

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

低水分魚肉加工食品のガラス状態に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 橋本, 朋子 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/721

博士学位論文
低水分魚肉加工食品のガラス状態
に関する研究

平成 15 年度

(2003)



東京水産大学大学院
水産学研究科
食品生産学専攻
食品冷凍学
橋本 朋子

博士論文目次

ページ

序論

1. 研究背景.....	1
1-1 食品科学におけるガラス転移.....	1
1-2 水産食品のガラス転移.....	3
2. 研究目的.....	4
3. 本論文の構成.....	6
参考文献.....	8

第1章 理論的背景と実験手法

1-1 はじめに.....	13
1-2 理論的背景.....	13
1-3 実験方法について.....	18
参考文献.....	29

第2章 低水分魚肉加工食品のガラス転移測定

2-1 はじめに.....	32
2-2 熱分析を用いた低水分魚肉加工品のガラス転移測定	
2-2-1 はじめに.....	32
2-2-2 実験方法.....	35
2-2-3 結果と考察.....	36
2-2-4 結論.....	45
2-3 DSCを用いた様々な加工魚肉のガラス転移測定	
2-3-1 はじめに.....	46
2-3-2 実験方法.....	46
2-3-3 結果と考察.....	47
2-3-4 結論.....	54
2-4 2章まとめ.....	54

参考文献.....	55
-----------	----

第3章 魚肉から抽出した筋形質、筋原繊維タンパク質のガラス転移測定

3-1 はじめに.....	57
3-2 実験方法.....	59
3-3 結果と考察.....	62
3-4 結論.....	75
参考文献.....	76

第4章 エンタルピー緩和測定によるガラス転移温度以下における低水分加工魚肉の状態把握

4-1 はじめに.....	79
4-2 実験方法.....	80
4-3 結果と考察.....	82
4-4 結論.....	94
参考文献.....	95

第5章 低水分加工魚肉のガラス状態に及ぼす加工条件の影響

5-1 はじめに.....	98
5-2 ヘモグロビンのガラス転移現象に及ぼす熱変性の影響について.....	99
5-2-1 ヘモグロビンの立体構造について.....	99
5-2-2 実験方法.....	100
5-2-3 結果と考察.....	100
5-2-4 結論.....	109
5-3 低水分カツオ肉のガラス状態に及ぼす加工条件の影響について.....	110
5-3-1 はじめに.....	110
5-3-2 実験方法.....	110
5-3-3 結果.....	112
5-3-4 考察.....	121

5-3-5 結論.....	124
5-4 タンパク質のガラス状態に及ぼす熱処理時間の影響について	
5-4-1 はじめに.....	125
5-4-2 実験方法.....	125
5-4-3 結果と考察.....	126
5-4-4 結論.....	129
5-5 5章まとめ.....	132
参考文献.....	133
第6章 総括.....	135
和文要旨.....	140
英文要旨.....	142

序論

1. 研究背景

魚肉を原料とした加工食品は、日本のみならず世界中に多数存在している。加熱、乾燥、燻煙、発酵など、その加工方法の多様性に加え、魚それ自身が持つ性質の違いもあいまって、その特色は多種多様である。本来、加工処理は非常に足の早い魚介類の保存安定性を高める事が主な目的とされるが、その他にも、加工食品だけにしか見られない独特の性質を付加させる働きもある。これら魚肉加工品の食品としての品質は、微生物学的な安定性、味、香り、テクスチャー、色などといった種々の性質を多角的に検討し、それぞれ別個に得られた情報を総合した上で判断される。食品の品質を決定するこれらの性質は、温度や水分といった因子に強く影響される。そのため、これまでは品質制御のための有効な指標として、水分活性を利用するのが一般的とされてきた。水分活性は水の存在状態を考慮した平衡論に基づく概念で、食品成分と水との相互作用を反映する。食品の品質劣化の主原因とされる微生物は、一定の水分活性以下では増殖しない。また、乾燥、凍結、塩や糖の添加など、加工食品の品質を高めるために用いられる種々の手法はいずれも水分活性を低下させる。しかしながら、凍結食品、乾燥食品、中間水分食品の多くは本質的に非平衡状態にあると考えるべきであり、これら食品に対して水分活性のような平衡論に立脚した性質を指標とする事にはおのずから限界がある事は確かであろう。実際、食品においてしばしば見られる吸着・脱着過程のヒステリシスなどの問題は、食品中の水が非平衡状態にある事を反映しており、平衡論的概念では解釈が困難であった。つまり、食品の性質を本質的に理解、把握するためには、まず食品を非平衡状態にあるとみなした上で、分子運動性という観点からの議論を加える事が重要である。そこで注目されるのが「ガラス転移」の概念である。そもそも、魚肉加工食品の物理化学的状态といえ、これまでは漠然としたイメージでのみ捉えられており、加工中、あるいは貯蔵中における品質に関わる状態変化、およびその結果として生じる種々の物性変化を、系統的に把握しようとする試みはなされてこなかったと言える。しかしガラス転移概念は、それを可能にするための有効な手段として期待できる。

1-1 食品科学におけるガラス転移

「ガラス状態」とは、液体状態と同じ乱雑な分子構造を有しているにも関わらず、明らかな流動性を持たず、見かけ上は固体と同じ状態のことをいう。そのような状態にある物質は、ある特定の温度（ガラス転移温度； T_g ）を境にしてガラス状態↔液体状態（あるいはラバー状態）間の状態転移、すなわち**ガラス転移現象**を示す。ガラス転移現象は古くから合成高分子の分野では広く知られてきた現象であり、冷却や加熱過程における高分子セグメントのマイクロブラウン運動の凍結・回復現象として理解されてきた。近年ではその概念が食品科学の分野にも取り入れられ、数多くの研究が進められている。食品及び生物系におけるガラス転移現象に付言した文献が初めて登場したのは古く 1960年代にさかのぼるが^{1,2)}、実際に広く注目を集めるようになったのは、1980年代になって、Slade と Levine が食品の品質安定性制御に対するガラス転移概念の有用性を提唱してからである^{3,4)}。ガラス転移概念は、食品を非平衡系とみなして、その性質を速度論的に解釈するものであり、その斬新性および普遍性から非常に大きな注目を集め、その後、世界中に食品の構成成分（糖、タンパク質、炭水化物など）、および実際の食品系に対するガラス転移研究が急速に広まっていった。これまでにガラス転移研究の対象となっている食品は、シリアルスナック^{5,6)}、乾燥野菜や果物⁷⁻¹⁴⁾、パン生地¹⁵⁾、粉ミルク¹⁶⁾、アイスクリーム¹⁷⁾など多岐に渡っており、これらの研究結果から、ほぼ全ての凍結食品、あるいは低水分食品が、全体的、あるいは部分的にガラス状態を取り得ることが明らかとなっている。

熱容量や粘度など、ガラス状物質の持つ様々な物理化学的性質は、 T_g を境にして劇的に変化する。ガラス状物質が T_g 以下にある場合、系の粘度は 10^{13} Pa s という実験的スケールでは測定不可能なほどの高い値を有すると定義されており¹⁸⁾、そのために内部の分子運動性は著しく制限される。食品の品質劣化に関わる諸現象、例えば結晶化¹⁹⁻²¹⁾、酸化^{22,23)}、香気成分の散逸²⁴⁾などの諸現象は分子の拡散に伴って進行するので、ガラス状態にある食品はそれらの劣化反応が著しく抑制される。また、乾燥工程中に生じるコラプス、ケーキングなどといった物理的な劣化現象²⁵⁻²⁷⁾、あるいは低水分食品に特徴的なクリスピーなテクスチャー^{28,29)}も、ガラス転移現象と密接に関わりあっている事が分かっている。以上の事から、ガラス転移概念が食品の製造時、あるいは保存時に生じるあらゆる現象を網羅している事が分かる。したがって、食品の物理化学的状態を理解する

上で、系のガラス転移温度を知る事は非常に重要である。実際、現在ではガラス転移温度は、食品を扱う上で非常に有用な基準温度であることが広く認識されている。

しかしながら近年になって、メイラード反応のような食品の品質に関わる現象が、 T_g 以下においてもなお、非常にゆっくりではあるが進行する事が明らかとなった³⁰⁻³²⁾。この現象は、 T_g が必ずしも食品の品質安定性を制御するための絶対的な指標ではない事を示している。合成高分子においては、 T_g 以下でも系の運動性が完全には凍結されず、主鎖の内部回転などにより、非常に長い時間スケールで分子の配置変化が進行している事が一般的によく知られている³³⁾。ガラス状態にある物質は熱力学的に非平衡な状態にあるため、たとえ T_g 以下であっても、長期間の保存中にエネルギー的により安定な低方向へと緩和していく性質がある。この現象は観測する熱力学量によって、エンタルピー緩和あるいは体積緩和と呼ばれる。そしてこの現象が、食品成分である糖³⁴⁻³⁸⁾や炭水化物³⁹⁻⁴³⁾、更にはタンパク質⁴⁴⁾においても同様に起こる事が示され、 T_g 以下で進行する劣化反応との相関性に対して、現在注目が集まっている⁴⁵⁾。その一方で、現段階では、食品そのものを対象とした研究例は報告されていない。食品の緩和現象に関する研究はまだ発展段階であり、今後急速に広まる事が予測される。 T_g 以下で生じる分子の配置変化が食品の巨視的物性に影響を及ぼし得るという可能性は、ガラス状食品の品質を理解・制御する上で、その緩和現象についても同時に考慮する必要性を強く示唆している。

1-2 水産食品のガラス転移

以上のように、食品科学におけるガラス転移概念の重要性が広く示されているにも関わらず、水産食品を対象としたガラス転移研究は非常に少ないと言っても良い。生鮮魚の冷凍保存、及び低温輸送時における鮮度保持技術の重要性から、生鮮魚におけるガラス転移研究例はいくつか報告されているが、その対象はメバチマグロ⁴⁶⁻⁴⁸⁾、キハダマグロ⁴⁹⁾、サバ⁵⁰⁾、タラ^{46,51,52)}をはじめとした比較的狭い範囲の魚種に限定されている。これら生鮮魚肉のガラス転移温度は、 -70°C 前後の超低温域にあるという報告と、 -15°C 前後の比較的高い温度域にあるという報告の2種類が存在し、どちらが魚肉の正しい T_g であるかは、現段階でも議論が続いている。その一方で、マグロ肉を -70°C 程度の温度で冷凍保存すると、鮮度指標となる K 値の進行速度が抑えられること⁴⁹⁾、あるいはタラ魚肉の凍結粉碎に要する破断応力が -80°C 付近で変化する事⁵³⁾などが報告され、超低

温域の T_g との関連性が指摘されている。更に、井上ら⁵⁴⁾は生鮮魚肉におけるガラス転移機構に関する研究を行い、マグロ魚肉で見られた超低温域のガラス転移現象が、筋肉タンパク質中の水溶性成分によるものであり、その本質は水溶性タンパク質の結合水に起因している可能性を示唆している。種々のタンパク質のガラス転移現象に関する既往の研究によれば、高水分で未変性状態のタンパク質の T_g は、タンパク質の種類によらず-70℃付近にある事、そしてそのガラス転移現象は、タンパク質の表面に強く結合した結合水のガラス転移による事などが明らかとなり⁵⁵⁾、この結果は井上によって示された生鮮マグロ魚肉のガラス転移機構と良く一致している。しかしながら Brake ら⁵⁰⁾は、サバ魚肉中の不溶性タンパク質成分が水溶性成分と同様にガラス転移を示す事を報告しており、マグロ魚肉のガラス転移現象が水溶性成分のみに起因すると主張する井上の説には疑問が残る。2種類のガラス転移温度、そのガラス転移現象の機構など、生鮮魚肉のガラス転移現象に関してはまだ検討の余地が残るが、少なくとも生鮮魚肉がガラス転移現象を示す事、更にはそのガラス転移温度が魚肉の性質と関連している事がすでに明らかにされている。

その一方で、水産加工食品を対象としたガラス転移研究はほとんど報告されていない。加工、あるいは貯蔵中の魚肉が、実際にガラス状態を取り得るのかという事さえ確認されておらず、まして、その機構などは全く分かっていないのが現状である。Aguilera らは、サバ魚肉タンパク質の加水分解物を原料とした乾燥粉末におけるガラス転移温度とケーキング現象との関連性について報告している⁵⁶⁾。また、Cuq らは、タラから抽出した筋原繊維タンパク質を原料とした生分解性フィルムに関して、熱分析を用いたガラス転移研究を行っている^{57,58)}。魚肉を原料とした低水分加工品のガラス転移に関する報告は、今のところこの2例だけであり、実際の食品そのものを対象として検討された例はない。

2. 研究目的

以上の事により、これまで不透明であった低水分魚肉加工食品における種々の物理化学的性質を理解・把握するためには、非平衡論に乗っ取った議論が必要である事が示された。そこで本研究では、そのための手段としてガラス転移概念を用いる事が適切であると考え、魚肉加工食品を対象としたガラス転移研究を行った。魚肉加工食品はその加

工条件の違いによって、それぞれに大きく異なった状態を取るため、すべての食品を網羅出来るような情報を得る事は困難である。よって本研究では、魚肉加工品を製造する際に、その製品の状態を左右する上で最も基本的で重要な工程である、「加熱」、「乾燥」という2つの処理工程に着目し、この両工程を加えられた食品に限定して研究対象とする事にした。

本研究の目的は、低水分魚肉加工食品におけるガラス転移概念の適用性を探り、実用的に利用可能な系統的データを取得する事にある。そのためには、まず低水分魚肉加工食品食品が実際にガラス状態を取り得ることを確認する必要がある。そこで、カツオ節を低水分魚肉加工食品における一つの典型的なモデル食品とみなし、熱分析によるガラス転移現象の検出、そのガラス転移温度に及ぼす水分含量の影響について検討した。同時に数種類の加工魚肉に対しても同様の検討を加え、より広い範囲の魚肉加工品に対するガラス転移概念の適用性を探った。更に、低水分魚肉加工品のガラス転移現象は魚肉中のどのような成分に起因するのか、そして低水分魚肉加工食品のガラス状態がどのような状態にあるのか、などについても詳細な検討を加えた。最終的には、実用的な見地から、加熱・乾燥という低水分魚肉加工食品を製造する上で最も重要な加工工程における条件の違いが、製品のガラス状態にどのような影響を及ぼすかについても調べた。

3. 本論文の構成

本論文は以下の6章から構成されている。

第1章の「理論的背景と実験手法」では、本研究の基礎となるガラス転移現象の理論的背景について概説し、更に本研究で用いられた実験手法の詳細について述べる。

第2章の「低水分魚肉加工食品のガラス転移測定」では、実際に低水分魚肉加工食品がガラス状態を取り得るのかを明らかにする事を目的として行った実験、およびその結果について述べる。本章では、カツオ節を低水分魚肉加工食品のモデル例として取り上げ、熱分析による T_g の決定、そしてその T_g に及ぼす水分含量の影響について詳細に検討した。その結果、市販カツオ節がガラス状態にあり、その T_g が明確な水分含量依存性を示す事が明らかとなった。また、より広い範囲の食品に対するガラス転移概念の適用性を探るため、ここではマグロ、サバ、タラ、タイといった日本人に非常になじみの深い魚種を対象に、DSC を用いたガラス転移現象の測定を行った。加熱乾燥処理が加えられたこれらの低水分加工魚肉においても、カツオ節と同様に明確なガラス転移現象が確認され、一定の条件下ではガラス状態を取り得ることが明らかとなった。更にこれら魚肉における T_g の水分含量依存性挙動が魚種によって若干異なっている事が明らかとなり、ガラス転移現象が魚種の違いによる影響を受ける事が示された。

第3章の「魚肉から抽出した筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質のガラス転移測定」では、魚肉ガラス転移現象の原因となる成分を明らかにする事を目的として行った実験、およびその結果について述べる。ここでは魚肉の主成分となる筋肉タンパク質に着目し、実際に2種類の魚（カツオ・タラ）の筋肉から2種類のタンパク質成分（筋形質・筋原繊維）を分離抽出し、乾燥・加工処理を加えた上で、それぞれの成分におけるガラス転移現象の測定を行った。その結果、魚肉のガラス転移現象がタンパク質成分によるものである事、更にはタンパク質以外の低分子量成分の影響も無視できない事が示された。そして異なる魚種から抽出されたタンパク質成分の挙動比較から、魚種によるガラス転移挙動の違いは、両者のタンパク質成分、特に筋原繊維タンパク質区分における性質の違いが反映されたものであることが明らかとなった。

第4章の「エンタルピー緩和測定によるガラス転移温度以下における低水分魚肉加工食品の状態把握」では、低水分魚肉加工品のガラス状態についての理解を深める事を目

的として行った実験、およびその結果について述べる。ここでは、ガラス状物質において重要な特性の一つである、 T_g 以下で進行するエンタルピー緩和現象に着目した議論を行った。測定対象にはモデル食品としてカツオ節を用い、DSCにより T_g 以下の温度で保存した場合に生じたエンタルピー緩和量を測定し、その緩和過程の保存温度・保存時間依存性について検討した。その結果、他のガラス状物質と同様に、カツオ節のエンタルピー緩和現象も保存温度、保存時間に依存する事が明らかとなった。更に既存の理論式を用いて解析する事により、カツオ節の T_g 以下における分子運動性に関する情報の取得を試みた。その結果、ガラス状態下における安定性の指標となる緩和時間 τ の値を求める事が出来た。また、保存中における緩和の進行が、合成高分子の場合と同様に、食品の巨視的物性に影響を与えるのかについての検討も行い、緩和の進行が試料の水分吸着能を低下させる事を明らかにした。

第5章の「低水分加工魚肉のガラス状態に及ぼす加工条件の影響」では、低水分魚肉加工食品の製造時における操作条件の違いが、魚肉のガラス状態にどのような影響を及ぼすのかについて知る事を目的として行った実験、およびその結果について述べる。まず、そもそも加熱変性がタンパク質のガラス転移現象とどのように関わっているのかを知るために、モデルタンパク質を用いて熱変性前後の T_g およびエンタルピー緩和挙動の比較を行った。その結果、タンパク質の熱変性に伴う構造変化が、熱変性前後のガラス状態に影響を及ぼしている可能性が示された。次に、加工条件の違いが魚肉のガラス状態に及ぼす影響について検討するために、加熱・乾燥条件の異なるカツオ魚肉を試料として T_g 測定、エンタルピー緩和測定を行い、そのガラス状態に関するデータを取得した。その結果、魚肉のガラス状態が加工条件の違いに大きく影響を受ける事が明らかとなった。

以上、第6章で研究内容の総括を行う。

序論 参考文献

1. White GW, Cakebread SH. The glassy state in certain sugar containing food products. *J. Food Technol.* 1966; **1**: 73-82.
2. Luet B, Rasmussen D. Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability of rapidly cooled solutions of glycerol, ethylene glycol, sucrose and glucose. *Biodynamica* 1968; **10**: 167-191.
3. Levine H, Slade L. A polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products (SHPs). *Carbohydr. Polym.* 1986; **6**: 213-244.
4. Slade L, Levine H. Non-equilibrium behavior of small carbohydrate-water systems. *Pure Appl. Chem.* 1988; **60**: 1841-1864.
5. Levine H, Slade L. The glassy state in applications for the food industry, with an emphasis on cookie and cracker production. In: Blanshard JMV, Lillford PJ (eds). *The Glassy State in Foods*. Nottingham: University Press. 1993; 95-108.
6. Nicolaidis A, Labuza TP. The glass transition state diagram of a baked cracker and its relationship to gluten. *J. Food Sci.* 1996; **61**: 803-810, 828.
7. Roos YH. Effect of moisture on the thermal behavior of strawberries studied using differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* 1987; **52**: 146-214.
8. Pääkkönen K, Roos YH. Effects of drying conditions on water sorption and phase transitions of freeze-dried horse radish roots. *J. Food Sci.* 1990; **55**: 206-209.
9. Sá MM, Sereno AM. The glass transitions and state diagrams for typical natural fruits and vegetables. *Thermochimica Acta* 1994; **246**: 285-297.
10. Valle DJM, Cuadros TRM, Aguilera JM. The glass transition and shrinkage during drying and storage of osmosed apple pieces. *Food Res. Int.* 1998; **31**: 191-204.
11. Sá MM, Figueiredo AM, Sereno AM. The glass transition and state diagrams for fresh and processed apple. *Thermochimica Acta* 1999; **329**: 31-38.
12. Khalloufi S, El-Maslouhi Y, Ratti C. Mathematical model for prediction of the glass transition temperature of fruit powders. *J. Food Sci.* 2000; **65**: 842-848.

13. Bai Y, Rahman MS, Perera CO, Smith B, Melton LD. State diagram of apple slices: the glass transition and freezing curves. *Food Res. Int.* 2001; **34**: 89–95.
14. Telis VRN, Sorbal PJA. The glass transitions for freeze-dried and air-dried tomato. *Food Res. Int.* 2002; **35**: 435–443.
15. Hallberg LM, Chinachoti P. Dynamic mechanical analysis for the glass transitions in long shelf-life bread. *J. Food Sci.* 1992; **57**: 1201–1204.
16. Jouppila K, Roos YH. The glass transitions and crystallization in milk powders. *J. Dairy Sci.* 1994; **77**: 2907–2915.
17. Goff HD. The influence of polysaccharides on the glass transition in frozen sucrose solutions and ice cream. *J. Dairy Sci.* 1993; **76**: 1268–1277.
18. Downton GE, Flores LJL, King CJ. Mechanism of stickiness in hygroscopic amorphous powders. *Ind. Eng. Chem. Fund.* 1982; **21**: 447–451.
19. Roos Y, Karel M. Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. *J. Food Sci.* 1991; **56**: 38–43.
20. Roos Y, Karel M. Crystallization of amorphous lactose. *J. Food Sci.* 1992; **57**: 775–777.
21. Jouppila K, Roos YH. Glass transition and crystallization in milk powders. *J. Dairy Sci.* 1994; **77**: 2907–2915.
22. Shimada Y, Roos Y, Karel M. Oxidation of methyl linolate encapsulated in amorphous lactose-based food model. *J. Agric. Food Chem.* 1991; **39**: 637–641.
23. Moreau DL, Rosenberg M. Oxidative stability of anhydrous milkfat microencapsulated in whey proteins. *J. Food Sci.* 1996; **61**: 39–43.
24. Gunning YM, Parker R, Rigby NM, Wegg B, Blake A, Ring SG. Phase behavior, component partitioning and the encapsulation of flavors in low water content amorphous carbohydrates. *J. Agric. Food Chem.* 1999; **48**: 395–399.
25. Labrousse S, Roos Y, Karel M. Collapse and crystallization in amorphous matrices with encapsulated compounds. *Sciences des Aliments* 1992; **12**: 757–769.
26. Chuy LE, Labuza TP. Caking and stickiness of dairy-based food powders as related to glass transition. *J. Food Sci.* 1994; **59**: 43–46.

27. Aguilera JM, De Valle JM, Karel M. Caking phenomenon in amorphous powders. *Trend. Food Sci. Technol.* 1995; **6**: 149-155.
28. Katz EE, Labuza TP. Effect of water activity on the sensory crispness and mechanical deformation of snack food products. *J. Food Sci.* 1981; **46**: 403-409.
29. Nelson KA, Labuza TP. Glass transition theory and the texture of cereal foods. In: Blanshard JMV, Lillford PJ (eds). *The Glassy State in Foods*. Nottingham: University Press. 1993; 513-517.
30. Karmas R, Buera MP, Karel M. Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems. *J. Agric. Food Chem.* 1992; **40**: 873-879.
31. Roos YH, Himberg MJ. Nonenzymatic browning behavior, as related to glass transition, of a food model at chilling temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 1994; **42**: 893-898.
32. Bell LN, Touma DE, White KI, Chen YH. Glycine loss and Maillard browning as related to the glass transition in a model food system. *J. Food Sci.* 1998; **63**: 625-628.
33. 吉田博久、高分子ガラスのエンタルピー緩和、「熱測定」、1986; **13**: 191-199.
34. Hancock BC, Shamblin SL, Zografi G. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. *Pharm. Res.* 1995; **12**: 799-806.
35. Duddu SP, Zhang G, Dal Monte PR. The relationship between protein aggregation and molecular mobility below the glass transition temperature of lyophilized formulations containing a monoclonal antibody. *Pharm. Res.* 1997; **5**: 596-600.
36. Shamblin SL, Zografi G. Enthalpy relaxation in binary amorphous mixtures containing sucrose. *Pharm. Res.* 1998; **15**: 1828-1834.
37. Noel TR, Parker R, Ring SM, Ring SG. A calorimetric study of structural relaxation in a maltose glass. *Carbohydr. Res.* 1999; **319**: 166-171.
38. Truong V, Bhandari BR, Howes T, Adhikari B. Physical aging of amorphous fructose. *J. Food. Sci.* 2002; **67**: 3011-3018.
39. Shogren RL. Effect of moisture content on the melting and subsequent physical

- aging of cornstarch. *Carbohydr. Polym.* 1992; **19**: 83-90.
40. Kim YJ, Suzuki T, Hagiwara T, Yamaji I, Takai R. Enthalpy relaxation and glass to rubber transition of amorphous potato starch formed by ball-milling. *Carbohydr. Polym.* 2001; **46**: 1-6.
 41. Borde B, Bizot H, Vigier G, Buleon A. Calorimetric analysis of the structural relaxation in partially hydrated amorphous polysaccharides. II. Phenomenological study of physical ageing. *Carbohydr. Polym.* 2002; **48**: 111-123.
 42. Lourdin D, Colonna P, Brownsey GJ, Noel TR, Ring SG. Structural relaxation and physical ageing of starchy materials. *Carbohydr. Res.* 2002; **337**: 827-833.
 43. Kim YJ, Hagiwara T, Kawai K, Suzuki T, Takai R. Kinetic process of enthalpy relaxation of glassy starch and effect of physical aging upon its water vapor permeability property. *Carbohydr. Polym.* 2003; **53**: 289-296.
 44. Micard D, Guilbert S. Thermal behavior of native and hydrophobized wheat gluten, gliadin and glutenin-rich fractions by modulated DSC. *Int. J. Biol. Macromol.* 2000; **27**: 229-236.
 45. Champion D, Le Meste M, Simatos D. Towards an improved understanding of glass transition and relaxations in foods: molecular mobility in the glass transition range. *Trends Food. Sci. Technol.* 2000; **11**: 41-55.
 46. Levine H, Slade L. Response to the letter by Simatos, Blond and Le Meste on the relation between glass transition and stability of a frozen product. *Cryo-Letters* 1989; **10**: 347-370.
 47. Inoue C, Ishikawa M. The glass transition of tuna flesh at low temperature and effects of salt and moisture. *J. Food Sci.* 1997; **62**:496-499.
 48. Rahman MS, Kasapis S, Guizani N, Al-Amri OS. State diagram of tuna meat: freezing curve and glass transition. *J. Food Eng.* 2003; **57**: 321-326.
 49. Tri WA, Suzuki T, Hagiwara T, Ishizaki S, Tanaka M, Takai R. Change of K value and water state of yellowfin tuna *Thunnus albacares* meat stored in a wide temperature range (20°C to -84°C). *Fish. Sci.* 2001; **67**: 306-313.
 50. Blake NC, Fennema OR. The glass transition values of muscle tissue. *J. Food Sci.*

- 1999; **64**: 10-15.
51. Nesvadba P. Glass transitions in aqueous solutions and foodstuffs. In: Blanshard JMV, Lillford PJ (eds). *The Glassy State in Foods*. University Press, Nottingham. 1993, 523-526.
 52. Simatos D, Blond G. Some aspects of the glass transition in frozen foods systems. In: Blanshard JMV, Lillford PJ (eds). *The Glassy State in Foods*. University Press, Nottingham. 1993, 394-415.
 53. Hagura Y, Watanabe H. Factors affecting separation of low fat flesh from fatty fish by cryo-shattering. *J. Food Sci.* 1991; **56**: 1567-1571.
 54. Inoue C. Glass transition of fish meat and model system. Doctoral thesis 1999.
 55. Ringe D, Petsko GA. The 'glass transition' in protein dynamics: what it is, why it occurs, and how to exploit it. *Biophys. Chem.* 2003; **105**: 667-680.
 56. Aguilera JM, Levi G, Karel M. Effect of moisture content on the glass transition and caking fish protein hydrolyzates. *Biotechnol. Prog.* 1993; **9**: 651-654.
 57. Cuq B, Gontard N, Guilbert S. Thermoplastic properties of fish myofibrillar proteins: application to biopackaging fabrication. *Polymer* 1997; **36**: 4071-4078.
 58. Cuq B, Gontard N, Guilbert S. Thermal properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by moisture content. *Polymer* 1997; **38**: 2399-2405.

第1章 理論的背景と実験手法

1-1 はじめに

本章では、本研究の全体を通して基礎となるガラス転移現象の理論的背景について概説する。ガラス状態の定義、ガラス転移とは何か、そしてガラス転移温度近傍における分子運動性についての説明を行う。更に、本研究で用いた実験手法の詳細について述べる。

1-2 理論的背景

1-2-1 ガラス状態およびガラス転移の定義

物質は多数の分子が凝集したものであり、気体、液体、結晶等の分子凝集状態は分子の配置、すなわち分子の位置と配向状態の違いに基づいて分類される (Fig.1-1)。

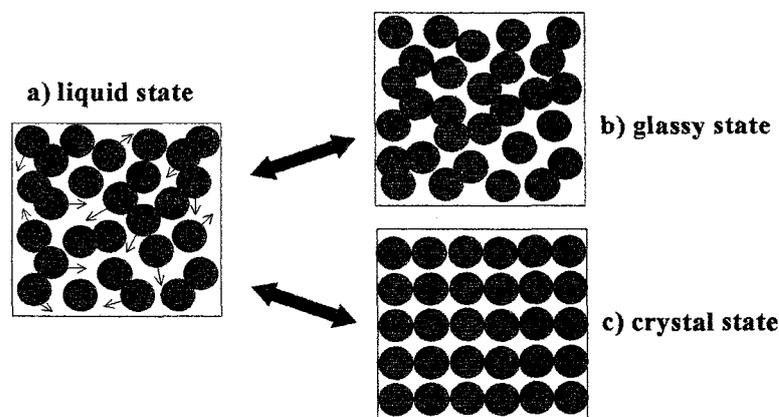


Fig.1-1 The model diagram of molecular motion in the liquid state (a), glassy state (b) and crystal state. The molecular motion in the liquid state has mobility.

気体の場合、分子配置に規則性が全く存在せず、無秩序な状態にある。また、液体状態では、隣り合う分子間の瞬時の配置に一定の制約、すなわち短距離的な秩序は存在するものの、平均としてその配置は無秩序な状態にあると言える (a)。一方、完全結晶状態では分子の位置と配向は秩序化しており、一義的に定まっている (c)。液体状態にある物質の温度を一定速度で下げていくと、通常は分子の配置変化が生じ、系は規則的な構造を持った結晶状態へと移行する。しかしながら、その冷却速度が分子の配置変化の

特性時間（緩和時間）に比較して非常に急速な場合、系は融点以下になっても結晶化する事なく、過冷却状態となる。そして過冷却状態のまま更に温度を低下させて行くと、ある一定の温度近傍で系の粘度が急激に上昇し、分子配置が無秩序なままガラス状態となる (b)。この過冷却液体状態-ガラス状態間の転移を**ガラス転移**、その温度を**ガラス転移温度 T_g** という。高分子物質の場合は、セグメントの動きに着目すれば低分子物質の場合と全く同じ機構で説明が出来る。一般的な高分子のガラス転移現象のモデル図を Fig.1-2 に示す。高分子の場合の液体状態とは、高分子鎖がランダムに絡み合って規則構造を持たない熔融状態に相当する (a)。一方ガラス状態では、熔融状態と同じ不規則なランダムコイル状態を保ったまま運動性が凍結している (b)。そして結晶状態では、高分子鎖がエネルギー的に最も低い状態になるように規則正しく折りたたまった構造を保っている (c)。

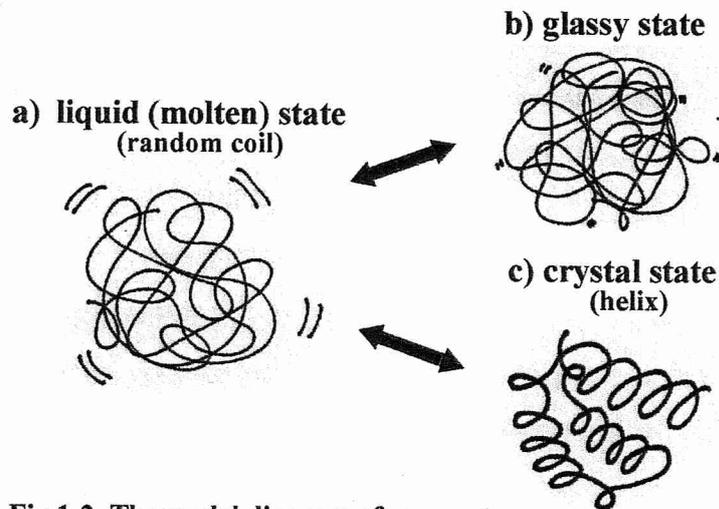


Fig.1-2 The model diagram of segment motion of polymer in the molten state (a), glassy state (b) and crystal state (c).

ガラス状高分子における粘度、あるいは自己拡散係数などの動的特性は、過冷却領域において一般的なアレニウス型の挙動から逸脱し、 T_g 近傍で急激に上昇する。ガラス転移温度近傍では、粘度だけでなく、分子運動性を反映する他の様々な物性、すなわち熱容量、誘電率、熱膨張係数の値に著しい変化が生じる (Fig.1-3)¹⁾。したがって、それらの物性を測定する事により、容易に物質のガラス転移現象を測定する事が出来る。ガラス状物質におけるガラス転移温度の検出には、熱分析が用いられる事が多く、中でも示差走査熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry: DSC)、動的粘弾性測定 (Dynamic

Mechanical Analysis: DMA)、そして誘電緩和測定が最も一般的に用いられている。その他には、熱機械測定 (Thermal Mechanical Analysis: TMA) や核磁気共鳴測定 (Nuclear Magnetic Resonance Analysis: NMR) などが利用される。

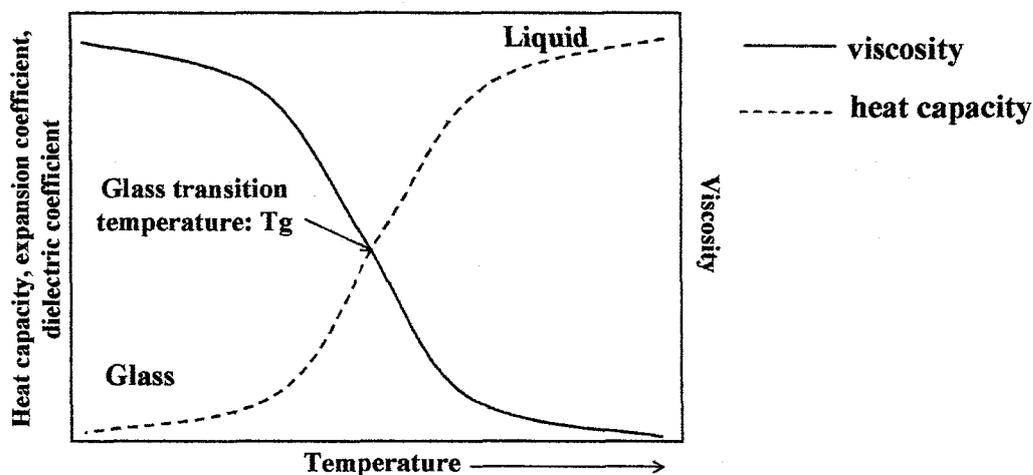


Fig.1-3 Change in physical properties at the glass transition temperature

1-2-2 T_g 以下におけるガラス状物質の分子運動性

通常、過冷却状態にある物質の粘度は 10^6 - 10^8 Pa \cdot s 程度であるが、その物質の温度が T_g 以下になると、粘度が急激に上昇し、 10^{12} - 10^{14} Pa \cdot s という実験的な時間スケールでは測定不可能なほど高い値を有するようになる²⁾。このような高粘度では、分子の運動性が凍結され、分子の拡散に伴って起こる、結晶化や溶質の析出、コラプスや酸化、腐敗などの食品の品質劣化に関わる種々の反応が著しく抑えられる。このことから、ガラス転移温度が食品の品質安定性制御において、非常に有用な指標となる事が一般的に広く認識されている。しかしながら、ガラス状態にあっても分子運動が完全に凍結されているわけではなく、分子側鎖、あるいは分子主鎖の一部における回転運動や振動運動などによる局所的な分子運動は、依然として起こっている。このような、局所的な分子の配置変化によって、ガラス状態は T_g 以下であっても、比較的長い時間スケールで経時的に変化していく。

Fig.1-4 に、ガラス転移温度近傍における物質の状態を、体積・エンタルピーと温度の関係として模式的に示す。熔融状態にある物質の温度を低下させていくと、通常の場合には平衡凝固点 (融点) T_m に達した時点で熱的に平衡で安定な結晶状態へと変化する。

しかしながら、冷却速度が十分に速ければ、 T_m に達してもその物質は結晶化を起こさず、熱的に非平衡で準安定な過冷却液体になる (f)。その過冷却状態にある液体を更に冷却していくと、ある一定の温度 (T_g) でエンタルピーの減少程度が急激に小さくなり、物質は過剰なエネルギーを有したままガラス状態へと移行する (a)。しかしながらガラスは熱力学的に非平衡状態にあるため、 T_g より低い温度で保持 (エージング) されると、この過剰なエネルギーがより安定な低方向へと緩和し、結果としてエンタルピー、あるいは体積の低下を引き起こす。この現象を、観測するパラメータによって体積緩和、あるいはエンタルピー緩和と呼ぶ。Fig.1-4 中にエンタルピー緩和を、エンタルピーとそれに対応する熱容量の温度変化として模式的に示した。ガラス状態にある a をエージングすると、その物質はより安定な低エンタルピー方向へと緩和するため、b へと変化する。これをエンタルピー緩和と言う。そしてある速度で b を加熱すると、 T_g 付近の温度帯で、緩和したエンタルピーが急激に平衡状態の e まで回復する。これをエンタルピーの回復現象といい、DSC 曲線においては、昇温時に余分なエネルギーを必要とするために吸熱ピークとして観察される。

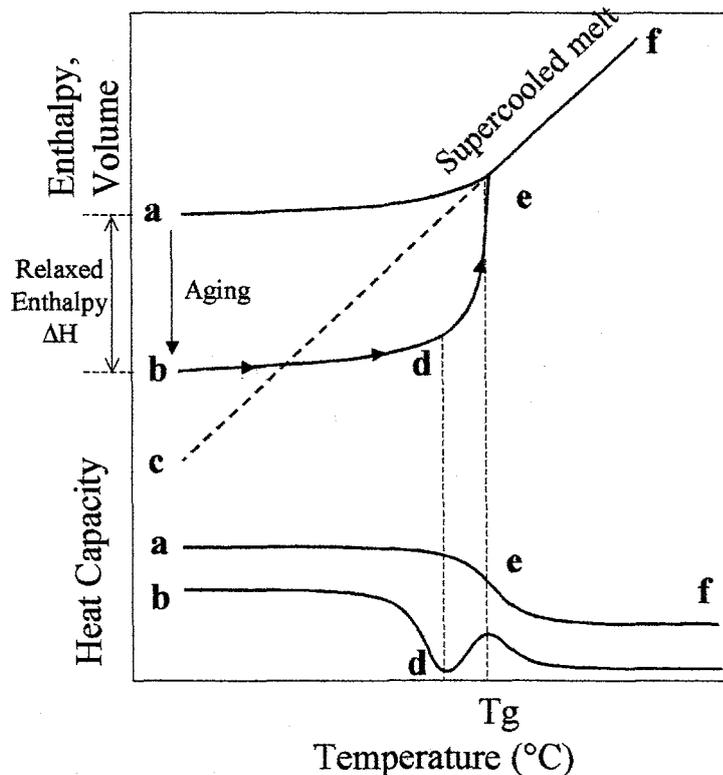


Fig.1-4 Schematic representation of the change in enthalpy of glassy materials on cooling and heating

高分子ではエンタルピー緩和が進行すると共に、動的弾性率や低分子物の拡散係数が影響を受ける事が知られており、フィジカル・エイジング(physical aging)と呼ばれている。非晶性高分子ではエンタルピー緩和と動的弾性率の緩和過程が対応することから、この現象がマクロな物理量である力学的性質にも関係すると考えられており、そのために、エンタルピー緩和現象はアモルファス物質の安定性に深く関与している重要な因子である事が広く認識されている³⁾。また、エンタルピー緩和現象が高分子の T_g 以下での分子運動性についての有用な指標となる事から、高分子材料の寿命予測などにも利用できる可能性がある⁴⁾。

最近では高分子化学の分野だけではなく、食品化学の分野においても、エンタルピー緩和現象の重要性が認識されつつある^{5,6)}。というのも、食品のガラス転移に関するいくつかの研究において、ガラス転移温度が必ずしも絶対的に有効なパラメータであるとは限らない、という報告がなされているからである。コラプスやケーキング、結晶化などの食品の保存中に生じる諸現象、そして乾燥やエクストルージョンなどの加工技術は、ガラス転移温度と良い相関性を有する^{5,7)}。その一方で、食品をガラス転移温度以下に保存した場合にも関わらず、非酵素的褐変や加水分解などの品質に関わる現象がしばしば観察される事が明らかとなっている⁸⁻¹⁰⁾。これは、例えガラス転移温度以下であっても、分子運動性が完全には凍結されておらず、分子の配置変化に伴って食品の物性が変化を受ける可能性がある事を示している。従って、食品の保存安定性を議論する上で、最近ではガラス状態下での分子運動性にも注目していく必要性が示されている。エンタルピー緩和挙動は、ガラス状物質の T_g 以下での分子運動性を反映したものであるため¹¹⁾、エンタルピー緩和現象に関する研究はその意味で非常に有用であると言える。

1-3 実験方法について

1-3-1 熱分析によるガラス転移温度測定

物質がガラス状態を取りうるかどうかを確認するためには、まずその物質の持つ T_g を検出する必要がある。本研究では、ガラス転移に伴う比熱の変化を測定する装置である DSC を、 T_g 測定の主な手段として利用する事にした。これは、他の方法に比べて測定が比較的容易で、試料の形状にも柔軟で、様々な条件を設定しやすいためである。また、一部の試料に関しては、補足的な手段として DMA による測定も行った。

1-3-1-1 DSC の原理及び装置の基本的構成

DSC は、「物質および基準物質の温度を調整されたプログラムに従って変化させながら、その物質と基準物質に対するエネルギー入力の違いを温度の関数として測定する技法である」と定義されている。DSC は用いる測定法により、入力補償型と熱流束型に区別されるが、本研究で使用した「島津示差走査熱量計 DSC-50」は熱流束型の DSC である。Fig.1-5 にその基本的構成を示す。

熱流束 DSC の原理は、DTA (示差熱分析) と同様である。銀のような熱伝導率の高い材質で作られた熱容量の大きい金属ブロックに接して、コンスタントなどで作られたヒートシンク (熱溜) が置かれている。ヒートシンクの上には温度センサーを介して試料ホルダーがあり、それぞれ試料と基準物質を入れた容器が設置されている。金属ブロックを電気炉内で定められたプログラムに従って加熱 (冷却) すると、熱源からの熱はヒートシンク、温度センサー、ホルダーを通じて伝達され、試料系、基準物質系にそれぞれ Q_s 、 Q_r の熱が流れ込み、それぞれの温度 T_s 、 T_r がプログラム温度に準じて昇降する。この時、温度センサーによって、試料系温度 T_s と基準物質系温度 T_r の温度偏差 $\Delta T = T_s - T_r$ を検出する。ヒートシンクは試料と比較して大きな熱容量を持ち、均一の温度になるように制御されており、試料の状態変化に伴って生じる温度降下あるいは上昇を吸収し、 T_s と T_r とを等しい温度に保持する作用をしている。したがって、ヒートシンクから試料系に単位時間あたりに移動する熱量、すなわち熱流束 (dQ_s/dt) は試料と基準物質の温度差 ΔT に比例する。熱量既知の物質で温度差と熱量の関係をあらかじめ求めておけば、温度差 ΔT を検出することにより、熱流束の差による信号を DSC 信号に変換して取り出す事が出来る¹²⁾。

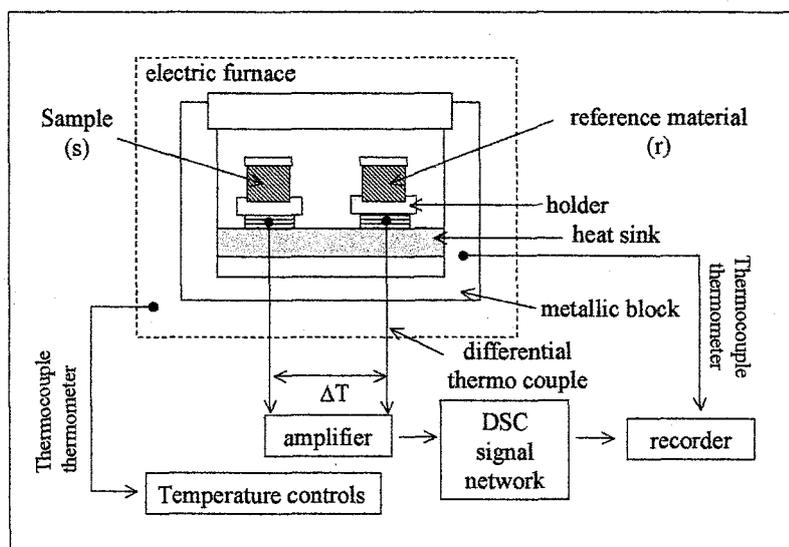


Fig.1-5 The schematic diagram of heat flux type differential scanning calorimeter.

