界面活性剤を用いずに難水溶性および親水性食品成分を分子レベルで 混合する技術と難水溶性食品機能性成分の高度水可溶化

岡山大学大学院 自然科学研究科 今村 維克

1. 研究の目的と背景

食品分野においては、親水性が極端に異なる物質を均一 に混合することが不可欠な場合が少なからずある。例え ば、β-carotene などの色素の多くや香気成分、さらに脂 溶性ビタミンなどの機能性成分の多くは、難水溶性であ り、デンプンやタンパク質からなる親水性の texture 中に これらをいかに均一混合・分散するかは、重要な課題であ る。特に curcumin のように脂溶性の機能性成分は本来、 生体中における溶解性、そして生体利用性が低いが、食品 texture 中での機能性成分の混合・分散状態を改善するこ とで生体利用性も改善することが知られている。従来の食 品材料において、親油性および親水性物質の均一混合は乳 化成分を添加することによって可能となっていたが、製品 組成の精密化およびコストダウン、さらには人体に対する 影響の観点から、界面活性物質を用いない脂溶性・水溶性 物質の混合技術は極めて重要となっている。

一方、アモルファス固体とは、結晶のように一定の分 子配向/配列を持たないまま流動性を失った構造体であ り、溶融状態のまま固化したため、媒質中に分散すること が出来れば、貧溶媒中においても溶解状態にすることがで きる.実際,難水溶性の薬物をアモルファス化した上で水 に溶かすと一時的に薬物濃度が飽和濃度の何倍にも達する ことが知られている^[1]. 逆に糖などの親水性物質もアモル ファス化すれば有機溶媒に溶解度以上に溶解する^[2].ここ で、難水溶性物質は有機溶媒に容易に溶解することを考え れば、以下のようにして、極めて溶解性の高い糖の固体マ トリクスの中に難水溶性物質を、界面活性物質を用いるこ となく,分散・包括できると考えられる^[3,4]:予め難水溶 性成分を溶解した有機溶媒にアモルファス化した糖を過溶 解させ、この糖と疎水性成分の混合溶液から有機溶媒を脱 溶媒する.これにより,糖のアモルファス固体中に機能性 成分が分子状態で分散した固体分散体が得られると考えら れる.これにより、生体内を含む水溶液系における難水溶 性物質の溶解度を高度に改善できる可能性がある.

本研究では、(i)上述の糖の有機溶媒に対する過溶解 現象を利用して、surfactant-free な難水溶性物質の固体分 散体の調製を行った.(ii)固体分散体における難水溶性物 質の状態(結晶性)および(iii)再溶解時(水中)におけ る難水溶性物質の溶出特性を調べた.

研究の方法

<u>実験材料</u>糖として二糖である a-maltose, trehalose, palatinose と糖アルコールである maltitol (和光純薬工 業株式会社製)を用いた.有機溶媒としては methanol (ナカライテスク)を用いた.難水溶性成分として,食 品性分である curcumin と分子内に塩素原子を含む indomethacin (ともに和光純薬工業)を用いた.

<u>糖のアモルファス化と有機溶媒 (methanol) に対する溶解</u> 各種糖を精製水に 100 mg/mL になるように溶解した. 調製した糖水溶液を液体窒素により瞬時に凍結し, 直ちに 凍結乾燥した^[5]. さらに P₂O₅ 共存下の真空デシケータ内 で3日間以上保存することにより残留水分を完全に除去し た.得られた糖類アモルファス試料は methanol 溶液に添 加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間撹拌するだけで室 温(15~30°C)条件で 100 mg/mL までは全て溶解する ことが分かっている^[4].尚, methanol 中における糖の溶 解濃度を測定する場合には、適当時間間隔で 100 μ L ずつ サンプリングし、採取した溶液を孔径 0.2 μ m のシリンジ フィルターで濾過した上で、フェノール - 硫酸法により糖 濃度を定量した^[6].

<u>固体分散体調製</u>難水溶性成分を予め(0.1~10 mg/mL, 通常1 mg/mL)溶かした methanol にアモルファス化し た糖を100 mg/mL になるように添加・溶解した.得ら れた糖/難水溶性成分混合 methanol 溶液を100 µL ずつ, ポリプロピレン製サンプリングチューブに分注し,直ち に真空乾燥を行った.真空乾燥は遠心濃縮器(Micro Vac MV-100,トミー精工社製)とダイアフラム式真空ポンプ (DA-15D, ULVAC 社製)を組み合わせて通常2h行った (固体分散体試料).尚,試料溶液の真空乾燥過程を把握す るため,糖/難水溶性成分混合の methanol 溶液について 乾燥時間と残留溶媒(methanol)量の関係を試料重量の 変化から求めた.

