

博士論文

食品油脂の結晶核形成および結晶多形転移と

それらの制御に関する物理化学的研究

平成 30 年 9 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

石橋ちなみ

目次

第1章 緒言

1.1 油脂物性研究の意義	1
1.2 油脂の結晶構造と物性	6
1.3 油脂結晶の核形成と結晶成長	9
1.4 乳化剤による油脂の結晶化制御	12
1.5 O/W エマルション食品と油脂の結晶化	14
1.6 本研究の目的と論文構成	17
文献	18

第2章 本研究で用いた試料および実験装置

2.1 試料	22
2.1.1 マヨネーズ	
2.1.2 マヨネーズの原材料	
2.1.3 パーム中融点油脂 (Palm Mid-Fraction: PMF)	
2.1.4 ソルビタン脂肪酸エステル (Sorbitan Fatty Acid Ester: SE)	
2.2 実験装置	31
2.2.1 示差走査熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry: DSC)	
2.2.2 X線回折測定 (X-ray Diffraction: XRD)	
2.2.3 放射光時分割 X線回折測定 (Time-resolved Synchrotron Radiation X-ray Diffraction: SR-XRD)	
2.2.4 放射光マイクロビーム X線回折測定 (Synchrotron Radiation microbeam X-ray Diffraction: SR- μ -XRD)	
2.2.5 偏光顕微鏡観察 (Polarized Light Microscopy: PLM)	
2.2.6 微分干渉顕微鏡観察 (Differential Interference Contrast Microscopy: DIC)	
文献	42

第3章 冷凍-解凍下における油脂の結晶化が O/W エマルションの安定性に及ぼす影響

3.1	はじめに	44
3.2	実験試料および実験方法	45
3.2.1	試料およびマヨネーズ様 O/W エマルションの調製方法	
3.2.2	示差走査熱量測定 (DSC)	
3.2.3	マヨネーズ様 O/W エマルションの冷凍-解凍安定性試験	
3.2.4	X 線回折測定 (XRD)	
3.2.5	偏光顕微鏡観察 (PLM)	
3.3	結果	50
3.3.1	マヨネーズ様 O/W エマルションの結晶化および融解挙動	
3.3.2	マヨネーズ様 O/W エマルションの冷凍-解凍安定性	
3.3.3	冷凍保存中のマヨネーズ様 O/W エマルションの温度履歴	
3.3.4	冷凍保存中におけるマヨネーズ様 O/W エマルションの油脂の結晶多形	
3.3.5	冷凍保存中におけるマヨネーズ様 O/W エマルションの油脂の結晶形態観察	
3.4	考察	68
3.5	まとめ	73
	文献	73

第4章 脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶核形成に与える影響

4.1	はじめに	77
4.2	実験試料および実験方法	78
4.2.1	試料および試料調製方法	
4.2.2	示差走査熱量測定 (DSC)	
4.2.3	放射光時分割 X 線回折測定 (SR-XRD)	
4.2.4	光学顕微鏡観察	
4.2.5	放射光マイクロビーム X 線回折測定 (SR- μ -XRD)	
4.3	結果	83

4.3.1	油脂の結晶化および融解挙動に対する乳化剤の添加効果	
4.3.2	油脂の結晶多形に対する乳化剤の添加効果	
4.3.3	乳化剤結晶に対する油脂結晶化のその場観察	
4.3.4	乳化剤結晶に対する油脂結晶の融解のその場観察	
4.3.5	放射光マイクロビーム X 線回折測定による乳化剤結晶および油脂結晶の 微細構造の解析	
4.4	考察 -----	109
4.5	まとめ -----	114
	文献 -----	114
第 5 章 脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶多形に及ぼす影響		
5.1	はじめに -----	116
5.2	実験試料および実験方法 -----	117
5.2.1	試料および試料調製方法	
5.2.2	放射光時分割 X 線回折測定 (SR-XRD)	
5.2.3	微分干渉顕微鏡観察 (DIC)	
5.3	結果 -----	118
5.3.1	油脂の β' 型結晶化に対する乳化剤の添加効果	
5.3.2	油脂の結晶形態観察	
5.4	考察 -----	132
5.5	まとめ -----	133
	文献 -----	135
第 6 章 総括 -----		
		137
	謝辞 -----	140

第1章 緒言

1.1 油脂物性研究の意義

脂質とは「水に不溶で、エーテル・ベンゼン・クロロホルムのような有機溶剤に可溶で、加水分解により脂肪酸を遊離し、生物体により利用される物質群」と定義される¹⁾。脂質は、生体を構成する主要成分であるとともに、食品、医薬品、化粧品といった産業分野でも欠かせない物質である。食品から摂取する脂質は、その大部分が油脂である。油脂とは、脂肪酸類のグリセロールエステルの総称である。油脂は、グリセロール1分子に3分子の脂肪酸がエステル結合したトリアシルグリセロール (Triacylglycerol: 以下、TAG と示す) と同義語的に用いられるが、食品・化学工業分野では副成分であるジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、遊離脂肪酸、また、長鎖脂肪族アルコール、ステロール、炭化水素、色素類などの微量の不けん化物、脂溶性ビタミン類、ならびに複合脂質類などを含む TAG を主成分とする脂質群と理解される²⁾。食用油脂は主に TAG から構成され、グリセロールに結合する脂肪酸の種類あるいは脂肪酸の組み合わせによって異なる性質を示す。

食品は、3つの機能性 (栄養機能, 感覚・嗜好機能, 生体調節機能) に大別されることが知られている。本節では脂質における機能性を以下に挙げる。まず、栄養機能としての脂質は生体膜の主要構成成分・エネルギー産出の主要な基質、脂溶性ビタミンの運搬体、必須脂肪酸の供給源などとして、生命活動にとって不可欠な成分である³⁾。また、感覚・嗜好機能としての脂質は、フレーバーを付与する役割や、特定の物理的状態をとることで、テクスチャー (食感) としてのおいしさを付与する役割を持つ。さらに、生体調節機能を有する脂質としては、虚血性心疾患や心不全等の予防効果が期待される⁴⁾ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) が例として挙げられる。本論文は、脂質の有する機能性のうち、感覚・嗜好機能を付与する油脂の物理的状態およびその物性を取り扱った内容である。

Fig. 1-1 に、油脂の物理的状態とその代表的な油脂食品を示す。固体状態の例にチョコレート、ゲル状態の例に液状ショートニング、水中油滴型 (O/W : Oil-in-Water) エマルション状態の例にマヨネーズや生クリーム、油中水滴型 (W/O : Water-in-Oil) エマルション状態の例にマーガリンやバター、ホイップ状態の例にホイップクリームやアイスクリームが挙げられる。同じ生クリームでも、O/W エマルション状態とホイップ状態で外観やテクスチャ

一が異なるように、油脂の物理的状態はおいしさに大きな影響を与える。また油脂の物理的状態の形成には、油脂結晶の存在が欠かせない。固体状態であるチョコレートは連続相が油脂結晶であり、W/O エマルションであるマーガリン、およびゲルでは、油脂結晶がネットワークを形成することで液状油脂を包含し保形性を持たせる役割を持つ。さらにホイップクリームやアイスクリームにおける油脂結晶は、気泡を取り囲むことで気泡を安定化させ、さらに結晶や気泡どうしのネットワーク構造を構築することも安定化に繋がる (Fig.1-2)。

一般的に、Fig. 1-1 や Fig. 1-2 に挙げた油脂の物理的状態は熱力学的に準安定であるため、時間の経過とともに最安定な状態となる。その結果、製品の外観やテクスチャーが変化し、製品の劣化が生じる。例えば、O/W エマルションは水相に油滴が分散した準安定状態をとるが、時間の経過に伴い、水と油の二層に分離した最安定状態となる。さらに、油脂結晶を含む食品においては、油脂の結晶サイズや結晶多形を考慮する必要がある。油脂は結晶化する際、多形現象をとることが知られている。多形については次節で詳しく説明するが、多形とは「同一の化学組成をもちながら、異なる結晶構造をもち、異なる結晶形を示す現象」と定義される¹⁾。多形はそれぞれ融点や密度、溶解度、安定性といった物理的性質が異なることから、製品に適した多形で結晶化させることが必要となる。加えて、準安定な多形はより安定な多形へと経時的に変化する。ある多形から別の多形へと変化することを“多形転移”と呼ぶ。油脂結晶の多形転移現象はチョコレート表面の白化現象(ファットブルーム) (Fig.1-3(a)) やマーガリン中の粗大結晶の出現といった品質劣化と密接に関わるため、油脂結晶の多形転移を抑制させることも必要となる。

さらに、油脂食品は保存性や利便性の向上を目的として低温および冷凍保存されることがある。例えば O/W エマルションであるマヨネーズを例に挙げると、冷凍の総菜パンにかかるマヨネーズや冷凍のお好み焼きに付属するマヨネーズ(厳密には、これらはマヨネーズの規格を満たさないため、マヨネーズと称されない) などがある。しかし、冷凍過程では通常の冷蔵保存では結晶化しないマヨネーズ中の油脂が結晶化する現象が起こる。このことが要因となり、解凍後には油と水に分離する劣化現象 (Fig.1-3(b)) がみられる。

以上のことから、人々の生命維持に欠かせない脂質をおいしく摂取するために、油脂の物理的状態や物性を知ることは必須である。そして、油脂の物理的状態や物性を制御し、その状態を長く維持するために、油脂の物性研究が必要となる。

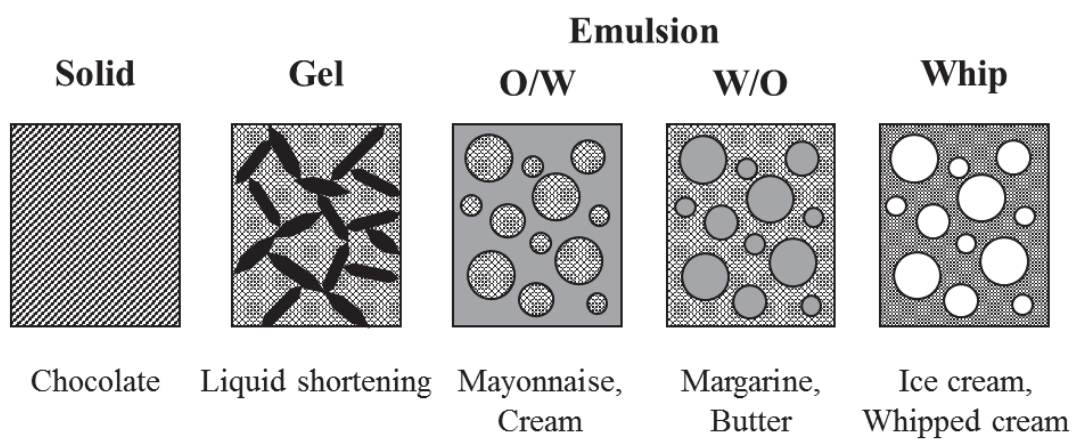
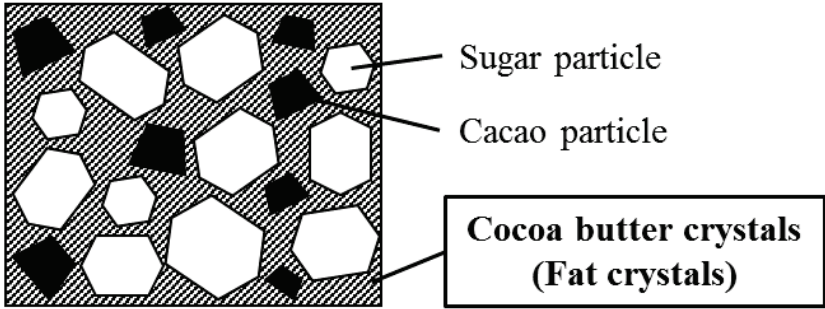
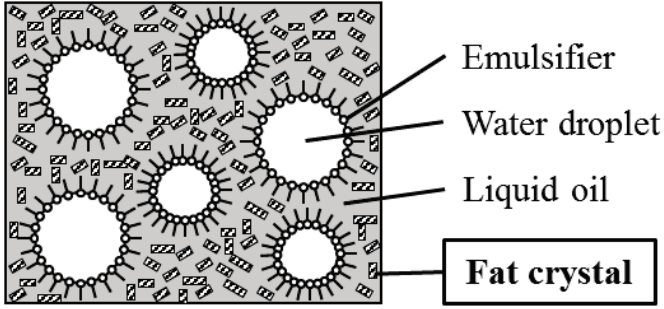


Fig. 1-1 Schematic illustration of physical condition in fat based food products.¹⁾

Chocolate



Margarine



Ice cream

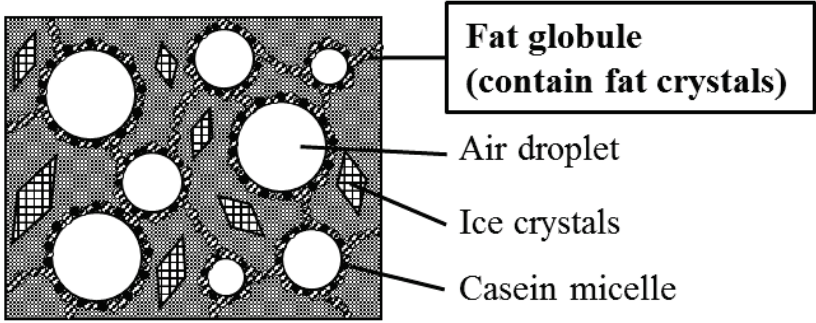


Fig. 1-2 Roles of fat crystals in fat based food products.

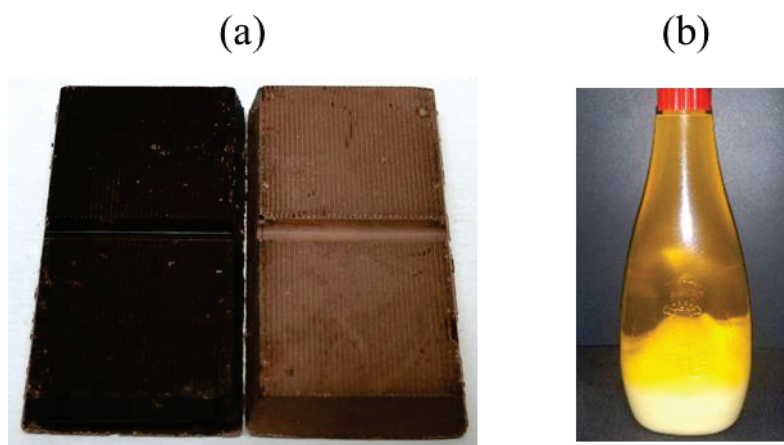


Fig. 1-3 Degradation in fat based food products.

(a) Normal chocolate (left side), Fat bloom in chocolate (right side),

(b) Phase separation in mayonnaise (upper side: oil phase, lower side: water phase).

1.2 油脂の結晶構造と物性

TAG は、結晶構造解析に必要となる単結晶の育成が難しく、TAG の結晶構造解析が行われているものはわずかである⁵⁾。そのため、油脂結晶は5つの構造的な要素（①鎖長構造、②副格子構造、③二重結合の立体配座、④グリセロールの立体配座、⑤末端メチル基の配列）によって特徴づけられている⁶⁾。本論文では、油脂の結晶構造を特徴づけるうえで最も基本的な鎖長構造と副格子構造について説明する（Fig. 1-4）。

1) 鎖長構造（Chain length structure）

鎖長構造とは、結晶中のラメラ構造の繰り返し周期に含まれる脂肪酸鎖の数を指す。TAG の鎖長構造は、1鎖長、2鎖長、3鎖長、4鎖長、6鎖長が報告されているが、そのほとんどは2鎖長または3鎖長構造をとる。鎖長構造は、X線回折測定の小角側に回折ピークとして現れる。鎖長構造はTAGを構成する脂肪酸によって決まる。一般的に、構成する脂肪酸が同一か類似している場合2鎖長構造をとる。一方、構成脂肪酸の鎖長の差が大きい場合や飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が混合するTAGでは3鎖長構造をとることが多い。

2) 副格子構造（Subcell structure）

前節でも述べた“多形”は副格子構造から決定される。油脂の結晶内部では、TAG内の炭化水素鎖同士が、その分子間力や疎水性相互作用により互いに密に集まって秩序化された配列をとる。この炭化水素鎖からなる配列様式（パッキング）を副格子構造という。副格子構造は、X線回折測定の広角側に回折ピークとして現れる。TAGでみられる結晶系は主に六方晶（ヘキサゴナル：H）、立方晶（O₁）、三斜晶（T₁₁）であるが、油脂ではそれぞれ α 型、 β' 型、 β 型と呼ばれるのが一般的である。それぞれの多形の構造的特徴を以下に示す。

【 α 型（六方晶型：Hexagonal packing (H)）】

α 型の副格子は炭化水素鎖が配向しておらず、TAG分子は流動的に回転したままラメラ面に垂直に配向している⁷⁾。炭化水素鎖同士のパッキングは緩いため、密度および融点は低く、不安定な構造である。

【 β' 型（直方晶垂直型：Orthorhombic perpendicular packing(O_{\perp}))】

β' 型の副格子は、すべての炭化水素鎖が近隣の炭化水素鎖のつくる面に直交する面を持ち、TAG の分子軸はラメラ面の垂線に対して傾斜している。隣接する炭化水素鎖、すなわち副格子の角の位置と中央の位置にある炭化水素鎖の繰返し単位の向きが直交する⁷⁾。

【 β 型（三斜晶平行型：Triclinic parallel packing($T_{//}$))】

β 型の副格子は、炭化水素鎖がつくる面がすべて平行であり、TAG の分子軸はラメラ面の垂線に対して β' 型よりもさらに傾斜している。隣接する炭化水素鎖の繰返し平面の向きが平行である⁷⁾。炭化水素鎖同士のパッキングは密であるため、密度および融点は最も高く、安定な構造である。

以上をまとめると、結晶多形の物理的性質として、 α 型、 β' 型、 β 型の順に融点、密度、安定性が高くなり、 β 型が熱力学的に最安定であるという特徴がある。最安定多形の β 型を除き、準安定な α 型、 β' 型は安定多形へと経時的に変化する。ある多形から別の多形へと変化することを“多形転移”と呼ぶ。多形転移は α 型、 β' 型、 β 型の順で起き、不可逆的である。一方で、油脂結晶には α 型、 β' 型、 β 型の主な多形とは異なる結晶構造を有する多形（サブフォーム）も存在する⁸⁾。本論文でも述べる sub- α 型は α 型よりも低い融点を有する結晶相である。sub- α 型と α 型は温度に依存して安定相が異なり、可逆的に変化するという特徴をもつ。ただし、サブフォームはすべての TAG で存在するのではなく、特定の TAG に出現する。

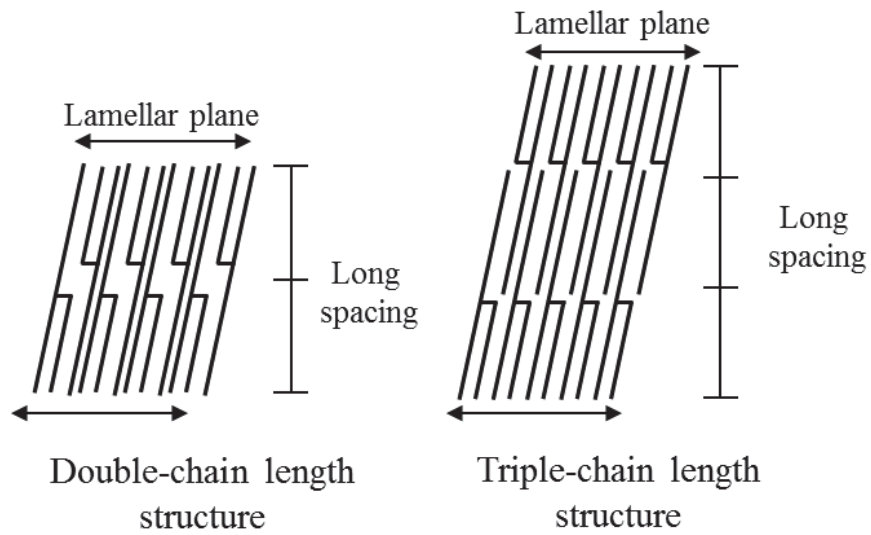


Fig. 1-4 Chain length structures in TAG polymorphism.

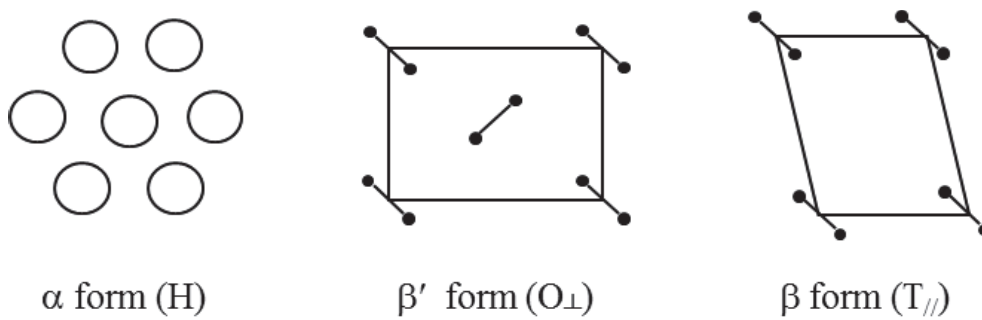


Fig. 1-5 Typical subcell structures in TAG polymorphism.

1.3 油脂結晶の核形成と結晶成長

油脂の結晶化は、核形成段階と成長段階の2つに分けられる。

① 核形成段階

核形成は、過冷却または過飽和状態の液体において、液体から固体へのエネルギー障壁を越え、油脂分子がある一定以上の大きさに会合した段階である。結晶核形成の前段階として、結晶核には至らない大きさに油脂分子が会合することがあるが、これをクラスター形成と呼ぶ。クラスター形成はまだ液体状態の段階であり、油脂分子は会合と溶解を繰り返す。Fig. 1-6に、液体状態の油脂分子から核形成に至る段階を表したものを示す。また、結晶の核形成は均一核形成と不均一核形成に大別される。均一核形成は、過飽和または過冷却状態の液体から結晶化する溶質同士の相互作用のみにより結晶核が形成されること、不均一核形成は、結晶化を促進する触媒機能をもつ物質（界面を有するものすべてであり、容器の壁やごみなども含まれる）の介在で溶質の核形成が促進されることである⁹⁾。よって、身の周りの結晶化のほとんどは不均一核形成によるものである。厳密に言えば以上の定義になるが、本論文の結果では、油脂に意図的に加えた物質（乳化剤）を介して結晶化する場合を特に“不均一核形成”と区別して用いる。そのため、油脂のみで結晶化させる場合は、通常の実験条件で除去できない因子（容器の壁やごみなど）は考慮せず、“不均一核形成”ではなく“均一核形成”と呼ぶこととする。

続いて、結晶核形成のエネルギーと油脂の結晶多形（ α , β' , β ）の関連性について説明する。一般的に油脂の結晶核形成の速度は、 $\alpha > \beta' > \beta$ の順で速いが、その理論について以下に記す。均一核形成による結晶化は、(1) 液体から固体へのエネルギー障壁を越えるための駆動力、(2) 固体（結晶）と液体との間に生じる新たな界面エネルギー、によって決定される。液体から結晶核を形成するために必要な核形成エネルギー ΔG^* は以下の式で表すことができる。

$$\Delta G^* = \frac{4f\gamma^3\Omega^2}{3\Delta\mu^2} \quad (\text{式 1})$$

f は結晶核の形状で決まる因子、 γ は結晶と液体の間の界面エネルギー、 Ω は分子の体積、 $\Delta\mu$ は結晶化の駆動力である。ここで、結晶多形を有する油脂の結晶核形成において特に重要なパラメータは界面エネルギー γ と結晶化の駆動力 $\Delta\mu$ である。まず、 $\Delta\mu$ は以下の式

で表すことができる。

$$\Delta\mu = \Delta H_m \cdot \Delta T / T_m \quad (\text{式 2})$$

ここで、 ΔH_m は融解エンタルピー、 $\Delta T / T_m$ ($\Delta T = T_m - T_c$, ΔT : 過冷却, T_c : 結晶化温度, T_m : 融点) は過冷却度である。融解エンタルピー ΔH_m , 過冷却度 ΔT , 融点 T_m のすべてが結晶多形によって異なるが、融解エンタルピー ΔH_m および融点 T_m は安定多形ほど高くなる。よって、一般的に安定多形であるほど結晶化の駆動力 $\Delta\mu$ は大きくなる。安定多形は結晶化の駆動力が大きく、結晶化しやすいと考えられるが、実際は安定多形ほど結晶化の速度は遅くなる。

続いて、界面エネルギー γ に関して、多形依存性についての正確なデータはないと言われている⁹⁾。油脂の結晶核形成の速度は、一般的に $\alpha > \beta' > \beta$ の順で速いという事実から考えると、 α の核形成エネルギー ΔG^* は小さく、 β の核形成エネルギー ΔG^* は大きくなる。結晶化の駆動力 $\Delta\mu$ は安定多形である β が大きい、結果として核形成エネルギー ΔG^* が大きくなる理由として、界面エネルギー γ は安定多形ほど大きくなることが考えられる。すなわち、(式 1) における $\Delta\mu^2$ よりも γ^3 の寄与が大きく、結果として核形成エネルギー ΔG^* が大きくなると考えられる。一方で、必ずしも $\alpha > \beta' > \beta$ の順で核形成速度が速くなるという訳ではない。例えば α 型結晶の融点 T_m 直下で結晶化させた場合、結晶化の駆動力 $\Delta\mu$ が極小となり、核形成エネルギー ΔG^* が大きくなるため、 α よりも β' や β の核形成エネルギー ΔG^* が小さくなり、 β' や β が核形成する場合もある。

一方で、不均一核形成は触媒機能をもつ物質と溶質との相互作用により、結晶核の界面自由エネルギーが低下する¹⁰⁾。よって、不均一核形成は均一核形成よりも核形成エネルギー ΔG^* が小さく、核形成が起りやすくなる。界面自由エネルギーの低下は、触媒機能をもつ物質の性質（親水性・疎水性、分子構造など）と油脂との分子間相互作用による。本論文においては、触媒機能をもつ物質として乳化剤を用い、乳化剤分子と油脂分子の構造の関連性から、乳化剤が油脂の結晶化に及ぼす影響について議論する。

② 成長段階

結晶成長は、油脂の結晶核から分子が集まっていくことで結晶が大きくなる段階である。液体状態から新たな界面（結晶）ができる過程である核形成段階に対し、成長段階は既に存

在する結晶に，融液あるいは溶液中に拡散している分子がキンクと呼ばれる位置に取り込まれる過程である (Fig. 1-6(b)). なお，分子一層分の段のことをステップと呼び，ステップ間の平坦な表面をテラスと呼ぶ. 拡散している分子はテラスに対して吸着，脱離を繰り返しながら，キンクに取り込まれていき，分子の取り込みが進んでいくことでステップが前進し，結晶が成長していく.

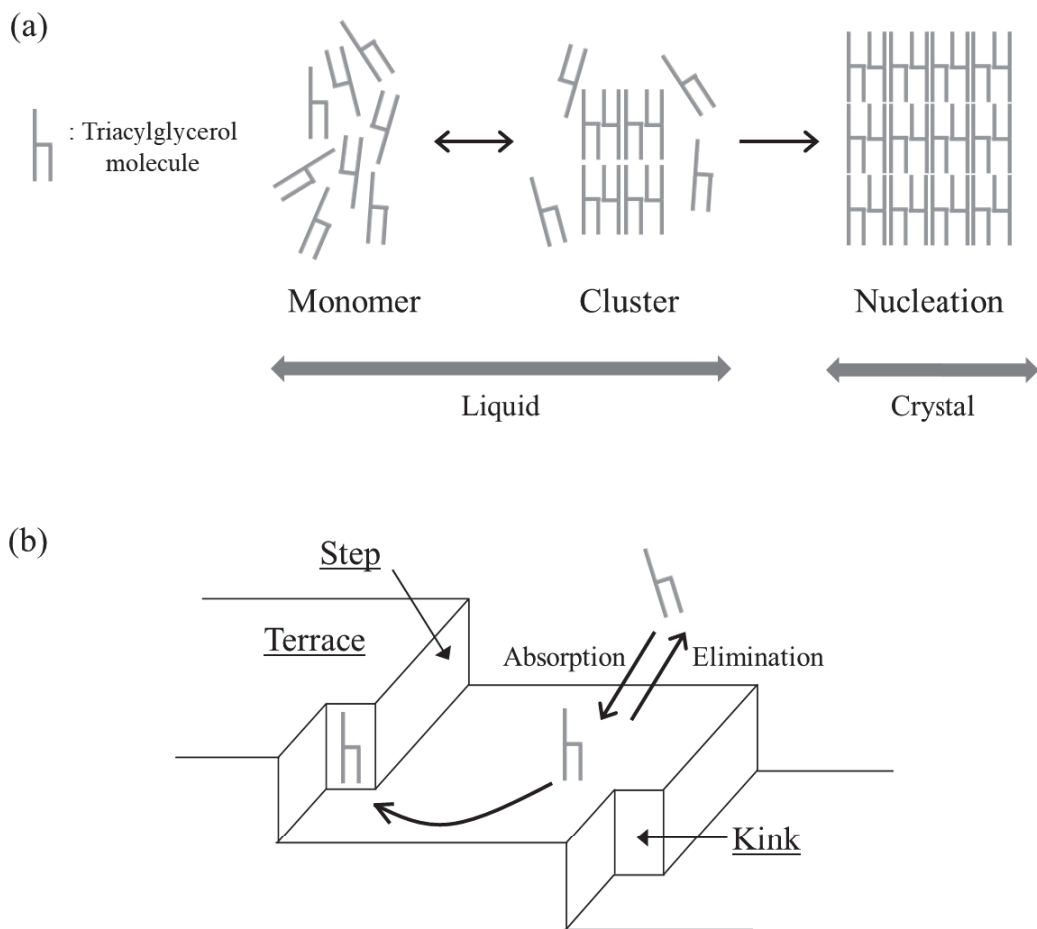


Fig. 1-6 Schematic illustrations of (a) nucleation and (b) crystal growth processes of fat crystals.

1.4 乳化剤による油脂の結晶化制御

乳化剤とは、1つの分子内に親水基と疎水基を有する両親媒性物質である。界面活性剤とも呼ばれるが、界面活性剤は化粧品・医薬品・食品・塗料・日用雑貨など様々な分野を含んだ広義的な意味合いを持ち、食品においては乳化剤と呼ばれることが一般的である。よって、本論文では、以下“乳化剤”と称する。食品で用いられる乳化剤は、人体の健康への影響の観点から使用できるものが限られており、日本では天然由来の乳化剤としてレシチン、合成して作られた乳化剤としてグリセリン脂肪酸エステル（モノグリセリン、ジグリセリン）、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステルなどが主に使用されている。世界規模で見ると、モノグリセリンとジグリセリンの消費量が圧倒的に多く、乳化剤の消費量のおよそ70%を占めると報告されている¹¹⁾。乳化剤は、水と油のような本来混ざり合わない物質を混ぜる役割（乳化機能）、固体を安定に分散させる役割、泡立てを行う役割、油脂の結晶化を制御する役割など、「乳化剤」という言葉に拠らず、より広い用途で使用される。さらに乳化剤は、1分子内に有する親水基と疎水基のバランス（Hydrophilic-Lipophilic Balance：HLB値）、親水基に結合する疎水基の種類（主に脂肪酸の種類）によって、融点や溶解度といった物性値が大きく変化する。そのため、使用する乳化剤は、使用目的、使用する材料、使用する油脂の組成など、様々な面を考慮して選択する必要がある。

本論文では乳化剤による油脂の結晶化制御に関する研究結果を扱うため、以下からは油脂の結晶化に対する乳化剤の添加効果について述べる。乳化剤は油脂の結晶核形成の抑制または促進、結晶成長の抑制または促進、さらに結晶多形の制御に効果があることが報告されている¹²⁾。結晶核形成と結晶成長に対する作用について、提唱されているメカニズムを述べる。乳化剤による油脂の結晶核形成の抑制と促進について、報告されているモデルをFig. 1-7(a)に示す¹³⁾。まず、乳化剤は油脂の結晶核形成を阻害し、油脂の結晶化を遅延させる効果がある。これは、液体状態の油脂分子が会合してクラスターを形成する際に、液体中に存在する乳化剤分子がその働きを阻害するためだと言われている。この抑制効果については、融点の低い乳化剤を使用した場合¹⁴⁻¹⁶⁾や、油相にジアシルグリセロールを用いた場合で報告されている¹⁷⁾。一方、油脂の結晶核形成の促進については、乳化剤が油脂の結晶核形成の鋳型となって油脂の結晶化が促進されると報告されている。これは“テンプレート効果”

と呼ばれている。過去の研究から、乳化剤がテンプレートとして働くために必要な条件が示されている^{13,18,19}；乳化剤と油脂の分子構造が類似すること、副格子構造が類似すること、熱安定性が高いこと、適切な過冷却度で結晶化させること。また、テンプレート効果については、油脂だけの系のみならず、O/W エマルション²⁰⁻²²、W/O エマルション²³の系でも報告されている。乳化剤による油脂の結晶核形成の抑制および促進には乳化剤の種類が影響することに加え、冷却速度や乳化剤の添加濃度にも影響されることも報告されている¹³。

続いて、油脂の結晶成長に対する乳化剤の添加効果について述べる。油脂の結晶成長の抑制については、結晶成長面であるキンク位置に乳化剤が取り込まれることで油脂分子が取り込まれなくなり、結晶成長を阻害すると言われている (Fig. 1-7(b))。一方で、油脂の結晶成長の促進については、乳化剤がテラスに新たにステップを形成することで促進すると言われている。

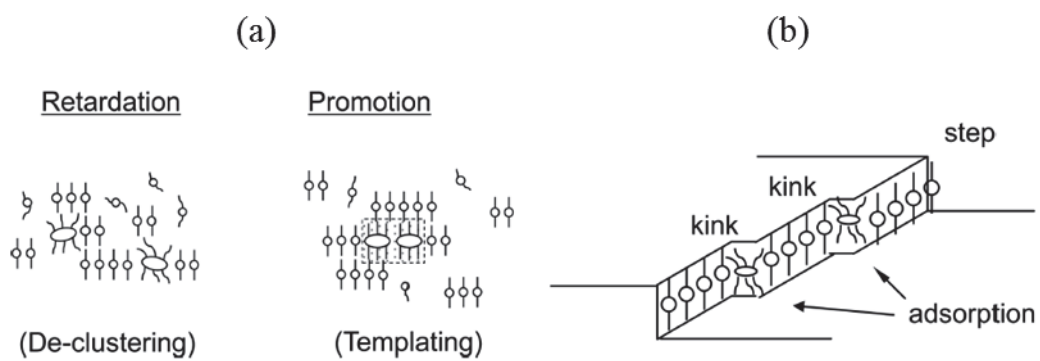


Fig. 1-7 Schematic illustrations of the interactions between fat and emulsifier molecules during (a) nucleation and (b) crystal growth processes.¹³⁾

1.5 O/W エマルション食品と油脂の結晶化

エマルションは、油脂の物理的状態の1つ (Fig. 1-1) であり、「互いに混ざり合わない2液相間で、一方が他方の相に粒子状に微分散している系」と定義されている²⁴⁾。エマルションは食品、化粧品、医薬品などの分野で利用されており、O/W (水中油滴型) エマルション、W/O (油中水滴型) エマルションなどがある。O/W エマルションは熱力学的に準安定な系であるため、水相と油相が互いに液体である場合、時間の経過とともに、良好な分散状態から、クリーミング、凝集、合一といった過程を経て、最終的に水と油の二相に分離した状態となる。これらの過程を“O/W エマルションの不安定化”と呼ぶ (Fig.1-8)²⁵⁾。O/W エマルション食品の不安定化現象は、外観の劣化をもたらし、さらにはおいしさも低下させる。O/W エマルションは熱力学的に準安定状態であり、その不安定化は止められないため、不安定化の進行をいかに抑制するかが重要となる。O/W エマルションの不安定化は、油滴の粒子サイズや分布、油相の体積分率、界面膜の厚さといった内的要因に加え、保存温度や温度変動といった外的要因にも影響され、不安定化要因は多岐にわたる²⁶⁾。さらに、O/W エマルションを低温で保存する場合は、油脂や氷が結晶化する。これらはO/W エマルション状態を大きく変化させるため、不安定化の主要因の一つであると考えられている²⁷⁾。

一般的に、油脂の結晶化によるO/W エマルションの不安定化は、油滴の部分合一によるものと言われている。部分合一とは、冷却によって油滴内にできた針状の油脂結晶が隣り合う油滴を突き破り、油滴同士を油脂結晶が架橋する現象のことである (Fig. 1-9)²⁸⁾。部分合一が生じると、油脂結晶が融解した際に油滴の合一が起こり、エマルションを不安定化させる。一方で、部分合一は、アイスクリームやホイップクリームの製造において重要な“解乳化”のプロセスである。ホイップクリームの場合には、部分合一した油滴粒子によって水相中の気泡が安定化され、アイスクリームの場合もクリーム中の脂肪球の結晶化が微細な気泡の安定化にとって必要である。以上のことから、油脂の結晶化による部分合一は一部の製品では製造プロセス上欠かせないものであるが、多くの場合はエマルションを不安定化させる要因となるため、油脂の結晶化による部分合一を防止することが望まれる。

部分合一を起こすには、油脂結晶が油滴の界面膜を突き破り、油滴内に油脂結晶が侵入する必要がある。そのため、油滴が完全な液体または固体では起こらず、油滴が部分的に結晶化していることが条件になる。実際に、単成分系であるアルカンと多成分系である CCF

(Confectionary Coating Fat) をエマルションの油相に用いた実験では、アルカンが結晶化が速やかに起こるため不安定化を起こさないが、一方で CCF は結晶化が緩やかに起こるため、油滴内に液体と固体が共存する時間が長く、部分合一が起こり不安定化することが示されている^{29,30}。また、固体脂含量 (Solid Fat Content : 以下、SFC と示す) によって合一の頻度は変化することが報告されている^{31,32}。合一が起こる頻度は SFC 量によって異なり、合一が起こる頻度は SFC 量の増加に伴い上昇し、SFC がおよそ 20% に達した際に最大となり、その後減少する。

また、油滴内の油脂結晶の大きさや結晶の位置も部分合一の頻度に大きく影響を与える。Walstra らや Boode らによって油滴内の結晶形状について分類が行われ、油滴内に針状の油脂結晶が分布したもの (type N)、油滴界面に油脂結晶が位置したもの (type L)、type N と type L を組み合わせたもの (type M) が示されている^{33,34}。ただし、油滴内の結晶構造は、油脂の脂肪酸組成、冷却速度、温度サイクル、せん断応力、油滴サイズの分布、乳化剤の種類、不純物の有無などの因子に依存するため、油滴内の結晶構造は他にもさまざま存在すると考えられる。エマルションの油滴内の結晶構造と部分合一との関連性については、更なる研究が必要であると言われている²⁶。

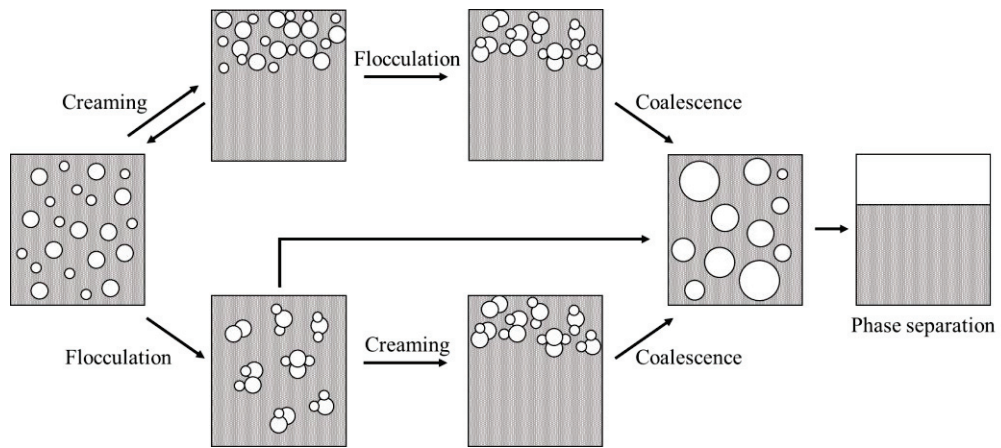


Fig. 1-8 Destabilization mechanism of O/W emulsion.²⁵⁾

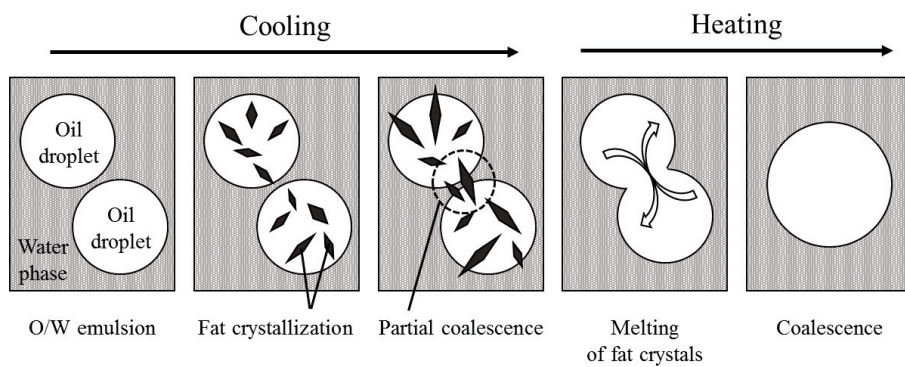


Fig. 1-9 Partial coalescence of fat crystals in O/W emulsion.²⁸⁾

1.6 本研究の目的と論文構成

チョコレートやマーガリン、マヨネーズなどの油脂製品は、様々な TAG を含み、かつエマルションやサスペンションといった複雑な物理的状態をとる。こうした油脂製品は、長期保存や温度変動によって物理的状態が変わり、チョコレート表面の白化現象（ファットブルーム）やマーガリン表面に発生する粗大結晶、マヨネーズにおける水と油の二相分離といった劣化が起こる。これらの劣化現象は、一般的に油脂の結晶化や油脂の結晶状態の変化が関係すると考えられているが、油脂結晶は、結晶サイズや結晶多形といった違いにより性質が大きく異なるため、油脂製品の劣化のメカニズムを詳細に明らかにする必要がある。しかし、様々な TAG を含み、複雑な物理的状態をとる油脂製品を対象として、製品劣化のメカニズムを研究した例は多くなく、実際の油脂製品を対象とした研究の知見を蓄積していくことが求められている。

また油脂の物性研究においては、上記で述べた品質劣化のメカニズムを明らかにするだけでなく、これらの研究結果を基に劣化抑制のための対策を講じ、製品の品質を制御していくことが必要となる。油脂の結晶化制御には、温度コントロール、乳化剤の添加、せん断印加、超音波、圧力といった外的因子³⁵⁾など多様な方法が挙げられる。中でも乳化剤の添加は、油脂の結晶化制御の主たる方法の1つである。乳化剤には、油脂中に主に含まれる脂肪酸と乳化剤の有する脂肪酸の鎖長が類似する場合、乳化剤が油脂結晶化の鋳型として働き、油脂の結晶化を促進する効果（テンプレート効果）があると言われている。テンプレート効果は、油脂結晶化の鋳型として働く乳化剤分子と油脂分子の間で特別な相互作用が生じると考えられる。しかし、テンプレート効果による油脂の結晶化促進のメカニズムや油脂の結晶多形に及ぼす影響については分かっていない。テンプレート効果による油脂の結晶化機構が明らかになれば、油脂の結晶化を制御することが可能となり、様々な油脂製品へ応用されることが期待される。

そこで本研究では、以下の2点について明らかにすることを目的として実験を行った。

(1) 実際の油脂製品で生じる劣化現象について、そのメカニズムを明らかにすること。本研究では油脂製品のモデルとしてマヨネーズを用い、マヨネーズが冷凍-解凍することで水と油に分離する現象について、その要因の解明を行った。

(2) テンプレート効果による油脂の結晶化機構を明らかにすること。本研究では、脂肪酸

鎖長の異なる乳化剤を用い、油脂の結晶核形成および結晶多形に及ぼす影響について調べることで、テンプレート効果による油脂の結晶化機構の解明を行った。

目的 (1) と (2) は、いずれも様々な TAG を含んだ食品油脂を対象とした研究であるが、目的 (1) は実際の製品を対象とした応用的な研究であり、目的 (2) は油脂と乳化剤のみを用いた基礎的な研究として位置づけられる。

続いて、本論文の構成について述べる。第 2 章は本論文で取り扱った試料および実験手法の説明を行う。第 3 章では目的 (1) の実験内容について述べる。第 3 章では O/W エマルション食品であるマヨネーズをモデルとし、油脂結晶化によるマヨネーズの不安定化メカニズムの解明を行った³⁶⁾。第 4 章および第 5 章では目的 (2) の実験内容について述べる。まず第 4 章では、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶化および融解挙動に及ぼす影響について調べた。さらに、乳化剤結晶に対する油脂の結晶成長様式の観察を行った結果から、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤に対する油脂の結晶核形成機構について考察を行った³⁷⁾。第 5 章では、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶多形に及ぼす影響について調べ、乳化剤と油脂の有する脂肪酸鎖長の類似性と結晶多形の関係性を基に、発現する油脂の結晶多形について考察した³⁸⁾。最後に、第 6 章では本研究を総括した。

文 献

1. 佐藤清隆, 上野聡「脂質の機能性と構造・物性 分子からマスカラ・チョコレートまで」丸善出版, 東京 (2011) pp. 1-14.
2. 「油化学辞典」, 第 2 版 (日本油化学会編), 丸善出版, 東京 (2006) p. 570.
3. 永尾晃治 (2014) 「脂質の栄養と代謝」, *オレオサイエンス*, 14(12), 563-567.
4. 「日本人の食事摂取基準 (2010 年版)」, 第一出版, 東京 (2010) p. 87.
5. Kaneko, F. (2001). Polymorphism and phase transitions of fatty acids and acylglycerols. In Garti, N., & Sato, K. (Eds.), *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems*, Marcel Dekker: New York, Chapter 2, pp 53-97.
6. Timms, R. E. *The confectionary fats handbook*. The oily press, Bridgewater: England. (2003). p. ~.
7. 佐藤清隆 (2009) 「脂質の構造と物性—食品物理学の立場から」 *J. Grad. Sch. Biosp. Sci., Hiroshima Univ.*, 48, 77-94.