DSCによって得られる記録がDSC曲線(DSC curve)であり、試料と基準物質へのエネルギー入力の差として両者間の温度差に基づく熱流束の差を縦軸に、温度または時間を横軸にとって表示する。Fig.1-6に、高分子物質を加熱して得られるDSC曲線を模式的に示した。加熱を始めて熱定常状態に達してから基線が急激に吸熱側へ移動して階段状に変化しているが、これはガラス転移によるもので、熱容量の急激な増加により温度上昇に遅れを生ずるからである。高温になるに従って、結晶化および酸化では発熱ピーク、融解と熱分解では吸熱ピークが現れる。

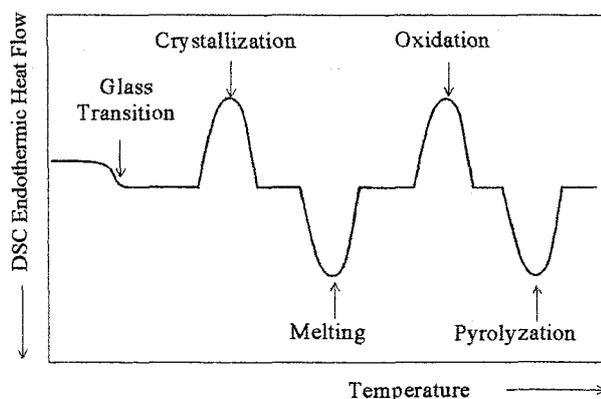


Fig.1-6 Typical heating DSC thermograms of polymer material

1-3-1-2 DSCによるガラス転移温度、ガラス転移時の熱容量変化 ΔC_p の決定方法

一般的なガラス状高分子においては、 10°C から 30°C 程度の温度範囲を有する熱容量のステップ状変化がDSC曲線状にガラス転移現象として検出される (Fig.1-7)。この熱容量変化の開始点を Onset T_g 、中間点を Midpoint T_g 、終了点を Endpoint T_g と称する。多くの場合、ガラス転移温度はこの Onset T_g あるいは Midpoint T_g に相当するが、どちらを系の T_g とするかは、研究者によって異なっており、一定していない。本研究においては、既往の研究に基づき、熱容量変化の中間点、すなわち Midpoint T_g を系のガラス転移温度とみなす事にした。ガラス転移時に、DSC 曲線上に現れる熱容量のステップ状変化から得られる ΔC_p 値も、その物質のガラス状態を知る上で有用なパラメータである。 ΔC_p 値は高分子セグメントの構造的自由度を反映しており、 ΔC_p 値が低ければ、その物質のガラス状態は構造的に安定であり、逆に ΔC_p 値が高ければ不安定である事を示している。

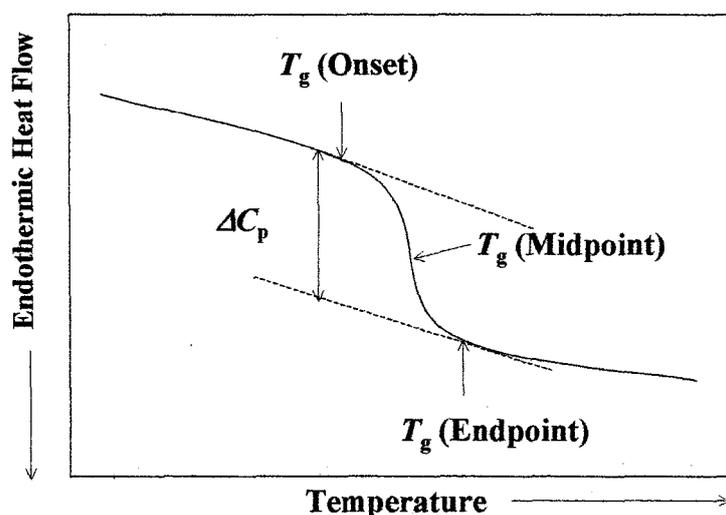


Fig.1-7 Determination of glass transition temperatures, T_g , and change in heat capacity, ΔC_p , that occurs over the glass transition temperature range from DSC thermograms. The endothermic step change in heat flow during heating of glassy materials occurs due to ΔC_p at the second-order transition temperature.

1-3-1-3 DMA を用いたガラス転移温度の検出方法

本研究では、試料のガラス転移現象を測定するための主な手法として DSC を用いているが、第2章における実験では、更に DMA（動的粘弾性測定）による T_g 測定も行っている。そこで、ここでは DMA の原理と、 T_g の検出方法について簡単に述べる。

DMA とは、物質の温度を与えられたプログラムに従って変化させながら、振動的な荷重を加え、その物質の動的弾性率および減衰を温度の関数として測定する手法である。DMA 測定では、試料の貯蔵弾性率 (E') と損失弾性率 (E'')、ならびに両者の比である正接損失 ($\tan \delta$) を、温度と測定周波数の関数として評価する事が可能であるため、高分子などの分子運動とその緩和時間に関する情報を得る事が出来る。本研究で使用した DMA はパーキンエルマー社製の DMA-7 である。

DMA 測定によって得られるガラス状高分子の典型的な DMA 曲線を Fig.1-8 に示す。 T_g 以下では、高分子は硬く弾性的であり、力学的エネルギーの大部分は貯蔵されるため E' は非常に大きく、通常は $10^{6.5}$ から $10^{9.5}$ Pa 程度の値を取ると言われている。また、1 周期あたりに熱として散逸される力学的エネルギーは小さいので、 δ すなわち $\tan \delta$ は 0 に近い。試料温度が T_g を超えると、 E' は温度とともに狭い温度範囲で 2 から 3 桁大きく減少する。 δ はここで徐々に大きくなり、 $\tan \delta$ は増大し始める。さらに温度が高くなると、絡み合いや架橋のない高分子は液体状態に近づくため、力学的エネルギーは貯蔵されずに熱として散逸されるようになり、 δ が 90° に近づく事から、 $\tan \delta$ は無限大へと増加する。しかしながら高分子の分子量が大きく、絡み合いや架橋が存在する場合には、高温で液状流動せずにゴム状弾性が現れ、力学的エネルギーが再び貯蔵されるようになり、 E' に平坦領域を生じ、 δ は小さくなる。つまり $\tan \delta$ が再び小さくなって、ある温度でピークを生じる。この $\tan \delta$ ピークは主分散と呼ばれ、高分子鎖のミクロブラウン運動が始まるガラス転移に対応している事から、ピーク温度をその物質の T_g とみなす場合が多い。本研究においても、 $\tan \delta$ ピーク温度を T_g として判断する事にした。Fig.1-7 中では、ガラス転移を示す $\tan \delta$ の大きなピークより低温域において、小さなピークが現れている。これは物質がガラス状態にある時に、局所的な分子運動が起こっている事を示している。ガラス転移を示す大きなピークが主分散、あるいは α 緩和と呼ばれるのに対して、このピークは副分散、あるいは β 緩和とも呼ばれ、 T_g 以下における分子運動に関する情報を与える。しかしながらこの変化は比較的小さいので、DMA では検出で

きない場合も多く見られる。

炭水化物、タンパク質、糖などの食品成分の T_g 検出に対する DMA の利用は、多数の報告例がある。Kalichevsky らは、いずれのアモルファス食品においても、同じような DMA 曲線が得られていることを報告している¹³⁾。すなわち、 T_g 付近で貯蔵弾性率の急激な低下と、 $\tan \delta$ のピークが現れる。アモルファス高分子の T_g は一般的に測定周波数依存性を示すが、Kokini らは昇温速度 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ で測定した DSC から求めた T_g と、測定周波数 1Hz で測定した DMA から求めた T_g が比較的良い一致を見せたと報告している¹⁴⁾。食品成分に対する DMA 測定条件を見ても、測定周波数を 1Hz として測定している場合が多い事から、本実験においても、測定周波数は 1Hz で統一する事にした。

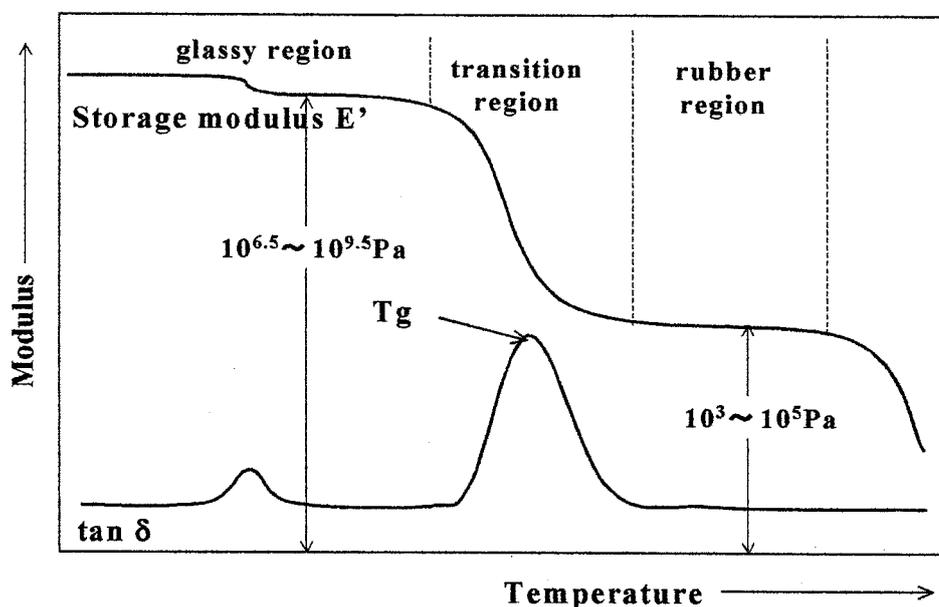


Fig.1-8 The change in storage modulus E' and $\tan \delta$ of typical amorphous polymer as a function of temperature.

1-3-2 低水分食品のガラス転移温度に及ぼす水分含量の影響

食品のような多成分混合系の示すガラス転移温度は、その構成成分である水分、炭水化物、タンパク質などに影響を受ける。その中でも特に、ガラス状食品のガラス転移現象に強い影響を及ぼすのが水分である。というのも、水分はマイナス 135℃という非常に低いガラス転移温度を有するため¹⁵⁾、その存在が食品のガラス転移温度に強い可塑効果を与えるからである。比較的水分含量の低い食品においては、水分の可塑効果がより顕著なものとなる。水分はどのような食品にも含まれる成分である事から、その影響の大きさからも、ガラス転移温度に及ぼす水分の影響を知る事は非常に重要である。実際、ガラス状食品のガラス転移研究においては、まず T_g に及ぼす水分含量の影響を検討するのが一般的とされる。Fig.1-9 に、いくつかのタンパク質におけるガラス転移温度の水分含量依存性を示す。水分含量の増加により、 T_g が低下していく傾向が明らかである。更に、その可塑効果が低水分領域に行くに従って増大している事が分かる。

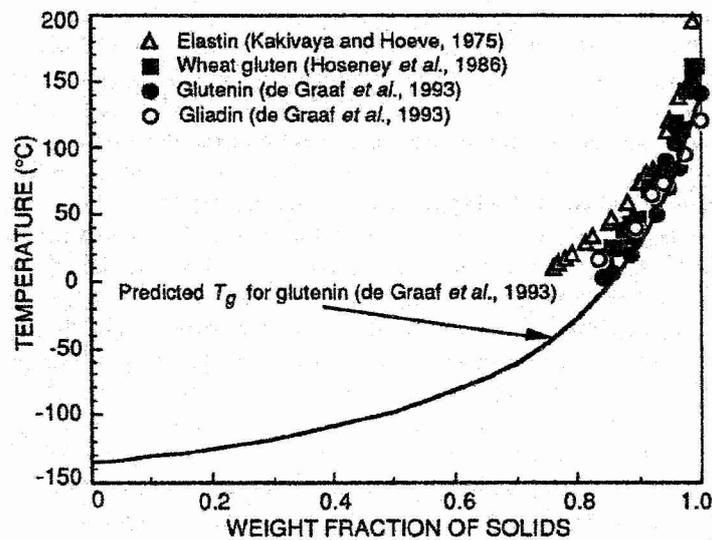


Fig.1-9 The effect of water content on T_g of several proteins. The predicted T_g line for glutenin was calculated using the Gordon-Taylor equation¹⁶⁾.

水分をはじめとして、様々な成分から構成される食品のガラス転移温度は、個々の構成成分におけるガラス転移温度の非線形関数として表わされる。混合系におけるガラス転移温度を決定するための半経験式として、最も一般的に用いられているのが、Gordon

と Taylor によって提唱された Gordon-Taylor 式である¹⁷⁾。

$$T_g = \frac{w_1 T_{g1} + k w_2 T_{g2}}{w_1 + k w_2} \quad (\text{Eq.1-1})$$

ここで T_g は混合系のガラス転移温度であり、 w_i は構成成分 i の存在比、 ΔC_{p_i} は構成成分 i のガラス転移時における熱容量変化量、同様に T_{g_i} は構成成分 i のガラス転移温度である。定数 k は Gordon-Taylor パラメータとも呼ばれ、以下の式でも記述することが出来る (Eq.1-2)¹⁸⁾。Gordon-Taylor 式は、一般的に系のガラス転移温度に及ぼす水分含量の影響を予測するため、あるいは高分子の2成分混合系におけるガラス転移温度を算出するために良く利用される。

$$k = \frac{\Delta C_{p2}}{\Delta C_{p1}} \quad (\text{Eq.1-2})$$

ここで ΔC_{p_i} は構成成分 i のガラス転移時における熱容量変化量である。

Gordon-Taylor 式におけるパラメータを実験的に求める事により、水や糖類、炭水化物、タンパク質などの様々な多成分混合系の T_g 予測への適用が可能である事が明らかとなっている¹⁹⁻²⁵⁾。そこで本研究においても、低水分魚肉加工食品を水-固体という2成分混合系とみなし、その T_g に及ぼす水分含量の影響を記述するために、Gordon-Taylor 式を利用した。

1-3-3 DSC 測定手順

1-3-3-1 試料準備

明確な DSC 曲線を得るためには、試料の熱伝導性を均一にする必要がある。そこで本研究では、DSC 用の試料は全て粉末状態に加工した。カツオ節などの固い試料は、金槌を用いて粉碎し、その後粒徑を揃えるためにふるい (Nonaka Rikaki Co., LTD. Aperture: 425 μ m、Wire Diameter: 290 μ m) にかけた。凍結乾燥した比較的やわらかな試料は、乳鉢中で細かい粉末状に加工した後、同様にふるいにかけた。

1-3-3-2 水分調整および水分含量の決定

試料の水分含量は、水分活性の異なる各種飽和塩を用いて内部の湿度を調整したコン

ウェイトユニットの中に、およそ 0.5g の試料を設置して水分を吸着させて調整した。本研究で用いた飽和塩の種類と、25°Cにおける相対湿度を Table1-1 に示す。試料の重量を 24 時間ごとに電子天秤で測定し、試料の重量変化が止まった時点で恒量に達したと判断した。慎重を期するため、重量変化が止まった時点より、更に 48 時間放置した。水分吸着後の試料は、秤量瓶に移して 110°Cに設定したオープン内で 48 時間乾燥させた。乾燥前後の重量から蒸発水分含量を求め、その結果から試料の水分含量を算出した。水分含量は 5 つの値の平均値を取った。

Table 1-1 The relative humidity of several saturated salt solutions used to calculated water sorption at 25°C²⁶⁾.

飽和塩	相対湿度 (%)
Lithium Bromide (LiBr)	6.6
Lithium Chloride (LiCl)	11.3
Potassium Acetate (CH ₃ COOK)	23
Magnesium Chloride (MgCl ₂)	33
Potassium Carbonate (K ₂ CO ₃)	44
Sodium Bromide (NaBr)	58
Potassium Iodide (KI)	70
Sodium Chloride (NaCl)	75.5
Potassium Chloride (KCl)	85

1-3-3-3 DSC 測定方法

DSC 用セルには島津耐圧型アルミセル (φ7mm×5mm、容量 60μl) を使用し、基準物質にはアルミナ粉末をそのままセルに試料重量の 2 倍量を入れて密封したものをを用いた。測定開始前に、DSC の温度・熱量のキャリブレーションを行った。キャリブレーションに当たっては、インジウム (melting point, 156.6°C、 ΔH_m , 28.5J/g) と蒸留水 (melting point, 0.0°C、 ΔH_m , 333J/g) を用いた。

約 20mg 程度の粉末試料を DSC セルに入れた後に上から金属棒で押さえ、油圧式ポンプを用いて 30kgf/cm² 程度の圧力をかけてプレス成型した。これは試料の詰め方によっては DSC 測定結果が大きく変化する事が知られているため、詰め方の条件を一定に

するための処理である。予備実験により、圧縮して成型すると DSC 曲線上のノイズが減少する事が確認されている。また、この程度の圧力であれば、ガラス転移温度に及ぼす圧縮処理の影響は無視できる程度であると判断した。その後、シーラーを用いてセルを密封し、基準物質とともに DSC 内で冷却・昇温走査を行った。

試料はまず液体窒素を用いて -50°C 程度まで冷却した後、 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 180°C まで昇温測定を行った。この測定温度範囲は、試料によって若干異なる。本研究ではガラス転移現象における重要な特性の一つである可逆性の有無を明らかにするため、いずれの試料も複数回の測定を行った。一回目の昇温測定を 1st run、2 回目、3 回目…をそれぞれ 2nd run、3rd run…と称する。また、各水分含量につき、最低 3 つの試料を測定し、得られたガラス転移温度の平均値を、その水分含量時のガラス転移温度とみなした。得られた DSC 測定データの解析には、熱分析ソフト Shimadzu TA-60WS を用いた。

1-3-4 エンタルピー緩和過程の解析方法

本研究では、熱分析による T_g 検出に加えて、DSC 測定によって得られるエンタルピー緩和過程を解析して、物質のガラス状態を把握する事を目的としている。ここでは DSC を用いたエンタルピー緩和過程の解析方法について述べる。

1-3-4-1 DSC によるエンタルピー緩和量の算出

DSC 曲線に現れる緩和ピーク面積から、その物質のエンタルピー緩和量を算出する事が出来る。Fig.1-10 にエンタルピー緩和量を求める手順を模式的に示した。

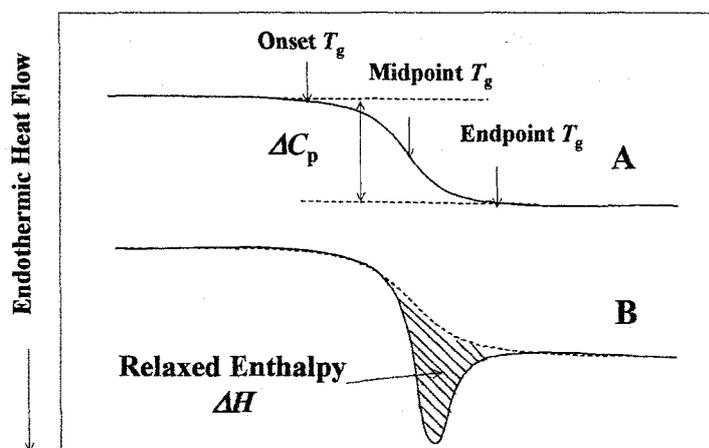


Fig.1-10 Schematic representation of the glass transition measured using DSC for unaged (A) and aged samples (B). The area under the endotherm associated with T_g is defined as enthalpy recovery, ΔH .

A は未緩和ガラスの DSC 曲線であり、B はエージングして緩和したガラスの DSC 曲線である。未緩和ガラスの熱容量から緩和ガラスの熱容量を差し引いた部分、図中では斜線の部分がそのガラスの緩和量になり、以下の式から算出できる。

$$\Delta H = \int C_{p,relax}(T)dT - \int C_{p,non-relax}(T)dT \quad (\text{Eq.1-3})$$

ここで $C_{p,relax}$ は緩和したガラスの熱容量、そして $C_{p,non-relax}$ は未緩和ガラスの熱容量である。

1-3-4-2 エンタルピー緩和過程の KWW 式へのフィッティング

ガラス状物質におけるエンタルピー緩和の進行速度、すなわち T_g 以下における分子運動性に関する情報を得るためには、Eq.1-3 から求めた緩和量 ΔH の値を解析する必要がある。アモルファス物質の緩和過程は、単純な指数関数的なものとはかけ離れた挙動を示す事が多いため、KWW と呼ばれる拡張型指数関数を用いた解析がしばしば行われる。KWW 式は以下のように記述される。すなわち、

$$\Phi(t) = \exp\left[-(t/\tau)^\beta\right] \quad (\text{Eq. 1-4})$$

ここで $\Phi(t)$ は緩和関数、 τ は緩和時間 (h)、 β は緩和時間分布・非指数関数パラメータで、0 から 1 の値を取る。 τ の値が大きいくほど、その物質のガラス状態は安定であると言える。また、 β の値が小さいほど、緩和時間の分布が広い、すなわち動的不均一性の高い物質である事を示している。一般に、高分子量物質よりも、低分子量物質や多成分混合系の方が高い β の値を示す事が知られている⁶⁾。KWW 式を用いた解析方法は半経験的であるが、多くのガラス状物質の緩和過程を比較的良好に記述できる事から、様々な物質において多用されている。合成高分子^{11,27,28)}はもちろん、マルトースやスクロースなどの糖類²⁹⁻³³⁾、そしてデンプン³⁴⁾などの食品素材においても、KWW 式適用の有用性が報告されている。しかしながら、この式を実際の食品に適用した例はこれまでに報告されていない。エンタルピー緩和過程を記述するための理論式には、KWW 式以外に Defect Diffusion モデル³⁵⁾、Multi-parameter Phenomological (MP)モデル²⁷⁾、Scherer-Hodge モデル^{36,37)}などが存在するが、簡便性という点を考えれば、KWW 式が最も利用しやすい。食品系のエンタルピー緩和現象に関する研究はまだ初期段階であり、最初のステップとし

ては、KWW 式のような比較的単純なモデルを用いた解析を行う事が望ましいと考え、本研究では KWW 式を利用する事にした。

Eq.1-4 中の緩和関数 $\Phi(t)$ は、以下のようにも記述できる。すなわち、

$$\Phi(t) = 1 - (\Delta H / \Delta H_{\infty}) \quad (\text{Eq.1-5})$$

ΔH は DSC 測定結果から算出される緩和量であり、 ΔH_{∞} はエンタルピー緩和量の最大値で、次式によって与えられる。

$$\Delta H_{\infty} = \Delta C_p (T_g - T_a) \quad (\text{Eq.1-6})$$

ここで、 T_g はガラス転移温度、そして T_a はエージング温度、 ΔC_p はガラス転移時の熱容量変化である。Eq.1-3、1-5、1-6 を組み合わせれば、KWW 式のフィッティングパラメータ τ と β を算出する事が出来る。

第1章 参考文献

- 1) Genin N, Rene F. Analyse du role la transition vitreuse dans le procedes de conservation agro-alimentaire. *J. Food Eng.* 1995; **26**: 391-407.
- 2) Downton GE, Flores LJJ, King CJ. Mechanism of stickiness in hygroscopic amorphous powders. *Ind. Eng. Chem. Fund.* 1982; **21**: 447-451.
- 3) 藤森祐基、小国正晴、「熱測定」、1996; **23**: 60
- 4) 日本熱測定学会／編、「熱量測定・熱分析ハンドブック」、丸善株式会社、1998
- 5) Champion D, Le Meste M, Simatos D. Toward improved understanding of glass transition and relaxations in foods: molecular mobility in the glass transition range. *Trend. Food Sci. Technol.* 2000; **11**: 41-55.
- 6) Le Meste M, Champion D, Roudaut G, Blond G, Simatos D. Glass transition and food technology: a critical appraisal. *J. Food. Sci.* 2002; **67**: 2444-2458.
- 7) Roos Y, Karel M. Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. *J. Food Sci.* 1991; **56**: 38-43.
- 8) Karmas R, Buera MP, Karel M. Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems. *J. Agric. Food Chem.* 1992; **40**: 873-879.
- 9) Roos YH, Himberg MJ. Nonenzymatic browning behavior, as related to glass transition, of a food model at chilling temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 1994; **42**: 893-898.
- 10) Bell LN, Touma DE, White KI, Chen YH. Glycine loss and Maillard browning as related to the glass transition in a model food system. *J. Food Sci.* 1998; **63**: 625-628.
- 11) Yoshida H. Enthalpy relaxation of engineering plastics. *Netsu Sokutei* 1988; **15**: 65-69.
- 12) 斎藤安俊／著、「物質化学のための熱分析の基礎」、共立出版株式会社、1990.
- 13) Kalichevsky MT, Blanshard JMV, Marsh RDL. Applications of mechanical spectroscopy to the study of glassy biopolymers and related systems. In: Blanshard JMV, Lillford PJ (eds). *The Glassy State in Foods*. Nottingham: University Press.

- 1993; 303-316.
- 14) Morales A, Kokini JL. The glass transition of soy globulins using differential scanning calorimetry and mechanical spectrometry. *Biotechnol. Prog.* 1997; **13**: 624-629.
- 15) Johari GP, Hallbrucker A, Mayer E. The glass liquid transition of hyperquenched water. *Nature* 1987; **330**: 552-553.
- 16) Roos YH. Phase transition in foods. Academic Press, San Diego, 1995.
- 17) Gordon M, Taylor JS. I Non-crystalline copolymers. *J. Appl. Chem.* 1952; **2**: 493-500.
- 18) Couchman PR, Karasz FE. A classical thermodynamic discussion of the effect of composition on glass-transition temperatures. *Macromol.* 1978; **11**: 117-119.
- 19) Roos YH. Glass transition-related physicochemical changes in foods. *Food Technol.* 1995; October: 97-102.
- 20) Orford PD, Parker R, Ring SG, Smith AC. Effect of water as a diluent on the glass transition behavior of malto-oligosaccharides, amylose and amylopectin. *Int. J. Biol. Macromol.* 1989; **11**: 91-96.
- 21) Kalichevsky MT, Blanshard JMV. The study of the effect on the glass transition of 1:1 mixture of amylopectin, casein and gluten using DSC and DMTA. *Carbohydr. Polm.* 1992; **19**: 271-278.
- 22) Kalichevsky MT, Blanshard JMV. The effect of fructose and water on the glass transition of amylopectin. *Carbohydr. Polm.* 1993; **20**: 107-113.
- 23) Kalichevsky MT, Jaroszkiewicz EM, Blanshard JMV. Glass transition of gluten. 1: gluten and gluten-sugar mixtures. *Int. J. Biol. Macromol.* 1992; **14**: 257-267.
- 24) De Graaf EM, Madeka H, Cocero AM, Kokini JL. Determination of the effect of moisture on gliadin glass transition using mechanical spectrometry and differential scanning calorimetry. *Biotechnol. Prog.* 1993; **9**: 210-213.
- 25) Kokini JL, Cocero AM, Madeka H, de Graaf E. The development of state diagrams for cereal proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 1994; **5**: 281-288.
- 26) 野口駿／著、「食品と水の化学」、幸書房、1992

- 27) Cameron NR, Cowie JMG, Ferguson R, McEwan I. Enthalpy relaxation of styrene-maleic anhydride (SMA) copolymers Part 1. Single component systems. *Polymer* 2000; **41**: 7255-7262.
- 28) Goitiandia L, Alegria A. Physical aging of poly (vinyl acetate). A thermally stimulated depolarization current investigation. *J. Non-cryst. Sol.* 2001; **287**: 237-241.
- 29) Hancock BC, Shamblin SL, Zografi G. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. *Pharm. Res.* 1995; **12**: 799-806.
- 30) Duddu SP, Zhang G, Dal Monte PR. The relationship between protein aggregation and molecular mobility below the glass transition temperature of lyophilized formulations containing a monoclonal antibody. *Pharm. Res.* 1997; **5**: 596-600.
- 31) Shamblin SL, Zografi G. Enthalpy relaxation in binary amorphous mixtures containing sucrose. *Pharm. Res.* 1998; **15**: 1828-1834.
- 32) Noel TR, Parker R, Ring SM, Ring SG. A calorimetric study of structural relaxation in a maltose glass. *Carbohydr. Res.* 1999; **319**: 166-171.
- 33) Truong V, Bhandari BR, Howes T, Adhikari B. Physical aging of amorphous fructose. *J. Food. Sci.* 2002; **67**: 3011-3018.
- 34) Kim YJ, Hagiwara T, Kawai K, Suzuki T, Takai R. Kinetic process of enthalpy relaxation of glassy starch and effect of physical aging upon its water vapor permeability property. *Carbohydr. Polym.* 2003; **53**: 289-296.
- 35) Perez J. Defect diffusion model for volume and enthalpy recovery in amorphous polymers. *Polymer* 1988; **29**: 483-489.
- 36) Scherer GW. Use an Adam-Gibbs equation in the analysis of structural relaxation. *J. Am. Ceram. Soc.* 1984; **67**: 504-511.
- 37) Hodge M. Effect of annealing and prior history on enthalpy relaxation in glassy polymers. 6. Adam-Gibbs formulation of non-linearity. *Macromol.* 1987; **20**: 2897-2908.

第2章 低水分魚肉加工食品のガラス転移測定

2-1 はじめに

低水分魚肉加工食品に対するガラス転移概念の適用性を明らかにするためには、まずそれら食品がガラス状態を取り得るのかを確認する必要がある。そこで本章では、実際に低水分魚肉加工品がガラス転移温度を有するのかどうかを確認する事を目的とし、熱分析によるガラス転移温度の検出を行った。

2-2 熱分析を用いた低水分魚肉加工品のガラス転移温度の検出

2-2-1 はじめに

カツオ節は日本の伝統的な加工保存食品の一つであり、カツオ魚肉を煮熟した後、段階的な加熱乾燥加工を加え、更にはカビ付けを行い安定性及び風味を高めた魚肉加工食品である。Fig.2-1 にカツオ節の典型的な製造工程を示した。全工程を経て出来上がったカツオ節は、硬い木や石のような外観を有し、「世界で最も硬い食品」などと言われる(Fig.2-2)。またそのカツオ節の破断面を見ると透き通った赤いガラスのように見える(Fig.2-3)。カツオ節は極めて保存性が高く、室温では1年近くの間、安定なまま保存できると言われている。また、加熱や吸水によってパリパリとした硬い状態から、柔らかいラバー状態へと変化する事は経験的に良く知られている。このような保存性の高さ、ガラスのような外観、そして温度・水分変化に伴う物性変化は、カツオ節がガラス状態にあることを示唆している。そこで本章では、カツオ節を一つの典型的なモデル低水分魚肉加工食品とみなし、熱分析によるカツオ節のガラス転移温度の検出を行った。更に、その転移温度に及ぼす水分含量の影響などを検討し、一般的なガラス状高分子におけるガラス転移挙動との比較を試みた。本実験で得られるカツオ節ガラス転移に関する情報は、カツオ節の持つ様々な物理化学的性質を理解し、制御する上で非常に有用な情報となる事が期待できる。

カツオ節のガラス転移現象に関する研究はすでに報告例がある。95年には、小野が初めてカツオ節のDSC測定を行い、水分約15%の市販カツオ節において、125℃付近にガラス-ラバー転移と思われる熱容量のステップ状変化が見られる事を明らかにした¹⁾。更に、水の可塑効果の影響を調べたところ、水分0-15%の範囲内において、カツオ

Raw bonito meat

1. Cutting

Remove the heads, entrails and fins

2. Boiling & Cooling

3. Remove the bones, skin and scale

4. First smoke drying

Namari-bushi

5. Second smoke drying

Repeat drying for 10~20 days

Ara-bushi

6. Shaving

Shave off black tar parts at surface of *Arabushi*

7. Accreting the mold

After sun drying for 1~2 days, spray the mold to bonito, and hold in warm and humid room. This step is repeated four times, which is called first mold, second mold, third mold and fourth mold. It takes for 10~20 days.

Honkare-bushi ※

※ used in this study

Fig.2-1 Typical production process of *Katsuobushi*



Fig.2-2 Photo of *Katsuobushi*

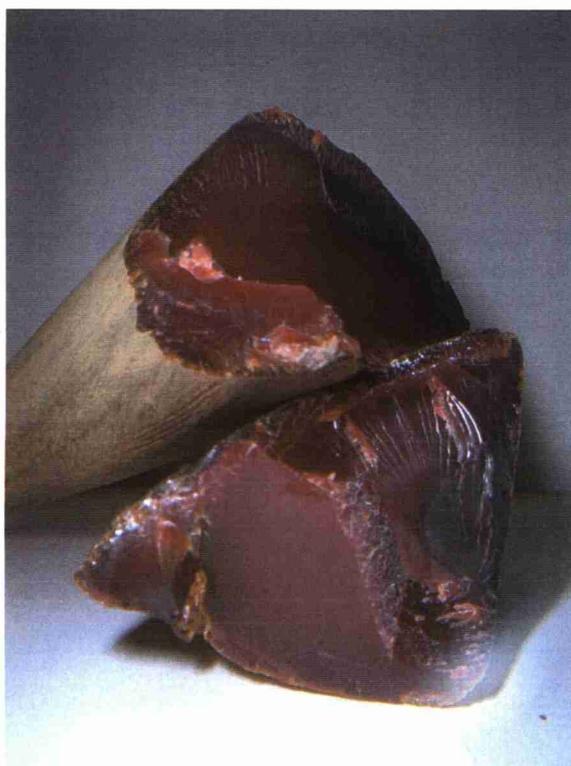


Fig.2-3 Photo of cross-section surface of *Katsuobushi*

節のガラス転移温度がある程度の水分含量依存性を有する事が示された¹²⁾。本研究においても、カツオ節のガラス転移現象に対して同様の実験を行ったところ、小野の結果と同様の結果が得られた。しかしながら、この実験結果から示されたカツオ節のガラス転移挙動には、以下に示したようないくつかの矛盾点が存在する事が明らかとなった。すなわち、

- 1) 一般的にガラス転移現象は可逆的なものである³⁾にも関わらず、カツオ節のガラス転移に関しては、DSC 曲線において可逆性が見られない。
- 2) 水分を 10% 超えた辺りで T_g の水分含量依存性が見られなくなり、これはカツオ節の見た目の物性変化と明らかに矛盾する。
- 3) ガラス転移現象が試料によっては検出出来る場合と出来ない場合があるなど、再現性に乏しい。

以上の事から、カツオ節のガラス転移について再検討する必要があると考えた。再検討するに当たっては、特に可逆性の有無の確認、サンプリング部位の限定、測定温度範囲などに配慮し、測定条件をより厳密に決定した。更に、エンタルピー緩和現象の可能性も考慮に入れた。また、食品のガラス転移温度を検出する際、複数の手法を併用する事が一般的とされている事から、本実験では DSC および DMA を併用し、両手法から得られる試料のガラス転移現象に関する情報について比較検討を行った。

2-2-2 実験方法

2-2-2-1 試料準備

カツオ節は市販小売店で購入した。にんべん (Ninben Co., Ltd., Tokyo) 製のカツオ節を主に試料として用いたが、DSC 測定に当たっては、比較のために柳屋製 (Yanagi-ya Honten Co., Ltd., Shizuoka) および秋元水産製 (Akimoto Suisan Co., Ltd., Shizuoka) のカツオ節の測定も同時に行った。論文中では、にんべん、柳屋、秋元水産製のカツオ節を、それぞれ A,B,C と称した。用いたカツオ節は全て「本枯れ節」(Fig.2-1 参照) である。カツオ節は電動ノコギリでスライスした後、一番外側のカビ部分と血合肉部分を除き、中心部の赤いガラス様部分だけを取り出した。これはデータの再現性を高めるための処置である。DSC 測定用の試料は、粉碎して細かい粉末状に加工した後、圧縮して直径 5mm、厚さ 1mm のペレット状に加工した。DMA 測定用の試料は、カッターナイフと

ヤスリを用いて、 $5 \times 20 \times 1.5$ mm の直方体に加工した。試料の水分調整および水分測定は、第1章で示した方法によって行った。超低水分試料は、 110°C のオープン内で一定時間水分を蒸発させて調製した。

2-2-2-2 DSC 測定

DSC によるカツオ節のガラス転移現象の検出およびガラス転移温度の決定は、第1章に示した方法に基づいて行った。

2-2-2-3 DMA 測定

DMA 分析には、パーキンエルマー社の DMA-7 を使用した。測定には3ポイントベンドイング測定システムを用いて温度スキャンを行い、貯蔵弾性率 (E') および $\tan \delta$ の測定を行った。試料は液体窒素を用いて冷却し、測定周波数 1Hz、昇温速度 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -100 から 200°C まで昇温走査を行った。2-2-2-1 に示したように、DMA の試料は DSC と異なり、サンプルの形状が大きい。従って、余り速い昇温速度で加熱すると、設定温度と実際の試料温度に差が生じる恐れがある。そこで DMA 測定の場合は、DSC の昇温速度よりも緩やかなスピードで加熱を行った。また、密封系で行われる DSC の場合とは異なり、DMA 測定は開放系で行われる。よって高温加熱時の水分蒸発をおさえるために、試料にはあらかじめシリコンオイルでコーティングを施した。測定試料の水分含量は、同じ相対湿度で水分調整した試料を 110°C のオープン内で恒量に達するまで乾燥し、その蒸発水分量から算出して求めた。既往の研究例に基づき、 $\tan \delta$ のピークトップ温度をガラス転移温度とみなした⁴⁾。

2-2-3 結果と考察

2-2-3-1 DSC 測定結果

Fig.2-4 に、市販カツオ節の DSC 測定結果を示す。まず 1st run の曲線においては、 60°C 付近に、熱容量のベースライン変化に重なるように吸熱ピークが現れた。カツオ節は製造工程中に煮熟・乾熱乾燥という2段階の加熱処理を受けているため、この吸熱ピークはカツオ節中のタンパク質の熱変性によるとは考えにくい。また、この吸熱ピークが 2nd run の曲線において消失していることから、融解などと言った1次相転移を示すとも

思えない。多くのガラス状物質において、DSC 曲線にこのような不可逆的な吸熱ピークが現れる事が報告されている⁵⁾。この吸熱ピークは、第1章で述べたガラス状物質を T_g 以下で保存した場合に進行するエンタルピーの緩和現象に起因すると考えられる。カツオ節におけるエンタルピー緩和現象の詳細については、第4章で改めて述べる。

多くの場合、エンタルピー緩和による吸熱ピークの存在は、正確なガラス転移温度の決定を困難にする。よって、この吸熱ピークが消失した 2nd run の曲線から、正しいガラス転移温度を求めるのが一般的である^{6,9)}。そこでカツオ節における 2nd run の曲線を見ると、吸熱ピークは消失し、30°C 付近に非常に明確なガラス転移現象に特有の熱容量のステップ状変化が観察された。3rd run の曲線においても、同温度帯に明らかな熱容量シフトが現れており、この現象が可逆的である事を示している。可逆性はガラス転移現象における重要な性質の一つである事から、この熱容量シフトはガラス転移現象に起因すると判断できる。緩和ピークの存在、熱容量のステップ状変化、そしてその変化の可逆性は、いずれもガラス状物質に特有の現象である。したがって、カツオ節が内部にガラス状態を有し、温度変化によってガラス転移現象を示す事が明らかとなった。

更に、DSC 曲線から、カツオ節が示すガラス転移現象が、比較的広い温度帯に渡って起こっている事がわかる ($\Delta T_g = T_g^{\text{endpoint}} - T_g^{\text{onset}} = 67.6^\circ\text{C}$)。このガラス転移温度幅は、他のガラス状ポリマーに比べるとかなり広い³⁾。これはおそらく、カツオ節が、性質の異なる数種類のタンパク質や、水、糖質、脂質、ミネラル分などから構成される非常に複雑な多成分混合系であることに起因しているのであろう。多成分混合系の場合、それぞれの構成成分に対応する複数のガラス転移現象が DSC 曲線上にしばしば現れる^{10,11)}。しかしながら、それら成分の T_g が比較的近い温度帯にある場合、それぞれのガラス転移現象が測定時の昇温速度では分離出来ず、重なり合った形で検出される。その場合、DSC 曲線において現れるガラス転移現象は、広い温度帯に渡ったブロード状のシフトとして現れることになる。従って、カツオ節の場合においても、比較的近い T_g を持つ構成成分のガラス転移現象が、重なり合って検出されたためにこのような広いガラス転移温度範囲を示したと考えられる。低水分加工魚肉のガラス転移現象に対する構成成分の影響については、第3章で詳細に議論する。

Fig.2-5 は、柳屋 (B) および秋元水産製 (C) のカツオ節の DSC 測定結果である。いずれのカツオ節も明確なガラス転移現象を示し、A のカツオ節とほぼ同じような熱挙動

を示した。また、メーカーの違いによって、 T_g や ΔC_p 、 ΔT_g に大きな違いは見られなかった。以上の結果から、ガラス転移現象はカツオ節の一般的特性の一つである事が明らかとなった。

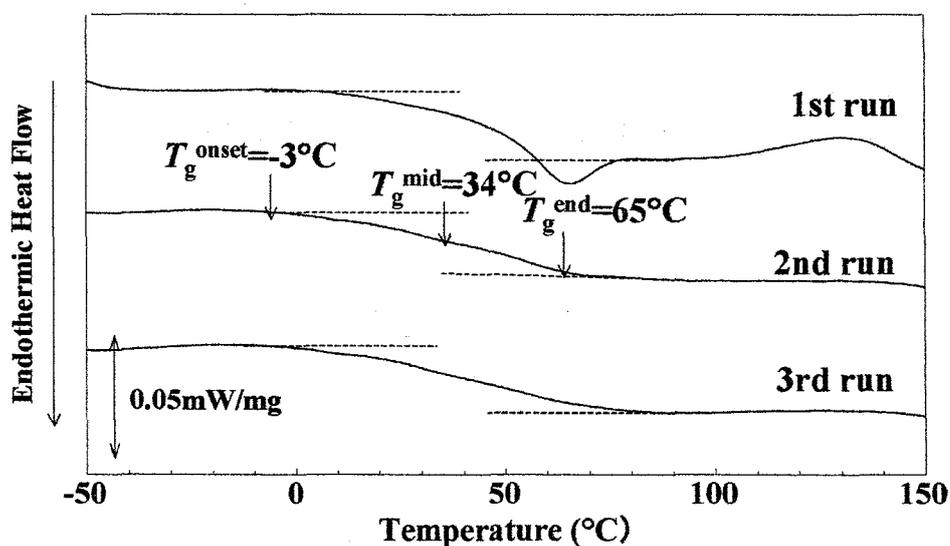


Fig.2-4 Typical DSC thermograms of *Katsuobushi*(A) with 12.8% moisture. The glass transition temperature was determined from the midpoint temperature of stepwise change in heat capacity.

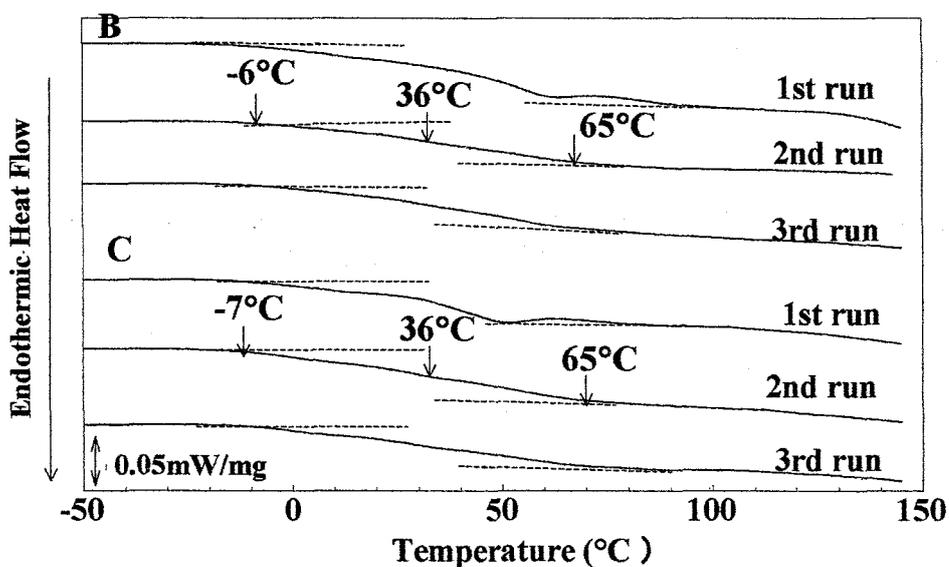


Fig.2-5 Typical DSC thermograms of *Katsuobushi* (B, C). Moisture content of B and C were 12.4% and 11.7%, respectively.

