

マイクロチャネルを利用したダブルエマルジョンの製造過程に及ぼす食塩の添加効果

黒岩 崇

東京都市大学工学部

概要 液体中に分散した液滴(水滴または油滴)内に、さらに微細な液滴が分散した多重構造の乳化懸濁液はダブルエマルジョンとよばれる。中でも、水中に分散した油滴内に微細な水滴が分散した **water-in-oil-in-water** 型(W/O/W)のダブルエマルジョンは、乳化食品中の油使用量を低減し、さらに内部水滴に水溶性の栄養機能成分を封入できることから、高機能な食品素材として応用が期待されている。実際の乳化食品では、数%程度の食塩が添加されることが多いが、ダブルエマルジョンの製造工程における食塩の添加効果については不明な点が多い。そこで本研究では、マイクロメートルサイズの微小流路を用いた「マイクロチャネル乳化法」を用いて、個々の液滴の形成過程を可視化しながら、ダブルエマルジョンの製造工程に及ぼす食塩(NaCl)の添加効果を調べた。

水溶性蛍光分子であるカルセインを溶解した水溶液と、油溶性乳化剤としてリン脂質を中心とする脂質混合物を溶解した有機溶媒を混合し、超音波処理により **water-in-oil** (W/O) エマルジョンを作製した。この W/O エマルジョンを分散相とし、乳化剤としてカゼインナトリウムを溶解した水溶液を連続相として、マイクロチャネル乳化法により W/O/W エマルジョンを作製した。この時、上記の両水溶液に種々の濃度の NaCl を添加して実験を行った。ダブルエマルジョン液滴の形成挙動は顕微ビデオシステムを用いた乳化部の直接観察により評価した。回収したダブルエマルジョン液滴へのカルセインの内包率は蛍光強度測定により求めた。

乳化剤としてカゼインナトリウムを用いてマイクロチャネル乳化法によりダブルエマルジョンの作製を試みた結果、0～0.5 M の NaCl 濃度範囲でダブルエマルジョンを作製できた。乳化挙動に対する NaCl 濃度の影響を調べた結果、NaCl 濃度の増加に伴い、ブレイクスルー圧(分散相がマイクロチャネルを通過するのに必要な圧力)の減少、平均液滴径の増大、および液滴径分布の均一化が認められた。界面張力の測定およびハイスピード撮影による液滴形成過程の解析の結果、NaCl を添加することで分散相-連続相間の界面張力が低下しマイクロチャネル出口近傍で分散相が分断されにくくなっている状況が示唆された。また、NaCl 添加の有無に関わらず、ダブルエマルジョン液滴へのカルセインの内包率は80%～90%程度の高い値が得られ、マイクロチャネルの利用により、水溶性成分を内包したダブルエマルジョンを様々な NaCl 濃度で作製できることが明らかとなった。

1. 研究目的

「ダブルエマルジョン」(Fig. 1)は、液体中に分散した液滴(水滴または油滴)内に、さらに微細な液滴が分散した多重液滴構造の乳化懸濁液である。中でも、水中に分散した油滴内に微細な水滴が分散した **water-in-oil-in-water** 型(W/O/W)のダブルエマルジョンは、マヨネーズやクリームなどの乳化食品中の油使用量を低減し、さらに内部水滴に水溶性の栄養機能成分を封入できるため、消費者の

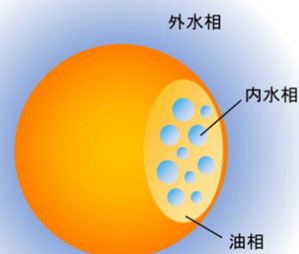


Fig. 1. ダブルエマルジョンの模式図

健康志向の高まりにマッチした高機能な食品素材として注目が集まっている。ところが、もともと非平衡系であるエマルションが二重になっているダブルエマルションは、その構造の複雑さから通常のエマルションよりも不安定化のリスクが高く、品質に関わる諸問題をクリアできずに製品化に到らない例も多い。

一般の乳化食品中には、塩味の付与や保存性の向上を目的として数%程度の食塩が添加される。ダブルエマルションの製造過程における食塩の添加は、浸透圧、界面張力、および乳タンパク類の構造などを変化させるため、乳化・分散挙動に顕著な影響を及ぼすと考えられる。しかし、「ダブルエマルションの製造過程と品質」という観点で、乳化工程における液滴形成に対する食塩の添加効果を詳細に調べた研究は見当たらない。

