

(1→3)- β -グルカンの TEMPO 触媒酸化に関する研究

田村 直之

目次

| | |
|--|----|
| 1. 緒言..... | 1 |
| 1.1. (1-3)- β -グルカンの特徴と応用..... | 2 |
| 1.2. TEMPO 触媒酸化..... | 3 |
| 1.2.1 弱酸性下での TEMPO 触媒酸化..... | 5 |
| 1.2.2. TEMPO 誘導体と pH による反応活性の違い..... | 6 |
| 1.3. 本研究の目的..... | 6 |
| 1.4. 参考文献..... | 8 |
| 2. 弱アルカリ性条件における(1-3)- β -グルカンの TEMPO 触媒酸化..... | 13 |
| 2.1. 研究背景..... | 14 |
| 2.2. 出発物質及び実験手法..... | 15 |
| 2.2.1. 出発物質..... | 15 |
| 2.2.2. TEMPO 触媒酸化..... | 15 |
| 2.2.3. 酸加水分解..... | 15 |
| 2.2.4. 位相差顕微鏡観察..... | 15 |
| 2.2.5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察..... | 16 |
| 2.2.6. SEC-MALLS 分析..... | 16 |
| 2.2.7. 他の測定手法..... | 17 |

| | |
|--|----|
| 2.3. 結果及び考察..... | 18 |
| 2.3.1. パラミロン及びカードランの TEMPO 触媒酸化 | 18 |
| 2.3.2. TEMPO 触媒酸化生成物の構造解析 | 22 |
| 2.3.3. TEMPO 触媒酸化物の分子量 | 24 |
| 2.4. 結論..... | 27 |
| 2.5. 参考文献..... | 28 |
| 3. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化を用いた高分子量 | 33 |
| ポリグルクロン酸調製の検討 | 33 |
| 3.1. 研究背景..... | 34 |
| 3.2. 出発物質及び実験手法..... | 35 |
| 3.2.1. 出発物質..... | 35 |
| 3.2.2. 多糖類の弱酸性下 TEMPO 触媒酸化 | 35 |
| 3.2.3. SEC-MALLS 測定..... | 36 |
| 3.2.4. 他の分析手法..... | 36 |
| 3.3. 結果・考察..... | 37 |
| 3.3.1. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO ₂ システムによる多糖類の酸化 | 37 |
| 3.3.2. 酸化多糖の NMR スペクトル分析..... | 39 |
| 3.3.3. TEMPO 酸化カードランにおける反応時間の影響..... | 41 |
| 3.3.4. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化における他の反応条件の検討..... | 44 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 3.4. 結論 | 50 |
| 3.5. 参考文献 | 51 |
| 4. カーデュロン酸水溶液の粘弾性特性に関する検討 | 55 |
| 4.1. 背景 | 56 |
| 4.2. 出発物質及び実験手法 | 56 |
| 4.2.1. 出発物質 | 56 |
| 4.2.2. カーデュロン酸の調製 | 56 |
| 4.2.3. 粘弾性測定 | 57 |
| 4.2.4. その他の測定 | 57 |
| 4.3. 結果・考察 | 58 |
| 4.3.1. カーデュロン酸水溶液の粘弾性特性 | 58 |
| 4.3.2. 各種金属イオンによるカーデュロン酸水溶液の粘弾性特性変化 | 62 |
| 4.4. 結論 | 64 |
| 4.5. 参考文献 | 65 |
| 5. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化を用いたパラミロン | 67 |
| ナノフィブリルの調製 | 67 |
| 5.1. 背景 | 68 |
| 5.2. 出発物質及び実験 | 70 |
| 5.2.1. 出発物質 | 70 |

| | |
|--|----|
| 5.2.2. パラミロンの弱酸性 TEMPO 触媒酸化 | 70 |
| 5.2.3. 微細化処理 | 70 |
| 5.2.4. 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察 | 71 |
| 5.2.5. 原子間力顕微鏡 (AFM) 観察 | 71 |
| 5.2.6. その他の分析手法 | 71 |
| 5.3. 結果及び考察 | 72 |
| 5.3.1. TEMPO 触媒酸化パラミロンのカルボキシル基量及び収率 | 72 |
| 5.3.2. TEMPO 触媒酸化によるパラミロンの結晶サイズ変化 | 73 |
| 5.3.3. TEMPO 触媒酸化パラミロンナノフィブリルの調製及び形状観察 | 74 |
| 5.4. 結論 | 77 |
| 5.5. 参考文献 | 78 |
| 6. 総括 | 81 |
| 2. 弱アルカリ条件における(1-3)- β -グルカンの TEMPO 触媒酸化 | 82 |
| 3. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化を用いた高分子量ポリグルクロン酸調製の検討 | 82 |
| 4. カーデュロン酸水溶液の粘弾性特性に関する検討 | 83 |
| 5. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化を用いたパラミロンナノフィブリルの調製 | 84 |

1. 緒言

1.1. (1→3)-β-グルカンの特徴と応用

(1→3)-β-グルカンは、植物や菌類、酵母などにより生産される D-グルコースの C1 位と C3 位の水酸基がグリコシド結合した多糖類である (図 1.1.a)。(1→3)-β-グルカンの特徴として図 1.1.b のように三重らせん構造を取ること、C6 位の分岐構造により水への溶解性が異なることが挙げられる[1]。本研究で用いた直鎖状(1→3)-β-グルカンは、水に対しては不溶であるが、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン (DMI) やジメチルアセトアミド (DMAc) などのアミド系溶媒や、ジメチルスルホキシド (DMSO)、アルカリ溶液には溶解する。(1→3)-β-グルカンの三重らせん構造は、1 巻きが 6 個のグルコースユニットで構成され、C2 位の水酸基が内側を C6 位が外側を向く形で配置され、各 C2 位の水酸基同士は水素結合していることが分かっている[2,3,4]。湿度条件により、三重らせん間に水分子を取りこみ、可逆的に湿潤条件では水和結晶及び、乾燥条件では無水和結晶を取ることが分かっている。

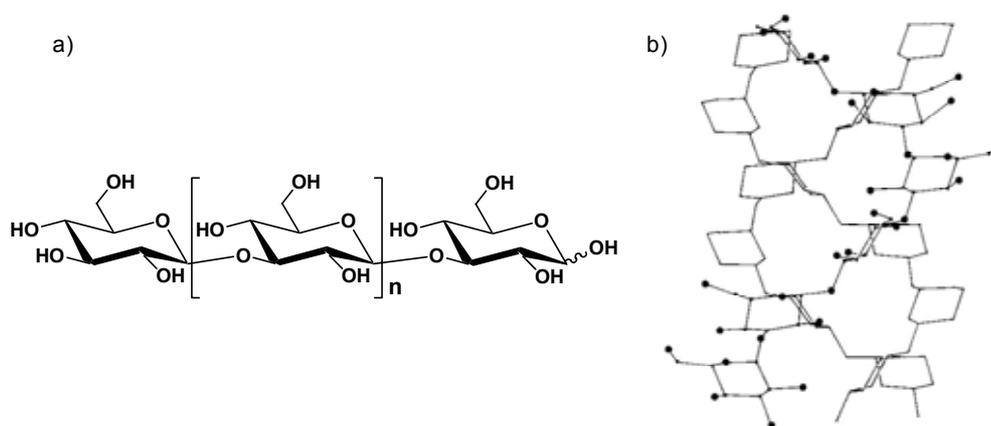


図1.1. (1→3)-β-グルカンの化学構造 (a)、及び三重螺旋構造 (b; Y. Deslandes, R. H. Marchessault, and A. Sarko (*Macromolecules*, 1980, 13, 1466-1471) より抜粋)

近年では、抗がん性、抗ウイルス性などの生理活性を示すとの研究報告から特に医療・医薬品分野への応用が期待されている材料である[29,30,31,32,33,34]。以下に、本研究で用いた直鎖状(1→3)-β-グルカンであるカードラン及びパラミロンについて記す。

カードランは、細菌類によって菌体外に生産される (1→3)-β-グルカンである[9,11]。1966 年に大阪大学産業科学研究所の原田篤也博士らによって発見され、加熱により凝

固する性質 (curdle) を持つことから、カードラン (curdlan) と命名された[28]。後に記すパラミロンと比較すると、精製時に溶解・再生を経ているために低結晶性である。また、アルカリ溶液や水懸濁液を熱することにより、不可逆性のゲルを与える[5]。食品添加物として認可が下りており、食用、工業用のほかゲル化機構の研究材料として、また近年では、抗がん活性を持つ多糖として注目されている[7,8,10]。

パラミロンは、*Euglena gracilis* (和名;ミドリムシ)等によって細胞質内に生産される(1-3)- β -グルカンである。1850年にGottlieb博士によって、スターチの異性体でありながら、ヨウ素デンプン反応を示さない物質であることから、paramylonと命名された[35]。扁平な顆粒状の形状をしており、長軸方向で1-3 μm の径を有している。三重らせん構造のフィブリルが高度に配向しているため、カードランと比べると高い結晶性を有している[3]。

1.2. TEMPO 触媒酸化

2,2,6,6-テトラメチルピペリジニル-1-オキシラジカル (TEMPO) 触媒酸化とは、共酸化剤存在下において、触媒量の TEMPO によりアルコールの酸化を行う手法である。この反応の利点として、多糖類に適用した場合には一般的な酸化反応と比べ、オキソアンモニウムイオンの立体障害により C6 位の 1 級水酸基が選択的に酸化可能であること、水系かつ温和な反応条件で反応が進むことが挙げられる。

良く用いられる反応条件として、常温、常圧、弱アルカリ条件において、共触媒として臭化ナトリウムを、主酸化剤として次亜塩素酸ナトリウムを用いて酸化する条件が挙げられる[15]。反応機構を図 1.2. に示す。この反応を多糖に応用した場合、C6 位の水酸基が選択的に酸化され、酸化剤が十分量ある条件ではアルデヒド基を介して、長くとも 2 時間以内に最終的にカルボキシル基まで酸化される[12,13,14]。この反応により得られる酸化多糖は、出発物質の固体構造などにより、次の二つに大別される。

一つは、再生セルロースなどから得られるポリグルクロン酸である。TEMPO 触媒酸化により得られるポリグルクロン酸は、水溶性で均一な化学構造を持つことが分かっている[15,16,17]。もう一つは、天然セルロースなどから得られる結晶表面のみが酸化さ

れた生成物である。天然セルロースの場合では、反応前と同じ形状を保ちながら、結晶表面に多数のカルボキシル基が存在するために、軽微な機械処理を施すことで、ナノオーダーのマイクロフィブリル単位まで分散することが見出されている[19]。

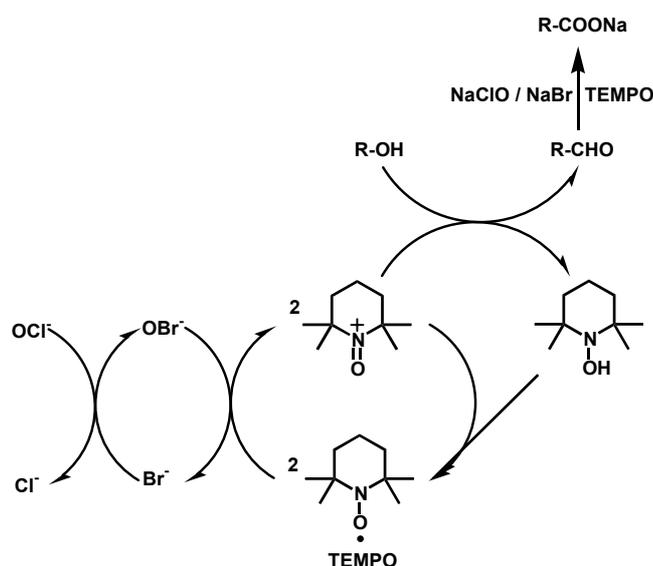


図1.2. 弱アルカリ下でのTEMPO触媒酸化の反応モデル

多糖類の弱アルカリ条件 TEMPO 触媒酸化の課題として、反応中における低分子化が避けられないことが挙げられる。特に、再生セルロースなどの最終的に水溶化する多糖ではその影響が顕著に現れ、反応生成物の重合度が元のと比べ、1 ケタ以上低下してしまうことが報告されている[17,23]。低分子化反応として、反応中間体であるアルデヒド基によるβ脱離反応[14,26,27]、反応中に生成される各種ラジカルによるグリコシド結合の開裂[23]、ピーリング反応による低分子化等、複数の反応が提案されているが、未だ特定されていない。これまで、低分子化を防ぐために様々な試みがなされてきたが、得られる水溶性ポリグルクロン酸の重合度は元の試料と比較すると、著しく低下していることから、反応条件として弱アルカリ条件が低分子化に影響を与えているのではないかと考えられる。

1.2.1 弱酸性下での TEMPO 触媒酸化

近年、アセトニトリル / 水系媒体中で、亜塩素酸ナトリウムを主酸化剤として用い、弱酸性下で反応させる TEMPO 触媒酸化が見出された[20,21]。提唱されている反応機構を図 1.3. に示す。まず弱アルカリ下の反応と同様に、次亜塩素酸ナトリウムによって活性化した TEMPO によって 1 級水酸基がアルデヒド基へと酸化され、続いて亜塩素酸ナトリウムによってアルデヒド基がカルボキシル基へと酸化される。亜塩素酸ナトリウムはアルデヒドを酸化したことにより、自身は還元され次亜塩素酸ナトリウムとなり、反応が進行していく。

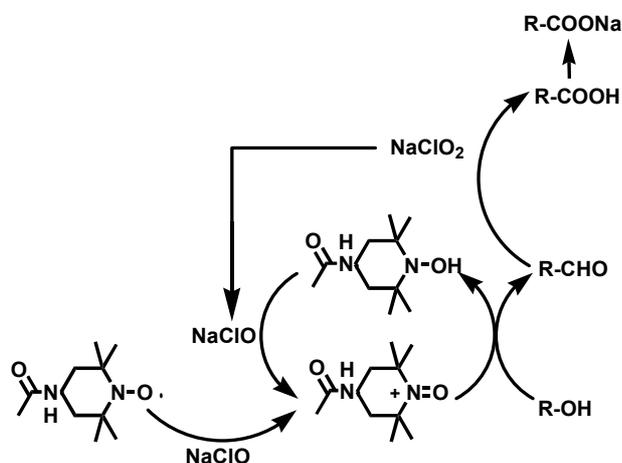


図1.3. 弱酸性下でのTEMPO酸化の反応モデル

報告によると、低分子化合物に水 / 有機溶媒中でこの反応を適用した場合、弱アルカリ下の反応と比べると、塩素化などの副反応が抑制でき、目的生成物の収率が增大すること、一方で反応時間が長くなることが報告されている。多糖に弱酸性下の TEMPO 触媒酸化を適用した場合、反応 pH が弱酸性であること、加熱が必要であることから、次のことが予測される。反応 pH が弱酸性のため、 β 脱離による低分子化が抑制される。このため、弱アルカリ性条件と比べ、高分子量のポリグルクロン酸を調製可能であること、高結晶性のパラミロンにおいて、結晶表面のみにカルボキシル基を導入可能であることが期待される。一方で、出発物質の多糖は酸に弱いいため、反応 pH や温度によっては酸加水分解による低分子化が起こる可能性がある。報告にある低分子アルコールと比

べると、多糖の分子量は非常に大きく、また一般的に水不溶性のため、反応時間が長くなる。したがって、反応時間、pH、温度などの反応条件が生成物にどのような影響を与えるか、検討する必要があった。

1.2.2. TEMPO 誘導体と pH による反応活性の違い

図 1.4. に示すように TEMPO には、4 位が置換された誘導体がいくつかあることが知られている[22]。4 位に異なる置換基を持つ TEMPO 誘導体を用いた場合でも、通常の TEMPO と同様に多糖の 1 級水酸基を選択的に酸化可能であることが分かっている[23]。一方で、4 位における置換基の違いによって、pH による反応活性が異なることが報告されている[22]。メチル- α -グルコピラノシドを出発物質として用い、次亜塩素酸ナトリウムを主酸化剤として反応させた結果では、4 位にアセトアミド基を持つ TEMPO 誘導体が他の誘導体と比べると、低い最適 pH を持つことが報告されている[22]。

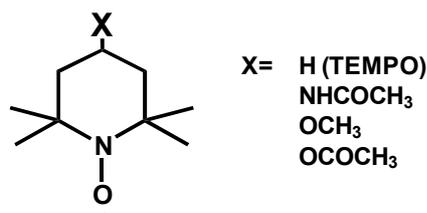


図1.4. TEMPO誘導体の化学構造

弱酸性下で TEMPO 触媒酸化を行うためには、弱酸性下での反応活性が落ちない TEMPO 誘導体が望ましい。したがって、今回は市販されている TEMPO 誘導体の内、低い pH においても、反応活性が高いと言われている 4-アセトアミド-TEMPO を用いて実験を行った。

1.3. 本研究の目的

これまで TEMPO を用いた多糖の酸化において、分子量が 100000 を超えるような高分子量の水溶性ポリマーを調製した報告例は存在しない。低分子化の要因の一つとされる反応 pH を弱アルカリ性から弱酸性にすることによって、低分子化を抑制し、高分子量の酸化多糖を得られると考えた。本研究において、水 / 有機溶媒系でかつ、低級アルコールに対してのみ報告例がある弱酸性下での TEMPO 触媒酸化を完全水系で(1-3)- β -グルカンに適用し、得られた生成物の分析を行うことにより、反応条件と生成物の分子

量や化学構造との相関性について、従来の弱アルカリ性条件下での反応と比較検討を行った。

また、TEMPO 触媒酸化を用いたナノフィブリルの調製は天然セルロースやキチンでしか確認されていない。弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用することで、高結晶性(1-3)- β -グルカンのパラミロンから三重らせん構造を有したナノフィブリルを調製出来るのではないかと考え、検討を行った。

1.4. 参考文献

- [1] Marchessault, R. H., & Deslandes, Y. (1979). Fine structure of (1→3)- β -D-glucans: Curdlan and paramylon. *Carbohydrate Research*, 75, 231–242.
- [2] Deslandes, Y., Marchessault, R. H., & Sarko, A. (1980). Triple-helical structure of (1→3)- β -D-glucan. *Macromolecules*, 13, 1466–1471.
- [3] Chuah, C. T., Sarko, A., Deslandes, Y., & Marchessault, R. H. (1983). Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. Part 14. Triple-helical crystalline structure of curdlan and paramylon hydrates. *Macromolecules*, 16, 1375–1382.
- [4] McIntire, T. M., & Brant, D. A. (1998). Observations of the (1→3)- β -D-glucan linear triple helix to macrocycle interconversion using noncontact atomic force microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 6909–6919.
- [5] Harada, T., Misaki, A., & Saito, H. (1968). Curdlan: a bacterial gel-forming β -1,3-glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 124, 292–298.
- [6] Gagnon, A., M., and Lafleur, M. (2007). From Curdlan Powder to the Triple Helix Gel Structure: An Attenuated Total Reflection-Infrared Study of the Gelation Process. *Applied Spectroscopy*, 61, 374–378.
- [7] Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., & Takeshige, K. (2002). Activation of macrophages by linear (1→3)- β -D-glucans - Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 36825–36831.
- [8] Yoshida, T., Htanaka, K., Uryu, T., Kaneko, Y., Suzuki, E., Miyano, H., Mimura, T., Yoshida, O., and Yamamoto, N. (1990). Synthesis and structural analysis of curdlan sulfate with a potent inhibitory effect in vitro of AIDS virus infection. *Macromolecules*, 23, 3717–3722

- [9] Pelosi, L., Bulone, V., and Heux, L. (2006). Polymorphism of curdlan and (1³)-b-glucans synthesized in vitro: A ¹³C CP-MAS and X-ray diffraction analysis. *Carbohydrate Polymers*, 66, 199-207.
- [10] Jagodzinski, P., P., Wiaderkiewicz, R., Kurawski, G., Kloczewiak, M., Nakashima, H., Hyjek, E., Yamamoto, N., Uryu, T., Kaneko, Y., Posner, R., M., Kozbor, D. (1994). Mechanism of the Inhibitory Effect of Curdlan Sulfate on HIV-1 Infection *in Vitro*. *Virology*, 202, 735-745.
- [11] Stasinopoulos, J., S., Fisher, R., P., Stone, A., B., and Stanisich, A., V. (1999). Detection of two loci involved in (1³)-^β-glucan (curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium* sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene. *Glycobiology*, 9, 31-41.
- [12] de Nooy A. E. J., and Besemer A. C. (1995). Selective oxidation of primary alcohols mediated by nitroxyl radical in aqueous solution. Kinetics and mechanism. *Tetrahedron*, 51, 8023-8032.
- [13] de Nooy, A. E. J., Besemer, A. C., & van Bekkum, H. (1995). Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. *Carbohydrate Research*, 269, 89-98.
- [14] de Nooy, A. E. J., Besemer, A. C., van Bekkum, H., van Dijk, J. A. P. P., & Smit, J. A. M. (1996). TEMPO-mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on the dimensions of obtained polyelectrolyte chains. *Macromolecules*, 29, 6541-6547.
- [15] Baitey, F., W., and Bobbitt, M., J. (2007). Mechanism of the Oxidation of Alcohols by Oxoammonium Cations. *J. Org. Chem.*, 72, 4504-4509.
- [16] Isogai, A., & Kato, Y. (1998). Preparation of polyuronic acid from cellulose by TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 5, 153-164.

- [17] Shibata, I., Yanagisawa, M., Saito, T., & Isogai, A. (2006). SEC-MALS analysis of cellouronic acid prepared from regenerated cellulose by TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 13, 73-80.
- [18] Kato, Y., Matsuo, R., & Isogai, A. (2003). Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system. *Carbohydrate Polymers*, 51, 69-75.
- [19] Saito, T., Nishiyama, Y., Putaux, J. L., Vignon, M., and Isogai, A. (2006). Homogeneous Suspensions of Individualized Microfibrils from TEMPO-Catalyzed Oxidation of Native Cellulose. *Biomacromolecules*, 7, 1686-1691
- [20] Zhao, M., Li, J., Mano, E., Song, Z., Tschaen, D. M., Grabowski, E. J. J., et al. (1999). Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by TEMPO and bleach. *Journal of Organic Chemistry*, 64, 2564-2566.
- [21] Zhao, M., Li, J., Mano, E., Song, Z., & Tschaen, D. M. (2005). Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by TEMPO and bleach: 4-methoxyphenylacetic acid. *Organic Syntheses*, 81, 195-199.
- [22] Bragd, P. L., Besemer, A. C., & van Bekkum, H. (2001). TEMPO-derivatives as catalysts in the oxidation of primary alcohol groups in carbohydrates. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 170, 35-42.
- [23] Shibata, I., and Isogai, A. (2003). Nitroxide-mediated oxidation of cellulose using TEMPO derivatives: HPSEC and NMR analyses of the oxidized products. *Cellulose*, 10, 335-341.
- [25] J. C. Morris (1966). The Acid Ionization Constant of HOCl from 5 to 35°. *J. Phys. Chem.*, 70, 3798-3805.
- [26] Potthast, A., Rosenau, T., & Kosma, P. (2006). Analysis of oxidized functionalities in cellulose. *Polysaccharides II*, 205, 1-48.

