食品における凍結と氷結晶構造について

宮 脇 長 人^{1,2}

¹ 石川県立大学生物資源環境学部, ² 水科学技術研究工房

Freezing and Ice Structure in Food

Osato Miyawaki^{1,2}

¹ Ishikawa Prefectural University, 1-308 Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836

² Resaech Laboratory for Water Science and Technology, 7-36-18 Negishi-dai, Asaka, Saitama 351-0005

The primary physicochemical aspects of freezing are the substantial reduction of water activity and the increase of osmotic pressure by freeze-induced concentration. The temperature-dependent ice fraction subsequently affects the changes in thermal properties and specific chemical reaction processes. In frozen food, the ice structure is strongly determined by the moving ice-front through the balance of water mass transfer and heat transfer. By controlling the ice structure, progressive freeze-concentration could be applied to concentrate liquid food with high quality. In some living organisms, freeze-related biosubstances are produced and accumulated for freeze-tolerance. The cell structure also plays an important role in the freeze-tolerance of cells in microorganisms, plants, and animals.

(Accepted Dec. 10, 2020)

Keywords : freezing and water activity, ice fraction, ice structure, progressive freeze-concentration, freeze-related biosubstance

キーワード : 凍結と水分活性, 氷結率, 氷結晶構造, 界面前進凍結濃縮, 凍結調節物質

1. はじめに

生物や食品においては, ほとんどの場合, 水は圧倒的大量的成分である。一方, 凍結現象は自然界では普遍的であり, これに対して生物は様々な対策を講じている。また, 食品においては, 冷凍は最も多用される保存法の一つである。本報告においては, 先ず, 凍結の物理化学的意義を明らかにし, 次に, 食品の氷結率とその温度依存性について論じ, さらに, 凍結によって必然にもたらされる濃縮により, 化学反応や伝熱物性が大きく影響されることを示す。凍結食品において形成される氷結晶構造については, 物質移動と熱移動の観点から凍結界面進行速度の重要性を指摘し, これに基づいた氷構造解析を行い, さらにこのことに関連した氷結晶構造制御に基づく界面前進凍結濃縮法の基礎とその応用について述べる。凍結と生物との関連については, 種々の凍結調節物質とその影響について, さらに凍結と細胞構造との関連について論ずる。

2. 凍結の物理化学的意義

凍結食品においては, 温度 $T(K)$ の場合, それに応じて水の蒸気圧および水分活性 (a_w) が変化することが知られ

ている¹⁾。このことは凍結食品の a_w は温度のみによって決定されることを意味しており, 次式により記述されている²⁾³⁾。

$$\ln a_w = (-\Delta H_f/R) (T_f - T)/T_f/T + (\Delta C_f/R) [(T_f - T)/T - \ln(T_f/T)] \quad (1)$$

ここに, T_f は水の氷点 ($=273.15 K$), ΔH_f は水の凍結潜熱 ($=6008 J/K/mol$), ΔC_f は凍結による水の比熱変化 ($=38.7 J/mol/K$), R は気体定数である。

さらに水分活性は次式により浸透圧 Π と理論的に関係づけられている⁴⁾。

$$\Pi = -(RT/V_w) \ln a_w \quad (2)$$

ここに, V_w は水のモル体積である。

式 (1) (2) に基づき, 水分活性および浸透圧の温度依存性を計算した結果を Fig. 1 に示す。これによれば, 標準的冷凍庫に相当する $-20^\circ C$ において, $a_w=0.82$ となり, 凍結はかなりの水分活性低下をもたらす。その低温効果と相俟って, 食品保存法としての凍結法の有効性を示している。また, 同条件における浸透圧は $\Pi=26.8 MPa$ となり, 凍結はかなりの高圧効果をもたらすことを理論的に示して

¹ 〒921-8836 石川県野々市市末松 1-308, ² 〒351-0005 埼玉県朝霞市根岸台 7-36-18

*連絡先 (Corresponding author), osatomiyawaki@yahoo.co.jp

Fig. 1 Water activity and osmotic pressure as a function of temperature in the frozen state

いるものの、このことは意外と知られていないように思われる⁵⁾。

3. 食品の氷結率

食品等においては水の存在状態は様でなく、しばしば、自由水、未凍水、不凍水などと分類されることがある。そして、凍結条件下では、自由水と未凍水の一部が凍結し、凍結水の割合、すなわち氷結率 f_i (g-ice/g-total mass) は温度依存的に変化し、次式によって記述される。

$$f_i = (x_w - x_b)(1 - \theta_f/\theta) = f_{FW}(1 - \theta_f/\theta) \quad (3)$$

ここに、 x_b (g-bound water/g-total mass) は不凍水含率、 x_w (g-water/g-total mass) は水分含率、 θ_f (°C) は凍結開始温度、 θ (°C) は任意温度、 f_{FW} (g-freezable water/g-total mass) は全可凍結水率である。

いくつかの食品において式 (3) におけるパラメーター x_b および θ_f が求められており^{6)~8)} これらの例を Table 1 に示す。また、溶液系における氷結率の依存性を Fig. 2 に示す⁹⁾。氷結率は、凍結開始温度から温度低下とともに急激に上昇し、やがて f_{FW} に近づく。

4. 食品の凍結と濃縮

(1) 凍結と濃縮

食品等において凍結する成分は水であり、その氷結率は上記式 (3) によって温度依存的に変化し、それとともに、未凍結部分の濃度は増加する。これが凍結に伴う濃縮であり、その様子を Fig. 3 に示す。氷結晶の生成に伴い未凍結領域での溶液濃度は α 倍になる¹⁰⁾。

$$\alpha = \theta_f/\theta \quad (4)$$

この理論結果は凍結と濃縮の関係を簡潔に示すとともに、食品の凍結開始温度の役割の重要性を意味するものでもある。

Table 1 Amount of unfrozen water (x_b) and initial freezing point (θ_f) for various food⁶⁾

Food	Water content, x_w (g/g)	x_b (g/g)	θ_f (°C)
Lean beef	0.800	0.037	-0.733
Lean beef	0.500	0.159	-3.628
Lean beef	0.261	0.165	-13.46
Calf veal	0.775	0.065	-0.682
Lamb loin	0.649	0.071	-0.896
Lamb loin	0.444	0.080	-0.841
Cod	0.803	0.046	-0.907
Haddock	0.791	0.043	-0.861
Egg white	0.865	0.015	-0.506
Egg yolk	0.500	0.051	-0.536
Bread	0.373	0.090	-4.833
Methyl cellulose	0.750	0.108	-0.768

Fig. 2 Fraction of frozen water as a function of temperature in solutions of glucose and Dextran T500

From Pradipasena *et al.* (2007)⁹⁾ with permission

Fig. 3 Concentration effect of solutes along with freezing

(2) 凍結と化学反応

ある種の化学反応は常温よりも、凍結条件下で加速されることが知られており¹¹⁾、酸加水分解反応¹²⁾ やアルカリ加水分解反応¹³⁾、或いは、大気中における亜硝酸の硝酸への酸化反応による酸性雨への変換¹⁴⁾ などが報告されている。これらの反応は、いずれも凍結による反応成分の濃縮が原因

Fig. 4 Changes in native and denatured soy protein concentrations during freeze preservation at -5°C

Native and denatured proteins were measured by optical absorbance at 280 and 600 nm, respectively. Solid and broken lines are predictions by the theoretical model by Eq. 6. From Miyawaki and Nishino (2016)¹⁰⁾ with permission.