2-2-3-2 DMA 測定結果

水分含量約 13%のカツオ節の典型的な DMA 曲線を Fig.2-6 に示す。図から明らかのように、ガラス転移の特徴である貯蔵弾性率(E')の急激な低下と、 $\tan \delta$ のピークが見られた¹²⁾。第1章でも述べたように、貯蔵弾性率の急激な低下は、その物質が硬いガラス状態からラバー状の弾性体へと転移した事を表わしており、 $\tan \delta$ のピークは高分子鎖のミクロブラウン運動が解放された事を示している。よって、カツオ節において見られたこれらの結果は、カツオ節のガラス-ラバー転移を表わしているとみなせる。転移前のカツオ節の弾性率 E' 値は 10^8 Pa 程度であり、この値はガラス状物質の弾性率が $10^{6.5} \sim 10^{9.5}$ Pa の範囲内にあるとする Kalichevsky ら¹³⁾の報告と一致している。貯蔵弾性率の変化は-40 から 80°C の温度帯で、そして $\tan \delta$ のピークは 30 から 110°C の温度帯で生じた。これらの変化は、DSC 測定におけるベースライン変化と同様に、あるいはそれよりも広い温度帯で起こっていた。この広い転移温度範囲については、カツオ節が多成分混合系である事、試料サイズが DSC のものよりも大きい事、更に測定中に生じた水分蒸発の影響などが考えられる。 $\tan \delta$ のピークから求めたガラス転移温度は約 70°C であり、この温度は同水分含量カツオ節の DSC 曲線から求めたガラス転移温度よりも 40°C 程度高い値であった。一般に、DSC の熱容量変化から求めた T_g は、DMA の $\tan \delta$ ピークから求めた T_g よりも低い値を示すのが一般的な傾向であり、これは両測定法の測定パラメータが異なっている事に起因するとされている¹⁴⁾。更に本実験の場合は、DMA 測定中に生じた試料水分の蒸発の影響が、DMA における高い T_g 値と関連している可能性もある。水分蒸発の影響によって、DMA で求めた T_g が DSC で求めたものよりも高い値を示すという結果は、グルテンや大豆タンパク質の DMA 測定結果においても報告されている^{4,7)}。DSC 測定は、試料を耐圧性のセルに密封した上で行うため、いかなる温度まで加熱しても試料の水分含量は変化しない。一方、DMA 測定はその設計上、開放系で行われるのが一般的である。従って、試料を 100°C 以上に加熱する場合、水分蒸発がどうしても避けられない。本研究ではあらかじめシリコーンオイルでコーティングを施したが、それでも測定前後で 6%以上の水分蒸発が認められた。 $\tan \delta$ の値が 70°C 付近で最大値を取った後、再度 110°C 付近でピークを示しているが、これは試料がガラス転移を起こしている途中で DMA 内の温度が 100°C を越えて水分の蒸発が始まり、その結果 T_g が高温側へシフトしたためではないかと考えられる。Kalichevsky らは、DMA 測定中

の1%の水分蒸発が、約5°Cのガラス転移温度上昇をもたらすと報告している⁷⁾。彼らの計算に従えば、今回DMAから求めたカツオ節のガラス転移温度は妥当な値であると考えられる。以上の事から、ある程度の水分を含む試料の場合は、DSCで求めたガラス転移温度の方が、DMAで求めたものよりも、より正確で信頼できる値であると考えられる。

$\tan \delta$ の曲線 (Fig.2-6) において、-30°C付近にも小さなピークが現われている。大豆タンパク製フィルムの場合においても、水分が26~2.8%の時、-72~-33°Cの温度帯に小さなピークが観察される事が報告されている⁴⁾。これは大豆タンパク質側鎖の運動を反映する β 緩和と呼ばれる現象に起因するピークである。しかしながら、カツオ節の場合、この低温域のピークは、毎測定時に観察されるわけではなく、更に大豆タンパク質フィルムの β 緩和と比べると、その温度帯はかなり高い領域にある事などから、 β 緩和とは考えにくい。これはむしろ測定時に生じたノイズとする方が妥当であろう。このようなノイズが生じたのは、試料の表面が完全にはフラットになっていなかったためと考えられる。従って、本実験結果において見られた-30°C付近のピークはカツオ節のガラス転移現象とは無関係であると判断した。

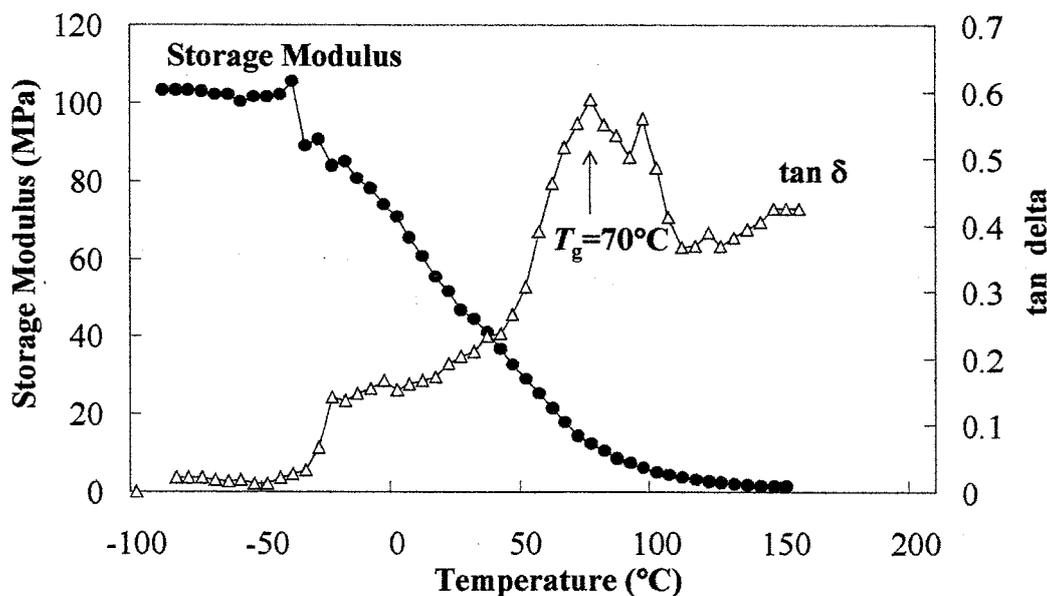


Fig.2-6 Typical dynamic mechanical analysis plot of *Katsuo-bushi* (A) at moisture content of 12.9%, showing $\tan \delta$ ($\tan \delta$) and storage modulus (E') as a function of temperature. The sample was cooled to -100°C with liquid nitrogen and heated at 3°C/min. Measuring frequency was 1Hz. The glass transition temperature was determined from a peak top temperature of the $\tan \delta$ curve.

2-2-3-3 カツオ節のガラス転移温度に及ぼす水分含量の影響

Fig.2-7 に、水分含量の異なるカツオ節の DSC 測定結果を示す。これらの結果はすべて 2nd run の曲線である。いずれの試料においても、ガラス転移を示す明らかな熱容量のステップ状変化が認められた。また、水分の増加に従って、ガラス転移温度が低下する傾向が見られた事から、水の可塑効果が確認された。また、異なる 2 つのメーカーのカツオ節においても同様に測定を行ったところ、いずれも A のカツオ節と同様に、水分の増加と共に T_g が低下する傾向を示した。熱容量シフトの開始点、中間点、終了点 (onset, midpoint, endpoint) から求めたガラス転移温度を、Table 2-1 にまとめる。この表からも、カツオ節のガラス転移温度が水分依存性を持つ事が明らかである。ある程度水分含量の高いカツオ節の onset の T_g 値は、 0°C 以下の温度帯ですでにガラス転移が始まっている事を示している。ただし、本実験においては ΔT_g の値の水分含量依存性は明確ではなかった。

次に、Fig.2-8 に水分含量の異なるカツオ節の DMA 曲線を示した。それぞれの曲線において、貯蔵弾性率 E' の急激な低下と、 $\tan \delta$ のピークが観察された。 E' 低下の開始点と $\tan \delta$ のピーク温度は、水分の増加に伴って低下する傾向が見られた。これらの傾向は、DSC における熱容量シフトと同じであった。水分 10% 以下の試料における $\tan \delta$ のピーク温度はそれぞれ近い値を示しているが、これは DMA 測定中の水分蒸発のためと推察した。すなわち、試料の初期水分含量に関わらず、測定中に高温まで加熱される事により水分が蒸発し、最終的にいずれの試料も大体同じような水分含量となったと考えられる。水分 12.9、9.2、5.6% の試料において、 $\tan \delta$ 曲線の低温側 (-40°C 付近) に小さなピークが観察された。これも先ほど述べたように、カツオ節の β 緩和である可能性も考えられるが、いずれもほとんど水分含量依存性を示さない事、更に再現性も良くない事などから、やはり測定上のノイズであると判断した。

DSC および DMA 測定から求めたカツオ節のガラス転移温度と水分含量の相関性を、Fig.2-9 に示した。前述のように、DSC と DMA 測定結果から求めたガラス転移温度の差は、測定手法の差による影響と、DMA 測定中に生じた試料の水分蒸発の影響によるものである。

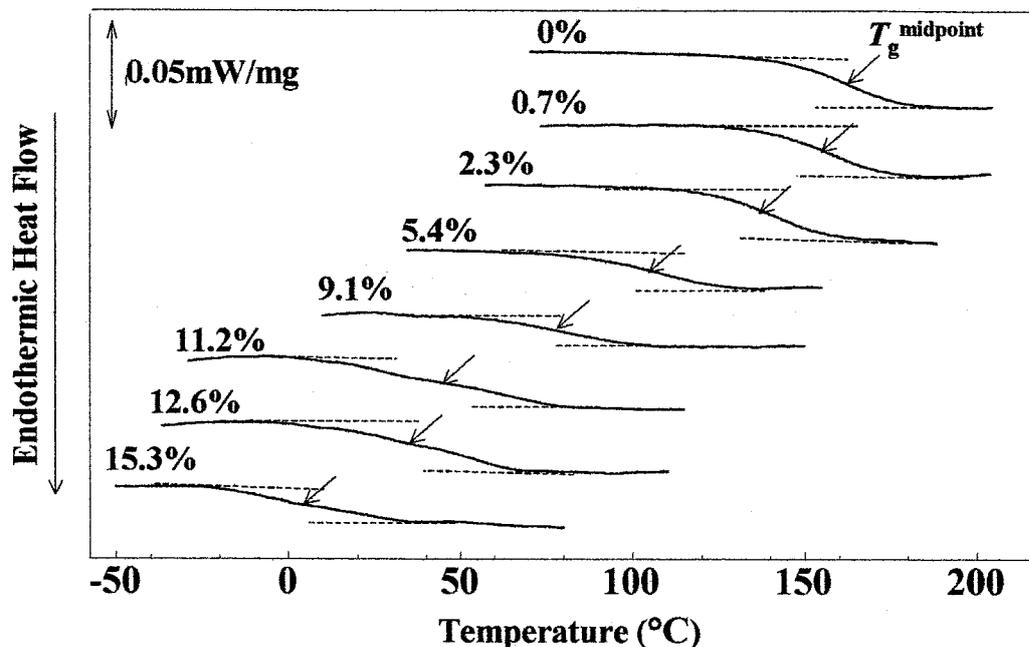


Fig.2-7 DSC thermograms of *Katsuobushi* (A) at different moisture contents. These are second-run curves to eliminate relaxation hysteresis effects at first scanning and T_g values shown are midpoint temperatures of stepwise change in heat capacity.

Table 2-1 The glass transition temperatures of *Katsuobushi* (A) determined by DSC at different moisture contents

Moisture Content (% dry basis)	Glass transition temperature (°C)*			
	T_{g1} (onset)	T_{g2} (midpoint)	T_{g3} (endpoint)	$\Delta T_g (T_{g3} - T_{g1})$
0	144.4±5.0	163.3±2.1	178.9±1.7	34.5±3.7
0.7	131.6±3.0	157.3±1.8	177.2±2.9	45.6±3.3
2.3	117.7±3.8	132.0±6.4	156.4±1.8	38.8±2.1
5.4	80.4±1.9	99.1±2.0	122.4±1.6	41.9±2.1
8.1	59.9±1.7	83.1±3.1	107.3±5.1	47.3±3.6
9.4	51.8±2.7	79.8±0.5	95.5±1.3	43.7±2.8
11.2	19.1±3.6	43.7±2.2	74.3±2.8	55.3±3.0
12.6	0.79±3.6	33.8±3.8	65.6±2.5	64.8±0.8
15.3	-22.3±1.8	10.5±1.5	32.2±1.5	54.6±2.6

* The glass transition temperature is an average of three determinations ± standard deviation

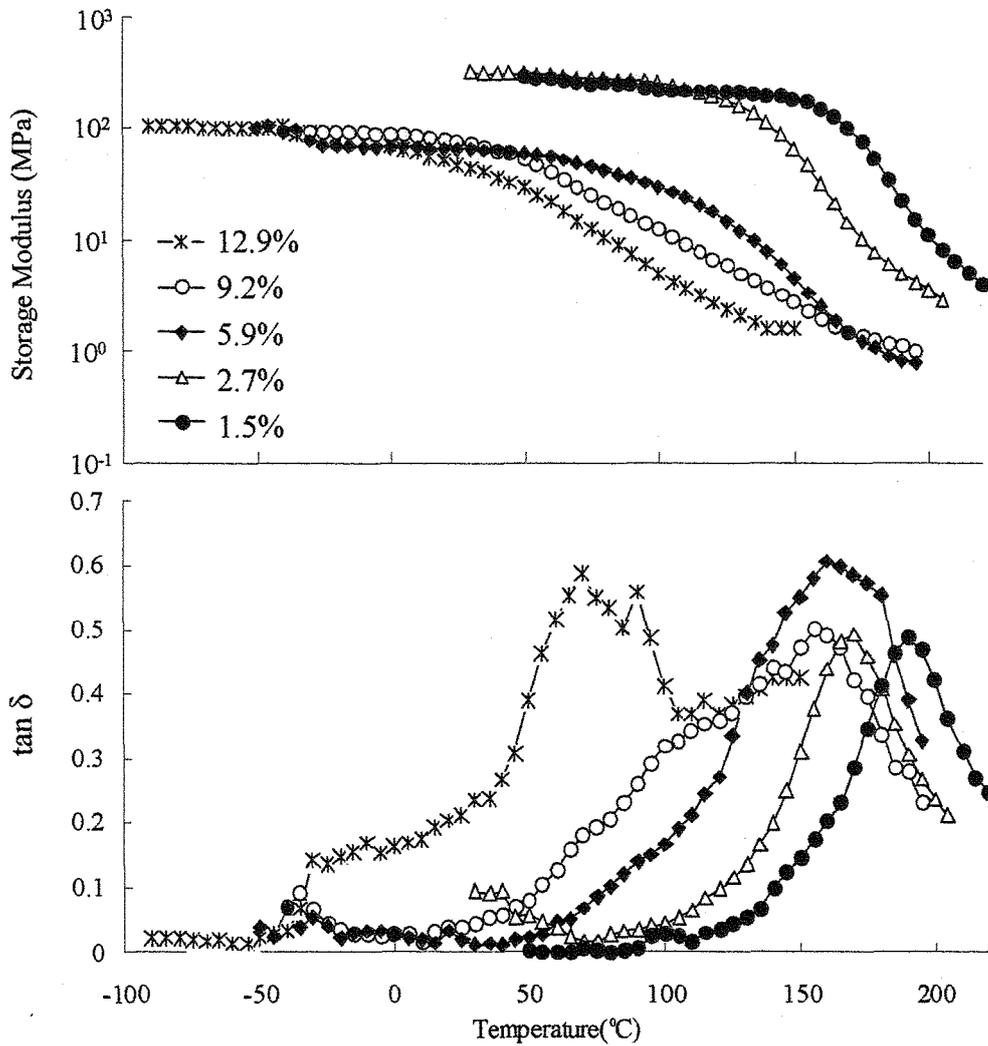


Fig.2-8 Variation of storage modulus (E') and tangent delta ($\tan \delta$) of *Katsuobushi* (A) as a function of temperature with different moisture contents

Fig.2-9 は、カツオ節のガラス転移温度が強い水分含量依存性を有している事を示している。図中の点線は、Gordon-Taylor 式 (Eq.1-1) へのフィッティングカーブである。フィッティングの相関係数は 0.99 以上であった事から、今回得られたカツオ節のガラス転移温度の水分含量依存性は、Gordon-Taylor 式で良好に記述可能である事が明らかとなった。

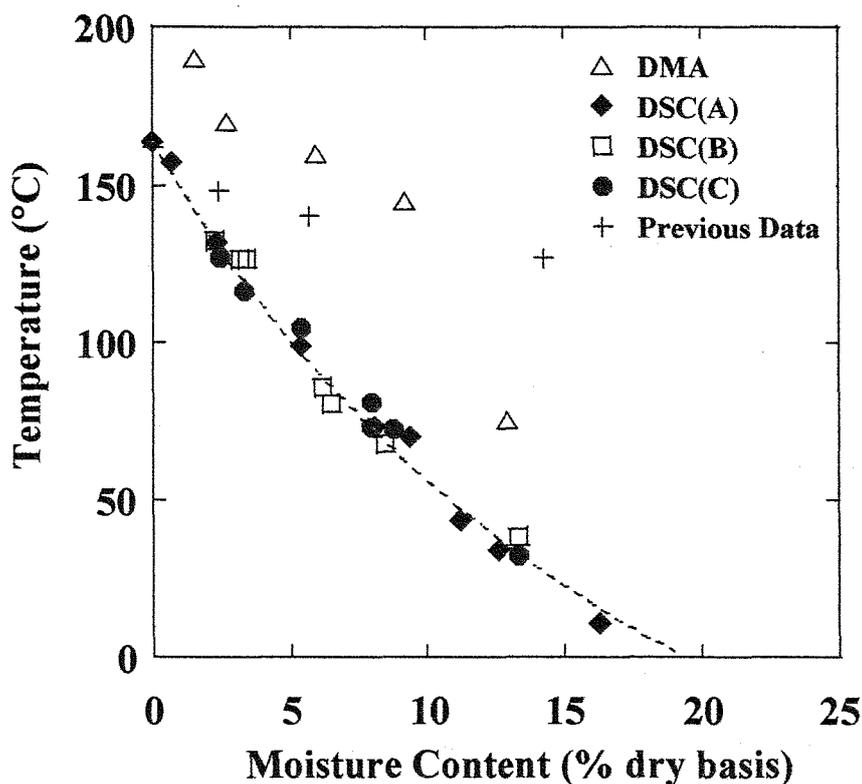


Fig.2-9 Plots of $\tan \delta$ peak temperatures (\blacktriangle) and DSC midpoint temperatures of *Katsuobushi* as a function of moisture content. DSC data were obtained from three different *Katsuobushi* manufactured by company A (\bullet), company B (\blacksquare) and company C (\blacklozenge). The dotted line was drawn using the Gordon-Taylor equation, as described in the text. The Gordon-Taylor parameter k obtained experimentally was 5.05. Furthermore, the data that were reported in the previous report (\square) were also plotted. The values of moisture content reported in the previous study were wet basis values, which were converted into dry basis values in the present figure.

Fig.2-9には、既往の研究²⁾におけるカツオ節のガラス転移温度も同時にプロットしてある。この図からも、超低水分領域においてはある程度一致するものの、それ以外の領域では本研究結果とは全く異なる挙動を示している事が明らかである。これほどの大きな差が試料の個体差に起因するとは考えにくく、既往の研究結果と本研究結果の示している現象は同じカツオ節のガラス転移現象であるとは判断できない。いくつかのタンパク質のエクストルージョン加工に関する研究によれば、100~130°C程度の温度域でタンパク質間に新たな共有結合が生じる事が報告されている¹⁵⁾。よって、水分15%程度の市販カツオ節において検出された130°C付近に見られた熱容量変化は、ガラス転移によるものではなく、高温域でのタンパク質間結合形成に伴う高次構造変化に起因する可能性が考えられる。

2-2-4 結論

DSCおよびDMA測定の結果から、市販カツオ節が内部にガラス構造を有する物質である事が明らかとなった。更に、カツオ節のガラス転移温度は水分が増加するに従って低下する傾向を示し、その依存性はGordon-Taylor式によって良好に記述可能であった。よって、カツオ節のガラス転移挙動は、一般的なガラス状物質と良く一致している事が明らかとなった。本実験では、DSCとDMAなどの食品の T_g 検出に良く用いられる2つの手法を併用した。しかしながら、得られた情報を比較すると、DSC単独で実験を行った場合でも十分に信用できる有用な情報が得られる事が示された。本実験結果により、カツオ節の持つ様々な性質、すなわちガラスのような外観や、温度・水分変化に伴う物性変化、そして高い保存性などが、いずれもそのガラス転移現象と相関している可能性が示された。

2-3 DSCによる様々な加工魚肉のガラス転移測定

2-3-1 はじめに

カツオ節がガラス状食品である事が明らかとなった事から、同様に加熱乾燥処理を加えられたその他の様々な低水分魚肉加工食品も、カツオ節と同じくガラス状態を取り得る可能性が示唆された。そこで本章では、カツオだけでなく、日本人の食卓にしばしば登場するマグロやサバなどの赤身魚、そしてタラ、タイなどの白身魚について、ガラス転移現象の有無を実証し、各々の魚肉におけるガラス転移温度の水分含量依存性挙動を比較検討することを目的とした。魚肉を原料とした水産加工品の性質は、原料魚そのものが持つ性質の違いによって左右される。従って、各々の魚肉におけるガラス状態もまた、魚種による依存性を示す事が推測される。

マグロ、サバなどの赤身魚は、カツオ節と同様に「節」に加工され、だしの原料として一般に用いられている。また、マダラやマダイなどの白身魚は、燻煙加工を施され、燻製品として食される場合もある。前章における実験により、DSCのみで十分有用な情報が得られる事が明らかとなったため、本章ではDMAなどの別の手法を併用せず、DSCのみを用いて実験を行った。

2-3-2 実験方法

ガラス転移温度の測定には、5種類の魚の筋肉を用いた。まず、赤身魚として、カツオ (Bonito: *Katsuwonus pelamis*)、メバチマグロ (Bigeye Tuna: *Thunnus obesus*)、マサバ (Mackerel: *Scomber japonicus*)、そして白身魚として、マダイ (Sea Bream: *Pagrus major*) とマダラ (Cod: *Gadus macrocephalus*) を用いた。いずれの魚も、新鮮なもの (漁獲後に凍結) を小売店で購入した。全ての魚の皮や骨、頭などの不可食部分を除去した後、背肉部分をナイフで1.5cm四方のブロック状に切り分けた。それらを沸騰水中で15分間加熱し、冷却した後、凍結乾燥した。凍結乾燥処理は、まず試料を-40°Cまで冷却して予備凍結させた後、5°C/10hours という昇温プログラムに従って徐々に温度を上げ、棚温度と試料温度に全く変化がなくなるまで乾燥させた。凍結乾燥後の試料は乳鉢中で粉末状になるまで磨り潰し、更なる乾燥のために、五酸化二リンを入れたデシケータ内で真空乾燥を行った。測定に用いるまで、いずれの試料も-30°Cの冷凍庫内で保存した。

Table 2-2 に、本実験で使用した魚肉の成分組成を示した。試料の水分調整および水分測定、更に DSC 測定は、第 1 章で述べた方法に基づいて行った。

Table 2-2 The proximate composition of several fishes¹⁶⁾

Fish	Water (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Carbohydrate (%)	Ash (%)
Bonito	70.4	25.8	2.0	0.4	1.4
Tuna	68.7	28.3	1.4	0.1	1.5
Mackerel	62.5	19.8	16.5	0.1	1.1
Cod	82.7	15.7	0.4	0	1.2
Sea Bream	78.4	19.5	0.7	0	1.4

2-3-3 結果と考察

2-3-3-1 様々な加工魚肉の DSC 測定結果

Fig.2-10 に、水分 1.5% の加熱乾燥マグロ肉における典型的な DSC 曲線を示す。初回昇温は試料の熱履歴を消去するために行ったが、カツオ節と同様に、エンタルピー緩和に起因すると見られる吸熱ピークが 130°C 付近の温度帯に現われた。2nd run の曲線には、140°C 付近に明確なガラスーラバー転移を示すステップ状の熱容量変化が検出された。この熱容量変化は 3rd run の曲線にも同温度帯で検出されており、ガラス転移現象にとって重要な特性の一つである可逆性も確認された。他の魚肉についてはデータを省略したが、いずれもマグロ肉における DSC 挙動と全く同様の傾向を示した。

次に、様々な魚肉における T_g の水分含量依存性挙動について比較した。Fig.2-11 に水分含量の異なる赤身魚（カツオ、メバチマグロ、マサバ）の DSC 測定結果を、そして Fig.2-12 に白身魚（マダラ、マダイ）の DSC 測定結果を示す。ここに示した DSC 曲線は、いずれも 2nd run の曲線である。Fig.2-11 に示したマグロ魚肉の場合と同様に、初回昇温時にはエンタルピー緩和に起因する吸熱ピークによって正確な T_g の決定が困難であったため、 T_g の決定には 2nd run の DSC 曲線を用いた。いずれの曲線にも、比較的是っきりとしたガラス転移を示す熱容量のステップ状変化が現われた。いずれの加工魚

肉においても、ガラス転移温度が水分の増加に伴って急激に低温側へシフトする傾向が見られた。これは水の可塑効果によるものであり、カツオ節を始めとするその他の様々なガラス状物質と同様のものではなかった。これらの結果から、カツオ節と同様に、様々な加工魚肉が一定の水分含量以下では室温でもガラス状態を取り得ることが明らかとなった。

以上の結果から、これら魚肉を原料とした数多くの低水分魚肉加工食品にとっても、ガラス転移概念の有用性が利用可能であることが示された。

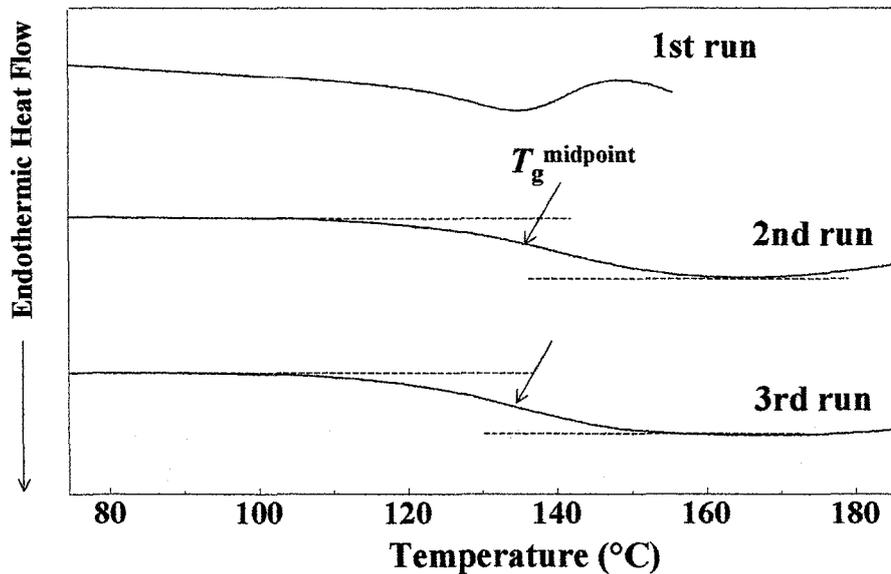


Fig.2-10 Typical DSC thermograms of boiled and freeze-dried tuna muscle with 1.5% moisture content. The 1st scanning was carried out to eliminate sample history.

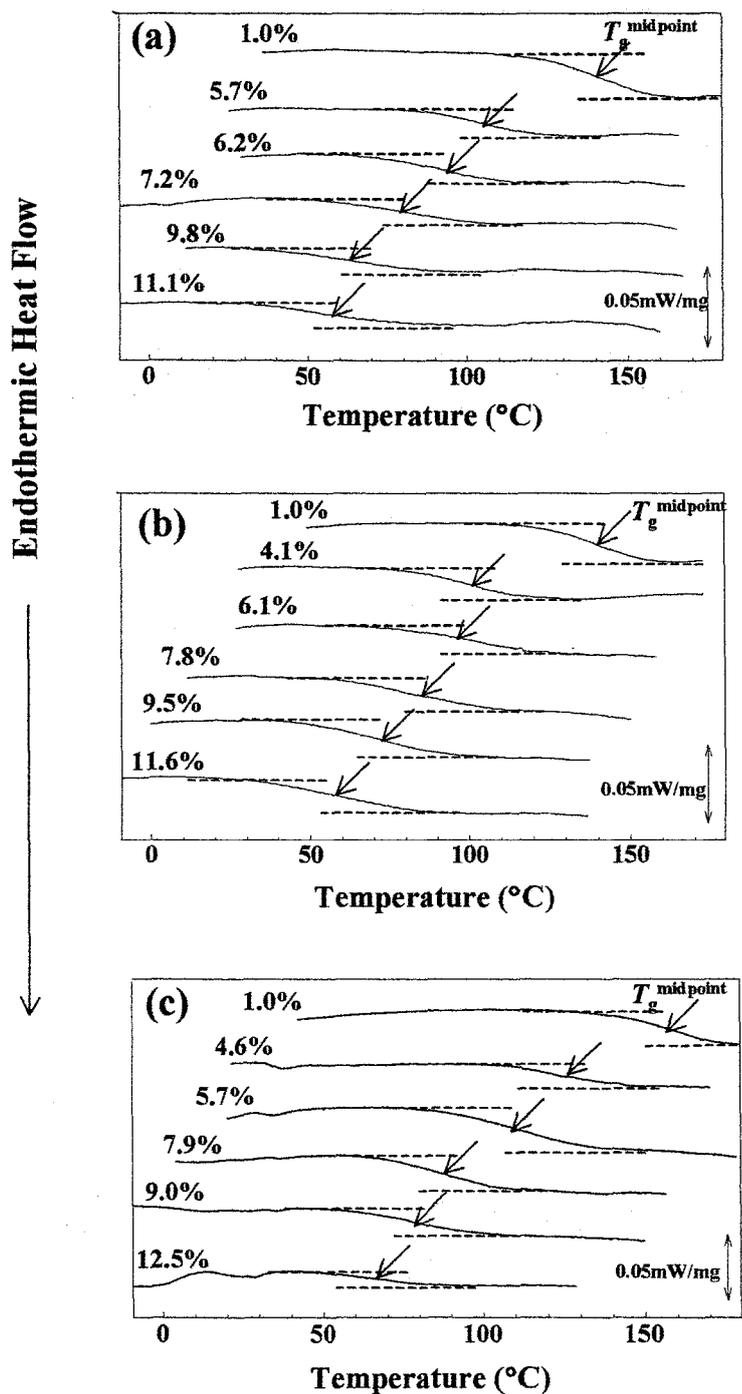


Fig.2-11 The DSC thermograms of several processed red meat fish muscles at different moisture content: (a) bonito; (b) tuna; and (c) mackerel. These are second scanning curves to eliminate relaxation hysteresis effects at first scanning.

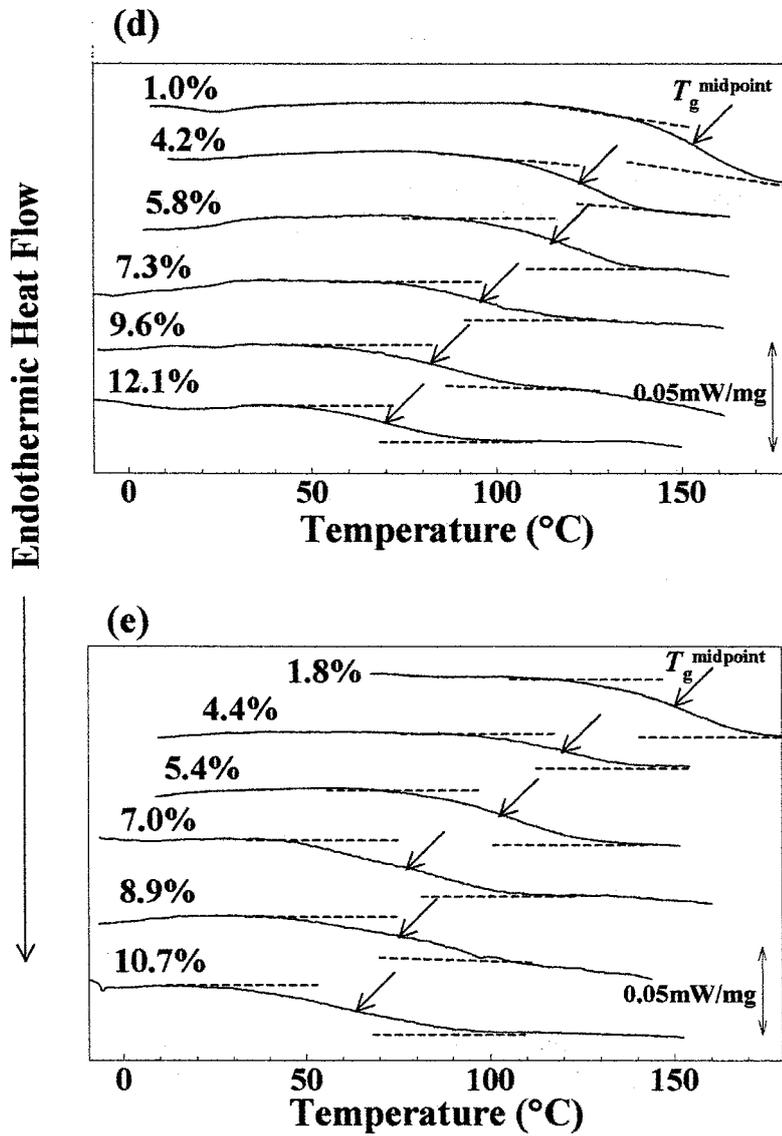


Fig.2-12 The DSC thermograms of processed white meat fish muscles at different moisture contents: (d) sea bream; and (e) cod. These curves are second scanning curves to eliminate the relaxation hysteresis effects at the first scanning.

Fig.2-13 に、各加工魚肉におけるガラス転移温度と水分含量の関係を示す。水分 0%の時の T_g は実験的に求める事が困難であったため、水分 5%以下の試料の T_g を水分に対してプロットし、得られた直線を外挿する事によって求めた。カツオ、マグロ、サバ、タラ、タイの無水状態での T_g は、それぞれ 157 ± 1.5 、 160 ± 1.7 、 165 ± 3.3 、 184 ± 1.5 、 $170 \pm 2.2^\circ\text{C}$ であった。いずれの試料の T_g も、明らかな水分含量依存性を示した。図中の点線は、Gordon-Taylor 式へのフィッティング曲線である。フィッティングの相関係数が、いずれの試料においても 0.99 以上であった事から、これら魚肉におけるガラス転移温度の水分含量依存性は、Gordon-Taylor 式により記述可能であるとみなせた。実験値の Gordon-Taylor 式へのフィッティングにより求められた、フィッティングパラメータ k の値は、カツオが 4.26、マグロが 4.10、マサバが 4.99、マダラが 4.22、マダイが 3.82 であり、魚種の違いによる顕著な影響は見られなかった。更に、得られた k の値を用いて、Eq.2-3 からガラス転移時の熱容量変化 ΔC_p の算出を行った。その結果、カツオ、マグロ、マサバ、マダラ、マダイの ΔC_p 値はそれぞれ 0.31、0.32、0.29、0.31、0.33 J/g となった。以上の結果を、Table2-3 にまとめる。いずれのガラス転移パラメータも、魚の種類によらず比較的近い値を示しており、特に顕著な魚種依存性は見られなかった。その一方で、Fig.2-13 を見ると、本実験で用いた水分含量範囲において、マダラやマダイなどの白身魚の T_g が、カツオ・マグロ・マサバなどの赤身魚の T_g よりも高い温度帯にある事が分かる。魚種の違いによって、このように T_g 値に差が見られるという事は、非常に興味深い。水分含量が 10%の時、赤身魚のガラス転移温度は大体 45 から 50 $^\circ\text{C}$ の範囲にあった。一方、同水分含量の時、白身魚のガラス転移温度は、60 から 65 $^\circ\text{C}$ の範囲にあった。試料の個体差などに起因するデータのばらつきを考慮しても、その差は有意な差であるとみなせる。

魚種の違いに起因するこのようなガラス転移挙動の違いに関して、2つの可能性が考えられる。すなわち、1) 魚肉中の脂質による可塑効果、2) 魚種間のタンパク質成分組成の差による影響である。

Table2-2 から明らかなように、本実験で用いた赤身魚は、白身魚に比べると脂質含量が高い。よって、このような脂質含量の差が試料の T_g に影響を及ぼしているのではないかと考えられた。しかしながら、タンパク質の T_g に対する脂質添加の影響についての研究例を見ると、タンパク質の T_g に対する脂質の影響は、水分や糖などと比べると

非常に小さいと報告されている。Kalichevsky らは、グルテンに数種類の脂質を添加して、その添加量および脂質の分子量が T_g にどのような効果を及ぼすかについて検討している¹⁷⁾。その結果、脂質の添加はグルテンの T_g に対して、ほとんど影響を及ぼさない事が明らかとなっている。更に、添加した脂質の種類によっては可塑効果が見られたが、その効果はわずかであったと述べている。その一方で、Shaw らは小麦タンパクから調製した可食性フィルムのガラス転移に及ぼす大豆油添加の影響についての研究を行っており、その結果、大豆油の添加は小麦タンパク質フィルムの T_g を上昇させる効果、すなわち反可塑効果が見られたが、その影響はわずか数℃程度であったと報告している¹⁸⁾。このように、食品成分のガラス転移現象に及ぼす脂質添加の影響に関する報告は一致していない。おそらくその影響は、添加する脂質の種類や、添加を受けるタンパク質の種類にも依存するのだろう。しかしながら、 T_g に及ぼす効果は、可塑効果であれ、反可塑効果であれ、どちらにせよ非常に小さいと言える。従って、本実験で見られたような魚種による違いが、脂質の含有量の影響によるかどうかは疑わしい。実際、用いた魚種の中で、一般的に最も脂質含量が高いと思われるマサバにおいて、特に目立って T_g が低いという傾向は見られなかった。むしろ同じ赤身魚であるカツオやマグロなどに比べると、わずかながら T_g が高い傾向を示した。従って、脂質含有量の差による影響は、自身と赤身の T_g 差の主原因ではないと判断した。

そこで次の可能性として考えられるのが魚種によるタンパク質成分組成比の違いによる影響である。魚肉を構成するタンパク質は、その溶解性の違いから、水溶性タンパク質、塩溶性タンパク質、不溶性タンパク質という主に3つの成分に大別される¹⁹⁾。水溶性タンパク質、塩溶性タンパク質、不溶性タンパク質は、それぞれ筋形質タンパク質 (sarcoplasmic proteins)、筋原繊維タンパク質 (myofibrillar proteins)、筋基質タンパク質 (stromal proteins) とも呼ばれる。赤身の魚は、自身の魚に比べて筋原繊維タンパク質と筋基質タンパク質成分の含有量が少なく、筋形質タンパク質を多く含むのが特徴である。筋肉の構成タンパク質の加熱特性は種類によって大きく異なり、それぞれの特性が筋肉全体の特性に反映される事は良く知られている²⁰⁾。よって、魚種によるガラス転移挙動の違いは、筋肉タンパク質成分の構成比、およびその性質の違いに起因している可能性が高いと考えた。この点については、次章で詳細に検討する。

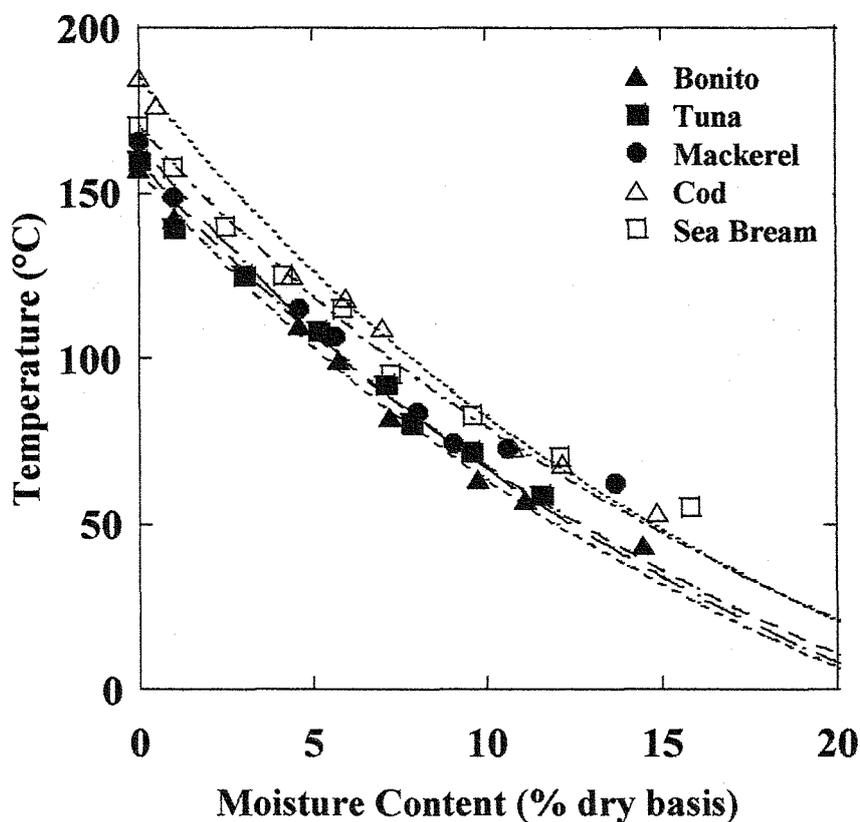


Fig.2-13 The effect of moisture content on the glass transition temperature of several processed fishes (bonito, tuna, mackerel, cod and sea bream). Dotted lines are fitting line to the Gordon-Taylor equation.

Table2-3 The glass transition parameters, T_g and ΔC_p and Gordon-Taylor parameter k of several processed fish meats.

Sample	T_g (°C)	^a k	^b ΔC_p (J/g solid)
Bonito	157.0±1.5	4.26	0.31
Tuna	159.2±1.7	4.10	0.32
Mackerel	165.3±3.3	4.40	0.29
Cod	184.6±1.5	4.22	0.31
Sea Bream	170.1±2.2	3.82	0.33

^a k values were obtained by fitting the experimental data to Eq.1-1.

^b ΔC_p values were calculated using Eq.1-2.

2-3-3 結論

メバチマグロ、カツオ、サバ、マダラ、マダイなどの数種類の加熱乾燥魚肉が、いずれも明確なガラス転移現象を示した事から、これらを原料とした低水分魚肉加工食品が、一定の水分含量以下では室温（25℃）でもガラス状態を取り得ることが示された。この結果から、ガラス転移概念が広い種類に渡る低水分魚肉加工品に適用可能である事が明らかとなった。各魚肉の T_g における水分含量依存性挙動は比較的類似していたが、白身魚の方が、赤身魚よりも T_g が高い傾向が見られた。これは魚種による脂質含量の違いによるものではなく、おそらくは筋肉タンパク質の構成比、および魚種によるタンパク質成分の性質の違いに起因する可能性が示唆された。

2-4 2章まとめ

本章の目的は、実際に低水分魚肉加工食品がガラス状態を取り得るのかどうかを明らかにする事であったが、熱分析の結果より、典型的な低水分魚肉加工食品であるカツオ節が、室温でガラス状態を取る「ガラス状食品」である事が明らかとなった。低水分の魚肉加工品が、「ガラス」という一つの非平衡状態を取り得るという事は、その状態を理解するためには、非平衡論的解釈が必要である事を示している。更に、マグロ、マサバ、マダイ、マダラなどの種々の低水分加工魚肉においても、同様に明確なガラス転移現象が確認された。

カツオ節のような低水分魚肉加工食品の示す様々な物理化学的特性、すなわち色やテクスチャー、保存安定性などを系統的に説明し得る概念はこれまで存在しなかったが、ここにガラス転移という概念を利用する事により、それを可能とする道が開けたと言える。また、カツオ節の保存安定性を制御するための情報と言え、これまでは主に経験的に求められたものであった。しかしながら、今回このようなガラス転移に関する情報が得られた事で、今後は科学的にカツオ節の最適保存条件を検討していく事が出来るようになるであろう。

第2章 参考文献

1. 小野規子、「水産食品のガラス転移に関する研究」、平成7年度卒業論文、1995
2. 鈴木徹・小野規子・高井陸雄：DSCによるかつお節のガラス転移の検出。日水誌, 1995; **61**: 389-390.
3. Gallagher PK. Thermoanalytical instrumentation, techniques, and methodology. In: Turi EA (ed). *Thermal Characterization of Polymeric Materials*, 2nd edn. San Diego: Academic Press. 1997.
4. Zhang J, Mungara P, Jane J. Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer*. 2001; **42**: 2569-2578.
5. Noel TR, Ring SG, Whittam MA. Relaxations in super-cooled carbohydrate liquids. In: Blanshard JMV, Lillford PJ (eds). *The Glassy State in Foods*. Nottingham: University Press. 1993; 303-316.
6. Aguilera JM, Levi G, Karel M. Effect of moisture content on the glass transition and caking fish protein hydrolyzates. *Biotechnol. Prog.* 1994; **9**: 651-654.
7. Kalichevsky MT, Jaroszkiewicz EM, Blanshard JMV. The glass transition of gluten. 1: gluten and gluten-sugar mixtures. *Int. J. Biol. Macromol.* 1992; **14**: 257-266.
8. Micard V, Guilbert S. Thermal behavior of native and hydrophobized wheat gluten, gliadin and glutenin-rich fractions by modulated DSC. *Int. J. Biol. Macromol.* 2000; **27**: 229-236.
9. Rouilly A, Orliac O, Silvestre F, Rigal L. DSC study on the thermal properties of sunflower proteins according to their moisture content. *Polymer*. 2001; **42**: 10111-10117.
10. Richardson MJ. "Calorimetry and thermal analysis of polymers", V. B. F. Mathot ed., Hanser/Gardner Publications, Inc., 1994, p.171.
11. Morales A, Kokini JL. The glass transition of soy globulins using differential scanning calorimetry and mechanical spectrometry. *Biotechnol. Prog.* 1997; **13**: 624-629.
12. Roos Y. *Phase Transition in Foods*, San diego: Academic Press Inc. 1995

13. Kalichevsky MT, Blanshard JMV, Marsh RDL. Applications of mechanical spectroscopy to the study of glassy biopolymers and related systems. In: Blanshard JMV, Lillford PJ (eds). *The Glassy State in Foods*. Nottingham: University Press. 1993; 303-316.
14. Rieger J. The glass transition temperature T_g of polymers – comparison of the values from differential thermal analysis (DTA, DSC) and dynamic mechanical measurements (torsion pendulum). *Polymer Test*. 2002; **20**: 199-204.
15. Arêas JAG. Extrusion of food proteins. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 1992; **32**: 365-392.
16. 岡田稔、衣巻豊輔、横関源延／編、「魚肉ねり製品」、恒星社厚生閣、1981
17. Kalichevsky MT, Jaroszkiewicz EM, Blamshard JMV. Glass transition of gluten. 2: The effect of lipids and emulsifiers. *Int. J. Biol. Macromol.* 1992; **14**: 267.
18. Shaw NB, Monahan FJ, O' Riordan ED, O' Sullivan M. Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. *J. Food Eng.* 2002; **51**: 299-304.
19. Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D.／著、北島典子／訳、「食品タンパク質ハンドブック」、食品シリーズ1、(株) エヌ・ティー・エス、1988
20. Lan YH, Novakofski J, Mccusker RH, Brewer MS, Carr TR, Mackeith FK. Thermal gelation of pork, beef, fish, chicken and turkey. *J. Food Sci.* 1995; **60**: 941-945.

