

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 鈴木 志 保

学位授与の日付 平成20年2月20日

論 文 名 「Physical and functional properties of novel polysaccharide films  
(新規多糖フィルムの物性と機能)」

論文審査委員 主査 北村 進一  
副査 切畑 光統  
副査 笠井 尚哉

## 論文要旨

### 第1章 緒 論

多糖は、自然界に豊富に存在しており、食品、繊維、紙などの原材料として、長年に渡り広く利用されてきた。近年、多糖は脱石油や次世代の高齢化社会に貢献する新しい環境・生体適合性材料としての可能性が示唆されているが、いまだ広く利用されるには至っていない。本研究でとり挙げる3種類の多糖、すなわち酵素合成アミロース、プルラン、キトサンは、特に注目されている多糖である。いずれも1種類の構成糖から成るホモ多糖であるが、その物性や機能は大きく異なると考えられる。酵素合成アミロースは、ショ糖から酵素合成により作られ、天然のアミロースとは異なり、分子量分布が狭く、分岐を持たないなどの構造上の特徴を有する。最近、工業レベルでの生産技術が確立され、さまざまな高機能素材としての利用が期待されている。プルランは、澱粉から *Aureobasidium pullulans* の働きにより生産される微生物産生多糖であり、マルトトリオースが $\alpha$ -1,6-グルコシド結合でつながった構造を持つ。すでに、BSE など感染症リスクのある動物由来素材に代替する、新しいカプセルやフィルム素材として実用化されているが、フィルムの強度不足などの問題が指摘されている。キトサンは、主に甲殻類から得られるキチンを脱アセチル化した多糖で、抗菌性素材などとして注目されている。本研究では、これら3種類の多糖の基礎物性、とくに水に対する溶解性、水溶液からのキャストフィルム形成能、水和水の状態など、水との相互作用をまず明らかにした。次に、基礎物性研究から得られた知見をもとに、キャストフィルムの機能性材料としての有用性を検証するため、力学特性とガス透過性について調べた。さらに、抗菌性を付加した高機能性フィルムの開発とその抗菌性発現のメカニズムの解析に

関する研究を行った。

## 第2章 多糖と水の相互作用

多糖の水への溶解度とキャストフィルム形成能について調べた。プルランは分子量によらず水によく溶解したが、重量平均分子量 ( $M_w$ ) 800,000 以上で良好なフィルムを形成した。同様に高分子量のキトサン ( $M_w = 1,400,000$ ) ではフィルムが形成された。一方、酵素合成アミロース (以下アミロース) の水溶液中の安定性はその分子量と濃度によって大きく異なった。 $M_w = 10,000 \sim 70,000$  (DP (重合度) = 60~400) では沈殿しやすく、 $M_w = 100,000 \sim 200,000$  (DP = 600~1200) ではゲルになりやすいが、 $M_w = 600,000$  から 2,400,000 (DP = 4,000~15,000) の範囲では低濃度では水溶液となった。これは他の多糖には見られない酵素合成アミロースに固有の特徴である。そこで、水に溶解してキャスト法によりフィルムを形成する  $M_w = 820,000$  のアミロースの水和水量を示差走査熱測定(DSC)により測定し、沈殿を形成する  $M_w = 55,000$  のアミロースの値と比較した結果、沈殿しやすいアミロース ( $M_w = 55,000$ ) では、水和水量が少なかった(グルコース 1 残基当たり 2.77mol) のに対し、フィルムを形成する高分子量のアミロースでは多かった(同 2.98mol)。この水和水量の差はアミロースの高次構造を反映したものと考えられる。

## 第3章 多糖キャストフィルムの力学特性とガス透過性

高分子量の多糖水溶液からキャスト法によりフィルムを作製し、フィルムの力学特性を調べた。高温(40°Cと 60°C)で作製したプルランフィルムは硬くてもろい材料に特徴的な応力-歪み曲線を示した。しかし、低温(4, 13, 25°C)で作製したフィルムは、柔軟性が向上した。プルランでは、水が可塑剤として働いていると考えられるが、フィルムの柔軟性は、保存時の相対湿度には関係なく、フィルム形成時の温度が力学特性に影響した。 $M_w = 1,400,000$  のキトサンフィルムも硬くてもろい力学特性を示した。一方、 $M_w = 1,690,000$  のアミロースから作製したフィルムは透明で、引張強度 38.0MPa, 弾性率 0.92GPa, 破断歪み 28.4%を示し、柔軟かつ粘り強いフィルムであることが分かった。さらにアセチル化アミロースフィルムについて調べたところ、アセチル化によって粘り強さが付加されることも分かった。アミロースフィルムの強度特性は、多糖材料の中でも優れており、市販のプラスチック材料と同等の特性を示した。

