

マイクロビーム X 線回折法による W/O エマルジョンの
油脂粗大結晶構造の解明
Fat Structure Analysis of Granular Crystals in Water-in-oil Emulsion
by Microbeam X-ray Diffraction

上野 聡^a, 土屋 美紀^a, 本同 宏成^a, 塩田 誠^b, 岩澤 愛^b, 佐藤 眞直^c
Satoru Ueno^a, Miki Tsuchiya^a, Hironori Hondoh^a, Makoto Shiota^b, Ai Iwasawa^b, Masugu Sato^c

^a 広島大学大学院生物圏科学研究科, ^b 雪印メグミルク株式会社, ^c (公財)高輝度光科学研究センター
^aGraduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, ^bSnowbrand-Megmilk Co., Ltd., ^cJASRI

ファットスプレッドにおける粗大結晶の形成メカニズムを調べるため、粗大結晶の形成過程を DSC および偏光顕微鏡にて経時観察を行った。特に粗大結晶の成長過程のうち、中期過程、すなわち、用いた油脂の低融点成分と高融点成分のうち、高融点成分の粗大結晶の周囲に低融点油脂成分が薄く拡がった結晶層の形成過程を伴うことが判明した。この薄い結晶層をマイクロビーム X 線回折測定にて解析したところ、2 鎖長のβ多形であることがわかった。そのため薄い結晶層は、油脂の分子間化合物であることが示唆された。

キーワード： fat spread, shortening, POP, granular crystal, microbeam X-ray diffraction, mapping, molecular compound

背景と研究目的：

ファットスプレッドは、W/Oエマルジョンタイプの食品であり、マーガリン様の食用油脂のうち油脂含有率が35%以上75%未満のものを指す。一般に、マーガリンおよびファットスプレッドには、その固体脂成分の原料油脂として、室温で半固体油脂であるパーム油を混ぜる作製方法が世界的に認知されている。しかし、パーム油を含むマーガリン・ファットスプレッドを冷蔵庫中で長期間放置すると、表面に白色の小さな粒々(粗大結晶(*granular crystal*))が現れる現象が確認され、マーガリン・ファットスプレッドの劣化現象として知られている。この粗大結晶の発生を抑えることがマーガリン・ファットスプレッドの品質向上につながるため、これまでさまざまな基礎的研究が行われてきた。その結果、「粗大結晶は、パーム油中の主要な油脂分子(トリアシルグリセロール)1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol (POP)の最安定多形であるベータ型から成っている」ことが推測されているが、粗大結晶は本当にPOPが粗大結晶化したものなのかどうか、さらに、粗大結晶の発生メカニズムは解明されていない。そこで、我々は、粗大結晶の正体の解明および粗大結晶の発生メカニズムを解明することを目的として、およそ10年にわたり調べてきた。これまでに得られた知見によれば、粗大結晶は、トリパルミチン(PPP)やPOPの最安定多形のベータ型と準安定多形のベータプライム型(β'型)やベータ型(β型)が混在している内郭部分とその周囲を取り囲むPOPの最安定多形のベータ型の外郭の二層構造を形成していることが明らかとなった[1]。しかし、ここで試料として用いられた粗大結晶は、2年間、定温(5°C)で放置し成長させたものを用いており、これまでの成長過程を解明するためには、より短期間での粗大結晶の構造を調べなければならない。そこで、直径5 μmのマイクロビームを数十μmごとに走査することにより粗大結晶の局所構造を解明する放射光マイクロビームX線回折(SR-μ-XRD)測定により調べている。これまでに、DSC測定・偏光顕微鏡観察およびX線回折測定にて得られている知見によれば、粗大結晶の成長過程には、初期(3日間)・中期(3日間-9日間)および終期(1ヶ月以降)の少なくとも3段階が存在し、初期段階では低融点および高融点油脂の混合、中期段階では低融点の薄い結晶層が粗大結晶から分離する様子が、そして終期段階では薄い結晶層が消え高融点油脂からなる粗大結晶のみからなることが確認された。そこで、得られた薄い結晶層や粗大結晶の構造・構成油脂成分等が明らかになれば、粗大結晶のより詳細な成長過程が明らかになると考えられる。そこで、本研究では、粗大結晶の成長機構の解明を目的とし、粗大結晶の構造および構成油脂成分を油脂結晶多形の観点から推測することを目的として局所構造の解析が可能なマイクロビームX線回折測定を試みた。