第3章 魚肉から抽出した筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質のガラス転移測定

3-1 はじめに

前章における研究により、カツオ節をはじめ、様々な加工魚肉がガラス状態を取り得ることが明らかとなった。多成分混合系である食品の示すガラス転移現象は、タンパク質、糖、炭水化物といった構成成分それぞれの持つ性質の違いによって影響を受ける¹⁾。特にカツオ節のような低水分魚肉加工品の場合は、全体の約80%をタンパク質が占めていることから、タンパク質の持つ性質が、その加工品のガラス転移挙動を決定づけていると考えられる。更に、様々な魚種から調製した加熱乾燥魚肉のDSC測定結果により、赤身魚と白身魚が若干異なるガラス転移挙動を示す事が明らかとなったが、魚種の違いによるこのようなガラス転移挙動の差も、魚肉中の構成タンパク質における違いに起因すると推察した。そこで本章では、低水分魚肉加工品のガラス転移現象に対して、筋肉タンパク質成分の果たす役割を明確にすることを目的とした。

魚の筋肉を構成するタンパク質は、筋肉中の所在位置によって、それぞれ筋形質タンパク質 (sarcoplasmic protein)、筋原繊維タンパク質 (myofibrillar protein)、筋基質タンパク質 (stromal protein) という3種類に大別される事は前章でも触れた。筋形質タンパク質は、比較的分子量の小さい球状タンパク質からなり、筋形質の中に溶けて存在し、筋肉の活動に必要ないろいろな代謝に関係する酵素群である。筋原繊維タンパク質と筋基質タンパク質はいずれも繊維状のタンパク質からなっているが、前者は筋肉の収縮機構である筋原繊維を構成し、その運動力の原動力になっているのに対して、後者は肉基質を構成し、筋肉の構造維持の役割を果たしている。

Table3-1に様々な魚肉のタンパク質組成を示す。魚肉タンパク質の場合、タンパク質全体の95%以上を占めるのが筋形質タンパク質と筋原繊維タンパク質の2つであり、筋基質タンパク質の占める割合は非常に少ない。このことから、魚種による加工特性の違いを左右するのは、主に筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質であると考えられる。実際、加熱凝固、あるいはゲル化といった加工時に生じる様々な現象は魚種によって異なっているが、これは主に筋形質タンパク質、あるいは筋原繊維タンパク質に起因する事がすでに明らかにされている²⁻⁵⁾。そこで本研究では、筋形質タンパク質と筋原

Table3-1 The composition of muscle protein fractions of several fishes and animals.

Species	Myofibrillar proteins (%)	Sarcoplasmic proteins (%)	Stromal proteins (%)	Researchers
Bonito	-	34	-	Uchiyama et al. ⁶⁾
Tuna	-	36	-	Takahashi et al. ⁷⁾
Mackerel	60	38	1	Yanauchi et al. ⁸⁾
Carp	70-72	23-25	3	Suzuki et al. ⁹⁾
Yellowtail	60	32	3	Shimidzu et al. ¹⁰⁾
Cod	76	21	3	Dyer et al. ¹¹⁾
Flatfish	73-79	18-24	3	Suzuki et al. ¹⁰⁾
Pork	54	42	4	
Beef	56	40	4	
Chicken (breast)	56	41	2	Lan et al. ¹²⁾
Chicken (thigh)	55	40	5	

繊維タンパク質に対する検討のみを行い、筋基質タンパク質に関する議論は行わなかった。本章では、魚筋肉のガラス転移挙動と、両タンパク質成分のガラス転移挙動を比較して、タンパク質成分が筋肉のガラス転移現象にどのように関わっているのかについて検討した。更に、赤身魚としてカツオ、白身魚としてマダラを選び、魚種によって異なるタンパク質成分の性質の違いが、魚肉のガラス転移現象にどのような影響を及ぼすのかについても検討を加えた。

未変性魚肉タンパク質成分のガラス転移現象については、メバチマグロから抽出した水溶性タンパク質に関してすでに報告例がある¹³⁾。しかしながら、この研究では、魚肉全体の挙動との比較が行われておらず、筋形質タンパク質成分が筋肉のガラス転移現象に対してどのように寄与しているのかは明らかにされていない。また、マサバから抽出した筋形質タンパク質および筋原繊維タンパク質のガラス転移温度を研究した研究例も存在する¹⁴⁾。しかしながら、これらの報告はいずれも高水分・未変性状態の魚を対象としたものであって、本研究で議論するような低水分状態での研究例は報告されていない。

3-2 実験方法

3-2-1 試料準備

新鮮なカツオ (Bonito: *Katsuwonus pelamis*) およびマダラ (Cod: *Gadus macrocephalus*) を試料として用いた。両魚肉は凍結状態のものを市販小売店で購入した。筋形質タンパク質および筋原繊維タンパク質成分の抽出は、既報の Lan らの方法¹²⁾に基づいて行った (Fig.3-1)。筋形質タンパク質成分は抽出後、塩などの低分子量物質を取り除くために、脱イオン水中で48時間透析した後、凍結乾燥を行った。筋原繊維タンパク質成分においても、塩などを除去するため、脱イオン水で6回洗浄した後、凍結乾燥した。同時に、魚肉をナイフで1.5センチメートル四方に切り分け、何の処理も施さないまま、同時に凍結乾燥した。すべての試料は凍結乾燥後、乳鉢を用いて細かい粉末状に加工した。更に、五酸化ニリンを入れたデシケータ内で真空乾燥した。

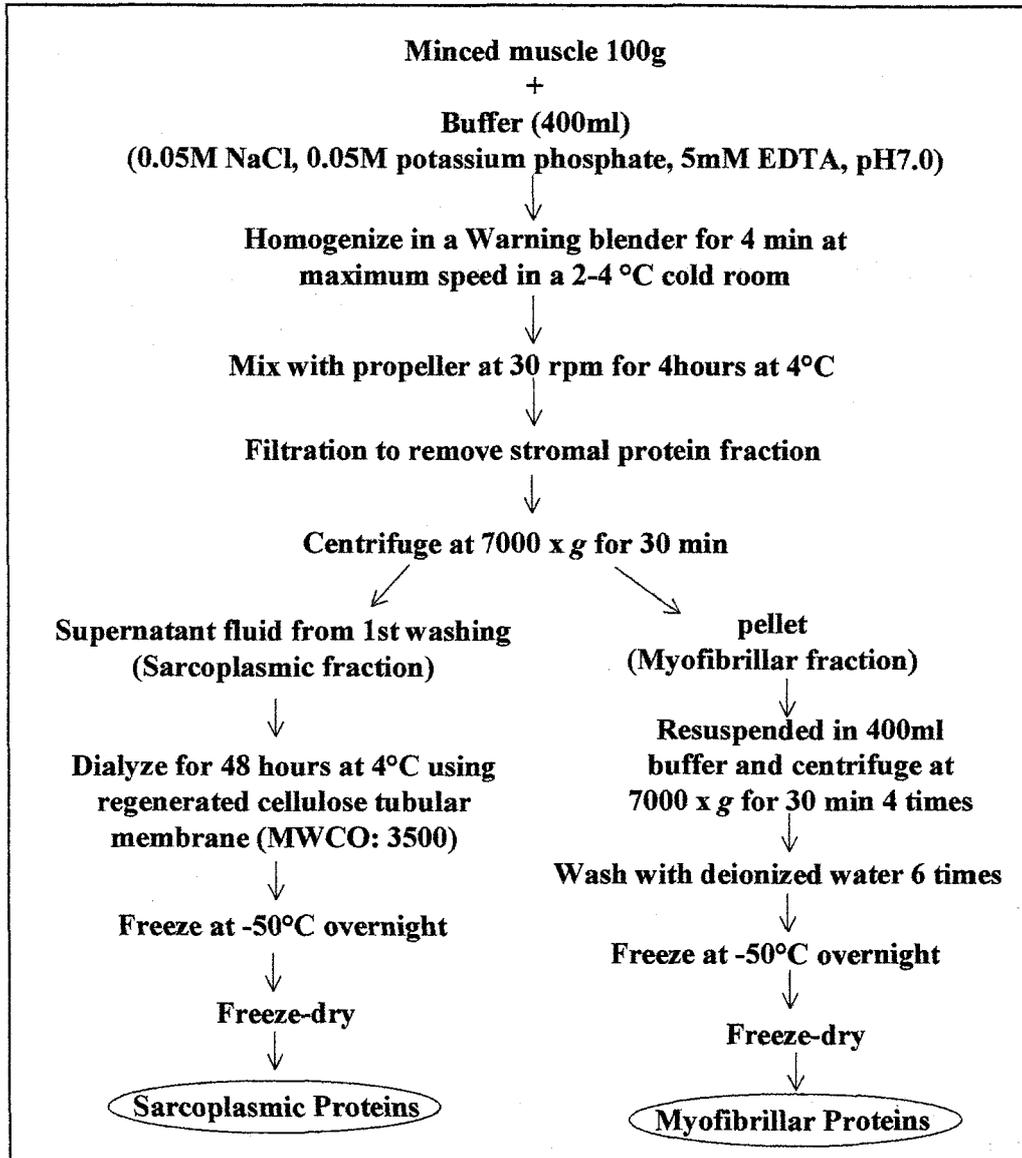


Fig.3-1 Procedures for separating sarcoplasmic and myofibrillar proteins from bonito and cod muscle. Adaptations involve the procedures for dialysis, freeze and freeze-drying.

3-2-2 SDS-PAGE によるタンパク質成分の抽出精度の確認

抽出した筋形質タンパク質と筋原繊維タンパク質の抽出精度を確認するために、両成分を Leammli の方法¹⁵⁾に基づき SDS-PAGE に供した。魚肉タンパク質成分の電気泳動用試料の調製に際しては、Craeys らの方法¹⁶⁾を参考とした。調製したタンパク質溶液は、電気泳動にかけるまで-50℃の冷凍庫内で保存した。泳動用緩衝液および分子量マーカーには、それぞれ Running Buffer Soln. (和光純薬工業 (株) Lot No.HPG9806)、Protein molecular weight standards broad range (Molecular Probes, Inc. Catalog No. P-6649)を用いた。電気泳動用ゲルには、ATTO SPG-520L 型パジェル (5-20%濃度勾配ゲル) (アトー (株)) を、そして電気泳動装置は ATTO ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (AE-6400 型) (アトー (株)) を用いた。泳動に際しては、付属の使用マニュアルに基づき、ゲル1枚につき 15~20mA の通電を約 90 分行った。泳動終了後、ゲルの CBB 染色を行った。十分に染色させるため、ゲルは染色液に一晩漬けた。脱色液には、蒸留水：酢酸：メタノールを 15：2：3 の割合で調合したものを用いた。染色、脱色の終了したゲルを、更に蒸留水中で 48 時間脱色させた。その後、ビニール袋にゲルを入れ、ポリシーラー (富士製作所 (有)) を用いて密封し、解析用ソフト Photo shop を用いてスキャナー (EPSON GT-7000) で取り込んだ。

3-2-3 DSC による抽出タンパク質の状態確認

筋肉および抽出タンパク質成分が、抽出工程、もしくは凍結乾燥工程ですでに変性している可能性が考えられたため、凍結乾燥後のタンパク質を再度水に溶解し、DSC を用いて変性ピークの確認を行った。粉末状の魚肉、筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質を入れた DSC セル内に蒸留水を注入し、固体と水の割合がおおよそ 3:7 になるように調整した。DSC の加熱条件はこれまでと同様である。

3-2-4 試料の水分調整および水分測定

試料の水分調整および水分含量の決定は、これまでと同様に行った。

3-2-5 DSC によるガラス転移測定

カツオ節、加工魚肉の場合と同じ測定条件で行った。

3-3 結果と考察

3-3-1 SDS-PAGE

カツオおよびマダラから抽出した筋形質タンパク質、および筋原繊維タンパク質の電気泳動図を Fig.3-2 に示した。一番右端のレーンが分子量マーカを示している。カツオ、マダラ双方の筋原繊維タンパク質において、200kDa 付近にミオシン重鎖、そして45kDa にアクチンに由来する太いバンドが見られた。また、筋形質タンパク質成分のパターンにミオシンとアクチンに基づくバンドが見られなかったことから、両成分の混入はないと判断した。

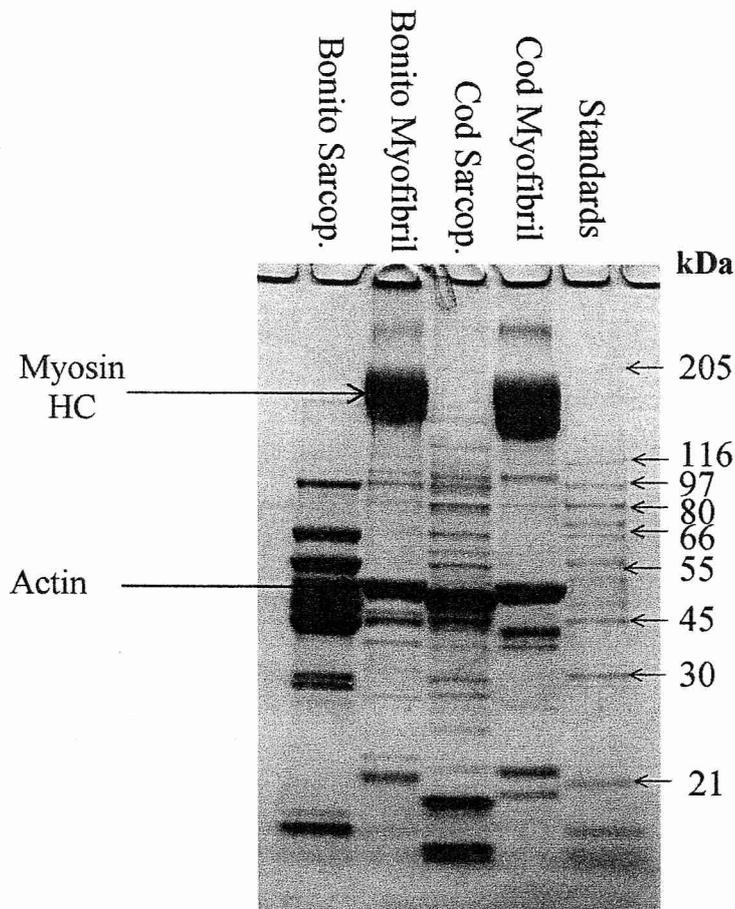


Fig.3-2 The SDS-PAGE patterns of sarcoplasmic and myofibrillar protein fractions extracted from bonito and cod muscles.

3-3-2 吸水試料の DSC 測定結果

Fig.3-3 に、凍結乾燥後、再度水を吸水させたカツオ、およびカツオから抽出した筋形質、筋原繊維タンパク質の DSC 測定結果を示す。いずれの試料においても、大体 40℃ から 80℃ 付近の温度帯にブロードな吸熱ピークが検出された。これはそれぞれの試料における構成成分の熱変性ピークが重なり合って検出されたためであると考えられる。この温度帯は、筋肉タンパク質の熱変性に関する既報のデータとほぼ一致していた¹⁷⁻¹⁹⁾。よって、本実験で用いた試料は、抽出工程、あるいは凍結乾燥工程を経た後でも完全には変性していない事が確認できた。もちろん、凍結乾燥などから受ける何らかのダメージの可能性を排除する事は不可能であるが、本実験においては、抽出した試料は十分に測定対象になると判断した。

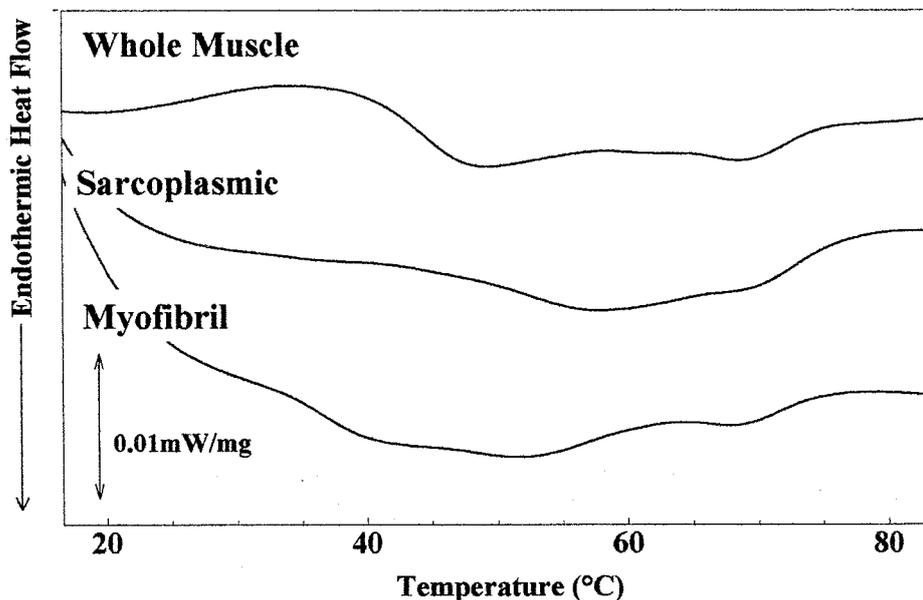


Fig.3-3 Typical DSC thermograms of whole muscle, sarcoplasmic and myofibrillar proteins of bonito with about 70% moisture. To adjust moisture content, distilled water was added to powdered freeze-dried samples in DSC pans.

3-3-3 DSC 測定結果

Fig.3-4、Fig.3-5 に、カツオおよびマダラの筋肉、筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質の DSC 測定結果を示す。これらの試料はいずれも同じ相対湿度 (RH=6.6%) で水分調整したものであり、調整後の水分含量は、カツオの場合がそれぞれ 4.9、5.5、4.9% であり、マダラの場合が 5.2、6.1、5.6% であった。魚種に関わらず、いずれの試料も大体同じような DSC 曲線を示した。まず初回昇温時においては、各試料とも熱変性に起因する吸熱ピークが一つだけ検出された。各試料の熱変性温度は、カツオの場合が筋肉、筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質の順にそれぞれ 127、137、140°C であり、マダラの場合が同様に、126、122、123°C であった。一方、Fig.3-3 に示したように、水分約 70% の試料の場合は DSC 曲線上に複数の熱変性ピークが検出された。水分約 5% の試料と 70% の試料が示した熱変性ピーク数の違いは、両試料の水分含量の違いによって、構成タンパク質の熱変性温度が大きく異なる事に起因すると考えられる。高水分試料の場合は、構成タンパク質の熱変性温度が比較的異なった温度帯にあるために、DSC 曲線上ではそれぞれの熱変性ピークが別個に検出された。しかしながら低水分試料の場合は、熱変性温度の水分含量依存性によって、構成タンパク質の熱変性温度がお互いに近い値を有するようになり、DSC 曲線上では個々の熱変性ピークが分離できず、結果として一つのピークのみが観察された可能性がある。本実験系のように、非常に低水分状態にある筋肉タンパク質の熱変性ピーク温度を測定した研究例が他にないため、現段階では本実験結果と既往のデータとの比較は出来なかった。本実験で見られた一つの吸熱ピークが複数の構成タンパク質の熱変性ピークが重なり合ったものであるかどうかを明らかにするためには、DSC の昇温速度を本実験条件よりも遅くした上での再測定、あるいは、変性温度の水分依存性挙動の検討などを行う必要があるが、本研究では更に詳細な検討は行わなかった。

更に、筋肉、筋形質、筋原繊維、いずれの試料においても、初回昇温時には熱変性による吸熱ピークが観察される一方で、ガラス転移を示す熱容量のステップ状変化を観察することが出来なかった。しかしながら、再昇温測定によって得られた 2nd run の曲線において、非常にはっきりとしたガラス転移を示す熱容量のベースラインシフトが観察された (Fig.3-4)。熱変性前の試料においてはガラス転移を示す熱容量変化が明確ではなく、熱変性後には非常にはっきりとしたガラス転移が検出された事は、タンパク質の

ガラス転移現象にとって、熱変性の及ぼす影響が重要である事を示している。DSC 曲線上に現れるガラス転移現象が熱変性前後で異なるという結果は、いくつかのタンパク質およびタンパク質を主成分とした食品においてすでに報告がなされている。Orlien らは、未加熱の凍結乾燥マグロ筋肉に対する DSC 測定を行い、本実験結果と同様に水分が比較的少ない場合はガラス転移現象が非常に検出しにくい事を報告している¹³⁾。また、Sochava らは大豆タンパク質の DSC 測定を行い、未変性試料はガラス転移時の熱容量変化が非常に小さいためにガラス転移が非常に検出しにくい事を明らかにしている²⁰⁾。また、Green らはチトクロームに対する DSC 測定で、高水分試料のガラス転移は容易に検出できるのに対して、乾燥試料のガラス転移は検出不可能であったと報告している²¹⁾。いずれの試料においても、低水分タンパク質のガラス転移現象は、未変性状態ではガラス転移時の熱容量変化が非常に小さいために DSC では検出しにくいのに対して、加熱変性すると、熱容量変化の度合いが増大し、非常に明確なガラス転移現象が見られるようになる、という点が共通している。本実験結果のみからでははっきりとした結論を得ることが出来なかったが、既往のタンパク質における傾向を考えると、筋肉タンパク質が熱変性前にもガラス転移を示す可能性は十分に考えられる。タンパク質のガラス転移現象に及ぼす熱変性の影響は、食品加工の上でも非常に重要であると考えられるが、それだけに焦点を絞って検討した例はほとんど報告されていない。この点については、第5章で詳細に検討を加える。

筋肉、筋形質、筋原繊維タンパク質の熱変性後のガラス転移温度は、カツオの場合がそれぞれ 74、100、107°C であり、マダラの場合が 84、93、118°C であった。図には示さなかったが、これらのベースラインシフトが再々昇温測定、すなわち 3rd run の DSC 曲線においても現れる事が分かっている。従って、ガラス転移現象にとって重要な特性である可逆性も確認された。カツオとマダラの DSC 曲線で異なっていたのは、タラ筋肉の初回昇温曲線において、50°C 付近に吸熱ピークが見られた点である。水分含量が非常に低い事を考えると、この程度の低温域で熱変性が起こるとは考えにくい事から、このピークは熱変性によるものではないと考えられる。これはおそらく、試料の保存履歴に依存する緩和ピークであろう。

以上の結果から、魚肉の主成分である筋形質タンパク質と筋原繊維タンパク質の両方が、熱変性後に明確なガラス転移現象を示す事が明らかとなった。この結果は、魚肉を

含め、筋肉タンパク質を主成分とする様々な低水分加工食品が、いずれもガラス状態を取り得る事を示している。

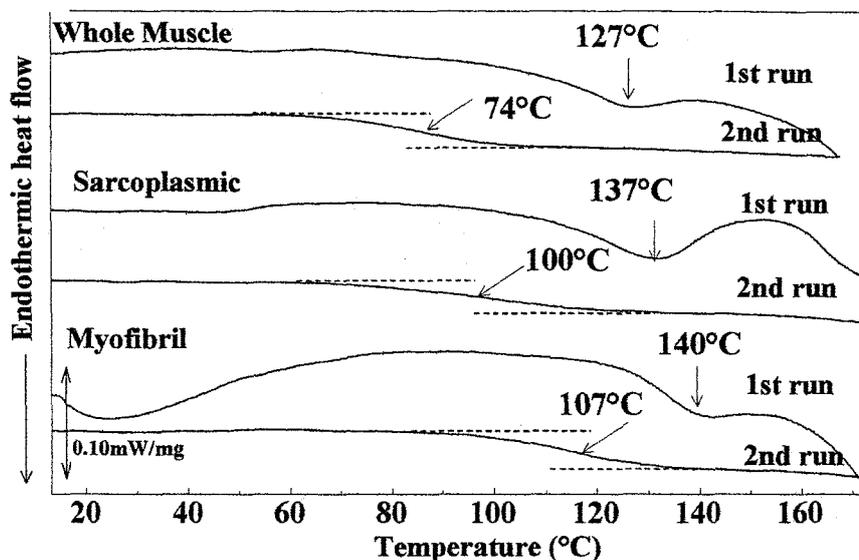


Fig.3-4 Typical DSC thermograms of whole muscle, sarcoplasmic and myofibrillar protein fractions of bonito adjusted at the same relative humidity (RH=6.6%). The moisture contents of whole muscle, sarcoplasmic and myofibrillar proteins were 4.9, 5.5, 4.9%, respectively.

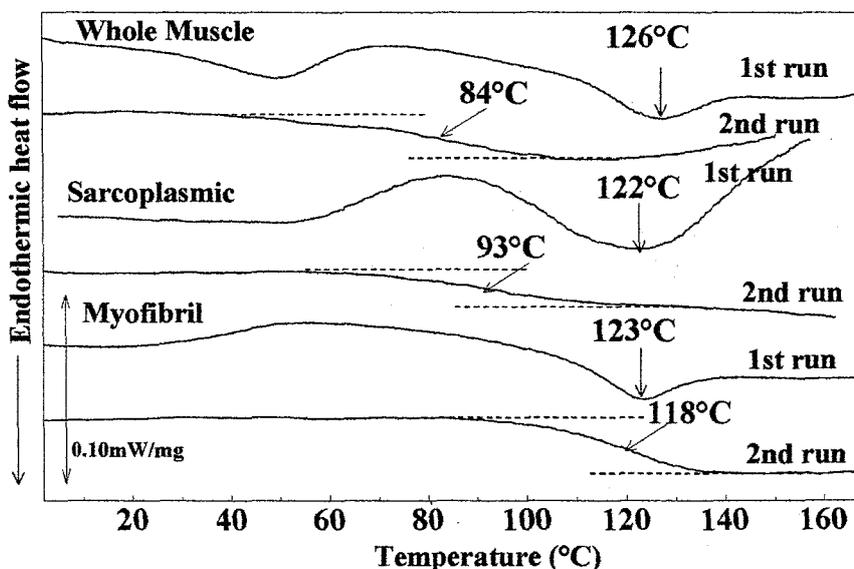


Fig.3-5 Typical DSC thermograms of whole muscle, sarcoplasmic and myofibrillar protein fractions of cod adjusted at the same relative humidity (RH=6.6%). The moisture contents of whole muscle, sarcoplasmic and myofibrillar proteins were 5.2, 6.1, 5.6%, respectively.

3-3-5 筋形質、筋原繊維タンパク質の T_g に及ぼす水分含量の影響について

Fig.3-6、3-7 に水分含量の異なるカツオ、マダラの筋肉およびその構成タンパク質成分の DSC 測定結果を示す。いずれも 2nd run の曲線であり、初回昇温時にすでに熱変性している。熱変性前には明確なガラス転移現象が見られず、 T_g の検出が困難であった事に加え、本研究は加熱処理を加えた食品を対象としているため、今回は熱変性後のガラス転移現象に関してのみ検討した。全ての試料において、明確なガラス転移を示す熱量のベースラインシフトが観察された。更に、水分含量の増加に伴って T_g が低温側へシフトする傾向が見られた事から、両筋肉タンパク質においても水の可塑効果が認められた。得られた各試料の T_g 値を Table3-2 にまとめた。

Fig.3-8 にカツオ・マダラ筋肉およびタンパク質成分における T_g 値の水分含量依存性を示す。図中の点線は、Eq.1-1 へのフィッティングカーブである。試料水分が約 15% 以下の時は、フィッティングの相関係数はいずれも 0.99 以上であり、各試料の T_g 値は Eq.1-1 で良好に記述可能であった。しかしながら、水分が 20% 以上になると、 T_g 値はフィッティングカーブから外れて、高い値を示す傾向が見られた。これは、ある一定の水分含量を超えてタンパク質が十分に水和すると、それ以上の水分はタンパク質と強く相互作用せず、結果として T_g に及ぼす水分増加の影響が小さくなるためではないだろうか。

本実験で用いた水分含量範囲 (0%~25%) において、カツオ・マダラ両魚肉のガラス転移温度が、抽出したタンパク質成分よりもかなり低い値を取る事が示された。この傾向は、魚の筋肉におけるガラス転移現象が、単純な水-筋形質タンパク質-筋原繊維タンパク質混合系としては記述できない事を示している。筋肉中に含まれるタンパク質以外の成分、すなわち糖や塩類、ミネラル分などの低分子量物質の影響も考慮に入れる必要がある。抽出したタンパク質成分に関しては、いずれも抽出工程で、これら低分子量物質を除去するための処理 (透析など) が行われている。それに反して、筋肉は凍結乾燥までに何の処理も施されておらず、これらの低分子量物質がそのまま試料中に混在していると考えられる。一般的に、水や糖などの低分子量物質は、高分子のガラス転移現象に対して可塑剤として作用すると言われている^{1,2)}。タンパク質においても、グルコースやスクロース、フルクトースなどの糖の添加が、グルテンの T_g を著しく低下させる事が報告されている²³⁾。したがって、魚肉においても、筋肉中に残存している糖や塩

などが、筋肉タンパク質の T_g に対して可塑効果を及ぼし、結果として筋肉の T_g をタンパク質成分の T_g よりも低下させたと推察できる。同様の傾向は、サバの凍結魚肉においてすでに観察されている。すなわち、Brakeらは、DSCを用いたサバ、およびその筋肉から抽出した筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質のガラス転移温度を測定した¹⁴⁾。その結果、生鮮サバ魚肉の T_g は約 -13°C であり、筋形質タンパク質および筋原繊維タンパク質の T_g はそれぞれ -8.3°C 、 -7.5°C であったと報告している。複数の実験の結果、いずれも筋肉の T_g の方が、構成タンパク質成分の T_g よりも低い事が示され、その傾向は明らかであった。彼らは、筋肉が示す T_g の低さは、筋肉中に残存している低分子量物質の可塑効果によるものと推察している。サバ筋肉における低分子量物質の可塑効果は、大体 5°C 程度であるが、本実験で得られたカツオ筋肉とタンパク質成分間の T_g 差は、約 30°C であった。この違いはおそらく、両試料中の低分子量物質の濃度に起因するのであろう。Brakeらの実験は、いずれも水分が70%以上含まれる高水分系で行われたのに対し、本実験は水分が0~10%程度の比較的low水分系で行った。魚種にも依存するが、水分が70~80%程度の未処理魚肉中に含まれる低分子量物質の量は、全体の1~2%程度である。一方で、乾燥して水分を10%程度にした魚肉の場合は、低分子量物質の占める割合は5~10%近くまで増加する。つまり低水分魚肉が示した低い T_g 値は、乾燥によって濃縮された低分子量物質が、高水分試料の場合よりもより高い可塑効果を発揮したことに起因するのであろう。ただし本研究では、低分子量物質の中のどの成分が、実際に筋肉タンパク質の T_g 低下に関与しているかについての詳細な検討は行わなかった。

更に、タンパク質成分同士の比較を行った結果、カツオ、マダラの両筋肉において、筋原繊維タンパク質が筋形質タンパク質よりも高い T_g を示す事が明らかとなった。このような2つのタンパク質成分における T_g の差は、おそらく両タンパク質の構造、すなわち球状タンパク質、繊維状タンパク質といった構造の違いに起因するのであろう。しかしながら、それぞれのタンパク質が持つ分子構造が、ガラス転移現象とどのように関わっているのかは現段階では不明である。この点についての解明も、今後の課題となる。

以上の結果から、魚肉のガラス転移現象は、主に主成分である筋形質タンパク質と筋原繊維タンパク質のガラス転移現象によるものであり、更に、ガラス状タンパク質中に閉じ込められた低分子量物質が、系全体の T_g を低下させている可能性がある事が明ら

かとなった。その他にも、筋肉の場合はタンパク質成分間相互作用の影響などを受ける可能性もある。

次に、魚種の違いによる影響を考察するために、Fig.3-9に筋肉、筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質の T_g の水分含量依存性を、それぞれ別個にプロットした。まずは筋肉の比較であるが、白身魚であるマダラの方が、赤身魚であるカツオよりも高い T_g 値を示した。一方、筋形質タンパク質における挙動を比較すると、両魚種ともほとんど差はなく、大体同じような挙動を示した。そして筋原繊維タンパク質には両魚種の違いが明確に現われていた。すなわち、タラの T_g の方が、カツオよりも高い値を示しており、この傾向は筋肉の挙動と類似していた。これらの結果は、筋肉において示された魚種による T_g 差が、筋原繊維における T_g 差に起因する可能性を示している。タンパク質成分各々もつ性質は、実際に筋肉中に存在する時と、抽出された状態で存在する時とは異なっている可能性があるため、筋肉と抽出タンパク質成分のガラス転移挙動を単純に比較する事は難しいが、魚種の違いによる筋肉の T_g 差に、筋原繊維タンパク質の T_g 差が関与している可能性は高い。特に魚の筋肉の場合は、その70%以上を占めるのが筋原繊維タンパク質である事から、筋原繊維タンパク質の特性が、筋肉の挙動に顕著に反映されるのであろう。

赤身魚と白身魚が示す性質の違いは、その筋肉の種類の違いに起因する。赤身魚は赤筋という筋繊維を多く含むのに対して、白身魚は白筋という筋繊維を多く含む。カツオやマグロなどの赤身魚は、遠海を長期間に渡って回遊する必要があるため、より長い持久力を持つ赤筋が発達する。赤筋は収縮速度が遅いので、「遅筋」とも呼ばれる²⁴⁾。また、タラやタイなどの白身魚は近海魚であり、持久力を必要としないため赤筋が発達せず、逆に瞬発力に必要な白筋が発達する。白筋は収縮速度が速いので、「速筋」とも呼ばれる^{25,26)}。赤筋も白筋も類似したアミノ酸組成を有するが、その配列が若干異なっている事が知られている。白身魚およびその筋原繊維タンパク質は、赤身魚およびその筋原繊維タンパク質よりも、明らかに高いゲル形成能力を示す事は一般的に良く知られている³⁻⁵⁾。一方で、赤身魚肉タンパク質の方が、白身よりも熱変性前には熱的に安定である事も報告されている²⁷⁻³⁰⁾。そしてこのような魚種による種々の加熱特性の違いは、いずれも赤筋、白筋という筋肉の種類の違いに起因している。

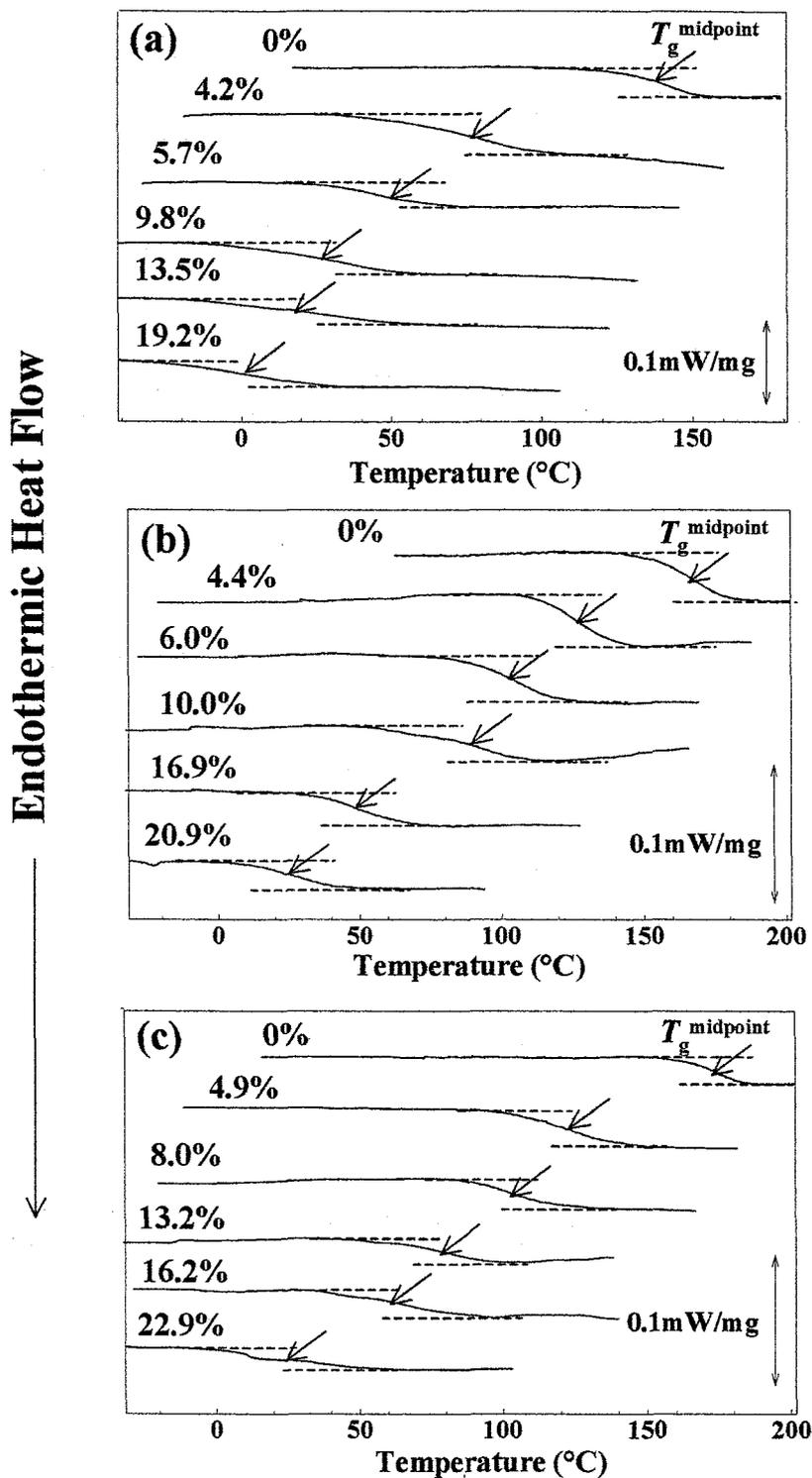


Fig.3-6 DSC thermograms of whole muscle (a), sarcoplasmic protein (b) and myofibrillar protein (c) of bonito at different moisture content. These were second scanning curves after heat denaturation at first scanning.

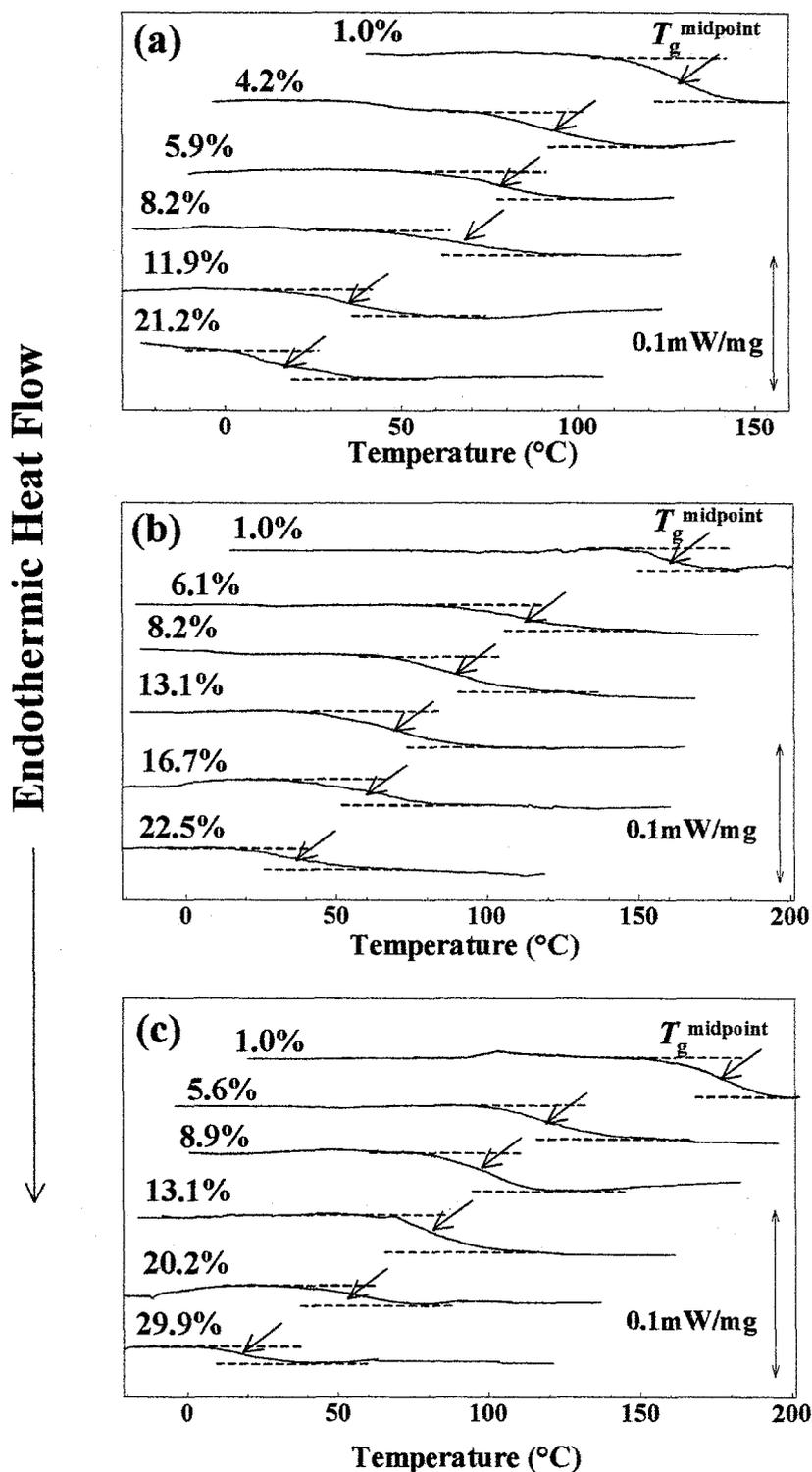


Fig.3-7 DSC thermograms of whole muscle (a), sarcoplasmic protein (b) and myofibrillar protein (c) of cod at different moisture content. These were second scanning curves after heat denaturation at first scanning.

Table 3-2 The glass transition temperatures of whole muscle and protein fractions extracted from bonito and cod muscle.

Bonito						Cod											
Whole Muscle			Sarcop			Myofibril			Whole Muscle			Sarcop			Myofibril		
^a MC (% dry basis)	^b T _g ^{midpoint} (°C)	MC (% dry basis)	T _g ^{midpoint} (°C)														
0	133.1±1.5	0	178.8±1.3	0	187.3±1.3	0	138.1±2.2	0	169.5±3.3	0	185.5±3.1	0	169.5±3.3	0	185.5±3.1		
1.0	120.0±1.8	1.0	166.2±3.2	1.0	173.3±2.7	1.0	126.9±1.0	1.0	160.3±2.3	1.0	168.2±4.3	1.0	160.3±2.3	1.0	168.2±4.3		
2.0	97.1±0.6	5.8	110.1±0.9	6.2	127.0±0.9	5.5	84.1±3.1	7.7	92.5±2.3	7.7	134.5±1.3	5.9	92.5±2.3	5.9	134.5±1.3		
4.9	62.6±1.2	6.3	103.5±1.2	8.3	111.1±1.2	6.2	76.5±1.6	8.9	83.4±0.3	8.9	120.7±1.2	7.6	83.4±0.3	7.6	120.7±1.2		
6.1	52.5±0.9	8.2	100.9±0.5	10.7	100.5±0.8	8.9	55.5±1.3	10.9	78.5±2.0	10.9	107.9±1.5	10.9	78.5±2.0	10.9	107.9±1.5		
7.6	42.3±2.3	11.1	83.6±2.6	12.8	83.9±0.6	10.9	48.1±2.3	12.3	70.6±2.6	12.3	97.4±1.5	12.9	70.6±2.6	12.9	97.4±1.5		
9.2	34.2±1.4	13.2	63.9±1.1	15.3	74.3±1.2	13.5	36.4±1.5	15.1	58.0±1.0	15.1	87.8±1.1	15.1	58.0±1.0	15.1	87.8±1.1		
10.8	28.2±2.1	16.3	52.5±0.7	19.3	56.6±2.6	18.4	24.9±2.5	20.0	44.6±0.7	20.0	71.2±1.7	19.7	44.6±0.7	19.7	71.2±1.7		
15.6	13.6±1.2	20.1	40.8±1.7	24.6	37.3±1.5	21.2	18.9±1.2	23.3	26.8±1.0	23.3	57.3±2.3	25.3	26.8±1.0	25.3	57.3±2.3		

^a MC is moisture content. ^b The T_g^{midpoint} value is an average of three determinations ± standard deviation.

