

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870111

研究課題名(和文)放射光を用いた多糖類複合ゲルの構造解析

研究課題名(英文) Structure analysis of polysaccharide mixed gels by synchrotron-radiation circular dichroism spectroscopy and X-ray scattering techniques

研究代表者

榎 靖幸 (Yasuyuki, Maki)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：50400776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：多糖類複合ゲルは食品等に広く用いられており、その構造と物性の相関を解明することは重要である。本研究では、放射光を用いた分光法(放射光真空紫外円二色性)と散乱法(放射光X線小角散乱)を多糖類複合ゲルの研究に適用し、混合前後での分子形態変化と架橋領域の構造変化を調べることによって、典型的な多糖類複合ゲルの網目構造を明らかにした。また、放射光真空紫外円二色性は、複合ゲル内部での微視的な分子レオロジー測定に適用可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Polysaccharide mixed gels, which are widely used in food industries, were investigated by use of synchrotron-radiation vacuum-ultraviolet circular dichroism (VUVCD) and small-angle synchrotron X-ray scattering (SAXS). The network structure of a typical polysaccharide mixed gel was clarified from the conformation of each polysaccharide chain determined by using VUVCD and junction-zone structure analyzed by using SAXS. The VUVCD technique was also effective in measuring microscopic molecular rheology in mixed gels.

研究分野：高分子溶液・ゲル

キーワード：多糖類 複合ゲル 食品 放射光

1. 研究開始当初の背景

独特の食感を有し、また窒息事故等の問題で関心が持たれているコンニャクゼリーは、コンニャクグルコマンナンや α -カラギーナンなどの複数の多糖類を含むゲルである。その特徴的な力学物性は、産業において重要であるだけでなく、例えば、単独ではゲル化しない多糖類を混合することでゲルが生成する等、学術的に興味深い現象を呈することから、膨大な研究報告があるが、その力学物性と構造の相関については未解明の点が多い。

多糖類複合ゲルの構造の種類として、次の4つの分類が過去に提案された(Cairn et al. (1987)) : (a)一方の網目にもう一方の鎖が取り込まれる(鎖包含網目) (b)二種類の網目が互いに侵入する(相互侵入網目) (c)それぞれの網目が相分離している(相分離網目) (d)異種高分子が結合することにより網目が生成する(結合網目)。しかし、実際の多糖類複合ゲル系で網目構造・架橋構造が解明されている例は少なく、上記の分類うちどれに該当するか不明である場合も多かった。

従来、多糖類複合ゲルの構造の研究には、旋光度、熱測定、繊維X線回折などの手法が用いられてきたが、これらの手法には以下のような欠点があった。旋光度測定は、鎖のらせん形態などの変化を検出することができるが、異種混合系ではどの成分の寄与であるかの特定が不可能である。熱測定は、鎖の形態変化・相互作用やマクロな相変化を検出することができるが、熱的な物性がどのような変化に対応するのかを直接決定することはできない。繊維X線回折は、架橋領域が分子の規則的な構造形成を伴う場合には、その架橋構造を推定することが可能だが、ゲルを乾燥させなければならず、得られた結果が真のゲル構造を反映していない可能性がある。従って、多糖類複合ゲルの構造を研究する際には、膨潤状態の試料に対して、観察している構造の成分と空間スケールが特定可能な実験手法の適用が必要であると考えた。

円二色性(CD)は、旋光度と同等の鎖の形態変化の情報を与えるが、CDは旋光分散よりスペクトルがシャープであるため、スペクトルから複数の構造成分の寄与への分解が容易である。このため、波長190nm以下の真空紫外域から広帯域で高感度な測定可能な放射光真空紫外円二色性(VUVCD)が、溶液中のタンパク質の二次構造精密予測等に用いられてきた。放射光VUVCDは、真空紫外域にしかスペクトルを持たない多くの多糖類にも適用可能であり、多成分系においてどの成分の構造の寄与が明確にすることができるため、多糖類複合ゲルの研究に有用であると考えられる。しかしこれまで、放射光VUVCDが複合ゲルの研究に用いられた例はなかった。

散乱法は、光源波長を選ぶことにより、特定の空間スケールの構造情報を取得可能な手法である。X線小角散乱(SAXS)は、多糖類ゲルの架橋領域程度の空間スケール(数nmか

