Proc. Sch. Sci. TOKAI UNIV.
47 (2012) 89–101

広帯域誘電分光法による部分的に氷結した ゼラチン水溶液のダイナミクス

佐々木海渡，藤田圭史，疋田由貴，山本航，栗山直哉，喜多理王，新屋敷直木，八木原晋

〒 259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1
東海大学 理学部 物理学科
E-mail: naoki-ko@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp
（2011 年 9 月 20 日受付；2011 年 11 月 4 日受理）

Dynamics of Partially Crystallized Gelatin-Water Mixture by Broadband Dielectric Spectroscopy

by

Kaito Sasaki, Keishi Hujita, Yuki Hikita, Wataru Yamamoto, Naoya Kuriyama, Rio Kita, Naoki Shinyashiki and Shin Yagihara

Department of Physics, Tokai University,
4-1-1 KitaKaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292, Japan
E-mail: naoki-ko@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp
(Received on Sept. 20, 2011; accepted on Nov. 4, 2011)

Abstract

We investigated partially crystalized gelatin-water mixtures with gelatin concentrations in a range of 10 − 35 wt% by Broadband Dielectric Spectroscopy (BDS) in

wide frequency (10 mHz-3 GHz) and temperature (113-298 K) ranges. Three dielectric relaxation processes were observed. The temperature dependences of the three relaxation processes observed for the gelatin-water mixtures are similar to those observed for the BSA-water mixtures. The fastest relaxation process is originated from uncrystallized water (UCW) in hydration shell and its relaxation time is good agreement with UCW in various uncrystallized binary water mixtures. The intermediate relaxation process is originated from ice and its temperature dependence of the relaxation time and strength are resembles in pure ice relaxation process especially above 240 K. The slowest relaxation process is originated from hydrated gelatin. This relaxation has a large value of the relaxation strength and it is similar to that of the relaxation of hydrated BSA. The characteristic properties of gelatin-water mixture are the change of the temperature dependences of relaxation times of the relaxations of UCW and hydrated gelatin at around 260 K, above which the melting of ice occurs.

1 緒言

生体中において，水に次いで多量に含まれているのはタンパク質である。それは，生体を構成する高分子であり，特に水を溶媒としたときに，その特有な構造を保ち，機能を発現する [1,2]。多くのタンパク質はその構造や機能の面で，数多くの研究がなされているが，水溶液中でのそれらの分子運動に関しては，構造や機能に関する研究と比べ解明されていない点が多い。分子運動の観測の難しさの最大の原因は，タンパク質や水，またその両方に起因する複数個の様々な運動モードが存在し，それらの時間スケールが，何桁にも及んで分布していることが挙げられる。

本研究で観測手法として用いた誘電分光法（Broadband Dielectric Spectroscopy:BDS）は，誘電体に交流電場を印加した時の電流を測定し，測定試料のインピーダンスから，複素誘電率 ε^* の周波数依存性を得る方法である。我々は，10 mHz − 3 GHz の周波数範囲，緩和時間 τ では，おおよそ 20 s − 50 ps に対応する広域な時間スケールでの運動を同時に観測することができる。

これまでの誘電分光法による広い温度，濃度範囲における様々な合成高分子水溶液の研究 [3] や，非水素結合性液体を溶媒とした合成高分子溶液の研究から，溶媒の凝固点 T_c 以下で溶液中の溶媒が凍結した場合でも，一部の溶媒は低温でも凍ることなく，液相を保った溶媒が溶液内に存在することが確かめられた。溶媒の部分的な凍結による凍結濃縮が，凍結した溶液中での合成高分子のダイナミクスに大きく影響していることが明らかにされている。

さらに，Oguni らによる断熱カロリメトリーを用いた氷結した 20 % (w/w) ウシ血清アルブミ

ン (BSA) 水溶液の熱容量とエンタルピー緩和速度測定 [4] により，複数のエンタルピー緩和 (ガラス転移) が報告された。300 K から 80 K に急冷後，200 − 240 K でアニールした BSA 水溶液では，1）100 K，2）135 K，および 3）180 K 以上の温度で 3 つのエンタルピー緩和が観測され，それぞれ，1）タンパク質に束縛された水和水，2）タンパク質構造の開口部に局在した内部の水，3）タンパク質の特定構造を持たない領域，の再配列に起因するものと解釈された。しかし，断熱カロリメトリーで観測できる緩和は時間領域が比較的長い 100 − 1000 s に限定されており，観測された緩和のメカニズムを理解するためには，広い温度範囲および周波数域の BDS 測定が最も有効である。そこで，我々は様々な濃度の部分的に氷結した BSA 水溶液の BDS 測定を，2 mHz − 1.8 GHz の周波数域，80 − 270 K の温度域で行ったところ，断熱カロリメトリーで観測された 3 つのエンタルピー緩和に近い温度域で緩和時間が 100 s 程度となる，不凍水 (I 緩和)，氷 (II 緩和)，水和したタンパク質 (III 緩和) の 3 つの緩和が観測された。特に，不凍水の緩和は，その緩和時間の温度依存性が低温で凍結しないさまざまな水溶液で観測された不凍水のものとよく似ていることがこれまでに分かっている [5]。