本研究の目的は、マイクロメートルサイズの微小流路である「マイクロチャンネル(MC)」を用いた乳化法(MC 乳化法^{1, 2)})によるダブルエマルションの製造過程における食塩の添加効果を詳細に調べることを通じて、ダブルエマルションの効率的製造およびより高度な乳化食品設計に資する知見を得ることである。MC 乳化を利用した検討を行うことで、(i) 1つひとつの液滴形成挙動をリアルタイムあるいは高時間分解能で観察可能なため、乳化プロセスに対する諸因子の影響を可視化できる、(ii) 条件検討により液滴径の均一性の高いエマルションを作製できるため、製造後の品質評価の面でも液滴のサイズや形状の変化及びその要因を追跡しやすい、等のメリットが期待できる。

2. 研究方法

2.1 試薬類

卵黄ホスファチジルコリン(純度99%以上)はフナコシ株式会社から購入した。コレステロール、オレイン酸、ヘキサン、カゼインナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(Tween 80)、塩化ナトリウムおよびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)は和光純薬工業株式会社から購入した。カルセインおよび塩化コバルトはそれぞれSigma-Aldrich Co. Ltd. および関東化学株式会社から購入した。いずれの試薬も購入後の精製等を行わずそのまま使用した。

2.2 MC 乳化法によるダブルエマルションの作製

まず、水溶性の蛍光マーカーとしてカルセイン(0.4 mM)を含む Tris-塩酸緩衝液(W_1 溶液)を分散相、卵黄ホスファチジルコリン、コレステロールおよびオレイン酸各 26 mMを含むヘキサン(O 溶液)を連続相とし、両者を1:3の体積比で混合して超音波バス(US-5, 株式会社エスエヌディ)または超音波分散機(US-150, 株式会社日本精機製作所)を用いて超音波処理を行い油中水滴型の W_1/O エマルションを得た。続いてこの W_1/O エマルションを分散相、種々の乳化剤を含む Tris-塩酸緩衝液(W_2 溶液)を連続相として MC 乳化を行いダブルエマルション($W_1/O/W_2$ エマルション)を作製した。MC 乳化装置の概略を Fig. 2 に示す。MC 基板³⁾としてはチャンネル幅 16 mm、テラス長 57 mm およびチャンネル深さ 11 mm のシリコン製デッドエン

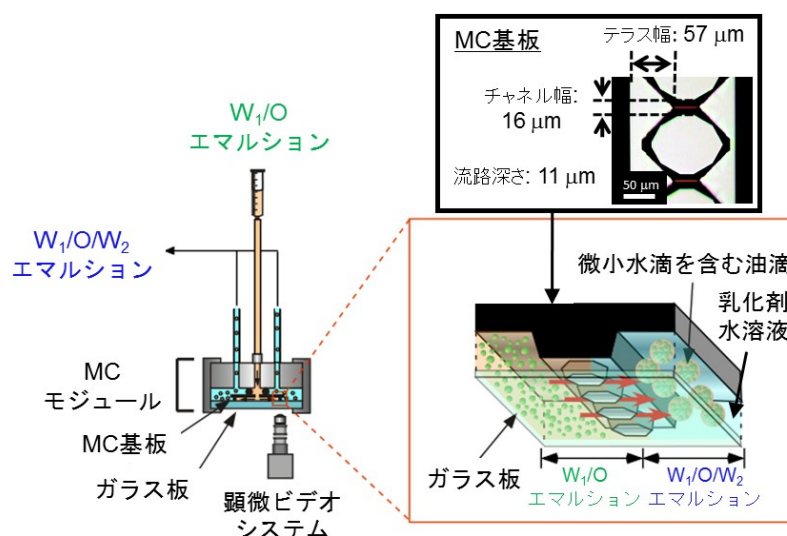


Fig. 2. MC 乳化装置の概略図

ド型基板 (MS2A 型, 株式会社イーピーテック) を使用した。MC 基板にガラス板を圧着させ微小流路である MC を形成し、この MC を介して水頭差圧により分散相を連続相に圧入することでダブルエマルジョンを得た。

2.3 分析評価

ダブルエマルジョンの作製過程は顕微ビデオシステム (株式会社イーピーテック) を用いて撮影し、得られた画像および動画から、液滴径および液滴形成プロセスの分析を行った。乳化画像の通常撮影およびハイスピード撮影には、CCDカメラ (WAT-231S2, ワテック株式会社) およびデジタルカメラ (Nikon 1 J1, 株式会社ニコン) をそれぞれ用いた。

W_1/O エマルジョンの液滴径はレーザー回折式粒度分布測定装置 (SALD-200V ER, 株式会社島津製作所) または動的光散乱装置 (ゼータサイザー ナノ ZS, Malvern Instruments, Ltd.) を用いて測定した。

