

## 解 説

# 熱処理によって生じる生体物質 - 水系の多重準安定状態

滝沢俊治

(受取日: 2003年7月29日, 受理日: 2003年8月5日)

## Multiple Metastable States of Biomaterial-Water Systems Produced by Heat Treatments

Toshiharu Takizawa

(Received July 29, 2003; Accepted August 5, 2003)

Heat treatments produce the ubiquitous endothermic transitions in the differential scanning calorimetry of biological substance-water systems. The transitions appear at the temperature ranges from 20 to 60 depending on both of the temperature and the duration of the heat treatments. The transition enthalpies per gram of water in the sample lie between 2 to 20 J g<sup>-1</sup> for the systems containing not so much water. These ubiquitous phenomena are explained as a memory effect of various kinds of weak hydrogen bonds formed in the biological substance-water system by the heat treatments.

### 1. はじめに

酵素分子は水溶液中でとる折りたたまれた立体構造により特定の基質反応を触媒し、また水に分散したり脂質分子は二分子膜の集合体を形成して膜たんぱく質とともに細胞の物質輸送を支えている。このように、たんぱく質、複合脂質さらには核酸などの生体分子は水溶液中で特異的な立体構造をとることによって化学反応の触媒、物質輸送、情報伝達などの機能を担っている。これらの分子がつくる多様な構造は溶液の温度やpH等を変えると、たんぱく質では変性、リン脂質ではゲル-液晶転移、核酸ではヘリックス-コイル転移などとよばれる各種の相転移を起こす。生体分子の機能はこれらの相転移を境にして発現したり停止したりするので、これらの相転移に関しては多くの研究がおこなわれ、転移にともなう生体分子の立体構造変化の詳細が報告されている。溶媒としての水は、そのような転移において疎水性相互作用をもたらす特異的な場となっていると考えられている。<sup>1)</sup>

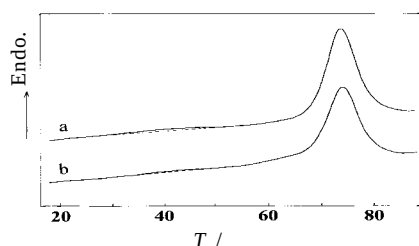
本稿では、最初にリゾチームで見出した生体物質-水系の新しいタイプの熱転移について解説する。その後の熱測定研究により類似のタイプの転移は非常に多くの生体物質-水系でみられることが分かった。<sup>2,3)</sup> この熱転移は熱処理

した系にのみ現れ、熱処理温度だけでなく処理時間にも依存する。したがって研究に際しては熱処理条件に十分な注意を払う必要がある。

### 2. リゾチーム-水系のDSC測定で見出した新たな吸熱転移

リゾチームはペニシリンの発見で有名なフレミングが鼻水から発見した溶菌酵素であり、卵白に多量に含まれている。ある種の細菌の細胞壁を作っている多糖類を分解する働きをもつ酵素であり、現在では風邪薬などにも利用されている。またリゾチームはX線構造解析によりその立体構造が初めて明らかにされた酵素たんぱく質であり、その結果に基づいて酵素作用の詳細なモデルが提唱された酵素としてもよく知られている。<sup>4)</sup> 比較的安定な酵素であり大型の結晶が精製しやすいことにより物性研究に適している。

リゾチームの過飽和水溶液を放置すると徐々に結晶が析出するが、母液が酸性の時、析出結晶は室温以下では斜方晶、室温以上では正方晶となる。<sup>5)</sup> 30年以上も前のことになるが、われわれはこの温度による多型現象に興味を持って、リゾチーム-水系の熱測定を行った。まず手始めに、含水結晶についてのDSC測定を行ったところ、70より高温域に現れる熱変性の大きな吸熱変化のほかに40から



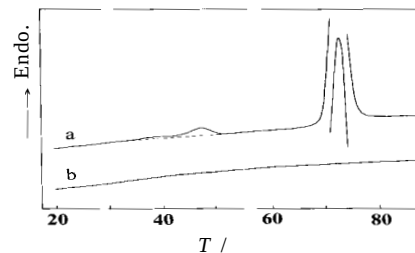
**Fig.1** DSC curves of lysozyme solution (16 wt%, pH4.65, 0.1M NaCl). (a) first scanning, (b) second scanning soon after the first scanning.

60 にかけての小さな吸熱を観測した。そこで、この微小転移に対応する熱転移をリゾチーム溶液でも観測しようと試みたが、当時のDSC装置の感度では濃厚溶液を用いても確度の高い測定をすることができなかった。しかしそのような濃厚溶液の密度の温度変化を精密に測定してリゾチームの偏比容の温度依存性を求めてみると、室温域に熱膨張の明らかな異常が観測されるので、温度変化にともなって溶液中の分子の立体構造に不連続な変化すなわち転移が起こっているのではないかと考えていた。<sup>6)</sup>

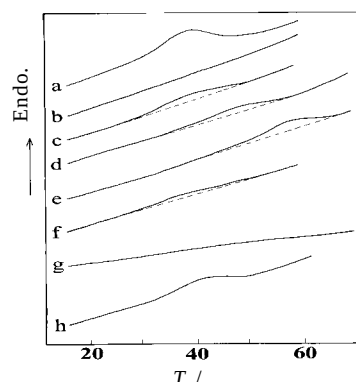
数年前に熱量計の感度と安定を向上させたのを機に、再びリゾチーム - 水系の熱測定を行った。まず手始めに、密度測定を行ったのと同じ濃度のリゾチーム濃厚溶液のDSC測定を行ってみたところ、70 以上にピークをもつ熱変性による大きい吸熱ピークとあわせて、より低温域に小さい吸熱ピークを観測した。この転移エンタルピーは変性エンタルピーの20分の1以下の値であった。さらに、第2回目の走査測定においては熱変性の吸熱ピークはほぼ再現されるのに対して、この小さな吸熱ピークはかすかに認められる程度のものでしかなかった (Fig.1)。

