〔総合論文〕

パーフルオロスルホン酸テトラエチルアンモニウム (FOSTEA),
パーフルオロスルホン酸リチウム (FOSLi) とサーファクチン
ミセルの極低温電子顕微鏡的構造研究

松本 陸朗^{*1}・A. KNOBLICH^{*1}

(受付 1995 年 5 月 22 日・審査終了 1995 年 7 月 20 日)

要 旨 ガラス状態の水中にパーフルオロスルホン酸テトラエチルアンモニウム (FOSTEA), パーフルオロスルホン酸リチウム (FOSLi) とサーファクチンミセル粒子を埋め、それをそのまま極低温電子顕微鏡的に、溶液物性・溶液条件と相関して、構造研究した結果を述べる。FOSTEA のミセル溶液は濃度を増すとともに溶液粘度も増え、FOSLi のそれは濃度に関係なく水と同じ粘度を示すことが知られている。極低温電顕的に見た FOSTEA ミセルはひも状構造体で、それが網目構造に進化することで粘度が増える。これに対し、FOSLi は球状ミセル構造で、網目構造は作らない。このテトラエチルアンモニウム (TEA) と Li の対イオン種によるミセル構造の相違は、疎水的な TEA イオンではミセルの負電荷のスクリーニングに伴ってミセル表面が疎水化し、疎水性相互作用によってひも状ミセルが形成されると考えた。サーファクチンミセルは pH 7, 9.5 と 12 でその構造が調べられた。このミセル溶液は粘度変化を見せないが、ミセルの大きさや形は不均一で、球状、楕円、棒状である。pH 12 では極性基の環式構造が壊れるが、ミセル形成能にはあまり影響しない。しかし、pH 9.5 でミセル溶液に 100 mM NaCl または 20 mM CaCl₂ を加えると、ミセルは非常に小さな球状となった。球状ミセルはアルキル基の内部構造の秩序性の大小である程度サイズ分布を説明できる。しかし、大きな楕円または棒状ミセルはこのような充填構造では説明できず、サーファクチン分子によるラメラ構造を考えた方が適切と思う。

1 はじめに

典型的な両親媒性物質のひとつである界面活性剤はミセルから液晶形成に至る構造変化と関連した機能と実用の観点から永年にわたり基礎的・応用的物性と構造研究がなされている¹⁾。これらの研究には界面化学的、分光学的、X 線の、電子顕微鏡的手段が用いられてきた。とりわけ、ミセルの形態と構造を実在に近い状態で視覚化できる氷埋試料を用いた低温透過電子顕微鏡法が開発されて以来、この種の研究は新たな発展を遂げつつある。これは水分子ですら結晶化できない、非常に短時間にミセル溶液を急速凍結する技術^{2), 3)}とそれを観察するための低温ステージが開発されたためである^{4), 5)}。今日まで、この方法でミセル構造が観察された例は非イオン性界面活性剤ではポリオキシエチレン誘導体⁶⁾、オクチルグルコシド⁷⁾、シロキサン誘導体⁸⁾、陽イオン性ではヘキサデシルトリメチルアンモニウム化合物^{9)~11)}、酢酸ジテトラメチルアンモニウム^{12), 13)}などである。これに対し、陰イオン性界面活性剤のミセル構造の研究例は非常に少ない¹⁰⁾。特に、ミセルサイズが小さい界面活性

剤についてはほとんど研究例がない。このことはフッ素系や生体系界面活性剤についても同様で、陰イオン型のみならず他の型の界面活性剤についてもミセルの低温電顕的構造研究は皆無に近い。フッ素系界面活性剤は臨界ミセル濃度 (cmc) が低く、水・油界面を問わず高い界面活性を示し、種々の固体表面にぬれ拡がり、容易に疎水化表面改質ができることなどから溶液物性との相関でミセルの構造研究が望まれている物質でもある^{14), 15)}。生体界面活性剤、バイオサーファクタント、は界面活性に留まらず、抗菌性や溶血作用などの機能を持つものが多く、フッ素系同様の研究の進展が待たれている。

そこで、本研究では陰イオン性パーフルオロオクチルスルホン酸塩について溶液粘度に関係したミセル構造を極低温電子顕微鏡的に明らかにした結果を述べる¹⁶⁾。また、生体界面活性剤では、非常に高い界面活性を示すことで知られるサーファクチン (陰イオン性) のミセル構造を添加塩の効果も含めて述べることにする¹⁷⁾。

