

低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], Vol. 54, No. 2, 71~77, 2008

[原著論文]

製造過程によるガラス状食品の非平衡状態の相違に関する解析手法

¹広島大学大学院生物圏科学研究科, ²東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科
川井清司¹, 黒崎香介², 鈴木 徹²

Analytical Approach for the Non-equilibrium State of Glassy Foods Affected by Its Manufacturing Process

Kiyoshi KAWAI¹, Kousuke KUROSAKI² and Toru SUZUKI²

¹*Department of Biofunctional Science and Technology, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528 Japan.*

²*Department of Food Science and Technology, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477 Japan.*

Glassy state is thermodynamically non-equilibrium state, and thus the various properties of glassy foods are affected more or less by thermal history such as manufacturing process and subsequent storage. Although the effect of isothermal storage on the non-equilibrium state of glassy foods has been evaluated through enthalpy relaxation measurement by using differential scanning calorimetry (DSC), there is no analytical approach for non-equilibrium state affected by its manufacturing process. To overcome this problem, the previous enthalpy relaxation measurement was extended theoretically, and an analytical approach to evaluate effect of manufacturing process on the non-equilibrium state of glassy materials was proposed. The approach involves that the value of relaxed enthalpy reflecting the thermal history of glassy materials can be evaluated from the difference between first-scanned DSC thermogram and second-scanned one. In addition, this approach was employed for freeze-dried trehalose powder, and the utility of the proposed approach was demonstrated.

(Received Aug. 11, 2008; Accepted Dec. 5, 2008)

緒 言

近年, 多くの乾燥食品がガラス状態にあることが

[Key words: Glass transition, Trehalose, Enthalpy relaxation, Non-equilibrium, DSC; ガラス転移, トレハロース, エンタルピー緩和, 非平衡状態, 示差走査熱量計]

明らかとなり, ガラス転移を考慮した乾燥食品の品質制御が検討されてきた¹⁻³⁾. 食品がガラス状態にあると, 並進・回転といった分子運動性が見かけ上凍結することから, 様々な劣化の遅延が期待される. また, ガラス特有の硬くて脆い性質が食品の加工性や食感などに影響を及ぼす. しかし, ガラス状態にある食品が水分収着や環境温度の上昇によってラバー状態になると, 凍結していた分子運動性が回復し,

(2)

保存性や力学的性質は著しく変化する。このガラスラバー間の状態変化はガラス転移として、またガラス転移を示す温度はガラス転移温度 (T_g) として理解されている。食品のアモルファスとしての性質を制御するにあたり、 T_g は最も重要な指標となる。

食品のガラス転移特性を考慮した既往の研究では、 T_g の水分含量依存性や T_g 前後における様々な性質の変化など、 T_g に基づく議論が行われてきた。しかし、ガラス状態は熱力学的非平衡状態にあるため、製造方法やその後の保持といった履歴によって、ガラスの状態 (分子配置) は変化する。そういったガラスの非平衡状態の相違が、結晶化特性や水分透過性など、様々な性質に影響を及ぼすことが知られている^{4,7)}。したがって、ガラス状乾燥食品の性質を制御するには、 T_g だけでなく履歴に依存するガラスの非平衡状態についても考慮しなければならない。

このような背景の下、ガラス状物質の等温保持過程における非平衡状態の変化が、示差走査熱量計 (DSC) を用いたエンタルピー緩和測定によって評価できることが認識され、これまでに多くのデータが集積されてきた⁸⁻²²⁾。一方、製造過程においてガラス状物質がどのような非平衡状態に陥ったかを把握することも実用上重要といえるが、既往のエンタルピー緩和測定ではそれを評価することはできなかった。本研究では、アモルファス素材を題材とした研究分野で培われてきた理論や研究手法を十分に検討した上で、それらを拡張し、製造履歴によるガラス状物質の非平衡状態を評価する手法を提案した。更にモデル凍結乾燥食品に適用することで、その有用性を検証した。

