

ガラス状態にある凍結乾燥食品の メイラード反応速度に及ぼす還元糖の影響

川井清司, 萩原知明, 高井陸雄, 鈴木 徹[†]

東京海洋大学 海洋食品科学科

Effect of Reducing Sugar on the Maillard Reaction Rate of Freeze-dried Food in the Glassy State

Kiyoshi KAWAI, Tomoaki HAGIWARA, Rikuo TAKAI, and Toru SUZUKI[†]

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

Maillard reaction rates of model freeze-dried foods which consist of lysine and various reducing sugars (*i.e.* ribose, arabinose, xylose, galactose, glucose, and maltose) embedded in glassy trehalose matrix were examined at various temperatures below the glass transition temperature (T_g), and the effect of reducing sugar on the Maillard reaction rate was studied. The extent of Maillard reaction was examined spectrophotometrically from the absorbance at 280 nm (ABS_{280}), and the reaction rate (k_{280}) was evaluated as a pseudo zero order reaction rate from the time course of ABS_{280} . The T_g of each sample was almost same value, however, the k_{280} showed a considerable different value depending on the kind of reducing sugar. From the comparison of the k_{280} , it was found that the k_{280} became lower as T_g of the reducing sugar itself which was contained in the sample became high. From this result and our previous result, it was suggested that the reducing sugar and lysine embedded in glassy matrix can react partially independently of the molecular mobility of the matrix, and the contribution of the molecular mobility of Maillard reaction reactants itself to the reaction rate in the glassy matrix should be considered.

Key words: freeze-dry, amorphous food, glass transition, Maillard reaction, reducing sugar

1. 緒 言

ガラス状態にある物質は、並進・拡散に基づく分子運動が極端に抑制された状態にある。そのガラス状物質の温度を上げていくと、物質固有のガラス転移温度 (T_g) でラバー状態となるガラス・ラバー転移を示す。この転移に伴い、分子は運動性を取り戻し、粘性は急激に低下する。近年、多くの食品・医薬関連物質にもガラス転移が起こることが認識されるようになり、ガラス転移を考慮した食品加工や製造プロセス、貯蔵安定性との関連について注目されてきた[1-6]。

一方、乾燥食品の貯蔵時におけるメイラード反応の進行は、褐変、フレーバー変化、酵素活性や栄養価の低下をもたらすため、その制御・予測が望まれてきた[7-9]。

したがって、食品のガラス転移とメイラード反応速度との関連性について、いち早く注目されることとなった。1992年、Karmasらは鎖状高分子であるポリビニルピロリドン (PVP) や非還元性二糖類であるトレハロースによって形成される非晶質マトリクスにメイラード反応物となる還元糖とアミノ酸を包埋したモデル凍結乾燥食品を用い、それらの T_g 前後におけるメイラード反応速度を調べ、食品がガラス状態にあるとメイラード反応速度は著しく低下することを示した[10]。その後、同様の研究結果は数多く報告されるようになり、食品の T_g を把握することの重要性が認識されるようになった[11-14]。しかし、これらの結果は、食品がガラス状態にあればメイラード反応は進行しないことを意味するものではない。事実、Scheborらは、還元糖とアミノ酸を T_g の高い高分子マトリクスに包埋したモデル凍結乾燥食品についてメイラード反応速度を調べたが、 T_g 以下でもメイラード反応は速やかに進行するといった結果を報告した[15]。彼らはこの結果に対して、高分子マトリクス内における

(受付 2004 年 10 月 20 日、受理 2005 年 2 月 1 日)

