

大分県産赤エビ *Metapenaeopsis barbata* 外骨格由来キチンの精製とキャラクタリゼーション

前田 良輔・井手 千智・土肥 尚幸・二文字 真一

Purification and characterization of chitin from exoskeleton of *Metapenaeopsis barbata* in Oita prefecture

Ryosuke MAEDA, Chisato IDE, Naoyuki DOHI, and Shin-ichi NIMONJI

Abstract

Chitin, poly (β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetyl-D-glucosamine) is a natural polysaccharide and widely distributed in nature such as fungi, algae, and arthropods. The amount of biosynthetic production of chitin is c.a. 10^9 – 10^{10} t/y, it's the second most ubiquitous biopolymer after cellulose. Purification of chitin from crustacean shells have been generally conducted by Hackman's method or its modified process concluding the three steps such as inorganic materials removal, proteins removal, and carotenoid pigments removal. We believe the purification of chitin is the most important process to unfold to the application of the biopolymer. In this paper chitin was purified from exoskeleton of red shrimp *Metapenaeopsis barbata* which is included in wastes of fisheries processing company by modified Hackman's method. The purified chitin was obtained as white solid and the yield was 9%. After deacetylation of purified chitin by treatment with concentrated alkaline solution, we estimated the molecular weight by viscometric procedure. The molecular weight of the polymer was estimated to be 6×10^4 and the degree of polymerization (DP) was c.a. 300. Then degree of deacetylation (DD%) of the chitin was obtained by colloidal titration using potassium polyvinyl sulfate (PVSK) solution in combination with the absorbance ratio A_{1655}/A_{2878} obtained from FT-IR measurements. The DD% of the purified chitin was calculated to be 13%.

Key words : Chitin, Purification, Degree of deacetylation, Molecular weight

1. 諸言

キチンは、木質系バイオマスとして莫大な生合成量を誇るセルロースに次ぐ10億~100億トンもの年間生合成量を有しており、菌類、昆虫類、そして甲殻類等自然界に広く分布している。キチンは甲殻類の外骨格等において炭酸カルシウム、タンパク質、色素などと共存しており、複雑な階層をなしていることが知られている¹⁾。キチンは、poly β (1 \rightarrow 4)-2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucose (*N*-acetylglucosamine)であり、**Figure 1(a)**に示したように、セルロース (**Fig. 1(c)**) と類似の構造を有しており、C2 位が水酸基 (–OH) ではなくアセトアミド基 (–NHCOCH₃) である点が大きく異なる。また、分子内および分子間の水素結合により、非常に結晶性が高く一般的な溶媒には溶解せず、このことはエビ殻などの原料からの精製方法の煩雑さとあわせてキチンに関する研究の大きな課題となっている。加えて、キチンを濃アルカリで脱アセチル化したキトサン (**Fig. 1(b)**) は1級のアミノ基 (–NH₂) を有しており、酢酸水溶液などに溶解し、抗菌性を備えているためキチンに比べて多くの研究が行われている。これらセルロースやキチン・キトサンといった天然高分子は、合成高分子にはない多くの優れた性質をもっており、それらの莫大な生合成量と合わせて考えると、非常に潜在能力を秘めた魅力的な素材であるといえる。これまでキチン・キトサンは、無機、有機、高分子物質などとの複合化によって、フィルム、繊維、微粒子、ナノファイバー等の形体で医用、食品、農業、水処理等の様々な分野での研究がなされている^{2)–4)}。

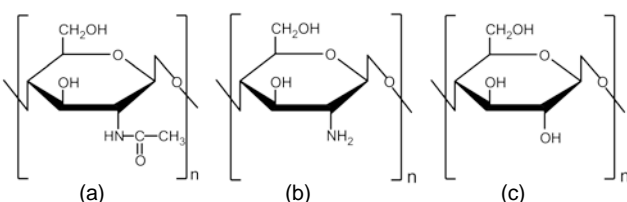


Figure 1 Chemical structures of (a) chitin, (b) chitosan and (c) cellulose.

