〔澱粉科学 (*Denpun Kagaku*) 第 37 巻 第 2 号 p. 79～86 (1990)〕

キチン，キトサンオリゴ糖の生産と利用†

坂井和男*，南条文雄*，碓氷泰市**

Production and Utilization of Oligosaccharides from Chitin and Chitosan

Kazuo SAKAI,* Fumio NANJO* and Taichi USUI**

* *Research and Development Department, Yaizu Suisankagaku Industry Co., Ltd. (5-8-13, Kogawashinmachi, Yaizu 425, Japan)*

** *Department of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University (836, Ohya, Shizuoka 422, Japan)*

Partial acid hydrolysis of chitin in mineral acid led to chitin-oligosaccharides of $GlcNAc_2$-$GlcNAc_5$ in quantitative yield, but it gives only low yields of $GlcNAc_6$ and $GlcNAc_7$. So we tried to improve such higher oligosaccharides of the hexamer and heptamer. A chitinase from *Nocardia orientalis* could be used for the synthesis of $GlcNAc_6$ and $GlcNAc_7$ from $GlcNAc_4$ and $GlcNAc_5$ as the initial substrates, respectively. Sugar-elongation reaction from $GlcNAc_2$ as an initial substrate to $GlcNAc_6$ and $GlcNAc_7$ was also efficiently induced through lysozyme catalysis. In these enzymatic reactions, the addition of ammonium sulfate to the reaction system resulted in a significant increase in the hexamer and heptamer productions. Furthermore, *p*-nitrophenyl penta-*N*-acetyl-β-chitopentaoside (PNP-$GlcNAc_5$), which is a substrate for a lysozyme assay, was synthesized by two techniques, enzymatically and chemically. On the other hand, enzymatic hydrolysis of chitosan by a chitosanase from *Bacillus* R-4 afforded a more convenient way of preparing chitosan-oligosaccharides ($GlcN_2$-$GlcN_6$) than the method using acid hydrolysis.

Utilization of these oligosaccharides has also been studied. Chitin-oligosaccharides may be of use as food materials in sweetness and growth factors of intestinal bacteria. A new colorimetric assay method of lysozyme using PNP-$GlcNAc_5$ as a substrate was very useful for routine microgram assay of lysozyme in pharmaceutical preparations and biological materials. The chromogenic trisaccharide analogue PNP-$GlcNAc_2$ proved to be an excellent substrate for assaying bacterial chitinases.

はじめに

キチンは *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が β-1,4 結合した多糖類でカニ，エビなどの甲殻類，カブトムシ，コオロギなどの昆虫類，その他シイタケ，菌類の細胞壁の構成成分として含まれ植物界におけるセルロースのように生物体の支持や防護の役割を担っている．また，その脱アセチル体であるグルコサミン (GlcN) のポリマーをキトサンと称している (Fig. 1)．キチン，キトサンは地球上で推定1000億トン/年も生産されるバイオマス資源で，その利用研究が盛んに行われている．

最近，これらオリゴ糖に種々の生理活性が見出された．キチンオリゴ糖 ($GlcNAc_6$) がマウスに対して顕著な免疫機能亢進効果や抗腫瘍活性を示し[1]，そして植物に対してはメロンのキチナーゼ活性誘導因子としてのエリシター活性を有していること[2]や，カボチャのエチレン生成に関与する酵素活性を誘導すること[3]を認めている．また，キトサンオリゴ糖 ($GlcN_7$) は植物病原菌 *Fusarium sorani* に対し抗菌活性を示し，さやえんどうの生

† "Proceedings of the Amylase Symposium, 1989"

* 焼津水産化学工業㈱研究所 (425 焼津市小川新町 5-8-13)

** 静岡大学農学部応用生物化学科 (422 静岡市大谷 836)

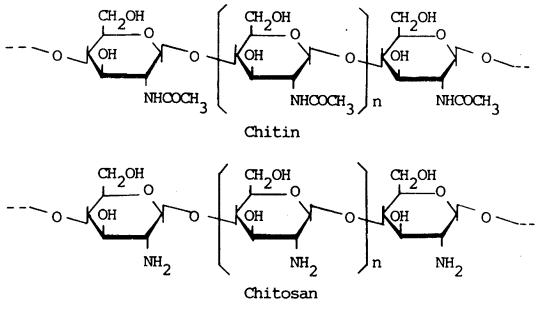

Fig. 1. Generalized structure of chitin and chitosan.

