とうもろこしタンパク質ゼインの挙動に与える 有機溶媒の影響

山田浩司*・野口明徳**・高橋秀和***

Effects of the Solvents on Properties of Zein

Kohji YAMADA*, Akinori NOGUCHI** and Hidekazu TAKAHASHI***

* University of Tsukuba, 1-1-1, Tennoudai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305

** National Food Research Institute, 2-1-2, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305

*** Showa Sangyo Co., Ltd., 2-20-2, Funabashi-shi, Chiba 273

Zein, water insoluble corn prolamin, can be transformed to the transparent, flexible and waterproof film by dissolving into the hydrate organic solvents such as ethyl alcohol and acetone and then drying. However, the resulting film prepared from aqueous ethanol did not show enough waterproof property, compared with the film from aqueous acetone. The behaviour of zein in both solvents and the properties of the resulting films were examined to find possible reasons for their different properties using the following methods; a particle distribution with laser scattering method, fourier transformation scanning electron microscope, fourier transformation nuclear magnetic resonance, infrared absorption spectroscopy and small angle X-ray scattering (SAXS). SAXS revealed that zein molecule in the film from aqueous acetone had more regular arrangement than that from aqueous ethanol. In addition, zein molecule in aqueous acetone relative quickly formed the basic small aggregates and grew into the huge aggregates, forming the film structure faster than in aqueous ethanol. According to the analysis using FT-NMR, the growing aggregate from acetone was likely to expose their hydrophobic regions outside more than that from ethanol, resulting in the better waterproof property.

(Received Aug. 11, 1995)

廃プラスチックによる環境問題および農作物の食品外用途の開発と連動し、天然物を用いた生分解性プラスチックの開発が世界各国で盛んである。中でもでん粉を用いた素材開発は1970年代から始まり、ヨーロッパでは現在、ほぼ100%でん粉の膨化成型容器が、食品用発泡スチロール容器の代替として試用されている。しかしこの膨化成型容器は α 化でん粉主体の為、耐水性が無くその用途は著しく制限されている。こうした問題を解決する一手段として、とうもろこしの水難溶性タンパク質ゼインから、生分解性を維持しながら耐水性を示すフィルム調製を検討した。その結果、含水アセトン系を溶媒に用いて耐水性フィルムを調製しうる条件を見出し、含水

エタノールを用いた場合との対比により、破断強度はやや低い、優れた耐水性、透明性、ヒートシール性を有することなどと併せて既に報告¹⁾した。同時に、タンパク質分子溶解時の環境が分子の凝集状態またはフィルム構造に影響し、これがフィルムの性質に反映されている可能性を認めた。そこで今回、2種類の有機溶媒系について、ゼインのフィルム形成に及ぼす影響を検討したので報告する。

実験方法

1. ゼイン溶液の調製

ゼインは、昭和産業(株)の昭和ツェイン DP と呼ばれ

* 筑波大学農学研究科 (〒300-01 茨城県つくば市天王台 1-1)

** 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

*** 昭和産業株式会社総合研究所 (〒273 千葉県船橋市日の出 2-20-2)

る粉末を購入し、SDS-PAGEにより夾雑物の存在しないことを確認してそのまま実験に供した。溶媒としては水を含んだ70%アセトン(v/v)および80%エタノール(v/v)を用いた。ゼイン1gに対して溶媒10mlを加え、速やかに攪拌して均一に分散させた後、50℃の水浴中で10分間加熱して完全に溶解させた。調製したゼイン溶液は室温で10分間冷却した後、直ちに次の実験に供した。

2. ゼインフィルムの調製

ゼイン溶液を、10ml当たり130cm²の面積になるように塗布し、アセトン溶液は30℃で、エタノール溶液は60℃でそれぞれ乾燥してフィルムとした。

3. 溶液中における挙動の経時的観察

1) NMRによる測定

ゼイン溶液を40℃で静置し、その際の変化をNMR Analyzer (Bruker製、NMS-120型)により、経時的に測定した。測定のための積算回数は50回とした。

