

(2)

低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], Vol. 46, No. 2, 2~6, 2000

[原著論文]

ポリリン酸塩及びアデノシン系リン酸エステルの
ガラス転移に関する研究

東京水産大学食品生産学科

川井 清司, 鈴木 徹, 萩原 知明, 高井 陸雄

Glass Transition of Inorganic and Adenosine Polyphosphates

Kiyoshi KAWAI, Toru SUZUKI, Tomoaki HAGIWARA and Rikuo TAKAI

Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries,

4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477

The thermal behaviors of Pyro- and Tripoly-phosphate solutions and its freeze-dried solid were investigated using DSC. In this study, ATP related compounds, which are similar on structure to tripolyphosphate, were also investigated. It was found that every phosphate solution system is freeze-concentrated, and finally not precipitate but turns to glassy state. And also, its freeze-dried samples were in glassy state. From moisture dependence of their glass transition temperature, the state diagrams, including glass transition line, were constructed. The glass transition temperatures T_g' ($-15^{\circ}\text{C} \sim -39^{\circ}\text{C}$) of their maximum freeze concentrated solution were found to be relatively higher in comparison with those of sugar solutions.

(Received October 4, 2000 ; Accepted December 18, 2000)

緒 言

ポリリン酸塩は畜肉ハムの結着剤, 冷凍魚介類の保水性の向上, 水産練り製品の物性改良など食品の添加物として, 様々な用途に使われている¹⁾. 特に, 冷凍すり身の凍結変性防止に有効であることは古くから知られており, その作用機構に関する研究は, 水産学の分野では数多く行われてきた. ポリリン酸塩の効果は, 凍結濃縮による pH の変化を中性付近に保持し²⁾, タンパク質を解膠して糖とタンパク質を結合しやすくし, 糖がタンパク質内部にまで浸透するのを助けるとされる³⁾. しかし, ポリリン酸塩

の緩衝能は同量のモノリン酸塩に比べ小さいにもかかわらず, ポリリン酸塩の方が, 凍結変性防止効果に優れているといった報告もあり⁴⁾, いまだ不明な点が多く残されている. 一方近年, 多くの水溶液が深温凍結する際, その濃縮部がガラス状態となることが知られるようになり, 糖類化合物のタンパク質に対する凍結保護効果とガラス転移の関係について, 多くの研究が行われてきた^{5), 6)}. その結果, 糖類では, ガラス転移温度-水分, 最大凍結濃縮相のガラス転移温度: T_g' について多くのデータが蓄積され, 食品の乾燥操作や凍結時の挙動がよく理解されるようになった. 無機工業分野においては, ポリリン酸塩ガラスはケイ酸塩ガラスと比較され, その性質の違いから興味深いものとして古くから多くの研究が行われてきた⁷⁾. しかし, 食品添加物としてのポリリン酸塩の凍結保護効果とガラス転移の関係

[Key words : Glass transition, Polyphosphate, ATP, Freeze-concentration, State diagram ; ガラス転移, ポリリン酸塩, ATP, 凍結濃縮, 状態図]

についての研究報告は見あたらない。

本研究ではポリリン酸塩のタンパク質に対する凍結変性防止効果とガラス転移の関連性を解明することを研究の目的とし、先ずそれら水溶液の低温における状態変化、及び凍結乾燥物の挙動について、DSCによる熱分析を通じて、その基礎物性の把握を試みた。すなわち、ポリリン酸塩がガラス状態となるのか、否か、またなるとしたらそのガラス転移温度 T_g は水分含量によってどの様に影響されるのかについて検討を行った。さらに、本研究では生体由来のリンの重合体である ATP, ADP, AMP についても同様の検討を行った。これら有機リン酸エステルも低温に対してタンパク変性防止効果を示すことが知られている⁸⁾。さらにクロレラの耐凍性の増大にとってタンパク質や ATP の合成が不可欠であるといった報告もある⁹⁾。それら作用機構を明らかにする上でも有機リン酸エステルのガラス転移挙動を把握しておくことは意味あるものと考えられる。ちなみにそれらの物質は広範に存在し利用されているにもかかわらず、それら水溶液の低温下での挙動、すなわち共晶点の存在、最大凍結濃縮層のガラス転移温度 T_g' などについてはこれまで調べられたことがなかった。