本研究では、大分県宇佐市の水産加工会社から出る赤エビ *Metapenaeopsis barbata* の加工廃棄物に含まれる外骨格よりキチンを精製し、その脱アセチル化度、粘度平均分子量を決定し、今後の高機能マテリアル創製の基材とするためのキャラクタリゼーションを行った。

2. 実験方法

2.1 キチンの精製

キチンの精製は大分県産赤エビ (*Metapenaeopsis barbata*) の殻を原料とし、以下に示す Hackman 法⁵⁾を改良した方法で行った。まず、外骨格以外の夾雑物を可及的に除いた殻を水洗し、70°Cで真空乾燥した。それを150g量り取り、2 mol/L塩酸中で4日間プロペラを用いて攪拌し、炭酸カルシウムを主成分とする無機物を除去した。固形物をガーゼでヌッチェ濾過を行い、その洗浄液が中性付近になるまでイオン交換水で洗浄し70°Cで真空乾燥した。次に、1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液中90°Cで36時間処理し、主にタンパク質の除去を行った。そして固形物を濾取し、水洗後70°Cで真空乾燥した。続いて、メタノールで6時間還流を行い色素や脂質の除去を行った。最後に1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液中、常温で1時間処理を行い、水洗後70°Cで真空乾燥し精製キチンを得た。

2.2 キトサンの調製

2.1で得た精製キチンを100 mL容三角フラスコに1gとり40wt%NaOH水溶液を適量加えたのち、60°Cまたは80°Cの水浴中で、6時間脱アセチル化反応を行った。これをイオン交換水で入念に洗浄し50°Cで真空乾燥しキトサンを得た。

2.3 精製キチンの脱アセチル化度(DD%)の決定

精製キチンのDD%の決定は、DD%が明らかな標準キトサンを用いたコロイド滴定とFT-IR測定を併用した方法³⁾により決定した。コロイド滴定は、標準キトサン5種類と2.2で精製したキトサンの計6種類について、これら0.125gを

5.0%酢酸水溶液に溶解し、0.5wt%キトサン溶液を調製した。100 mL 容三角フラスコにキトサン溶液を 1.0 g を量り取り、イオン交換水 30 g を加えて希釈した。これにトルジンプルー指示薬(TB)を 3 滴加え、N/400 ポリビニル硫酸カリウム水溶液(PVSK)で滴定を行った。FT-IR 測定は日本電子製(JNM-ECS400)を用いて KBr 法により、分解能 4.0 cm^{-1} 、積算回数 32 回で行った。

2.4 精製キチンの分子量測定

2.2で調製したキトサンを粘度測定用の溶媒(尿素 4.0 mol、塩化ナトリウム 0.10 mol、酢酸 0.20 mol となるように調製した)に溶解し、0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 g/dL のキトサン溶液を調製した。ウベローデ型粘度計を用いて 25°C に調整した恒温槽中で、それぞれのキトサン溶液及び溶媒の標線間の流下時間を測定し、いずれも 5 回の測定における平均値とした。

3 結果と考察

3.1 キチンの精製

Figure 2 に示すように、精製キチンを白色粉末とし収率約 9% で得た。一般的な外骨格中のキチン質の含有率がおよそ 30% とされており、今回非常に収率が低くなったのは、原料であるエビの加工廃棄物中の肉部、内臓、眼球といった夾雑物を除去したが、これらの嵩密度が高く、除去も十分ではなかったことが原因と考えられる。

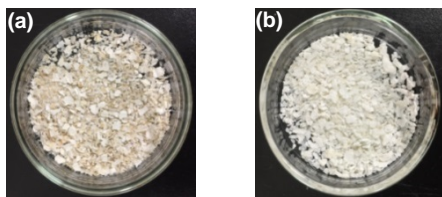


Figure 2 Photographs of (a) exoskeleton of that shrimp and (b) purified chitin by modified Hackman's method.

