

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500930

研究課題名(和文)食品に有用なナノサイズエマルションの省エネな調製のための基礎研究

研究課題名(英文)Preparation of food nano-emulsion by low-energy method

研究代表者

合谷 祥一 (Gohtani, Shoichi)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：00153742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ポリグリセリン脂肪酸エステルとポリグリセリン縮合リシノール酸エステルの混合系を乳化剤とし、水、乳化剤、食用油の状態図を作成して、混合状態と滴下法による省エネルギーな乳化法によって作成したエマルションの粒径の関係を調べた。ポリグリセリン脂肪酸エステルとポリグリセリン縮合リシノール酸エステルを混合することにより、ポリグリセリン脂肪酸エステル単独の場合よりも、水と乳化剤と油が均一に混合した状態(L3)が大きく広がることが分かった。L3あるいはこれに液晶が混合した状態から乳化すると、平均粒径が50nm以下の、微細な、O/Wナノエマルションが調製されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It is investigated that the relationship between the phase behavior of vegetable oil/mixture of polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and polyglycerol fatty acid ester/water systems and the emulsification in this system by low-energy method. Phase diagrams were constructed to elucidate the optimal process for preparing the fine emulsions. In all the systems examined in this study, the phases, including the liquid crystal phase (Lc) and sponge phase (L3), spread widely in the phase diagrams. It was examined droplet-sized emulsions prepared from each phase and found that an o/w nano-emulsion with droplet size as small as 50 nm were formed by emulsifying either from a single L3 phase or a two-phase region, Lc + L3. These results indicate that a sponge phase L3 or liquid crystal phase Lc or both is necessary to form an o/w nano-emulsion whose average droplet diameter is less than 50 nm for PGPR and polyglycerol fatty acid ester mixtures used as surfactant using low-energy method.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ナノエマルション 省エネな乳化 相図 小角X線散乱 スポンジ相 液晶 ラメラ

1. 研究開始当初の背景

乳化に関する研究では安定なエマルジョンの調製とともに、微細な、小さな粒径の液滴から構成されているエマルジョンをいかに調製するかが、常に重要なテーマであり、特に、粒径がナノサイズのエマルジョンが注目されている。粒径の小さなエマルジョンの利点を以下に示す。

1) 液滴径が500nm以下になると分離せず、保存性が向上するため、ドレッシングのようにエマルジョンそのものを利用するときや、エマルジョン系を利用した均一な反応において有用となる。

2) 油滴が小さいエマルジョンの方が、大きいエマルジョンより脂っこさを感じにくい

3) 粒径100nm以下では低粘度で透明性が增大し、高い水和性を有し化粧品や医薬品のクリームとしてなめらかで、操作性がよい。

4) さらに、体内への吸収性の向上、有効な機能性成分を体内のあらゆる場所に運ぶ機能を有するなど、ドラッグデリバリーシステムとしても有用である。

2. 研究の目的

微細な油滴を含むエマルジョンの調製法として通常用いられる、高圧ホモジナイザーやコロイドミル及び超音波乳化機などは、今回の方法と比べると多くのエネルギーを必要とする。例えば、実験室レベルの高圧ホモジナイザーでは、200mLのエマルジョンを得るために、 $1.0\sim 2.0 \times 10^6$ ジュールのエネルギーが必要であり、投入したエネルギーの多くは熱として無駄になっている。一方、今回の界面科学的乳化法では、 $1.0\sim 2.0 \times 10^4$ ジュールのエネルギーで十分であり、非常に省エネな方法である。

また、一般的な乳化の研究では、乳化剤としてTween系などの乳化力が強い種類を用い、油相としてヘキサデカンのような無機油や中鎖脂肪酸のトリグリセライド(MCT)など、比較的乳化しやすい系で、モデル的に行われることが多い。しかし、日本で一般に食品で使用される乳化剤は、乳化力が低い。油は通常の植物油であり、MCTより乳化しにくいことがよく知られている。従ってモデル系でナノサイズのエマルジョンが得られても、実際の応用には有効でない場合が多い。

そこで本研究では、食品用乳化剤と食用油を用い、省エネな方法でナノサイズのエマルジョン(ナノエマルジョン)を調製するための基礎研究として、水、食品用乳化剤、食用油の系で三成分の相図を作成し、この状態図をもとに省エネな方法(滴下法)で乳化し、乳化時にどのような状態を通過するとナノエマルジョンが形成されるか調べることが目的とした。