2) 溶液中の微小集合体の測定

ゼイン溶液を自動演算機(Malvern Instruments製、Multi computing correlator 7032 CN型)を装備したレーザー散乱型粒度分布測定装置(Malvern Instruments製、Zetasizer 3, 測定領域: 2~5 000 nm)を用いて経時的に測定した。尚、ゼイン溶液は、測定直前に0.45μmのミリポアフィルターで濾過した。

4. 電界放射型走査電子顕微鏡による観察

観察用試料の調製は定法に準じて次のように行った。まずホウ化カリウム結晶の直方体の一面に、その面に垂直になるように安全剃刀を当てて打ち割り、新しい切断面を作成した。この切断面上に形成させたゼインフィルムに、オスミウム酸蒸気による真空プラズマ蒸着処理²⁾を0.05 Toor, 1.2 kV, 10 mA, 20 秒の条件にて施した後、水中でホウ化カリウム結晶を溶解除去して蒸着試料片を得た。この試料片を80%の含水アルコールで洗浄してゼインを除去し、オスミウム酸からなるレプリカ膜を得た。これらの蒸着試料片およびレプリカ膜を電界放射型走査電子顕微鏡(FT-SEM: トプコン製、DS-720型)での観察に供した。

5. NMRによるフィルム中の水分子の観察

FT-NMR (JEOL製、JNM-GSX-270型, 270.05 MHz)を用いて、¹⁷O-NMR測定を行うことにより、ゼインフィルムに含まれる水分子の状態を推定した。フィルムは水分を6%に調整して測定に供し、128回の積算を行った。

6. フィルム中のゼイン分子の存在状態の解析

1) 赤外吸収スペクトルの測定

ポリエチレンシート上で調製したゼインフィルムについて、赤外吸収スペクトルの測定を、MCT検出器付赤外分光光度計(JEOL製、JIR-6 500 FT-IR)により、4 cm⁻¹の分解能で行った。入射角は45°とし、接触スペクトルサンプラーにはセレン化亜鉛を用い、S/N比を充分取るように200回の走査を行った。近赤外スペクトルの測定は、TGS検出器付近赤外分光光度計(JEOL製、JRS-6 500 FT-Raman)を用い、200回の積分から求めた。

2) 円偏光二色性の測定

フィルムの円偏光二色性(CD)をSpectropolarimeter (日本分光(株)製、J-720)を用いて、波長は250~350 nm, 積算数は100回にて測定した。

実験結果及び考察

1. ゼイン溶液の観察

ゼインフィルムは原料の粉末と同様の可溶性を示し、その溶液からフィルムが繰り返し調製できる。また、これらのフィルムは使用する溶媒の種類に応じて異なる耐水性を示す。したがって、ゼインフィルムの耐水性発現は、タンパク質の不可逆的な変性に依るものでないと考えられる。このゼインは古くからプロラミンに分類される疎水性タンパク質として報告されてきたが、分子内の疎水性アミノ酸含量は約65モル%であり、4割近くは親水性アミノ酸である。さてタンパク質の構造については、中間的構造の存在が熱力学的な計算により導かれており、二次元NMRを用いた球状タンパク質に関する最近の研究では、モルテングロビュール³⁾と呼ばれる中間的な構造状態について、平衡論的あるいは速度論的に明らかにされつつある。これらの情報を基にして我々は、種々の溶媒から調製したフィルムの耐水性差異を理解するために、ゼイン分子同志の集合状態が溶媒の極性に依って異なり、それが溶媒蒸散時のゼイン分子配列に影響して、フィルム形成後の耐水性の有無に反映されるというモデルを提唱した¹⁾。疎水性蛋白質の中でもフィブリンやケラチンは、構造状態のいくつかがかなり明確にされている。しかしゼインについては、ARGOSを始め2, 3の報告⁴⁾⁵⁾が認められる程度であり、しかも意見の一致に至っていない。

