

# 高温・高圧水マイクロ化学プロセスによる 多糖の高速・高選択低分子化反応

松嶋 景一郎, 吉田 誠一郎, 水本 秀二\*, 山田 修平\*, 菅原 一幸\*\*

## Highly Selective and High-Speed Depolymerization of Polysaccharides Using High-Pressure-High-Temperature Water Micro Chemical Process

Keiichiro MATSUSHIMA, Seiichiro YOSHIDA,  
Shuji MIZUMOTO\*, Shuhei YAMADA\*, Kazuyuki SUGAHARA\*\*

キーワード：マイクロ化学プロセス, 高温・高圧水, 環境調和型プロセス, 多糖, オリゴ糖

### 1. はじめに

多糖は、増粘剤やコーティング剤などとして、かねてより食品や製紙・繊維工業など、様々な分野で利用されている。近年では、細胞認識といった生体内での機能の解明が急速に進み、医薬品への応用に需要が高まっている。

多糖を産業的に利用する際に、分子量を調整する「低分子化」は極めて重要な反応処理である。このとき、低分子化された多糖の機能が構成糖の数や官能基などの構造に依存するため、官能基の脱離などの副反応を抑え、単位糖同士を繋ぐグリコシド結合のみを開裂させる高い選択性を持った分解法が要求される。工業的には酵素反応が用いられているが、酵素の価格や反応時間等に課題があり、機能性を期待されながら製品化されていない多糖が数多く存在する。また、市場展開されている多糖についても、製造法の改善や新規製造法の創出が求められている。

一方、水の機能を活用した高温・高圧水マイクロ化学プロセス（HP・HTW- $\mu$ CP）が、次世代の環境調和型・高効率製造技術として実用化が期待されている。我々はこの先端技術を用いて、高価な酵素や触媒を用いずに水のみで、多糖の低分子化を効率的に促進させる反応技術の開発を進めている<sup>1,2)</sup>。なかでも医薬品等として広く利用されている高分子多糖「コンドロイチン硫酸」について、オリゴ糖にまで高選択かつ高速で低分子化させるシステムを実生産スケールで構築しており、高分子と異なる機能や、高い生理活性が報告されてい

ながら、既存の酵素法では製造コストの問題があった「コンドロイチン硫酸オリゴ糖」の商品化に、既に成功している<sup>3)</sup>。

本報では、コンドロイチン硫酸以外の多糖で、オリゴ糖まで選択的に低分子化反応を促進させた研究例を紹介する。

### 2. 高温・高圧水マイクロ化学プロセス

#### 2.1 概念

水は超臨界や亜臨界といった高温・高圧状態になると、イオン積や誘電率などが著しく変化し、反応性に富んだ物性を持つようになる。しかも、それらの物性を温度・圧力条件により連続で変化させることができる。この水の機能と、数百ミクロン以下の微小な流路を反応場に利用した連続・高速反応システムが、高温・高圧水マイクロ化学プロセスである。その概念を図1に示す。

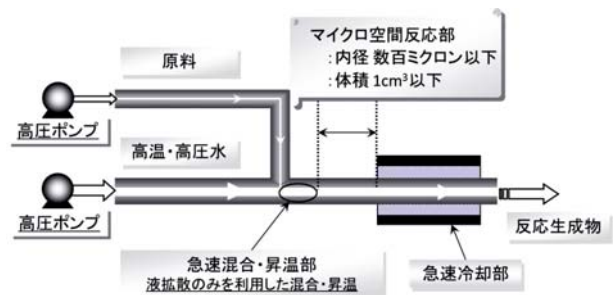


図1 高温・高圧水マイクロ化学プロセスの概念図

微小空間の特性から、流体の拡散のみによる混合、反応温度までの急速昇温、及び反応を急停止させる急速冷却ができる。すなわち、精密な反応時間・温度制御が可能で、これにより副反応が抑制され、反応選択性の向上が可能になり、水