これらの研究に用いた透過電子顕微鏡は試料ステージが液体ヘリウム温度に冷却されており¹⁸⁾、今まで用いられてきた液体窒素温度の試料ステージとは試料観察条件が異なる。試料を極低温で観察し、結果像を得る利点は、液体窒素のそれに比べて、電子線損傷による試料破

^{*}1 京都大学化学研究所 (〒611 宇治市五ヶ庄)

壊が著しく低減されることである¹⁹⁾。これは、電子線損傷を受け、立体構造が変わりやすい生体物質に特に有用な条件である²⁰⁾。

2 試 料

フッ素系界面活性剤にはパーフルオロスルホン酸テトラエチルアンモニウム (FOSTEA, アルドリッチ社製, 純度 98%) とパーフルオロスルホン酸リチウム (FOSLi) の 2 種類を用いた。FOSLi は濃硫酸 (純度 95%) 中に PCR 社製パーフルオロオクチルスルホン酸カリウム (純度 98%) を溶かし, free acid 化したものを蒸留, これを水酸化リチウム (純度 98%) で中和滴定して得た²¹⁾。生成物はエタノールとクロロホルム混合溶媒中で 5~6 回再結晶し精製した。再結晶化物の純度は特に調べていないが, この物質の表面張力・濃度曲線で cmc 付近には不純物による極小の存在は認められなかった。

サーファクタンは和光純薬(株)製 (純度 98%, 分子量 1036) をそのまま精製せずを用いた。その他の試薬はすべて特級品をそのまま用いた。

3 方 法

FOSTEA と FOSLi は溶液粘度が異なり, 前者では濃度の増大とともに著しく増し, 後者では水の粘度と大差がない。そこで, 半径 0.2 と 0.3 mm の毛管粘度計を用いて水に対する相対粘度を測定した。この方法は比較的低粘度の溶液系に実用性があり, 測定に極めて長時間を要する高粘度では文献値を用いた¹⁴⁾。

サーファクタンは本実験に用いた濃度範囲で目視的に粘度の変化はなく, 測定は行っていない。

極低温電子顕微鏡的ミセル構造観察用試料は自作マイクログリッドを用いて行った²²⁾。自作マイクログリッドフィルムはサブマイクロメーターから数マイクロメーターの多数の空孔を持ち, これをメッシュシートに張り上げた後, 電気伝導性を付与するため約 10 nm 程度カーボン直接真空蒸着して使用した。

マイクログリッド付メッシュシートをピンセットに挟み, この上にミセル溶液数 μl を乗せる。過剰な溶液をろ紙で吸い取るや否や, 瞬時に液体窒素温度に保たれた低温凍結装置 (Richert-Jung KF-80) 中の液化メタンに浸ける。これにより溶液試料は $10^4 \sim 10^5 \text{ K/s}^{23)}$ の速度で冷却され, ミセルを含んだガラス状態の水として凍結される。このように, 水のような低分子ですら結晶化のための分子再配列が起きない速さで冷却して観測用試料を作る事が, 低温電顕によるミセル構造観察研究に必須の条件である。凍結試料の観察は極低温透過電子顕微鏡 (JEM 3000SFF) で行った。この電子線源は電界放射型で, 輝度が明るい特徴を持つ加速電圧 300 kV の電子顕

Fig. 1. Dependence of relative viscosity on the concentrations of FOSTEA and FOSLi. Curve A, FOSTEA; curve B, FOSLi. Arrows indicate micellar solutions used for cryo-transmission electron microscopy. Solid circles in curve A were taken from the literature¹⁴⁾.

