

イカ軟甲からの有用糖質の調製と用途開発

山城利枝子・平良秀春・照屋正映・鎌田靖弘・比嘉賢一

1 緒言

キチン・キトサンは食品や医療用材料等の分野で広く利用されているものの、その原料となっているのはカニ・エビ殻のみであり、同様にキチンを含有しているイカ軟甲の利用は少ない。沖縄県では大型のイカであるソデイカは年間約2,000tの漁獲があるが、ソデイカの軟甲はすべて廃棄処分されている。それはイカ軟甲にキチン質という有用成分が存在することがあまり知られていないこと、さらに沖縄県内に利用技術が蓄積されていないことが大きな要因と考えられる。

現在のキトサンの製造法は、除タンパクおよび脱アセチル化と、それに伴う洗浄および乾燥など多くの工程があり、原料からキトサンを得るまで約1週間ほど必要である。

また、イカ軟甲キチンから調製したキトサンやキチン質オリゴ糖は、脱アセチル化度や重合度などの性状と機能性の強さとの関係が解明されていないものも多く、それらの特性が明らかになり調製条件が確立されれば、利用法の開発も進むものと考えられている。

そこで、平成12年度は、イカ軟甲を直接濃アルカリ溶液で処理してキトサンを調製する条件を検討し、キトサン製造工程の短縮を試みた。また、キトサンの抗菌性に注目し、分子量や脱アセチル化度の異なるキトサンの抗菌性を評価し、より抗菌性の強いキトサンを調製することを目標とした。

2 実験方法

2-1 イカ軟甲の前処理

原料は、ソデイカの軟甲を使用した。

イカ軟甲は、肉片などの不純物を取り除き水洗いした後送風乾燥機(60℃)で一晩乾燥した。乾燥品を超遠心粉砕機(ZM100、メッシュ0.5mm、三田村理研工業^(株))で粉砕して(以後イカ軟甲粉末と言う)試料とした。

2-2 イカ軟甲からキチンの調製

キチンの調製は栗田¹⁾の方法に準じて行った。

イカ軟甲粉末を1N塩酸中、室温で一晩攪拌した後、ろ過し洗液が中性になるまで蒸留水で洗浄した。次に残渣を2N水酸化ナトリウム中、室温で一晩攪拌した後ろ過し、新しい2N水酸化ナトリウムを加え100℃で4時間加熱攪拌した。残渣をろ過し、洗液が中性になるまで

蒸留水で洗浄した後、70℃で乾燥してキチンを得た。

2-3 イカ軟甲からのキトサンの調製

キトサンの調製は、従来のイカ軟甲からキチンを調製し、さらにキチンからキトサンを調製する方法を改変して、イカ軟甲を直接濃水酸化ナトリウム溶液で処理する方法で行った。すなわち、イカ軟甲粉末を濃水酸化ナトリウム溶液中で加熱攪拌した後、洗液が中性になるまで水洗浄し、さらにエタノールおよびアセトンで洗浄後、乾燥してキトサンを得た。

2-4 キトサンの低分子化反応

2-3の方法で得られたキトサンを20倍量の塩酸中で加熱攪拌して、低分子化反応を行った。反応後、水を加えて希塩酸溶液としキトサンを溶解させ、不溶物を除去し、水酸化ナトリウムで中和してキトサンを析出させた。析出したキトサンを洗液が中性になるまで洗浄し、さらにエタノールおよびアセトンで洗浄した後、乾燥して低分子化キトサンを得た。

2-5 灰分の測定

550℃灰化法で測定した。

2-6 タンパク質の測定

キトサン100mgに1N水酸化ナトリウム20mlを加え、95~100℃で2h加熱攪拌した後ろ過し、ろ液を1N水酸化ナトリウムで50mlに定容して、タンパク質測定用試料とした。上記の1N水酸化ナトリウム溶液を、Lowry法²⁾で測定し、ウシ血清アルブミン溶液を標準物質として、タンパク質含量を算出した。