\* 名城大学, \* Meijo University

\*\* 北海道大学, \*\* Hokkaido University

事業名：経常研究

課題名：環境に配慮したバイオマス変換技術に関する研究

の高い反応性と相乗効果により、高速・高選択反応を実現できる。

## 2.2 高温・高圧水マイクロ化学プロセス処理ラボシステム

高温・高圧水マイクロ化学プロセスを用いてラボスケールで構築した多糖の低分子化システム（PS-DP<sub>syst</sub>）を図2に示す。

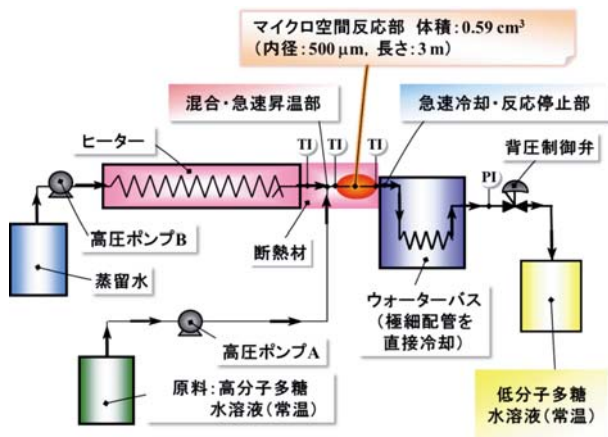


図2 低分子多糖製造ラボシステム

高圧ポンプAにて連続送液された常温の原料多糖水溶液は、ヒーターで加熱しながら高圧ポンプBにより連続送液された蒸留水と、反応部入り口で互いの拡散により精密混合され、所定の反応温度まで急速昇温される。また、反応部出口の極細配管を冷却することで混合液が急速冷却され、反応を急停止させる。これらの機構が精密な反応時間・温度制御を可能にし、高速・高選択で低分子化を促進させる。

なお、本研究では昇温効果を高めるため、蒸留水の流量は原料水溶液の3倍とした。また、マイクロ空間反応部は、内径500 μmのSUS316配管を用いて、空間体積を0.59cm<sup>3</sup>に調製した。

## 3. 多糖の低分子化

### 3.1 キトサン

カニやエビなどの甲殻類や、節足動物の外骨格の主成分であるキチンは、N-アセチルグルコサミンで構成されるホモ多糖である。多糖としては、セルロースに次ぐ資源量を誇り、その有効利用が検討されているが、構造が極めて強固であるため、溶解性・反応性が非常に乏しく、それ自体が商業的に利用されている量は少ない。キチンの多くは、図3に示す様に、脱アセチル化処理を行いグルコサミンのホモ多糖であるキトサンに変換することで、食品、化粧品や、工業、医薬等の分野で幅広く使用されている。また、キトサンのオリゴ糖は、食品として市場展開されているが、免疫賦活などの生理

活性について盛んに研究されており、機能性素材として注目されている。

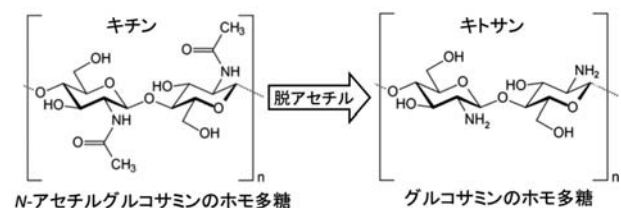


図3 キチンの脱アセチル化によるキトサンの生成

2.2節で示した低分子化システム（PS-DP<sub>syst</sub>）を用いて、反応時間8.8秒、圧力10MPaの条件のもと、反応温度を調整し処理したときのキトサンの分子量変化を図4に示す。

