

酸性および鉄アルギン酸ゲルのCDスペクトル

清田 佳美¹

Circular dichroism spectra of acid and Fe alginate gels

Yoshimi SEIDA¹

Abstract

CD spectra of alginate gels prepared under various methods were measured, and correlation between the preparation methods and structure of the prepared gels was organized along with the knowledge in the reported studies. Ca type, Fe type and Acid type alginate gels were prepared in this study. Acid gels were prepared in HCL or GDL (gluconic acid- δ -lactone). solutions. Ca type gel showed CD spectra that is characteristic in alginate with G segment and GG block. In the case of gels prepared with Fe^{3+} aqueous solution, Acid gel was predominantly formed in dilute Fe^{3+} solution, and a gel showing a CD spectrum with a broad negative peak on the longer wavelength side was formed in concentrated Fe^{3+} solution. When contacting with Ca^{2+} ions and Fe^{3+} ions, the Acid gel showed CD spectra similar to Ca^{2+} type and Fe^{3+} type gels type gels, which indicated the change in network structure of Acid gel from hydrogen-bonded network structure to the structurally stable ion binding one.

Keywords : Alginate gels, Acid gel, Conformation, Circular Dichroism

1. 緒言

ウロン酸は多糖類で多く見られる分子である。その一つであるアルギン酸はゲル化剤、増粘剤、吸着剤、印象材など幅広い用途を有する天然高分子である。アルギン酸は β -D-マンヌロン酸 (M) と α -L-グルロン酸 (G) の2種のブロックが結合した線状高分子である (Fig.1)。グルロン酸はマンヌロン酸のC-5エピマーである。酵素反応を利用してM \rightarrow Gの変換が可能である。アルギン酸の広範な応用を可能にするキーポイントは、天然由来の

¹ 東洋大学自然科学研究室 112-8606 文京区白山 5-28-20

Natural Science Laboratory, Toyo Univ., 5-28-20, Hakusan, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8606

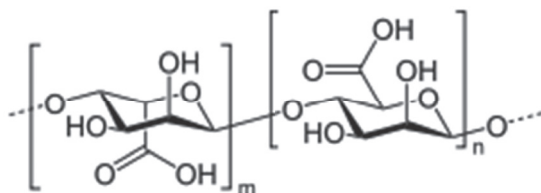


Fig.1 Chemical structures of alginate constituents. (1→4)-linked β -D-mannuronic acid(M) (right) and α -L-guluronic acid(G) (left)

化学組成とモノマー配列の多様性である。粘弾性基準の評価では、MブロックとGブロックが交互につながったものが最も柔軟性があり、Gブロックからなるものは固く、2価カチオン (Ca^{2+} など) と安定な複合体をつくってゲルを形成するという点が挙げられる。GGブロックはCaなどの二価カチオンとエッグボックス型のイオンコンプレックスを形成することが一般に知られている。アルギン酸は低い pH では粘弾性の非常に高い酸性ゲル (Acid gel) を形成する。Acid gelは熱的にも安定なゲルを形成する。Dentiniらは、GDL (gluconic acid- δ -lactone) をプロトンドナーとして用い均質な酸性ゲルを生成している (Dentini et al., 2006)。これらのゲルの中で、分子間の結合をつくるのは主にホモポリマーブロック (MまたはGの繰り返し構造) であり、ゲル強度を決めるのはGブロックの含有比率である。

円偏光二色性 (CD : Circular Dichroism) は、天然化合物の多糖構造、立体配座、および相互作用の探索に有用なツールであり、ウロン酸もCD活性であるためその構造解析に適用されている (Morris et al., 1975)。多糖類などのCDスペクトルは、カルボキシル基の分子環境の変化の敏感な指標となる。ウロン酸の高分子構造とCDスペクトルの特徴の相関関係については、Morrisらによる先駆的研究がとても有用である。CDスペクトルはポリマーのコンホメーションを反映することから間接的にアルギン酸ゲルの高分子鎖コンホメーションの変化を観測できる。Dentiniらはアルギン酸の酸性ゲル (Acid gel) 形成におけるアルギン酸構成ブロックの影響をCDスペクトル並びに粘弾性の観点から検討している。

本報告ではCaもしくは Fe^{3+} イオン架橋アルギン酸ゲルおよびアルギン酸の酸性ゲルのCDスペクトルを取得すると同時に既存の報告例をまとめ、アルギン酸ゲルの作製方法とゲル構造の相関についてCDスペクトルを用いて整理した。さらに、アルギン酸ポリマーのポリマー内およびポリマー間水素結合によって形成する酸性ゲルを Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 水溶液に投入した場合のゲルのコンホメーションに及ぼす影響をCD測定に基づき評価した。

