[農化 第 52 卷, 第 9 号, p.355~360, 1978]

タンパク質分解菌 *Pseudomonas maltophilia* を用いたクルマエビ甲皮からのキチンの精製

池田正彦, 島原健三

(成蹊大学工学部工業化学科)

昭和 53 年 3 月 22 日 受 理

Purification of Chitin from Carapace of *Penaeus japonicus*
by a Proteolytic Bacterium, *Pseudomonas maltophilia*

Masahiko IKEDA and Kenzo SHIMAHARA

Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
Seikei University, Musashino-shi, Tokyo

From 134 samples of soil and water, 224 strains, which utilized protein, but not chitin, in the carapace of *Penaeus japonicus*, were isolated. The strain LC 102, possessing the highest proteolytic activity, was identified as *Pseudomonas maltophilia*. After shaking cultivation of strain LC 102 was carried out at 30°C and pH 7.0 for 10 days in a medium prepared with K_2HPO_4 and the decalcified carapace, the protein content of the carapace was reduced from 18.6% to 0.1% or less. Deacetylation of chitin in the carapace was not observed. On the other hand, about 14% of chitin was deacetylated when the carapace was deproteinized by Hackman's method, *i.e.*, treatment in a 1N NaOH solution at its boiling point for 36 hr. Viscometric data of alkali chitin solutions indicated that the molecular weight of chitin prepared by shaking cultivation was larger than that of the polymer prepared by Hackman's method. It was concluded, therefore, that the deproteinization by strain LC 102 is preferable to Hackman's method to isolate the polymer having less modified structure.

(Received March 22, 1978)

緒 言

キチンは、おもに節足動物の外骨核、糸状菌の細胞壁等として天然に広く分布する、N-アセチル-D-グルコサミンが β (1, 4) グリコシド結合した多糖類であり、機能性高分子として注目をあびている。キチンは生体中ではふつうタンパク質と結合しており、また一般に原料として用いられる甲殻類の甲皮ではさらに炭酸カルシウム等の無機塩が加わっているため、現在、塩酸または EDTA で炭酸カルシウムを除いたのち、希水酸化ナトリウムまたは濃ギ酸でタンパク質を加水分解する精製法⁽¹⁻³⁾が通常行なわれている。しかし、これらの精製過程では脱アセチル、解重合等の変化がおり、得られた物質は天然のままのキチンとはいくぶん異なっていると考えら

れている⁽⁴⁻⁶⁾。武田と阿部⁽⁷⁾および武田と勝浦⁽⁸⁾は、EDTA で脱カルシウムしたタラバガニ甲皮に、タンパク質分解酵素を作用させる精製法を試みたが、タンパク質を完全に除去することができなかった。著者らは、キチンの精製にタンパク質分解菌を利用することを考え、塩酸で脱カルシウムしたクルマエビ甲皮に存在するタンパク質を唯一の炭素源および窒素源とする培地を用いて、強力なタンパク質分解酵素を生産する細菌の検索、分離を行った。その発育菌体を用いてクルマエビ甲皮のタンパク質を分解除去したところ、通常精製法である Hackman のアルカリ加水分解法⁽¹⁾、すなわち 1N 水酸化ナトリウムで 100°C, 36 hr 処理した場合よりも天然の状態に近いと考えられるキチンが得られたので、報告する。

実験方法

1. 培養 培地は、水道水を用いて調製した 0.2% リン酸水素二カリウム溶液に次項で述べる脱カルシウム甲皮を加えたものを用いた。甲皮の添加量は、試験管またはL字管の場合は、培地 10 ml 当り 1 片 (約 25 mg)、振盪フラスコの場合は、培地 80 ml 当り 0.8 g である。培養温度は、特記せぬかぎり 30°C とした。振盪はL字管の場合は振幅 2 cm, 56 strokes per min, 振盪フラスコの場合は振幅 7 cm, 128 strokes per min の往復式で行なった。培地の pH はそれぞれの項で述べる。

2. 脱カルシウム甲皮および精製キチンの調製 クルマエビ (*Penaeus japonicus*) の甲皮を Hackman の方法⁽¹⁾に従って調製した。以下、最初 2 N 塩酸によって炭酸カルシウムを除いたものを脱カルシウム甲皮、それを 1 N 水酸化ナトリウム中で 100°C, 36 時間処理したのち充分水洗したものをアルカリ処理キチンと称する。一方、細菌を用いた精製はつぎのように行なった。つまり、後述の *Pseudomonas maltophilia* LC 102 株を前項の培地 (pH 7.0) を用いて、30°C で 10 日間フラスコによる振盪培養を行ない、残ったキチン片は高圧滅菌後充分に水洗した。この方法によって得られた精製キチンは、以下、細菌処理キチンと称する。なお、甲皮、キチンとも、次項以下の分析に供するときは擂潰機を用いて 200 メッシュ以下の粉末とした。