本研究では，球状タンパク質である BSA とは異なり，トリプルヘリックス構造をとる繊維状タンパク質のコラーゲンに熱を加えて破壊した，ランダムコイル状のゼラチンを溶質とした水溶液を使用し，ゼラチン濃度 10 − 35 wt%の範囲で，凍結する温度を含む 113 − 298 K の温度範囲を，10 mHz − 3 GHz の周波数域で BDS 測定を行い，観測された緩和の特徴を様々な水溶液や BSA 水溶液のものと比較した。

2 実験

溶質には，洗浄による脱イオン処理を行ったブルーム強度 251 bloom，分子量約 60000 g/mol，PM Bio 製，豚皮由来のゼラチンを使用した。ここで言う洗浄とは，ゲル化させた濃度 10 wt%程度のゼラチンゲルを，5 mm 角の立方体に裁断し，比抵抗 18.3 MΩ・cm の純水（Millipore, Milli-Q Lab.）中に浸すことで，ゲル中のイオンを水中に分散させ，ゼラチンからイオンを除去する。一般に生体高分子は電解質高分子であるため，その水溶液の複素誘電率は溶液中に含まれるイオンの影響による直流電気伝導成分や電極分極などにより分子運動に起因する緩和が隠れてしまう。そのため，イオン除去は必要不可欠であり，球状タンパクなどでは，透析膜を使う方法がよく使われる。溶媒には，蒸留後，紫外線による殺菌やイオン交換を施した比抵抗 18.3 MΩ・cm の純水 (Millipore，Milli-Q Lab.) を使用した。測定試料として，これらの溶質，溶媒を用い，ゼラチン濃度 C_{gelatin} が 10，20，30，35 wt%となるようにそれぞれ調製し，313 − 333 K に加熱し，約 30 分間マグネティクスタラーで撹拌し均一に混合した。

BDS 測定は, 10 mHz − 3 GHz の周波数範囲を, Alpha-A Analyzer（Novocontrol）, Impedance/

Material Analyzer (IMA)（Agilent Technology, E4991）の二つの装置を使用した。測定温度範囲は，Quatro Cryosystem（Novocontrol）を使用し 113 − 253 K の間 を 10 K ごと，254 − 274 K の間を 1 K ごと，さらに 283 K と 298 K で ±0.01 K の範囲に温度を安定させて昇温過程で BDS 測定を行った。

3 結果及び考察

図 1 に 35 wt%ゼラチン水溶液の，123 − 298 K の温度での複素誘電率の実部 ε'(a) および虚部 ε"(b) を示す。低温側のデータから説明すると，まず 123 Kにおいて緩和が低周波側から測定周波数範囲に見え始める。この緩和のピークが虚部で明確に確認できるのは，図 1 (b) では 153 K 以上である。この最も低温で観測された緩和を I 緩和と呼ぶ。163 K で 2 つ目の緩和が低周波側から見え始め，この緩和のピークは図 1 (b) では 173 K から現れる。これを II 緩和と呼ぶ。更に 203 K で別の緩和が低周波側から見え始める。しかし，電極分極及び，直流電気伝導成分の寄与により，この緩和のピークは虚部では隠されてしまい，図 1 (b) ではっきりと確認できるのは 268 K 以上の温度である。これを III 緩和と呼ぶ。すべての緩和は温度上昇に伴い高周波側へとシフトする。I 緩和の虚部のピークは 254 K 以上では測定周波数範囲の高周波側へと外れた。温度上昇による緩和のシフトとは別に，II 緩和は 270 K 付近で III 緩和と重なってしまい，2 つの緩和を識別することが困難になり，III 緩和の虚部のピークは 273 K 以上で識別することができなくなった。この挙動を明らかにするためには，より高周波側の測定が必要である。

