

第 8 節 寒天ゲルのゲル構造形成メカニズム

はじめに

寒天は日本では古来から食用に利用されているゲル化剤である。本稿では所謂“寒天”のゲル形成成分であるアガロースのゲル形成メカニズムについて概説する。

1. アガロースについて

アガロースは所謂寒天の約 70% を占める主要な構成成分であり、その化学構造は D- グルコースと 3,6- アンヒドロ-L- ガラクトースが 1,4 β 結合した 2 糖の繰り返し単位（アガロビオース）が 1,3 α 結合で連なった中性多糖である。寒天のもう一つの構成成分はアガロペクチンと総称される多糖類であり、これはアガロースの構造中に硫酸基、メトキシ基、ピルビン酸等を含んでおり、アガロースに比べてゲル化能が低いとされている。寒天（アガロース）は熱可逆性の物理ゲルを形成する。このアガロースのゲル化は温度変化という物理的刺激のみで引き起こされ、またゲル化温度が室温付近であるため、その特徴を生かして様々な分野で活用されている。主な用途としては、微生物や細胞の培養培地、遺伝子工学や生化学分野におけるタンパク質や核酸の分析に用いられる電気泳動ゲル、またゲル浸透クロマトグラフィーの担体などがある。食品分野での応用はここであらためて述べる必要もないが、ゲル化剤として様々な食品にされている。日本においては古くから食用として用いられていたためにこの原料には「安全である」という印象が強いし、また実際にゲル化に寒天それ自体以外の添加物が不要であることから、この原料は安全でかつ環境親和性が高いということが言える。そのような理由もあり、生活用品の分野でも例えば化粧品の増粘ゲル化剤としての活用も行われている。本稿では寒天の成分のなかで主にゲル化に関与する中性多糖であるアガロースを対象を絞って論述する。

1.1 アガロースの分子特性

アガロースは多糖類すなわち高分子であるのでその基本的な分子特性値として分子量は最も重要なパラメータの一つである。しかしながらアガロースは後述するとおり室温程度の温度では水に溶解しないためにその分子特性の測定には高温で試料溶液を扱う必要がある。そのために他の水溶性多糖類に比べてアガロースの分子特性値に関連するデータは少ない。いくつかの報告ではゲル化阻害剤を添加した溶液を用いた測定により、多くの工業用原料としてのアガロースは比較的分子量分布が狭く、その重量平均分子量は 10^5 程度と報告されている¹⁻³⁾。近年では多角度光散乱測定装置とサイズ排除クロマトグラフィーを組み合わせた測定装置（MALLS）等の分析機器の性能が向上しているため、今後はアガロースの基礎的な分子特性である分子量に関する情報が増えることが期待される。

1.2 アガロースの希薄溶液物性

分子量と同様に溶液状態での高分子の形態に関する情報もまたゲル化を考察する際に非常に重要なパラメータであるが、これもまた上述の理由から研究例が極めて少ないのが現状である。アガロースがゲル化しない 65℃での固有粘度と分子量の測定値から Mark-Houwink の粘度式を決定した報告があるが^{4,5)}、それによればアガロースの Mark-Houwink 指数は 0.7 程度であり、この値は、アガロースは高温で水中に溶解した状態では排除体積効果でわずかに広がったコイル状の形態であることがわかる。ゲル化機構を考える際のもっとも基本的な情報としてその高分子が溶液状態（ゾル）でどの程度の濃度で高分子同士が接触を開始するか、所謂「重なり合い濃度」、という情報と、この重なり合い濃度以上の濃度の準希薄溶液～濃厚溶液における高分子鎖の絡み合いの状況が挙げられる。これらの情報からゾルからゲルへの状態変化の原因である架橋構造の形成がどのようなメカニズムで起こるのかを推定するわけである。しかしながらアガロースに関してはこの情報が少ないのが現状であり、このような状況がアガロースのゲル化機構また架橋構造形成メカニズムの理解を困難なものにしている。