ら数10nm)の構造を測定可能である。放射光源の応用により、ゲルのような希薄な系においても高精度のSAXS測定が可能となり、様々なソフトマター研究へ放射光SAXS実験は用いられてきたが、多糖類複合ゲルの構造解析には十分活用されていなかった。

過去の多糖類複合ゲルの研究は断片的な実験結果が多く、現象の統一的な理解への障害となっていた。天然由来の多糖類では、試料の由来や精製法の微妙な違いにより物性が定量的に異なるため、分子特性からゲルの特性評価、構造解析まで、同一試料による一貫した実験に立脚した構造・物性相関の研究が重要であると考えた。

2. 研究の目的

食品等の分野で多く利用されている多糖類複合ゲルについて、放射光を利用した散乱法(SAXS)・分光法(VUVCD)を活用してゲルの階層構造(分子形態、分子間相互作用、相分離構造)の解析を行い、多糖類複合ゲルの力学物性と構造の相関を明らかにすることを目的とする。全ての多糖類複合ゲルを網羅することは不可能なので、数種のモデル系を選んで研究を行い、それらを通して様々な多糖類複合ゲルの構造・物性相関を調べるための方法論を与えることを目指す。モデル系として、以下の3つを用いて実験を行う。

(1) α -カラギーナン(CAR)+ガラクトマンナン(GM)の構造・物性相関

CARはゲル化剤として広く用いられている多糖類である。GMは水溶性であり、単独でゲル化はしない。CARにGMを混合すると破断強度が向上する現象(相乗効果)が知られている。過去の研究では、CARとGM間の分子間相互作用により新たな架橋構造が形成されるモデルも提案されているが、実験に基づいた直接的な証明は得られていない。放射光VUVCDを用いて分子間相互作用によるCAR鎖・GM鎖の形態変化の有無を調べ、放射光SAXSを用いて混合による架橋構造の変化について調べることにより、相乗効果と混合ゲルの構造との相関を明らかにする。

(2) キサンタンガム(XAN)+GMの構造・物性相関

XANはGMと同様に水溶性の多糖類で、単独ではゲル化しないが、XANとGMを混合するとゲル化する相乗効果が報告されている。ゲル化においてXANとGMの相互作用による架橋構造の形成が示唆されているが、架橋領域におけるXAN鎖がらせん形態であるモデルとランダムコイル形態であるモデルの二つが提案されており、どちらのモデルが妥当であるかは未解明である。放射光VUVCDを用いて分子間相互作用によるXAN鎖・GM鎖の形態変化の有無を調べ、放射光SAXSを用いて混合による架橋構造の生成について調べることにより、相乗効果と混合ゲルの構造との相関を

明らかにする。

(3) アガロース (AG)+ゼラチン (GT) の力学特性に対する相分離構造の影響

多糖類複合ゲルの構造として、二つの成分が相分離したドメイン状のゲルを形成する (相分離網目) 場合があることが知られている。相分離網目ゲルの力学特性と構造の関係についての知見を得るため、相分離網目ゲルを構成する典型的な系として、AG と GT の複合ゲルについて実験を行う。GT は両性高分子なので、相分離構造は pH に依存すると考えられる。異なる組成と pH に対する AG+GT 複合ゲルの力学特性と相分離構造との相関を調べる。また、放射光 VUVCD は複合ゲル中の GT 分子の架橋構造形成を調べるのに有効であり、GT 分子のダイナミクスは周辺の影響を受けるため、VUVCD 測定により GT 成分のゲル化における微視的なレオロジー特性を調べることができると考えられる。放射光 VUVCD を利用して、AG+GT 複合ゲルにおける GT のゲル化の微視的レオロジーと相分離構造との相関を調べる。

3. 研究の方法

(1) CAR+GM の構造・物性相関

CAR+GM 系では、混合によりゲルの破断強度が向上する相乗効果が報告されている。まず、複合ゲルの一軸圧縮試験により、破断強度の組成依存性を測定し、相乗効果が現れる条件を決定した。次に、力学試験と同様の条件で放射光 VUVCD 測定と放射光 SAXS 測定を行い、混合による CAR・GM 鎖の形態と架橋構造への影響をそれぞれ明らかにした。放射光 VUVCD は広島大学放射光科学センター (HiSOR) における協同利用により行った。放射光 SAXS は高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 (KEK-PF) における協同利用により行った。これらの実験結果に基づいて CAR+GM 複合ゲルの構造と力学物性の相関について考察した。