〒 108-8477 東京都港区港南 4-5-7

Tel: 03-5463-0623, Fax: 03-5463-0585, E-mail: toru@s.kaiyodai.ac.jp

メイラード反応物のパッキングの緩さによる影響を示唆したが、実際にガラスマトリクス内におけるメイラード反応物のパッキング状態の違いが確認された例はなく、漠然とした抽象に過ぎなかった。一方、 T_g 以下においても高い運動性を有している高分子マトリクス内の局所的な運動、すなわち、側鎖の回転や伸縮に基づく β -緩和過程の影響について、Lievonon と Roos は T_g 以下のメイラード反応速度との相関検証を試みたが、両者の間に明確な関連性は認められなかった[16]。このような背景のもと、筆者らは上記問題だけでなく、メイラード反応物とガラスマトリクス間の分子間相互作用をも考慮に入れる必要があると考え、メイラード反応物となるグルコースとリシンを様々なガラスマトリクス (*e.g.*, 分子量や水分含量の異なる PVP, 二糖類や多糖類) によって包埋したモデル凍結乾燥食品を用い、それらの T_g 以下におけるメイラード反応速度を系統的に調べた[17]。得られた結果から、PVP, 二糖類, 多糖類といった同じタイプのガラスマトリクス間でメイラード反応速度を比較したところ、 T_g と貯蔵温度の差、すなわち $(T_g - T)$ が高いマトリクスほどメイラード反応速度を抑制する傾向が確認できた。しかし、全体で比較すると、 $(T_g - T)$ は低くても分子間水素結合を形成し易いマトリクスの方がメイラード反応速度を抑えられる傾向にあることも明らかとなった。

一方、我々の既報はグルコース・リシン間のメイラード反応速度に限定した結果であり、メイラード反応物の影響については考慮していなかった。メイラード反応物がガラスマトリクスに包埋されているなら、そのメイラード反応速度はマトリクスの分子運動性に支配されるため、メイラード反応物の影響はほとんどないと考えられる。しかし、これまでの研究結果が示すように、ガラスマトリクス内においてもメイラード反応は速やかに進行することから、マトリクスとメイラード反応物との分子運動性が必ずしも同じとはいえず、メイラード反応物自身の分子運動性もその反応速度に寄与すると考えられる[17]。しかし、メイラード反応物、とくに還元糖に関して、ガラスマトリクス内でのメイラード反応速度に及ぼす影響を系統的に調べた研究はほとんどない。そこで本研究では、ガラスマトリクスとしてトレハロースを、アミノ酸としてリシンを、還元糖として以前検討したグルコースに加え、5種類の還元糖 (リボース, アラビノース, キシロース, ガラクトース, マルトース) を用い、凍結乾燥によってガラス状トレハロースマトリクスに包埋されたリシンと各還元糖におけるメイラード反応速度を、その T_g 以下となる $70^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ の温度範囲で調べた。さらに、得られた結果と還元糖自身の T_g との関連性についても調べた。DSC によって検出される T_g は並進・拡散に基づく分子緩和時間がおおよそ 100 sec に達する温度であり[18]、還元糖の分子運動性を示す指標となり得る。すなわち、ある温度 T

で比較したとき、 T_g が高いほど $(T_g - T)$ が大きく、分子運動性は低いことを意味する。還元糖のバルクにおける分子運動性を示す T_g によって、ガラスマトリクス内におけるメイラード反応速度を関連付けられるかを検討した。

2. 実 験

D(-)リボース (99% purity, Sigma), D(-)アラビノース (99% purity, Sigma), D(+)キシロース (99% purity, Sigma), D(+)ガラクトース (98% purity, Sigma), D(+)グルコース (99.5% purity, Sigma), マルトース一水和物 (第一級試薬 Wako), L(+)リシン (特級試薬 97% purity, Wako), トレハロース二水和物 (99.3% purity, Hayashibara) を用いた。

上記の試薬から、各種還元糖：リシン：トレハロース = 1 : 1 : 98 g の 10% (w/w) 水溶液を調製し、10 mL 容ガラス製バイアル瓶 (外径 24.3 mm × 高さ 48.0 mm) に 2 mL ずつ採った。これを -50°C の冷凍庫で 12 hr 予備凍結したのち、あらかじめ棚冷却しておいた凍結乾燥機 (共和真空技術(株) RLE-52) へ移し、真空度 3×10^{-2} Torr で、棚温度を -40°C から 25°C まで昇温しながら、2 日間かけて凍結乾燥した。さらに凍結乾燥物の残存水分を取り除くため、五酸化二リンを共存させた真空デシケータ内で 1 週間放置した。試料の吸水を避けるため、真空デシケータを乾燥窒素ガスの雰囲気下で復圧し、凍結乾燥試料の入った各バイアル瓶にゴム栓とスクリュウキャップを施して試料を密閉した。試料の残存水分量はカールフィッシャー法によって調べた。