続いて行った凍結乾燥リゾチーム粉末に0.5M NaCl溶液を等量加えて作ったペースト状の試料のDSC測定では、Fig.2に示すように小さいけれど鋭いピークを観測した。この転移熱はリゾチーム1モル当り24 kJであり、70 以上の高温に現れる変性熱 ( $360 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) の15分の1の大きさである。この濃厚試料は昇温によって不可逆な熱変性を起こし、第2回目の昇温測定時には熱変性による大きな吸熱ピークが消失し、また着目する小さな吸熱ピークも現れない。

試みに含水率が10.2 %の凍結乾燥リゾチーム粉末についてDSC測定を行なってみたところ、この試料でも変性の大きな吸熱とは別の微小な吸熱ピークを観測した。この試料の変性温度は100 以上であるが、変性温度以下で同一試料の熱測定を繰り返してFig.3の結果を得た。すなわち、昇温測定後に試料を急冷した後直ちに開始した再測定では吸熱ピークが観測されないが、一定温度で試料を長時間保存 (熱



**Fig.2** DSC curves of lysozyme paste (prepared by addition of equal amount of 0.5M NaCl solution).



**Fig.3** DSC curves of lyophilized lysozyme powder (water content: 10.2 wt%). (a) first scanning of original powder, (b) second scanning, (c) third scanning after heat treatment at 20 for 20 h, (d) 30 for 16 h, (e) 30 for 5 days, (f) 20 for 18 h, (g) after drying, (h) after water regaining.

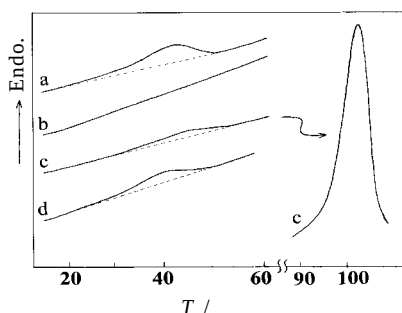
処理) してから昇温測定を行うと再び微小熱転移が現れる。このとき現れる吸熱ピークはFig.3のcからfに見られるように熱処理温度が高いほど高温域に現れる。測定fの後、ねじ蓋式の試料セルを開けて試料を真空乾燥すると曲線gに見られるように吸熱ピークは消失するが、次に最初と同じ含水率になるまで吸湿させると再び吸熱ピークが現れる。なおこれらのDSC測定はすべて  $1 \text{ min}^{-1}$  の昇温速度で行った。

凍結乾燥リゾチームの含水率を変えて転移エンタルピーの測定を行った結果をTable 1に示す。転移エンタルピーはリゾチーム分子当りと、試料が含んでいる全水分子当りの2通りで表示してある。ただしこれらの値は、各試料に対する初回のDSC走査測定のさいに得られた吸熱ピークから求めたものである。この結果からみると、適量の含水率のとき転移エンタルピーが最大になり、試料の含水率がそれよりも多くてもまた少なくとも転移エンタルピーはそれより小さい。

偏光顕微鏡観察によると凍結乾燥粉末は無定形固体であ

**Table 1** Thermodynamic parameters of the small endothermic transitions in lysozyme-water systems as a function of water content.

| Water content<br>(w/w %) | $\Delta H_p$<br>(kJ mol <sup>-1</sup> protein) | $\Delta H_w$<br>(J g <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O) |
|--------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 7                        | 9.3                                            | 8.7                                                  |
| 10                       | 20                                             | 12                                                   |
| 13                       | 25                                             | 11                                                   |
| solution                 | 11                                             | -                                                    |

**Fig. 4** DSC curves of lyophilized ribonuclease (water content: 11 wt%). (a) first scanning, (b) second scanning, (c) third scanning after heat treatment at 20 °C for a day, (d) denatured sample after heat treatment at 20 °C for a day.

り、DSCの昇温測定中に結晶転移がおこっているとは考えられない。したがってこれら種々の状態に共通して観測される微小吸熱転移現象はリゾチームの結晶多形変化に直接関係する転移ではないと考えざるを得ない。

### 3. 広範な生物物質 - 水系のDSC測定で観測した新たな吸熱転移

#### 3.1 他の球状たんぱく質

そこで試みにリゾチーム以外の球状たんぱく質の含水凍結乾燥粉末のDSC測定を行ってみたところ驚いたことに、リボヌクレアーゼ、キモトリプシン、ミオグロビン、アルブミンなど用いたすべての試料でリゾチームのときと同じ特性を持つ微小吸熱ピークが現れた。ここではリボヌクレアーゼのDSC測定結果をFig.4に示す。高温度領域に見られる鋭い吸熱ピーク(曲線c)は試料の熱変性に起因するものであるが、曲線dの結果が示しているように、試料が非可逆的に熱変性した後でも熱処理することによって微小吸熱転移を観測することができる。これは他の球状たんぱく質でも同じであり、微小熱転移を生じさせるのにたんぱく質が生体状態(native state)にある必要はないことが分かる。いくつかの球状たんぱく質の含水凍結乾燥粉末について測定した転移熱の測定結果をTable 2に示す。これらの