産する抗菌物質ピサチンを誘導することを認めている[4]. このようなオリゴ糖の機能は未利用資源であるキチン, キトサンの高度利用を達成するうえで非常に重要と考えられる. そこで, 筆者らはオリゴ糖の生産法とその利用について検討した. 本稿では, キチン, キトサンオリゴ糖の製法の概要とその用途開発の一端について述べる.

1. キチンオリゴ糖

1) 酸加水分解によるオリゴ糖の生産

Fig. 2 に, キチンから調製されるオリゴ糖とその関連を示した. キチンオリゴ糖の調製は過去いくつかなされていた[5~7] が, 一連の重合度のオリゴ糖 ($GlcNAc_2$～$GlcNAc_7$) は得られていなかった. しかし, 1958 年 Barker ら[8] はキトサンを塩酸により加水分解し, これを *N*-アセチル化した後, 活性炭カラムによる分離を行い, $GlcNAc_7$ までのオリゴ糖を得た. そして, 1964 年 Rupley[9] はリゾチーム基質としてオリゴ糖を得るためにキチンを種々の条件で塩酸加水分解し, 活性炭カラムによる分離精製を行い, $GlcNAc_5$ までのオリゴ糖を得た. この方法はキチンオリゴ糖の一般的調製法として広く用いられている. また最近ではふっ化水素によりキチンを加水分解する改良法が示されている[10].

筆者らは, これら一連の重合度のキチンオリゴ糖を効率的に生産するための検討を行った. キチンを濃塩酸で所定時間加水分解し, 中和後反応液を活性炭カラムに吸着させ, エタノールにより溶出したオリゴ糖の収率および組成の経時変化を HPLC により調べた. 反応温度はアセチル基の加水分解をできるだけ抑えるため 40℃ で行った (Table 1). 加水分解の経過時間にしたがいオリゴ糖の収率は高くなり, $GlcNAc_2$, $GlcNAc_3$ など重合度の低いオリゴ糖が増加した. しかし, $GlcNAc_5$, $GlcNAc_6$ など重合度の高いオリゴ糖は増加後減少する傾向にあった. この場合, 重合度の高いオリゴ糖を生産するには, 40℃ では 2 時間の加水分解が最適であった. また 30℃ では 6 時間の加水分解で同様の結果が得られた.

キチンの加水分解液からのオリゴ糖の回収には活性炭カラムを用いた. この方法は, 活性炭がオリゴ糖を特異的に吸着し単糖や中和により生成した塩類を吸着しない特性を利用したもので, 溶出には 50%エタノールを用いた. オリゴ糖の分離精製は 0→50% エタノール濃度勾配により $GlcNAc_2$～$GlcNAc_7$ を順次溶出して行い, それぞれのオリゴ糖画分を分画した. $GlcNAc_2$, $GlcNAc_3$ は約 10%, $GlcNAc_4$, $GlcNAc_5$ は 5～10%, $GlcNAc_6$, $GlcNAc_7$ は 3～5%の収率でキチンから得ることができた. また, $GlcNAc_2$～$GlcNAc_6$ の純度は HPLC で

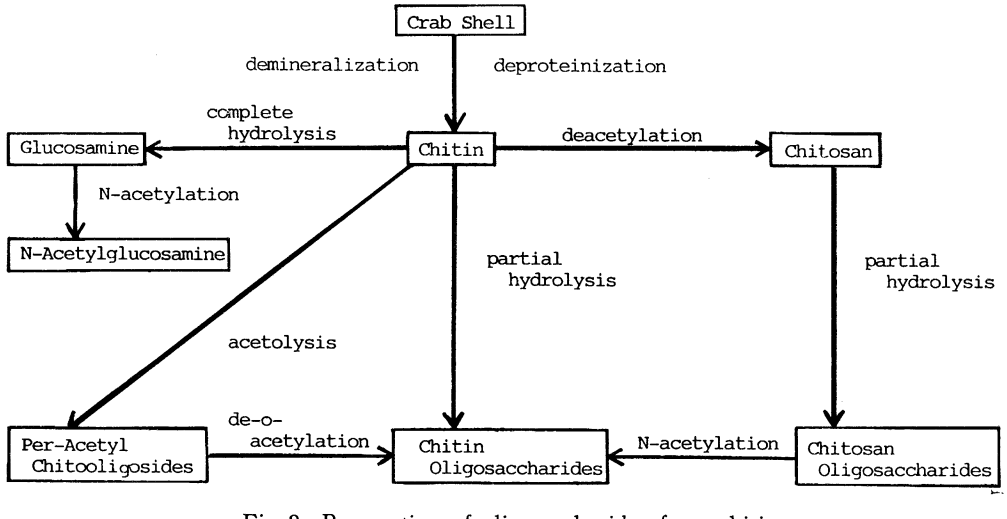

Fig. 2. Preparation of oligosaccharides from chitin.