使用した各溶液の密度はピクノメーターを用いて測定した。各溶液間の界面張力は自動接触角計・界面張力計 (DM-301, 協和界面科学株式会社) を用いたペンダントドロップ法により測定した。

ダブルエマルジョンの液滴内へのカルセインの内包率は、「ダブルエマルジョン中の全カルセイン量に対する内部水滴に内包されたカルセイン量のパーセンテージ」と定義し、塩化コバルトを使用した蛍光消光法⁴⁾により、分光蛍光光度計 (RF-5300PC, 株式会社島津製作所) を使用して測定した。

3. 研究結果

3.1 MC 乳化によるダブルエマルジョンの作製

超音波バスを使用して2.2の手順により作製した W_1/O エマルジョン (平均水滴径 1.7 μm) を分散相として MC 乳化によるダブルエマルジョン ($W_1/O/W_2$ エマルジョン) の作製を試みた。カゼインナトリウムおよび NaCl の添加の有無がダブルエマルジョンの形成挙動に及ぼす影響を Fig. 3 に示す。連続相中にカゼインナトリウムおよび NaCl のいずれも添加しない場合 (Fig. 3 左上)、分散相供給圧 6.5 kPa 以上で分散相が MC を通過し、液滴の形成が認められた。このとき、分散相が MC を通過する様子は断続的で、ごく一部の MC から不規則なタイミングで液滴が形成した。連続相中に 3 wt% のカゼインナトリウムを添加した場合 (Fig. 3 右上)、分散相供給圧 4.3 kPa 以上で分散相が MC を通過し、カゼインナトリウム無添加の場合と比較してより多くの MC で高頻度に液滴形成が認められた。さらに、連続相中に 3 wt% のカゼインナトリウムおよび 0.5 M の NaCl を添加した場合 (Fig. 3 右下)、より低い圧力 (2.8 kPa 以上) で分散相が MC を通過しはじめ、多くの MC から滑らかに規則的な液滴形成が認められた。一方、連続相中にカゼインナトリウムを添加せず、0.5 M の NaCl のみを添加した場合 (Fig. 3 左下)、わずか 0.7 kPa 程度の分散相供給圧でも分散相が連続相中に連続的に流出し液滴が形成せず、この条件ではダブルエマルジョンが作製できないことがわかった。分散相が MC を通過し始めるのに必要な圧

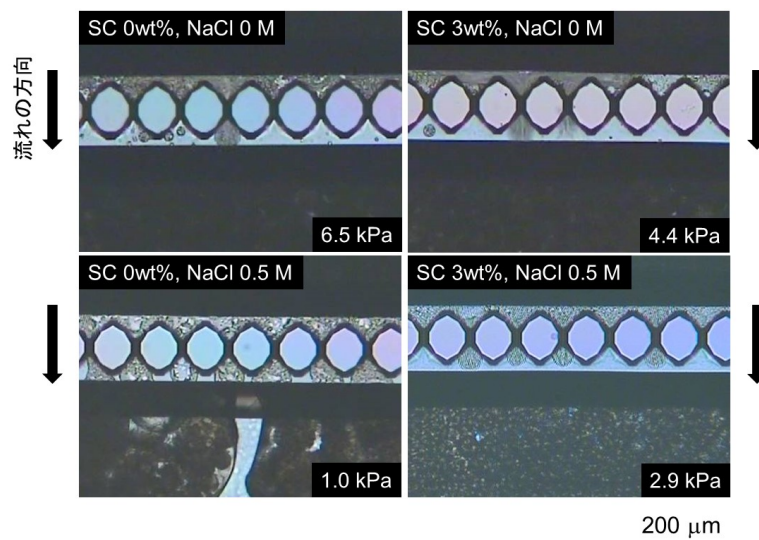


Fig. 3. MC 乳化によるダブルエマルジョン形成に対する乳化剤および NaCl の添加効果

力(ブレイクスルー圧^{5, 6)})に対するカゼインナトリウムおよびNaCl添加の影響を Fig. 4 に示す。カゼインナトリウム濃度 0 および 3 wt% のいずれの場合においても、NaCl 濃度の増加によりブレイクスルー圧が低下し、特にカゼインナトリウム無添加の場合にその影響が顕著であった。

上記の検討において液滴形成が可能であった3つの条件で MC 乳化を行った後、回収したそれぞれのダブルエマルジョンの顕微鏡画像と液滴径分布を Fig. 5 に示す。

連続相中にカゼインナトリウムおよび NaCl のいずれも添加しない場合 (Fig. 5 上段)、平均液滴径は 35.3 μm、液滴径のばらつきを表す変動係数 (coefficient of variation: CV, 平均液滴径に対する液滴径の標準偏差のパーセンテージで定義される) の値は 28% であり、得られた液滴の大きさは不均一であった。連続相中に 3 wt% の

