

بررسی بلورهای یخ در غذاهای منجمد

رحمت... رحیمی

دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

لیلا حجت کاشانی*

دانشکده شیمی، واحد شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرری، ایران

چکیده

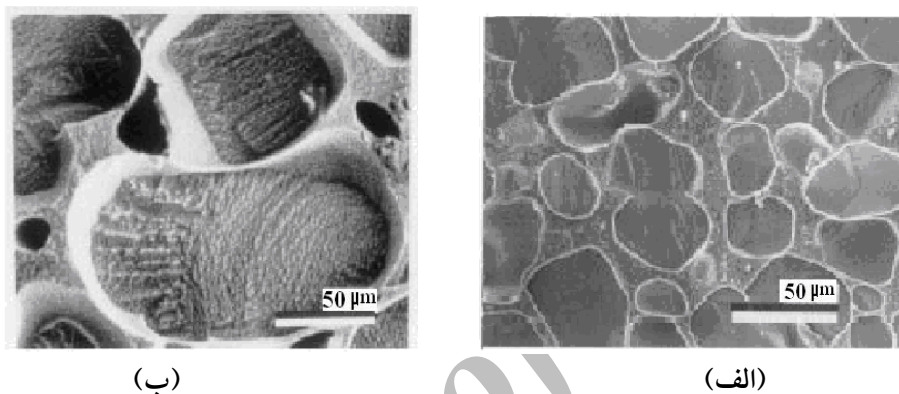
در این مقاله، آنالیز فرکتال ساختار بلورهای یخ، در غذای منجمدی مانند سویای خشک منجمد (لوبیای ژاپنی) مورد بررسی قرار گرفته است. از آنالیز یک تصویر میکروسکوپی از ذرات بلوری یخ، مشخص شده که محیط ذرات بلورهای یخ را می توان از طریق آنالیز فرکتال شناسایی کرد. اثر زمان ذخیره در یخدان و همینطور دمای ذخیره مواد منجمد، بر روی ابعاد محیط فرکتال (dp) ذرات بلوری یخ نیز مورد بررسی قرار گرفته است. از بعد فرکتال (dp) می توان به عنوان یک عامل شناساگر کمی، جهت نشان دادن سطح ناهموار ذرات بلوری یخ استفاده کرد.

واژه های کلیدی: آنالیز فرکتال، بلور یخ، آنالیز تصویری، تبلور مجدد، بعد فرکتال، قطر متوسط بلور یخ، محیط اطراف بلورهای یخ، مساحت بلور یخ

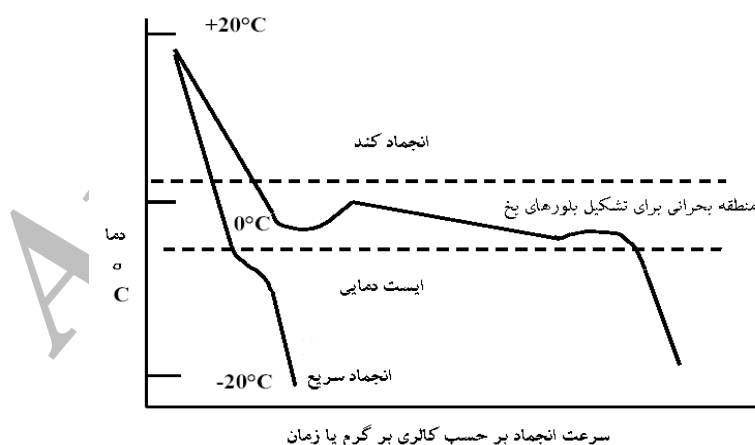
مقدمه

بعضی خواص بلورهای یخ مانند اندازه، شکل و توزیع، نقش مهمی را در تعیین خواص فیزیکی و ساختاری خیلی از محصولات یخ زده ایفا می کنند. فهم این نوع خواص بلورهای یخ نه تنها برای کنترل کیفیت مواد غذایی یخ زده، بلکه برای ارائه طرح توسعه صحیح خیلی از فرآیندهای مرتبط با انجماد مواد غذایی مهم هستند (به عنوان مثال می توان از خشک کردن تحت حالت خلأ و سرمای فراوان و یا از تغلیظ در سرمای زیاد نام برد).

