

ペクチンオリゴ糖の旋光特性の平均重合度依存性

青森職業能力開発短期大学校 高井 秀悦
 竹花 洋次郎
 宮城職業能力開発短期大学校 成田 敏明

Dependence of Optical Activity on Average Degree of Polymerization in Pectic Oligo-saccharide

Shuetsu TAKAI, Yojiro TAKEHANA, Toshiaki NARITA

要約 リンゴの搾り粕などに含まれるペクチンに微生物酵素を作用させて、平均重合度別のペクチンオリゴ糖を製造するバイオリアクタシステムにおいて、酵素反応の様子や生成物の状態を非破壊かつリアルタイムにモニタするセンサの研究開発が必要とされている。本論文では、重合度センサを開発することを目的として、ペクチンオリゴ糖の主成分であるオリゴガラクトロン酸の旋光特性を実験的に調べた結果について述べている。平均重合度が10程度以下のとき、重合度の増加と共に偏光回転角は増大し、それ以上の重合度になると偏光回転角が飽和傾向を示すことを明らかにしている。

次に、オリゴガラクトロン酸の旋光特性の平均重合度依存性を利用したセンサ方式として、ファラデー効果を用いた光センサについて検討している。まず試作したファラデー結晶の偏光回転特性の評価結果を説明している。そして平均重合度が10程度以下のとき、直交ニコル配置した偏光子と検光子の間に溶液セルとファラデー回転子を配置し、オリゴガラクトロン酸が示す右旋性の光学活性をファラデー回転子の左旋性の偏光回転特性で相殺するように電流制御すれば、回転子に流す電流によりオリゴガラクトロン酸の平均重合度をモニタできることを明らかにしている。

I まえがき

青森県の代表的な特産物であるリンゴなどに含まれるペクチンからペクチンオリゴ糖を連続的に生産するバイオリアクタシステムの研究開発が、近年継続して進められている^{(1),(2)}。このシステムは廃棄処分されることの多い加工用リンゴなどの搾り粕から、付加価値の高い新しい有機素材を製造するものである。ペクチンオリゴ糖は動植物や微生物に対して多様な生理活性を示すため、新たな機能性食品素材などへの利用が期待されている⁽¹⁾。

このシステムにおいて、酵素反応や生成物の状態を

知るために、ペクチンオリゴ糖の主成分であるオリゴガラクトロン酸の重合度(Degree of Polymerization)を非破壊かつリアルタイムにモニタするセンサを開発することが求められている。そのためには、オリゴガラクトロン酸の物理的性質を十分に明確にすることが必要である。

一般に糖が旋光特性(光の偏光面を回転させる性質、光学活性ともいう)を示すことは光学の分野では古くからよく知られており⁽³⁾、種々のオリゴ糖に対してもその光学活性が調べられている⁽⁴⁾。オリゴガラクトロン酸の場合には、そのカルシウム塩の水和物に対して、重合度5まで比旋光度が測定された例が報告さ

れている⁽⁴⁾。従って重合度センサを開発するために、重合度の情報を含む物理量として詳細に検討すべき量はオリゴガラクトン酸の旋光特性である^{(5)~(7)}。

そこで本論文ではまず、複数の重合度のオリゴガラクトン酸分子が混じり合っているが、平均重合度が前もって確定している溶液のサンプルを数種類用いて、633nmと691nmの2つの波長でそれらの偏光回転角を測定して、旋光特性の平均重合度依存性を求め、偏光回転角が平均重合度の増加と共に飽和傾向を示しながら増大することを明らかにする。この特性を利用すれば、偏光回転特性が飽和しない重合度の範囲において、光センサ方式を検討することが可能になる。そこで次に、ファラデー効果を用いて、オリゴガラクトン酸が示す右旋性の偏光回転特性をファラデー回転子の左旋性の偏光回転特性で相殺し、分子の平均重合度を回転子に流す電流でモニタする光センサ方式を検討し、基本的な動作原理を確認した結果について述べる。