で反応が加速され、この現象は希薄溶液において起りやすいことが式 (4) から推測される。

このような反応において、反応成分濃度を C_N とし、 n 次反応を仮定すると、反応速度式は、未凍結条件下では下記のように記述される。

$$-(dC_N/dt) = kC_N^n \quad (5)$$

ここに、 k は反応速度定数、 t は時間である。

一方、この反応が凍結条件で起こると、反応成分が式 (4) に従って α 倍に凍結濃縮されるため、反応速度は以下のようになる。

$$-(dC_N/dt) = k\alpha^{n-1}C_N^n \quad (6)$$

式 (5) と (6) を比較すると反応速度は、 $n > 1$ の場合には凍結により加速、 $n < 1$ の場合には減速、 $n = 1$ の場合には変化しないこととなる。

大豆タンパク質は凍結変性し不溶化することを利用して凍豆腐が製造されることが知られている¹⁵⁾。このことに関連してわれわれは、分離大豆タンパク質溶液の凍結変性を解析し (Fig. 4)、温度を -5 、 -18 、 -40°C と変化させた結果、大豆タンパク質変性率および変性速度のいずれにおいても -5°C が最大となり、また、反応は 2 次反応であることを明らかにした¹⁰⁾。

5. 食品凍結と伝熱物性

水の伝熱物性は Table 2 に示すように凍結によって大きく変化する。密度 (ρ) はそれほど変化しないものの、凍結

Table 2 Thermal properties of water in unfrozen and frozen states

	Unfrozen (0°C)	Frozen (0°C)
Density ρ (kg/m^3)	999.8	917
Specific heat C_P (kJ/kg/K)	4.217	2.034
Thermal conductivity k (10^{-3} kW/m/K)	0.55	2.85
Thermal diffusivity κ ($10^{-7}\text{ m}^2/\text{s}$)	1.47	15.3
Dielectric constant ϵ' (-)	80.2 (5°C)	3.2 (-12°C)
Loss factor ϵ'' (-)	22.0 (5°C)	0.0028 (-12°C)

Fig. 5 Comparison of effective thermal conductivity measured experimentally and that predicted by ME model for glucose solutions

From Miyawaki and Pongsawatmanit (1994)¹⁶⁾ with permission.

によって熱伝導度 (k) は約 5 倍になる。このことと氷結率の影響により、Fig. 5 にグルコース溶液の例を示すように、凍結食品の有効熱伝導度は溶質濃度によって変化し、強い温度依存性を示す。このような場合、氷結部分 (氷) と未凍結部分とのそれぞれの熱伝導度に大きな差があるため、その氷構造状態により、直列伝熱モデル、並列モデル、分散モデルにより見かけの熱伝導度が変化するため、これを有効熱伝導度として記述する必要がある。実際にこれらの伝熱モデルを適用して実験結果を解析した結果、Fig. 5 のように、氷分散構造に基づく伝熱モデル (Maxwell-Eucken モデル) が適用できることが明らかとなった¹⁶⁾。

比熱 (C_P) も凍結により約 1/2 となり、従って、温度伝導度 (κ) は約 10 倍変化する。

$$\kappa = k / (\rho C_P) \quad (7)$$

このことは、非定常伝熱である食品の凍結・解凍において重要な役割を果たす。この場合、温度伝導度が支配的パラメーターであり、凍結においては食品外部から氷結晶が成長するため温度伝導度が増加して伝熱が容易になってゆく

Fig. 6 Microwave thawing (2450 MHz) of glucose solution initially frozen at -10°C

From Kawaura *et. al.* (2020)¹⁷⁾ with permission.

のに対して、解凍においては、食品外部から融解相が成長するため、温度伝導度は低下して伝熱速度も低下する。このことと、温度差条件の相違もあり、一般に食品の凍結に対して解凍は約数倍の時間が必要とされており、このことは解凍後の食品品質との関連において注意が必要である。

凍結食品の解凍においてマイクロ波を使用する場合、一般的には発熱量は P_t に比例する。

$$P_t = 2\pi f \epsilon_0 \epsilon'' E^2 \quad (8)$$

ここに、 f は周波数、 ϵ_0 は真空の誘電率、 ϵ'' は誘電損失、 E は電場の強さである。しかしながら、凍結食品においては Table 2 のように誘電損失 ϵ'' がほぼゼロに近いので、式(3)の水結率の影響を補正して、発熱量は以下ようになる。

$$P_t = 2\pi f \epsilon_0 \epsilon'' E^2 (1 - f_i) \quad (9)$$

実際に、濃度を変化させたグルコース水溶液を -10°C で凍結後、マイクロ波解凍 (2450 MHz) を行った結果、Fig. 6 に示すように水結率による影響により、加熱速度は大きく異なっていることがわかる¹⁷⁾。

6. 食品凍結と氷結晶構造

従来、凍結食品において形成される氷結晶構造は、標準的には $0 \sim -5^{\circ}\text{C}$ の温度の最大氷結晶生成帯通過時間によって決定され、この時間が短い急速凍結の場合には微細氷結晶構造が、この時間が長い緩慢凍結においては粗大氷結晶構造が形成され、一般には前者が望ましいとされてきた。しかしながら、この最大氷結晶生成帯理論は定性的説明には有効であっても、実際の氷結晶構造と凍結条件との定量的説明は困難である。

凍結においては、(1) 氷核生成、(2) 氷結晶成長の二段プロセスにより氷結晶構造が形成される¹⁸⁾。氷核生成においては均一氷核生成と不均一氷核生成があり、前者は水分子クラスターのみが新たに集合して核生成するための大き

な表面エネルギー障壁を乗り越えるために大きな過冷却を必要とする。これに対して、後者の不均一氷核生成は水中の不純分固体などの表面に付着して氷核生成するため、エネルギー障壁が小さく、食品凍結などはこの機構によると思われる。