تاکنون معلوم شده است که انجماد سریع به جای انجماد آرام باعث تولید بلورهای یخ کوچکتر در غذای یخ زده می شود. از عوامل موثر بر سرعت انجماد می توان توانایی سیستم در انتقال حرارت به بیرون، اختلاف دما بین محصول و محیط، سرعت جریان هوا، ضخامت محصول، تماس بین محصول و محیط و همچنین دمای اولیه محصول را نام برد. همچنین گزارشهایی وجود دارد که نشان می دهند بلورهای یخ در طی ذخیره شدن مجدد در یخدان رشد می کنند (شکل ۱) ^(۱) که به مدت زمان ذخیره در یخدان و دمای انجماد بستگی دارد (شکل ۲) ^(۲).



شکل ۱: الف) بلورهای یخ قبل از ذخیره شدن ب) بلورهای یخ رشد کرده پس از ذخیره شدن در یخدان ^(۱)



شکل ۲: نمودار سرعت انجماد بر حسب دما ^(۲).

بیشترین مطالعات ذکر شده به تعداد و اندازه بلورهای تشکیل شده، مربوط می شود. ولی ساختار بلورهای یخ نیز بایستی مورد بررسی قرار گیرد زیرا آنها نیز در خواص فیزیکی و ساختمانی مواد غذایی یخ زده موثر می باشند. برای مثال شکل بلورهای یخ تشکیل شده ممکن است با مقدار آب موجود در غذا مرتبط باشد (جدول ۱) یا در فرآیند خشک کردن به طریق انجماد، نفوذ بخار غذا و طرز خشک کردن می توانند تحت تاثیر ساختار بلورهای یخ

قرار گیرند. نهایتاً رفتار جذب مجدد آب (در محصولات خشک شده به طریق انجماد) ممکن است باز هم به ساختار بلورهای یخ تشکیل شده در چنین غذاهایی مربوط شود. بنابراین اطلاعات مربوط به ساختار بلورهای یخ بایستی مورد بررسی قرار گیرند. زیرا این اطلاعات می‌توانند روشی در بهینه کردن کیفیت غذاهای یخ زده و همینطور فرایند عمل انجماد غذاها ارائه دهند.

غذا	درصد آب (%)	نقطه انجماد
سبزیجات	۷۸-۹۲	-۲/۸ تا -۰/۸
میوه جات	۸۷-۹۵	-۲/۷ تا -۰/۹
گوشت	۵۵-۷۰	-۲/۲ تا -۱/۷
ماهی	۶۵-۸۱	-۲/۰ تا -۰/۶
شیر	۸۷	-۰/۵
تخم مرغ	۷۴	-۰/۵

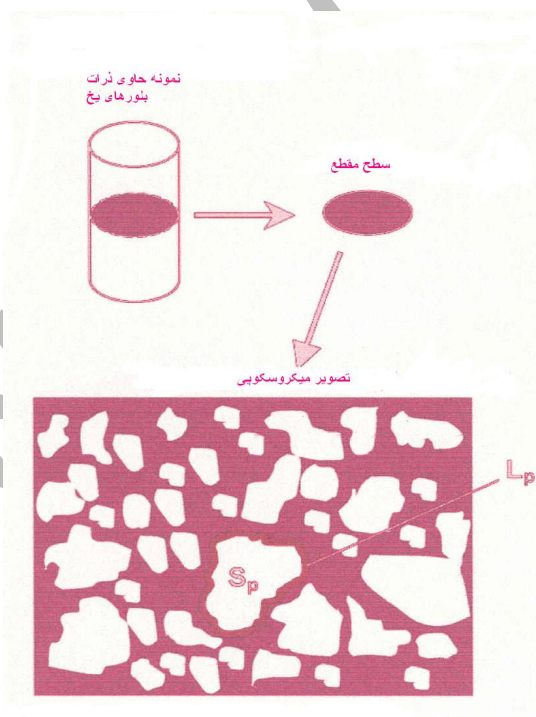
جدول ۱: نقطه انجماد و درصد آب موجود در غذاهای مختلف^(۲)