II ペクチンオリゴ糖の旋光特性

1 オリゴガラクトン酸の分子構造

オリゴガラクトン酸を構成する基本単位であるガラクトン酸のハース投影式による分子構造を図1に示す⁽⁸⁾。同図には6員環の5つの頂点に存在する炭素原子が示されていないが、炭素原子の結合の相手になる4つの原子または原子団が全て相異なるとき、その炭素原子は不斉炭素と呼ばれる。不斉炭素を含む分子は一般に光学活性を示すことが知られている。またガラクトン酸には、不斉炭素の1つに結合するHとOHの位置が上下逆になった構造異性体が存在し、それらは通常 α -異性体と β -異性体と呼ばれ、共に右旋性の偏光回転特性を示す（観測者が光学活性体を通してくる偏光を見ているとき、偏光面が時計方向に回転すれば右旋性、反時計方向に回転すれば、左旋性の偏光回転特性である、と定義する）。

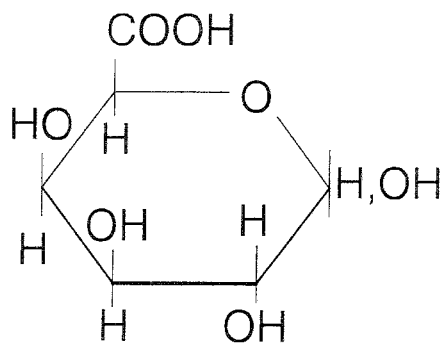


図1 ガラクトン酸の分子構造

次に、図2はピラノース環法によるオリゴガラクトン酸の分子構造であり⁽¹⁾、還元末端（RT）と非還元末端（NRT）の間に、INNER分子がn個結合している。繰り返し単位の分子の数が重合度であるから、図2のオリゴガラクトン酸の重合度はn+2である。なお定義は厳密ではないが、重合度が2から10程度までのものをオリゴガラクトン酸、n=50程度以上のものをポリガラクトン酸と呼んでいる。オリゴガラクトン酸の旋光特性も右旋性である。

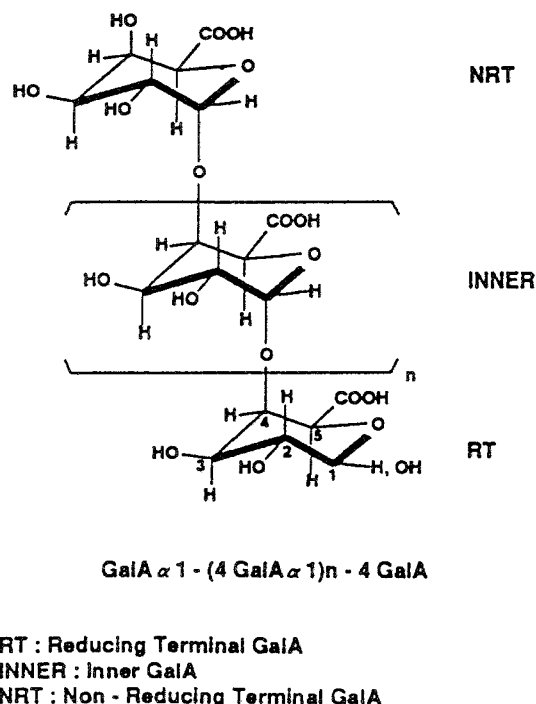


図2 オリゴガラクトン酸の分子構造

2 オリゴガラクトン酸の旋光特性の測定系

化学の分野では、旋光計を用いてナトリウムのD線の波長で有機分子の光学活性を測定するのが一般的である。しかしながら本研究では、オリゴガラクトン酸の旋光特性を測定する他に、光センサ方式の検討も合わせて行うため、個別の光学素子を組み合わせて光学系を構成した。

図3にオリゴガラクトン酸の旋光特性の測定系を示す。光源には、発振波長が633nmのHe-Neレーザを用いた。また比較のために、発振波長が691nmの半導体レーザ（LD）でも旋光特性の測定を行った。半導体レーザからの出射光はAPC制御によりその光電力を安定化し、コリメートレンズでほぼ平行ビームにした。2つのレーザとも連続（CW）動作で使用した。偏光子と検光子は共にグラントムソンプリズムであり、その角度分解能はそれぞれ0.1°と1分である。

また消光比はそれぞれ 10^{-5} と 10^{-6} である。溶液セルは長さが1 dmのものを使用した。光検出器には光パワーメータを用いた。その受光電力の最小値は -70dBm である。

図3の測定系から溶液セルを取り除いた状態において、偏光子と検光子を直交ニコル配置しておき、次にオリゴガラクトロン酸の入った溶液セルを測定系に挿入し、光パワーメータで測定した光電力が最小になる検光子の回転角度 α を読み取ることにより、オリゴガラクトロン酸の偏光回転角を求めることができる。

