

機関番号：16201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580130
 研究課題名(和文) 新しい結晶変換技術によるサブミクロン多孔構造を有する新規糖質結晶の創製と応用
 研究課題名(英文) Application and formation of new sugar crystal with porous structure of sub-micron size pore by new crystal transformation technique
 研究代表者
 吉井 英文 (YOSHII HIDEHUMI)
 香川大学・農学部・教授
 研究者番号：60174885

研究成果の概要(和文)：新たな糖質結晶構造体を作製する手法，すなわち結晶変換という結晶再構築により微細な構造体を作製する手法としてエタノールを脱水溶媒として，含水結晶から結晶水を脱水する方法を提案し，トレハロース含水結晶，マルトース含水結晶の脱水操作を実施した．含水結晶糖の結晶水を、エタノールにより脱水することによりエタノール中での結晶変換（含水結晶糖からアモロファス糖へ、アモロファス糖から無水結晶糖へ）が生じ、多孔で比表面積が大きな糖を作製できた．この糖質の包括剤として用いることができるかどうか検討し、無水結晶糖が混合包括剤として有用であることを確認した．

研究成果の概要(英文)：Dehydration of dihydrate trehalose or monohydrate maltose to its anhydrous form was performed via crystal transformation in a pressure pan and reactor vessel with a differential scanning calorimeter using ethanol as the drying medium. The effect of water content of ethanol on the dehydration kinetics was investigated by differential scanning calorimetry (DSC), under two experimental conditions: isothermal and temperature ramping. Porous crystalline trehalose could be used as the matrix to encapsulate functional compounds. The anhydrous trehalose crystals obtained by crystal transformation using ethanol of 0.005-2.5% water content were visually observed as aggregates of nano-sized acicular crystals, which inherited the shapes of the dihydrate trehalose crystals. Kinetics of crystal transformation from monohydrate maltose to anhydrous maltose were correlated with Jandor equation and obtained the activation energies of the crystal transformation rates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：結晶変換、トレハロース、マルトース、エタノール、

1. 研究開始当初の背景

近年、動植物や微生物から分離・精製した生理活性物質（生理活性脂質，生理活性蛋白

質，抗菌香気物質）やアロマセラピーに用いられる各種フレーバー物質を，糖質などを用いて粉末化し，熱，光，酸素に対する保存安

定性の向上, 加工中の安定性の保持などを図ると同時に, 徐放制御特性などの新しい機能を付与した, 機能性粉末を作製する研究が行われている. この粉末化において, 賦形剤のガラス転移温度に注目した研究は非常に多い. 報告者らは, 無水結晶糖に結晶水相当量の機能性物質溶液を添加することにより, 水分子を結晶水として取り込ませると同時に, 機能性物質を結晶粒子内に包括する手法を開発し, その機構について検討してきた (H.Yoshii et al. *J. Appl. Glycosci.*, 53, 99-103 (2006)). 次に, 賦形剤の形態制御に着目し糖質の比表面積, 溶解度の観点から含水結晶から無水結晶への結晶変換法としてエタノール法を用いた脱水手法を開発した. 従来の糖質の微細な粒子形態としては, 粉糖, 顆粒糖などがあるが, 大きな粒子を粉砕により微細化したものである. これに対して, 新たな結晶構造体作製する手法は, 結晶変換という結晶再構築により微細な構造体を作製する方法である (*Carbohydrate Research* 342, 819-825 (2007)). 従来, 生理活性物質, 蛋白質を, 賦形剤溶液と混合後噴霧乾燥により粉末化する場合, 生理活性物質との親和性, ガラス転移温度についての研究が殆どである. 粉末包括基剤の研究として, ナノ粒子化技術の開発と機能性成分の包括, ナノ粒子の構造の物性と制御に関して蛋白質, 油脂, 脂質を用いた研究が活発に行われている, しかし, 糖質を粉末化基剤として用いる研究は数少なく, 糖質の形態制御に関する研究もトレハロースについての結晶形についての数報に過ぎなかった. マルトースは, グルコース 2 分子が α -1,4-結合した還元性の 2 糖であり, α , β のアノマーが存在する. マルトースの無水結晶は, β アノマーからなる無水結晶 β -マルトースと無水結晶 α -マルトースと呼ばれている α , β の錯体結晶 (α アノマーが 70-80%) が存在する. 糖マルトースの結晶変換については, Hodge(1972)らが水分吸着と関連した水分, 温度依存の結晶変換挙動について報告した. 彼らは, 1 含水結晶 β -マルトースを 40°C で 3 週間の乾燥を行うことにより, 無水結晶 β -マルトースを得ている. この無水結晶 β -マルトースは, 吸湿性が高く利用はできないと評価されている. それに対して, 無水結晶 α -マルトースは吸湿性が低く安定な結晶である. β -含水結晶を真空乾燥した場合, 含水結晶の形状を保ったまま結晶変換しており図の一点鎖線が変換経路と考えられる. 一方, エタノール法では個々の結晶粒子は球状に近い形状に変化していることから, 一旦アモルファスを經由する変換経路と考えられる. エタノール法で得られる結晶形は新規な結晶形であり, 微細な細孔を有する. この細孔を有した結晶は, 油脂の粉末化や液体物質の固化

