

吸着技術を用いた機能性糖鎖の脱色

吉田 誠一郎, 松嶋 景一郎, 鎌田 樹志
宮本 宜之*

Decolorization of Oligosaccharides by Adsorption

Seiichiro YOSHIDA, Keiichiro MATSUSHIMA, Tatsuyuki KAMADA
Nobuyuki MIYAMOTO*

抄 録

高分子糖鎖である「グルコサミノグリカン (GAG)」を低分子化したGAGオリゴマーは、高分子糖鎖と比較して生体への吸収性が増加した新しい糖鎖医薬品として期待されている。これまでの検討により、当场が保有する「高温・高圧水マイクロ化学プロセス」を利用してGAGオリゴマーを効率的に得ることに成功した。しかし、得られたGAGオリゴマーは製造プロセスの過程で着色しており、商品価値をさらに高めて医薬品や試薬グレードの商品に展開するためにはGAGオリゴマーを脱色する精製プロセスを構築する必要がある。そこでGAGオリゴマーの精製プロセスとして活性炭による脱色プロセスの構築を検討した。

キーワード：グルコサミノグリカンオリゴマー、高温・高圧水マイクロ化学プロセス、吸着、脱色、活性炭

1. はじめに

グルコサミノグリカン (GAG) は、アミノ糖とウロン酸、あるいはアミノ糖とガラクトースの二糖単位からなる繰り返し構造を有する高分子糖鎖の一種である。GAGは生体内で重要な機能を担っており、医薬品や食品、化粧品の分野で注目を集めている機能性糖鎖である。このGAGを低分子化して得られるGAGオリゴマーは高分子のGAGに比べて生体への吸収性が高く、新たな医薬品としての利用の可能性を有している。これまで当场では高温・高圧水マイクロ化学プロセスを用いることで、北海道の未利用水産資源から抽出したGAGを効率的に低分子化する技術を開発した。本研究ではGAGオリゴマーの純度を向上し、医薬品や試薬グレードの商品へと用途を拡大する目的で、着色成分を除去するプロセスの構築を検討した。

2. 回分式脱色試験

2.1 脱色度の時間変化

はじめに、市販の脱色用活性炭をいくつか選定し、GAG

オリゴマー水溶液の回分式脱色試験を実施した。試験では、GAGオリゴマー水溶液に0.5～2 wt%となるように活性炭を添加し、これを25℃の恒温槽で振とうした。所定時間ごとにサンプリングした溶液を0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過して活性炭を除き、ろ液の吸光度 (420nm) を測定した。活性炭ごとの接触時間と脱色割合の関係を図1に示す。どの活性炭を用いた場合でも脱色は24時間以内にはほぼ平衡に達しているが、平衡時の脱色割合には差があることがわかる。特に活性炭A, B, Cでは48hの時点での脱色割合は約96%であるのに対し、活性炭Dでは67%であった。この差の原因を調査するために、それぞれの活性炭の窒素吸脱着測定を行い、活性炭の細孔特性の評価を行った。

食品の着色の主原因であるメイラード反応は還元糖とアミノ化合物が加熱により反応し、高分子量の褐色色素 (メラノイジン) が生成する反応である。GAGオリゴマーの水溶液にはGAGだけでなく、原料由来のタンパク質も含まれているため、GAGオリゴマー水溶液の着色物質の主成分はこれらが反応して生成したメラノイジンと考えられる。メラノイジンの分子量や分子サイズを正確に見積もることは困難であるが、GAGオリゴマーとタンパク質が反応して生成した高分子量の色素であり、比較的分子サイズが大きいと予想される。よって、GAGオリゴマー水溶液の着色成分を吸着できる細孔はメソ細孔 (2～50nm) であると考えられる。窒素の吸着等温線からDollimore-Heal (DH) 法¹⁾により活性炭

* 丸共バイオフーズ株式会社, * Marukyou Bio Foods Co. Ltd.