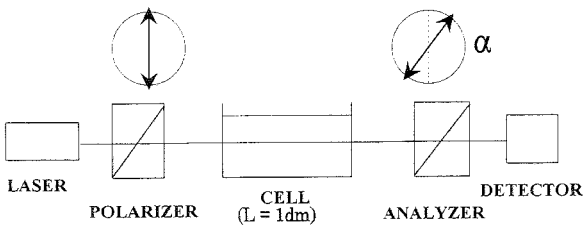


図3 旋光特性の測定系

3 オリゴガラクトロン酸の旋光特性の平均重合度依存性

ポリガラクトロン酸に微生物酵素を作用させ、流速や温度などの反応条件を変化させると、重合度の異なるオリゴガラクトロン酸を調製することができる⁽¹⁾。このときに得られるオリゴガラクトロン酸の重合度は単一ではなく、複数の重合度の分子が混じり合ったものになる。そこで平均重合度は、カルバゾール-硫酸法により求めた全ガラクトロン酸量を、ミルナー-アビガド法で求めた還元末端量で割算して算出した⁽¹⁾。このようにして作製し、平均重合度を算出したオリゴガラクトロン溶液のサンプルを数種類用いて、それらの旋光特性を測定した。各溶液は酢酸ナトリウムを30 mmol含み、酢酸でpHを4.3に調節した濃度が0.5%のものである。

オリゴガラクトロン酸溶液の偏光回転角の平均重合度依存性を測定した結果を図4に示す。縦軸は比旋光度であり

$$[\alpha] = 100 \frac{\alpha}{Lc} \quad (1)$$

で定義される。ここで α は偏光回転角、 L と c はそれぞれセル長 [dm] および [g/100 ml] で表した濃度であり、本実験の場合、 $L = 1\text{ dm}$ 、 $c = 0.5\%$ である。従って、比旋光度は溶液濃度が1%でセルの長さが1 dmの場合に換算した偏光回転角を更に100倍し

た値を表す。また比旋光度は測定に用いた光の波長と媒質の温度に依存する量である。測定は室温で行ったが、各サンプルの測定時刻が異なるので、 2°C 程度の温度変化があった。厳密な測定のためには、溶液の温度を一定にすることが必要であるが、この程度の温度変化の場合、偏光回転角の変化は検光子の角度分解能の1分より小さいと考えられる。

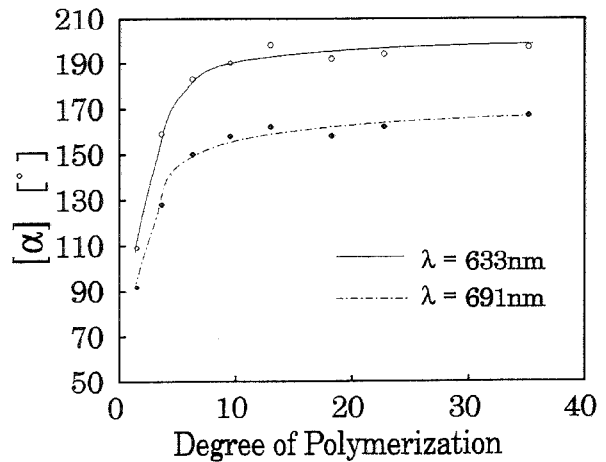


図4 比旋光度の平均重合度依存性

図4より以下のことがわかる。光源はHe-Neレーザーと半導体レーザーとしたが、どちらのレーザー光を用いた場合も、比旋光度は平均重合度の増加と共に増大し、重合度が10程度以上になると、比旋光度は飽和傾向を示す。また旋光分散のためにどの重合度でも、633nmの波長で測定した偏光回転角は691nmの波長で測定した偏光回転角よりも大きい。

測定データに多少のばらつきが見られるが、その原因としては、オリゴガラクトロン酸溶液を作製したときの濃度の調製誤差が最も大きく、次に溶液中で光がかなり強く散乱されるため、迷光となって光検出器に入り込み、検光子の角度分解能を劣化させていることが考えられる。