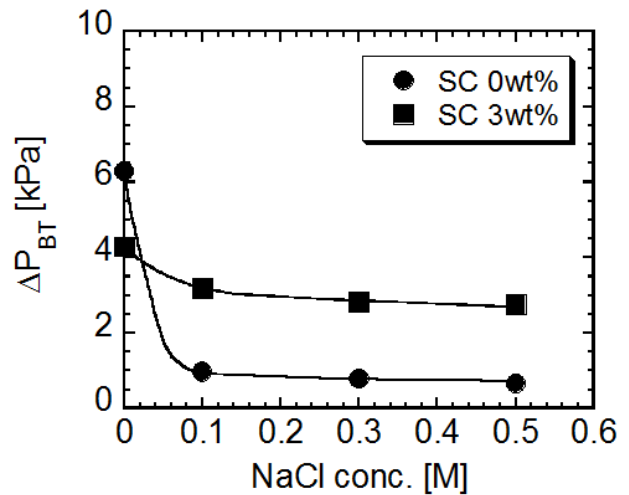


Fig. 4. MC 乳化時の「ブレイクスルー圧」に対するカゼインナトリウムおよび NaCl 添加の影響

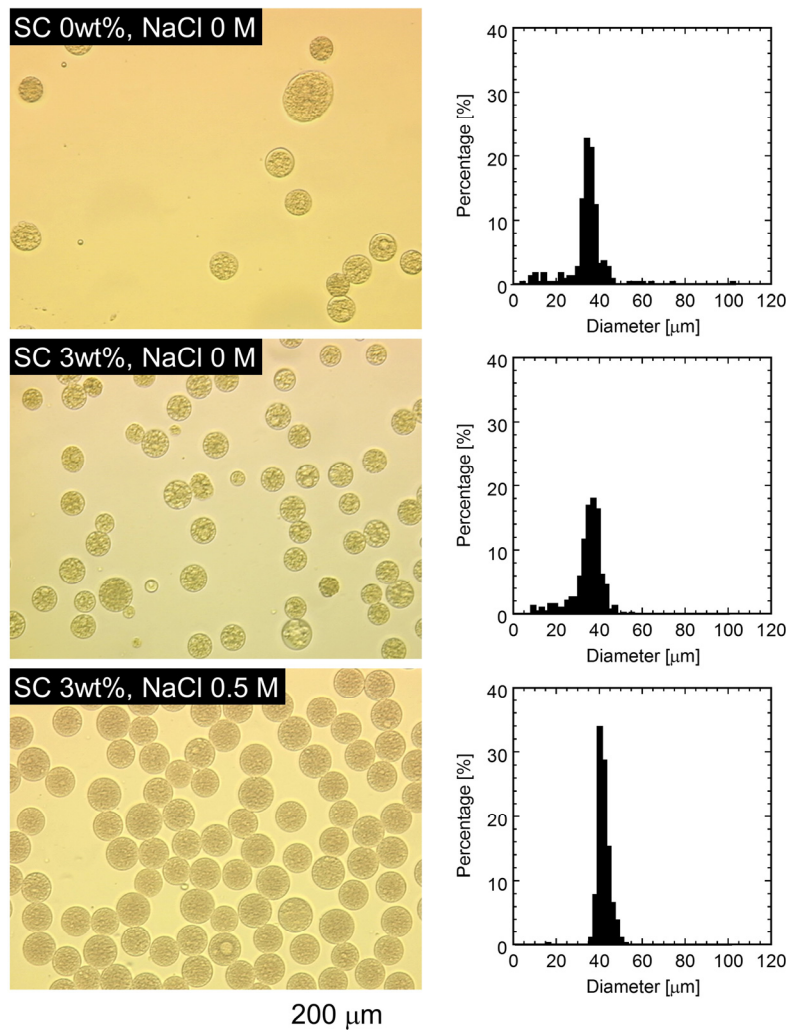


Fig. 5. ダブルエマルジョンの液滴径に対する乳化剤(カゼインナトリウム)および NaCl 濃度の影響。右のグラフは左の顕微鏡画像に示したダブルエマルジョンの液滴径分布を示す。

カゼインナトリウムを添加した場合 (Fig. 5 中段)、平均液滴径は 32.1 μm 、CV 値は 24%であった。連続相中に 3 wt%のカゼインナトリウムおよび 0.5 M の NaCl を添加した場合 (Fig. 5 下段)、平均液滴径は 41.6 μm 、CV 値は 10% であり、NaCl の添加により液滴径がやや増大し均一性の高いダブルエマルジョンが得られた。

