

博士論文

ジアシルグリセロールの結晶化挙動と
乳化剤による結晶化抑制メカニズムの解析

平成30年8月

齋藤 勝義

目次

第1章 序論

1.1 油脂含有製品における油脂結晶の役割.....	1
1.2 油脂の結晶性を支配する因子.....	5
1.3 油脂の結晶化制御技術.....	10
1.4 添加剤が油脂の結晶化を促進および抑制する効果.....	12
1.5 ジアシルグリセロール (DAG)	15
1.5.1 DAG の栄養学的特性.....	15
1.5.2 DAG の特徴.....	18
1.5.3 DAG の結晶構造と物性.....	21
1.6 本研究の目的および本論文の構成.....	24
1.7 引用文献.....	25

第2章 DAG の結晶化挙動の解析

2.1 はじめに.....	31
2.2 実験方法.....	32
2.2.1 試料.....	32
2.2.2 DSC および偏光顕微鏡観察.....	34
2.2.3 ガスクロマトグラフィー (GC)	34
2.2.4 2成分系相挙動.....	35
2.3 結果と考察.....	36
2.3.1 DSC および偏光顕微鏡による DAG の結晶化挙動の観察.....	36
2.3.2 GC による結晶化成分の分析.....	36
2.3.3 2成分混合系での 1,3-DAG の相挙動—DSC による解析.....	43

2.3.4	2成分混合系での1,3-DAGの相挙動—XRDによる解析.....	46
2.4	まとめ.....	48
2.5	引用文献.....	49

第3章 DAGの結晶化に対する乳化剤の効果

3.1	はじめに.....	52
3.2	実験方法.....	53
3.2.1	試料.....	53
3.2.2	固体脂含量 (SFC)	54
3.2.3	DSCおよび偏光顕微鏡観察.....	56
3.2.4	小角X線回折 (SAXD)	56
3.3	結果と考察.....	57
3.3.1	SFCの時間変化.....	57
3.3.2	偏光顕微鏡およびDSCによる分析.....	61
3.3.3	DAGの単純化モデルによる検討—偏光顕微鏡観察.....	64
3.3.4	DAGの単純化モデルによる検討—SAXDによる解析.....	67
3.4	まとめ.....	71
3.5	引用文献.....	72

第4章 PGFEによるDAGの結晶化抑制メカニズム

4.1	はじめに.....	74
4.2	実験方法.....	75
4.2.1	試料.....	75
4.2.2	固体脂含量 (SFC)	75

4.2.3	複屈折の観察.....	75
4.2.4	レオロジー測定.....	78
4.2.5	XRD 測定.....	78
4.3	結果と考察.....	79
4.3.1	PGFE の SFC に対する影響.....	79
4.3.2	DAG に発生する複屈折の観察.....	79
4.3.3	複屈折の発生挙動に対する温度依存性.....	82
4.3.4	レオロジー特性の変化.....	86
4.3.5	複屈折構造の X 線解析.....	92
4.3.6	PGFE 添加によ DAG の結晶化抑制メカニズム.....	96
4.4	まとめ.....	100
4.5	引用文献.....	101

第 5 章 本研究の総括

5.1	本研究のまとめ.....	103
5.2	今後の展望.....	105

謝辞

第 1 章 序論

1.1 油脂含有製品における油脂結晶の役割

食品、化粧品や医薬品など幅広い分野において、多くの製品で油脂が主要成分となっている。そのような製品において、油脂が果たしている重要な役割は、脂溶性機能物質（フレーバー、ビタミン、アミノ酸など）の可溶化と徐放、エマルションの生成、気泡の分散性や安定性の向上など、多岐にわたっている。これら油脂の機能は、それぞれの油脂が持つ物性に左右される。とりわけ、油脂の結晶性は、製品の品質に非常に大きな影響を与える因子の 1 つである。

油脂の結晶性が製品に与える影響は、全体の系が示す物理状態によって異なる。各物理状態における油脂の機能性を Figure 1-1 に整理した。油脂を固体として利用する製品としては、食品においてはチョコレート、化粧品ではリップスティックやせっけんなどが挙げられる。これらの製品において、油脂の結晶性は硬さや口どけ、舌触りや肌触りなどを左右する¹⁴。例えばチョコレートでは、室温ではパリッと割れ、口の中ではサッと融ける物性が求められるが、それを実現するのは油脂結晶の性質である¹。また、油脂結晶は外観の維持にも重要である。せっけんのつややかで滑らかな表面の光沢感は、油脂結晶が精緻に配列することで生み出される^{3,4}。反対に、油脂結晶の配列の乱れは外観を悪化させる。チョコレートの表面に白い粉が吹く劣化現象、いわゆるファットブルームはその一例である。ファットブルームは、油脂結晶の粗大化がきっかけとなり、チョコレート成分の空間配置が再編成されることで起こるとされている^{4,5}。

エマルション形態の製品においても、油脂の結晶は非常に重要である。エマルションは分散相が水相で連続相が油相の W/O エマルションと、分散相が油相で連続相が水相の O/W エマルションとに分類される。W/O エマルションの代表的製品としては、食品ではバター、マーガリンやファットスプレッド、化粧品では油性クリームなどが挙げられる。これら W/O エマルションの製品において最も重要な性質は、塗布する時にスッ

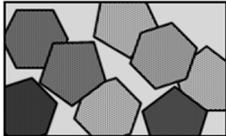
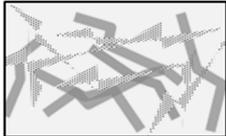
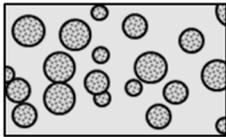
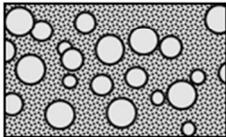
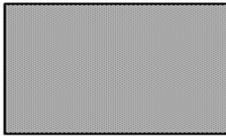
Physical state		Function
Crystal		Melting, Shape Rheology, Texture
Gel		Shape Rheology, Texture
Emulsion		
O / W		Stability, Dispersion Carrier Rheology, Texture
W / O		Stability Shape Rheology, Texture
Liquid		Hydrophobicity Heating medium

Figure 1-1. Function of fats and oils in various physical states ⁴.

とのびる展延性と、使っていない時には元の形を維持する保型性である^{6,7}。この2つを両立した物性、すなわち可塑性を左右するのも油脂結晶の状態、および油脂結晶どうしがつくるネットワーク構造である^{3,4}。

O/W エマルションの代表的製品はアイスクリームやマヨネーズなどで、薬物のキャリアとしてもO/W エマルションは使われることがある。多くの場合、O/W エマルションの製品では、油脂結晶は物性の不安定化の要因となる⁸。それは、Figure 1-2 に示すようなプロセスにより、油脂結晶がエマルションの破壊を起こすことによる。O/W エマルションの油滴内部で発生した結晶は、成長して一定のサイズを超えると油水界面に突出しはじめる。水相に露出した油脂結晶は、隣り合う油滴を架橋して、それをきっかけに界面の融合と油滴の粗大化が起こる。これが繰り返されると最終的に油相と水相が分離し、O/W エマルションが破壊される。

また、クッキングオイルや化粧オイルのように、油脂を液体として使用する場合にも、結晶化は品質にとっての大きな課題となる。液体油製品の結晶化は、外観を悪化させるだけでなく、容器からの吐出不良など使用性の低下につながるため、避けるべき現象である。

以上のように、油脂結晶は多くの製品の物理的性質に影響し、品質に対してプラスに作用することもあれば、マイナスにも働くこともある。油脂結晶の性質が製品全体の品質を決めるといっても過言ではない。したがって、製品の開発においては、望み通りの製品物性を実現するために、油脂の結晶性について分子レベルで詳細に理解し、油脂結晶を巧みに使いこなすことがとても重要となっている。

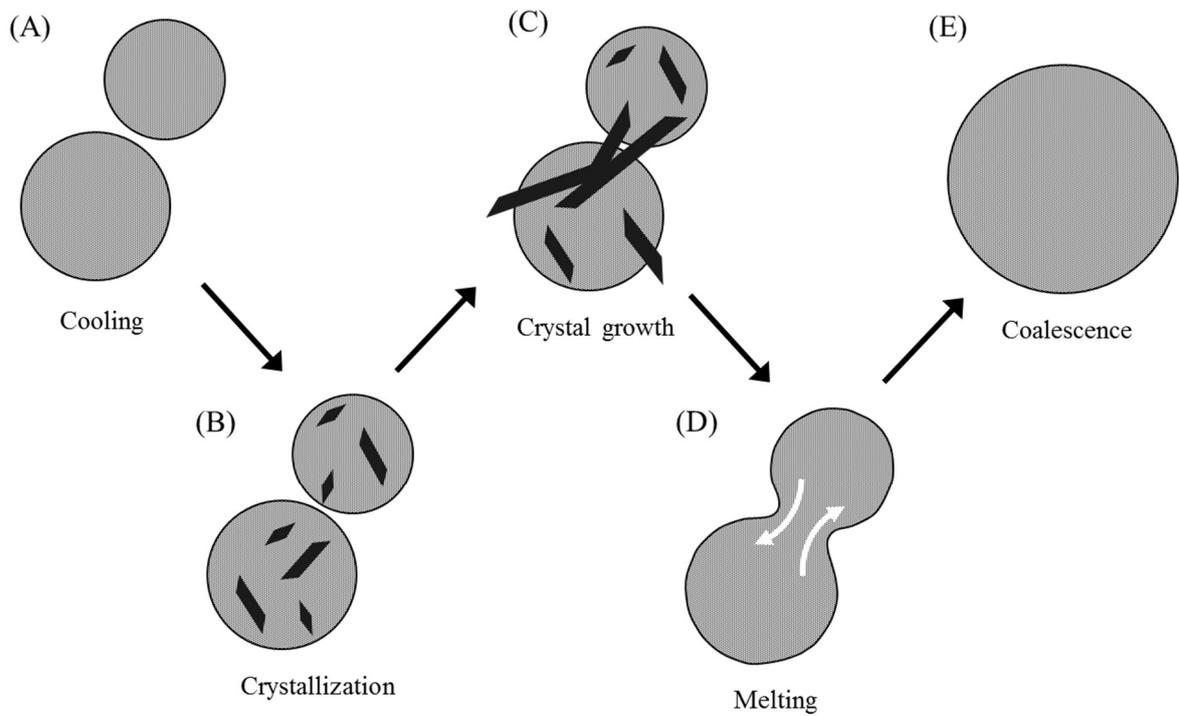


Figure 1-2. Mechanism of coalescence in O/W emulsions affected by the fat crystallization. (A) When O/W emulsion system is cooled, (B) fat crystals start to form. (C) Fat crystals grow larger, which protrude into the continuous water phase and bridge between adjacent fat droplets. (D) As the bridging crystals melt, (E) coalescence occurs from the bridging point ⁴.

1.2 油脂の結晶性を支配する因子

油脂の結晶性は多くの要因によって支配されている^{4,9}。まず油脂の結晶化のプロセスを考えると、油脂の結晶化は、結晶核形成と結晶成長という2つの段階から生じる。結晶核形成では、液体状態の油脂が過冷却状態に達した後に、油脂分子が会合してクラスターと呼ばれる集合体を形成する。このクラスターが、固液界面を新たに形成するのに必要なエネルギーを獲得すると、結晶核へと変化する (Figure 1-3)。いったん結晶核が形成されると、結晶の界面に油脂分子が吸着して成長していく結晶成長の段階に移る。一般に過冷却度が大きいほど核形成の頻度が高くなる。寒冷地では、冬場にクッキングオイルが微細に結晶化し曇りが生じる現象が見られるが、これにはクッキングオイル中に含まれる高融点油脂成分の結晶核形成が強く影響している^{10,11}。反対に、過冷却度が小さい時には結晶成長が優位となる。したがって、油脂を融点よりもわずかに低い温度で冷却しながら結晶化させると、新たな結晶核の形成を抑え、単結晶を大きく成長させることができる⁴。

油脂結晶のミクロな部分に視点を移せば、油脂分子1つ1つの配列も、油脂の結晶性に大きな影響を与える。油脂結晶には、分子配列が異なる複数の構造が存在し、これは結晶多形と呼ばれる^{12,13}。トリアシルグリセロール (TAG) では α 型、 β' 型、 β 型が代表的な結晶多形である。これらは互いに TAG の脂肪酸部の配列様式が異なり、Figure 1-4 に示すように、 α 型は六方晶型、 β' 型は直方晶垂直型、 β 型は三斜晶平行型の構造をとる。結晶の安定性は α 型、 β' 型、 β 型の順に大きくなり、従って融点はこの順で高くなる。油脂含有製品の融解・結晶化・液油への溶解挙動などは、この結晶多形によって強く影響される。例えば、 β' 型は展延性に優れた結晶となりやすいため、マーガリンやスプレッドなどに用いられる^{6,7}。結晶性の良い β 型は、チョコレートに必要なつややか表面とパリッとした食感を実現できる多形である^{2,14}。不安定多形である α 型は、結晶形態が流動的であるが故に、コーティング用油脂に向いている⁴。このように油脂含有製品には

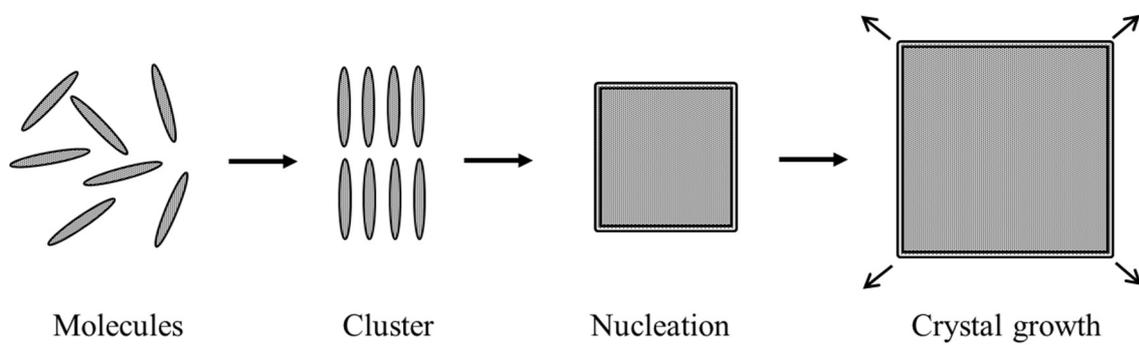


Figure 1-3. Schematic model of fat crystallization. From molecules to nucleation and crystal growth ⁴

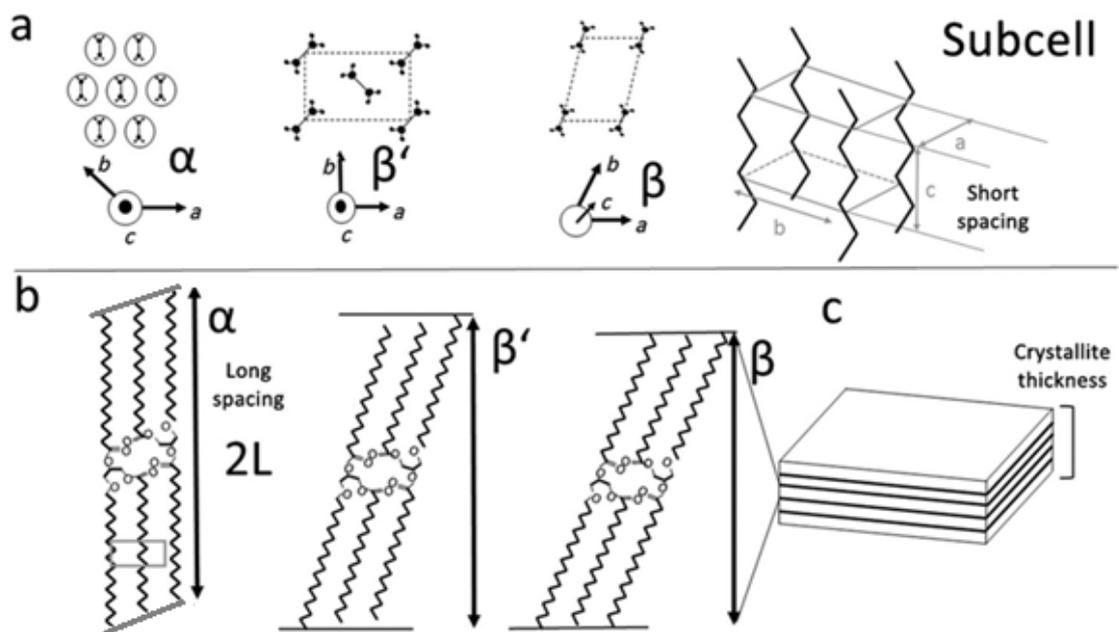


Figure 1-4. Schematic diagram of crystal structures found in TAG polymorphs. (a) Schematic of the three common subcells (α -, β' -, and β -forms). (b) Sketch of the vertical packing of TAG molecules in full extended two $2L$ (α -form) and in tilted $2L$ (β' - and β -forms). (c) Schematic 3D representation of a TAG crystallite showing the different lamellas packed together and the crystallite thickness dimension¹³

それぞれ最適な結晶多形がある。

油脂分子が配列してできた結晶の形（モルフォロジー）も、油脂結晶の性質において重要な因子である。一般に油脂の結晶の形は薄片の板状である¹⁵。これは結晶成長速度が、分子軸に垂直な面よりも平行な面の方で速いことに起因する。β型の結晶では、成長速度の異方性がさらに顕著であるため、針状の形となりやすい。針状の結晶は、気泡や水滴を取り込む性質は著しく低下する。そのため、針状の結晶はショートニングやマーガリンなどの製品には不適である。加えて、O/W エマルションにおいては、前述のように乳化破壊を引き起こす原因となりうる（Figure 1-2）。一方で、針状の結晶は、結晶粒子どうしが強固なネットワークを形成し、ゲル状の物性を発現する。連続相が油脂のゲルをオルガノゲル（またはオレオゲル）と呼ぶ。

たとえば、こめ油から抽出されるワックスは、液油中で長針状の結晶となり、オルガノゲルを形成する。オルガノゲルはトッピングやフィリング用の保型性素材、液状ショートニング、ホイップ用の起泡性素材などとして、近年注目を集めている¹⁶。

油脂結晶は単結晶として存在することは稀で、上述のオルガノゲルの例のように、多くの場合は隣り合う結晶粒子どうしが影響を及ぼし合う。通常、油脂結晶は数 μm から数百 nm の微細な結晶の集合体として、互いに連携したネットワークを形成している（Figure 1-5）。一般に粗大結晶が凝集した状態よりも、微細な結晶が分散した状態の方が、結晶どうしの引力によって機械的強度が増すとともに、製品にとって望ましい展延性や粘弾性が生まれる¹⁷。微細結晶のネットワークをつくるためには、過冷却度を大きくして核形成が優位な条件下で結晶化することが望ましい。反対にオストワルド熟成⁸や結晶多形転移¹²などによって結晶が粗大化することは、テクスチャーや安定性の低下などの悪影響を及ぼす。

また、菜種油やパーム油など、油脂含有製品で用いられるほとんどの油脂は多成分からなっている。すなわち、異なる脂肪酸組成の TAG、ジアシルグリセロール（DAG）、

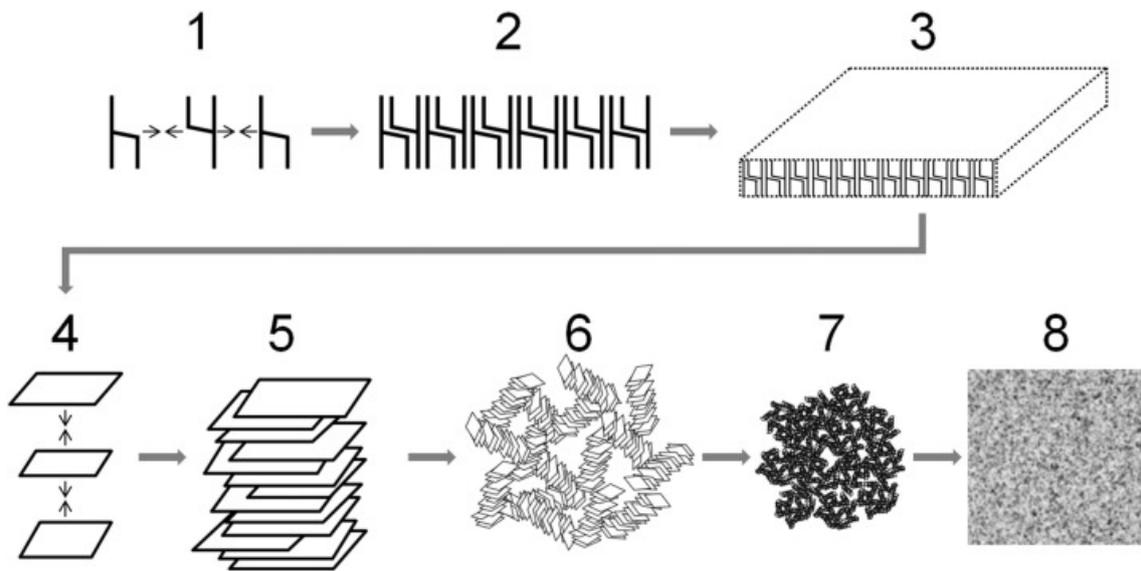


Figure 1-5. Structure hierarchy and multi-step crystallization of TAG. 1) Formation of stable crystal nuclei; 2) Assembly into lamellae; 3) Association of lamellae to form crystal nanoplatelets (CNP); 4) Aggregation of CNP; 5) Formation of CNP stacks; 6) Random assembly of CNP stacks into crystallites; 7) Aggregation of crystallites into crystals; 8) Formation of 3D crystal network¹⁷.

モノアシルグリセロール (MAG)、さらには遊離脂肪酸、リン脂質、ステロール、ワックスなどの微量不純物が油脂中には混在している。このような多成分からなる油脂が冷却されると、融点が高い成分ほど過冷却度が大きくなるために結晶化が速く、融点が高い成分は高融点成分に遅れて結晶化する⁴。このケースでは、先に結晶化した高融点成分がテンプレート (種結晶) となり、低融点成分の結晶化を誘起するような連続的・段階的な結晶化が起こる。この段階的結晶化は、結晶多形や結晶の形態、さらには結晶ネットワーク全体に影響を与える¹⁸。

以上のように、油脂の結晶性は多岐にわたる因子によって決まる。さらに、それぞれの因子は互いに独立して作用するわけではなく、構造的、熱力学的、速度論的に非常に複雑に影響し合って油脂の結晶性を決定している。したがって、油脂含有製品の開発においては、その複雑な結晶化挙動を1つ1つ解明し、なおかつそれを望ましい形へと制御していく必要がある。

1.3 油脂の結晶化制御技術

1.1 節および 1.2 節で述べてきたように、油脂含有製品の開発において油脂の結晶性をコントロールすることは非常に重要である。そこで製品の品質を向上させるために、さまざまな結晶化制御技術が開発されている。

油脂中の微量成分を利用する方法は、産業上汎用性の高い結晶化制御技術の1つである。例えば Gordon らが、精製工程を経た油脂が結晶化しやすくなることを発見し、その主要因として結晶化遅延効果を持つ遊離脂肪酸の除去を挙げている¹⁹。Fredrick らはパーム油にモノアシルグリセロール (MAG) を添加することで結晶核発生が促進され、 α 型結晶から β' 型結晶への多形転移が加速することを報告している²⁰。MAG の添加効果については Verstringe らが一連の研究にて詳細に検討を行っている²¹⁻²³。

結晶化に影響を与える添加剤として、分子内に親水基と疎水基を併せ持つ界面活性剤も頻繁に使用される。Herrera らは、ショ糖脂肪酸エステルを 0.1 % 添加するだけで、水添ヒマワリ油の結晶核の形成および β' 型から β 型への結晶多形の転移が抑制されることを明らかにしている²⁴。Masuchi らはソルビタン脂肪酸を添加したココアバターでは、結晶化温度が上昇し、結晶化挙動および結晶形状が変化することを報告している²⁵。次節で詳述するように、Shimamura らは、TAG の結晶化におよぼすポリグリセリン脂肪酸エステル (PGFE) の添加効果を系統的に研究し、PGFE の種類や添加濃度、冷却速度によって、結晶化を遅延する場合と促進する場合が生じることを示している²⁶。

結晶性の制御技術としては、添加剤を使用する他に、結晶化の温度制御による方法が知られている。例としては、チョコレートなどの製造で用いられるテンパリングが挙げられる¹⁴。テンパリングとは、油脂を急冷して準安定な多形の結晶を生成させた後に、目的の温度へ昇温、融解、そして再結晶化させる一連の操作のことである。このように環境温度の刺激を与えることによって、安定な多形を効率的に発生させることができる。

また、せん断力を外部から加えることで安定な結晶多形を得る方法も、油脂含有製品の製造に応用されている。これは、せん断力をかけた際に油脂分子が流れに沿って配向することを利用している^{4,17}。

ここに挙げた例以外にも、油脂の結晶性をコントロールする技術として、圧力を印加する方法²⁷や超音波にて刺激する方法^{28,29}など、様々なものが検討されている。油脂含有製品の製造においては、使用する油脂の特徴に応じてこれら技術をカスタマイズし、いくつかの技術を組み合わせることで、より繊細かつ安定な物性を実現している。

1.4 添加剤が油脂の結晶化を促進および抑制する効果

油脂の結晶化挙動に対する添加剤の効果については、非常に多くの研究が報告されている^{19-26, 30-43}。前節で挙げた Shimamura らの報告例²⁶のように、添加剤には結晶化を促進する効果と、結晶化を抑制する効果とがある。

添加剤が結晶化を促進または抑制するメカニズムについて、Table 1-1 に整理した。添加剤のメカニズムとして、まず熱力学的作用が挙げられる。これは、油脂結晶の融点や溶解度に影響を与える作用である。一般に、溶媒に溶質を溶かすと凝固点降下が起こるが、これは油脂においても同様である。また、高融点成分の添加により融点が増加することがあるが、これは結晶化を促進する熱力学的作用である。

上記のような熱力学的作用に加え、添加剤のメカニズムには油脂結晶の結晶化挙動に影響を与える速度論的作用がある。速度論的作用は、結晶核を形成する段階への作用と、結晶成長の段階への作用に分けて考えることができる。

結晶成長段階への作用は、Figure 1-6 に示すモデルが提唱されている⁴。このモデルによれば、結晶成長を促進する効果は、添加剤が結晶成長面に吸着し、油脂分子が取り込まれやすい階段状の表面（ステップ）を提供することで発揮される。結晶成長を抑制する効果は、油脂分子が取り込まれる位置（キンク）に添加剤が吸着することで、油脂分子の取り込みをブロックするために起こると想定されている。

結晶核を形成する段階への作用に関しては、Figure 1-7 に示すモデルが提唱されている。このモデルが示すように、結晶核形成を促進する効果に関しては、“テンプレート効果”として理解されている^{3,4}。テンプレート効果とは、親油性で融点の高い添加剤が油脂よりも先に結晶化することで、添加剤の結晶が鑄型、すなわちテンプレートとなって油脂分子の結晶化を促す効果のことである。テンプレート効果の例として、Smith らは、トリラウリンにモノラウリンを添加すると、発生する結晶の数が増加して核形成支配的な結晶化挙動へと変化するとともに、トリラウリンの結晶化が促進されることを観

Table 1-1. Summary of the effects of additives on fat crystallization ⁴

	Process	Mechanism	Effect
Thermodynamics	Melting point	Increase	Promotion
		Decrease	Retardation
	Solubility	Increase	Retardation
		Decrease	Promotion
Crystallization kinetics	Nucleation	Disturbing Clusters	Retardation
		Template	Promotion
	Crystal growth	Creating Steps	Promotion
		Blocking Absorption	Retardation