- [27] Röhring, J., Lange, T., Potthast, A., Rosenau, T., Sixta, H., Kosma, P. (2001). Novel methods to determine carbonyl functions in cellulosic substances. Proceedings of the Post-Symposium 11th International Symposium on Wood Pulping Chemistry, Grenoble, June 18-19, (pp. 94-97).
- [28] Hrada, T., Masada, M., Hidaka, H., and Takada, M. (1966). *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 mutant K による加熱凝固性多糖類の生産. *Journal of Fermentation Technology*, 44, 20-24
- [29] Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., & Takeshige, K. (2002). Activation of macrophages by linear (1→3)- β -D-glucans - Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 36825-36831.
- [30] Ohya, Y., Nishimoto, T., Murata, J., & Ouchi, T. (1994). Immunological enhancement activity of muramyl dipeptide analogue CM-curdlan conjugate. *Carbohydrate Polymers*, 23, 47-54.
- [31] Ooi, V. E. C., & Liu, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 715-729.
- [32] Suzuki, T., Ohno, N., Adachi, Y., Cirelli, A. F., Covian, J. A., & Yadomae, T. (1991). Preparation and biological activities of sulfated derivatives of (1→3)- β -D-glucans. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 14, 256-266.
- [33] Usui, S., Matsunaga, T., Ukai, S., & Kiho, T. (1997). Growth suppressing activity for endothelial cells induced from macrophages by carboxymethylated curdlan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 1924-1925.
- [34] Vismar, R., Vestri, S., Frassanito, A. M., Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2004). Stress resistance induced by paramylon treatment in *Artemia* sp.. *Journal of Applied Physiology*, 16, 61-67.

[35] Gottlieb, J. (1850). Ueber eine neue, mit Starkmehl isomere Substanz. *Ann Chem Pharm* ,
75, 51–61.

2. 弱アルカリ性条件における(1→3)- β -グルカンの TEMPO 触媒酸化

2.1. 研究背景

(1→3)-β-グルカンは自然界に広く存在し、植物や菌類、酵母、細菌類などによって生産されている[6, 21]。本研究で用いたパラミロンとカードランは、直鎖状(1→3)-β-グルカンであり、室温ではどちらも水不溶性である。パラミロンは *Euglena gracilis* によって生産される顆粒状の多糖であり、高い結晶性(約90%)を持つ。カードランは、細菌により菌体外に生産される多糖であり、精製において溶解・再生を経るため、パラミロンと比較すると低結晶性(約30%)である[22]。X線回折や固体¹³C-NMRによるパラミロン及びカードランの水和及び乾燥状態における結晶や固体構造解析から、これらの(1→3)-β-グルカンの三重らせん構造を有していることが明らかにされてきた[10, 22, 5, 12, 20]。

近年では、(1→3)-β-グルカンの持つ免疫調節作用や、抗ガン作用などの生理活性に着目し、生体医療分野への応用が期待されている[3, 18, 23, 26, 34, 36]。これらの分野に(1→3)-β-グルカンをを用いるに当たって課題となるのが、(1→3)-β-グルカンの水可溶性であり、特に直鎖状(1→3)-β-グルカンであるパラミロンやカードランは水不溶性であるため、化学的手法により水可溶化させる必要がある。従来はパラミロンやカードランの水酸基の一部に硫酸基やカルボキシメチル基などの親水性の高い官能基を導入し、誘導体化させることで水可溶性を与えてきた[13, 25, 31, 33]。

本章では、2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド(TEMPO)を触媒量用い、多糖のC6-OHを選択的に酸化する手法(TEMPO触媒酸化)に注目した[4, 7, 2]。水不溶性のβ-シクロデキストリンやキチン、再生セルロースにTEMPO触媒酸化を適用すると、C6-OHの一部もしくはほぼ全てがカルボキシ基へと酸化されたポリグルクロン酸となり、水可溶化することが報告されている[11, 16, 19, 24]。そこで、本章では弱アルカリ性TEMPO触媒酸化をパラミロン及びカードランに適用し、水可溶性のポリグルクロン酸を調製することを目的とし、得られたTEMPO触媒酸化生成物の化学構造や分子量について詳細な検討を行った。

2.2. 出発物質及び実験手法

2.2.1. 出発物質

市販のパラミロン及びカードラン (Wako Pure Chemicals, Japan) を出発物質として用いた。TEMPO、臭化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム水溶液及び他の試薬は市販 (Wako Pure Chemicals, Japan) されているものを精製せずに用いた。

2.2.2. TEMPO 触媒酸化

パラミロン又はカードラン(2 g)を脱イオン水(200 ml)中に分散させ、TEMPO(0.032 g, 0.2 mmol)及び臭化ナトリウム(0.2058 g, 2 mmol)を加えて室温で十分攪拌した。所定量の次亜塩素酸ナトリウムを添加することで反応を開始させた。反応中は、pH スタットを用いて0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液を滴下させ、反応 pH を 10 に保った。水酸化ナトリウム水溶液の消費が見られなくなった時を反応終点とし、透析により精製を行い、凍結乾燥を経て、90%程度の収率で反応生成物を得た。

2.2.3. 酸加水分解

パラミロン又はカードラン(0.5 g)を2 M 塩酸(50 ml)に分散させ、80 °C に設定したオーブン中で4時間反応させた。遠心分離により残渣成分を分離し、脱イオン水を用いて洗浄し、塩酸を除去した。続いてアセトンに溶媒置換し、60 °C で1日真空乾燥した。酸加水分解物の収率は、パラミロンが82%、カードランが66%であった。

2.2.4. 位相差顕微鏡観察

試料(元のパラミロン又はカードラン、及びそれらの酸化物)を蒸留水に分散させ、1%水分散液を調製した。水分散液をスライドグラスに滴下し、カバーガラスをかけてプレパラートを作製し、観察に供した。観察にはBX-50(OLYMPUS, Japan)に位相差コンデンサ及び位相差用対物レンズを組み合わせて用いた。

2.2.5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

2.2.4 で作成した 1%水分散液をカバーガラスを貼付した SEM マウント上にキャストし、乾燥させた後、白金スパッタコーターによりコートし観察に供した。S-4000 SEM (Hitachi, Japan) を用い、加速電圧 10 kv として観察を行った。

2.2.6. SEC-MALLS 分析

元のパラミロン及びカードラン、また 2.2.3.で調製した酸加水分解物の重量平均分子量 (M_n) 及び重量平均分子量 (M_w) を測定するためにサイズ排除クロマトグラフィー・多角度光散乱 (SEC-MALLS) を用いた。SEC-MALLS は SEC システムとして、オンラインデガッサー (DGU-12A; Shimadzu, Japan)、高圧ポンプ (LC-10ADVP; Shimadzu, Japan)、サンプル注入器 (Model 7125; Rheodyne, U.S.A.)、カラム、カラムオープン (CTO-10ACVP; Shimadzu, Japan)、屈折率検出器 (RID-10A; Shimadzu, Japan) から構成されているものに MALLS 検出器 (DAWN, $\lambda=690$ nm; Wyatt Technologies, U.S.A.) を付属したものをを用いた。SEC パターンは流速 0.5 ml/min で検出した。MALLS の設定に関しては(1-3)- β -グルカンがセルロースと同じ β -グルコースを構成単位としているため、 dn/dc として、セルロースの 1% LiCl/DMI 溶液の dn/dc 値である 0.087 ml/g を用い、各パラメーターを算出した[37]。本測定では、1% LiCl/DMI (1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン) を溶離液とし、カラムに KD-806M (Shodex, Japan) を用いた。測定試料の調製は試料を濃度が 0.1%となるように 1% LiCl/DMI に分散させた後、オイルバス中で 10 分間 100 に加熱することで溶解させた。これらの試料を孔径 0.2 μm のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) メンブレン (Millipore, U.S.A.) を用いてろ過し、測定に供した。試料注入前に、ポリスチレン (M_w 30000) を用いて MALLS 検出器と屈折率検出器の較正及び正規化を行った。 M_n 及び M_w の算出には解析ソフトウェアとして、ASTRA (Wyatt Technologies, U.S.A.) を用いた。

また、TEMPO 触媒酸化により水溶化した生成物の M_n 及び M_w を測定するために、0.1 M 塩化ナトリウム水溶液を溶離液とし、上記と同様のシステムを用いて SEC-MALLS 測定を行った。カラムは DB-806MHQ (Shodex, Japan) を用い、MALLS 検出器の設定のために TEMPO 触媒酸化(1-3)- β -グルカンと構成単位が同じである水可溶

性 TEMPO 触媒酸化セルロース（セロウロン酸）の dn/dc 値である 0.125 ml/g を用いて各種パラメーターの算出を行った[31]。

2.2.7. 他の測定手法

カルボキシル基量を測定するために、電気伝導度滴定を行った。手法としては 0.1 g 精秤した試料を蒸留水 50 ml に溶解させた後、pH をポリグルクロン酸の pK_a よりも十分に低い 2.0 まで 0.2M 塩酸を滴下して調製し、0.05 M 水酸化ナトリウム水溶液を自動ビュレット(ABT-511, TOA-DKK, Japan)及び自動滴定装置(AUT-501, TOA-DKK, Japan)により定速で滴下して測定を開始した。測定にはマルチ水質計 (MM-60R, TOA-DKK, Japan)に pH 電極(GST-5741C, TOA-DKK, Japan)、伝導度電極(CT-57101B, TOA-DKK, Japan)を接続して用いた。得られた電気伝度曲線より、カルボキシル基量を算出した[29]。

TEMPO 触媒酸化前後における化学構造の変化を調べるため、ALPHA-500 (JEOL, Japan) を用いて ^{13}C -NMR 測定を行った。元のパラミロン及びカードランは重ジメチルスルホキシド (DMSO- d_6) に 100 で数分間攪拌することで溶解させ、標準物質としてテトラメチルシランを用いて測定に供した。水可溶性の TEMPO 触媒酸化(1-3)- β -グルカンには重水 (D_2O) に溶解させ、3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸ナトリウムを標準物質として用いて測定に供した。積算回数を 25000 回とし、測定データは解析ソフトウェア (Delta; JEOL, Japan) を用いてデータ処理を行った。

結晶構造の変化を調べるために、X 線回折測定を行った。試料を 24 時間真空乾燥した後、0.1 g を精秤し、ペレット成型機にて 750 MPa で 1 分間保持することによりペレットを成型し、RINT 2000 (Rigaku, Japan) による測定に供した。CuK α 線 (波長 0.15418 nm) を用い、加速電圧を 40 kV、加速電流を 40 mA に設定し、ステップ幅を $2\theta = 0.1^\circ$ 、積算時間を 10 秒間として、 $2\theta = 3-30^\circ$ まで測定を行った。

2.3. 結果及び考察

2.3.1. パラミロン及びカードランの TEMPO 触媒酸化

パラミロン及びカードランの TEMPO 触媒酸化は、室温条件で所定量の次亜塩素酸ナトリウムを主酸化剤として用い、触媒量の TEMPO 及び臭化ナトリウム存在下で、水酸化ナトリウム水溶液が消費されなくなるまで行われた。試料の C6 位の水酸基をすべて酸化するために必要な次亜塩素酸ナトリウムの量は、化学量論的に試料 1 g に対して、12.3 mmol である。しかしながら、反応容器を密栓せずに反応を行ったため、反応中に一部の次亜塩素酸ナトリウムが蒸発することを考慮に入れ、化学等量に対し、約 20% 過剰な次亜塩素酸ナトリウム (15 mmol/g) を添加して反応を行った。

図 2.1. に示すように、反応前のパラミロンの顆粒形状は 1-5 μm であったが、TEMPO 触媒酸化後では顆粒のサイズが小さくなるとともに顆粒を中心に構造がほぐれた様子が観察され、次亜塩素酸ナトリウム添加量が増えるに従って、より構造がほぐれていた。更に詳しく見てみると、TEMPO 触媒酸化後でも一部顆粒形状が残っていることから、反応が顆粒の外側から進んでいると考えられる。パラミロンの場合では、次亜塩素酸ナトリウム添加量が 7.5 mmol/g の条件でも酸化物は水不溶性であり、顆粒形状が一部残存していることが確認されたが、カードランの場合では、同じ次亜塩素酸ナトリウム添加条件で水可溶化したことが分かった。次亜塩素酸ナトリウム添加量 3.8 mmol/g では、反応前のカードランの形状は観察されなかったが、一部水不溶性のままであった(図 2.1.)。

次亜塩素酸ナトリウム添加量と反応時間及び C6 位の水酸基の酸化度、また結晶化度もしくは水可溶化したかについて表 2.1. にまとめた。電気伝導滴定から、TEMPO 触媒酸化により C6 位の水酸基が酸化され、カルボキシル基となったことが分かった。パラミロン及びカードランから、TEMPO 触媒酸化によって水可溶性酸化物が定量的に得られた。すべての C6 位の 1 級水酸基が次亜塩素酸ナトリウム 15 mmol/g 添加条件の TEMPO 触媒酸化によって、カルボキシル基に酸化されたことから、この反応がほぼ化学量論的に進んだとみられる。特にカードランの場合には、62%の C6 位水酸基が酸化された次亜塩素酸ナトリウム 7.5 mmol/g の添加条件でも、反応生成物は水可溶化した。

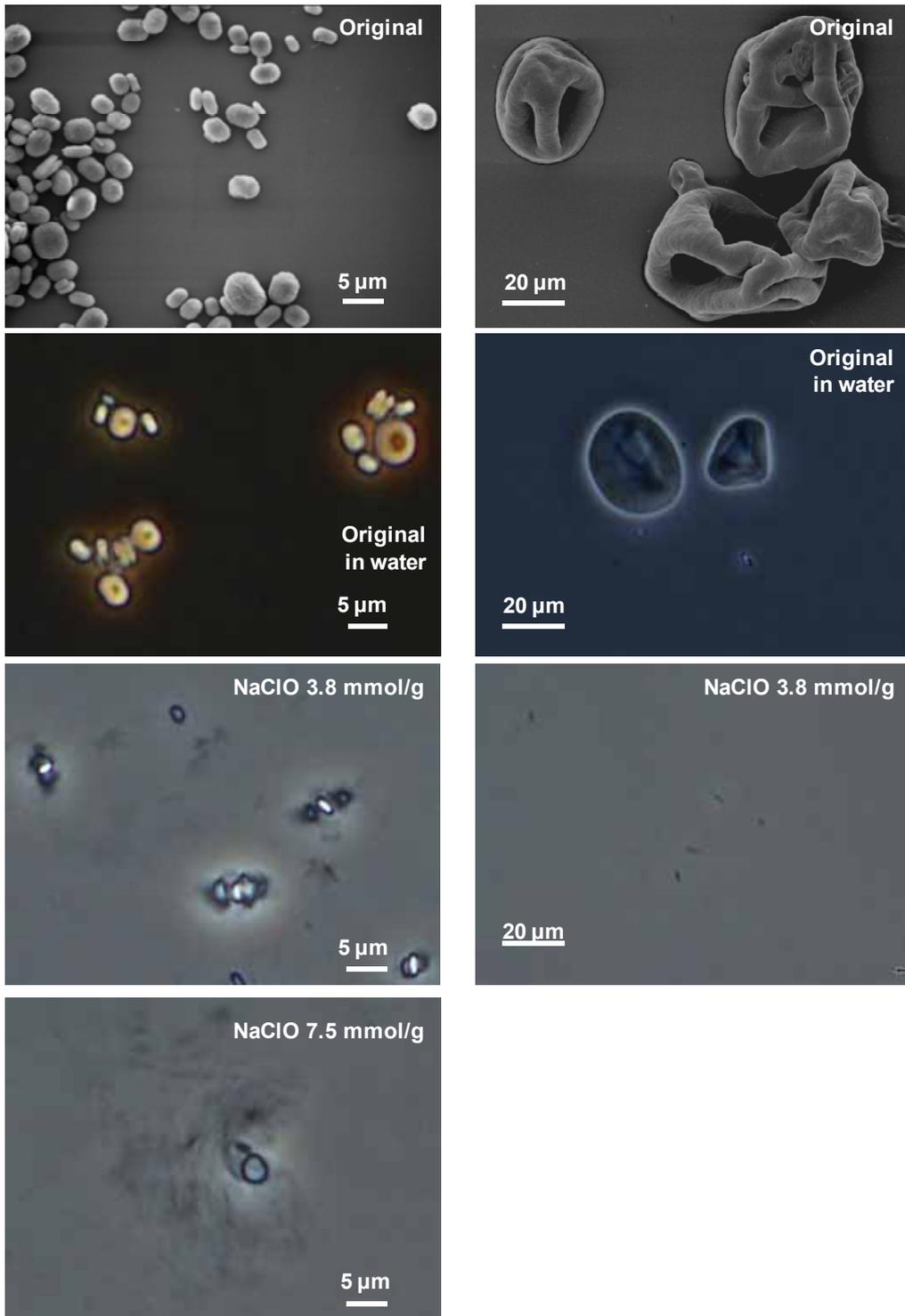


図2.1. 元のパラミロンのSEM画像及びTEMPO触媒酸化パラミロンの位相差顕微鏡像(左段)。元のカードランのSEM画像及びTEMPO触媒酸化カードランの位相差顕微鏡像(右段)

表2.1. TEMPO触媒酸化反応条件と、反応生成物の各種特性

| | NaClO added (mmol/g) | Reaction time (min) | Ratio of C6 carboxylate group | Crystallinity Index | Water- solubility |
|--------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------|
| Paramylon | 0.0 | 0 | 0.01 | 0.47 | - |
| Oxidized paramylon | 3.8 | 10 | 0.22 | 0.05 | - |
| Oxidized paramylon | 7.5 | 20 | 0.43 | 0.00 | - |
| Oxidized paramylon | 15.0 | 100 | 1.00 | 0.00 | + |
| Curdlan | 0.0 | 0 | 0.02 | 0.28 | - |
| Oxidized curdlan | 3.8 | 5 | 0.28 | 0.02 | - |
| Oxidized curdlan | 7.5 | 15 | 0.62 | 0.00 | + |
| Oxidized curdlan | 15.0 | 50 | 1.00 | 0.00 | + |

表 2.1.のデータをグラフ化したのが図 2.2.である。TEMPO 触媒酸化パラミロン、カードランのどちらの場合でも、次亜塩素酸ナトリウムの添加量に従って導入されたカルボキシル基量は増加したが、カードランの方がわずかではあるが導入量が多かった。特に次亜塩素酸ナトリウムが消費されつくすまでの時間を比べてみると、次亜塩素酸ナトリウム添加量 15 mmol/g の条件ではカードランはパラミロンの半分の時間で反応が終了していたことが分かった。したがって、パラミロンの方がカードランと比べると酸化反応に対する抵抗性が強く、このことはパラミロンの高い結晶性に起因するものと考えられる。結晶性に関しては、2.3.2.においてX線回折を用いてより詳細に検討する。

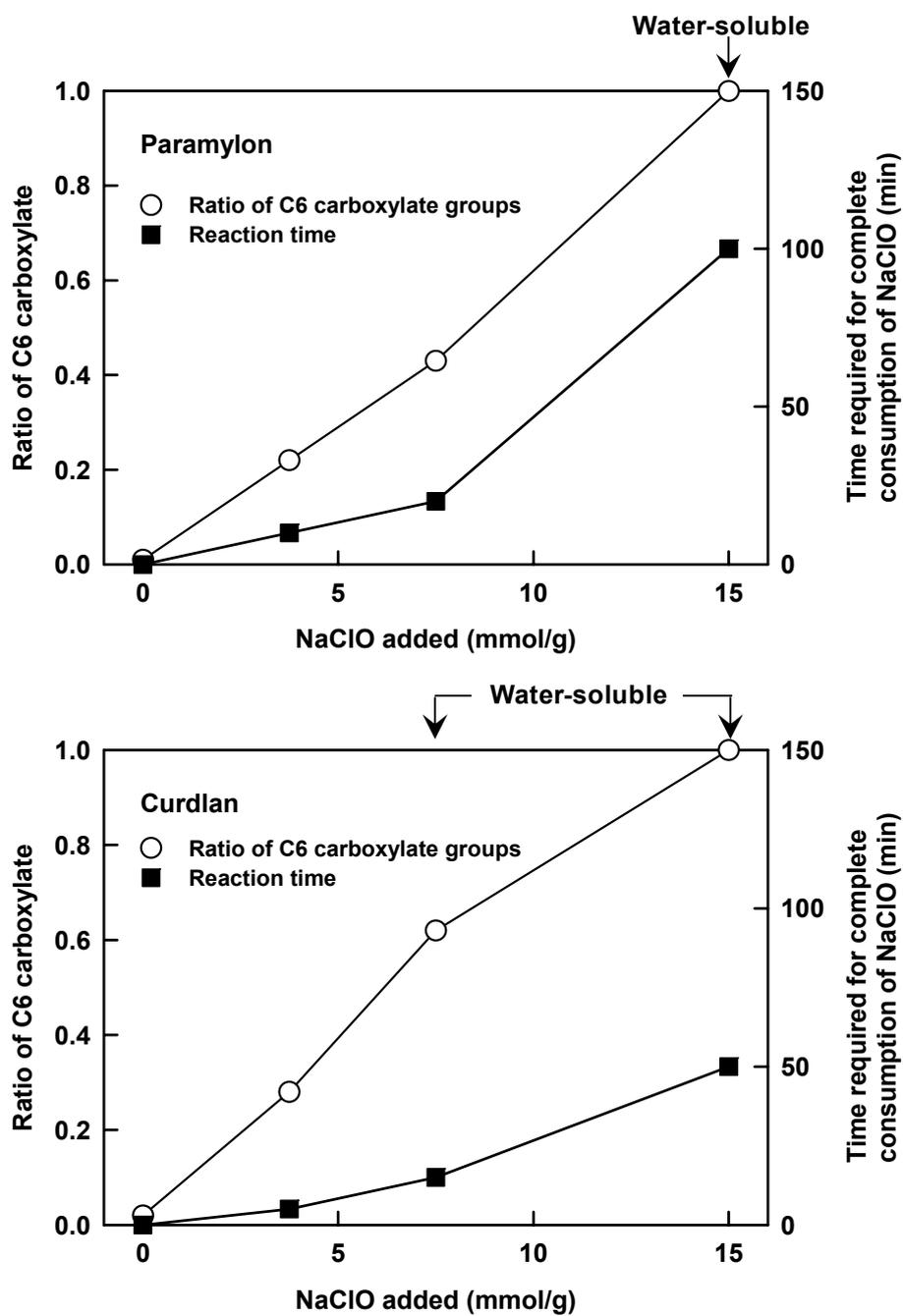


図2.2. TEMPO触媒酸化パラミロン及びカードランのC6-OHの酸化度と、各種次亜塩素酸ナトリウム添加量における反応終了時間

2.3.2. TEMPO 触媒酸化生成物の構造解析

図 2.3.には元のパラミロン及びカードラン (DMSO-*d*6 溶液)、TEMPO 触媒酸化生成物 (D₂O 溶液) の ¹³C-NMR スペクトルを示す。元のパラミロン及びカードランのスペクトルには、6 つの単一シグナルしか確認できないことから、これらの多糖が分岐を持たない直鎖状(1→3)-β-グルカンであることを示している。次亜塩素酸ナトリウム添加量 15 mmol/g 条件で TEMPO 触媒酸化して得られた生成物のスペクトルでは、60 ppm 付近に C6 位由来のシグナルが確認されず、一方で、カルボキシル基に由来するシグナルが 175 ppm 付近に確認された。このことから、パラミロン及びカードランのすべての C6 位の 1 級水酸基が、TEMPO 触媒酸化によってカルボキシル基へと酸化されたことが分かった。次亜塩素酸ナトリウム添加量 7.5 mmol/g の添加条件で TEMPO 触媒酸化したカードランでは、カルボキシル基由来のシグナルも、元の C6 位由来のシグナルも確認された。ここで、カルボキシル基由来のシグナル面積と元の C6 位由来のシグナル面積の和に対するカルボキシル基由来のシグナル面積の比率を求めると、0.7 であった。この値は表 2.1.に示した電気伝導度より算出した酸化度 0.62 と近い値であった。

