

酵素反応で生成したカルボニル基導入型デキストランによる 金属の吸着

瀬戸弘一、原田浩幸、大渡啓介、川喜田英孝*

佐賀大学大学院工学系研究科（〒840-8502、佐賀県佐賀市本庄町1）

Metal Adsorption by Carbonyl-Group-Containing Dextran Produced by Enzymatic Reaction in Porous Membrane

By

Hirokazu SETO, Hiroyuki HARADA, Keisuke OHTO, Hidetaka KAWAKITA

Department of Applied Chemistry, Saga University (1-Honjo, Saga 840-8502, Japan)

Abstract : Carbonyl-containing dextran was generated via transferase reaction of dextransucrase in porous hollow-fiber membrane, SPG membrane, to demonstrate the metal adsorption ability. Dextransucrase was immobilized onto the pore surface of SPG membrane, and subsequently sucrose with carbonyl group was reacted with the immobilized dextransucrase, generating carbonyl-containing dextran from the active site of the immobilized dextransucrase. The resultant membrane was used for the copper adsorption material.

Keywords : dextran; dextransucrase; carbonyl group; metal adsorption; porous membrane

1. 緒言

末端が固定され、もう一方の末端が固定された高分子をポリマーブラシという。ポリマーブラシは、自由に伸縮するために、固体担体表面に三次元の高分子による反応場あるいは分離場を形成できる。ポリマーブラシの導入方法には、以下の二つの方法がある。1) 予め末端に官能基をもつ高分子を調製し、高分子と結合する部位をもつ担体表面と共有結合で結合させる方法¹⁾、および2) 担体表面にラジカル種のような活性種を形成させ、それとモノマーを反応させて高分子を成長さ

せる方法²⁾、である。1) の反応では、担体表面に導入する高分子自身の立体排除体積が問題となるために、高密度なポリマーブラシによる場の形成は困難である。2) の反応では、ラジカル種を形成するために、放射線やプラズマなどの高エネルギーを担体表面に与える³⁾。そのため、担体自体の強度が損なわれるなどの問題点がある。

デキストランシユクララーゼ (DSase) は、転移酵素の一種であり、ショ糖からフルクトースとデキストランを生成する。デキストランは、DSaseの活性中心と複合体を形成する。この酵素の性質

平成 22 年 6 月 1 日受理

大学院工学系研究科循環物質化学専攻、先端融合工学専攻

(c) 佐賀大学大学院工学系研究科

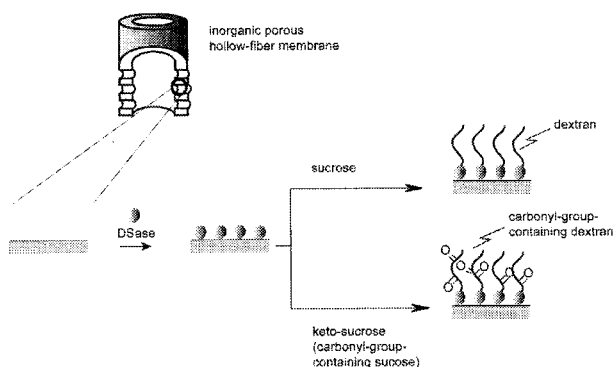


Fig. 1 Illustrated scheme for the production of dextran using DSase's reaction

を利用すると、上記2)のような表面修飾へと応用できる。すなわち、担体表面に DSase を固定した後、基質であるショ糖と反応すると、DSase の活性中心からデキストランを成長させることができる。酵素反応は、温和な環境で反応を行うことができるために、担体の化学的あるいは物理的な性質を損なうことがない。現在では、合成高分子による表面修飾手法として、原子移動ラジカル重合法の研究も盛んに行われている⁴⁾。上記の DSase の反応を利用して表面修飾する方法は、酵素を介した担体表面のデキストランによる修飾が可能である。現在までに、無機多孔性中空糸膜を担体として用い、その孔表面に DSase の反応によるデキストランによる表面修飾を行ってきた。すなわち、多孔性膜の孔表面に酵素を固定してデキストランを生成し、膜の孔径（空孔率）の制御⁵⁾、コロイド除去⁶⁾、およびレクチン吸着⁷⁾などを行っている。