方 法

本研究では試料としてピロリン酸ナトリウム十水和物、トリポリリン酸ナトリウムは WAKO 社製特級試薬を、ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHATE (ATP) Disodium Salt, ADENOSINE 5'-DIPHOSPHATE (ADP) Sodium Salt, ADENOSINE 5'-MONOPHOSPHATE (AMP) Sodium Salt は SIGMA 社製試薬を用いた。これらのリン酸化合物から、それぞれ 5%~15% の水溶液を調製し、アルミニウムセルに 10mg 程度を封入した。基準物質としてアルミナ粉末を同様に封入し、島津熱流束型示差走査熱量計 DSC-50 を用いて、 $-6^\circ\text{C}/\text{min}$ で -60°C 付近まで冷却後、 1°C または $2^\circ\text{C}/\text{min}$ で 20°C まで昇温走査した。また低水分状態のガラス転移挙動の把握には、トリポリリン酸ナトリウム、ATP、ADP の凍結乾燥物の試料について検討した。それらの 5%~15% 水溶液を棚温度 -40°C で 1 日~3 日間、凍結乾燥し、得られた粉末状試料

を更にコンウェイユニット及び、オープン中にて水分調整を行い、耐圧アルミニウムセルに封入後、 -60°C ~ 100°C の間を $2^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温走査した。その後、試料を封入した耐圧セルにピンホールを開け、常圧乾燥にて水分含量を算出した。尚、実験結果の再現性の確認のため、各測定は 2 回から 3 回行った。

結 果

ピロリン酸ナトリウム、トリポリリン酸ナトリウム、ATP、ADP、AMP の各 10% 水溶液の DSC 昇温曲線を Fig. 1 に示す。いずれの曲線にもガラス転移と考えられる吸熱側へのベースラインのシフトが見られた。ただし、ピロリン酸ナトリウム水溶液に関しては転移量が少なく、昇温速度 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ では水の融解ピークと重なりシフトを検出しにくかったため、昇温速度 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ での測定結果を示した。

Fig. 1 より、ピロリン酸ナトリウム水溶液は -15°C 、トリポリリン酸ナトリウム水溶液は -39°C 、ATP 水溶液は -24°C 、ADP 水溶液は -27°C 、AMP 水溶液は -22°C にガラス転移がみられた。それぞれの溶液のガラス転移はいずれも氷結晶の融解吸熱ピークより低温にあり、しかも初期濃度依存性がみられない点から考慮して最大凍結濃縮相のガラス転移によるものであると考えられる。また AMP 水溶液に関しては -15°C 付近に再結晶による発熱ピークが見られた。尚、本研究ではベースラインが変化し始める温度と終了した温度の中間温度をガラス転移温度として読みとった。さらにリン酸を含む水溶液のガラス転移の特徴として、糖溶液のような 2 段階のガラス

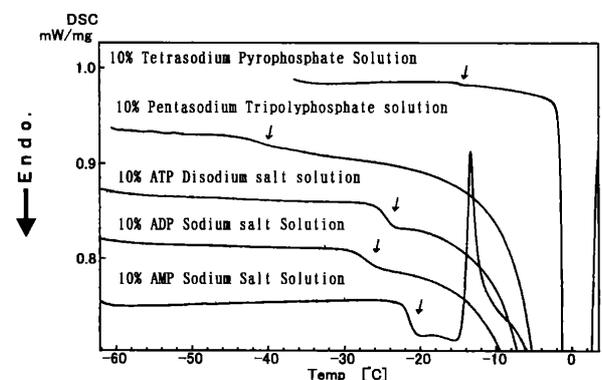


Fig. 1. DSC 1st heating curves of 10% polyphosphate solutions; (Heating rate 1 or 2/min)

(4)

転移¹⁰⁾が見られないこと、また糖に比べてT_g'が相対的に高い傾向にあることが挙げられる。

Fig. 2 にトリポリリン酸ナトリウム及び ATP, ADP の凍結乾燥試料の DSC 昇温曲線を示す。それらは粉末状試料であるため 1 st スキャンは熱伝導が悪く、ベースラインが安定しない場合が多かったためここでは 2 nd スキャンの測定結果を示す。トリポリリン酸ナトリウム, ATP, ADP いずれも水分の減少と共にそのガラス転移温度 (T_g) が上昇することが分かる。

以上の実験結果を整理し、トリポリリン酸ナトリウム及び ATP, ADP, それぞれと水の 2 成分系状態図を作成し、Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 に示す。図中に示したガラス転移曲線は、以下の Couchman の式^{11,12,13)}を用いてフィッティングにより求めた。

$$Tg = \frac{X_1 \Delta Cp_1 Tg_1 + X_2 \Delta Cp_2 Tg_2}{X_1 \Delta Cp_1 + X_2 \Delta Cp_2}$$

