

論文の内容の要旨

氏名：呉 鵬

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：食品由来の生体高分子の複合化と糖鎖ネットワークの制御による分子認識機能膜の開発

1. 緒論

食品由来の生体高分子は環境負荷が小さく・再生産可能な高分子素材である。生産地の偏在に陥る可能性も少なく、広く持続的な利用が可能な高分子資源であり、石油由来のポリマーの代替資源としても新規の用途開発は重要である。生体高分子鎖の多くは構造多糖類であるが、これを工業原料の視点から見直し、付加価値の高い機能性素材として活用できれば、生物資源の新しい高度利用に資するばかりでなく、食品産業の多角的な展開としても期待できる。

本研究は生体高分子としてカニ・エビ殻などとして廃棄されている資源から得られる chitosan において、反応性に富むアミノ基をその高分子鎖に多く有することに着目し、特定の分子種に高い選択性を有するリガンドを化学修飾によって固定化し、タンパク質やペプチド等の医薬原料となるバイオ系機能性分子の分離を試みた。特に、高い透過流束を実現するため、表面改質を施すことにより、膜の実質的な表面積を増す試みを行った。また、澱粉を原料とし、黒酵母の一種である *Aureobasidium pullulans* を培養して得られる多糖類の pullulan と海藻由来の高分子(κ -carrageenan)との複合化を試みた。

本研究の目的は、分子サイズ認識能力の異なる生体高分子膜を複合化する糖鎖ネットワークの化学修飾と制御によって、高い透過流束と分子認識機能を発現させ、分子サイズに応じた分子群の選択分離を多段的に行うプロセスを開発することである。そのために、Chitosan 膜の調製においては、溶媒の高流束を実現するため、微細粒子による鋳型形成をキトサン膜の表面改質の手法として導入し、膜の機械的強度を損なうことなく膜一枚当たりの流束の向上を図り、一方、分子認識機能のリガンドとしてタンパク質親和性の高い Cibacron Blue F3GA を膜の化学修飾として導入し、タンパク質の選択的吸着と分子ふるい効果を合わせもった高流束の高度分離を行うことである。それによって、分離操作の上流側 (Up Stream) を担当する分離膜としての可能性を追求する。また、二種の生体高分子 (pullulan and κ -carrageenan) の複合化として、糖鎖ネットワークの構造制御の指標として κ -carrageenan 存在割合 (F_c) に注目し、その精密な分子サイズの認識能力によって分離操作の下流側 (Down Stream) を担当する分離膜としての可能性を追求する。これら、一連の研究成果により、食品由来の生体高分子の複合化と化学修飾により、糖鎖ネットワークの制御を実現し、注目成分の特性に応じて分離操作の上流側と下流側をそれぞれ担当する高分子膜を新規に調製し、分離操作の多段的、かつ連続的なプロセスを提案する。

2. Chitosan を基材とする高流束タンパク質分離膜の開発

2.1 Silica 微粒子による表面鋳型改質による高流束の実現

分子認識機能膜にとって、溶媒の透過流束の大きさは注目成分に対する選択性と共に重要である。本研究では、一枚の膜の実質的な表面積を増す工夫として、膜の機械的強度を損なうことなく、微細な凹凸構造を微粒子の鋳型として表面に形成し、膜の高流束の実現を図った。すなわち、chitosan-酢酸水溶液に silica 微粒子を懸濁させ、微粒子を完全に沈降させた後に乾燥し、乾燥膜に 1.5M 水酸化ナトリウム溶液を注いで酸を中和し、湯煎して膜表面の silica 微粒子を除去して、微細な凹凸構造を施した湿潤膜を得た (Figure 1)。

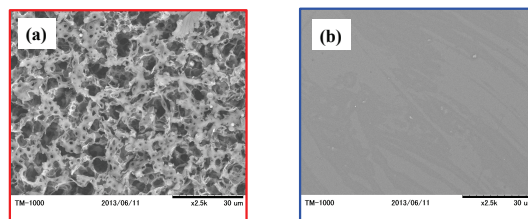


Figure 1. SEM image of surface modified chitosan membrane (a) imprinted surface (b) original surface