در مطالعاتی که بر روی بلورهای یخ در غذا صورت گرفته بیشتر به مشاهده عینی ساختار بلورهای یخ اکتفا شده است. از این روشها می‌توان مشاهده بلورهای یخ در یک نمونه منجمد توسط میکروسکوپ نوری با استفاده از تابش اپی فلئورسانس و تابش نور سبز/زرد و مقایسه تصاویر بدست آمده از این دو تابش را نام برد. در این روش برای هر نمونه ۲ تصویر بدست می‌آید. از آنالیز کمی تصویری برای تخمین قطر متوسط بلورهای یخ در هر تصویر استفاده می‌شود. سرعت تبلور ذرات یخ را می‌توان از شیب میانگین قطرهای بلورهای یخ که از تصاویر بدست آمده محاسبه کرد. این روش برای اندازه گیری سرعت تبلور ذرات یخ و اندازه ذرات بلوری یخ در محلولهای سوکروز ۲۴٪ و ۱۶٪ همراه با شیر بدون چربی و تثبیت کننده‌های پروتئینی هیدروکلوئیدی (که تبلور یخ را به تأخیر می‌اندازند) به کار رفته است.^(۳) روش دیگر برای اندازه گیری توزیع و اندازه بلورهای یخ در غذاهای منجمد، استفاده از عوامل بیوژنیک فعال برای هسته سازی بلورهای یخ برای راندمان دلخواه بلورهای یخ در توزیع یکنواخت آنها می‌باشد. در این روش (بیشتر از گوشت استفاده می‌شود) پس از انجماد و خشک کردن، نمونه به قطعات مختلف بریده می‌شود. اسکن میکروسکوپی، سوراخهای به وجود آمده توسط بلورهای یخ را در ساختمان نمونه خشک شده و بی‌آب مشخص می‌کند. تصاویر ساختمانهای متخلخل (اسفنج مانند) که توسط آنالیز تصویری آشکار می‌شود، یک روش برای اندازه گیری تعداد و توزیع ذرات بلوری یخ را به وجود می‌آورند.^(۴)

می‌توان گفت مطالعات زیادی در مورد کمیت ساختاری بلورهای یخ صورت نگرفته است. جهت درک اثر ساختار بلورهای یخ در غذا به طور سیستماتیک ضروری است که یک روش صحیح برای اندازه گیری ساختار آنها

توسعه یابد. تعیین ویژگی ساختار بلورهای یخ در غذاهای منجمد مشکل است زیرا اغلب بلورهای یخ شکلهای پیچیده‌ای می‌سازند که بعضاً غیر معمول می‌باشند.

اخیراً در شناسایی انواع زیادی از اشکال نامنظم، آنالیز فرکتال به عنوان روشی مناسب توجه همه را به خود جلب کرده است. با استفاده از این مفهوم می‌توان درجه بی‌نظمی را با ابعاد فرکتال به طور صحیح تخمین زد. عموماً زیادتر بودن مقدار ابعاد فرکتال به زمختی یا نامنظم بودن ماده بستگی دارد. مفهوم آنالیز فرکتال در تعیین خصوصیت ساختار غذا نیز به کار گرفته شده است. پلیج و نورمند به وسیله آنالیز فرکتال بی‌نظمی شکل ذرات قهوه پودر شده را تخمین زده‌اند.^(۵) سوزوکی و یانو نشان داده‌اند که سطح چندین غذای پودر شده را می‌توان با آنالیز فرکتال شناسایی کرد.^(۶ و ۷) چندین مطالعه نیز بر روی توده‌های متراکم پروتئین در غذا و شبکه‌های بلوری چربی انجام شده است.^(۸) در این مطالعه، آنالیز فرکتال ذرات بلوری یخ در سویای خشک منجمد با استفاده از تکنیک آنالیز تصویری مطالعه شده و تغییر ابعاد فرکتال در طی ذخیره، در دمای زیر صفر درجه نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد. مطالعه ذرات بلوری یخ در غذای منجمد، اغلب به وسیله مشاهده میکروسکوپی برش افقی نمونه صورت می‌گیرد. یک تصویر شماتیک از یک شکل مخصوص که بوسیله میکروسکوپ تهیه شده در شکل (۳) نشان داده شده است.