2-7 脱アセチル化度の測定

脱アセチル化度は、コロイド滴定法³⁾により測定した。

キトサン100mgを5%酢酸溶液に溶解し、合わせて20gとした。キトサン酢酸溶液1gを正確に採取し、脱イオン水30mlを加え、トルイジンブルー溶液を指示薬として、1/400Nポリビニル硫酸カリウム溶液で滴定した。

2-8 分子量の測定⁴⁾

酢酸緩衝液に溶解したキトサン溶液を、サイズ排除クロマトグラフィーにより分子量分布を測定し、重量平均

分子量(MW)を算出した。尚、光散乱検出器の校正にはブルランP-50を使用した。

測定条件 カラム：OHpak SB-803HQ、SB-805H、SB-806HQ
 移動相：0.33M酢酸+0.1M酢酸ナトリウム (pH4.2)
 流速：1ml/min カラム温度：40℃
 検出器：光散乱検出器 (DAWN-E ワイアットテクノロジー社)、示差屈折計 (RID-10A 島津製作所)

2-9 抗菌試験法

2-9-1 使用菌株

抗菌試験には、表1のIAM保存菌株4種を使用した。

表1 抗菌試験に使用した細菌類

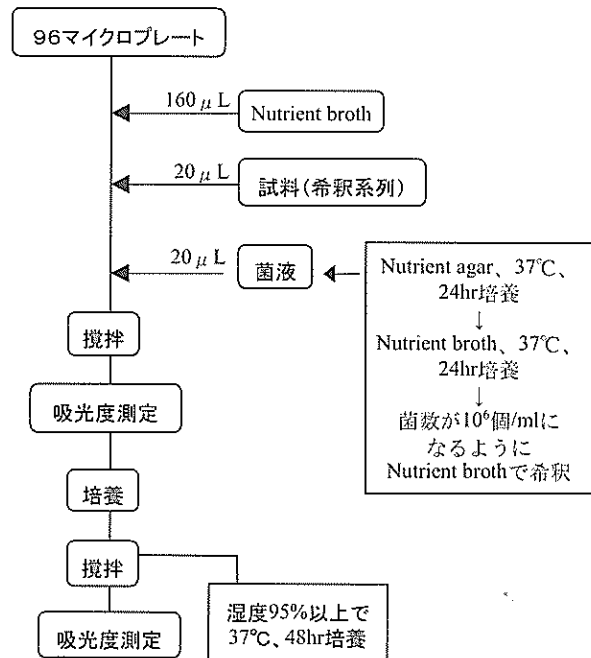
菌株	IAM番号
<i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌)	IAM 12118
<i>Escherichia coli</i> (大腸菌)	IAM 12119
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (肺炎かん菌)	IAM 12015
<i>Staphylococcus aureus</i> (黄色ブドウ球菌)	IAM 12082

2-9-2 キトサン溶液の調製

キトサン1gを蒸留水40mlに膨潤させ、1M酢酸溶液10mlを加え、酢酸ナトリウムでpH5.0に調整後、100mlに定容しキトサン1%溶液とした。抗菌試験にはキトサン1%溶液を順次希釈して使用した。

2-9-3 抗菌試験

キトサンの抗菌試験は比濁法を用いて行った。試験を行うに当たっては保存菌株を2回継代培養することにより活性を揃えた、菌数を106個/mlになるよう調整した後に試験用菌分散溶液とした。培養においてはNutrient Brothを160μl加えた96穴マイクロプレートに濃度調節したキトサン20μl及び菌分散溶液20μlを加え、マイクロプレート専用攪拌機(JANNE&KUNKEL IKA-SCHUTTER MTS4)にて10分間攪拌した後に37℃で48時間培養した。培養前後の吸光度(630nm)をマイクロプレートリーダー(Bio-TEK INSTRUMENTS, INC Elx 800)で測定した。培養前後の吸光度の増加を求め、コントロールの増加分の半分以下になった最小の濃度を最小生育阻止濃度(MIC)とした。また、MICの算出にあたって培養前の吸光度が高いものについては凝集による混濁が起こっていると見なしデータから除外した。試験の流れをスキーム1に示す