一方で、次亜塩素酸ナトリウム添加量 15 mmol/g 条件で調製した TEMPO 触媒酸化生成物には、71, 74, 94, 96 ppm 付近に小さなシグナルが確認された。これらの小さなシグナルはアノマー炭素由来と考えられ、反応中に(1→3)-β-グルカンのグリコシド結合が開裂したことを示している。このような、C2 位もしくは C3 位におけるケトンの生成や低分子化などの副反応が弱アルカリ条件下での TEMPO 触媒酸化において起こることが報告されている[27, 28]。しかしながら、パラミロン及びカードランの TEMPO 触媒酸化により、β-1,3 結合のグルクロン酸からなるほぼ均一なポリグルクロン酸を調製することができたと結論づけられる。よって、パラミロン及びカードランより調製したポリグルクロン酸をそれぞれ、パラウロン酸、カーデュロン酸と名付けた。

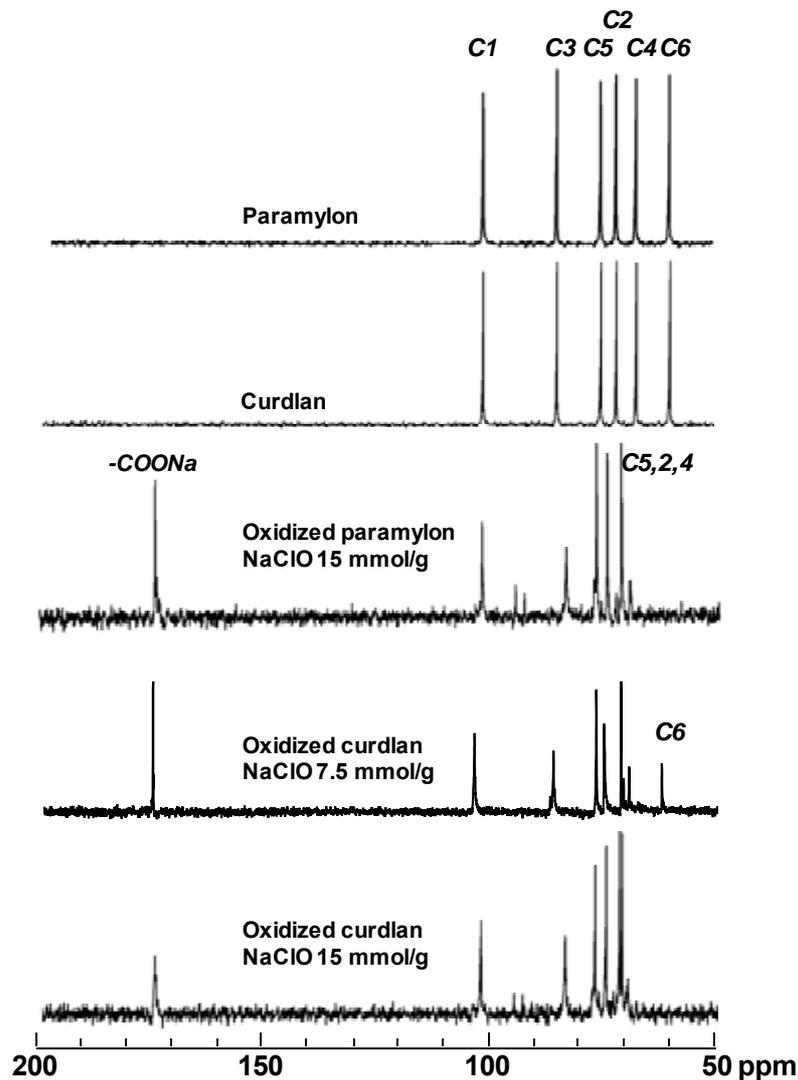


図2.3. 元のパラミロン及びカードラン (DMSO- d_6)、TEMPO触媒酸化パラミロン及びカードランの ^{13}C -NMRスペクトル

TEMPO 触媒酸化前後における(1-3)- β -グルカンの X 線回折パターンを図 2.4. に示す。元のパラミロンはカードランと比べて、明らかに高い結晶性を持つことが分かる。TEMPO 触媒酸化物の結晶性は、パラミロン、カードランのいずれも次亜塩素酸ナトリウム添加量が増加するに従って低下した。しかしながら、パラミロンはカードランと比較すると次亜塩素酸ナトリウムの同じ添加条件における酸化物の結晶性が高いことから、パラミロンの高結晶性がパラミロンに対する TEMPO 触媒酸化の反応性を抑制していることが分かった。C6 位の水酸基が完全に酸化された条件 (次亜塩素酸ナトリウム

添加量 ; 15 mmol/g) では、共に非晶性の構造となっていた。これは、再生セルロースから TEMPO 触媒酸化によって調製したポリグルクロン酸 (セルウロン酸) と同様の挙動であった。

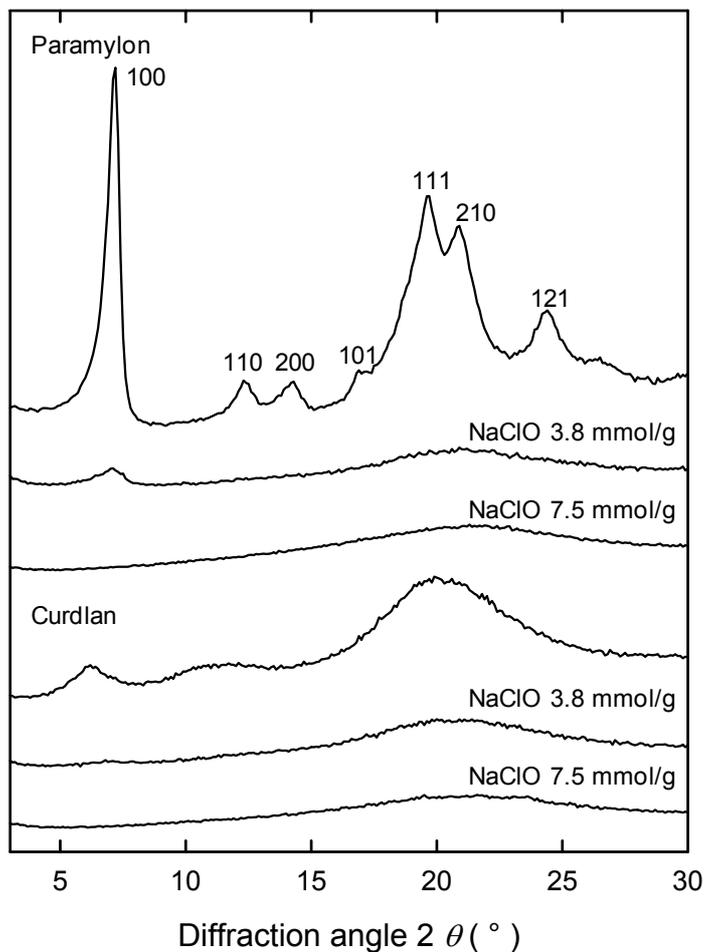


図2.4. TEMPO触媒酸化前後でのパラミロン及びカードランのX線回折パターン

2.3.3. TEMPO 触媒酸化物の分子量

水溶性のパラウロン酸及びカーデュロン酸の分子量は0.1 M塩化ナトリウム水溶液を溶離液とした SEC-MALLS 測定によって求めた。一方で、元のパラミロン及びカードラン、またこれらの酸加水分解物は、1% LiCl/DMI 溶液に 100 付近まで加熱することで溶解させ、1% LiCl/DMI 溶液を溶離液とした SEC-MALLS 測定に供した。調製した(1

3)- β -グルカン溶液は、室温に冷やした後も溶解状態を保っていた。測定した重量平均、数平均重合度 (DP_w 及び DP_n) は表 2.2.にまとめた。表 2.2.から、元のカードランの DP_w は 6790 であるのに対し、パラミロンは 1670 と 1/4 程度であった。一方で、酸加水分解後の DP_w を比較してみると、カードランは 270 と元の試料の 1/25 程度まで低分子化しているのに対し、パラミロンは 1010 であった。パラミロンの高い結晶性は、酸加水分解に対しても高い抵抗性を示すことが示された。

水可溶性パラウロン酸及びカーデュロン酸の DP_w はそれぞれ、68 と 86 であった。従って、TEMPO 触媒酸化によって著しい低分子化が起こったことが分かった。再生セルロースの pH 10 における TEMPO 触媒酸化では、得られたセロウロン酸の DP_w は 40 と再生セルロースの酸加水分解によるレベルオフ重合度と同じ値のものが得られている[15]。しかしながら、パラミロンやカードランの場合には、TEMPO 触媒酸化生成物の重合度と、酸加水分解物の重合度には相関が見られない。したがって、(1-3)- β -グルカンの TEMPO 触媒酸化による低分子化には、レベルオフ重合度以外の要素(反応中に生成するラジカル種など)が関係していることが考えられる。また、TEMPO 触媒酸化パラミロンの方が TEMPO 触媒酸化カードランと比べて低分子量だったのは、パラミロンの方が次亜塩素酸ナトリウムを消費するまでの時間が長かったためだと考えられる。

表2.2. 元のパラミロン及びカードラン、酸加水分解物、TEMPO触媒酸化物の数平均及び重量平均分子量 (M_n 及び M_w)と数平均及び重量平均重合度 (DP_n 及び DP_w)

| | M_n | (DP_n) | M_w | (DP_w) | M_w/M_n |
|--------------------------|---------|------------|-----------|------------|-----------|
| Paramylon | 212,000 | (1,310) | 270,000 | (1,670) | 1.37 |
| Acid-hydylyzed paramylon | 99,300 | (610) | 164,000 | (1,010) | 1.66 |
| Sodium parauronate | 9,920 | (50) | 13,600 | (68) | 1.26 |
| Curdlan | 890,000 | (5,500) | 1,100,000 | (6,790) | 1.24 |
| Sodium curduronate | 29,900 | (180) | 43,300 | (270) | 1.45 |
| TEMPO-oxidized curdlan | 13,500 | (68) | 17,000 | (86) | 1.26 |

SEC-MALLS により求めた重合度分布を図 2.5.に示す。すべての試料において、複数のピークやショルダーピークは確認されず、単分散のピークのみが得られたことから、溶離液に溶解していた。TEMPO 触媒酸化生成物の重合度は 68-86 程度であったが、これらの生成物は β -1,3 結合や水可溶性に由来した生物活性が期待できる。

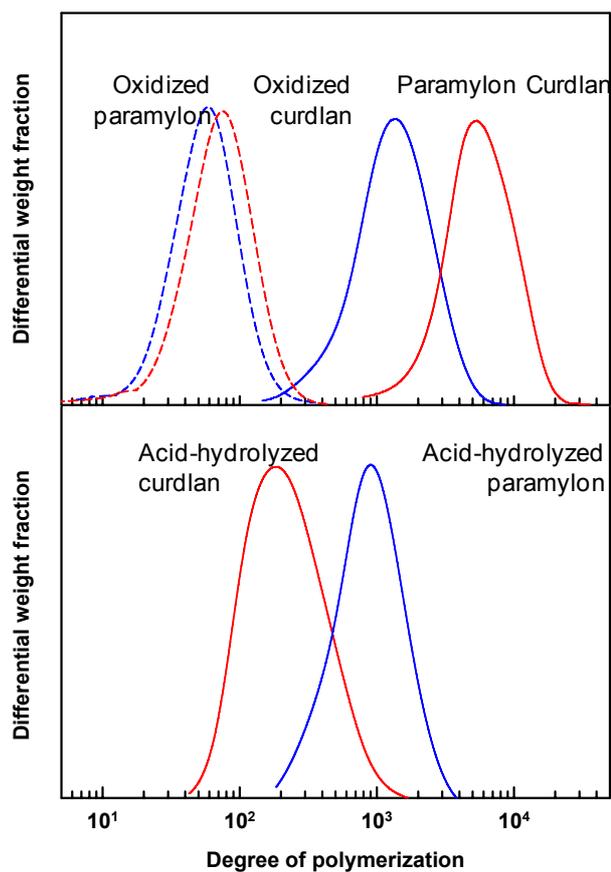


図2.5. 元のパラミロン及びカードラン、酸加水分解物、TEMPO 触媒酸化物の重合度分布

2.4. 結論

水不溶性のパラミロン及びカードランから、TEMPO/NaBr/NaClO システムによって水系、pH 10 という条件で水可溶性の生成物を得ることに成功した。次亜塩素酸ナトリウム 15 mmol/g の添加条件で、ほぼすべての C6 位の 1 級水酸基が酸化され、カルボキシル基へと酸化された。また、この反応はパラミロン及びカードランのどちらでも 100 分以内に完了したが、パラミロンは結晶性がカードランよりも高いために C6 位をすべて酸化するためにより長時間を必要とした。このように、 β -1,3 結合のほぼ均一な構造を持つポリグルクロン酸ナトリウム塩が、TEMPO 触媒酸化により化学量論的に調製することができた。一方で、反応中に β -1,3 グリコシド結合の開裂によって、著しい低分子化が起こり、得られた水可溶性生成物の重合度はパラミロン及びカードランでそれぞれ、68、86 となってしまった。パラミロン及びカードランは、(1 \rightarrow 3)- β -グルカンであるので、TEMPO 触媒酸化によって C6、C2 や C4 の水酸基が、アルデヒド基またはケトン基へと酸化されたとしても、 β 脱離反応による低分子化は起こらない。従って、弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化中にパラミロン及びカードランが著しく低分子化してしまう原因は、 β 脱離反応ではなく他の要因、おそらくは反応中に生成したラジカル種によるものであると考えられる[30,31]。

2.5. 参考文献

- [1] ASTRA for Windows user's guide version 4.90.
- [2] Barbosa, A. M., Steluti, R. M., Dekker, R. F., Cardoso, M. S., & da Silva, M. L. C. (2003). Structural characterization of Botryosphaeran: A (1→3,1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.. *Carbohydrate Research*, 338, 1694–1698.
- [3] Bohn, J. A., & BeMiller, J. N. (1995). (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: A review of structure–functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28, 3–14.
- [4] Bragd, P. L., van Bekkum, H., & Besemer, A. C. (2004). TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: Survey of methods and applications. *Topics Catalysis*, 27, 49–66.
- [5] Chuah, C. T., Sarko, A., Deslandes, Y., & Marchessault, R. H. (1983). Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. Part 14. Triple-helical crystalline structure of curdlan and paramylon hydrates. *Macromolecules*, 16, 1375–1382.
- [6] Clarke, A. E., & Stone, B. A. (1960). Structure of the paramylon from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 44, 161–163.
- [7] De Nooy, A. E. J., Besemer, A. C., & van Bekkum, H. (1995). Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. *Carbohydrate Research*, 269, 89–98.
- [8] de Nooy, A. E. J., Besemer, A. C., van Bekkum, H., van Dijk, J. A. P. P., & Smit, J. A. M. (1996). TEMPO-mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on the dimensions of obtained polyelectrolyte chains. *Macromolecules*, 29, 6541–6547.
- [9] Desai, R. N., & Blackwell, L. F. (2003). TEMPO-mediated regiospecific oxidation of glycosides to glucuronides. *Synlett*, 13, 1981–1984.

- [10] Deslandes, Y., Marchessault, R. H., & Sarko, A. (1980). Triple-helical structure of (1→3)- β -D-glucan. *Macromolecules*, 13, 1466-1471.
- [11] Fraschini, C., & Vignon, M. R. (2000). Selective oxidation of primary alcohol groups of β -cyclodextrin mediated by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical (TEMPO). *Carbohydrate Research*, 328, 585-589.
- [12] Fyfe, C. A., Stephenson, P. J., Taylor, M. G., Bluhm, T. L., Deslandes, Y., & Marchessault, R. H. (1984). Hydration effects in the ^{13}C CP/MAS NMR spectra of solid (1→3)- β -D-glucans. *Macromolecules*, 17, 501-502.
- [13] Gao, F.-P., Zhang, H.-Z., Liu, L.-R., Wang, Y.-S., Jiang, Q., Yang, X.-D., et al. (2008). Preparation and physicochemical characteristics of self-assembled nanoparticles of deoxycholic acid modified-carboxymethyl curdlan conjugates. *Carbohydrate Polymers*, 71, 606-613.
- [14] Hirokawa, Y., Fujiwara, S., Suzuki, M., Akiyama, T., Sakamoto, M., Kobayashi, S., et al. (2008). Structural and physiological studies on the storage β -polyglucan of haptophyte *Pleurochrysis haptoneofera*. *Planta*, 227, 589-599.
- [15] Isogai, T., Yanagisawa, M., & Isogai, A. (2009). Degrees of polymerization (DP) and DP distribution of cellouronic acids prepared from alkali-treated celluloses and ball-milled native celluloses by TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 16.
- [16] Isogai, A., & Kato, Y. (1998). Preparation of polyuronic acid from cellulose by TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 5, 153-164.
- [17] Johansson, L., Virkki, L., Maunub, S., Lehto, M., Ekholm, P., & Varo, P. (2000). Structural characterization of water-soluble β -glucan of oat bran. *Carbohydrate Polymers*, 42, 143-148.
- [18] Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., & Takeshige, K. (2002). Activation of macrophages by linear (1→3)- β -D-glucans - Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 36825-36831.

- [19] Kato, Y., Kaminaga, J., Matsuo, R., & Isogai, A. (2004). TEMPO-mediated oxidation of chitin, regenerated chitin and N-acetylated chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 58, 421–426.
- [20] Kiss, J. Z., Roberts, E. M., Brown, R. M., Jr., & Triemer, R. E. (1988). X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. *Protoplasma*, 146, 150–156.
- [21] Manners, D. J., Masson, A. J., & Patterson, J. C. (1973). Structure of a β -(1 \rightarrow 3)-Dglucan from yeast-cell walls. *The Biochemical Journal*, 135, 19–30.
- [22] Marchessault, R. H., & Deslandes, Y. (1979). Fine structure of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans: Curdlan and paramylon. *Carbohydrate Research*, 75, 231–242.
- [23] McIntire, T. M., & Brant, D. A. (1998). Observations of the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan linear triple helix to macrocycle interconversion using noncontact atomic force microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 6909–6919.
- [24] Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Cosani, A., & Terbojevich, M. (1999). 6-Oxychitins, novel hyaluronan-like regiospecifically carboxylated chitins. *Carbohydrate Polymers*, 39, 361–367.
- [25] Ohya, Y., Nishimoto, T., Murata, J., & Ouchi, T. (1994). Immunological enhancement activity of muramyl dipeptide analogue CM-curdlan conjugate. *Carbohydrate Polymers*, 23, 47–54.
- [26] Ooi, V. E. C., & Liu, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 715–729.
- [27] Potthast, A., Rosenau, T., & Kosma, P. (2006). Analysis of oxidized functionalities in cellulose. *Polysaccharides II*, 205, 1–48.
- [28] Rohring, J., Lange, T., Potthast, A., Rosenau, T., Sixta, H., & Kosma, P. (2001). Novel methods to determine carbonyl functions in cellulosic substances. Proc. Post-Symp. 11th Int. Symp (pp. 94–97). *Wood Pulping Chem.*, Grenoble, June 18–49.

- [29] Saito, T., & Isogai, A. (2004). TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the waterinsoluble fractions. *Biomacromolecules*, 5, 1983–1989.
- [30] Shibata, I., & Isogai, A. (2003). Depolymerization of cellouronic acid during TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 10, 151–158.
- [31] Shibata, I., Yanagisawa, M., Saito, T., & Isogai, A. (2006). SEC-MALS analysis of cellouronic acid prepared from regenerated cellulose by TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 13, 73–80.
- [31] Suzuki, T., Ohno, N., Adachi, Y., Cirelli, A. F., Covian, J. A., & Yadomae, T. (1991). Preparation and biological activities of sulfated derivatives of (1→3)- β -D-glucans. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 14, 256–266.
- [32] Tada, R., Harada, T., Nagi-Miura, N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., et al. (2007). NMR characterization of the structure of a β -(1→3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*. *Carbohydrate Research*, 342, 2611–2618.
- [33] Usui, S., Matsunaga, T., Ukai, S., & Kiho, T. (1997). Growth suppressing activity for endothelial cells induced from macrophages by carboxymethylated curdlan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 1924–1925.
- [34] Vismar, R., Vestri, S., Frassanito, A. M., Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2004). Stress resistance induced by paramylon treatment in *Artemia* sp.. *Journal of Applied Physiology*, 16, 61–67.
- [35] Wada, M., Heux, L., & Sugiyama, J. (2004). Polymorphism of cellulose I family: Reinvestigation of cellulose IV. *Biomacromolecules*, 5, 1385–1391.
- [36] Wood, P. J. (1994). Evaluation of oat bran as a soluble fibre source Characterization of oat β -glucan and its effects on glycemic response. *Carbohydrate Polymers*, 25, 331–336.

[37] Yanagisawa, M., & Isogai, A. (2005). SEC-MALS-QELS study on the molecular conformation of cellulose in LiCl/amide solutions. *Biomacromolecules*, 6, 1258-1265.

3. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化を用いた高分子量 ポリグルクロン酸調製の検討

3.1. 研究背景

TEMPO 触媒酸化(TEMPO/NaBr/NaClO ; pH 8.5-11)による多糖の1級水酸基(C6-OH)の選択的酸化によって、糖化学の新しい領域が切り拓かれてきた[1,2,3]。水不溶性の β -シクロデキストリンやキチン、再生セルロースに適用した例では、C6-OH の一部又は全てがカルボキシル基に酸化されることで水可溶性になった[5, 8, 11]。しかしながら、反応中における低分子化が、特にすべての C6-OH が酸化されたポリウロン酸を調製する条件では、避けられないという課題があった[4, 9, 11, 13, 14]。再生又はマーセル化、ボールミル処理したセルロースより調製した(1-4)- β -ポリグルクロン酸(セロウロン酸)では、元の重合度から著しい低分子化によって、セロウロン酸の重合度(DP_w)は40-80になってしまった。低分子化の主要因として、反応条件がアルカリ性であることに起因する β 脱離反応[4]や、反応中に副生成物としてできるヒドロキシラジカルなどの活性種[14]が考えられている。

第2章において TEMPO 触媒酸化を結晶性の異なる(1-3)- β -グルカンであるパラミロン及びカードランに適用すると、十分な量の次亜塩素酸ナトリウム添加により、C6-OH がほぼすべて酸化された(1-3)- β -ポリグルクロン酸を調製することができた。しかしながら、(1-3)- β -グルカンの場合でも反応中に著しい低分子化が起こり、元のパラミロン及びカードランの DP_w ; 1680 及び 6790 が、TEMPO 触媒酸化後では 68 及び 86 になることが明らかになった。

そこで、近年見出された4-アセトアミド-TEMPO 及び次亜塩素酸ナトリウムを触媒量用い、次亜塩素酸ナトリウムを主酸化剤とする弱酸性 TEMPO 触媒酸化に注目した[16, 17]。この新規 TEMPO 触媒酸化を再生及びマーセル化、天然セルロースに適用すると、従来の弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化と比較して、得られる生成物の重合度が高いことが報告されている[6, 7, 12]。本研究では、弱酸性から中性条件において4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ システムをカードランに適用し、高重合度の(1-3)- β -ポリグルクロン酸を調製することを目的とし、反応条件の最適化を検討した。また、各種スターチ(アミロペクチンとアミロースとの複合物)やアミロース、プルランにも同様の反応を適用し、各種多糖における C6-OH の反応性の違いを検討した。

3.2. 出発物質及び実験手法

3.2.1. 出発物質

カードラン、プルラン、アミロース及びスターチ（ポテト、コーン、小麦由来）は全て市販品（Wako Pure Chemicals, Japan）を用いた。4-アセトアミド-TEMPO、次亜塩素酸ナトリウム、亜塩素酸ナトリウム（有効塩素量；80%）及びその他の試薬や溶媒は全て市販品を精製せずに実験に用いた。水溶性生成物の SEC-MALLS 測定用に、HPLC グレードの蒸留水を用いた（Wako Pure Chemicals, Japan）。

3.2.2. 多糖類の弱酸性下 TEMPO 触媒酸化

カードラン、プルラン、アミロース、及びスターチの弱酸性下 TEMPO 触媒酸化の基準となる実験プロセスを以下に記す。カードラン、アミロース（1 g；6.0 mmol C6-OH）またはスターチ（1 g；<6 mmol C6-OH C6 位に分岐があるため）を密栓フラスコに入れ、pH 4.7 に調製した 0.2 M 酢酸緩衝液を 100 ml 加えて分散させた。4-アセトアミド-TEMPO（0.096 g；0.45 mmol）、亜塩素酸ナトリウム（有効塩素量；80%、0.68 g；6.0 mmol）を密栓フラスコに加え、攪拌によって溶解させた。分散液に次亜塩素酸ナトリウム（12%、0.62 ml；1.0 mmol）を一度に加え、すぐ栓をして反応を開始させた。分散液を 35 ℃ に保ち、24 時間反応させた。アミロースを除くすべての多糖で、24 時間後の反応液が透明であったことから、水可溶性の生成物が得られたことが分かった。アミロースは反応時間を長くしても反応液が透明にはならず、分散状態のままであった。反応は、反応液と同量のエタノールを添加することで停止され、生じた白色沈殿を遠心分離によって回収した。沈殿物は脱イオン水を用いた透析により精製され、凍結乾燥を経て反応生成物を得た。本研究では、反応に影響を与える因子として、反応時間、反応に用いる緩衝液の pH、反応温度、及び試薬添加量を考え、様々な反応条件を検討することで、反応の最適化を試みた。プルラン（1 g；4.0 mmol C6-OH）を用いた場合には、亜塩素酸ナトリウムの添加量を 4.0 mmol として反応を行った。

3.2.3. SEC-MALLS 測定

2.2.6.の手法に従って、数平均分子量 (M_n) 及び重量平均分子量 (M_w) 測定を行った。TEMPO 触媒酸化後の試料は、 dn/dc 値をセロウロン酸の 0.1 M 塩化ナトリウム水溶液における値、0.125 mL/g を用いて各パラメーターを算出した[15]。

3.2.4. 他の分析手法

カルボキシル基量を測定するために、2.2.7.に従って電気伝導度滴定を行った。

TEMPO 触媒酸化前後における化学構造の変化を調べるため、ALPHA-500 (JEOL, Japan) を用いて 2.2.7.に従って、 ^{13}C -NMR 測定を行った。元のカードラン、アミロース、及びポテトスターチは重ジメチルスルホキシド ($\text{DMSO-}d_6$) に 100 で数分間攪拌することで溶解させ、標準物質としてテトラメチルシランを用いて測定に供した。水可溶性の TEMPO 触媒酸化試料は重水 (D_2O) に溶解させ、3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸ナトリウムを標準物質として用いて測定に供した。積算回数を 15000 回とし、測定データは解析ソフトウェア (Delta; JEOL, Japan) を用いてデータ処理を行った。

3.3. 結果・考察

3.3.1. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システムによる多糖類の酸化

表 3.1. に TEMPO 触媒酸化カードラン、各種スターチ、アミロース及びプルランのカルボキシル基量を示す。検討を行ったすべての条件で、pH 4.7 における 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ によるカルボキシル基の導入が確認された。また、表 3.1. において、酸化度は次式 (3.1.) を用いて計算を行った。

$$R=10X/(162+36X/100) \quad (3.1.)$$

ただし、R はカルボキシル基量 (mmol/g)、X は酸化度 (%) を示す。この式を用いて計算すると、カードランでは C6-OH の 95% が 24 時間の酸化反応によってカルボキシル基へと酸化されたことが分かった。一方で、TEMPO 触媒酸化スターチのカルボキシル基量は 1.34 - 2.23 mmol/g とカードランと比較すると、同じ反応条件にも関わらず低い値であった。スターチのアミロペクチンに由来する C6 位に存在する分岐構造を考慮に入れずに直鎖状と仮定した場合、23 - 39% の C6-OH が酸化されていることになる。また、スターチは分岐構造を有するアミロペクチンと直鎖状のアミロースとの混合物であり、由来によりそれぞれの含有率は異なるが、一般的にアミロースを 20 - 25%、アミロペクチンを 80 - 75% 含有すると言われている[18]。また、アミロペクチンの分岐構造は、一般的に平均でグルコースユニット約 25 個に 1 個の割合で存在していることから、スターチ全体ではグルコースユニット約 31 - 33 個に 1 個の割合で分岐を有する[18]。したがって、分岐構造を考慮に入れたとしても、40% 以下しか酸化されていないと考えられる。TEMPO 触媒酸化アミロースでは、反応時間を長くした場合でも水不溶性のままであり、カルボキシル基量も 2.74 mmol/g (C6-OH の 49.2%) であった。酸化アミロースの場合では各種スターチよりもカルボキシル基の導入量が多かったが、おそらく高い分子量と直鎖構造のために水可溶化しなかったと推測される。

表3.1. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35 ℃, 24時間) を用いて調製したTEMPO触媒酸化カードラン、各種スターチ、アミロース及びプルランのカルボキシル基量及び収率

| | Carboxylate content (mmol/g) | Oxidation ratio of C6-OH (%) | Yield (%) |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|-----------|
| Oxidized curdlan | 4.85 | 95.0 | 90 |
| Oxidized starch from | | | |
| Potato | 2.23 | >39.3 | 83 |
| Corn | 1.64 | >28.2 | 85 |
| Wheat | 1.34 | >22.8 | 84 |
| Oxidized amylose | 2.74 | 49.2 | 96 |
| Oxidized pullulan | 0.32 | 8.0 | 90 |

カードラン、スターチ、アミロースの結果は、分岐の有無に関わらず(1-4)- α -グルカンの C6-OH よりも、(1-3)- β -グルカンの C6-OH の方が、弱酸性 TEMPO 触媒酸化によって酸化されやすいことを示している。スターチについて、その結晶構造は C1 位から C4 位へ左巻きの二重らせん構造を取り、二重らせん構造が水素結合やファンデルワールス力により平行に配置している[19]。また、C6 位の 1 級水酸基は二重らせん構造の長軸方向を向いているため、1 級水酸基が三重らせん構造に対して外側を向いているカードランと比べると、4-アセトアミド-TEMPO との反応性が低くなったと考えられる。アミロースとスターチを比較すると、酸化スターチの方が、酸化アミロースに比べて C6-OH の酸化度が低いことから、 α -1,6 結合による分岐構造又は分岐に導入されたカルボキシル基が、分岐構造近くに存在する C6-OH の酸化を妨げていることが推測される。この仮説は次のプルランの結果からも、説明できる。プルランは、マルトトリオース単位が α -1,6 グリコシド結合した直鎖状多糖であり、反応前後に関わらず反応液中で水可溶性を維持していた。プルランに弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用した場合、酸化物のカルボキシル基量は、プルランの C6-OH の僅か 8.0%にあたる 0.32 mmol/g であった。このように、 α -1,6 結合を有する多糖では、たとえプルランのように均一系であったとしても pH 4.7、4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ システムによる C6-OH の酸化が抑制されることが分かった。酸化が抑制される理由としては、 α -1,6 結合のために、N-オキソニウムイオンと C6-OH との反応中間体の形成が立体障害を受けたためと考えられる。

弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化 (TEMPO/NaBr/NaClO ; pH 10) では、プルランもスターチもほぼ全ての C6-OH がカルボキシル基へと酸化可能であったので、上記の C6-OH の不完全な酸化は、pH 4.7、4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ システムの特徴と言える。同様の結果は、溶解再生又はマーセル化したセルロースに対する弱酸性から中性における 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ システムの適用においても確認されている[6,7]。弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化をアミロース、スターチ、プルランに適用した場合は、ほぼ全ての C6-OH をカルボキシル基へと酸化することはできたが、常に著しい低分子化を伴ってしまった[9,13,14]。後述するように、弱酸性 TEMPO 触媒酸化 (4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ ; pH 4.7) では、生成物の低分子化を抑制することができた。このことから、弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化の反応中における著しい低分子化は、多糖のすべての C6-OH をカルボキシル基へと効率的に酸化するために必要な条件であることが示唆された。

3.3.2. 酸化多糖の NMR スペクトル分析

元の多糖及び TEMPO 触媒酸化多糖の ¹³C-NMR スペクトルを図 3.1. に示す。TEMPO 触媒酸化アミロースは水に溶解しなかったため、希塩酸を用いてナトリウム塩型のカルボキシル基をプロトン型に換えた後、重 DMSO (DMSO-*d*₆) に溶解させ測定に供した。カードランは、弱酸性 TEMPO 触媒酸化 (4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂; pH 4.7) によって C6-OH がほぼすべて酸化されたポリグルクロン酸 (カーデュロン酸) へと変換されていることが分かった (図 3.1.)。

元のポテトスターチ (重 DMSO 溶液) の α -1,6 結合に由来する C1 位と結合している C6 位 (C6' 位) のピークは、C2 位、C3 位、C5 位由来のピークと重なってしまったため、確認できなかった。しかしながら、TEMPO 触媒酸化ポテトスターチでは、72.8 ppm に C6' 位が確認された。水溶性スターチの酸化において、弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化では、ほぼすべての α -1,6 結合が失われ、直鎖状の (1-4)- α -ポリグルクロン酸が得られている[10]。このことから、弱酸性 TEMPO 触媒酸化では、弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化よりも α -1,6 結合が安定に存在していることが分かった。

プルランのカルボキシル基量は 0.32 mmol/g (表 3.1.) であったが、 ^{13}C -NMR を非定量モードで測定したため、スペクトルでは 178 ppm 付近に非常に小さいピークのみが確認されただけであった。

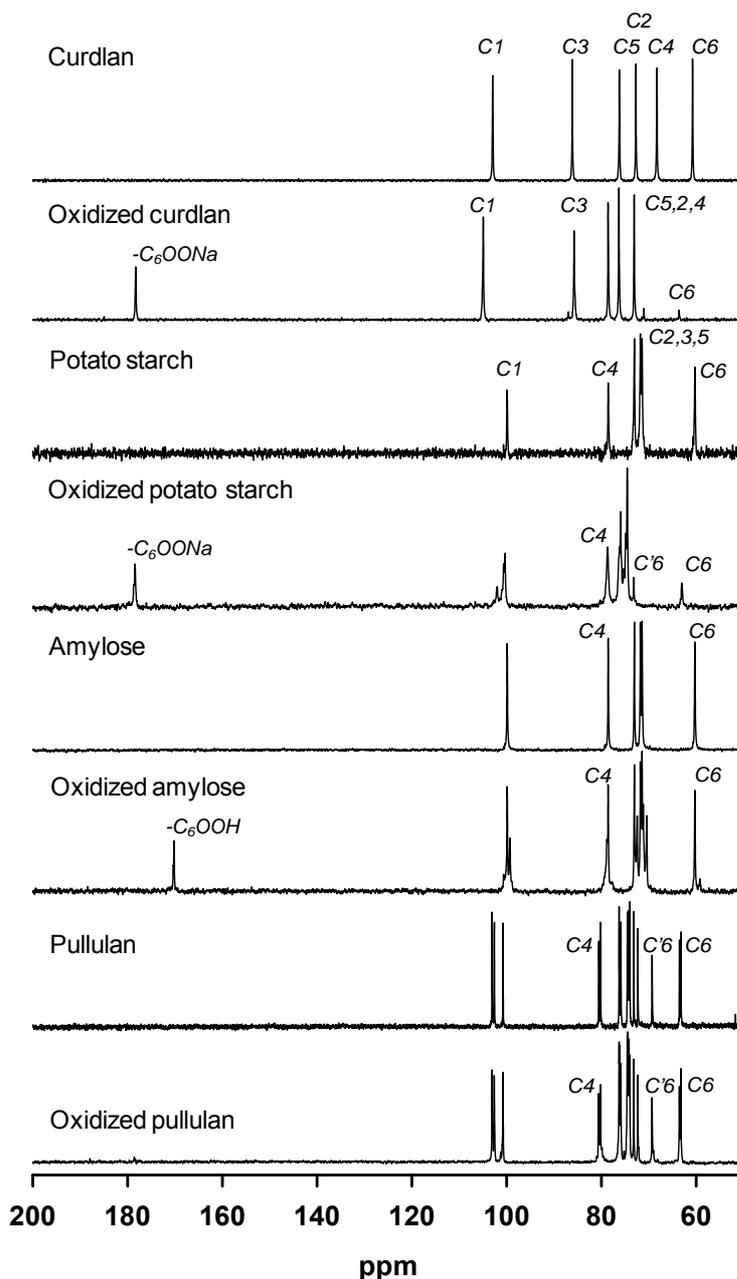


図3.1. 元のカードラン、ポテトスターチ、アミロース及びプルランと、これらのTEMPO触媒酸化物(4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム, pH 4.7, 35 °C, 24時間)の ^{13}C -NMRスペクトル

3.3.3. TEMPO 酸化カードランにおける反応時間の影響

反応時間が 4 時間から 24 時間に増加するにつれ、カルボキシル基量が 2.27 mmol/g から 4.85 mmol/g まで増加した (図 3.2.)。いずれの反応時間で調製した酸化カードランも水可溶性であった。このことから、反応時間を変えることで水不溶性のカードランから、カルボキシル基量の異なる水可溶性酸化生成物を調製可能なことが分かった。第 2 章の結果から弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化 (TEMPO/NaBr/NaClO ; pH 10) では、50 分以内にすべての C6-OH をカルボキシル基に酸化可能であったが、弱酸性 TEMPO 触媒酸化 (4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ ; pH 4.7) では、95%の C6-OH を酸化するのにより長い時間 (24 時間) を要した。

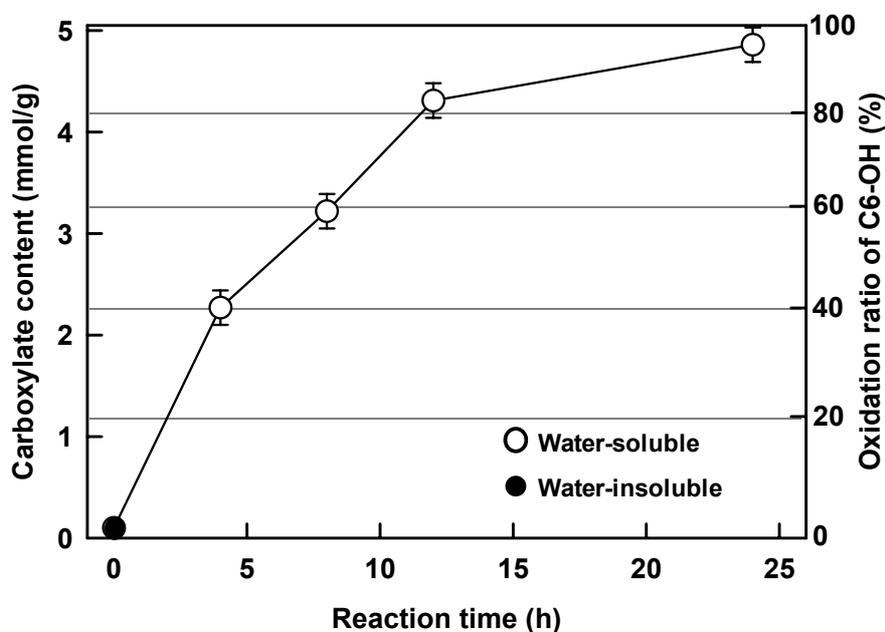


図3.2. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35)を反応時間0-24時間の間で適用し、調製したTEMPO触媒酸化カードランのカルボキシル基量及びC6-OHの酸化率

図 3.3.に 4-24 時間反応させた酸化カードランの ¹³C-NMR スペクトルを示す。反応が進むに連れ、64 ppm の C6-OH に由来するピークは減少し、反対に 178 ppm の C6-カルボキシル基に由来するピークの増加が見られた。NMR 測定は非定量モードで行ったため、C6-カルボキシル基に由来するピーク強度に定量性はない。一方で、グルコース単位及びグルクロン酸単位の C3 位に由来するピークが、それぞれ 86 と 87 ppm に確認さ

れ、これらのピークの強度比は電気伝導度より求めたカルボキシル基量とよく相関していた。同様の結果が C4 位のピーク (71 及び 73 ppm) からも得られた。このように、酸化カードランのおおよそのカルボキシル基量が NMR のスペクトル強度から算出することができた。

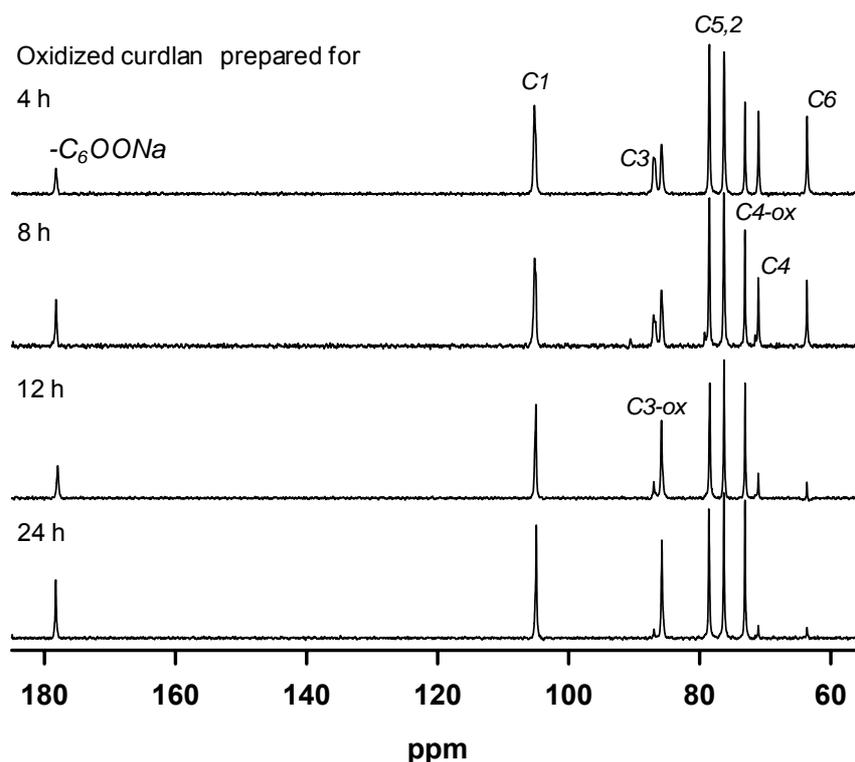


図3.3. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35)を反応時間0-24時間の間で適用し、調製したTEMPO触媒酸化カードランの¹³C-NMRスペクトル(in D₂O); C3-ox及びC4-oxは、(1→3)-β-グルクロン酸ユニット由来

酸化カードランの重合度は SEC-MALLS により測定した。反応時間の増加に伴い、重合度分布のピークトップが、低重合度側へとシフトしていた(図 3.4.)。このことから、弱酸性 TEMPO 触媒酸化(4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂; pH 4.7)においても、低分子化は避けられないことが示された。元のカードラン及び、弱アルカリ性又は弱酸性 TEMPO 触媒酸化により調製した酸化カードランの分子量及び重合度を表 3.2.にまとめた。元のカードランは 6790 と高い重合度を有していたが、弱酸性 TEMPO 触媒酸化によって酸化後は、重合度が 1020 まで低分子化した。しかしながら、第 2 章で得られ

た弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化により調製した酸化カードランの重合度 86 と比べると、遥かに高い重合度を有していることが明らかになった。すなわち、弱酸性 TEMPO 触媒酸化 (4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂; pH 4.7) によって、弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化 (TEMPO/NaBr/NaClO; pH 10) よりも高重合度のカーデュロン酸を調製可能なことが分かった。

表 3.2. 元のカードラン、TEMPO/NaBr/NaClO システム (pH 10) 及び 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ システム (pH 4.7, 35 °C, 24時間) を用いて調製した TEMPO 触媒酸化カードランの重量平均及び数平均分子量 (M_w , M_n) 及び重合度 (DP_w , DP_n)

| Sample | Reaction time (h) | Oxidation ratio of C6-OH (%) | M_w (DP_w) | M_n (DP_n) | M_w/M_n |
|---|-------------------|------------------------------|------------------|------------------|-----------|
| Original curdlan | - | - | 1,100,000 (6790) | 890,000 (5490) | 1.24 |
| Oxidized curdlan prepared by TEMPO/NaBr/NaClO at 25°C and pH 10 | 0.8 | 100 | 17,000 (86) | 13,500 (68) | 1.26 |
| 4-AcNH-TEMPO/NaClO/NaClO ₂ at 35°C and pH 4.7 | 24 | 95 | 197,000 (1020) | 130,000 (670) | 1.52 |