平均重合度の増加と共に偏光回転角がなぜ飽和傾向を示すかについては、複数の重合度の分子を含むオリゴガラクトロン酸溶液よりも単一の重合度に近いオリゴガラクトロン酸溶液を用いて、旋光特性の重合度依存性を測定すれば明確にすることができる。そして100 mlの溶液に含まれるオリゴガラクトロン酸分子の数を同じにして、偏光回転角の重合度依存性を考察することによって説明することができる。この点の検討結果については別の機会に報告する。

以上のように平均重合度によりオリゴガラクトロン酸の旋光特性が変化することが明らかになったので、

溶液濃度が一定でかつ、偏光回転角が飽和特性を示さない重合度の範囲では、偏光を利用すれば、重合度の情報をモニタする光センサが実現できると考えられる。

III 光センサ方式の検討

1 光センサ方式

II節における実験結果で述べたように、オリゴガラクトクロン酸の旋光特性の平均重合度依存性を用いれば、偏光利用形のセンサ方式を検討することが可能である。その基本形は図3の測定系にある。考えられる光センサ方式をいくつか列挙すると

- ①検光子をステッピングモータで回転する方式
- ②ファラデー効果を用いて偏光面を回転する方式
- ③電気光学効果を用いて偏光面を回転する方式
- ④表面プラズモン共鳴を利用する方式

などである。

①の方式は最も簡単に実現できると思われるが、機械的な可動部があるので信頼性に難点がありそうである。また③は検討する価値があるが、結晶の入手や加工法が問題である。更に④はバイオセンサとして近年活発に研究されている方式である⁽⁹⁾。我々は被測定媒質が光学活性を示す場合の表面プラズモン共鳴形光センサの電磁界解析を進めているが、キラルアドミタンス(II節の比旋光度に関係する量)が変化すると、共振角もかなり大きく変化する結果が得られている⁽¹⁰⁾。重合度センサとして機能する条件があるか否か更に検討を進める必要がある。

一方②の方式を検討するためには、600nm付近の波長で損失が小さく、大きなファラデー効果を示す結晶が必要になるが、比較的容易に結晶を入手可能なので、この方式を検討の対象にすることにした。

2 ファラデー結晶の特性評価

ファラデー結晶は光アイソレータを製造している誘致企業に試作を依頼した。入手した結晶の構造を図5に示す。500 μm の厚さのガドリニウム・ガリウム・ガーネット (GGG) 基板上に薄膜部としてビスマス置換形ガーネットを液相で成長させ、両面にTiO₂、SiO₂の順に厚さ約1 μm の無反射 (AR) コーティングを施している。薄膜の厚さは2~4 μm であり、成長温度と成長時間の異なる3個のサンプルを評価した。

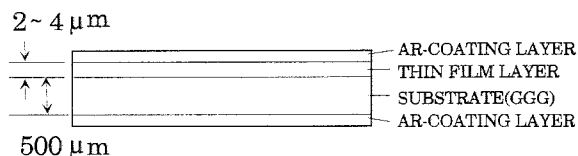


図5 ファラデー結晶の構造

図6はファラデー結晶の偏光回転角の磁界依存性を測定する系であり、図4に示した測定系で溶液セルを電磁石に置き換えた構成である。電磁石の2つの磁極の間に結晶を固定して測定を行った(次節では、電磁石の磁極間にファラデー結晶を固定したものをファラデー回転子と呼ぶ)。3個のサンプルのうちの1つを用いて、偏光回転角の磁界依存性を測定した結果を図7に示す。光源はHe-Neレーザとした。測定時の室温は12 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ であった。同図より、この結晶は左旋性を示すこと、そして結晶は強磁性体だから、偏光回転角の磁界依存性もヒステリシス特性を示し、磁束密度が約45mT(電磁石の電流は約1.8A)⁽⁶⁾を越えると、偏光回転角が飽和し、その飽和値はおおよそ-6.6 $^{\circ}$ であることがわかる。なお結晶の挿入損失は約1.5dBであった。偏光回転角の飽和値は異なるが、残り2個のサンプルも同様な特性⁽⁶⁾を示した。