ここで、添字_{1,2}は溶液の成分を示しており、₁: トリ

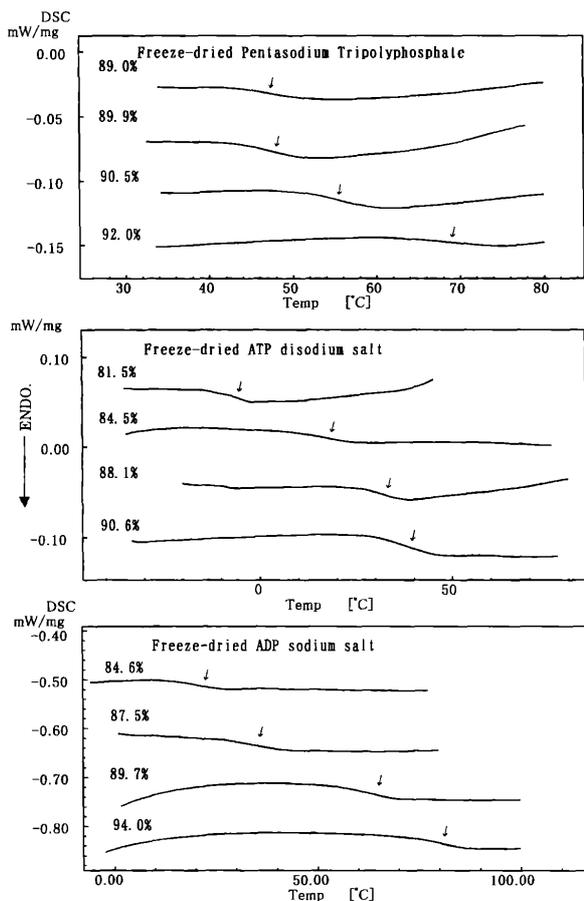


Fig. 2. DSC 2nd heating curves of freeze-dried phosphates adjusted to different water content ; (Heating rate 2°C/min)

ポリリン酸ナトリウム及び ATP, ADP₂: 純水である。また、X_{1,2}: モル分率、T_{g1,2}: ガラス転移温度、ΔCp_{1,2}: ガラス転移に伴う熱容量変化量を示している。

ただしそれらの計算に際しては文献値より純水の T_{g2} を -139°C, ガラス転移における熱容量変化量 ΔCp₂ を 35 J mol⁻¹ · K⁻¹ とした¹⁴⁾。未知数であるトリポリリン酸ナトリウム及び ATP, ADP の T_{g1}, ΔCp₁ を変化させ、実験値とベストフィットするように、T_{g1}, ΔCp₁ を求めた。

Fig. 3 より、トリポリリン酸ナトリウムの T_{g1} が 127°C, ΔCp₁ が 200 J mol⁻¹ · K⁻¹ の時、最も実験値とベストフィットした曲線が得られた。また最大凍結濃縮相の溶質濃度 C_g' はこの図より 67% であることが分かった。同様に Fig. 4 より、ATP の T_{g1} は 97°C, ΔCp₁ は 355 J mol⁻¹ · K⁻¹, C_g' は 74%, Fig. 5 より ADP の T_{g1} は 130°C, ΔCp₁ は 233 J mol⁻¹ · K⁻¹, C_g' は 76% となった。