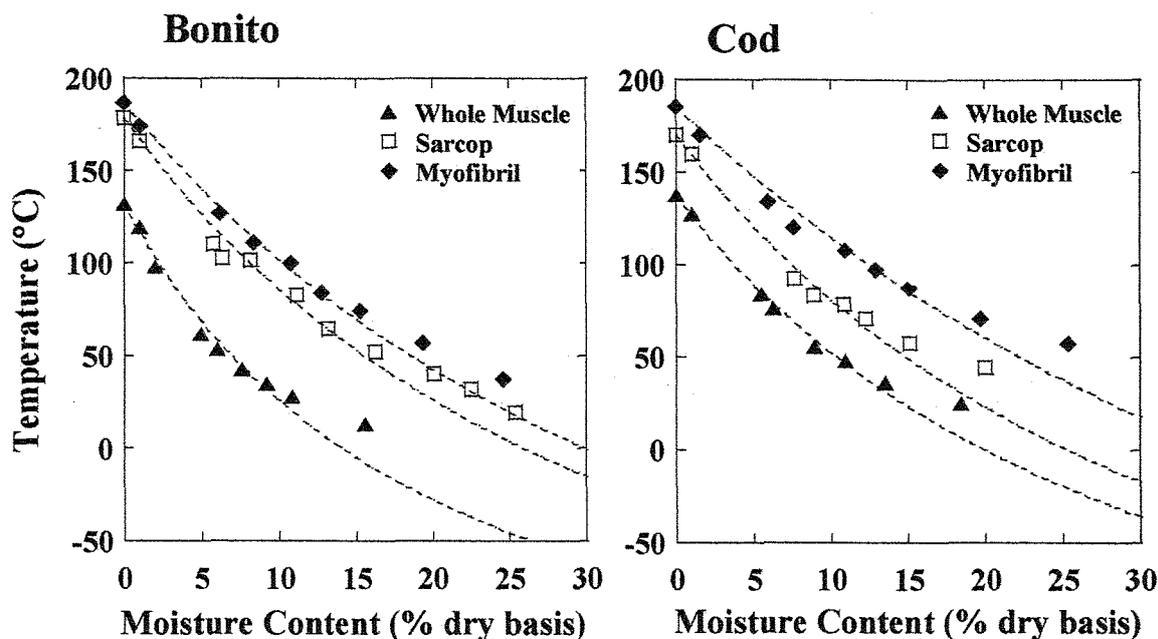


Fig.3-8 The effect of moisture content on T_g of whole muscle and protein fractions extracted from bonito and cod muscle

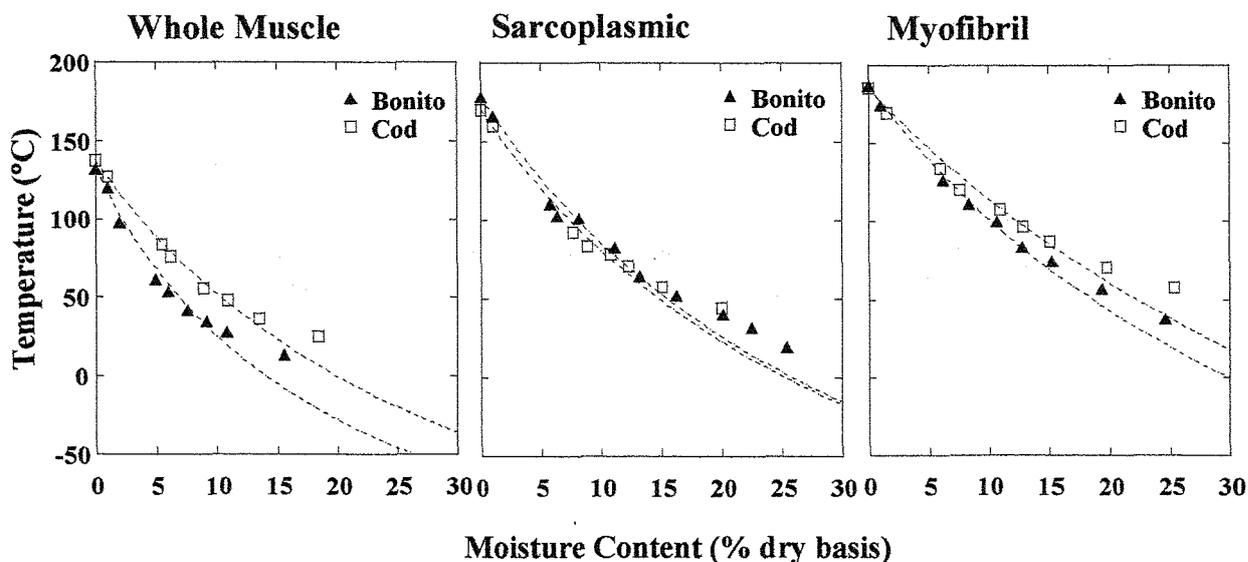


Fig.3-9 The comparison of T_g values of whole muscle, sarcoplasmic protein and myofibrillar protein as a function of moisture content between bonito and cod.

Boyer らは、白身と赤身の示すこのような特性の違いの原因を、「タンパク質の表面疎水性」という概念を用いて以下のような議論を加えている³¹⁾。

赤身から得たミオシンは、白身から得たミオシンよりも、表面に多くの脂肪族および芳香族アミノ残基を有する。従って、熱変性前には赤身魚の方が高い表面疎水性を有する。赤身魚の持つ高い疎水性は、加熱前のタンパク質の溶解性を低下させ、結果としてタンパク質の熱安定性を増加させる。一方、白身魚肉ミオシンの方は、加熱工程中に、赤身魚肉ミオシンよりも、より多くの内部に埋もれていた疎水性残基を露出させるようになる。これらの疎水性残基は、ゲル形成過程中的より強固な3次元高次構造を発達させるのに強く寄与しているため、結果として、白身魚肉ミオシンの方がより多くの疎水結合によって安定化された強いゲルを形成すると考えられる。このような Boyer らの説に従えば、魚種によるガラス転移挙動の違いも、筋肉タンパク質における「表面疎水性の違い」と関連している可能性がある。しかしながら本実験では、いずれの試料も低水分状態、すなわち自由水の不在下で変性させているため、疎水的相互作用のような水の存在状態に左右される結合が形成される可能性は低い。つまり、本実験で白身魚の筋原繊維タンパク質が、赤身魚のものよりも高い T_g を示したのは、結合の増加によるタンパク質構造の安定化のためではないと考えた方が妥当である。むしろ、表面に露出してきた疎水基の影響により、タンパク質の T_g に可塑効果を引き起こす水の影響が抑制されるためではないだろうか。しかしながら、タンパク質の表面疎水性と T_g に及ぼす水の可塑効果との相関性は、現段階では明らかでない。したがって、この点については更に詳細に検討を行っていく必要がある。

本実験では、変性過程が自由水の不在下で進行した事により、疎水的相互作用、あるいは水素結合などの水分子に関わる非共有結合の形成が妨げられたと考えられる。もしも変性過程が自由水存在下で起こった場合、これら非共有結合の影響により、魚のガラス転移挙動はまた異なった傾向を示す可能性もある。第2章で行った種々の低水分加工魚肉の実験では、高水分状態にある魚肉を加熱後、乾燥処理を加えたものを試料としている。一方、本章における実験では、始めに乾燥を行った後、DSC 内で加熱変性させたものを試料としている。両方とも同じ低水分加熱試料であるが、その加工プロセスが異なっている。赤身魚の T_g が白身魚の T_g よりも低い値を示すという傾向は、どちらのプロセスでも同じであったが、このような加工プロセスの違いが、そのガラス状態にど

のように影響するのかわかる事は重要であると考えられる。その点については、第5章で詳細に検討する。

いずれにしても、本研究により魚肉タンパク質のガラス転移現象が魚種によって異なる事が明らかとなった点は興味深い。

3-4 結論

本章の実験結果より、乾燥および加熱という2つの加工処理を加えられた筋形質タンパク質と筋原繊維タンパク質が、DSC曲線上に明らかなガラス転移現象を示す事が明らかとなった。また、熱変性前試料では T_g が検出出来ず、熱変性後には非常に明確なガラス転移が確認された事から、熱変性がタンパク質のガラス状態の形成に重要な役割を果たしている可能性が示された。筋肉、筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質における T_g の水分含量依存性挙動を比較すると、全体的な傾向はほぼ一致していたが、 T_g 自体の値が大きく異なっていた。すなわち、本実験で用いた水分含量域(0%~25%)では、筋肉の T_g がタンパク質成分の T_g よりも30°C以上も低い値を示す事が明らかとなった。この傾向は、筋肉中に含まれる糖や塩などの低分子量物質の可塑作用に起因すると考察した。また、魚種の違いによる比較を行ったところ、筋肉の T_g はカツオの方が、タラよりも若干低い値を示した。一方、両魚種の筋肉から抽出した筋形質タンパク質の T_g は、カツオ、マダラともほぼ同じような値を取った。更に、筋原繊維タンパク質の T_g は、マダラの方が高く、カツオの方が低い値を示し、その傾向は筋肉が示した結果と良く一致していた。以上の結果から、筋肉におけるカツオとタラの T_g 差は、筋形質タンパク質成分に起因するものではなく、筋原繊維タンパク質成分における T_g 差が反映されたものである可能性が高い事が明らかとなった。筋原繊維タンパク質が示した魚種による T_g 差は、赤身魚と白身魚の筋肉構造の違いに起因している可能性がある。

第3章 参考文献

- 1) Roos Y, *Phase Transition in Foods*, San diego: Academic Press Inc. 1995
- 2) 志水寛・西岡不二男：マアジアクトミオシンと筋形質たん白の熱凝固の際の相互作用. 日水誌, 1974; 40: 231-234.
- 3) Tanaka M, Lo JR, Yang CC, Nagashima Y, Taguchi T. Thermal gelation of dark meat and myosin pastes from sardine and tuna. *J. Tokyo Univ. Fish.* 1988; 75: 257-261.
- 4) Culioli J, Boyer C, Vignon X, Ouali A. Heat-induced gelation properties of myosin – Influence of purification and muscle type. *Sci. Alim.* 1993; 13: 249-260.
- 5) Xiong YL. Myofibrillar protein from different muscle fiber type: Implications of biochemical and functional properties in meat processing. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1994; 34: 293-320.
- 6) 内山均・鈴木たね子・江平重男・野口栄三郎：ヒラメ・カツオの氷蔵中における鮮度低下に関する生化学的研究. 日水誌, 1966; 32: 280-285.
- 7) 高橋豊雄：煮熟魚介肉についての諸現象. ニューフードインダストリー, 1960; 2: 38-48.
- 8) 柳内直一：赤身肉のねり製品原料化試験-I. 茨城水産試験場試験報告, 1966: 129-138.
- 9) Suzuki T. *Fish and krill protein processing technology*. London, England: Applied Science Publishers. 1981.
- 10) 志水寛・西岡不二男：魚肉アクトミオシンと筋形質タンパク質混合系の熱凝固特性. 日水誌, 1974; 40: 267-270.
- 11) Dyer WJ, Morton ML. Storage of frozen plaice filets. *J. Fish Res. Bd. Canada.* 1956; 13: 129-134.
- 12) Lan YH, Novakofski J, Mccusker RH, Brewer MS, Carr TR, Mckeith FK. Thermal gelation of myofibrils from pork, beef, fish, chicken and turkey. *J. Food Sci.* 1995; 60: 941-945.
- 13) Orlien V, Risbo J, Andresen L, Skibsted LH. The question of high- or

- low-temperature glass transition in frozen fish. Construction of the supplemented state diagram for tuna muscle by differential scanning calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* 2003; **51**: 211-217.
- 14) Blake NC, Fennema OR. The glass transition values of muscle tissue. *J. Food Sci.* 1999; **64**: 10-15.
- 15) 堀井 武一／編、「タンパク質・酵素の基礎実験法」(改訂第2版)、南江堂、1995.
- 16) Claey's E, Uytterhaegen L, Buts B, Demeyer D. Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. *Meat Sci.* 1995; **39**: 177-193.
- 17) Stabursvik E, Martens H. Thermal denaturation of proteins in post rigor muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. *J. Sci. Food Agric.* 1980; **31**: 1034-1042.
- 18) Wright DJ, Leach IB, Wilding P. Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. *J. Sci. Food Agric.* 1982; **28**: 557-564.
- 19) Murphy RY, Marks BP, Marcy JA. Apparent specific heat capacity of chicken breast patties and their constituent proteins by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* 1998; **63**: 88-91.
- 20) Sochava IV, Smirnova OI. Heat capacity of hydrated and dehydrated globular proteins. Denaturation increment of heat capacity. *Food Hydrocolloids* 1993; **6**: 513-524.
- 21) Green JL, Fan J, Angell CA. The protein-glass analogy: some insights from homopeptide comparisons. *J. Phys. Chem.* 1994; **98**: 13780-13790.
- 22) Bhandari BR, Howes T. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *J. Food Eng.* 1999; **40**: 71-79.
- 23) Kalichevsky MT, Jaroszkiewicz EM, Blanshard JMV. Glass transition of gluten. 1: Gluten and gluten-sugar mixtures. *Int. J. Biol. Macromol.* 1992; **14**: 257-266.
- 24) Jhonston IA. Biochemistry of myosins and contractile properties of fish skeletal muscle. *Mol. Physiol.* 1982; **2**: 15-29.
- 25) Stickland NC. Growth and development of muscle fibers in the rainbow trout

- (*Salmo gairdneri*). *J. Anat.* 1983; **137**: 323-333.
- 26) Kiessling A, Storebakken T, Asgard T, Kiessling KH. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age – I. Growth dynamics. *Aquaculture* 1991; **93**: 335-356.
- 27) Watabe S, Hashimoto K. Myosins from white and dark muscles of mackerel – Some physico-chemical and enzymatic properties. *J. Biochem.* 1980; **87**: 1401-1499.
- 28) Watabe S, Maruyama J, Hashimoto K. Myofibrillar ATPase activity of mackerel ordinary and dark muscles. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1983; **49**: 655.
- 29) Taguchi T, Lo JR, Tanaka M, Nagashima Y, Amano K. Thermal activation of actomyosin Mg-ATPases from ordinary and dark muscles of tuna and sardine. *J. Food Sci.* 1989; **54**: 1521-1523, 1529.
- 30) Lo JR, Endo K, Nagashima Y, Tanaka M, Iso N, Taguchi T. Thermal transitions of myosins subfragments from black marlin (*Makaira mazara*) ordinary and dark muscles. *J. Food Sci.* 1991; **56**: 954-957.
- 31) Boyer C, Joandel S, Ouali A, Culioli J. Determination of surface hydrophobicity of fast and slow myosins from rabbit skeletal muscles: implication in heat-induced gelation. *J. Sci. Food Agric.* 1996; **72**: 367-375.

第4章 エンタルピー緩和測定によるガラス転移温度以下における低水分魚肉加工食品の状態把握

4-1 はじめに

ここまでの章で行ってきたカツオ節および種々の低水分加工魚肉、さらには筋肉タンパク質成分のDSC測定により、これら物質がガラス状態を取り得ること、更には T_g の水分含量依存性などが、一般的なガラス状食品の挙動と完全に一致している事が明らかとなった。しかしながら、低水分魚肉加工品におけるガラス状態が、実際にどのような状態にあるのかは明らかとされていない。第1章で述べたように、ガラス状物質における T_g 以下での分子運動性を把握するためには、その物質のエンタルピー緩和過程を解析するのが有効な手段とされている。そこで本章では、低水分魚肉加工食品におけるエンタルピー緩和現象を詳細に検討することにより、そのガラス状態に関する情報の取得を試みた。食品成分の緩和現象については、すでに糖や炭水化物などにおいて多数の研究報告がなされている事は先に述べた。その一方で、タンパク質におけるエンタルピー緩和現象に関する報告はほとんど見られない。大豆グロブリンなどのタンパク質や、タンパク質を主成分とするモデル食品系において、DSC曲線にエンタルピー緩和に起因すると思われる吸熱ピークが観察されたと言う報告はあるものの¹⁴⁾、その現象に着目し、詳細な検討を加えた例はこれまでに存在しないようである。また、実際の食品で起こるエンタルピー緩和に関する研究例は一つも報告されていない。

第2章で、カツオ節あるいは低水分加工魚肉のDSC測定により、一定期間保存された試料のDSC曲線に、初回昇温時にガラス転移現象に重なった吸熱ピークが観察される事、そしてこの吸熱ピークが再昇温測定時には消失する事を明らかにした。これらの傾向から推察して、この吸熱ピークはガラス状魚肉のエンタルピー緩和現象を示していると考えられる。そこで本章では、試料としてモデル食品であるカツオ節を用い、そのエンタルピー緩和過程に対する詳細な検討を行った。

まず、種々の条件でエージングしたカツオ節のDSC測定を行い、保存温度、あるいは保存時間の変化がカツオ節のエンタルピー緩和現象に及ぼす影響について検討した。更に、その結果を既存の理論式を用いて解析して、 T_g 以下における分子運動性に関する情報を得る事を試みた。ここでは、高分子のエンタルピー緩和過程を記述するのにはば

しば用いられる KWW(Kohlrausch-William-Watts)式を用いた解析を行った⁵⁾。

本章では更に、緩和の進行が実際にカツオ節の巨視的物性に影響を及ぼすのかどうかについても検討を加えた。今回は巨視的物性の一つとして、乾燥食品の保存安定性にとって非常に重要な因子である水分吸着特性に着目した。既往の研究によると、ジャガイモデンプンにおいて、緩和の進行と共に水分吸着能が低下すると報告されている⁶⁾。また、数種類の合成高分子における緩和と水分透過性に関する研究においても、緩和の進行と共に水分透過性が低下すると言う報告もある⁷⁻¹¹⁾。従って、カツオ節においても、これらガラス状物質と同様に、緩和の進行に伴い、巨視的な物理学的特性に何らかの変化が起こる事が予想される。

4-2 実験方法

4-2-1 DSC を用いたカツオ節のエンタルピー緩和測定

4-2-1-1 試料準備

試料には、2章と同じにんべん製のカツオ節を用いた。試料の加工方法は2-3-1-1と同様に行った。試料の水分含量は、LiCl(相対湿度11.3%)の飽和塩を用いて調整した。最終的に得られたカツオ節の水分含量は、約6.3%であった。

4-2-1-2 エージング処理方法

試料のガラス転移温度を決定するために、最初に5°C/minで150°Cまで加熱し、あらかじめ試料の保存中に進行した緩和の影響を消去した。その後液体窒素を用いて5°C/minで-50°Cまで冷却し、再度同昇温速度で150°Cまで加熱した。得られた再昇温測定時のDSC曲線から、試料のガラス転移温度とガラス転移時の熱容量変化 ΔC_p を求めた。エージングプロセスは、Hancockら¹²⁾の方法に基づいて行った。エージング処理を行う前に、まず T_g より約30°C高い温度まで5°C/minで加熱し、その後すみやかに液体窒素を用いて-50°Cまで冷却して試料の熱履歴を消去した。そして試料を目的のエージング温度(25、42、60°C)まで再加熱し、DSC内で一定期間放置してエージングを行った。エージング終了後、すみやかに液体窒素を用いて試料を-50°Cまで冷却した後、再度150°Cまで昇温してDSC曲線を得た。最終的な昇温測定においてDSC曲線に現われた吸熱ピーク面積から、試料のエンタルピー緩和量を算出した。緩和ピーク面積の算

出は、第1章に述べた方法に基づいて行った。

4-2-1-3 カツオ節エンタルピー緩和過程の KWW 式へのフィッティング

カツオ節におけるエンタルピー緩和の進行に関する情報を得るために、KWW 式を用いた解析を試みた。DSC から求められた緩和面積 ΔH の値を用いて、第1章で述べた方法に基づき、KWW 式へのフィッティングを行った。フィッティングに当たっては、Kaleida Graph for Windows (Version 3.08, Synergy Software, U.S.A.)を利用した。

4-2-2 水分吸着実験

4-2-2-1 試料準備

試料には、DSC 測定に使用したのと同じものを用いた。

4-2-2-2 エージング処理方法

エージング処理を行う前に、水分蒸発が起こらない程度に密封した秤量瓶にカツオ節を詰め、120°C の恒温槽内で1時間保存する事によって、試料の熱履歴を消去した。まずエージング温度の与える影響を調べるために、所定の温度 (20、30、40、60°C) に設定した恒温槽内に一週間試料を保存した。同時に、エージング時間の与える影響についての検討のため、試料を 40°C の恒温槽内で1、2、3週間保存した。

4-2-2-3 水分吸着等温線の作成

試料の水分調整および水分含量の算出は、これまでと同様に行った。更に、得られたデータの解析には、食品の水分吸着等温線を記述するのにしばしば用いられている GAB モデル式を利用した。GAB 式は以下のように記述される¹³⁾。

$$X = \frac{X_m C k a_w}{(1 - k a_w)(1 - k a_w + C k a_w)} \quad (\text{Eq. 3-5})$$

ここで X は乾量基準による試料の含水量であり、 X_m は単分子吸着層、 C は Guggenheim 定数、 k はフィッティングパラメーターである。実験データの GAB 式へのフィッティングに当たっては、KWW 式へのフィッティングの際と同様に、Kaleida Graph for

Windows (Version 3.08, Synergy Software, U.S.A.)を用いた。

4.3 結果と考察

4.3-1 異なる温度・時間でエージングしたカツオ節のエンタルピー変化

Fig.4-1 に、様々な温度 (25、42、60°C) で一定時間 (0-70 hours) エージングしたカツオ節の DSC 曲線を示す。まず未処理のカツオ節の DSC 曲線に、ガラス転移を示す明確な熱容量のシフトが見られた。この結果は、第 2 章におけるカツオ節の DSC 測定結果と一致していた。この DSC 曲線から、本実験で用いたカツオ節のガラス転移温度および熱容量変化量を算出する事が出来た。得られたガラス転移温度の開始点 (onset)、中間点 (midpoint)、終点 (endpoint) は、それぞれ 43.1、76.0、108.9°C であった。また、ガラス転移量 (ΔC_p) は 0.26J/g であった。

エージング処理を施した試料には、いずれもガラス転移現象を示す熱容量シフトに重なるようにして吸熱ピークが現われていた。これらの吸熱ピークは、いずれもカツオ節のエンタルピー緩和現象に起因していると考えられる。これらの DSC 曲線から、吸熱ピークの大きさ、すなわちエンタルピー緩和量 (ΔH) を算出した。Fig.4-2 に、エージング時間に対するエンタルピー緩和量を示す。他の様々なアモルファス物質において報告されているのと同じく^{12,14-16}、カツオ節においても、エージング時間が長くなるに従って、緩和量が増加していく傾向が見られた。また、緩和量のエージング温度依存性も認められた。一般的に、エージング温度がその物質のガラス転移温度に近いほど、緩和速度は速くなると言われており、カツオ節においても 60°C でエージングした試料の緩和量が最も高くなる傾向が見られた。これは、より高い温度で保存された試料の方が、当然ながらタンパク質分子鎖の運動性が高く、その結果として、分子の再配列の速度が速まるからである。これらの実験結果から、カツオ節が明らかなエンタルピー緩和現象を示す事、更にそのエンタルピー緩和現象は明らかなエージング時間およびエージング温度を示す事が明らかとなった。これらの傾向は、これまでに報告されている一般的なガラス物質の緩和挙動と一致していた。

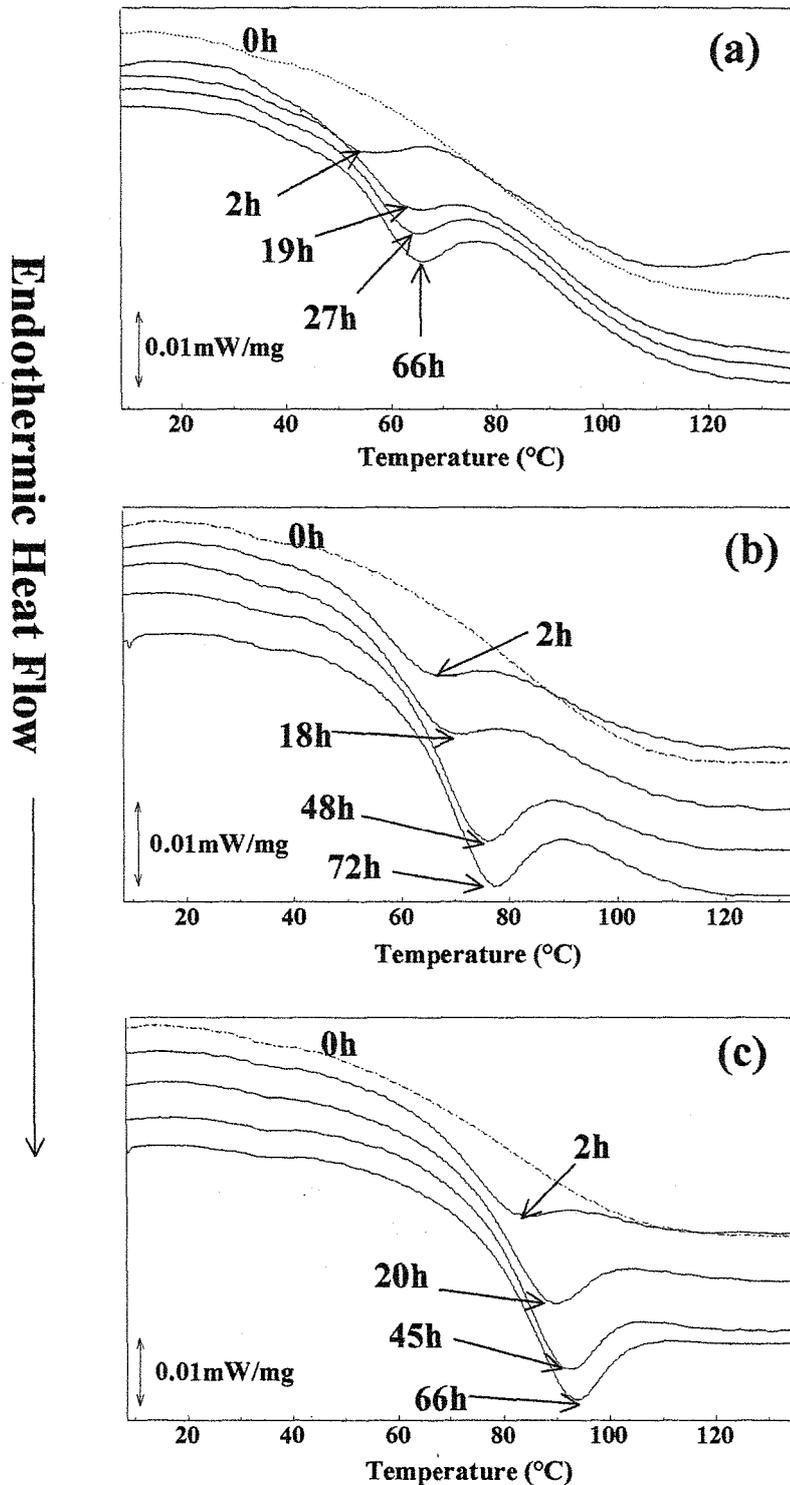


Fig.4-1 Typical DSC thermograms of Katsuobushi with 6.3% moisture aged at different aging temperatures (25, 42, 60°C) for different times (0-70 hours): (a) 25°C; (b) 42°C; and (c) 60°C.

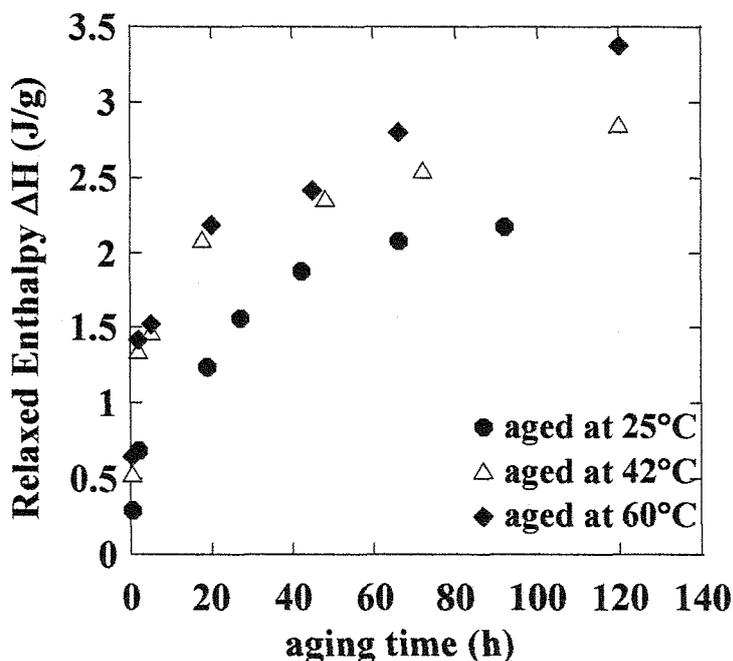


Fig.4-2 The aging time dependence of relaxed enthalpy of *Katsuobushi* with moisture content of 6.3% aged at different aging temperatures.

4-3-3 カツオ節エンタルピー緩和挙動の KWW 式による記述

第1章で示した方法で算出したエージング時間に対する緩和関数 Φ の値を Fig.4-3 に示す。図中の点線は、KWW 式へのベストフィッティングカーブである。いずれの試料においても、相関係数は 0.99 以上であったことから、KWW 式へのフィッティングは妥当であると考えられた。すなわち、カツオ節のエンタルピー緩和過程も、他のガラス状物質と同様に、KWW 式によって良好に記述可能であった。今回行ったエージング時間は、最大で 120h であり、これは一般的に用いられている食品の保存期間と比較すると、比較的短い。しかしながら、この KWW 式へのフィッティングにより、短期間のデータから、より長期間エージングした場合の緩和挙動が予測可能となった。フィッティングから算出した緩和時間 τ と緩和時間分布 β の値を、Table 4-1 に示す。

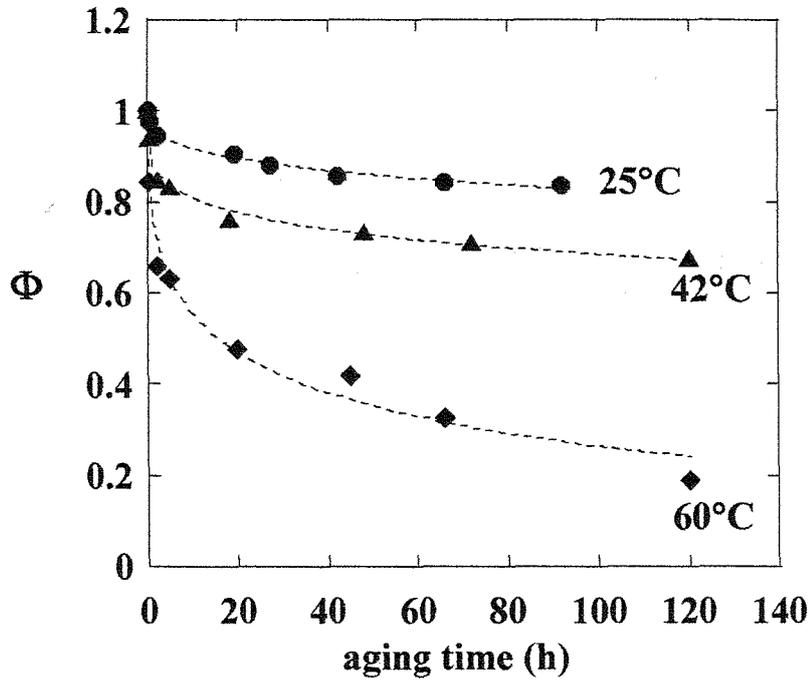


Fig.4-3 Plot of the relaxation function (Φ) of glassy *Katsuobushi* at 25, 42 and 60°C

Table 4-1 The fitting parameters β and τ of KWW equation for ΔH change in *Katsuobushi*

Aging Temp. Ta (°C)	β (-)	τ (h)
25	0.35	1.05×10^4
42	0.25	4.65×10^2
60	0.35	0.44×10^2

各々のエージング温度におけるカツオ節の β 値は0.25から0.35であり、この値は1からは大きく離れている。この結果は、カツオ節の緩和時間分布が広い事を示している。カツオ節は種々の成分が混在する多成分混合系である事を考慮すると、このように広い緩和時間分布を示したのは妥当である。これまでに報告されている合成高分子の β 値は0.5程度であり¹⁷⁾、この値は比較的カツオ節に近い。また、カツオ節の β 値はエージング温度に依存しなかった。合成高分子の β は一般的にエージング温度依存性を有しており、エージング温度が下がると β 値が急激に下がる傾向がある¹⁸⁾。既往の研究においても、ガラス状 benzodiazepines の β 値が、エージング温度が低くなるにつれて小さくなる事が報告されている¹⁹⁾。しかしながらその一方で、Styrene-maleic anhydride (SMA)の共重合体や²⁰⁾、デンプン¹⁶⁾においては、 β のエージング温度依存性が認められなかったという報告もあり、 β とエージング温度の相関性についての報告は必ずしも一定していない。特にカツオ節のように内部に複数の異なるガラス状物質を含む試料の場合、その緩和現象は非常に複雑な挙動を示すと考えるべきであり、KWW式のような単純なモデル式から求められる β 値からどのような情報が得られるのか、現段階では判断が難しい。Le Mesteら²¹⁾も指摘しているように、KWW式から求められる β 値の食品に対する適用性および有効性を正確に評価するためには、より多くの試料を対象とした実験データが必要である。

ガラス転移温度とエージング温度の差 T_g-T_a に対するカツオ節の緩和パラメータ τ の変化を、Fig.4-4に示す。緩和時間 τ は、ガラス状態下におけるその物質の緩和速度の指標となる。 τ の値が大きいほど緩和速度が遅い、すなわち安定な物質である事を示している。カツオ節の τ 値はエージング温度の上昇に従って小さくなり、この傾向はデンプンやスクロースなどのガラス状物質において報告されている結果と一致した^{12,16)}。すなわち、エージング温度が高くなって T_g に近づくと、その物質が平衡状態へ回復するために要する時間が短くなる事を示している。カツオ節の τ 値は、タンパク質やタンパク質を主成分とする実際の食品系でこのような解析を行った例が他にないため、類似試料との比較が難しい。そこで今回は、同様の方法で算出されたスクロースとジャガイモデンプンの既報^{12,16)}の τ 値を、参考のためにFig.4-4中に同時にプロットした。試料の水分含量の違いによる影響も考えられるため、単純に比較をする事は出来ないが、この図からガラス状態下の安定性が物質によって大きく異なっている事が示唆される。特に

カツオ節のような多成分混合系の場合、そのガラス状態における安定性は、構成成分の違いにも大きく影響を受けることが予想される。現段階では、カツオ節の構成成分それぞれが、系全体のガラス状態の安定性にどのように関わっているのかは明らかとされていない。それを知るためには、今後より多くの食品およびその構成成分に対するエンタルピー緩和挙動を検討していく必要がある。以上の結果から、異なる物質の T_g 以下における安定性を比較するには、KWW式から算出される τ 値が有効である事が明らかとなった。

更に、実験で求められた緩和時間 τ に対する温度変化の影響を調べるために、アレニウス活性化エネルギーの算出を試みた。Fig.4-5 に、カツオ節の緩和速度 $1/\tau$ に対するエージング温度の影響をプロットしたアレニウスプロットを示す。このプロットの傾きから求めた活性化エネルギーの値は 129kJ/mol であった。既往の報告によれば、ガラス状物質における緩和時間の温度に対する見かけの活性化エネルギーの値は、およそ 200~400kJ/mol である²²⁾。カツオ節で求められた値は、これと比べると若干低かった。カツオ節の活性化エネルギー値が低いのは、食品において一般的であるのか、カツオ節に特有のものであるのかは、比較の対象がないため現段階では明らかでない。この点についても今後検討していく必要がある。

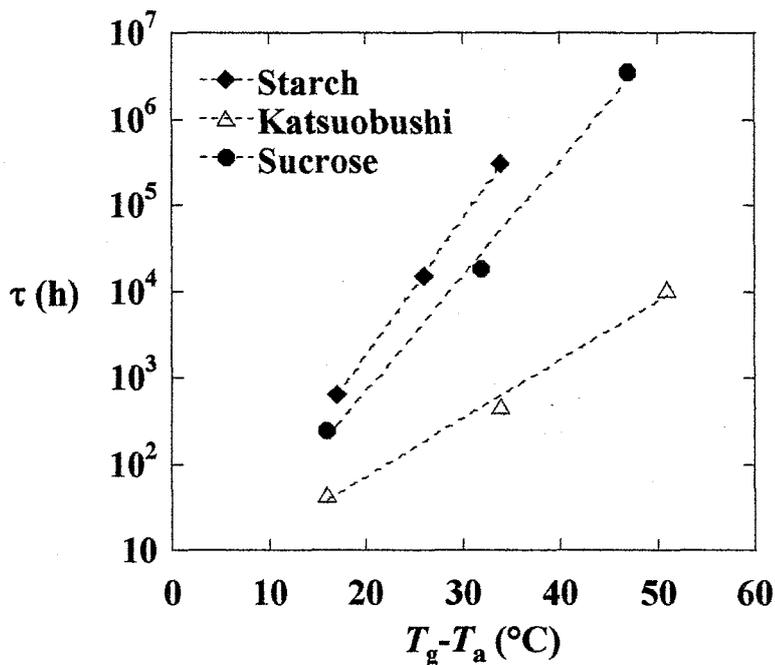


Fig.4-4 Semi logarithmic plot of mean relaxation time τ as a function of the scaled temperature $T_g - T_a$

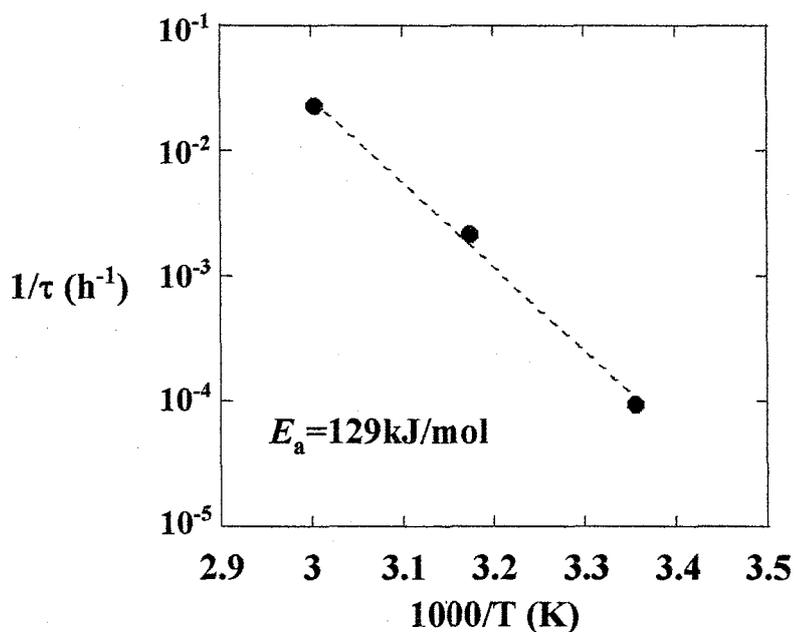


Fig.4-5 The Arrhenius plot of the molecular relaxation time of *Katsuobushi* obtained by enthalpy relaxation measurement

4-3-4 エージングによるカツオ節の水分吸着能の変化

Fig.4-6 に、同じエージング温度 (40°C) で 1-3 週間エージングしたカツオ節の、そして Fig.4-7 には異なるエージング温度 (20、30、40、60°C) で 1 週間エージングしたカツオ節の水分吸着等温線を示す。いずれの試料も、親水性高分子に特有の S 字型の曲線を示した。この傾向は、既往のカツオ節の水分吸着に関する報告と一致していた²⁰⁾。エージング処理前の試料の水分含量はいずれも 9% 前後であり、DSC で測定したガラス転移温度は約 70°C であった。この事から、試料はエージング処理中も常にガラス状態を保っていると考えられる。この水分吸着等温線から、カツオ節の水分吸着能に及ぼすエージング処理の影響が明らかとなった。すなわち、エージング時間が長くなると、あるいはエージング温度が高くなると、水分吸着量が減少する傾向が見られた。一例として、未処理試料と 40°C で 3 週間エージングした試料の平衡水分含量の値を比較すると、平均して 4% 程度の水分差が見られた。水分含量の測定誤差はいずれの試料も $\pm 0.2\%$ 以下であった事から、4% の差は有意な差であるとみなした。図中の点線は、実験データの GAB 式へのフィッティングカーブである。このフィッティングから得られた GAB パラメータの値を Table4-2 に示す。この表から、単分子層吸着量 X_m の値がエージング条件に依存している事が明らかである。Fig.4-8 および Fig.4-9 に、エージング時間およびエージング温度に対する単分子層吸着量の変化をプロットした。エージング時間依存性は、2 週間まで吸着量が低下したが、2 週間以降はあまり変化が見られなかった。これは 2 週間で過ぎた段階で、すでに緩和がほぼ平衡値に達していたためであろう。また、吸着量のエージング温度依存性も明らかであった。これらの結果は、エージング処理に伴う緩和の進行が、カツオ節の水分吸着能を低下させる事を強く示唆している。このような傾向は、ジャガイモデンプンにおいてすでに報告されている⁶⁾。また、高分子フィルムの水分透過性に関する既往の研究においても、緩和の進行に伴う水分透過性の低下が報告されている^{7-11,16)}。その中でも、ジャガイモデンプンから作成した可食性フィルムの水分透過性に関する研究において、金らは緩和の進行に伴う透過性低下のメカニズムを「自由体積」の概念を用いて説明している¹⁶⁾。彼らは、デンプンフィルムの水分透過性低下は、緩和の進行に伴う自由体積の減少によると推測している。「自由体積」とは、高分子の分子構造によって占有されていない空間として定義される²³⁾。自由体積概念によると、自由体積が減少すると、それに伴って高分子材料中の物質の移動性が低下する

と言われている²⁴⁾。すなわち、エージング処理にともなって、エンタルピー緩和と同時に構造緩和が進行し、その結果、自由体積が減少すると考えられる。自由体積が減少すれば、水分吸着のための空間が減少し、結果として水分吸着能の低下が生じるのであろう。

以上の結果から、食品にとって非常に重要な物理学的特性の一つである水分吸着特性が、エージングプロセスに影響を受ける事が明らかとなった。更にその影響は、保存温度と保存時間に依存していた。これらの傾向は、他の様々なガラス状合成高分子の報告とも一致していた。食品の水分吸着に関する研究は、これまでに数え切れないほど報告されている。しかしながら、それら食品の水分吸着能と緩和の影響について論じているものは全く存在しないと言ってもよいだろう。保存条件に依存する緩和の進行が、食品の水分吸着能に影響を及ぼすと言う今回の実験結果は、食品科学の分野においても、非常に興味深い発見であると考えられる。今回は特に水分吸着特性に着目して検討を行ったが、輸送特性などを始めとするその他の様々な物理学的特性が同じように緩和の影響を受ける事が予想される。その点については今後検討する必要がある。

Table 4-2 The GAB constants for water sorption at 25°C in non-aged and aged Katsuobushi at different temperatures for different times

GAB parameters	No aging	Aging time			Aging temperature			
		1week	2weeks	3weeks	20°C	30°C	40°C	60°C
X_m	6.98	6.34	6.07	6.07	6.85	6.62	6.34	6.10
C	85.6	48.9	44.0	35.2	65.4	66.8	48.9	43.7
k	0.99	0.99	0.10	0.10	0.99	0.99	0.10	0.10

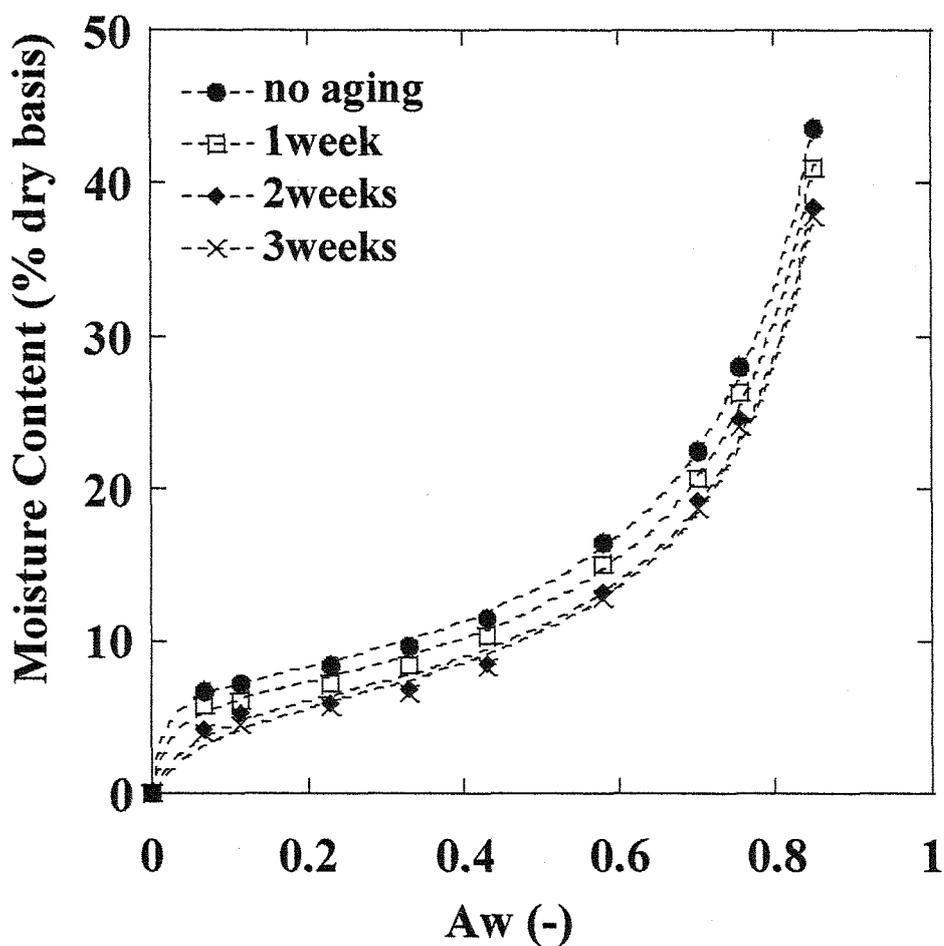


Fig.4-6 Water sorption isotherms of *Katsuoobushi* no-aged and aged at 40°C for 1, 2, 3 weeks. Dotted lines are fitting lines to the GAB equation.