3. 研究の方法

供試材料

乳化剤は阪本薬品工業(株)のヘキサグリセリンラウリン酸エステル、デカグリセリンラウリン酸エステル、テトラグリセリンラウ

リン酸エステル、デカグリセリンモノミリスチン酸エステル、デカグリセリンモノカプリン酸エステル、デカグリセリンモノカプリル酸エステル、ポリグリセリン縮合リシノール酸エステル及びテトラグリセリン縮合リシノール酸エステルを、何れも特に精製せず使用した。

食用油は日清オイリオ(株)せい、サラダ油を特に精製せず使用した。

水は、E-pure system (Dubuque, USA)で精製した超純水を用いた。

相図の作成

乳化剤、水、食用油を任意の割合でサンプル管瓶に計り取り、加熱攪拌の後、25℃で静置した。試料の状態は偏光板の間に試料を置いて透過光の状態を肉眼で観察する方法、偏光顕微鏡(オリンパス(株)、BH-2)による観察および高速2次元X線検出器であるPILATUSを備えたNANO-Viewer((株)リガク製)を用いた小角エックス線散乱法によって決定し、相図を作成した。

乳化

任意の割合で乳化剤、水、食用油を混合し、この混合物3gに対して水を7g滴下して加えながら300rpmの速度で攪拌し、エマルジョンを得た。得られたエマルジョンの液滴の粒径は動的光散乱測定装置(大塚電子、FPAR-1000)を用いて測定した。

4. 研究成果

テトラグリセリンモノラウリン酸エステル(TGML)とポリグリセリン縮合リシノール酸エステル(PGPR)=1:1混合乳化剤(TLP)、水、食用油、デカグリセリンモノラウリン酸エステル(DGML)とポリグリセリン縮合リシノール酸エステル(PGPR)=1:1混合乳化剤(DLP)、水、ヘキサグリセリンモノラウリン酸エステル(HGML)とポリグリセリン縮合リシノール酸エステル(PGPR)=1:1混合乳化剤(HLP)、水、食用油、及びデカグリセリンモノラウリン酸エステル(DGML)とポリグリセリン縮合リシノール酸エステル(PGPR)=1:1混合乳化剤(DLP)、水、食用油系について、相図を作成し、乳化を試みた。その結果、TLP、水、食用油系では、ともに乳化しなかったが、HLP、水、食用油系及びDLP、水、食用油系では、乳化過程にスポンジ相を通過するとナノエマルジョンが調製され、特に、DLP、水、食用油系において、最も小さい場合、20nmほどの平均粒径を有するナノエマルジョンが調製されることが分かった。

次に、縮合リシノール酸エステルのグリセリン重合度の影響を調べるため、テトラグリセリン縮合リシノール酸エステル(CRT)とデカグリセリンラウリン酸エステル(DGML)、ヘキサグリセリンラウリン酸エステル(HGML)及びテトラグリセリンラウリン酸エステル(TGML)の1:1混合系において、混合乳化剤/水/食用油の比率を変えて、相図を作成した。

さらに、状態図を用いて、乳化し、得られたエマルションの粒径を測定し、微細なエマルションが得られるかどうか検討した。

その結果、CRT:DGML=1:1 混合系では相状態が、PGPR:DGML=1:1 混合系よりも複雑で、明確なラメラやスポンジ(L3)状態の確認はできなかった。一方、CRT:TGML=1:1 の混合系乳化剤による相図よりも CRT:HGML=1:1 の混合系乳化剤による相図の方が LC 相が広がり、虹色 LC や流動 LC など多くの種類の LC が観察された。これは、CRT:TGML=1:1 が親油性乳化剤 2 つの混合系であるのに対し、CRT:HGML=1:1 は親水性乳化剤と親油性乳化剤の混合系であるためと考えられた。X 線散乱測定を行った結果、CRT:HGML=1:1/水/食用油系では目視及び偏光板示唆装置でスポンジ(L3)相と判断していた相図の左上領域は、ラメラ構造とその他の構造が混合した状態であった。CRT:TGML=1:1/水/食用油系ではラメラ構造が主に見られた。CRT:HGML=1:1 混合系の乳化では O/W エマルションが生じ、CRT:TGML=1:1 混合系の乳化では、乳化剤の比率が低い場合には O/W エマルションが、乳化剤の比率が高い場合には W/O エマルションが生じた。CR-310:HGML=1:1 系では、乳化過程の初めにラメラ構造を経由した場合エマルションが大きくなり、L3 相を経由しない方が微細なエマルションが生じる傾向がみられた。

