

微生物を用いた高純度 *N,N'*-Diacetylchitobiose 生産方法の開発

日大生産工(院) ○BUBPHASAWAN SURIYAPORN 日大生産工 吉宗 一晃

1. 緒言

キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が β -1,4 グリコシド結合した多糖で、自然界でセルロースに次いで多い。¹⁾ カビの細胞壁、昆虫の外骨格、そして甲殻類の殻の主成分に含まれている天然の素材である。²⁾ 毎年、水産加工産業などの産業によって 600-800 万トンのキチンの廃棄物が排出されている。これらのキチンの廃棄物は普通の溶媒には溶けないためほとんど利用されず、生分解性が低いため、その廃棄は環境負荷が大きい。また、キチンは加水分解によって機能性のキトオリゴ糖が生成する。そのキトオリゴ糖は抗菌剤、抗腫瘍剤、および抗炎症剤として利用できる。³⁾したがって、キチンの加水分解によってキトオリゴ糖を生産することによるキチンの廃棄物の問題を解決できることが期待できる。

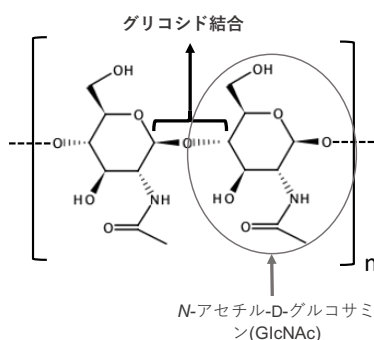


Fig. 1 キチンの化学構造式

キトオリゴ糖の一つである *N,N'*-Diacetylchitobiose (GlcNAc₂) はキチンを構成する *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の 2 分子がグリコシド結合で結合した二糖である。GlcNAc₂ は食品、化粧品、薬物や機能性バイオ素

材などに広く応用される可能性を有している。例えば、ポリスチレンに GlcNAc₂ を修飾することで神経細胞の接着を促進することができる。⁴⁾しかしながら高純度の GlcNAc₂ は精製コストが高く、非常に高価である。GlcNAc₂ はキチンを原料とし、塩酸による加水分解もしくは酵素による加水分解によって生産される。その原料であるキチンは構成する単糖として *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の他にグルコースなども含んでいる。そのため、高純度の GlcNAc₂ を生産するために、それらの糖を構成成分とするオリゴ糖は除く必要がある。工業的に GlcNAc₂ はキチンの塩酸による加水分解後、クロマトグラフィーにより分取して生産されている。⁵⁾しかしこの方法は処理コストが高く、得られる二糖の収率も低いうえ、副産物が多い。さらに添加した塩酸を中和する必要があるため、環境負荷が大きい。一方、酵素による加水分解方法は副産物が少なく反応温度も低いので環境にやさしい。そのため、最近キチンの加水分解酵素に多くの注意が向けられ研究が進められている。

キチンの代表的な加水分解酵素はキチナーゼである。キチナーゼは動物、植物、微生物に広く分布している。キチナーゼは、キチンの β -1,4 グリコシド結合を切断し、*N*-アセチルキトオリゴ糖を生産する。⁶⁾最近、多くの研究者は GlcNAc₂ の生産のために最適な酵素を発見した。例えば、*Myceliophthora thermophila* 由来キチナーゼ Chi1⁷⁾、*Paenibacillus barengoltzii* 由来のキチナーゼ PbChi70⁸⁾、また、*Salinivibrio* sp. BAO-1801 由来キチナーゼ⁹⁾などである。他に、微生物は多糖を分解する能力を持っている。これらの能力を利用して、キチンの加水分解によって副生する GlcNAc₂ 以外のキトオリゴ糖を分解させ、環境にやさしくて低価格で高純度の GlcNAc₂ を生産できるこ

Production of high-purity *N, N'*-Diacetylchitobiose from chitin using microorganisms

Suriyaporn BUBPHASAWAN and Kazuaki YOSHIMUNE

とが期待される。

本研究では加水分解酵素によってキチンを分解し、生成する副産物を微生物に分解させ、高純度の GlcNAc_2 を生産する方法を開発することを目的としている。本実験では、 GlcNAc_2 を生産できる最適酵素をスクリーニングした。 GlcNAc_2 を分解しない微生物の調査実験を行い、発酵生産法により高純度の GlcNAc_2 を生産できる培養条件の検討を行なった。

