

大豆由来リポキシゲナーゼによるキチン・キトサンの漂白

Bleaching of Chitin and Chitosan by Soybean Lipoxygenase

吉田晋一*・寺田直文*

Shinichi Yoshida and Naofumi Terada

*電子・有機素材研究所 有機材料科

キチン・キトサン製造工場で行われる漂白工程のために、安全性を考慮して、大豆由来のリポキシゲナーゼを用いた漂白方法を検討した。本法によるキチン・キトサンの漂白の変化と化学構造の変化を調べ、さらに過酸化水素あるいは紫外線 (UV) 照射による漂白の場合と比較した。キチン・キトサンはどちらも、本酵素の存在下で良好に漂白され、さらに漂白されたキチン・キトサンの赤外線分光 (IR) 分析と漂白後のキトサンのゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 分析から大きな化学変化が生じていることは示唆されなかった。これらの結果から、本法は、残存していると考えられる色素 (アスタキサンチン) を選択的に分解し、キチン・キトサンの化学的な変質への寄与は少ない方法であると考えられた。

1. はじめに

鳥取県で水揚げされ、加工された後に排出されるベニズワイガニの殻のうち、脚の部分の大半がキチン・キトサンの製造に使われる。キチンは、*N*-アセチルグルコサミンが β -1,4-結合した糖鎖高分子である。キトサンは、キチンの*N*-アセチル基を除去することにより得られる。キチン・キトサンはどちらも種々の生理作用を持つことから、多分野から興味を持たれている。

キチン・キトサンは、工業的にはカニ殻を原料にして製造されるが、一般的な手順は、①希塩酸水溶液による脱カルシウム処理、②希水酸化ナトリウム水溶液による脱タンパク処理、③濃水酸化ナトリウム水溶液による脱アセチル化処理からなる。製品によっては、キチン・キトサン製品の“色”に対する要望もあり、引き続き漂白工程が入れられる場合もある。

色素の除去には、過酸化水素、次亜塩素酸ナトリウム、オゾンおよび有機溶剤等が用いられる^{1)~6)}。一般に、有機溶剤は過酸化水素や次亜塩素酸ナトリウム、オゾンと比較して、工業的な規模での漂白には効率的でないと考えられる。新しい方法としては、

紫外線照射法が報告された⁷⁾が、これらの方法では、漂白処理中にキチン・キトサンの分子量の低下を引き起こす^{7)~10)}。

製紙用パルプの漂白では、セルロースの分子主鎖の β -1,4-結合の開裂だけでなく、分子中のグルコース単位の化学的な分解が生じることが報告されており^{11), 12)}、このことは、キチン・キトサンの漂白時にもその分子鎖中の*N*-アセチルグルコサミンやD-グルコサミン残基も同様な分解反応を受けていることを示唆している。

キチン・キトサンはサプリメントや食品添加物等として流通するため、漂白された製品が人体の健康に対して何らかの影響を与える可能性は、留意すべき点である。

キチン・キトサンの主な残留色素はカロテノイドの一種であるアスタキサンチンであるが、同じカロテノイドである β -カロテンとルテインは、リノール酸と酸素の存在下でリポキシゲナーゼによって脱色されることが報告されている^{13), 14)}。酵素を用いた方法は、キチン・キトサン分子に化学的な変性を与えない色素特異的漂白として期待できる。

本稿では、大豆リポキシゲナーゼによるキチン・キトサンの漂白について検討を加え、過酸化水素あるいは紫外線 (UV) 照射処理と比較した結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 原材料

未漂白キチン及び未漂白キトサンは、(有)宝水産(鳥取県境港市、現、(株)オーク)から提供して頂いた。これらの未漂白キチン・キトサン試料は約5 mm角の大きさにカットし、以後の実験に用いた。

2.2 大豆リポキシゲナーゼによるアスタキサンチンの酸化

アスタキサンチン (2 mg) を 2 mL のクロロホルムに溶解し、次いで Tween 80 (80 μ L) を添加した。混合したのち、エバポレーターによりクロロホルムを除去し、残渣を 0.25% の EDTA \cdot 2Na 水溶液 (w/v) に再溶解した (溶液 A)。別に、リノール酸 (32.8 μ L)、Tween 80 (65.6 μ L) と 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 68 mL に蒸留水を加え、全量を 100 mL としたものを調製した (溶液 B)。アスタキサンチンの酸化反応は、溶液 A (0.2 mL) と溶液 B (2.795 mL) を UV セルに入れた後、酸素ガスを 30 秒間吹き込み、大豆リポキシゲナーゼ (Sigma, Type V) 0.018 mg 分を添加することで開始した。この時、セル内の溶液量は、最終濃度 3 mL となるように調整した。反応時の吸収スペクトルの変化は、紫外可視分光光度計 (日立 U-3300) を用いて、25 $^{\circ}$ C で経時的に追跡した。

