

希薄溶液系材料内氷結晶の3次元計測法に 関する研究

東京大学

上野茂昭・都甲洙・相良泰行

東京大学

工藤謙一・樋口俊郎

日本冷凍空調学会論文集 Vol.19 No.4 別刷

社団法人 日本冷凍空調学会

希薄溶液系材料内氷結晶の3次元計測法に関する研究

Three-Dimensional Measurement of Ice Crystals in Frozen Dilute Solutions

上野茂昭* 都甲洙* 相良泰行*
 Shigeaki UENO Gab-Soo DO Yasuyuki SAGARA

工藤謙一** 樋口俊郎**
 Ken-ichi KUDOH Toshiro HIGUCHI

* 東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻 (113-8657 東京都文京区弥生1-1-1)

Department of Global Agricultural Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo (1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657)

** 東京大学大学院工学系研究科精密機械専攻 (113-8658 東京都文京区本郷7-3-1)

Department of Precision Machinery Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo (7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8658)

Summary

A Micro-Slicer Image Processing System (MSIPS) has been applied to observe the ice crystal structure formed in frozen dilute solutions three-dimensionally. Several parameters were also proposed to investigate three-dimensional (3-D) morphology and distribution of ice crystals quantitatively, based on reconstructed images obtained by multi-slicing of a frozen sample with the thickness of $5\mu\text{m}$.

The equivalent diameter of ice crystals were in the range of $85\mu\text{m}$ up to $169\mu\text{m}$, and then decreased exponentially in increasing freezing rate at the freezing temperature of -20°C to -80°C .

The 3-D morphology of ice crystal was found to be a bundle of continuous columns at any freezing temperature under the usual freezing conditions except supercooling.

Key words : Freezing, Ice crystal, 3-Dimensional, Morphology, Micro-slicer, Image processing

1. 緒言

食品加工プロセスにおける凍結操作は、凍結濃縮法、凍結乾燥法、凍結破砕法および凍結テクスチャーリゼーション法など多岐に渡り、また様々な食品に対して応用されている。

食品は水を多く含むため、食品の凍結は基本的には水の液相から固相への相変化現象である。そのため、凍結により食品内部に形成される氷結晶性状の動態は食品加工操作や、最終製品の

品質を設計する上で重要な情報となる。特に溶液系材料の凍結濃縮や凍結乾燥プロセスの最適操作条件を決定するためには、まず凍結プロセスを氷結晶性状という観点から把握することが不可欠となる。例えば凍結乾燥操作では、前処理凍結プロセスにおいて材料内に形成される氷結晶構造は、その後の凍結乾燥プロセスにおける既乾燥層の多孔質構造と熱伝導率や水蒸気透過係数および乾燥速度に影響を及ぼし、また最終製品の多孔質構造すなわち品質を決定する¹⁾。

さらに、氷結晶形成性状とりわけ 3 次元構造が製品の食感など品質に大きく関与するものと考えられる。しかしながら、氷結晶性状を 3 次元かつ定量的に計測することが困難であったため、食品の内部構造計測に基づく凍結プロセスの最適化は不可能であるとされてきた。

氷結晶観察法は観察時の氷結晶の状態により、直接観察法と間接観察法とに大別される。直接観察法には、低温走査型電子顕微鏡 (Cryo-SEM)、冷凍顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡などがあり、いずれの手法でも低温条件下で直接試料を観察する²⁾。間接観察法には凍結置換法³⁾、凍結固定法⁴⁾および凍結乾燥法⁵⁾がある。これらの間接観察法は、置換および昇華プロセス後において元の氷結晶構造が維持されるという仮定に基づいている。この仮定の妥当性の検証は困難であり、また昇華プロセス前後において、試料内にミクロン単位の構造変化が生じているものと考えられる⁶⁾。氷結晶サイズおよび存在位置などの 2 次元情報はこれらの従来法により得られるものの、氷結晶構造すなわち 3 次元構造の定量的な把握は困難である。

Faydi ら⁶⁾ は、氷結晶観察に特化した反射投影照射器付きの光学顕微鏡を開発し、冷室温度 -20°C の条件下で直接的に氷結晶を観察した。また同時に、従来の間接観察法である凍結乾燥法による氷結晶観察結果との比較から、直接法と間接法で観察した氷結晶の形状に相違が認められることを示した。このことは従来の凍結乾燥法による氷結晶観察法の限界を示唆しており、また試料前処理時に構造変化が生じていることを示している。

