HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	キチンの利用に関する研究 ： 主として酵素による構成糖およびその誘導体の生産法
Author(s)	坂井, 和男
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	乙第4013号
Issue Date	1991-12-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3086338
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51157
Type	doctoral thesis
File Information	000000245530.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

主　論　文

キチンの利用に関する研究

—主として酵素による構成糖およびその誘導体の生産法—

坂　井　和　男

平　成　三　年

(1)

主　論　文

キチンの利用に関する研究

－ 主として酵素による構成糖およびその誘導体の生産法 －

平 成 三 年

坂 井　和 男

目　次

		頁
序論	-----	1
第一章　キチンおよびキトサンオリゴ糖の生産と利用	-----	6
第一節　酸加水分解によるキチンオリゴ糖の生産	-----	8
１．キチンの加水分解条件の検討	-----	8
２．イオン交換膜電気透析脱塩法によるキチンオリゴ糖の生産	-----	13
第二節　酸加水分解によるキトサンオリゴ糖の生産	-----	20
第三節　キチンオリゴ糖の特性	-----	28
第四節　要約	-----	36
第二章　バイオリアクターによるＮ－アセチルグルコサミンの生産	-----	37
第一節　固定化酵素の調製とその諸性質	-----	39
第二節　バイオリアクターによるＮ－アセチルグルコサミンの生産	-----	52
第三節　要約	-----	61
第三章　キトサン分解酵素によるグルコサミンの生産	-----	62
第一節　エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼの精製と諸性質	-----	64
第二節　キトサナーゼの精製と諸性質	-----	88
第三節　酵素によるグルコサミンの生産	-----	107
第四節　要約	-----	114

第四章　β－ガラクトシダーゼによるＮ－アセチルラクトサミンおよび
Ｎ－アセチルアロラクトサミンの酵素合成 ----- 115

第一節　Ｎ－アセチルラクトサミンの生産に適する市販β－ガラク
トシダーゼの検索 ----- 117

第二節　Ｎ－アセチルラクトサミンの酵素的生産法の検討 ----- 123

第三節　Ｎ－アセチルアロラクトサミンの酵素的生産法の検討 ----- 136

第四節　要約 ----- 144

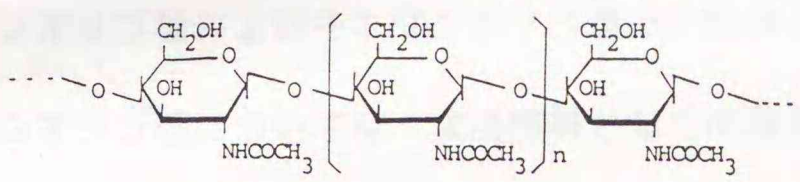
総括 ----- 146

謝辞 ----- 149

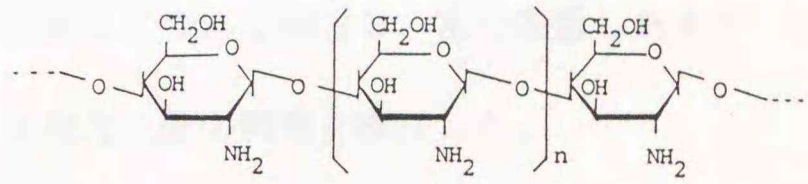
文献 ----- 150

序論

キチンは、Ｎ－アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合した多糖類の一種で、カニ、エビ等の甲殻類、カブトムシ、コオロギ等の昆虫類、その他、シイタケ、菌類等の細胞壁の構成成分として含まれ、植物界におけるセルロースのように生物体の支持や防護の役割を担っている。また、キチンの脱アセチル体であるグルコサミンのポリマーをキトサンと称している。それらの構造を下図に示す。



キチン



キトサン

このキチンは、地球上で推定 1000 億トン／年も生物生産される大きく活用されるべき未利用の天然資源として注目されている。とくに、海洋資源であるカニ、エビ、オキアミ等の甲殻中には、カルシウムやタンパク質とともに主な構成成分として大量に含まれ、また大量に入手し易いことから、その利用が一層期待されている。

最近、キチンオリゴ糖やキトサンオリゴ糖に種々の生理活性が見出された。例えば、ヘキサ－Ｎ－アセチルキトヘキサオースがマウスに対して顕著な免疫機能増強作用や抗腫瘍活性を示し[1]、そして植物に対してはメロンのキチナーゼ活性誘導因子としてのエリシター活性を有していること[2]や、カボチャのエチレン生成に関与する酵素活性を誘導すること[3]を認めている。また、キトヘプタオースは、植物病原菌である Fusarium solani に対し抗菌活性を示し、さやえんどうの生産する抗菌物質ピサチンを誘導することを認めている[4]。このように、これらオリゴ糖の機能には極めて興味深いものがある。

しかしながら、キチンオリゴ糖やキトサンオリゴ糖の生産は、従来の酸加水分解法あるいはキチナーゼ、キトサナーゼを用いた酵素法により試みられているが、効率的かつ大量に生産できるまでには至っていない。

そこで、筆者は、キチン、キトサンを加水分解して得られるオリゴ糖や単糖の利用は、未利用資源としてのキチンの高度利用を達成するうえで極めて重要なことと考え、これらオリゴ糖であるキチンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖および単糖であるＮ－アセチルグルコサミン、グルコサミンの効率的生産法とその利用について検討した。

筆者は、これらオリゴ糖の大量生産を目標として、第一章では、酸加水分解によるキチンオリゴ糖およびキトサンオリゴ糖の効率的な生産法について検討し、また生産したキチンオリゴ糖については、食品素材としての利用を考え、その特性を検討した。

キチンの構成単位である単糖のＮ－アセチルグルコサミンはビフィズス菌増殖因子として知られ[5]、食品素材として期待される物質である。しかし、Ｎ－アセチルグルコサミンの工業生産は、キチンを塩酸で完全加水分解して得られるグルコサミン塩酸塩を原料として有機溶媒中で無水酢酸を用いてＮ－アセチル化する化学合成によって行われていることから、国内では食品として容易に使用することができないのが現状である。これは、キチンを原料として酸加水分解を行うとグリコシド結合の加水分解と同時にＮ－アセチルグルコサミン残基のアセチル基も分解され、グルコサミン塩酸塩が生成することに起因している。このようなことから、キチン分解酵素であるキチナーゼやβ－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼを用いたキチンオリゴ糖やＮ－アセチルグルコサミンの生産が試みられている。しかしながら、キチンが水に不溶であることから、その酵素反応は著しく遅く、工業生産を行うまでには至っていない。

そこで、第二章では、キチンを酸により部分加水分解して得られる水可溶性のキチンオリゴ糖を用い、キチン分解酵素の研究過程において見出した Nocardia orientalis の生産

するキチナーゼとβ－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼを固定化し、バイオリアクターによるＮ－アセチルグルコサミンの連続生産を試みた。

一方、グルコサミンは、キトサンの構成単位であるが、前述したようにキチンを塩酸で完全に加水分解してグルコサミン塩酸塩の形で工業的に製造され、化学合成原料や医薬品原料として用いられている有用な物質である。このようなグルコサミンの生産のための、酸加水分解に代わる優れた方法として、キトサンの酵素分解法によるグルコサミンの生産が考えられた。キトサンを分解する酵素としてはキトサナーゼが知られ、数多くの微生物から見出されている。しかし、これらのキトサナーゼはキトサンを分解してキトサンオリゴ糖を生成する典型的なエンド型酵素である[6-15]。したがって、キトサンまたはキトサンオリゴ糖を分解するエキソ型酵素を見出すことが強く望まれた。

筆者は、N. orientalis が、そのエキソ型酵素であるエキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼをキチン分解酵素（キチナーゼ、β－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼ）とキトサナーとともに生産することを見出すことができた。このことにより、キトサンの酵素による完全分解を達成できるものと考え、第三章では、これら酵素の精製と諸性質について検討し、酵素によるグルコサミンの生産を試みた。

次に、Ｎ－アセチルグルコサミンの高度利用を目的とし、Ｎ－アセチルグルコサミン残基を含む有用物質のひとつであるＮ－アセチルラクトサミンの糖転移反応による酵素合成を試みた。Ｎ－アセチルラクトサミン［Gal-β-(1-4)GlcNAc］は、ガラクトース（Gal）とＮ－アセチルグルコサミン（GlcNAc）がβ-1,4 結合した二糖類で、ウシ初乳中に遊離状態で比較的多量に存在し[16]、また多くの人乳オリゴ糖中の構成糖として含まれ[17]、その他、リポ多糖、各種の糖タンパク質および糖脂質の糖鎖中に基本構造として存在し[18,19]、ビフィズス菌増殖因子[5,20]はもとより生化学的にも非常に重要なオリゴ糖である。しかしながら、未だ効率的な生産法が開発されていないことから、

Ｎ－アセチルラクトサミンは著しく高価であり、また試薬レベルでの供給しかできていない。

そこで、第四章では、Ｎ－アセチルグルコサミンを受容体基質、ラクトースを供与体基質として、Ｎ－アセチルラクトサミンを優先的に生成する糖転移活性の高いβ－ガラクトシダーゼの検索を行い、生化学的素材や食品素材として適するＮ－アセチルラクトサミンの効率的生産法を検討した。また、Ｎ－アセチルアロラクトサミン（β-1,6 結合異性体）についても効率的生産法の開発を試みた。

略　語

本論文において、次に示す略語は以下の物質を表すものとする。

GlcNAc	N-acetylglucosamine
$GlcNAc_2$	di-N-acetyl-chitobiose
$GlcNAc_3$	tri-N-acetyl-chitotriose
$GlcNAc_4$	tetra-N-acetyl-chitotetraose
$GlcNAc_5$	penta-N-acetyl-chitopentaose
$GlcNAc_6$	hexa-N-acetyl-chitohexaose
$GlcNAc_7$	hepta-N-acetyl-chitoheptaose
PNP-GlcNAc	p-nitrophenyl 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside
GlcN	glucosamine
$GlcN_2$	chitobiose
$GlcN_3$	chitotriose
$GlcN_4$	chitotetraose
$GlcN_5$	chitopentaose
$GlcN_6$	chitohexaose
PNP-GlcN	p-nitrophenyl 2-deoxy-2-amino-β-D-glucopyranoside
Gal	galactose
GalN	galactosamine
NAL	N-acetyllactosamine
NAAL	N-acetylallolactosamine
NAHase	β-N-acetylhexosaminidase

第一章　キチンおよびキトサンオリゴ糖の生産と利用

キチンオリゴ糖は、Ｎ－アセチルグルコサミン（GlcNAc）がβ-1,4 結合で数個[*]結合したオリゴ糖で、一般にキチンを部分加水分解して調製される。キチンオリゴ糖の調製の試みは、過去いくつかなされてきた[21-23]が、一連の重合度のオリゴ糖（$GlcNAc_2$～$GlcNAc_7$）は得られていなかった。しかし、1958年にBarkerら[24]は、キトサンを塩酸により加水分解し、これをＮ－アセチル化した後、活性炭カラムによる分離を行い、$GlcNAc_7$までのオリゴ糖を得た。そして、1964年にRupley[25]は、リゾチームの基質としてのオリゴ糖を得るために、キチンを種々の条件で塩酸加水分解し、活性炭カラムによる分離精製を行い、$GlcNAc_5$までのオリゴ糖を得た。この方法は、キチンオリゴ糖の一般的調製法として広く用いられている。また、最近では、ふっ化水素によりキチンを加水分解する改良法も示されている[26]。

しかし、このような酸分解法は、グリコシド結合がランダムに加水分解し、しかもアセチル基の脱離を起こすことがわかり、目的とする重合度のキチンオリゴ糖を効率的に得るには、加水分解条件を正確に設定する必要がある。

そこで、筆者は、従来から行われている塩酸加水分解によるキチンオリゴ糖の生産に際して、加水分解時における各種の重合度のオリゴ糖の生成量を調べ、最適加水分解条件について検討した。また、工業的生産を目標としたキチンオリゴ糖の製法を検討し、得られたキチンオリゴ糖については、今まで明らかにされていなかった食品素材としての特性を調べた。

一方、キトサンオリゴ糖は、グルコサミン（GlcN）がβ-1,4 結合したオリゴ糖で、キチ

---

[*] 本論文では、２～６個結合したものをキチンオリゴ糖として取り扱った。

ンを熱濃アルカリ処理して得られるキトサンを部分加水分解して調製することができる。

酸加水分解によるキトサンオリゴ糖の調製は、1957年にHorowitzら[27]により行われた。この方法は、キトサンを溶解し塩酸で加水分解後、イオン交換クロマトグラフィーで分離精製を行うものである。しかしながら、加水分解は、キトサンに対し多くの塩酸を用い、しかも長時間を要していた。また、分離精製も大量に行えるものではなかった。

このようなことから、筆者は、キトサンの塩酸加水分解条件ならびにイオン交換クロマトグラフィーによるキトサンオリゴ糖の分離精製法について検討を加え、効率的なキトサンオリゴ糖の製造法の開発を試みた。

第一節　酸加水分解によるキチンオリゴ糖の生産

１．キチンの加水分解条件の検討

キチンオリゴ糖の調製法として一般的に広く用いられているRupleyによる方法[25]において、キチン加水分解時のオリゴ糖の組成ならびに収率変化の詳細については明らかにされていなかった。そこで、目的とする重合度のキチンオリゴ糖を効率的に生産するために必要と考えられるキチン加水分解時のオリゴ糖の生成変化を調べた。さらに、活性炭カラムによるオリゴ糖の回収実験を行い、効率的分解条件について検討した。

実験方法

（１）試料

鳥取県産のベニズワイガニ（Chionoecetes japonicus, Rathbun）の甲殻を、Hackmanの方法[28]に準じて調製したキチンを用いた。

（２）キチンの加水分解および分解液の調製

キチン 200 gに１kgの濃塩酸（35%、和光純薬製）を加え、撹拌しながら 40℃で分解を行った。１時間毎に分解液 30 gを採取し、これを分析試料とした。分析試料は等量の蒸留水で希釈後 25%水酸化ナトリウム溶液 30 gを加えて中和し、再び中和溶液と等量の蒸留水で希釈した後、セライト 10 gを加えて濾過した。濾液は還元力、GlcN量を測定した後、200 mlの陽イオン交換樹脂（Dowex 50W×4)カラムおよび 100 mlのイオン交換樹脂混合（アンバーライトIR120B：アンバーライトIRA400 = 1:1）カラムに供し、流出液は濃縮後凍結乾燥し、キチン分解物（Chitin hydrolysates）を得た。

（３）分解物からのキチンオリゴ糖の分別

キチンを前記と同様に 40℃で 1.5、2.0、2.5、3.0 時間、30℃で 2.0、4.0、6.0 時

間分解を行った後、中和および濾過を行った。濾液を活性炭カラム（4.4×100 cm、活性炭：セライト = 1:1）に供し、オリゴ糖を吸着させた。カラムを ５ℓの蒸留水を用いて洗浄した後、オリゴ糖を、６ℓの 50%エタノールを用いて溶出した。溶出液は減圧濃縮によってエタノールを除去した後、イオン交換樹脂カラム（4.5×30 cm、アンバーライトIR120B：アンバーライトIRA400 = 1:1）に供し、流出液を減圧濃縮および凍結乾燥し、オリゴ糖粉末を得た。

（４）還元力の測定

分解液の還元力の測定は、濾液 50μｌを 10 mlに希釈し、その１mlに３mlのSchales試薬[29]を加え 15 分間煮沸後、420 nmの吸光度を測定することによって行った。

（５）GlcNの測定

分解物中のGlcN量はGlcNの塩酸塩を標準として、ninhydrin法[30]により測定した。

（６）キチンオリゴ糖の分析

キチンオリゴ糖の分離定量はHPLCを使用した。分析は、下記の条件で行った。

使用機種　　：Waters製、201Dコンパクト型

検出器　　：Waters製、R401型示差屈折計

データ処理　：島津製、クロマトパックC-R3A

カラム　　：Waters製、μ-bondapack CH (3.9×300 mm)

流速　　：0.8 ml／min

移動相　　：$CH_3CN : H_2O$ = 70:30 (v/v)

温度　　：室温

結果と考察

（１）キチンの加水分解条件の検討

目的とする重合度のキチンオリゴ糖を効率的に生産するために、キチンの酸加水分解における生成物と生成量の経時変化を調べた。反応温度はアセチル基の加水分解をできるだけ抑えるため 40℃で行った。Fig. 1 に、加水分解時におけるキチン分解物、GlcNの生成量ならびに分解濾液の還元力の経時変化を示した。キチン分解物の生成量は、加水分解の経過時間とともに４時間までは急激に増加し、その後はほぼ最高値を示した。しかし、10 時間後には減少する傾向を示した。また、還元力値も４時間までは急激に増加し、以後緩やかに増加し続け、10 時間経過後に減少した。脱アセチル化物のGlcNの生成は緩やかであるが加水分解時間とともに増加した。一方、この時のキチン分解物中のオリゴ糖のキチンに対する生成量変化をFig. 2 に示した。その結果、キチン分解物はGlcNAcとキチンオリゴ糖から成り、その組成、生成量ともに加水分解時間に大きく影響されることが明らかとなった。キチン分解物の生成量は約４時間で最大に達し、この時キチンオリゴ糖の生成量も最大になることがわかった。しかし、それ以後キチン分解物の生成量は変化せず、キチンオリゴ糖の３～６糖（$GlcNAc_3$～$GlcNAc_6$）が次第に減少し、GlcNAcと２糖（$GlcNAc_2$）が増大した。これは、生成したオリゴ糖の加水分解が進行し、単糖や２糖へ分解されたと考えられ、このことは、還元力の緩やかな増大からも示唆された。

以上の結果から、40℃でのキチンの最適加水分解時間は次のように考えられた。$GlcNAc_5$、$GlcNAc_6$の効率的生産を目的とするならば約２時間、$GlcNAc_3$、$GlcNAc_4$では約４時間、そしてGlcNAc、$GlcNAc_2$では約７時間であった。

（２）活性炭カラムによるオリゴ糖の分別

キチンの塩酸加水分解物から$GlcNAc_2$～$GlcNAc_6$のオリゴ糖混合物を得るために、従来から用いられている活性炭カラムによる方法を試みた。この方法は活性炭がオリゴ糖を特異的に吸着し、単糖や酸の中和により生成した塩類を吸着しない特性を利用したもので、

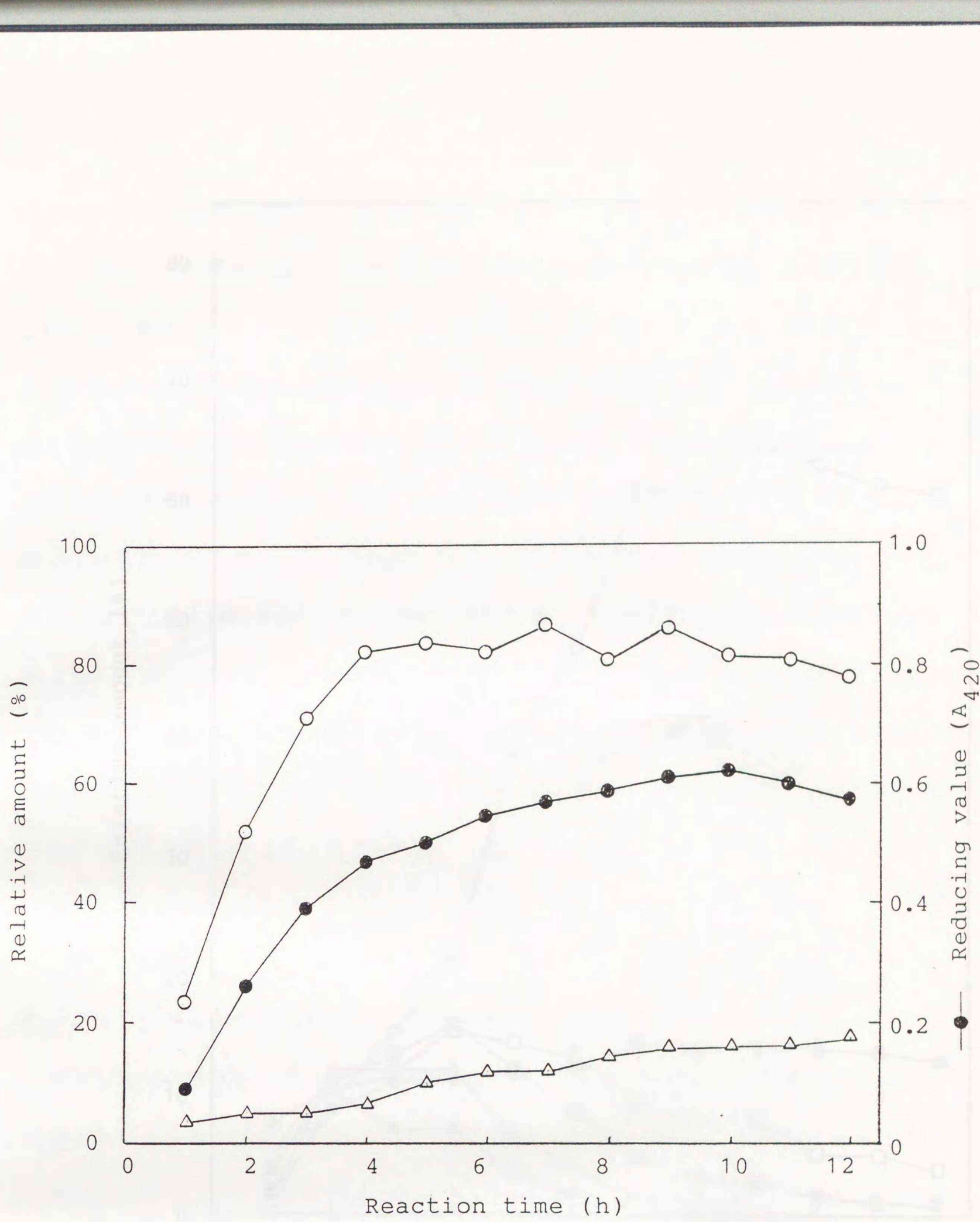


Fig. 1. Course of acid hydrolysis of chitin.
Chitin (200 g) was hydrolyzed with 1 kg of 35% HCl at 40°C. At the indicated time, 30 g of hydrolysate was taken out, and analyzed as described in the text.
○, chitin hydrolysate; △, GlcN; ●, reducing value

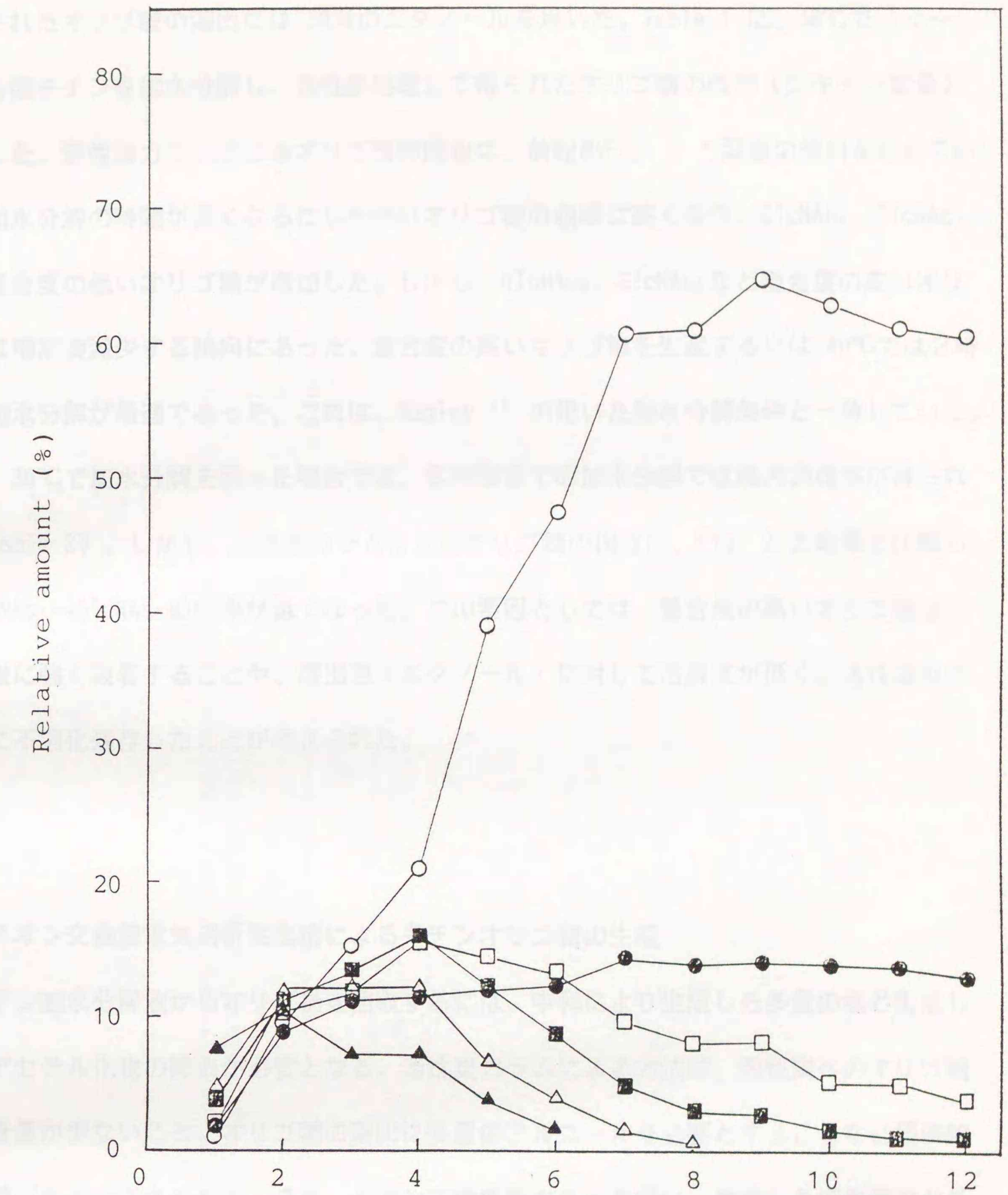


Fig. 2. Production of chitin-oligosaccharides by HCl hydrolysis.
The reaction conditions were the same as in Fig. 1. The production of chitin-oligosaccharides were analyzed by HPLC as described in the text.
○, GlcNAc; ●, $GlcNAc_2$; □, $GlcNAc_3$; ■, $GlcNAc_4$; △, $GlcNAc_5$; ▲, $GlcNAc_6$

吸着されたオリゴ糖の溶出には 50%のエタノールを用いた。Table 1 に、40℃で 1.5～3.0 時間キチンを加水分解し、活性炭処理して得られたオリゴ糖の収率（対キチン重量）を示した。活性炭カラムによるオリゴ糖の回収は、前記のFig. 2 と同様の傾向を示していた。加水分解の時間が長くなるにしたがいオリゴ糖の収率は高くなり、$GlcNAc_2$、$GlcNAc_3$など重合度の低いオリゴ糖が増加した。しかし、$GlcNAc_5$、$GlcNAc_6$など重合度の高いオリゴ糖は増加後減少する傾向にあった。重合度の高いオリゴ糖を生産するには 40℃では２時間の加水分解が最適であった。これは、Rupley [25] の用いた加水分解条件と一致していた。また、30℃で加水分解を行った場合では、６時間までの加水分解では最大の収率が得られた（Table 2）。しかし、活性炭カラムによるオリゴ糖の回収は、Fig. 2 の結果と比較して$GlcNAc_4$～$GlcNAc_6$の収率が低くなった。この要因としては、重合度の高いオリゴ糖は、活性炭に強く吸着することや、溶出液（エタノール）に対して溶解度が低く、活性炭カラム内に不溶化残存したことが考えられた。

２．イオン交換膜電気透析脱塩法によるキチンオリゴ糖の生産

キチン加水分解液からオリゴ糖を回収するには、中和により生成した多量の塩と生成した脱アセチル化物の除去が必要となる。活性炭カラムによる方法は、活性炭へのオリゴ糖の吸着量が少ないこと、オリゴ糖の溶出に多量のアルコールを必要とすることなど経済的な問題があると考えられる。また、イオン交換樹脂カラムを用い、生成した塩や脱アセチル化物の除去は可能であるが、多量の塩の除去が必要であることから設備が大型化する。このようなことから、効率的生産を目的として、キチン加水分解液からのオリゴ糖の回収をイオン交換膜電気透析装置による脱塩を行って検討した。

Table 1. Yields of chitin-oligosaccharides by acid hydrolysis with 35% HCl at 40°C
The reaction procedure was the same as in Fig. 1.

Reaction time (h)	Yield (%)					
	$GlcNAc_2$	$GlcNAc_3$	$GlcNAc_4$	$GlcNAc_5$	$GlcNAc_6$	Total
1.5	5.3	6.4	6.3	5.5	3.9	27.4
2.0	7.1	8.2	8.0	6.9	4.9	35.1
2.5	9.9	10.0	8.2	5.2	3.4	36.7
3.0	12.0	10.7	7.9	5.2	2.2	38.0

Table 2. Yields of chitin-oligosaccharides by acid hydrolysis at 30℃
The reaction conditions were the same as in Table 1. except for the temperature.

Reaction time (h)	Yield (%)					
	$GlcNAc_2$	$GlcNAc_3$	$GlcNAc_4$	$GlcNAc_5$	$GlcNAc_6$	Total
2.0	1.0	1.5	1.6	1.6	0.7	6.4
4.0	2.4	2.6	2.6	3.1	2.8	13.5
6.0	6.4	8.4	8.7	8.6	4.0	36.1

実験方法

（１）試料

前項の実験と同様にして調製したキチンを用いた。

（２）キチンの加水分解及び分解液の調製

キチン 500 gに 2.5 kgの濃塩酸（35％）を加え、撹拌しながら 40℃で３時間 15 分、分解を行った。分解液は、３ℓの蒸留水で希釈後、25％水酸化ナトリウム溶液を加えて中和した。次に、セライト 300 gおよび活性炭 10 gを加えて濾過し、キチン分解濾液７ℓを得た。

（３）イオン交換膜電気透析装置による脱塩

分解濾液の脱塩は、陽イオン交換膜（ネオセプタCM-2、徳山曹達製）、陰イオン交換膜（ネオセプタACS、徳山曹達製 ）の 10 対の膜で構成されるイオン交換膜電気透析装置（徳山曹達製、YS-2-10 型）を用いて行った。脱塩槽（４ℓ容量）にはキチン分解濾液を入れ、濃縮槽と電解液槽に５％食塩水４ℓを使用して、流速３ℓ/min で循環させながら電気透析を行った。電気透析後、溶液は 400 mlの陽イオン交換樹脂カラム（三菱化成製、ダイヤイオンUBK510L ）および 200 mlの陰イオン交換樹脂カラム（三菱化成製、ダイヤイオンWA30）に供し、得られた流出液を濃縮後凍結乾燥した。

（４）塩分の測定

塩化物イオンをモール法で測定し、塩化ナトリウムとして算出した。

（５）キチンオリゴ糖の分析

前項の実験方法と同様にして行った。

結果と考察

キチン分解濾液中には、キチンオリゴ糖、GlcNAcの他、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウ

ム、GlcN等が含まれている。これらイオン物質の除去にイオン交換膜電気透析装置を用いて検討した。Table 3 に、イオン交換膜電気透析装置の運転条件とキチン分解濾液中の塩分の経時変化を示した。塩分は、経過時間とともに低下し、４時間後には 0.6%となった。このとき、キチン分解濾液量も徐々に減少し、初発の約1/2量まで濃縮された。また、経過時間とともに、pHの緩やかな上昇と２時間までは、わずかながらの温度上昇が認められた。一方、運転条件においては、脱塩が進行するとともに３時間以降は急激な電流値の低下が認められた。

次に、残存した少量の塩分を完全に除去するためにイオン交換樹脂カラムを用い精製を行い、最終的に得られたキチン分解物の組成をHPLCにより調べた。その結果、Table 4 に示すように$GlcNAc_2$～$GlcNAc_6$のオリゴ糖の他、加水分解によって多量に生成したGlcNAcが回収されていた。また、乾燥物収量は 255 gで、キチンからの収率は 51%であった。イオン交換膜電気透析装置を用いたキチンオリゴ糖の生産は、従来の活性炭カラムによる方法では回収できなかったGlcNAcを含め、キチンオリゴ糖を簡便にしかも大量に生産できることが明らかとなった。この方法は工業的生産法として優れていると判断された。

Table 3. Time courses of NaCl concentrations in hydrolysates and various conditions of the electrodialyzer

Time (h)	Operating condition		Hydrolysates			
	Voltage(V)	Amperage(A)	NaCl(%)	pH	Volume(ml)	Temperature(°C)
0	8.3	8.0	15.5	3.9	3393	19.0
0.5	8.3	8.5	14.3	4.2	3276	21.0
1.0	8.0	8.5	12.7	4.3	3089	24.0
1.5	8.0	8.6	11.1	4.4	2902	26.0
2.0	8.0	8.6	9.0	4.4	2621	28.0
2.5	8.0	8.6	7.3	4.4	2410	29.0
3.0	8.2	8.0	5.2	4.5	2153	27.5
3.5	8.5	7.4	2.9	4.6	1919	29.0
4.0	9.4	5.5	0.6	4.8	1661	30.0

Table 4. Composition and yield of chitin hydrolysates obtained after desalting by the electrodialyzer

Chitin-oligosaccharides	Composition (%)	Yield* (%)
GlcNAc	38.6	21.3
$GlcNAc_2$	21.0	11.6
$GlcNAc_3$	16.6	9.1
$GlcNAc_4$	12.2	6.7
$GlcNAc_5$	7.9	4.4
$GlcNAc_6$	3.7	2.0

*Yield was calculated on the amount of chitin.

第二節　酸加水分解によるキトサンオリゴ糖の生産

キトサンオリゴ糖の酸加水分解による調製は、Horowitzら[27]により試みられた。この方法は、キトサンを希酸に溶解し、加水分解はキトサンに対し多くの塩酸を用い、しかも反応温度約 50℃で１～２日を要していた。このようなことから、キトサンオリゴ糖の効率的生産を目的として、従来より高温での短時間分解によるキトサンオリゴ糖の生産性について調べた。また、得られたキトサンオリゴ糖の溶解度を明らかにし、その性質を利用したキトサンオリゴ糖の分離精製法についても検討を加えた。

実験方法

（１）試料

キチンを 50％水酸化ナトリウム溶液中で 60℃、６時間反応させた後、水洗、乾燥してキトサンを調製した。キトサンはミキサー（松下電器 MX-V350）で 10 mesh程度に粉砕し、以下の加水分解に用いた。

（２）キトサンの加水分解及び分解物の調製

キトサン 200 gに２ℓの濃塩酸（35％）を加え、撹拌しながら 80℃で分解を行った。加水分解液を１、２、４、６、８時間後に 200 ml採取し、同量の蒸留水を加えた後、不溶物を遠心分離で除去した。得られた上清液に活性炭を加え脱色後、減圧濃縮乾固してキトサン分解物を得た。

（３）キトサンオリゴ糖の分離精製

前記と同様、キトサン 750 gを 7.5ℓの濃塩酸を用い 80℃で１時間加水分解した。反応後、7.5ℓの蒸留水を加え、この分解液の不溶物を遠心分離で除去し、上清液に活性炭を加え脱色後、減圧濃縮乾固した。この分解物にメタノール 6.5ℓを加え室温で２時間撹拌

後、吸引濾過で不溶物を除去、濾液を減圧濃縮乾固した。ここで、メタノールの溶解分離により 300 gのキトサン分解物を得た。次に、この分解物（300 g）をイオン交換樹脂（Dowex 50w×4）カラム（8×100 cm）に吸着させた。キトサンオリゴ糖の溶出は、1.1、1.9、2.6、3.1、3.7、4.1 Mの塩酸によるステップワイズで行い、検出は、ニンヒドリン発色で 570 nmの吸光度を測定して行った。各々の画分は濃縮後乾燥した。

（４）溶解度の測定

撹拌しながら 20℃に保った溶媒 10 mlに、GlcN～$GlcN_6$を正確に秤量し添加した。溶媒に溶解する溶質（GlcN～$GlcN_6$）の最大添加量を測定し、溶解度を算出した。

結果と考察

（１）キトサンの加水分解

キトサンの加水分解は、従来の方法とは異なり、キトサンを希酸に溶解せず 10 mesh程度に粉砕したフレーク状のままで使用し、しかも比較的高温の 80℃の濃塩酸（35％）中で行った。加水分解を１～８時間行った後、分解液を濃縮し塩酸除去後、陽イオン交換樹脂カラムに吸着させ、0－4.1 Mの塩酸濃度勾配により各々のキトサンオリゴ糖を分離してキトサンからの収率を調べた。加水分解は、Table 5 に示すように従来の 50℃で１～２日を要していた方法に比べ、本法では短時間のうちに進行することが明らかとなった。重合度の高いオリゴ糖は、加水分解時間とともに減少した。すなわち、６時間以上の加水分解ではオリゴ糖の収率が著しく低下し、単糖（GlcN）の割合が 50％以上を占めた。 また、$GlcN_2$、$GlcN_3$のオリゴ糖は比較的高い収率で得ることができたが、$GlcN_4$以上のオリゴ糖は６時間以上の加水分解では極めて収率が低くなる傾向を示した。これらの結果から、$GlcN_2$～$GlcN_6$の一連のオリゴ糖を得る最適分解時間は１時間で十分であることがわかり、またキトサンオリゴ糖の最大収率が得られるのは１～２時間であることがわかった。

Table 5. Yields of chitosan-oligosaccharides by acid hydrolysis
Chitosan (200 g) was hydrolyzed with 2l of 35% HCl at 80°C. At the indicated time, 200 ml of hydrolysate was taken out, and diluted with the same volume of water. After centrifugation, the supernatant was concentrated to dryness in vacuo.

Reaction time (h)	Yield (%)						
	GlcN	$GlcN_2$	$GlcN_3$	$GlcN_4$	$GlcN_5$	$GlcN_6$	Total
1.0	12.8	13.9	12.4	2.6	2.5	2.3	46.5
2.0	20.8	16.6	13.0	3.2	2.5	1.4	57.5
4.0	24.3	15.3	11.3	3.0	2.3	–	56.2
6.0	50.8	10.9	6.2	0.9	–	–	68.8
8.0	66.7	4.3	–	–	–	–	71.0

一般にキトサンは希酸には溶解するが、濃い酸には常温では溶解しないことがわかった。しかし、筆者はキトサンが 80℃の濃塩酸中では徐々に分解し、短時間でオリゴ糖の生成を認めた。本法では、使用する塩酸量が少なく、しかも従来の方法と比較して非常に短時間で行える利点があり、オリゴ糖の生産に十分利用できることを明らかにした。

（２）キトサンオリゴ糖の溶解性

キトサンの加水分解物中には、キトサンオリゴ糖の他、多くの単糖（GlcN）が含まれていた。次のイオン交換樹脂カラムを用いるオリゴ糖の分離工程では、単糖が多い分だけオリゴ糖の負荷量が少なくなり、またオリゴ糖の分離にも悪影響を及ぼすことなどの問題があった。そこで、キトサンの加水分解物から単糖を簡便に除く方法について検討した。

Table 6 に、GlcN～$GlcN_6$のメタノールと水に対する溶解度を調べた結果を示す。単糖およびキトサンオリゴ糖は水に対して各々 37%および 68%以上の高い溶解度を示した。とくに、$GlcN_2$～$GlcN_4$は著しく高い溶解性を示し、粘性の高い溶液となった。一方、有機溶媒に対しては、エタノール、プロパノール、ブタノール、ピリジン、酢酸エチル、アセトン等にはほとんど溶けなかったがメタノールにおいて溶解性を示した。メタノールに対しては、GlcNに比べ$GlcN_2$～$GlcN_6$の方が高い溶解度を示した。このように、モノマーがメタノールに対し、比較的溶解し難いことから、この性質を利用してGlcNを選択的に除いた後、イオン交換樹脂カラムでオリゴ糖の分離精製を試みた。

（３）キトサンオリゴ糖の分離精製

メタノールの溶解分離により得たキトサン分解物を蒸留水に溶解し、陽イオン交換樹脂（Dowex 50W×4）を充填したカラム（4×100 cm）に吸着させ、0－4.1 Mの塩酸（14 ℓ）による直線濃度勾配で溶出した。キトサンオリゴ糖の検出は、ニンヒドリン発色で

Table 6. Solubility of chitosan-oligosaccharide hydrochlorides at 20°C

	Solubility (%)	
	Methanol	Water
GlcN	0.4	37
$GlcN_2$	5.4	190
$GlcN_3$	37.0	177
$GlcN_4$	45.0	158
$GlcN_5$	4.6	86
$GlcN_6$	1.7	68

570 nmの吸光度を測定して行い、それぞれの画分は濃縮後乾燥した。その分離結果をFig. 3 に示した。メタノールで単糖を選択的に除去したことにより、オリゴ糖の分離は著しく改善され、7糖以上と思われるオリゴ糖も認められた（Fig. 3）。また、このときのオリゴ糖の収量およびキトサンからの収率を、Table 7 に示した。これらの結果は、イオン交換樹脂カラムに、より多量のキトサンオリゴ糖を負荷することができ、一度の操作で大量のオリゴ糖を分離することが可能となることを示している。

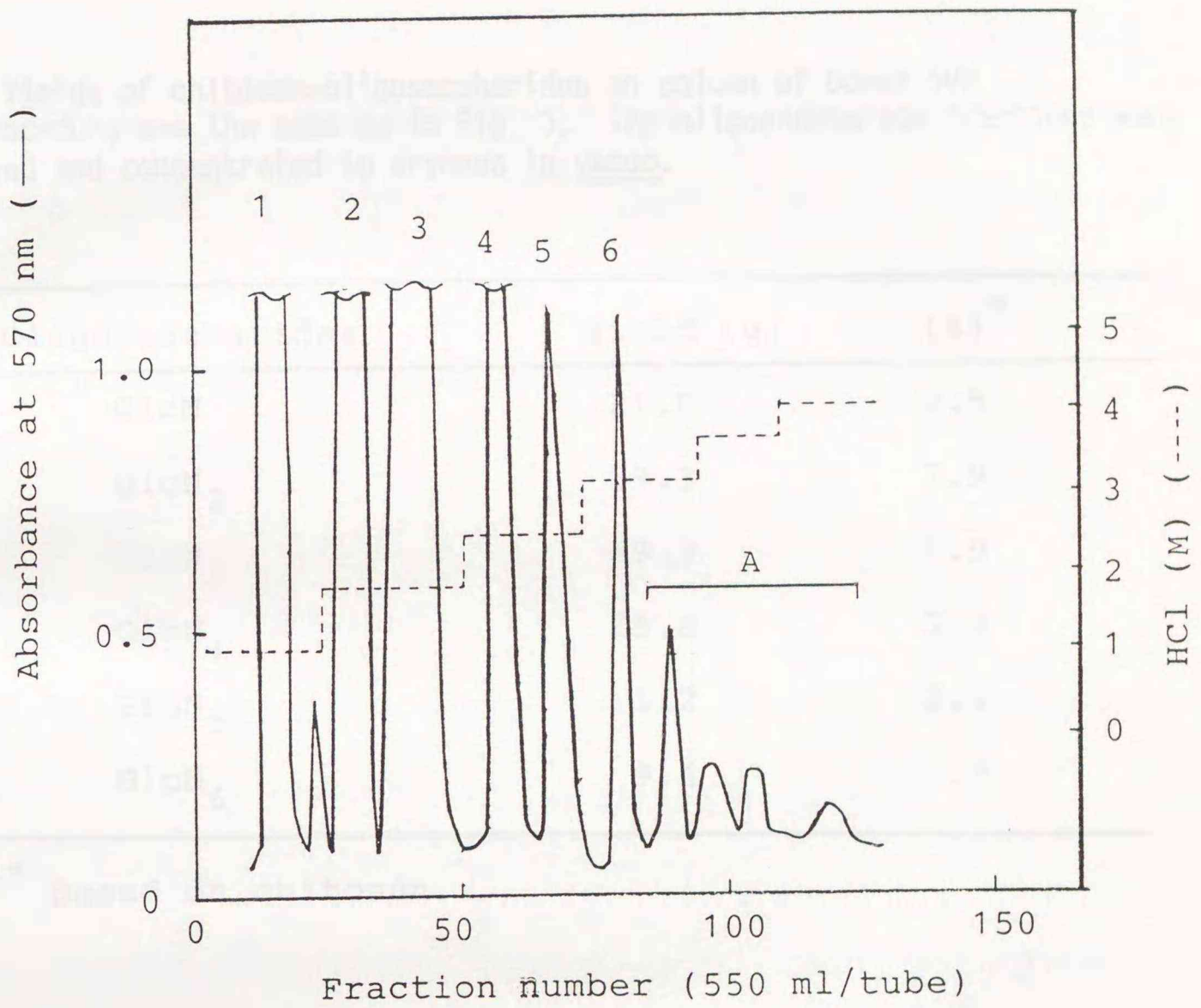


Fig. 3. Elution pattern of chitosan hydrolysate on column of Dowex 50W. Chitosan hydrolysate (300 g) was applied to a column (8×100 cm) of Dowex 50W and eluted with a gradient of 1.1-4.1 M HCl. The elution pattern was monitored by absorbance at 570 nm with ninhydrine reaction. 1, GlcN; 2, $GlcN_2$; 3, $GlcN_3$; 4, $GlcN_4$; 5, $GlcN_5$; 6, $GlcN_6$; A, higher oligosaccharide molecular weight more than $GlcN_6$; ---, hydrochloride concentration (M)

Table 7. Yields of chitosan-oligosaccharides on column of Dowex 50W
The procedure was the same as in Fig. 3. The oligosaccharide fractions were combined and concentrated to dryness in vacuo.

