

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20906

研究課題名(和文)局所粘弾性測定による食品関連ソフトマターのガラス的側面

研究課題名(英文)Glassy behavior of food-related soft matter systems studied with particle tracking microrheology

研究代表者

榎 靖幸 (Maki, Yasuyuki)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：50400776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食品に広く用いられているタンパク質や多糖類のレオロジー特性は、食品が持つ特徴的な食感などに深く関係している。本研究では、粒子追跡マイクロレオロジー法を用いて、食品関連ソフトマターのマイクロメートルスケールでの局所的なレオロジー特性の分布を計測した。ゼラチンのゲル化は、ゲル化温度以下への急冷後非常にゆっくり進行する(エイジング)。粒子追跡マイクロレオロジー法を用いたゼラチンゲルのエイジングの計測により、ゼラチンのゲル化時間の少し後に、コロイドガラスの動的不均一性に類似したレオロジー特性の不均一性が出現した。

研究成果の概要(英文)：Rheological properties of aqueous solutions of food proteins and food polysaccharides are strongly related to food textures. In this study, particle-tracking microrheology (PTM) was used to investigate the distribution of local rheological properties on the micron scale of food-related soft matter systems. The gelation of gelatin proceeds very slowly after the quench to temperatures below the gelling temperature (aging). The PTM measurements of the aging of gelatin showed that an inhomogeneity of the rheological properties appeared slightly after the gelling time, which is reminiscent of the dynamic inhomogeneity in colloidal glassy systems near the glass transition point.

研究分野：高分子溶液・ゲル

キーワード：ゲル レオロジー 食品 コロイド ガラス

1. 研究開始当初の背景

食品に広く用いられているタンパク質や多糖類の水溶液は、しばしばゲルのような半固形状となり、そのソフトマターとしての物性は、その食品固有の食感や呈味成分放出特性を支配している。

このような食品関連ソフトマターのレオロジー特性は、ある意味で「ガラス的」に見える場合がある。その一つの側面は、エイジングである。例えば、タンパク質の一種であるゼラチンは高温では液体状、低温では固体状となる温度応答性ゲルを形成するが、溶液を低温へ冷却後のゲル形成は非常に緩やかに進行し、ゲル化後も弾性率等の物性が長期間にわたり変化し続けるエイジングを示す。また、エイジング中の温度変化やずり変形の印加により、その後の物性変化が大きく影響を受ける履歴効果を示す。つまり、ゼラチンゲルは本質的に非平衡系であり、ガラス状物質と類似したエイジング挙動を示す。もう一つの側面は、「流れる固体」と言うべきレオロジー特性である。温度低下や密度増加によって物質の構成要素の運動性が低下し、物質の流動性が失われて固体状になることをガラス化と表現するならば、コロイド粒子の分散液もある濃度以上で一種のガラス(コロイドガラス)となることが知られている。コロイドガラスは、小さな振幅の振動ずりに対しては固体的な粘弾性応答を示すが、大きな振幅に対しては液体的な粘弾性応答を示し、その変化は可逆的である。増粘多糖類として広く用いられるカラギーナンやゼンサンにおいて報告されているレオロジー特性は、上のコロイドガラスのものと同様点が多く、これらの多糖類水溶液が一種のコロイドガラスである可能性を示唆している。

このように、食品に関連した様々なソフトマターはガラス的側面を持つように見えるが、従来そのような観点でエイジング挙動やレオロジー特性の機構解明を検討した研究はごく少数であり、具体的にどういった意味で、あるいはどの程度、それが「ガラス的」であるのかという点については未知であった。

2. 研究の目的

ガラス状物質の研究においては近年、メソスケールにおける分子ダイナミクスの不均一性の観点からガラス転移を理解しようとする試みが行われている。本研究では、この観点を食品関連ソフトマターのレオロジー特性のガラス的側面を理解するために適用し、マイクロメートルスケールの局所粘弾性の不均一性とガラス的なレオロジー特性との相関を明らかにすることを目的とした。具体的には、測定対象中に分散した多数の微粒子のブラウン運動を顕微鏡下で同時に観察し、それらの粒子の変位の解析から対象のレオロジー的性質を算出する粒子追跡マイクロレオロジー (particle tracking

microrheology, PTM) 法により、食品関連ソフトマターの局所的なレオロジー特性の分布を計測し、マクロな測定により計測されるレオロジー特性から見たガラス的な挙動は、マイクロメートルスケールでのレオロジーの不均一性・分布の観点ではどのように記述されるかを検討した。