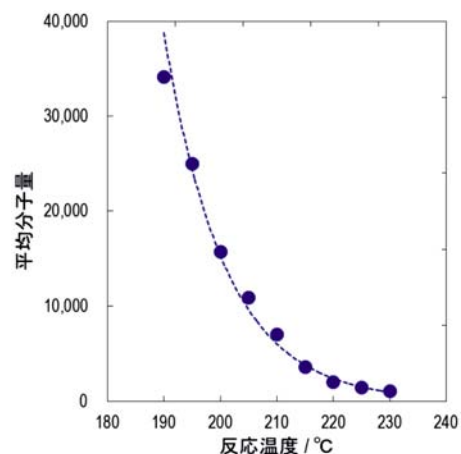


図4 HP・HTW-μCP処理によるキトサンの分子量変化

分子量15万以上の高分子キトサンを、1/150以下の分子量のオリゴ糖（約5糖）まで、酵素や触媒を用いずに、かつ官能基の脱離などの副反応を起こさずに高選択的に低分子化することができた。

キトサンオリゴ糖は、酵素を使用した多段階プロセスで製造されている。本プロセスは水のみで、分子量を精密に制御しながら低分子化できるため、精製工程の簡便化も可能になると考えられ、産業的に有効な方法になり得ると期待できる。

### 3.2 ヒアルロン酸

ヒアルロン酸（HA）は、我々が商業化に成功したコンドロイチン硫酸（CS）と同じくグリコサミノグリカン（GAG）に分類される多糖の一種で、図5に示す様にグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの2糖が基本単位となり、それが規則的に繰り返され分子量が100万以上にもなる直鎖の高分子多糖である。

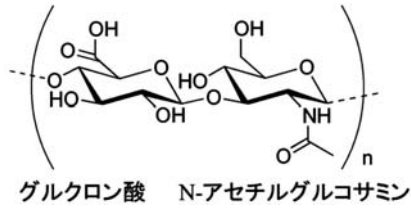


図5 ヒアルロン酸の構造

CSなど他のGAGと異なり硫酸基を持っていない、また、コアタンパク質と呼ばれるタンパク質に結合したプロテオグリカンとしては存在していない。しかしながら、他と同様に生体内で重要な役割を果たしており、関節軟骨では、アグリカン（プロテオグリカン）、リンクタンパク質と非共有結合し、超高分子複合体を作って、軟骨に弾力性を持たせている。そのため、現在のHAの主な市場は化粧品であるが、関節サポート素材としても広がっており、13~15万円/kgの高値で販売されている。また、そのオリゴ糖は世界的に最も研究されている多糖の一つで、特に高分子にない特異的な機能が多数報告されている4糖が注目されている<sup>4-6)</sup>。そこで、キトサンと同様にPS-DP Systを用いて、HAオリゴ糖、特に4糖を高収率で得られる反応条件の探索を行った。