3. タンパク質含量の測定 窒素分析は島津製作所製アプトメーターを用いて、強リン酸-ヨウ素酸分解法⁽⁹⁻¹²⁾によって行ない、その測定値から、キチンおよびタンパク質の窒素含量を 6.89% および 16.0% とし、タンパク質含量を計算した。しかし、菌株の検索の段階では多数の試料の処理が必要なので、つぎの方法でタンパク質含量を推定した。すなわち、培養後の試料片を充分水洗したのち、試料 1 片に対して 10 N 水酸化ナトリウム溶液 20 ml を加え、2 時間煮沸し、塩酸で中和、全量を 100 ml に希釈、その 4 ml に 0.3% ニンヒドリン溶液 1 ml を加えて煮沸、3 分間放冷した。そして、そのときの呈色の程度を同じ方法で発色させた濃度既知のカゼイン溶液と肉眼的に比較し、試料の残存タンパク質含量を推定した。

4. アセチル含量の測定 アセチル基は Elek と Harte のヨウ素滴定法⁽¹³⁾を用いて定量した。脱アセチルの程度はこの測定値から、N-アセチル-D-グルコサミン

残基と D-グルコサミン残基の総数に対する後者の百分比として算出した。

5. アルカリキチン溶液の調製と粘度測定 200 メッシュ以下に粉碎したキチン試料を Sannan⁽¹⁴⁾の方法で 40 wt % 水酸化ナトリウム溶液に溶解し、最終的にキチン濃度 0.4%, アルカリ濃度 10% となるようにアルカリキチン溶液を調製した。この溶液は調製後ただちに G-3 のガラスフィルターで汙過し、汙液の粘度をウペローデ型粘度計を用いて、25°C で測定した。

6. X線回折 理学電機製 GF-S 型の装置を使用し、Ni でフィルターした CuK α 線を用いて、粉末法で $2\theta=45\sim5^\circ$ まで測定した。

7. 赤外吸収スペクトル 日本分光製 IR-G 型装置を用い、KBr 錠剤法で測定した。

8. 同定 分離菌株の細菌学的特性の試験は、常法⁽¹⁵⁻¹⁷⁾によった。同定は、主として Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (第8版)⁽¹⁸⁾の記載に従って行なった。

結果および考察

1. 高活性タンパク質分解菌の検索および分離

分離源には、東京都および神奈川県において採取した河川、田畑等の水および土壌計 134 試料を用いた。これらの試料を脱カルシウム甲皮を唯一の炭素源および窒素源とする培地に投入し、pH 6.0, 7.0, 8.0 および温度 23°C, 30°C を組合せた各種条件下で数代静置培養をくり返し、混濁の認められた培養については普通寒天培地で平板分離を行なった。ついで、平板上の代表的なコロニーは、脱カルシウム甲皮片をリン酸水素二カリウム溶液に半分浸るようにガラス製毛細管で吊した培地に接種して静地培養を行ない、甲皮片を切断または溶解した菌株 (これらはキチナーゼを生産しキチンを解重合させるものと考えられる) は、混濁の認められなかった菌株とともに途中で廃棄し、キチンの解重合はおこさずタンパク質のみを分解する菌株 224 株を得た。つぎに、この 224 株の中からタンパク分解能のすぐれた菌株を選択するために、L字管を用いて 4 日間振盪培養し、脱カルシウム甲皮片中に残存するタンパク質量を、ニンヒドリンの呈色によって推定した。この結果、残存タンパク質量のもっとも少ない菌株として、LC 102, LC 422, LA 311 の 3 株が得られた。これらはいずれも pH 8.0, 30°C で分離された菌株である。Fig. 1 は、これら 3 菌株を pH 8.0,

Fig. 1. Time Courses of Deproteinization of the Decalcified Carapace by Shaking Cultivation at 30°C, pH 8.0. ●, strain LC 102; ○, LC 422; ▲, LA 311.