凍結乾燥試料を密閉したバイアル瓶を 70°C , 60°C , 50°C , 40°C にコントロールしたインキュベータに移し、数時間から数ヶ月間貯蔵した。その後、蒸留水によって 0.04 g/mL の濃度に復水し、Shimadzu UV-160 によって試料 1 g あたりの 280 nm の吸光度 (ABS_{280}) を測定した。 ABS_{280} は、おもにメイラード反応の中間生成物であるヒドロキシメチルフルフラールに由来する[19,20]。各 ABS_{280} は少なくとも 3 検体について測定し、その平均を値とした。貯蔵前の ABS_{280} を差し引いた ΔABS_{280} をメイラード反応量とした。

凍結乾燥試料の T_g と非晶質還元糖の T_g は differential scanning calorimetry (DSC: Shimadzu DSC-50) によって調べた。DSC の温度および熱量校正は蒸留水とインジウムによって行い、測定はすべて $5^\circ\text{C}/\text{min}$ で行った。単糖類はコラプス生成温度が高く[2]、ガラス状凍結乾燥物を調製することが困難であったため、融解・冷却によってガラス化させた試料について測定した。その他の試料は凍結乾燥によって得られたものを用いた。

3. 結 果

非晶質還元糖の DSC 昇温測定結果を Fig. 1 に示す。

それぞれのDSC昇温曲線においてガラス転移による吸熱シフトが観察され、その開始点を T_g として読み取った。得られた T_g をTable 1にまとめたが、それらは文献値[21]とほぼよく一致していたことから合理的な値であると判断した。同様に、それら還元糖、リシン、トレハロースから構成される凍結乾燥試料のDSC昇温測定結果をFig. 2に示す。いずれの試料も残存水分は0.5% (w/w) 以下であり、 T_g は88.8℃から96.4℃の間にあった。この結果もまたTable 1にまとめた。還元糖の T_g はそれぞれ異なる値であったが、それらはリシンとともに過剰量のトレハロースにガラス包埋されたことで、どれも同程度の T_g となった。これらの T_g は報告されるトレハロース単成分の $T_g = 120.9^\circ\text{C}$ [22]より低かったが、還元糖やリシン、わずかに含まれた残存水分による可塑効果が原因と考えられる。

メイラード反応について調べた結果の一例として、アラビノースを含む凍結乾燥試料に関する ΔABS_{280} の経時変化をFig. 3に示す。 ΔABS_{280} は零次反応的に貯蔵

Table 1 T_g of reducing sugar and freeze-dried sample.

Reducing sugar	This work [°C]	Reference[21] [°C]	Freeze-dried sample [°C]
Ribose	-12.5	-11.0	90.9
Arabinose	1.4	4.0	91.2
Xylose	10.2	13.0	92.7
Galactose	30.2	32.0	88.8
Glucose	37.6	38.0	90.3
Maltose	93.7	95.0	96.4

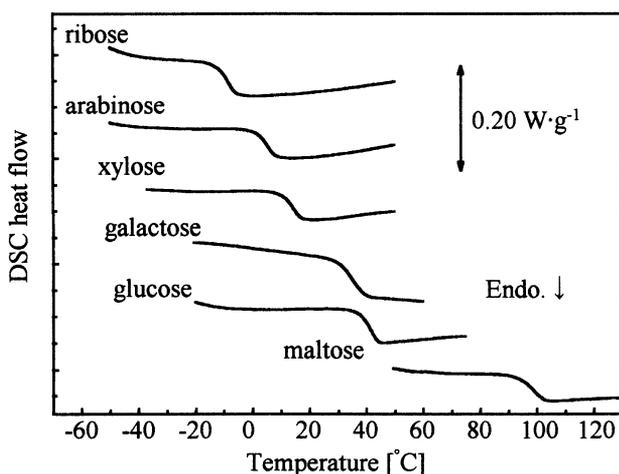


Fig. 1 DSC heating curves of glassy reducing sugars.

