

低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], Vol. 42, No.2, 139~142, 1996.

高分子ゲルの凍結の熱解析と凍結状態の電顕観察

東京電機大学理工学部化学教室, *東京水産大学食品生産学科
村勢則郎, 井上智広, 高野哲也*, 鈴木 徹*, 高井陸雄*

Thermal Analysis of Frozen Polymer Gels and Observation of Their Frozen State by Scanning Electron Microscopy

Norio MURASE, Tomohiro INOUE, Tetsuya TAKANO*, Toru SUZUKI* and Rikuo TAKAI*

Laboratory of Chemistry, Faculty of Science & Engineering, Tokyo Denki University, Hiki-gun, Hatoyama,
Saitama 350-03,

*Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries,
4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108

Thermal analysis of freezing behaviour of polymer gels was carried out by differential scanning calorimetry (DSC) together with the observation of their frozen state by scanning electron microscopy (SEM). As a result, it was indicated by DSC that small ice crystals, whose melting temperature is lowered because of the size effect, are formed trapped by the polymer network, and that vitrification is an extreme case of the formation of small ice crystals. However, no such small ice crystals were observed by the SEM observation.

1. 緒 言

適当な網目構造をもった架橋高分子ゲルを冷却すると、網目内の水は凍結せずに部分的にガラス化し、昇温時に結晶化する。昇温結晶化はDSC測定で発熱ピークとして観測される。しかし、ゲル中に氷が残っている状態から再冷却したり、氷核活性物質を添加して“平衡”凍結を引き起こすと、昇温結晶化は消失する¹⁻³⁾。このようにゲル中における氷晶形成は冷却条件によって異なってくる事が明らかになってきたが、昇温結晶化のメカニズムは未だ明らかでない。昇温結晶化による発熱ピークに先行して、DSC昇温曲線は吸熱方向に移行するが、この移行は“平衡”凍結で高

温側にシフトする。移行の原因として、(i) ガラス転移による比熱の変化、(ii) ガラス転移による比熱の変化にエンタルピー緩和が重なったもの、(iii) 結晶サイズが小さいために融点降下した氷晶の融解によるものが考えられるが、明らかでない。

本研究では、この吸熱方向への移行に注目してさらに詳しいDSC測定を行った。また、凍結状態における氷晶のサイズあるいは網目構造を明らかにするために、走査型電子顕微鏡による観察を試みた。

2. 実験方法

試料：架橋デキストラン (Sephadex; Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala) と架橋ポリアクリルアミド (Bio-Gel; Bio-Rad Laboratories, Calif.) を使用した。

DSC測定：含水率50%の試料(10~12mg)をアルミニウム試料セル内で調製し、封じて測定用試料とした。試料は、水がよくなじむようにするために一昼夜放置後、DSC測定を行った。冷却、昇温速度は通常5℃min⁻¹である。装置は島津製作所DSC-41型、

第42回低温生物工学会研究報告5.

[Key words : Polymer gels, Ice crystals, Vitrification, DSC (differential scanning calorimetry), SEM (scanning electron microscopy); 高分子ゲル, ガラス化, 示差走査熱量測定, 走査型電子顕微鏡観察]

(56)

及び動的特性を調べる目的で、T A Instruments 社製 MDSC を使用した。

SEM測定：含水率80~90%のゲル試料の入ったストロー（直径約5mm）を液体窒素中に浸漬して凍結し、予め冷却しておいたナイフで切断した後、すばやくクライオSEMの試料台にのせた。試料はクライオSEM中で表面を部分的に凍結乾燥した状態で、観察した。使用した装置は日立製作所製S-4000である。

