

分子量および官能基を制御した新規キトサン系界 活性剤の機能化に関する研究 —市販ペクチナーゼとその化学修飾酵素による N-アセチル化キトサンの加水分解に及ぼす N-アセチル化度の影響—

東京工業大学大学院 理工学研究科

梶 内 俊 夫

Three types of N-acetylated chitosans (NACs) with different degree of acetylation (DA) were prepared and used as a substrate for enzymatic hydrolysis with a commercially available pectinase and a modified one. Pectinase modification was conducted using polyalkyleneoxide-maleic anhydride copolymer (PEO-MA copolymer). The effects of DA on enzymatic reaction with native and modified pectinases were investigated experimentally. Initial hydrolysis rate and Michaelis-Menten kinetic parameters were measured by analysis of reducing sugars. DA of NAC strongly affected the hydrolytic characteristics of native and modified pectinases. N-acetylation of chitosan increased the initial hydrolysis rate and the enzyme-substrate affinity with respect to both pectinases; NACs with DA over 0.3 showed high initial hydrolysis rate and strong affinity between enzyme and substrate. Especially when NAC with DA over 0.3 was treated with modified pectinase, the affinity became much stronger than the native pectinase.

1. 緒 言

キトサンは甲殻類、昆虫、カビなどの外骨格に存在する天然多糖類キチンの脱アセチル化物である。キチン類は固体廃棄物として水産加工場などから得ることが出来る。

キトサンは D-グルコサミン (GlcN) と N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の β -1,4-結合によって出来る直鎖状のヘテロ多糖類である。市販のキトサンは主にキチンの不均一系 N-脱アセチル化によって得られ、GlcNAc 含量は 0 から 0.3 程度であり、GlcNAc 残基はブロック状に分布している。このようなキトサンは酸性水溶液にのみ可溶であり、中性あるいは塩基性水溶液には溶解しない¹⁾。

近年キトサン類は興味深い生理活性を多く持つことから注目を集めている。生理活性と重合度の関係からみると、低分子化キトサンはキトサン高分子に匹敵する生理活性を持つことが明らかになっている。さらに、キトサンの低分子化によってその水溶性は向上し、溶液粘度は低下する。このため、キトサンの低分子化によってキトサン類を広範な分野で応用可能にすることが期待されている。

酵素的加水分解はキトサンの低分子化を行う方法として期待されている。酵素的加水分解は化学的加水分解よりも通常穏和な条件で行われる。しかしながら、キトサンの酵素的加水分解は、キトサナーゼやキチナーゼなどの特異的酵素が高価であることから、工業的規模では利用されるに

至っていない。

近年、数種類の加水分解酵素、例えばリゾチーム、セルラーゼ、パパイン、リパーゼ、ペクチナーゼなどがキトサン高分子中のグリコシド結合を加水分解することが明らかになってきた²⁻⁴⁾。これらの酵素は現在工業的に広く利用されており、安価に利用することができる。さらに、我々はポリエチレンノキシド-無水マレイン酸共重合体 (PEO-MA) で化学修飾したペクチナーゼが高い熱安定性を有し、酵素とキトサンとの間の親和性が高いことを報告した⁵⁾。

本研究では、異なる N-アセチル化度 (DA) を持つ 3 種類の N-アセチル化キトサン (NAC) を用いて酵素的加水分解を行い、NAC の酵素的加水分解に及ぼす DA の影響を未修飾酵素および修飾酵素を用いた場合について明らかにした。

2. 実 験

2.1 実験材料

キトサン 10B (フナコシ (株)) を NAC を調製するために使用した。市販のペクチナーゼ (MERCK) を NAC の酵素的加水分解に使用した。ペクチナーゼの修飾剤として、日本油脂 (株) から提供していただいた PEO-MA を用いた。

2.2 NAC の調製

異なる DA を持つ NAC は Kubota 等の報告したキトサンの均一系 N-アセチル化法にしたがって行った⁶⁾。最終的に得られた NAC の DA は Hirai 等の報告した ¹H-NMR 法によって決定した⁷⁾。

2.3 ペクチナーゼの化学修飾

ペクチナーゼの化学修飾は、我々が以前報告した方法にしたがって行った⁵⁾。使用した PEO-MA の分子量は 15,000 であり、その構造を Fig. 1 に示した。本研究で使