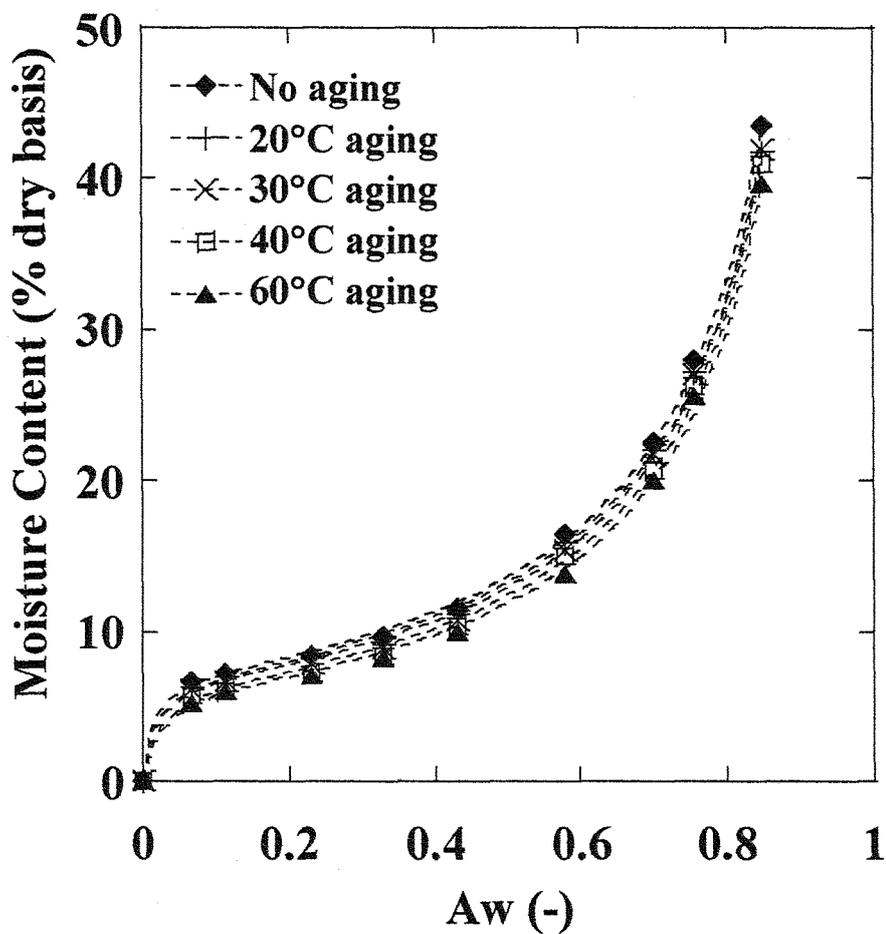


Fig.4-7 Water sorption isotherms of *Katsuobushi* no-aged and aged at different temperatures (20, 30, 40, 60°C) for 1 week. Dotted lines are fitting lines to the GAB equation.

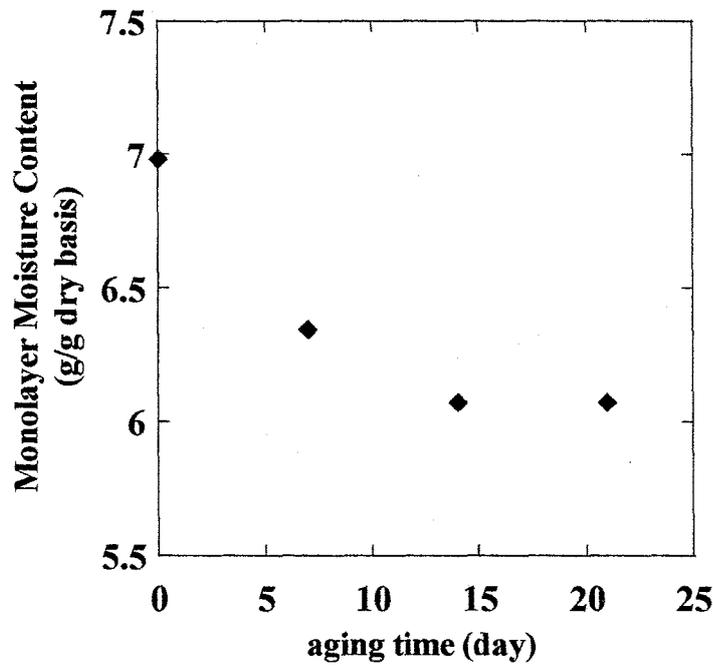


Fig.4-8 The GAB monolayer values of *Katsuobushi* aged at 40°C as a function of aging time.

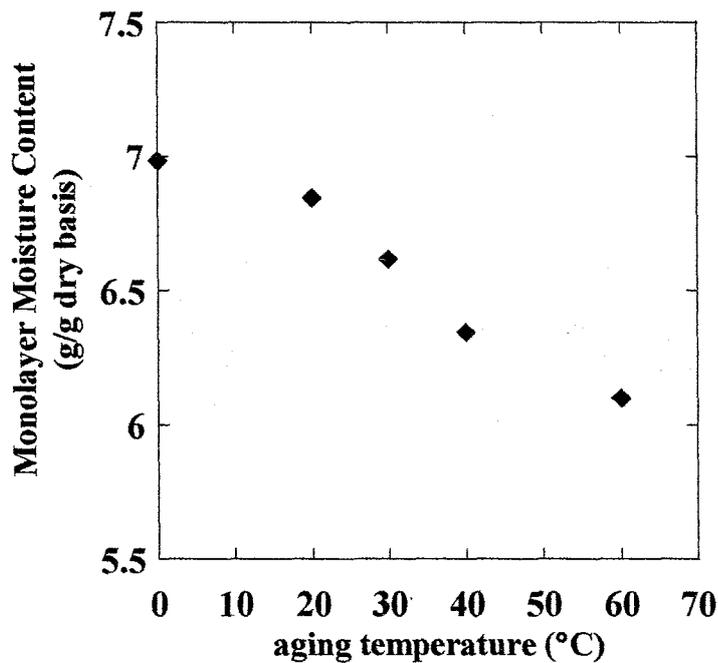


Fig.4-9 The GAB monolayer values of *Katsuobushi* aged for 1 week as a function of aging temperature

第1章でも述べたように、ガラス状態にある物質は分子運動性が著しく制限されているために品質劣化が起こりにくく、そのため、ガラス転移温度は食品の保存安定性にとって非常に有用なツールである事が広く認識されている。しかしながら今回行った実験により、食品をガラス転移温度以下に保った場合でさえも、わずかながら分子の再配列などが生じ、結果として生じる緩和の影響に伴って、貯蔵中に何らかの物理学的特性が変化する可能性がある事が示された。今回の実験で用いた貯蔵期間は1から3週間であり、これは通常の食品の貯蔵期間に比べると比較的短い。しかしながら、このような短時間でも、見た目にも明らかな影響が観察された事は、長期保存の際の緩和現象はその食品の物性変化にとって決して無視できない事を示している。

4-4 結論

以上の結果から、カツオ節が保存中にエンタルピー緩和を示し、さらにその緩和量がエージング温度およびエージング時間に依存する事が明らかとなった。この傾向は、他の様々なガラス状物質と一致していた。また、そのエンタルピー緩和挙動は、アモルファス物質の緩和過程を記述するのに一般的に用いられている KWW 式で良好に記述可能であった。KWW 式を用いたエンタルピー緩和過程の解析により、緩和時間分布 β 、緩和時間 τ というカツオ節のガラス状態に関する情報を与えるパラメータを得る事が出来た。そして KWW 式から求められる緩和時間 τ の値は、異なる物質のガラス状態下における安定性の違いを比較議論する上で有用である事が示された。更に、エージング処理がカツオ節の水分吸着能に影響を及ぼす事から、ガラス転移温度以下で保存した場合でも、食品の物理学的特性が変化する可能性がある事が明らかとなった。従って、今後はガラス転移温度を知るだけでなく、 T_g 以下における緩和挙動にも着目する必要性が示された。また、DSC を用いた食品のエンタルピー緩和測定は簡便であり、有効である事が示された。

第4章 参考文献

- 1) Kalichevsky MT, Jaroszkiewicz EM, Blanshard JM. The glass transition of gluten. 1: gluten and gluten-sugar mixtures. *Int. J. Biol. Macromol.* 1992; **14**: 257-266.
- 2) Aguilera JM, Levi G, Karel M. Effect of moisture content on the glass transition and caking fish protein hydrolyzates. *Biotechnol. Prog.* 1994; **9**: 651-654.
- 3) Micard V, Guilbert S. Thermal behavior of native and hydrophobized wheat gluten, gliadin and glutenin-rich fractions by modulated DSC. *Int. J. Biol. Macromol.* 2000; **27**: 229-236.
- 4) Rouilly A, Orliac O, Silvestre F, Rigal L. DSC study on the thermal properties of sunflower proteins according to their moisture content. *Polymer.* 2001; **42**: 10111-10117.
- 5) Williams G, Watts DC. Non-symmetrical dielectric relaxation behavior arising from a simple empirical decay function. *Trans. Faraday Soc.* 1970; **66**: 80-85.
- 6) Kim YJ, Suzuki T, Matsui Y, Pradistsuwannna C, Takai R. Water sorption for amorphous starch and structural relaxation by ball milling. *Jp. J. Food. Eng.* 2002; **2**: 121-125.
- 7) Nagai K, Nakagawa T. Effect of aging on the gas permeability and solubility in poly (1-trimethylsilyl-1-propyne) membranes synthesized with various catalysts. *J. Memb. Sci.* 1995; **105**: 261-272.
- 8) MaCaig MS, Paul DR. Effect of UV crosslinking and physical aging on the gas permeability of thin glassy polyarylate films. *Polymer.* 1999; **40**: 7209-7225.
- 9) MaCaig MS, Paul DR. Effect of film thickness on the change in gas permeability of a glassy polyarylate due to physical aging, part I. Experimental observations. *Polymer.* 2000; **41**: 629-637.
- 10) MaCaig MS, Paul DR, Barlow JW. Effect of film thickness on the change in gas permeability of a glassy polyarylate due to physical aging, part II. Mathematical model. *Polymer.* 2000; **41**: 639-648.
- 11) Tiemblo P, Guzman J, Riande E, Mijangos C, Reinecke H. Effect of physical aging

- on the gas transport properties of PVC and PVC modified with pyridine groups. *Polymer*. 2001; **42**: 4817-4823.
- 12) Hancock BC, Shamblin SL, Zografi G. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures. *Pharm. Res.* 1995; **12**: 799-806.
- 13) Bizot H. Using the GAB model to construct sorption isotherms. In: R. Jowit. *Physical Properties of Foods*. London: Applied Science. 1983; 43-54.
- 14) Duddu SP, Zhang G, Dal Monte PR. The relationship between protein aggregation and molecular mobility below the glass transition temperature of lyophilized formulations containing a monoclonal antibody. *Pharm. Res.* 1997; **5**: 596-600.
- 15) Shamblin SL, Zografi G. Enthalpy relaxation in binary amorphous mixtures containing sucrose. *Pharm. Res.* 1998; **15**: 1828-1834.
- 16) Kim YJ, Hagiwara T, Kawai K, Suzuki T, Takai R. Kinetic process of enthalpy relaxation of glassy starch and effect of physical aging upon its water vapor permeability property. *Carbohydr. Polym.* 2003; **53**: 289-296.
- 17) Matsuoka S. Relaxation phenomena in polymer. (1992) Munich: Carl Hanser Verlag, pp.80-142.
- 18) 松岡皎朗／著、市原祥次／訳、「高分子の緩和現象」、講談社サイエンティフィック、1995.
- 19) Mooter G. Stability prediction of amorphous benzodiazepines by calculation of the mean relaxation time constant using the Williams-Watts decay function. *Europe. J. Pharm. Biopharm.* 1999; **48**: 43-48.
- 20) Cameron NR, Cowie JMG, Ferguson R, McEwan I. Enthalpy relaxation of styrene-maleic anhydride (SMA) copolymers Part 1. Single component systems. *Polymer*. 2000; **41**: 7255-7262.
- 21) Le Meste M, Champion D, Roudaut G, Blond G, Simatos D. Glass transition and food technology: a critical appraisal. *J. Food. Sci.* 2002; **67**: 2444-2458.
- 22) Champion D, Le Meste M, Simatos D. Towards an improved understanding of glass transition and relaxations in foods: molecular mobility in the glass transition range.

Trend. Food Sci. Technol. 2000; **11**: 41-55.

23) Benczedi D. Estimation of the free volume of starch-water barriers. *Trend. Food Sci. Technol.* 1999; **10**: 21-24.

24) 滝沢章、コンピュータで見る高分子材料中の物質移動、講談社サイエンティフィック、(1994), pp.201-203.

第5章 低水分魚肉加工食品のガラス状態に及ぼす加工条件の影響

5-1 はじめに

ここまでに行ってきた研究により、一定の条件で加熱・乾燥処理を加えられた低水分加工魚肉がガラス状態を取り得る事、更にはそのガラス状態がエージングなどの処理を加えられる事により、異なった状態へ変化する事が示された。よって、これら魚肉加工品のガラス状態が、製造プロセスにおける加工条件の違いによっても異なる事が予想される。今後、ガラス転移概念を低水分魚肉加工品の品質制御に役立てるためには、加工時における操作条件の違いが、そのガラス状態の形成に及ぼす影響についても検討する必要がある。

低水分魚肉加工食品を製造する際、加熱工程はその食品の品質に強い影響を及ぼす。何故ならば、タンパク質を主成分とする魚肉加工食品の場合、加熱変性に伴って起こるタンパク質の構造変化が、その食品の性質を大きく左右するためである。しかしながら、熱変性が低水分タンパク質のガラス転移現象に及ぼす影響についての研究例はほとんど報告されておらず、両者がどのような相関性を持つのか、その機構については未だ明確な結論は得られていない。第3章で行った凍結乾燥魚肉タンパク質のDSC測定結果により、熱変性前試料が検出可能なガラス転移現象を示さなかったのに対して、熱変性後試料は非常に明確なガラス転移現象を示す事を明らかにした。この結果は、魚肉タンパク質がガラス状態を取るためには、加熱変性過程が大きな役割を果たす事を示しているが、その詳細は不明のままである。

本章の目的は魚肉のガラス転移現象に及ぼす加熱処理条件の影響を検討する事であるが、それに先立って、タンパク質の加熱変性がそのガラス転移現象とどのように関わっているのかをまず把握しておく必要がある。

魚肉タンパク質でははっきりとした結論を得る事が出来なかった。そこで本章では、成分組成や構造が複雑な魚肉タンパク質ではなく、より単純な系での検討を行うために、代表的なタンパク質であるヘモグロビンを試料として用いる事で、一般的なタンパク質が示す傾向を探った。ヘモグロビンは魚肉中にも含まれる水溶性の色素タンパク質であり、筋形質タンパク質の一つに分類される。立体構造や機能がすでに詳細に検討されており、更に比較的安価に手に入る事から、今回測定対象とした。

更に、ヘモグロビンにおいて得られる結果を参考とし、次節では実際に魚肉を測定対象として、加熱工程、乾燥工程における条件の違いがそのガラス状態に及ぼす影響について検討した。

5-2 ヘモグロビンのガラス転移現象に及ぼす熱変性の影響について

5-2-1 ヘモグロビンの立体構造について¹⁾

Fig.5-1 にヘモグロビンの構造を示す。ヘモグロビンは種の進化の段階に応じて、1本あるいは複数のポリペプチド鎖（グロビン）で構成されている。グロビンは153個のアミノ酸からなる一本鎖のペプチドであり、AからHの8つのヘリックス領域を持ち、その領域間の121個のアミノ酸は無秩序構造、すなわちランダムコイル状態を取っている。非常に緻密に折りたたまれた構造の内部に、ひとつの窪みが観察されている。その窪みの内面はEFCのヘリックス領域とCD間の非ヘリックス領域とによって形成され、窪みの奥の底部分はB,GそしてHのヘリックス領域で形成されている。ヘモグロビンはβシート構造を含まず、全体の構造のうち、約75%がα-ヘリックスで構成されているため、α-タンパク質とも呼ばれる。

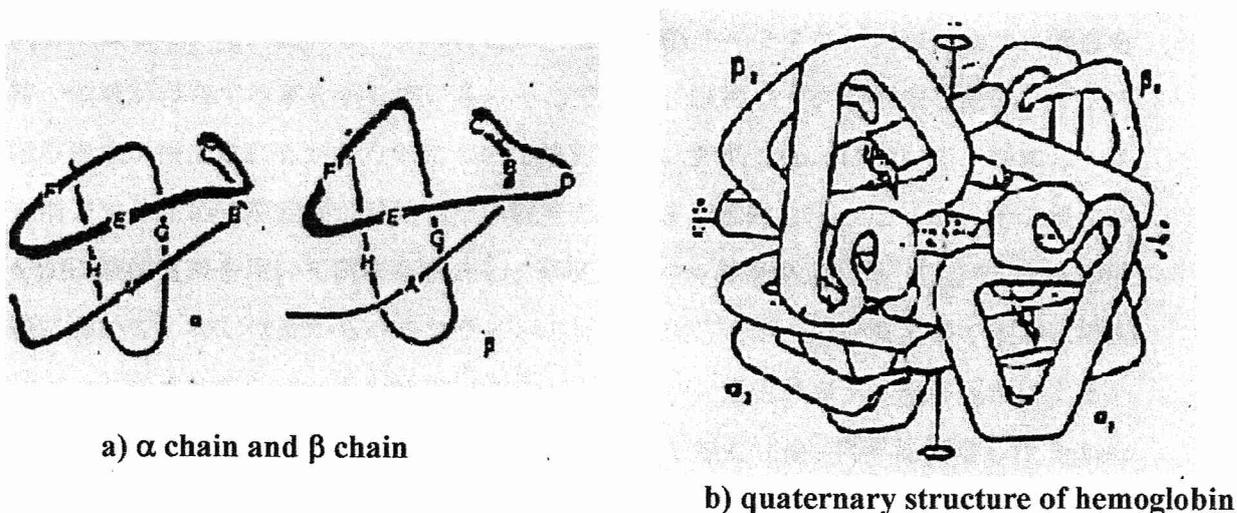


Fig.5-1 The structure model of hemoglobin

5-2-2 実験方法

5-2-2-1 試料準備

試料には、牛血液製のヘモグロビン（和光純薬工業（株）No.082-00122）を用いた。乳鉢で細かい粉末状にした後、第1章に示した方法に基づいて水分調整を行った。

5-2-2-2 DSC 測定

水分調整を終えたヘモグロビン粉末を DSC 測定し、熱変性前のガラス転移温度、熱変性温度、熱変性後のガラス転移温度の検出を試みた。DSC の測定条件はこれまでと同様であった。

5-2-3 結果と考察

5-2-3-1 熱変性前後におけるヘモグロビンの T_g 比較

Fig.5-2 に、水分約 15% のヘモグロビン粉末の DSC 測定結果を示す。点線で示したのが、典型的 1st run の曲線であるが、大きく 2 つの吸熱ピークが観察された (A)。100°C 付近の吸熱ピークはヘモグロビンの熱変性に起因するピークである。一方、65°C 付近の吸熱ピークは熱変性に起因するものではなく、未変性状態のヘモグロビンにおけるエンタルピー緩和現象に起因するピークであると推察した。初回昇温時の DSC 曲線上に緩和ピークと熱変性ピークが現れるという結果は、既報の大豆グロブリンの傾向と一致していた。緩和ピークの存在は、熱変性前のヘモグロビン中にガラス構造を持つ領域が存在する事を示している。そこで次に、緩和ピークを消去した後、ガラス転移現象が検出されるかどうかについて検討した。まず 1st run において、緩和ピークを消去するために熱変性が開始しない程度の温度まで加熱を行った (B)。その後すみやかに液体窒素を用いて試料を冷却し、再度同条件で昇温測定した (C)。2nd run の曲線において、40°C 付近からベースラインの低下が生じたが、近い温度帯ですぐに熱変性ピークが現れてしまったために、このベースライン変化がガラス転移現象によるものなのかを結論づける事は困難であった。2nd run で熱変性後、再昇温測定した 3rd run の曲線においては、非常に明確なガラス転移現象が確認された (D)。

合成高分子のガラス転移研究において、ガラス転移時の熱容量変化が非常に小さく DSC 曲線上にガラス転移現象の検出が困難である場合、「アニーリング処理」と呼ば

れる手法が用いられる。アニーリング処理とは、予測される T_g 近傍でその物質を一定時間熱処理（エージング）し、エンタルピー緩和現象が現れるかどうかを調べる事で、その物質がガラス状態にあるかを確認する手法である。この処理は、氷の融解ピークが重なるために検出が困難とされる凍結魚肉のガラス転移測定にも利用されており²⁾、その方法についてはいくつかの論文が報告されている³⁻⁵⁾。そこで本実験においても、アニーリング処理を利用して、未変性ヘモグロビンのガラス転移現象の確認を試みた。

Fig.5-2 には、初回昇温測定であらかじめ緩和ピークを消去した後、40℃で24時間エージングした試料のDSC曲線も示す(E)。初回昇温直後に測定した試料の場合は、ガラス転移現象はあまり明確でなかったが、エージングした試料の場合は、変性ピークのオンセット部分に重なるように明確な熱容量変化が現れた。これは処理中に進行したエンタルピー緩和に起因する緩和ピークであると考えられる。この結果から、ヘモグロビンが熱変性前であってもガラス領域を有しており、熱変性温度と近い温度帯でガラス転移する事が明らかとなった。これまでの実験によると、ある程度 T_g に近い温度帯でエージングした試料が示すエンタルピー緩和ピークの開始温度が、未緩和試料のガラス転移温度のオンセット値 (T_g^{onset}) と等しくなる事が分かっている。従って、本実験においては、エージングした試料が示した緩和ピークの開始温度が、未変性試料における T_g^{onset} 値とみなした。

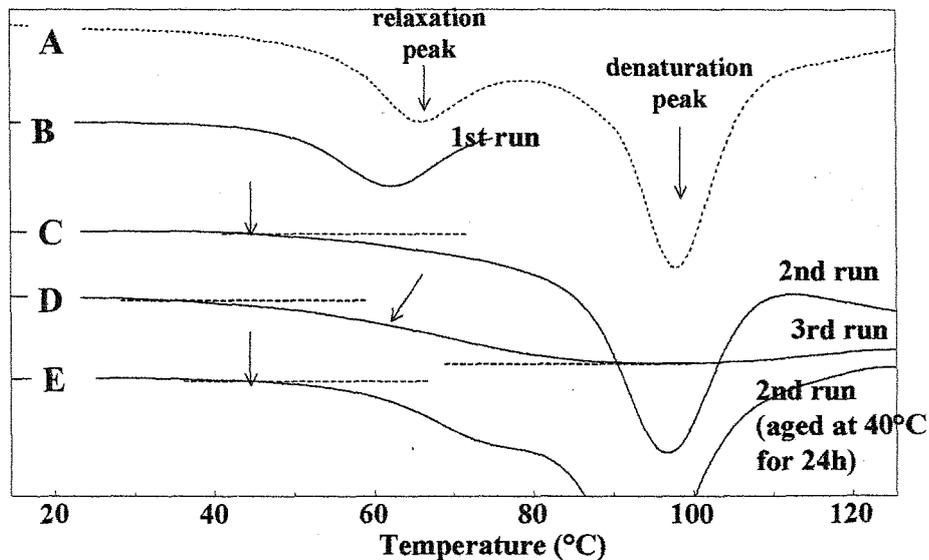


Fig.5-2 Typical DSC thermograms of hemoglobin powder with 15% moisture content.

次に、ヘモグロビンのガラス転移温度が熱変性前後でどの程度変化するのかを調べるために、熱変性前後の試料におけるガラス転移温度の水分含量依存性を検討した。水分含量の異なるヘモグロビン粉末に対して、それぞれ異なる温度でエージングし、DSC 測定を試みた。実験にあたっては、いくつかの温度を用いてあらかじめ予備実験を行い、各試料における最適エージング温度を決定した。

Fig.5-3 に示したのは、それぞれ異なる温度で 24 時間エージングした、水分含量の異なるヘモグロビン粉末の DSC 測定結果である。いずれの試料においても、熱変性ピークの開始温度より低温域に、エンタルピー緩和に起因する熱容量変化が明らかに現れた。それぞれの熱容量変化の開始温度を、その試料における T_g^{onset} 値とみなし、各水分含量におけるガラス転移温度を決定した。熱変性前試料の T_g^{onset} 値は明らかな水分含量依存性を示した。Fig.5-4 に示したのは、1st run ですすでに変性させた、熱変性後の試料の DSC 測定結果である。熱変性後の試料の場合は、いずれも非常に明確なガラス転移現象が現れた。変性前試料との比較のため、変性後試料に関しても、今回はガラス転移温度として T_g^{onset} 値を取った。Fig.5-5 に示したのは、DSC 曲線から得られた変性前試料と変性後試料における T_g^{onset} 値を水分含量に対してプロットしたものである。一般的なガラス状物質と同様に、いずれの T_g も明らかな水分含量依存性を示したが、両者の T_g 値が若干異なっていた。すなわち、熱変性前試料の方が、熱変性後試料よりも、高い T_g 値を有する事が明らかとなった。

以上の結果から、熱変性前においてもヘモグロビン中にガラス領域が存在し、熱変性温度に近い温度帯でガラス転移現象を示す事、そしてその T_g^{onset} 値が熱変性前後で変化する事が明らかとなった。熱変性を経る事で T_g が低下する、という傾向は、Sochava ら⁶⁾が示した大豆グロブリンの場合と一致していた。また、ヘモグロビンの場合は、熱変性ピークとガラス転移現象が DSC 曲線上で重なって検出されたため、熱変性前試料の ΔC_p 値を実験的に求める事は出来なかった。

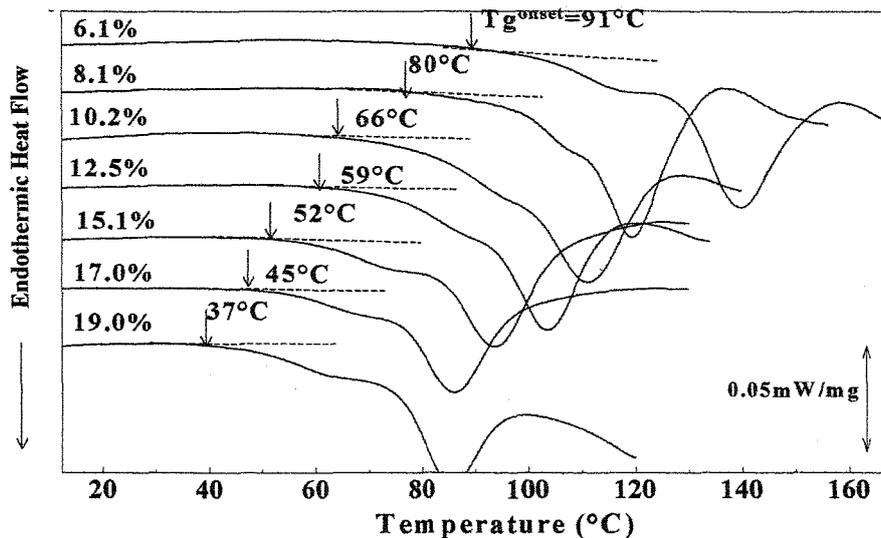


Fig.5-3 Typical DSC thermograms of non-denatured hemoglobin powder with different moisture content. All samples were aged at several aging temperatures for 24 hours. The T_g values of these samples were determined from onset temperature of the changes in heat capacity.

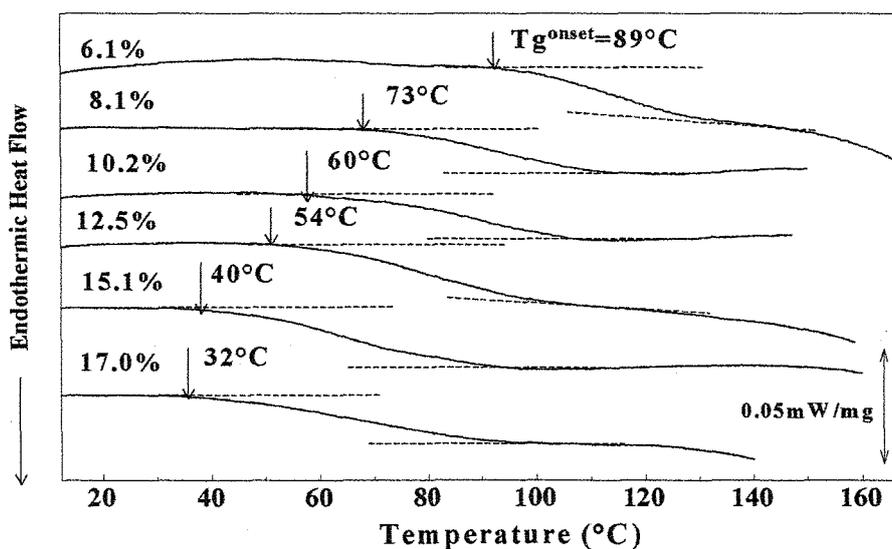


Fig.5-4 Typical DSC thermograms of heat-denatured hemoglobin powder with different moisture contents. All samples were denatured in DSC during 1st heating scan. The T_g values were determined from onset T_g values.

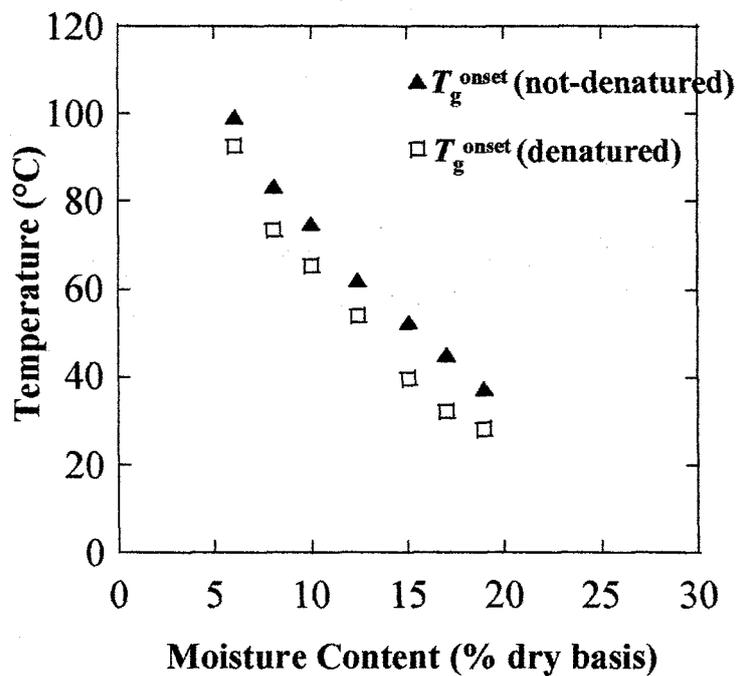


Fig.5-5 The effect of moisture content on the onset T_g value of non-denatured and heat-denatured hemoglobin powder.

5-2-3-2 熱変性前後におけるヘモグロビンのエンタルピー緩和挙動比較

次に、熱変性前後でヘモグロビンのエンタルピー緩和挙動に違いが現れるかどうかについて検討を加えた。Fig.5-6 に 60℃で一定時間エージングした熱変性前ヘモグロビンの DSC 曲線を示す。いずれの試料においても、変性ピークと重なってエンタルピー緩和に起因する吸熱ピークが現れた。更に、そのピーク面積はエージング時間が長くなるに従って、大きくなる傾向を示した。この結果から、熱変性前ヘモグロビン中に存在するガラス領域がエージングによってエンタルピー緩和現象を生じ、さらにその緩和量がエージング時間に依存する事が明らかとなった。

Fig.5-7 は、あらかじめ DSC 内で 150℃まで加熱して変性させた変性ヘモグロビンを 60℃で一定時間エージングした場合の DSC 測定結果である。変性ヘモグロビンの場合は、ガラス転移現象に重なって緩和ピークが現れた。変性ヘモグロビンの場合も、エージング時間が長くなるに従って、緩和ピーク面積が大きくなる傾向が見られた。

熱変性および未変性ヘモグロビンを同一条件でエージングした時の緩和エンタルピー量を比較するため、同時間エージングした試料の DSC 曲線を Fig.5-8 に示す。両者の差はさほど顕著ではなかったが、同じエージング時間でも、熱変性後の試料の方が面積の大きい緩和ピークを示す傾向が見られた。緩和ピーク面積が大きい事は、熱変性試料の方が、内部により多くのガラス領域を有している事を示唆している。すなわち、熱変性によってヘモグロビン中のガラス領域の割合が増大し、結果として熱変性試料の緩和ピーク面積の方が大きい傾向を示したのだろう。更に、熱変性後の試料の方が、そのガラス状態が不安定であるために、緩和の進行が速い事も一つの要因となっている可能性もある。

本実験においては、緩和ピークが変性ピークと重なっているために緩和量 ΔH の算出が困難であった事から、未変性ヘモグロビンにおけるエンタルピー緩和挙動を定量的に把握する事が出来なかった。タンパク質の熱変性前後におけるエンタルピー緩和現象の定量的な検討については、今後の課題としたい。いずれにしても、本実験により、ヘモグロビン中のガラス構造領域が、熱変性前後で異なるエンタルピー緩和現象を示す事が明らかとなった。

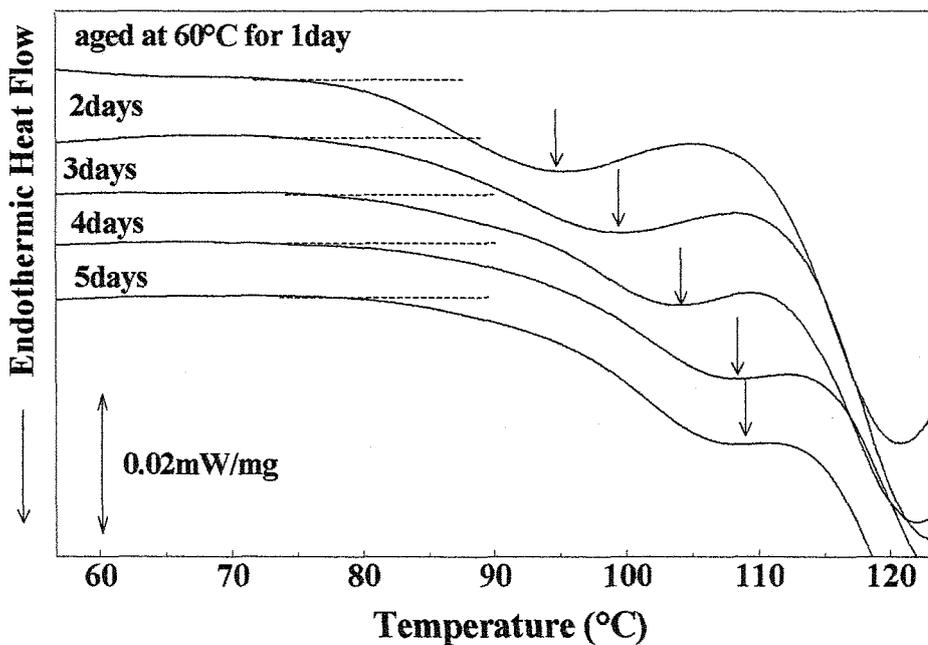


Fig.5-6 Typical DSC thermograms of non-denatured hemoglobin powder with about 8% moisture aged at 60°C for 1-5 days. Each sample shows clear relaxation peak lapped over denaturation peak.

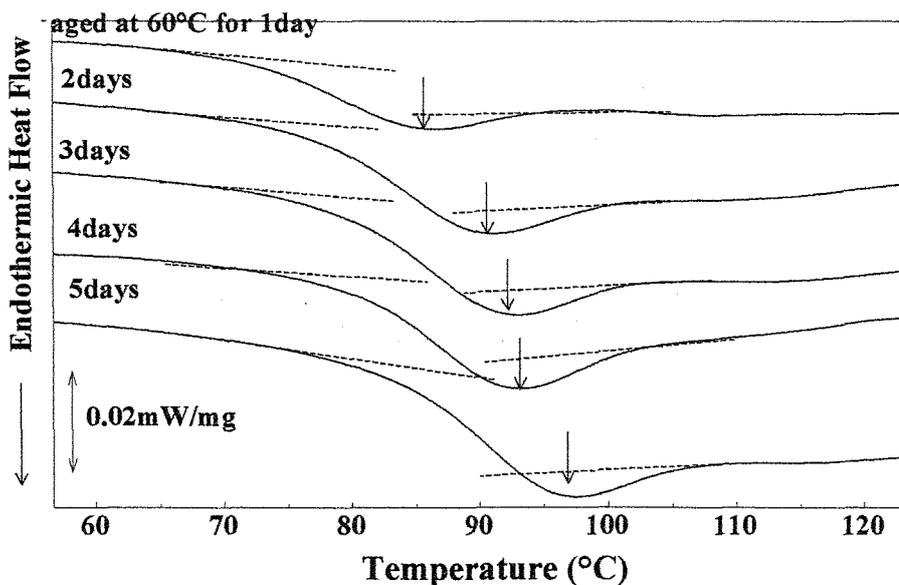


Fig.5-7 Typical DSC thermograms of denatured hemoglobin powder with about 8% moisture aged at 60°C for 1-5 days. This sample was pre-heated to 150°C for denaturation at the first scanning in a DSC pan. Each sample shows clear relaxation peak lapped over base-line shift.

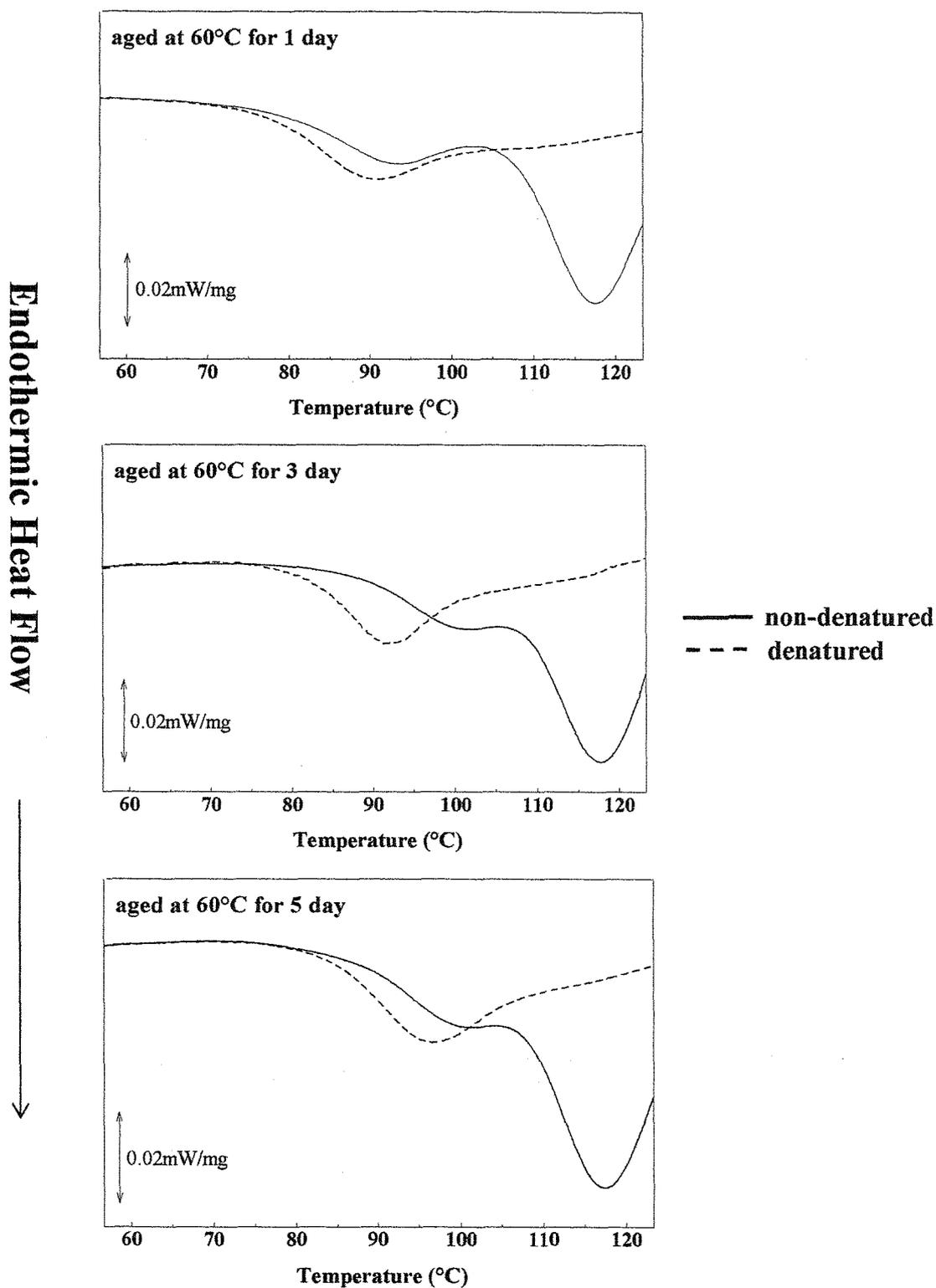


Fig.5-8 Comparison of DSC thermograms between non-denatured and denatured hemoglobin powder aged at 60°C for 2, 3, 5 days in a drying oven.

大豆グロブリン、あるいはヘモグロビンにおいて見られた熱変性前後のガラス転移挙動の変化、すなわち加熱による T_g の低下、 ΔC_p の増大は、デンプン⁷⁾やゼラチン⁸⁾ などにおいても同様に見られる傾向である。デンプンの場合、ネイティブデンプンはガラス転移時の ΔC_p 値が非常に小さく、 T_g も高いが、加熱して融解させた後は ΔC_p 値が飛躍的に増大し、 T_g が低下する。これは、ネイティブデンプンはアモルファス領域と結晶領域の両方を含んでおり、融解前にはアモルファス領域の占める割合が少ないため ΔC_p 値が小さく^{7,9)}、更に結晶領域が系全体の自由度を低下させているため、 T_g が高くなると考えられている^{10,11)}。加熱融解により結晶領域が崩壊すると、系全体がアモルファス状態となるため、結果として ΔC_p が大きくなり、系の自由度が増すため T_g が低下するのである。本実験において示されたヘモグロビンの熱変性前後におけるガラス転移挙動の違いも、これと同様の機構で生じている可能性がある。

Fig.5-9 に、球状タンパク質の構造モデルを示す。ネイティブ状態のタンパク質は、 α -ヘリックス、 β -シートなどの規則構造と、ランダムコイルなどの不規則構造から構成されている。そして、これら規則構造からなる領域が結晶領域に相当し、不規則構造からなる領域が、非結晶領域、つまりガラス領域に相当するとみなせる。タンパク質は完全に熱変性すると、規則構造が崩壊してランダムコイル化するが、このような構造変化が、デンプンで言えば融解に伴う結晶領域の崩壊に相当すると考える事が出来る。つまり、熱変性後のタンパク質が大きい ΔC_p 値を示すのは、ネイティブ状態では少なかったガラス領域の占める割合が熱変性によって増大するからであり、 T_g が低くなるのは、剛直なヘリックス構造が崩壊して柔軟なランダムコイル構造へ変化したために、系の運動性が増すからである。Hayashi ら¹²⁾ は卵白アルブミンゲルのガラス転移に関する報告の中で、乾燥工程中に生じるヘリックス領域の崩壊、すなわちヘリックス-コイル転移が、アルブミンゲルのガラス化の原因である可能性を示唆しており、これは規則構造の崩壊がガラス転移現象と関連するという本研究の仮説と一致している。

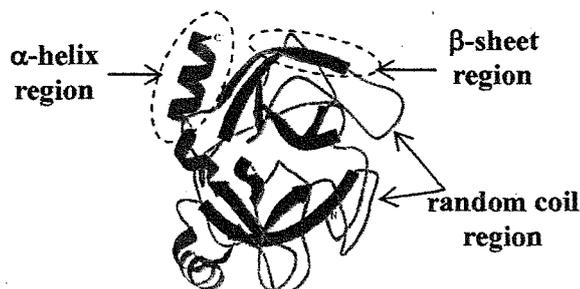


Fig.5-9
The structure model
of globular protein.