**Table 2** Thermodynamic parameters of the small endothermic transitions of globular protein-water systems.

|              | Water content<br>(w/w %) | $T_p$ | $\Delta H_p$<br>(kJ mol <sup>-1</sup> protein) | $\Delta H_w$<br>(J g <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O) |
|--------------|--------------------------|-------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Lysozyme     | 10.2                     | 40    | 20                                             | 12                                                   |
| Ribonuclease | 11.1                     | 42    | 11                                             | 8.9                                                  |
| Chymotrypsin | 13.5                     | 46    | 22                                             | 5.5                                                  |
| Myoglobin    | 14.9                     | 42    | 28                                             | 9                                                    |

値は長期に冷凍保存した試料について初回の昇温測定の際に得られたものであり、それらの試料が測定時まで経てきた熱履歴はさまざまであるにもかかわらず、同じ程度の大きさになっていることが注目される。

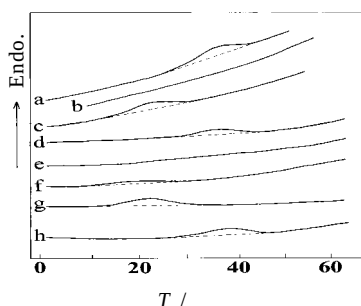
#### 3.2 馬鈴薯澱粉

球状たんぱく質以外の水を含んだ生体高分子についてもDSC測定をおこなってみると、測定したすべての試料で同様な微小の吸熱ピークが観測された。つぎに含水率20.3 wt%の馬鈴薯澱粉についてDSC測定を行った結果をFig.5に示す。リゾチームのときと同じく測定直後に引き続いて行う測定では微小吸熱ピークは観測されない(曲線b)。熱処理することによって現れるこの吸熱ピークはDSC曲線のfとgを比較すれば明らかなように処理時間とともに成長する。また高温で熱処理するほどピーク温度も高温になる傾向もリゾチームの場合と同じである。初回の昇温走査測定時に得られた含水率の異なる試料についての転移エンタルピーの値をTable 3に示す。これらの値はTable 1およびTable 2に示した球状たんぱく質のそれと大差ない。

#### 3.3 アミロースとオリゴ糖

これまでの結果はすべて生体関連高分子についてのものだった。この新しい転移は高分子 - 水系に固有のものであって低分子 - 水系では現れない転移なのであろうか。そのことを調べるために水を吸着した低分子量のアミロースおよびオリゴマルトースを用いてDSC測定を試みた。まず分子量2800のアミロースについて3種類の異なる含水率の試料を作成してDSC測定を行った。結果はFig.6にそれぞれの試料について第1回目の昇温測定曲線と引き続く第2回目の昇温測定曲線によって示したが、どの試料でも第1回目の昇温測定時には微小吸熱ピークが現れている。得られた転移エンタルピーを分子量が15000のアミロースについての結果と合わせてTable 4に示した。分子量が15000のアミロースの転移熱の大きさは先に紹介した馬鈴薯澱粉の転移熱とほぼ同じ大きさであるが、分子量が2800のアミロースではそれより小さい。

つぎに、より分子量の低いオリゴ糖についての結果を紹介する。われわれの測定では各種の低い重合度の市販試料が入手できるマルトース系のオリゴマーを用い、重合度が



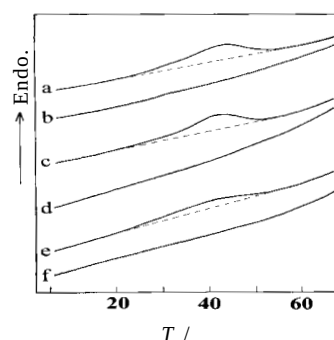
**Fig.5** DSC curves of starch (water content: 20.3 wt%). (a) first scanning of original powder, (b) second scanning, (c) third scanning after heat treatment at 4 °C for 6 days, (d) 20 °C for 20 h, (e) 30 °C for 3 days, (f) 4 °C for 18 h, (g) 4 °C for 5 days, (h) 20 °C for 3 days.

**Table 3** Transition enthalpies of starch-water systems as a function of water content.

| Water content (w/w %)  | $\Delta H_w$ (J g <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O) |
|------------------------|---------------------------------------------------|
| 20.3 (fully wet)       | 2.5                                               |
| 14.6 (original sample) | 18.5                                              |
| 7.8 (partially dried)  | 20.0                                              |

2から7までの、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースについて測定を行った。その結果、重合度2のマルトースでは転移ピークは観測されなかったが、重合度が3以上のすべてのオリゴマーで転移ピークを観測することができた。ここでは重合度が3のマルトトリオースと4のマルトテトラオースの結果を紹介する。

Fig.7には含水率4.4%のマルトトリオースについて熱処理条件をかえてDSC測定を行った結果を示してある。この系では60 °C付近にガラス転移があり、DSC測定ではベースラインの大きい跳びとして観測される。一旦試料をガラス転移温度以上にしたあと急冷し、直ちに昇温測定を行ったときのDSC曲線にはガラス転移を示す跳びがみられるだけであるが(曲線e)、急冷試料を20 °Cで5日間保存(熱処理)すると50 °C付近に小さな吸熱ピークが現れる(曲線b)。つぎに4 °Cで15日間熱処理すると、40 °Cに幅広いピークを持つ曲線dが得られる。この両曲線では微少吸熱ピークがガラス転移以下に現れているが、試料の含水率や熱処理の条件によっては、Fig.8の曲線cにみられるように微少熱転移がガラス転移温度以上に現れることもある。このFig.8はマルトテトラオースに水蒸気を吸着させて作った3種の含水試料について、それぞれ初回に行ったDSC測定の結果であ



**Fig.6** DSC curves of amylose (Mw = 2800). (a),(b) first and second scanning of the sample with water content of 9.5 wt%, (c),(d) water content: 11.7 wt%, (e),(f) water content: 13.8 wt%.