事業名：短期実用化

課題名：機能性糖鎖の製造技術に関する研究

のメソ細孔容積を計算し、その結果を表1にまとめた。表1より、平衡時の脱色割合が高い活性炭A, B, Cはメソ細孔容積が0.79~1.00cm³/gと活性炭Dの4倍以上大きいことがわかる。前述したようにGAGオリゴマー水溶液に含まれるメラノイジンは分子サイズが大きくメソ細孔に吸着すると予想されるため、メソ細孔容積の大きな活性炭A, B, Cが高い脱色割合になったものと考えられる。

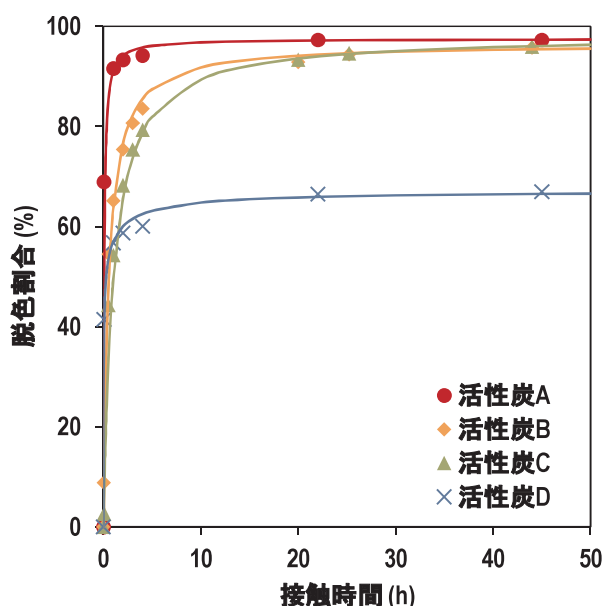


図1 GAGオリゴマー水溶液の脱色割合及び接触時間の関係 (25°C, 活性炭添加量 1 wt%)

表1 平衡時の脱色割合とメソ細孔容積の関係

活性炭	平衡時の脱色割合	メソ細孔容積 (cm ³ /g)
A	97%	1.00
B	96%	0.79
C	96%	0.91
D	67%	0.18

2.2 白色度測定

活性炭と48h接触させたGAGオリゴマー水溶液を凍結乾燥して得られた粉末 (GAGオリゴマー粉末) の白色度を測定した。GAGオリゴマー粉末をポリ袋に入れ、できるだけ平坦にならした後、ポリ袋の上からハンター白色度試験機で白色度を測定した。粉末の白色度を図2に示す。水溶液の脱色割合が67%の場合 (活性炭D), 得られる粉末の白色度は85%であったが、水溶液の脱色割合が96から97%の場合 (活性炭A, B, C), 粉末の白色度は89から90%となっていた。この結果からGAGオリゴマー水溶液を脱色することで白色度の高い粉末が得られることを確認した。

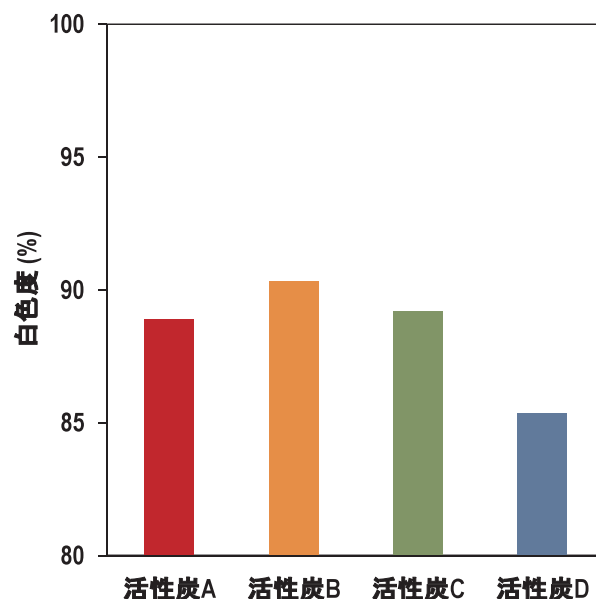


図2 白色度測定の結果

2.3 脱色の等温線

それぞれの活性炭の脱色能力をより詳細に検討するため、活性炭の添加量を変えた脱色試験を実施した。得られたデータを整理するために、活性炭重量あたりの脱色度合い x を次のように定義した。