2. 試料ならびに実験方法

2.1 試料

試料として紀文フートケミファのアルギン酸ナトリウム（商品名ダックアルギン）を用いた。マンヌロン酸（M）とグルロン酸（G）の組成比（M/G比）は0.47、粘度50 mPa・s（1%）の試料を用いた。所定濃度（0.2 or 1.0 wt%）のアルギン酸ナトリウム水溶液を調整し、所定濃度のCaCl₂, FeCl₃, HCl, GDL（D-gluconic acid- δ -lactone）水溶液中に滴下することによって球形のアルギン酸ゲルを得た。溶液条件によっては自重で変形するゾルに近いゲルが得られた。それぞれ滴下する溶液をもとに、作製したゲルの呼称をCa gel（Ca型gel）、Fe gel（Fe型gel）、Acid gel（HCl or GDL）とする。（Fig.2参照）GDLはDentiniらの報告を参考にして、均質なAcid gelを作製するために用いた。各試料の調整条件と得られた試料の性状をTable 1に示す。

2.2 CD測定

CDの測定は日本分光製のJASCO J-820を用いて測定した。0.1mmセルに試料を投入することによって測定した。ゲルの性状に依存して試料セルを調整した。溶液試料の場合には、溶液セルを用い、透過法によって測定した。溶液に近いゾルの場合には積分球を用いた拡散透過法を用いた。一方、弾性のあるゲルの場合は石英板でゲルをはさみ込んで厚みを調整し、拡散透過法により測定した。測定範囲は200~500 nm, 0.1 mdegの解像度でいずれも室温にて測定を行なった。試料ごとの測定方法はTable 1に示した。

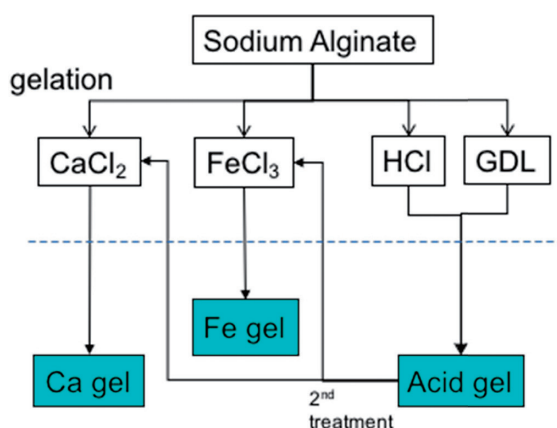


Fig.2 Preparation routes and the names of the synthesized alginate gels

2.3 アルギン酸のCDスペクトル

アルギン酸水溶液およびイオン架橋したゲル、酸性溶液中で生成するゲルのCDスペクトルの特徴についてはMorrisらおよびDentiniらの先駆的な研究がある。アルギン酸構造