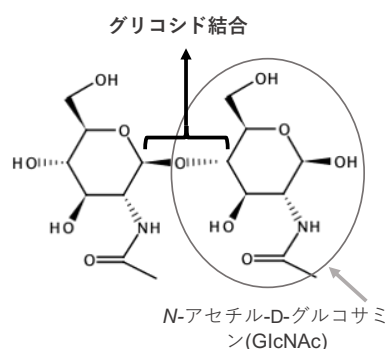


Fig. 2 N,N' -Diacetylchitobiose (GlcNAc_2) の化学構造式

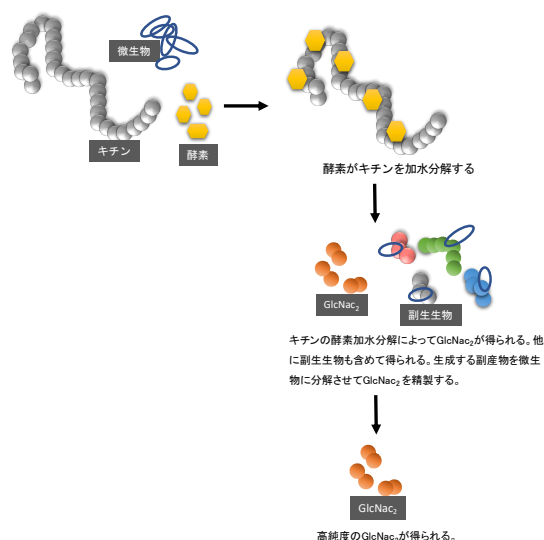


Fig. 3 微生物を用いたキチンから高純度 N,N' -Diacetylchitobiose 生産するイメージ

2. 実験方法

2.1 酵素のスクリーニング

キチンを加水分解し、 GlcNAc_2 を生産する酵素のスクリーニングを目的として 0.01g/ml 低分子

キチンを 4 種類の酵素で反応させた。酵素は Chitinase (EC3.2.1.14), Thermostable, recombination, solution, Wako (最適反応条件 pH 7.5, 85°C), Cellulase (EC 3.2.1.4), Thermostable, recombination, solution, Wako (最適反応条件 pH 5.6, 85°C), Cellulase from *Aspergillus niger*, Sigma (最適反応条件 pH 5.0, 37°C), および Yatalase, Takara (最適反応条件 pH 7.2, 37°C) を用いた。これら 4 種類の酵素で最適反応条件において 44 時間加水分解し、得られた加水分解生成物の溶液の生成した GlcNAc_2 は Thin layer chromatography (TLC) により調べた。TLC は、吸着剤を薄膜状に固定した薄層プレートを用いたクロマトグラフィであり、TLC の展開溶媒が上昇していく過程で試料の中に含まれる化合物の固定相 (シリカゲル) の上に移動の速度により分離される。標準試料と同じ移動距離であれば同じものであると判断できる。

2.2 微生物のスクリーニング

GlcNAc_2 を分解しないで、その他のキトオリゴ糖を分解する微生物のスクリーニングを目的として、研究室に保存されている 14 種類の単離株を培養して確認した。微生物の生育には主に炭素源と窒素源が必要である。酵素で分解したキトオリゴ糖を唯一の炭素源もしくは窒素源として培養を行い、その生育及び培養液中に残存する GlcNAc_2 を TLC で調べた。

2.3 GlcNAc_2 の生産培養条件の検討

スクリーニングによって得られた微生物と酵素を用いて培養の温度の影響を確認した。 Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , NH_4Cl , MgSO_4 , carbon source (20% glucose) と CaCl_2 から調製した M9 培地に 0.1g/ml 低分子キチンと 5 μl 酵素を入れて培地を調製した。その培地を用いて pH7.5 27°C, 37°C, および 47°C においてそれぞれ微生物を 7 日間培養した。さらに、微生物の分解能力に対して培地中に含んでいる炭素源の影響も調べた。そ