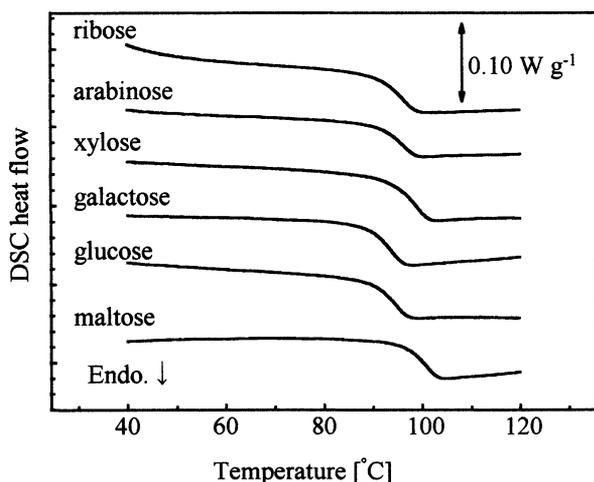


Fig. 2 DSC heating curves of glassy freeze-dried samples containing each reducing sugar.

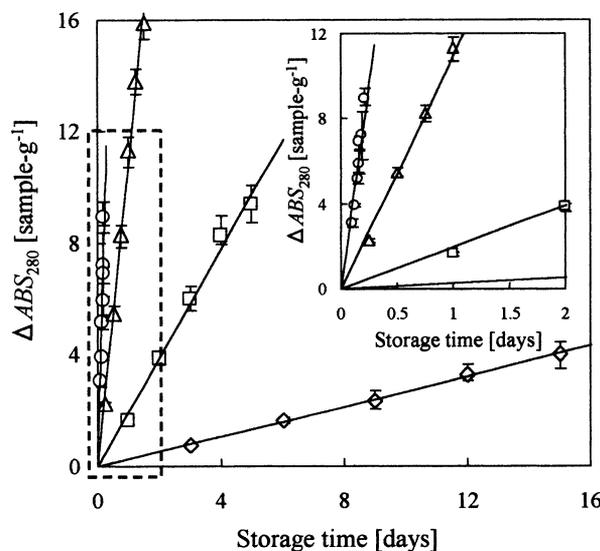


Fig. 3 Time course of ΔABS_{280} for glassy freeze-dried sample containing arabinose at various storage temperatures: circle, at 70°C ; triangle, at 60°C ; square, at 50°C ; diamond, at 40°C . Dash line area was enlarged in the insert figure.

時間とともに一定の割合で増加し、その増加の割合は貯蔵温度とともに高くなった。したがって、零次反応過程として見かけのメイラード反応速度(k_{280})を求めることができた。ここでは示さないが、他の還元糖を含む凍結乾燥試料についても同様の結果が得られており、 $R^2 > 0.95$ の良好な結果に基づき、 k_{280} を求めることができた。メイラード反応はいくつもの過程を経て進行する複雑な反応であり、280 nmの吸光度に寄与するメイラード反応生成物も完全に特定されているわけではない。したがって、 ΔABS_{280} によるメイラード反応の零次反応としての評価は経験的な理解によるものだが、実験結果を扱ううえではもっともよい適合性が得られることが確かめられており、他の研究者によってもしばしば用いられている[10,13,20]。

さらに各試料の k_{280} と貯蔵温度との関係を、以前調べたグルコースに関する結果[17]も付け加え、アレニウスプロットとしてFig. 4に示す。いずれの試料も、 k_{280} は測定温度範囲においてアレニウス則に従う結果が得られ、各凍結乾燥試料のメイラード反応における活性化エネルギー(ΔE)および頻度因子(A)を求めることができ

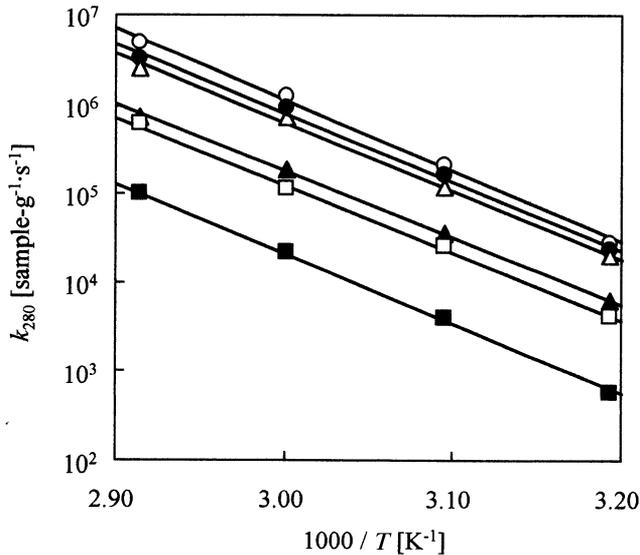


Fig. 4 Arrhenius plot of k_{280} for glassy freeze-dried sample containing each reducing sugar: open circle, ribose; close circle, arabinose; open triangle, xylose; close triangle, galactose; open square, glucose; close square, maltose.