基質としてショ糖を使用した場合には、多孔性膜に孔表面にデキストランを生成することができる。ここで、デキストランは α -1,6 グリコシド結合をもつグルコースの高分子である。水酸基を複数もち、柔軟性に富む。水酸基の代わりにさらに強い相互作用をデキストラン分子に導入するために、予めショ糖分子のグルコース部位に官能

基を導入し、それを DSase の反応で重合する方法を我々は開発した⁸⁾。このような官能基が導入されたデキストランの重合方法を、膜の表面修飾に応用できれば、官能基をもつデキストランを膜の孔表面に形成することができる。

本研究では、多孔性膜の孔表面に DSase を固定し、官能基（カルボニル基）がグルコース部位に導入されたショ糖と反応させてカルボニル基が導入されたデキストランを導入した（Fig. 1）。このデキストランは膜の孔表面に末端が固定され、片端が自由端であるためにポリマーブラシのような三次元の分離場を形成できる。そして、デキストランに導入されたカルボニル基による銅イオンの吸着サイトとしての可能性を調べた。

2. 実験

2.1 カルボニル基を導入したショ糖の合成

既報に基づき、pyranose 2-oxidase(P2Ox)を固定した固定化酵素膜を用いて、カルボニル基の合成を行った⁹⁾。Durapore 膜に透過法によって P2Ox を固定した。その後に、ショ糖溶液を P2Ox 固定膜に透過して、カルボニル基が導入されたショ糖溶液を得た。

2.2 遊離したカルボニル基導入型デキストランの生成および粘性評価

バッチ法を用いて、DSase と、ショ糖およびカルボニル基が導入されたショ糖とを反応させて、それぞれデキストランおよびカルボニル基が導入されたデキストランを生成した。重合方法は既報に従った⁸⁾。デキストランおよびカルボニル基導入型デキストランの粘性を粘度計（DVII+Pro、Brookfield）を用いて測定した。

2.3 多孔性中空糸膜の孔表面でのデキストランの生成

無機多孔性中空糸膜（Shirasu Porous Glass: SPG

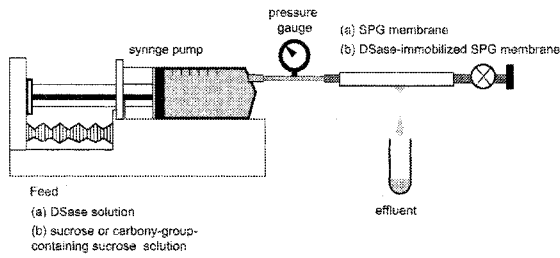


Fig. 2 The apparatus of DSase immobilization and dextran production in the porous membrane.

膜、平均孔径 2000 nm、内径 4 mm、外径 5 mm、有効長 2 cm) を Fig. 2 に示す装置に取り付け、膜の内面から外面に DSase 溶液を透過させた。流出液中の DSase の活性から、DSase の多孔性中空糸膜への固定量を算出した。

デキストランおよびカルボニル基が導入されたデキストランを生成するために、DSase が固定された膜を再び Fig. 2 の装置に取り付け、ショ糖およびカルボニル基が導入されたショ糖溶液を透過した。デキストランおよびカルボニル基が導入されたデキストランの生成量は、副生成物であるフルクトースの生成量から算出した。

2.4 デキストラン生成膜の銅イオンの吸着能の評価

カルボニル基が導入されたデキストランを生成した多孔性膜の銅イオンの吸着性能を透過法を用いて調べた。SPG 膜、デキストラン生成 SPG 膜、およびカルボニル基が導入されたデキストラン生成 SPG 膜に、Fig. 2 の装置を用いて銅イオン溶液を透過した。ここで、空間速度とは溶液透過流量を膜体積で割った値であり、今回は 23 h^{-1} に設定した。銅イオンの濃度は、原子吸光分光光度計 (AA-6650、Shimadzu) を用いて測定した。

