

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05239

研究課題名(和文) イオン液体を活用したキチンからの新奇素材の創製

研究課題名(英文) Preparation of Novel Materials from Chitin using Ionic Liquid

研究代表者

山元 和哉 (YAMAMOTO, Kazuya)

鹿児島大学・理工学域工学系・准教授

研究者番号：40347084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：キチンは地球上に豊富に存在するバイオマス資源であるが、強固な結晶構造を有するため、溶媒への溶解性に乏しく材料としての利用範囲が限られている。我々はキチンを良好に溶解するイオン液体を見出しており、キチンの誘導化やファイバー化などを報告している。また、良好な分散性を有するスケールダウンキチンナノファイバー分散液が得られることも見出した。本研究では、このスケールダウンキチンナノファイバーに還元アミノ化を利用して単糖を修飾したところ、反応の進行に伴い再び集合し、ヒドロゲルを形成することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キチンの材料化を目的に、当初、キチンの低分子量化や、再生過程を考慮した自己組織化に伴う構造体形成の制御を目的として検討したが、適切な条件下での低分子量化を見出すことはできなかった。しかしながら、自己組織化キチンナノファイバーのバンドル構造を解繊することで得られたスケールダウンキチンナノファイバーを用いて還元アミノ化により単糖を修飾することで、多糖成分のみからなるヒドロゲルの形成が成し遂げられた。さらに、スケールダウンキチンナノファイバーは、支持体もしくは強化剤として天然多糖や合成高分子との複合化が可能であり、機能性や物性に優れた材料創製に展開している。

研究成果の概要(英文)：Chitin is a natural polysaccharide consisting of N-acetyl-D-glucosamine residues linked through glycosidic bonds. Although chitin is one of the most abundant polysaccharides on the earth, it has been difficult to provide material applications from chitin, due to lack of solubility and processability. We previously reported that self-assembled chitin nanofibers were fabricated by regeneration from a chitin ion gel with 1-allyl-3-methylimidazolium bromide using methanol. Recently, we also fabricated the scaled-down chitin nanofiber dispersion by partially deacetylation of the above chitin nanofibers and subsequent sonication with acetic acid aq. In this study, we found that hydrogelation from the scaled-down chitin nanofibers occurred by reductive amination of xylose with amino groups.

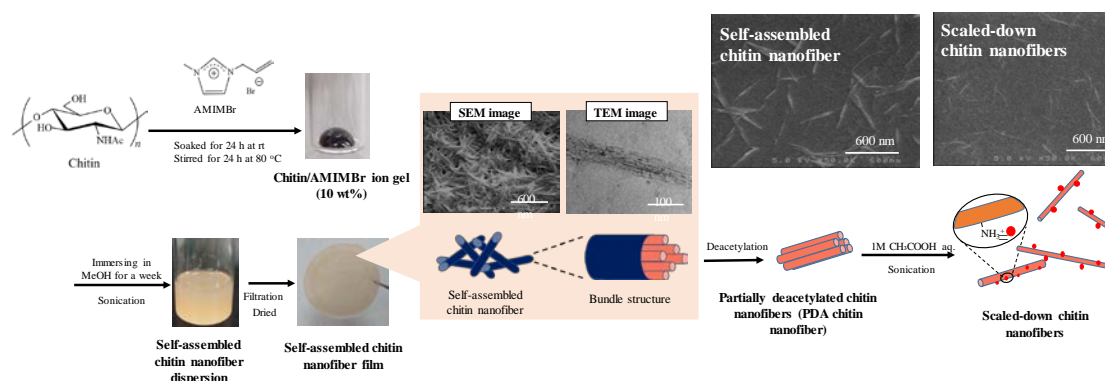
研究分野：機能性高分子

キーワード：キチン ヒドロゲル ナノファイバー

1. 研究開始当初の背景

天然多糖は地球上に豊富に存在するバイオマス資源であり、自然界や生体内において個々に特有の高度な機能を発現している。そのため、多糖の構造を活かしながら材料素材として利用できれば、多糖特有のナノ構造・階層構造や高度な機能を基盤とした新物性、新機能を有する材料の創出が期待できる。なかでもキチンは、カニや昆虫などの節足動物の甲殻を構成する構造多糖として機能しており、*N*-アセチル-*D*-グルコサミンが β (1 \rightarrow 4)-グリコシド結合で直鎖状につながっており、セルロースに次いで自然界に豊富に存在する天然多糖である。キチンの特徴として、安全性が高く、生分解性を有するなどが挙げられるが、特に、生体吸収性や創傷治癒促進効果を示すことから、生分解性プラスチックなど工業的用途以外に医療用材料への応用が期待されている。しかしながら、キチンは分子間・分子内で強い水素結合を有し、強固な結晶構造を構築するために有機溶媒への溶解が困難であり、そのほとんどが未利用である。