Table I. Deacetylation of Purified Chitins Prepared by Shaking Cultivation for 12 days at 30°C, pH 8.0

Strain	Deacetylation (%)
LC 102	0.6
LC 422	4.0
LA 311	1.9

30°C でフラスコ振盪培養したときのタンパク質含量の経日変化を示す。LC 102 株は、他の 2 株に比して、脱タンパクの速さおよび脱タンパク率においてすぐれていた。この菌株は、脱カルシウム甲皮中に存在するタンパク質を 6 日間で 1% 以下にし、9 日間でほとんど完全に除去することができた。Table I はフラスコ振盪培養で得られた標品のアセチル基の分析結果である。各菌株によるキチンの脱アセチルの程度はいずれも 0 ではなく、また菌株間でバラツキがみられるが、これは、甲殻類起源のキチンは天然に存在しているときからすでに部分的な脱アセチルがおこっていること⁽¹⁹⁾(Fig. 3 をも参照)、天然物であるため試料間にかかなりのバラツキがあること、および分析誤差によるものであろう。この脱アセチ

Table II. Description of Strain LC 102

Rods, 0.8 to 0.9 by 2.4 to 2.8 μm , occurring singly. Motile with 1 to 3 polar flagella. Gram-negative.

Agar colonies: Circular, convex, entire, yellow.

Agar slant: Growth filiform.

Broth: Turbid, with ring and sediment.

Neither fluorescent pigments nor pyocyanine produced.

Poly- β -hydroxybutyrate not accumulated.

Gelatin stab: Stratiform liquefaction.

Starch not hydrolyzed.

Oxidase reaction negative.

Catalase positive.

Denitrification not occurred.

Nitrate reduced to nitrite.

Methyl red test negative.

Voges-Proskauer test negative.

Hydrogen sulfide produced.

Indole not produced.

Methionine required as the only organic growth factor.

Kinds of carbon sources utilized for growth (in the presence of methionine): Glucose, lactose, maltose, trehalose, mannose, cellobiose, Tween 80.

Kinds of carbon sources not utilized for growth (in the presence of methionine): Mannitol, ethanol, glycerol, L-histidine, DL- β -hydroxybutyrate.

Obligately aerobic.

Optimum temperature for growth: 30 to 35°C.

No growth at 5 and 40°C. Grows well at pH 5 to 10.

Isolated from garden soil in Musashino-shi, Tokyo.

ルが各菌株の生産する酵素にもとづくと考えするには、脱アセチルの程度が少なく、かつ再現性にも乏しすぎる(たとえば、LC 102 株を用いた別の実験では、脱アセチル 2.8% という値も得られた)。以上要するに、脱タンパクにおいてもっともすぐれ、脱アセチルに関与しない菌株として LC 102 株を得たわけであり、以下の実験にはこれを用いた。本菌株は東京都武蔵野市の庭の土壌から分離された菌株である。

2. LC 102 株の同定

LC 102 株の形態学的ならびに生化学的試験の結果を Table II に示す。本菌株は、硝酸塩を還元する点およびヒスチジンを利用しない点が一致しないが、メチオニン を唯一の growth factor とすること、オキシンダーゼ反

Fig. 2. Relation between pH and Removal of Protein by Shaking Cultivation of Strain LC 102 for 10 days at 30°C.

応が陰性であること、等、主要な分類基準はすべて一致しているので、*Pseudomonas maltophilia* Hugh and Ryschenkow と同定することがもっとも妥当とおもわれる。

3. LC 102 株による脱タンパクのための至適 pH

LC 102 株を用いて、pH 5~10 まで変えて 10 日間振盪培養したときのタンパク質除去率を Fig. 2 に示す。脱タンパクのための至適 pH は 7~8 付近と考えられる。以後、培養はすべて pH 7.0 で行なうことにした。

4. アルカリ処理における脱カルシウム甲皮のタンパク質含量およびキチンのアセチル含量の変化

細菌処理キチンとの比較のため、200 メッシュ以下に粉碎した脱カルシウム甲皮を 1N 水酸化ナトリウム溶液中で 100°C に加熱し、経時的に採取して、タンパク質含量および脱アセチルの程度を分析した (Fig. 3)。アルカリ処理時間 0 すなわち塩酸で処理しただけの甲皮においても、すでに 2% 程度の脱アセチルが認められた。変態、成長の過程で脱皮を伴う甲殻類起源のキチンは、天然に存在しているときから部分的に脱アセチルされているといわれている⁽¹⁹⁾。アルカリ処理中の脱アセチルは、煮沸 10 時間以降急速に進行し、Hackman 法の通常の処理時間である 36 時間目には 14% 程度の脱アセチルが認められた。一方、タンパク質の加水分解はアルカリ

Fig. 3. Time Courses of Alkaline Hydrolysis of the Decalcified Carapace in 1N NaOH Solution at 100°C. ●, protein content; ○, deacetylation.