(2) XAN+GM の構造・物性相関

XAN+GM 系では、単独ではゲル化しない溶液の混合によりゲル形成が生じる相乗効果が報告されている。まず、XAN 溶液と GM 溶液の混合前後で線形粘弾性測定を行い、相乗効果が現れる条件を決定した。相乗効果には XAN 鎖のらせん構造の有無が重要であると考えられているため、条件として、混合後に 80 で熱処理を行う影響と、塩の添加の影響について検討を行った。VUVCD 測定において、Cl イオンは短波長での光の吸収が大きく、測定精度に影響を与える可能性があるため、ここでは塩として NaF を用いた。次に、力学試験と同様の条件で放射光 VUVCD (HiSOR で測定) と放射光 SAXS (KEK-PF で測定) の実験を行った。これらの実験に基づいて XAN+GM 複合ゲルの構造と力学物性の相関について検討を行った。

(3) AG+GT の力学特性に対する相分離構造の影響

相分離網目ゲルの典型である AG+GT 系を用いて、異なる pH における平衡弾性率の組成依存性を調べた。GT として、酸処理ゼラチン (GT-A)、アルカリ処理ゼラチン (GT-B)、コハク化ゼラチン (GT-S) の三種類を用いた。これらの試料の等イオン点 (pI) はそれぞれ pI = 8 (GT-A), pI = 5 (GT-B), pI = 4 (GT-S) である。平衡弾性率は、押し込み法により測定される緩和弾性率から求められた。複合ゲルの相分離構造は、濁度測定と、AG ゲルドメインをトルイジンブルー溶液で染色した試料の光学顕微鏡観察により調べた。

放射光 VUVCD を用いた GT のゲル化の微視的レオロジーの実験は、AG と GT の複合ゲルを 60 に加熱して溶解後 10 へ急冷し、ゲル化過程を波長 =198 nm における楕円率の時分割測定により観察した。GT ゲルの架橋は GT 分子のコラーゲン様三重らせん形成と関連しており、=198 nm での楕円率の測定によってこの分子形態変化を調べることができる。測定には HiSOR の放射光 VUVCD 分光器を用いた。

4. 研究成果

(1) CAR+GM の構造・物性相関

CAR+GM 複合ゲルの破断強度を多糖類中の CAR の重量分率 f_c でプロットすると、 $f_c = 0.5$ 付近でピークを示し、相乗効果が確認された。破断強度の向上は GM の分子量が大きいほど顕著であることがわかった。

CAR+GM 複合ゲルの放射光 VUVCD スペクトルの形状は、単純な混合則

$$m(\lambda) = f_c c(\lambda) + (1-f_c) c_g(\lambda) \quad (1)$$

を用いて、CAR および GM の単一系の VUVCD スペクトルから計算した曲線とほぼ一致した。ここで、 m , c , c_g はそれぞれ複合ゲル、CAR ゲル、GM 溶液の VUVCD スペクトルである。図 1 は =180 nm における楕円率 θ_{180} の組成依存性である。直線関係から、式(1)の混合則の成立が確認できる。式(1)は、混合の前後で CAR と GM の鎖の形態に変化がないことを示している。

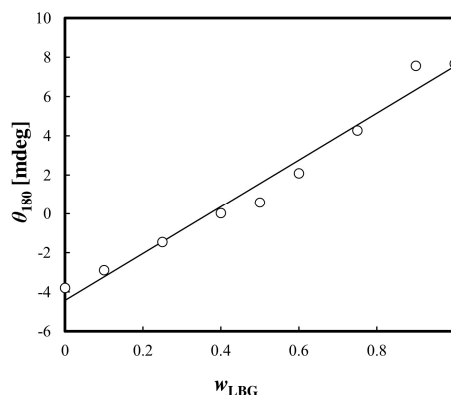


図 1: CAR+GM 複合ゲルの =180 nm での楕円率 θ_{180} の GM の重量分率 w_{LBG} に対するプロット。

CAR+GM 複合ゲルの放射光 SAXS では、CAR 網目の架橋領域に対応する q 領域の散乱関数の形は GM の混合により影響を受けず、より小角では GM の混合により散乱強度が減少することがわかった(図 2)。これは、混合により架橋構造や鎖の形態には変化はないが、CAR 分子の形成する架橋領域の分布がより均一になることを示している。