3. 結果及び考察

室温から冷却した（非平衡凍結）後のDSC昇温曲線と、一度冷却して昇温し、氷が残っている状態から再冷却した（平衡凍結）後の昇温曲線をFig.1に示す³⁾。非平衡凍結後の昇温曲線は-20℃付近から吸熱方向へ移行を開始し、-11℃付近で水の結晶化による発熱ピークが観測される。平衡凍結後の昇温曲線では結晶化による発熱ピークが消失し、吸熱方向への移行開始温度は非平衡凍結の場合に比べて数℃上昇する。このような現象は網目構造あるいは架橋密度に依存し、

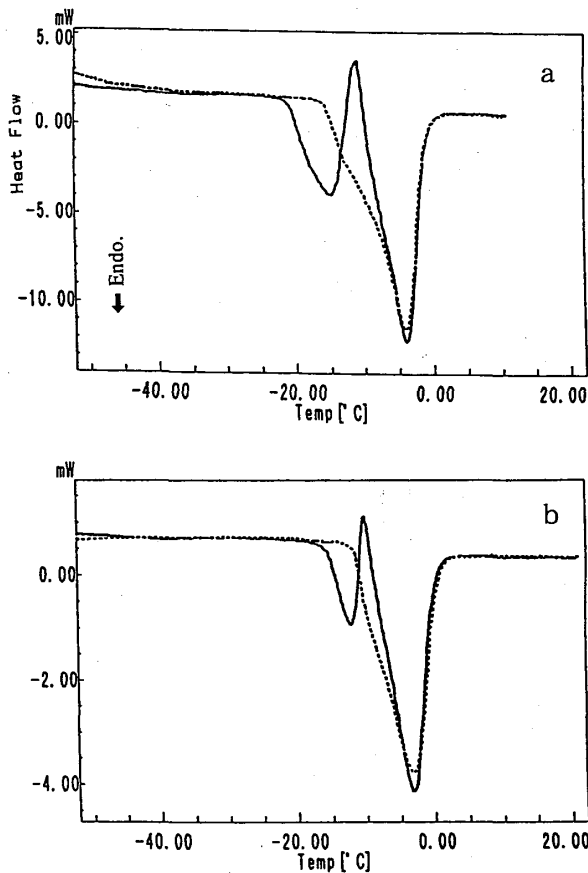


Fig. 1. DSC heating traces obtained with crosslinked polymer gels. (a) Sephadex G-25; (b) Bio-Gel P-6. After non-equilibrium freezing: —, after equilibrium freezing: ···. Water content: 50 wt%. Cited from ref. 3. See text.

Sephadex ゲルの場合はG-25ゲルで、Bio-Gel ゲルの場合はP-6ゲルで最も顕著に観測される。

吸熱方向への移行がガラス転移による比熱の変化に起因するとして計算すると、既に報告したように変化の程度が大きすぎる¹⁻³⁾。そこで、この移行は網目構造内のできる小さな氷の融解によるものとして氷のサイズを計算した。融点降下 ΔT_f は、Laplace の式及び Gibbs-Duhem の式を用いて

$$\Delta T_f = 2 V_m T_f^\circ \sigma / (\Delta H_f r)$$

r : キャピラリー半径

ΔT_f : 融点降下度

V_m : 水のもル体積

T_f° : バルクの水の凝固点

σ : 氷-水の界面自由エネルギー

($\sim 30 \times 10^{-7} \text{Jcm}^{-2}$)

