

凍結及び乾燥研究会会誌 (Japanese Journal of Freezing and Drying), Vol. 39, 31~35, 1993.

糖, アミノ酸水溶液の組成とガラス転移温度

東京水産大学食品生産学科, *Pafra Ltd. Biopreservation
鈴木 徹, 高井 陸雄, 小嶋 秩夫, Felix Franks*

Effect of Glycine on Glass Transition Temperature of Sucrose Solution.

Toru SUZUKI, Rikuo TAKAI, Tsuneo KOZIMA and Felix FRANKS*

*Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries,
4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108***Pafra Ltd., Biopreservation Division, Cambridge, CB4 4GG U.K.*

The liquid - solid thermal equilibrium and the glass transition behaviour for glycine solution and sucrose - glycine mixture were investigated by using DSC. For glycine solutions the glass transition was not observed at all, but instead, it was found that a eutectic mixture of glycine and ice is formed during freezing. On reheating the eutectic mixtures, the crystal form of glycine changed from β type to α type.

For sucrose - glycine blends, a typical glass transition was recognized on DSC heating curves, and the transition temperature decreased as the weight ratio of glycine increased. This shows that glycine effects on glassy sucrose as a plasticizer. These results, concerning the relation between the glass transition temperature and the weight fraction of glycine, could be represented by a semi - empirical equation.

It was possible to figure a ternary state diagram by the combination of three binary state diagrams, sucrose - glycine, sucrose - water and glycine - water. Although the ternary state diagram is not complete, it could predict the behaviour during freezing of the ternary system.

1. 緒 言

ガラス転移は従来、液体の急速な冷却によって達成されるものと考えられていたが、糖や高分子などの水溶液では緩慢な冷却速度で凍結した場合にもガラス転移が起こることが認識されるようになった。水溶液のガラス転移は溶質濃度に依存し、濃度が高いほどガラス転移温度が高くなる。したがって水溶液の凍結過程では凍結濃縮の進行にともない残存溶液のガラス転移温度は徐々に上昇する。このため、残存溶液は過冷却

あるいは過飽和状態から溶質の析出を見ずに直接ガラス状態に転移する傾向がある¹⁾。いったんガラス状態の中に化学物質や、生体成分が閉じこめられると、ガラス状態の中の物質移動が極端に遅いため、年のオーダーで安定に保たれる。またこのようにしてできた低温でガラス状態にあるものから水分を低温乾燥などによって除去すれば、残存物のガラス転移温度はさらに上昇し、室温でもガラス状態となることもあり得る。すなわちこれが凍結乾燥の原理であると考えられるようになった²⁾。

こういった系の挙動は従来から使われてきた固液平衡図にガラス転移曲線(組成とガラス転移温度との関係)を加えたいわゆる状態図によって読みとることができる^{1,2)}。(細胞や食品素材の)凍結や乾燥に対する保

第39回凍結及び乾燥研究会研究報告4。

[Key Words : Glass transition, Glycine, Sucrose ;
ガラス転移, グリシン, スクロース]

護物質として糖類がよく使われることから糖類-水の2成分系の状態図は盛んに研究され³⁾, 凍結, 乾燥時の糖類による保護作用がガラス転移と密接に関係することが明らかにされつつある。

しかしながら, 実際の凍結保存や凍結乾燥に供される系は複成分系であることが多く, 凍結, 乾燥時の挙動はより複雑である。Glycine は糖類とともに凍結保護物質としてよく用いられるが, glycine 溶液の凍結挙動や溶解度についての報告は, ごくわずかしき見られない⁴⁾。また glycine が sucrose-水系の系に加えられた場合, 糖溶液のガラス転移にどのような影響を及ぼすかについてはほとんどわかっていない。そこで本研究では, DSC を使って, glycine-水系, sucrose-glycine系の温度による状態変化を把握することを試みた。また多成分系のガラス転移温度を決める半経験式の適用についても検討を加えた。

