報 文

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol. 62, No. 10, pp. 1463~1469, 1988]

Absidia 属におけるキトサンの分布および性状

小林 丘, 滝口泰之, 島原健三, 山南隆徳*

(成蹊大学工学部工業化学科, *大日精化工業株式会社)

昭和 63 年 3 月 9 日 受 理

Distribution of Chitosan in *Absidia* Strains and Some Properties of the Chitosan Isolated

Takashi KOBAYASHI, Yasuyuki TAKIGUCHI, Kenzo SHIMAHARA
and Takanori SANNAN*

Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Seikei University,
Musashino-shi, Tokyo 180

*Dainichiseika Color and Chemicals Mfg. Co., Horinouchi,
Adachi-ku, Tokyo 123

Thirty-six authentic strains of *Absidia* were cultivated on a rotary shaker in a medium containing glucose, peptone, yeast extract and inorganic salts for 44 hr at 24°C. The harvested mycelium of each strain was treated with hot 2% sodium hydroxide to isolate the alkali-insoluble materials. The extraction of chitosan from the alkali-insoluble materials was carried out with 2% acetic acid at room temperature. The yield of chitosan varied from 10 to 244 mg per flask (containing 200 ml of medium) depending on the strain. The degree of deacetylation of the chitosan preparation was from 79 to 91%. The viscosity of 0.1% solution (in 0.5% acetic acid) of the preparation was from 2.2 to 6.1 cP. *Absidia butleri* HUT 1001 produced a relatively large amount of chitosan which exhibited the highest viscosity. Its molecular weight was determined to be 1.2×10^6 which was approximately identical to that of crab-shell chitosan.

(Received March 9, 1988)

緒 言

近年, 機能性高分子材料として注目を集めているキトサンは, グルコサミンの β -(1,4)-結合した多糖で, 工業的にはカニ殻やエビ殻を酸およびアルカリで脱灰および除タンパクすることにより単離したキチン⁽¹⁾を, さらに熱濃アルカリで脱アセチル化する⁽²⁾ことにより調製されている。ところが, 原料となるカニ殻やエビ殻は収集, 保存が容易ではなく⁽³⁾, その価格も漁獲量などによって大きく変動する。さらにキチンおよびキトサン製造工程での高 BOD 廃水は河川や海洋の汚染源として問題になりつつある。

一方, Mucoraceae 科に属する糸状菌の細胞壁にはキ

チンとともにかなりの量のキトサンが含まれていることが Bartnicki-Garcia ら⁽⁴⁾によって報告されている。これらを大量培養し, そこからキトサンを抽出する方法は, カニ殻やエビ殻から調製する場合に比べ, 脱灰および脱アセチルなどの工程が省略でき, また均質な製品の獲得が期待できるから, キトサンを大量に蓄積する菌株と培養条件が見出されるならば, キトサンの新しい製造法となりうる可能性がある。このような糸状菌の培養によるキトサンの調製法の研究は, White ら⁽⁵⁾が *Mucor rouxii* を, McGahren ら⁽⁶⁾が *Absidia coerulea* を用いて行っているが, かならずしも系統的, 網羅的な検討が行われてきたとはいえない。そこで著者らは, 細胞壁にキトサンを含むと報告されている接合菌類 Mucora-

ceae 科⁽⁶⁾を取り上げ、それに属する諸菌株の細胞壁アルカリ不溶物質のキトサン含量および抽出されたキトサンの性状を網羅的に検討することを試みた。本報では *Absidia* 属 36 株についての結果を報告する。

なお、Bartnicki-Garcia は糸状菌の分類と細胞壁の構成成分との関連について報告を行っている⁽⁴⁾が、対象とされた菌株数はかならずしも多くない。本研究のような細胞壁の組成に関する網羅的な検討は、分類学上からみても意義があると考えられる。