本研究の目的は、希薄溶液系材料内の氷結晶性状を観察する方法を確立し、氷結晶形成のメカニズムを探るのに有用と考えられる、凍結条件と氷結晶性状に関する基礎的な情報を得ることにある。

主な記号

| | |
|-----|-----------------------------------|
| Tcp | 冷却銅板温度 (凍結温度), $^{\circ}\text{C}$ |
| Tf | 凍結時間, min |
| R | 凍結速度, $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ |
| d | 円相当直径, μm |

| | |
|----|---|
| ML | 長径, μm |
| MW | 短径, μm |
| q | 熱流束, $\text{J}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ |

2. 実験装置および方法

2.1 凍結装置

試料の凍結は凍結温度条件によって、プログラムフリーザ (-10°C ~ -150°C) または、試作した液体窒素凍結装置 (-190°C) の 2 種類の凍結装置を使用した。

2.1.1 プログラムフリーザ

図 1 に試料凍結に使用したプログラムフリーザ (日本フリーザ製 TNP87S 型) の概略図を示す。プログラムフリーザはフリーザ、プログラムコントローラ、液体窒素ポンプおよび温度記録計により構成される。また、このフリーザ上表面に冷却銅板を設け、その表面温度は液体窒素の流量と電熱ヒータを制御することにより、室温から -150°C の範囲で温度変動幅 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で一定値に制御可能である。

2.1.2 液体窒素凍結装置

図 2 に試作した液体窒素凍結装置の概略図を示す。液体窒素凍結装置は、断熱容器内に設置した試料凍結用冷却銅板の底面が、常に液体窒素液面と接触を保つように、液体窒素を補充することにより、冷却銅板表面温度を -190°C に維持した。

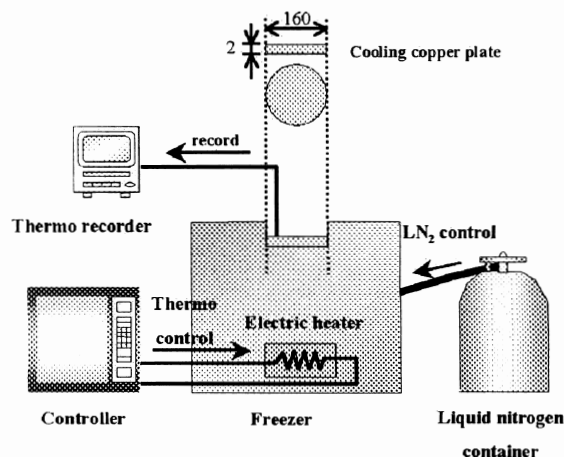
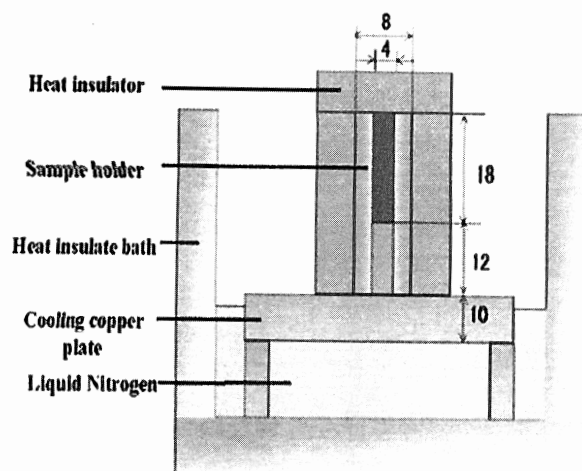


Fig. 1 Program Freezer

Fig. 2 LN₂ Freezer

2.2 マイクロスライサ画像処理システム⁷⁾

図3にマイクロスライサ画像処理システムのブロック図を示す。マイクロスライサ画像処理システムは、3次元内部構造顕微鏡を指し、切削断面作成装置、断面画像取り込み装置および断面画像記録装置で構成される。具体的には、対象とする凍結試料を連続的に切削、すなわちマルチスライシングし、その断面画像作成装置、露出した2次元断面像をCCDカラーカメラで取り込む断面画像取込装置、取り込んだ原画像をレーザーディスク(LD)に収録する画像記録装置、記録した原画像の情報に基づきボリュームレンダリング法により3次元画像を再構築し、実際には切断していない任意の試料断面画像を再構成して表示するなど、画像情報処理を行うワークステーションとしての機能を有する3次元画像構築装置(クボタグラフィックス, AVS)からなる。従来の試料内部観察方法では、試料切片などの扱いに技術的に困難な点がみられるが、本システムを用いることにより、試料作成に熟練を要さず、高速かつ平易に試料を観察することが可能である。また、包埋材で冷却固定化する方法により、試料の変形・位置ずれを防ぐことができる。さらに、得られた画像情報はレーザーディスクに保存されるので、データの劣化が起こらず、いつでも試料を作成した当時の画像情報を利用して、立体像を再現することができる。