Table 2 Activation energy and frequency factor of k_{280} .

	ΔE [kJ mol ⁻¹]	A [sample-g ⁻¹ · s ⁻¹]
Ribose	154.8	2.0×10^{30}
Arabinose	148.3	1.4×10^{29}
Xylose	146.4	5.6×10^{28}
Galactose	143.2	5.0×10^{27}
Glucose	146.0	9.6×10^{27}
Maltose	152.0	1.4×10^{28}

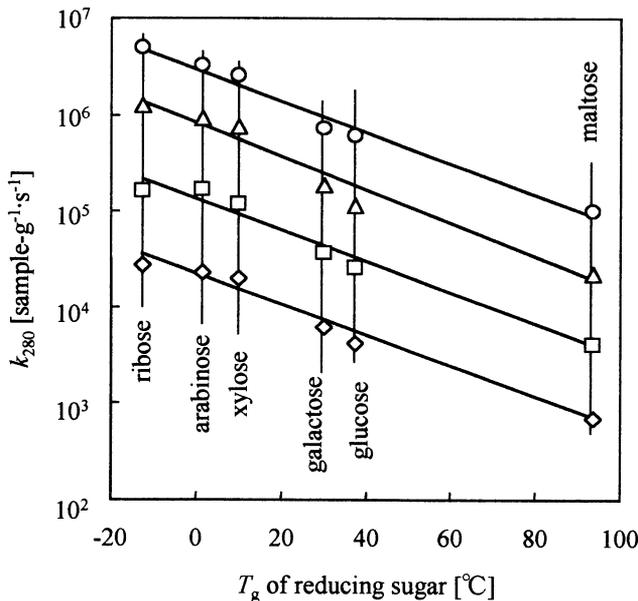


Fig. 5 Relationship between k_{280} for glassy freeze-dried sample containing each reducing sugar and T_g of the reducing sugar itself at various storage temperatures: circle, at 70°C; triangle, at 60°C; square, at 50°C; diamond, at 40°C.

た. ΔE は 143.2 ~ 154.8 kJ · mol⁻¹ 程度にあり, 試料間に顕著な差異を見出すことはできなかった. 一方, A は $5.0 \times 10^{27} \sim 2.0 \times 10^{30}$ sample-g⁻¹ · s⁻¹ の間にあり, 試料によって異なる値を示した. これらの結果は Table 2 にまとめた.

Fig. 4 より, 各貯蔵温度における k_{280} を比較すると, リボース, アラビノース, キシロース, ガラクトース, グルコース, マルトースの順に高かった. この順序は, Fig. 1 および Table 1 に示す還元糖自身の T_g の低い順序に対応した. そこで, 両者の相関性を探るため, 各貯蔵温度における k_{280} を還元糖の T_g に対してプロットした. 結果を Fig. 5 に示すが, 各貯蔵温度において, 反応物としての還元糖の T_g が高くなるとともに, k_{280} は低下する傾向が確認できた. 本結果より, ガラス状トレハロースマトリクスに包埋された還元糖・リシン間のメイラード反応速度は, 試料の巨視的な T_g ではなく, 還元糖自身の T_g によって統一的に整理できることが明らかとなった.