Oligosaccharides	Yield (g)	(%)*
GlcN	21.0	2.8
$GlcN_2$	59.3	7.9
$GlcN_3$	89.3	11.9
$GlcN_4$	25.8	3.4
$GlcN_5$	15.2	2.0
$GlcN_6$	9.4	1.3

* Based on chitosan.

第三節　キチンオリゴ糖の特性

最近、オリゴ糖は食品分野で注目を集めている。例えば、シュクロースのグルコース分子にグルコースが１～８個結合したカップリングシュガー、シュクロースにフラクトースが１～４個結合したフラクトオリゴ糖、その他、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖など数多くあげられる。これらは、低う蝕性、非消化性を生かした甘味剤、ビフィズス菌増殖因子として食品へ広く利用されるようになった。しかし、キチン、キトサンオリゴ糖については、食品素材としての適性や特性が明らかにされていないことから、未利用のままである。そこで、キチンオリゴ糖について甘味、溶解性、腸内細菌による利用性を調べ、食品素材としての評価を行った。

実験方法

（１）試料

キチンオリゴ糖は、次のようにして調製した混合物（M-1H、M-1、M-2）と活性炭カラムクロマトグラフィーにより分離した$GlcNAc_2$～$GlcNAc_6$を用いた。

1）M-1H

キチンを濃塩酸（35％）で 40℃、６時間加水分解し、中和後、前項で述べたイオン交換膜電気透析で脱塩し調製した。

2）M-1

M-1Hの調製と同様に、キチンを濃塩酸で 40℃、３時間加水分解した後、脱塩し調製した。

3）M-2

M-1を蒸留水に溶解し活性炭カラムに吸着させ、蒸留水で洗浄（GlcNAcの除去）後、

50%エタノールで溶出して調製した。

4) $GlcNAc_2$～$GlcNAc_6$

M-2の調製において、オリゴ糖の溶出を 0－50%エタノール直線濃度勾配で行い、各々の画分に分けて調製した。

（２）甘味度の測定

各々 10%（w/w）のM-1H、M-1、M-2の水溶液と５%（w/w）GlcNAc水溶液を調製し、1.5～4.0%（w/w）ショ糖の水溶液を対照として甘味度を比較した。

（３）溶解度の測定

試料 1 gを正確に秤量し、これに一定温度で蒸留水を徐々に加え撹拌した。目視で濁りが消失した時点まで加えた蒸留水量を測定し、溶解度を算出した。

（４）腸内細菌による利用性の測定

1) 菌株

Lactobacillus acidophilus JCM 1132

Bifidobacterium breve JCM 1192

Bifidobacterium bifidum JCM 1255

Bifidobacterium adolescentis JCM 1275

Bifidobacterium longum JCM 1217

Escherichia coli IFO 3301

2) 培地

滅菌Peptone-Yeast-Fildes（PYF）培地[31]に、試料を水溶液として濾過滅菌した後、最終濃度 0.5%になるよう添加した。PYF培地の組成は次の通りである。

PYF培地

トリプティケース（BBL）	10 g

酵母エキス（Difco）	5 g
Fildes溶液*	40 ml
塩類溶液	40 ml

$CaCl_2$（無水）	0.2 g
$MgSO_4$	0.2 g
K_2HPO_4	1.0 g
$NaHCO_3$	10.0 g
NaCl	2.0 g
精製水	1000 ml

L－システイン・HCl・H_2O	0.5 g
精製水	920 ml

(pH 7.2)

*Fildes溶液

生理食塩水（0.85%）	150 ml
濃塩酸（35%）	6 ml
馬無菌脱繊血（日研生物）	50 ml
ペプシン（和光純薬、1:1000）	1 g

上記の成分を混合し、55℃で1夜保持し、消化した。これに 20%水酸化ナトリウム溶液 12 mlを加えた後、水酸化ナトリウムによりpH 7.6になるよう調整した。

3）培養および測定

寒天平板培地で培養した菌株を、PYF培地（試料 0.5%添加）に各菌株の濃度が各々10^8／tubeとなるよう接種し、嫌気条件下（炭酸ガス加スチールウール法）で 37℃、48 時

間培養した。培養液は蒸留水で適当に希釈し 660 nmにおける濁度を測定した。利用性は、下記の式により、対照として用いたグルコースを添加したPYF培地に対する生育度で判定した[32]。

$$\text{生育度} = \frac{OD_{660}(\text{試料}) - OD_{660}(\text{PYF培地})}{OD_{660}(\text{グルコース}) - OD_{660}(\text{PYF培地})} \times 100$$

結果と考察

（１）甘味度

キチンを塩酸で部分加水分解後、イオン交換膜電気透析装置や活性炭カラムによる脱塩を行い、糖組成の異なるキチンオリゴ糖混合物３種類（M-1H、M-1、M-2）を調製した。その糖組成をTable 8 に示す。これらキチンオリゴ糖の甘味について調べた。キチンオリゴ糖は、さわやかな甘味を有していた。ショ糖（甘味度 100％）と比較したところ、GlcNAcで 55％、M-1Hで 35％、M-1で 30％、M-2で 25％の甘味を呈した。モノマーが最も甘味度が高く、オリゴ糖の重合度が高くなるにしたがって甘味度は低下した。このように、キチンオリゴ糖は、さわやかな甘味を有し、異味がないことから食品素材として適していると思われた。

（２）溶解性

キチンオリゴ糖の水に対する溶解性を調べた。その結果、GlcNAc～$GlcNAc_6$の 20℃における溶解度は、各々 32.3％、37.0％、2.5％、2.0％、1.9％、1.4％であった。$GlcNAc_2$はGlcNAcよりわずかながら溶解度が高く、いずれも易溶性物質であった。しかしながら、$GlcNAc_3$以上のオリゴ糖は、溶解度が著しく低下した。Fig. 4 に、キチンオリゴ糖混合物M-1H、M-1、M-2の溶解性を示した。それによると、これらキチンオリゴ糖混合物は、低温

Table 8. Composition of chitin-oligosaccharide preparations

Preparations	Composition (%)					
	GlcNAc	$GlcNAc_2$	$GlcNAc_3$	$GlcNAc_4$	$GlcNAc_5$	$GlcNAc_6$
M-1H	54	20	12	9	4	1
M-1	36	21	17	13	10	3
M-2	-	33	29	21	12	5

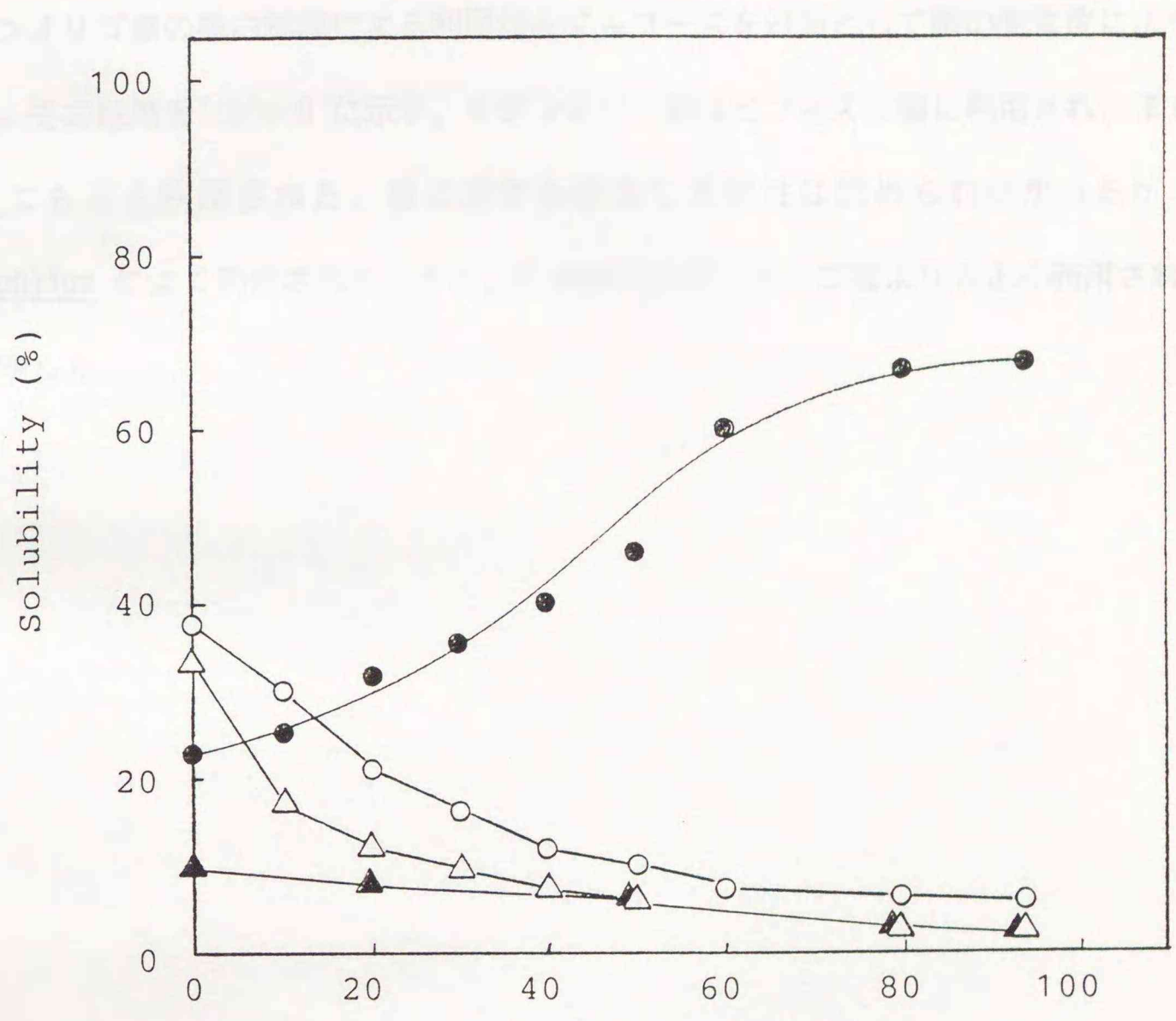


Fig. 4. Solubility of chitin-oligosaccharide preparation in water at various temperatures.
The preparations of M-1H, M-1 and M-2 were described in the text.
●, GlcNAc; ○, M-1H; △, M-1; ▲, M-2

ほど高い溶解性を示すことがわかった。これは、GlcNAc～$GlcNAc_4$や一般の糖類とは異なり、$GlcNAc_5$、$GlcNAc_6$が低温ほど溶解しやすくなるという特徴を反映しているものと考えられた。

（３）腸内細菌による利用性

キチンオリゴ糖の腸内細菌による利用性をグルコースを対照として菌の発育度により判定した。その結果をTable 9 に示す。キチンオリゴ糖はビフィズス菌に利用され、また E. coliにもよく利用された。菌に対する顕著な選択性は認められなかったが、L. acidophilus によく利用された。また、GlcNAcの方が、オリゴ糖よりもよく利用されることが判明した。

Table 9. Growth response of intestinal bacteria to chitin-oligosaccharide preparations

The cutivation and assay conditions were described in the text.

Bacteria	GlcNAc	M-1H	M-1	M-2
Lactobacillus acidophilus JCM 1132	++[a)]	++	++	+
Bifidobacterium breve JCM 1192	+	+	±	-
Bifidobacterium bifidum JCM 1255	+	+	±	±
Bifidobacterium adolescentis JCM 1275	±	±	±	±
Bifidobacterium longum JCM 1217	±	±	±	±
Escherichia coli IFO 3301	++	++	++	++

a) ++ 75%<, + 50-75%, ± 25-50%, - 25%>

第四節　要約

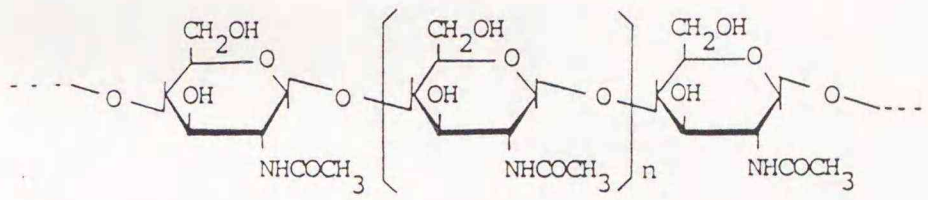
キチンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖の酸加水分解法による効率的生産について検討した。キチンオリゴ糖では、目的とする重合度のオリゴ糖を得るための加水分解条件を明らかにした。 $GlcNAc_5$、$GlcNAc_6$の効率的生産を目的とするならば 40℃で約２時間、$GlcNAc_3$、$GlcNAc_4$を目的とするならば約４時間、そしてGlcNAc、$GlcNAc_2$を目的とする場合では約７時間の加水分解が適当であった。次に、キチン加水分解液からのオリゴ糖の回収、すなわち中和により副生した塩類を、イオン交換膜電気透析法で除く方法を検討し、従来の活性炭カラムによる方法では達成できなかったGlcNAcの回収を含め、キチンオリゴ糖の大量生産の可能性を示した。さらに、得られたキチンオリゴ糖はさわやかな甘味を有し、また、ビフィズス菌にも利用されることから、新しい食品素材として利用できる可能性を明らかにした。

一方、キトサンオリゴ糖では、キトサンをフレーク状のまま濃塩酸（35％）中、80℃で約１時間加水分解することにより、従来の方法に比べ、使用する塩酸量が少なく、しかも飛躍的に短時間でオリゴ糖の生産が行えることを明らかにした。また、キトサンオリゴ糖をイオン交換樹脂カラムにより分離精製する際に、予めメタノールに対する溶解性の違いを利用して、キトサン分解物から不要のGlcNを除去することにより、多量のキトサンオリゴ糖を一度の操作で分離する効率的生産法を開発した。

第二章　バイオリアクターによるＮ－アセチルグルコサミンの生産

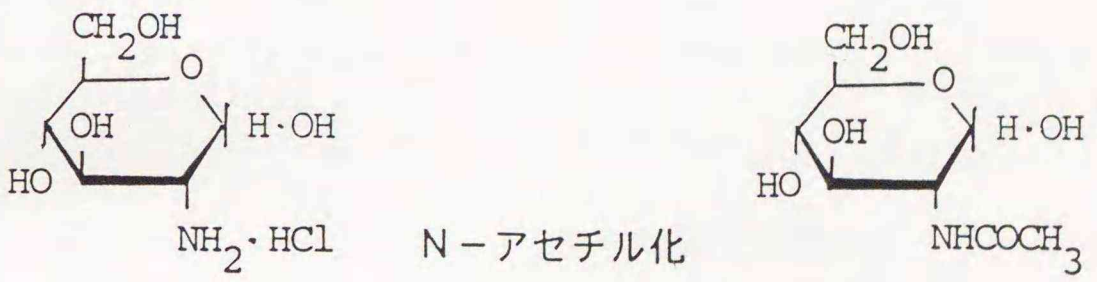
キチンの構成単位である単糖のＮ－アセチルグルコサミン（GlcNAc）は、ビフィズス菌増殖因子として知られ[5]、また第一章で述べたように大変さわやかな甘味を有していたことから、食品素材として期待される物質である。

しかし、GlcNAcの工業生産は、キチンを塩酸で完全加水分解して得られるグルコサミン（GlcN）の塩酸塩を原料として有機溶媒中で無水酢酸を用いてＮ－アセチル化する化学合成によって行われている[33、34]ため、国内では食品として容易に使用することができないのが現状である。これは、キチンを原料として酸加水分解を行うとグリコシド結合の加水分解と同時にGlcNAc残基のアセチル基も分解され、GlcNの塩酸塩が生成することに起因している。



キチン

↓ 完全加水分解（塩酸）



グルコサミン塩酸塩 ⟶ Ｎ－アセチルグルコサミン

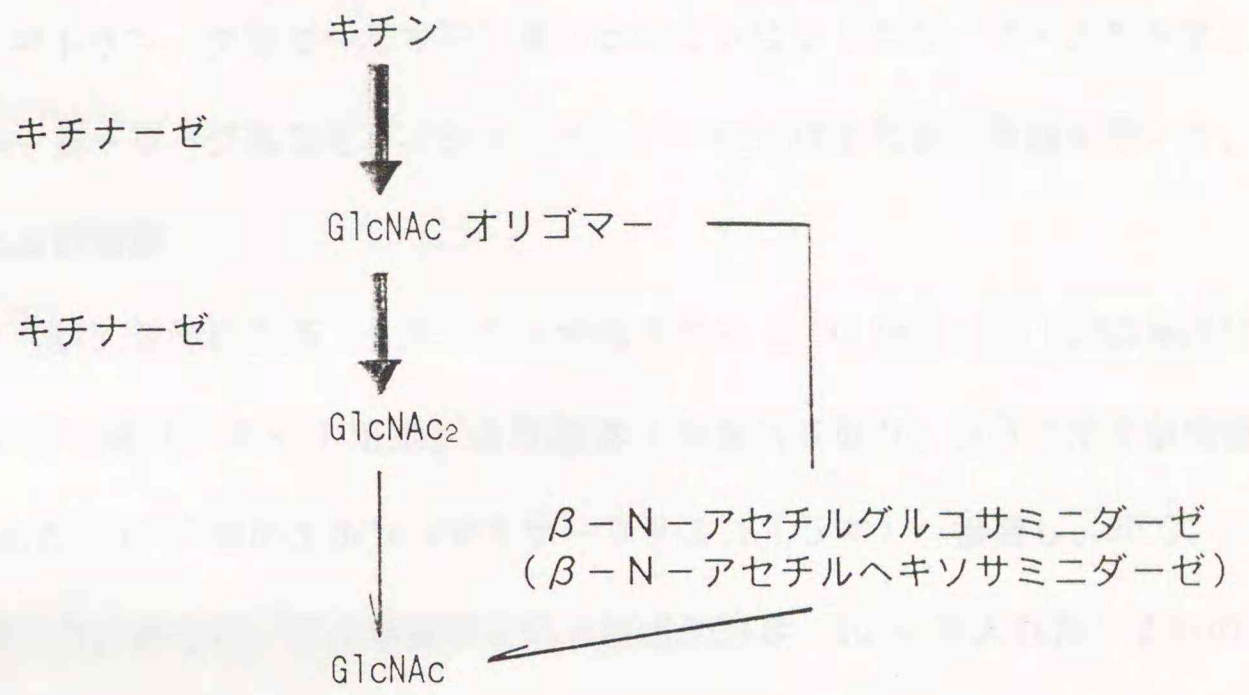
したがって、分解中に脱アセチル化されないように、キチン分解酵素であるキチナーゼやβ－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼを用いたキチンオリゴ糖やGlcNAcの生産が試みられている。しかしながら、キチンが水に不溶であることから、その酵素反応は大変遅く、GlcNAcの工業生産を行うまでには至らず、また工業生産に関する報告[35-37]も数少ないの

が現状である。

そこで、第一章で開発したキチンを酸により部分加水分解して得た水可溶性のキチンオリゴ糖を用い、キチン分解酵素の研究過程において見出した[38-40] Nocardia orientalis の生産するキチナーゼとβ－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼを固定化し、バイオリアクターによるGlcNAcの連続生産を試みた。

第一節　固定化酵素の調製とその諸性質

キチンからのGlcNAcまでの酵素分解は、キチナーゼ（EC 3.2.1.14）とβ－N－アセチルグルコサミニダーゼ（EC 3.2.1.30）またはβ－N－アセチルヘキソサミニダーゼ（EC 3.2.1.52、NAHase）の共同作用により進行することが知られている。



前述のように、キチンは不溶性物質であり、フレーク状またはパウダー状として分解を行っても、ほとんど反応が進行しない。したがって、基質にコロイダルキチンを用いる場合が非常に多いのが現状である。しかし、このコロイダルキチンは、キチンを濃酸に溶解した後、大量の水に注いで再沈澱して回収するなど調製が困難で、工業生産には適していない。また、酵素反応においても、パウダー状のキチンよりは反応し易いものの、分解には数十時間～数日間を要し、しかも完全に分解するまでに至らず、GlcNAcの収率は低いものであった。したがって、基質に可溶性のキチン、すなわちキチンオリゴ糖を用いれば、非常に短時間にGlcNAcの生産が行えることが考えられた。また、基質が可溶性であれば、さらに効率的な固定化酵素による連続生産も可能と考えた。

そこで、筆者はN. orientalis IFO12806の生産するキチン分解酵素（キチナーゼ、

NAHase ）の固定化を検討し、その諸性質について調べた。

実験方法

（１）実験材料

CM-、SP-Sephadex C-50及びSepharose CL-4Bはファルマシア製、アルミナは和光純薬製、キチン、キトサン、グリコールキチン及びｐ－ニトロフェニル　２－アセトアミド－２－デオキシ－β－Ｄ－グルコピラノシド（PNP-GlcNAc）は生化学工業製を用いた。

（２）菌株および培養

菌株は、（財）発酵研究所（大阪）から分与された N. orientalis 12806を用いた。前培養は、斜面培地（ベネット培地）より菌体１白金耳を取り、以下に示す前培養培地 10 mlを入れた 100 ml容のエルレンマイヤーフラスコ（５本）へ接種し、30℃、24 時間振盪培養を行った。さらに、この培養液を同一組成の培地 100 mlを入れた１ℓ容のエルレンマイヤーフラスコ（５本）へ 10 ml接種し、30℃、24 時間回転振盪培養を行った。

本培養は、７ℓ容のジャーファーメンター（高崎科学器械㈱製TSO-M7）を用いた。以下に示す本培養培地５ℓに前培養液 500 mlを接種し、撹拌速度 150 rpm、通気量３ℓ／min、pH 7.0、30℃の条件で 96 時間培養を行った。

前培養培地

グルコース	10.0	(g/ℓ)
ペプトン	10.0	
酵母エキス	5.0	
K_2HPO_4	0.7	
KH_2PO_4	0.3	
$MgSO_4\ 7H_2O$	0.5	

pHを 7.0に調整

本培養培地

コロイダルキチン	5.0	(g/ℓ)
N－アセチルグルコサミン	5.0	
ペプトン	2.0	
酵母エキス	0.1	
K_2HPO_4	0.7	
KH_2PO_4	0.3	
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.5	

pHを 7.0に調整

（３）酵素液の調製

菌体を培養した後、培養液を４℃で冷却遠心分離（10000×g、15 分間）し、上清液をメンブランフィルターで濾過した。濾液（4.4ℓ）は限外濾過（分画分子量 10000）によって 1.2ℓまで濃縮した。濃縮液は、75%飽和となるように硫安を添加し、４℃で一夜放置後、沈澱物を冷却遠心分離（10000×g、20 分間）して集めた。 沈澱は蒸留水に溶解後、２ℓの蒸留水に対し４℃で 16 時間透析した。この操作を３回繰り返した後、酵素液200mlを得た。酵素液はタンパク質として 23.1 mg/ml（比活性：キチナーゼ 49.8 U/mg-protein、NAHase 31.4 U/mg-protein）を含み、これを固定化酵素の調製に用いた。

（４）固定化酵素の調製

固定化の方法として、次の３方法について検討した。

1）イオン結合

CM-またはSP-Sephadex（10 g、湿潤）を、酵素液（80 mgタンパク質）とともに 20 mlの 10 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.6）中、４℃で 24 時間振盪を行った。

振盪後、酵素と結合した担体は蒸留水で洗浄し、過剰の水をG4グラスフィルターで吸引除去した。

2) 共有結合

(a) アミノヘキシルSepharose (AH-Sepharose) はMatsumotoら[41]とWatanabeら[42]の方法により調製した。すなわち、10 g (湿潤) のSepharoseを酵素液 (80 mgタンパク質) とともに 360 mgのカルボジイミド試薬 (1-ｼｸﾛﾍｷｼﾙ-3-(2-ﾓﾙﾌｫﾘﾉｴﾁﾙ) ｶﾙﾎﾞｼﾞｲﾐﾄﾞ ﾒﾄ-p-ﾄﾙｴﾝｽﾙﾌｫﾈｲﾄ) を含む 30 mlの 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) 中、4℃で 24 時間振盪を行った。

(b) シアノゲンブロマイド活性化Sepharose (CNBr-Sepharose) は、Marchらの方法[43]によって調製し、このCNBr-Sepharose (10 g、湿潤) を、酵素液 (80 mgタンパク質) とともに 20 mlの 100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、4℃で 24 時間振盪を行った。

(c) アミノシラン化アルミナ (AS-alumina) は、Weetallの方法[44]によって調製し、Dixonらの方法[45]によりグルタルアルデヒド処理を行った。この担体 (10 g、湿潤) を、酵素液 (80 mgタンパク質) とともに 20 mlの 100 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) 中、4℃で 24 時間振盪を行った。

以上のようにして調製した酵素と結合した各々の担体は、500 mMの塩化ナトリウム溶液と蒸留水で洗浄し、過剰の水をG4グラスフィルターで吸引除去した。

3) 物理吸着

固定化担体のタンニン-Sepharose及びタンニンーキトサンの調製は、Watanabeらの方法[42]を改良して行った。すなわち、10 gのSepharoseまたはキトサンビーズを 160 mlの蒸留水に懸濁し、6mlのエピクロルヒドリンを加え、1時間煮沸を行った。 その後、100 mlの 12%水酸化ナトリウム溶液を添加し、再び1時間煮沸した。次いで、エポキシ活

性化した担体を蒸留水で洗浄し、1gのタンニン酸とともに 40 mlの 100 mM水酸化ナトリウム溶液中に懸濁させた。得られた懸濁液を 40℃で 24 時間振盪した後、G4グラスフィルターで担体を集め、過剰の水を吸引で除去した。次に、各々の担体（10 g、湿潤）を、酵素液（80 mgタンパク質）とともに 40 mlの 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.6）中、4℃で 24 時間振盪を行った。その後、酵素を吸着した担体を、前記と同様にして洗浄した。

なお、キトサンビーズは次のようにして調製した。すなわち、3％酢酸溶液に溶解した3％キトサン溶液 100 gを 0.4 mlのスパン85を含む 60 mlのシクロヘキサンとともにホモジナイザーで乳化した。得られた乳化液を、撹拌しながら 12％の水酸化ナトリウム溶液中へ注ぎ込み、30 分間放置した。形成されたキトサンビーズは、シフター（80－150 mesh）で集め、蒸留水で洗浄し、過剰の水をG4グラスフィルターで吸引除去した。

（5）分析方法

1）遊離酵素及び固定化酵素のタンパク質の定量はロイシンを標準としてMcGrathの方法[46]によりに行った。

2）キチナーゼ活性は、次のようにして測定した。1.2％グリコールキチン溶液 1.5 mlに 1.45 mlの 100 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.6）を加え、これに 0.05 mlの酵素液または固定化酵素（懸濁液 100 mg/ml）を加え、40℃で 10 分間反応を行った。反応液は、沸騰湯浴中で5分間加熱して反応を停止し、遠心分離を行った。得られた上清液にSchales試薬[29]を加え、沸騰湯浴中に 15 分間保った後、急冷し、溶液の 420 nmにおける吸光度を測定した。酵素単位1ユニット（U）は、1分間に1 μmolのGlcNAcに相当する還元力を生じる酵素量と定義した。

3）NAHase活性は、次のようにして測定した。10 mMのPNP-GlcNAc 0.5 mlに 1.95 mlの 50 mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）を加え、これに 0.05 mlの酵素液または固定化

酵素（懸濁液 100 mg/ml）を加え、40℃で５分間反応を行った。これに、1.0 M炭酸ナトリウム溶液５mlを加えて反応を停止するとともに、遊離したｐ－ニトロフェノールを発色させ 405 nmにおける吸光度を測定した。酵素単位１Uは、１分間に１μmolのｐ－ニトロフェノールを遊離する酵素量と定義した。

4) キチンオリゴ糖からのGlcNAcの生成量の分析はHPLCを使用した。分析は下記の条件で行った。

使用機種　　：Waters製、201Dコンパクト型

検出器　　：Waters製、Lambda-Max 481LC UV detector

データ処理　：島津製、クロマトパックC-R3A

カラム　　：ワイエムシィ製、YMC-Pack A-014 (6.0×300 mm)

流速　　：1.0 ml／min

移動相　　：$CH_3CN : H_2O$ = 70:30 (v/v)

温度　　：室温

（６）固定化酵素の諸性質

固定化酵素のキチナーゼ活性およびNAHase活性のpH、温度による変化を調べ、遊離酵素のそれらと比較した。至適pHの測定は、100 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 2.0－5.6）および 100 mMリン酸緩衝液（pH 6.8－8.0）を用い、前記キチナーゼ活性、NAHase活性の測定方法と同条件で行った。 pH安定性は、上記緩衝液（pH 2.0－8.0）を用い、40℃で１時間保った後、残存する酵素活性を測定した。至適温度の検討は、10－80℃の温度範囲で行った。温度安定性は、上記温度（10－80℃）で１時間保持した後、残存する酵素活性を測定した。

結果と考察

（１）キチン分解酵素の固定化

GlcNAcの連続生産を目的とし、N. orientalisの生産するキチナーゼとNAHaseを含む酵素の固定化を試みた。酵素の固定化法として、CM-とSP-Sephadexを担体としたイオン結合法、AH-Sepharose、CNBr-Sepharose、AS-aluminaを担体とした共有結合法、ならびにタンニン-Sepharose、タンニンーキトサンを担体とした物理吸着法を用い、各々調製した固定化酵素の評価を行った。Table 10 に固定化酵素担体のタンパク質、キチナーゼ活性およびNAHase活性の固定化収率を示した。その結果、タンニンーキトサンを担体とした物理吸着法による固定化酵素はキチナーゼ活性が 42.6％と最も高く、CNBr-Sepharoseを担体とした共有結合法による固定化酵素はNAHase活性が最も高く、38.7％を示した。また、CNBr-Sepharoseを用いた固定化酵素担体は、ほぼ完全にタンパク質と結合していたにもかかわらず、NAHase活性の発現に比べキチナーゼ活性が著しく低かった。これら固定化酵素の中では、タンニンーキトサンを担体とした固定化酵素がキチナーゼ、NAHase活性ともに高い値を示していた。そこで、本研究ではタンニンーキトサンを担体とした物理吸着法による固定化酵素を選定し、以後の実験に用いることにした。

次に、酵素の固定化反応に及ぼす担体に対する酵素の添加量の影響を調べた。Fig. 5 に示すように、酵素添加量の増加とともに、固定化キチナーゼとNAHase活性は徐々に増大し、キチナーゼ活性は 230 U/g-carrier、NAHase活性は 30 U/g-carrierが最大となり、以後変化しなかった。固定化酵素の調製時における酵素の添加量は、最大活性を示した 16 mg protein/g-carrier とした。

（２）固定化酵素の諸性質

Fig. 6 に、固定化キチナーゼの性質を遊離酵素と比較して示した。固定化キチナーゼ

Table 10. Immobilization of chitinolytic enzymes with various carriers

Carrier	Ratio of immobilization[a] (%)		
	Protein	Chitinase activity	NAHase activity
CM-Sephadex	32.4	20.2	0.6
SP-Sephadex	40.6	15.3	0.2
AH-Sepharose	22.6	6.6	1.1
CNBr-Sepharose	100	5.1	38.7
AS-alumina	48.7	17.3	8.7
Tannin-Sepharose	2.9	1.1	1.4
Tannin-chitosan	82.5	42.6	10.6

Preparations of immobilized enzymes are described in the text.

[a] Ratios of immobilization were calculated on the amount of chitinolytic enzymes applied.

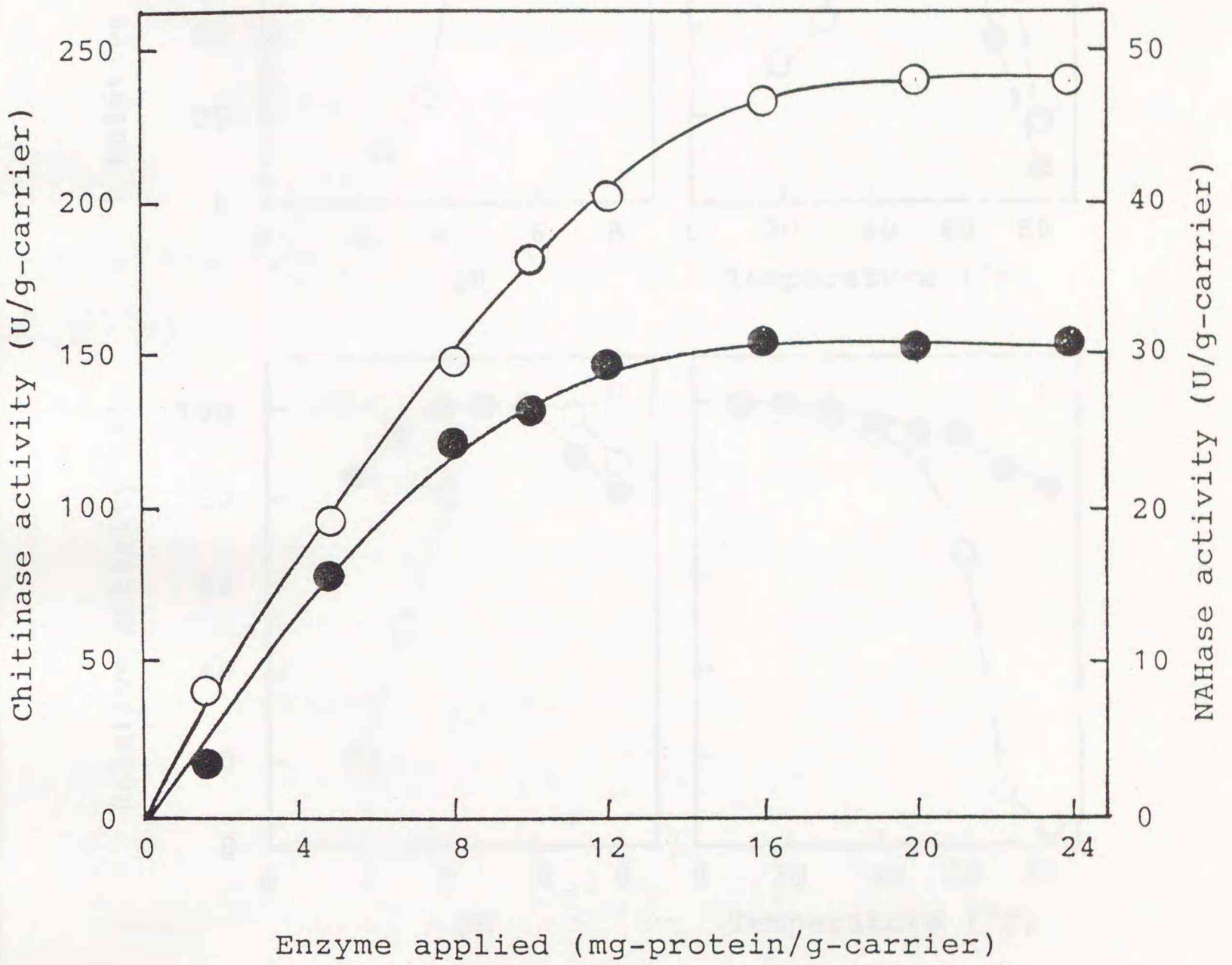


Fig. 5. Effects of the amount of chitinolytic enzymes on immobilization with tannin-chitosan.

Tannin-chitosan (10 g, wet) was incubated at 4°C for 24 h with shaking with enzyme solution dissolved in 40 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.6). After incubation, the enzyme-adsorbing carrier was washed and excess water was removed. The enzyme activities were assayed as described in the text.
○, chitinase; ●, NAHase.

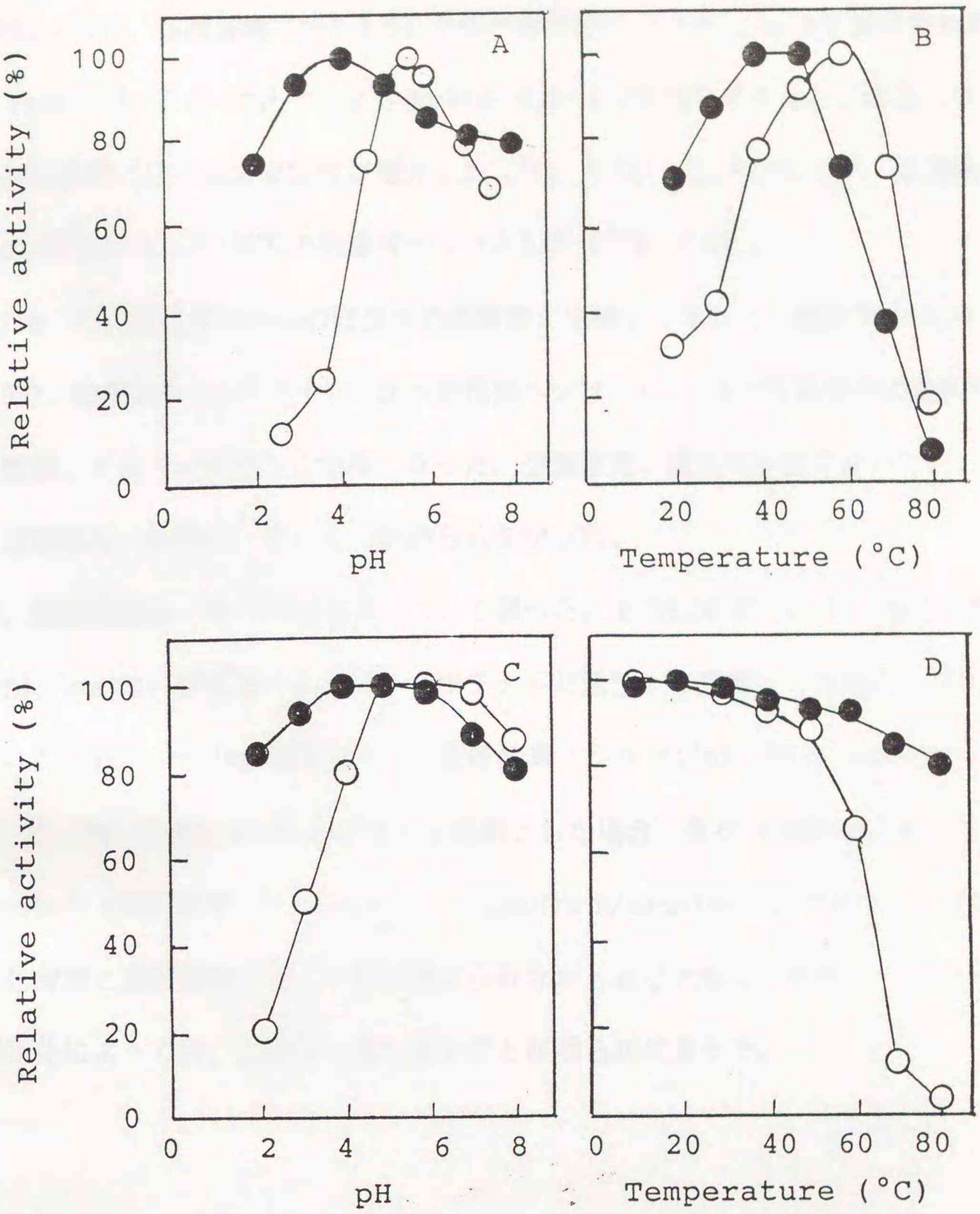


Fig. 6. Effects of pH and temperature on chitinase activity of immobilized enzyme.

The enzyme activity was determined as described in the text. A, Effects of pH. Buffers used were sodium acetate buffer at pH 2.0-5.6 and sodium phosphate buffer at pH 6.0-8.0. B, Effects of temperature. C, pH-stability. The pH-stability was observed by assaying the enzyme activity after incubation at 40℃ for 1 h at various pHs. D, Thermo-stability. The thermo-stability was observed by assaying the enzyme activity after incubation for 1 h at various temperatures.

●, immobilized chitinase; ○, free chitinase.

