

赤エビ由来キチンの精製とキチンブチレートの合成および評価

前田 良輔^{†*}, 仲西 大輝[†], 杉村 和紀[‡], 上高原 浩[‡], 西尾 嘉之[‡]

Purification of chitin from red rice prawn and synthesis and characterization of chitin butyrate.

Ryosuke MAEDA^{†*}, Daiki NAKANISHI[†], Kazuki SUGIMURA[‡], Hiroshi KAMITAKAHARA[‡]
and Yoshiyuki NISHIO[‡]

Abstract

Chitin has an annual biosynthesis amount of 1 billion to 10 billion tons, next to cellulose, and is widely distributed in fungi, insects and crustaceans. Its structure is like that of cellulose, but because it is an amino polysaccharide with *N*-acetyl-D-glucosamine as a unit, it is a polymeric material that has been attracting attention in terms of functions not found in cellulose and harmony with the environment. Furthermore, unlike synthetic polymers, natural polymers such as chitin have biocompatibility because they are products of life activity, and are applied to medical materials such as medicines and wound dressings. Due to not only the acetamide group but also amino groups, that is partially deacetylated substance, chitin has unique and attractive properties different from cellulose. To prepare biocompatible, biodegradable, and good workable composite materials, firstly chitin having 26% of degree of deacetylation (DD) was purified from exoskeleton of red rice prawn, *Metapenaeopsis barbata*, by modified Hackman's method. To create attractive biocompatible and biodegradable materials using chitin as a base polymer, firstly chitin butyrate (ChBu) was synthesized with chitin solution prepared by solvent exchange method and butyryl chloride/base catalyst system, and then it was characterized by FT-IR measurements. As the derivatization progresses, absorbance of 1625, 3300 and 3500 cm^{-1} for high reactive amino groups, NH and OH stretching vibration, respectively, disappeared or decreased. Solubility tests and film forming properties of ChBu synthesized here was also investigated.

Key words: Chitin, Chitin butyrate, Solvent exchange,

1. 諸言

キチンは、自然界に広く分布し、甲殻類の外骨格や菌類、昆虫類に多く含まれており¹⁾、その年間生合成量はセルロースに次ぐ 10 億~100 億トン²⁾にのぼり、新規材料の基材として非常に注目を集めている。キチン (poly $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucose) は、Fig. 1(a) に示すように、セルロース (Fig. 1(c)) と類似の化学構造を持つ。化学構造から明らかのように、キチンは C2 位がアセトアミド基 ($-\text{NHCOCH}_3$) であるため、C3 位の水酸基と C2 位のアセトアミド基の分子内および C6 位の水酸基が水を介する分子間の水素結合³⁾により、非常に結晶性が高く、水や汎用有機溶媒には溶解しない。一方、キチンの魅力は、莫大な生合成量だけではなく、天然由来であるため生分解性、生体適合性等に優れ、さらに分子内に窒素原子を有する多糖であるため、その反応性や吸着性が優れることがあげられる。キチンを濃アルカリで処理すると脱アセチル化が進行しキトサン (Fig. 1(b)) となる。キトサンは、C2 位の脱アセチル化により遊離のアミノ基 ($-\text{NH}_2$) に変換されるため、キチンに比べて幾分結晶性が緩和され塩酸水溶液や酢酸水溶液などの酸性媒体に溶解し、アミノ基の存在により抗菌性を示すようになる⁴⁾。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持っており、それらの莫大な生合成量と合わせて考えると、大きな潜在能力を秘めた非常に魅力的な素材であるといえる。そのためキチン・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、多孔質ビーズ等の形で医療品、食品、農業、水処理等の幅広い分野での研究や商品開発がなされている⁵⁻⁸⁾。

本研究では、廃棄物から高性能材料を開発することも重要なコンセプトの一つとして捉えており、大分県宇佐市の水産加工会社から出る加工廃棄物中に含まれる赤エビ (*Metapenaeopsis barbata*) の外骨格よりキチンを精製し、キチン誘導体であるアシル化反応の一つとして、キチンブチレート (ChBu) の合成を行い、材料としての評価を行った。

