

低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], Vol. 46, No. 1, 1~5, 2000

## [原著論文]

## 水溶液系における過冷却解消温度について

東京水産大学食品生産学科

君塚 道史, 鈴木 徹, 萩原 知明, 高井 陸雄

## Supercooling Ability of Solution

Norihiro KIMIDUKA, Toru SUZUKI, Tomoaki HAGIWARA, Rikuo TAKAI

Tokyo University of Fisheries, 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477

For different concentrate solutions of several kinds of solute, the homogeneous nucleation temperature  $T_h$  and the equilibrium melting point  $T_m$  were determined by using so-called emulsion method. The obtained  $T_h$  and  $T_m$  for each solute dropped with concentration increasing, however, the relationship between both temperatures showed good linearity with different gradients depending on the kind of solute. That is, the relations could be expressed by an equation  $T_h = a \cdot T_m$  for each solute, of which the gradients  $a$  are considered to represent the degree of supercooling ability. The correlation between the  $a$  values for each solute and the chemical structure or hydrate characters was examined. As a result, the dynamic hydration number of solute was found to have a good correlation with the  $a$  value representing supercooling ability.

(Received December 30, 1999; Accepted June 27, 2000)

## 1. 緒 言

低温における“水溶液”からの氷結晶の生成は、生命活動や食品産業にとって重要な意味を持つ。生物にとって細胞内水溶液からの氷結晶の析出は、生物細胞の死を決定づける。近年利用されている生物細胞や組織の凍結保存技術は氷結晶の生成を抑制するための技術であるといっても過言ではない。また近年多くの高等生物に見いだされたAFP (Anti-freeze protein)<sup>1)</sup>は、溶液中で氷結晶の生成を特殊なメカニズムで抑制する点に多くの注目が集まった。さらに、食品中の氷結晶の生成、成長は、食品

の品質に重大な影響を及ぼすことは言うまでもなく、近年では食品中の溶液の結晶化を抑制するガラス化技術<sup>2)</sup>に注目が寄せられている。いずれの場合においても‘水溶液’からの氷結晶析出現象の理解、特に過冷却状態からの核生成の理解が重要な鍵となっている。しかし、純水に比べ‘水溶液’の冷却過程における過冷却状態の安定性とその破壊である氷核生成に関しては報告の数も少なく、メカニズムについては今日でも未知な部分が多い。

MacKenzieら<sup>3)</sup>は、水を直径1~10 $\mu$ mの微小液滴状態(w/o型エマルジョン)にすることで不均質核生成の影響を排除し、水の均質核生成温度が-40 $^{\circ}$ Cである事を実験的に明らかにした。すなわちこの温度が純水の過冷却の下限となる。さらにMacKenzieら<sup>3), 4)</sup>及びFranks<sup>5)</sup>は、このマイクロエマルジョン法から、各種水溶液の平衡凝固点 $T_m$ と均質核生成

[Key words: Ice, Supercooling, Dynamic hydration number, Emulsion, Homogeneous nucleation; 氷, 過冷却, 動的水和数, エマルジョン, 均質核生成]

(2)

温度 $T_h$ の間に経験的な一般則として、高濃度領域まで次式の直線関係が成立する事を示した。

$$T_h = a \cdot T_m$$

ここで、比例定数 $a$ は、言わばその溶液の‘過冷却能’を意味し、値が大きければ大きいほどその溶液が、過冷却を起こし易い事を示している。彼等の結果によると、 $a$ の値は2から4の間であり溶質分子の違いにより異なってくる。傾向としては分子量が高くなるに従い $a$ も大きくなる傾向が得られている。また低分子の溶質に限れば、糖及びglycerolといった水の分子構造に合いやすいものは値が大きく、尿素や塩などでは小さくなっている。MacKenzie<sup>3)</sup>らは、 $T_h$ が濃度増加とともに大きくなる理由として、水分子の拡散に要する活性化エネルギーの増加、クラスターと溶液の固液界面における界面エネルギーの増大などを挙げている。またPruppacher<sup>6)</sup>は、水溶液において溶質は水分子の配置構造に影響を及ぼし、0℃から2℃の過冷却の増加をもたらすとの考えを示している。しかしながら、 $T_h$ 、 $T_m$ 両者の直線関係の理論的根拠については不明とされている。

本研究では、水溶液の過冷却能が、溶質のいかなる性質によって決まるかを探ることを目的とした。すなわちMacKenzie<sup>3)</sup>と同様の手法を用い、数種の水溶液の過冷却能 $a$ 値を実験的に求め、溶質の化学的構造や水和特性と過冷却能 $a$ 値との関係を詳細に検討した。