の至適pHは 4.0で、遊離酵素（pH 5.5）に比べ酸性側へシフトした。pH安定性もまた、遊離酵素（pH 5.0－7.0）に比べ、より低pHの 4.0－6.0で安定であった。固定化キチナーゼは、遊離酵素に比べ温度安定性が増大した（Fig. 6 D）にもかかわらず、至適温度は遊離酵素の 60℃から 40－50℃の低温域へシフトした（Fig. 6 B）。

また、Fig. 7 に固定化NAHaseの性質を遊離酵素と比較して示した。固定化NAHaseの至適pHは 4.0で、遊離酵素（pH 5.0）に比べ酸性側へシフトした。pH安定性は遊離酵素に比べやや酸性側、アルカリ性側ともに高くなった。至適温度、温度安定性においては、固定化酵素と遊離酵素の差異は、ほとんど認められなかった。

さらに、固定化酵素の動力学的性質について調べた。その結果をFig. 8 に示す。固定化酵素のKm値、Vmaxは、グリコールキチン（キチナーゼ活性）を基質とした場合、各々 9.0 mg/ml、3.2 μmol/min/mg-protein （遊離酵素：6.0 mg/ml、58.5 μmol/min/mg-protein）で、PNP-GlcNAc（NAHase活性）を基質とした場合、各々 0.090 mM、4.1 μmol/min/mg-protein（遊離酵素：0.094 mM、12.5 μmol/min/mg-protein）であった。このように、固定化酵素と遊離酵素で著しい差が認められなかったことから、キチナーゼ、NAHaseともに固定化によって著しい変化を受けないことが明らかになった。

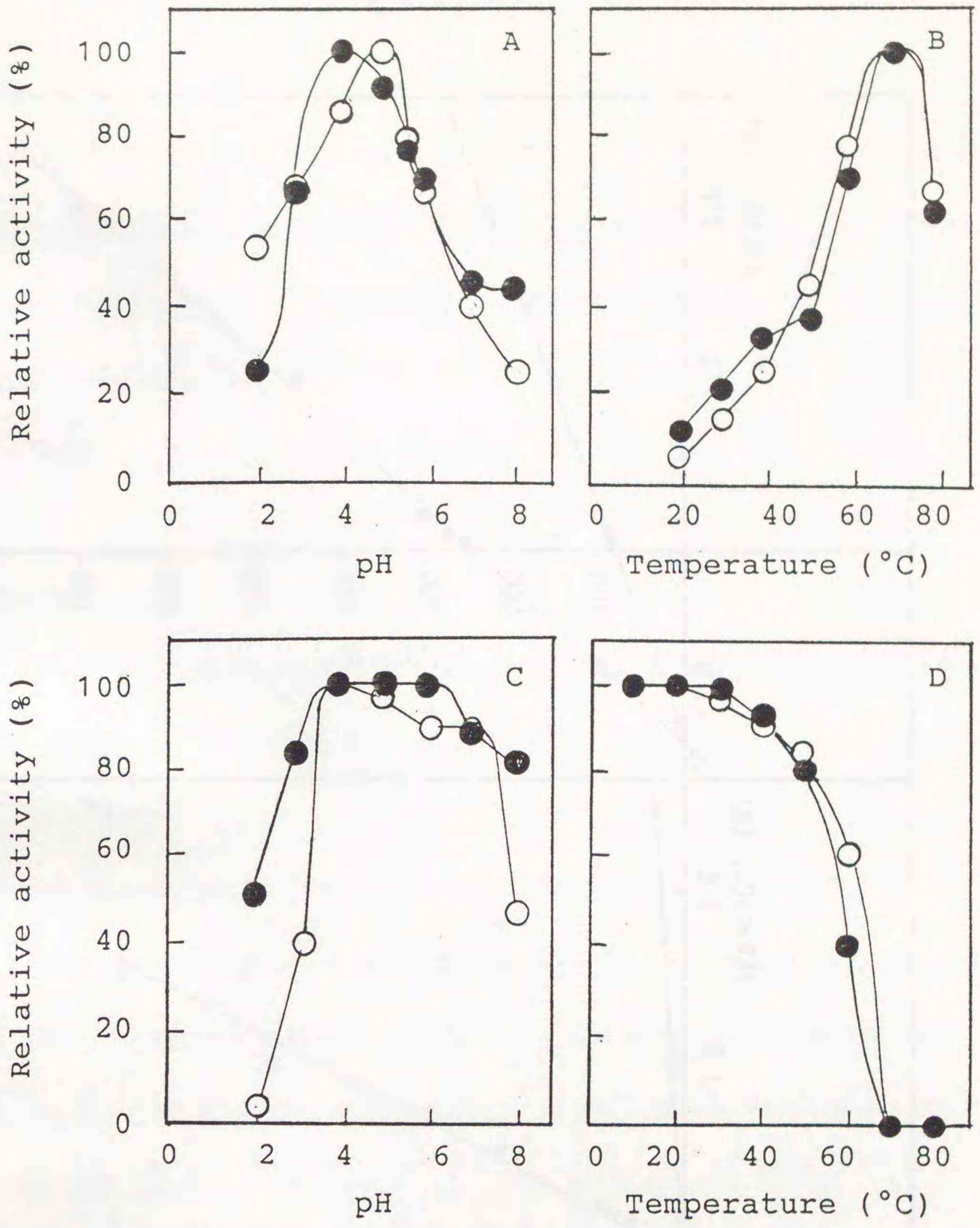


Fig. 7. Effects of pH and temperature on NAHase activity of immobilized enzyme.
The enzyme activity was determined as described in the text. A, Effects of pH. Buffers used were sodium acetate buffer at pH 2.0-5.6 and sodium phosphate buffer at pH 6.0-8.0. B, Effects of temperature. C, pH-stability. The pH-stability was observed by assaying the enzyme activity after incubation at 40°C for 1 h at various pHs. D, Thermo-stability. The thermo-stability was observed by assaying the enzyme activity after incubation for 1 h at various temperatures.
●, immobilized NAHase; ○, free NAHase.

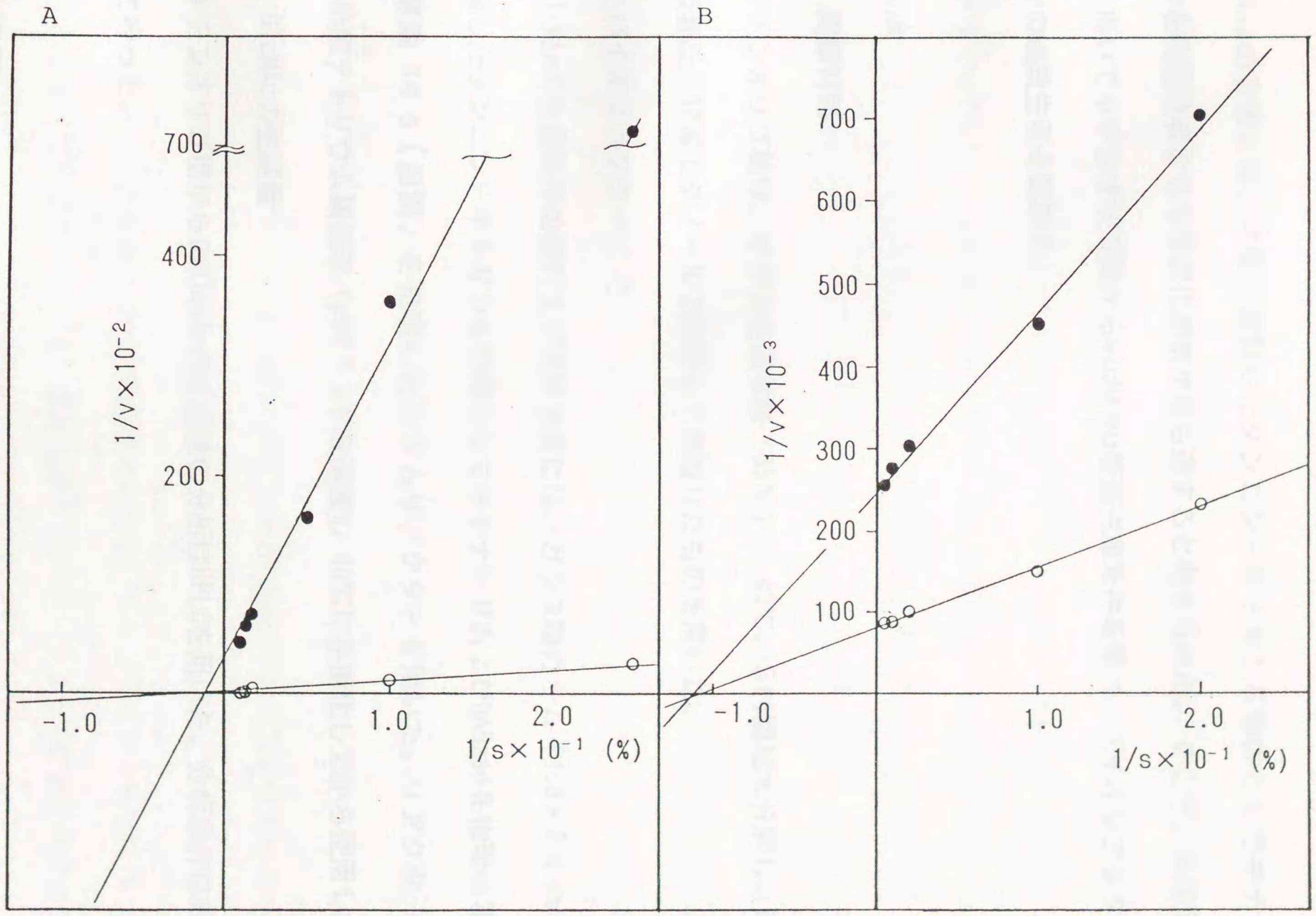


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of the immobilized and free enzymes.
A, chitinase; B, NAHase; ●, immobilized enzyme; ○, free enzyme.

第二節　バイオリアクターによるＮ－アセチルグルコサミンの生産

GlcNAcの生産には、前節で調製したタンニン－キトサンを担体としてキチナーゼ、NAHaseを物理吸着させた固定化酵素が最も適すると考えられた。そこで、本固定化酵素担体を用いてキチンオリゴ糖からGlcNAcの最適生産条件を調べ、バイオリアクターによるGlcNAcの連続生産を試みた。

実験方法

（１）実験材料

キチンオリゴ糖は、キチンを濃塩酸（35％）で 40℃、３時間加水分解し、活性炭カラムに吸着後、50％エタノールで溶出して調製したものを用いた。

（２）バイオリアクター

GlcNAcの生産条件の検討及び連続生産には、ガラス製カラム（1.8×7.6 cm ）に前節で調製したタンニン－キトサンを担体としてキチナーゼおよびNAHaseを物理吸着させた固定化酵素 14 g（湿潤）を充填したカラムリアクターを用いた。リアクターは、予め 10 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）を通液し 40℃に平衡化してから使用した。

（３）GlcNAcの生成量

キチンオリゴ糖からのGlcNAcの生成量の分析はHPLCを用いた。分析条件は前節と同様にして行った。

結果と考察

（１）生産条件の検討

固定化酵素によるGlcNAcの生産において、基質に可溶性のキチン、すなわちキチンオ

リゴ糖を用いれば非常に短時間にしかも効率的な連続生産が可能と考えられた。

この場合、GlcNAcの存在によりNAHaseが阻害を受けることが考えられるので、GlcNAc濃度がNAHase活性に及ぼす影響を調べた。 その結果を、Fig. 9 に示した。それによれば、NAHase活性は遊離型と固定型とにかかわらず、GlcNAc濃度の上昇につれ、著しく阻害を受けた。固定化酵素は遊離酵素に比べ、やや阻害が弱かったものの、60 mM (13.3 mg/ml) のGlcNAc濃度でNAHase活性は 50%の阻害を受けていた。これらの結果から判断して、分解効率を上げるためには、基質として用いるキチンオリゴ糖にGlcNAcが含まれないことが必要となった。そこで、以後の実験の基質はGlcNAcを完全に除いたキチンオリゴ糖（組成：23 %$GlcNAc_2$、35%$GlcNAc_3$、24%$GlcNAc_4$、15%$GlcNAc_5$、３%$GlcNAc_6$）を調製して用いた。

さらに、カラムリアクターを用いる場合、カラム内のGlcNAc濃度は、GlcNAcの生成速度と基質溶液の流速によっても影響を受ける。そこで、GlcNAc生産に及ぼす基質濃度と流速の影響について検討した。基質（キチンオリゴ糖）を、10 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）に各々１、２、４%濃度（w/v）となるように溶解し、space velocity（SV*）= 0.5～2.0 h^{-1} の流速として、40℃でリアクターに供した。カラムボリュームの５倍容が流出した時点で、その溶出液の一部をHPLCによるキチンオリゴ糖からのGlcNAc生成量測定に供した。その結果をFig. 10 に示す。基質濃度が１または２%で、SV = 0.5～1.0 h^{-1} の流速で供した場合、キチンオリゴ糖からのGlcNAc生成率は約 93%で最大となった。しかしながら、基質濃度が４%と高く、しかもSV = 2.0 h^{-1} の速い流速で供した場合は、キチンオリゴ糖からのGlcNAc生成率は 60%程度であった。したがって、本研究では、生成率そして生成量ともに有利な条件として、基質濃度２%、SV = 1.0 h^{-1} の流速を選定した。

---

*
１時間にカラム容積の何倍の容量（基質）を流すかを示す。

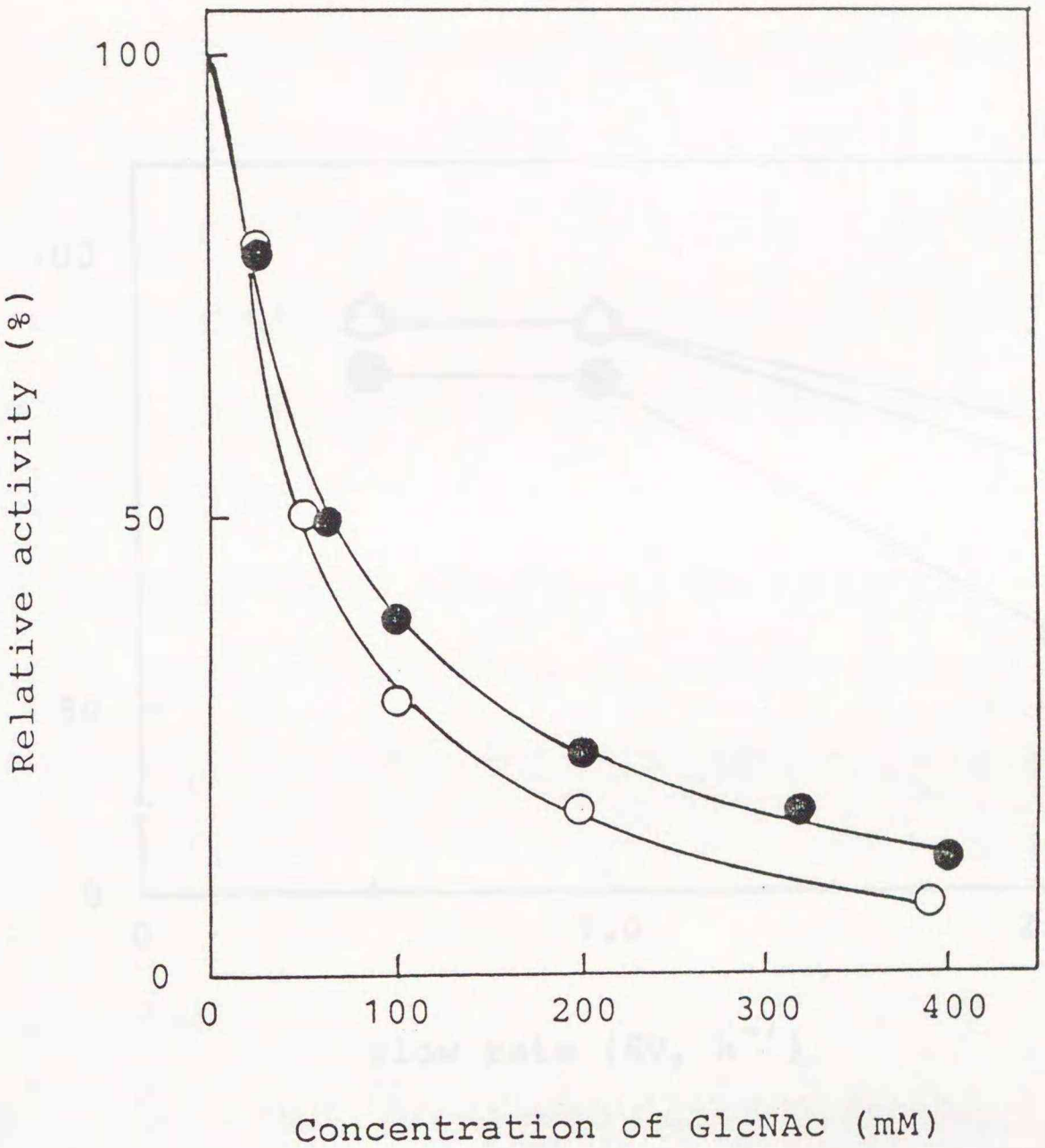


Fig. 9. Effects of GlcNAc concentration on NAHase activity of immobilized enzyme.

The NAHase activity of the immobilized enzyme was determined as described in the text at various concentrations of GlcNAc in the reaction mixture.

●, immobilized NAHase; ○, free NAHase.

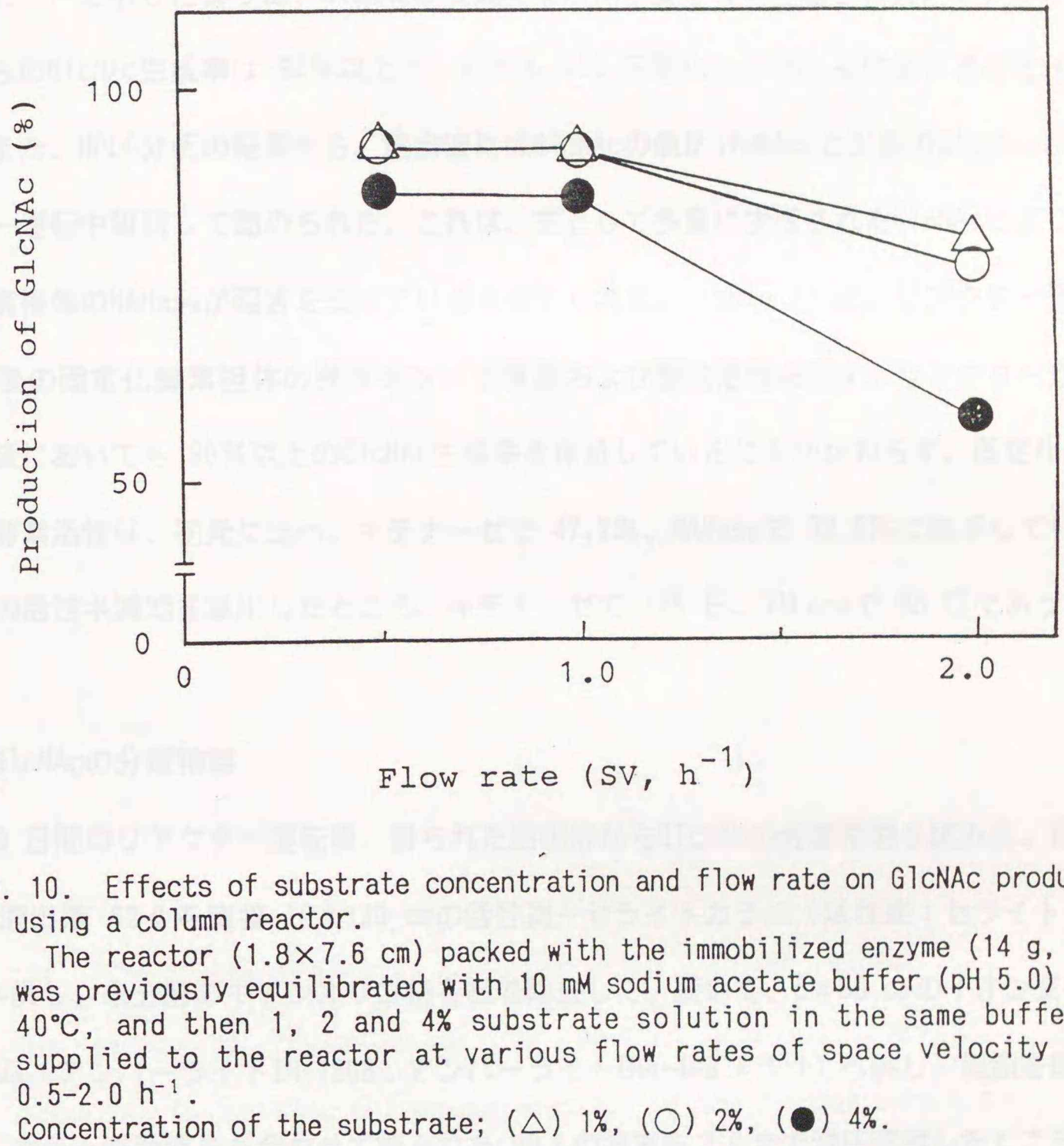


Fig. 10. Effects of substrate concentration and flow rate on GlcNAc production using a column reactor.

The reactor (1.8×7.6 cm) packed with the immobilized enzyme (14 g, wet) was previously equilibrated with 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 40°C, and then 1, 2 and 4% substrate solution in the same buffer were supplied to the reactor at various flow rates of space velocity (SV) = 0.5-2.0 h^{-1}.

Concentration of the substrate; (△) 1%, (○) 2%, (●) 4%.

（２）GlcNAcの連続生産

固定化酵素担体を充填したカラムリアクターを用い、キチンオリゴ糖からGlcNAcの連続生産を試みた。リアクターの運転は、前記設定条件の基質濃度２％、SV = 1.0 h^{-1} の流速、温度 40℃で行い、溶出液は経時的に採取しGlcNAcの生成量をHPLCで分析した。その結果、Fig. 11 に示したように、GlcNAcは長期間にわたり安定して生産された。キチンオリゴ糖からのGlcNAc生成率は 90％以上で、しかも 130 日間以上GlcNAcを生産することができた。また、HPLC分析の結果から、溶出液にはGlcNAcの他に$GlcNAc_2$と少量の$GlcNAc_3$がリアクター運転中継続して認められた。これは、主として多量に生産されたGlcNAcにより固定化酵素担体のNAHaseが阻害を受けていると考えられた。 Table 11 に、リアクター運転 133 日後の固定化酵素担体の残存タンパク質量および酵素活性を示す。リアクター運転 133 日後においても 90％以上のGlcNAc生成率を保持していたにもかかわらず、固定化酵素担体の酵素活性は、初発に比べ、キチナーゼで 47.2％、NAHaseで 32.5％に低下していた。これらの活性半減期を算出したところ、キチナーゼで 125 日、NAHaseで 98 日であった。

（３）GlcNAcの分離精製

130 日間のリアクター運転後、得られた溶出液からGlcNAcの分離精製を試みた。得られた全溶出液 62 ℓ を直接 10×120 cmの活性炭－セライトカラム（活性炭：セライト = 1:1）へ供し、未分解のキチンオリゴ糖を吸着除去した。続いて、5×60 cmのイオン交換樹脂カラム（アンバーライトIR-120B：アンバーライトIRA-400 = 1:1）へ供し、塩類を除去した。 カラム洗浄液をも合わせて得られた 80 ℓ の溶液を３ ℓ まで減圧濃縮したところ、GlcNAcの結晶が容易に析出した。この結晶を減圧濾過で分離し、少量のエタノールで洗浄した後、真空乾燥して 1123 g（キチンオリゴ糖からの収率 90.6％）を得ることができた。結晶品は、HPLC、元素分析、^{13}C-ＮＭＲによりGlcNAcであることを確認した。

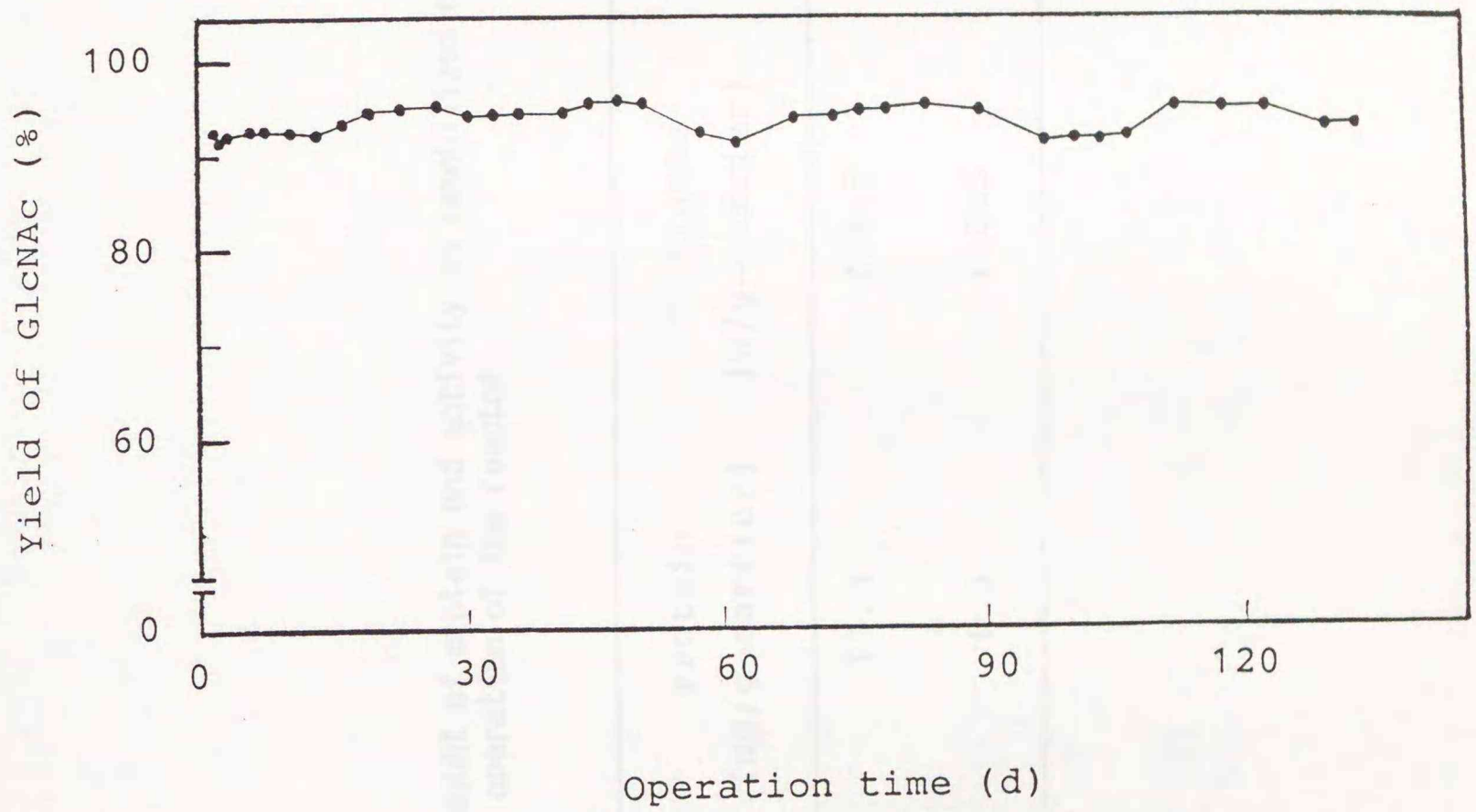


Fig. 11. Continuous production of GlcNAc using a column reactor.
The reactor used for GlcNAc production is the same as in Fig.10. The reactor was previously equilibrated with 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), and then 2% chitin-oligosaccharides solution dissolved in the same buffer was supplied to the reactor at a flow rate of SV = 1.0 h^{-1}. The effluents were analyzed by HPLC.

Table 11. Residual amount of protein and activity on immobilized enzyme preparation after operation of the reactor

Operating time (d)	Protein (mg/g-carrier)	Chitinase (U/g-carrier)	NAHase (U/g-carrier)
0	11.8	234.3	30.8
133	6.5	110.5	10.0

以上の結果から、100 kgの固定化酵素を充填したバイオリアクターを用いれば月産約 1800 kgのGlcNAc生産ができると推定され、本製造法はGlcNAcの工業的生産に適していると考えられた。以上の結果を総合して、固定化酵素リアクターを用いたGlcNAcの新しい生産システムをFig. 12 のようにすることを提案する。

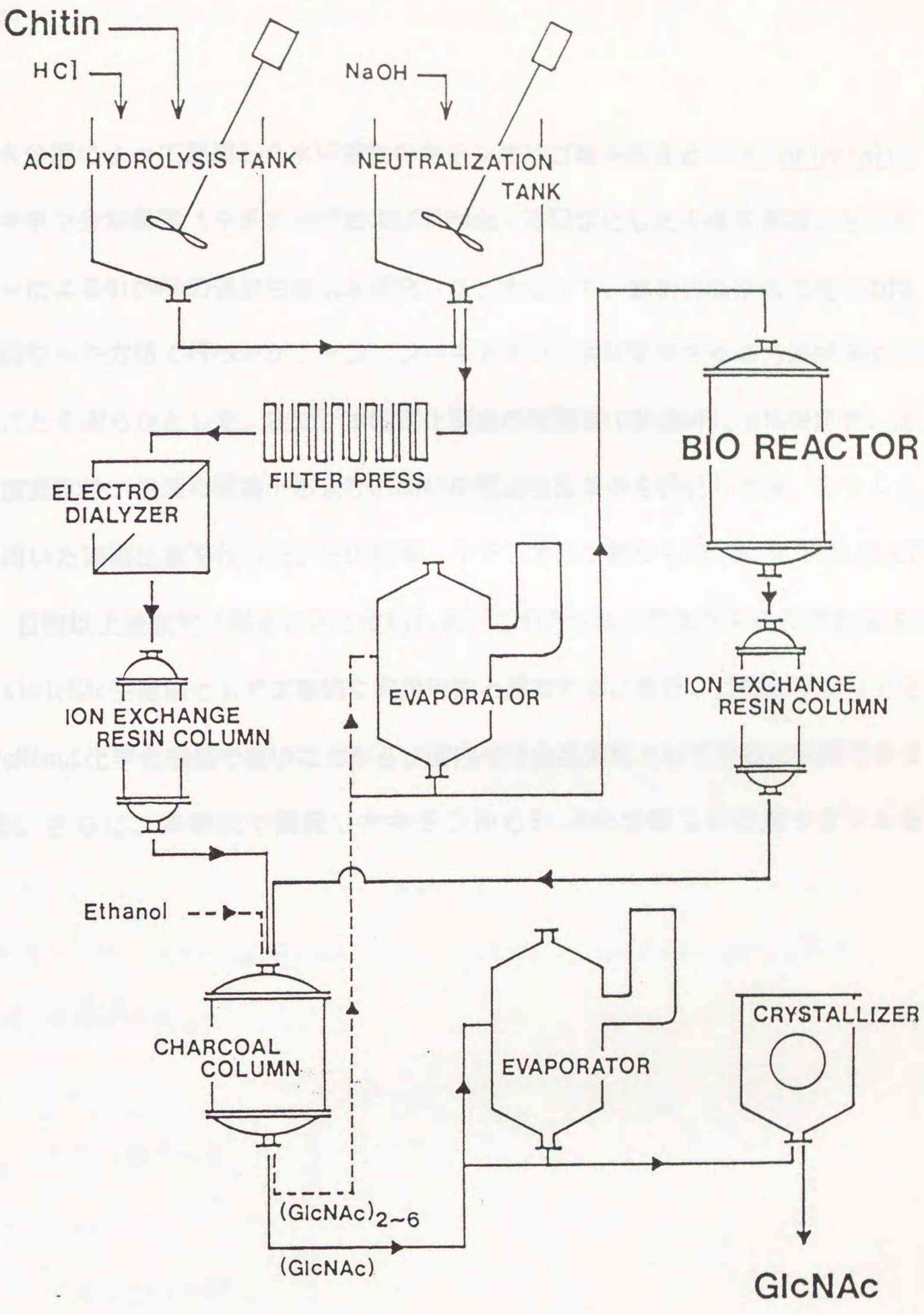


Fig. 12. Proposed processing scheme for production of GlcNAc.

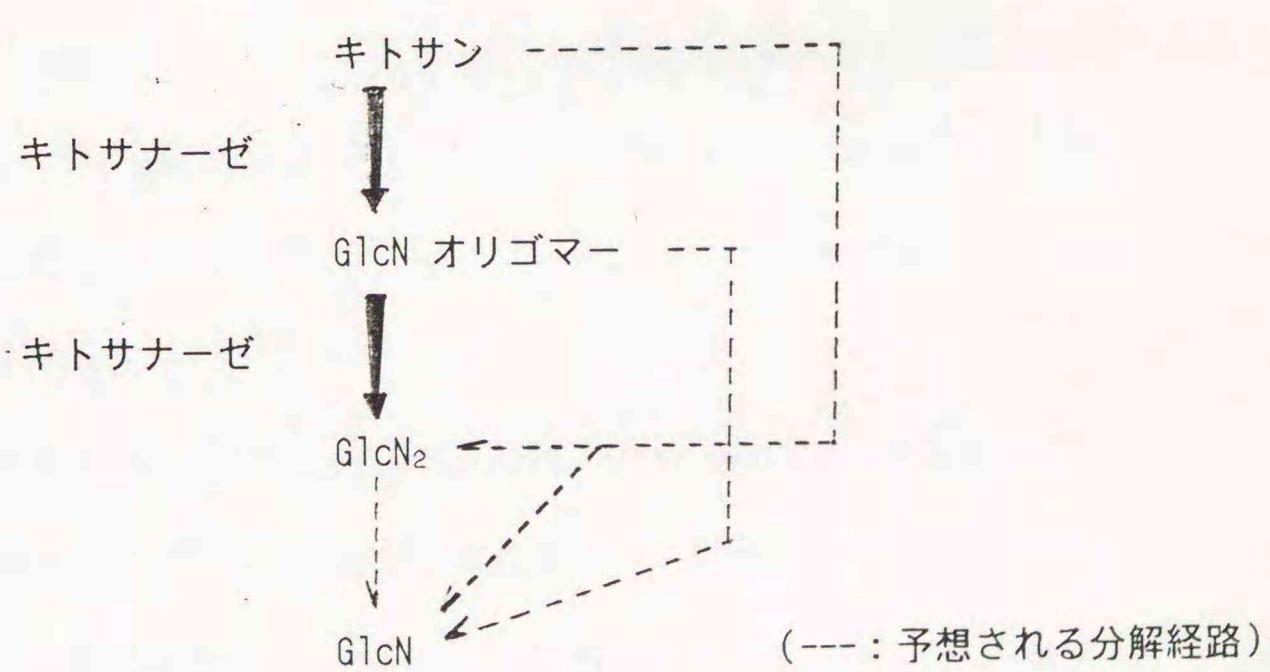
第三節　要約

酸部分加水分解によって調製した水可溶性のキチンオリゴ糖を基質とし N. orientalis の生産するキチン分解酵素（キチナーゼおよびNAHase）を固定化した担体を充填したバイオリアクターによるGlcNAcの連続生産法を開発した。すなわち、酵素の固定化は種々の固定化担体に異なった方法で行ったが、タンニンーキトサンに物理吸着させる方法が極めて有効であることを明らかとした。次に、本固定化酵素の諸性質（至適pH、pH安定性、至適温度、温度安定性、生産物阻害）およびGlcNAcの最適生産条件を検討した後、カラムリアクターを用いた連続生産を行った。その結果、キチンオリゴ糖からGlcNAcを 90％以上の収率で 130 日間以上連続的に得ることに成功した。この方法は、従来からの化学合成法に代わる新しいGlcNAc生産法として工業的に利用可能と思われる。また、このようにして生産されたGlcNAcは化学合成品でないことから、国内では食品素材として有効に利用できるものである。さらに、本研究で開発したキチンからGlcNAcの新しい生産システムを提案した。

第三章　キトサン分解酵素によるグルコサミンの生産

グルコサミン（GlcN）は、化学合成原料や医薬品原料として工業的に用いられている有用な物質である。GlcNは、キチンを塩酸で完全に加水分解してグルコサミン塩酸塩の形で製造されている。これはすでに述べたように、キチンのグリコシド結合の加水分解とGlcNAc残基の脱アセチル化反応により生成するものである。このようなキチンの化学分解によるGlcNの生産に対し、反応が非常に温和で、また特殊な設備を必要としない、GlcNのポリマーであるキトサンの酵素分解による方法が考えられた。

キチンを分解する酵素は前章で述べたように、キチナーゼとβ－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼまたはβ－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼの共同作用によりGlcNAcまで完全に分解されることが知られている。一方、キトサンを分解する酵素としてはキトサナーゼが知られ、数多くの微生物から見出されている。しかし、これらのキトサナーゼは、キトサンを分解してキトサンオリゴ糖（$GlcN_2$～$GlcN_6$）を生成する典型的なエンド型酵素[6-15]である。このようなことから、酵素によるキトサンからキトサンオリゴ糖の生産は容易に行えるが、エキソ型の酵素が見出されていないためGlcNの生産を達成することができないのが現状である。



筆者は、キチン、キトサン分解酵素の研究過程において、N. orientalis IFO12806が、キチン分解酵素であるキチナーゼ[38,39]とβ－N－アセチルヘキソサミニダーゼ[40]の他に、キトサナーゼ、さらには新規酵素であるエキソ－β－D－グルコサミニダーゼを生産することを見出した。そこで、キトサンの酵素による完全分解が達成できるものと考え、新規酵素であるエキソ－β－D－グルコサミニダーゼおよびキトサナーゼの精製を行い、キトサンの酵素分解によるGlcNの生産を試みた。

第一節　エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼの精製と諸性質

従来、数多くの微生物から見出されているキトサンを分解するキトサナーゼは、キトサンオリゴ糖を生成するエンド型酵素である。しかし、本研究において筆者は、キチンの代わりにキトサンを唯一の炭素源として N. orientalis IFO12806を培養すると、キトサナーゼのみならず、$GlcN_2$を加水分解してGlcNを生成する新しいエキソ型酵素（エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼと命名）が生産されることを見出した。そこで、本酵素の精製を行い、その諸性質について調べた。

実験方法

（１）実験材料

キトサンは、Mimaらの方法[47]によって調製した完全脱アセチル化キトサンを用いた。キトサンオリゴ糖糖アルコール（chitobiitol～chitohexaitol）は、キトサンオリゴ糖（$GlcN_2$～$GlcN_6$、各 10 mmol）に対し、水素化ホウ素ナトリウム（20 mmol）で 25℃、２時間処理後、Dowex 50Wのイオン交換クロマト法で精製して調製した[46]。キチンオリゴ糖糖アルコールは、Barkerらの方法[24]によって調製し、セロオリゴ糖は、Millerの方法[49]により調製した。グリコールキトサンは和光純薬製を用いた。 GalNα1-4GalNはフナコシ薬品製、Sephadex G-25、CM-Sephadex C-50、Sepharose CL-4B、Sephadex G-200、DEAE-Sephadexはファルマシア製、Toyopearl HW-55Sは東ソー製を用いた。

（２）菌株および培養

菌株は前章と同様、N. orientalis IFO12806を用いた。前培養は、前章（第二章、第一節）と同様にして 48 時間回転振盪培養を行い、本培養は、７ℓ容のジャーファーメンター（高崎科学機械㈱製TSO-M7）を用いて、撹拌速度 300 rpm、 通気量 3.5ℓ／min、

温度 30℃の条件で 96 時間培養を行った。 本培養培地には、前章のコロイダルキチンとGlcNAcの代わりに同量のコロイダルキトサンを用いた。

（３）粗酵素の調製

前項（２）で得た培養液を４℃で遠心分離（10000×g、15 分間）した。得られた上清液に 80%飽和となるように固形硫安を加えてタンパク質を沈澱させ、さらに、冷蔵庫に一夜放置した。生じた沈澱を遠心分離（10000×g、10 分間）して集め、20 mlの 25 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）に溶解した。次に、この溶液を、予め前記と同様の緩衝液で平衡化したSephadex G-25カラム（2.2×84 cm）に供して、粗酵素溶液とした。なお、酵素の調製は、特記しない限り０－４℃にて行った。

（４）酵素活性の測定

1）エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼ

２mMのchitotriitolに適当量の酵素液と 0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）を加えて全量を 1.0 mlとし、40℃で 10 分間反応を行った。次に、Schales試薬[29]を加えて 15 分間煮沸後、420 nmの吸光度を測定し、GlcNを標準として、生成した還元糖を定量した。酵素単位１Uは、１分間に１μmolのGlcNに相当する還元糖を生じる酵素量と定義した。

2）キトサナーゼ

1.0%（w/v）のグリコールキトサンに適当量の酵素液と 0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）を加えて全量を 1.0 mlとし、40℃で 10 分間反応を行った。 次に、上記エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼの方法と同様にして還元糖を定量した。 酵素単位１Uは、１分間に１μmolのGlcNに相当する還元糖を生じる酵素量と定義した。

（５）アフィニティークロマトグラフィー担体（chitotriitol-Sepharose CL-4B）の調製

Marchらの方法[43]によって調製したシアノゲンブロマイド活性化Sepharose CL-4Bを

0.5 Mの 1,6－ヘキサンジアミン溶液（500 ml、pH 10.2）に懸濁し、室温で５時間振盪を行った。　次いで、担体は、0.5 Mの塩化ナトリウムを含む 1.0 M炭酸水素ナトリウム溶液、蒸留水、1.0 M塩酸、1.0 M水酸化ナトリウム溶液、および蒸留水を用いて順次洗浄し、ω－アミノヘキシル－Sepharoseを調製した。　次に、Dixonらの方法[45]に従い、この担体を 2.5%（v/v）グルタルアルデヒドを含む 600 mlの 10 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）に懸濁し、40℃で１時間振盪を行って活性化した。得られたグルタルアルデヒド活性化担体は、蒸留水および 0.5 M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）で順次洗浄した後、20 gの$GlcN_3$を含む同緩衝液 400 mlに懸濁し、25 gのシアノ水素化ホウ素ナトリウムを加え、反応を行った[50]。反応は、40℃、８時間減圧に保った後、40℃で 14 時間振盪して行った。反応後、調製した担体を蒸留水で洗浄し、さらに 400 mlの 0.5%（w/v）水素化ホウ素ナトリウム溶液に懸濁して、減圧下、室温で２時間振盪しながら還元した。このようにして調製したchitotriitol-Sepharose CL-4Bを、50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）で洗浄し、使用するまで同緩衝液中で冷蔵保管した。

（６）ｐ－ニトロフェニル　２－デオキシ－２－アミノ－β－Ｄ－グルコピラノシド（PNP-GlcN）の合成

エキソ－β－Ｄ－ヘキソサミニダーゼの基質として用いるPNP-GlcNは、概略Fig. 13に示す方法で合成した。

まず、1,3,4,6－テトラ－O－アセチル－２－デオキシ－２－アミノ－β－Ｄ－グルコピラノース（Ｉ）をBergmannらの方法[51]により調製した。すなわち、化合物Ｉ（15 g、43 mmol）を予め－10℃に保ったアセトン（100 ml）と無水トリフルオロ酢酸（15 ml、106 mmol）の混液に撹拌しながら徐々に添加した。反応混液を、－５～－10℃で 20 分間保った後、500 mlの氷水中に注ぎ込み、４℃で１時間撹拌を行った。生成した沈澱結晶をフィルターで集め、冷水で洗浄後、真空乾燥した。この反応により 1,3,4,6－テトラ－O－アセ

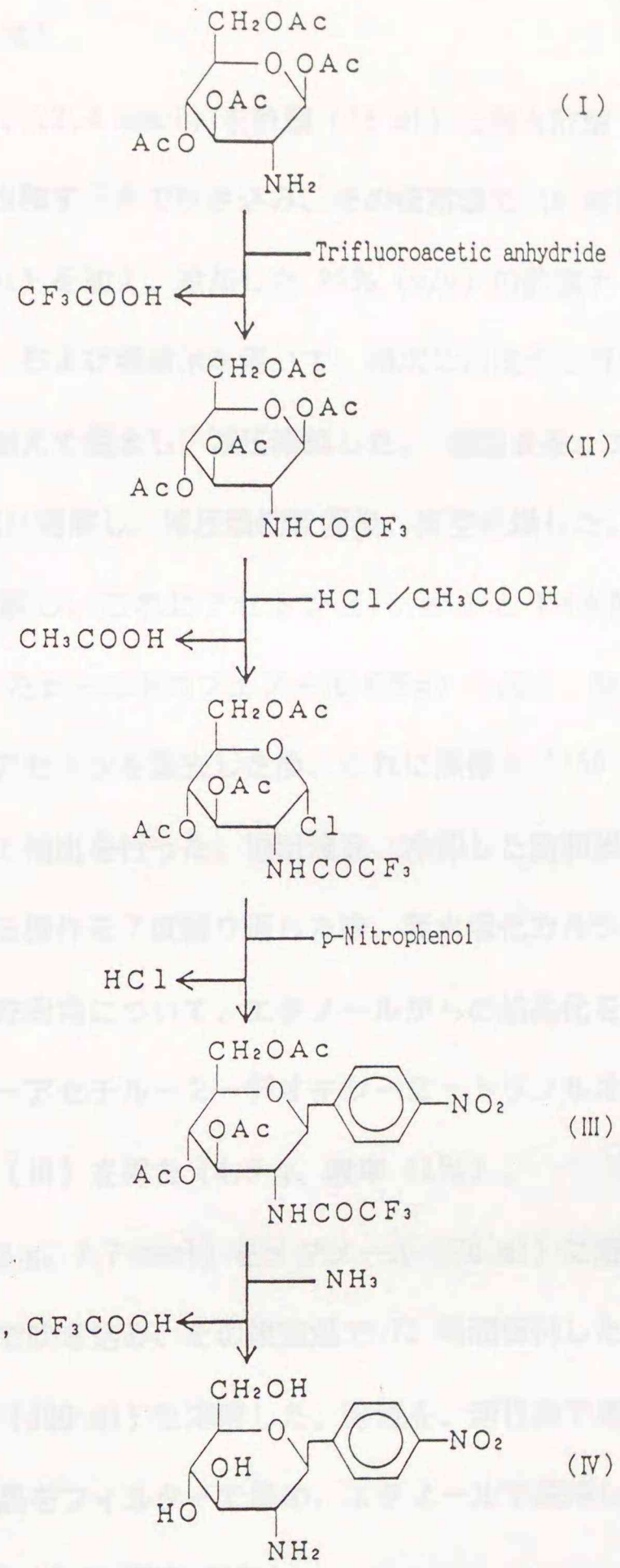


Fig. 13. Synthetic scheme of p-nitrophenyl β-D-glucosaminide.