実験方法

1. 菌株 国内の大学および研究機関より分与された *Absidia* 属 36 菌株を用いた。

2. 培養 前培養は酵母エキス (Difco) を 0.3% 補強したポテトデキストロース寒天 (栄研化学) 斜面を用い、24°C で培養、胞子が十分着生したところで、その一白金鈎を本培養培地に接種した。本培養は、水道水 1 l に対し、グルコース 20 g、ペプトン (大五栄養化学、ポリペプトン) 10 g、酵母エキス (Difco) 1 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g、 K_2HPO_4 1 g、NaCl 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g および $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g を溶解、pH を 4.5 に調整した培地 200 ml を 500 ml 三角フラスコに分注し、24°C で振幅 5 cm、150 rpm の回転振盪培養を行った。

3. 乾燥菌体量 培養液を 1 G 3-ガラスフィルターで濾過し、集めた菌体を十分水洗し、減圧下で恒量になるまで乾燥して秤量した。

4. キトサンの抽出 細胞壁成分は Fig. 1 に従って分画した。すなわち、培養液を 1 G 3-ガラスフィルターで濾過して得られた菌体を、2% 水酸化ナトリウム水溶液 50 ml 中で 115°C、1 時間アルカリ処理し、12,000 × g、12 分間の遠心分離で分離してアルカリ不溶物質を得た。これを遠心分離で 1 回水洗し、2% 酢酸 50 ml 中で室温 30 分間攪拌して可溶部分を抽出した。この残渣をもう一度同条件で抽出し、残留物を水洗、減圧下で恒量になるまで乾燥して秤量した。(以下、これを残渣量という。) この残渣には、キチンその他の多糖が含まれるものと思われる⁽⁴⁾。一方、2 回分の抽出液を合わせて桐山 No. 4 の濾紙で濾過後、5 N 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 8.5 に調節して析出したものを水洗、減圧下で恒量になるまで乾燥、秤量した。この酢酸抽出物は、結果および考察に述べるように、ほぼ純粋なキトサンであると考えられる。また、数回の実験から

Fig. 1. Fractionation Method of Mycelium. Each of *Absidia* strains was incubated at 24°C for 44 hr on a rotary shaker in the medium (pH 4.5) containing following components (g/liter of tap water): glucose 20, peptone 10, yeast extract 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, K_2HPO_4 1, NaCl 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1. The "washing"s in the parentheses were omitted in the experiments given in Table IV.

キトサン量と残渣量の合計とアルカリ不溶物質量との差は 10% 以内であったので、アルカリ不溶物質量はキトサン量と残渣量の合計重量より求めた。なお、第一次選択の実験では操作簡略化のため Fig. 1 の括弧で示した洗浄操作は省略した。

5. 粘度 粘度は 0.5% 酢酸を溶媒として、キトサンの 0.1% 溶液を室温で 2~3 時間攪拌して調製し、20°C で B 型粘度計 (東京計器製, BL 型) を用いて測定した。

6. 赤外吸収スペクトル 赤外吸収スペクトル (以下、IR と記す) は、日本分光 IR-G 型赤外吸収分光光度計を用い、薄膜法により測定した。キトサンの薄膜は、1% のキトサンを含む 0.5% 酢酸溶液をガラス板上で乾燥させた後エタノール中で膨潤させ、剝離した後デシケーター中でアンモニアにより試料中の酢酸を中和、交換水で洗浄後減圧乾燥させて調製した⁽⁷⁾。

7. 脱アセチル度 脱アセチル度は、一般には山南ら⁽⁸⁾の IR 法を用いて求めたが、一部の試料については、コロイド滴定法も併用した。すなわち、0.5% 酢酸溶液にキトサンを 0.5% となるように溶解し、一晚放置