Table 1. Yields of chitin-oligosaccharides by acid hydrolysis at 40℃.

Reaction time (hr)	Yield (%)				
	$GlcNAc_2$	$GlcNAc_3$	$GlcNAc_4$	$GlcNAc_5$	$GlcNAc_6$
1.5	5.3	6.4	6.3	5.5	3.9
2.0	7.1	8.2	8.0	6.9	4.9
2.5	9.9	10.0	8.2	5.2	3.4
3.0	12.0	10.7	7.9	5.2	2.2

80～95%で重合度が高いほど悪く，$GlcNAc_7$ の画分は50%以下であった．これらはさらに，ゲル濾過または分取用 HPLC で高純度のオリゴ糖を調製することができた．活性炭カラムによる方法はオリゴ糖の粗分離には適していたが，オリゴ糖の吸着量が少なく溶出に多量のアルコールを必要とし単糖の GlcNAc が回収できないことなど大量生産法として適さないと思われた．そこで，キチンの加水分解後の中和溶液からの塩類の除去をイオン交換膜電気透析装置で検討したところ，オリゴ糖混合物を大量に生産することができた．本法は工業的生産法として優れていると思われる．

2) キチナーゼによるオリゴ糖の生産

キチン，キトサン分解酵素は細菌，放線菌，カビなど微生物に広く分布し，プロトプラストの調製に利用されている．キチンの分解にはキチナーゼと *β-N*-アセチルグルコサミニダーゼが関与している．微生物の生産するキチナーゼは，ほとんどがエンドタイプでキチンの β-1,4 結合をランダムに加水分解し，オリゴ糖に対しては2糖単位で加水分解するものが多い．また，*β-N*-アセチルグルコサミニダーゼはキチンオリゴ糖および $GlcNAc_2$ に作用し，その非還元末端より GlcNAc を遊離する．滝口ら[11,12]は好熱性細菌による $GlcNAc_2$ の特異な生産法を報告している．しかしながら，3糖以上のオリゴ糖を特異的に生産するキチナーゼまたは微生物はまだ発見されていない．このようなことから，生理活性を有する高重合度のオリゴ糖の生産は難しいものと思われた．

そこで，筆者らはキチン分解酵素の研究過程において，*Nocardia orientalis* IFO 12806 株産生キチナーゼがキチンオリゴ糖に対し強い糖転移能を有することを見出し[13]，低重合度のオリゴ糖から高重合度のオリゴ糖の効率的生産を試みた．*Nocardia orientalis* IFO 12806 株の培養液を硫安分画後，順次 CM-Sephadex C-50, Bio-Gel P-60 によるカラムクロマト，Phenyl-Sepharose CL-4B アフィニティクロマトを行い，本酵素を精製した．酵素を高基質濃度5% $GlcNAc_4$ 存在下 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中，40℃で22時間反応を行った．反応液は時間経過に伴い白濁し，やがて沈澱を生じた．反応液全体を水で希釈可溶化し，Bio-Gel P-4 ゲル濾過クロマトを行った (Fig. 3)．この反応により $GlcNAc_6$ が生成し，また沈澱の主成分であることがわかった．同様に，2.5% $GlcNAc_5$ を基質として5時間反応を行うと，$GlcNAc_7$ が得られた．糖転移反応によって得られた $GlcNAc_6$, $GlcNAc_7$ は，基質あたりそれぞれ21%と18%の転換率であった．本反応によるオリゴ糖の生成は，基質濃度，反応温度，pH により著しく影響を受けた．さらに本反応系に20%硫安を添加したところ，無添加に比べ $GlcNAc_6$ の最大生成に達する時間は2倍を要したが，その収率は1.6倍に増加した[14]．以上の結果から，本酵素は2糖単位で鎖延長を行う特異性の高い糖転移作用を有し，Fig. 4 に示す反応機構に基づいて反応が進行

