

竹酢液を固定化したキトサンフィルムの創製と性質

木幡進^{*1}, 山下奈津子¹, 種村公平¹, 墨利久¹, 栗原正日呼¹, 小林高臣²

¹ 八代工業高等専門学校生物工学科 (〒866-8501 八代市平山新町 2627)

*kohata@as.yatsushiro-nct.ac.jp

² 長岡技術科学大学物質材料系 (〒940-2188 長岡市上富岡町 1603-1)

Preparation and Characterization of a Chitosan-Bamboo vinegar Immobilization Film

Susumu KOHATA^{*1}, Natsuko YAMASHITA¹, Kouhei TANEMURA¹,
Toshihisa SUMI¹, Masahiko KURIHARA¹, Takaomi KOBAYASHI²

¹Department of Bioengineering, Yatsushiro National College of Technology
Hirayama-shinmachi 2627, Yatsushiro City, Kumamoto 866-8501, Japan

²Department of Materials Science and Technology, Nagaoka University of Technology
Kamitomioka 1603-1, Nagaoka City, Niigata 940-2188, Japan

(Received May 21, 2007; Accepted June 18, 2007)

Abstract

In an effort to make efficient use of bamboo vinegar, a composite film derived from bamboo vinegar and chitosan has been developed. Employing natural drying methods, a composite film with approximately 0.05 mm in thickness and a tensile strength of approximately 38 Nmm⁻² was obtained. Although the film surface was smooth and uniform, it contained fibrils, and, while it was insoluble in water, it could be degraded in soil within two months. Film formation from chitosan was associated with distinct reflectance IR spectrum absorptions at 960-840, 1170, 1680, and 3800-3400 cm⁻¹. The composite film did not exhibit any growth-inhibiting effect against *Escherichia coli*; however, the antibacterial property of the film was clarified against bacteria that had contaminated the film. An application of this film to the insole sheet incorporated into the ventral surface of tatami mats exhibited some anti-fungal characteristics on the tatami surface. The addition of a β -cyclodextrin polymer to the film reduced the offensive odor associated with the bamboo vinegar liquid but decreased the tensile strength of the film.

Keywords: Bamboo vinegar, Chitosan, Film, Cyclodextrin

1. 緒言

竹炭を製造する際の熱分解反応では、水蒸気の発生後、ヘミセルロース・セルロースの熱分解 (200~300℃) により有機酸類やアルコール類が発生し、リグニンの熱分解

(300~400℃) によりフェノール類が発生する。竹酢液はこの煙を冷却・液化したもので、古くから防虫剤、抗菌・抗カビ剤、土壌改良剤、植物活性剤などに活用されてきた [1]。その成分は水分が約 80% で、残りの約 20% には酢酸

を主成分に、アルコール類、フェノール類など約二百数十種類以上の成分が含まれている [1-3].

一方、天然物由来の多糖類のキトサンは、キチンを脱アセチル化して得られ、D-グルコサミンが β -(1, 4)-結合した直鎖状の多糖類で、水、アルカリ溶液には不溶で酢酸等の有機酸へ溶解する性質や抗菌性、凝集作用を有する [4].

著者らは、竹酢液を輸送する上で、体積が高張る問題点を解決するために、基材に固定化することを検討する過程で、キトサンが竹酢液に可溶である点に着目し、竹酢液をキトサンへ固定化したフィルムの作製を試みた。しかし、得られたフィルムは難水溶性であり、再溶解した溶液状態で、竹酢液成分の特性を再発現できないことがわかった。そこで、本研究では竹酢液およびキトサンの有効利用の観点から、これらの天然物由来物質を組み合わせた竹酢液固定化フィルムとして活用することを目指して、その特性について検討した。キトサンフィルムの研究例としては、キトサンとポリビニルアルコールを複合化した、キトサン・PVA複合化フィルム（可塑剤としてグリセリンを、架橋剤としてメラミン樹脂を添加して調製）についての報告が知られている [5].

