

博士学位論文

水溶液からの氷核生成に関する研究

平成19年度
(2008年3月)

君塚 道史

第1章 序論

1.1 研究背景

氷核生成の制御、即ち過冷却制御は氷点下の温度域を利用する産業(食品・医療・気象・エネルギー)にとって重要な技術である。特に食品産業では冷凍食品に代表される『保存』を目的とした分野から、氷菓、凍結濃縮、凍結乾燥、凍結粉碎と言った『加工』を利用とした分野まで、その商品価値をも左右する重要な制御因子の一つである事が認知されている。言い換えればこれは、氷核生成の『促進』から『抑制』に至るまでの利用であり、その制御がこれらの食品産業における技術の根幹を成していると言っても過言ではないと思われる。これは、近年における磁場・電場を利用した新規凍結技術[1]および不凍タンパク質[2][3]、氷核生成タンパク質[4]と言った氷核生成を制御する技術が、産業界から常に注目を集めている点からもよく理解できる。しかしながら、このような新しい応用技術が示されている一方で、水溶液等における基本的な氷核生成のメカニズムに対して未知な部分が多数存在しているのが現状である。端的に言えば均質核生成の場合に限定したとしても、その水溶液が何度で結晶化するのか予測するまでには至っていない。無論、それが溶液系では無く生体組織・食品等の複合系であればより一層困難となる。本研究では、水溶液の氷核生成(過冷却)が既往の研究[5][6][7]から、何らかの溶液物性(溶質-水分子間相互作用、水和パラメータ)により説明可能であろうと言う仮説に基づき、溶液系のみならず生体系を含めた種々の水溶液の均質、不均質核生成温度、平衡凝固点、過冷却の傾向、と溶液物性の関係について考察を行った。これらの関係が明確となれば、氷核生成、過冷却の予測が可能となり、氷点下の温度域を利用する産業ではその一助になると思われる。今後、冷凍技術の発展を考慮する上で、このような凍結に関する基礎的な理解、即ち水溶液中における氷核生成の原理に対するより深い理解が重要となる事は述べるまでもないと思われる。

1.2 過冷却と氷核生成に関する既往の研究

純水および水溶液の氷核生成温(過冷却)に関しては、古くから数多くの研究が報告されている。その特筆すべき成果を纏めると、①純水における核生成温度の体積依存性と下限の特定。[8] ②エマルジョン法の利用

による、過冷却水物性と均質核生成に関する研究[5]。③水溶液の平衡凝固点および均質核生成温度に対する熱力学的側面からの整理[9] [10]。④純水における均質核生成の計算機シミュレーション[11] [12]等が挙げられる。

①については古くから数多くの研究報告があり、既に 1800 年代 Reguntt により水が -32.8°C まで過冷却できる事が報告されている。現在では純水の過冷却は液滴サイズに依存する事が示されており、その下限は $1\mu\text{m}$ で -42°C 程度になる事が明らかとなっている[8]。しかしながら、Fig1.1 における多数の実験結果からも明らかな様に、氷核生成温度と液滴サイズの関係は研究者により大きく異なり、両者の詳細な関係については現在でも明らかにはされていない事が分かる。これは、氷核生成温度が液滴のサイズ、即ち『氷核生成に参加できる水分子数(核生成確率)』以外にも、『不均質核生成の排除の程度(異物質の有無)』と『冷却速度、振動、揺らぎ等(外的要因)』等の要因が複雑に関係しており、再現性を得る事が困難である為と考えられる。一方、氷と過冷却液体界面エネルギーを $\sigma=22\text{erg}/\text{cm}^2$ として、次章に示した Eq2.1~3 から理論的に均質核生成温度を見積もると、おおよそ Fig1.1 上における青色破線のデータを得る事が出来る[13]。この事から破線付近にある Mossop や Langham & Masson 等の実験データが均質核生成を示し、これよりも温度の高い Bigg 等のデータは不均質核生成である事が示唆されている[14]。しかしながらこれらの研究成果から、どちらの核生成であっても、その温度が液滴サイズの対数と直線関係にある事には違いは無い事が確認できる。