考 察

以上の結果を Table. 1 にまとめた。糖のガラス転移と比較するため、文献より¹⁵⁾ スクロース及びリボー

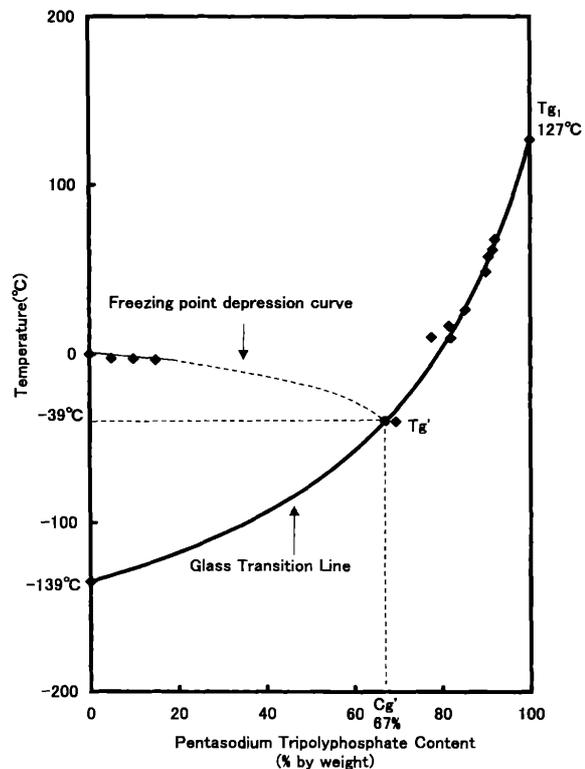


Fig. 3. State diagram of Pentasodium Tripolyphosphate-water binary system

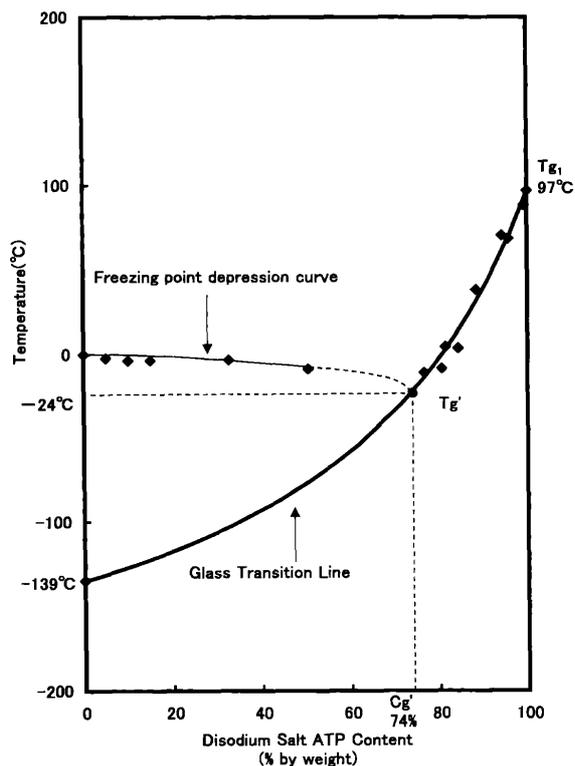


Fig. 4. State diagram of ATP disodium salt-water binary system

スのデータを掲載したが、リン酸化合物はスクロースやリボースと比べ T_g , ΔC_p ともに高い傾向にあることが分かる。一般に、ガラス転移温度は溶質の分子量の増加と共に高くなるといわれている⁶⁾。しかし、本研究で用いたリン酸化合物に関しては一概にそのような関係は成り立たず、また構造中に含まれるリン酸の数とガラス転移の関係についても相関を見出すことは困難であった。しかしピロリン酸ナトリウムの転移量の小ささ、ATP と ADP の T_g' の差や AMP にみられた再結晶ピーク等からリン酸の数が多いほど結晶化しづらい傾向にあることが示唆された。

無機工業的にはポリリン酸は非常に高粘性であり、これを塩などと反応させさらに加熱濃縮、脱水

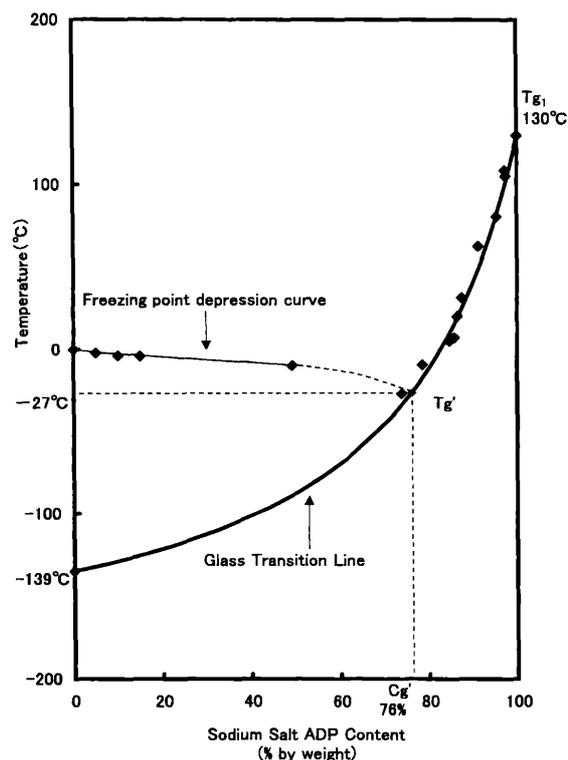


Fig. 5. State diagram of ADP sodium salt-water binary system

縮合することでリン酸塩ガラスが生成することが知られている¹⁶⁾。一方、食品添加物として利用されているピロリン酸ナトリウムやトリポリリン酸ナトリウムにおいては、凍結濃縮過程においてその粘性が高まることで（縮合は起こっていないと考えられる。）それぞれの T_g' でガラス化すると考えられる。リン酸二水素ナトリウムやリン酸水素二ナトリウムなどモノリン酸塩は生化学試料の緩衝剤としてしばしば使用されるが、これらリン酸塩 buffer は凍結過程において結晶化し、塩として析出することが報告されている¹⁷⁾。すなわちこれらのリン酸塩 buffer を添加した試料を凍結させても本来の緩衝能を発揮できず、凍結濃縮に伴う pH 変化が生じてしまう。一方、ピロリン酸ナトリウムやトリポリリン酸ナトリ