さらに、本研究では天然物由来の環状オリゴ糖である β -シクロデキストリン（グルコース7分子が α -1, 4結合した分子、以下 β -CDと略記）を添加したフィルムの作成も試みた。これは、 β -CDのもつ包接作用により、竹酢液成分をゲストとして包接させ、フィルムの臭気の抑制と竹酢液成分の徐放を図ることを検証するためである。

2. 実験

2.1 実験材料

(1)竹酢液は、原液中に含まれるホルムアルデヒドなどの有害物質を除去するために常圧蒸留精製した竹酢液（九州資源開発研究所より恵与）を用いた。酸度を測定した結果は3.87%であった。

(2)キトサンは、キトサン500（和光純薬工業）またはコスト面を考慮して食品用キトサン（コーヨーキトサンSK-400, 甲陽ケミカル）を用いた。コロイド滴定法により算定した脱アセチル化度は、キトサン500は88.1%, 食

品用キトサンは76.1%であった。

(3) β -CDは、水への溶解度の高いジメチル β -CD（日本食品化工より恵与）、文献 [6] に従い β -CDをエピクロロヒドリンで架橋して合成した橋かけ度の低い水溶性 β -CDポリマーの2種類を用いた。

2.2 フィルムの作製

キトサン500または食品用キトサン1.5gに、竹酢液100ml, 蒸留水200mlを加え、約1日かけて溶解させた。別途、さらに β -CD（ジメチル β -CD, 水溶性 β -CDポリマー）を竹酢液に対して3%の量を添加したキトサン溶解液をステンレス皿（19.5×13cm）内に展開し、約3週間自然乾燥させてキャストフィルムを得た。以下、キトサン500から作製したフィルムを“竹酢フィルム”, 食品用キトサンから作製したフィルムを“食品用キトサン竹酢フィルム”, β -CD無添加の竹酢フィルムを“ β -CD添加竹酢フィルム”と略す。さらに、比較（コントロール）のため、酢酸を用いて作成したフィルムを“酢酸フィルム”と略す。酢酸は、竹酢液と同じ酸度となるように調製した。

2.3 フィルムの引張試験

竹酢フィルム, 酢酸フィルム, 水溶性 β -CDポリマーを添加した竹酢フィルムおよび比較のためにセロファンフィルム, ポリエチレンフィルムをそれぞれ20×70mmにカットし、膜厚をマイクロメーターで測定した後、引張試験機（EZTest, 島津製作所）で測定した。測定室内の温度は20±2°C, 湿度45±5%であった。

2.4 フィルムの土壌分解性試験

土壌分解性試験は、夏期と冬期で行った。竹酢フィルム, 酢酸フィルムをそれぞれ5×5cmにカットし、網戸ネットに縫いつけたものを土壌に埋設し、形状変化を観察した。

2.5 フィルムの表面分析

竹酢フィルム, 酢酸フィルム, 食品用キトサン竹酢フィルム, β -CD添加竹酢フィルムについて、走査型電子顕微鏡（日本電子5310LV）、原子間力顕微鏡（セイコーインスツルメントNanoptics 1000）、顕微FT-IR分光装置（島津

製作所 IR Prestige-21 FTIR-8400s) を用いて表面の形態を測定した。

2.6 畳中敷としてのフィルムの抗カビ試験

竹酢フィルムを、畳表と芯材との間に中敷として織り込んだ畳と、織り込んでいない畳を新規に作成 (27×27cm, 稗田畳店) し、八代高専内の階段下倉庫内の暗所に静置して約 2 週間観察を行った。条件は平均湿度 70%, 平均気温 27°C であった。

2.7 竹酢フィルムの抗菌性試験

竹酢フィルム, 酢酸フィルム, ポリエチレンフィルム (コントロール) について大腸菌 *Escherichia coli* (IFO 3301) に対する抗菌性をハロー法により試験した。標準寒天培地 (日本製薬) を用い、37°C で 24 時間培養して観察を行った。また、フィルム上へ空中落下した表面付着菌に対する抗菌性試験も行った。実験室内に、表面をアルコール殺菌した小テーブルを置き、竹酢フィルムを貼り付けた。1 週間後にフィルム面上およびテーブル面上の付着菌を DD 寒天スタンプ培地 (生研) でサンプリングし、37°C で 24 時間培養してコロニーを観察した。