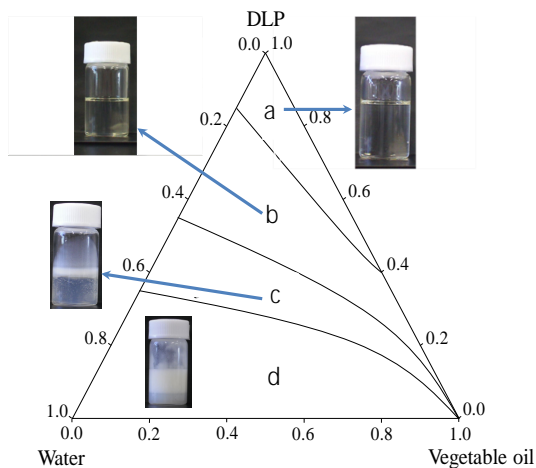


図1 水/DLP/食用油系の相図と状態

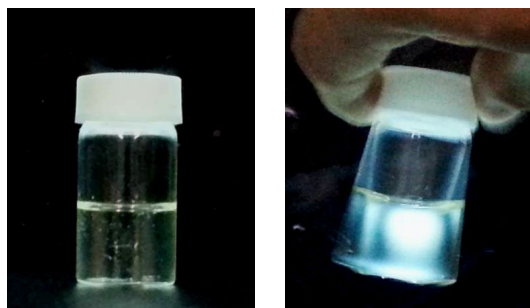


図2 静置状態(左)及び流動状態(右)における領域aの偏光写真

最終年度は、これまでの検討でナノエマルションが調製できた DGML-PGPR 混合系(DLP)、HGML-POP R 混合系(HLP)及び、脂肪酸鎖の影響を調べるため、デカグリセリンミリスチン酸エステル(DGMM)-PGPR 混合系(DMP)、水、油系について、より詳細に相図を作成し、ナノエマルション調製との関係を調べた。

図1に水/DLP/食用油系の相図と、それぞれの領域の典型的な試料の写真を示した。図1のaの領域は1相で光学的に等方性(偏光下で水と同様に像が観察できない)であった。領域bは光学的等方性と液晶からなる2相であった。cは水と油に液晶が混じった3相領域であり、領域dは水と油の2相領域であった。

a 領域は図2左に示したように、偏光下で静置状態では光学的に等方性であったが、図2右のように流動状態では光学的に異方性と成り、流動複屈折性を有することが分かった。さらに小角エックス線測定によりブロードな散乱曲線を示した(図3)。これらの結果及び偏光顕微鏡観察から、a 領域はスポンジ相であると判断された[1, 2]。

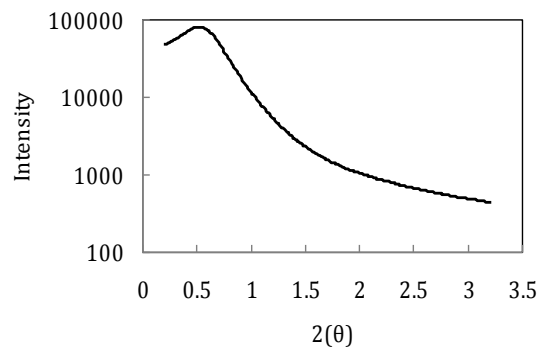


図3 領域aの小角X線散乱曲線

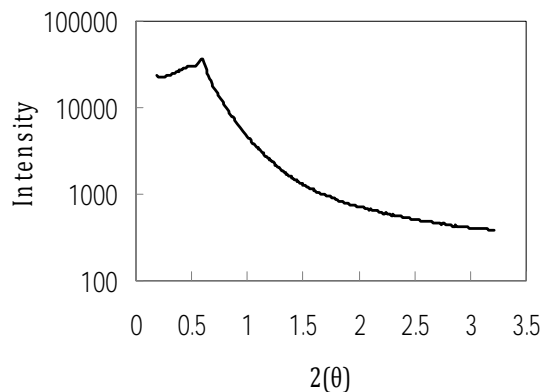


図4 領域bの小角X線散乱曲線

一方、領域bの小角X線散乱曲線は、ブロードなピークとわずかに鋭いピークが重なっていた(図4)。

また、偏光顕微鏡写真において明らかな偏光像が観察され、この領域はスポンジと液晶の2相領域であると判断された。小角X線散乱曲線では、液晶由来の鋭いピークが1本しか観察されず、液晶の型は判定できなかったが、偏光画像などから、ラメラ液晶ではないかと推測している。