微鏡である。また, 観察試料部が液体ヘリウム温度に冷却されており, この温度で数時間の像観察に耐える。

電子顕微鏡の欠点のひとつは電子線照射による試料損傷である。この損傷は試料温度が低く保たれるほど小さくなる。ちなみに, ミセルの構造観察は通常液体窒素温度で行われており, 室温で試料に加えられた一定電子線量による損傷を 1 とした時の 1/4 まで低減される。これに対し, 液体ヘリウム温度では 1/20 となり, 電子線損傷に弱い有機物に有用な観察方法である¹⁹⁾。

さらに, ここではミセル粒子の焦点合わせに用いた位置から電子線を自動的にずらして撮像する, Minimum Dose System を併用して, 損傷の可能性をさらに除いて像記録した²⁴⁾。ミセル像の記録条件は試料温度を 4.2 K 以下に保ち, 像コントラストを上げる目的から defocus 量を 2 または 4 μm とし, 照射線量はほとんどの場合 7 electrons/ Å^2 以下, 直接倍率は 40000 倍とした。

4 FOSTEA と FOSLi 溶液粘度相関ミセル構造

FOSTEA と FOSLi の cmc と相対粘度は既に Hoffmann^{14), 15)} らによって調べられている。それによると, FOSTEA の表面張力測定から得られた cmc は 0.9 mM (20°C), FOSLi は 7 mM (20°C) である。cmc 的には両者に著しい差を認めない。しかし, 相対粘度は非常に異なる。FOSTEA の相対粘度は約 10 mM 以上で異常に大きくなり始め, 20 mM, 30 mM, 50 mM で約 10 倍, 1000 倍, 50000 倍にもなる (Fig. 1 曲線 A)。この粘度

Fig. 2. A control cryo-micrograph of pure water. Arrows show finely scattered small dots with a size of approximately 1 to 2 nm.

Fig. 3. Cryo-micrographs of micellar solutions with increasing concentration of FOSTEA. The loop structure by threadlike micelles increased with concentration. (a) 20 mM; (b) 60 mM; (c) 100 mM. In (a), (b), and (c), arrows indicate threadlike micelles, looped structure, and spherical particles, respectively.

は 60 mM で最大で、濃度の増加とともに少し減少する。FOSLi の場合は 120 mM まで水の値とほぼ等しく、この傾向は濃度 400 mM においても変わらない。

このような、対イオンによる粘度の増加については、Hoffmann らはひも状ミセルがある網目構造を作るためであるとして説明しているが、その構造の直接的な証明はない。また、TEA の何が網目構造をつくる原因であるかについても述べられていない。

そこで、対イオン TEA と Li による FOS ミセル溶液の粘度挙動相関でのミセル構造を極低温電子顕微鏡的に調べた。この構造観察に用いた濃度は FOSTEA では 10, 20, 60 と 100 mM (Fig. 1 曲線 A 矢印)、FOSLi では 120 mM とした。

Fig. 2 に純水のコントロール像を示す。矢印で示した所々に散乱する直径約 1~2 nm の黒点を除いて、顕著な構造体の存在を認めない。この黒点は何であるかは特定できていないが、凍結試料作成の手順から、紛れ込む異物として固体エタンまたは窒素が考えられる。実際、この粒子は電子線照射に弱く、少し照射を与え続けると消失する。

FOSTEА ミセルはここに調べた濃度範囲で一般にひも状構造体である (Fig. 3)。10 mM の結果は図示されていないが、幅約 3 nm で長さが数百 nm の非常に長いひも状ミセルである。ただし、その数密度は粗である。20 mM (Fig. 3a) になると、幅約 3 nm でやや短いひも状ミセル (矢印) が多数見られるようになり、所々に大きな網目構造が認められるようになる。同様のことは 60 mM と 100 mM (Fig. 3b と c) についても見られるが、ひも状ミセルの数が増すだけでなく、網目の直径は小さくなり、数が増える (Fig. 3b 矢印)。それとともに、強い像コントラストを持った直径約 3 nm の球状粒子が多数現れる (Fig. 3c 矢印)。この粒子は Fig. 2 のコントロールの粒子より明らかにコントラストが強く、FOS ミセルである。

一方、FOSLi のミセル像は図の視野全体に単純分散した直径 3~4 nm の球状である (矢印)。結局、極低温電顕像から見た水埋ミセル構造と溶液粘度の関係はミセルがひも状で網目構造を作るとき、粘度も増すが、単純分散した球状ミセルの無構造溶液は粘度に影響しないと結論できる。

それでは、なぜ対イオン種によってひも状または球状ミセルとなるのであろうか。FOS ミセル系でひも状ミセルを作る対イオン TEA は油性で疎水的である。TEA が疎水的であることは、吸着研究の一方法である滴水銀電極の微分容量が非イオン型有機物の吸着挙動とほとんど変わらないことからわかる²⁵⁾。これに対し、Li イオンは水和しやすく、油に難溶で親水性である。つまり、負電荷を持つ FOS ミセルはその電荷が対

Fig. 4. A cryo-micrograph of pure FOSLi at 120 mM. Scattered particles with a size of approximately 3 to 4 nm are spherical micelles shown by arrows.

