

<平成25年度助成>

キトサンと脂肪酸の複合化による 食用サブミクロン微粒子製造と機能成分の担持・分散化

黒 岩 崇

(東京都市大学工学部エネルギー化学科)

1. はじめに

分子が自発的に集合化・組織化することで微細構造を形成するボトムアップアプローチは省エネルギーなものづくりプロセスとして注目を集めている。本アプローチに基づく素材加工技術は、特に食品をはじめとする激しいせん断や発熱等の物理的ストレスに弱い対象物の加工に適していると期待され、様々な検討がなされている¹⁾。一方、分子の自己組織化を利用した材料開発においては、高分子電解質と両親媒性分子といった異種分子の複合化が注目されており、多様な微細構造と物性を発現する例が知られている²⁾。

本研究では、海洋性バイオマスとして注目される多糖類であるキトサンと、動植物由来の長鎖脂肪酸を水溶液中で混合するだけという極めてシンプルな手法で食用のサブミクロンサイズ微粒子を作製する手法について検討した。本稿では、長鎖脂肪酸としてオレイン酸を用いて作製した複合微粒子のキャラクタリゼーションを行うとともに、機能成分の分散剤としての利用について検討した結果について報告する。

2. 実験材料および方法

2.1. 試薬類

キトサンとしては、キトサンHD(ヤエガキ発酵技研株式会社)を使用した。コロイド滴定法³⁾により測定した脱アセチル化度は98%、粘度法⁴⁾により測定した分子量は58,000 g/molであった。オレイン酸、エタノール(99.5%)、ピレン、酢酸お

よび水酸化ナトリウムは和光純薬工業株式会社から購入し使用した。

2.2. キトサン-オレイン酸複合サブミクロン微粒子の作製

0.2Mの酢酸水溶液に5g/Lの濃度になるようにキトサンを溶解しpHを5.0に調整した後、吸引濾過により固形夾雑物を除去してキトサン溶液を作製した。このキトサン溶液20mLに種々の濃度のオレイン酸エタノール溶液2mLを滴下し、所定の温度下で400rpmで一日攪拌してキトサン-脂肪酸複合微粒子の分散液を得た。キトサンと脂肪酸の混合モル比を「キトサンのグルコサミン残基(GluN)あたりのオレイン酸添加モル量(OA/GluN)」と定義し、混合モル比を種々変化させて微粒子を作製した。微粒子の形成は紫外可視分光光度計(UV-1600、島津製作所)を用いた光透過率測定(測定波長660nm)および2.6に示す蛍光プローブを用いた蛍光強度測定により判定した。

2.3. 走査型電子顕微鏡(SEM)観察

適当な濃度に希釈した微粒子分散液をシリコン基板上で自然乾燥後、SEM(S-4100、日立製作所)による観察を行った。

2.4. 粒子径およびゼータ電位の測定

分散微粒子の粒径および分散微粒子のゼータ電位はゼータサイザーナノZS(マルバーン株式会社)を利用した動的光散乱法およびレーザードップラー電気泳動法により測定した。上記方法により調製した微粒子分散液は必要に応じて超純水で希釈し、測定はいずれも25℃で行った。

2.5. キトサン-オレイン酸複合体のフーリエ変換赤外吸収 (FT-IR) スペクトルの測定

キトサン-オレイン酸複合微粒子分散液をセルロースチューブに封入し、超純水中で72時間以上透析して脱塩した後、チューブ内の残存試料を凍結乾燥して分析用試料とした。FT-IR スペクトルの測定はフーリエ変換赤外分光光度計 (FT/IR-5300、日本分光株式会社) を用いてKBrプレート法により行った。

2.6. 蛍光プローブを利用した微粒子の形成挙動の解析

キトサン-オレイン酸複合微粒子の形成挙動を、ピレンを利用した蛍光プローブ法⁵⁾により調べた。種々の混合モル比で作製したキトサン-オレイン酸複合微粒子分散液にピレンを添加し、2時間平衡化させた後、分光蛍光光度計 (RF-5300、島津製作所) を用いて励起波長335nmにおける蛍光スペクトルを測定した。