3. 結果および考察

3.1 フィルムの作製結果

予備実験により竹酢液 100ml に溶解することのできるキトサン 500 の最大量は 7.5g であったことから、竹酢液 100ml に対しキトサン 500 を溶解範囲内の 0.2, 0.4, 0.8, 1.0g, 1.5g 添加し、フィルムが得られるかどうかを調べた結果、すべてにおいてフィルムが得られ、キトサン添加量とフィルムの膜厚はほぼ比例することがわかった。この知見をもとに、本研究ではキトサン 1.5g を竹酢液 100ml に溶解して大きさ 19.5×13cm のフィルムを作製した結果、竹酢フィルム (黄褐色, 透明), 食品用キトサン竹酢フィルム (黄褐色, 透明) および酢酸フィルム (黄色, 透明) が得られ、いずれのフィルムも水にほとんど溶解しなかった。ジメチル β -CD を添加した溶解液は、乾燥後、鱗片状に剥離し、脆く、フィルム状のものは得られなかったが、水溶性 β -CD ポリマーを添加した溶解液からはフィルム

が得られた。 β -CD 添加竹酢フィルムの嗅覚官能試験では、 β -CD 無添加の竹酢フィルムと比べて、臭気の抑制効果が認められた。

3.2 フィルムの引張試験結果

キトサン 1.5g をそれぞれの液に溶解して得られた各フィルムの引張強度および伸び率の測定結果を表 1 に示す。竹酢フィルムは、セロファンフィルムの引張強度の約半分となったが、PE フィルムとほぼ同じ引張強度であった。汎用プラスチックのポリプロピレン (19.6-40N/mm², 300-600%) [7] と比較しても、伸び率は低いが、引張強度は大きく、竹酢フィルムは実用できる機械的強度であると考えた。酢酸フィルムの引張強度は竹酢フィルムの 1/2 程度と低かったが、伸び率は約 2 倍を保持していた。また、 β -CD 添加竹酢フィルムは、竹酢フィルムと比較して引張強度、伸び率が低くて脆いフィルムであった。

表 1 フィルムの引張強度および伸び率

フィルムの種類 (膜厚)	引張強度 (N/mm ²) [測定回数]	伸び率 (%) [測定回数]
竹酢フィルム (0.046mm)	37.4 ± 8.7 [n=4]	8.4 ± 3.2 [n=4]
酢酸フィルム (0.054mm)	15.8 ± 0.9 [n=2]	15.1 ± 0.5 [n=2]
β -CD 添加 竹酢フィルム (0.182mm)	22.5 ± 0.1 [n=2]	1.5 ± 0.1 [n=2]
PE フィルム (0.028mm)	36.1 ± 2.6 [n=3]	7.6 ± 1.7 [n=3]
セロファンフィルム (0.023mm)	68.6 ± 2.3 [n=3]	2.8 ± 0.4 [n=3]

3.3 竹酢フィルムの土壌分解性試験結果

夏期試験 (試験期間 2005 年 6 月～7 月の八代地域の平均気温は 25.8°C, 降水量は月平均 460mm) では、フィルムの分解が速いことが予測されたので、埋設 12 日後、埋設 25 日後にフィルムを掘り起こし観察した。埋設 12 日後で

は、竹酢フィルムの分解は確認されなかったが、酢酸フィルムは部分的に分解されていた。埋設 25 日後には、いずれのフィルムも完全に分解されていることが確認できた。冬期試験（試験期間 2005 年 11 月～2006 年 1 月の八代地域の平均気温は 8.7℃、降水量は月平均 49mm）での分解は遅いことが予測されたので、埋設 1 ヶ月後と、埋設 2 ヶ月後にフィルムを掘り起こした。埋設 1 ヶ月後では竹酢フィルムは分解されておらず、酢酸フィルムは完全に分解されていた。埋設 2 ヶ月後には、竹酢フィルムも完全に分解されていた（図 1）。コントロールとして埋設したキトサン 500 は夏期・冬期とも試験期間終了まで分解されなかった。