なお、本報告では、得られたデータのうち、薄い結晶層のマイクロビーム解析に絞って報告する。粗大結晶の初期・中期・終期の局所構造の変化については、未だ測定途上であるため、また紙面の関係上、ここでの記述は控えておく。

実験：

試料には、ショートニングを用い、ナタネ極度硬化油・パーム油・大豆白絞油を、それぞれ、4 g・40 g・96 gずつ配合して用いた(すべて雪印メグミルク株式会社提供)。ここでショートニングを用いた理由は、エマルションよりも作成操作が簡便で、粗大結晶が比較的短時間に現れるためである。なお、偏光顕微鏡観察・DSC・X線回折測定の結果によれば、ショートニングとファットスプレッドに現れた粗大結晶に物性の相違はみられなかった。原料油脂を混合し、70°Cで融解させ、続いて12°Cまで急冷させたのち、結晶粉碎を行ってショートニングを作製した。作製直後のショートニングを、厚さ10 μmのスペーサーを敷いたカバーガラス上に採取し、上からカバーガラスをかけて押し広げ薄膜状試料を作製した。薄膜状試料を3日間7°Cで保存し、4日目以降は15°C 12時間、5°C 12時間の温度サイクルにかけて粗大結晶を成長させた。

測定には、BL46XUステーションを用いた。マイクロビームは、フレネルゾーンプレートにより、ビームサイズが5 μmに絞り込まれ、試料の上流側に同軸で顕微鏡がセットされ、試料中のマイクロビーム照射開始位置を目視で調整できる。カメラ距離は約300 mmで、検出器には、PILATUS 2Mを用いた。今回、試料の薄膜基板に顕微鏡用のカバーガラスを用いている関係上、マイクロビームのエネルギーは、20 keVを選択した。試料の薄膜基板は、顕微鏡観察用試料加熱冷却装置(LINKAM TH-600)に設置され、冷却加熱装置は、専用の固定具で固定されている。温度制御に関して、加熱は装置内のヒーターで、冷却は液体窒素から発生させた低温の窒素ガスにより行った。実験開始時には、装置の温度を5°Cに固定し、試料薄膜を設置した。試料薄膜設置後、上流側の同軸の顕微鏡により、粗大結晶を確認し、粗大結晶周囲の薄い結晶層を探してマイクロビーム照射開始位置を決め、マイクロビーム制御用ソフトによりマッピング測定を行った。スキャンステップは、試料条件によりその都度変えたが、概ね10-100 μmの範囲であった。同軸の顕微鏡には、偏光板が準備されていなかったため、試料位置、とりわけ薄い結晶層は見えづらく、研究室と同じ条件ではなかなか結晶化してくれず、試行錯誤の結果、ようやく一例、薄い結晶層が得られた(Fig.1(a)の通り顕微鏡で確認済)。薄い結晶層場所の確認には時間を要した。測定時間の短縮と確実な測定には偏光板の早期の設置が望まれる。

結果および考察：

Fig.1に5°C (Fig.1(a))と15°C (Fig.1(b))における中期段階で生じた薄い結晶層の光学顕微鏡写真を示す。両方の写真に見える中央の白い円状の塊が粗大結晶である。5°C (Fig.1(a))の粗大結晶の下に薄く見える白い部分が「薄い結晶層」である。薄い結晶層は、右側の Fig.1(b)では、不鮮明であり、周囲に溶解した、もしくは溶解しかけている様子が観察されている。顕微鏡写真における赤い点はマイクロビームの照射位置(マッピング位置)を示す。写真中の実線の黒枠内にある上部の二つの赤い点は、粗大結晶内にあり、中央の破線の黒枠内にある六つの赤い点は薄い結晶層内にあり、下の破線の黒枠内の赤い一点は、薄い結晶層から外れた位置にある。

この薄い結晶層のマイクロビーム X 線回折測定(マッピング測定)の結果の一部を Fig.2 に示す。これは、Fig.1 のマイクロビーム照射位置のうち、黒枠内の赤い点の位置での X 線回折結果を示している。Fig.1 の上から下への赤い点の配置に沿って、Fig.2 の X 線回折の結果も並べた。したがって、データの実線は粗大結晶の、細