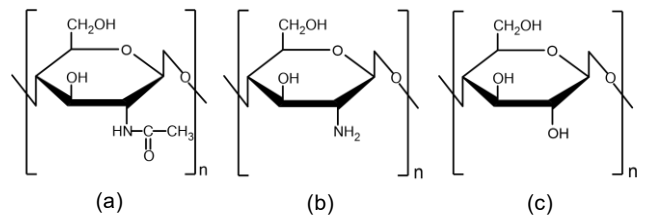


Fig. 1 Chemical structures of (a) chitin, (b) chitosan and (c) cellulose.

2. 実験方法

2.1 キチンの精製

キチンは、大分県産赤エビの殻を原料とし Hackman 法⁹⁾を改良した方法¹⁰⁾で精製した。

2.2 溶媒置換法によるキチン溶液の調製¹¹⁾

精製キチン 2.5 g を水中で 24 時間以上浸漬し、その後親水性 PTFE メンブレン (細孔径 1.0 μm) を用いキチンを回収した。続いてメタノール中で 24 時間以上浸漬した。同様に回収した後、ジメチルアセトアミド (DMAc) 中で 24 時間以上浸漬した。次に、予め 110 $^{\circ}\text{C}$ で真空乾燥させた塩化リチウム (LiCl) を用いて 7%-DMAc/LiCl 溶液を調製した。この 7%-DMAc/LiCl 溶液を用いて溶媒置換後のキチンを室温下で溶解し、1 週間以上遮光下で攪拌し 0.5% キチン-

[†] 北九州高専, [‡] 京都大学大学院農学研究科

* Corresponding author

DMAc/LiCl 溶液を調製した。また得られた溶液の正確なキチン濃度の決定は、以下のように行った。キチン溶液 5 g をテフロンシャーレ中に精秤し、これをステンレスバット中に置いたものをメタノール雰囲気中で静置し十分にゲル化させ、得られたキチンゲルを入念にイオン交換水で洗浄し、70 °C 下で真空乾燥を行ったものの質量から求めた。

2.3 ChBu の合成¹²⁾

ChBu の合成は 1000 mL セパラブルフラスコに 0.5% キチン-DMAc/LiCl 溶液 200 g を窒素雰囲気下水浴中で攪拌しながら 80 °C に整温した。これにトリエチルアミン(TEA)を等量の DMAc で希釈したものを徐々に添加した。TEA 添加後 30 分間攪拌し、塩化ブチリルを等量の DMAc で希釈し徐々に添加した。塩化ブチリル溶液の添加完了時を反応開始とし反応させた。所定時間後に反応液を約 3000 mL の蒸留水中に加え反応を停止させた。この反応液をセルロースアセテート製メンブレン(細孔径 3.0 μm)を用いた吸引ろ過で回収し、それを 60 mL のアセトン中に溶解させた後、600 mL の水中で再沈殿させ、PTFE 製メンブレン(細孔径 1.0 μm)を用いて吸引ろ過で回収した。この操作を 3 回行った後、生成物を 50 °C で真空乾燥し茶褐色の最終生成物を得た。Table 1 に ChBu 合成のための実験条件を示した。Lot 1 ~5 については、合成時に反応液がゲル化したケースや、FT-IR や溶解性試験によるブチリル化の評価を行い、十分な置換度が得られていないと判断したものである。

Table 1 Experimental conditions of synthesis of ChBu.