後2時間攪拌した。これを10倍に希釈したものから10mlをとり、水90mlを加えて0.1% トリイジンプルを指示薬とし、N/400 ポリビニル硫酸カリウム溶液で滴定した。脱アセチル度 (DDA) はその滴定値 (A ml) から (1) 式より求めた。

$$\text{DDA (\%)} = 80.5 \times A \times f \quad (1)$$

ただし、 f は N/400 ポリビニル硫酸カリウムの力価である。

8. 分子量 ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー (GPC) により測定した。すなわち、東曹-CP-8000 および東曹-TSK gel GMPWXL を用いて、0.5 M 酢酸緩衝液を溶離液とし、流速 0.5 ml/min, 35°C でクロマトグラフィーを行い、分子量既知のキトサン試料から得られた検量線より分子量を算出した。ただし、標準試料はレーザー散乱により分子量を求めた。また、キトサン試料を 0.2 M 酢酸-0.1 M NaCl-4 M 尿素水溶液に溶解し、ウペローデ型粘度計を用いて 25°C の極限粘度を求め、Lee⁽⁹⁾ により提唱された (2) 式により分子量を算出した。

$$[\eta] = 8.93 \times 10^{-4} M_w^{0.71} \quad (2)$$

ここで $[\eta]$ は極限粘度、 M_w は分子量を示す。

9. 甲殻類キトサン 甲殻類起源のキトサンとしては、カニ起源のものとして大日精化ダイキトサン VH、エビ起源のものとして加ト吉の製品を用いた。

結果および考察

1. 菌体の分画方法の検討

Absidia butleri HUT 1001 および *Absidia glauca* var. *paradoxa* NRIC 1183 の 44 時間培養菌体を用いて、分画方法の検討を行った。Fig. 1 に示す操作のうち

アルカリ処理の温度および時間を変えた結果を Table I に示す。反応は、40~100°C については水浴、115°C についてはオートクレーブを用いて行った。Table I に見られるように、低温ではアルカリ可溶分の抽出が不十

Table II. Effect of the Duration and Repetition of Acid Treatment on the Chitosan Extractability from the Alkali-insoluble Materials of the *Absidia glauca* var. *paradoxa* NRIC 1183 Mycelia

Duration × Repetition (min × times)	Alkali-insoluble materials (A) mg/200 ml	Chitosan (B) mg/200 ml	Yield (B/A) %
60 × 1	400	188	47
30 × 2	382	204	53
60 × 2	400	215	54

The nonextractable material prepared from 44-hr culture by the method shown in Fig. 1 was agitated in 2% acetic acid at a room temperature.

Table III. Effect of the Kind of Acid on the Chitosan Extractability from the *Absidia butleri* HUT 1001 Mycelia

Acid	Alkali-insoluble materials (A) mg/200 ml	Chitosan (B) mg/200 ml	Yield (B/A) %
2% Acetic acid	416	180	43
2% HCl	346	148	43

The mycelia from 44-hr culture were fractionated by the method shown in Fig. 1 except for the kind of acid used.

Table I. Effect of the Conditions of Alkaline Treatment on the Deproteinization of and the Chitosan Extractability from the *Absidia butleri* HUT 1001 Mycelia

Temp. °C	Duration min	Alkali-insoluble materials (A) mg/200 ml	Chitosan (B) mg/200 ml	Yield (B/A) %	Viscosity cP
25	60	702	66	9	10.9
40	60	674	90	13	7.0
60	60	436	98	23	15.1
80	60	364	127	35	19.4
100	60	368	149	41	32.0
115	15	349	149	43	27.7
115	60	416	180	43	16.0

* The mycelia from 44-hr culture were allowed to stand in 2% NaOH solution and fractionated by the method shown in Fig. 1.