②の研究については特に 1970 年代以降 Rasmussenら[5] [15] [16]から始まったと言える。彼らは界面活性剤、Sorbitan Tristearate (SPAN65)を使用した W/O 型エマルジョンの導入により、純水を均質核生成温度付近まで容易に且つ、再現性良く過冷却させる方法を確立した。この手法により、水溶液を含め過冷却の再現性が向上した為、過冷却水が実験材料としてなり得る様になった。例えば、定圧熱容量 C_p が過冷却領域で温度の降下につれて急激に増加 [17]することが発見されたのを機に、密度[18]、スピン-格子緩和時間(T_1) [19]、粘度[20]等の諸物性がこの手法により次々に明らかにされていった。また最近では過冷却の再現性を生かして、不明確な中間温度領域(no-man's land)にあると考えられる、水の第二臨界点の有無についてもこの手法により研究が進められている[21]。これら研究の中で本研究の基礎となるべき成果は、水溶液の平衡凝固点と均質核生成温度との間に経験的な一般則として、高濃度領域まで一次の直線関係が成立する事を示した事である。純水を基準にこの様な直線関係が成立する事は、溶液系においても均質核生成温度の考慮が可能

である事を示していると考えられる。

$$\Delta T_{f\text{-hom}} = \lambda \cdot \Delta T_m \quad (\text{Eq1.1})$$

ここで $\Delta T_{f\text{-hom}} = T_f^0 - T_f$ 、 $\Delta T_m = T_m^0 - T_m$ であり、 T_f^0 、 T_m^0 はそれぞれ純水における均質核生成と平衡凝固点、 T_f 、 T_m は各溶液の均質核生成温度と平衡凝固点である。また λ は溶質により異なる事から、溶質固有の過冷却のし易さ、即ち過冷却能として取り扱いが可能である事が分かる。以後、このエマルジョン法を用いて種々の水溶液における均質核生成温度が求められ、最近に至るまで議論されるようになった。例えば菅野ら[7] [22] [23] [24]は、アルコール・糖およびアルカリ塩水溶液における均質核生成温度を求め、均質核生成温度が溶質のヒドロキシル基の数ならびにアルカリイオン半径と言った溶質の官能基や構造単位に依存する事、ならびに PEG 水溶液 (M_w 200~2000) の実験から分子量と均質核生成温度の間に加生成が成立する事を示した。何れの結果も、熱力学的に準安定状態である過冷却を経て起きる均質核生成が、溶質の functional group あるいは構造単位に影響しており興味深い結果と言える。

③の研究については、Franks らがエマルジョン法により得られた水溶液の均質核生成温度を平衡凝固点と同様にクラペイロン・クラジウスの式により説明を行った事が挙げられる[25]。一方、近年では Koop ら[6] [26] [27]が種々の低分子水溶液ならびに PEG 水溶液の均質核生成温度が平衡凝固点と同様に、溶質の種類によらず一律に水分活性のみ依存する事を経験的に示した。また、これら Koop らの実験結果を踏まえ Khvorostyanov ら[8]が古典核生成理論を使用し、エマルジョン法により得られた各種水溶液の均質核生成温度が水分活性と同様な熱力学的に平衡なパラメータにより理論的に説明が可能である事を示唆した。何れの結果も非平衡とされる均質核生成温度が、熱力学的に平衡なパラメータにより説明が可能である事が示された結果と言える。

④の研究については 1990 年代後半から急速に進歩を見せた。結晶化過程はコンピュータシミュレーションの黎明期から強い関心が寄せられており、相転移を取り扱った最も古い研究は 1950 年代まで遡ることができる。しかしながら、外的な要因を与えずに『ゆらぎ』により自発的に核が形成され、成長していくプロセスが再現できるようになったのは極最近のことである。これにより、シミュレーション結果と古典核生成理論との相違を指摘できるようになった。松本ら[28]の水核生成シミュレーション結果によれば、核生成は古典核生成理論の想定と同様に

