

X線散乱・回折による多糖類の構造解析

大阪電気通信大学・工学部応用化学科 湯口宜明

1. 緒言

食品は水分を大量に保持し構造を保ったゲル状態のものがほとんどである。ゲルは元来アモルファス状態であると考えられており、その構造は曖昧で評価するのは複雑である。ゲルの基本構造は分子鎖が網目構造を形成し、その中に溶媒分子が保持されたものであり、架橋構造などの特性によって様々な物性を呈すると考えられる。食品においては、ナタデココやグミなど一言でゲル（ゼリー）といっても、様々な食感がある。これらはマイクロ構造においても多様性があることを意味している。とりわけ本研究では多糖類を扱うが、その物性は多糖類の種類、濃度、添加塩などの添加成分、異種多糖類の混合などでも異なってくる。多糖類の場合ナノレベルにおいて特徴的な凝集構造を示す場合が多く示されている。近年ナノサイエンスやナノテクノロジーが重要視されているなか、多糖類のゲル化をナノレベルで構造観察し、そのメカニズムを解明することは1種のナノサイエンスであり、この情報をうまく使って、将来的にはナノ構造を制御できれば、糖鎖ナノテクノロジーが可能となろう。それによって単なるゲル化剤にとどまることなく、高機能な食品や医療材料などの高度な応用も期待できる。

その構造観察の強力な手法が、X線散乱・回折測定である。通常水溶液やゲルの散乱測定は微弱でありシンクロトロン放射光を利用しなければ測定できない場合が多い。これによってサブナノからナノレベルの観察を試料に対して処理することなく直接的に測定することができるのが特徴である。現在日本にある放射光として兵庫県にある **SPring-8** とつくば市にある高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーが代表的である。輝度は **SPring-8** が最強であり、希薄溶液などこれまで十分な精度で測定できない試料も測定することが可能となった。対象物が液体などの等方的なものに対する散乱の場合、得られるデータは一次元の散乱曲線が得られるのみで、詳細な解析をするためにはいくつかの異なる条件を測定して、その変化を追跡することや他の測定手段を補足すると有効である。また **SPring-8** ではその強力なX線ビームを利用してマイクロオーダーサイズのX線ビーム（マイクロビーム）を利用することができる。これにより純物質でなく、様々な個体そのもののマイクロオーダーでのマイクロ構造分布をとらえることができる。

2. カラゲナンを例として

カラゲナンは増粘剤やゲル化剤などの食品添加物としてよく知られており、海藻より抽出される多糖類である。化学構造によって κ 型、 ι 型、 λ 型などが存在し、それぞれ2糖の繰り返し単位中に硫酸エステル基が1つ、2つ、3つ程度含まれた構造をとっている。

このうち κ 型と ι 型の水溶液は低温にすることによってゲルを形成するが、 λ 型はゲル化しないことが知られている。ゲルの形成機構は図 1 に示されているように、高温では分子鎖は分子分散しコイル状態で存在しているが、冷却によって部分的に二重らせん構造を形成さらにはそれらが会合することによって架橋領域を形成し、系全体が網目構造をとると考えられている。

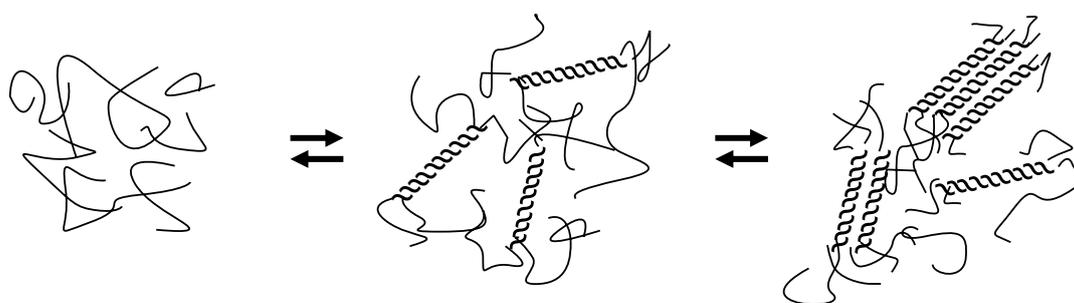


図 1.カラゲナンのゲル化モデル.