$$x = (A_0 - A_e) \frac{V}{m}$$

ここで A_0 , A_e はそれぞれ初期および平衡時の吸光度, V は水溶液の重量, m は活性炭の重量である。平衡時の吸光度に対して脱色度合い x をプロットすれば、吸着における吸着等温線に相当する図3が得られる。活性炭A, B, Cでは類似した等温線が得られたが、活性炭Dではそれらから外れた領域の等温線が得られた。得られた等温線を定量的に評価するために、吸着における以下のFreundlich式¹⁻³⁾に相当する曲線を用いて得られたデータをフィッティングした。

$$x = kA_e^{1/n}$$

ここで, n , k はそれぞれ等温線のフィッティングパラメータである。フィッティングにより得られたそれぞれのパラメータを表2に示す。Freundlich式は実験式ではあるが, n は吸着質と吸着剤の親和力の強さ, k はそれら親和力と吸着容量を意味すると考えられている^{1,2)}。今回の系でも同様の議論が成り立つと仮定すると, 活性炭Dは n の値が0.2とほかの活性炭に比べて低く, 着色成分と活性炭の親和力が弱いと考えられる。前述したように活性炭Dは着色成分を吸着できる大きさのメソ細孔がほかの活性炭に比べて少なく, 着色成分は細孔以外の活性炭表面に弱く保持されていると考えられる。

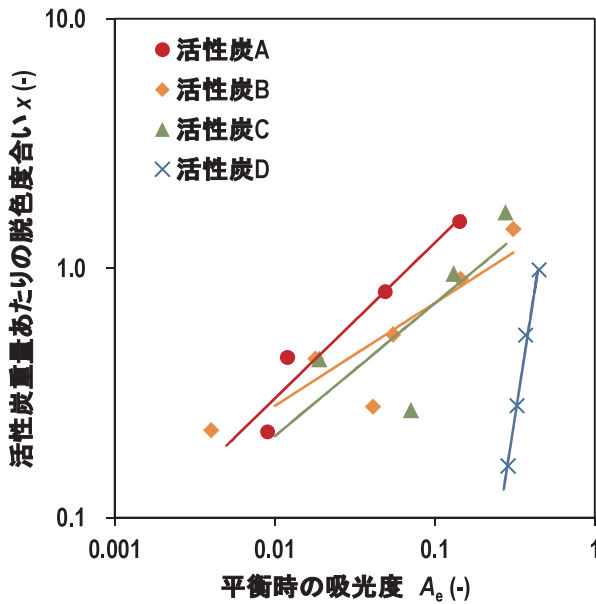


図3 GAGオリゴマー水溶液の脱色の等温線 (25°C)