イオン TEA または Li イオンによってスクリーニングされるであろう。その結果、ミセル表面は TEA 系は疎水的、Li 系は親水的となる。TEA 系ミセルの疎水性表面はミセル間の疎水性相互作用によって集合ミセルを作りやすくなり、それがひも状ミセルへと進化するのであろう。これに対し、親水性表面が保たれる Li 系ミセルは疎水性相互作用は起きず、ひも状ミセルへの進化も起さない。

一般に、共有結的に作られる高分子はからまり合うと切れることなく、網目構造を作り、それによって溶液粘度も増える。この高分子溶液と同様の理論^{26), 27)}を用いて、臭化セチルトリメチルアンモニウム^{28), 29)}や塩素酸セチルピリジニウム^{29)~31)}ひも状ミセルの粘弾性挙動が説明されている。Clausen¹¹⁾らはセチルトリメチルアンモニウムにサリチル酸を結合させたミセル溶液の粘度上昇を低温電顕的に構造研究し、その関連を明らかにした。それによると、ミセルはひも状であり、そのひもが互いに絡まりあって網目構造に進み、大きな粘度を与える原因になっていると結論した。同様の解釈はフッ素系界面活性剤である FOSTEA ミセル系にも適用できるかもしれない。しかし、通常の炭化水素鎖間より弱いフッ素鎖間の凝集力を考慮すると、ひも状ミセルの絡まりが保持され網目構造に成長するよりはむしろ、からまれば切れやすく、ひとつのひもは他のひもミセルを通り抜けると考える方が良いように思う。そして、網目構造は looping したひもミセル³²⁾の集合または樹枝状に成長したひも状ミセルと考えるのが妥当のように思う。

FOSTEА 系ミセル溶液の粘度は 60 mM で最大で、100 mM でやや小さくなる傾向があることは先に述べた。この濃度に対応した Fig. 3b と c では網目構造の保持と増加以外に多数の球状粒子の存在も指摘した。この球状粒子がミセルであることはその像コントラストの強さから（フッ素の電子線散乱係数は高い）明らかであるが、球状ミセルであるか電子線照射方向と平行に並んだひも状ミセルの末端部であるかは特定できない。しか

Fig. 5. Cryo-micrographs of surfactin micelles as a function of pH. (a) Spherical micelles with a diameter of 5~30 nm and ellipsoidal micelles with a length and width of approximately 19 nm and 11 nm, respectively, at pH 7; (b) spherical micelles with a diameter of 10~20 nm and rod-shaped micelles with a length of approximately 40~160 nm and a width of approximately 10~14 nm at pH 9.5; (c) spherical micelles with a diameter of approximately 8 nm and ellipsoidal micelles with a length and width of approximately 9 nm and 6 nm, respectively, at pH 12. The concentration of surfactin in this solution was kept constant at 5 mM in a 5 mM Tris buffer for pH 7 and 9.5. An unbuffered solution of NaOH provided a pH of 12. The areas of rather strong contrast indicated by long arrows, in (c), may not be due to micelles but to ice.

し、FOSLi 系に見られたように、無構造的な球状ミセルの分散液は粘度の上昇をもたらさない事実から、球状ミセルである可能性が高い。これは FOSTEA 濃度の増加とともにひも状ミセル間のブラウン衝突が起きやすく、したがってひもは切れやすく、それによって球状ミセルが生成しやすいと考えれば説明できる。

このほか、ここでは詳述しないが、FOSTEAまたはFOSLiと非イオン性界面活性剤ペンタエチレングリコールモノデシルエーテル ($C_{10}EO_5$, ニッコークミカル, 純度 100%) との混合ミセル溶液の粘度相関ミセル構造も調べた¹⁷⁾。それによると、純 $C_{10}EO_5$ ミセルは直径約 3 nm の球状ミセルを作るが、 $C_{10}EO_5$ と FOSTEA 混合系の FOSTEA 高濃度において粘度とミセル構造は純 FOSTEA 系と同様になる。また、FOSLi と $C_{10}EO_5$ 混合系は粘度に変化なく、ミセル構造も一般に球状である。