埋設前 → 冬期（1 ヶ月）→（約 2 ヶ月）

図 1 土壤埋設前後の様子（上：キトサン 500，中：酢酸フィルム，下：竹酢フィルム）

緒言に述べたキトサン・PVA 複合化フィルム[5]では、埋設初期に土壤水分によるフィルム可溶分の溶出が起こり、その後の微生物による代謝に由来し徐々に分解されることが推定されている。本研究では、酢酸や竹酢液の成分がキトサンに比べて基質（炭素源）として利用しやすく、これを資化する土壤菌（放線菌など [8]）が早期に増殖し、結果的にキトサンの分解をも早めたと推察した。また、夏期と冬期では、温度、湿度、水分量や微生物活性が異なる

ことから、分解速度に差が生じたと推測される。

3.4 フィルムの表面分析結果

(1) 走査型電子顕微鏡によるフィルムの観察結果

竹酢フィルムの SEM 写真を図 2 に示す。竹酢フィルム断面と表面の写真より、フィルムはほぼ均一な厚さの平面であることが分かった。また、酢酸フィルムは滑らかな表面で、竹酢フィルムと食品用キトサン竹酢フィルムではクレーター状のくぼみが表面に確認された。高倍率での SEM の観察結果から、フィルム作製の際に均一に溶けているようであったが、フィブリルを形成 [9] していることが示唆された。

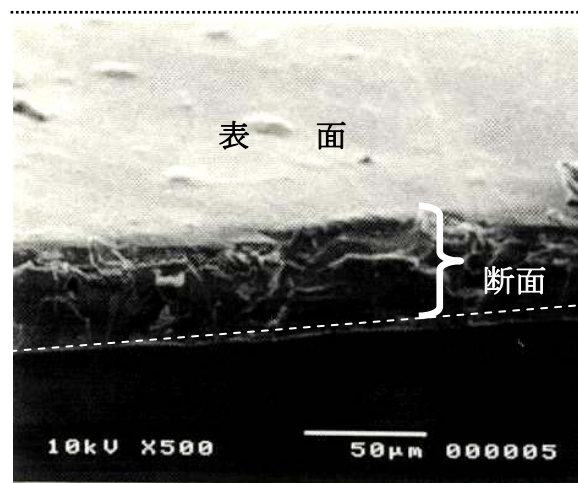


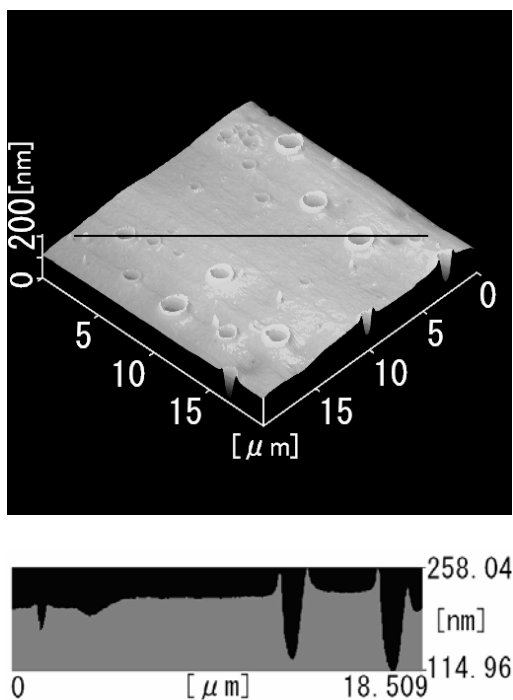
図 2 竹酢フィルム表面と断面の SEM 写真(×500)

一方、 β -CD を添加した竹酢フィルムの表面には同一方向に筋（溝）状の凹凸のある表面構造であった。以上の結果より、キトサン 500 を溶解した溶解液の違い、 β -CD 添加の有無が、フィルムの表面状態に大きく影響していた。また、引張試験結果において硬く脆かった β -CD 添加竹酢フィルムは、その表面構造を反映していると推測される。