スキーム1 抗菌試験法

3 結果および考察

3-1 ソデイカ軟甲のキチン含量

ソデイカ軟甲の成分組成を表2に示した。

表2 ソデイカ軟甲のキチン含量

キチン	34.3%
タンパク質	62.6%
灰分	0.4%

栗田の方法¹⁾により得られたソデイカのキチン含量は34.3%であった。また、ソデイカ軟甲はタンパク質含量が62.6%と高く、キチン質とタンパク質で約97%を占めており、灰分含量は0.4%と低かった。

郡山⁵⁾によると、ムラサキイカ軟甲の成分はキチン33.7%、タンパク質65.5%、灰分0.5%であり、イカ軟甲には灰分がほとんど存在しないことから、脱灰分(塩酸処理)を緩やかな条件で行えるとしている。また、上谷⁶⁾らは、イカ軟甲を原料とした場合、脱灰分操作は必要ないと報告している。ソデイカ軟甲の成分組成はムラサキイカのそれと同様の値であり、灰分が0.4%と少ないことから、ソデイカ軟甲からキチンの調製においても、脱灰分操作を省略することが可能と考えられる。

3-2 イカ軟甲からキトサンの調製

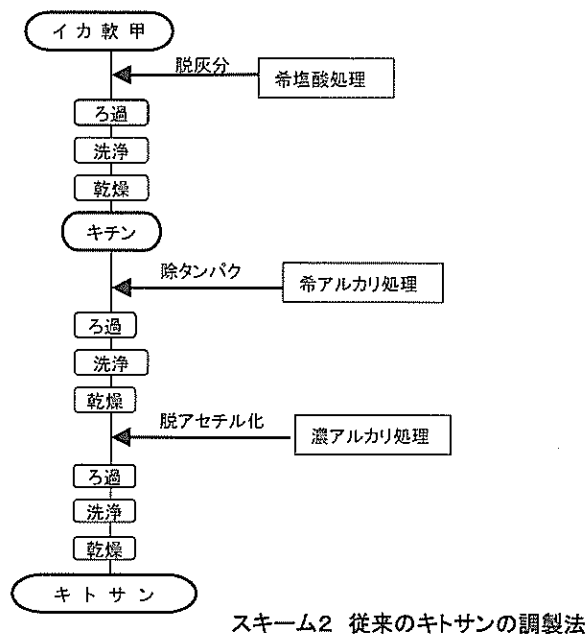
キトサンは通常、脱灰分、除タンパクおよび脱アセチ

ル化の3段階の工程を経て製造されるが、イカ軟甲では脱灰分操作は省略できることが明らかとなっている。本研究では、除タンパクおよび脱アセチル化操作でアルカリ溶液が使用されていることに着目し、ソデイカ軟甲（以後イカ軟甲と言う）を濃水酸化ナトリウム溶液処理による1段階の工程でのキトサンの調製を試みた。従来のキトサン調製法および濃アルカリ処理によるキトサンの調製法をスキーム2および3に示す。