8. Timms, R. E. *The confectionary fats handbook*. The oily press, Bridgewater: England. (2003). p. ~.
9. 佐藤清隆, 上野聡「脂質の機能性と構造・物性 分子からマスカラ・チョコレートまで」丸善出版, 東京 (2011) pp. 59–62.
10. 佐藤清隆「溶液からの結晶成長 構造と形のデザイン」共立出版, 東京 (2002) p. 25.
11. Moonen, H., & Bas, H. (2004). Mono- and diacylglycerides. In R J. Whitehurst (Ed.), *Emulsifiers in food technology*, 104, 819–824.
12. Smith, K. W., Bhaggan, K., Talbot, G., & van Malssen, K. F. (2011). Crystallization of fats: Influence of minor components and additives, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 1085–1101.
13. Shimamura, K., Ueno, S., Miyamoto, Y., Sato, K. (2013). Effects of polyglycerine fatty acid esters having different fatty acid moieties on crystallization of palm stearin, *Cryst Growth Des.*, 13, 4746–4754.
14. Maruyama, J. M., Soares, F. A. S. D. M., D'Agostinho, N. R., Gonçalves, M. I. A., Gioielli, L. A., da Silva, R. C. (2014). Effects of emulsifier addition on the crystallization and melting behavior of palm olein and coconut oil, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 2253–2263.
15. Chen, C., Zhang, H., Bi, Y., & Cheong, L. (2015). Effects of sucrose esters on isothermal crystallization of palm oil-based blend. *J Am Oil Chem Soc*, 92:277–286.
16. Sonwai, S., Podchong, P., & Rousseau, D. (2016). Crystallization kinetics of coconut oil in the presence of sorbitan esters with different fatty acid moieties, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 93, 849–858.
17. Saitou, K., Homma, R., Kudo, N., Katsuragi, Y., & Sato, K. (2014). Retardation of crystallization of diacylglycerol oils using polyglycerol fatty acid esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91, 711–719.
18. Sato, K., & Ueno, S. (2014). Physical properties of fats in food. In: Rajah, K. K. (Eds.), *Fats in Food Technology*, John Wiley & Sons: Chichester, U.K., pp 1–38.
19. Bayés-García, L., Patel, A. R., Dewettinck, K., Rousseau, D., Sato, K., & Ueno, S. (2015). Lipid crystallization kinetics—roles of external factors influencing functionality of end products, *Curr Opin. Food Sci.*, 4, 32–38.
20. Katsuragi, T., Kaneko, N., & Sato, K. (2001). Effects of addition of hydrophobic sucrose fatty acid oligoesters on crystallization rates of *n*-hexadecane in oil-in-water emulsions. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 20(3), 229–237.

21. Sakamoto, M., Ohba, A., Kuriyama, J., Maruo, K., Ueno, S., & Sato, K. (2004). Influence of fatty acid moiety and esterification of polyglycerol fatty acid esters on the crystallization of palm mid fraction in oil-in-water emulsion. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 37, 27–33.
22. Sonoda, T., Takata, Y., Ueno, S., & Sato, K. (2006). Effects of emulsifiers on crystallization behavior of lipid crystals in nanometer-size oil-in-water emulsion droplets. *Cryst Growth Des.*, 6(1), 306–312.
23. Wassell, P., Okamura, A., Yong, N. W. G., Bonwick, G., Smith, C., Sato, K., & Ueno, S. (2012). Synchrotron radiation macrobeam and microbeam X-ray diffraction studies of interfacial crystallization of fats in water-in-oil emulsions. *Langmuir*, 28(13), 5539–5547.
24. 「油化学辞典」, 第2版 (日本油化学会編), 丸善出版, 東京 (2006) p. 71.
25. 北原文雄, 古澤邦夫「分散・乳化系の科学」工学図書, 東京 (1979) pp.236.
26. McClements, D. J. Food emulsions, principles, practice, and techniques, CRC Press: Boca Raton, London. (1999).
27. Degner, B. M., Chung, C., Schlegel, V., Hutkins, R., & McClements, D. J. (2014). Factors influencing the freeze-thaw stability of emulsion-based foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 98–113.
28. 佐藤清隆, 上野聡「脂質の機能性と構造・物性 分子からマスカラ・チョコレートまで」丸善出版, 東京 (2011) p. 176.
29. Vanapalli, S. a., Palanuwech, J., & Coupland, J. N. (2002). Influence of fat crystallization on the stability of flocculated emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5224–5228.
30. Vanapalli, S. a., Palanuwech, J., & Coupland, J. N. (2002). Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: Effect of oil type, dispersed phase volume fraction, and cooling rate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204(1-3), 227–237.
31. Boode, K. and Walstra, P. (1993). Kinetics of partial coalescence in oil-in-water emulsions, in Food Colloids and Polymers, Stability and Mechanical Properties, Dickinson, E. and Walstra, P., Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 23-30.
32. Fredrick, E., Walstra, P., & Dewettinck, K. (2010). Factors governing partial coalescence in oil-in-

- water emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 153(1-2), 30–42.
33. Boode, K. (1992). Partial Coalescence in Oil-in-Water Emulsions, Ph.D. thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands.
 34. Walstra, P. (1967). On the crystallization habit in fat globules, *Netherlands Milk Dairy Journal*, 21, 166–191.
 35. Sato, K., Bayés-García, L., Calvet, T., Cuevas-Diarte, M. À., & Ueno, S. (2013). External factors affecting polymorphic crystallization of lipids. *Eur J Lipid Sci Technol*, 115, 1224–1238.
 36. Ishibashi, C., Hondoh, H., & Ueno, S. (2016). Influence of morphology and polymorphic transformation of fat crystals on the freeze-thaw stability of mayonnaise-type oil-in-water emulsions. *Food Res Int*, 89(1), 604–613.
 37. Ishibashi, C., Hondoh, H., & Ueno, S. (2017). Epitaxial growth of fat crystals on emulsifier crystals with different fatty acid moieties. *Cryst. Growth Des.*, 17(12), 6363–6371.
 38. Ishibashi, C., Hondoh, H., & Ueno, S. (2018). Influence of fatty acid moieties of sorbitan esters on polymorphic occurrence of the palm mid-fraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 95, 709–720.

第2章 本研究で用いた試料および実験装置

2.1 試料

2.1.1 マヨネーズ

マヨネーズは卵、酢、油の混合物であり、世界中で広く消費されている O/W エマルションである。マヨネーズは通常、70~80%油脂が含まれており、卵黄に含まれるリポタンパク質が乳化剤として働きエマルションを安定化させている¹⁾。日本のマヨネーズは現在、その用途からドレッシングの中の1つとして考えられており、ドレッシングの日本農林規格(JAS)に以下のように定義されている²⁾「半固体状ドレッシングのうち、卵黄又は全卵を使用し、かつ、必須原材料、卵黄、卵白、たん白加水分解物、食塩、砂糖類、はちみつ、香辛料、調味料(アミノ酸等)及び香辛料抽出物以外の原材料を使用していないものであって、原材料に占める食用植物油の重量の割合が65%以上のもの」。ここで半固形状ドレッシングとは、粘度が30Pa·s以上のものをいう。また必須原材料とは、ドレッシングの定義である食用植物油および食酢もしくはかんきつ類の果汁のことである。日本では、以上の基準を満たした製品のみがマヨネーズと表示することができる。一方で、アメリカやヨーロッパのマヨネーズの規格は酸味料や酸化防止剤といった食品添加物を添加することができるため、JASは厳しい規格であることがわかる³⁾。本研究では O/W エマルション食品のモデル系としてマヨネーズを用いた。油相にはキャノーラ油と大豆油を用いた。

2.1.2 マヨネーズの原材料

なたね油

なたね油は、植物のなたねの種子から採取される油を指すが、現在はカナダで開発・改良されたなたね(品種:キャノーラ)から採取される油(キャノーラ油)が食用なたね油のほとんどを占めている。これは、なたねの種子油には過剰摂取すると心臓病を誘発する恐れがあるエルカ酸(C_{22:1})や辛味成分であるグルコシノレートが多く含まれており、その結果、なたねの品種改良が行われ、低エルカ酸、低グルコシノレートである品種のキャノーラが開発されたことが背景にある⁴⁾。なたね油はわが国で最も多く消費されている植物油⁵⁾であり、家庭用の天ぷら油、サラダ油、マーガリンといった加工用油脂など、広く利用されている。

なたね油はわが国でもわずかに生産されているが⁶⁾、近年では中国、ドイツ、カナダの生産が主である⁵⁾。

食用なたね油（低エルカ酸）の脂肪酸組成を Table 2-1 に示す⁷⁾。なたね油（低エルカ酸）はオレイン酸が多く、脂肪酸バランスが優れたサラダ油である。また、なたね油はあっさりした淡白な風味でやや緑色を帯びた淡色のサラダ油であり、マヨネーズやドレッシングの主要な油の一つになっている³⁾。本研究では、市販品のキャノーラ油（日清オイリオ（株））をスーパーマーケットで購入したものを使用した。

大豆油

世界における大豆油の生産量は、生産量1位のパーム油の5,822万トンに次ぐ5,092万トンであり（2015–16年）、中国、アメリカ、ブラジル、アルゼンチンが主な生産国である⁵⁾。大豆油の味は淡白で、色はやや黄色味を帯びている。

大豆油の脂肪酸組成を Table 2-1 に示す⁷⁾。大豆油は植物油脂のなかではビタミン K を多く含み、リノール酸、 α -リノレン酸といった必須脂肪酸を多く含んでいる。一方で、酸化されやすく、保存中に光が当たったりすると青豆臭、枯れ草様の不快なおいを生じることがある。そのため、マヨネーズやドレッシングに使用する場合は、製造方法の改善や他のサラダ油とブレンドするなどによって対応している³⁾。本研究では、市販品の大豆油（（株）淳子）をスーパーマーケットで購入したものを使用した。

卵黄

卵黄は水分 48.2%、タンパク質 16.5%、脂質 33.5%、灰分 1.7%、炭水化物 0.1%から成る³⁾。卵黄には小さな粒子が含まれており、低密度画分（32.5%）、水溶性画分（5.0%）、ホスπιチン（2.0%）、高密度画分（8.0%）などがある³⁾。このうち、低密度画分を LDL（Low density lipoprotein：低密度リポタンパク質）、高密度画分を HDL（High density lipoprotein：高密度リポタンパク質）といい、これらがマヨネーズの乳化に関与するリポタンパク質である。LDL は脂質を多く含むためサラダ油に吸着しやすく、多くのサラダ油を乳化することができる（＝乳化容量が高い）。HDL は食塩が存在すると含まれるグラニューールのタンパク質が溶解して油界面に分散するので油滴を安定化させると言われている（＝乳化安定性が高い）⁸⁾。本研究では、市販品の鶏卵（（株）マルサン）をスーパーマーケットで購入したものを使用した。

Table 2-1 Fatty acid compositions in vegetable oils. ⁷⁾

Fatty acid composition [%]	Vegetable oils	
	Low erucic acid rapeseed oil	Soybean oil
Palmitic acid (C16)	4.3	10.7
Palmitoleic acid (C16:1)	0.2	
Stearic acid (C18)	1.9	4.0
Oleic acid (C18:1)	61.3	24.2
Linoleic acid (C18:2)	20.0	52.6
Linolenic acid (C18:3)	9.0	6.9
Arachidic acid (C20)	0.6	0.3
Icosenoic acid (C20:1)	1.3	0.2
Behenic acid (C22)	0.3	0.3
Erucic acid (C22:1)	0.3	
Lignoceric acid (C24)	0.1	0.1

2.1.3 パーム中融点油脂 (Palm Mid-Fraction: PMF)

PMF は、アブラヤシの果肉から得られるパーム油から分別された油脂である。パーム油は 2004–2005 年以降、世界で最も生産量の多い植物油脂となっており⁵⁾、その用途は約 90% が食用である⁹⁾。パーム油は大きく 3 飽和（主に PPP）、2 飽和（主に POP）、1 飽和（主に POO）の TAG から成る油脂であるため、幅広い融点を有する。このことから通常、パーム油は融点の違いを利用してドライ分別が行われており、分別された油脂は製菓用油脂からフライ油まで様々な製品に利用されている。Fig. 2-1 に、パーム油の多段階ドライ分別によって得られる分別油とその主な用途を示す¹⁰⁾。なおドライ分別とは、油脂を一定温度に加熱し、液体部分と固体部分をろ過またはプレスによって分離する方法である¹¹⁾。パーム油はまず高融点のステアリン分画と低融点のオレイン分画に分別され、その後さらに高融点分画と低融点分画に分別されていく。PMF は、主にパーム油の中融点成分で構成されており、ソフト PMF とハード PMF の 2 つがある。PMF は、商業的には主にココアバター代用脂 (Cocoa Butter Equivalent: CBE ; 化学的、物理的性質がココアバターと等価な油脂¹²⁾) やクリームに用いられている。Table 2-1 に、パーム油およびハード PMF の脂肪酸組成を示す¹³⁾。

本研究で PMF を用いた理由は、以下の 2 点である。(1) パーム油は世界での生産量が多く、汎用性の高い油脂であることから、本研究の成果がパーム油を含んだ多様な油脂製品へ応用されることが期待できること。(2) 本研究では、脂肪酸鎖の異なる乳化剤と油脂との相互作用を調べることを目的としているため、油脂に含まれる主要な脂肪酸の比率が高いこと。すなわちパーム油を分別した PMF はパーム油よりもパルミチン酸の含有率が高いため、本研究では PMF を使用した。また本研究で用いた PMF は、不二製油 (株) から入手した。

2.1.4 ソルビタン脂肪酸エステル (Sorbitan Fatty Acid Ester: SE)

SE は 1945 年に米国 Atlas 社が開発した非イオン系界面活性剤であり、わが国の食品添加物として指定された乳化剤の 1 つである。SE は食品用のみならず、化粧品や工業用など広く利用されている。SE は、ソルビタンと脂肪酸のエステルであり、ソルビトールまたはソルビタンと脂肪酸とのエステル化反応で得られる (Fig. 2-2)。反応は、アルカリを触媒として常圧において 170~240°C、減圧下において 130~180°C で行われる¹⁴⁾。しかし、ソルビト

ールを脱水するとソルビタンのほか、イソソルビドができる。ソルビトールは6個、ソルビタンは4個、イソソルビドは2個の水酸基があり、脂肪酸はこれらと無差別にエステル化する。よって、各種のモノエステル、ジエステル、トリエステルができる。このような混合成分の分別は容易でないため、SEは1つの種類であっても含まれる成分は多様である^{15,16}。

本研究でSEを用いた理由は、SEは親水基に結合する脂肪酸の種類を変えることができるのに加えて、ソルビタンを有するSEはモノアシルグリセロールと比べてTAGの構造に類似していないからである。これは、モノパルミチンとパーム油を用いた場合、テンプレート効果によってモノパルミチンにパーム油が結晶化するという先行研究の結果¹⁷があり、モノアシルグリセロールよりも親水基が大きいSEを用いた場合でもテンプレート効果が起こるか調べるためである。また本研究では、ソルビタンに3つ脂肪酸が結合したトリエステルのSEを用いた。ソルビタントリエステルはモノエステルよりもHLBが低く、油脂への溶解度が高い。ソルビタントリエステルを用いた理由は、第4章の実験において、光学顕微鏡で観察できる程度にSEの結晶を作製する必要があり、そのために油脂にSEを多量に溶かし込む必要があったからである。また、SEに結合する脂肪酸はパルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸がそれぞれ結合した、ソルビタントリパルミテート (Sorbitan tripalmitate: STP)、ソルビタントリステアレート (Sorbitan tristearate: STS)、ソルビタントリベヘネート (Sorbitan tribehenate: STB) の3種類を用いた。この3種類を用いた理由は、油脂と乳化剤の有する脂肪酸の鎖長の類似性が油脂の結晶化に与える影響を明らかにするためである。油脂にパルミチン酸が主に含まれるPMFを用いたことから、油脂と乳化剤の有する脂肪酸鎖長が一致する系 (STP)、油脂と乳化剤の有する脂肪酸鎖長が類似する系 (STS)、油脂と乳化剤の有する脂肪酸鎖長が大きく異なる系 (STB) と設定した。Fig. 2-3 に、PMFに主に含まれるTAGであるPOPおよび乳化剤として使用したSTP、STBの分子構造を示す¹⁸。

本研究で用いたソルビタン脂肪酸エステルは、理研ビタミン (株) から提供された。Fig. 2-4 に、本研究で使用したSEのDSC融解曲線を示す¹⁸。SEの融点 (オンセット値) は、STPで $37.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、STSで $47.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、STBで $62.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$ であった。Fig. 2-5 に、本研究で使用したSEの放射光X線回折測定で得られた回折パターンを示す¹⁸。SE結晶の長面間隔は、STPで4.82 nm、STSで5.34 nm、STBで6.35 nmであった。SE結晶の短面間隔は、STPで0.417 nm、STSで0.414 nm、STBで0.413 nmであり、多形はいずれも α 型であった。

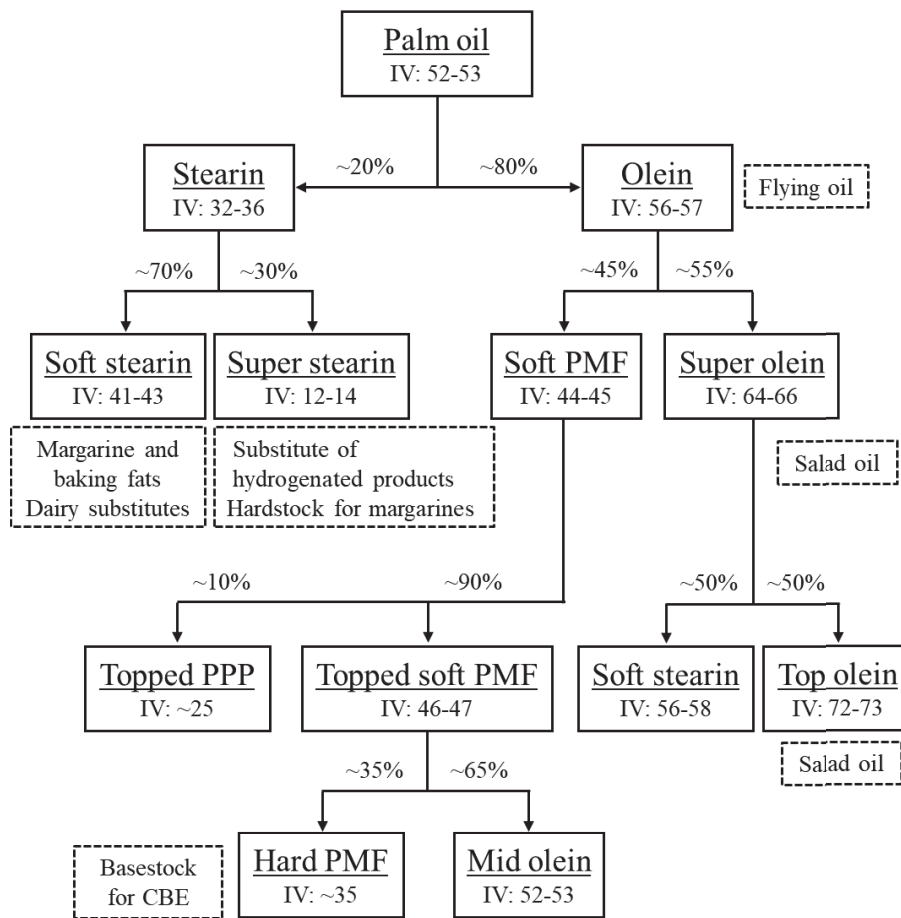


Fig. 2-1 Multi-step dry fractionation of palm oil.¹⁰⁾ IV: iodine value.

Table 2-1 Fatty acid compositions in palm oil and hard PMF.¹³⁾

Fatty acid composition [%]	Palm oil	Hard PMF
Palmitic acid (C16)	43.7	54.3
Stearic acid (C18)	4.4	5.5
Oleic acid (C18:1)	39.9	34.5
Linoleic acid (C18:2)	9.7	4.1

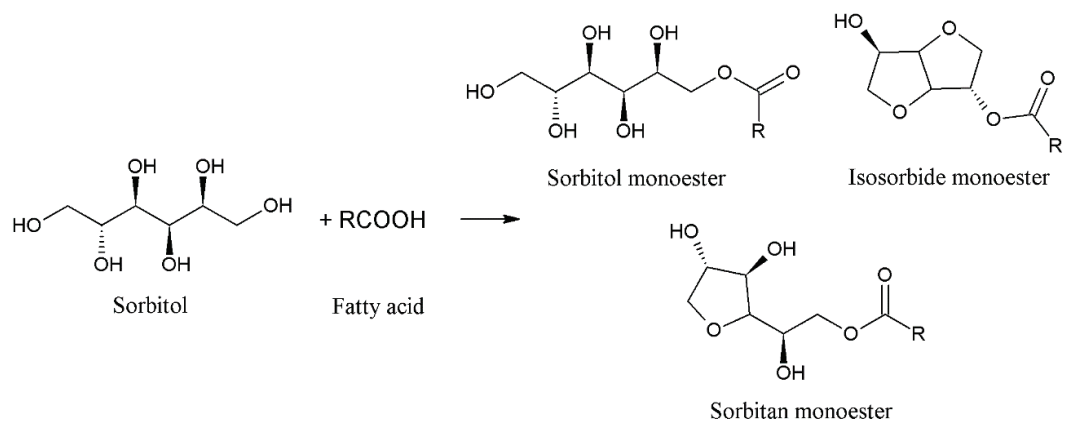


Fig. 2-2 Synthesis of sorbitan fatty acid monoesters. ^{15,16} R: hydrocarbon

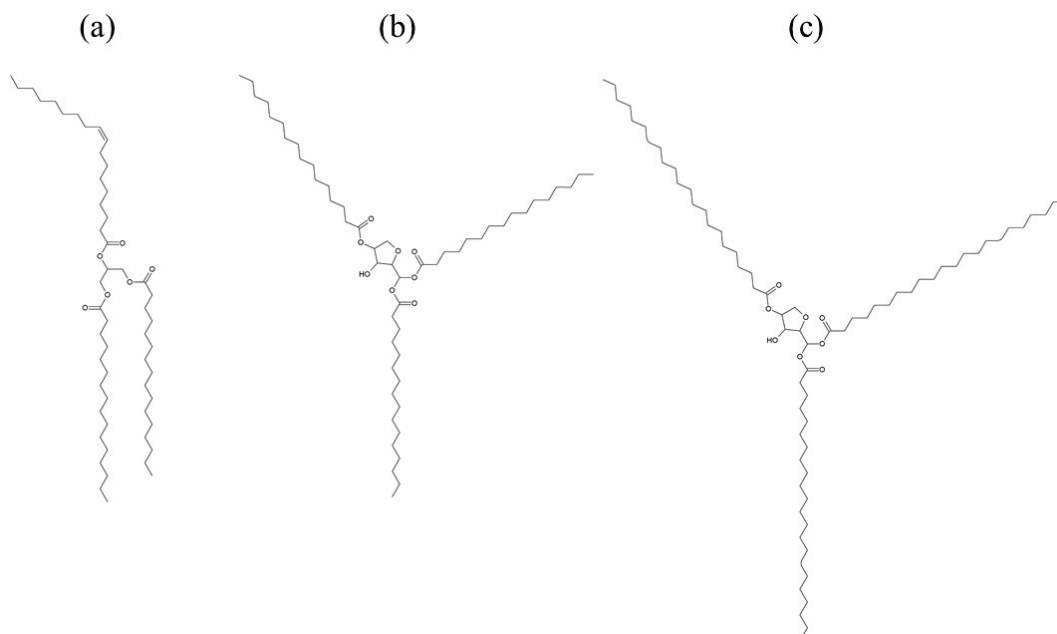


Fig. 2-3 Molecular structures of principle components of (a) PMF (1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol: POP), (b) sorbitan tripalmitate (STP) (c) sorbitan tribehenate (STB). ¹⁸⁾

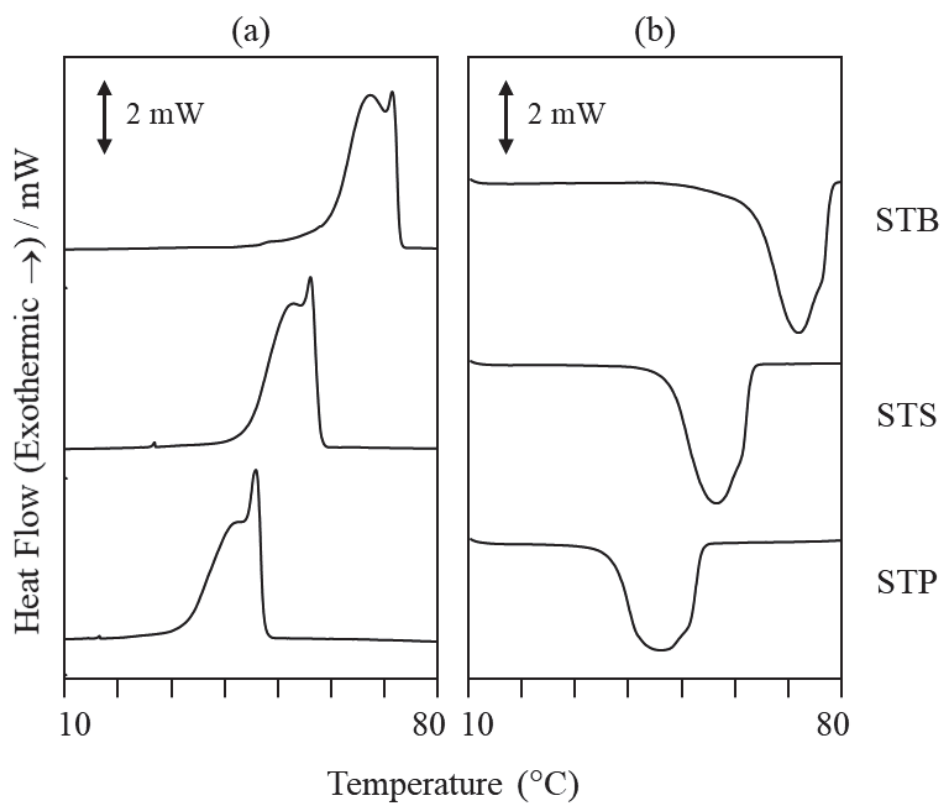


Fig. 2-4 DSC thermograms of SEs during (a) cooling from 80 to 10°C and (b) heating from 10 to 80°C.¹⁸⁾

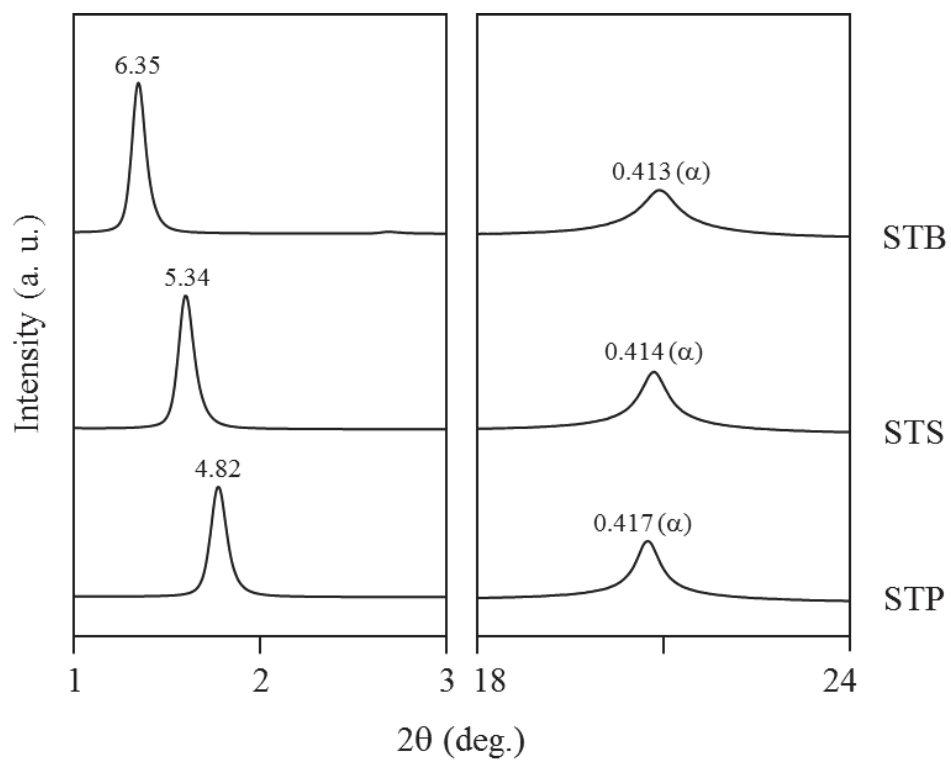


Fig. 2-5 Synchrotron radiation X-ray diffraction patterns of SEs at room temperature. Unit: nm.

(α) indicates the subcell packing of SEs. ¹⁸⁾

2.2 実験装置

2.2.1 示差走査熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry: DSC)

DSC とは熱分析の手法の 1 つであり、「物質および基準物質の温度を調節されたプログラムに従って変化させながら、その物質と基準物質に対するエネルギー入力の差を温度の関数として測定する技法」と定義されている¹⁹⁾。DSC は油脂に限らず、化学や金属学など幅広い分野で用いられる手法である。油脂の分野においても古くから、DSC によって油脂の相転移（結晶化、融解）や相転移に伴うエネルギー量（エンタルピー）を求めることで油脂の物性を評価してきた。DSC には入力補償型 DSC と熱流束型 DSC がある。入力補償型 DSC では、試料と基準物質の温度が等しくなるように熱エネルギーを加え、試料と基準物質に加えた熱エネルギーの入力差を温度の関数として測定する。一方、熱流束型 DSC では、試料と基準物質の熱源となるヒートシンクとの間に熱障壁を設け、熱障壁で測定された試料と基準物質のそれぞれの熱流束の差を温度の関数として測定する。本研究で用いた熱流束型 DSC の基本的構成を Fig. 2-6 に示す¹⁹⁾。

本研究では、熱流束型 DSC (Thermo Plus 8240, (株) リガク) を用いて、試料の結晶化および融解挙動を調べた。試料はアルミパンに封入し、冷媒にはドライアイス、標準物質には Al_2O_3 を用いて測定を行った。また、DSC 曲線における相転移温度の決定には、以下の 3 通りの方法がある¹⁹⁾。

- (1) オンセット値 (外挿開始温度) : ピークの立ち上がり部分の最大傾斜の点で引いた接線とピーク前の外挿基線との交点の温度。
- (2) ピークトップ値 (融解・結晶化ピーク温度) : 融解および凝固ピークの両側の最大傾斜の点で引いた接線の交点の温度。
- (3) オフセット値 (外挿終了温度) : ピーク終了前の最大傾斜の点で引いた接線とピーク後の外挿基線との交点の温度。

本研究では、オンセット値を求めることで結晶化および融解開始温度とした。しかし、本研究の DSC 測定の結果では、結晶化および融解ピークが連続的に出現する場合もあり、その場合はピークトップ値を求めることで結晶化および融解温度とした。

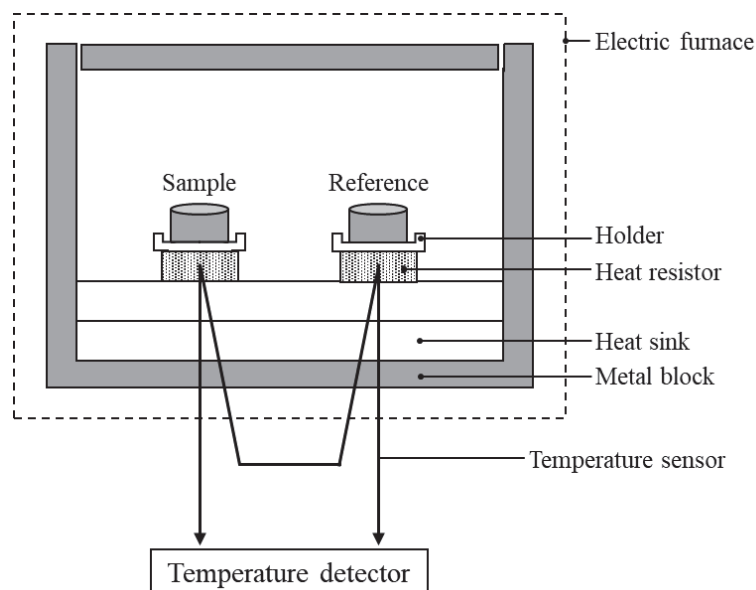


Fig. 2-6 Layout of heat-flux DSC.¹⁹⁾

2.2.2 X線回折測定 (X-ray Diffraction: XRD)

X線とは、およそ 0.05~0.25 nm の波長を有する電磁波であり、大きなエネルギーを持つ。結晶に X線を照射すると、結晶中の電子から散乱が生じる。このとき、Bragg の式 ($2d\sin\theta=n\lambda$) を満たす条件において、電子からの散乱が強め合う (Fig. 2-7)。ここで、 d は面間隔、 θ は入射角、 λ は波長、 n は整数である。すなわち、Bragg の式を満たす面間隔 d は結晶の周期的な構造を反映する。X線回折測定には、単結晶に X線を照射し、結晶構造を決定する単結晶 X線回折法と、多結晶体に対して X線を照射することで、多結晶体の有する周期的な構造を知ることができる粉末 X線回折法がある。油脂結晶における X線回折測定とは、ほとんどが粉末 X線回折法を指す。これは、単結晶 X線回折法で解析するために必要な大きさの油脂の単結晶を育成することが困難であるためである。よって、本論文における X線回折測定とは、以下、粉末 X線回折法のことを指す。

油脂結晶における X線回折測定では、油脂結晶の鎖長構造と副格子構造を知ることができる。多形を決定できる X線回折測定は、融点やエンタルピーといった熱特性を求める DSC と並んで、油脂結晶の物性を評価するうえで欠かせない手法である。回折角の小角側では長面間隔 (分子の長さ) に由来する回折ピーク、広角側では短面間隔 (炭化水素鎖間の長さ) に由来する回折ピークが出現する。すなわち、小角側の回折ピークから鎖長構造、広角側の

回折ピークから副格子構造がわかる。油脂の結晶多形は副格子構造から決定され、広角側に出現する回折ピーク位置と回折ピークのパターンによって結晶多形を同定する。また、鎖長構造から結晶多形を同定することはできないが、鎖長構造も結晶多形を推測する手掛かりとなる。これは、多形の違いによって鎖長構造が変化する TAG が存在することと、同じ鎖長構造であっても安定多形になるほど分子の傾きが大きくなり、長面間隔が短くなるためである。

本研究の第3章では粉末 X 線回折装置（試料水平強力 X 線回折装置：RINT-TTR, (株) リガク）を用いた。試料の冷却には試料水平型中低温装置を用い、冷媒には液体窒素を使用した。小角側（Small-angle X-ray diffraction: SAXD）である $2\theta = 1\sim 8 \text{ deg.}$ で得られた回折ピークで長面間隔を、広角側（Wide-angle X-ray diffraction: WAXD）である $2\theta = 15\sim 25 \text{ deg.}$ で得られた回折ピークで短面間隔を求めた。測定条件は以下の通りである。

[RINT-TTR 測定条件]

・ X 線	Cu-K α 線, $\lambda = 0.154 \text{ nm}$	・ サンプル幅	0.02 deg.
・ 出力	7.5 kW (30 kV, 250 mA)	・ 発散スリット	1°
・ 散乱スリット	1°	・ 受光スリット	0.3 mm
・ 測定範囲	$2\theta = 1.2 \sim 27 \text{ deg.}$	・ スキャンスピード	2.0 deg./min

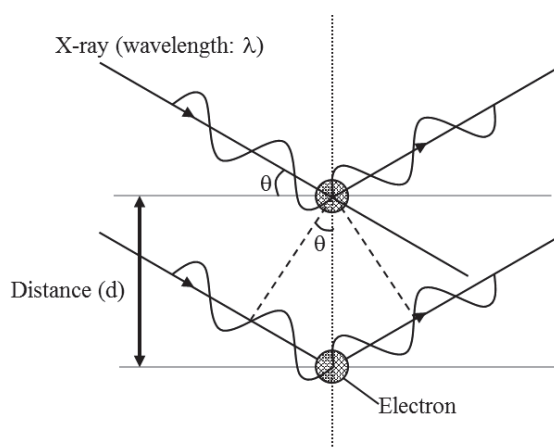


Fig. 2-7 Bragg's law

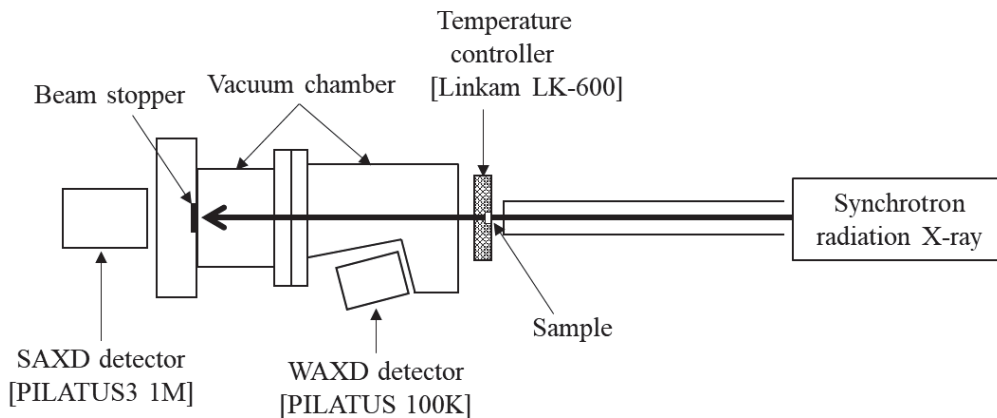


Fig. 2-8 Illustration of the optical system of time-resolved synchrotron radiation X-ray diffraction at Photon Factory, BL-6A.

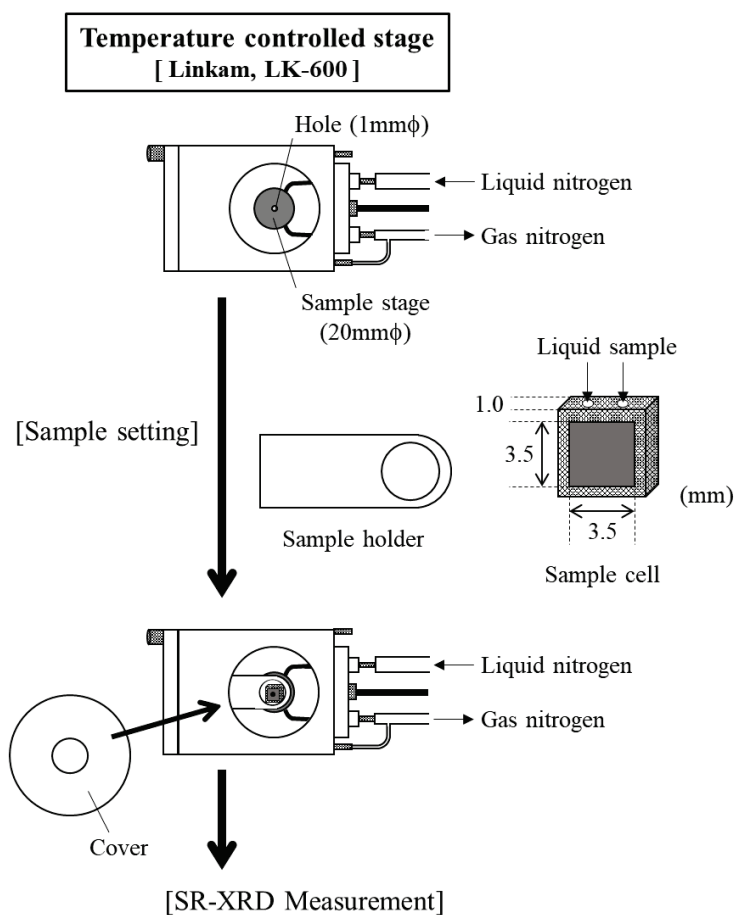


Fig. 2-9 Illustration of sample cell and holder for time-resolved synchrotron radiation X-ray diffraction at Photon Factory, BL-6A.

2.2.4 放射光マイクロビーム X 線回折測定

(Synchrotron Radiation microbeam X-ray Diffraction: SR- μ -XRD)

SR- μ -XRD 測定とは、マイクロメートルのサイズに絞った X 線を用いて、結晶の局所位置の鎖長構造や多形を知る方法である。試料全体（バルク）の X 線回折パターンを得る粉末 X 線回折測定 (2.2.2) や SR-XRD 測定 (2.2.3) とは異なり、SR- μ -XRD 測定では特定の場所（数十 μm^2 単位）の X 線回折パターンを得ることができる。微小なサイズの X 線ビームを用いて測定できるのは、高輝度であり指向性の高い放射光を利用しているためである。

第 4 章では、SR- μ -XRD 測定によって結晶の局所位置における多形と配向の調査および鎖長構造から結晶化した物質の同定を行った。測定は、高輝度光科学研究センター SPring-8（兵庫県佐用郡佐用町）BL-46XU で行った。Fig. 2-10 に、測定時の光学系の概略を示す。測定条件は以下の通りである。

[SR- μ -XRD 測定条件]

- | | | | |
|----------|---|----------|----------------------------------|
| ・ X 線波長 | 0.1 nm | ・ エネルギー | 12.398 KeV |
| ・ カメラ距離 | 475 mm | ・ ビームサイズ | 2.91 \times 4.39 μm |
| ・ 二次元検出器 | PILATUS 2M (DECTRIS Ltd., Baden, Switzerland) | | |
| ・ 温度制御 | 顕微鏡用冷却加熱ステージ
(Linkam, LK-600PM, Linkam Scientific Instruments, Ltd., Tadworth, U.K.) | | |

得られた X 線回折パターンの画像データは以下の方法で解析を行った。解析方法の概略図を Fig. 2-11 に示す。

結晶の局所位置におけるラメラ面の配向の調査 (Fig. 2-11(b))

得られた X 線回折パターンの画像データ (Fig. 2-11(a)) は、Image J (version 1.51k, National Institutes of Health, USA) を用いて画像の SAXD のトリミングおよび画像の白黒反転の処理を行った (Fig. 2-11(b'))。処理した画像データは、マイクロビームを照射した位置に並べた。照射箇所の結晶のラメラ面に配向がある場合は、ラメラ面の配向に対してマーク (Fig. 2-11(b')) 中の矢印で指した箇所) を示した。なお、ラメラ面の配向は方位角展開によって得られたデータ (Fig. 2-11(c)) から角度を 10° 間隔で読み取ることで解析した。

一次元化処理【方位角展開 (Azimuthal extension)】 (Fig. 2-11(c))

方位角展開とは、指定した回折角の範囲を方位角方向 ($0^{\circ} \sim 360^{\circ}$) に展開し、結晶の配向の有無および配向の角度を調べる解析方法である。本実験では、SAXD の範囲を解析することで、結晶のラメラ面の配向を調べた。方位角展開は、Image J にプラグインしたプログラム (Plot Radially version 2.20, 高輝度光科学研究センター 産業利用推進室) を用いて行った。得られた X 線回折パターンの画像データ (Fig. 2-11(a)) は、Plot Radially を用いて方位角方向に対して平均化処理を行った。SAXD の範囲にラメラ面の配向がある場合、Fig. 2-11(c') のように 180° 間隔でピークが 2 つ出現する。この角度を読み取ることで、ラメラ面の配向を決定した。

一次元化処理【回折角展開 (2θ extension)】 (Fig. 2-11(d))

回折角展開とは、X 線回折パターンの画像データ (Fig. 2-11(a)) を動径方向 ($2\theta = 0.003 \sim 23.367$) に平均化処理して一次元の X 線回折パターン (Fig. 2-11(d')) に変換し、鎖長構造および副格子構造を調べる解析方法である。回折角展開は、Image J にプラグインしたプログラム (Plot Radially) を用いて行った。この結果を基に、マイクロビームを照射した位置の結晶の鎖長構造および多形の同定を行った。

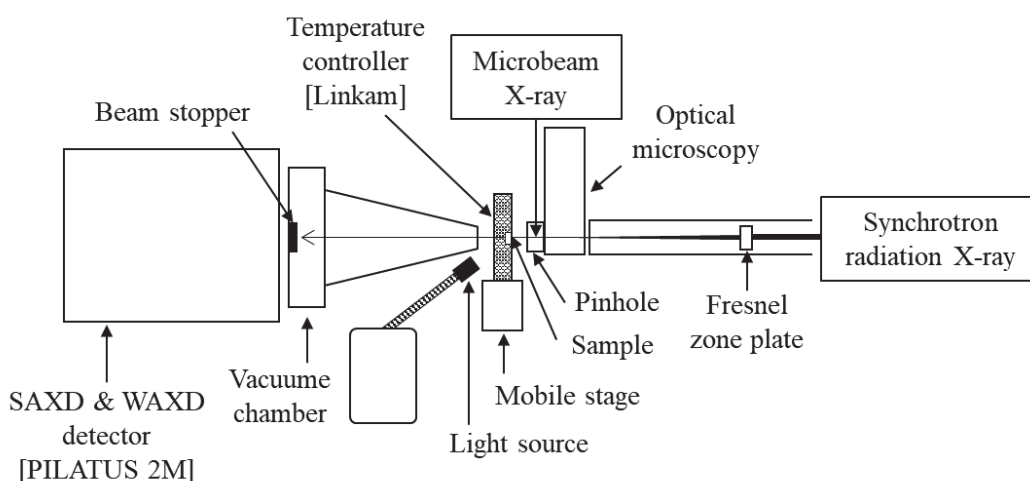


Fig. 2-10 Illustration of the optical system of synchrotron radiation microbeam X-ray diffraction at SPring-8, BL-46XU.