ΔH_f : 氷の融解熱

と近似される^{4, 5)}。網目構造をキャピラリー状と仮定し、融点をDSC測定での実測値-12℃とすると、氷晶のサイズはnmオーダーと見積もられる。

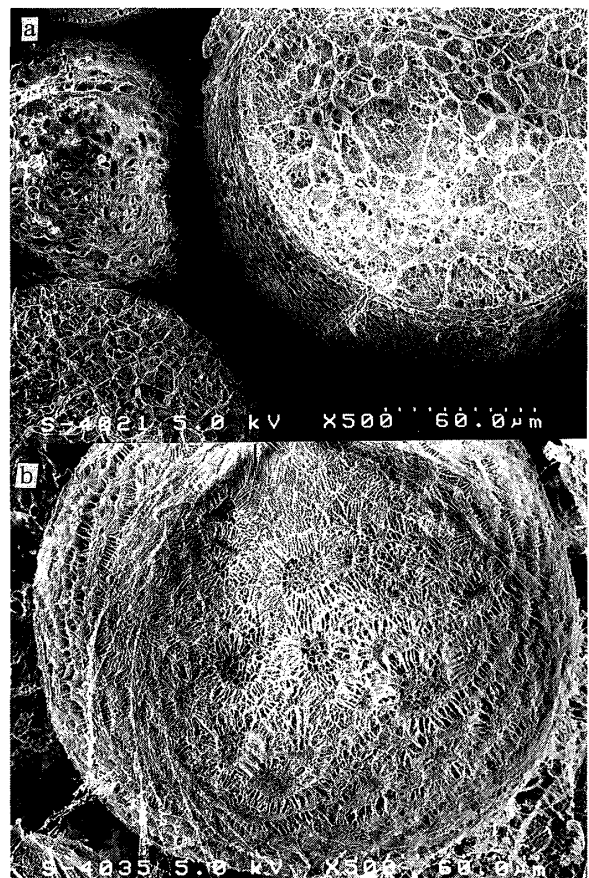


Fig. 2. Images observed by a Cryo-SEM of frozen Sephadex gel beads. (a) Sephadex G-25; (b) Sephadex G-100. Water content: 90 wt%.

クライオSEMによる観察結果をFig. 2に示す。ビーズの切断された表面には網目構造が観察される。この網目は構造、氷晶の分離によって高分子鎖が集合して形成されたものと考えられる⁶⁾。様々なサイズの網目が観察されるが、nmオーダーのサイズの網目構造は観察できなかった。このような小さな網目が実際に存在するのかもしれないが、別の可能性として、網目のサイズは大きくても σ の値が大きくなるために、融点が低くなる可能性もある。 σ として水-水の界面自由エネルギーの値⁷⁾をそのまま用いることに問題があるかもしれない。

緒言で述べたように、ガラス転移にエンタルピー緩和が重なっても、DSC曲線では吸熱ピーク状に観測される。そこで、熱転移挙動が可逆的か不可逆的かを調べる目的で、熱変調を与えながら昇温測定を行うM (Modulated) DSC測定を試みた。結果をFig. 3に示す。通常、ガラス転移による比熱変化、融解による吸熱は可逆成分 (Reversing) に、エンタルピー緩和、結晶化による発熱ピークは不可逆成分 (Nonreversing) に現れる⁸⁾。図の可逆成分から、 -19°C 付近における吸熱方向への移行はガラス転移によるものと考えられよう。昇温結晶化に先行する吸熱方向への移行は不可逆成分に現れており、エンタルピー緩和による可能性がある。しかし、氷晶融解による吸熱のメインピーク (-5°C) も不可逆成分に現れていることを考えると、

必ずしもエンタルピー緩和とは断定できない。熱伝導性の遅れが原因で、融解ピークが不可逆成分に現れてくるのかもしれない。

ガラス化する液体は“strong liquid”と“fragile liquid”に分類され、水は“strong liquid”に分類される⁹⁾。その場合、ガラス転移点近傍における ΔC_p やエンタルピー緩和によるピークは小さい。糖、多糖-水系であっても、Fig. 1にあるほど大きな吸熱方向への移行は期待できない。したがって、吸熱方向への移行は小さな氷の融解によるものと考えられる。

4. ま と め

ガラス状態は氷のサイズが小さくなった極限とみなすことができる。ガラス化と氷晶形成が同時に起こる系において、ガラス転移と氷晶の融解ピークは連続的に生じ、これを明確に分離・区別することはかなり難しいことであると考えられる。しかしながら、氷晶サイズの分布は生体系試料や食品の凍結保存において極めて重要である。なんらかの手法を用いて、昇温結晶化に先行する吸熱方向への移行がガラス転移によるものか氷晶の融解なのか、明らかにする必要がある。