## 2. 実 験

### 水溶液の調製

水溶液の調製において、Sucrose, NaCl, Ethanediol, 1,3-Propanediol, 1,4-Butanediolは和光純薬工業社製特級または1級試薬を、またGlucoseはSigma社製試薬をそのまま使用した。これらの水溶液の調製にはすべてHPLC用蒸留水（和光純薬工業社製）を使用した。各水溶液の濃度に関しては、重量モル濃度で塩水溶液 1.0, 1.5, 2.0 [mol/kg], アルコール水溶液2.0, 3.0, 4.0, 6.0 [mol/kg], 単糖1.0, 1.5, 2.0 [mol/kg], 二糖水溶液1.0, 1.5, 1.75 [mol/kg]とした。

### 水溶液の乳化

エマルジョンの調製には、MacKenzie<sup>3)</sup>と同様の方法に従い、シリコンオイルにTSF451-10（東芝シリコン）、界面活性剤にはソルビタントリステアレート SPAN65（SIGMA製）を用いた。前記、調製された水溶液をSPAN65が5 wt%入ったシリコンオイル5 [ml] にシリンジを利用して、等量になるまで滴下しながらホモジナイザーの回転数1000rpmで5分間攪拌しエマルジョンを調製した。さらに、調製された各試料のエマルジョン粒径分布を光学顕微鏡下で予め調べた。

### $T_m$ と $T_h$ の測定

$T_m$ と $T_h$ の測定には、島津熱流束型示差走査熱量計DSC-50を用いた。本研究ではエマルジョン状態にした試料2 mg ( $\pm 0.1$ mg) を時間を置かずセルに封入し、室温から冷却速度 $-3$  [°C/min] で $-70$ °Cまで冷却し、ただちに昇温速度 $+3$  [°C/min] で約 $20$ °Cまで昇温する操作を行った。

## 3. 結果及び考察

一般的に純水の均質核生成温度はその水溶液の液滴サイズにも依存し $10\mu\text{m}$ 程度で、ほぼ均質核生成温度の下限である $-40$ °C付近に達することが知られている<sup>7)</sup>。Fig. 1は、蒸留水をエマルジョンにした試料の光学顕微鏡写真像であるが、およそ $10\mu\text{m}$ 程度の粒径となっている事がわかる。ここには示さないが、他の試料でも同様な状態になっている事が確認された。すなわち、溶液の濃度、溶質の種類によらず、エマルジョンサイズは一定で、均質核生成に



