

博士論文

ファットスプレッドにおける粗大結晶発現機構と
分子間相互作用の微細構造解析

平成21年12月

田中 礼央

ファットスプレッドにおける粗大結晶発現機構と 分子間相互作用の微細構造解析

目次

第1章 序論	(1)
1.1 ファットスプレッドとは	(1)
1.1.1 食品におけるW/Oエマルションの意義	
1.1.2 ファットスプレッドの特徴	
1.1.3 ファットスプレッドにおける固体脂	
1.1.4 ファットスプレッドの製造過程	
1.2 トランス酸とその代替技術	(8)
1.2.1 食用油脂におけるトランス酸の利用	
1.2.2 いわゆる「トランス酸問題」	
1.2.3 トランス酸代替技術とパーム油の利用	
1.2.4 パーム油の特性	
1.3 油脂の結晶化	(25)
1.3.1 油脂の多形現象	
1.3.2 油脂の結晶化過程	
1.3.3 粗大結晶の生成モデル	
1.4 ファットスプレッドにおける粗大結晶化の問題	(39)
1.4.1 粗大結晶化とファットスプレッドの組織変化	
1.4.2 粗大結晶化に及ぼすパーム油の影響	
1.4.3 粗大結晶化に関する研究動向	
1.5 油脂の微細構造解析とマイクロビーム放射光X線回折法	(40)

1.6 本研究の目的-----	(41)
参考文献-----	(41)
第2章 本研究で用いた実験方法-----	(45)
2.1 ファットスプレッド製造装置-----	(45)
2.2 脂肪酸組成分析法-----	(45)
2.3 トリアシルグリセロール組成分析法-----	(47)
2.3.1 ガスクロマトグラフィーによる分析法	
2.3.2 組成解析によるトリアシルグリセロール 分子種組成の推定	
2.4 DSC-----	(49)
2.5 光学顕微鏡観察-----	(49)
2.6 走査型電子顕微鏡観察-----	(49)
2.7 X線回折法-----	(50)
2.7.1 回転対陰極型X線回折装置	
2.7.2 放射光X線回折	
2.7.3 マイクロビームX線回折	
参考文献-----	(56)
第3章 パーム油高含有配合ファットスプレッドに おける粗大結晶化-----	(58)
3.1 試料-----	(58)
3.2 粗大結晶化に対するパーム油の影響-----	(58)
3.3 粗大結晶化に対するトリパルミチンの影響-----	(58)
3.4 考察とまとめ-----	(66)
参考文献-----	(69)

第4章	ファットスプレッドにおける	
	トリアシルグリセロール分子種の相互作用	(71)
4.1	試料	(71)
4.2	粗大結晶化に対する脂肪酸の影響	(71)
4.3	粗大結晶化に対するトリアシルグリセロールの影響	(71)
4.4	考察とまとめ	(80)
	参考文献	(81)
第5章	マイクロビームX線回折法による粗大結晶の	
	微細構造解析	(82)
5.1	試料	(82)
5.2	粗大結晶の発現過程	(83)
5.3	走査型電子顕微鏡による観察	(83)
5.4	粗大結晶の熱特性	(83)
5.5	粗大結晶の多形構造	(88)
5.6	マイクロビームX線回折法による微細構造解析	(91)
5.7	考察とまとめ	(86)
	参考文献	(104)
第6章	本研究の総括	(107)
6.1	本研究のまとめ	(107)
6.2	今後の研究課題	(109)
	謝辞	

第1章 序論

1.1 ファットスプレッドとは

1.1.1 食品におけるW/Oエマルションの意義

油脂含有食品は、ショートニング、マーガリン、ファットスプレッド、チョコレート、ドレッシング、各種クリーム類、乳製品、アイスクリーム、クリーム、マヨネーズ、あるいは各種パン製品、など多種多様である。食品の物性構造という立場からみると、固体、ゲルなどの物性の違いや、W/OエマルションやO/Wエマルション、あるいはホイップクリームなどに代表される物理状態の違いにより、それぞれ全くことなる物性を有する食品となっている。特に、エマルション系では、性質の異なる水相と油相の分散状態を制御する必要があり、油脂の存在による食品の物性制御が非常に重要であることがわかる。

エマルションとは、「互いに完全に混じり合わない二つの物質が、一方の液体中にもう一方の液体滴が、コロイド粒子滴、あるいはそれより粗大な粒子滴として分散して乳状をなすもの」である(1)。水溶液中に有機溶媒(油)が液滴を作るものは水中油滴型(oil-in-water; O/W)エマルションと呼ばれ、有機溶媒中に水溶液が液滴となるものは油中水滴型(water-in-oil; W/O)エマルションと呼ばれる。前者は乳やマヨネーズ、後者はバターやマーガリンなどに見られる。その特性は水と油の体積比、エマルションの製造法、用いた乳化剤の種類などによって決定される場合が多い。また、複数の乳化段階をふまえることによって多相エマルション(multiple emulsion)が得られる。この系は複合エマルション(double emulsion)とも呼ばれており、エマルション液滴の中にさらに液滴が含まれている系でW/O/W型とO/W/O型とがある(Fig. 1-1)。

W/Oエマルションの代表的な食品であるマーガリンは、19世紀後半に

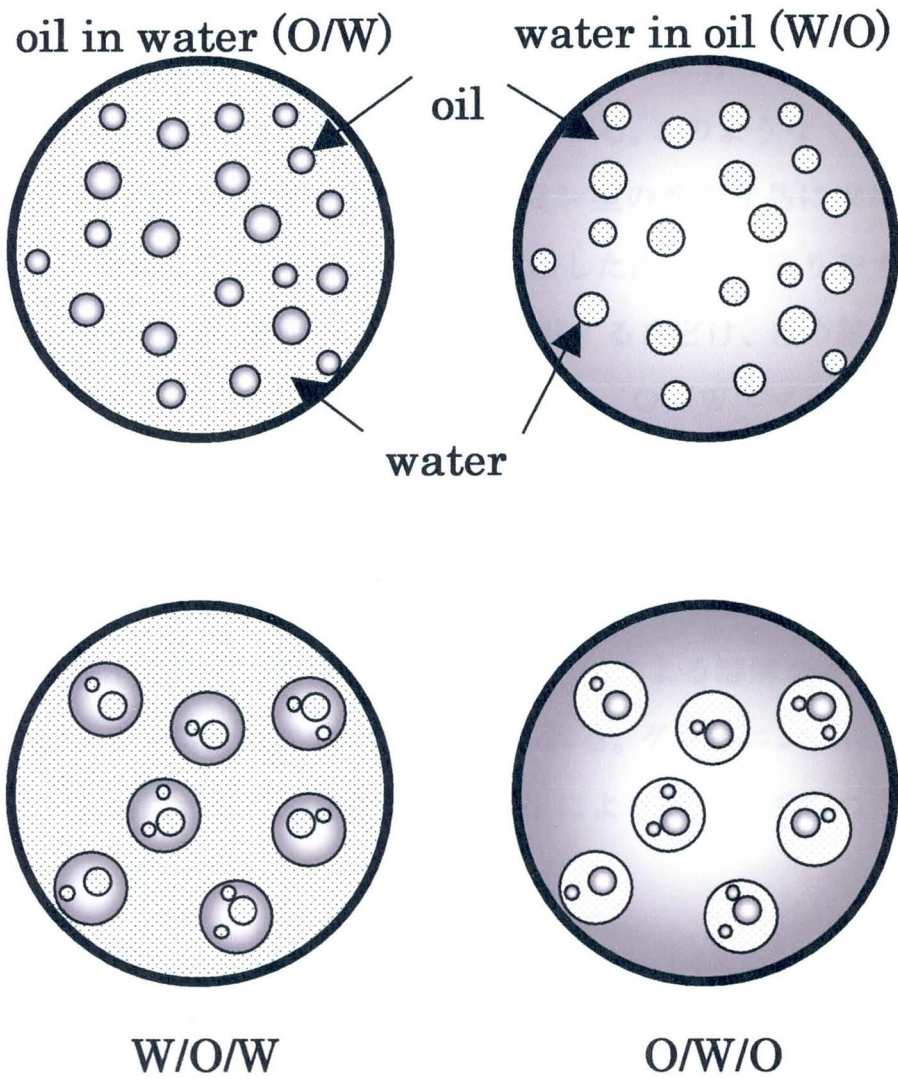


Fig. 1-1 Schematic illustration of various types of emulsion.

バターの安価な代替物として開発されたが、現在では代替物の枠を超えた食品として我々の食生活に定着している。マーガリン (margarine) という名前は、製造途中で形成される油脂の粒子が美しい真珠の粒のように見えたことから、ギリシャ語で真珠をあらわす「margarite」に由来している。マーガリンは主として植物油脂から構成されており、半固形状で可塑性あるいは流動性を有するW/Oエマルジョン型の油脂食品である。Table 1-1 に示す日本農林規格(2)では、その油脂含有率、水分、乳脂肪含有率などにより、マーガリン、ファットスプレッドなどに分類される。このようなマーガリン、ファットスプレッドなどのW/Oエマルジョン型の油脂食品に求められる物性は、色合いや艶などの外見、冷蔵庫から出した直後でも塗りやすい展延性と保形性を併せ持つ可塑性、口中温度で溶解する口どけ、きめ細かい組織の稠密度などがある(3)。W/Oエマルジョンは、O/Wエマルジョン食品と異なり連続相の油脂が物性に大きく影響を与えるため、油脂配合設計において、展延性、口どけなどの要求を満たす可塑性、粘弾性、溶解性などの物理特性の構築が非常に重要である。さらに品質確保の面から、油脂の酸化、油水分離、グレイニングあるいは流通時温度変化による溶解などの防止が、W/Oエマルジョン型食品において必要とされる。グレイニングは、W/Oエマルジョン食品における油脂結晶の粗大化により組織がざらつくことである。

1.1.2 ファットスプレッドの特徴

本論文においては、W/Oエマルジョン型食品のうち、油脂含量が80%未満であるファットスプレッドを主な研究対象として検討を行った。また、ファットスプレッドの分類では、健康志向の油分40%以下の製品も存在するが、主要なファットスプレッドでは、油脂含量が60%から75%程度、水分含量が25%から40%程度である。ファットスプレッドの主要原料をTable

Table 1-1 Standard of margarine and fat spread

category	margarine	fat spread
aspect	clear tone, good state of the flavor and emulsification, no different taste, no nasty smell	1.clear tone, good state of the flavor and emulsification, no different taste, no nasty smell 2.peculiar flavor of raw material, hardly containing impurities(when raw material of flavor is mixed)
fat	$\geq 80\%$	$< 80\%$ and to be appropriate to indication
milk fat	$< 40\%$	$< 40\%$ and $< 50\%$ in fat
fat and water	—	$\geq 85\%$ or $\geq 65\%$ (when sugars, honey or raw material of flavor is mixed)
water	$\leq 17.0\%$	—
foreign object	to be not mixed	
interior content	to be appropriate to indication	

1-2 に示す。この中で、油脂以外では乳化剤が物性に大きく寄与しており、含有量としては 0.1% から 1.0% 程度である。

Table 1-2 の油相を溶解し、予め溶解した水相を加えて乳化したものを冷却、混練することで、Fig 1-2 のような水相が微細化、分散したファットスプレッドを得ることができる。

1.1.3 ファットスプレッドにおける固体脂

1.1.1 で述べた通り、ファットスプレッドにおける油脂配合の設計は非常に重要であり、高融点油脂(融点 40°C~55°C)、中融点油脂(融点 20°C~40°C)、低融点油脂(融点 20°C以下)といった異なる融点の油脂を組み合わせて設計が行われる。特に、ファットスプレッドの骨格を形成する高融点油脂ならびに中融点油脂が、展延性や口どけに大きく影響する。

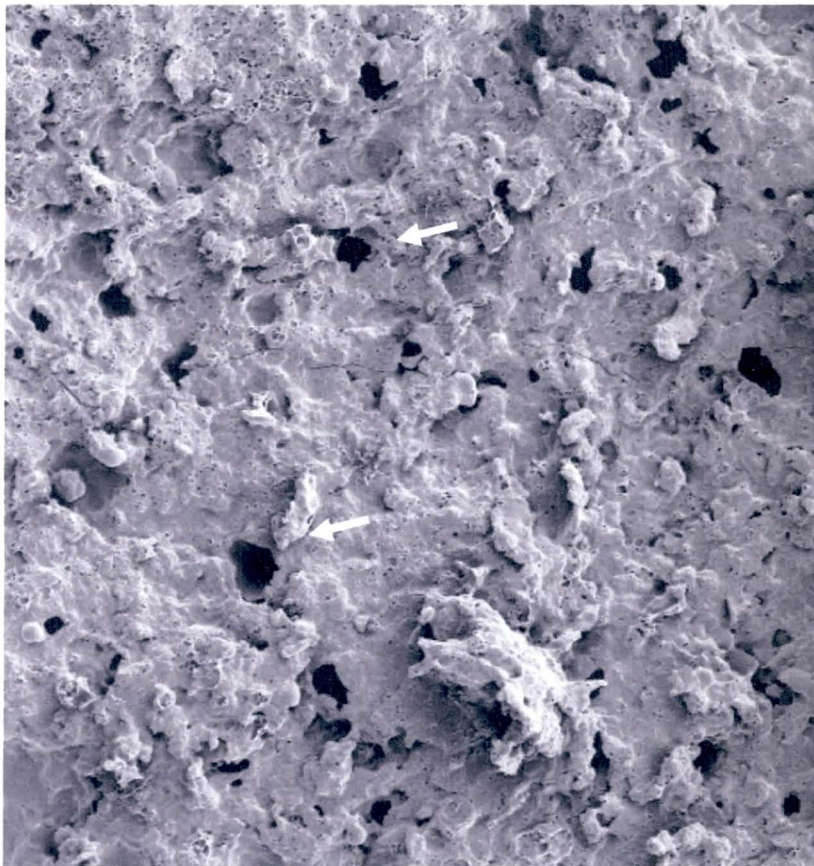
通常使用される高融点油脂の多くは天然に存在せず、油脂の水素添加による硬化によって得られる。この硬化油は、原料の油脂や硬化度合いによりトランス型脂肪酸(以下トランス酸)や飽和脂肪酸を増加させることで、様々な融点にコントロールすることが可能である。更に、水素添加によりバラエティに富んだトリアシルグリセロールが生成するため、好ましい物性を得ることができ、これまで食用油脂産業の発展に非常に大きな貢献をしてきた。

また中融点油脂は、中融点にコントロールされた硬化油に加え、トロピカルオイルであるパーム油、ヤシ油あるいはパーム核油が主として用いられる。

パーム油は、パルミチン酸とオレイン酸の含量が高く、トリアシルグリセロール組成では、1,3-ジパルミトイル-2-オレオイル-グリセロール(POP)が約 25%と 1-パルミトイル-2,3-ジオレオイル-グリセロール(P00)が 20%~25%と非常に偏った組成である。また、ヤシ油とパーム核油は、ラウリン酸を他の油脂より多く含有し、口どけの良い物性を付与することを特徴とする油脂である。

Table 1-2 Major materials of fat spread

oil phase	vegetable oil
	oil soluble flavor
	emulsifier
	food colorant
aqueous phase	water
	hydrosoluble flavor
	salt
	milk solid
	stabilizer
	preservative



10 μ m

Fig. 1-2 Electron microscope picture of W/O emulsion.
White arrows indicate water droplets in oil phase.

1.1.4 ファットスプレッドの製造過程

Fig. 1-3 に、ファットスプレッドの製造工程を示す(4)。まず油脂原料の調合では、固体脂を高温で溶解した後で他の油相成分を混合する(5)。さらに水相成分の混合によりW/Oエマルションが生成される(6)。次に、Aユニット(かきとり式冷却機、Fig. 1-4a)によりW/Oエマルションを急速冷却し油脂の結晶化を行なう。冷却時の過冷却の程度は、結晶化に影響する。過冷却の程度が小さければ、わずかな核形成しか起こらず、結晶は大きく成長する。過冷却の程度が大きければ、多くの核形成が起こり、たくさんの小さな結晶ができる(7)。

この時、同時にエマルション粒子径も微細化される。さらにBユニット(練圧機、Fig. 1-4b)により油脂結晶を混練することで、滑らかな組織を形成する(8)。最後に冷蔵による熟成(9)を経て結晶状態を安定化させることで、固体脂ネットワークが液状油を均一に抱き込み、乳化状態が安定した品質の良いファットスプレッドを得ることができる(Fig. 1-5)。

1.2 トランス酸とその代替技術

1.2.1 食用油脂におけるトランス酸の利用

天然の油脂は、その脂肪酸構成とトリアシルグリセロール分子種構成によって融点などの物理特性値がほぼ決定されるため、目的とする物性の油脂を自由に得ることが難しい。そこで、工業的に利用されるようになった技術が、水素添加による油脂の硬化技術である。これは、主としてニッケル系触媒の存在下にて脂肪酸へ水素を付加する油脂加工技術のことで、シス型不飽和脂肪酸を飽和脂肪酸あるいはトランス型不飽和脂肪酸へ変換することにより、油脂を硬化する技術である(10)。たとえば、ジエン酸であるリノール酸であれば、水素添加により、モノエン酸のオレイン酸などを経て、最終的に飽和

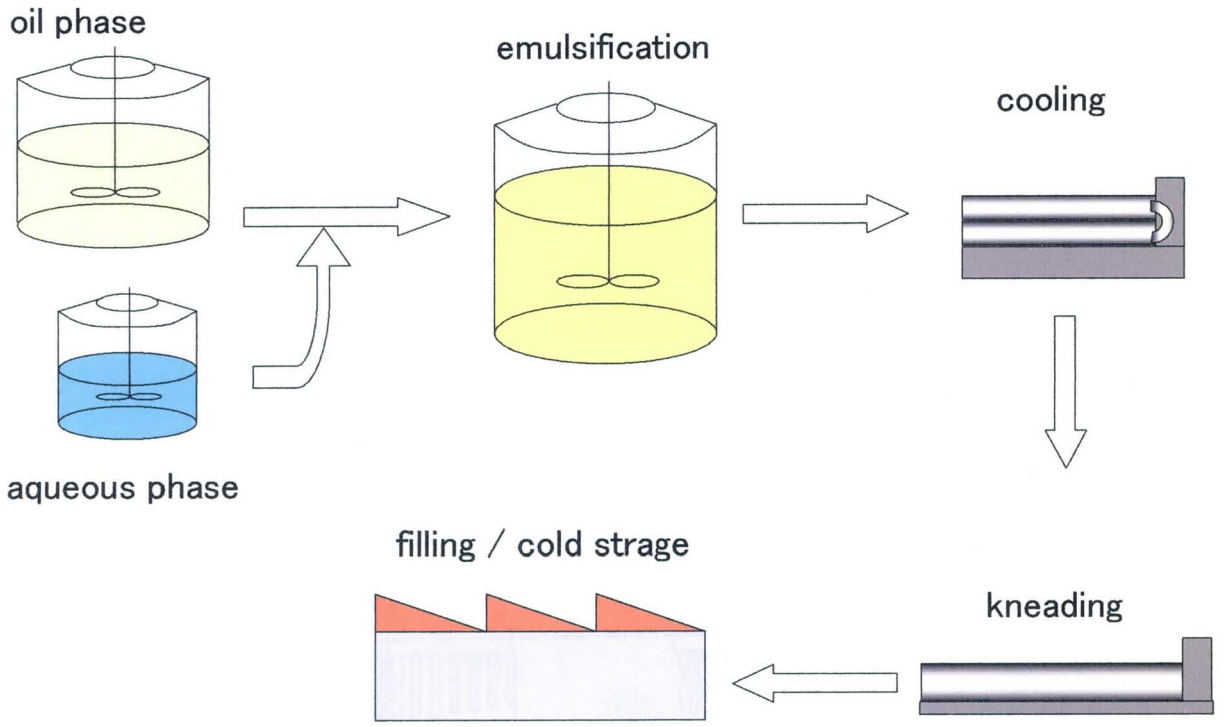


Fig. 1-3 Production process of fat spread

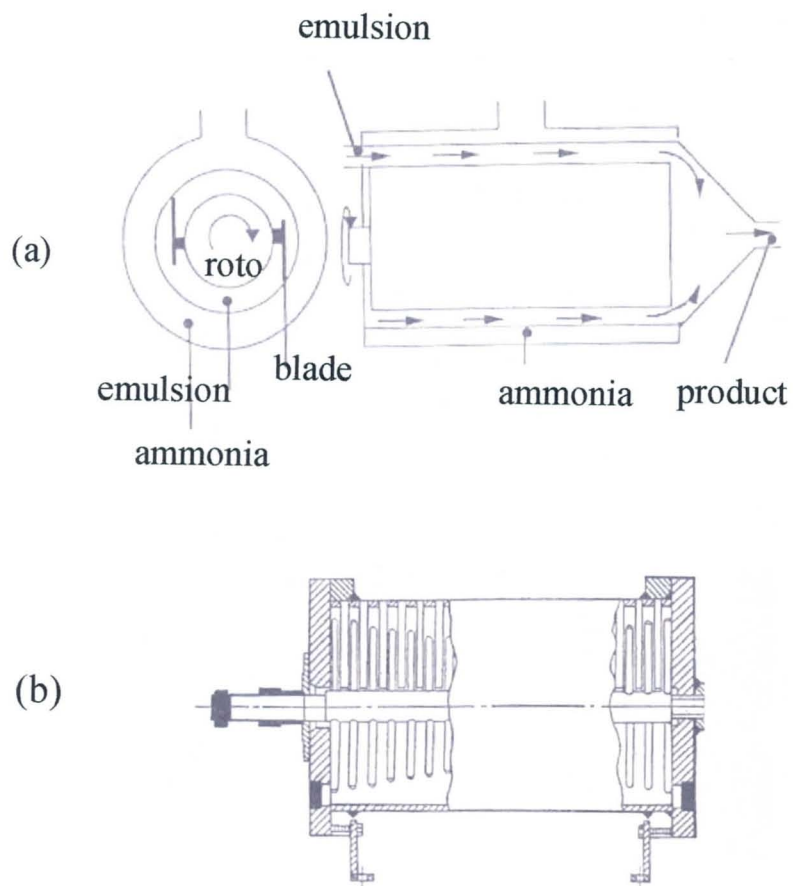


Fig. 1-4 (a) A nit and (b) B unit.

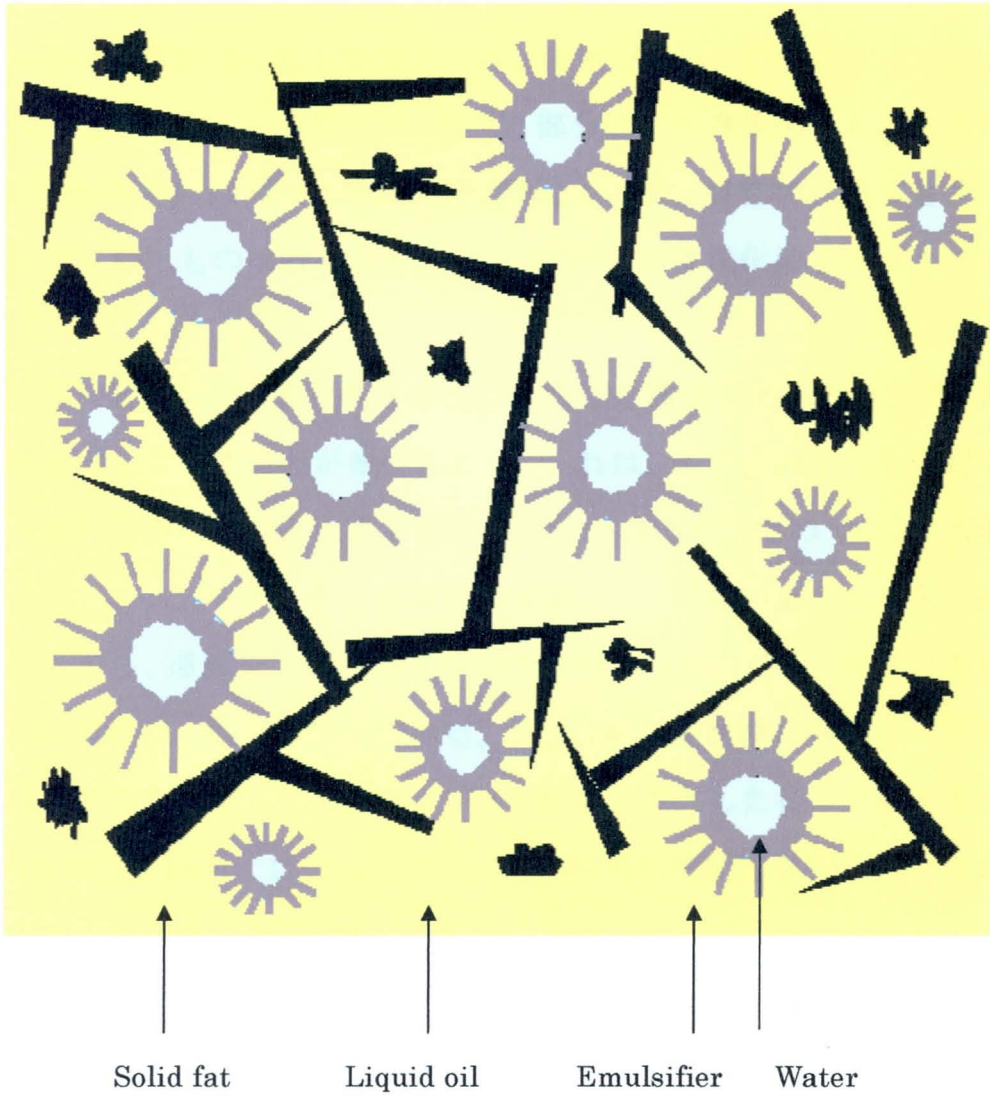


Fig. 1-5 Schematic figure of W/O emulsion

脂肪酸であるステアリン酸に段階的に変化する (Fig. 1-6)。水素添加によって得られた油脂は硬化油と呼ばれ、食用に供するものでは、食用硬化油と呼ぶ。すなわち、大豆油を水素添加したものであれば、食用大豆油硬化油となり、パーム油を水素添加したものであれば、食用パーム油硬化油となる。食用硬化油は、適度な硬さを必要とするので、部分的に水素添加されたものが多く、微水添油あるいは部分水添油と呼ばれる。一方、完全に二重結合すべてを水素添加されたものは特殊なものとして扱い、極度硬化油と呼ばれている。

水素添加の目的として、必要な硬さをもった油脂を製造すること以外に、油脂の安定性を向上させることが挙げられる。これは、酸化に対して不安定な二重結合を飽和化させることにより酸化安定性が向上するためである。水素添加の方法は、ニッケルのような金属触媒を用いて、所定の量の水素を油脂に吹き込みながら、温度を上昇させて水素を油脂に付加させる。実際に製造される工程の概略は、以下の通りである。まず、原料油を攪拌機付きの反応釜に仕込み、原料油に対して 0.05~0.15%の触媒を投入した後、水素圧常圧~ 10^5 Pa の水素圧を保ち、 $120\sim 175^\circ\text{C}$ で 2~6 時間程度反応を行ない、反応終了後に製品を抜き出す。その後、触媒をろ過によって除き、白土とクエン酸を投入して除ききれなかった触媒等の不純物を除去して硬化油を得る。

一般に、水素添加の反応性は、脂肪酸基の不飽和度の増加とともに増大する。すなわち、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸では、リノレン酸がもっとも水素添加速度が速く、オレイン酸がもっとも遅い。この反応性の差は、脂肪酸の構造に起因する。二重結合に挟まれているメチレン基は、特に反応性が高い活性メチレン基となり、その数が多いほど反応速度が高くなるためである。したがって、モノエン酸がステアリン酸に変化する前に、トリエン酸やジエン酸がほとんどモノエン酸に変化する (Fig. 1-7)。この反応速度は、水素添加の条件反応によりある程度調整することが可能である。すなわ

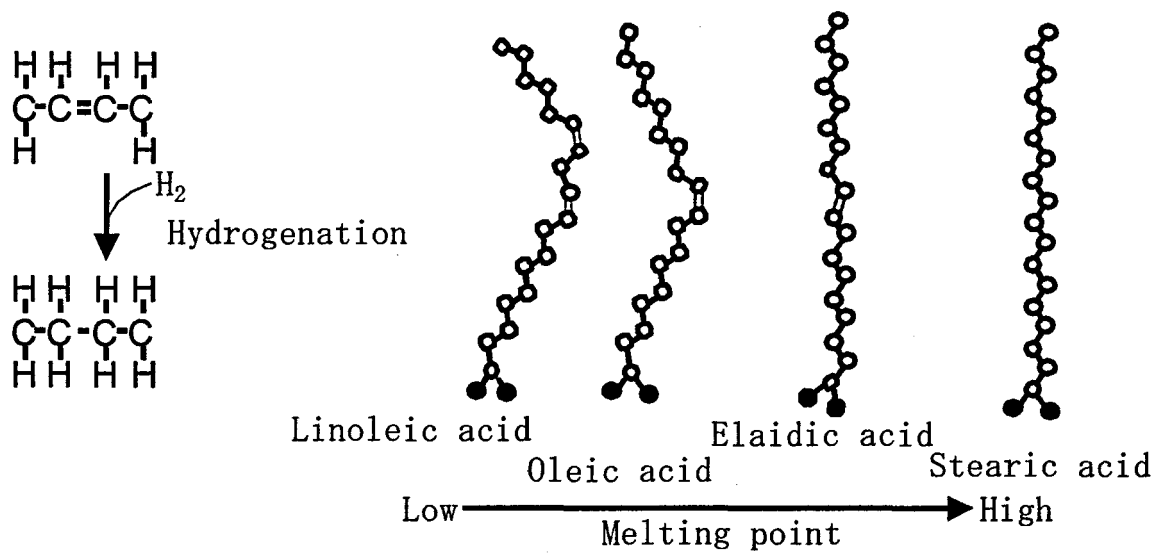


Fig. 1-6 Hydrogenation of linoleic acid.