5 サーファクチンミセルの構造

生体界面活性剤として知られるものには多数あるが³³⁾、その中で細菌 (*Bacillus subtilis*) から作り出されたサーファクチンは非常に高い界面活性を示す³⁴⁾。サーファクチンは環式構造を持つリポペプチドの一種で、界面活性のみならず、抗菌性、溶血性、抗酵素作用、生体膜中イオンチャンネル形成などの機能を持つ^{34)~37)}。サーファクチンの pK は 5.8 であるため³⁸⁾、低い pH では展開単分子膜として^{38), 39)} また高い pH ではミセル溶液として物性と構造の研究が行われている^{38)~40)}。石上らは pH 8.7 の炭酸水素ナトリウム溶液中のサーファクチンのミセル形成能を光散乱的に調べ、会合数 173 の棒状ミセルが形成されているとした³⁸⁾。サーファクチンの環式構造を示す FT-IR のラクトンバンド (1730 cm^{-1})⁴¹⁾ は高 pH で消失し、ペプチド基が開環することが示唆されている⁴⁰⁾。しかし、このような構造変化と関係したミセル形成能と構造を直接視覚的に評価した例はない。

サーファクチンの cmc は pH に依存する。100 mM 炭酸水素ナトリウム (pH 8.7) で $9\text{ }\mu\text{M}$ (25°C)³⁸⁾、5 mM トリス (pH 9.5) で 0.2 mM (25°C)⁴²⁾、NaOH (pH 14) では 0.01 mM (25°C)⁴⁰⁾ である。ここでは 5 mM トリス緩衝液を用いて pH を 7 と 9.5 とし、NaOH にて pH 12 とした。なお、ミセル構造観察は pH 7, 9.5 と 12 で行ったが、7 と 12 での cmc は測定していない。しかし、上記 pH で cmc が低いことを参考に、ここではサーファクチン濃度を十分高い 5 mM 一定にして用いた。

Fig. 5 に各 pH におけるサーファクチンミセルの極低温電顕像を示す。pH 7 の Fig. 5a では直径 5~30 nm の球状ミセルと長さ幅約 $19\text{ nm}\times 11\text{ nm}$ の楕円形ミセルが共存する。pH 9.5 の Fig. 5b では直径 10~20 nm の球状ミセルと長さ幅 $40\sim 120\text{ nm}\times 10\sim 14\text{ nm}$ の棒状ミセルが認められる。pH 12 の Fig. 5c では直径約 8 nm の球状と長さ幅約 $9\text{ nm}\times 6\text{ nm}$ の楕円形ミセルが生成しているのがわかる。石上らは光散乱的に求めた pH 8.7 でのサーファクチンミセルが棒状とした時、その平均長さは 231 nm、直径は 6 nm となるとしている³⁸⁾。これは Fig. 5b (pH 9.5) の棒状ミセルの結果に近い。

pH 7 と 9.5 で測定した FT-IR のラクトンバンドは、pH 12 では消失し、前者の溶液中のサーファクチンはペプチドが環式構造をとるのに対し、後者ではペプチドが開環している。pH 7, 9.5 と 12 の極低温電顕像から見たミセルの形態は、pH 9.5 の棒状ミセルを除き、pH 12 でやや小さくなってはいるものの、他に特徴的な変化は見当たらない。これらの結果像から、サーファクチン分子の立体構造の違いがミセル構造にいかに関与するかは言及できないが、その違いによるミセル形成能には大差はないと言える。