Fig. 1. W/O型エマルジョン（蒸留水）の光学顕微鏡写真

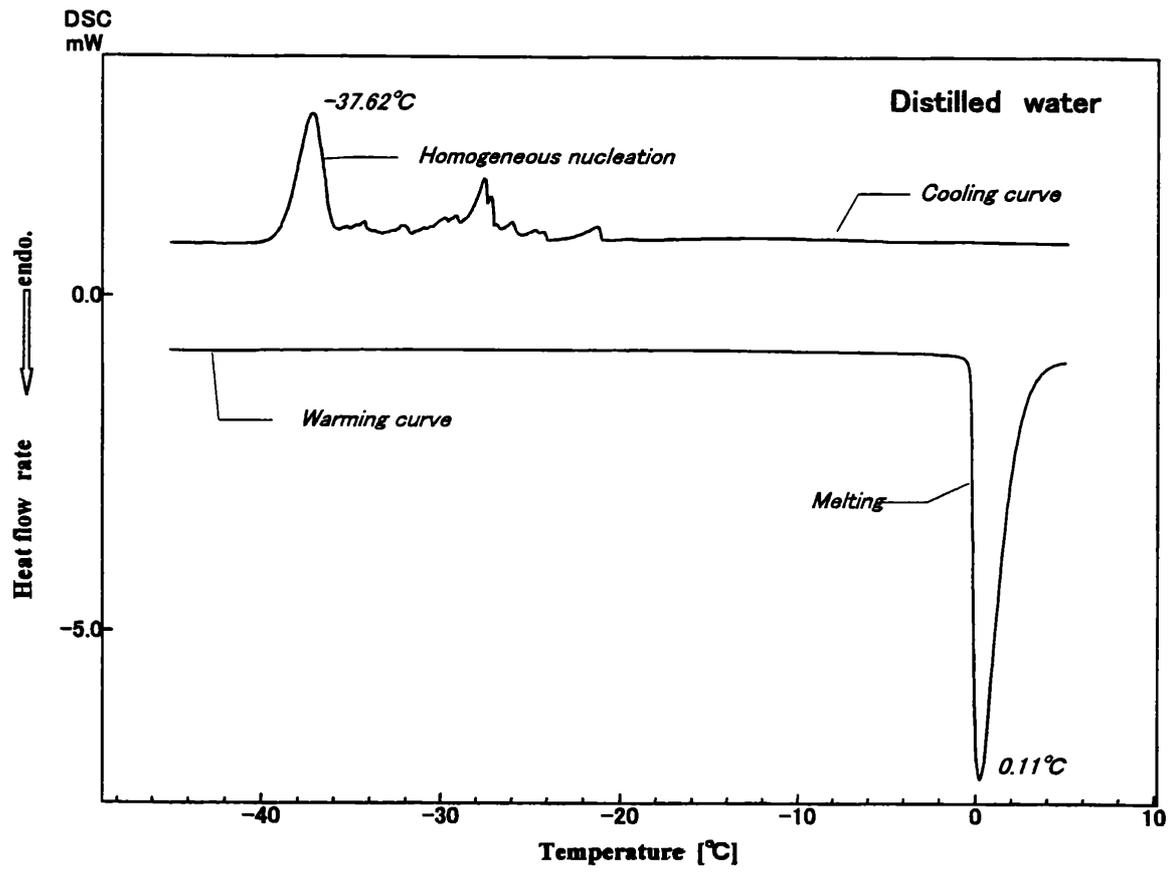


Fig. 2. W/O型エマルジョン (蒸留水) のDSC曲線

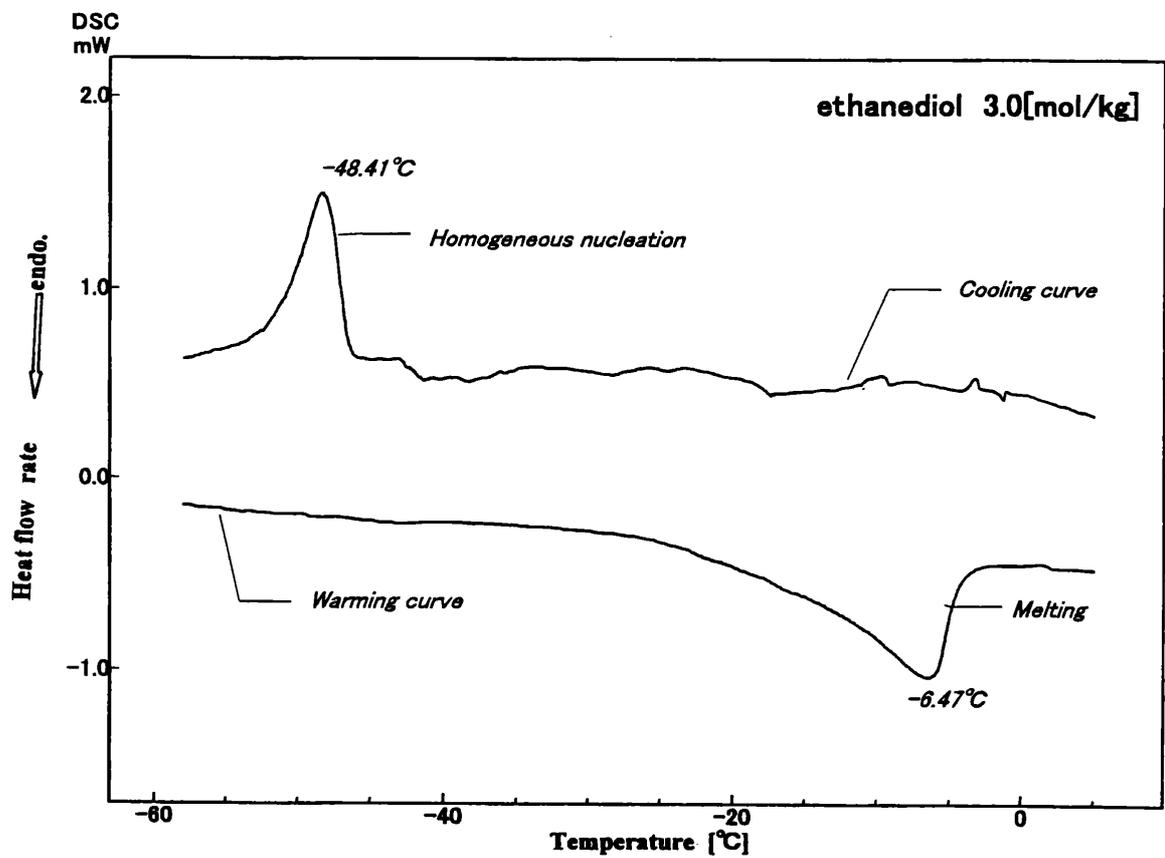


Fig. 3. W/O型エマルジョン (Ethanediol 3 [mol/kg]) のDSC曲線

(4)