解析手法の構築

製造履歴によるガラス状物質の非平衡状態の相違を解析する手法を構築するため、ガラス転移前後での冷却及び昇温速度が緩和エンタルピー (ΔH_{relax}) に及ぼす影響について考察する (Fig. 1)。まず、ある基準となるスキャン速度 ($q^{standard}$) を任意に決定する。ここで、アモルファス物質を $-q^{standard}$ で冷却していくと、やがて液体の構造変化が温度変化に追従不可能となり、ガラス転移温度 ($T_g^{standard}$) でガラス状態となる (b)。このガラスを $+q^{standard}$ で昇温していくと、同じく $T_g^{standard}$ に達した時点で過冷却

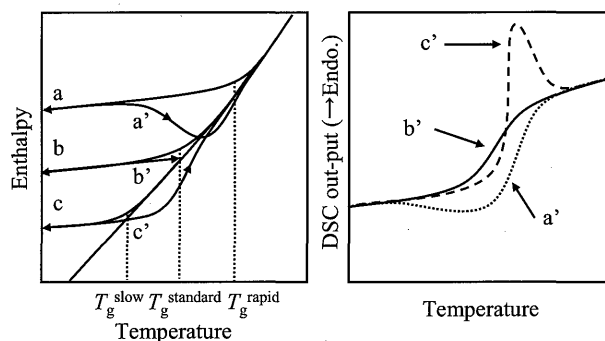


Fig. 1. Enthalpy vs temperature diagram (left) and DSC heating curves (right) for an amorphous material: a, cooling at $-q^{rapid}$; b, cooling at $-q^{standard}$; c, cooling at $-q^{slow}$; a', b' and c', heating at $+q^{standard}$.

液体となる (b')。このガラス転移は、DSC 昇温曲線上では吸熱シフトとなって現れる。これを基準ガラス転移とする。一方、このアモルファス物質を $-q^{slow}$ ($q^{slow} < q^{standard}$) で冷却すると、液体の構造変化が温度変化に対して、 $T_g^{standard}$ より低温まで追従可能となるため、ガラス転移温度は T_g^{slow} へと見かけ上低くなる (c)。また、基準ガラス状態と比較すると、過剰エンタルピーの低いガラス状態となる。このガラスを $+q^{standard}$ で昇温すると、このガラスにとっては急速昇温を与えられたこととなり、 T_g^{slow} で平衡を実現できず、過加熱される (c')。この場合、ガラス転移は吸熱シフトと吸熱ピークが重なった熱応答として DSC 昇温曲線上に検出される。対照に、このアモルファス物質を $-q^{rapid}$ ($q^{rapid} > q^{standard}$) で冷却すると、液体の構造変化が温度変化に対してより高温で追従不可能となり、ガラス転移温度は T_g^{rapid} へと見かけ上高くなる (a)。また、基準ガラス状態と比較すると、過剰エンタルピーの高いガラス状態となる。このガラスを $+q^{standard}$ で昇温すると、このガラスにとっては緩慢昇温を与えられたこととなり、昇温過程において過剰エンタルピーが平衡値に近づきつつ、ガラス転移する (a')。この場合、緩和による発熱と吸熱シフトとが重なった熱応答として DSC 昇温曲線上に検出される。以上の知見はアモルファス素材を扱う研究分野で培われてきたものであり、ガラス転移近傍での分子再配置過程の活性化エネルギーを熱分析によって測定する方法として利用されている²³⁾。また、冷却速度を変化させることで、ガラス転移による吸熱シフトが吸熱或いは発熱ピークとして現れることを利用し、熱的応答の小