<u>固体分散体の分析(示差走査熱分析 DSC, フーリエ変換赤</u> <u>外分光分析 FTIR, 走査型電子顕微鏡 SEM, エネルギー分 散 X 線分光分析 EDAX)</u>真空乾燥によって得られた固 体分散体試料を示差走査熱量計(TA Q2000, TA インス ツルメンツ社製)を用いて分析した.調製した固体分散試 料をアルミ製密閉パン(15 μ L)に 3-15 mg 充填し, 0℃ から 200℃まで 3℃ /min で昇温した.比較のため,難水 溶性成分および糖単体の試料の熱分析も行った.見かけ の比熱変化からガラス転移温度, T_g を読み出すとともに, 糖の結晶の融解に伴う吸熱ピークの有無から,調製した固 体分散体試料の非結晶性を検証した.

 一部の試料については、赤外線吸収(IR)スペクトル を測定した。Nicolet 社製 Magna 560 FTIR を用いて拡散 反射法(SpectraTech 社製 Gemini システム)により測定 した。得られたスペクトルを比較し、水および methanol から乾燥した糖の相互作用状態を調べた。

調製した固体分散試料のミクロ構造を観察するため、走 査型電子顕微鏡(SEM)観察を行った。Hitachi E-1030 ion sputter 装置(Hitachi High-Technologies Co.)を用 いて、試料表面にplatinum/palladium 合金を40 nmの 厚みで蒸着し、KEYENCE VE9800 scanning electron microscope(KEYENCE Co.)により加速電圧は15 kV で観察した。また、難水溶性物質として indomethacin を用いた場合は、上述の SEM システムと組み合わせた KEYENCE VE9800 EDAX system により、SEM での観 察視野における炭素元素,酸素元素,塩素元素の分布をマッ ピングした(curcumin は炭素,酸素,水素以外の元素を 含まないため、固体分散試料内における分子レベルの分布 を解析できない).

<u>難水溶性物質の水溶解性測定</u>作製した固体分散試料 は 37℃の水浴中で精製水に添加し、マグネティックス ターラーを用いて撹拌した.このとき、難水溶性物質の 精製水に対する添加量は curcumin の場合は 10 µg/mL, indomethacin の場合は 50 µg/mL とした.適当時間間 隔でサンプリングした試料溶液の UV スペクトルを測定 し、curcumin の場合は 300 ~ 500 nm 付近に検出される curcumin 特有のピークの面積値を算出した.難水溶性物 質として indomethacin を用いた場合は 318 nm における 吸光度を読み出した (indomethacin の場合はサンプリン グした溶液は予め孔径 0.2 µm のシリンジフィルターでろ 過したものを分析した). これらピーク面積および吸光度 と,予め測定した検量線から水に対する難水溶性物質の溶 解濃度を求めた.

研究の内容

有機溶媒(methanol)を溶媒とする糖/難水溶性成分混合 溶液の真空乾燥過程 Fig. 1 に各種糖/methanol 溶液の乾 燥過程の測定結果を示す.乾燥開始とともに溶媒は急激に 蒸発していく(この時点では発泡は生じていない)が,あ る程度乾燥が進むと乾燥の進行が緩やかになった.その後, 発泡が生じると再び急激に乾燥が進行した.発泡後,数分 で methanolの残留量は検出限界(0.01 g-methanol/g-dry matter)以下になり,30分も乾燥すれば methanolの残留 許容量(30 mg/10 g-dry matter)^[7]以下になると考えられ る.