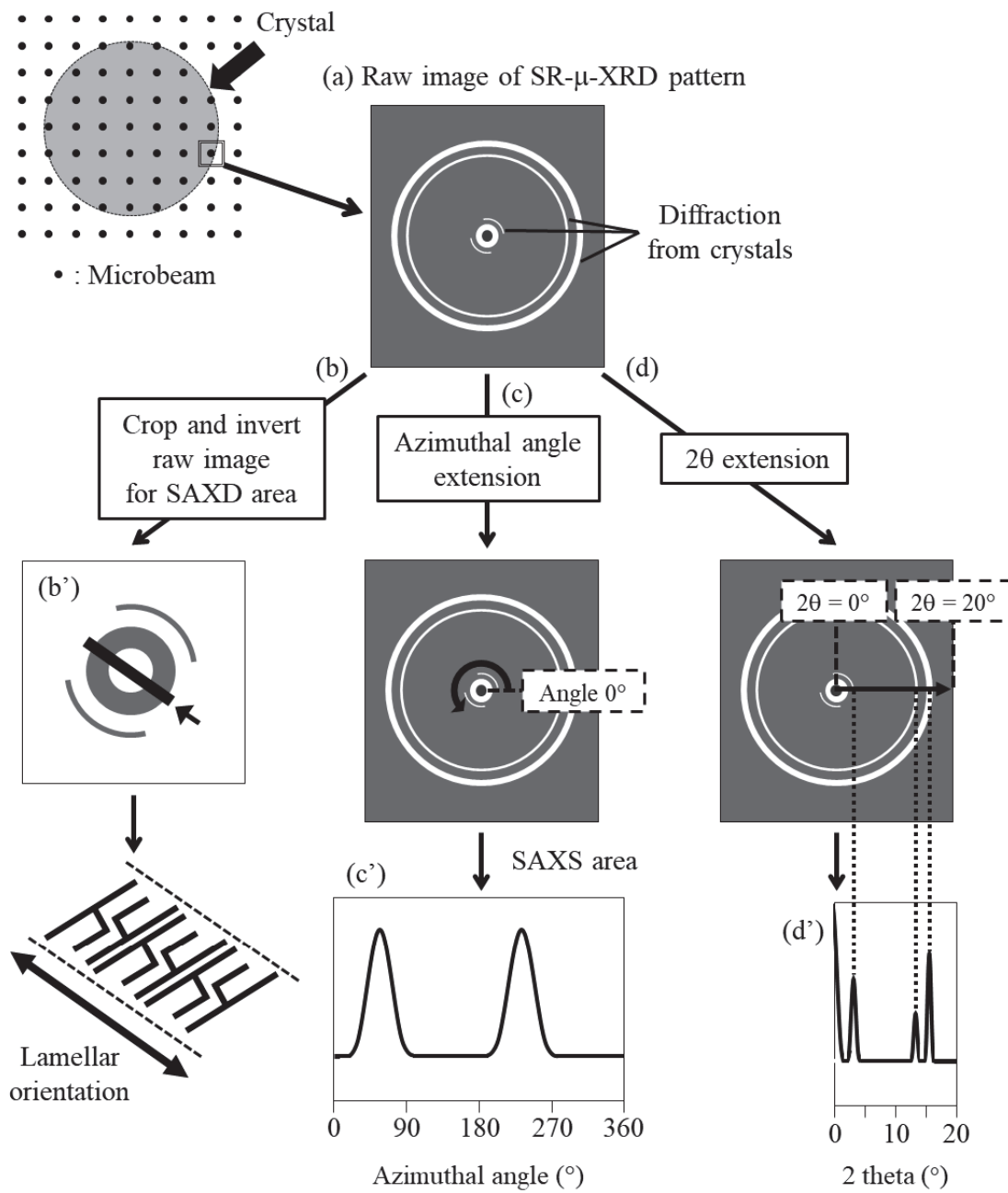


Fig. 2-11 Illustration of the analytical methods of SR- μ -XRD.

2.2.5 偏光顕微鏡観察 (Polarized Light Microscopy: PLM)

偏光顕微鏡は、集光レンズ系の部分にポラライザと呼ばれる偏光板（偏光子）を、対物レンズと接眼レンズの間にアナライザと呼ばれる偏光板（検光子）を備えた顕微鏡である²³⁾。

Fig. 2-12 に、偏光顕微鏡の構成図を示す。ポラライザは、光源から生じたあらゆる方向の光の振動を 1 つの方向（直線偏光）のみ透過させる偏光板であり、アナライザは、ポラライザを透過した光の振動方向に対して直交させた（90°回転した）直線偏光のみ透過させる偏光板である。なお、アナライザは 360°回転させることができるが、本研究はポラライザに対して 90°回転させた状態（＝クロスニコル）で使用した。すなわち、試料が何も存在しない場合、顕微鏡から除いた像は真っ暗である（Fig. 2-13(a)）。この真っ暗な状態から、複屈折を有する試料、すなわち本研究では油脂結晶あるいは乳化剤結晶が存在する試料をポラライザとアナライザの間に置くと、一般的に結晶は白く光って観察することができる。油脂や乳化剤の結晶は光学的に異方性のある結晶であり、光を入射させると、結晶中で振動面が直交した 2 つの屈折光に分かれる現象（複屈折）がみられる。この 2 つの屈折光はそれぞれ屈折率が異なるため、位相のずれ（位相差）が生じる。位相のずれた距離はレタデーション (R) と呼ばれ、 $R = d(n_1 - n_2)$ で表される（d: 試料の厚さ、 n_1 : 速い光の屈折率、 n_2 : 遅い光の屈折率）。この位相差のある直交した 2 つの屈折光が再び合成されると、直線偏光から一般的に楕円偏光あるいは円偏光へと変化する。楕円偏光あるいは円偏光はアナライザを透過することができるため、複屈折を有する結晶が存在する場合、偏光顕微鏡で像として観察することができる（Fig. 2-13(b)）。また一般的に、偏光顕微鏡では結晶は色づいた状態（干渉色）で観察される。この干渉色は試料の厚みや複屈折量によって変化するが、本研究で示した偏光顕微鏡像においては、油脂結晶および乳化剤結晶は白く観察される。

さらに、本研究では偏光顕微鏡の光学系に鋭敏色板 (Sensitive tint plate) を入れることで、結晶の伸長方向の違い、すなわち結晶の配向の有無を調べた。鋭敏色板観察は、複屈折を有する結晶の光軸に関する情報を与える観察手法であり、青色と橙色で示される結晶は、結晶の伸長方向の違いを反映している²⁵⁾。鋭敏色板は、波長を 530nm 付与する検板であり、クロスニコルの状態で、対物レンズとアナライザの間に、ポラライザおよびアナライザの向きに対して 45°の向きで挿入することで観察することができる（Fig. 2-12）。

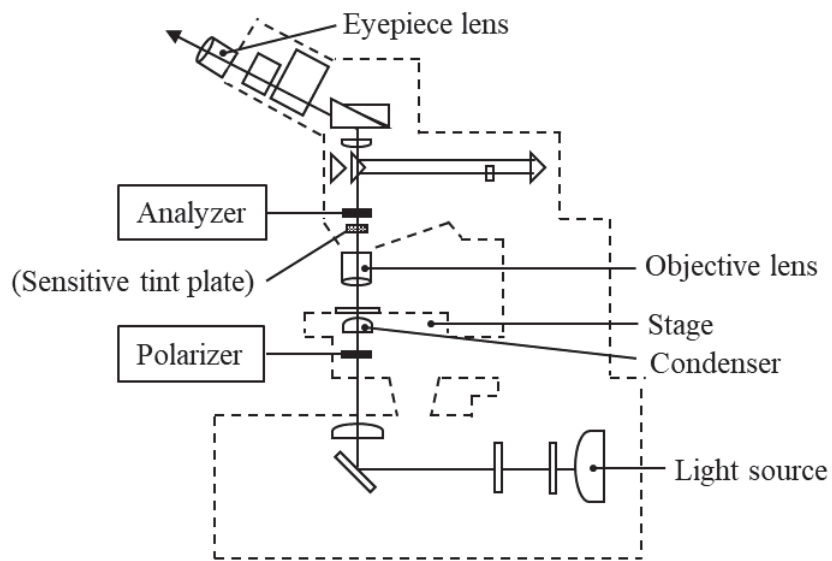


Fig. 2-12 Layout of polarized light microscopy

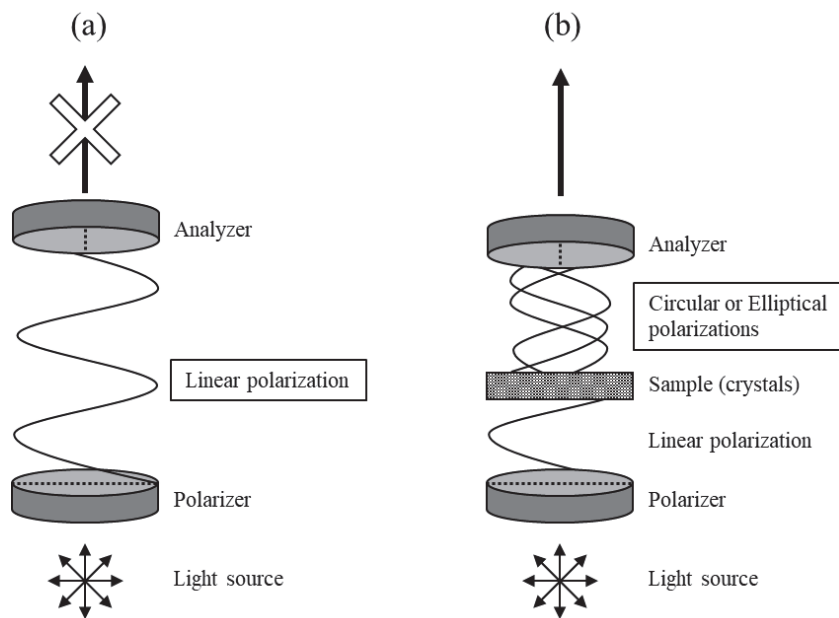


Fig. 2-13 Schematic illustrations of principle of polarized light microscopy. (a) Cross-nicol condition in the absence of crystals (b) Cross-nicol condition in the presence of crystals.²⁴⁾

2.2.6 微分干渉顕微鏡観察

(Differential Interference Contrast Microscopy: DIC)

微分干渉顕微鏡は、偏光顕微鏡の光学系にノマルスキープリズムを組み込んだ顕微鏡である。ノマルスキープリズムはポラライザとコンデンサの間およびアナライザと対物レンズの間に備えられる (Fig. 2-14)。微分干渉顕微鏡では、試料の高さ方向の厚さの傾斜が色または明暗のコントラストに反映され、通常の光学顕微鏡の観察方法よりも試料の微細な構造をより鮮明に観察することができるという特徴を持つ。微分干渉顕微鏡の観察原理について述べる。まず、光源からあらゆる方向の振動を持つ光 (Fig. 2-14(a)) はポラライザを通過すると1つの振動方向を持つ光 (直線偏光) になる (Fig. 2-14(b))。その後、ノマルスキープリズムを通った光は互いに振動方向が直交し、少しだけ離れて進む2つの光線に分解される (Fig. 2-14(c))。その2つの光線はコンデンサを通過して平行になり、試料を通過する。このとき、2つの光線が試料の傾斜面を通過すると位相差が生じる (Fig. 2-14(d))。その後、対物レンズを通過し、ノマルスキープリズムで再び1つの光に重ね合わされる (光の振動面は直交している) (Fig. 2-14(e))。最後にアナライザを通過する際に光が合成され (Fig. 2-14(f))、その結果、干渉が起こることで微分干渉像が観察される。

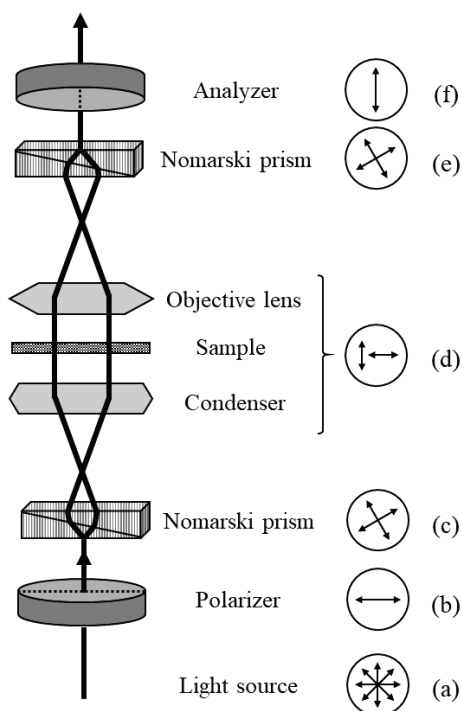


Fig. 2-14 Schematic illustration of principle of differential interference contrast microscopy.²⁴⁾

文 献

1. Depree, J. A., & Savage, G. P. (2001). Physical and flavour stability of mayonnaise. *Trends in Food Science & Technology*, 12(5-6), 157-163.
2. ドレッシングの日本農林規格, 最終改正 平成 20 (2008) 年 10 月 16 日農林水産省告示 第 1503 号
3. 小林幸芳, 食品知識ミニブックスシリーズ「マヨネーズ・ドレッシング入門」, 日本食糧新聞社, 東京 (2005)
4. 宮川高明, 「食用油脂の科学」, 愛智出版, 東京 (2006) p. 117.
5. ISTA Mielke 社「Oil World」2017 年報.
6. 農林水産省, 2017 年油糧生産実績調査.
7. 「日本油化学便覧 一脂質・界面活性剤一」, 第 4 版 (日本油化学会編), 丸善出版, 東京 (2001) p. 604.
8. Kiosseoglou, V. D., & Sherman, P. (1983). The influence of egg yolk lipoproteins on the rheology and stability of O/W emulsions and mayonnaise. *Colloid & Polymer Science*, 261(6), 520-526.
9. 佐藤 清隆, 上野 聡「脂質の機能性と構造・物性 分子からマスカラ・チョコレートまで」丸善出版, 東京 (2011) pp. 130-132.
10. Oi-Ming Lai, Chin-Ping Tan, Casimir C. Akoh, Palm Oil Production, Processing, Characterization, and Users, AOCS Press, Urbana (2012) pp. 364-368.
11. Stephen T Beckett 著, 小谷野哲夫 訳「チョコレート カカオの知識と製造技術」, 幸書房, 東京 (2015) p. 91.
12. 佐藤清隆, 蜂屋巖, 「製菓用油脂ハンドブック」幸書房, 東京 (2010) p. 5.
13. Deffense, E. (1995). Dry multiple fractionation: trends in products and applications. *Lipid Technology*, 7, 34-38.
14. 公益社団法人 日本油化学会, 「界面活性剤評価・試験法一製法・物性・応用・分析・環境一」第二版, 日本印刷, 東京 (2016) pp.22.
15. 日高徹, 「食品用乳化剤」第 2 版, 幸書房, 東京 (1991) pp. 31-34.
16. 戸田義郎, 門田則昭, 加藤友治, 「食品用乳化剤一基礎と応用一」, 光琳, 東京 (1997) pp. 57-62.

17. Verstringe, S., Dewettinck, K., Ueno, S., & Sato, K. (2014). Triacylglycerol crystal growth: templating effects of partial glycerols studied with synchrotron radiation microbeam X-ray diffraction, *Cryst. Growth Des.*, 14, 5219–5226.
18. Ishibashi, C., Hondoh, H., & Ueno, S. (2017) Epitaxial growth of fat crystals on emulsifier crystals with different fatty acid moieties, *Cryst. Growth Des.*, 17(12), 6363–6371.
19. 斎藤安俊「物質科学のための熱分析の基礎」, 共立出版, 東京 (1990).
20. 菊田星志「X線回折・散乱技術 上」, 東京大学出版会, 東京 (1992) p. 176.
21. 植木龍夫 (2004)「放射光とは—その特徴・利用と将来—」, *高分子*, 53(2), 58–61.
22. Shimizu, N., Yatabe, K., Nagatani, Y., Saijyo, S., Kosuge, T., & Igarashi, N. (2016). Software development for analysis of small-angle X ray scattering data. *AIP Conf. Proc.*, 1741, 050017.
23. 栗屋裕「高分子素材の偏光顕微鏡入門」, アグネ技術センター, 東京 (2001).
24. 野島博「顕微鏡の使い方ノート 光学顕微鏡から CCD カメラまで」, 羊土社, 東京 (1997).
25. Yun, J. H., Kuboyama, K., & Ougizawa, T. (2006). High birefringence of poly(trimethylene terephthalate) spherulite, *Polymer*, 47, 1715–1721.

第3章 冷凍-解凍下における油脂の結晶化が O/W エマルションの安定性に及ぼす影響

3.1 はじめに

冷凍食品は、その利便性から家庭用から業務用まで広く利用されていることは周知の事実であるが、近年では O/W エマルション食品（マヨネーズ、ソース、飲料など）も保存性や利便性の向上を目的として冷凍して扱われることが望まれている¹⁻³⁾。しかし、冷凍下では油脂や氷が結晶化するため、O/W エマルションは解凍後に容易に不安定化する^{4,5)}。これまで、冷凍-解凍による O/W エマルションの不安定化機構について様々な報告がなされている。氷の結晶化は、冷凍-解凍による O/W エマルションの不安定化を引き起こす要因であることが知られている。O/W エマルション中に氷結晶が形成されることで生じる変化は、以下の通りである：油滴の凝集、水相のイオン強度の増加、不凍水の pH の変化^{6,7)}。これらの変化は油滴どうしの接触を増加させる。加えて、保存中に氷の再結晶化が起こることによって氷結晶が大きくなり、その結果、油滴の界面膜が破壊される⁸⁾。さらに、氷の結晶化によって油滴界面に吸着した乳化剤が損傷され（タンパク質の変性など）、乳化剤の乳化機能が失われる可能性がある^{9,10)}。また、乳化剤が油滴や氷界面に再分散し、油滴界面の乳化剤が失われることで、O/W エマルションの安定性が低下する¹¹⁾。さらに、O/W エマルションを低温で保存すると、油脂の結晶化によって不安定化することが知られている。油滴内で油脂結晶が核形成、結晶成長し、隣り合う油滴界面を突き破ることを、油脂結晶の部分合一と呼ぶ¹²⁻¹⁵⁾。油脂結晶によって部分合一した油滴は、昇温し油脂結晶が融解すると 1 つの大きな油滴となる。また、O/W エマルションの安定性には、油脂の結晶多形、結晶形態、油滴内の結晶化位置が影響する¹⁶⁾。油脂の結晶多形や結晶形態は、様々な要因に依存して変化する。すなわち、油脂の化学組成や冷却速度、温度変動、せん断応力、油滴粒子径の分布、乳化剤の種類などである¹⁷⁻¹⁹⁾。Boode ら¹⁷⁾は、油水界面にできた大きな結晶、または配向した結晶は、より部分合一を起こしやすいことを報告している。Arima ら^{20,21)}は、油脂の結晶多形と O/W エマルションの安定性の関係性について調べている。彼らは、油相にパーム中融点油脂を用いたエマルションは α 型から β' 型へ多形転移することで不安定化すると考察している。しかし、油脂結晶が O/W エマルションの冷凍-解凍安定性に及ぼす影響（油脂結

晶の位置および配向，結晶形態，結晶多形) は不明である。

そこで本章では，油脂の結晶化挙動（油滴中における油脂の結晶化位置，結晶形態，結晶多形) に着目し，冷凍-解凍による O/W エマルションの不安定化機構を解明することを目的とした。本章では，O/W エマルション食品のモデル系として，マヨネーズ様 O/W エマルションを用いた。実験系を簡単にするために，マヨネーズ様 O/W エマルションには塩や人工的な乳化剤は添加しなかった。また，脂肪酸組成の影響（キャノーラ油：オレイン酸を主に含む，大豆油：リノール酸を主に含む) や保存温度（ -15°C ， -20°C ， -30°C) を変化させることで，油脂の結晶化挙動が O/W エマルションの冷凍-解凍安定性に及ぼす影響について調べた。

3.2 実験試料および実験方法

3.2.1 試料およびマヨネーズ様 O/W エマルションの調製方法

キャノーラ油（日清オイリオ（株）），大豆油（（株）淳子），酢（ミツカン（株）），鶏卵（（株）マルサン）はスーパーマーケットで購入した。ヨウ化銀（純度 99.0%）は Sigma-Aldrich Co. で購入した。

マヨネーズ様 O/W エマルションの組成はキャノーラ油または大豆油 70 wt%，酢 15 wt%，卵黄 15 wt%（油相：水相 = 7:3）とし，1 回あたりの O/W エマルションの作製量は 70 g とした。Fig. 3-1 に，O/W エマルションの調製方法を示す。はじめに，卵黄と酢の半量をガラス製ビーカーに入れ，1,000 rpm で 2 分間攪拌した（スリーワンモータ，BLh1200，新東科学（株））。次に，卵黄と酢の混合溶液を 1,000 rpm で攪拌しながら，キャノーラ油または大豆油をチューブポンプ（ペリスタルティックチューブポンプ，MP-3，東京理化工械（株））を用いて 0.1 ml/s で滴下していった。最後に，残りの酢を加えて，1,000 rpm で 2 分間攪拌を行い，粒子径の大きい予備乳化試料を得た。なお，粒子径の細かい本乳化試料は，予備乳化試料を 13,600 rpm で 3 分間攪拌することで得た（Ultra-Turrax T25 Digital, IKA（株））。キャノーラ油で調製した O/W エマルションを以下，キャノーラ油エマルション，大豆油で調製した O/W エマルションを以下，大豆油エマルションと表記する。

予備乳化試料および本乳化試料の平均粒子径サイズと粒度分布はレーザー回折式粒子径分布測定装置を用いて測定した（SALD-2000J,（株）島津製作所）。Fig. 3-2 に，予備乳化試

料および本乳化試料の粒度分布の代表例を示す。本実験で使用した予備乳化試料の平均粒子径は $12 \pm 3 \mu\text{m}$ ，本乳化試料の平均粒子径は $3.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ であった。なお，実際に商品として流通されているマヨネーズの粒度分布は左右対称の $1\sim 4 \mu\text{m}$ の範囲の分布である²²⁾。本実験では，マヨネーズ様 O/W エマルジョン中の結晶形態を観察しやすくするため，顕微鏡観察のみ予備乳化試料を用い，その他の実験は本乳化試料を用いた。なお，予備実験で予備乳化試料の DSC 測定を行い，予備乳化試料と本乳化試料で結晶化挙動は大きく変化しないことを確認した。作製したマヨネーズ様 O/W エマルジョンは冷蔵庫で保管し，試料作製後 1 か月の間で粒子径が変化しないことを確認した上で，実験には作製後 1 か月以内のマヨネーズ様 O/W エマルジョンを使用した。

3.2.2 示差走査熱量測定 (DSC)

マヨネーズ様 O/W エマルジョンおよび植物油の結晶化および融解挙動は DSC (Thermo Plus 8240, (株) リガク) を用いて調べた。試料 (20 mg) はアルミパンに封入して測定を行った。温度プログラムは， 0°C から -40°C まで $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で冷却， -40°C で 10 分保持後， 10°C まで $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で加熱を行った。結晶化温度はオンセット値，融解温度はピークトップ値によって決定した。また， -15°C で 0, 2, 4, 6 時間保持した大豆油の融解挙動の測定も行った。測定は， -15°C から 0°C まで $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で加熱を行った。測定は各試料で 3 回ずつ行った。

3.2.3 マヨネーズ様 O/W エマルジョンの冷凍-解凍安定性試験

マヨネーズ様 O/W エマルジョンの冷凍-解凍安定性試験は，保存温度 -15°C ， -20°C ， -30°C で行った。 -15°C ， -20°C は冷凍保存中， -30°C は冷凍する際の温度を想定した温度である²³⁾。実験方法は橋岡ら²⁴⁾の方法を参考にして行った。プラスチック製のマイクロチューブ (1.5 mL) に 1 g のマヨネーズ様 O/W エマルジョンを入れ， 20°C に設定した超低温アルミブロック恒温槽 (CS-80CP, (株) サイニクス) の中に入れた。その後，恒温槽を保存温度 (-15°C ， -20°C ， -30°C) まで冷却した。その時の冷却速度はおよそ $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ である。超低温アルミブロック恒温槽の温度が保存温度に達した時を保存 0 時間と設定した。なお，結果で示す「保存 0 時間」とは，超低温アルミブロック恒温槽の温度が冷凍保存温度に到達後，10 分間保持した試料と定義した。10 分間の保持は，試料温度が保存温度に到達するまでの

時間である。一定時間の冷凍保存を行った試料は、25°Cの恒温槽で1時間静置して解凍を行った。その後、冷凍-解凍によって分離した油相を回収するため、遠心分離（2,000 rpm, 5分間, 20°C）にかけて。上層に分離した油はシリンジを用いて採取し、採取した油の重量を測定した。冷凍-解凍によって不安定化した油の割合（以下、不安定化割合：Destabilization rate と呼ぶ）は次の式を用いて算出した。

Destabilization rate (%)

$$= \frac{\text{amount of upper oil layer after freeze - thawing (g)}}{\text{amount of oil phase before freezing}} \times 100$$

さらに、冷却および冷凍保存中のマヨネーズ様 O/W エマルションの温度を測定することで、冷却および冷凍保存中におけるマヨネーズ様 O/W エマルション中の結晶化熱を測定した。試料の入ったマイクロチューブの蓋に穴を空け、その穴に K 型熱電対を挿入してハンディロガー（MR2041-MU, (株) チノー）を用いて試料の温度を測定した。-15°C 保存の試料には、ヨウ化銀を 1 wt% 添加した。これは、氷の結晶化に必要な過冷却が十分でなく、氷の結晶化までの誘導時間に再現性が得られなかったためである。ヨウ化銀を添加したことで氷の結晶化までの誘導時間に再現性がみられた。これによって、いずれの冷凍保存温度でも冷却中に氷が結晶化することを予備実験で確認した。

3.2.4 X 線回折測定 (XRD)

冷凍保存中におけるマヨネーズ様 O/W エマルション中の油脂の結晶多形を調べるため、XRD 測定を行った。試料は X 線回折用セル（内径 (mm) : 12.0 × 20.0 × 0.5）に入れ、測定ステージ上で、室温から冷凍保存温度（-15°C, -20°C, -30°C）まで 2°C/min で冷却し、その後等温保持を行った。測定間隔および測定時間は、マヨネーズ様 O/W エマルションの冷凍-解凍安定性試験から得られた不安定化割合の結果を基に決定した。大豆油エマルションの -20°C 保存でのみ、試料は超低温アルミブロック恒温槽（CS-80CP, (株) サイニクス）で保存し、測定時に測定ステージ上に移動させた。測定時は、試料表面の結露を防ぐため、測定ステージに取り付けたチャンバー内に乾燥窒素を充填させた。

3.2.5 偏光顕微鏡観察 (PLM)

マヨネーズ様 O/W エマルション中の油脂結晶の形態を観察するため、PLM 観察 (BX-51, オリンパス (株)) を行った。試料の温度制御は、顕微鏡用冷却加熱ステージ (LK-600PM, Linkam Scientific Instruments Ltd., Tadworth, U.K.) および顕微鏡用ペルチエ式冷却加熱ステージ (Linkam model 10021, Linkam Scientific Instruments Ltd., Tadworth, U.K.) を用いた。温度プログラムは室温から冷凍保存温度 (-15°C, -20°C, -30°C) まで 2°C/min で冷却を行い、一定時間保持した後、2°C/min で加熱を行った。試料は 2 枚のカバーガラス (18×18 mm および 18 mm φ) で挟んだものを使用した。冷却加熱ステージにはカバーを取り付け、カバー内に乾燥窒素を充填することで、カバーガラス表面の結露を防いだ。なお、本実験の PLM 像は、氷結晶ではなく油脂結晶とみなして結果および考察を述べる。これは、観察された結晶の形態が氷結晶と大きく異なるため²⁵⁾と、試料中の結晶の融解挙動が DSC でみられた油脂結晶の融解挙動と対応していたためである。

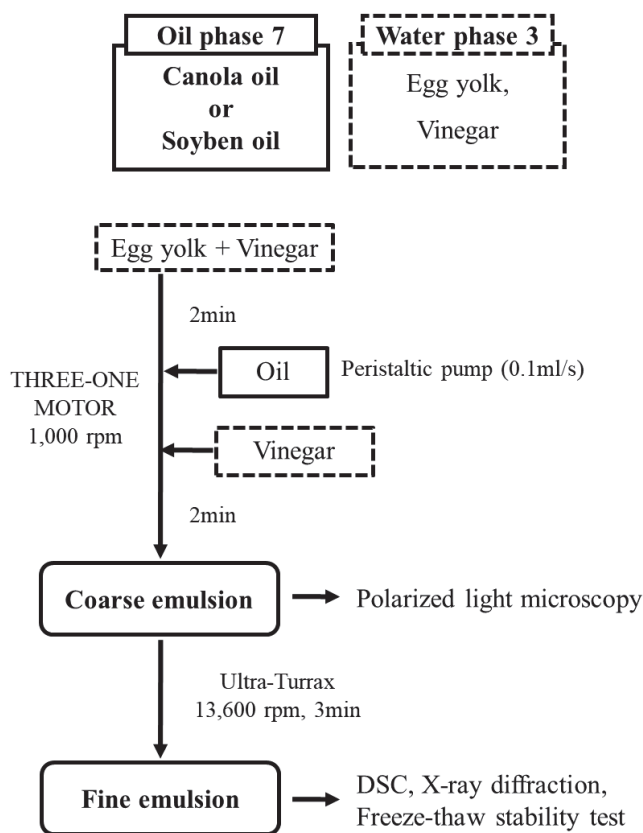


Fig. 3-1 Preparation method of mayonnaise-type O/W emulsion.

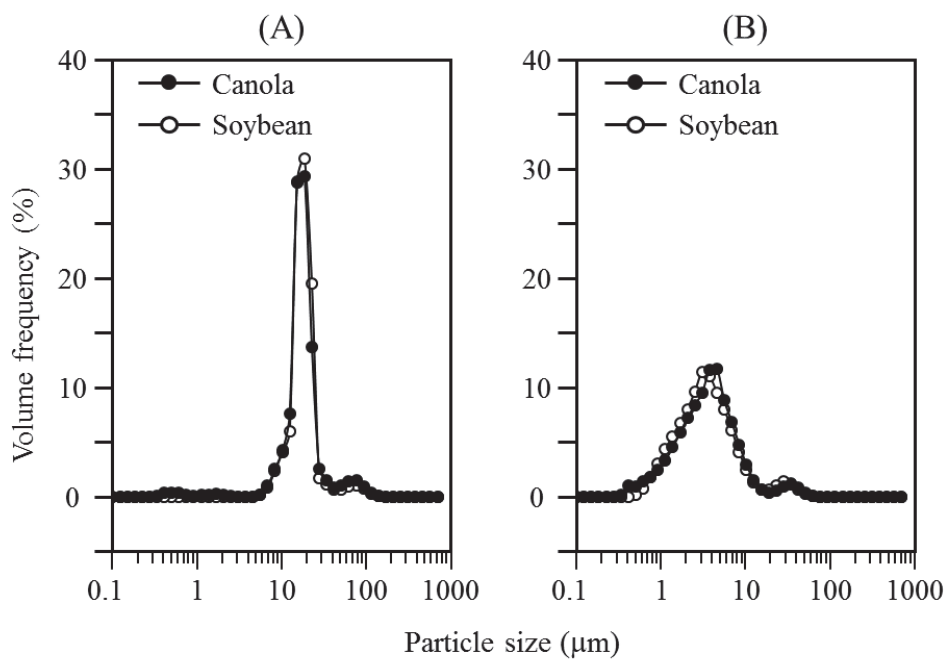


Fig. 3-2 Particle size distributions of canola and soybean emulsions. (A) Coarse emulsion, (B) Fine emulsion.

3.3 結果

3.3.1 マヨネーズ様 O/W エマルションの結晶化および融解挙動

Fig. 3-3 に、0°C から-40°C まで 2°C/min で冷却した際のキャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションの DSC 曲線を示す。キャノーラ油エマルション、大豆油エマルションともに-40°C までの冷却中に 3 つの発熱ピークがみられた。-21.3 ± 3°C でみられたシャープで強度の大きい発熱ピークは、氷の結晶化を示している²⁾。氷の結晶化前と結晶化後にみられた他の 2 つの発熱ピークは油脂の結晶化を示しており、これらの油脂の結晶化の様子は PLM 観察によっても確認されている (3.3.5 参照)。氷の結晶化前の結晶化ピークは、キャノーラ油エマルションでは-20.7 ± 0.5°C、大豆油エマルションでは-12.5 ± 0.1°C で確認され、大豆油エマルションの結晶化エンタルピーはキャノーラ油エマルションの結晶化エンタルピーよりも大きかった。氷の結晶化後は、キャノーラ油エマルションでは-34.9 ± 1.4°C に大きな発熱ピークがみられたが、大豆油エマルションでは-28 ± 2°C にブロードな発熱ピークがみられた。以上の結果から、-40°C までの冷却過程でキャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションは以下の順で結晶化すると考えられる：油脂中の高融点成分の結晶化、氷の結晶化、油脂中の低融点成分の結晶化。Fig. 3-4 に、-40°C から 10°C まで 2°C/min で加熱した際の植物油単体の試料（キャノーラ油および大豆油）とエマルション試料（キャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルション）の DSC 曲線を示す。エマルション試料では、0°C 付近にシャープで大きな吸熱ピークがみられた。これは、氷の融解と考えられる。植物油単体の試料とエマルション試料では氷の融解挙動を除き、融解挙動に大きな違いはみられなかった。キャノーラ油およびキャノーラ油エマルションは-20°C から-5°C にかけて大きな吸熱ピークがみられたが、大豆油では-33.4 ± 1.1°C、-16.7 ± 0.3°C、-0.2 ± 0.2°C に小さな吸熱ピークがみられた。キャノーラ油試料と大豆油試料の吸熱ピークのエンタルピーの違いは、-40°C までの結晶化量の違いを反映し、吸熱ピーク温度の違いは、脂肪酸組成の違いを反映していると考えられる。

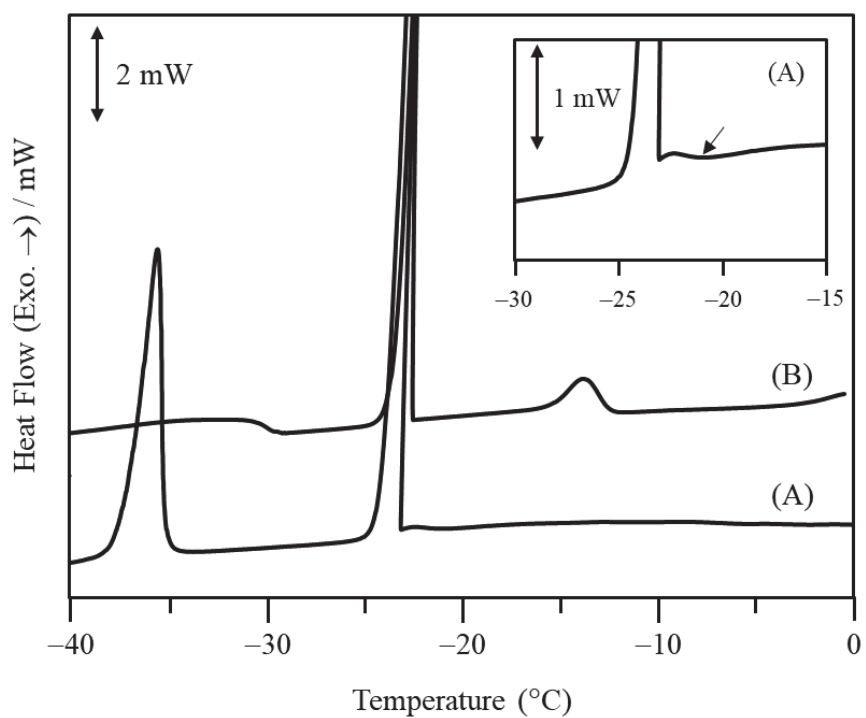


Fig. 3-3 DSC thermograms of (A) canola emulsion and (B) soybean emulsion during cooling at a rate of 2°C/min. Insert presents magnified thermograms of (A) from -15 to -30°C.

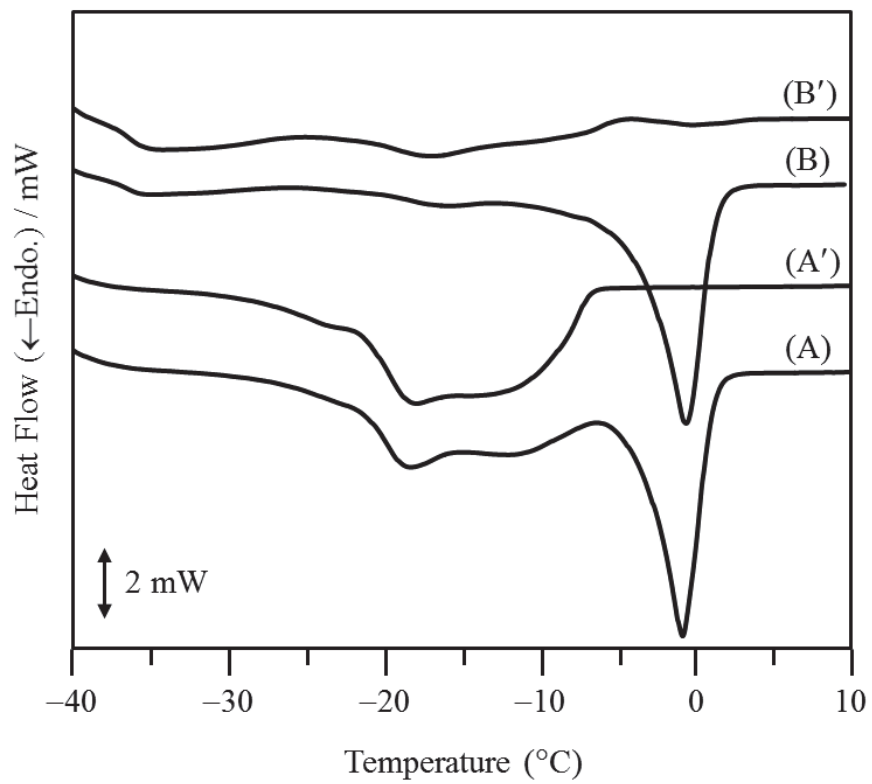


Fig. 3-4 DSC thermograms of (A) canola emulsion, (A') canola oil, (B) soybean emulsion, and (B') soybean oil during heating at a rate of 2°C/min.

3.3.2 マヨネーズ様 O/W エマルションの冷凍-解凍安定性

Fig. 3-5 に、マヨネーズ様 O/W エマルションの冷凍-解凍安定性試験の結果を示す。すべてのマヨネーズ様 O/W エマルションおよび冷凍保存温度において、冷凍温度に到達後に解凍させた試料（保存 0 時間）は安定であった。キャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションは、 -30°C 保存では保存 1 時間の間、 -15°C 保存では保存 4-6 時間の間で不安定化割合が急激に上昇しており、油相の種類による安定性の違いはみられなかった。しかし、 -20°C 保存では、大豆油エマルションは保存 30~42 時間、キャノーラ油エマルションは保存 4~6 時間の間で不安定化割合が上昇しており、大豆油エマルションはキャノーラ油エマルションよりも安定性が顕著に高かった。Table 3-1 に、各冷凍保存温度におけるキャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションの不安定化時間（不安定化割合が急激に増加した時間）をまとめた表を示す。

3.3.3 冷凍保存中のマヨネーズ様 O/W エマルションの温度履歴

冷凍保存中のマヨネーズ様 O/W エマルションの結晶化熱を調べるため、冷凍-解凍安定性試験における試料の温度を測定した。Fig. 3-6 に、冷凍保存中（ -15°C 、 -20°C 、 -30°C ）のキャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションの温度履歴を示す。いずれの試料も -15°C 、 -20°C 保存では、冷凍保存温度に到達する前に温度が急激に上昇した。Fig. 3-6 には示されていないが、その様子は -30°C 保存でもみられた。これらの急激な温度上昇は、氷の結晶化によるものと考えられる。その後、キャノーラ油エマルションでは、冷凍保存中に温度上昇がみられた（Fig. 3-6 に、温度が上昇し始めた点を矢印で示す）。これは油脂の結晶化によるものと考えられる。Table 3-2 に、各冷凍保存温度における油脂結晶化の誘導時間（=温度上昇がみられるまでの時間）をまとめた結果を示す。冷凍保存温度が低いほど誘導時間は短くなり、油脂の結晶化が早く起こった。一方、大豆油エマルションは冷凍保存中に温度は上昇しなかった。これは、大豆油エマルションはキャノーラ油エマルションと比べて油脂の結晶量が少ない、または結晶化速度が遅いことを示唆している。さらに本実験の結果は、DSC でみられたキャノーラ油エマルションと大豆油エマルションの低融点成分の結晶化エンタルピーの違いとも一致していた（Fig. 3-3）。よって、キャノーラ油エマルションの冷凍保存中の温度上昇は、キャノーラ油の低融点成分の結晶化によるものと考えられる。

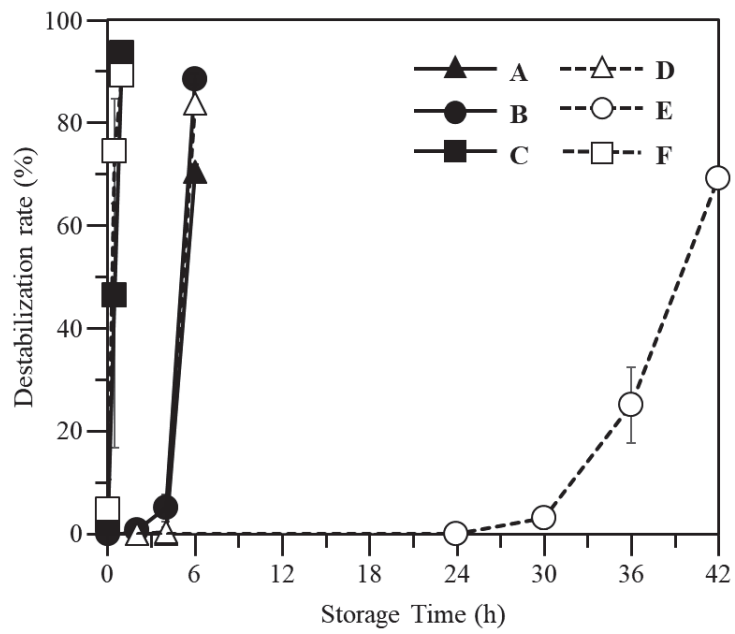


Fig. 3-5 Destabilization rate in the emulsions during storage from 0 to 42 h. (A) -15°C , (B) -20°C , and (C) -30°C of canola emulsions. (D) -15°C , (E) -20°C , and (F) -30°C of soybean emulsions. Error bars are S.D. ($n=4$).

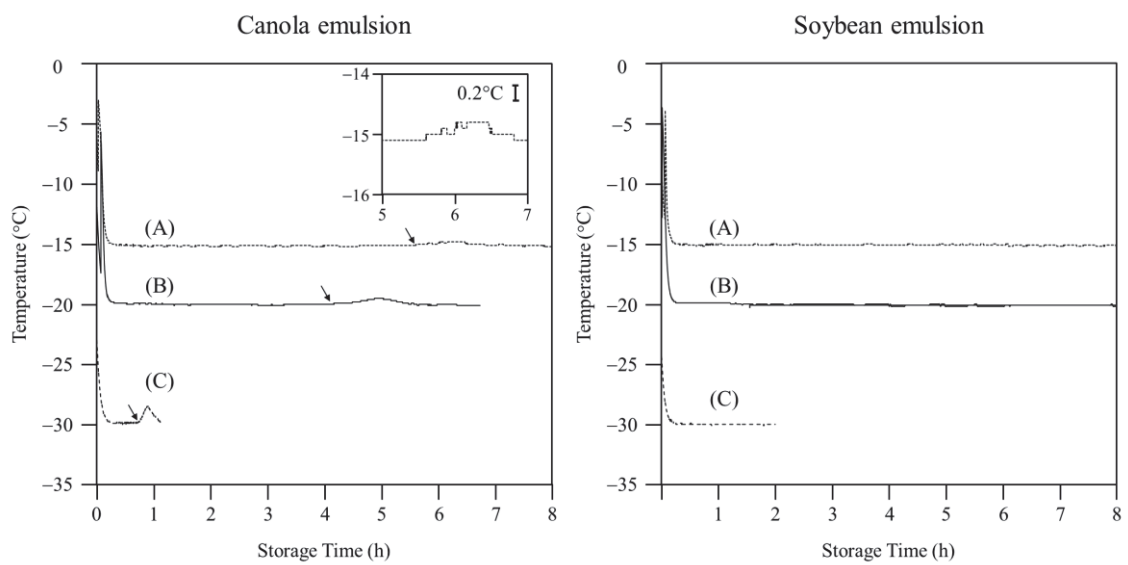


Fig. 3-6 Temperature change of canola and soybean emulsions during storage at (A) -15°C , (B) -20°C , and (C) -30°C . Insert presents magnified curve at -15°C from 5 to 7 h. Arrows indicate the start point of increasing temperature.

Table 3-1 Destabilization periods of canola emulsion and soybean emulsion at -15°C , -20°C , and -30°C .

Storage temperature	Destabilization periods (h)	
	Canola	Soybean
-15°C	4 ~ 6	4 ~ 6
-20°C	4 ~ 6	30 ~ 42
-30°C	0 ~ 1	0 ~ 1

Table 3-2 Induction time of canola emulsion crystallization at -15°C , -20°C , and -30°C .

Storage temperature	Induction time
-15°C	5 h 42 min \pm 6min
-20°C	4 h 4 min \pm 5min
-30°C	42 min \pm 0.6min

Values are given as means \pm SD from triplicate measurements.