4. 考 察

一般に, 乾燥食品におけるメイラード反応は水分活性と分子運動性に影響されることが知られているが[14], 本研究で用いた試料の水分含量はいずれも 0.5% 以下であったため, 水分活性による影響はほとんどない. また, 試料の巨視的な T_g はどれも同程度であったため, k_{280} は還元糖によらないと考えられる. しかし, Fig. 4 に示すように, ガラスマトリクスに包埋された還元糖によって, k_{280} はまったく異なることが明らかとなった. トレハロースにはメイラード反応物との反応性はなく, T_g 以下において分解などが起こるといった報告例もないことから, ガラスマトリクス自身が貯蔵中に変化したとは考えられない. これは, 還元糖がガラス状トレハロースマトリクスに包埋されているにもかかわらず, 同じ分子運動状態になかったことを意味するであろう. さらに, Fig. 5 より還元糖自身の T_g が高いほど, k_{280} は低くなるという傾向が確認できた. この結果については, 著者らの既報[17]と関連付けて次のように考えられる. ガラスマトリクスに包埋されたメイラード反応物質の反応速度は, マトリクスの T_g だけでなく, マトリクスとメイラード反応物質との水素結合を介した分子間相互作用によって影響される. したがって, ガラスマトリクス内において, マトリクスと水素結合できなかったメイラード反応物は分子運動的にもマトリクスから独立した状態にあるため, メイラード反応物自身の分子運動性がその反応速度に影響すると考えられる. 上述のように, T_g が高いことは分子運動性が低いことを意味する. ゆえに, Fig. 5 に示す結果は, 還元糖自身の分子運動性の差異を反映したものかもしれない. しかし, 還元糖の T_g が $T > T_g$

にある単糖類と $T < T_g$ にあるマルトースとの間に k_{280} の際立った差はなかったことから、還元糖のバルクにおける T_g がそのままガラスマトリクス内の分子運動性を表わしているとはいえない。また、糖のように水酸基を多くもつ物質の T_g が高いことは、水素結合による分子間相互作用に優れることを意味する。したがって、還元糖の T_g が高い、すなわち水素結合形成に優れる糖ほど、ガラスマトリクスに束縛され易くなり、メイラード反応速度が低下したとの見方もある。Fig. 5 に示す k_{280} と還元糖の T_g との相関は、こういった因子が積み重なった結果であろう。

以上、ガラスマトリクス内におけるメイラード反応メカニズムの詳細については依然として不明な点を多く残す。しかし現段階において、モデル凍結乾燥食品のメイラード反応速度を還元糖の T_g によって統一的に特徴付けられたという結果は興味深い。本結果は、乾燥食品におけるメイラード反応を制御・予測するための新たな見方となり得るであろう。

5. 結 論

これまでに、ガラスマトリクス内におけるメイラード反応速度は、マトリクスの分子運動性と、マトリクスとメイラード反応物との水素結合形成に影響されることが分かっていたが、本研究結果より、メイラード反応物自身の分子運動性にも影響されることが示唆された。ガラスマトリクス内におけるメイラード反応機構の解明には、まだ多くの問題を残している。今後、乾燥食品におけるメイラード反応の予測・制御を可能にするには、食品の水分活性や分子運動性といった巨視的な視点からだけでなく、食品内部におけるメイラード反応物の存在状態や分子運動性といった微視的な視点から研究を進める必要がある。

謝 辞

本研究は文部科学省特別研究員奨励費からの助成による。Shimadzu UV160 の使用に関して、東京海洋大学海洋食品科学科、田中宗彦教授に、トレハロース二水和物試薬の提供に関して、株式会社林原生物化学研究所、茶園博人博士に感謝の意を表す。

引 用 文 献

[1] H. Levine, L. Slade; Principles of "cryostabilization" technology from structure/property relationships of carbohydrate/water system - a review. *Cryo-Lett.*, **9**, 21-63 (1988).
 [2] F. Franks; Freeze drying: from empiricism to predictabil-

ity. *Cryo-Lett.*, **11**, 93-110 (1990).