Fig. 6a と b は pH 9.5 で塩を 100 mM NaCl と 20 mM CaCl_2 加えたサーファクチン (5 mM) のミセル像である。この結果の再現性は特に念入りに追試した。ミセルは球状で直径は 4~16 nm である。塩無添加の Fig. 5b に比べ、ミセルは小さな球状となるが、塩の種類にはあまり影響されない。pK 以上の pH でサーファクチンは陰イオン性であるから、NaCl や CaCl_2 の添加によって塩析または電荷の強いスクリーニング効果を受ける。一般的には、これらの効果はミセルの会合数を増やし、粒子サイズも大きくなるとされる。しかし、実際にどの程度大きくなるかは簡単に予言できない⁴³⁾。例えば、室温でドデシル硫酸ナトリウム (cmc, 8 mM) の 70 mM でのミセル会合数は 62, 100 mM NaCl 添加 (cmc, 2 mM) で 90 とされ⁴⁴⁾、ドデシル硫酸ナトリウム 50 mM でのミセル会合数は 68, 1 mM CaCl_2 添加 (cmc, 1 mM) で 74 である⁴⁵⁾。したがって、これらと Fig. 6 の結果から塩添加が必ずしもミセルを大きくするとは言えないであろう。

pH 7 と 9.5 で環式ペプチド構造を持つサーファクチンの分子模型をコンピューター⁴⁶⁾で作ると、アルキル鎖長は約 1.5 nm、ペプチド極性基の高さと幅が約 1.5 nm と 1.0 nm と概算された。これを基に、サーファクチンミセルの内部構造を推察すると、小さな球形ミセルではミセル内アルキル鎖の内部秩序性の高低でその大きさが説明できる。しかし、大きな球状ミセル、幅の広い棒状ミセルや楕円ミセルではこのモデルは適用しにくく、もはやミセルとは呼べないかも知れないが、サーファクチン分子が多層化したラメラ構造体からなっていると考えの方が合理的のように思う。

以上、低温電顕的にも極低温電顕的にも未だ明らかでなかった、フッ素系界面活性剤ミセル溶液の粘度に及ぼす対イオン種の効果とミセル構造との関係および生体界面活性剤の構造に及ぼす pH と塩添加の効果について述べた。その結果、ここに用いたフッ素系界面活性剤では対イオン種によりミセル構造が変わり、その構造は溶液粘度と相関することがわかった。対イオン種の効果は対イオンの親水性・疎水性と関係し、疎水性イオンは疎水性相互作用によってひも状ミセルを作る。ひも状ミセル

Fig. 6. Cryo-micrographs of surfactin micelles in the presence of 100 mM NaCl and 20 mM CaCl_2 in a 5 mM Tris buffer at pH 9.5. In (a) and (b), spherical micelles distributed their sizes with diameters of approximately 4~16 nm. (a) Small spherical micelles of surfactin at 100 mM NaCl; (b) small spherical micelles at 20 mM CaCl_2 . Short arrows denoted small particles similar to those found in the control images. Long arrows in (a) indicate spherical micelles.

が網目構造に進化すると、溶液粘度も増大する。生体界面活性剤、サーファクチンは球状ミセルのみならず棒状・棒状ミセルを作る。サーファクチンの極性基ペプチド環の pH 変化による開閉はミセル形成能には影響しないが、ナトリウムやカルシウムの対イオンの添加はミセルサイズをむしろ小さくする効果があることがわかった。

謝 辞 本研究に当たって極低温電子顕微鏡の使用に便宜をお計らい頂き、また有益な助言と討論を戴いた松下電器産業(株)国際研 藤吉好則博士と村田和義氏に深く謝意を表する。物質工学技術研の石上 祐博士と M. Osman 博士にはサーファクチンに関する数々の助言と討論を戴いた。ここに、併せて謝意を表する。