対する液滴サイズの影響は無視出来るものと考えられる。

Fig. 2は蒸留水をエマルジョンにした試料のDSC曲線であるが、昇温曲線から読み取れる平衡凝固点はほぼ0℃であった。これは、約10 $\mu$ mのエマルジョン中に分散された水が、液滴の曲率増大の影響を受けておらず、バルクの水として扱えることを示している。一方、冷却過程については、不活性な油中にエマルジョン化された液滴状の水溶液の場合、凍結時の発熱ピークの形はガウス分布型になることが知られている<sup>8)</sup>が、本研究においても、約-38℃に同様の発熱ピークを得ることができた。この温度は、MacKenzie<sup>3)</sup>らの調べた純水の均質核生成温度-40℃と非常に近い値である事から、本研究で用いた実験手法の妥当性が裏づけられた。ただし、比較的温度の高い所に発生する鋭い発熱ピークは、液滴サイズの大きなものによる核生成と考えられるため、無視することとした。

Fig. 3は3 [mol/kg]のEthanediol水溶液のDSC曲線を代表例として示す。純水の場合と同様にいずれの水溶液でもDSC冷却曲線にガウス分布型の発熱ピークを認めることができた。以降、本研究では、こ

のピークの頂点の温度をその水溶液の均質核生成温度 $T_h$ とした。また、昇温曲線で検出される吸熱ピークの頂点を同様に平衡凝固点温度 $T_m$ とした。

Fig. 4は本研究で用いた種々の水溶液の $T_h$ と $T_m$ の関係を示す。MacKenzieら<sup>3)</sup>の結果と同様に広い濃度範囲において、よい直線関係が成り立つことが分る。また分子量が大きくなるほど先に定義した過冷却能が大きくなる傾向にあるが、Glycerolと比べ1,3-Propanediolの過冷却能の方が大きいと言った矛盾も存在する。またこの結果は分子内におけるヒドロキシル基の数にも単純に依存しないことも示している。

一方、糖類は過飽和、過冷却、ガラス化し易い溶質であることが知られている<sup>9)</sup>が、今回の過冷却能についてもGlucose, Sucroseはアルコール水溶液と比べ $a$ の値が大きくなった。

次に本研究で用いた溶質の分子量また水和パラメータを過冷却能 $a$ と共に整理し、Table 1に示す。動的水和数 $n_{DHN}$ は上平ら<sup>10)</sup>によって提唱され、NMRを利用し水溶液中の水( $^1H$ ,  $^2H$ ,  $^{17}O$ )のスピ-格子緩和時間 $T_1$ の濃度依存性から定義されている水和量である。物理的な意味は、水和層内の全水

