

脂質成分の相互作用が脂質の過冷却解消と平衡凝固点降下に及ぼす影響

玉置亮* 李潤珠**† 鈴木徹**

* 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科応用生命科学専攻 (108-8477 東京都港区港南 4-5-7)

** 東京海洋大学産学・地域連携推進機構サラダサイエンス寄附講座 (108-8477 東京都港区港南 4-5-7)

要約

n-Hexadecane (HD) の結晶化に与える n-Dacane (DCA) および n-Octane (OCT) の影響を調べた。これにより、脂質成分どうしの相互作用が脂質の過冷却解消に及ぼす影響を体系的にとらえることを目的とした。HD-DCA 系, HD-OCT 系それぞれについて平衡凝固点に対して結晶核生成温度をプロットしたところ、一次の相関が見られた。しかしながらその傾きから評価すると、HD は水溶液系ほど過冷却が進行しなかった。n-Alkane 類は極性を持たず、水溶液系ほど分子間の相互作用が強くないため、過冷却解消の障壁が高くないことがひとつの要因として推察された。また、HD-OCT 系より HD-DCA 系の方が相対的に過冷却が進行する結果となり、共存物質によって過冷却の進行度合いが異なることも明らかとなった。

キーワード: 脂質, 凍結, 結晶化, 乳濁液, 凝固点, 過冷却

1. 緒言

食品の冷凍技術において、食品中において氷結晶が生成することは、食品の品質上必ずしも好ましいこととは言えない。氷結晶の生成・成長が細胞や組織に物理的な損傷を与え、食感を損なうなどの悪影響をおよぼし、ひいては商品価値の低下を招くリスクがあるためである。このため、氷結晶の生成・成長をコントロールするための試みはこれまで多くなされてきた。

一方、トリグリセリドや脂肪酸などに代表される脂質も、食品の主要な成分のひとつである。これら各種脂質成分は常温で結晶であるものから、マイナス数十度の環境下で液体を保つものまで様々あるが、脂質成分の結晶化など相転移も水の場合と同様食品の巨視的物性に影響を与え得る。このため、この方面からもこれまで多くの議論がなされてきたが、そのなかで典型的な研究対象のひとつが、マヨネーズをはじめとした O/W(Oil-in-water)エマルジョンの凍結安定性に関するものであろう¹⁻²⁾。O/W エマルジョンにおいて、連続相である水相の結晶化と分散相である脂質成分の結晶化はどちらも系の不安

定化をもたらすため、解凍時にエマルジョンが崩壊する場合がある。これを解決するために、界面活性剤や連続相の組成を変更するアプローチがいくつか報告されている³⁻⁵⁾。しかしながら、こうした研究報告の多くが単一の脂質成分を用いている。脂質成分間での相互作用が結晶化挙動におよぼす影響について検討した例は多くなく、その現象理解が進んでいるとは言えない。本研究では、脂質 2 成分系における結晶化挙動を調べ、それを体系的に理解することを目的とした。

結晶化挙動として水溶液系においては、溶質濃度が高くなるほど平衡凝固点(T_m)が下がるが、同様に溶質濃度が高くなるほど水の結晶核生成温度(T_c)が下がる(過冷却が進行する)ことも明らかになっている。 T_m と T_c の相関関係に関して、式(1)のように一次の相関があることが報告されている⁶⁻⁷⁾。

$$\Delta T_c = \lambda \Delta T_m \quad (1)$$

λ は実験的に得られる定数であり、直線の傾きを表している。 λ が 1 より大きくなるほど、平衡

凝固点が低下する度合いに比べて過冷却の度合いが大きいことを意味している。この値は過冷却の度合いならびに挙動を評価するひとつの指標になるといえる。

脂質成分でも式(1)が成り立つことは既報のとおりであるが⁸⁾、共存物質の影響についての体系的な理解には及んでいない。本研究では、脂質の熱分析のモデル物質としてよく使われる n-Hexadecane を引き続き分析対象とし、共存物質として n-Decane と n-Octane を採用した。n-Decane と n-Octane は炭素鎖の長さだけが異なる n-alkane 類であり、その構造的な差異が n-Hexadecane の過冷却挙動にどう影響を与えるかを調べることを目的とした。n-Hexadecane に n-Decane, n-Octane をそれぞれ混合したものを分散相とした O/W エマルジョンを調製し、n-Hexadecane の T_c を測定した。また、 T_m については乳化操作を行わずバルク状態での測定を行った。n-Decane と n-Octane の共存による挙動を式(1)を用いて調べた。さらにこれまで報告されている水溶液系の挙動との比較も行い、脂質系における特徴について考察を加えた。