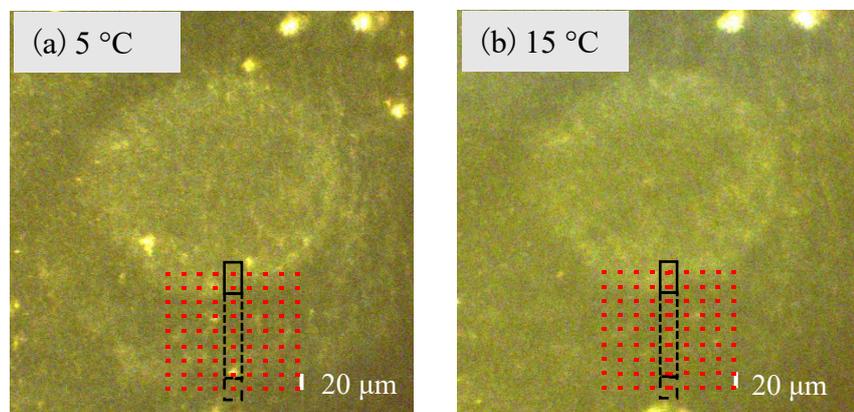


Fig.1. 各温度における粗大結晶および薄い結晶層. (a) 5°C, (b) 15°C.

かい点線は薄い結晶層の、そして一番下の破線は薄い結晶の外側の X 線回折データに対応する。各温度における X 線回折データの左側および右側は、それぞれ小角度領域($2\theta \sim 1.0\text{--}2.4^\circ$)および高角度領域($2\theta \sim 12.0\text{--}15.5^\circ$)を示し、それぞれ脂肪酸鎖の積み重なり様式(鎖長構造またはラメラ構造)および試料油脂の構成脂肪酸鎖のパッキング配列様式(副格子構造)を表している[2][3]。マイクロビームのスキャンステップは $20 \mu\text{m}$ である。 5°C と 15°C の時のマイクロビーム X 線回折測定の結果、 15°C では、薄い結晶層の存在領域では、2 鎖長構造(2L)の回折ピークが弱くなり、かつ 5°C で現れていた β 型の回折ピークが消失している。この解析の結果、薄い結晶層はこれまでの我々の研究で明らかになっていたように低融点油脂から成ることが再確認され、また本測定結果により 2L (2 鎖長構造)を持ち、結晶多形は β 型であると判明した。油脂の構成成分の鎖長構造と多形を考慮すると、主要な油脂の単成分で 2 鎖長の β 型多形を示すものはないが、POP と PPO が 1 分子ずつ集まって分子間化合物(molecular compound)を形成することが知られており[4]、また油脂成分中 4% を占めていると考えられるため、POP と PPO の分子間化合物が薄い結晶層の構成物質ではないか考えられる。一方、粗大結晶部では、 5°C の結果と 15°C の結果には大きな変化はない。したがって、粗大結晶を形成している油脂成分は、全油脂成分の比較的高融点成分から構成され、鎖長構造には 2L と 3L (3 鎖長構造)、結晶多形には β' 型と β 型が混在する状態であることが判明した。

