

誘電分光法による部分的に氷結した ゼラチン水溶液の水のダイナミクス

佐々木海渡, 宮本陽介, 宮良政彦, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋

〒 259-1292

神奈川県平塚市北金目 4-1-1

東海大学 理学部 物理学科

E-mail: naoki-ko@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

(2012 年 9 月 21 日受付; 2012 年 11 月 30 日受理)

Dynamics of Water in Partially Crystallized Gelatin-Water Mixture Studied by Dielectric Relaxation Spectroscopy

by

Kaito SASAKI, Yosuke MIYAMOTO, Masahiko MIYARA, Rio KITA, Naoki
SHINYASHIKI and Shin YAGIHARA

Department of Physics, Tokai University,

4-1-1 KitaKaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292, Japan

E-mail: naoki-ko@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

(Received on Sept. 21, 2012; accepted on Nov. 30, 2012)

Abstract

Dielectric Relaxation Spectroscopy (DRS) measurement has been performed for partially crystallized gelatin water mixture in temperatures between -50 and 25 °C and a frequency range from 1 MHz to 50 GHz with a gelatin concentration up to 40 wt% to study the dynamics of water in the protein aqueous solutions under ice melting. Below the melting temperature, T_m , part of water crystallizes and another part of water, uncrystallized water (UCW), remains in a liquid state with the gelatin in an uncrystallized phase. Mobility of water is controlled by dilution with ice melting during increase in temperature. The relaxation strength, relaxation time, and relaxation time distribution of UCW changes dramatically at T_m . We estimate the gelatin concentration in uncrystallized phase $C_{g,UCP}$ at temperatures below T_m . $C_{g,UCP}$ is higher than the prepared concentration and it is a key factor in the dynamics of UCW

1 緒言

生体中において、水に次いで多量に含まれているのはタンパク質である。それは生体を構成する主な高分子の一つであり、水の中に存在することではじめてその特有な構造を保ち、機能を発現する [1, 2]。多くのタンパク質はその構造や機能に関して数多くの研究がなされているが、水溶液中におけるタンパク質の分子運動については解明されていない点が多い。

これまでに、合成高分子水溶液やタンパク質水溶液について、断熱熱量計や示差走査型熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry : DSC) などの熱分析により、水の凍結及び融解が盛んに研究されてきた [3, 4]。これらの測定は、一定のプログラムに従って試料温度をコントロールしながら、温度や構造の変化に伴う熱の出入りを測定する手法である。その簡便さから、水を含んだ物質の 0°C 以下の温度域での物性研究に頻繁に用いられている。様々な高分子水溶液で観測される水の融解エンタルピー ΔH は、溶液中のすべての水が凍結した場合と比較して小さい値を持つ。これは融解温度 T_m 以下でも凍ることなく、液体状態を維持した不凍水と呼ばれる水が存在するためであると考えられる。我々はこのような状態を「部分的な凍結」と呼んでいる [5, 6]。

しかし、これらの熱的な測定手法では分子運動のメカニズムを詳細に議論することができない。そこで、我々は幅広い観測時間窓を持つ誘電分光法 (Dielectric Relaxation Spectroscopy : DRS) を用い、タンパク質の一つであるゼラチンを溶質として用いた水溶液の融解と、それに伴う水のダイナミクスの変化を観測した。DRS は測定試料のインピーダンスから複素誘電率 ϵ^* の周波数依存性を得る方法である。

これまでの DRS による広い温度・濃度範囲における様々な高分子溶液の研究 [5–10] から、溶媒の凝固点 T_c 以下で溶液中の溶媒が凍結した場合でも、一部は低温でも凍ることなく、液相を保ったままであることが確かめられた。また、様々な濃度の部分的に氷結したゼラチン水溶液の広帯域誘電分光測定を 10 MHz~3 GHz の周波数域、113~298 K の温度域で行ったところ、不凍水 (I 緩和)、氷 (II 緩和)、水和したタンパク質 (III 緩和) の 3 つの緩和が観測された。特に不凍水の緩和は、その緩和時間の温度依存性が、低温で凍結しない様々な水溶液で観測された不凍水のものとよく似ていることがこれまでに分かっている [11]。

本研究では、ゼラチンを溶質として用い、ゼラチン濃度 10~40 wt% の範囲で水溶液を調製し、凍結する温度を含む $-50\sim 25^{\circ}\text{C}$ の温度範囲と 1 MHz~50 GHz の周波数域で DRS 測定を行った。DRS 測定では、およそ $0.1\ \mu\text{s}\sim 3\ \text{ps}$ に対応する広域な時間スケールでの分子運動を、同じ温度で同時に観測することができる。比較のため、 $-55\sim 25^{\circ}\text{C}$ の温度範囲において昇温速度 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で DSC による熱分析を行った。

2 実験

溶質として使用したゼラチンは、PM Biomedicals 製、豚皮由来のものであり、ブルーム強度 251 bloom, 分子量約 60,000 g/mol である。一般にゼラチンなどの生体高分子は電解質高分子であるため、その水溶液は溶液に含まれるイオンによる直流電気伝導成分 (dc) や電極分極の寄与により分子運動に起因する緩和が隠れてしまう。それらを軽減するために、ゼラチンに対して脱イオン処理を施した。まず、ゲル化させた濃度 10 wt% 程度のゼラチン水溶液を 5 mm 角の立方体に裁断し、純水に浸す。ここで用いた純水は、蒸留後、純水製造器 (Millipore, SimSimplicity UV) を用い、紫外線による滅菌や活性炭フィルターによるろ過、イオン交換樹脂による脱イオン処理などの精製を施したものであり、比抵抗は $18.3\ \text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ であった。この処理によってゼラチンゲル中のイオンは純水中に分散され、除去さ

表 1: 様々なゼラチン濃度 C_g のゼラチン水溶液の DSC による熱分析によって得られた融解ピークのオンセット温度, ピーク温度, 融解熱, 及び不凍溶液相のゼラチン濃度。

C_g wt%	$T_{m,onset}$ °C	$T_{m,peak}$ °C	ΔH J/g	$C_{g,UCP}[\Delta H]$ wt%
10	-3.9	-1.0	271	54
20	-4.5	-1.3	215	57
30	-5.0	-2.3	164	59
40	-6.6	-3.3	71	51

れる。脱イオン処理は5日間行われ, 最初の1日は数時間おきに5回以上, 2日目以降は1日最低2回水換えを繰り返した。その後, 水分を除去するために凍結乾燥を行った。最後に凍結乾燥したゼラチンを上記のものと同一純水に溶解し, ゼラチン水溶液試料を調整した。試料はゼラチン濃度 C_g が 10, 20, 30, 40 wt% となるようにそれぞれ混合した後, 40~60 °C に加熱し, 濃度が均一となるよう最大約1時間マグネティクスタラーで撹拌した。