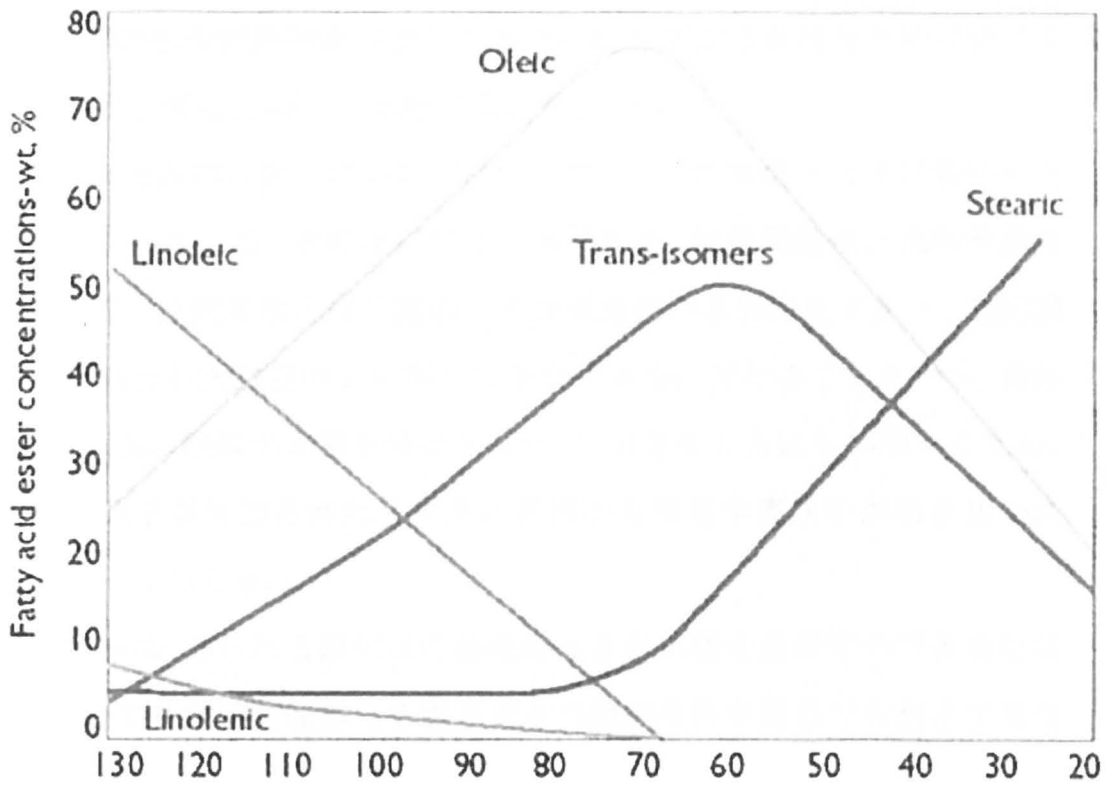


Fig. 1-7 Variation of fatty acid with iodine value during hydrogenation process.

ち、水素圧、反応温度、触媒量、攪拌速度によってこれらの脂肪酸基の反応速度を調整している。主に、リノール酸やリノレン酸を水素添加してオレイン酸を残そうとする反応条件を選択的水素添加と呼び、均一に水素添加を行なう条件を非選択的水素添加と呼ぶ。これらの反応条件は、目標とする食用硬化油脂の物性によって使い分けられ、一般的には同じヨウ素価の硬化油を得る場合、選択的水素添加を行なうと非選択的水素添加を行なう時に比べて、固体脂含量が、低温で高く、高温で低い値を示す。

さらに、水素添加の反応においては、二重結合が飽和化されずに異性化と呼ばれる反応も起こる。その反応には二種類あり、位置異性化と幾何学異性化と呼ばれる。位置異性化は二重結合の位置が変わる異性化であり、幾何異性体は二重結合が天然型のシス型からトランス型に変わることをいう。異性化は、水素添加の触媒が水素を付加する一方、引き抜く方にも作用するため、一つの水素原子が付加されたラジカル状態から再度水素原子が引き抜かれることによって生じる。

幾何異性体は、得られる硬化油の物性に大きな影響を及ぼすので重要な反応である。つまり幾何異性体化を起こすと二重結合数が同じでも融点が異なってくる。オレイン酸の場合を例にとると、オレイン酸の二重結合がトランス化した幾何異性体はエライジン酸であるが (Fig. 1-6)、オレイン酸の融点が約 11℃であるのに対してエライジン酸の融点は約 45℃と著しく上昇する。天然に存在する不飽和脂肪酸は、主にシス型脂肪酸であり融点が低い。一方、トランス型脂肪酸は不飽和型であるが、シス型脂肪酸よりも直鎖構造で融点が高い。一部のトランス型脂肪酸は天然でも存在し、反芻動物中にみられる。トランス型脂肪はシス型脂肪酸より融点が高いため、硬化の程度を進め、飽和脂肪酸とトランス酸の含有量を増加させると油脂の硬化に繋がる。また、硬化によって生成するトランス酸は多種の異性体を含むため、油脂構成脂肪酸のバリエーションを増加させることができる (Fig. 1-8)。

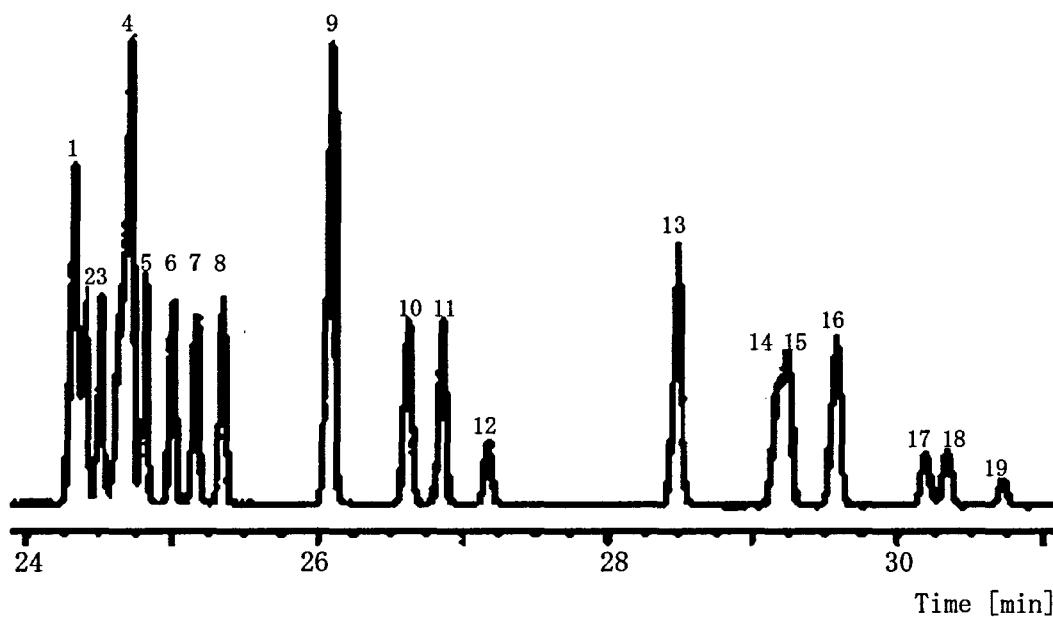


Fig. 1-8 Variation of *trans* fatty acids

1. C18:1(7t), and C18:1(6t) 2. C18:1(9t) 3. C18:1(11t) 4. C18:1(12t), C18:1(6c), C18:1(7c), and C18:1(13t) 5. C18:1(9c) 6. C18:1(11c) 7. C18:1(12c) 8. C18:1(13c) 9. C18:2 (9t, 12t) 10. C18:2(9c, 12t) 11. C18:2(9t, 12c) 12. C18:2(9c, 12c) 13. C18:3(9t, 12t, 15t) 14. C18:3(9t, 12t, 15c) 15. C18:3(9t, 12c, 15t) 16. C18:3(9c, 12t, 15t), and C18:3(9c, 12c, 15t) 17. C18:3(9c, 12t, 15c) 18. C18:3(9t, 12c, 15c) 19. C18:3(9c, 12c, 15c)

このように硬化技術は、水素の添加量による硬化度調整、すなわち飽和脂肪酸とトランス酸の含量を調整することで融点を 30℃前後から 60℃以上まで制御できるため、目的とする物性の油脂を比較的容易に得ることができる。さらにこの硬化油を用いると、ファットスプレッドの滑らかな物性に適する微細な油脂結晶ネットワークを形成し易いことが経験的に知られている。これら優れた硬化油の特性により、食用油脂産業の発展が支えられてきた。

1.2.2 いわゆる「トランス酸問題」

硬化油は、好ましい物理的特性を有する油脂として重要であるが、栄養生理学の側面からトランス酸の是非について活発な議論がなされている。これは、トランス酸が血清 LDL コレステロール濃度を増加させ、心疾患リスクを増加させるというものである(11)。この生理作用に関して様々な検証がなされてきており、デンマークやスイスではトランス酸含量の規制が行われ、米国、カナダ、韓国、ブラジル、アルゼンチン、台湾や香港などでは、表示の義務化が行われている。一方、英国、オランダ、オーストラリアやニュージーランドは規制を不要とし、EU、中国やフランスは規制を検討中であるなど、各国の対応が分かれている。摂取量に関しては、WHOの見解(12)によれば、「トランス酸の平均的な摂取量をエネルギー比で1%以下」であり、「エネルギー比で1%以下」が信頼できる基準となっている。各国のトランス酸の規制に差異がみられる原因として、トランス酸の生理作用が完全に解明されていないことが挙げられる。

まず、天然の油脂に含まれるトランス酸（反芻動物由来など）と硬化により生成するトランス酸の区別に関して、デンマークでは表示上区別されており、米国では区別されていない。この背景には、トランス酸の異性体により代謝が異なるという説と、同一であるという説の対立がある。異性体に着目した場合、天然由来のトランス酸はバクセン酸が多く、硬化由来のトランス

酸はエライジン酸が多い。そのため、この二つのトランス酸に注目した生理学的な研究が報告されているが、共に血清コレステロール上昇作用が認められないことが指摘されている(13)。特に、バクセン酸はヒト体内にて共役リノール酸に容易に転換されると考えられており、エライジン酸と代謝が異なる可能性が高い。このように、硬化油中のどの脂肪酸、あるいはどの成分が問題なのかについて、現在も研究されている段階である。

次に、トランス酸とトランス酸以外の脂肪酸を比較すると、頸動脈の内膜肥厚を指標として、1日あたりの摂取量が通常よりも1g多いトランス酸と、10g多い飽和脂肪酸では、それぞれ内膜肥厚促進効果があり、不飽和脂肪酸では抑制効果が認められている(14)。また、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸は、LDL/HDLコレステロール比に対してそれぞれ異なる影響を示し(15)、リノール酸摂取量が多い(12.5エネルギー%)場合はLDL/HDLコレステロール比が有意に低下するという報告(16)がなされている。したがって、トランス酸のみの生理学的影響ではなく、摂取される脂肪酸の種類と量を総合的にコントロールする必要がある。

日本では、国内外のトランス酸への関心の高まりを受けて、2007年に内閣府の食品安全委員会にてトランス酸に関するファクトシートが発表された。この中で、日本人のリノール酸摂取量が十分量であることと、トランス酸摂取量は、積上げ方式によれば0.3エネルギー%(0.7g/人・日)であり、WHOにおいて推奨される1エネルギー%未満を満たしていることから、日本人の平均的な摂取においては問題がないことが再確認されている。一方で、欧米人なみの摂取量(若年女性25名中3名が3.0g/人・日)の存在もあり、この層への対応が必要である。

「日本人の食事摂取基準2010年版」では、「工業的に生産されるトランス酸は、全ての年齢層で、少なく摂取することが望まれる。しかし、他の脂肪のように摂取すべき範囲(又は許容できる範囲)として表すことが困難

な脂肪酸なので、目標量としての基準設定は行っていない」とされているが、今後は、日本人に妥当な基準設定に向けた取組みが行われると考えられる。

1.2.3 トランス酸代替技術とパーム油の利用

このようにトランス酸に関しては、「少なく摂取することが望まれる」とあるように、できるだけトランス酸に替わる油脂を使用することが好ましい。トランス酸代替に関しては、以下の5つの技術が考えられる。

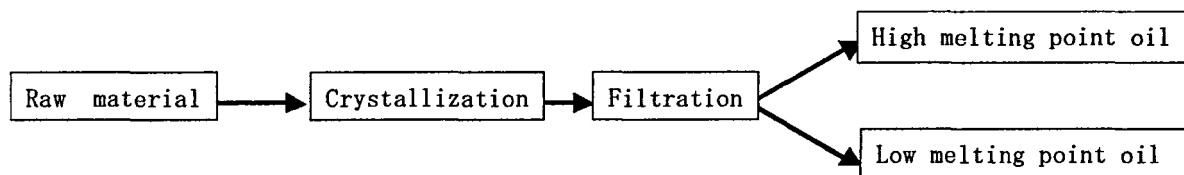
1. 水添方法の改良
2. 完全水素添加植物油と植物油のエステル交換
3. 天然の中融点油脂の分別
4. 天然の中融点油脂のエステル交換
5. 高融点乳化剤の利用

あるいは2～5を併せた方法である。水添方法の改良に関しては非常に困難であり、現実的には2～5の方法が検討されている。

特に、分別に関しては、中融点油脂であるパーム油の分別がコスト面でメリットが高く、多くの検討がなされている。Fig. 1-9 に示す通り、パーム油は、まず高融点のパームステアリンと低融点のパームオレインに分別できる。このパームオレインを分別することで、中融点画分 (PMF) とスーパーオレインとなり、さらに分別をすることも可能である。このようにして得られたパームの分別油は、ファットスプレッドに適した固体脂含量変化を示すため (Fig. 1-10)、この分別を用いた融点調整油脂の利用に関する研究が多くなされている (17, 18)。

エステル交換は、分子構造を変化させることで物性を調整する技術として重要である。エステル交換により、グリセロール骨格に結合した脂肪酸の位置を変えることができるため、分別だけでは不可能な物性が得られる (19, 20)。このエステル交換は、複数の油脂を混合して全く新しい油脂を作るこ

(a)



(b)

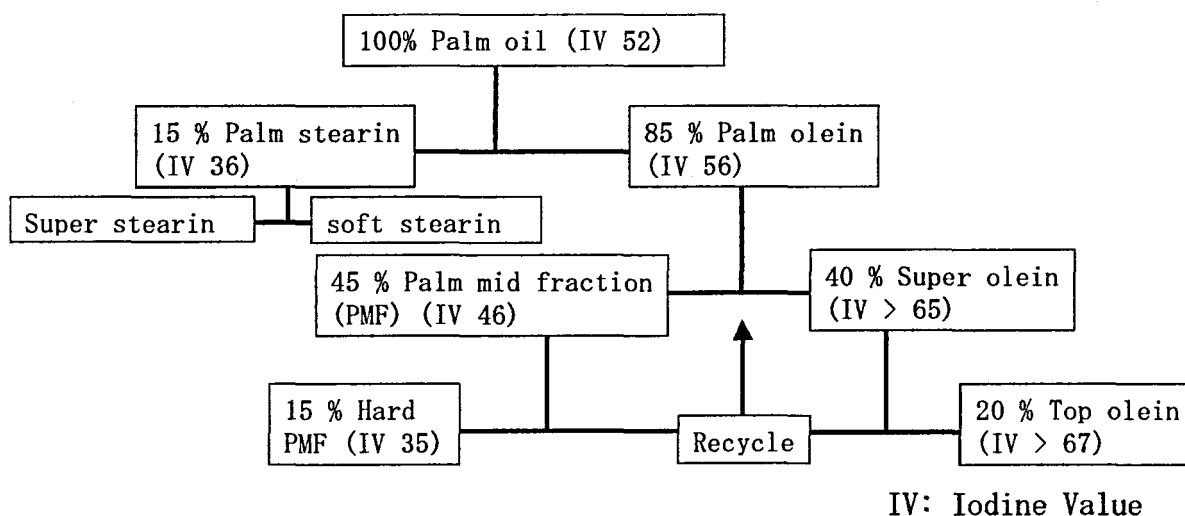


Fig. 1-9 Fractionation of Palm oil

(a) Basic process and (b) various stages of fractionation.

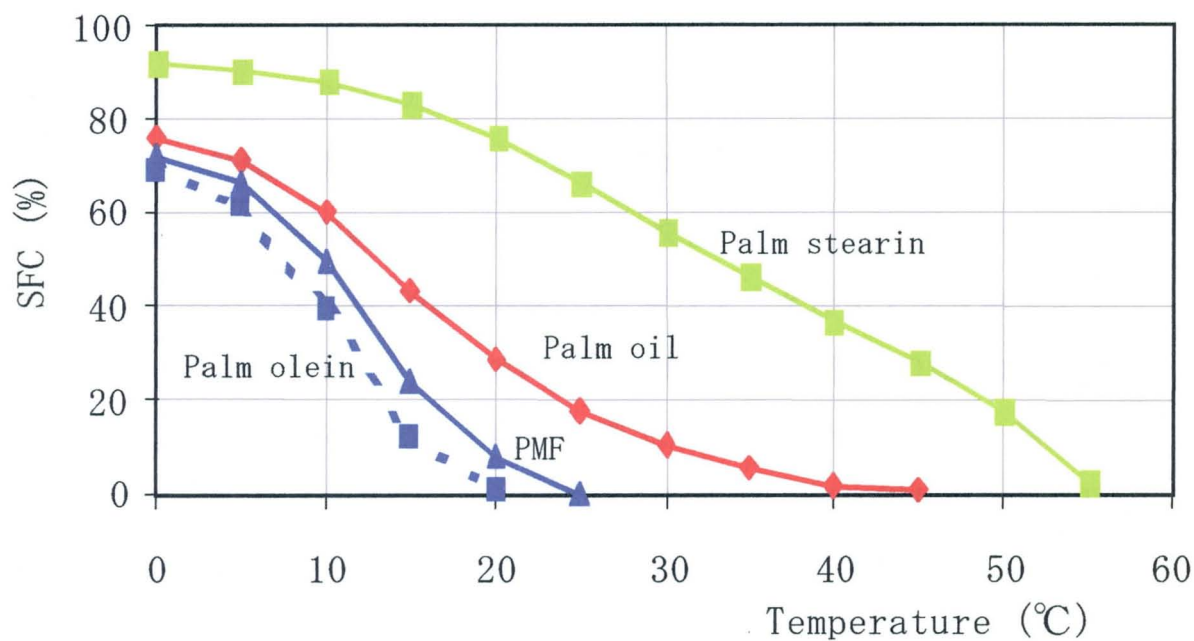


Fig. 1-10 Solid fat content (SFC) of fractionated palm oil

とが可能である。そのため、完全水素添加した高融点油脂と液状油の混合油脂や、幾つかの中融点油脂の混合油脂を、エステル交換することで、天然では得られない物性をもつ油脂を得ることが可能である。また、1種類の油脂のみで反応させることも可能であり、天然の油脂をエステル交換することで、天然油脂の改質にも使用することができ、非常に利用価値の高い技術である。

エステル交換には以下の二つの方法が用いられる。

1. 化学触媒を用いたランダムエステル交換
2. リパーゼを用いた酵素的エステル交換

ランダムエステル交換の化学触媒には、苛性ソーダやナトリウムメチレートが用いられる。実際のプロセスは、まず原料油脂を所定の温度まで加熱、その間に、真空下あるいは窒素吹込み等で十分に水分を除去し、油脂温度50℃～80℃で、触媒のナトリウムメチレートを0.2%～2%添加し、さらに攪拌を続けると、油脂の色調が濃褐色に変化し反応が終了する。

酵素的エステル交換では、加水分解酵素であるリパーゼが用いられる。本来リパーゼは加水分解酵素であるが、その反応が可逆的であることからエステル交換に用いることが可能である。加水分解作用と合成作用の平衡関係は、反応中の水分含有量に支配される。ランダムエステル交換と比較して、選択的なエステル交換が可能であり、温和な条件の常圧、常温付近での反応のため熱劣化が起こりにくいというメリットがあるが、ランニングコストが割高となる。リパーゼは、植物、動物、微生物から単離されるが、微生物由来のものが多様性に富むため一般的に用いられる。クモノスカビ(*Rhizopus delemere*)やケカビ(*Mucor javanicus*)由来のものが主流である。リパーゼの特異性には以下の4種類があり、1～3の性質を持つリパーゼを用いて選択的なエステル交換を行うことが可能である。

1. 1, 3位置のみを加水分解するもの
2. 特定の脂肪酸を加水分解するもの

3. モノアシルグリセロールあるいはジアシルグリセロールに加水分解する活性の強いもの

4. ランダムに加水分解するもの

以上のように、安価なパーム油の分別油を主体として、他の天然油脂や加工油脂とを組み合わせることでエステル交換して融点を調整することで、トランス酸を含む硬化油代替油脂に関する検討がなされている。

1.2.4 パーム油の特性

パーム油は、安価でコストメリットが高い常温で固体の中融点油脂である。すでに述べたようにパーム油は特徴的な脂肪酸組成を示し、Table 1-3 に示すようにPOP/PP0とP00が非常に多い偏ったトリアシルグリセロール組成である(21)。また、物性面の特徴として結晶化速度が遅いという特徴を持つ。そのため、ファットスプレッドの製造直後は非常に均一で滑らかな組織を有するが、徐々に結晶化が進行するため、結晶が経時的に粗大化しやすい。この遅い結晶化速度は、ジアシルグリセロールによる結晶化遅延効果と、POPやPP0の安定多形の結晶化速度が遅いことが原因となっている。パーム油は、このような非常に扱い難い物理特性を有し、その特性を改質する必要がある。一方で、パーム油は分別され易いという特性も持つため、改質にあたり分別が用いられることが多く、Fig. 1-9(b)のような分別が行われている。もちろん、分別だけではP00やPOPといった天然パーム油に多く含まれるトリアシルグリセロールの構造は変化しないため、さらにエステル交換を行ないP00やPOPを減らすこともパーム油の改質の方法として用いられる。

パーム油は熱帯における有用な油脂資源としてきわめて有望視されており、その生産量は急速に増加している。しかしながら、それを硬化油の代替として利用する技術は、いまだに多くの問題点を含んでいる。それは、主要なTAGであるPOPやOP0などのTAGの結晶化挙動に起因する。

Table 1-3 Composition of triacylglycerol species of palm oil.

<u>Molecular species</u>	<u>Ratio[%]</u>
POP/PPO	31.8
P00	22.5
PPP	7.0
POS	5.6
S00	2.4
PLP	9.2
000	3.9
POL	8.2
other	9.4

1.3 油脂の結晶化

1.3.1 油脂の多形現象

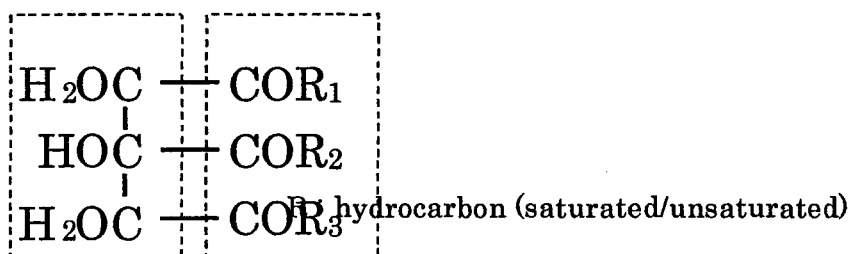
結晶多形は、「同一の化学組成を持ちながら、異なる結晶構造をもち、異なる結晶形を示す現象」と定義されている(22)。油脂の結晶は多形現象によって、その性質が大きく変化し、それはW/Oエマルションにおいても同様である。

油脂結晶には3つの代表的な多形(α 型、 β' 型、 β 型)が存在することが知られている(23, 24)。この結晶多形構造は、以下に述べる分子鎖傾斜、鎖長構造、副格子構造によって特徴付けられる。

Fig. 1-11(a)に示したトリアシルグリセロールの3本の脂肪酸の縦方向のパッキングをFig. 1-11(b)に示す。油脂分子は、横方向の引力相互作用が縦方向より強いため、ラメラ構造を形成している。ラメラの両端には、通常、メチル末端基が位置する。このメチル末端基のつくるラメラ面に対する油脂分子軸の傾きを分子鎖傾斜という。一般に隣り合うメチル末端基は同一平面上にはないため、ラメラ面に分子が垂直に配向するのは不安定であり、安定な結晶構造では分子鎖はラメラ面に対して傾斜している。

さらに、油脂結晶中のラメラ内に含まれる脂肪酸基の数が異なる場合に、鎖長構造が異なる。例えば、パーム油に多く含まれるPOPの β' 型は2鎖長であり、 β 型は3鎖長である(Fig. 1-11(b))。2鎖長構造では、基礎となるラメラ構造に2本の脂肪酸基と1本のグリセリン基があり、3鎖長構造では、3本の脂肪酸基と2本のグリセリン基が含まれる。一般的な傾向として、構成する脂肪酸の性質が同一か類似している場合には2鎖長構造となり、構成脂肪酸の鎖長の差が大きいトリアシルグリセロールや飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が混在したトリアシルグリセロールの安定多形では、3鎖長構造を形成する。X線回折パターンの小角側に、ラメラの厚みに対応する鎖長構造が長面間隔(long spacing)として反映される。

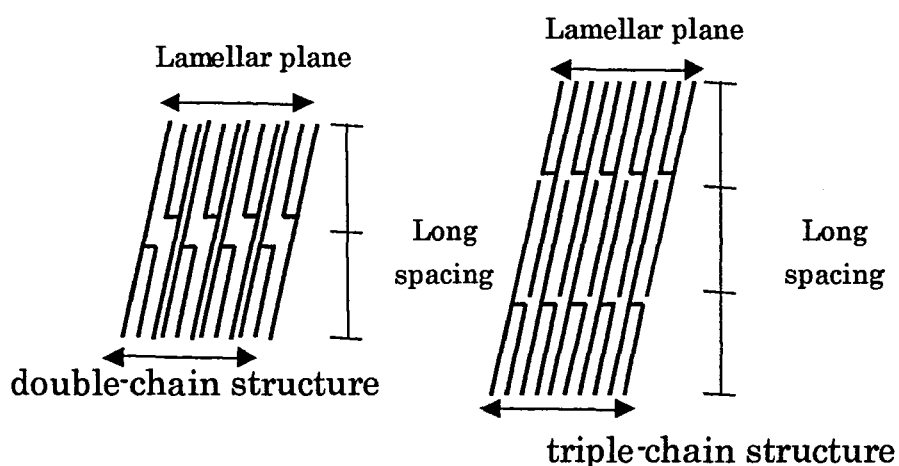
(a) TAG molecule



glycerol structure

fatty acid moieties

(b) molecular chain tilt and Chain length structure



(c) subcell packing

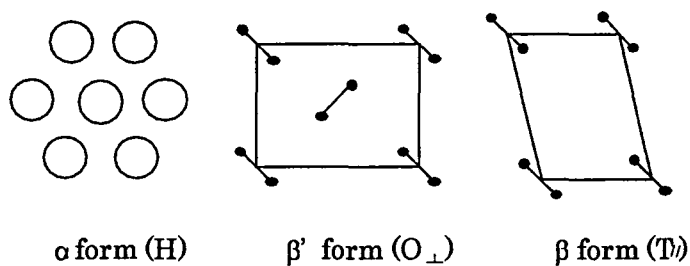


Fig.1-11 (a) A schematic molecular structure of TAG, (b) molecular chain tilt and chain-length structures of TAG and (c) subcell packing in TAG polymorphism.