表2 等温線から得られたパラメータ

活性炭	k	n
A	5.3	1.6
B	2.5	1.9
C	1.9	2.4
D	28.7	0.2

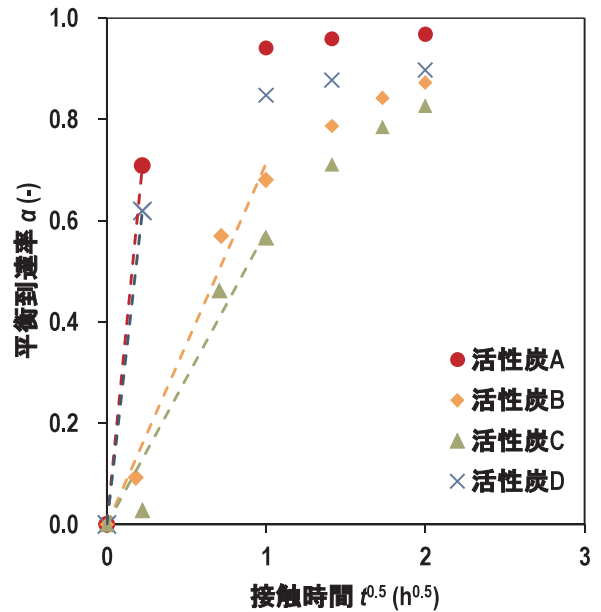


図4 脱色速度のBoydプロット

表3 Boydプロットから得られたパラメータ

活性炭	$D_p(\mu\text{m})$	$k'(1/\text{h}^{0.5})$
A	56	3.2
B	800	0.7
C	490	0.6
D	30	2.8

2.4 脱色速度の解析

続いて、脱色の速度について詳細に検討した。吸着速度を評価する手法は様々なものがあるが、今回はBoydらの手法^{1,3)}を参考にして吸着速度を評価した。Boydらは吸着初期における近似式として、以下の式を導いた。

$$\alpha = \frac{A_0 - A_t}{A_0 - A_c} = \frac{12}{D_p} \sqrt{\frac{D'_1 t}{\pi}} = k' \sqrt{t}$$

ここで、 α は平衡到達率、 A_t はある時点での吸光度、 D_p は活性炭の粒子径、 D'_1 は有効拡散係数、 t は接触時間、 k' は粒子内拡散速度定数を表す。Boydらの手法に従ったプロットを図4に、計算された各パラメータを表3に示す。粒子径が小さな(数十 μm オーダー)活性炭A、Dは着色成分が速やかに活性炭内部まで拡散するため速度定数は大きい。それに対して粒子径の大きな(数百 μm オーダー)活性炭B、Cでは着色成分が活性炭内部まで拡散するのに時間がかかるため、速度定数は小さくなっている。

3. 圧力損失の推算

回分式脱色試験により、GAGオリゴマー水溶液の脱色にはメソ細孔を有する活性炭が適していることが明らかとなった。実際の脱色プロセスを考えた場合は、脱色後の活性炭を分離するプロセスの煩雑さを避けるために流通式のプロセスを適用することが望ましい。流通式の脱色は活性炭を充填したカラムに対して処理液を連続的に通液することで実施されるが、この際カラムの圧力損失を考慮する必要がある。カラムに高い圧力損失が生じる場合には、偏流によるカラムの利用効率の低下やポンプへの負荷が生じる可能性がある。よって、できるだけ低い圧力損失を示す活性炭を利用すべきである。そこでまずは、回分式脱色試験で検討した活性炭を充填したカラムの圧力損失を推算することとした。粒子充填カラムの圧力損失を推算する式として、以下に示すKozeny-Carmanの式⁴⁾を用いた。

$$\frac{\Delta P}{L} = 36k \frac{(1-\epsilon)^2}{\epsilon^3} \frac{\mu u_s}{D_p^2}$$

ここで、 ΔP はカラムに生じる圧力損失、 L は充填高さ、 k はKozeny定数、 ϵ は充填層の空隙率、 μ は流体の粘度、 u_s は空塔速度、 D_p は活性炭の粒子径である。今回の計算では、 k と ϵ は、それぞれ5、0.4を用いた⁴⁾。また、 μ は20°Cの水

の値 (0.001Pa・s) を用いた。空塔速度と圧力損失の関係をグラフ化したものを図5に示す。活性炭B, Cを充填したカラムの圧力損失は, A, Dのそれらに比べて約2から3オーダー低い値を示すことがわかる。これは, Kozeny-Carmanの式からも明らかであるが, 圧力損失が粒子径 D_p の二乗に反比例するためである。この結果から, 圧力損失という視点で見ただけでは活性炭Bが流通脱色に適した活性炭であるといえる。以降の流通脱色試験では活性炭Bを用いた。