これらの結果や偏光観察などから、水/DLP/食用油の相図(図1)においてaはスポンジ相、bはスポンジ相+液晶相、cは水相+油相+液晶相、dは水相+油相(エマルション)と判断できた。

図5に水/HLP/食用油系の相図と、それぞれの領域の典型的な試料の写真を示した。

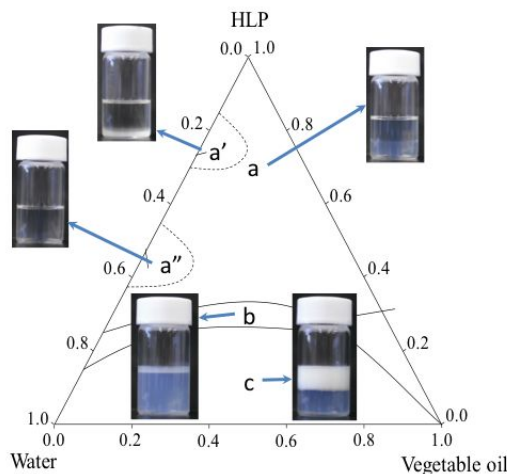


図5 水/HLP/食用油系の相図と状態

DLP系と異なり、HLP系では2相領域が大きく広がった。図5中のa、a'及びa''である。bは3相、cは2相領域であった。aの2相領域は光学的に等方性な部分と異方性を有する部分から形成された。a、a'及びa''の小角エックス線散乱曲線をそれぞれ、図6、7及び8に示した。

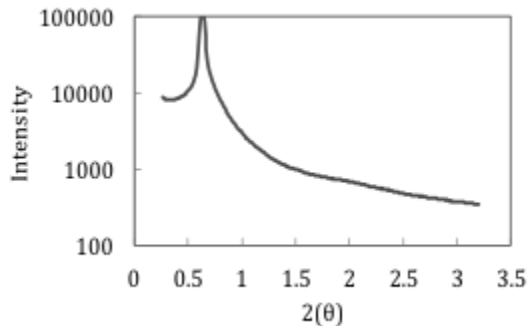


図6 図5中a領域の小角X線散乱曲線

図6のa領域の小角X線散乱は一本のピークとブロードな曲線が重なっていた。図4と同様に、ピークが1本しか観察できず、液晶の同定は出来なかったが、スポンジ相と液晶相から形成される領域と判断できた。図7及

び8では、ブロードな曲線とそれぞれ2本の鋭いピークが重なって観察された。

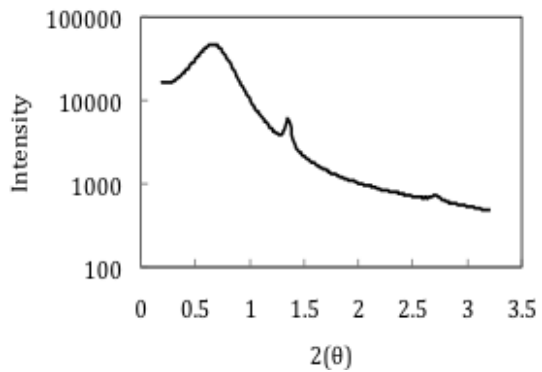


図7 図5中a'領域の小角X線散乱曲線

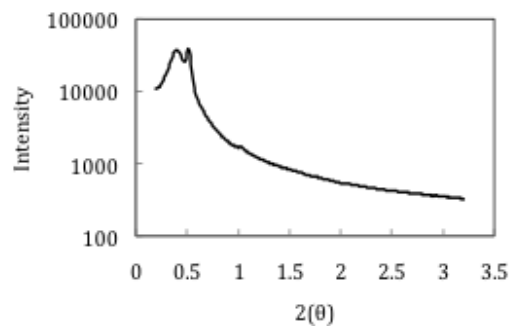


図8 図5中a''領域の小角X線散乱曲線

下記の Bragg の式を用い、2本の鋭いピークの内的小角側のピークの面間隔(d)を算出したところ、a'では6.53nm、a''では17.3nmであった。

$$d = \lambda / 2 \sin \theta \quad \text{Braggの式}$$

この式で測定に用いたX線の波長、は散乱ピークの角度である。それぞれ、第2ピークの面間隔と比較し、どちらも、第1ピークから算出された面間隔と第2ピークから算出された面間隔の比が、1:0.5であったことから、この領域の液晶はどちらもラメラ構造であることが分かった。