氷結晶成長については、(1) 完全な結晶面からの成長、(2) ラセン転位による成長、(3) 継続的成長、三つの機構が知られている。この場合、水蒸気からの成長と液相からの成長を区別する必要がある。これは、両者において水の分子拡散係数 D_W と式(7)の温度伝導度 κ の比率が大きく異なっているからである⁵⁾。

$$D_W/\kappa \sim 2 \quad (\text{for gas phase}) \quad (10)$$

$$D_W/\kappa \sim 0.01 \quad (\text{for liquid phase}) \quad (11)$$

気相からの成長においては、式(10)のように水の物質移動速度と熱移動速度はバランスしている。雪の結晶はこの条件により、おそらく、完全な結晶面からの成長あるいはラセン転位によって、結晶習癖に従って自由に氷成長し、その結晶構造は水蒸気圧と過冷却温度の二次元空間で著名な中谷ダイアグラムとして整理されている^{19/20)}。

これに対して、食品などのような液相からの結晶成長においては、式(11)に示されるように、水の物質移動速度よりも熱移動速度は遥かに大きくなる。そのため、伝熱速度に対して水分子の拡散速度が追いつかず、粗いデンドライト界面からの継続的成長が支配的となり、伝熱により強制的に氷結晶成長がなされ、凍結界面進行速度 u が重要な役割を果たすこととなる。このような場合における氷結晶構造代表径を d_p とし、この氷代表径が成長することに要する時間を t_1 とすると、これは分子拡散係数 D_W のみによるため、

$$t_1 = d_p^2 / D_W \quad (12)$$

一方、このような氷代表径が凍結界面進行速度 u で通過するまでに許される時間 t_2 は

$$t_2 = d_p / u \quad (13)$$

となり、 $t_1 = t_2$ であるため、

$$u d_p / D_W = 1 \quad (14)$$

となり、氷結晶構造代表径は凍結界面進行速度に反比例することとなる²¹⁾。以上の理論的予測と実験結果は Fig. 7 に示すように良好に一致しており、また、この図における直線の勾配は、水の分子拡散係数とオーダー的な一致がみられる。

このような凍結食品等の氷結晶構造の解析はいろいろな研究者によって試みられており、Table 3 にその一覧を示す²²⁾。これらの理論には若干の差異点も見られるが、氷結

Fig. 7 Effect of advance rate of ice front (u) on mean ice crystal size formed in soy protein curd

From Miyawaki *et al.* (1992)²¹⁾ with permission.

Table 3 Characterization of mean ice crystal size (d_p) in relation to freezing rate²²⁾

Item	Method	Relation with freezing rate	Ref.
Beef	Freeze-substitution	$d_p \propto 1/(uG_2)$	23
Sucrose sol'n	CryoSEM	$d_p \propto 1/u^{-b}$	24
Apple tissue	CryoSEM	$d_p \propto 1/(uG_1)^{0.5}$	25
Protein gels	Freeze-fixation	$d_p \propto D_w/u$	21
Gelatin gels	Freeze-drying	$d_p \propto 1/(uG_1)^{0.5}$	26

u , Advance rate of ice front (m/s); D_w , Water diffusivity (m^2/s); G_1 , Temperature gradient in frozen phase at the interface; G_2 , Temperature gradient in unfrozen phase

晶構造に対する凍結界面進行速度の役割の重要性については見解が一致している。以上のことは、食品における氷結晶構造の解析は伝熱条件との組み合わせが必須であることを意味している。

通常の凍結においては過冷却がしばしば見られ、そのエンタルピー対温度曲線を Fig. 8 に示す。この図において、通常の凍結は $a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow d$ のルートを通るのに対し、過冷却を伴う場合には、 $a \rightarrow b \rightarrow f \rightarrow g \rightarrow c \rightarrow d$ のルートを通り、 $b \rightarrow f \rightarrow g$ が過冷却区間である。この場合、 f 点において過冷却は終了し、その $f \rightarrow g$ の温度遷移は過冷却空間全体で急速に伝播するため、極めて急速な凍結が起こる。これが大規模に起こった場合、式 (14) に従って、凍結界面進行速度 u が大きい超急速凍結となり、微細な氷結晶構造 d_p が形成されることが報告されている²¹⁾²⁷⁾。しかしながら、過冷却は非平衡状態であるため本質的に制御困難である。そこで、これに高压技術を適用して、圧力を 200 MPa として水の氷点を -20°C まで低下させた後、瞬間的に圧力

Fig. 8 Enthalpy-temperature relationship in the standard freezing ($a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow d$) and the freezing with supercooling ($a \rightarrow b \rightarrow f \rightarrow g \rightarrow c \rightarrow d$)

を解放させることによって平衡状態を維持しながら超急速凍結させる圧力移動凍結法が提案されている²⁸⁾。しかしながら、これら過冷却凍結法や圧力移動凍結法のいずれにおいても、超急速凍結の際のエンタルピー変化は水の凍結潜熱の数分の 1 であり、完全凍結には至らず、その後は通常における伝熱条件で凍結完了させる必要がある。

7. 凍結濃縮法について

(1) 凍結濃縮法の分類

果汁や牛乳などの液状食品においては、その輸送や貯蔵のために、蒸発法、逆浸透法、凍結濃縮法などの濃縮技術が多く用いられている。液状食品の濃縮法には蒸発法、膜濃縮法、凍結濃縮法の三つの方法がある。

蒸発法は気液平衡を脱水原理とし、装置が簡単なためコストは最も安価で、品質は劣るものの、最も多用されるが、消費エネルギーは最も大きく、この対策として多重効用法が用いられる。

膜濃縮法は膜の分子ふるい効果を利用する、相変化を伴わない濃縮法であるため、エネルギー消費の面では有利であるが濃縮限界が浸透圧に制限され、また、膜コストの比率が大きいため、膜寿命がプロセスコストを大きく左右する。膜濃縮法は非加熱濃縮法であるために、蒸発法と比較して高品質濃縮が可能である。

凍結濃縮法は固液平衡がその濃縮原理で、理論的には 100% の純氷が生成し、他成分はそのまま濃縮されるが、実際には氷結晶への溶質の取り込みが起るため、収率が低下することがある。しかしながら、この溶質の取り込み機構は氷結晶粒界への機械的取り込みであり²⁹⁾、成分非選択的で、従って、濃縮前後に成分プロファイルがほとんど変化せず、また、低温操作であるため、高品質濃縮が可能である。しかしながら、従来法の場合、凍結濃縮法は装置が複雑であるため高品質が得られるものの、最も高コストとされている³⁰⁾。

Fig. 9 Classification of methods for freeze concentration

凍結濃縮法には大別して、微細氷結晶を作製する懸濁結晶方式と、それ以外の巨大氷結晶を作製する方式に分類でき、これを Fig. 9 に示す⁵⁾。前者では、先ず試料溶液を冷却して、掻き取り伝熱装置などによるクリスタライザーで微細氷を生成し、これを直ちに遠心分離などによって氷結晶を除去する非平衡懸濁結晶法が歴史的には多く研究されてきたが、この方式においては、氷結晶純度が十分でなく、また氷結晶サイズも小さく固液分離が困難であった。