Development of Novel Chitosan-based Surfactant with Controlled molecular weight and functional groups: Effect of N-Acetylation Degree on N-Acetylated Chitosan Hydrolysis with Commercially Available and Modified Pectinase

Toshio Kajiuchi

Graduate School of Science and Engineering,
Tokyo Institute of Technology

用した PEO-MA 修飾ペクチナーゼの修飾率は 88% であった。

2.4 キトサンの酵素的加水分解

2.5g/L 酵素溶液(0.50mL)を 1w%キトサン溶液(0.50 mL)に加えることにより酵素反応を開始した。ただちに反応液を 40℃の恒温槽に移し、120rpm による振とうを行った。初期基質濃度および初期酵素濃度はそれぞれ 0.5w% および 1.25g/L とした。反応液の pH は 5.9 とした。反応開始から 2 時間後に 0.5mol/L Na_2CO_3 水溶液 (1mL) を反応液に添加し反応を停止させた後、生成還元糖を定量した。生成還元糖の定量は D-グルコサミンを標準物質として Schales 変法によって行った⁸⁾。

酵素反応速度論を求めるためには、初期 NAC 濃度(S_0)を $0.5\text{g}/\text{dm}^3$ から $5.0\text{g}/\text{dm}^3$ の間で変化させて、初期加水分解速度 (v_0) の測定を行った。ミカエリス定数 (K_m) と最大速度 (V_m) の値は S_0/v_0 対 S_0 プロットの勾配 (V_m^{-1}) と切片 (K_m/V_m) より求めた。

3. 結果と考察

3.1 調製した NAC の DA

NAC の DA と N-アセチル基の分布はキトサンの溶液物性に著しい影響を及ぼす^{6, 9)}。これによって NAC の酵素的加水分解も影響を受けることが予想される。本実験ではキトサンの N-アセチル化を均一系で行った。したがって、N-アセチル基はキトサン分子鎖中でランダムに分布

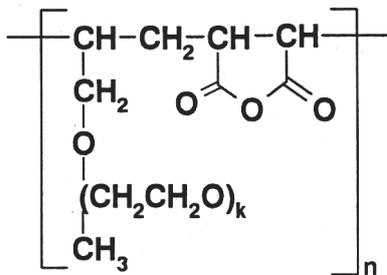


Fig.1 Structure of polyethyleneoxide-maleic anhydride copolymer.

Table 1 Characteristics of N-acetylated chitosans prepared under homogeneous condition.

Rm* [-]	DA** [-]	Solubility***
0	0.022	soluble
2.06	0.153	soluble
6.17	0.328	soluble
25.7	0.540	soluble

*) Rm, Molar ratio of acetic anhydride to D-glucosamine unit in Chitosan 10 B.

**) DA, Degree of N-acetylation, was determined by ¹H-NMR method.

***) Solubility, Solubility in acetate buffer (pH 5.9)

しているものと考えられる。NAC の DA の調整は添加する無水酢酸の量を変化させることによって行った。得られた NAC の DA を Table 1 に示す。すべての NAC は酵素反応に使用する酢酸緩衝液に溶解した。

3.2 異なる DA を持つ NAC の初期加水分解速度

ヘテロ多糖類としてのキトサンに作用する酵素は 2 種類に分類することができる。一つは GlcN 還元末端での加水分解を触媒するキトサナーゼ型の酵素であり、もう一つは GlcNAc 還元末端での加水分解を触媒するキチナーゼ型の酵素である。このように DA はキトサンに対する酵素の作用において重要な役割を果たす。キトサナーゼの場合は DA の増加とともに初期活性は増大する¹⁰⁾。キチナーゼの場合は DA の増加とともに初期活性は減少する^{11, 12)}。

本実験では酵素反応を 40℃, pH5.9 の条件下でキトサンの均一溶液を用いて行った。Fig. 2 に NAC の DA と初期加水分解速度の関係を示す。未修飾酵素を用いた場合には、キトサン 10B (DA = 0.022) の初期加水分解速度はほとんど 0 であったが、DA = 0.3 までの範囲では DA の増大とともに初期加水分解速度は増大した。DA = 0.3 以上では初期加水分解速度は変化しなかった。この結果は未修飾酵素が NAC 分子中の GlcNAc 残基を認識していることを示している。また、キトサンの N-アセチル化によってペクチナーゼによる初期加水分解速度を増大させることがわかった。