DRS 測定は, Impedance/Material Analyzer (IMA)(Agilent Technologies, E4991A) と Network Analyzer(NA)(Agilent Technologies, N5230C) の2つの装置を使用し, 昇温過程で行った。IMA での測定には, Quatro Cryosystem(Novocontrol) を使用し, 測定温度範囲 -50~25 °C の間で ± 0.01 °C の範囲に温度を安定させた。NA での測定には循環式恒温槽を用い, -10~25 °C の間で ± 0.05 °C の範囲に温度を安定させた。IMA での測定には直径 2.6 mm の極板を極板間隔 1.3 mm に設定した平行平板型電極を用い, NA での測定には接触式の同軸開放端電極 (Agilent Technologies, 85070E) を用いた。

また, 示差走査型熱量計 (DSC)(Perkin Elmer, DSC7) により, ゼラチン水溶液の融解に伴う熱の出入りを -55~25 °C の範囲で測定した。熱量計は予めベンゼンおよび 1, 2 ジクロロエタンを用い, 測定と同じ昇温・降温速度で校正を行った。測定は窒素雰囲気下で行い, アルミニウム容器に封入された 10 mg 程度の試料を, 25 °C から -60 °C まで 5 °C/min の冷却速度で冷却し, -60 °C で 10 分間放置した後, 5 °C/min の昇温速度で 25 °C まで加熱しながら測定した。

水は過冷却状態になりやすく, 結晶化温度は冷却速度によって大きく変化するため包括的な議論が困難である。そのため, 本研究では昇温過程における測定結果についてのみ議論する。

3 結果

図 1 に DSC での熱測定の結果を示す。すべての濃度のゼラチン水溶液で, 溶液中の水の融解による吸熱ピークが -6~0 °C の間で見られる。また, 濃度の増加に伴い, 融解熱 ΔH の減少, 融解のオンセット温度 $T_{m,onset}$ およびピーク温度 $T_{m,peak}$ の低温側へのシフトが確認できる。30 wt% より高濃度では明らかに低温結晶化が見られる。また, 測定された融解熱 ΔH から, 以下の式 (1) により不凍溶液相の濃度 $C_{g,UCP}$ を算出することができる。

$$C_{g,UCP} = \frac{C_g}{1 - \frac{\Delta H}{333}} \quad (1)$$

ここでは, 純水 1 g の融解熱 333 J/g を用いて, ゼラチン水溶液の融解熱量から凍っていない水の量を算出し, $C_{g,UCP}$ を見積もった。熱測定によって得られたそれらの数値を表 1 に示す。

図 2 に, 30 wt%ゼラチン水溶液の, -50~25 °C の温度で測定された複素誘電率の実部 (比誘電率) ϵ'

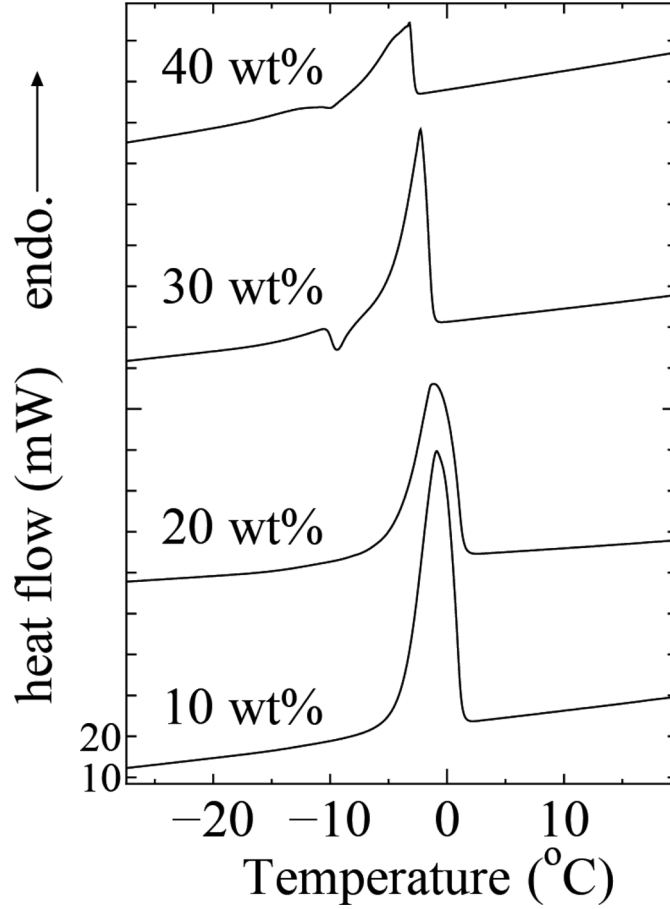


図 1: 10～40 wt%ゼラチン水溶液の熱流の温度依存性。

および虚部 (誘電損失) ε'' を示す。図 2 から, 最も低い $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ では, 10 MHz 付近にピークを持つ緩和を一つ確認することができる。この緩和は温度上昇とともに高周波側へシフトし, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ では 10 GHz 付近にピークを持つ緩和へと続く。また, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ を境に緩和が極端に変化していることがわかる。

複素誘電率の虚部のピークがはっきりと識別できる緩和を I 緩和として, Cole-Cole の式でフィットした。また, ピークを識別することができないが, それ無しでは複素誘電率をうまく表現できないと考えられる I_b 緩和, さらに, 緩和強度が 100 程度の大きさを持ち, 測定周波数範囲の更に低周波側に存在する水の緩和 [11] を II 緩和として, それぞれ Cole-Cole の式 [12] でフィットした。この 3 つの緩和に加え, 直流電気伝導成分 (dc) を仮定して式 (2) の様に足しあわせてカーブフィットを行うことで, 測定で得られた複素誘電率の周波数依存性をうまく記述することができた。ただし, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上の温度域では II 緩和は消失し, 測定周波数より低周波側に存在する電極分極として Cole-Cole の式により緩和を 1 つ仮定した。

$$\varepsilon^* = \varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta\varepsilon_I}{1 + (i\omega\tau_I)^{\beta_I}} + \frac{\Delta\varepsilon_{I_b}}{1 + (i\omega\tau_{I_b})^{\beta_{I_b}}} + \frac{\Delta\varepsilon_{II}}{1 + (i\omega\tau_{II})^{\beta_{II}}} + \frac{\sigma}{i\omega\varepsilon_0} \quad (2)$$