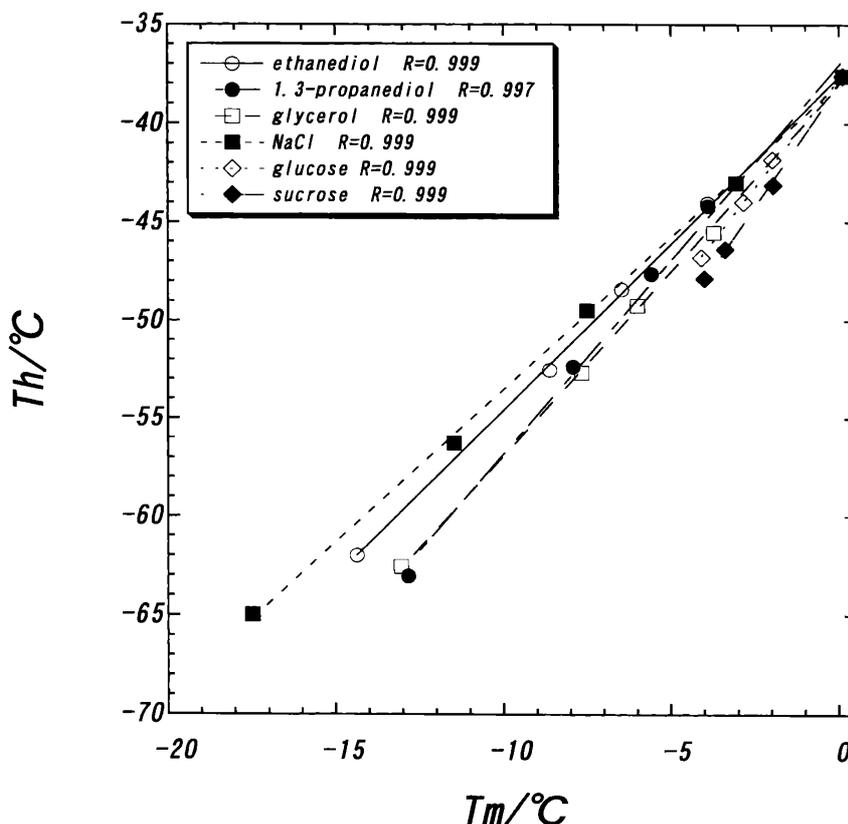


Fig. 4. 各水溶液における均質核生成温度,  $T_h$ と平衡凝固点,  $T_m$ の関係

**Table 1.** 各水溶液の水和パラメーター及び分子量, ヒドロキシル基数と過冷却能 (a)

	Mw	$\frac{a}{(=Th/Tm)}$	n-OH	$n_b$	n-DHN	$\tau_b^h/\tau_b^o$
ethanediol	62.07	1.69	2	16	5.7	1.36
1,3-propanediol	76.09	1.98	2	18	10.3	1.56
glycerol	92.10	1.88	3	-	-	-
glucose	180.16	2.19	5	6	18.6	4.1
sucrose	360.31	2.48	8	8	25.2	3.52
NaCl	58.44	1.55	-	14	2.74	2.32

<sup>b</sup> Ref.10, 11, 12, 13

分子の熱運動とバルク水中の同数の水分子の熱運動の相対的变化量であり,  $n_{DHN}$ の正負がそれぞれ従来の正負の水和に対応している. Table 1 からも分かるように過冷却能と水分子の回転の相関時間  $\tau_b^h/\tau_b^o$ , または溶質の分子量との相関は低く, またFig. 3でも述べた様にヒドロキシル基数n-OHが多いほど過冷却能が高いわけではない. これらパラメータの中でも特によい相関を持つのは動的水和数であった. これに対しては以下の様に考えられる.

水溶液の過冷却解消温度, すなわち均質核生成温度を考える上で重要となってくるのは, MacKenzieら<sup>3)</sup>が示すように水分子の拡散, 及び水分子クラスター表面と溶液の間における界面エネルギーであるが, 動的水和数自体これらの値と何らかの形で相関を持っている. 例えば, 界面エネルギーと動的水和数の関係としては, 電解質水溶液の表面ポテンシャルの濃度依存性と動的水和数が1次の直線関係になることが示されている<sup>10)</sup>. このように, Thは界面エ

ネルギーを介して動的水和数と関係を持つため, 過冷却能は動的水和数と比較的よい相関を持つものと考えられる.

以上, 本研究の結果から, 水溶液の過冷却能はその溶質が周囲の水分子に与える効果, すなわち動的水和数を調べることで予測が可能であることが示唆された.

## 参考文献

- 1) DeVries, A.L. and D.E.Wohlschlag: *Science*, **163**, 1073(1969).
- 2) 鈴木, 高井: 低温生物工学会誌, **43**, 40 (1997).
- 3) Rasmussen, D.H. and A.P.MacKenzie: *In "Water structure at the water-polymer Interface"*, H.H.G.Jellinek, ed., Plenum Press, New York, p.126 (1971).
- 4) Mackenzie, A.P.: *Phil.Trans.R.Soc.B*, **278**, 167(1977).
- 5) Franks, F.: *Cryo-Letters*, **2**, 27(1981).
- 6) Pruppacher, H.R.: *J.Chem.Phys.*, **89**, 1586(1963).
- 7) Bigg, B.K.: *Quart.L.Met.Soc.*, **79**, 510(1953).
- 8) Franks, F.: *In "Biophysics and biochemistry at low temperatures"*, Cambridge University Press(1985).
- 9) Franks, F.: *Cryobiology*, **20**, 335(1981).
- 10) 上平: 「水の分子工学」, 講談社サイエンティフィック (1998).
- 11) Isimura, Y., S.Ohkochi and H.Uedaira: *J.Chem.Soc., Faraday Trans.*, **93**(18), 3337(1997).
- 12) Uedaira, H.: *Bull.Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 1(1989).
- 13) Uedaira, H.: *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **63**, 3376(1990).