

イカ軟甲からの有用糖質の調製と用途開発 (第2報)

山城利枝子、平良秀春、照屋 亮、比嘉賢一

1 まえがき

ソデイカなどのイカ類の加工残滓として排出されるイカ軟甲には、機能性素材として注目されているキチン質が含まれている。キチン質にはキチンとキトサンがあるが、イカ軟甲からタンパク質を除去するとキチンが得られ、キチンをさらにアルカリ処理するとキトサンが得られる。キトサンには、創傷治癒促進効果¹⁾や抗菌性²⁾、コレステロール低下作用³⁾等の機能性があることが知られており、医療材料や食品素材などとして広い分野で利用されている。そこで、前報⁴⁾ではキトサンの供給源となるイカ軟甲を有効利用するために、これまでにイカ軟甲からキトサンを効率よく調製する方法として、イカ軟甲を直接濃水酸化ナトリウム溶液で処理する条件を確立するとともに、低分子化キトサンに強い抗菌性があることを確認した。また、キトサンを利用した製品開発として抗菌製品の開発も進めている。一方、キトサンは酸溶液に溶解するが水には溶解しない点や、キトサン溶液は苦みを呈するなど、食品素材としては扱いにくい点も有している。キトサンは単糖が多数結合した多糖類であり、結合を切断して単糖やオリゴ糖にすると溶解性や呈味性が改善する。さらに、オリゴ糖にも抗腫瘍性^{5,6)}や肝機能改善効果⁷⁾など色々な機能性があることが明らかにされており、キトサンからオリゴ糖を調製することでさらに用途を拡大することが可能となる。キトサンを分解してオリゴ糖を調製する方法には、塩酸などによる酸分解法もあるが、この方法では単糖が多く生成し色々な機能性を有するといわれている5糖や6糖などの比較的高重合度のオリゴ糖の生成が困難であることが報告されている^{8,9)}。また、これらオリゴ糖を効率的に調製する方法として酵素分解によるオリゴ糖調製が検討され、カニ殻由来キトサンを原料とした酵素分解によるオリゴ糖調製が報告されている^{10,11,12)}。そこで平成13年度は、イカ軟甲由来キトサンからオリゴ糖を調製するために、酵素分解条件の検討を行った。

2 実験方法

2-1 原料

2-1-1 イカ軟甲由来キチンおよびキトサン

イカ軟甲由来キチンは、ソデイカ軟甲を除タンパク質して調製した。軟甲を2N水酸化ナトリウム溶液中、室

温で一晩攪拌した後吸引ろ過し、ろ液が中性になるまで水洗浄を行った。次にエタノールおよびアセトンで洗浄後乾燥しキチンを得た。

イカ軟甲由来キトサンは前報⁴⁾に従い、ソデイカ軟甲を濃水酸化ナトリウムおよび希塩酸で処理することにより調製した脱アセチル化度70~100%のキトサンを使用した。

2-1-2 カニ殻由来キチンおよびキトサン

カニ殻由来キチン：ナカライテクス株式会社製

カニ殻由来キトサン：キトサン10B (加ト吉株式会社)

2-1-3 酵素

市販のキトサナーゼ、キチナーゼおよび粗酵素製剤を使用した。酵素の一覧を表1に示す。

表1 使用した酵素製剤

	酵素製剤名	起 源	発 売
キトサナーゼ	キトサナーゼRD	<i>Bacillus sp.</i>	生化学工業株式会社
	キトサナーゼL	<i>Bacillus sp.</i>	阪急共栄物産株式会社
	キトサナーゼ*1	<i>Bacillus pumilus</i>	和光純薬工業株式会社
キチナーゼ	キチナーゼGODO	<i>Aeromonas hydrophila</i>	生化学工業株式会
	キチナーゼ*2	<i>Bacillus sp.</i>	和光純薬工業株式会社
	キチナーゼC-1650	<i>Serratia marcescens</i>	シグマ78トリップジャパン株式会社
粗酵素製剤	セルラーゼXP-425	<i>Trichoderma viride</i>	ナガセムテックス株式会社
	ベクチナーゼナガセ	<i>Aspergillus niger</i>	ナガセムテックス株式会社
	セルロシンHC100	<i>Aspergillus niger</i>	阪急共栄物産株式会社
	セルロシンTP25	<i>Trichoderma viride</i>	阪急共栄物産株式会社