ここで τ は緩和時間で, 緩和をもたらしている分子運動の時間スケールを示す。 $\Delta\varepsilon$ は緩和強度で, 緩和に寄与する双極子モーメントの大きさや単位体積当たりの双極子モーメントの数, 温度などで決まる。 $\beta (0 < \beta \leq 1)$ は緩和の対称的な広がりを表すパラメータであり, β の値が小さいほど広がった緩和となる。 ε_{∞} は測定周波数よりも光学領域に近い高い周波数での誘電率, i は虚数単位, σ は電気伝導度, ω は角周波数である。図 3 に $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ における 30 wt%ゼラチン水溶液の複素誘電率を, 式 (2) で得た曲

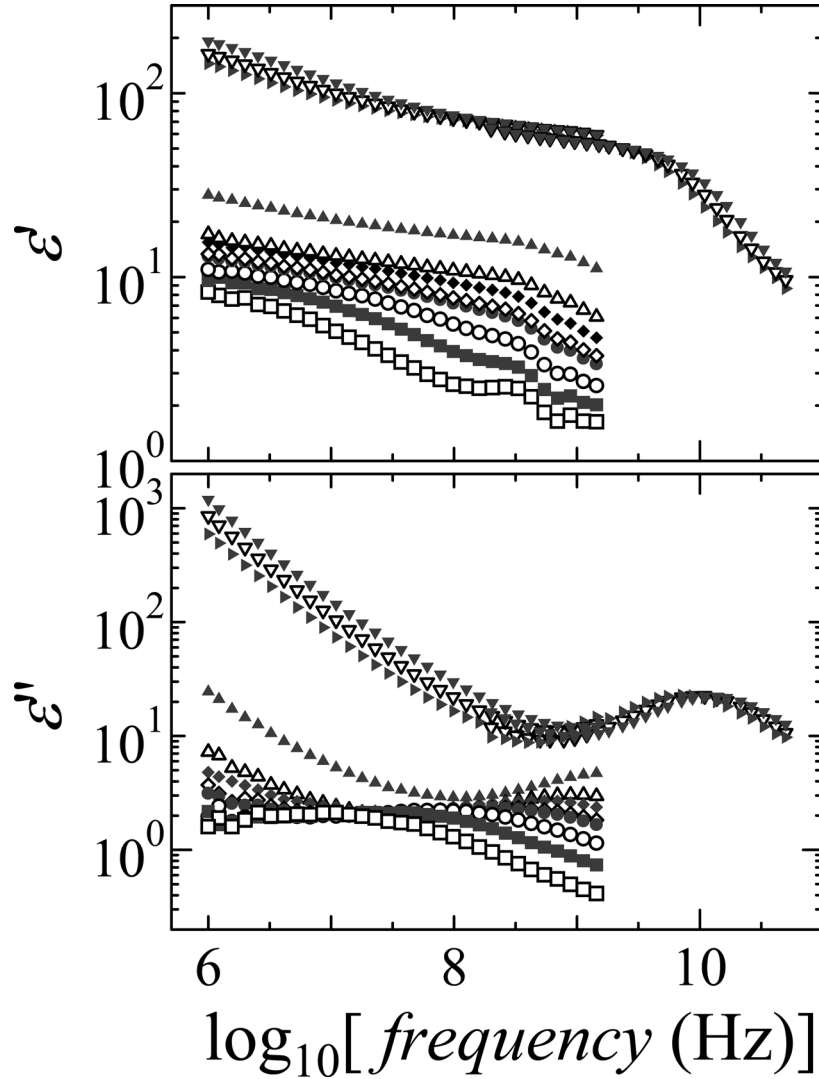


図 2: 30 wt%ゼラチン水溶液の, $-50 \sim 25$ $^{\circ}\text{C}$ における複素誘電率の実部 ϵ' および虚部 ϵ'' の周波数依存性。プロットのマークの形はそれぞれ $\square$ -50 $^{\circ}\text{C}$, $\blacksquare$ -40 $^{\circ}\text{C}$, $\circ$ -30 $^{\circ}\text{C}$, $\bullet$ -20 $^{\circ}\text{C}$, $\diamond$ -16 $^{\circ}\text{C}$, $\blacklozenge$ -12 $^{\circ}\text{C}$, $\triangle$ -8 $^{\circ}\text{C}$, $\blacktriangle$ -4 $^{\circ}\text{C}$, $\blacktriangleright$ 5 $^{\circ}\text{C}$, ∇ 15 $^{\circ}\text{C}$, $\blacktriangledown$ 25 $^{\circ}\text{C}$ の各温度を表している。

線と共に一例として示す。

カーブフィットをすべての濃度, 温度に対して行い, それぞれの濃度での緩和時間 τ , 緩和強度 $\Delta\epsilon$, 緩和の対象な広がりを表すパラメータ β を得た。I 緩和の τ , $\Delta\epsilon$, β の温度依存性を図 4 に示す。図 4(b) に示した直線は, 濃度ごとに 1 $^{\circ}\text{C}$ 以上のプロットから最小二乗法によって描いた。I_b 緩和は I 緩和に比べ最大 9 % 程度の強度しかなく, 複素誘電率の虚部でのピークを識別することができないためここでは議論しない。また, II 緩和は, 複素誘電率の虚部でのピークが測定周波数より低周波側に存在するため, 同様に議論しない。図 4 から, すべての緩和パラメータは 0 $^{\circ}\text{C}$ 以上の範囲ではゆるやかに変化している事がわかる。しかし, 0 $^{\circ}\text{C}$ から -10 $^{\circ}\text{C}$ の範囲では劇的に変化し, それ以下の温度ではまたゆるやかな変化となる。