I，II，III の 3 つの緩和過程を Cole − Cole の式 [6] で記述することができ，この 3 つの緩和に加え，電極分極（EP），直流電気伝導成分（DC）を仮定して式（1）の様に足しあわせてカーブフィットを行い，測定で得られた複素誘電率をうまく記述することができた。

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon_{\mathrm{I}}}{1+(i\omega\tau_{\mathrm{I}})^{\beta_{\mathrm{I}}}} + \frac{\Delta\varepsilon_{\mathrm{II}}}{1+(i\omega\tau_{\mathrm{II}})^{\beta_{\mathrm{II}}}} + \frac{\Delta\varepsilon_{\mathrm{III}}}{1+(i\omega\tau_{\mathrm{III}})^{\beta_{\mathrm{III}}}} + \frac{\Delta\varepsilon_{\mathrm{EP}}}{1+(i\omega\tau_{\mathrm{EP}})^{\beta_{\mathrm{EP}}}} + \frac{\sigma}{i\omega\varepsilon_0} \quad (1)$$

ここで τ は緩和時間であり，注目する分子運動の時間スケールを反映し，$\Delta\varepsilon$ は緩和強度であり，緩和に寄与する双極子モーメントの大きさや，単位体積当たりの双極子モーメントの数，温度などで決まる。$\beta(0 < \beta \leq 1)$ は緩和の対称的な広がりを表すパラメータであり，β の値が小さいほど広がった緩和となる。ε_∞ は測定周波数よりも高い周波数の誘電率，i は虚数単位，σ は電気伝導度，ω は角周波数である。図 2 に 35 wt%，260 K の複素誘電率を式（1）で得た曲線と共に示す。

カーブフィットにより得られた 35 wt%ゼラチン水溶液のそれぞれの緩和の τ， $\Delta\varepsilon$， β と Johari らによる純粋な氷の緩和時間 τ_{ice}[7] の温度依存性を図 3 に示した。それぞれの緩和の特徴を以下に記述する。

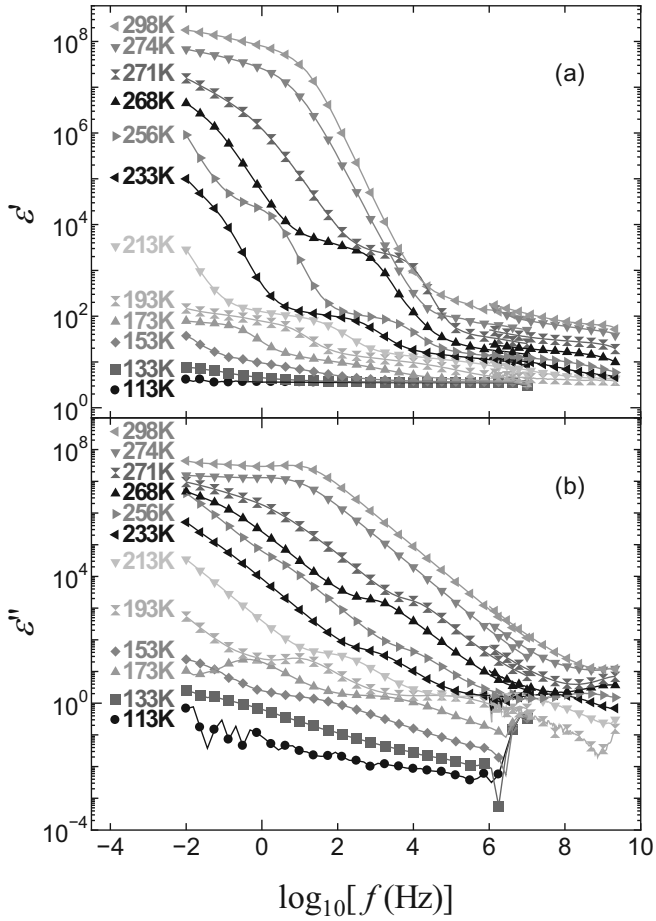


図 1: 113-298 K での 35 wt%ゼラチン水溶液の複素誘電率の実部（a）と虚部（b）の周波数依存性を示した。10 mHz-10 MHz を Alpha-A analyzer （Novocontrol）で，1 MHz-3 GHz を Impedance/Material Analyzer （Agilent Technology， E4991）で測定した。各温度はそれぞれのマークとマークの濃淡に対応している。