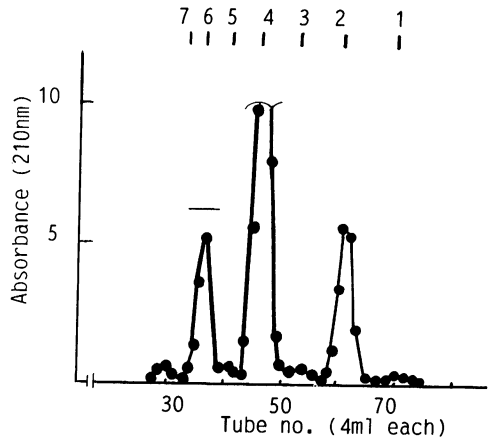

Fig. 3. Gel chromatographic separation of transglycosylation products by the action of chitinase on $GlcNAc_4$.

Chromatography of carbohydrates was carried out on a column (2.6×95 cm) of Bio-Gel P-4, 200–400 mesh, at 50℃. The column was eluted with degassed water at a flow rate of 12 ml/hr.

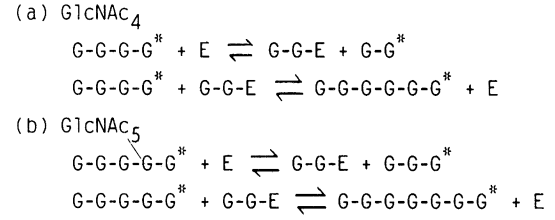

Fig. 4. Proposed mechanism of chitinase transglycosylation.

E, chitinase ; G, *N*-acetylglucosamine ; G*, reducing-end group.

するものと考えた．すなわち，高濃度の基質存在下では，酵素が $GlcNAc_4$ を分解して $GlcNAc_2$ とジ-*N*-アセチルキトビオシル-複合体を生成し，これに大過剰の基質が受容体となり，転移して $GlcNAc_6$ を合成する．この反応機構は $GlcNAc_5$ から $GlcNAc_7$ の合成反応にも適応できる．また硫安の添加は生成量の増大をもたらした．

3) リゾチームによるオリゴ糖の生産

リゾチームは本来加水分解酵素であるが，糖転移能をもつ酵素として知られている．市販酵素として容易に入手できるニワトリ卵白リゾチームを用いて，キチンオリゴ糖の最小単位である $GlcNAc_2$ から高重合度オリゴ糖の開発を試みた[15]．$GlcNAc_2$ を10%基質濃度として，30%硫安を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中にリゾチーム1%を添加し，70℃で8時間反応を行った．反応液は時間経過に伴い白濁し，そして多量の沈澱を生じた．沈澱を遠心で集め，再溶解後 Bio-Gel P-4 ゲル濾過クロマトを行った (Fig. 5)．この反応によって，$GlcNAc_6$ と $GlcNAc_7$ が生成することがわかった．その収率は用いた $GlcNAc_2$ 重量に対してそれぞれ 9.5%と 6.5%で

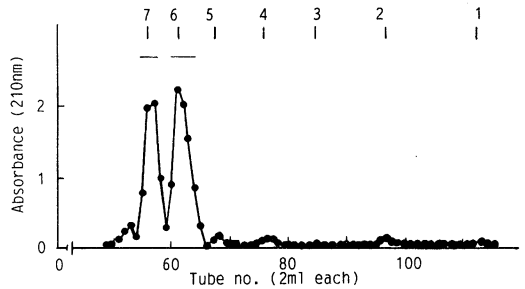

Fig. 5. Gel chromatographic separation of transglycosylation products by the action of lysozyme on $GlcNAc_2$.

Chromatography of carbohydrates was carried out on a column (2×100 cm) of Bio-Gel P-4, 200–400 mesh, at 50℃. The column was eluted with degassed water at a flow rate of 12 ml/hr.

