ノ ー ト

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol. 65, No. 11, pp. 1655~1658, 1991]

N, N'-ジアセチルキトビオース酸酵生産
においてコロイド状キチンの代替え
となるキチンの形態

滝口泰之*, 島原健三

(成蹊大学工学部, *現在, 信越化学工業株式会社)

平成 3 年 4 月 22 日 受 理

Forms of Chitin Substitutable for Colloidal
Chitin on Fermentative Production of
N, N'-Diacetylchitobiose

Yasuyuki TAKIGUCHI and Kenzo SHIMAHARA

Department of Industrial Chemistry, Faculty
of Engineering, Seikei University,

Musashino-shi, Tokyo 189

Colloidal chitin is the most suitable form of chitin for the production of *N, N'*-diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] by *Bacillus licheniformis* X-7u, but it is unsuitable for use in mass production because it is prepared with difficulty. We therefore sought forms of chitin that are easily prepared and that can be used instead of colloidal chitin. Chitin prepared by the soaking of chitin film from prawn pleon cuticle in 25% HCl at 20°C for 1 hr gave satisfactory results. When strain X-7u was cultivated with the HCl-swollen chitin, 5.1 g/l (GlcNAc)₂ accumulated within 4 days. The (GlcNAc)₂ yields based on the starting material, the chitin film, when HCl-swollen chitin and colloidal chitin were used were 32% and 35%, respectively.

(Received April 22, 1991)

著者らは、温泉より分離した好熱性細菌 *Bacillus licheniformis* X-7u がコロイド状キチンを唯一の炭素源とする培地で培養すると、多量の *N, N'*-ジアセチルキトビオース [(GlcNAc)₂] を蓄積することを見出した⁽¹⁾。この菌株は、最適培地 (コロイド状キチン 15 g/l, 酵母エキス 0.5 g/l, および無機塩, pH 7.0) で培養すると、フラスコ振盪培養では 50°C, 3.5 日間でコロイド状キチンからの変換率にして 63% の, 5 l ジャーフェーメンタ

ー培養では 50°C, 33 時間で 72% の (GlcNAc)₂ を生産する⁽²⁾。しかし、粉末状のキチンまたは未粉碎のキチン小片を用いるときは X-7u の発育はきわめて悪く、(GlcNAc)₂ への変換率も数% にすぎない⁽²⁾。著者らは、キチン形態の (GlcNAc)₂ 生産におよぼすこのような大きな差は、主としてキチンの結晶性の差に基づくもの、つまり、コロイド状キチンは調製の際いったん塩酸に溶かすため、結晶性が低下し、細菌による攻撃を受けやすくなるからであろうと推定した。

X-7u は上述のようにコロイド状キチンから (GlcNAc)₂ を高収率で蓄積するが、コロイド状キチンの調製に多くの時間と手間を要するので、工業的な大量生産のキチン源としては適さないと思われる。そこで著者らは、より簡単な方法で調製しうる種々の形態のキチンを用い、コロイド状キチンとの代替えの可能性を検討した。検討したキチンの形態は、1) 精製過程の一部を省略した、NaCl 含量の高いコロイド状キチン懸濁液 (以下、含 NaCl コロイド状キチンと称する)、2) エビの腹節の形状を保ったままで精製したフィルム状キチンを酸、アルカリ、有機溶剤などで膨潤させたもの (膨潤キチン)、および、3) キチン溶剤として知られている 5% 塩化リチウムを含む *N, N'*-ジメチルアセトアミド溶液 (LiCl/DMA)⁽³⁾ にキチンを溶解後、水中で固化させたビーズ状のもの (再沈キチン) である。培養はすべてフラスコ規模であり、特記しないかぎり前報⁽²⁾ の最適培地および培養条件において行い、通常のコロイド状キチンを用いた培養を対照として、これと比較した。キチン分解物の定量はすべて前報⁽²⁾ に準じた。

コロイド状キチンはキチン粉末を濃塩酸に溶解後、その溶液を多量の冷水に加えることで、キチンを微粒子状に析出させて調製する⁽⁴⁾が、使用した塩酸の除去に長時間を要する。たとえば、キチン 20 g より調製したコロイド状キチンを洗浄するのに、濾紙による吸引濾過とイオン交換水約 1 l への再懸濁を 5, 6 回繰り返さねばならず、通常の実験室で行うと塩酸の完全な除去に 10 時間以上が必要であった。そこで、調製に要する時間を短縮するために、洗浄操作の全部または一部を省略することによって得られる含 NaCl コロイド状キチンが通常のコロイド状キチンの代替えになりえるか否かを検討した。結果を Table I に示す。洗浄操作を省略したコロイド状キチン懸濁液は塩酸を含んでいるので、培地の調製にあたっては水酸化ナトリウムによって中和したものを用い