ここではまず、アセトンとエタノールの両溶媒中においてゼイン分子の挙動を各種手法を用いて比較検討する事により、溶液中での分子状態と溶媒との関係をより明確に把握しようと試みた。溶液中のタンパク質の立体構

造を考察するには、各種の分光光学的手法が簡便且つ多様な測定法として知られている⁶⁾。しかしながら含水アセトンの UV 透過率は極端に低く、80% の透過率を示す波長でさえ 340 nm 付近であり、より短波長では UV に対し完全に不透明となる。従って、吸収スペクトルをはじめ、円偏光二色性、旋光分散等の測定は不可能であった。また、タンパク質分子中の疎水領域が、水溶液中でどの程度分子表面に配位しているかを見積もるには、疎水性蛍光プローブでタンパク質をラベルする手法が一般に用いられる。しかし、本実験で用いた溶媒系に試みたところ、アセトン及びエタノールのどちらの系においても、溶媒自体に起因する蛍光強度が非常に強く、溶液中のゼインについて観察することは不可能であった。ゼイン溶液の分析に用いた NMR は、系全体をバルクとして測定するもので、情報は通常、系に含まれる固体成分の量として % 値で表される : SFC (Solid Fat

Content)。2つの系において蛋白質分子の集合状態が異なる場合、例えばタンパク質表面の親水領域分布が異なる場合には、SFC に反映されるものと考えた。それぞれ溶媒のみの系を対照区としゼインを溶解させた場合について測定を行ったが、S/N 比が小さく両者の比較は為し得なかった。

以上のように、溶液中の分子構造について直接に比較を行うことは非常に困難であったが、レーザー散乱測定装置による観察では、顕著な相違が認められた (Fig. 1)。溶解直後のエタノール中では、見かけ直径 20~35 nm 及び 150~450 nm と測定される二種類の分布状態が観察された。これに対しアセトン系では、17~19 nm のみ存在を認めた。さて、含水エタノール中のゼイン分子は長円形もしくは楕円体でそのサイズは 10~20×0.4~1.5 nm⁷⁾ と報告されている。本研究にもこの数値を適用すると、測定可能領域内 (2~5 000 nm) では溶解直後

Fig. 1 Particle size distribution of zein in solvents

A, acetonic solution ; B, ethanolic solution.

—, 0 min after dissolving at 45°C ;

....., leaving at 45°C for 20 min after dissolving.

に、エタノール系では2~4分子および $(1\sim 27)\times 10^3$ 分子程度の2グループの集合体を形成し、アセトン系ではほぼ単分子に近い状態で存在していると考えられる。集合状態の経時変化においても、溶媒間で明らかな差異が観察された。即ち、エタノール系では、比較的小型の集合状態と大型の集合状態の2種類が常に存在した。これらは時間と共に徐々に成長し、80分以降では5~10 nm および280~430 nm を主成分とする2グループが安定に存在する様子が認められた。一方アセトン系では、比較的大型の集合状態が単独で観察されるのみであった。その成長速度および最終的な大きさはエタノール系に比べ、極めて大きいことが認められた。これは、エタノール系中のゼイン分子がその環境下で安定な溶解状態を維持しているのに対して、アセトン系に一旦溶解されたゼイン分子は、それ自体の自由度がエタノール系に比べて高く、分子間の相互作用がより発現できるためと考えられる。したがってフィルム形成時には、分子相互の結びつきがエタノール系に比べて強固なため、可撓性がやや劣るフィルムが形成されることになると予想されるが、これは先に報告¹⁾した実際のフィルムの物性と一致する。