近年、セルロースなどの難溶性多糖に対する良溶媒としてもイオン液体が注目されており、その中でも、イミダゾリウム塩型のイオン液体がセルロースを良好に溶解することがいくつか見出されている。しかしながら、キチンを溶解するイオン液体は、ほとんど報告されておらず、我々は、イミダゾリウム塩型のイオン液体が多糖に対して相性が良いということに着目し、さらに、対アニオンに臭化物イオンを有するイミダゾリウム塩型のイオン液体がポリアミドやポリイミド合成の良好な溶媒となることが報告されていることを考慮して、臭化 1-アリル-3-メチルイミダゾリウム (AMIMBr) がキチンを良好に溶解・ゲル化することを見出した。この AMIMBr を溶媒に用いた穏和な条件下でのキチンのアセチル化や原子移動ラジカル重合の開始基を導入したキチンマクロ開始剤を調製し、これを用いたスチレンのラジカル重合による複合化を報告している。さらに、このイオンゲルをメタノールに浸漬させることでキチンが自己組織的に再生したキチンナノファイバー/メタノール分散液が得られ、この分散液をろ別、乾燥することでナノファイバーが集積したキチンナノファイバーフィルムが得られることを報告している (Scheme 1)。このキチンのナノファイバー化は材料化への有効な手段であり、様々な合成および天然高分子との複合化についても報告している。



Scheme 1. Preparation of self-assembled chitin nanofibers and scaled-down chitin nanofibers.

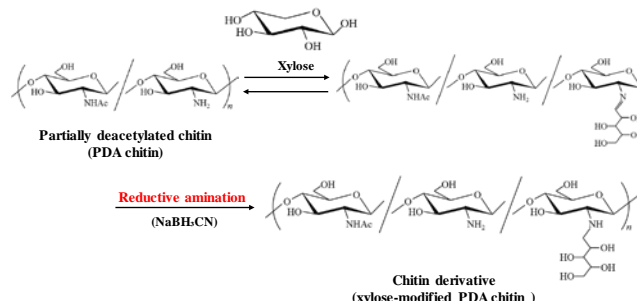
2. 研究の目的

イオン液体に可溶化させたキチンの低分子量化や、再生過程で構造制御されたキチンナノ素材の創製を検討し、これらを修飾剤や支持体とした新奇な材料創製を目的とした。低分子キチン (キチンオリゴマー) は、*N*-アセチル-*D*-グルコサミン (単糖) や二糖からのグリコシル化や、キチンの加水分解により調製されている。前述のグリコシル化は側鎖の水酸基の選択的な修飾や、その後の化学合成や酵素合成、またはそれらの組合せから調製されているが、修飾や脱保護などの多段的な反応が必要であり、10 量体以上のキチンオリゴマーの調製も困難である。また、後述の低分子量化は一般に大量の酸を触媒とするため、主鎖のグリコシド結合の分解とともに側鎖の *N*-脱アセチル化 (キトサン) も進行し、さらに反応系が不均一であるためキチン・キトサン鎖の端から分解が進みやすく、大部分は単糖まで分解され、効率的な分子量の制御は困難である。先述したように我々の研究グループは、イオン液体を用いたキチンの誘導化や材料化について世界に先駆けて報告している。特にキチンイオンゲルからメタノールを用いて得られる自己組織化キチンナノファイバーは、ボトムアップ的な手法による独自のナノファイバー構築法である。本研究では、まずイオン液体に可溶化させたキチンの均一反応系において、適切な触媒等の存在下でのグリコシド結合の切断により、簡便で高効率な分子量制御が期待できる低分子量化を提案した。さらに適度に低分子量化したキチンは、汎用溶媒への溶解性や誘導化の向上が予想されたため、修飾剤としての材料展開も広範囲に進展することを期待した。また、これまでの知見をもとに、再生過程を考慮することで多様なキチンナノ素材が調製できれば、これらを用いた機能性や物性に優れた材料創製が可能であると考えた。