شکل (۳). نمودار شماتیکی برای یک تصویر نمونه میکروسکوپی. قسمت سفید مبین ذرات بلوری یخ هستند. L_p محیط و S_p مساحت ذرات بلور یخ هستند.

بسیاری از ذرات بلوری یخ در این تصویر شبیه به جزیره می‌باشند. آنالیز فرکتال تصاویر ذرات بلوری یخ، با استفاده از روش محیط-سطح صورت گرفته است. بر اساس این روش، ابتدا محیط اطراف (L_p) برای بلورهای

یخ با اندازه های مختلف و همینطور سطح (Sp) آنها با واحد طولی یکسان اندازه گیری شده‌اند. بین Sp و Lp رابطه زیر وجود دارد:

$$Lp^{2/dp} \propto Sp \quad (1)$$

dp، بعد فرکتال برای کناره یک ذره بلور یخ در تصویر می باشد. برای اشکال منظم مثل دایره یا مربع Sp=1 است. اما وقتی که کناره شکل، بسیار پیچیده و دارای ویژگیهای خاص به خود باشد مقدار dp بین ۱ تا ۲ خواهد بود.

مواد و روش‌ها

سویا دارای ساختاری نسبتاً یکنواخت است. به این دلیل به عنوان یک نمونه ساده برای آنالیز شکل ذرات بلوری یخ انتخاب شده است. سویا را به صورت یک صفحه (قطر ۳۰ در میلی‌متر × ارتفاع ۷ میلی‌متر) بریده و بر روی قطعه‌ای عایق از جنس پلی استیرن قرار داده و سپس آن را در داخل یک پاکت پلی اتیلن تحت خلاء بسته بندی می کنند. مجموعه را داخل مخلوط آب نمک و اتانول قرار داده و توسط ترموستات دما را در دمای $C \pm 0.5$ ثابت نگه می دارند. قطعه عایق پلی استیرن باعث انتقال گرما به صورت یکنواخت از بالا به پایین نمونه می شود. دمای وسط نمونه در طی انجماد بطور مداوم کنترل می شود. بعد از اینکه دمای اصلی در $C \pm 0.5$ ثابت شد، بعضی از نمونه‌ها برای مشاهدات میکروسکوپی آماده می شوند. برای بررسی اثر مدت ذخیره در ساختار بلورهای یخ، نمونه های دیگری پس از انجماد در دماهای ۵۰- و ۳۰- و ۲۰- و ۵- سانتی گراد قرار گرفتند. مدت دوره‌های ذخیره به صورت ۳۰، ۶۰، ۸۰ روز تعیین شده است.

برای تثبیت نمونه منجمد، از روش مارتینو و زاریتسکی استفاده شده است.^(۹) نمونه منجمد را به شکل استوانه (۷ میلی متر ارتفاع × ۷ میلی متر قطر) در داخل یک فضا در دمای $C \pm 20$ بریده می شود و سپس داخل یک مخلوط فورمالین و اتانول^۱ به مدت ۱۴-۱۲ روز در دمای ۵۰- برای تثبیت ساختار پروتئین و جابجا کردن یخ با محلول قرار می گیرد. برای تثبیت نمونه ذخیره شده، دمای محیط آزمایش باید با دمای ذخیره یکسان باشد. بعد از تثبیت، نمونه در دمای اتاق به مدت یک روز ذخیره می گردد، سپس شسته شده و داخل ژلاتین آب شده قرار می گیرد. نمونه های موجود به صورت ورقه‌هایی به کلفتی ۲ تا ۱۰ میلی متر توسط یک میکروتوم منجمد شده بریده می شوند، بطوری که جهت برش عمود بر جهت انتقال حرارت باشد. فقط نمونه‌هایی که به فواصل یکسان از سطح انجماد قرار دارند (سرعت انجماد یکسان دارند) برای مطالعه مورد استفاده قرار می گیرند. نمونه‌هایی که به صورت ورقه‌های نازک بریده شده اند را با محلول ۱٪ اوسئین وای برای عکس برداری باکیفیت خوب برای آنالیز تصویری رنگی می کنند. سپس با یک میکروسکوپ نوری آنها را مشاهده کرده و تصاویر بدست آمده را توسط یک اسنکر به تصاویر بزرگتر تبدیل می کنند.