これに対して Huige and Thijssen ら³¹⁾ は平衡懸濁結晶法 (ESC) を提案した。この方式の特長は、再結晶槽におけるオストワルドライピング効果による結晶成長にある。この原理により再結晶槽において氷結晶は成長し、また氷結晶状態も本来の平衡状態に近づくため、その純度も高められる。ESC においては高純度の氷結晶が得られるため収率が高く、非常に優れた方法で、これまでに既に多くの実用化例がある。しかしながら、長い滞留時間と精密な温度制御を必要とし、操作が大規模連続生産方式に限られ、操作中の洗浄・殺菌が出来ない欠点がある。さらに懸濁結晶法に共通の欠点として、流動性を保つためには懸濁液中の氷結晶比率を 1/2 以上とするのは困難であるため、高濃度濃縮が必要な場合は多段操作が必要不可欠なことである。

一方、Fig. 9 におけるもう一つのグループである巨大氷結晶を生成する方法には、凍結融解法と界面前進凍結濃縮法があり、凍結融解法は試料をブロックアイスとして凍結後、ゆっくり融かしてゆくと、最初の融解画分は高濃度で、後の画分になるほどだんだん低濃度になることを利用するもので、最も簡単な凍結濃縮法として、海水淡水化などにおいて研究例がある³²⁾。しかしながらこの方法は濃縮度に限界があり、高濃度濃縮が必要な場合は多段操作を繰り返す必要がある。

界面前進凍結濃縮法 (PFC; Progressive freeze-concentration) は巨大氷結晶を生成するもう一方の凍結濃縮法で、冷却面に単一方向に氷結晶を生成させて凍結濃縮を行う方法で、システム単純化によりコストを大きく低下できる可能性がある。PFC 法においては、流下液膜方式³³⁾³⁴⁾と、流路閉鎖循環流方式³⁵⁾がある。このうち前者は、最も単純な機械的構成で、鉛直冷却板に試料液を繰り返し流下させる方式で、操作時間が長く、濃縮比も不十分であり、多段操作を必要とする。これに対して、流路閉鎖循環流方式においては、短い操作時間で一段で高い濃縮比が得られる。さらに、操作方式も数時間単位の繰り返し回分操作でフレキシビリティの高い生産ができ、洗浄・殺菌操作を組込むこともできる。

(2) 界面前進凍結濃縮法の特徴

PFC はもともと、希薄溶液分析のための予備濃縮法として提案されたが、この方法を食品などに適用するには、①凍結初期における過冷却による氷結晶純度の大幅な低下、②操作条件と凍結濃縮効率の関係が不明であること、③スケールアップ法、④高濃度試料における氷結晶への成分取り込みによる収率の低下、などの欠点があった。

PFC について、先ず、Fig. 10 (A) に示すような試料処理量 100~1000 mL 程度の小型実験装置³⁶⁾を用いることにより、初期過冷却防止にはあらかじめ冷却面に種氷の植氷が有効であることが示された³⁷⁾。

さらに、操作条件の凍結濃縮効率への影響については、氷結晶成長速度をなるべく小さく、また、固液界面における攪拌速度を大きくすることで氷結晶純度改善ができることがわかり、このことを理論的に解明するために界面濃度分極理論が適用された³⁸⁾。これは Fig. 11 に示すように、固液界面付近の溶質濃度の物質収支を、氷結晶成長速度と界

Fig. 10 Small test apparatus (A) and closed circulating tubular ice system (B) for progressive freeze-concentration

Fig. 11 Concentration polarization model for progressive freeze-concentration

From Miyawaki *et al.* (1998)³⁸⁾ with permission.

面から排除される溶質により形成される濃度分布による分子拡散のバランスにより記述するものである。その結果、PFCにおける溶質の固液間分配係数 $K (=C_S/C_L : C_S, \text{氷相濃度}; C_L, \text{濃縮液濃度})$ は次式で記述できることがわかった。

$$K = K_0 / [K_0 + (1 - K_0) \exp(-u/k)] \quad (15)$$

ここに、 K_0 は極限分配係数と呼ばれるパラメーターで、 $u \rightarrow 0$ または $k \rightarrow \infty$ の条件で実験的に決定され、 u は氷結晶成長速度、また、 k は固液界面付近での物質移動係数で、次式により記述される。

$$k = aN^{0.2} \quad (16)$$

ここに、 N は攪拌速度、また a は実験パラメーターである。

これらの式 (15)–(16) を用いることで、先の凍結濃縮効率に関する操作条件、即ち、氷結晶成長速度および攪拌条件の影響を良好に説明できる。この界面濃度分極理論結果を簡潔に表現すれば、高い氷結晶純度を得るためには強い攪拌条件と遅い氷結晶成長速度が重要であるということである。また、式 (15) の極限分配係数 K_0 は溶液濃度 (浸透圧) に依存して増加し、高濃度溶液ほど氷相への溶質取り込みが増えることがわかった⁴⁾。

PFC のスケールアップについては、冷却板または冷却コイル表面に試料液を重力で流下させることによって氷結晶を成長させる流下液膜方式が多く研究されてきている³³⁾³⁴⁾。しかしながら、この方式では、固液界面の液流速が自然流下のため不十分であり、また、気液界面がオープン構造であるため、凍結濃縮法の最大の特長としての香気成分保持特性が発揮されにくい、などの欠点がある。そこで、われわれは、Fig. 10 (B) に示すような閉鎖系の中で、液流速を自由に制御できるような循環流壁面冷却方式による PFC 装置を開発した³⁹⁾。

一方、高濃度試料における氷への成分取り込みによる収率低下の問題に関しては、凍結濃縮後の生成氷結晶に対して氷結晶部分融解法を適用した。これは Fig. 9 の凍結融解法の原理をそのまま応用するもので、成分を取り込んだ氷結晶をゆっくり融解して、初期の高濃度画分のみを回収して収率改善を図る⁴⁰⁾。このための小型装置を試作して、操作条件の影響を検討した結果、氷結晶融解温度をあまり高くせず、ゆっくり攪拌することが有効で⁴¹⁾、このことを踏まえて氷結晶部分融解大型装置を作製、これと循環流壁面冷却 PFC 装置とを組み合わせた統合システムを開発した⁴²⁾。

Fig. 12 Comparison of flavor profile before and after the concentration of pear (*Pyrus Communis* L. 'La France') juice flavor condensate by progressive freeze-concentration (PFC) and reverse osmosis (RO)

(1, ethylacetate; 2, ethanol; 3, butylacetate; 4, 1-butanol; 5, pentylacetate; 6, 2-methyl-1-butanol; 7, hexylacetate; 8, 1-hexanol; 9, 3,4,5-trimethyl-4-heptanol; 10, 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol; 11, 1-octanol; 12, allylmethylsulfide). From 'Gunathilake *et al.* (2014a)⁴³⁾ with permission.