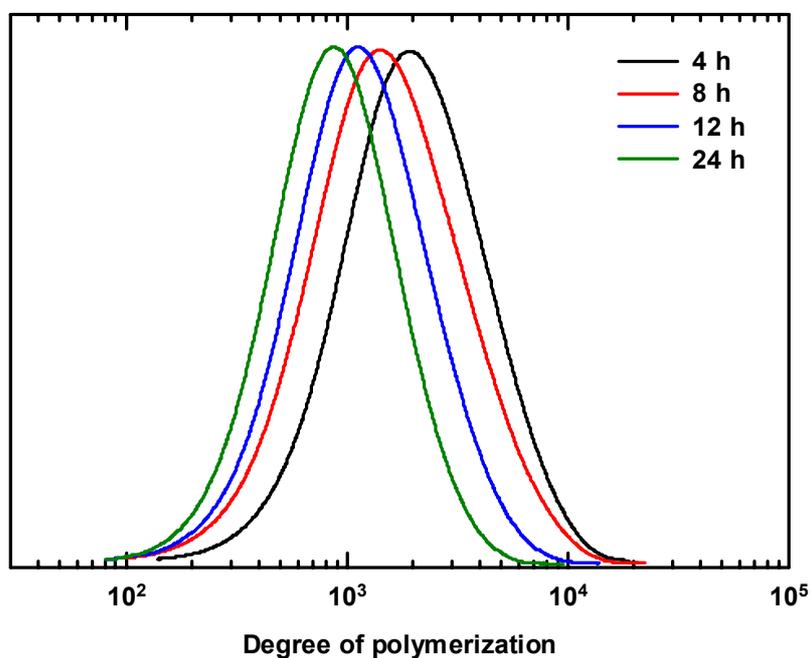


図3.4. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ システム (pH 4.7, 35 °C) を反応時間0ー24時間の間で適用し、調製した TEMPO 触媒酸化カードランの重合度分布

3.3.4. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化における他の反応条件の検討

反応時間を 8 時間、反応温度 35 とし、反応 pH 3.7-6.7 の緩衝液 (pH 3.7; クエン酸緩衝液、pH 4.7, 5.7; 酢酸緩衝液、pH 6.7; リン酸緩衝液) を用いてカードランに弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用し、反応 pH の影響を検討した。図 3.5. に示すように、pH 4.7、5.7、6.7 で調製した酸化カードランは水可溶性であった。反応 pH 4.7 及び 5.7 で調製した試料のカルボキシル基量はそれぞれ、3.13 及び 3.00 mmol/g であったのに対し、反応 pH 3.7 及び 6.7 で調製した試料では、0.69 及び 1.87 mmol/g と少なかった。このことから、C6-OH の酸化効率という点で、pH 4.7 及び 5.7 が反応に適した条件であると言える。

次に、反応 pH を変えて調製した試料の重合度分布を図 3.6. に示す。反応 pH 4.7 及び 5.7 で調製した酸化カードランのカルボキシル基量はほぼ同程度であったが、重合度は pH 4.7 で調製した生成物の方が高かった。カードランの TEMPO 触媒酸化における低分子化の要因が反応中に生成するラジカル種であるという仮説が正しいとすると、反応 pH 5.7 においてはより多く生成されたと考えられる。pH 6.7 では、調製した酸化カードランのカルボキシル基量が 1.87 mmol/g であり、反応がすべての C6-OH で起きていないため、図のような広い重合度分布を持ったと考えられる。この結果から、C6-OH のカルボキシル基への酸化はカードランの低分子化を伴って起こる、又は 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂ 系によって高いカルボキシル基導入量を達成しようとする場合には、低分子化が避けられないということが示された。

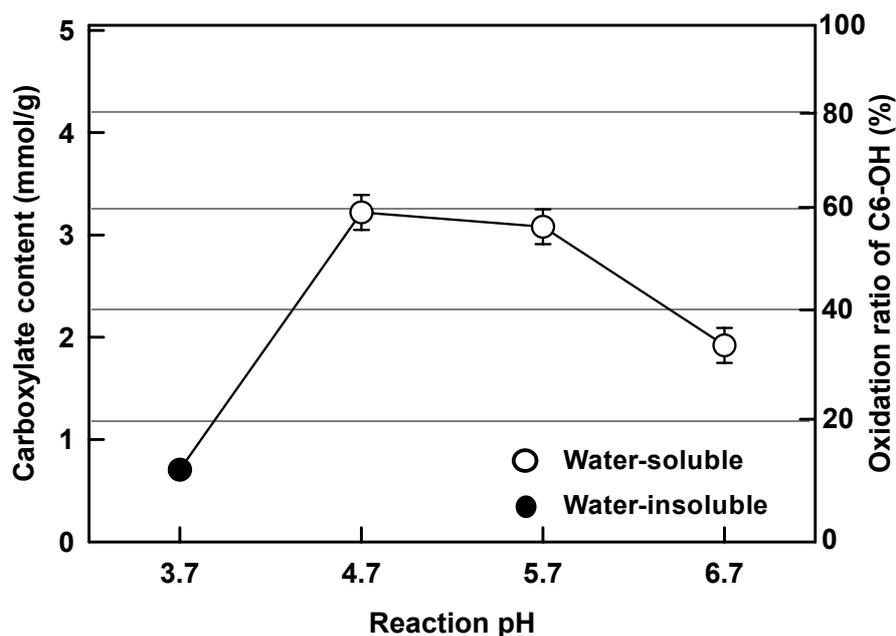


図3.5. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (35 ℃, 8時間) を用いて反応pH 3.7–6.7で調製したTEMPO触媒酸化カードランのカルボキシル基量及びC6-OHの酸化度

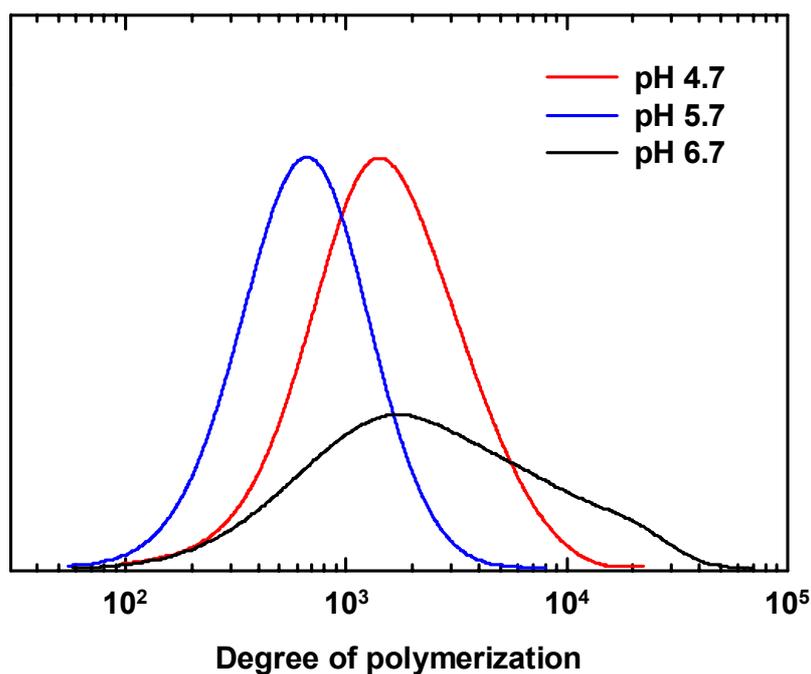


図3.6. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (35 ℃, 8時間) を用いて反応pH 3.7–6.7で調製したTEMPO触媒酸化カードランの重合度分布

反応時間を 8 時間、反応 pH を 4.7 として、反応温度について検討した結果から、室温 (ca. 20 ℃) から、35、50、65 ℃ まで温度を上げて反応を行うことで、酸化カードランのカルボキシル基量が、2.11 mmol/g から、3.11、3.53、3.72 mmol/g まで増加した (図

3.7.)。このことから、反応温度を上げることで、TEMPO 触媒酸化による C6-OH の酸化を効率的に行うことができることが分かった。異なる反応温度で調製した酸化カードランの重合度分布を図 3.8.に示す。カルボキシル基量において、35、50、65 で調製した酸化カードランに大きな差は見られなかったのに対して、重合度においては、明らかに 50 及び 65 で調製した生成物では、35 で調製したものと比べ、低い値であった。

室温で調製した酸化カードランのカルボキシル基量は、2.11 mmol/g と低く十分に酸化されていないことから、重合度分布も幅広く、高重合度であったと考えられる。pH 4.7, 35 , 4 時間で調製した酸化カードラン (図 3.4.) と室温, 8 時間で調製した酸化カードランのカルボキシル基量は、2.27 と 2.11 mmol/g と同程度であったが、重合度分布は大きく異なっていた。このことは、高重合度の酸化カードランを調製する場合には、反応温度を下げるのが効果的であることを示唆している。しかしながら、カルボキシル基量が 4 mmol/g を超える酸化カードランは、室温条件では反応時間を 3 日間以上かけても得られていないことから、pH 4.7 及び 35 という条件が高いカルボキシル基導入量を持ち、高重合度の酸化生成物を得るのに最適な条件であると結論づけた。

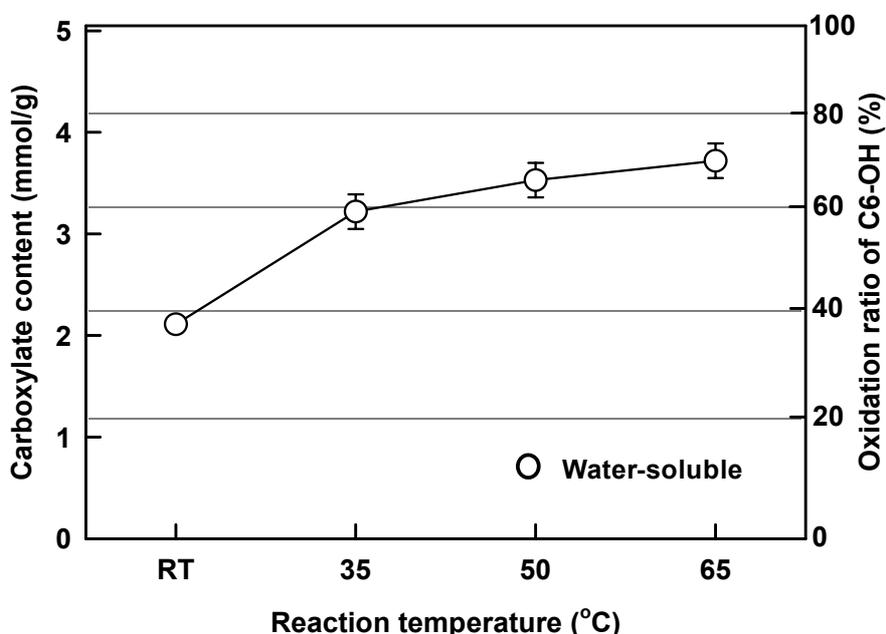


図3.7. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 8時間)を用いて反応温度20(室温) - 65 で調製したTEMPO触媒酸化カードランのカルボキシル基量及びC6-OHの酸化度

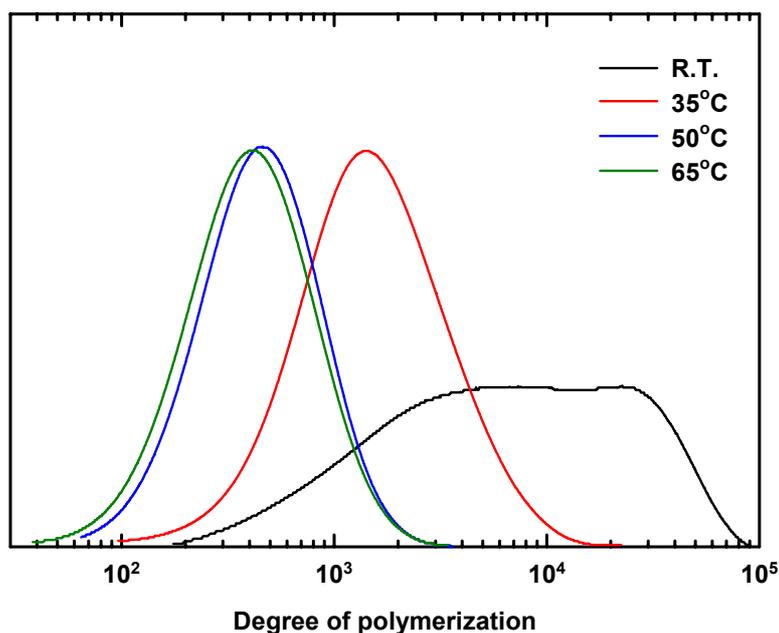


図3.8. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 8時間)を用いて反応温度20(室温) - 65 で調製したTEMPO触媒酸化カドランの重合度分布

次亜塩素酸ナトリウム及び4-アセトアミド-TEMPOの最適添加量を検討するため、それぞれ、0.25-1.0 mmol/g 及び 0.1-0.9 mmol/g の条件で反応を行った。反応時間は8時間、反応pHは4.7、反応温度は35とした。図3.9.に示すように、4-アセトアミド-TEMPOの添加量を増加させることで、酸化効率は上昇した。4-アセトアミド-TEMPO添加量が0.1及び0.2 mmol/gの条件では、カルボキシル基導入量が少ないため、酸化カドランは水不溶性であった。また、この時には次亜塩素酸ナトリウム添加量はC6-OHの酸化に影響を与えていなかった。一方で、4-アセトアミド-TEMPO添加量0.45 mmol/gの条件では、次亜塩素酸ナトリウム添加量の増加に従って、カルボキシル基量が増加した。そして、4-アセトアミド-TEMPO添加量0.9 mmol/gの条件では、C6-OHの酸化効率が明らかに向上した。しかしながら、弱アルカリ性TEMPO触媒酸化(TEMPO/NaBr/NaClO; pH 10)ではTEMPOの添加量は、0.1 mmol/gで十分であったことを考えると、弱酸性TEMPO触媒酸化で4-アセトアミド-TEMPO添加量0.9 mmol/gという添加量は、触媒量としては過剰な条件である。

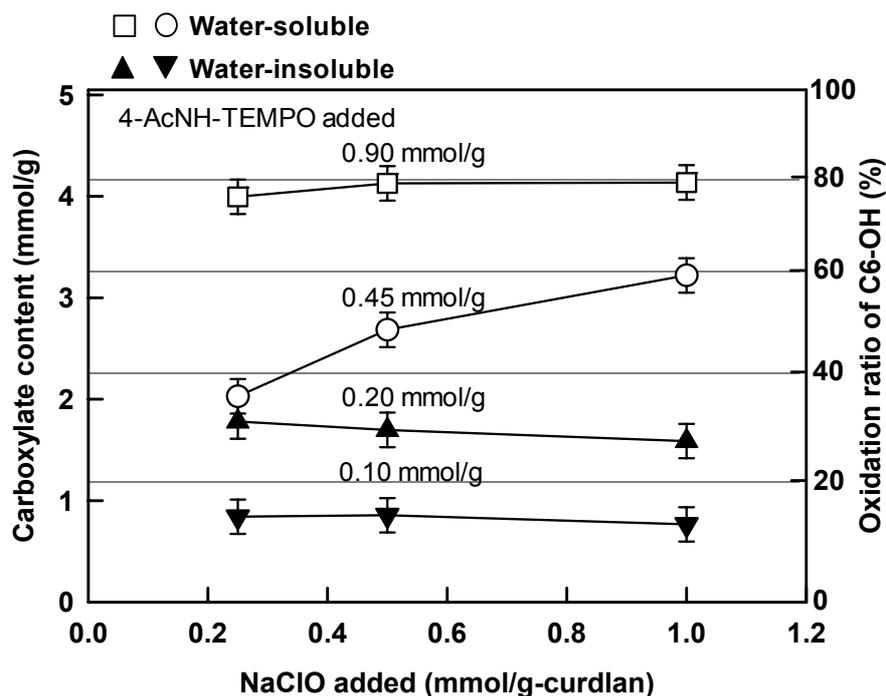


図3.9. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35 ℃, 8時間) を用いて4-アセトアミド-TEMPO、次亜塩素酸ナトリウム添加量を変えて調製したTEMPO触媒酸化カードランのカルボキシル基量及びC6-OHの酸化度

4-アセトアミド-TEMPO 添加量 0.9 mmol/g、次亜塩素酸ナトリウム添加量 0.25-1.0 mmol/g という条件で、調製した TEMPO 触媒酸化カードランの重合度分布を図 3.10. に示す。4-アセトアミド-TEMPO 添加量が 0.45 mmol/g から 0.9 mmol/g へと増加することにより、より多くのカルボキシル基が導入されたが、4-アセトアミド-TEMPO 添加量 0.45 mmol/g、次亜塩素酸ナトリウム添加量 1.0 mmol/g で調製した酸化カードランの重合度分布 (図 3.4.) と比較すると、低重合度側へとピークがシフトしてしまった。

4-アセトアミド-TEMPO 添加量を 0.45 から 0.9 mmol/g へと増加させることで、C6-OH の酸化は効率的に進んだが、高重合度の酸化カードランを調製することはできなかったため、4-アセトアミド-TEMPO 添加量 0.45 mmol/g が本研究では、最も適した条件であった。しかしながら、カルボキシル基量が多く、高重合度の酸化カードランを得るためには、4-アセトアミド-TEMPO 添加量を更に増やし、より短時間で反応を終了する条件が適している可能性がある。このように、弱酸性 TEMPO 触媒酸化により、高いカルボ

キシル基量を持ち、高重合度の酸化カードランを調製するためにはより最適な酸化条件を今後検討する余地がある。

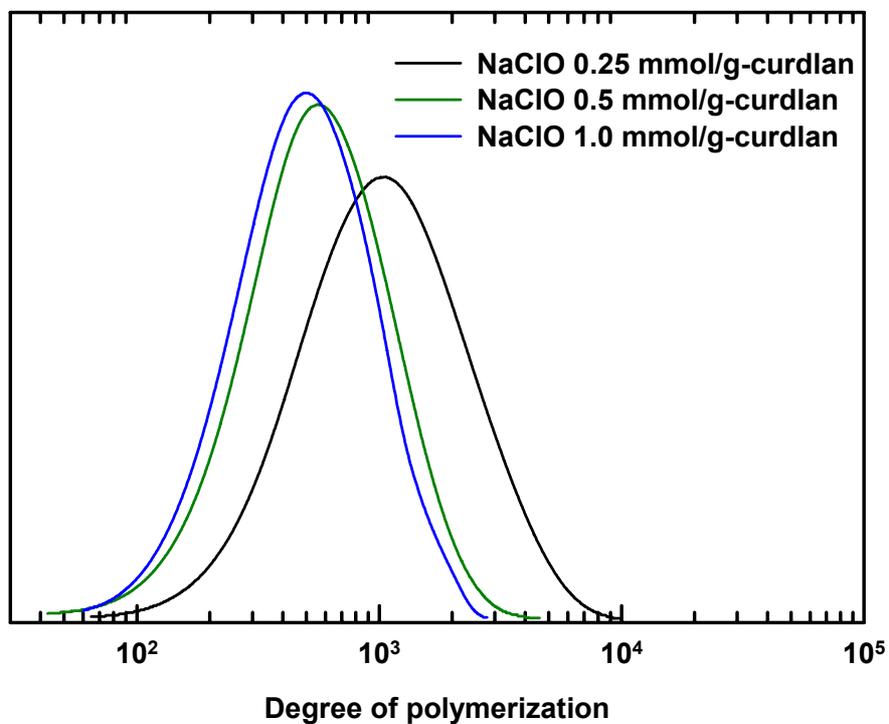


図3.10. 4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35℃, 8時間) を用いて 4-アセトアミド-TEMPO添加量を0.9 mmol/g-curdlanとし、次亜塩素酸ナトリウム添加量を変えて調製したTEMPO触媒酸化カードランの重合度分布

3.4. 結論

弱酸性 TEMPO 触媒酸化 (4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂; pH 4.7 ; 35 ; 24 時間) をカードランに適用することで、低分子化を抑制しつつ、C6-OH が選択的にカルボキシル基へと酸化された高分子量カーデュロン酸を調製することに成功した。反応時間を 4 - 24 時間とすることで、酸化カードランのカルボキシル基量を 2.27 - 4.85 mmol/g (C6-OH の酸化度 ; 40 - 95%) と制御することができた。また、カードランの場合ではカルボキシル基量が 2 mmol/g を超えると、水可溶化することが分かった。酸化中の低分子化を完全に抑制することはできなかったが、C6-OH の酸化度 95%、重合度 1000 を超えるカーデュロン酸を調製することができた。各種スターチやアミロース、プルランに適用した場合には、導入されたカルボキシル基量は同じ反応条件でカードランと比べ少なかった。このことから、(1-4)- α -グルカンの C6-OH は(1-3)- β -グルカンと比べ、酸化を受けづらく、また、 α -1,6 結合の近くに存在する C6-OH もまた、TEMPO により酸化されづらいことが示唆された。(1-4)- α -グルカンにおける弱酸性 TEMPO 触媒酸化の反応性の低さについて、結晶構造中の C6 位の 1 級水酸基が二重らせん構造の長軸方向を向いているために、1 級水酸基が三重らせん構造の外側に出ているカードランと比較すると、4-アセトアミド-TEMPO との反応中間体の形成が阻害されたことが考えられる。

3.5. 参考文献

- [1] Bragd, P. L., Besemer, A. C., & van Bekkum, H. (2001). TEMPO-derivatives as catalysts in the oxidation of primary alcohol groups in carbohydrates. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 170, 35–42.
- [2] Bragd, P. L., van Bekkum, H., & Besemer, A. C. (2004). TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: survey of methods and applications. *Topics Catalysis*, 27, 49–66.
- [3] de Nooy, A. E. J., Besemer, A. C., & van Bekkum, H. (1995). Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. *Carbohydrate Research*, 269, 89–98.
- [4] de Nooy, A. E. J., Besemer, A. C., van Bekkum, H., van Dijk, J. A. P. P., & Smit, J. A. M. (1996). TEMPO-mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on the dimensions of obtained polyelectrolyte chains. *Macromolecules*, 29, 6541–6547.
- [5] Fraschini, C., & Vignon, M. R. (2000). Selective oxidation of primary alcohol groups of β -cyclodextrin mediated by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical (TEMPO). *Carbohydrate Research*, 328, 585–589.
- [6] Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., & Isogai, A. (2009). Oxidation of regenerated cellulose with NaClO₂ catalyzed by TEMPO and NaClO under acid-neutral conditions. *Carbohydrate Polymers*, 78, 330–335.
- [7] Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., & Isogai, A. (2010). Water dispersion of cellulose II nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of mercerized cellulose at pH 4.8. *Cellulose*, 17, 279–288.
- [8] Isogai, A., & Kato, Y. (1998). Preparation of polyuronic acid from cellulose by TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 5, 153–164.