2. コイルーヘリックス転移と状態変化

アガロースは良く知られているとおり、高温で水に溶解し、その溶液を冷却することでゲル化する。そしてこのゲル化過程は温度ヒステリシスを持つものの可逆的である。この現象はアガロースのゲル化が何らかの共有結合による架橋構造を形成するのではなく熱可逆的な分子間相互作用（水素結合など）で架橋構造を形成することを予想させる。ここでは高温では排除体積効果でわずかに広がったコイル状のアガロース分子が、冷却によりどのような分子形態変化を来すのかを考察する。

2.1 ヘリックス構造

アガロースのゾルーゲル転移の熱量測定研究の結果、アガロースのゲル化は発熱反応であること⁶⁾、またゲルに含まれる繊維質のX線による分析結果から⁷⁾、アガロースゲルには規則的周期構造が存在すること、また旋光度の測定結果⁷⁾よりこの規則的構造はらせん構造であることが明らかになった。ゾル（溶液）状態ではこれらのらせん構造由来する様々な特徴は観察されないことからアガロースは少なくともゾルーゲル転移の際にらせん構造を形成することは明らかになっている。このアガロースゲルに含まれているらせん構造の詳細、シングルヘリックスか、あるいはダブルヘリックスか、については未だ論争中であり決定的などちらかの証拠は得られていない。

図1に現時点で広く認められていると思われるアガロースゲルの形成に関する概念図を示す。高温で溶液状態ではコイル状に系中に分散しているアガロース分子は冷却によりらせん構造を形成する（ここではダブルヘリックスとした）。

このらせん構造が集合して架橋構造を形成し系がゲル化する。この架橋構造は弱い分子間相互作用により形成されているためこれを再度加熱することでそれらの分子間相互作用は解離して再度コイル状の溶液に戻る。おそらくこのようなメカニズムでアガロースゲルは形成されると思われるが、注意を要する点は、この概念図はゾル状態およびゲル状態それぞれの平衡状態（ゲルの場合は準平衡状態かもしれない）での物性、すなわち溶液においては固有粘度、光散乱あるいは沈降平衡等の測定結果からの高分子の広がりパラメータ。また一方でゲルにおいてはX線回折、旋光度等の構造情報でありまた熱量測定によるエンタルピー変化等から類推したメカニズムであり、ゾルからゲルに変化する際の過渡現象に関する情報はあまり含まれていないという点である。

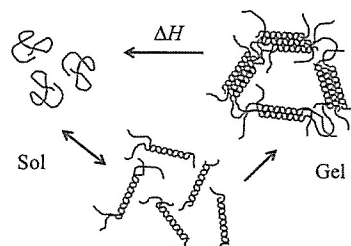


図1 アガロースのゾルーゲル変化の概念図

2.2 スピノーダル分解

粉末状のアガロースは冷水には溶解しないが、熱水溶液中では溶解する。すなわち、熱水溶液中で溶解していたアガロース分子は冷却によりコイルーヘリックス転移を起こし不溶化する。高温で溶解し、低温で析出するこのような高分子は上部臨界共溶解温度(UCST)を持つということができる。UCSTをもつ高分子の溶液の概念的な相図を図2に示す。

図中の上に凸の実曲線が共存曲線でこの曲線よりも上の一相(1 ϕ)領域と準安定領域の境界である。また点線はスピノーダル曲線をしめし、このスピノーダル線で囲まれた領域は不安定領域である。一相溶液である状態からその系を冷却するとやがて共存曲線、すなわち共存温度をまたぐ。共存温度より低い温度では2相(2 ϕ)に系は分離するが、過冷却状態から核生成ー成長を経て相分離が生じる。一方スピノーダル線はその過冷却状態の限界温度ということもできる。一般的に知られているようにアガロースゲルは完全な透明ではなく濁っている。これはアガロースゲルが本質的には二相分離した状態であることを物語っている。アガロースの熱水溶液を冷却する過程の濁度変化から、アガロースの重量濃度0.05%程度のアガ

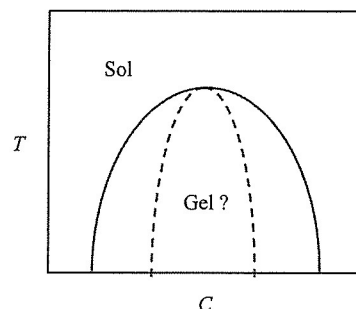


図2 上部臨界共溶解温度 (UCST) をもつ高分子溶液の相図 (概念図)