**Table 4** Transition enthalpies of amylose-water systems.

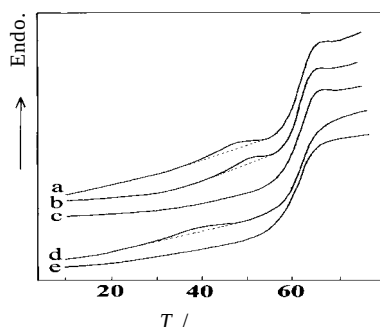
| Molecular weight | Water content (w/w %) | $\Delta H_w$ (J g <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O) |
|------------------|-----------------------|---------------------------------------------------|
| 2800             | 9.5                   | 13                                                |
|                  | 11.7                  | 13                                                |
|                  | 13.8                  | 5.1                                               |
|                  | 21.6                  | 0.7                                               |
| 15000            | 9.4                   | 21                                                |
|                  | 13.0                  | 23                                                |

る。図にみられるように、水分率が4.7%と7.8%の試料ではそれぞれの試料のガラス転移温度以下に微少吸熱ピークが現れるが、水分率が9.4%になると微少吸熱ピークは、曲線cのようにガラス転移温度以上に現れる。このことからみて、DSCで観測される熱転移をもたらしうなオリゴ糖 - 水系の分子運動は、ガラス転移をもたらしうオリゴ糖の熱運動とは独立した運動であると考えられる。

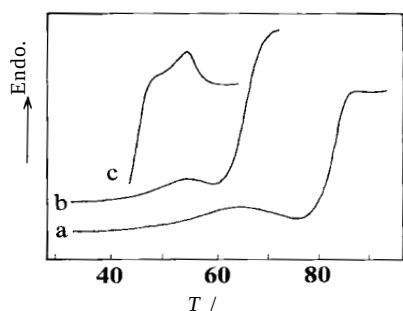
#### 3.4 ゼラチン<sup>7,8)</sup>

これまでみてきた球状たんぱく質や澱粉の場合、微少吸熱ピークは含水率が大きくなると急激に小さくなりDSCでの観測が困難になる。しかしゼラチンのようにゼリー状になる生体物質ではかなり高い含水率の試料でもこの吸熱ピークが現れる。ここでは市販のゼラチンについての測定結果を紹介する。

はじめに、ゼラチンとしては含水率が比較的低い試料(15 wt%)について、熱処理条件を変えて測定した結果をFig.9に示す。この試料でもさきに紹介したオリゴ糖のときと同じく、40 °C付近に明瞭なガラス転移が現れる。急冷した試料のDSC曲線にはこのガラス転移以外には何の異常もないが(曲線a)、ガラス転移以上の高温から急冷した試料



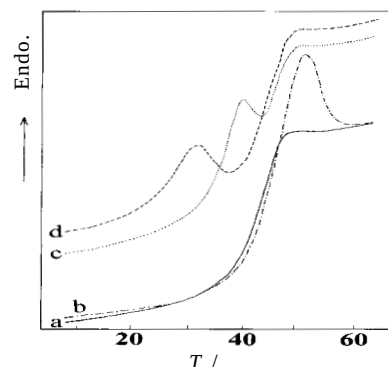
**Fig.7** DSC curves of maltotriose (water content: 4.4 wt%). (a) first scanning of original powder, (b) second scanning after heat treatment at 20 for 5 days, (c) third scanning soon after the second scanning, (d) fourth scanning after heat treatment at 4 for 15 h, (e) fifth scanning soon after the fourth scanning.



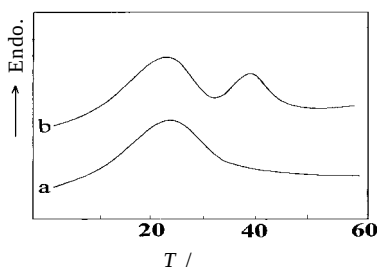
**Fig.8** Water content dependence of the endothermic peaks in DSC curves of maltotetraose-water system heat treated at 30. Water content; (a) 4.7 wt%, (b) 7.8 wt%, (c) 9.4 wt%.

を10で19時間熱処理すると30付近に鋭い吸熱ピークが現れる(曲線d)。20で27時間熱処理した試料ではこのピークが転移の中間温度付近に現れる(曲線c)。さらに高温の45で3時間の熱処理をすると、非常に明瞭なピークがすでに試料のガラス転移の完了している50以上の高温に現れる(曲線b)。

次に乾燥ゼラチンに等重量の水を加えた試料(含水率50 wt%)のゼラチン-水系の測定結果をFig.10に示す。この系では20から30の間で固体状のゲルから液体状のゾルへ状態が変化する。ゾル状態の試料を急冷した後ただちにDSC測定を開始すると、曲線aに見られるようにゾル-ゲル転移に対応する一つの幅の広い大きい吸熱ピークが現れるだけであるが、ゾル状態から急冷した試料を30で22



**Fig.9** Effect of heat treatments on DSC curves of a gelatin-water system (15 wt% water). Heat treatment; (a) quenched sample, (b) 45 / 3 h, (c) 20 / 27 h, (d) 10 / 19 h.