あった．これらの収量は硫安無添加に比較し約6倍の収量を与えた．以上の結果から，リゾチームは Fig. 6 に示す反応機構に基づいて $GlcNAc_2$ から高重合度オリゴ糖を合成するものと考えた．また硫安のような高塩濃度下では，いったん生成した $GlcNAc_6$ や $GlcNAc_7$ の溶解度が低いために，これらオリゴ糖が優先的に不溶化沈澱してくるものと思われる．

2. キトサンオリゴ糖

1) 酸加水分解によるオリゴ糖の生産

酸加水分解によるキトサンオリゴ糖の調製は，1957年 Horowitz ら[16]により行われた．分解はキトサンに対し多くの塩酸を用いしかも長時間を要していた．筆者らは効率的なキトサンオリゴ糖の製造法について検討した．

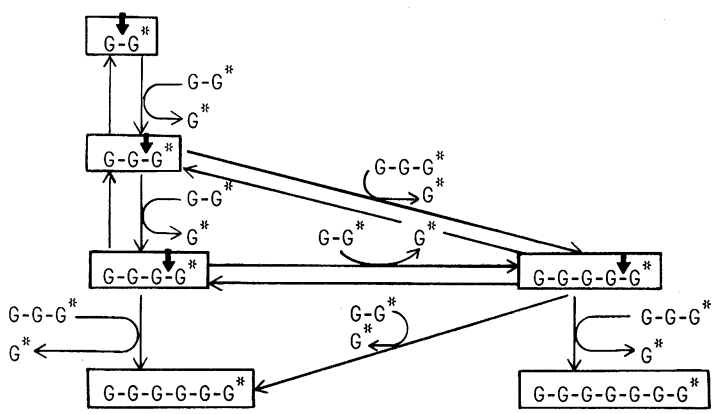

Fig. 6. Proposed mechanism of sugar-elongation reaction by lysozyme on $GlcNAc_2$.

G, *N*-acetylglucosamine ; G*, reducing-end group.

Table 2. Yields of chitosan-oligosaccharides by acid hydrolysis at 80℃.

Reaction time (hr)	Yield (%)					
	GlcN	$GlcN_2$	$GlcN_3$	$GlcN_4$	$GlcN_5$	$GlcN_6$
1.0	12.8	13.9	12.4	2.6	2.5	2.3
2.0	20.8	16.6	13.0	3.2	2.5	1.4
4.0	24.3	15.3	11.3	3.0	2.3	—
6.0	50.8	10.9	6.2	0.9	—	—
8.0	66.7	4.3	—	—	—	—

Table 3. Solubility of chitosan-oligosaccharide hydrochlorides at 20℃.

	Solubility (%)	
	Methanol	Water
GlcN	0.4	37
$GlcN_2$	5.4	190
$GlcN_3$	37.0	177
$GlcN_4$	45.0	158
$GlcN_5$	4.6	86
$GlcN_6$	1.7	68

キトサンに5倍量の濃塩酸を加え，80℃で1～8時間加水分解を行った．分解液は濃縮し塩酸除去後，Dowex 50 W のイオン交換樹脂カラムに展開し，0→4 N の塩酸濃度勾配によりそれぞれのオリゴ糖を分離して収率を調べた (Table 2)．4時間以上の加水分解ではオリゴ糖の収率が低下し単糖の GlcN が大きく増加した．最適の分解時間は1時間であった．しかしキトサンの加水分解物中には単糖が多く含まれ，次のオリゴ糖の分離工程に悪影響を及ぼした．そこで，単糖を簡便に除く方法について検討した．Table 3 には単糖とオリゴ糖のメタノールと水に対する溶解度を示した．単糖だけがメタノールに対して非常に溶解しにくいことが判明し，この性質を利用して単糖を除いた後，Dowex 50 W のイオン交換クロマトでオリゴ糖を分離した．この結果，良好な分離パターンが得られ，またカラム規模の縮小化を図ることができた．しかしながら，キトサンオリゴ糖もキチンオリゴ糖と同様，酸加水分解法では高重合度のオリゴ糖の量産には限界があると思われる．

2) キトサナーゼによるオリゴ糖の生産

キトサンの分解には主としてキトサナーゼが関与している．キトサナーゼは種々の微生物から見出され，キトサンオリゴ糖の生産が試みられている[17]．キトサナーゼの多くは単糖の生成がほとんどなく，オリゴ糖の生産には有効であると考えられる．そこで，*Bacillus* R-4[18,19]の生産するキトサナーゼを用いてオリゴ糖の生産について検討した．基質には80%と100%脱アセチル化したキトサンを用いキトサナーゼによる分解を試みた (Fig. 7)．100%脱アセチル化キトサンに比べ，80%脱アセチル化キトサンの分解の進行度合いは明らかに低いことが示された．これは分解物中に存在するアセチル基により阻害されたと考えられる．またこの分解物の HPLC 分析の結果，キトサンオリゴ糖と同定できないピークがいくつか存在していた．このことから，オリゴ糖の生産には100%脱アセチル化したキトサンが適していることがわかった．6時間の分解反応では，$GlcN_2$～$GlcN_6$ が主生成物で生成し，48時間では $GlcN_2$～$GlcN_4$ が主生成物であ