これは炭素源としたものであるグルコース、グリセリン、グリシン、酢酸ナトリウムそしてクエン酸をそれぞれ含まれた培地に 0.1g/ml 低分子キチンと 5 μ l 酵素を入れて培地を調製した。その培地を用いて pH7.5, 47 $^{\circ}$ Cにおいて微生物を 7 日間培養した。得られた生成物を TLC により生成した GlcNAc₂を確認した。また、得られた生成物の溶液の還元末端量を Somogyi-Nelson 法で測定した。生成物の還元末端量が分かれば、GlcNAc₂の量を推測できる。Somogyi-Nelson 法は、Somogyi 試薬の銅試薬による還元糖の定量法である。Nelson の発色試薬を用いて、最終的には分光光度計で吸光度を測定する。作成した検量線より還元糖の濃度を求めた。

3. 実験結果および考察

3.1 酵素のスクリーニング

GlcNAc₂ を生産する酵素のスクリーニングを行った(Fig.4)。

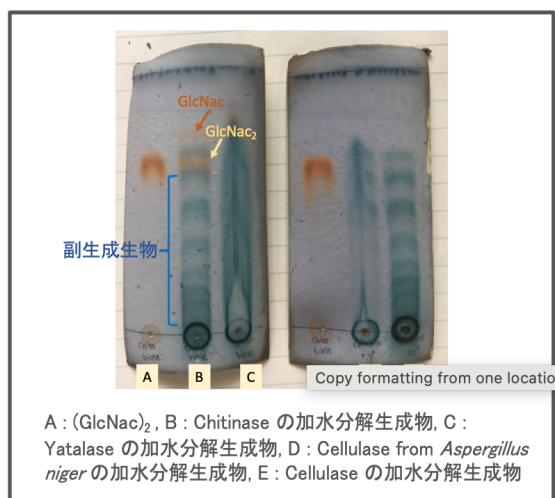


Fig. 4 4 種類の酵素の加水分解生成物の TLC 分析。

その結果、低分子キチンを Chitinase (EC 3.2.1.14), Thermostable, recombination, solution, Wako で加水分解し、TLC で分析したところ、加水分解生成物中に GlcNAc₂が含まれていることを確認できた。しかし GlcNAc₂の他にも様々な多糖が検出された。

3.2 微生物の調査

Brevibacillus という微生物を用いて培養した (Fig.5)。その結果、低分子キチンから得られた加水分解生成物を唯一の炭素源とする培地中で培養する場合は、夾雑多糖を分解し、最終的に GlcNAc₂を生産した。その結果によると、*Brevibacillus* は GlcNAc₂を高純化できるということが分かった。一方、低分子キチンから得られた加水分解生成物を唯一の窒素源とする培地の場合は、*Brevibacillus* は働けないで夾雑多糖を分解しなかった。このことから、低分子キチンは窒素源が少ない。微生物が生育するために必要な窒素源が足りなくなって、働けなくなったと考える。

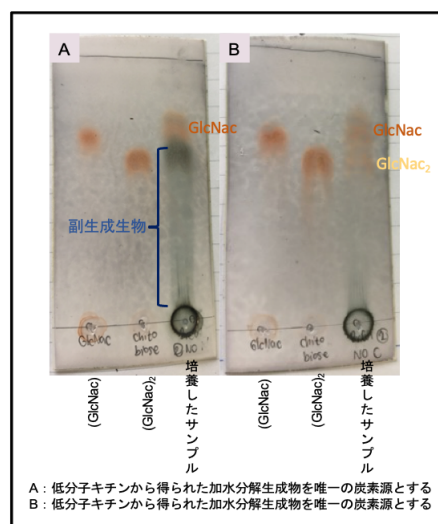


Fig. 5 *Brevibacillus* と培養したサンプルの TLC 分析。

1.3 GlcNAc₂を生産できる培養条件の調査

培養の温度の影響を確認した。得られた生成物の溶液の還元末端量を測定したところ、温度が 47 $^{\circ}$ C の場合は最適な温度であった。27 $^{\circ}$ Cおよび 37 $^{\circ}$ Cの場合と比べるとたくさん GlcNAc₂を生産できた。また、47 $^{\circ}$ Cの場合は培養 2 日目から高純度キトビオースを生成できた。一方 37 $^{\circ}$ C の場合は培養 6 日目から高純度キトビオースを生成できた。このことから、温度により酵素の反応速度が変化していることが示唆された。