I 緩和

まず，最も高周波側に観測される I 緩和について述べる。図 3(a) より τ_{I} は温度の上昇に伴い小さくなっているが，その温度依存性が 260 K 付近で変化していることが確かめられる。図 3(b) から，$\Delta\varepsilon_{\mathrm{I}}$ は低温から 260 K 付近まではわずかに増加しているが，260 K 以上では急激に大きくなる。さらに，図 4 に示すように，C_{gelatin} が高くなると $\Delta\varepsilon_{\mathrm{I}}$ が大きくなる事がわかる。

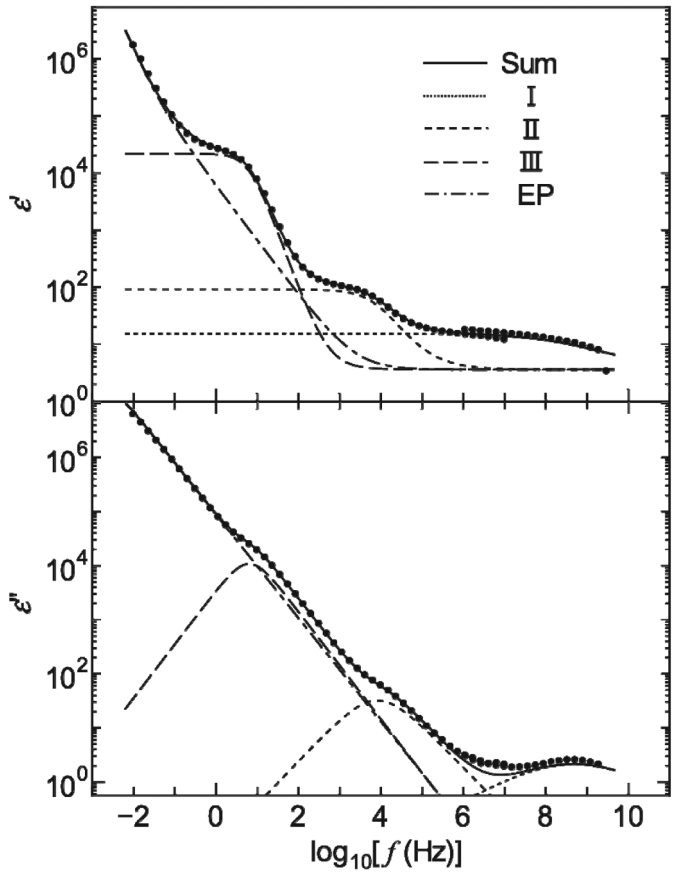


図 2: 35wt%ゼラチン水溶液 260 K での解析例として，I 緩和，II 緩和，III 緩和，電極分極（EP）とその足し合わせを示した。プロットは実測値である。

様々な物質で誘電緩和時間と熱測定によって得られたガラス転移温度の関係が調べられてきた [8]。その結果によると，誘電緩和時間が 100 − 1000 s になる温度で，熱測定でガラス転移が観測された。そのため BDS 測定では，ガラス転移の原因となる分子運動によって引き起こされる緩和の τ が 100 秒または 1000 秒になる温度を，その緩和に寄与する分子運動のガラス転移温度 T_g と定義してきた [8]。図 3（a）から I 緩和の T_g が 128 K であることがわかる。Oguni らによる 20 wt% BSA 水溶液の熱測定により得られた 3 つのエンタルピー緩和のうち，最も低温で観測されたエンタルピー緩和は T_g=110 K[4] である。一方，Oguni らによる 1.1 nm の細孔に水を含んだシリカゲルの断熱カロリメトリーによる熱測定 [9] で観測された細孔に捉えられた凍らな