2. 実験方法

2.1 試料の調整

3種類の脂質成分, n-Hexadecane (99.9% Purity, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd), n-Decane (99.9% Purity, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd) および n-Octane (97.0% Purity, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd)を用い, n-Hexadecane(HD)を分析対象とした。HD に n-Decane(DCA)および n-Octane (OCT)を混合し, 2つの系を作製した。実験試料は HD のモル分率が, おおむね 1.00~0.75 の範囲で 0.05 刻みとなるように, 調整した (Table 1)。モル分率 1.00 は HD 単一成分のものである。

Table 1 The prepared samples of n-Hexadecane

Sample	Mole fraction of n- Hexadecane (X_{HD})
1	0.75
2	0.80

3	0.85
4	0.90
5	0.95
6	1.00

また, O/W エマルジョン試料を調製するため, ポリソルベート 20(Tween20, Wako)を 12 倍量の蒸留水に完全に溶解させたものを連続相とし (7.7wt%), Xantan gum 粉末(Wako)を連続相に 0.5wt%加え, 連続相と油相の重量比が 8:1 となるように Table 1 より作製された混合脂質溶液を加えた (全体に占める油相の割合=11wt%)。これをホモジナイザー (MICCAD-8 タイプ/ART Moderne Labortechnik, Germany) を用いて 39000 rpm で約 1 分間攪拌させ, O/W エマルジョン試料を作製した。O/W エマルジョン試料を光学顕微鏡(BX51TF, Olympus, Japan)で観察したところ おおむね 5~10 μ m の微細なエマルジョンであった (Fig. 1)

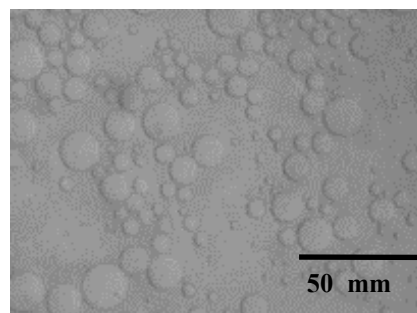


Fig. 1 Microscopic image of O/W emulsion used for experiment.

2.2 熱分析

試料の熱分析では示差走査熱量測定法 (Differential scanning calorimetry, DSC)を用いた。調製したエマルジョン 15~30 mg 程度をアルミニウム製耐圧セルに封入し, 熱分析装置 (SHIMADZU, DSC-50)を用いて, 一旦 50 $^{\circ}$ C付近まで昇温させた後, 液体窒素を用いて -3 $^{\circ}$ C/min で -20 $^{\circ}$ C付近まで冷却し, 結晶化温度を決定した。冷却プロセス中の発熱側へのピークのピークトップを結晶化温度(T_c)とした。

また, 混合脂質溶液の融点を決定するため, エマルジョン調製に使用したものと同一混合脂質溶液を乳化させていない試料をバルク状態とし

て測定した。−20°C付近まで冷却させた試料を+3°C/minで50°C付近まで昇温させ、融点を決定した。昇温プロセス中の吸熱側へのピークのピークトップを平衡凝固点(T_m)とした。

DSCの基準物質としては、酸化アルミニウム(アルミナ)を使用し、Indiumと蒸留水の融点および融解エンタルピーで温度と熱量の校正を行った。解析ソフトウェア(SHIMADZU, TA60)を用いてデータの解析を行った。

3. 実験結果

3.1 冷却曲線

DSCを用いたHD-DCA系およびHD-OCT系の冷却曲線をFig. 2に示す。HD-DCA系(Fig. 2A), およびHD-OCT系(Fig. 2B)における $X_{HD}=1.00$ の1.02°Cに観察された発熱ピークは、HDの過冷却解消(結晶核生成)にともなうものであると考えられる。

O/Wエマルション状態におけるHDの過冷却度(平衡凝固点(T_m)と結晶核生成温度(T_c)の差)はおおよそ16°C前後であるとの報告が多い^{5,9)}。本研究で得られた T_m は後述するとおり18.3°Cであったことから過冷却度は約17°Cとなり、エマルション状態のHDの過冷却度として妥当であると判断できた。

3.2 昇温曲線

HD-DCA系およびHD-OCT系の昇温曲線をFig. 3に示す。HD-DCA系(Fig. 3A), およびHD-OCT系(Fig. 3B)における $X_{HD}=1.00$ の18.3°Cに観察された吸熱ピークは、HDの融解にともなうものであると判断できる。なお、エマルションとせず、混合脂質溶液をそのまま測定した。これは、エマルション状態で測定を行うとHDの融解と水の融解が重なって検出される場合があるためであるが、 T_m 自体はバルク状態とエマルション状態で変化するものではない。

