

マイクロバブル超臨界二酸化炭素による *Absidia fusca*由来キトサンの脱臭

(家政教育教室) 谷 本 昌 太
(広島県立総合技術研究所食品工業技術センター) 坂 本 宏 司
(愛媛県産業技術研究所食品産業技術センター) 宮 岡 俊 輔
(九州女子大学) 三 宅 正 起
(九州大学農学研究院) 下 田 満 哉
(九州女子大学) 箆 島 豊

Deodorization of Chitosan from *Absidia fusca* by Extraction with Microbubbles of Supercritical Carbon Dioxide

Shota TANIMOTO, Koji SAKAMOTO, Shunsuke MIYAOKA, Masaki MIYAKE, Mitsuya SHIMODA and Yutaka OSAJIMA

(平成22年6月5日受理)

欧文抄録

Key words: Deodorization, Chitosan, Volatile compounds, Supercritical carbon dioxide, *Absidia fusca*

キーワード: 脱臭, キトサン, 揮発性成分, 超臨界二酸化炭素, *Absidia fusca*

Volatile compounds in chitosan from *Absidia fusca* that were collected by the SPME method were analyzed by gas chromatography–FID and gas chromatography–mass spectrometry methods. In addition, the volatiles were removed from chitosan by extraction with microbubbles of supercritical carbon dioxide. We identified 21 compounds: 2 hydrocarbons, 1 ketone, 12 aldehydes, and 6 alcohols. Hexanal was the main volatile compound and accounted for approximately 55% of total quantitative value of the identified volatiles. The extraction was performed at 40°C and 60°C under a pressure of 20 MPa for 60 min. After treatment at 40°C, the total quantitative value of the identified volatile compounds decreased to

about 20% of the pretreatment value. After treatment at 60°C, volatiles were either not detectable or present in trace amounts. Furthermore, the quantitative values of 2-butenal and hexanal after treatment at 60°C were approximately 1% of the corresponding pretreatment values.

1. はじめに

キチンは、地球上に大量に存在するバイオマス資源であり、その推定年間生産量はセルロースに匹敵する100億トンともいわれている。多くの機能性を有した天然素材として注目され、近年、医療用材料・抗菌剤・化粧品・農業分野などに利用されている¹⁻³⁾。現在、キトサンはカニ殻やエビ殻など加工食品廃棄物から製造されている。しかし、この方法は原料の安定供給、品質の安定性、濃厚廃液の処理など様々な課題を有している。これまでに我々は高品質なキトサンの安定生産を目的として Mucoraceae科の子状菌についてスクリーニングを行い、*Absidia fusca* NRIC1179株がキトサンの発酵生産に最適であり、その特徴的な構造について報告している⁴⁾。しかしながら、微生物由来のキトサンを食品等に利用する場合、臭いが障害となり、添加量が制限される可能性

がある。

超臨界二酸化炭素流体は、比較的低い圧力・温度で作製可能で、しかも人体に無害であることから、これまで香気成分や機能性成分の抽出など食品製造分野において応用・実用化されている⁵⁾。マイクロバブル超臨界二酸化炭素法^{6, 7)}は、二酸化炭素を微小な泡として水系の試料に導入し、水への溶解度を飛躍的に増大させることを可能とし、殺菌・酵素失活分野を中心に応用されている。我々はマイクロバブル超臨界二酸化炭素法が清酒の酵素失活および火落菌殺菌に有効であり、従来法と比べて低温での加熱処理で十分に清酒の品質保持が可能なることを報告している⁸⁻¹⁰⁾。一方、従来法の超臨界二酸化炭素の欠点として、水分の多い試料において抽出効率が低いことが挙げられる。対して、二酸化炭素の溶解度の増加により水系試料からの物質抽出力が向上するマイクロバブル超臨界二酸化炭素法を用いた水溶液から揮発性成分の抽出、ミカン果汁からリモノイドの抽出さらに魚醤油の脱臭が報告されている¹¹⁻¹³⁾。他方、Huは*Spirulina platensis*の活性成分の精製と脱臭に従来型の超臨界二酸化炭素が応用可能なことを報告している¹⁴⁾。そこで、本報では*A. fusca*由来キトサンの揮発性成分の同定・定量を行うとともに、マイクロバブル超臨界二酸化炭素法の*A. fusca*由来キトサンの揮発性成分の除去効果について検討した。