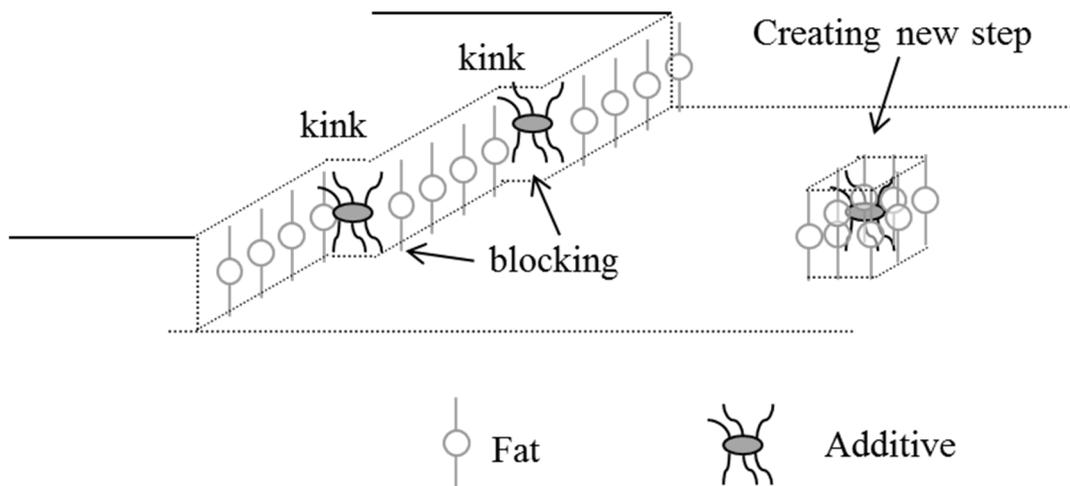


Figure 1-6. Schematic diagram of the effects of additives on crystal growth of fat. When additives block the absorption of fat molecules at kink site, crystal growth rate is retarded. When additives create new steps, crystal growth is accelerated⁴

察している⁴³。これは添加したモノラウリンが先に結晶化し、脂肪酸基を介した相互作用によってトリラウリンの結晶化を誘起したためであると考えられる。1.3 節で述べたように、TAG の結晶化に及ぼす MAG のテンプレート効果は、放射光 X 線マイクロビーム解析において直接証明された²³。

添加剤が結晶核の形成を抑制する効果に関しても、経験的にはよく知られており、産業上も利用されている²⁶。想定メカニズムとしては、Figure 1-7 に示すように、添加剤が油脂分子のクラスターを破壊することで、結晶核の形成を阻害しているものと考えられているが、詳細は未だ分かっていない。添加剤が結晶核形成を抑制するメカニズムについては、現状では研究例が極めて不十分であり、学術的な知見の蓄積が望まれているが、本研究はそのための重要な一例を示している。

1.5 ジアシルグリセロール (DAG)

1.5.1 DAG の栄養学的特性

栄養学的観点からすると、油脂は生体のエネルギー源であり、生体膜やシグナル伝達分子としても機能するため、生命の維持に無くてはならない栄養素である。一方で油脂の過剰摂取は、肥満やメタボリックシンドロームの主要因である。肥満は動脈硬化や脳卒中につながり、健康長寿の阻害因子であることに加え、医療費や介護負担を増大させる原因となるため、先進国を中心に世界的な課題となっている⁴⁴。

このような背景から、近年、健康機能を持つ油脂に注目が集まっている。例えばドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの ω 3 脂肪酸は血中中性脂肪を低下させ、動脈硬化の予防に有効であると考えられている^{45,46}。豆類や穀類の胚芽に多く含まれる植物性ステロールには、コレステロールの吸収を阻害することが知られている⁴⁷。中鎖脂肪酸は消化・吸収後に速やかに肝臓に運ばれエネルギーとして使われやすいことから⁴⁸、体に脂肪が付きにくい油脂として特定保健用食品に認定されてい

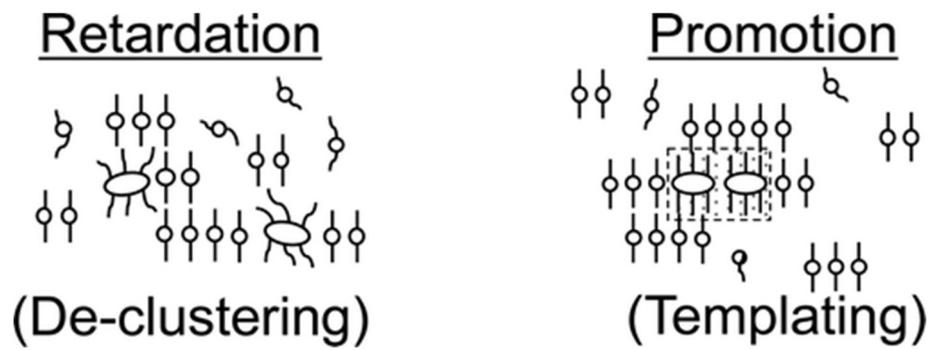
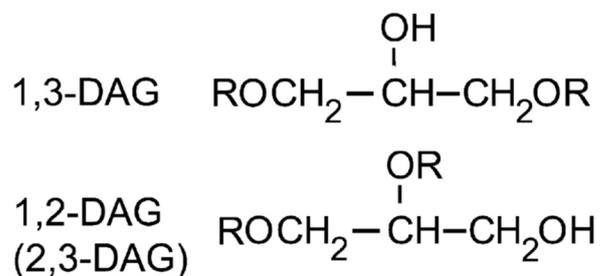


Figure 1-7. Schematic diagram of the effects of additives on crystal nucleation. Additives can prevent clusters of fats from forming crystal nuclei (declustering; left panel) or promote the nucleation by template effects (right panel), or act as a “template” to promote nucleation (templating: right panel) ²⁶.

る。

ジアシルグリセロール (DAG; Figure 1-8) は、その多彩な生理作用が注目されている油脂の1つである。例えば、DAG を摂取した場合、同じ脂肪酸組成の TAG に比べて、食後の血中中性脂肪の増加が抑制されることが明らかになっている^{49,50}。また、1日当たりの脂質摂取量の約 20 %を DAG にすることは、ボディマス指数 (body mass index, BMI)や体脂肪の低減に効果があることが示されている⁵¹。その他にも、空腹時の中性脂肪を低下させる効果や LDL コレステロールを低下させる効果など⁵²、DAG の有効性に関するさまざまな研究が報告されている。DAG の作用は、1,3-DAG がリパーゼにより酵素分解された際に、2-MAG を生成せず、生体内での代謝経路が TAG とは異なることに起因すると考えられている⁵³。以上のことから、DAG は糖尿病、脂質異常症をはじめとする生活習慣病、さらにはそれに続く動脈硬化や脳卒中の予防に有用なものとして考えられている。



R: fatty acid moiety

Figure 1-8 Chemical structures of 1,3- and 1,2-diacyl glycerol (DAG)⁶⁶

1.5.2 DAGの特徴

DAGはグリセリンと2本の脂肪酸から構成される分子である。TAGと比べて脂肪酸の数が1つ少ない構造であるが、菜種油やオリーブ油などの油脂にも1-10%程度含まれる天然成分である⁵⁴。種々の油脂中に含まれるDAGの含量をTable 1-2に示す。このように、DAGは通常の油脂からも摂取される食経験豊富な成分であるとともに、安全性についても十分な確認がされていることから、乳化剤などの食品添加物としてのみならず、TAGと同じ食用油としても使用できる素材である。

DAGには、グリセリンの1位と2位に脂肪酸基が結合した1,2体(1,2-DAG)と、1位と3位に脂肪酸基が結合した1,3体(1,3-DAG)とが存在する。脂肪酸基は容易に転位するため、加熱することで1,2-DAGから1,3-DAGへ、1,3-DAGから1,2-DAGへと異性化を起こす。長鎖脂肪酸からなるDAGの場合、平衡状態における1,2-DAGと1,3-DAGの比率はおよそ1:2である。DAGを工業生産する際には、油脂とグリセリンのグリセロリシス反応^{55,56}、あるいはFigure 1-9に示すような1,3位選択リパーゼによる脂肪酸とグリセリンのエステル化などによって⁵⁴、高純度品として製造することができる。

DAGはTAGと比べて、比重や粘度などの性質がほぼ同等であることから、加熱調理にもTAGと同様に使用可能である⁵⁴。一方でDAGにはTAGとは異なる物理化学的性質もいくつかある。その1つが極性である。DAGはフリーの水酸基が極性基として働くため、比較的多くの極性物質を溶解することができる。また、水や界面活性剤との親和性もTAGとは異なるため、乳化性能にも特徴がある^{57,58}。DAGは水との界面張力が低いため、乳化されやすく、W/O型の構造をとりやすい⁵⁷。したがって、マヨネーズなどO/W型の製品をつくる際には工夫が必要である⁵⁸。

Table 1-2. Contents of Acylglycarols in Edible Oils ⁵⁴

(ND, not determined; <DL, below detectable limit)

	TAG	DAG	MAG	Others
	(g/100 g)			
Soybean	97.9	1.0	0.0	1.1
Palm	93.1	5.8	< DL	1.1
Cottonseed	87.0	9.5	0.2	3.3
Corn	95.8	2.8	< DL	1.4
Safflower	96.0	2.1	< DL	1.9
Olive	93.3	5.5	0.2	2.3
Rapeseed	96.8	0.8	< DL	ND
Canola	97.1	2.9	< DL	ND
Sesame	95.2	4.1	0.6	ND
Rice	92.4	7.6	< DL	ND
Grapeseed	94.2	5.8	< DL	ND

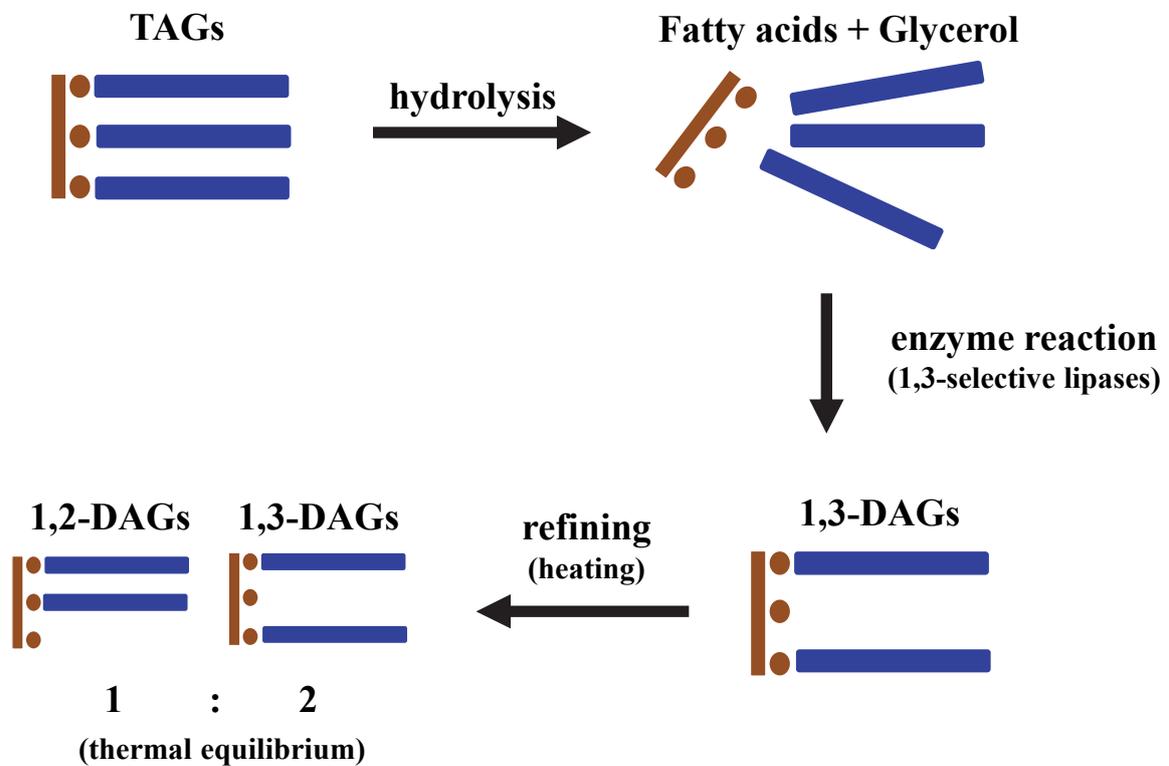


Figure 1-9. Example of industrial production processes for concentrated DAG-oil. In these processes, TAGs are hydrolyzed into fatty acids and glycerol. Then, they are resynthesized into 1,3-DAGs with 1,3-selective lipase. Some of 1,3-DAGs are rearranged into 1,2-DAGs during refining processes. Thermal equilibrium ratio of 1,2-DAGs and 1,3-DAGs is about 1:2.

1.5.3 DAGの結晶構造と物性

DAGは結晶性においてもTAGとは異なる特徴を持つ^{4,59}。これはTAGの結晶構造が、音叉型または椅子型のコンフォメーションを示すのに対し、DAGの結晶構造がそれとは大きく異なることに由来する。

Figure 1-10に1-ステアロイル-2-オレオイルグリセロール(1,2-SO)、1-ステアロイル-3-オレオイルグリセロール(1,3-SO)および1,2-ジパルミトイルグリセロール(1,2-PP)の結晶構造を示す。1,3-DAGは脂肪酸基がそれぞれ両端まで伸びたV字型のコンフォメーションをとる。1,3-DAGでは、2位の酸素原子とそれに隣接するオレオイル鎖のアシル基との間に水素結合が働く。一方で、1,2-DAGは脂肪酸基が同じ方向に巻き戻るヘアピン型のコンフォメーションをとる。このような結晶構造の違いに起因して、どの炭素数の脂肪酸においても、どの結晶多形においても、1,2-DAGよりも1,3-DAGの方が融点が高い(Figure 1-11)。

DAGの結晶性については、古くはLuttonらが、単一脂肪酸からなる1,3-DAGの結晶構造について詳細に解析している⁶⁰。続いて1990年代に入り、Smallらが混酸型の1,3-DAGおよび1,2-DAGの結晶性について検証した⁶¹⁻⁶³。また近年では、Cravenらが2成分混合系のDAGの結晶化挙動について体系的な研究結果を報告している^{64,65}。このように、1成分系および2成分系のDAGの結晶化挙動は多くの検討が行われている。一方で、工業的に生産される多成分系のDAGの研究例は限られている。

1-1節で述べたように、油脂の結晶性は製品の品質に大きく影響する因子である。DAGをクッキングオイルのような液体油として使用する場合には、1,3-DAGの高い結晶性は品質低下の原因となる。一方で、DAGを固体として利用する際には、TAGとの結晶性の違いが新たな製品物性を生み出す可能性を秘めている。したがって、DAGの産業上の有用性をさらに高めるためには、TAGとは異なるDAGの結晶性についてさらに理解を深め、結晶性をコントロールする技術の確立が求められている。

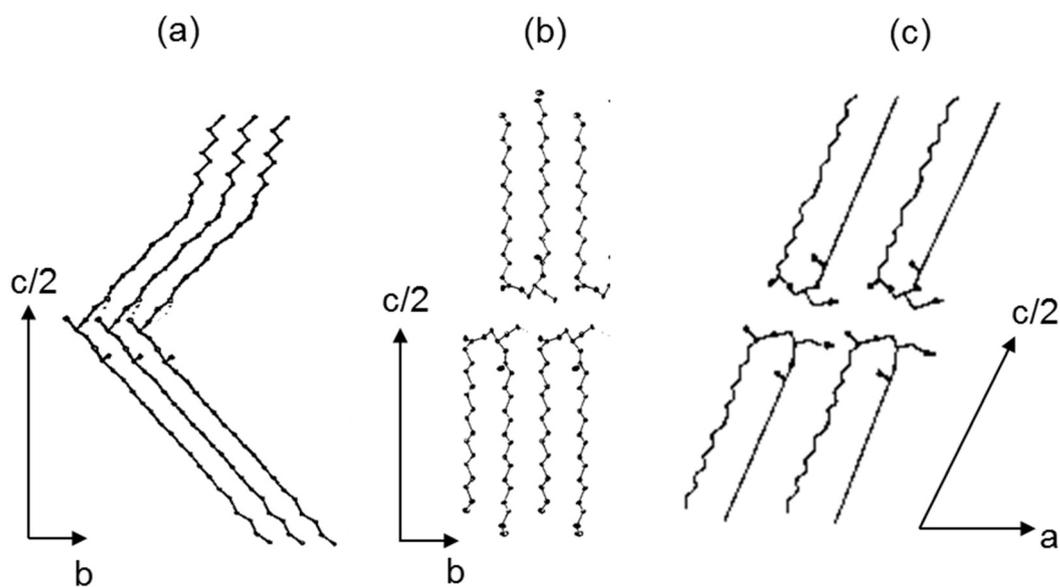


Figure 1-10 Molecular packing of DAG crystals. The structure of (a) 1,3-SO, (b) 1,2-PP and (c) 1,2-SO. 1,3-DAGs form a V-shaped structure with the two chains extending in opposite directions. In contrast, 1,2-DAGs form a hairpin-shaped conformation⁴.

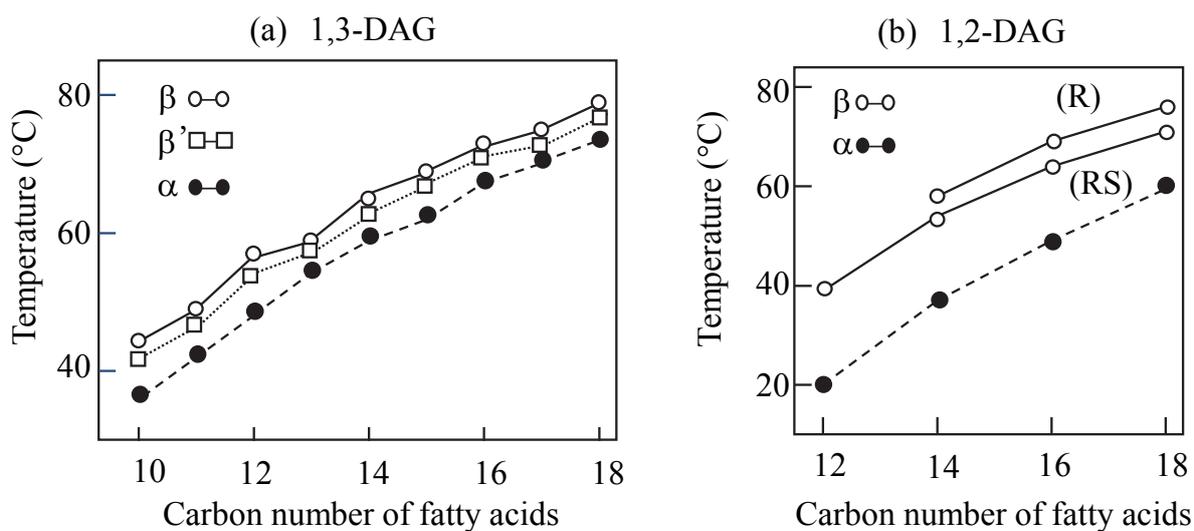


Figure 1-11. Melting points of DAG consisting of saturated fatty acids in various polymorphisms. Melting points of (a) 1,3-DAG and (b) 1,2-DAG. 1,3-DAG has higher melting points than the 1,2-DAG with the same fatty acid. In 1,2-DAGs, the racemic mixture (RS) has lower melting points than stereoselective one (R) ⁴.

1.6 本研究の目的および本論文の構成

日本では、糖尿病をはじめとする生活習慣病の患者数が年々増加している⁶⁶。生活習慣病は健康長寿の阻害因子であることに加え、医療費や介護負担を増大させることから、超高齢社会を迎えた日本にとって、その対策は喫緊の課題となっている。1.5 節で述べたように、DAG は生活習慣病に対応する生理作用を持つと同時に⁴⁹⁻⁵²、TAG と同様に調理や食品に使用できることから⁵⁴、医薬品に頼らずとも食習慣からの生活習慣病の一次予防が期待できる素材である。

すでに述べたように、油脂含有製品の開発において、使用する油脂の結晶性は非常に重要な因子である。これは DAG においても例外ではなく、多様な製品へとアプリケーションを拡大していくためには、DAG の結晶化をコントロールする技術開発が必要である。しかしながら現状では、DAG の結晶性に関する研究知見は十分に蓄積されているとは言い難い。

本研究の目的は、DAG の産業上の利用価値を高めるために、DAG の結晶化制御技術を確立することにある。本研究では、クッキングオイルなど液体油としての製品を念頭に、菜種油から合成した DAG (DAG-oil) を検討に用いた。まず第 2 章では、対象となる DAG-oil の結晶化挙動について詳細な解析を行った。示差走査熱量測定 (DSC) および DSC と連動した偏光顕微鏡観察、さらには結晶成分のガスクロマトグラフィー (GC) による分析を行い、DAG-oil の結晶化は高融点成分から低融点成分へ向かって連続的に起こることを明らかにした。第 3 章では、DAG-oil の結晶化に対して効果のある添加剤を検討し、ポリグリセリン脂肪酸エステルが非常に効率的に結晶化を抑制することを見出した。第 4 章では、ポリグリセリン脂肪酸エステルが DAG-oil の結晶化を抑制するメカニズムについて検証および考察を行った。最後に、第 5 章で本研究を総括した。

1.7 引用文献

1. Afoakwa EO, Paterson A, Fowler M (2007) **Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate—a review.** Trends Food Sci Technol 18:290–298
2. Hachiya I, Koyano T, Sato K (1989) **Seeding effects on solidification behavior of cocoa butter and dark chocolate. II. Physical properties of dark chocolate.** J Am Oil Chem Soc 66:1763–1770
3. Sato K (Ed) **Crystallization of Lipids: Fundamentals and Applications in Food, Cosmetics, and Pharmaceuticals.** Wiley-Blackwell, New Jersey (2018)
4. 佐藤 清隆、上野 聡 (著) **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** 丸善出版株式会社 (2011)
5. Bricknell J, Hartel RW (1998) **Relation of fat bloom in chocolate to polymorphic transition of cocoa butter.** J Am Oil Chem Soc 75:1609–1615
6. Rousseau D, Marangoni AG (1999) **The effects of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat–canola oil spreads.** Food Res Int 31:381–388
7. Shukla A, Bhaskar AR, Rizvi SSH, Mulvaney SJ (1994) **Physicochemical and rheological properties of butter made from supercritically fractionated milk fat.** J Dairy Sci 77:45–54
8. Rousseau D (2000) **Fat crystals and emulsion stability — a review.** Food Res. Intern. 33:3-14
9. Hjorth J, Miller R, Woodley J, Kiil S (2015) **Kinetic modeling of multi-component crystallization of industrial-grade oils and fats.** Eur. J. Lipid Sci. Technol. 117: 1066–1078.
10. Swe PZ, Che Man YB, Ghazali HM, Wei LS (1994) **Identification of major triglycerides causing the clouding of palm olein.** J Am Oil Chem Soc 71:1141–1144
11. Swe PZ, Che Man YB, Ghazali HM (1995) **Composition of crystals of palm olein formed at room temperature.** J Am Oil Chem Soc 72:343–347
12. Hernqvist L (1990) **Polymorphism of triglycerides. A crystallographic review.** Food Structure 9:39-44
13. Lopes GD, Becker K, Stehr M, Lochmann D, Hack D, Zimmer A (2015) **Role of Lipid Blooming and Crystallite Size in the Performance.** J Pharm Pharm Sci. 104:4257–4265
14. Hachiya I, Koyano T (2000) **New chocolate technology on improvement of physical properties.** J. Adv. Sci. 12(3):189-193

15. Hollander F.F.A, Kaminski D, Duret D, van Enkevort W.J.P, Meekes H, Bennema P (2002) **Growth and morphology of thin fat crystals.** Food Res. Int. 35(10): 909-918
16. Singh A, Auzaneau FI, Rogers MA (2017) **Advances in edible oleogel technologies –A decade in review.** Food Res. Int. 97:307-317
17. Tran T, Rousseau D (2016) **Influence of shear on fat crystallization.** Food Res. Intern. 81:157-162
18. 佐藤清隆 (2005) 油脂の結晶化—バルク系と分散系の比較— オレオサイエンス 5(1):3-11
19. Gordon MH, Rahman IA (1991) **Effects of minor components on the crystallization of coconut oil.** J Am Oil Chem Soc 68:577–579
20. 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
21. Verstringe S, Danthine S, Blecker C, Depypere F, Dewettinck K (2013) **Influence of monopalmitin on the isothermal crystallization mechanism of palm oil.** Food Res. Intern.51:344–353
22. Verstringe S, Danthine S, Blecker C, Dewettinck K (2014) **Influence of a commercial monoacylglycerol on the crystallization mechanism of palm oil as compared to its pure constituents.** Food Res. Intern. 62:694–700
23. 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
24. Herrera M, Rocha FM (1996) **Effects of sucrose ester on the kinetics of polymorphic transition in hydrogenated sunflower oil.** J Am Oil Chem Soc. 73:321–326
25. Masuchi MH, Grimaldi R, Kieckbusch TG (2014) **Effects of Sorbitan Monostearate and Monooleate on the Crystallization and Consistency Behaviors of Cocoa Butter.** J. Am. Oil Chem. Soc. 91:1111–1120
26. 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
27. Buchheim W, Schütt M, Frede E (1996) **High pressure effects on emulsified fats.** Prog Biotechnol. 13:331-336
28. Higaki K, Ueno S, Koyano T, Sato K (2001) **Effects of ultrasonic irradiation on crystallization behavior of tripalmitoylglycerol and cocoa butter.** J Am Oil Chem Soc 78(5):513–518

29. Wu L, Cao J, Bai X, Chen H, Zhang Y, Wu Q (2016) **Effects of Ultrasonic Parameters on the Crystallization Behavior of Virgin Coconut Oil.** *J Oleo Sci.* 65(12):967-976.
30. 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
31. Niiya I, Maruyama T, Imamura M, Okada M, Matsumoto T, Matsumoto T (1971) **Effect of emulsifiers on the crystal growth of edible solid fats. Part III. Effect of saturated fatty acid monoglyceride.** *Jap J Food Sci Technol* 20:182–190
32. Maruyama JM, Soares FASDM, D'Agostinho NR, Gonçalves MIA, Gioielli LA, da Silva RC (2014) **Effects of Emulsifier Addition on the Crystallization and Melting Behavior of Palm Olein and Coconut Oil.** *J. Agric. Food Chem.* 62:2253–2263
33. Foubert I, Vanhoutte B, Dewettinck K (2004) **Temperature and concentration dependent effect of partial glycerides on milk fat crystallization.** *Eur J Lipid Sci Technol* 106:531–539
34. Loisel C, Lecq G, Keller G, Ollivon M (1998) **Dynamic crystallization of dark chocolate as affected by temperature and lipid additives.** *J Food Sci* 63:73–79
35. Silva RC, Soares FASDM, Maruyama JM, Dagostinho NR, Silva YA, Calligaris GA, Ribeiro APB, Cardoso LP, Gioielli LA (2014) **Effect of diacylglycerol addition on crystallization properties of pure triacylglycerols.** *Food Res. Intern.* 55:436–444
36. Lončarević I, Pajin B, Omorjan R, Torbica A, Zarić D, Maksimović J, Gajić JS, Švarc J (2013) **The Influence of Lecithin from Different Sources on Crystallization and Physical Properties of Nontrans fat.** 44(6):450–458
37. 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(6):849–858
38. Ming CC, Gonçalves LAG (2015) **Effects of industrial sorbitan monolaurate on the crystallization and consistency of zero trans-fat from soybeans.** *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117:1754–1761
39. Cerdeira M, Martini S, Hartel RW, Herrera ML (2003) **Effect of sucrose ester addition on nucleation and growth behavior of milk fat-sunflower oil blends.** *J Agric Food Chem* 51:6550–6557
40. Rincón-Cardona JA, Agudelo-Laverde LM, Martini S, Candal RJ, Herrera ML (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. Intern.* 64:9–17

41. Cerdeira M, Pastore V, Vera LV, Martini S, Candal RJ, Herrera ML (2005) **Nucleation behavior of blended high-melting fractions of milk fat as affected by emulsifiers.** *Eur J Lipid Sci Technol* 107:877–885
42. Kuriyama J, Miyamoto Y, Sakamoto M (2001) **Effect of polyglycerol fatty acid esters on resistance to crystallization of palm olein.** *J Oleo Sci* 50:831–838
43. Smith PR, Cebula DJ, Povey MJW (1994) **The effect of lauric-based molecules on trilaurin crystallization.** *J Am Oil Chem Soc.* 71:1367-1372
44. Abarca-Gomez L et. Al. (NCD Risk Factor Collaboration) (2017) **Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults.** *Lancet* 390:2627-2642
45. Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH, Schaefer EJ (2008) **Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives.** *Atherosclerosis.* 197(1):12-24
46. Weber P, Raederstorff D (2000) **Triglyceride-lowering effect of omega-3 LC-polyunsaturated fatty acids--a review.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 10(1):28-37
47. RE Ostlund Jr (2004) **Phytosterols and cholesterol metabolism.** *Curr Opin Lipidol.* 15(1):37-41
48. Papamandjaris AA, MacDougall DE, Jones PJ (1998) **Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications.** *Life Sci.* 62(14):1203-1215.
49. Taguchi H, Watanabe H, Onizawa K, Nagao T, Gotoh N, Yasukawa T, Tsushima R, Shimasaki H, Itakura H (2000) **Double-blind controlled study on the effects of dietary diacylglycerol on postprandial serum and chylomicron triacylglycerol responses in healthy humans.** *J Am Coll Nutr,* 19:789-796
50. Tada N, Watanabe H, Matsuo N, Tokimitsu I, Okazaki M. (2001) **Dynamics of Postprandial Remnant-Lipoprotein Particles in Serum After Loading of Diacylglycerols.** *Clin Chem Acta,* 311:109-117
51. Nagao T, Watanabe H, Goto N, Onizawa K, Taguchi H, Matsuo N, Yasukawa T, Tsushima R, Shimasaki H, Itakura H (2000) **Dietary Diacylglycerol Suppresses Accumulation of Body Fat Compared to Triacylglycerol in Men in a Double-Blind Controlled Trial.** *J Nutr,* 130:792-797
52. Katsuragi Y, Toi T, Yasukawa T (1999) **Effects of dietary diacylglycerol on obesity and hyperlipidemia.** *J Jpn Human Dry Dock* 14:258-262