(3) 界面前進凍結濃縮法の応用

山形県特産の洋梨ラ・フランス果汁の濃縮は減圧濃縮で行われており、香氣成分のほとんどは濃縮液ではなく蒸発凝縮液に移行してしまう。そこで、この凝縮液を PFC 濃縮して香氣成分の回収を試みた⁴³⁾。凝縮液を濃縮後、濃縮還元した試料について、香氣成分の対原液比のレーダーチャートを、濃縮法として逆浸透法を用いた結果とともに Fig. 12 に示す。逆浸透法ではいくつかの成分は大きく変化しているが、PFC 法では成分分布のあまり変化しない良好な濃縮ができていることがわかる。なお、蒸発法を用いた場合、香氣成分はほとんど揮散してしまうため、結果をこのグラフにプロットすると原点付近の「点」になる。このような天然香氣成分溶液は基本的に浸透圧が低いいため PFC 法との相性が良く、天然香料素材生産への実用化が試みられている⁴⁴⁾。

PFC 法による果汁の濃縮は容易であり、いくつかの果汁でこれを試みた。このうち、スイカやメロンは耐熱性が低く、加熱臭発生のため、蒸発法が適用できず、また高粘度のため膜濃縮法も適用困難であった。しかしながら PFC 法を用いれば濃縮は容易であり、この方法を用いたこれまでにないスイカ・メロンなどの高品質濃縮新食品素材⁴⁵⁾の開発も可能となる。

PFC 法のさらなる高付加価値利用を目指して、PFC 濃縮果汁を発酵させて果実ワイン生産を試みることにした。本格的果汁ワインとしてアルコール濃度 10 vol% 以上を目的とする場合、まず、果汁糖度を 20°Brix 以上とすることが理論的に必要であるが、PFC によればこの基準は容易に達成できる。そこで、実際にこのような PFC 濃縮果汁を

発酵させた結果、リンゴ⁴⁶⁾、パイナップル⁴⁷⁾、ブルーベリー⁴⁸⁾濃縮果汁より、それぞれ、補糖不要でアルコール濃度 13.7, 12.7, 11.1 vol% の果実ワインができることがわかった。

PFC のユニークな応用の 1 つとして日本酒の濃縮を挙げることができる。一般に、アルコール飲料の濃縮には蒸発法が用いられ、ウイスキー、ブランデー、焼酎などが生産されているが、このような蒸留酒の場合、濃縮前後での成分プロファイルは完全に変化してしまう。しかしながら、PFC 法を用いた場合、アルコールや他の香氣性成分のみならず、糖分やアミノ酸類などの非揮発性成分もそのまま濃縮されるため、これまでとは全く異なる濃縮日本酒の製造が可能となる⁴⁹⁾。そこで、実際にこのことを試みた結果、アルコール度数は 27.1 vol% となり、また、濃縮液をアルコール濃度基準で濃縮還元して香氣成分を比較した結果、香氣成分プロファイルは、濃縮前後でほとんど変化しておらず、同様の結果は有機酸分布についても得られている。

以上の方法により、これまでには存在しなかった新しい濃縮日本酒の製造が可能となり、また、このような濃縮日本酒の官能試験結果も良好で、実際、PFC 濃縮日本酒が国内数社からすでに市販されている。さらに、この方式によるアルコール飲料の濃縮は日本酒以外にも広い有効性が期待される。

8. 凍結と生物

自然界において寒冷や凍結は普遍的な現象であるが、生物にとっては大きな脅威であり、従って、生物はそのために種々な対策を講じている。ある種の微生物や植物あるいは魚類は寒冷などの水ストレス条件にさらされると、体内に、ポリオール類（グリセロール、スクロースなど）やアミノ酸誘導体（グリシン、サルコシン、ベタインなど）などのオスモライト類を蓄積して、束一的性質に基づく浸透圧上昇をもたらすとともに、タンパク質などの高分子機能を保護するとされている⁵⁰⁾⁵¹⁾。

凍結に直接影響する生物由来物質として凍結調節物質があり、これには凍結促進物質と凍結抑制物質とがある。前者は氷核活性物質としての氷核タンパク質が *Pseudomonas syringe*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola*, *Xanthomonas campestris* などの微生物から発見されており⁵²⁾⁵³⁾、そのアミノ酸配列が解析されて、多数の繰り返し構造があること、また、氷核タンパク質は細胞外膜に局在化されていることが報告されている。このような微生物由来の氷核タンパク質は植物の凍霜害の大きな原因物質であるとされている。氷核タンパク質の生物学的意義の一つとして、後述する細胞外凍結誘導による細胞内凍結回避効果を挙げることができる。

一方、凍結抑制物質としては寒冷地の魚類をはじめ、植物、昆虫、微生物など、あらゆる生物から不凍タンパク質

や不凍糖タンパク質の存在が報告されている^{54)~57)}。この物質は水の過冷却によって凍結耐性を促進するとされているが、その機構ははるかに複雑であり、生物によって寒冷条件下で凍結そのものは不可避であるものの、氷結晶生成状態を制御して、結晶を微細化することによって体液の全面凍結を防止することが重要であるとされる。従って、‘不凍’タンパク質という呼称は必ずしも適当ではない可能性があり、いずれにしても物理現象としての凍結は不凍タンパク質の存在の有無にかかわらず進行するため、むしろ、凍結後の不凍タンパク質の挙動が重要であるものと思われる。

9. 細胞と凍結

生細胞の凍結保存においては、細胞内・外の水が別々に凍結するため、状況はより複雑となる。この場合、通常、Fig. 13 に示すように細胞外凍結が先行し、このことによって生ずる浸透圧による、凍結誘起浸透圧脱水によって細胞内水は強く脱水され、最終的に細胞内凍結は起こらないまま、細胞内液はガラス状態で維持されることが細胞生存のための必要条件である (Fig. 13 の左側のルート)。これに対して、浸透圧脱水が遅い場合、細胞内凍結が起こり、この場合には生体膜構造が破壊されるため⁵⁸⁾、細胞は致命的な傷害を受ける (Fig. 13 の右側のルート)。

このような現象においては、細胞膜の水透過係数 L_P および細胞の大きさ d_P を組み合わせたパラメーター L_P/d_P が細胞の浸透圧応答速度を決定する。そこで細胞に浸透圧ショックを与え、その後の脱水による細胞形状変化を誘電率測定することにより、 L_P および L_P/d_P が植物培養細胞 (イネ, *Oryza sativa*; ブドウ, *Vitis* sp.)、動物細胞 (CH27)⁵⁹⁾ および微生物 (酵母)⁶⁰⁾ について報告された (Table 4)。その結果、植物細胞においては L_P/d_P の値が、動物・微生物に比較して1桁以上低く、そのために植物細胞は凍結誘起浸透圧脱水への適応が遅く、細胞内凍結が起こりやすいこと、そしてこのことが原因となり凍結耐性が低いものと推察される。

