

低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], Vol. 51, No. 2, 163~166, 2005

## 断熱型熱量計を用いたエンタルピー緩和速度測定による BSA-水 2 成分系のガラス転移に関する研究

<sup>1</sup>独立行政法人食品総合研究所, <sup>2</sup>東京海洋大学海洋食品科学科, <sup>3</sup>東京工業大学大学院理工学研究科  
川井 清司<sup>1</sup>, 鈴木 徹<sup>2</sup>, 小國 正晴<sup>3</sup>

### Glass Transition in a BSA-Water System: Application of Enthalpy Relaxation Rate Measurement Using Adiabatic Calorimetry

Kiyoshi KAWAI<sup>1</sup>, Toru SUZUKI<sup>2</sup> and Masaharu OGUNI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>National Food Research Institute, 2-1-12 Kan-nondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7  
Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology,  
O-okayama 2-12-1 Meguro-ku, Tokyo 152-8551, Japan

The enthalpy relaxation rates of freeze-dried bovine serum albumin (BSA) with or without a small amount of water were investigated in a temperature range of 50-300 K by using adiabatic calorimetry. While not found in anhydrous BSA, spontaneous enthalpy relaxation was observed due to a glass transition from 120K to 180K in BSA with 1.85 % moisture. A typical glass transition temperature in the wide enthalpy relaxation range was estimated as 155 K based on an empirical interpretation. Since globular proteins with a small amount of water are generally immobilized at room temperature, this low-temperature glass transition is interpreted as attributed to the rearrangement of water molecules within BSA.

(Received Oct. 14, 2005; Accepted Nov. 23, 2005)

### 緒 言

非晶質状態にある製剤・食品成分の貯蔵性はガラス-ラバー転移温度 ( $T_g$ ) を境に著しく変化する<sup>1,2)</sup>.  $T_g$  以下にある非晶質は並進に基づく分子運動が抑制されたガラス状態にあり, 劣化要因となる化学反応及び物理的変化速度は停滞する. しかし,  $T_g$  以上

のラバー状態になると分子運動は顕著に増加するため, 長期安定性は期待できない. 一般に, 製剤・食品成分の  $T_g$  は水分含量によって著しく変化する. この  $T_g$  変化は溶質-水 2 成分系状態図におけるガラス転移曲線として整理されており<sup>1,2)</sup>, ガラス転移曲線以下において溶質と水とは共にガラス状態にあると理解されてきた.

製剤や食品の主成分として広範に含まれる水溶性タンパク質はヘリックスなどの周期構造領域とランダムコイルの非晶質領域とからなる半結晶性高分子であり, 非晶質領域は水分含量及び温度変化によってガラス転移する<sup>3-5)</sup>. 上述の解釈によると,  $T_g$  が室温以上のガラス状態にある乾燥タンパク質

第 51 回低温生物工学会研究報告 18.

[Key words : Adiabatic calorimetry, Enthalpy relaxation rate, Glass transition, Bovine serum albumin, Water; 断熱型熱量計, エンタルピー緩和速度, ガラス転移, 牛血清アルブミン, 水]

(108)

は、長期間安定な常温保存が可能であると期待される。しかしタンパク質がガラス状態にあっても加水分解など水の関与する劣化反応は容易に進行することから、水がまだ高い分子運動性を残していると考えられるようになった<sup>6,7)</sup>。事実、ガラス状態にある水分子はわずか1mmの距離を拡散するのにおよそ $10^{12}$ secもの時間を要すると見積もられているが<sup>8)</sup>、ガラス状態の水溶性高分子に含まれる水分子は1mmを1sec以下の時間で拡散可能であることがNMR測定を通じて示唆されている<sup>9)</sup>。また、タンパク質水溶液状態において、250~260Kに存在する最大凍結濃縮相のガラス転移温度( $T_g$ )<sup>10,11)</sup>の他に、タンパク質と直接水素結合した水和水のガラス転移と考えられる $T_g$ が160~200Kで確認されている<sup>12-14)</sup>。しかし乾燥状態にある低水分含量のタンパク質において水和水に由来するガラス転移が確認された例は無い。これは、ガラス転移に伴う応答が非常に小さく、示差走査熱量計などガラス転移を調べる一般的な測定手段では捉えられないためと考えられる。