بحث و نتایج

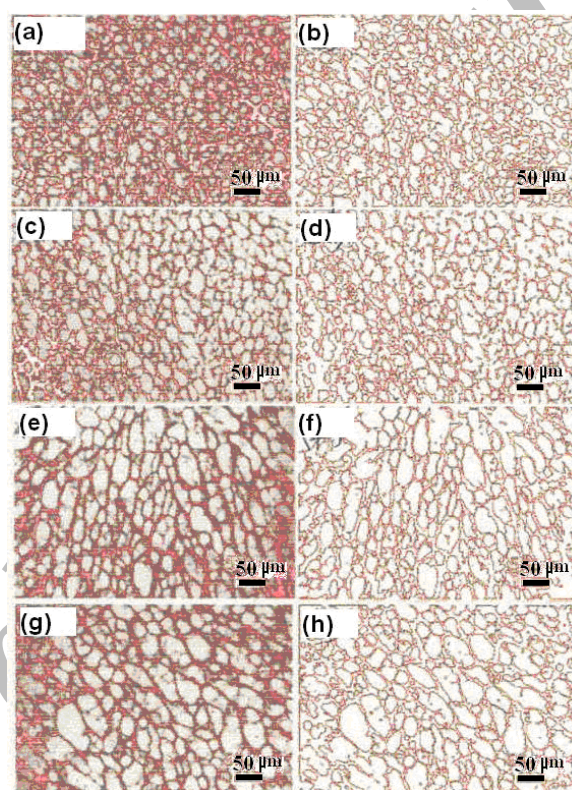
اندازه‌های محیط اطراف (Lp) و سطوح (Sp) ذرات بلوری یخ مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از داده‌ها

¹Formalin and ethanol

² Eosin Y

³Software WinRoof(Mitani.,Japan)

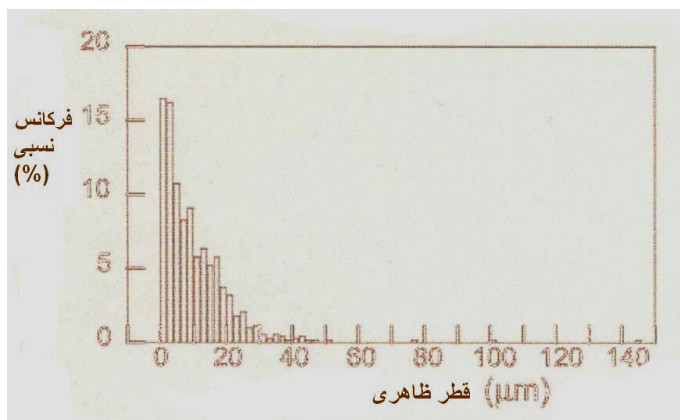
و معادله (۱) ابعاد فرکتال dp تعیین می شود. همچنین قطر ظاهری برای هر بلور یخ به عنوان قطری از یک دایره تعریف می شود که دارای سطوح یکسان و معادل (Sp) هستند. این مقدار با استفاده از نرم افزار^۳ تخمین زده می شود. از سری داده‌های هر قطر ظاهری، قطر متوسط هر بلور (Dep) محاسبه می گردد. تمام آنالیزها برای سه نمونه مختلف تحت شرایط مختلف زمان ذخیره و دما انجام گرفته است و مقادیر میانگین، محاسبه شده است. تعداد ذرات یخ بلوری در هر تصویر بیشتر از ۱۰۰ عدد می باشد.



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپی برای نمونه های سویا در زمانهای مختلف انجماد و در دمای $-5^{\circ}C$. ردیف بالا بدون زمان

ذخیره: (a) تصویر اصلی. (b) تصویر دوم؛ ردیف دوم: $-5^{\circ}C$ و ۳۰ روز. (c) تصویر اصلی. (d) تصویر دوم؛ ردیف سوم $-5^{\circ}C$ و ۶۰ روز. (e) تصویر اصلی. (f) تصویر دوم. ردیف آخر: $-5^{\circ}C$ و ۱۰ روز. (g) تصویر اصلی. (h) تصویر دوم.