3 結果および考察

3.1 カルボニル基導入型デキストランの粘度特性

カルボニル基は水酸基よりも分極しているため

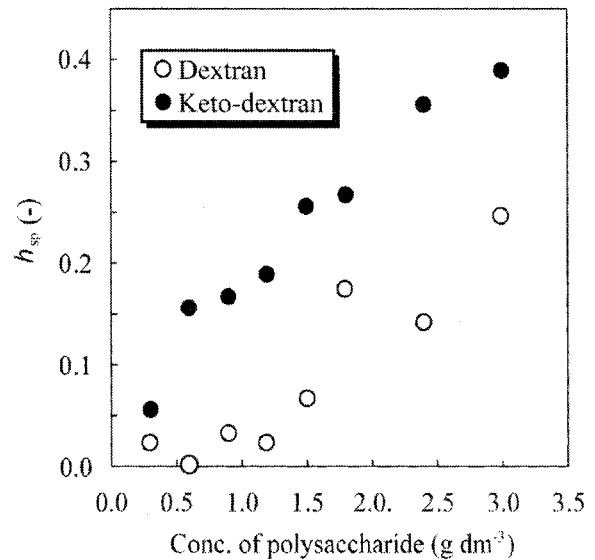


Fig. 3 Rheological properties of dextran and carbonyl-group-containing dextran.

に、カルボニル基導入型デキストランは、分子間あるいは分子内でデキストランよりも相互作用する可能性がある。デキストランおよびカルボニル基導入型デキストラン (Keto-dextran) の濃度を変化させて粘度特性を評価した (Fig. 3)。ここで、生成したデキストランの分子量は 200 万程度の巨大分子であった。濃度を増加するにつれて、デキストランおよびカルボニル基導入型デキストランの粘度も増加した。また、カルボニル基が導入されているデキストランが高い粘度を示した。すなわち、水溶液中で分子間および分子内で相互作用していることが粘度特性より明らかになった。

3.2 固定された DSase からのデキストランの生成

DSase を SPG 膜に透過法によって固定し、続いてショ糖溶液およびカルボニル基が導入されたショ糖溶液を透過した。カルボニル基が導入されたショ糖溶液を DSase 固定膜に透過したときのデキストラン生成量の経時変化を Fig. 4 に示す。カルボニル基を導入したショ糖の溶液を透過すると、カルボニル基が導入されたデキストランが膜内で DSase によって生成した。それに伴って、膜

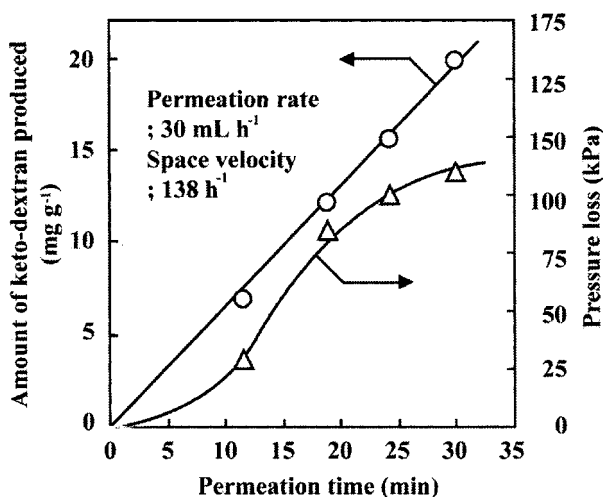


Fig. 4 Production of carbonyl-group-containing dextran by the immobilized DSase along with the pressure loss in permeating substrate solution.