通常は識別し難いガラス転移をも捉える事が可能な測定手段として、断熱型熱量計を用いたエンタルピー緩和速度測定があるが、タンパク質に含まれる水のガラス転移を調べる目的でこの手法が適用された例は無かった。本研究では牛血清アルブミン(BSA)を試料とし、断熱型熱量計を用いたエンタルピー緩和速度測定によってBSAに含まれる水の $T_g$ について検討した<sup>15)</sup>。

## 材料および方法

### 1. 試料調製

凍結乾燥によって調製されたBSA試薬(fraction V, Sigma Co. Ltd.)を用いた。標準品の水分含量をカールフィッシャー法によって調べたところ1.85% (w/w)であり、本研究ではこれを含水BSA試料とした。一方、室温にて1週間以上真空乾燥し、ほぼ完全に脱水したBSAを無水BSAとした。試料容器にそれぞれ数gを封入し、東京工業大学小園研究室既設の断熱型熱量計に設置した。

### 2. エンタルピー緩和速度測定による $T_g$ の決定

ガラス転移は緩和現象であり、ガラス状態にある

物質を昇温熱容量測定すると、 $T_g$ 近傍温度において熱履歴に依存したエンタルピー緩和が認められる(Fig.1-[a])。断熱型熱量計による熱容量測定では、10K/min程度の急冷(Process A)によってガラス化した物質には発熱の(Process B)、20mK/min程度の徐冷(Process C)によってガラス化した物質には吸熱の(Process D)エンタルピー緩和が起こる。これら発熱及び吸熱のエンタルピー緩和をエンタルピー緩和速度、即ち $-dH/dt$ として表すと、緩和時間分布の無い単一緩和過程であった場合、Fig.1-[b]に示すような正(Process B)及び負(Process D)のピークとなる。このピーク強度は熱履歴、即ち急冷及び徐冷速度と熱容量測定時における昇温速度との差や測定試料量に依存するため、ガラス転移に伴う熱容量差が極めて小さいガラス転移過程であっても捉えることができる。徐冷後の $-dH/dt$ に認められる吸熱ピークトップ温度は緩和時間が1ksecに達する温度に対応するとの経験的理解から、この温度を $T_g$ として見積もることができる<sup>15-17)</sup>。本研究では50~300Kの間において急冷及び徐冷後、昇温熱容量測定した際の $-dH/dt$ 変化を調べた。

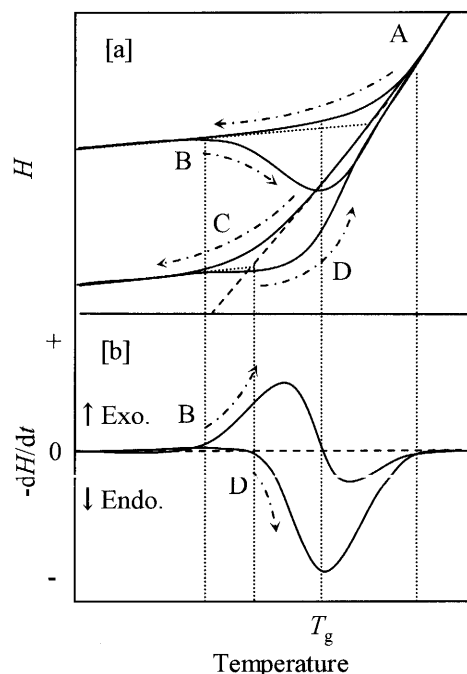


Fig. 1. Effect of cooling rate on the enthalpy relaxation [a] and the enthalpy relaxation rate [b] in a glass transition region. [Process A: rapid cooling, Process B: heat capacity measurement after rapid cooling, Process C: slow cooling, Process D: heat capacity measurement after slow cooling].