修飾酵素の場合には、DA の値にかかわらず未修飾酵素より初期加水分解速度は若干低くなった。これは PEO-MA 共重合体による酵素の化学修飾によって、部分的に酵素活性が失われたためと考えられる。一方、修飾酵素の場合も、DA の増大とともに初期加水分解速度は増大しており、修飾酵素も NAC の GlcNAc 残基を認識していることがわかった。

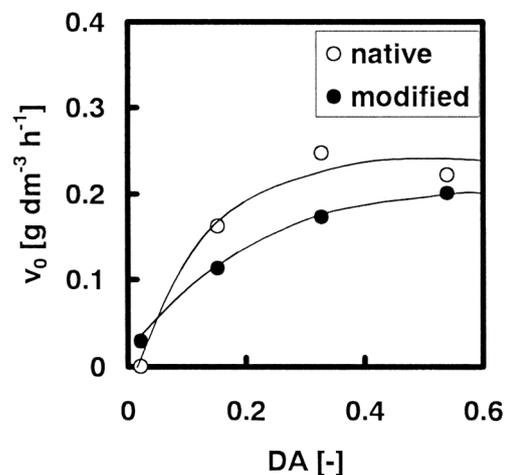


Fig.2 Effect of DA on v_0 . Open and closed circles show the v_0 value of native and modified pectinases, respectively.

3.3 速度論量に及ぼすDAおよび酵素の化学修飾の影響

基質のDAによって酵素と基質との間の親和性が変化することが予想される。そこで初期基質濃度 (S_0) を 5.0 g/dm^3 から 5.0 g/dm^3 の範囲で変化させて、初期加水分解速度 (v_0) を測定し、速度論量 K_m と V_m を S_0/v_0 対 S_0 プロットより求めた (Fig. 3)。

K_m と基質のDAの関係を Fig. 4 に示す。 K_m 値は酵素とNACとの間の親和性を表す指標と考えることが出来る。未修飾酵素を用いた場合、NACのDAが高いほど K_m 値は小さくなり、酵素とNACとの間の親和性が增大した。この結果から、未修飾酵素によるNACの加水分解はGlcNAc残基を認識することによって起こることがわかった。

PEO-MAによるペクチナーゼの化学修飾によって酵素

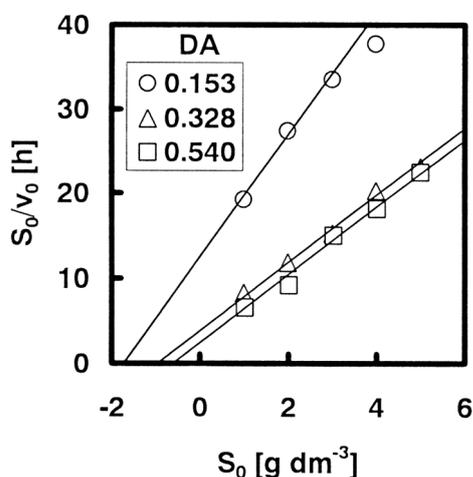


Fig. 3 Examples of S_0/v_0 versus S_0 plots for the determination of kinetic parameters. Open circle, triangle and square mean the data of NACs with DA of 0.153, 0.328 and 0.540, respectively, used as substrate. Enzyme, native pectinase.

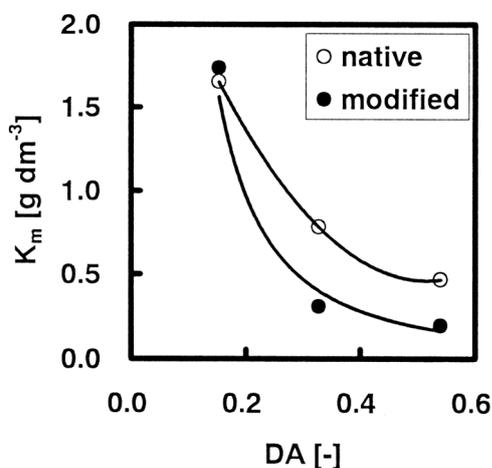


Fig. 4 Relationship between K_m and DA. Open and closed circle show the K_m value of native and modified pectinases, respectively.