Vacuum foam drying とは、真空下での発泡により乾燥 面積が増加し、その結果、乾燥を迅速に進行させるもので ある.これまでワクチンなどのバイオ産物の乾燥に適用さ れている^[8,9].本実験においても発泡現象により、乾燥時 間が格段に短縮された.しかし、発泡は本質的に確率的に 生じるものであり、一定の乾燥(減圧)条件においても 発泡が生じるタイミングはサンプルによってまちまちとな る.実際、本実験でもサンプル毎に、真空乾燥における乾 燥履歴、そして、得られる材料の性状も様々なものとなっ た.そこで、筆者らは発泡のタイミングをコントロール する手法について模索した.その結果、比較的低真空(~ 1,000 Pa)で1時間真空乾燥後(この時点では発泡は生じ ていない、trehalose の場合は2時間)、一旦、乾燥を停止



Fig. 1 Drying processes for methanol solutions containing sugar and a model drug (indomethacin) during vacuum drying at 25° C. Initial concentrations of sugar and indomethacin were 100 mg/mL and 1 mg/mL, respectively, which corresponds to a 1% w/w indomethacin content in the solid dispersion. The solution volume was 100 µL. The arrow in the graph denotes the time point at which the vacuum drying was interrupted and the sample solution was then stimulated with a stainless steel needle, which resulted in the immediate foaming of the solution after the restart of the vacuum drying. The results for the absence of needle-stimulation are shown as cross marks.

して、試料溶液を針 (needle) で刺し抜きし、その後、真 空乾燥を再開すると直ちに発泡が生じた. このときの発 泡確率は100%であり、乾燥履歴を制御することに成功し た. また,発泡により乾燥が速やかに進行するため,乾燥 時間を劇的に短縮することができた.以下の実験検討では、 「needle 刺激」により乾燥履歴を画一化した試料を用いた. Surfactant-free 固体分散体の分析 糖 (α-maltose) と難水 溶性成分 (indomethacin) からなる固体分散体を調製し, 難水溶性成分単体とともに示差走査熱分析(DSC)を行っ た(Fig. 2). その結果,固体分散体において糖結晶の融 解に伴う吸熱ピークは認められなかった. また、ガラス転 移特有の比熱変化が見られたことから、糖は非晶質状態を 維持していることが分かった.また,ガラス転移温度(Tg) は糖単体からなる場合(90℃)^[10]よりも50℃以上低下し ているものの,一点しか検出されなかったことから,難水 溶性成分(indomethacin)は糖のマトリクス中に均一に分 散しているものと考えられる.

各種 surfactant-free 固体分散試料についてガラス転移 温度を測定した結果,室温よりやや高い程度であり,保存 安定性の点で,既存の固体分散体よりも著しく劣ることが 分かった.

Fig. 3 に糖 (α-maltose) と難水溶性成分 (indomethacin) からなる固体分散体の SEM image と EDX によって酸素



Fig. 2 DSC thermograms for surfactant-free solid dispersions (SD) of indomethacin as well as their constituents (indomethacin and α -maltose). Solid dispersions were obtained from methanol solutions, containing 100 mg/mL α -maltose and 1 of 10 mg/mL indomethacin. Arrows in the graph denote T_{α} values.

原子と塩素原子の分布をマッピングした結果を示す. 調製 した固体分散試料は厚みが数 µm 程度の薄片からなってい た. 真空乾燥時に発泡が生じ, その気泡の shell が破断す ることによってこのような構造が形成されたと考えられ る. 一方, indomethacin の塩素原子のマッピング結果より, 塩素原子(つまり indomethacin 分子)が局在している箇 所は確認できず, indomethacin が糖のアモルファス中に 分子レベルで均一に分散しているものと考えられる. Surfactant-free 固体分散試料からの難水溶性成分の水に対

<u>する溶解挙動</u> Fig. 4 に各種糖からなる curcumin 固体分 散試料の精製水中における溶解過程を示す.いずれの糖 を用いた surfactant-free 固体分散試料からの薬剤の溶解 過程は,初期に急激に溶解し,極大値を示した後,低下し, 飽和溶解度に漸近していった.このような溶解挙動は製剤 学分野において spring & parachute^[11] と呼ばれており, 結晶標品と比べて終始高い溶解濃度を示していることか ら,本固体分散技術により難水溶性物質の対水溶解性を改 善できることが検証できた.

糖の種類による違いを比較すると、糖として palatinose を用いた場合に水添加直後の curcumin の溶解濃度の極大 値が最も高くなることがわかる (Fig. 4). α -maltose を用 いた試料では、curcumin の溶解濃度の極大値は palatinose 程ではないが、低下速度 (parachute) は他の試料に比べて



Fig. 3 (a) SEM images of (a) an α -maltose-based solid dispersion containing indomethacin (0.1 g/g-sugar) and EDX elemental mapping images of (b) oxygen and (c) chloride.