5-2-1 で述べたように、ヘモグロビンは未変性状態でもある程度の不規則構造を含んでいる。したがって、未変性試料で見られたガラス転移現象は、この不規則構造領域に起因すると推察できる。しかしながら実際にタンパク質のガラス状態がランダムコイル領域に相当するのかどうかについては、今後更に構造既知のタンパク質を用いて、ランダムコイル構造の含有量と ΔC_p 値を比較するなどして検討する必要がある。

また、本章ではタンパク質のガラス状態に及ぼす熱変性の影響についての機構を推察するために、分子内の構造変化に着目した議論を行った。しかしながら、一般に高分子のガラス転移現象は、セグメントの構造だけでなく、セグメント同士の協同性によっても大きく支配される。よってタンパク質の場合も、熱変性に伴う分子内構造変化だけでなく、熱変性に伴うタンパク質分子間の相互作用が及ぼす影響についても今後考察していく必要がある。

5-2-4 結論

これまで、低水分タンパク質のガラス転移現象が、熱変性前後でどのように変化するかについて詳細に検討した例は報告されていなかった。しかしながら本実験結果より、低水分ヘモグロビンが熱変性前にすでにガラス領域を有しており、変性温度に近い温度帯でガラス転移する事が明らかとなった。更には、熱変性に伴うタンパク質の構造変化が、ガラス状態の安定性に影響を及ぼす事も明らかとなった。しかしながら、未変性状態のヘモグロビンにおいては、ガラス転移現象と熱変性ピークの分離が困難であったために、 ΔC_p の決定や、エンタルピー緩和量 ΔH の算出などの定量的検討を行う事が出来なかった。今後、熱変性前後におけるタンパク質のガラス転移現象に関するより詳細な情報を取得するためには、更に多種類のタンパク質を対象として測定を行っていく必要がある。また、今回はタンパク質の変性要因として加熱を用いたが、熱以外の原因、例えば圧力や有機溶媒などで変性過程を制御したタンパク質を利用する事で、変性とガラス転移の相関性を詳細に検討する事が可能となるかもしれない。更に、熱分析だけでなく、タンパク質の分子構造変化を直接的に測定できるような手法を併用することも必要となるだろう。

5-3 低水分カツオ肉のガラス状態に及ぼす加工条件の影響について

5-3-1 はじめに

前節におけるヘモグロビンを試料とした実験により、タンパク質のガラス転移現象には、熱変性に伴う構造変化が影響を及ぼしている事が示された。タンパク質の構造変化の様式は、加熱条件あるいは乾燥条件をはじめとした種々の加工条件の違いによっても左右される。そこで本節では、加熱変性時における条件の違い、そして乾燥方法の違いなどが、カツオ魚肉のガラス転移挙動に及ぼす影響を明らかにする事を目的として実験を行った。変性条件や乾燥条件の異なるいくつかの試料を作成し、DSCを用いてそれぞれのガラス転移温度を求め、同時にガラス転移温度の水分含量依存性についても検討を加えた。また、前章において、DSC測定から得られるエンタルピー緩和現象に関する情報が、低水分食品のガラス状態を知る上で有用である事が示された。そこで本章においても、加工条件の異なる各試料に対するエンタルピー緩和挙動の測定を行い、実験データのKWW式へのフィッティングを試みた。フィッティングから算出される緩和時間 τ の値を比較する事で、各試料のガラス状態の違い、すなわちガラス転移温度以下における分子運動性の比較を行った。加工条件の違いによって魚肉のガラス状態の安定性に明確な違いが見られるとするならば、本実験において得られる情報を利用して、より安定性の高いガラス状食品を作成するための最適加工条件を推測する事が可能となるだろう。

5-3-2 実験方法

5-3-2-1 試料準備

試料にはカツオ (*Bonito: Katsuwonus pelamis*) を用いた。カツオ魚肉はナイフを使って1センチメートル四方のブロック状に切り分けた後、加工条件の異なる次の4種類の試料を作成した。

- 1) 煮熟オープン乾燥カツオ (Boiled and Oven-dried Bonito: **BOB**) : 100°Cの沸騰水中でブロック状のカツオ魚肉を15分間加熱処理した後、80°Cに設定したオープン内で48時間加熱乾燥して作成した。
- 2) 煮熟凍結乾燥カツオ (Boiled and Freeze-dried Bonito: **BFB**) : 1)と同様に、100°Cの沸

騰水中で15分間加熱処理した後、第3章におけるタンパク質成分と同様の条件で凍結乾燥を行って作成した。

- 3) 未加熱凍結乾燥カツオ (Freeze-dried Bonito: **FB**) : あらかじめ加熱処理を施さず、そのまま凍結乾燥処理を加えて作成した。
- 4) 乾燥乾熱加工カツオ (Freeze-dried and Dry-heated Bonito : **FDB**) : 3) の凍結乾燥カツオ魚肉をDSC内で150℃まで加熱して、完全に熱変性させる事により作成した。

Fig.5-10 に、上記の試料調製方法をまとめた。いずれの試料も、乾燥後に乳鉢を用いて粉末状に加工し、使用するまで-30℃の冷凍庫内で保管した。

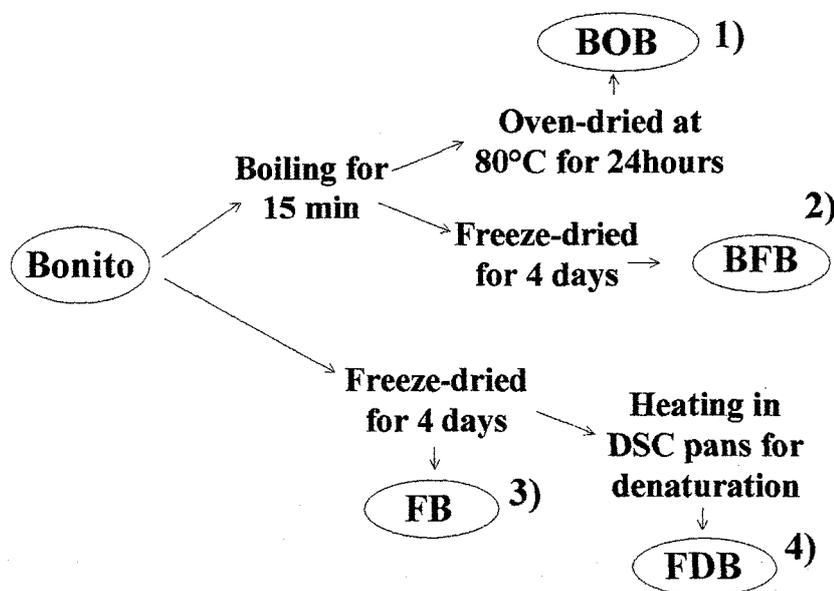


Fig.5-10 Procedures for sample preparation. BOB is boiled and oven-dried bonito. BFB is boiled and freeze-dried bonito. FB is only freeze-dried bonito and FDB is dry-heated at 5°C/min to 150°C in DSC pans for heat denaturation.

5-3-2-2 水分含量調整および水分含量測定

試料の水分含量調整および水分含量測定は、第1章に述べた方法に基づいて行った。

5-3-2-3 DSC 測定

試料の DSC 測定は、これまでと同様の条件で行った。

5-3-2-4 各試料におけるエンタルピー緩和挙動測定

加工条件の異なる各試料のエンタルピー緩和挙動を比較するにあたって、各試料の水分含量が等しくなるように調整した。BOB および BFB に関しては、飽和塩 LiCl (相対湿度：11.3%) を用い、FB (FDB) に関しては、飽和塩 LiBr (相対湿度：6.6%) を用いた。最終的に得られた水分含量は、いずれも 4% 前後であった。また、本実験では水分含量の変化がガラス状態の安定性に与える影響についても検討するため、BOB および BFB に関しては、飽和塩 MgCl₂ (相対湿度：33%) を用いて水分を約 8% に調整した試料に対しても実験を行った。各試料のガラス転移温度 (T_g) および熱容量変化 (ΔC_p) の決定、エンタルピー緩和過程の測定、そして得られた実験データの KWW 式へのフィッティングは、第4章で述べた方法に基づいて行った。

煮熟処理の有無、および加熱時における試料の状態の違いが与える影響について検討するため、BFB、FB、FDB、それぞれにおけるガラス転移挙動の比較を行った。次に乾燥条件の違いが与える影響について検討するため、BOB と BFB の比較を行った。更にここでは、モデル食品であるカツオ節のガラス転移挙動との比較も同時に行った。

5-3-3 実験結果

5-3-3-1 種々の条件で加工した低水分カツオのガラス転移温度比較

Fig.5-11 に各試料における典型的な DSC 測定結果を示す。カツオ節と同様の方法で加工した BOB (a) は、カツオ節とほとんど同じ DSC 曲線を示した。すなわち、1st run の曲線において、熱容量のベースラインシフトに重なるようにエンタルピー緩和現象に起因する吸熱ピークが見られた。再昇温測定すると、この緩和ピークは消失し、90°C 付近に非常に明確なガラス転移現象が検出された。3rd run の曲線においても同温度帯で熱容量シフトが見られる事から可逆性も明らかであった。次に BFB (b) の DSC 曲

線を見ると、BOB とほとんど同じ挙動が示された。次に、**FB** (c) における DSC 測定結果を見ると、1st run の曲線においては、55°C と 120°C 付近にそれぞれ吸熱ピークが観察された。この程度の水分含量では 55°C という低温域で熱変性が生じるとは考えにくい。低温側のピークはエンタルピー緩和に起因し、120°C 付近のピークが熱変性に起因すると考えられる。これは前節におけるヘモグロビンの DSC 測定結果と類似していた。この結果は、加熱前の乾燥カツオ肉中にガラス領域が存在する事を示唆している。しかしながら、緩和ピークのみを消去した後に再度昇温測定を行ってみたが、第3章におけるタンパク質成分の場合と同様に、やはり熱変性前における T_g 検出は困難であった。一方、DSC 内で熱変性した試料 **FDB** (c: 2nd run の曲線) においては非常に明確なガラス-ラバー転移が検出された。これは第3章で行った実験結果と一致していた。

次に、BOB、BFB、FDB、そして第2章の実験で求めたカツオ節のガラス転移温度の水分含量依存性を Fig.5-12 に示す。凍結乾燥処理したカツオ、すなわち **FB** に関しては、ガラス転移温度の検出が困難であったためプロットしていない。いずれの試料も同じく加熱・乾燥処理を加えられたカツオであるが、その製造プロセスの違いによって、ガラス転移温度の水分依存性挙動が異なっている事が明らかとなった。図中の点線は Eq.1-1 式へのベストフィッティングカーブである。乾燥前に同じく煮熟処理を加えている BOB と BFB の T_g はほぼ同じような水分含量依存性を示し、明らかな差は見られなかった。この結果は、オープン乾燥、凍結乾燥という乾燥方法の違いは、加工カツオ肉の T_g にさほど大きな影響を及ぼさない事を示している。一方、あらかじめ煮熟処理を加えず、DSC 内で変性させた FDB の T_g は、BOB、BFB に比べると明らかに低かった。この結果は、加熱変性時の条件の違いがカツオ肉の T_g に大きな影響を及ぼしている事を示している。更に、実験的に求めた BOB、BFB、FDB のガラス転移時の ΔC_p は、それぞれ、0.25、0.20、0.42J/g であり、FDB の値が特に低い傾向を示した。第1章で述べたように、 ΔC_p の大きさはその物質がガラス状態にある時の構造的自由度を反映している。従って、乾燥後に熱変性した魚肉のガラス状態は、あらかじめ煮熟した後乾燥した魚肉に比べると、構造的に不安定な状態にある事が示された。

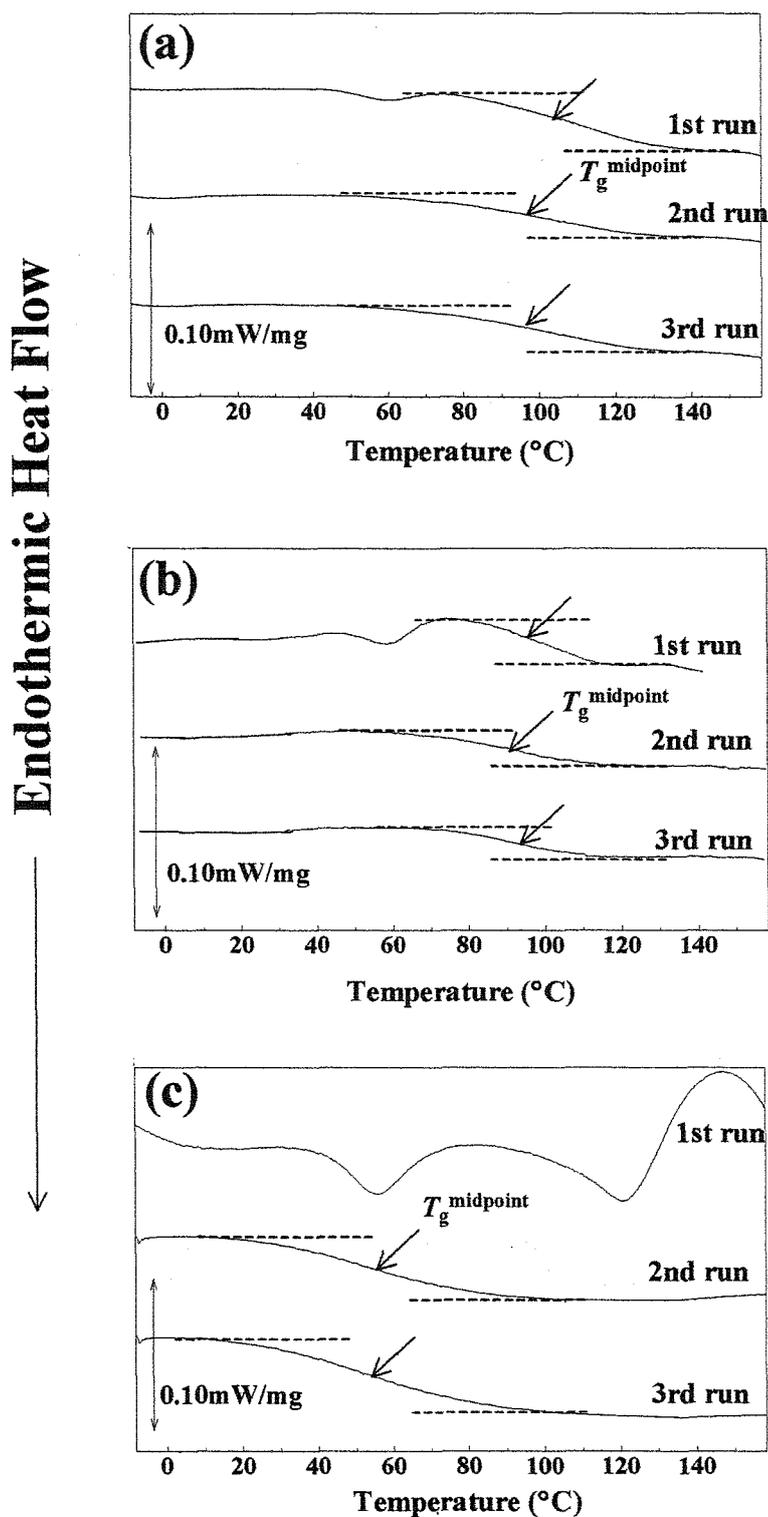


Fig.5-11 Typical DSC thermograms of processed bonito muscles: (a) boiled and oven-dried bonito with 4.0% moisture; (b) boiled and freeze-dried bonito with 4.3% moisture; and (c) freeze-dried bonito with 5.7% moisture. The second scanning curves of (c) means freeze-dried and dry-heated bonito.

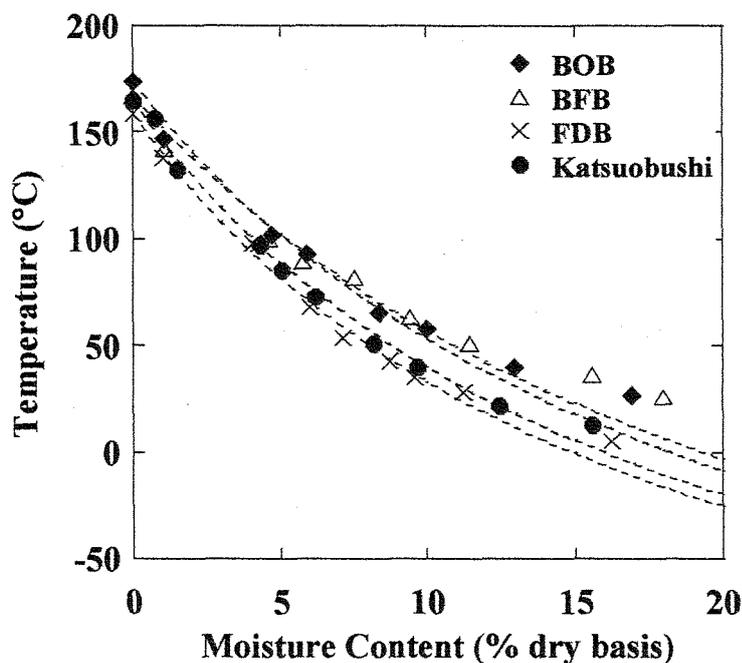


Fig.5-12 The effect of moisture content on T_g of several dried bonito meat processed by several processing conditions. The data of Katsuobushi obtained in chapter 2 experiments are also plotted. (BOB: boiled and oven-dried bonito BFB: boiled and freeze-dried bonito FDB: freeze-dried and dry-heated bonito)

5-3-3-2 種々の条件で加工した低水分カツオ魚肉のエンタルピー緩和挙動比較

次に、加工条件の異なる各試料に対するエンタルピー緩和過程の測定を行い、ガラス状態下での分子運動性の指標となるパラメータ、緩和時間 τ の値を比較する事によって、より詳細なガラス状態のキャラクタリゼーションを試みた。

Fig.5-13 に、40°Cで0-120時間エージング処理を施したBOB、BFB、FDBのDSC測定結果を示す。それぞれの試料において、ガラス転移を示す熱容量のベースラインシフトに重なるように、エンタルピー緩和を示す吸熱ピークが現れた。第4章のカツオ節における結果と同様に、各試料のエンタルピー緩和量 (ΔH) はエージング時間依存性を示した。異なるエージング温度 (20°C、60°C) においても、40°Cエージングの場合と同様に、 ΔH のエージング時間依存性が見られた。Fig.5-14 に、各試料のエンタ

ルピー緩和量 ΔH とエージング時間の関係を示す。いずれの試料においても、エージング時間およびエージング温度依存性が明らかであり、この傾向は第4章におけるカツオ節や他のアモルファス物質におけるものと一致していた。従って、乾燥カツオ魚肉に対しても KWW 式を用いたエンタルピー緩和過程の解析が可能であると判断した。

Fig.5-15 に、エージング時間に対する緩和関数 Φ の値を示す。図中の点線は KWW 式へのベストフィッティングカーブである。いずれの試料においても、フィッティングの相関係数が 0.99 以上であった事から、これら乾燥カツオ魚肉のエンタルピー緩和過程が KWW 式により良好に記述可能である事が明らかとなった。KWW 式へのフィッティングから算出されたフィッティングパラメータ τ および β の値を Table 5-1 にまとめた。ここでは β についての議論は行わず、 τ にのみ着目した。第3章におけるカツオ節の場合と同じく、ガラス転移温度とエージング温度差、 $T_g - T_a$ に対する τ の変化を Fig.5-16 に示す。各試料は明らかに異なる τ 値を示した。すなわち、低水分加工魚肉のガラス状態における安定性が、加工処理条件の違いに影響を受ける事が明らかとなった。乾燥方法の異なる BOB と BFB を比較すると、BOB の τ 値の方が若干高い傾向を示す事が明らかとなった。 T_g の水分含量依存性挙動は、BOB と BFB との間にほとんど差は見られなかったが、両者のエンタルピー緩和挙動を解析する事により、その違いを明らかにする事が出来た。BOB と BFB に関しては、水分含量が異なる試料に対しても検討を加えた。水分が 8% の試料においても、BOB の方が BFB よりも高い τ 値を示しており、4% 試料の傾向と変わらなかった。また、両試料において、水分含量が 4% 程度増加すると、 τ 値が著しく低下する事が明らかとなった。水分と τ の相関性については、すでにデンプンにおいても報告されている¹³⁾。一方、同程度の水分含量(4%)を有する試料の場合、最も低い τ 値を示したのが FDB であり、BOB および BFB はそれよりも若干高い値を示した。第4章でも述べたように、 τ の値が高い、すなわち緩和時間が長いほど分子運動性が低い、構造的に安定なガラスである事を意味している。従って本実験結果から、最もガラス状態下での安定性が低いのが FDB である事が明らかとなった。この傾向はこれまでの実験で得られた T_g や ΔC_p などのパラメータによって示されたものと一致していた。

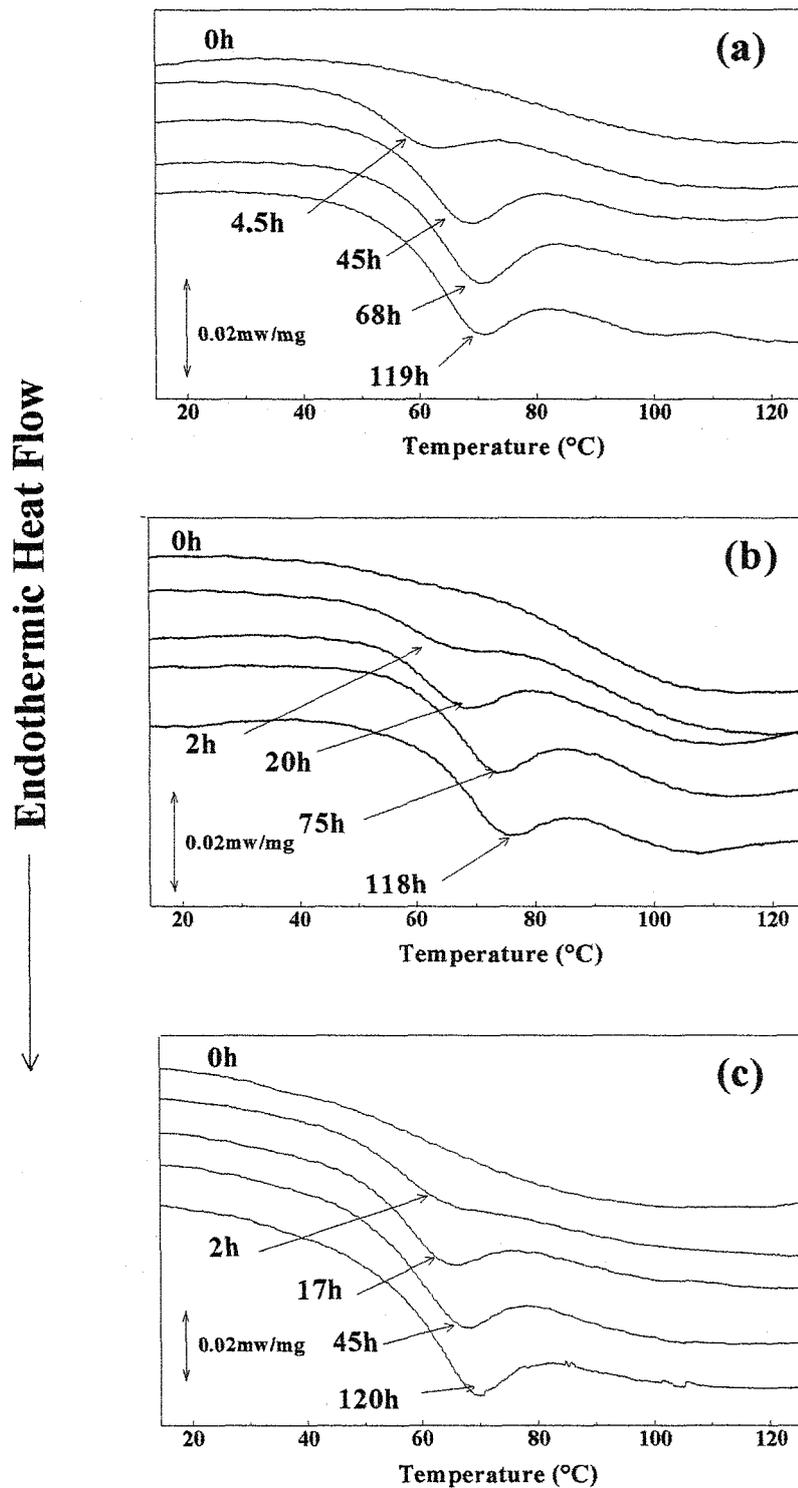


Fig.5-13 Typical DSC thermograms of processed bonito muscles aged at 40°C for several aging times: (a) boiled and oven-dried bonito with 8% moisture, (b) boiled and freeze-dried bonito with 8% moisture, (c) freeze-dried and dry-heated bonito with 4% moisture.

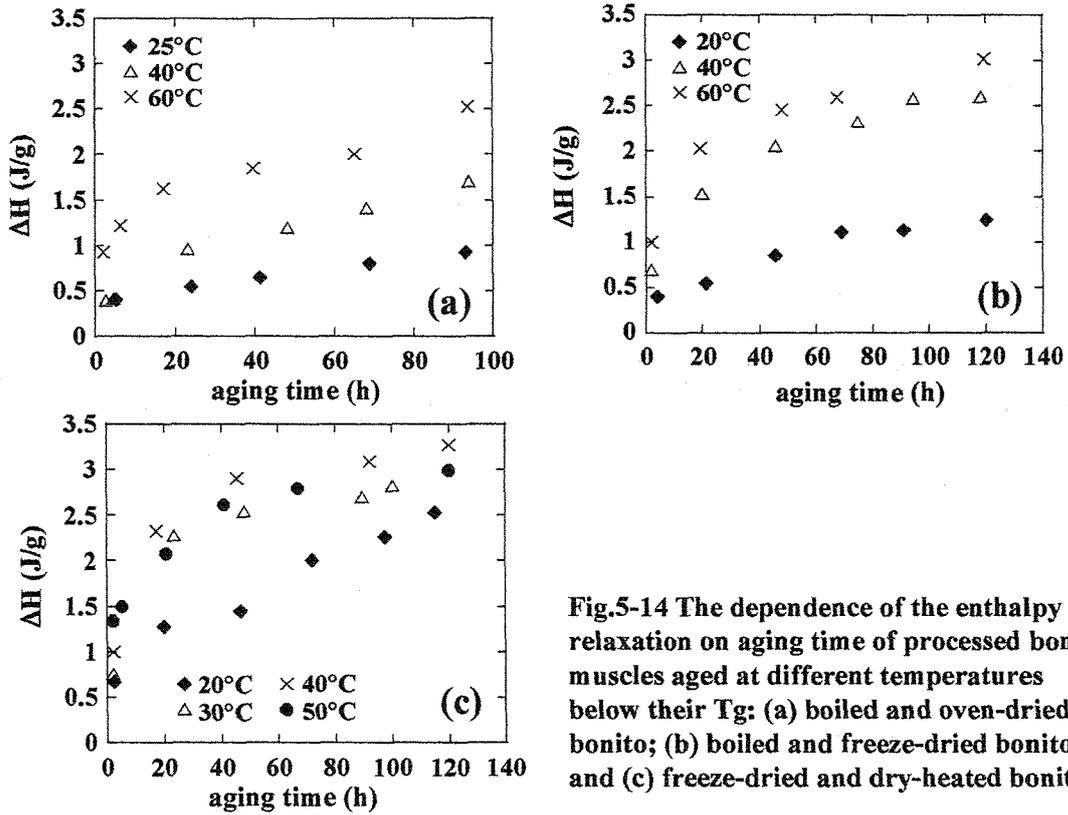


Fig.5-14 The dependence of the enthalpy relaxation on aging time of processed bonito muscles aged at different temperatures below their T_g : (a) boiled and oven-dried bonito; (b) boiled and freeze-dried bonito; and (c) freeze-dried and dry-heated bonito.

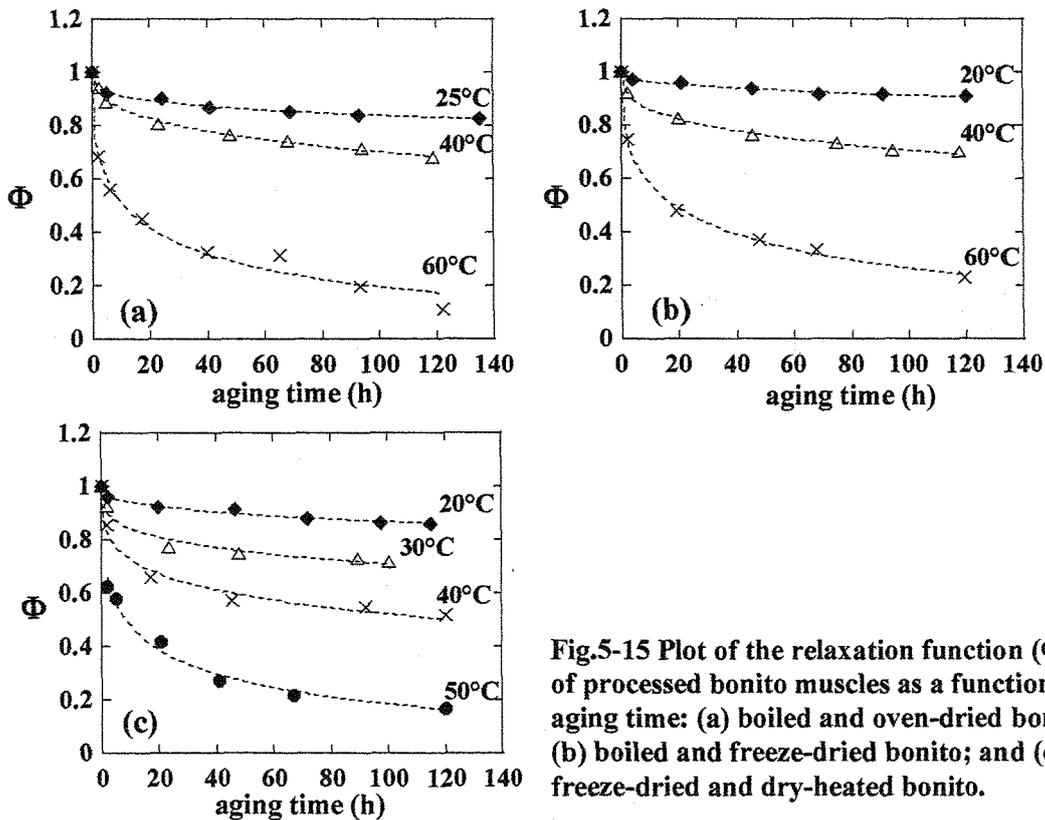


Fig.5-15 Plot of the relaxation function (Φ) of processed bonito muscles as a function of aging time: (a) boiled and oven-dried bonito; (b) boiled and freeze-dried bonito; and (c) freeze-dried and dry-heated bonito.

Table 5-1 The glass transition parameters, T_g and ΔC_p and the fitting parameters β and τ of the KWW equation for ΔH change in several bonito meat processed by several processing conditions.

Sample	T_a (°C)	β (-)	τ (h)	T_g (°C)	ΔC_p (J/g)
BOB (8%)	25	0.28	4.35×10^4	75.5	0.23
	40	0.39	1.46×10^3		
	60	0.38	0.28×10^2		
BOB (4%)	60	0.27	2.94×10^5	108.1	0.28
	70	0.34	5.19×10^4		
	80	0.40	4.42×10^3		
BFB (8%)	20	0.39	4.01×10^4	76.2	0.24
	40	0.36	1.45×10^3		
	60	0.38	0.24×10^2		
BFB (4%)	50	0.26	1.17×10^5	94.9	0.29
	60	0.23	3.05×10^4		
	70	0.34	1.91×10^3		
FDB (4%)	20	0.37	1.81×10^4	61.2	0.35
	30	0.30	3.40×10^3		
	40	0.31	4.02×10^2		
	50	0.36	0.23×10^2		

T_a : aging temperature, T_g : glass transition temperature, **BOB**: boiled and oven-dried bonito, **BFB**: boiled and freeze-dried bonito, **FDB**: freeze-dried and dry-heated bonito

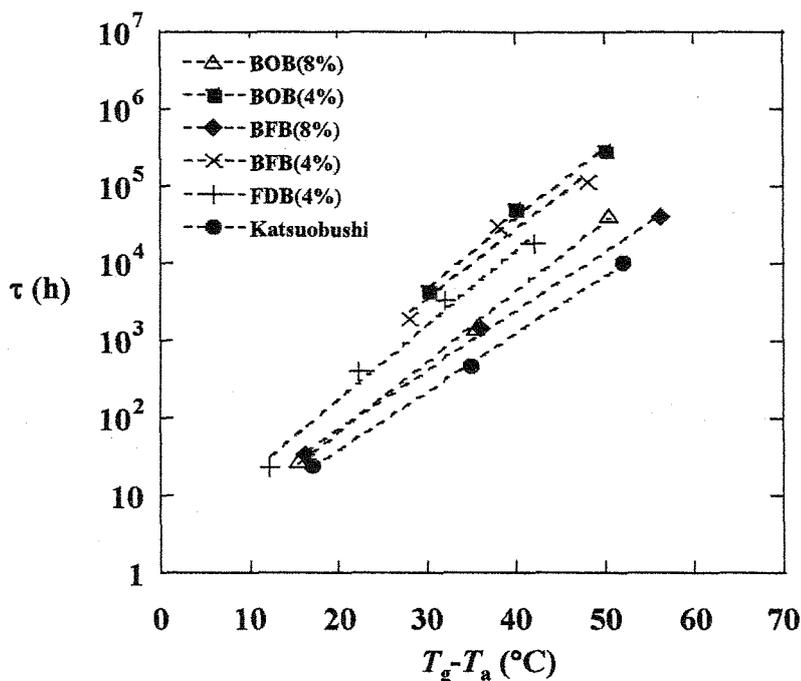


Fig.5-16 Semi logarithmic plot of mean relaxation time τ of several processed bonito as a function of scaled temperature $T_g - T_a$. T_g is the glass transition temperature and T_a is the aging temperature. The data of *Katsuobushi* with 6% moisture was also plotted.

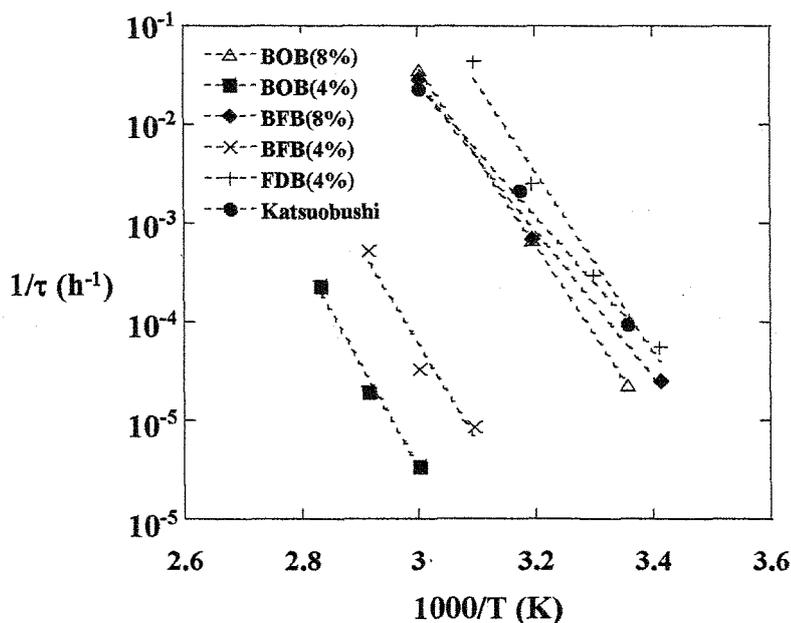


Fig.5-17 The Arrhenius plot of the molecular relaxation time of processed bonito muscles and *Katsuobushi* obtained by enthalpy relaxation measurement

Fig.5-17 は緩和速度 $1/\tau$ に対するエージング温度の影響を示すアレニウスプロットである。このプロットの傾きから求めた活性化エネルギーの値を Table5-2 にまとめる。いずれの試料も 150~200kJ/mol 程度の値を示した。水分4%の時の BOB、BFB、FDB の値を比較すると、BOB>BFB>FDB という傾向を示した。水分が8%の時も、BOB>BFB という傾向は変わらなかった。また、BOB と BFB 両方の試料において、水分8%の試料よりも水分4%の試料の方が若干高い値を示す傾向が見られた。一方、第4章で算出されたカツオ節の活性化エネルギーの値は 129kJ/mol であり、これは他の試料よりも明らかに低い値であった。以上の傾向は、各試料の緩和時間 τ において見られた傾向と良く一致していた。

Table 5-2 The apparent activation energy (E_a) of several processed bonito

Sample	BOB(8%)	BOB(4%)	BFB(8%)	BFB(4%)	FDB(4%)
E_a (kJ/mol)	173	204	142	189	175

5-3-4 考察

まず乾燥方法の異なる BOB と BFB を比較すると、 T_g 値はほぼ BOB=BFB という傾向を示したのに対して、緩和時間 τ は BOB>BFB という傾向を示す事が明らかとなった。この結果は、大体同じようなガラス転移温度を有する試料であっても、オープン乾燥した試料の方が、凍結乾燥試料よりもガラス状態下での安定性が高い事を意味している。 T_g 値が同じであっても、 T_g 以下での構造的安定性が異なる事は興味深い。つまり、ガラス状食品のキャラクタリゼーションには、 T_g 比較に加えて緩和時間の比較を行う事で、より詳細な情報を得る事が出来る事が明らかとなった。また、BOB、BFB ともに、水分が多くなると緩和時間が短くなる傾向を示した。この事から、ガラス状態下の分子運動性が水分含量によってもまた、大きく左右される事が明らかとなった。 τ が BOB>BFB という傾向を示したのは、オープン中で熱を加えながら試料を乾燥させた場合、水分の減少に伴って試料の収縮が起こり、結果としてタンパク質分子間の距離が縮まり、密で安定な構造が形成されたことに起因するのであろう。ただ、乾燥方法の違いによる影響はさほど顕著ではなかった。

一方、 T_g 、 ΔC_p 、 τ などのガラス転移パラメータは、いずれも加熱条件の違いによ

って、明らかに異なる値を示した。あらかじめ煮熟処理した BOB と BFB に比べると、DSC 内で加熱した FDB の T_g は明らかに低く、 τ も明らかに短かった。これらの傾向は、本実験で調製した試料中で、FDB のガラス状態が最も不安定で緩和しやすい事を示している。BOB・BFB と FDB の主な違いは、各試料が加熱処理を受けた際の水分含量の違いにある。BOB と BFB の加熱時の水分含量は約 80% であり、魚肉タンパク質は高水分状態で熱変性している。一方、FDB の加熱時の水分含量は 15% 以下であり、魚肉タンパク質はほとんど自由水の存在しない乾燥状態で熱変性している。このような変性時における試料水分含量の違いが、魚肉タンパク質の変性様式に影響を及ぼし、結果として各試料のガラス状態に差が生じた可能性がある。

タンパク質の熱変性に関する研究は数多く報告されているが、そのほとんどが水溶液系におけるものであり、低水分状態下での加熱変性に関する研究例は非常に少ない。これまでに、卵白タンパク質を試料とした研究例が数件報告されているのみである¹⁴⁻¹⁸⁾。卵白を自由水存在下で加熱すると、変性に伴って種々の結合、主に疎水的相互作用が形成され、凝固・ゲル化して、不溶化する事は良く知られているが¹⁹⁾、その一方で、乾燥状態で加熱変性させた卵白の場合、変性後であっても溶解性を失わない事が報告されている¹⁷⁾。この結果は、多量の自由水存在下で熱変性した場合と、乾燥状態で熱変性した場合では、変性後のタンパク質の性質が異なる事を示している。変性後にも関わらず、タンパク質の溶解性が低下していないという事は、すなわち溶解性低下に関わる結合であり、卵白ゲルの主体である疎水的相互作用が、低水分状態では形成されにくいためである可能性がある。一方で、卵白の凝固・ゲル化に関与している結合の一つである S-S 結合は、乾燥状態で変性した場合でも形成される事が確認されている¹⁴⁾。

水分含量の違いによるタンパク質の変性様式の違いについて、次のようなモデルを考えた (Fig.5-18)。未変性状態のタンパク質は、高分子鎖が折りたたまれて、比較的コンパクトな状態を取っている (a)。その状態にあるタンパク質が加熱によって変性すると、高次構造を安定化させていた種々の結合が切断されて unfolding し、タンパク質セグメントの分子運動性が高くなる (b)。変性時にタンパク質の周囲に過剰の自由水が存在すれば、unfolding によって表面に露出してきた疎水基同士の相互作用でタンパク質は熱凝固し、その結果セグメントの分子運動性が低下する (c)。一方、変性時

に周囲に自由水が存在しない場合、疎水的相互作用の形成は妨げられて、**unfolding** したタンパク質は熱凝固したタンパク質に比べると高い運動性を保ったままとなる (**d**)。

卵白タンパク質と同様に、魚肉タンパク質の加熱に伴う凝固・ゲル化にも疎水的相互作用や水素結合などの水の存在状態に影響を受ける結合が深く関与している²⁰⁾。したがって、上記の仮説に従えば、あらかじめ煮熟処理した魚肉の方が、凍結乾燥後にDSC内で熱変性させた魚肉よりも高いガラス状態の安定性を示したのは、煮熟処理中に生じた熱凝固、すなわち分子間結合の形成により構造が安定化されたためではないだろうか。新たな架橋形成による系の構造安定化が T_g の上昇をもたらすという結果は、合成高分子においても一般的に見られる現象である²¹⁾。タンパク質の場合も、トランスグルタミナーゼなどで酵素処理して、分子間に新たな共有結合を形成させると、 T_g が上昇する事が報告されている²²⁾。また、高温処理して多量化したグルテンは、Nativeグルテンよりも T_g が上昇し、 ΔC_p が低下するという報告もある²³⁾。熱変性に伴う疎水的相互作用や水素結合などの非共有結合の形成が、タンパク質の T_g に及ぼす影響についての研究例はこれまでに報告されていなかったが、本実験結果は、両者に相関性がある可能性を示した。加熱時の水分含量の違いが試料のガラス転移温度およびそのガラス状態の安定性に強く影響を及ぼすという本実験結果は、今後低水分加工食品のガラス転移現象に関する研究を進めていく上で重要な情報となるだろう。

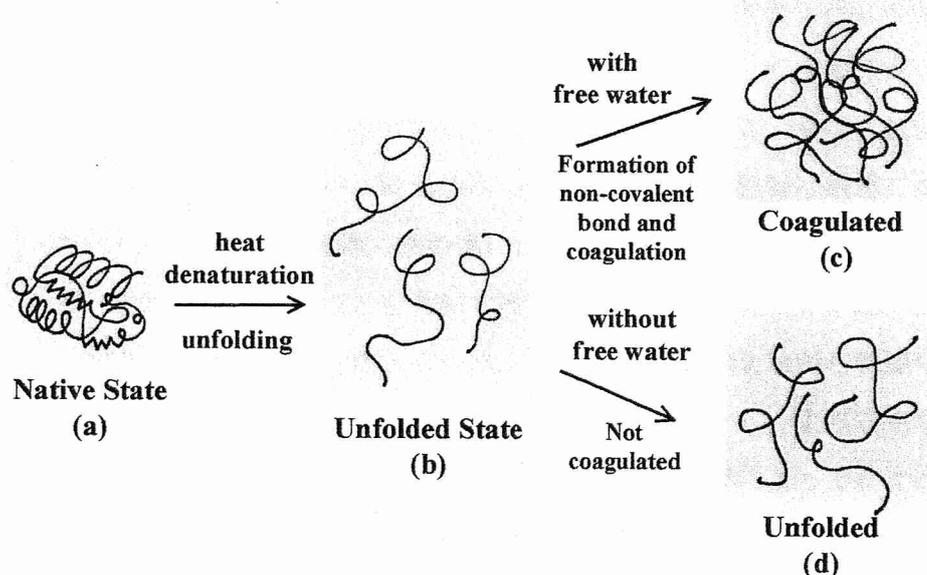


Fig.5-18 The schematic presentation of denaturation process of protein, with or without free water. In the absence of free water, protein cannot coagulate.