2.3 未漂白キチン・キトサンのリポキシゲナーゼ処理

未漂白キチン・キトサン (50 mg) を試験管に入れ、2.2 で述べた溶液 B (2.95 mL) を加えた。酸素ガスを 1 分間吹き込んだのち、大豆リポキシゲナーゼを 0.18 mg 分添加し反応を開始し、25 $^{\circ}$ C で撹拌した。24 時間後、リノール酸 (0.5 μ L) とリポキシゲナーゼ (0.18 mg) を追加し、さらに酸素ガスを 1 分

間吹き込み、さらに 24 時間撹拌を継続した。反応終了後、反応液をろ別し、徹底的に蒸留水で洗浄した。漂白したキチン・キトサンは、暗所下、室温で風乾した。

2.4 未漂白キチン・キトサンの過酸化水素処理

未漂白キチン・キトサン (50 mg) を試験管に入れ、30%過酸化水素水溶液 (5 mL) を加え、未漂白キチンの場合は室温で 24 時間、未漂白キトサンの場合は室温で 40 分間撹拌した (未漂白キトサンを 30%過酸化水素水溶液で 24 時間処理した場合、完全に溶解し固形分が残存しないため)。反応終了後、ろ別しさらに徹底的に蒸留水で洗浄を行い、暗所下、室温で風乾した。

2.5 未漂白キチン・キトサンの紫外線照射処理

未漂白キチン・キトサン (50 mg) を時計皿に入れ、0.1 mL の蒸留水で湿らした。クリスタル製のシートで覆いをしたのち、UV ランプ (東芝 G15、253.7 nm、15 W) で、高さ 60 cm のところから一定時間照射した。照射終了後、漂白したキチン・キトサンを徹底的に蒸留水で洗浄し、暗所下、室温で風乾した。

2.6 色の変化の測定

色の変化は、分光測色計 (ミノルタ CM2600d) を用いて測定した。結果は、 L^* (明度)、 a^* (赤味 (+ 値の場合) ~ 緑味 (- 値の場合))、 b^* (黄色味 (+ 値の場合) ~ 青味 (- 値の場合)) で報告した。

2.7 分子量分布

分子量分布は、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を用いて以下の条件により測定した。

[カラム, TOSOH TSKgel GMPWXL (ϕ 7.8 mm \times 30 cm) 2 本連結; 測定温度, 30 $^{\circ}$ C; 溶出液, 0.5 M 酢酸 + 0.5 M 酢酸ナトリウム; 流速, 1.0 mL/分]

3. 結果と考察

3.1 漂白処理後の色の変化について

リポキシゲナーゼは、*cis,cis*-1,4-ペンタジエン系を

含む長鎖不飽和脂肪酸とそのエステル類の酸化を触媒する¹⁵⁾。カロテノイドは、リポキシゲナーゼによって生じるヒドロパーオキシ脂肪酸ラジカル作用により無色の化合物へと酸化される¹⁴⁾。大豆は、特にリポキシゲナーゼの良い原料として知られ、その粉体は小麦の漂白を助けるために広く用いられている^{16), 17)}。コストの点から、大豆のリポキシゲナーゼは工業スケールでのキチン・キトサンの漂白に対する触媒として可能性を秘めている。

まず、紫外可視分光光度計を用いて、大豆リポキシゲナーゼのアスタキサンチンに対する反応性を調べた。アスタキサンチンの最大吸収は 482 nm に現れるが、リノール酸と酸素の存在下でリポキシゲナーゼの作用によりこの吸収は経時的に減少し、本条件下では 40 分以内で完全に消失した (図 1 b)。酵素を含まない対照実験では、この吸収の減少は観察されなかった (図 1 a)。これらの結果は、大豆リポキシゲナーゼが、未漂白キチン・キトサンに残存している色素であるアスタキサンチンを漂白できることを示唆している。