分であることが認められた。また、キトサンの収量も温度の上昇とともに増加した。以上の結果に基づき、アルカリ処理は以後、115°C、1時間で行うことにした。

酸による抽出の時間および回数を変えた場合の結果を Table II に示す。処理時間全体の長さが同じでも操作を分割したほうが抽出効果が高まるという結果が得られたので、以後の実験では2%酢酸を用い30 min ずつ2回の抽出を行うことにした。

Table III は2%酢酸を2% HCl におきかえた場合の、抽出効果の検討結果である。White らは *Mucor rouxii* ATCC 24905 の細胞壁物質からのキトサン抽出の際、1 N HCl を用いると10%酢酸を用いたときの2倍またはそれ以上が抽出されるとの結果を得ている⁽⁵⁾が、本実験の結果はこれとまったく異なっていた。また、酢酸の濃度を2~20%まで変えて抽出を行ったが、抽出されたキトサン量の変化はほとんどなかった。

Table IV. Yields and Some Properties of Chitosan from *Absidia* Strains

Strain ^a		Alkali-insoluble materials (A) mg/200 ml	Chitosan ^b (B) mg/200 ml	Yield (B/A) %	Vis. ^c cP	D. D. A. ^d %
<i>A. anomala</i>	NRIC 1161	222	107	48	3.7	83
<i>A. atrospora</i>	IFO 9471	13	10	77		
<i>A. blakesleeana</i>	NRIC 1164	119	49	41	2.9	
<i>A. butleri</i>	HUT 1001	375	189	50	6.1	89
<i>A. butleri</i>	HUT 1002	306	114	37	3.1	88
<i>A. butleri</i>	HUT 1003	306	159	52	3.4	86
<i>A. californica</i>	NRIC 1165	389	190	49	4.8	88
<i>A. coerulea</i>	IFO 4011	275	144	52	4.2	88
<i>A. corymbifera</i>	IFO 4009	129	52	40	2.2	
<i>A. cuneospora</i>	NRIC 1174	268	92	34	3.3	88
<i>A. cylindrospora</i>	IFO 4000	178	82	46	3.4	87
<i>A. fassatia</i>	NRIC 1177	253	135	54	2.8	91
<i>A. fusca</i>	NRIC 1179	43	35	81	2.3	
<i>A. ginsan</i>	AHU 9003	219	67	31	3.1	85
<i>A. glauca</i>	HUT 1020	287	106	37	4.9	84
<i>A. glauca</i>	IFO 4002	306	140	46	3.1	87
<i>A. glauca</i>	IFO 4003	340	168	49	2.9	89
<i>A. glauca</i>	NRIC 1180	293	137	47	4.4	88
<i>A. glauca</i>	NRIC 1181	318	129	41	5.1	89
<i>A. glauca</i> var. <i>paradoxa</i>	HUT 1022	308	144	47	4.3	83
<i>A. glauca</i> var. <i>paradoxa</i>	IFO 4007	328	184	56	4.6	90
<i>A. glauca</i> var. <i>paradoxa</i>	NRIC 1182	327	131	40	5.6	91
<i>A. glauca</i> var. <i>paradoxa</i>	NRIC 1183	430	244	57	4.2	85
<i>A. griseola</i>	IFO 9472	106	35	33		
<i>A. hesseltinii</i>	NRIC 1178	104	41	39	2.2	
<i>A. hyalospora</i>	IFO 8082	57	24	42		78
<i>A. japonica</i>	AHU 9006	475	218	46	5.5	87
<i>A. macrospora</i>	NRIC 1188	286	96	33	4.9	89
<i>A. orchidis</i>	HUT 1034	410	236	57	5.7	90
<i>A. pseudocylindrospora</i>	NRIC 1190	279	167	60	4.8	90
<i>A. ramosa</i>	IFO 8083	72	33	45		
<i>A. ramosa</i>	NRIC 1192	255	66	26	2.8	
<i>A. reflexa</i>	IFO 5874	81	30	38		
<i>A. repens</i>	NRIC 1195	458	203	44	4.2	90
<i>A. spinosa</i>	IFO 5873	134	75	56	2.7	90
<i>A. zychnae</i>	NRIC 1199	145	48	33	2.3	

^a A.: *Absidia*. ^b Small amount of CH₃COONa was contained. ^c Viscosity of 0.1% (in 0.5% acetic acid) solution measured at 20°C. ^d Degree of deacetylation evaluated from infrared absorption spectrum⁽⁸⁾. The mycelia from 44-hr culture were fractionated by the method shown in Fig. 1.