3.3.4 冷凍保存中におけるマヨネーズ様 O/W エマルションの油脂の結晶多形

マヨネーズ様 O/W エマルションの冷凍-解凍安定性に対する油脂の結晶多形の影響を調べるため、XRD 測定を行った。冷凍保存時間はマヨネーズ様 O/W エマルションの不安定化時間 (Table 3-1) を基に決定し、冷凍保存中のマヨネーズ様 O/W エマルション中の油脂の結晶多形を経時的に調べた。Fig. 3-7 に、各冷凍保存温度におけるキャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションを XRD で経時的に測定した結果を示す。グレーの実線は、冷凍保存温度 (-15°C, -20°C, -30°C) に到達した直後 (0 時間) のキャノーラ油単体および大豆油単体の X 線回折パターンを示し、黒の実線は、キャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションの X 線回折パターンを示す。キャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションでは、すべての冷凍保存温度、測定時間において氷の結晶化を表す 3 つの強い回折ピーク (0.39 nm, 0.37 nm, 0.35 nm) がみられた。その他の回折ピークは油脂結晶由来による回折ピークと考えられる。

キャノーラ油単体は-20°C と-30°C で sub- α 型を表す 0.42 nm と 0.37 nm の回折ピークがみられたが、-15°C では回折ピークはみられなかった。キャノーラ油エマルションは、いずれの冷凍保存温度でも保存 0 時間後では、氷の結晶化による回折ピークに加えて 0.42 nm に回折ピークがみられた。油脂結晶の sub- α 型および氷の結晶化の回折ピークはいずれも 0.37 nm に回折ピークが出現するが、キャノーラ油単体では sub- α 型で結晶化していたため、エマルションにおいてもキャノーラ油は sub- α 型で結晶化していたと考えられる。また、DSC 測定の結果 (Fig. 3-3) から、キャノーラ油エマルションの高融点成分は $-20.7 \pm 0.5^\circ\text{C}$ で結晶化することがわかっているため、sub- α 型の結晶はキャノーラ油の高融点成分由来と考えられる。キャノーラ油エマルションの-15°C 保存では、保存 0 時間後に sub- α 型 (0.42 nm) の弱い回折ピークがみられたが、その回折ピークは保存 2 時間後には消失していた。さらに、保存 6 時間後は β' 型 (0.43 nm, 0.41 nm) と β 型 (0.52 nm, 0.46 nm) が出現し、 β 型の回折強度は保存 8 時間後に増加していた。キャノーラ油エマルションの-20°C 保存では、冷凍保存中に 0.42 nm の回折ピークが消失し、0.43 nm に弱い回折ピークが出現した。これは、sub- α 型から β' 型に多形転移した、または保存中に β' 型の結晶化が起こったことを意味している。保存 4 時間後には、 β 型 (0.52 nm, 0.46 nm) の回折ピークが出現し、

β 型の回折強度は、保存 6 時間後に増加していた。キャノーラ油エマルションの -30°C 保存では、 0.42 nm の sub- α 型の回折ピークに加え、保存 0.5 時間後には β' 型 (0.44 nm , 0.42 nm) と β 型 (0.45 nm) の回折ピークが出現した。 β' 型および β 型の結晶は、キャノーラ油の低融点成分由来と考えられる。これは、キャノーラ油の高融点成分は保存 0 時間後で既に sub- α 型で結晶化しているためである。

キャノーラ油エマルションと同様、大豆油エマルションはすべての冷凍保存温度で保存直後 (0 時間後) では sub- α 型 (0.42 nm , 0.37 nm) で結晶化していた。DSC 測定の結果 (Fig. 3-3) では、 $-12.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ で大豆油の高融点成分が結晶化していたため、sub- α 型で結晶化したものは大豆油の高融点成分由来と考えられる。大豆油エマルションの -15°C 保存では、sub- α 型の X 線回折ピーク (0.42 nm) は保存 2~6 時間、 -20°C 保存では、保存 24~42 時間間に消失していった。それらに伴い、回折ピーク強度は小さいが、 β' 型および β 型を表す 0.43 nm と 0.45 nm に新たな回折ピークが出現した。これらの結果は、大豆油エマルションの不安定化が起きる間に大豆油結晶の多形転移が起きていることを意味している。一方、大豆油エマルションの -30°C 保存では、不安定化時間間に X 線の回折パターンや回折ピーク強度に変化はみられなかった。

XRD 測定では、大豆油エマルションの -15°C 保存と -20°C 保存でみられた β' 型および β 型の回折ピーク強度は小さかった。そこで、冷凍保存中に大豆油結晶の多形転移が起きているかどうかを確認するため、DSC 測定を行った。大豆油を -15°C まで冷却し、0, 2, 4, 6 時間保存した後、昇温させる過程の DSC 曲線を得た。大豆油エマルションではなく大豆油のみを用いた理由は、大豆油結晶の融解ピークの一部と氷の融解ピークが重なるためである。また、エマルション試料と油単体の試料で DSC の融解曲線に大きな違いはなかったことから (Fig. 3-4)、本実験では大豆油を試料として用いた。大豆油を -15°C で保存した場合、冷凍保存時間の増加に従って大豆油結晶の融点が上昇することがわかった (Fig. 3-8)。すなわち、大豆油を -15°C で 0 時間保存した場合、 -10°C 付近にブロードな融解ピークが 1 つみられていたのに対し、冷凍保存時間が長くなるに従って、 -10°C 付近の融解ピークが小さくなり、 0°C 付近に新たな融解ピークが出現し、融解エンタルピーが大きくなっていった。結晶は安定な多形ほど融点が高くなることから、冷凍保存中に大豆油結晶の多形転移が起きたと考えられる。大豆油結晶の融点の上昇は -15°C でのみ確認したが、 -20°C 保存では大豆油

の融点から大きく離れているため、 -15°C 保存と比べて多形転移が著しく抑制されていると考えられる。

3.3.5 冷凍保存中におけるマヨネーズ様 O/W エマルションの油脂の結晶形態観察

Fig. 3-9 に、キャノーラ油エマルションを -15°C 、 -20°C 、 -30°C で冷凍保存した際の PLM 像を示す。 -15°C 保存では、保存 0 時間後にキャノーラ油エマルション中に油脂結晶は観察されなかったが、 -20°C 保存および -30°C 保存では、顕微鏡視野内に小さな油脂結晶が所々に観察された。これらの結晶は、キャノーラ油の高融点成分由来と考えられる。冷凍保存時間の経過に伴い、キャノーラ油の結晶化が徐々に進行していき、最終的にはすべての冷凍保存温度において視野全体に結晶が観察された。結晶化が進行していく様子は -15°C 保存では保存 6~8 時間、 -20°C 保存では保存 4~6 時間、 -30°C 保存では保存 40~60 分の間でみられた。これは XRD 測定の結果とも一致していた。

キャノーラ油エマルションで観察された結晶の形態は冷凍保存温度によって異なっていた。すなわち、 -15°C 保存では針状結晶、 -20°C 保存では球晶状の結晶、 -30°C 保存では細かい粒状の結晶であった。さらに、 -15°C 保存および -20°C 保存では油脂結晶が部分合一する様子が観察された (Fig. 3-10)。すなわち、 -15°C 保存では保存時間の経過に伴い、針状結晶が真っすぐ伸びていき、針状結晶が油滴を突き破りながら成長していく様子が観察された。また、 -20°C 保存では球晶状の結晶が放射状に成長していきながら油滴界面を突き破っていた。 -20°C 保存では、 -15°C 保存とは異なり、油滴界面で結晶成長が抑制されている様子が観察された。すなわち、結晶が油滴界面を突き破った後、扇状に広がって成長していた。そのため、 -20°C 保存では油滴界面で結晶成長の方向が変化したと考えられる (Fig. 3-10 に矢印で示す)。これまでココアバター代用脂を用いた O/W エマルションで油脂結晶の部分合一が観察されていたが¹³⁻¹⁵⁾、マヨネーズのような実際の食品をモデルとした O/W エマルションで部分合一が観察された例は本実験が初めてである。Fig. 3-11 に、部分合一したキャノーラ油エマルションが、結晶の融解に伴って合一していく様子を示す。PLM 像 (Fig. 3-11, 下段) では、 -15°C から -8°C の間で針状結晶が融解していく様子が観察され、偏光なしの顕微鏡写真 (Fig. 3-11, 上段) では、針状結晶が存在していた部分のみ、油滴の合一が起き

ていることが確認された。よって、キャノーラ油エマルジョンを -15°C 、 -20°C で保存した場合、冷凍保存中に生じる油脂結晶が部分合一を起こすことで不安定化することがわかった。一方、 -30°C 保存では、油滴内に油脂が結晶化する様子が観察されたが、その結晶は -15°C 保存や -20°C 保存で観察された結晶と比べて微細であった。そのため、 -30°C 保存では油脂結晶が油滴界面を突き破る様子を観察することはできなかった (Fig. 3-9)。しかし、結晶化は個々の油滴で独立して起こっているのではなく、隣り合う油滴へと伝播しながら進行していた (Fig. 3-12)。このことは、 -30°C 保存でも油脂結晶の部分合一が起こっていることを示唆している。以上の結果から、キャノーラ油エマルジョンはいずれの冷凍保存温度でも油脂結晶の部分合一が起こっていると考えられる。

大豆油エマルジョンでは、いずれの冷凍保存温度でも、保存0時間後から油滴界面に沿った油脂結晶が観察された (Fig. 3-13)。大豆油や乳化剤として働く卵黄は、いずれも高い融点を有するパルミチン酸を含む²⁶⁾。そのため、大豆油エマルジョンの油滴界面で油脂が結晶化した可能性がある。 -15°C 保存および -20°C 保存では、冷凍保存時間の経過に伴い、油脂結晶の明度が低下していく様子が観察された。この結果は、冷凍保存時間の経過に伴い、 0.42 nm の回折強度が低下していったXRD測定の結果 (Fig. 3-7, 大豆油エマルジョン (A, B))と一致していた。最終的に、 -15°C 保存の6時間後には油脂結晶は観察されなくなった。一方で、大豆油を -15°C で0~6時間保存した際の融解挙動を測定したDSCの結果 (Fig. 3-8)では、冷凍保存時間の経過に伴い、大豆油結晶の多形転移が進行していた。以上の結果をまとめると、PLM観察やXRD測定では大豆油結晶の経時変化を追うことはできなかったが、DSCの結果より、大豆油エマルジョンの油滴界面の油脂結晶は、冷凍保存時間の経過に伴い、より安定な多形に転移したと考えられる。一方、 -30°C 保存では、大豆油エマルジョンの冷凍-解凍安定性試験から求めた不安定化時間の間に結晶量や結晶形態が変化する様子は観察されなかった。このことは、油脂の結晶量が増加し、部分合一を起こしたことで不安定化したキャノーラ油エマルジョンや、油脂結晶の明度が低下し、多形転移が起きていた大豆油エマルジョンの -15°C 保存および -20°C 保存の挙動とは異なることを示している。

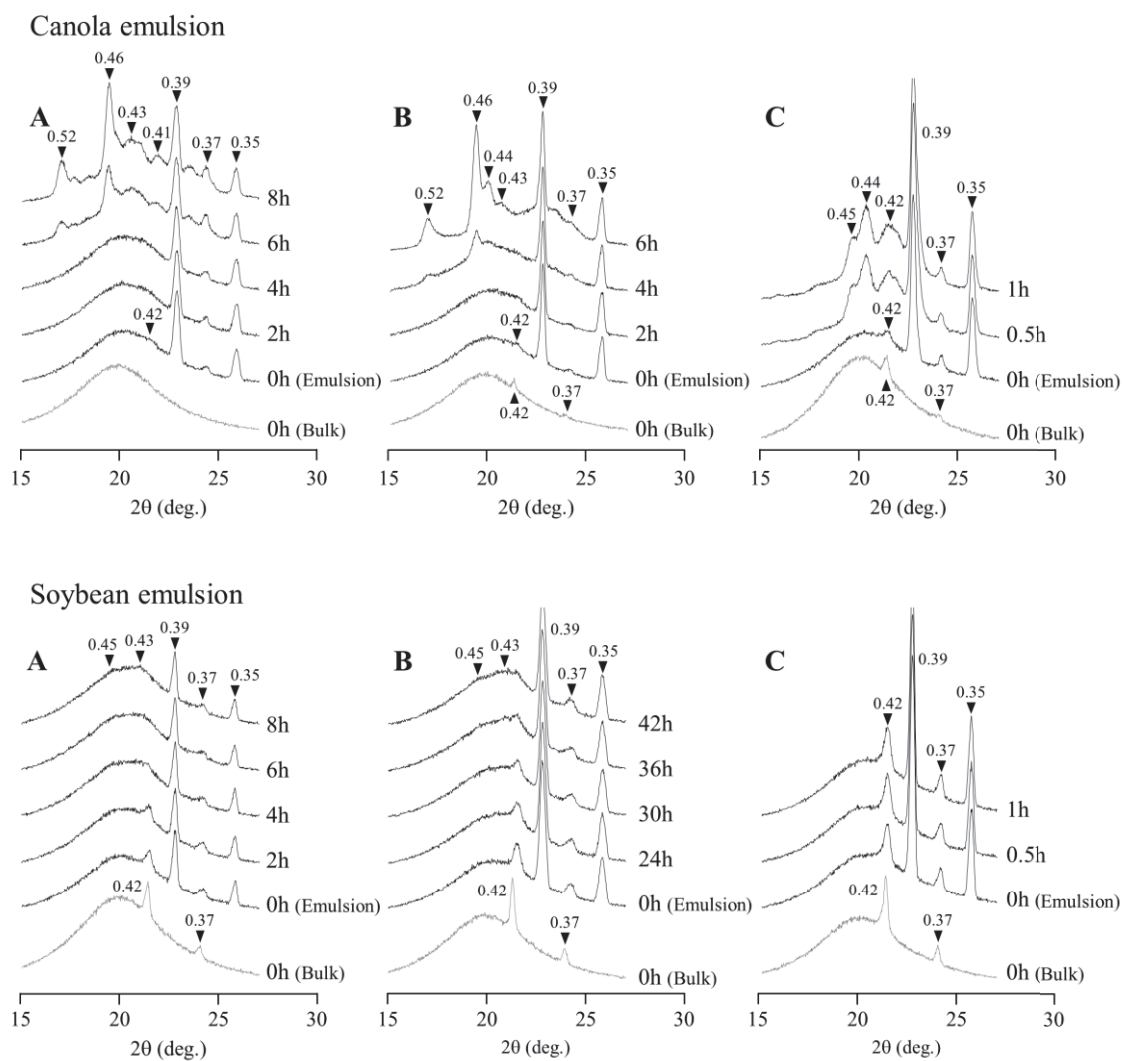


Fig. 3-7 XRD patterns of canola and soybean emulsions and canola and soybean oils during storage at (A) -15°C , (B) -20°C and (C) -30°C . Solid lines represent the emulsions, and gray lines represent the bulk oils. Unit: nm.

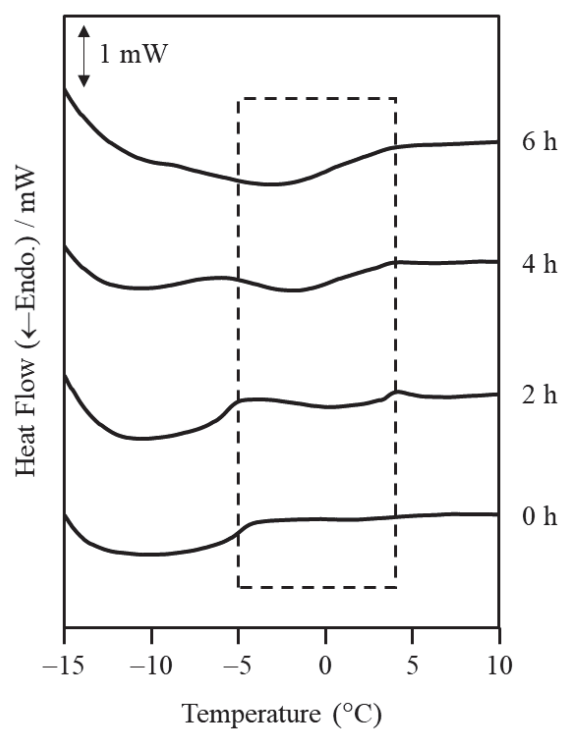


Fig. 3-8 DSC thermograms of soybean oil after storage at -15°C for 0 to 6 h during heating at a rate of $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Melting enthalpy in the dashed box increased with storage time.

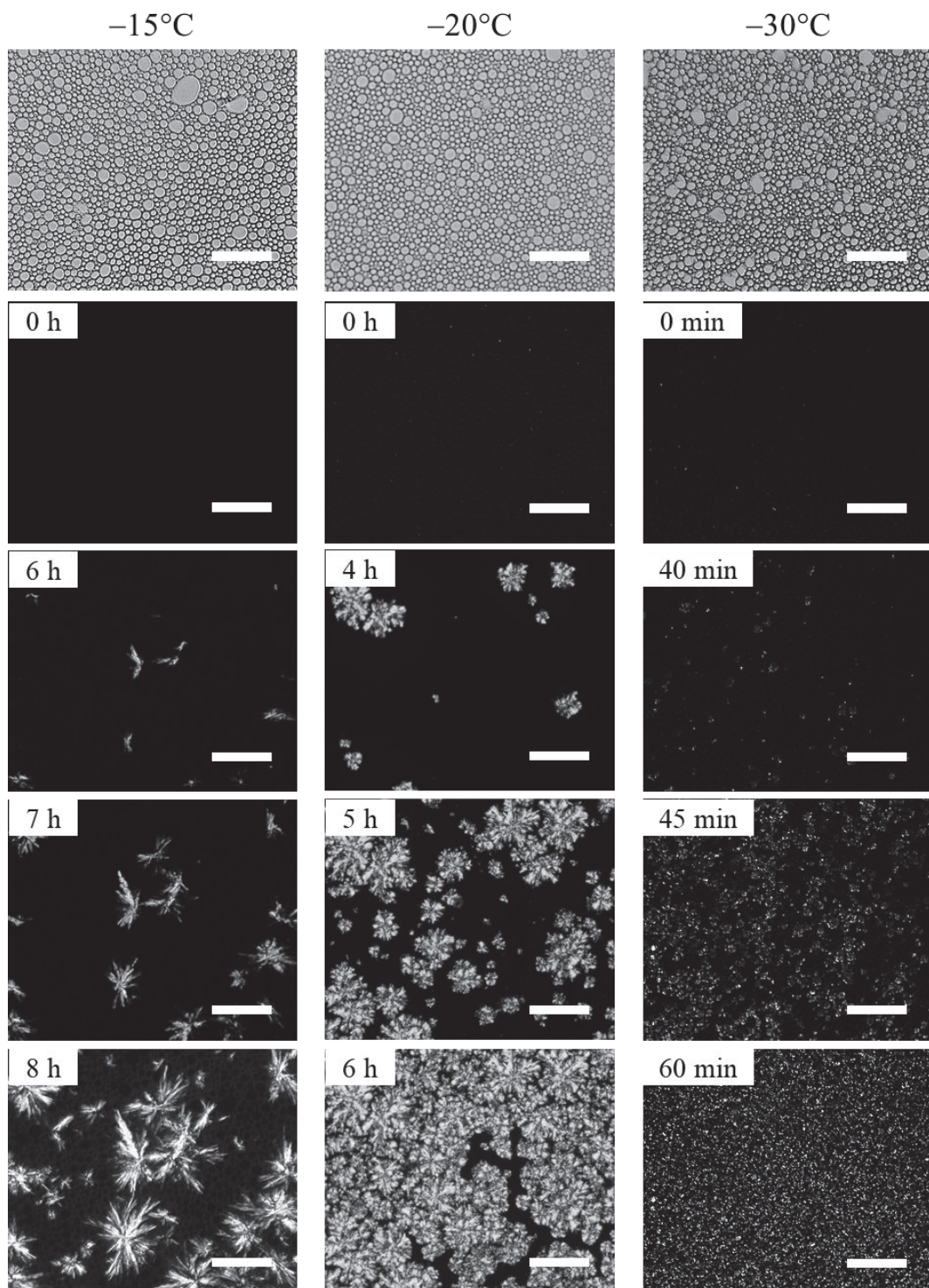


Fig. 3-9 Microscopic images of canola emulsion during storage at -15 , -20 , and -30°C . Scale bar is $100\ \mu\text{m}$. Upper images were taken using an optical microscope, and others were taken using a PLM.

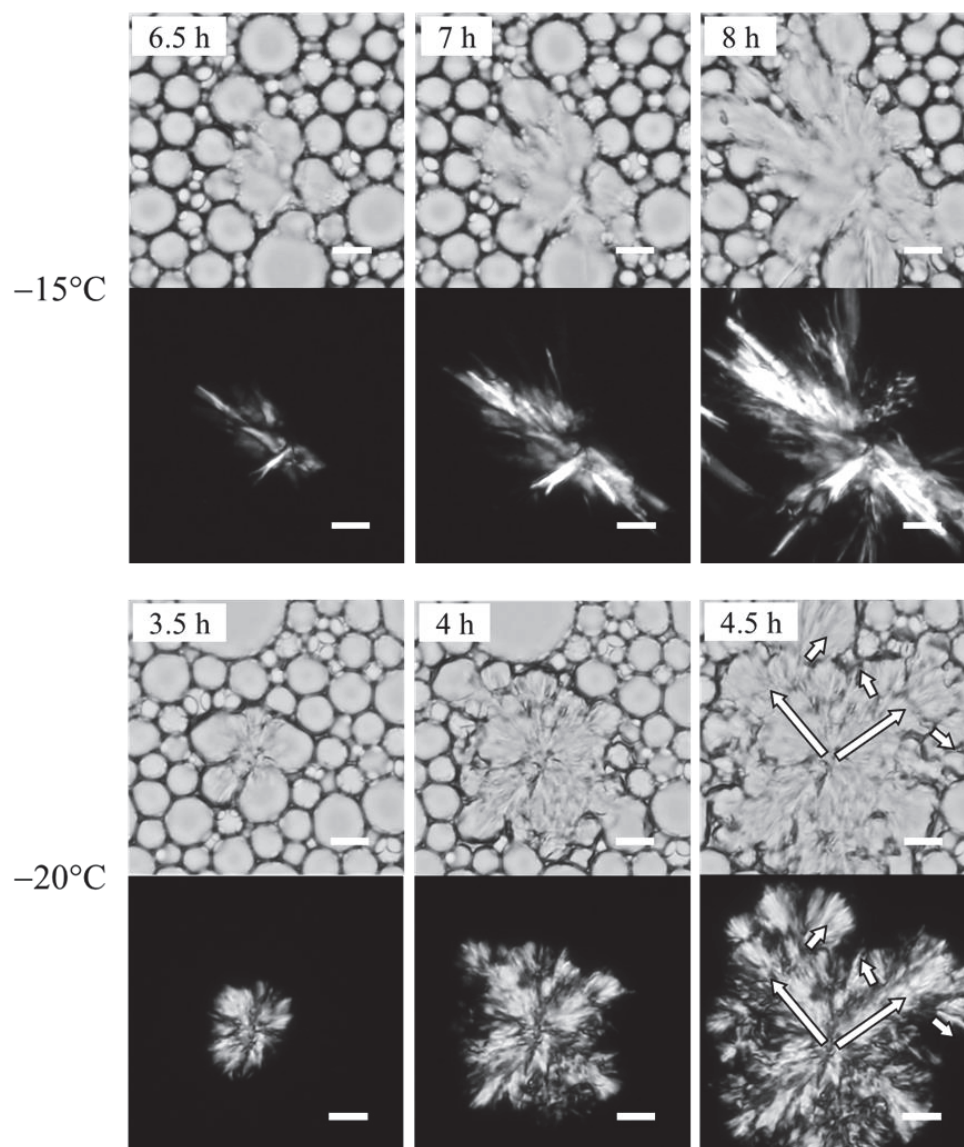


Fig. 3-10 Magnified images of canola emulsion during storage at -15 and -20°C . Scale bar is $10\ \mu\text{m}$.

Upper images were taken using an optical microscope, and lower images were taken using a PLM.

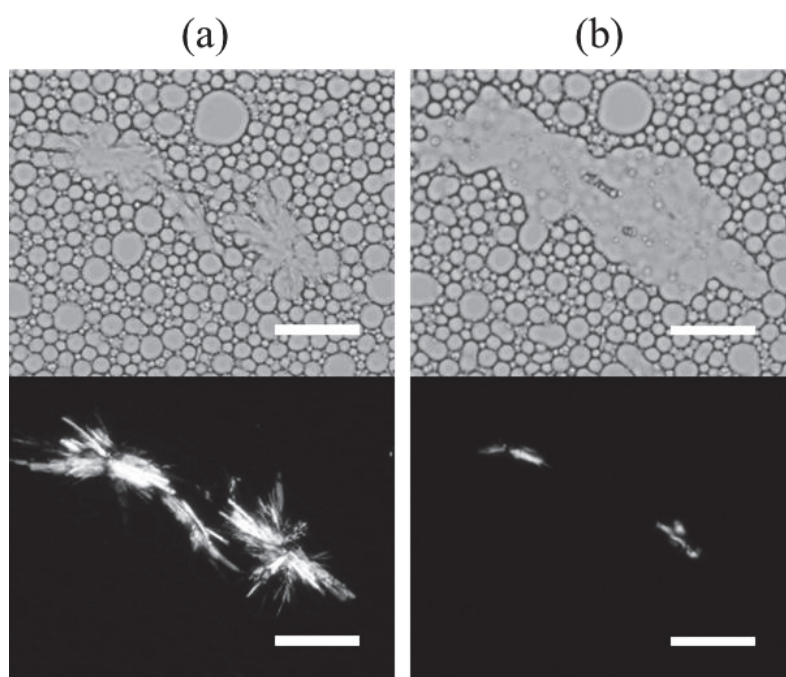


Fig. 3-11 Melting of fat crystals in the canola emulsion during heating at (a) -15°C and (b) -8°C . Scale bar is $50\ \mu\text{m}$. Upper images were taken using an optical microscope, and lower images were taken using a PLM.

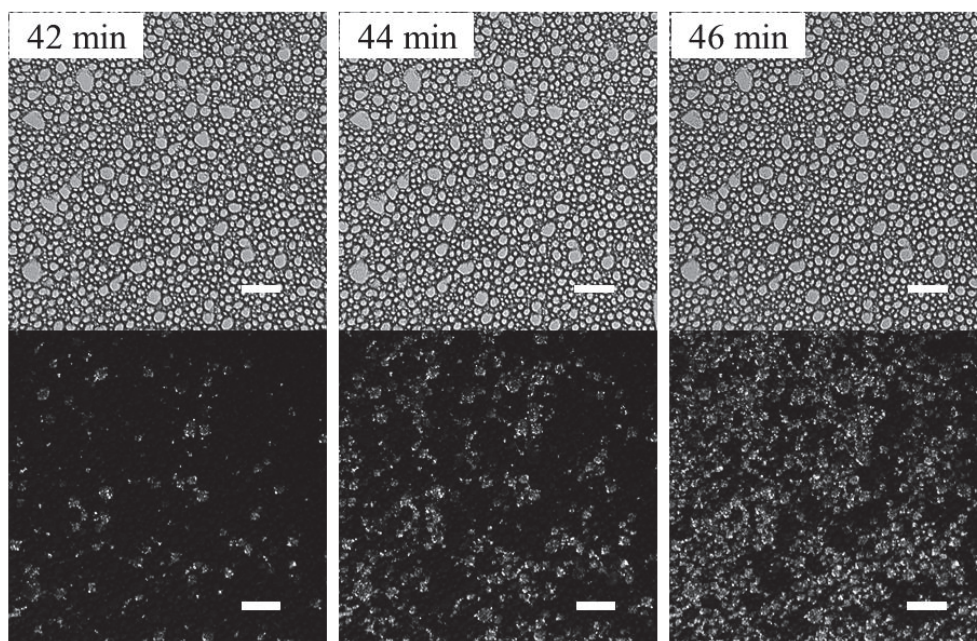


Fig. 3-12 Magnified images of canola emulsion during storage at -30°C . Scale bar is $50\ \mu\text{m}$. Upper images were taken using an optical microscope, and lower images were taken using a PLM.

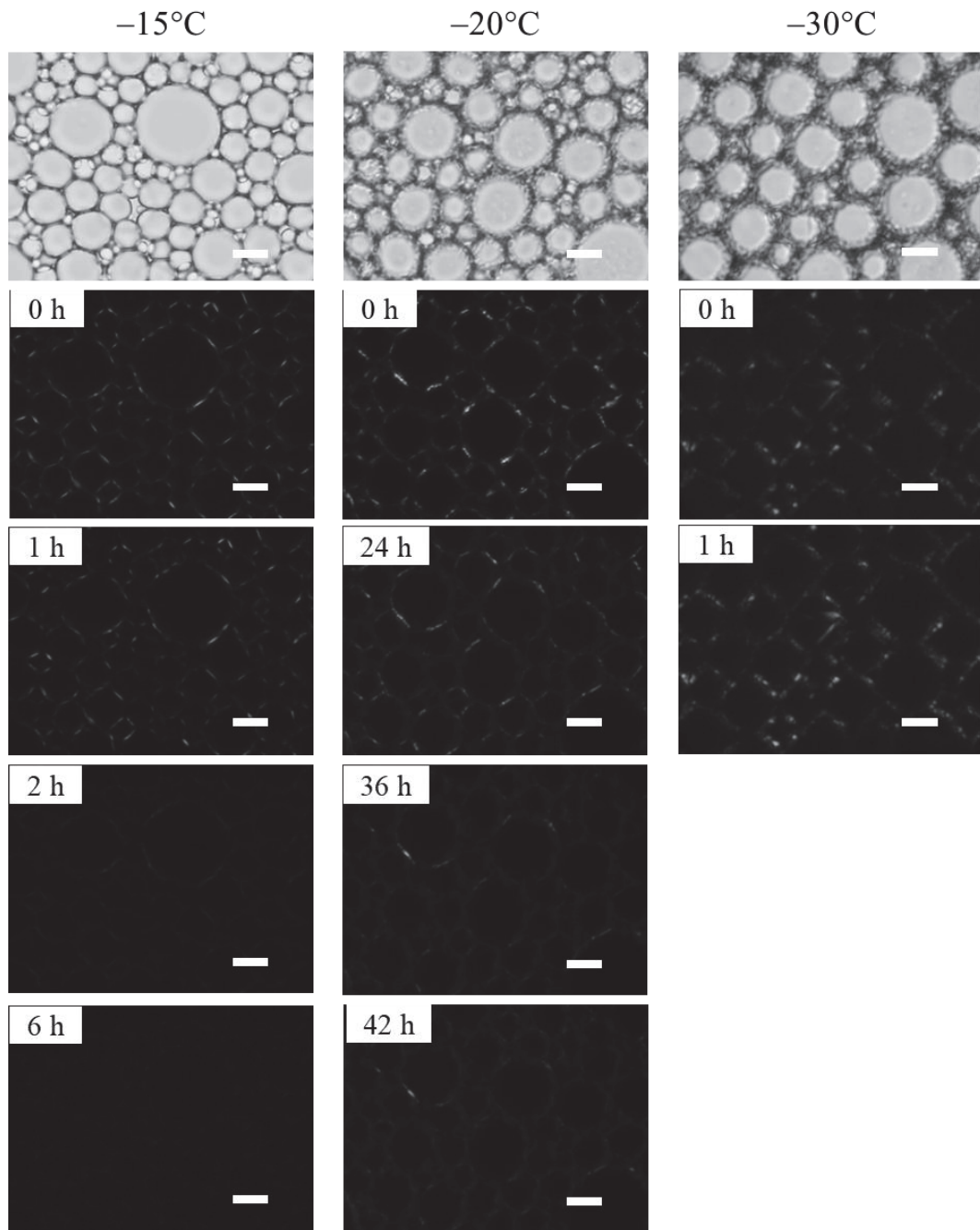


Fig. 3-13 Microscopic images of soybean emulsion during storage at -15, -20, and -30°C. Scale bar is 10 µm. Upper images were taken using an optical microscope, and others were taken using a PLM.

3.4 考察

本章では、異なる冷凍保存温度におけるマヨネーズ様 O/W エマルションの冷凍-解凍安定性および不安定化要因を調べた。その結果、油相に大豆油を用いたエマルションを -20°C で保存した場合に最も冷凍-解凍安定性が高くなったが、その他の冷凍保存温度およびキャノーラ油エマルションでは、すべて保存 6 時間以内に不安定化した。過去の研究から、冷凍下における氷や油脂の結晶化は O/W エマルションの安定性に大きく影響することが報告されている^{4,5)}。本章の結果では、冷凍保存温度に到達した直後である保存 0 時間では、キャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションは安定であった。よって、冷却過程で生じる氷および油脂の結晶化はマヨネーズ様 O/W エマルションを不安定化させないことがわかった。過去の研究では、氷と油脂の結晶化の順序によって O/W エマルションの安定性が変わると報告されているが、未だ一貫した見解は得られていない²⁷⁻²⁹⁾。すなわち、氷の結晶化前に油脂の結晶化が起こると安定化する、あるいは不安定化することが報告されている。本章の DSC の結果 (Fig. 3-3) では、油脂の高融点成分が結晶化した後に、氷が結晶化していた。よって、氷よりも先に結晶化した高融点成分の油脂結晶が、氷の結晶化から油滴の崩壊を保護した可能性がある。

続いて、マヨネーズ様 O/W エマルションの冷凍-解凍不安定化機構について考察する。Fig. 3-14 に、キャノーラ油エマルションおよび大豆油エマルションの冷凍保存中における油脂の結晶化挙動をまとめた模式図を示す。まずキャノーラ油エマルションでは、キャノーラ油エマルションの不安定化時間とキャノーラ油の低融点成分の結晶化の誘導時間がほぼ一致していたことがわかった (Tables 3-1, 3-2)。さらに、XRD 測定や PLM 観察からも、キャノーラ油エマルションの不安定化時間の間に油脂の結晶量が急激に増加することがわかっている。さらに DSC によって、キャノーラ油エマルションには、高融点成分の結晶よりも低融点成分の結晶が多く含まれていることを確認している (Fig. 3-3)。以上のことから、キャノーラ油エマルションの不安定化の主要因は、キャノーラ油の低融点成分の結晶化であると考えられる。また、XRD 測定では、キャノーラ油の高融点成分の結晶は sub- α 型を示していた。 -15°C 保存および -20°C 保存では、保存中に sub- α 型の回折パターンの強度が消失していった。これは、冷凍保存中に sub- α 型の油脂結晶がより安定な多形に転移したためだと考えられる。しかし、キャノーラ油エマルションにおいて、sub- α 型の油脂結晶の多

形転移は不安定化を促進しないと考えられる。これは、キャノーラ油エマルションの -20°C 保存では保存4時間後に β' 型の油脂結晶が出現したが、冷凍-解凍安定性試験では安定であった。加えて、PLM観察では、針状結晶または球晶状の結晶が油滴を突き破りながら成長していく様子が観察されている (Fig. 3-10)。 -15°C 保存および -20°C 保存で観察された油脂結晶の形態は異なっていたが、結晶多形はいずれも β' 型と β 型を示していた。結晶多形が同じであっても、異なる結晶形態を有していたことは、過飽和度の違いによるものと考えられる。一般的に、温度が低いほど過飽和度は高くなり、核形成頻度は上がる。すなわち、 -20°C 保存は -15°C 保存よりも過飽和度が高く、核形成が多く生じる。ゆえに、 -20°C 保存では枝分かれした球晶状の結晶になり、 -15°C 保存では枝分かれの少ない針状結晶が得られたと考えられる。また、 -20°C 保存は核形成頻度が高いため、核形成後の油滴内の過飽和度は -15°C 保存よりも -20°C 保存で大きく低下すると考えられる。そのため、 -20°C 保存の結晶成長速度は低下し、隣接する油滴から様々な向きで結晶成長したと考えられる。一方、 -30°C 保存では、結晶サイズが小さいため、結晶が油滴界面を突き破る様子は観察できなかった。しかし、微細な結晶が隣り合う油滴に伝播しながら結晶化していたため、油脂結晶の部分合一が起きていたと考えられる。また -30°C 保存では、キャノーラ油の低融点成分の結晶化の前に、高融点成分の結晶化も観察された。高融点成分の結晶は、個々の油滴に独立して存在しており、結晶量も少なかったことから、高融点成分の結晶化はキャノーラ油エマルションの不安定化に影響していないと考えられる。

一方、大豆油エマルションでは、冷凍保存中に油脂の結晶量は増加せず、低融点成分の結晶化は起こらなかったと考えられる。よって、大豆油エマルションの不安定化機構はキャノーラ油エマルションとは異なると推察される。大豆油エマルションの油脂結晶は油滴界面に沿っており、キャノーラ油エマルションよりも結晶量は少なかった (Fig. 3-13)。大豆油の高融点成分の結晶多形は、キャノーラ油と同様に $\text{sub-}\alpha$ 型であった。大豆油の高融点成分の結晶は、冷凍保存温度に到達直後 (0時間) から観察されたが、大豆油エマルションは安定であった。しかし、冷凍保存中に、XRD測定ではX線回折パターンが変化し (Fig. 3-7)、PLM観察では結晶の明度が低下 (Fig. 3-13) したことから、大豆油の高融点成分の結晶は冷凍保存中に多形転移したと考えられる。さらに、冷凍保存時間の経過に伴う大豆油の融点の変化を測定したDSCの結果 (Fig. 3-8) から、冷凍保存時間の経過に伴い、大豆油の融点

が上昇していることが確認された。このことは、大豆油結晶が冷凍保存中に多形転移したことを支持している。大豆油エマルジョンで油脂結晶の多形転移が起こったとき、油脂の結晶量は変化しなかったにもかかわらず、大豆油エマルジョンは不安定化した。大豆油の高融点成分の結晶は油滴界面に沿って存在していたことから、油滴界面で油脂結晶の多形転移が起きたと考えられる。多形転移によって向きの異なる新たな安定多形が核形成、結晶成長することで油脂結晶が油滴界面を突き破り、部分合一を起こしたことで不安定化したと推察される。以上のことから、大豆油エマルジョンでは冷凍保存中に油脂結晶量の増加は起こらないものの、油脂結晶の多形転移によって不安定化すると考えられる (Fig. 3-14)。一方で、大豆油エマルジョンの -30°C 保存は、不安定化時間である 1 時間の間に多形転移および結晶量の増加はみられなかった。この結果は、大豆油エマルジョンの -30°C 保存では、油脂結晶の多形転移や油脂の結晶量の増加とは異なる要因で不安定化したことを示している。低密度リポタンパク質 (LDL) は卵黄の主要成分であり、卵黄の乳化機能を担う成分である³⁰⁾。乳化の際、LDL は油滴界面で崩壊した後、タンパク質やリン脂質が油滴界面に吸着し、O/W エマルジョンを安定化させる³¹⁾と考えられるが、 -30°C 保存では、タンパク質やリン脂質が O/W エマルジョンの安定化に作用しなかったと考えられる。油滴界面のタンパク質と結合した水分子はタンパク質の 3 次元構造を維持するために重要な役割を果たし、この結合水の凝固点は自由水よりも低い。しかし、 -30°C といった低温では結合水が凝固し、結合していたタンパク質から解離することが考えられる。その結果、タンパク質は自身の構造を維持することができず、タンパク質の乳化機能が失われたと考えられる³²⁾。また、大豆油エマルジョンが -30°C 保存で不安定化した要因として、解凍中に油脂結晶の多形転移が起きた可能性がある。大豆油を -40°C まで冷却し、その後 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温を行った DSC の結果では、 $-0.2 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ に融解ピークがみられた (Fig. 3-4)。一方で、 -15°C まで冷却し、保持を行わず (保存 0 時間) その後 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温を行った DSC の結果では、 $-0.2 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ に対応する融解ピークはみられなかった (Fig. 3-8)。これらの結果は、 -40°C まで冷却、昇温を行った場合に多形転移が起きたことを意味している。

マヨネーズ様 O/W エマルジョンの冷凍-解凍安定性試験の結果から、 -20°C 保存において、大豆油エマルジョンは高い冷凍-解凍安定性を有することがわかった (Fig. 3-5)。この結果は、マヨネーズ様 O/W エマルジョンを -25°C で保存して安定性試験を行った Magnusson ら

2)の結果や 70 wt%の油相を含む O/W エマルションを -20°C で保存した Harada ら³³⁾の結果と一致していた。本章の結果では、キャノーラ油エマルションの -20°C 保存の場合、 -15°C 保存よりも低融点成分の結晶化が早く起こったが、大豆油エマルションの -20°C 保存の場合、 -15°C 保存と比べて大豆油結晶の多形転移が抑制されたため、安定性が顕著に高かったと考えられる。また、 -30°C 保存の場合、キャノーラ油エマルションと大豆油エマルションの安定性は同じであった。これは、 -30°C 保存では油相の種類にかかわらず、氷の結晶化やタンパク質の変性などの不安定化要因が影響している可能性がある。

キャノーラ油エマルションと大豆油エマルションの油脂の結晶化量はキャノーラ油と大豆油の脂肪酸組成に依存していると考えられる。キャノーラ油に含まれる主要脂肪酸はオレイン酸であるが、大豆油に含まれる主要脂肪酸はリノール酸である²⁶⁾。オレイン酸の融点はリノール酸の融点よりも高いため、キャノーラ油エマルションでのみ低融点成分が結晶化したと考えられる。Miyagawa ら³⁴⁾は、大豆油の低融点成分の融点はキャノーラ油の融点よりも低いことを報告している。Magnusson ら²⁾は、オレイン酸を多く含む油はマヨネーズ様 O/W エマルションの安定性を低下させることを報告している。一方で、大豆油はキャノーラ油よりもパルミチン酸とステアリン酸といった高融点の脂肪酸が多く含まれている。このことは、DSC の結果とも一致していた (Fig. 3-3)。よって、大豆油エマルションでのみ観察された油滴界面に沿った油脂結晶は、高融点脂肪酸由来の結晶だと考えられる。以上のことから、油相に含まれる脂肪酸組成の違いがマヨネーズ様 O/W エマルションの不安定化に大きく影響すると考えられる。

本章の結果を基に、油脂の結晶化による O/W エマルションの不安定化を抑制するために留意する 3 点を以下に挙げる：(1) 油脂の結晶量を増加させないこと。すなわち、低融点の油脂を用いる、あるいは油脂が結晶化しない冷凍保存温度を選ぶこと。(2) 油滴界面に油脂を結晶化させないこと。すなわち、乳化剤などの結晶化調整剤の使用や冷却速度等の結晶化条件を検討すること。(3) 油脂結晶の多形転移を抑制すること。本実験では、油滴界面の油脂結晶が多形転移することで不安定化したと説明したが、Arima ら^{20,21)}は多形転移によって油脂が結晶成長し、不安定化したと述べている。そのため、油滴内の油脂の結晶化位置に関わらず、油脂結晶の多形転移は不安定化と密接に関係していると言える。よって、冷凍保存温度や多形転移を抑制する乳化剤等の使用を検討する必要がある。

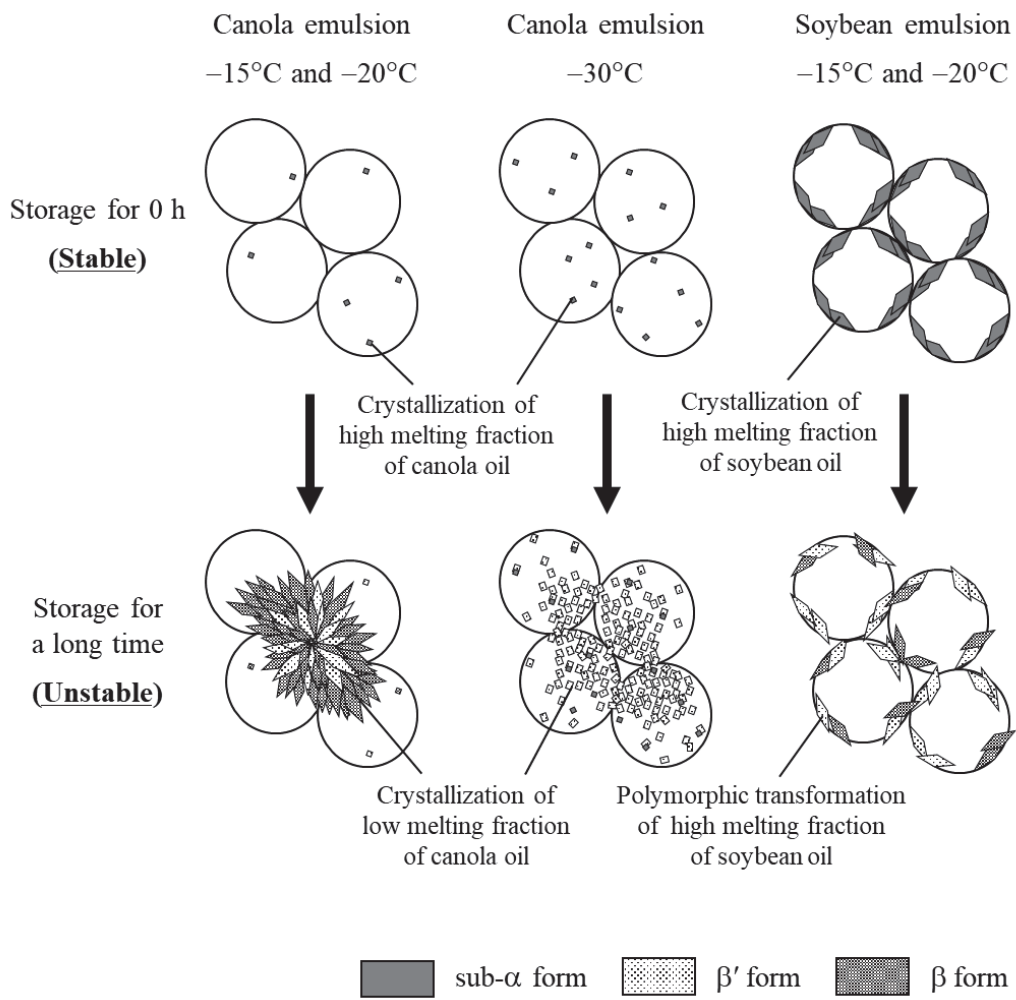


Fig. 3-14 Schematic illustration of destabilization mechanisms of canola and soybean emulsions by freeze-thawing.

3.5 まとめ

本章では、油相にキャノーラ油と大豆油を用いたマヨネーズ様 O/W エマルションの冷凍-解凍安定性に対する油脂結晶化の影響を明らかにすることを目的にして実験を行った。その結果、油脂結晶化によるキャノーラ油エマルションと大豆油エマルションの不安定化機構はそれぞれ異なることが明らかとなった。すなわち、キャノーラ油エマルションは、冷凍保存温度によって油脂の結晶形態は異なっていたが、いずれの冷凍保存温度もキャノーラ油の低融点成分の結晶化によって部分合一が起こり、不安定化した。一方、大豆油エマルションでは大豆油の高融点成分が油滴界面に沿って結晶化しており、 -15°C 保存および -20°C 保存では、いずれも油脂結晶の多形転移によって不安定化していた。しかし、大豆油エマルションの -30°C 保存は油脂結晶の部分合一や多形転移とは異なる機構（氷の結晶化、タンパク質の変性など）によって不安定化したと考えられた。キャノーラ油エマルションと大豆油エマルションの不安定化機構の違いは、油脂の脂肪酸組成が影響していると推察される。以上の結果から、冷凍-解凍による O/W エマルションの安定性には、油相の種類および冷凍保存温度が大きく影響することが明らかとなった。

文 献

1. Degner, B.M., Olson, K.M., Rose, D., Schlegel, V., Hutkins, R., & McClements, D. J. (2013). Influence of freezing rate variation on the microstructure and physicochemical properties of food emulsions. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 244–253.
2. Magnusson, E., Rosén, C., & Nilsson, L. (2011). Freeze-thaw stability of mayonnaise type oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25, 707–715.
3. Márquez, A. L., Salvatore, G. N., Otero, R. G., Wagner, J. R., & Palazolo, G. G. (2015). Impact of freeze-thaw treatment on the stability of calcium-fortified soy beverages. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 474–481.
4. Degner, B. M., Chung, C., Schlegel, V., Hutkins, R., & McClements, D. J. (2014). Factors influencing the freeze-thaw stability of emulsion-based foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 98–113.
5. Ghosh, S., & Coupland, J. N. (2008). Factors affecting the freeze-thaw stability of emulsions.