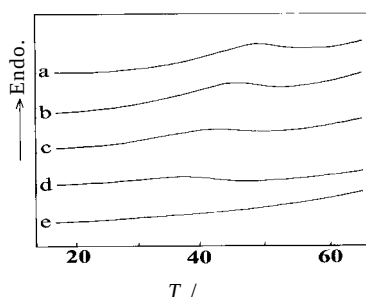
**Fig.10** DSC curves of gelatin-water system (1/1 wt/wt). (a) quenched sample from 100, (b) heat treated at 30 for 22 h.

時間熱処理すると、ゾル-ゲル転移が完了した高温域に明瞭なピークが現れる。つぎに詳しく述べるように、この新たに現れる吸熱ピークもこれまでに紹介してきたのと同じ傾向の熱処理依存特性を持っている。

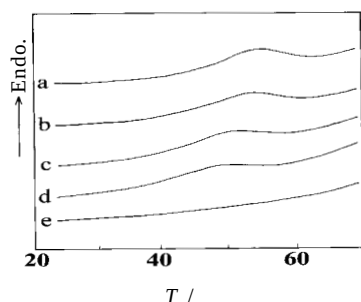
#### 4. 新たな転移の熱処理温度および熱処理時間依存性

初期のわれわれの研究目標はできるだけ多くの生体関連物質-水系についてこの新たな吸熱ピークの有無とそれぞれの系での特質を調べることであった。その結果これまでに紹介した以外にも食品を含むほとんどすべての生体関連物質-水系で新たな転移を観測することができた。

次の課題は、この転移ピークを生み出す熱処理条件についてより系統的に研究することである。これまでに見てきたように、転移ピークの出現温度及びその大きさは熱処理の温度と時間の双方によって決まるので、この二つの熱処理パラメータを分離して系統的に調べなければならない。



**Fig.11** Effect of periods of heat treatments at 20 on the endothermic peak temperature of a lysozyme-water system (water content: 13.8 wt%). (a) 239 h, (b) 96 h, (c) 29 h, (d) 2 h, (e) 0 h.



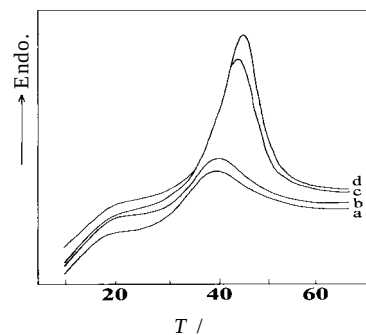
**Fig.12** Effect of periods of heat treatments at 30 on the endothermic peak temperature of a lysozyme-water system (water content: 13.8 wt%). (a) 166 h, (b) 97 h, (c) 43 h, (d) 3 h, (e) 0 h.

以下に、リゾチーム - 水系およびゼラチン - 水系において、熱処理時間を変えて行った熱測定の結果を紹介する。この結果は同一試料を用いた長期間にわたる一連の測定により得たものであるが、熱処理条件が同じ場合に得られるDSC曲線の再現性は大変良い。

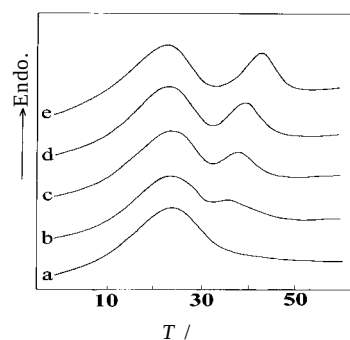
はじめに、含水率13.8 wt%の凍結乾燥リゾチーム粉末を20 および30 で熱処理するとき、熱処理時間をパラメータとして得られるDSC曲線をそれぞれFig.11およびFig.12に示す。図から分るように、同一温度での熱処理では、熱処理時間が長くなるにつれて、ピーク温度の位置が高温側に移動するとともに、その面積（転移エンタルピー）も増えている。Fig.11とFig.12から熱処理温度の効果を比較してみると、30 では比較的短時間の熱処理により20 で長時間熱処理した場合よりも転移が高温域に現れていることが分る。これらの図から転移のピーク温度と転移エンタルピーを見積もった値をTable 5に示した。

**Table 5** Thermodynamic parameters of the novel endothermic transition of a lysozyme-water system (13.8 wt% H<sub>2</sub>O).

| Heat Treatment         | $T_p$<br>(°C) | $\Delta H_p$<br>(kJ mol <sup>-1</sup> lysozyme) | $\Delta H_w$<br>(J g <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O) |
|------------------------|---------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Virgin Sample          | 47            | 23.1                                            | 10.1                                                 |
| With no heat treatment | -             | 0                                               | 0                                                    |
| 20 / 29 h              | 40            | 8.7                                             | 3.8                                                  |
| 96                     | 46            | 11.6                                            | 5.1                                                  |
| 239                    | 48            | 12.2                                            | 5.3                                                  |
| 30 / 43 h              | 50            | 11.4                                            | 5.0                                                  |
| 97                     | 53            | 12.6                                            | 5.5                                                  |
| 166                    | 54            | 14.2                                            | 6.2                                                  |



**Fig.13** Effect of periods of heat treatments at 30 on the DSC curves of gelatin-water system (26.5 wt% water). (a) 1 h, (b) 2 h, (c) 20 h, (d) 40 h.