- [9] Isogai, T., Yanagisawa, M., & Isogai, A. (2009). Degree of polymerization (DP) and DP distribution of cellouronic acids prepared from alkali-treated celluloses and ballmilled native celluloses by TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 16, 117–127.
- [10] Kato, Y., Matsuo, R., & Isogai, A. (2003). Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system. *Carbohydrate Polymers*, 51, 69–75.
- [11] Kato, Y., Kaminaga, J., Matsuo, R., & Isogai, A. (2004). TEMPO-mediated oxidation of chitin, regenerated chitin and N-acetylated chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 58, 421–426.
- [12] Saito, T., Hirota, M., Tamura, N., Kimura, S., Fukuzmi, H., Heux, L., & Isogai, A. (2009). Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst under neutral conditions. *Biomacromolecules*, 10, 1992–1996.
- [13] Shibata, I., & Isogai, A. (2003). Depolymerization of cellouronic acid during TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 10, 151–158.
- [14] Shibata, I., Yanagisawa, M., Saito, T., & Isogai, A. (2006). SEC-MALS analysis of cellouronic acid prepared from regenerated cellulose by TEMPO-mediated oxidation. *Cellulose*, 13, 73–80.
- [15] Yanagisawa, M., & Isogai, A. (2005). SEC-MALS-QELS study on the molecular conformation of cellulose in LiCl/amide solutions. *Biomacromolecules*, 6, 1258–1265.
- [16] Zhao, M., Li, J., Mano, E., Song, Z., Tschaen, D. M., Grabowski, E. J. J., et al. (1999). Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by TEMPO and bleach. *Journal of Organic Chemistry*, 64, 2564–2566.
- [17] Zhao, M., Li, J., Mano, E., Song, Z., & Tschaen, D. M. (2005). Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by TEMPO and bleach: 4-methoxyphenylacetic acid. *Organic Syntheses*, 81, 195–199.
- [18] Brown, W. H.; Poon, T. (2005). Introduction to organic chemistry (3rd edition). Wiley

[19] Imberty, A., Buléon, A., Tran, V., and Pérez, S. (2006). Recent Advance in Knowledge of Starch. *Starch*, 43, 375-384

4. カーデュロン酸水溶液の粘弾性特性に関する 検討

4.1. 背景

弱酸性 TEMPO 触媒酸化をカードランに適用することにより、水可溶性の高分子量ポリグルクロン酸（カーデュロン酸）が得られた[第 3 章]。得られたカーデュロン酸はほぼ均一な化学構造を持ち、これまで TEMPO 触媒酸化により得られたポリグルクロン酸の中で最も高分子量であることが分かっている。

カーデュロン酸と似た構造を持つ多糖類やその誘導体として、アルギン酸ナトリウムやカルボキシメチルセルロース（CMC）が挙げられる。これらの物質は生分解性があり、毒性がないことから増粘剤として広く使われている[1,2]。また、水溶液に金属イオンを添加することで、ゲル化することが知られている[3,4,5,6,7]。そこで、本研究では、カーデュロン酸の溶液物性に着目し、粘弾性測定を行った。また、金属イオン添加による粘弾性の変化の検討を行った。

4.2. 出発物質及び実験手法

4.2.1. 出発物質

カードランは市販品（Wako Pure Chemicals, Japan）を用いた。4-アセトアミド-TEMPO、次亜塩素酸ナトリウム、亜塩素酸ナトリウム（有効塩素量；80%）及びその他の試薬や溶媒は全て市販品を精製せずに実験に用いた。粘弾性測定の対照試料として、アルギン酸ナトリウム（Wako Pure Chemicals, Japan）及び CMC（DS=0.93、ナトリウム塩型）を用いた。CMC は植松武彦氏（Kao Corporation）のご厚意により提供していただいたものを用いた。

4.2.2. カーデュロン酸の調製

カーデュロン酸をカードランに弱酸性下 TEMPO 触媒酸化適用することにより調製した。カードラン 10 g を密栓フラスコに入れ、pH 4.7 に調整した 0.2 M 酢酸緩衝液を 1000 ml 加えて分散させた。4-アセトアミド-TEMPO（0.96 g；0.45 mmol/g）、亜塩素酸ナトリウム（有効塩素量；80%、6.8 g；6.0 mmol/g）を密栓フラスコに加え、攪拌によって溶解させた。分散液に次亜塩素酸ナトリウム（12%、6.2 ml；1.0 mmol/g）を一度に加え、すぐ栓をして反応を開始させた。分散液を 35℃ に保ち、24 時間反応させた。24 時間後の反

反応液が透明であったことから、水可溶性の生成物が得られたことが分かった。反応は、反応液と同量のエタノールを添加することで停止し、生じた白色沈殿を遠心分離によって回収した。沈殿物は脱イオン水を用いた透析により精製し、凍結乾燥を経て反応生成物を得た。

4.2.3. 粘弾性測定

回転式レオメーター（Rheostress RS600, HAAKE, Germany）を用いて粘弾性測定を行った。測定にはコーンプレート型治具を用い、測定温度は 25 ± 0.15 とした。コーンプレート型治具は、溶液試料用に直径 60 mm；コーン角度 1° の治具を、塩を添加してゲル化させた試料には直径 20 mm；コーン角度 2° の治具をそれぞれ用いた。

各試料は含水率を考慮して、蒸留水に所定の濃度（w/v）で溶解させ、測定に供した。また、ゲル化挙動を測定するために各濃度に調整した塩化カルシウム水溶液を調製し、治具の間にセットした試料に計 10 μl を添加した。2 時間静置させた後に測定を開始した。また、測定中の試料の乾燥を防ぐため、脱イオン水をリザーバーに満たし、ふたをするとともに食品用ラップフィルムで全体を覆った。ひずみ振幅は、0.05 に設定した。

4.2.4. その他の測定

カルボキシル基量を測定するために 2.2.7. に従って、電気伝導度滴定を行った。

サイズ排除クロマトグラフィー・多角度光散乱（SEC-MALLS）を用いて、粘弾性測定に供した試料の数平均及び重量平均分子量と数平均及び重量平均重合度を算出した。測定は、2.2.6. に従って行った。アルギン酸ナトリウム及び CMC は、0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に対する dn/dc 値として、0.174 及び 0.147 ml/g を用いた[8,9]。

金属イオンによるゲル化を調べるため、各種 0.5 M 塩化物イオン水溶液 0.1 ml（金属イオン；0.05 mmol）を 20wt% カルデュロン酸水溶液 0.5 ml（カルボキシル基量；0.45 mmol）に添加し、ゲルを生成するか観察した。1 価の金属塩として、塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化セシウム、2 価の金属塩として、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、塩化ストロンチウム、塩化バリウムを用いた。

4.3. 結果・考察

4.3.1. カーデュロン酸水溶液の粘弾性特性

図 4.1. に 2.5 - 20wt% に調製したカーデュロン酸水溶液のせん断応力 (τ) 及び粘度 (η) のせん断速度 ($\dot{\gamma}$) 依存性を示す。高せん断領域において、せん断応力が直線的に増加していることから、流動領域であることが分かる。濃度が 5.0wt% 以上のカーデュロン酸水溶液では、低せん断領域において降伏応力が見られた。濃度の上昇と降伏応力の増加に相関性が見られることから、水溶液中でのカーデュロン酸同士の絡み合いによる構造粘性であると考えられる。

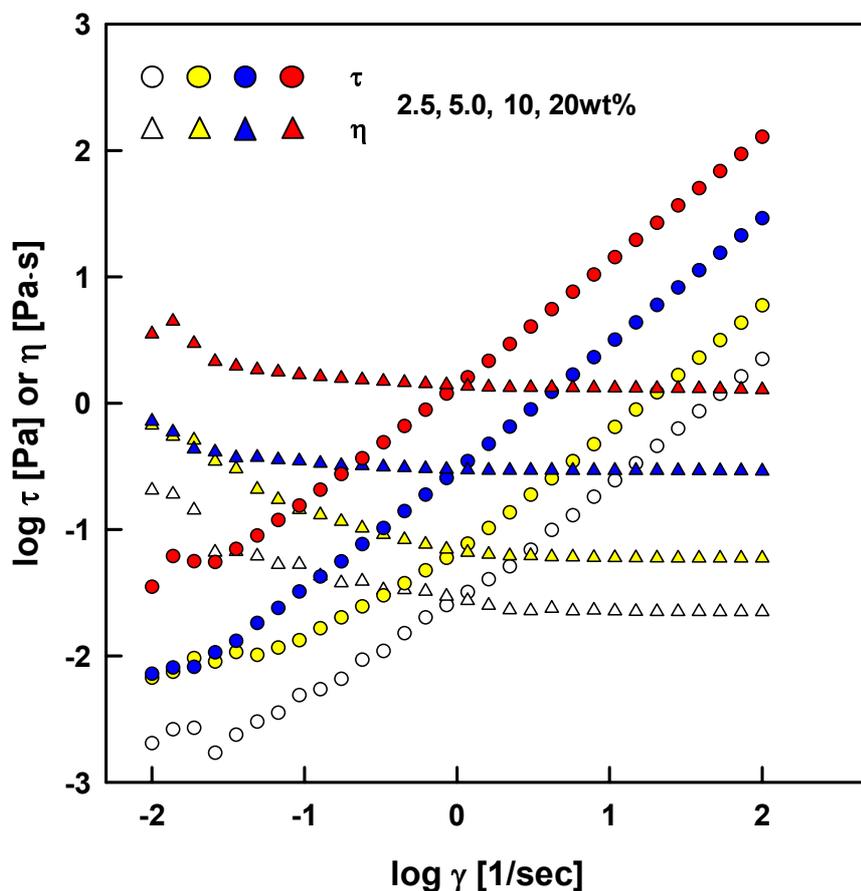


図4.1. 2.5-20wt%カーデュロン酸水溶液の τ 及び η のせん断速度依存性

濃度 2.5 - 20wt%カーデュロン酸水溶液の貯蔵弾性率 (G') 及び損失弾性率 (G'') の周波数依存性を図 4.2. に示す。2.5wt%溶液においては、カーデュロン酸の濃度が低いために 10 rad/sec 以下の周波数領域において、測定限界の下限を超えてしまい、正確な値を測定できなかった。しかしながら、どの濃度においても G'' が G' を上回っており、10 rad/sec を超える高周波数領域において $G' \propto \omega^2$ かつ $G'' \propto \omega^1$ に近似でき、一般的な高分子溶液と同様の傾向を示した。また、10 rad/sec 以下のせん断領域において G' に平坦部が見られた。カーデュロン酸水溶液の濃度が増加するとともに、平坦部の値も増加しているので、分子よりも大きな会合体すなわち分子の絡み合いの緩和を表していると考えられる。そこで、次式 (4.1.) を用いて絡み合い点間分子量 (M_e) を算出し、カーデュロン酸のグルクロン酸ユニットの分子量 198 で除することで、絡み合い点間重合度 (DP_e) を算出した。

$$DP_e = \rho RT / (G_N' \cdot 198) \quad (4.1)$$

ただし、 DP_e ; 絡み合い点間重合度、 ρ ; 溶液密度 (g/m^3)、 R ; 気体定数 ($8.314 \text{ J}/\text{K}\cdot\text{mol}$)、 T ; 絶対温度 (K) とする。これによると、 DP_e は 1.25×10^8 となり測定に用いたカーデュロン酸の重合度 (表 4.1.) よりも遥かに大きな値となってしまった。このことから、平坦部における緩和は複数のカーデュロン酸分子による会合体の緩和を示していると考えられる。

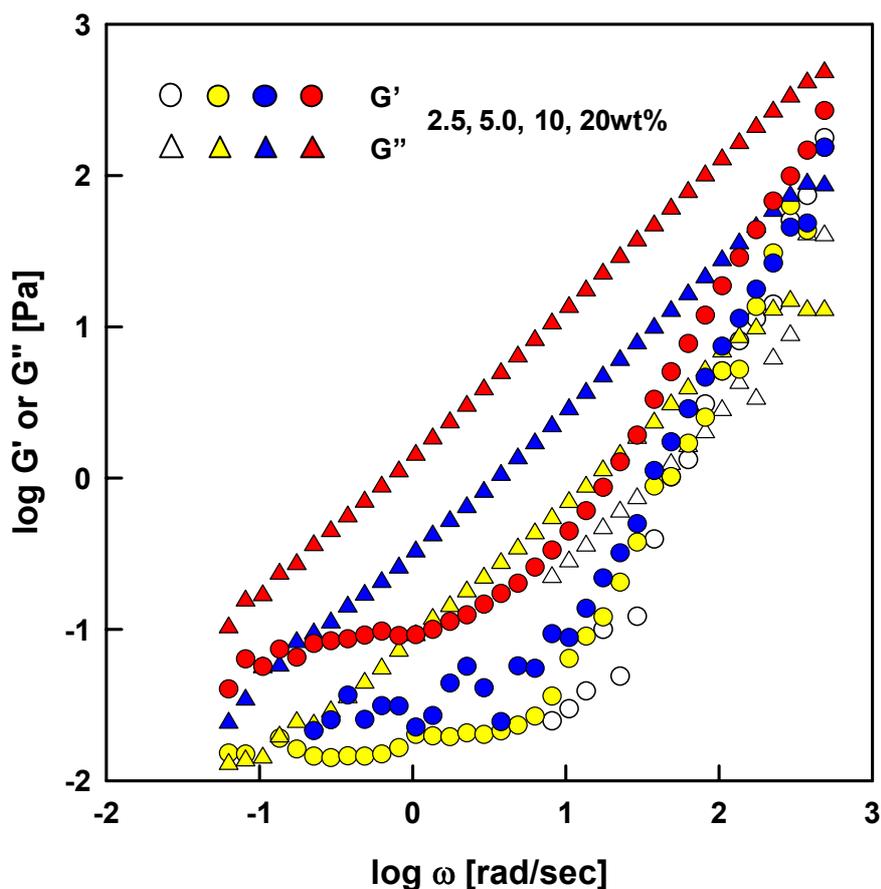


図4.2. 2.5-20wt%カーデュロン酸水溶液のG'及びG''の周波数依存性

図 4.3. に 5.0wt% に調整したカーデュロン酸水溶液、アルギン酸ナトリウム水溶液、及び CMC 水溶液の τ 及び η のずり速度依存性を示す。また、表 4.1. に分子量及び重合度を測定した結果を示す。カーデュロン酸水溶液は、アルギン酸ナトリウム、CMC 水溶液と比較すると、同濃度において 1 ケタ以上、低粘度であることが明らかになった。表 4.1. から重合度においてアルギン酸ナトリウムや CMC と比較して、カーデュロン酸の重合度は大きいことから、カーデュロン酸水溶液が低粘度を示したのはカーデュロン酸分子の溶解状態が、アルギン酸ナトリウムや CMC と異なっていることを示唆している。アルギン酸ナトリウム、CMC 水溶液において、せん断速度の上昇に伴って粘度が低下する現象 (shear-thinning) が見られた。カーデュロン酸水溶液においても同様の低下は確認できるが、より低せん断領域で起きていることから、アルギン酸ナトリウムや CMC と比べると、高分子溶液における shear-thinning を引き起こす主要因である分子鎖の絡み合いが弱いことが考えられる。以上の結果から、カーデュロン酸水溶液がアルギン酸

ナトリウムや CMC 水溶液と比較すると低粘度であるのは、濃厚溶液中にてカーデュロン酸分子がアルギン酸ナトリウムや CMC と比べると、分子の広がりが小さいことが考えられる。

表4.1. カーデュロン酸、アルギン酸ナトリウム、CMCの数平均及び重量平均分子量と重合度

| | Mn (DPn) | Mw (DPw) | Mw/Mn |
|-------------|--------------|---------------|-------|
| Curduronate | 96,400 (490) | 165,000 (850) | 1.71 |
| Alginate | 66,900 (340) | 136,000 (690) | 2.03 |
| CMC | 91,200 (370) | 182,000 (730) | 2.00 |

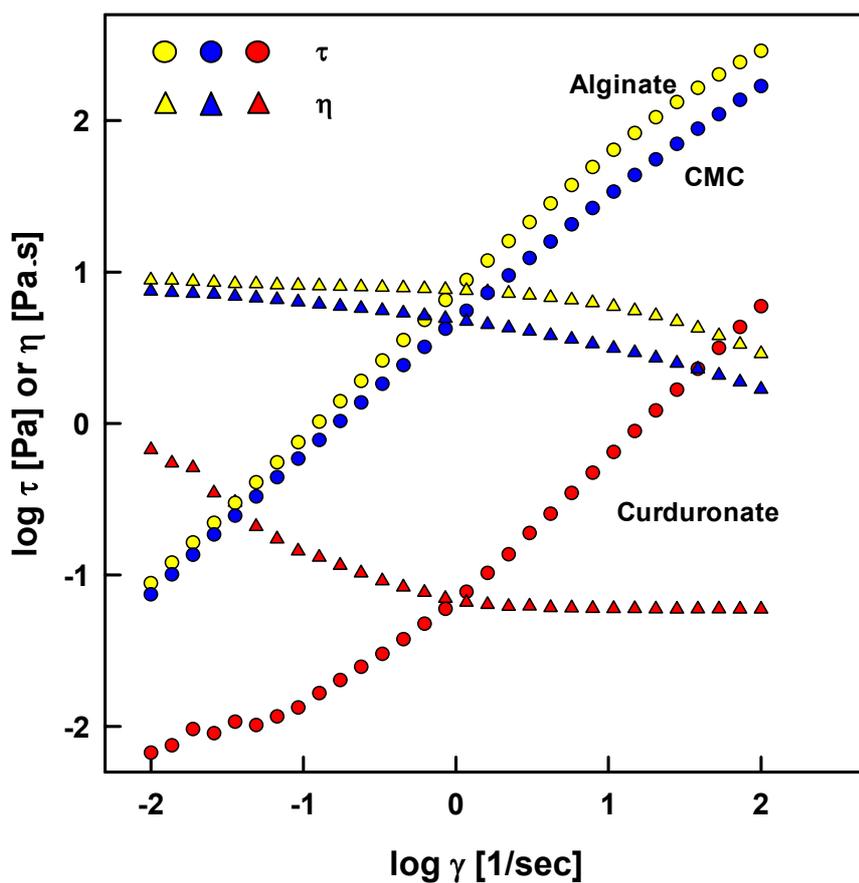


図4.3. 5.0wt%カーデュロン酸、アルギン酸ナトリウム、CMC水溶液の τ 及び η のせん断速度依存性

4.3.2. 各種金属イオンによるカーデュロン酸水溶液の粘弾性特性変化

各種金属塩を添加し、24 時間後に観察した結果を図 4.4. に示す。カルシウム、ストロンチウム、バリウムの各塩化物塩を添加した場合には、液面に塩化物水溶液を滴下させた際に生じた陥没が観察された。これは、塩化物水溶液とカーデュロン酸水溶液との界面からゲルが生成したためだと考えられる。1 価の金属塩では、液滴の添加による陥没は確認されず、ゲル化していないことが分かった。このことから、1 価の金属塩ではゲル化に必要な架橋点として働いていないことが考えられる。また、2 価イオンである塩化マグネシウム水溶液を添加した試料においてもゲル化が確認できなかった。アルギン酸ナトリウムにおいて、2 価金属イオンにおけるゲル化強度はイオン化傾向が大きい元素ほど強度が増加することから、カーデュロン酸においても、イオン化傾向の増加に伴ってゲル化しやすくなったと考えられる。

ゲル化挙動をより詳細に検討するため、20wt%カーデュロン酸水溶液（カルボキシル基濃度；900 mM）に濃度の異なる塩化カルシウム水溶液（塩濃度；9.0 - 90 mM）を添加し、 G' 及び G'' の周波数依存性を図 4.5. に示す。塩濃度 9.0 mM では未添加と比べ、 G' 、 G'' 共に 1 ケタ増加しているが、 G'' が G' を上回っており、系としては流動状態であった。18 mM 以上の添加条件では、 G' が G'' を上回り、また 2 ケタ以上の周波数領域において G' と G'' が平行であることから、ゲル化していることが分かった。水溶液中のカルボキシル基量に対して、カルシウムイオン濃度が 1/50 から 1/20 でゲル化していることから、2 価のカルシウムイオンによってカルボキシル基間に架橋構造が形成されていることが考えられる。式 (1) を用いて 1 Hz (6.28 rad/sec) における絡み合い点間重合度を算出すると、570 となった。実験に用いたカーデュロン酸の重合度（表 4.1.）に対して、絡み合い点間重合度が小さいことから、カーデュロン酸分子内及び分子鎖間のカルボキシル基間でカルシウムイオンによる架橋が起こっていることが示された。