キチン (α -キチン) は甲殻類のうち例えばアメリカロブスターの場合、Figure 3 に示したような複雑な階層構造の中に存在していると考えられている¹⁾。簡単に述べると、キチンの逆平行に配置した分子鎖は 18~25 本が細く長い結晶となっており、その周囲をタンパク質が覆い $2\sim5 \times 300 \text{ nm}$ 程度のナノファイブリルを形成している。さらにこのナノファイブリルが集まり $50\sim300 \text{ nm}$ 程度のキチンタンパク質繊維となっている。

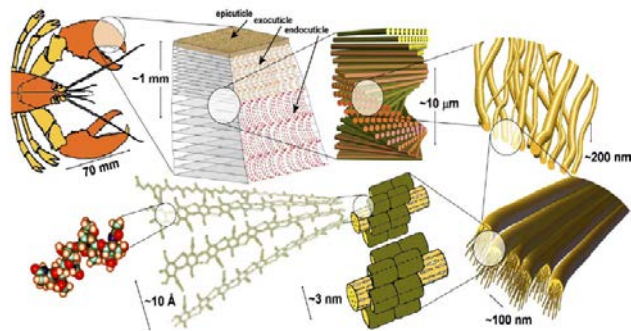


Figure 3 Hierarchy of the main structural levels and microstructure elements of the exoskeleton material of *H. americanus* (American lobster)¹⁾.

これらの繊維が平板状に編み込まれ、その間隙にタンパク質

や結晶性の(あるいは無定形の)炭酸カルシウムなどのバイオミネラルが満たされている。そして顕微鏡でも観察できる最も特徴的な階層構造として Bouligand パターンと呼ばれる、キチンタンパク質平板層がよじれながら螺旋構造をとっている。さらにマクロにみると、上で述べたミネラルと複合化したキチンタンパク質層が endocuticle および exocuticle を形成し、外骨格の機械的強度を生み出している。最も外に存在する epicuticle (外皮) は非常に薄く、wax 層として外界との仕切りとなっている。これら甲殻類の外骨格の三大成分であるキチン、タンパク質、ミネラルに加え、アスタキサントンと呼ばれるカロテノイドに分類される色素もタンパク質に結合する形で含まれている (Figure 4 and 5)。

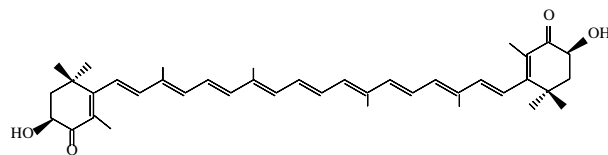


Figure 4 The chemical structure of the astaxanthin.

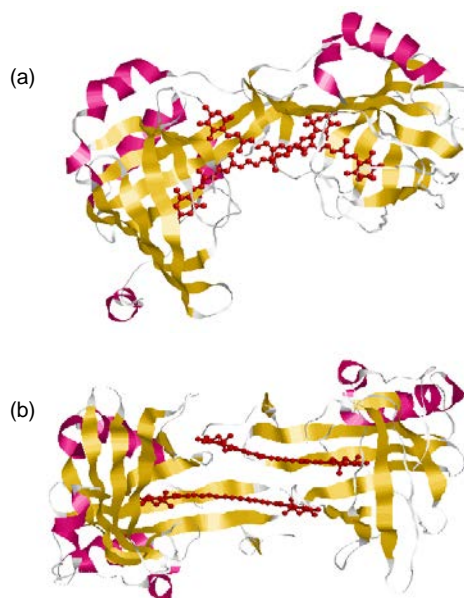


Figure 5 Two astaxanthin (AXT) molecules were existing in chitin-binding protein, β -crustacyanin, of the exoskeletons in lobster shell⁷⁾. Panel (a) and (b) show the upper and side view of the laminar AXT molecules, respectively (drawing with red balls and sticks). These schematic representations were drawn by RASMOL^{a)} software with PDB data of ID:1GKA^{b)}.