53. 松尾 登, 島崎 弘幸 (2001) **体脂肪になりにくいジアシルグリセロールの効果とその代謝の特徴**. 脂質栄養学 10 (1): 20-29
54. Katsuragi Y, Yasukawa T, Matsuo N, Tokimitsu I, Flickinger BD, Matlock MG (Eds) **Diacylglycerol oil**. AOCS, Illinois,
55. Zhang N, Yang X, Fu J, Chen Q, Song Z, Wang Y (2016) **Production of Diacylglycerol-enriched Oil by Glycerolysis of Soybean Oil using a Bubble Column Reactor in a Solvent-free System**. J Oleo Sci. 65(3):207-16.
56. Satriana, Arpi N, Lubis YM, Adisalamun, Supardan MD, Mustapha WAW (2016) **Diacylglycerol-enriched oil production using chemical glycerolysis**. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 118:1880–1890
57. Shimada A, Ohashi K (2003) **Interfacial and Emulsifying Properties of Diacylglycerol**. Food Sci. Technol. Res. 9(2): 142-147
58. Kawai S (2004) **Characterization of diacylglycerol oil mayonnaise emulsified using phospholipase A₂-treated egg yolk**. J Am Oil Chem Soc 81(11): 993–99
59. Saitou K, Mitsui Y, Shimizu M, Kudo N, Katsuragi Y, Sato K (2012) **Crystallization behavior of diacylglycerol-rich oils produced from rapeseed oil**. J Am Oil Chem Soc 89:1231–1239
60. Baur FJ, Jackson FL, Kolp DG, Lutten ES (1949) **The polymorphism of saturated 1,3-diglycerides**. J Am Chem Soc 71:3363–3366
61. Kodali RD, Fahey DA, Small DM (1990) **Structure and polymorphism of saturated monoacid 1,2-diacyl-sn-glycerols**. Biochemistry 29:10771–10779
62. Goto M, Honda K, Li D, Small DM (1995) **Crystal structure of a mixed chain diacylglycerol, 1-stearyl-3-oleoyl-glycerol**. J Lipid Res 36:2185–2190
63. Li D, Small DM (1993) **Physical behavior of the mixed chain diacylglycerol, 1-stearyl-2-oleoyl-sn-glycerol: difficulties in chain packing produce marked polymorphism**. J Lipid Res 34:1611–1623
64. Craven RJ, Lencki RW (2011) **Binary phase behavior of diacid 1,3-diacylglycerols**. J Am Oil Chem Soc 88:1125–1134
65. Craven RJ, Lencki RW (2011) **Crystallization, polymorphism and binary phase behavior of model enantiopure and racemic 1,3-diacylglycerols**. Cryst Growth Des 11:1566–1572
66. 平成 28 年 厚生労働省 国民健康・栄養調査報告

67. Saitou K, Taguchi K, Homma R, Shimizu M, Yasunaga K, Katsuragi Y, Ueno Sato K (2017)
Retardation Mechanism of Crystallization of Diacylglycerols Resulting from the Addition of Polyglycerol Fatty Acid Esters. *Cryst. Growth Des.*, 17(9):4749–4756

第2章 DAGの結晶化挙動の解析

2.1 はじめに

第1章で述べたように、油脂の結晶化抑制技術を確立する上で、対象となる油脂の結晶化挙動を理解することは非常に重要である。これは DAG においても例外ではなく、多彩な健康効果を持つ DAG¹⁻⁶の産業上の有用性をさらに高めるためには、その結晶化挙動を詳細に理解する必要がある。

DAGの結晶性に関する研究については、古くは Lutton らが単一脂肪酸からなる DAGの結晶構造について詳細に解析している⁷。Larsson らは硫黄を含む DAG を用いて、1,3-DAGの結晶構造は、脂肪酸基がそれぞれ両端まで伸びた V字型のコンフォメーションであることを示した⁸。1,2-DAGに関しては、Pascher らが⁹、脂肪酸基が同じ方向に巻き戻るヘアピン型のコンフォメーションをとることを見出している (Figure 1-8)。1-ステアロイル-3-オレオイルグリセロール (1,3-SO) のような、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸からなる混酸型の DAGの結晶構造についても、単一脂肪酸の DAG と同一の構造であることが、Small らの研究によって明らかになっている¹⁰⁻¹²。また近年では、Craven らが2成分混合系の DAGの結晶化挙動について、体系的な研究結果を報告している¹³⁻¹⁴。

上記の研究は全て、純品を用いた基礎的な DAGの結晶性に関する研究例である。一方で、工業的に生産される DAGは、1,2-DAGも1,3-DAGも、飽和脂肪酸から成る DAGも不飽和脂肪酸から成る DAGも、多種多様な分子種が混ざり合った混合物である。この混合物としての DAGの結晶性に関しては、未だ報告例が少ない。Lai らは、パーム油から製造した固体脂としての DAGの結晶性について一連の研究を行い、産業上の応用につながる知見を示している¹⁵⁻¹⁷。例を挙げれば、パーム油由来の DAGを10~90%の範囲でパームオレインに添加すると、添加濃度依存的に結晶性が高まることを報告している¹⁷。また、Xu らも同様にパーム油由来の DAGを用いて、DAGが細かな針状の結晶を形成し、より強い結晶ネットワークを形成する傾向があることを示している¹⁸。

このように、固体脂としての DAG の結晶性についてはいくつか報告があるものの、液体としての DAG の研究はこれまでに全く報告がない。

液体油はクッキングオイルやマヨネーズ、あるいは化粧オイルなどの製品に適用できる。したがって、液体の DAG の結晶化挙動の理解は、DAG の応用範囲を大きく広げる可能性がある。そこで、DAG の結晶化制御技術を確立するにあたり、まずは菜種油から合成した室温で液体の DAG (DAG-oil) について、その結晶化挙動を詳細に解析した。

2.2 実験方法

2.2.1 試料

本研究で用いた DAG-oil は以下の方法にて調製した。菜種油を酵素（リパーゼ AY、天野エンザイム株式会社）の存在下で加水分解し、菜種脂肪酸を得た。この菜種脂肪酸とグリセリンを、1,3 位選択的固定化リパーゼ (Lipozyme RM IM, Novozymes, Danmark) で減圧下にてエステル化反応させた。反応後に残った遊離脂肪酸と MAG は蒸留にて除いたのち、減圧下にて蒸気脱臭を行った。こうして得られた DAG-oil は、DAG 含量 80 % 以上、水分含量 200 ppm 以下のものであった。DAG-oil の詳細な組成を Table 2-1 に示す。

GC 分析に供するサンプルは、誘導体化試薬（シリル化剤 TH、関東化学株式会社）にてトリメチルシリル化した。ピークの定性のための標品は以下の方法にて調製した。0.25 mM の脂肪酸 (A) と等量の別の脂肪酸 (B) を 0.25 mM のグリセリンとともに 5 mL のヘキサンと混合した。Lipozyme RM IM (Novozymes) 存在下で 3 時間反応させた後、フロリジル（和光純薬工業株式会社）を充填したカラムで分画し、反応液から DAG を分取した。窒素でヘキサンを乾燥させた後、180°C で 1 時間加熱して DAG の異性体を平衡化した。こうして 1,2-AA、1,3-AA、1,2-AB、1,3-AB、1,2-BB および 1,3-BB の 6 種の DAG 混合物を得た。なお、この GC の標品の合成には 99 % 純度の脂肪酸試薬（和光

Table 2-1. Chemical compositions of DAG-oil ¹⁰

Glyceride composition (wt%)	
TAG	14.1
DAG	85.0
(1,2-DAG)	(28.9)
(1,3-DAG)	(56.1)
Monoacylglycerol	0.8
Free fatty acid	< 0.1

Fatty acid composition (wt%)	
C16:0	4.0
C18:0	1.9
C18:1	60.6
C18:2	19.9
C18:3	11.1
C20:0	0.7
C20:1	0.9
Others	0.9

純薬工業株式会社) を用いた。

DAG の 2 成分系相挙動の分析には、1,3-ジパルミチン (99 %, Sigma-Aldrich, US)、1-パルミチン-3-オレイン (rac 98 %+, Larodan Fine Chemicals, Sweden) および 1,3-ジオレイン (99 %, Sigma-Aldrich) を用いた。

2.2.2 DSC および偏光顕微鏡観察

DSC の測定は、Mettler DSC-820 (Mettler Toledo, Switzerland) を用いて行った。10 ± 0.1 mg の DAG-oil をアルミニウム製のサンプルパンに充填し、空のサンプルパンを対照として窒素パーズ下で測定を行った。サンプルは 60 °C で 10 分間加熱した後、0.2 °C/min で -20 °C まで冷却し、結晶化の発熱ピークを観察した。

偏光顕微鏡観察は、CCD カメラ (DP72、オリンパス株式会社) および温度コントローラー (10002L, Linkam Scientific Instruments Ltd., U.K.) の付いた偏光顕微鏡 (BX50、オリンパス株式会社) を用い、ステージ上のサンプルを DSC と同じ条件で冷却しながら観察を行った。

2.2.3 ガスクロマトグラフィー (GC)

GC により DAG の分子種分析を行った。約 10 mg のサンプルをガラスバイアルにとり、シリル化剤 TH (関東化学株式会社) にてトリメチルシリル化した後、水とヘキサンで分層し、ヘキサン層を GC に供した。GC 装置は水素炎イオン化検出器の付いた GC システム (Agilent 6890 series, Agilent Technologies, US) を、キャピラリーカラムは CP-TAP CB for Triglycerides (Varian Inc., US) を用いた。キャリアガスはヘリウムとし、流速を 1 mL/min とした。注入器の温度は 345 °C、検出器の温度は 350 °C とした。カラムオーブンの温度は 220 °C で 12 分間保持した後、1 °C/min の昇温速度で 305 °C まで上昇させ、305 °C で 15 分間保持、さらに 10 °C/min の昇温速度で 354 °C まで上昇させた。各ピー

クの同定は、2.2.1 項に記載の方法にて調製した標品とリテンションタイムを比較することで行った。

結晶サンプルは以下のように処理することで得た。内径 26.5 mm のガラスバイアル (SV-50、日電理化硝子株式会社) に 30 ± 0.1 g の DAG-oil を入れて 3°C で冷却した。冷却開始から 15 分、1 時間、3 時間、6 時間および 24 時間の時点で析出した結晶をろ過により分取した。分取した結晶は 50 mL の水と 2 wt% 界面活性剤水溶液 (sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate) で交互に 5 回ずつ洗浄し、液体部を取り除いた。得られたサンプルを上記の方法にて GC による分析を行った。

2.2.4 2 成分系相挙動

DAG の 2 成分系の相挙動については、DSC と X 線回折 (XRD) にて解析を行った。DSC では、1,3-ジオレイン (1,3-OO) と 1-パルミチン-3-オレイン (1,3-PO) の混合物 (1,3-OO/1,3-PO) について、60°C から 0°C へ、続いて 0°C から 60°C へ、2 °C/min の速度で温度を変化させ、その間のサーモグラムを観察した。同様に、1,3-OO と 1,3-ジパルミチン (1,3-PP) の混合物 (1,3-OO/1,3-PP) については、80°C から 0°C の間で、1,3-PO と 1,3-PP の混合物 (1,3-PO/1,3-PP) については 80°C から 20°C の間で温度を変化させながら測定を行った。結晶が融解する際の吸熱ピークが生じた温度を融点とし、相図を作成した。

XRD では装置として X'Pert powder diffractometer (PANalytical, Netherlands) を用い、CuK α 線 ($\lambda=0.15418$ nm)、管電圧 45 kV、管電流 40 mA、ステップ幅 0.03°、積算時間 1.5 秒の条件にて測定を行った。測定ではサンプルを 80 °C から 0 °C へ 2 °C/min の速度で温度を変化させ、途中 10、30、50 および 80 °C の時点で 30 分間温度を保持した。そして温度を保持している間の XRD パターンを記録した。

2.3 結果と考察

2.3.1 DSC および偏光顕微鏡による DAG の結晶化挙動の観察

Figure 2-1 に 0.2 °C/min の降温速度にてサンプルを冷却した際の、DSC の結果を示す。DAG-oil は冷却されると、まず小さな発熱ピーク ($\Delta H = 2.1$ J/g、ピーク温度 4.8 °C) が現れ、続いて大きな発熱ピーク ($\Delta H = 30.2$ J/g、ピーク温度 -3.2 °C) が観察された。両ピークの面積は約 15 倍の差があり、これは後半のピークでより多くの結晶が析出したことを示唆している。

Figure 2-2 に DSC と同じ降温速度で冷却した際に、析出した結晶の偏光顕微鏡写真を示す。6 °C 付近の温度において、5~20 μm のサイズの小さな粒状結晶が観察された (Figure 2-2a)。温度が 0 °C 以下になると、針状結晶が次々と現れはじめ (Figure 2-2b)、-3~-4 °C になるとさらに異なる形態をもった結晶が析出した (Figure 2-2c)。これら DSC および偏光顕微鏡観察の結果は、DAG-oil の結晶化には複数のステージが存在することを示唆している。Figure 2-1 で見られた DSC の小さな発熱ピークは、6 °C 付近で観察された結晶 (Figure 2-2a) の結晶化と対応し、大きな発熱ピークはその後に観察された形態の異なる結晶 (Figure 2-2b,c) の結晶化に対応すると考えられる。

2.3.2 GC による結晶化成分の分析

Figure 2-3 に結晶化前の DAG-oil (Figure 2-3A) と、3 °C で 15 分後 (Figure 2-3B) および 24 時間後 (Figure 2-3C) に析出した結晶の GC クロマトグラムを示す。結晶化前の DAG-oil において、主要成分はジオレイン (OO) をはじめとする不飽和脂肪酸の DAG である。15 分後に回収した結晶では、1,3-ジパルミチン (1,3-PP)、1-パルミチン-3-ステアリン (1,3-PS)、1,3-ジステアリン (1,3-SS) など、飽和脂肪酸からなる 1,3-DAG、および 1-パルミチン-3-オレイン (1,3-PO)、1-ステアリン-3-オレイン (1,3-SO) など飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸からなる 1,3-DAG の強いピークが観察された。24 時間後に回収

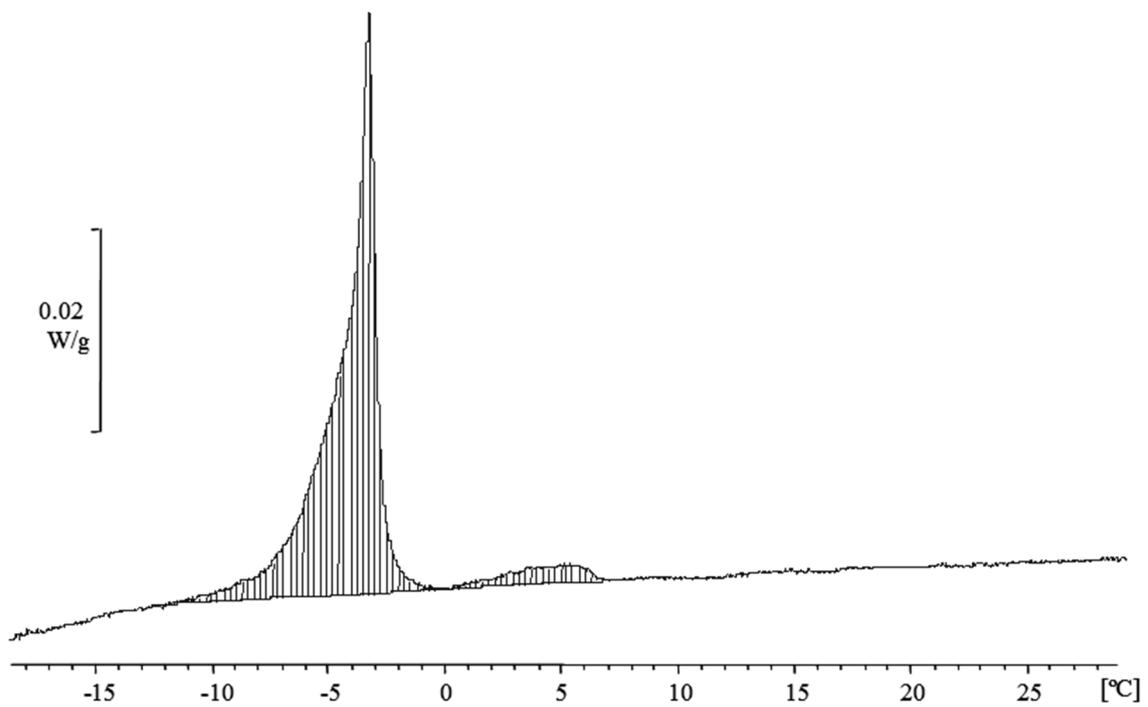


Figure 2-1. DSC analysis of crystallization behaviors of DAG-oil. The thermogram of DAG-oil was obtained by cooling at a rate of 0.2 °C /min from 60 to -20 °C¹⁹.

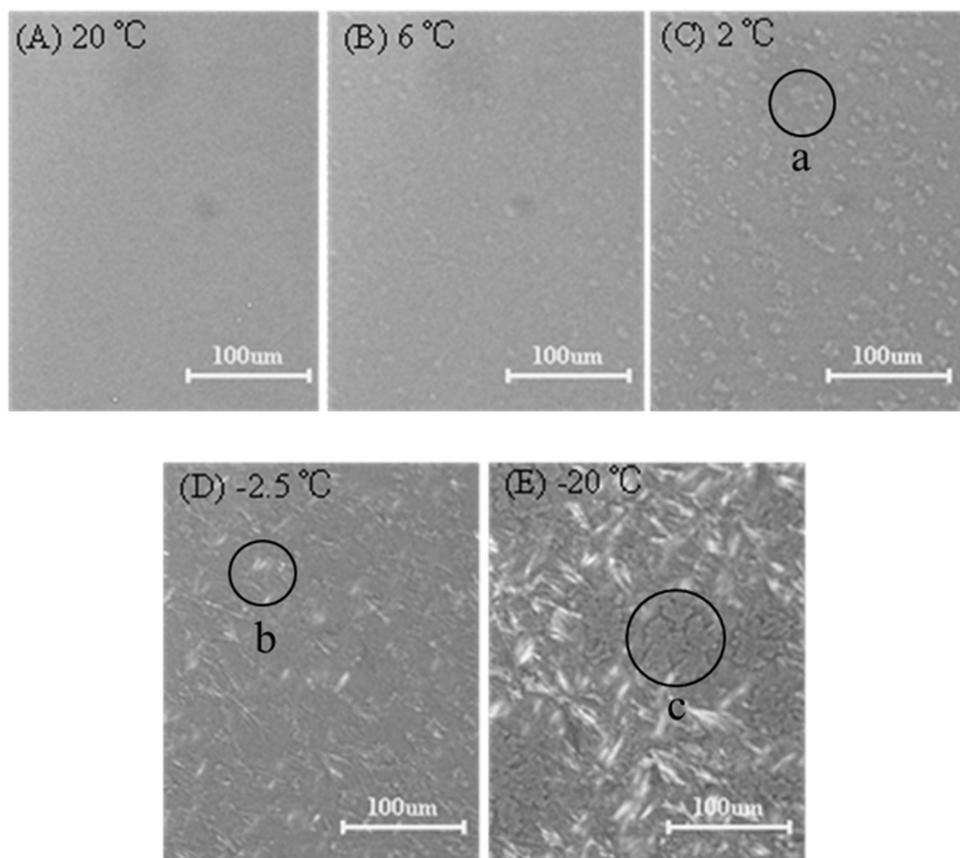


Figure 2-2. Optical micrographs taken at different crystallization stages of DAG-oil. DAG-oil was cooled on the stage at the same rate as DSC (0.2 °C /min). The images are at (A) 20 °C, (B) 6 °C, (C) 2 °C, (D) -2.5 °C, (E) -20 °C. Small crystals appeared first (circle a), followed by the emergence of crystals of two different morphologies (circle b and c) ¹⁹.

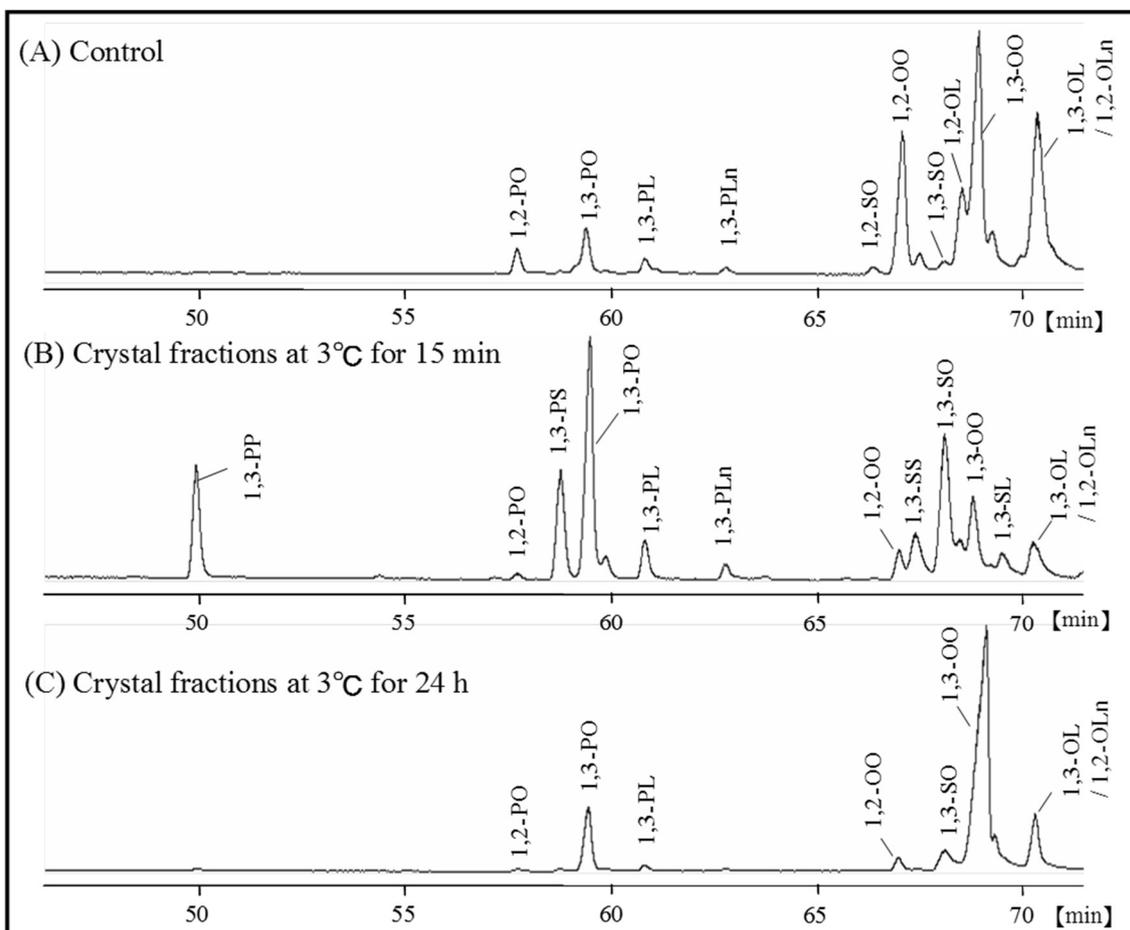


Figure 2-3. Gas chromatography chromatogram of DAG-oil and its crystal fractions separated after crystallization for different periods at 3 °C . (A) DAG-oil (Control). (B) Crystal fractions at 3 °C for 15 min. (C) Crystal fractions at 3 °C for 24 h ¹⁹.

した結晶では 1,3-OO の強いピークが観察され、その他のピークの強度は相対的に弱まった。

Table 2-2 および Table 2-3 に GC の全測定結果を示す。1,3-DAG の相対ピーク面積は、結晶を回収する時間によって大きく変化したのに対し (Table 2-2)、1,2-DAG に関してはほとんど変化がなかった (Table 2-3)。これは、3°C で結晶化する成分のほとんどが 1,3 体であることを示唆している。純粋な試薬を用いた先行研究によれば、一般に 1,3-DAG は同一脂肪酸組成の 1,2-DAG よりも融点が高く、結晶化しやすいとされている^{6-12,20,21}。この 1,3 体と 1,2 体の違いは、おそらくは結晶のコンフォメーションの違いに起因する。1,3-DAG は 2 本の脂肪酸鎖を異なる方向へ広げた V 字型の構造をとるのに対し、1,2-DAG は 2 本の脂肪酸が同じ方向に伸びたヘアピン型の構造をとる (Figure 1-8)。1,3-DAG の結晶構造は、分子同士が近接することでより強い分子間力を受けることができる。本研究の結果は、さまざまな分子種が混ざった混合系の DAG 中であっても、純品と同じように 1,3 体の方が結晶となりやすいことを明らかにした。

Figure 2-4 に 3 つのタイプの 1,3-DAG の相対ピーク面積の時間変化を示す。1,3-PP や 1,3-PS など飽和脂肪酸 2 本からなる 1,3-DAG、および 1,3-PO や 1,3-SO など飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸からなる 1,3-DAG に関しては、結晶化の初期の段階 (~15 min) で結晶として析出している。これら高融点成分の結晶は、種結晶としてその他成分の結晶化を引き起こす可能性がある。冷却開始から 1~3 時間の時点で、1,3-PO や 1,3-SO の相対ピーク面積は最も高い値となった。冷却開始から 6 時間を過ぎると、1,3-OO のピーク面積の増加が観察された。DSC (Figure 2-1) や偏光顕微鏡観察の結果 (Figure 2-2) と合わせて考えると、DAG-oil の結晶化挙動は、まず飽和脂肪酸を含む 1,3-DAG が結晶化し、続いて主要成分である 1,3-OO が結晶化する段階的なものであると考えられる。

Table 2-2. Relative peak areas (% total area) of 1,2-DAG components of crystal fraction ¹⁹

	1,2-DAG peak area (% total area)								
	1,2-disaturated			1,2-saturated-unsaturated				1,2-diunsaturated	
	1,2-PP	1,2-PS	1,2-SS	1,2-PO	1,2-SO	1,2-PL	1,2-PLn	1,2-OO	1,2-LL
Control	< 0.1	< 0.1	N.D.	2.0	0.7	0.4	N.D.	12.4	0.8
15 min	< 0.1	0.2	0.2	0.4	0.2	N.D.	N.D.	2.3	0.2
1 h	< 0.1	0.1	0.1	0.7	0.4	N.D.	N.D.	2.4	0.2
3 h	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.8	0.4	N.D.	N.D.	2.5	0.1
6 h	< 0.1	< 0.1	N.D.	0.6	0.3	N.D.	N.D.	3.6	0.5
24 h	< 0.1	< 0.1	N.D.	0.4	0.2	N.D.	N.D.	2.1	0.1

Table 2-3. Relative peak areas (% total area) of 1,3-DAG components of crystal fraction ¹⁹

	1,3-DAG peak area (% total area)								
	1,3-disaturated			1,3-saturated-unsaturated				1,3-diunsaturated	
	1,3-PP	1,3-PS	1,3-SS	1,3-PO	1,3-SO	1,3-PL	1,3-PLn	1,3-OO	1,3-LL
Control	0.1	0.2	N.D.	3.78	0.93	1.14	0.51	23.39	2.69
15 min	7.6	8.7	5.4	18.22	14.74	2.78	1.19	7.20	0.41
1 h	3.8	3.6	2.2	23.75	17.22	3.34	1.40	8.24	0.74
3 h	2.8	2.6	1.6	24.82	15.81	3.21	1.23	13.98	0.72
6 h	0.9	0.8	1.0	10.60	7.18	1.36	0.58	42.17	1.05
24 h	0.3	0.4	0.2	9.79	5.48	0.99	0.38	53.48	0.69

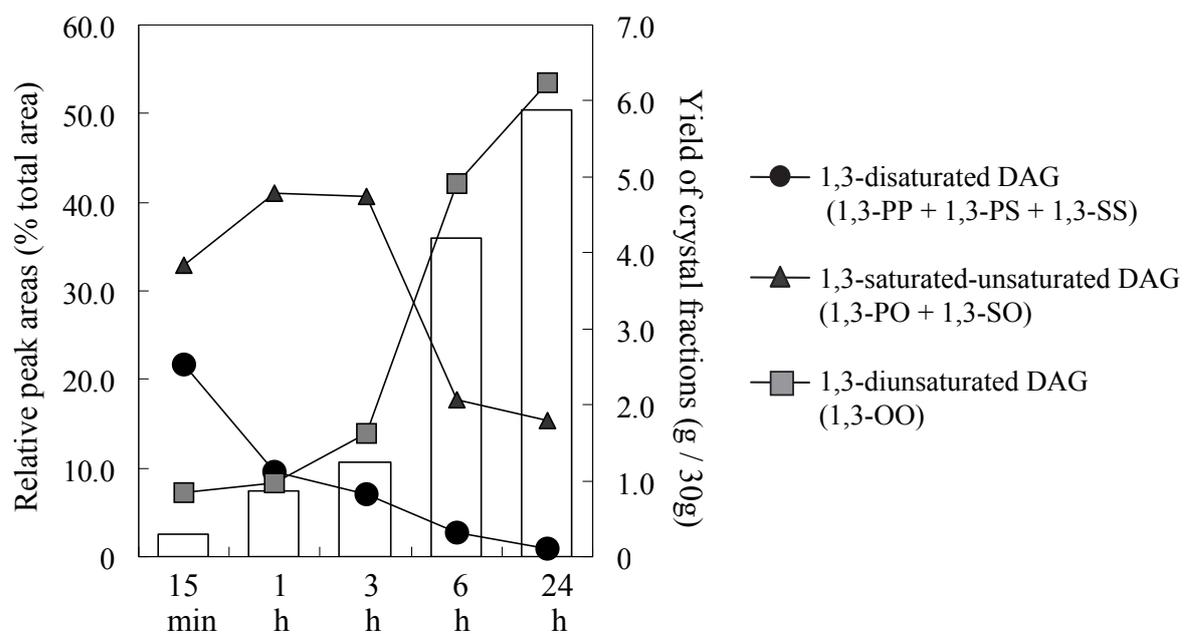


Figure 2-4. The changes of relative peak areas of 1, 3-DAGs. Relative peak areas (% total area) of 1,3-disaturated DAGs (●), 1,3-saturated-unsaturated (▲), and 1,3-diunsaturated DAGs (■) were plotted over time¹⁰.