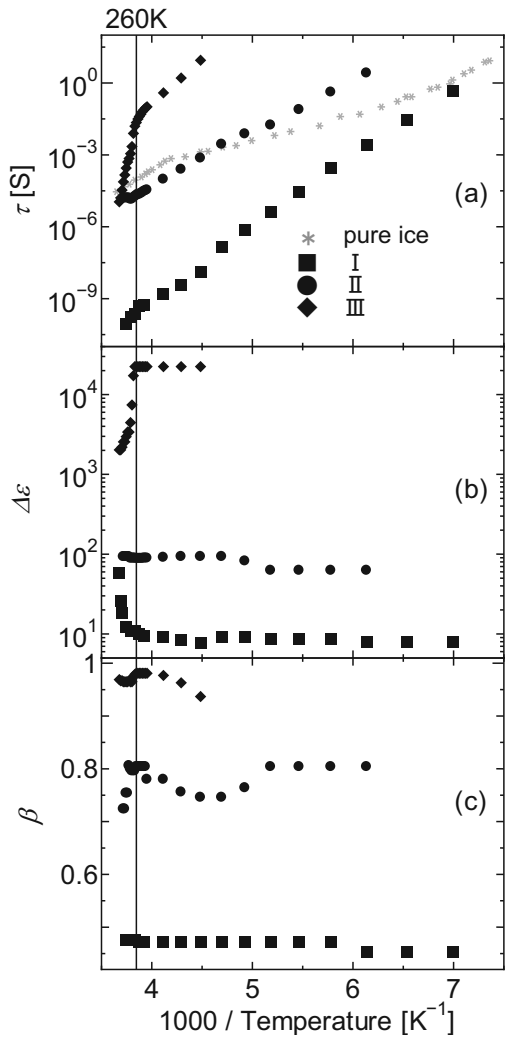


図 3: 35wt%ゼラチン水溶液の，緩和時間（a），緩和強度（b），緩和の形を表すパラメータ（c）の温度依存性を示した。■が I 緩和（不凍水），●が II 緩和（氷），◆が III 緩和（水和ゼラチン）を示し，＊が Johari らによる純粋な氷の緩和を示している。

い水の緩和であると解釈されている早い緩和は，T_g=115 K であり，低温でも凍らない水であると解釈された。その後，我々が行った 20 wt% BSA 水溶液の BDS 測定により得られた最も早い緩和である不凍水の緩和の T_g=92 K[5] とほぼ一致していたが，どちらもゼラチン水溶液の I 緩

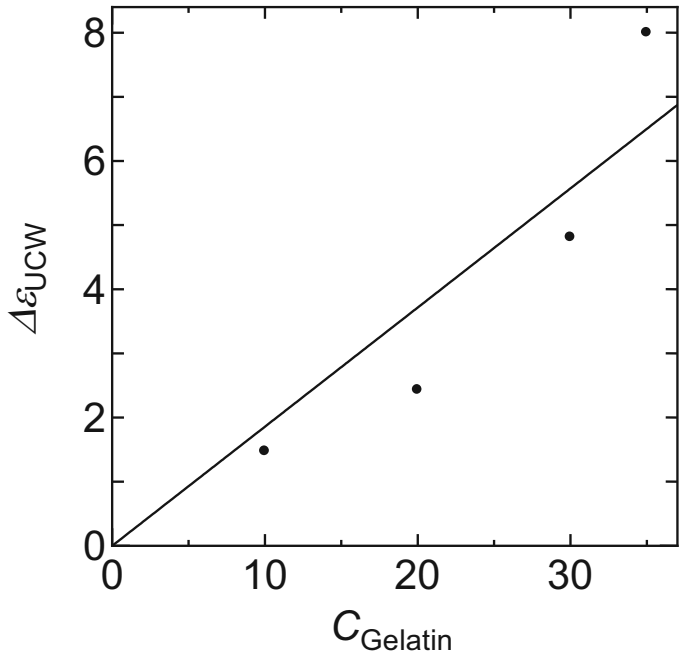


図 4: 143 K における I 緩和（不凍水）の緩和強度のゼラチン水溶液濃度に対するプロット。直線は最小二乗法により原点を通る直線を描いた。

和の T_g よりも低い温度である。しかし，ゼラチン水溶液で観測された I 緩和の τ_{I} やガラス転移温度は，ガラス転移温度以下まで氷結せずガラス状態となる様々な水溶液 [10,11] で観測された水分子の局所的な運動による緩和とよく一致する。

BSA 水溶液で最も低温で観測された不凍水の緩和に類似しており，ガラスを形成する様々な氷結しない水溶液での水の緩和と緩和時間及び緩和強度がほぼ同等であること，さらに，図 3(b) から，260 K 付近で $\Delta\varepsilon_{\mathrm{I}}$ が急激に大きくなることがわかるが，これは I 緩和に由来する分子の量が増えていると考えられる。これは，氷が溶けて不凍水量が増えていることを示唆している。さらに水の融点に近づくことで I 緩和の強度が急激に増加し，融点以上で水の緩和と一致することから，ゼラチン水溶液で観測された I 緩和は低温でも氷結せずに液体状態で存在することのできる水分子の運動に由来するものである。この水が低温で氷結しないのは不凍水がゼラチン近傍に存在していたり，囲まれた状態であるため，氷の結晶構造を形成できないためと推測される。