Lot No.	TEA	塩化ブチリル	反応時間
1	6mL	12mL	20時間
2	6mL	12mL	20時間
3	10mL	12mL	21時間
4	9mL	17mL	24時間
5	9mL	17mL	24時間
6	14mL	15mL	21時間

2.4 ChBu の評価

ChBu の評価は FT-IR 測定、溶解性試験および製膜性試験によって行った。FT-IR 測定は日本電子製(FT/IR-4200)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。溶解性試験は合成したキチンブチレートに 0.01 g 取り、DMAc、DMF、DMSO、メタノール、ピリジン、ヘキササン、クロロホルム、THF の 8 種類の溶媒を 1 mL 添加しマグネチックスターラーで 24 時間攪拌した後、目視により可溶、膨潤、不溶を決定した。製膜性試験はアズワン製小型熱プレス機(AH2003)を用い、165 °C に保った状態で 3 分間 5 MPa でプレスし、続いて 30 秒間 15 MPa でプレスした。この高温でのプレス後、適当な荷重をかけながら常温下で放冷した。

3. 結果と考察

3.1 キチンの精製

キチンは白色フレークとして収率 12.1% で得られた。赤エビと近い種のシバエビのキチン含有量¹³⁾は 32.4% であり、単純比較できないもののそれに比べて収率が非常に低くなった。原因としては元来赤エビのキチン含有率が低いことに加え、エビ殻原料中に外骨格以外の夾雑物が多く、それが事前に十分除去されず、依然として多く含まれていること、及び実験操作中のロスが考えられる。得られた精製キチンの脱アセチル化度は、FT-IR 測定とコロイド滴定を組み合わせた方法により 26% と決定し、キトサンに変換したものの希薄溶液を用いた粘度測定と Mark-Houwink-Sakurada 式から求めた粘度平均分子量は 1.9×10⁵ (平均重合度 995) であった。

3.2 溶媒置換法で調製したキチン溶液及び ChBu の合成

キチンは分子内ならびに分子間水素結合に起因する結晶性の高さから、一般的な溶媒には難溶である。また、キチンの溶解法についてはいくつかの事例が報告されているが¹⁴⁾⁻¹⁶⁾、DMAc/LiCl 系^{11), 17), 18)}が一つの大きなブレイクスルーであるとされている。McCormic¹⁸⁾によれば、本溶媒系のセルロースにおける溶解機構は、Fig. 2 に示すように、セルロースの水酸基中のプロトンと水素結合により結合した塩化物イオンが、Li[DMAc]⁺マクロカチオンと相互作用することによると提案されている。従って、セルロースと類似の構造を有するキチンについても同様の溶解機構が推測される。結果として、遮光下で入念に攪拌を行い、淡黄色で粘稠な均一溶液を得た。また、ChBu の合成は Table 1 に示すように、いくつかの合成条件を試みた。本反応は攻撃試薬である塩化ブチリルの水との反応性が非常に高いため、キチン溶液調製時や反応時の水の混入を防止することが非常に重要である。3.3 で述べる FT-IR による生成物の状況を確認しながら合成条件を変更したが、最終的に触媒量を増加させた Lot 6 において置換度 (DS) が大きいと思われる ChBu の合成が行われた。

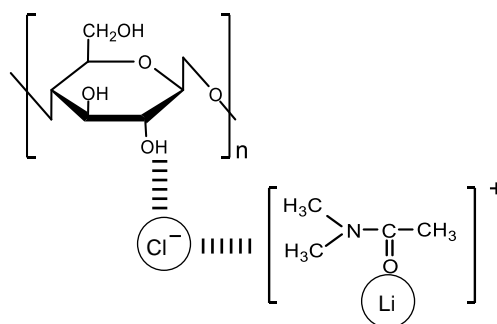


Fig. 2 Schematic representation of proposed mechanism of dissolving cellulose.

3.3 ChBu の FT-IR 測定

Fig. 3 に ChBu の化学構造を、Fig. 4 に赤エビ由来のキチンおよび ChBu(Lot 6) の FT-IR スペクトルをそれぞれ示した。Fig. 3 における R とは、置換されていないプロトン(-H) またはブチリル基(-COC₃H₇)を示している。Fig. 4(a)および(b)を比較すると明らかなように、ブチリル化が進行するに従い、3300cm⁻¹ と 3500 cm⁻¹ 付近の NH 伸縮振動および OH 伸縮振動の大きな吸収はアセトアミド基(-NHCOCH₃)および水酸基(-OH)がブチリル化されるためそれらのピークはほぼ消失した。さらに 1660 cm⁻¹ 付近の吸収は、NHCOR のカルボニルに帰属され、DS の増大に従って消失しており、代わって 1710 cm⁻¹ 付近の吸収が DS の増大と共に現れており、N(COR)₂ へと置換が進んでいることが示唆される。また 1750 cm⁻¹ 付近の大きな吸収はブチリル化が進行するに伴うエステル性カルボニルの吸収である。