また、ラメラ内に含まれる脂肪酸の横方向の配列様式である副格子構造によっても結晶状態を特徴づけることができる (Table 1-4, Fig. 1-11 (c))。X線回折パターンの広角側に、副格子構造が短面間隔 (short spacing) として反映される。

安定な結晶多形では三斜晶平行型 ($T_{//}$: triclinic-平行)、準安定結晶多形では斜方晶垂直型 (O_{\perp} : orthorhombic-垂直) やヘキサゴナル型 (H) をとる。 α 型の副格子構造は H 型であり、アシル鎖は無秩序なため油脂分子が回転可能な状態でラメラ面に垂直に配向している。そのため油脂分子が低密度に配列し、熱力学的に不安定な多形で、正三角形を束ねた 6 方対称性を持つ。 β 型の副格子構造は $T_{//}$ 型である。 $T_{//}$ 型では、トリアシルグリセロールの分子軸はラメラ面に対して傾斜し、アシル鎖の繰り返し平面の向きが平行なため油脂分子の密度が高く、熱力学的に最も安定である。 β 型の結晶形態は針状であり、固い結晶となる。 β' 型はこの両者の中間の多形で、代表的な副格子構造が O_{\perp} である。この構造では、トリアシルグリセロールの分子軸はラメラ面に対して傾斜し、アシル鎖の繰り返し単位の向きが直交しており、油脂分子の密度、融点が他の多形の間値を示し、結晶の形態も微細で平板状となる。

ほとんどのトリアシルグリセロールにはこの 3 つの多形が存在するが、場合によっては α 型と β' 型のみの場合がある。例えば、Fig. 1-11(A) の脂肪酸が大きく異なったりすると、 β' 型が最安定型になりやすい。油脂を急冷すると、まず α 型が析出するが、徐々に転移して準安定な β' 型、さらに安定な β へ移行する。 β' 型は最も細かい結晶で網目構造を形成し易い。一方、 β 型は針状結晶を示しやすいことから網目構造を破壊し、非常に硬い「Brittle」な組織になってしまう。この網目構造は、油脂の固体脂含量や固化速度を制御することにより形成される。ネットワーク状の結晶同士の相互作用には、結晶成長中に形成される 1 次結合 (結晶粒子同士の直接的な接

Table 1-4 Physical properties of fat polymorphs

<u>form</u>	<u>density</u>	<u>melting point</u>	<u>crystal morphology</u>
α	lowest	lowest	amorphous-like
β'	medium	medium	tiny, granular
β	highest	highest	granular, needle

触)、弱い分子間力 (ファンデルワールス力) による 2 次結合 (結晶粒子同士の間接的な接触) があり、前者は不可逆的、後者は可逆的な結合である (25, 26)。そして、前者がネットワーク形成に主要な役割を果たすことが知られている。また、 β' から β 型への転移は結晶の粗大化を引き起こす可能性が高く、固体脂結晶を β' 型に保持することが食品加工で好ましいと考えられている。乳化剤は固液界面である結晶成長面に吸着し、析出する油脂の結晶多形に影響を与え、また結晶に取り込まれることで多形転移を抑制することが期待されている (27)。

Fig. 1-12 に、結晶多形のギブスの自由エネルギー変化 (ΔG) と温度 (T) の関係を示す。この場合、結晶多形 A (準安定) から結晶多形 B (最安定) への不可逆的な相転移のみが起こり、逆向きの転移は起こらない。さらに、 ΔG と T の関係から、結晶多形 A から結晶多形 B への転移には、以下に示す二種類の転移機構が存在する (Fig. 1-13)。

① 固相転移 (solid-state transformation)

結晶状態のまま、準安定多形から安定多形へと転移する。このときの転移速度は、転移の活性化エネルギー (ΔG^*) により決定する。一般的には、ゆっくりとした昇温過程では、固相転移が優先する。

② 融液媒介転移 (melt-mediated transformation)

低融点の多形が融解し、その直後により安定な高融点の多形が核形成・結晶成長することにより転移が進行する。転移の駆動力は、自由エネルギーの差であるが、融液媒介転移の活性化エネルギーは、準安定多形の融解と安定多形の核形成および結晶成長によるものである。融解に必要な ΔG^* は極めて小さいので、融液媒介転移の転移速度は、融解後に現れる安定多形の核形成と結晶成長で決まる。一般的には、準安定な多形を析出させた後に急激に昇温させると、この転移が起こる。

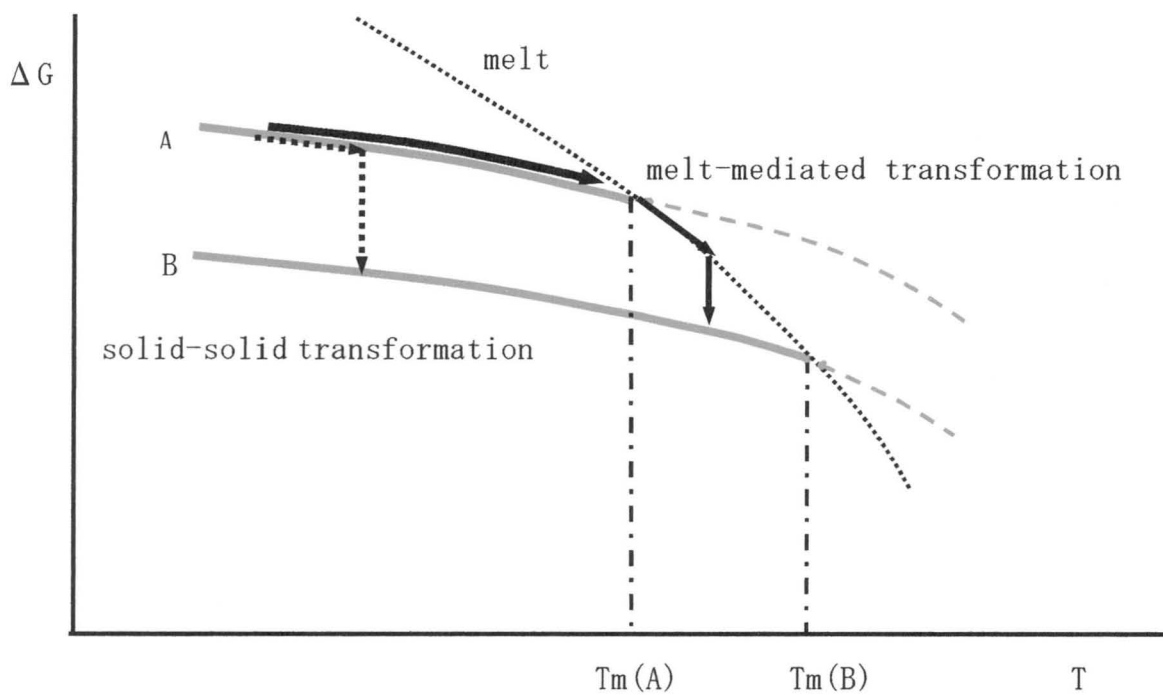


Fig. 1-12 The relationship between Gibbs energy (ΔG) and temperature for monotropic polymorphism.

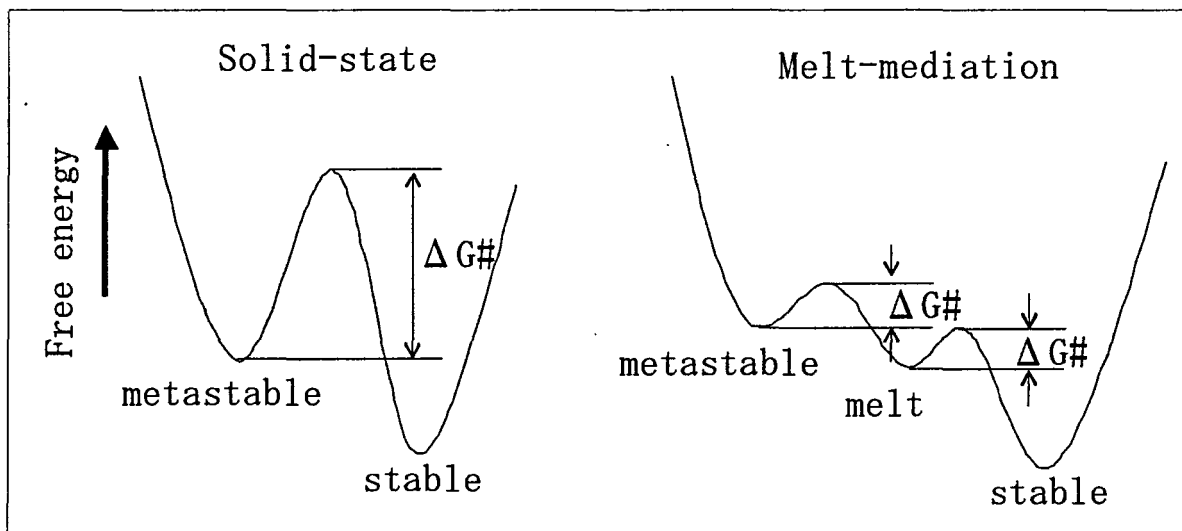


Fig.1-13. Activation free energy values of solid-state and melt-mediated transformations.

1.3.2 油脂の結晶化過程

結晶化は、過冷却状態、核形成、結晶成長の3段階によって進行する。油脂の結晶化は、多形性により以下のような複雑な現象が生じる。

(1) 過冷却状態

ある液体が、その融点(T_m)以下の温度に冷却されても固まらずに液体のままにしていることがある。この状態を過冷却状態という。これは液体から固体へ結晶化する際のエネルギー障壁が存在するためである。そのため、結晶化の速さは、過冷却の大きさ(過冷却度： $\Delta T = T_m - T_c$) (T_c :結晶化温度)で見積もることができる。

(2) 結晶核形成

結晶化での重要な過程は結晶核形成であり、核形成エネルギー ($\Delta G^\#$) を必要とする (Fig. 1-14(a))。 $\Delta G^\#$ は、溶質以外の不純物が含まれる不均一核形成では低下し、結晶核形成が起こりやすくなる (Fig. 1-14(b))。

油脂の代表的な結晶多形の $\Delta G^\#$ の大きさは、 α 型 $<$ β' 型 $<$ β 型である (Fig. 1-15)。したがって、 ΔT の最も小さい α 型が核形成速度が最も高く、 ΔT の最も小さい β 型が核形成速度が最も低くなるという矛盾が生じる。この理由は、 α 型結晶の密度が小さく、 β 型結晶の密度が大きく、 β' 型結晶の密度がその間となるため、密度の小さい α 型結晶の界面エネルギーが一番低下し過冷却の効果を凌駕するためである。したがって、油脂の液体を急速に冷却した場合、結晶化温度が α 型の融点よりも低くなれば、過冷却度は β' 型や β 型の方が大きくても、界面エネルギーの効果により α 型が優先的に核形成する。

(3) 結晶成長

いったん結晶核が形成すると、次に結晶成長が起こる (Fig. 1-16)。核形成は、溶質分子が結晶核を形成する相転移であるが、結晶成長は、結晶核に溶質が組み込まれる界面反応である (22)。これは、Fig. 1-17 のように、結

(a)

$$\Delta G^{\#} = \frac{f V^2 \gamma^3}{(\Delta\mu)^2}$$

f: shape factor
V: molecular volume
 γ : interfacial
 $\Delta\mu$: super cooling

(b)

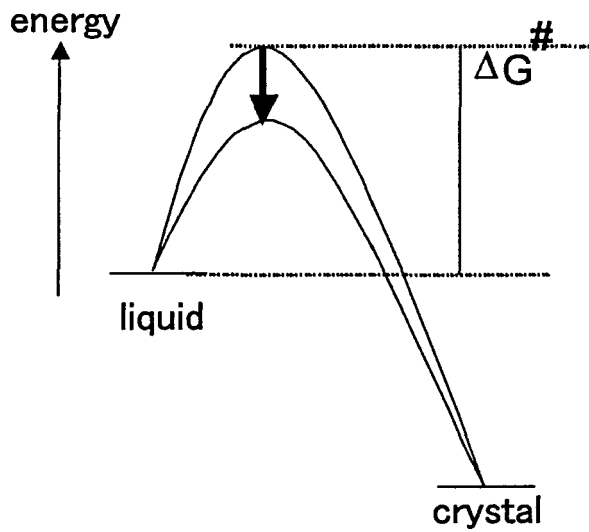


Fig. 1-14 Activation Gibbs free energy $\Delta G^{\#}$ for nucleation of crystals.

(a) Expression of $\Delta G^{\#}$ and (b) reduction of $\Delta G^{\#}$ by impurity.

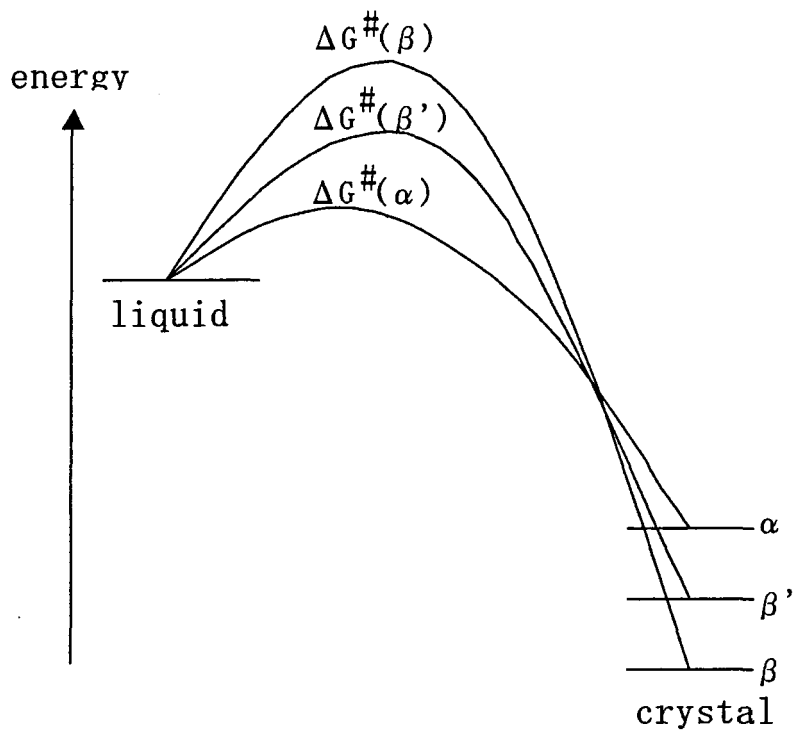


Fig. 1-15 Activation Gibbs free energy ΔG^\ddagger depending on crystal morphology.

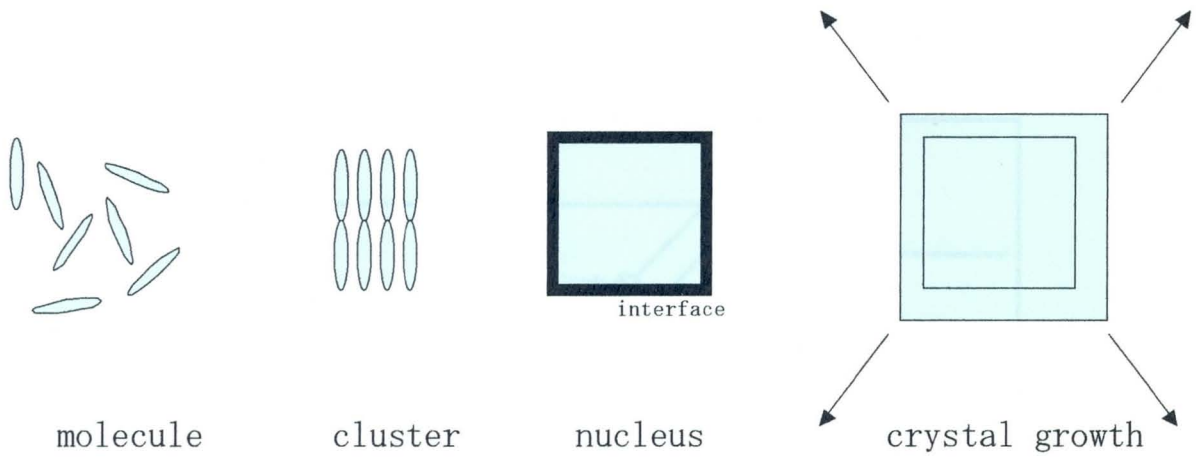


Fig. 1-16 Process from crystal nucleation to crystal growth.

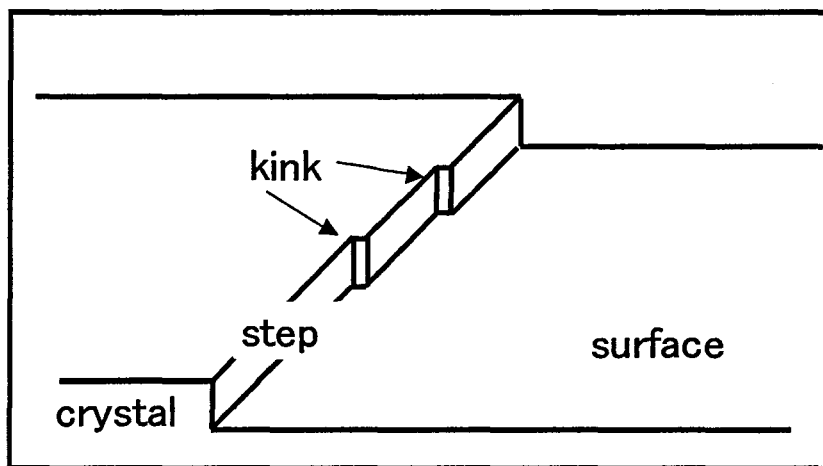


Fig. 1-17 Crystal growth process at the crystal surface.

晶表面に存在する階段状のステップや、ステップの折れ曲がった部分であるキックの部分に、更に溶液中の分子が衝突し結晶が成長する。この結晶成長は、結晶核形成に必要な温度変化よりも小さい過冷却で起こる。

(4) 結晶形態

生成した脂質の結晶の形態が、実際の製品の機能性と関係するが、結晶の形態は以下の3つの要因により決定される。

- ① 結晶の対称性
- ② 成長速度と異方性
- ③ 拡散と反応

いずれの場合も、もっとも大きく発達する面は成長速度の遅い面で、成長速度の速い面は成長の過程で消失する。脂質の結晶は薄片の板状の形態を示すが、これは、結晶の成長速度に著しい異方性があるためである。

(5) 結晶の凝集状態

最後に重要となるのが、脂質結晶の凝集状態である。これが、結晶性脂質を含む食品のテクスチャーを決定する。一般的には、微細結晶が分散した状態は、粗大結晶が凝集した状態よりも展延性や分散性などが高くなる。しかし、以下の理由により、熟成や保存の段階で微細結晶の分散した状態から、粗大な結晶が成長する現象が観察される。

① 球晶の成長

少ない数の結晶核が、最初から放射状に成長し、針状結晶の集合体(球晶)に成長する場合である。これは、 β 型が最初から成長する場合や、液体の中に発生した α 型や β' 型が時間経過と共に β 型に転移する過程でしばしば観察される。

② オストワルド熟成

小粒子結晶から大粒子結晶への溶質移動により生じる。結晶多形が同じ場合でも、結晶の界面エネルギーの大小関係で発生する。

③多形の再結晶化

過冷却度の大きい条件で発生した α 型や β' 型の準安定多形が、熟成と保存の段階で生じる温度変化により、融解や固相転移を経て β' 型や β 型の多形に再結晶化する場合に生じる。

⑤混合相挙動の変化

異なる脂質を混合して固める場合、冷却直後では準安定な結晶多形が発生し十分混合して結晶化する傾向がある。しかし熟成や保存の段階で安定多形に移行するにつれて、異なる脂質結晶へ分離する状態変化が起こり、その際に粗大な結晶が発生する。

これら4つの凝集化は同時に進行するため、時系列的に観察し解析することが必要である。また、非常に微細な範囲での構造変化であるため、 μm あるいは nm レベルの微細な構造解析が必要である。

1.3.3 粗大結晶の生成モデル

パーム油を含む固体油脂の油脂結晶成長において、一部の結晶粒子が非常に大きく成長すると粗大結晶となり、不均一な状態となることが知られている。この粗大結晶の生成現象に関して、さまざまなモデルが提案されている。Watanabeらは、パーム油およびPOPをそれぞれ菜種油に配合して粗大結晶を生成させ、その結晶型が最安定型の β 型であり、さらにトリアシルグリセロール組成では、POPが増加していたことを報告している(28)。石川らも、パーム油に着目し、 β 型が粗大結晶生成の一つの原因であると述べている(29)。Miuraらはパーム油を多く含むマーガリンでの検討を行い、粗大結晶中ではPOPが主要なトリアシルグリセロールであると報告している(30)。彼らはまた、粗大結晶に β 型は必須ではなく、トリアシルグリセロールの分離が主要因であると考察している。これらの報告から、粗大結晶の生成にはPOPが関与することは確実であるが、核形成から結晶成長を経て粗大結晶に

至るまでの詳細な過程や、 β' 型から β 型へ転移する時期などに関して、さらなる研究が期待されている。

1.4 ファットスプレッドにおける粗大結晶化の問題

1.4.1 粗大結晶化とファットスプレッドの組織変化

正常なファットスプレッドは、製造時の急速冷却により形成される β' 型の滑らかな組織が維持されるが(31-33)、粗大結晶が生成すると、テクスチャーの悪化や展延性の低下などにより機能性が失われたり、光沢の低下や不均一な状態により外観が損なわれ、食感にもざらつきが生じるなど、品質が著しく低下する(34, 35)。このため、ファットスプレッドにおける粗大結晶の生成は非常に重要な問題であり、粗大結晶生成機構の理解とその制御は、品質確保に関する根本的な技術課題となっている。

1.4.2 粗大結晶化に及ぼすパーム油の影響

パーム油は、他の植物油脂に比べて、粗大結晶を生成し易い油脂の一つである。したがって、パーム油を多く用いると、 β 型結晶形への多形転移を伴う粗大結晶生成などのテクスチャー劣化が生じてしまう。この原因として、粗大結晶生成に関与するPOPを多く含むことがまず挙げられるが、さらに結晶核を形成すると考えられる高融点トリアシルグリセロールを多く含むことも影響していると考えられる。

1.4.3 粗大結晶化に関する研究動向

すでに述べたように粗大結晶に関する研究は、古くは1960年代からの報告がある。この頃の報告では、 $50\mu\text{m}$ の β 型結晶が寄り集り、直径1mm以上の粗大結晶を形成するということが示されている(35)。また、1980年にかけて、POPを多く含む分別油が粗大結晶生成を促進するという報告や、ジア

シルグリセロールが粗大結晶生成に与える影響に関する報告がなされている(29)。次いで1992年には、純粋なPOPを用いた検討により、3鎖長構造を持つPOPが粗大結晶生成の原因物質の一つであることが確かめられている(28)。さらに1990年代では、純粋なトリアシルグリセロール混合系を用いた検討が精力的にされており、POPとPPPは分離するが、POPとPPOなどは β_c と呼ばれる混晶を形成することが見出されている(36-38)。2000年代では、乳化されたW/Oエマルションでも粗大結晶中にPOPが多く存在することが示され、粗大結晶生成時におけるトリアシルグリセロールの分離が β 型への転移よりも先に起こるという報告がなされている(30)。また、乳化剤が結晶性に与える影響が検討され(39)、さらに冷却工程での温度変化(40)やせん断力(41)が結晶性に与える影響が解析されるなど、様々な側面から油脂の結晶化挙動に関する機構解明が進められてきた。

1.5 油脂の微細構造解析とマイクロビーム放射光X線回折法

放射光は、高エネルギーの電子が、磁場により円形加速器内にて光速度に近い速度で円運動する時、軌道円の接線方向へ放射される電磁波である。この放射光は、1. 高輝度性(従来のX線源の10,000倍の強度)、2. 広い波長領域(赤外からX線まで)、3. 強い指向性、4. 偏光性、5. パルス性などの特徴を持つ。マイクロビームX線回折法は、この放射光をマイクロメートルレベルの大きさに絞ったX線を用いて、 $5\mu\text{m}$ から $20\mu\text{m}$ レベルで物質の微細構造を解析する最先端の方法である(42)。この方法は、生体組織(43, 44)、澱粉粒子(45, 46, 47)、ポリマー(48)などの微細構造解析に応用されている。最近Uenoらは、世界で初めてマイクロビーム放射光X線回折法を用いて、油脂結晶の微細構造の解析に成功した(49, 50, 51)。

本研究において、マイクロビーム放射光X線回折法によりファットスプレッドの微細構造を世界で初めて観察したが、その詳しい方法は第2章で記述

する。

1.6 本研究の目的

これまで、ファットスプレッドにおける粗大結晶生成に関して、油脂種の特徴、油脂結晶の特性、生成メカニズムの観点から概観した。粗大結晶の問題を解決するためには、①油脂複合系における特定のトリアシルグリセロールが物性に与える影響を把握すると共に、②複数のトリアシルグリセロールによる物性への相互作用を明らかにし、③粗大結晶の詳細な生成メカニズムの解明が求められる。

このような観点からの基礎研究は、近年の各種技術の発展により可能となっている。すなわち、複雑なトリアシルグリセロール分子種の濃度推定がコンピューターの進歩によって可能となり、さらに、物質の微細構造解析に有用なマイクロビーム放射光X線が食品分野にも利用されるようになるなど、新しい環境が整っている。

本論文では、ファットスプレッドを中心として、トリアシルグリセロール分子同士の相互作用ならびに微細構造を詳細に解明し、W/Oエマルション系の物性改質に繋がる結晶物理学的な研究の成果をまとめた。

参考文献

- [1] 玉虫文一，岩波理化学辞典 第4版，岩波書店，東京（1987）p. p. 143.
- [2] 農林水産省 HP, <http://www.maff.go.jp/index.html>
- [3] 佐藤清隆，コロイド分散系における油脂の構造と物性，食品ハイドロコロイドの開発と応用，西成勝好 編，シーエムシー出版，東京（2007）p. p. 89.
- [4] 西村彰夫，機能性脂質の開発と応用，佐藤清隆、山根恒夫、岩橋慎夫、

- 森弘之 編, シーエムシー出版, 東京 (1992) p.p. 300.
- [5] 江戸博, 川出智, 油化学, **40**, (1991) 904.
- [6] 柳原昌一, 食用加工油脂の知識, 幸書房, 東京 (1984) p.p. 52.
- [7] J. M. de Man, Food Microstructure, **1**, (1982) 209.
- [8] 中澤君敏, マーガリン ショートニング ラード, 光琳 (1979) p.p. 35.
- [9] 広川典夫, 原納淑郎, 油化学, **40**, (1991) 648.
- [10] 横山和明, 油脂・脂質の基礎と応用, 伊藤俊洋 編, 日本油化学会, 東京 (2005) p.p. 213.
- [11] R. Tsanev, A. Russeva, T. Rizov, Iv. Dontcheva, J. Am. Oil Chem. Soc., **75**, (1998) 143.
- [12] R. Uauy, A. Aro, R. Clarke, R. Ghafoorunissa, M. L' Abbe, D. Mozaffarian, M. Skeaff, S. Stender, M. Tavella, Eur. J. Clin. Nutr., **63**, (2009) S68.
- [13] C. Tyburczy, C. Major, A. L. Lick, F. Destailats, P. Lawrence, J. Thomas Brenna, A. M. Salter, D. E. Bauman, J. Nutr. **139**, (2009) 1.
- [14] A. T. Merchant, Am. J. Clin. Nutr., **87**, (2008) 168.
- [15] R. P. Mensink, Am. J. Clin. Nutr., **77**, (2003) 1146.
- [16] M. Iwamoto, Eur. J. Clin. Nutr., **56**, (2002) 629.
- [17] M. Kellens, V. Gibon, M. Hendrix, W. D. Greyt, Eur. J. Lipid Sci. Tech., **109**, (2007) 336.
- [18] S. B. Danthine, V. Gibon, Eur. J. Lipid Sci. Tech., **109**, (2007) 359.
- [19] N. L.H. M. Dian, K. Sundram, N. A. Idris, J. Am. Oil Chem. Soc., **83**, (2006) 739.

- [20] H. Ishikawa, M. Shiota, M. Murakami, I. Nakajima, *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **3**, (1997) 77.
- [21] G. J. Sassano, B. S. J. Jeffrey, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, (1993) 1111.
- [22] 佐藤清隆, *オレオサイエンス*, **5**, (2005) 3.
- [23] 上野聡, *食品とガラス化・結晶化技術*, 村勢則郎・佐藤清隆 編, サイエンスフォーラム, 東京 (2000) p. p. 85.
- [24] 佐藤清隆, 小林雅通, *脂質の構造とダイナミクス*, 共立出版, (1992) p. p. 104.
- [25] 小原哲二郎, *食用油脂とその加工*, 健帛社, 東京 (1981) p. p. 130.
- [26] 佐藤清隆, *食品の物性, 食品の品質と成分間反応*, 並木満夫, 松下雪郎 編, 講談社, (1990) p. p. 159.
- [27] 上野聡, 佐藤清隆, *食品固体状油脂の構造物性と応用, 食品工業における科学・技術の進歩(IX)*, 日本食品科学工学会, 光琳出版 (2002) p. p. 19.
- [28] A. Watanabe, T. Tashima, N. Matsuzaki, J. Kurashige, K. Sato, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, (1992) 1077.
- [29] 石川秀敏, 水口恒夫, 近藤敏, *油化学*, **29**, (1980) 235.
- [30] S. Miura, H. Konishi, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **103**, (2001) 804.
- [31] I. Wilton, G. Wode, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, (1963) 707.
- [32] L. de Man, J.M. de Man, B. Blackman, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, (1989) 128.
- [33] G. Rivarola, J. A. Segura, A. C. Anon, A. Calvelo, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, (1987) 1537.
- [34] 三浦 晋, *科学と工業*, **76**, (2002) 196.
- [35] C. W. Hoerr, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, (1960) 539.