**Fig.14** Effect of periods of heat treatments at 30 on the DSC curves of gelatin-water system (50 wt% water). (a) 0 h, (b) 1 h, (c) 3 h, (d) 22 h, (e) 169 h.

続いてゼラチンの場合の熱処理時間依存性を見てみよう。Fig.13には、30 で熱処理時間を変えて熱処理した含水率

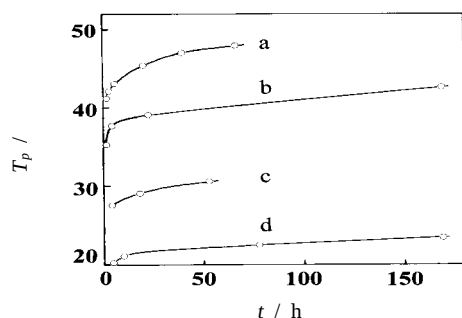


Fig.15 Peak temperatures of the endothermic transitions versus periods of heat treatments in Fig.13 and Fig.14. (a) gelatin with 26.5 wt% H<sub>2</sub>O/30 °C, (b) 50 wt%/30 °C, (c) 50 wt%/20 °C, (d) 50 wt%/10 °C.

26.5 % のゼラチン - 水系の DSC 曲線を示した。この試料では 1 時間の熱処理により、明瞭な転移が 20 °C 以下にあるガラス転移温度より高温に現れ（曲線 a），熱処理時間が長くなると転移は鋭くなるとともに転移ピークが徐々に高温側に移動する（曲線 b-d）。Fig.14 は含水率 50 % の試料（ゼラチン：水 = 1:1）についての結果であり、その一部はすでに前章で示してある。系のゾル - ゲル転移は熱処理時間には関係なくほぼ一定の温度に現れるが、それより高温に現れる新しい転移は熱処理時間とともに成長し、そのピーク温度は熱処理時間が長くなるにしたがってより高温側に移動する。この結果を含めて、熱処理時間が長くなるにつれてより高温側に移動する転移ピーク温度の変化の様子を、2 種の含水率試料について熱処理温度を変えた場合の結果を Fig.15 にまとめて示す。

##### 5. 新たな吸熱転移と系が経た熱処理の記憶

これまでに紹介してきたように、新たな DSC 吸熱ピークは広範な生物物質 - 水系で観測されるが、いずれの系においても適当な温度で一定時間熱処理することによってのみ現れ、ピーク温度と転移エンタルピーは熱処理条件によって変化する。このようにこれらの系は系が経た熱処理の記憶を新たな熱転移の特性として保持している。しかし、時間は系に残されている記憶を喪失させる過程でもあると考えられるので、そうした熱処理（熱履歴）の記憶を DSC 測定によって読むことには限界があるであろう。それらの記憶は、熱処理温度だけでなくその持続時間にも関わるものであり、そのような複雑な記憶の解析は大変難しい。

以下では、この新たな転移の熱処理時間依存性に対して、スピングラス転移における特性緩和時間の温度依存性を非平衡の緩和過程として説明する方法を適用して考察してみる。スピングラスとは、常磁性金属に少量の磁性原子を入

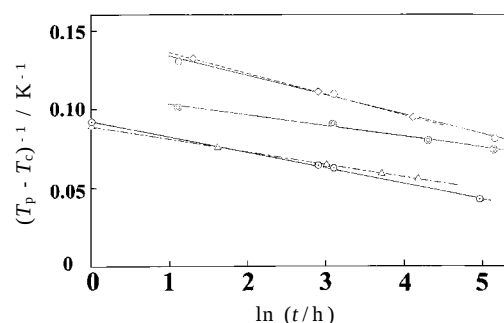


Fig.16 Vogel-Fulcher plots of the peak temperatures of the transitions. ○, △, □, ◇; gelatin with 26.5 wt% H<sub>2</sub>O, heat treated at 283 K, 293 K and 303 K, ○, △; gelatin with 50 wt% H<sub>2</sub>O, heat treated at 303 K and 313 K.

れたある種の合金が鋭いカブス状の磁化率の温度依存性を示すことを説明するために導入された、新しい秩序相の概念である。<sup>9)</sup> スピングラスにはとり得る無数の準安定状態があり、転移温度以下の低温側では温度が下がるにつれて系がとる状態の数が増えると考えられている。本稿でこれまでに紹介してきたような、熱処理時間もパラメータとして含むような多状態を示す系の解析にスピングラス物質の相転移に対する解析方法が適用できるかもしれない。

スピングラス転移の特性緩和時間  $\tau_c$  の温度依存性にも Arrhenius 則を変形した Vogel-Fulcher 則が適用できることから、スピングラス転移は非平衡現象であるとする解釈がある（ただし、最近ではスピングラスの平衡相転移説が有力になっているようである）。Vogel-Fulcher 則は次式で表される。<sup>10)</sup>

$$\tau_c = \tau_0 \exp[E_b/(T - T_0)] \quad (1)$$

ここで  $\tau_c$  は特性緩和時間、 $E_b$  は活性化の自由エネルギー、 $T_0$  は転移温度である。ここで、試料の吸熱ピーク温度を  $T_p$ 、熱処理温度を  $T_c$ 、熱処理時間を  $t$  として、試みに Fig.15 の結果を  $\ln t$  に対する  $1/(T_p - T_c)$  の形式でプロットしてみると、それぞれ Fig.16 のようにきれいな直線になる。すなわち、

$$\ln t = -1/\alpha (T_p - T_c) - \beta \quad (2)$$

(2) 式を次のように書き換え、式の物理的意味を考えてみる。

$$t = k \exp[-E/R(T_p - T_c)] \quad (3)$$

式の右辺の  $\exp[-E/R(T_p - T_c)]$  は、系が  $T_p$  の転移ピーク温度をもつ状態の存在確率に相当し、これが左辺の熱処理時間に対応している。これを次のように考えると、(3) 式の成り立つ理由が理解できる。すなわち、急冷により凍結状態にある系（クエンチ系）は、ある熱処理温度  $T_c$  で熱処理時間  $t$  だけ待つことによって  $T_p$  の転移温度を示す状態になる。