A'領域よりa''領域の面間隔が広いのは、a''領域の方が水の含有率が高く、ラメラ構造の親水基に挟まれた部分に水分子が入り込み、この部分の間隔が広がったためと考えられた。

小角X線散乱曲線の結果及び偏光顕微鏡観察などの結果から、水/HLP/食用油の相図(図5)においてaはスポンジ相+液晶相、bは水相+油相+液晶相、dは水相+油相(エマルション)と判断できた。

水/DMP/食用油系についてもこれまでと同様に相の状態を観察し、図9に示したような相図を得ることが出来た。aは1相、bは2相、cが3相、dは2相領域であった。領域aは光学的に等方性であり、小角X線散乱曲線などから、スポンジ相と判断できた。同様に、bはスポンジ相+液晶相、cは水相+油相+液晶相、dは水相+油相(エマルシ

オン)と判断された。

相図の全体の傾向はDLP系と似ており、DLP系でラメラ液晶の面間隔が主に水の影響を受けたことも考え合わせると、脂肪酸の長さが大きく異ならない限り、水/乳化剤/食用油系の相図は乳化剤の親水基の影響を大きく受けると予想された。

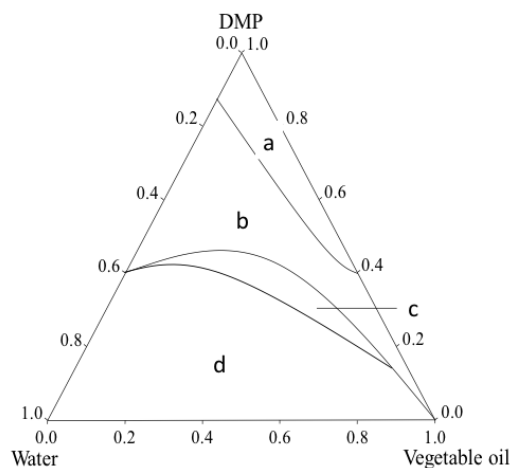


図9 水/DMP/食用油系の相図

表1 乳化前の混合物の状態と乳化後の平均粒径の関係

系	O ^{a)}	S ^{b)}	W ^{c)}	Phase ^{d)}	Size(nm) ^{e)}
DLP系	0.1	0.6	0.3	L ₃ +Lc	31.0
	0.1	0.55	0.35	L ₃ +Lc	29.9
	0.1	0.5	0.4	L ₃ +Wm+O	198.6
	0.4	0.55	0.05	L ₃	102.3
	0.4	0.5	0.1	Lc+L ₃	114.4
	0.4	0.3	0.2	L ₃ +Wm+O	Um ^{f)}
HLP系	0.1	0.8	0.1	L ₃ +Lc	32.2
	0.1	0.7	0.2	L ₃ +La	17.8
	0.1	0.3	0.6	L ₃ +Lc	29.9
	0.1	0.2	0.7	Wm+O	892.7
	0.4	0.4	0.2	L ₃ +Lc	78.5
	0.4	0.3	0.3	L ₃ +Wm+O	257.9
DMP系	0.1	0.8	0.1	L ₃	40.5
	0.1	0.45	0.45	L ₃ +Lc	41.7
	0.1	0.4	0.5	L ₃ +Wm+O	1244.6
	0.4	0.55	0.05	L ₃	Um
	0.4	0.45	0.15	L ₃ +Lc	126
	0.4	0.4	0.2	L ₃ +Wm+O	Um