2.7. キトサン-オレイン酸複合微粒子を利用したクルクミンの分散安定化

上記の微粒子作製方法において、オレイン酸エタノール溶液にクルクミンを添加したものを利用して、クルクミンを担持したキトサン-オレイン酸複合微粒子を作製した。遠心分離により粗大粒子を除去後、分散液をエタノールで希釈したものの吸収スペクトルを上記紫外可視分光光度計で測定し、分散化されたクルクミン量を求めた。得られたクルクミン担持複合微粒子分散液を室温下で保蔵し、所定の時間ごとに遠心分離して分散液の濁度変化を調べることで分散液の安定性を評価した。

3. 結果および考察

3.1. キトサンとオレイン酸の複合化によるサブミクロン微粒子の形成

キトサン水溶液にオレイン酸エタノール溶液を滴下し室温下で一日攪拌すると白濁した分散液が得られた。Fig. 1には、得られた分散液の外観と

遠心分離後の光透過率を示す。分散液は遠心分離後も白濁状態を維持しており、キトサンとオレイン酸の混合モル比 (OA/GluN) が高いほど試料の透過率は低下した。この透過率の低下は微粒子形成による濁度上昇に起因するものと考えられた。そこで、混合モル比0.18の条件において得られた分散液試料についてSEM観察を行ったところ、サブミクロンサイズの微粒子が認められた (Fig. 2)。同様の分散液を遠心分離後、動的光散乱法により粒径分布を測定したところ、平均粒径約600nmの微粒子が形成されていることがわかった (Fig. 3)。