Fig. 6 にダブルエマルジョンの平均液滴径および CV 値に対する NaCl 濃度の影響を示す。NaCl 濃度の増加に伴い、液滴径の増大および CV 値の低下 (= 液滴径の均一化) が認められた。

ここで、NaCl の添加がダブルエマルジョンの液滴径に及ぼす影響についてさらに詳しく検討するため、乳化剤としてカゼインナトリウムを添加して MC 乳化を行った際の MC 出口部 (液滴形成部) のハイスピード動画を撮影し、1 つひとつの液滴の形成挙動を詳細に調べた (**Fig. 7**)。

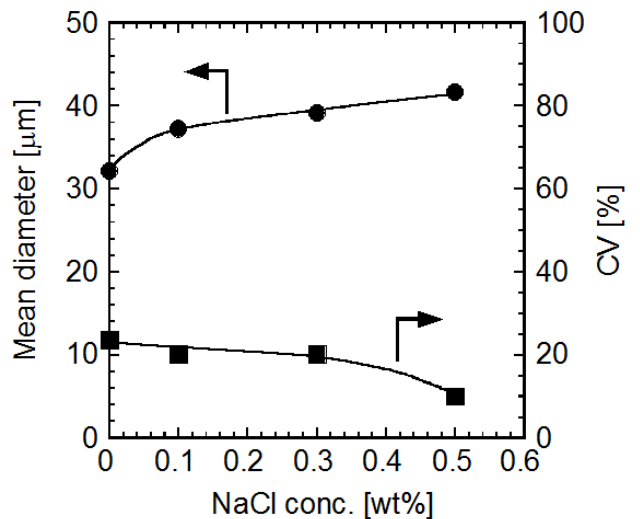


Fig. 6. 乳化剤としてカゼインナトリウム (3 wt%) を利用して作製したダブルエマルジョンの平均液滴径および変動係数 (CV) に対する NaCl 濃度の影響