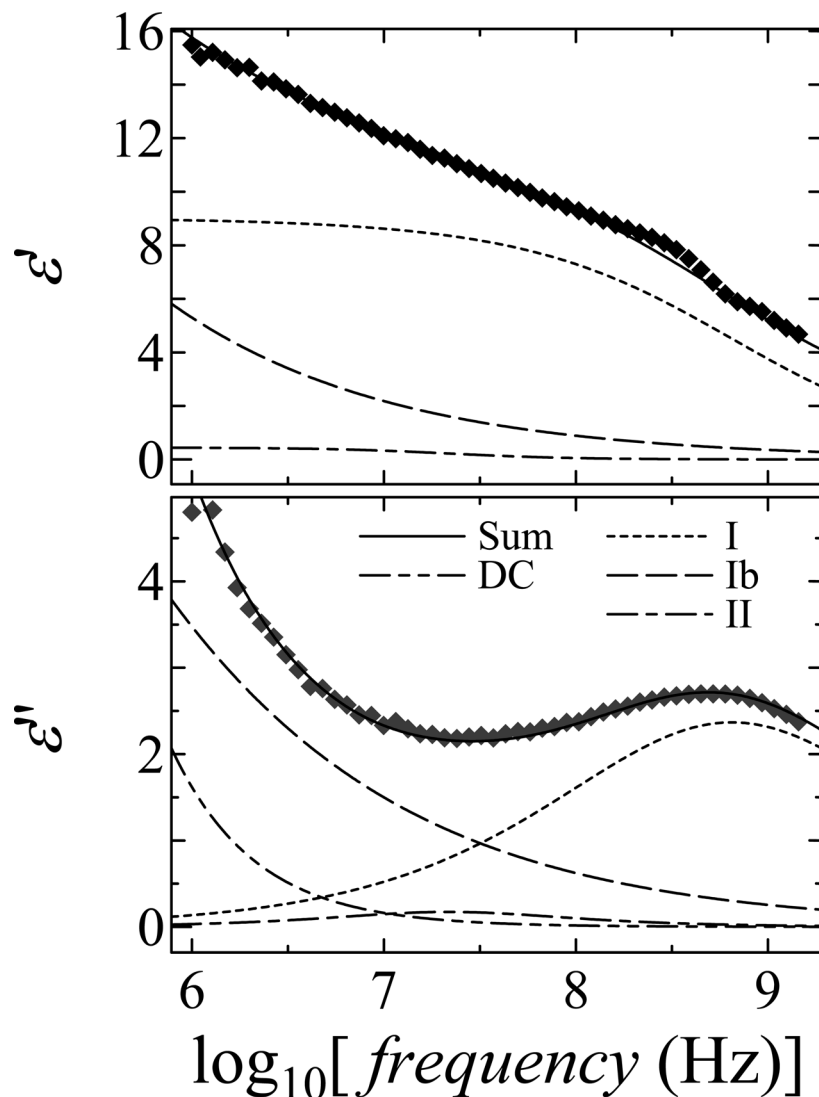


図 3: 30 wt%, $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ における複素誘電率の実部 ϵ' および虚部 ϵ'' の周波数依存性。実線 (Sum) は式 (1) で得られる緩和曲線であり, 点線は I 緩和を, 1 点破線は Ib 緩和を, 破線は II 緩和を, 2 点破線は dc 成分を示す。

4 考察

図 4(a) から, I 緩和の緩和時間は $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近から急激に減少し, 融点以上で水の緩和とよく一致する [13, 14]。また, ゼラチン水溶液のガラス転移に関する研究で見られた, 低温でも凍らない水の緩和時間の温度依存性とよく一致する [11]。このことから, ゼラチン水溶液で観測された I 緩和は, 低温でも結晶化しない不凍水のダイナミクスに由来するものであることが分かる。この不凍水が低温でも氷結しないのは, 水分子がゼラチン近傍に存在することや, それらに囲まれた状態にあることで氷の結晶構造を形成できないためであると推測される [5]。

一般に緩和強度は, 温度の低下に対して凍結やガラス転移などが起こらない限り増大する。例えば高分子水溶液中の水の緩和の緩和強度は, 結晶化温度を境に大きく減少する [5]。したがって $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下で

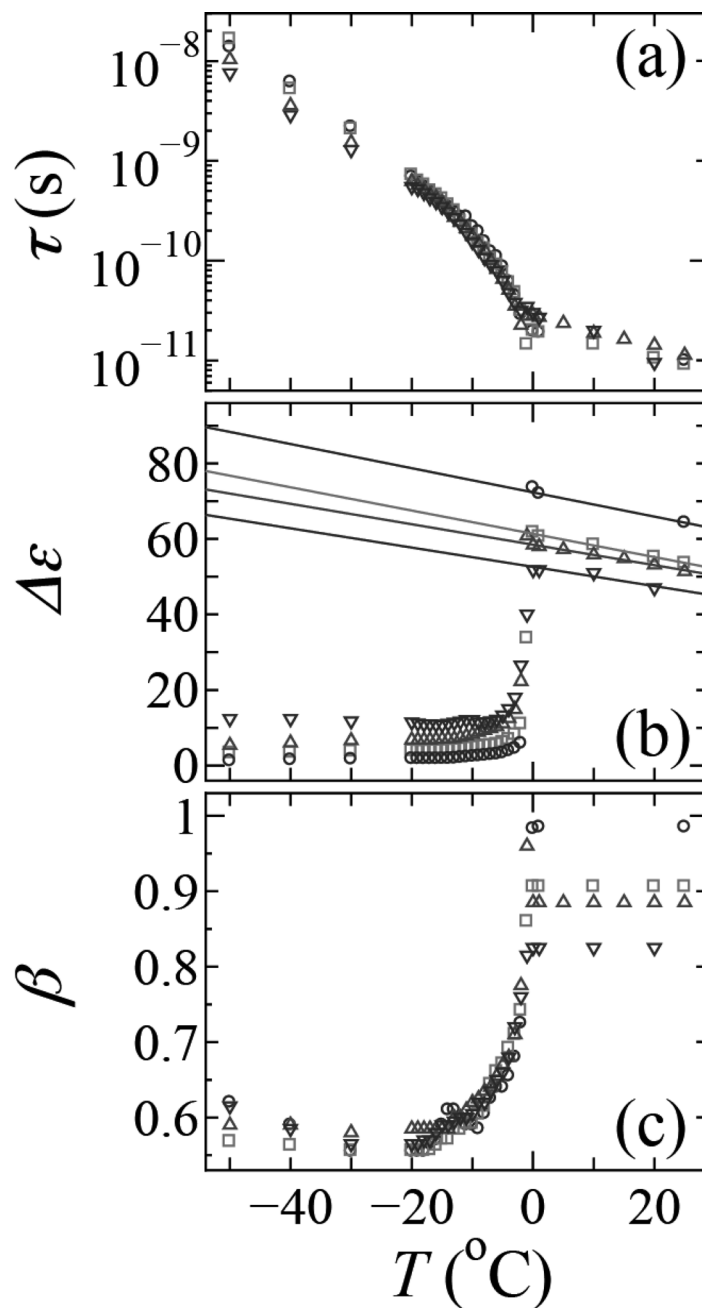


図 4: 10～40 wt%ゼラチン水溶液で観測された水の緩和の緩和時間 τ (a), 緩和強度 $\Delta\epsilon$ (b), 緩和の形を表すパラメータ β (c) の温度依存性。○ は 10 wt%, □ は 20 wt%, △ は 30 wt%, ▽ は 40 wt% をそれぞれ示す。また, (b) の直線は 1 °C 以上でのプロットから最小二乗法により描いた。