توزیع نسبی تغییرات قطر ظاهری بلور برای نمونه‌های غیر ذخیره که در تصویر دوم تهیه شده‌اند در شکل ۵ نشان داده شده‌اند.

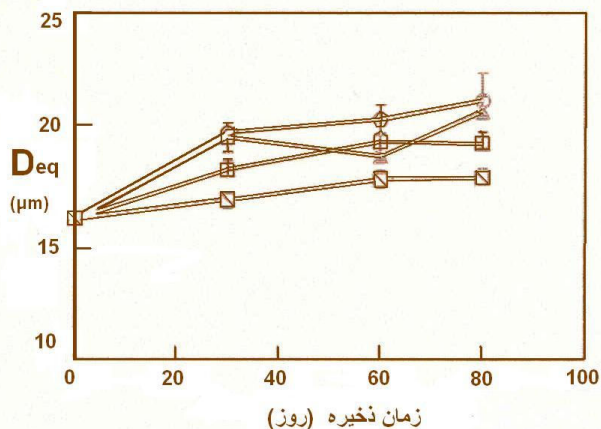


شکل ۵. نمونه هایی از توزیع نسبی قطر ظاهری بلورها.

محدوده توزیع از یک مقدار ناچیز تا ۵۰ میکرومتر می باشد و قطر متوسط بلوری Deq برابر $1/6 \pm 15/4$ میکرومتر تخمین زده شده است. میاواکی و همکاران، اندازه میانگین قطر بلورهای یخ پروتئین سویا را از ۵۰ الی ۵۰۰ میکرومتر اعلام کرده اند که خیلی بیشتر از آنچه در این مطالعه بدست آمده، می باشد.^(۱۰) دمای انجماد در این مطالعه ($-50^{\circ}C$) بسیار کمتر از دمایی است که در مطالعه میاواکی و همکاران ($-15^{\circ}C$) استفاده شده است. بعلاوه اندازه سویا استفاده شده در این مطالعه بسیار کوچکتر از سویا استفاده شده در مطالعه آنها است. بنابراین منطقی است که در این مطالعه، این تفاوتها باعث افزایش سرعت انجماد و همچنین باعث تشکیل بلورهای یخ کوچکتر شوند.

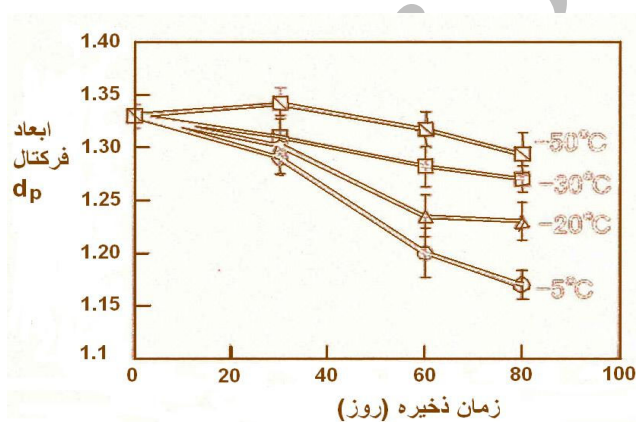
در شکل ۴a یک نمونه تصویر میکروسکوپی اصلی برای نمونه غیر ذخیره بعد از انجماد در $-50^{\circ}C$ نشان داده شده است. قسمت های سفید در نمونه ذرات بلوری یخ هستند. بسیاری از ذرات بلورهای یخ همانطور که در شکل ۳ نشان داده شدند مانند جزیره به نظر می آیند. شکل ۴b تصویر دومی از همان نمونه است. شکل های c, e, g نمونه ای از تصاویر اولیه بلورهای یخ ذخیره شده در زمانهای مختلف در دمای $-5^{\circ}C$ را به ما نشان می دهند.