*1および*2は、今後それぞれキトサナーゼ(和光)およびキチナーゼ(和光)と記載する

2-2 キトサン溶液の調製

pH5.0のキトサン溶液は、キトサン500mgを0.2M酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解させ100mlに定容した。また、pH6.0のキトサン溶液は、キトサン500mgを脱イオン水40mlに分散し、1M酢酸9mlを加えキトサンを溶解させ酢酸ナトリウムを加えてpH6に調製した後、100mlに定容した。

2-3 キトサンの酵素分解

0.5%キトサン溶液5mlに所定量の酵素を添加し、37℃で振とう(100rpm)して酵素分解を行った。経時的に

サンプリングを行い、還元糖量およびオリゴ糖組成を分析した。酵素添加量は、キトサナーゼおよびキチナーゼはキトサンに対して2%となるように添加し、粗酵素製剤はキトサンと同量添加した。また、キトサンの酵素分解性比較ではキトサナーゼをキトサンの0.2%添加した。

2-4 コロイダルキチンの調製⁹⁾

5℃以下に冷却した濃塩酸200mlにキチン5gを少量ずつ加え、キチンが均一に分散した後、徐々に加温し37℃に30分間保ちキチンを溶解させる。不溶物を吸引ろ過し、ろ液は5℃以下に冷却したイオン交換水2Lに注ぎ込み30分間攪拌して白濁させた後、5℃で一晩放置した。上澄みをのぞいた後、吸引ろ過とイオン交換水による洗浄をpH5以上になるまで繰り返し、コロイダルキチンを得た。コロイダルキチンはイオン交換水200mlに懸濁させて保存し、酵素分解に使用する際には、0.5% (w/v) 懸濁液となるように希釈して使用した。

2-5 水分散キチンの調製

キチン0.5gにイオン交換水100mlを加え、ホモジナイズ (POLYTORON PT-2000 KINEMATICA AG社製) 30分を2回行い、0.5%水分散キチンとした。

2-6 キチンの酵素分解⁹⁾

0.5%濃度に調製したコロイダルキチン懸濁液またはキチン水分散液1mlにMcIlvaine緩衝液 (pH6.0) 2mlと酵素液1mlを加え、37℃で20分間振とうして反応させた。沸騰水浴中 (3分) で反応を停止させて遠心分離し、上澄液中の還元糖を測定した。酵素液はキチナーゼ (和光) を0.3mg/ml濃度に調製した。

2-7 酵素分解で生成した還元糖の定量

還元糖量はSchalesの変法¹⁰⁾で測定した。

2-8 酵素分解で生成したオリゴ糖の高速液体クロマトグラフ (HPLC) 分析

キトサンの酵素分解液0.5mlにメタノール0.5mlおよび無水酢酸80 μ lを加え一晩室温で攪拌してアセチル化した後、HPLCで生成したオリゴ糖の定量を行った。

HPLC測定条件

装置 LC10Avpシリーズ (株式会社島津製作所)

カラム Asahipak NH2P-50 4E (Shodex)

移動層 アセトニトリル：水=7:3

流速 1.0ml/min、カラム温度 30℃

検出波長 UV 210nm

3 結果および考察

3-1 イカ軟甲由来キトサンの酵素分解によるオリゴ糖調製

3-1-1 酵素の選定

キトサンからのオリゴ糖調製に使用される酵素には、キトサンの構成糖であるグルコサミンに作用するキトサナーゼや、部分的に脱アセチル化されたキトサンのN-アセチルグルコサミンに作用するキチナーゼなどの精製された酵素がある。また、セルラーゼ製剤などの粗酵素製剤によるオリゴ糖生成が報告されており¹¹⁾、これは粗酵素製剤に含まれる微量のキトサナーゼやキチナーゼによるものと考えられている。今回は、市販されている数種のキトサナーゼ、キチナーゼおよび糖分解用の粗酵素製剤を使用した。

まず、表1に示したキトサナーゼ、キチナーゼおよび粗酵素の各酵素群の中から、オリゴ糖調製に適した酵素の選定を行った。選定条件は、オリゴ糖生成量および3糖以上のオリゴ糖を多く生成することを基準とした。