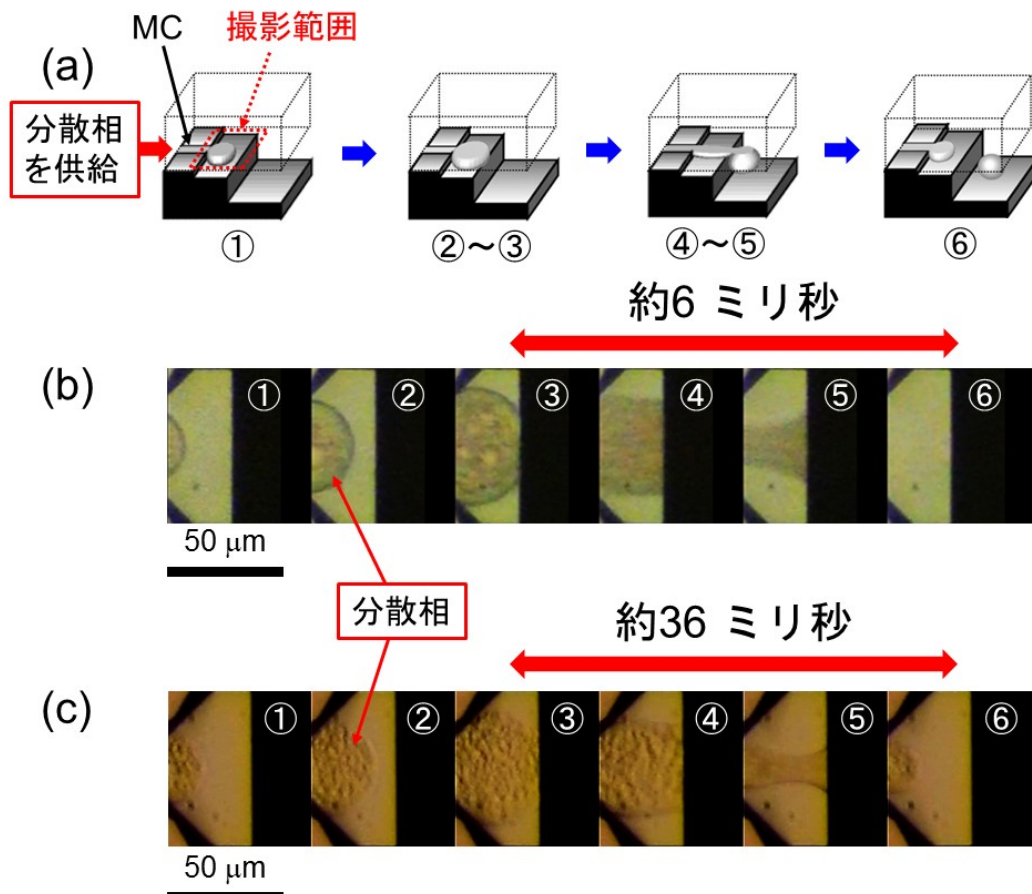


Fig. 7. ダブルエマルジョンの液滴形成挙動に対する NaCl 添加の影響。(a) は MC 出口部における液滴形成の模式図 (文献 3 より改変)、(b) および (c) はそれぞれ NaCl 濃度 0 および 0.5 M の場合の MC 出口部の顕微鏡画像 (ハイスピード撮影)。顕微鏡画像 (b) (c) 中の番号 ① ~ ⑥ は、模式図 (a) 中の ① ~ ⑥ のステップに対応している。乳化剤には 3 wt% のカゼインナトリウムを使用した。

なお、ここでは、超音波分散機を使用して作製した W_1/O エマルジョン(平均水滴径 0.19 μm)を分散相として MC 乳化を行った。MC 乳化では、MC 上流から供給された分散相が MC を通過して下流の連続相に流れ込む際、MC 出口の浅い部分(テラス部)で分散相が扁平に広がりながら流れ (Fig. 7(a) ①~③)、さらに下流の深い部分(井戸部)に流れ込む際に (Fig. 7(a) ④~⑤)、界面張力を駆動力として分散相が変形する過程で分散相が分断され液滴が形成する (Fig. 7(a) ⑥)メカニズムが明らかにされている³⁾。NaCl 添加の有無に関わらず、Fig. 7(a) に示した模式図に準じた液滴形成挙動が観察されたが、そのプロセスを詳細に調べたところ両者に違いが認められた。すなわち、分散相がテラスに差し掛かった後、変形しながら井戸部に流れ込み分断される過程の所要時間を比較した場合、NaCl を添加していない場合は約 6 ms であったのに対し、0.5 M の NaCl を添加した場合には約 36 ms であり、NaCl を添加することで分散相の変形・分断による液滴化過程におよそ 6 倍もの時間を要していることが明らかとなった。

3. 2 ダブルエマルジョンの内部水滴への水溶性成分の内包化

ダブルエマルジョンの内部水滴となる W_1 溶液に水溶性の蛍光色素であるカルセインを添加してダブルエマルジョンを作製し、内部水滴へのカルセインの内包率を調べた。Fig. 8 に示すように、ダブルエマルジョンの内部水滴から、カルセインに由来する緑色蛍光が観察され、外水相とのコントラストが明瞭であったことから、高い割合でカルセインが内部水滴に内包されていたことが確認された。蛍光強度測定により求めたカルセインの内包率は、塩濃度によらず 80~90%以上の高い値を示した (Fig. 9)。

4. 考 察

4. 1 MC 乳化によるダブルエマルジョンの形成挙動に対する NaCl の影響

MC 乳化では、微細な溝を加工したシリコン基板 (MC 基板) とガラス板を圧着させることにより形成される微小な流路を介して、分散相を連続相中に圧入することで、MC 下流部分において界面張力を駆動力として自発的に液滴が形成される³⁾。このとき、分散相が MC を通過するのに必要な圧力は「ブレイクスルー圧」と呼ばれ、毛管現象