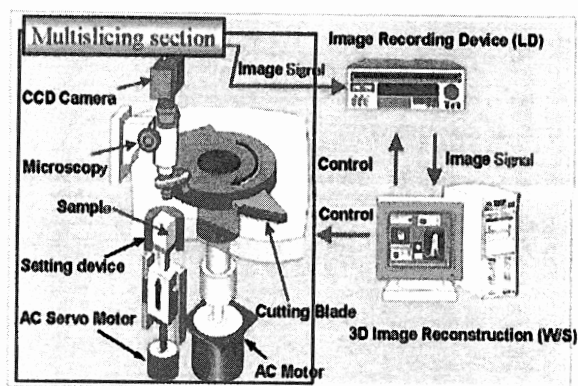


Fig. 3 Micro-slicer image processing system

2.3 供試材料

本研究では、蒸留水に蛍光試薬である RhodamineB ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, 励起波長 510nm ~ 550nm, 蛍光波長 590nm) 0.1wt%および寒天 1wt% を添加して希薄溶液とし、これを供試材料とした。

2.4 サンプルホルダ

プログラムフリーザおよび液体窒素凍結装置における試料凍結時に、熱電対(OMEGA, Hypodermic Needle Probes, 素線直径 0.3mm)およびモバイルコーダ(横河電機製, MV100)により試料内の温度履歴を経時的に計測した。

図4にサンプルホルダおよび温度計測箇所の概略図を示す。内径4mmおよび高さ30mmのパラフィン製円筒形サンプルホルダの下部に熱流束測定用の銅柱(12mm)を挿入し、その上部に試料を注入した。さらに、試料を一次的に凍結するためにサンプルホルダの周囲をスタイロフォーム断熱材で断熱した。温度履歴は冷却銅板、銅柱側面および試料内温度分布の経時変化を5mm間隔に配置した熱電対により測定した。また、冷却銅板の表面温度を凍結温度とした。凍結時間および凍結速度は、凍結曲線が水の最大氷結晶生成帯(0℃~-5℃)を通過するのに要する時間および速度をそれぞれ示す。