さいガラス転移過程を検出する目的でも利用されている^{24, 25)}。

以上の知見に基づき、履歴が未知なガラス状物質の非平衡状態を評価する手法を以下に提案する。履歴が未知なガラスを $+q_{\text{standard}}$ で昇温すると、製造履歴に依存した吸熱或いは発熱のピークが観測される。これを直ちに $-q_{\text{standard}}$ で T_g 以下にまで冷却し、再度 $+q_{\text{standard}}$ で昇温することで、基準ガラス転移が得られる。基準ガラス転移と履歴情報を含んだガラス転移との差から、履歴に依存した吸熱或いは発熱ピークが抽出され、このピーク面積から正或いは負の ΔH_{relax} が求まる。したがって、この ΔH_{relax} の値からガラスの非平衡状態の相違を特徴付けることができると考えられる。更に ΔH_{relax} と冷却速度との関係を把握しておくことで、凍結乾燥など複雑なガラス化過程を冷却速度の相違として表すことができると考えられる。以下では、本解析手法をモデル食品に適用することで、その有用性について検討した。

材料および方法

1. 試料調製

トレハロース二水和物結晶 (Sigma-Aldrich 社製) を用いて、約 10% トレハロース水溶液を調製し、凍結乾燥した。更に得られた凍結乾燥粉末を真空デシケータ内に放置することで十分に乾燥させた。この乾燥トレハロース粉末を相対湿度 11% のデシケータに入れ、調湿したものを試料とした。

2. DSC 測定

DSC 測定には、パーキンエルマー社製 Diamond DSC を用いた。試料を DSC 耐圧パンに数 mg 採り、以下の手順で走査した。まず、 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ でガラス転移以上に昇温し、試料調製による履歴を含んだガラス転移を得た (1st スキャン)。直ちに $10^\circ\text{C}/\text{min}$ で ($T_g - 50$) $^\circ\text{C}$ 以下まで冷却し、再び昇温することで基準ガラス転移を得た (2nd スキャン)。両者の差より得られた吸熱或いは発熱ピーク的面積から ΔH_{relax} を求めた。本研究では発熱ピークを正の ΔH_{relax} 、吸熱ピークを負の ΔH_{relax} とした。更に様々な冷却速度 ($1 \sim 20^\circ\text{C}/\text{min}$) でガラス化した試料を $10^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温し、基準ガラス転移を差し引くことで、 ΔH_{relax} と冷却速度との関係について調べた。

結果および考察

本研究ではモデル食品として相対湿度 11% 下で調湿した凍結乾燥トレハロースを選定した。これは、凍結乾燥が食品だけでなく生物素材や医薬品など、様々な物質に利用されている汎用性の高い乾燥技術であること、トレハロースのガラス化特性は多方面から注目を浴びていること、絶乾状態よりも水分を少し含んだ方がモデル食品 (或いは医薬品) として適切と考えられること、などの理由による。

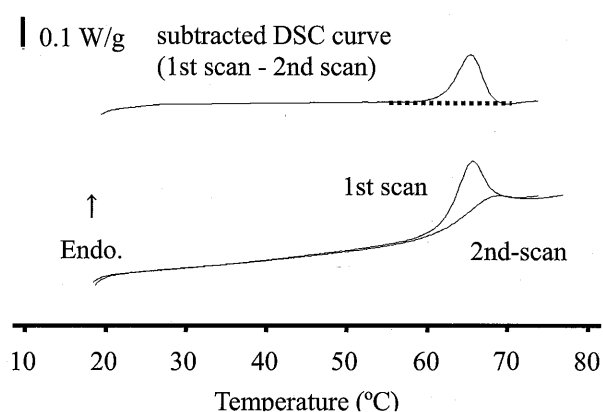


Fig. 2. DSC heating curves for glassy trehalose.