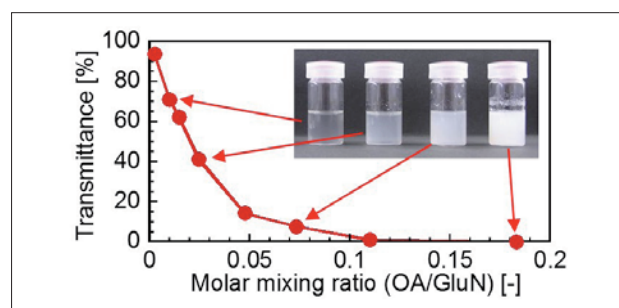


Fig. 1 種々の混合モル比で作製したキトサン-オレイン酸複合微粒子分散液の外観および光透過率

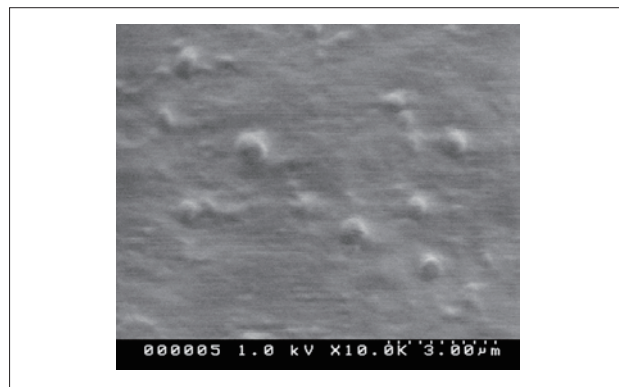


Fig. 2 キトサン-オレイン酸複合微粒子のSEM画像

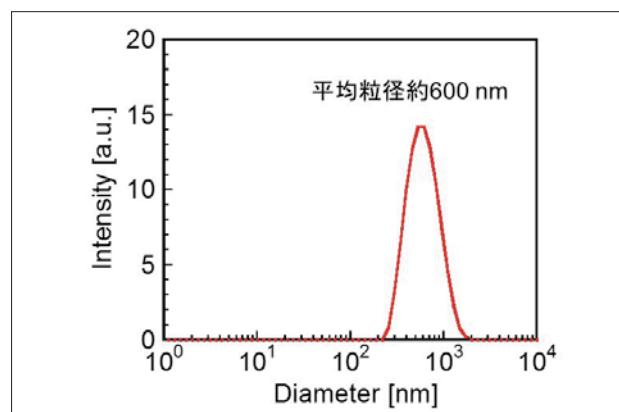


Fig. 3 動的光散乱法により測定したキトサン-オレイン酸複合微粒子の粒径分布

このとき、粒径の多分散指数は0.14程度と比較的小さく、キトサン水溶液とオレイン酸エタノール溶液を混合する簡便な方法により均一性の高いサブミクロンサイズの微粒子分散液が得られることが明らかとなった。微粒子のゼータ電位を測定したところ、約+50mV程度の値であった。この値はキトサンのアミノ基がプロトン化したことによる正電荷に由来すると考えられ、微粒子の正電荷による静電的な反発によって微粒子の分散状態が維持されているものと推察される。

キトサン-オレイン酸複合微粒子を透析膜を用いて洗浄後、凍結乾燥して得られたキトサン-オレイン酸複合体のFT-IRスペクトルをFig. 4に示す。キトサン-オレイン酸複合体のスペクトルでは、オレイン酸のみのスペクトルにみられるカルボキシル基の吸収(1700 cm^{-1} 付近)が減少し、新たに1560 cm^{-1} 付近に強い吸収が認められた。この吸収帯はカルボキシラートイオン(COO^-)に帰属される⁶⁾ことから、上記方法で得られるCHI-OA複合微粒子の形成には、プロトン化したキトサンのアミノ基($-\text{NH}_3^+$)と脱プロトン化したオレイン酸のカルボキシラートイオンとの静電的相互作用を介した複合化過程が関与していると推察される。

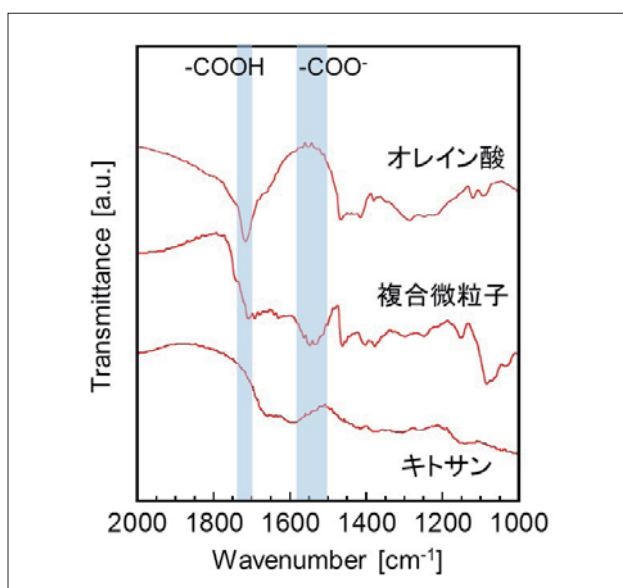


Fig. 4 オレイン酸、キトサン、およびキトサン-オレイン酸複合微粒子のFT-IR スペクトル

3.2. 蛍光プローブを利用したキトサン-脂肪酸複合微粒子の形成挙動評価

両親媒性分子の自己集合挙動の評価には、ピレンを蛍光プローブとして利用する手法が広く用いられている⁵⁾。すなわち、蛍光スペクトルにみられるピークのうち、ピレンの置かれている微視的環境の影響を受けるピークの強度(I_1)と環境の影響をほとんど受けないピークの強度(I_3)の比は、ピレン分子の周囲の環境を反映する指標として集合体形成の評価に利用できる。Fig. 5には、5g/Lの濃度のキトサン溶液に対して種々の混合モル比でオレイン酸を添加したときの蛍光スペクトルの変化を示す。混合モル比の増大に伴い、蛍光スペクトルの形状が変化していることがわかる。蛍光強度比 I_1/I_3 の値はある混合モル比以上になると急激に減少した(Fig. 6)。蛍光強度比が変化したことは、ピレン分子が置かれている環境が変化したことに対応し、試料中における疎水性ドメインの形成を示唆している。混合モル比の増加に対する蛍光強度比の低下と試料の光透過率の減少(Fig. 1)は概ね対応していることから、微粒子の形成にはオレイン酸の疎水基の会合プロセスが寄与していることが示唆された。上記3.1の結果を考慮すると、微粒子の形成は(1)静電的相互作用によるキトサンとオレイン酸の複合化および