チル－２－デオキシ－２－トリフルオロアセトアミド－β－Ｄ－グルコピラノース（II）を得た（17.6 g、収率 92%）。

次に、化合物II（10 g、22.4 mmol）を酢酸（28 ml）と無水酢酸（２ml）に溶解し、0℃下で塩化水素ガスを飽和するまで吹き込み、その後室温で 16 時間反応させた。反応後、クロロホルム（150 ml）を加え、冷却した 20%（w/v）の酢酸ナトリウム溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、および蒸留水を用いて、順次２回洗浄を行った。得られた溶液に、硫酸マグネシウムを加えて脱水し、減圧濃縮した。 濃縮液を、エーテル（80 ml）とヘキサン（30 ml）の混液に溶解し、減圧濃縮乾固後、真空乾燥した。得られた乾燥物を、アセトン（45 ml）に溶解し、これにアセトン（15 ml）と１M水酸化ナトリウム溶液（15 ml）の混液に溶解したｐ－ニトロフェノール（５g）を加え、室温で８時間反応させた。反応後、反応液からアセトンを留去した後、これに蒸留水（150 ml）を加え、クロロホルム（150 ml）を用いて抽出を行った。抽出液を、冷却した飽和炭酸水素ナトリウム溶液と蒸留水で順次洗浄する操作を７度繰り返した後、無水塩化カルシウムを用いて脱水し、濃縮乾固した。得られた乾固物について、エタノールからの結晶化を行い、ｐ－ニトロフェニル　3,4,6－トリ－O－アセチル－２－デオキシ－２－トリフルオロアセトアミド－β－Ｄ－グルコピラノシド（III）を得た（4.9 g、収率 44%）。

次いで、化合物III（4.0 g、7.7 mmol）をメタノール（70 ml）に溶解し、0℃下でアンモニアガスを飽和するまで吹き込み、その後室温で 72 時間保持した。反応後、反応液を濃縮乾固し、エタノール（100 ml）に溶解した。溶液を、活性炭で処理した後、冷蔵庫で一夜放置し、析出した結晶をフィルターで集め、エタノールで洗浄した後、真空乾燥して、PNP-GlcN（IV）を得た（2.14 g、収率 93%）。

以下に、（II）、（III）、（IV）の分析値を示す。その結果から、（IV）はPNP-GlcNであることを確認した。

（II）1,3,4,6－テトラ－O－アセチル－２－デオキシ－２－トリフルオロアセトアミド－β－D－グルコピラノース

m.p.168-169℃（文献値[50]、m.p.166-168℃）

Anal. Calcd. for $C_{16}H_{20}NO_{10}F_3$: C 43.35, H 4.55, N 3.16, F 12.86. Found: C 43.53, H 4.51, N 2.98, F 12.93.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 1.95, 2.01, 2.03, 2.08 (12H, s, OAcx4), 4.01-4.09 (3H, m, H-2, 5, and 6a), 4.23 (1H, dd, $J_{5,6b}$=13.0 Hz, $J_{6a,6b}$=4.9 Hz, H-6b), 5.00 (1H, t, $J_{3,4}$=$J_{4,5}$=9.7 Hz, H-4), 5.30 (1H, t, $J_{2,3}$=$J_{3,4}$=10.0 Hz, H-3), 5.85 (1H, d, $J_{1,2}$=8.8 Hz, H-1), 9.71 (1H, d, $J_{NH,2}$=8.8 Hz, N-H).

（III）p－ニトロフェニル　３，４，６－トリ－O－アセチル－２－デオキシ－２－トリフルオロアセトアミド－β－D－グルコピラノシド

m.p.196-198℃ (decomp.)

Anal. Calcd. for $C_{20}H_{21}N_2O_{10}F_3$: C 45.98, H 4.05, N 5.36, F 10.91. Found: C 46.03 H 4.02, N 5.42, F 10.88.

IR: 3300cm^{-1} (NH), 1759 (OAc), 1700 (amide I), 1600 (Ph, C=C), 1530 (amide II), 1350 (Ph, NO).

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 1.98 (3H, s, OAc), 2.04 (6H, s, OAcx2), 4.13 (1H, d, $J_{6a,6b}$= 10.6 Hz, H-6a), 4.21-4.32 (3H, m, H-2, 5, and 6b), 5.08 (1H, t, $J_{3,4}$=$J_{4,5}$=9.5 Hz, H-4), 5.33 (1H, t, $J_{2,3}$=$J_{3,4}$=9.9 Hz, H-3), 5.64 (1H, d, $J_{1,2}$=8.4 Hz, H-1), 7.28 (2H, d, J=9.2 Hz, o-Ph protonx2), 8.26 (2H, d, J=9.5 Hz, m-Ph protonx2).

（IV）p－ニトロフェニル　２－デオキシ－２－アミノ－β－D－グルコピラノシド (PNP-GlcN)

m.p.181-182℃ (decomp.)

Anal. Calcd. for $C_{12}H_{16}N_2O_7$: C 48.00, H 5.37, N 9.33. Found: C 47.87 H 5.31, N 9.22.

$[\alpha]_D$ = -105.0° (C=3.0, water)

IR: 3350cm^{-1} (OH), 1610 (NH), 1590 (Ph, C=C), 1350 (Ph, NO).

^{13}C-NMR (DMSO-d_6): 57.20 (C-2), 60.68 (C-6), 69.63 (C-4), 76.63 (C-3), 77.49 (C-5), 101.24 (C-1), 116.72 (o-Ph, carbonx2), 125.76 (m-Ph, carbonx2), 141.81 (Ph carbon attached to the phenolic oxygen), 162.45 (p-Ph, carbon).

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 2.71 (1H, m, H-2), 3.20 (2H, m, H-3 and 4), 3.35-3.45 (1H, b, H-5), 3.49 (1H, dd, $J_{5,6b}$=1.4 Hz, H-6b), 4.98 (1H, d, $J_{1,2}$=8.2 Hz, H-1), 7.24 (2H, d, J=9.2 Hz, o-Ph protonx2), 8.26 (2H, d, J=9.5 Hz, m-Ph protonx2).

（７）分析方法

1）タンパク質の定量は、標準タンパク質として仔牛血清アルブミンを用い、Lowryらの方法[53]に従って行った。

2）ネイティブポリアクリルアミド電気泳動は、７％ポリアクリルアミドゲルを用い、Reisfeldらの方法[54]に準じて行った。ＳＤＳ-ポリアクリルアミド電気泳動は、7.5％ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmliの方法[55]に準じて行った。また、５％ゲルを用いたＳＤＳ-ポリアクリルアミド電気泳動により、酵素の分子量は、WeberとOsbornの方法[56]に従って測定した。等電点電気泳動は、ポリアクリルアミドゲルプレート（pH 3.5～9.5）を用い、pIカリブレーションキット（ファルマシア製）を用いて行った。酵素タンパク質の染色は、Coomassie Brilliant Blue R-250を用いて行った。ゲル濾過法による分子量の測定は、Sephadex G-200を用い、Andrewsの方法[57]に従って行った。

3）酵素分解生成物は、TLCおよびHPLCで分析した。 TLC分析には、シリカゲル60アルミニウムプレート（メルク製）を用い、展開溶媒には、 プロパノール：30％アンモニア ＝

2:1 (v/v) を用いた。GlcNおよびキトサンオリゴ糖の検出は、ニンヒドリン法 [30] によって行った。HPLC分析は、前章（第二章、第一節）と同様の条件で行い、キトサンオリゴ糖およびキトサンオリゴ糖糖アルコールは、 Amanoらの方法 [58] によりN－アセチル化した後、HPLC分析を行った。

結果と考察

（1）エキソ－β－D－グルコサミニダーゼの精製

1) CM-Sephadex クロマトグラフィー

粗酵素液を、予め 25 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）で平衡化したCM-Sephadex C-50カラム（1.8×25 cm）に供した。カラムを同緩衝液 300 mlで洗浄後、吸着部を0－0.6 Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液（１ℓ）を用いた直線濃度勾配で、流速 80 ml/hで溶出した。溶出液は 10 mlずつ分取し、酵素活性（エキソ－β－D－グルコサミニダーゼおよびキトサナーゼ活性）およびタンパク質濃度（280 nm吸光値）を測定した。その結果、Fig. 14 に示すように、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼ活性を有する画分（フラクションNo.65－75）とキトサナーゼ活性を有する大部分の画分（フラクションNo.12－21）とを分離することができた。そこで、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼ活性画分を集め、70%飽和となるように固形硫安を加えてタンパク質を沈澱せ、さらに、冷蔵庫に一夜放置した。生じた沈澱を遠心分離（10000×g、10 分間）して集め、少量の 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）に溶解した。

2) Toyopearl HW-55S クロマトグラフィー

上記 CM-Sephadex クロマトグラフィーで得たエキソ－β－D－グルコサミニダーゼ画分を、予め 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）で平衡化したToyopearl HW-55Sカラム（2.7×78 cm）に供した。 同緩衝液を用いて流速 20 ml/minで溶出し、溶出液は５mlずつ

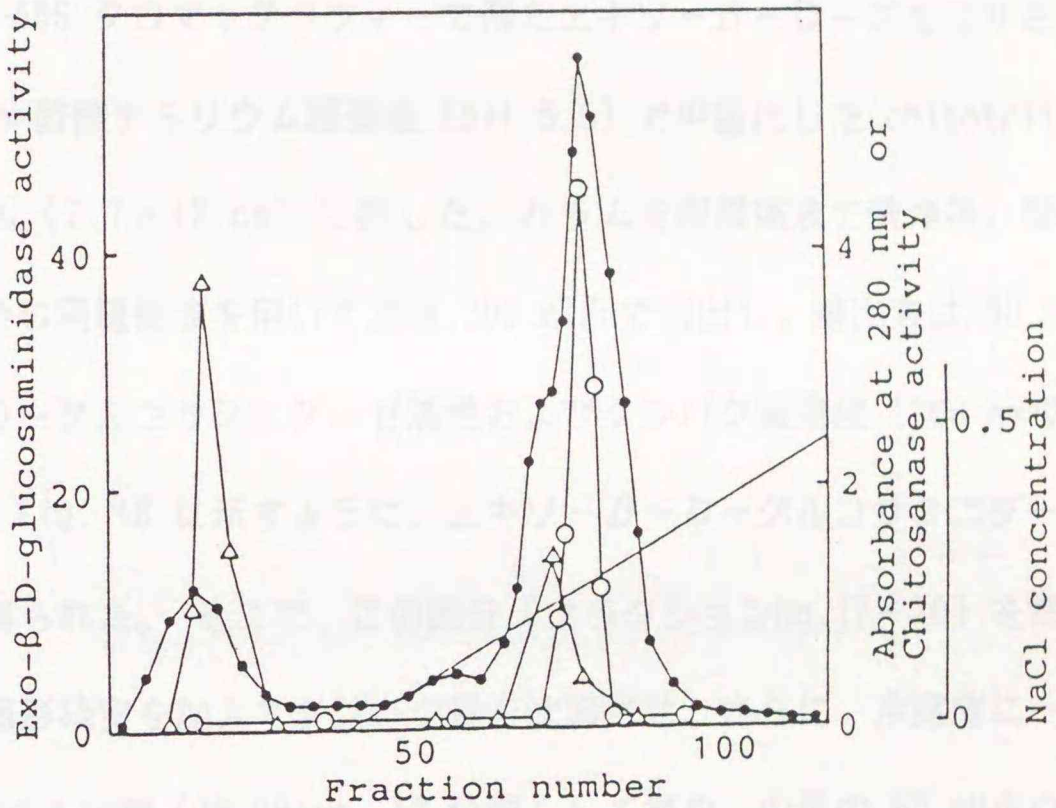


Fig. 14. Purification of exo-β-D-glucosaminidase by CM-Sephadex C-50 chromatography.
●, absorbance at 280 nm; ○, exo-β-D-glucosaminidase activity (units/ml); △, chitosanase activity (units/ml); ---, sodium chloride concentration (M).

分取し、エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼ活性およびタンパク質濃度（280 nm吸光値）を測定した。 その結果、Fig. 15 に示すように、タンパク質は３つのピークとして溶出され、エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼは最初の画分（フラクションNo.50－60）に溶出された。

3) chitotriitol-Sepharose CL-4B アフィニティークロマトグラフィー

上記 Toyopearl HW-55S クロマトグラフィーで得たエキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼ画分を、 予め 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）で平衡化した chitotriitol-Sepharose CL-4Bカラム（2.7×42 cm）に供した。カラムを同緩衝液で洗浄後、酵素を２mMのchitotriitolを含む同緩衝液を用いて流速 200 ml/hで溶出し、溶出液は 50 mlずつ分取し、エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼ活性およびタンパク質濃度（280 nm吸光値）を測定した。その結果、Fig. 16 に示すように、エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼ活性が単一ピークとして得られた。 そこで、この画分（フラクションNo.17－20）を集め、70％飽和となるように固形硫安を加えてタンパク質を沈澱させ、さらに、冷蔵庫に一夜放置した。 生じた沈澱は遠心分離（10000×g、10 分間）して集め、少量の 50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH 9.0）に溶解した。

イオン交換クロマトグラフィー（CM-Sephadex、DEAE-Sephadex）、ゲル濾過クロマトグラフィー（Sephadex G-100、Bio-Gel P-60）、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、phenyl-Sepharose クロマトグラフィー等、 他の精製手段を用いても完全な精製ができなかったが、chitotriitol-Sepharose CL-4B アフィニティークロマトグラフィーは、エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼの精製に非常に有効であった。

4) DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィー

上記 chitotriitol-Sepharose CL-4B アフィニティークロマトグラフィーで得たエキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼ画分をさらに精製するため、500 mlの 50 mMホウ酸ナト

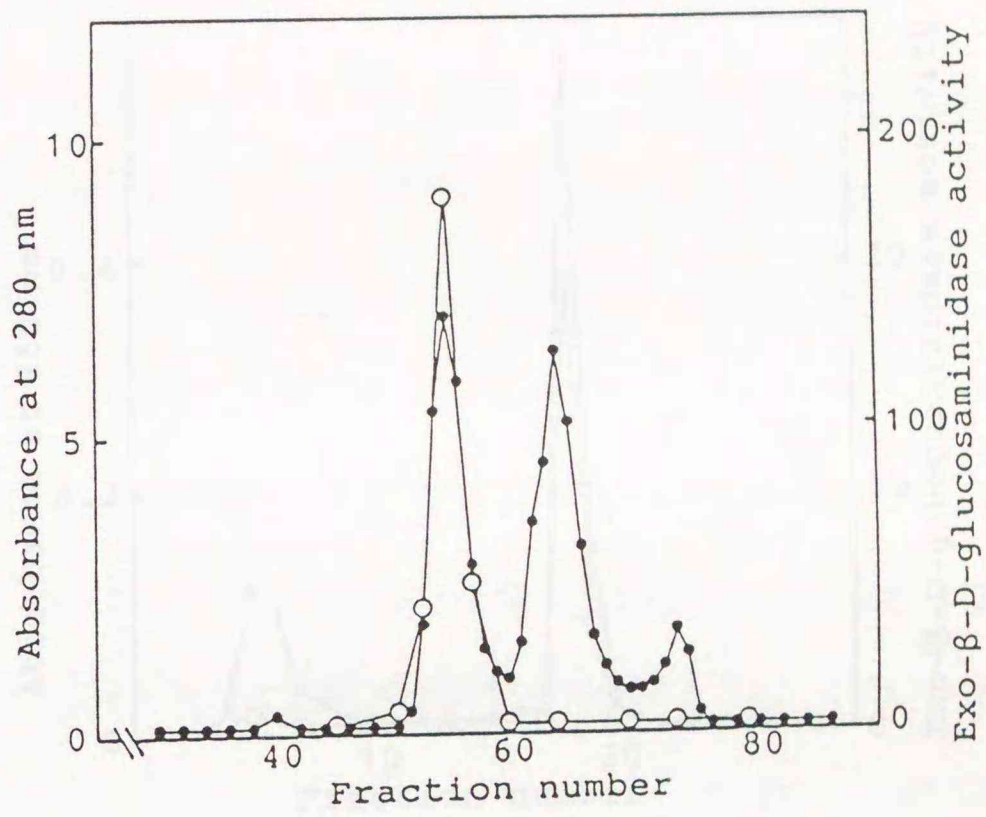


Fig. 15. Purification of exo-β-D-glucosaminidase by Toyopearl HW-55S chromatography.
●, absorbance at 280 nm; ○, exo-β-D-glucosaminidase activity (units/ml).

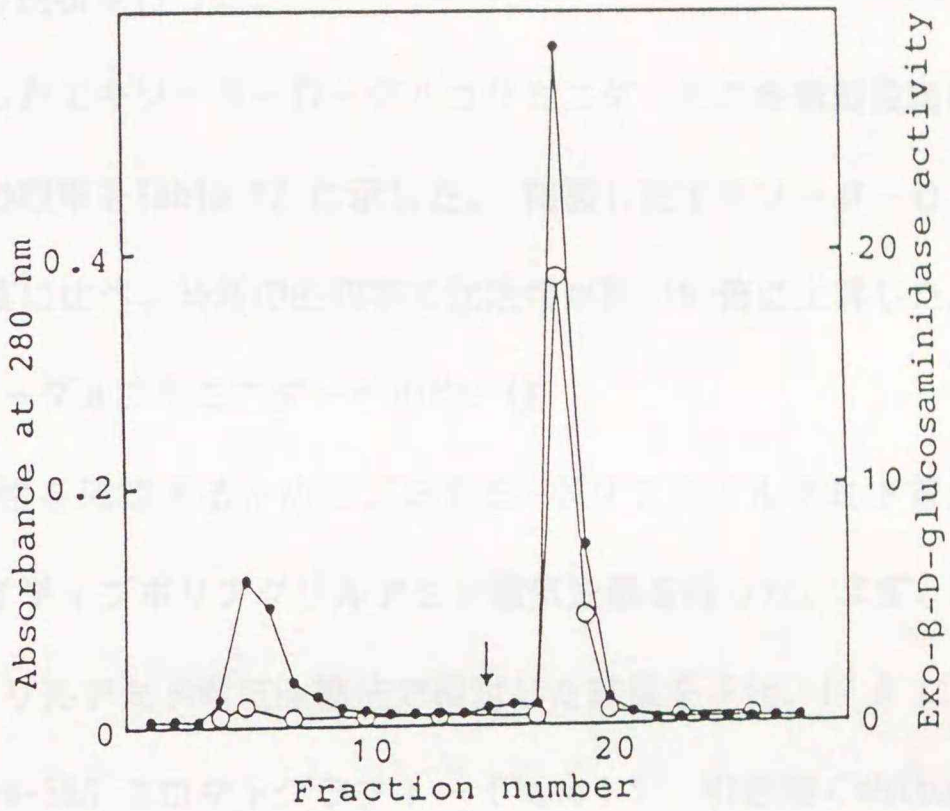


Fig. 16. Purification of exo-β-D-glucosaminidase by chitotriitol-Sepharose CL-4B affinity chromatography.
The arrow indicates the beginning of the elution.
●, absorbance at 280 nm; ○, exo-β-D-glucosaminidase activity (units/ml).

リウム緩衝液（pH 9.0）に対して透析を行い、予め同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-50カラム（1.8×9.5 cm）に供し、非吸着画分を集めた。 これに、70%飽和となるように固形硫安を加えてタンパク質を沈澱させ、さらに冷蔵庫に一夜放置した。生じた沈澱は遠心分離（10000×g、10 分間）して集め、少量の20 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）に溶解し、同緩衝液に対し透析を行った。

以上のようにして精製したエキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼの各精製段階における酵素活性、比活性及びその収率をTable 12 に示した。 精製したエキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼは、培養濾液に比べ、35%の回収率で比活性が約 16 倍に上昇した。

5) 精製エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼの均一性

精製した酵素の均一性を確認するために、ＳＤＳ-ポリアクリルアミド電気泳動、等電点電気泳動およびネイティブポリアクリルアミド電気泳動を行った。まず、酵素の精製過程をＳＤＳ-ポリアクリルアミド電気泳動法で検討した結果を Fig. 17 A に示した。それによるとToyopearl HW-55S クロマトグラフィー（lane１）、引き続くchitotriitol-Sepharose CL-4B アフィニティークロマトグラフィー（lane２）と、ステップを経るごとに精製され、DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィーにより、完全に単一バンド（lane３、４）になった。また、等電点電気泳動において単一バンドを示し（Fig. 17 B）、ネイティブポリアクリルアミド電気泳動においてもエキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼ活性を示す単一バンドが認められた（Fig. 18）。

ＳＤＳ-ポリアクリルアミド電気泳動法によって求めた本酵素の分子量は約 97000、ゲル濾過法では約 70000であった。また、本酵素の等電点は、pH 8.8付近であった（Fig. 17 B）。

Table 12. Purification of exo-β-D-glucosaminidase from N. orientalis

Step	Protein	Specific activity	Total activity	Yield	Purification
	mg	unit/mg	units	%	-fold
Culture broth	1936	2.23	4322	100	1.0
$(NH_4)_2SO_4$ ppt.	1300	3.49	4540	105	1.5
CM-Sephadex C-50	530	8.53	4520	105	3.8
Toyopearl HW-55	104	24.90	2590	60	11.2
$GlcN_3$ -Sepharose [a)]	56	35.71	2000	46	16.0
DEAE-Sephadex A-50	42	35.83	1505	35	16.1

[a)] $GlcN_3$ -Sepharose; Chitotriitol-Sepharose CL-4B

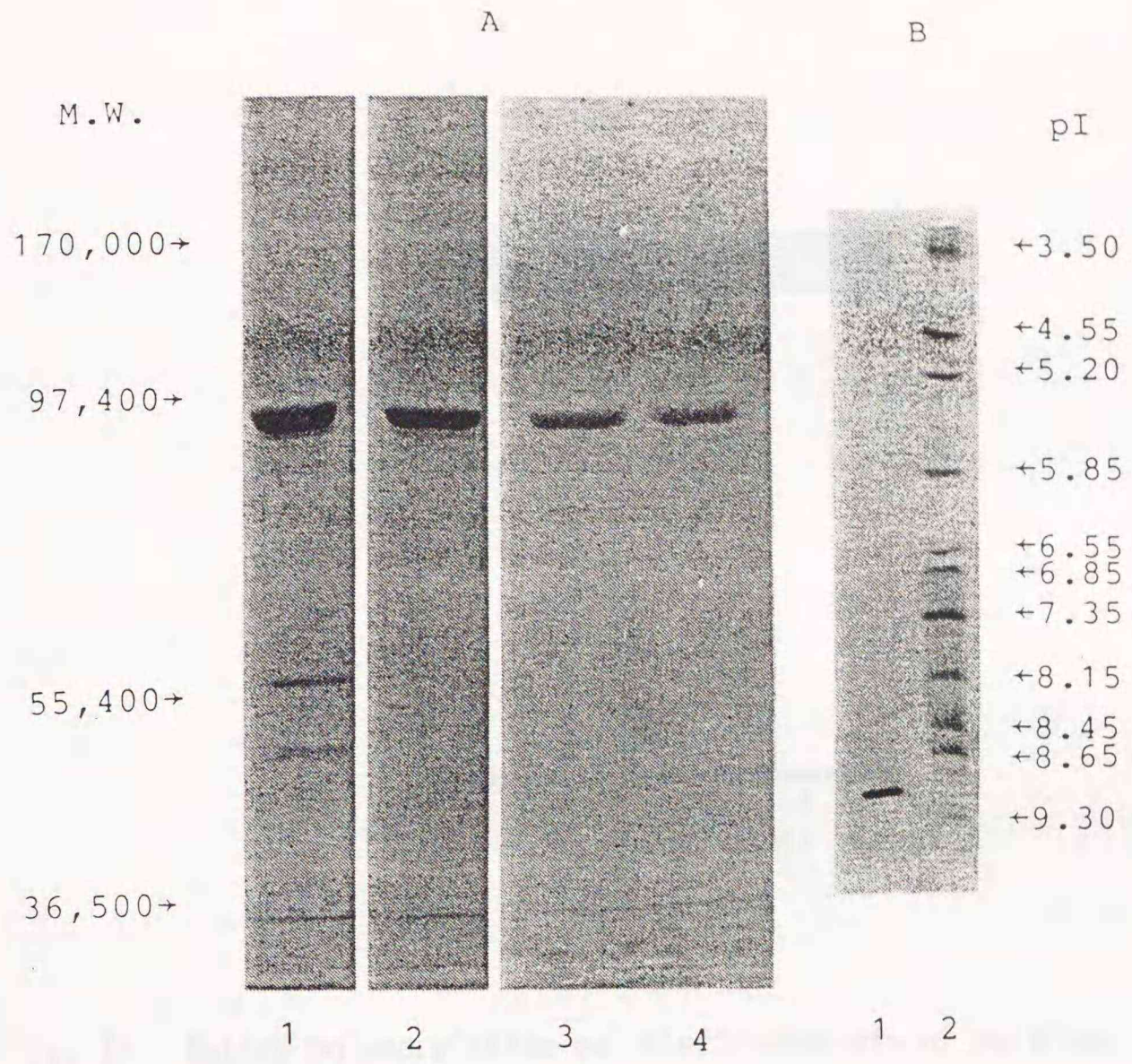


Fig. 17. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A) and isoelectric focusing (B) of purified exo-β-D-glucosaminidase.

Gel A, the partially purified enzyme (50 μg) obtained from the Toyopearl HW-55S step (lane 1). The enzyme (30 μg) obtained from the chitotriitol-Sepharose step (lane 2). 30 μg (lane 3) and 20 μg (lane 4) of the purified enzyme. Molecular weight markers: reduced α_2-macroglobulin (Mr=170,000), phosphorylase b (Mr=97,400), glutamate dehydrogenase (Mr=55,400), and lactate dehydrogenase (Mr=36,500).

Gel B, lane 1, purified enzyme (10 μg); lane 2, pI marker proteins: amyloglucosidase (3.50), soybean trypsin inhibitor (4.55), β-lactoglobulin A (5.20), bovine carbonic anhydrase B (5.85), human carbonic anhydrase B (6.55), myoglobulin-acidic band (6.85), myoglobulin-basic band (7.35), lentil lectin-acidic band (8.15), lentil lectin-middle band (8.45), lentil lectin-basic band (8.65), and trypsinogen (9.30).

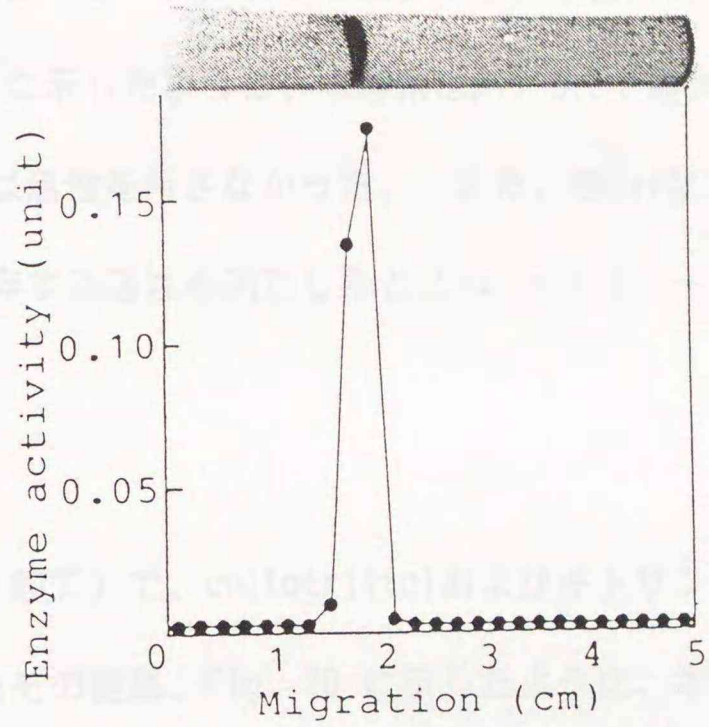


Fig. 18. Native polyacrylamide gel electrophoresis of purified exo-β-D-glucosaminidase.
The purified enzyme (30 μg) was electrophoresed (2 mA/gel) at 4℃ for 3 h. After the gel was cut into 2-mm sections and the gel slices were incubated in 0.5 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, at 4℃ for 18 h, the exo-β-D-glucosaminidase activity in each incubation mixture was measured.

（2）エキソ－β－D－グルコサミニダーゼの諸性質

1) pHの影響

0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 3.0－6.0）、 0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0－8.0）および 0.1 Mホウ酸－NaOH緩衝液（pH 8.0－10.0）を用い、 chitotriitolを基質として、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼの至適pHおよびpH安定性を調べた。その結果、Fig. 19 A に示したように、本酵素はpH 5.5で最大活性を示し、pH 3.5以下およびpH 8.0以上では活性を示さなかった。 また、各pHに調整した酵素液を、4℃で96 時間置いた後、残存する活性を測定したところ、pH 3.0－10.0の範囲で安定であった（Fig. 19 B）。

2) 温度の影響

種々の温度（25－80℃）で、chitotriitolおよびキトサンを基質として、活性を測定し、至適温度を調べたその結果、Fig. 20 に示したように、本酵素は 60℃付近で最大活性を示した。また、酵素液を各温度（4－75℃）で 15 分間置いた後、残存する活性を測定し、温度安定性を調べた。その結果、本酵素は 50℃以下で安定であったが、60℃以上では安定性が著しく低下し完全に失活した。

3) エキソ－β－D－グルコサミニダーゼの分解様式

精製したエキソ－β－D－グルコサミニダーゼの種々の基質に対する作用と分解様式を調べた。本酵素は、キトサンオリゴ糖およびキトサンに対しては特異的に作用したが、p－ニトロフェニル α－およびβ－グルコシド、p－ニトロフェニル α－およびβ－ガラクトシド、p－ニトロフェニル α－およびβ－アセチルグルコサミニド、 p－ニトロフェニル α－およびβ－アセチルガラクトサミニド、コロイダルキチン、キチンオリゴ糖、セルロース、カルボキシメチルセルロース、セロオリゴ糖、GalNα1-4GalNは全く分解しなかった。

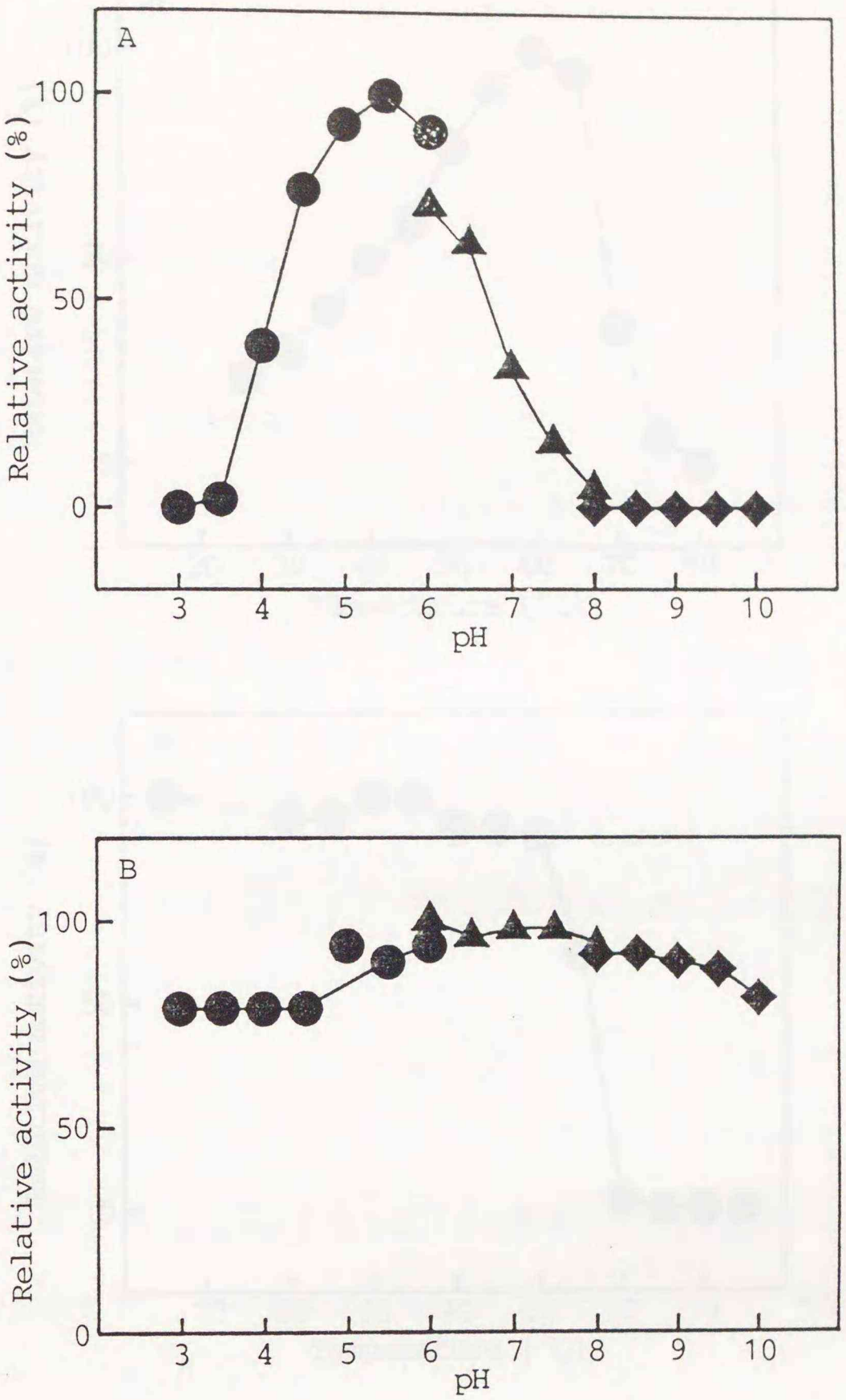


Fig. 19. Effects of pH on exo-β-D-glucosaminidase activity and stability.
(A)The enzyme activity was measured at various pH values ranging from pH 3.0 to 10.0 under the standard assay procedure. (B)The pH-stability was obserbed by assaying the enzyme activity after standing for 96 h at 4℃ at various pHs.
●, 0.1 M sodium acetate buffer; ▲, 0.1 M sodium phosphate buffer;
◆, 0.1 M borate-NaOH buffer.

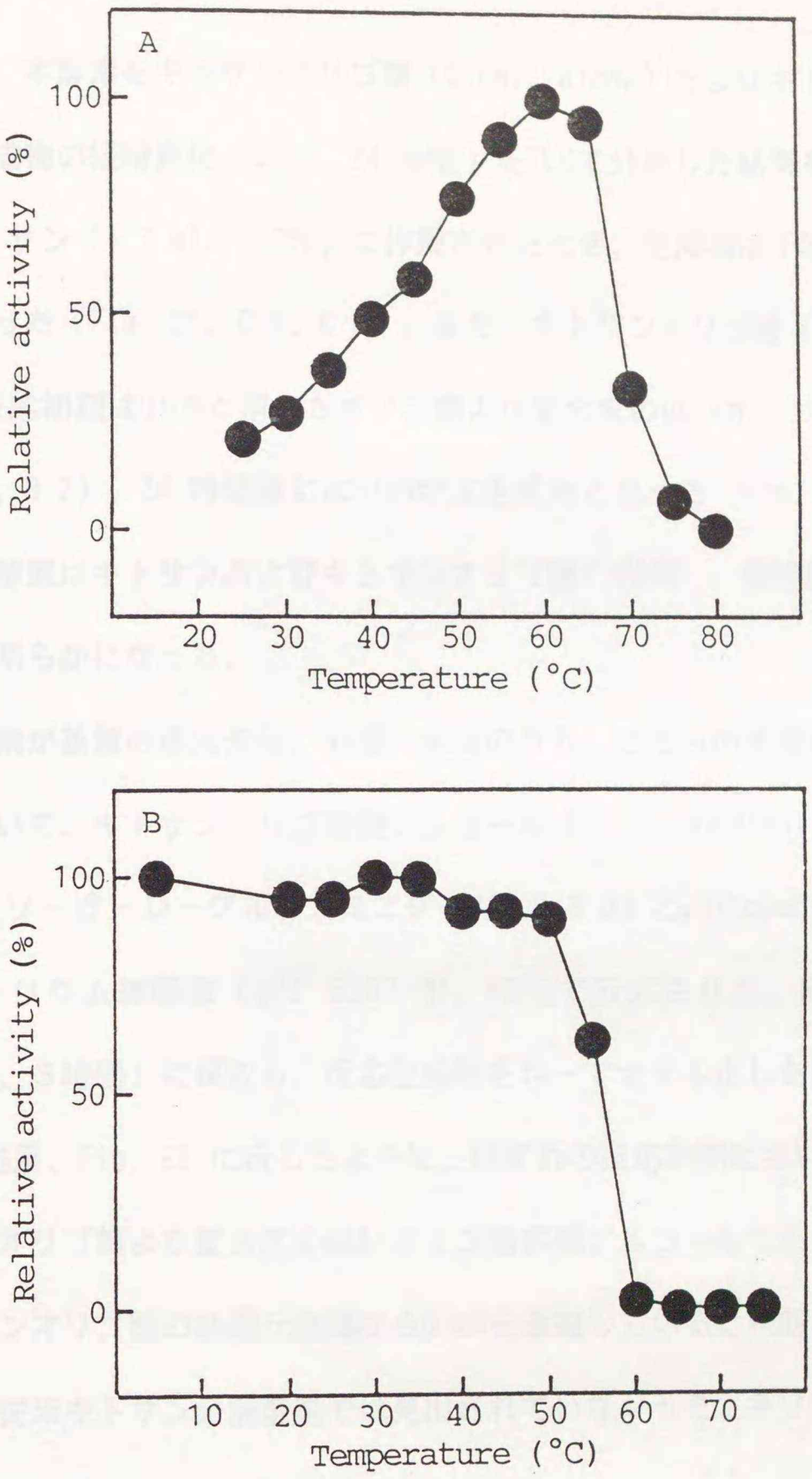


Fig. 20. Effects of temperature on exo-β-D-glucosaminidase activity and stability.
(A)The enzyme activity was measured at various temperatures under the standard assay procedure. (B)The thermo-stability was obserbed by assaying the enzyme activity after incubation for 15 min at various temperatures.

Fig. 21 には、本酵素をキトサンオリゴ糖（$GlcN_2$、$GlcN_6$）およびキトサンに作用させたときの分解生成物の経時変化（0、1、24 時間）をTLCで分析した結果を示した。本酵素（2.0 U）をキトサン（1.0 ml、1.0%）に作用させたとき、生成物は1時間、24 時間ともにGlcNのみであった（Fig. 21、C 2, C 3）。また、キトサンオリゴ糖（1.0 ml、50 μl）に対しては、 反応初期はGlcNと用いたオリゴ糖より重合度の低いオリゴ糖を生成したが（Fig. 21、A 2, B 2）、24 時間後にはGlcNが主生成物となった（Fig. 21、A 3, B 3）。このように、本酵素はキトサンおよびキトサンオリゴ糖に作用し、最終産物としてGlcNを生成することが明らかになった。

さらに、本酵素が基質の還元末端、非還元末端のうち、どちらの末端側からGlcNを遊離しているかについて、キトサンオリゴ糖糖アルコール（chitopentaitol）を用いて調べた。すなわち、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼ（0.3 U）とchitopentaitol（2mM）を5mlの酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）中、40℃で反応させた。反応液を、経時的（10 分、20 分、3時間）に採取し、反応生成物をN－アセチル化した後、HPLCで分析を行った。 その結果、Fig. 22 に示したように、いずれの反応時間においても、生成物はGlcNAcと用いたオリゴ糖より重合度の低いオリゴ糖の糖アルコールであったことから、本酵素は、キトサンオリゴ糖の非還元末端からGlcNを遊離していると判断された。このように、本酵素は、従来キトサン分解酵素では見出されていなかったエキソ型の酵素であると判断された。

4）エキソ－β－D－グルコサミニダーゼのキトサン関連物質に対する分解速度

PNP-GlcN、キトサンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖糖アルコールおよびキトサンを基質とし、本酵素の加水分解初速度を調べた。Table 13 に、各々の基質に対する相対分解速度を示した。その結果、本酵素は、$GlcN_4$、$GlcN_5$およびそれらの糖アルコールに対して最大分解速度を示し、重合度が$GlcN_4$、$GlcN_5$以上およびそれ以下では、やや分解速度の低下が

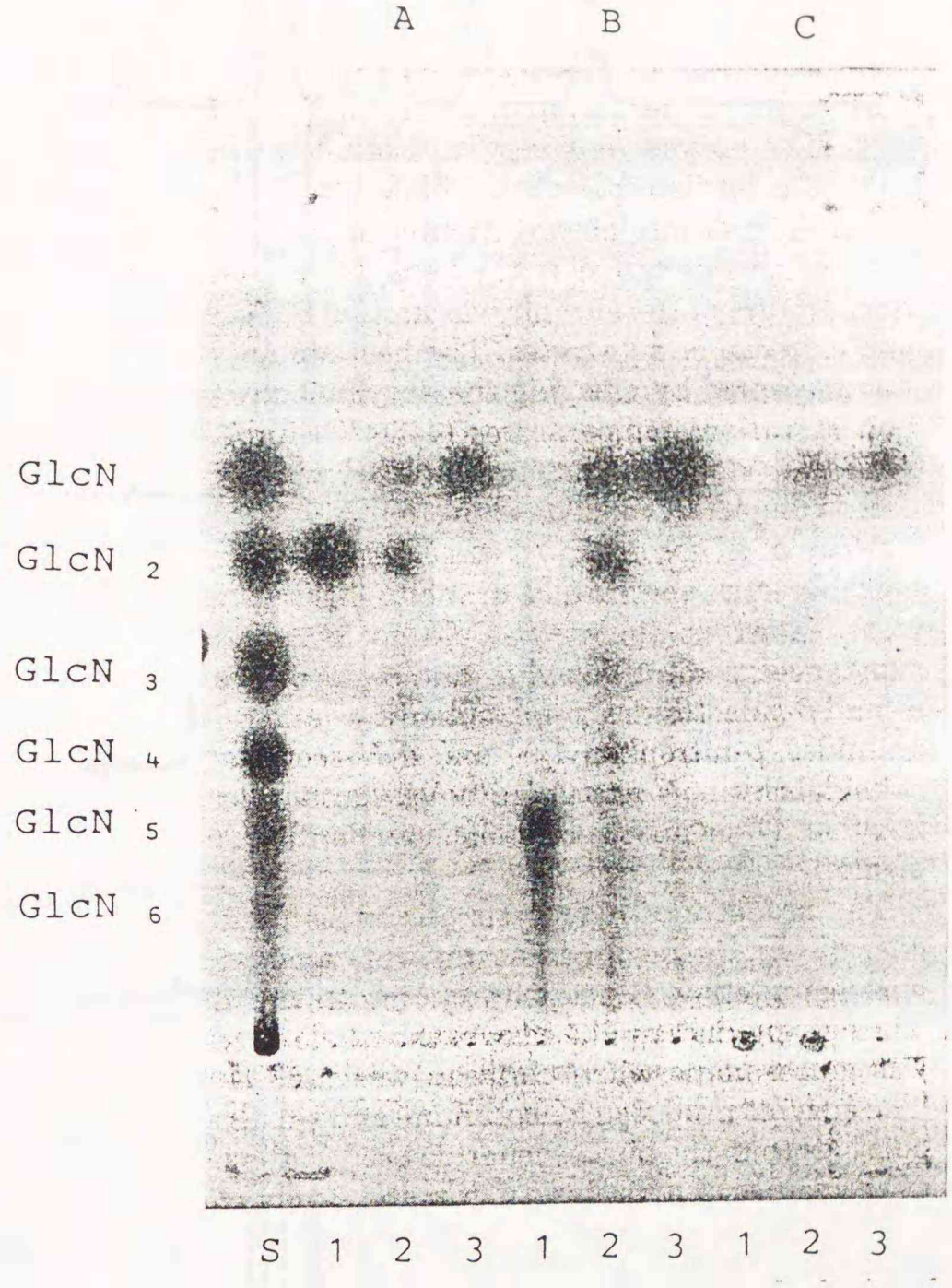


Fig. 21. Thin layer chromatogram showing hydrolysis of $GlcN_2$ (A), $GlcN_5$ (B), and chitosan (C) by exo-β-D-glucosaminidase.