Figure 2 に膜面の圧力差を推進力とする純水透過の結果より、silica 微粒子で表面処理された膜は明らかに高い純水透過流束を示した。これは、製膜時に導入した silica 微粒子が膜表面に鋳型とし、その微粒子が溶け出した跡に膜微細な凹凸構造が生じて、実質的に膜一枚当たりの表面積を増加させたと考えられる。これより、silica 微粒子の粒子径や導入量を変化させることにより、膜面積の実質的な増大をもたらす膜表面の改質を制御できる可能性がある。

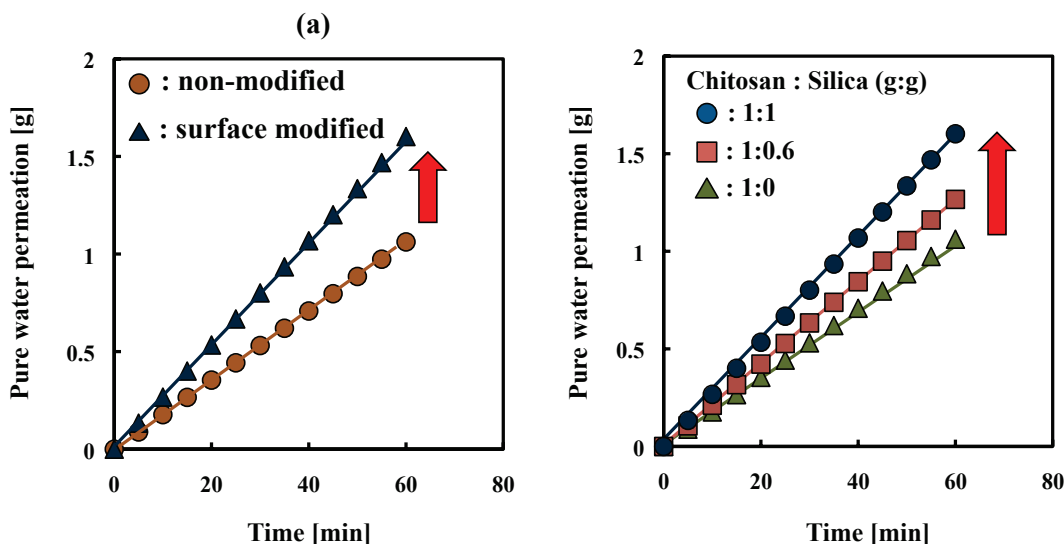


Figure 2 Elevation of pure water permeability (a) Effect of surface modification, (b) Effect of added amount of silica particles (Operational pressure: 100KPa)

2.2 Chitosan を基材とする高流束タンパク質分離膜の開発

タンパク質の選択リガンドとして、Cibacron Blue F3GA のトリアジン環にあるクロロ基とキトサンのアミノ基との求核置換反応によって共有結合を形成し、chitosan 膜にタンパク質吸着リガンドを導入した。圧力を推進力とするタンパク質水溶液の透過実験では、Pepsin (34KDa)、Egg Albumin (43KDa)のタンパク質に対し、阻止率がほぼ 90%に達した。大きな分子群の代表としてタンパク質 (BSA) がリガンドによって膜面に捕獲されたことによって、小さな分離を含む溶媒が高流束のもとに透過し、下流側に位置する別の高分子膜の糖鎖ネットワークによって小さな分子群の分画分離が多段的に実現される可能性が見出された。