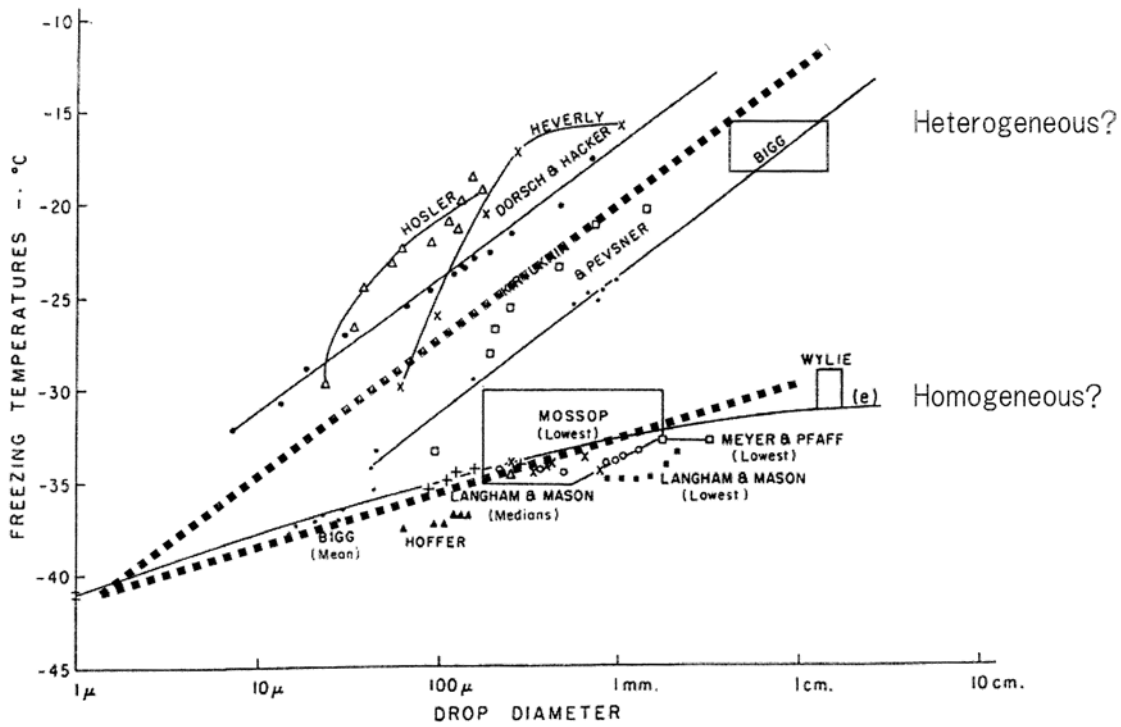
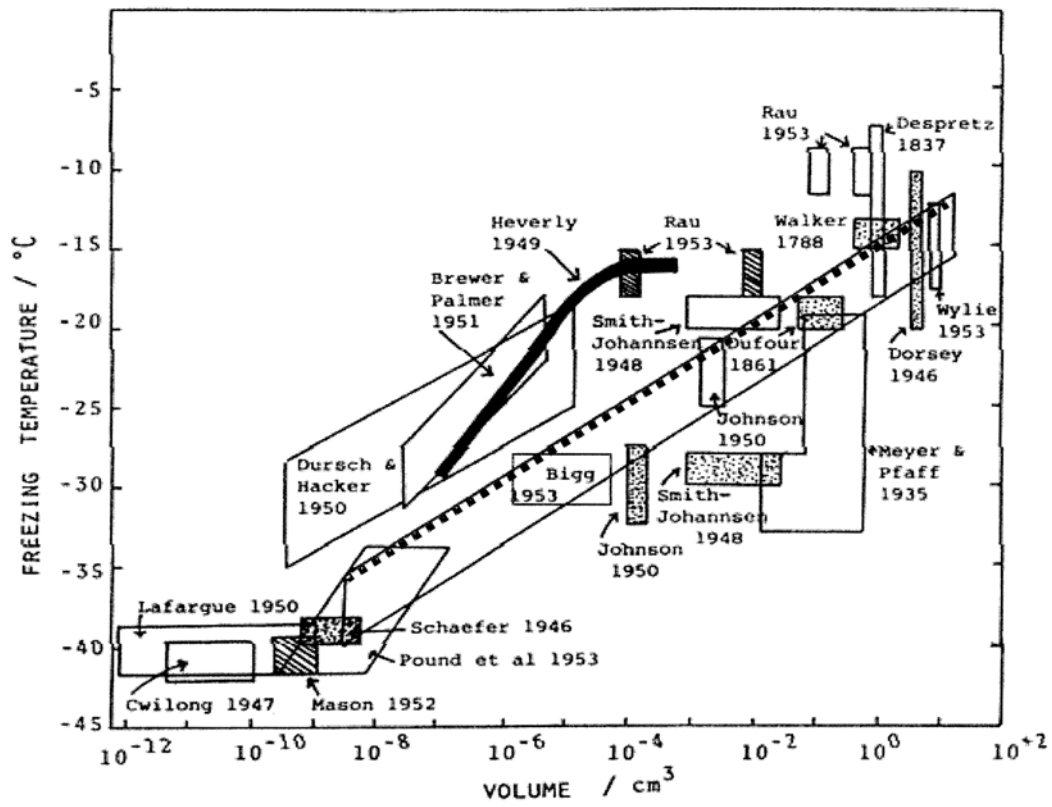
間欠的に生成と消滅を繰り返し、一定サイズの核が形成されるとそれが結晶へと成長するが、初期の核の形状は球では無く大きく歪んでいる事、および内部は非晶質的な構造をもっている事が示唆されており、単純にこれまでの核生成理論が適用できない事を指摘している。これらの結果が溶液系における均質核生成に対しても適用可能であるか否かについては今後興味を持たれる点である。