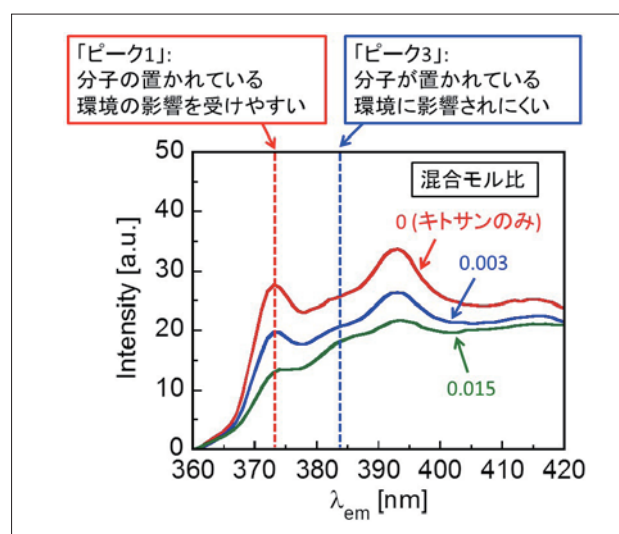


Fig. 5 種々の混合モル比で作製したキトサン-オレイン酸複合微粒子懸濁液中でのピレンの蛍光スペクトル変化

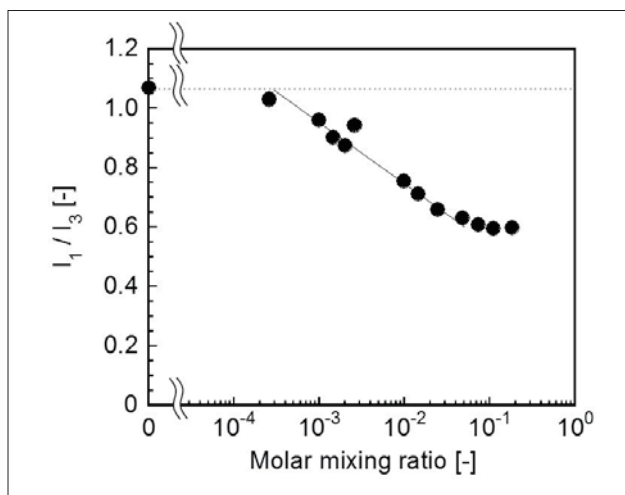


Fig. 6 混合モル比の増加に伴う蛍光強度比の減少

(2) 疎水的相互作用によるオレイン酸の会合、の2つの要因によるものと推察された。

3.3. キトサン-オレイン酸複合サブミクロン微粒子へのクルクミンの内包化

キトサン-オレイン酸複合微粒子作製時にクルクミンを添加し、水にほとんど溶けないクルクミンを安定に分散させることを試みた。対照として、溶媒のみ、溶媒にオレイン酸およびキトサンのいずれか一方を添加したものそれぞれにクルクミンを加えた試料も作製したが、いずれにもクルクミンはほとんど溶解・分散しなかった。これに対し、複合微粒子分散液ではクルクミンが多く含まれており、その含有量はクルクミンの水への溶解度の約100倍に相当することがわかった (Fig. 7)。ク