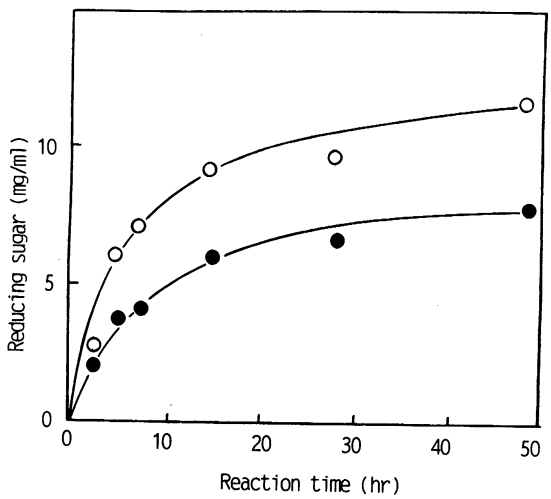

Fig. 7. Course of hydrolysis of 100% deacetylated chitosan (○) and 80% deacetylated chitosan (●) by chitosanase R-4.

Reaction mixtures (200 ml) containing 80% or 100% deacetylated chitosan (2.0 g) and chitosanase R-4 (2.0 U) in 50 mM acetate buffer (pH 5.5) were incubated at 40℃. The reducing sugar was measured by Schales' method with glucosamine as standard.

Table 4. Composition of chitin-oligosaccharides mixture.

Mixture	Composition (%)					
	GlcNAc	$GlcNAc_2$	$GlcNAc_3$	$GlcNAc_4$	$GlcNAc_5$	$GlcNAc_6$
M-1H	54	20	12	9	4	1
M-1	36	21	17	13	10	3
M-2	—	33	29	21	12	5

Table 5. Growth response of intestinal bacteria to chitin-oligosaccharides mixture.

Bacteria	GlcNAc	M-1H	M-1	M-2
Lactobacillus acidophilus JCM 1132	++[a]	++	++	+
Bifidobacterium breve JCM 1192	+	+	±	−
Bifidobacterium bifidum JCM 1255	+	+	±	±
Bifidobacterium adolescentis JCM 1275	±	±	±	±
Bifidobacterium longum JCM 1217	±	±	±	±
Escherichia coli IFO 3301	++	++	++	++

[a] Symbols : ++, 75 %< ; +, 50-75 % ; ±, 25-50 % ; −, 25 %>.

った．このときオリゴ糖の収率はキトサンに対し，$GlcN_2$ で14%，$GlcN_3$ で32%，$GlcN_4$ で30%であった．このように，キトサナーゼによるキトサンオリゴ糖の製造法は単糖の生成がほとんどなく，またオリゴ糖を高い収率で得られることからきわめて有力な手段と思われる．

3. キチンオリゴ糖の利用

1) 食品素材としての特性

キチンを塩酸で加水分解後，電気透析装置または活性炭カラムを用いて糖組成の異なるキチンオリゴ糖混合物3種類（M-1H, M-1, M-2）を調製した．その糖組成をTable 4に示す．次に，これらオリゴ糖の味覚，溶解性，腸内細菌による利用性を調べた．キチンオリゴ糖は大変さわやかな甘味を有し，砂糖と甘味度を比較したところ，GlcNAc で 55%，M-1H で 35%，M-1 で 30%，M-2 で25%であった．オリゴ糖の重合度が高くなるにしたがって甘味度は低下した．また，溶解性において2糖は単糖より溶解度が高く（37%），3糖以上になると溶解度が大きく低下し（2.5%以下），また5，6糖は低温ほど溶解しやすくなるという特徴が認められた．これらはM-1H, M-1, M-2 の溶解性にも反映され，また溶解度はそれぞれ20，10，5%であった．腸内細菌による利用性はグルコースを対照として菌の発育度により判定した．PYF 培地にそれぞれ0.5%の糖を添加し，37℃，48時間嫌気培養後 660 nm における濁度を測定して行った(Table 5)．キチンオリゴ糖はビフィズス菌に利用され，また *E. coli* にも利用された．とくに *Lactobacillus acidophilus* によく利用されることがわかった．食品素材としての利用の可能性があると思われる．