3. 新規 κ -carrageenan/pullulan 複合膜の創成

製膜はキャスト法を基本手法とし、架橋剤の選択と添加方法に特に留意 (濃度・添加のタイミング) を払って、糖鎖ネットワークの構築を図った。最初に、グルタルアルデヒドによる架橋された高分子溶液をガラスの平滑面上に流延して加温乾燥により乾燥膜を成形する。また、複合化の一方の成分である κ -carrageenan の二重螺旋分子構造はカリウムイオンにより pullulan と架橋することができる。これより複合膜は実用に耐えられる機械的強度を得た。本研究の手法によって湿潤状態でも安定な平滑面を有する κ -carrageenan/pullulan 複合自立膜の再現性の高い調製法を確立した。

4. κ -Carrageenan/pullulan 複合膜に対する濃度勾配を推進力とした分子サイズ認識機能の評価

4.1 実験方法

κ -carrageenan/pullulan 複合膜を一對のガラスセルで挟み、膜で仕切られた供給相と透過相の間に生じた指標分子の濃度勾配を推進力とする拡散透過を行い、膜内の有効拡散係数を求めることによって膜の分子サイズ認識機能の評価した。指標分子は、膜を構成する高分子と静電的、疎水的相互作用に中立性が高く、かつ、分子サイズのモデルとなるにふさわしい物質を選考した。すなわち、Urea (60Da)、Glucose (180Da)、Methyl Orange (327Da)、Indigo Carmine (466Da)、Bordeaux S (604Da)、Brilliant Blue (826Da)、Rose Bengal (1017Da)である。

4.2 結果および考察

各成分単独系の透過流束に基づいて膜内の有効拡散係数を求めた。Figure 3 に示した結果より、分子量が 17 倍変化する (60~1017Da) の変域において有効拡散係数が 15,000 倍変化するを見出した。 κ -carrageenan/pullulan 複合膜が極めて鋭敏な分子分画性能を有することを、この分野で初めて明らかにした。分子量 327Da 付近で有効拡散係数の変化が最も著しいことから、膜内の透過経路は当該分子サイズ(約 11Å)に集中して揃っていることが示唆された。分子量の変域には食品由来の機能性成分 (アミノ酸・ビタミン等) が多く存在しており、これらの機能性成分の分子サイズに基づく選択分離膜として期待できる。

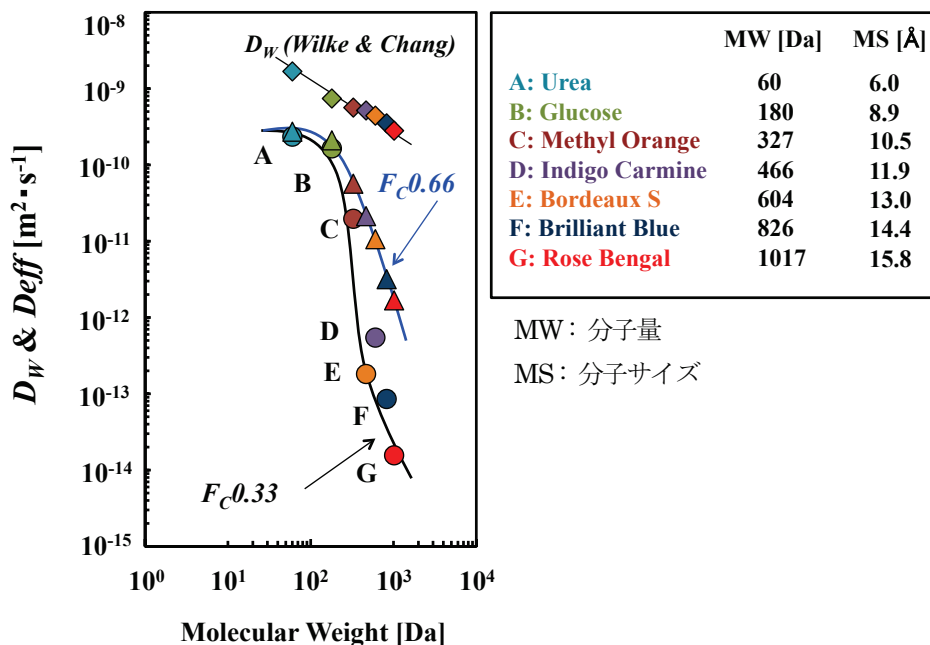


Figure. 3 Effect of molecular weight on the effective diffusion coefficient of κ -carrageenan/pullulan composite membrane.