3. 研究の方法

マイクロレオロジー測定の実施にあたり、測定時の振動の影響を最小限にするための除震装置と、試料に対して温度変化を加えるための温度制御ステージと、微粒子のブラウン運動を記録するためのデジタルビデオカメラを備えた光学顕微鏡を準備した。

マイクロレオロジーの測定は以下のように行った。直径 600nm のポリスチレン微粒子を試料中に濃度 0.001% 以下になるように分散した。顕微鏡下で撮影された動画は、画像解析ソフト (ImageJ) を用いて粒子変位の時間変化を計測し、アンサンブル平均二乗変位 (MSD) と変位分布関数 (van Hove 自己相関関数) を計算した。

マクロなレオロジー特性は、二重円筒型レオメータを用い、定常流粘度または動的粘弾性の測定により評価した。

研究対象としては、ガラスに類似したエイジング挙動や履歴効果について以前より知見を得ていたゼラチンを選んだ。これに加えて、コロイドガラスとなり得るソフトマター系の構築を目的として、タンパク質の脱溶媒和を利用した微粒子分散系の調製と評価と、温度応答性高分子マイクロゲルの動電特性への脱溶媒和の効果に関する研究を行った。

4. 研究成果

(1) PTM によるゼラチンのゲル化とエイジング (学会発表)

マクロなレオロジー測定と PTM の測定の間に対応について検討するため、高温から低温への温度変化に伴うゼラチン溶液の粘度変化の測定を行った。試料として豚由来ゼラチン 5% 水溶液を用い、温度を 50 から 26 まで段階的に冷却しながらレオロジー測定を行った。図 1 に、50 と 26 で得られた PTM 測定における微粒子のブラウン運動の軌跡の例を示す。温度の低下によりゲル化温度に近づくにつれて溶液粘度が上昇することに対応して、粒子の運動が遅くなることを示している。図 2 は各温度の PTM 測定で得られたアンサンブル平均 MSD である。MSD と遅れ時間の関係は直線的であるため、Stokes-Einstein 関係式によりゼラチン溶液の粘度を決定した。図 3 に、PTM 測定により求められたゼラチン溶液の粘度の温度依存性である。ゲル化温度に近づくにつれて粘度が発散的に増加している。図 3 の実線は、マクロなレオロジー測定で求められた定常流粘度の温度依存性である。50 から 27 の範囲では、PTM 測定による粘度とマクロなレオロジー測定による粘度はほぼ一

致した。アンサンブル平均 MSD から計算される粘度は、局所的な粘度の空間平均を表すはずなので、マイクロレオロジーによる局所的な粘弾性を空間平均すればマクロなレオロジーの測定結果を再現することを確認できた。一方、26 °C では PTM 測定による粘度はマクロなレオロジー測定による粘度よりもやや大きい値を示した。このずれの要因として、PTM 測定では溶液のマクロな流動を伴わないため、ゲル化点近傍の弱い構造形成による粘度変化をより非侵襲的に測定できている可能性が考えられる。ただし、一般的に PTM 測定では、微粒子の運動が非常に遅い場合には変位の検出におけるシグナル/ノイズ比が小さく、測定精度が悪い場合もあるので、この点についてはさらに検討を要する。

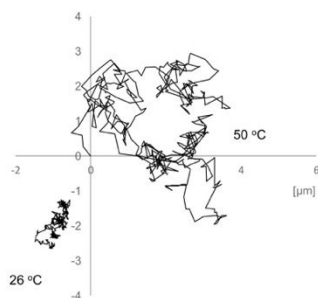


図1 50 °C, 26 °C における 5%ゼラチン溶液中に分散した微粒子の重心の軌跡の例

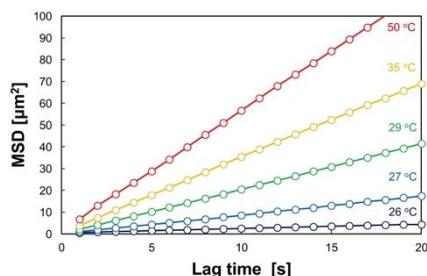


図2 5%ゼラチン溶液の PTM 測定における MSD の温度依存性

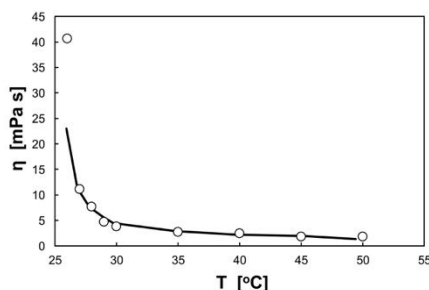


図3 PTM 測定による 5%ゼラチン溶液の粘度 (白丸) と、マクロなレオロジー測定による定常流粘度 (実線) の温度依存性

次に、ゲル化温度以下におけるゼラチンのエイジングについて検討した。試料として魚由来ゼラチン 10% 溶液を用い、溶液を 40 °C から 25 °C へ急冷後のレオロジー特性の経時変