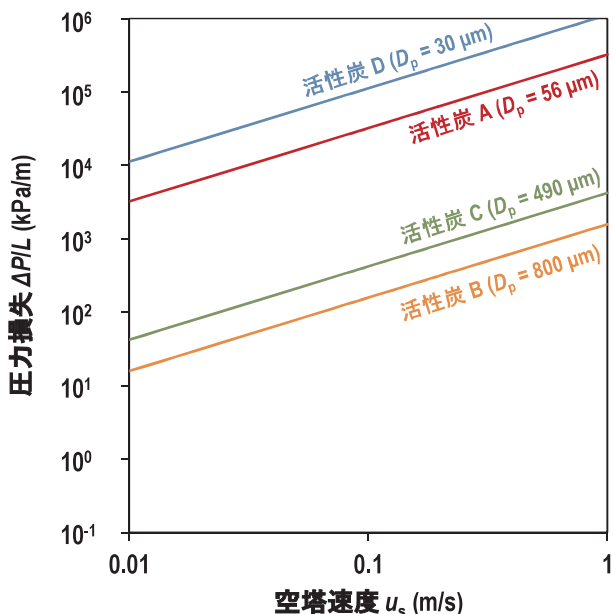


図5 活性炭充填カラムの圧力損失

4. 流通脱色試験

流通式脱色試験の手順を以下に示す。110°Cで1時間加熱処理した活性炭Bを3g秤量し, 脱イオン水に加えた。得られた活性炭のスラリーをダイヤフラムポンプで脱気し, 細孔の中に含まれる気体を除いた。このスラリーを, 空気が入らないようにガラス製カラム (内径12mm) に充填した。カラムの前後には石英ウールを充填した。得られた活性炭の充填層の高さは185mmであった。GAGオリゴマー水溶液を所定の滞留時間になるようにポンプでカラムに通液させた。カラム出口をUV-vis測定装置のフローセルに接続し, 420nmにおける吸光度を連続的に測定した (図6)。

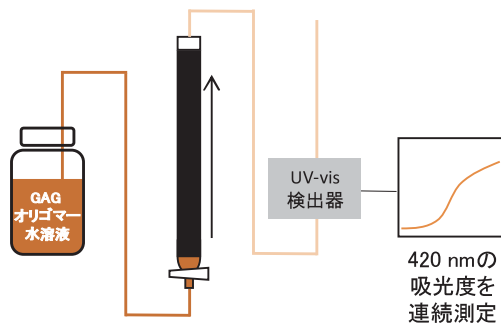


図6 流通脱色試験の模式図

GAGオリゴマー水溶液の滞留時間を変えて得られたカラム出口の吸光度変化を時間に対してプロットしたものの (破過曲線) を図7に示す。通液の初期では, 着色物質が全て吸着するためにカラム出口の吸光度はゼロである。時間の経過とともにカラム内部で吸着が起こっている領域 (吸着圏) がカラムの下流に移動し, この吸着圏がカラム出口に到達した段階から徐々に吸光度が増加する (破過)。吸着対象の濃度が入り口濃度に対して5%程度になった段階を破過とする場合が多い⁴⁾。吸着が平衡に到達していれば, 吸着容量は一定であるため, 破過するまでの総通液量は滞留時間によらない。一方, 今回の系では滞留時間が長くなると雑菌の繁殖などが懸念されることから, 滞留時間をできるだけ短くとした非平衡での脱色操作が必要となる。よって, 非平衡の脱色プロセスの設計には滞留時間と処理可能な容量の関係を明確にする必要がある。今回は, 脱色という観点からカラム出口の吸光度が供給液の5%になった時点で脱色操作を打ち切ることとし, その時点までの総通液量を処理可能な液量とした。滞留時間と処理可能な液量の関係を図8に示す。図8より, 滞留時間の増加とともに, 処理可能な液量が増加することがわかった。これは, 滞留時間が長いほど吸着が平衡に向かって進み, 吸着容量が増加したためと考えられる。このデータをもとに, 任意の滞留時間で通液した際の処理可能容量を見積もることができ, 流通式脱色プロセスの設計が可能となる。

