

Accounts of Materials & Surface Research

Surface Properties and Practical Applications of Biobased Surfactants

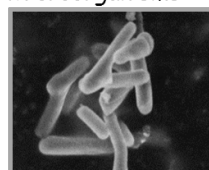
Tomohiro IMURA

*Research Institute for Chemical Process Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Tsukuba, Ibaraki 305-8565
t-imura@aist.go.jp*

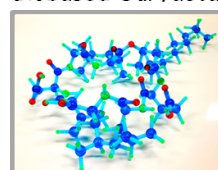
Biobased surfactants (BSs) are amphiphilic molecules which are produced from a variety of renewable resources by microorganisms. They have recently attracted much attention as a relatively new class of surfactants because of a growth in environmental awareness. BSs exhibit not only excellent surface and self-assembling properties but also versatile biological activities. They are generally classified into three categories; glycolipid, peptide, and fatty acid types, depending on the structure of their hydrophilic group.

In this account, I will describe the fundamentals and practical applications of biosurfactants including sugar (mannosyl erythritol lipid) and peptide surfactant (surfactin).

Microorganisms

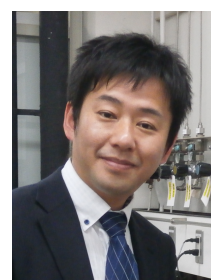


Biobased Surfactant



Keyword: biobased surfactant, mannosyl erythritol lipid, surfactin, surface property, phase diagram

Tomohiro Imura earned his Ph.D from Tokyo University of Science in 2003. He is currently a group leader of Energy-efficient Chemical System group, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST). He is also an Associate Professor of Department of Pure and Applied Chemistry at Tokyo University of Science. He received the Progress Award of the Japan Oil Chemists' Society in 2009. His current research interests focus on the developments of biobased/catalytic surfactants and nanoporous materials which are applicable to energy-efficient chemical systems.



バイオベース界面活性剤の界面物性とその応用

井村 知弘

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 化学プロセス研究部門

1. はじめに

界面活性剤は産業における“鍵マテリアル”であり、身近なところでも我々の生活のあらゆる場面で利用されている。多くの場合、使用後に環境中に放出されることから、社会の要請とともに技術革新が進められ、環境に調和したマイルドな界面活性剤が作られてきた。

近年では、原料の多様化といった観点から、石油から再生可能な資源への転換や、より少量で機能を発揮する界面活性剤の開発が必要となっている。最近では界面活性物質というだけでなく、生理活性や触媒活性などの機能を付与したものも開発されている。

既存の天然界面活性剤として、植物由来のレシチンやサポニン、動物由来の胆汁酸やカゼインなどは古くから知られている。こうした天然の界面活性剤の中でも、我々は微生物によって生産されるバイオベースサーファクタント（以下、BS）の研究に取り組んできた¹⁻³⁾。BSは生体内で酵素反応によって合成されるため、複数の不斉炭素有し、合成界面活性剤と比較して複雑でかさ高い構造であるにもかかわらず、『分子の形・向き』が均一な分子として得られる。その結果、界面でのユニークな分子集合や配向が可能となり、既存の界面活性剤に比べて『より低濃度で界面活性を発揮』できる。また、多様な生理活性を示すなど、生体由来の素材との併用による相乗効果も期待される。

本稿では、産業技術総合研究所（産総研）で系統的に研究を進めてきた酵母が生産する非イオン性界面活性剤の糖型 BS『マンノシルエリスリトールリピッド（MEL）』及び枯草菌が生産するアニオン性界面活性剤のペプチド型 BS『サーファクチン（SF）』を中心に概説する。

2. バイオベース界面活性剤(BS)の種類

BS は、大豆油、菜種油などの植物油脂類を原料として、微生物を培養することで菌体外に分泌され、培養液中に蓄積される。通常、植物ソースによる生産性の違いはあまりなく、各種の油脂を幅広く利用可能である。また、生産菌によっては、その他の脂質系原料（脂肪酸、アルコール、エステル類）や、グルコース等の糖質など、植物由来の各種再生可能資源から生産可能である。生産菌としては、一般的な酵母や細菌（枯草菌）が知られている。代表的なBSの構造とその生産菌を図1に示した。BSは、その分子内の親水基の構造の違いからいくつか分類される。親水基が糖型、ペプチド型、脂肪酸型の中でも、特に糖型のBSは生産性が高い。