- Food Hydrocolloids*, 22, 105–111.
6. Komatsu, H., Okada, S., & Handa, T. (1997). Suppressive effects of salts on droplet coalescence in a commercially available fat emulsion during freezing for storage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 497–502.
 7. Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2004). Impact of fat and water crystallization on the stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 246, 49–59.
 8. Fioramonti, S. A., Arzeni, C., Pilosof, A. M. R., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2015). Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions. *Journal of Food Engineering*, 156, 31–38.
 9. Davey, E. M., Zabik, M. E., & Dawson, L. E. (1969). Fresh and frozen egg yolk protein fractions: Emulsion stabilizing power, viscosity, and electrophoretic patterns. *Poultry Science*, 48(1), 251–260.
 10. Xiong, Y. L. (1997). Protein denaturation and functionality losses. In M. C. Erickson, & Y. C. Huang (Eds.), *Quality in frozen foods* (pp. 111–139). New York: Chapman & Hall.
 11. Hillgren, A., Lindgren, J., & Aldén, M. (2002). Protection mechanism of Tween 80 during freeze–thawing of a model protein, LDH. *International Journal of Pharmaceutics*, 237, 57–69.
 12. Boode, K., Walstra, P., & de Groot-Mostert, A. E. A. (1993). Partial coalescence in oil-in-water emulsions 2. Influence of the properties of the fat. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 81, 139–151.
 13. Palanuwech, J., & Coupland, J. N. (2003). Effect of surfactant type on the stability of oil-in-water emulsions to dispersed phase crystallization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 223, 251–262.
 14. Vanapalli, S. A., Palanuwech, J., & Coupland, J.N. (2002). Influence of fat crystallization on the stability of flocculated emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5224–5228.
 15. Vanapalli, S. A., Palanuwech, J., & Coupland, J. N. (2002). Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: Effect of oil type, dispersed phase volume fraction, and cooling rate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204, 227–237.

16. Rousseau, D. (2000). Fat crystals and emulsion stability — A review. *Food Res Int*, 33, 3–14.
17. Boode, K., Bisperink, C., & Walstra, P. (1991). Destabilization of O/W emulsions containing fat crystals by temperature cycling. *Colloids and Surfaces*, 61, 55–74.
18. McClements, D. J. (1999). *Food emulsions: Principles, practices, and techniques*. Boca Raton: CRC Press.
19. Walstra, P. (1967). On crystallization habit in fat globules. *Milk and Dairy Journal*, 21, 166.
20. Arima, S., Ueji, T., Ueno, S., Ogawa, A., & Sato, K. (2007). Retardation of crystallization-induced destabilization of PMF-in-water emulsion with emulsifier additives. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 55(1), 98–106.
21. 有馬哲史, 小川晃弘, 上野聡, 佐藤清隆 (2009) O/W エマルションの低温安定性に及ぼす疎水性および親水性シヨ糖脂肪酸エステルの添加効果, *日本食品科学工学会誌*, 56 (4), 236–243.
22. 小林幸芳, 食品知識ミニブックスシリーズ「マヨネーズ・ドレッシング入門」, 日本食糧新聞社, 東京 (2005) pp. 135–136.
23. Fellows, P. J. (2009). *Food processing technology: Principles and practice* (3rd ed.). CRC Press.
24. 橋岡祐介, 渡辺学, 鈴木徹 (2010) 低温化における O/W エマルション脂質結晶化に及ぼす植物油脂種の影響, *低温生物工学会誌*, 56 (2), 127–134.
25. Ueno, S., Do, G. -S., Sagara, Y., Kudoh, K., & Higuchi, T. (2004). Three-dimensional measurement of ice crystals in frozen dilute solution. *International Journal of Refrigeration*, 27(3), 302–308.
26. Chow, C. K. (1992). *Fatty acids in foods and their health implications*. New York: Marcel Dekker.
27. Ariyaprakai, S., & Tananuwong, K. (2015). Freeze–thaw stability of edible oil-in-water emulsions stabilized by sucrose esters and Tweens. *Journal of Food Engineering*, 152, 57–64.
28. Cornacchia, L., & Roos, Y. H. (2011). Lipid and water crystallization in protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25(7), 1726–1736.
29. Cramp, G. L., Docking, A.M., Ghosh, S., & Coupland, J. N. (2004). On the stability of oil-in-water emulsions to freezing. *Food Hydrocolloids*, 18(6), 899–905.
30. Le Denmat, M., Anton, M., & Beaumal, V. (2000). Characterisation of emulsion properties and of

- interface composition in O/W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids*, 14(6), 539–549.
31. Kiosseoglou, V. D., & Sherman, P. (1983). The influence of egg yolk lipoproteins on the rheology and stability of O/W emulsions and mayonnaise. *Colloid & Polymer Science*, 261(6), 520–526.
 32. Yanagisawa, T., Watanuki, C., Ariizumi, M., Shigematsu, Y., Kobayashi, H., Hasegawa, M., & Watanabe, K. (2009). Super chilling enhances preservation of the freshness of salted egg yolk during long-term storage. *Journal of Food Science*, 74(2), E62–E69.
 33. Harada, T., & Yokomizo, K. (2000). Demulsification of oil-in-water emulsion under freezing conditions: Effect of crystal structure modifier. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77(8), 859–864.
 34. Miyagawa, Y., Ogawa, T., Nakagawa, K., & Adachi, S. (2016). Destabilization of mayonnaise induced by lipid crystallization upon freezing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(4), 786–790.

第4章 脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が 油脂の結晶核形成に与える影響

4.1 はじめに

結晶性油脂食品のテクスチャーや硬さ、安定性といった物理的特性は、油脂結晶の多形転移挙動、油脂結晶の微細構造や結晶ネットワークに大きく影響される¹⁾。このような結晶の特性は、結晶の核形成をコントロールすることで制御することができる。油脂の結晶化は、油脂の結晶核形成に乳化剤を鋳型として用いることで促進される（テンプレート効果）¹⁾。過去の研究では、テンプレート効果は基質と脂質の分子構造が似ている場合に生じると報告されている。Takiguchiら²⁾は、脂肪酸を蒸着した薄膜（テンプレート膜）に *n*-アルコールを結晶化させた実験を行った。その結果、脂肪酸と *n*-アルコールの炭素数が等しい、または脂肪酸の炭素数が2つ多い場合に、*n*-アルコールの核形成を促進した。さらに、*n*-アルコール結晶の配向と副格子構造はテンプレート膜と一致していた。Fujiwaraら³⁾は、モノアシルグリセロール（MAG）のテンプレート膜を用いて、MAGと *n*-アルコールの鎖長が類似する場合に、テンプレート膜と *n*-アルコール結晶の配向と副格子構造が一致したことを示した。

乳化剤は、油脂結晶の核形成を促進または抑制する効果があると言われている。この効果は、乳化剤の添加濃度、冷却速度、乳化剤と油脂の構造の類似性に依存する^{4,9)}。油脂の結晶化は、乳化剤結晶の表面で不均一核形成が生じること、あるいはテンプレート効果が生じることによって促進される。このような乳化剤結晶は、油脂結晶化の種結晶や不純物として働く⁸⁻¹⁰⁾。Sonwaiらは、p-NMR（パルス核磁気共鳴法）を用いて、室温で固体状のソルビタン脂肪酸エステルは、不均一核形成によってココナッツ油の早期段階での結晶化を促進したが、室温で液状のソルビタン脂肪酸エステルはココナッツ油の結晶化を抑制したことを示している⁸⁾。Fredrickら⁹⁾は、DSCを用いて、硬化パーム油から得られたモノアシルグリセロールは、モノアシルグリセロール結晶がパーム油結晶化の核となったことで、パーム油の核形成を促進したと報告している。Verstringeら¹⁰⁾は、放射光マイクロビーム X線回折測定を用いて、パーム油結晶（主にパルミチン酸が含まれる）のラメラ面の配向がモノパルミチン結晶のラメラ面の配向に沿っていることを示した。

しかし、これらの研究はテンプレート効果と不均一核形成の違いを明らかにしていない。

トリアシルグリセロール (TAG) の分子構造がテンプレートと類似する場合、結晶化した乳化剤は TAG 結晶のラメラ面の配向と副格子構造を引き継ぐと考えられる。すなわち、テンプレート効果はエピタキシャル成長すると考えられる。エピタキシャル成長とは、基板となる結晶の配向に沿って新たな成長層が形成される成長様式である。エピタキシャル成長では、純度が良く欠陥の少ない良質な結晶を得ることができ、半導体デバイスや磁性材料などの多くの分野で応用されている手法である。テンプレート効果に必要な条件は、過去の研究によって示されている^{1, 5, 11)}；乳化剤と油脂の分子構造が類似すること、乳化剤と油脂の副格子構造が類似すること、熱安定性が高いこと、適切な過冷却度で結晶化させること。しかし、テンプレート効果および不均一核形成による油脂の結晶成長の違いは示されておらず、分子レベルでテンプレート効果を理解するための研究が求められている。

そこで本章では、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶化・融解挙動に及ぼす影響を調べることで、そして、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤結晶に対する油脂の結晶成長のその場観察を行い、油脂結晶の形態および配向について調べることを目的とした。本章では、油脂結晶と乳化剤結晶の区別をつけるために、油脂の結晶化前に乳化剤結晶を予め作製した後に油脂を結晶化させ、乳化剤結晶に対する油脂の結晶化挙動を顕微鏡で観察した。また、乳化剤結晶および油脂結晶の多形とラメラ面の配向を放射光マイクロビーム X 線回折測定 (SR- μ XRD) で調べた。加えて、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶多形に及ぼす影響について、放射光時分割 X 線回折測定 (SR-XRD) を用いて調べた。

4.2 実験試料および実験方法

4.2.1 試料および試料調製方法

試料には、油相にパーム中融点油脂 (PMF)、乳化剤に 3 種類のソルビタン脂肪酸エステル (SE) (ソルビタントリパルミテート (STP)、ソルビタントリステアレート (STS)、ソルビタントリベヘネート (STB)) を用いた。SE の結晶化・融解挙動、および長面・短面間隔については 2 章 Fig. 2-4, Fig. 2-5 に示した通りである。

DSC 測定および SR-XRD 測定には、5 wt% SE を添加した PMF を用いた。SE および PMF はスクルー瓶 (5mL) に入れ、ホットプレート上で融解させた。その後、転倒攪拌を行って溶液を均一にした。調製した試料は冷蔵庫で保管し、使用時は試料を再度ホットプレート

上で融解させた。通常、製品に添加される乳化剤の量は 1 wt%未満であるが、本章の実験では乳化剤を 5 wt%添加しており、通常よりも高い濃度である。乳化剤が高濃度なのは、DSC 測定や SR-XRD 測定において、SE の結晶化および融解挙動を検出するためである。また、光学顕微鏡観察用の試料は、キャノーラ油に 20 wt% SE を添加した混合溶液、SR- μ -XRD には、PMF に SE を 20 wt%添加した混合溶液を用い、これらも上記と同様の方法で作製した。

4.2.2 示差走査熱量測定 (DSC)

DSC によって、PMF および 5 wt% SE 添加 PMF の結晶化および融解挙動を調べた。試料 (約 18 mg) はアルミパンに封入した。試料を融点以上 (PMF 単体および STP 添加 : 60°C, STS 添加 : 70°C, STB 添加 : 100°C) で 10 分間保持した後、以下の温度プログラムにおける DSC 曲線を得た : -10°C まで 2°C/min で冷却した後、60°C まで 2°C/min で昇温。測定は各試料で 3 回ずつ行った。

4.2.3 放射光時分割 X 線回折測定 (SR-XRD)

SR-XRD では、結晶化および融解過程における PMF および 5 wt% SE 添加 PMF の結晶多形を調べた。試料は融点以上 (PMF 単体および STP 添加 PMF : 60°C, STS 添加 : 70°C, STB 添加 : 80°C) で 10 分間保持した後、以下の温度プログラムにおける X 線回折パターンを得た : 5°C まで 2°C/min で冷却し、10 分間保持した後、40°C まで 2°C/min で昇温。なお、温度条件は DSC 測定の結果を基に決定した。測定では、小角 X 線回折 (SAXD) および広角 X 線回折 (WAXD) のパターンを 30 秒に 1 枚取得し、X 線の照射時間は 20 秒とした。

4.2.4 光学顕微鏡観察

SE 結晶に対する PMF の結晶形態および結晶の配向を調べるため、光学顕微鏡観察 (微分干渉顕微鏡観察 (DIC), 偏光顕微鏡観察 (PLM), 鋭敏色板観察) を行った (BX-51, オリパス (株))。試料には 20 wt% SE 添加キャノーラ油を用いた。試料温度の制御は、顕微鏡観察用ペルチエ式冷却加熱ステージ (Linkam model 10021, Linkam Scientific Instruments, Ltd., Tadworth, U.K.) の上で行った。顕微鏡観察における試料作製方法を Fig. 4-1 に示す。60 μ m のスペーサーを付けたカバーガラス (サイズ : 18 mm \times 18 mm) に融解させた 20 wt% SE

添加キャノーラ油を少量載せ、新たなカバーガラス（サイズ：18 mm × 18 mm）で挟んだ。試料は融点以上（PMF 単体および STP 添加 PMF：60°C，STS 添加 PMF：70°C，STB 添加 PMF：100°C）で 10 分間保持して融解させ、0.1°C/min で冷却した。冷却速度を遅くしたのは、SE 結晶を光学顕微鏡で観察できる程度（10 μm 以上）に大きく成長させるためである。その後、上面のカバーガラスおよび下面のカバーガラスのスペーサーを取り外し、融解させた後 30°C に温調した PMF 3 μL を添加した。新しいカバーガラス（サイズ：15 mmφ）で再び覆った後に、以下の温度プログラムにおける PMF の結晶化および融解挙動を観察した：30°C から 5°C まで 2°C/min で冷却、5°C で 10 分間保持した後、30°C まで 2°C/min で昇温。

4.2.5 放射光マイクロビーム X 線回折測定 (SR-μ-XRD)

SR-μ-XRD 測定では、SE 結晶および SE 結晶に結晶化した PMF 結晶のラメラ面の配向および多形を調べた。測定は、20 wt% STS 添加 PMF、20 wt% STB 添加 PMF の試料で行った。1 cm × 1 cm のマイラーフィルム上に融解させた試料 1.5 μL を載せ、100°C で 10 分間保持後、80°C まで 5°C/min で冷却し、30°C まで 0.1°C/min で冷却した。これらの温度コントロールは顕微鏡観察用ペルチエ式冷却加熱ステージ（Linkam model 10021）上で行った。30°C に到達した試料は、測定箇所を設置された顕微鏡用冷却加熱ステージ（30°C）（Linkam LK-600PM, Linkam Scientific Instruments, Ltd., Tadworth, U.K.）に固定させた。マイクロビームのスキャンは 5 μm 間隔で行い、照射時間は 1 秒とした。測定は 30°C と 10°C で行った。

Fig. 4-2 に、方位角展開における STS 結晶、STB 結晶、PMF α 型結晶の解析範囲をそれぞれ示す。本章の実験結果から、STB 添加 PMF では、STB 結晶のピークトップが $2\theta = 0.91$ 、PMF α 型のピークトップが $2\theta = 1.20$ に出現することがわかっている。よって、方位角展開における回折角の解析範囲は、それぞれのピークトップを中心とし、STB は $2\theta = 0.85-0.95$ 、PMF α 型は $2\theta = 1.15-1.25$ とした。一方、STS 添加 PMF では、STS 結晶のピークトップが $2\theta = 1.09$ に出現し、PMF α 型の回折ピーク位置と近いことがわかる。そのため、STB 添加 PMF のようにそれぞれのピークトップを中心とした解析範囲とすると、互いの回折パターンを含んで解析される恐れがある。そこで、STS 添加 PMF では STS および PMF α 型の回折ピークのすそを解析範囲とし、STS は $2\theta = 0.95-1.05$ 、PMF α 型は $2\theta = 1.30-1.40$ とした。なお、データのプロット点数は 180 とした。

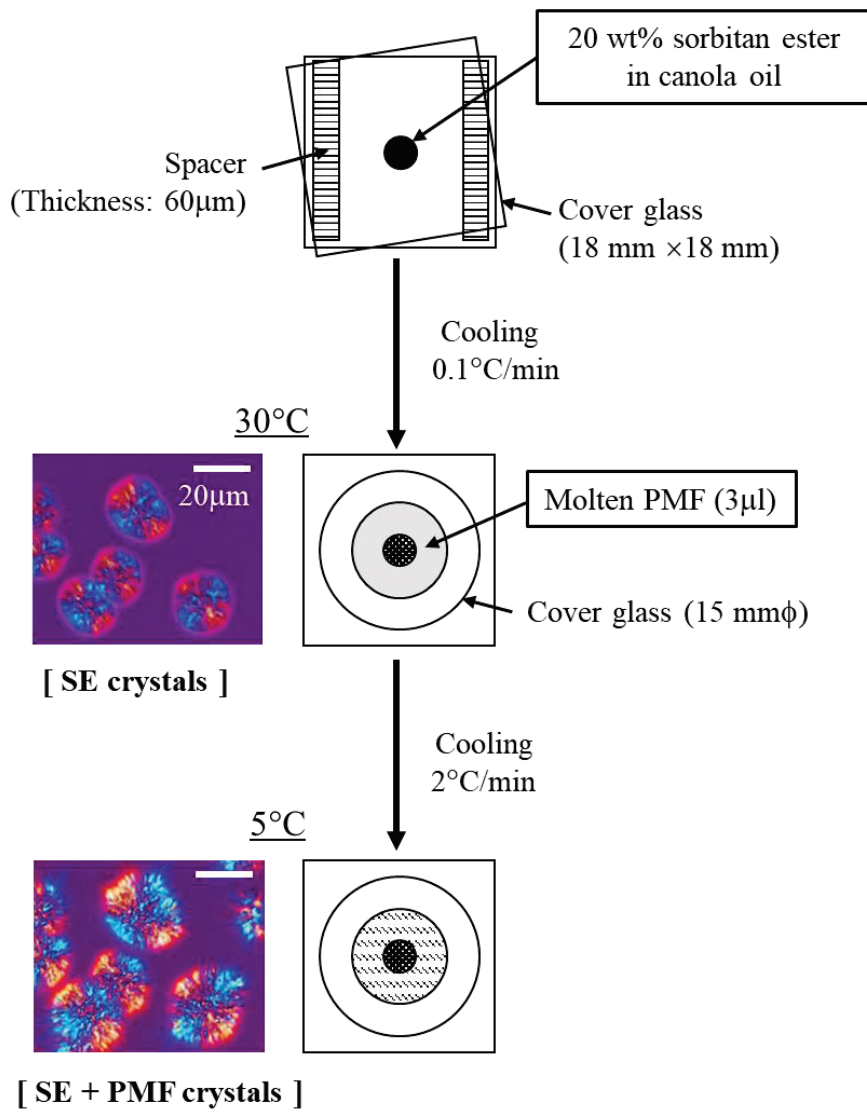


Fig. 4-1 Schematic image of preparation method for optical microscopy.

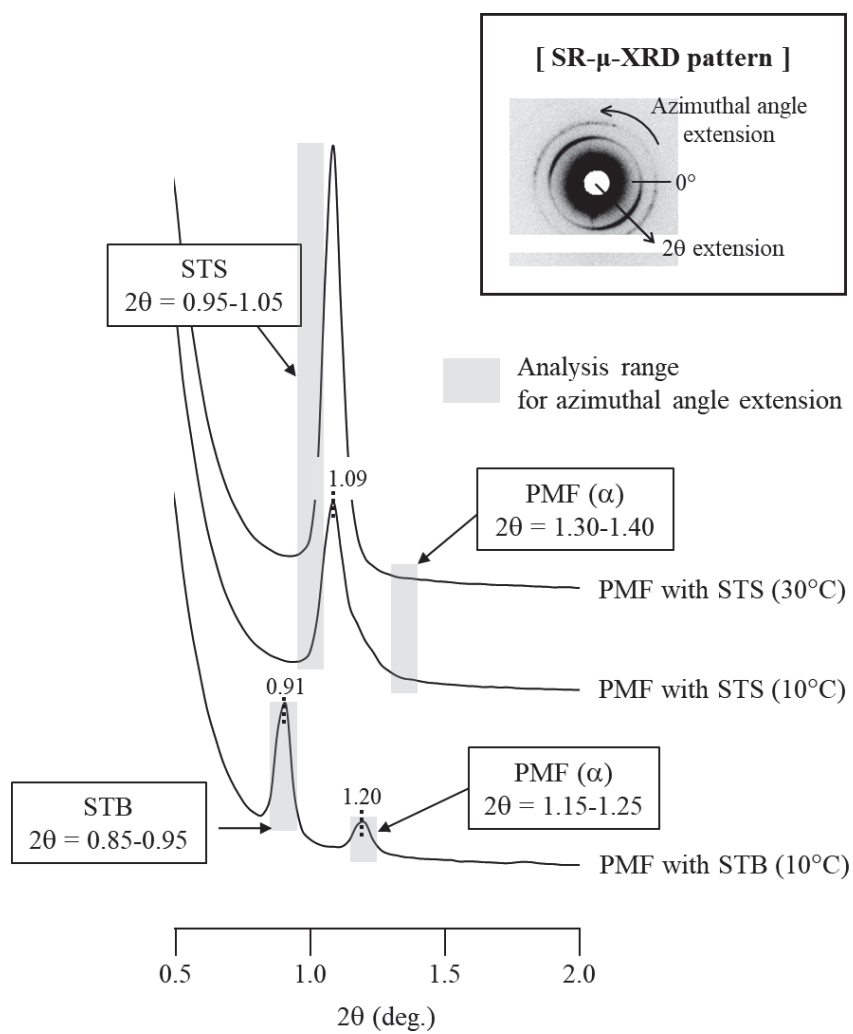


Fig. 4-2 Illustration of analysis range for azimuthal angle extension.

4.3 結果

4.3.1 油脂の結晶化および融解挙動に対する乳化剤の添加効果

Fig. 4-3 に、60°C から-10°C まで 2°C/min で冷却した際の PMF 単体および SE 添加 PMF の DSC 曲線を示す。PMF は-10°C までの冷却中、2 つの主要なピーク ($15.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$, $8.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$: すべてオンセット値) と 1 つのマイナーなピーク ($-5.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$: ピークトップ値) を示した。これらのピークは、結晶化温度の高い順から、高融点成分、低融点成分、超低融点成分と呼ぶ。SE 添加 PMF の低融点成分および超低融点成分の結晶化温度は PMF 単体と比較して違いはなかった。しかし、STP 添加 PMF の高融点成分の結晶化温度は 30°C 付近 (矢印で示す) にあり、PMF 単体よりも高融点成分の結晶化温度が高かった。STS 添加 PMF および STB 添加 PMF はいずれも高温で 2 段階の結晶化が起きており、PMF 単体とは異なる DSC 曲線を示していた。はじめに、STS 添加では 39°C 付近、STB 添加では 55°C 付近で結晶化が起こり (矢印で示す)、続いて、STS 添加では 20°C 付近、STB 添加では 17°C で結晶化が起きた。次節の SR-XRD (Fig. 4-5) の結果で詳しく述べるが、最初に起こった結晶化は SE の結晶化と考えられる。

Fig. 4-4 に、-10°C から 60°C まで 2°C/min で昇温した際の PMF 単体および SE 添加 PMF の DSC 曲線を示す。PMF 単体は、60°C までの昇温中に 4 つの融解ピーク ($-3.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$, $11.1 \pm 0.3^\circ\text{C}$, $19.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$, $23.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$: すべてピークトップ値) がみられた。STS 添加および STB 添加の DSC 曲線は、PMF 単体と大きな違いはみられず、PMF の DSC 曲線に影響しなかった。しかし、STP 添加によって、PMF の DSC 曲線は変化した。すなわち、PMF 単体でみられた 2 つの融解ピーク ($11.1 \pm 0.3^\circ\text{C}$, $19.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$) が 1 つの大きな融解ピーク ($17 \pm 0.3^\circ\text{C}$) になっていた。これは、STP が PMF の結晶多形転移に影響したためだと考えられる。また、いずれの SE 添加 PMF も、PMF 高融点成分のオフセット値 (Fig. 4-4 に破線で示す) が低下していた。その効果は、SE の脂肪酸鎖長が短くなるほど顕著であった。SE 添加では、PMF 高融点成分よりもさらに高温側でブロードな融解ピークがみられた。すなわち、STP 添加は 29–34°C、STS 添加は 31–44°C、STB 添加は 34–60°C であった。これらは SE の融解によるピークと考えられる。

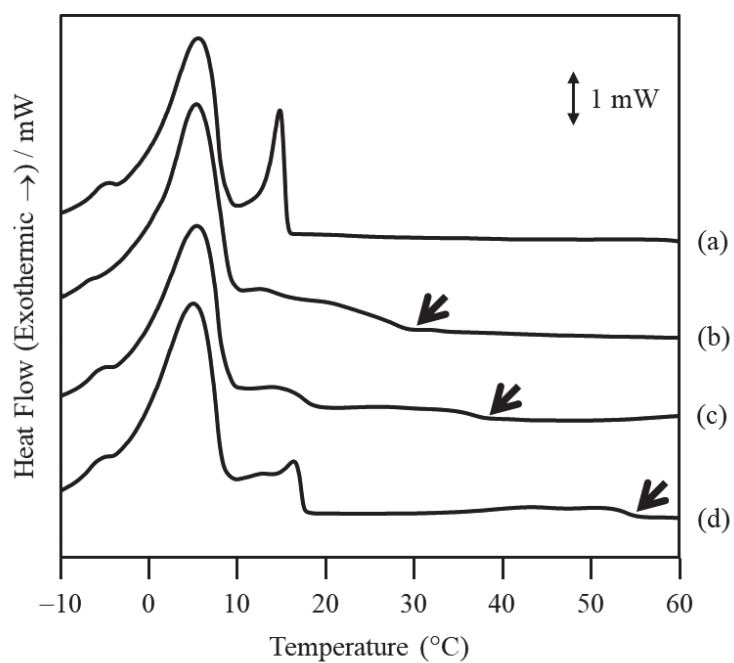


Fig. 4-3 DSC thermograms of PMF and PMF mixed with 5 wt % SEs during cooling from 60 to -10°C at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$: (a) PMF, (b) PMF with STP, (c) PMF with STS, and (d) PMF with STB. Arrows indicate the first crystallization of PMF–SE blends.

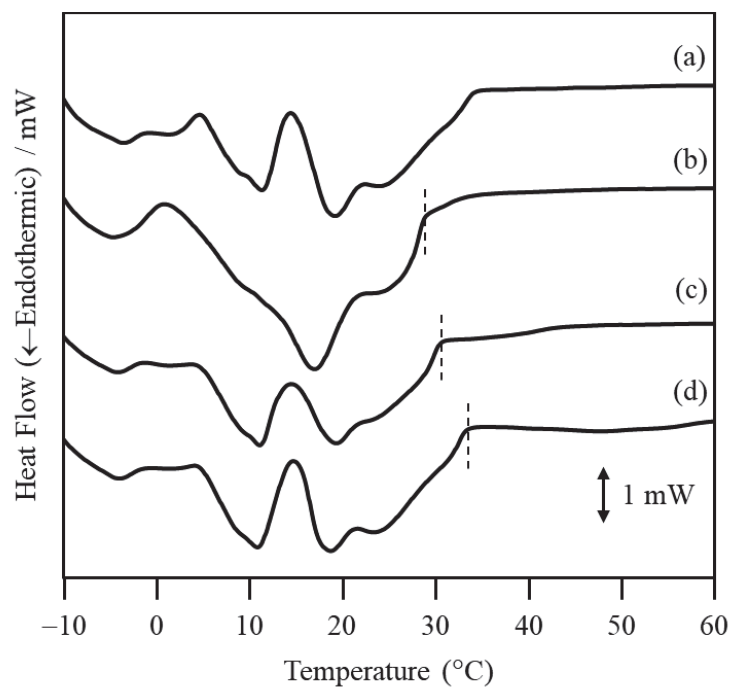


Fig. 4-4 DSC thermograms of PMF and PMF mixed with 5 wt % SEs during heating from -10 to 60°C at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$: (a) PMF, (b) PMF with STP, (c) PMF with STS, and (d) PMF with STB. Dotted lines indicate the offset temperatures of the high-melting fraction of PMF in SE-PMF blends.

4.3.2 油脂の結晶多形に対する乳化剤の添加効果

Fig. 4-5 に、冷却および等温結晶化過程における PMF 単体および SE 添加 PMF の SR-XRD の結果を示す。PMF 単体 (Fig. 4-5(a)) では、SAXD で 16°C に 4.73 nm の回折ピーク、WAXD で 15°C に 0.420 nm の回折ピークが出現した。WAXD の回折ピークから、PMF は α 型で結晶化することがわかった。PMF α 型の結晶化温度は、DSC 測定でみられた PMF 高融点成分の結晶化温度 $15.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$ (Fig. 4-3(a)) と一致していた。PMF 単体をさらに冷却すると、SAXD の回折ピークは 4.73 nm から 4.68 nm の小角側へと徐々にシフトしていった。これは、低温になることでラメラ間隔が短くなったためだと考えられる。PMF 単体は、6°C で新たに SAXD に 5.26 nm の回折ピークが出現したが、WAXD では SAXD に対応する回折ピークはみられなかった。これは Mykhaylyk ら¹²⁾の結果とも一致していた: Mykhaylyk らは、1,3-ジパルミトイル-2-オレオイルグリセロール (POP) を融液から 253 K に急冷させると、253 K の等温結晶化の初期過程で 5.20 nm の周期性を持つ準安定相 (α_2 phase) が出現するが、 α_2 phase の副格子構造の回折ピークはみられなかったと報告している。よって、本章でみられた 5.26 nm の回折ピークは α 型の副格子構造を有する準安定相であると考えられる。

STP 添加 PMF (Fig. 4-5(b)) においても、冷却および等温結晶化過程で観察された結晶多形は α 型であった。しかし、SAXD の回折ピークは PMF 単体よりも高温で出現 (32°C) し、5.03 nm のラメラ間隔も PMF 単体よりもわずかに長かった。SAXD の回折ピークは、冷却 10°C 付近にかけて、5.03 nm から 4.63 nm にシフトしていった。STP 単体の室温での回折ピークは 4.82 nm であることから、STP 添加 PMF では、32°C で STP が α 型で結晶化し、その後の冷却で、PMF が α 型で結晶化したと考えられる。STS 添加 PMF でも同様の SAXD および WAXD パターンが得られた (Fig. 4-5(c))。SAXD では 41°C で 5.55 nm の回折ピークが出現し、冷却 20°C 付近にかけて 4.68 nm にシフトしていった。一方、WAXD では 37°C で 0.417 nm に回折ピークが出現した。これらの結果は、PMF の結晶化前に STS が核形成したこと、STS および PMF は α 型で結晶化したことを示している。また PMF 単体と同様、SAXD では 6°C で 5.23 nm の回折ピークが新たに出現した。STB 添加 PMF (Fig. 4-5(d)) は、SAXD では 58°C で 6.54 nm、WAXD では 52°C で 0.416 nm の回折ピークが出現した。これは、STB が α 型で結晶化したことを示している。冷却過程における STB 添加 PMF の DSC 曲線の結果 (Fig. 4-3(d)) と併せると、55°C でみられた DSC の発熱ピークは STB の

結晶化と考えられる。さらに冷却すると、SAXD では 18°C で 4.79 nm に回折ピークが出現し、それと同時に、WAXD では 0.416 nm の α 型の回折ピーク強度が増加した（強度が増加し始めた箇所を点線の矢印で示す）。SAXD では 8°C で 5.26 nm の回折ピークが出現し、それと同時に、WAXD では 0.414 nm に回折ピークの肩が出現した。よって、PMF 単体では 5.26 nm の回折ピーク出現に伴う WAXD の回折ピークの出現はみられなかったものの、5.26 nm の回折ピークは炭化水素鎖間の距離が 0.414 nm の α 型を有する準安定相の結晶であると推察される。

Fig. 4-6 に、昇温過程における PMF および SE 添加 PMF の SR-XRD の結果を示す。PMF 単体 (Fig. 4-6(a)) の 5°C から 40°C への昇温過程では、SAXD の 4.68 nm の回折ピークが 19°C で消失し、新たに 4.31 nm に回折ピークが出現した。4.31 nm の回折ピークは 33°C で消失した。SAXD のピークの挙動に対応して、WAXD では、0.420 nm の回折ピークが消失し、 β' 型を示す 0.437 nm, 0.425 nm, 0.393 nm の回折ピークが出現した。これらの β' 型の回折ピークは 32°C で消失した。よって、PMF 単体は昇温中に α 型から β' 型へ多形転移することがわかった。STP 添加 PMF (Fig. 4-6(b)) の SAXD では、昇温中に 4.65 nm よりも広角側にピークの肩がみられた (白矢印で示す)。この SAXD のピークの出現に対応して、WAXD では β' 型の回折ピークが出現していた (0.437 nm, 0.392 nm, 0.383 nm) ことから、SAXD のピークの肩は β' 型に由来するものと考えられる。一方で、WAXD のピークは 28°C で消失しており、STP 添加 PMF で生じた β' 型の融点は PMF 単体で生じた β' 型の融点よりも低かった。よって、STP の添加は PMF 単体で生じた β' 型とは異なる組成または異なる構造の β' 型へ多形転移を誘発させたと考えられる。また STP 添加 PMF では PMF β' 型の融解後も、SAXD では 4.88 nm, WAXD では 0.419 nm の STP 由来による回折ピークがみられた。ゆえに、DSC の融解曲線でみられた 29–34°C のブロードな融解ピーク (Fig. 4-4(b)) は STP の融解によるものと考えられる。STS 添加および STB 添加 (Fig. 4-6(c),(d)) においても、40°C でそれぞれ STS および STB 由来による回折ピーク (STS : 5.26 nm, 0.419 nm ; STB : 6.14 nm, 0.417 nm) がみられた。しかし、SE 結晶による回折ピークを除いて、STS 添加および STB 添加はいずれも PMF 単体の回折パターンと類似していた。よって、STS 添加および STB 添加は昇温過程における PMF の結晶多形に影響しないことがわかった。

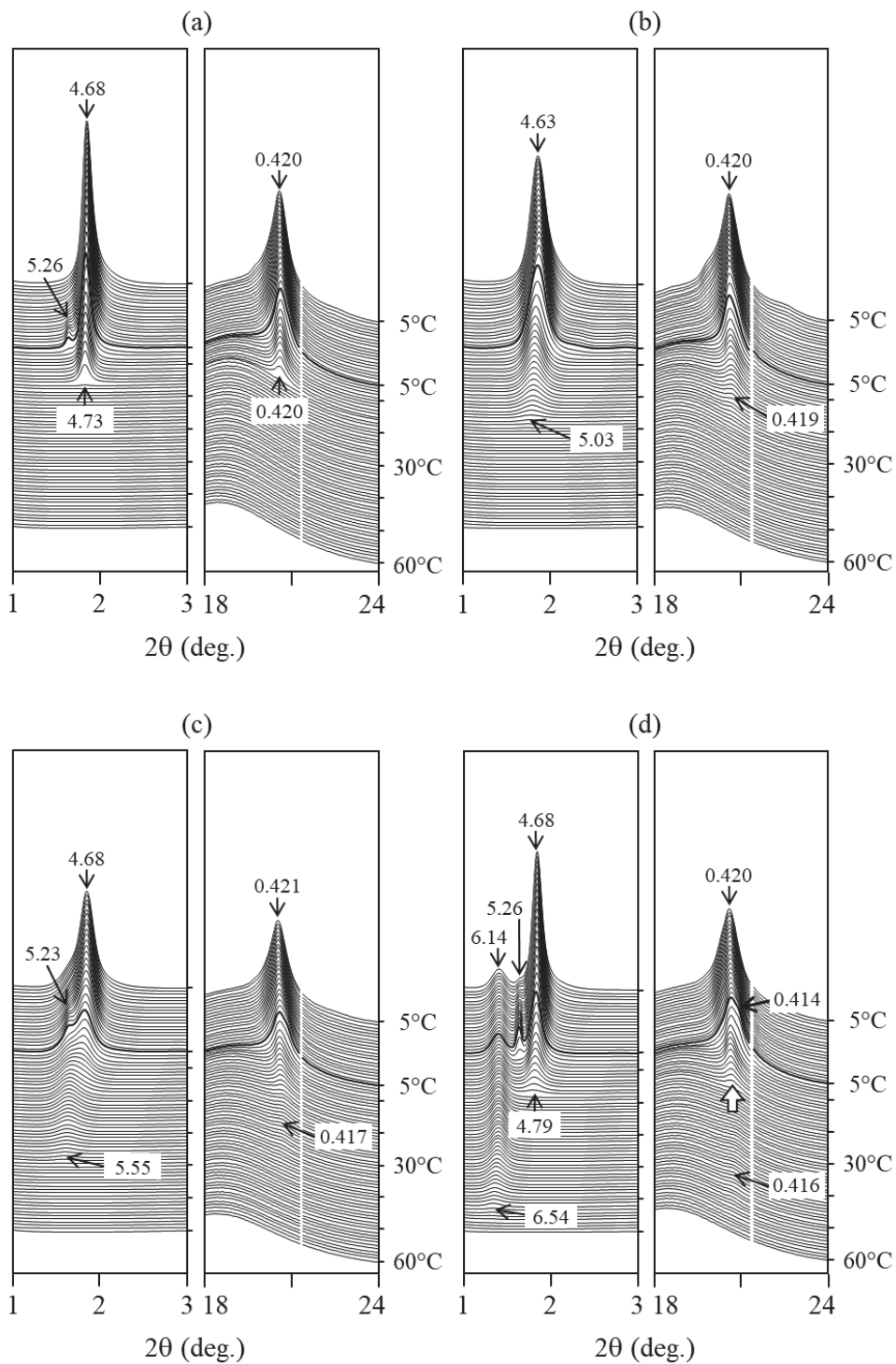


Fig. 4-5 SR-XRD patterns of PMF and PMF mixed with 5 wt % SEs during cooling from 60 to 5°C at 2°C/min and following isothermal crystallization at 5°C for 10 min: (a) PMF, (b) PMF with STP, (c) PMF with STS, and (d) PMF with STB. The white arrow indicates the crystallization of PMF in the PMF-STB blend. Unit: nm.

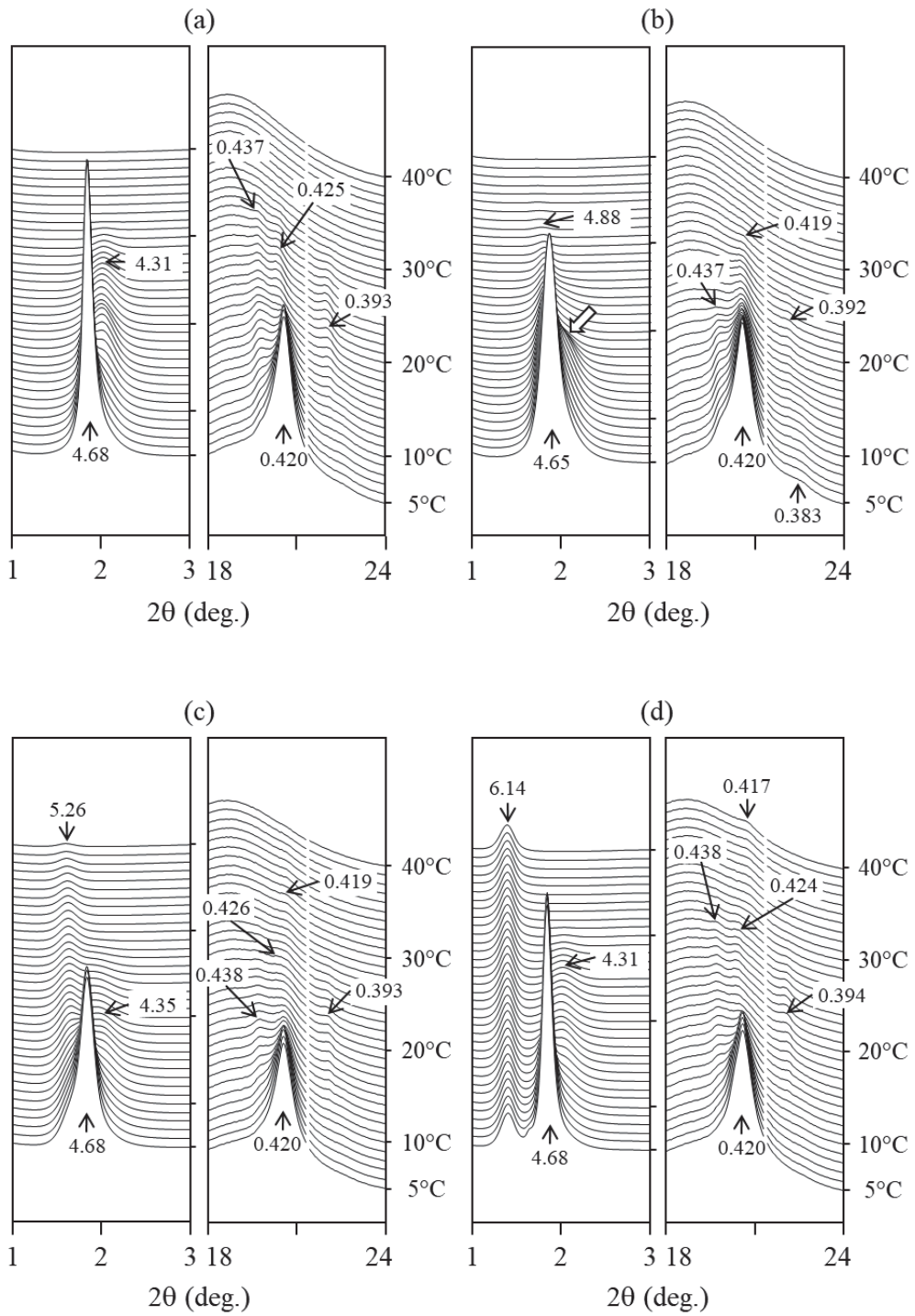


Fig. 4-6 SR-XRD patterns of PMF and PMF mixed with 5 wt % SEs during heating from 5 to 40°C at 2°C/min: (a) PMF, (b) PMF with STP, (c) PMF with STS, and (d) PMF with STB. The white arrow indicates a shoulder peak in the PMF–STP blend. Unit: nm.

4.3.3 乳化剤結晶に対する油脂結晶化のその場観察

脂肪酸鎖長の異なる SE 結晶に対する PMF の結晶化挙動の違いを明らかにするために、顕微鏡観察を行った。Fig. 4-7 ~ Fig. 4-9 に、30°C から 5°C まで冷却させた際の DIC 観察像（上段）および鋭敏色板観察像（下段）を示す。DSC 測定の結果（Fig. 4-3(a)）から、5°C までの冷却過程では PMF の高融点および低融点成分の結晶化が観察されることが考えられる。

30°C の顕微鏡観察像（Fig. 4-7(a), Fig. 4-8(a), Fig. 4-9(a)）では、直径 20 μm 程度の球晶が観察された。これらの観察像は SE 結晶に PMF の融液を加えた直後に撮影したため、PMF は結晶化しておらず、これらの球晶はすべて SE のみからなると推察される。Fig. 4-7 に、STP 結晶に対する PMF の結晶化挙動を観察した結果を示す。PMF は主にパルミチン酸を含むため、PMF の有する主な脂肪酸と STP の有する脂肪酸の鎖長は同じである。よって、STP は PMF の核形成のテンプレートとして働くと考えられる。5°C までの冷却過程では、球晶がその形状を保ちながら大きく成長していく様子が観察された（Fig. 4-7(b)-(e)）。また、鋭敏色板観察像では、STP の球晶でみられた橙色と青色の配列様式は PMF 結晶化後も変化しておらず、30°C で観察された STP の球晶の配向と同じ向きで PMF が結晶化していることを示している。すなわち、STP 結晶の向きに沿って PMF が結晶化していた。STP 添加 PMF の DSC（Fig. 4-3(b)）および SR-XRD（Fig. 4-5(b)）の結果から、PMF の高融点および低融点成分はいずれも α 型で結晶化していると考えられる。次に、STS 結晶に対する PMF の結晶化挙動を観察した結果を Fig. 4-8 に示す。STS に含まれるステアリン酸は PMF に主に含まれるパルミチン酸よりも炭素が 2 原子分長い構造である。よって、STS も PMF の核形成のテンプレートとして働くと考えられる。10°C までの冷却過程では、STS 結晶に対する PMF の結晶成長様式は、STP 結晶の場合と同じであった（Fig. 4-8(b)-(d)）。すなわち、STS の球晶でみられた橙色と青色の配列様式は PMF 結晶化後も変化しておらず、STS 結晶の配向に沿って PMF が結晶化していた。加えて、5°C では球晶表面から細長い結晶が新たに出現する様子が観察された（Fig. 4-8(e)）。この細長い結晶については、考察で詳しく説明する。一方、STB 結晶に対する PMF の結晶化挙動は STP や STS の結果と大きく異なっていた（Fig. 4-9）。PMF が有する主な脂肪酸と STB の有する脂肪酸は鎖長が大きく異なっている。すなわち、STB に含まれるベヘン酸は PMF に主に含まれるパルミチン酸よりも炭素が 6 原子分長い構造である。まず、冷却 15°C において、STB 結晶の表面から PMF が結晶化する様子

が観察された。しかし、PMF 結晶はあらゆる方向を向いて成長しており、DIC 像からは STB の球晶と PMF 結晶の境界が明瞭に観察された (Fig. 4-9)。加えて、鋭敏色板観察像からは STB の球晶で観察された橙色と青色の結晶を引き継がない PMF 結晶が観察された。これは、STB 結晶の配向に沿わずに PMF が結晶化したことを示している。冷却 5°C では、STS の場合と同様、PMF 結晶の表面から細長い結晶が成長していく様子が観察された。

4.3.4 乳化剤結晶に対する油脂結晶の融解のその場観察

Fig. 4-10 に、SE 結晶に結晶化した PMF の 5°C10 分保持後 (Fig. 4-10 (a), (g), (m)) および融解過程 (Fig. 4-10 (b)-(f), (h)-(l), (n)-(r)) の DIC 観察像を示す。5°C で 10 分保持した後、STP-PMF 結晶の周りには針状結晶が観察された (Fig. 4-8 (e), Fig. 4-10 (a))。この針状結晶は 10°C までの昇温過程で融解していったが、一部の結晶は 25°C 付近で融解した。SR-XRD の結果 (Fig. 4-6(b)) では、昇温過程で PMF α 型が β' 型へ多形転移していたことから、25°C 付近で融解した結晶は、多形転移した PMF β' 型の結晶だと考えられる。また、10°C から 30°C までの昇温過程では (Fig. 4-10 (b)-(f))、STP-PMF 結晶の大きさが徐々に小さくなっていき、その大きさは昇温 30°C の時点で初期の STP 結晶の大きさとなっていた。これは、PMF α 型の融解と考えられる (Fig. 4-6(b))。STS を乳化剤として用いた場合 (Fig. 4-10 (g)-(l))、昇温 10°C で針状結晶はほとんど融解していた。20°C に昇温する際は、PMF 結晶は界面から融解していた。30°C まで昇温する間には、 α 型由来の β' 型の結晶は PMF-STB 結晶の周りで観察された。これは PMF-STP 結晶の観察結果と類似していたが、PMF-STB 結晶の系では、PMF-STP の系よりも、 β' 型の結晶量が明らかに多かった。これは、PMF-STP の系では PMF の多形転移が抑制されていたことを示唆している。一方で、STB 結晶の周りで結晶化した PMF 結晶は、STB と PMF の境界が明瞭であった (Fig. 4-10 (m))。PMF-STB の系は、PMF-STS の系と似た融解挙動を示した (Fig. 4-10 (n)-(r))。

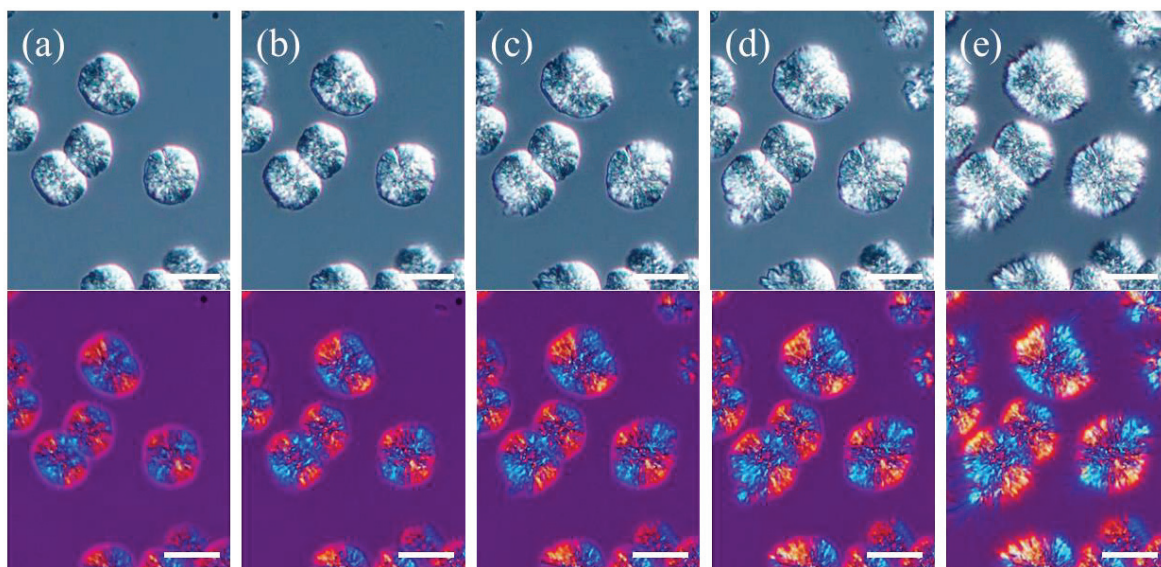


Fig. 4-7 Microscopy images of PMF crystallization on STP crystals during cooling from 30 to 5°C at 2°C/min: (a) 30°C, (b) 20°C, (c) 15°C, (d) 10°C, and (e) 5°C. The upper images were taken using a differential interference contrast (DIC) microscope, and the lower images were taken using a polarized light (PL) microscope with a sensitive tint plate. Scale bars are 20 μm .