Table 1 List of samples that were used in the CD measurement

No.		試料 タイプ	合成条件		試料性状		CD測定法			
		A液	B液 Alginate 濃度, M/G比, 粘度 (分子量反映)	状態		透過法 (溶液 セル)	拡散透 過(積分 分球)	石英板+ 拡散透 過(積分 球)	備考	
1	ブランク	0.1M CaCl ₂	5 ml	-	コントロール溶液	○				
2	ブランク	0.1M FeCl ₃	5 ml	-	コントロール溶液	○				
3	Alg水溶液	-	-	0.2% w/v, Alg(M/G=0.47, 50cp)	コントロール (Alg水溶液)	○				溶液セルを用いた通常の透過測定
4	Ca Alg ゾル	0.1M CaCl ₂	5 ml	Alg(M/G=0.47, 50cp)	沈殿ゲル形成 (ゾルに近い)	△	○			溶液セル測定→ゾル沈殿(弱シグナル) 積分球の入口に薄膜セル設置する測定→強 シグナル
5	Fe Alg	0.1M FeCl ₃	5 ml	Alg(M/G=0.47, 50cp)	沈殿ゲル形成 (ゾルに近い)		し			どの手法もCD信号を検出できず。
6	Ca Alg	0.1M CaCl ₂	5ml	1.0% w/v, Alg(M/G=0.47, 50cp)	0.5g Alg/50ml-H2O条件ゲル			し		石英板に挟み、均一に伸ばし、積分球を用い た拡散透過測定
7	Fe Alg	0.1M FeCl ₃	5ml	1.0% w/v, Alg(M/G=0.47, 50cp)	ゲル			し		石英板に挟み、均一に伸ばし、積分球を用い た拡散透過測定
8	Acid gel (GDL)	GDL	0.71 g	0.2% w/v, Alg(M/G=0.47, 50cp)	即混合操作。白濁ゲル形成後 すぐに溶解した粘調液になる	○				溶液セルを用いた通常の透過測定
9	Acid gel (GDL)	GDL	0.71 g	1.0% w/v, Alg(M/G=0.47, 50cp)	即混合操作。白濁ゲル形成			し		石英板に挟み、均一に伸ばし、積分球を用い た拡散透過測定
10	Acid →Ca	0.1M CaCl ₂	5ml	No.9のゾル液	球形ゲル形成, 中心部は白い ゲル			し		石英板に挟み、均一に伸ばし、積分球を用い た拡散透過測定
11	Acid →Fe	0.1M FeCl ₃	5ml	No.9のゾル液	球形ゲル形成			し		石英板に挟み、均一に伸ばし、積分球を用い た拡散透過測定
12	Acid →Fe	0.002M FeCl ₃	5ml	No.9のゾル液	沈殿ゲル形成		し			溶液セルを用いた通常の透過測定
13	Ca Alg	1.0N CaCl ₂	50 ml	1.0% w/v, Alg(M/G=0.47, 50cp)	球形ゲル形成			し		石英板に挟み、均一に伸ばし、積分球を用い た拡散透過測定 (乳鉢で磨り潰した試料を石 英板に挟み、積分球の前に設置)
14	Acid gel (HCl)	1.0N HCl	50 ml	1.0% w/v, Alg(M/G=0.47, 50cp)	H型の球形ゲル			し		石英板に挟み、均一に伸ばし、積分球を用い た拡散透過測定

(官能基の解離度, polymer間の水素結合性相互作用, イオン結合, こらなに起因するコンホメーションの変化)とCDスペクトルの相関関係が知られている。要点をまとめると以下のような 特徴が報告されている (Morris et al., 1975, 1978, 1980, Dentini et al., 2006, 2007)。

1. グルロン酸は全体に負のシグナル, マンヌロン酸はダブルバンドスペクトルを呈する。
2. イオンもしくは分子の存在によりアルギン酸ポリマーのコンホメーション変化を誘発する場合には大なり小なりCDスペクトルの変化を生じる。
3. アルギン酸水溶液では, pHの上昇とともにCD値が低下し, 負のピークが長波側にシフトする。マンヌロン酸のみからなるアルギン酸のCDスペクトルはCaイオン量の相対量に独立である。
4. Caが共存するイオン架橋系(ゲル生成系)では, Caの相対量の増加とともにCD値が上昇する。同時に, 正のピーク及び負のピークもCa相対量の増加とともに長波長側にシフトする。

3. 結果と考察

Figs. 3, 4に得られたCDスペクトルを示す。比較基準としてアルギン酸水溶液のCDスペクトルを見ると一般的に知られているように, 250nm以下にCD信号が見られ, 211.1nm