多糖フィルムのガスバリア性を調べた結果、アミロースとプルランフィルムは測定したすべてのガス(酸素、窒素、炭酸ガス、エチレンガス)に対して極めて高いバリア性を示した。それに対し、キトサンではアミロースやプルランと比較するとバリア性はやや低かった。低置換度のアセチル基を導入したアミロースフィルムも十分に高いバリア性を示した。

アミロースフィルムは柔軟な力学特性を持つが、キトサンを添加すると、特に破断歪みに関する力学特性が向上した。ガスバリア性はキトサンの添加により低下したが、実用上は十分なバリア性を保持していた。

## 第4章 キトサン混合アミロースフィルムの抗菌性

アミロースフィルムに抗菌性を付与することを目的として、少量(多糖重量全体の10%以下)のキトサンを添加した混合フィルムを作成し、その特性を調べた。大腸菌に対する抗菌性を調べた結果、アミロースとキトサンのみから作成したフィルムはそれぞれ抗菌性を示さなかったが、キトサン混合アミロースフィルムは強い抗菌性を示した。また、キトサン濃度 2.5%という低濃度で高い効果が得られ、それ以上では抗菌性に対するキトサン濃度依存性は認められなかった。この抗菌性のメカニズムを解明するため、細菌が接触するフィルム表面において、抗菌性に関与していると考えられているキトサン分子のアミノ基の荷電状態と分布を調べた。水溶液中(pH=7.0)でのフィルム表面のゼータ電位を測定した結果、キトサンのみフィルム表面ではほとんど電荷が認められなかった(0.9mV)のに対して、5%混合フィルム表面は大きく正に帯電(21.6mV)していた。X線光電子分光測定によるフィルムの表面分析を行った結果、フィルムのより浅い部分で、キトサンのみでは窒素原子がほとんど存在していないのに対し、混合フィルムでは、相対的に多くの窒素原子の存在が認められた。窒素原子の存在比はキチンの添加濃度に比例せず、2.5%という少量の添加により著しく増加した。これらの結果は、混合フィルム中のキトサンのアミノ基がフィルムの最も表面近くに存在して、正に帯電していることを示す。その結果、高い抗菌性が発現したものと考えられる。

## 第5章 総括

本研究において、再生可能な有機資源から生産される3種類の多糖、酵素合成アミロース、プルラン、キトサンをとりあげて基礎物性を明らかにしたが、特にフィルムへの応用において、既存の合成高分子に匹敵する、あるいはそれ以上の優れた素材を開発するための基礎的知見が得られた。中性多糖フィルムは、高いガスバリア性を有しており、特にアミロースフィルムの優位性は、その柔軟な力学特性にある。さらに天然の抗菌性成分であるキトサンを添加したアミロースフィルムは、高い抗菌性を持つフィルムとして応用できることを示すとともに、この抗菌性発現のメカニズムについても明らかにした。本研究により、酵素合成アミロース、プルラン、キトサンを食品、医薬、化粧品、化学などの幅広い産業分野で利用するための基礎的知見が得られたと考えられる。

## 審査結果の要旨

多糖は、自然界に豊富に存在しており、食品、繊維、紙などの原材料として、長年に渡り広く利用されてきた。近年、多糖は脱石油や次世代の高齢化社会に貢献する新しい環境・生体適合性材料としての可能性が示唆されているが、いまだ広く利用されるには至っていない。本研究では、特に注目されている3種類の多糖、すなわち酵素合成アミロース、プルラン、キトサンをとり挙げ、そのフィルムの物性と機能を調べている。これらは自然界に豊富に存在するショ糖、澱粉、キチンから得ることができ、特に酵素合成アミロースは、最近工業レベルでの生産技術が確立され、さまざまな高機能素材としての利用が期待されている多糖である。本研究では、まず、これら3種類の多糖の基礎物性、とくに水に対す