2. 実験方法

本実験に用いた glycine, sucrose は Sigma analytical grade をそのまま, また水は蒸留水を使用した。DSC には Perkin Elmer DSC-2 を使用し, 全実験を通じて冷却, 昇温速度は 5 deg/min に固定した。

「Glycine-水」系の試料の測定方法は以下の2通りの方法を用いた。

a. 濃度20 wt% 以下の試料は常温で十分溶解するため, 数種の濃度に調整した溶液をDSCパンに封入し, DSC にセットした。これを230K まで冷却し, 再び昇温する過程を DSC で追跡した。

b. 濃度20wt% 以上の高濃度試料は常温で溶解しないため, DSC パン内で glycine と水を数種の比率で混合し, サスペンション状態で密封したものを DSC にセットした。このパンを DSC 内で始め加熱し, 内部の glycine をいったん溶解させた後230K まで冷却した。この試料を再加熱する際の過程を DSC で調べた。

「Sucrose - glycine」系ではそれぞれの結晶粉末を DSC パン内で種々の割合で混合し, 密封する事で組成を調整した。その種々の組成の試料を DSC 内で加熱溶解させ, すぐに230K まで冷却後, 昇温する過程を調べた。

3. 結果と考察

「Glycine-水」系: Fig. 1 と 2 はそれぞれ glycine の希薄溶液と濃厚溶液の DSC 昇温曲線を示す。ガラス転移点は DSC 昇温カーブにおいて熱容量のステップ状の上昇から検出される⁵⁾が, どちらの濃度

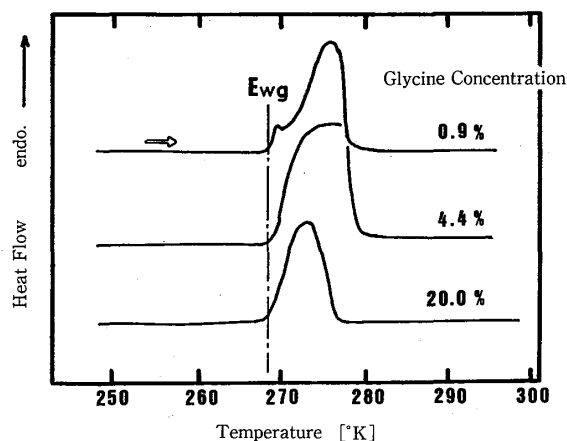


Fig. 1. DSC heating power-time curves of frozen glycine solutions. Cooling and heating rate: 5.0 degree min⁻¹. Sample weight: 8-17 mg. E_{wg} line shows the estimated eutectic temperature. Reproduced from reference 7.

領域のカーブにもガラス転移は認められなかった。また Fig.1 の0.9%溶液のカーブには共晶混合物の融解と見られる小さな独立ピークが, 氷の融解を示す大きなピークの低温側に見られた。このことから glycine 水溶液では糖類の溶液と凍結挙動がかなり異なるものと考えられる。Glycine 溶液では凍結過程においてガラス転移を起こさず共晶点で glycine の析出が起こっているのか, あるいはガラス転移点がかかなり低い場合検出できなかったのかは重要なポイントでは

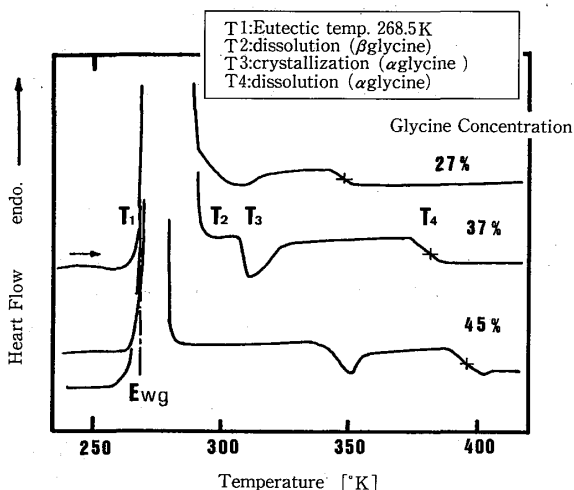


Fig. 2. Second DSC heating power-time curves of concentrated glycine solutions. Cooling and heating rate: 5.0 degree·min⁻¹. Sample weight: 45-80 mg. Redrawn, with alterations, from reference 7.