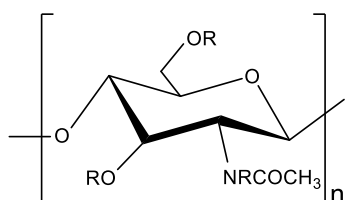


Fig. 3 Chemical structure of ChBu.(R = H or COC₃H₇)

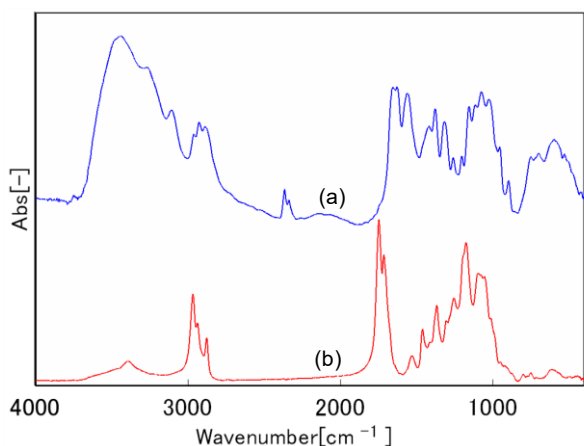


Fig. 4 FT-IR spectra of (a) purified chitin from red rice prawn and (b) ChBu (Lot 6).

3.4 ChBu の溶解性試験

溶解性試験の結果について、合成前の出発物質であるキチンはいずれの溶媒にも溶解しなかった。また、Fig. 5 に示すように、最終的に ChBu(Lot 6)では、本研究で用いた 8 種類の溶媒のうち、極性が非常に低い *n*-ヘキサン以外の有機溶媒に溶解した。画像から明らかなように、7 種類の溶媒は淡黄色透明な均一溶液となっており、ヘキサンについては褐色の沈殿物が確認され、溶媒は無色透明のままであった。以上の結果を Table 2 にまとめた。溶解性試験の結果からも ChBu(Lot 6)の DS は十分高いものと考えられる。

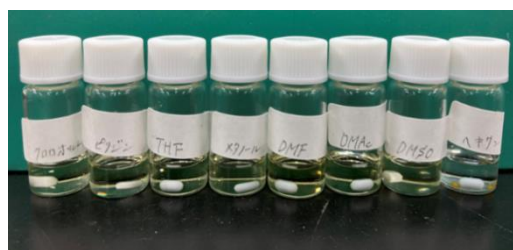


Fig. 5 Photograph of the results of solubility test of ChBu (Lot 6) in various solvents at room temperature.

Table 2 Results of solubility tests of original chitin and ChBu.

	Chitin	ChBu Lot6
クロロホルム	×	○
ピリジン	×	○
THF	×	○
メタノール	×	○
DMF	×	○
DMAc	×	○
DMSO	×	○
ヘキサン	×	×

○：可溶 △：膨潤 ×：不溶

3.5 ChBu の製膜性試験

Fig. 6 に製膜性試験の結果を示した。Fig. 6(a)は精製キチンの製膜性試験の結果である。キチンはガラス転移温度(*T_g*)をもたず、軟化することもない。Fig. 6(b)および(c)は、それぞれ ChBu (Lot 4) および ChBu (Lot 5) である。これらはいずれもブチリル基への DS が低いいため完全に溶解することはなく、一部がフィルム化している。また、Fig. 6(d)は、ChBu (Lot 6) を示しており、FT-IR の結果からも、DS が非常に高いと推測され、茶褐色透明なフィルムが形成されていると考えられる。