- [36] A. Minato, S. Ueno, J. Yano, A. H. Wang, H. Seto, Y. Amemiya, K. Sato, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, (1996) 1567.
- [37] A. Minato, S. Ueno, K. Smith, Y. Amemiya, K. Sato, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **101**, (1996) 3498.
- [38] A. Minato, S. Ueno, J. Yano, K. Smith, H. Seto, Y. Amemiya, K. Sato, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, (1997) 1213.
- [39] M. S. Miskandar, Y. B. Che Man, R. Abdul Rahman, I. Noraini, M. S. A. Yusoff, *J. Food Lipids*, **13**, (2006) 57.
- [40] M. S. Miskandar, Y. B. Che Man, M. S. A. Yusoff, R. Abdul Rahman, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, (2002) 931.
- [41] S. Sonwai, M. R. Mackley, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **83**, (2006) 583.
- [42] 上野聡, *化学と生物*, **45**, (2007) 550.
- [43] C. Riekkel, F. Vollrath, *Biol. Macromolec.*, **29**, (2001) 203.
- [44] B. Sedel, A. Gourrier, M. Burghammer, C. Riekkel, G. Jeronimidis, O. Paris, *Micron*, **39**, (2008) 198.
- [45] A. Buleon, B. Pontoire, C. Riekkel, H. Chanzy, W. Helbert, R. Vuong, *Macromolrcules*, **30**, (1997) 3952.
- [46] H. Lemke, M. Burghammer, D. Flot, M. Rosse, C. Riekkel, *Biomacromolcules*, **5**, (2004) 1316.
- [47] H. Chanzy, J. L. Putaux, D. Dupeyre, R. Davies, M. Burghammer, S. Montanari, C. Riekkel, *J. Struct. Biol.*, **154**, (2006) 100.
- [48] C. Riekkel, *Methods Phys. Res. B*, **199**, (2003) 106.
- [49] S. Ueno, T. Nishida, K. Sato, *Cryst. Growth Des.*, **8**, (2008) 751.
- [50] Y. Shinohara, T. Takamizawa, S. Ueno, K. Sato, I. Kobayashi, M. Nakajima, Y. Amemiya, *Cryst. Growth Des.*, **8**, (2008) 3123.
- [51] S. Arima, S. Ueno, A. Ogawa, K. Sato, *Langmuir*, **25**, (2009) 9777.

第2章 本研究で用いた実験方法

2.1 ファットスプレッド製造装置

ファットスプレッドの製造では、油相部を 70℃以上 50rpm で攪拌しながら乳化剤を溶解した。これを攪拌しながら 65℃の水相部を添加した後、45℃～55℃まで冷却して10分以上乳化した。高圧ポンプ(Schröder GMBH&Co, Germany)にてかきとり式の熱交換冷却機(Schröder GMBH&Co, Germany)へ送液し、W/Oエマルションの油脂を結晶成長させると同時に混練した。冷却機のシャフト回転数は 400 rpm で、冷却機の出口温度は 10℃とした。固化したW/Oエマルションを、引き続き連続的にピンマシン(Schröder GMBH&Co, Germany)に送り、滑らかな組織を形成させた。

ファットスプレッドのビーカースケール調製では、300mL 容ビーカーに 70℃以上で溶解した油相部をスリワンモーター(HEIDON 600G、新東科学(株)製)目盛5にて攪拌し、100mL 容ビーカーに 40℃以上で溶解した水相を加え、5分間乳化させた。その後、300mL 容ビーカーの周囲を氷水で覆い、スリワンモーター目盛7にて攪拌してビーカー内部が 12℃以下になるまで冷却した。その後、氷水で冷却しておいた TK ホモミキサー(MARK II、特殊機化工業(株)製)を用い 8000rpm にて 4分間攪拌した。

2.2 脂肪酸組成分析法

総脂肪酸組成の分析では、脂肪酸をメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーを用いて脂肪酸組成を分析した。まず、スプレッド中の水相を除去する為に、試料 10 mg 程度をヘキサンに溶解し、2000 rpm にて 5分間遠心分離した。この上層をとり、窒素を吹き付けてヘキサンを除去したものをメチルエステル化に供した。

メチルエステル化は次の方法に従って行なった。まず 15mL 容ねじ口付試

験管に試料 50mg を採取し、0.5 mol/NaOH 1mL を加えて、密栓後に適時振り混ぜながら、10 分間沸騰水中で保持した。これを流水で冷却した後、三フッ化ホウ素-メタノール試薬 (SUPELCO、BF3-Methanol Kit) 1 mL を加え攪拌し、密栓後に 2 分間沸騰水中で反応させた。これを再度流水で冷却した後、ヘキサン 5 mL を加え攪拌し、密栓後に 1 分間沸騰水中で保持した。これを流水で冷却し、飽和 NaCl 溶液を試験管の口まで加え攪拌した。これを 1500 rpm で 1 分間遠心分離し、上層を脂肪酸のメチルエステル化サンプル溶液とした。

ガスクロマトグラフィー分析は HP5890 SERIES II (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA)、SP-2560 (100 m, 0.25 mm ID, 0.20 μ m, 液相 biscyanopropyl polysiloxane : Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA) カラムを用いて行なった。注入口温度を 250 $^{\circ}$ C、検出器温度を 300 $^{\circ}$ C とし、キャリアーガス He の流量は 1 mL/min とした。オープン温度は 180 $^{\circ}$ C で 45 分間保持した後、昇温速度 2.0 $^{\circ}$ C/min にて 200 $^{\circ}$ C まで昇温した。

次に、 β 位脂肪酸組成の分析では、トリアシルグリセロールの脂肪酸を位置特異的に加水分解するリパーゼを用いて分析を行った。

まず、リパーゼによる加水分解を次の方法に従って行った。試料約 50~100 mg をネジ口試験管に採取し、40 $^{\circ}$ C 恒温水槽中で予熱した (試料が固体の時はヘキサン 0.1 mL を添加し液化した)。次に 1 mol/mL トリス緩衝液 (pH 7.0) にリパーゼ (ファインリパーゼ 生化学工業(株)製) 5 mg/mL となるように調製した溶液を 2 mL 加え、振とうしながら恒温水槽中で 1 分間保持した。恒温水槽から出して激しく 1 分間振とうした後、再び恒温槽に戻し、さらに振とうしながら恒温水槽中で 1 分間保持した。速やかに 2 mol/L 塩酸 1 mL を加えて軽く振り、ジエチルエーテル 2mL を加え、スクリーキャップを閉め激しく振とうした後、静置した (必要に応じて遠心分離機を用いてジエチルエーテル層を分離させた。)

次に、モノグリセリドの分離を次の方法に従って行った。ジエチルエーテル層 400 μ L を、シリカゲル薄層板の下端 20 mm に約 80 mm の長さに塗布し、展開溶媒で上端から 10 mm まで展開した。展開後風乾しヨウ素充填槽に 1 分間入れ、着色したモノアシルグリセリン画分をシリカゲル薄層板から掻き落とし、ネジロ試験管に移した。

最後に、通常の脂肪酸組成分析と同様に以下の方法に従ってメチルエステル化を行った。

0.5 mol/mL 水酸化ナトリウムメタノール溶液 1 mL を加え、密栓して沸騰水中で 5 分間保持した。水冷した後、三フッ化ホウ素メタノール溶液 1 mL を加え、密栓して沸騰水中で 2 分間保持した。再度水冷した後、ヘキサン 1 mL を加え激しく振とうし、密栓して沸騰水中で 1 分間保持した。水冷後に塩化ナトリウム飽和水溶液 5 mL を加え激しく振とうし、遠心分離でヘキサン層をとり 5 μ L をガスクロマトグラフィーにて分析した。ガスクロマトグラフィーは、脂肪酸分析と同じ条件を用いた。

2.3 トリアシルグリセロール組成分析法

2.3.1 ガスクロマトグラフィーによる分析法

トリアシルグリセロール組成は、ガスクロマトグラフィーにて測定した。25 mg から 35 mg の油脂を 2 mL のバイアル (Alltech Japan Inc.) に量り、1 mL のヘキサンに溶解して測定サンプルを調製した。ガスクロマトグラフィー分析は HP5890 SERIES II (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) と DB-1HT (30 m, 0.25 mm ID, 0.10 μ m, Agilent Technologies, USA) カラムを用いて行なった。注入口温度を 250 $^{\circ}$ C、検出器温度を 300 $^{\circ}$ C とし、キャリアーガス He の流量は 1 mL/min とした。オープン温度は 300 $^{\circ}$ C で 15 分間保持した後、昇温速度 2.0 $^{\circ}$ C/min にて 350 $^{\circ}$ C まで昇温した。

2.3.1 組成解析によるトリアシルグリセロール分子種組成の推定

石川らも引用している通り、Coleman トリアシルグリセロール中の脂肪酸の分布説によれば、総脂肪酸組成と β 位脂肪酸組成から、トリアシルグリセロールの分子種分布を数値計算により推定することができる(1)。現在は分析の検出感度が以前よりも高くなっており、検出可能な脂肪酸種が増加しているため、トリアシルグリセロール全分布を推定すると膨大なデータ量となる。しかしながら、不可能な量ではないため、以下のように Coleman の分布説に基づき数値計算を行って、トリアシルグリセロールの分子種分布の推定を行った。

グリセロール骨格 1 位、2 位、3 位に、それぞれ X、Y、Z という脂肪酸が結合したトリアシルグリセロールの濃度 TAG(XYZ)は、1 位、2 位、3 位に結合した X、Y、Z の脂肪酸濃度 FA(X)₁、FA(Y)₂、FA(Z)₃ を用いて(1)式のように表される。

$$\text{TAG}(XYZ) = n \times \text{FA}(X)_1 \times \text{FA}(Y)_2 \times \text{FA}(Z)_3 \quad (1)$$

ここで

$n = 1$ (X = Z) または $n = 2$ (X \neq Z) であり、また(1)式の FA₁、FA₃ は、総脂肪酸組成である FA と 2 位の脂肪酸組成である FA₂ から、(2)式を用いて算出することができる。

$$\text{FA}_{1,3} = (3 \times \text{FA} - \text{FA}_2) \div 2 \quad (2)$$

FA と、FA₂ は測定可能な値であるため、(2)式より FA_{1,3} を計算し、(1)式に代入することで、各トリアシルグリセロール分子種の濃度を算出することが可能である。トリアシルグリセロール分子種の数は、脂肪酸組成の数に依存するため、計算に用いる脂肪酸の数が 13 種類の場合は、(3)式より 118 種類となる。

$$n_{\text{TAG}} = 0.5 \times (n^3_{\text{FA}} + n^2_{\text{FA}}) \quad (3)$$

ここで n_{TAG} は全トリアシルグリセロールの種類、 n_{FA} は脂肪酸の種類を表す。

本論文では、幾つかの含量の少ない脂肪酸や同一グループの脂肪酸をまとめて計算することで、次の 9 種類の脂肪酸を計算に用いた。Mc (C8:0 と C10:0), La (C12:0), M (C14:0), P (C16:0), S (C18:0), O (C18:1-cis), E (C18:1-trans), Up (C18:2 and C18:3), Lc (C20:0, C22:0 and C24:0)。Mc は、中鎖脂肪酸、Up と Lc は、多価不飽和脂肪酸という同一のグループとして扱った。

2.4 DSC

油脂の結晶化および融解挙動の測定は、示差走査熱量計(DSC) (Thermo Plus 8240 リガク(株)製)を用いて行った。15°C以下の部屋にてアルミニウムパンにサンプル1~10mgを封入し、5°Cに冷やされたDSCの測定部にセットした。融解条件では、-20°Cで5分間保持した後、-20°Cから80°Cまで2°C/分で加熱した。また、粗大結晶の分析では、目視で確認可能な粗大結晶を含むサンプルをサンプルパンに封入した。なお、リファレンスとして酸化アルミニウムを用い、冷媒にはドライアイスを用いた。

2.5 光学顕微鏡観察

最初に、約 50mg のファットスプレッドのサンプルを 5°Cに冷却したガラスプレートに乗せ、カバーガラスに乗せた。次に、針先にてカバーガラス越しに結晶が観察できる程度までサンプルを平板状にして、偏光顕微鏡にて観察を行った。結晶の観察には、偏光顕微鏡 Microphot-FX (株Nikon 社製)を用いた。

2.6 走査型電子顕微鏡観察

電子顕微鏡 S-2380N (株日立社製)を用いて観察を行った。ファットスプ

レッドのサンプルは -10°C 、約 1 Torr 下にて測定を行った(2, 3, 4)。サンプル中の液状油脂を除去するために、サンプルを 5mm 立方体の形状に切り出し、2wt%の AOT (sodium bis (2-ethyl hexyl) sulfosuccinate) 水溶液に 12 時間浸し、48 時間以内に電子顕微鏡で観察した。

2.7 X線回折法

2.7.1 回転対陰極型 X線回折装置

長期低温保存におけるファットスプレッドサンプル中の固体脂の結晶多形現象は、回転対陰極型 X線回折測定装置 (RINT2000、(株)リガク製)にて観察した(5, 6)。サンプルは 5°C 下にて X線回折測定を行った。回転対陰極型 X線回折の測定条件を下記に記す。

装置名 :	RINT-2000
CuK α 線 :	$\lambda = 1.542 \text{ \AA}$
出力 :	7.5kW (30 kV , 250mA)
操作角 :	$1.2 \sim 25^{\circ}$ (2θ)
操作速度 :	2° /分 (2θ)

2.7.2 放射光 X線回折

本研究では、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光研究施設 (茨城県つくば市)、フォトンファクトリーのビームライン BL-9C、15A を利用した。利用したビームラインで得られる X線の波長は、 1.5 \AA である。X線回折パターンは、2つの一次元位置敏感型比例計数管 (PSPC)を用いて、1回のスキュンを 30秒に設定し、小角・広角領域の同時測定を行った。厚さ 1.5 mm のアルミニウム製のサンプルセルを加熱冷却ステージ LINKAM に設置し、サンプルが溶解しないように冷却状態でサンプルを乗せた後、測定を行

った。Fig. 2-1に実験装置の概略図を示す。本研究では、5℃における観察を行った。

2.7.3 マイクロビームX線回折

放射光マイクロビームX線回折測定は、マイクロメートルオーダーの非常に細いX線を用い、物質の微細構造解明を行なうことができる。本実験は、茨城県つくば市にある高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光研究施設内のビームライン4Aにて行った(7-9)。この放射光マイクロビームX線回折装置には顕微鏡が装着されており、マイクロビームX線を照射する位置を確認しながら、実験を行なうことができる(Fig. 2-2)。ただし粗大結晶観察においては位置確認の光が透過しないため、ブラインドでの操作となった。本研究で用いたマイクロビームX線の波長は0.11nm (エネルギー：11 keV)、マイクロビームX線の大きさは5 μ m \times 5 μ mである。

この装置には、マイクロビームX線の進行方向に直角な上下左右方向へ試料台の位置を移動可能なステッピングモーターが装着されているため、5 μ m程度の間隔でマイクロビームX線を照射する位置を移動することが可能である。

入射器より発生したマイクロビームX線をRINKAMで固定したサンプルに当て、その際に生じる回折X線をイメージインテンシファイヤー-CCDカメラシステムでとらえ、パソコンで二次元データ化した。測定はスキヤニング法によって行ない、サンプルに一定間隔でX線を照射した。また得られた回折像から、鎖長構造やラメラ面の配向の向きを解析した。サンプルは0.2mmにスライスし(Fig. 2-3)、冷却・加熱制御装置LINKAM LM-600で温度を制御し、7℃もしくは7℃ \sim 30℃間の任意の温度で測定を行った。マイクロビームX線を縦横50 \sim 200 μ m毎に照射し、スキヤニング測定を行った(Fig. 2-4)。マイクロビームX線の1スキヤンごとの照射時間は2秒とした。この方法により、

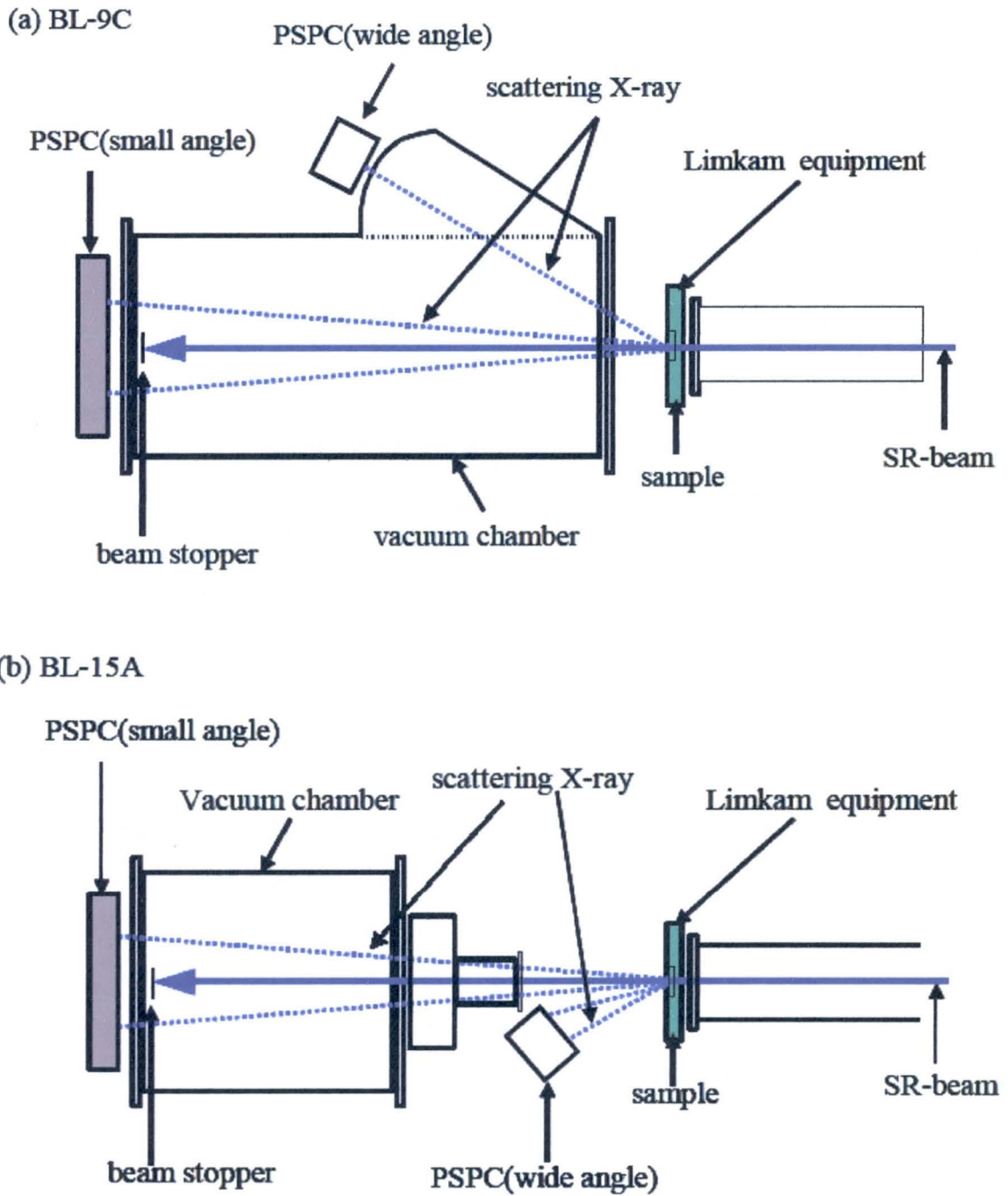


Fig. 2-1 Synchrotron radiation X-ray diffraction device at beam line BL-9C and BL-15A

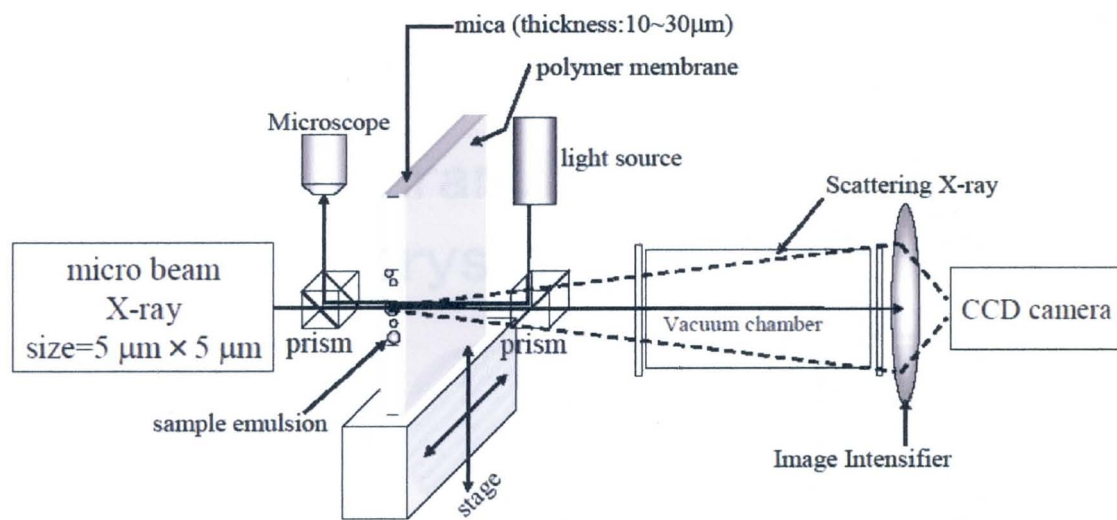


Fig. 2-2 System for synchrotron radiation microbeam X-ray diffraction (SR- μ B-XRD) measurement.

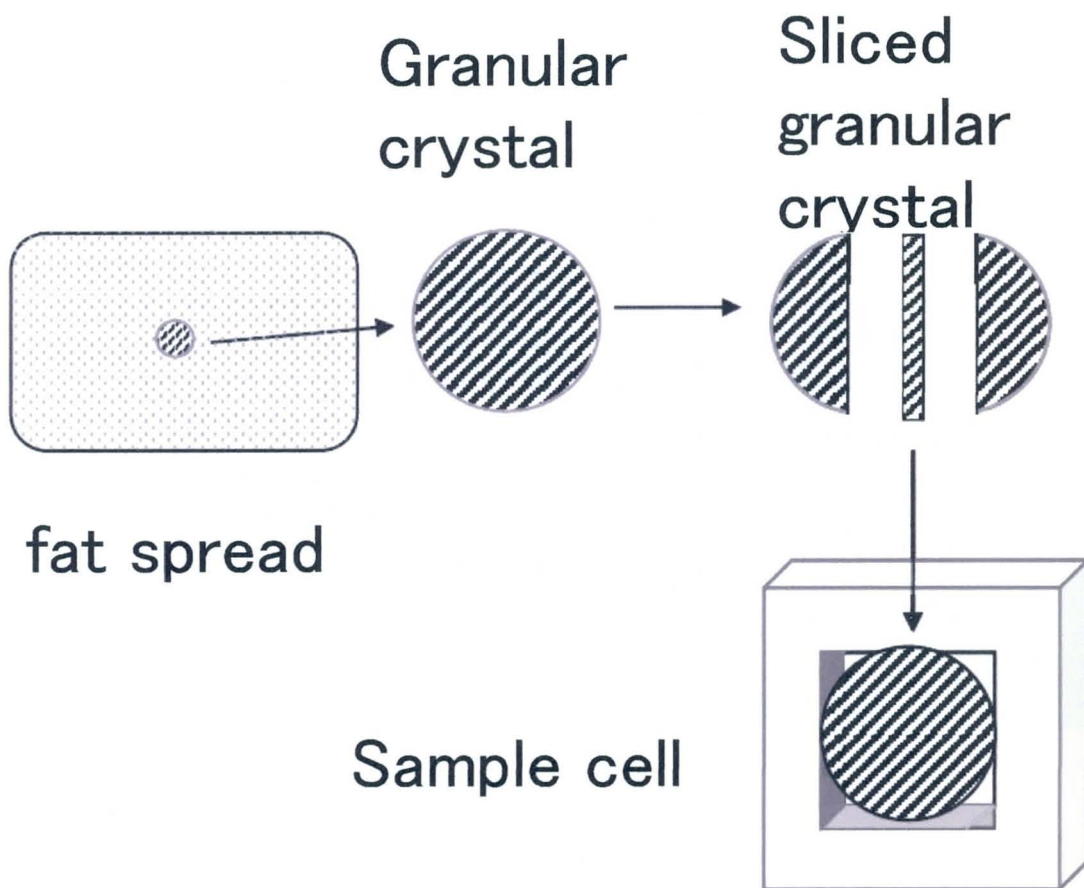


Fig.2-3 Preparation of fat spread samples for microbeam X-ray diffraction measurements

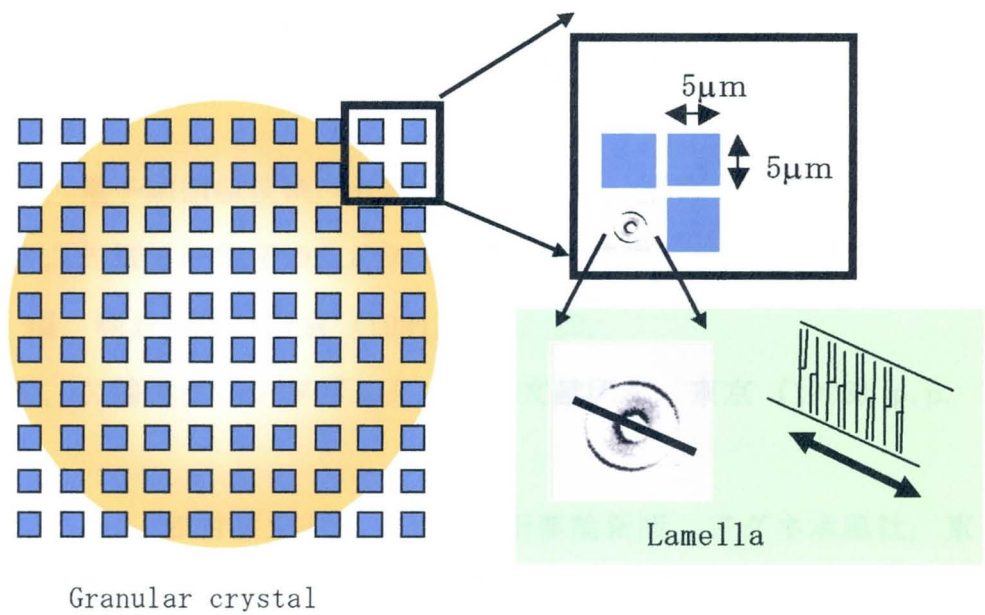


Fig. 2-4 Scanning analysis by μ -SAXD

回折角展開のパターンから得られる脂質結晶の長面間隔と短面間隔、すなわち結晶多形構造の情報と、一定の回折角度でビームに垂直な2次元面内の方位角を変えた回折強度分布(方位角展開)のパターンから得られる脂質結晶の分子の配向の情報を、 $5\mu\text{m}$ のオーダーで微細解析できる(Fig. 2-5)。

参考文献

- [1] M. H. Coleman, The Structural Investigation of Natural Fats. *Advances in Lipid Research*, edited by R. Paoletti, D. Kritchevsky, Vol.1, Academic Press Inc. London (1963) p.p. 1.
- [2] 走査電子顕微鏡、日本電子顕微鏡学会関東支部 編, 共立出版, 東京 (2000) p.p. 12.
- [3] 黒田勝広, 電子顕微鏡技術, 外村彰 編, 丸善, 東京 (1989) p.p. 115.
- [4] 高柳邦大, 先端材料評価のための電子顕微鏡技法, 日本電子顕微鏡学会関東支部 編, 朝倉書店、東京 (1991) p.p. 29.
- [5] 理学電機, X線回折ハンドブック, 国際文献印刷, 東京 (1998) p.p. 24.
- [6] B. D. Cullity, 松村源太郎訳, X線回折要論新版, アグネ承風社, 東京 (1980) p.p. 217.
- [7] 上野聡, 化学と生物, 45, 8, (2007) 550.
- [8] A. Iida, T. Noma, *Nuclear Instrument and Method in Physics Res. B*, 82, (1993) 129.
- [9] Y. Shinohara, T. Takamizawa, S. Ueno, K. Sato, I. Koabayashi, M. Nakajima, Y. Amamiya, *Cryst. Growth Des.*, 8, (2008) 3123.