などに利用することができる.

本稿では, β -含水結晶をエタノール溶媒により脱水し, β -無水結晶へと変換する反応機構の解明するために, 含水率測定および熱分析により反応速度の解析を行い, 表面構造解析, X線回折, アノマー量測定を行ったので, その研究成果を報告する.

2. 研究の目的

エタノール等アルコール溶媒を用いたトレハロース, 及びマルトース結晶の粒子としての形状, 構造に注目し, 粒子構造, 結晶変換, 包括粉末化のキーワードをもって粒子設計に関する結晶変換の工学的研究を実施する. 具体的には, 1) サブミクロン空間糖質材料の最適作製条件の探索, 2) 多孔性無水結晶糖による機能性脂質の粉末化, 3) 新規多孔性無水結晶マルトースの特質とその応用法の開発を実施する.

含水結晶マルトースから無水結晶マルトースへの変換機構を明らかにするとともに, エタノール法で作製する多孔性無水結晶マルトース生成機構の解明及び速度論的解析を実施する. 無水結晶マルトースの結晶形が新規な結晶であることを, X線構造解析により確認する. エタノール法により, アモルファス構造の糖質の脱水操作により, 多孔性結晶糖質が得られることを確認する.

3. 研究の方法

(1) 材料

エタノールは日本アルコール販売製の発酵アルコール 99 度, を使用した. エタノール純度は 99.8%以上である. 2 含水結晶トレハロース, 含水結晶マルトースと真空乾燥により得た無水結晶トレハロース, 無水結晶マルトースは株式会社林原製を使用した. トレハロース純度, マルトース純度は 99%以上, 2 含水結晶トレハロースの水分は 9.7%, メディアン径は約 380 μm , 粒度分布の Rosin-Rammler 代表径は 417 μm , 分散は 4.20 である.

(2) エタノール法による結晶変換

エタノール法による結晶変換の装置図を Fig. 1 に示した. 反応容器は 2000 mL 容量のガラス製フラスコ (セパラブルフラスコ, 円筒型, 丸底, バンド式, 柴田科学株式会社) を使用し, タービン翼の攪拌装置 (スリーワンモーター, モデル BL600, 新東科学株式会社) を取り付け, フラスコは恒温水槽に入れ, 内液温度が一定になるように温水温度をコントロールした. まず 1200 mL のエタノールをフラスコに入れ予熱する. 次いで 120 g の含水結晶トレハロースを加え, 170 rpm で攪拌しながら脱水, 結晶変換反応を行った. 所定

時間ごとに 500 mL 容のガラス容器に反応液 50~100 mL を吸引して、結晶粒子をサンプリングした。採取した結晶を含むスラリー溶液は、直ちにバスケット型遠心分離機(モデル SKY3000-15A, 三陽理化学器械製作所)で固液分離した。サンプリングから遠心分離開始までの時間は 30 秒以内で行った。遠心分離した湿潤結晶はあらかじめ予熱したステンレス製バットに薄く広げて、乾燥機(モデル FV-630, 東洋製作所)に入れ 50 °C、20 分間乾燥した。