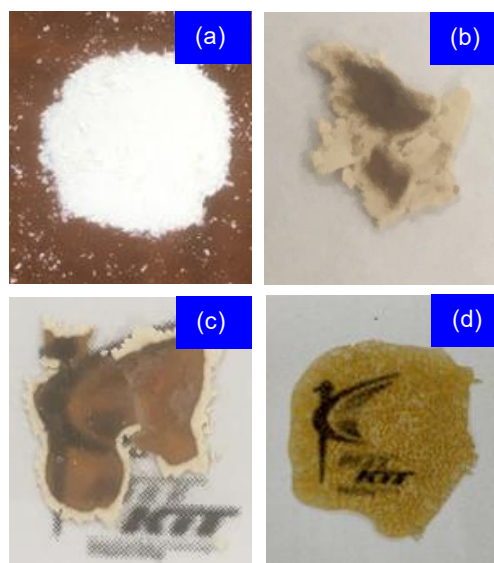


Fig. 6 Photographs of results of film forming test of (a) purified chitin from red rice prawn, (b) ChBu (Lot 4), (c) ChBu (Lot 5), and (d) ChBu (Lot 6).

4. 結言

海産物の加工残滓として廃棄された赤エビの外骨格から Hackman 法によりキチンを精製し、これを基材としてアシル化誘導体の一つであるキチンブチレート合成した。合成は DS を上げる工夫を行いながら 6 回実施し、それぞれ FT-IR 測定、8 種類の有機溶媒への溶解性試験およびホットプレスによる製膜性試験による評価を行った。その結果、ChBu (Lot 6) は FT-IR スペクトルから、OH および NH 伸縮振動に帰属される吸収がほぼ消失しており、ブチリル化の進行が示唆され、それに呼応するように、溶解性試験では調べた 8 種類の有機溶媒のうち、極性の乏しい *n*-ヘキサン以外には全て溶解し均一溶液となった。また、製膜性試験でもムラなく茶褐色で透明なフィルムとなった。今後は、DS を決定するために、クロロホルムへの溶解性が確認された ChBu (Lot 6) について ¹H NMR 測定を行う予定である。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、原料である赤エビの外骨格を含む原料を、乾燥状態で十分な量をご提供下さった、大分県宇佐市(有)上野水産関係各位には、心よりの謝意を表します。

6. 参考文献

- 1) Muzzarelli, R. A. A: Chitin, Pergamon Press, New York, p.6 (1977).
- 2) 平野茂博 : キチン, キトサンの利用, シーエムシー, p. 201 (1982).
- 3) Carlstorm, D: Crystal structure of α -chitin, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 669 (1957).
- 4) 内田 泰: キチン・キトサンの抗菌性, 月刊フードケミカル, 22 (1988).
- 5) P. K. Dutta *et al.*, *J. Sci. Ind. Res.*, **63**, 20 (2004).
- 6) M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 603 (2006).
- 7) C. K. S. Pillai *et al.*, *Prog. Polym. Sci.*, **34**, 641 (2009).
- 8) 吉村昌也、鶴谷良一; 「創傷保護材からアキレス腱の再建まで活用できる」、*ibid*, pp.88-92.
- 9) Hackman, R.H., *Austr. J. Biol. Sci.* 7168 (1954).
- 10) 前田ら, 北九州工業高等専門学校研究報告, **第 51 号**, 65 (2018).
- 11) Y. Nishio, *et al.*, *Polymer*, **28**, 1385 (1987).
- 12) R. Kusumi, *et al.*, *Cellulose*, **15**, 1 (2008).
- 13) キチン・キトサン研究会編, キチン、キトサンの応用, 技報堂(東京), p.195
- 14) X. Hu, *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, **70**, 451 (2007).
- 15) H. Tamura, *et al.*, *Adv. Chitin Sci.*, 84 (2004).
- 16) G. L. Clark and A.F. Smith, *J. Phys. Chem.*, **40**, 863 (1936).
- 17) P. R. Austin, *US Patent*, 3, 879, 731 (1975).
- 18) C. L. McCormic, *et al.*, *Macromol.*, **18**, 2394 (1985).

(2021 年 11 月 1 日 受理)