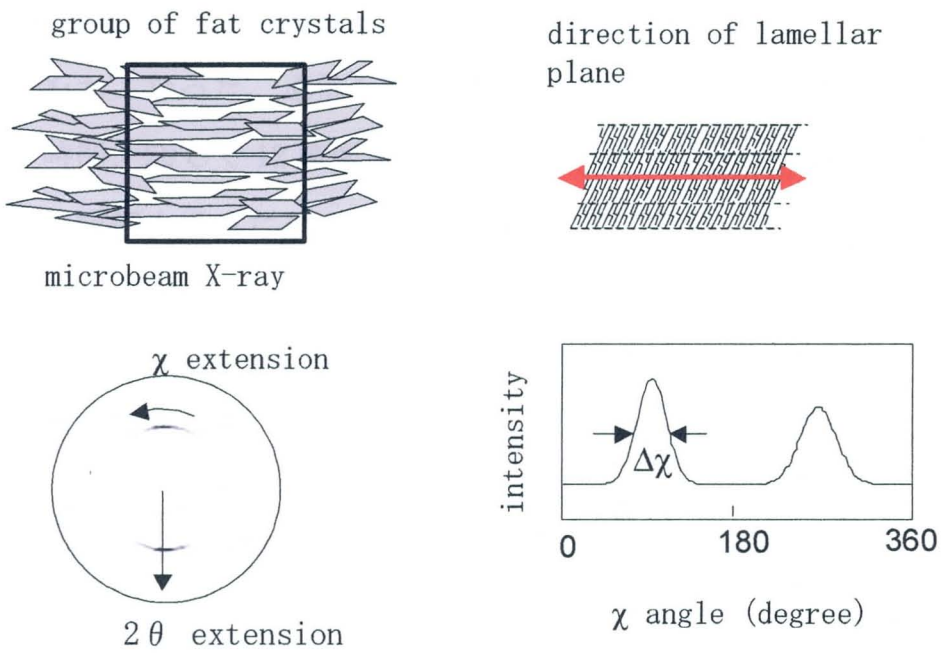


Fig. 2-5 Information about fat crystals obtained by using μ -SAXD Analysis.

第3章 パーム油高含有配合ファットスプレッドにおける粗大結晶化

3.1 試料

Table 3-1 に、本実験で用いたファットスプレッド配合を示す。コントロール配合と比較して 1.5 倍量のパーム油、2.0 倍量のパーム油を含む配合にて検討をおこなった。通常の方法でファットスプレッドを製造した後に、5°C で 12 時間、20°C で 12 時間の温度サイクル処理を行い、偏光顕微鏡にて一週間毎の観察を行った。

3.2 粗大結晶化に対するパーム油の影響

温度処理下にあるサンプルを偏光顕微鏡にて観察した結果を Fig. 3-1 に示す。コントロールサンプルでは、粗大結晶は観察されなかった(A)。他のサンプルでは、3 週後に矢印で示すような粗大結晶が観察された (B、C)。コントロールと比較して 1.5 倍量あるいは 2.0 倍量のパーム油を含むサンプルにて粗大結晶が観察されたことから明らかなように (Table 3-1)、パーム油を多く含むほど粗大結晶の粒子径が増加することが明らかとなった。2.0 倍量のパーム油を含むサンプルでは、100 μm 以上の粗大結晶が生成しており、パーム油が粗大結晶成長を促進することが示唆された。

3.3 粗大結晶化に対するトリパルミチンの影響

前節で示した結果は、パーム油中のトリアシルグリセロールが粗大結晶生成を促進していると考えられる。パーム油中で、結晶核となる高融点のトリアシルグリセロールは PPP であり、その含量が約 7% と高めである (Table 3-2) (1-5)。従って、高融点の PPP が増加することで結晶核形成が促進され、

Table 3-1 The composition of model fat spread.

Ingredients	Ratio[%]		
	Control	1.5 times of palm oil	Twice palm oil
Partially hydrogenated soybean oil	35.0	27.5	20.0
Palm oil	15.0	22.5	30.0
Soybean oil	20.0	20.0	20.0
Emulsifiers	0.7	0.7	0.7
Sodium chloride	1.2	1.2	1.2
Spray-dried whey	0.5	0.5	0.5
Water	27.6	27.6	27.6
Total	100.0	100.0	100.0

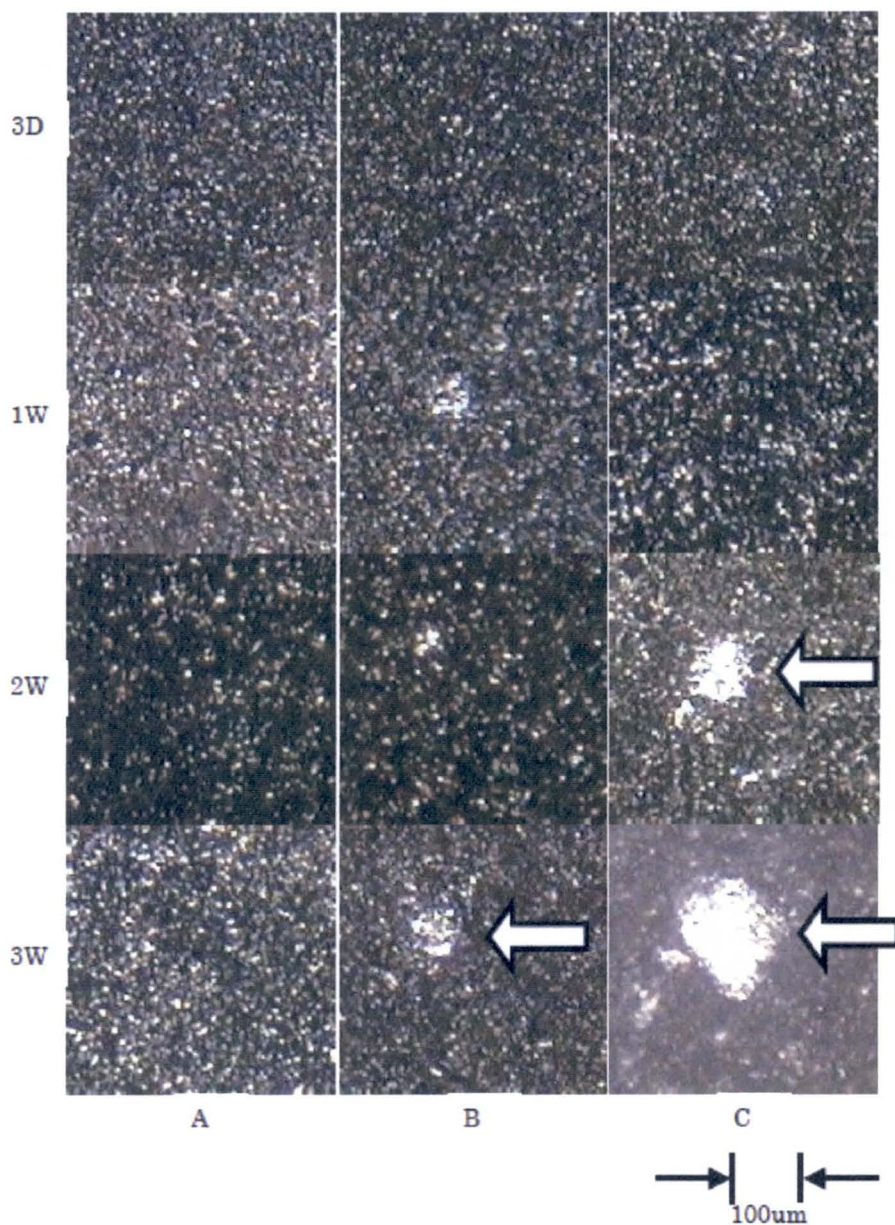


Fig. 3-1 Granular crystals observed by polarized microscope in the model fat spread under temperature fluctuation cycle after 3 days (3D), 1 week (1W), 2 weeks (2W), and 3weeks (3W). A. Control, B. 1.5 times of palm oil, C 2.0 times of palm oil

Table 3-2 Melting point of polymorphs of major TAGs in palm oil

Molecular species	Ratio[%]	Melting point [°C]			
		α	β'	β or $\beta 2$	$\beta 1$
POP	23.7	15.2	30.3	35.1	36.7
P00/OPO	21.5	-18.3	11.7	15.8	21.9
PPP	7.2	44.7	56.6	66.4	—
PPO	6.9	18.5	35.2	—	—

P : palmitic acid, O : oleic acid

さらに粗大結晶生成が進むのではないかという仮説のもとで検討を行った。そこで、パーム油を増量した場合と同等量になるように PPP を添加したサンプルを調製し、同様の観察を行った。

温度処理下にあるサンプルを、偏光顕微鏡によって3日後から3週間まで観察した結果を Fig. 3-2 に示す。コントロールサンプルでは、前述のサンプルと同様に粗大結晶は観察されなかった (Fig. 3-2A)。PPP を添加したサンプルでは、粗大結晶の生成が確認された。特に PPP を 3% 添加したサンプルにおいて、早期の粗大結晶生成を確認した (Fig. 3-2D)。また、PPP をコントロールの 1.5 倍量含むサンプル (Fig. 3-2B)、2.0 倍量含むサンプル (Fig. 3-2C) にて、コントロールと異なり、粗大結晶が生成したことから、PPP 含量の増加によって粗大結晶径が増加することが示唆された。また、4 倍量の PPP を含むサンプル (Fig. 3-2D) は、100 μ m 以上の粒子径であった。この結果より、PPP もファットスプレッドにおいて粗大結晶生成を促進することが示された。

Table 3-3 に、PPP を添加して生成した粗大結晶ならびに周辺部の脂肪酸組成を示す。脂肪酸組成を調べた結果、粗大結晶の部分では、ステアリン酸含量が 4 倍程度に増加していた。一方、PPP を添加したにも関わらず、パルミチン酸含量はあまり増加しなかった。従って、PPP の添加により粗大結晶生成は促進されるが、PPP 単独で粗大結晶を形成するのではないことが示唆された。

増加したステアリン酸の由来として、部分水添大豆油が考えられる。Table 3-4 に部分水添大豆油、パーム油、大豆油の脂肪酸組成を示す。脂肪酸組成から考えると、水添前的大豆油には、炭素数 18 の脂肪酸のみで構成されたトリアシルグリセロールが 60% 以上含まれており、これに水添した部分水添大豆油では、ステアリンを多く含むトリアシルグリセロールが増加していると考えられる。特にトリステアリンは、針状の β' 型を持つことが知られて

Table 3-3 Fatty acid composition of granular crystal in fat spread with excess PPP

Fatty acid	Crystal [%]	Surroundings [%]
Palmitic acid	18.4	17.3
Stearic acid	36.7	6.2
Oleic acid	19.7	28.5
Linoleic acid	23.0	32.2

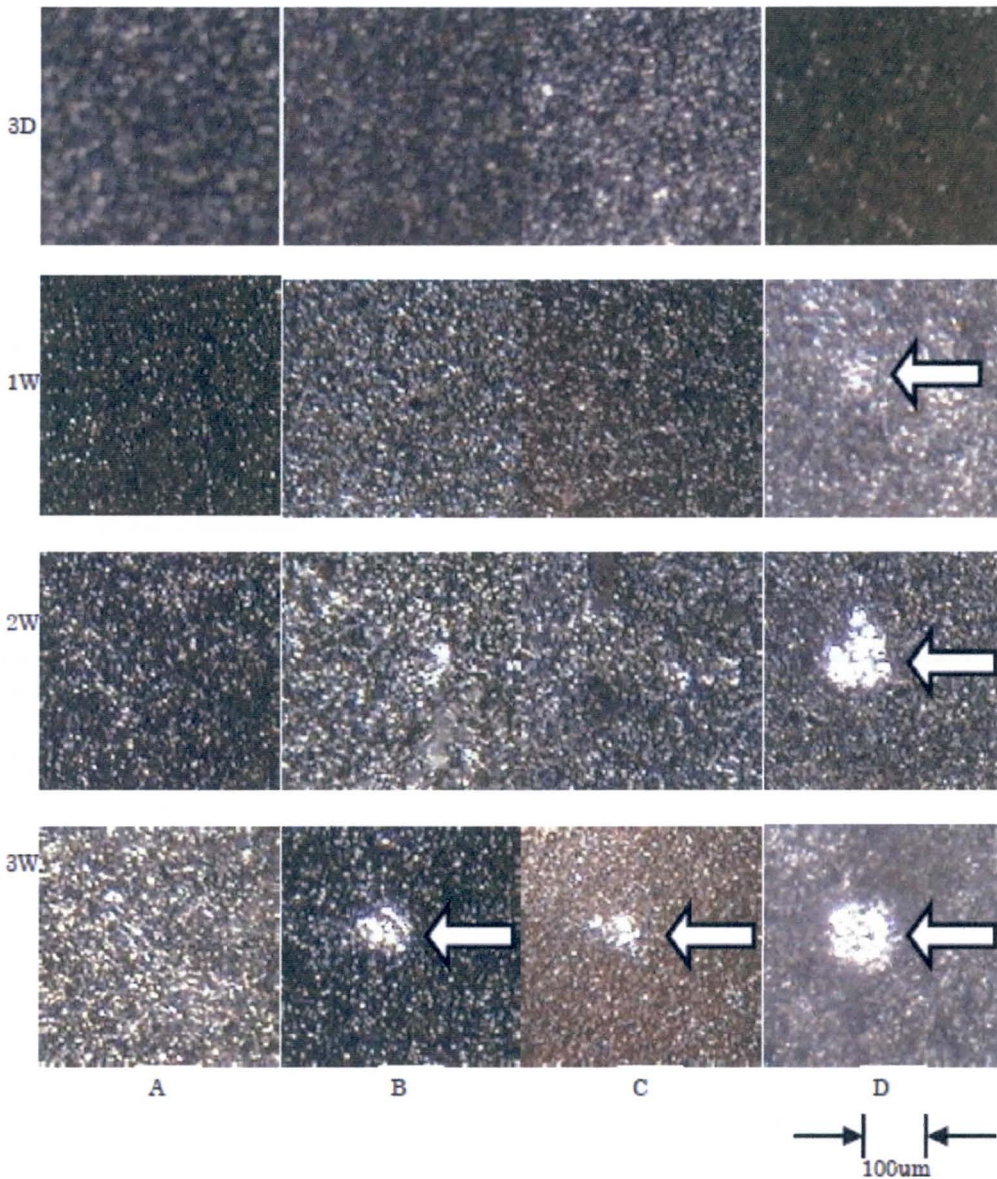


Fig. 3-2 Granular crystals observed by polarized microscope in the model fat spread under temperature fluctuation cycle after 3 days (3D), 1 week (1W), 2 weeks (2W), and 3weeks (3W). A. Control (1.0% PPP is included), B. Additional 0.5 % PPP was added, C Additional 1.0 % PPP was added, D Additional 3.0 % PPP was added

Table 3-4 The fatty acid composition of oils

Fatty acid species	Ratio [%]		
	Partially hydrogenated		
	soybean oil	Palm Oil	Soybean oil
C16	12.3	44.0	10.6
C18	7.7	4.4	4.0
C18:1t	17.7	0.5	0.0
C18:1c	24.2	39.5	24.1
C18:2c	31.6	8.8	52.3
C18:3c	3.5	0.1	5.9
others	2.9	2.8	3.1
Total	100.0	100.0	100.0

おり、結晶成長を促進すると考えられる。

したがって、これらのことより、PPPは高融点トリアシルグリセロールの局在化による粗大結晶生成を促すが、PPP自体は局在化や結晶成長の主要な構成因子ではないことが考えられる。それよりも、PPPによってステアリン酸結合型の高融点トリアシルグリセロールの局在化が促される。もちろん、PPPが結晶核の中心に存在して粗大結晶の成長を促していたとしても、それを本実験で確認することは難しく、結晶核がステアリン酸を結合したトリアシルグリセロールにより、目視で観察可能な大きさに結晶成長する現象のみが捉えられたことになる。

不飽和脂肪酸含量では、オレイン酸とリノール酸が、ともに粗大結晶中では減少した。したがって、不飽和脂肪酸が少ないトリアシルグリセロールが粗大結晶中で増加していると考えられる。不飽和脂肪酸が少ないトリアシルグリセロールは、一般的に融点が高くなる (Table 3-5) (6-10)。したがって、高融点のトリアシルグリセロールが粗大結晶形成に関わっていることも示唆された。

PPPを3%添加したサンプルとパーム油を2倍量にしたサンプルのX線回折結果は、全て β' 型を示した (Fig. 3-3)。これは、 β 型への転移なしに高融点トリアシルグリセロールの局在化が起こることを示している。 β 型への転移は1ヶ月後にも見られなかった。この現象は、POP/POO混合物を用いた結果と異なるが、純粋系と比較して天然油脂を用いた複雑系では、結晶転移が遅れることが考えられる。

3.4 考察とまとめ

本実験の結果から、ファットスプレッド中におけるパーム油やPPPの濃度が上昇することにより、粗大結晶生成が促進されることを確認した。これは、パーム油に含まれるPPPのような高融点トリアシルグリセロールが結晶核

Table 3-5 Higher melting point TAG species with long saturated fatty acids

Molecular species	Melting point at most stable polymorph [°C]
OOO	5.5
OPO	21.9
POP	36.7
PPP	66.4
OSO	25.0
SOS	43.0
SSS	73.5

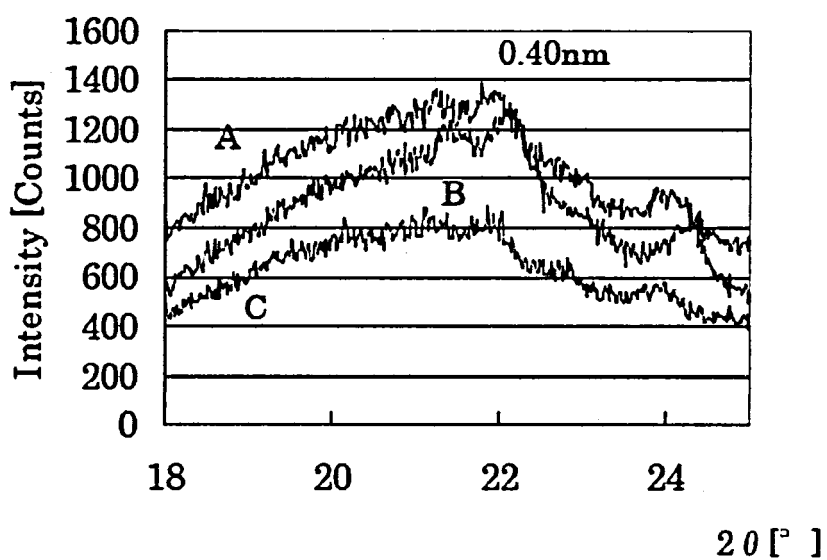


Fig.3-3 X-ray diffraction patterns of model margarine after four weeks

A. Control (1.0% PPP is included), B. Additional 3.0 % PPP was added,
 C 2.0 times of palm oil

となって集まることで、粗大結晶が生成することを示唆している。結晶核が形成されると、他の高融点トリアシルグリセロールが結晶成長の骨格となり、粗大結晶の成長に繋がると考えられる。また、その時の結晶多形は β' 型であることから、粗大結晶の生成は β 型の発現よりも高融点トリアシルグリセロールの局在化が重要であると考えられる。これは、Miuraらの報告を支持する結果である(11)。

参考文献

- [1] 阿部芳郎, 油脂・油糧ハンドブック, 幸書房, 東京 (1988) p.p. 263.
- [2] 海老原熊雄, 油脂化学便覧改訂 2 版, 日本油化学会 編, 丸善, 東京, (1971) p.p. 100.
- [3] Minato, A., S. Ueno, J. Yano, K. Smith, H. Seto, Y. Amemiya and K. Sato, J. Am. Oil Chem. Soc., 74, (1997) 1213.
- [4] Minato, A., S. Ueno, K. Smith, Y. Amemiya, and K. Sato, J. Phys. Chem. B, 101, (1997) 3498.
- [5] Minato, A., S. Ueno, J. Yano, Z.H. Wang, H. Seto, Y. Amemiya, and K. Sato, J. Am. Oil Chem. Soc., 11, (1996) 1567.
- [6] Sato, K., T. Arishima, Z.H. Wang, K. Ojima, N. Sagi, and H. Mori, J. Am. Oil Chem. Soc., 79, (2002) 931.
- [7] Sato, K., T. Arishima, Z.H. Wang, K. Ojima, N. Sagi, and H. Mori, J. Am. Oil Chem. Soc., 66, (1989) 664.
- [8] Hagemann, J. W., and W.H. Tallent, J. Am. Oil Chem. Soc., 49, (1972) 118.
- [9] Takeuchi, M., S. Ueno, E. Flöter, and K. Sato, J. Am. Oil Chem. Soc., 79, (2002) 627.
- [10] Kodali, D.R., D. Atkinson, T.G. Redgrave, and D.M. Small, J. Lipid

Res., 28, (1987) 403.

[11] Miura, S., H. Konishi, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 103, (2001)
804.

第4章 ファットスプレッドにおけるトリアシルグリセロール分子種の相互作用

4.1 試料

Table 4-1 に示す配合のうち、固体脂 (Solid fat) 部分で、30 種類の原料油 (日清オイリオグループ(株)製) を用いてファットスプレッドサンプルを調製した。通常の製造の後、5°C で 12 時間、20°C で 12 時間の温度サイクル処理(1)を行い、一週間毎に偏光顕微鏡にて粗大結晶の発生の様子を観察した。テクスチャーの劣化の指標として、粗大結晶が 100 μm を超えた時の週数を、テクスチャー劣化時間 (Texture degradation time (TDT)) としてカウントした。

4.2 粗大結晶化に対する脂肪酸の影響

粗大結晶が生成する前後の X 線回折結果 (Fig. 4-1) から、粗大結晶が確認できた段階の結晶多形が β' 型であることを確認した。また、 β 型への転移は、粗大結晶生成を確認後 2 ヶ月で生じた。本研究では、 β 型への転移時期ではなく、粗大結晶の生成時期である TDT に着目して解析を行った。

Fig. 4-2 に、30 種類のサンプルそれぞれの TDT とパルミチン酸の濃度の関係を示す。この図より、パルミチン酸が 10% 以上になると TDT が減少していることを確認した。すなわち、パルミチン酸の濃度依存的に粗大結晶生成が促進されることが示唆された。その他の脂肪酸では、その傾向はみられなかった。したがって、これまで報告されている通り、パルミチン酸が粗大結晶生成に大きく関与していることを確認できた(2)。

4.3 粗大結晶化に対するトリアシルグリセロールの影響

まず、炭素数別トリアシルグリセロールが TDT に与える影響について検討

Table 4-1 Composition of O/W emulsions.

Ingredients	Ratio [wt%]
Solid fat	50.0
Soybean oil	20.0
Emulsifiers	0.4
Sodium chloride	1.2
Spray-dried whey	0.5
Water	27.9
Total	100.0

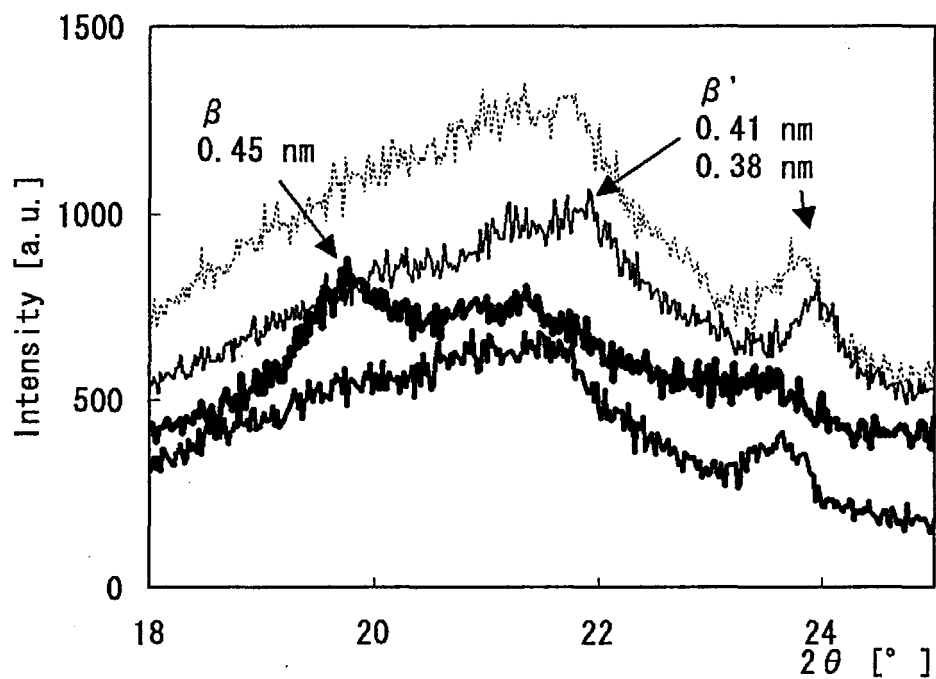


Fig. 4-1 X-Ray diffraction patterns of model W/O emulsion
 Temperature fluctuation cycle of 5°C 12 h and 20°C for another 12 h
 Before granular crystals were observed,
 ---- After granular crystals were observed,
 — First week after granular crystals were observed,
 ——— 2 months after granular crystals were observed

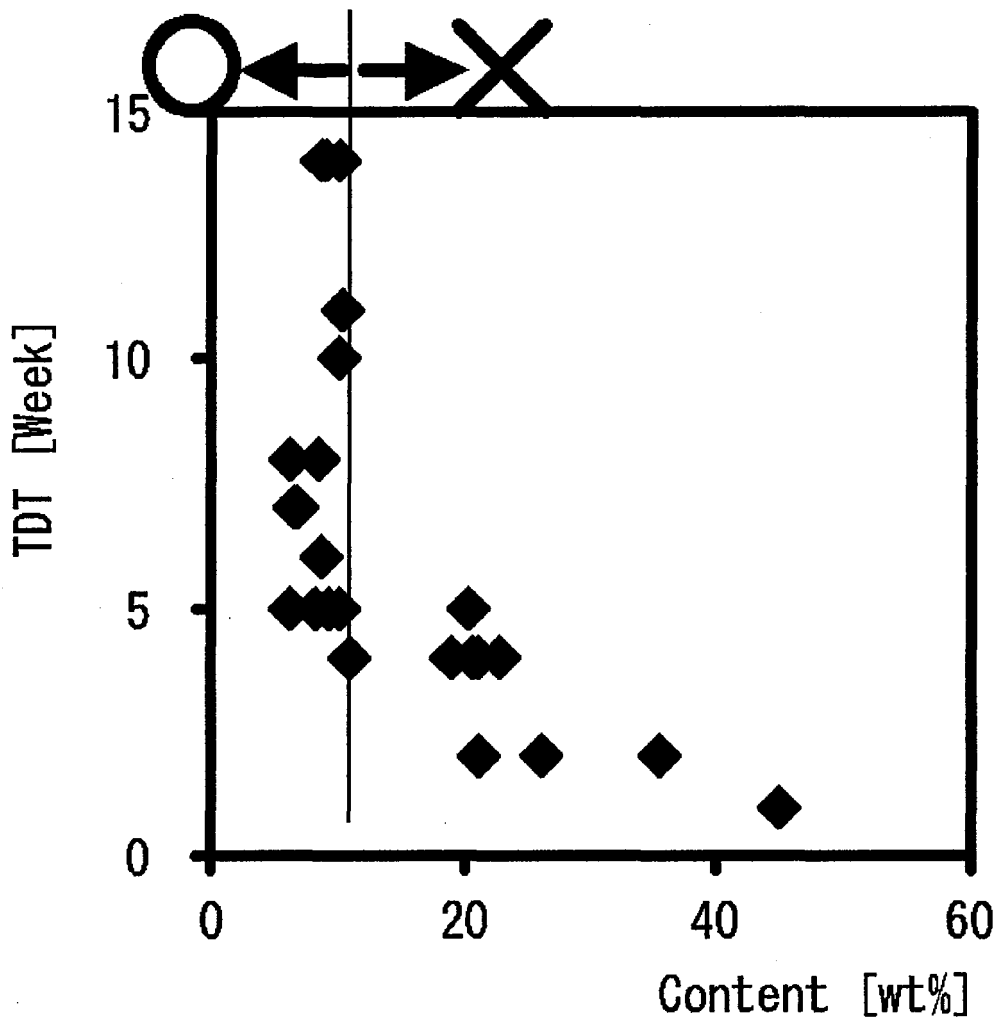


Fig. 4-2 Palmitic acid concentration and TDT

Each 30 W/O emulsion under temperature fluctuation cycle of 5°C for 12 h and 20°C for another 12 h. Palmitic acid wt% concentration was determined by GLC measurement. (O) Permissible range of TDT, (X) Impermissible range

を行った。パルミチン酸が主として結合しているトリアシルグリセロールの炭素数は 48、50、52 であるため、C48、C50、C52 と TDT との関係プロットした (Fig. 4-3)。その結果、C48 は濃度依存的に TDT を増加させることがわかった。また、C52 は TDT に影響を与えなかったが、C54 は C48 と逆で TDT を減少させることを確認した。しかしながら、炭素数別のトリアシルグリセロール含量が TDT に与える影響はそれ程明確ではないと考えられる。それは、炭素数別に分離した C48、C50、C52 の中には、パルミチン酸を含まないトリアシルグリセロール分子種も数多く存在するためと考えられる。