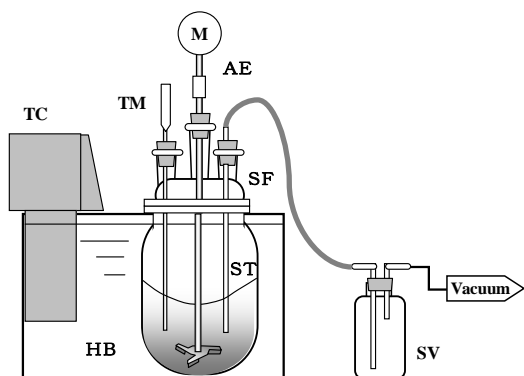


Fig.1. エタノール法による含水糖の脱水結晶変換装置: SF, セパラブルフラスコ; HB, 恒温槽; ST, サンプル採取チューブ; TM, 温度計; AE, 攪拌装置 TC, 温度制御器; SV, サンプル容器。

(3) 分析方法

水分量

水分量はカールフィッシャー法 (MK-SS 型、京都電子工業株式会社製) により測定した。約 100 mg のサンプルを脱水溶剤であるメタノール: ホルムアミド系 (アクアミクロン® 脱水溶剤 FM, 三菱化学株式会社製) に溶解させ、カールフィッシャー試薬 (アクアミクロン® 滴定剤 SS 3 mg, 三菱化学株式会社製) を使用して滴定した。

X 線回折

結晶の粉末 X 線回折分析は、X 線回折装置 (ガイガーフレックス RAD-II B, Cu, K α 線使用、株式会社リガク製) を用いて行った。結晶粉末を乳鉢ですり潰し、アルミ試料板に押し付けて充填し、その表面に X 線を照射した。走査スピードは 3 °/min, 走査範囲は 3~140 °で行った。粉末 X 線回折の結果から Ruland 法(47) により結晶化度を求めた。

熱分析

示差走査熱量計 (DSC) 分析における吸熱パターンは、示差走査熱量計 (DSC8230, 株式会社リガク製) を用いて行った。試料約 6 mg を簡易密閉アルミニウムパンに入れ、昇温速度は 10 °C/min で 30~310 °C の範囲で測定した。

微細構造

捜査型電子顕微鏡 (SEM, JSM 6060 型、日本電子株式会社製) を使用して粒子の微細構造を観察した。サンプルは SEM の資料台に両面粘着テープ (日新 EM 株式会社製) で固定した。全ての分析は低加速電圧 2.0 kV で行った。

比表面積

結晶の比表面積は窒素ガス吸着法により比表面積測定装置(モデル ASAP-2400、マイクロメリティックス社製)を用いて測定した。比表面積測定の前処理として試料 2~3 g を無水結晶は約 40 °C で 15 時間の減圧乾燥、含水結晶は室温にて 15 時間の減圧乾燥による脱ガス処理を行ったのち測定に供した。

細孔分析

細孔分布および細孔体積は、水銀圧入法により細孔分布測定装置 (オートポア 9520、マイクロメリティックス社製) を用いて測定した。試料量は約 0.5 g、初期圧 15 kPa の条件で測定した。

粒度分布

粒子の粒度分布は標準フルイ規格 (JIS Z-8801) のフルイを使用して電磁式振とう機で測定した。フルイ上積算重量について Rosin-Rammler 分布への近似によりメディアン径を算出した。

アノマー

サンプル約 70 mg を無水ピリジン 5 mL に溶解した後、この 100 μ L を、常法に従いトリメチルシリル (TMS 化) し、ガスクロマトグラフィー (GLC) 法にて分析しマルトースの α -アノマーと β -アノマーの含量を単純面積百分率法により求め、アノマー比とした。なお、GLC は以下の条件で行った。