このような特徴的な架橋領域の構造はナノレベルで現れ、小角 X 線散乱法は有効な観測方法となる。図 2 は κ カラゲナン水溶液から得られた小角 X 線散乱の温度依存性である。ここで $I(q)$ は散乱強度で、 q は散乱ベクトルの大きさを、

$$q = (4\pi/\lambda) \sin \theta \quad (1)$$

と定義されている。ただし λ は入射 X 線の強度、 2θ は散乱角である。小角領域では q はほぼ θ に比例するので、 q は散乱角に相当する。従って図 2 の各散乱曲線は散乱強度の角度依存性とみることができる。

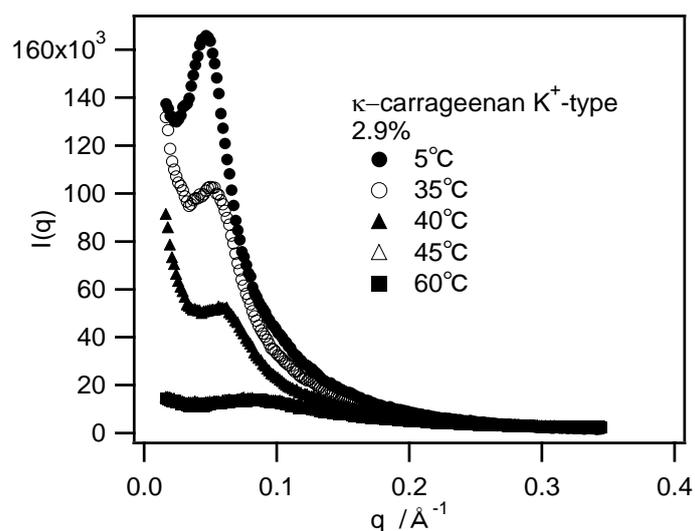


図 2. κ カラゲナン水溶液から得られた小角 X 線散乱の温度依存性.

この系では約 40°C あたりでゾルゲル転移が起こるが、小角散乱でもそれを反映した結果が得られている。つまりゲルを形成することにより散乱強度が増加している。これは分

鎖が凝集することによるもので、架橋構造が形成されていることを示している。またカラゲナンの場合、電解質多糖類であるため分子鎖間あるいは形成された会合体間の静電的反発相互作用によりピークが現れる。ピーク位置が低温になるほど小角側にシフトしているのは、架橋ドメインのサイズが大きくなることで相互作用の相関距離が長くなっているためである。このように小角 X 線散乱によって多糖類のゾルゲル転移を観察することが可能である。詳しく解析することによって、ナノレベルでの架橋構造に関する情報を得ることができる。特にこのような電解質多糖類の場合、相互作用も散乱曲線に反映される。このことはより多くの情報を得るためには有益であるが、1つの曲線に多数の情報が含まれることになるので、それらの分離が難しいことがある。この解析は扱う系によって多種多様となる。

3. キシログルカンのゲル化

3. 1. キシログルカンについて

本研究で用いた多糖類キシログルカンはタマリンド種子より抽出したもので、セルロース骨格にガラクトースあるいはガラクトキシロースを側鎖に有している（図3参照）。セルロースの場合結晶化によって不溶性であるが、キシログルカンは側鎖の立体障害によって水溶性を示す。タマリンド種子キシログルカンは、すでにドレッシングのドレッシングなどの増粘剤として食品添加物に広く使用されている。この水溶液は様々な第3成分を添加することによりゲルを形成する。例えばアルコール、色素であるコンゴレッドを添加するとゲル化する。またヨウ素呈色反応を示し、それと同時にゲルを形成する。さらに酵素である β -ガラクトシダーゼを作用させるとゲルを形成する。これらの様々なゲル化について小角 X 線散乱測定によって構造を観察し、そのメカニズムを検討することができた。それらのうちのいくつかの例を示す。