3. 研究の方法

当初、キチンの低分子量化や、再生過程を考慮した自己組織化に伴う構造体形成の制御を目的として検討したが、適切な条件下での低分子量化を見出すことはできなかった。次に自己組織化キチンナノファイバーを主鎖成分とした部分脱アセチル化 (PDA) キチンのアミノ基に、還元アミノ化を利用して市販のキチンオリゴマーを修飾させた分岐状キチンの創製を検討したところ、反応時間が経過するにつれて反応溶液中にゲル状の凝集物が形成されることが確認された。さらに同時期に、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察の結果より、自己組織化キチンナノファイバーはバンドル状集合体であることが確認され (J. Kadokawa et al., *ChemistrySelect*, **2019**, 4,797.)、キチンナノファイバーフィルムを脱アセチル化した PDA キチンを酢酸溶液中で超音波処理することで静電反発により自己組織化キチンナノファイバーのバンドルがほぐれ、スケールダウンナノファイバーとなることを見出した

(Scheme 1)。そこで本研究では、静電反発によりバンドルをほぐした状態で還元アミノ化を利用してキシロース、グルコース、*N*-アセチル-*D*-グルコサミン、マルトースを修飾したところ、解繊したスケールダウンキチンナノファイバが再び集合し、ヒドロゲルを形成することを見出した (Scheme 2)。



Scheme 2. Preparation of chitin derivatives by reductive amination.

4. 研究成果

(1) 還元アミノ化法を用いたキシロース修飾によるヒドロゲル形成

まず既報 (J. Kadokawa et al., *Carbohydr. Polym.*, **2011**, 84, 1408.) に従って自己組織化キチンナノファイバーフィルムを調製した (Scheme 1)。得られたフィルムを 30 wt% NaOH 水溶液に 80°C で 5 時間攪拌させることで PDA キチンナノファイバーフィルムを得た (脱アセチル化度 23%)。次に、還元アミノ化法によるキシロース修飾を検討した。得られた PDA キチンナノファイバーフィルムを 1.0 mol/L 酢酸溶液中で超音波処理することで、解繊による分散液を調製し、さらに PDA キチンのアミノ基に対して 200 当量のキシロース水溶液を混合した。その後、還元剤である NaBH₃CN を PDA キチンのアミノ基に対し 200 当量添加し、室温で攪拌して還元アミノ化を行ったところ、反応時間の経過に伴い反応溶液中にヒドロゲルが形成された (Scheme 2、Table 1)。酢酸濃度を 0.1M とした場合、およびキシロースおよび還元剤濃度をアミノ基に対して 50 当量とした場合、ヒドロゲルは形成しなかった。酢酸濃度が 0.1 M の場合、SEM 観察の結果より、まだ解繊していないファイバーが観察され、静電反発による解繊が十分に生じなかったためと考えられる。また、還元剤やキシロースが PDA キチンのアミノ基に対して 50 当量の場合、¹H NMR 測定よりキチンに対するキシロースの導入率は 4% であり、十分な修飾ができていないためにヒドロゲルが形成しなかったと考えられる。

1.0 mol/L 酢酸溶液中で、PDA キチンのアミノ基に対して 200 当量のキシロースおよび還元剤存在下で得られたヒドロゲルを蒸留水で洗浄・精製し、ヒドロゲルの重さと凍結乾燥後のクリオゲルの重さから、含水率を算出した結果、20.1 であった。さらに、凍結乾燥後のキシロース修飾キチンを DCI/D₂O 中で加水分解して ¹H NMR 測定を行ったところ、キチン由来のシグナルに加えて、キシロースのメチレンプロトン由来のシグナルが 3.1~3.3 ppm に観測された。これらのシグナルの積分比からキチンに対するキシロースの導入率を算出した結果、15%であった (Figure 1. b)。

Table 1. Reductive amination of PDA chitin with xylose under various conditions

CH ₃ COOH aq. (M)	Sugar/-NH ₂ ^{a)}	NaBH ₃ CN/-NH ₂ ^{a)}	Time (day)	Hydrogel formation [Water content (%)]	DS ^{b)} (%)
0.1	50	50	7	-	15
1	50	50	7	-	4
1	200	200	3	+ [20.1]	15

a) PDA chitin ; Degree of deacetylation : 23%
b) Estimated by ¹H NMR spectra.