<GLC 条件>

ガスクロマトグラフ: GC-14A (株式会社島津製作所製)
 カラム: 2%シリコン 0V-17/クロモゾルブ W・AW・DMCS (内径 3 mm、長さ 2 m)
 カラム温度: 210 °C
 注入口温度: 330 °C
 キャリヤーガス: 窒素 流速: 40 mL/min
 燃焼ガス: 水素 流速: 40 mL/min
 助燃ガス: 空気 流速: 600 mL/min
 検出器: F I D

(4) 結晶変換の解析

含水結晶トレハロースが無水結晶トレハロースに結晶変換する変換率は、結晶内の水分含量を測定することによって求められる。様々な条件で 2 含水結晶トレハロースを無水結晶トレハロースに結晶変換したときの変換率 Φ_c をトレハロースの水分含量を用いて以下の式で定義した。

$$\Phi_c = (m_d - m) / (m_d - m_a) \quad (1)$$

ここで m はトレハロースの水分含量で m_d

と m_a は 2 含水結晶トレハロースと無水結晶トレハロースの水分含量である. 本研究ではこれらの値を, 実験条件に関わらず, それぞれ 9.7%, 0.6% で一定とした (得られた無水結晶の水分含量は 0.2~0.6% の範囲であった). 結晶変換過程は, 結晶成長を解析するのによく用いられている Avrami の式を用いて相関した.

$$\Phi_a = 1 - \Phi_c = \exp [-(kt)^n] \quad (2)$$

ここで Φ_a は含水結晶の残存率, k は結晶変換の速度定数, n は結晶変換メカニズムを表すパラメータ, t は反応時間を示す. 通常, 一定温度での結晶成長では n の値は 1~4 の範囲である.

Jander 式は中心粒子 B (含水結晶) を考えてその周囲をとりかこむ反応粒子 A (無水結晶) の成分が B 粒子に向かって一方拡散するモデルにもとづいている. この式を用いて, マルトースの結晶変換速度を相関した.

$$\left[1 - (1 - \phi_c)^{1/3} \right]^2 = k_{obs} \cdot t \quad (3)$$

ここで, k_{obs} は β -含水結晶マルトースの β -無水結晶マルトースへの変換反応における β -含水結晶マルトースの消失反応速度定数である. t は反応時間である.

4. 研究成果

Fig. 2 にエタノール処理時間に対するマルトースの含水率をプロットした図を示す. 含水率は, カールフィッシャー法により測定した. この含水率変化から, 含水結晶マルトースの消失率を求めた. 実線は, Jandar の式 (3) により計算した. これは, β -含水結晶マルトースの水分子がエタノールに脱水されることにより, 水が一方拡散で抜けていく機構を推察している.

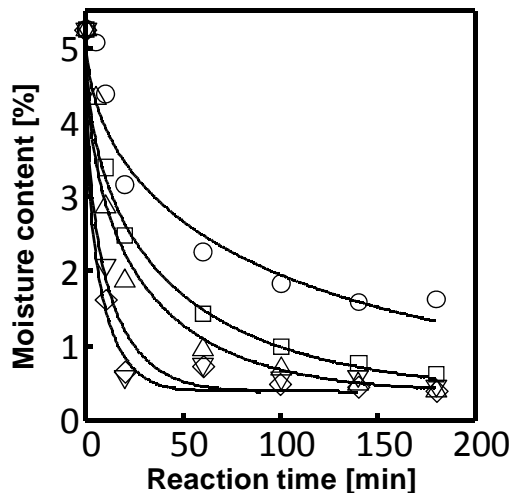


Fig.2. 含水率の経時変化
○: 45°C, □: 50°C, △: 55°C, ▽: 60°C ◇: 70°C.