ガラス状トレハロース試料の DSC 測定結果を Fig. 2 に示す。1st スキャンと 2nd スキャンとではガラス転移近傍での熱応答が異なる結果が得られた。本測定には耐圧製の DSC パンを用いたため、測定中に試料の水分が蒸散することはない。また、ガラス転移による吸熱シフト幅が一致していることから、結晶化などの不可逆的変化も起こっていないと考えられる。したがって、1st スキャンと 2nd スキャンとでの DSC 昇温曲線の相違は、ガラス状態の履歴の相違によるものと考えられる。1st スキャンの結果から 2nd スキャンの結果 (基準ガラス転移) を差し引くことで、試料調製履歴による熱応答が抽出された。この熱応答が吸熱ピークであったことから、本研究で用いたトレハロース試料は、基準ガラス状態と比べ、過剰エンタルピーが低いガラス状態に陥っていたことが明らかとなった。過剰エンタルピーが低いことは、密度が高く分子運動性が低いガラス状態であることを意味する^{21, 22)}。本結果は凍結乾燥

(4)

過程だけでなく、その後の調湿過程や測定に至るまでの保持期間といった全ての履歴を反映したものであることから、その原因を特定することは現時点では困難である。今後、凍結乾燥条件（試料凍結時の冷却速度、乾燥時の棚温度、時間及び真空度）や調湿条件（相対湿度、保持温度及び時間）が ΔH_{relax} に及ぼす影響について検討を進めていくことで、製造履歴とガラス状物質の非平衡状態との関連が明らかになるものと期待される。

以上の結果より、本研究手法を用いることで、複雑な履歴を有したガラス状物質においても、最終的に陥ったガラスの非平衡状態を ΔH_{relax} として特徴付けることが可能なことが確かめられた。更にこの凍結乾燥試料の履歴を冷却速度として表現するため、 ΔH_{relax} と冷却速度との関係について調べた。DSC 測定結果の一例を Fig. 3 に示すが、冷却速度によって得られた DSC 昇温曲線が変化し、これらのガラス転移から基準ガラス転移を差し引くことで、冷却速度の寄与が導き出された（挿入図）。このピーク面積から ΔH_{relax} を求め、 ΔH_{relax} と冷却速度との関係を Fig. 4 に示す片対数プロットによって整理したところ、両者には一次の正の相関が認められた。更にこの直線関係が測定範囲外にも成り立つと仮定し、凍結乾燥によってガラス化した試料が示した ΔH_{relax} から冷却速度を読み取ると、本研究で用いた凍結乾燥試料のガラス状態は、 $0.06^\circ\text{C}/\text{min}$ での冷却によってガラス化したときの非平衡状態に相当することが分かった。以上の結果より、試料が有する複

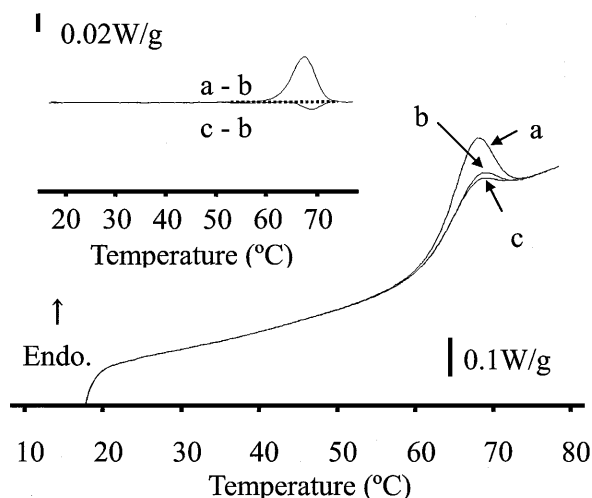


Fig. 3. DSC heating curves for glassy trehalose with different pre-cooling rate: a, $1^\circ\text{C}/\text{min}$; b, $10^\circ\text{C}/\text{min}$; c, $20^\circ\text{C}/\text{min}$.