Table 1. Glass transition temperature of each phosphate.

compound	T_g' (°C)	C_g' (W%)	T_g' (°C)	ΔC_p ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)	FW ($g \cdot mol^{-1}$)
Tetrasodium Pyrophosphate	-15				266.06
Pentassium Tripolyphosphate	-39	67	127	200	367.86
ATP Disodium Salt	-24	74	97	355	551.1
ADP sodium Salt	-27	76	130	233	427.2
AMP sodium Salt	-22				347.2
※Sucrose	-32	69	62	167	342.3
※Ribose	-47	67	-10		150.1

(6)

ウムは冷凍すり身の pH 調整剤として実際に添加されているが、これらは本研究の結果より凍結プロセスで結晶析出せず、ガラス化することが明らかになった。よって冷凍すり身内においても尚 pH 緩衝能を低温で保持していると考えられる。

生体内において ATP はエネルギー代謝における通貨であるといわれているが、本研究によってこれら一連の物質、即ち ATP, ADP, AMP は水溶液において低温下で凍結濃縮を受けガラス転移することが明らかになった。これらの物質は生化学分野において盛んに研究されているものの、ガラス転移に関するデータはこれまで整備されていなかった。本研究で使用した ATP は Disodium, ADP, AMP は Monosodium とすべてナトリウムを含んでいるが、モノリン酸ナトリウムの場合、Disodium と Monosodium の共晶点温度など、熱挙動に違いがみられるといった報告がある¹⁷⁾。アデノシン系リン酸化合物のガラス転移を考える際にも正イオンによる影響を今後検討する必要がある。

生体を構成する元素の中でリンはカルシウムに次ぎ六番目に多く存在する生体元素といわれているが¹⁸⁾、それら化合物の水溶液の低温下における挙動は十分に研究されているとはいえない。ATP 及びリン酸関連化合物が比較的高い温度帯でガラス転移するという本研究の結果は生体の凍結保存や食料源としての長期凍結保存を実現する上でも意味あるものと思われる。

参考文献

- 1) 鈴木, 野島, 谷村: 「第7版食品添加物公定書解説書」, 初版, (株) 廣川書店, 東京, D-1280 (1999).
- 2) 花房: 凍結及び乾燥研究会会誌, 33, 62 (1987).
- 3) 松田: 日本水産学会誌, 37, 130 (1971).
- 4) Ohshima, T., T. Suzuki and C. Koizumi: Trends in Food Science & Technology, 4, 157 (1993).
- 5) Franks, F., R. H. M. Hatley and S. F. Mathias: Biopharm. October, 38 (1991).
- 6) 鈴木: 「魚介類の鮮度と加工貯蔵」 渡辺編, 成山堂書店, 東京, p.135 (1995).
- 7) 金澤: 「リンー謎の元素は機能の宝庫」, 初版, 株式会社研成社, 東京, p.62 (1997).
- 8) 花房: 「凍結乾燥と保護物質」 根井編, 東大出版会, 東京, p.10 (1971).
- 9) 酒井, 吉田: 「UP BIOLOGY 植物と低温」, 初版, 東京大学出版会, 東京, p.53 (1983).
- 10) Shalaev, E. Yu. and F. Franks: J. Chem. Soc. Faraday Trans, 91, 1511 (1995).
- 11) Couchman, P. R.: Polym. Eng. Sci., 24, 135 (1984).
- 12) Couchman, P. R.: Macromolecules, 20, 1712 (1987).
- 13) Couchman, P. R.: Polym. Eng. Sci., 27, 618 (1987).
- 14) Suzuki, T. and F. Franks: J. Chem. Soc. Faraday Trans, 89, 3283 (1993).
- 15) 高井: 「魚介類の鮮度判定と品質保持」 渡辺編, 恒星社厚生閣, 東京, p.110 (1995).
- 16) 柴田, 木村: 「無機化学全書 VI-6 リン」, 丸善株式会社, 東京, p.178 (1965).
- 17) Murase, N., P. Echlin and F. Franks: Cryobiology, 28, 364 (1991).
- 18) 金澤: 「リンー謎の元素は機能の宝庫」, 初版, 株式会社研成社, 東京, p.32 (1997).