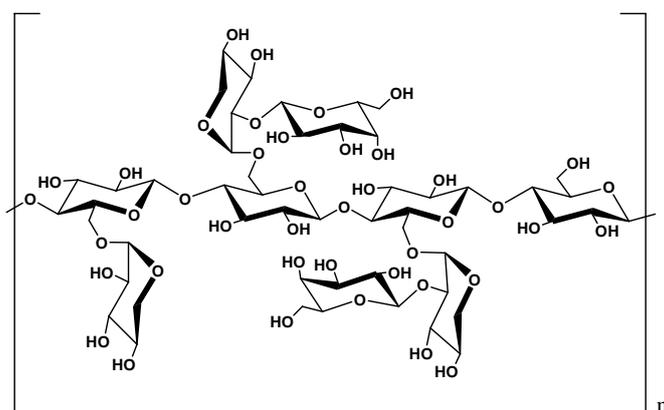


図3. キシログルカンの化学構造.

3. 2. キシログルカンの溶液構造

ゲル化する以前のキシログルカンの水溶液構造について小角 X 線散乱の結果を示す。キシログルカンの分子量は約 80 万程度である。図 4 は水溶液中におけるキシログルカンからの小角 X 線散乱である。散乱曲線は図 4 のように散乱強度の角度依存性であり、この場合 q が大きくなるにつれて単調に強度減少する典型的な散乱挙動を示した。キシログルカンの分子モデルを図 5 に示す。この分子モデルの各原子を Van der Waals 半径をもった球と仮定して、球の散乱の重ね合わせで次式の Debye の式により計算することができる。

$$I(q) = \sum_{j=1}^n f_j^2 g_j^2(q) + 2 \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{k=j+1}^n f_j f_k g_j(q) g_k(q) \frac{\sin(d_{jk}q)}{d_{jk}q} \quad (2)$$

ここで f_j は原子 j の散乱の重み因子、 d_{jk} は j 原子と k 原子の距離である。 $g(q)$ は剛体球の形状因子で、各原子の Van der Waals 半径を用いた。分子モデルからの計算曲線についても図 4 に実験値と比較するために重ね合わせた。 q の大きな領域で良い一致をしており、水溶液中ではキシログルカン鎖は基本的に 1 本鎖の状態であると推定できる。 q の小さなところではモデルの鎖長が短いことや溶液中でのキシログルカンの部分的な凝集の存在が原因で一致していないと考えられる。

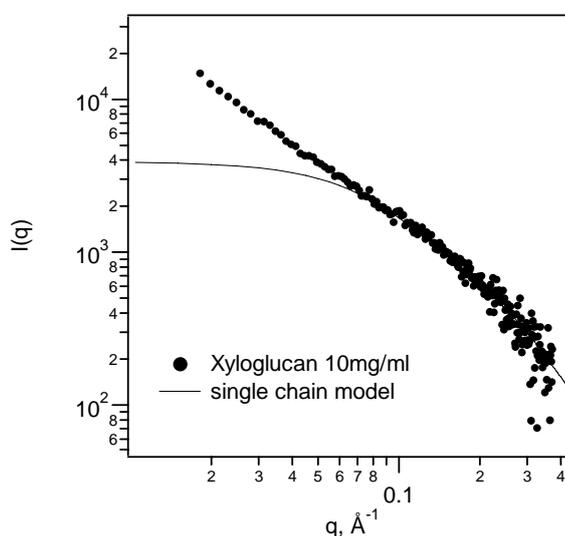


図 4. キシログルカン水溶液からの小角 X 線散乱.