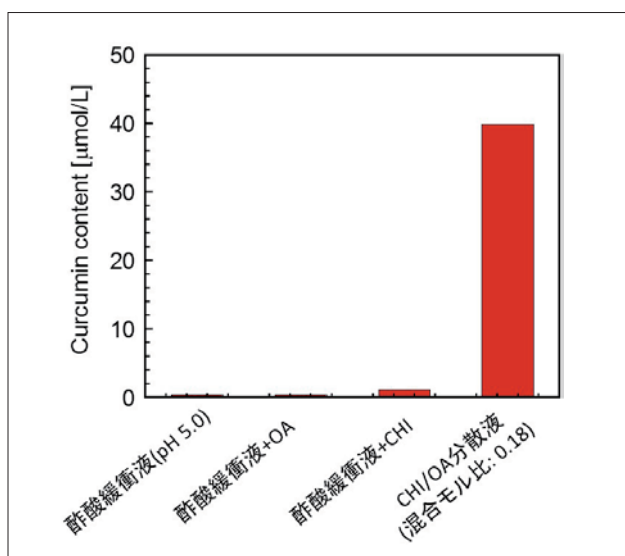


Fig. 7 各試料中のクルクミン濃度の比較

ルクミンを担持した微粒子の粒径は約700nmであり、依然としてサブミクロンサイズを維持していた (Fig. 8)。クルクミン担持複合微粒子分散液の濁度を経時的に測定した結果 (Fig. 9)、若干の濁度低下が認められたものの、21日経過後にも安定な分散状態が維持されることが示された。

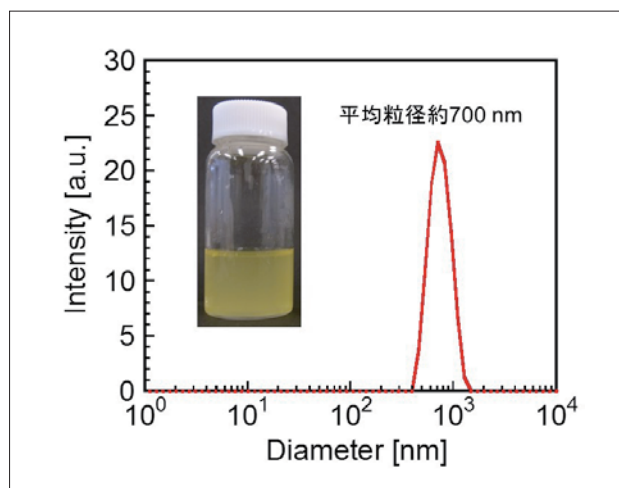


Fig. 8 クルクミン担持複合微粒子分散液の外観および粒径分布

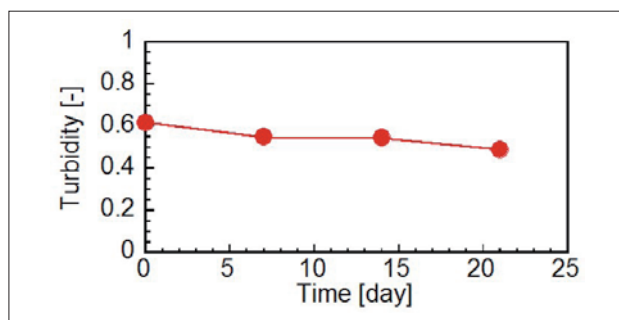


Fig. 9 クルクミン担持複合微粒子分散液の濁度変化

4. おわりに

本研究では、キトサンとオレイン酸の溶液を混合するだけという極めてシンプルな手法により可食性素材からなるサブミクロン微粒子を作製できることを明らかにするとともに、得られる微粒子のキャラクタリゼーションを行った。さらに、本微粒子には機能性成分として注目されているクルクミンを担持させることができ、3週間以上にわたって安定な分散状態を維持できることを示した。