2. *Absidia* 属諸菌株のキトサン含量およびキトサンの性状

Table IV に *Absidia* 属 36 菌株の 44 時間培養菌体のアルカリ不溶物質量, キトサン量およびその含有率, 抽出されたキトサンの粘度および脱アセチル度を示す。アルカリ不溶物質量, キトサン量, キトサン含有率は種によって著しい差異があったが, 同一種における菌株ごとの差は *Absidia ramosa* の場合を除き, 比較的少なかった。また, 抽出されたキトサンの脱アセチル度はすべて約 80~90% でほぼ一定の範囲にあったが, 粘度は菌株ごとにかかなりの差が見られた。後者は, 抽出されたキトサンの重合度は菌株によってかなりの差があることを, 意味するものと思われる。これら 36 菌株のうちから, キトサン含量が高く, かつキトサン溶液の粘度も高いものとして, *Absidia butleri* HUT 1001, *Absidia californica* NRIC 1165, *Absidia glauca* NRIC 1181, *Absidia glauca* var. *paradoxa* NRIC 1182, *Absidia japonica* AHU 9006, *Absidia orchidis* HUT 1034 の 6 菌株を選択し, 次項の第二次選択に供した。なお, 今回はとりあげなかったが, *Absidia atrospora* IFO 9471 や *Absidia fusca* NRIC 1179 はアルカリ不溶物質量は少ないがそのキトサン含有率が高いので, 培養条件, 培養時間などを変えることによりアルカリ不溶物質量を増加させれば, キトサン量も増加する可能性はあるように思われる。今後検討を行いたい。

3. 優良菌株の選択

上述のように第一次選択で優良菌株 6 株を選択したが, この場合の実験では水洗を一部省略したため, キトサン中にいくらかの酢酸ナトリウムが含まれているものと考えられる。そこで 6 菌株について, 水洗を十分にしました実験を繰り返した。その結果を Table V に示す。キトサン量は平均 20% 前後減少したが, 粘度は 2~3 倍

に上昇した。これより Table IV に示したキトサン量は平均 20% の酢酸ナトリウムを含んでいることがわかった。また, 粘度が上昇したのは酢酸ナトリウムを除去したため粘度測定時のキトサンの見かけ上の濃度が上がったためと, イオン凝縮の効果⁽¹⁰⁾がなくなったためと思われる。

この 6 菌株のなかからキトサン収量の多さと, 粘度の高さから, *Absidia butleri* HUT 1001 を選択し, 以後の実験に用いた。

4. *Absidia butleri* HUT 1001 の培養経過

Fig. 2 に *Absidia butleri* HUT 1001 の振盪培養における乾燥菌体量, アルカリ不溶物質量, キトサン量の経時変化を示す。菌体量は 168 hr を頂点として以後減少し

Fig. 2. Incubation Profile of *Absidia butleri* HUT 1001 at 24°C. ○, Dry mycelial weight; ●, weight of alkali-insoluble materials; △, weight of extracted chitosan.

Table V. Yields and Some Properties of Chitosan from Some *Absidia* Strains (2nd Screening Test)

Strain		Alkali-insoluble materials (A) mg/200 ml	Chitosan (B) mg/200 ml	Yield (B/A) %	Vis. cP	D. D. A. %
<i>A. butleri</i>	HUT 1001	416	180	43	16.1	87
<i>A. californica</i>	NRIC 1165	352	137	49	9.4	87
<i>A. glauca</i>	NRIC 1181	334	140	42	10.6	86
<i>A. glauca</i> var. <i>paradoxa</i>	NRIC 1182	290	108	37	16.5	87
<i>A. japonica</i>	AHU 9006	275	124	45	8.4	86
<i>A. orchidis</i>	HUT 1034	328	163	50	16.9	87

See the legend of Table IV.

