

# 酵素法によるキチン・キトサンからの有用オリゴ糖生産 - 麹菌が生産するキトサン分解酵素の利用 -

○下坂 誠, 岡崎光雄, 田口悟朗\*, 小平律子

信州大学繊維学部応用生物科学科, \*信州大学遺伝子実験施設

## 1. 緒言

豊富に存在するバイオマスであるキチン・キトサンの有効利用をはかるため、微生物の生産する酵素キチナーゼ・キトサナーゼを用いたオリゴ糖生産とその利用に注目した。既に、キチン分解細菌 *Burkholderia gladioli* CHB101 株を土壌より分離同定し、本株が生産するキチナーゼを用いてキトサンオリゴ糖を生産した。このオリゴ糖は、抗細菌・抗カビ作用を示し防腐剤などへの利用の可能性が開けた。さらに、幅広い微生物を検索したところ、麹菌 *Aspergillus oryzae* が強力なキトサン分解能を示すことがわかった。麹菌は古来より発酵醸造に利用されており、安全性においては申し分ない。そこで、キチン・キトサンを新たな食品素材へ変換することを視野に入れて、麹菌のキトサン分解酵素を精製し、その性質を調べた。また、酵素の大量生産およびタンパク工学的的手法による酵素機能の改良を目指して、キトサナーゼ遺伝子のクローニングを行った。

## 2. 実験方法

麹菌 *A. oryzae* IAM2660 株を実験に使用した。培養は Czapek-Dox 培地を用いて行い、菌体を除去した後の培養上清をキトサン分解酵素源として用い、各種クロマトグラフィーにより酵素の精製を行った。酵素活性の測定は、キトサンを基質に用いて、酵素反応によって生じる還元糖量を定量することにより行った。IAM2660 株染色体 DNA よりファージベクター  $\lambda$  DASHII を用いてゲノムライブラリーを作成し、この中よりキトサナーゼ遺伝子を単離し塩基配列を決定した。

## 3. 結果と考察

麹菌 *A. oryzae* IAM2660 株を用いて、炭素源として N-アセチルグルコサミンを用いた培養液より 2 種類のキトサン分解酵素 (分子量 40 kDa と 135 kDa) を精製した。キトサン溶液の粘度

低下活性と反応生成物の薄層クロマトグラフィー分析の結果、40 kDa の酵素は基質をエンド型に分解するキトサナーゼであり、135 kDa の酵素はエキソ型に分解する  $\beta$ -D-グルコサミニダーゼであることが判明した (Table 1)。

Properties of the two chitosan-degrading enzymes from *A. oryzae* IAM 2660

	Chitosanase	Exo- $\beta$ -glucosaminidase
	40 kDa	135 kDa
Molecular weight	40 kDa	135 kDa
Substrate specificity:		
chitosan (D.A. 0%)	○	○
chitosan (D.A. 30%)	○	△
colloidal chitin	×	×
glycol chitin	×	×
GlcN oligomer	○ (≥ pentamer)	○
GlcNAc oligomer	×	×
Reaction products	trimer (dimer, tetramer)	monomer
Reaction mechanism	endo-type	exo-type
Optimum pH	5.5	5.5
Optimum temperature	50°C	50°C

Table 1. Properties of two chitosan-degrading enzymes from *A. oryzae* IAM2660

報告のある菌類キトサナーゼ一次配列を基にプライマーを設計した。IAM2660 株染色体 DNA を鋳型とした PCR を行い、増幅断片をプローブとして IAM2660 株ゲノムライブラリーより全長キトサナーゼ遺伝子を含むクローンを選択し塩基配列を決定した。その結果、糸状菌キトサナーゼの一次配列は互いに保存されており、細菌キトサナーゼとは起源を異にすることが明らかとなった。

## 4. 結論

強力なキトサン分解活性を示した麹菌 *A. oryzae* IAM2660 株の培養上清より 2 種類の酵素、キトサナーゼ (エンド型) と  $\beta$ -グルコサミニダーゼ (エキソ型) を精製した。両酵素ともに部分アセチル化を受けたキトサンを分解することよりオリゴ糖生産への利用が期待でき、現在試験中である。また、キトサナーゼ遺伝子を単離できたことから、遺伝子工学的的手法により酵素の機能や安定性の改良を検討したい。