雑な履歴を、冷却速度という比較的簡単な指標に置き換えて表現可能なことが確かめられた。

上述の結果は Fig. 4 に示す関係、即ち冷却速度の対数と ΔH_{relax} との間に直線関係が成り立つという条件の下で得られた。以下では、その意味について

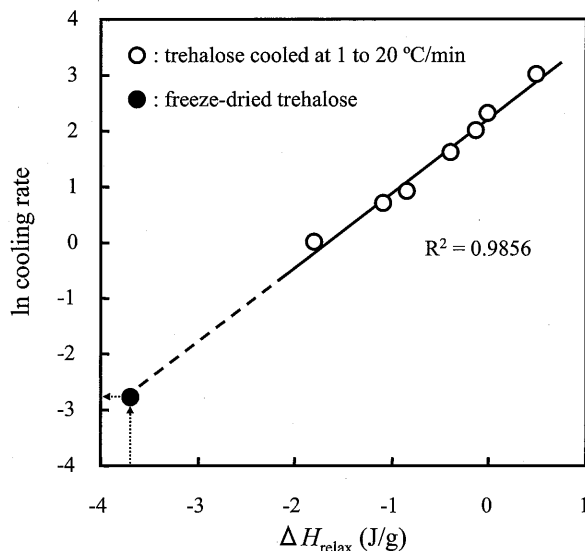


Fig. 4. Natural logarithm of pre-cooling rate versus relaxed enthalpy.

既往の研究に基づいて考察する。Wang ら²³⁾は、同様の方法で求めた ΔH_{relax} を次式で表した。

$$\Delta H_{\text{relax}} = (T_f - T_f^{\text{standard}}) \cdot \Delta C_p \quad (\text{Eq. 1})$$

ここで ΔC_p は基準測定でのガラス転移に伴う熱容量変化 ($\text{J}/(\text{g} \cdot \text{K})$) であり、物質に依存した定数である。

また、 T_f^{standard} 及び T_f は本研究での T_g^{standard} 及び冷却過程でのガラス転移温度に相当し、前者は物質に依存した定数、後者は ΔH_{relax} と同じく冷却速度の関数として表される。彼らは T_f の逆数に対する冷却速度の片対数プロット ($\ln \text{cooling rate vs } 1/T_f$) において、両者の関係は負の一次関数で表されることを明らかにした。Eq.1 より T_f と ΔH_{relax} との関係は正の一次関数で表されることから、Fig.4 の直線関係が成立することは彼らの結果と一致するものといえる。更に Wang らは、得られた直線の勾配からガラス転移近傍での分子再配置過程における見かけの活性化エネルギー (ΔE) を求めることが可能であり、勾配が大きいほど ΔE が高いことを示した。既往の研究によると、ガラス転移近傍温度での液体の分子再配置過程では、個々の分子が独立して運動するのではなく、幾つかの分子が共同的に運動すると考え

られており、 ΔE が高いことは分子運動の共同性が高いことを意味する。先述の見解によると、 ΔE が高いことは Fig.4 に示す直線の勾配が大きいことに相当する。したがって、ガラス状態に陥る際の分子の共同運動性がガラス化した後の非平衡状態での性質に影響を及ぼすことが示唆される。

本研究では凍結乾燥によって得られたガラス状物質の履歴を冷却速度として表現可能であることを明らかにしたが、噴霧乾燥、加熱乾燥、メカニカルミリング、クエンチングなど、凍結乾燥以外にも様々なガラス化操作がある。これらの複雑なガラス化過程を冷却速度の相違として一律に評価・比較できることは、製造操作によって異なるガラス状食品の様々な性質の相違を理解する上で有意義なことである。本研究の目的はガラス状物質の非平衡状態を把握することであり、最終的には非平衡状態の相違を冷却速度の相違としてではなく、分子緩和時間の相違として理解する必要がある。過冷却液体の分子緩和時間を測定するには、誘電緩和測定などの測定手段が有効であり、得られたデータから分子緩和時間の温度依存性を広く予測することが可能である²⁶⁻³⁰⁾。また、非平衡ガラス状態での分子緩和時間はエンタルピー緩和時間として評価することが可能であり、その温度依存性を予測するモデルも幾つか報告されている³¹⁻³³⁾。今後、これらの測定手法および知見を駆使することで、ガラス状物質の非平衡状態に関する理解が更に広がるものと期待される。