II 緩和

図 3(a) から，τ_{II} は温度の上昇に伴い小さくなるが，他の緩和にみられるような明らかな温度依存性の変化は認められない。$\Delta\varepsilon_{\mathrm{II}}$，$\beta_{\mathrm{II}}$ は 173 − 270 K の温度範囲において，温度によらずほぼ一定値を示した。しかし，270 K 付近で III 緩和に隠れてしまい II 緩和のピークを認識することができなくなった。また，水の融点である 273 K 以上で II 緩和の存在を完全に認識できなくなることや，τ_{II} の温度依存性が，特に 240 K 以上の高温において，我々と Johari らによる純粋な氷の τ_{ice} [7] とよく一致すること，さらに，図 3(a) から得られたゼラチン水溶液の II 緩和の T_g が 145 K であり，我々が行った 20 wt% BSA 水溶液の BDS 測定により得られた氷の T_g=139 K[5] とよく一致したことから，II 緩和は氷の緩和である。

Oguni らによる 20 wt% BSA 水溶液の熱測定 [4] でも 135 K にブロードなエンタルピー緩和が見られ，彼らによってタンパク質構造の開口部に局在した内部の水の緩和と解釈されたが，その根拠は熱測定で観測された T_g が水よりは高温でタンパク質の局所的な運動よりも低温であることから強く束縛されたタンパク質に取り込まれた水であると解釈された。しかし，後に我々が行った同じ水溶液での BDS 測定 [5] と，我々と Johari らによる純粋な氷の τ_{ice} [7] との比較などにより，明らかに II 緩和は氷の緩和であり，同じ温度で現れたエンタルピー緩和も氷の緩和であると考えられる。

III 緩和

最も高温で現れる，つまり，低周波側で観測される III 緩和について，Oguni らによる 20 wt% BSA 水溶液の熱測定では，170 − 220 K の温度範囲にエンタルピー緩和が見られ，我々による BDS 測定では，202 K に水和 BSA の T_g が存在した。一方，本研究で得られたゼラチン水溶液の III 緩和の T_g は 210 K であり，BSA 水溶液で観測された T_g とほぼ同等か少し高温である。Oguni らによる BSA 水溶液の熱測定で見られた最も高温で観測された緩和は，タンパク質の特定構造を持たない領域の再配列に起因すると彼らによって解釈された [4]。

ガラスを形成する多くの水溶液において，高周波側に水の局所的な緩和が観測され，その低周波側に水和した溶質，つまり溶質分子と水分子の協同的な運動による緩和が観測される。この水の局所的な緩和と溶質と水の協同的な運動による緩和の特徴は，さまざまな分子性液体，高分子，ファンデルワールス液体の混合系などで観測された Johari-Goldstein(JG) 緩和と，ガラス転移をもたらす分子運動に起因する α 緩和とまったく同じ特徴を持つことがわかった。そのため水溶液の水の局所的な緩和と，溶質と水の協同的な運動による緩和の関係は，JG-β 緩和と α 緩和との間の関係があることが明らかにされた。溶媒である水の緩和時間は，溶質のガラス転移温度以下で活性化エネルギー 50 kJ/mol 程度のアレニウス型の温度依存性を示すが，ガラス転移温度以上の高温では，その温度依存性は変化する [10]。我々の行った BSA 水溶液の BDS 測定の結

果からも，観測された最も早い緩和と最も遅い緩和が，ガラスを形成する様々な水溶液 [5,10,12] や，Swenson らのミオグロビン-グリセロール水溶液 [13,14] でみられる水の JG-β 緩和と α 緩和の関係にあることが確かめられ，最も遅い緩和は水和している不凍水と協同的な運動をしている BSA，つまり，水和した BSA の緩和であると解釈された。ゼラチン水溶液においても同じ温度域で BSA 水溶液と類似したそれぞれの緩和が観測されたため，I 緩和と III 緩和は JG-β 緩和と α 緩和の関係にあることが期待され，III 緩和は水和したゼラチンの緩和であると考えている。

さらに，III 緩和の緩和強度が異常に大きく，タンパク質の構造ゆらぎのみに起因するとは考えにくい。これは，BSA 水溶液でも同様 [5] であるが，部分的に氷結する系によくみられる不均一な構造形成による界面分極や，高周波側に緩和強度の大きな氷や不凍水の緩和が存在するため，内部電場の影響により，III 緩和が大きく観測されることが考えられる。さらに，III 緩和は水和タンパク質の緩和以外にも，プロトンゆらぎや，洗浄で取りきれなかったカウンターイオンによるイオン性緩和の寄与が考えられる。III 緩和の強度の本質がイオン性緩和である可能性もあるが，本研究のみでは，III 緩和の強度のメカニズムを決定づけることができないため，さらなる研究が必要である。しかし，強度が大きすぎるという事実にもかかわらず，緩和時間の温度依存性から得られる III 緩和の T_g が水和 BSA の熱測定や，誘電緩和で得られた T_g に近いことは，III 緩和がタンパク質のガラス転移に関係した時間スケールであることを示唆している。