a)油、b)乳化剤、c)水、d)相の状態、e)平均粒径、f) Um:乳化せず

乳化前の水/乳化剤/食用油の混合物の組成と状態及び乳化後の平均粒径の関係について表1にまとめた。

DLP

系の油を0.1の比率で含む場合、乳化前の混合物の相状態がスポンジ相(L₃)あるいはスポンジ相+液晶相(L₃+La)の場合、平均粒径は約30nmであり、ほとんど透明であった。乳化前の混合物の相状態がスポンジ相+水相+油相あるいは水相+油相の場合、平均粒径は約200nmかそれ以上になった。乳化剤と水の割合から、乳換えの混合物の組成の変化が僅かであっても、平均粒径が大きく異なることが分かる。油を0.4含む場合においても、油含量が高いにもかかわらず、乳化前の混合物の状態がスポンジ相かスポンジ相+液晶相であれば平均粒径は100~130nmを示し、ナノエマルションが調製出来る。一方、混合物の状態がスポンジ相+水相+油相の3相系になると、乳化できなかった。

HLP系の油を0.1の比率で含む場合、乳化前の混合物の相状態がスポンジ相+液晶相(L₃+LaあるいはL₃+La)の場合、平均粒径は約30nm以下であり、透明なエマルションを形成した。一方、乳化前の混合物の相状態が水相+油相の場合、平均粒径は800nm以上になった。DLP系と同様に、乳化剤と水の割合から、乳換えの混合物の組成の変化が僅かであっても、平均粒径が大きく異なることが分かる。油を0.4含む場合においても、油含量が高いにもかかわらず、乳化前の混合物の状態がスポンジ相+液晶相であれば平均粒径は約80nmを示し、ナノエマルションが調製出来た。一方、混合物の状態がスポンジ相+水相+油相の3相系になると、平均粒径は大きくなった。

DMP系の油を0.1の比率で含む場合、乳化前の混合物の相状態がスポンジ相かスポンジ相+液晶相(L₃+La)の場合、平均粒径は約40nmであり、濁ったエマルションを形成した。一方、乳化前の混合物の相状態がスポンジ相+水相+油相の場合、平均粒径は1000nm以上になった。DLP及びHLP系と同様に、乳化剤と水の割合から、乳換えの混合物の組成の変化が僅かであっても、平均粒径が大きく異なることが分かる。油を0.4含む場合は、DLP系及びHLP系と少し異なり、乳化前の状態がスポンジ相の場合でも乳化できない場合があった。これについては、スポンジ相状態であっても水の含有率が低く(0.05)水が連続相を形成できにくいのではないかと原因ではないかと推測している。

今回の科研費による研究について全体として考察すると、PGPRとポリグリセリン脂肪酸エステルを乳化剤として用いた場合には、スポンジ相あるいはスポンジ相と液晶その形成が平均粒径50nm以下のO/Wナノエマルションの生成に

必要であることが分かった。本研究の成果は、日本の食品工業会の発展に大きなインパクトを与えることが予想される。

[1] Hill, R.M. *et al.*, *Langmuir*, 15, 2278(1999)

[2] Maldonado, A. *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 308, 485(2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Satoshi Wakisaka, Masami Nakanishi and Shoichi Gohtani, Phase Behavior and Formation of O/W Nano-Emulsion in Vegetable Oil/Mixture of Polyglycerol Polyricinoleate and Polyglycerin Fatty Avid Ester/water Systems, *J. Oleo Sci.*, 査読有り, 63, 229-237(2014)

Doi:10.5650/jos.ess13139

〔学会発表〕(計3件)

1 : Gohtani, S., Wakisaka, S. , Preparation of o/w nano-emulsion in mixture surfactant system by low energy method, 2nd Finnish-Japanese Symposium, Nano-emulsion and encapsulation for delivering functionality in foods, 34-37, 17th, September, 2013, Takamatsu

2 : 脇坂聡, 合谷祥一, PGPR を用いた O/W ナノエマルションの調製に関する研究, 日本食品科学工学会第 60 回記念大会 講演要旨集, 102, 2013 年 8 月 30 日, 実践女子大学, 日野

3 : 合谷祥一, 中西雅美, 池田新矢, 脇坂聡, 食品用乳化剤/水/食用油系におけるナノエマルションの調製, 日本食品科学工学会第 59 回大会, 講演要旨集, 135, 2012 年 8 月 30 日, 藤女子大学, 札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

合谷 祥一 (GOHTANI, Shoichi)

香川大学・農学部・教授

研究者番号 : 00153742

(4) 研究協力者

脇坂 聡 (WAKISAKA, Satoshi)

愛媛大学連合農学研究科博士後期課程
大学院生

グリコ栄養食品株式会社、開発課