反応時間8.8秒、圧力10MPaの条件下で、反応温度を調整し製造したHAオリゴ糖について、ゲルろ過クロマトグラフィーにより測定した分子量分布の結果を図6に示す。

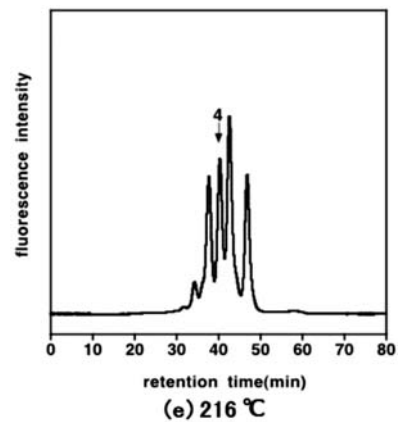
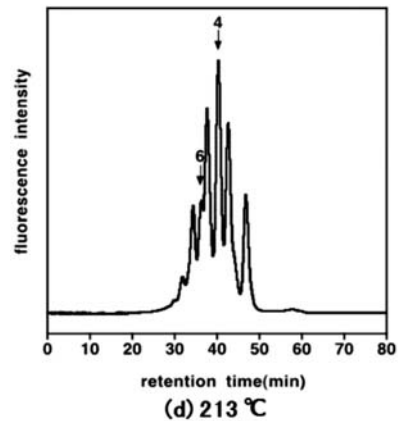
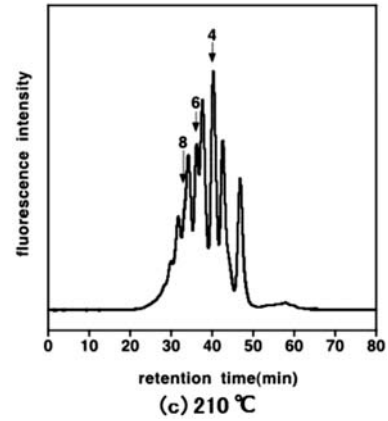
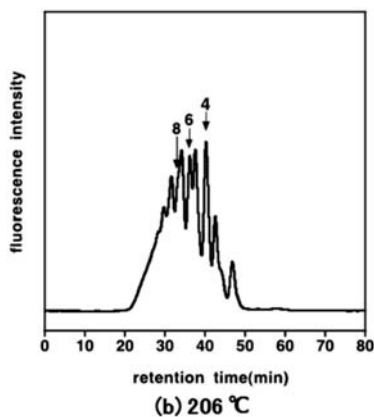
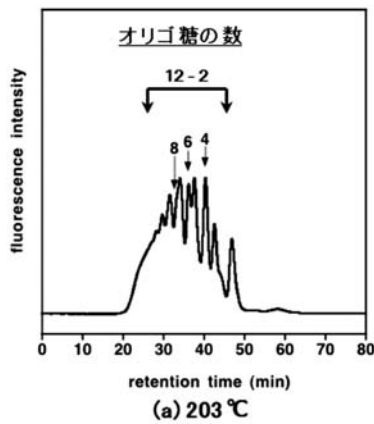


図6 HP・HTW- $\mu$ CP処理により得たヒアルロン酸オリゴ糖の分子量分布

この反応時間、圧力条件下で、高分子を残さず12糖以下まで低分子化する反応温度を探索したところ、2~12糖のオリゴ糖の全体の収率は、反応温度203°Cが最も高く59.8%であった。4糖の生成に注目すると、213°C処理の収率が8.6%、210°C処理が8.4%で、いずれも酵素反応の2倍以上の収率であったが、生成したオリゴ糖の4糖の占める割合としては、213°C処理が24.9%と最も高かったことから、後の分離精製工程を考慮すると、213°Cが最適と考えられた。

以上より、数十分から数時間かかる酵素反応と比較し、水のみを用いて10秒以下の高速、かつ高収率でHAオリゴ糖を製造することができた。

### 3.3 デルマトン硫酸

デルマトン硫酸 (DS) は、図 7 に示す様に硫酸化されたイズロン酸とN-アセチルガラクトサミンの2糖が基本ユニットとなるGAGで、皮膚や骨に多く存在し、コラーゲンと会合し、組織の弾性の維持に寄与している。医薬品、化粧品や機能性食品として利用されているが、その市場は大きくない。しかし、近年、生体系でDSが果たす重要な機能に関する研究が進められており、その解明が待たれている。



図7 デルマトン硫酸の構造

これまでの糖鎖科学の研究で、GAGの生理活性機能が長い糖鎖全体ではなく、GAGのオリゴ糖単位のユニット構造に由来することが分かってきた。そこで、DSの機能解明に向け、PS-DPysystによりDSオリゴ糖を高収率で得る条件を検討した。

反応時間8.8秒、圧力25MPaの条件下で、反応温度を調整し検討したところ、図8のゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分布測定結果が示す様に180~190℃の範囲で12糖以下のオリゴ糖を効率良く製造できることがわかった。