2. 実験方法

2-1. 菌株

東京農業大学より分譲を受けた*A. fusca* NRIC1179株を用いた。

2-2. キトサンの調製

前報⁴⁾と同様の方法でキトサンを調製した。すなわち、ジャーファメンターにより20Lスケール、28℃、通気量：0.5 VVM、攪拌翼の回転数：200 rpmの条件で48時間培養後、ろ過により集菌した。菌体の熱アルカリ処理により不溶物を得た。凍結乾燥したアルカリ不溶物を酢酸により可溶化し、不純物を除去後、再びアルカリ性として不溶化した。不溶化した酸可溶性成分を洗浄後、凍結乾燥し試料とした。

2-3. ミクロバブル超臨界二酸化炭素処理

キチン・キトサンを0.1% (w/v) になるように蒸留水および20%エタノール水溶液 (w/v) にけん濁したものを試料とした。マイクロバブル超臨界二酸化炭素処理は、(株)島津製作所製のバッチ式マイクロバブル超臨界処理装置 (図1) により行った。液化二酸化炭素をエバポレーターにより所定の温度まで上昇させた後、孔径10 μ mのマイクロフィルターを介して所定の温度に設定した抽出槽 (400mL) にプランジャーポンプで送液 (10g/分) し、徐々に20MPaまで加圧した。加圧後、二酸化炭素を送液 (10g/分) しながら20MPaで60分間保持した。その後、大気圧に減圧し、抽出槽から試料を取り出し、揮発性成分の分析に供した。

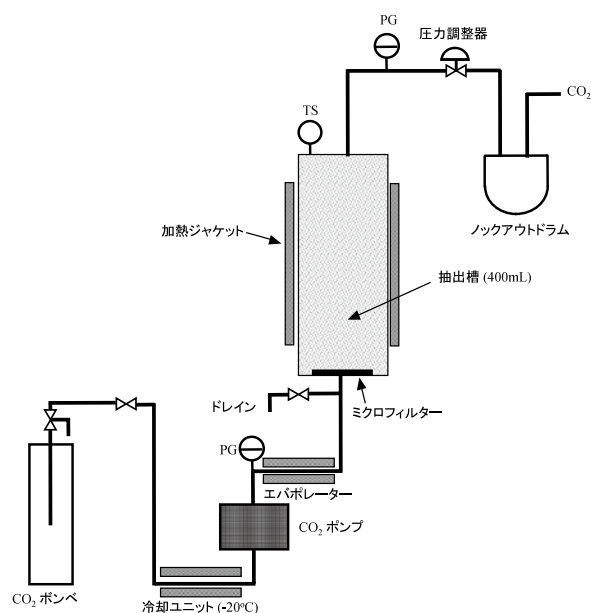


図1 バッチ式マイクロバブル超臨界二酸化炭素処理装置の模式図
PGおよびTSはそれぞれ圧力ゲージおよび温度センサーを示す。

2-4. 揮発性成分の分析

揮発性成分はSPME法¹⁵⁾により捕集を行い、ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard社製 HP-5890 II) を用いて分析を行った。すなわち、10mLのバイアル瓶に試料および内部標準を添加し、スターラーで攪拌しながら60℃で30分間揮発性成分の吸着を行った。内部標準として1%シクロヘキサノール水溶液を用いた。SPMEファイバーとして75 μ m Carboxen / Polydimethylsiloxane (Supelco® Analytical) を用いた。ガスクロマトグラフへの揮発性成分の導入は、液体窒素によりク