2. ゼインフィルムの観察

フィルムのFT-SEMによる観察画像をFig. 2に示した。エタノール系においては、フィルム全域にわたって、ほぼ完全な球形をした粒子状構造が多数観察され、その下部にフィルムとしての構造が観察された。粒子状構造の疑似直径は0.2~2 μm の範囲であった。これは溶液内で形成された集合体が、溶媒の蒸発過程で、さらに成長しつつ同時に相互に接着しながら固定されたものと考えられる。他方、アセトン系のフィルム表面は全域で平滑かつ均質であった。粒子状構造はその表面に、融着した状態で散在する様子が認められた。個々の粒子形状はエタノール系と同様にほぼ完全な球形だが、その直径は0.2 μm 内外と1 μm 内外の2グループに大別された。また、アセトン溶液のレーザー散乱に於いて観察された比較的大型の集合体は、フィルム中には観察されなかった。これは、エタノール系に比べて、より大きな集合状態を速やかに形成するため、最終的に粒状構造としては観察され得なかったものと思われる。

X線小角散乱(SAXS)による予備的分析を行ったところ、アセトン系フィルム中においてのみ、分子の配列にある種の規則性を認めた。一方、赤外吸収スペクトルの測定結果からは、アセトン系とエタノール系との間に差異は見いだせず、フィルムを構成しているゼイン分子

自体の二次構造には、殆ど差異が無いものと考えられた。タンパク質の構造解析におけるCDスペクトルは、 α -ヘリックスあるいは β 構造に関する知見を得るために紫外部よりの領域について測定することが多いが、本研究では赤外吸収スペクトルの結果に基づき、比較的低波長側の測定のみを試みた。その結果、両フィルムともに255~280 nmに複数のCD帯を認めたが、そのスペクトルパターンは明らかに異なっていた(Fig. 3)。旋光性は、アルコール系フィルムでは正、アセトン系フィルムでは負と、逆の性質を示し、且つモル楕円率 $[\theta]$ はアセトン系の方が大きな値を示した。この吸収帯はチロシン、フェニルアラニン等の芳香族アミノ酸側鎖に基づくとされている。一方、ヘムペプチドに関する研究では、単量体の示すガウス曲線様の単純なCDスペクトルが、会合状態になるとCD帯数の増加、負のCD帯の出現等の変化を生じること、およびこれらの変化の様子は会合状態に応じて異なることが報告⁸⁾されている。したがって、2種類のゼインフィルムのスペクトルパターンにおける差異は、疎水性アミノ酸側鎖の存在状態あるいは構造状態が両フィルムで異なることならびに、ゼイン分子の会合状態が両フィルムで異なることを示唆していると考えられる。

両フィルムについて得られたFT-NMRスペクトルをFig. 4に示した。一般にシグナルの線幅は水分子の自由度の増加に連れて減少するが、本実験では両試料の測定条件が同一なのでそのままppm表示により比較した⁹⁾。その結果、エタノール溶液から調製したフィルムでは、アセトンの場合の約70%の値となった。これはエタノール系フィルム中での自由度が高く、逆にアセトン系フィルム中で水分子がより強く拘束されていることを示すものである。水分子が拘束されているのはタンパク質の疎水領域と予測されることから、エタノール系フィルムを構成している基本構造体としては、その表面に親水性の側鎖がより多く露出しており、それに対してアセトン系フィルムでは疎水性側鎖がより多く露出していると考えられる(Fig. 5)。この結果に基づき、耐水性の発現機作について次のように結論づけた。水と接触した場合、アルコール系フィルムは個々の基本構造体とその親水領域を介して水を受け入れるため速やかに膨潤崩壊し、耐水性を発現し得ない。一方、アセトン系フィルムでは、相互の分子あるいは基本構造体は疎水結合により強固に結合されており、水分子はその間には侵入し得ないため極めて緩慢な拡散が生じるのみとなり、水と接触しても崩壊することなく優れた耐水性を示す。

Fig. 2 Fine structure of zein films prepared from acetonetic and ethanolic solutions

A, the film from acetonetic solution ;

A few globules ① were observed on the film ② which showed the vague pattern of tortoiseshell.