a) RASMOL is one of the free software to view the protein molecule with PDB data.

b) PDB: Protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

このように、階層化した甲殻類外骨格の内奥に存在するキチンの抽出は、2.1 で述べたように酸、塩基、有機溶媒を段階的に使い、高温と比較的長い時間を必要とするため、必然的に精製段階におけるキチン分子へのダメージも起こりうる。また、甲殻類の外骨格の収集を含め、精製キチンやその後に続くキトサンの有効利用の阻害要因とも言える。さらに市販のキチン、キトサン、セルロースの販売価格を 500 g あたりで比較すると、セルロースが 2,300 円であるのに対し、キチンは 8,000 円、キトサンに至っては 36,000 円となることからもうかがえる (いずれもナカライテスク(株))。

3.2 精製キチンの脱アセチル化度(DD%)の決定

コロイド滴定の様子は **Figure 6** から明らかなように、TB の明確なメタクロマジーによる青色から赤紫色への色調変化によって判断した⁸⁾⁻¹⁴⁾。これを簡潔に述べると、酢酸溶液中でカチオン性のキトサン溶液中において、TB 指示薬(**Figure 7**)は本来の青色を示す。滴定当初は滴下したアニオン性の PVSK(**Fig. 7**)が速やかにキトサンと反応しポリイオンコンプレックスを形成する。このとき、溶液は青色のまま濁り始める。さらに PVSK を滴下し、キトサンの $-NH_2 \rightleftharpoons -NH_3^+$ 基と PVSK の $-OSO_3^-$ 基が当量点を迎え、PVSK が過剰になった時点で PVSK と TB が反応し、このとき鋭敏なメタクロマジーによって色調が変化する。Hattori ら¹⁴⁾によれば、TB の濃度が適当であれば、明確な色調変化が観察されることがわかる(**Figure 8**)。

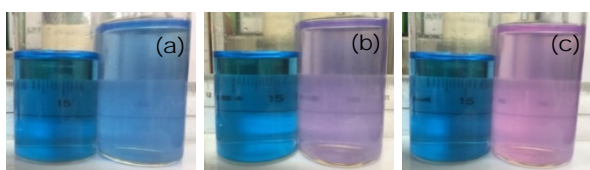


Figure 6 Photographs of the progress of the titration, (a) just before the end point, (b) the end point, when one drop of PVSK solution is added in the media(a), and (c) past the end point.

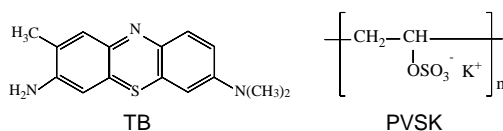


Figure 7 Chemical structures of TB and PVSK.

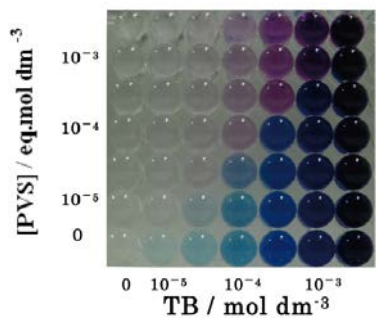


Figure 8 Photographs of TB solution mixed with PVSK¹¹⁾.