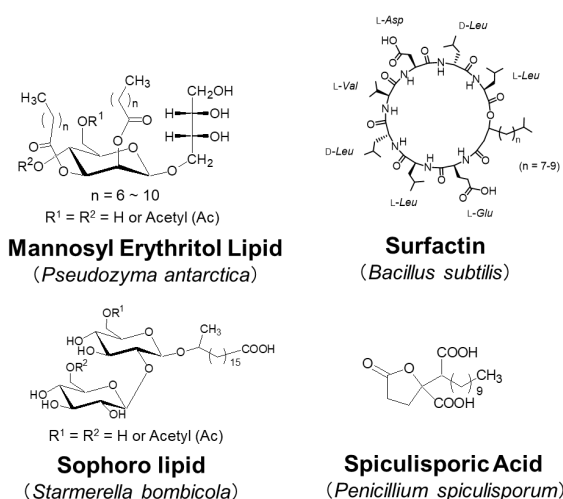


Figure 1. Structure of biobased surfactants.

糖型 BS の一種である『マンノシルエリスリトールリピッド（MEL）』は、マンノースとエリスリトールが β -グリコシド結合した糖鎖を親水基とし、2 モルの中鎖脂肪酸を疎水基に有する

(図 1 左上)。MEL は、大豆油を原料として、土壌や花木からスクリーニングされ、果皮等に存在する酵母菌 (*Pseudozyma antarctica*) から生産される。一方、サーファクチン (SF) は、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) が生産するペプチド型 BS の一種である。SF は、二つの D-アミノ酸を含むヘプタペプチド (L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu) とヒドロキシ脂肪酸が環化したユニークな構造を持つ⁴⁾ (図 1 右上)。以下、主にこれら二つの BS について紹介する。

3. 糖型バイオサーファクタント (MEL) の生化学的特性

MEL は優れた抗菌活性を有し、枯草菌や黄色ブドウ球菌などのグラム陽性細菌の生育を低濃度で阻害できる³⁾。その作用濃度は、糖型の合成界面活性剤に比べると、1/100~1/300 である。これらの抗菌活性に加え、MEL はヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL60 細胞) を始めとする各種の白血病細胞に対して 5~10 μM で、増殖抑制や分化誘導を示す。さらに MEL は、ラット褐色細胞腫由来細胞 (PC12) に対しては、神経突起の伸展促進と分化誘導を示し、悪性腫瘍であるマウスメラノーマ細胞 (B16) に対しては、増殖抑制とアポトーシスを示す。さらに MEL は、アレルギー反応に寄与するマスト細胞 (RBL-2H3 細胞) からのヒスタミン、ロイコトリエン C4、TNF- α 、などの炎症性メディエーターの分泌を阻害するという報告もなされている⁵⁾。

また MEL は優れたラメラ液晶形成能を示すが、このような特性があれば、リン脂質や他の素材と組み合わせて高機能性リポソームの開発や、化粧品や薬剤成分の送達システムへの応用も可能となる。実際、MEL を含有する陽イオン性リポソームは、DNA の安定化作用を示し、動物細胞などへの遺伝子導入 (トランスフェクション) において、極めて高い効率を示す^{6,7)}。

4. 糖型バイオサーファクタント (MEL) の界面化学的特性

MEL は、疎水基 (脂肪酸) の鎖長が中程度 ($\text{C}_8\sim\text{C}_{12}$) であるにもかかわらず、非常に小さな臨界ミセル濃度 ($\text{cmc}: 2.7 \times 10^{-6} \text{ M}$) で、大きな界面活性作用を示す。例えば、cmc で水の表面張力を 28 mN/m まで、水/*n*-ヘキサデカンの界面張力を 2 mN/m まで低下させる。また MEL は、大豆油や炭化水素類に対する乳化能で見ると、代表的な糖型の合成界面活性剤であるシヨ糖脂肪酸エステルやポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルに比べ、数倍以上の活性を示す³⁾。

特に、MEL は、水溶液中で非常にユニークな自己集合特性や自己組織化構造を示す。アセチル基を二つ有する MEL-A (1 mM) の薄膜を水和させると、直径 1~20 μm の油滴状の構造体を形成する。透過型電子顕微鏡観察や小角 X 線散乱法によって、その構造体がスポンジ相 (L_3 相、二分子膜がランダムに連結してできる三次元ネットワーク) であることが確認されている。一方、MEL-A からアセチル基が一つはずれた構造を持つ MEL-B は、スポンジ相ではなく、直径 10~20 μm の巨大リポソーム (ラメラ相、 L_α 相) を形成する。すなわち、マンノース上の一つの水酸基の有無が、自己組織化の方向を決め、スポンジ相 (ランダム)