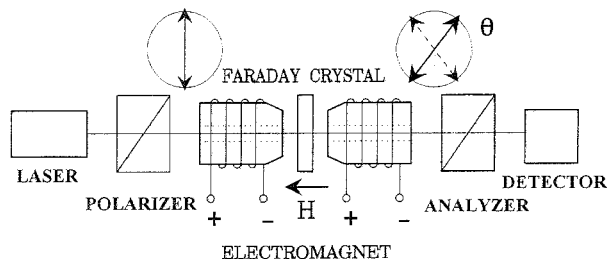


図6 ファラデー結晶の偏光回転特性の測定系

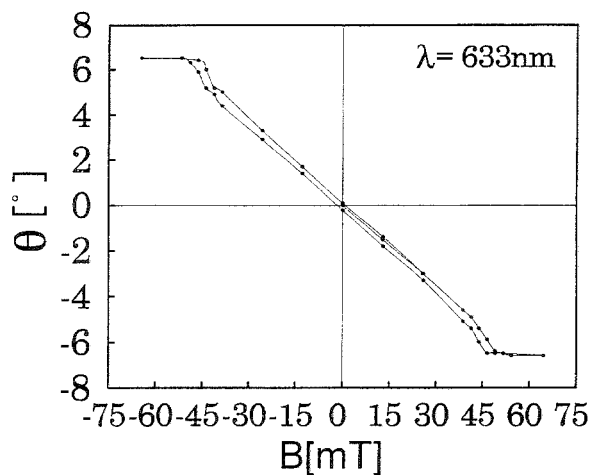


図7 偏光回転角の磁界依存性

3 ファラデー効果を用いる光センサ方式とその動作原理の確認

図8に示したように、直交ニコル配置した偏光子と検光子の間に溶液セルとファラデー回転子を配置し、オリゴガラクトン酸が示す右旋性の光学活性を左旋性の偏光回転特性で打ち消すようにファラデー回転子に流す電流を制御すれば、平均重合度を電流でモニターする光センサが実現されると考えられる。そこでII節で偏光回転角の平均重合度依存性を求めるために使用したオリゴガラクトン酸溶液と、前節で評価したファラデー結晶とを再び用いて、この方式の動作原理の確認を行った。

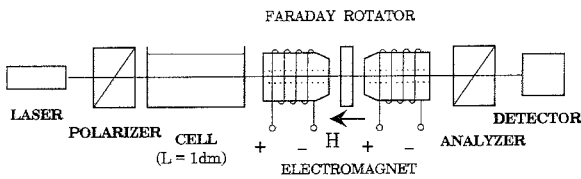


図8 オリゴガラクトン酸の平均重合度を電流でモニターする光センサの構成

図4の縦軸は比旋光度で表示したが、濃度が0.5%でセル長が1 dmのとき、オリゴガラクトン酸溶液の実際の偏光回転角は最大でも1.0°以下である。一方ファラデー回転子が飽和するまで電流を流すと、偏光回転角は約-6.6°となり、溶液が示す右旋性の偏光回転特性を相殺して余りあるものとなる。そこでファラデー回転子に流す電流を±0.5Aの範囲に制限して、結晶が飽和動作しないようにして、回転子の電流と偏光回転角の関係を測定し直した。その結果を図9に示す。同図の第4象限の一部を直線近似して、偏光回転角 θ [min] と電流 I [mA] の関係を求めると

$$\theta = 3.0 - 0.168 \cdot I \quad (2)$$

となる。

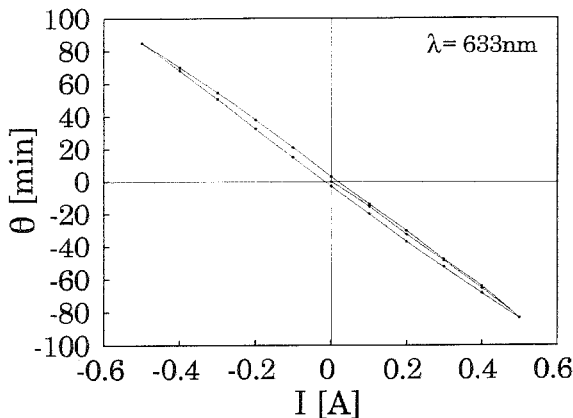


図9 電流を±0.5Aの範囲で変化した場合のファラデー回転子の偏光回転特性

式(2)と図4のデータとを用いれば、オリゴガラクトン酸溶液の右旋性の偏光回転特性を相殺するために、ファラデー回転子に流さなければならない電流値を推定することができる。この見積もり値を図10に黒丸で示す。