2.3.3 2成分混合系での1,3-DAGの相挙動—DSCによる解析

2成分混合系での相挙動は、多成分の実際系を理解する上で重要であり、TAGでは多くの研究がなされている²²⁻²⁶。一方でDAGの混合系相挙動に関しては知見が少ない。近年、Cravenらが中鎖脂肪酸を含む1,3-DAGの相挙動を報告しているが^{13,14}、1,3-PP、1,3-POや1,3-OOなど、DAG-oilに含まれる代表的成分については未だ検討がなされていない。そこで、2.3.1項および2.3.2項で観察された段階的な結晶化挙動についてさらに理解を深めるために、1,3-PP、1,3-PO、1,3-OOの2成分混合系について、相挙動の詳細な解析を行った。

Figure 2-5は1,3-OOと1,3-POの混合物について、2°C/minで降温および昇温させた時のDSCサーモグラムを示している。純粋な1,3-OOおよび1,3-POは、それぞれ25.2°Cと42.7°Cに融解ピークが観察された。2成分混合系では2つの融解ピークが観察され、1,3-POの濃度が低いほど、高融点側のピークが低融点側のピークに近づいていった (Figure 2-5B)。

1,3-OOと1,3-PPの混合系および1,3-POと1,3-PPの混合系でも同様の実験を行い、融解ピークの温度をプロットすることで相図を作成した (Figure 2-6)。すべての相図は、2つの成分が別々に結晶化する、非相溶性の偏晶もしくは共晶の性質を示した。

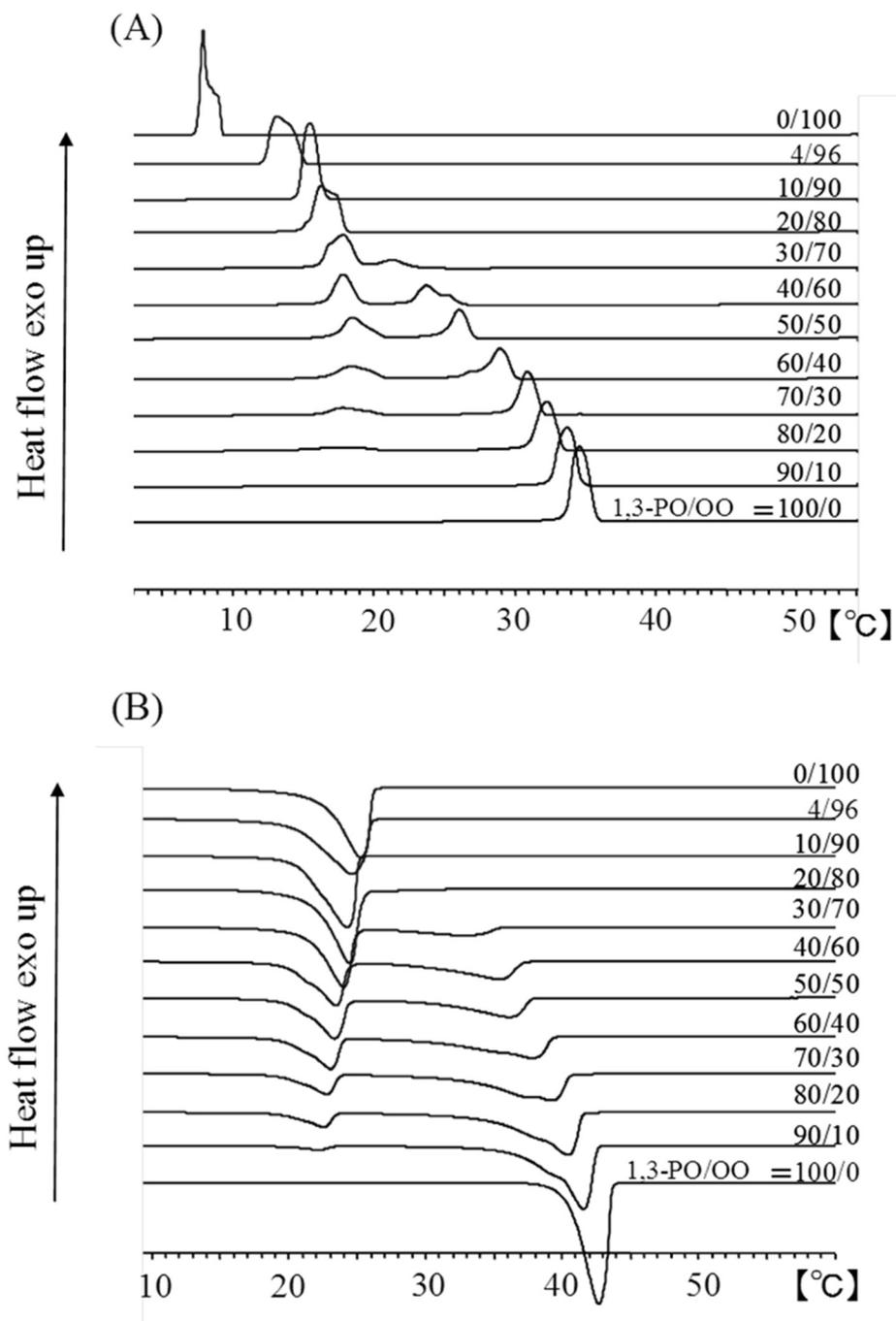


Figure 2-5. DSC thermograms of 1, 3-PO/1,3-OO mixtures. The exotherm (A) and endotherm (B) were obtained by cooling and heating 1, 3-PO/1,3-OO mixtures at a rate of 2 °C /min¹⁰.

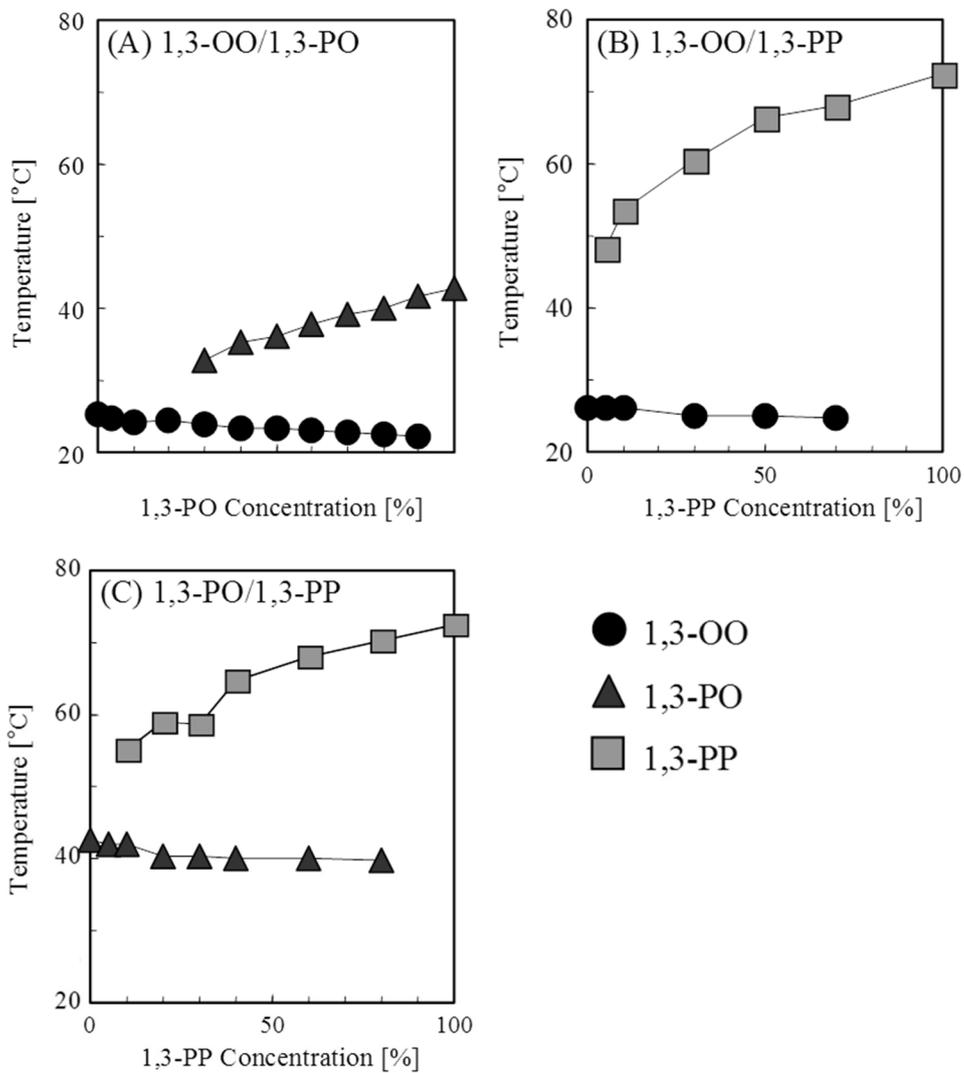


Figure 2-6. Melting points of the mixtures of 1, 3-DAGs. The diagrams were constructed by plotting the melting points of 1, 3-OO/1,3-PO (A), 1, 3-PP/1,3-PP, (B) and 1, 3-PO/1,3-PP (C) mixtures. ● for 1, 3-OO, ▲ for 1, 3-PO, and ■ for 1, 3-PP¹⁰.

2.3.4 2成分混合系での1,3-DAGの相挙動—XRDによる解析

次に、1,3-DAGのXRDパターンについて分析を行った (Figure 2-7A-C)。1,3-OOのXRDパターンは、0.47 nm、0.38 nm、0.36 nmの長面間隔に相当する強い回折ピークが観察され、これは1,3-OOの結晶多形が β 形であることを示している²⁷。1,3-PPは0.46 nm、0.39 nm、0.37 nmの長面間隔に相当する強い回折ピークが観察され、これも β 形であった^{7,28}。Padleyらは、1,3-PPの結晶多形について2種類の β 形 (β_1 、 β_2)を同定しているが²⁹、XRDパターンから本実験での β 形は β_2 に対応するものと思われる。1,3-POについては0.47 nmと0.38 nmに比較的幅の広い回折ピークが観察された。

等量混合の2成分系のXRDパターンをFigure 2-7D-Fに示す。10 °CでのXRDパターンは、1,3-OOと1,3-PO (Figure 2-7D)、1,3-OOと1,3-PP (Figure 2-7E) および1,3-POと1,3-PP (Figure 2-7F)のすべての組み合わせにおいて、2つの成分の各XRDパターンが重なった形となった。温度を30 °C (Figure 2-7D, E) または50 °C (Figure 2-7F)に上昇させると、低融点側の成分のXRDパターンが消失し、高融点側の成分のパターンがはっきりと観察できるようになった。これらの結果は、1,3-DAGの2成分混合系が非相溶性の挙動となるという結論を支持している。

一般にTAGの系では、PPPとSSS、SOSとSLSなど脂肪酸組成が似ている分子は相溶性の挙動を示す^{25,26}。本研究において、1,3-OOと1,3-PO、および1,3-POと1,3-PPの組み合わせは、それぞれパルミチン酸とオレイン酸を共通の脂肪酸として含有している。それにも関わらず非相溶性の挙動を示したことは、1,3-DAG どちらの相溶性が非常に低いことを表している。これは、本研究において観察されたDAG-oilの結晶化挙動、すなわち高融点成分から低融点成分への段階的な結晶化 (ex. Figure 2-3) の原因であると考えられる。今後、多成分におけるDAGの結晶化挙動についてさらに明確にするためには、1,2-DAGと1,3-DAGが混在する系で、かつ結晶多形まで考慮した相挙動について詳細に検討する必要がある。

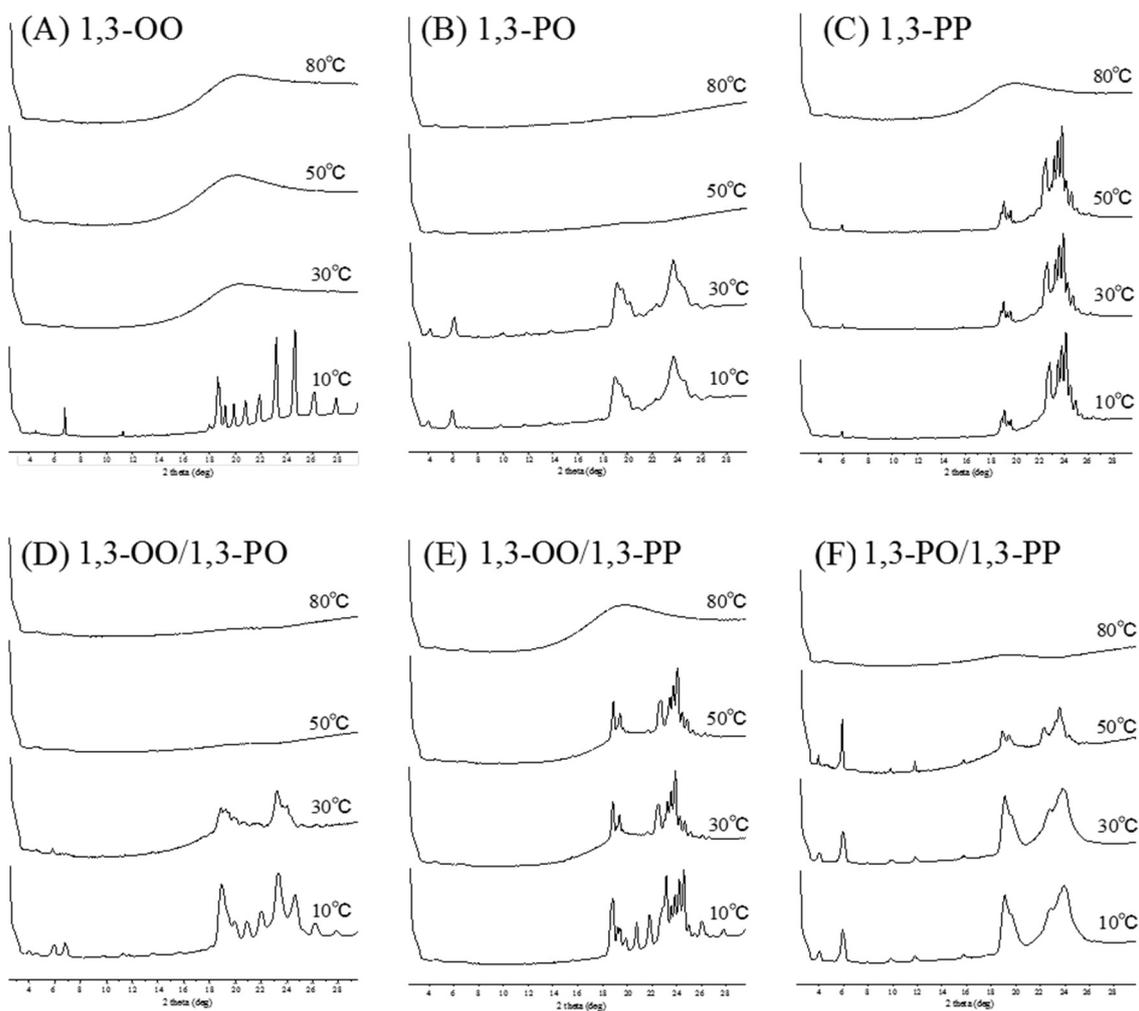


Figure 2-7. X-ray diffraction spectra of the purified and mixed 1, 3-DAGs. The spectra of (A) 1, 3-OO, (B) 1,3-PO, (C) 1,3-OO, (D) 1,3-OO/1,3-PO, (E) 1,3-PO/1,3-PP at 10, 30, 50 and 80 °C ¹⁰.

2.4 まとめ

本章では、菜種油から合成した室温で液体の DAG-oil について、結晶化挙動の解析を行った。DSC、偏光顕微鏡観察および結晶成分の GC 分析の結果、DAG-oil 中で結晶化する成分のほとんどが 1,3 体であることが示された。また、DAG-oil に含まれる 1,3-DAG の中では、1,3-PP や 1,3-PO など飽和脂肪酸を含む高融点成分が最初に結晶化し、続いて 1,3-OO など低融点成分が結晶化するという段階的な結晶化挙動を示した。さらに本章では、1,3-DAG の 2 成分混合系の相挙動について詳細な検討を行った。その結果、1,3-OO、1,3-PO および 1,3-PP は偏晶もしくは共晶の相挙動となることを明らかにした。この非相溶性の挙動が DAG-oil の段階的な結晶化につながっているものと推察される。

一般に、段階的な結晶化挙動においては、最初に析出する結晶が種結晶として働き、その他成分の結晶化を引き起こす。本研究の結果から、DAG-oil では 1,3-PP や 1,3-PO など飽和脂肪酸を含む 1,3-DAG が種結晶となりうることが示された。したがって、DAG-oil をクッキングオイルやマヨネーズなど液体油として製品化するに当たっては、飽和脂肪酸を含む 1,3-DAG の結晶化を制御することが、最も重要であると考えられる。

2.5 引用文献

1. Taguchi H, Watanabe H, Onizawa K, Nagao T, Gotoh N, Yasukawa T, Tsushima R, Shimasaki H, Itakura H (2000) **Double-blind controlled study on the effects of dietary diacylglycerol on postprandial serum and chylomicron triacylglycerol responses in healthy humans.** *J Am Coll Nutr*, 19:789-796
2. Tada N, Watanabe H, Matsuo N, Tokimitsu I, Okazaki M. (2001) **Dynamics of Postprandial Remnant-Lipoprotein Particles in Serum After Loading of Diacylglycerols.** *Clin Chem Acta*, 311:109-117
3. Nagao T, Watanabe H, Goto N, Onizawa K, Taguchi H, Matsuo N, Yasukawa T, Tsushima R, Shimasaki H, Itakura H (2000) **Dietary Diacylglycerol Suppresses Accumulation of Body Fat Compared to Triacylglycerol in Men in a Double-Blind Controlled Trial.** *J Nutr*, 130:792-797
4. Katsuragi Y, Toi T, Yasukawa T (1999) **Effects of dietary diacylglycerol on obesity and hyperlipidemia.** *J Jpn Human Dry Dock* 14:258-262
5. 松尾 登, 島崎 弘幸 (2001) 体脂肪になりにくいジアシルグリセロールの効果とその代謝の特徴. *脂質栄養学* 10 (1): 20-29
6. Katsuragi Y, Yasukawa T, Matsuo N, Tokimitsu I, Flickinger BD, Matlock MG (Eds) **Diacylglycerol oil.** AOCS, Illinois,
7. Baur FJ, Jackson FL, Kolp DG, Lutton ES (1949) **The polymorphism of saturated 1,3-diglycerides.** *J Am Chem Soc* 71:3363–3366
8. Larsson K (1963) **The crystal structure of the 1,3-diglyceride of 3-thiadodecanoic acid.** *Acta Cryst.* 16:741-748
9. Pascher I, Sundell S, Hauser H (1981) **Glycerol conformation and molecular packing of membrane lipids. The crystal structure of 2,3-dilauroyl-D-glycerol.** *J. Mol. Biol.* 153, 791–806
10. Goto M, Honda K, Li D, Small DM (1995) **Crystal structure of a mixed chain diacylglycerol, 1-stearyl-3-oleoyl-glycerol.** *J Lipid Res* 36:2185–2190
11. Li D, Small DM (1993) **Physical behavior of the mixed chain diacylglycerol, 1-stearyl-2-oleoyl-sn-glycerol: difficulties in chain packing produce marked polymorphism.** *J Lipid Res* 34:1611–1623
12. Li D, Small DM (1995) **Physical Behavior of the Hydrophobic Core of Membranes: Properties of 1-Stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycerol.** *Biochem.* 34:16672—16677
13. Craven RJ, Lencki RW (2011) **Binary phase behavior of diacid 1,3-diacylglycerols.** *J Am Oil Chem Soc* 88:1125–1134

14. Craven RJ, Lencki RW (2011) **Crystallization, polymorphism and binary phase behavior of model enantiopure and racemic 1,3-diacylglycerols.** *Cryst Growth Des* 11:1566–1572
15. Phuah, ET, Beh BK, Lim CSY, Tang TK, Lee YY, Lai OM (2016) **Rheological properties, textural properties, and storage stability of palm kernel - based diacylglycerol - enriched mayonnaise.** *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118:185–194.
16. Saberi AH, Lai OM, Toro-Vázquez JF (2011) **Crystallization kinetics of palm oil in blends with palm-based diacylglycerol.** *Food Res. Intern.* 44, 425–435.
17. Ng SP, Lai OM, Abas F, Lim HK, Beh BK, Ling TC, Tan CP (2014) **Compositional and thermal characteristics of palm olein-based diacylglycerol in blends with palm super olein.** *Food Res. Intern.* 55:62–69.
18. Xu Y, Wei C, Zhao X, Lu C, Dong C (2016) **A comparative study on microstructure, texture, rheology, and crystallization kinetics of palm-based diacylglycerol oils and corresponding palm-based oils.** *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118:1179–1192
19. Saitou K, Mitsui Y, Shimizu M, Kudo N, Katsuragi Y, Sato K (2012) **Crystallization behavior of diacylglycerol-rich oils produced from rapeseed oil.** *J Am Oil Chem* 89:1231–1239
20. Howe RJ, Malkin T (1951) **An X-ray and thermal examination of the glycerides. Part VI. The 1:2-diglycerides, and further observations on 1:3-diglycerides.** *J Chem Soc* 2663–2667
21. Lo SK, Tan CP, Long K, Yusoff M, Lai OM (2008) **Diacylglycerol oil properties, processes and products: a review.** *Food Bioprocess Technol* 1:223–233
22. Koyano T, Hachiya I, Sato K (1992) **Phase behavior of mixed system of SOS and OSO.** *J Phys Chem* 96:10514–10520
23. Minato A, Ueno S, Yano J, Wang ZH, Seto H, Amemiya Y, Sato K (1996) **Synchrotron radiation x-ray diffraction study on phase behavior of PPP–POP binary mixtures.** *J Am Oil Chem Soc* 73:1567–1572
24. Boodhoo MV, Bouzidi L, Narine SS (2009) **The binary phase behavior of 1,3-dipalmitoyl-2-stearoyl-sn-glycerol and 1,2-dipalmitoyl-3-stearoyl-sn-glycerol.** *Chem Phys Lipids* 160:11–32
25. Kellens M, Meeussen W, Hammersley A, Reynaers H (1991) **Synchrotron radiation investigations of the polymorphic transitions of saturated monoacid triglycerides. Part 2: Polymorphism study of a 50:50 mixture of tripalmitin and tristearin during crystallization and melting.** *Chem Phys Lipids* 58:145–158

26. Takeuchi M, Ueno S, Floeter E, Sato K (2002) **Binary phase behavior of 1,3-distearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol (SOS) and 1,3-distearoyl-2-linoleoyl-sn-glycerol (SLS).** J Am Oil Chem Soc 79:627–632
27. Daubert BF, Lutton ES (1947) **X-ray diffraction analyses of synthetic unsaturated monoacid diglycerides.** J Am Chem Soc 69:1449–1451
28. Craven RJ, Lencki RW (2011) **Crystallization and polymorphism of 1,3-acyl-palmitoyl-rac-glycerols.** J Am Oil Chem Soc 88: 1113–1123
29. Shannon RJ, Fenerty J, Hamilton RJ, Padley FB (1992) **The polymorphism of diglycerides.** J Sci Food Agric 60:405–417

第3章 DAGの結晶化に対する乳化剤の効果

3.1 はじめに

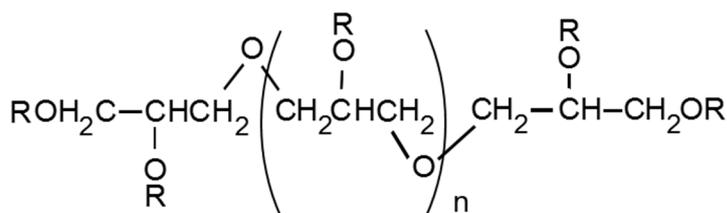
第2章では、菜種油から合成した DAG (DAG-oil) の結晶化挙動について検討を行い、その結果、DAG-oil は 1,3-PP や 1,3-PO などの高融点成分がまず結晶化し、続いて 1,3-OO などが結晶化する段階的な結晶化挙動をとることが明らかとなった。本章ではこれを踏まえて、DAG-oil の結晶化を制御する方法について検討を行った。

油脂の結晶化を制御する方法としては、1-3 節および 1-4 節で述べたように、添加剤を使用する方法が広く用いられている¹。油脂の結晶化に影響を与える食品用添加剤としては、レシチン²、ソルビタン脂肪酸エステル³⁻⁵、ショ糖脂肪酸エステル⁶⁻⁹およびポリグリセリン脂肪酸エステル (PGFE) などが挙げられる⁹⁻¹¹。本検討ではその中で PGFE に着目した。PGFE は、グリセリンが重合してできたポリグリセリン部と、そこに結合する脂肪酸部からなる (Figure 3-1)。PGFE は親水基であるポリグリセリン部の大きさ (重合度) や分岐の有無、疎水基である脂肪酸部の種類や結合数を自由に替えられる。また、食品としての安全性や食経験も十分に認められた、非常に汎用性が高い乳化剤である^{12,13}。