たのに対し、アルカリ不溶物質量はそれ以降も増加を続けた。一方、キトサン量の増加は培養初期において著しく、培養 100 hr 前後ではほぼ一定量に達し、その後は細胞壁の増加にかかわらず増加しなかった。

White らが *Mucor rouxii* をジャー型醗酵槽で培養した実験を行い、1 l 当りの乾燥菌体量 9~14 g、アルカリ不溶物質量 (White らは菌糸体を凍結乾燥後、粉碎し、2% NaOH 中 121°C、15 min 処理後の不溶物重量を基準に細胞壁含量を算出しているが、ここではアルカリ不溶物質量という表現を用いる) はその 16~22%、1 N HCl で 24 hr 抽出して得られるキトサンはアルカリ不溶物質量の 39% (10% 酢酸による抽出では 20%) という結果を報告している⁽⁸⁾。本実験はフラスコによる振盪培養であるが、最高値をこれと比較すると、乾燥菌体量で同程度、キトサン量で同程度ないし若干上回る程度の量が得られた。また、McGahren らの *Absidia coerulea* を用いた醗酵槽試験では、36 hr 培養で 18 g/l の乾燥菌体

が得られ、その 27% がキトサンであった、という報告がなされている⁽⁵⁾。

また、*Absidia butleri* HUT 1001 のアルカリ不溶物質を 50 w/w% 水酸化ナトリウム水溶液中で 127°C (オートクレーブ中)、1 時間処理したときのアルカリ不溶物質量、キトサン量、残渣量を Fig. 3 に示す。その結果、アルカリ不溶物質成分のほとんどが酢酸に可溶性キトサンとなったので、残渣の主成分はキチンであったと考えられる。しかし、酢酸不溶成分も培養時間とともに増加しており、細胞壁にはキチン、キトサン以外の多糖が含まれるものと思われる。

5. 酢酸可溶分画の同定

各菌株のアルカリ不溶物質から抽出された物質がキトサンであることの確認は、それぞれの IR とカニおよびエビ甲殻由来のキトサンの IR と比較することにより行った。どの菌から得られた抽出物もほぼ同一のパターンを示し、かつ甲殻類甲殻起源のものと本質的には一致していた。Fig. 4 に *Absidia butleri* HUT 1001, *Absidia glauca* var. *paradoxa* NRIC 1182, カニ甲殻 (大日精化製) およびエビ甲殻から得られたキトサンの IR を示

Fig. 3. Effect of Hot Alkaline Treatment on the Chitosan Extractability from Alkali-Insoluble Materials of *Absidia butleri* HUT 1001. The alkali-insoluble materials from the cultures of various incubation times were deacetylated with 50 w/w % NaOH at 127°C for 1 hr. The hydrolyzate mixture was filtrated by glass filter and washed with water, repeatedly. The residue was extracted with 2% acetic acid. Δ, Weight of the substances soluble to acetic acid (chitosan+deacetylated chitin); ▲, weight of the substance insoluble to 2% acetic acid; ●, sum of the above-mentioned substances (Δ+▲ hyphal wall).

Fig. 4. Infrared Absorption Spectra of Chitosan Films. The films were casted from acid solutions. Chitosan samples were prepared from crab shell (A), prawn shell (B) and alkali-insoluble materials of *Absidia glauca* var. *paradoxa* NRIC 1182 (C) and *Absidia butleri* HUT 1001 (D).

Table VI. Viscosities and Molecular Weights of Fungal and Crustacean Chitosan Preparations

Sample	Viscosity ^a cP	Molecular weight by	
		GPC ^b	Viscometry ^c
Fungal chitosan	20	1.2×10^6	7.0×10^5
Prawn-shell chitosan	34	4.0×10^5	9.5×10^5
Crab-shell chitosan	90	1.5×10^5	1.8×10^5

^a See the legend of Table IV.^b Determined by gel permeation chromatography.^c Determined by the method of Lee.