Fig. 4 Dissolution profiles of model drugs in water from a surfactant-free solid dispersion, containing different types of sugars. The drug content in the solid dispersion sample was 1%w/w. The amounts of curcumin added to the water were 10μ g/mL.

緩やかであり、curcumin の生体利用性の観点からはより 有効であると考えられる.一方、trehalose および maltitol を用いた試料では、それぞれ糖(trehalose)自体の溶解 速度が遅いこと、また、methanol 中において分離しやす いこと(maltitol)により、curcumin の溶解濃度はさほど 増加しなかったものと考えられる.

Fig. 5 には curcumin と糖(α -maltose)の混合比を変 化させた場合の固体分散試料からの curcumin の対水溶解 過程を測定した結果を示す(curcumin の水に対する添加 濃度は 10 μ g/mL に固定). Curcumin に対して糖が 10 倍 量しか含まれない場合は,curcumin の溶解濃度の極大値 が低いだけでなく,極大濃度に到達するまで 10 分程度要 した.これに対し,糖の割合が高くなるにつれ,極大濃度 は最大 7 μ g/mL まで上昇し,試料の溶解も 1 分程度で完 了するようになった.また,糖を curcumin の 500 倍量加 えた場合には curcumin の極大濃度は 7 μ g/mL で頭打ち となったが,溶解濃度の低下過程が顕著にゆるやかになる ことが分かった.



Fig. 5 Dissolution profiles of curcumin in water from a surfactant-free solid dispersion, containing different contents of α -maltose. The amount of curcumin added to the water was 10 µg/mL-water.

このような傾向の原因としては次のように考えられる. まず,固体分散体の水溶液に対する溶解において,curcumin 分子の溶解濃度は固体分散体の溶解面近傍が最も高くな り,curcumin 分子の会合および不溶化も溶解面近傍で最 も生じやすくなるはずである(Fig. 6).従って,固体分 散体における糖の割合が高いほど,溶解面近傍における curcumin 分子間の距離が大きくなり,会合・不溶化より も拡散・溶解が支配的になり,バルク水溶液における溶解 濃度も高くなるものと考えられます.また,溶液中におけ る curcumin 分子の分散状態が高いほど,析出の核となる 会合体の形成が生じにくく,溶解濃度の低下速度も緩和さ れるものと考えられる(糖を curcumin の 500 倍量加えた 場合).

次に難水溶性成分として疎水性薬剤の indomethacin を 用い, surfactant-free 固体分散体からの水中における溶解 挙動を調べた(Fig. 7). Curcumin の固体分散試料と同様



Fig. 6 Possible mechanism for the increase in the deissolved concentration of hydrophobic ingredient (curcumin) with increasing the sugar content in surfactant-fee solid dispersion.



Fig. 7 Dissolution profiles of indomethacin in water from a surfactant-free solid dispersion, containing different types of sugars and PVP. The drug content in the solid dispersion sample was 1%w/w. The amounts of indomethacin added to the water were 50 µg/mL.

に α -maltose と palatinose で indomethacin の 高度な 溶解 が見られた.一方、薬剤キャリアとして両親媒性の高分 子が用いられることが多い.そこで、比較のため、両親 媒性高分子である polyvinylpyrrol-done (PVP, 平均分子 量 40,000)を用いて indomethacin の固体分散体を調製し、 その対水溶解挙動を調べた.その結果、indomethacin の 溶解濃度は糖として α -maltose と palatinose を用いた場合 と同程度であるが、高度な溶解状態が格段に長い期間維持 されていることがわかる.このことは疎水性機能性成分の 吸収性、そして、生体利用性の点で、本研究で考案した surfactant-free 固体分散技術は従来の両親媒性高分子を用 いた技術の水準に至っていないことを意味している.