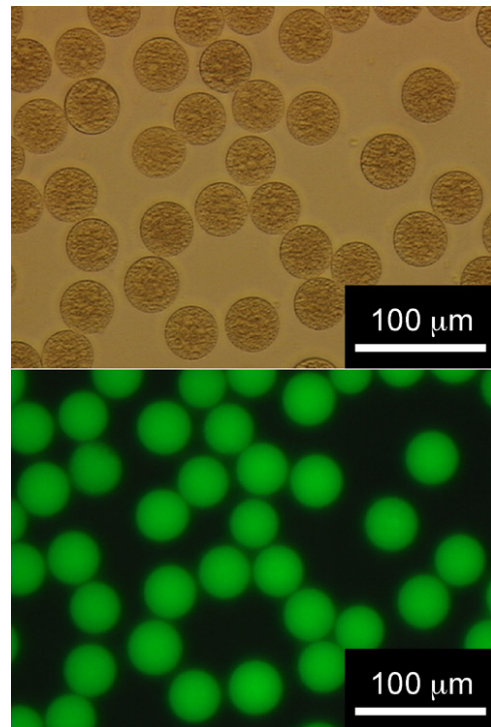


Fig. 8. 水溶性蛍光色素カルセインを内包したダブルエマルジョンの顕微鏡画像。カゼインナトリウム濃度 3 wt%、NaCl 濃度 0.5 M

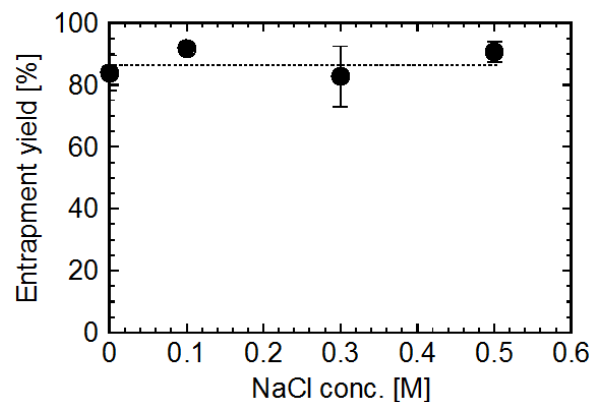


Fig. 9. ダブルエマルジョンへのカルセイン内包率に対する NaCl 濃度の影響。乳化剤には 3 wt% のカゼインナトリウムを使用した。プロットおよびエラーバーはそれぞれ平均値および標準偏差を表す (n=4)。

の理論に基づいて MC のサイズ、界面張力、接触角などのパラメーターが影響することが知られている⁷⁾。データは示していないが、本研究の実験系において、NaCl の添加が、分散相と連続相間の界面張力を顕著に低下させることを示す結果が得られている。したがって、Figs. 3 および 4 に示されるような、NaCl 添加によるブレイクスルー圧の変

化には界面張力が影響を及ぼしていると考えられる。NaCl の添加によりブレークスルー圧が低下し、より多くの MC から規則的に液滴が形成されることは、NaCl の添加により MC 乳化の生産性が向上することを示唆しており、MC 乳化の実用上興味深い結果といえる。

さらに、NaCl の添加により、ダブルエマルジョンの液滴径が変化し、その均一性が向上した結果 (Figs. 5 および 6) も、MC 乳化の応用面で重要である。NaCl の添加が液滴径に与える影響について詳しく調査するため、ハイスピード撮影を利用した液滴形成挙動の観察を行った (Fig. 7)。MC 乳化における液滴形成のメカニズムに関する報告³⁾によれば、MC を介して連続相中に入射した分散相がテラス部に差し掛かり (Fig. 7(a) ①~③)、続いて井戸部に流れ込む際 (Fig. 7(a) ④~⑤)、深さの異なる部分にまたがる分散相内にラプラス圧に基づく圧力差が生じ、そのため高压部 (テラス側) から低压部 (井戸部側) に向かって急速に分散相が移動し、これに上流からの分散相の流れが追従できずに分散相が分断され液滴化する (Fig. 7(a) ⑥) と考えられている。ラプラス圧差に基づく分散相の移動の駆動力は界面張力であるため、液滴化には界面張力が重要な役割を果たしている。乳化挙動のハイスピード解析の結果、NaCl 添加系では無添加系に比べて液滴の分断プロセスに 6 倍もの時間がかかっていた (Fig. 7(b) (c)) ことは、NaCl の添加により分散相-連続相間の界面張力が低下した結果として、分散相が「切れにくく」なったことを示しており、分散相が分断されるまでの間、より多くの分散相が井戸部に流入することで液滴径の増大をもたらしたものと考えられる (Fig. 6)。なお、界面張力が極端に低い条件では、カゼインナトリウムを添加せずに NaCl のみを添加した場合 (Fig. 3 左下) のように、MC 下流で液滴が形成せず連続流出したことから、適切な乳化剤の添加による界面物性の制御も重要であると考えられる。

4. 2 水溶性成分の内包率に対する NaCl の影響

Figs. 8 および 9 に示すように、本法により、水溶性のカルセインを高効率 (80~90%) でダブルエマルジョンに内包させることができた。ダブルエマルジョンの作製法としては、予め作製した W/O エマルジョンを、攪拌している外水相中に徐々に添加していく攪拌法が一般的であるが、作製時の攪拌による内部水滴の破壊や内外水相の接触等の要因⁸⁾により、必ずしも高い内包率を得ることは難しいと

されている。これに対し、MC 乳化では、外力を必要とせず界面張力に基づき自発的に液滴が形成されるメカニズムにより、液滴形成時の物理的ストレスを最小限に抑えることで、高い内包率が達成できたと推察される。0.5 M 程度の NaCl を添加した場合にも高い内包率を維持できていること、実際の食品にみられるような比較的高塩濃度のエマルジョンにおいても、機能成分を高効率で内包することが可能になると期待される。