Table I. Relationship between Sodium Chloride Concentration of the Medium and (GlcNAc)₂ Production by *B. licheniformis* X-7 u

	Repetition times of washing			
	0	1	2	(Control) ^a 5
Yield of colloidal chitin (=A) (%) ^b	90	86	80	76
NaCl concentration in the medium (g/l)	139	11.7	4.7	0.5
Cultivation period (day) ^c	6	4	4	4
Concentration of (GlcNAc) ₂ (g/l)	0.5	4.5	4.8	9.6
Concentration of (GlcNAc) ₃ (g/l)	0.00	0.00	0.00	0.22
Concentration of GlcNAc (g/l)	0.00	0.62	0.51	0.00
Yield of (GlcNAc) ₂ (%) based on colloidal chitin, the substrate (=B)	3	28	30	61
based on chitin powder, the starting material (=A × B)	3	24	24	46

^a The composition of medium (g/l): colloidal chitin, 15; yeast extract, 0.5; Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 3.4; NH₄NO₃, 2; NaCl, 0.5; MgSO₄ · 7 H₂O, 0.5; CaCl₂ · 2 H₂O, 0.1 (pH 7.0).

^b Yield of colloidal chitin based on chitin powder, the starting material.

^c Cultivation period when the concentration of (GlcNAc)₂ reached to its maximum.

た。このため、0, 1 および 2 回洗浄しただけの標品を用いて調製した培地は NaCl 濃度が 139, 11.7 および 4.7 g/l もあり、最適培地の NaCl 含量 0.5 g/l と比べて著しく高かった。洗浄をまったく行わなかった含 NaCl コロイド状キチンを用いた培養では、発育は微弱で、(GlcNAc)₂ 生産もきわめて低かったが、1 および 2 回洗浄の含 NaCl コロイド状キチンを用いた場合には、発育は良好で、(GlcNAc)₂ の蓄積量は対照のそれぞれ 46 および 50% に達した。なお、洗浄回数が少ないと、コロイド状キチンの歩留りが上がるので、原料キチンに対する (GlcNAc)₂ の収率は上記の値より高くなり、1 および 2 回洗浄の場合とも、対照の 52% となる。このように X-7 u は NaCl 濃度が約 10 g/l 以下の場合には、かなりの量の (GlcNAc)₂ を蓄積した。しかし同時に、副生成物として GlcNAc が (GlcNAc)₂ の約 10% 生成した。この値は、対照の、通常のコロイド状キチンを用いた培養における副生成物量よりかなり大きい。

塩酸による膨潤キチンは次のように調製した。すなわち、クルマエビに近縁の *Penaeus affinis* の腹節部クチクラからその形状を保ったまま調製したフィルム状キチン⁽⁴⁾を 15, 20, 25 および 30 (w/v) % 塩酸中に 20°C で 1 時間浸漬、十分洗浄することによりフィルム状の膨潤キチンを調製した。これらの膨潤キチンを用いて培養した場合の (GlcNAc)₂ 蓄積の経日変化を Fig. 1 に示す。15 および 20% 塩酸で調製した膨潤キチンを用いた場合には (GlcNAc)₂ の蓄積は 0.3~0.6 g/l であり、対

Fig. 1. (GlcNAc)₂ Production from Various HCl-swollen Chitins by *B. licheniformis* X-7 u. HCl-swollen chitins were prepared by soaking prawn chitin in 15% (□), 20% (▲), 25% (●), and 30% (△) hydrochloric acid at 20°C for 1 hr. ■, Untreated prawn chitin; ○, colloidal chitin.

照の数%にすぎなかったのに対し、25% 塩酸による膨潤キチンを用いると、(GlcNAc)₂ の蓄積は 4.8 g/l、対照の 59% に達した。30% 塩酸による膨潤キチンを用いた場合も、ほぼ同様の結果が得られた。塩酸による膨潤キチンは、調製の際のキチンの損失がコロイド状キチンの場合より小さい。原料キチンに対する (GlcNAc)₂ の収率と比較すると、25% 塩酸による膨潤キチンでは、対照の 53% となった (Table II)。また、培養後、最初に添加した膨潤キチンの 30% が残留したが、この残留キ

Table II. (GlcNAc)₂ production from HCl-Swollen Chitin and DMA-Reprecipitated Chitin by *B. licheniformis* X-7 u

	HCl-swollen chitin films	DMA-reprecipitated chitin beads
Yield of treated chitin (%)	90	98
Cultivation period (day)	4	4
Concentration of (GlcNAc) ₂ (g/l)	5.1	5.9
Concentration of (GlcNAc) ₃ (g/l)	0.00	0.00
Concentration of GlcNAc (g/l)	0.03	0.12
Residual chitin (g/l) ^a	5.0	0.6
Yield of (GlcNAc) ₂ (%)		
based on treated chitin	32	37
based on starting material	29	37
based on consumed chitin ^b	42	38

^a Chitin remained in the culture broth after cultivation.^b Amount of chitin consumption was calculated as starting material minus residual chitin.