تصاویر اصلی در شکل های ۴d, f, h نشان داده شده اند. از تصاویر اصلی معلوم می شود که رشد ذرات بلورهای یخ با افزایش زمان ذخیره بیشتر می شود که با گزارشات قبلی در مورد ذرات بلوری یخ در غذا در چنین شرایط ذخیره مطابقت دارد. شکل ۶، وابستگی قطر متوسط (Deq) به زمان ذخیره را که از تصاویر دوم تخمین زده شده است و شامل نتایج نمونه هایی است که در دماهای دیگر ذخیره شده اند، نشان می دهد.



شکل ۶: وابستگی قطر متوسط D_{eq} بلورها بر حسب زمان در دماهای مختلف.

(○) $-5^{\circ}C$ و (△) $-20^{\circ}C$ و (□) $-30^{\circ}C$ و (◻) $-50^{\circ}C$



شکل ۷: وابستگی ابعاد فرکتال بر حسب زمان ذخیره در دماهای مختلف.

(○) $-5^{\circ}C$ و (△) $-20^{\circ}C$ و (□) $-30^{\circ}C$ و (◻) $-50^{\circ}C$

شکل ۷ وابستگی زمان ذخیره را به ابعاد فرکتال dp برای نمونه‌های ذخیره شده در دماهای مختلف نشان می

دهد. با افزایش زمان ذخیره مقدار dp تمایل به کاهش دارد.

نتیجه گیری

مقادیر dp بدست آمده برای تمام نمونه‌ها در این مطالعه بیشتر از یک است. این مطلب مبین اینست که کناره شکل ذرات بلوری یخ دارای اشکال هندسی مشخص یکسان مانند دایره و یا مربع نمی باشند. بنابراین، از نقطه نظر روابط اندازه گیری فرکتال، کناره های ذرات بلورهای یخ را می توان به عنوان فرکتال در نظر گرفت.

از مطالعه بر روی رفتار رشد ذرات بلورهای یخ در مواد غذایی نتیجه گرفته می شود که در دمای ذخیره یکسان، هر چقدر زمان ذخیره بیشتر شود، بلورهای یخ رشد کرده و قطر متوسط آنها بیشتر می شود که در شکل ۴ این مطلب نشان داده شده است.

هنگامی که در زمان ذخیره یکسان، دمای ذخیره تغییر کند ممکن است نتایج دیگری بدست آیند. چندین مکانیزم برای رشد بلورهای یخ در طی ذخیره وجود دارد که از جمله می توان مکانیسم انجماد مجدد مهاجر و مکانیسم انجماد مجدد رشد را نام برد. مکانیسم انجماد مجدد رشد، وقتی غالب است که بلورها کوچک و نزدیک همدیگر باشند. در صورتیکه مکانیسم انجماد مجدد مهاجر، زمانی صورت می گیرد که بلورها رشد کرده و جدا باشند.^(۱۱) این نتایج بیانگر اینست که اختلاف در مکانیسم رشد ممکن است تغییر شکل و اندازه بلورهای یخ را به وجود آورد که در شکل ۶ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۶ دیده می شود، قطر متوسط بلورهای یخ در زمان ذخیره یکسان با بالا رفتن دمای ذخیره، بیشتر می شود که تاییدی بر وجود مکانیسم انجماد مجدد رشد است. مکانیسم انجماد مجدد رشد در بلورهای یخ در شکل ۴ (دمای ذخیره یکسان و افزایش زمان ذخیره) نیز دیده می شود. اما در زمان ذخیره ۶۰ روز و دمای ذخیره 20°C کاهش قطر متوسط بلورهای یخ دیده می شود که دلیلی بر وجود مکانیسم انجماد مجدد مهاجر است که دوباره در زمان ذخیره ۸۰ روز و دمای ذخیره 20°C مکانیسم انجماد مجدد رشد غالب می شود. در تایید نظریه انجام آنالیزی شبیه به این مطالعه با استفاده از نمونه‌ای مثل فرکتوز ضروری است.

