◆◆◆ 総説 ◆◆◆

食品素材の集合化を利用した生体適合性ナノ／マイクロ分散系の作製

市川創作^{1,†}, 黒岩 崇², Ai Mey Chuah^{1,3}, 中嶋光敏¹

¹ 筑波大学大学院生命環境科学研究科

² 東京都市大学工学部エネルギー化学科

³ 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

Biocompatible Nano/Micro-Dispersion Systems Prepared via the Self Assembly of Food Materials

Sosaku ICHIKAWA^{1,†}, Takashi KUROIWA², Ai Mey CHUAH^{1,3} and Mitsutoshi NAKAJIMA¹

¹ Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

² Faculty of Engineering, Tokyo City University, Tamazutsumi 1-28-1, Setagaya, Tokyo 158-8557, Japan

³ Food Engineering Division, National Food Research Institute, Kannondai 2-1-12, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Preparation of nano/micro-dispersion systems via the self-assembly of food materials were investigated. Here, we summarized our recent results on (1) nanoparticle formation via electrostatic and hydrophobic interactions between modified lecithin and chitosan, (2) stabilization of monodisperse O/W emulsions by the addition of charged polysaccharides, and (3) formation of nanoparticles from chitosan and carboxymethylcellulose via the polyelectrolyte complexation. In each system, the preparation procedures were quite simple: two or more materials dissolved or suspended in aqueous media were just only mixed to each other without high energy input nor harmful chemicals addition. The particle size, surface charge and dispersion stability were significantly affected by the mixing ratio of the concerned materials. The results suggested that the nano/micro-dispersions having preferable properties could be designed by adjusting the mixing ratio adequately. These dispersion systems would be useful for developing novel foods having high functionality and good stability.

Keywords: nano/micro-dispersion system, bottom-up processing, polyelectrolytes, electrostatic interaction, hydrophobic interaction

1. 緒 言

ナノテクノロジーの進展は、材料や情報通信の分野における技術革新をもたらし、新たな産業の創出と、豊かな社会の実現に寄与している。食品関連の分野においても、食品素材をマイクロからナノメートルのサイズまで加工する技術の開発、ならびに、マイクロ／ナノサイズに加工された食品素材の特性評価や生体影

響評価が進められている [1,2,i]。微細化加工を行う手法は、模式的に Fig. 1 に示すようにトップダウン法とボトムアップ法に大別される。このうち、大きなサイズの素材を微細化加工によりナノサイズ化するトップダウン法は、剪断力など多くのエネルギーが必要となり、食品素材を対象とした加工では、成分が変性したり、失活したりする場合がある。一方、分子が集合化・組織化することでナノサイズの素材を作製するボトムアップ法は比較的省エネルギーな手法であり、食品性の活性を損なわない穏やかな条件でマイクロからナノサイズの微細加工が実現できると期待され、種々の検討が進められている。本稿では、食品素材の分子間相互作用を利用した集合化・組織化により、ナノから

(受付 2009 年 8 月 20 日, 受理 2009 年 11 月 18 日)

1 〒305-8572 茨城県つくば市天王台1-1-1

2 〒158-8557 東京都世田谷区玉堤1-28-1

3 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

† Fax: 029-853-4605, E-mail: ichikawa.sosaku.fn@u.tsukuba.ac.jp

Fig. 1. Schematic illustration of top-down and bottom-up approaches in the fabrication of nano/micro dispersion systems.

マイクロメートルサイズの微細粒子分散系を作製する手法について筆者らの成果を紹介する。

2. 改質レシチンとキトサンを利用したナノ粒子の作製と特性評価

大豆や卵黄に含まれるリン脂質はレシチンとよばれる。化学の分野では、卵黄レシチンの主成分であるフォスファチジルコリンをはじめとするグリセロリン脂質と同義で用いられる場合もあるが、本稿では食品添加物としての定義に従い油糧種子あるいは動物原料から得られるリン脂質の総称とする。レシチンは主に油溶性の界面活性剤として食品に利用されるが、ハンドリングの悪さや乳化安定性の低さが利用範囲を限定する要因となっている。そこで、このレシチンに酵素分解や水素添加など様々な改質処理を施すことで特性の向上が図られている [3]。本節では、この改質レシチンと、エビやカニなどの甲殻から得られるアミノ多糖であるキトサンとの分子間相互作用を利用した生体適合性ナノ粒子の作製とその諸特性に関する検討について紹介する [4]。