## 結果および考察

無水及び含水 BSA 試料の $-dH/dt$ 測定結果をそれぞれ Fig.2-a 及び-b に示す. 図中に示す白丸は急冷後, 黒丸は徐冷後の測定結果である. 測定温度範囲において, 無水 BSA にはガラス転移の存在を意味するエンタルピー緩和を見出すことができなかったが, 含水 BSA には 120~180K の範囲にてガラス転移の存在を意味する急冷後の発熱及び徐冷後の吸熱エンタルピー緩和を見出すことができた.

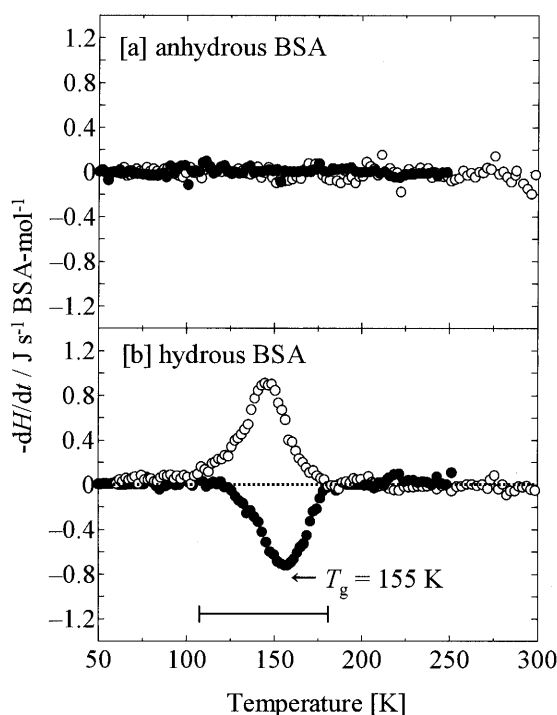


Fig. 2.  $-dH/dt$ s measured after rapidly [○] and slowly [●] cooling for anhydrous [a] and hydrous [b] BSA sample. Horizontal bar and arrow indicate the glass transition region and the  $T_g$ , respectively.

タンパク質-水系のガラス転移についてはこれまでに数多くの研究結果が報告されてきたが, 1.85%程度の低水分状態にあるタンパク質においてこのような低温でのガラス転移が見出された報告は無い. 前述のとおり, 水分含量が数%程度の乾燥タンパク質は室温でガラス状態にある. また, 無水 BSA には一切のガラス転移が認められなかった. 以上の知見より, 本研究において明らかにされたガラス転移は BSA に含まれる水分子の再配置過程の凍結に由来するものと考えられる. 経験的理解<sup>16,17)</sup>に基づき,

徐冷後の $-dH/dt$ 測定結果より見出された吸熱ピークトップ温度から, このガラス転移過程の  $T_g$  を 155K と見積もる事ができた. 但し, 同手法においてその他多くのガラス転移過程は十数 K 程度の温度幅を持った吸熱ピークとして確認されてきた<sup>16,17)</sup>のに対し, 本結果が示した吸熱ピークはおおよそ 60K にも渡る幅広い温度範囲において起こったことから, 非常に広い緩和時間分布をもったガラス転移過程であることが示唆される. 従って,  $T_g = 155K$  はおおよそ 120~180K でのガラス転移領域における代表的な値と言える. 急速冷却によって調製されたガラス状態の水は  $T_g = 136K$  とされるが, 水分子間の水素結合ネットワークの発達或いは欠落の程度によっては,  $T_g$  が数十 K 程度前後することが示唆されている<sup>18)</sup>. 本研究によって明らかにされたガラス転移は水素結合状態の異なる様々な水分子の再配置過程によるものと考えられる.

## 総括

ガラス状態にある低水分凍結乾燥タンパク質のガラス転移特性を断熱型熱量計によるエンタルピー緩和速度測定を通じて調べることで, タンパク質に取り残された水分子の再配置過程の凍結に由来すると考えられるガラス転移を 155K 近傍に見出すことができた. タンパク質を主成分とした製剤や食品の貯蔵安定性をガラス転移概念に基づいて制御・予測するにあたっては, その構成成分である水の  $T_g$  は室温よりも遥かに低い事を認識しておく必要がある.