Fig.5-12 と Fig.5-16 には、カツオ節の T_g および τ も同時にプロットしてある。BOB はカツオ節と同様に、煮熟および乾熱乾燥処理を加えたものであるが、製造工程の類似性にも関わらず両者のガラス転移パラメータは大きく異なっていた。BOB に比べると、カツオ節の T_g および τ の値は明らかに低く、カツオ節のガラス状態の方が、不安定で緩和しやすい事を示している。BOB とカツオ節の主な違いは、両者の加熱処理工程に要する時間の長さにある。本実験で用いた BOB の試料は、加熱乾燥工程が約 48 時間と比較的短い。しかしながらカツオ節の場合、まず煮熟工程が 70~90 分、そして焙乾工程に至っては、3 週間近くを要する。焙乾工程では、カツオを 1 日 5~6 時間焙乾して火から下ろし、夜間に放置して冷却するという作業が繰り返して行われる²⁴⁾。BOB は短時間で一気に水分が除去されるのに対して、カツオ節は長い時間をかけて、段階的に水分を除去される。つまり、カツオ節は長期間、品質変化を起こしやすいラバーな状態で保持されていると考える事が出来る。その結果、焙乾工程中にカツオ肉中のタンパク質が状態変化し、最終的に完成したカツオ節のガラス状態が低い安定性を示すようになったのではないだろうか。熱処理時間がタンパク質のガラス状態に及ぼす影響については、次節で詳細を述べる。

5-3-4 結論

T_g の水分含量依存性挙動、そして緩和時間 τ の比較を行った結果、煮熟工程、乾燥工程、いずれの工程においても、加工条件の違いが魚肉のガラス状態に影響を及ぼす事が明らかとなった。本実験で行った結果によると、あらかじめ多量の自由水存在下で加熱処理し、その後オープン中で加熱乾燥した魚肉が最も高いガラス状態の安定性を示す事が明らかとなった。特に乾燥前における煮熟処理の影響は顕著であった。凍結乾燥、オープン乾燥という乾燥方法の違いによる影響はさほど明確ではなかったが、エンタルピー緩和過程の違いなどを考察すると、オープン乾燥の方がより安定なガラス状態の形成を促す事が示された。これはおそらく、熱を加えながら乾燥する事によって、分子間距離の低下に伴いタンパク質構造が緻密に集合し、より安定な構造を呈するようになるためであろう。以上の実験結果は、煮熟処理によってタンパク質の結合形成を促し、その後加熱乾燥処理を加える事が、安定性の高いガラス状態を有する魚肉加工食品を得るための有効な手段である事を示している。

5-4 タンパク質のガラス状態に及ぼす熱処理時間の影響について

5-4-1 はじめに

5-3 で行った実験により、カツオ節の T_g および緩和時間 τ が、実験用に調製した煮熟乾燥カツオ (BOB) に比べると明らかに低い値を示す事が明らかとなった。両者の加工方法は手順としては同一であるが、カツオ節は BOB に比べると、熱処理に要する時間が非常に長い。つまり、カツオ節に加えられる熱処理時間の長さが、カツオ節のガラス状態における低い安定性と関連している可能性がある。魚肉加工食品のように、タンパク質を主成分とする食品のガラス転移現象において、製造工程中に加えられる熱処理時間の違いが、そのガラス状態に及ぼす影響を知る事は重要である。しかしながら、加熱処理時間とガラス転移現象の関連性を詳細に検討した例はこれまでに報告されていない。そこで本節では、タンパク質を高温で処理した場合の処理時間の違いが、そのガラス状態に及ぼす影響について検討を加えた。魚肉のような複雑な成分組成を有する多成分系で実験を行うと、試料の個体差や成分組成の複雑さの影響などから、安定なデータの取得が困難であった。そこで今回は、5-1 と同様に代表的なタンパク質であるヘモグロビンを試料として用い、タンパク質における一般的挙動の把握を試みた。

5-4-2 実験方法

5-4-2-1 試料準備

試料には、前節と同じく、牛血液製のヘモグロビンを用いた。乳鉢ですり潰して細かい粉末状にした後、相対湿度 58% の飽和塩 NaBr 下で水分調整を行った。最終的に平衡に達したヘモグロビンの水分含量は、約 15% であった。

5-4-2-2 DSC 測定

水分調整を終えた粉末状のヘモグロビンを DSC セルに詰め、一度 DSC 内で 150°C まで加熱して完全に熱変性させた。その後液体窒素を用いて -5°C/min で -50°C まで冷却した後、再度 5°C/min で 150°C まで昇温測定を行い、ガラス転移温度を求めた。同試料を、DSC のセルに入れたままオープン内で保存した。本実験では加熱による影響をより明

確なものとするため、処理温度に 110°C という比較的高い温度を用いる事にした。熱処理済み試料を一定時間ごとにオープンから取り出して上記と同条件で DSC 測定を行い、ガラス転移温度および ΔC_p の検出を行い、処理時間による変化を観察した。

5-4-2-3 熱処理試料におけるエンタルピー緩和過程の KWW 式による記述

これまでと同様に、熱処理時間の異なる試料のエンタルピー緩和測定を行い、その挙動の処理時間依存性を検討した。試料には、DSC セル内で熱変性後、110°C のオープン内で 20 日間熱処理したものをを用いた。未処理試料および処理試料を、25°C の恒温槽内で 0-148h エージングした。DSC 測定、KWW 式へのフィッティングは前節で述べた方法に基づいて行った。

5-4-3 結果と考察

Fig.5-19 に、熱処理時間の異なるヘモグロビンの DSC 測定結果を示す。熱処理時間が長くなると、ガラス転移を示す熱容量変化が低温度領域へシフトする傾向が見られ、ガラス転移現象の熱処理時間依存性が示された。Fig.5-20 に、熱処理時間に対するヘモグロビンのガラス転移温度、および ΔC_p の変化を示す。処理時間の増加に伴い、 T_g は低下し、 ΔC_p は増加する傾向が見られた。未処理試料と比べると、熱処理わずか 1 週間程度で 10°C 近くも T_g が低下する事が分かる。Table5-3 に、熱処理時間の異なるヘモグロビンの T_g (T_g^{onset} 、 T_g^{midpoint} 、 T_g^{endpoint}) と、ガラス転移温度範囲 ΔT 、そして ΔC_p をまとめた。 T_g^{onset} の値が、熱処理時間の増加とともに低下する事が分かる。その一方で、 T_g^{endpoint} の値は、 T_g^{onset} よりも変化が少なかった。つまり、熱処理時間とともに、ガラス転移温度範囲が広くなる傾向が見られた。これは熱処理によってタンパク質の部分的な分解が生じ、系の分子量分布に幅が生じたためと推察する事が出来る。というのも、一般に、高分子物質の T_g は分子量依存性を有しており、分子量が大きくなるほど T_g は高くなり、逆に T_g が小さくなれば T_g は低下するという傾向があるからである。実際、グルテンなどのタンパク質においても、結合形成による系の平均分子量増加が T_g の上昇をもたらす事、更には高温処理による熱分解がグルテンの T_g 低下を引き起こすという事も報告されている²³⁾。つまり、本実験において処理時間に伴ってガラス転移温度幅が広くなる傾向が見られたのは、高温処理による分解で試料の一部が低分子化し、

その部分の T_g が低下した事に起因すると考える事が出来る。

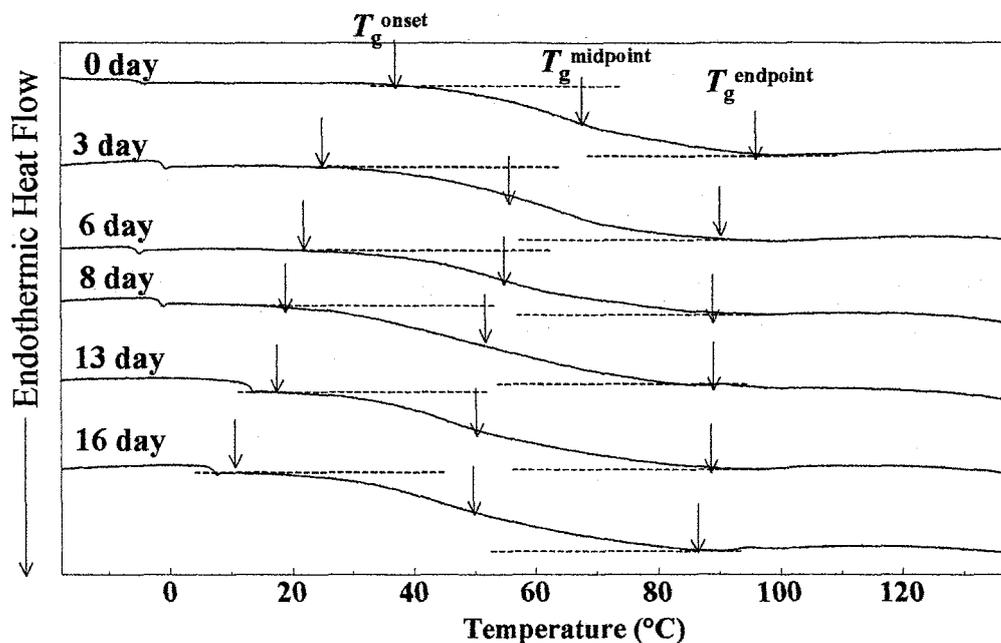


Fig.5-19 DSC thermograms of denatured hemoglobin aged at 110°C in a drying oven for several times. The glass transition temperature of hemoglobin decreased with degradation proceeded.

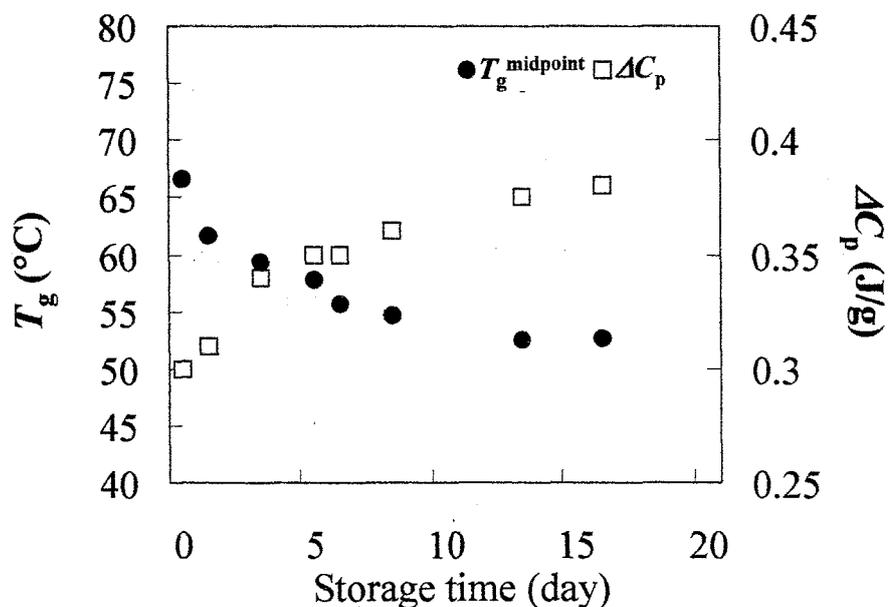


Fig.5-20 The change in midpoint T_g values and ΔC_p of denatured hemoglobin stored at 110°C as a function of storage time. Each glass transition parameter showed storage time dependence.

Table 5-3 The glass transition temperatures and ΔC_p values of denatured hemoglobin aged at 110°C for several times. The moisture content of the sample was about 15%.

Time (day)	The glass transition temperatures (°C)				ΔC_p (J/g)
	T_g^{onset}	T_g^{midpoint}	T_g^{endpoint}	ΔT_g ($T_g^{\text{end}} - T_g^{\text{onset}}$)	
0	39.9	66.6	93.3	53.4	0.30
1	33.5	61.7	91.3	57.8	0.31
3	32.8	59.3	89.5	56.7	0.34
6	26.8	56.7	88.1	61.3	0.35
8	24.2	54.6	86.9	62.7	0.36
13	22.7	52.5	86.2	63.5	0.36
16	20.2	51.6	85.8	65.6	0.38

次に、Fig.5-21 に、25°Cで一定時間エージングした未処理試料および熱処理試料のDSC測定結果を示す。両試料とも、エージング時間の増加に伴い、緩和ピーク面積の増大が見られた。ピーク面積から算出される緩和量 ΔH の値を、エージング時間に対してプロットしたのがFig.5-22である。熱処理試料の方が、明らかに緩和量が多い事が分かる。これまでと同様に、 ΔH の値を用いて、KWW式へのフィッティングを行った。Fig.5-23に緩和関数 Φ とエージング時間の関係を示す。両試料の挙動は明らかに異なっていた。エンタルピー緩和過程のKWW式へのフィッティングから算出された緩和時間 τ の値は、未処理試料が 8.85×10^3 であり、熱処理試料が 1.11×10^2 であった (Table 5-4)。水分含量が等しいにも関わらず、同じ温度でエージングした場合、未処理試料と比べると、熱処理済み試料の方が著しく緩和時間が短かった。これは熱処理したヘモグロビンの方が、不安定で緩和しやすい事を示唆している。また、緩和時間分布を示す β 値は、熱処理済み試料の方が高かった。既往の研究によれば、高分子量物質よりも低分子量物質の方が高い β 値を示すのが一般的とされている²⁵⁾。つまり、この験結果は、熱処理によってタンパク質に分解が生じ、分子量が低下した事を示している。

以上の結果から、高温熱処理によってタンパク質のガラス状態の安定性が大きく変

化する事が明らかとなった。熱処理時間の増加に伴い、 T_g の低下と ΔC_p の増加が見られ、更には、25°Cで長時間エージングした試料の示す緩和速度($1/\tau$)が、未処理試料に比べて約80倍も速い事から、熱処理がタンパク質のガラス状態の安定性を低下させる事が明らかとなった。この結果は、熱処理によってタンパク質が分解して低分子化した事により、タンパク質分子鎖の運動性が高まった事に起因していると考察できる。

熱分解によるタンパク質の低分子化と緩和現象の関連性に関する研究例はこれまでに全く報告されていない。しかし本実験により、熱処理に伴うタンパク質の構造変化、おそらくは低分子化により、そのガラス状態の安定性が大きく低下する事が明らかとなった。

5-4-4 結論

以上の結果から、高温での熱処理がタンパク質のガラス状態に影響を及ぼし、 T_g の低下、 ΔC_p の増加、そして緩和時間 τ の短縮をもたらす事が明らかとなった。これはタンパク質が高温での加熱処理によって分解されて低分子化し、結果として構造が不安定化したためと考察できる。5-2における魚肉を試料として用いた実験では、加熱に伴うタンパク質分子間の結合形成が T_g の上昇、 τ 増加の要因となる可能性について述べた。一方、本節での実験により、過剰な熱処理は T_g 低下と τ 短縮という、全く逆の現象を引き起こす事が明らかとなった。

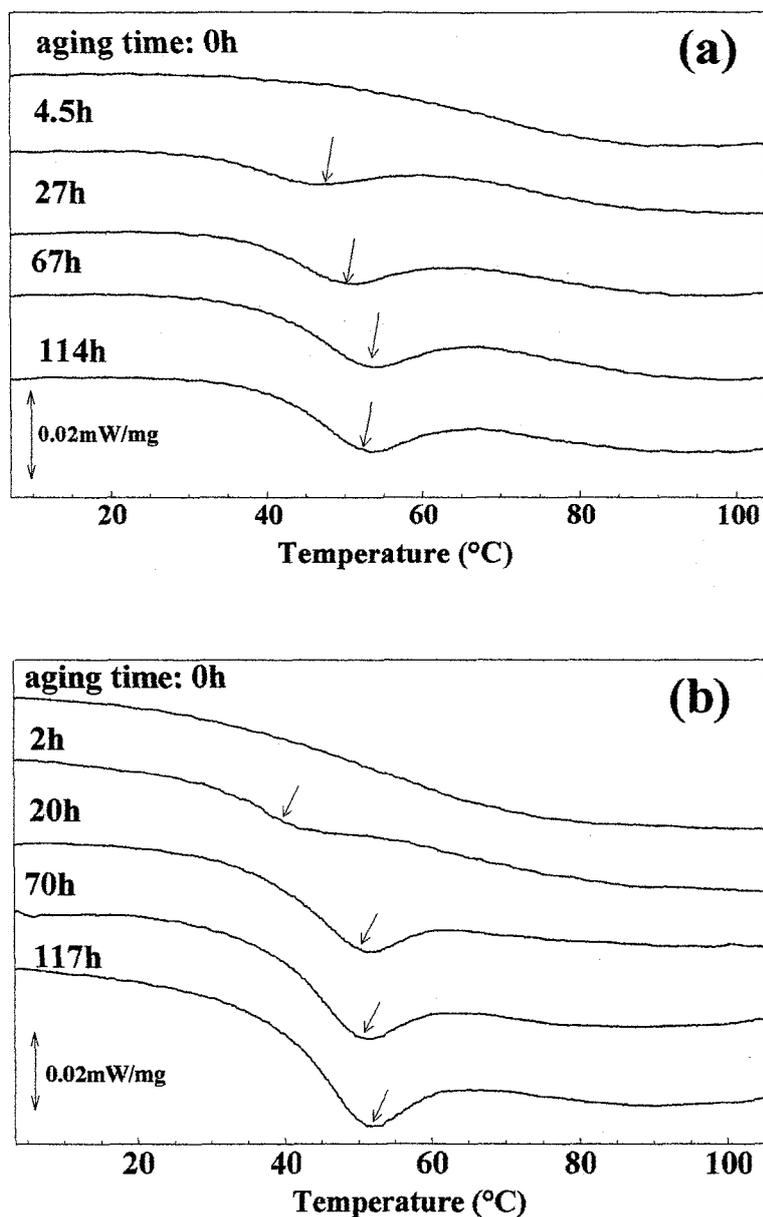


Fig.5-21 Typical DSC thermograms of non-treated and heat-treated hemoglobin powder with the same moisture content, 15% aged at 25°C for several aging time: (a) non-treated hemoglobin; and (b) heat-treated hemoglobin. Heat-treated sample was heated in a drying oven at 110°C for 10 days for degradation.

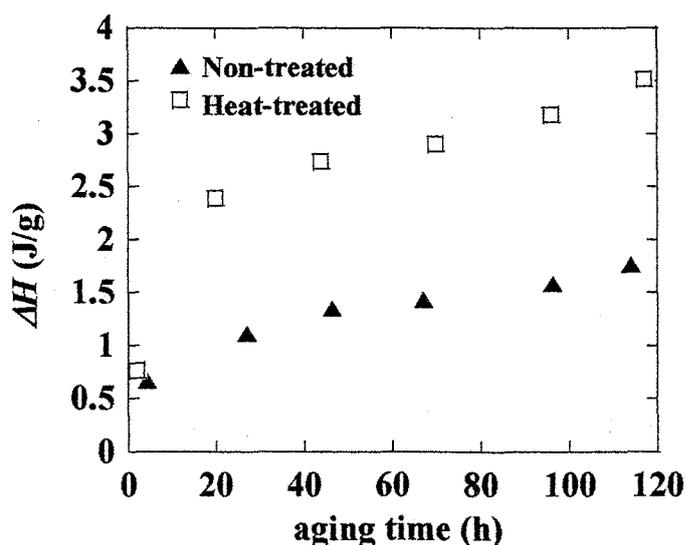


Fig.5-22 The dependence of enthalpy relaxation on aging time of non-treated and heat-treated hemoglobin powders heated in drying oven at 110°C for 10days with the same moisture content (15% dry basis).

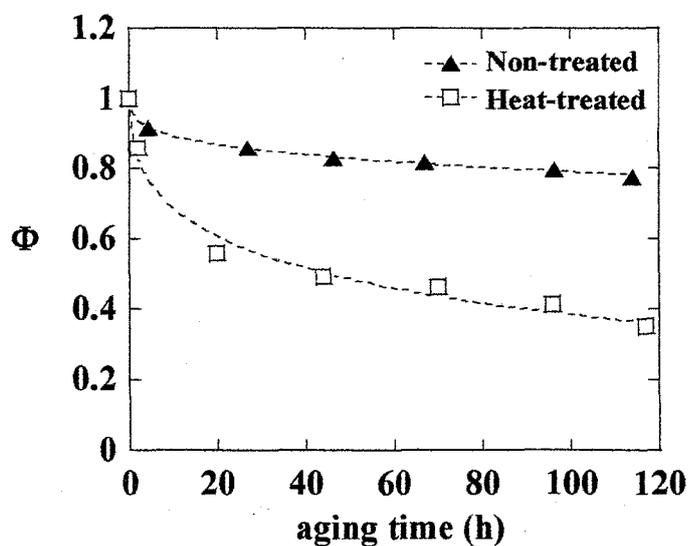


Fig.5-23 Plot of relaxation function (Φ) of non-treated and heat-treated hemoglobin powders as a function of aging time. Dotted lines are best-fitting curves to the KWW equation.

Table 5-4 The glass transition parameters, T_g and ΔC_p and the KWW fitting parameters, τ and β of non-treated and heat-treated hemoglobin powder with 15% moisture aged at 25°C.

Sample	T_g (°C)	ΔC_p (J/g)	τ (h)	β (-)
Non-treated	66.3	0.19	8.85E+03	0.32
Heat-treated	50.4	0.35	0.11E+03	0.41

5-5 第5章まとめ

本章での実験により、熱変性前のヘモグロビンにおいてもガラス転移現象が見られる事、更にはそのガラス転移挙動が、熱変性前後で異なる事が明らかとなった。ヘモグロビンのような球状タンパク質が示した結果を、本研究の対象としている魚肉およびその筋肉タンパク質のような複雑な系に対して単純に適用する事は出来ないが、筋肉タンパク質においても、同様の現象が見られる可能性は十分に考えられる。つまり、第3章の実験で熱変性前試料に明確なガラス転移現象が検出出来なかったのは、それが存在しないためではなく、見えにくかったためと考えるべきであろう。

更に、魚肉を試料として、加工方法の違いがそのガラス転移挙動に及ぼす影響について検討した結果、乾燥工程よりはむしろ、加熱工程における処理条件の違いが及ぼす影響の方が顕著である事が明らかとなった。これは加熱時の処理条件の違いによって、熱変性時の構造変化の様式が異なる事に起因すると推察した。更にもう一つ興味深い結果として、実験用に調製した加工カツオ肉に比べると、カツオ節の方が明らかに不安定で緩和しやすい状態にある事が示された。ヘモグロビンの場合、高温での熱処理によって、 T_g 低下、 ΔC_p 増加、そして緩和時間の短縮が引き起こされる事が明らかとなった。これは高温処理によってタンパク質が熱分解して低分子化した事に起因するとみなせる。本実験で用いたヘモグロビンの処理条件は、実際のカツオ節の製造条件と対応していないので比較は出来ないが、タンパク質の分解とガラス状態の不安定化の関係を考慮すると、カツオ節ガラス状態の低い安定性も、長期に渡る加熱処理工程中に進行した、魚肉タンパク質の部分的分解（熟成）と関連していると推察できる。

以上の結果は、いずれも熱変性に伴うタンパク質の構造変化とガラス状態が密接に関わっている事を示している。従って、魚肉加工品のようなタンパク質食品の T_g や T_g 以下での安定性を、より実用的な観点から制御していくためには、加熱処理条件をより詳細に設定した上で、検討を加えていく必要がある。

第5章 参考文献

- 1) Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D / 共著、北畠典子 / 訳、「食品タンパク質ハンドブック」、1988: p.201
- 2) Blake NC, Fennema OR. The glass transition values of muscle tissue. *J. Food Sci.* 1999; **64**: 10-15.
- 3) Rasmussen D, Luyet B. Complementary study of some nonequilibrium phase transitions frozen solutions of glycerol, ethylene glycol, glucose and sucrose. *Biodynamica* 1969; **10**: 319-331.
- 4) Simatos D, Faure M, Bonjour E, Cauach M. Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry in the study of water in foods. In: Duckworth (ed.), *Water Relations of Foods*. Academic Press, London, U. K. 1975, p.193-209.
- 5) Roos Y, Karel M. Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 1991; **26**: 553-566.
- 6) Sochava IV, Smirnova OI. Heat capacity of hydrated and dehydrated globular proteins. Denaturation increment of heat capacity. *Food Hydrocolloids* 1993; **6**: 513-524.
- 7) Chung HJ, Lee EJ, Lim ST. Comparison in glass transition and enthalpy relaxation between native and gelatinized rice starches. *Carbohydr. Polym.* 2002; **48**: 287-298.
- 8) Slade L, Levine H. Collagen as a Food. An AVI Book, 1987, pp.251-266.
- 9) Roos Y. *Phase Transition in Foods*, San diego: Academic Press Inc. 1995
- 10) Zelenznak KJ, Hosney RC. The glass transition in starch. *Cereal. Chem.* 1987; **64**: 121-124.
- 11) ten Brinke G, Karasz FE, Ellis TS. Depression of glass transition temperature of polymer networks by diluents. *Macromol.* 1983; **16**: 244-249.
- 12) Hayashi Y, Miura N, Shinyashiki N, Yagihara S, Mashimo M. Globule-coil transition of denatured globular protein investigated by a microwave dielectric technique. *Biopolymer* 2000; **54**: 388-397.
- 13) Chung HJ, Lim ST. Physical aging of glassy normal and waxy rice starches: effect

- of aging time on glass transition and enthalpy relaxation. *Food Hydrocolloid*. 2003; **17**: 855-861.
- 14) Kato A, Ibrahim HR, Watanabe H, Honma K, Kobayashi K. New approach to improve the gelling and surface functional properties of dried egg white by heating in dry state. *J. Agric. Food Chem.* 1989; **37**: 433-437.
- 15) Kato A, Ibrahim HR, Watanabe H, Honma K, Kobayashi K. Structural and gelling properties of dry-heating egg white proteins. *J. Agric. Food Chem.* 1990; **38**: 32-37.
- 16) Kato A, Ibrahim HR, Takagi T, Kobayashi K. Excellent gelation of egg white preheated in the dry state is due to the decreasing degree of aggregation. *J. Agric. Food Chem.* 1990; **38**: 1868-1872.
- 17) Xu JQ, Shimoyamada M, Watanabe K. Heat aggregation of dry-heated egg white and its inhibiting effect on heat coagulation of fresh egg white. *J. Agric. Food Chem.* 1998; **46**: 3027-3032.
- 18) Ogawa N, Mineki M, Nakamura Y, Shimoyamada M, Watanabe K. Rheological and microstructural characteristics of heat-induced gels of egg white proteins and ovalbumin dry-heated at 120 °C. *J. Cookery Sci. Jpn.* 2003; **36**: 210-218.
- 19) 並木 満夫、松下 雪郎／編、食品の品質と成分間反応、(株) 講談社、1990.
- 20) 岡田稔、衣巻豊輔、横関源延／編、「魚肉ねり製品」、恒星社厚生閣、1981
- 21) Brinke GT, Karasz FE, Ellis TS. Depression of glass transition temperatures of polymer networks diluents. *Macromol.* 1983; **16**: 244-249.
- 22) Mizuno A, Mitsuki M, Motoki M. Glass transition temperature of casein as affected by transglutaminase. *J. Food Sci.* 1999; **64**: 796-799.
- 23) Sartor G, Johari GP. Polymerization of a vegetable protein, wheat gluten, and the glass-softening transition of its dry and reacted state. *J. Phys. Chem.* 1996; **100**: 19692-19701.
- 24) 藤井建夫／著、「塩辛・くさや・カツオ節」、恒星社厚生閣、1992、p.99.
- 25) Le Meste M, Champion D, Roudaut G, Blond G, Simatos D. Glass transition and food technology: a critical appraisal. *J. Food. Sci.* 2002; **67**: 2444-2458.

第6章 総括

多様性に富む魚肉加工食品の品質は、微生物学的安定性、テクスチャー、味、香り、色などといった種々の性質を多角的に検討し、その結果を総合した上で判断される。従来、これら物理化学的性質を制御するための有効な指標として、水分活性を用いるのが一般的とされてきた。水分活性は食品中の水の存在状態を配慮した、平衡論に基づく概念である。しかしながら、多くの食品は本質的に非平衡状態にあると考えるべきであり、製造中、あるいは貯蔵中に生じる食品の物性変化を系統的に把握し、理解するためには、まずその食品の状態を非平衡状態とみなした上で、分子運動性という観点から論じていく必要がある。そしてそのための手段として有効であると考えられるのが、「ガラス転移概念」の利用である。ガラス転移概念とは、食品を非平衡系とみなし、その性質を速度論的に解釈するものであり、その普遍性からこれまでに多岐にわたる食品、あるいは食品成分における品質制御のために利用されている。しかしながら、水産食品に対するガラス転移研究例は非常に少なく、マグロ、マダラ、マサバの凍結魚肉を対象とした研究が数例報告されているのみである。特に、加工処理を加えられた魚肉加工食品に関する研究例は、これまでに一つも報告されておらず、ガラス転移現象が見られるのかどうかさえ確認されていないのが現状であった。

そこで本研究は、これまで漠然としたイメージとしてしか捉えられなかった魚肉加工食品の物理化学的状態を理解し、制御するためにはガラス転移概念の適用が必要不可欠であると考え、特に低水分の魚肉加工食品に対するガラス転移概念の適用性を探り、そして実用的に利用可能なデータを取得することを目的として行った。そして本研究において求められた実験結果より、低水分魚肉加工食品に対するガラス転移概念の適用性が明らかとなり、さらにはそのガラス状態に対する新たな知見を多数得る事が出来た。

本研究で行われた研究内容を以下に要約する。

低水分魚肉加工食品に対するガラス転移概念の適用性を明らかにするには、まずその食品がガラス状態を取り得るのかを明らかにする必要がある。そこで第2章の「低水分魚肉加工食品のガラス転移測定」では、実際に市販されている低水分魚肉加工食品に対する熱分析を行い、ガラス転移現象の有無を検討した。本研究は、種々の魚肉加工食品

の中でも、特に加熱・乾燥という両プロセスを加えられたものを測定対象に限定した。そこで、典型的モデルとしてカツオ節を取り上げ、カツオ節のガラス転移検出を行った。本章では測定手段として、食品のガラス転移検出に最も一般的に用いられている DSC と DMA を併用した。その結果、どちらの測定結果においても、ガラス状物質に典型的なガラス転移現象が検出された。更に、カツオ節ガラス転移温度に対する水分含量の影響を調べたところ、水分含量の増加に伴い T_g が低下する傾向が見られた。カツオ節の T_g に対する水の可塑効果も、一般的なガラス状食品と完全に一致していた。以上の結果から、カツオ節のような加熱・乾燥工程を加えられた低水分魚肉加工食品がガラス状態を取り得ることが明らかとなり、ガラス転移概念の適用性が示された。次に、より広範囲の魚肉加工品に対する適用性を明らかにするため、カツオ、マグロ、マサバ、マダラ、マダイなどの魚肉に、カツオ節と同じような加熱・乾燥工程を加えた後、DSC を用いてガラス転移現象の検出を行った。その結果、いずれの魚肉も明確なガラス転移現象を示し、更に T_g の水分含量依存性も示された。また、 T_g の水分含量依存性挙動が、魚種によって異なることが明らかとなった。すなわち、赤身魚の T_g の方が、白身魚の T_g よりも低い傾向が見られた。このような T_g の魚種による依存性は、おそらく魚種によるタンパク質成分組成の違い、更には魚種によるタンパク質成分の性質の違いに起因している可能性が示された。

第3章の「魚肉から抽出した筋形質タンパク質、筋原繊維タンパク質のガラス転移測定」では、低水分加工魚肉の主成分である筋肉タンパク質に着目した実験を行った。魚肉タンパク質の95%以上を占める筋形質タンパク質と筋原繊維タンパク質を魚肉（カツオ、マダラ）から抽出し、乾燥および加熱処理を加えた後、DSC によりガラス転移現象の検出を試みた。その結果、両成分が熱変性後に非常に明確なガラス転移現象を示し、更にガラス転移温度の水分含量依存性も明らかになった。この結果は、魚肉のガラス転移現象が、主に筋形質、筋原繊維という両タンパク質成分に起因する事を示している。更に、筋肉の T_g がタンパク質成分の T_g よりも約 30°C 低い値を示す事が明らかとなり、魚肉中に含まれるタンパク質以外の成分、糖や塩、ミネラル分などの低分子量物質が、魚肉の T_g に対して可塑効果を及ぼしている可能性が示された。更に、カツオとマダラから抽出したタンパク質成分のガラス転移挙動を比較したところ、筋形質成分の挙動にはほとんど差が見られなかったのに対して、筋原繊維タンパク質のガラス転移挙動

には明確な差が現れていた。赤身魚から抽出した筋原繊維タンパク質の T_g の方が白身魚から抽出したものよりも低い値を示し、この傾向は筋肉におけるものと完全に一致した。すなわち、魚種の違いによる T_g 差は、筋原繊維タンパク質成分の T_g 差が反映されたものである可能性が示された。

第4章の「エンタルピー緩和測定によるガラス転移温度以下における低水分加工魚肉の状態把握」では、低水分加工魚肉のガラス状態がいかなるものであるかを知るために、エンタルピー緩和現象に着目した検討を行った。近年、 T_g 以下における食品の分子運動性を知る有効な手段として、エンタルピー緩和現象の解析が注目されている。しかしながら、実際の食品そのものを対象としたエンタルピー緩和研究例はこれまでに報告されていない。そこで本章では、まず、低水分魚肉加工品においてもエンタルピー緩和測定を用いたガラス状態の解析が可能であるかの確認を行った。測定対象にはカツオ節を用い、 T_g 以下の温度帯で保存した場合に生じたエンタルピー緩和現象を、DSC を用いて検出した。その結果、カツオ節が DSC 曲線上に明確な緩和ピークを示し、更にピークから算出されるエンタルピー緩和量が、保存時間、保存温度依存性を有する事が明らかとなった。この傾向は、他のガラス状高分子と一致した。このように、カツオ節が一般的なガラス状物質と全く同じようなエンタルピー緩和挙動を示した事から、既存の理論式を用いた解析が可能であると考え、種々のガラス状物質のエンタルピー緩和過程を記述するのに多用されている KWW 式による解析を行った。その結果、カツオ節のエンタルピー緩和過程が KWW 式で良好に記述可能である事が明らかとなり、ガラス状態における分子運動性の指標となる緩和時間 τ の値を求める事が出来た。実際の食品を対象とした KWW 解析はこれまでに例がないため、カツオ節の τ 値を他の食品と比較することは出来なかった。しかしながら、今後、ガラス状食品のガラス状態下における安定性を比較議論する上で、エンタルピー緩和測定から求めた τ 値の利用が有効である事が明らかとなった。

更に本章では、保存中に進行する緩和現象が、実際に低水分魚肉加工食品の巨視的物性に影響を及ぼすかを明らかにするため、特に水分吸着特性に着目し、保存温度および保存時間変化に対するカツオ節の水分吸着能変化を検討した。その結果、カツオ節の水分吸着能が、保存温度の上昇、あるいは保存時間の増加に伴い、低下する事が明らかとなった。これは保存中に進行する体積緩和によって、試料中の自由体積が減少したこと

に起因すると推察した。通常、ガラス状態下にある食品は非常に安定で、長期に渡って品質が保たれるとされている。しかしながら本実験により、比較的短い保存期間であっても (1-3 weeks)、実験的に測定可能なほどの物性変化が起こり得る事が示された。

第5章の「低水分加工魚肉のガラス状態に及ぼす加工条件の影響」では、ここまでの研究で得られた低水分魚肉加工品のガラス状態に関するデータを基に、実用的な見地から、実際に食品が製造される際の、加熱条件、あるいは乾燥条件の違いが、そのガラス状態の形成にどのような影響を及ぼすのかを明らかにした。加熱工程が魚肉加工品のガラス状態とどのように関わっているのかを議論するためには、まずタンパク質のガラス転移現象に対する加熱変性の影響を明確にする必要がある。そこで、本章ではモデルタンパク質としてヘモグロビンを用いて、ガラス転移現象、およびエンタルピー緩和現象の熱変性前後の挙動比較を行った。その結果、ヘモグロビンが熱変性前にもガラス転移現象を示し、 T_g が熱変性によって低下する事が明らかとなり、更にはエンタルピー緩和と挙動の比較から、熱変性によって緩和量が大きくなる事も明らかとなった。これはおそらく、熱変性によってタンパク質分子中の規則構造領域が崩壊し、不規則構造領域、すなわちガラス領域が増大する事に起因するのではないかと考えた。

次に、加工条件の違いが低水分加工魚肉のガラス状態に及ぼす影響を検討するために、加熱・乾燥条件の異なるカツオ魚肉を試料として、 T_g 測定、ならびにエンタルピー緩和測定を行った。その結果、魚肉のガラス状態が、加工条件の違いによって大きく影響される事が明らかとなった。乾燥条件の違いが及ぼす影響よりも、加熱時の条件の違いが及ぼす影響の方が、より顕著であった。これは加熱条件の違いに起因するタンパク質の熱変性時における構造変化の様式の違いが、そのガラス状態に大きく関わっているためであると考えられる。更に、実験用に作成した加熱乾燥カツオ肉に比べると、カツオ節の T_g 、 τ がともに低い値を示す事が明らかとなった。これは非常に長期間を要するカツオ節の加熱工程中に、カツオ中のタンパク質が変化する事に起因するのではないかと推察した。実際、モデルタンパク質として用いたヘモグロビンを 110°C という極めて高温で熱処理すると、処理時間の増加に伴って T_g 低下、 ΔC_p 増加が見られ、更に、熱処理した試料の緩和速度が増すことが明らかとなった。これらの結果は、高温熱処理によってヘモグロビンが熱分解し、低分子化した事でヘモグロビンのガラス構造の安定性が低下した事を示している。この傾向から、カツオ節が示した速い緩和速度は、製造工程中

に進行したカツオ肉中のタンパク質の分解（熟成）に起因すると推察した。

以上、本研究により、低水分魚肉加工食品がガラス転移現象を示すことが明らかとなり、これら食品に対するガラス転移概念の適用性が示された。低水分魚肉加工食品が「ガラス」という一つの非平衡状態にある事を示した本研究結果は、水産学の分野に新たな知見をもたらしたと考えられる。種々の低水分食品に関するガラス転移研究は世界中に多数存在するが、本研究では低水分食品のガラス転移研究に対する新たなアプローチとして、緩和現象に着目した議論を行った。これまでに実際の食品そのものを対象としたエンタルピー緩和研究は報告例がないが、本研究により、低水分食品の T_g 以下における状態を把握する上で、エンタルピー緩和研究が有効な手段であることが明らかにされた。食品の緩和現象に関する研究はまだ初期段階であり、今後急速に発展すると予想されるが、本研究で用いられた手法、ならびに研究結果が有用な情報となることが期待される。

本研究結果は、低水分魚肉加工食品のガラス状態に関する基本的な情報を与えるが、今後、実際に魚肉加工食品の性質をガラス転移概念に基づいて把握・制御するためには、より詳細で実用的なデータの取得が必要とされるだろう。本研究により、水産の分野においてもガラス転移概念の重要性が広く認識されるようになる事を期待したい。

「低水分魚肉加工食品のガラス状態に関する研究」

「ガラス転移」は高分子科学の分野では古くから知られてきた現象であるが、現在ではその概念が食品科学の分野にも広く適用され、我々の身近にある様々な低水分食品がガラス状態にあり、温度や水分の変化によってガラスからラバーへのガラス転移現象を示す事が明らかとなっている。また、低水分食品の持つ重要な物理化学的性質がそのガラス転移現象と密接に関わりあっている事から、低水分食品を扱う上でガラス転移現象の把握は必要不可欠なものであると考えられている。しかしながらその重要性にも関わらず、水産物を対象としたガラス転移研究例は非常に少ないのが現状で、特に魚肉を原料とした低水分加工食品に関する報告例は一つも存在しない。そこで本研究では、これまで検討された例のない低水分魚肉加工食品に対するガラス転移研究を行った。本研究の目的とするところは、実際の低水分魚肉加工品がガラス転移現象を示すことを明らかにし、そのガラス転移温度に与える諸因子の解明、及びそのガラス状態の評価を通じて、低水分魚肉加工食品に対するガラス転移理論の適用性を示すことにある。

本論文は全 6 章から構成されており、第 1 章では本研究の基礎となるガラス転移の理論的背景について述べた。

第 2 章では、低水分魚肉加工食品が実際にガラス状態を取り得るのかどうかを明らかにするために、まずカツオ節を一つのモデル食品として取り上げ、熱分析によるガラス転移現象の検出を試みた。その結果、カツオ節がガラス状態にある事、更にはそのガラス転移温度(T_g)が水分含量の増加と共に急激に低下する事が明らかとされた。同様に、加熱乾燥処理を施されたマグロ、カツオ、マサバ、マダラ、マダイを調べ、そのすべての魚種の筋肉がカツオ節と同じようにガラス転移現象を示す事が明らかとされ、これら魚肉を原料とした低水分魚肉加工食品がおよそ 20%の水分以下では常温でもガラス状態にある事が明らかとなった。更に、白身魚の T_g が赤身魚より高い値を示す事実も明らかにされた。

第 3 章では、魚筋肉のガラス転移現象が魚肉中の筋肉タンパク質の性質を反映する可能性を考慮し、2 種類の魚 (カツオ・マダラ) の筋肉から筋形質、筋原繊維タンパク質を分離抽出し、乾燥・加工処理を加えた上で、それぞれの成分におけるガラス転移挙動を調べた。その結果、魚筋肉のガラス転移の主因子は両タンパク質成分であるものの、タンパク質以外の低分子量物質の影響も無視できない事も明らかとなった。更に、異なる魚から抽出されたタンパク質成分のガラス転移温度の比較から、魚種間の筋肉における T_g 差は、筋原繊維タンパク質区分における T_g 差と相関があることが示唆された。

第 4 章では、低水分魚肉加工食品のガラス状態を評価する事を目的とし、ガラス状物質において重要な特性の一つであるエンタルピー緩和現象に着目した検討を行った。エンタルピー緩和現象は、ガラスが非平衡状態にあるがために起こるエネルギー安定化現象であり、この緩和過程を解析する事でガラス状物質の分子運動性に関する情報を得る事が出来

る。本章では測定対象にカツオ節を用い、熱分析を用いて T_g 以下の温度で保存した場合に生じたエンタルピー緩和量を測定し、その結果を解析することでカツオ節のガラス状態の定量的評価把握を試みた。その結果、ガラス状高分子のエンタルピー緩和過程の記述に良く利用される Kohlrausch-Williams-Watts (KWW) 式を用いた解析が有効であり、ガラス状態下における安定性の指標となる緩和時間 τ の値を求める事が出来た。また、カツオ節をガラス状態に保っておいても、重要な巨視的物性の一つである水分吸着能がエンタルピー緩和と共に保存中に低下していく事が明らかとなった。

第 5 章では、実用的な見地から、低水分魚肉加工食品における製造時の加熱、乾燥条件の違いが、そのガラス状態に及ぼす影響について検討を行った。カツオ筋肉に条件の異なる加熱・乾燥処理を施し、熱分析による T_g 決定、そして前章で利用した手法に基づいたエンタルピー緩和速度の評価を行った。その結果、乾燥操作条件の違いによる影響は小さかったが、加熱時の試料の水分含量や加熱時間などの違いによる影響は顕著で、 T_g およびエンタルピー緩和時間 τ の値が大きく異なってくる事が明らかとなった。この結果から、加熱処理工程が魚肉加工食品のガラス状態を左右する重要な工程である事が示唆された。

第 6 章では、本研究の総括を行った。

以上、本研究により、低水分魚肉加工食品が一般的にガラス転移現象を示す事が明らかとなり、これら食品に対するガラス転移理論の適用性が示された。低水分魚肉加工食品の製造中、保存中の状態といえばこれまで漠然としたイメージでのみ捉えられてきたが、今後はガラス転移理論を利用する事により、その物理化学的状态を科学的に理解・把握していく事が可能となるだろう。本研究で得られた結果は、低水分魚肉加工食品に対する今後の更なるガラス転移研究のための有用な基礎的知見を与えたものと考えられる。

Summary

It has been recognized widely that the glass transition is very important phenomenon in the field of food science because any types of food properties related molecular mobility, including texture and shelf-life, are affected strongly by its glass transition behavior. Over the last decade, so many researches about the glass transition for huge variety of food materials and food ingredients have been reported for its importance. However, the researches regarding with processed fish products are relatively scarce though there are so many processed foods manufactured from marine products all over the world. The objectives of this study are to generalize the glass transition concept to the wide variety of fish dried fish products, elucidated the factors affect its glass transition temperature (T_g), and estimate its glassy state quantitatively.

This thesis consists of six chapters besides **Introduction**. In **Chapter 1**, the theoretical background about the glass transition is described. In **Chapter 2**, the glass transition of Katsuobushi and several boiled and dried fish muscles (bonito, tuna, mackerel, cod and sea bream) was studied using DSC in order to generalize the glass transition concept to the wide variety of dried fish products. Katsuobushi and these processed fish muscles showed clear glass transition in their DSC curves and its T_g values were plasticized strongly by moisture. Furthermore, it became clear that white meat fishes (cod and sea bream) showed higher T_g value than red meat fishes (bonito, tuna and mackerel). In **Chapter 3**, the glass transition of two types of protein fractions (sarcoplasmic and myofibrillar proteins) extracted from bonito and cod muscles was studied in order to examine the contribution of protein fractions to the glass transition behavior of fish whole muscle. Both sarcoplasmic and myofibrillar protein fractions showed clear glass transition after heat denaturation. The T_g values of fish whole muscles were considerably lower than that of extracted protein fractions because of the plasticizing effect of small solutes contained in the muscle. Furthermore, it became clear that the difference in T_g values between red meat fishes and white meat fishes as described in **Chapter 2** was closely affected by its myofibrillar protein fraction rather than sarcoplasmic protein fraction. In **Chapter 4**, the enthalpy relaxation behavior of Katsuobushi during several storage conditions below its T_g was studied using DSC in order to estimate its glassy state. The enthalpy relaxation process of Katsuobushi could be described successfully by the Kohlrausch-William-Watts (KWW) equation, which is often used to describe the kinetic process of enthalpy relaxation for many glassy polymers, and the mean relaxation time constant (τ), which can be considered as an indicator of molecular mobility under the T_g , could be obtained. This result suggests that the enthalpy relaxation process for glassy food materials can provide the useful information about its glassy state. Furthermore, it became clear that the water sorption ability of Katsuobushi decreased with the enthalpy relaxation proceeded during storage even it kept in the glassy state. In **Chapter 5**, the effect of the difference in processing condition on the glassy state of dried bonito muscle was studied. The T_g value and relaxation time τ of dried bonito muscle were affected strongly by the difference in processing conditions. The effect of the difference in drying condition was relatively small, but the effect of the difference in heating condition was remarkable. This result suggests the heating process can play the dominant role to control the glassy state of dried processed fish muscle. In **Chapter 6**, the general conclusion of this study is described.

From this study, the applicability of the glass transition concept to the wide variety of dried fish products is confirmed. It is expected that the results obtained in this study can provide useful information for further researches about the glass transition of dried fish products.

謝辞

本研究を行うにあたり、長期に渡って終始懇切な御指導、御鞭撻を下さいました、食品冷凍学研究室の高井陸雄教授、鈴木徹助教授、萩原知明助手に心から感謝の意を表します。また、本論文の執筆にあたり、お忙しい中にも関わらず貴重な御指導、御助言を下さいました、小川廣男教授、田中宗彦教授、渡辺徳子教授、渡辺尚彦教授に、この場を借りて深く御礼を申し上げます。

金有珍さん、食品プロセス工学研究室の八幡淑子さんには、いつも励ましのお言葉を頂き、心の支えとなって下さった事を深く感謝致します。また、松井悠子さん、吉川明美さん、玉置亮さんを始めとする食品冷凍学研究室の皆さんにも、感謝の気持ちを送ります。

そして何よりも、絶えず励まし、支えてくれた私の家族に、心からの感謝の気持ちを送ります。