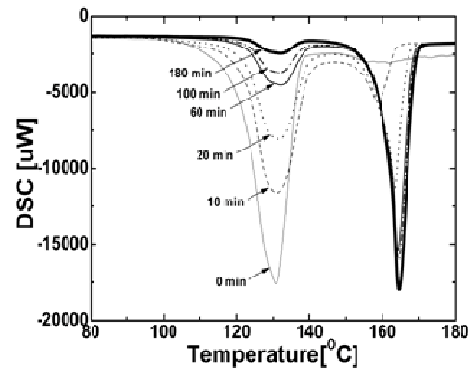


Fig.3. DSC による結晶変換挙動測定

この結晶変換を DSC で測定した例を, Fig. 3 に示す. エタノールによる脱水により β -含水結晶マルトースの融解熱のピーク 131°C の面積が減少し, 165°C のピーク面積が増加していることがわかる. 温度 50°C のときの両融解熱の面積から求めた β -含水結晶マルトースの消失率, β -無水結晶マルトースの生成率, マルトースの含水率の測定より求めた脱水率を, Fig.4 に示す. Fig. 4 から, 脱水により β -含水結晶マルトースの消失し, 少し遅れて β -無水結晶マルトースが生成していることが明らかである. これは, β -含水結晶マルトースの消失により非晶質マルトースを経由して β -無水結晶マルトースが生成していると考えられる. Jandar の式を用いて各反応速度定数の活性化エネルギーを求めた. 脱水反応速度定数,

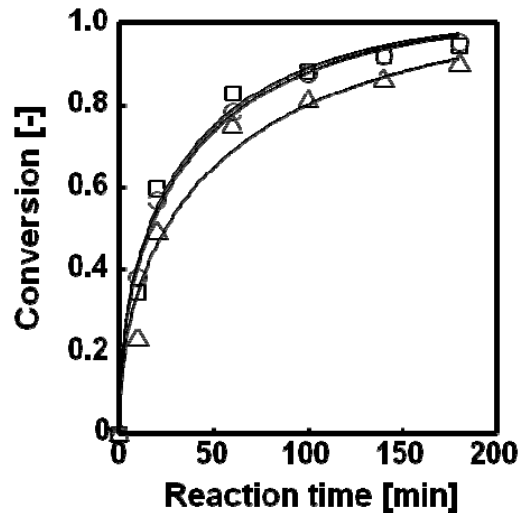


Fig.4 変換率の経時変化 (50°C)
□: 結晶水の脱水, ○: 含水結晶の消失, △: 無水結晶の生成

及び β -含水結晶マルトースの消失反応速度について 100 kJ/mol, β -無水結晶マルトースの生成速度定数について, 90 kJ/mol

が得られた。また、 β -無水結晶マルトースの生成速度定数が、脱水反応速度定数及び β -含水結晶マルトースの消失反応速度よりも遅く、結晶変換反応において α -無水結晶マルトースの生成が律速と考えられる。

DSC を用いた含水結晶から無水結晶への変換反応解析

含水結晶から無水結晶への変換反応速度を簡易的に測定するため、DSC パンを用いた反応速度解析法について検討している。DSC の特徴を生かした定速昇温法を用いてトレハロースの含水結晶から無水結晶への結晶変換速度を測定した結果を、Fig. 5 示す。