コロイド滴定による標準キトサンの DD% の決定は、以下に示す式(1)~(3)を用いて行った^{8),15)}。ここで X, Y はそれぞれ溶液中のグルコサミンユニットおよび N-アセチルグルコサミンユニットの質量[g], f は N/400 PVSK 溶液のファクター (f = 1.00)、v は N/400 PVSK 溶液の滴下量[mL]、n はキトサン溶液の質量[g]を示している。また、161 および 203 はそれぞれグルコサミンユニットおよび N-アセチルグルコサミンユニットの分子量である。

$$DD\% = \frac{\frac{X}{161}}{\frac{X}{161} + \frac{Y}{203}} \times 100 \quad (1)$$

$$X = \frac{f}{400} \times \frac{v}{1000} \times 161 \quad (2)$$

$$Y = \frac{0.5}{100} \times n \cdot X \quad (3)$$

得られた DD% は **Table 1** に示した。なお、表中のサンプルコードは以下の通りである。

K7B~10B: 旧加ト吉バイオ(株)製(フナコシ(株)販売)キトサン
 W10 : 和光純薬工業(株)製キトサン

Table 1 DD% values of commercially obtained standard chitosan.

	DD%	
	This work	from Agencies ^{a)}
K7B	63.7	74.3
K8B	74.0	84.0
K9B	84.3	90~96
K10B	94.7	100.0
W10	77.9	min.80

a) Information from Funakoshi Co., Ltd. about the K7B, K8B, K9B, and K10B. W10 is from the description on the reagent label.

Table 1 から明らかなように、本研究でコロイド滴定により求めた DD% はメーカーのスペックに比べて幾分小さいものとなったが実験誤差の範囲であると考えられる。今回得られた脱アセチル化度は後述する FT-IR で求めた吸光度の比 A_{1655}/A_{2878} に対してプロットし、検量線を作成し精製キチンの脱アセチル化度の決定に用いる。

Figure 9 に精製キチンの FT-IR スペクトルを示した。スペクトル上でベースラインを決定後、 A_{1655}/A_{2878} を求め、コロイド滴定から求めた DD% との関係を示した。詳細なキチンの IR スペクトルの帰属は、Pearson ら¹⁶⁾によって行われており、ここでは脱アセチル化度の決定に必要な吸収について述べる。Sannan ら⁶⁾は、IR スペクトルを用いたキチンの脱アセチル化度の決定について、アミドに由来する 3 種類のバンド(Amide I at 1655 cm^{-1} , Amide II at 1550 cm^{-1} , and Amide III at 1310 cm^{-1})のうち、Amide I に由来する 1655 cm^{-1} での吸光度 A_{1655} を用いて、その基準として脱アセチル化の影響を受けない C-H 伸縮振動に由来する 2878 cm^{-1} での吸光度 A_{2878} をとった。

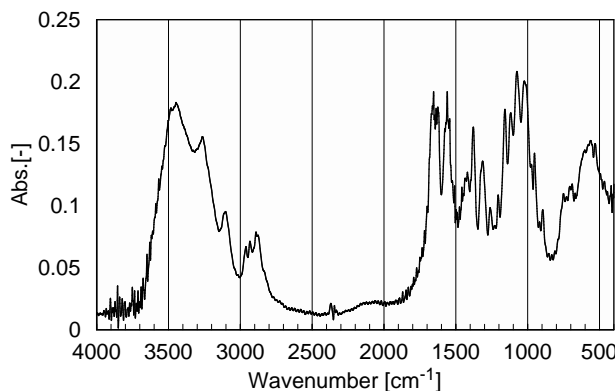


Figure 9 FT-IR spectrum of the purified chitin.

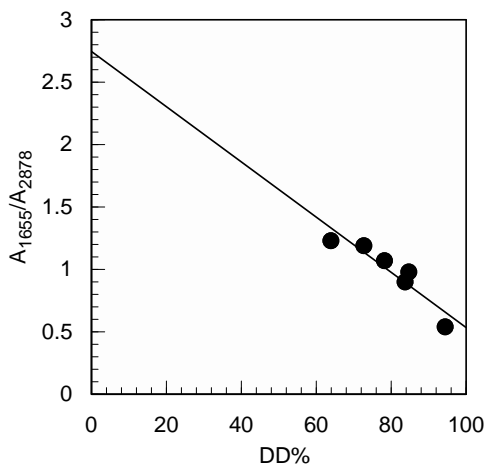


Figure 10 Relationship between ratio of A_{1655}/A_{2878} and $DD\%$.