100℃で3時間加熱攪拌し、1段階処理によるキトサンの調製を行った。得られたキトサンの性状を表3に示した。

表3 キトサンの収率および性状

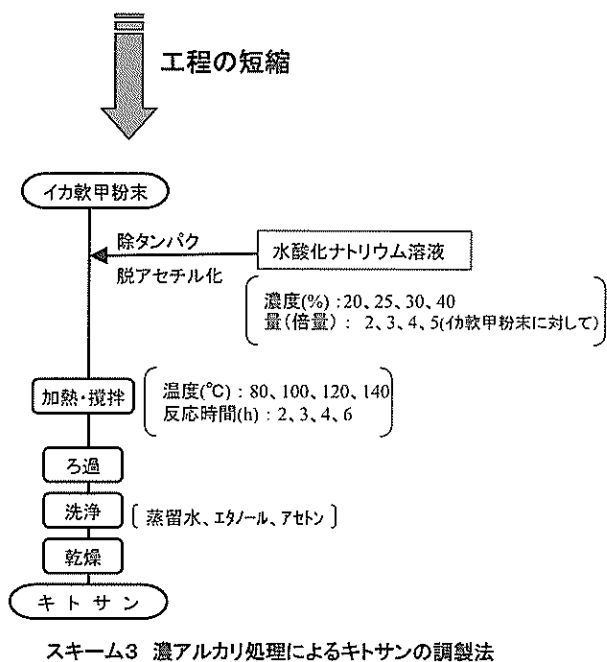
キトサン (収率)	24%
脱アセチル化度	72%
タンパク質含量	0.2%



イカ軟甲からのキトサンの収率は24%であった。これは、栗田らにより、アカイカ軟甲由来キチンを脱アセチル化して得られたキトサンの収率23.3%と同様な値である。また、キトサンの脱アセチル化度は72%、タンパク質含量は0.2%であり、イカ軟甲に濃水酸化ナトリウム溶液を作用させることで、除タンパクおよび脱アセチル化反応を同時に行い、1段階の処理でのキトサンの調製が可能であることがわかった。

キトサンを調製する際には、水酸化ナトリウム濃度などの反応条件により、脱アセチル化度が異なる性状のキトサンが得られることが知られている。そこで次に、反応に使用する水酸化ナトリウムの濃度および量、反応時間、反応温度のちがいによるキトサンの脱アセチル化度の変化を調べ、キトサン調製のための反応条件の検討を行った。

工程の短縮



3-2-2 水酸化ナトリウム濃度と脱アセチル化度

図1に、各種濃度の水酸化ナトリウム溶液で、イカ軟甲を処理したときに得られる、キトサンの脱アセチル化度の変化を示した。

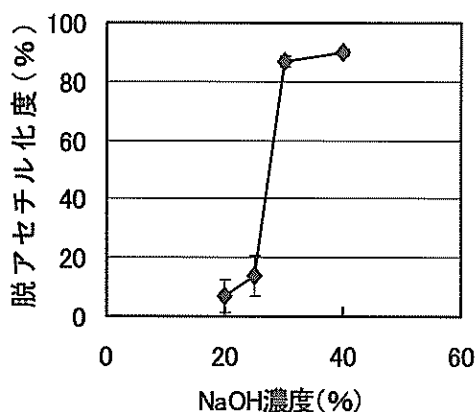


図1 水酸化ナトリウム濃度と脱アセチル化度
NaOH量: 4倍量、反応温度: 100℃、
反応時間: 3時間

3-2-1 イカ軟甲の濃水酸化ナトリウム処理で得られたキトサンの性状
30%水酸化ナトリウム溶液をイカ軟甲の3倍量用いて、

水酸化ナトリウム溶液の濃度が25%では、脱アセチル化度が20%以下であり、脱アセチル化反応がほとんど進行していないことがわかる。しかし、30%濃度では脱アセチル化度は87%へ急激に増加し、40%濃度では脱アセチル化度は90%であった。

このことから、反応には30%以上の濃度の水酸化ナトリウム溶液を使用することが必要であると考えられる。

3-2-3 水酸化ナトリウム量と脱アセチル化度

次に、30%水酸化ナトリウム溶液を用いて、水酸化ナトリウムの量とキトサンの脱アセチル化度の変化を調べた。結果を図2に示す。

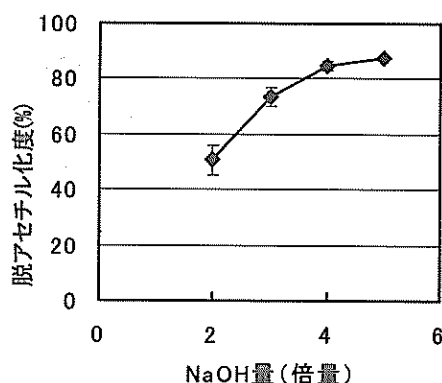


図2 水酸化ナトリウム量と脱アセチル化度
NaOH濃度：30%、反応温度：100℃、
反応時間：3時間

水酸化ナトリウム溶液をイカ軟甲の2倍量(w/w)使用したときの、得られたキトサンの脱アセチル化度は50%であったが、3倍量使用すると脱アセチル化度は74%に増加し、5倍量では87%まで増加した。