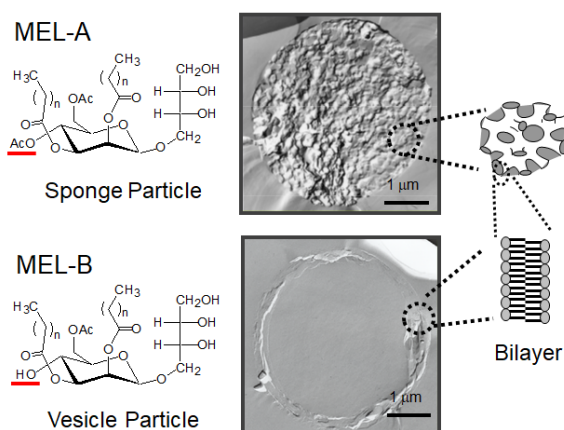


Figure 2. Self-assembled structures of mannosyl erythritol lipids.

からラメラ相(秩序化)への構造変化を引き起こす(図2)⁸⁾。

通常の界面活性剤や両親媒性脂質は、水溶液中で自己集合して容易にミセルを形成するが、二分子膜構造を持つ巨大リポソームを形成できるのは、ごく限られた物質だけである。リン脂質(レシチン)がリポソームを形成することは良く知られているが、糖脂質の場合、単独系でベシクルを形成することは稀である。

また、図3には、現在実用化が進められている2種類のMELの水溶液系での相図(リオトロピック液晶の形成)を示した。両者とも幅広い濃度域、かつ温度域で各種の液晶を形成可能であることが分かる。しかも、MEL-Aでは濃度変化に伴いスポンジ相、両連続逆キュービック相、ラメラ相へ液晶構造が変化、MEL-Bでは全領域にわたってラメラ相を形成するなど、少しの分子構造の違いが、相挙動に変化を持たらすことが示された^{9, 10)}。MEL/水/油三成分系での相挙動についても検討を進めており、興味深い相図が得られている¹¹⁾。

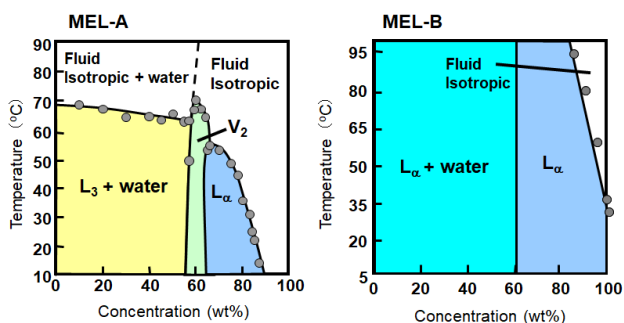


Figure 3. Binary phase diagrams of mannosyl erythritol lipids.

5. ペプチド型バイオサーファクタント(SF)の生化学的特性

SFは様々な生理活性を示す。例えば、フィブリンポリマーの形成を阻害し、血液凝固阻害活性を示す⁴⁾。また、SFはイオノフォアとして働き、そのアルキル鎖が脂質膜を貫通して細胞膜を破壊することで抗菌活性や抗炎症

作用を示す。SFは抗腫瘍活性を示すことも報告されている^{12, 13)}。さらに、枯草菌の一種である納豆菌もSFを生産し、食品用の納豆にSFを0.3 wt%添加した飼料を高脂肪食飼育ラットに与えると、血清総コレステロール、肝臓トリグリセリドの低下など、脂質代謝改善作用が増強されるとの報告もある¹⁴⁾。

6. ペプチド型バイオサーファクタント(SF)界面活性

SFの界面活性剤としての特徴は、複数の官能基を有する環状ペプチド構造を頭部に持つ点にある。この環状ペプチドは、N末端から2番目のL-Leuと5番目のL-Aspの間に働く水素結合によりペプチド鎖が折れ曲がり、"horse saddle(鞍)"構造になると分子モデリングにより明らかにされている¹⁵⁾。その際、1番目のL-Gluと5番目のL-Aspのカルボキシ基が頭頂部に張り出し親水部位を形成する。一方で、4番目のL-Valは脂肪酸側に折れ曲がり疎水部位を形成するため、分子全体として両親媒性を示す。さらに、この折れ曲がった環状ペプチドは、分子間で重なり合い β -シートを形成する¹⁶⁾。SFの臨界ミセル濃度(CMC)は0.1 M炭酸水素ナトリウム存在下、pH 8.7の条件において 9.4×10^{-6} Mと報告されており¹⁶⁾、これは代表的なアニオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)のCMCと比べると1/100以下である。