5. 今後の課題

本研究では、MC 乳化によるダブルエマルジョンの作製工程に対する NaCl 添加の影響について調査し、NaCl の添加によって液滴形成の可否と作製条件、ならびにダブルエマルジョンの液滴径やその均一性が変化することを見出すとともに、種々の NaCl 濃度下で水溶性成分を高効率で内包したダブルエマルジョンの作製が可能であることを明らかにした。

今後は、より具体的な食品設計を目指して、内外水相 (W_1 および W_2) や油相 (O) の組成とダブルエマルジョンの形成挙動との関係を明らかにしていく。多様な食用ダブルエマルジョンの製造に適用するために、今回行ったような詳細な乳化挙動の解析をさらに進め、液滴形成に影響を及ぼす因子およびその物理化学的背景に関する知見を集積していくことが望まれる。

また、通常のエマルジョンよりも不安定化のリスクが高いダブルエマルジョンの安定性も興味深く重要な研究課題である。本研究で作製に成功した、液滴径の均一性が高く、かつ水溶性成分を高効率で内包したダブルエマルジョンは、各種物理的および化学的ストレス下における液滴の変形・崩壊・内包物の漏出の挙動をより明確に把握するためのツールとしても有用と考える。

6. 文献

- (1) 中嶋光敏, 2004: 単分散液滴作製のためのマイクロチャンネル乳化技術の開発, 日本食品工学会誌, 5 (2), 71-81.
- (2) Kawakatsu T, Kikuchi Y, Nakajima M. 1997: Regular-sized cell creation in microchannel Emulsification by visual microprocessing method, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74 (3), 317-321.

- (3) Sugiura S, Nakajima M, Iwamoto S, Seki M. 2001: Interfacial tension driven monodispersed droplet formation from microfabricated channel array, *Langmuir*, **17** (18), 5562-5566.
- (4) Sugiura S, Nakajima M, Yamamoto K, Iwamoto S, Oda T, Satake M, Seki M. 2004: Preparation characteristics of water-in-oil-in-water multiple emulsions using microchannel emulsification, *J. Colloid Interf. Sci.*, **270**, 221-228.
- (5) Kobayashi I, Nakajima M, Tong J, Kawakatsu T, Nabetani H, Kikuchi Y, Shohno A, Sato K. 1999: Production and characterization of monodispersed oil-in-water microspheres using microchannels, *Food Sci. Technol. Res.*, **5** (4), 350-355.
- (6) Sugiura S, Nakajima M, Tong J, Nabetani H, Seki M. 2000: Preparation of monodispersed solid lipid microspheres using a microchannel emulsification technique, *J. Colloid Interf. Sci.*, **227**, 95-103.
- (7) Florence AT, Whitehill D. 1981: Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions, *J. Colloid Interf. Sci.*, **79** (1), 243-256.
- (8) Peng SJ, Williams RA. 1998: Controlled production of emulsions using a crossflow membrane: Part I-droplet production from a single pore, *Trans. IchemeE*, **76** (A), 894-901.

Effect of Salt Addition on the Formulation Process of Double Emulsions by Using Microchannels

Takashi Kuroiwa

Department of Chemistry and Energy Engineering, Faculty of Engineering, Tokyo City University

Summary

Double emulsions consist of oil droplets dispersed within an external water phase, with the droplets themselves containing smaller internal water droplets. Their double-compartment structure can be used to reduce the fat content of emulsion-based foods or to encapsulate substances within the internal water droplets. Generally, emulsion-based foods contain salt in concentration of several percent. However, effects of salt on the preparation process and quality of double emulsions have not been clarified yet. In this study, the formulation of double emulsions by using a microfluidic emulsification method called “microchannel (MC) emulsification” was conducted under various salt concentrations to study the effect of salt addition on the preparation process of double emulsions.

Preparation of double emulsions by MC emulsification consists of two steps: (1) ultrasonic treatment to obtain the primary water-in-oil emulsions that contain a water-soluble fluorescent dye, calcein, in their dispersed water droplets and oil-soluble emulsifiers in the oil phase; (2) MC emulsification to prepare water-in-oil-in-water double emulsions.

Double emulsions were successfully prepared by MC emulsification using sodium caseinate as a water-soluble emulsifier dissolved in the external water phase with the addition of NaCl (0-0.5 M). The presence of NaCl affected the breakthrough pressure of MC emulsification, average droplet diameter and droplet size distributions of double emulsions. Interestingly, the uniformity of droplet diameter of double emulsions was improved by the increase of NaCl concentration. Difference in droplet generation behavior between the emulsification systems with and without NaCl addition were revealed by high-speed observation of the MC emulsification process. Under the all NaCl concentrations tested, high entrapment efficiency (80-90% determined by fluorescence measurement) of calcein into the internal water droplets of double emulsion was obtained.