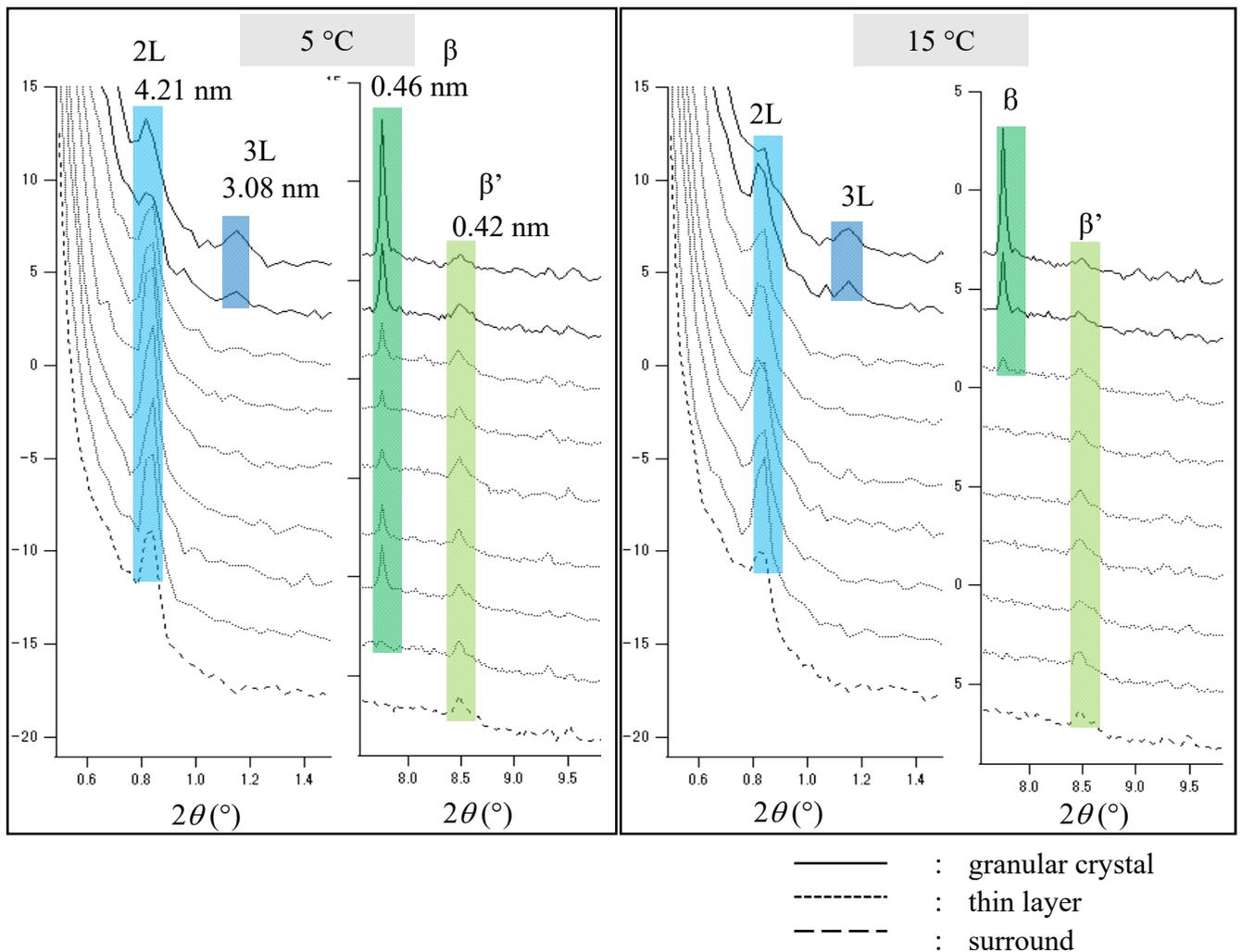


Fig.2. Fig.1 の黒枠内の赤い点の位置でのマイクロビーム X 線回折測定の解析結果。
 左側 : 5°C , 右側 : 15°C .

今後の課題および期待される成果：

今後、粗大結晶の形成機構の解明のためには、以下の諸点が課題とし挙げられる。

- (1) 粗大結晶の初期・中期・終期の局所構造の変化の測定
- (2) 粗大結晶の高融点成分と考えられている POP および PPP の配合比率を変えた系での測定
- (3) 薄い結晶層の構成油脂を明らかにするため、POP および PPO の配合比率を変えた油脂での測定
- (4) 薄膜でなく、実際の系に近いバルク状態での粗大結晶形成過程の解明
- (5) ショートニングではなく、ファットスプレッドを用いた粗大結晶の測定

上記のことを行うことにより、油脂または W/O エマルションにおける粗大結晶形成過程を解明することが可能となる。この問題の解明は、単にファットスプレッド・マーガリン系やショートニングのみならず、非食品である化粧品における油脂の粗大結晶化や医薬品の油脂成分の凝集などの諸現象の解明や回避などの問題にもつながり波及効果は大きいと考えられる。

参考文献：

- [1] L. Tanaka et al., *Food Biophys.*, **4**, 331-339 (2009).
- [2] 上野聡 他、放射光、**11**, 208-218 (1998).
- [3] 佐藤清隆、上野聡、脂質の機能性と構造・物性-分子からマスカラ・チョコレートまで-, 丸善出版, 東京, pp. 16-17, 108-111 (2011).
- [4] A. Minato et al., *J. Phys. Chem. B*, **101**, 3498-3505 (1997).