す。また, *Absidia butleri* HUT 1001 のキトサンの元素分析結果は C : 44.18, H : 5.95, N : 8.91 であり, 計算値 (C : 44.72, H : 6.83, N : 8.70) とほぼ一致した。

6. *Absidia butleri* HUT 1001 からのキトサンの性状

Table VI に *Absidia butleri* HUT 1001 キトサンの酢酸溶液の粘度と分子量とを, 甲殻類キトサンとの対比において示す。脱アセチル度を IR チャートおよびコロイド滴定から求めた結果, *Absidia butleri* HUT 1001 由来のキトサンはそれぞれ 86.8%, 90.7% でエビ甲殻由来のキトサンはそれぞれ 85.4%, 77.7% となった。酢酸溶液の粘度も甲殻類キトサンとほぼ同程度であった。

GPC 法で測定した *Absidia butleri* HUT 1001 由来のキトサンの分子量は 1.2×10^6 であった。カニ甲殻起源のキトサン (大日精化製) も 1.5×10^6 と同程度の分子量を示した。一方, 粘度法で測定した分子量では糸状菌由来のキトサンのほうがやや低い値を示した。

以上の結果を総合すると, *Absidia butleri* HUT 1001 から本実験の方法で得られたキトサンは, 重合度, 脱アセチル度ともに甲殻類甲殻起源のキトサンとほぼ同程度であると思われる。

要 約

Mucoraceae 科 *Absidia* 属の代表的な 36 菌株について

キトサン含量およびその性状を測定したところ, 培地 200 ml 当り概ね 100~400 mg のアルカリ不溶物質が得られ, その 40~50% がキトサンであった。キトサンは菌体を 2% 水酸化ナトリウム水溶液中, 115°C, 1 時間加熱することによりアルカリ処理を行い, さらに 2% 酢酸溶液中, 室温, 30 分間の攪拌を 2 回繰り返すことにより抽出された。これらのキトサンの脱アセチル度は約 80~90% の範囲にあった。

また, 優良菌株として選択した *Absidia butleri* HUT 1001 をグルコース, ペプトン, 酵母エキスおよび無機塩を含む培地で振盪培養したところ, 44 時間で培養液 200 ml 当り 150~200 mg のキトサンが得られた。このキトサンは, 脱アセチル度は約 90% で, 分子量は約 1.2×10^6 であった。また, 培養時間を延ばすとアルカリ不溶物質量は増大したが, キトサン量の変化はほとんどなかった。

- (1) R. A. A. Muzzarelli: "Chitin," Pergamon Press, Oxford, 1977, p. 90.
- (2) M. L. Wolf from, G. G. Maher and A. Chaney: *J. Org. Chem.*, **23**, 1990 (1958).
- (3) R. C. W. Berkeley: "Microbial Polysaccharides and Polysaccharases," Academic Press, New York, 1979, p. 212.
- (4) S. Bartnicki-Garcia: *Annu. Rev. Microbiol.*, **22**, 87 (1968).
- (5) S. A. White, P. R. Farina and I. Fulton: *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 323 (1979).
- (6) W. J. McGahren, G. A. Perkinson, J. A. Growich, R. A. Leese and G. A. Elléstad: *Proc. Biochem.*, **19**, 88 (1984).
- (7) 片岡清一, 安東忠直: 高分子論文集, **36**, 175 (1979).
- (8) T. Sannan, K. Kurita, K. Ogura and Y. Iwakura, *Polymer*, **19**, 458 (1978).
- (9) V. F. P. Lee: University of Washington 学位論文 (1974).
- (10) 社団法人高分子学会: "高分子科学の基礎", 東京化学同人, 1978, p. 95.