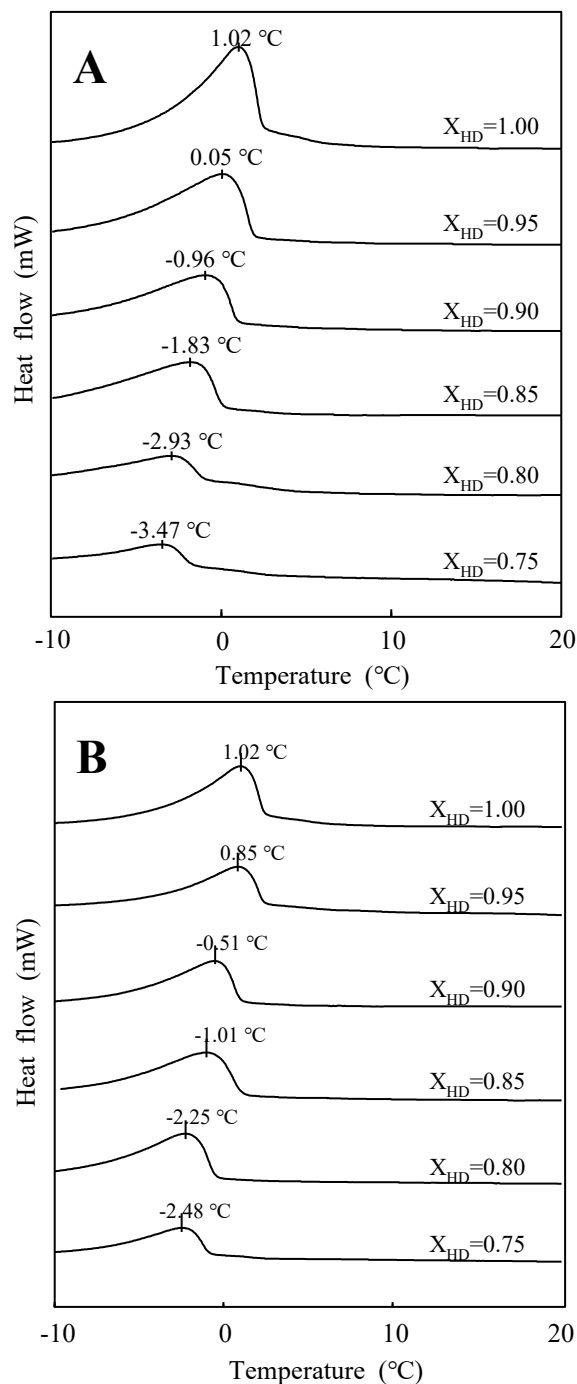


Fig. 2 DSC cooling curves of the (A) HD-DCA system and (B) HD-OCT system in the oil-in-water emulsified state. (X_{HD} : mole fraction of n-Hexadecane)