Each substrate (50 μmol with respect to $GlcN_2$ and $GlcN_5$ and 1% with respect to chitosan) was separately incubated with 2.0 units of the exo-β-D-glucosaminidase in 1 ml of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, at 40°C. At intervals, aliquots (0.2 ml) of each reaction mixture were taken and then heated for 3 min in a boiling water bath. The products formed from each substrate were analyzed by thin layer chromatography as described in the text.

Lane S, GlcN and chitosan-oligosaccharides from $GlcN_2$ to $GlcN_6$. All lanes of A, B, and C are as follows: lane 1, unhydrolyzed substrates; lane 2, enzymatic hydrolysates after 1 h of incubation; lane 3, enzymatic hydrolysates after 24 h of incubation.

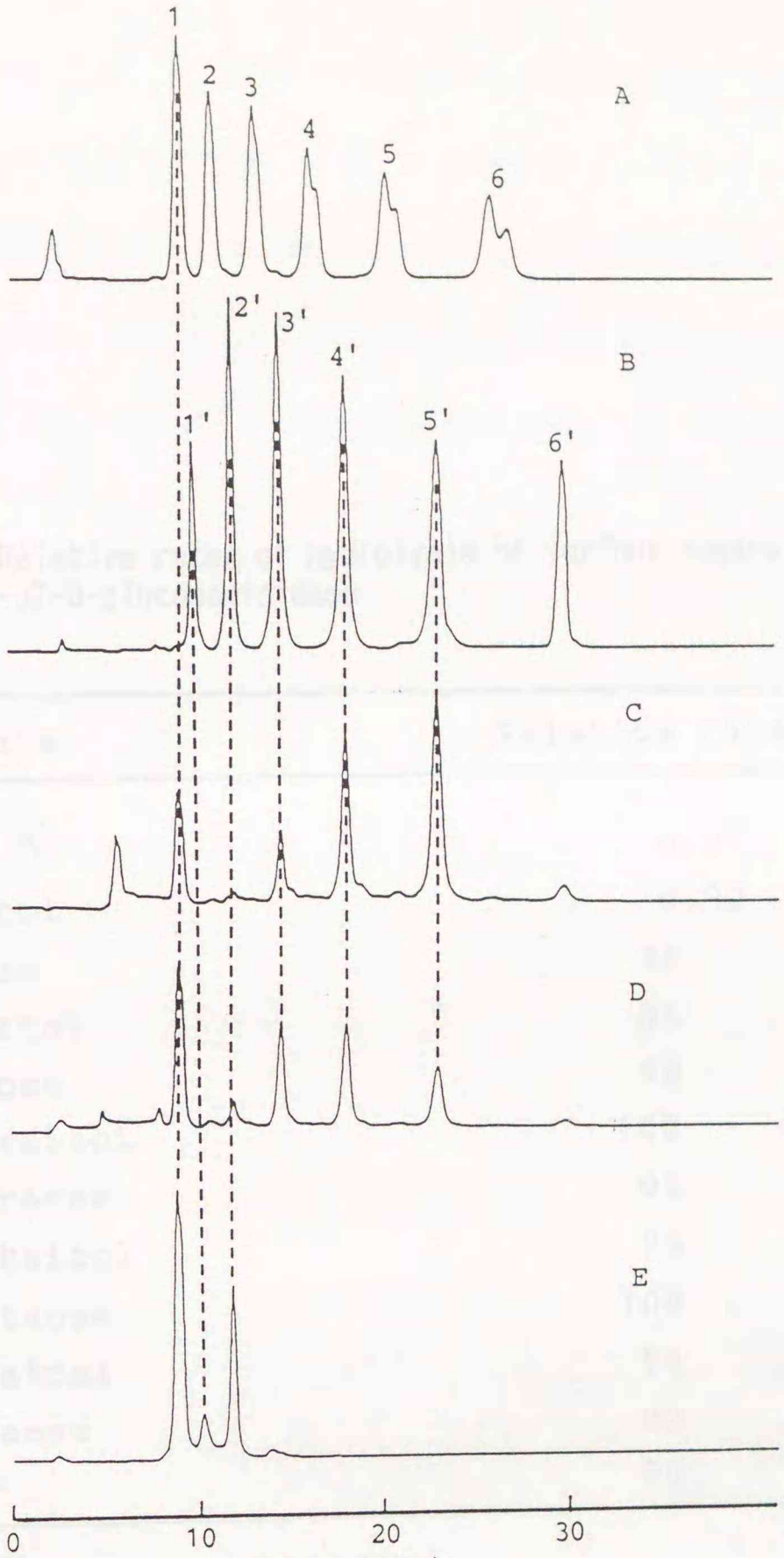


Fig. 22. HPLC chromatogram showing hydrolysis of chitopentaitol by exo-β-D-glucosaminidase.
A, standard N-acetylglucosamine (1) and chitin-oligosaccharides from di-N-acetyl-chitobiose (2) to hexa-N-acetyl-chitohexaose (6); B, standard N-acetylglucosaminitol (1') and reduced chitin-oligosaccharides from di-N-acetyl-chitobiitol (2') to hexa-N-acetyl-chitohexaitol (6'); C, the products after 10 min of incubation; D, the products after 20 min of incubation; E, the products after 3 h of incubation.

Table 13. Relative rates of hydrolysis of various sugars by exo-β-D-glucosaminidase

Substrate	Relative rate (%)
PNP-GlcN [a)]	0.21
chitobiitol	0.30
chitobiose	38
chitotriitol	85
chitotriose	92
chitotetraitol	100
chitotetraose	99
chitopentaitol	99
chitopentaose	100
chitohexaitol	94
chitohexaose	92
chitosan	90

a) PNP-GlcN, p-nitrophenyl β-D-glucosaminide

認められた。とくに、PNP-GlcN、chitobiitolでは著しい分解速度の低下が認められ、一般的にβ－グリコシダーゼの基質として用いられているアリル β－グリコシドとは異なった作用を示した。また、$GlcN_2$に対しても、$GlcN_3$に比べ 2.4 倍も分解速度が低かった。

以上のことから、エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼの活性の発現には、３個以上のGlcN残基（GlcNβ1-4GlcNβ1-4GlcN）の存在が重要な役割をしていると考えられた。

第二節　キトサナーゼの精製と諸性質

N. orientalis IFO12806の生産するキトサナーゼの精製を行い、その諸性質について調べた。

実験方法

（１）実験材料

キトサンは、前述の方法によって調製した完全脱アセチル化キトサンおよび部分アセチル化キトサンを用いた。グリコールキトサンは和光純薬製を用いた。キトサンオリゴ糖糖アルコール及びキチンオリゴ糖糖アルコールは、前節と同様にして調製した。β－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼは、N. orientalis IFO12806起源の酵素を用いた[40]。

（２）菌株および培養

菌株は前節と同様、N. orientalis IFO12806を用い、前節と同じ方法で培養を行った。

（３）粗酵素の調製

前記培養液（１ℓ）を用い、前節と同様の操作を行って粗酵素溶液を調製した。

（４）キトサナーゼ活性の測定

キトサナーゼ活性は、前節と同様の方法で測定した。

（５）アフィニティークロマトグラフィー（chitotriose-Sepharose CL-4B）の調製

Marchらの方法[43]によって調製したシアノゲンブロマイド活性化 Sepharose CL-4B（10 g）を、 chitotriose塩酸塩（1.0 g、1.64 mmol）を含む 20 mlの 0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 8.0）に懸濁し、室温で３時間振盪を行った。振盪後、担体は、0.5 MのNaClを含む 1.0 M炭酸水素ナトリウム溶液、続いて蒸留水、そして 50 mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）で洗浄した。このようにして調製したchitotriose-Sepharose CL-4B

は、10%エタノール（v/v）を含む同緩衝液（pH 5.5）中で冷蔵保管した。

（６）分析方法

1) タンパク質の定量は、前節と同様の方法で行った。

2) ＳＤＳ-ポリアクリルアミド電気泳動は、12.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、前節と同様の方法で行った。また、等電点電気泳動は、前節と同様の方法で行った。ゲル濾過法による分子量の測定は、Sephadex G-75を用い、前節と同様の方法で行った。

3) 酵素分解生成物は、TLCおよびHPLCで分析を行った。TLCおよびHPLC分析の条件は、前節と同様にして行った。

結果と考察

（１）キトサナーゼの精製

1) CM-Sephadex クロマトグラフィー

粗酵素液を、予め 25 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）で平衡化したCM-Sephadex C-50カラム（1.8×9.5 cm）に供し、同緩衝液（120 ml）により、流速 30 ml/hで展開した。溶出液は６mlずつ分取し、キトサナーゼ活性およびタンパク質濃度（280 nm吸光値）を測定した。その結果、前節のFig. 14 に示したと同様、非吸着画分にキトサナーゼ活性を有する画分が、タンパク質の主ピークよりやや遅れて溶出された。そこで、キトサナーゼ活性画分を集め、70%飽和となるように固形硫安を加えてタンパク質を沈澱させ、 さらに、冷蔵庫に一夜放置した。 生じた沈澱を遠心分離（10000×g、10 分間）して集め、少量の 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）に溶解した。次いで、この溶液を、予め前記と同様の緩衝液で平衡化した Sephadex G-25カラム（2.2×87 cm）に供して脱塩を行い、タンパク質画分を集めた。

2) chitotriose-Sepharose CL-4B アフィニティークロマトグラフィー

上記クロマトグラフィーで得たキトサナーゼ画分を、予め 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）で平衡化したchitotriose-Sepharose CL-4Bカラム（2.2×12 cm）に供した。カラムを同緩衝液で洗浄後、 酵素を２mMのchitotetraitolを含む同緩衝液を用いて流速 20 ml/hで溶出し、10 mlずつ分取して、キトサナーゼ活性およびタンパク質濃度（280 nm 吸光値）を測定した。その結果、Fig. 23 に示すように、chitotetraitolを用いた溶出で、キトサナーゼ活性が単一ピークとして得られた。そこで、この画分（フラクションNo.24－39）を集め、70%飽和となるように固形硫安を加えてタンパク質を沈澱させ、さらに、冷蔵庫に一夜放置した。生じた沈澱を遠心分離（10000×g、10 分間）して集め、これを少量の 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）に溶解した。

本アフィニティーゲルのリガンドをglucosamine～chitohexaose（GlcN～$GlcN_5$）とした場合の、精製キトサナーゼに対する吸着および溶出挙動を比較し、その結果をFig. 24 に示した。 GlcNをリガンドとしたアフィニティーゲルは、キトサナーゼを吸着しなかった（Fig. 24 A）。また、$GlcN_2$では、キトサナーゼがやや遅れて溶出され、キトサナーゼを弱く吸着するものと判断された（Fig. 24 B）。一方、$GlcN_4$、$GlcN_5$をリガンドとしたアフィニティーゲルは、本酵素の精製に用いた$GlcN_3$（Fig. 24 C）と同様に、強くキトサナーゼを吸着した（Fig. 24 D, E）。また、吸着したキトサナーゼの溶出には、用いたリガンドより重合度の高いオリゴ糖糖アルコールが適していた。リガンドと同じ重合度のオリゴ糖糖アルコールでは、キトサナーゼの溶出ピークがブロードになり、また、それ以下の重合度のオリゴ糖糖アルコールでは、溶出されなかった。このようなことは、オリゴ糖の重合度が高いリガンドほど、キトサナーゼを強く吸着することを示唆するものである。

この精製ステップにおけるchitotriose-Sepharose CL-4B アフィニティークロマトグラフィーは、キトサナーゼの精製に非常に有効であった。なお、前節のエキソ－β－Ｄ－グ

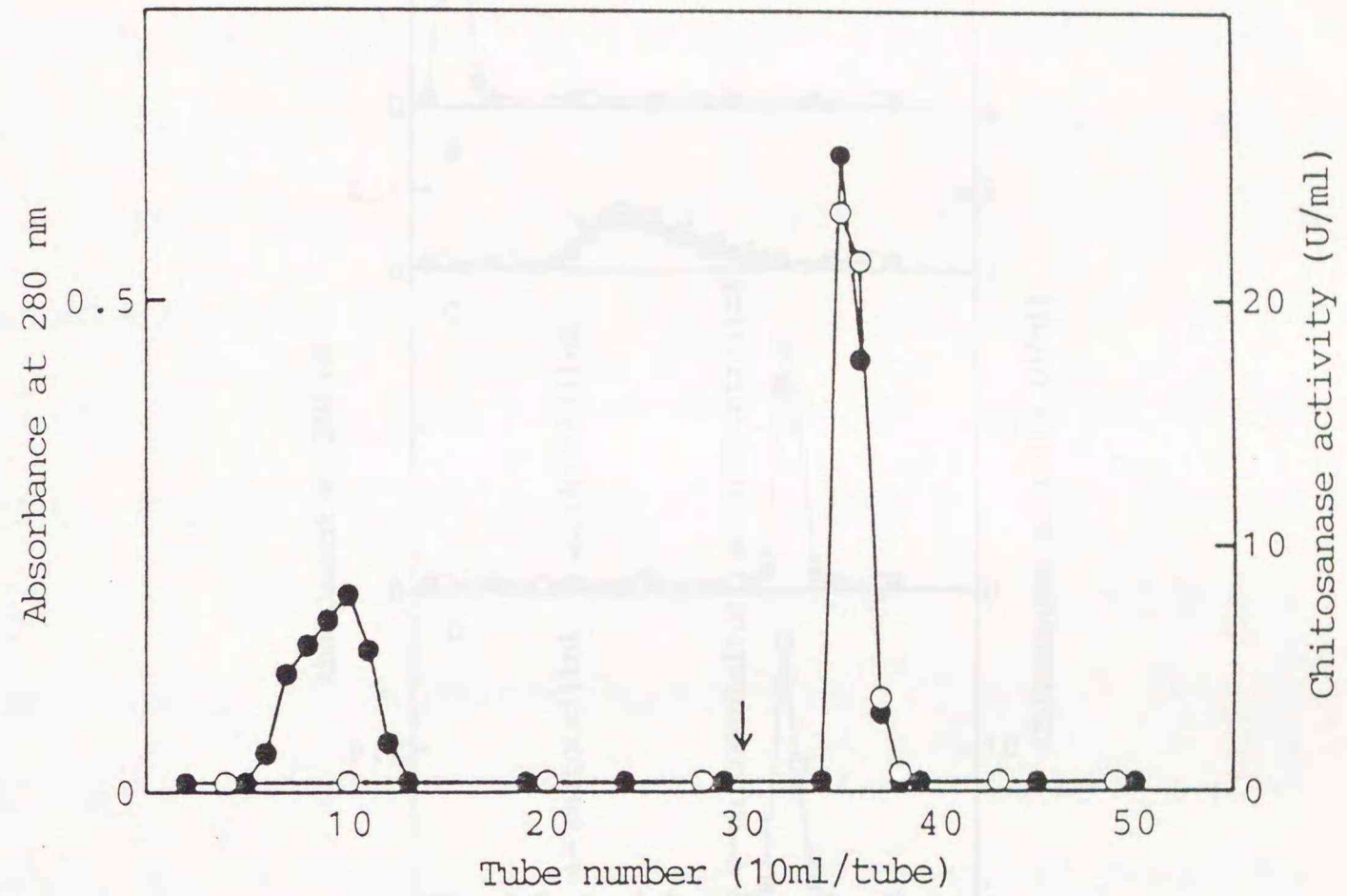


Fig. 23. Purification of chitosanase on chitotriose-Sepharose CL-4B affinity chromatography.
The arrow indicates the beginning of the elution.
●, absorbance at 280 nm; ○, chitosanase activity (units/ml).

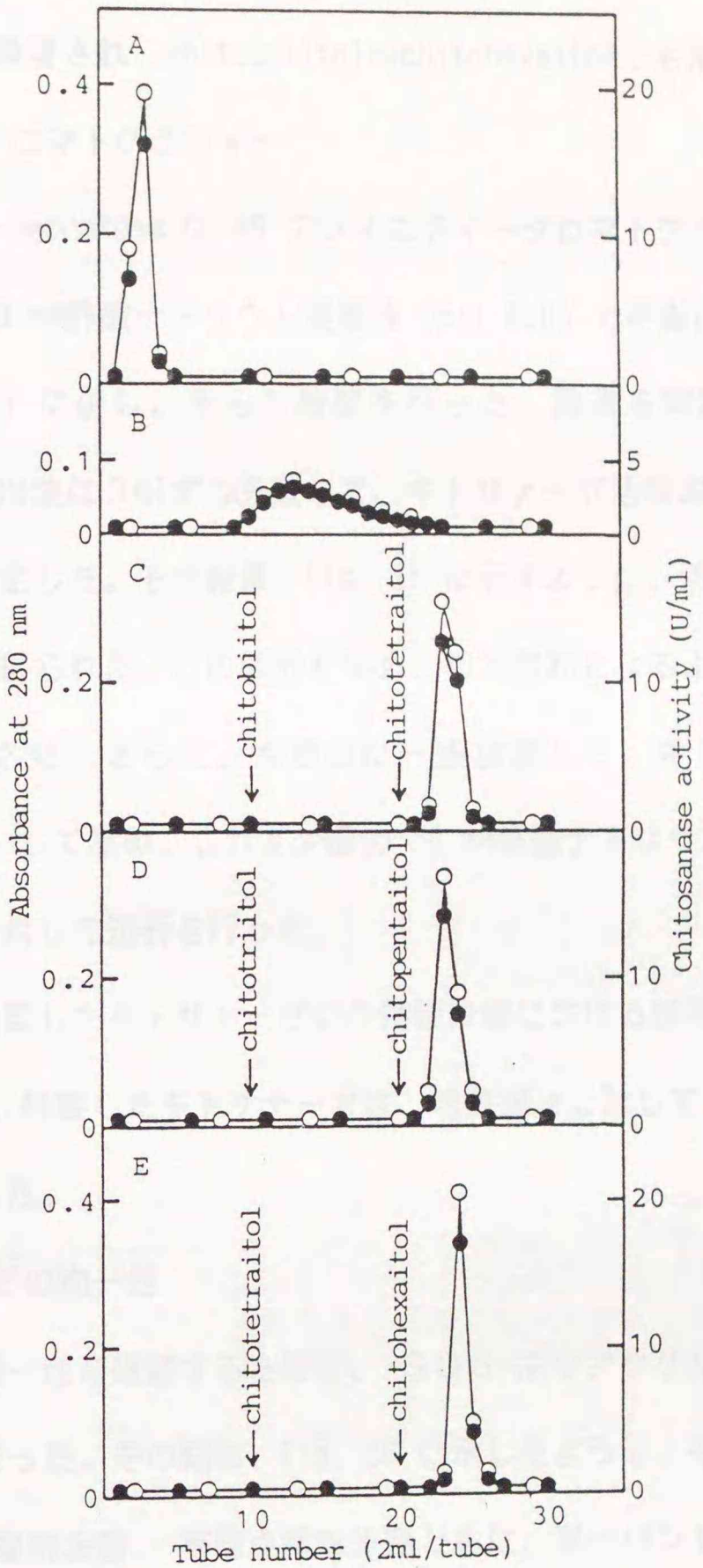


Fig. 24. Affinity chromatography on Sepharose CL-4B with immobilized chitosan-oligosaccharides.

(A)Sepharose CL-4B with immobilized glucosamine; (B)the gel with immobilized chitobiose; (C)the gel with immobilized chitotriose; (D)the gel with immobilized chitotetraose; (E)the gel with immobilized chitopentaose.

●, absorbance at 280 nm; ○, chitosanase activity (units/ml).

ルコサミニダーゼの精製に用いたchitotriitol-Sepharose CL-4B アフィニティーゲルでは、本キトサナーゼは強く吸着され、chitotriitol～chitohexaitolでも溶出されなかった。

3) Sephadex G-75 クロマトグラフィー

上記 chitotriose-Sepharose CL-4B アフィニティークロマトグラフィーで得たキトサナーゼ画分を、予め 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）で平衡化したSephadex G-75 カラム（2.2×87 cm）に供し、さらに精製を行った。酵素を同緩衝液を用いて流速 15 ml/hで溶出し、 溶出液は3mlずつ分取して、キトサナーゼ活性およびタンパク質濃度（280 nm吸光値）を測定した。その結果、Fig. 25 に示すように、活性とタンパク質が一致した主要なピークが得られた。この画分を集め、70%飽和となるように固形硫安を加えてタンパク質を沈澱させ、さらに、冷蔵庫に一夜放置した。生じた沈澱を遠心分離（10000×g、10 分間）して集め、これを少量の 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）に溶解し、同緩衝液に対して透析を行った。

以上のようにして精製したキトサナーゼの各精製段階における酵素活性およびその収率をTable 14 に示した。精製したキトサナーゼは、培養濾液に対して、31%の回収率で比活性が約 52 倍に上昇した。

4) 精製キトサナーゼの均一性

精製した酵素の均一性を確認するために、 ＳＤＳ-ポリアクリルアミド電気泳動および等電点電気泳動を行った。その結果、Fig. 26 に示したように、キトサナーゼはＳＤＳ-ポリアクリルアミド電気泳動、 等電点電気泳動ともに、単一バンドにまで精製されていることが明らかとなった。

ＳＤＳ-ポリアクリルアミド電気泳動法によって求めた本酵素の分子量は約 26000 （Fig. 26 A）であり、ゲル濾過法では約 24000 であった。また、本酵素の等電点は、pH 4.0 付近であった（Fig. 26 B）。

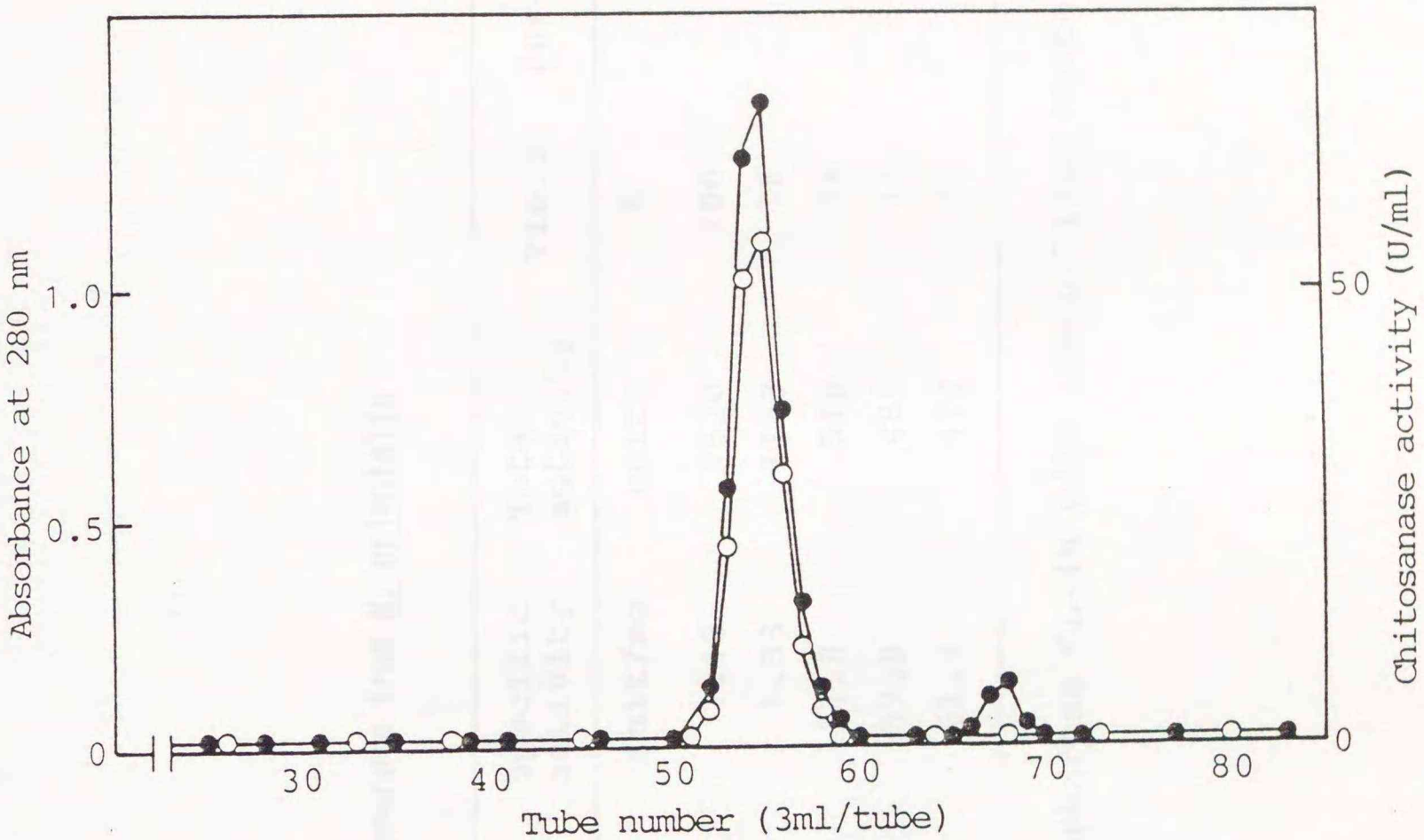


Fig. 25. Purification of chitosanase by Sephadex G-75 chromatography.
The enzyme obtained at the affinity chromatography step was applied to a Sephadex G-75 column (2.2×87 cm) previously equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer (pH 6.0). The column was eluted with the above buffer at a flow rate of 15 ml/h, and 3-ml fractions were collected.
●, absorbance at 280 nm; ○, chitosanase activity (units/ml).

Table 14. Purification of chitosanase from N. orientalis

Step	Protein	Specific activity	Total activity	Yield	Purification
	mg	unit/mg	units	%	-fold
Culture broth	1290	1.18	1520	100	1
$(NH_4)_2SO_4$ ppt.	867	1.33	1153	76	1.13
CM-Sephadex C-50	13.5	37.8	510	34	32.0
$GlcN_3$-Sepharose [a)]	8.37	57.9	485	32	49.1
Sephadex G-75	7.72	61.4	474	31	52.0

[a)] $GlcN_3$-Sepharose; Sepharose CL-4B with immobilized chitotriose

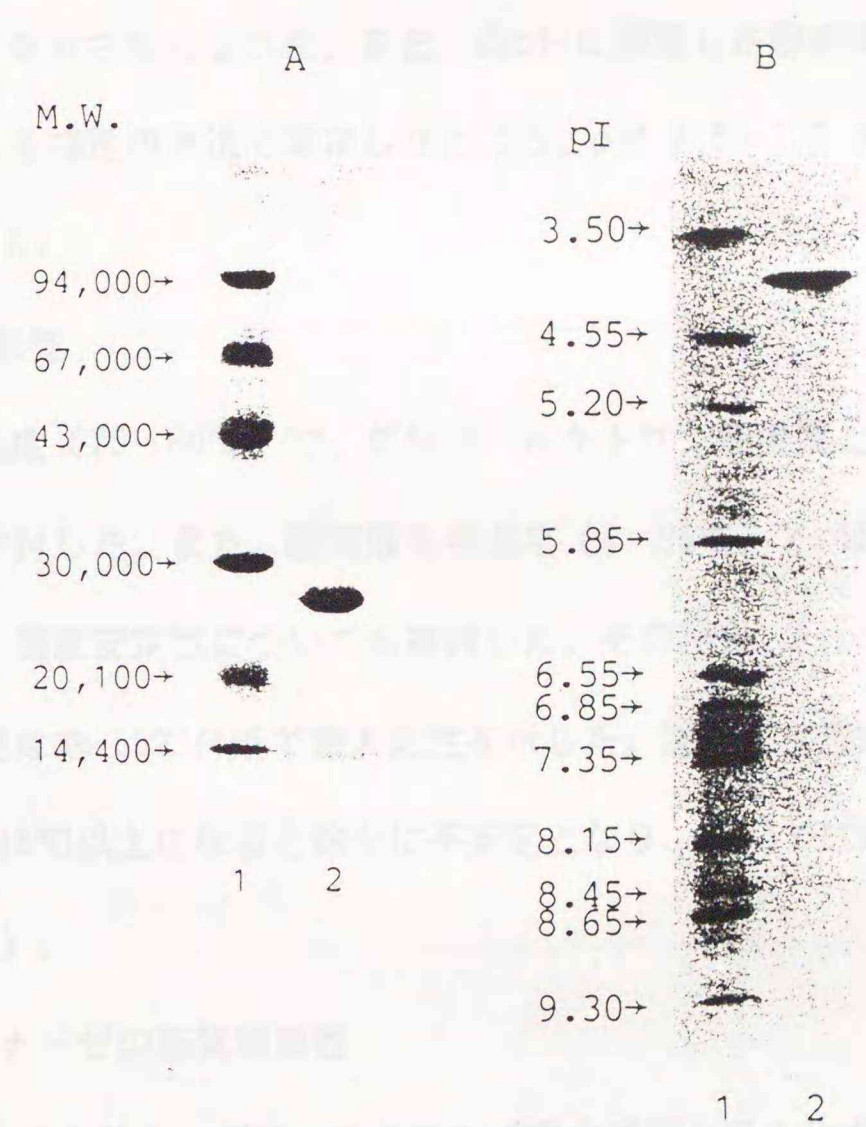


Fig. 26. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (A) and isoelectric focusing (B) of purified chitosanase.

Gel A, lane 1, molecular weight markers: phosphorylase (Mr=97,400), bovine serum albumin (Mr=67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (Mr=30,000), soybean trypsin inhibitor (Mr=20,100), and α-lactalbumin (Mr=14,400); Lane 2, purified chitosanase (5 μg)

Gel B, lane 1, pI marker proteins: amyloglucosidase (3.50), soybean trypsin inhibitor (4.55), β-lactoglobulin A (5.20), bovine carbonic anhydrase B (5.85), human carbonic anhydrase B (6.55), myoglobulin-acidic band (6.85), myoglobulin-basic band (7.35), lentil lectin-acidic band (8.15), lentil lectin-middle band (8.45), lentil lectin-basic band (8.65), trypsinogen (9.30); Lane 2, purified chitosanase (30 μg)

（２）キトサナーゼの諸性質

1）pHの影響

0.1 Mクエン酸－リン酸緩衝液（pH 3.0－8.0）および 0.1 Mホウ酸－NaOH緩衝液（pH 8.0－10.0）を用い、グリコールキトサンを基質として、至適pHおよびpH安定性を調べた。その結果、Fig. 27 A に示したように、本キトサナーゼはpH 5.0－6.0 で最大活性を示し、pH 4.5－6.5 の範囲で最大活性の 80%以上を示していた。 しかし、pH 8.0 以上では活性を示さなくなった。また、各pHに調整した酵素液を、40℃で３時間置いた後、残存する活性を規定の方法で測定したところ、pH 4.5－7.5 の範囲では非常に安定であった（Fig. 27 B）。

2）温度の影響

種々の温度（25－80℃）で、グリコールキトサンを基質として活性を測定し、至適温度について検討した。また、酵素液を各温度（4－95℃）で 15 分間置いた後、残存する活性を測定し、温度安定性についても検討した。その結果、Fig. 28 A に示したように、本キトサナーゼは約 50℃付近で最大活性を示した。温度安定性は、40℃までは比較的安定であったが、 45℃以上になると徐々に不安定となり、80℃では最大活性の 45%に低下した（Fig. 28 B）。

3）キトサナーゼの基質特異性

精製したキトサナーゼは、キトサン（完全脱アセチル化キトサンおよび部分脱アセチル化キトサン）、キトサンオリゴ糖およびキトサンオリゴ糖糖アルコールに対して特異的に作用したが、キチン、コロイダルキチン、キチンオリゴ糖、セルロース、カルボキシメチルセルロース、セロオリゴ糖、ｐ－ニトロフェニル α－およびβ－グリコシドには全く作用しなかった。

本酵素をキトサンオリゴ糖（$GlcN_4$～$GlcN_6$）および完全脱アセチル化キトサンに作用さ

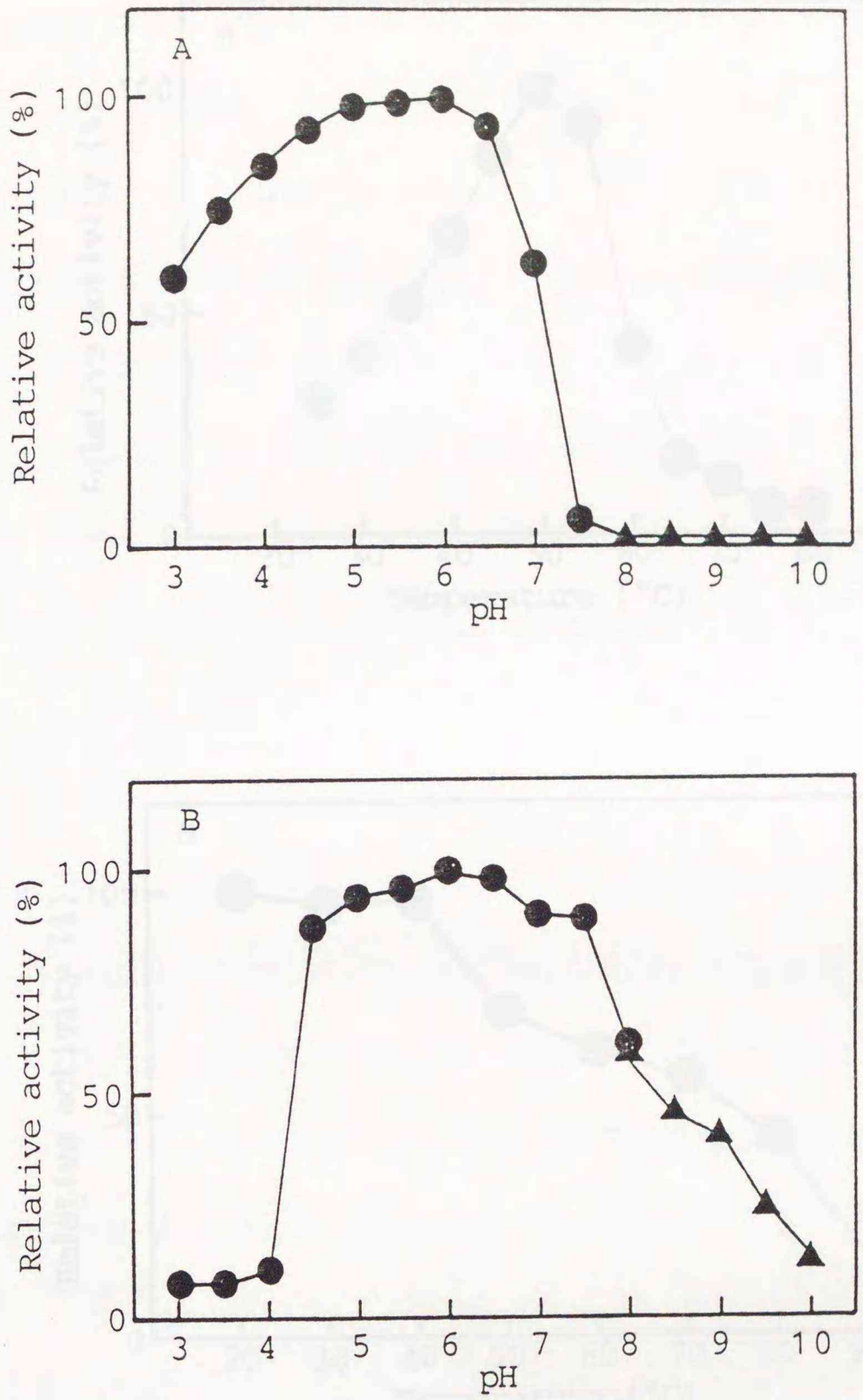


Fig. 27. Effects of pH on chitosanase activity and stability.
(A)The enzyme activity was measured at various pH values ranging from pH 3.0 to 10.0 under the standard assay procedure. (B)The pH-stability was observed by assaying the enzyme activity after incubation at 40℃ for 3 h at various pHs.
●, 0.1 M citrate-phosphate buffer; ▲, 0.1 M borate-NaOH buffer.

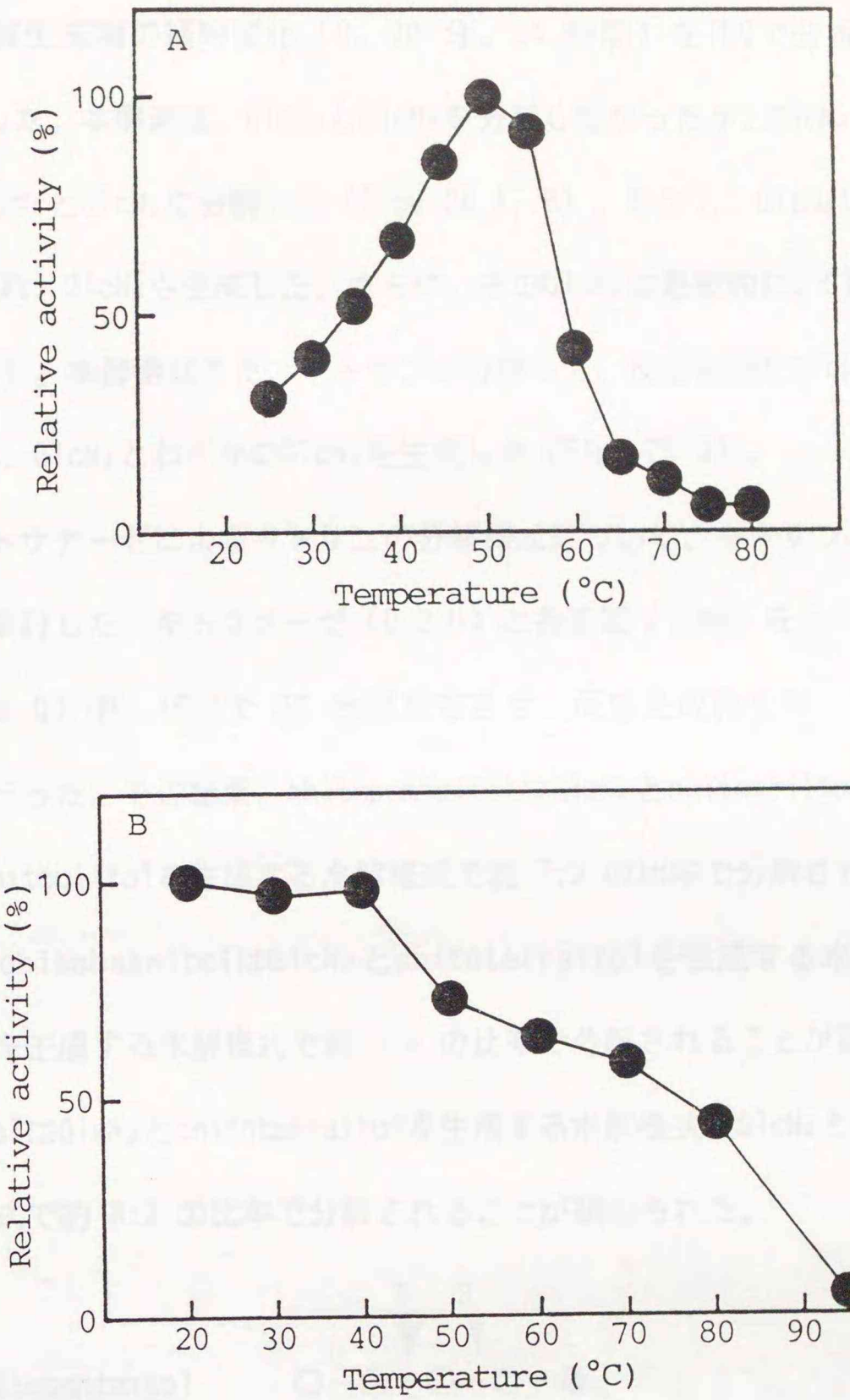
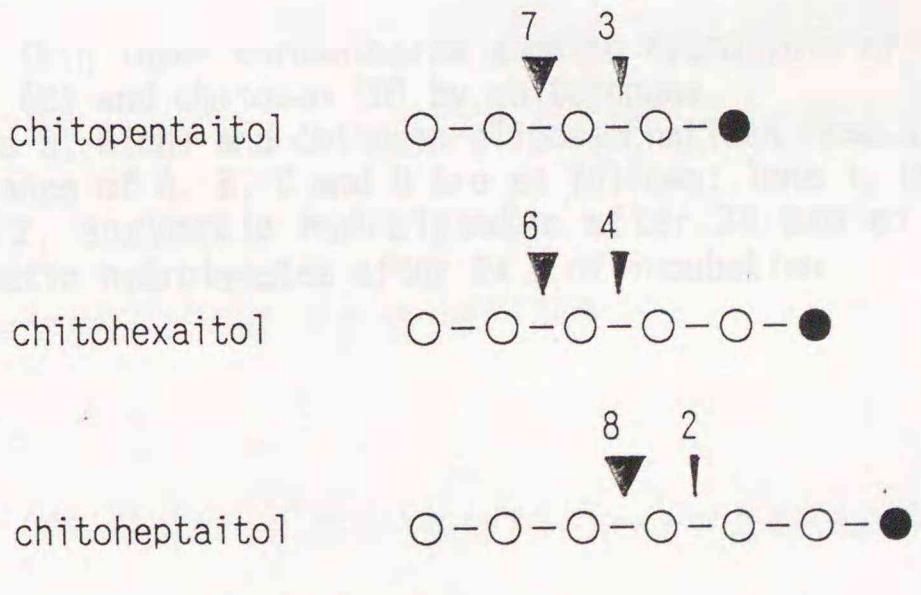


Fig. 28. Effects of temperature on chitosanase activity and stability. (A)The enzyme activity was measured at various temperatures under the standard assay procedure. (B)The thermo-stability was obserbed by assaying the enzyme activity after incubation for 15 min at various temperatures.