化を PTM 測定により調べた。アンサンブル平均 MSD を遅れ時間に対して両対数プロットすると、急冷後 10 分から 70 分の範囲では傾き 1 の直線となり MSD と遅れ時間は比例したが、90 分以降では傾きが 1 より小さくなり、300 分以降では遅れ時間が 0.1 秒から 5 秒の範囲で傾きはほぼ 0 になった。これは、急冷後 70 分まではゼラチン溶液は液体的挙動であるが、90 分以降に粘弾性的挙動が現れ、300 分以降は低周波数域で固体的な挙動を示すことを意味している。また、ブラウン運動における変位分布関数は、均一なニュートン流体中ではガウス分布になる。急冷後 10 分における変位分布関数はガウス分布に従ったが、1105 分ではガウス分布からのずれが見出された。この結果は、ゼラチン溶液はゲル化前には均一なニュートン流体と近似することが可能であるが、ゲル化に伴ってレオロジー特性にマイクロメートルのスケールで一種の不均一性 (動的不均一性) が生じることを表している。ガウス分布からのずれの割合を、データをガウス分布関数でフィッティングした際の χ^2 とデータ数 N を用いて χ^2/N で表すとすると、 χ^2/N は急冷後 120 分まではほぼ一定値だったが、120 分以降時間とともに次第に増大した。このことは、急冷後 120 分以降に動的不均一性が増大することを示している。一方、マクロなレオロジー測定による周波数 0.5 Hz における動的粘弾性は、急冷後 70 分から 100 分の間に貯蔵弾性率 G' の立ち上がりが見られる。約 100 分において G' は損失弾性率 G'' を上回り弾性的な挙動が顕著となった。この G' と G'' が等しくなる点は、しばしばゲル化点と定義される。上の PTM の測定結果とマクロなレオロジー測定の結果と比較すると、マクロなレオロジー測定での G' の立ち上がりに対応して PTM 測定では粘弾性的挙動が検出され、マクロなレオロジーにおけるゲル化点 (ゲル化時間) より少し後に PTM における動的不均一性の顕在化が生じたことがわかる。ガラス状物質においては、ガラス転移点付近で同じような動的不均一性が表れることが報告されている。本研究は、ゼラチンゲルにおいてもゲル化点 (液体状から固体状への変化の点) の付近において、ガラス転移点におけるガラス状物質と同様の動的不均一性が表れることを明らかにした。

(2) ゼラチンのエイジングにおける温度変化の効果 (学会発表)

ゼラチンのゲル化においては、冷却に伴ってゼラチン分子が構造変化し、部分的にコラーゲンに類似したヘリックス構造をとることで架橋領域の形成が生じ、網目形成が起こると考えられている。ゼラチン分子の構造変化は、紫外円二色性測定や旋光度測定により定量化することができる。マクロなレオロジー測定に加えて、旋光度測定を組み合わせることにより、ゼラチンゲルのエイジング挙動に対して以下に示すような新しい知見が得

られた。ゼラチンをゲル化温度以上の温度 T_0 からゲル化温度以下のある温度 (T_1) に急冷し、一定時間保存後にゲル化温度以下の別の温度 (T_2) へ温度上昇すると、 G' は一旦時間とともに減少するがその後時間とともに増加に転じる。長時間経過後の G' の経時変化は、 T_0 から T_2 に急冷したときの G' の経時変化と一致する。一方、 T_1 で一定時間保存後に T_1 以下の別の温度 T_2' へ温度降下すると、 G' は時間とともに急激に増加し、長時間経過後の G' の経時変化は、 T_0 から T_2' へ急冷した時の G' の経時変化より速い。このようにゼラチンゲルは、エイジング中の温度変化によってその後の物性変化が大きく影響を受ける履歴効果を示す。この機構をゼラチン分子の構造の観点で考察するため、上記のような温度履歴を与えたゲルに対し、 T_2 または T_2' からゲル化点以上まで一定速度で温度上昇し、ゼラチン分子のヘリックス構造の融解過程を旋光度により計測した。 T_1 を経由して T_2 へ温度上昇した場合の融解プロファイルは T_1 を経由しない場合と一致したが、 T_1 を経由して T_2' へ温度降下した場合の融解プロファイルは T_1 を経由しない場合と異なることがわかった。すなわち、長時間経過後の G' の挙動と融解プロファイルとの間に相関が見出された。この融解プロファイルは、ゼラチン分子がヘリックス構造をとる領域のサイズ分布を表すと考えられている。従って、ゼラチン分子のヘリックス構造領域のサイズ分布の時間発展が、ゼラチンゲルのエイジングを理解する際の有効な手がかりとなることが示された。