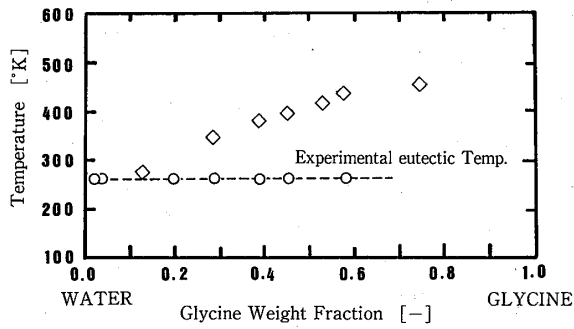


Fig. 3. Phase diagram of the glycine-water binary system. \diamond and \circ are the experimental dissolution temperatures of glycine and the eutectic temperatures at various concentration. Redrawn, with alterations, from ref. 7.

あるが、本実験からは明らかにできなかった。

また、どの濃度においてもピークの立ち上がり温度 (低温側) が 0.9% 溶液の共晶融解ピークの立ち上がり温度 E_{wg} (268.5K) と一致していることから、高濃度では共晶が存在するが、その融解ピークは水の融解ピークと重なりあっていると考えられる。

さらに、Fig. 2 に見られるように高濃度の試料の DSCカーブは 270K 以上の温度域でかなり複雑なパターンを示した。これは glycine が結晶多形⁹⁾であることを考慮すると理解される。すなわち T_1 で共晶が融解し、 T_2 で β -glycine の溶解が起き、それにひき続いて T_3 では α -glycine の結晶化が起こっているものと解釈できる。そして最終的に T_4 では α -glycine

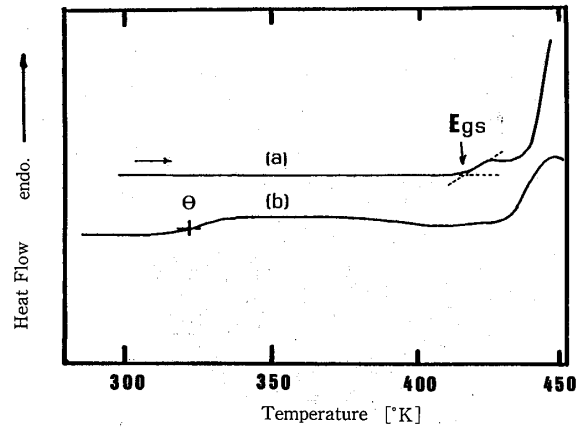


Fig. 4. Typical DSC heating power-time curves of the binary sucrose-glycine blends. (a) first, (b) second heating scan of the crystal mixture (glycine 3.4% wt). Heating rate 5.0 degree·min⁻¹. θ indicates the glass transition point and E_{gs} the eutectic point of sucrose-glycine system. Redrawn, with alterations, from ref. 7.

の溶解が起こると考えられる。この T_4 は明らかに濃度の増加と共に高温側にシフトする傾向が認められた。この関係を整理して Fig. 3 に示すが、共晶点濃度はかなり低濃度であり、glycine の濃度にしておよそ 10wt% 付近にあるものと見なせる。このことから glycine 水溶液を凍結する場合、ガラス転移を起こす前に共晶が生成され易いことが推察される。