本研究で用いた大豆由来の改質レシチンは、主なリン脂質として、リゾフォスファチジルコリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミンおよびフォスファチジン酸を含む。この改質レシチンは、中性～弱酸性の pH 領域では全体としてアニオン性を示す。一方、キトサンは同様の pH 領域でカチオン性を示す多糖類である。筆者らは、両者の水溶液を適切な条件下で混合するだけで、両者の合計濃度に依存して粒径 120～350 nm 程度のナノ粒子が得られることを見出した (Fig. 2A)。キトサンのアミノ基と改質レシチンのリン酸基の

Fig. 2. (A) Mean particle size and (B) ζ-potential of nanoparticles prepared at different molar mixing ratios of chitosan to modified lecithin (NH_3^+/PO_3^-) and polyelectrolyte concentration at pH 3. Total concentration of modified lecithin and chitosan: 0.1wt% (●); 0.5wt% (■); 1.0wt% (▲). P indicated by two-head arrows in (A) represents the range of molar mixing ratio at which precipitation occurred.

モル混合比 ($-NH_3^+/-PO_3^-$) を種々変えてナノ粒子作製を試みた結果、広いモル混合比範囲でナノ粒子が形成されることがわかった。このとき、モル混合比の増大に伴いナノ粒子のゼータ電位は負から正の値に変化し、その値は混合時の合計濃度には依存しなかった (Fig. 2B)。なお、ゼータ電位が 0 に近い条件ではいずれの条件でも大きな沈澱が生成した (Fig. 2A の “P” で示した領域)。このモル混合比の範囲では、リン酸基とアミノ基の電荷が中和されることで粒子間の静電的反発力が弱まり、安定な分散状態が得られなくなったと考えられる。

Fig. 3 に、作製した改質レシチン-キトサンナノ粒子をネガティブ染色法により透過型電子顕微鏡で観察した画像を示す。図から判別できるように、主として球形で 100 nm 前後の粒子の存在が確認され、動的光散乱法により求めたサイズと対応していた。また、得られた画像から粒子内に白黒のコントラストがついた部分が認められた。とくに Fig. 3 右側の写真では明瞭である。このネガティブ染色法では、親水性部分は黒く染色されやすく、疎水性部分は染色されにくいため、試料の微細構造を反映した電子顕微鏡像が得られる。観察されたナノ粒子の内部のコントラストは、ナノ粒子の構造を反映したものと考えられ、粒子内で親水性部分と

Fig. 3. Transmission electron micrograph images of chitosan-modified lecithin nanoparticle complexes prepared at molar mixing ratio of chitosan to modified lecithin ($\text{NH}_3^+/\text{PO}_3^-$) of 4.9 at pH 3 and total polyelectrolyte concentration of 0.5wt%.

疎水性部分が不均一に分布していることを示唆している。この結果に基づき、筆者らは、改質レシチンの疎水基が水溶液中で会合して疎水性コア部分を形成し、これをキトサンの糖鎖が絡め合わせるようなナノ粒子形成メカニズムを提案した (Fig. 4)。

このナノ粒子には、種々の水溶性物質を封入できることがわかった (Fig. 5)。ウシ血清アルブミン (BSA)、デキストラン (FITC-Dex; デキストランを蛍光物質フルオレセインイソチオシアネート (FITC) で標識したもの) およびクマシーブリリアントブルー (CBB) について、それぞれ 32.7, 8.7 および 62.7% の封入効率が得られた。正および負荷電を有する BSA および CBB の内包率が顕著に高かった結果から、本ナノ粒子への物質封入は主として静電的相互作用によるものと推察された。

また、各種食品製造への応用を考慮し、凍結乾燥による粉末化やエバポレーションによる濃縮過程でのナ

Fig. 5. Encapsulation efficiency of model hydrophilic compounds into nanoparticles prepared at molar mixing ratio of chitosan to modified lecithin ($\text{NH}_3^+/\text{PO}_3^-$) of 4.9 at pH 3 and total polyelectrolyte concentration of 0.5wt%.