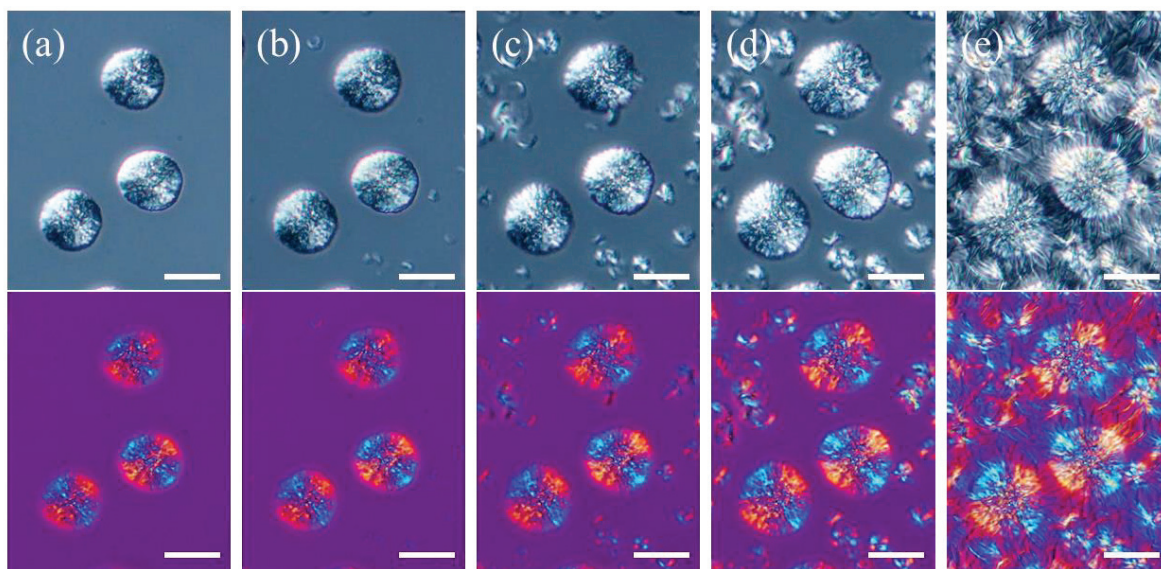


Fig. 4-8 Microscopy images of PMF crystallization on STS crystals during cooling from 30 to 5°C at 2°C/min: (a) 30°C, (b) 20°C, (c) 15°C, (d) 10°C, and (e) 5°C. The upper images were taken using a DIC microscope, and the lower images were taken using a PL microscope with a sensitive tint plate. Scale bars are 20 μm .

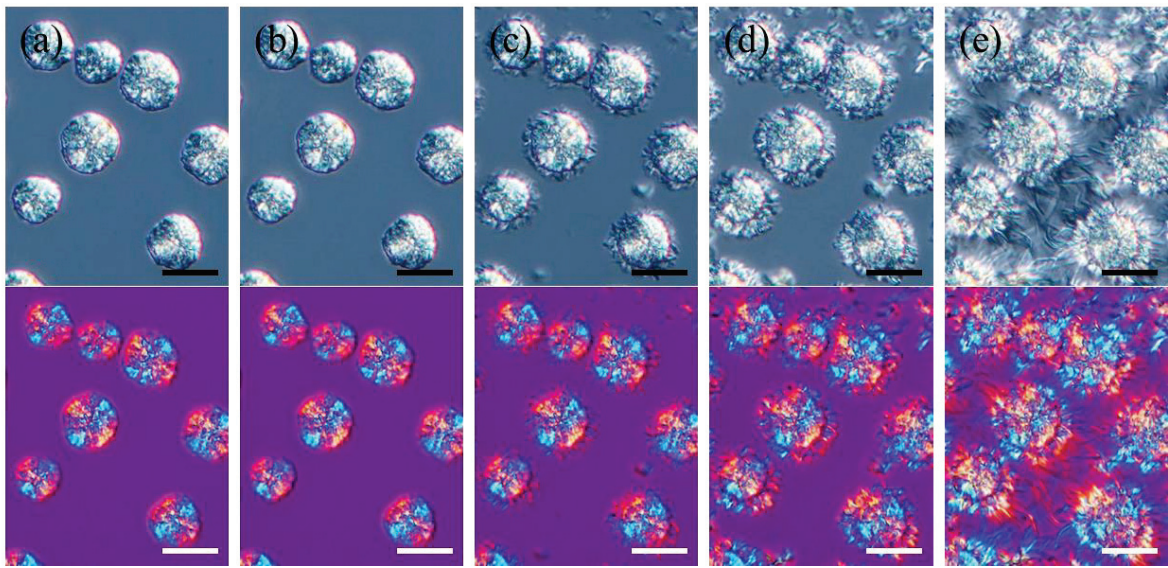


Fig. 4-9 Microscopy images of PMF crystallization on STB crystals during cooling from 30 to 5°C at 2°C/min: (a) 30°C, (b) 20°C, (c) 15°C, (d) 10°C, and (e) 5°C. The upper images were taken using a DIC microscope, and the lower images were taken using a PL microscope with a sensitive tint plate. Scale bars are 20 μm .

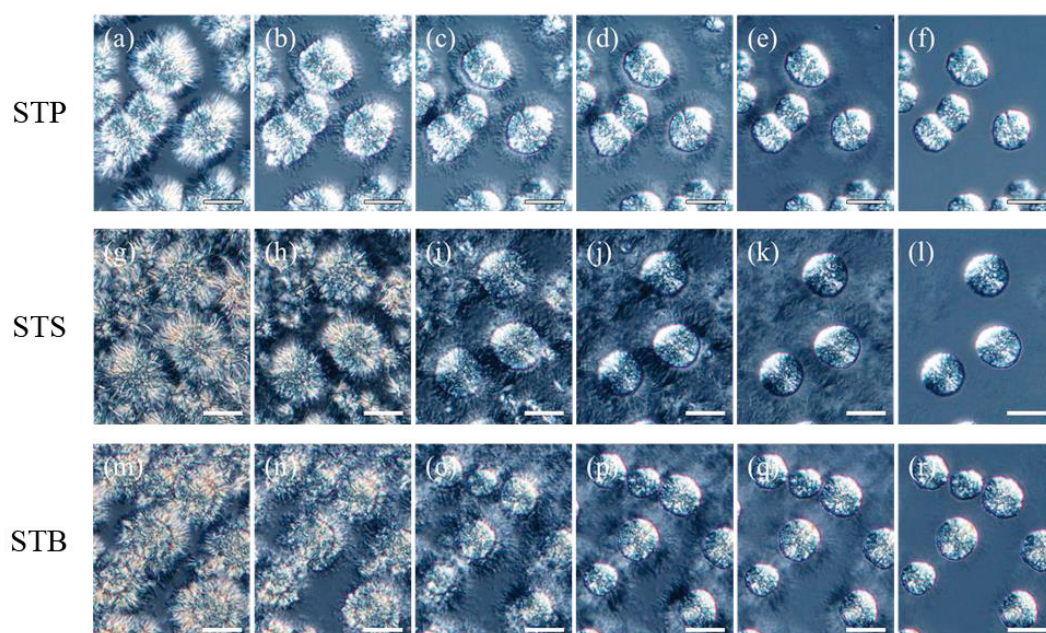


Fig. 4-10 DIC microscopy images of the melting behavior of PMF that was crystallized around SE crystals during heating from 5 to 30°C at 2°C/min: (a, g, m) 5°C; (b, h, n) 10°C; (c, i, o) 15°C; (d, j, p) 20°C; (e, k, q) 25°C; and (f, l, r) 30°C. Scale bars are 20 μm .

4.3.5 放射光マイクロビーム X 線回折測定による乳化剤結晶および油脂結晶の微細構造の解析

顕微鏡観察から、PMF と SE の有する脂肪酸鎖長が類似する場合、すなわち STP および STS を用いた場合、SE 結晶の配向を引き継いで PMF が結晶化する様子が観察された。一方、PMF と SE の有する脂肪酸鎖長が大きく異なる場合、STB 結晶の配向を引き継がずに PMF が結晶化するものが観察された。SR- μ -XRD では、上記の顕微鏡観察の結果を確認するとともに、方位角展開による SE 結晶の配向に対する PMF 結晶の配向の程度を調べると、SE および PMF の結晶多形を明らかにすることを目的として実験を行った。

SR- μ -XRD では、20 wt% SE 添加 PMF を融液から 30°C まで 0.1°C/min で徐冷した後、30°C および 10°C で測定を行った。Figs. 4-11~14 に 20 wt% STS 添加 PMF, Figs. 4-15~19 に 20 wt% STB 添加 PMF の SR- μ -XRD の結果を示す。なお、20 wt% STP 添加 PMF も測定を行ったが、本論文では結果を示していない。これは、STP および PMF α 型の回折ピーク位置が近く、回折ピークが重なっており、方位角展開を行うことができなかつたためである。

Fig. 4-11 に、STS 添加 PMF の結晶を 30°C および 10°C でマイクロビーム照射した際の顕微鏡画像およびマイクロビーム照射位置の小角側の X 線回折画像を並べたものを示す。マイクロビームを照射した結晶の直径は、30°C では約 45 μ m, 10°C では約 50 μ m であった (Fig. 4-11(A))。10°C で結晶サイズがわずかに大きくなったのは、PMF が結晶化したためだと考えられる。また、小角側の X 線回折画像を並べた図 (Fig. 4-11(B)) では、顕微鏡画像に示したマイクロビームの照射箇所と比較して回折パターンが出る位置が数 μ m 程度ずれていることがわかる。結晶の周りは液油であり、測定試料は X 線の入射方向に対して垂直に置かれているため、測定中にわずかに結晶が移動した影響だと考えられる。30°C および 10°C で得られた SR- μ -XRD の結果について、結晶の周辺部 8 か所 (Figs. 4-12(A), 4-13(A)) を取り上げて方位角方向に対して展開したものを Figs. 4-12(B), 4-13(B) に、回折角方向に対して展開したものを Figs. 4-12(C), 4-13(C) に示す。30°C での小角側の X 線回折画像 (Fig. 4-12(A)) では、円弧状または同心円状の回折パターンがみられた。STS 結晶の回折範囲 ($2\theta = 0.95\text{--}1.05$) を基に方位角展開を行った図 (Fig. 4-12(B), 黒線で示す) からは、すべての箇所で 2 つのピークがみられ (黒矢印で示す)、ラメラ面が配向していることがわかった。すなわち、小角側の X 線回折画像において、同心円状にみられた回折パターンでもラメラ面が配向してい

ることがわかった。さらに、Fig. 4-12(A)の(a)から(f)へマイクロビームを照射する位置の角度とほぼ一致して、Fig. 4-12(B)の矢印のピーク位置が移動している。すなわち、STS 結晶はどの位置においても同じ配向性を示すことを意味している。一方、PMF α 型結晶の回折範囲 ($2\theta=1.30-1.40$) における解析結果 (Fig. 4-12(B), グレー線で示す) からはピークはみられず、PMF は結晶化していないことがわかった。回折角展開図 (Fig. 4-12(C)) では、すべての箇所でも 5.27 nm および 0.416 nm の回折ピークがみられた。これは、STS 結晶が α 型で結晶化したことを示している。10°C での小角側の X 線回折画像 (Fig. 4-13(A)) では、30°C で観察された濃い円弧状または同心円状の回折パターンに加え、その外側に薄い回折パターンがみられた。これは、PMF が α 型で結晶化したものと考えられる。方位角展開図 (Fig. 4-13(B)) からは、STS 結晶の回折範囲から得られた 2 つのピークを示すパターンに加えて、PMF α 型結晶の回折範囲からも STS 結晶と同様のパターンが得られた。すなわち、PMF α 型結晶においても、どの位置においても同じ配向性を示すことがわかった。さらに、回折角展開図からは (Fig. 4-13(C)), STS 由来の 5.27 nm の回折ピークの広角側にピークの肩がみられた。これは、PMF α 型の結晶化によるものと考えられる。Fig. 4-14 に、30°C および 10°C でマイクロビームを照射したすべての箇所に対して STS 結晶および PMF 結晶の配向を記したものを示す。STS 結晶は中心から放射状に伸びている球晶であり、10°C において、PMF はその STS 結晶のラメラ面と同じ向きで結晶化していることがわかる。以上の結果から、STS 添加 PMF では、STS α 型結晶の配向に沿って PMF が α 型で結晶化することが示された。

Fig. 4-15 に、STB 添加 PMF の結晶を 30°C および 10°C でマイクロビーム照射した際の顕微鏡画像およびマイクロビーム照射位置の小角側の X 線回折画像を並べたものを示す。マイクロビームを照射した結晶の直径は、30°C では約 40 μm 、10°C では約 50 μm であり、10°C でわずかに大きくなった (Fig. 4-15(A))。これは、PMF の結晶化によるものだと考えられる。30°C および 10°C で得られた SR- μ -XRD のデータに対し、結晶の周辺部 8 か所 (Figs. 4-16(A), 4-17(A)) を取り上げて方位角方向に対して展開したものを Figs. 4-16(B), 4-17(B) に、回折角方向に対して展開したものを Figs. 4-16(C), 4-17(C) に示す。30°C の小角側の X 線回折画像 (Fig. 4-16(A)) では、いずれの箇所も円弧状または同心円状の回折パターンが観察された。STB 結晶の回折角範囲 ($2\theta=0.85-0.95$) を基に方位角展開を行った図 (Fig. 4-16(B)) では、

すべての箇所でも 2 つのピークが観察された。すなわち、STB 結晶のラメラ面が配向していることがわかった。さらに、Fig. 4-16(A)の(a)から(f)へマイクロビームを照射する位置の角度とほぼ一致して、Fig. 4-16(B)の矢印のピーク位置が移動している。すなわち、STB 結晶はどの位置においても同じ配向性を示すことを意味している。一方、PMF α 型結晶の回折範囲 ($2\theta=1.15-1.25$) における解析からはピークはみられず、PMF は結晶化していないことがわかった。さらに、回折角を展開した図 (Fig. 4-16(C)) からは、すべての箇所でも 6.28 nm および 0.414 nm の回折ピークがみられた。これは、STB 結晶が α 型で結晶化したことを示している。10°C の小角側の X 線回折画像 (Fig. 4-17(A)) では、いずれの箇所でも 30°C で観察された回折パターンに加えて、その外側に新たな回折パターンが出現した。これは、PMF が α 型で結晶化したものと考えられる。STS 添加 PMF においては、PMF α 型結晶は一樣に薄い回折パターンとして出現していたが、STB 添加 PMF においては、PMF α 型結晶は濃淡のある回折パターンとして出現した。また、STB 添加 PMF では、PMF α 型結晶の回折リング上にスポット状の回折パターンが観察された (矢印で示す)。スポット状の回折パターンは、結晶サイズが大きいことに由来する。STB 結晶の回折角範囲 ($2\theta = 0.85-0.95$) および PMF α 型結晶の回折角範囲 ($2\theta = 1.15-1.25$) を基に方位角展開を行った図 (Fig. 4-17(B)) では、STB 結晶は 30°C の場合と同様、すべての箇所でも結晶のラメラ面が配向している様子が観察された。一方で、PMF α 型結晶の回折範囲から得られたパターンは、STB 結晶と同様のピークを示すものに加えて、STB 結晶のピークとは異なる角度にピークを示すものがあった (グレーの破線矢印で示す)。回折角を展開した図 (Fig. 4-17(C)) では、30°C で観察された STB 由来の 6.28 nm と α 型を示す 0.418 nm の回折ピークに加えて、4.75 nm に新たに回折ピークがみられた。これは、PMF α 型由来の回折ピークと考えられる。Fig. 4-18 に、STB 添加 PMF を 10°C で測定したうち、STB 結晶のラメラ面の配向に対して PMF α 型結晶が配向していない箇所を一部取り上げたものを示す。方位角展開を行った図からは、STB 結晶のラメラ面の配向とは異なる向きで PMF 結晶が配向しているもの (Fig. 4-18(B)(a))、PMF 結晶が配向していないもの (Fig. 4-18(B)(b))、PMF 結晶が一箇所のみ強いピークを示すもの (Fig. 4-18(B)(b),(c)) が観察された。また、これらの回折パターンの回折角展開では、いずれも STB 結晶に由来する 6.28 nm、PMF α 型結晶に由来する 4.75 nm、 α 型を示す 0.418 nm が存在していた。Fig. 4-19 に、30°C および 10°C でマイクロビームを照射したすべての

箇所に対して STB 結晶および PMF 結晶の配向を記したものを示す。これらの結果から、STB 結晶は中心から放射状に伸びている球晶であり、PMF は STB 結晶のラメラ面の配向と同じ向きで結晶化するものがある一方、STB 結晶のラメラ面の配向とは異なる向きで結晶化するものがあることがわかった。また、STB α 型の結晶に対して PMF が α 型で結晶化しており、STS 添加 PMF の場合と同様、すべて α 型で結晶化することがわかった。

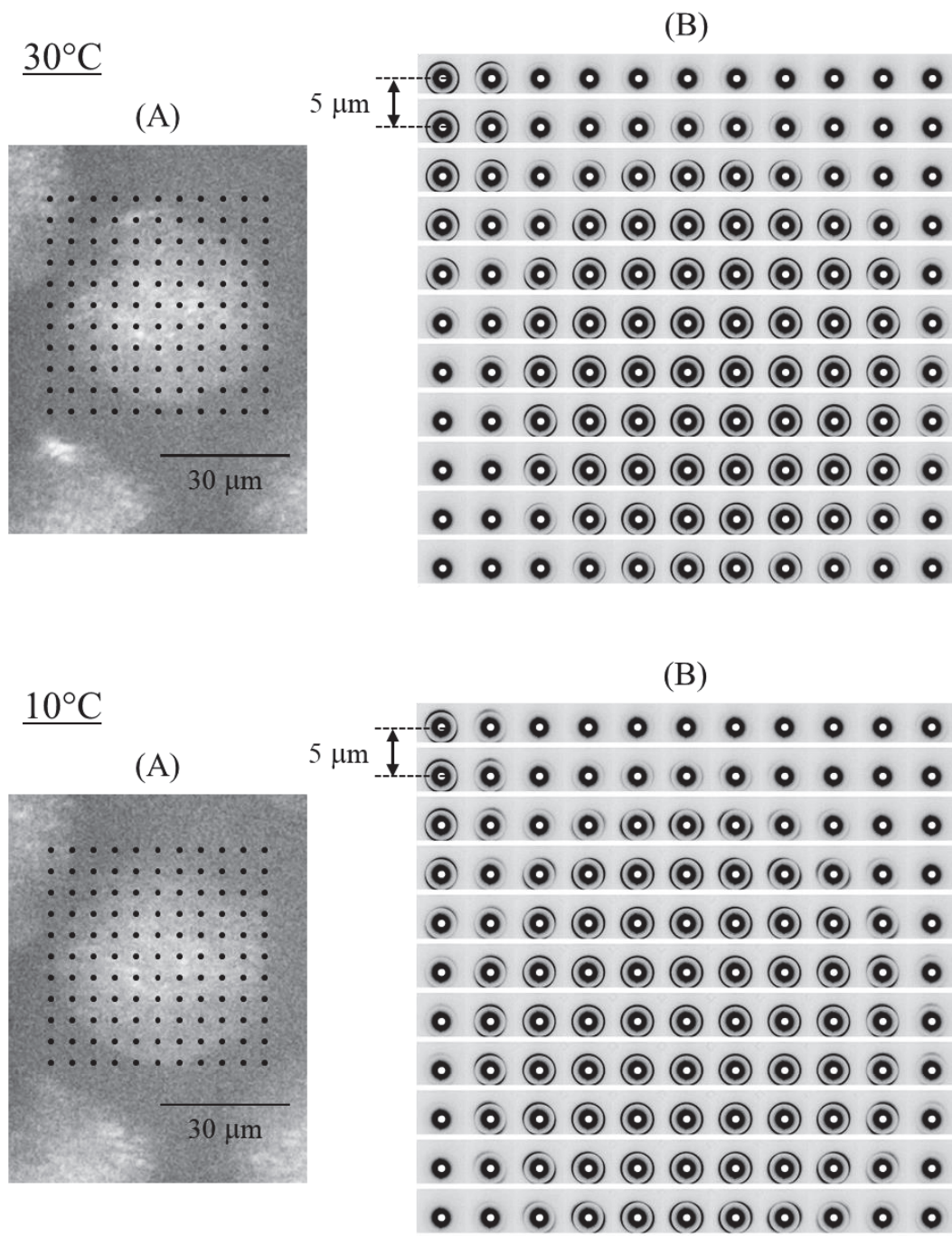


Fig. 4-11 PMF with 20 wt% STS crystallized at 30°C and 10°C for SR-μ-XRD measurement. (A) Microscopic image of scanning area. Black spots correspond to the exposure position of microbeam. (B) Scanning SR-μ-SAXD patterns.

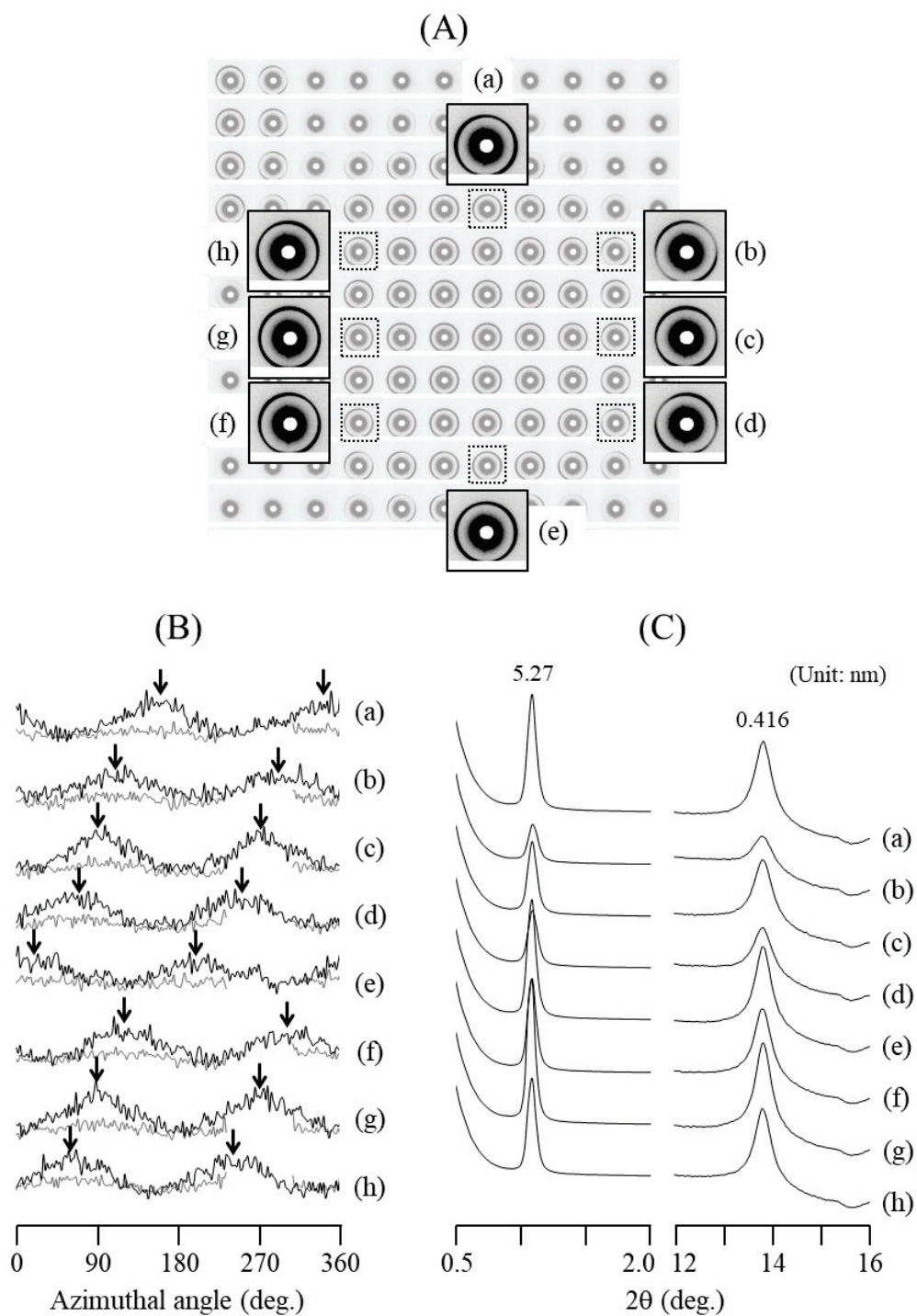


Fig. 4-12 PMF with 20 wt% STS crystallized at 30°C for SR- μ -XRD measurement. (A) Scanning SR- μ -SAXD patterns: enlarged positions were analyzed. (B) Azimuthal angle extension patterns of STS crystals (Black lines) and PMF α crystals (Gray lines). The orientation of lamellar planes of STS crystals is indicated by black arrows. (C) 2θ extension of SR- μ -XRD patterns.

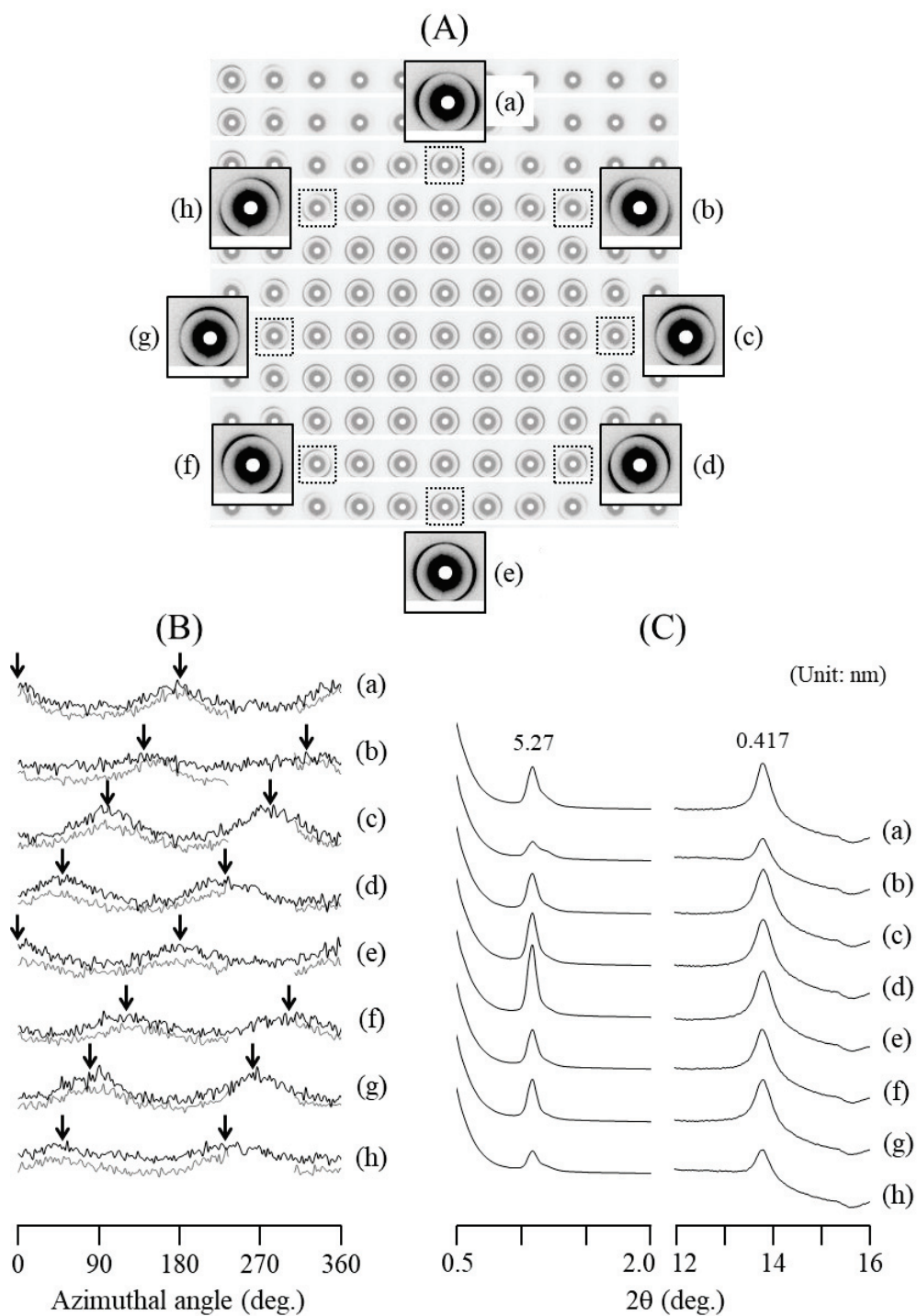


Fig. 4-13 PMF with 20 wt% STS crystallized at 10°C for SR- μ -XRD measurement. (A) Scanning SR- μ -SAXD patterns: enlarged positions were analyzed. (B) Azimuthal angle extension patterns of STS crystals (Black lines) and PMF α crystals (Gray lines). The orientation of lamellar planes of STS crystals is indicated by black arrows. (C) 2 θ extension of SR- μ -XRD patterns.

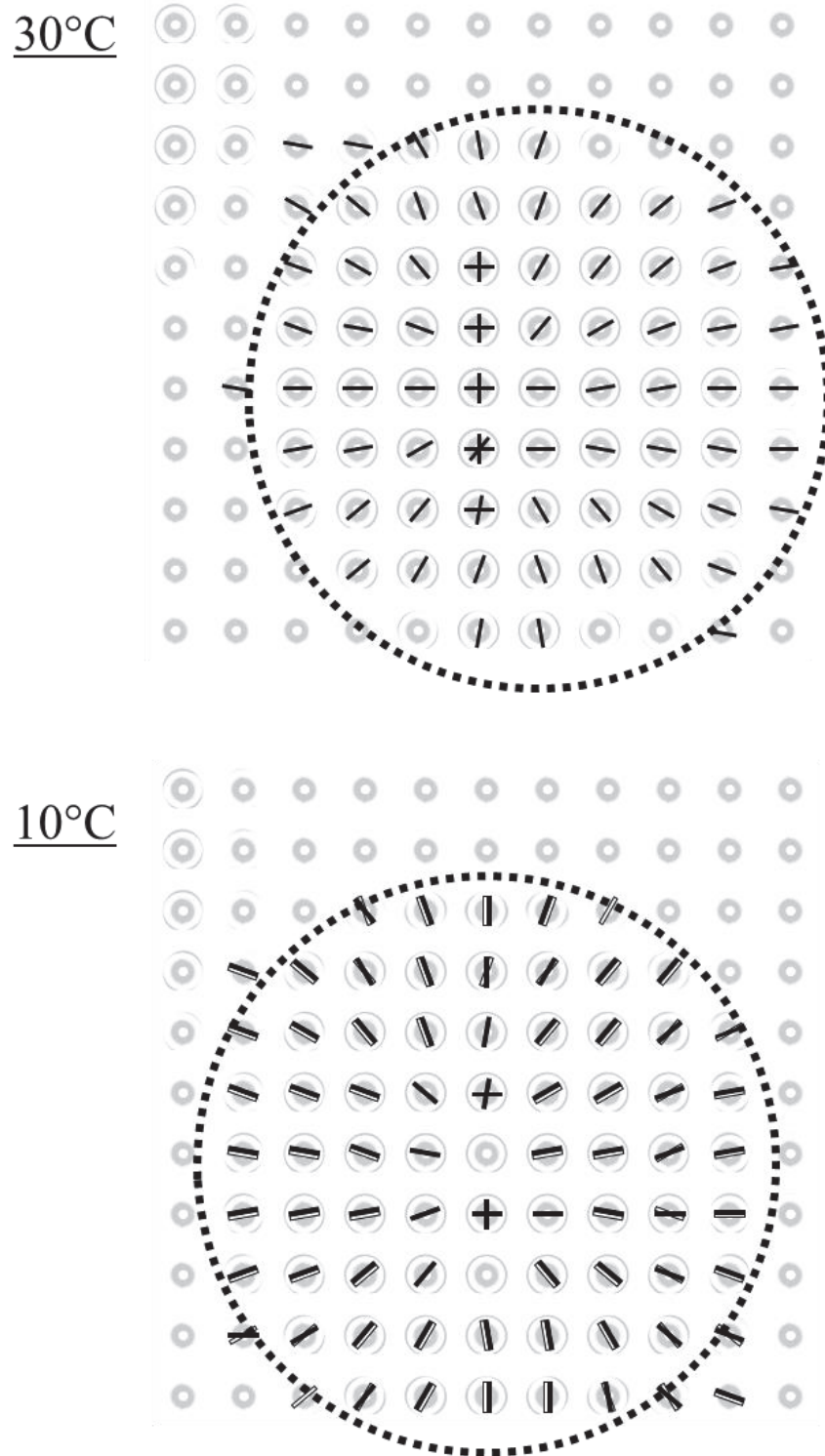


Fig. 4-14 PMF with 20 wt% STS crystallized at 30°C and 10°C for SR- μ -XRD measurement. The lamellar plane orientations are indicated with black lines (STS crystals) and white lines (PMF crystals).

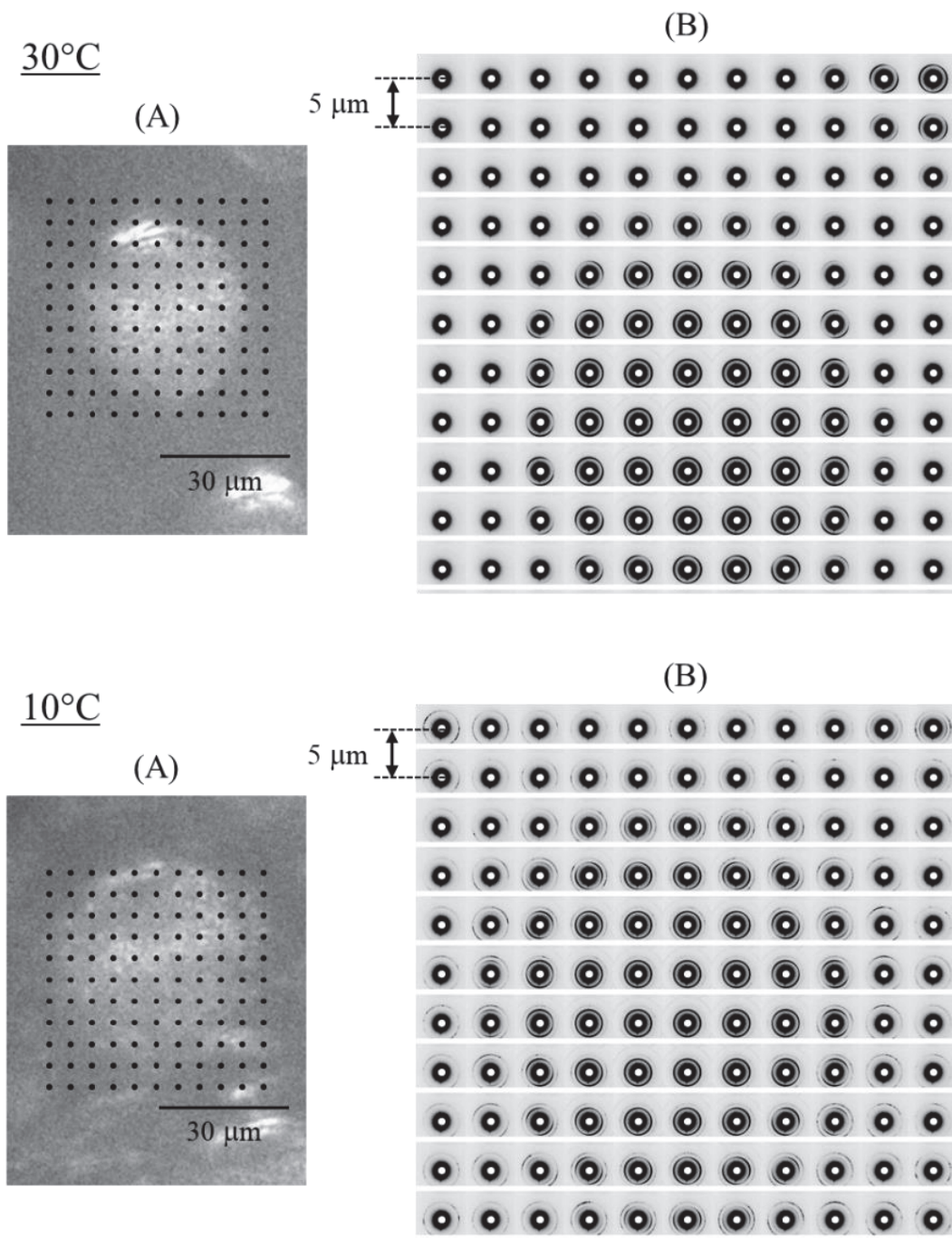


Fig. 4-15 PMF with 20 wt% STB crystallized at 30°C and 10°C for SR-μ-XRD measurement. (A) Microscopic image of scanning area. Black spots are the exposure position of microbeam. (B) Scanning SR-μ-SAXD patterns.

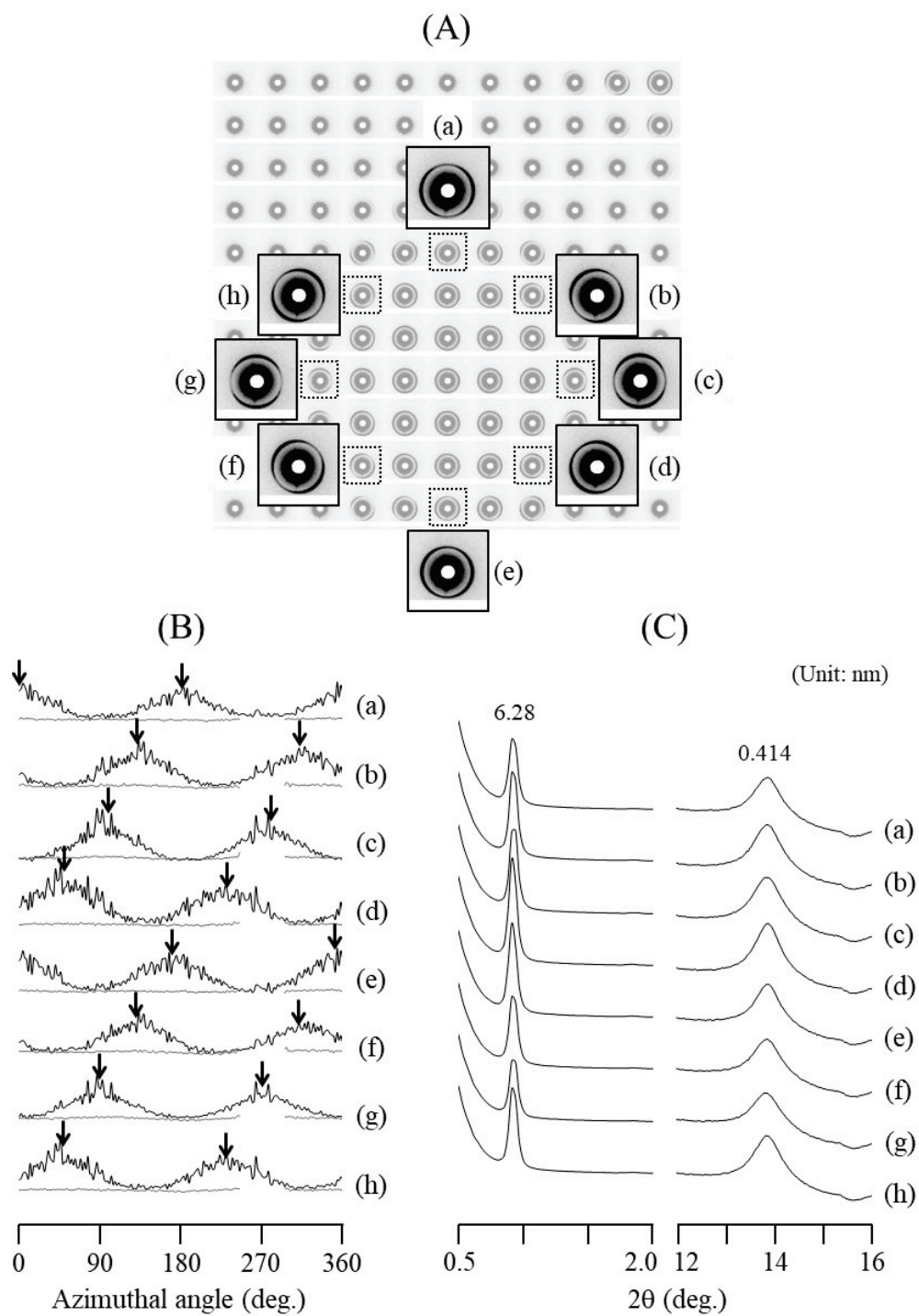


Fig. 4-16 PMF with 20 wt% STB crystallized at 30°C for SR- μ -XRD measurement. (A) Scanning SR- μ -SAXD patterns: enlarged positions were analyzed. (B) Azimuthal angle extension patterns of STB crystals (Black lines) and PMF α crystals (Gray lines). The orientation of lamellar planes of STB crystals is indicated by black arrows. (C) 2θ extension of SR- μ -XRD patterns.

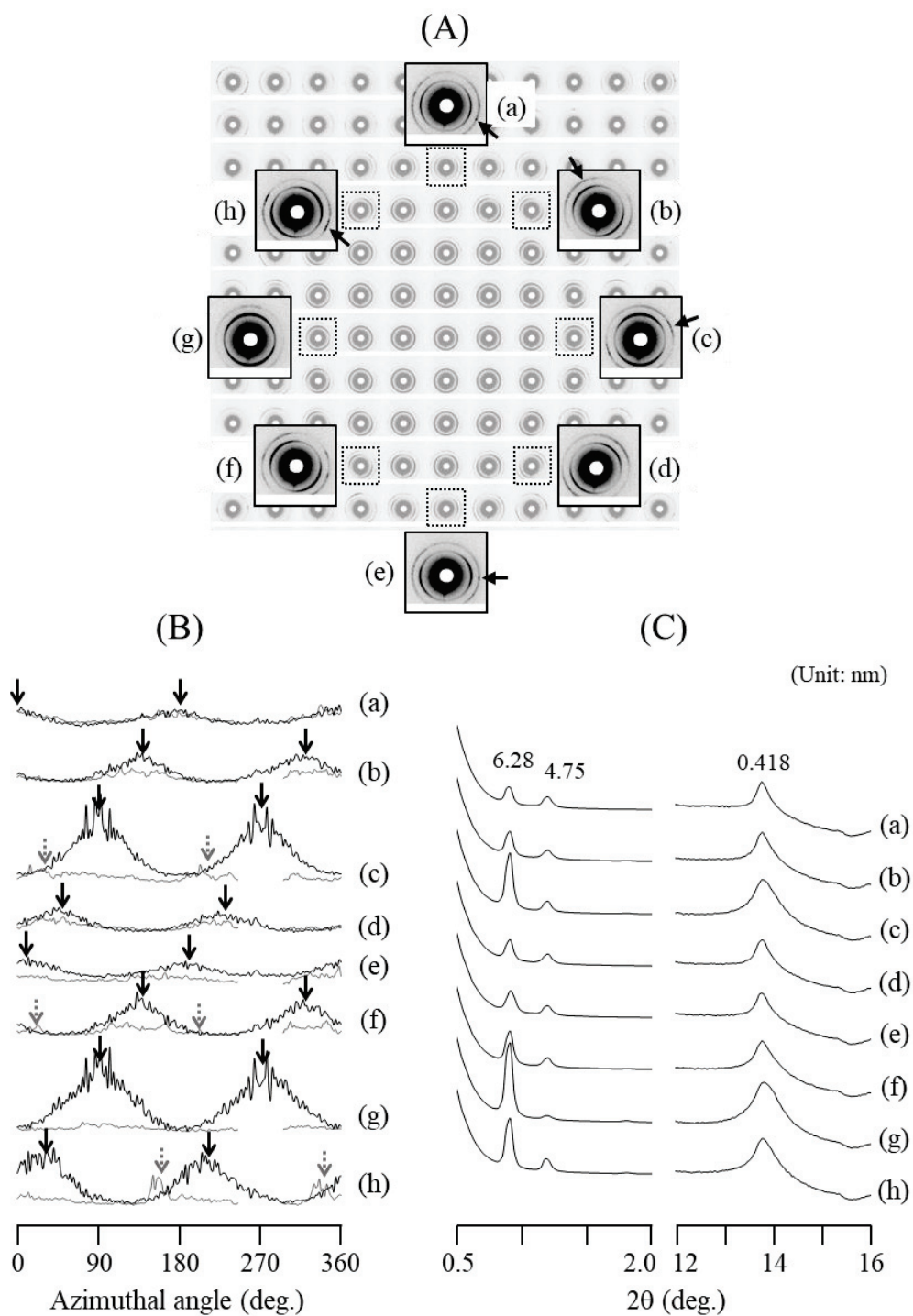


Fig. 4-17 PMF with 20 wt% STB crystallized at 10°C for SR- μ -XRD measurement. (A) Scanning SR- μ -SAXD patterns: enlarged positions were analyzed. (B) Azimuthal angle extension patterns of STB crystals (Black lines) and PMF α crystals (Gray lines). The orientation of lamellar planes of STB crystals is indicated by black arrows. (C) 2θ extension of SR- μ -XRD patterns.