5. κ -Carrageenan/pullulan 複合膜に対する圧力を推進力とする物質透過性能の評価

5.1 実験方法

κ -carrageenan/pullulan 複合膜を攪拌式限外濾過セルに設置し、窒素ガスの圧力を純水透過の推進力とし、膜を透過した水の質量を電子天秤により経時的に測定し、水の密度により体積へ換算し、膜面単位面積・単位膜厚さ・単位時間当たりの純水の透過流束 J_V [$\text{m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] 算出した。含水率の測定として、濾紙を用いて膜表面の付着水を取り除き、電子天秤により湿潤膜の質量 (w_e) を測定した、湿潤膜を 343K (24 時間) で乾燥させた後、乾燥膜の質量 (w_d) を求め、含水率は $(w_e - w_d) / w_e$ より算出した。この含水率は湿潤状態の膜内の空隙率として考えることができる。

5.2 結果および考察

親水性高分子膜にとって、水分子の透過性能の評価は溶媒分子の透過機構に関する基盤として重要である。 κ -carrageenan の質量割合 F_C の増大に従って膜の含水率が増大した。これは、高分子内の硫酸基は親水性が高いためと考えられる。 κ -carrageenan/pullulan 複合膜の純水の透過流束は操作圧力に一次比例して増大したことから、水は高分子膜内の透過経路を層流条件で流れる Hagen-Poiseuille 流れとしてモデル的に捉えられることができる。 F_C の高い複合膜ほど透過流束に対する液粘度の影響が一定ではなく、より顕著に現れたことから、透過機構について今後詳細な検討が必要である。

膜によって溶質分子の透過が阻止される割合 (阻止率) は溶質の分子サイズによって変化する。分子分画が最も鋭敏に現れる分画分子量は κ -carrageenan の質量比 F_C が 0.33 の複合膜では 327Da、 F_C が 0.66 の複合膜では 466Da であり、 F_C を制御因子として、複合膜の分子分画性能を設計できることが明らかとなった。なお、分子量 500 以

上の分子の阻止率は 96~98% で実質的に分子の透過は生じない。本研究が調製した膜は分子量 500 以上の分子については、むしろ逆浸透膜として利用できることが示唆された。

6. 高流束と分子認識機能による分子群選択分離膜プロセス

Figure 4 には一連の研究結果を多段式連続膜分離プロセスとして利用した場合のイメージを示す。今後、全体的な実証実験をする必要がある。まず、バイオ生産物の多成分系原料を個別に分離する場合は上流側においては高い溶媒透過流束を維持している chitosan 膜によって大きな分子群（タンパク質等）を捕獲する。本研究ではモデル的に Lysozyme や BSA の捕獲によって示した。次に、中程度の分子群（グルコースや色素分子）を κ -carrageenan/pullulan 分子サイズ認識膜によって分離した。さらに、小さな分子群（尿素など）は最も下流側において分離するプロセスである。上流側に表面改質を施した chitosan 膜、下流側に κ -carrageenan/pullulan の複合膜を用いて、膜分離プロセスを多段化することにより、分子サイズによって分画することができる。