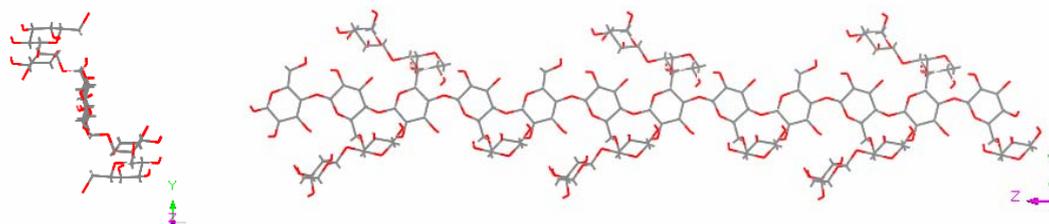


図 5. キシログルカンの分子モデル.

3. 3. アルコール添加によるゲル化

いくつかの多糖類水溶液はアルコールをある程度添加すると沈殿を生じる。キシログルカンの場合、アルコールを 20%程度入れるとゲル化を起こす。アルコールを入れた系にお

ける小角 X 線散乱についてみると、図 6 のように 2 成分で示せることが分かった。1 つはキシログルカン鎖の溶解成分である棒状体についてのギニエ近似式に基づく成分である。つまりキシログルカンは比較的剛直な棒状体であることが予想できるため、棒状体からの散乱関数はギニエの近似式により以下のように表すことができる。

$$q \cdot I(q) \approx \exp(-R_{G,c}^2 q^2 / 2) \quad (3)$$

ここで $R_{G,c}$ は棒状体の断面の慣性半径である。もう 1 つは以下の式によって表されるランダム凝集構造からの散乱関数 Debye-Bueche 型により表せた。

$$I(q) \approx 1/(1+a^2 q^2)^2 \quad (4)$$

ここで a は不均一さのサイズである。このようにアルコール系についてはランダム凝集によるゲル化であることが小角 X 線散乱から推定できる。

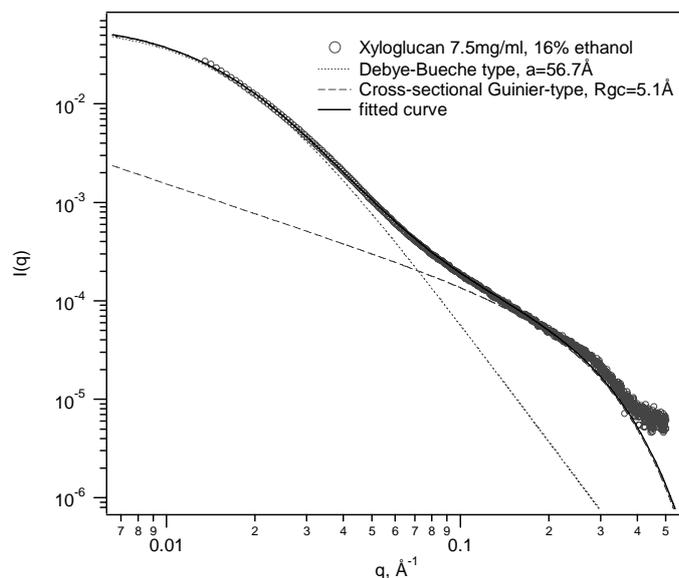


図 6. 水/アルコール系におけるキシログルカングルからの小角 X 線散乱と計算散乱関数.