4. 研究の実施経過

平成28年度早々より、実験的検討を開始し、秋頃まで に上記結果をほぼ得た.当該年度は、難水溶性成分として 食品添加物であるcurcuminと、これと並行して、難水溶 性物質が扱われることが多い薬剤分野より indomethacin を含む数種類の薬剤成分を取り上げ、surfactant-free 固 体分散技術の可能性について検討した.これらの研究結

果は Molecular Pharmaceutics 誌にすでに発表した (Mol. Pharm., 14: 791-798 (2017)). 尚. これらの検討の過程で、 本研究で用いた surfactant-free 固体分散技術において, (i) 固体分散体自体の保存安定性(ガラス転移温度)が低 い、そして(ii)難水溶性成分の溶解性が既存の両親媒性 高分子を用いた場合よりも著しく劣る、という2点の課題 が明らかとなった. そこで, 当該年度秋以降, まず, なぜ, (i) surfactant-free 固体分散試料のガラス転移温度が低くなる のか,その原因を検討した.その結果,糖分子のコンフォ メーションが水から乾燥した場合と有機溶媒から乾燥した 場合で異なることが明らかとなった. その知見に基づき, 糖分子のコンフォメーションを正常化する方策として熱処 理を行い、ガラス転移温度を相当程度上昇させることに成 功した. また、この熱処理が(ii) 難水溶性物質の対水溶 解特性に対する影響を調べた. その結果, surfactant-free 固体分散試料を熱処理することにより、難水溶性物質の溶 解濃度の低下が高度に緩和され、両親媒性高分子を用いた 場合よりも格段に溶解状態が維持されるようになった. 以 上の検討内容は「6.残された課題,今後の課題」に示す.

5. 研究から得た結論,考察

糖を凍結乾燥などによって非晶質化することで,有機 溶媒に高度に溶解することができる.この現象を利用 し,両親媒性物質を用いることなく糖のアモルファスマ トリクス中に curcumin などの難水溶性物質を均一に分 散包括した固体分散体を調製することに成功した.この surfactant-free 固体分散技術により難水溶性物質の水に対 する溶解性を改善することに成功した.さらに,調製した surfactant-free 固体分散試料に一定の条件で熱処理を加え ることで,難水溶性物質の対水溶解性(溶解状態の安定性) および固体材料としての物理的安定性(ガラス転移温度) を格段に改善できることが分かった.

6.残された問題、今後の課題

本研究で用いた surfactant-free 固体分散技術において, (i) 固体分散体自体の保存安定性(ガラス転移温度)が 低い,そして(ii) 難水溶性成分の溶解性が既存の両親媒 性高分子を用いた場合よりも著しく劣る,という2点の課 題が明らかとなった.本研究では,さらにこれらの課題に ついても切り込んだ.まず,(i) surfactant-free 固体分散 試料のガラス転移温度が低くなる原因について知見を得る ため,水および methanol 中での糖分子が占める体積を測 定・比較した.すなわち,既知量(10 mL)の水あるいは methanol に既知量の絶乾したアモルファスα-maltose を 加えてゆき,それに伴う体積変化を求めた(Fig. 8).糖 アモルファスの展開量に対する体積の増加勾配は糖の単位 質量当たりの見かけの体積であり,Fig. 8 で各直線の勾配 を比較すると,マルトース分子の占める体積が methanol 中ではかなりコンパクトになっていることが分かった.



Fig. 8 Relationships between solution (methanol or water) volume and the added amount of amorphous maltose. A $0 \sim 3$ g of amorphous sugar (α -maltose) was added to 10 mL of Water of MeOH. Apparent Partial Volume was determined as an increased volume per added amount.

次にα-maltose をそれぞれ水および methanol から乾燥 した試料の赤外線吸収スペクトルを測定した (Fig. 9). 測定した IR スペクトルの内, 糖の水酸基の伸縮振動に起 因する吸収帯を比較すると, methanol から乾燥した試料 のピーク波数は水から乾燥した場合より低波数側に位置し ていることが分かる.ここで,水酸基の伸縮振動のピーク 波数は,分子間水素結合の形成度と対応していると考え る.従って, methanol から乾燥したアモルファスマトリ クスの方が分子間水素結合を高度に形成していると考えら れる.上述の糖分子の methanol 中における占有体積に関 する知見と考え合わせると,糖のアモルファスマトリクス において糖分子間の平均距離が小さい,つまり,糖分子の 占有体積が小さく,分子間水素結合の形成度が高くなった ものと考えられる.



Fig. 9 IR spectra of amorphous sugar matrices, dried from methanol and water. Amorphous sugar (α -maltose) matrices were prepared by freeze-drying an aqueous solution and vacuum foam drying a methanol soulution (100 mg/mL).