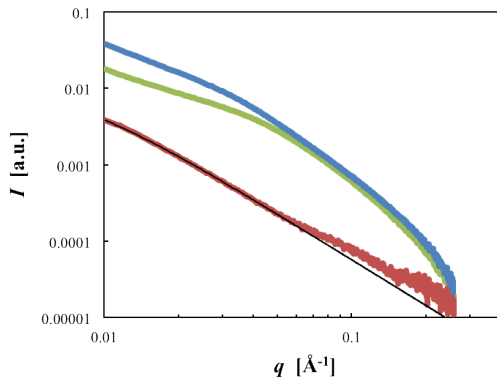


図 2: 上から CAR ゲル, CAR+GM 複合ゲル($f_c=0.5$), GM 溶液の SAXS プロフィール。

放射光 VUVCD と放射光 SAXS の実験結果に基づいて、CAR+GM 複合ゲルの構造が複合ゲル構造の 4 つの分類(鎖包含網目/相互侵入網目/相分離網目/結合網目)のいずれに該当するかを考える。まず、GM は単独でゲルを形成しないため、相互侵入網目は形成しない。次に、放射光 VUVCD と放射光 SAXS で CAR と GM の鎖の形態は混合により変化せず、分子間相互作用による新しい架橋の形成は認められないため、結合網目でもないと考えられる。また、放射光 SAXS は、混合によりゲル構造の均一化が進むことを示唆し、相分離網目形成の可能性も除外される。従って、CAR+GM 複合ゲルは鎖包含網目構造であると結論づけられる。破断強度向上のメカニズムとゲル構造との関連について現在検討中である。

(2) XAN+GM の構造・物性相関

XAN+GM 系の線形粘弾性測定により、XAN と GM を室温で混合すると粘弾性の顕著な液体となり、これを 80 に加熱するとゲル化することが分かった。粘弾性の向上は塩を添加しない系でより顕著であった。この結果は、XAN 鎖のらせん構造の崩壊に伴ってより強い相乗効果が得られることを示唆している。塩の添加によるらせん構造の安定化は旋光度測定によって確認された。

放射光 VUVCD 測定では、混合後の加熱により鎖の形態変化が検出されたのに対し、放射光 SAXS では、架橋構造に顕著な変化が観察されなかった。現時点では放射光 VUVCD スペクトルの精度が不十分であり、分子間相互作用による新しい架橋構造の有無については今後さらに検討を要する。

(3) AG+GT の力学特性に対する相分離構造の影響

AG+GT 複合ゲルの平衡弾性率 E における混合の効果を調べた。GT 試料として GT-A, GT-B を用いると、pH によらず E は混合により減少した。これに対し、GT-S では pH7, pH10 では E は混合により減少するが、pH4 では E は顕著に増大した。この結果はゲルの濁度と相関があり、ゲルの相分離構造に起因していると考えられた。AG+(GT-S)複合ゲルの E の組成依存性は、pH10 では混合による E の減少(相殺効果)が、pH4 では混合による E の増加(相乗効果)が明らかにされた(図 3)。トルイジンブルーで染色された複合ゲルの光学顕微鏡観察により相分離によるゲルドメインが観察され、 E の組成依存性は相分離ゲルの弾性率モデル(Clark et al. (1983))によって部分的に説明可能であった。

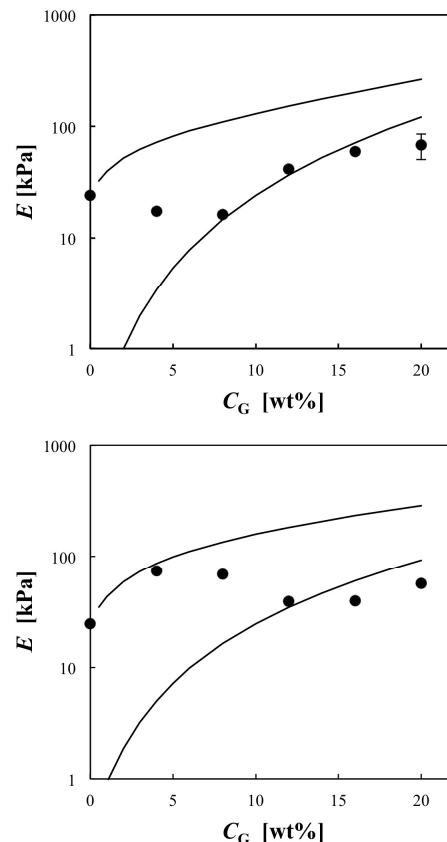


図 3: AG+(GT-S)ゲルの平衡弾性率 E の GT 濃度 C_G 依存性。(上) pH = 10 では、 $C_G = 5$ wt%付近で E が極小となり、混合による弾性率の低下(相殺効果)を示している。(下) pH = 4 では、 $C_G = 5$ wt%付近で E が極大となり、混合による弾性率の増加(相乗効果)を示している。実線は、Clark らの相分離ゲルの弾性率モデルに基づく計算値を示す。