「Sucrose - glycine」系：結晶粉末の混合物を昇温していくと、いずれの組成でも Fig. 4 (a) と類似のカー

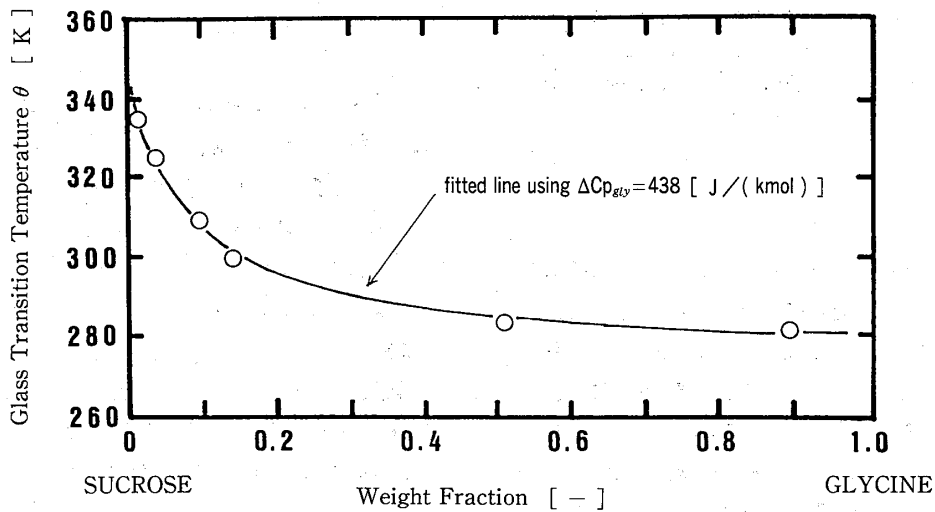


Fig. 5. Glass transition temperature θ versus weight fraction of glycine to sucrose. Solid line shows the calculated data by Eq.(1). Redrawn, with alterations, from ref. 7.

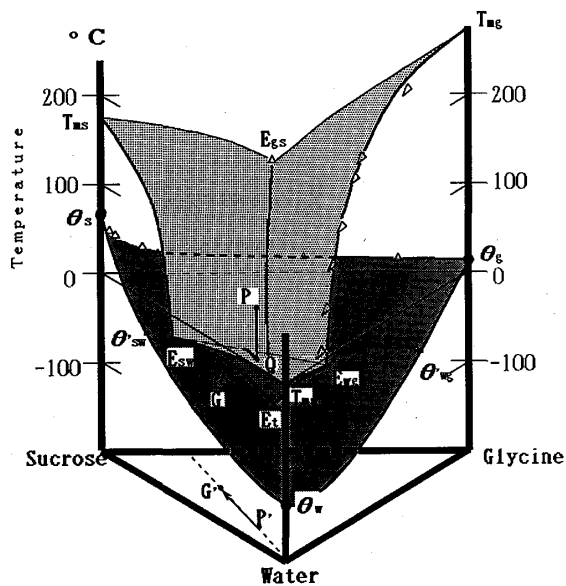


Fig. 6. Estimated state diagram of the sucrose-glycine-water ternary system. Δ : data obtained in this study. T_{ms} , T_{mw} , and T_{mg} are the melt temperatures of pure sucrose, water, and glycine. E_{sm} , E_{wg} and E_{gs} are the respective eutectic points of the binary systems, E_t is the ternary eutectic point. E_{wg} and E_{gs} were reliably established in this study, but other eutectic points are uncertain. θ_s , θ_w and θ_g indicate the glass transition temperatures of the pure materials. A point θ'_{sm} is the intercept between the extrapolation line of $T_{mw}-E_{sm}$ and the $\theta_s-\theta_w$ glass transition line. And also a point θ'_{wg} is the intercept between the extrapolation line of $T_{mw}-E_{wg}$ and the $\theta_w-\theta_g$ glass transition line. Reproduced from ref. 7.

ブが得られた。それら昇温カーブにはガラス転移は認められず、共晶融解と見なせる E_{gs} で示されるような小さなピークとそれにつづく Sucrose の融解のピークが観測された。これに対し、溶解冷却後の再昇温カーブでは組成割合によらず Fig.4 (b) に見られるような θ 点で典型的なガラス転移が認められた。またこの θ 点は glycine の重量比が大きくなるにつれて、低温側へシフトする傾向があった。Fig.5 はそのガラス転移温度 θ と glycine の重量分率との関係をプロットしたものであるが、sucrose に glycine が混入する