炭素数別のトリアシルグリセロール濃度は、脂肪酸濃度と比較してテクスチャーの劣化に与える影響が明確ではないため、次に、トリアシルグリセロールの分子種濃度がテクスチャーの劣化に与える影響について数値計算を用いて検討した。トリアシルグリセロール分子種の濃度は、配合した各油の脂総脂肪酸組成および、 β 位脂肪酸組成から Coleman の方法 (3) に基づき算出した。

まず、PPP、PPO と POP の各濃度がテクスチャーの劣化に与える影響については、Fig. 4-4 に示すように、POP と PPP は 2.5mol% 以上、PPO は 4.5mol% 以上で TDT を減少させることを確認した。この挙動は、パルミチン酸が TDT に与える影響と似ており、2 つまたは 3 つのパルミチン酸が結合したトリアシルグリセロールが、パルミチン酸に代表される特性をもつと考えられる。一方、OPO や P00 などのパルミチン酸を一つだけ結合したトリアシルグリセロールは、TDT に対する濃度依存性がほとんど見られなかった (Fig. 4-5)。これは、OPO や P00 は、テクスチャーの劣化に対してほとんど影響を与えないということを表している。

最後に、テクスチャーの劣化に対するトリアシルグリセロール分子種の複合作用に関して検討を行った。サンプル中の PPP、PPO そして POP の各モル濃度の総和が TDT に与える影響について Fig. 4-6 に示す。この結果、これら

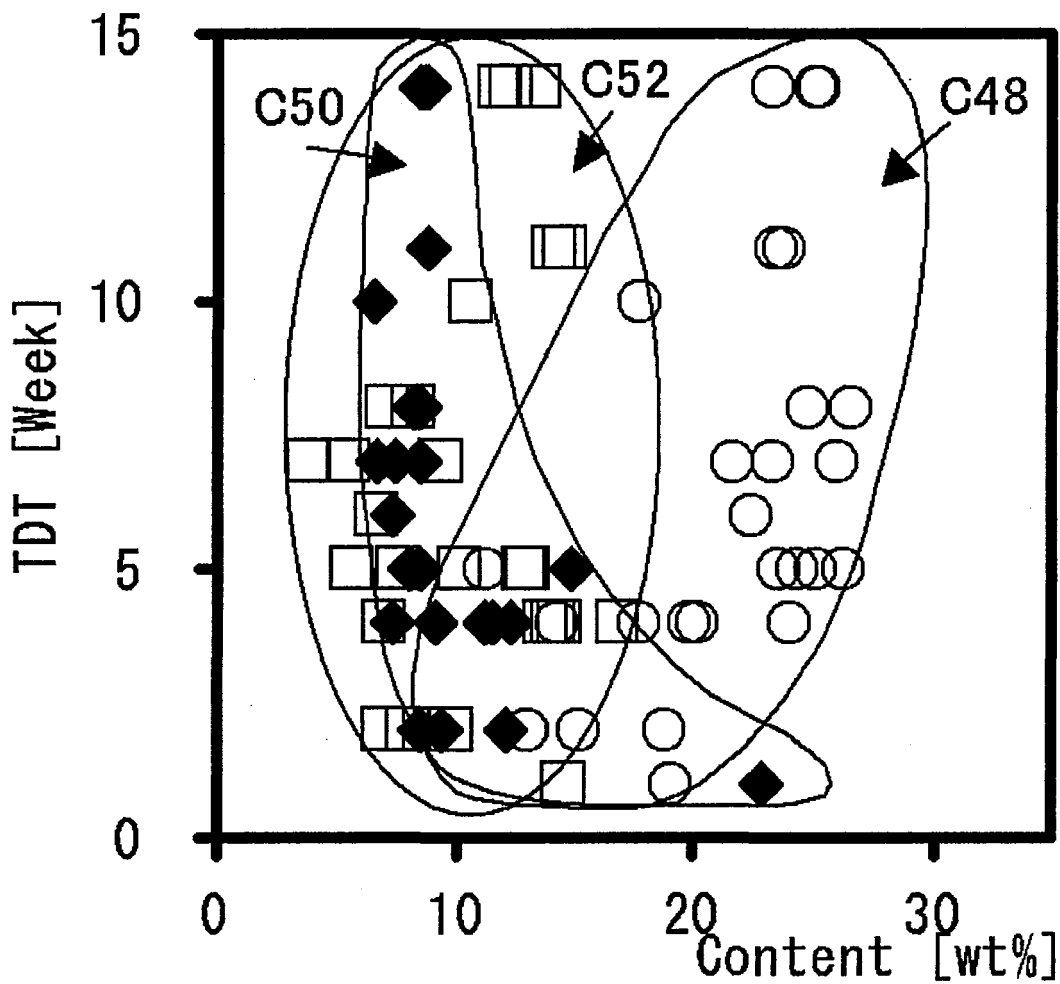


Fig. 4-3 TAGs of (○) C48, (◆) C50 and (□) C52 concentration and TDT
 Each 30 W/O emulsion under temperature fluctuation cycle of 5°C for 12 h and 20°C for another 12 h. C48, C50, C52 wt% concentrations were determined by GLC measurement.

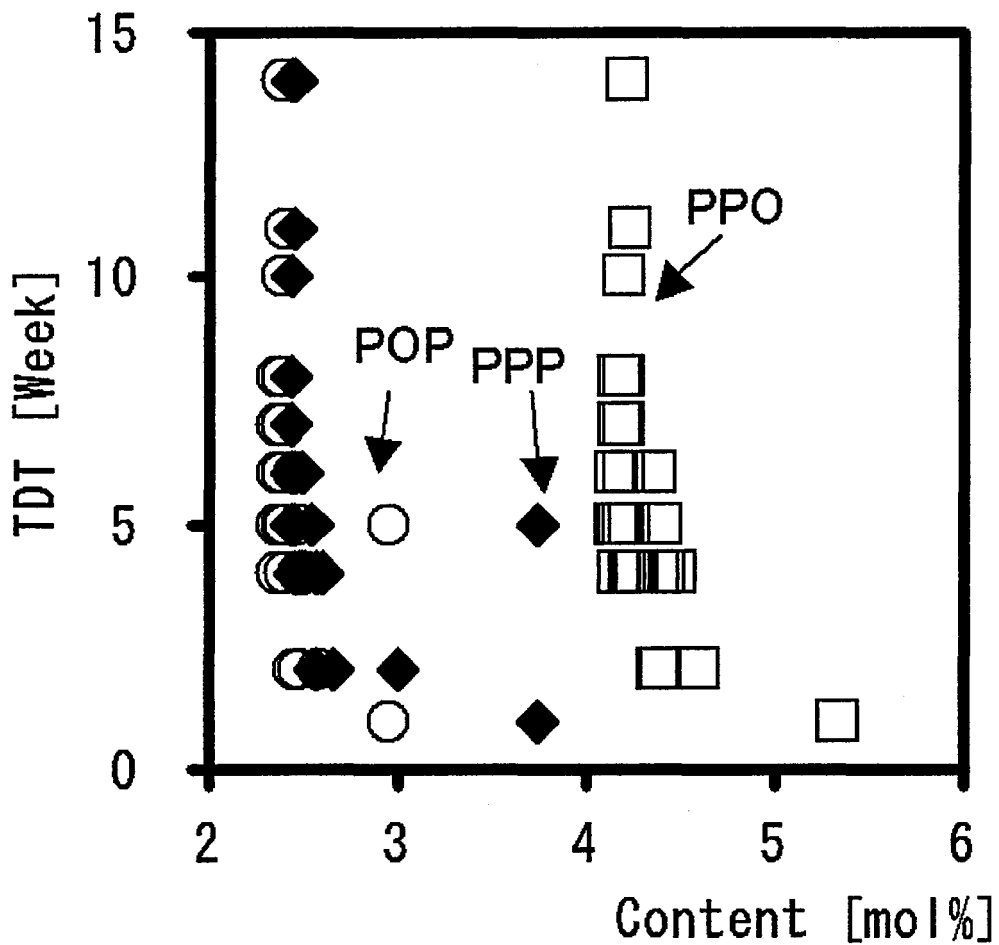


Fig. 4-4 TAGs of (◆) PPP, (□) PPO and (○) POP mole% and TDT

Each 30 W/O emulsion under temperature fluctuation cycle of 5°C for 12 h and 20°C for another 12 h. PPP, PPO and POP mole% concentrations were calculated from Coleman's theory.

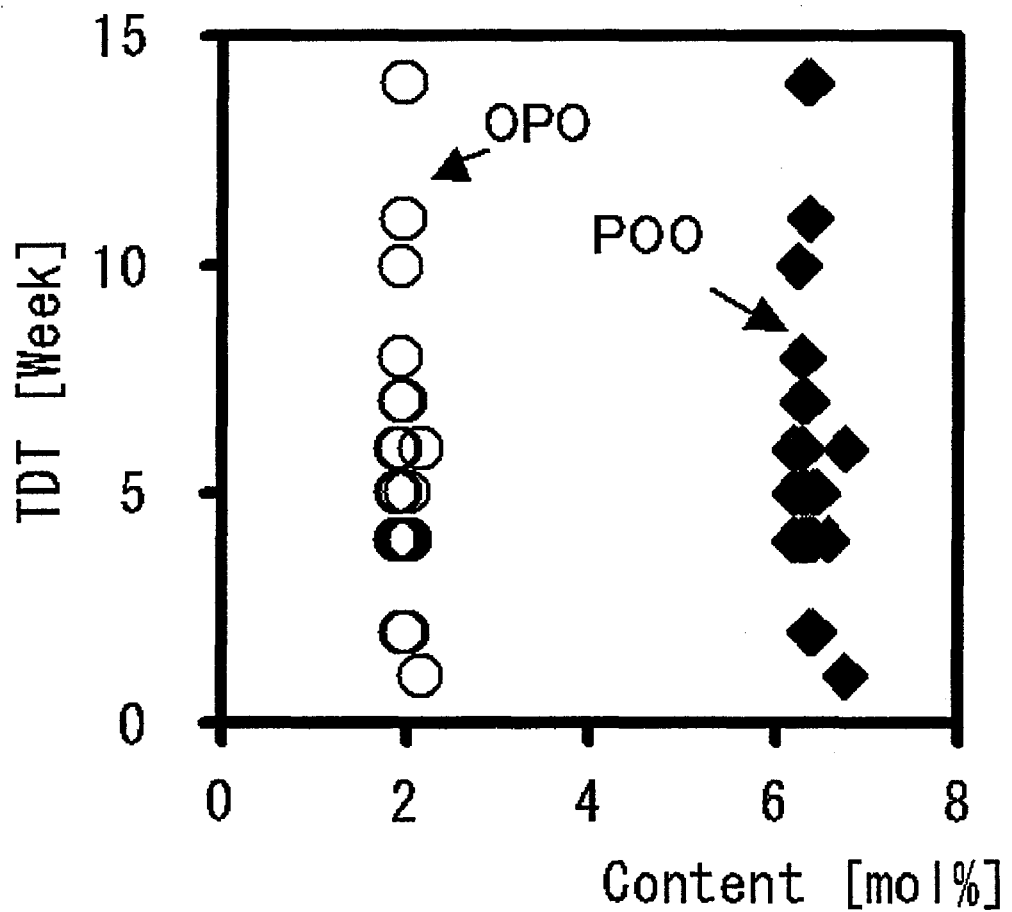


Fig. 4-5 TAGs of (◆) P00 and (○) OPO mole% and TDT

Each 30 W/O emulsion under temperature fluctuation cycle of 5°C for 12 h and 20°C for another 12 h. P00 and OPO mole% concentrations were calculated from Coleman's theory.

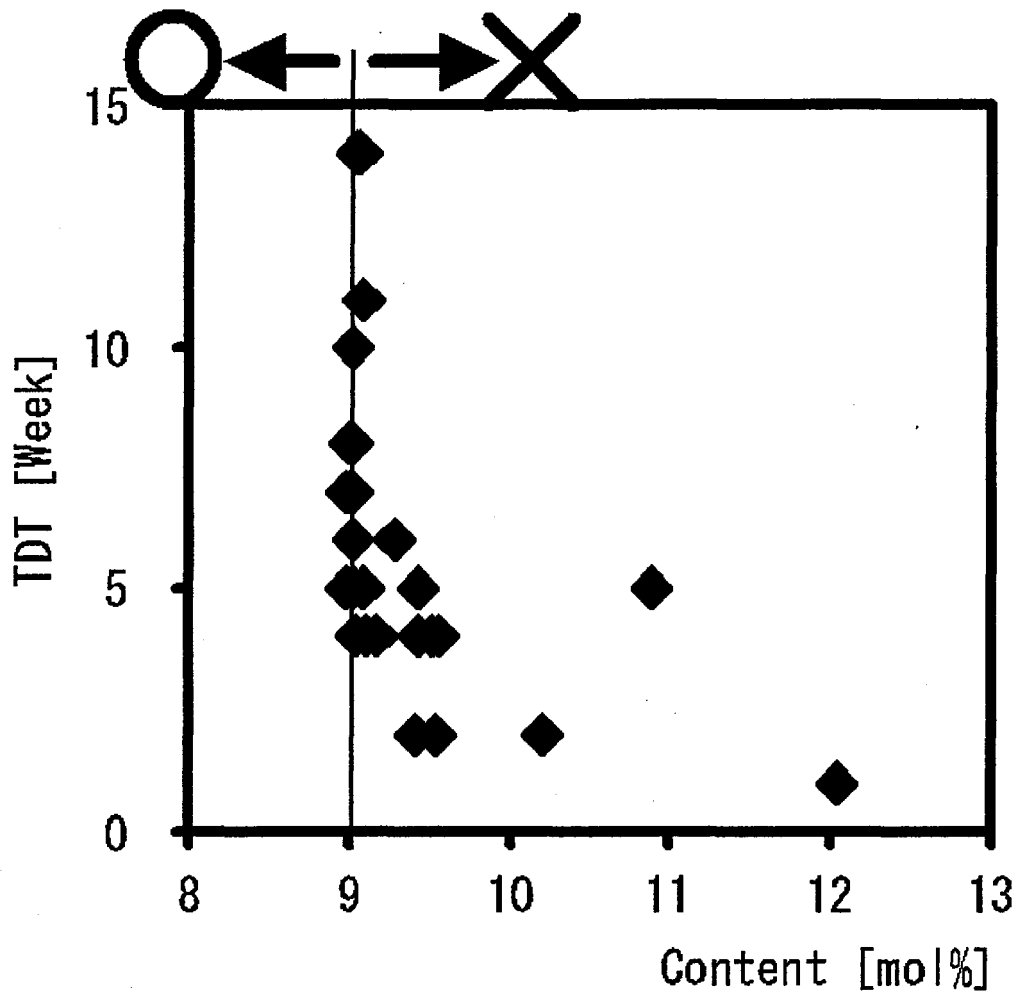


Fig. 4-6 TAGs summation of PPP, PPO, and POP mole% and TDT

Each 30 W/O emulsion under temperature fluctuation cycle of 5°C for 12 h and 20°C for another 12 h. PPP, PPO and POP mole% were calculated from Coleman's theory. (O) Permissible range of TDT, (X) Impermissible range

のトリアシルグリセロール分子種の総和が 9.1mol%以上で TDT を減少させることが明らかとなった。

4.4 考察とまとめ

第 3 章と同様に、本研究においても β' 型 \rightarrow β 型転移の前に、粗大結晶の生成が認められ、Miura らの報告(1)を支持する結果となった。したがって、 β 型への転移は、高融点油脂の局在化の後に起こるのではないかと考えられる。

炭素数別のトリアシルグリセロールである C48、C50 および C52 の濃度が、テクスチャー劣化に与える影響は明確ではなかった。これは、パルミチン酸を含むトリアシルグリセロールと、パルミチン酸を含まないトリアシルグリセロールとが分離できていないためと考えられる。したがって、炭素数別ではなく個々のトリアシルグリセロール分子種の影響が重要である。

トリアシルグリセロール分子種 PPP、PPO と POP は、濃度上昇と共に TDT を減少させた。またこの現象は、PPP、PPO と POP のモル濃度の総和によりさらに明確となった。PPP は、高融点トリアシルグリセロールであり、結晶核を形成しやすい(4, 5)。また PPO と POP は、結晶成長に関与するとされる 3 鎖長構造を形成する(2, 6)。したがって、PPP が結晶核形成を促進し、PPO と POP が結晶成長に関与すると考えられる。

一方、分子内に 1 つだけのパルミチン酸を含むトリアシルグリセロール分子種である P00、OPO は、テクスチャー劣化に与える影響が僅かであった。これは、分子内にパルミチン酸が存在しても、トリアシルグリセロール中の他の脂肪酸によって、パルミチン酸によるテクスチャー劣化の特性が妨げられていると考えられる。したがって、パルミチン酸を多く使用する場合でも、分子内に 1 つだけのトリアシルグリセロールを多く調製することができれば、テクスチャー劣化を極力少なくすることができると考えられる。

参考文献

- [1] S. Miura, H. Konishi, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **103**, (2001) 804.
- [2] A. Watanabe, I. Tashima, N. Matsuzaki, J. Kurashige, K. Sato, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, (1992) 1077.
- [3] M. H. Coleman, *The Structural Investigation of Natural Fats. Advances in Lipid Research*, edited by R. Paoletti, D. Kritchevsky, Vol.1, Academic Press Inc. London (1963) p.p. 1.
- [4] L. Tanaka, S. Miura, T. Yoshioka, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **84**, (2007) 421.
- [5] H. Ishikawa, M. Shiota, M. Murakami, I. Nakajima, *Polymorphic Behavior of Palm Oil and Modified Palm Oils. Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **3**, (1997) 77.
- [6] A. Minato, S. Ueno, K. Smith, Y. Amemiya, K. Sato, *J. Phys. Chem. B*, **101**, (1997) 3498.

第5章 マイクロビームX線回折法による粗大結晶の微細構造解析

5.1 試料

試料の原料として、3種類の油相成分、3種類の水相成分、3種類の乳化剤を使用した。

油相成分として、菜種極度硬化油、パーム油、大豆白絞油の混合油を用いた。また、モノグリセリド、ソルビタン脂肪酸エステル、レシチンの3種類の乳化剤を添加した。水相成分として、蒸留水、食塩、スキムミルクパウダー (SMP)を用いた。

本実験では、パーム油 20%配合のマーガリンを作成し、保存、成長させた粗大結晶を実験試料とした。それぞれの材料の配合比をTable 6-1に示す。

試料の保存温度に関しては、家庭における使用状況を勘案し、冷蔵庫の出し入れに相当する温度変化を想定して強制劣化保存を行った。強制劣化保存とは、まず試料調製後3日間5°Cで保存し結晶を安定化させた後、4日目以降、12時間ごとに7°Cと15°Cの温度変化を与える方法である。この3日間5°Cでの保存は、製造した製品を工場で保管する期間に相当し、7°Cと15°Cの温度サイクルは、家庭で試用される際の冷蔵庫の出し入れを想定して設定した。

実際には、恒温機を使用し、①～④の温度サイクルを繰り返した。

- ①30分かけて15°C→7°Cまで降温する。
- ②7°Cの状態を11時間30分保つ。
- ③30分かけて7°C→15°Cまで昇温する。
- ④15°Cの状態を11時間30分保つ。

以上の温度操作の間に発生して成長した粗大結晶の物性と構造を、詳細にか観察した。

5.2 粗大結晶の発現過程

Fig. 5-1 にパーム油含有サンプルの偏光顕微鏡写真を示す。温度サイクル前(Fig. 5-1a)は、粗大結晶の生成はみられなかった。しかしながら温度サイクル後は、サンプル調製後 1 週間で粗大結晶が生成した(Fig. 5-1c 写真の白色部分)。また、時間経過と共に、温度サイクル 2 週間後(Fig. 5-1c)、1 ヶ月後(Fig. 5-1d)と粒子径が増加した。X線回折の結果から、温度サイクル中のテクスチャー変化は、試料中の高融点油脂画分が β' 型から β 型へ転移することに起因していることが示された。

5.3 走査型電子顕微鏡による観察

粗大結晶の固体脂ネットワーク構造の違いを走査型電子顕微鏡により観察した。実験試料として、調製後 14 ヶ月保存し成長した粗大結晶粒を用いた。Fig. 5-2 に観察結果を示す。粗大結晶中に網目構造が観察されたが、粗い網目構造が多く見られた。これは、粗大結晶部は主として β 型結晶により構成されているため、 β' 型結晶の非常に細やかな網目構造が破壊されたと考えられる。また、粗大結晶粒中に多くの凹凸が観察された。この構造から、目視で観察される 1 つの粗大結晶は、いくつかの油脂結晶クラスターの集合体である可能性が考えられる。

5.4 粗大結晶の熱特性

粗大結晶に特異的な融解挙動を調べるため、粗大結晶部および粗大結晶以外の部分の DSC 測定を行った。Fig. 5-3 に加熱時の DSC 測定結果を示す。実験試料は、調製直後(Fig. 5-3a)と保存 2 週間(Fig. 5-3b)のものを用いた。Fig. 5-3a では、比較的ブロードな融解ピークが 10°C 以下に、小さな融解ピークが 20°C と 40°C の間にみられた。前者は、低融点油脂画分のピークを示しており、後者は高融点油脂画分ならびに乳化剤の変化に相当するピークを

Table 5-1 Composition of main ingredients

Ingredients	Weight [g]
Soybean oil	67.20
Palm oil	28.00
Fully hydrogenated rapeseed oil	2.80
Emulsifiers	0.77
SMP	1.12
Salt	1.40
Water	38.71
Total	140.00

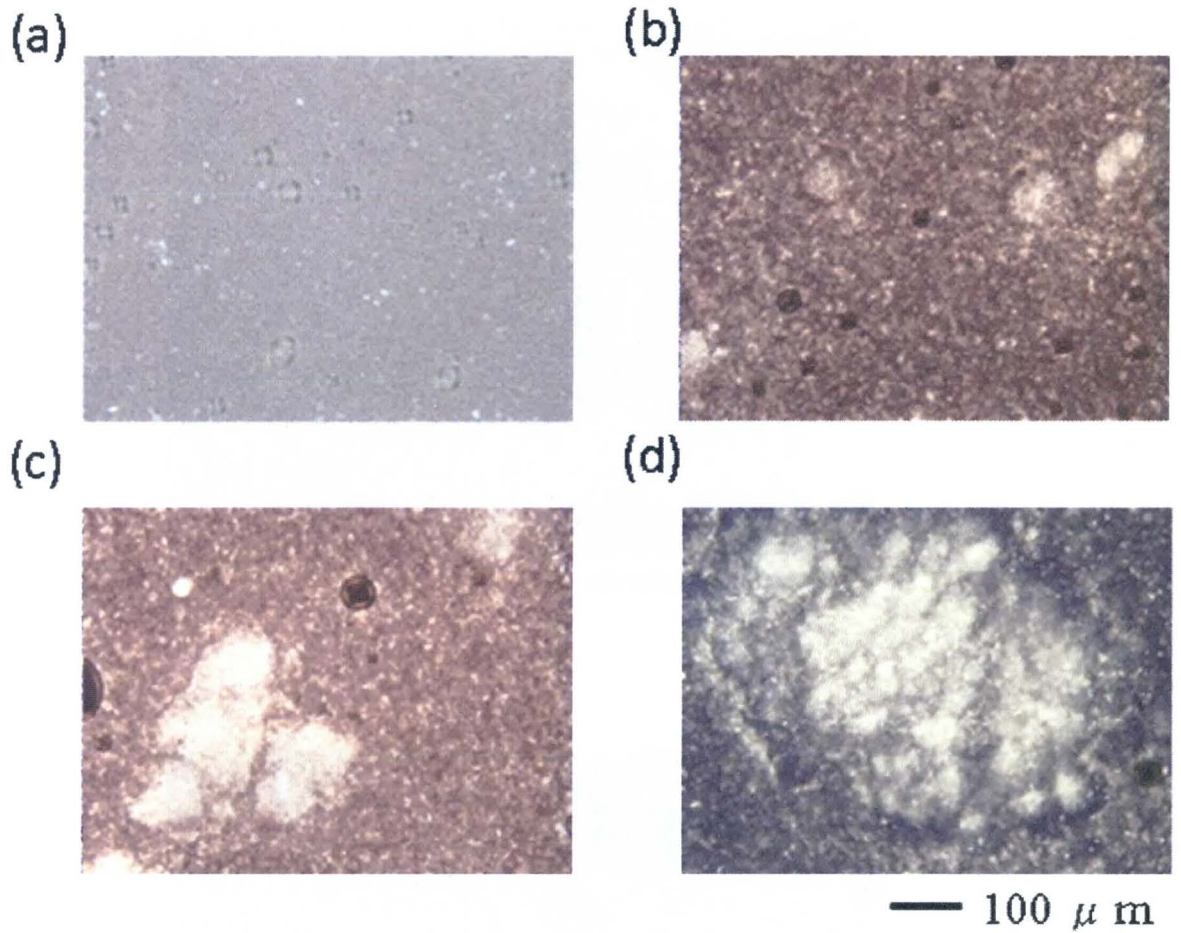


Fig.5-1 Polarized optical microscope images of palm-oil-blended fat spread.

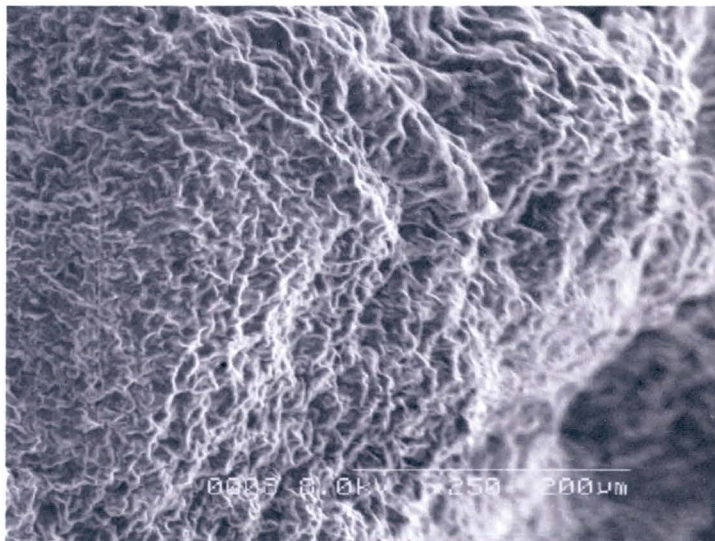
a. 1 day after keeping at 5 ° C, b. 4days after thermal thawing, c. 5 days after thermal thawing, d. 7 days after thermal thawing.

(a)



1mm

(b)



0.2mm

Fig. 5-2 Structure of granular crystal by scanning electron microscope. (a)Low magnification, (b)high magnification.

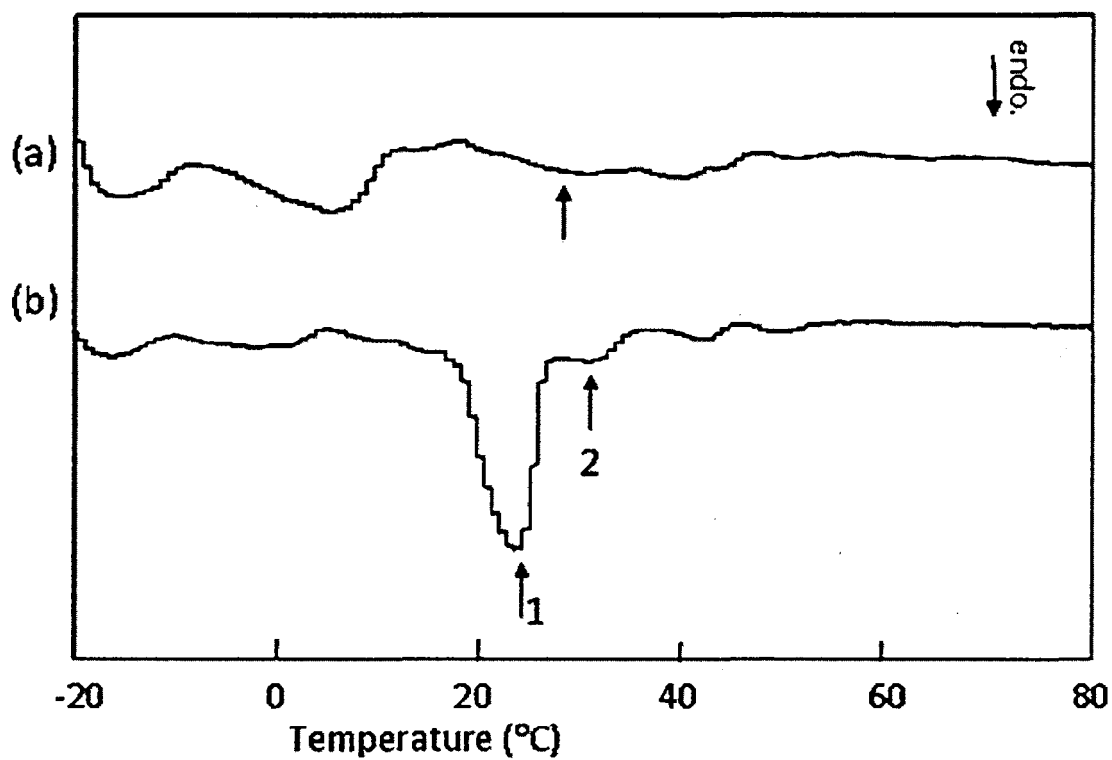


Fig. 5-3 DSC heating thermopeaks. (a) Normal fat spread. (b) Granular Crystals.