の温度上昇に伴う緩和強度の上昇は, 氷の融解による不凍水量の増加によるものと解釈できる。

緩和強度が図 4(b) に示す直線のように温度の変化に対して一次関数的に変化すると仮定すれば, 以下の式 (3) を用いることで, T_m 以下の任意の濃度における不凍溶液相のゼラチン濃度 $C_{g,UCP}$ を算出することができる。

$$C_{g,UCP} = \frac{C_g}{C_g + (100 - C_g) \frac{\Delta\epsilon_l}{\Delta\epsilon_{Iall}}} \quad (3)$$

ここで, C_g は調製したゼラチン濃度, $\Delta\epsilon_{Iall}$ はそれぞれの温度ですべての水が凍らなかつたと仮定し

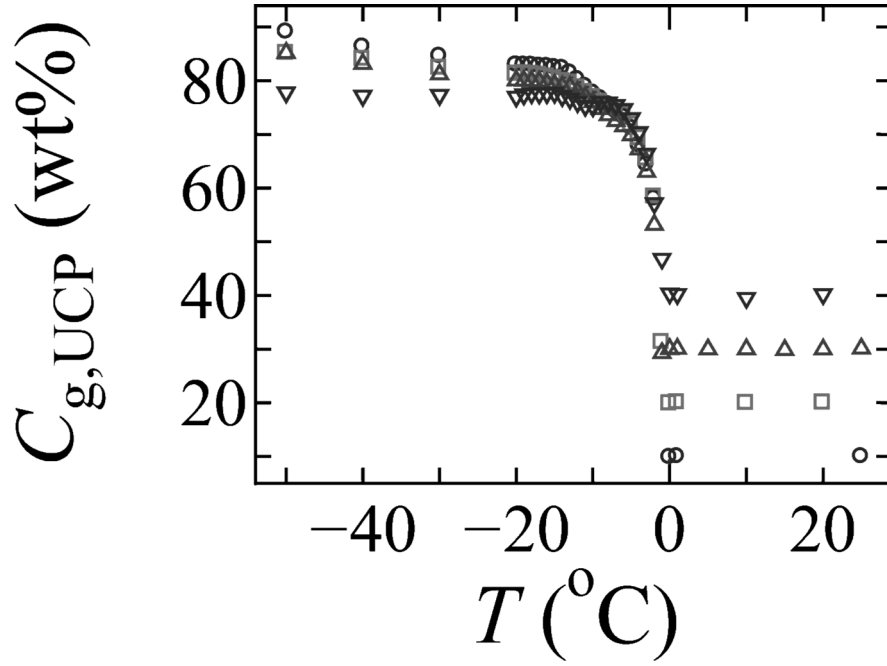


図 5: 不凍溶液層のゼラチン濃度 $C_{g,UCP}$ と温度の関係。○ は 10 wt%, □ は 20 wt%, △ は 30 wt%, ▽ は 40 wt% のデータを示す。

た場合の I 緩和の緩和強度である。温度低下に対する誘電率の増大は、極性液体の緩和強度と注目する分子の永久双極子モーメントの関係を示すカークウツの式 [15] から予測される。現象論的には、それは温度低下に伴い熱運動による擾乱が少なくなること起因する分極率の増大で説明できる。カークウツの式によれば、緩和強度は温度の逆数に対して比例する。しかし、図 4(b) に示された緩和強度の温度依存性を見ると、1 °C 以上の測定温度範囲では、I 緩和の緩和強度が温度の変化に対して一次関数でよく記述されることが分かる。もし、緩和強度が本研究の測定温度範囲において温度の逆数に比例したとしても、式 (3) で仮定している $\Delta\epsilon_{Iall}$ と比べて最大でも 6 % の違いしかない。さらに、算出された $\Delta\epsilon_{Iall}$ を用いて式 (3) で計算される $C_{g,UCP}$ との違い 1 % 以下である。また、カークウツの式によれば、緩和強度は双極子密度の減少に伴い減少する。一般に、水は結晶化の際に密度が減少することが知られており、10 wt% の高分子水溶液の場合、水溶液中のすべての水が凍った場合でも、密度の減少は大きく見積もっても 9 % 程度である。つまり、式 (3) では、密度変化に起因する誤差 9 % 程度で $C_{g,UCP}$ を計算することができると言える。式 (3) を用いて得られた $C_{g,UCP}$ の温度依存性を図 5 に示す。図から、十分低い温度で $C_{g,UCP}$ は 75~90 wt% 程度であることがわかる。温度の上昇に伴って $C_{g,UCP}$ は -10 °C 付近から低下し始め、0 °C 以上で C_g と一致する。

$C_{g,UCP}$ と τ , β の関係を図 6 に示す。溶液中の水の融解による不凍溶液相の濃度低下に伴い、 τ , β はいずれも黒の×で示した 0.2 °C での純粋な水のプロット [13] に近づいていることが分かる。また、 β には 0 °C 以上の温度域で明らかな C_g 依存性が認められるが (図 4(c)), 0 °C 以下の温度域では図 6(b) に示されるように、凍結による濃縮によって C_g に対する依存性が消滅する。以上のことから、不凍溶液相の水のダイナミクスは、 $C_{g,UCP}$ によって決定されることが考えられる。これらを部分的に凍結した合成高分子水溶液中の不凍水のダイナミクス [5] と比較すると、上記の特徴が非常によく似ていることがわかる。