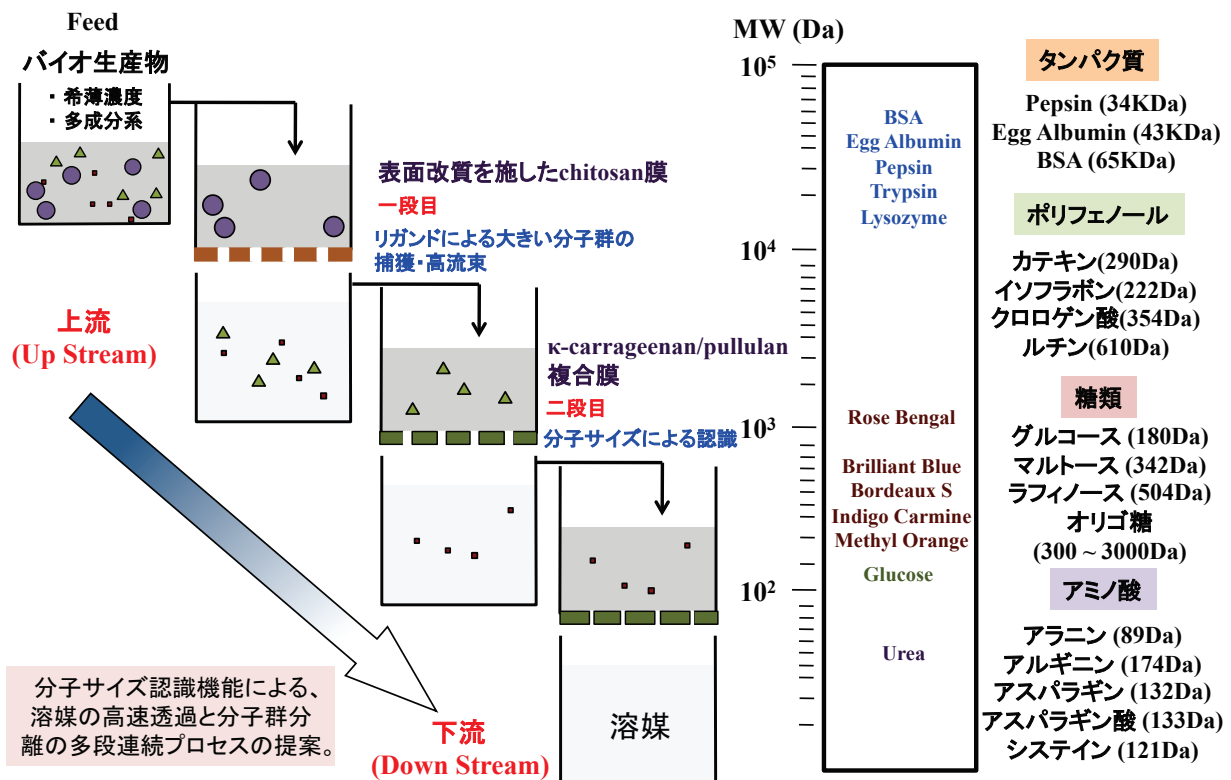


Figure 4 The image of a multi-stage membrane separation process.

7. 総括

生体高分子の糖鎖ネットワークの制御に注目し、新規な複合化により、分子認識機能膜の調製とその応用について研究を展開した。

① Silica 微粒子による鋳型による表面改質を行い、高流束の実現を図るとともに、Cibacron Blue F3GA をリガンドとし、大きな分子群（タンパク質等）を選択的に膜面に捕獲することによって上流側 (Up Stream) の分離操作に相応しい高分子膜を調製した。

② κ -carrageenan と pullulan を複合させ、湿潤状態でも安定な自立複合膜の調製に成功した。複合膜は分子サイズ(60~1017Da)を鋭敏に認識し、物質分離膜として可能性が認められるとともに、 κ -carrageenan の存在割合を制御因子として、分子サイズ認識能力の変化が期待できる。

一連の研究成果は、食品由来の生体高分子の複合化と化学修飾により、糖鎖ネットワークの制御を実現し、注目成分の特性に応じて分離操作の上流側と下流側をそれぞれ担当する高分子膜を新規に調製し、分離操作の多段的かつ連続的なプロセスを提案することができる可能性を示した点でオリジナルである。