(3) 脱溶媒和法によるウシ血清アルブミン溶液のゲル化と特性評価 (学会発表)

ウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液にエタノールを添加することで脱溶媒和させるとナノ粒子が調製できることが報告されていたが、BSA 濃度とエタノール添加量を調整すると、条件によっては溶液全体が透明なゲル状固体になることがわかった。このゲルは振動ずりに対してコロイドガラスと同様の粘弾性応答を示し、またゲルの形成が非常に緩やかに進行するエイジング挙動が観察された。静的・動的散乱および X 線小角散乱の実験による構造解析の結果、BSA のゲル状固体は半径 20nm のマイクロゲルの集合体であることが示され、一種のコロイドガラスであると考えられた。

(4) 脱溶媒和法によるゼラチンのナノゲル粒子の調製と特性評価 (雑誌論文)

BSA 以外のタンパク質でコロイドガラスとなり得る系について検討するため、脱溶媒和法によりゼラチンのナノゲル粒子の調製を行った。ゼラチンの水溶液に硫酸ナトリウム水溶液を添加して塩析・脱溶媒和することで、ゼラチンのコアセルベートを得た。このコアセルベートを紫外線照射により架橋するこ

とで、安定なゼラチンナノゲル粒子を調製することができた。ゼラチンナノゲル粒子は温度応答性があり、温度上昇によってゼラチンのヘリックス-コイル転移温度付近で粒子径が急激に減少することが見出された。

(5) 温度応答性高分子マイクロゲルの動電特性への脱溶媒和の効果 (雑誌論文)

高分子マイクロゲルの濃厚分散液はコロイドガラスとして振る舞うことが知られており、コロイドガラスのモデル系としてしばしば用いられる。高分子マイクロゲルは温度応答性モノマーである N-イソプロピルアクリルアミド (NIPA) のラジカル沈殿重合により容易に調製することができる。NIPA ポリマー (PNIPA) は本来中性高分子であるが、ラジカル重合による PNIPA ミクロゲルは開始剤に起因する解離基を持つ場合がある。一般にコロイド粒子が帯電している場合、粒子の静電的相互作用は分散液のレオロジー特性に影響を及ぼす。PNIPA ミクロゲルは温度応答性であり、臨界温度以上で脱水和により収縮することがよく知られているが、マイクロゲル収縮による実効電荷の変化については諸説があった。そこで、動的散乱と電気泳動散乱の測定により、脱水和による PNIPA ミクロゲルの粒子径と動電特性の変化を調べ、球状高分子電解質モデルを用いて解析した結果、脱水和に伴ってマイクロゲルの実効電荷が急激に減少することが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Yasuyuki Maki, Wataru Saito, Toshiaki Dobashi, Preparation and thermo-responsive behaviors of UV-crosslinked gelatin nanogels, Journal of Biorheology, in press. 査読有

Yasuyuki Maki, Kentaro Sugawara, Daisuke Nagai, Temperature dependence of electrophoretic mobility and hydrodynamic radius of microgels of poly(N-isopropylacrylamide), Gels 4, 37 (2018), DOI: 10.3390/gels4020037 査読有

[学会発表] (計 5 件)

榎靖幸, 安中雅彦, 粒子追跡マイクロレオロジーによるゼラチンのゲル化過程, 第 41 回日本バイオレオロジー学会年会 (名古屋, 2018 年 6 月)

Yasuyuki Maki, Marika Katakai, Sho Watabe, Toshiaki Dobashi, Physical aging of gelatin gels under temperature jump, IUMRS-ICAM 2017 (京都, 2017 年 9 月)

片貝茉莉花，榎靖幸，土橋敏明，ゼラチンゲルのエイジングにおける温度ジャンプの影響，第64回レオロジー討論会(大阪，2016年10月)

片貝茉莉花，榎靖幸，土橋敏明，ゼラチンゲルのエイジングと温度変化の効果，第39回バイオレオロジー学会年会(東京，2016年6月)

Yasuyuki Maki，Kazuki Yajima，Toshiaki Dobashi，Stress-responsive gel-sol transformation of serum albumin in aqueous ethanol solution，15th International Congress of Biorheology and 8th International Conference on Clinical Hemorheology (Seoul (Korea)，2015年5月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎 靖幸 (MAKI, Yasuyuki)
九州大学・理学研究院・准教授
研究者番号：50400776