そして、微生物の分解能力に対して培地中に

含んでいる炭素源の影響を確認した(Fig.6)。その結果、クエン酸ナトリウムまたは酢酸を炭素源とした存在下で培養すると、*Brevibacillus* はよく副生成する糖を分解できて、他の炭素源の場合と比較すると、もっと高純度の GlcNAc₂ を得られたことを確認できた。微生物では環状 AMP によるグルコースを供給する酵素やグルコース以外の糖を異化する酵素の産生を活性化する。これまで微生物におけるグルコースの細胞内濃度の少ない時に環状 AMP が合成する。すなわち、グルコースが環状 AMP の合成を阻害するという報告がある¹⁰⁾。今回の系においても、グルコース、グリジン、グリセリンそして低分子キチンに含まれているグルコース(炭素源がない場合)による環状 AMP の合成を阻害することによって解糖反応を阻害することが考えられた。

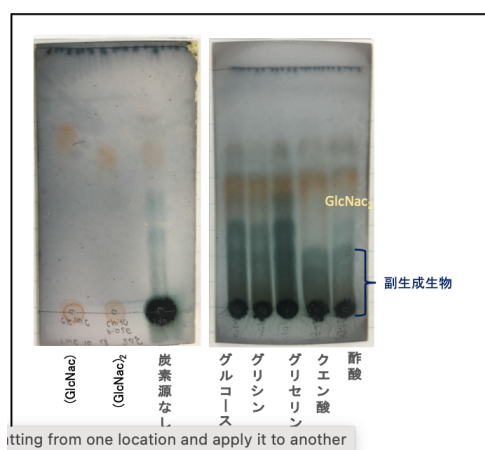


Fig. 6 異なる炭素源で培養したサンプルの TLC 分析。

4. まとめ

今回の結果から、微生物を用いたGlcNAc₂を生産することは培養の温度と培地中に含んでいる炭素源により影響を受けるということが分かった。今回は、Chitinase (EC 3.2.1.14), Thermostable, recombination, solution, Wakoと低分子キチンを含まれてクエン酸ナトリウムまたは酢酸を炭素源として調製した培地を用いた*Brevibacillus*をpH7.5, 47°Cにおいて2日間培養する場合は最適な条件であり、GlcNAc₂を生産できた。また、*Brevibacillus*によって副生成する糖を分解でき、

GlcNAc₂を精製できるということが分かった。したがって、加水分解酵素によってキチンを分解し、生成する副産物を微生物に分解させ、高純度のGlcNAc₂を生産する可能性がある。しかし、生産されたGlcNAc₂はまだ少量であって分解できないキチンも残った。そのため、今後生産されたGlcNAc₂の収率と純度を上げることが必要である。大量の酵素による分解効率が向上すると考えるため酵素の量を上げることを提案した。今後は、酵素の量を上げるために選べた酵素を遺伝子組換えした微生物に生産させていく。

参考文献

- 1) Ju Hee Kuk et al., *Biotechnology Letters*, 27, 7–11, (2005)
- 2) Shailesh R. et al., *Carbohydrate Research* 345, 2630–2635, (2010)
- 3) Malgorzata Krolicka et al., *J. Agric. Food Chem.* 66, 1658–1669, (2018)
- 4) Sun-Jung Kim et al., *Biomaterials* 33, 2154–2164, (2012)
- 5) Yasuyuki Takiguchi et al., *Nippon Nogeikagaku Kaishi* Vol.63, No.2, 167–173, (1989)
- 6) 渡邊 剛志, *化学と生物* Vol. 35, No. 6, (1997)
- 7) Krolicka, M. et al., *J. Agric. Food Chem.* 66, 1658–1669, (2018).
- 8) Yang, S. et al., *Food Chemistry*, 192, 1041–1048, (2016).
- 9) Le, B. et al., *J Basic Microbiol*, 1–9, (2018).
- 10) 井手 節, 岡林 直, 塩野義製薬株式会社研究所, *化学と生物*, Vol.8, No.7 (1970) pp.387–397