1.3 研究目的

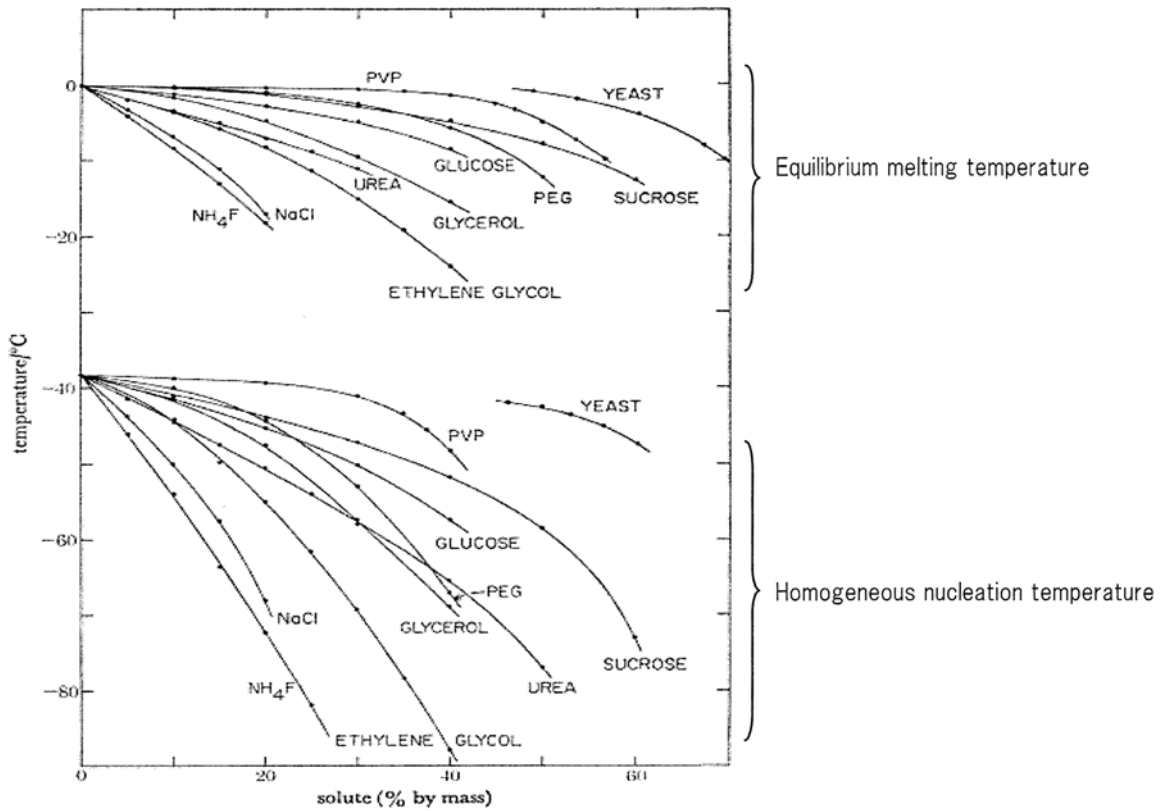
種々水溶液の氷核生成(過冷却)に関して、Rasmussen[4]、Franks[9] [25]、菅野[7]、Koop[6]、などの結果を纏めると、現時点までに次の事項が明らかにされていると言える。

- ①均質核生成温度と平衡凝固点の間には一次の直線関係が成立する[4]。($\Delta T_{f-hom} = \lambda \cdot \Delta T_m$)
- ②均質核生成温度は-OH 基数及びイオン半径と言った溶質の構造単位に依存し、加成性が成立する[7]。
- ③均質核生成温度・平衡凝固点は、水分活性に依存する傾向を示す[6]。