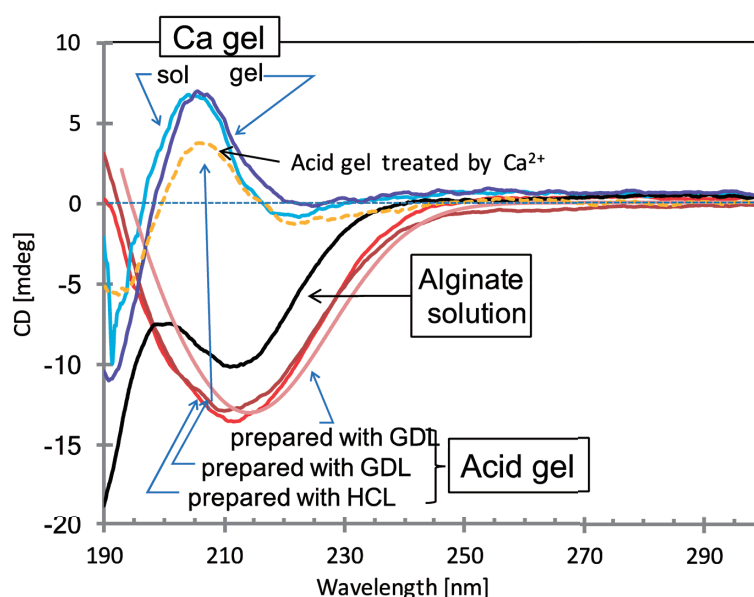


Fig.3 CD specter of alginate solution, Ca type alginate gels and Acid gels

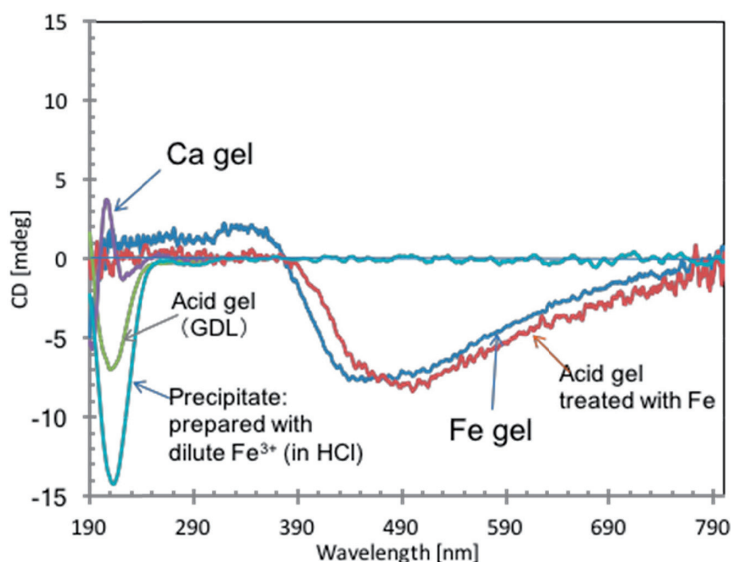


Fig.4 CD specter of Fe type gels prepared with dilute Fe^{3+} solution and concentrated Fe^{3+} solution, Acid gel treated with Fe^{3+} solution, respectively.

に負のピーク、200.9nmに生のピークが観察された。このスペクトルは、GGブロックを有するポリマーに特有のパターンである。Caイオンでゲル化した場合、205nmに正のピークを有するCDスペクトルが得られ、CD値は上昇している。いわゆるイオンコンプレックスの形成によりポリマーのコンホメーションが変わることを反映している。図中には、Acid gelのCDスペクトルを併記している。Acid gelは、塩酸中にアルギン酸水溶液を滴下して生成したゲルと、GDL中に滴下して生成したゲルについて測定した。GDLで調整した試料は、アルギン酸の濃度が0.5と小さい系では、アルギン酸を滴下後、すぐに白濁したゲルを形成したが、その後ゲルが溶け始め粘稠な溶液となったものを測定している。一方、アルギン酸の濃度が1.0と濃い系では白濁したゲルを形成した。HClに滴下した系では透明な強度のあるゲルを形成した。GDLで形成した粘稠液は214.2nmに負のピークを有し、白濁ゲルでは210nmに負のピークを有するCDスペクトルを示した。一方、HClで作成したAcid gelでは、211.6nmに負のピークを有するCDスペクトルとなり、GDLで作成した白濁ゲルと類似のCDスペクトルであった。アルギン酸溶液およびCa gelのCDスペクトルと比べると、Acid gel中のアルギン酸ポリマーのコンホメーションがこれらと異なることがわかる。Acid gelはアルギン酸の水酸基間の水素結合によって形成する高分子鎖のネットワーク構造（高分子鎖のバンドル形成）に起因するゲル化物である。Acid gelのCDスペクトルはアルギン酸中のカルボキシル基の解離依存性があり、特にpKa付近で大きく変化する。Fig.3に示したスペクトルを比較すると、本検討で作成したAcid gelはいずれも類似ではあるが、水素結合によるバンドル形成が弱いと考えられる試料（本検討ではアルギン酸の濃度が低い条件で調整した試料）では負のピークが長波長側にシフトした。酸性ゲルのCDスペクトルの負のピークはゲル化することによって（すなわち酸性ゲルを

生成することによって) 長波長側にシフトし, さらにpHが低い条件で生成することによって, より負のピークは長波長側にシフトすることがDentiniらによって報告されている(Dentini et al., 2006)。GDLで作成した白濁ゲル(生成時)→粘稠な溶解ゲルのスペクトルは他の条件で作成したAcid gelに比べて負のピーク位置が長波長側にシフトしている。 Fe^{3+} イオン水溶液中で生成したゲルについてはより長波長域でブロードな負のピークを呈した。 Fe^{3+} イオンの水溶液は $\text{pH} < 1$ の水溶液であり, 外観から Fe^{3+} とイオンコンプレックスを形成していると考えられるものの水素結合性の相互作用によって形成されたネットワーク構造を有することが示唆される。Acid gelを作成後, 引き続き Ca^{2+} 水溶液もしくは Fe^{3+} 水溶液中に投入して24時間放置後のゲルのCDスペクトルをFig.4に示す。Acid gelは Ca^{2+} 水溶液中に投入すると, Ca gelのCDスペクトルを呈するようになり, すなわち, 高分子鎖のコンホメーションはCaイオンとのイオンコンプレックスにより形成されるエッグボックス型構造が優位になっていると考えられる。同様に, Acid gelを Fe^{3+} イオン水溶液中に24時間投入した試料では, Fe gelと類似のスペクトルに変化しており, イオンコンプレックスの形成による構造転移が示されている。この観測結果は, Acid gelが粘弾性のとても高いゲルであるにもかかわらず, これに比べイオン架橋によるゲルのコンホメーションの安定化が優位であることを示唆している。