次に -40 °C における $\Delta\epsilon_I$ のゼラチン濃度依存性を図 7 に示す。図から、ゼラチンの濃度が増大する

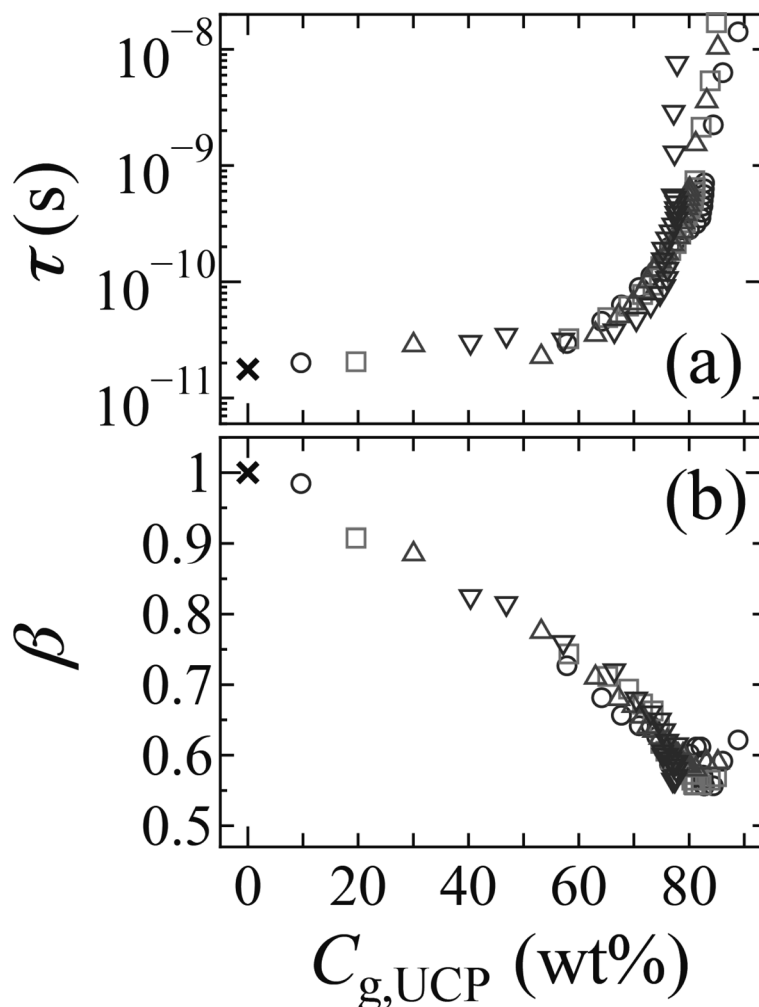


図 6: 緩和時間 (a) および緩和の形を表すパラメータ β (b) と $C_{g,UCP}$ 依存性。○ は 10 wt%, □ は 20 wt%, △ は 30 wt%, ▽ は 40 wt%。× は 0.2 °C における純水のデータ [13] を示す。

と不凍水量も増大することがわかり、不凍水はゼラチンを包み込むように存在していると推測される。また、すでに報告されているように [11], 不凍水の緩和強度がゼラチン濃度に比例しない様子も見て取れる。図中の実線は、濃度 10, 20, 30 wt% 水溶液のプロットに対し、原点を通るような直線を最小二乗法により描いたものであるが、40 wt% 水溶液のプロットは直線から大きく外れていることが分かる。次に、 -40 °C での $C_{g,UCP}$ を用いて、式 (4) から算出したゼラチン 1 g あたりの不凍水量を UCW/gelatin として C_g との関係を図 8 に示した。

$$\text{UCW/gelatin} = \frac{100}{C_{g,UCP}} - 1 \quad (4)$$

図 8 から、ゼラチン 1 g が保持することのできる不凍水の量は、10~30 wt% 水溶液まではほぼ一定か、わずかにゼラチン濃度と共に増加しているが、40 wt% 水溶液ではそれ以下の濃度の水溶液と比べて明らかに不凍水の量が多いことが分かる。

さらに、DSC で得られた $C_{g,UCP}$ と、DRS 測定で得られた -40 °C における $C_{g,UCP}$ の C_g 依存性を図 9 に示す。図から、それぞれの測定法で得られた $C_{g,UCP}$ のばらつきが大きいこと、DSC と DRS の測定で得られた $C_{g,UCP}$ が大きく異なることが分かる。DSC 測定では $C_{g,UCP}$ が 50~60 wt% となった

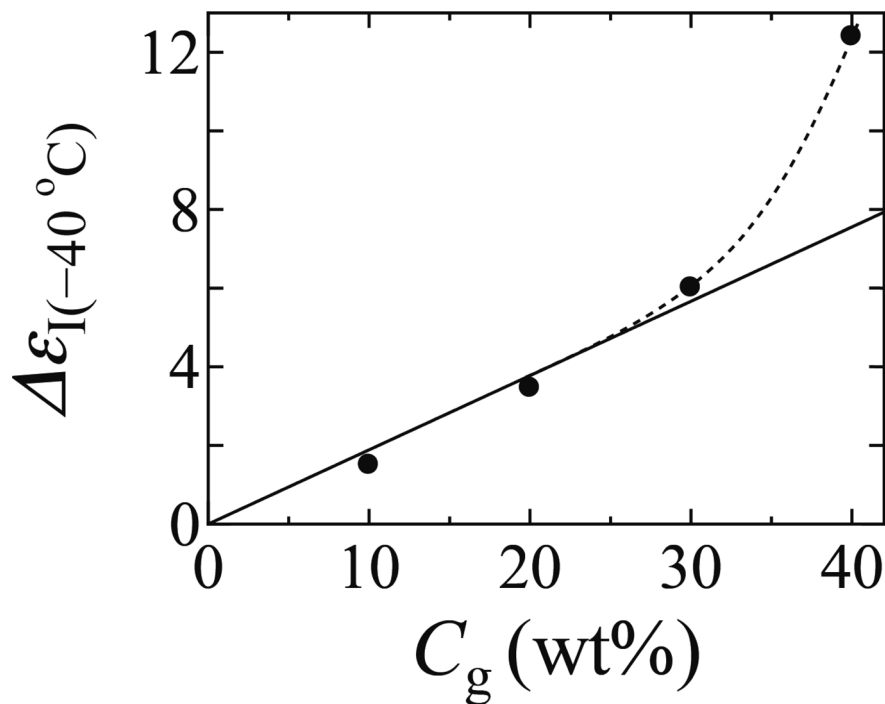


図 7: $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ における I 緩和の緩和強度と C_g の関係。図中の直線は 10～30 wt% のプロットから最小二乗法により描いたものであり、破線はグラフを見やすくするために描いたものである。