とガラス転移温度は急激に下降することがわかる。すなわち glycine は sucrose に対して水と同じように可塑剤として作用していることになる。また Fig.5 に示した実線は多成分系のガラス転移温度をその組成から推算する半経験式(1)⁶⁾による計算結果である。

$$\theta = \left[\frac{\sum_{i=1}^n X_i \Delta C_{p_i} \theta_i}{\sum_{i=1}^n X_i \Delta C_{p_i}} \right] \quad (1)$$

ただし X_i はモル分率、 θ_i は純成分 i のガラス転移温度、 ΔC_{p_i} は純成分のガラス転移点における熱容量の変化である。これらのパラメーターのうち sucrose と glycine のガラス転移温度は実験結果の外挿からそれぞれ 343K 及び 283K と求められ、sucrose の熱容量変化も実験結果の外挿から 167J/(K·mol) と決められた。しかし glycine の ΔC_p は、glycine 比が高くなると非常に小さくなる傾向があり、求めることが困難であった。そのため glycine の ΔC_p をパラメーターとして、実験結果に最もよく合うように fitting を行った。その結果 glycine の ΔC_p が 438J/(K·mol) の時、(1)式が実験結果を非常によく表せることがわかった。

しかし、この ΔC_p の値は sucrose の 167J/(K·mol) と比較しても大きく、また前述の実験結果にも矛盾する。したがって $\Delta C_p = 438J/(K·mol)$ という値は単純に glycine のガラス転移による熱量変化とはいえず、(1)式の適用を検討する必要がある。

以上の結果と sucrose-水の状態図²⁾を組み合わせることで、sucrose-glycine-水の3成分系の状態図の概要がつかめる。Fig.6 にその結果を示す。不明な箇所も多々あるが、3成分溶液のガラス転移温度は各2成分どうしのガラス転移線3本によって囲まれたおそらく下に凸な3角曲面によって表されるものと考えられる。

図中 P 点にある溶液を冷却すると、固液平衡面上の点 Q に到り、水の生成にともなって glycine/sucrose 比を一定に保ったまま溶質が濃縮されて行き、共晶線 $E_{sw}-E_t$ に到達する。しかしここでは sucrose 溶液の凍結の場合と同じく sucrose は析出せず、さらに濃縮が進み G 点でガラス転移面と交わり、残存溶液がガラス状態になることが読める。この G 点は初期水分含量に関係なく、glycine と sucrose の量的な比で決まる点で、glycine の量が増えると G 点は低い温度にシフトしていくことが定性的に理解できる。

要 約

Glycine 水溶液は糖類の溶液と異なり、平衡図上で共晶点が浅く凍結時にガラス転移しづらいことがわ

かった。また凍結した glycine 水溶液を解凍していく過程で、glycine の結晶形は β 型から α 型に転移していくことが DSC カーブから読み取られた。

水を含まない sucrose - glycine の混合系ではメルト状態から 5 deg/min 程度のスピードで冷却した場合にもガラス転移することがわかった。またその際、ガラス転移温度は glycine の量が増えるにしたがって降下することから、glycine は sucrose のガラス状態に対して可塑剤として作用すると考えられる。

本実験で得られたデータと sucrose 溶液の状態図を合わせ glycine - sucrose - 水の 3 成分系の状態図の様相を描くと、3 成分溶液のガラス転移を含めた凍結挙動を定性的に説明できることがわかった。

文 献

- 1) Levine, H. and L. Slade: *In* "Water and Food Quality", T. M. Hardman, ed., Elsevier, p. 71 (1989).
- 2) Franks, F.: *Cryo-Letters*, **11**, 93 (1990).
- 3) Orford, P.D., R. Parket and S. G. Ring: *Carbohydrate Research*, **196**, 11 (1990).
- 4) Weast, C. R. : *CRS Handbook of Chemistry and Physics*, c-291 (1986).
- 5) Iitaka, Y.: *Acta Cryst.*, **13**, 35 (1960).
- 6) Orford, P. D., R. Parker, S. G. Ring and A. C. Smith : *Int. J. Biol. Macromol.*, **11**, 91 (1989).
- 7) Suzuki, T. and F. Franks : *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, in press (1993).