示している。下記で述べるようにX線回折測定の結果では、Fig. 5-3a の矢印で示す融解ピークが β' 型結晶の融解に対応している。一方 Fig. 5-3b では、23°Cにシャープなピーク(矢印1)と、小さなピーク(矢印2)が観察された。これは、Fig. 5-2 の偏光顕微鏡観察における粗大結晶の生成を示している。

5.5 粗大結晶の多形構造

回転対陰極型X線回折による測定結果を Fig. 5-4 に示す。正常サンプルと粗大結晶生成サンプルを、保存温度から 45°Cまで昇温しX線回折により測定することで、粗大結晶の結晶多形構造を決定した。

Fig. 5-4a では、4°Cにて広角側 0.42nm と 0.37nm、小角側 4.20nm (001 反射)と 1.40nm (003 反射)がみられた。これらは、通常のマーガリンにて特徴的にみられる2鎖長の β' 型構造($\beta' - 2$)を示していた。しかしながら、Fig. 5-4b では、4°Cにて広角側に β 型である0.46nm、 β' 型である0.42nmのピークが観察された。また、 2θ が 1° から 10° 小角側に4.20nm、3.04nm、1.40nm、1.02nmの回折ピークが現れた。1.40nmの回折ピークは、2鎖長構造である鎖長4.20nmの003反射を示し、3.04nmと1.02nmは、それぞれ3鎖長構造である鎖長6.08nmの002反射と005反射を示す。ただし、 $2\theta^\circ$ の測定限界により、6.08nmのピークは現れていない。これらの結果より、粗大結晶の生成は、高融点油脂が($\beta' - 2$)型から3鎖長構造と2鎖長構造の β 型と β' 型が混在する複雑な多形転移が関与していることが示唆された。

温度変化によるX線回折パターン変化は、正常サンプルと粗大結晶生成サンプルとで、大きく異なった挙動を示した。0.42nm、0.37nm、4.20nmならびに1.40nmのX線回折ピークは、29度までの昇温で減少し、39°Cで消失した。正常サンプルにおける小角側4.20nmと1.40nmピーク強度の温度変化を Fig. 5-5 に示す。回折強度は、5°Cから23°Cにかけて大幅に減少した。これ

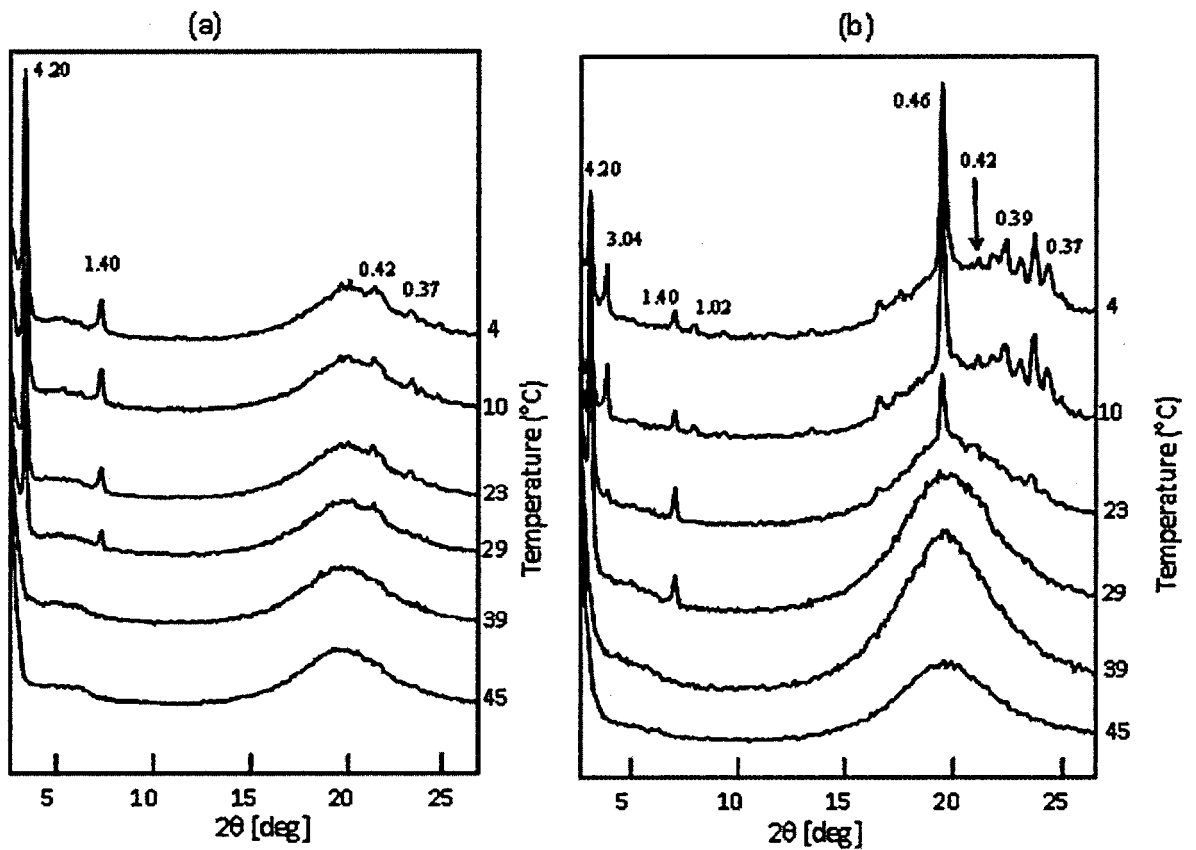


Fig. 5-4 Conventional XRD patterns taken during heating processes. (a) Normal fat spread. (b) Granular crystals. Unit, nm.

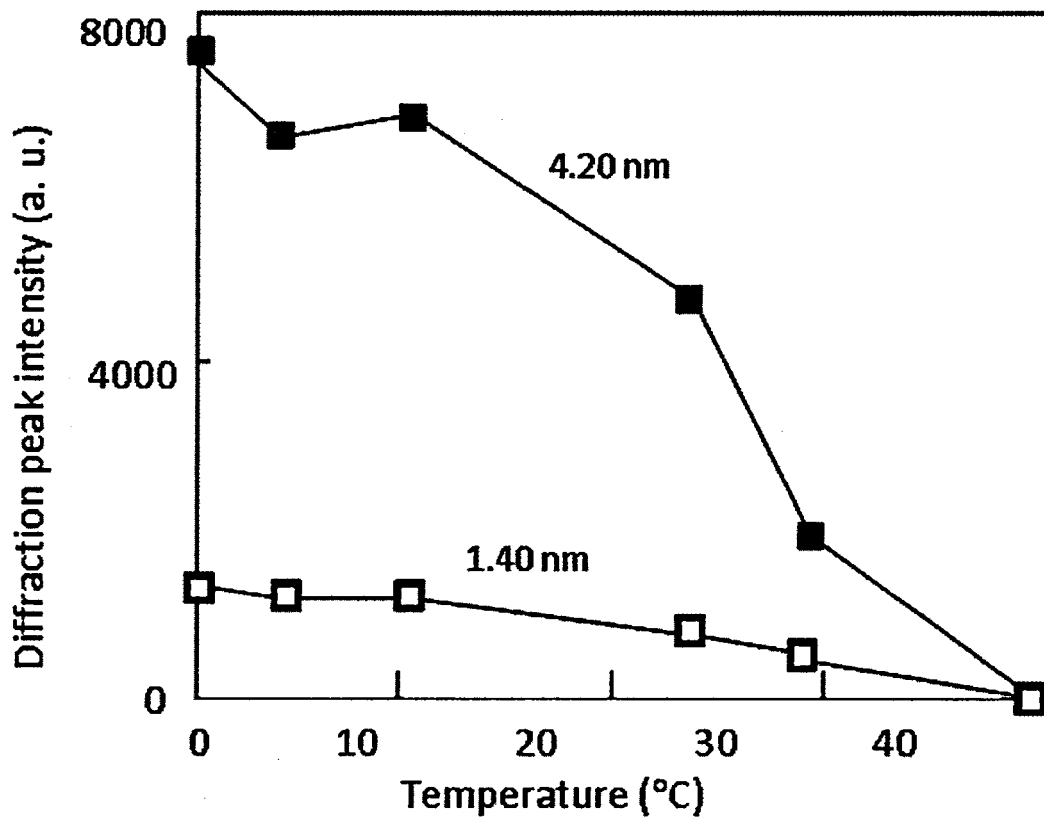


Fig.5-5 Temperature variations in intensity of small-angle diffraction peaks of normal fat spread presented in Figure 4a.

は、Fig. 5-3a でみられる DSC の融解ピークに対応していた。

粗大結晶 (Fig. 5-4b) の β 型を示した広角側 0.46nm のピークは、23°C にて明確に強度が低下した。それに対応して、小角側 X 線回折ピーク 3.04nm および 1.02nm の強度も低下した。これらの変化は、DSC 測定結果 (Fig. 5-3b) の融解ピーク (矢印 1) に対応している。しかしながら小角側 X 線回折ピーク 4.20nm、1.40nm は、23°C では変化しなかった。29°C において小角側 3.04nm が消失したが、4.20nm と 1.40nm は維持され、10°C と比較して僅かに強度が増加した。広角側は 29°C で β 型 (0.46nm) が維持されたが減少していた。非常に弱い広角側の β' 型 (0.42nm) は維持された。39°C にて、0.42nm、4.20nm および 1.40nm のピークが消失し、それ以上の温度では、ピークが検出されなかった。29°C でのピーク変化は、Fig. 5-3b の矢印 2 で示す融解ピークに対応している。

これまで述べてきた回折ピークの温度依存性より、3 鎖長構造 (3.04nm) は β 型 ($\beta-3$) に対応し、2 鎖長構造 (4.20nm と 1.40nm) は、 β' 型 ($\beta'-2$) と β 型 ($\beta-2$) に対応しているといえる。さらに、 $\beta-3$ 型の融点は、 $\beta'-2$ 型と $\beta-2$ 型よりも低い。言い換えれば、準安定な $\beta'-2$ 型と安定な $\beta-3$ 型が、同時に粗大結晶内部に存在するということである。

5.6 マイクロビーム X 線回折法による微細構造解析

粗大結晶の微細構造を解明するために、マイクロビーム X 線回折法による走査分析を行った。正常な試料を分析した結果を Fig. 5-6a に示す。走査ステップの距離は 200 μm とした。正常な試料では、回折パターンは同一であった (1 例として 1 つのパターンを矢印で示す)。Fig. 5-6b は、このパターンを 2 次元展開した図を表している。中心の空白部分とその周囲の黒い円は回折パターンではなくマイクロビームの端のパターンである。一方、外周の黒い円は回折パターンであり、Fig. 5-6b に示す矢印のように 2θ を測定す

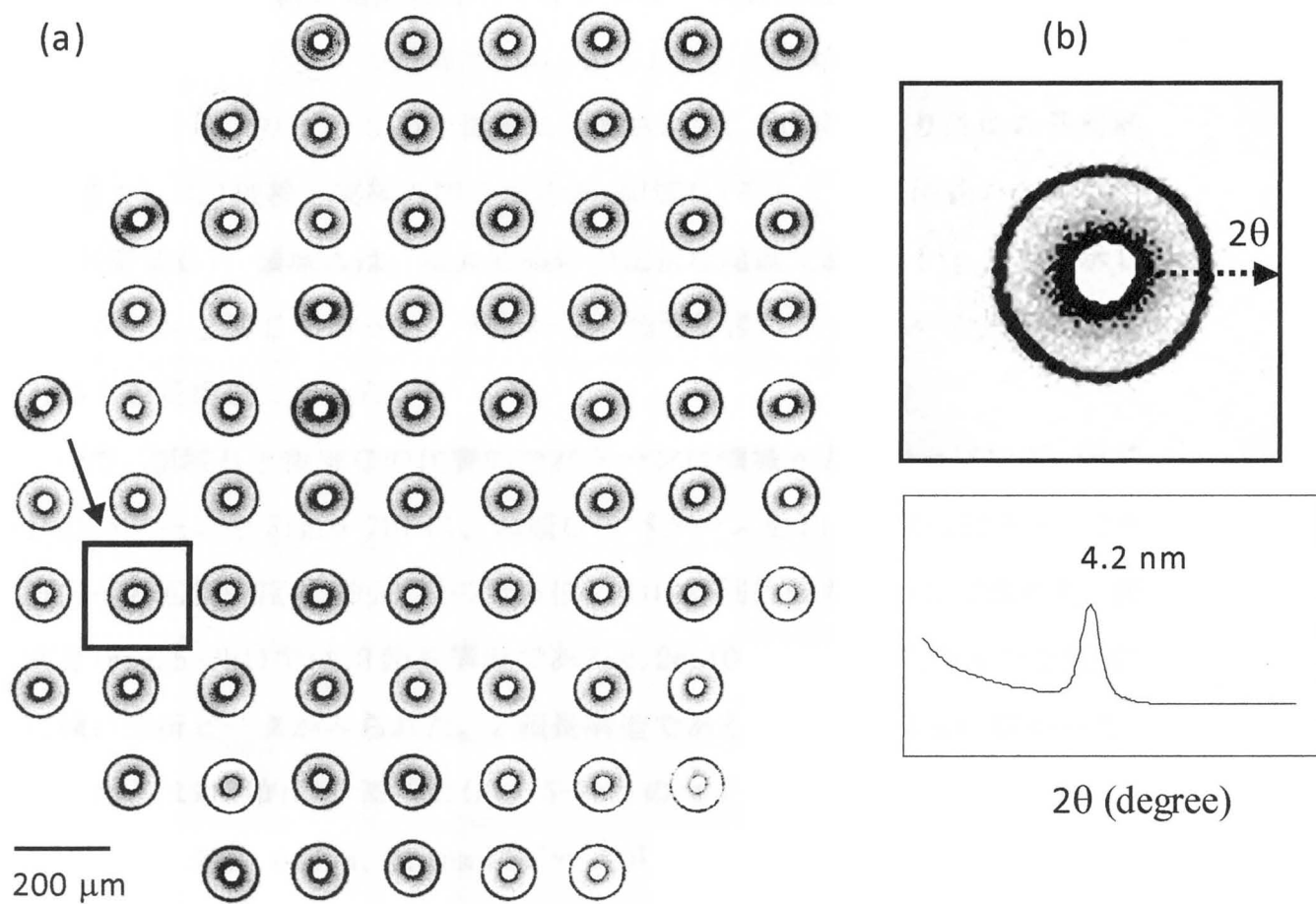


Fig. 5-6 SR- μ -SAXD patterns of normal margarine. (a) Overall patterns. (b) 2θ extension of the pixel noted by the arrow in (a).

ると、長面間隔が 4.20nm であった。この値は、Fig. 5-4a で示された正常な試料での 2 鎖長構造を持つ油脂結晶の長面間隔と同じであった。

Fig. 5-7a に、粗大結晶切片のマイクロビーム X 線回折法によるパターンを示す。走査ステップの距離は 100 μm とした。粗大結晶は、マイクロビーム X 線回折により次の 3 つの領域に分割された。(1) 実線より外側の外周部 (領域 A)、(2) 破線と実線の間周辺部 (領域 B) そして、(3) 破線の内側の中心部 (領域 C)。領域 A は、粗大結晶外の正常な組織であり、Fig. 5-6 で示したパターンと同じであった。すなわち、油脂結晶は、4.20nm の長面間隔をもつ 2 鎖長構造であった。

一方、領域 B と領域 C の代表的なパターンは領域 A と異なっていた。領域 B のパターンを Fig. 5-7b1 に、領域 C のパターンを Fig. 5-7b2 に示す。2 θ 方向への回折強度は、回折円の全方位における回折強度積分して求めた。領域 B (Fig. 5-7b1) では、3 鎖長構造である 6.2nm (001 反射) と 3.1nm (002 反射) に強い回折ピークがみられた。2 鎖長構造である 4.2nm は非常に弱かった。

これとは対照的に、領域 C (Fig. 5-7b2) のマイクロビーム X 線回折パターンでは、4.2nm、6.2nm、3.1nm にピークがあらわれた。Fig. 5-7b1 と比較すると、4.2nm のピークが高かった。Fig. 5-7b1 に示すように領域 B の回折ピークには、2 鎖長構造と 3 鎖長構造の両方が観察されたが、3 鎖長構造に対応するピーク強度は 2 鎖長構造のピークより常に強かった。本研究では、5 サンプルの粗大結晶切片を用いて同様の検討を行い、同じ結論を得た。

以上の結果より、粗大結晶部は、3 鎖長構造を持つ最安定多形 β 型結晶が主体的であり、POP β 型の結晶に由来することが明らかとなっている。しかし、2 鎖長構造を持つ高融点油脂は、2 鎖長構造の β' 型結晶と 2 鎖長構造の β 型結晶の存在が共に考えられるため、その油脂の構造はいまだ解明されていない。また粗大結晶部と粗大結晶以外の部分の 2 鎖長構造の β 型結晶に由来する油脂は解明されていない。そこで、粗大結晶部また粗大結晶以外の

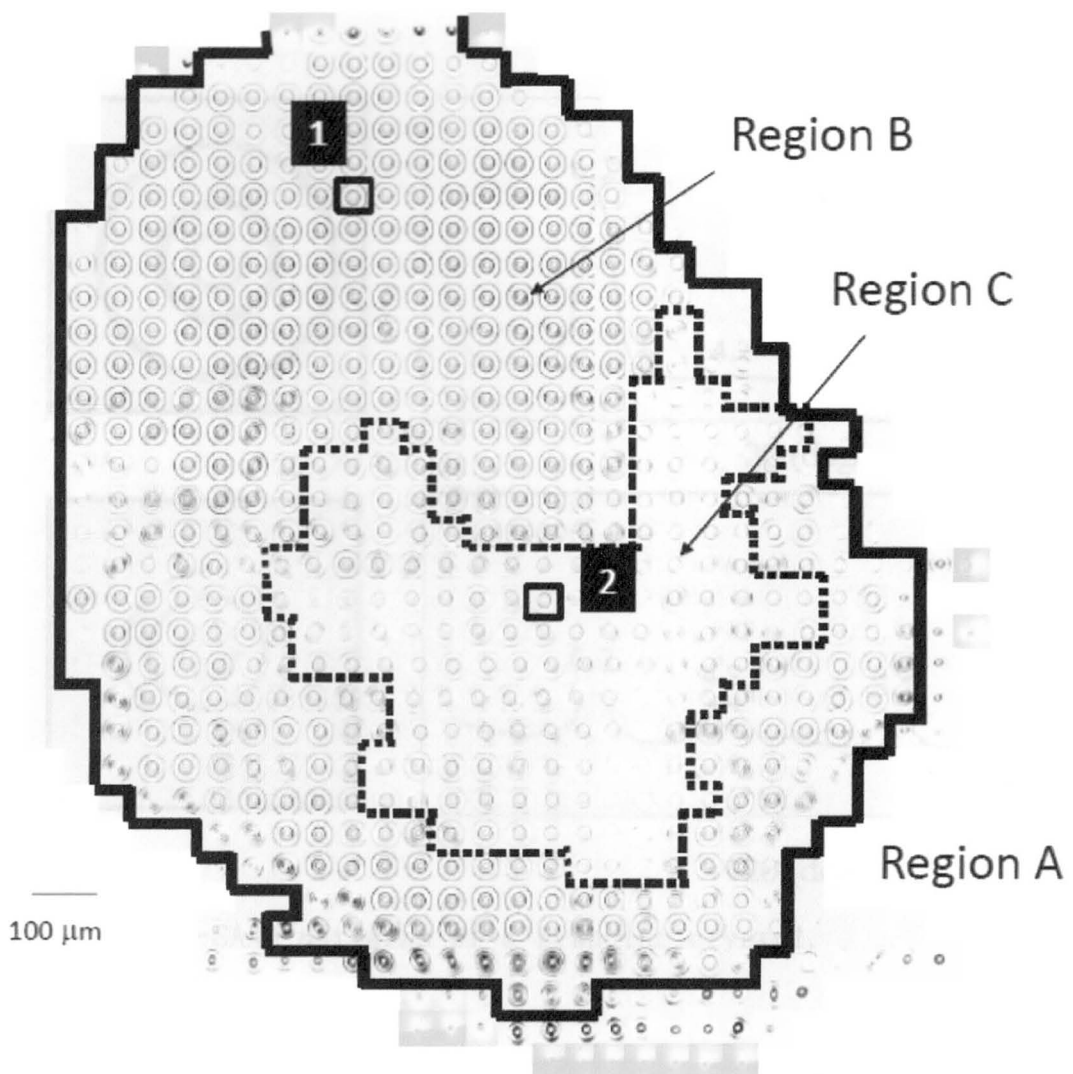


Fig. 5-7a SR- μ -SAXD patterns of a granular crystal.

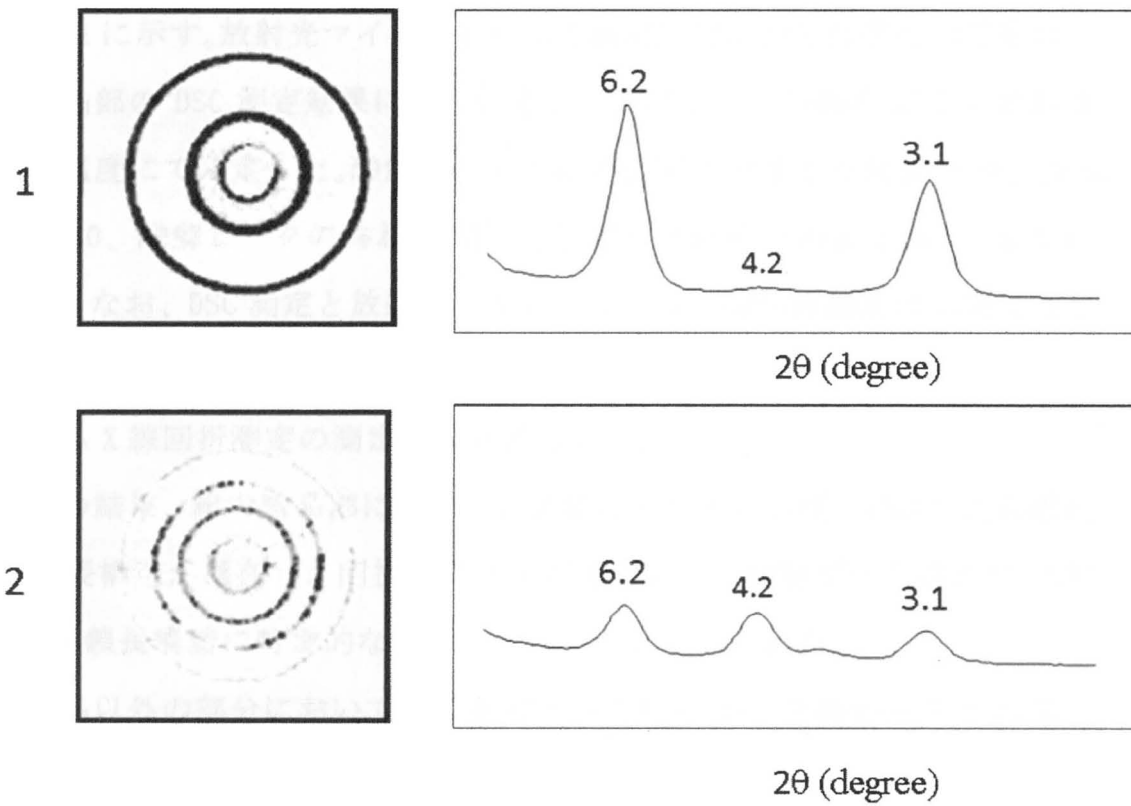


Fig.5-7b SR- μ -SAXD patterns of a granular crystal.

部分でそれぞれ温度変化を加えた放射光マイクロビーム X 線回折測定を行なうことにより、油脂結晶の鎖長構造と分布を特定し、結晶の同定を試みた。

粗大結晶部の結果を Fig. 5-8、Fig. 5-9、粗大結晶以外の部分を Fig. 5-10、Fig. 5-11 に示す。放射光マイクロビーム X 線回折測定のそれぞれの温度は、粗大結晶部の DSC 測定結果により設定し、融解ピークの始め 23°C と終わり 30°C の温度にて測定した。融解ピークの始め 23°C で測定した結果を Fig. 5-8、Fig. 5-10、融解ピークの終わり 30°C で測定した結果を Fig. 5-9、Fig. 5-11 に示す。なお、DSC 測定と放射光マイクロビーム X 線回折測定は同時に行ったものではなく、始めに測定した DSC のデータを参考にして、放射光マイクロビーム X 線回折測定の測定温度を設定した。

測定の結果、粗大結晶部において、融解ピーク始め 23°C では 2 鎖長構造と 3 鎖長構造が混在した回折パターンが得られた。融解ピーク終わり 30°C では、2 鎖長構造に特徴的な回折パターンのみが見られた。

粗大結晶以外の部分においては、融解ピーク始め 23°C と終わり 30°C の温度のどちらも 2 鎖長構造に特徴的な回折パターンのみが見られた。

本実験において、粗大結晶部また粗大結晶以外の部分のどちらも融解ピークが終わる 30°C の温度において、2 鎖長構造に特徴的な回折パターンのみが観測された。そのため、粗大結晶部と粗大結晶以外の部分の油脂結晶の区別を行うことが出来なかった。そのため、温度をさらに上昇させ 39°C 以上にて放射光マイクロビーム X 線回折測定を行い、粗大結晶部と粗大結晶以外の部分それぞれに関して、油脂結晶の融点を求める必要がある。

5.7 考察とまとめ

以上の結果を、以下の 2 点について考察する。

- (1) 正常試料と粗大結晶試料における、主要なトリアシルグリセロールとその結晶多形。

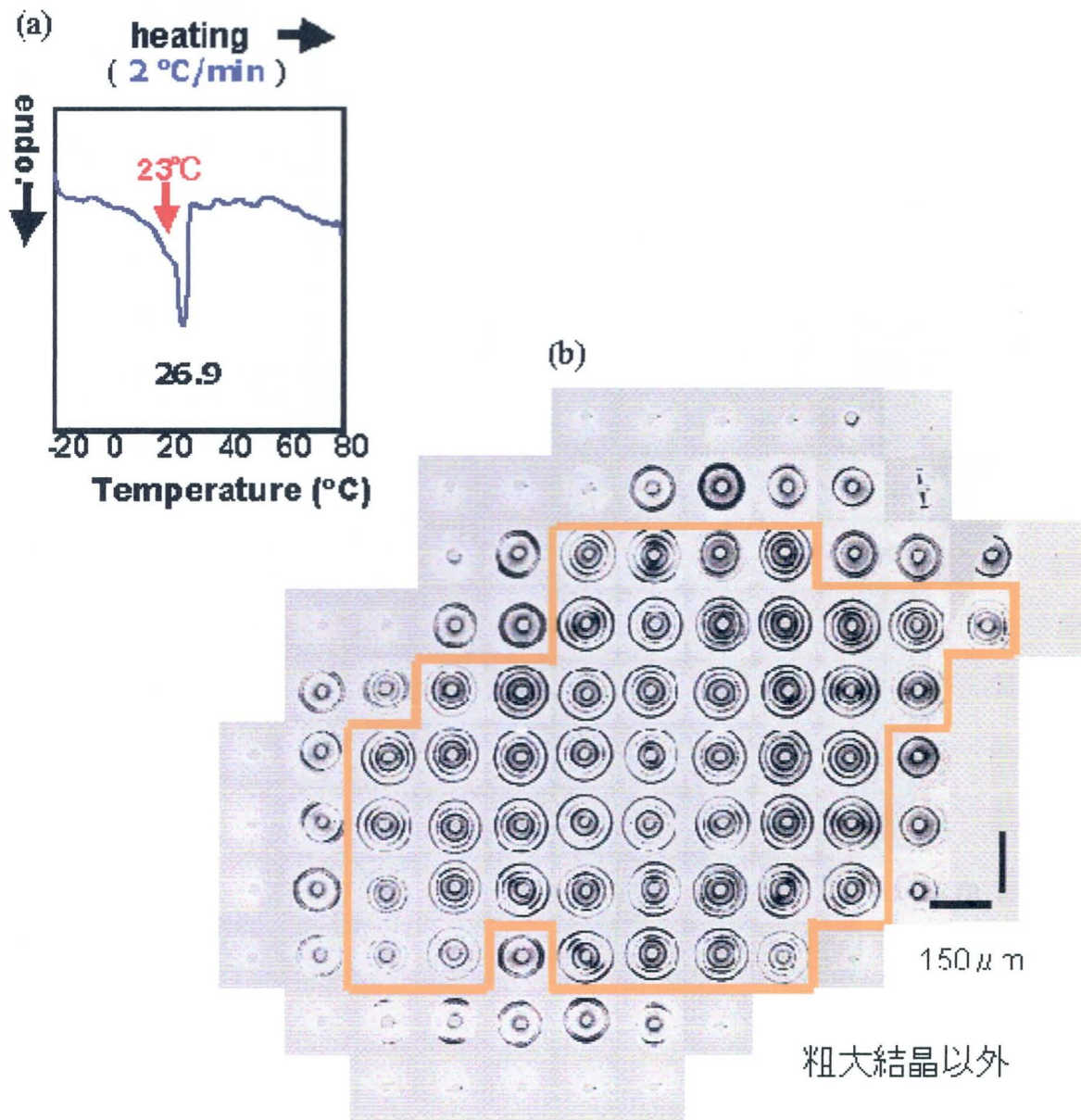


Fig. 5-8 (a) DSC heating thermopoint and (b) SR- μ -XRD pattern of a granular crystal observed at 23°C.