Fig. 10 Glass transition temperatures and OH stretching peak wavenumbers for surfactant-free solid dispersion samples, heated at different temperatures for 60 min. A-Maltose and indomethacin were used as sugar and model hydrophobic ingredient, respectively.

上述の結果より、糖分子が methanol から乾燥されるこ とにより窮屈な conformation を取っている可能性が考え られるが、その場合、何らかの外部刺激を加えれば、糖分 子の conformation が正常化され、物理的安定性の指標で あるガラス転移温度も高くなる可能性が考えられる. そこ で、調製した surfactant-free 固体分散試料を種々の温度 で加熱し、そのガラス転移温度および水素結合形成度(糖 の水酸基の伸縮振動波数)を測定した(Fig. 10). その結果, ガラス転移温度, O-H 伸縮振動のピーク波数とも温度に対 してシグモイド型の曲線を示し、水から凍結乾燥によって 調製したときの値に漸近していくことが分かった. シグモ イド型に変化する理由としては次のように考えられる。ま ず、加熱による熱エネルギーで糖分子のコンフォメーショ ンが,安定な水から乾燥したときのものに近づいていくが, その際、糖分子のコンフォメーション変化は、まわりの分 子と協同的に動いていくものと考えられる. その結果, 温 度が高く,動ける分子が多くなるほど,コンフォメーショ ン変化が顕著になり、結果的に自触媒型の傾向を示したも のと考えられる.

次に、固体分散試料を熱処理した後、精製水に溶解し たときの indomethacin の溶解濃度を測定した(Fig. 11). これより、熱処理によって indomethacin の最大溶解濃度 は少し低下するが、溶解濃度の減少速度が格段に緩やかに なり、PVPと比べても、非常に長い時間、高濃度を保て るようになることが分かった。

現在は methanol 以外の有機溶媒を用いて surfactantfree 固体分散体を調製したときの物性解析を進めている.



Fig. 11 Dissolution profiles of indomethacin in water from a surfactant-free solid dispersion, heated at 120°C for 60 min, as well as PVP-based solid dispersion. The drug content in the solid dispersion sample was 1%w/w. The amounts of indomethacin added to the water were 50 μ g/mL.

引用文献

- Hancock, B.C., and Parks, M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm. Res.*, 17: 397–404 (2000).
- [2] Flores, M.V., Naraghi, K., Engasser, J.M., and Hailing, P.J. Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl 2-butanol. *Biotechnol. Bioeng.*, 78: 815–21 (2002).
- [3] Imamura, K., Ishida, N., Imanaka, H., Satoh, T., Miyake, K., Yoshiyama, N., and Matsuura, T. *Japanese pantent application* No. 2014–06195.
- [4] Satoh, T., Hidaka, F., Miyake, K., Yoshiyama, N., Takeda, K., Matsuura, T., Imanaka, H., Ishida, N.,and Imamura, K. Surfactant-free solid dispersion of fatsoluble flavour in an amorphous sugar matrix, *Food*

Chem. 197: 1136-1142 (2016).

- [5] Imamura. K., Asano. Y., Maruyama, Y., Yokoyama, T., Nomura, M., Ogawa. S., and Nakanishi, K. Characteristics of hydrogen bond formation between sugar and polymer in freeze-dried mixtures under different rehumidification conditions and its impact on the glass transition temperature. J. Pharm. Sci., 97: 1301-1312 (2008).
- [6] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Repers P.A., and Smith, F.Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350–356 (1956).
- [7] Japanese Ministry of Welfare, "Guidelines for residual solvents in drug products," 1998.
- [8] Pisal, S., Wawde, G., Salvankar, S., Lade, S., and Kadam, S. Vacuum foam drying for preservation of LaSota virus: Effect of additives. *AAPS PharmSciTech*, 7: article 60 (2006).
- [9] Ohtake, S., Martin, R., Saxena, A., Pham, B., Chueh, G., Osoro, M., Kopecko, D., Xu, D-Q, Lechuga-Ballesteros, D., and Trung-Le, V. Room temperature stablzatio of oral, live attenuated Salmonella entercaserovarTyphivectored vaccines. *Vaccine*, 29: 2761-2771 (2011).
- [10] Roos, Y., and Karel, M. Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food model. *J. Food Sci.*, 56: 38–43 (1991).