Table III. Viscosities of Various Alkali Chitin Solutions

Method of deproteinization	Viscosity efflux time (sec)
Alkaline hydrolysis for 12 hr ^a	310 to 319
Alkaline hydrolysis for 36 hr ^{a,b}	262 to 276
Hydrolysis by strain LC 102 for 10 days ^c	311 to 316

Purified chitins were prepared by various methods.

^a in a 1N NaOH solution at its boiling point, ^b the method described by Hackman⁽¹⁾, ^c shaking cultivation at 30°C.

処理 6 時間までに急激に行なわれ、以後徐々に進行して、36 時間目においては完全にタンパク質が除去された。

5. 細菌処理キチンの性状および本法と他の精製法との比較

Pseudomonas maltophilia を用い、30°C で 10 日間フラスコ振盪培養して得られたキチンのタンパク質含量は 0.1% であった。また、この細菌処理キチンは原料に比して脱アセチルが進んでいないことは 1 項で述べたとおりである。一方、Fig. 3 に示したアルカリで 36 時間処理したキチンでは 14% 程度の脱アセチルが起きていた。

つぎに、細菌処理キチンおよびアルカリ処理キチン

Fig. 4. X-ray Diffraction Patterns of Purified Chitins (by the powder method with the use of nickel-filtered $\text{CuK}\alpha$ radiation). A, Chitin prepared by use of strain LC 102; B, Chitin prepared by Hackman's method; C, Decalcified carapace (containing 20.8% of protein).

(12 時間および 36 時間) を用いて調製したアルカリキチン溶液の粘度測定の結果を Table III に示す。キチンの解重合はアルカリキチン溶液調製の間にもおこっている可能性があるが、各試料とも同じ条件で調製したものであるから、粘度の相違はアルカリ溶液中に存在しているキチンの重合度の差だけでなく、溶解前の各キチン標品の重合度の相違を示しているものとおもわれる。36 時間のアルカリ処理キチンではおそらくある程度重合度が低下しているのであろう。細菌処理キチンの重合度はこれよりも高いが、LC 102 株はキチナーゼ生産菌を排除するような検索方法で分離された菌であるから、細菌処理キチンにおいては解重合がおこっているとは考えにくい。

Fig. 4 は細菌処理キチン、アルカリ 36 時間処理キチンおよび脱カルシウム甲皮の X 線回折図である。これら 3 試料とも結晶性を有しているが、 $2\theta=9^\circ$ 付近のピークの面積を比較すると、前 2 者の結晶性はほぼ等しく、脱カルシウム甲皮のそれはやや劣るようである。本図からみれば、クルマエビの脱カルシウム甲皮は脱タンパク質されることによって処理方法の種類にかかわらず結晶性

Fig. 5. IR spectra of purified chitins (in KBr). A, Chitin prepared by use of strain LC 102; B, Chitin prepared by Hackman's method.

を増している。また、細菌処理とアルカリ処理キチンは脱アセチルの程度において 10% 程度の差があったが、ほぼ等しい結晶性を有していた。この点については、他の精製法によるものとあわせて今後少しく検討するつもりである。Fig. 5 は細菌処理キチンおよびアルカリ 36 時間処理キチンの赤外吸収スペクトルである。細菌処理キチン、アルカリ処理キチンともこの物質に特有な 1650 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1550 cm^{-1} (N-H) 付近の吸収⁽²⁰⁾を示しており、両者の間にはとくに差は認められない。

以上の結果から、LC 102 株による精製法は Hackman のアルカリ 36 時間処理による精製法よりも、重合度とアセチル基含量において天然に近いキチンが得られることが明らかである。前者は後者に比して著しく長い処理時間を要するが、この 10 日間という長さは、原料キチンを粉末にすることや培養条件を改良することによって、多少は短縮することが可能であろう。なお、12 時間のアルカリ処理によって得られたキチンは 36 時間処理のものに比して当然天然の形に近いが、脱アセチルがある程度進行していることとタンパク質が多少残存していることの点で、細菌処理キチンよりも劣っているといえよう。

前述のように、武田らはタンパク質分解酵素 (papain, Pronase-P 等) を用いてタラバガニ甲皮中のタンパク質の除去を試みている。しかし、Pronase-P を用いた場合でも 1 種の酵素による処理だけではタンパク質含量を 2% 以下に低下させることは不可能であり、これらの酵素処理を組合せてはじめてタンパク質含量を 1% 以下まで低下させることができた。それに比して本研究の LC