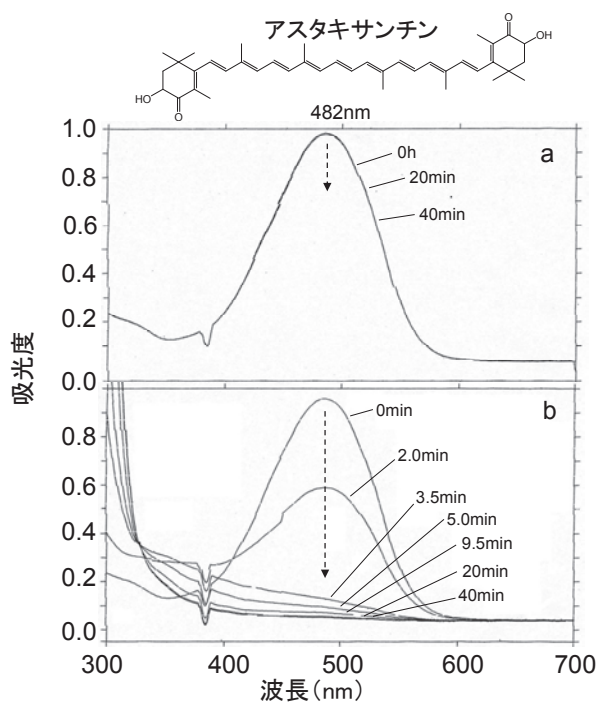


図 1 大豆リポキシゲナーゼによるアスタキサンチンの酸化
a 対照実験、b リポキシゲナーゼあり

続いて、リポキシゲナーゼによる漂白物の色の変

化について検討を加えた。すでに報告のある過酸化水素もしくは UV 照射処理をした漂白物との比較も行った。その結果、未漂白キチンとキトサンどちらも、リノール酸と酸素の存在下でのリポキシゲナーゼ処理により、 L^* 値が増加し、 a^* と b^* 値については減少した (表 1)。酵素処理後のこれらの値は、市販で販売されているキチン・キトサンと同程度のものである。また、リポキシゲナーゼ処理後のキトサンの L^* 値については、UV 照射⁷⁾により漂白されたものよりも高かった。酵素を添加しない対照実験でも L^* は増加し、 a^* と b^* については減少する結果となったが、その変化の程度は、酵素が存在する系よりも小さかった。この結果は、リノール酸と酸素だけでも 48 時間以内にわずかな漂白反応が起きるが、リポキシゲナーゼの存在で漂白度が高められることを示している。また、過去の報告通り、UV 照射はキチン・キトサンの漂白には効果的であった⁷⁾が、本条件下では b^* 値が依然として高く、まだ黄色系化合物が残存していることを示した。過酸化水素処理も L^* 値を増加させ、 a^* と b^* を減少させる結果となり、市販品とほぼ同程度まで漂白されたが、リポキシゲナーゼ処理に比べて、 L^* 値が依然として低かった。

表 1 大豆リポキシゲナーゼ、紫外線照射、過酸化水素処理により漂白されたキチン・キトサンの L^* a^* b^* 値

処理方法	L^* a^* b^* 値					
	キチン			キトサン		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
1. リポキシゲナーゼ						
酵素あり						
0時間	58.2	24.0	28.9	69.2	8.9	20.2
48時間後	91.9	-0.3	9.9	84.3	-0.7	7.2
酵素なし						
0時間	59.9	26.4	28.9	71.1	10.9	30.2
48時間後	85.5	4.7	21.5	81.5	-0.3	14.9
2. UV 照射						
0時間	64.0	25.5	31.1	68.2	15.7	29.4
32時間(乾燥)	87.0	3.8	16.8	75.2	7.4	24.9
32時間(湿潤)	89.8	-0.2	14.1	83.2	-0.4	13.5
3. 30% H_2O_2 ^a	85.5 ^a	-0.2 ^a	6.9 ^a	85.8 ^b	-0.9 ^b	8.0
4. コントロール ^b	87.1	-2.1	9.2	91.5	-0.7	7.2

^a キチンに対しては24時間の処理後、キトサンについては40分の処理後に測定。

^b 市販で入手できる漂白キチン・キトサン。

3.2 漂白処理後の化学構造変化についての考察

漂白キチン・キトサンは、サプリメントや食品添加物として主に使われている。漂白処理過程に起きると予想されるキチン・キトサンの化学変化は、人

体の健康に対して何らかの影響を与える可能性を有していると考えられる。そのため、このような化学変化について知見を得ることは重要である。キチンの IR 分析では、漂白処理前後に変化は見られなかった (図 2 上)。このことは、リポキシゲナーゼ処理ではマクロなレベルでキチンの化学構造に変化が起きていないことを示している。