細胞内凍結が起こることにより、細胞原形質膜は破壊され、細胞は死に至る。このことを直接測定する手段として複素インピーダンスを測定し、Cole-Cole 解析をする方法がある⁶⁶⁾。これを各種野菜などの農産物に適用した結果、新鮮時には明瞭に見られた Cole-Cole 円弧が、凍結・解凍に伴ってほぼ完全に消失し、原形質膜構造が完全に破壊されていること⁶⁷⁾ (Fig. 14)、そしてそれに伴い力学物性も劇的に変化し、この現象には細胞膨圧が大きく関与していることがわかった^{68)~71)}。凍結による植物細胞の原形質膜破壊については NMR による制限拡散現象の測定によっても明らかにされた⁷²⁾。そこで、植物細胞に対して、凍結前に浸透圧脱水処理をした後、凍結・解凍・復水操作を施すと、農産物の種類によっては、凍結・解凍に伴う力学物性変化を或る程度抑制できることが報告されている⁷³⁾。

Fig. 13 Extracellular and intracellular ice crystal formation in the freezing of cell

Table 4 Comparison of water permeation parameter through membrane (L_P/D) for various cells^{59) 60)}

Cell	Temperature. (°C)	L_P	D	L_P/D	Ref.
Yeast	25	0.0332	6	5.53	60
Rice (<i>Oryza sativa</i>)	25	0.0147	20.2	0.73	59
Grape (<i>Vitis</i> sp.)	25	0.020	34.2	0.58	59
Murine B-cell (CH27)	25	0.090	14	6.4	59
Hamster pancreatic islet	22	0.041	11.4	3.6	61
Human erythrocytes	25	0.94	7	134	62
Human granulocyte	25	0.189	<10	>19	63
Human spermatozoa	22	0.476	6.2	77	64
Ram spermatozoa	25	1.39	6.7	207	64
Holstein spermatozoa	22	0.461	6.8	6.78	65

L_P , water permeability (pm/s/Pa); D , cell diameter (μm); L_P/D , 10^{-9} (1/s/Pa)

Fig. 14 Impedance spectra (A) and Cole-Cole plot (B) for carrot tissue before and after freezing-thawing
From Miyawaki and Shimiya (2002)⁶⁷⁾ with permission.

10. ま と め

凍結の物理化学的意義は水分活性低下効果および浸透圧の大きな上昇にある。食品においては水分だけが凍結し、その氷結率は温度依存的に変化し、それに応じて未凍結部分は凍結濃縮される。この凍結濃縮により、ある種の化学反応が大きく加速されることがあり、その機構が明らかとなった。さらに、凍結食品の有効熱伝導度、温度伝導度やマイクロ波加熱特性が、氷結率によって大きく変化することが示された。

凍結食品における氷結晶構造は、雪のような大気中からの結晶成長とは異なり、物質移動速度と熱移動速度に大きな差がある。そのために、伝熱によって強制的に氷結晶成長が決定されるため、凍結界面進行速度が重要なパラメーターとなって氷結晶構造が決定される。

界面前進凍結濃縮法は伝熱面からの巨大氷結晶を成長させることによって凍結濃縮する方法であり、従来法の微細氷結晶を多数生成させる懸濁結晶法と比較して、システムの単純化と操作性における高いフレキシビリティに特長があり、新しい高品質濃縮法として、凍結濃縮法の適用範囲を大きく拡大することが期待される。

生物にとって寒冷や凍結は大きな脅威であるため、その対策として、オスモライトの蓄積、氷核タンパク質の生成、不凍タンパク質などの蓄積により、それらのストレスに対

抗する。一方、細胞の凍結においては、細胞内凍結は致命的であるため、細胞外凍結による凍結誘起浸透圧脱水により細胞内凍結を回避することが生存のための必須条件となる。これには細胞膜の水透過係数が重要であり、この値が高い微生物や動物細胞は凍結耐性が高いが、この値の小さい植物細胞は凍結耐性が低く、実際、野菜や果物は凍結保存に適していないため、食品としての工夫が必要である。

文 献

- 1) Troller, J.A. and Christian, J.H.B. (1978). "Water activity and food." Academic Press, New York.
- 2) Hildebrand, J.H. and Scott, R.L. (1962). "Regular solutions", Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., p. 20.
- 3) Miyawaki, O., Saito, A., Matsuo, T., and Nakamura, K. (1997). Activity and activity coefficient of water in aqueous solutions and their relationship with solution structure parameters. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 466-469.
- 4) Gu, X., Suzuki, T., and Miyawaki, O. (2005). Limiting partition coefficient in progressive freeze-concentration. *J. Food Sci.*, **70**, E546-551.
- 5) Miyawaki, O. (2018). Water and freezing in food. *Food Sci. Technol. Res.*, **24**, 1-21.
- 6) Pham, Q.T. (1987). Calculation of bound water in frozen food. *J. Food Sci.*, **52**, 210-212.
- 7) Cogne, C., Andreu, J., Laurent, P., Besson, A., and Nocquet, J. (2003). Experimental data and modeling of thermal properties of ice cream. *J. Food Eng.*, **58**, 331-341.
- 8) Pongsawatmanit, R. and Miyawaki, O. (1993b). Measurement of temperature-dependent ice fraction in frozen foods. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1650-1654.
- 9) Pradipasena, P., Tattiakul, J., Nakamura, K., and Miyawaki, O. (2007). Temperature dependence of fraction of frozen water in solutions of glucose and its oligomers, dextrans, and potato starch. *Food Sci. Tech. Res.*, **13**, 286-290.
- 10) Miyawaki, O. and Nishino, H. (2016). Kinetic analysis of freeze denaturation of soyprotein by a generalized theoretical model for freeze-acceleration reaction. *J. Food Eng.*, **190**, 109-115.
- 11) Fennema, O. (1974). Reaction kinetics in partially frozen aqueous systems, In "Water relations of foods," ed. by Duckworth, R.B., Academic Press, London, pp. 539-556.
- 12) Yamasaki, N., Tsujita, T., Sakiyama, F., and Matsuda, N. (1976). Preferential acid-catalyzed hydrolysis of the formamide linkage of *N*-formylkynurenine in frozen solution. *J. Biochem.*, **80**, 1287-1292.
- 13) Shija, R., Sunderland, V.B., and McDonald, C. (1992). Alkaline hydrolysis of methyl, ethyl and *n*-propyl 4-hydroxybenzoate esters in the liquid and frozen states. *Intern. J. Pharm.*, **80**, 203-211.
- 14) Takenaka, N., Ueda, A., and Maeda, Y. (1992). Acceleration of the rate of nitrite oxidation by freezing in aqueous solution. *Nature*, **358**, 736-738.
- 15) Hashizume, K., Kakiuchi, K., Koyama, E., and Watanabe, T. (1971). Denaturation of soybean protein by freezing. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 449-459.
- 16) Miyawaki, O. and Pongsawatmanit, R. (1994). Mathematical analysis of the effective thermal conductivity of food materials in the frozen state. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1222-1225.
- 17) Kawaura, K., Kimura, S., Komichi, Y., Watanabe, M.,