キトサナーゼでは脱アセチル化度100%のキトサンを酵素分解したところ、キトサナーゼ (和光) およびキトサナーゼLが3糖以上のオリゴ糖の他に2糖の生成量も多いのに対して、キトサナーゼRDは2糖以下のオリゴ糖の生成は少なく、3糖以上のオリゴ糖を多く得るという目的にはキトサナーゼRDが適していた。キチナーゼでは脱アセチル化度80%のキトサンを酵素分解したところ、キチナーゼGODOおよびキチナーゼC-1650ではオリゴ糖はほとんど生成していなかったが、キチナーゼ (和光) では1~6糖が生成しているのが確認され、オリゴ糖生成量からキチナーゼ (和光) が適していると判断した。粗酵素製剤でも脱アセチル化度80%のキトサンを酵素分解したところ、セルロシンTP25は1~6糖が生成しオリゴ糖生成量が多かったが、それ以外の酵素ではオリゴ糖の生成が少ないか全く生成しておらず、セルロシンTP25を選定した。キトサナーゼRD、キチナーゼ (和光) およびセルロシンTP25によるキトサンの酵素分解で生成したオリゴ糖のクロマトパターンを図1に示した。

3-1-2 酵素分解により生成したオリゴ糖組成の経時変化

次に、キトサンの酵素分解により生成するオリゴ糖組成およびオリゴ糖総量の経時変化を調べた。その結果を図2~図4に示した。

キトサナーゼRDによるキトサンの分解では、分解3時間でも3糖~6糖が生成しているが、7時間以降では5糖および6糖がさらに分解して減少し3糖および4糖が増加した。これは、キトサナーゼRDが主にエンド型

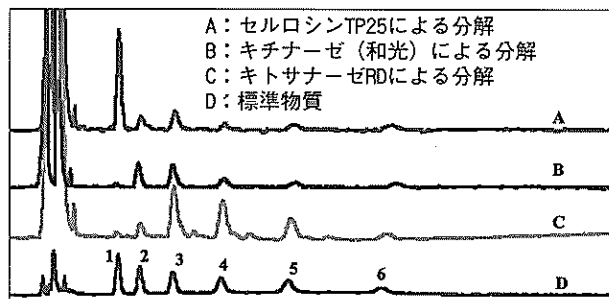


図1 キトサンの酵素分解で生成したオリゴ糖のクロマトパターン

1: 単糖(N-アセチルグルコサミン)、2: 2糖(N-アセチルグルコサミンダイマー)、3: 3糖(N-アセチルグルコサミントリマー)、4: 4糖(N-アセチルグルコサミンテトラマー)、5: 5糖(N-アセチルグルコサミンペンタマー)、6: 6糖(N-アセチルグルコサミンヘキサマー)

の酵素で3糖を多く生成する性質を有しているためである。また、オリゴ糖総量は分解3時間からほぼ一定であり、酵素添加量2%では分解時間は3時間で十分であった。キチナーゼ(和光)によるキトサンの分解では、分解開始数時間ではオリゴ糖生成は僅かであるが時間の経過とともに増加し、96時間後にはオリゴ糖収率は80%に達した。また、生成したオリゴ糖組成は、分解48時間では3糖以上のオリゴ糖をそれぞれ0.5mg/ml生成し、さらに分解が進むに従い3糖~5糖の生成量が増加した。セルロシンTP25によるキトサンの分解では、単糖を多く生成するのが特徴的であった。セルロシンTP25はキシラナーゼを主体とする糖分解用の酵素であるが、キトサンの分解により単糖を生成することから、エキソ型のキトサナーゼが含まれていると推定される。生成したオリゴ糖組成は分解48時間で2糖~6糖の生成量がほぼ等しく、セルロシンTP25によるキトサンの分解で3糖~6糖の含有率がほぼ等しいオリゴ糖混合物の調製が可能である。

3-1-3 脱アセチル化度の異なるキトサンの酵素分解
次に、選定した3種酵素で脱アセチル化度が異なるキトサンの酵素分解を行いオリゴ糖生成状態を検討した。キトサナーゼRDおよびセルロシンTP25は脱アセチル化度70%~100%のキトサン、キチナーゼWは脱アセチル化度70%~90%のキトサンの酵素分解を行った。結果を図5~図7に示した。

分解により生成したオリゴ糖総量は、キトサナーゼRDでは脱アセチル化度100%のキトサンが多く、キチナーゼ(和光)およびセルロシンTP25では脱アセチル化度90%および80%のキトサンが多かった。またオリゴ糖組成は、キトサナーゼRDおよびキチナーゼでは、各脱アセチル化度のキトサンでほとんど差異は見られなかったが、セルロシンTP25では脱アセチル化度70%のキトサ