ノ粒子の状態変化を調べた。興味深いことに、数%程度のスクロース共存下で凍結乾燥したナノ粒子は、水に再分散させた後にも凍結乾燥前の粒径を保っていることが明らかとなった。また、エバポレーションによる濃縮処理により粒径はやや増大するものの、5倍程度に濃縮した段階でも依然として 500 nm 以下の粒径を保っていた。

このように、作製した改質レシチン-キトサンナノ粒子は、改質レシチンの水溶液とキトサンの水溶液を混合するだけという極めて簡便な方法で得られ、さらに種々の物質を担持することが可能で、粉末化しても分散性を損なわないという特性をもつ。また、改質レシチンおよびキトサンともそれぞれ様々な生理機能を有することが報告されており [3,5,6], これらを穏和な条件下で複合化した本ナノ粒子を利用することで、さらに高機能な食品素材の開発が期待される。

3. 荷電性多糖類を利用した O/W エマルションの安定性向上

Fig. 4. Schematic illustration of possible mechanism of nanoparticle formation via self-assembly of chitosan and modified lecithin (not drawn to scale).

互いに混じり合わない液体の一方に他方が液滴として分散した状態、すなわちエマルションは熱力学的に不安定な分散系であり、その安定性は食品の保藏安定性を左右する最も重要な因子の1つである。水中油滴型 (O/W) エマルションの場合、油滴表面に荷電性高分子が存在することで、静電的および立体的な液滴間相互作用によりエマルションが安定化される場合が知られている。本節では、生体由来の乳化剤と荷電性多糖類による自発的な集合体形成能を利用した O/W エマルションの安定化に関する研究を紹介する。なお、本研究では、極めて均一な液滴の作製が可能なマイクロチャンネル (MC) 乳化法 [7,8] により作製した単分散 O/W エマルションを利用した。これにより、機器分析および顕微鏡観察の両面から油滴の状態を調べるこ

ができるため、多糖類添加によるエマルションの安定化効果をより明確に評価できると考えた。

前節で用いた改質レシチンは、親水性の界面活性剤として食品の乳化に用いられている。前述のとおり、改質レシチンは中性～弱酸性の pH 領域では全体としてアニオン性の乳化剤としてふるまい、改質レシチンにより安定化される O/W エマルションの油滴表面は負電荷を持つ。これにカチオン性多糖類であるキトサンを添加し、油滴表面の改質レシチンと分子集合体を形成させることにより油滴をキトサンでコーティングできれば、O/W エマルションの安定性が向上できると考えた。そこで、改質レシチンを乳化剤として作製した O/W エマルションにキトサンを添加し、その安定性に及ぼす影響を検討した [9]。

大豆油を分散相、0.25wt% の改質レシチンを含む酢酸緩衝液 (pH 3) を連続相として MC 乳化法により作製した O/W エマルションに対するキトサン添加の影響を Fig. 6 に示した。キトサンの終濃度を高くしていくと、0.01wt% のキトサン濃度を超えたあたりで粒径および変動係数 (CV, 油滴径の平均値に対する標準偏差の大きさを百分率で表したものの) が顕著に増大し、さらにキトサン濃度を高くすると再び減少した (Fig. 6A)。キトサン濃度が低い条件で、油滴のゼータ電位は負の値を示したが、キトサン濃度の増加に伴い 0 に近づき (Fig. 6B), さらにキトサン濃度を高くすると正の値となった。Fig. 6C には、種々のキトサン濃度における油滴の顕微鏡写真を示した。キトサン濃度が増加してゼータ電位

の値が 0 に近づく条件 (キトサン濃度 0.01~0.05wt%) では油滴の凝集や合一が顕著に認められた。しかし、それ以下およびそれ以上のキトサン濃度では油滴サイズはほぼ等しく均一であった。ゼータ電位の値が 0 に近づく条件で油滴が不安定化する現象は、前節のナノ粒子の場合と同様に、静電滴相互作用により油滴表面に吸着するキトサンの量が増えることで油滴表面の電荷が中和され、油滴間の静電的反発力が弱められて不安定化したためと考えられる。その際、顕微鏡による液滴形状観察から、調製直後の油滴径を維持したまま橋かけ凝集が起きている場合 (Fig. 9C, キトサン濃度 0.025wt%) と、液滴が合一または枯渇凝集が起きている場合 (Fig. 9C, キトサン濃度 0.05wt%) がそれぞれ認められた。

キトサンを添加した改質レシチン安定化エマルションの加熱処理後の安定性および長期保蔵安定性についても検討した。キトサンを添加していないエマルションでは、70℃ 以上、30 分間の加熱処理において顕著な油滴の合一が認められた。これに対し、0.25wt% のキトサンを添加したエマルションでは 90℃、30 分の加熱処理を経ても油滴径がほぼ維持されていた。また、室温下、3 ヶ月間の保蔵実験において、キトサン無添加エマルションでは目視で確認できるほどの大きな合一油滴が形成されたが、キトサン添加エマルションでは顕微鏡観察においても油滴径にほとんど変化が認められなかった (Fig. 7)。また、レーザー回折粒度分布計を用いた油滴径測定においても、キトサン添加エマルシ

Fig. 6. Effect of chitosan concentration on the (A) mean particle size (●) and coefficient of variation (■), (B) zeta-potential (●) and (C) morphology of 1wt% soybean oil-in-water monodispersed emulsions (0.25wt% modified lecithin, 0–0.5wt% chitosan, pH 3).