ライオフォーカスしながら、SPMEファイバーを注入口(260℃)にスプリットレスモードで7分間保持後、スプリットモードでさらに3分間保持して捕集成分を加熱脱着することで行った。

ガスクロマトグラフ分析は、以下の条件で行った。検出器, FID; カラム, J&W Scientific製化学結合型のシリカキャピラリーカラムDB-wax (i.d. 0.25mm × 60m, 膜厚0.25 μm); カラム温度, 40 ~ 230℃ (3℃昇温/分); 注入口温度, 230℃; キャリアーガス, He; カラム内線速度20cm/秒; スプリット比, 1:30とした。成分の定量値は、内部標準に対する各ピークの相対面積比に係数(100)を掛けた値とした。成分の同定は、kovats インデックス およびGC/MSにより行った。

GC/MS分析は、以下の条件で行った。装置, Magnum (Finnigan MAT, Varian GC3400); カラム温度等の分析条件, GC分析に準ずる; イオン化モード, EI/CI; 走査, full scanモード (26 ~ 250amu/秒); イオントラップ・マニホールド温度, 220℃; データ処理, Magnumライブラリーサーチシステムとした。

3. 結果と考察

3-1. *A. fusca*由来キトサンの臭気成分

*A. fusca*由来キトサンの揮発性成分のガスクロマトグラフおよび定量値を図2-aおよび表1に示す。キトサンより炭化水素類(2), ケトン類(1), アルデヒド類(12), アルコール類(6)の合計21成分が同定された。微生物キトサンの全揮発性成分の約55%はHexanalで主要成分であった。その他のアルデヒド類としてPentanal, 2-Butenal, Heptanal, Octanal, (E)-2-Heptenal, (E)-2-Octenalが比較的多く含まれていた。アルコール類では1-Octene-3-olおよび1-Octanolが高い値を示した。比較的多く含まれていた炭化水素はTetradecaneであった。同定されたケトン類は2-Methyl-2-hepten-6-oneのみで量的にも少なかった。アルデヒド化合物は、一般的に臭いの閾値が低く¹⁶⁾, アルカナルおよびアルケナル類のほとんどは, fatty-oilyな香りに寄与し, アルカジエナルは, fried-fattyな香りに寄与していると報告されている¹⁷⁾。また, Hexanalは, 特有の青草味をもち, 大豆不快臭の原因物質であり, リノール酸がリポキシゲナーゼ等の酵素により分解することにより生じ

る¹⁸⁾。したがって, キトサンの主要な臭気成分は, 直鎖のアルデヒド類であり, 脂肪酸の分解生成物であると推定された。

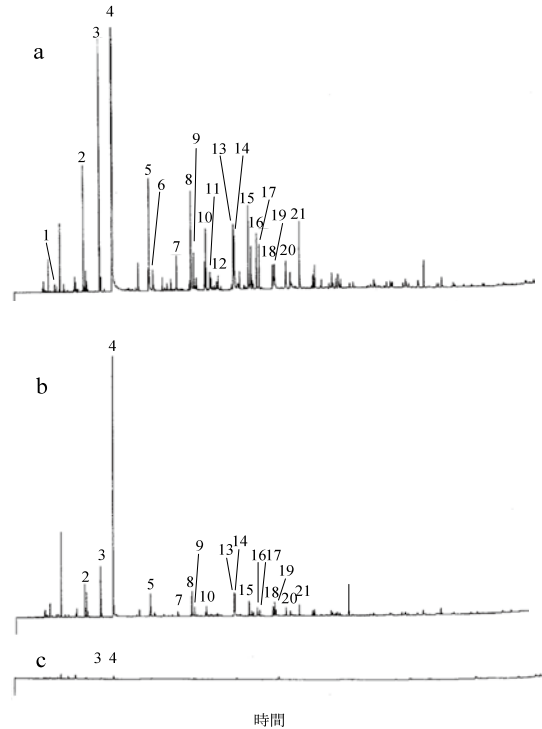


図2 超臨界二酸化炭素処理した*A. fusca*由来キトサンの揮発性成分のガスクロマトグラム
a: 処理前, b: 40℃, c: 60℃. ミクロバブル超臨界二酸化炭素処理は圧力20MPa, 二酸化炭素流量10g/分で行われた。