このことから、水酸化ナトリウムの量は、イカ軟甲の3倍量(w/w)以上必要であると判断した。

3-2-4 反応時間と脱アセチル化度

次に、30%水酸化ナトリウムをイカ軟甲の3倍量使用して、反応時間による脱アセチル化度の変化を調べた。結果を図3に示した。

反応時間2時間では、脱アセチル化度は56%と低かったが、反応時間が長くなるとともにキトサンの脱アセチル化度は増加し、4時間以上では脱アセチル化度は80%でほぼ一定となった。よって、反応時間は3または4時間が適当であると判断した。

3-2-5 反応温度と脱アセチル化度

次に、反応温度による脱アセチル化度の変化を調べた。

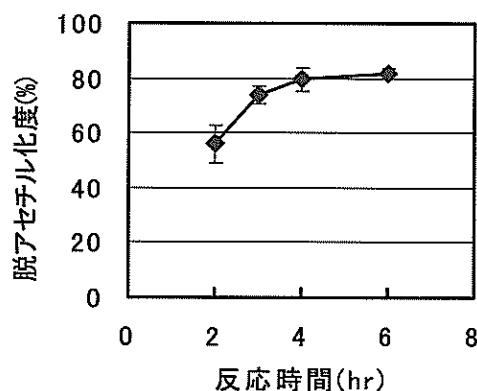


図3 反応時間と脱アセチル化度
NaOH濃度：30%、反応温度：100℃、
NaOH量：3倍

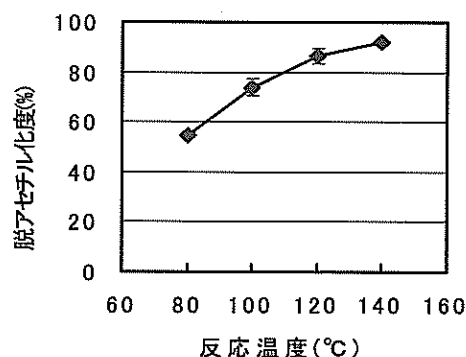


図4 反応温度と脱アセチル化度
NaOH濃度：30%、NaOH量：3倍
反応時間：3時間

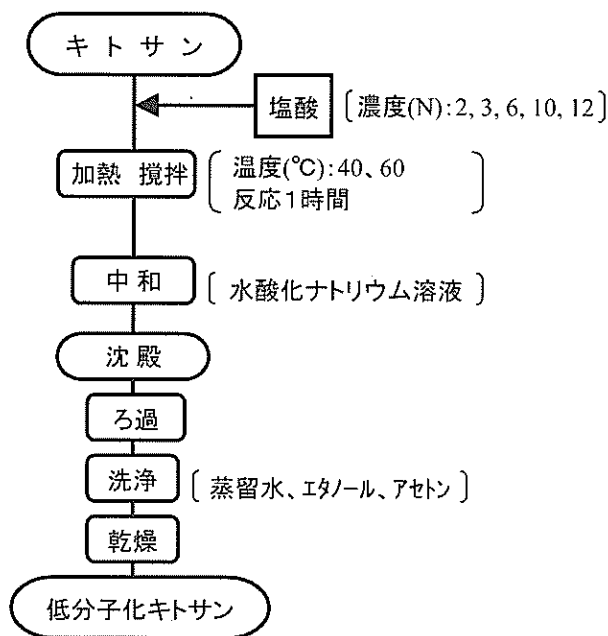
反応条件は、30%水酸化ナトリウム溶液を3倍量使用して、反応時間3時間で行った。結果を図4に示した。

反応温度80℃では、脱アセチル化度は55%であったが、反応温度が高くなるに従い、キトサンの脱アセチル化度も増加した。140℃では脱アセチル化度は90%以上に達するが、反応中にかなりの発泡が見られるため、扱いが困難であった。