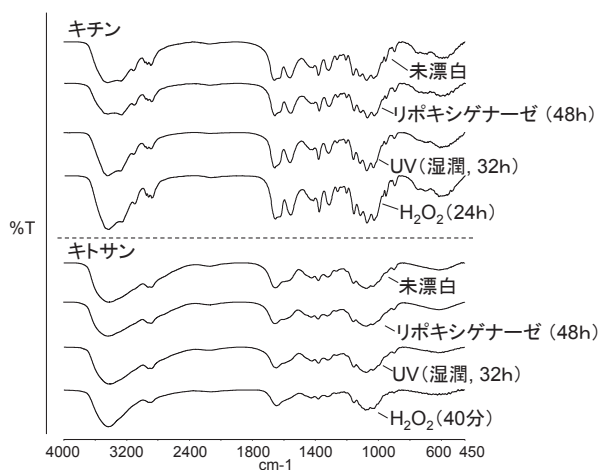


図 2 種々の方法により未漂白および漂白されたキチン・キトサンの IR スペクトル

同様に、キトサンの場合でも、リポキシゲナーゼ処理による IR スペクトルの変化は観察されなかった (図 2 下)。また、漂白処理によってキチン・キトサンの分子量の低下が予想されるが、一般にキチンは溶解性が悪いため分子量の測定は難しいが、キトサンはキチンと異なり弱酸溶液に溶解するため、GPC による分子量評価が可能である。そこで、キトサンをリポキシゲナーゼで 48 時間漂白処理した重量平均分子量を測定したところ、未漂白では 1.8×10^6 、漂白後は 1.9×10^6 であった。これらの結果は、分子量低下はなく、リポキシゲナーゼ処理によるキトサンのマクロな化学的変化はないものと考えられた。過酸化水素と UV 照射による処理では、キトサンの分子量が低下することが報告されている。本研究でも、23 時間の UV 照射で、重量平均分子量の若干の低下が確認された (未漂白 : 1.8×10^6 、漂白 : 1.4×10^6)。

リポキシゲナーゼの触媒機構¹⁴⁾を考えると、キチン・キトサン分子が何らかの化学変化を受けてい

る可能性は依然として残っており、この点を解明するためにも、漂白処理後の化学変化についてモデル化合物などを用いて詳細な検討を進める必要があると考えられる。

4. おわりに

大豆リポキシゲナーゼによりキチン・キトサンの漂白が可能であることが分かった。また、本法はキチン・キトサン分子への影響が少ない方法であることが示唆された。

文献

- 1) Brine, C.J., and Austin, P.R.; Chitin variability with species and method of preparation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B, p. 283-286 (1981).
- 2) Moorjani, M.N., et al.; Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste. *J. Food Sci. Technol.*, 12 (4), p. 187-189 (1975).
- 3) No, H.K., and Lee, M.Y.; Isolation of chitin from crab shell waste. *J. Korean. Soc. Food Nutr.*, 24 (1), p. 105-113 (1995).
- 4) No, H.K., and Meyers, S.P.; Preparation and characterization of chitin and chitosan. *J. Aquat. Food Product Technol.*, 4 (2), p. 27-52 (1995).
- 5) No, H.K., et al.; Isolation and characterization of chitin from crawfish waste. *J. Agric. Food. Chem.*, 37 (3), p. 575-579 (1989).
- 6) Seo, S., et al.; Simultaneous depolymerization and decolorization of chitosan by ozone treatment. *J. Food Sci.*, 72 (9), p. C522-C526 (2007).
- 7) Youn, D.K., et al.; Decoloration of chitosan by UV irradiation. *Carbohydr. Polym.*, 73 (3), p. 384-389 (2008).
- 8) Kabal'nova, N.N., et al.; Oxidative destruction of chitosan under the effect of ozone and hydrogen peroxide. *J. Appl. Polym. Sci.*, 81 (4), p. 875-881 (2001).
- 9) Wang, S.-M., et al.; Study on the synergetic

- degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Carbohydr. Res.*, 340 (6), p. 1143-1147 (2005).
- 10) Tian, F., et al.; Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. *Carbohydr. Polym.*, 57 (1), p. 31-37 (2004).
 - 11) Zeronian, S.H., and Inglesby, M.K.; Bleaching of cellulose by hydrogen peroxide. *Cellulose*, 2 (4), p. 265-272 (1995).
 - 12) Theander, O.; Polysaccharide modifications occurring in bleaching, Carbonyl glycosides: formation and properties. *Tappi*, 48 (2), p. 105-110 (1965).
 - 13) Larsen, T.W., et al.; The in vitro destruction of rumen fluid carotenoids by plant lipoxygenases. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 30 (2), p. 197-207 (1993).
 - 14) Wu, Z., and Robinson, D.S.; Co-oxidation of β -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (12), p. 4899-4906 (1999).
 - 15) Brash, A. H.; Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.*, 274 (34), p. 23679-23682 (1999).
 - 16) Kieffer, R., und Grosch, W.; Verbesserung der Backeigenschaften von Weizenmehlen durch die Typ II-Lipoxygenase aus Sojabohnen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 170 (4), p.258-261 (1980).
 - 17) Junqueira, R. M., et al.; Effect of proofing time and wheat flour strength on bleaching, sensory characteristics, and volume of French breads with added soybean lipoxygenase. *Cereal Chem.*, 84 (5), p.443-449 (2007).