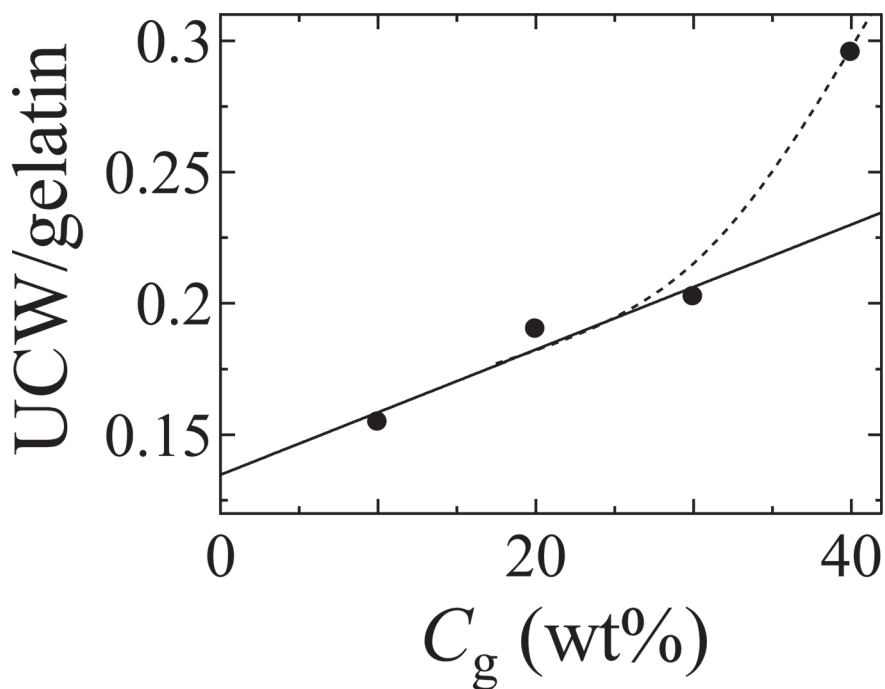


図 8: $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ におけるゼラチン 1 g あたりの不凍水量と C_g の関係。図中の直線は 10～30 wt% のプロットから最小二乗法により引いた。また、破線はグラフを見やすくするために引いた。

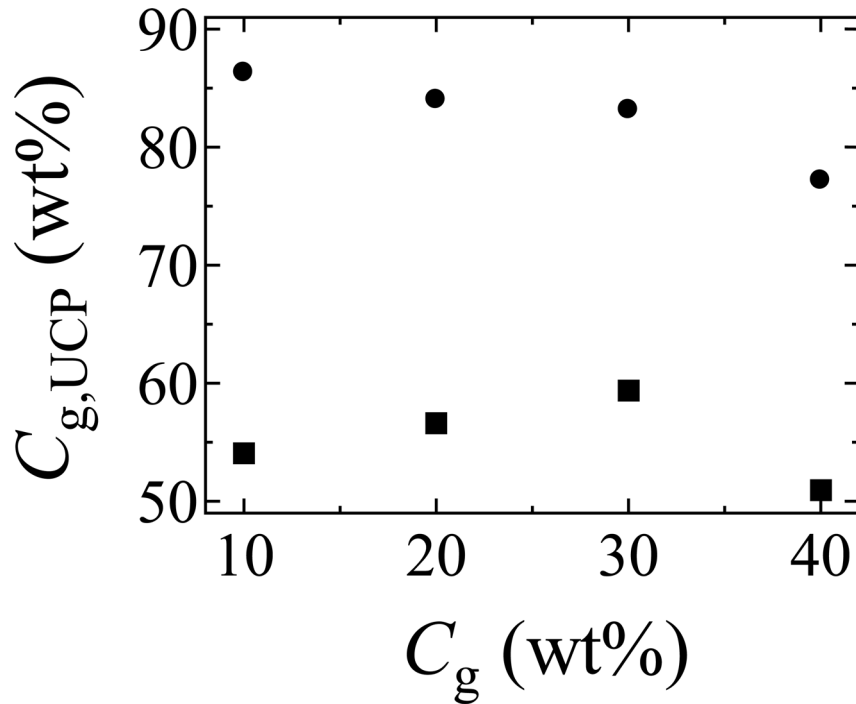


図 9: DRS, DSC それぞれの手法で得られた $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ における $C_{g,UCP}$ の C_g 依存性。●のプロットが DRS で得られた $C_{g,UCP}$ を示し, ■は DSC で得られた $C_{g,UCP}$ を示す。

が, DRS 測定では 75~90 wt% となり一致しない。この原因として先ず考えられるのが, 測定における試料の温度履歴が大きく異なるという点である。DRS 測定では, 測定前に最低 20 分程度は温度の安定化を行う。一方で DSC 測定では, ある一定の速さで連続的に温度を変えて測定を行う。そのため, DSC での熱分析では, 冷却過程において氷の結晶が十分に成長することができず, 不凍溶液相の濃度が低くなると考えられる。

図 7, 8, 9 から 2 つの解釈が考えられる。ひとつは, 単位量あたりのゼラチンが保持することのできる不凍水の量が, ばらつきの範囲で一定であるという解釈である。もうひとつは, 単位量のゼラチンが保持することのできる不凍水の量が, ゼラチン濃度と共に増加するという解釈である。前者に対しては, ゼラチン近傍のある決まった範囲に存在する水分子が氷の結晶構造を形成することができない, というモデルが考えられる。一方, 後者に対して図 10 に示すようなモデルを考えた。図は二本のゼラチンのトリプルヘリックスを示しており, ゼラチン濃度が高くなるにつれてその間隔が狭くなっていることを表している。ここでは簡単のためトリプルヘリックス構造のみを描いているが, 実際のゼラチン水溶液にはランダムコイル状態のゼラチンも存在する。ただし, 濃度増加に伴って隣り合う溶質同士の距離が小さくなるという描像に関しては, 両者は同じである。ペプチド鎖には周囲の水分子を結晶化させない能力があるとし, それに加えてさらに 2 つの規則を設定する。ひとつは, ゼラチンが水分子を凍結させない能力が, ゼラチン分子鎖から離れるにつれある関数に従って減少していくという規則である。もう一つは, 溶液中の水分子は, 複数のゼラチン分子鎖の「凍結させない能力」の和が閾値を超えた場合に凍結しないという規則である。そうすることで, 不凍水量がタンパク質濃度に対して比例しないモデルを考えることができる。