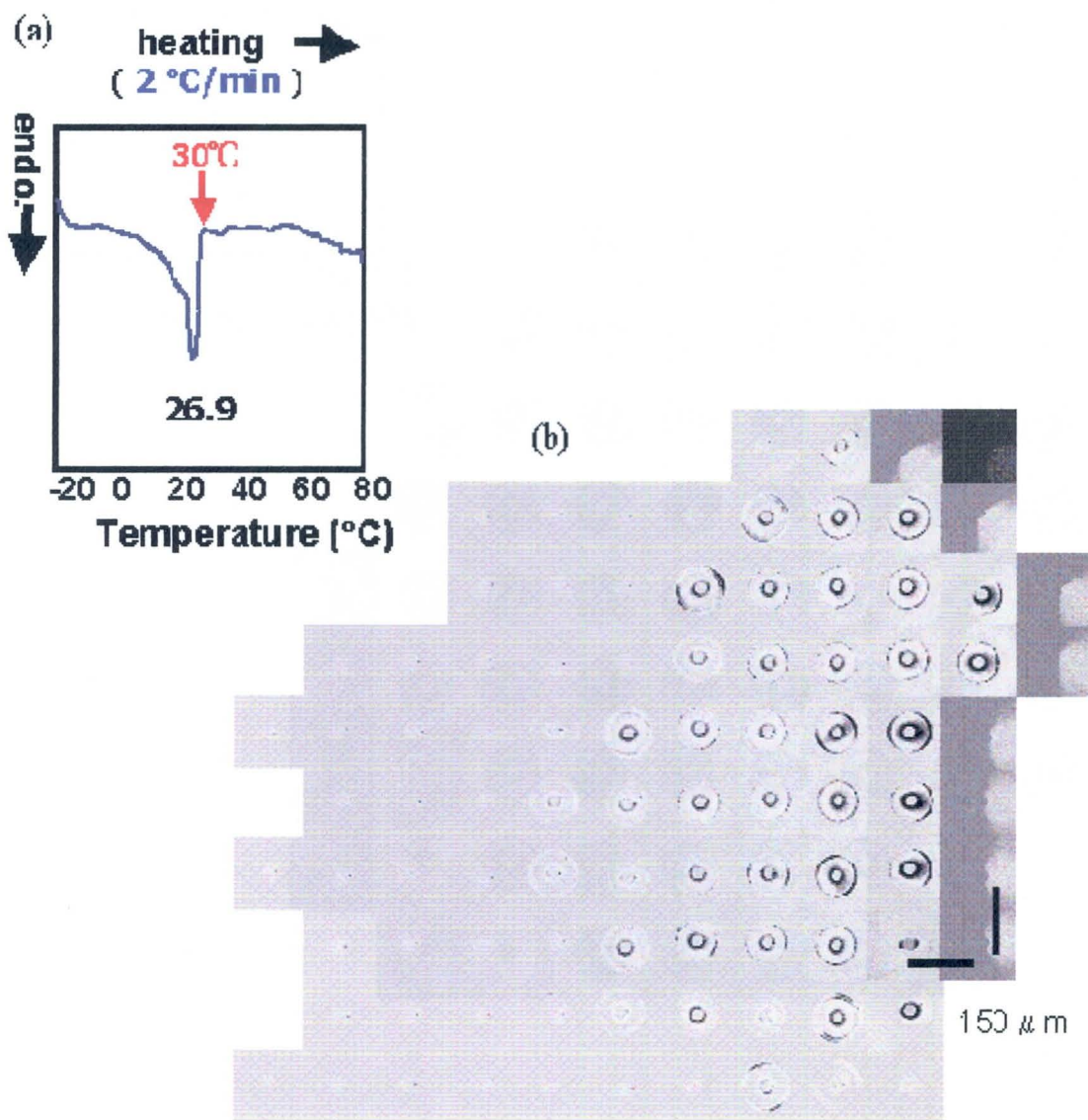


Fig. 5-9 (a) DSC heating thermopik and (b) SR- μ -XRD pattern of a granular crystal observed at 30°C

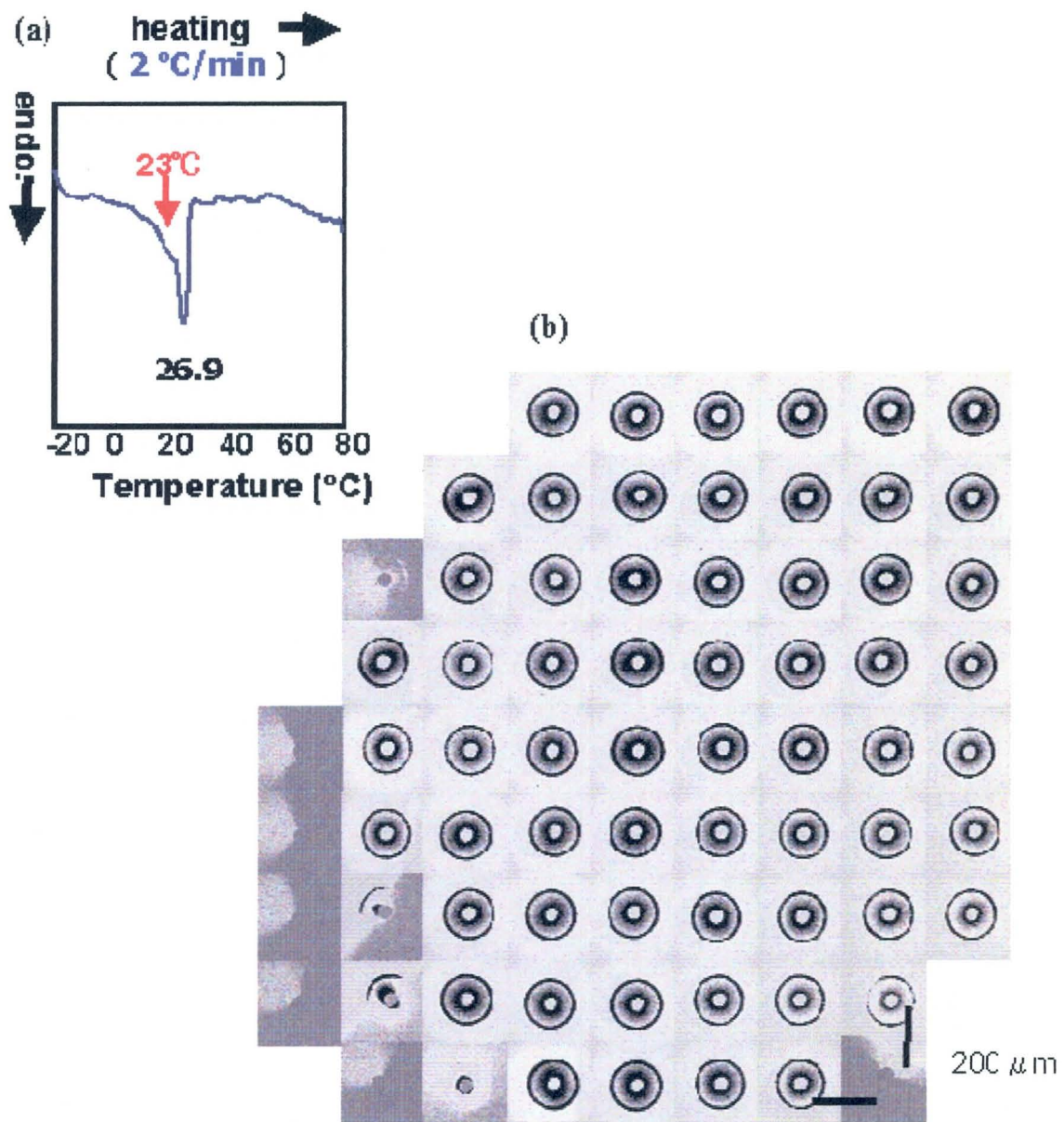


Fig. 5-10 (a) DSC heating thermopoint and (b) SR- μ -XRD pattern of the portion around a granular crystal observed at 23°C

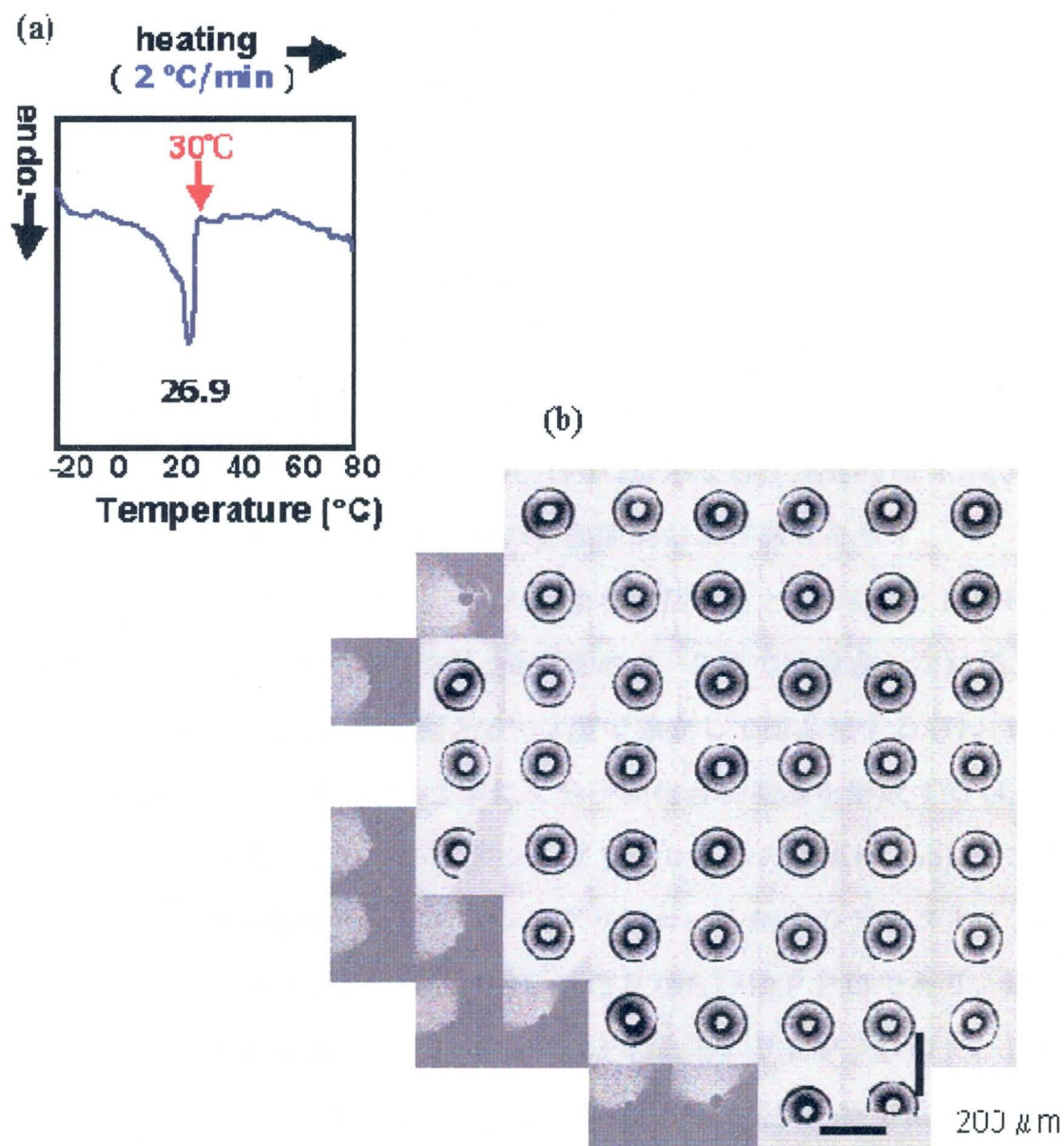


Fig. 5-11 (a) DSC heating thermopoint and (b) SR- μ -XRD pattern of the portion around a granular crystal observed at 30°C

(2) 温度サイクル中における粗大結晶の生成過程。

Table 5-2 は試料中に含まれる脂肪酸と油脂、ならびにパーム油中の主要なトリアシルグリセロールを示している(1)。注目するのは、液状油の存在下にて 20°C以上で溶解するトリアシルグリセロールである。その様なトリアシルグリセロールには、菜種極度硬化油に含まれている S S S、パーム油に含まれている P P P、P O P、P P O などがある。Table 5-2 の濃度(2, 3, 4)を考慮すると、試料中の主要な高融点油脂の濃度(wt%)が算出でき、S S S (2%)、P P P (1%)、P O P (6%)、P P O (2%)となる。Table 5-3 には、主要トリアシルグリセロールの多形毎の長面間隔および融点を示す。

主要なトリアシルグリセロールの挙動を総括すると、S S S と P P P は準安定の β' -2 型では混合するが、最安定の β -2 型では混合しない(5, 6)。P O P と P P P は、 β' -2 型と β -3 型で独立して結晶化する(7)。P O P と P P O は、 β' -2 型と β -2 型にて分子間化合物結晶を形成する(4, 8)。液状油の共晶作用により、トリアシルグリセロールの融点は Table 5-3 よりも低くなる。脂肪酸組成とトリアシルグリセロール組成のデータより、正常試料中の主要油脂は P P P、S S S、P O P ならびに P P O であり、結晶多形は準安定の 2 鎖長構造の β' 型であるといえる。P P P、P O P、P P O の β' 型の長面間隔は似ているため、本研究の X 線回折分析では分離して測定できなかった。

マイクロビーム X 線回折測定による粗大結晶 (Fig. 5-7) と正常試料 (Fig. 5-6) の結果を比較すると、粗大結晶を 2 つの領域に分離することができる。中心部は 2 鎖長構造と 3 鎖長構造の油脂結晶を共に含んでいる (Fig. 5-7 の領域 C)。そして周辺部の主要な油脂は、3 鎖長構造の油脂結晶である。前述の考察と Table 5-3 によれば、領域 B は、 β -3 型の P O P を主要トリアシルグリセロールとして含み、領域 C は、 β -3 型の P O P と β' -2 型の P P P、S S S ならびに P O P を含んでいると考えられる(9)。

Table 5-2 Fatty acid compositions (%) of the total fats and oil phase in a model margarine and component fats and oil

Fatty acid	Fats and oil phase (70 %)	Soy bean oil (48 %)	Palm oil (20 %)	Fully hydrogenated rapeseed oil (2 %)	Major triacylglycerols in palm oil ^a (wt. %)	
C12:0	0.1	0.0	0.2	0.0	StStSt	8.8
C14:0	0.3	0.1	1.0	0.1	St0St	30.9
C16:0	19.9	10.4	44.9	4.7	StSt0	7.1
C18:0	6.6	3.8	4.3	93.0	StLSt	8.8
C18:1 <i>cis</i>	27.5	24.6	39.5	0.1	St00	22.2
C18:2 <i>cis</i>	38.5	52.0	9.1	0.0	0St0	2.1
C18:2	0.6	1.1	0.3	0.0	StL0	10.0
<i>trans</i>	4.3	5.4	0.1	0.0	000	3.5
C18:3 <i>cis</i>	1.1	1.7	0.0	0.0	> 3db	4.5
C18:3	0.4	0.4	0.4	1.8		
<i>trans</i>	0.2	0.2	0.1	0.0		
C20:0	0.3	0.4	0.1	0.3		
C20:1 <i>cis</i>						
C22:0						

a St=saturated; 0=oleic; L=linoleic; db=double bond

Table 5-3 Physical properties of major high melting TAG contents of palm oil blended margarine

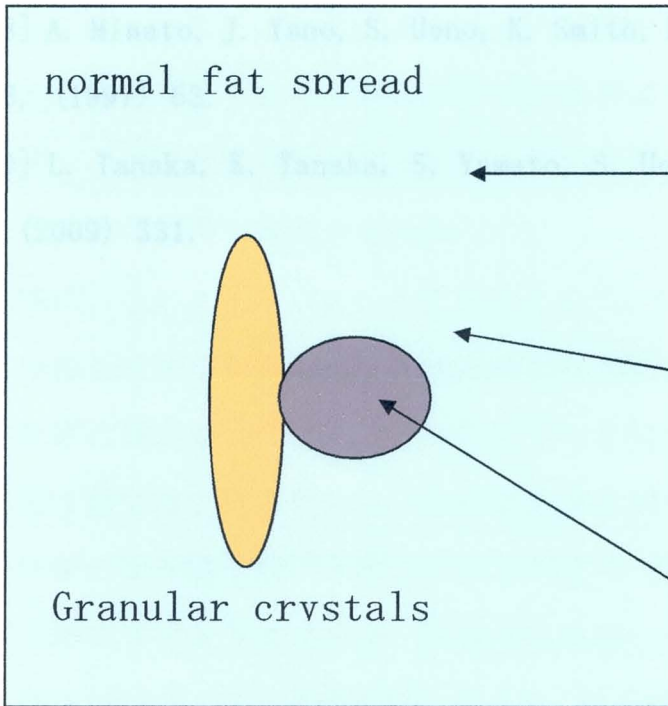
	TAG, polyaorph	Melting point (°C)	Long spacing (nm)
Palm oil	POP (β -3)	36.7 ^a	6.10 ^a
	POP (β' -2)	33.5 ^a	4.24 ^a
	PPP (β -2)	66.4 ^b	4.09 ^b
	PPP (β' -2)	56.6 ^b	4.23 ^b
	POP+PPO (β' -2)	29.0 ^c	4.20 ^c
	POP+PPO (β -2)	31.2 ^c	4.10 ^c
Fully-hydrogenated rapeseed oil	SSS (β -2)	73.5 ^b	4.51 ^b
	SSS (β' -2)	63.2 ^b	4.68 ^b

領域Bと領域Cとして示される不均一な構造が、粗大結晶の生成機構の鍵となっていることが示唆された。それをもとにして、粗大結晶生成機構は以下のように推定される。

まず温度低下に伴い、PPP、SSS、POPあるいはPPOの β' -2型結晶が形成される。次に温度サイクルによりPOPが β' -2型から β -3型へ転移する駆動力が働く。このとき、PPPやSSSの凝集が開始された部分から、POP画分が β' -2型から β -3型へ結晶転移すると、 β -3型は β' -2型を基に成長し、POP分子の体積拡散を通して周辺の正常な領域まで成長を続ける。したがって粗大結晶は、マイクロビームX線回折測定で観察された通り、周辺部では β -3型POPが主要結晶構造で僅かに β' -2型PPPと β' -2型SSSが存在し、中心部に β -3型POP、 β' -2型POP、 β' -2型PPPさらに β' -2型SSSが存在するという2つの領域を持つ構造となる (Fig. 5-12)。

参考文献

- [1] K.W. Smith, Crystallization of Palm Oil and Its Fractions, in Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems, edited by N. Garti and K. Sato, Marcel Dekker, New York, (2001) 357.
- [2] K. Sato, T. Arishima, Z.H. Wang, N. Sagi, H. Mori, J. Am. Oil Chem. Soc. **66**, (1989) 664.
- [3] E.S. Lutton and A.J. Fehl, Lipids, **5**, (1970) 90.
- [4] A. Minato, S. Ueno, K. Smith, Y. Amemiya, K. Sato, J. Phys. Chem. B, **101**, (1997) 3498.
- [5] R. Kerridge, J. Chem. Soc., (1952) 4577.
- [6] M. Kellens, W. Meeussen, A. Hammersley, H. Reynarers, Chem. Phys. Lipids, **58**, (1991) 145.



$\beta' - 2$ (PPP+SSS) \gg $\beta - 3$ (POP)

$\beta - 3$ (POP) \gg $\beta' - 2$ (PPP+SSS)

$\beta' - 2$ (PPP+SSS)
 + $\beta - 3$ (POP) + $\beta' - 2$ (POP)

Fig. 5-12 Model of granular crystal formation in palm oil-blended fat spread.

- [7] A. Minato, S. Ueno, J. Yano, Z.H. Wang, H. Seto, Y. Amemiya, K. Sato, J. Am. Oil Chem. Soc., **73**, (1996) 1567,
- [8] A. Minato, J. Yano, S. Ueno, K. Smith, K. Sato, Chem. Phys. Lipids, **88**, (1997) 63.
- [9] L. Tanaka, K. Tanaka, S. Yamato, S. Ueno, K. Sato, Food Biophys., **4** (2009) 331.

第6章 本研究の総括

6.1 本研究のまとめ

W/Oエマルション系における粗大結晶生成に関して、①油脂複合系における特定のトリアシルグリセロールが物性に与える影響の把握、②複数のトリアシルグリセロールによる物性への相互作用、③粗大結晶の詳細な生成メカニズムの解明の観点から検討した。

特に、ファットスプレッドを中心として、トリアシルグリセロール分子同士の相互作用ならびに微細構造を詳細に解明し、W/Oエマルション系の物性改質に繋がる結晶物理学的なアプローチにて検討を行った。

第2章では、本研究で用いた実験手法を説明した。とりわけ本研究では、最先端の微細構造解析手法である放射光 X 線マイクロビーム回折法を世界で初めてファットスプレッドに適用したが、その手法を詳しく説明した。

第3章では、パーム油やPPPにより、粗大結晶生成が促進されることを確認した。これは、パーム油に含まれるPPPのような高融点トリアシルグリセロールが結晶核となって集まることで、粗大結晶が生成することを示唆している。結晶核が形成されると、他の高融点トリアシルグリセロールが結晶成長の骨格となり結晶成長に繋がると考えられた。また、その時の結晶多形は β' 型であることから、粗大結晶の生成は β 型の発現よりも高融点トリアシルグリセロールの局在化が重要であると考えられた。

第4章では、炭素数別のトリアシルグリセロール C48、C50 および C52 の濃度がテクスチャー劣化に与える影響を調べた。しかしながら炭素数別の解析では明確な結論は得られなかったが、これはパルミチン酸を含むトリアシルグリセロールと、パルミチン酸を含まないトリアシルグリセロールとが分離できていないためと考えられる。したがって、炭素数別ではなく個々のトリアシルグリセロール分子種の影響が重要であると結論した。

トリアシルグリセロール分子種 PPP、PPO と POP は、濃度上昇と共に TDT を減少させた。またこの現象は、PPP、PPO と POP のモル濃度の総和によりさらに明確となった。PPP は高融点トリアシルグリセロールであり、結晶核を形成しやすい。また PPO と POP は、結晶成長に関与するとされる 3 鎖長構造を形成する。したがって、PPP が結晶核形成を促進し、PPO と POP が結晶成長に関与すると考えられる。

一方、分子内に 1 つだけのパルミチン酸を含むトリアシルグリセロール分子種である P00、OPO は、テクスチャー劣化に与える影響が僅かであった。これは、分子内にパルミチン酸が存在しても、トリアシルグリセロール中の他の脂肪酸によって、パルミチン酸のもつテクスチャー劣化の特性が妨げられていると考えられる。したがって、パルミチン酸を多く使用する場合でも、分子内に 1 つだけのトリアシルグリセロールを多く調製することができれば、テクスチャー劣化を極力少なくすることができると考えられる。

以上のように第 4 章では、数値計算を用いてトリアシルグリセロール分子種がテクスチャー劣化へ与える影響を濃度依存的に求めた。この方法論は油脂の組成と物性の相関を求めるために、今後も幅広く応用できると考えられる。

第 5 章では、放射光 X 線マイクロビーム回折法によって世界で初めて明らかにされた、粗大結晶内部で 2 つの領域として示される不均一な構造をもとに、粗大結晶の生成機構を提唱した。まず温度低下に伴い、PPP、SSS、POP あるいは PPO の β' -2 型結晶が形成される。次に温度サイクルにより POP が β' -2 型から β -3 型へ転移する駆動力が働く。このとき、PPP や SSS の凝集が開始された部分から、POP 画分が β' -2 型から β -3 型へ結晶転移すると、 β -3 型は β' -2 型を基に成長し、POP 分子の体積拡散を通して周辺の正常な領域まで成長を続ける。したがって粗大結晶は、マイクロビーム X 線回折測定で観察された通り、周辺部では β -3

型POPが主要結晶構造で僅かに β' -2型PPPと β' -2型SSSが存在し、中心部に β -3型POP、 β' -2型POP、 β' -2型PPPさらに β' -2型SSSが存在するという2つの領域を持つ構造となることが明らかとなった。

6.2 今後の研究課題

本研究によって、これまで不明確であった粗大結晶の生成モデルを提唱することができたが、依然として粗大結晶中心部の複合的な結晶構造は完全には解明されていない。今後、以下の諸点に関する研究が必要と思われる。

(1)粗大結晶のより詳細な微細構造解析

本研究にて提唱した粗大結晶モデルでは、中心部における β -3型のPOP、 β' -2型と β -2型のPPP、さらに β' -2型と β -2型のSSSが存在する可能性を示唆したが、これらの結晶多形が全て混在しているのか、あるいは別々に分離しているのかは明らかではない。したがって、マクロビームX線回折分析による微細構造解析にて温度を変えて融点を確認することで、それぞれの領域の結晶多形を詳細に解析することが今後の検討課題である。

(2)核形成に関与する油脂分子種の同定

トリアシルグリセロール分子種の組合せとその組成比が、粗大結晶の生成初期段階である核形成にどのように影響するのかが不明確である。特に結晶核を形成すると考えられる高融点トリアシルグリセロールであるPPPやSSSが、POPなどの他のトリアシルグリセロール存在下にて、どのように核形成するか挙動を把握する必要がある。したがって、2成分混合系「PPPとPOP」「SSSとPOP」の固溶限界の解明が課題である。

(3)パーム油の濃度依存性

粗大結晶の微細構造に対するパーム油の濃度依存性が、まだ十分に解明さ

れていない。パーム油を 20%以上に増量しても本研究での結果と相違なければ、提唱したモデルはパーム油を 20%程度含有するファットスプレッドにおいて普遍的なモデルであると考えられる。

(4) 乳化剤の添加効果

粗大結晶の形成を防止する手法として、多くの場合に乳化剤の添加が行われるが、そのメカニズムの解明が期待される。乳化剤は、W/Oエマルションの油水界面や結晶の成長界面において配向する傾向があるため、乳化剤の有無により界面の結晶構造が変化する可能性が高い。この結晶構造の制御に着目した乳化剤の粗大結晶抑制メカニズム解明も、今後の検討課題である。

謝辞

本論文を草するにあたり、始終ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、広島大学大学院生物圏科学研究科、佐藤清隆教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文を草するにあたり、始終数々のご指導、ご助言を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科、上野聡准教授に厚く感謝の意を表します。

また、本研究を行なうにあたり、ご便宜を賜りました吉岡俊満博士（技術研究所所長）、椎木靖彦博士（技術研究所副所長）、富澤章様（技術研究所主幹）、中島肇博士（技術研究所主幹）、芹澤篤氏（技術研究所主席）、垣田誠博士（技術研究所主席）、堂迫俊一博士（技術研究所主事）、秋元毅一郎氏（家庭用商品部部長）、村上元威氏（家庭用商品部課長）、池田範夫氏（家庭用商品部課長）、小西寛昭博士（広報部長）、佐藤薫博士（日本ミルクコミュニティ株式会社営業統括部課長）に深く感謝致します。

さらに、本研究を行なうにあたり、研究の細部にわたり数々のご助言とご協力を頂きました、三浦晋博士（国際栄養食品部）、加藤健博士（技術研究所課長）ならびに雪印乳業株式会社技術研究所の諸兄々に深く感謝申し上げます。

また、本研究を実施するにあたり、実験面でご協力を頂きました高エネルギー加速器研究機構の飯田厚夫教授、野村昌治教授、森丈晴技師、ならびに東京大学大学院新領域創成科学研究科 篠原裕也助教、広島大学大学院生物圏科学研究科の田中真由美氏、山戸志保氏、田中圭氏に深く感謝申し上げます。

最後に、心身ともに支えて頂きました、家族に心から感謝致します。