表1 *A. fusca*由来キトサンの揮発性成分

ピーク番号	化合物名	KI ^{*1}	定量値 ^{*2}
炭化水素類 (2)			
9	Tridecane	1300	13.6
13	Tetradecane	1400	26.9
ケトン類 (1)			
11	2-Methyl-2-hepten-6-one	1339	4.7
アルデヒド類 (12)			
1	Butanal	866	1.6
2	Pentanal	975	31.3
3	2-Butenal	1038	70.0
4	Hexanal	1081	568.0
5	Heptanal	1186	38.1
6	(E)-2-hexenal	1220	4.8
8	Octanal	1291	36.8
10	(E)-2-Heptenal	1329	23.7
14	Nonanal	1397	31.6
15	(E)-2-Octenal	1436	35.2
19	Benzaldehyde	1534	17.3
20	(E)-2-Nonenal	1543	10.8
アルコール類 (6)			
7	Pentanol	1251	13.8
12	1-Hexanol	1354	5.2
16	1-Octene-3-ol	1450	21.5
17	1-Heptanol	1456	17.5
18	2-Ethyl-1-hexanol	1490	14.3
21	1-Octanol	1559	26.5

*¹ Kovats インデックス。*² 各化合物のピークエリア/内部標準のピークエリア×100。*³ すべての化合物はマススペクトラムとKI値により同定した。

表2 ミクロバブル超臨界二酸化炭素処理した*A. fusca*由来キトサンの揮発性成分の残存率*

ピーク番号	化合物名	40℃	60℃	40℃ 20%エタノール
1	Butanal	—	—	—
2	Pentanal	27%	—	—
3	2-Butenal	20%	1%	—
4	Hexanal	20%	1%	1%
5	Heptanal	19%	—	10%
6	(E)-2-hexenal	—	—	—
7	Pentanol	17%	—	—
8	Octanal	25%	—	8%
9	Tridecene	24%	—	11%
10	(E)-2-Heptenal	16%	—	—
11	2-Methyl-2-hepten-6-one	—	—	—
12	1-Hexanol	—	—	—
13	Tetradecane	35%	—	15%
14	Nonanal	29%	—	15%
15	(E)-2-Octenal	17%	—	—
16	1-Octene-3-ol	12%	—	—
17	1-Heptanol	14%	—	—
18	2-Ethyl-1-hexanol	20%	—	35%
19	Benzaldehyde	20%	—	—
20	(E)-2-Nonenal	18%	—	—
21	1-Octanol	19%	—	—

*圧力：20MPa，二酸化炭素流量：10g/分，残存率：処理後の定量値/処理前の定量値。

3-2. キトサンの臭気成分の除去

ミクロバブル超臨界二酸化炭素処理した微生物キトサンのガスクロマトグラフおよび揮発性成分の分析結果を図2-b, cおよび表2に示す。20MPa, 40℃処理の場合、揮発性成分の定量値の合計値は処理前の約20%に減少し、ほとんどの化合物は処理前の30%以下になった。20MPa, 60℃の処理の場合、ほとんどの成分が痕跡または不検出となり、検出された2-ButenalおよびHexanalも処理前の約1%であった。これらの結果は、比較的極性の高い揮発性成分でも、処理温度を高めることによってほぼ完全に除去できることを示している。一方、20MPa, 40℃で20%エタノールを添加した場合、揮発性成分の定量値の合計値は処理前の約3%に減少し、揮発性成分を大幅に除去できることが明らかとなった。通常、超臨界二酸化炭素抽出に抽出率を向上させる目的でエタノールのような極性溶媒をエントレナーとして添加する⁵⁾。表2に示すようにミクロバブル超臨界二酸化炭素においても、脱臭効率の飛躍的な増大が認められた。今回用いた試料に含まれる揮発性成分は含酸素系化合物が主体であったが、炭化水素系化合物のように