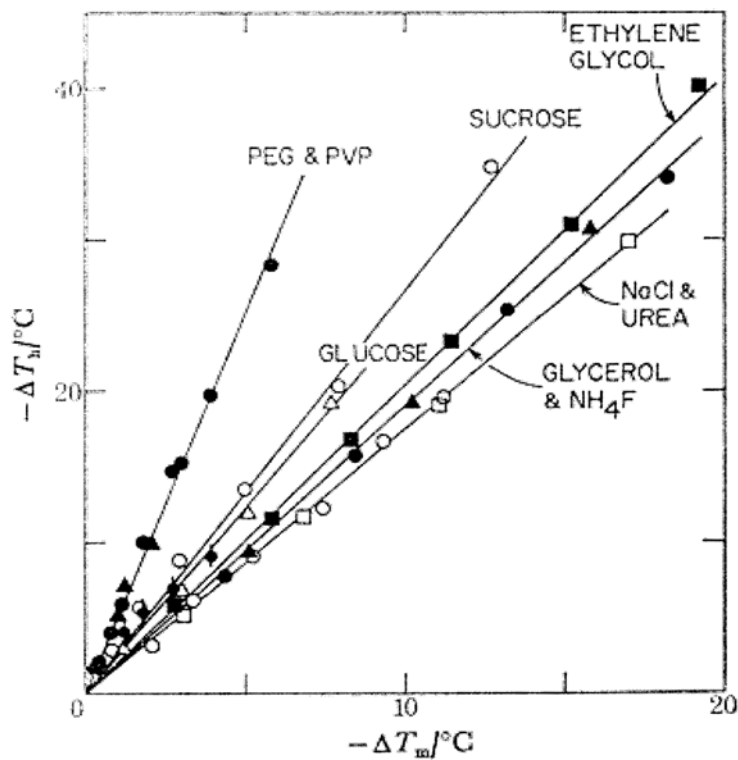
以上、均質核生成温度についても平衡凝固点と同様、熱力学的に平衡として取り扱いが可能である点を考慮すると、水溶液過冷却の傾向(上式における λ)についても何らかの溶液物性により説明が可能であると予測される。 λ とこれらの関係が明確となれば、水溶液過冷却の溶質依存性について、例えば②③に示した様なパラメータから均質核生成温度を考察する場合に比べ、より直接的な理解が可能となり、更にはこれが水溶液核生成全般に対する予測と制御にも繋がる事が期待できる。本研究ではまず溶液のサイズが限定された場合(W/O型エマルション)の氷核生成温度、即ち均質核生成温度の検討として、① λ を溶質固有の過冷却能と定義し、低分子から高分子まで種々の水溶液についてこれを求めた。また、②得られた λ と溶液物性(水和パラメータ)との関係から、水溶液核生成(過冷却)に対し考察を試みた。次に液滴サイズを限定しない場合の検討として、③溶質の種類および容量を問わず、氷核生成温度が系における相転移が可能な水分子数(融解熱量)に依存するか検討を行った。最後に本研究の応用として、④凍結保護物質を導入して凍結した、生体組織(ヒメダカ胚)の λ と水溶液の λ の関係について考察を行い、溶液物性から生体組織の氷核生成温度が予測可能であるか検討を行った。本研究の目的は、生体組織を含めた水溶液系全般における氷核生成温度・過冷却解消と溶液物性の関係を明らかにする事にある。



(Fig1.1) Freezing temperature of water drops as function of their diameters and volume. [29] [30]



(Fig1.2) 'Phase diagram' containing equilibrium melting temperature depression and the homogeneous nucleation temperature for the solutes. [31]



(Fig1.3) Relation between the depression of the homogeneous nucleation temperature (ΔT_h) and the depression of the equilibrium melting point (ΔT_m). [31]

1.4 論文構成

本研究は第一章から第七章で構成されている。

第一章…研究背景及びこれまで行われてきた、水および水溶液の氷核生成(過冷却)に関する研究の概要として、主としてエマルションを用いた諸研究について整理を行った。また、これら既往の研究を踏まえ、本研究の目的を記した。

第二章…古典核生成理論における『核生成に伴う自由エネルギー変化』および『核生成速度式』から、これらの各パラメータと水溶液における均質核生成温度の関係について考察した。一方、水系以外における結晶化温度と融点の経験則に対する理論背景についても、本研究の視点から整理を行った。また、実験手法として本研究で用いた均質核生成温度、平衡凝固点等の測定条件についても記した。