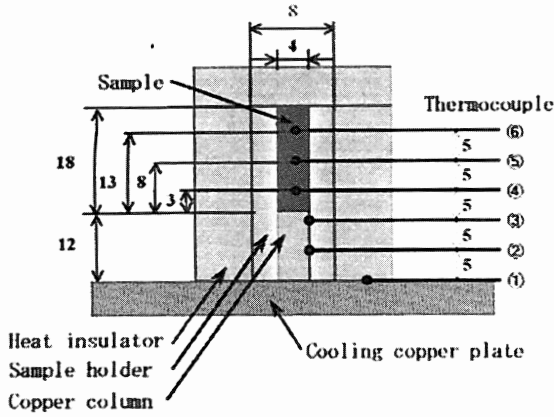


Fig. 4 Sample fixed in sample holder and temperature measuring locations

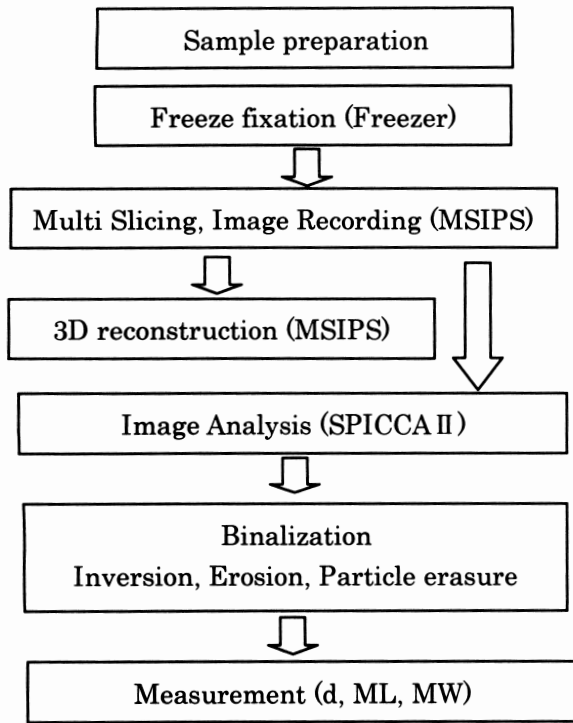


Fig. 5 Flow diagram of measuring procedure

2.5 手順

凍結終了後の試料は、すばやくマイクロスライサ部にセットされ、切削厚さ 5 μm および切削回転数 60rpm で連続的に切削し、露出断面を蛍光顕微鏡および CCD カメラを介して撮像し、LD に収録した。そして LD に収録された 2 次元画像を用いて 3 次元像構築をした。またマイクロスライサ画像処理システムによる画像記録後、画像解析ソフト(日本アビオニクス SPICCA II TVIP-5100)を用い、図 5 の手順により氷結晶の

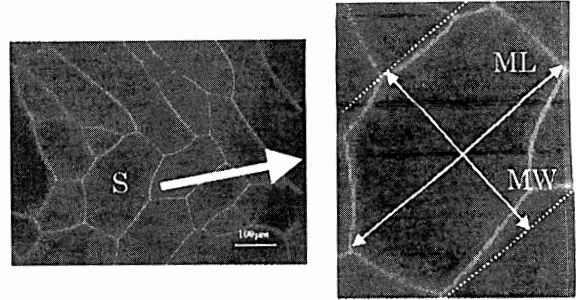


Fig. 6 Measurement of characteristics

特徴量の計測を行った。すなわち、①レーザディスクからの画像取り込み、②色彩抽出法による 2 値化、③ 2 値化画像処理 (色相反転、4 連結性収縮による輪郭修正、微小粒子除去) および④円相当直径、長径および短径の特徴量計測を行った。特徴量測定は、氷結晶 1 個の面積(S)に相当する円の直径を円相当直径(d)とし、各氷結晶周囲上において最大長のを長径(ML)、また計測対象となる氷結晶を、長径に平行な 2 直線間で挟んだ際の最短距離を短径(MW)とした(図 6)。

3. 実験結果および考察

3.1 凍結曲線

図 7 に凍結温度 -120℃における凍結曲線を示す。図中の数字は図 4 における温度測定点すなわち冷却銅板表面、銅柱側面および試料内温度測定箇所をそれぞれ示す。凍結曲線および熱流束が平衡状態に達してから凍結を終了とした。また熱流束は、2 箇所の銅柱側面温度履歴(温度測定点②および③) および銅の熱伝導率から算出した。凍結温度 $T_{cp} = -120℃$ における、冷却面から 8 mm の部位の凍結時間 t_f は 22.8×10^{-3} h であり、凍結速度 R は 219.5℃/h であった。

3.2 氷結晶断面形状

図 8 と図 9 に、到達温度 -24.5℃(凍結温度 -30℃) および到達温度 -152.1℃ (凍結温度 -190℃)、冷却面から 8 mm の部位の氷結晶断面画像 (700×530 μm) をそれぞれ示す。これらの図に示すように、凍結濃縮された RhodamineB の蛍光部位が赤く、また氷結晶部位が黒く明瞭に識別され、マイクロスライサ画像処理システムに