ローズ溶液に曇点が観察されている⁸⁾。しかしながらこの濃度は、アガロースの分子特性から推定される重なり合い濃度よりもはるかに低濃度であると考えられる⁹⁾。アガロース水溶液の状態変化（相変化）を考える際のもう一つの問題は「いかに冷却するか」という冷却速度である。90℃近い温度で十分に溶解しているアガロース熱水溶液を、4℃の冷蔵庫で冷却する場合と35℃程度のゲル化の臨界温度近くの温度で保持する場合では相図上では例えば前者は不安定領域に入り、後者では準安定領域となる。これらのサンプルが全く同じゲルを形成するとは考えにくい。

3. アガロースのゲル構造形成メカニズム

アガロース分子が高温でコイル状に溶解しており、それが冷却によりらせん構造を形成し、さらにそのらせん構造が会合して架橋構造を形成するというシナリオはおそらく間違っていないと思われる。但し、この分子の形態変化が相図上の何処で起こっているのか、という問題はまだ論争中である。アガロース溶液がスピノーダル分解によって相分離するという研究は Feke and Prins¹⁰⁾ の研究がその嚆矢であったと思われる。彼らはアガロース熱水溶液を冷却する過程で光散乱強度の角度依存性を観察し、スピノーダル分解で特徴的に観察されるブラッグピークを観察した。そしてこの知見を元にアガロースのゲル化はスピノーダル分解により系内に濃度揺らぎが生じ、それをきっかけにコイルヘリックス転移を経てヘリックスの会合の結果ゲルが形成するという説を提唱した。

アガロース溶液の系は UCST とゾルーゲル転移温度が共存する非常に複雑な系であり、かつ USCT とゾルーゲル転移温度が極めて近いという特殊な系であるとも考えることもできる。最近、極めて遅い冷却速度、すなわち、限りなく準静的に、アガロース溶液を冷却し状態図を検証してみるとゲル化温度よりも曇点温度の方が低温であるとの実験結果が報告されている^{11,12)}。これらの報告の著者は熱力学的相転移現象と（ゲル構造の）結合性の転移現象とは物理学的には全く異なる現象であり、必ずしもカップルしている必要はないと述べている。アガロースゲルに関するこのような実験結果の齟齬はどこから来るのかということを考えてみると、様々な要因が考えられる。一つは1.で述べたようにアガロースの分子特性値に関する情報が少ないという点が挙げられる。アガロースに関しては多くの研究報告がなされているが用いたサンプルの分子特性値を明記していないケースも散見される。今一つはサンプルの純度の問題である。アガロースは藻類から抽出されるが既に述べた通り中性多糖のアガロースとそれ以外（イオン性残基本やアルコキシを持っている）アガロペクチンとの混合物として得られる。工業的な原料では用途に応じてアガロース／アガロペクチン比を調整していると想像できる。一方純粋なアガロースサンプルを得ることは非常に難しいと思われる。イオン性残基をもつアガロペクチンはヘリックス形成能や分子間の会合性もアガロースとは大きく異なると思われ、その混入はゲル形成能に少なからぬ影響を及ぼすであろう。また溶媒である水自体の性質に影響を及ぼす不純物、例えば糖やポリオールなどはアガロースゲルの物性に多大な影響を及ぼす¹³⁾、無機塩類も水の構造変化を通して間接的にアガロースゲルの物性に影響を及ぼす¹⁴⁾。これらの問題を払しょくするためにはサンプルの純度を上げれば良いのであるが、アガロースの水への溶解性の低さがここでもネックとなり、サンプルの精製は難しい。もう一つの大きな問題は、ゲル化点（温度）の決定法である。ゲル化点の決定は実験的には極めて困難な課題である。一般的に用いられているのは例えばゲルの上に鉄球を載せ、ゲルを昇温させて鉄球が落下する温度をゲル融解温度とする方法や密封容器に封入したサンプル溶液を傾けて流動の有無をチェックする傾斜法が汎用されているが、いずれの方法もその精度は高いとはいえない。二重円筒のジオメトリーを用いてレオメータで動的弾性率の温度依存性からゲル化点を見出す方法もあるが「極めて粘度が高い状態」と「三次元網目構造が張り巡らされたゲル状態」を判別するのは難しい。そもそもどのような状態をゲルと認定するかという根本的な問題をはらんでいる。ゲル化の理論によればゲルとは分子量が無限大に発散した状態¹⁵⁾、トポロジー的には構成する系内のプリカーサーがすべてもれなく連結した状態ということになるが現実の系でそのような状況に達成するのかどうかは明らかではない。特にアガロースのようにゲル形成過程のどこかでらせん構造を形成するわけなので、非常に硬い棒状分子が高い体積分率で分散しているとすればその棒状分子の jamming¹⁶⁾ によっても系のコンシステンシーは大きく上昇するであろう。