SFの優れた界面活性性は環状ペプチド構造に起因しており、これを化学的に開環して直鎖状にすると β -シート構造を形成せず、その界面活性は著しく低下する。分子レベルでの配向を評価するために、環状体及び直鎖状体の不溶性単分子膜を固体基盤上に形成させて原子間力顕微鏡(AFM)により観察した(図4)¹⁷⁾。その結果、両者は混和せず、ペプチド部位のトポロジーの違いにより配向挙動が変化する。さらに、分子モデリングによる分子長の解析より、明るいドメインは直鎖状体に

よって構成され、暗部は環状体によって構成されていることが示唆された。すなわち、直鎖状体では分子同士で水素結合のネットワークを形成できないのに対し、環状体の通常の SF は分子同士が水素結合により自己集合し、上手く配向できるものと考えられる。

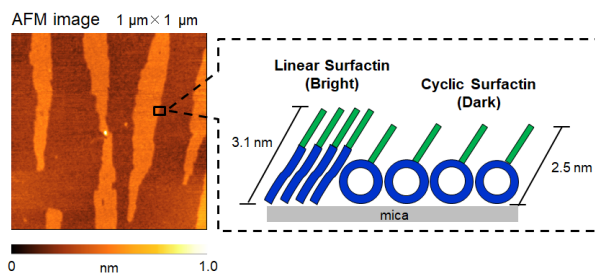


Figure 4. Self-assembled structure of cyclic and linear surfactins on the solid surface.

前述したように、SF は単独でも優れた界面活性作用を示すばかりでなく、一部の界面活性剤との併用により優れたコサーファクタント効果を発現する¹⁸⁾。例えば、汎用的な界面活性剤である直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)に対して SF のナトリウム塩を 1~10 mol% 添加すると、その CMC は 1/10~1/100 に減少する。このように、界面活性剤の使用総量が減っても、SF の添加により同等以上の表面張力低下能が得られる。このようなコサーファクタント効果は、直鎖状 SF を添加した場合には発現せず、環状ペプチドを構成する D-アミノ酸と SDS や LAS との特異な水素結合形成の寄与が核磁気共鳴スペクトル測定から示唆されている。

SF は希薄溶液中において優れた界面活性性を発現するだけでなく、濃厚領域においても興味深い配向を示す。SF は、幅広い濃度において良好な水溶性を示し、また、50 wt%以上の領域においてはラメラ相を形成する¹⁹⁾。偏光顕微鏡により 50 wt%の SF 水溶液を観察すると、ラメラ相に特有のモザイクテクスチャーが確認された。小角 X 線散乱測定においては長周期の繰り返しは 1 : 2 : 3 の面間隔を与えることから(図 5)、SF が濃厚領域においてラメ

ラ相を形成することがわかった。トポロジーのみが異なる直鎖状 SF は、等方性の両連続キュービック相 (V_2) を形成したことから、環状ペプチド間に働く水素結合が、濃厚領域においても分子の配向性に大きな影響を及ぼすことが考えられる。

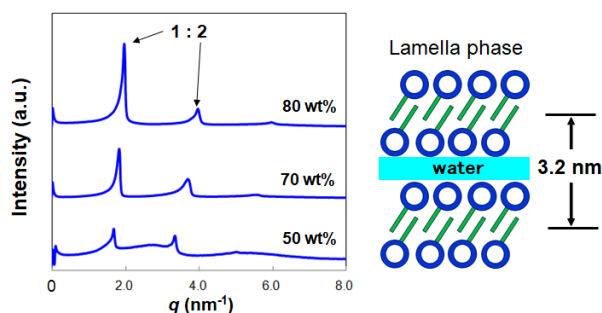


Figure 5. Small angle X-ray scattering patterns of lyotropic liquid crystals of surfactin.