せたときの分解生成物の経時変化（0、30 分、24 時間）をTLCで分析し、その結果をFig. 29 に示した。本酵素は、$GlcN_2$と$GlcN_3$を分解しなかったが、$GlcN_4$を$GlcN_2$に分解し、また$GlcN_5$を$GlcN_2$と$GlcN_3$に分解した（Fig. 29 A, B）。しかし、$GlcN_6$は主として$GlcN_3$や$GlcN_2$に分解され、$GlcN_4$も生成した。さらに、その$GlcN_4$は最終的に、$GlcN_2$まで分解された（Fig. 29 C）。本酵素はまた、キトサンを分解して、反応初期に$GlcN_3$～$GlcN_6$を生成し、最終的に$GlcN_2$、$GlcN_3$とわずかの$GlcN_4$を生成した（Fig. 29 D）。

次いで、キトサナーゼによるキトサンの分解様式について、キトサンオリゴ糖糖アルコールを用いて検討した。キトサナーゼ（0.2 U）と各基質（２mM）を５mlの酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）中、40℃で 30 分間反応させ、反応生成物をＮ－アセチル化した後HPLCで分析を行った。その結果、chitopentaitolは$GlcN_2$とchitotriitolを生成する水解様式と$GlcN_3$とchitobiitolを生成する水解様式で約 7:3 の比率で分解されることが認められた。同様に、chitohexaitolは$GlcN_2$とchitotetraitolを生成する水解様式と$GlcN_3$とchitotriitolを生成する水解様式で約 6:4 の比率で分解されることが認められた。さらに、chitoheptaitolは$GlcN_3$とchitotetraitolを生成する水解様式と$GlcN_4$とchitotriitolを生成する水解様式で約 8:2 の比率で分解されることが認められた。



（○：GlcNAc残基，●：N-acetylglucosaminitol残基）

このことから、本キトサナーゼは、キトサンオリゴ糖の重合度が高くなるにつれ、より

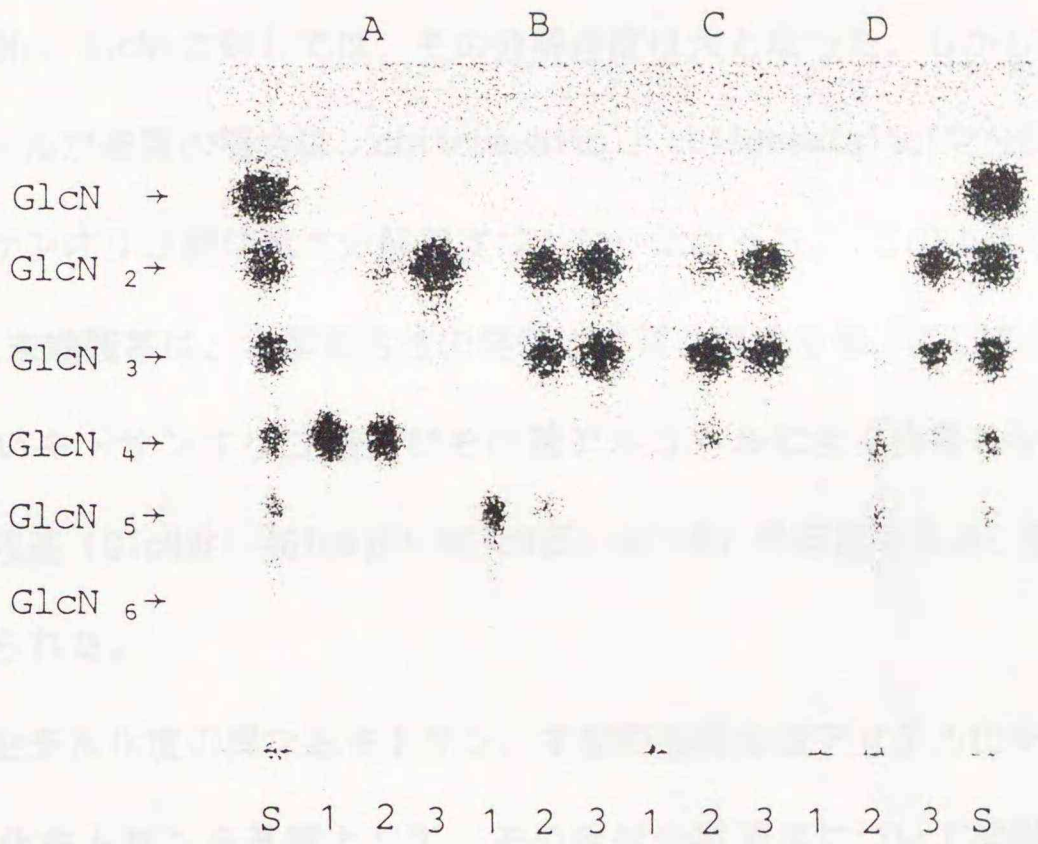


Fig. 29. Thin layer chromatogram showing hydrolysis of $GlcN_4$ (A), $GlcN_5$ (B), $GlcN_6$ (C) and chitosan (D) by chitosanase.
lane S, GlcN) and chitosan-oligosaccharides from $GlcN_2$ to $GlcN_6$.
All lanes of A, B, C and D are as follows: lane 1, unhydrolyzed substrate; lane 2, enzymatic hydrolysates after 30 min of incubation; lane 3, enzymatic hydrolysates after 24 h of incubation.

高い重合度のオリゴ糖を非還元末端から遊離することが示唆された。

4) キトサナーゼのキトサン関連物質に対する分解速度及び作用様式

キトサンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖糖アルコールを基質とし、本酵素の加水分解速度を調べた。Fig. 30 に、キトサナーゼの各基質に対する加水分解速度から求めた相対分解速度を示した。 その結果、本酵素は重合度の低いchitobiitol、chitotriitol、chitotetraitolには全く作用しないが、重合度が高くなると作用するようになり、さらに重合度が増した$GlcN_6$、$GlcN_7$に対しては、その分解速度は大となった。しかし、キトサンオリゴ糖糖アルコールが基質の場合は、chitohexaitol、chitoheptaitolで分解速度は最大となったが、キトサンオリゴ糖に比べ分解速度はかなり低かった。 このようなことから、$GlcN_6$、$GlcN_7$の還元末端残基は、本酵素活性の発現に重要な関連を有していると考えられた。また、重合度の低いキトサンオリゴ糖及びその糖アルコールに全く作用しなかったことから、４個のGlcN残基（GlcNβ1-4GlcNβ1-4GlcNβ1-4GlcN）の存在もまた、重要な意義を有していると考えられた。

次に、アセチル化度の異なるキトサン、すなわち完全脱アセチル化キトサンおよび部分脱アセチル化キトサンを基質として、その相対分解速度について検討した。その結果、Fig. 31 に示したように、本キトサナーゼは、アセチル化度約 30%のキトサンを最もよく分解した。しかし、アセチル化度が減少するに伴って分解速度は低下して行き、完全脱アセチル化キトサンでも低い分解速度を示した。これらの結果は、キトサナーゼの最適活性発現にはGlcNおよびGlcNAc残基の両者が必要であったとしているFentonらの報告[59]と一致していた。

さらに、本キトサナーゼの部分アセチル化キトサンに対する作用様式を明らかにするために、分解生成物を調べることによって検討した。キトサナーゼ（2.0 U）と 33%アセチル化キトサン（５mg）を 1.0 mlの 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）中、 40℃で

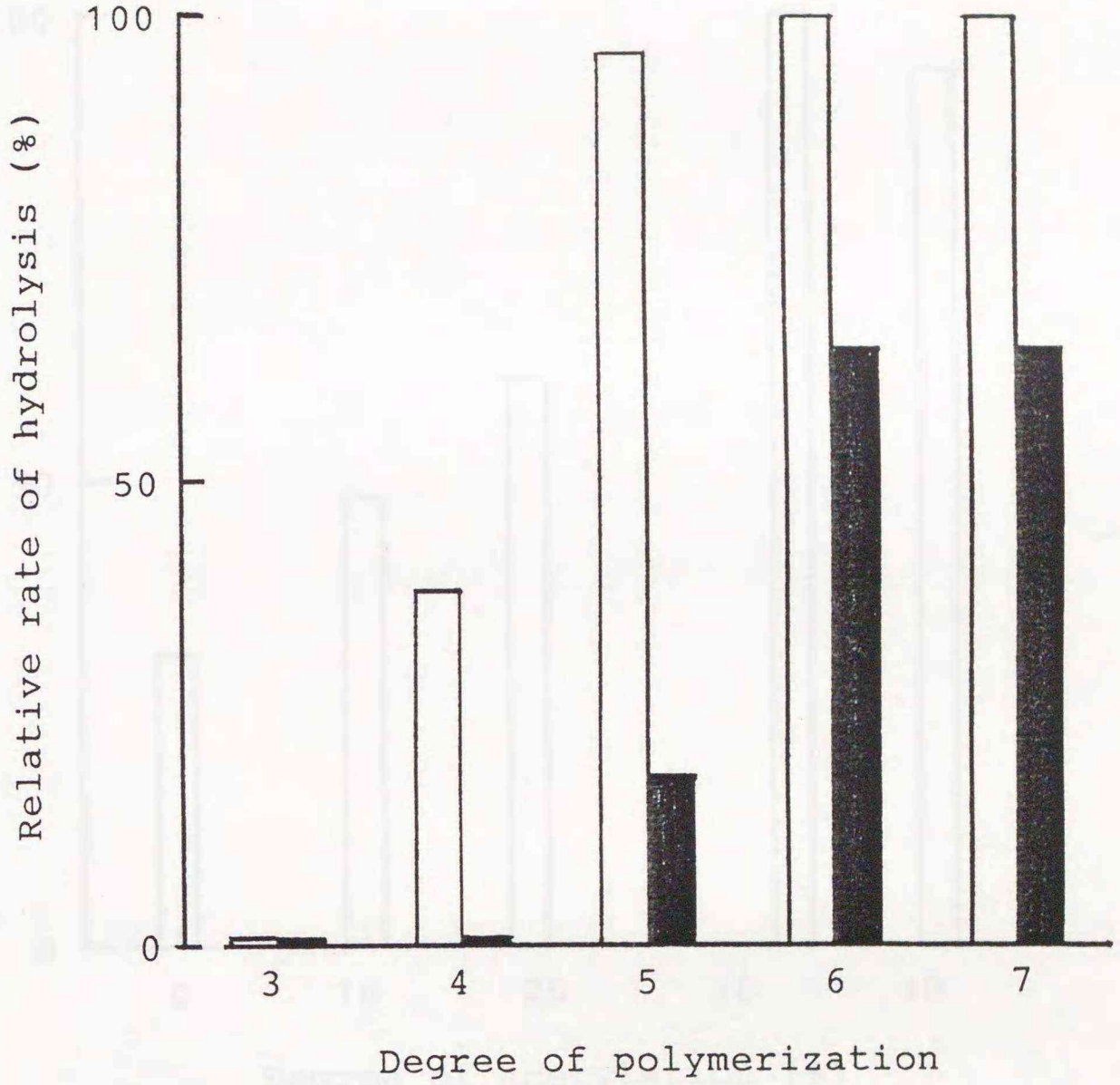


Fig. 30. Relative rates of hydrolysis of chitooligosaccharides and reduced chitooligosaccharides by chitosanase.

The enzymatic reaction was performed by incubating 1.0 mM substrate with 0.05 unit of the enzyme in 1 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 6.0) at 40°C. The enzymatic reaction was stopped at 3-min intervals up to 12 min by adding 1 ml of 1.0 M sodium carbonate solution. The amount of amino sugars liberated from each substrate was measured by the method of Blix.

□, chitooligosaccharides; ■, reduced chitooligosaccharides.

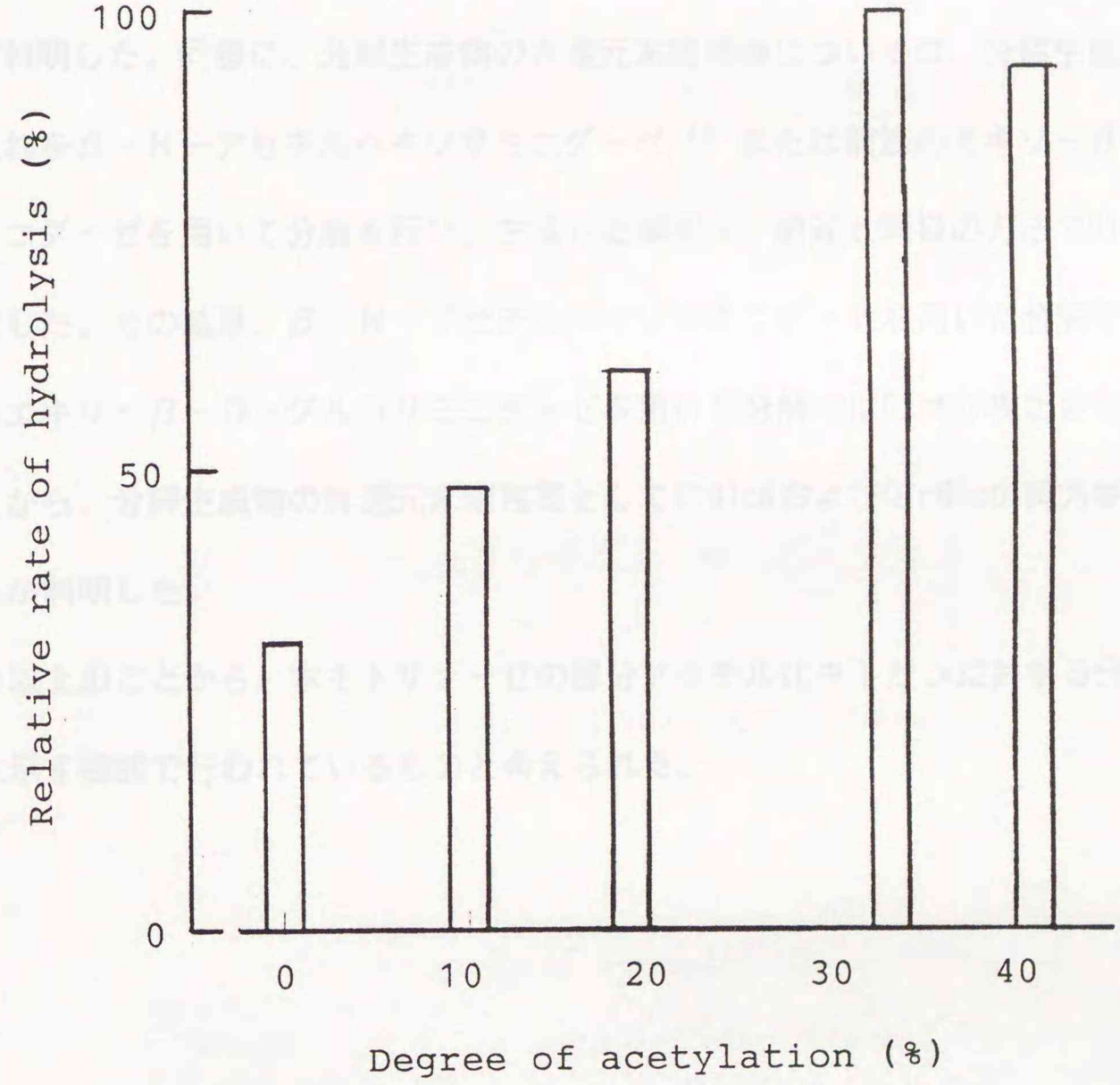


Fig. 31. Relative rates of hydrolysis of partially acetylated chitosans by chitosanase.
The enzyme (0.05 unit) was incubated with 0.5% (w/v) substrate in 1 ml of 50 mM sodium acetate buffer (pH 6.0). The rate of hydrolysis was measured by the same method as described in Fig. 30.

48 時間反応させた。反応液を凍結乾燥後、少量の蒸留水を加えて溶解し、TLCおよびHPLC分析に供した。その結果、標準オリゴ糖のクロマトグラフムから判断して、主要分解生成物としての二糖および三糖の他、少量の四糖が見出された。次に、これら分解生成物の還元末端残基を調べるため、 Blixの方法[60]によるGlcN残基、Reissigらの方法[61]によるGlcNAc残基の分析を行った。その結果、分解生成物の還元末端残基は全てGlcNであることが判明した。同様に、分解生成物の非還元末端残基については、分解生成物を還元した後、これをβ－N－アセチルヘキソサミニダーゼ[40]または前節のエキソ－β－D－グルコサミニダーゼを用いて分解を行い、生成した単糖は、前述と同様の方法でGlcN、GlcNAcを決定した。その結果、β－N－アセチルヘキソサミニダーゼを用いた分解ではGlcNAcが、またエキソ－β－D－グルコサミニダーゼを用いた分解ではGlcNが検出された。これらのことから、分解生成物の非還元末端残基としてはGlcNおよびGlcNAcの両方が存在していることが判明した。

以上のことから、本キトサナーゼの部分アセチル化キトサンに対する分解は、Fig. 32に示す様式で行われているものと考えられた。

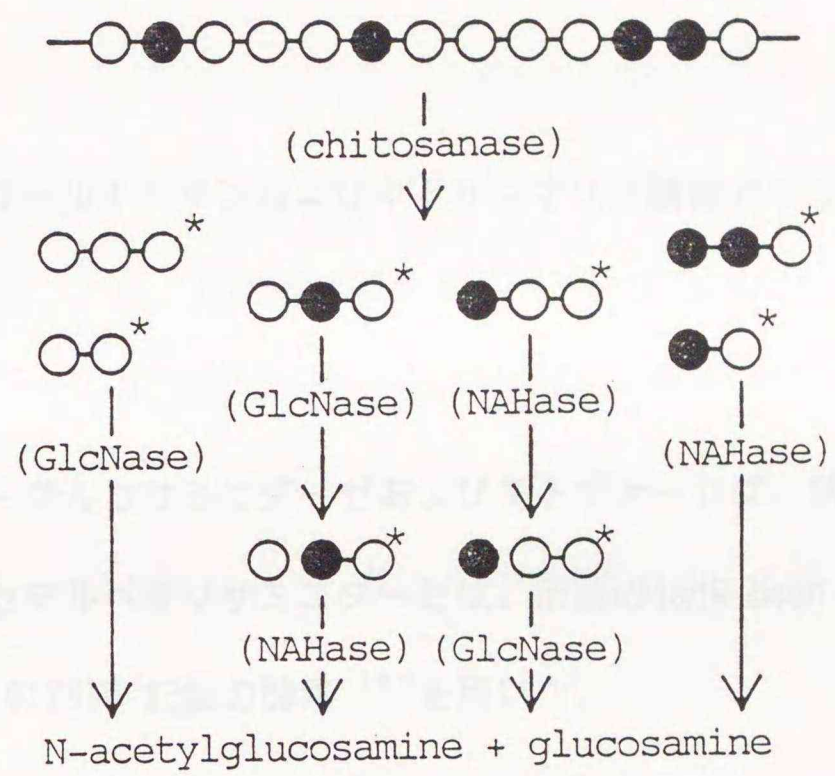


Fig. 32. Proposed pathway of enzymatic degradation of partially acetylated chitosan.
GlcNase, exo-β-D-glucosaminidase; NAHase, β-N-acetylhexosaminidase. ●, N-acetylglucosamine residue; ○, glucosamine residue; ○*, reducing terminal glucosamine residue.

第三節　酵素によるグルコサミンの生産

前節で精製した新規酵素エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼおよびキトサナーゼを用い、キトサンからの酵素的ClcNの生産法について検討した。

実験方法

（１）実験材料

キトサン、グリコールキトサンおよびキトサンオリゴ糖糖アルコールは前節と同様のものを用いた。

（２）酵素

エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼおよびキトサナーゼは、前節と同様の方法で調製した。β－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼは、市販のjack bean 起源の酵素[62]および N. orientalis IFO12806 起源の酵素[40]を用いた。

（３）酵素活性の測定

エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼおよびキトサナーゼ活性は、前節と同様の方法で測定した。β－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼ活性は、 前述（第二章 第一節）の方法によって測定した。

（４）分析方法

酵素分解生成物は、TLCおよびHPLCで分析を行った。TLC分析の条件は、前節と同様にして行った。HPLC分析は、下記の条件で行った。

使用機種　　：Waters製、201Dコンパクト型

検出器　　：Waters製、R-410 differential refractometer

データ処理　：島津製、クロマトパックC-R3A

カラム　　：ワイエムシィ製、YMC-Pack PA-03 (4.6×250 mm)

流速　　：1.0 ml/min

移動相　　：CH_3CN：H_2O = 75:25 (v/v)

温度　　：室温

結果と考察

（1）エキソ－β－D－グルコサミニダーゼによるキトサンの分解

キトサンは自然界において、その多くは部分的にアセチル化されている。キチンを完全に脱アセチル化することは、技術的に極めて困難でかつ経済的にも問題があるので、工業的に用いられるキトサンの場合も通常 10～20%程度アセチル化されているものが用いられているのが現状である。このようなことから、GlcN生産の出発原料として用いるキトサンについて、そのアセチル化度がエキソ－β－D－グルコサミニダーゼの分解作用に及ぼす影響について、予め検討しておく必要があると考えられた。

Fig. 33 にアセチル化度の異なるキトサン（完全脱アセチル化キトサン、18%アセチル化キトサンおよび33%アセチル化キトサン）およびグリコールキトサンをエキソ－β－D－グルコサミニダーゼで分解したときの還元力の経時変化を、GlcNの生成量として示した。同図より、キトサン誘導体のグリコールキトサンは、極めて加水分解を受け難いことが明らかとなり、また 18%および 33%アセチル化キトサンは反応初期において急速に分解されたが、その後の分解はほとんど進行しなかった。一方、完全脱アセチル化キトサンは、少なくとも 30 分間までは直線的に分解が進行した。このようなことから、キトサン中のエチレングリコール基やアセチル基の存在が、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼの分解作用に大きく影響していることが考えられた。その要因のひとつとして、前節で述べたように、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼは、PNP-GlcNAcやchitobiitolに作用し難か

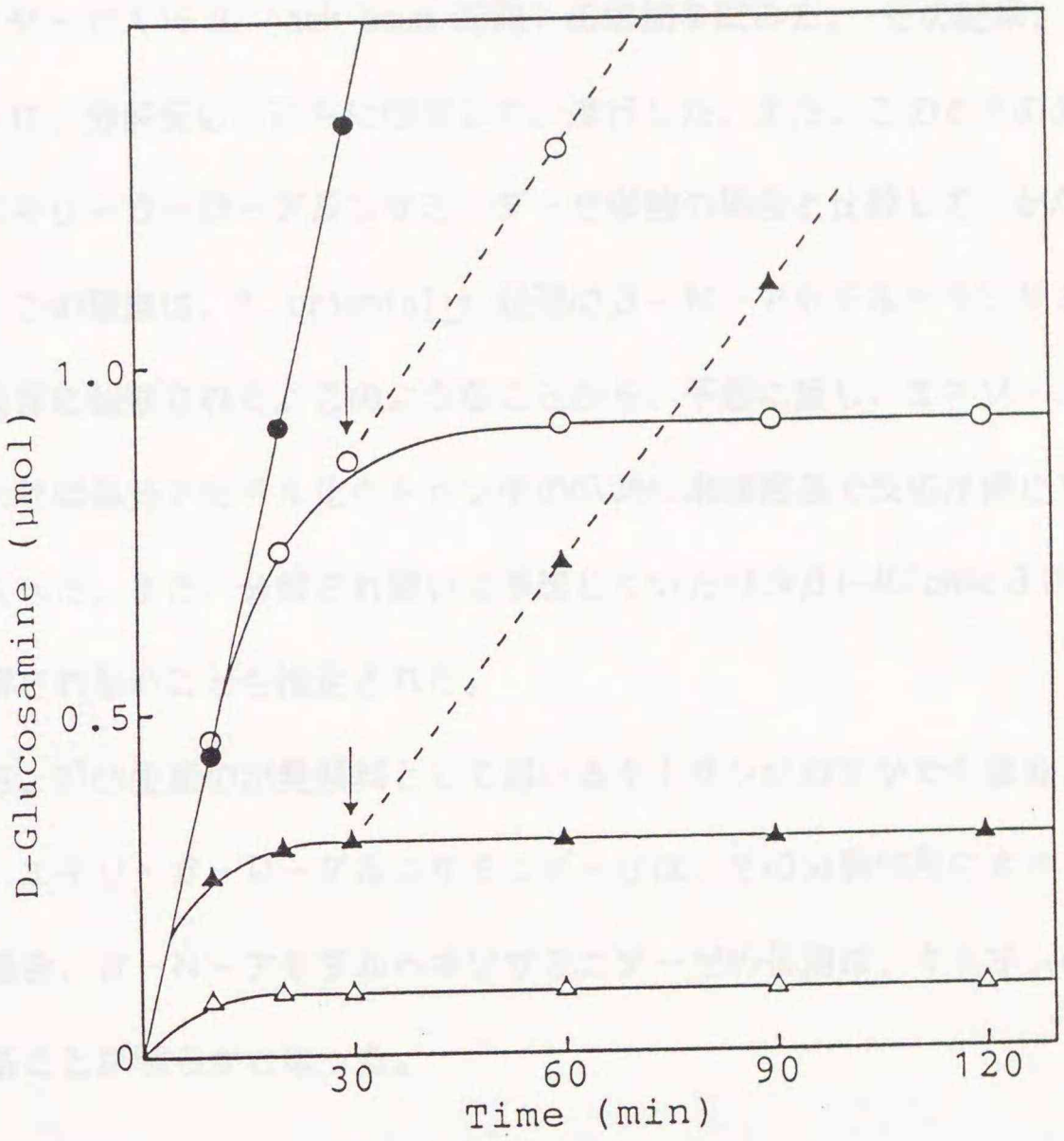


Fig. 33. Time course of hydrolysis of chitosan analogues by exo-β-D-glucosaminidase.

Each chitosan analogue (1%) was individually incubated with 0.03 unit of the enzyme in 1 ml of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, at 40°C. In the cases of partially acetylated chitosans, β-N-acetylhexosaminidase (5 units) was added to the reaction mixtures after 30 min of incubation. The arrows indicate the addition of β-N-acetylhexosaminidase. ●, chitosan (completely deacetylated); ○, 18% acetylated chitosan (——) and after the addition of β-N-acetylhexosaminidase (- - -); ▲, 33% acetylated chitosan (——) and after the addition of β-N-acetylhexosaminidase (- - -); △, glycol chitosan.

ったことから、部分アセチル化キトサン中のGlcNβ1-4GlcNAcβ1→末端残基で反応が停止していることが予想された。そこで、この予想の可否を確かめるため、キトサンの分解反応が進行しなくなった反応開始 30 分後、非還元末端からGlcNAcを遊離するβ－N－アセチルヘキソサミニダーゼ（10 U、jack bean 起源）の添加を試みた。 その結果、Fig. 33 の破線で示すように、分解反応は直ちに回復して、進行した。また、このときの分解速度は、反応初期のエキソ－β－D－グルコサミニダーゼ単独の場合と比較して、かなり近い速度で進行した。この現象は、N. orientalis 起源のβ－N－アセチルヘキソサミニダーゼを用いても、同様に観察された。このようなことから、予想に反し、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼは部分アセチル化キトサン中のGlcNAc末端残基で反応が停止していることが明らかとなった。また、分解され難いと予想していたGlcNβ1-4GlcNAcβ1→末端残基は、比較的分解され易いことも推定された。

以上のことから、GlcN生産の出発原料として用いるキトサンがわずかでも部分アセチル化されていれば、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼは、その分解作用に大きく影響を受けるが、この場合、β－N－アセチルヘキソサミニダーゼの併用は、キトサンの分解に非常に有効であることが明らかとなった。

（２）酵素によるグルコサミンの生産

これまでの知見から、酵素によるGlcNの生産に際しては、できるだけアセチル化度の低いキトサンを用いることが有利であることが考えられた。そこで、工業的に生産され、入手可能な２％アセチル化キトサンを用いた。酵素は、キトサンの分解が効果的に進行するように、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼの他に、キトサナーゼおよびβ－N－アセチルヘキソサミニダーゼ（N. orientalis 起源）を併用した。

10 gの２％アセチル化キトサンを２ℓの水に懸濁し、塩酸溶液（18 ％）で pH 5.0－

6.0 に調整し可溶化させ、 エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼ、キトサナーゼおよびβ－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼを各々 100 Uずつ添加後、40℃で 12 時間反応を行った。反応液を経時的に採取し、GlcN、GlcNAcを定量して、キトサンの分解度の変化を調べた。その結果、Fig. 34 に示すように、20 分間の反応で、キトサンの約 90％が分解され、約４時間で、ほぼ完全に分解されることが明らかとなった。Fig. 35 には、12 時間反応後の生成物についてのHPLC分析結果を示したが、GlcNの大きなピークとGlcNAcの小さなピークのみが認められた。

次に、反応液に活性炭（10 g）を加え脱色した後濾過し、次いで 20 mlの濃塩酸（35％）を加え、減圧濃縮した。この操作により、GlcNは塩酸塩の結晶として析出した。この結晶を濾過して集め、エタノールで洗浄後、真空乾燥した。その結果、9.0 g（キトサンからの収率 90％）のGlcNの塩酸塩を得た。

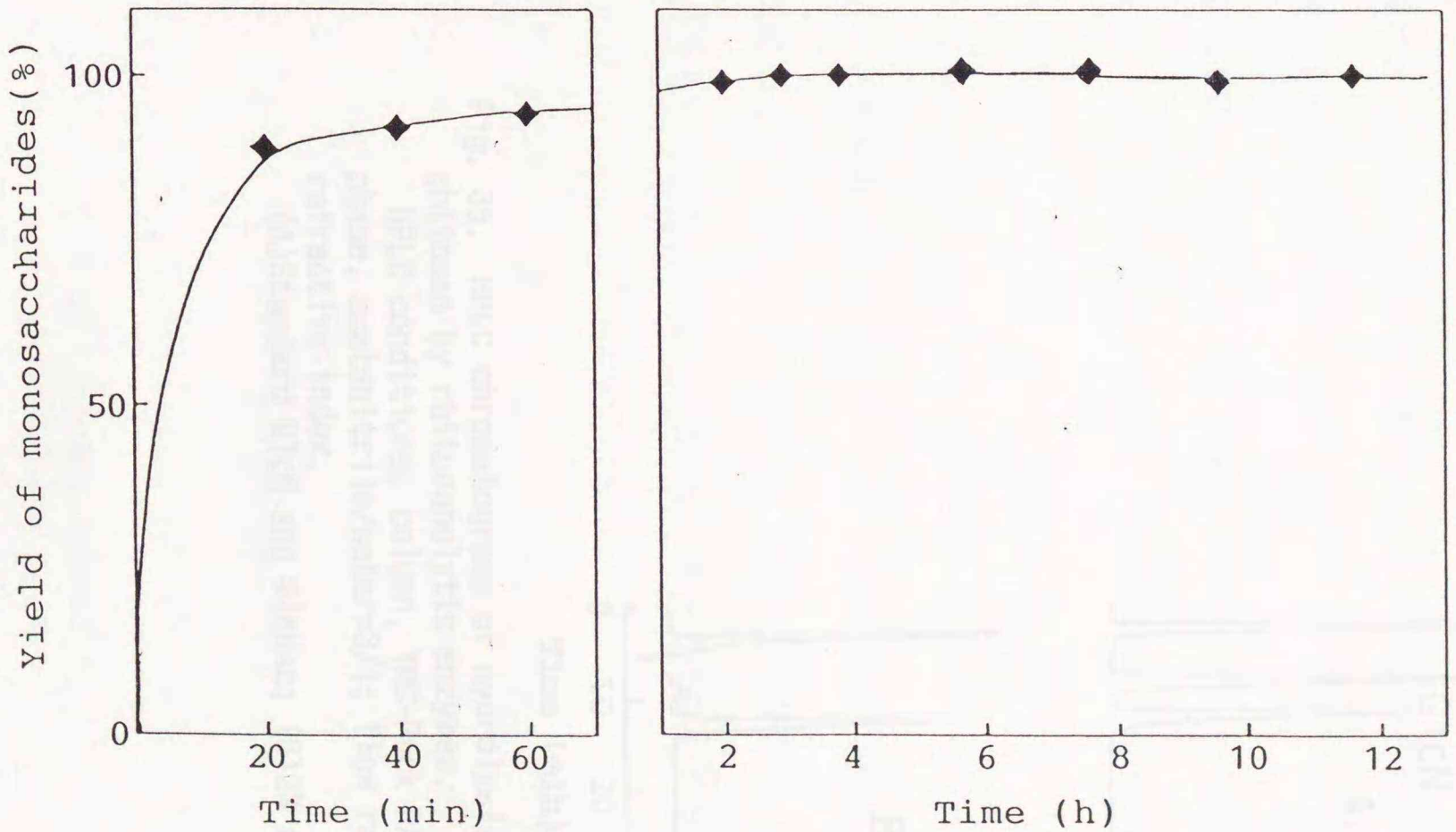


Fig. 34. Time course of hydrolysis of 2% acetylated chitosan by chitosanolytic enzymes.

2% acetylated chitosan (10g) was dissolved in water (2ℓ) with 18% HCl, and adjusted to PH 5.0-6.0. The solution was incubated with 100 units each of exo-β-D-glucosaminidase, chitosanase, and β-N-acetylhexosaminidase for 12 h at 40℃. The amounts of GlcNAc and GlcN were determined by the method described in the text. Yield (%) of the monosaccharides was calculated based on the weight of chitosan sample.

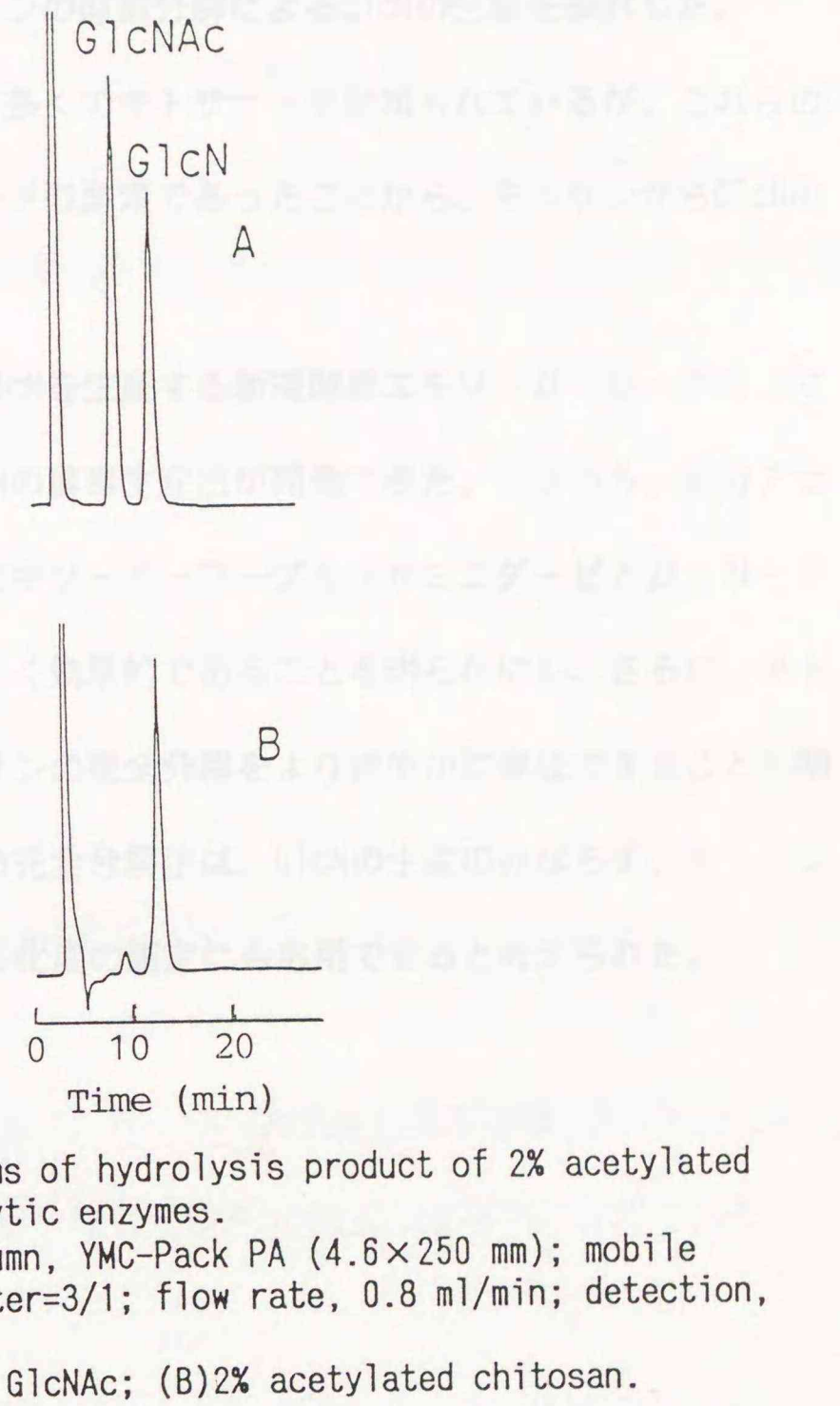


Fig. 35. HPLC chromatograms of hydrolysis product of 2% acetylated chitosan by chitosanolytic enzymes.
HPLC conditions: column, YMC-Pack PA (4.6×250 mm); mobile phase, acetonitrile/water=3/1; flow rate, 0.8 ml/min; detection, refractive index.
(A)Standard GlcN and GlcNAc; (B)2% acetylated chitosan.