現在は本手法をさらに発展させるべく、種々の分析手法を駆使してより詳細な微粒子の構造解析

を進めている。また、様々な脂肪酸を用いて微粒子を作製しその形成挙動を調べることで微粒子形成のメカニズムについても検討を行っている。更なる研究を通じて、本法で得られる微粒子の特性および形成機序を明らかにすることで、高機能な食用分散液を低コストで製造可能な技術の確立につながると期待している。

謝 辞

本研究の遂行にあたり研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に篤く御礼申し上げます。動的光散乱法による粒子径測定に際しては、筑波大学生命環境系 市川創作教授ならびに独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所 植村邦彦博士、同小林功博士のご指導を賜りました。フーリエ変換赤外吸収スペクトルの測定では東京都市大学工学部エネルギー化学科 岩村武准教授のご助言を賜りました。ここに記して深謝いたします。研究を進めるにあたりご支援・ご協力をいただきました東京都

市大学工学部エネルギー化学科 金澤昭彦教授ならびに河内勇人、中谷将大の各氏に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 市川ら：日本食品工学会誌, **10**, 207 (2009).
- 2) Thünemann AF: Prog. Polym. Sci., **27**, 1473 (2002).
- 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, pp. 51-52, 技報堂出版, 東京, (1991).
- 4) Wang W *et al.*: Int. J. Biol. Macromol., **13**, 281 (1991).
- 5) Wilhelm M *et al.*: Macromol., **24**, 1033 (1991).
- 6) 中西ら：赤外線吸収スペクトル—定性と演習—(改訂版) 定性編, p. 43, 南江堂, 東京 (1978).

[付記]

本研究の一部は以下の学会で発表された。

1. 河内勇人, 黒岩崇, 小林功, 植村邦彦, 金澤昭彦:「キトサンと脂肪酸からなる複合微粒子の形成に対する脂肪酸種の影響」, 日本食品工学会第15回(2014年度)年次大会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2014年8月.
2. 河内勇人, 黒岩崇, 小林功, 植村邦彦, 金澤昭彦:「キトサンと長鎖脂肪酸からなるサブミクロン微粒子分散系の作製と特性評価」, 第63回高分子討論会, 長崎大学(長崎県長崎市), 2014年9月.

Production of submicron-sized edible particle dispersions via the complexation of chitosan with a fatty acid and their application for encapsulation and dispersion of functional food components

Takashi Kuroiwa

Department of Chemistry and Energy Engineering

Tokyo City University

[Summary]

Preparation of submicron-sized particle dispersions consisting of chitosan and a long-chain fatty acid was investigated. Chitosan having molecular weight of 58,000 with degree of deacetylation of 98% was used. Oleic acid was used as a long-chain fatty acid. The procedure for preparing the particle dispersion was quite simple: a turbid dispersion sample could be obtained by simply mixing chitosan aqueous solution and oleic acid ethanol solution at room temperature. Transmittance of particle dispersions at 660 nm of wavelength decreased with the increase of molar mixing ratio of oleic acid to glucosamine unit of chitosans. Scanning electron microscopy and dynamic light scattering measurement revealed the formation of submicron-sized particles. Average diameter of the particles was ca. 600 nm. The zeta-potential value of the obtained particles was around +50 mV, indicating that the particles were stably dispersed by electrostatic repulsion based on positively charged groups derived from chitosan molecules. Fourier-transform infrared spectrometry and fluorescence measurement using pyrene as a fluorescent probe indicated that the particle formation was attributed to both electrostatic and hydrophobic interactions between mixed components. Curcumin could be encapsulated into the chitosan-oleic acid complex particles and be dispersed in aqueous solution. Amount of curcumin dispersed by the chitosan-oleic acid complex particles corresponded to almost 100 times of solubility of curcumin in water. Curcumin-encapsulated particles had an average diameter of ca. 700 nm, still a submicron level. The particles were stably dispersed without significant precipitation for at least 3 weeks. We believe that the particle dispersions prepared by our method should be useful for developing novel foods and beverages containing functional components having low solubility in water.