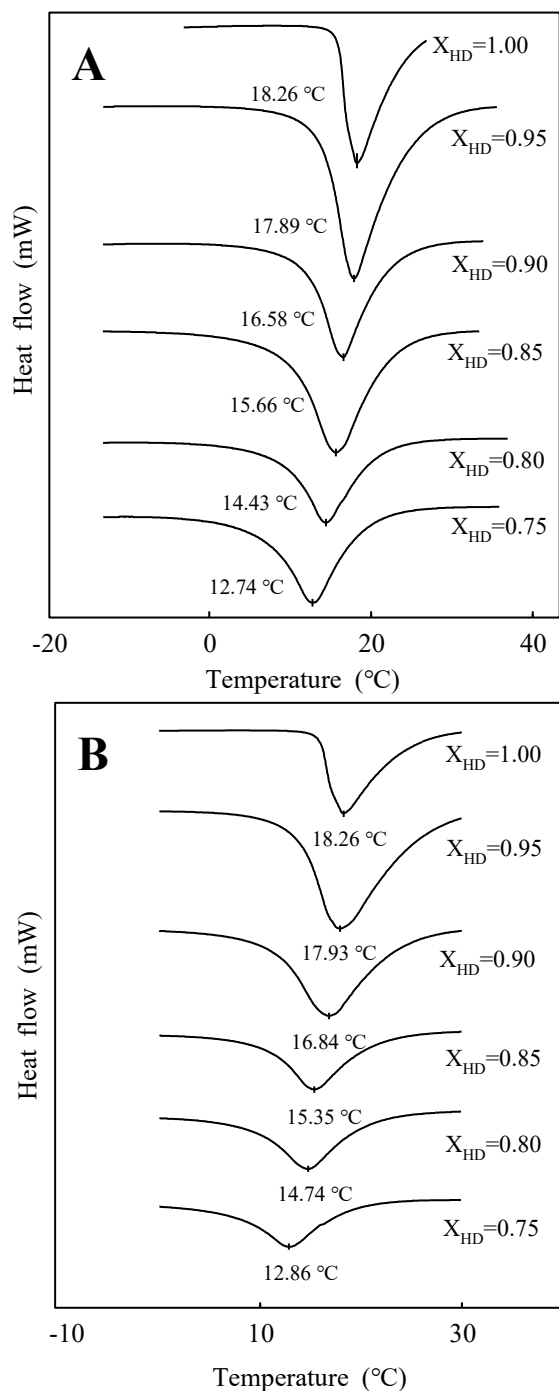


Fig. 3 DSC heating curves of the (A) HD-DCA system and (B) HD-OCT system in the bulky state.

(X_{HD} : mole fraction of n-Hexadecane)

3.3 平衡凝固点(T_m)と結晶核生成温度(T_c)の相関関係

Fig.2 および Fig. 3 では、いずれも HD の割合が減少するにつれて、 T_c や T_m とともに低温側へシフトする様子が観察された。この T_c , T_m の相関を示したのが Fig. 4 である。 $X_{HD}=1.00$ における T_c , T_m を基準に、そこからの差をそれぞれ ΔT_c , ΔT_m とし、 ΔT_m に対して ΔT_c をプロットした結果 HD-DCA, HD-OCT とともに直線近似の R-2 乗値が 0.92 また 0.93 となり、既報⁸⁾の値 (0.94~0.99) と比べて、相関が低かったものの、既報⁸⁾と同様に直線とみなして扱うこととした。両者の関係は式(1)で与えられ、 λ が直線の傾きに相当する。水溶液系における λ の値は、溶質分子によって比較的大きな幅があるが、通常 1~2 前後が一般的であるとされており^{6,10)}、系によっては 2 を超えるものもめずらしくない⁷⁾。一方、今回実験的に求められた λ の値は HD-DCA 系で 0.93, HD-OCT 系で 0.74 となった。HD が条件によっては 1.0 前後を示すことがあるのは既報のとおりであるが⁸⁾、本研究における HD-OCT 系ではそれをさらに大きく下回る値を示した。

まず、HD の λ の値が水溶液系より小さくなる要因に対するひとつの仮説としては、分子間の相互作用の影響が考えられる。水溶液系では λ の大きさと動的水和数に正の相関があることが示されているが⁷⁾、これは溶質分子が水分子の運動性に関与する度合いが大きいほど、過冷却が進行するという解釈ができるものである。今回対象とした n-alkane 類は極性を持たないため、分子間に水和のような強い相互作用は存在していない。このため HD の運動性は大きく妨げられることなく、比較的容易に過冷却状態が解消したと推察され、結果として λ の値が小さくなったことが示唆される。

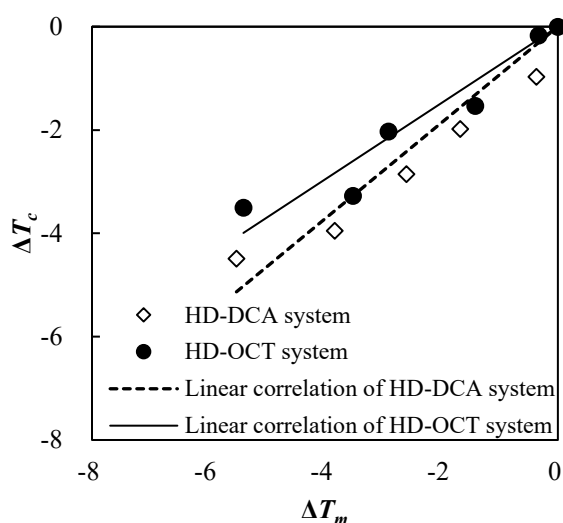


Fig. 4 The relationship between ΔT_m (equilibrium freezing point depression) and ΔT_c (crystallizing temperature depression) in the HD-DCA system and in the HD-OCT system.