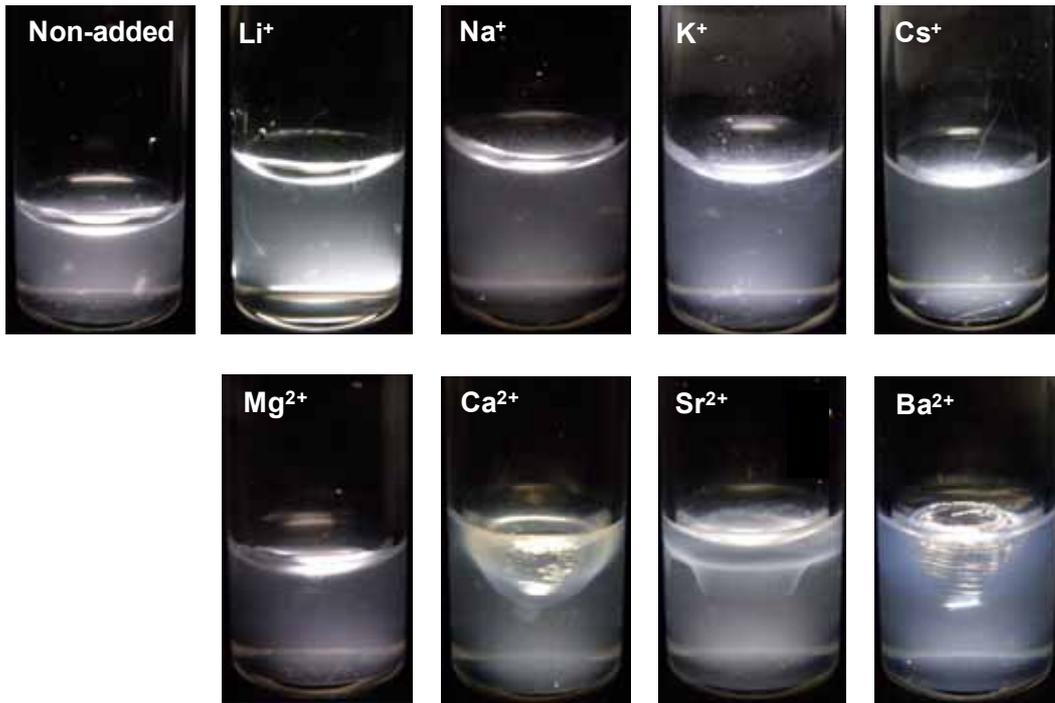


図4.4. 各種金属塩化物水溶液を添加した20wt%カーデユロン酸水溶液のゲル化挙動の違い

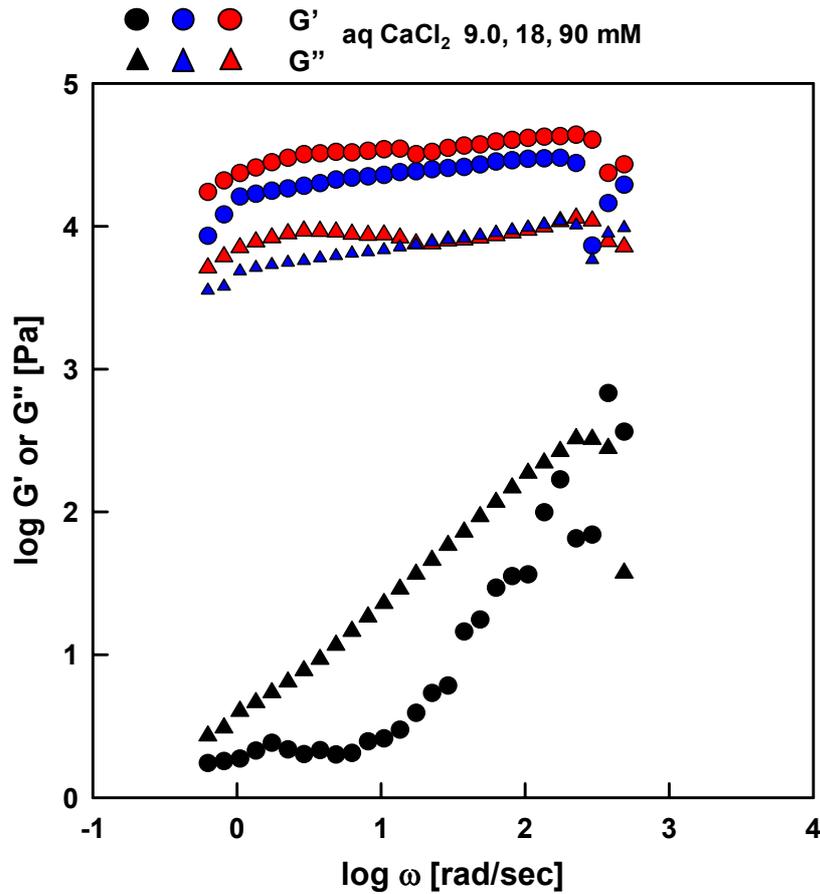


図4.5. 9.0-90 mM塩化カルシウム水溶液を添加した20wt%カーデユロン酸水溶液のG'及びG''の周波数依存性

4.4. 結論

カーデュロン酸水溶液の粘弾性測定を行った。濃度依存性を調べたところ、濃度が増加するにつれ粘度増加が見られたが、濃度 20wt%においても、ゲル化せずに溶解状態を保っていたことが分かった。また、濃度の増加に伴い降伏応力が増加していることから、濃度増加に伴う粘度上昇は分子鎖の絡み合いによるものであることが分かった。貯蔵弾性率の周波数依存性から、低周波数領域に平坦部が見られ、絡み合い点間重合度を算出したところ、試料の重合度よりも遥かに大きな値であったことから、カーデュロン酸分子は、水中において比較的大きな分子会合体を形成していることが示唆された。

カーデュロン酸と化学構造が類似した物質であるアルギン酸ナトリウムや CMC と比較すると、同濃度においてカーデュロン酸水溶液は 1 ケタ以上、低粘度であることが分かった。測定に供した試料の重合度は、カーデュロン酸が最も大きいことから、水溶液中での溶解状態がアルギン酸ナトリウムや CMC とは異なることが示唆された。

20wt%カーデュロン酸水溶液に各種金属塩化物水溶液を添加すると、アルカリ土類金属塩の添加によってゲルが形成された。塩化カルシウム水溶液の添加についてより詳細に検討を行ったところ、カルボキシル基量に対して、1/50 程度のカルシウム塩を添加することでゲル化することが分かった。以上から、カーデュロン酸水溶液は高濃度においても低粘度であり、希薄な金属イオン添加によってゲル化することから、ドラッグデリバリー等で用いられる新規内包剤としての応用が期待される。

4.5. 参考文献

- [1] Kennedy, J. F., Griffiths, A. J., & Atkins, D. P. (1984). In G. O. Phillips, D. A. Wedlock & P. D. Williams, *Gums and stabilizers for the food industry*, 2, 422, Oxford: Pergamon Press
- [2] McNeely, W. H., & Pettit, D. J. H. (1973). In R.L.Whistler & J. N. Bemiller, *Industrial gums*, 2, 49, New York: Academic Press
- [3] Kratochvil, D., and Volesky, B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, 16, 291-300
- [4] Orav, S., and Gudmund, S. B. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71-78
- [5] Ostberg, T., Lund, E. M., and Graffner, C. (1994). Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: IV. Release characteristics in different media. *International Journal of Pharmaceutics*, 112, 241-248
- [6] Qiu, X., Leporatti, S., Donath, E., and Möhwald, H. (2001). Studies on the Drug Release Properties of Polysaccharide Multilayers Encapsulated Ibuprofen Microparticles. *Langmuir*, 17, 5375-5380
- [7] Regand, A., and Goff, H. D. (2003). Structure and ice recrystallization in frozen stabilized ice cream model systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 95–102
- [8] Pelletier, S., Hubert, P., Lapique, F., Payan, E., and Dellacherie, E. Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions. *Carbohydrate Polymers*, 43, 343-349.
- [9] Polymer handbook 4th edition

5. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化を用いたパラミロン ナノフィブリルの調製

5.1. 背景

直鎖状(1-3)- β -グルカンであるパラミロンは、三重らせん構造を単位とする結晶を有し、その結晶性は天然高分子の中では高い[1,2]。これまでに、三重らせん構造という特異的な構造は、X線回折や固体 ^{13}C -NMRによって分析されている。三重らせん構造の繰り返し単位は、3本鎖それぞれが6個のグルコース単位が一巻きとなる右巻きらせんであり、三重らせん構造のサイズは直径方向が1.556 nm、長軸方向が1.878 nmであることがX線回折により求められている[3,4,5,6,7,8]。図5.1にパラミロンの1本のらせん構造について断面方向の模式図を示した。らせん構造の内側は、O2位同士の水素結合によって、構造を安定化している。三重らせん構造間には、O6位及びO4位同士が水素結合していることが明らかになっている[1]。また、TEMPO触媒酸化によって酸化されるC6位の1級水酸基は、三重らせん構造の外側を向いていることが分かる。パラミロンは、三重らせん構造からなるマイクロフィブリルが高度に配向していることから、ダウンサイジングによってパラミロンからナノフィブリルが調製可能であると考えられる[5,9,10]。

TEMPO触媒酸化と軽微な機械処理を天然セルロースやキチンに適用することで、高い結晶性を有したセルロースシングルナノフィブリルを調製できることが見出された[9,10,11]。TEMPO触媒酸化によって、結晶表面に露出しているC6-OHがカルボキシル基へと選択的に酸化されると、導入されたカルボキシル基同士の電荷反発や浸透圧効果によって、マイクロフィブリル間の水素結合が切れ、マイクロフィブリル単位で分散可能になることが報告されている[9,10,11]。

第2章で弱アルカリ性TEMPO触媒酸化(TEMPO/NaBr/NaClO; pH 10)をパラミロンに適用すると、十分な次亜塩素酸ナトリウム添加条件では低分子量のポリグルクロン酸となり、水可溶化することが明らかになった。そこで、本章では弱酸性TEMPO触媒酸化(4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂; pH 4.7)に着目した[12,13]。第3章の結果及び既報から、低結晶性(1-3)- β -グルカンであるカードランや再生セルロースに新規TEMPO触媒酸化を適用した場合、高分子量のポリグルクロン酸が得られることが分かった[14,15]。また、天然セルロースに適用した場合、弱アルカリ性TEMPO触媒酸化で

得られる生成物よりも高分子量でかつ、得られるナノフィブリルがより長いということが分かっている[16,17]。これらの結果から、高結晶性(1-3)- β -グルカンであるパラミロンに弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用することにより、弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化で起きた低分子化等の副反応が抑制され、パラミロンからもナノフィブリルが調製可能ではないかと考えた。

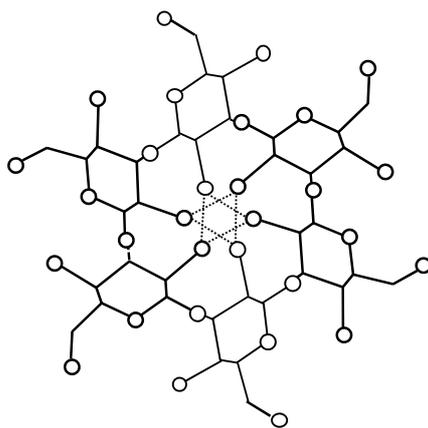


図5.1. パラミロンのらせん構造模式図(断面方向、破線は水素結合を示す)

5.2. 出発物質及び実験

5.2.1. 出発物質

市販されているパラミロンを出発物質として用いた (Wako Pure Chemicals, Japan)。4-アセトアミド-TEMPO、亜塩素酸ナトリウム (有効塩素量 ; 80%)、12% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液、及びその他の試薬や溶媒はすべて特級グレードのものをそのまま用いた。

5.2.2. パラミロンの弱酸性 TEMPO 触媒酸化

パラミロンの弱酸性下 TEMPO 触媒酸化の基準となる実験プロセスを以下に記す。パラミロン (1 g ; 6.0 mmol C6-OH、顆粒状) を密栓フラスコに入れ、pH 4.7 に調製した 0.2 M 酢酸緩衝液を 100 ml 加えて分散させた。4-アセトアミド-TEMPO (0.096 g ; 0.45 mmol)、亜塩素酸ナトリウム (有効塩素量 ; 80%, 0.68 g ; 6.0 mmol) を密栓フラスコに加え、攪拌によって分散させた。分散液に次亜塩素酸ナトリウム (12%, 0.62 ml ; 1.0 mmol) を一度に加え、すぐ栓をして反応を開始させた。分散液を 35 °C に保ち、72 時間反応させた。72 時間後の反応液が白濁したままであったことから、カードランに適用した場合と異なり、反応生成物が水可溶化していないことが分かった。168 時間反応させた条件においても水可溶化していなかった。反応液は遠心分離によって、上澄みを水可溶成分、沈殿物を水不溶性成分として回収した。水可溶性成分は同量のエタノールを加えて沈殿を分離し、透析・凍結乾燥を経て乾燥試料を経た。水不溶性成分は透析したのち、水分散液として回収した。

5.2.3. 微細化処理

TEMPO 触媒酸化により得られた酸化パラミロン水分散液 (固形分濃度 ; 約 1%) を固形分濃度 0.1%、50 ml に希釈した。調製した水分散液を超音波ホモジナイザー (US-300T ; Nihonseiki, Japan) を用い 19.5 kHz、出力 230W という条件で、1 回の処理を 1 分間とし 2 回行った。超音波処理は水分散液の温度が上がらないように、氷浴中に行った。遠心分離によって十分に微細化されていない粗大物を除去し、透明な分散液を得た。

5.2.4. 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

微細化処理した酸化パラミロン水分散液を固形分濃度 0.01%に希釈し、10 μl を TEM 用グリッドに滴下した。過剰液滴をろ紙で吸い取り、1%酢酸ウラニル 10 μl を滴下して染色した。同様に、過剰液滴をろ紙で吸い取り観察に供した。観察には、JEM-2000EX (JEOL, Japan) を用い、起電圧を 100 kV で観察した。

5.2.5. 原子間力顕微鏡 (AFM) 観察

微細化処理した酸化パラミロン水分散液を蒸留水により、固形分濃度 0.002%に希釈したのち 10 μl を剥離した直後のマイカ板に滴下した。真空乾燥により水を除去したのち、AFM (Nanoscope Multimode, Digital Instruments) のタッピングモードを用いて観察を行った。

5.2.6. その他の分析手法

カルボキシル基量を測定するために 2.2.7.に従って、電気伝導度滴定を行った。

分光光度計 (UV-1700, Shimadzu, Japan) を用いて、微細化処理により得られた TEMPO 触媒酸化パラミロン水分散液の吸光度を測定した。測定は 300 - 700 nm において行った。0.1, 1.0%に調製した TEMPO 触媒酸化パラミロン水分散液と、比較として低結晶性 (1 \rightarrow 3)- β -グルカンであるカードランを弱酸性 TEMPO 触媒酸化して得られる水可溶性ポリグルクロン酸 (カーデュロン酸) を同濃度に調製して測定に供した。

弱酸性 TEMPO 触媒酸化前後での結晶構造を比較するため、X 線回折測定を行った。試料は、TEMPO 触媒酸化パラミロン水分散液を凍結乾燥し、調湿塩 (飽和塩化カリウム水溶液; 85%RH, 25 $^{\circ}\text{C}$) を用いて密閉容器中で 24 時間調湿した後、2.2.7 の手順に従って測定を行った。元のパラミロンについても、同様の条件で調湿し、測定を行った。

5.3. 結果及び考察

5.3.1. TEMPO 触媒酸化パラミロンのカルボキシル基量及び収率

図 5.2.に、TEMPO 触媒酸化パラミロン (TOP) の水不溶性成分の回収率及びカルボキシル基量を示す。反応時間が長くなるほど水不溶性成分の回収率は下がることから、反応が進むに従って水可溶性成分が増加していることが明らかになった。水可溶性成分について ^{13}C -NMR 測定を行ったところ、ほぼ全ての C6-OH が酸化されたポリグルクロン酸であることが確認された。水不溶性成分のカルボキシル基量は反応時間の増加に伴って増加したが、72 時間を超えると増加が緩やかになり、1.7 mmol/g で一定値に達した。これらのことから、反応時間を変えることにより、水不溶性成分の回収率及びカルボキシル基量を制御できることが示された。

パラミロンに弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化を適用すると反応時間 100 分以内にすべての C6-OH が酸化され、水可溶性ポリグルクロン酸が得られた[第 2 章]のに対し、弱酸性 TEMPO 触媒酸化では 168 時間後でも、すべての C6-OH は酸化されず水不溶性成分が 40%程度残存していた。このことから、天然セルロースに弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用した例[17]と同様に、低分子化等の副反応が抑制されたために完全には水可溶化しなかったと考えられる。また第 3 章より、低結晶性(1-3)- β -グルカンであるカードランに弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用した場合には、水可溶性ポリグルクロン酸が得られていることから、パラミロンから水不溶性成分が得られたのはパラミロンの高結晶性が弱酸性 TEMPO 触媒酸化に対して抵抗性を示したためだと考えられる。

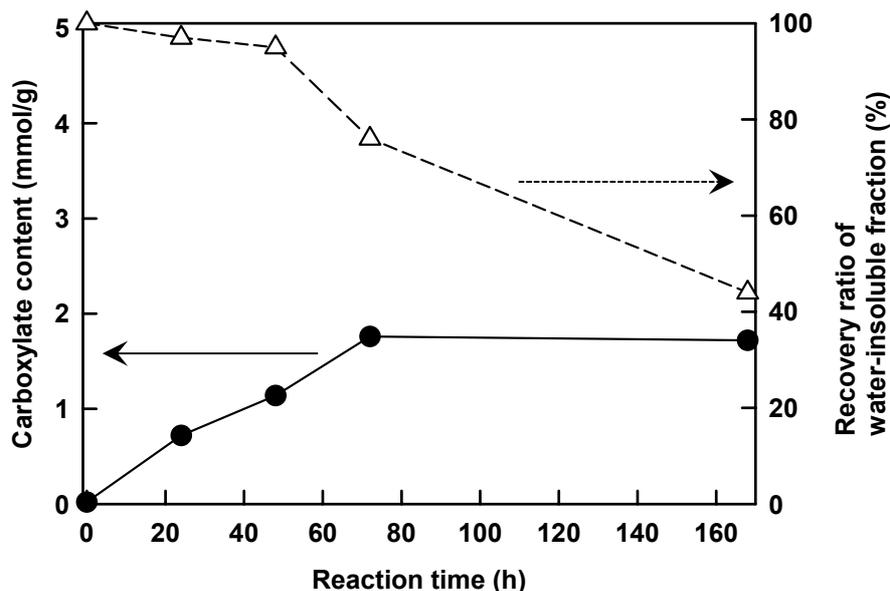


図5.2. 元のパラミロン及び、4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35°C, 24-168 h) システムを用いて調製したTEMPO触媒酸化パラミロン (TOP) のカルボキシル基量

5.3.2. TEMPO 触媒酸化によるパラミロンの結晶サイズ変化

元のパラミロン及び TOP の水不溶性成分の X 線回折パターンを図 5.3. に示す。回折パターンから TEMPO 触媒酸化後では結晶性は低下しているものの、元の回折パターンは維持されていた。

各結晶面における面間隔の変化を見ると、TEMPO 触媒酸化後ではごくわずかではあるが面間隔が増加していた。これは、カルボキシル基が導入されたことにより、三重らせん構造間の荷電反発が起きたためだと考えられる。結晶サイズが、反応時間 24 時間後において大きく減少したのち一定になっていることから、反応は結晶内部にも進行するが、パラミロンの三重らせん構造は維持されていることが示された。

TEMPO 触媒酸化後では、どの反応時間においても結晶サイズに大きな変化が見られないことから、反応時間 168 時間における水不溶性成分回収率の減少は、TEMPO 触媒酸化により結晶の乱れや分子鎖の開重合が生じた場所から、水可溶化が進んだためと考えられる。

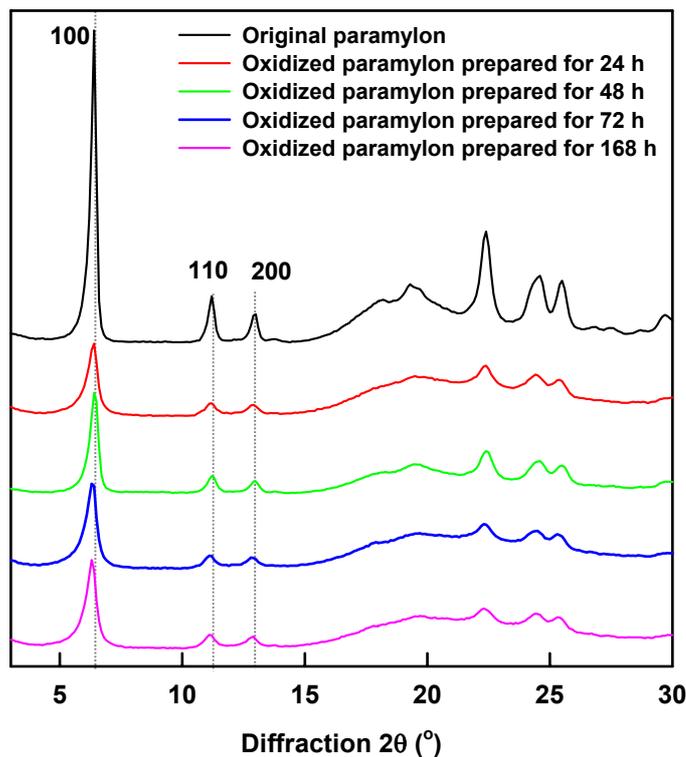


図5.3. 元のパラミロン及び、4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂システム (pH 4.7, 35°C, 24-168 h)システムを用いて調製したTEMPO触媒酸化パラミロンの水不溶性分のX線回折パターン

5.3.3. TEMPO 触媒酸化パラミロンナノフィブリルの調製及び形状観察

水不溶成分に対し超音波処理及び遠心分離を施すことにより、透明な水分散液を得た (図 5.4.a.)。TEMPO 触媒酸化パラミロン (TOP) 水分散液 (固形分濃度; 0.1, 1.0%) 及び TEMPO 触媒酸化カードラン (カーデュロン酸) 水溶液 (濃度; 0.1, 1.0%) の吸光スペクトルを図 5.4.c.に示す。可視光領域において、分子溶解しているカーデュロン酸では、濃度が上昇しても吸光スペクトルに大きな変化は見られないが、TOP 水分散液では濃度の上昇に伴って、吸光度が大きく変化した。このことは、TOP 水分散液中には、分子よりも大きな構造体が分散していることを表している。また、1%水分散液を直交偏光板に挟んで観察すると、静置下で複屈折性が確認された (図 5.4.b.) ことから、水分散液中の構造体はフィブリルであることが示唆された。

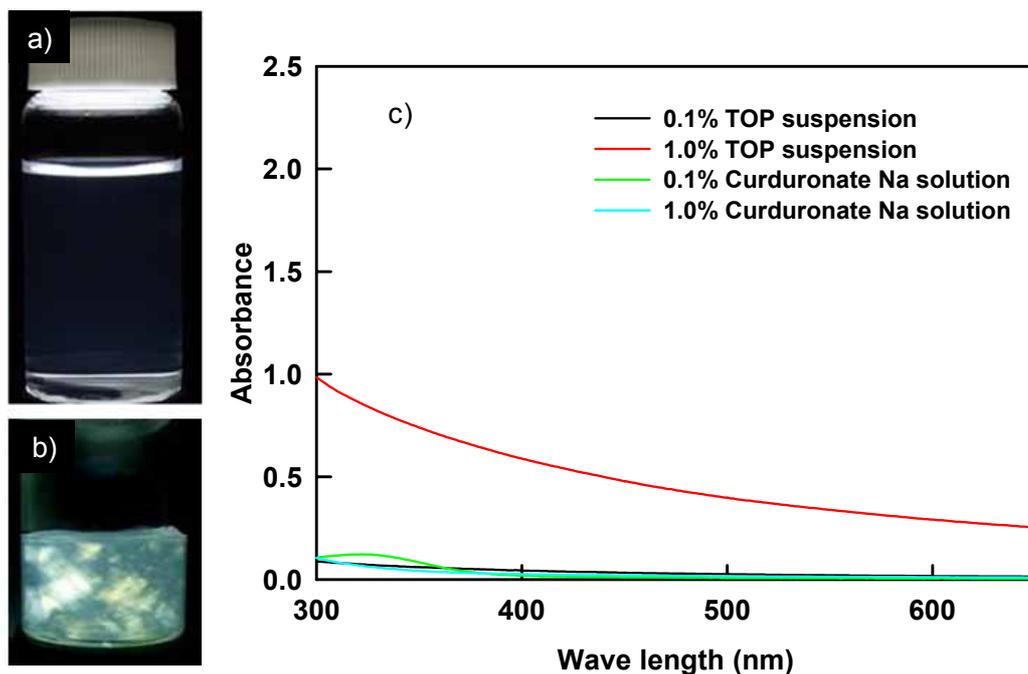


図5.4. a) 0.1% TEMPO触媒酸化パラミロン (TOP) 水分散液、b) 1.0% TOP水分散液 (直交偏光板に挟んで観察)、c) 0.1, 1.0% TOP水分散液及び0.1, 1.0% カーデュロン酸水溶液の吸光度 (300–700 nm)