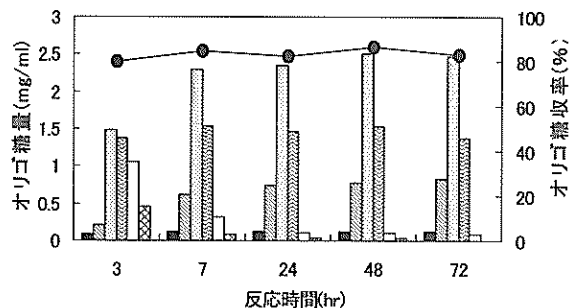


図2 キトサナーゼRDによるキトサン分解で生成したオリゴ糖組成とオリゴ糖収率の経時変化

0.5%キトサン溶液(脱アセチル化度100%)、
酵素添加量: 2%、温度: 37℃、pH5.0

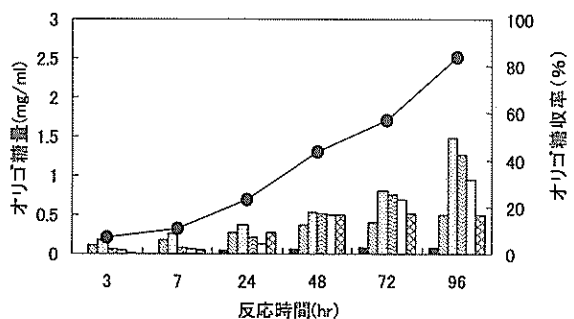


図3 キチナーゼ(和光)によるキトサン分解で生成したオリゴ糖組成とオリゴ糖収率の経時変化

0.5%キトサン溶液(脱アセチル化度80%)、
酵素添加量: 2%、温度: 37℃、pH5.0

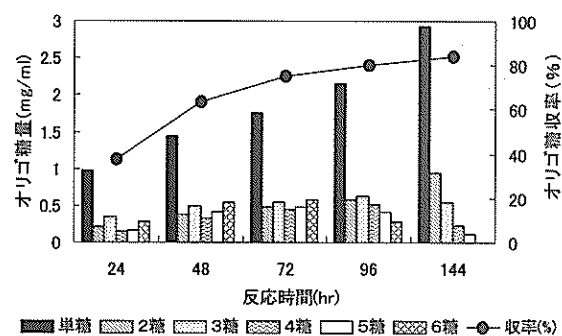


図4 セルロシンTP25によるキトサン分解で生成したオリゴ糖組成とオリゴ糖収率の経時変化

0.5%キトサン溶液(脱アセチル化度80%)、
酵素添加量: 等量、温度: 37℃、pH5.0

ンで2糖から6糖の生成が少なかった。これらのことから、各酵素による分解に適したキトサンの脱アセチル化度は、キトサナーゼRDでは100%、キチナーゼ(和光)およびセルロシンTP25では80%であることが明らかと