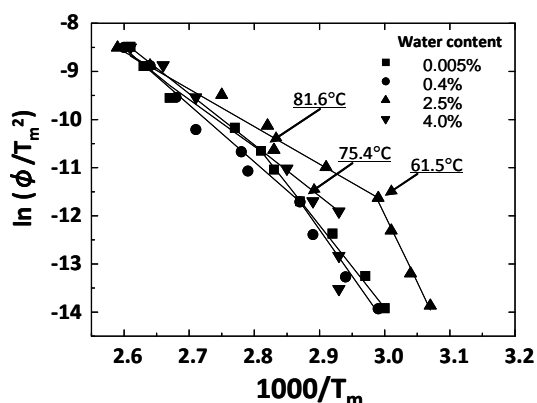


Fig.5 Kissinger 法によるトレハロースの含水結晶から無水結晶への変換反応解析

Kissinger らは、一定昇温速度 (Φ) 下での結晶変換に伴う吸熱ピークの温度 T_m を用いて反応の活性化エネルギーを求める手法を考案した。

$$\frac{d \ln(\phi/T_m^2)}{d(1/T_m)} = -\frac{E}{R} \quad (4)$$

この方法により、結晶変換反応の活性化エネルギーを求めることができる。エタノール中の含水率に依存して、屈曲点温度の異なる活性化エネルギーの直線が得られた。含水率 0.005%、0.4%、2.5%のエタノールの場合、屈曲点温度 61.5°C、75.4°C、81.6°C が観察された。屈曲点温度以下の温度に対する活性化エネルギーは約 141-145 kJ/mol であった。大橋らは攪拌槽を用いたトレハロースの脱水による結晶変換反応を実施し、結晶変換反応を Avrami の式で解析し結晶変換反応の活性化エネルギー 132 kJ/mol を報告している。DSC パンで実験した場合エタノールの流動が全くない条件での結果であるが、大橋らの報告値と近い値が得られた。屈曲点温度は、トレハロースのガラス転移温度 113°C 付近であることから含水率に依存したガラス転移温度と推察できる。4%

の含水率のエタノール場合、約 70°C 以下で結晶変換反応は生じなかった。含水結晶トレハロースから無水結晶トレハロースの変換において、糖質の非晶質構造、エタノールの脱水能が重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Paramita, V., Iida, K., Yoshii, H., Furuta, T.: Effect of feed liquid temperature on the structural morphologies of d-limonene microencapsulated powder and its preservation J. Food Sci. 75, E39-E45 (2010) 査読有
- ② Neoh, T. L., Koecher, K., Reineccius, G., Furuta, T., Yoshii, H.: Dissociation characteristic of the inclusion complex of cyclomaltohexaose (α -cyclodextrin) with 1-methylcyclopropene in response to stepwise rising relative humidity. Carbohydr Res., 345, 2085-2089 (2010) 査読有
- ③ Paramita, V., Furuta, T., Yoshii, H., Microencapsulation efficacy of d-limonene by spray drying using various combinations of wall materials and emulsifiers. Food Science and Technology Research, 16 365-372 (2010) 査読有
- ④ Lauruengtana, V., Paramita, V., Neoh, T. L., Furuta, T., Yoshii, H.: Encapsulation of enzymes by spray drying. Jpn. J. Food Eng, 10, 79-85 (2009). 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 吉井英文: 糖質結晶の新しい形を作る-エタノールを用いた結晶変換による新規糖質構造の創製-、平成 22 年度日本応用糖質科学会中国・四国支部シンポジウム、平成 22 年 11 月 19 日、酒類総合研究所、東広島、2-6(2010)
- ② Verhoeven, N., Ohashi, T., Kurozumi, S., Izumi, E., Furuta, T., Yoshii, H.: Characteristics of dehydration kinetics from hydrous sugars to anhydrous sugars in ethanol by DSC. Proceedings of the 17th International Drying Symposium (IDS2010) Volume C, 2171-2177 (2010. 10. 3-6)、Magdeburg, Germany
- ③ Verhoeven N. Ohashi T. Furuta T. Yoshii H.: Dehydration kinetics of hydrous sugars to anhydrous sugars in ethanol by DSC. 化学工学会第 42 回秋季大会、0304,

2010年9月8日、京都、同志社大学

- ④吉井英文：招待講演、環境応答型 フレーバー徐放噴霧乾燥粉末の作製とその特質解析、化学工学会第42回秋季大会、0217, 2010年9月7日、京都(2010)、同志社大学
- ⑤吉井英文：噴霧乾燥法による機能性生理活性物質等の粉末化、製剤化、四国健康食品フォーラム2010、2010年9月1日、松山、松山総合コミュニティーセンター
- ⑥吉井英文、出雲栄悠、大橋哲也、Verhoeven Nicolas、Tze Loon Neoh、古田武：エタノール溶媒法を用いた砂糖の新規微細結晶化、日本食品工学会第11回(2010年度)年次大会、125(P09)、2010年8月4日、東京、東京海洋大学
- ⑦吉井英文：機能性食品粉末の創製、FOOMA JAPAN 2010、アカデミックプラザ、2010年6月8-11日、273-274、東京(2010)、東京国際展示場

[その他]

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/foodeng.yoshii/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉井 英文 (YOSHII HIDEFUMI)

香川大学・農学部・吉井英文

研究者番号：60174885