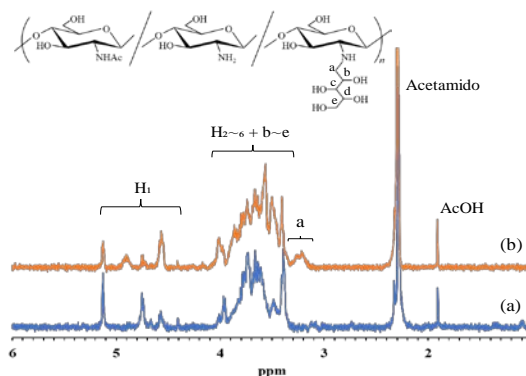


Figure 1. ¹H NMR spectra of (a) PDA chitin and (b) xylose-modified PDA chitin (DCI/D₂O).

得られたキシロース修飾キチンの結晶構造を確認するために高速 X 線回折 (XRD) 測定を行った (Figure 2)。PDA キチンと同様に、キチンの結晶構造に由来する $2\theta = 9^\circ$ および 19° のピークが確認されたことから、結晶性を維持していることが確認された。

次に、反応の経過に伴うナノファイバーの形態を確認するために SEM 観察を行った (Figure 3)。反応前 (0 時間) の PDA キチンは均一に分散している状態であったが、還元アミノ化反応の 6 時間後には凝集体が目視で確認でき、解繊したスケールダウンナノファイバーが再び集合した形態が SEM で観察され、72 時間後にはヒドロゲル状の形態が形成され、網目状に絡み合った形態が観察された。

また ^1H NMR 測定の結果より、反応時間の進行に伴い、キシロースの導入率が増加することが分かった。これよりゲル化の機構は静電反発により解繊したスケールダウンナノファイバーにキシロースが部分的に修飾することで静電反発が抑えられ、不規則的にナノファイバーが配列し、さらに、不規則的にスケールダウンナノファイバーが配列、集積することでヒドロゲルを形成すると考えられた。

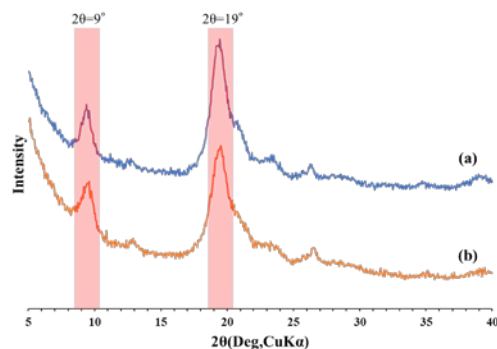


Figure 2. XRD patterns of (a) PDA chitin and (b) xylose-modified PDA chitin.

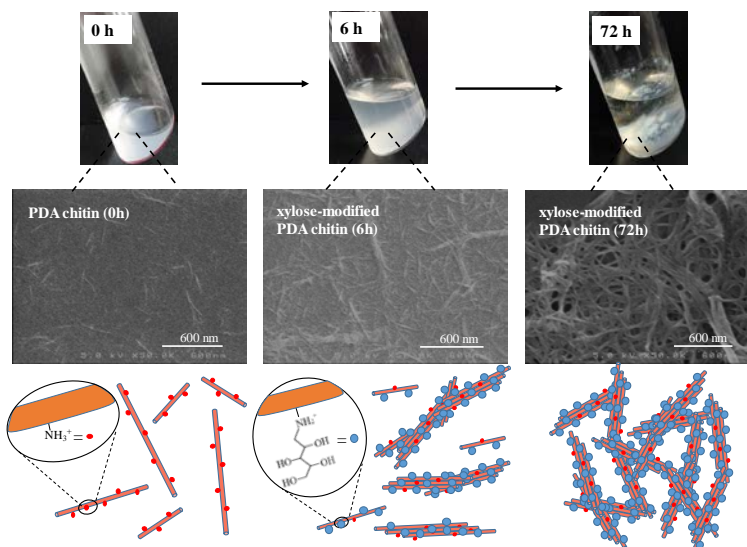


Figure 3. SEM images of PDA chitin and xylose-modified PDA chitin.