(2) 原子間力顕微鏡によるフィルムの観察結果

竹酢フィルムの AFM 像を図 3 に示す。観察範囲は $20 \times 20 \mu\text{m}$ である。SEM 写真と同様の表面像が得られた。さらに、フィルムの深さ方向の像から、竹酢フィルムでは表面

に存在する径が約 $5\mu\text{m}$ 、最大深さが約 140nm のくぼみ以外の面は滑らかであること、食品用キトサン竹酢フィルムでは表面のくぼみ以外の面が粗いこと、 β -CD 添加竹酢フィルムでは表面全体が不均一で凹凸が顕著であるのに対して、酢酸フィルムの表面は、くぼみが無く均一で、全体的に滑らかであることがわかった。なお、観測範囲内でのフィルムの平均面粗さと最大高低差は、それぞれ次のとおりであった：竹酢フィルム (1.09nm , 2.10nm)、食品用キトサンフィルム (3.64nm , 3.17nm)、酢酸フィルム (1.83nm , 1.11nm)。



(上：表面の像，下：深さ方向の像，実線は深さ方向の計測位置を示す)

図3 竹酢フィルムのAFM像

(3) 赤外線反射吸収分光法によるフィルムの評価

竹酢フィルムおよびキトサン500のIR反射スペクトルを図4、図5に示す。酢酸フィルム、竹酢フィルムおよび食品用キトサン竹酢フィルムのIRスペクトルはいずれも差異が認められず、基材のキトサンの吸収帯を反映していた。吸収帯A ($3800\sim 3400\text{cm}^{-1}$)はO-H結合に、吸収帯B ($3000\sim 2840\text{cm}^{-1}$)はC-H結合に起因する[10, 11]。A吸収帯のピークは、フィルムを形成すると高波数側へシフ

トしており、キトサンのアミノ基と水酸基間に生じる水素結合がフィルムのマイクロ構造へ大きな影響を及ぼすことが示唆された。吸収帯Cは空気由来の CO_2 吸収帯である[12]。吸収帯Dは、C=Oバンド (1735cm^{-1} 近傍)、N-HアミドI, IIバンド (1655cm^{-1} , 1550cm^{-1} 近傍)に起因し[10, 11]、吸収帯F ($1260\sim 1000\text{cm}^{-1}$ 近傍)はC-O結合に帰属される[13]ことから、これらの吸収帯は主としてキトサンのアミノ基、酢酸のC-O伸縮、グルコース環の酸素ならびに水酸基のC-Oに起因する。A吸収帯 (3450cm^{-1})を基準に用いて、D吸収帯 (1680cm^{-1})およびF吸収帯 (1170cm^{-1})の強度を、その強度比で比較[11]すると、キトサン500の強度比 $D/A \approx 0.86$, $F/A \approx 0.64$ に対し、竹酢フィルムでは $D/A \approx 1.00$, $F/A \approx 1.68$ 、食品用キトサンフィルムでは $D/A \approx 1.04$, $F/A \approx 1.50$ 、酢酸フィルムでは $D/A \approx 0.94$, $F/A \approx 1.97$ を与え、吸収帯Dのほか、特に吸収帯Fの強度比の変化が顕著に現れていることがわかる。