また、本研究において鎖長が短い OCT (C_8H_{18}) よりも、鎖長が長い DCA ($C_{10}H_{22}$) の方が λ の値が大きく、過冷却が進行する傾向が認められた。仮説として、鎖長が長いと HD の結晶化を物理的に阻害する度合いが大きく、それが結果的に過冷却を促進させる方向に働くと言えるのではないだろうか。同じ脂質成分であっても、トリグリセリド類では過冷却が比較的進みやすく、 λ が 1 を超える場合が多いが⁸⁾、これはトリグリセリドの構造が相対的に複雑であることから考えても、上記の仮説と矛盾しないと言えるだろう。水溶液系では、水分子と溶質の相互作用が強いため、それが過冷却に与える因子として支配的であるが、極性のない脂質成分では、構造の複雑さの因子がより強く影響してくる可能性は十分に考えられる。いずれにせよ、現象理解のために今後さらなる知見の集積が必要と言えよう。

4. 総括

HD-DCA 系、HD-OCT 系いずれにおいても、HD の平衡凝固点 T_m と結晶核生成温度 T_c には一次の相関が認められた。この直線の傾きは水溶液系とは異なりいずれも 1 を下回る値が示され、

水溶液系よりも過冷却が進行しづらいことが明らかとなった。また、HD-OCT 系よりも HD-DCA 系の方が過冷却が相対的に進行しやすいことが明らかとなり、共存物質によって過冷却進行の度合いが異なることが示された。

References

- 1) Magnusson, E., Rosén, C. and Nilsson, L., Freeze-thaw Stability of Mayonnaise Type Oil-in-water Emulsions. *Food Hydrocolloids*, 2011, **25**(4), pp. 707-715.
- 2) Ishibashi, C., Hondoh, H. and Ueno, S., Influence of Morphology and Polymorphic Transformation of Fat Crystals on the Freeze-thaw Stability of Mayonnaise-Type Oil-in-water Emulsions. *Food Research International*, 2016, **89**(1), pp. 604-613.
- 3) Ariyaprakai, S. and Tananuwong, K., Freeze-thaw Stability of Edible Oil-in-water Emulsions Stabilized by Sucrose Esters and Tweens. *Journal of food engineering*, 2015, **152**, pp. 57-64.
- 4) Ghosh, S. and Coupland, J.N., Factors Affecting the Freeze-thaw Stability of Emulsions. *Food Hydrocolloids*, 2008, **22**(1), pp. 105-111.
- 5) Cramp, G.L., Docking, A.M., Ghosh, S. and Coupland, J.N. On the Stability of Oil-in-water Emulsions to Freezing. *Food Hydrocolloids*, 2004, **18**(6), pp. 899-905.
- 6) Khvorostyanov, V.I. and Curry, J.A., Thermodynamic Theory of Freezing and Melting of Water and Aqueous Solutions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2004, **108**(50), pp. 11073-11085.
- 7) Kimiduka, N., Suzuki, T., Hagiwara, T., and Takai, R., Supercooling Ability of Solution. *Cryobiology and Cryotechnology*, 2000, **46**(1), pp. 1-5. (In Japanese)
- 8) Tamaki, R., Kawai, K., Viriyarattanasak, C., Kimizuka, N. and Suzuki, T., Crystallization and Equilibrium Melting Temperatures from Binary Lipid Mixture. *Japan Journal of Food Engineering*, 2005, **6**, pp. 253-258. (In Japanese)
- 9) Vanapalli, S. A., Palanuwech, J. and Coupland, J.N., 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*, 2002, **204**(1-3), pp. 227-237.
- 10) Charoenrein, S. and Reid, D.S., The Use of DSC to Study the Kinetics of Heterogeneous and Homogeneous Nucleation of Ice in Aqueous Systems. *Thermochimica Acta*, 1989, **156**(2), pp. 373-381.

Effect of Lipid Components Interaction on Supercooling and Depression of Equilibrium Freezing Point

Ryo TAMAKI*

Younju LEE**†

Toru SUZUKI**

*Course of Applied Marine Biosciences, The Graduate School of Marine Science and Technology,
Tokyo University of Marine Science and Technology
(4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo, 108-8477)

**Salad Science (Endowed Laboratory), Office of Liaison and Cooperative Research, Tokyo University
of Marine Science and Technology
(4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo, 108-8477)

Summary

The effects of n-Decane (DCA) and n-Octane (OCT) on the crystallization of n-Hexadecane (HD) were investigated to systematically assess the effect of lipid component interactions on lipid supercooling. We plotted the crystal nucleation temperature against the equilibrium freezing point for the HD-DCA and HD-OCT systems and found a first-order correlation. However, slope evaluation revealed that HD did not supercool as much as the aqueous solution system. n-Alkanes are nonpolar and form weaker molecular interactions than aqueous solutions, possibly contributing to their low supercooling temperature. Supercooling progressed more in the HD-DCA than in the HD-OCT system, demonstrating that the degree of supercooling is dependent on the lipid component interactions.

Keywords: Lipid, Freezing, Crystallization, Emulsion, Freezing point, Supercooling