凍結乾燥後のキシロース修飾キチンの SEM 観察を行ったところ、ナノレベルで網目状に絡み合った形態が観察された。また、このサンプルに水を添加したところ、再膨潤し、含水率は 20.1 % だった。

(Figure 4)。再膨潤したサンプルの動的粘弾性測定を行った結果、貯蔵弾性率 (G') が損失弾性率 (G'') を上回っていたことから再ゲル化していることを確認した (Figure 4)。

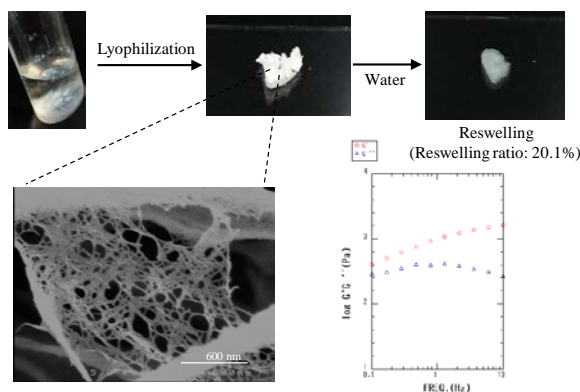


Figure 4. Reswelling behavior of xylose-modified PDA chitin.

(2) 還元アミノ化法を用いた糖修飾

キシロース以外にグルコース、*N*-アセチル-D-グルコサミン、マルトースの修飾を行い、同様にヒドロゲルを形成するのかキシロースのゲル化条件と同一の条件で検討したところ、グルコース、*N*-アセチル-D-グルコサミンはヒドロゲルを形成したが、マルトースはヒドロゲルを形成しなかった。そこで、グルコース、*N*-アセチル-D-グルコサミンについてキシロースと同様、 ^1H NMR 測定、XRD 測定、SEM 観察、動的粘弾性測定により詳細に検討を行った。

凍結乾燥により回収したグルコース修飾キチン、*N*-アセチル-D-グルコサミン修飾キチンを $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ 中で加水分解して ^1H NMR 測定を行ったところ、キチン由来のシグナルに加えて、グルコース、*N*-アセチル-D-グルコサミンのメチレンプロトン由来のシグナルが 3.1~3.3 ppm に観測された。これらのシグナルの積分比からキチンに対するグルコース、*N*-アセチル-D-グルコサミンの導入率を算出した結果、それぞれ 15 %、14 % であった (Figure 5)。さらに凍結乾燥後の糖修飾キチン誘導体に水を添加したところ、再膨潤・再ゲル化することを確認した。

(3) まとめ

静電反発によりバンドルをほぐした状態で還元アミノ化を利用して糖を修飾したところ、解繊したスケールダウンキチンナノファイバーが再び集合し、ヒドロゲルを形成した。

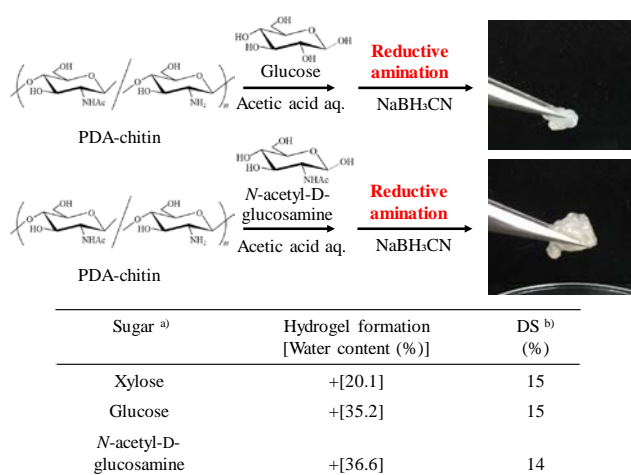
○PDA キチンのアミノ基のプロトン化を抑えるため、酢酸濃度を低くした場合、ファイバーの解繊状態が維持できない。

○¹H NMR 測定からキチンに対する導入率を算出した結果、キシロース修飾キチンは15%、グルコース修飾キチンは15%、*N*-アセチル-D-グルコサミンは14%だった。これより、キチンに対する還元糖の導入率が15%前後の場合、ヒドロゲルを形成すると考えられる。

○XRD 測定の結果より、キチンの結晶構造に由来する $2\theta = 9^\circ$ および 19° のピークが確認されたことから、結晶性を維持していることが確認された。

○SEM 観察の結果から、解繊したスケールダウンナノファイバーが再び集合していることが観察された。また、凍結乾燥後の生成物ではナノレベルで網目状に絡み合った形態が観察された。

○凍結乾燥後の生成物に水を添加したところ再膨潤し、動的粘弾性測定結果から、再ゲル化していることを確認した。



a) PDA-chitin : Sugar : NaBH₃CN = 1 : 200 : 200, Reaction temp. : r.t., Reaction time ; 3 days
b) Estimated by ¹H NMR spectra.