- Miyawaki, O., Lee, Y., and Suzuki, T. (2020). Effect of unfreezable water in food on microwave thawing. *J. Japan Assoc. Food Preserv. Sci. (Nippon Shokuhin Hozokagaku Kaishi)*, **46**, 51–55 (川浦宏太, 木村 慎, 小迫勇志, 渡辺学, 宮脇長人, 李 潤珠, 鈴木 徹. 食品中の不凍水がマイクロ波解凍に及ぼす影響について, 日本食品保蔵科学会誌).
- 18) Fletcher, N. H. (1970). “The chemical physics of ice.” Cambridge University Press, Cambridge.
- 19) Nakaya, U. (1954). “Snow crystals: Natural and artificial.” Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.
- 20) Hallett, J. and Mason, B. J. (1958). The influence of temperature and supersaturation on the habit of ice crystals grown from the vapour. *Proc. Roy. Soc. London*, **A247**, 440–453.
- 21) Miyawaki, O., Abe, T., and Yano, T. (1992). Freezing and ice structure formed in protein gels. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 953–957.
- 22) Chevalier, D., Le Bail, A., and Ghoul, M. (2000). Freezing and ice crystals formed in a cylindrical food model: Part 1. Freezing at atmospheric pressure. *J. Food Eng.*, **46**, 277–285.
- 23) Bevilacqua, A., Zaritzky, N. E., and Calveo, A. (1979). Histological measurement of ice in frozen beef. *J. Food Technol.*, **14**, 237–251.
- 24) Reid, D. S. (1980). Cryomicroscope studies of the freezing process in tissue and model systems. *Intern. J. Refrig.*, **3**, 226–228.
- 25) Bomben, J. L. and King, C. J. (1982). Heat and mass transport in the freezing of apple tissue. *J. Food Technol.*, **17**, 615–632.
- 26) Woinet, B., Andrieu, J., Laurent, M., and Min, S. G. (1998). Experimental and theoretical study of model food freezing. Part 2. Characterization and modeling of ice crystal size. *J. Food Eng.*, **35**, 395–407.
- 27) Kobayashi, R., Kimizuka, N., Watanabe, M., and Suzuki, T. (2015). The effect of supercooling on ice structure in tuna meat observed by using X-ray computed tomography. *Intern. J. Refrig.*, **60**, 270–277.
- 28) Fuchigami, M., Teramoto, A., and Ogawa, N. (1998). Structural and textural quality of kinu-tofu frozen-then-thawed at high pressure. *J. Food Sci.*, **63**, 1054–1057.
- 29) Watanabe, A., Miyawaki, O., Watanabe, M., and Suzuki, T. (2013). Mechanism of solute incorporation into ice phase in progressive freeze-concentration. *J. Japan Soc. Food Eng. (Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi)*, **14**, 163–168 (渡邊敦史, 宮脇長人, 渡辺学, 鈴木 徹. 界面前進凍結濃縮法における氷相の溶質取り込み機構について, 日本食品工学会誌).
- 30) Deshpande, S. S., Bolin, H. R., and Salunkhe, D. K. (1982). Freeze concentration of fruit juices. *Food Technol.*, **36**, 68–82.
- 31) Huige, N. J. J. and Thijssen, H. A. C. (1972). Production of large crystals by continuous ripening in a stirrer tank. *J. Cryst. Growth*, **13/14**, 483–487.
- 32) Johnson, W. E. (1993). The story of freeze desalting. *Desalin. Water Reuse*, **3**, 20–27.
- 33) Flesland, O. (1995). Freeze concentration by layer crystallization. *Dry. Technol.*, **13**, 1713–1739.
- 34) Hernandez, E., Raventos, M., Auleda, J. M., and Ibarz, A. (2010). Freeze concentration of must in a pilot plant falling film cryoconcentrator. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **11**, 130–136.
- 35) Miyawaki, O., Liu, L., Shirai, Y., Sakashita, S., and Kagitani, K. (2005). Tubular ice system for scale-up of progressive freeze-concentration. *J. Food Eng.*, **69**, 107–113.
- 36) Liu, L., Miyawaki, O., and Nakamura, K. (1997). Progressive freeze-concentration of model liquid food. *Food Sci. Technol. Intern. Tokyo*, **3**, 348–352.
- 37) Liu, L., Fujii, T., Hayakawa, K., and Miyawaki, O. (1998). Prevention of initial supercooling in progressive freeze-concentration. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 2467–2469.
- 38) Miyawaki, O., Liu, L., and Nakamura, K. (1998). Effective partition constant of solute between solid and liquid phases in progressive freeze-concentration. *J. Food Sci.*, **63**, 756–758.
- 39) Miyawaki, O., Liu, L., Shirai, Y., Sakashita, S., and Kagitani, K. (2005). Tubular ice system for scale-up of progressive freeze-concentration. *J. Food Eng.*, **69**, 107–113.
- 40) Miyawaki, O., Kato, S., and Watabe, K. (2012). Yield improvement in progressive freeze-concentration by partial melting of ice. *J. Food Eng.*, **108**, 377–382.
- 41) Gunathilake, M., Dozen, M., Shimmura, K., and Miyawaki, O. (2014). An apparatus for partial ice-melting to improve yield in progressive freeze-concentration. *J. Food Eng.*, **142**, 64–69.
- 42) Miyawaki, O., Omote, C., Gunathilake, M., Ishisaki, K., Miwa, S., Tagami, A., and Kitano, S. (2016). Integrated system of progressive freeze-concentration combined with partial ice melting for yield improvement. *J. Food Eng.*, **184**, 38–43.
- 43) Gunathilake, M., Shimmura, K., Dozen, M., and Miyawaki, O. (2014). Flavor retention in progressive freeze-concentration for concentration of coffee extract and pear (La France) juice flavor concentrate. *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 547–554.
- 44) Ito, Y. (2017). Application of progressive freeze-concentration to aromatic industry. *Koryo*, **273**, 87–92 (伊藤嘉浩. 界面前進凍結濃縮法の香料産業への応用, 香料).
- 45) Miyawaki, O., Shimmura, K., and Inakuma, T. (2018). Progressive freeze-concentration of water melon and melon. *Kaju-Kyokai-Ho*, **714**, 1–10 (宮脇長人, 新村希世美, 稲熊隆博. スイカ類果汁の界面前進凍結濃縮について, 果汁協会報).
- 46) Miyawaki, O., Gunathilake, M., Omote, C., Koyanagi, T., Sasaki, T., Take, H., Matsuda, A., Ishisaki, K., Miwa, S., and Kitano, S. (2016a). Progressive freeze-concentration of apple juice and its application to produce a new type apple wine. *J. Food Eng.*, **171**, 153–158.
- 47) Miyawaki, O., Omote, C., Koyanagi, T., Sasaki, T., Take, H., Matsuda, A., Tadokoro, K., Miwa, S., and Kitano, S. (2017). Progressive freeze-concentration of pineapple juice and its application to wine production. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **64**, 256–262 (宮脇長人, 表 千晶, 小柳 喬, 笹木哲也, 武 春美, 松田 章, 田所佳奈, 三輪章志, 北野 滋. パイナップル果汁の界面前進凍結濃縮とそのワイン製造への応用, 日本食品科学工学会誌).
- 48) Miyawaki, O., Omote, C., Koyanagi, T., Sasaki, T., Take, H., Matsuda, A., Tadokoro, K., Miwa, S., and Kitano, S. (2017). Progressive freeze-concentration of blueberry juice and its application to produce blueberry wine. *Japan Journal of Food Engineering (Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi)*, **18**, 45–51 (宮脇長人, 表 千晶, 小柳 喬, 笹木哲也, 武 春美, 松田 章, 田所佳奈, 三輪章志, 北野 滋. ブルーベリー果汁の界面前進凍結濃縮とそれを用いたブルーベリーワイン製造, 日本食品工学会誌).
- 49) Miyawaki, O., Omote, C., Koyanagi, T., Sasaki, T., Take, H., Matsuda, A., Tadokoro, K., and Kitano, S. (2017a). Progressive freeze-concentration of Japanese sake. *J. Jap. Soc. Food*

