

酵素反応によるキトサンのゲル化と耐水性接着剤への応用

日大生産工(院) ○青木 俊裕
日大生産工 平田 光男・山田 和典

【緒言】

ムラサキイガイが分泌する付着性タンパク質の研究においてはその付着防御に重点が置かれていたが、近年では機能材料としての利用に観点が集まり、付着機構の解明、単離精製したタンパク質及び人工合成したタンパク質を用いた接着に関する研究が行われている。カテコール基をもつドーパミンをチロシナーゼによる酵素酸化で α -キノン化合物へと変換した後、アミノ基を有する高分子であるキトサンと化学反応させると、高粘性のゲルを形成する¹⁾。本研究では、ムラサキイガイの接着性タンパク質による付着機構と甲虫類の外皮形成を模倣してチロシナーゼによる酵素反応とキノン架橋によるキトサンのゲル化を利用した耐水性接着剤への応用を目指すとともに²⁾、酵素反応によって生成する α -キノン化合物のチロシナーゼとの相互作用を抑える働きがあると言われているpoly(ethylene glycol)(PEG)の添加効果を検討した。

【実験操作】

〈UVスペクトル測定〉

濃度10mMのドーパミン水溶液に濃度が0.2～1.0mg/cm³となるようにPEGを溶解させた。次に、ドーパミン溶液50cm³中での濃度が60U/cm³となるように調製したチロシナーゼ水溶液1cm³を加え、所定時間ごとに混合溶液のUVスペクトルを測定することで酵素反応におけるPEG濃度依存性を調べた。

〈粘度測定〉

アミノ基濃度30mMのキトサン溶液100cm³にドーパミン約0.183g(濃度10mM)を溶解させた後、0.5～2.0g/dm³となるようにPEGを溶解させた。続いて、この溶液中で濃度が60U/cm³となるようにチロシナーゼ溶液1cm³を加えて反応を開始させ、所定時間ごとにDV-II+粘度計(Brookfield社製)を用いて反応溶液の粘度を測定した³⁾。

〈引っ張りせん断接着強度測定〉

所定時間ごとにスライドガラス板表面にゲル化したキトサン溶液を塗布し、接着面積が26×26mmになるように重ね合わせた後、固定した状態で水中に2日間浸漬した。その後、引っ張り強度試験機(ORIENTIC社製STA-1225)を用いて測定した強度から、(1)式を用いて引っ張りせん断強度を算出した。

$$\text{Tensile shear adhesive strength(kPa)} = \frac{S}{Aad} \times \frac{1}{1000} \quad (1)$$

S : Tensile shear adhesive strength (N)

Aad : Adhesion area (m²)

【結果及び考察】

〈UVスペクトル測定〉

図1に示したドーパミン+チロシナーゼ混合溶液の470nm付近のピークが反応時間とともに上昇していることから、ドーパミンが α -キノン化合物に変換されていることがわかる。また、溶液中のPEG濃度0～1.0mg/cm³の範囲では、濃度の増加に伴い470nm付近のピークが高くなった。これは、PEGの添加により生成したキノン化合物のチロシナーゼへの相互作用が抑えられたためと考えられ⁴⁾、その結果 α -キノン化合物の生成速度が上昇し、より効率良くドーパミンが酵素酸化したと言える。しかし、PEG濃度をさらに上昇させると α -キノン化合物が急速に生成することによって溶液が数秒で黒色化し、オリゴマー化による不溶生成物が生じるため、スペクトルが測定できなくなった。よって、分子量10万のPEGを用いた場合の至適濃度を1.0mg/cm³とした。また、分子量10万のPEGを用いると、分子量1万のPEGを用いたときよりも短時間で470nmの吸光度が上昇したので、今度分子量依存性について詳細な検討を行う予定である。

〈粘度測定〉

反応溶液内の濃度が0.5～2.0mg/cm³になるようにPEGを加えたときの反応時間に対する溶液

Gelation of Chitosans by Enzymatic Reaction and Their Application to Water-Resistant Adhesives

Toshihiro AOKI, Mitsuo HIRATA and Kazunori YAMADA

の粘度の変化を図2に示す。図2よりPEGを添加していないキトサン溶液の粘性は、反応開始2時間で急激に上昇した。溶液の粘性上昇は、酵素酸化によってドーパミンから生成した α -キノン化合物がキトサンのアミノ基にMichael's付加やshiff塩基反応することによってキノン架橋結合を形成するためである。また、PEGを加えることにより粘性の上昇が短時間で起こるようになり、PEG濃度 $1.0\text{mg}/\text{cm}^3$ において最も急激に粘性が上昇した。UVスペクトル測定の結果と併せると、 α -キノン化合物の生成が顕著に起こることによってキトサンのゲル化がさらに進行し、粘性が上昇したと考えられる。しかし、PEG濃度をさらに上昇させると、粘性の上昇が緩やかになった。これは不溶性オリゴマーの生成によりMichael's付加やshiff塩基反応が起こりにくくなったためと考えられる。