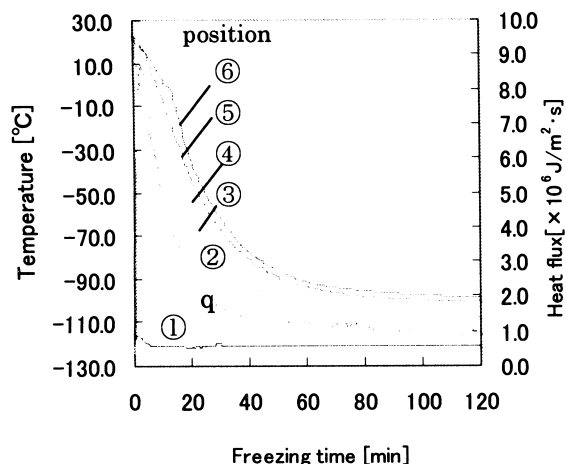


Fig.7 Freezing curves at $T_{cp} = -120^{\circ}\text{C}$

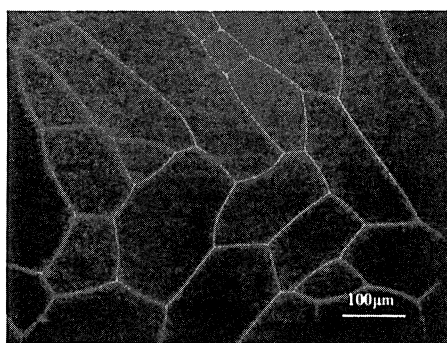


Fig. 8 Cross-section of Ice crystals at $T_{cp} = -30^{\circ}\text{C}$

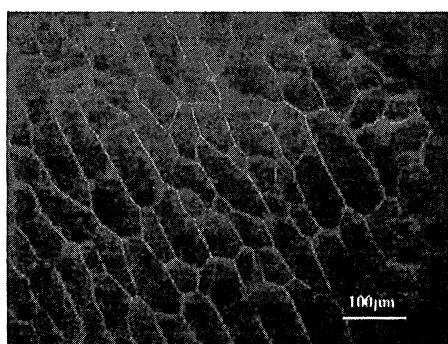


Fig. 9 Cross-section of Ice crystals at $T_{cp} = -190^{\circ}\text{C}$

より溶液系材料内の氷結晶構造を観察可能であることが分かった。凍結濃縮された RhodamineB は、ゲル網目構造に拘束されたために、氷結晶が鮮明に識別されたものと考えられる。

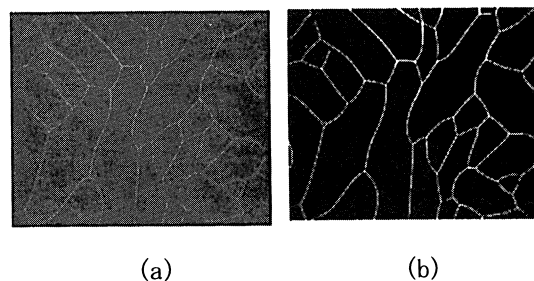


Fig.10 Image analysis

(a) initial image (b) binary image

図 10 に解析前後の氷結晶断面画像($700 \times 530 \mu\text{m}$)を示す。原画像(a)を色相反転、輪郭修正、微小粒子除去したものが2値化画像(b)である。この2値化画像を用いて、円相当直径、長径および短径の計測を行った。

3.3 氷結晶性状の統計的分析

氷結晶の円相当直径は、すべての凍結条件においてばらつきがあった。図 11 に氷結晶円相当直径と累積分布を示す。この曲線は凍結温度 -40°C における冷却面から 3 mm, 8 mm および 13mm における累積分布をそれぞれ示した。凍結温度 -40°C においては、凍結速度が大きい試料下部における氷結晶円相当直径の累積分布は左へシフトし、氷結晶円相当直径は小さくなった。この傾向は、 -20°C から -80°C の凍結条件の範囲で顕著であることが観察された。

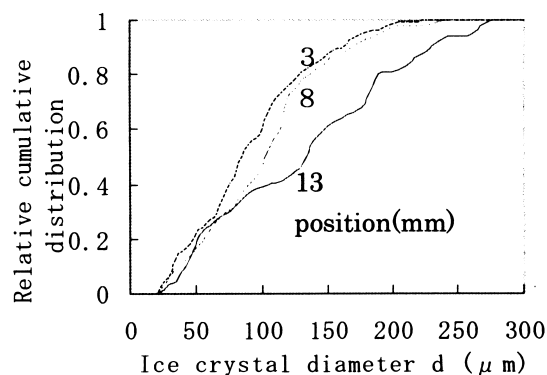


Fig.11 Relative cumulative distribution of ice crystal diameter at $T_{cp} = -40^{\circ}\text{C}$

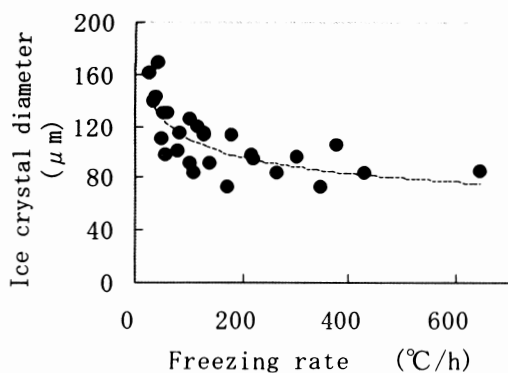


Fig. 12 Ice crystal diameter according to the freezing rate. Experimental data: (●) and fit model (-)