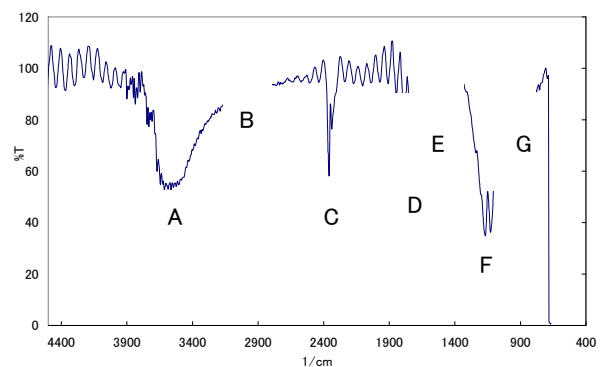


図4 竹酢フィルムのIRスペクトル

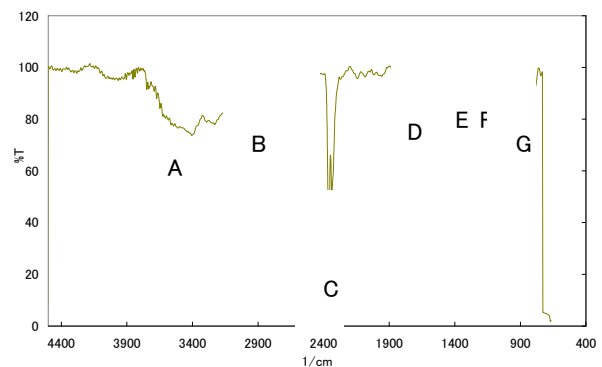


図5 キトサン500のIRスペクトル

フィルム形成時の赤外吸収帯の特徴的な変化は、キトサンと酢酸が塩を形成する[14]ためと考えられる。さら

に、吸収帯G (960-840 cm^{-1}) もフィルムの形成に伴いスプリットし、顕著に変化することがわかった。

酢酸を除く竹酢液成分に由来する赤外吸収帯は観測されなかったが、キトサンと酢酸から形成するキトサン塩 (Type II) では分子鎖間に水分子が入ることが知られている [14] ことから、竹酢液成分は分子鎖間に存在するものと推察される。なお、作製後一年経過した竹酢フィルムの IR スペクトルも測定したが、新しい竹酢フィルムとほぼ同一のスペクトルであった。

3.5 畳中敷フィルムの抗カビ試験結果

竹酢フィルムを中敷として織り込まないコントロールの畳では畳表全体にクロカビ (*Cladosporium* 属) やアオカビ (*Penicillium* 属) の発生が確認された。これに対して、竹酢フィルムを中敷とした畳では、局所的なカビの発生に止まり、十分な抑制効果とまでは言えないが、両者に差が認められた。従って、抗カビ効果はキトサンの抗カビ効果 [15] ではなく、竹酢液成分 (主としてフラン類) の抗カビ効果 [16] が反映されていると考えられた。なお、畳表表面の色調への影響はなかった。

3.6 竹酢フィルムの抗菌性試験結果

竹酢フィルム、酢酸フィルムおよびPEフィルム (コントロール) の結果を表2に示す。酢酸フィルム (酢酸濃度で約 20%) では阻止円が確認されたが、竹酢フィルムでは確認されず、大腸菌に対しては抗菌性を示さないことがわかった。竹酢フィルムでは、竹酢液が濃縮されているにもかかわらず、キトサンと塩を形成する理由で、酢酸成分による抗菌機能が十分に発現しないと示唆された。一般生菌を用いたキトサン複合化フィルムの抗菌性試験 (シェークフラスコ法) では菌の増殖抑制効果が高いこと [5] や、大腸菌に対するキトサン自身の静菌性 [17] が知られているが、本実験で作製した竹酢フィルムはそれらの効果を反映していなかった。

フィルム上へ空中落下した表面付着菌に対する試験では、図6に示すように、卓上でのコントロール (コロニー数, $\ln N = 3.2$) と比べると、竹酢フィルム (コロニー数,

$\ln N = 2.0$) 上の生菌数が少ないことが確認できた。なお、菌の同定には至らなかった。

表2 フィルムの抗菌性試験結果

フィルムの種類	阻止円 (mm)
竹酢フィルム	0
酢酸フィルム	1.2
PEフィルム	0



卓上 (コントロール) 竹酢フィルム上
図6 表面付着菌 (室内) の抗菌試験

4. まとめ

竹酢液を輸送する上で、体積が高張る問題点を解決するための固定化法として、竹酢液固定化フィルムの創製を試みたが、難水溶性のフィルムが得られ、竹酢液成分を再度溶液状態へ戻し、その性質を再発現できなかったことから、固定化フィルムとしての活用を目指して性質を検討した。