文 献

- 1) M. J. Schick, Ed., "Nonionic Surfactants", Surfactant Science Series, Vol. 23, Marcel Dekker, New York, N.Y. (1987); D. N. Rubingh and P. M. Holland, Ed., "Cationic Surfactants", Surfactant Science Series, Vol. 37, Marcel Dekker, New York, N.Y. (1990); W. M. Linfield, Ed., "Anionic Surfactants", Surfactant Science Series, Vol. 11, Marcel Dekker, New York, N.Y. (1981); N. Kosaric, Ed., "Biosurfactants", Surfactant Science Series, Vol. 48, Marcel Dekker, New York, N.Y. (1990); E. Kissa, Ed., "Fluorinated Surfactants", Surfactant Science Series, Vol. 50, Marcel Dekker, New York, N.Y. (1994).
- 2) P. Brüggele and E. Mayer, *Nature*, **288**, 569 (1980).
- 3) J. Dubochet and A. W. McDowell, *J. Microscopy*, **124**, RP3-4 (1981).
- 4) H. Fernandez-Moran, *Expl. Cell Res.*, **3**, 282 (1952).
- 5) K. A. Taylor and R. M. Glaeser, *Science*, **186**, 1036 (1974).
- 6) J. L. Burnes and Y. Talmon, Proceedings of the 45th Annual Meeting of Electron Microscopic Society, America, G. W. Bailey, Ed., 2-7 August, San Francisco Press, (1987), p. 500.
- 7) P. K. Vinson, Y. Talmon, and A. Walter, *Biophys. J.*, **56**, 669 (1989).
- 8) Z. Lin, R. M. Hill, H. T. Davis, L. E. Scriven, and Y. Talmon, *Langmuir*, **10**, 1008 (1994).
- 9) L. J. Margid, J. C. Gee, and Y. Talmon, *Langmuir*, **6**, 1609 (1990).
- 10) P. K. Vinson, J. R. Bellare, H. T. Davis, W. G. Miller, and L. E. Scriven, *J. Colloid Interface Sci.*, **142**, 74 (1991).
- 11) T. M. Clausen, P. K. Vinson, J. R. Minter, H. T. Davis, Y. Talmon, and W. G. Miller, *J. Phys. Chem.*, **96**, 474 (1992).
- 12) J. R. Bellare, T. Kaneko, and D. F. Evans, *Langmuir*, **4**, 1066 (1988).
- 13) D. D. Miller, J. R. Bellare, T. Kaneko, and D. F. Evans, *Langmuir*, **4**, 1363 (1988).
- 14) M. Angel, H. Hoffmann, U. Krämer, and H. Thurn, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **93**, 184 (1989).
- 15) K. Tamori, K. Esumi, K. Meguro, and H. Hoffmann, *J. Colloid Interface Sci.*, **147**, 33 (1991).
- 16) A. Knoblich, M. Matsumoto, K. Murata, and Y. Fujiyoshi, *Langmuir*, **11**, 2361 (1995).
- 17) A. Knoblich, M. Matsumoto, K. Murata, Y. Fujiyoshi, Y. Ishigami, and M. Osman, *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, in press (1995).
- 18) Y. Fujiyoshi, T. Mizusaki, K. Morikawa, H. Yamagishi, Y. Aoki, H. Kihara, and Y. Harada, *Ultramicroscopy*, **38**, 241 (1991).
- 19) Y. Fujiyoshi, N. Uyeda, H. Yamagishi, K. Morikawa, T. Mizusaki, Y. Aoki, H. Harada, and Y. Harada, Proceedings of the 11th International Congress of Electron Microscopy, Japanese Society of Electron Microscopy JEM, Kyoto, Vol. 3, Center for Academic Publishers, Tokyo (1988), p. 1829.
- 20) W. Külbrandt, D. N. Wang, and Y. Fujiyoshi, *Nature*, **367**, 614 (1994).
- 21) T. Suzuki, K. Esumi, and K. Meguro, *J. Colloid Interface Sci.*, **93**, 205 (1983).
- 22) A. Fukami and K. Adachi, *J. Electron Microscopy*, **14**, 112 (1965).
- 23) M. J. Costello, R. Fetter, and J. M. Corless, in "Science of Biological Specimen Preparation", O. Johari, Ed., SEM Inc., AMF O'Hare Chicago (1982), p.105.