B, the film from ethanolic solution ; Many small globules ① were observed on the surface of film ② which was unclear in this figure.

The white bars in the figure correspond to 2 μm.

Fig. 3 Circular dichroism of zein films
 —, film made from acetonitrile solution; ·····, film made from ethanol solution.
 $[\theta]$, molar ellipticity ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$).

要 約

ゼインの溶液およびフィルムについて、アルコール系とアセトン系との比較を、レーザー散乱粒度分布測定装置、FT-SEM、FT-NMR、赤外吸収スペクトル、CD、SAXSを用いて行った。その結果、ゼインフィルムの耐水性の有無については次のモデルを提唱できると考える。アセトン系とエタノール系ではゼイン分子の集合状態が明らかに異なり、アセトン溶液中では、分子表面に疎水性アミノ酸がより多く分布していたために分子間の相互作用が強い。そのため一旦分子同志が集合し始めると、その速度および結合力はエタノール系に比べて大きく、集合体の稠密度も高い。この凝集過程において構築される構造体がフィルム形成の最小単位と考えられ、したがって、アセトン系フィルムは水と接した場合、水との作用に抗して構造を維持する力が大きく、且つ水と馴染み易い領域の少ない構造状態となる。そのため、可撓性はやや低い値をとるが、水に対する抵抗性は大きな値を示すようになる。

Fig. 4 FT-NMR spectra of zein films
 A, film made from acetonitrile solution; B, film made from ethanol solution.

本研究を行うに当たり、赤外吸収スペクトルおよびX線小角散乱の測定についてはそれぞれ関西学院大学・理学部・化学科・尾崎幸洋教授、ヨーロッパ放射光研究所・若槻荘市博士のご協力を賜りました。FT-SEMは

Fig. 5 Possible mechanism of film formation from zein solution

- Acetone A, basic aggregates exposing the hydrophobic region of zein molecules ; B, transformation to the film from the basic aggregates through the hydrophobic interaction.
- Ethanol A, basic aggregates exposing the hydrophilic region of zein molecules ; B, transformation to the film from the basic aggregates through the hydrophobic interaction.
- Gray zone shows hydrophobic region.

物質工学研究所・構造解析研究室・八瀬清志室長に、また溶液の NMR 分析では機能水研究所(株)・荒田洋治所長にご協力いただきました。此処に感謝の意を表します。

文 献

- 1) YAMADA, K. and NOGUCHI, A. : *84th Am. Oil Chem. Soc. Annual Meeting Abstracts*, 524, California (1993).
- 2) TANAKA, A. : *J. Electron Microsc.*, **43**, 177 (1994).
- 3) DEGRADO, W.F. : *Nature*, **365**, 488 (1993).
- 4) ARGOS, P., PEDERSON, K., MARKS, M.D. and LARKINS, B.A. : *J. Biol. Chem.*, **257**, 9984 (1982).
- 5) GARRATT, R., OLIVA, G., CARACELLI, A. and

ARRUDA, P. : *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **15**, 88 (1993).

- 6) タンパク質化学, 3 巻, 安藤鋭郎・今堀和友・伊勢村寿三・早石 修編 (共立出版, 東京), p. 344 (1973).
- 7) TATHAM, A.S., FIELD, J.M., MORRIS, V.J., I'ANSON, K.J., CARDLE, L., DUFTON, M.J. and SHEWRY, P.R. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 26253 (1993).
- 8) 浜口浩三・武貞啓子 : 生物化学実験法, C・4 巻, 瓜谷郁三・志村憲助・中村道徳・船津 勝編 (東京大学出版会, 東京), p. 185 (1971).
- 9) 玉城 武・松下和弘・樋岡克哉・高宮義治 : 農化, **60**, 191 (1986).

(平成 7 年 8 月 11 日受理)