ま と め

本研究では、アモルファス素材を題材とした研究分野で培われてきた理論や研究手法を十分に検討した上でそれらを拡張し、製造履歴によるガラス状物質の非平衡状態の相違を評価する解析手法を提案した。更にそれをモデル凍結乾燥食品に適用することで、食品の複雑なガラス化過程を冷却速度の相違として評価できることを明らかにした。本研究手法によって、非平衡状態という扱い難い対象に新たな知見がもたらされるものと期待される。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金事

業 (課題番号 19880029) により行われた。

文 献

- 1) Roos, Y. H.: Food processing and storage, *In* "Phase Transitions in Foods", Academic Press, San Diego, p. 313-347 (1995)
- 2) Le Meste, M., Champion, D., Roudaut, G., Blond, G. and Simatos, D.: Glass transition and food technology: A critical appraisal. *J. Food Sci.*, **67**, 2444-2458 (2002)
- 3) Slade, L. and Levine, H.: Polymer science approach to water relationship in foods. *In* "Food preservation by moisture control" G. V. Barbosa-Cánovas and J. Welti-Chanes, eds., Technomic Publishing, Western Hemisphere, p. 33-132 (1995)
- 4) Chang, Z. H. and Baust, J. G.: Physical aging of glassy state: DSC study of vitrified glycerol systems. *Cryobiol.*, **28**, 87-95 (1991)
- 5) Kim, Y. J., Hagiwara, T., Kawai, K., Suzuki, T. and Takai, R.: Kinetic process of enthalpy relaxation of glassy starch and effect of physical aging upon its water vapor permeability property. *Carbohydr. Polym.*, **53**, 289-296 (2003)
- 6) Surana, R., Pyne, A. and Suryanarayanan, R.: Effect of aging on the physical properties of amorphous trehalose. *Pharm. Res.*, **21**, 867-874 (2004)
- 7) Surana, R., Pyne, A. and Suryanarayanan, R.: Effect of preparation method on physical properties of amorphous trehalose. *Pharm. Res.*, **21**, 1167-1176 (2004)
- 8) Hancock, B. C., Shamblin, S. L. and Zografi, G.: Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperature, *Pharm. Res.*, **12**, 799-806 (1995)
- 9) Schmidt, S. J. and Lammert, A. M.: Physical aging of maltose glasses. *J. Food Sci.*, **61**, 870-875 (1996)
- 10) Duddu, S. P., Zhang, G. and Dal Monte, P. R.: The relationship between protein aggregation and molecular mobility below the glass transition temperature of lyophilized formulations containing a monoclonal antibody, *Pharm. Res.*, **14**, 596-600 (1997)

(6)