Figure 5. Reductive amination of several sugars on scaled-down chitin nanofibers gave hydrogels.

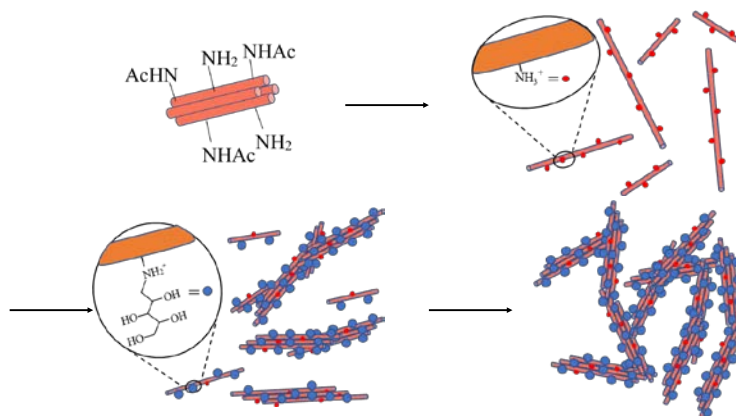


Figure 6. Plausible aggregation mechanism for hydrogelation.

以上のことより、アンモニウムカチオンどうしの静電反発により解繊したスケールダウンキチンナノファイバー上にキシロースが導入されることで静電反発が抑えられ、ナノファイバーの集積が起こり、さらに、集積が進むことでネットワークを構築し、ヒドロゲルが得られたと考えられる (Figure 6)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 渡辺隆太、山元和哉、門川淳一
2. 発表標題 スケールダウンキチンナノファイバー上への種々の糖残基の導入によるヒドロゲル形成
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺隆太、山元和哉、門川淳一
2. 発表標題 スケールダウンキチンナノファイバーへの還元アミノ化によるヒドロゲル創製
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会（2021）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺隆太、山元和哉、門川淳一
2. 発表標題 スケールダウンキチンナノファイバーへの還元アミノ化によるキチンゲルの構築
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山元和哉、渡辺隆太、門川淳一
2. 発表標題 スケールダウンキチンナノファイバーを用いた還元アミノ化によるヒドロゲルの創製
3. 学会等名 34回 日本キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山元和哉、渡辺 隆太、門川 淳一
2. 発表標題 キチンナノファイバーを用いた還元アミノ化によるヒドロゲルの創製
3. 学会等名 2020年繊維学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺隆太、山元和哉、門川淳一
2. 発表標題 自己組織化キチンナノファイバーへの還元アミノ化によるキチンゲルの構築
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山元 和哉、小濱 祐、渡辺 隆太、門川 淳一
2. 発表標題 還元アミノ化によるキチンナノファイバーのヒドロゲル化
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会(2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小濱 祐、山元 和哉、門川 淳一
2. 発表標題 分岐状キチンの創製
3. 学会等名 平成30年度 繊維学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小濱 祐、山元 和哉、門川 淳一
2. 発表標題 還元アミノ化による分岐状キチンの合成
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会および外国人研究者交流国際シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yu Obama, Kazuya Yamamoto and Jun-ichi Kadokawa
2. 発表標題 Synthesis and Characterization of Branched Chitin
3. 学会等名 Joint Symposium of JTBW2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yu Obama, Kazuya Yamamoto and Jun-ichi Kadokawa
2. 発表標題 Preparation and characterization of branched chitin
3. 学会等名 256th American Chemical Society National Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小濱 祐、山元 和哉、門川 淳一
2. 発表標題 ヘキサノイル基置換分岐状キチンからの非晶フィルムの創製
3. 学会等名 平成30年度 繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yu Obama, Kazuya Yamamoto and Jun-ichi Kadokawa
2. 発表標題 Synthesis and Characterization of Branched Chitin
3. 学会等名 Joint Seminar at Tainan: the Department of Chemical Engineering, National Cheng Kung University and the Seibu-branch, the Cellulose Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	門川 淳一 (KADOKAWA Jun-ichi) (30241722)	鹿児島大学・理工学域工学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------