これらのことより、反応温度は100℃～120℃が適当であると考えられた。

3-3 キトサンの低分子化

キトサンの抗菌性は低分子のキトサンが強い傾向を示すと言われており、本研究の目標である、抗菌性の強いキトサンを調製するには、イカ軟甲をアルカリ処理して得られたキトサンの低分子化を行う必要がある。そこで、塩酸を用いた酸加水分解による低分子化反応を行った。キトサンの低分子化法をスキーム4に示す。



スキーム4 キトサンの低分子化法

3-3-1 塩酸濃度の影響

脱アセチル化度が約80%のキトサンを用いて、反応温度40℃、反応時間1hrの条件下、各塩酸濃度で低分子化反応を行った。

1)分子量(MW)の変化

低分子化反応における塩酸濃度と分子量の変化を図5に示した。

塩酸濃度2Nおよび3Nによる反応では、キトサンの分子量はそれぞれ、100~200万および50~100万とまだ大きく、さらに値にもばらつきがみられた。しかし、6N塩酸では20万程度、10N塩酸では5万程度、12N塩酸では3万程度にまで分子量は低下し、ばらつきもほとんど見られなかった。

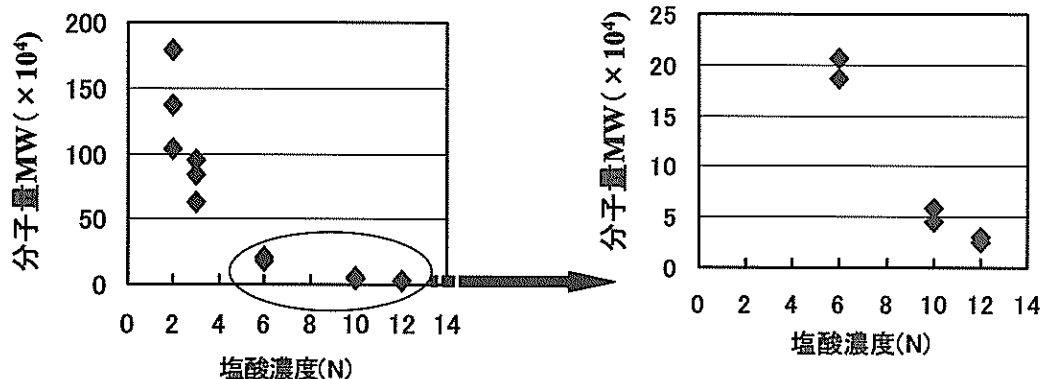


図5 低分子化反応における塩酸濃度と分子量(MW) の変化
反応温度:40℃、反応時間:1時間

このように、低い塩酸濃度ではキトサンの分解が不十分であり、低分子化反応には6N以上の濃度の塩酸を使用した方がよいと考えられる。

2)脱アセチル化度の変化

低分子化反応に伴う脱アセチル化度の変化を図6に示した。

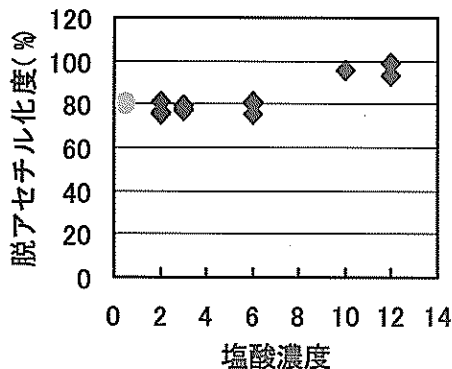


図6 低分子化に伴う脱アセチル化度の変化反応
温度:40℃、反応時間:1時間

脱アセチル化度80%のキトサンを原料とした場合、2N、3N、6Nの塩酸中40℃で低分子化反応を行っても、脱アセチル化度に変化はみられなかった。10Nおよび12Nの塩酸では、脱アセチル化度はそれぞれ96~100%に変化しており、10N以上の塩酸中40℃で低分子化反応を行うと、脱アセチル化度が15~20%上昇することがわかった。

3-3-2 反応温度の影響

脱アセチル化度が約80%、90%、100%のキトサンを、6N塩酸を用いて、反応温度40℃および60℃の条件で低分子化を行い、低分子化反応における温度の影響を検討した。結果を表4に示した。