- 11) Andronis, V. and Zografi, G.: The molecular mobility of supercooled amorphous indomethacin as a function of temperature and relative humidity, *Pharm. Res.*, **15**, 835-842 (1998)
- 12) Shamblin, S. L. and Zografi, G.: Enthalpy relaxation in binary amorphous mixtures containing sucrose, *Pharm. Res.*, **15**, 1828-1834 (1998)
- 13) Mooster, G. V. D., Augustijns, P. and Kinget, R.: Stability prediction of amorphous benzodiazepines by calculation of the mean relaxation time constant using the Williams-Watts decay function, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **48**, 43-48 (1999)
- 14) Tong, P. and Zografi, G.: Solid-State characteristics of amorphous sodium indomethacin relative to its free acid, *Pharm. Res.*, **16**, 1186-1192 (1999)
- 15) Martino, P. D., Palmieri, G. F. and Martelli, S.: Molecular mobility of the paracetamol amorphous form, *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1105-1108 (2000)
- 16) Craig, D. Q. M., Barsnes, M., Royall, P. G. and Kett, V. L.: An evaluation of the use of modulated temperature DSC as a means of assessing the relaxation behaviour of amorphous lactose, *Pharm. Res.*, **17**, 696-700 (2000)
- 17) Six, K., Verreck, G., Peeters, J., Augustijns, P., Kinget, R. and Van den Mooter, G.: Characterization of glassy itraconazole: a comparative study of its molecular mobility below T_g with that of structural analogues using MTDSC, *Int. J. Pharm.*, **213**, 163-173 (2001)
- 18) Christensen, K. L., Pedersen, G. P. and Kristensen, H. G.: Physical stability of redispersible dry emulsions containing amorphous sucrose, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **53**, 147-153 (2002)
- 19) Kakumanu, V. K. and Bansal, A. K.: Enthalpy relaxation studies of celecoxib amorphous mixtures, *Pharm. Res.*, **19**, 1873-1878 (2002)
- 20) Liu, J., Rigsbee, D. R., Stotz, C. and Pikal, M. J.: Dynamics of pharmaceutical amorphous solids: the study of enthalpy relaxation by isothermal microcalorimetry. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 1853-1862 (2002)
- 21) Kawai, K., Hagiwara, T., Takai, R. and Suzuki, T.: Comparative investigation by two type analytical approaches on enthalpy relaxation for glassy glucose, sucrose, maltose and trehalose. *Pharm. Res.*, **22**, 490-495 (2005)
- 22) Haque, Md. K., Kawai, K. and Suzuki, T.: Glass transition and enthalpy relaxation of amorphous lactose glass. *Carbohydr. Res.*, **341**, 1884-1889 (2006)
- 23) Wang, L., Velikov, V. and Angell, C. A.: Direct determination of kinetic fragility indices of glassforming liquids by differential scanning calorimetry: kinetic versus thermodynamic fragilities. *J. Chem., Phys.*, **117**, 10184-10192 (2002)
- 24) 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)
- 25) Kawai, K., Suzuki, T. and Oguni, M.: Low-temperature glass transitions of quenched and annealed bovine serum albumin aqueous solutions. *Biophys. J.*, **90**, 3732-3738 (2006)
- 26) Chan, R. K., Pathmanathan, K. and Johari, G. P.: Dielectric relaxation in the liquid and glassy states of glucose and its water mixtures. *J. Phys. Chem.*, **90**, 6358-6362 (1986)
- 27) Noel, T. R., Ring, S. G. and Whittam, M. A.: Dielectric relaxation of small carbohydrate molecules in the liquid and glassy states. *J. Phys. Chem.* **96**, 5662-5667 (1992)
- 28) Noel, T. R., Parker, R. and Ring, S. G.: A comparative study of the dielectric relaxation behaviour of glucose, maltose, and their mixtures with water in the liquid and glassy states. *Carbohydr. Res.*, **282**, 193-206 (1996)
- 29) Iwamoto, S., Kumagai, H., Hayashi, Y. and Miyawaki, O.: Conductance and relaxations of gelatin films in glassy and rubbery states. *Int. J. Biol. Macromol.*, **26**, 345-351 (1999)
- 30) Faivre, A., Niquet, G., Maglione, M., Fornazero, J., Jal, J. F. and David, L.: Dynamics of sorbitol and maltitol over a wide time-temperature range. *Eur. Phys. J. B*, **10**, 277-286 (1999)

- 31) Shamblin, S. L., Tang, X., Chang, L., Hancock, B.C. and Pikal, M. J.: Characterization of the time scales of molecular motion in pharmaceutically important glasses. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 4113-4121 (1999)
- 32) Mao, C., Chamarthy, S. P., Byrn, S. R. and Pinal, R.: A calorimetric method to estimate molecular mobility of amorphous solids at relatively low temperature. *Pharm. Res.*, **23**, 2269-2276 (2006)
- 33) Mao, C., Chamarthy, S. P. and Pinal, R.: Time-dependence of molecular mobility during structural relaxation and its impact on organic amorphous solids: an investigation based on a calorimetric approach. *Pharm. Res.*, **23**, 2269-2276 (2006)