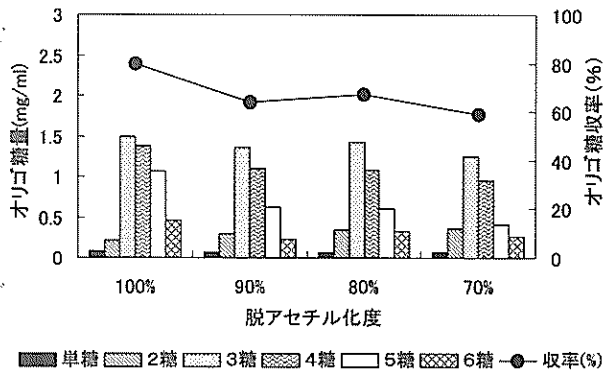


図5 脱アセチル化度の異なるキトサンのキトサナーゼRDによる分解で生成したオリゴ糖組成とオリゴ糖収率

0.5%キトサン溶液、酵素添加量：2%、
温度：37℃、pH5.0、分解時間3hr

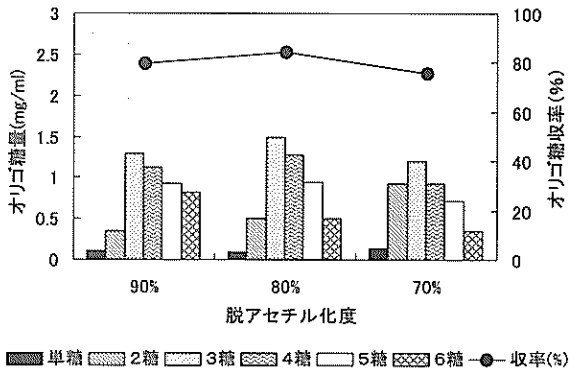


図6 脱アセチル化度の異なるキトサンのキチナーゼ(和光)による分解で生成したオリゴ糖組成とオリゴ糖収率

0.5%キトサン溶液、酵素添加量：2%、
温度：37℃、pH5.0、分解時間96hr

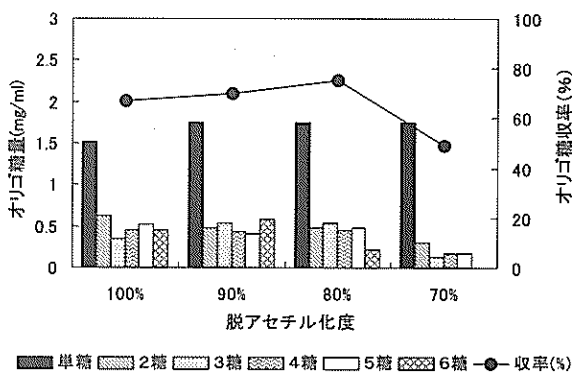


図7 脱アセチル化度の異なるキトサンのセルロシンTP25による分解で生成したオリゴ糖組成とオリゴ糖収率

0.5%キトサン溶液、酵素添加量：2%、
温度：37℃、pH5.0、分解時間72hr

なった。

3-2 イカ軟甲由来およびカニ殻由来キチン・キトサンの酵素分解性比較

現在、利用されているキトサンのほとんどはカニ殻由来のものであり、カニ殻由来キトサンの酵素分解は多数研究されている^{10,11,12)}。しかし、イカ軟甲由来キトサンの酵素分解についての報告や、イカ軟甲由来キトサンとカニ殻由来キトサンの酵素分解性の比較検討はほとんどみられない。そこで、イカ軟甲由来キトサンとカニ殻由来キトサンのキトサナーゼによる分解性の比較を行った。使用したキトサンの性状は、イカ軟甲由来キトサンは脱アセチル化度100%で重量平均分子量300,000、カニ殻由来キトサンは脱アセチル化度100%で重量平均分子量260,000であった。また、イカ軟甲由来キチンとカニ殻由来キチンについても酵素分解性を比較した。

図8はイカ軟甲由来およびカニ殻由来キトサンを、キトサナーゼRDで分解して生成する還元糖量を示したものである。両者とも時間とともに還元糖量は増加しているが、分解速度は異なっており、イカ軟甲由来キトサンの分解速度はカニ殻由来キトサンの約1.5倍であった。

表2はイカ軟甲由来キチンとカニ殻由来キチンのキチナーゼ(和光)による分解性を比較した結果である。キチンは水や希酸溶液に溶解しないため、酸処理して得られるコロイダルキチンを酵素分解の基質として使用するのが一般的であり、今回の試験でもコロイダルキチンを調製して使用した。値はカニ殻由来コロイダルキチンの還元糖生成量を100として表示した。

イカ軟甲由来コロイダルキチンの還元糖生成量は133

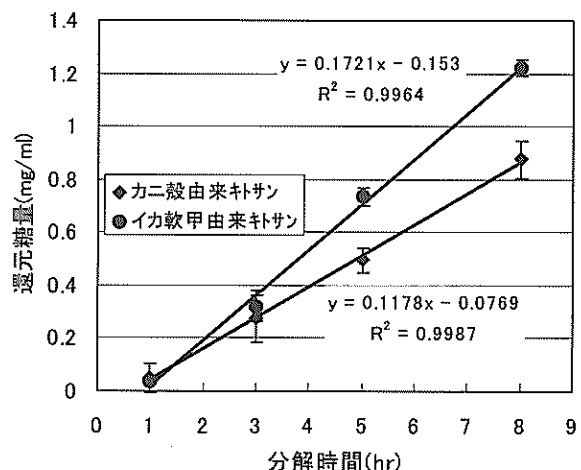


図8 イカ軟甲由来キトサンおよびカニ殻由来キトサンの酵素分解により生成した還元糖量の経時変化

0.5%キトサン溶液(脱アセチル化度100%)、
酵素添加量：0.2%、温度：37℃、pH6.0

表2 キチンの酵素分解性比較

	コロイダルキチン	水分散キチン
カニ殻由来キチン	100	0
イカ軟甲由来キチン	133	133

酵素:キチナーゼ(和光)