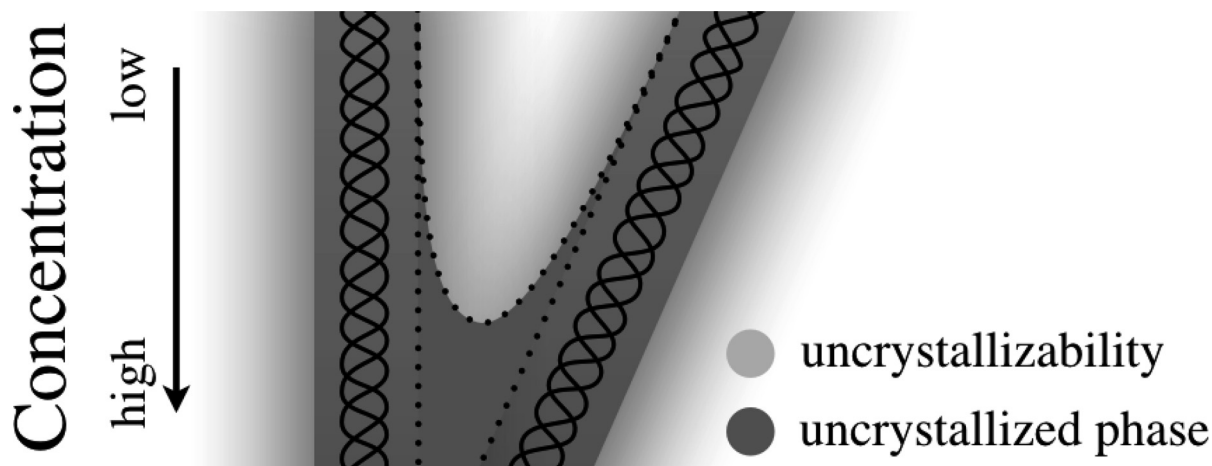


図 10: 部分的な凍結状態のゼラチン水溶液のモデル。図では上から下に向けて濃度が濃い状態の水溶液を示しており、雲のように見える領域は、その色の濃さがゼラチンが周りの水を凍らせない能力の大きさを示し、境界が明確なグレーで示されているのが不凍溶液層である。

5 まとめ

周波数範囲 10 MHz~50 GHz, 温度範囲 $-50\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 濃度範囲 10~40 wt%のゼラチン水溶液の昇温過程による DRS 及び DSC 測定により, 氷の融解に伴う水のダイナミクスの変化を観測した。その結果を以下にまとめる。

- 1) タンパク質水溶液においても, 合成高分子水溶液と同じように $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下でも凍らない水が存在することが DRS 測定で確かめられた。
- 2) 液体としての水の緩和強度の温度依存性から, $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下での不凍溶液相のゼラチン濃度は 75~90 wt%であることがわかった。
- 3) 水のダイナミクスは, 部分的な凍結による不凍溶液相のゼラチン濃度の増加によって決定されることがわかった。
- 4) DRS 測定と DSC 測定では, 算出された不凍溶液相のゼラチン濃度が異なった。

現段階では測定結果のばらつきも大きく, また他のタンパク質水溶液での報告がないため明確には言えないが, DRS 測定から, 誘電緩和パラメータを通してダイナミクスや不凍水量などの情報を得ることができることが明らかになった。本研究の結果から, それぞれの濃度におけるゼラチン 1 g あたりの不凍水量について, ばらつきの範囲で一定であるというモデルと, ゼラチン濃度とともに増加するという二つのモデルを考えた。今後, データのばらつきを評価して, 様々なタンパク質水溶液の測定を行う。また, 図 9 に示されたモデルを元に数値計算を行うことで, どのような高分子-水間での相互作用が不凍水の存在に対して支配的であるのかを解明することができるだろう。

謝辞

本研究の一部は, JSPS 科研費 22540420, 東海大学プロジェクト研究「水構造プロジェクト」, 科学

技術振興機構研究成果展開事業・先端計測分析技術プログラムの支援を得て遂行された。関係各位に感謝する。

参考文献

- [1] D. Ringe and G. A. Petsko, *The ‘glass transition’ in protein dynamics: what it is, why it occurs, and how to exploit it*, Biophys. Chem., **105** (2003), 667 – 680.
- [2] D. Beece, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, D. Good, M. C. Marden, L. Reinisch, A. H. Reynolds, L. B. Sorensen and K. T. Yue, *Solvent viscosity and protein dynamics*. Biochem., **19** (1980), 5147 – 5157.
- [3] F. Franks, “Water, A Comprehensive Treatise” Plenum Press: New York, 1982.
- [4] D. Simatos, G. Blond: “In The Glassy State in Foods”, Nottingham University Press, Nottingham, U.K., 1993.
- [5] N. Shinyashiki, M. Shimomura, T. Ushiyama, T. Miyagawa and S. Yagihara, *Dynamics of water in partially crystallized polymer/water mixtures studied by dielectric spectroscopy*. J. Phys. Chem. B, **111** (2007), 10079 – 10087.
- [6] A. Panagopoulou, A. Kyritsis, R. Sabater i Serra, J.L. Gómez Ribelles, N. Shinyashiki and P. Pissis, *Glass transition and dynamics in BSA-water mixtures over wide ranges of composition studied by thermal and dielectric techniques*, Biochim. Biophys. Acta, **1814** (2011), 1984 – 1996.
- [7] N. Shinyashiki, M. Asano, M. Shimomura, S. Sudo, R. Kita and S. Yagihara, *Dynamics of polymer and glass transition in partially crystallized polymer solution studied by dielectric spectroscopy*. J. Biomater. Sci. Polym. Ed., **21** (2010), 1937 – 1946.
- [8] N. Shinyashiki, W. Yamamoto, A. Yokoyama, T. Yoshinari, S. Yagihara, R. Kita, K. L. Ngai and S. Capaccioli, *Glass transitions in aqueous solutions of protein (bovine serum albumin)*, J. Phys. Chem. B, **113** (2009), 14448 – 14456.
- [9] A. Yokoyama, H. Ishikawa, M. Shinohara, N. Shinyashiki, S. Yagihara, and Y. Hayashi. *Broadband Dielectric Spectroscopy of Albumin-Water Mixture in Frozen State*, AIP Conf. Proc. **832** (2005), 163 – 166.
- [10] A. Panagopoulou, A. Kyritsis, A. M. Aravantinou, D. Nanopoulos, R. Sabater i Serra, J. L. Gómez Ribelles, N. Shinyashiki and P. Pissis, *Glass Transition and Dynamics in Lysozyme – Water Mixtures Over Wide Ranges of Composition*, Food Biophys., **6** (2011), 199 – 209.
- [11] K. Sasaki, K. Hujita, Y. Hikita, W. Yamamoto, N. Kuriyama, R. Kita, N. Shinyashiki and S. Yagihara, *Dynamics of Partially Crystallized Gelatin-Water Mixture by Broadband Dielectric Spectroscopy*, Proc. School Sci. Tokai Univ, **47** (2012), 89 – 101.
- [12] K. S. Cole and R. H. Cole, *Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics*, J. Chem. Phys., **9** (1941), 341 – 351.
- [13] R. Buchner, J. Barthel and J. Stauber, *The dielectric relaxation of water between 0 °C and 35 °C*, Chem. Phys. Lett., **306** (1999), 57 – 63.
- [14] U. Kaatz, *Complex permittivity of water as a function of frequency and temperature*. J. Chem. Eng. Data, **34** (1989), 371 – 374.
- [15] J. G. Kirkwood, *The Dielectric Polarization of Polar Liquids*, J. Chem. Phys., **7** (1939), 911 – 919.