- 24) Y. Fujiyoshi, T. Kobayashi, K. Ishizuka, N. Uyeda, Y. Ishida, and Y. Harada, *Ultramicroscopy*, **5**, 459 (1980).
- 25) P. Delahay, "Double Layer and Electrode Kinetics", John Wiley and Sons, New York, N.Y. (1965), p. 229.
- 26) M. E. Cates and S. J. Candau, *J. Phys.: Condens. Matter*, **2**, 6869 (1990).
- 27) M. E. Cates, *J. Phys. Chem.*, **94**, 371 (1990).
- 28) A. Khatory, F. Lequeux, F. Kern, and S. J. Candau, *Langmuir*, **9**, 1456 (1993).
- 29) S. J. Candau, A. Khatory, F. Lequeux, and F. Kern, *J. Physique IV*, **3**, 197 (1993).
- 30) J. Appell, G. Porte, A. Khatory, F. Kern, and S. J. Candau, *J. Physique II*, **2**, 1045 (1992).
- 31) A. Khatory, F. Kern, F. Lequeux, J. Appell, G. Porte, N. Morie, A. Ott, and W. Urbach, *Langmuir*, **9**, 933 (1993).
- 32) T. J. Drye and M. E. Cates, *J. Chem. Phys.*, **96**, 1367 (1992).
- 33) J. Reiser, A. K. Koch, U. A. Ochsner, and A. Fiechter, in "Biosurfactants", N. Kosaric, Ed., Marcel Dekker, New York, N.Y. (1990), Chapter 8.
- 34) A. Kakinuma and K. Arima, *Annual Report of the Takeda Research Laboratories*, **28**, 140 (1969).
- 35) K. Arima, K. Kakinuma, and G. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 488 (1968).
- 36) K. Hosono and H. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11252 (1985).
- 37) J. D. Sheppard, C. Jumarie, D. G. Cooper, and R. Laprade, *Biochim. Biophys. Acta*, **1064**, 13 (1991).
- 38) Y. Ishigami, M. Osman, H. Nakahara, Y. Yano, R. Ishiguro, and M. Matsumoto, *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, **4**, 341 (1995).
- 39) R. Marget-Dana and M. Ptak, *J. Colloid Interface Sci.*, **153**, 285 (1992).
- 40) M. Osman, Y. Ishigami, K. Ishikawa, Y. Ishizuka, and H. Holmsen, *Biotechnol. Lett.*, **16**, 913 (1994).
- 41) K. Hosono and H. Suzuki, *J. Antibiotics*, **36**, 667 (1983).
- 42) L. Thimon, F. Peypoux, and G. Michel, *Biotechnol. Lett.*, **14**, 713 (1992).
- 43) D. Myers, "Surfaces, Interfaces, and Colloids", VCH, Weinheim (1991), p. 323, p. 340.
- 44) P. Lianos and R. Zana, *J. Phys. Chem.*, **84**, 3339 (1980).
- 45) M. Almgren and S. Swarup, *J. Phys. Chem.*, **87**, 876 (1983).
- 46) QUANTA ver 3.3, CHARMM ver 22, Molecular Simulations Inc., San Diego, CA, U.S.A.

[Comprehensive Papers]

Cryo-Transmission Electron Microscope Studies of Micellar Structure on Tetraethylammonium, Lithium Perfluorooctyl-sulfonates, and Surfactin

Mutsuo MATSUMOTO*^{1,†} and Armin KNOBLICH*¹

*¹Institute for Chemical Research, Kyoto University (Uji, Kyoto, 611 Japan)

Cryo-transmission electron microscopy at the liquid helium temperature was applied to visualize the micellar structure of perfluorooctylsulfonates (FOS) and surfactin. The micellar system of tetraethylammonium (TEA) perfluorooctyl-sulfonate showed the formation of threadlike micelles. At a high concentration of FOSTEA, threadlike micelles evolved to form a randomly dense loop structure, which correlated with an increase in bulk viscosity. On the other hand, lithium perfluorooctylsulfonate (FOSLi) only showed the formation of spherical micelles with no loop structures, which indicated no change in the bulk viscosity. The different influence between TEA and Li ions on the formation of threadlike and spherical micelles was discussed in terms of the hydrophobic and hydrophilic nature of these ions. For surfactin, a biosurfactant, micelles were spherical, ellipsoidal, and rod-shaped structures with an inhomogeneous size distribution at pH 7, 9.5, and 12. The disappearance of a characteristic FT-IR band of a lactone group in surfactin at pH 12 suggested that the micelles with different structure of a linear head group are formed. At pH 9.5, the addition of 100 mM NaCl and 20 mM CaCl₂ to a surfactin solution transformed the rod-shaped micelles into small sized spherical micelles. The small sized micelles were explained by a common understanding model with a high or low degree of internal order in the structure of alkyl chains. The large sized spherical, ellipsoidal, and rod-shaped micelles were explained in terms of bilayered unilamellar or multilamellar structures.

KEY WORDS Cryo-Electron Microscopy / Micelle / Fluorinated- and Bio-surfactants / Viscosity / pH /

(Received May 22, 1995; Accepted July 20, 1995)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **52**(12), 746—752 (1995)]

[†] To whom all correspondence should be addressed.