表4 キトサンの塩酸(6N HCl)による低分子化

キトサン (脱アセチル化度%)	40°C		60°C	
	分子量(MW)	脱アセチル化度 (%)	分子量(MW)	脱アセチル化度 (%)
I (81%)	189000	80	97000	96
II (91%)	98000	91	23000	99
III (98%)	270000	100	90000	100

反応温度60°Cで、重量平均分子量10万以下のキトサンが得られ、40°Cで得られたキトサンの1/2~1/3まで分子量が低下していた。低分子化反応に伴う脱アセチル化度の変化は、40°Cではほとんど変化がなかったが、60°Cでは10~15%増加していた。

また今回は、原料キトサンの脱アセチル化度別に低分子化反応を行ったが、反応後の分子量にはばらつきがみられた。キトサンの低分子化には、原料キトサンの分子量も影響すると考えられ、より詳細に検討するには、原料キトサンの分子量を明らかにすることが必要である。

しかし、今回の低分子化反応の結果から、脱アセチル化度が80%以上のキトサンを原料として、6N塩酸を用い、60°Cで1時間反応を行うと、重量平均分子量が10万以下で、脱アセチル化度が100%に近い低分子化キトサンが得られることがわかった。また、40°Cでの反応結果より、6N塩酸、反応温度40°C、反応1時間の条件で低分子化反応を繰り返し行くと、脱アセチル化度を変化させずに、分子量10万以下のキトサンを調製できると考えられる。

3-4 イカ軟甲由来キトサンの抗菌活性

3-4-1 マイクロプレート法における細菌の増殖曲線

従来の比濁法による抗菌試験では、①試験管が大量に必要、②吸光度測定が煩雑、③試料量が比較的多く必要、④広い培養スペースが必要などの問題点がある。本研究では、操作が簡便で少量の試料で抗菌試験が行える方法として、マイクロプレートを利用した比濁法を試みた。

比濁法では通常、培地はpH7に調製して行われるが、キトサン酢酸溶液をpH7の液体培地に添加すると、キトサンが析出して培地に懸濁が生じてしまう。そこで、内田⁷⁾が行っているpH6の液体培地を用いる方法で、マイクロプレート上での細菌の増殖を調べた。図7に増殖曲線を示した。

各菌とも、培養開始後10時間までは増殖が見られない

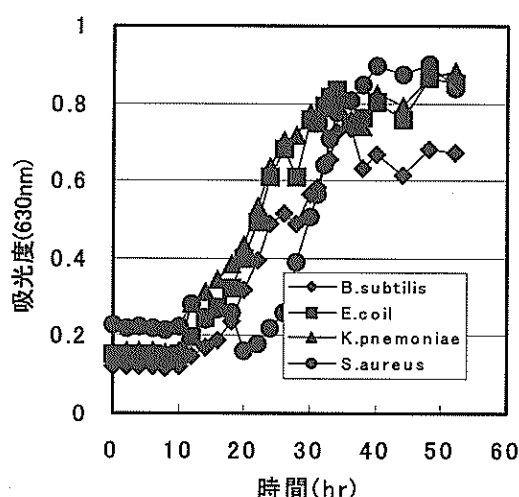


図7 pH6における細菌の増殖曲線

が、10時間目から増殖が始まり、その後も順調に増殖していることがわかる。また、30時間を過ぎると増殖が緩やかになり、40時間以降は吸光度がほぼ一定となり、増殖が停止している。このように、マイクロプレート上でも細菌は増殖しており、キトサンの抗菌試験にマイクロプレート法を適用できるものと考えられる。また、培養40時間以降は吸光度がほぼ一定となっていることから、測定の便宜上抗菌試験における培養時間は48時間と決定した。

3-4-2 キトサンの細菌に対する抗菌活性

重量平均分子量が約10万で脱アセチル化度の異なる4種のキトサンと、重量平均分子量が20万以上で脱アセチル化度の異なる3種のキトサンを調製し、抗菌試験を行った。その結果を表5に示した。

キトサンの抗菌活性は、B. subtilis、E. coli、K. pneumoniae、S. aureusの4種の細菌に対してほとんど差は

表5 イカ軟甲由来キトサンの各種細菌に対する最小生育阻止濃度(MIC)