102株による精製は処理時間は長くなるが、単一の操作によってほとんど完全にタンパク質を除去することができる。武田と阿部⁽⁷⁾はタラバガニ甲皮に含まれるタンパク質には分解の難易度の異なる2種類があると推定している。武田と勝浦⁽⁸⁾の2種類の酵素の組合せによる実験の結果は、上の推定と対応するものであろう。本研究の場合は、原料がクルマエビ甲皮であるので単純に比較することは不可能であるが、LC 102株が複数のタンパク質分解酵素を生産し、それらの協同作用によってすぐれた脱タンパク率が得られているのかもしれない。この菌株の生産する酵素の甲殻類甲皮に対する作用機構は、今後検討を要するところであらう。

要 約

1. クルマエビ甲皮中のタンパク質を唯一の炭素源および窒素源として発育し、かつキチナーゼを生産しない細菌を、水、土壌計134試料について検索し、タンパク分解能のもっとも高い菌株として、東京都武蔵野市の庭の土壌からLC 102株を分離した。この菌株の、甲皮からのタンパク質分解のための至適pHは、7~8付近であった。

2. LC 102株は、*Pseudomonas maltophilia*と同定された。

3. 炭酸カルシウムを除いたクルマエビ甲皮を1%添加した0.2%リン酸水素二カリウム水溶液(pH 7.0)を培地として、LC 102株を30°Cで10日間振盪培養したところ、甲皮中のタンパク質はほとんど完全に除去された。また、原料甲皮中のキチンに比して脱アセチル反応の進行は見られず、1N水酸化ナトリウム溶液中で100°C、36時間加熱してタンパク質を除去したときよりも脱アセチルの程度の少ないキチンを得ることができた。両方法によって精製したキチンを濃水酸化ナトリウム溶液に溶解し、粘度を比較したところ、LC 102株を用いて精製したキチンの方が高い粘度を示し、したがって重合度が高いものと推定された。

4. 前項の結果から、LC 102株を用いた生物化学的精製法は、通常行なわれているアルカリ溶液中で加熱する精製法に比して、処理時間は長くなるが、より天然に近い状態のキチンを得るのに適した方法であると結論

した。

本研究に関して、ご教示、ご討論いただいた東京水産大学佐伯和昭氏、成蹊大学小倉勝幸博士、栗田恵輔博士、秀島正明氏、山南隆徳氏、実験にご協力いただいた成蹊大学岩上通浩氏、岡野雅司氏、高岡裕明氏に深く感謝する。

- (1) R. H. Hackman: *Aust. J. Biol. Sci.*, **13**, 568 (1960).
- (2) S. T. Horowitz, S. Roseman and H. J. Blumenthal: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046 (1957).
- (3) A. B. Foster and R. H. Hackman: *Nature*, **180**, 40 (1957).
- (4) A. B. Foster and J. M. Webber: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **15**, 378 (1960).
- (5) A. G. Richards: "The Integument of Arthropods," University of Minnesota Press, Minneapolis, Minn., 1951, p.9.
- (6) R. H. Hackman: *Aust. J. Biol. Sci.*, **15**, 526 (1963).
- (7) 武田道夫, 阿部栄善: 水産大学校研究報告, **11**, 399 (1962).
- (8) 武田道夫, 勝浦 洋: 水産大学校研究報告, **13**, 109 (1964).
- (9) 木羽敏泰: 分析化学, **9**, 651 (1960).
- (10) 高木友雄, 本多次徳: 分析化学, **11**, 286 (1962).
- (11) 高木友雄, 林 永: 日化, **78**, 445 (1957).
- (12) 瀬戸寿太郎: 分析化学, **9**, 669 (1960).
- (13) A. Elek and R. A. Harte: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **8**, 267 (1936).
- (14) T. Sannan, K. Kurita and Y. Iwakura: *Makromol. Chem.*, **176**, 1191 (1975).
- (15) 長谷川武治: 微生物の分類と同定, 東大出版会, 1975, p.203.
- (16) H. J. Conn, M. W. Jennison and O. B. Weeks: "Manual of Microbiological Methods," McGraw-Hill Book Co., New York, 1957, p.148.
- (17) R. Y. Stanier, N. J. Palleroni and M. Doudoroff: *J. Gen. Microbiol.*, **43**, 175 (1966).
- (18) R. E. Buchanan and N. E. Gibbons: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- (19) R. A. A. Muzzarelli: "Natural Chelating Polymer," Pergamon Press, New York, 1973, p.85.
- (20) R. A. A. Muzzarelli: *ibid.*, p.120.