AG+GT 複合ゲルの放射光 VUVCD スペクトルは、 $\lambda = 198$ nm 付近に GT に起因する負のシグナルが、 $\lambda < 180$ nm に AG に起因する正のシグナルが観察され、 $\lambda = 198$ nm での楕円率は GT 分子の形態変化のみを反映することを確認した。急冷後、 λ は時間とともに変化し、

GT 成分のゲル化にともなう分子の形態変化のダイナミクスが観察された。ダイナミクスの詳細な解析により、GT 分子の形態変化の速度は AG 成分の存在に依存せず、一方で AG 成分の影響で架橋構造を形成しない GT 分子が増加することがわかった。この結果は、AG 成分と GT 成分の局在化(相分離構造)によって説明可能である。すなわち、GT ドメイン内の GT 分子の形態変化のダイナミクスは AG ドメインの影響を受けないが、AG ドメイン内に少数の GT 分子が存在し、AG ドメイン内の GT 分子の形態変化は抑制されていると解釈できる。このように放射光 VUVCD による微視的レオロジーを用いて、AG+GT 複合ゲルの相分離構造内部における局所的分子ダイナミクスの検出が可能であることが明らかにされた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Yasuyuki Maki, Kazushi Toriba, Yoshiharu Toyama, Toshiaki Dobashi, Correlation between rheological properties and turbidity of mixed gels of gelatin and agar, Journal of Biorheology, in press, 査読有.

Yasuyuki Maki, Kazushi Toriba, Kazuya Ishizaka, Hiroyuki Yoshida, Sho Yasuraoka, Koichi Matsuo, Effect of molecular weight on synergy in mixed gels of κ -carrageenan and locust bean gum studied by vacuum ultraviolet circular dichroism, HiSOR Activity Report 2014, in press, 査読無.

榎 靖幸, 鳥羽一史, 吉田啓恭, 安羅岡 翔, 土橋敏明, κ -カラギーナンとローカストビーンガムの X 線小角散乱に対する混合の効果, Photon Factory Activity Report 2014, in press, 査読無.

Yasuyuki Maki, Sho Yasuraoka, Kazushi Toriba, Koichi Matsuo, Synergistic effect in mixed gels of polysaccharides studied by vacuum ultraviolet circular dichroism, HiSOR Activity Report 2013, 査読無.
<http://www.hsrb.hiroshima-u.ac.jp/activity.htm>

榎 靖幸, 安羅岡 翔, (κ -カラギーナン+ローカストビーンガム)混合ゲルの X 線小角散乱, Photon Factory Activity Report 2013, 査読無.
http://pfwww.kek.jp/acr2013pdf/part_b/pf13b0267.pdf

[学会発表](計4件)

鳥羽一史, 榎 靖幸, 外山吉治, 土橋敏

明, 松尾光一, ゼラチン・寒天混合系のゲル化のレオロジー, 第 37 回バイオレオロジー学会年会(さいたま市, 2014 年 6 月).

鳥羽一史, 榎 靖幸, 外山吉治, 土橋敏明, ゼラチン・寒天混合ゲルのレオロジーにおける pH 依存性, 第 37 回バイオレオロジー学会年会(さいたま市, 2014 年 6 月).

Yasuyuki Maki, Gelation of food macromolecules studied by vacuum-ultraviolet circular dichroism (VUVCD), Hiroshima International Workshop on Circular Dichroism Spectroscopy (Higashi-hiroshima, 2014/3/4).

安羅岡 翔, 榎 靖幸, κ -カラギーナンとローカストビーンガムの混合系ゲルの構造解析, 物構研サイエンスフェスタ 2013 (つくば市, 2014 年 3 月)

[その他]

ホームページ等

<http://biorheo.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/maki/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

榎 靖幸 (MAKI, Yasuyuki)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：50400776