- Sci. Technol. (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **64**, 98–101 (宮脇長人, 表 千晶, 小柳 喬, 笹木哲也, 武春美, 松田 章, 田所佳奈, 北野 滋. 日本酒の界面前進凍結濃縮, 日本食品科学工学会誌).
- 50) Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., and Somero, G.N. (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science*, **217**, 1214–1222.
- 51) Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Experiment. Biology*, **208**, 2819–2830.
- 52) Arny, D.C., Lindow, S.E., and Upper, C.D. (1976). Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature*, **262**, 22–284.
- 53) Wolber, P. and Warren, G. (1989). Bacterial ice-nucleation proteins. *TIBS* **14**, May, 179–182.
- 54) Feeney, R.E. and Yea, Y. (1978). Antifreeze proteins from fish bloods. *Adv. Protein Chem.*, **32**, 191–282.
- 55) Knight, C.A., Cheng, C.C., and DeVries, A.L. (1991). Adsorption of α -herical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes. *Biophys. J.*, **59**, 409–418.
- 56) Nishiyama, Y., Sato, R., Takamichi, M., Miura, A., and Tsuda, S. (2005). Co-operative effect of the isoforms of type III antifreeze protein expressed in Notched-fin eelpout. *Zoarces elongatus* Kner. *FEBS Lett.*, **272**, 482–492.
- 57) Gupta, R. and Deswal, R. (2014). Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions. *J. Biosci.*, **39**, 931–944.
- 58) Ishikawa, E., Bae, S.-K., Miyawaki, O., Nakamura, K., Shiinoki, Y., and Ito, K. (1997). Freezing injury of cultured rice cell analyzed by dielectric measurement. *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 222–226.
- 59) Ishikawa, E., Miyawaki, O., and Nakamura, K. (1997). Water permeability of plasma membranes of cultured rice, grape, and CH27 cells measured dielectrically. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1826–1830.
- 60) Hanazawa, T., Ishikawa, E., and Miyawaki, O. (1988). Water permeability of plasma membrane of various cells measured by dielectric method. *Cryobiol. Cryotechnol. (Teion Seibutu Kogaku Kaishi)*, **44**, 38–40 (花沢智仁, 石川英撰, 宮脇長人. 誘電率法による細胞原形質膜水透過係数の測定, 低温生物工学会誌).
- 61) Liu, C., Benson, C.T., Gao, D., Haag, B.W., McGann, L.E., and Crister, J.K. (1995). Water permeability and its activation energy for individual hamster pancreatic cells. *Cryobiology*, **32**, 493–502.
- 62) Sidel, V.W. and Solomon, A.K. (1957). Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *J. Gen. Physiol.*, **41**, 243–257.
- 63) Diller, K.R. and Bradley, D.A. (1984). Measurement of the water permeability of single human granulocytes on a microscopic stopped-flow mixing system. *Trans. ASME*, **106**, 384–393.
- 64) Curry, M.R., Millar, J.D., and Watson, P.F. (1994). Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biol. Reproduct.*, **51**, 1014–1021.
- 65) Chaveiro, A., Liu, J., Engel, B., Crister, J.K., and Woelders, H. (2006). Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and glycerol: Possible implications for semen freezing protocols for individual males. *Cryobiology*, **53**, 349–359.
- 66) Cole, K.S. (1932). Electric phase angle of cell membranes. *J. Gen. Physiol.*, **15**, 641–649.
- 67) Miyawaki, O. and Shimiya, Y. (2002). Freezing-thawing dehydration of food waste. *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **28**, 618–620 (宮脇長人, 四宮陽子. 食品廃棄物の凍結・解凍・脱水処理, 化学工学論文集).
- 68) Ohnishi, S., Fujii, T., and Miyawaki, O. (2002). Electrical and rheological analysis of freezing injury of agricultural products. *Intern. J. Food Propert.*, **5**, 317–332.
- 69) Dejmeek, P. and Miyawaki, O. (2002). Relationship between the electrical and rheological properties of potato tissue after various forms of processing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1218–1223.
- 70) Ohnishi, S., Fujii, T., and Miyawaki, O. (2003). Freezing injury and rheological properties of agricultural products. *Food Sci. Tech. Res.*, **9**, 367–371.
- 71) Ohnishi, S., Shimiya, Y., Kumagai, H., and Miyawaki, O. (2004). Effect of freezing on electrical and rheological properties of food materials. *Food Sci. Technol. Res.*, **10**, 453–459.
- 72) Ando, H., Fukuoka, M., Miyawaki, O., Watanabe, M., and Suzuki, T. (2009). PFG-NMR study for evaluation of freezing damage in onion tissue. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1257–1261.
- 73) Ohnishi, S. and Miyawaki, O. (2005). Osmotic dehydro-freezing for protection of rheological properties of agricultural products from freezing injury. *Food Sci. Technol. Res.*, **11**, 52–58.

(令和2年12月10日受理)