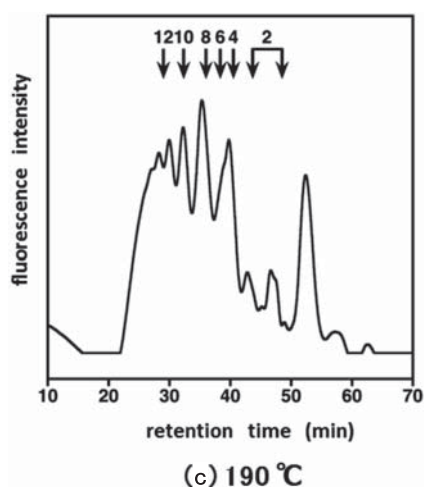
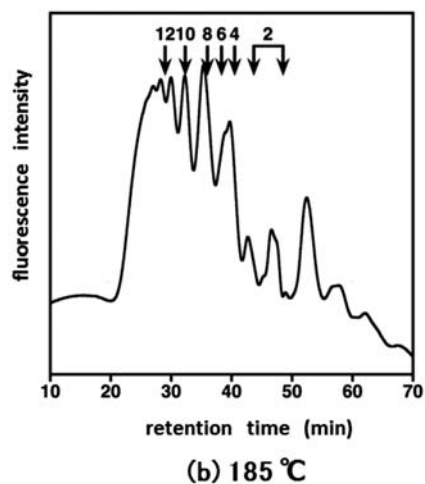
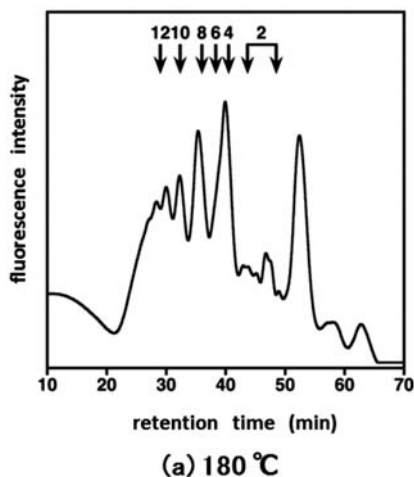


図8 HP・HTW- $\mu$ CP処理により得たデルマトン硫酸オリゴ糖の分子量分布

また、DSの生理活性について評価するため、DSを生合成できないCHO細胞の変異株 (pgsA) に繊維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) とDSオリゴ糖を添加し、ウェスタンブロッティングでMAPキナーゼのリン酸化の亢進の有無で評価した。その結果、亢進が観察され、DSが血管形成、創傷治癒のための肉芽組織形成に作用する生理活性があることが確かめられた。

### 3.4 ヘパリン

ヘパリン (HPN) は、おもにイズロン酸とグルコサミンを基本単位とする不均一な構造のGAGで、図9の分子模型が示す様に、多数の硫酸基が結合している<sup>7)</sup>。抗凝固薬といった医薬品として、世界中で幅広く使用されており、特に低分子量ヘパリンは、副作用の少なさを理由に使用量が増えてきている。

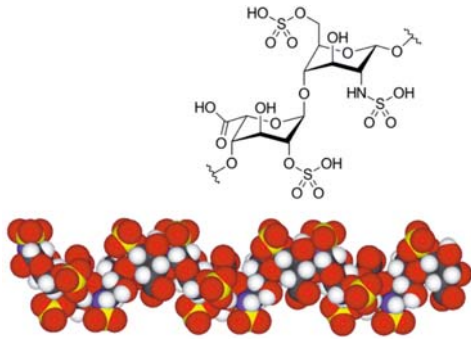


図9 ヘパリンの分子模型

低分子量ヘパリンは酵素反応により製造されているが、一般的に酵素処理で得られたオリゴ糖は、その末端に不飽和結合を有する構造をとるため、免疫原性が高いことが示されている。そこで、新たな低分子量ヘパリン製造法の提案を目的に、PS-DPsystによるHPNの分子量制御を検討した。