一方図8の測定系において、ファラデー回転子の電流を±0.5Aの範囲で変化して、光パワーメータの受光電力が最小になる電流値を測定すれば、平均重合度別のオリゴガラクトン酸溶液に対して、電流の実測値を知ることができる。図10の白丸が測定値である。測定データの数が少ないが、推定値と実測値の差は10 mA以下であり、誤差は検光子の角度分解能と電流計の読み取り精度の範囲内にある。従って、オリゴガラクトン酸分子の平均重合度をファラデー回転子に流す電流でモニターすることが可能であることがわかる。

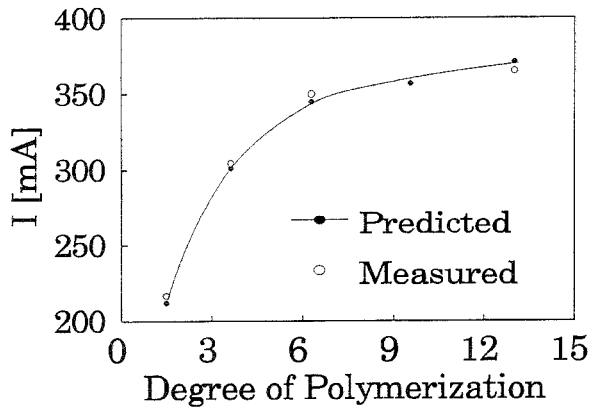


図10 オリゴガラクトン酸の平均重合度とファラデー回転子の電流との関係

IV むすび

本論文では、ペクチンオリゴ糖の主成分であるオリゴガラクトン酸分子の重合度を非接触かつリアルタイムにモニターするための物理量として、光波の偏りを取り上げ、その旋光特性を明らかにした。また光学活性の重合度依存性を利用した光センサ方式として、ファラデー効果を用いる方法を提案すると共に、その動作原理を実験により検討した。その結果、オリゴガラクトン酸の平均重合度が10程度の値までは、重合度の増加と共に偏光回転角が増加し、それ以上の重合度になると、偏光回転角は飽和すること、10程度以下の平均重合度の場合、偏光子と検光子を直交ニコル配置し、その間に溶液セルとファラデー回転子を配置し、オリゴガラクトン酸の右旋性の旋光特性をファラデー回転子の左旋性の偏光回転特性で相殺するように電

流制御すれば、回転子に流す電流で分子重合度をモニタできること、が明らかにされた。

今後の課題は、オリゴガラクトロン酸とファラデー結晶の旋光分散特性や温度特性を詳細に調べること、本論文では、電磁石の磁極間にファラデー結晶を配置してファラデー回転子としたが、ファラデー結晶にコイルを巻いて本格的なファラデー回転子を設計し試作すること、および本光センサ方式を実用化すること、などである。

謝辞

オリゴガラクトロン酸溶液のサンプルを提供して下さった青森県産業技術開発センターと青森県オリゴ糖利用研究開発協同組合の関係各位、並びにファラデー結晶を試作しサンプルを提供して下さった並木精密宝石(株)黒石工場の関係各位に深く感謝する。

[参考文献]

- (1) 中小企業庁、青森県産業技術開発センター編、ペクチンオリゴ糖の製造技術の開発とその応用、平成7年10月。
- (2) 平成9年度青森県地場産業技術開発費補助事業報告書、青森県オリゴ糖利用研究開発協同組合、平成10年3月。
- (3) E.Hecht、Optics、Addison-Wesley、1990、p.314。
- (4) 日本生化学会編、生化学データブック I、東京化学同人、1979、p.466。
- (5) 高井秀悦、ペクチンオリゴ糖の光学活性に関する研究、青森職業能力開発短期大学校産業技術高度化振興会産業技術情報誌、No.1、1995年3月、p.12。
- (6) 高井秀悦、ペクチンオリゴ糖の光学活性、青森職業能力開発短期大学校紀要、第4号、1995年4月、p.12。
- (7) 高井秀悦他、ペクチンオリゴ糖重合度光センサ方式の研究開発 I、青森職業能力開発短期大学校産業技術高度化振興会産業技術情報誌、No.2、1996年3月、p.16。
- (8) 理化学辞典(第4版)、岩波書店、1987年。
- (9) 塩川祥子、表面プラズモンバイオセンサ、電子情報通信学会誌、vol.77、1994年、p.55。
- (10) 須田潤他、半無限大キラル媒質を装荷した金属薄膜による全反射減衰特性の解析、1995年電子情報通信学会総合大会、1995年3月。