## 6. 異なる温度の熱処理によって異なるポテンシャルの谷に落ち込んだ系のおかれた準安定状態

DSCの吸熱ピークとして観測される系の転移温度は、系が受けた熱処理のさいの温度と時間の関数として(3)式で表されるが、時間は熱処理の進行度を示すパラメータであり、熱処理によって系のエネルギー状態を本質的に規定するのは熱処理温度であると考えてよいであろう。

われわれが対象とする系は、それぞれがエネルギー障壁によって隔てられた多くの谷のあるポテンシャル構造をもっていると仮定する。高温から急冷した試料はポテンシャルエネルギーの高い状態に凍結されているが、この凍結系は、熱処理温度が高いほどより多くのエネルギー障壁を越えて、より低いポテンシャルの谷に落ち着くものと考えられる。このようにして異なる温度で熱処理した系は、異なるエネルギーの谷に準安定状態として存在している。このように考えると、転移のピーク温度は熱処理温度が高いほど、より高温に現れるようになることが理解できる。

引き続き二つ以上の温度で熱処理を行ってみると、熱処理における処理温度の意味がさらに明瞭になる。Fig.17は重量比1:1のゼラチン - 水系の同一試料に対して、各種の多段階の熱処理を施したとき得られたDSC曲線である。所定の熱処理は試料セルを100 から急冷した後に行う。100ではそれ以前に経た熱履歴のメモリーをすべて失っていると考えてよい。

3.4節で示したように急冷試料のDSC曲線(曲線a)にはこの系のゾル - ゲル転移に対応する幅広い一つの吸熱ピークが現れるだけである。急冷試料を30 で熱処理した後10 で熱処理するとb2のDSC曲線が得られる。この曲線には45 の明瞭な吸熱ピークと30 以下に二つの山を持つ吸熱ピークが見られる。熱処理の順序を逆にして10 での熱処理の後に30 での熱処理を行った場合には、10 での熱処理はそれより高温の30 の処理にとって代わられるだけで、急冷試料を直接30 で熱処理したときと同じ形のDSC曲線b1が得られる。最初30 で熱処理したあと20 で熱処理した場合と、その順序を逆にした場合に得られるDSC曲線との関係も同様である(曲線c2とc1)。ただしこの場合、高温域のピーク位置がさきの場合よりも低温側にずれているのは、30 での熱処理時間が短いためである。

これらの結果から、より高温での熱処理はそれ以前により低温で行われた熱処理の効果(記憶)を失わせるが、逆に低温での熱処理はそれ以前に行われた高温での熱処理の効果を消すことはない結論される。また、複数のピークを持つ各DSC曲線の囲む面積は、ベースラインのとり方にあいまいさはあるが、急冷試料の幅広く大きい単一の吸熱ピークの面積にほぼ近いものになっているとみてよさそう

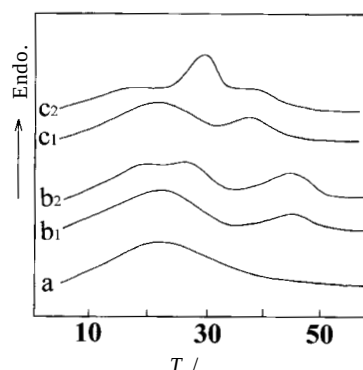


Fig.17 Effects of multi-step heat treatments on a gelatin-water system (1/1 wt/wt). (a) quenched sample, (b1) 10 / 6 h to 30 / 26 h, (b2) 30 / 116 h to 10 / 168 h, (c1) 20 / 20 h to 30 / 3 h, (c2) 30 / 3 h to 20 / 18 h.

である。このことは、試料を熱処理することによってもたらされる各種構造のもつ転移エンタルピーの総和は、急冷試料が示すゾル - ゲル転移の転移エンタルピーと同じ大きさになっていることを意味している。

## 7. 熱処理によって生成する水分子の多様な水素結合

新しい熱転移が観測できるためには系が水を含んでいること、およびその系に適切な熱処理が施されていることが必要である。熱処理することによってどのような構造が生じるのか、また微少熱転移の前後でどのような構造変化が起きるのかという点にはこれまで全く触れてこなかった。以下にその問題を考えてみよう。

この転移は水を含んだ広範な生体関連物質で共通に観測されるということだけでなく、転移温度の熱処理依存性においても共通した特徴が顕著であり、多様な物質による特異性は現れない。このことからみて、転移の主役を演じているのは水分子であると見て間違いはない。中性子線構造解析による結晶中の水分子の配位の研究が進展するにつれて、炭化水素とも弱い形で水素結合をしている水分子の存在が明らかにされている。それによると、水分子はアクセプターとしても、またドナーとしても機能し、弱い水素結合も含め最大で5個の他の分子または残基と結合できることが示されている。<sup>11)</sup>