- [3] S. Iwamoto, H. Kumagai, Y. Hayashi, O. Miyawaki; Conductance and relaxations of gelatin films in glassy and rubbery states. *Int. J. Biol. Macromol.*, **26**, 345-351 (1999).
 [4] K. Izutsu, S. Kojima; Freeze-concentration separates proteins and polymer excipients into different amorphous phases. *Pharm. Res.*, **17**, 1316-1322 (2000).
 [5] T. Suzuki, K. Imamura, H. Fujimoto, M. Okazaki; Relation between thermal stabilizing effect of sucrose on LDH and sucrose-LDH hydrogen bond. *J. Chem. Eng. Jap.*, **31**, 565-570 (1998).
 [6] K. Imamura, T. Ogawa, T. Sakiyama, K. Nakanishi; Effect of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state. *J. Pharm. Sci.*, **92**, 266-274 (2003).
 [7] F. G. R. Reyes, B. Poocharoen, R. E. Wrolstad; Maillard browning reaction of sugar-glycine model systems: changes in sugar concentration, color and appearance. *J. Food Sci.*, **47**, 1376-1377 (1982).
 [8] T. P. Labuza, S. A. Massaro; Browning and amini acid loss in model total parenteral nutrition solutions. *J. Food Sci.*, **55**, 821-826 (1990).
 [9] L. Burin, M. P. Buera, G. Hough, J. Chirife; Thermal resistance of β -galactosidase in dehydrated dairy model systems as affected by physical and chemical changes. *Food Chem.*, **76**, 423-430 (2002).
 [10] R. Karmas, M. P. Buera, M. Karel; Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 873-879 (1992).
 [11] Y. H. Roos, M. J. Himberg; Nonenzymatic browning behavior, as related to glass transition, of a food model at chilling temperatures. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 893-898 (1994).
 [12] M. P. Buera, M. Karel; Effect of physical changes on the rates of nonenzymic browning and related reactions. *Food Chem.*, **52**, 167-173 (1995).
 [13] S. M. Lievonon, T. J. Laaksonen, Y. H. Roos; Glass transition and reaction rates: Nonenzymatic browning in glassy and liquid systems. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2778-2784 (1998).
 [14] E. Maltini, D. Torreggiani, E. Venir, G. Bertolo; Water activity and the preservation of plant food. *Food Chem.*, **82**, 79-86 (2003).
 [15] C. Schebor, M. P. Buera, M. Karel, J. Chirife; Color formation due to non-enzymatic browning in amorphous, glassy anhydrous, model systems. *Food Chem.*, **65**, 427-432 (1999).
 [16] S. M. Lievonon, Y. H. Roos; Comparison of dielectric properties and non-enzymatic browning kinetics around

- glass transition. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **4**, 297–305 (2002).
- [17] K. Kawai, T. Hagiwara, R. Takai, T. Suzuki; Maillard Reaction Rate in Various Glassy Matrices. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2285–2288 (2004).
- [18] C. A. Angell; Formation of glasses from liquids and biopolymers. *Science*, **267**, 1924–1935 (1995).
- [19] J. M. Flink; Nonenzymatic browning of freeze-dried sucrose. *J. Food Sci.*, **48**, 539–542 (1983).
- [20] J. O'Brien; Stability of trehalose, sucrose and glucose to nonenzymatic browning in model systems. *J. Food Sci.*, **61**, 679–682 (1996).
- [21] P. D. Orford, R. Parker, S. G. Ring; Aspects of the glass transition behavior of mixtures of carbohydrates of low molecular weight. *Carbohydr. Res.*, **196**, 11–18 (1990).
- [22] B. C. Hancock, C. R. Dalton, M. J. Pikal, S. L. Shamblin; A pragmatic test of a simple calorimetric method for determining the fragility of some amorphous pharmaceutical materials. *Pharm. Res.*, **15**, 762–767 (1998).

ガラス状態にある食品は並進・拡散に基づく分子運動性が抑制されており、諸々の劣化反応速度も著しく低下すると考えられている。しかし筆者らは、メイラード反応物（グルコースとリシン）を様々なガラスマトリクスに包埋した凍結乾燥食品を用いた研究より、メイラード反応はそのガラス転移温度 (T_g) 以下でさえ速やかに進行することを報告した。このメカニズムについて追及するため、ガラス状トレハロースマトリクスにリシンと様々な還元糖を包埋した凍結乾燥食品に関して、その T_g 以下におけるメイラード反応速度を調べた。その結果、それぞれの試料の T_g は同程度であったが、メイラード反応速度はまったく異なることが明らかとなった。また、含まれる還元糖自身の T_g が高いほどメイラード反応速度は遅くなる傾向が見出された。ガラスマトリクス全体の分子運動性だけでなく、還元糖自身の分子運動性もメイラード反応速度に寄与している可能性が示唆された。