値はカニ殻由来コロイダルキチンの還元糖生成量を100としたときの換算値

であり、イカ軟甲由来キチンがカニ殻由来キチンよりも酵素分解されやすいことを示している。また、キチンを機械的に水に分散させた水分散キチンでは、カニ殻由来水分散キチンはほとんど分解されなかったが、イカ軟甲由来水分散キチンはコロイダルキチンと同様に酵素分解された。

イカ軟甲由来キチンの酵素分解性については郡山によりすでに報告されている。郡山¹⁵⁾は、イカ軟甲由来キチンは β 型キチンであり、カニ殻由来キチンの α 型よりもルーズな結晶構造をしていることが酵素分解されやすい一要因としており、今回キトサンの酵素分解性でもイカ軟甲由来キトサンが分解されやすい結果となったことも、イカ軟甲由来キトサンが β 型キトサンであることに起因しているのではないかと考えられる。また、一般にキチンの酵素分解ではキチンを分解しやすくするために、酸処理によりコロイダルキチン調製やキチンの低分子化などが行われるが、イカ軟甲由来キチンは水に分散させるだけで酵素分解されることから、酸処理を行わず安全に酵素分解することが可能であり、酵素分解の原料として有用であると考えられる。

4 まとめ

イカ軟甲由来キトサンの酵素分解により、3糖以上のオリゴ糖を生成することを条件に酵素の選定および諸条件の検討を行った。その結果、キトサンの酵素分解に適した酵素として、キトサナーゼRD、キチナーゼ(和光)、セルロシンTP25を選定した。キトサナーゼRDは脱アセチル化度100%のキトサンから数時間の分解でオリゴ糖を生成し、キチナーゼ(和光)およびセルロシンTP25は脱アセチル化度80%または90%のキトサンから数日間の分解でオリゴ糖を生成できることがわかった。しかし、今回設定した酵素分解条件では、キトサナーゼRDは分解が速く制御が困難であること、キチナーゼ(和光)およびセルロシンTP25では分解時間が数日と長いなどの課題もある。これらを課題を解決するためには、酵素添加量や反応温度、pH等などの条件をさらに検討するこ

とが必要である。

また、イカ軟甲由来キチンおよびキトサンは、カニ殻由来キチンおよびキトサンよりも酵素で分解されやすく、イカ軟甲由来キチンについては機械的に水に分散させるだけで酵素分解されることがわかった。このことはイカ軟甲由来キチンおよびキトサンが、オリゴ糖を効率よくしかも安全に製造するための原料となることを示している。

謝辞

この研究は中小企業庁の地域ものづくり対策事業により実施したものである。

本研究を行うに当たり、ご助言を賜りました琉球大学教授 安田正昭様に感謝申し上げます。また、酵素を提供していただいた阪急共栄物産株式会社およびナガセケムテックス株式会社に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 木船敏爾、キチン、キトサンのメディカルへの応用 技報堂出版 (1994)
- 2) キチン、キトサン研究会編 キチン、キトサンの応用 技報堂出版 (1990)
- 3) 今泉勝己 FOOD Styl 21 1 (7) pp.25-29 (1997)
- 4) 山城利枝子他 平成12年度沖縄県工業技術センター研究報告 pp.1-7 (2001)
- 5) Ko SUZUKI, et.al., Carbohydrate Research 151 pp.403-408 (1986)
- 6) Akio TOKORO, et.al., Chem. Pharm. Bull. 36 (2) pp.784-790 (1988)
- 7) 又平芳春 FOOD Styl 21 1 (7) pp.53-57 (1997)
- 8) キチン、キトサン研究会編 キチン、キトサン実験マニュアル 技報堂出版 (1994)
- 9) J. A. RUPLEY BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA ACTA 83 pp.245-255 (1964)
- 10) Sei-ichi Aiba Carbohydrate Research 265 pp.323-328 (1994)
- 11) Sei-ichi Aiba Carbohydrate Research 261 pp.297-306 (1994)
- 12) Masaru MITSUTOMI, et.al., Agric. Biol. Chem. 54 (4) pp.871-877 (1990)
- 13) Taiji IMOTO, Kazuyoshi YAGISHITA Agric. Biol. Chem. 35(7) pp.1154-1156 (1971)
- 14) Einosuke Muraki, Humiko Yaku, Hiroyuki Kojima Carbohydrate Research 239 pp.227-237 (1993)
- 15) 郡山剛 化学工業 10月号 pp.25-29 (1991)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。