I 緩和と III 緩和の関係

図 3(a)，(b) より，I 緩和の温度依存性と III 緩和の温度依存性には関係がみられる。測定温度域において，温度の上昇に伴い，τ_{III} は小さくなってゆくが，260 K 付近を境にその温度依存性が大きくなり，τ_{I} の温度依存性も 260 K 付近で同様に変化している。さらに，低温ではほぼ一定であった $\Delta\varepsilon_{\mathrm{I}}$ が，260 K を境に急激に増大している。ゼラチン水溶液は，温度の低下に伴う部分的な氷結により，凍結濃縮が起こり，113 − 260 K の温度範囲において，不凍溶液相のゼラチン濃度は調製した濃度より高い濃度になっている。しかし，260 K 付近で氷が溶け始め，不凍水量が増加することにより，不凍溶液相のゼラチン濃度が低下する。一般に，高分子溶液では，その高分子に由来する緩和は濃度の影響を強く受け，高分子濃度が低くなれば，緩和時間は小さくなる [15,16,17]。ゼラチン水溶液では，温度の上昇による不凍水量の増加に伴い，不凍溶液相のゼラチン濃度が低下したことで，τ_{III} の温度依存性が 260 K 付近で急激に変化したと考えることができる。これは，BSA 水溶液には見られない特徴 [5] である。その原因として，水溶液中での BSA とゼラチンの立体構造の違いが考えられる。BSA は球状タンパク質であり，BSA 水溶液の誘電測定の温度範囲 [5] では水溶液中でグロビュール状態となり特定の構造を保つため，一部の氷の融解により不凍溶液相の濃度が変化してもタンパク質分子鎖の局所的な濃度はそれほど変化しない。一方，ゼラチンはランダムコイル状のタンパク質であるため，一部の氷の融解が起こる温

度で不凍水量の増加に伴い，高分子鎖が溶液中で空間的に広がり，ゼラチン分子鎖の局所的な濃度が低くなる。不凍水量の増加による溶液相のゼラチン濃度低下によりゼラチン分子鎖の運動の緩和時間が急激に小さくなったと考えることができる。さらに，20wt% BSA 水溶液における水の凝固点以下での不凍水の緩和強度は，同じ濃度のゼラチン水溶液の不凍水の緩和強度 [5] より小さい。それは，水溶液中でゼラチン分子が水と接することのできる面積が BSA に比べ大きいためと考えることができる。ゼラチン分子は水溶液中で分子鎖が広がった状態であり，同じ重量の BSA と比べるとより多くの水分子と接することができる。そのためゼラチンは BSA と比べ不凍水量が多い。

4 まとめ

周波数範囲 10 mHz − 3 GHz，温度範囲 113 − 298 K，濃度範囲 10 − 35wt% のゼラチン水溶液の BDS 測定から明らかになったこととして，以下の 3 項目があげられる。

1）3 つの緩和，I 緩和，II 緩和，III 緩和が観測され，それぞれ不凍水，氷，水和したゼラチンの分子運動に起因していると考えられる。

2）3 つの緩和の T_g が BSA 水溶液 [5] のものと比較して高い温度にあることから，ゼラチン水溶液では BSA 水溶液に比べ，全ての緩和時間が大きい。

3）260 K 以上の温度域では，I 緩和の強度の増加と共に，BSA 水溶液 [5] には見られない III 緩和の緩和時間の温度依存性の変化が見られた。これは，260 K 以上の温度で温度の上昇とともに氷が溶けることで不凍水量が増加し，その結果，不凍溶液相中のゼラチンが動き易くなったためである。

2）や 3) で挙げた BSA 水溶液とゼラチン水溶液の違いは，球状タンパク質とランダムコイル状のタンパク質であるという幾何学的な形状の違いがもたらしたと考えられる。今後，タンパク質と比較してより構造が単純な合成高分子水溶液や，エラスチンなどの繊維状タンパク質，特定のアミノ酸が規則正しく配列したポリアミノ酸などの水溶液を同様に測定することで，タンパク質構造と I，II，III 緩和をもたらす分子運動との関係を明らかにすることができると考えられる。

謝辞

本研究は東海大学プロジェクト研究「水構造プロジェクト」として，また一部科学技術振興機構研究成果展開事業・先端計測分析技術プログラムの支援を得て遂行された。関係各位に深謝する。

参考文献

[1] Ringe, D. Petsko, G. A., *The 'glass transition' in protein dynamics: what it is, why it occurs, and to exploit it.*, Biophys. Chem. **105** (2003), 667-680.