反応時間8.8秒、圧力25MPaの条件下で反応温度を変化させHPNを処理し、生成物の分子量分布をゲルろ過クロマトグラフィーにより測定した結果を図10に示す。

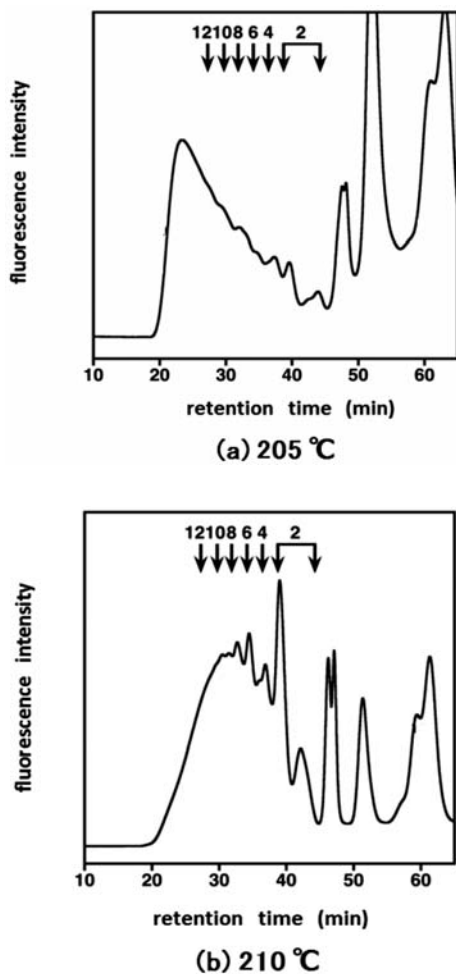


図10 HP・HTW- $\mu$ CP処理により得た低分子量ヘパリンの分子量分布

測定結果から、この条件下では10糖以上の低分子ヘパリンの生成には、反応温度205°C以下が、2～8糖のオリゴ糖の生成には、反応温度210°Cが適していることが示された。

#### 4. まとめ

高温・高圧水マイクロ化学プロセスを利用し、多糖を高選択・高速で低分子化するシステムをラボスケールで構築した。

本システムで、キトサン・ヒアルロン酸・デルマトン硫酸・ヘパリンの低分子化を検討したところ、高価な酵素や触媒を用いずに、水のみで分子量を制御しながら反応を進めることができた。さらに、対象とする多糖の種類を変えても、反応条件を調整することで、マイクロ空間反応部を変えずに一つのシステムで適正な製造条件を見出すことができたことから、システムの汎用性も明確になった。

今後も引き続きマイクロ化学プロセスを用いて、糖類やアミノ酸等の天然物を対象に、環境負荷を低減した変換反応の検討を進めていく。

#### 参考文献

- 1) K.Matsushima・H.Minoshima・Y.Ikushima・M.Nishizawa *et al.* : Decomposition Reaction of Alginic Acid Using Subcritical and Supercritical Water, *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol.44 Iss.25, pp.9626-9630, (2005)
- 2) S.Yamada・K.Matsushima・N.Miyamoto・K.Sugahara *et al.* : Mass Preparation of Oligosaccharides by the Hydrolysis of Chondroitin Sulfate Polysaccharides with a Subcritical Water Microreaction System, *Carbohydr. Res.*, Vol.371, pp.16-21, (2013)
- 3) 特許第6146733号
- 4) J. Wang・X. Wang・J. Wei *et al.* : Hyaluronan Tetrasaccharide Exerts Neuroprotective Effect and Promotes Functional Recovery After Acute Spinal Cord Injury in Rats, *Neurochem Res.*, Vol.40 Iss. 1, pp.98-108, (2015)
- 5) N.Wakao・S.Imagama・Y.Matsuyama・K.Kadomatsu *et al.* : Hyaluronan Oligosaccharides Promote Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Rats, *Neurosci Lett.*, Vol.488 Iss.3, pp.299-304, (2011)
- 6) H.Yamanokuchi : Effects of Hyaluronan Tetrasaccharide on the Differentiation of Neuronal Cells and Oligodendrocyte Precursor Cells, *Kokubyo Gakkai Zasshi*, Vol.79 Iss.3, pp100-109, (2012)
- 7) <https://en.wikipedia.org/wiki/Heparin>