

## 「キトサンからオリゴ糖：反応装置を開発 効率 3 倍に向上」

### 【ポイント】

- ・ キトサン分解酵素キトサナーゼを多段円盤型攪拌翼に固定化した新規なキトサン分解用反応装置を開発。
- ・ 開発した反応装置を利用して、キトサンオリゴ糖を従来の 3 倍以上高い濃度で効率的に生産することに成功。

### 【概要】

国立大学法人 筑波大学[学長：岩崎洋一]（以下「筑波大」という）生命環境科学研究科向高祐邦教授の研究グループは、キトサン分解酵素を多段円盤型攪拌翼に直接固定化した新規なバイオリクター（生化学反応装置）を開発し、生理活性が高いキトサンオリゴ糖の 5 糖と 6 糖を高い濃度で効率的に生産することに成功しました。

微生物由来のキトサン分解酵素キトサナーゼを、寒天ゲルで被覆した多段円盤攪拌翼に多点結合法により直接固定化した反応装置を開発しました。この装置により、粘性が高いキトサン溶液を効率的に攪拌しながらキトサンを分解し、オリゴ糖を高い収率で生産することができました。さらに、目的のオリゴ糖である 5 糖と 6 糖を高い濃度で生産するため、基質の高濃度化法を開発しました。キトサンの加水分解反応を行いながら、キトサン粉末を反応液に逐次的に添加する手法により、オリゴ糖の原料であるキトサンの濃度を  $50\text{kg/m}^3$  にまで高めることができました。この濃度のキトサン溶液は極めて粘稠ですが、開発した反応装置を用いることで、攪拌しながらキトサンの加水分解反応を行うことができました。反応操作条件を最適化した結果、 $50\text{kg/m}^3$  のキトサン溶液から  $20\text{kg/m}^3$ （対原料収率 40%）という高濃度かつ高い収率で 5 糖と 6 糖を生産することに成功しました。この濃度は、従来の生産法のおよそ 3 倍に相当します。さらに、同一の固定化酵素を使用して、オリゴ糖を繰り返し生産することができました。以上の成果より、開発した反応装置がキトサンオリゴ糖の効率的な生産に有効であることが明らかになりました。

## 【研究の背景および目的】

カニやエビなどの外殻から作られる天然多糖類のキトサンを加水分解すると、数個のアミノ糖が連結したオリゴ糖（キトサンオリゴ糖）が得られます。中でも、アミノ糖が5個あるいは6個つながったオリゴ糖、すなわち5糖と6糖は、抗菌性、抗腫瘍（しゅよう）性および免疫増強活性などの生理活性を示すことが知られています。このため、これらのオリゴ糖は、機能性食品や医薬品などへの利用が期待されています。しかし、5糖や6糖はキトサンの加水分解反応の中間生成物であり、反応が進みすぎると機能性の低い2糖や3糖にまで分解されてしまいます。そのため、5糖や6糖を効率よく生産するには、キトサン分解反応の進行を制御することが課題となっていました。そこで、筑波大では、ゲルなどの水不溶性の固体にキトサン分解作用のある酵素を結合させた「固定化酵素」を開発し、これを利用したキトサンオリゴ糖の生産を研究してきました。固定化酵素を用いると、キトサン分解酵素を反応溶液から簡単に分離することができるため、任意の時点で反応を停止できます。このため、生産された5糖や6糖が分解されてしまう前に、反応を止めて目的のオリゴ糖を回収することで、効率よく5糖と6糖を得られるようになりました。本研究では、この固定化酵素を利用して、従来の方法よりも高い濃度、高い収率で目的とするキトサンオリゴ糖の5糖と6糖を生産する技術の開発を目指し、原料として粘稠な高濃度のキトサン溶液が利用できる新規な固定化酵素反応装置を開発しました。さらに、本装置によりキトサンオリゴ糖の5糖と6糖を効率よく生産するための反応操作方法も考案しました。

## 【成果・応用】

### （1）反応装置の開発

これまでの基礎研究で、5糖と6糖を高い収率で生産するためには、固定化酵素近傍の物質移動を促進する必要があることを明らかにしてきました。このため、高濃度のキトサン溶液を原料基質としてオリゴ糖を効率的に生産するバイオリクターは、高粘性溶液に対して十分な攪拌能力を備えている必要があります。そこで、図1に示すような多段円盤型固定化酵素リアクターを開発しました。攪拌翼は金網を基板とする円盤型（図1 a）とし、これを寒天ゲルで被覆して、その表面にキトサン分解酵素であるキトサナーゼ（*Bacillus pumilus* BN-262 由来）を多点結合法により直接固定化しました。円盤を多段化して寒天ゲルの表面積を増やすことで、より多くの酵素を固定化して反応を効率よく行うことができます（図1 b, c）。