重量平均分子量	約100000				200000以上		
	脱アセチル化度(%)	77.5	90.7	96.5	100	80.5	90.6
<i>B. subtilis</i>	0.01	0.03	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
<i>E. coli</i>	0.01	0.01	0.01	0.008	0.02	0.01	0.01
<i>K. pneumoniae</i>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>S. aureus</i>	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02

* 培養48時間後の吸光度が対照の1/2となるキトサンの濃度(%)

なく、MICは0.01~0.02%であった。重量平均分子量約10万と20万以上のキトサンでは、分子量約10万のキトサンの抗菌性がやや強い傾向が見られた。また、脱アセチル化度の違いによる抗菌活性は、脱アセチル化度が高いほど活性が強くなる傾向が見られた。これは、分子量が小さく脱アセチル化度が高いキトサンが、抗菌活性が強い傾向を示すと報告している、内田⁷⁾の結果と一致するものである。今回、抗菌活性を評価したなかでは、重量平均分子量約10万で、脱アセチル化度が95%以上のキトサンの抗菌活性が強かった。

4 結言

イカ軟甲から抗菌性の強いキトサンを調製することを目的に、イカ軟甲のアルカリ処理条件および酸分解による低分子化条件を検討し、得られたキトサンの抗菌性を評価したところ、以下のような結果が得られた。

- ①イカ軟甲を直接、濃水酸化ナトリウム溶液で処理することで、キトサンを調製することができた。この方法は、除タンパクおよび脱アセチル化反応を同時に行うものであり、キトサン製造工程の短縮に繋がると考えられる。
- ②イカ軟甲の水酸化ナトリウムによる処理条件は、水酸化ナトリウム濃度30~40%水酸化ナトリウム量3~4倍量(イカ軟甲重量に対して)、反応温度100~120℃、反応時間3~4時間が最適であり、脱アセチル化度70~90%範囲でキトサンを調製することが可能であった。
- ③キトサンの塩酸による低分子化には、6N以上の濃度の塩酸が必要であった。60℃で1時間の反応で、重量平均分子量10万以下のキトサンが得られた。6N塩酸を用い40℃で1時間の反応を繰り返し行うことで、キトサンの脱アセチル化度に影響を及ぼさずに低分子化することが可能である。

④イカ軟甲由来キトサンの細菌に対する抗菌性は、分子量が小さく、脱アセチル化度が高いほど強い傾向が見られた。

⑤今回、抗菌活性を評価したなかでは、重量平均分子量約10万で、脱アセチル化度が95%以上のキトサンの抗菌活性が強かった。

謝辞

この研究は、中小企業庁の地域ものづくり対策事業により実施したものである。

本研究を行うに当たり、ご指導ご鞭撻を賜りました琉球大学教授 安田正昭様、抗菌試験法について御助言を賜りました佐賀大学教授 内田泰様に厚く御礼申し上げます。また、イカ軟甲をご提供いただきました沖縄県漁業協同組合連合会、(有)水実、キンシロ鮮魚の皆様にも御礼申し上げます。

5 参考文献

- 1)K.Kurita, K.Tomita, T.Tada, S.Ishii, S.Nishimura and K.Shimoda, J. Poly. Sci. : Part A : Poly. Chem., Vol.31, p485 (1993).
- 2)Lowry O.H., N.J.Rowebrough, A.L.Farr and R.J.Randall, J. Biol. Chem., Vol.193, p265 (1951).
- 3)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」 技報道出版 (1994).
- 4)Rajesh G.Beri, John Walker, Elwyn T.Reese and James E.Rollings, Carbohydr. Res.,Vol.238, p11 (1993).
- 5)郡山剛, 化学工業, 10月号, p25 (1991).
- 6)上谷昌博, 三浦陸, 岩間保憲 (扶桑化学工業株), 「イカ軟甲の処理方法」, 特開平11-243905.
- 7)キチン、キトサン研究会編 「キチン、キトサンハンドブック」 技報道出版 (1995).

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。