Fig. 7. Appearance of modified lecithin-stabilized soybean oil-in-water monodisperse emulsion in the presence and absence of 0.25wt% chitosan at 3 months storage at pH 3.0. The oil phase was colored in red with Sudan IV in order to facilitate observation.

ンでは、調製直後および3カ月後の油滴径分布はほぼ一致した。以上の結果から、改質レシチンにより安定化されたO/Wエマルジョンに適切な濃度のキトサンを添加することで、油滴の安定性が向上することが示された。

さらに著者らは、乳タンパク質である β -ラクトグロブリン(β -Lg)を乳化剤として作製したO/Wエマルジョンの安定性に対するカルボキシメチルセルロース(CMC)の添加効果についても検討した[10]。pH4~6の弱酸性条件において、 β -Lgは正電荷、CMCは負電荷を持つ。O/Wエマルジョンの作製には、上記と同様にMC乳化法を用いた。種々の濃度のCMCを添加したエマルジョン中の油滴径の変化を調べた結果、修飾レシチン-キトサン系と類似の挙動が観察された。また、CMCを適切な条件で添加することで加熱処理に対する安定性および保藏安定性が向上することを示す結果が得られた。

以上の結果から、適切な乳化剤と荷電性多糖類の組み合わせを選択し、エマルジョン滴の表面で自発的に分子集合体を形成させることで、エマルジョンの安定化を実現できることが示唆された。

4. キトサンとカルボキシメチルセルロース酵素分解物の集合化を利用したナノ粒子の作製

セルロースおよびキチン・キトサンは、地球上に豊富に存在するバイオマス資源であり、その利用法が広範な分野で検討されている。セルロースの一部にカルボキシメチル基を導入したアニオン性のカルボキシメチルセルロース(CMC)は、増粘剤や乳化安定剤として使用されている。一方、キチンを脱アセチル化して得られるキトサンは、アミノ基を有するカチオン性の

多糖である。これら生体由来の荷電性高分子であるCMCおよびキトサンをそれぞれ酵素で加水分解した素材を使用してナノ粒子を形成する手法について検討を行った[11,12]。

市販されているキトサン(分子量 4.0×10^5)およびCMC(分子量 2.2×10^5)の各水溶液を調製して混合すると、大きなゲル粒子が形成されてしまった。そこで、キトサンを酵素キトサナーゼあるいはリゾチームで部分的に加水分解してキトサン加水分解物を調製した。一方、CMCを酵素セルラーゼで部分加水分解してCMC加水分解物を調製した。これらの加水分解物を適切な条件で混合することで、粒径200 nm程度のナノ粒子が自発的に形成されることがわかった。このキトサン-CMCナノ粒子の作製手順をFig. 8に示す。ナノ粒子は、カチオン性のキトサンとアニオン性のCMCが静電的に相互作用して集合化し、ポリイオンコンプレックスを形成することで自発的に生成したと考えられる[11]。

CMCの加水分解条件を一定とし、キトサンを加水分解する反応時間を変化させてナノ粒子を作製すると、粒径はキトサンの反応時間の増加に伴い、減少した(Fig. 9)。すなわち、キトサン加水分解物の分子量が減少すると、粒径は減少することがわかった。また、各加水分解物の混合比によっても粒径は変化し、適切な混合比で極小となることがわかった[11]。さらに、このナノ粒子にタンパク質や核酸断片など、荷電を有する生体高分子を効率的に内包することができた。また、キトサンをキトサナーゼで部分加水分解して作製したナノ粒子は、酵素リゾチームの作用を受けると分解され内包した物質を徐放することがわかった[12]。

以上、この系では素材分子を酵素加水分解することで分子量を制御し、これら各水溶液を混合するだけでナノ粒子を比較的容易に作製できることを示した。

Fig. 8. Preparation procedure of chitosan-CMC nanoparticles.

Fig. 9. Effect of hydrolysis reaction time of chitosan on the size of chitosan-CMC nanoparticles.