〈接着強度測定〉

引っ張りせん断接着強度測定の結果を図3に示す。いずれのPEG濃度においてもゲル化反応開始直後に塗布したキトサン溶液の接着強度は非常に低いが、反応開始2時間で接着強度は急激に上昇した。24時間ゲル化反応させたキトサンを塗布したガラス板の強度は、PEG濃度 0.5 , $2.0\text{mg}/\text{cm}^3$ では減少したが、PEG濃度 $1.0\text{mg}/\text{cm}^3$ ではPEGを添加していないときとほぼ同様の結果が得られた。これはPEG濃度 $1.0\text{mg}/\text{cm}^3$ で最も酵素反応が速く進行するためと考えられる。図1, 2よりPEGを添加することで酵素反応が効率良く進行するようになり、PEGを添加することで短時間でゲル化を進行させて高い粘性を得ることができたが、図3において接着強度の更なる上昇は見られなかった。

以上の結果から、チロシナーゼによる酵素酸化反応によってドーパミンから生成する α -キノン化合物とキトサンのアミノ基が架橋反応し、高粘性キトサンゲルを生成することができ、キトサンゲルの耐水性接着剤としての可能性を見出した。

【参考文献】

- 1) J. H. Waite, M. L. Tanzer, *Science*, **212**, 1038 (1981).
- 2) M. Jimenez, F. Carcia-Carmona, F. Caria-Canovas, J. L. Iborra, J. A. Lazano, F. Maetinez, *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 438 (1984).
- 3) K. Yamada, T. Chen, G. Kumar, O. Vesnovsky,

L. D. T. Topoleski, and G. F. Payne, *Biomacromolecules*, **1**, 252 (2000).

- 4) N. Caza, J. K. Bewtra, N. Biswas, and K. E. Taylor, *Wat. Res.* **33**, 3012 (1999).

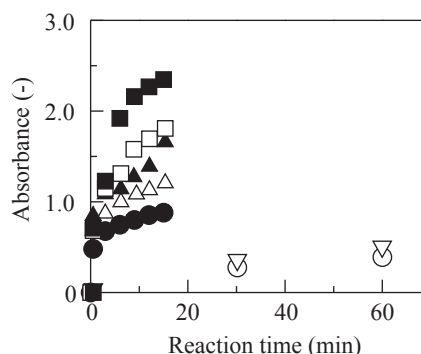


Figure 1 Changes in the absorbance at 470 nm of the dopamine and tyrosinase mixtures containing PEG 1.0×10^5 (at 0 ($\circ$), 0.2 ($\bullet$), 0.4 ($\triangle$), 0.6 ($\blacktriangle$), 0.8 ($\square$) and 1.0 ($\blacksquare$) mg/cm^3) and 1.0×10^4 (∇ : $1.0 \text{ mg}/\text{cm}^3$) with the reaction time.

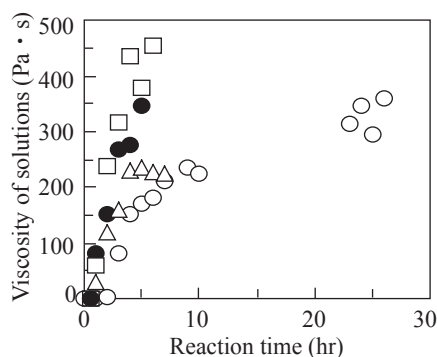


Figure 2 Changes in the viscosity of the dopamine, tyrosinase, and chitosan mixtures containing PEG with the reaction time. PEG ($M=1.0 \times 10^5$) concentration=0 ($\circ$), 0.5 ($\bullet$), 1.0 ($\square$) and 2.0 ($\triangle$) mg/cm^3 .

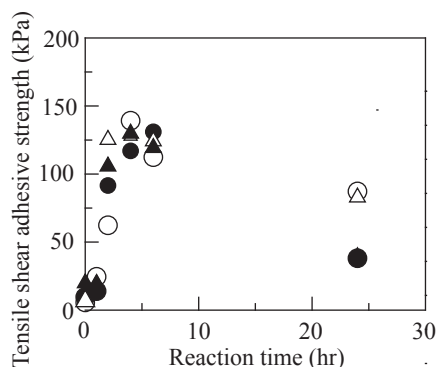


Figure 3 Changes in the tensile shaer adhesive strength of the glass plates coated with gelled mixtures with the reaction time. PEG ($M=1.0 \times 10^5$) concentration=0 ($\circ$), 0.5 ($\bullet$), 1.0 ($\triangle$) and 2.0 ($\blacktriangle$) mg/cm^3