در این بررسی، محیط ذرات بلورهای یخ را می توان از طریق سطح مقطع آنها بدست آورد. با فرض اینکه سطح بلور یخ دارای یک شکل هندسی ایزوتروپیک می باشد، ابعاد فرکتال سطوح بلورهای یخ (ds) را می توان از dp با استفاده از معادله (۲) بدست آورد:

$$ds = dp + 1 \quad (2)$$

این معادله برای ارزیابی عملی سطوحی که دارای قابلیت دفع بسیار زیاد آب می باشند، توسط شیوچی و همکاران به کار رفته است.^(۱۲) استفاده از معادله ۲ برای ارزیابی ابعاد فرکتال سطوح بلورهای یخ، مستلزم ایزوتروپیک بودن سطح ساختمان بلور یخ می باشد. مشخص شده است که شکل بلورهای یخ در طی ذخیره در فرآیند کریستالیزه شدن (تبلور مجدد) در غذاهای منجمد، به طرف شکل مدور و گرد تمایل پیدا می کند. بویلاکو و زاریتسکی علت این پدیده را حرکت مولکولهای آب از سطوح محدب (که انرژی مولکولها در آنجا بیشتر است) به سطوح مقعر می دانند.^(۱۳) با توجه به مفهوم فرکتال، کاهش dp در شکل ۷ بمعنای این است که افزایش زمان ذخیره باعث مدور شدن کناره های بلورهای یخ می شود. که در اثر نرم شدن بلورهای یخ، در طی عمل تبلور مجدد می باشد. پس کاهش مقدار dp در طی ذخیره نشانگر عمل مدور شدن است. پیشنهاد می شود که بعد فرکتالی dp به عنوان یک شناساگر کمی، برای تعیین میزان ناهمواری و زمخت بودن سطوح ذرات بلورهای یخ به کار رود.

در این مطالعه ابعاد فرکتال ذرات بلورهای یخ از ۱/۱۷ تا ۱/۳۴ تغییر می کند که مقدار تغییر آنها به زمان و دمای ذخیره (مطابق با شکل ۷) بستگی دارد. تجربه نشان داده است که شکل ذرات بلوری یخ با شرایط انجماد،

تغییری کند (مانند سرعت سرد شدن و دما).^(۱۵و۱۴) پس تحت شرایطی که بررسی شده است، ذرات بلوری یخ ابعاد فرکتالی متفاوتی را پیدامی کنند. این مطالعات به منظور کنترل خواص ساختمانی ذرات یخ در غذاهای منجمد ذخیره شده صورت گرفته است.

Reference:

1. Goff , D., *The Official Magazine Of The Ice Cream Alliance*, Derby, UK, **55**(7), 294 (2004).
2. Fellows, P.J., *Food Processing Technology: Principles And Practice*, Taylor and Francis, LLC, New York (2002).
3. Regand, A., Goff, D., and Baker, K., *J. Food Sc.i*, **70**(9), 552 (2005).
4. Van Sleevwen, RM.T., and Lee,T.C., *Annual Meeting And Food Expo-Anaheim, California*, Session 91F, Refrigerated And Frozen Food (2002)
5. Peleg, M., and Normand,D., *J. Food Sci.*, **50**, 822 (1985).
6. Suzuki, T., and Yano, T., *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3131 (1990).
7. Suzuki, T., and Yano, T., *Agric. Biol.Chem.*, **55**, 697 (1991).
8. Hagiwara, T., Kumagai, H., and Nakamura, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1663, (1997).
9. Martino, M. N.,and Zaritsky, N.E., *J. Food Sci.*, **53**, 1631 (1988).
10. Miyawaki, O., Abe, T., and Yano, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 953 (1992).
11. Sutton, R.L., Lips, A., and Piccirillo, G., *J.Food Sci.*, **61**, 748 (1996).
12. Shibuichi, S., Onda, T., Satoh, N., and Tsuji, K., *J. Phys. Chem.*, **100**, 19512 (1996).
13. Bevilacqua. A.E., and Zaritszky, N. E., *J. Food Sci.*, **47**, 1410 (1982).
14. Fennema, O. R., Powrie, W.D., and Marth, E.H., *Low-Temperature Preservation Of Foods And living Matter.*, Marcel Dekker, Newyork , 150 (1973).
15. Franks, F., *Biophysics and Biochemistry At Low Temperatures*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (1985).