3. 4. ヨウ素呈色反応ともなうキシログルカンのゲル化

澱粉のヨウ素呈色反応はよく知られている。キシログルカンなどのセルロース系多糖類でもヨウ素呈色反応が起こる。アミロースの場合、らせん構造の内部にヨウ素イオンクラスターが直線に並ぶことで呈色するが、キシログルカンの場合はどうなるのかは分かっていなかった。キシログルカン水溶液にヨウ素溶液を加えると青紫色に呈色して沈殿を生じる。加熱して溶解すると呈色は消える。それを冷やすと系全体が呈色したゲルとなる。これは熱可逆的なゾルゲル転移を起こす。その呈色ゲルの構造を小角 X 線散乱法により観察し、メカニズムを考察した。図 7 はキシログルカン水溶液とヨウ素溶液を加えてゲルとなったものからの散乱曲線を断面のギニエプロット ($\ln(qI(q))$ vs q^2) したものである。キシログ

ルカンは比較的剛直な棒状体であることが予想できるため、(3)式に基づき、断面のギニエプロットが直線領域を示した場合、適当な角度領域において棒状体としての近似が成立し、その直線部の傾きから断面の慣性半径を評価できる。図7からゾル及びゲルにおいて良好な直線領域を見つけることができた。 $R_{g,c}$ はゲル化にともない4.3Åから6.6Åへと太くなった。これはキシログルカン1本鎖状態が、平行に会合して2～3本鎖程度の会合体となっていると考えられる。この場合ヨウ素イオンのクラスターはキシログルカン鎖2～3本程度が並んで会合している構造の間に包接して介在し、ヨウ素錯体を形成していると推測できる。これらが架橋領域となりゲルを形成すると同時に発色していると考えられる。

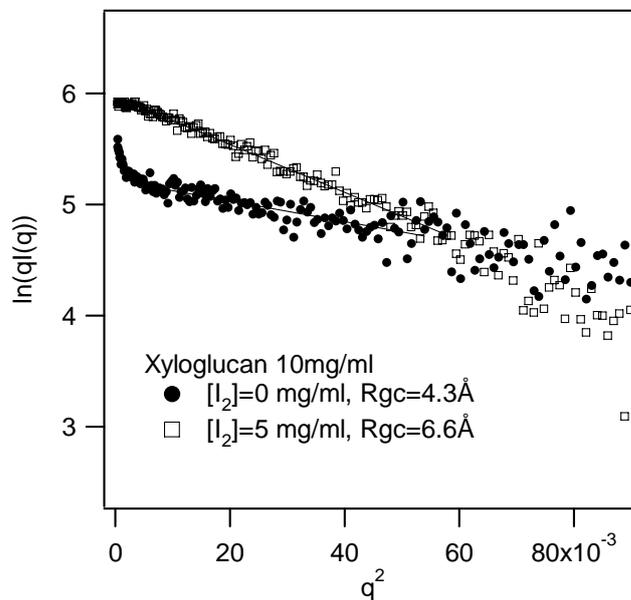


図7. キシログルカン水溶液及びヨウ素呈色ゲルからの小角 X 線散乱に対する断面のギニエプロット。

4. 環状糖鎖

シクロデキストリンは6～8の糖が環状につながった構造をとっている。これらはその環の空洞に様々な分子を包接することができ、食品添加剤などにも広く用いられている。最近ではそれよりも高い重合度をもった環状糖鎖シクロアミロースが開発されており、さらなる応用に期待がかかっている。小角 X 線散乱ではこれらの環状糖鎖の溶液構造や包接構造の解析も可能である。例えば、環状と線状を見分けることができる。図8はマルトヘキサオースと α シクロデキストリンからの小角 X 線散乱をクラットキープロット($q^2 I(q)$ vs q)で表したものである。環状であ