## 文献

- 1) Franks, F. : Freeze drying: from empiricism to predictability, *CryoLetters*, **25**, 93-110 (1990)
- 2) Roos, Y. H. : Food processing and storage, *In* "Phase Transitions in Foods", Academic Press, San Diego, p.313-347 (1995)
- 3) Sochava, I. V. : Heat capacity and thermodynamic characteristics of denaturation and glass transition of hydrated and anhydrous proteins, *Biophys. Chem.*, **69**, 31-41 (1997)
- 4) Tsereteli, G. I. Belopolskaya, T. V. Grunina, N. A. and Vaveliuk, O. L. : Calorimetric study of the

(110)

- glass transition process in humid proteins and DNA, *J. Therm. Anal. Cal.*, **62**, 89-99 (2000)
- 5) Shamblin, S. L. Hancock, B. C. and Zografi, G. : Water vapor sorption by peptides, proteins and their formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 239-247 (1998)
  - 6) Lai, M. C. Hageman, M. J. Schowen, R. L. Borchardt, R. T. and Topp, E. M. : Chemical stability of peptides in polymers. I. Effect of water on peptide deamidation in poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) matrixes, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1073-1080 (1999)
  - 7) Yoshioka, S. Aso, Y. and Kojima, S. : Temperature dependence of bimolecular reactions associated with molecular mobility in lyophilized formulations, *Pharm. Res.*, **17**, 925-929 (2000)
  - 8) Chang, Z. H. and Baust, J. G. : Physical aging of glassy state : DSC study of vitrified glycerol systems, *Cryobiol.*, **28**, 87-95 (1991)
  - 9) Oksanen, C. A. and Zografi, G. : Molecular mobility in mixtures of absorbed water and solid poly(vinylpyrrolidone), *Pharm. Res.*, **10**, 791-799 (1993)
  - 10) Levine, H. and Slade, L. : Cryostabilization technology: thermoanalytical evaluation of food ingredients and systems, *In* "Thermal analysis of foods", V. R. Harwalkar, C.-Y. Ma, eds., Elsevier Applied Science, New York, p. 221-305 (1990)
  - 11) Chang, B. S. and Randall, C. S. : Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization, *Cryobiol.*, **29**, 632-656 (1992)
  - 12) Sartor, G. Hallbrucker, A. and Mayer, E. : Characterizing the secondary hydration shell on hydrated myoglobin, hemoglobin and lysozyme powders by its vitrification behavior on cooling and its calorimetric glass-liquid transition and crystallization behavior on reheating, *Biophys. J.*, **69**, 2679-2694 (1995)
  - 13) Green, J. L. Fan, J. and Angell, C. A. : The protein-glass analogy: some insights from homopeptide comparisons, *J. Phys. Chem.*, **98**, 13780-13790 (1994)
  - 14) Inoue, C. and Ishikawa, M. : The contribution of water to the specific heat change at the glass-to-rubber transition of the ternary system BSA-water-NaCl, *J. Food Sci.*, **65**, 1187-1193 (2000)
  - 15) Kawai, K. Suzuki, T. and Oguni, M. : Finding of an unexpected thermal anomaly at very low temperatures due to water confined within a globular protein, bovine serum albumin, *Thermochim. Acta*, **431**, 4-8 (2005)
  - 16) Fujimori, H. and Oguni, M. : Construction of an adiabatic calorimeter at low temperatures and glass transition of crystalline 2-bromothiophene, *J. Phys. Chem. Solids.*, **54**, 271-280 (1993)
  - 17) Mizukami, M. Fujimori, H. and Oguni, M. : Possible emergence of plural sets of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glass transitions in orientationally disordered crystal, cyclohexanol, *Solid State Commun.*, **100**, 83-88 (1996)
  - 18) Hofer, K. Astl, G. Mayer, E. and Johari, G. P. : Vitrified dilute aqueous solutions. 4. effects of electrolytes and polyhydric alcohols on the glass transition features of hyperquenched aqueous solutions, *J. Phys. Chem.*, **95**, 10777-10781 (1991)