PGFE が油脂の結晶化に与える影響については、これまでにいくつか報告されている。Sakamoto らは、PGFE にパームオレインの結晶化を抑制する効果があること、およびその効果は脂肪酸部の種類によって異なることを明らかにした。その中で、特に飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸、または飽和脂肪酸と中鎖脂肪酸からなる混酸型の PGFE に強い結晶抑制効果があることを示している¹⁰。すでに述べたように、Shimamura らは、脂肪酸部の構成、添加濃度、および冷却速度によって、パームステアリンに対する PGFE の効果が結晶化抑制としても結晶化促進としても働きうることを示している¹¹。

上述のように、TAG の結晶化に対する PGFE の効果に関しては詳しく検討されているのに対し、DAG に対する PGFE の効果についてはこれまでに報告例がない。そこで

本章では、DAG の結晶化に及ぼす PGFE の添加効果を検討した。第 1 章で明らかになった DAG-oil の結晶化挙動を踏まえ、本検討では対象の油脂として、DAG-oil に加えて、DAG-oil の代表的な成分のみで構成した単純化モデル（モデル DAG）を用い、PGFE の作用点を検証した。



R: fatty acid moiety

n: degrees of polymerization

Figure 3-1. Structures of polyglycerol fatty acid esters ²⁰

3.2 実験方法

3.2.1 試料

DAG-oil は、第 2 章に記載のものと同様の方法を用いて菜種油から調製した。本章で用いた DAG-oil の詳細な組成を Table 3-1 に示す。

DAG-oil の単純化モデル（モデル DAG）については、以下の方法で調製した。PP および OO については Larodan Fine Chemicals (Sweden) から純度 99%以上の試薬を購入した。PO については既報に基づき合成した¹⁴。すなわち、5 g の 1-モノオレイン (99 %, Sigma-Aldrich)、2.3 mL の塩化パルミトイル (関東化学株式会社) および 0.18 g の 4-ジメチルアミノピリジン (和光純薬工業株式会社) を 40 mL のジクロロメタン (和光純薬工業株式会社) に溶解し、その溶液に、10 mL のジクロロメタンに 4 mL のトリエチルアミン (Sigma-Aldrich) を加えた溶液を滴下しながら、スターラーで 3 時間攪拌し、1-

モノオレインと塩化パルミトイルを反応させた。反応終了後、0.5 mL の水を加え、すべての液体をエバポレーターにより留去した。残渣をヘキサン (Sigma-Aldrich) で回収し、フロリジル (和光純薬工業株式会社) を充填したカラムで分画した。得られた PO の純度は 98.1%であることを GC により確認した。PP、PO、OO については窒素雰囲気下で 150 °C にて 30 分間加熱し、1,2 体と 1,3 体を熱力学的に平衡な割合 (約 1 : 2) へと転位させた。

上記の方法で作成した PP、PO、OO を 1 : 16 : 64 の重量比で混合し、この混合物をさらに 1 : 1.2 の重量比でジリノレイン (LL: Larodan Fine Chemicals) と混合することで、モデル DAG を調製した。GC により分析したモデル DAG の組成を Table 3-2 に示す。

PGFE としては、太陽化学株式会社から提供された以下 3 つの PGFE を用いた。Q-1710S は、グリセリンの平均重合度が 10 で、脂肪酸部はオレイン酸からなる。PGFE 6 と PGFE 10 はそれぞれグリセリンの平均重合度が 6 と 10、脂肪酸部はオレイン酸とパルミチン酸が 1 : 1 の割合である。上記の PGFE は、いずれもエステル化率 80 %以上であった。

3.2.2 固体脂含量 (SFC)

SFC はパルス核磁気共鳴 (p-NMR) にて測定した。装置は Maran SFC (Resonance Instrument Ltd., UK) を用いた。3 g のサンプルを内径 0.8 cm のガラス製チューブに入れ、70 °C で 10 分間加熱した後、0 °C の恒温槽に移した。0 °C に移した時点を 0 min とし、各時点での SFC を測定した。

SFC の測定結果より、結晶化誘導時間 (τ_{lag})、Avrami 指数 (n) および速度定数 (k) を求めた。 τ_{lag} は SFC 値がベースラインよりも上昇しはじめた温度と定義した。n および k については、下記 Avrami 式に基づき算出した。

$$\text{Avrami 式: } \frac{\text{SFC}(t)}{\text{SFC}_{\infty}} = 1 - e^{-kt^n}$$

Table 3-1. Composition of DAG-oil¹⁵

Acylglycerol composition (wt.%)		Fatty acid composition (wt.%)	
TAG	13.2	C16:0	4.1
DAG	85.8	C18:0	1.9
(Sat-Sat)	(0.5)	C18:1	60.8
(Sat-Unsat)	(9.9)	C18:2	19.5
(Unsat-Unsat)	(75.4)	C18:3	11.6
* 1,2-DAG : 1,3-DAG = 1 : 2		C20:0	0.7
MAG	0.9	C22:0	0.4
Free Fatty acid	0.1	C24:0	0.2
		Others	0.8

Table 3-2. Composition of model DAG-oil¹⁵

DAGs	wt.%
PP	0.6
(1,2-PP)	(0.2)
(1,3-PP)	(0.4)
PO	8.9
(1,2-PO)	(3.4)
(1,3-PO)	(5.5)
OO	35.6
(1,2-OO)	(12.0)
(1,3-OO)	(23.6)
LL	54.0
Others	0.9

3.2.3 DSC および偏光顕微鏡観察

DAG-oil の結晶化の温度プロファイル測定は DSC (Mettler DSC-820, Mettler Toledo, Switzerland) により行った。10 ± 0.1 mg の DAG-oil をアルミニウム製のサンプルパンに充填し、空のサンプルパンを対照として窒素パージ下で測定した。サンプルは 60 °C で 10 分間加熱した後、0.5 °C/min の降温速度にて -20 °C まで冷却していき、結晶化の際の発熱ピークを観察した。

DAG-oil の偏光顕微鏡観察は、CCD カメラ (DP72、オリンパス株式会社) および温度コントローラー (10002L, Linkam Scientific Instruments Ltd.) の付いた偏光顕微鏡 (BX50、オリンパス株式会社) を用いた。観察はステージ上のサンプルを DSC と同じ条件で冷却しながら行った。

モデル DAG の偏光顕微鏡観察は、上記と同じ装置を用いて以下のように行った。モデル DAG をステージ上で 60 °C で 5 分間加熱した後、0、1、2、3、5、7 または 10 °C に 40 °C/min の降温速度で急速に冷却した。各温度で 60 分間維持し、結晶が析出するまでの誘導時間と結晶化挙動を記録した。本研究における誘導時間は、偏光顕微鏡下で最初の結晶が観察されるまでの時間と定義した。

3.2.4 小角 X 線回折 (SAXD)

結晶化した DAG 成分の分子構造を評価するために、ラメラ面の構造に対応する小角 X 線回折 (SAXD) 実験を行った。

SAXD では装置として NANO-Viewer (株式会社リガク)、イメージングプレート (IP) として BAS-SR (富士フィルム株式会社)、IP 読み取り装置として R-AXIS DS3C、温度コントローラーとして PTC-30 (以上、株式会社リガク) を用いた。測定は CuK α 線 ($\lambda=0.15418$ nm)、管電圧 40 kV、管電流 30 mA、サンプルと IP の距離 650 mm の条件にて行った。測定ではモデル DAG を 40 °C から 3 °C へ 1 °C/min で冷却し、冷却の途中

30、10、3 °C の時点で 120 分間温度を保持し、後半 60 分間に SAXD パターンを記録した。SAXD 測定におけるサンプルの温度の推移を Figure 3-2 に示す。

3.3 結果と考察

3.3.1 SFC の時間変化

PGFE 添加および無添加の DAG-oil について、0 °C における SFC の時間変化を Figure 3-3 に示す。PGFE 6 および PGFE 10 は DAG-oil の結晶化を抑制した。また、その効果は PGFE 6 よりも PGFE 10 の方が大きかった。PGFE 6 と PGFE 10 の脂肪酸部は同じであり、グリセリン重合度のみ異なる (6 vs. 10)。このことは、PGFE のグリセリン重合度が大きいものほど、結晶化抑制効果が大きくなることを示している。また、PGFE 10 は濃度を 0.2 % から 1 % へ上昇させることでその効果がより顕著となったのに対し、PGFE 6 では濃度に対する応答がほとんど見られなかった。PGFE 6 と PGFE 10 で濃度に対する SFC の変化の程度が違う理由は不明であるが、この結果はそれぞれの PGFE によって、結晶化抑制効果を示す最適な濃度が異なることを示唆している。

脂肪酸部にパルミチン酸とオレイン酸を持つ PGFE 6 と PGFE 10 に結晶化抑制効果が認められた一方で、オレイン酸のみからなる Q-1710S では、DAG-oil に対する結晶化抑制効果は全く認められなかった (Figure 3-3)。このことから、PGFE の脂肪酸部は結晶化抑制に対して非常に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

SFC 曲線から求めた結晶化誘導時間 (τ_{lag})、Avrami 指数 (n) および速度定数 (k) の各パラメータを Table 3-3 にまとめた。Q-1710S を添加した DAG-oil では結晶化誘導時間に変化がなかったのに対し、PGFE 6 および PGFE 10 では明確に誘導時間を延長した。これは PGFE 6 および PGFE 10 が DAG-oil の結晶核の形成を抑制したことを示唆している。

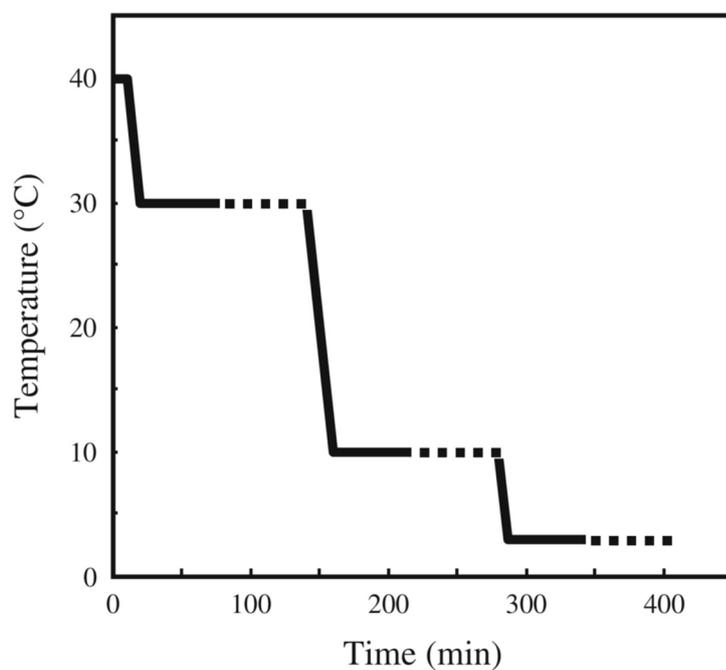


Figure 3-2. Time/temperature program for small angle X-ray diffraction (SAXD) experiment. The samples were cooled in a stepwise manner. SAXD patterns were recorded (dotted line) after holding the samples at the target temperatures for 60 min¹⁵.

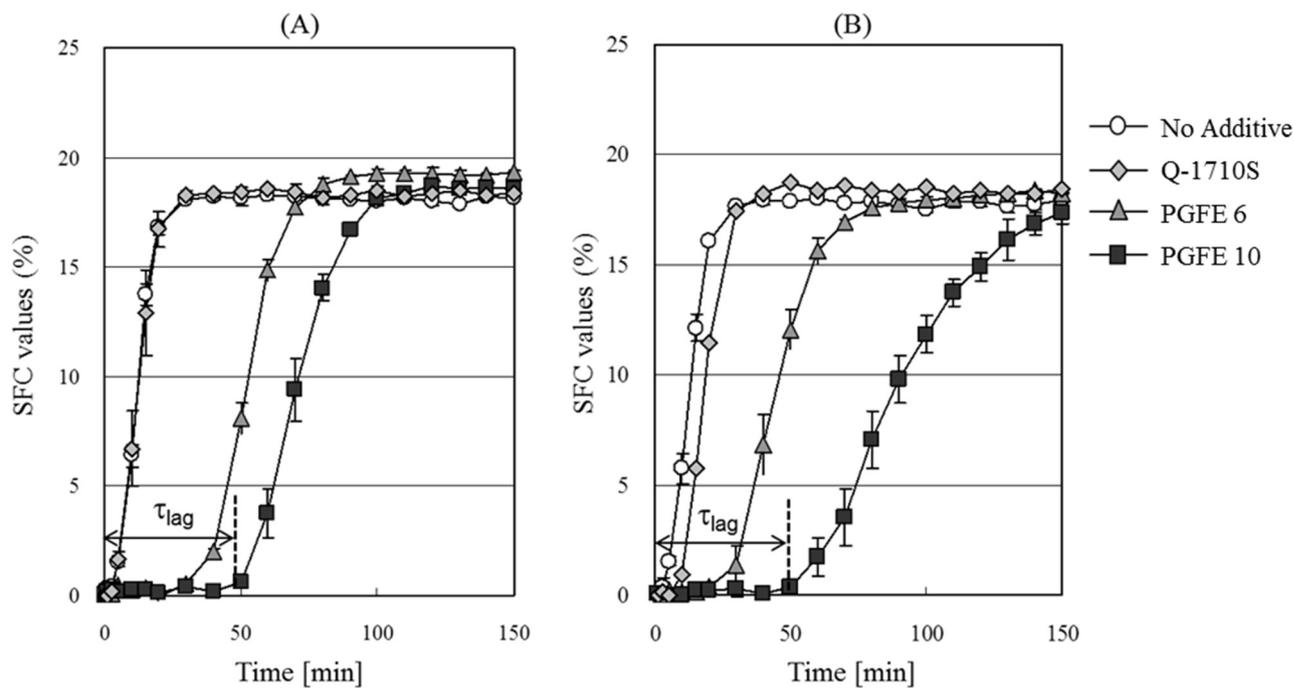


Figure 3-3. Time-variations in SFC values of DAG-oil with and without PGFE additives of (A) 0.2 % and (B) 1.0 % measured at 0 °C. τ_{lag} is induction time for crystallization. Values are means \pm S.E. (n = 3) ¹⁵.

Table 3-3. Nucleation Induction times (τ_{lag}) and Avrami constants of SFC values shown in Figure 3-3 (PGFE concentration: 0.2 %) ¹⁵

additive	τ_{lag} (min)	Avrami constant, k	Avrami exponent, n
No additive	0	$1.9 \times 10^{-3} \pm 0.6 \times 10^{-3}$	2.4 ± 0.2
Q-1710S	0	$2.1 \times 10^{-3} \pm 3.1 \times 10^{-3}$	2.4 ± 0.2
PGFE 6	24.0 ± 1.4	$8.7 \times 10^{-10} \pm 5.5 \times 10^{-10}$	5.2 ± 0.2
PGFE 10	48.0 ± 1.6	$5.6 \times 10^{-12} \pm 4.6 \times 10^{-12}$	6.1 ± 0.3

また PGFE 6 および PGFE 10 を添加した DAG-oil では、Avrami 指数 (n) および速度定数 (k) においても無添加のものと同じが見られ、PGFE は結晶核形成に加え結晶成長速度にも影響を与えた可能性がある。

3.3.2 偏光顕微鏡および DSC による分析

PGFE による結晶化抑制効果についてさらに詳細に検討するため、以降の実験は、より結晶化抑制効果の大きい PGFE 10 を用いて行った。

Figure 3-4 に 0.5 °C/min で冷却した際の DAG-oil の結晶化挙動を、偏光顕微鏡で観察した結果を示す。第 2 章で観察された結果と同様に (Figure 2-2)、PGFE 無添加の DAG-oil では、まず小さな粒状の結晶が析出し、そこから別の形態を持った結晶が発生する様子が観察された (Figure 3-4(a))。0.2 %の PGFE 10 を添加した DAG-oil では、その結晶化挙動が大きく変化した。特に顕著な変化としては、PGFE 10 を添加した DAG-oil では、無添加のもので粒状の結晶が発生する温度帯では全く結晶が観察されず、-4 °C あるいは -10 °C で観察される結晶の数も少なくなっていた (Figure 3-4(b))。また結晶のサイズに関しても、PGFE 10 を加えることで、析出する結晶が大きくなる様子が観察された。これらの結果は、PGFE 10 の添加が DAG-oil の結晶核発生速度を遅延させることを示している。

Figure 3-5 に DSC 分析の測定結果を示す。PGFE 無添加の DAG-oil では、4.5 °C に小さな発熱ピーク ($\Delta H = 3.8$ J/g)、-5.1 °C に大きな発熱ピーク ($\Delta H = 40.7$ J/g) が観察された。第 2 章で示されたように (Figure 2-1、Figure 2-3)、この 2 つのピークのうち小さな発熱ピークは 1,3-PP や 1,3-PO など飽和脂肪酸を含む高融点成分の結晶化を、大きな発熱ピークは 1,3-OO など低融点成分の結晶化をそれぞれ示しているものと考えられる。一方で、PGFE 10 を添加した DAG-oil では、高融点成分の結晶化を示す発熱ピークが観察されなかった (Figure 3-5(b))。代わりに、低融点成分の結晶化を示す発熱ピークは無

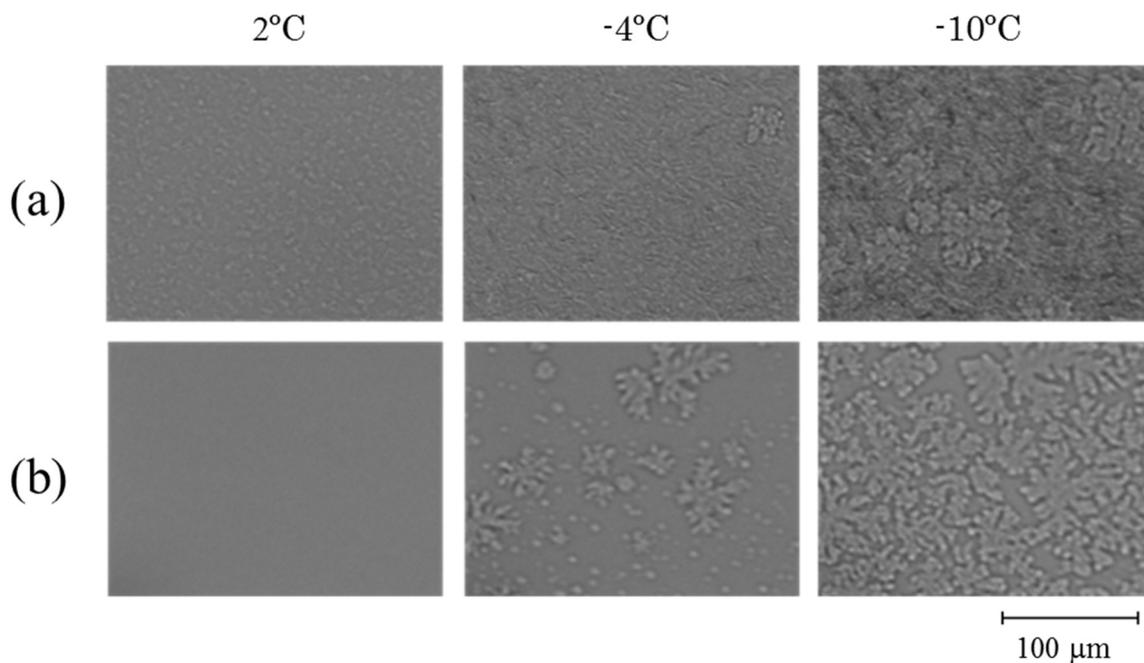


Figure 3-4. Optical micrographs obtained at different crystallization stages of DAG-oil (a) without and (b) with PGFE 10 additive (0.2 %). For both oils, micrographs were obtained at four temperatures during the cooling processes at a rate of 0.5 °C/min¹⁵.

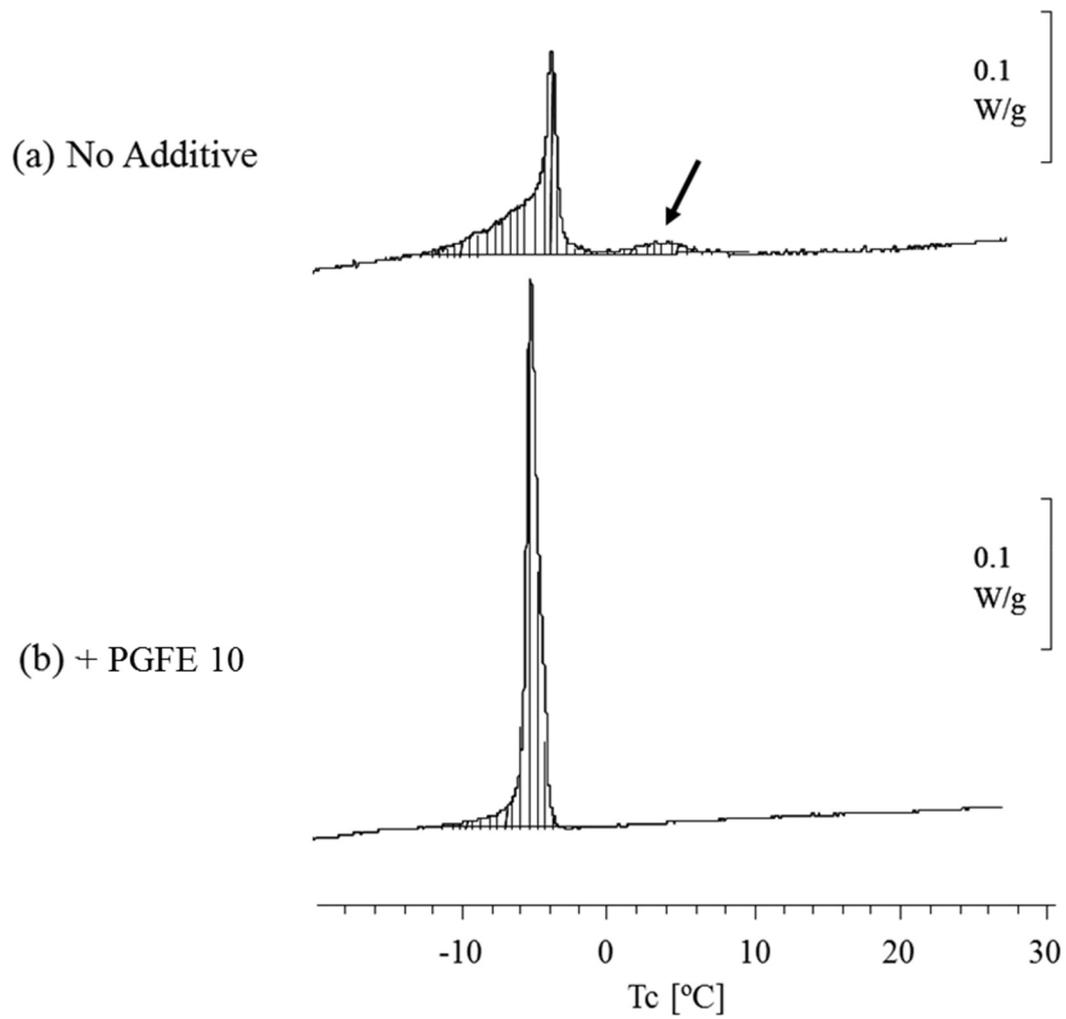


Figure 3-5. DSC cooling thermopeaks of DAG-oil with and without PGFE 10 additive (0.2 %) ¹⁵.

添加時よりも大きくなった ($\Delta H = 43.3 \text{ J/g}$)。これは、PGFE 10 が高融点成分の結晶化を遅延させ、低融点成分と同時に結晶化した結果であると考えられる。この DSC の結果は偏光顕微鏡観察の結果 (Figure 3-4) と一致しており、PGFE 10 は高融点成分の結晶化を顕著に抑制することが示された。

3.3.3 DAG の単純化モデルによる検討—偏光顕微鏡観察

PGFEの結晶化抑制効果の作用点をより詳細に検討するため、1,3-PP、1,3-POおよび1,3-OOの純品を用いてモデルDAGを作成し (Table 2-2)、等温条件での結晶化挙動を偏光顕微鏡にて観察した。Figure 3-6に3 °Cでの観察結果を示す。PGFE無添加のモデルDAGでは23秒で結晶が析出しはじめ、粒状に成長した。さらに続けて、粒状結晶から針状の結晶が発生する様子が観察された (Figure 3-6(a))。一方で0.2 %のPGFE 10を添加したモデルDAGでは、結晶の発生過程も形状も大きく変化した (Figure 3-6(b))。PGFE 10を添加したモデルDAGでは、無添加のもので粒状の結晶が発生する温度帯で結晶が観察されなかった。これは3.3.2項でのDAG-oilの観察結果 (Figure 3-4) と一致しており、PGFE 10がモデルDAGでも結晶核形成を抑制する効果を発現したことを示している。また、PGFE 10を添加したモデルDAGでは、析出する結晶の形状が球形に変化した。これはPGFE 10の結晶成長を抑制する効果を反映しているものと考えられる。

Figure 3-7に、各冷却温度で結晶化挙動の観察を行い、融液から結晶が発生するまでの時間 (誘導時間) をプロットした結果を示す。PGFE無添加のモデルDAGでは、0 °Cにおける誘導時間は2.6秒であった。温度が上がるにつれて誘導時間は上昇し、10 °Cでは71秒であった。一方でPGFE 10を添加すると誘導時間は顕著な上昇を示した。例えば、0 °Cの誘導時間は117秒、3 °Cでは468秒まで延長した。さらに5 °C以上では2時間という時間の中で全く結晶の析出が観察されなかった。結晶化の誘導時間が大幅に延長したことは、PGFE 10が強い結晶核形成抑制効果を発揮したことを示している。

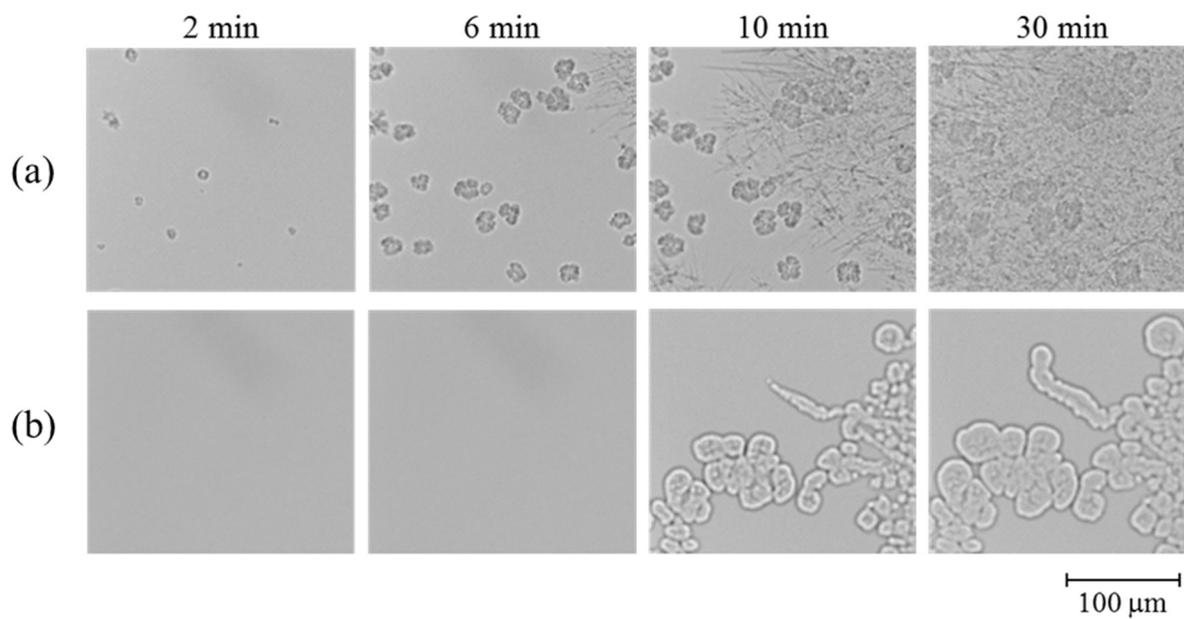


Figure 3-6. Optical micrographs of model-DAG oil (a) without and (b) with PGFE 10 (0.2 %) obtained at different stages of isothermal crystallization (3 °C)

15.