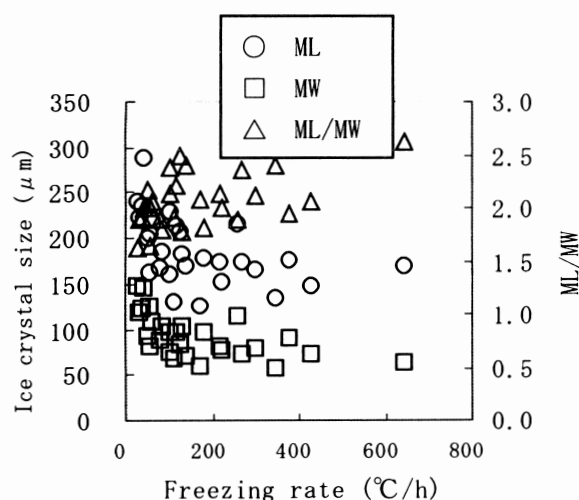


Fig. 13 Ice crystal morphology (ML/MW) according to the freezing rate

3.4 凍結速度と円相当直径

図 12 に凍結速度と氷結晶円相当直径の関係を示す。氷結晶のサイズは凍結速度が小さいほど大きく、凍結速度が大きいほど小さいことが定量的に明らかになった。しかしながら、凍結速度を無限に大きくとれば氷結晶サイズが無限に小さくなるのではなく、氷結晶サイズは凍結速度に依存して指数関数的に減少する傾向を示した。

3.5 凍結速度と氷結晶形状

マイクロスライサ画像処理システムにより得られた断面画像における氷結晶の形状を示す指

標として、長径 / 短径比を採用した。長径 / 短径比が 1 であれば氷結晶は円もしくは正方形を示し、長径 / 短径比が 1 から離れるほど、氷結晶は楕円もしくは長形状を示す。図 13 に凍結速度と氷結晶形状の関係を示す。各凍結条件における長径 / 短径の値は 2.0 ± 0.5 の範囲にあることから、氷結晶断面形状の凍結速度依存性は低いことが定量的に明らかになった。

3.6 氷結晶性状の 3 次元像

図 14 と図 15 に到達温度 -101.5°C (凍結温度 -120°C)、冷却面から 8 mm の部位の氷結晶再構築像および、その再構築像を実際には切削していない任意断面で切削した 3 次元像をそれぞれ示す。図 14 および図 15 のスケールは、 $678 \mu\text{m} \times 473 \mu\text{m} \times 1000 \mu\text{m}$ および $530 \mu\text{m} \times 700 \mu\text{m} \times 1000 \mu\text{m}$ である。

マイクロスライサ画像処理システムにより、溶液系材料内に形成される氷結晶を 3 次元的に観察し、またその 3 次元再構築像の任意断面を切削し観察することが可能となった。

図 16 に過冷却の生じた凍結温度 -10°C における氷結晶 ($530 \mu\text{m} \times 700 \mu\text{m} \times 1000 \mu\text{m}$) の 3 次元性状を示した。過冷却の生じていない凍結条件下 (図 14) において氷結晶は連続的な氷柱を形成するのに対し、過冷却発生時 (図 16) の氷結晶 3 次元性状は塊状であった。