結論としては“形成された”アガロースの分子論的な描像はおそらく図1のようなものであると思われるが、それが

形成される過程についてはまだまだ多くの未解決の問題が山積しているということを喚起しておきたい。材料科学という観点から考えると最終的に得らる材料の特性に興味があり、その形成過程にはあまり興味がないと考えるかもしれないが、その形成過程をコントロールすることで最終形態を制御することも可能ではないかと考えられる。特にアガロースのようなゲル化のドライビングフォースがただ温度変化のみという一見非常に単純に見える系であるが、考え方によっては非常に複雑であるということも言えるのである。アガロースゲルは溶質濃度として、たかだか1%程度でヤング率として 10^5 Pa 程度のハイドロゲルを形成する。アガロースゲルの実態は99%が溶媒である水なのである。アガロースゲルをアルコールで固定したサンプルの電子顕微鏡観察像はアガロースゲルが一種のスポンジ体であること（電顕観察像からは厳密には“であった”こと）を物語っている。ゲル化の条件（冷却速度やクエンチ温度）によりこのスポンジ構造は大きく変化する。簡単な実験として寒天を熱水で溶解し、冷却する温度（クエンチ温度）を変化させると形成するゲルの濁度が大きく変化するが観察される。この実験は温度のコントロールのみでサブミクロンサイズのアガロースゲルの網目構造をコントロールすることが可能であることを暗示している。

文 献

- 1) Hickson, T.G., Polson, N. *Biochim Biophys Acta*, 43, 165(1968)
- 2) Djabourov, M., Clark, A.H., Rowlands, D.W., Ross-Murphy, S.B. *Macromolecules*, 22, 180 (1989)
- 3) Rochas, C., Lahaye, M. *Carbohydr. Polym.* 10, 289 (1989)
- 4) Tashiro, Y., Mochizuki, Y., Ogawa, H., Iso, N. *Fish. Sci.* 62, 80 (1996)
- 5) Tashiro, Y., Ogawa, H., Iso, N. *Fish. Sci.* 63, 281 (1997)
- 6) Reid, D.S., Tibbs, D.J. *Thermal Analysis*, 3, 423 (1972)
- 7) Arnott, S., Fulmer, A., Scott, W.E. et al *J. Mol. Biol.*, 90, 269 (1974)
- 8) Nishinari, K., Koide, S., Ogino, K. *J. Phys. (France)*, 46, 793 (1985)
- 9) Normand, V., Lootens, D.L., Amici, E., Plucknett, K.P., Aymard, P., *Biomacromolecules*, 1, 730 (2000)
- 10) Feke, G.T., Prins, W. *Macromolecules*, 7, 527 (1974)
- 11) Morita, T., Narita, T., Tokita, M., *FFI Journal of Japan*, 213, 452 (2008)
- 12) Morita, T., Narita, T., Mukai, S., Yanagisawa, M., Tokita, M. *AIP Advances*, in print
- 13) Nishinari, K., Watase, M., Williams, P.A., Phillips, G.O. “Water Relationships in Food”, Edited by H. Levine and L. Slade, Plenum Press (1991), p235
- 14) Letherby, M.R., Young, D.A. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I.*, 77, 1953
- 15) Flory, J.P. “Principles of Polymer Chemistry”, Cornell University Press (1953)
- 16) Doi, M., Edwards, S.F. “The Theory of Polymer Dynamics”, Oxford Press (1986)