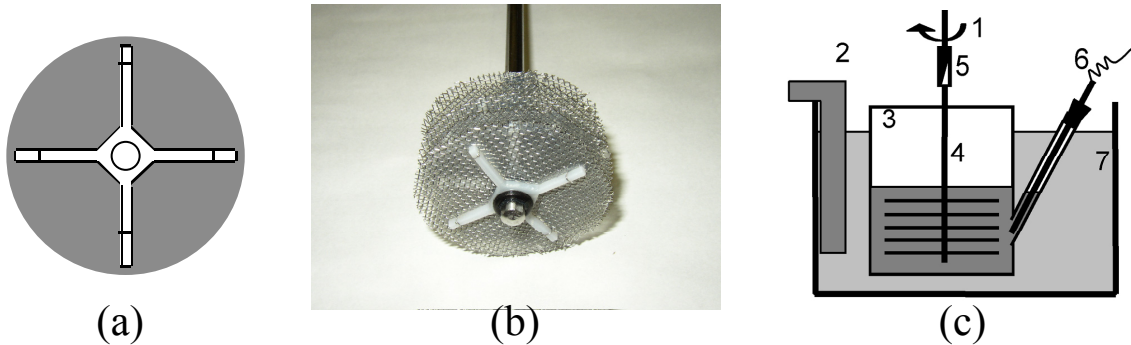


図 1. 反応装置の概要： (a)円盤型ステンレス金網；(b)多段円盤型攪拌翼；(c)反応装置の構成 (1)攪拌モーター, (2)ヒーター, (3)反応器, (4)多段円盤型酵素固定化攪拌翼, (5)トルクメーター, (6)pH 電極, (7)恒温水槽.

## (2) 高濃度のオリゴ糖を生産するための反応操作方法

目的とする 5 糖と 6 糖を高い濃度で生産するため、加水分解反応を進めながら原料であるキトサンの粉末を逐次的に添加する反応操作方法 (図 2) を考案しました。原料キトサンの飽和溶解濃度が  $20 \text{ kg/m}^3$  であるため、これまでは高濃度での反応ができませんでしたが、この方法では、原料キトサンの飽和濃度  $20 \text{ kg/m}^3$  で反応を開始し、多段円盤型固定化酵素リアクターでキトサンの加水分解を緩やかに行いながら、反応液にキトサン粉末を逐次的に添加していくことで原料キトサンの濃度を高めることができます。キトサン粉末の添加時期は、キトサンの溶解挙動を反映している攪拌トルク値の変化を指標として決定しました (図 2 a)。また、キトサン粉末の溶解を促進するため、キトサン粉末添加直後に反応溶液の pH を下げる調整を行いました。その結果、キトサンの濃度を  $50 \text{ kg/m}^3$  にまで高めることができ、最大で  $15 \text{ kg/m}^3$  の 5 糖と 6 糖を生産することに成功しました。さらに、攪拌翼表面への酵素の固定化密度や、攪拌速度および反応温度を最適化した後、この高濃度キトサン溶液を原料として、同一の反応装置によりキトサンオリゴ糖を 3 回繰り返して生産したところ、いずれの反応においても従来の約 3 倍にあたる  $20 \text{ kg/m}^3$  (対原料収率 40%) という非常に高い濃度で 5 糖と 6 糖を効率的に生産することができました (図 3)。この間、固定化されたキトサン分解酵素の活性はほとんど低下せず、高価な酵素を安定に再利用できることもわかりました。