第三章…低分子水溶液を中心に、各種水溶液の均質核生成度ならびに平衡凝固点から Eq1.1 により各溶質の λ を求め、分子量及び溶液物性のパラメータとして知られる、Jones-Dole の粘度式における第二ビリアル係数(粘度 B 係数)、 B 係数から溶質の形状因子を除外したパラメータ($B-0.0025\bar{V}^0$)、溶質の部分分子容(\bar{V}^0)、無限希釈における溶質分子の自己拡散係数(D_0)、NMR 法により得られる回転相関時間の比(τ_c^h/τ_c^0)、およびガラス転移温度(T_g')との関係を調べ、これらパラメータと λ との関係から水溶液過冷却に対し考察を試みた。結果、 λ は特に溶質分子の拡散係数 D_0 と最も良好な相関関係にあり、 τ_c^h/τ_c^0 または $B-0.0025\bar{V}^0$ と言った、主として水分子-溶質分子間に働く相互作用を示すパラメータとは相関関係が低い事が確認された。これは、水溶液中における溶質分子構造(水中における溶質分子半径およびサイズ)、言い換えれば各溶液における粘度の違いが氷核生成速度、即ち過冷却に影響を及ぼす事を示唆した結果と考えられる。一方、 λ は T_g' とも良好な相関関係を得る事が出来た。この点からも上記の過冷却能(λ)と粘度の関係は妥当性の高い結果である事を示している。尚、考察では Koop ら[27]により λ との関係が示唆されている水分活性値の温度依存性と、溶質分子の拡散係数(D_0)との関係に触れ、 a_w の温度依存性自体が溶質の自己拡散係数により定まる量である事を示唆した。

第四章…各種分子量にある PEG、PVP、Dextran 水溶液の $\Delta T_{f, hom}$ 、 ΔT_m および λ を第三章と同様の手法により求め、これら温度の分子量依存性についての確認、及び第三章で特に相関性の高かった D_0 と λ の関係が高

分子水溶液まで拡張可能であるか検討を行った。その結果、PEG 水溶液の $T_{f,hom}$ 、 T_m および λ は分子量に依存して増加するが、何れも M_w 600~1000 付近を境に変化する事が明らかとなった。尚、これら分子量依存性は $T_{f,hom}$ 、 T_m に限らず、極限粘度及び慣性半径等についても同様な領域で成立する事から、本研究における各パラメータの分子量依存性は溶液中における分子の存在状態が粘度(拡散係数)を介して影響している事が示唆された。一方、各高分子水溶液の λ は、第三章の結果と同様に溶質分子の拡散係数 D_0 の対数值と良好な相関関係にある事が確認された。更にこの相関関係には低分子水溶液の λ も、同一の直線上に存在し得る事から、エマルション法により得られる λ は低分子から高分子に至るまで、溶質分子の構造由来のパラメータである拡散係数 D_0 により説明可能である事が示唆された。

第五章…実験・理論共に純水における氷核生成温度は液相における水分子数に依存することが明らかとなっている。第五章ではこの考え方を溶液系に拡張する事を試みた。即ち、溶質の種類ならびに液滴サイズを問わず、氷核生成温度が系における相転移が可能な水分子数(融解熱量)に依存するか検討を行った。その結果、各種液滴体積にある水溶液の核生成温度は、純水結果と同様に融解熱量の対数と直線関係にある事が確認された。この事から純水のみならず水溶液の核生成温度は、相転移が可能である水分子数に依存する事が実験的に示唆された。

第六章…第一章から第五章までの応用として、メダカ胚を透過型の凍結保護物質とされる(ethylene glycol, 1,3-propanediol, 1,4-butanediol, glycerol)水溶液に浸漬処理し、無浸漬胚の凍結・融解温度を基準として ΔT_f 、 ΔT_m を求めた。その結果、メダカ胚であっても先に示したエマルションの結果同様、 ΔT_f 、 ΔT_m の間に比較的良好的な一次の直線関係が成立する事が確認された。更にこの直線関係から得られた λ 、即ち各水溶液に浸漬した胚の過冷却能と、エマルションで得られた水溶液の λ の間には相関関係が成立する事が明らかとなった。したがって、凍結保護物質により処理された生体系の過冷却の傾向は水溶液から予測可能である事が示唆された。

第七章…本章では以上の研究成果を纏め、得られた知見を整理した上で今後の展望について記した。