特定の温度で長時間の熱処理を行うとき、生体分子と相互作用している水分子は、その熱処理温度での系の自由エネルギーを極小とするように、とりうる無数に近い配位空間のなかから特定の水素結合の配位を選択するのである。走査熱測定による昇温過程で、この水素結合した水分子は局所的なエネルギーの谷から解放され、これがDSC測定の

微少吸熱ピークとして観測されるのではなからうか。

以前リゾチームおよび澱粉に吸着した水のNMR シグナルを観測し、その線幅の温度依存性を測定した。室温からの温度上昇に伴って線幅は著しく狭化する。その後、温度を室温まで下げると線幅は再び広がるが、直ちにもとの線幅には回復せず数日かかってゆっくり広がる。これが室温での熱処理に対応する水分子の動的振る舞いであるが、現段階ではわれわれはこれ以上の構造的知見は持ち合わせていない。

## 8. おわりに

これまで見てきたように、一定の条件で生体物質 - 水系を熱処理すると、走査熱測定において共通する特性をもった微少吸熱ピークを観測することができる。われわれがリゾチーム - 水系の熱測定を行っていたころは、まだ熱処理における処理時間の重要性についての正しい認識がなく、吸熱ピークを観測できたりできなかったりしていた。したがって、対象を他のたんぱく質に広げた後しばらくの間は、普遍的に現れる吸熱転移の存在には半信半疑であり、測定装置の信頼性を検討してみたりした。明瞭で鋭いピークが観測された物質のなかには、薬剤や化粧品基材として広く用いられているポリビニルピロリドンのような親水性の合成高分子も含まれる。また米、餅、こんにゃくなどの食品でもこの転移が観測でき、さらに木綿、毛髪、絹のような繊維物質でも傾いたDSCの基線に乗る肩状の吸熱異常として現れる。ただし、水飴ではこのようなピークが現れなかった。多分これは、オリゴ糖を調べたときマルトースではピークが観測されなかったのと同じことで、吸熱ピークをもたらず構造の形成にはある程度以上の分子量を持つことが要求されるためであろう。

さきに考察したように、熱処理によってできる構造は、生体物質と水分子の間に生成する新たな弱い水素結合と考えられるが、このようにしてできた構造にはどのような生物学的意味があるであろうか。最初われわれは、酵素リゾチームの結晶多形についての興味から走査熱量測定を始め、本稿のはじめに紹介したリゾチームの濃厚溶液中での微少吸熱ピークを観測し、さらにそのピークが熱履歴をもつことも知ったのだが、これが溶液中のリゾチームのどのような構造変化なのか、またリゾチームの酵素活性と関係があるのか否かということは分っていない。ただし、リゾチーム溶液を熱処理するとその酵素活性が増すという古い報告があるので、そのことと関係があるかもしれない。<sup>12)</sup> しかし多くの場合、われわれが観測した新たな吸熱ピークは、系の水分含率が増大すると急激に消失することから考えると、熱処理で形成された水素結合が水分の多い生体内で残るのはむしろ特殊な場合なのかもしれない。比較的水分含有率の低い固体状試料では、熱処理の効果がはっきりしている。

この場合には、熱処理によってその物質が持つ機能に大きな変化が生まれる可能性がある。

## 文 献

- 1) F. Franks, *Biophysics of Water*, John Wiley & Sons, New York (1982).
- 2) T. Takizawa and Y. Nakata, *Thermochimica Acta* **352-353**, 223 (2000).
- 3) T. Takizawa and Y. Nakata, *Rept. Prog. Polym. Phys. Japan* **43**, 819 (2000).
- 4) D. C. Phillips, *Scientific American* **251**, 78 (1966).
- 5) P. Jolles and J. Berthou, *FEBS Letters* **23**, 212 (1972).
- 6) T. Takizawa and S. Hayashi, *Gunma J. Lib. Arts Sci.* **19**, 99 (1985).
- 7) T. Takizawa and Y. Nakata, 17th IUPAC Conference on Chemical Thermodynamics, Book of Abstracts, p.175 (2002).
- 8) 滝沢俊治, 中田吉郎, 第38回熱測定討論会予稿集, p.164 (2002).
- 9) 高山 一, スピングラス, 丸善 (1991).
- 10) M. H. Cohen and G. S. Grest, *Phys. Rev.* **B20**, 1077 (1979).
- 11) G. R. Desiraju and T. Steiner, *The weak hydrogen bond*, Oxford Univ. press, New York, p.415 (1999).
- 12) K. Hayashi, K. Hamaguchi and M. Funatsu, *J. Biochem.* **53**, 374 (1960).

## 要 旨

リゾチーム - 水系を適当な条件で熱処理すると示差走査熱量測定の際に新たな吸熱転移が観測される。転移ピークは熱処理温度が高いほど高温に現れ、熱処理時間を長くするとピーク面積が成長するとともにピーク温度も徐々に高温側に移動する。類似の特性をもつ熱転移はその他の広範な生体高分子 - 水系でも共通してほぼ同じ温度域にみられ、さらにオリゴ糖のような分子量の小さい生体関連物質の水系でも観測できる。これらの生体物質と水との間には熱処理条件によって異なる様々な様式の水素結合が生成し、その結果生成した準安定構造が試料の経た熱処理の記憶として保存されていると考え、新たに観測された熱転移現象を統一的に説明できる。

滝沢俊治 Toshiharu Takizawa  
群馬大学 名誉教授,  
e-mail: toshitaki@jcom.home.ne.jp  
研究テーマ: 生体物質の熱測定, 物理教育  
趣味: 絵画鑑賞, 野菜栽培