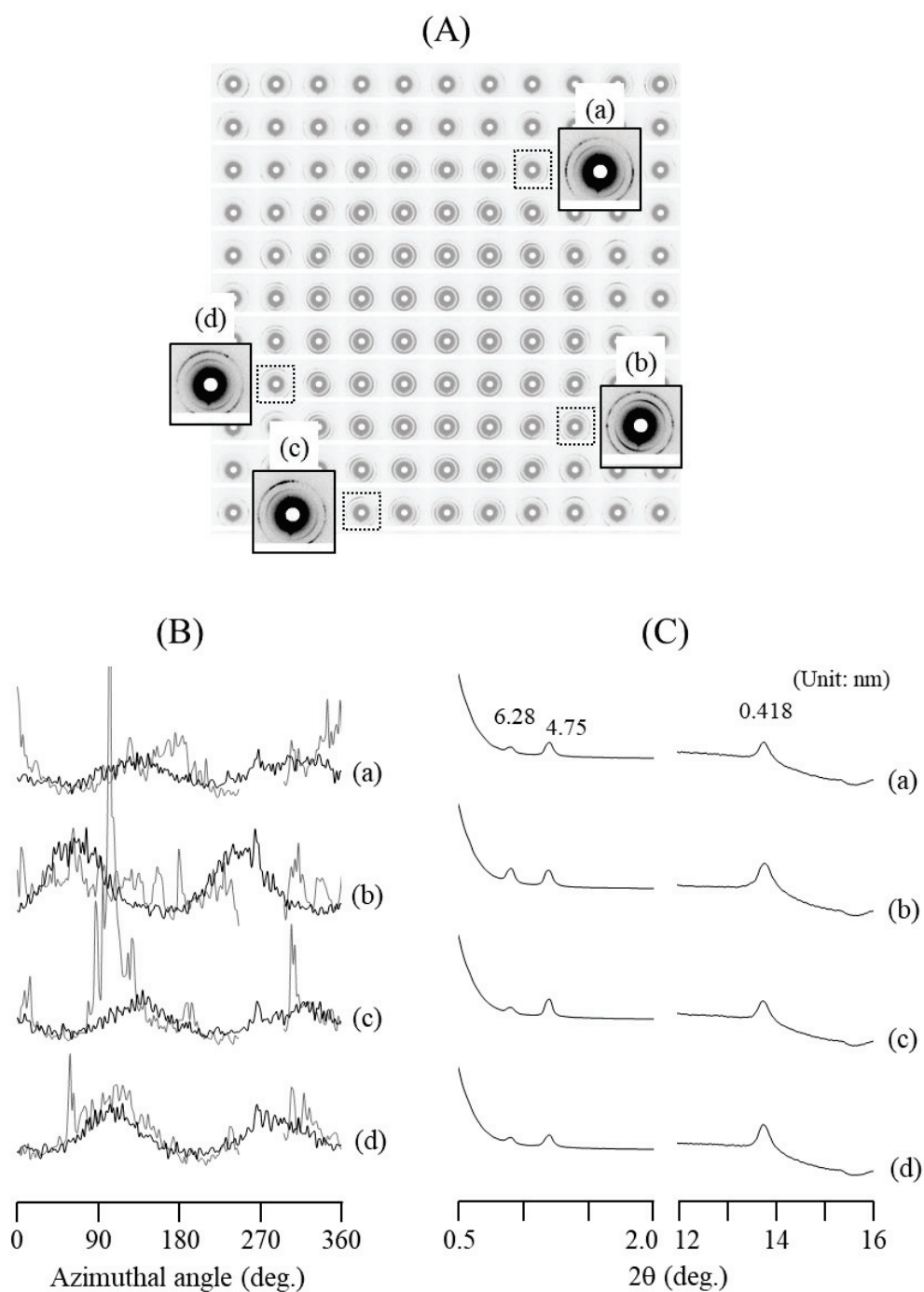


Fig. 4-18 PMF with 20 wt% STB crystallized at 10°C for SR- μ -XRD measurement. (A) Scanning SR- μ -SAXD patterns: enlarged positions show that PMF crystals did not orient along the STB crystals. (B) Azimuthal angle extension patterns of STB crystals (Black lines) and PMF α crystals (Gray lines). The orientation of lamellar planes of STB crystals are indicated by black arrows. (C) 2θ extension of SR- μ -XRD patterns.

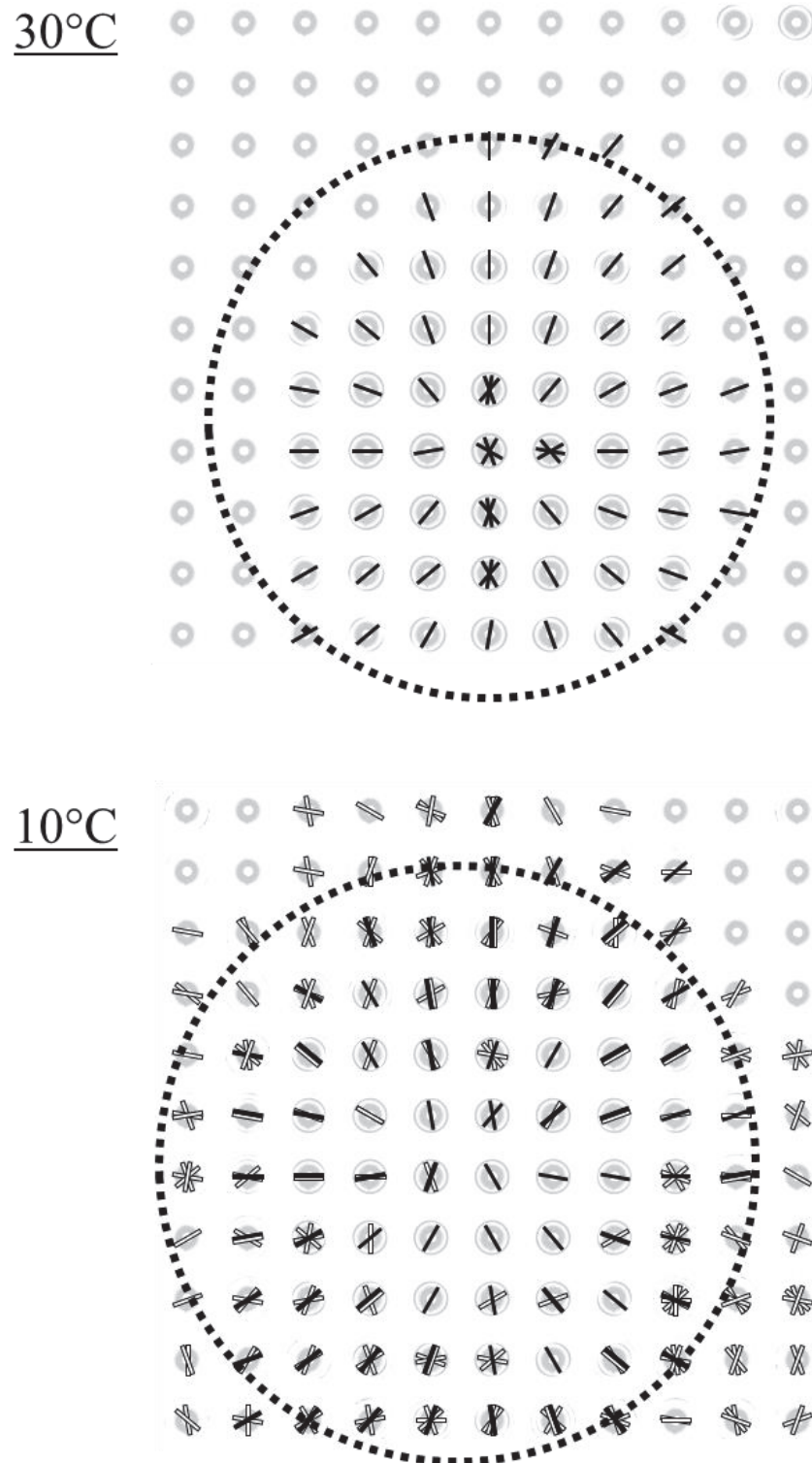


Fig. 4-19 PMF with 20 wt% STB crystallized at 30°C and 10°C for SR- μ -XRD measurement. The lamellar plane orientations are indicated with black lines (STB crystals) and white lines (PMF crystals).

4.4 考察

本章では、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶化挙動（結晶化温度、結晶形態・配向、結晶多形）に及ぼす影響を調べることを目的とした。そこで、乳化剤を添加した油脂のバルク状態を、DSC および SR-XRD によって調べるとともに、顕微鏡観察および SR- μ -XRD を用いて、1つの乳化剤結晶に対する油脂の結晶成長様式および局所箇所の結晶多形を調べることで、乳化剤による油脂の結晶化および融解挙動への作用機構を明らかにすることを試みた。

DSC および SR-XRD では、いずれの SE を添加しても高融点成分の結晶化を促進しており、SE が先に α 型で結晶化した後に PMF が α 型で結晶化したことを確認した。PMF 高融点成分の結晶化温度については、STP 添加および STS 添加では決定することができなかった。これは、以下の理由が挙げられる：(i) DSC では、ブロードな結晶化ピークを示しており、SE と PMF の結晶化ピークが区別できなかったこと、(ii) SR-XRD では、SE と PMF α 型のラメラ間隔が近く（STP : 4.82 nm ; STS : 5.34 nm ; PMF α 型 : 4.68 nm）、回折パターンが一部重なるため、回折ピークの出現温度が確認できなかったこと、(iii) 冷却過程における SE と PMF の副格子構造はいずれも α 型であり区別ができなかったこと。STP 添加の DSC では、高融点成分のピーク強度が徐々に増加し、ブロードな発熱ピークを描いていた。SR-XRD の結果 (Fig. 4-5(b)) と併せると、DSC でみられたブロードな結晶化ピークは、STP と PMF の結晶化が連続的に起こったことによるものと考えられる。STS 添加 (Fig. 4-3(c)) でも高融点成分の結晶化ピークはブロードであったが、20°C 付近でわずかに発熱量が増加していた。この発熱量の増加は、PMF 高融点成分の結晶化によるものと考えられる。一方で、STB 添加 (Fig. 4-3(d)) では、STB の結晶化による小さくブロードな発熱ピークがみられ、その後、PMF の結晶化によるシャープなピークがみられた。STP 添加や STS 添加でブロードな結晶化ピークを示したのは、乳化剤と油脂の構造が類似しており、油脂の核形成の前に結晶化した乳化剤によって、小さい過冷却度で油脂が結晶化したためだと考えられる。STB 添加でシャープな結晶化ピークが出現したのは、PMF の結晶化に十分な過冷却度が必要なことを示している。以上の結果から、STP 添加および STS 添加の PMF 高融点成分の結晶化温度を決定することはできなかったが、SE と PMF の脂肪酸鎖長が類似する場合、先に結晶化した SE によって PMF 高融点成分の結晶化がより促進されることが推察される。

顕微鏡観察では、SE と PMF の有する脂肪酸鎖長が類似するとき、SE 結晶の配向と同じ向きで PMF が結晶化することがわかった。一方で、SE と PMF の有する脂肪酸鎖長が大きく異なるとき、STB の球晶の表面に PMF があらゆる方向を向いて結晶化した。また、SR- μ -XRD においても、顕微鏡観察と同様の結果が得られた。さらに、SR- μ -XRD の結果から、SE および PMF の結晶多形はいずれも α 型であることがわかった。これまでに結晶構造解析が行われている TAG はわずかであり¹³⁾、本実験で用いた乳化剤と油脂の結晶構造解析は行われていないが、乳化剤結晶と油脂結晶のラメラ間隔の周期性および副格子構造が類似する条件の場合、エピタキシャル成長することが明らかとなった (Fig. 4-20)。本実験は、油脂と乳化剤の有する脂肪酸鎖長が類似する場合に、乳化剤結晶に TAG がエピタキシャル成長することを初めて観察した研究である。Verstringe ら¹⁰⁾は、SR- μ -XRD を用いてモノパルミチンとパーム油のラメラ面の配向を調べたが、本実験では、SR- μ -XRD に加えて顕微鏡観察によっても、乳化剤結晶の配向に対する油脂結晶の配向を示すことができた。さらに、本実験の結果は、モノアシルグリセロールよりも大きな親水基をもつ乳化剤であるソルビタン脂肪酸エステルであっても、油脂の核形成のテンプレートとなり得ることを示した。

脂肪酸鎖長の異なる SE に対する PMF の結晶化の違いは、PMF の核形成機構の違いによると考えられる。乳化剤と油脂の有する脂肪酸鎖長が類似する場合、すなわち、乳化剤に STP および STS を用いた場合、STP および STS と PMF α 型のラメラ間隔および副格子構造が類似するため、PMF 分子は STP および STS 結晶のキック位置に取り込まれることができると推察される。よって、STP および STS 結晶の配向を引き継いで PMF が結晶成長する、すなわちエピタキシャル成長すると考えられる (Fig. 4-21(a))。一方、乳化剤と油脂の有する脂肪酸鎖長が大きく異なる場合、すなわち、乳化剤に STB を用いた場合、PMF 分子は STB 結晶のキック位置に取り込まれないと考えられる (Fig. 4-21(b))。よって、PMF は STB 結晶表面であらゆる方向を向いて結晶化したと考えられる。しかし、STB 添加 PMF においても PMF の結晶化が促進されたのは、PMF の核形成は STB 結晶の表面で不均一核形成したためだと考えられる。

顕微鏡観察において、STS および STB を用いた際、冷却 5°C で細長いひげ状の結晶が観察された (Figs. 4-8(e), 4-9(e))。Fig. 4-22 に、STB 結晶からひげ状結晶が成長する様子を観察した DIC 像および PLM 像を示す。なお Fig. 4-22 は、Fig. 4-9 と同じ顕微鏡視野内である。

DIC 像 (Fig. 4-22 : 上段) で観察されるひげ状結晶の構造は, PLM 像 (Fig. 4-22 : 下段) では明瞭に観察されなかったことから, DIC 観察は油脂結晶の微細構造を観察する有効な手法であるといえる. DIC 像から, 冷却 6°C から 5°C の間に細長い結晶が急激に成長し, 5°C 保持中に結晶が消失する様子が観察された. 細長い結晶の結晶化挙動は SR-XRD でみられた 5.26 nm と 0.414 nm の回折ピークの出現および消失のタイミングと一致していたことから (Fig. 4-5(d)), 細長い結晶は α 型の副格子構造を有する不安定な準安定相であると考えられる. 一方で, 乳化剤に STP を用いた場合は, ひげ状結晶も 5.26 nm の回折ピークもみられなかった (Fig. 4-5(b), Fig. 4-7). これは, PMF α 型と STP の脂肪酸鎖長が類似しているためだと考えられる. STP は STS や STB よりも PMF α 型の脂肪酸鎖の長さに近いため, STP が最も PMF の核形成を促進すると推察される. STP を乳化剤として用いた場合, PMF の結晶化が促進されたことで過飽和度が急激に減少したと考えられる. よって, STP ではひげ状結晶が成長しなかったと考えられる.

STP と STS からの PMF の結晶成長様式は変わらなかったものの, SR-XRD と DIC 観察の結果は, STP の添加は昇温中の PMF α 型から β' 型への多形転移を抑制していたことを示した. これらの違いは, STP は STS よりも PMF α 型と構造の類似性が高いことが考えられる. SE の副格子構造は常に α 型であるため, 冷却過程で生じる PMF 結晶と SE 結晶の副格子構造は同じである. 一方で, PMF α 型のラメラ間隔 (4.68 nm) は STS のラメラ間隔 (5.34 nm) よりも STP (4.82 nm) が近い. このことが, STP が PMF α 型から β' 型への多形転移を抑制した理由だと考えられる.

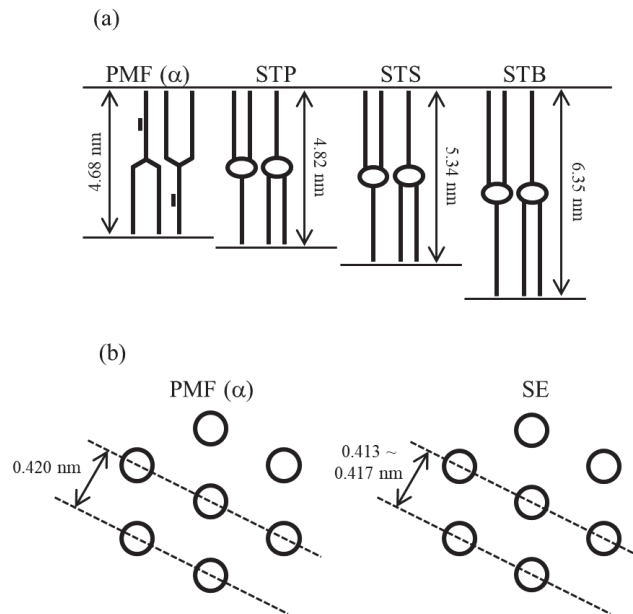


Fig. 4-20 Schematic illustration of (a) lamellar structures and (b) subcell packing of PMF α form and SEs.

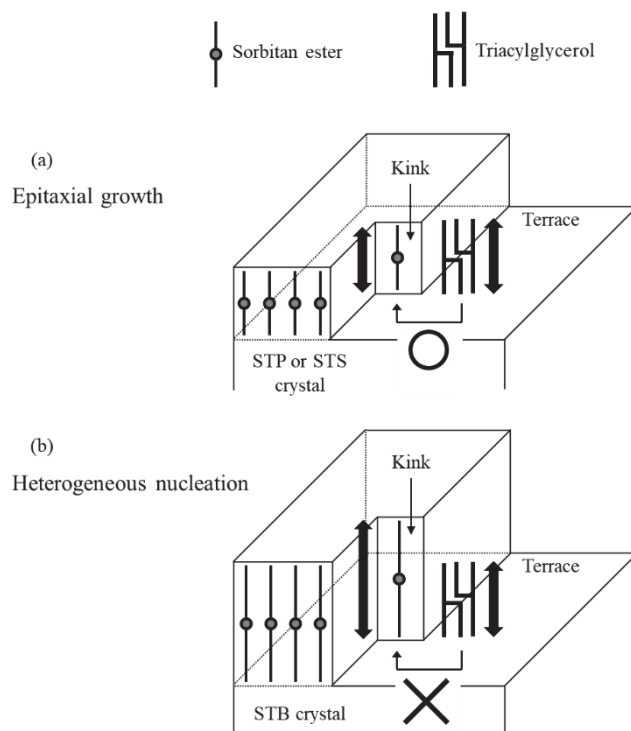


Fig. 4-21 Schematic illustrations of nucleation mechanisms of PMF crystals at the surface of SE. (a) Similarity in chain lengths of fatty acid moieties between PMF and SE (STP and STS) (b) Dissimilarity in chain length of fatty acid moieties between PMF and SE (STB).

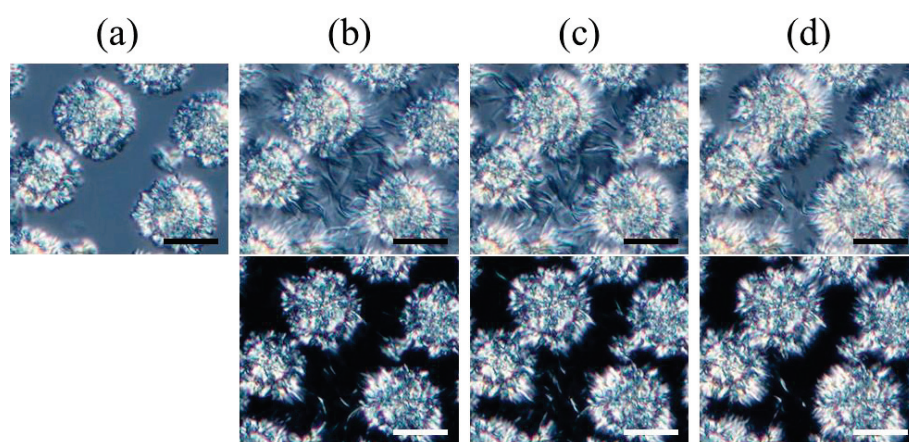


Fig. 4-22 Crystal growth of elongated crystals on STB crystals: (a) 6°C; (b) 5°C, 0 min; (c) 5°C, 2 min; and (d) 5°C, 4 min. The upper images were taken using a DIC microscope, and the lower images were taken using a PLM. Scale bars are 20 μm .

4.5 まとめ

本章では、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶化挙動（結晶化温度、結晶形態・配向、結晶多形）に及ぼす影響を調べることを目的とした。その結果、いずれの SE も PMF の高融点成分の結晶化を促進することがわかった。これは、PMF の核形成の前に SE が結晶化したためだと考えられる。特に、PMF に主に含まれる脂肪酸と同じ脂肪酸を有する STP、または炭素が 2 原子分長い脂肪酸を有する STS を用いた場合、PMF 高融点成分の結晶化が著しく促進された。また、顕微鏡観察では STP 結晶および STS 結晶の配向に沿って PMF が結晶化する様子が観察された。すなわち、SE 結晶に対して PMF がエピタキシャル成長することが示された。しかし、PMF が主に有する脂肪酸よりも炭素が 6 原子分長い脂肪酸を有する STB を用いた場合、STB 結晶の表面で PMF があらゆる方向を向いて結晶化する様子が観察された。すなわち、不均一核形成による結晶化が観察された。また、STP 添加のみ PMF 高融点成分の α 型から β' 型への多形転移を抑制していた。これは、STP と PMF α 型の構造の類似性が PMF の多形転移の抑制に影響したと考えられる。

文 献

1. Bayés-García, L., Patel, A. R., Dewettinck, K., Rousseau, D., Sato, K., & Ueno, S. (2015). Lipid crystallization kinetics—roles of external factors influencing functionality of end products, *Curr. Opin. Food Sci.*, 4, 32–38.
2. Takiguchi, H., Iida, K., Ueno, S., Yano, J., & Sato, K. (1998). Heterogeneous nucleation of n-alcohol crystals from solution assisted by vapor-deposited thin films of fatty acids, *J. Cryst. Growth*, 193, 641–647.
3. Fujiwara, K., Nagahisa, S., Yano, J., Ueno, S., & Sato, K. (2000). Kinetics of heterogeneous nucleation of n-Alcohol crystals from solution assisted by template thin films of monoacylglycerols and fatty acids, *J. Phys. Chem. B*, 104, 8116–8123.
4. Smith, K. W., Bhaggan, K., Talbot, G., & van Malssen, K. F. (2011). Crystallization of fats: Influence of minor components and additives, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 1085–1101.
5. Shimamura, K., Ueno, S., Miyamoto, Y., Sato, K. (2013). Effects of polyglycerine fatty acid esters having different fatty acid moieties on crystallization of palm stearin, *Cryst. Growth Des.*, 13,

4746–4754.

6. Maruyama, J. M., Soares, F. A. S. D. M., D'Agostinho, N. R., Gonçalves, M. I. A., Gioielli, L. A., da Silva, R. C. (2014). Effects of emulsifier addition on the crystallization and melting behavior of palm olein and coconut oil, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 2253–2263.
7. Saitou, K., Homma, R., Kudo, N., Katsuragi, Y., & Sato, K. (2014). Retardation of crystallization of diacylglycerol oils using polyglycerol fatty acid esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91, 711–719.
8. Sonwai, S., Podchong, P., & Rousseau, D. (2016). Crystallization kinetics of coconut oil in the presence of sorbitan esters with different fatty acid moieties, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 93, 849–858.
9. Fredrick, E., Foubert, I., Van De Sype, J., & Dewettinck, K. (2008). Influence of monoglycerides on the crystallization behavior of palm oil, *Cryst. Growth Des.*, 8, 1833–1839.
10. Verstringe, S., Dewettinck, K., Ueno, S., & Sato, K. (2014). Triacylglycerol crystal growth: templating effects of partial glycerols studied with synchrotron radiation microbeam X-ray diffraction, *Cryst. Growth Des.*, 14, 5219–5226.
11. Sato, K., & Ueno, S. (2014). Physical properties of fats in food. In: Rajah, K. K. (Eds.), *Fats in Food Technology*, John Wiley & Sons: Chichester, U.K., pp 1–38.
12. Mykhaylyk, O. O., Smith, K. W., Martin, C. M., & Ryan, A. J. (2007). Structural models of metastable phases occurring during the crystallization process of saturated/unsaturated triacylglycerols, *J. Appl. Crystallogr.*, 40, s297–s302.
13. Kaneko, F. (2001). Polymorphism and phase transitions of fatty acids and acylglycerols. In Garti, N., & Sato, K. (Eds.), *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems*, Marcel Dekker: New York, Chapter 2, pp 53–97.

第5章 脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が 油脂の結晶多形に及ぼす影響

5.1 はじめに

チョコレートやマーガリン、ファットスプレッドといった結晶性油脂食品は、製造するうえで油脂の結晶多形を制御する必要がある。これは、油脂の結晶多形は融点、密度、結晶形態を決定するからである。油脂の結晶多形は、熱処理、せん断の印加、超音波や圧力の付与、微量成分や乳化剤の添加などによって制御することができる¹⁻³⁾。製品に不適切な不安定多形を結晶化させると、製品のテクスチャーといった物性が変化するだけではない。不安定多形から安定多形への多形転移が起こり、チョコレートのファットブルームやファットスプレッド中の粗大結晶の発現といった、製品の品質の低下も引き起こす。

乳化剤には、油脂の結晶核形成や結晶成長、結晶形態、熱挙動や結晶多形を変化させる効果がある^{4,5)}。これらの効果を目的に応じて発揮させるためには、適切な乳化剤を選択することが必要となる。油脂の結晶化に対する乳化剤の添加効果は、乳化剤の構造^{6,7)}、脂肪酸の鎖長⁸⁻¹²⁾、脂肪酸が飽和か不飽和か^{13,14)}に依存する。さらに、結晶化条件や乳化剤の濃度^{7,11,14-18)}、冷却速度¹⁵⁾も油脂の結晶化挙動に影響を与える。

乳化剤が油脂の結晶多形に与える影響について、これまで数多くの研究が行われてきた。Sonwai ら^{8,9)}は、ソルビタン脂肪酸エステルはそのエステル化度や脂肪酸の種類に関わらず、ココナツ油やココアバター¹⁰⁾の結晶多形に影響しないと報告している。一方で、Shimamura ら¹⁵⁾は、ポリグリセリン脂肪酸エステル (PGFE) はパームステアリンの β' 型の結晶化を抑制すると述べている。これは、PGFE 分子内のパルミチン酸とオレイン酸の比率に依存する。Shimamura らは、パームステアリンの α 型よりも β' 型の副格子のパッキング密度が高く、PGFE とパームステアリン β' 型の相互作用が強いためだと推察している。しかし、過去の研究では乳化剤の結晶多形が油脂の結晶多形に与える効果について十分に研究されておらず、乳化剤が油脂の結晶多形に及ぼす影響について系統的理解には至っていない。これは、乳化剤は通常、油脂に対して 1 wt% 以下で添加されており、DSC や XRD 測定で乳化剤自身の結晶化や融解のシグナルを検出することが難しいからである^{6,7,10-12,15,19)}。

油脂の結晶化は、テンプレート効果によって促進されることは第4章でも述べた。また、

第 4 章の結果から乳化剤と油脂の有する脂肪酸鎖長が一致または類似する場合に、乳化剤結晶の配向を引き継いで油脂が結晶化したことがわかった。これまでの報告から、テンプレートとして働く乳化剤は、配向だけでなく、特定の副格子構造を選択的に出現させると考えられている¹⁾。テンプレート効果の機構について調べた過去の研究では、テンプレートとなる脂肪酸と *n*-アルコールの脂肪酸の炭素数が類似するとき、テンプレートの副格子構造を引き継いで *n*-アルコールが結晶化することが報告されている²⁰⁾。モノアシルグリセロールと *n*-アルコールの系でも同様の結果が得られている²¹⁾。しかし、天然の食用油脂と乳化剤を用いた系で、油脂と乳化剤の副格子構造に着目して研究を行った例はほとんどない。Verstringe ら²²⁾は、モノパルミチンとパーム油を用いてテンプレート効果について調べており、モノパルミチンとパーム油のラメラ面の一致がみられたが、一方でモノパルミチン結晶とパーム油結晶の副格子構造の一致はみられなかったと報告している。すなわち、モノパルミチン結晶は sub- α 型または α 型であったが、パーム油結晶は β' 型であった。しかし、乳化剤と油脂の結晶多形に着目した研究は少なく、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤および乳化剤の多形が、油脂の結晶多形に及ぼす影響について系統的な研究は行われていない。

本章では、脂肪酸鎖長の異なるソルビタン脂肪酸エステル (SE) がパーム中融点油脂 (PMF) の結晶多形に及ぼす影響について、乳化剤と油脂の結晶多形に着目して調べた。すなわち、PMF β' 型が結晶化する条件下において、 α 型の SE 結晶が存在する場合に、PMF がどの多形で結晶化するかを調べた。本章の実験では、PMF を 22°C で等温結晶化させることで、PMF の β' 型結晶を得た。また、PMF の結晶化の前に SE を結晶化させ、かつ SE の結晶多形も追跡できるように、高濃度の SE を添加した PMF を試料とした。SE および PMF の結晶化および結晶多形の挙動は、放射光時分割 X 線回折測定 (SR-XRD)、SE 結晶および PMF 結晶の形態は微分干渉顕微鏡 (DIC) を用いて調べた。

5.2 実験試料および実験方法

5.2.1 試料および試料調製方法

試料は、油相に PMF、乳化剤に 3 種類の SE (ソルビタントリパルミテート (STP)、ソルビタントリステアレート (STS)、ソルビタントリベヘネート (STB)) を用いた。SE の結晶化・融解挙動および長面・短面間隔については 2 章 Fig.2-4, Fig.2-5 に示した通りである。

試料は、5 wt%SE を添加した PMF を用いた。SE および PMF はスクリー瓶 (5mL) に入れ、ホットプレート上で融解させた。その後、転倒攪拌を行って溶液を均一にした。調製した試料は冷蔵庫で保管し、使用時は試料を再度ホットプレート上で融解させた。

5.2.2 放射光時分割 X 線回折測定 (SR-XRD)

SR-XRD 測定では、試料を融点以上 (PMF 単体および STP 添加 : 60°C, STS 添加 : 70°C, STB 添加 : 80°C) で 10 分間保持した後、以下の温度プログラムにおける X 線回折パターンを得た : 22°C まで 2°C/min で冷却, 22°C で 3 時間保持した後, 40°C まで 2°C/min で昇温。

5.2.3 微分干渉顕微鏡観察 (DIC)

DIC 観察では、ホットプレート上で融解させた試料 (3 μ L) を 2 枚のカバーガラス (下面 : 18 mm \times 18 mm, 上面 : 15 mm ϕ) で挟み、融点以上 (PMF 単体 : 60°C, STP 添加 PMF : 70°C, STS 添加 PMF : 80°C, STB 添加 PMF : 100°C) で 10 分間保持した後、以下の温度プログラムにおける結晶形態の観察を行った : 22°C まで 2°C/min で冷却, 22°C で 3 時間保持した後, 40°C まで 2°C/min で昇温。試料温度の制御は、顕微鏡観察用ペルチェ式冷却加熱ステージ (Linkam model 10021, Linkam Scientific Instruments, Ltd., Tadworth, U.K.) を用いて行った。

5.3 結果

5.3.1 油脂の β' 型結晶化に対する乳化剤の添加効果

はじめに、予備実験にて PMF が融液から β' 型のみ結晶化する温度および保持時間を決定した。その結果、PMF を 22°C で 3 時間保持する間に PMF が融液から β' 型で結晶化することを確認した。Fig. 5-1 に、PMF 単体を 22°C で 3 時間保持し、その後 40°C まで 2°C/min で昇温した際の SR-XRD の結果を示す。なお、PMF 単体を 60°C から 22°C に冷却する際は、回折ピークは出現しなかった (データは示していない)。PMF 単体を 22°C で等温保持中、SAXD では 1 時間 40 分後に 4.35 nm の回折ピーク、WAXD では 2 時間 40 分後に 0.437 nm, 0.422 nm, 0.393 nm の β' 型の回折ピークが出現した (Fig. 5-1 (a))。その後、SAXD の 4.35 nm のピークは 4.28 nm にシフトした。これは、結晶化中に PMF の分子がより密にパッキング

グしたためだと考えられる。4.35~4.28 nm の回折ピークは、PMF α 型の長面間隔 (4.68 nm (Fig. 4-5(a))) とは大きく異なっていたことから、PMF β' 型由来の回折ピークと考えられる。よって、PMF 単体を 22°C で等温保持した場合、融液から β' 型で結晶化することを確認した。昇温過程では (Fig. 5-1 (b)), PMF β' 型由来の回折ピーク位置は大きく変化することなく、SAXD では 38°C, WAXD では 35°C で回折ピークが消失した。

Fig. 5-2 に、60°C から 22°C の冷却過程における SE 添加 PMF の SR-XRD の結果を示す。冷却中、いずれの試料も SAXD および WAXD に回折ピークが出現した。SAXD では STP 添加は 33°C に 5.16 nm, STS 添加は 41°C に 5.55 nm, STB 添加は 58°C に 6.62 nm, WAXD では α 型を示す 0.415 nm または 0.416 nm に回折ピークが出現した。冷却が進むに従い、SAXD の回折ピークは広角側にシフトした。これは、冷却によりラメラ間隔が短くなったためだと考えられる。冷却過程で観察された SAXD および WAXD の回折ピークは、PMF β' 型の長面間隔 (4.35~4.28 nm) と大きく異なるため、SE 由来の回折ピークだと考えられる。しかし、PMF α 型の長面間隔は STP および STS の長面間隔と近く (STP : 4.82 nm, STS : 5.34 nm, PMF α 型 : 4.68 nm), 副格子構造も同じであるため、PMF α 型の回折ピークが重なっている可能性もある。

Fig. 5-3 に、22°C で 3 時間保持した際の SE 添加 PMF の SR-XRD の結果を示す。STP 添加 PMF では、等温保持中に回折ピーク位置はほとんど変化せず、4.80 nm から 4.75 nm にわずかに回折ピークがシフトしただけであった (Fig. 5-3 (a))。また、SAXD の回折ピーク強度は保持 1 時間 40 分まで連続的に上昇していき、その後、ほぼ一定となった (Fig. 5-4 (a))。PMF 単体では、3 時間保持の間に PMF β' 型が結晶化したにもかかわらず、STP 添加では PMF β' 型の回折ピークは確認されなかった。一方、3 時間保持中における STS 添加 PMF の結晶化挙動は、STP 添加とは異なっていた (Fig. 5-3 (b))。1 時間 45 分保持後から、SAXD の 5.28 nm の回折ピークがブロードになり始め、広角側に回折ピークの肩が出現した (白矢印で示す)。また、WAXD では β' 型を示す 0.386 nm の回折ピークが出現した。PMF β' 型は SAXD に 4.28 nm の回折ピークが出現するため (Fig. 5-1 (a)), SAXD のブロードな回折ピークは PMF β' 型の結晶化と考えられる。SAXD の回折ピーク強度は 22°C 1 時間までの間に上昇したが、1 時間 30 分後から回折ピーク強度が減少していった (Fig. 5-4 (b))。また、SAXD の回折ピーク強度が減少するタイミングと SAXD の回折ピークがブロードになるタ

イミングが一致していた。SR-XRD のパターンから STS と PMF α 型の区別をつけることはできなかったが、これらの結果は、STS 添加では冷却中または等温保持中に PMF が α 型で結晶化したことを示している。以上のことから、STS 添加では、PMF ははじめに α 型で結晶化し、その後、 β' 型へ多形転移したと推察される。一方で、STB 添加 PMF の結晶化挙動は PMF 単体の挙動と類似していた (Fig. 5-3(c))。すなわち、22°C の等温保持中、SAXD では 4.35 nm の回折ピーク、WAXD では 0.437 nm, 0.422 nm, 0.392 nm の β' 型の回折ピークが出現し、PMF 融液から β' 型への結晶化が確認された。しかし、STB 添加では PMF β' 型結晶化の誘導時間が PMF 単体よりも短かった (SAXD : 50 分, WAXD : 1 時間 15 分)。以上の結果から、STS 添加 PMF では冷却中または等温保持中に PMF が α 型で結晶化すること、STB 添加 PMF では PMF β' 型の結晶化が促進されることが明らかになった。

Fig. 5-5 に、22°C から 40°C の昇温過程における SE 添加 PMF の SR-XRD の結果を示す。STP 添加 PMF (Fig. 5-5 (a)) の WAXD では、 α 型の回折ピーク位置を維持しながら、回折ピーク強度が減少していった。SAXD では、4.75 nm から 5.10 nm に回折ピーク位置が小角側にシフトしていった。これは、昇温に伴いラメラのパッキングが緩くなったことに起因すると考えられる。STS 添加 PMF (Fig. 5-5 (b)) でも、SAXD の 5.24 nm の回折ピークが昇温に伴い小角側にシフトしていく様子が観察された。また、SAXD の 5.24 nm の広角側に出現したブロードなピークの肩は 32°C で狭くなり、WAXD では、PMF β' 型を示す 0.386 nm のピークが 29°C で消失した。SAXD では STS 由来の 5.44 nm のピークは 40°C でも確認された。STB 添加 PMF (Fig. 5-5 (c)) では、PMF β' 型の融点は STS 添加で観察された PMF β' 型の融点よりも高かった。すなわち、PMF β' 型由来の回折ピークは SAXD で 35°C, WAXD で 32°C であった。昇温 40°C では、STB 由来の SAXD ピーク (6.24 nm) および WAXD ピーク (0.414 nm) がみられた。

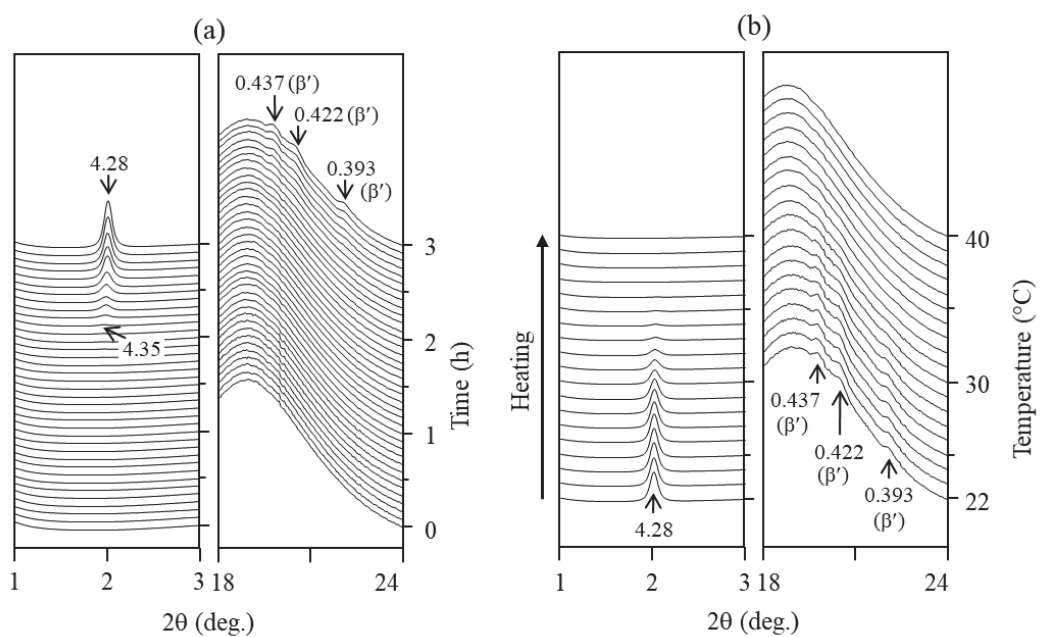


Fig. 5-1 SR-XRD patterns of PMF during (a) isothermal crystallization at 22 °C for 3 h (SR-XRD profiles were taken every 5 min) and following (b) heating from 22 to 40 °C at 2 °C / min. Unit: nm.

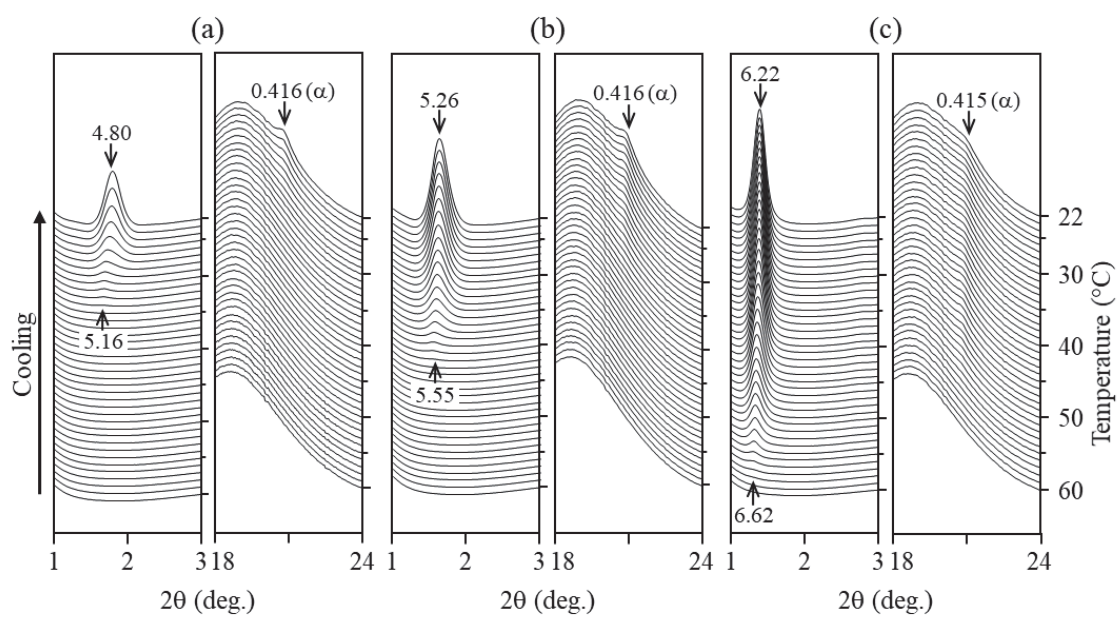


Fig. 5-2 SR-XRD patterns of PMF mixed with 5 wt % SEs during cooling from 60 to 22 °C at 2 °C / min. (a) PMF with STP, (b) PMF with STS, and (c) PMF with STB. Unit: nm.

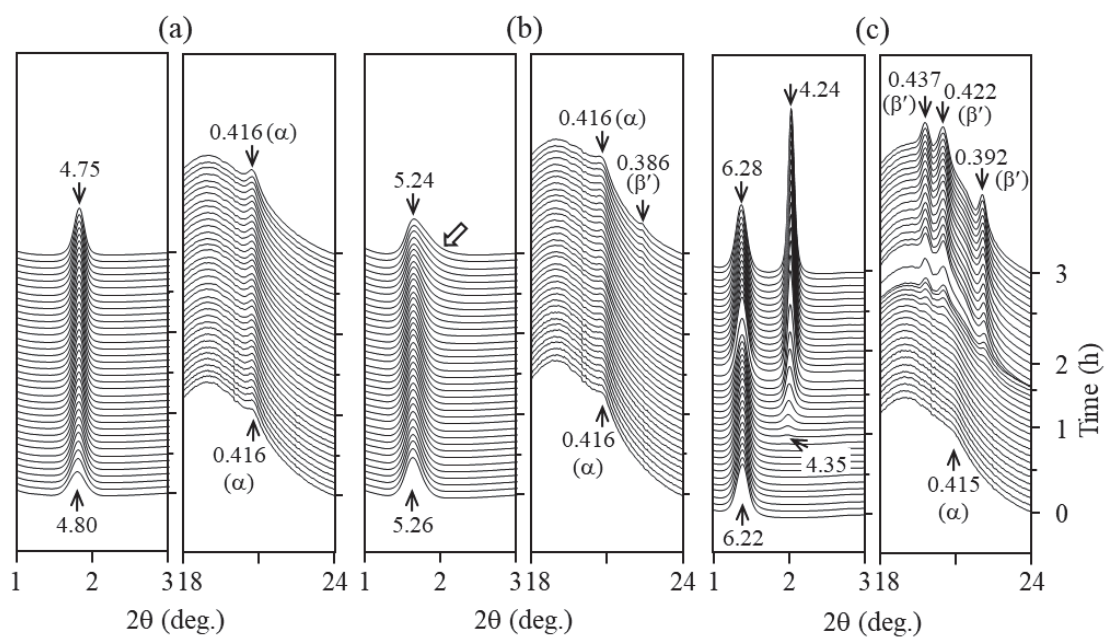


Fig. 5-3 SR-XRD patterns of PMF mixed with 5 wt % SEs during isothermal crystallization at 22 °C for 3 h. (a) PMF with STP, (b) PMF with STS, and (c) PMF with STB. SR-XRD profiles were taken every 5 min. Unit: nm.