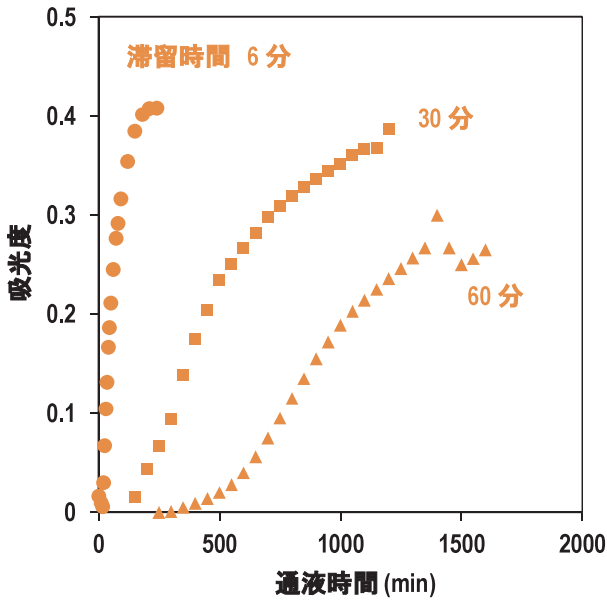


図7 流通式脱色試験の結果（破過曲線）

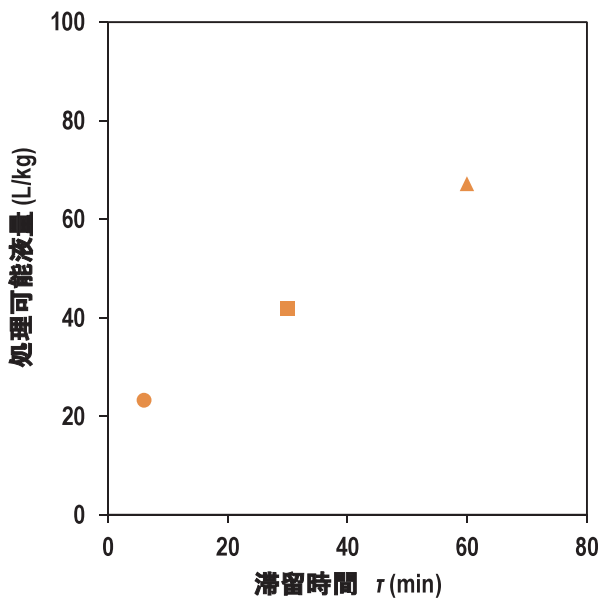


図8 滞留時間と処理可能な液量の関係

5. 実機での検討

今回得られたデータを元に、実プロセスでのGAGオリゴマー精製を行った。カラムに活性炭Bを充填し、GAGオリゴマー水溶液を通液させ脱色処理を行った（図9）。脱色されたGAGオリゴマー水溶液をスプレードライ（図10）で処理することでGAGオリゴマーの粉末を得た。今後は医薬品や試薬グレードの商品へと展開していく予定である。



図9 実際の流通式脱色プロセスの写真



図10 スプレードライによる乾燥

6. おわりに

本研究では、GAGオリゴマーの精製を目的として、活性炭を用いたGAGオリゴマー水溶液の脱色を検討した。回分式脱色試験により脱色用活性炭のスクリーニングを行い、メソ細孔容積の大きな活性炭が、GAGオリゴマーの脱色に適していることを見出した。続いて、選定した活性炭を用いて流通式の脱色試験を実施し、滞留時間と処理可能なGAGオリゴマー水溶液の液量の関係を明らかにした。ラボでの脱色試験の結果を元に実際の連続式脱色を実施した。

参考文献

- 1) 近藤精一・石川達雄・安部郁夫著：吸着の科学，丸善株式会社，228PP.，（1991）
- 2) 柳井弘著：吸着工学要論，共立出版株式会社，250PP.，（1977）
- 3) D. M. Ruthven：Principles of Adsorption and Adsorption Processes，John Wiley & Sons, Inc.，464PP.，（1984）
- 4) 橋本健治・荻野文丸編：現代化学工学，産業図書株式会社，386PP.，（2001）