キトサン 500 と竹酢液を所定 (1.5g : 100ml) の割合で調製したキトサン溶解液を、大きさ 19.5×13cm に展開し、自然乾燥することにより、膜厚が約 0.05mm のキャストフィルムを得た。表面および断面の観察から、竹酢フィルムはほぼ均一な厚さの平面で (クレーター状のくぼみが確認された)、フィブリルの形成が示唆された。竹酢フィルムの引張強度は約 38N/mm² でフィルムとして実用できる機械的強度と考えられた。フィルムの赤外線反射吸収分光測定では、有機酸が塩を形成してフィルム化することによる赤外吸収帯の特徴的な変化が認められた。竹酢フィルムは、夏期約 1 ヶ月、冬期約 2 ヶ月間で土壤中での完全分解が認められた。竹酢フィルムの大腸菌に対する抗菌性は確認されなかったが、フィルム上へ落下した室内表面付着菌に対

してある程度の抗菌性を示し、竹酢フィルムを中敷として織り込んだ量ではカビの発生が抑えられていた。

食品用キトサン竹酢フィルムは表面が粗い点を除いて、竹酢フィルムと同等の特性を持つと判断され、コスト面からは有利と考えられる。さらに、 β -CD 添加竹酢フィルムは、竹酢フィルムと比較して引張強度、伸び率が低く脆いフィルムであったが、臭気を低減できることがわかった。

謝辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金、基盤研究 C (課題番号 165802771)、および長岡技術科学大学学長裁量経費の支援のもとで遂行した。記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 池嶋庸元, 「竹炭・竹酢液の作り方と使い方」, 農山漁村文化協会 (2003), p. 24.
- 2) Y. Kimura, S. Suto, M. Tatsuka, Evaluation of Carcinogenic/Co-carcinogenic Activity of Chikusaku-eki, a Bamboo Charcoal By-product Used as a Folk Remedy, in BALB/c 3T3 Cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 25(8), 1026-1029 (2002).
- 3) O. Sulaiman, R. J. Marphy, R. Hashim, C. S. Gritsch, The Inhibition of Microbial Growth by Bamboo Vinegar, *J. Bamboo and Rattan*, 4(1), 71-80 (2005).
- 4) 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 (1992), p. 26.
- 5) 吉村治, 吉本克彦, 隅田弘, 上田一正, 「キトサン系生分解性樹脂の開発」, 石川県工業試験場 平成 11 年度研究報告, Vol. 49 (2003).
- 6) 伊藤勝, 籾野昌弘, 「 β -シクロデキストリン橋かけ化ポリマーの構造と性質」, 日本化学会誌, 1987 巻, 6 号, 1040-1045 (1987).
- 7) 高分子学会編, 「高分子材料便覧」, コロナ社 (1973).
- 8) 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 (1992), p. 189.
- 9) E. F. Titoba, E. M. Belavtseva, A. I. Gamzazade, A. M. Skylar, S. A. Pavlova, S. V. Rogozhin, Study of structure conformation of chitosan in solutions by transmission electron microscopy, *Acta Polymer*, 37, 121-124 (1986).
- 10) 荒木峻, 益子洋一郎, 「有機化合物のスペクトルによる同定法」, 東京化学同人 (1981), pp. 80-87.
- 11) J. G. Domszy, G. A. F. Roberts, Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan, *Makromol. Chem.*, 186, 1671-1677 (1985).
- 12) 島内武彦, 「赤外線吸収スペクトル解析法 (増補版)」, 南江堂 (1976), p. 21.
- 13) 中西香爾, P. H. Solomon, 古舘信生, 「赤外線吸収スペクトル—定性と演習— (改訂版, 定性編)」, 南江堂 (1981), p. 33, p. 116-117.
- 14) J. Kawada, T. Yui, K. Okuyama, K. Ogawa, Crystalline Behavior of Chitosan Organic Acid Salts, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 2542-2547 (2001).
- 15) 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 (1992), p. 76-80.
- 16) 松下洋一, 菅本和寛, 松井隆尚, 「木酢液成分の抗カビ試験」, 第 34 回化学関連支部合同九州大会要旨集 (1997), p. 175
- 17) 戸倉清一, 「キチン・キトサンの化学と特性」, 化学と教育, 46 巻 11 号, 692-695 (1998).