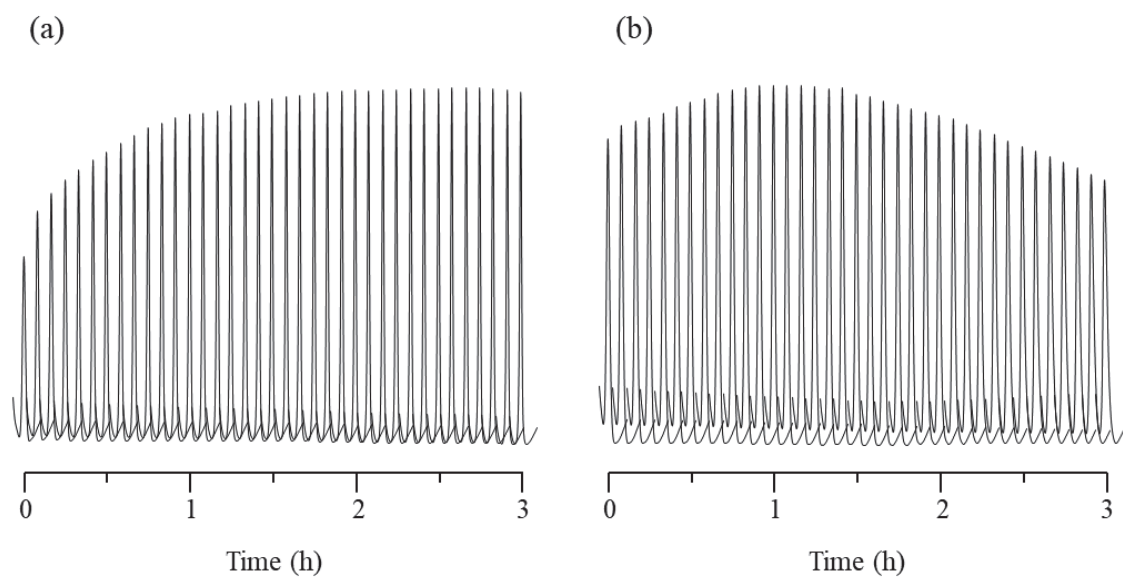


Fig. 5-4 Time variations of SR-XRD SAXD intensity of PMF mixed with 5 wt % SEs during isothermal crystallization at 22 °C for 3 h. (a) PMF with STP and (b) PMF with STS. Unit: nm.

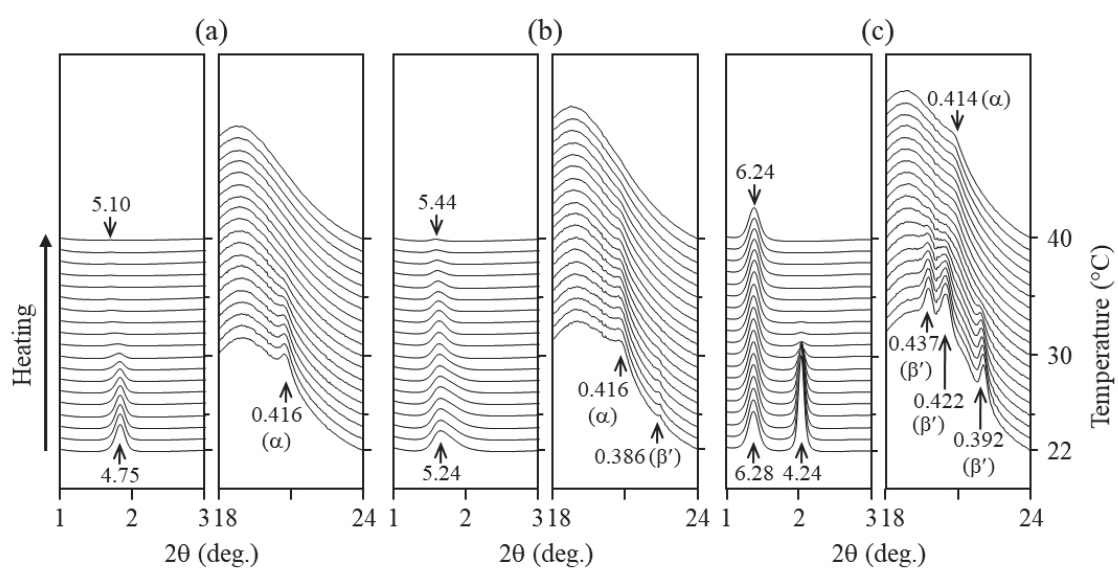


Fig. 5-5 SR-XRD patterns of PMF mixed with 5 wt% SEs during heating from 22 to 40°C at 2°C/min.

(a) PMF with STP, (b) PMF with STS and (c) PMF with STB. Unit: nm.

5.3.2 油脂の結晶形態観察

Fig. 5-6 に、PMF 単体の結晶化および融解挙動を DIC で観察した結果を示す。PMF の結晶は 22°C 保持 1 時間後に出現し (Fig. 5-6 (a))、SR-XRD における PMF 結晶化のタイミングよりも早かった。これは、DIC 観察は結晶を検出する感度が高いためだと考えられる。22°C 2 時間後、多くの針状結晶から成る PMF の球晶が観察された (Fig. 5-6 (b))。22°C 3 時間後、PMF 結晶は 70–90 μm 程度に成長した。22°C 3 時間後の PMF の結晶形態は内側と外側で異なっていた。すなわち、内側は小さな針状結晶が多く密に詰まった構造を有していたのに対し、外側は大きな針状結晶が外側に向かって伸びている構造であった。また、内側の PMF 結晶の融点は外側の結晶の融点よりも高く、外側の結晶の融点は 30°C、内側の結晶の融点は 40°C であった (Fig. 5-6 (d)-(f))。これらの PMF の結晶形態や融点の違いは PMF 結晶の組成の違いを反映していると考えられる。PMF 結晶化の誘導時間は SR-XRD と DIC 観察で異なっていたが、内側と外側の PMF 結晶はともに β' 型であると考えられる。これは、内側および外側の PMF 結晶の成長のタイミングと β' 型の出現のタイミングが一致していたためである。よって、内側と外側の結晶は低融点成分および高融点成分の PMF β' 型結晶であると考えられる。

Figs. 5-7 ~ 5-9 に、SE 添加 PMF の結晶化および融解挙動を DIC で観察した結果を示す。まず 22°C までの冷却中、視野内に小さな結晶が出現した。すなわち、STP 添加は 30°C (Fig. 5-7 (a))、STS 添加は 40°C (Fig. 5-7 (e))、STB 添加は 60°C (Fig. 5-7 (i)) であった。SR-XRD の結果から、これらは SE の結晶だと考えられる。22°C までの冷却に伴い、STP 添加および STS 添加で観察された結晶は徐々に大きく成長していった (Fig. 5-7 (b)-(d), (f)-(h))。一方、STB 添加で観察された結晶は 30°C 以降は成長しなかった (Fig. 5-7 (j)-(l))。SR-XRD の結果から、STP 添加および STS 添加では PMF α 型も結晶化している可能性があるが (Fig. 5-2)、DIC 像からは、STP 結晶および STS 結晶と PMF α 型の結晶形態の区別をつけることはできなかった。22°C で 1 時間保持中、STP 添加では、小さな結晶の数は増加したが、結晶サイズに大きな変化はみられなかった (Fig. 5-8 (b))。さらに 22°C で保持を続けても、結晶の数およびサイズに変化はみられなかった (Fig. 5-8 (b)-(d))。これは 22°C で 3 時間保持した際の SAXD の回折ピーク強度の変化を調べた結果と一致していた (Fig. 5-4 (a))。一方、STS 添加では、22°C で 2 時間保持した後に、STS 結晶の表面からひも状の結晶が出現した (Fig. 5-8

(f), 白矢印で示す). さらに保持を続けると, ひも状結晶が成長していく様子が観察された (Fig. 5-8 (g), (h)). SR-XRD の結果から, これらの結晶は PMF β' 型と考えられる (Fig. 5-3 (b)). STB 添加においても, 22°C 保持中に結晶が成長する様子が観察されたが, STB 添加 PMF で観察された結晶の形態は STS 添加の場合と異なっていた. すなわち, STB 添加では, 22°C 保持 1 時間後に STB 結晶の表面から針状結晶が成長する様子が観察され (Fig. 5-8 (j)), 保持時間に伴ってさらに成長していった (Fig. 5-8 (k), (l)). これらの針状結晶は PMF β' 型であると考えられる (Fig. 5-3(c)).

Fig. 5-9 に, 22°C 等温保持後の結晶を昇温する様子を DIC で観察した結果を示す. 昇温 35°C までの間に, STP 添加 PMF の結晶サイズは徐々に小さくなっていった (Fig. 5-9 (a)-(d)). STS 添加 PMF で観察されたひも状結晶は昇温 28~35°C の間で融解した (Fig. 5-9 (f)-(h)). これらの結果は, STP 添加および STS 添加では PMF 単体とは異なり, PMF 結晶は内側と外側の構造を持たないことを示している. STB 添加 PMF で観察された PMF の内側と外側の結晶は 2 段階の融解挙動を示した. すなわち, 外側は 28°C, 内側は 35°C で融解した (Fig. 5-9 (i)-(l)). STB 添加で観察された PMF β' 型の融点は PMF 単体よりも低かった. これは, STB 添加による凝固点降下だと考えられる. よって, STB 添加で観察された PMF の結晶形態と融解挙動は PMF 単体と類似していると言える (Fig. 5-6).

PMF β' 型の結晶形態は SE の結晶形態と大きく異なっていた. 一方で, PMF α 型結晶と STS 結晶の形態の区別はつけることができなかった. 加えて, STS 添加と STB 添加で観察された PMF β' 型結晶の形態も異なっていた. すなわち, STS 添加ではひも状結晶 (Fig. 5-8 (f)-(h)), STB 添加では針状結晶 (Fig. 5-8 (k),(l)) であった. SR-XRD の結果では, STB 添加における PMF β' 型の回折ピークは 0.437 nm, 0.422 nm, 0.392 nm であったが, STS 添加では 0.386 nm にのみ回折ピークが出現していた (Fig. 5-3 (b),(c)). さらに, DIC 観察では PMF β' 型結晶の融点が異なることも示された (Fig. 5-9 (e)-(h), (i)-(l)). 以上のことから, STS 添加および STB 添加で観察された PMF β' 型は, それぞれ異なる組成および異なる結晶構造から成る β' 型であると考えられる.

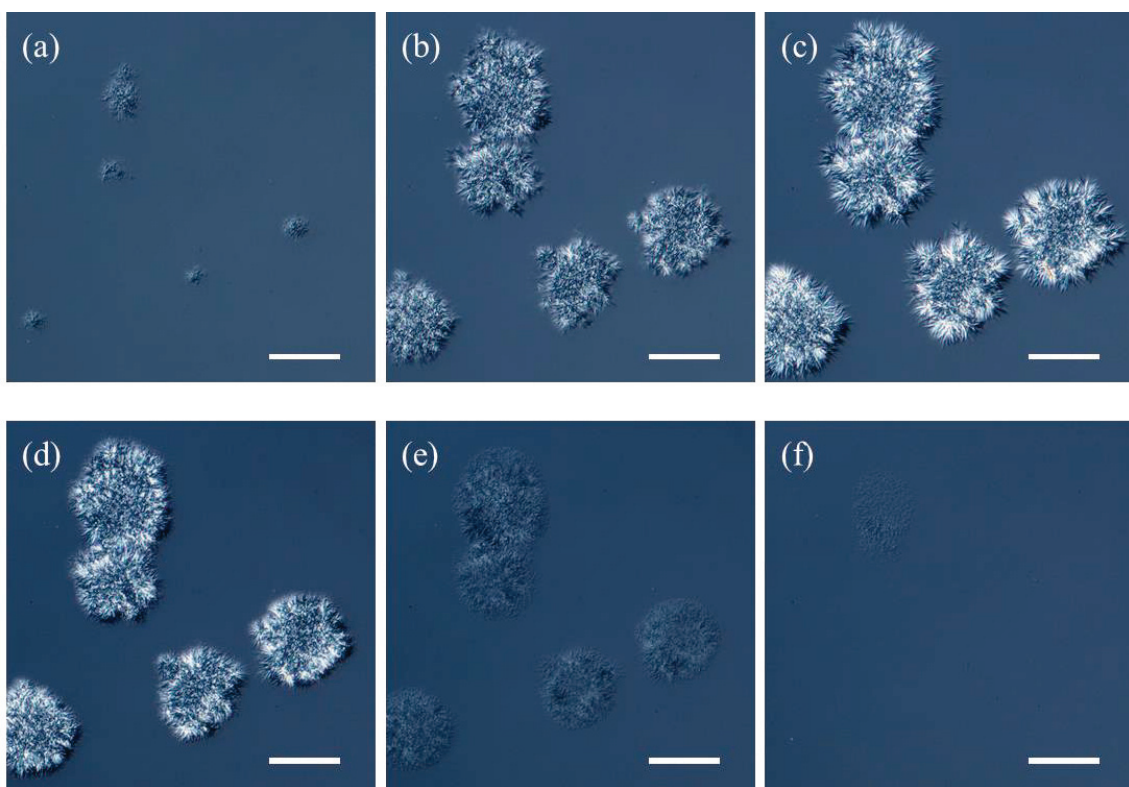


Fig. 5-6 DIC microscopic images of PMF during isothermal crystallization at 22°C for (a) 1 h (b) 2 h and (c) 3 h, and following heating to (d) 30°C (e) 35°C and (f) 40°C at 2°C/min. Scale bar is 50 μm.

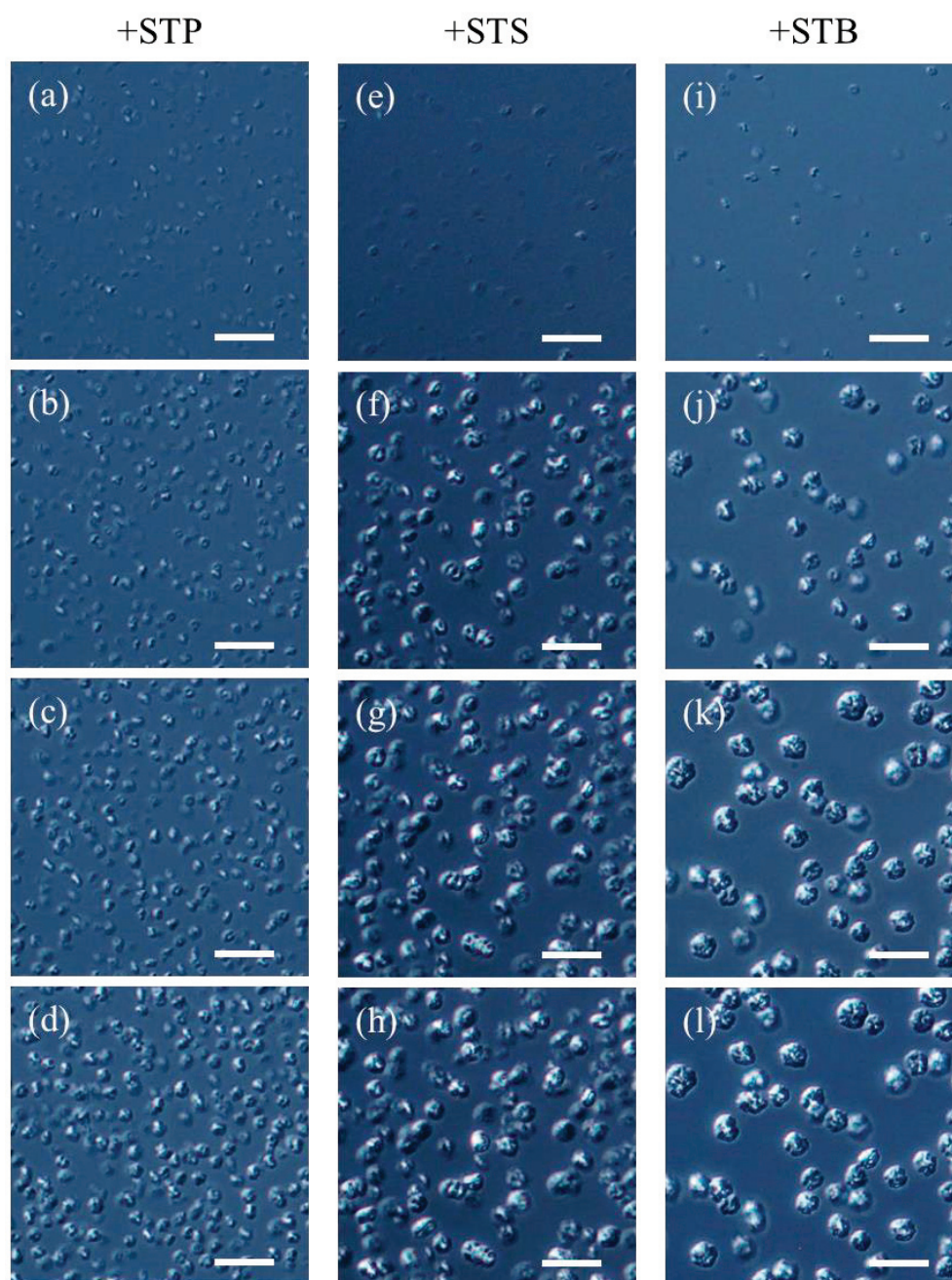


Fig. 5-7 DIC microscopic images of PMF mixed with 5 wt% SEs during cooling to 22°C at 2°C/min. (a, k) 30°C, (b) 27°C, (c) 25°C, (d, h, l) 22°C, (e) 40°C, (f) 30°C, (g) 25°C, (i) 60°C, and (j) 50°C. (a–d) PMF with STP, (e–h) PMF with STS, and (i–l) PMF with STB. Scale bar is 20 μm .

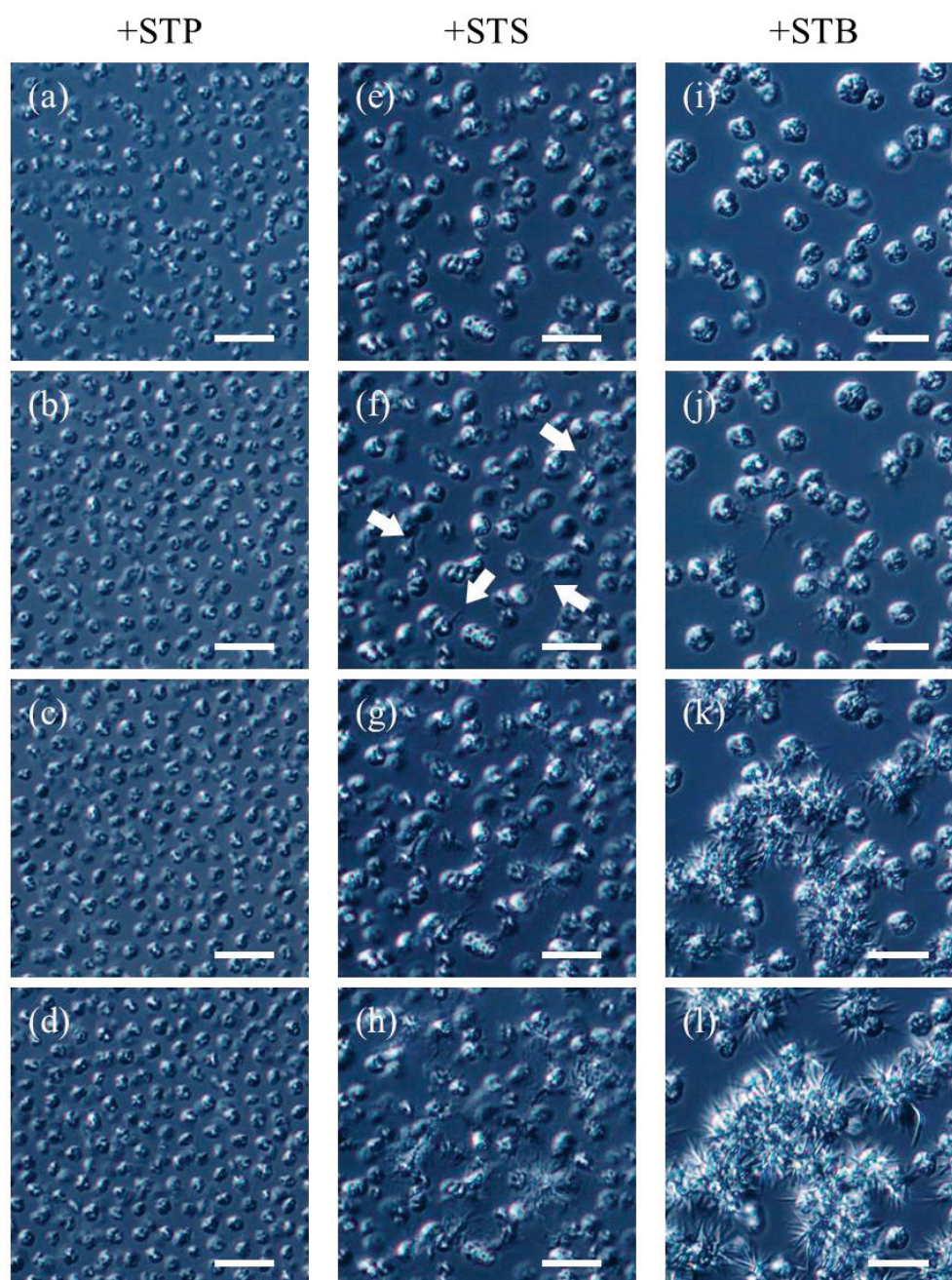


Fig. 5-8 DIC microscopic images of PMF mixed with 5 wt% SEs during isothermal crystallization at 22°C for (a, e, i) 0 h, (b, j) 1 h, (c, f) 2 h, (d, h, l) 3 h, (g) 2.5 h, and (k) 1.5 h. (a–d) PMF with STP, (e–h) PMF with STS, and (i–l) PMF with STB. Scale bar is 20 μm .

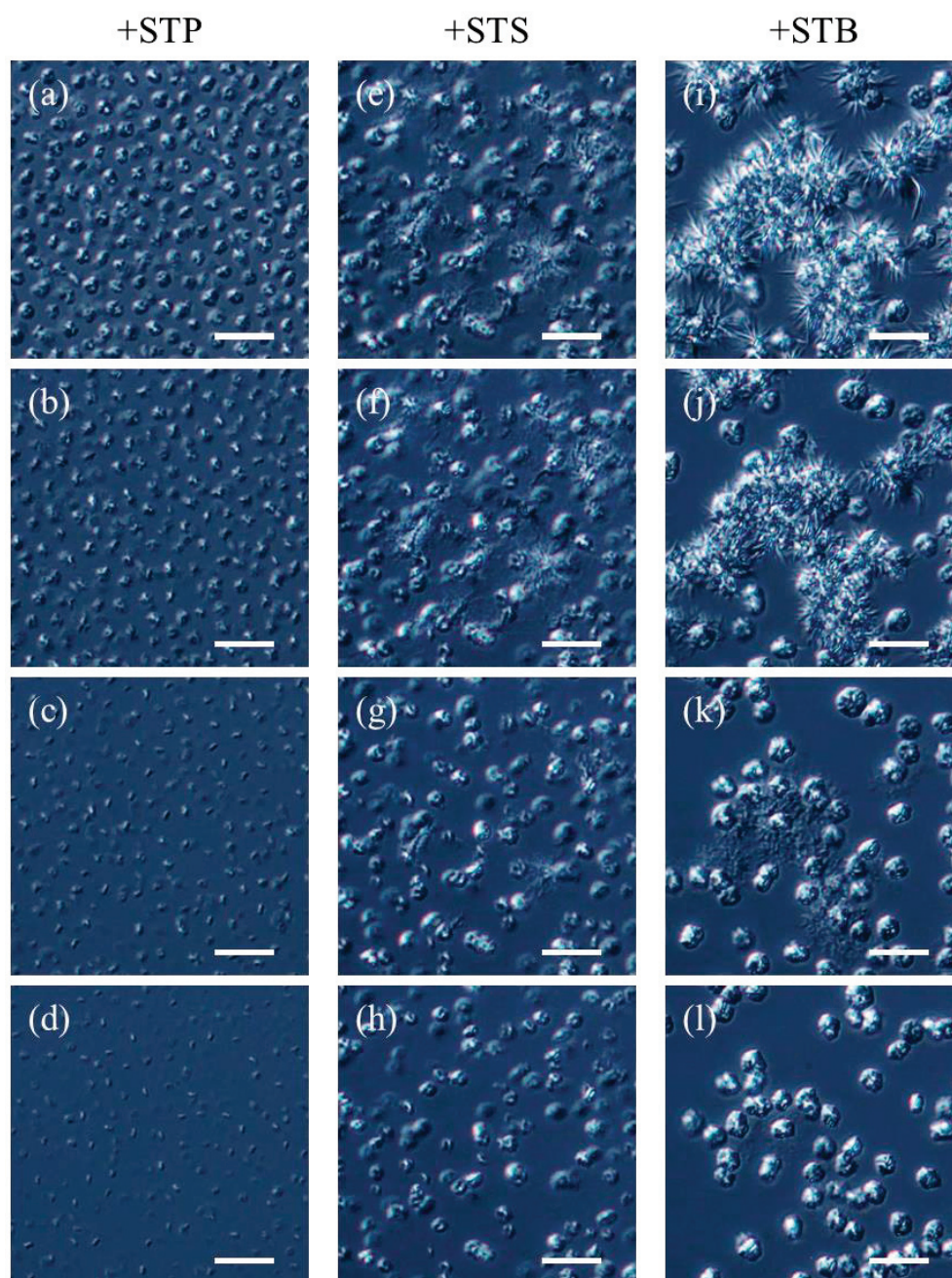


Fig. 5-9 DIC microscopic images of PMF mixed with SEs during heating from 22 to 35°C at 2°C/min. (a, e, i) 22°C, (b, f, j) 28°C, (c, g, k) 32°C, (d, h, l) 35°C. (a–d) PMF with STP, (e–h) PMF with STS, and (i–l) PMF with STB. Scale bar is 20 μm .

5.4 考察

SR-XRD の結果から、PMF 単体が融液から β' 型で結晶化する条件であっても、PMF に主に含まれる脂肪酸と SE の有する脂肪酸の鎖長が類似する場合 (STS), 冷却中または等温保持中に PMF が α 型で結晶化した (Fig. 5-2 (b), Fig. 5-3 (b)). このことは、STS 添加は PMF α 型の結晶化を促進したと言える。これは、PMF の結晶化前に核形成した STS 結晶の副格子構造 (α 型) が PMF α 型結晶化のテンプレートとして働いたことによると考えられる。STP は STS よりも PMF に主に含まれる脂肪酸の鎖長に近いので、STS と同様、STP も PMF を α 型で結晶化させる働きがあると考えられる。しかし、SR-XRD および DIC 観察の結果から、PMF α 型結晶と STP 結晶の区別をつけることはできなかった (Fig. 5-7 (a)-(d), Fig. 5-8 (a)-(d), Fig. 5-9 (a)-(d)). 一方、STB 添加は PMF α 型の結晶化を促進せず、PMF β' 型の結晶化の誘導時間を減少させた (Fig. 5-3 (c)). PMF α 型の結晶化を促進しなかったのは、STB と PMF の有する脂肪酸の鎖長が大きく異なるためだと考えられる。以上のことから、乳化剤と油脂の有する脂肪酸の鎖長と副格子構造がともに類似する場合、乳化剤によって油脂の結晶多形が制御できると考えられる。

STP 添加においては、22°C 3 時間保持中における PMF β' 型への結晶化が抑制されていた (Fig. 5-2 (a)). STS 添加においては、PMF α 型から β' 型への多形転移は起きていたものの、融液からの PMF β' 型の結晶化は抑制されていた (Fig. 5-2 (b)). これは、融解した PMF 中に溶け込んだ STP 分子や STS 分子が PMF 分子のクラスター形成を阻害したためだと考えられる¹⁵⁾。また SE 添加によって PMF の結晶化が促進されると、SE 添加 PMF 中の過飽和度は低下する。STP や STS のように、SE 結晶が PMF α 型結晶のテンプレートとして働いた場合、PMF β' 型の結晶化前に PMF α 型の結晶化が促進されると考えられる。その結果、融解した PMF 中の過飽和度が低下し、PMF β' 型の結晶化を抑制したと考えられる。

本実験の結果を踏まえ、22°C における PMF 核形成のエネルギー障壁に SE 結晶の構造が与える影響を考察した (Fig. 5-10). 22°C 等温保持下における PMF 単体では、均一核形成による PMF β' 型の核形成のエネルギー障壁は、PMF α 型の核形成のエネルギー障壁よりも低い。SE を添加した場合、SE は PMF α 型と β 型の核形成のエネルギー障壁をともに減少させる。SE 結晶は PMF α 型結晶化に対してテンプレートとして働き、SE 結晶の副格子構造および鎖長の長さが PMF α 型結晶の核形成のエネルギー障壁の減少に寄与する。一方、

SE を添加した場合、PMF β' 型の結晶化は不均一核形成によって促進され、SE 結晶は PMF β' 型の核形成のための界面を与える。いずれの SE 結晶も、不均一核形成によって PMF β' 型結晶の核形成のエネルギー障壁を減少させる (Fig. 5-10 : Contribution from the surface of SE crystals)。一方で、PMF α 型の核形成のエネルギー障壁に対する SE 結晶の効果は SE の鎖長の長さに依存する。SE と PMF の有する脂肪酸の鎖長が類似する場合、PMF α 型の核形成のエネルギー障壁が大きく減少する。なお、SE 結晶の副格子構造はすべて α 型であるため、副格子構造からの核形成のエネルギー障壁の減少は、SE の鎖長の長さに関わらず同様に寄与する (Fig. 5-10 : Contribution from subcell packing)。よって、テンプレート効果には SE の鎖長の長さが大きく寄与すると考えられる (Fig. 5-10 : Contribution from chain length structure)。SE の鎖長の長さが PMF の鎖長の長さと類似する場合、不均一核形成による PMF β' 型結晶化よりも、テンプレート効果による PMF α 型結晶化により効果的に働くと考えられる。しかし、SE と PMF の鎖長の長さが大きく異なる場合、SE 結晶の表面で不均一核形成が生じると考えられる。その結果、STP 添加 PMF および STS 添加 PMF で PMF α 型が結晶化し、STB 添加 PMF で PMF β' 型が結晶化したと考えられる。

5.5 まとめ

本章では、SR-XRD および DIC 観察によって、 α 型の副格子構造を有する脂肪酸鎖長の異なる SE が PMF β' 型の結晶化に及ぼす影響について調べた。PMF 単体を 22°C で等温保持した場合、PMF は融液から β' 型で結晶化した。乳化剤に PMF の有する脂肪酸鎖長に類似する STS を用いた場合、22°C までの冷却中あるいは 22°C 保持中に PMF が α 型で結晶化した。一方、乳化剤に PMF の有する脂肪酸鎖長と大きく異なる STB を用いた場合、PMF α 型は結晶化せず、PMF β' 型の結晶化を促進した。また、DIC 観察によっても PMF β' 型の結晶化を確認することができた。以上の結果から、PMF の結晶多形の出現は、PMF と SE の脂肪酸鎖長の類似度によって決定されることがわかった。本章における結果は、油脂と乳化剤の有する脂肪酸の鎖長の類似度および乳化剤の結晶多形によって油脂の結晶多形を制御することができるという知見を与えた。

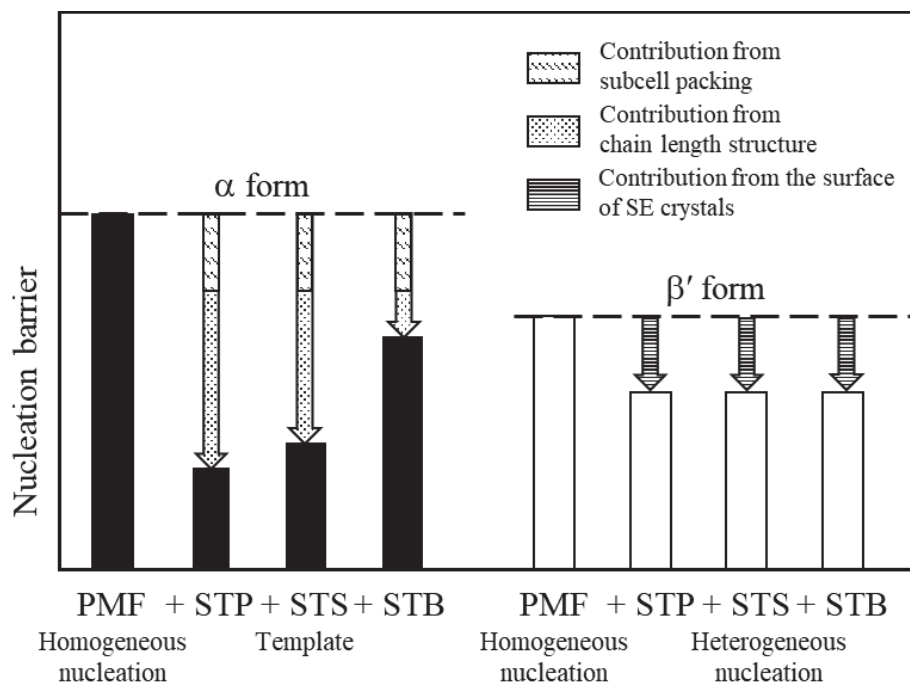


Fig. 5-10 Conceptual image of nucleation barrier reduction by structural factors for PMF α and β' forms during isothermal crystallization at 22°C. Black bars: nucleation barrier for PMF α form. White bars: nucleation barrier for PMF β' form.

文 献

1. Sato, K., Bayés-García, L., Calvet, T., Cuevas-Diarte, M. À., & Ueno, S. (2013). External factors affecting polymorphic crystallization of lipids. *Eur J Lipid Sci Technol*, 115, 1224–1238.
2. Bayés-García, L., Patel, A. R., Dewettinck, K., Rousseau, D., Sato, K., & Ueno, S. (2015). Lipid crystallization kinetics—roles of external factors influencing functionality of end products, *Curr. Opin. Food Sci.*, 4, 32–38.
3. Patel, A. R., & Dewettinck, K. (2015). Current update on the influence of minor lipid components, shear and presence of interfaces on fat crystallization. *Curr. Opin. Food Sci.*, 3, 65–70.
4. Smith, K. W., Bhaggan, K., Talbot, G., & van Malssen, K. F. (2011). Crystallization of fats: Influence of minor components and additives, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 1085–1101.
5. Ribeiro, A. P. B., Masuchi, M. H., Miyasaki, E. K., Domingues, M. A. F, Stroppa, V. L. Z., de Oliveira, G. M., & Kieckbusch, T. G. (2015). Crystallization modifiers in lipid systems. *J Food Sci Technol*, 52, 3925–3946.
6. Wang, F., Liu, Y., Jin, Q., Huang, J., Meng, Z., & Wang, X. (2011). Kinetic analysis of isothermal crystallization in hydrogenated palm kernel stearin with emulsifier mixtures. *Food Res Int*, 44, 3021–3025.
7. Rizzo, G., Norton, J. E., & Norton, I. T. (2015). Emulsifier effects on fat crystallisation. *Food Struct*, 4, 27–33.
8. Sonwai, S., Podchong, P., & Rousseau, D. (2016). Crystallization kinetics of coconut oil in the presence of sorbitan esters with different fatty acid moieties, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 93, 849–858.
9. Sonwai, S., Podchong, P., & Rousseau, D. (2017). Crystallization kinetics of cocoa butter in the presence of sorbitan esters, *Food Chem.* 214, 497–506.
10. Chen, C., Zhang, H., Bi, Y., & Cheong, L. (2015). Effects of sucrose esters on isothermal crystallization of palm oil-based blend. *J Am Oil Chem Soc*, 92, 277–286.
11. Basso, R. C., Ribeiro, A. P. B., Masuchi, M. H., Gioielli, L. A., Gonçalves, L. A. G., dos Santos, A. O., Cardoso, L. P., & Grimaldi, R. (2010). Tripalmitin and monoacylglycerols as modifiers in the crystallisation of palm oil. *Food Chem*, 122, 1185–1192.
12. Chaleepa, K., Szepes, A., & Ulrich, J. (2010). Effect of additives on isothermal crystallization

- kinetics and physical characteristics of coconut oil. *Chem Phys Lipids*, 163, 390–396.
13. Fredrick, E., Foubert, I., Van De Sype, J., & Dewettinck, K. (2008). Influence of monoglycerides on the crystallization behavior of palm oil, *Cryst. Growth Des.*, 8, 1833–1839.
 14. Maruyama, J. M., Soares, F. A. S. D. M., D’Agostinho, N. R., Gonçalves, M. I. A., Gioielli, L. A., da Silva, R. C. (2014). Effects of emulsifier addition on the crystallization and melting behavior of palm olein and coconut oil, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 2253–2263.
 15. Shimamura, K., Ueno, S., Miyamoto, Y., Sato, K. (2013). Effects of polyglycerine fatty acid esters having different fatty acid moieties on crystallization of palm stearin, *Cryst. Growth Des.*, 13, 4746–4754.
 16. Saw, M. H., Hishamuddin, E., Chong, C. L., Yeoh, C. B., & Lim, W. H. (2017). Effect of polyglycerol esters additive on palm oil crystallization using focused beam reflectance measurement and differential scanning calorimetry. *Food Chem*, 214, 277–284.
 17. Kim, G. Y., & Marangoni, A. G. (2017). Engineering the nucleation of edible fats using a high behenic acid stabilizer. *Eur J Lipid Sci Technol*, 119, 1–13.
 18. Verstringe, S., Danthine, S., Blecker, C., Depypere, F., & Dewettinck, K. (2013). Influence of monopalmitin on the isothermal crystallization mechanism of palm oil. *Food Res Int*, 51, 344–353.
 19. Rincón-Cardona, J. A., Agudelo-Laverde, L. M., Martini, S., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2014). *In situ* synchrotron radiation X-ray scattering study on the effect of a stearic sucrose ester on polymorphic behavior of a new sunflower oil variety. *Food Res Int*, 64, 9–17.
 20. Takiguchi, H., Iida, K., Ueno, S., Yano, J., & Sato, K. (1998). Heterogeneous nucleation of n-alcohol crystals from solution assisted by vapor-deposited thin films of fatty acids, *J. Cryst. Growth*, 193, 641–647.
 21. Fujiwara, K., Nagahisa, S., Yano, J., Ueno, S., & Sato, K. (2000). Kinetics of heterogeneous nucleation of n-Alcohol crystals from solution assisted by template thin films of monoacylglycerols and fatty acids, *J. Phys. Chem. B*, 104, 8116–8123.
 22. Verstringe, S., Dewettinck, K., Ueno, S., & Sato, K. (2014). Triacylglycerol crystal growth: templating effects of partial glycerols studied with synchrotron radiation microbeam X-ray diffraction, *Cryst. Growth Des.*, 14, 5219–5226.

第6章 総括

本研究では、実際の油脂製品のモデルとしてマヨネーズを用い、油脂結晶化によるマヨネーズの不安定化機構を明らかにすること、さらに油脂の結晶化制御の方法として乳化剤を用い、脂肪酸鎖長の異なる乳化剤が油脂の結晶化に及ぼす影響について調べ、テンプレート効果による油脂の結晶化機構を明らかにすることを目的として実験を行った。

第3章では、冷凍条件下における油脂の結晶化がマヨネーズ様 O/W エマルジョンの不安定化に及ぼす影響を調べた。マヨネーズ様 O/W エマルジョンは油相にキャノーラ油と大豆油を用い、 -15°C 、 -20°C 、 -30°C の冷凍保存温度条件において実験を行った。第3章で得られた結果を以下にまとめる。

- (1) マヨネーズ様 O/W エマルジョンの冷凍-解凍安定性は、大豆油エマルジョンの -20°C 保存で最も高かった。一方で、 -15°C および -30°C 保存は油種の違いによる安定性の違いはなかった。また、冷凍保存温度の低い -30°C 保存で最も安定性が低くなった。
- (2) キャノーラ油エマルジョンの -15°C 保存、 -20°C 保存では、油脂の結晶成長によって部分合いが起き、不安定化していた。また、 -30°C 保存のキャノーラ油エマルジョンでは、油滴を伝播しながら油脂が結晶化していく様子が観察され、 -30°C 保存でも油脂結晶の部分合いが起きていることが推察された。
- (3) 大豆油エマルジョンでは油滴界面に沿って結晶化した油脂結晶が冷凍保存中 (-15°C 、 -20°C) に多形転移することで不安定化した。一方で、大豆油エマルジョンの -30°C 保存は冷凍保存中の油脂の結晶化とは関係なく不安定化した。

以上の結果から、油脂の結晶化による O/W エマルジョンの不安定化は、キャノーラ油エマルジョンは油脂の結晶量の増加による油滴の部分合、大豆油エマルジョンは油滴界面の油脂結晶の多形転移によって生じることがわかった。よって、油脂結晶化による O/W エマルジョンの不安定化を抑制するためには、①油脂の結晶量を増加させないこと、②油滴界面に油脂を結晶化させないこと、③油脂結晶の多形転移を抑制することが必要であると考えられる。

第4章では、脂肪酸鎖長の異なるソルビタン脂肪酸エステル (SE) がパーム中融点油脂 (PMF) の結晶化挙動に及ぼす影響および SE 結晶に対する PMF 結晶化のその場観察を行

い、油脂結晶化に対する乳化剤の添加効果について調べた。SE は PMF に対して 5 wt% 添加し、DSC による結晶化・融解挙動測定、放射光時分割 X 線回折測定による結晶多形の調査を行った。さらに、SE 結晶を作製し、SE 結晶から PMF が結晶化する様子の顕微鏡観察およびマイクロビーム X 線回折測定による結晶の局所箇所の配向および多形の調査を行った。第 4 章で得られた結果を以下にまとめる。

- (1) 脂肪酸鎖長の異なる SE (ソルビタントリパルミテート (STP), ソルビタントリステアレート (STS), ソルビタントリベヘネート (STB)) はいずれも PMF の結晶化開始温度を上昇させた。これは、PMF よりも先に SE が結晶化することで、SE 結晶が PMF 結晶化の核となったためだと考えられる。PMF の結晶化促進効果は STP > STS > STB の順に高く、PMF に主に含まれる脂肪酸 (パルミチン酸) と SE の有する脂肪酸の鎖長が類似するほど結晶化促進効果が高いことがわかった。また、結晶化過程では SE と PMF はともに α 型の結晶であった。
- (2) PMF に主に含まれる脂肪酸と鎖長が一致または類似する STP または STS を用いた場合、STP 結晶または STS 結晶の配向を引き継いで PMF が結晶化した (エピタキシャル成長)。一方、PMF に主に含まれる脂肪酸と鎖長が大きく異なる STB を用いた場合、STB 結晶の配向に対してランダムな方向で PMF が結晶化した (不均一核形成)。

以上の結果から、PMF と SE の有する脂肪酸鎖長の類似性とは関係なく、PMF よりも先に SE が結晶化することで PMF の結晶化が促進されること、一方で、PMF と SE の有する脂肪酸鎖長の類似性によって PMF の結晶成長様式が異なることが明らかとなった。

第 5 章では、脂肪酸鎖長の異なる SE の α 型結晶が PMF β' 型の結晶化に及ぼす影響を調べた。SE は PMF に対して 5 wt% 添加し、PMF β' 型が結晶化する条件である 22°C 保持過程における結晶化挙動を放射光時分割 X 線回折測定および微分干渉顕微鏡によって調べた。第 5 章で得られた結果を以下にまとめる。

- (1) PMF に主に含まれる脂肪酸と鎖長が同じである STP を用いた場合、PMF 単体では β' 型で結晶化する条件下であっても、融液からの PMF β' 型の結晶化は起こらなかった。
- (2) PMF に主に含まれる脂肪酸と鎖長が類似する STS を用いた場合、PMF 単体では β' 型で結晶化する条件下であっても、PMF を α 型で結晶化させ、融液からの PMF β' 型の結晶化を抑制した。

(3) PMF に主に含まれる脂肪酸と鎖長が大きく異なる STB を用いた場合、PMF は α 型で結晶化せず、PMF 単体よりも PMF β' 型の結晶化が早く起こった。

以上の結果から、PMF と SE の有する脂肪酸の鎖長が類似する場合、PMF は α 型で結晶化するが、PMF と SE の有する脂肪酸の鎖長が大きく異なる場合、PMF は β' 型で結晶化することがわかった。SE は α 型で結晶化するため、STS を用いた場合では、STS 結晶が PMF 結晶化のテンプレートとなり、STS 結晶の多形を引き継いで PMF が結晶化したと考えられる。一方で、STB を用いた場合では、PMF は β' 型で結晶化したことから、STB 結晶は PMF 結晶化のための単なる表面として作用した、すなわち、不均一核形成によって PMF β' 型が結晶化したと考えられる。

本研究の結果から、O/W エマルション食品の不安定化抑制には、①油脂の結晶量を増加させないこと、②油滴界面に油脂を結晶化させないこと、③油脂結晶の多形転移を抑制することが必要であることが明らかになった。さらに、乳化剤による油脂結晶化の制御には、①乳化剤と油脂の有する脂肪酸の鎖長の類似性を考慮すること、②乳化剤の結晶多形を把握すること、③油脂よりも先に乳化剤が結晶化する条件（乳化剤の融点、溶解度など）を考慮する必要があることがわかった。

今後の課題としては、本研究で得られた乳化剤による油脂の結晶化制御条件をマヨネーズ様 O/W エマルションに応用することが挙げられる。本研究ではバルク系で油脂の結晶化に対する乳化剤の添加効果を調べたが、O/W エマルション状態では油水界面ができることや界面が増加することで、乳化剤の存在状態や結晶化挙動が変化する可能性がある。よって、今後は冷凍下におけるマヨネーズ様 O/W エマルションへの応用をはじめ、エマルション中の油脂結晶化に対する乳化剤の添加効果を調べる必要がある。また、バルク系においては、油脂の結晶化に対する乳化剤の親水基の影響について検討する必要がある。本研究では乳化剤にソルビタン脂肪酸エステルを用いたが、ショ糖脂肪酸エステルやポリグリセリン脂肪酸エステルなど親水基の構造が異なる乳化剤でも、乳化剤と油脂の有する脂肪酸の鎖長の類似性に依存して油脂の結晶化挙動が変化するか調べる必要がある。本論文での結果が、食品油脂の結晶化に関する基礎的知見となり、今後の結晶性油脂食品の研究、開発へ広く応用されることを願っている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，本研究実施の機会を与えて頂き，終始ご指導，ご助言を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科 上野聡教授，本同宏成講師に厚く御礼申し上げます。また，広島大学食品物理学研究室の皆様および同研究室卒業生の皆様に御礼申し上げます。実験面でご協力頂きました，高エネルギー加速器研究機構物質科学研究所放射光研究施設 BL-6A 担当の五十嵐教之准教授，清水伸隆准教授，公益財団法人高輝度光科学研究センター（JASRI）BL-46XU 担当の佐藤眞直氏に感謝申し上げます。またソルビタン脂肪酸エステルを提供して頂いた，理研ビタミン株式会社に感謝の意を表します。

最後に，心身ともに丈夫に育ててくれた家族に心から感謝致します。

2018年8月5日