The others are the same as in Table I.

チンは回収後塩酸処理をすると、再使用が可能であった。なお、塩酸による膨潤キチンを用いたときの副生成物はいずれの場合も GlcNAc のみで、その濃度も (GlcNAc)₂ の 1% 以下と対照より低かった。

塩酸以外の試薬で膨潤させたキチンの検討結果は次のとおりであった。用いた試薬は 99% 酢酸⁽⁵⁾、ジクロロ酢酸-99% 酢酸 (29 : 71 (v/v))⁽⁵⁾、トリクロロ酢酸-酢酸 (80 : 20 (w/w))⁽⁶⁾、メタンスルホン酸-酢酸 (40 : 60 (v/v))⁽⁶⁾、42% (w/w) 水酸化ナトリウム水溶液⁽⁷⁾、ピリジン⁽⁸⁾であり、これらを用いてフィルム状キチンを 20°C で 1 時間処理、洗浄して膨潤キチンを調製した。これらをキチン源として培養を行ったところ、(GlcNAc)₂ の最大蓄積量はそれぞれ 3.0, 2.2, 1.9, 1.9, 2.1 および 0.5 g/l となった。これらの値は 25 または 30% 塩酸による膨潤キチンを用いた場合のそれよりもかなり低い。

次に、LiCl/DMA 溶液から再沈させたキチンを用いて検討を行った。すなわち、この溶剤 200 ml にキチン粉末 2.0 g を溶解後、その溶液を水中に滴下したところ平均 5 × 10 mm の楕円状で半透明の弾力性のあるビーズが形成された。このビーズは一晩水中に浸漬することで、ビーズ中に残留した DMA を除去した。この再沈キチンを基質として培養を行ったところ、(GlcNAc)₂ 濃度は培養 4 日目で最大値 5.9 g/l、対照の 61% に達した。原料キチンに対する (GlcNAc)₂ の収率は、対照の 80% であった (Table II)。

以上、*B. licheniformis* X-7 u による (GlcNAc)₂ 生産のために適したキチンの形態を検索したが、コロイド状

キチンに匹敵する収率を示すものは得られなかった。しかし、洗浄回数を 1, 2 回に減らして調製過程を簡略化したコロイド状キチン、25~30% 塩酸を用いた膨潤キチン、および LiCl/DMA 溶液から再沈させたキチンビーズを用いたときは、通常の調製法によるコロイド状キチンを用いたときの 46~62% の (GlcNAc)₂ を蓄積した。さらに、これらの処理においては原料キチンからの損失が少ないので、原料に対する収率では対照の 51~80% に達した。以上のうち、25~30% 塩酸を用いた膨潤キチンは収率においてはやや劣るものの、基質の調製が容易なこと、調製用試薬の価格が低く、かつ安全であること、培養中に蓄積する副生成物が少ないこと、培養後の残留キチンの再利用が可能なこと、の点から、(GlcNAc)₂ の大量生産にもっとも適していると思われる。

原料キチンの提供および実験に対するご援助をいただいた株式会社加ト吉および同社の次田隆志博士に深謝いたします。

- (1) Y. Takiguchi and K. Shimahara : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1537 (1989).
- (2) 滝口泰之, 島原健三 : 農化, **63**, 1199 (1989).
- (3) P. R. Austin : "Methods in Enzymology" Vol. 161, ed. by W. A. Wood and S. T. Kellogg, Academic Press, New York, 1988, p. 403.
- (4) K. Shimahara and Y. Takiguchi : "Methods in Enzymology" Vol. 161, ed. by W. A. Wood and S. T. Kellogg, Academic Press, New York, 1988, p. 417.

- (5) J. Noguchi, S. Tokura and N. Nishi : "Proc. 1st Int. Conf. Chitin/Chitosan," ed. by R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser, MIT Sea Grant Program, Massachusetts, 1978, p. 315.

(6) P. R. Austin : U. S. Patent 3892731 (1975).
 - (7) T. Sannan, K. Kurita and Y. Iwakura : *Makromol. Chem.*, **176**, 1191 (1975).

(8) 栗田恵輔, 小山義之, 村上千おり, 吉田誠司, グエン・チョウ : 昭和 60 年度文部省科学研究費総合研究 (B), 研究報告書, p. 5.
-