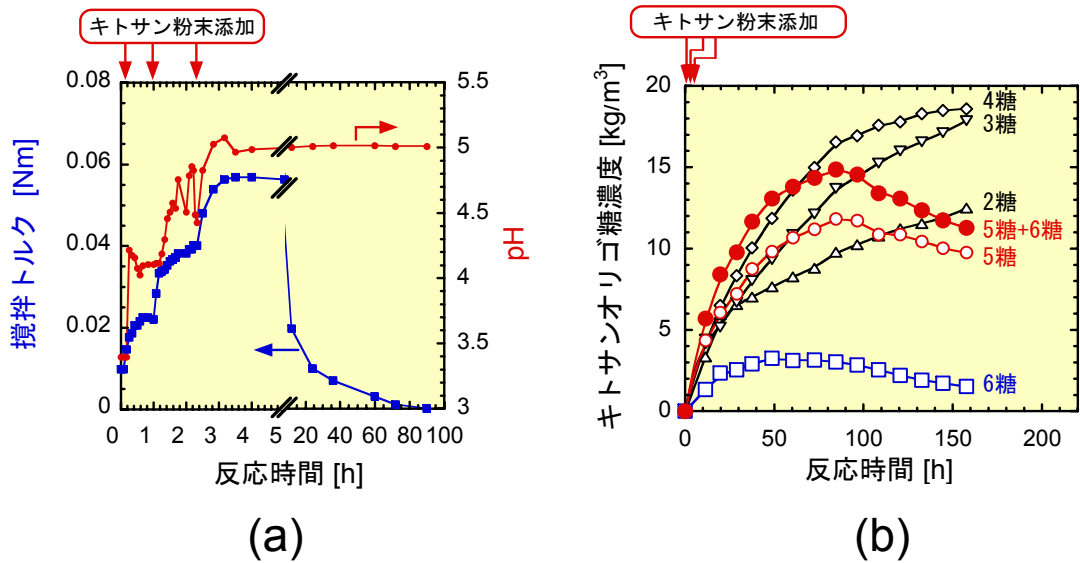


図2. キトサン粉末の逐次添加によるキトサンオリゴ糖の高濃度生産. (a): キトサン粉末添加時の攪拌トルク値の変化と pHの調整; (b): 各種キトサンオリゴ糖の生成濃度.

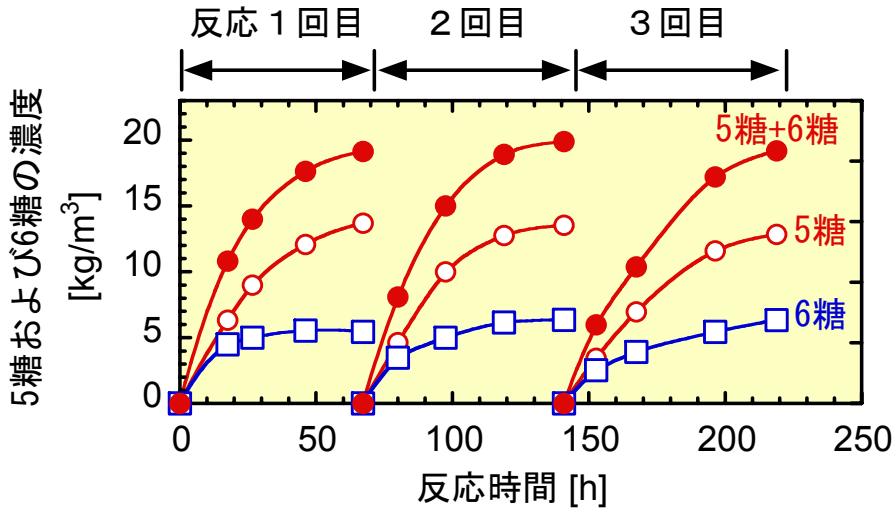


図3. 高濃度キトサンオリゴ糖の繰り返し生産.

**(3) 本研究成果の応用可能性**

本研究で開発した反応装置では、キトサン分解酵素を固定化しましたが、他の酵素を固定化して利用することで、さまざまな高分子物質の分解に応用できる可能性があります。特に、近年注目されている農産・食品廃棄物系のバイオマス資源には、多糖類やたんぱく質などの高分子物質が多く含まれており、これらを効率よく分解して、有効に利用するための反応装置、および、反応操作方法として、本研究の成果が役立つと期待されます。

### 【関連論文】

1. Ichikawa *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 201-206 (2002).
2. Kuroiwa *et al.*: *Biotechnol. Progr.*, **18**, 969-974 (2002).
3. Kuroiwa *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **84**, 121-127 (2003).
4. 黒岩ほか: 日本食品科学工学会誌, **52**, 285-296 (2005).
5. 黒岩ほか: 酵素工学ニュース, **54**, 6-11 (2005).
6. Ming *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **28**, 289-294 (2006).
7. Ming *et al.*: *Food Sci. Technol. Res.*, **12**, 印刷中 (2006).

### 【関連特許】

1. 「寒天を担体とした安定な固定化キトサナーゼ」, 特開平 11-56357 号 (1999 年 3 月公開) .
2. 「キトサンオリゴ糖の製造方法」, 特開 2000-60591 号 (2000 年 2 月公開) .
3. 「キトサン分解物の製造方法および製造装置」, 特開 2005-229962 号 (2005 年 9 月公開) .

### 【本件問い合わせ先】

国立大学法人 筑波大学

大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻

教授 向高 祐邦・講師 市川 創作

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Tel: 029-853-4627, Fax: 029-853-4605

E-mail: sosakui アット sakura.cc.tsukuba.ac.jp (アットの部分に@を入れて下さい)

---

[プレス発表・取材に関する窓口]

国立大学法人 筑波大学 総務・企画部 広報課 広報・報道

専門職員 和田 〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Tel: 029-853-2040 (ダイヤルイン) Fax: 029-853-2014