と基質の親和性が変化することが予想される。Fig. 4 に示したように、DA = 0.15 のNACに対しては酵素を化学修飾した場合も K_m 値は変化しなかった。一方、DA = 0.3 以上のNACに対しては酵素を化学修飾した場合には K_m 値は著しく低下し、酵素と基質との親和性が高まることがわかった。このような修飾酵素と基質の親和性が增大する理由として、疎水的相互作用、静電的相互作用、水素結合などにより酵素表面の微小環境が変化したことが考えられる¹³⁾。

V_m とDAの関係を Fig. 5 に示す。未修飾酵素、修飾酵素どちらの場合も、DAが0から0.3の範囲ではDAの増加とともに V_m 値は増大し、DAが0.3以上では V_m 値は変化しなかった。

4. 総括

未修飾ペクチナーゼおよび修飾ペクチナーゼを用いて異なるDAを持つNACの加水分解を行った。実験結果から、どちらの酵素の場合もNACのDAによって加水分解特性が影響を受けることが明らかになった。さらに、修飾酵素を用いた場合には未修飾酵素とは異なる加水分解特性を示した。

未修飾酵素を使用した場合、DAが0.3までの範囲ではDAの増加とともに初期加水分解速度は増大し、DAが0.3以上の範囲では初期加水分解速度は変化しなかった。一方、修飾酵素を使用した場合、DAが0.5までの範囲でDAの増加とともに初期加水分解速度は増大した。また、修飾酵素の初期加水分解速度は未修飾酵素より若干低い値であった。

未修飾酵素および修飾酵素によるNAC加水分解における K_m 値はどちらの場合もDAの増加とともに減少した。すなわち、DAの増加とともにNACと酵素の親和性が增大することがわかった。DAが0.3以上の範囲では修飾酵素は未修飾酵素より低い K_m 値を示した。これによって、

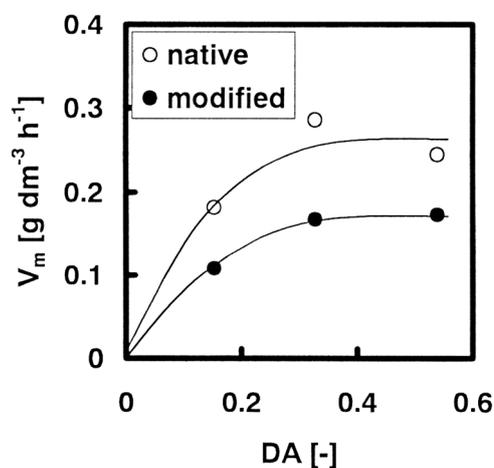


Fig. 5 Relationship between V_m and DA. Open and closed circle show the V_m value of native and modified pectinases, respectively.

ペクチナーゼの PEO-MA による化学修飾が酵素と NAC の親和性を向上させる働きがあることが明らかになった。

なお、本研究の成果は *Biochemical Engineering Journal*, 7, 85-88 (2001) に報告した。

(引用文献)

- 1) K.M. Varum, M.H. Ottoy, O. Smidsrod, *Carbohydr. Polym.* 25 (1994) 65-70
- 2) D. Pantaleone, M. Yalpani, M. Scollar, *Carbohydr. Res.* 237 (1992) 325-332
- 3) R.A.A. Muzzarelli, W. Xia, M. Tomasetti, P. Ilari, *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1995) 541-545
- 4) M. Yalpani, D. Pantaleone, *Carbohydr. Res.* 256 (1994) 159-175
- 5) Y. Shin-ya, T. Kajiuchi, H. Hinode, J.W. Park, *J. Chem. Eng. Japan* 31 (1998) 930-935
- 6) N. Kubota, Y. Eguchi, *Polym. J.* 29 (1997) 123-127
- 7) A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima, *Polym. Bull.* 26, (1991) 87-94
- 8) T. Imoto, K. Yagishita, *Agr. Biol. Chem.* 35 (1971) 1154-1156
- 9) M.W. Anthonsen, K. M. Varum, O. Smidsrod, *Carbohydr. Polym.* 22 (1993) 193-201
- 10) N. Hutadilok, T. Mochimasu, H. Hisamori, K. Hayashi, H. Tachibana, T. Ishii, S. Hirano, *Carbohydr. Res.* 268 (1995) 143-149
- 11) S. Hirano, H. Tsuchida, N. Nagao, *Biomaterials* 10 (1989) 574-576
- 12) S. Aiba, *Int. J. Biol. Macromol.* 15 (1993) 1-5
- 13) H.F. Gaertner, A.J. Puigserver, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 150-155