Fig. 10 は、精製したキチンやそれを脱アセチル化したキトサンの $DD\%$ を求める検量線となる。ここで $DD\%$ がおよそ 60% 以下の領域においてプロットが存在しないのは、この領域の市販キトサンがなく、低い $DD\%$ のキトサン（すなわちキチンとなる）は、もはや酢酸水溶液に溶解しなくなることが理由である。本研究で精製した大分県産赤エビの外骨格由来のキチンの $DD\%$ は 13% となった。

3.3 精製キチンの分子量測定

溶媒や試料濃度を変化させたキトサン溶液について測定した標線間の流下時間は、希薄溶液 ($\rho_0 \approx \rho$) であることを前提に式(4)に示すように相対粘度 η_r が表わされる。ここで、 ρ_0 および ρ は溶媒および溶液の密度、 t_0 および t はそれぞれ溶媒および溶液の流下時間である。

$$\eta_r = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0} \approx \frac{t}{t_0} \quad (4)$$

また、式(5)によって比粘度 η_{sp} を求め、溶液濃度 c [g/dL] を含めた次の(6)~(8)式に示されるような3種類の相関式が表わされている。

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{t - t_0}{t_0} = \eta_r - 1 \quad (5)$$

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k'[\eta]^2 c \quad (6)$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta] - \left(\frac{1}{2} - k'\right) [\eta]^2 c \quad (7)$$

$$\frac{\left[2(\eta_{sp} - \ln \eta_r)\right]^{1/2}}{c} = [\eta] + \left(k' + \frac{1}{3}\right) [\eta]^2 c \quad (8)$$

(6)~(8)式はそれぞれ Huggins 式、Mead-Fuoss 式 (Kraemer 式)、Billmeyer 式と呼ばれる。ここで、 $[\eta]$ を極限粘度 (固有粘度)、 k' は Huggins 定数である。Huggins 定数は濃度に無関係な定数であり、極端に低分子量の高分子や添加塩濃度の低い (< 0.01 M) 水溶液中の高分子電解質を除けば、分子量、分子

形態、溶媒条件に鈍感で、たいていは 0.3~0.6 の範囲内にある¹⁷⁾。Figure 11 に上述した3種類の式に基づくプロットを示した。また、最小二乗法に基づく直線相関も行い、それから得られた切片が $[\eta]$ となる。

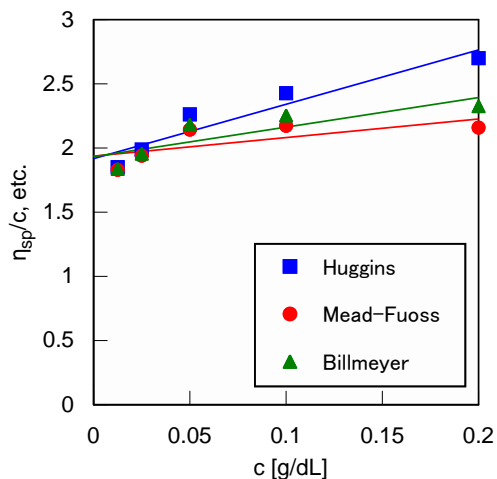


Figure 11 Plots for determination of intrinsic viscosity of deacetylated chitin prepared from purified chitin.