4. 結論

種々の条件で調整したアルギン酸ゲルのCDスペクトル測定を行ない, ゲルの作製条件とゲル構造の相関を整理した。Acid gelは, Ca^{2+} イオンや Fe^{3+} イオンと接触するとCa型gelやFe型gelと類似のCDスペクトルを示すようになり, 水素結合したネットワーク構造を形成したAcid gelからCa型gelやFe型gelのコンホメーションが優位に形成されることが示された。 Fe^{3+} イオン水溶液中で調整したゲルでは, Fe^{3+} イオン濃度が小さい条件ではAcid gelが優位に生成し, Fe^{3+} イオン濃度が高い条件では長波長側にブロードな負のピークを有するCDスペクトルを呈するゲルを形成する。

5. 謝辞

本研究でアルギン酸ナトリウムの試料は株式会社紀文フードケミファ(現キッコーマンバイオケミファ株式会社)より提供していただいた。CD測定は日本分光株式会社のご協力を得た。ここに記して謝意を表します。

6. 参考文献

Morris, E. R., Rees, D. A., Sanderson, G. R., & Thom, D.. Conformation and circular

- dichroism of uronic acid residues in glycosides and polysaccharides. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions II*, (1975) pp.1418-1428.
- Morris, E. R., Rees, D. A., & Thom, D., Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerization process in alginate gelation. *Carbohydrate Research*, 66, (1978) pp.145-154.
- Morris, E. R., Rees, D. A., & Thom, D., Characterization of alginate composition and block-structure by circular dichroism. *Carbohydrate Research*, 81, (1980) pp.305-314.
- Dentini, M., Rinaldi, G., Barbetta, A., Risica, D. and Skjåk-Bræk, G., Acid gel formation in (pseudo) alginates with and without G blocks produced by epimerizing mannuronan with C5 epimerases, *Carbohydrate Polymers*, 63, pp.519-526(2006)
- Dentini M., Rinaldi G., Barbetta A., Risica D., Anselmi C., Skjåk-Bræk G., Ionic gel formation of a (pseudo)alginate characterised by an alternating MG sequence produced by epimerising mannuronan with AlgE4, *Carbohydrate Polymers*, 67, (2007) pp.465-473.
- Liangbin Li, Yapeng Fang, Rob Vreeker, Ingrid Appelqvist, and Eduardo Mendes, Reexamining the Egg-Box Model in Calcium – Alginate Gels with X-ray Diffraction, *Biomacromolecules*, 2007, 8(2), pp.464-468, DOI: 10.1021/bm060550a
- David G. Cziner, Eugene S. Stevens, Edwin R. Morris, and David A. Rees, Vacuum ultraviolet circular dichroism of dermatan sulfate: iduronate ring geometry in solution and solid state, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108 (13), pp.3790-3795.
- K.I. Draget, G. Skjåk-Bræk, B.E. Christensen, O. Gåserød and O. Smidsrød, Swelling and partial solubilization of alginic acid gel beads in acidic buffer, *Carbohydrate Polymers* 29 (1996) pp.209-215.
- Kurt Ingar Draget, Kjersti Steinsvåg, Edvar Onsøyen, Olav Smidsrød, Na⁻ and K-alginate; effect on Ca²⁺-gelation, *Carbohydrate Polymers* 35 (1998) pp.1-6.
- K.I. Draget, G. Skjåk-Bræk and O. Smidsrød, Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight, *Carbohydrate Polymers* 25 (1994) pp.31-38.
- S. T. Moe, K. I. Draget, G. Skjåk-Bræk and O. Smidsrød, Temperature dependence of the elastic modulus of alginate gels, *Carbohydrate Polymers* 19 (1992) pp.279-284.
- Kurt Ingar Draget, Kjetill Østgaard & Olav Smidsrød, Homogeneous Alginate Gels: A Technical Approach, *Carbohydrate Polymers* 14 (1991) pp.159-178.