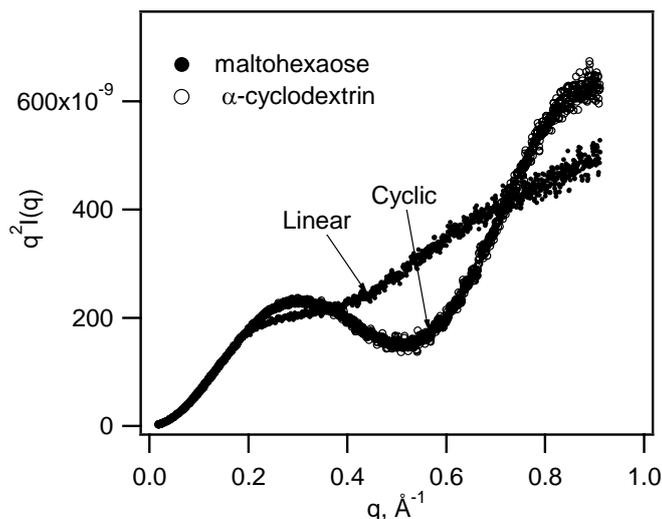


図8. 6糖の環状糖鎖及び線状糖鎖からの小角 X 線散乱。

る α シクロデキストリンはブロードな極大をもったプロファイルをしており、環状の特徴を反映している。またマルトヘキサオースは鎖状構造を反映している。

5. マイクロビームを利用した米粒における結晶構造分布の観察

澱粉粒は部分的に微小な結晶構造を持つ多結晶体であり、その結晶性は澱粉の物性に大きく関わると考えられる。澱粉にX線を照射して得られる回折図には2つの型があり、イネ、コムギなどの穀物澱粉はA型、ジャガイモなどの根茎澱粉はB型の結晶形を示すことが多い。従来、X線回折は精製した澱粉粉末で行われるのがほとんどであるが、SPring8内の高フラックスのビームラインにおけるマイクロビームを利用することで、胚乳切片の組織を特別な処理無しで胚乳内の位置による結晶性の分布状態を知ることが可能である。粉末X線回折法で必要だった澱粉粒抽出の過程が不要になり、抽出時の人為的影響を除くことが可能となる。いくつかの変異体を用いて、その結晶構造分布を探ってみた。

6. 終わりに

いくつかの実際に食品添加物として使用されている多糖類についての小角X線散乱について実例を示した。さらには米のマイクロビームを利用したX線回折の手法のような精製や抽出を必要としない非破壊分析の手法が広まりつつある。これまでアカデミックな立場から基礎的な構造解析を進めてきたわけであるが、これが今後応用へと展開するためには、よりレオロジーや熱などのマクロ物性とこれらのマイクロ構造との相関について考察を深めていくことが重要となる。これらの基礎研究は将来的にはテーラーメイド型の食品増粘剤やゲル化剤、さらにはナノレベルで構造制御されたナノ機能性食品へと発展することが期待できる。

7. 参考文献

- 1) O. Glatter and O. Kratky, "Small-angle X-ray Scattering", Academic Press, London (1982)
- 2) P. Debye and A. M. Bueche, "Scattering by inhomogeneous solid", *J. Appl. Phys.*, **20**, p518-525 (1949)
- 3) Y. Yuguchi et al, "Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence", *Food Hydrocolloids*, **16**, p515-522 (2002)
- 4) Y. Yuguchi et al, "Gelation of Xyloglucan in Water/Alcohol Systems", *Cellulose*, **11**, 203-208 (2004)
- 5) Y. Yuguchi et al, "Structural Characteristics of Xyloglucan - Congo Red Aggregates as Observed by Small Angle X-ray Scattering", *Cellulose*, **12**, 473-481 (2005)
- 6) Y. Yuguchi et al "Color Formation and Gelation of Xyloglucan Upon Addition of Iodine Solutions", *Macromolecular Rapid Communications*, **26**, 1315-1319 (2005)
- 7) A. Kubo et al, "The Use of Micro-beam X-ray Diffraction for the Characterization of Starch

Crystal Structure in Rice Mutant Kernels of Waxy, Amylose Extender, and Sugary1”, in press,
Journal of Cereal Science

謝辞

本研究の一部は大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科・北村進一教授、久保亜希子氏、鈴木志保氏、武政誠氏との共同研究である。また SPring-8 での測定に際しては JASRI のスタッフである井上勝晶氏、太田昇氏の多大なご協力に対し感謝いたします。