水分散液の上澄みを TEM により観察した像を図 5.5.に示す。図から明らかなように非常に細いフィブリル (TEMPO 触媒酸化パラミロンナノフィブリル; TOPN) が多数観察された。TEM 像上で TOPN の長さを画像解析ソフトウェア (Image J, NIH, U.S.A.) によって算出すると、数平均で 380 nm であることが分かった。元のパラミロンの重量平均重合度は 1670[第 2 章]、三重らせん構造の繰返し単位 (グルコース単位 6 個分) のナノフィブリル長軸方向の長さが 1.878 nm [1]であることから、三重らせん構造の途中で分子鎖の開裂が起きていないと仮定すると、元のパラミロンの三重らせん構造の長軸方向の長さは 520 nm である。したがって、TEMPO 触媒酸化や超音波処理の一方もしくはその両方によって、得られたナノフィブリルは元のパラミロンの三重らせん構造と比較すると短くなっていた。

パラミロンナノフィブリルの AFM 像を図 5.6.に示す。AFM 像においても、アスペクト比の大きなフィブリルが確認できた。AFM の高さプロファイルにより得られたフィブリルの高さをフィブリルの幅と考えその平均を算出すると、 1.98 ± 0.5 nm であることが分かった。X 線回折から得られた三重らせん構造の直径方向のサイズが 1.556 nm [1]

であることと合わせると、今回調製された TOPN は三重らせん構造が単離されたものであると考えられる。

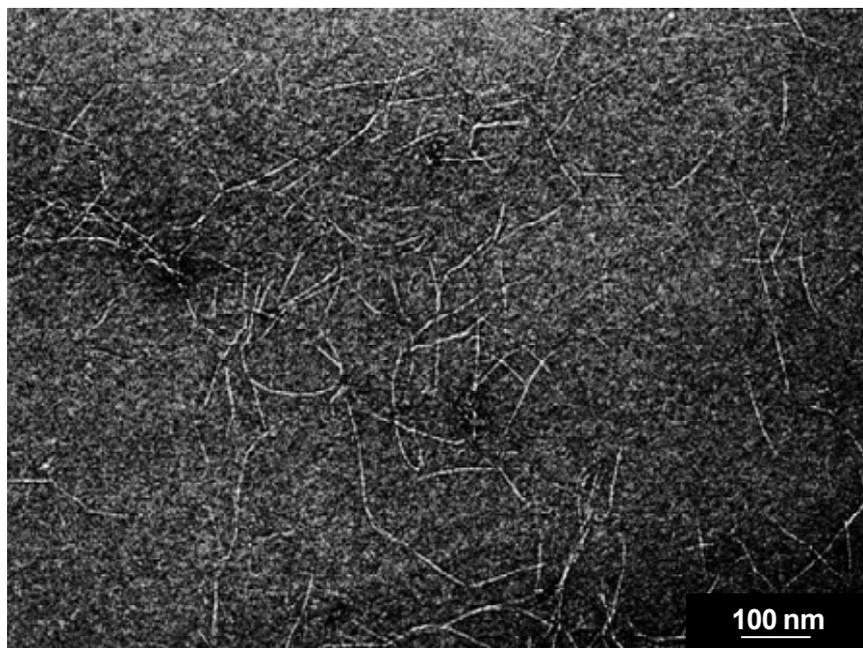


図5.5. 0.01%TOPN水分散液のTEM観察像

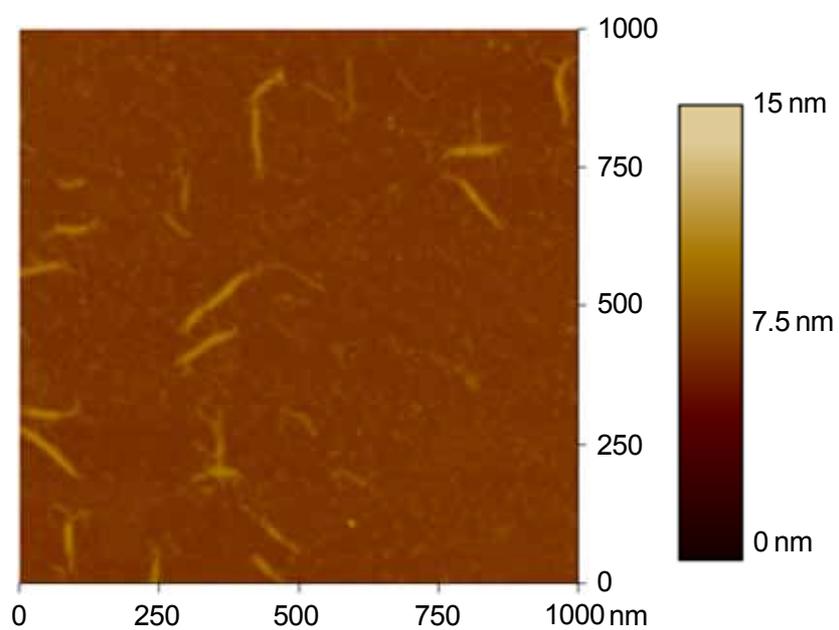


図5.6. 0.002%TOPN水分散液のAFM位相像

5.4. 結論

パラミロンに弱酸性TEMPO触媒酸化を適用すると、低結晶性のカードランと異なり、完全には水可溶化せず、168時間後においても水不溶成分が約20%存在した。X線回折から、水不溶成分は結晶サイズの減少が見られるものの、元のパラミロンの三重らせん構造は維持されていた(図5.6.)。

パラミロンに弱酸性TEMPO触媒酸化を適用し、超音波による微細化処理を行うことによりTEMPO触媒酸化パラミロンナノフィブリル(TOPN)を調製することに成功した(図5.6.)。TOPNの形状観察を行ったところ、長さ380nm、幅1.98nmであった。X線回折により明らかになっている三重らせん構造の直径1.556nmと、重合度より算出した三重らせん構造の長軸方向の長さ560nmを併せて考えると、調製したTOPNは長軸方向にグリコシド結合の開裂が見られるものの、三重らせん構造を維持していることが示唆された。

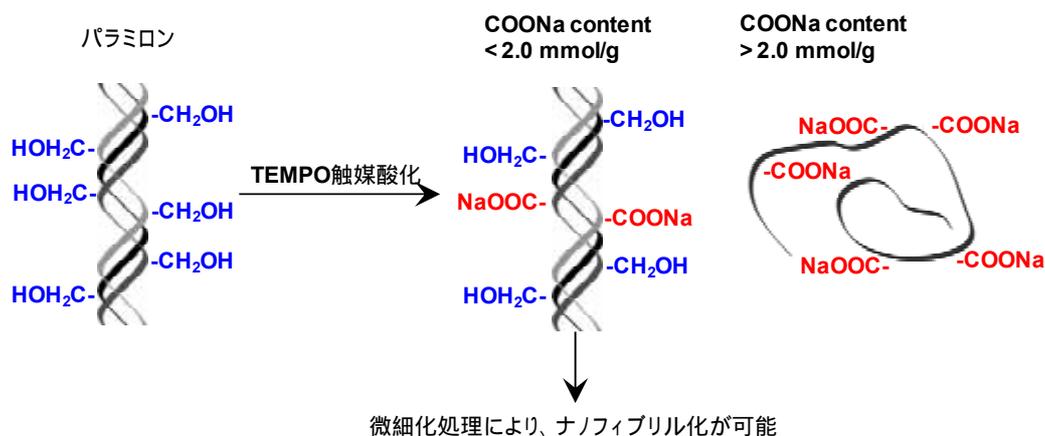


図5.6. パラミロンの弱酸性TEMPO触媒酸化

5.5. 参考文献

- [1] Chuah, C. T., Sarko, A., Deslandes, Y., & Marchessault, R. H. (1983). Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. Part 14. Triple-helical crystalline structure of curdlan and paramylon hydrates. *Macromolecules*, 16, 1375–1382.
- [2] Clarke, A. E., & Stone, B. A. (1960). Structure of the paramylon from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 44, 161–163.
- [3] Deslandes, Y., Marchessault, R. H., & Sarko, A. (1980). Triple-helical structure of (1→3)- β -D-glucan. *Macromolecules*, 13, 1466–1471.
- [4] Fyfe, C. A., Stephenson, P. J., Taylor, M. G., Bluhm, T. L., Deslandes, Y., & Marchessault, R. H. (1984). Hydration effects in the ^{13}C CP/MAS NMR spectra of solid (1→3)- β -D-glucans. *Macromolecules*, 17, 501–502.
- [5] Kiss, J. Z., Roberts, E. M., Brown, R. M., Jr., & Triemer, R. E. (1988). X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. *Protoplasma*, 146, 150–156.
- [6] Manners, D. J., Masson, A. J., & Patterson, J. C. (1973). Structure of a β -(1→3)-Dglucan from yeast-cell walls. *The Biochemical Journal*, 135, 19–30.
- [7] Marchessault, R. H., & Deslandes, Y. (1979). Fine structure of (1→3)- β -D-glucans: Curdlan and paramylon. *Carbohydrate Research*, 75, 231–242.
- [8] Kobayashi, K., Kimura, S., Togawa, E., Wada, M., and Kuga, S. (2010). Crystal transition of paramylon with dehydration and hydration. *Carbohydrate Polymers*, 80, 491-497
- [9] Saito, T., Nishiyama, Y., Putaux, J. L., Vignon, M., and Isogai, A. (2006). Homogeneous Suspensions of Individualized Microfibrils from TEMPO-Catalyzed Oxidation of Native Cellulose. *Biomacromolecules*, 7, 1686-1691
- [10] Fan, Y., Saito, T., and Isogai, A. (2009). TEMPO-mediated oxidation of β -chitin to prepare individual nanofibrils. *Carbohydrate Polymers*, 77, 832-838

- [11] Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y., & Isogai, A. (2007). Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, 8, 2485–2491.
- [12] Zhao, M., Li, J., Mano, E., Song, Z., Tschaen, D. M., Grabowski, E. J. J., et al. (1999). Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by TEMPO and bleach. *Journal of Organic Chemistry*, 64, 2564–2566.
- [13] Zhao, M., Li, J., Mano, E., Song, Z., & Tschaen, D. M. (2005). Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by TEMPO and bleach: 4-methoxyphenylacetic acid. *Organic Syntheses*, 81, 195–199.
- [14] Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., & Isogai, A. (2009). Oxidation of regenerated cellulose with NaClO₂ catalyzed by TEMPO and NaClO under acid-neutral conditions. *Carbohydrate Polymers*, 78, 330–335.
- [15] Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., & Isogai, A. (2010). Water dispersion of cellulose II nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of mercerized cellulose at pH 4.8. *Cellulose*, 17, 279–288.
- [16] Saito, T., Hirota, M., Tamura, N., Fukuzumi, H., Kimura, S., Heux, L., and Isogai, A. (2009). Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst under neutral conditions. *Biomacromolecules*, 10, 1992–1996.
- [17] Saito, T., Hirota, M., Tamura, N., and Isogai, A. (2010). Oxidation of bleached wood pulp by TEMPO/NaClO/NaClO₂ system: effect of the oxidation conditions on carboxylate content and degree of polymerization. *J. Wood Sci.*, 56, 227–232.
- [18] Saito, T., and Isogai, A. (2004). TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions. *Biomacromolecules*, 5, 1983–1989.

6. 総括

2. 弱アルカリ条件における(1→3)-β-グルカンの TEMPO 触媒酸化

水不溶性のパラミロン及びカードランから、TEMPO/NaBr/NaClO システムによって水系、pH 10 という条件で水可溶性の生成物を得ることに成功した。次亜塩素酸ナトリウム 15 mmol/g の添加条件で、ほぼすべての C6 位の 1 級水酸基が酸化され、カルボキシル基へと酸化された。また、この反応はパラミロン及びカードランのどちらでも 100 分以内に完了したが、パラミロンは結晶性がカードランよりも高いために C6 位をすべて酸化するためにより長時間を必要とした。このように、β-1,3 結合のほぼ均一な構造を持つポリグルクロン酸ナトリウム塩が、TEMPO 触媒酸化により化学量論的に調製することができた。一方で、反応中にβ-1,3 グリコシド結合の開裂によって、著しい低分子化が起こり、得られた水可溶性生成物の重合度はパラミロン及びカードランでそれぞれ、68、86 となってしまった。パラミロン及びカードランは、(1→3)-β-グルカンであるので、TEMPO 触媒酸化によって C6、C2 や C4 の水酸基が、アルデヒド基またはケトン基へと酸化されたとしても、β脱離反応による低分子化は起こらない。従って、弱アルカリ性 TEMPO 触媒酸化中にパラミロン及びカードランが著しく低分子化してしまう原因は、β脱離反応ではなく他の要因、おそらくは反応中に生成したラジカル種によるものであると考えられる。

3. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化を用いた高分子量ポリグルクロン酸調製の検討

弱酸性 TEMPO 触媒酸化 (4-アセトアミド-TEMPO/NaClO/NaClO₂; pH 4.7; 35 ; 24 時間) によって、低分子化を抑制しつつ、C6-OH が選択的にカルボキシル基へと酸化されたカードランを調製することに成功した。反応時間を 4 - 24 時間とすることで、酸化カードランのカルボキシル基量を 2.27 - 4.85 mmol/g (C6-OH の酸化度; 40 - 95%) と制御することができた。また、カードランの場合ではカルボキシル基量が 2 mmol/g を超えると、水可溶化することが分かった。酸化中の低分子化を完全に抑制することはできなかったが、C6-OH の酸化度 95%、重合度 1000 を超える酸化カードランを調製することができた。各種スターチやアミロース、プルランに適用した場合には、導入されたカルボキシル基量は同じ反応条件でカードランと比べ少なかった。このことから、(1

4)- α -グルカンの C6-OH は(1-3)- β -グルカンと比べ、酸化を受けづらく、また、 α -1,6 結合の近くに存在する C6-OH もまた、TEMPO により酸化されづらいことが示された。(1

4)- α -グルカンで弱酸性 TEMPO 触媒酸化の反応性が低さについて、結晶構造中の 1 級水酸基が三重らせん構造の長軸方向を向いているために、1 級水酸基が三重らせん構造の外側に出ているカードランと比較すると、4-アセトアミド-TEMPO との反応中間体の形成が阻害されたことが考えられる。

4. カーデュロン酸水溶液の粘弾性特性に関する検討

カーデュロン酸水溶液の粘弾性測定を行った。濃度依存性を調べたところ、濃度が増加するにつれ粘度増加が見られたが、濃度 20wt%においても、ゲル化せずに溶解状態を保っていたことが分かった。また、濃度の増加に伴い降伏応力が増加していることから、濃度増加に伴う粘度上昇は分子鎖の絡み合いによるものであることが分かった。貯蔵弾性率の周波数依存性から、低周波数領域に平坦部が見られ、絡み合い点間重合度を算出したところ、試料の重合度よりも遥かに大きな値であったことから、カーデュロン酸分子は、水中において比較的大きな分子会合体を形成していることが示された。

カーデュロン酸と化学構造の似た物質であるアルギン酸ナトリウムや CMC と比較すると、同濃度においてカーデュロン酸水溶液は 1 ケタ以上、低粘度であることが分かった。測定に供した試料の重合度は、カーデュロン酸が最も大きいことから、水溶液中での溶解状態がアルギン酸ナトリウムや CMC とは異なることが明らかになった。

20wt%カーデュロン酸水溶液に各種金属塩化物水溶液を添加すると、アルカリ土類金属塩の添加によってゲルが形成された。塩化カルシウム水溶液の添加についてより詳細に検討を行ったところ、カルボキシル基量に対して、1/50 程度のカルシウム塩を添加することでゲル化することが分かった。以上から、カーデュロン酸水溶液は高濃度においても低粘度であり、希薄な金属イオン添加によってゲル化することから、ドラッグデリバリー等で用いられる新規内包剤としての応用が期待される。

5. 弱酸性 TEMPO 触媒酸化を用いたパラミロンナノフィブリルの調製

パラミロンに弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用すると、低結晶性のカードランと異なり、完全には水溶化せず、168 時間後においても水不溶成分が約 20%存在した。X 線回折から、水不溶成分は結晶サイズの減少が見られるものの、元のパラミロンの三重らせん構造は維持されていた。

パラミロンに弱酸性 TEMPO 触媒酸化を適用し、超音波による微細化処理を行うことにより TEMPO 触媒酸化パラミロンナノフィブリル (TOPN) を調製することに成功した。TOPN の形状観察を行ったところ、長さ 380 nm、幅 1.98 nm であった。X 線回折により明らかになっている三重らせん構造の直径 1.556 nm と、重合度より算出した三重らせん構造の長軸方向の長さ 560 nm を併せて考えると、調製した TOPN は元のパラミロンの三重らせん構造と比較するとフィブリルの長さは短くなっているものの、三重らせん構造を維持していることが示唆された。

投稿論文

1. Tamura, N., Wada, M., & Isogai, A. (2009). TEMPO-mediated oxidation of (1 → 3)- β -glucans. *Carbohydrate Polymers*, 77, 300–305.

2. Tamura, N., Hirota, M., Saito, T., and Isogai, A. (2010). Oxidation of curdlan and other polysaccharides by 4-acetamide-TEMPO/NaClO/NaClO₂ under acid conditions. *Carbohydrate Polymers*, 81, 592-598

参考論文

1. Saito, T., Hirota, M., Tamura, N., Kimura, S., Fukuzumi, H., Heux, L., and Isogai, A. (2009). Individualization of Nano-Sized Plant Cellulose Fibrils by Direct Surface Carboxylation Using TEMPO Catalyst under Neutral Conditions. *Biomacromolecules*, 10, 1992-1996

2. Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., and Isogai, A. (2009). Oxidation of regenerated cellulose with NaClO₂ catalyzed by TEMPO and NaClO under acid-neutral conditions. *Carbohydrate Polymers*, 78, 330-335.

3. Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., and Isogai, A. (2009). Surface carboxylation of porous regenerated cellulose beads by 4-acetamide-TEMPO/NaClO/NaClO₂ system. *Cellulose*, 16, 841-851.

4. Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., and Isogai, A. (2010). Water dispersion of cellulose nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of mercerized cellulose at pH 4.8. *Cellulose*, 17, 279-288.

5. Saito, T., Hirota, M., Tamura, N., and Isogai, A. (2010). Oxidation of bleached wood pulp by TEMPO/NaClO/NaClO₂ system: effect of the oxidation conditions on carboxylate content and degree of polymerization. *Cellulose*, 56, 227-232.

研究発表

1. 国際学会での発表（口頭発表）

Tamura, N.; Watanabe, E.; Saito, T.; and Isogai, A. “TEMPO-mediated oxidation of (1→3)- β -D-glucans” Polysaccharides as source of advanced and sustainable products 2nd International Polysaccharide Conference, Wageningen, The Netherlands, 2011, Aug.

2. 国際学会での発表（ポスター発表）

Tamura, N.; Hirota, M.; Saito, T.; and Isogai, A. “Oxidation of polysaccharides by TEMPO/NaClO₂/NaClO” American Chemical Society, Salt Lake City, USA, 2009, Mar.

3. 国内学会での発表（口頭 5 件、ポスター 4 件）

A 口頭発表

田村直之、齋藤継之、和田昌久、磯貝 明 “-1,3 グルカンの TEMPO 触媒酸化” 繊維学会（1D02）、東京、2007 年 7 月

田村直之、廣田真之、齋藤継之、磯貝 明 “TEMPO 触媒酸化による高分子量ポリグルクロン酸の調製” 繊維学会（1D03）、東京、2008 年 6 月

田村直之、廣田真之、齋藤継之、磯貝 明 “TEMPO 触媒酸化を用いた高分子量ポリグルクロン酸の調製と最適反応条件の検討” 繊維学会（2B14）、東京、2010 年 6 月

田村直之、齋藤継之、磯貝 明 “TEMPO 触媒酸化カードラン水溶液のレオロジーについて” 繊維学会（1D03）、東京、2011 年 6 月

田村直之、齋藤継之、磯貝 明 “(1-3)- β -グルカンの TEMPO 触媒酸化” 高分子討論会 (3V07)、岡山、2011 年 9 月

B ポスター発表

田村直之、齋藤継之、和田昌久、磯貝 明 “ β -1,3 グルカンの TEMPO 触媒酸化” セルロース学会 (P11)、静岡、2007 年 7 月 (ポスター賞受賞)

田村直之、齋藤継之、磯貝 明 “TEMPO 触媒酸化を用いた天然多糖のナノダウンサイジングに関する検討” セルロース学会 (P50)、京都、2008 年 7 月

田村直之、齋藤継之、磯貝 明 “TEMPO 触媒酸化を用いたパラミロンナノフィブリルの調製” セルロース学会 (P25)、香川、2010 年 7 月

田村直之、齋藤継之、磯貝 明 “TEMPO 触媒酸化による高分子量(1-3)- β -グルクロン酸の調製と溶液物性” 高分子討論会 (3Pb122)、札幌、2010 年 9 月

謝辞

本論文は、私が東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料専攻製紙科学研究室に在籍した2006年4月から2012年3月までに行った研究成果をまとめたものです。本研究を進めるに当たり、多くの方からご指導、ご鞭撻、ご協力を賜りました。ここに感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

特に、磯貝明教授には、研究や実験の進め方、研究に対する姿勢など多岐に渡ってご助言を頂きました、心より感謝申し上げます。また、木村実特任教授、江前敏晴准教授には、研究に対するご助言だけでなく、製紙科学全般に関する数々のご教示を頂きましたこと感謝の限りです。齋藤継之助教には、装置の使い方から、実験データのまとめ方など実際の研究生活において、細やかな御指導を賜りました、厚く御礼申し上げます。6年間に渡る研究室生活において、同研究室の皆様や柳原正弘博士(住友化学株式会社)吉田穰博士(花王株式会社)を始めとする研究室の諸先輩方には、研究面及び研究室の雰囲気盛り上げて下さったことに感謝いたします。植松武彦博士(花王株式会社)には、試料を提供していただき、また粘弾性測定において測定方法からデータの解析までお力添えいただきました、御礼申し上げます。快く副査を引き受けて下さった、羽生直人教授(宇都宮大学)、和田昌久准教授、岩田忠久准教授にはお忙しい中、審査に時間を割いて下さりありがとうございます、厚く御礼申し上げます。

博士課程において、特別研究員として私を採用して下さい、経済的な面から研究をご支援下さった日本学術振興会に深く感謝の意を表します。

最後に、学部、大学院併せ計10年間大学に通わせてくれた両親に感謝いたします。

2012.3.22 田村直之