る溶解性、水溶液からのキャストフィルム形成能、水和水の状態など、水との相互作用を明らかにした。次に、基礎物性研究から得られた知見をもとに、キャストフィルムの機能性材料としての有用性を検証するため、力学特性とガス透過性について調べた。さらに、抗菌性を付加した高機能性フィルムの開発とその抗菌性発現のメカニズムの解析に関する研究を行った。

第一章では、多糖と水の相互作用について調べている。多糖の水への溶解度とキャストフィルム形成能について調べた結果、プルランは分子量によらず水によく溶解し、重量平均分子量 ( $M_w$ ) 800,000 以上で良好なフィルムを形成した。同様に高分子量のキトサン ( $M_w = 1,400,000$ ) ではフィルムが形成された。一方、酵素合成アミロース (以下アミロース) は他の多糖には見られない固有の特徴を示し、水溶液中の安定性はその分子量と濃度によって大きく異なった。 $M_w = 10,000 \sim 70,000$  では沈殿しやすく、 $M_w = 100,000 \sim 200,000$  ではゲルになりやすいが、 $M_w = 600,000 \sim 2,400,000$  の範囲では低濃度では水溶液となった。分子量の異なる 2 種類のアミロースの水和水量を示差走査熱測定により測定した結果、沈殿しやすいアミロース ( $M_w = 55,000$ ) では、水和水量が少なかった (グルコース 1 残基当たり 2.77mol) のに対し、水に溶解してフィルムを形成する高分子量  $M_w = 820,000$  のアミロースでは多い (グルコース 1 残基当たり 2.98mol) ことを明らかにし、水溶液中での安定性と高次構造の相関について考察した。

第二章では多糖キャストフィルムの力学特性とガス透過性を調べている。高分子量の多糖水溶液からキャスト法によりフィルムを作製し、フィルムの力学特性を調べた結果、プルランフィルムと  $M_w = 1,400,000$  のキトサンフィルムは硬くてもろい力学特性を示した。一方、 $M_w = 1,690,000$  のアミロースから作製したフィルムは透明で、引張強度 38.0MPa、弾性率 0.92GPa、破断歪み 28.4% を示し、柔軟かつ粘り強いフィルムであることが分かった。この強度特性は、多糖材料の中でも優れており、市販のプラスチック材料と同等の特性であることが分かった。多糖フィルムのガスバリア性を調べた結果、すべての多糖フィルムは、測定したすべてのガス (酸素、窒素、炭酸ガス、エチレンガス) に対して極めて高いバリア性を示した。アミロースフィルムは柔軟な力学特性を持つが、キトサンを添加すると、特に破断歪みに関する力学特性が向上した。

第三章ではキトサン混合アミロースフィルムの抗菌性とメカニズムについて調べている。少量 (多糖重量全体の 10% 以下) のキトサンを添加した混合アミロースフィルムを作成し、大腸菌に対する抗菌性を調べた結果、アミロースとキトサンのみから作成したフィルムはそれぞれ抗菌性を示さなかったが、キトサン混合アミロースフィルムは、キトサン濃度 2.5% という低濃度で強い抗菌性を示した。そこで、抗菌性に関与していると考えられているキトサン分子のアミノ基の、フィルム表面における荷電状態と分布を調べている。フィルム表面のゼータ電位を測定した結果、キトサンのみではほとんど電荷が認められなかったのに対し、5% 混合フィルム表面は大きく正に帯電していた。X 線光電子分光測定によるフィルムの表面分析の結果、フィルムのより浅い部分で、キトサンのみでは窒素原子がほとんど存在していないのに対し、混合フィルムでは、相対的に多くの窒素原子の存在が認められた。これらの結果から、混合フィルム中のキトサンのアミノ基がフィルムの最も表面近くに存在して、正に帯電していることから高い抗菌性が発現したものと考えられた。

本研究の成果は、再生可能な有機資源から生産される 3 種類の多糖、酵素合成アミロー

ス、プルラン、キトサンをとりあげて水に対する基礎物性を明らかにし、その結果をもとに、既存の合成高分子に匹敵する、あるいはそれ以上の優れたフィルムを開発するための基礎的知見を得たことである。天然の抗菌性成分であるキトサンを添加したアミロースフィルムは、高い抗菌性を持つフィルムとして応用できることを示すとともに、この抗菌性発現のメカニズムについても明らかにした。本研究により、酵素合成アミロース、プルラン、キトサンを食品、医薬、化粧品、化学などの幅広い産業分野で利用するための基礎的知見が得られたと考えられる。よって、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。