第四節　要約

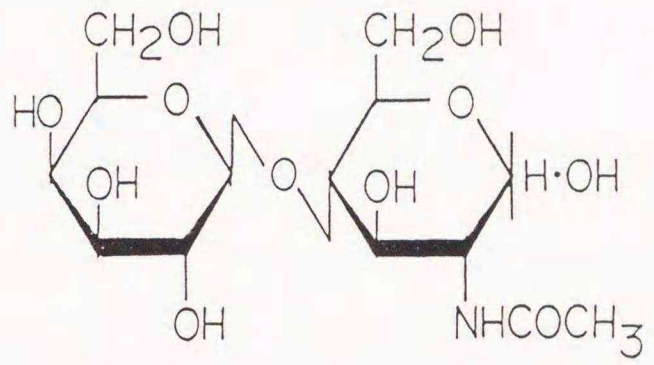
N. orientalisの生産するエキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼとキトサナーゼの精製を行い、その諸性質について調べ、キトサンの酵素分解によるGlcNの生産を検討した。

従来、キトサンを分解する酵素として多くのキトサナーゼが知られているが、これらの酵素はオリゴ糖を生産する典型的なエンド型酵素であったことから、キトサンからGlcNの生産を達成することができなかった。

本章では、キトサンを加水分解してGlcNを生産する新規酵素エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼを発見したことにより、GlcNの酵素生産法が開発できた。すなわち、部分アセチル化キトサンを分解するためには、エキソ－β－Ｄ－グルコサミニダーゼとβ－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼの併用が著しく効果的であることを明らかにし、さらに、キトサナーゼを併用することにより、キトサンの完全分解をより速やかに達成できることを明らかにした。このキトサンの酵素による完全分解法は、GlcNの生産のみならず、キトサンの特性を示す重要な指標であるアセチル化度の測定にも応用できると考えられた。

第四章　β－ガラクトシダーゼによるＮ－アセチルラクトサミンおよびＮ－アセチルアロラクトサミンの酵素合成

Ｎ－アセチルグルコサミン（GlcNAc）の高度利用を目的とし、その残基を含む有用物質のひとつであるＮ－アセチルラクトサミン（NAL）の生産を試みた。NALはガラクトースとGlcNAcがβ-1,4 結合した二糖類 （4-O-β-D-galactopyranosyl-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose）で、 糖タンパク質および糖脂質の糖鎖中に基本構造として存在する重要な糖質として知られている[18,19]。



Ｎ－アセチルラクトサミン（NAL）

NALは、Tomarelliら[20]によって、Lactobacillus biffidus var. pennysylvanicus の増殖因子として、豚の胃のムチンから初めて単離された。また、Kuhnら[17]は、人乳オリゴ糖の糖鎖中に見出し、さらに、斎藤ら[16]は、ウシ初乳中に遊離状態でNALが比較的多量に存在することを見出している。このようなことから、NALは生化学的に極めて興味深い物質として注目されている。

従来から、NALの生産は化学合成法[63,64]もしくは UDP-Gal（ウリジンニリン酸ガラクトース）とGlcNAcを基質としてラクトース合成酵素により合成する方法[65-67]が知られている。しかし、化学合成法では種々の保護基の導入など工程が複雑であること、またラクトース合成酵素による方法では基質である UDP-Galの調製など、製法が複雑で経済的にも問題があり、いずれも工業的生産にはほど遠いものであった。また、簡便な方法として

GlcNAcとラクトースまたはガラクトースを基質として微生物の粗酵素や菌体を用いる方法[68,69]やβ－ガラクトシダーゼを用いる方法[70]が試みられているが、これら糖転移反応を利用した方法ではNALの生成量が少ないことやNALの生成に比べβ-1,6 結合異性体であるＮ－アセチルアロラクトサミン（NAAL）の生成比率が高いことなどの問題があり、実用的ではなかった。

そこで、筆者はGlcNAcを受容体基質、ラクトースを供与体基質として、NALを優先的に生成する糖転移活性の高いβ－ガラクトシダーゼの検索を行い、NALの効率的生産を試みた。また、NAALについても同様に効率的生産法の開発を試みた。

第一節　Ｎ－アセチルラクトサミンの生産に適する市販β－ガラクトシダーゼの検索

β－ガラクトシダーゼ（EC 3.2.1.23）は別名ラクターゼと呼ばれ、乳糖を加水分解する酵素として植物、動物、微生物に広く分布している。また、本酵素は食品工業においては、乳糖不耐症用ミルクの製造やホエーからの甘味シロップの製造に用いられている[71]。

一方、β－ガラクトシダーゼを乳糖に作用させたときにオリゴ糖が生成することは、1951年にWallenfels[72]によって見出されている。また、反応によって生成するオリゴ糖の量と種類は酵素の起源によって異なることが知られ[73,74]、糖転移反応により生成したオリゴ糖の構造に関しては、戸羽[73]によって詳しくまとめられている。一般的に微生物起源のβ－ガラクトシダーゼはβ-1,6 結合を含むオリゴ糖の生成が多いとしている。

このようなことから、筆者はβ-1,4 結合であるNALの効率的生産を達成するため、GlcNAcを受容体基質、ラクトースを供与体基質としてβ-1,4 結合を優先的に生成する糖転移活性の高いβ－ガラクトシダーゼを市販酵素の中から検索した。

実験方法

（１）実験材料

市販のβ－ガラクトシダーゼは、Table 15 に示す種々の微生物起源の酵素７標品（酵母 Ａ～Ｄ、細菌 Ｅ、糸状菌 Ｆ,Ｇ）を用いた。HPLCによるNALおよびNAALの分析には、NALおよびNAALの市販の標準品（Biocarb Chemicals）を使用した。

（２）酵素の調製

糖転移反応には、Table 15 に示した市販標品を、各々次のように調製して使用した。

1) 酵素Ａ（100 ml）を蒸留水で 250 mlに希釈後、80％飽和となるように硫安を添加し、４℃で４時間放置した。沈澱物を冷却遠心分離（10000×g、10 分間）して集め、70 mlの

Table 15. Commercial β-Galactosidases examined for preparation of N-acetyllactosamine

Enzyme	Origin	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Supplier
A	Kluyveromyces fragilis	6.5	47	Novo Industry
B	Kluyveromyces lactis	6.5	45	KI Chemical Industry
C	Kluyveromyces lactis	6.0	45	Godo Shusei Co.,Ltd.
D	Kluyveromyces sp.	6.5	40	Amano Pharmaceutical
E	Bacillus circulans	6.0	65	Daiwa Kasei Co.,Ltd.
F	Aspergillus oryzae	4.5	55	Amano Pharmaceutical
G	Penicillium multicolor	4.5	55	KI Chemical Industry

蒸留水（４℃）に懸濁した。懸濁液は２ℓの蒸留水に対し４℃で６時間透析し、この操作を３回繰り返した後、メンブランフィルター（0.45μm）で濾過後、凍結乾燥した（収量：1.14 g）。

2）酵素B（200 mg）は、２mMの塩化マンガンを含む 10 mlの 0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）に懸濁し、冷却遠心分離（10000×g、10 分間）後、上清液をメンブランフィルターで濾過した。

3）酵素C（10 ml）、酵素D（５ml）、酵素E（2.5 g／10 ml蒸留水）は、２ℓの蒸留水に対し４℃で 16 時間透析し、この操作を３回繰り返した後、さらに２mMの硫酸マグネシウムを含む 500 mlの 50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）に対し４℃で 24 時間透析した。透析液は、冷却遠心分離（10000×g、15 分間）後、上清液をメンブランフィルターで濾過した。

4）酵素F、G （2.5 g／10 ml蒸留水）は、２ℓの蒸留水に対し４℃で 16 時間透析し、この操作を３回繰り返した後、冷却遠心分離（10000×g、15 分間）後、上清液をメンブランフィルターで濾過した。

（３）糖転移反応

GlcNAc 1.1 g（５mmol）とラクトース・１水和物 0.9 g（2.5 mmol）を 0.1 Mリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）または 0.1 M酢酸カリウム緩衝液（pH 4.5）に溶解し５mlとした。これに酵素A～E（pH 7.0）、酵素F、G（pH 4.5）を各々 14 酵素単位（U）添加し 25℃で反応を行った。反応液は経時的に採取し、HPLC分析に供した。

（４）β－ガラクトシダーゼの活性測定

酵素A～Eは、２mMの o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside（ONPG）を含む 0.9 mlの 50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）に適当な濃度の酵素溶液 0.1 mlを加え 30℃で 10 分間反応させた。反応液に、1.0 Mの炭酸ナトリウム溶液２mlを加えて反応を停

止すると同時に、遊離したｏ－ニトロフェノールを 420 nmの吸光度で測定した。酵素Ｆおよびｇは、50 mM酢酸カリウム緩衝液（pH 4.5）を用いて同様に行った。酵素単位１U は、１分間に１μmolのｏ－ニトロフェノールを遊離する酵素量と定義した。

（５）糖転移生成物の分析

NAL、NAALの分析はHPLCによって行った。分析は、下記の条件で行った。

使用機種　　：島津製、LC-6A

検出器　　：島津製、UV detector SPD-6A (210 nm)

データ処理　：島津製、クロマトパックC-R3A

カラム　　：旭化成工業製、Asahipak NH2P-50 (4.6×250 mm)

流速　　：1.0 ml/min

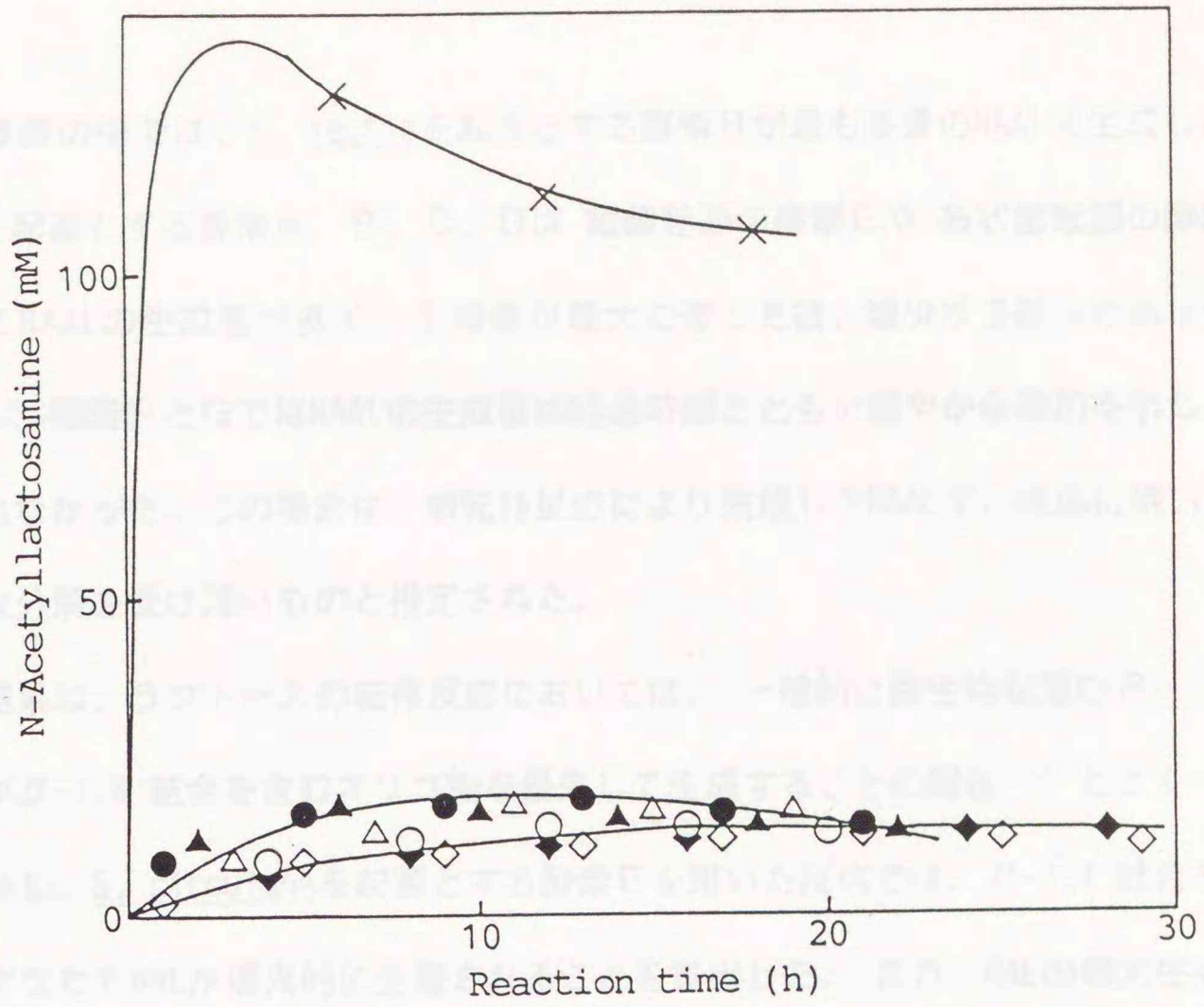
移動相　　：$CH_3CN : H_2O$ = 75:25 (v/v)

温度　　：室温

結果と考察

Table 15 に示した７標品の市販β－ガラクトシダーゼを用い、GlcNAcを受容体基質、ラクトースを供与体基質として糖転移反応を行い、NALおよびNAALの生成量の経時変化をHPLCにより調べた。その結果、Fig. 36 に示すように、これら市販酵素の中では、B. circulansを起源とする酵素Ｅのみが著しく多量のNALを生成した。他の酵素では、NALの生成が認められたものの、いずれも少量であった。また酵素Ｅの場合、NALの生成量は反応初期において急激に増加し、最大に達した後、徐々に減少した。これは、反応初期においては糖転移反応が優先して起こっているが、NAL生成量が最大に達する頃には、生成したNALが反応に用いた酵素により加水分解を受けて徐々に減少したものと思われる。

一方、NAALの生成量は、NALの場合とは対照的に酵素Ｅの場合が最も少なかった。 また、



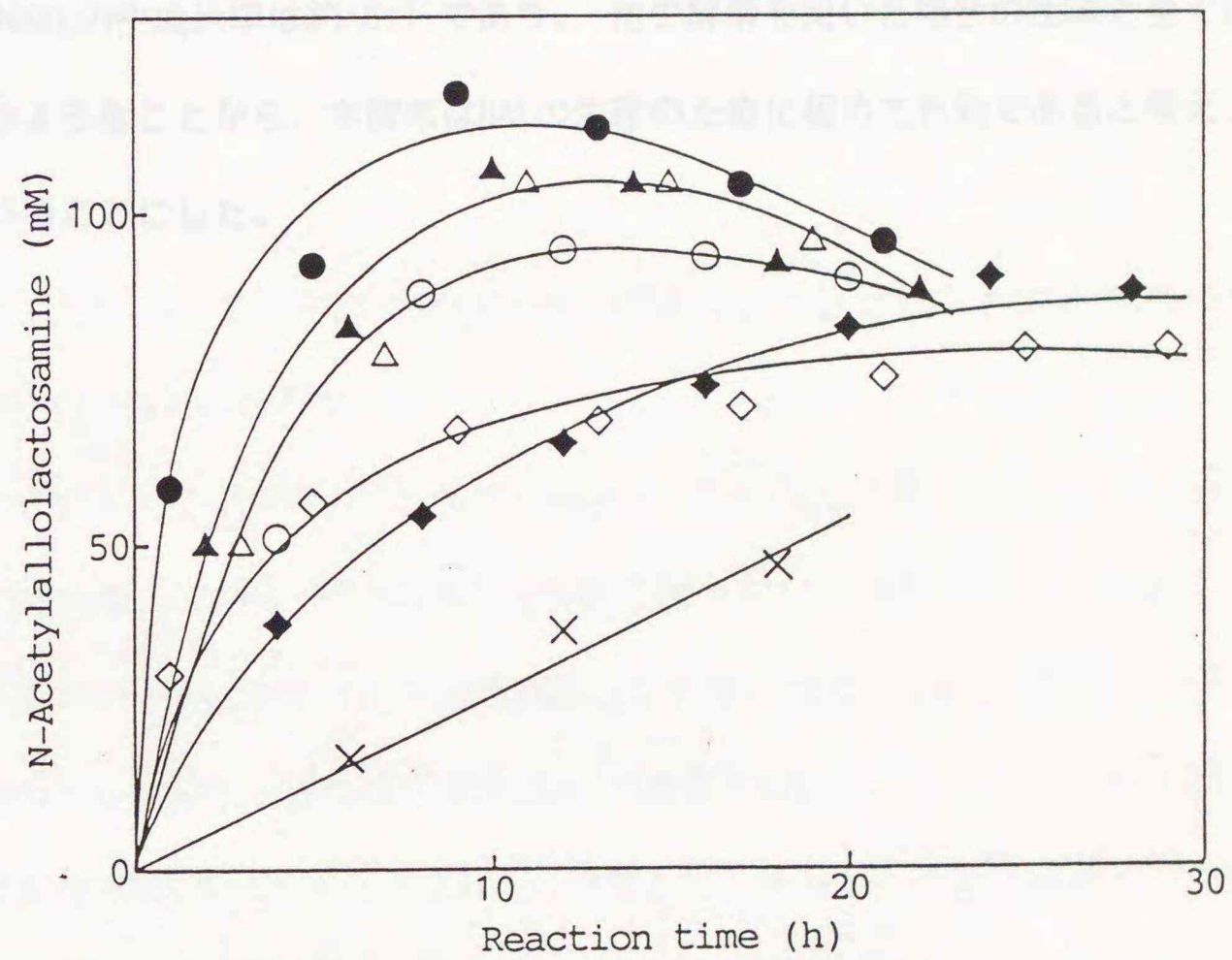


Fig. 36. Time course of transglycosylation reaction of commercial β-galactosidases.
○, (A)K. fragilis; ●, (B)K. lactis; △, (C)K. lactis;
▲, (D)K. sp.; ×, (E)B. circulans; ◇, (F)A. oryzae;
◆, (G)P. multicolor.

これら市販酵素の中では、K. lactisを起源とする酵素Bが最も多量のNAALを生成した。また、酵母を起源とする酵素A、B、C、Dは 細菌起源の酵素Eや 糸状菌起源の酵素F、Gと比較してNAALの生成量が多く、生成量が最大に達した後、減少する傾向にあった。

これに対し、酵素FとGではNAALの生成量は経過時間とともに緩やかな増加を示し、減少は認められなかった。この場合は、糖転移反応により生成したNAALが、反応に用いた酵素による加水分解を受け難いものと推定された。

これらの結果は、ラクトースの転移反応においては、 一般的に微生物起源のβ－ガラクトシダーゼがβ-1,6 結合を含むオリゴ糖を優先して生成することの報告[73]とよく一致していた。しかし、B. circulansを起源とする酵素Eを用いた反応では、β-1,4 結合を含むオリゴ糖、すなわちNALが優先的に生産されることを見出した。 また、NALの最大生成時におけるNALとNAALの生成比率は約 8:1 であり、 他の酵素を用いた場合の比率と全く逆転していた。このようなことから、本酵素はNALの生産のために極めて有効であると考え、以後の実験に用いることにした。

第二節　Ｎ－アセチルラクトサミンの酵素的生産法の検討

前節においてNAL生産に有効であった、B. circulansのβ－ガラクトシダーゼを用い、反応により生成した糖転移反応生成物の分離精製および同定を行った。さらに、NALの効率的生産を目的に、糖転移反応に及ぼす諸条件（pH、温度、酵素量、基質量）について検討した。

実験方法

（１）実験材料

β－ガラクトシダーゼは B. circulansを起源とするBIOLACTA（大和化成製）を用いた。糖転移反応生成物の分離には活性炭カラム（4×120 cm、活性炭：セライト = 1:1）を用いた。

（２）HPLC分析

NAL、NAALの分析は、前節の実験方法と同様にして行った。UV210 nmの吸収とRI（Waters製、R401型示差屈折計）をモニターとするHPLCによって行った。

３．機器分析

日本電子GSX-400型高分解能核磁気共鳴装置を用い、TPS（3-(trimethylsilyl) propanesulfonate sodium salt）を内部標準としてＮＭＲスペクトル（^{13}Ｃ：100 MHz；^{1}Ｈ：400 MHz）を測定し、日本電子 DX-303HF型質量分析計（DA-500データシステム連動）を用いてＦＡＢ-ＭＳスペクトル（３kV）を測定した。また、ユニオン技研PM-101型旋光光度計を用い、比旋光度を測定し、パーキンエルマー 240C型元素分析装置を用いて元素分析を行った。

結果と考察

（１）糖転移反応生成物の分離精製及び同定

GlcNAc（22 g）とラクトース（18 g）を 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（100 ml、pH 5.0）に溶解し、B. circulansのβ－ガラクトシダーゼ（15 U）を加え、30℃で 24 時間反応を行った。 反応後、95℃、10 分間の加熱によって反応を停止した。 この反応液のHPLC分析の結果をFig. 37 に示す。本反応によりUVの吸収 210 nm（アセチル基）を示すオリゴ糖が生成していることが認められた。 次に、反応液を減圧下で約半量まで濃縮したところ、受容体基質として用いたGlcNAcの結晶が析出した。 この結晶をグラスフィルターで濾過して除き、少量のメタノールで洗浄した。 得られた濾液を活性炭カラムに供し、蒸留水（480 ml）で洗浄後、反応生成物（オリゴ糖）を、0－30％エタノールによる直線濃度勾配法（溶媒 10ℓ）で溶出し、その時の溶出パターンをGlcNAc残基のＮ－アセチル基に由来する 210 nmの吸光値と、フェノール硫酸法による 485 nmの吸光値で調べた。 その結果をFig. 38 に示してある。 10％エタノール付近で溶出したF-a画分（フラクションNo.47－67）は 210 nmと 485 nmの吸収ピークが一致していたことから、NALを含む画分と考えられ、この画分を集め濃縮した。しかしながら、F-a画分には隣接ピークのラクトースとの混在が認められた。 そこで、ラクトースの完全除去のため再度、前記と同様にして活性炭カラムクロマトグラフィーを行い、F-a’画分（フラクションNo.43－65）を得た。F-a’画分をHPLC分析した結果、NALとNAAL標品と保持時間が同一であり、ピーク成分がモル比で 10:1 の割合で混在することが認められた。この画分の２成分はメタノールからの結晶化で容易に分離することができ、5.1 g（F-a’-１画分）の結晶を得た。

次に、得られたF-a’-１画分をHPLC分析した結果、単一のピークを示し、その保持時間はNAL標品と完全に一致した。また、^{13}C-NMRスペクトルの測定結果は、市販標品のNALの炭素共鳴シグナルと完全に一致した。 さらに、F-a’-１画分のC-H COSYス

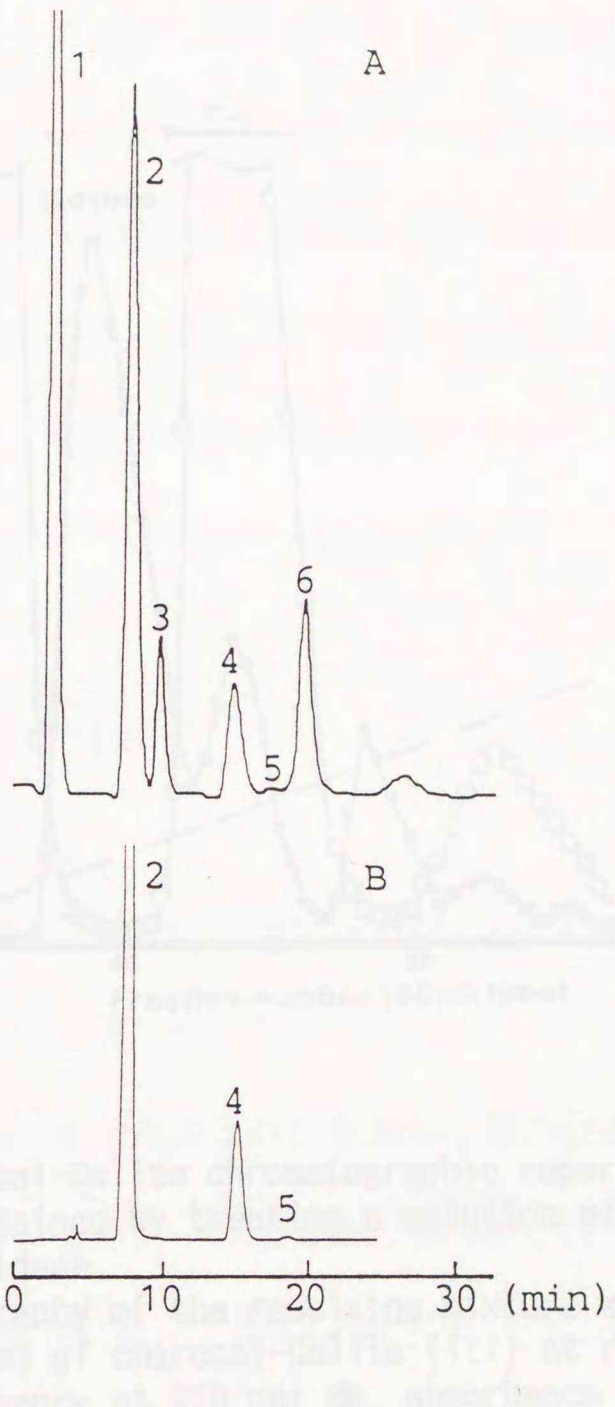


Fig. 37. - HPLC chromatograms of reaction mixture of transglycosylation.
A, refractive index detector; B, ultraviolet detector (210 nm).
1, water; 2, GlcNAc+glucose; 3, galactose; 4, NAL; 5, NAAL;
6, lactose.

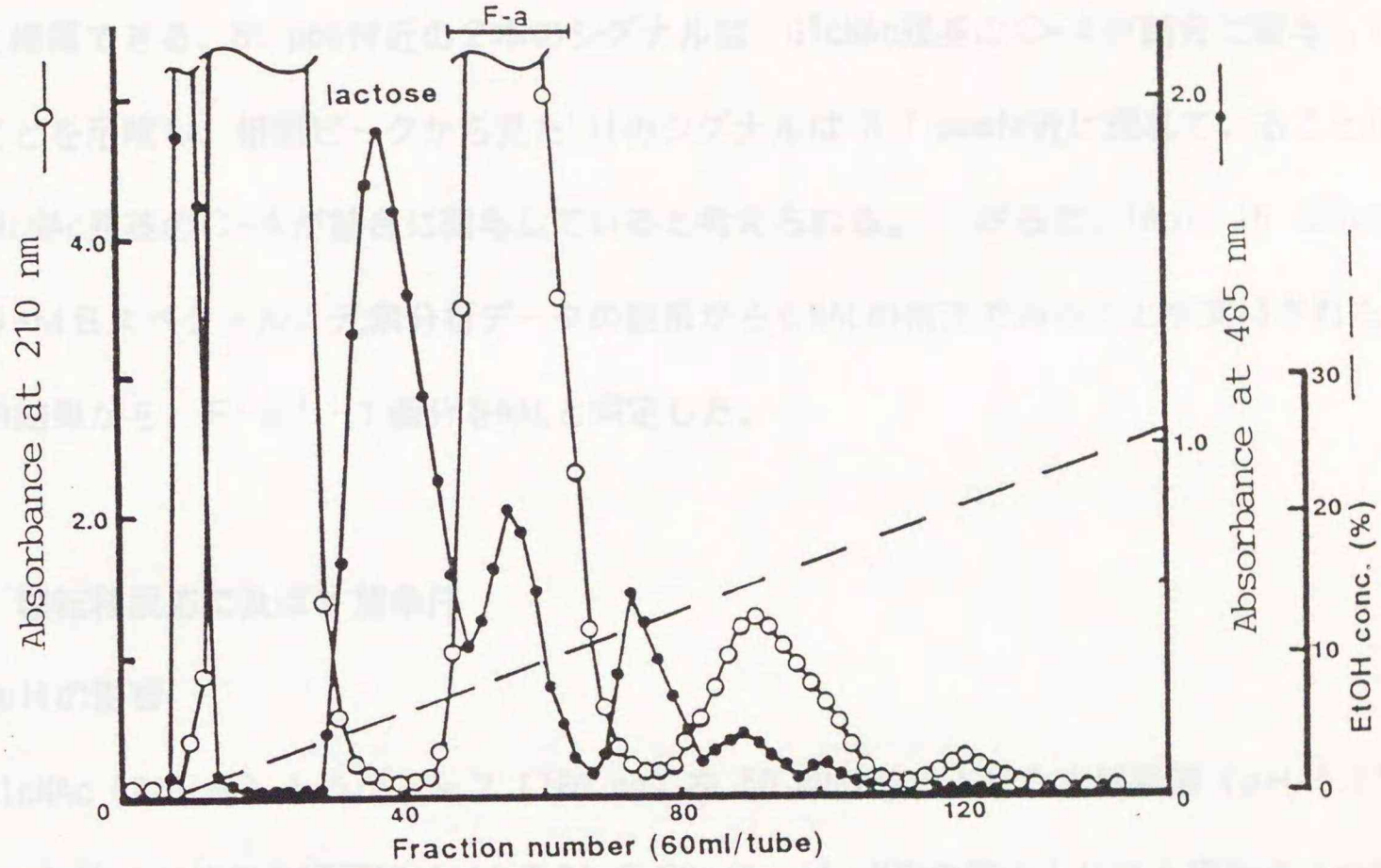


Fig. 38. Charcoal-Celite chromatographic separation of transglycosylation products obtained by treating a solution of lactose and GlcNAc with β-galactosidase.

Chromatography of the resulting mixture was carried out on a column (4.0×120 cm) of charcoal-Celite (1:1) at room temperature.

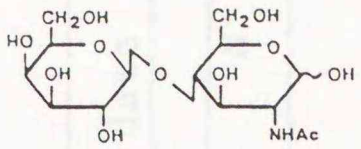
○, absorbance at 210 nm; ●, absorbance at 485 nm; ---, ethanol concentration (%).

ペクトル（Fig. 39）によって^{13}C-NMRと^{1}H-NMRのシグナルの帰属を確かめた。すなわち、105.6 ppmのシグナルはガラクトース残基のβ結合しているグリコシディック炭素（C-1）に帰属され、^{1}H-NMRにおいてもβ結合（$J_{1,2}$ = 7.3 Hz）であると確認された。 97.6と 93.3 ppmのシグナルは、各々還元末端のGlcNAc残基のβ－（$J_{1,2}$ = 7.3 Hz）およびα－（$J_{1,2}$ = 2.2 Hz）体に由来するグリコシディック炭素（C-1、βおよびα）と帰属できる。81 ppm付近の２本のシグナルは、GlcNAc残基のC-4が結合に関与していることを示唆し、相関ピークから見た^{1}Hのシグナルは 3.7 ppm付近に現れていることから、GlcNAc残基のC-4が結合に関与していると考えられる。 さらに、Table 16 に示すFAB-MSスペクトル、元素分析データの結果からもNALの構造であることが支持された。以上の結果から、F-a'-1画分をNALと同定した。

（２）糖転移反応に及ぼす諸条件

1）pHの影響

GlcNAc（220 mg）とラクトース（180 mg）を 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）あるいは、50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH 9.0および 10.0）に 1.0 mlとなるように溶解し、これにβ－ガラクトシダーゼ（0.15 U）を加えて 30℃で反応を行った。 反応液を、経時的に採取し、NALおよびNAALの生成量をHPLCで分析し、その結果をFig. 40 にNALの生成量とNAL／（NAL＋NAAL)の生成率として示した。その結果、NALの最大生成量（135 mM）および生成速度（25 時間反応）は、pHの影響をほとんど受けないことが明らかになった。また、反応時間を長くするにしたがい、いずれのpHにおいてもNALは減少した。 pH 7.0において最も大きく減少したが、pH 5.0においては最も減少が小さかった。NALとNAALの生成比率は、反応初期にはNALが圧倒的に高い比率で優先して生成されたが、反応時間の経過とともにNALの生成比率が減少した。



MW. 383

N-acetyllactosamine

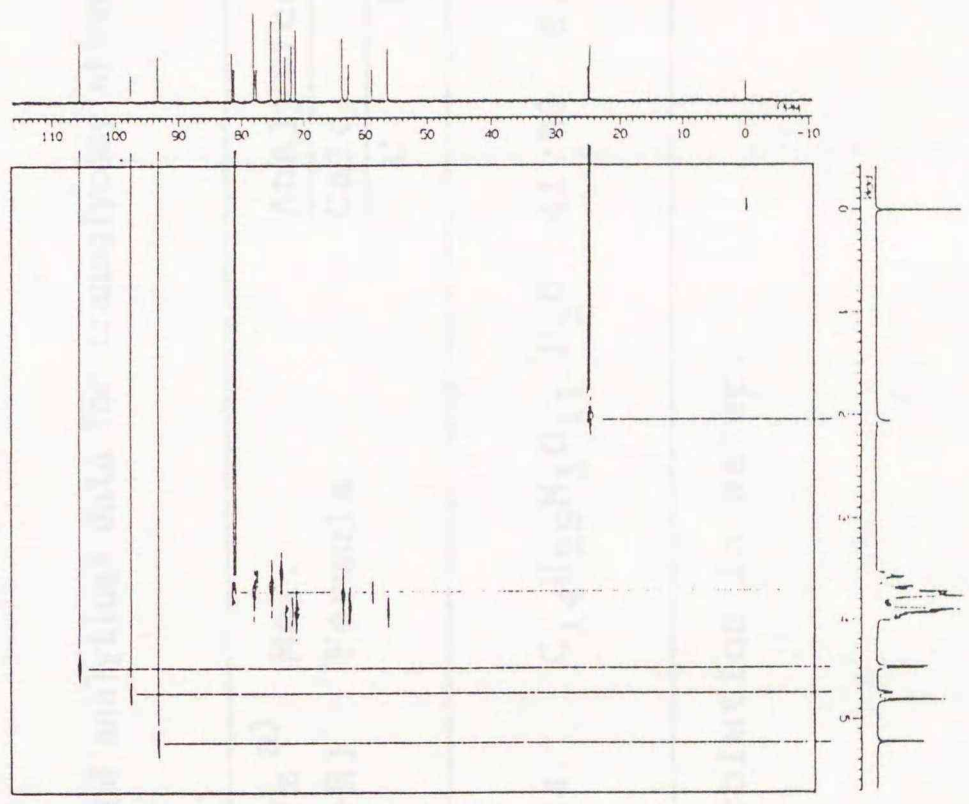


Fig. 39. C-H COSY spectrum of N-acetyllactosamine in D_2O.

Table 16. Optical rotation, m.p., FAB, and analytical data for transglycosylation product " F-a'-1 "

Fraction	$[\alpha]_D^{25}$ (degree)	m.p.	m/z (M+H) [a]	Mol. Formula	Analytical data					
					Calc.			Found		
					C	H	N	C	H	N
F-a'-1	+27.0(1.0) [b]	172	384	$C_{14}H_{25}N_1O_{11}\ H_2O$	41.90	6.78	3.49	41.94	7.11	3.19

[a] In FAB +ionization mode. [b] For a solution in water.

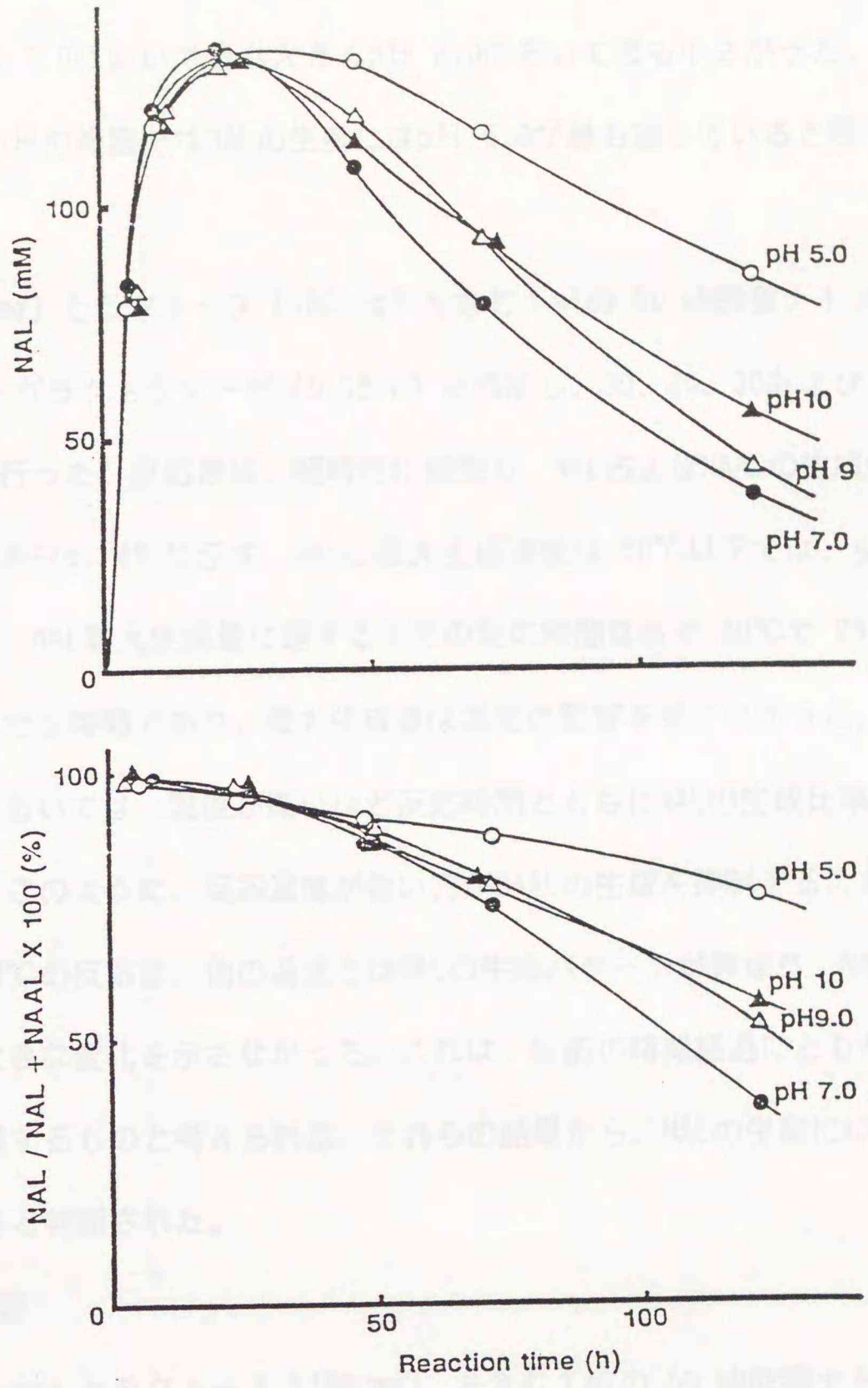


Fig. 40. Effects of pH on β-galactosidase-mediated NAL production. Lactose (180 mg) and GlcNAc (220 mg) in 1 ml of different pH buffers were incubated with β-galactosidase (0.15 U) at 30°C and samples were taken during the incubation for analysis by HPLC. Sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0), sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0 and 9.0), and sodium borate buffer (50 mM, pH 10.0) were used. The upper figure shows the amount of NAL as a function of time and lower the ratio of NAL to NAL+NAAL production by HPLC analysis.

この減少傾向はpH 7.0において最も大きくpH 5.0において最も小さかった。これらの結果から、検討したpHの範囲ではNALの生産にはpH 5.0が最も適していると思われた。

2）温度の影響

GlcNAc（220 mg）とラクトース（180 mg）を含む1mlの 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）にβ－ガラクトシダーゼ（0.15 U）を添加し、30、40、50および 60℃の各温度で糖転移反応を行った。反応液は、経時的に採取し、NALおよびNAALの生成量をHPLCで分析した。その結果をFig. 41 に示す。NALの最大生成速度は 50℃以下では、反応温度の上昇とともに増大し、NAL最大生成量に達するまでの反応時間は各々 30℃で 25 時間、40℃で 10 時間、50℃で５時間であり、最大生成量は温度の影響を受けなかった。また、NALとNAALの生成比率においては、温度が高いほど反応時間とともにNALの生成比率が減少することが認められた。このように、反応温度が低い方がNAALの生成を抑制することが明らかとなった。一方、60℃の反応は、他の温度とはNALの生成パターンが異なり、NALの生成が最大に達した後、大きな変化を示さなかった。これは、反応の時間経過にともなう酵素の熱による失活に起因するものと考えられた。これらの結果から、NALの生産には比較的低温の30℃が適していると判断された。

3）酵素量の影響

GlcNAc（220 mg）とラクトース（180 mg） を含む1mlの 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）にβ－ガラクトシダーゼを各々 0.01、0.02、0.05、0.10、0.15、0.30 U 添加し、30℃で反応を行った。反応液を、経時的に採取し、NALの生成量をHPLCで分析した。その結果をFig. 42 に示してある。酵素量が多くなるにしたがってNALの最大生成量に達するまでの時間は早くなる傾向が認められた。しかし、0.1 U 以上ではNAL生成量の差異は認められなかった。 また、酵素量が多いほど、NALの最大生成量に達した後の、NALの生成量の減少が著しかった。 このようなことから、酵素量は反応液1ml当り、0.1～0.15 U が適

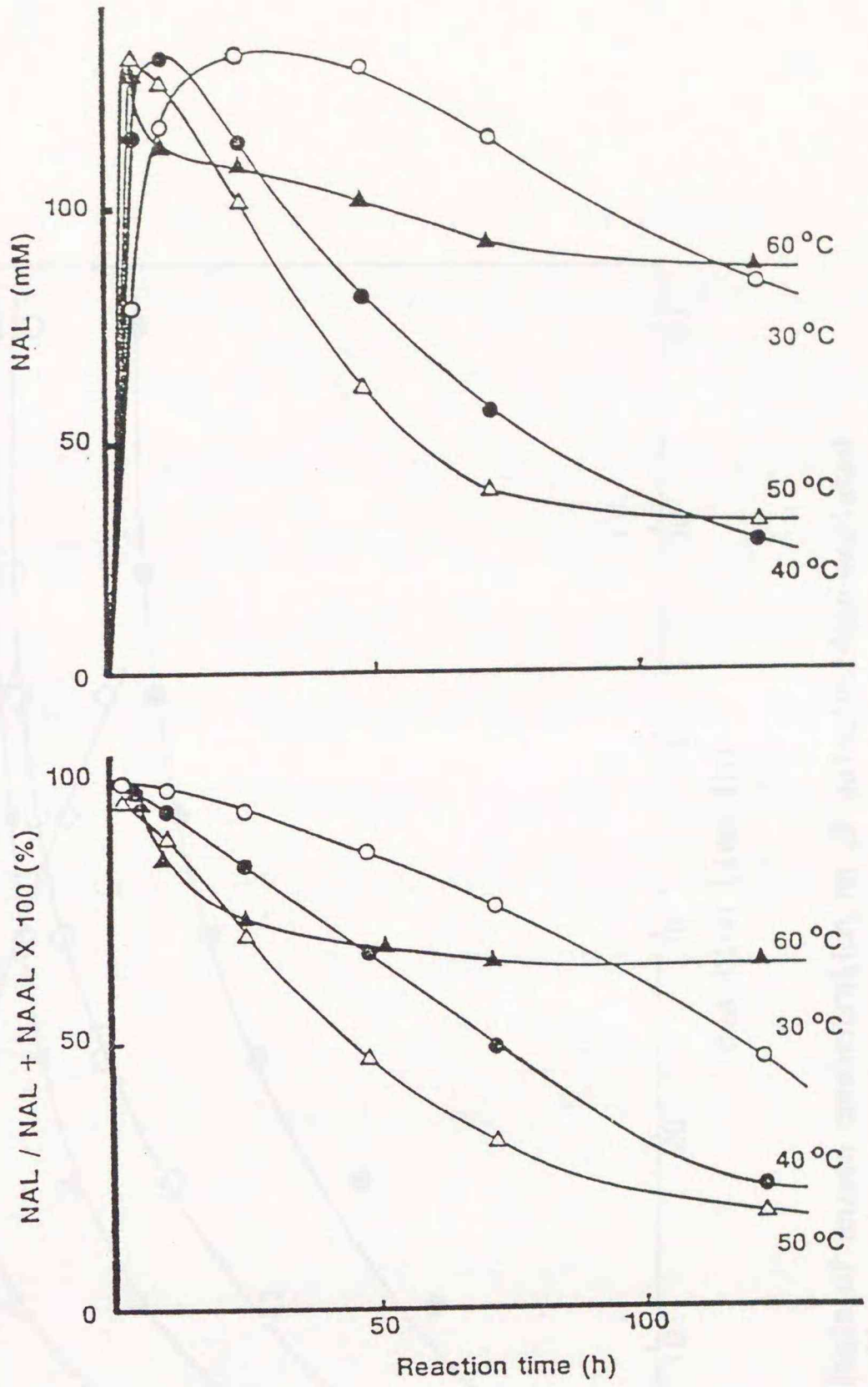


Fig. 41. Effects of temperature on β-galactosidase-mediated NAL production.

Lactose (180 mg) and GlcNAc (220 mg) in 1 ml of sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) was incubated with β-galactosidase (0.15 U) at different temperatures and samples were taken during the incubation for analysis by HPLC. The upper figure shows the amount of NAL as a function of time and lower the ratio of NAL to NAL+NAAL production by HPLC analysis.

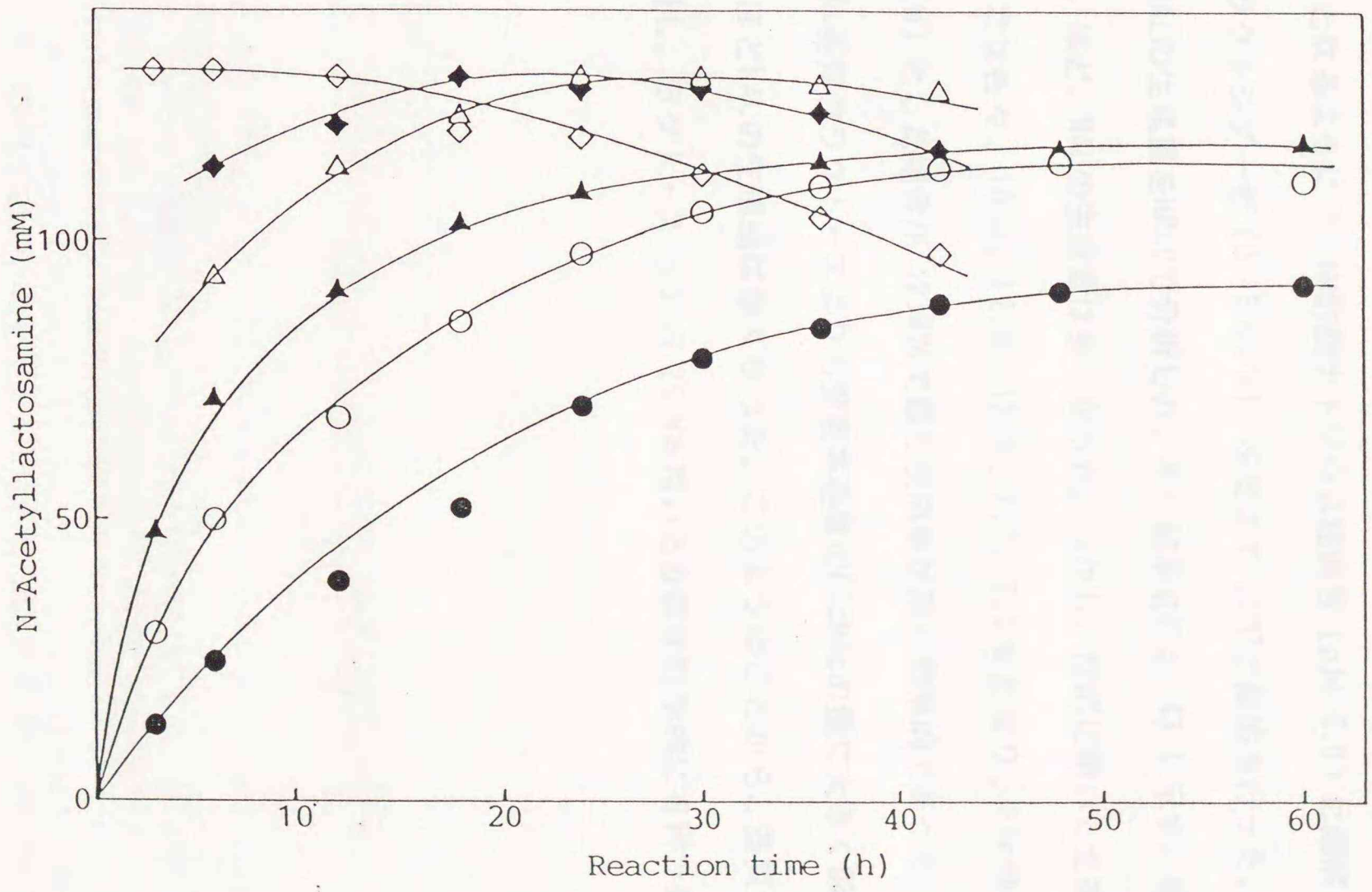


Fig. 42. Effects of enzyme concentration on β-galactosidase-mediated NAL production.

Lactose (180 mg) and GlcNAc (220 mg) in 1 ml of sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) was incubated with various amount of β-galactosidase at 30℃ and samples were taken during the incubation for analysis by HPLC.

enzyme concentration (U/ml): ●, 0.01; ○, 0.02; ▲, 0.05; △, 0.10; ◆, 0.15; ◇, 0.30.

