), tofu froze rapidly. Therefore, texture was good. As pressure rose above 500MPa, stress and strain increased, and texture became worse. Also, the ice crystals in tofu frozen at 200MPa ~ 400MPa were smaller than in tofu frozen at 100MPa and 700MPa, and those on the outer part were smaller than in the center (L). Ice pores in small size tofu (S) were smaller than those in large size (L). It was found that freezing caused ice crystals to form in the gel network causing it to contract. Tofu with a tight network was firmer than tofu with a loose network observed using cryo-SEM. It seemed that the shrinkage which was due to the growth of ice crystals affected the firmness, while the size of the ice crystals affected the frozen tofu strain. Thus, high pressure-freezing at 200MPa ~ 400MPa was effective in improving the texture of frozen tofu.

To determine phase transition of ices during reduction of pressure, high pressure-frozen tofu (L) was thawed at high pressure, and then reduced pressure. The pore size of tofu frozen at 200 ~ 500MPa was the same as untreated tofu. This suggested that phase transitions (ice VI $\rightarrow$ ice V $\rightarrow$ ice III $\rightarrow$ liquid $\rightarrow$ ice I) occurred during reduction of pressure at -20°C or storage in a freezer.