この他にも、我々は SF の環状構造を利用した応用として、セシウムイオン等の捕捉・回収技術²⁰⁾、洗剤酵素を失活させない界面活性剤²¹⁾に関する研究を行っている。SF は、皮膚刺激性が極めて低く、生分解性にも優れており、洗浄剤、化粧品素材、バイオ素材として国内外での実用が進んでいる。

7. おわりに

BS は、石油ではなく、各種の再生可能資源から量産することができる。BS の幅広い分野での実用化にとって、微生物生産のコストは常に重要な技術課題ではあるが、最近のバイオテクノロジーの飛躍的革新や周辺技術の進歩により、ブレークスルーが可能となりつつある。冒頭で述べたように、界面活性剤は我々の身の回りの生活から、産業のありとあらゆるところで汎用されており、まさに産業を支える基盤技術である。ユニークな構造を持つ多様な BS を世に送り出し、これらが幅広い産業において利用されることに期待したい。

謝 辞

本研究の遂行に関して、国立研究開発法人産業技術総合研究所の北本 大博士、森田友岳博士、福岡 徳馬博士、平 敏彰博士に深く感謝致します。また、本研究を共同で実施した関連企業の皆様に、心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 井村 知弘, 福岡 徳馬, 森田 友岳, 北本 大, 山本 周平, 柳谷 周作, 北川 優, *コスメティックジャパン*, **2012**, 2(1), 81-88.
- 2) D. Kitamoto, H. Isoda, T. Nakahara, J. *Bioeng. Biosci.*, **2002**, 94, 187-201.
- 3) 北本 大, *薬学雑誌*, **2008**, 128(5), 695-706.
- 4) K. Arima, A. Kakinuma, G. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1968**, 31(3), 488-494.
- 5) Y. Morita, S. Tadokoro, M. Sasai, D. Kitamoto, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **2011**, 1810(12), 1302-1308.
- 6) S. Igarashi, Y. Hattori, Y. Maitani, *J. Control. Release.*, **2006**, 112, 362-368.
- 7) Y. Ueno, Y. Inoh, T. Furuno, N. Hirashima, D. Kitamoto, M. Nakanishi, *J. Control. Release.*, **2007**, 123, 247-253.
- 8) T. Imura, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, H. Negishi, H. Yanagishita, D. Kitamoto, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 2434-2440.
- 9) T. Imura, Y. Hikosaka, W. Worakitkanchanakul, H. Sakai, M. Abe, M. Konishi, H. Minamikawa, D. Kitamoto, *Langmuir*, **2007**, 23, 1659-1663.
- 10) W. Worakitkanchanakul, T. Imura, T. Fukuoka, T. Morita, H. Sakai, M. Abe, R. Rujiravanit, S. Chavadej, H. Minamikawa, D. Kitamoto, *Colloid Surf. B.*, **2008**, 65, 106-112.
- 11) W. Worakitkanchanakul, T. Imura, T. Fukuoka, T. Morita, H. Sakai, M. Abe, R. Rujiravanit, S. Chavadej, H. Minamikawa, D. Kitamoto, *Colloid Surf. B.*, **2009**, 68, 207-212.
- 12) X. Cao, A. H. Wang, R. Z. Jiao, C. L. Wang, D. Z. Mao, L. Yan, B. Zeng, *Cell Biochem. Biophys.*, **2009**, 55, 163-171.
- 13) C. L. Wang, T. B. Ng, F. Yuan, Z. K. Liu, F. Liu, *Peptides*, **2007**, 28(7), 1344-1350.
- 14) 谷 由美子, 水野 さやか, 住岡 美由貴, 古市 幸生, 大島 芳文, 伏見 宗士, 柿沼 淳司, *日本栄養・食糧学会誌*, **2006**, 59(5), 255-263.
- 15) J. M. Bonmatin, M. Genest, H. Labbé, M. Ptak, *Biopolymers*, **1994**, 34, 975-986.
- 16) Y. Ishigami, M. Osman, H. Nakahara, Y. Sano, R. Ishiguro, M. Matsumoto, *Colloids Surf. B.*, **1995**, 4, 341-348.
- 17) T. Taira, S. Ikeda, D. Kawamura, H. Sakai, M. Abe, D. Kitamoto, T. Imura, *J. Oleo Sci.*, **2014**, 63, 407-412.
- 18) 井村 知弘, 平 敏彰, 柳澤 恵広, 長野 卓人, 北本 大, 日本油化学会第53回年会講演要旨集, **2014**, 142.
- 19) T. Imura, S. Ikeda, K. Aburai, T. Taira, D. Kitamoto, *J. Oleo Sci.*, **2013**, 62, 499-503.
- 20) T. Taira, S. Yanagisawa, T. Nagano, Y. Zhu, T. Kuroiwa, N. Koumura, D. Kitamoto, T. Imura, *Colloids Surf. B.*, **2015**, 134, 59-64.
- 21) T. Taira, S. Yanagisawa, T. Nagano, T. Tsuji, A. Endo, T. Imura, *Colloids Surf. B.*, **2017**, 156, 382-387.