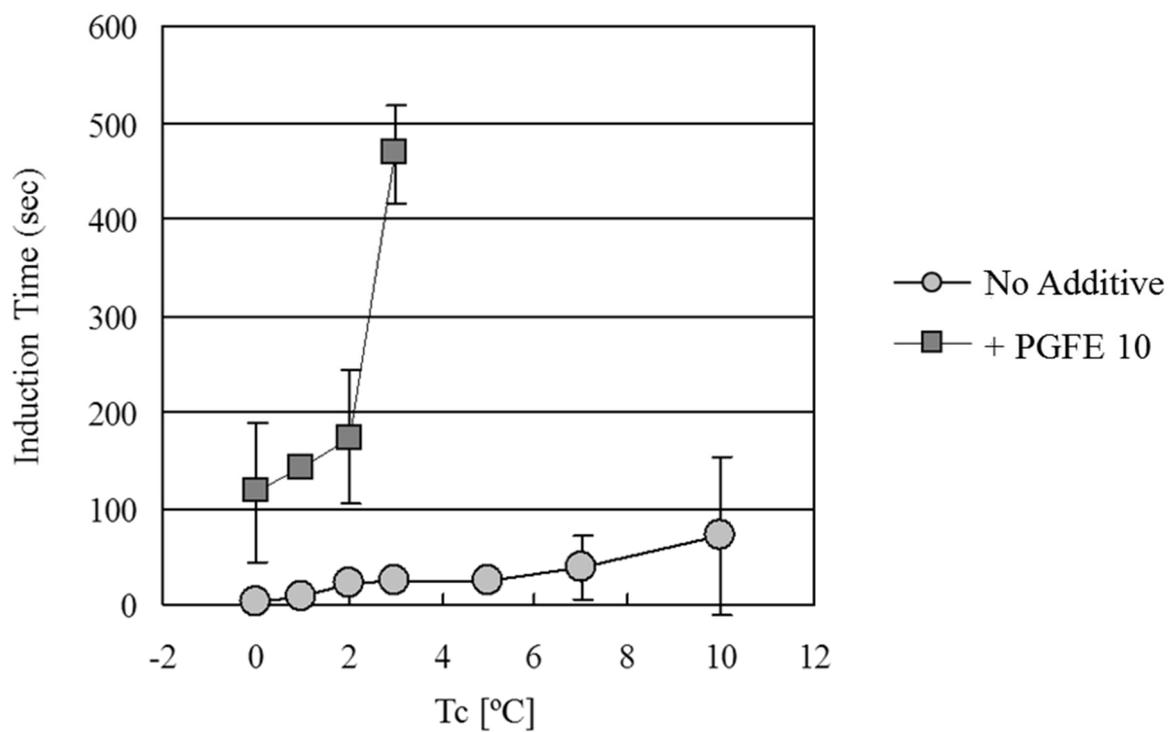


Figure 3-7. Induction time for crystallization of model-DAG oil with and without PGFE 10 (0.2 %) measured at different temperatures ¹⁵. Values are means \pm S.D. (n=3)

3.3.4 DAGの単純化モデルによる検討—SAXDによる解析

モデルDAGにおいて、冷却によって結晶化したDAG成分を決定するため、SAXDの測定を行った。リファレンスとして、1,3-PP、1,3-POおよび1,3-OOのみのSAXDパターンをFigure 3-8(a)に示す。1,3-PP、1,3-PO、1,3-OOの結晶の長面間隔は、それぞれ4.60、4.65、4.00 nmであった。

PGFE無添加のモデルDAGでは、10 °Cで4.63 nmに相当する回折ピークが観察された (Figure 3-8(b))。これは非常に近い長面間隔を持つ1,3-PP (4.60 nm) と1,3-PO (4.65 nm) の回折ピークが重なった結果であると考えられる。モデルDAGを3 °Cまで冷却すると、1,3-OOに相当する4.00 nmの回折ピークが観察された。この結果から、モデルDAGの結晶化は、1,3-PPと1,3-POが10 °Cで最初に結晶化し、それに続いて3 °Cで1,3-OOが結晶化する2段階の結晶化挙動であることが明確になった。

一方で、0.2 %のPGFE 10を添加したモデルDAGでは、10 °Cでは1,3-PPや1,3-PO に相当する回折ピークは観察されなかった (Figure 3-8(c))。3°Cにおいては、1,3-OOに相当する回折ピークは観察されたが、1,3-PPや1,3-POの回折ピークの出現は依然として大幅に抑制されていた。これらの結果は、PGFE 10の添加が1,3-PPや1,3-POの結晶化に大きく影響したことを示しており、これは実際系のDAG-oilでのSFC (Figure 3-3、Table 3-3)、偏光顕微鏡 (Figure 3-4) およびDSC (Figure 3-5) での観察結果と一致する。

Figure 3-9に示すように、油脂の結晶化は結晶核形成と結晶成長の2つのプロセスからなる^{16,17}。PGFEの作用メカニズムに関して、これらのプロセスを踏まえて以下のように考察した。

まず核形成のプロセスは、油脂分子がモノマーの状態から集合して、クラスターを形成し、そして核へと変化していく過程である。一般に、核形成を抑制する添加剤の必要条件是、結晶化分子と相互作用する類似性と、クラスターの状態を攪乱する相違性である^{1,11}。本研究で用いた3つのPGFEの中で、最も結晶化の誘導時間を延長し、結晶核

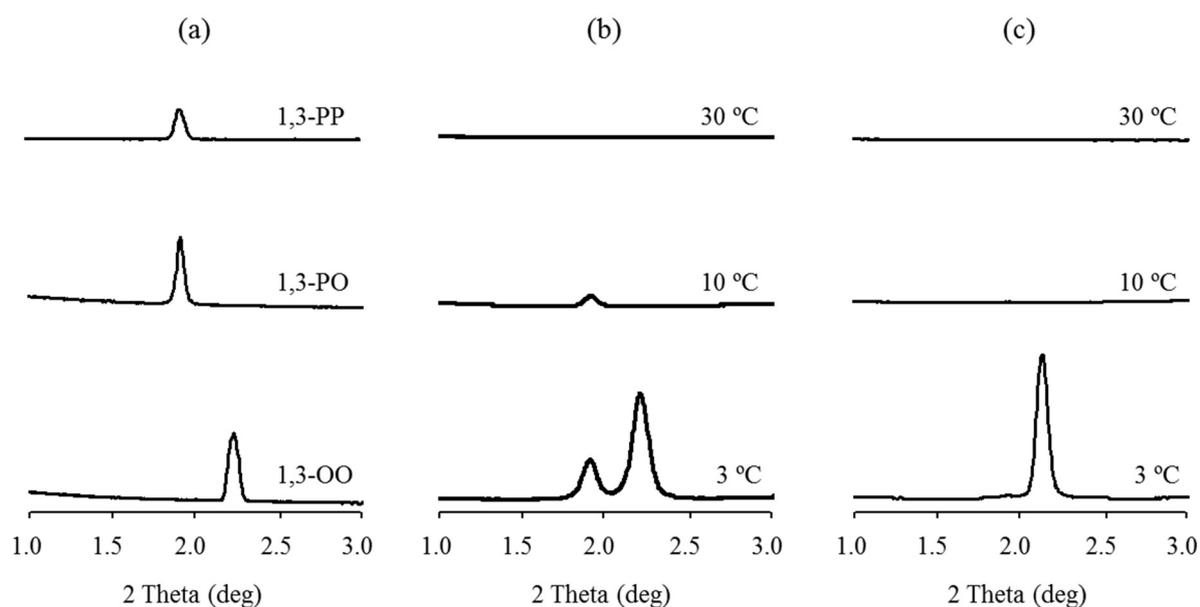


Figure 3-8. Small angle X-ray diffraction (SAXD) patterns. (a) Reference patterns of component DAG, (b) model-DAG oil without additive, and (c) model-DAG oil with PGFE 10 (0.2 %) ¹⁵.

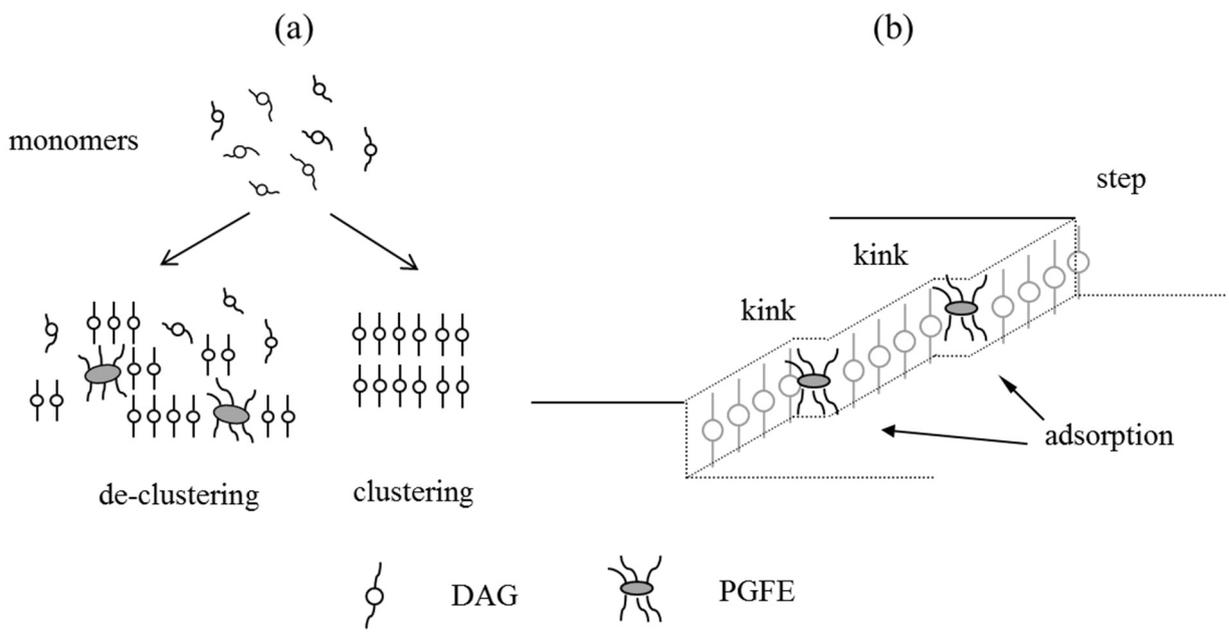


Figure 3-9. Model of (a) de-clustering during the nucleation process and (b) prohibition during the growth process of DAG crystals by a PGFE additive¹⁵.

の形成を抑制したのはPGFE 10であった(Table 3-3)。PGFE 6も誘導時間を延長したが、その効果はPGFE 10と比較して小さなものであった。Q-1710Sに関しては全く誘導時間に影響を与えなかった。PGFE 6とPGFE 10は脂肪酸部にパルミチン酸とオレイン酸を持ち、一方でQ-1710Sはオレイン酸のみからなる。DAG-oilで最初に結晶化する成分が1,3-PPや1,3-POなどパルミチン酸とオレイン酸を含む分子であることを考慮すると、PGFE 6とPGFE 10は、それらと相互作用するために十分な類似性を、脂肪酸部に持ち合わせていると考えられる。添加剤のもう1つの必要条件である「相違性」に関しては、PGFEのポリグリセリン部の極性基の寄与が重要である。ポリグリセリン部はDAGの極性基とはサイズが大きく異なる(Figure 3-1)。脂肪酸部の類似性によりDAGに吸着したPGFEは、ポリグリセリン部の立体障害により、クラスターにさらなるDAG分子が組み込まれることを抑制するものと推察される。したがって、ポリグリセリン部のサイズが大きいほど立体障害が大きくなり、結晶抑制効果が高くなるものと考えられる。グリセリン重合度10のPGFE 10が、グリセリン重合度6のPGFE 6よりも高い結晶抑制効果を示したことは、この考察を支持している。

結晶成長を抑制するメカニズムに関しても、同じように類似性と相違性の概念から説明できる。油脂の結晶は、結晶成長面のキンクと呼ばれる溝に油脂分子が組み込まれることによって成長する^{18,19}。PGFEは、DAGとの類似性を脂肪酸部に持つためにキンクに吸着し、ポリグリセリン部によってDAG分子がキンクに組み込まれることを阻害するものと考えられる(Figure 3-9(b))。

3.4 まとめ

第3章では、DAG-oil に対する PGFE の結晶化抑制効果について検討した。脂肪酸部にパルミチン酸とオレイン酸を持つ PGFE は、DAG-oil の結晶化を抑制した。このことは、DAG-oil を液体油として製品に使用する上で、PGFE 添加が有効な結晶化制御方法となることを示している。また、DAG-oil の単純化モデルを用いた検討から、PGFE の主な作用点は、1,3-PP や 1,3-PO など高融点成分の結晶核形成プロセスであることが示された。これらのことから、第2章で考察したように、DAG-oil の結晶化制御のためには飽和脂肪酸を含む 1,3-DAG の結晶化をコントロールすることが非常に重要であり、PGFE はそのポイントに作用することで全体の結晶化を効率的に抑制できるものと考えられる。

3.5 引用文献

1. Smith KW, Bhaggan K, Talbot G, van Malssen KF (2011) **Crystallization of Fats: Influence of Minor Components and Additives.** J. Am. Oil Chem. Soc. 88(8):1085–1101
2. Lončarević I, Pajin B, Omorjan R, Torbica A, Zarić D, Maksimović J, Gajić SJ (2013) **The Influence of Lecithin from Different Sources on Crystallization and Physical Properties of Nontrans fat.** J Texture Stud 44(6):450–458
3. 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(6):849–858
4. Masuchi MH, Grimaldi R, Kieckbusch TG (2014) **Effects of Sorbitan Monostearate and Monooleate on the Crystallization and Consistency Behaviors of Cocoa Butter.** J. Am. Oil Chem. Soc. 91:1111–1120
5. Ming CC, Gonçalves LAG (2015) **Effects of industrial sorbitan monolaurate on the crystallization and consistency of zero trans-fat from soybeans.** Eur. J. Lipid Sci. Technol. 117:1754–1761
6. Cerdeira M, Martini S, Hartel RW, Herrera ML (2003) **Effect of sucrose ester addition on nucleation and growth behavior of milk fat-sunflower oil blends.** J Agric Food Chem 51:6550–6557
7. Herrera M, Rocha FM (1996) **Effects of sucrose ester on the kinetics of polymorphic transition in hydrogenated sunflower oil.** J Am Oil Chem Soc 73:321–326
8. Rincón-Cardona JA, Agudelo-Laverde LM, Martini S, Candal RJ, Herrera ML (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. Intern. 64:9-17
9. Cerdeira M, Pastore V, Vera LV, Martini S, Candal RJ, Herrera ML (2005) **Nucleation behavior of blended high-melting fractions of milk fat as affected by emulsifiers.** Eur J Lipid Sci Technol 107:877–885
10. Kuriyama J, Miyamoto Y, Sakamoto M (2001) **Effect of polyglycerol fatty acid esters on resistance to crystallization of palm olein.** J Oleo Sci 50:831–838
11. 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. 2013, 13, 4746–4754
12. 松下 和男, 塩山 浩 (1986) ポリグリセリン脂肪酸エステルの現状. 油化学 35(2):71-79

13. GRAS Notice No. GRN 000269 (2009) U.S. Food and Drug Administration
14. Craven RJ, Lencki RW (2010) **Preparation of diacid 1,3-diacylglycerols**. *J Am Oil Chem Soc* 87:1281–1291
15. Saitou K, Homma R, Kudo N, Katsuragi Y, Sato K (2014) **Retardation of Crystallization of Diacylglycerol Oils Using Polyglycerol Fatty Acid Ester**. *J Am Oil Chem Soc* 91:711-719
16. Sato K (Ed) **Crystallization of Lipids: Fundamentals and Applications in Food, Cosmetics, and Pharmaceuticals**. Wiley-Blackwell, New Jersey (2018)
17. 佐藤 清隆、上野 聡 (著) **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** 丸善出版株式会社 (2011)
18. Marangoni AG (2005) **Fat crystal networks**. Marcel Dekker, New York
19. Larsson K, Quinn P, Sato K, Tiberg F (2006) **Lipids: structure, physical properties and functionality**. The Oily Press, Bridgewater
20. Saitou K, Taguchi K, Homma R, Shimizu M, Yasunaga K, Katsuragi Y, Ueno S, Sato K (2017) **Retardation Mechanism of Crystallization of Diacylglycerols Resulting from the Addition of Polyglycerol Fatty Acid Esters**. *Cryst. Growth Des.*, 17(9):4749–4756

第4章 PGFE による DAG の結晶化抑制メカニズム

4.1 はじめに

第2章と第3章では、DAG-oil の結晶化に対する PGFE の添加効果を検討した。その結果、PGFE に、1,3-PP や 1,3-PO など DAG-oil 中の高融点成分の結晶核形成を抑制する効果があることが示された。このことは、DAG-oil を液体油として製品に使用する上で、PGFE の添加が有効な結晶化制御方法となることを示している。

この知見を基にして、さらに DAG の結晶化制御技術を発展させていくためには、「PGFE がどのように DAG 分子に作用して効果を発現するのか」ということについての詳細なメカニズムを明らかにすることが非常に重要である。

第1章で述べたように、乳化剤が油脂の結晶化に対して影響する現象については、経験的によく知られており¹、そのメカニズムに関しても解明が進んでいる²⁻⁵。例えば、結晶成長を促進する効果は、乳化剤が結晶成長面に吸着し、新たなステップを提供するために起こるとされている。反対に結晶成長の抑制は、キック位置に乳化剤が入り込むことで、油脂分子の吸着を阻害すると考えられている (Figure 1-6)。結晶核の形成段階への作用に関しては、形成を促進するものは“テンプレート効果”として理解されている^{4,5}。テンプレート効果とは、脂肪酸鎖の長さが油脂分子と類似した親和性の高い乳化剤が結晶化することで、その結晶が鋳型となって油脂分子の結晶化を促す効果のことである (Figure 1-7)。

以上のように、油脂の結晶化に対する乳化剤の作用メカニズムが解明されつつある中で、乳化剤が結晶核発生を抑制するメカニズムに関しては、これまでに研究例が乏しく、ほとんど明らかになっていない。したがって、PGFE が DAG-oil の結晶核形成を抑制するメカニズムが解明されれば、その知見は DAG の製品開発のみならず、TAG を含めた油脂全般の結晶化制御技術の発展につながる可能性がある。

本章では、PGFE が DAG-oil の結晶核形成を抑制するメカニズムを解明するために、結晶化が起こる前の過冷却状態の DAG-oil の状態に着目し、さまざまな検討を行った。

4.2 実験方法

4.2.1 試料

DAG-oil については第 2 章に記載のものと同様の方法にて調製した。本章で用いた DAG-oil の詳細な組成を Table 4-1 に示す。

本研究では、第 3 章と同じ 3 つの PGFE を用いた (Table 4-1)。Q-1710S は、グリセリン平均重合度が 10、脂肪酸部はオレイン酸からなる PGFE である。PGFE 6 と PGFE 10 はグリセリン平均重合度がそれぞれ 6 と 10、脂肪酸部はオレイン酸とパルミチン酸が 1 : 1 の割合で含まれる PGFE である。

4.2.2 固体脂含量 (SFC)

SFC はパルス核磁気共鳴 (p-NMR) にて測定した。装置は Maran SFC (Resonance Instrument Ltd., UK) を用いた。3 g のサンプルを内径 0.8 cm のガラス製チューブに入れ、70 °C で 10 分間加熱した後、0 °C または 6 °C の恒温槽に移した。恒温槽に移した時点を 0 min とし、各時点での SFC を測定した。

4.2.3 複屈折の観察

以下の方法で、PGFE を添加した DAG-oil 中に生じた複屈折現象を観察した。30 g のサンプルを内径 26.5 mm の円柱状ガラスバイアル (日電理化学硝子株式会社) あるいは底面 36.0 mm × 36.0 mm の四角柱状のガラスバイアル (株式会社宝製作所) に入れた。サンプルを 70 °C で 10 分間加熱した後、恒温槽に静置した。恒温槽の温度は 20 °C から 0 °C

Table 4-1. Chemical Compositions of DAG-oil and PGFE Additives ⁶

DAG-oil			PGFEs				
			PGFE 6	PGFE 10	Q-1710S		
Acylglycerol composition ^a (wt.%)	TAG	13.2	Fatty acid moieties ^b (wt.%)	C16:0	50	50	0
	DAG	85.8		C18:1	50	50	100
	MAG	0.9					
	FFA	0.1					
Fatty acid moieties ^b (wt.%)	C16:0	4.1	Esterification degree (%)	>80	>80	>80	
	C18:0	1.9	Polymerization degree	6	10	10	
	C18:1	60.8					
	C18:2	19.5					
	C18:3	11.6					
	Others	2.1					

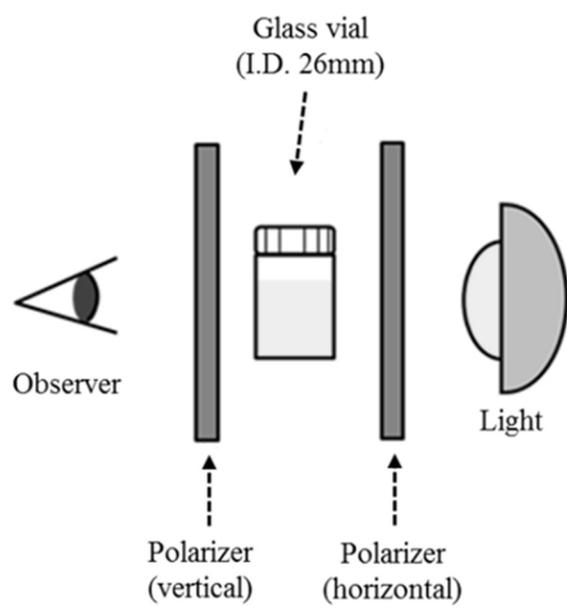


Figure 4-1. Experimental set-up for observation of birefringent patterns ⁶.

まで 2 °C 刻みで冷却した後に、24 °C まで 2 °C 刻みで加熱した。各温度では 30 分間維持し、その間に Figure 4-1 に示すように偏光板間にバイアルを置いて複屈折を観察した。

偏光顕微鏡観察は CCD カメラ (DP72、オリンパス株式会社) および温度コントローラー (10002L, Linkam Scientific Instruments Ltd.) の付いた偏光顕微鏡 (BX50、オリンパス株式会社) を用いた。直径 15 mm の円盤状スライドガラス上にサンプルを置き、70 °C で 10 分間加熱した後、5 °C/min の降温速度で 5 °C まで冷却した。5 °C で 60 分間維持している間のサンプルの様子を偏光顕微鏡にて観察した。

4.2.4 レオロジー測定

レオロジーの測定は直径 50 mm、角度 1° のコーンプレート型治具 CP50-1 の付いたレオメーター MCR501 (Anton Paar, AT) を用いて行った。

粘度の温度依存性の測定では、サンプルを 25 °C から 3 °C まで 1 °C 刻みで冷却し、各温度で 2 分間維持した。粘度は 100 s⁻¹ のずり速度にて測定した。

ずり速度依存性の測定では、サンプルの温度を 10 °C に維持し、ずり速度を 1 s⁻¹ から 1000 s⁻¹ まで 10 段階で対数的に増加させていった。周波数依存性の測定では、サンプルの温度を 10 °C、歪みを 4 % に維持した状態で、周波数を 10 Hz から 0.001 Hz まで 16 段階で対数的に減少させていった。

4.2.5 XRD 測定

XRD 測定は、NANO-Viewer (株式会社リガク) および 2 次元ピクセル型検出器 PILATUS 100K (DECTRIS Ltd., Switzerland) を用いて行った。測定は CuK α 線 ($\lambda=0.15405$ nm)、管電圧 40 kV、管電流 30 mA、サンプルと検出器の距離は、SAXD 測定では 1002 mm、WAXD 測定では 89.7 mm の条件にて行った。測定ではサンプルを 30 °C、10 °C、6 °C へと段階的に冷却し、各温度で 180 分間保持した。SAXD 測定では、サンプルが目

的の温度に達してから 30 分後から 180 分後まで X 線を照射し、得られた回折ピークから長面間隔を計算した。WAXD では、サンプルが目的の温度に達してから、30 分毎に 6 回 X 線を照射し、得られた回折ピークから短面間隔を計算した。

4.3 結果と考察

4.3.1 PGFE の SFC に対する影響

PGFE 添加および無添加の DAG-oil について、0 °C および 6 °C における SFC の時間変化を Figure 4-2 に示す。0 °C において、PGFE 6 および PGFE 10 は DAG-oil の結晶化開始までの時間を遅延し、PGFE 6 よりも PGFE 10 でより大きな効果を示した (Figure 4-2(A))。1%の PGFE 6 添加時の誘導時間が約 20 分、1%の PGFE 10 添加時の誘導化時間が約 50 分であり、これらは第 3 章の結果と一致する (Figure 3-3)。6°Cにおいては、無添加の DAG-oil でわずかな SFC の上昇 (~2%) が認められたが、PGFE 6 または PGFE 10 を添加したものでは SFC に変化がなかった。PGFE を添加したものでは、6°Cでは 24 時間後であっても SFC に変化がなく (Figure 4-2(B))、この温度での結晶化が非常に起こりにくくなっていることを示している。これらの結果より、第 3 章で示された PGFE の結晶核抑制効果が改めて確認された。

4.3.2 DAG に発生する複屈折の観察

PGFE が DAG-oil の結晶核形成を抑制するメカニズムを解明するために、過冷却状態の DAG-oil について偏光下で観察を行った。

Figure 4-3 に、5 °C における DAG-oil の観察写真を示す。非偏光下の観察では、PGFE 無添加の DAG-oil では完全に結晶化した白色の状態が観察された。一方で 1%の PGFE 10 を添加した DAG-oil では、結晶化が遅延され透明な状態であった (Figure 4-3(A))。これ

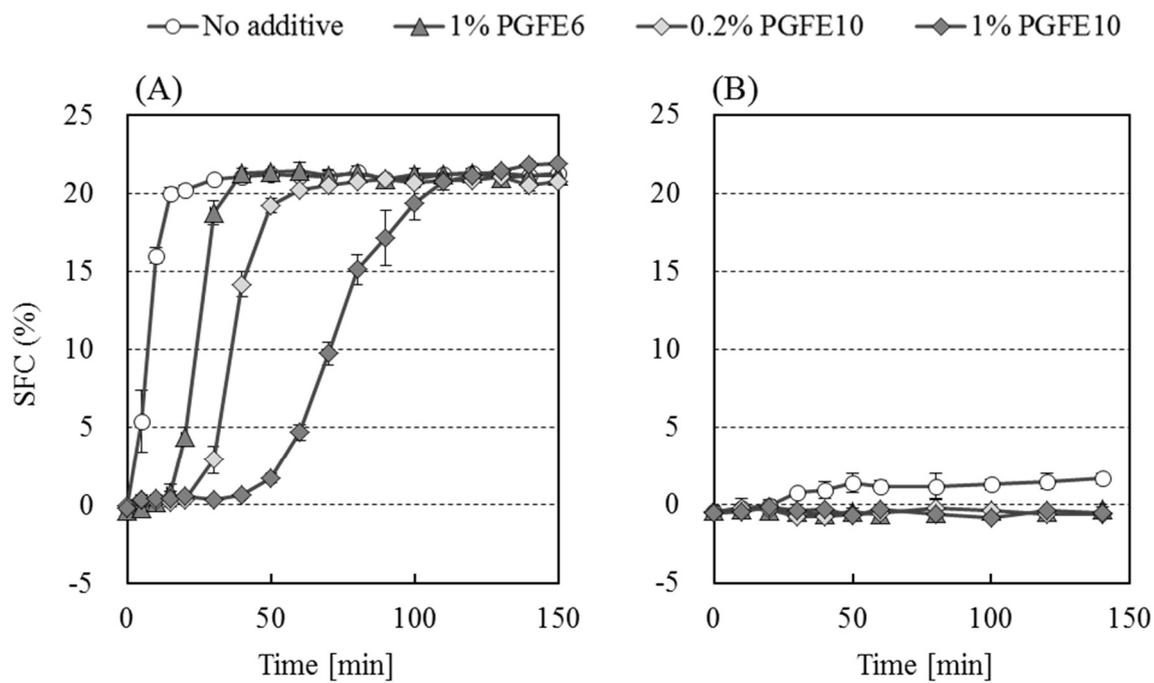


Figure 4-2. Time-variations in SFC values of DAG-oil with and without PGFE additives at (A) 0 °C and (B) 6 °C. Values are means \pm S.E. (n = 3) ⁶.