の圧力損失が増加した。これは、DSaseの活性中心から生成したカルボニル基導入型デキストランが膜内部に生成し、膜の空孔率を減少させたためである。

3.3 カルボニル基が導入されたデキストランへの銅イオンの吸着

カルボニル基が導入されたデキストランは、分子間あるいは分子内で相互作用を形成することが明らかになった。これは水酸基のみであるデキストランでは存在しない現象であった。このカルボニル基がもつ分極構造を分離サイトとして利用できる可能性を検証するために、デキストランが生成した膜およびカルボニル基が導入されたデキストラン生成膜に銅イオンを透過してその吸着性能を調べた。SPG膜、デキストランを生成したSPG膜、およびカルボニル基を導入したデキストランを生成したSPG膜による銅イオンの吸着能をFig. 5に示す。カルボニル基が導入されたデキストランをもつ膜が、高い銅イオンの吸着性能を示した。このことから、官能基をもつデキス

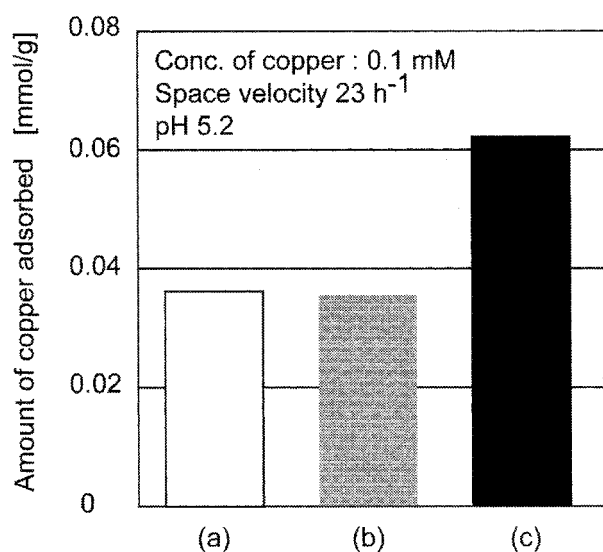


Fig. 5 Copper ion adsorption to the various membranes. (a) SPG membrane, (b) dextran-containing membrane, (c) keto-dextran-containing membrane.

トランを形成すると、分離場としての応用が可能であることが実証できた。

4 結言

デキストランシユクララーゼの反応を用いて、多孔性中空糸膜の孔表面にカルボニル基をもつデキストランを形成した。カルボニル基がデキストラン内部に存在すると、その分極部位が、金属イオンの吸着サイトとなることがわかった。

多糖を生成する酵素はデキストランシユクララーゼ以外にも自然界には存在する。酵素を表面に固定し、そこから多糖を形成する技術は、新規な多糖重合用酵素が発見されれば、様々な多糖による表面修飾技術として用いることができるであろう。

謝辞

本研究は、財団法人理工学振興会研究助成および(株) KRI 研究助成を受けて実施されました。深く

御礼申し上げます。

参考文献

- 1) H. Zhang, J. Ruhe, *Macromol. Rapid Commun.*, 24 (2003) 576.
- 2) S. Edmondson, V. L. Osborne, W. T. S. Huck, *Chem. Soc. Rev.*, 33 (2004) 14.
- 3) T. Kawai, K. Saito, W. Lee, *J. Chromatogr. B*, 790 (2003) 131.
- 4) K. Urayama, S. Yamamoto, Y. Tsujii, T. Fukuda, D. Neher, *Macromolecules*, 35 (2002) 9459.
- 5) H. Seto, H. Kawakita, K. Ohto, H. Harada, K. Inoue, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82, (2007) 248.
- 6) H. Kawakita, H. Seto, K. Ohto, K. Inoue, H. Harada, *Biochem. Eng. J.*, 36 (2007) 190.
- 7) H. Kawakita, K. Hamamoto, H. Seto, K. Ohto, H. Harada, K. Inoue, *J. Ion Exch.*, 18, (2007) 324.
- 8) H. Seto, H. Kawakita, K. Ohto, H. Harada, K. Inoue, *Carbohydr. Res.*, 343 (2008) 2417.
- 9) H. Seto, H. Kawakita, K. Ohto, *Biochem. Eng. J.*, 48 (2009) 36.