Huggins プロット、Mead-Fuoss プロット、Billmeyer プロットにおいて切片はほぼ一致し、これらの平均値から $[\eta]$ を 1.93 と決定した。ただし、低濃度領域における直線性が良好ではなく、これは粘度計の毛細管内径とキトサン溶液の粘度のバランスが悪く、十分な測定時間幅を維持できていないことが原因と考えられる。続いて(9)式に示す Mark-Houwink-Sakurada 式より粘度平均分子量 M_v を算出した。ただし、パラメータ K および α は脱アセチル化度約 91% のキトサンに対して求められた文献値 $K = 8.93 \times 10^{-4}$, $\alpha = 0.71$ を用いた¹⁸⁾。

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (9)$$

脱アセチル化度 91% のキトサンに対して得られたパラメータによる M_v は 4.97×10^4 となり、これを先に求めた脱アセチル化度 13% に換算すると (ユニットあたりの平均分子量換算) M_v は 5.96×10^4 、平均重合度 (DP) は 302 となった。

4. 結言

大分県産赤エビの外骨格由来のキチンを Hackman 法を改良した方法で精製した。キチンの収率は原料ベースで約 9% となり、一般的な含有率といわれる約 30% に比べて非常に低い収率となった。これは原料である水産加工廃棄物が外骨格以外の夾雑物を多く含んでおり、それらを十分除去できていないことが原因と考えられる。また、精製キチンの $DD\%$ をコロイド滴定法と FT-IR 法を合わせた手法によって 13% と決定した。幾分脱アセチル化が進行したのは、精製段階におけるアルカリ処理が原因と考えられ、基本的にキチンとは *N*-アセチル-D-グルコサミンと *D*-グルコサミンの共重合体であると考えるのが一般的である。また、粘度法によって精製キチンの分子量をキトサンに変換してから見積もると、 M_v が 5.96×10^4 、平均重合度 (DP) は 302 となった。

このキチンを基材とし、様々な手法により複合材料を創製する。

5. 引用文献

- 1) D. Raabe et al., *Acta Mater.*, **53**, 4281(2005)
- 2) P. K. Dutta et al., *J. Sci. Ind. Res.*, **63**, 20 (2004)
- 3) M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 603 (2006)
- 4) C. K. S. Pillai et al., *Prog. Polym. Sci.*, **34**, 641 (2009)
- 5) R. H. Hackman, *Australian Journal of Biological Science*, **7**, 168 (1954)
- 6) T. Sannan, K. Kurita, K. Ogura and Y. Iwakura, *POLYMER*, **19**, 458 (1978)
- 7) M. Cianci et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9795 (2002)
- 8) キチン、キトサン研究会編, キチン、キトサン実験マニュアル, 技報堂出版(東京), pp. 51-52 (1991)
- 9) 寺山宏, 化学の研究, **1**, 75 (1948)
- 10) 千手諒一, コロイド滴定法, 南江堂 (東京)(1969)
- 11) 桐原恭二, 河田清, *JAPAN ANALYST*, **21**, 1510 (1972)
- 12) 寺山宏, ぶんせき, 623 (1979)
- 13) K. Ueno and K. Kina, *Journal of Chemical Education*, **62**, 627 (1985)
- 14) T. Hattori et al., *BUNSEKI KAGAKU*, **60**, 419 (2011)
- 15) M. Yabuki et al., *The Journal of General Applied Microbiology*, **34**, 255 (1988)
- 16) F. G. Pearson et al., *Journal of Polymer Science*, **43**, 101 (1960)
- 17) 高分子学会編, 新高分子実験学 1 高分子実験の基礎, 分子特性解析, 共立出版(東京), pp. 187-195 (1994)
- 18) キチン、キトサン研究会編, キチン、キトサン実験マニュアル, 技報堂出版(東京), pp. 61-66 (1991)

謝辞

本研究成果は、平成 28 年度内地研究員制度により派遣された京都大学大学院農学研究科森林科学専攻において、西尾嘉之教授ならびに杉村和紀助教のご指導の賜物であり、ここに記して心からの謝意を表します。また、本研究の出発原料である赤エビの加工廃棄物を乾燥と粉碎まで行っていただき、その十分な量をご提供いただいた、大分県宇佐市有限会社上野水産の皆様に感謝致します。

(2017 年 11 月 6 日 受理)