[2] Beece, D. Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Good, M., Marden, et. al. *Solvent viscosity and protein dynamics*, **19** (1980), 5147-5157.

[3] N. Shinyashiki, M. Shimomura, T. Ushiyama, T. Miyagawa, and S. Yagihara, *Dynamics of water in partially crystallized polymer/water mixtures studied by dielectric spectroscopy,* J. Phys. Chem. B **111** (2007), 10079-10087.

[4] K. Kawai, T. Suzuki, and M. Oguni, *Low-Temperature Glass Transitions of Quenched and Annealed Bovine Serum Albumin Aqueous Solutions*, Biophys. J. **90** (2006), 3732-3738.

[5] N. Shinyashiki, W. Yamamoto, A. Yokoyama, T. Yoshinari, S. Yagihara, R. Kita, K. L. Ngai, and S. Capaccioli, *Glass transitions in aqueous solutions of protein (bovine serum albumin)*, J. Phys. Chem. B **113** (2009), 14448-14456.

[6] Cole, K. S. and Cole, R. H., *Dispersion and Absorption in Dielectrics*, J. Chem. Phys. **9** (1941), 341-351.

[7] G. P. Johari and E. Whalley, *The dielectric properties of ice Ih in the range 272–133 K*, J. Chem. Phys. **75** (1981), 1333-1340.

[8] N. Shinyashiki, M. Shinohara, Y. Iwata, T. Goto, M. Oyama, S. Suzuki, W. Yamamoto, S. Yagihara, T. Inoue, S. Oyaizu, S. Yamamoto, K. L. Ngai, and S. Capaccioli, *The glass transition and dielectric secondary relaxation of fructose-water mixtures*, J. Phys. Chem. B **112** (2008), 15470–15477.

[9] Oguni, M.; Maruyama, S.; Wakabayashi, K.; Nagoe, *Glass Transitions of Ordinary and Heavy Water within Silica-Gel Nanopores*, A. Chem. Asian J. **2** (2007), 514-520.

[10] S. Capaccioli, et al. *The Johari-Goldstein β-relaxation of water*, J. Phys. Chem. B **111** (2007), 8197-8209.

[11] Shinyashiki, N.; Sudo, S.; Yagihara, S.; Spanoudaki, A.; Kyritsis, A.; Pissis, P., *Relaxation processes of water in the liquid to glassy states of water mixtures studied by broadband dielectric spectroscopy*, J. Phys. Condensed Matter **19** (2007), 205113.

[12] S. Capaccioli, K. L. Ngai, S. Ancherbak, P. A. Rolla, N. Shinyashiki, *The role of primitive relaxation in the dynamics of aqueous mixtures, nano-confined water and hydrated proteins,* J. Non-Cryst. Solids. **357** (2011), 641-654.

[13] Swenson, J.; Jansson, H.; Hedstrom, J.; Bergman, R. J., *Properties of hydration water and its role in protein dynamics*, Phys.: Condens. Matter **19** (2007), 205109.

[14] Ngai, K. L., Capaccioli, S., Shinyashiki, N., *The Protein "Glass" Transition and the Role of the Solvent*, J. Phys. Chem. B **112** (2008), 3826-3832.

[15] N. Shinyashiki, R. J. Sengwa, S. Tsubotani, H. Nakamura, S. Sudo, and S. Yagihara. *Broadband dielectric study on dynamics of poly(vinyl pyrrolidone)- ethylene glycol oligomer blends*, J. Phys. Chem. A **110** (2006), 4953-4957.

[16] N. Shinyashiki, D. Imoto, and S. Yagihara, *Broadband Dielectric Study of Dynamics of*

Polymer and Solvents in Poly(vinyl pyrrolidone) / Normal Alcohol Mixtures, J. Phys. Chem. B **111** (2007), 2181-2187.

[17] N. Shinyashiki, M. Asano, M. Shimomura, S. Sudo, R. Kita, and S. Yagihara, *Dynamics of polymer and glass transition in partially crystallized polymer solution studied by dielectric spectroscopy,* J. Biomaterials Science: Polymer Edition **21** (2010), 1937-1946.