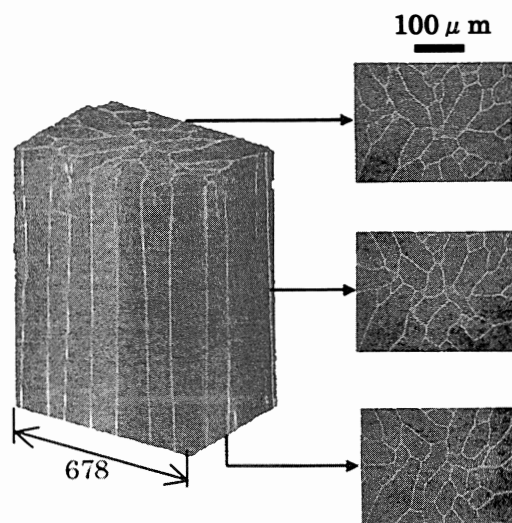


Fig. 14 3-D image of ice crystal at $T_{co} = -120^{\circ}\text{C}$

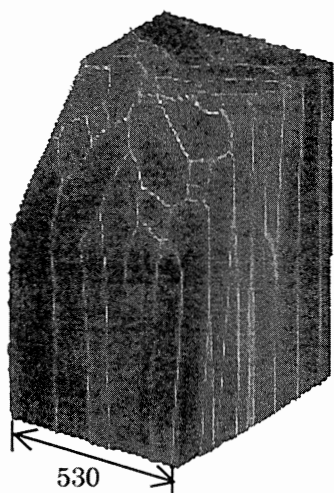


Fig. 15 Arbitrary cross-section of 3-D ice crystal at $T_{cp} = -120^{\circ}\text{C}$

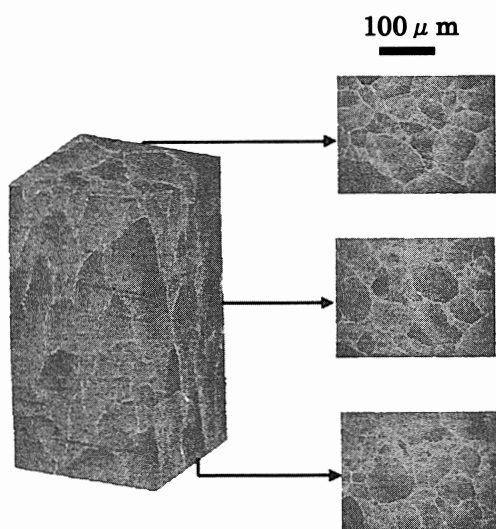


Fig. 16 3-D image of ice crystal at $T_{cp} = -10^{\circ}\text{C}$

過冷却の生じている凍結条件における溶液系材料の断面画像は、蛍光試薬と氷結晶の境界があまり鮮明ではなかった。このことから、溶液系材料の凍結においては過冷却が生じると、氷結晶内もしくはゲルの網目状構造内に蛍光試薬が取り込まれることにより、蛍光試薬と氷結晶の境界が不鮮明になるものと推察された。

過冷却の生じていない条件下における氷結晶 3次元性状は、熱流束方向に平行な連続的冰柱であることが分かった。

4. 摘要

生体・食品の3次元構造を計測するために開発された「マイクロスライサ画像処理システム」を利用し、溶液系材料内の氷結晶3次元構造観察に適用する方法を開発し、さらに画像処理法により氷結晶断面の形状を計測して、氷結晶性状の凍結速度依存性に関する基礎的知見を得ることを目的とした。以下に本研究により得られた成果を要約する。

- 1) マイクロスライサ画像処理システムにより、溶液系材料内に形成される氷結晶を3次元的に観察し、さらに画像処理により氷結晶断面像の円相当直径、長短径および長短径比などの定量的パラメータを計測する方法を開発した。
- 2) 氷結晶断面像の円相当直径は、凍結温度 -20°C ～ -80°C の範囲において指数関数的に減少し、顕著な凍結速度依存性を示した。さらに、氷結晶断面形状、特に長短径比の凍結速度依存性は低いことが定量的に明らかになった。
- 3) 氷結晶3次元性状は、過冷却の生じていない条件下において氷結晶は柱状に形成されることが分かった。

参考文献

- 1) Sagara, Y. : Food Sci. Tech. Res., 7 (3), 183 (2001)
- 2) Chevalier, D., Le, A. and Ghoul, M. : J. Food Eng., 46, 279(2000)
- 3) Bevilacqua, A., Zertizky, E. and Calvelo, A. : J. Food Tech., 14, 239 (1979).
- 4) Miyawaki, O., Abe, T. and Yano, T. : Biosci. Biotech. and Biochem., 56(6), 953 (1992)
- 5) Woinet, B., Andrieu, J. and Laurent, M. : J. Food Eng., 35, 398 (1998).
- 6) Faydi, E., Andrieu, J. and Laurent, P. : J. Food Eng., 48(4), 290 (2001)
- 7) 都甲洙, 相良泰行, 工藤謙一, 横田秀夫, 樋口俊郎 : 農業施設, 28(1), 22 (1997)