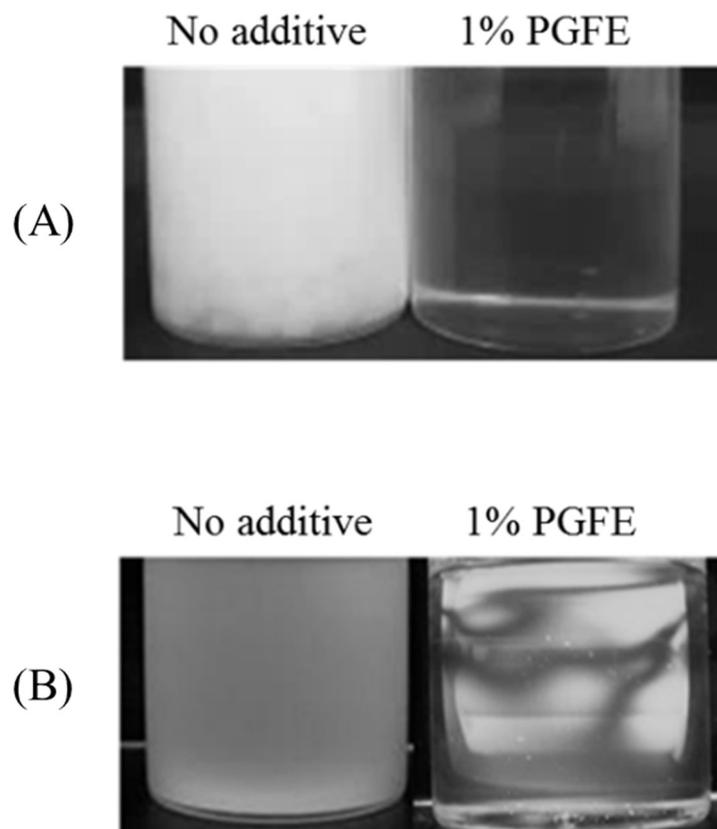


Figure 4-3. Birefringence observation. Optical images taken at 5 °C in the presence and absence of 1% PGFE 10 under (A) non-polarized and (B) polarized crossed-Nicols conditions ⁶.

に対して、直交ニコルの偏光下での観察においては、PGFE 10 を添加した DAG-oil で複屈折が観察された (Figure 4-3(B))。これは PGFE を添加することで、過冷却状態の DAG-oil 中に光学的異方性を持つ構造が形成されたことを示している。上記のような複屈折パターンは、サンプルの厚さが 1 mm 以下の偏光顕微鏡では観察されなかった (Figure 4-4)。

したがって、光学的異方性を有する構造体が検知されるためには、ある程度の光路長が必要であったと推定される。この理由としては、光学的異方性を持つ構造体が、DAG-oil 中で希薄な状態で存在するために、光路長が短い場合は十分な強度の複屈折画像が得られなかったことが考えられる。また、観察される複屈折のパターンは見る角度によって異なった。これは配向した分子が、DAG-oil 中に均等に分布せず、空間に不均一に広がっていることを示唆している。

静置下で観察された複屈折構造が、攪拌によって動的に変化する様子を観察した。スターラーにより 150 rpm の条件下で攪拌すると、中央の明部が干渉色を示すようになった (Figure 4-5)。また、暗部は攪拌のつくる流れの軸に沿って観察された。これらの変化は、複屈折性を誘起する光学的異方性を示す構造体が、攪拌によりできた対流に対して何らかの配向効果を示すことを示唆している。

これらのことから、PGFE の添加と冷却によって、溶媒の流れに依存してパターンが変わるような流動性を持った光学的異方性をもつ構造体が、DAG-oil 中に形成されたと考えることができる。

4.3.3 複屈折の発生挙動に対する温度依存性

複屈折の発生挙動に対する温度依存性を調べた結果を Table 4-2、Table 4-3 に示す。本検討では前項と同様の観察を、冷却過程および加温過程で行った。

冷却過程での観察では (Table 4-2)、無添加の DAG-oil の場合は高融点成分が 12 °C

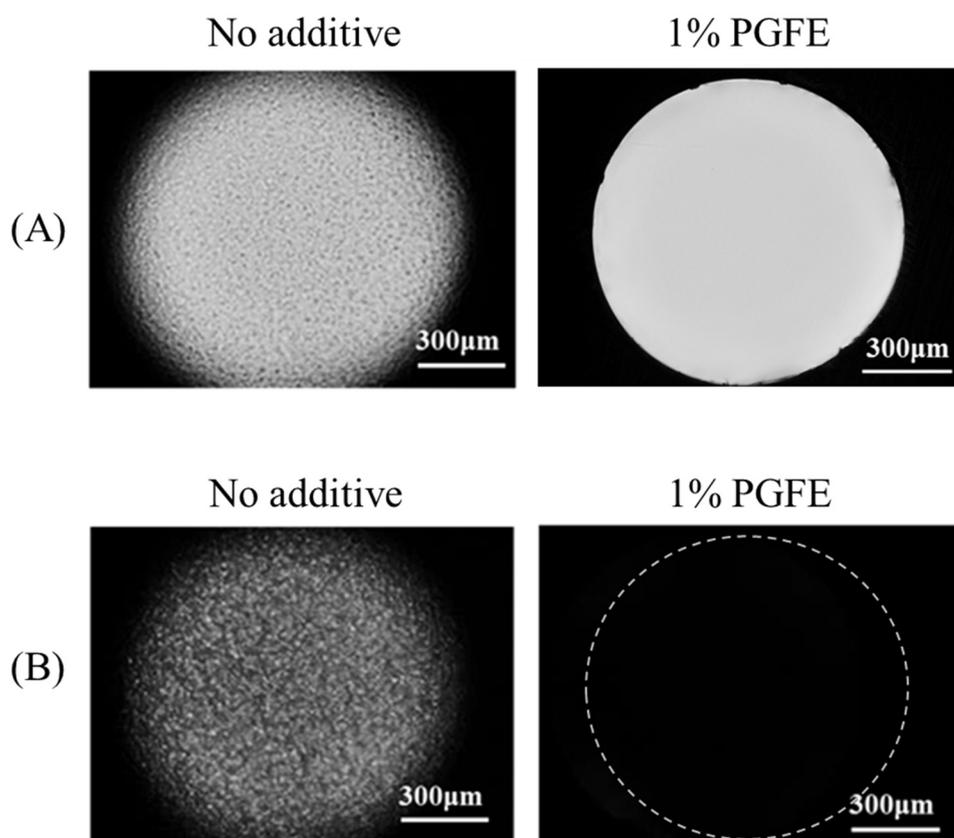
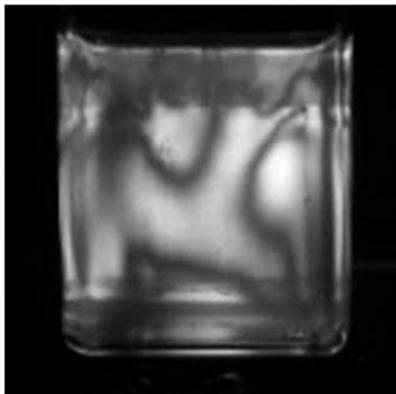


Figure 4-4. Polarized optical microscopy. Optical images taken at 5 °C in the presence and absence of 1% PGFE 10 under (A) non-polarized and (B) polarized crossed-Nicols conditions. Without PGFE, DAG crystals were observed. With PGFE, on the other hand, nothing was observed either under non-polarized or polarized condition.

(A)



(B)

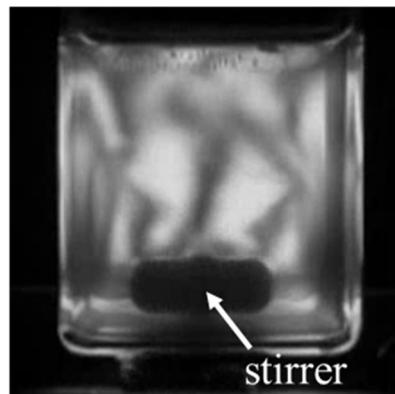


Figure 4-5. Polarized optical images (A) under static conditions and (B) under stirring ⁶.

Table 4-2. Occurrence of birefringent patterns in DAG-oil observed under polarized crossed-Nicols conditions during cooling processes.

Temperature [°C]		14	12	10	8	6	4	2	0
No additive		-	C	C	C	C	C	C	C
PGFE 6	0.2%	-	-	-	-	-	+	++/C	C
	1%	-	-	-	-	++	++	++/C	C
	3%	-	+	+	++	++	++	++	C
PGFE 10	0.2%	-	-	-	-	+	+	++/C	C
	1%	-	-	-	+	++	++	++	C
	3%	-	+	++	++	++	++	++	C

-: no image, +: weak birefringent image ++: strong birefringent image, C: crystallization

Table 4-3. Disappearance of birefringent patterns in DAG-oil observed under polarized crossed-Nicols conditions during heating processes.

Temperature [°C]		4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
No additive		C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-
PGFE6	0.2%	C	+/C	+/C	C	C	C	C	C	C	-	-
	1%	C	++/C	+/C	-	-						
	3%	C	++/C	+	-							
PGFE10	0.2%	C	+/C	+/C	+/C	C	C	C	C	C	-	-
	1%	C	++/C	+/C	-	-						
	3%	C	++/C	+	-							

で結晶化を開始して、その後の冷却で結晶量が増加した。PGFE の存在下では結晶化が遅延されるとともに、結晶化が始まる温度より高い温度から複屈折が観察され、PGFE の添加濃度が上がるほど複屈折が観察される温度が上昇した。また、PGFE 10 は PGFE 6 よりもわずかに強い複屈折を生じさせた。0 °C では PGFE の有無に関わらず、1,3-OO などの DAG 成分の結晶化により DAG-oil 全体が結晶化した。

加温過程での観察では (Table 4-3)、冷却過程で結晶化した DAG-oil が 6 °C で溶解しはじめた。PGFE を添加した DAG-oil では、結晶が溶解するとともに複屈折パターンが再び観察された (Figure 4-6(B))。これは複屈折構造が結晶とは別のものであることを明確に示している。また、DAG-oil 中に発生した複屈折構造は熱的ヒステリシスを示した。つまり、冷却過程で複屈折が観察された温度よりも、加温過程で複屈折が消失した温度の方が高かった。例えば 3 %の PGFE を添加した DAG-oil では、冷却過程では 12 °C で複屈折が観察された一方で、加熱過程では 22 °C で複屈折が消失した。

ここには示さないが、脂肪酸部がオレイン酸のみからなる Q-1710S では全く複屈折が観察されなかった。第 3 章で示されたように、オレイン酸のみからなる PGFE は、DAG-oil に対する結晶抑制効果を全く発揮しない。これらの結果は、複屈折の発生のためには、PGFE の脂肪酸部にパルミチン酸が必要であることを示すとともに、この複屈折が結晶抑制効果と密接に関連していることを示唆している。

4.3.4 レオロジー特性の変化

Figure 4-7 に DAG-oil を冷却しながら、一定のせん断速度下 (100 s^{-1}) で粘度を測定した結果を示す。1 %の PGFE を添加した DAG-oil は、25 °C で無添加の DAG-oil と比較してごくわずかに高い粘度を示し、冷却によって両者の粘度の差は次第に大きくなっていった。PGFE 無添加の DAG-oil では、9 °C から粘度が急激に上昇した。これは DAG-oil が結晶化したことによる。PGFE を添加した DAG-oil では 3 °C まで結晶化が起こらず、

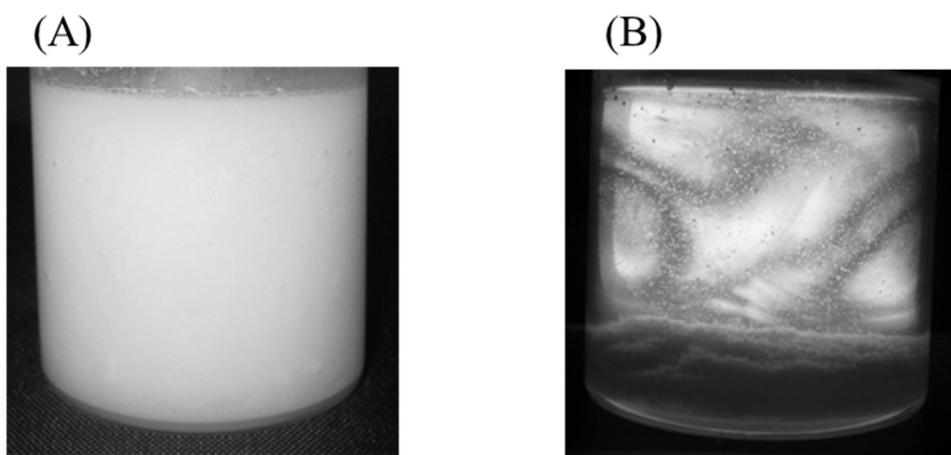


Figure 4-6. Optical images of DAG-oil containing 1% PGFE 10. (A) Non-polarized image taken after crystallization at 0 °C and (B) polarized crossed-Nicols image after heating to 8 °C. ⁶

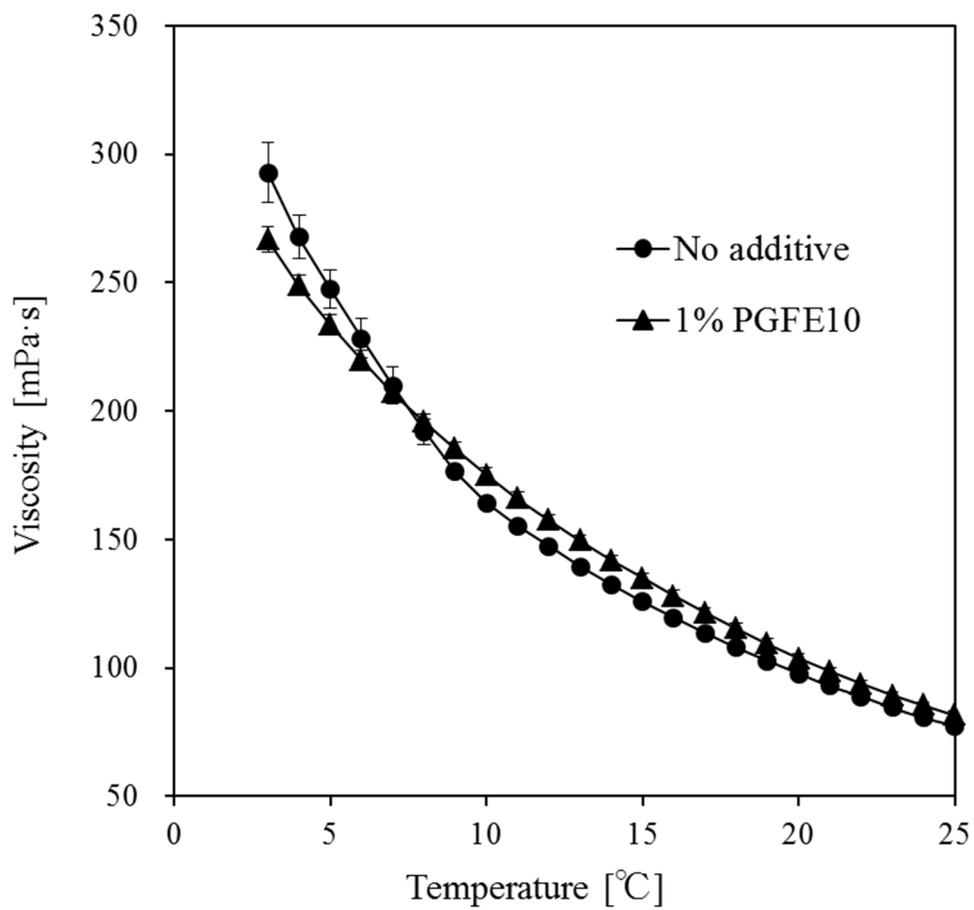


Figure 4-7. Variations in viscosity of DAG-oil in the presence and absence of PGFE 10 under a shear rate of 100 s^{-1} . Values are means \pm S.D. ($n = 3$)⁶.

両者の粘度は 7 °C で逆転した。

Figure 4-8 に、10 °C での粘度のせん断速度依存性を示す。無添加の DAG-oil では、非常に低いせん断速度域 ($< 10 \text{ s}^{-1}$) において速度が上がるほど粘度が下がる非ニュートン流体の挙動を示し、せん断速度が一定以上になるとニュートン流体の挙動を示すようになった。先行研究によれば、これは菜種油のような TAG でも見られる現象である^{7,8}。

PGFE 10 を添加した DAG-oil では、無添加のものと比較して非ニュートン流体の挙動が顕著に現れ、低せん断速度域での粘度が大きく上昇した (Figure 4-8)。PGFE の添加濃度を 0.2 % から 3 % まで増加させると、その効果はより大きくなった。この DAG-oil のレオロジー変化は、PGFE の添加によって DAG-oil 中に液晶的な構造ができていることを示唆している。4.3.1 項の検討で、攪拌時に複屈折が強く観察されたことと合わせて考えると (Figure 4-5(B))、非ニュートン流体の挙動は、せん断速度を大きくしていくほど流れの方向に分子が並ぶことで、見かけの粘度が低下していくことに起因するものと想定される。

3 % の PGFE を添加した DAG-oil について、歪み 4 % の時の粘度の周波数依存性を解析した。測定温度は結晶化が起こらない 10 °C とした。その結果、Figure 4-9 に示すように、損失弾性率 (G'') に加え貯蔵弾性率 (G') が検出された。周波数が大きいときには G' より G'' の方が小さいが、周波数が小さくなるにつれて両者の差が縮まり、0.86 Hz で逆転した。低周波数域において G'' よりも G' が大きいことは、DAG-oil が弾性を示すレベルまで構造化していることを示唆している。これら一連の結果は、DAG-oil 中に液晶様構造体が存在するという仮説を支持している。

対照的に、30 °C で測定した際には G' が検出することができないほどに小さかった ($< 0.005 \text{ Pa}$)。これは液晶様構造体の形成に冷却が必要であることを改めて示している。

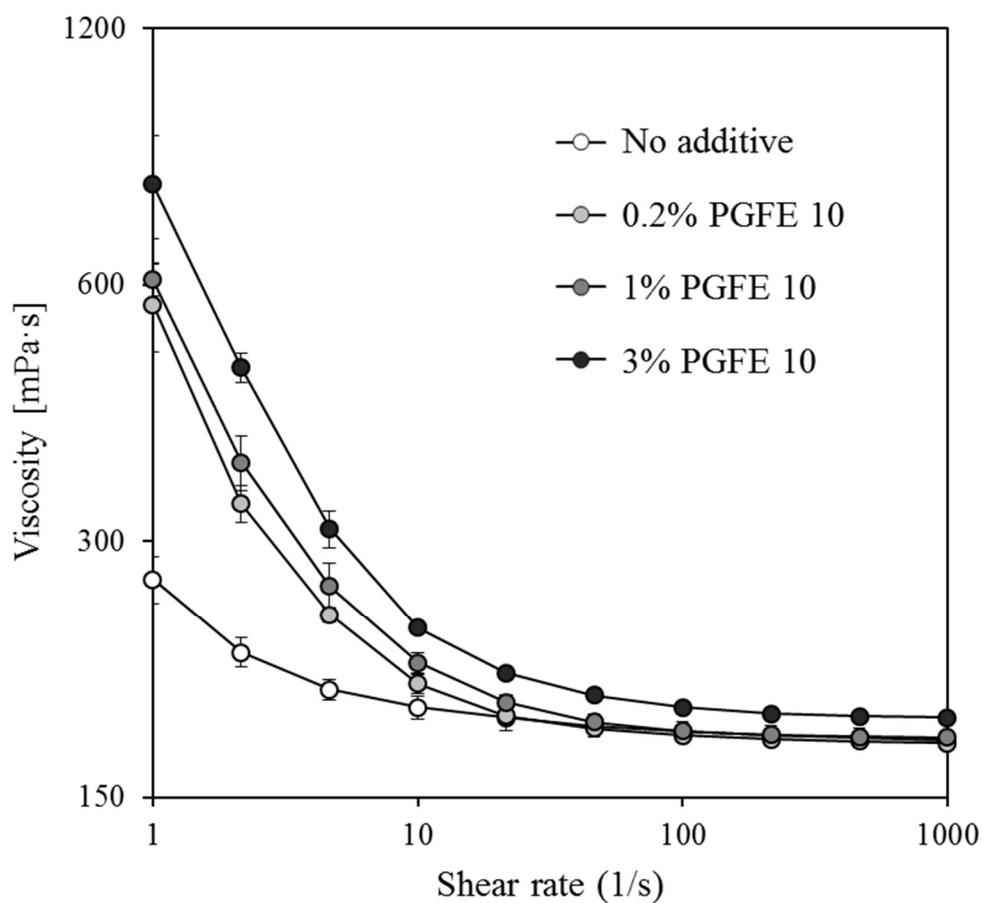


Figure 4-8. Variations in the viscosity of DAG-oil in the presence and absence of PGFE 10 under varying shear rates measured at 10 °C. Values are means \pm S.D. (n = 3) ⁶.

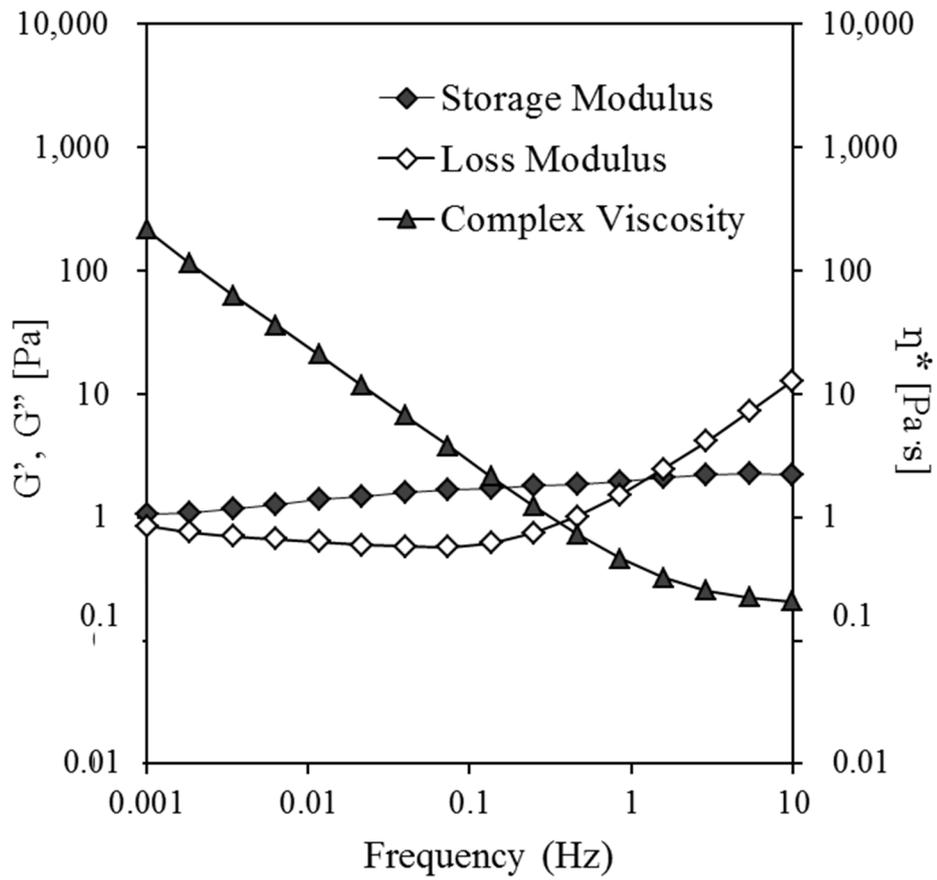


Figure 4-9. Frequency sweep test of DAG-oil containing 3% PGFE 10 at 10 °C ⁶.

4.3.5 複屈折構造の X 線解析

PGFE を添加した DAG-oil 中に生じた複屈折構造について、X 線解析を行った。冷却過程にて測定した SAXD パターンを Figure 4-10 に示す。PGFE 無添加の DAG-oil では、6 °C で 4.65 nm に相当する回折ピークが観察された。この回折ピークは、第 2 章における結果と一致しており、1,3-PP や 1,3-PO など高融点成分の結晶の長面間隔を反映している⁹。一方で、3 %の PGFE 6 を添加した DAG-oil では、DAG 結晶を反映する 4.6 nm 付近の回折ピークは出現せず、代わりに 4.19 nm の小さな回折ピークが 6 °C で観察された (Figure 4-10(B))。これは、PGFE の添加によって、DAG 結晶とは異なる構造の凝集体が DAG-oil の中に生じたことを示している。

この凝集体の構造をより詳しく明らかにするために、PGFE の添加濃度を 10 %まで増やさせて SAXD の解析を行った。その結果、3%の PGFE 添加で観察された 4.19 nm の回折ピークに加え、8.37 nm の回折ピークが出現した (Figure 4-10(C))。この 8.37 nm および 4.19 nm のピークは、ラメラ構造中のラメラの繰返し周期 (長面間隔) による 001 反射と 002 反射に相当する回折ピークである。また、002 反射の強度は 001 反射と比較して非常に大きいものであった。このように、001 反射に対して 002 反射の強度が大きくなる例としては、TAG では 1,3-ジステアリン-2 オレイン (SOS) が形成する 3 鎖長型の結晶構造が挙げられる^{10,11}。すなわち、3 鎖長構造の結晶のピーク強度は 002 > 005 > 003 > 001 の順になる¹¹。今回の検討で、回折ピークの強度が 002 >> 001 であったことは、DAG-oil 中で形成しているラメラ構造が 3 鎖長構造、あるいはそれに近い構造に由来するものである可能性を示している。

PGFE 10 に比べポリグリセリン部が小さい PGFE 6 を添加した DAG-oil でも、同様の回折ピークが観察された (Figure 4-10(D))。この結果は、複屈折構造のサイズに対して、ポリグリセリン部の大きさはほとんど影響を与えないことを示している。

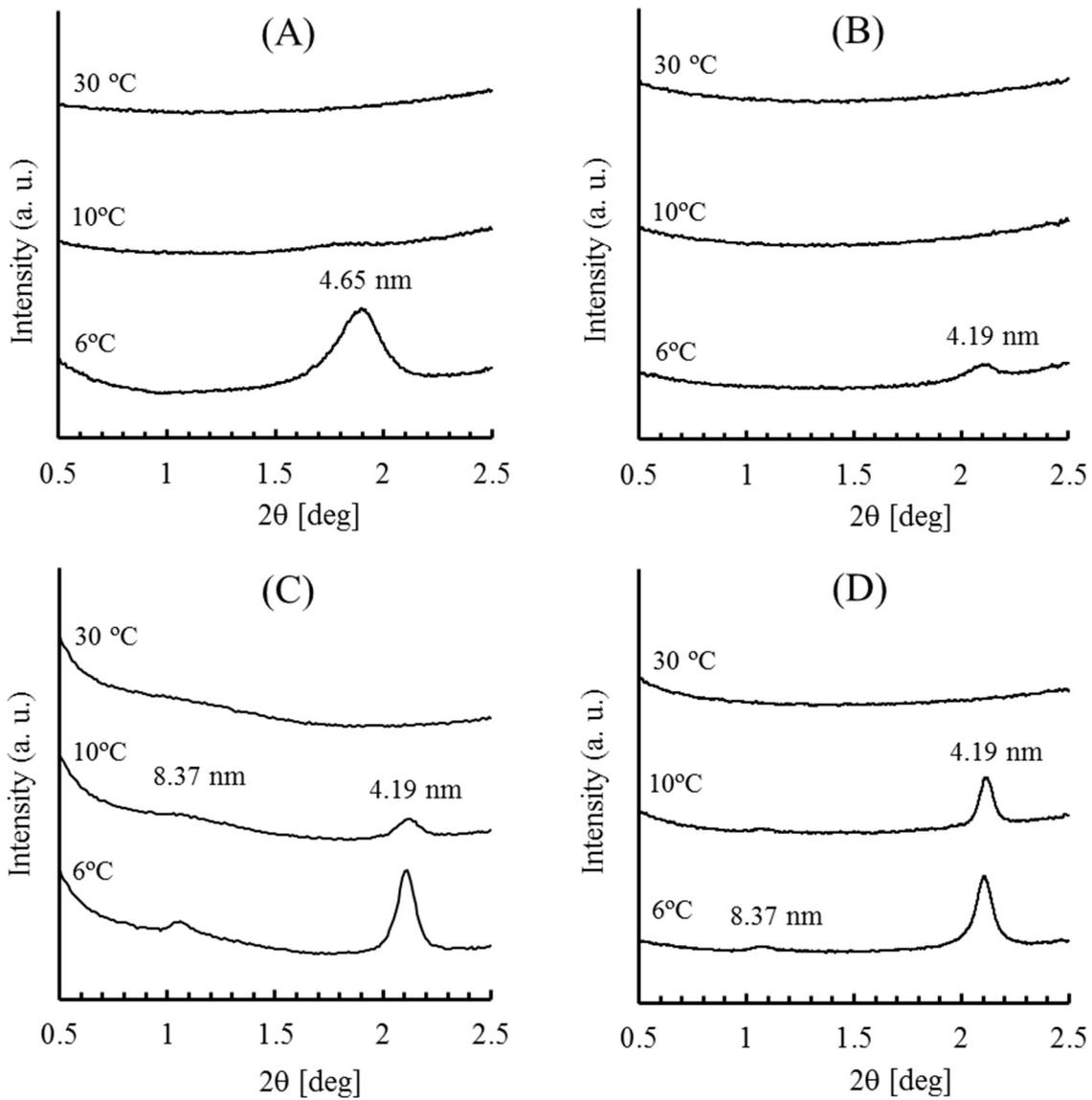


Figure 4-10. Small-angle X-ray diffraction patterns of DAG-oil (A) without additives, and (B) with 3% PGFE 10, (C) 10% PGFE 10, and (D) 10% PGFE 6 taken at 6, 10, and 30 °C⁶.