謝辞

MDSCの装置の使用に際して便宜をはかって下さいました。TA Instruments Japan Inc. に感謝致します。ま

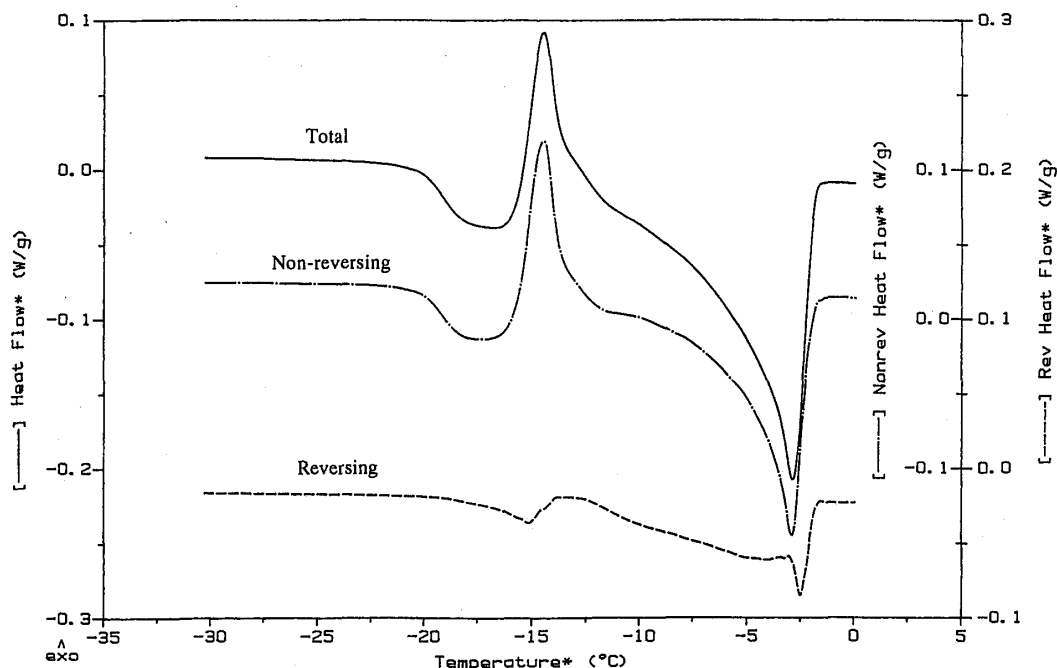


Fig. 3. heating trace of a Sephadex G-25 gel obtained by M DSC. Water content: 50 wt%. Cooling: $5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$; heating: $0.5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$; modulation: $0.08^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$.

(58)

た, 有益な助言を賜りました. Dr. Harry Levine (Nabisco Brands, Inc.) に感謝致します.

文 献

- 1) Murase, N. : *Cryo-Lett.*, **14**, 367 (1993).
- 2) 村勢, 岩井: 凍結及び乾燥研究会会誌, **39**, 36 (1993).
- 3) 村勢, 井上: 低温生物工学会誌, **41**, 17 (1995).
- 4) Homshaw, L. G. : *J. Colloid & Int. Sci.*, **84**, 127 (1981).
- 5) 村勢: 熱測定, **23**, 149 (1996).
- 6) Takano, T., H. Hayashi, T. Suzuki and R. Takai: 低温生物工学会誌, **41**, 58 (1995).
- 7) Ketcham, W.M. and P.V. Hobbs : *Phil. Mag.* **19**, 1161 (1969).
- 8) 十時: 熱測定, **22**, 88 (1996).
- 9) Angell, C.A., R.D. Bressel, J.L. Green, H. Kannno, M. Oguni and E.J. Sare : *J. Food. Engineering*, **22**, 115 (1994).