当であると考えられた。

4) 基質量の影響

GlcNAcとラクトースを各々モル濃度（M）で 1.0:1.0、1.0:0.5、1.0:0.25、0.5:0.5、0.25:0.5 となるように 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）に溶解し（5ml）、これにβ－ガラクトシダーゼ（0.15 U／ml）を加えて 30℃で反応を行った。反応液を経時的に採取し、NALの生成量をHPLCで分析した。その結果をFig. 43 に示す。反応に用いた全基質濃度が高いほど、NALの生成量は多くなった。しかし、反応に用いた全基質量に対するNALの生成率では各々、10.3、12.9、12.8、7.7、5.3％となり、GlcNAcとラクトースを1.0:0.5（M）とした場合が 12.9％で最も生成率が高く効率的であった。また、NALの生成量は供与体基質のラクトースよりも受容体基質のGlcNAcの量に大きく影響され、受容体の量が多いほどNALの生成量は多くなった。このようなことから、基質量としてはGlcNAc 1.0 Mに対し、ラクトース 0.5～0.25 Mを用いる反応が効率的に有利であると考えられた。

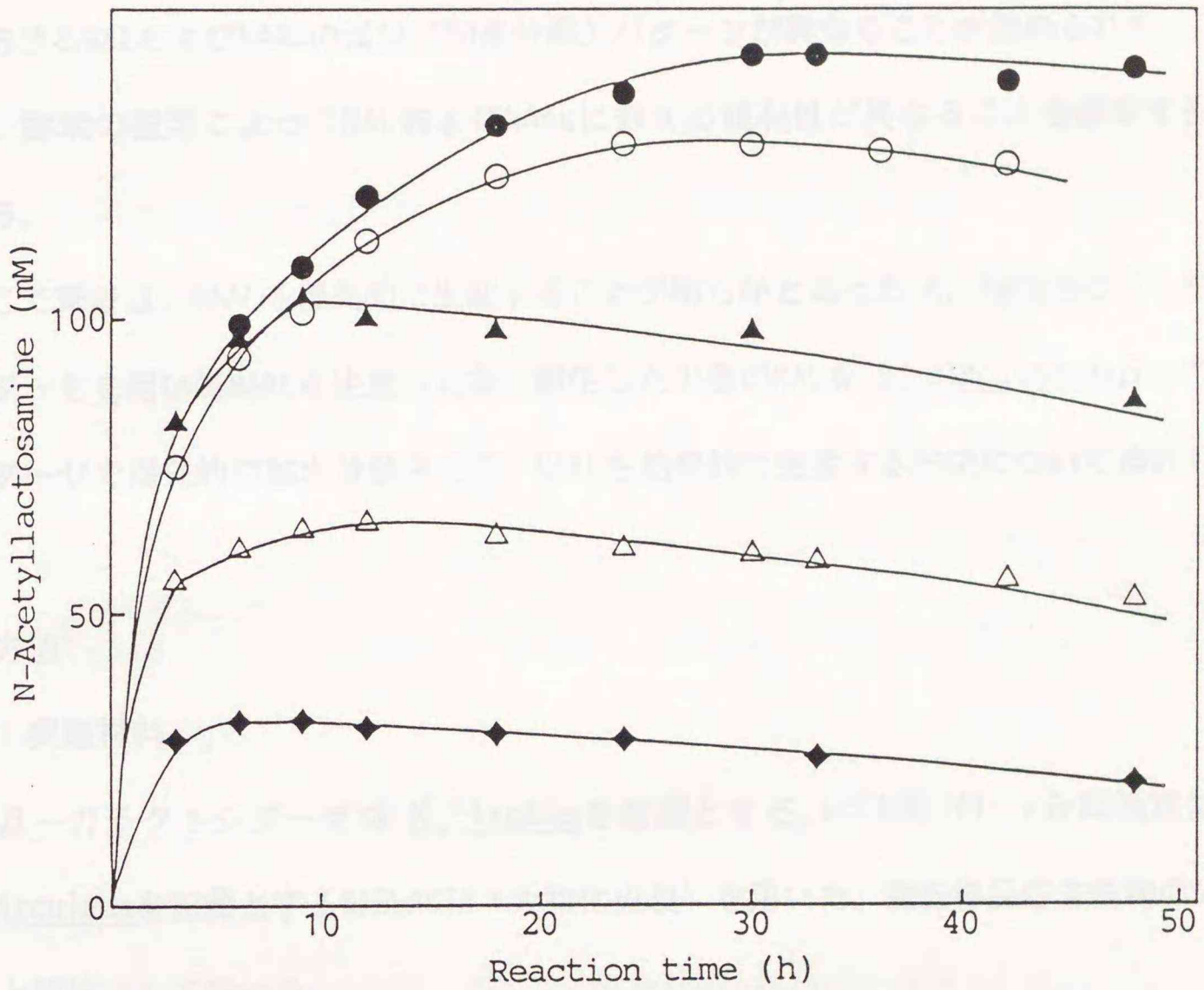


Fig. 43. Effects of substrate concentration on β-galactosidase-mediated NAL production.
Various amount of Lactose and GlcNAc in 5 ml of sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) was incubated with β-galactosidase (0.15 U/ml) at 30°C and samples were taken during the incubation for analysis by HPLC.
substrate concentration (GlcNAc:lactose): ●, 1.0 M:1.0 M; ○, 1.0 M:0.5 M; ▲, 1.0 M:0.25 M; △, 0.5 M:0.5 M; ◆, 0.25 M:0.5 M.

第三節　Ｎ－アセチルアロラクトサミンの酵素的生産法の検討

本章 第一節で述べたように、市販のβ－ガラクトシダーゼを用いたGlcNAcとラクトースの糖転移反応において、酵素の種類によりNALとNAALの生成比率が異なることや長時間の反応におけるNALおよびNAALの減少（加水分解）パターンが異なることが認められた。このことは、酵素の種類によってNALおよびNAALに対する親和性が異なることを示唆するものである。

そこで筆者は、NAALを優先的に生産することが明らかとなった K. lactisのβ－ガラクトシダーゼを用いてNAALを生産した後、副生した少量のNALを B. circulansのβ－ガラクトシダーゼで優先的に加水分解させて、NAALを効率的に生産する方法について検討した。

実験方法

（１）実験材料

β－ガラクトシダーゼは K. lactisを起源とするLACTASE YNL（合同酒精製）と B. circulansを起源とするBIOLACTA（大和化成製）を用いた。糖転移反応生成物の分離は前節と同様にして行った。

（２）NALおよびNAALの加水分解速度

NALおよびNAALに対するB. circulansのβ－ガラクトシダーゼの加水分解速度は次のようにして測定した。NALまたはNAALを 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）に５％溶解した後、0.05 U／mlの酵素を添加し、30℃で反応を行った。反応液は経時的（3、6、9、12、15 分後）に採取し、遊離したGlcNAc量をHPLCで測定した。

（３）HPLC分析およびその他の機器分析

前節の実験方法と同様にして行った。

結果と考察

（１）糖転移反応生成物の分離精製および同定

GlcNAc（22 g）とラクトース（18 g）を 0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液（100 ml、pH 6.5）に溶解し、K. lactisを起源とするβ－ガラクトシダーゼ （30 U／ml）を加え、30℃で 17 時間反応を行った。反応後、95℃で 10 分間の加熱によって反応を停止し、不溶物を遠心分離して除去した。得られた上清液を活性炭カラムに供し、蒸留水（5.0ℓ）で洗浄後、前節のNALの分離と同様に、エタノールによる直線濃度勾配で、生成物（オリゴ糖）を溶出した。その結果をFig. 44 に示す。約 15％エタノール付近で溶出した 210 nm（アセチル基）の吸収ピークをF-b画分（フラクションNo.133－185）とし、この画分を集め濃縮し、凍結乾燥した（収量：4.6 g）。 F-b画分にはNAALと少量のNALが含まれていた（NAAL：NAL = 8:1，モル比）。そこで、次に、このNALを除去するため、B. circulansのβ－ガラクトシダーゼを用い、NALを優先的に加水分解することを試みた。すなわち、F-b画分（4.6 g）を 920 mlの 20 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）に溶解し、B. circulansのβ－ガラクトシダーゼ（25 U／ℓ）を添加し、40℃で反応させた。反応液は経時的に採取し、NALおよびNAALの量的変化をHPLCで測定したところ、3.5 時間経過後、NALが検出されなくなった。そこで、反応液をpH 3.5に調整し、95℃、15 分間加熱して反応を停止した。再びpH 6.5に調整し、約半量まで濃縮した。濃縮液について、再度、前記の活性炭カラムクロマトグラフィーを行い、エタノール濃度 15％付近で溶出してくるF-b’画分（フラクションNo.130－181）を得、これを凍結乾燥した（収量：3.9 g）。

F-b’画分はHPLC分析の結果、NAAL標準品の保持時間と同一の単一ピークとして認められた。 この画分をＦＡＢ-ＭＳ測定したところ、Table 17 に示すように、そのスペクトルは m/z = 384 [M+H$^+$] のイオンピークが観察され、 分子量は 383であり、本酵素反応様式と考え合わせると、Gal-GlcNAcであると推定された。 さらに、^{1}H-ＮＭＲを測定したとこ

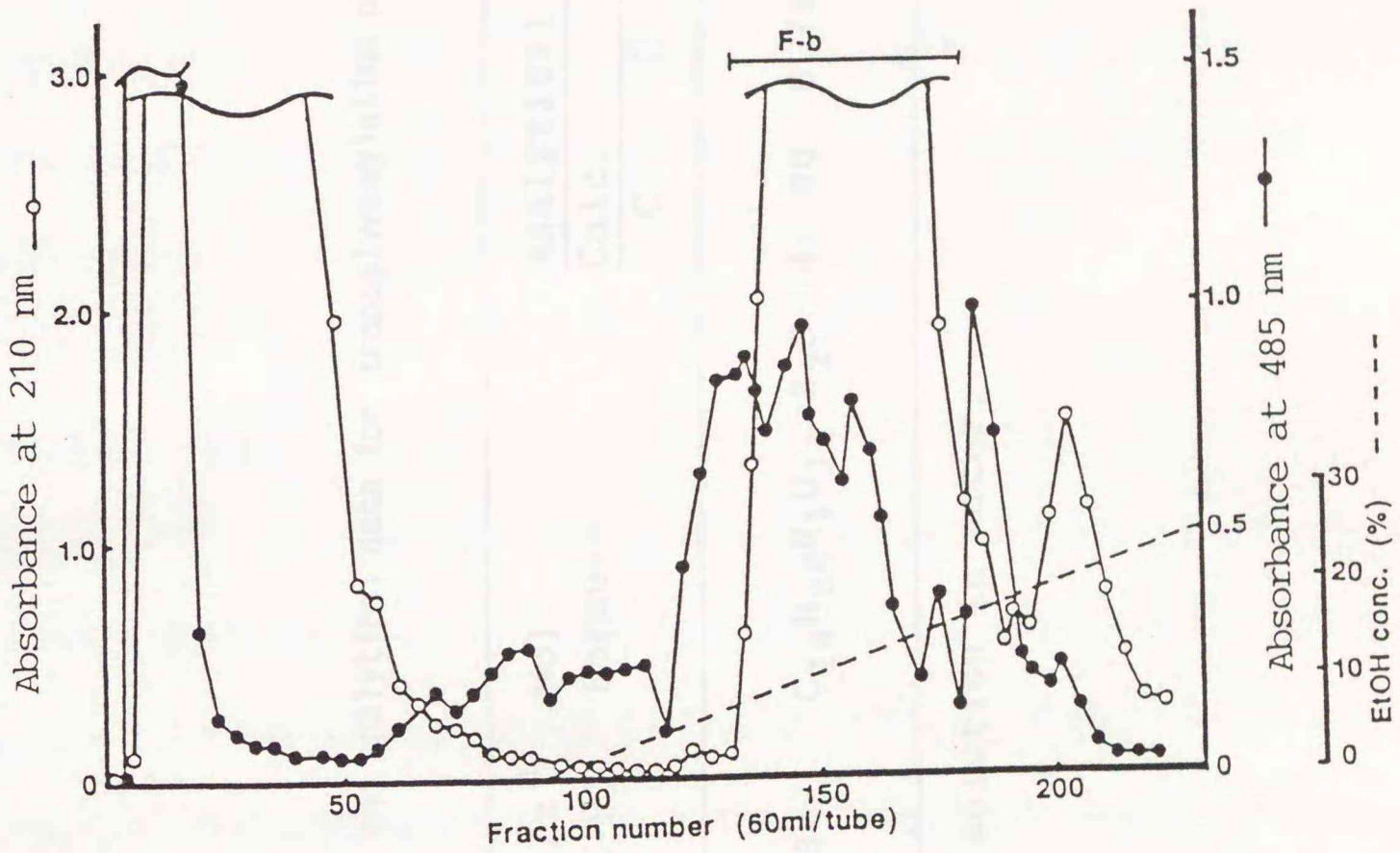


Fig. 44. Charcoal-Celite chromatographic separation of transglycosylation products obtained by treating a solution of lactose and GlcNAc with β-galactosidase.

Chromatography of the resulting mixture was carried out on a column (4.0×120 cm) of charcoal-Celite at room temperature.

○, absorbance at 210 nm; ●, absorbance at 485 nm; ---, ethanol concentration (%).

Table 17. Optical rotation, m.p., FAB, and analytical data for transglycosylation product " F-b' "

Fraction	$[\alpha]_D^{25}$ (degree)	m.p.	m/z [a] (M+H)	Mol. Formula	Analytical data					
					Calc.			Found		
					C	H	N	C	H	N
F-b'	+29.5(1.0) [b]	-	384	$C_{14}H_{25}N_1O_{11}\ H_2O$	41.90	6.78	3.49	41.90	6.59	3.21

[a] In FAB +ionization mode. [b] For a solution in water.

ろ、アノメリック領域においてβ-1.6 結合に関与するグリコシディックプロトンが 4.439 ppm（d，$J_{1,2}$ = 7.3 Hz，H-1'α）および 4.455 ppm（d，$J_{1,2}$ = 7.0 Hz，H-1'β）に、さらに還元末端のα、βアノマーに由来するアノメリックプロトンが 5.205 ppm（d，$J_{1,2}$ = 3.3 Hz）および 4.729 ppm（d，$J_{1,2}$ = 8.4 Hz）に認められた。^{13}C-NMRスペクトルのシグナルの同定は、NAL、ジ－N－アセチルキトビオース（$GlcNAc_2$）およびGlcNAcβ1-6GlcNAcなどのモデル化合物のスペクトルデータ[16,75,76]との比較に基づいて行った（Fig. 45）。 さらに、元素分析データ等の結果（Table 17）からもNAALの構造であることが支持された。 以上の結果から、F-b'画分中の成分はNAALと同定された。

（２）NALの選択的除去

前記したように、F-b画分にはNAALとNALが 8:1（モル比）の割合で混在していた。これからNAALを精製するため、B. circulansのβ－ガラクトシダーゼによるNALの選択的加水分解を試みた。その典型的な加水分解反応をFig. 46 に示した。反応は、F-b（５mg）を含む１mlの 20 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）に 0.025 Uのβ－ガラクトシダーゼを添加し、30℃で反応を行った。反応液を経時的に採取し、NAALおよびNAL量をHPLCで測定した。図より明らかなように、3.5 時間反応後、 NALは完全に加水分解されたが、NAALの加水分解は５％以下に留まっていた。このようなことから、NALの加水分解速度を 100 とした場合のNAALのそれは 2.0 であり、50 倍の違いが認められ（Fig. 47）、本酵素によるNALの選択的な除去が可能であることが明らかとなった。

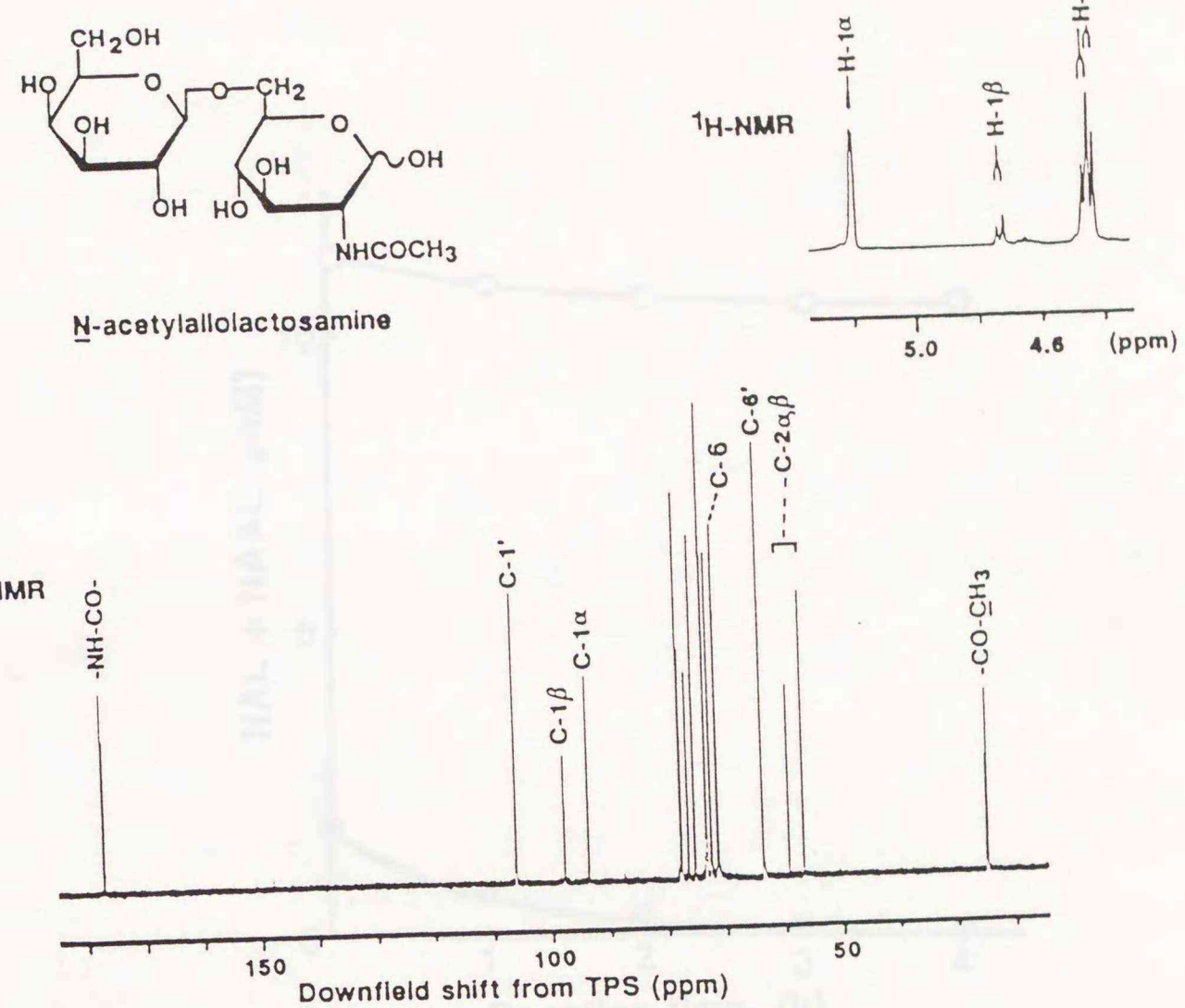


Fig. 45. ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra of NAAL in D_2O.

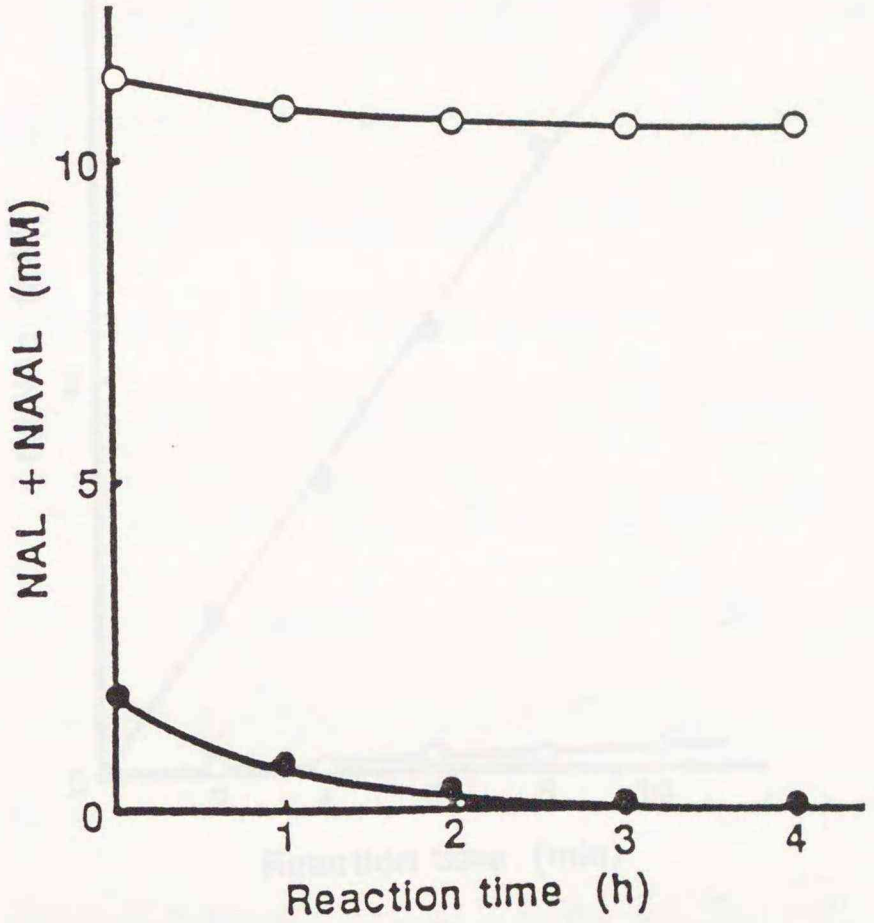


Fig. 46. Time-course of hydrolysis of NAL and NAAL in F-b fraction by B. circulans β-galactosidase.
A reaction mixture (1 ml) containing F-b (5 mg) in 20 mM phosphate buffer (pH 6.0) was incubated at 30°C with 0.025 units of the enzyme.
○, NAAL; ●, NAL.

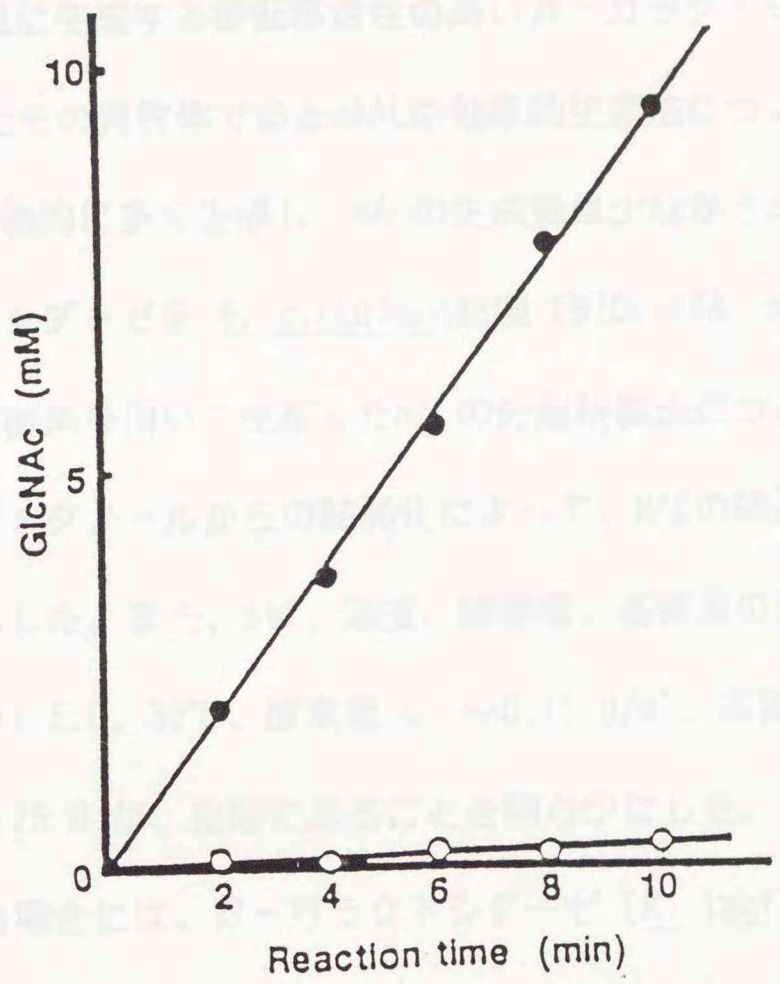


Fig. 47. Time-course of GlcNAc liberated from NAL and NAAL by B. circulans β-galactosidase.
A reaction mixture (1.0 ml) containing 50 mg of NAL or NAAL in 20 mM phosphate buffer (pH 6.0) was incubated at 40°C with 0.20 units of the enzyme.
○, NAAL; ●, NAL.

第四節　要約

従来、NALは化学合成法もしくは酵素法で調製されている。しかし、化学合成法では種々の保護基の導入など工程が複雑であること、また酵素法では収率が低いことなどの理由で、大量に調製することが困難であった。本章では、GlcNAcを受容体基質、ラクトースを供与体基質として、NALを多量に生成する糖転移活性の高いβ－ガラクトシダーゼの検索を市販酵素の中から行い、NALとその異性体であるNAALの効率的生産法について検討した。市販酵素のほとんどはNAALを圧倒的に多く生成し、NALの生成量は少なかったが、唯一NALを多量に生成するβ－ガラクトシダーゼを B. circulans起源（BIOLACTA、大和化成製）に見出すことができた。次に、本酵素を用いて生産したNALの分離精製法について検討し、活性炭クロマトグラフィーおよびメタノールからの結晶化によって、NALの結晶標品を容易にしかも大量に得られることを示した。また、pH、温度、酵素量、基質量の影響を調べ、NALの効率的生産条件として、pH 5.0、30℃、酵素量 0.1～0.15 U/ml、基質量; GlcNAc 1.0 Mに対しラクトース 0.5～0.25 M が、良好であることを明らかにした。

一方、NAALを生産する場合には、β－ガラクトシダーゼ（K. lactis起源、LACTASE YNL、合同酒精製）を用いて、NAALと少量のNALを生成した後、NALをβ－ガラクトシダーゼ（B. circulans起源、BIOLACTA、大和化成製）で選択的に加水分解し、除去する方法を開発した。これは、B. circulans起源のβ－ガラクトシダーゼのNALとNAALに対する加水分解速度の違い（100:2）を利用したものであり、異性体であるNALを含むNAALの精製を容易に行うことができる優れた方法であった。

以上述べたように、β－ガラクトシダーゼの糖転移反応を利用したNALおよびNAALの効率的生産法を開発した。この開発は、従来から大量に生産することが困難で、したがって高価であるため試薬レベルの供給しかできなかったこれらの糖類を、安価に、しかも大量に

供給することを可能にするものである。

総括

本研究では、海洋資源「キチン」の利用に関する研究を行った。筆者は、キチン、キトサンを加水分解して得られるオリゴ糖や単糖の利用は、未利用資源としてのキチンの高度利用を達成するうえで極めて重要なことと考え、これらオリゴ糖であるキチンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖および単糖であるN－アセチルグルコサミン（GlcNAc）、グルコサミン（GlcN）の効率的生産とその利用について検討した。

第一章では、キチンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖の酸加水分解法による効率的生産法を開発した。キチンオリゴ糖では、目的とする重合度のオリゴ糖を得るための加水分解条件を明らかにした。また、キチン加水分解液からのオリゴ糖の回収、すなわち中和により副生した塩類の除去を、イオン交換膜電気透析法で試み、従来の活性炭カラムによる方法では達成できなかったGlcNAcの回収を含め、キチンオリゴ糖の大量生産の可能性を示した。さらに、得られたキチンオリゴ糖はさわやかな甘味を有し、また、ビフィズス菌にも利用されることから、新しい食品素材として利用できる可能性を明らかにした。一方、キトサンオリゴ糖では、従来の方法に比べ、使用する塩酸量が少なくしかも飛躍的に短時間でオリゴ糖の生産が行える加水分解条件を見出した。また、キトサンオリゴ糖の分離精製において、予めメタノールに対する溶解性の違いを利用して、キトサン分解物から不要のGlcNを除去することにより、多量のキトサンオリゴ糖を一度の操作で分離する効率的生産法を開発した。

次に、単糖であるGlcNAcおよびGlcNの酵素的生産法について検討した。第二章では、酸加水分解によって調製したキチンオリゴ糖を基質とし、N. orientalisの生産するキチン分解酵素（キチナーゼおよびβ－N－アセチルヘキソサミニダーゼ）を固定化した担体を充填したバイオリアクターによるGlcNAcの連続生産法を開発した。すなわち、タンニン－キ

トサン担体に酵素を物理吸着させた固定化酵素は、GlcNAcの生産に極めて有効であり、その諸性質およびGlcNAcの最適生産条件を明らかにした。さらに、カラムリアクターを用いた連続生産を行い、キチンオリゴ糖からGlcNAcを 90%以上の収率で 130 日間以上連続的に得ることに成功した。この方法は、従来からの化学合成法に代わる新しいGlcNAc生産法として工業的に利用可能と思われる。また、このようにして生産されたGlcNAcは化学合成品でないことから、国内では食品素材として有効に利用できるものである。

第三章では、N. orientalisの生産する新規酵素エキソ－β－D－グルコサミニダーゼとキトサナーゼの精製を行い、その諸性質について調べ、キトサンの酵素分解によるGlcNの生産を検討した。従来、キトサンを分解する酵素として多くのキトサナーゼが知られているが、これらの酵素はオリゴ糖を生産する典型的なエンド型酵素であったことから、キトサンからGlcNの生産を達成することができなかった。本章では、キトサンを加水分解してGlcNを生産する新規酵素エキソ－β－D－グルコサミニダーゼを発見したことにより、GlcNの酵素生産法を開発することができた。すなわち、部分アセチル化キトサンを分解するためには、エキソ－β－D－グルコサミニダーゼとβ－N－アセチルヘキソサミニダーゼの併用が著しく効果的であることを明らかにし、さらに、キトサナーゼを併用することにより、キトサンの完全分解をより速やかに達成できることを明らかにした。このキトサンの酵素による完全分解法は、GlcNの生産のみならず、キトサンの特性を示す重要な指標であるアセチル化度の測定にも応用できると考えられた。

次に、第四章では、GlcNAcの高度利用を目的とし、GlcNAc残基を含む有用物質のひとつであるN－アセチルラクトサミン（NAL）の糖転移反応による酵素合成を試みた。 従来、NALは化学合成法もしくは酵素法で調製されている。しかし、化学合成法では種々の保護基の導入など工程が複雑であること、また酵素法では収率が低いことなどの理由で、大量に調製することが困難であった。本章では、GlcNAcを受容体基質、ラクトースを供与体基質

として、NALを多量に生成する糖転移活性の高いβ－ガラクトシダーゼの検索を市販酵素の中から行い、唯一NALを多量に生成するβ－ガラクトシダーゼ（B. circulans起源）を見出すことができた。市販酵素のほとんどは、NALのβ-1,6 結合異性体であるＮ－アセチルアロラクトサミン（NAAL）を圧倒的に多く生成し、NALの生成量は少なかった。次に、本酵素を用いて生産したNALの分離精製法について検討し、活性炭クロマトグラフィーおよびメタノールからの結晶化によって、NALの結晶品を容易にしかも大量に得られることを示した。また、pH、温度、酵素量、基質量の影響を調べ、NALの効率的生産条件を明らかにした。一方、NAALについても効率的生産を試みた。β－ガラクトシダーゼ（K. lactis起源）を用いてNAALと少量のNALを生成した後、NALをβ－ガラクトシダーゼ（B. circulans起源）で選択的に加水分解し、除去する方法を開発した。これは、B. circulans起源のβ－ガラクトシダーゼのNALとNAALに対する加水分解速度の違い（100:2）を利用したものであり、異性体であるNALを含むNAALの精製を容易に行うことができる優れた方法であった。これらの開発は、従来から大量に生産することが困難で、したがって高価であるため試薬レベルの供給しかできなかったこれら糖類を、安価に、しかも大量に供給することを可能にするものである。

以上、本論文では、キチンの利用に関し、主として酵素による構成糖およびその誘導体の生産法について述べた。本研究が、未利用資源としてのキチンの高度利用に少しでも役立てば幸いである。

謝辞

本研究をまとめるのに際し、御指導、御鞭撻を賜わりました北海道大学教授、高間浩蔵博士に心より深謝致します。また、本研究をまとめるのに際し、貴重な御助言をいただきました北海道大学教授、西田清義博士、並びに同大学助教授、鈴木鐵也博士に深謝致します。

さらに、本研究をまとめるのに際し、適切な御指示をいただきました北海道大学教授、新井健一博士、並びに同大学教授、羽田野六男博士に心から感謝致します。

本研究の直接的な御指導をしていただきました静岡大学教授、碓氷泰市博士、焼津水産化学工業㈱研究開発部顧問、石川正人博士に深謝致します。また、本研究の遂行にあたり、共同研究をしていただき貴重な御指導、御助言を賜わりました東京薬科大学教授、石戸良治博士に心より深謝致します。本研究の一部の共同研究をしていただきました静岡大学助教授、河岸洋和博士、並びに同大学大学院生、大井浩資氏に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、深い御理解をいただきました焼津水産化学工業㈱代表取締役、松本圭一郎氏、同専務取締役、甲賀伊元氏をはじめ、役員各位に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、多くの御援助、御助言をいただきました焼津水産化学工業㈱研究開発部、南条文雄博士、徳武　聡氏、内山毅彦氏、又平芳春氏、勝見亮介氏、石川真理子氏、磯部綾子氏をはじめ、研究開発部の皆様に心より感謝致します。

最後に、私の研究生活を多くの面で支えてくれた妻俊子、並びに長男悠介、長女佑美、次女紅緒に心より感謝します。

文献

1) Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., and Suzuki, M., Carbohydr. Res., 151, 403 (1986)

2) Roby, D., Gadelle, A., and Toppan, A., Biochem. Biophys. Res. Commun., 143, 885 (1987)

3) Hyodo, H., Fujinami, H., Okada, E., and Mochizuki, T., in Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants, Clijsters, H. et al., eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.229 (1989)

4) Kendra, D.F., and Hadwiger, L.A., Exp. Mycol., 8, 276 (1984)

5) Gyorgy, P., and Rose, C.S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 219 (1955)

6) Ramireez-Leon, I.F., and Ruiz-Herrera, J., J. Gen. Microbiol., 73, 281 (1972)

7) Monaghan, R.L., Eveleigh, D.E., Tewari, R.P., and Reese, E.T., Nature New Biol., 245, 78 (1973)

8) Hedges, A., and Wolfe, R.S., J. Bacteriol., 120, 844 (1974)

9) Price, J.S., and Storck, R., J. Bacteriol., 124, 1574 (1975)

10) Tominaga, Y., and Tsujisaka, Y., Biochim. Biophys. Acta, 410, 145 (1975)

11) Ohtakara, A., Ogata, H., Taketomi, Y., and Mitsutomi, M., in Chitin, Chitosan, and Related Eneymes, Zikakis, J.P. ed., 147, Academic Press, orland, FL (1984)

12) Uchida, Y., and Ohtakara, A., Methods Enzymol., 161, 501 (1988)

13) Fenton, D.M., and Eveleigh, D.E., J. Gen. Microbiol., 126, 151 (1981)

14) Yabuki, M., Uchiyama, A., Suzuki, K., Ando, A., and Fujii, T., J. Gen. Appl. Microbiol., 34, 255 (1988)

15) Pelletier, A., and Sygusch, J., Appl. Environ. Microbiol., 56, 844 (1990)

16) Saito, T., Itoh, T., and Adachi, S., Biochim. Biophys. Acta, 801, 147 (1984)

17) Kuhn, R., Baer, H.H., and Gauhe, A., Chem. Ber., 87, 1553 (1954)

18) Fukuda, M., Biochim. Biophys. Acta, 780, 119 (1985)

19) Feize, T., Gooi, H.C., Childs, R.A., Pickard, J.K., Uemura, K., Loomes, L.M., Thorpe, S.J., and Hounsell, E.F., Biochem. Soc. Trans., 12, 591 (1984)

20) Tomarelli, R.J., Hassinen, J.B., Eckhardt, E.R., Clark, R.H., and Bernhart, F.W., Arch. Biochem. Biophys., 48, 225 (1954)

21) Bergmann, M., and Silberkweit, E., Chem. Ber., 64, 2436 (1931)

22) Zechmeister, L., and Toth, G., Chem. Ber., 64, 2028 (1931)

23) Zilliken, F., Braun, G.A., Rose, C.S., and Gyorgy, P., J. Am. Chem. Soc., 77, 1296 (1955)

24) Barker, S.A., Foster, A.B., Stacey, M., and Webber, J.M., J. Chem. Soc., 2218 (1958)

25) Rupley, J.A., Biochim. Biophys. Acta, 83, 245 (1964)

26) Bosso, C., Defaye, J., Domard, A., and Gadelle, A., Carbohydr. Res., 156, 57 (1986)

27) Horowitz, S.T., Roseman, S., and Blumenthal, H.J., J. Am. Chem. Soc., 79, 5046 (1957)

28) Hackman, R.H., Austr. J. Biol. Sci., 7, 168 (1954)

29) Schales, O., and Schales, S.S., Arch. Biochem., 8, 285 (1945)

30) Moore, S., and Stein, W.H., J. Biol. Chem., 211, 907 (1954)

31) Fildes, P., Br. J. Exp. Pathol., 1, 129 (1920)

32) Kohmoto, T., Fukui, F., Takaku, H., Machida, Y., Arai, M., and Mitsuoka, T., Bifidobacteria Microflora, 7, 61 (1988)

33) Purchase, E.R.,and Braun, C.E., Org. Syn., 26, 36 (1946)

34) Inouye, Y., Onodera, K., Kitaoka, S., and Hirano, S., J. Am. Chem. Soc., 78, 4722 (1956)

35) Carroad, P.A., and Tom, R.A., J. Food Sci., 43, 1158 (1978)

36) Tom, R.A., and Carroad, P.A., J. Food Sci., 46, 646 (1981)

37) Casio, I.G., Fisher, R.A., and Carroad, P.A., J. Food Sci., 47, 901 (1982)

38) Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K., and Ishido, Y., Biochim. Biophys. Acta, 923, 302 (1987)

39) Nanjo, F., Sakai, K., Ishikawa, M., Isobe, K., and Usui, T., Agric. Biol. Chem., 53, 2189 (1989)

40) Nanjo, F., Ishikawa, M., Katsumi, R., and Sakai, K., Agric. Biol. Chem., 54, 899 (1990)

41) Matsumoto, I., Mizuno, Y., and Seno, N., J. Biochem., 85, 1091 (1979)

42) Watanabe, T., Matuo, Y., Mori, T., Sano, R., Tosa, T., and Chibata, I., J. Solid-phase Biochem., 3, 161 (1978)

43) March, S.C., Parikh, I., and Cuatrecasas, P., Anal. Biochem., 60, 149 (1974)

44) Wetall, H.H., Biochim. Biophys. Acta, 212, 1 (1970)

45) Dixon, J.E., Stolzenbach, F.E., Berenson, J.A., and Kaplan, N.O., Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 905 (1973)

46) McGrath, R., Anal. Biochem., 49, 95 (1972)

47) Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R., and Yoshikawa, S., J. Appl. Polym. Sci., 28, 1909 (1983)

48) Distler, j.j., and Roseman, S., Methods Carbohydr. Chem., 1, 305 (1962)

49) Miller, G.L., Methods Carbohydr. Chem., 3, 134 (1963)

50) Parikh, I., March, S., and Cuatrecasas, P., Methods Enzymol., 34, 77 (1974)

51) Bergmann, M., and Zervas, L., Chem. Ber., 64, 975 (1931)

52) Wolform, M.L., and Conigliaro, P.J., Carbohydr. Res., 11, 63 (1969)

53) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)

54) Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., and Williams, D.E., Nature, 195, 281 (1962)

55) Laemmli, U.K., Nature, 227, 680 (1970)

56) Weber, K., and Osborn, M., J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969)

57) Andrews, P., Biochem. J., 91, 222 (1964)

58) Amano, K., Hayashi, H., and Ito, E., Eur. J. Biochem., 76, 299 (1977)

59) Fenton, D.M., and Eveleigh, D.E., J. Gen. Microbiol., 126, 151 (1981)

60) Blix, G., Acta Chem. Scand., 2, 467 (1948)

61) Reissig, J.L., Strominger, J.L., J. Biol. Chem., 217, 959 (1955)

62) Li, S.-C., and Li, Y.-T., J. Biol. Chem., 245, 5153 (1970)

63) Lee, R.T., and Lee, Y.O., Carbohydr. Res., 77, 270 (1979)

64) Alais, J., and Veyrieres, A., Carbohydr. Res., 93, 164 (1981)

65) Brew, K., Vanaman, T.C., and Hill, R.L., Proc. Natl. Acad. Sci.,V.S., 59, 491 (1968)

66) 出家栄記，天谷三枝子，五十嵐清一郎，阿彦健吉，雪印乳業技術研究所報告，83，25 (1986)

67) Wong, C.H., Haynie, S.L., and Whitesides, G.M., J. Org. Chem., 47, 5416 (1982)

68) Zilliken, F., Smith, P.N., Rose, C.S., and Gyorgy, P., J. Biol. Chem., 208, 299 (1954)

69) Zilliken, F., Smith, P.N., Rose, C.S., and Gyorgy, P., J. Biol. Chem., 217, 79 (1955)

70) Ajisaka, K., Nishida, H., and Fujimoto, H., Biotechnol. Lett., 9, 387 (1987)

71) Gekas, V.,and Lopez-Leiva, M., Process Biochem., 20, 2 (1985)

72) Wallenfels, K., Naturwissenschaften, 38, 306 (1951)

73) 戸羽隆宏，酪農科学，食品の研究，34，A169 (1985)

74) Prenosil, J.E., Stuker, E., and Bourne, J.R., Biotechnol. Bioeng., 30, 1019 (1987)

75) Nanjo, F., Ishikawa, M., Katsumi, R., and Sakai, K., Agric. Biol. Chem., 54, 899 (1990)

76) Saito, T., Itoh, T., Adachi, S., Suzuki, T., and Usui, T., Biochim. Biophys. Acta, 678, 256 (1982)

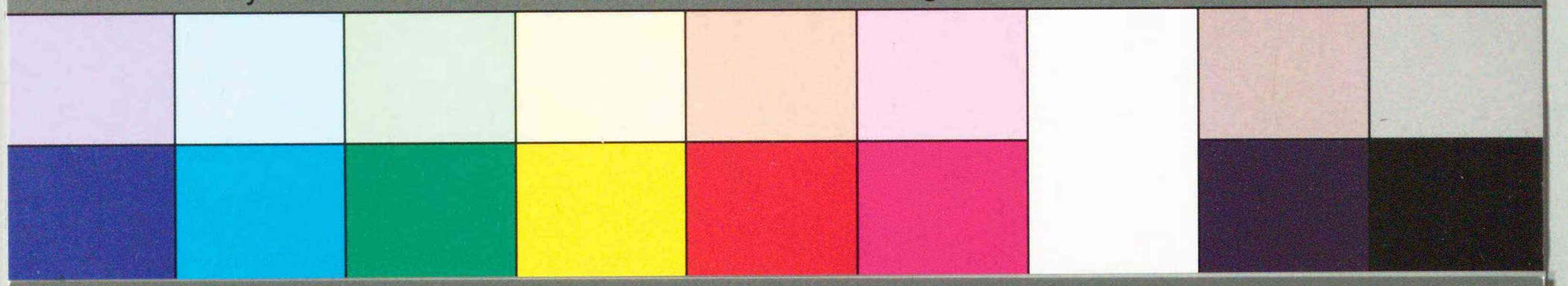
inches 1 2 3 4 5 6 7 8

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