Figure 4-11 に広角領域まで含めた XRD の測定結果を示す。液体相から生じるハローを消去するために、各測定で最後の X 線照射 (150~180 分) で得られた回折パターンから、最初の X 線照射 (0~30 分) で得られた回折パターンを差し引くことで補正を行った。無添加の DAG-oil では、0.46 nm、0.39 nm および 0.37 nm に相当する回折ピークが観察された。この回折パターンは、第 2 章で観察された 1,3-PP と 1,3-PO の 2 成分混合系の回折パターンと一致している (Figure 2-7)。したがって、無添加の DAG-oil では高融点成分が結晶として析出していることが裏付けられるとともに、結晶多形が β 形であることが示された^{9,12,13}。

PGFE 10 を添加した DAG-oil の広角領域の XRD には、6 °C で $2\theta = 22^\circ$ 付近にブロードな回折ピークが検出された (Figure 4-11(B))。この時、小角領域には 4.19 nm のシャープな回折ピークが観察された。これらの結果は、PGFE を添加した DAG-oil 中には、脂肪酸鎖が縦に並んだ規則的な構造を持つが、脂肪酸鎖と脂肪酸鎖の間には明確なパッキングを持たない層状の構造が形成していることを示唆している。小角領域に明確なピークと広角領域に不明瞭なピークが共存することは、スメクチック液晶に典型的な XRD のパターンである¹⁴。両親媒性の物質を含む油脂が、水の存在なしに液晶構造を形成する例は、これまでも報告されている¹⁵⁻¹⁷。例えば MAG を数%含む油脂では、MAG が親水性のグリセリン部同士で凝集し、疎水性の脂肪酸鎖を外側に向けたラメラ層を形成する¹⁶。PGFE を添加した DAG-oil においても同様の構造が形成したと思われる。

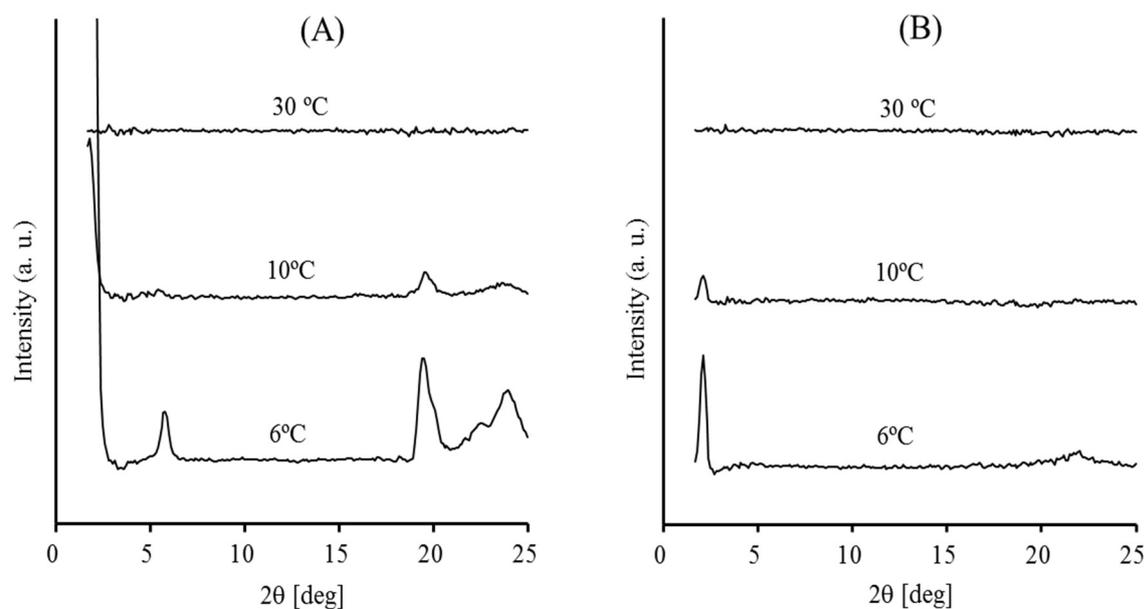


Figure 4-11. X-ray diffraction patterns of DAG oil (A) without additives and (B) with 3% PGFE 10 taken at 6, 10, and 30 °C. The diffraction patterns were calculated by subtracting the data of the first irradiation (0–30 min) from those of the last (150–180 min) after an intensity correction⁶.

4.3.6 PGFE 添加による DAG の結晶化抑制メカニズム

第 3 章で示されたように、脂肪酸部にパルミチン酸とオレイン酸を含む PGFE は、DAG-oil に対する結晶核形成抑制効果を発現する (Figure 3-3、Figure 3-4、および Figure 4-2)。また第 3 章で考察したように、一般に油脂の結晶化挙動に影響を与える乳化剤は、脂肪酸部の組成が油脂の脂肪酸組成と類似している^{1-4, 18}。脂肪酸部の類似性は、分子間のファンデルワールス力を増加させ、乳化剤と油脂が相互作用することを促進すると考えられている。油脂が乳化剤よりも先に結晶化する際には、結晶の成長面に乳化剤が入り込むことで、結晶成長を促進したり抑制したりする。反対に乳化剤が油脂に先立って結晶化する際には、乳化剤が“テンプレート”として働き結晶化を促進する。本研究においては、PGFE 6 や PGFE 10 の脂肪酸部は DAG-oil 中の高融点成分(1,3-PP や 1,3-PO)と非常によく類似しており、結晶化を制御する乳化剤の必要条件を満たしている。

偏光観察 (Figure 4-3)、レオロジー測定 (Figure 4-7、Figure 4-8) および XRD 測定 (Figure 4-10、Figure 4-11) の結果が示すように、PGFE を添加した DAG-oil 中には、過冷却状態の時に液晶様の構造体が観察される。この液晶様構造体と結晶核形成抑制効果の関係について、以下のように推察した。

Figure 4-12 に DAG-oil 中に発生した液晶様構造体の仮説を示す。この図において、液晶様構造体では、1,3-PP や 1,3-PO など DAG-oil 中の高融点成分のグリセリン骨格と、PGFE のポリグリセリン部とが極性基間の相互作用で 1 つになり、脂肪酸基は別の層に配列している。この時、パルミチン酸とオレイン酸が別々の層に並ぶことで、P-O-P タイプまたは O-P-O タイプの 3 鎖長構造を形成する (Figure 4-12(B))。TAG での先行研究が示すように¹⁹、POP や OPO の 3 鎖長結晶構造のラメラ間隔は約 6 nm である。本研究で観察された構造のラメラ間隔は 8.37 nm で (Figure 4-12(C))、TAG の結晶に比べて広い間隔であった。この原因としては、DAG と PGFE が大きな 1 つの極性基を形成すること、液晶は結晶と異なり柔軟性を持つ構造であること、および 1,3-SO などの分子も

混合して構造を形成していることなどが考えられる。

上記のような液晶様構造体を形成することが、DAG の結晶化抑制につながると考えるのは合理性がある (Figure 4-13)。1,3-PP や 1,3-PO などの高融点成分は、液晶様構造体の中に取り込まれることで運動性が低下する。その結果として、DAG-oil 中で高融点成分同士が会合する確率が下がり、結晶核の形成速度が低下する。高融点成分が液晶構造体の中に取り込まれているという直接的な証拠はないものの、1,3-PP や 1,3-PO の結晶を示す X 線回折ピーク (約 4.6 nm) が消失したこと (Figure 4-10(C)) は、この仮説を裏付けている。また、1,3-PP や 1,3-PO の回折ピークの消失は第 3 章でも観察されている (Figure 3-8)。

PGFE の脂肪酸部が、高融点成分をトラップする役割を果たしていることに加え、ポリグリセリン部も結晶抑制効果に対して重要な役割を担っていると考えられる。ポリグリセリン部は非晶質部として、DAG と PGFE が結晶化せず液晶状態を保つことに寄与していると推測される。加えて、Table 4-2 や Table 4-3 にて PGFE 10 の方が PGFE 6 よりも強い複屈折が観察されたように、ポリグリセリン部には液晶様構造体を形成するために最適なサイズがあると考えられる。実際、PGFE 10 の方が PGFE 6 よりも強い結晶抑制効果を示した (Figure 3-3、および Figure 4-2)。これらの結果より、ポリグリセリン部のサイズが大きくなるほど、DAG との親水性相互作用が強くなり、液晶様構造が安定化するものと考えられる。

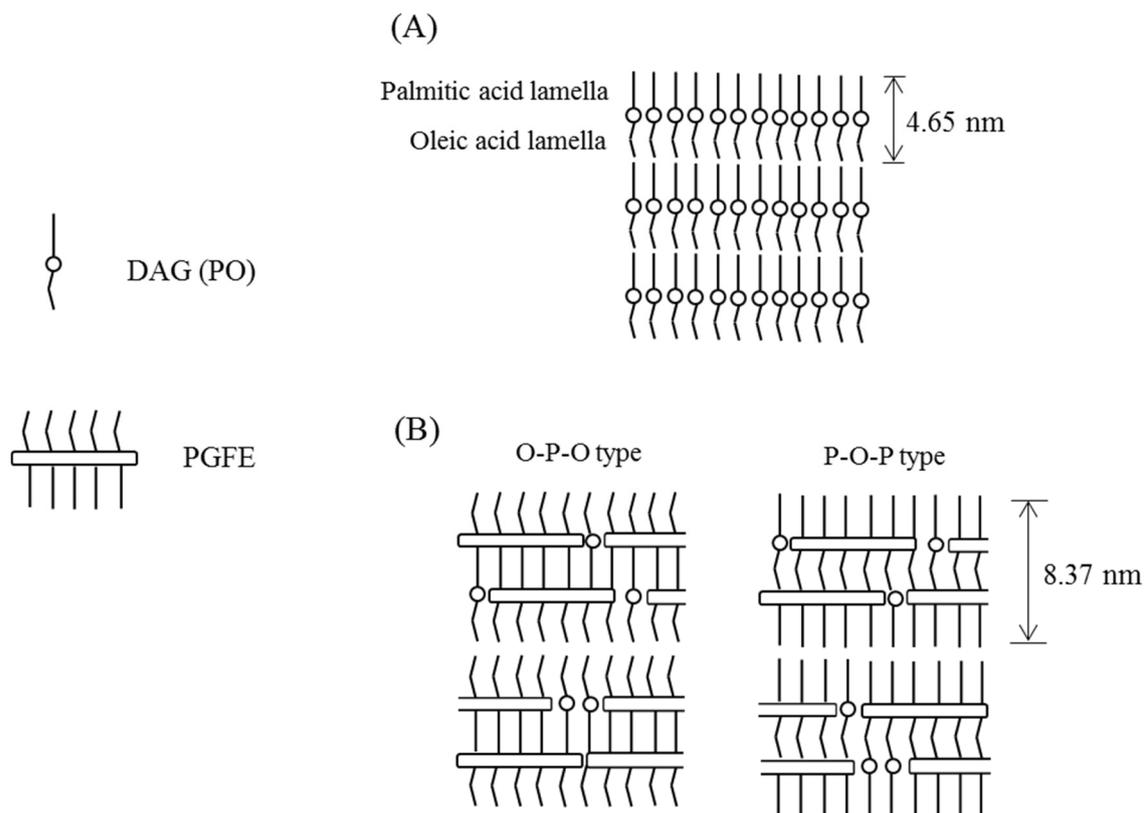


Figure 4-12. Schematic models of (A) the cluster of 1, 3-PO DAGs and (B) supramolecular assembly of 1, 3-PO DAGs/PGFEs containing palmitic and oleic acid moieties. In the supramolecular assembly model, the polar groups of DAGs and PGFEs form one unit layer, and the fatty acid moieties are aligned differently to form a triple-chain-length structure.⁶

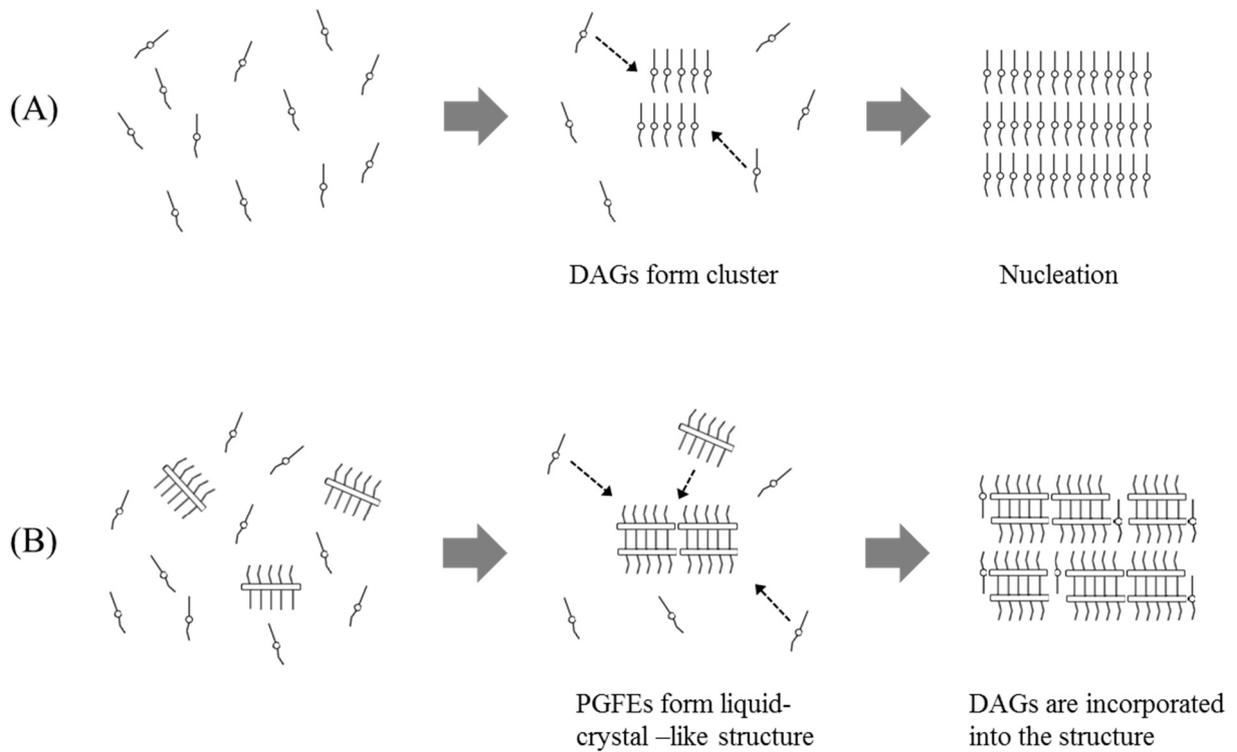


Figure 4-13. Putative retardation mechanism of the crystal nucleus formation resulting from PGFE addition. (A) Without PGFE, DAG molecules pack together and form cluster, followed by the nucleation. (B) With PGFE, PGFEs form liquid-crystal like structure, which incorporate DAG molecules through palmitic acid moiety and polar glycerol group. As a result, the concentration of high-melting DAG fractions decrease, thus reducing the probability of nucleus formation.

4.4 まとめ

第4章では、PGFEがDAG-oilの結晶化を抑制するメカニズムについて検討した。脂肪酸部にパルミチン酸とオレイン酸を含むPGFEは、DAG-oilに添加することで結晶化抑制効果を発現する。この時、結晶化が起こる前の過冷却状態に着目すると、偏光下にてDAG-oil中に複屈折構造が観察された。加えて、レオロジー測定で明らかになった粘度の微小な変化や、XRD測定で示されたラメラ間隔の変化は、DAG-oil中に液晶様の構造体が形成されたことを示唆している。またXRDのパターンから、この液晶様構造体はPGFEとDAGとが形成する3鎖長構造に由来するものと推察される。

以上のことから、PGFEによるDAG-oilの結晶抑制メカニズムの仮説として、1,3-PPや1,3-POなどDAG-oil中の高融点成分が、液晶様構造体に取り込まれることで、DAG-oil中で高融点成分がお互いに会合する確率が下がり、結晶核の形成速度を低下させるものと考えられる。

4.5 引用文献

1. Smith KW, Bhaggan K, Talbot G, van Malssen KF (2011) **Crystallization of Fats: Influence of Minor Components and Additives**. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88(8):1085–1101
2. Sato K (Ed) **Crystallization of Lipids: Fundamentals and Applications in Food, Cosmetics, and Pharmaceuticals**. Wiley-Blackwell, New Jersey (2018)
3. 佐藤 清隆、上野 聡 (著) **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** 丸善出版株式会社 (2011)
4. Marangoni AG (2005) **Fat crystal networks**. Marcel Dekker, New York
5. 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
6. Saitou K, Taguchi K, Homma R, Shimizu M, Yasunaga K, Katsuragi Y, Ueno Sato K (2017) **Retardation Mechanism of Crystallization of Diacylglycerols Resulting from the Addition of Polyglycerol Fatty Acid Esters**. *Cryst. Growth Des.*, 17(9):4749–475
7. Liu, C Yang, M Huang F (2012) **Influence of Extraction Processing on Rheological Properties of Rapeseed Oils**. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89:73–78
8. Geller DP, Goodrum JWJ (2000) **Rheology of vegetable oil analogs and triglycerides**. *Am. Oil Chem. Soc.* 77:111–114
9. Saitou K, Mitsui Y, Shimizu M, Kudo N, Katsuragi Y, Sato K (2012) **Crystallization behavior of diacylglycerol-rich oils produced from rapeseed oil**. *J Am Oil Chem* 89:1231–1239
10. Sato K, Ueno S, Yano J (1999) **Molecular interactions and kinetic properties of fats**. *Prog. Lipid Res.* 38:91–116.
11. Mykhaylyk OO, Hamley, IWJ (2004) **The Packing of Triacylglycerols from SAXS Measurements: Application to the Structure of 1,3-Distearoyl-2-oleoyl-sn- glycerol Crystal Phases** *Phys. Chem. B* 108:8069–8083.
12. Baur, FJ, Jackson, FL, Kolp DG, Lutton, ES (1949) **The Polymorphism of Saturated 1,3-Diglycerides**. *J. Am. Chem. Soc.* 71:3363–3366.
13. Craven RJ, Lencki RW (2011) **Crystallization and polymorphism of 1,3-acyl-palmitoyl-rac-glycerols**. *J Am Oil Chem Soc* 88: 1113–1123
14. De Vries A. (1985) **The Use of X-Ray Diffraction in the Study of Thermotropic Liquid Crystals With Rod-Like Molecules**. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 131:125–145.
15. Chen CH, Terentjev EM (2010) **Effects of Water on Aggregation and Stability of Monoglycerides in Hydrophobic Solutions**. *Langmuir.* 26(5):3095–3105
16. Chen CH, Terentjev EM (2009) **Aging and Metastability of Monoglycerides in Hydrophobic Solutions**. *Langmuir.* 2009, 25, 6717–6724.

17. Chen CH, Van Damme I, Terentjev EM (2009) **Phase behavior of C18 monoglyceride in hydrophobic solutions.** *Soft Matter.* 5:432–439
18. 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
19. Arishima T, Sato K (1989) **Polymorphism of POP and SOS III. Solvent crystallization of β_2 and β_1 polymorphs.** *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66:1614–1617.

第5章 本研究の総括

5.1 本研究のまとめ

本研究では、DAG の結晶化制御技術の確立を目的とし、菜種油から合成した DAG (DAG-oil) を用いて検討を行った。

まず第2章では、DAG-oil の結晶化挙動について、DSC、偏光顕微鏡観察、および GC による分析を行った。その結果、DAG-oil で結晶化する成分は 1,3-DAG であることが示され、各 1,3-DAG は飽和脂肪酸を含む微量な高融点成分 (1,3-PP や 1,3-PO など) からメインの結晶化成分 (1,3-OO) へと段階的に結晶化する挙動を示した。さらに第2章では、純度の高い 1,3-DAG を用いて 2 成分混合系の相挙動を分析し、1,3-OO、1,3-PO および 1,3-PP は偏晶もしくは共晶の相挙動となることを明らかにした。この非相溶性の挙動が、DAG-oil で観察された段階的な結晶化挙動につながっているものと推察される。第2章における検討結果から、DAG-oil の結晶化制御技術を確立するためには、冷却時に最初に結晶化する高融点成分、すなわち 1,3-PP や 1,3-PO などの結晶化をコントロールすることが、最も重要であると考えられる。

第3章では、DAG-oil の結晶化に対して効果のある乳化剤を検討し、脂肪酸部にパルミチン酸とオレイン酸を持つ PGFE が、非常に効率的に DAG-oil の結晶化を抑制することを見出した。DSC や偏光顕微鏡観察の結果から、PGFE の作用点は、1,3-PP や 1,3-PO など DAG-oil 中の高融点成分の結晶核形成プロセスであることが示された。これは、試薬を用いて調製した DAG-oil の単純化モデルによる検討からも裏付けられた。これらのことから、第2章で考察したように、DAG-oil の結晶化制御のためには飽和脂肪酸を含む 1,3-DAG の結晶化をコントロールすることが非常に重要であり、PGFE はそのポイントに作用することで、全体の結晶化を効率的に抑制できるものと考えられる。

第4章では、PGFE が DAG-oil の結晶化を抑制するメカニズムの検討を行った。結晶化が起こる前の過冷却状態の DAG-oil に着目すると、PGFE を添加した DAG-oil では偏

光下で複屈折が観察された。加えて、レオロジー測定における粘度の微小な変化や、XRD 測定におけるラメラ間隔の変化は、DAG-oil 中に液晶様の構造体が形成されたことを示した。また XRD のパターンから、この構造が PGFE と DAG が形成する 3 鎖長構造である可能性が示された。これらのことから、PGFE による DAG-oil の結晶抑制メカニズムとして、1,3-PP や 1,3-PO など DAG-oil に含まれる高融点成分が、液晶様構造体に取り込まれることで、高融点成分同士が会合する確率が下がり、結晶核の形成速度を低下させるという仮説が考えられる。

油脂の結晶化は最終製品の品質に大きく影響する因子である。これまでに 1 成分や 2 成分の純粋な DAG の結晶性に関する研究は数多く報告されていたが、工業的に生産される多成分混合物としての DAG に関しては、研究例が非常に限られていた。本研究では、菜種油から合成した DAG について結晶化挙動を明らかにし、結晶化制御のターゲットを明確にするとともに、その制御方法の一例を示した。これは DAG をさまざまな製品へと応用する上で、有用な知見となると期待される。

PGFE をはじめとする乳化剤が、油脂の結晶化に作用することは経験的によく知られており、簡便で汎用性の高い制御方法の 1 つである。一方でその作用メカニズムについては学術的に未解明な部分があり、特に結晶核形成を抑制するメカニズムについては、研究が極めて不十分であった。本研究にて提唱する仮説は、これまで未知であった結晶核形成を抑制するメカニズムについて、全く新しい考え方を提案するものである。結晶核形成は結晶化のスタートの段階であり、その後の結晶化全体に影響する過程であることを考慮すると、その制御メカニズムを示したことは、結晶化制御技術の確立に向けて非常に大きな意義があると考えられる。

5.2 今後の展望

本研究により、DAG-oil の結晶化挙動とその制御方法の一例が示された。今後の検討として、まずは本研究で提示された制御方法、すなわち PGFE の添加が、最終製品として十分な性能を DAG-oil に付与するものであるか、実際の製品での確認が必須である。特に、クッキングオイルのような液体油としての利用にあたっては、寒冷時の低温耐性は、結晶化による外観の悪化や使用性の低下を防止するために不可欠である。また PGFE が、乳化系においてもバルク油脂と同様の結晶化抑制効果を発現するかどうかを確認することも、マヨネーズやスプレッドなどへと製品の応用範囲を広げる上で重要である。

PGFE の添加のみでは、DAG-oil に十分な性能を付与できなかった場合には、本研究の知見を活かすことで更なる改善を図ることができる。例えば、第 2 章で示された DAG-oil の結晶化挙動を考慮して、1,3-PP や 1,3-PO などの高融点成分をウィンタリングのような製造プロセスにより減らすことは、結晶化の確率を大きく低下させると期待される。また、第 4 章で示された PGFE の結晶化抑制メカニズムの側からは、PGFE を DAG と相互作用しやすい構造に最適化することで、より強い結晶化抑制効果を実現できると考えられる。さらに、PGFE が結晶核形成を抑制するという点から、結晶成長抑制効果を持つ乳化剤と併用することは、相乗効果を生む可能性がある。

本研究では、これまで未知であった結晶核形成の抑制メカニズムについて、新たな仮説を提案するに至った。しかしながら、依然としてそのメカニズムの全容が解明されたとは言い難い。まずは DAG-oil 中に形成する液晶様構造体について、さらに詳細に解析する必要がある。本研究では XRD 測定における回折ピークのパターンを TAG の先行研究と比較することで、DAG と PGFE が 3 鎖長構造を形成していると考察したが、この仮説とは全く異なる構造を形成している可能性もある。事実、純粋な 3 鎖長構造から推定されるラメラ間隔（約 6 nm）よりも、本研究で観察された間隔（約 8nm）は大きいものであった。今後、PGFE や DAG の種類に応じて、液晶様構造体がどのように変化

するのかを検討し、動的光散乱やラマン分光などの手法を導入することで、液晶様構造体についてさらに理解を深めていくことが重要である。加えて、PGFE と DAG がどのように相互作用しているかという点についてもデータが乏しい。放射光 X 線を用いて、完全な液体から液晶を形成するまでの過程を観察し、NMR を用いて局所構造や運動性の解析を行うことは、PGFE の作用メカニズムについて、一步踏み込んだ知見や考察を与えてくれる可能性がある。以上については、今後検討すべき課題である。

本研究で提案した結晶核形成の抑制メカニズム仮説が、TAG やパラフィン、バイオディーゼルなど、DAG 以外の油脂へも適用可能なものであるか否かは、非常に興味があるところである。もし、様々な油脂へと広く応用できるものであれば、本研究の知見は普遍的な油脂の結晶制御技術として大きく展開していく可能性がある。食品、燃料油脂、化粧品や医薬品など、油脂含有製品の品質向上を実現し、油脂産業の発展につながる基盤的知見として今後の研究の進展が期待される。

謝辞

本研究において、広島大学大学院生物圏科学研究科に在職中から退職後の現在まで、研究の初期から本論文のとりまとめに至る過程において、終始温かいご指導を賜りました佐藤清隆広島大学名誉教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、常に的確なご助言やご指導を頂きました広島大学大学院生物圏科学研究科の上野聡教授に心から感謝いたします。

研究について丁寧にご指導いただき、実験結果について議論させて頂きました広島大学大学院総合科学研究科の田口健准教授に深く感謝申し上げます。

本論文をご精読いただき、適切な助言と有益な議論の場を提供して頂きました京都大学大学院農学研究科の松村康生教授、広島大学大学院生物圏科学研究科の羽倉義雄教授、鈴木卓弥教授、川井清司准教授、本同宏成講師に心より御礼申し上げます。

また、本研究においてご便宜を賜り、数々のご助言とご協力を頂きましたヘルスケア食品研究所の桂木能久所長、安永浩一室長、三井友毅グループリーダー、清水将夫グループリーダー、本間里佳グループリーダー、開発研究第2セクターの安増毅研究主幹、品質保証部門の工藤尚人室長をはじめ、花王株式会社の関連部署の皆様には感謝の意を表します。

最後に、今日に至るまで私をあたたく応援していただき、様々な面から支えてくれた父母や妻に心から感謝の意を表します。