5. ま と め

食品素材の分子間相互作用を利用した集合化・組織化により、ナノからマイクロメートルサイズの微細粒子分散系を作製する手法について紹介した。何れの系も、適切な条件で、溶液あるいは懸濁液を混合するだけの極めてシンプルな手順である。また、素材分子の混合比率を主として、各種の調製条件を調整することで、静電的相互作用や疎水相的相互作用などの分子間相互作用を制御し、用途に応じた特性やサイズ、形態の分散系を調製することができた。今後、ミクロな分子レベルからマクロな系の挙動まで、食品素材の分子間相互作用に関する理解が進み、食品素材分子を巧く組み合わせて集合化・組織化する技術を利用することで、安全性や機能性に優れた食品の開発に繋がることを期待したい。

謝 辞

本研究は、農林水産省食品ナノテクノロジープロジェクトの助成を受けて行った。謝意を表する。

引 用 文 献

- 1) J. Weiss, P. Takhistov, J. McClements; Functional materials in food nanotechnology. *J. Food Sci.*, **71**, R107-R116 (2006).
- 2) H. Bouwmeester, S. Dekkers, M. Y. Noordam, W. I. Hagens, A. S. Bulde, C. de Heer, S. E. C. G. ten Voorde, S. W. P. Wijnhoven, H. J. P. Marvin, A. J. A. M. Sips; Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **53**, 52-62 (2009).
- 3) R. Sono; Development and production of functional materials. *Shokuhin Kogyo*, **48** (8), 1-9 (2005).
- 4) A. M. Chuah, T. Kuroiwa, S. Ichikawa, I. Kobayashi, M. Nakajima; Formation of biocompatible nanoparticles via the self-assembly of chitosan and modified lecithin. *J. Food Sci.*, **74**, N1-N8 (2009).
- 5) K. Tokuyasu; Utilization of chitin and chitosan in food industry. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **46**, 356-360 (1999).
- 6) M. Morimoto, Y. Shigemasa; Application of chitin and chitosan as biomass. *Kobunshi*, **50**, 236-239 (2001).
- 7) T. Kawakatsu, Y. Kikuchi, M. Nakajima; Regular-sized cell creation in microchannel emulsification by visual microprocessing method. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 317-321 (1997).
- 8) I. Kobayashi, M. Nakajima; Microchannel emulsification technology: formulation and application of monodisperse emulsions. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **53**,

- 317-326 (2006).
- 9) A. M. Chuah, T. Kuroiwa, I. Kobayashi, M. Nakajima; Effect of chitosan on the stability and properties of modified lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification. *Food Hydrocolloids*, **23**, 600-610 (2009).
- 10) A. M. Chuah, T. Kuroiwa, I. Kobayashi, M. Nakajima; β -Lactoglobulin stabilized monodisperse oil-in-water emulsion prepared by microchannel emulsification as affected by the addition of carboxymethylcellulose. Abstract 9th Ann. Meeting Jpn. Soc. Food Eng., 2A07 (2008).
- 11) S. Ichikawa, S. Iwamoto, J. Watanabe; Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1637-1642 (2005).
- 12) J. Watanabe, S. Iwamoto, S. Ichikawa; Entrapment of some compounds into biocompatible nano-sized particles and their releasing properties. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **42**, 141-146 (2005).

引用 URL

- i) <http://nfri.naro.affrc.go.jp/>; 農林水産省農林水産技術会議事

務局(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
「食品素材のナノスケール加工及び評価技術の開発」HP
(Oct. 31, 2009).

要 旨

食品素材の分子相互作用を利用した集合化・組織化により、ナノからマイクロメートルサイズの微細粒子分散系を作製する3つの系を紹介した。(1)改質レシチンとキトサンとの相互作用を利用して粒径120~350 nm程度のナノ粒子を作製し、タンパク質などの水溶性物質を封入できた。(2)改質レシチンを乳化剤としたO/Wエマルジョンにキトサンを添加し、油滴表面で分子集合体を形成させることでエマルジョン油滴をコーティングし、熱安定性および保藏安定性を向上できた。(3)キトサンおよびCMCの各酵素加水分解物を混合することでポリイオンコンプレックスを形成させ、タンパク質や核酸断片などの荷電性生体高分子を効率的に内包化した粒径200 nm程度のナノ粒子を作製できた。何れの系も、溶液あるいは懸濁液を混合するだけのシンプルな操作により、様々な特性やサイズ、形態の分散系を調製できた。