疎水性の揮発性成分を多く含む試料の場合、含酸素系化合物以上に揮発性成分除去効果は高いものと推測される。

3-3. まとめ

*A. fusca*由来キトサンの揮発性成分の同定・定量を行うとともに、ミクロバブル超臨界二酸化炭素によるキトサンの揮発性成分の除去効果について検討した。キトサンより炭化水素類(2)、ケトン類(1)、アルデヒド類(12)、アルコール類(6)の合計21成分が同定された。キトサンの全揮発性成分の約55%はHexanalで主要成分であった。20MPa, 40℃処理の場合、揮発性成分の定量値の合計値は処理前の約20%に減少した。20MPa, 60℃の処理でほとんどの成分が痕跡または不検出となり、検出された2-ButenalおよびHexanalも処理前の約1%となった。

参考文献

- 1) キチン，キトサン研究会編，“キチン，キトサンハンドブック”，技報堂出版（1995）p302.
- 2) キチン，キトサン研究会編，“最後のバイオマス キチン，キトサン”，技報堂出版，（1988）p 1.
- 3) キチン，キトサン研究会編，“キチン，キトサンの応用”，技報堂出版（1990）p 1.
- 4) 宮岡俊輔，新谷智吉，相羽誠一，村木永之介，玉井洋一，木場洋次郎，キチン・キトサン研究，第10巻，p13（2004）.
- 5) 佐古毅編，“超臨界流体—環境浄化とリサイクル・高効率合成の展開”，アグネ承風社（2001）p207.
- 6) 下田満哉，箴島豊，日食工誌，第45巻，p334（1998）.
- 7) 下田満哉，三宅正起，箴島豊，製剤機械技術研究会誌，第9巻，p 9（2000）.
- 8) S. Tanimoto, H. Matsumoto, K. Fujii, R. Ohdoi, K. Sakamoto, S. Izuwa, Y. Yamane, M. Miyake, M. Shimoda, Y. Osajima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2094（2005）.
- 9) S. Tanimoto, H. Matsumoto, K. Fujii, R. Ohdoi, K. Sakamoto, Y. Yamane, M. Miyake, M. Shimoda, Y. Osajima, *Food Sci. Technol. Res.*, **13**, 210（2007）.
- 10) S. Tanimoto, H. Matsumoto, K. Fujii, R. Ohdoi, K.

- Sakamoto, Y. Yamane, M. Miyake, M. Shimoda, Y. Osajima, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 22 (2008).
- 11) M. Shimoda, H. Ishikawa, T. Kawano, Y. Osajima, *J. Food Sci.*, **59**, 231 (1994).
- 12) 綾野茂, 三宅正起, 伊福靖, 石川洋哉, 下田満哉, 箴島豊, 日食工誌 第43巻, p395 (1996).
- 13) M. Shimoda, Y. Yamamoto, J. Cocunubó-Castellanos, T. Yoshimura, M. Miyake, H. Ishikawa, Y. Osajima, *J. Food Sci.*, **65**, 1349 (2000).
- 14) Q. Hu, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2705 (1999).
- 15) 片岡洋行, 齊藤啓太, FFIジャーナル, 第213巻, p100 (2008).
- 16) 永田好男, 竹内教文, 日環セ所報, 第17号, p77 (1990).
- 17) Y. J. Cha, K. R. Cadwallader, *J. Food Sci.*, **60**, 19 (1995).
- 18) 山内文男, 大久保一良編, “大豆の科学”, 朝倉書店 (1992) p64.