2) リゾチーム活性測定基質

キチンオリゴ糖はリゾチームによって分解されることが知られており，$GlcNAc_4$ に *p*-ニトロフェニル基や4-メチルウンベリフェリル基を結合させた誘導体が合成され，リゾチーム活性測定基質としての検討が試みられている[20~22]．筆者らは，$GlcNAc_4$ に比較しリゾチームの分解速度の速い $GlcNAc_5$ に *p*-ニトロフェニル基を結合させた *p*-ニトロフェニル ペンタ-*N*-アセチル-β-キトペンタオシド (PNP-$GlcNAc_5$) を合成し[23]，リゾチーム基質としての検討を行った．リゾチームは PNP-$GlcNAc_5$ に作用し，PNP-GlcNAc を優先的に遊離することから，PNP-GlcNAc を分解する β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼを共役酵素として反応系に加え，遊離する *p*-ニトロフェノールを測定することによってリゾチームの定量を試みた．その反応を Fig. 8 に示す．Fig. 9 には PNP-$GlcNAc_5$ と PNP-$GlcNAc_4$ に対する卵白リゾチームと人尿リゾチームの活性測定結果を示した．PNP-$GlcNAc_5$ は PNP-$GlcNAc_4$ よりも卵白リゾチームにおいて20倍，人尿リゾチームにおいて13倍感度が高く，優れた基質であることが判明した．さらに本法は，15～60分反応でリゾチーム酵素量 2～120 μg の範囲において直線的な酵素濃度依存性を示した[24]．また，その製剤への適用性について報告され[25]，従来から用いられ

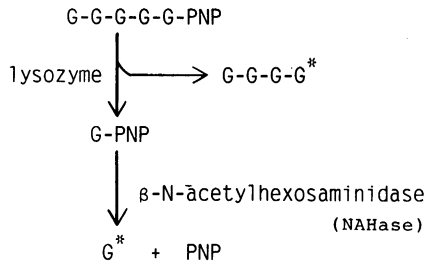

Fig. 8. Principle of the colorimetric method for lysozyme assay.

G, *N*-acetylglucosamine ; PNP, *p*-nitrophenol ; G*, reducing-end group.

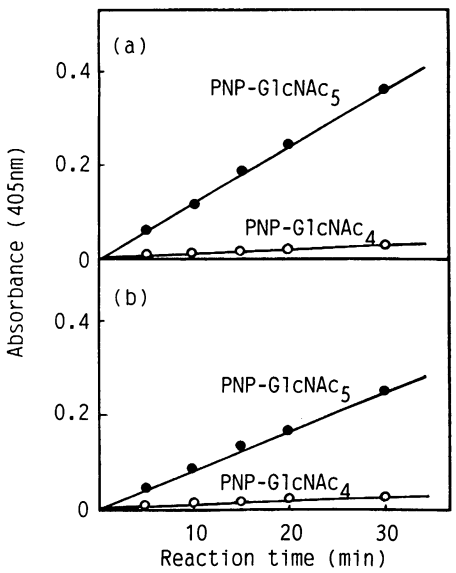

Fig. 9. Comparison of the sensitivity of PNP-GlcNAc$_5$ with that of PNP-GlcNAc$_4$.

(a) A reaction mixture (1.5 ml) containing 0.28 mM PNP-GlcNAc$_5$ or 1.0 mM PNP-GlcNAc$_4$, 25 μg of hen egg-white lysozyme, and 0.2 unit of NAHase in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) was incubated at 37℃. (b) Conditions were the same as in (a) except for using 25 μg of human urinary lysozyme.

ている溶菌法にかわる新しいリゾチーム活性測定法として期待される．

3) キチナーゼ活性測定基質

同様に，PNP-GlcNAc$_2$を用いて *Nocardia orientalis* のキチナーゼ活性測定を試みた．これは本キチナーゼがPNP-GlcNAc$_2$～PNP-GlcNAc$_5$に対し，非還元末端よりGlcNAc$_2$を優先的に遊離する特性[14]に基づく．とくにPNP-GlcNAc$_2$では*p*-ニトロフェノールを直接遊離する．その結果，遊離した*p*-ニトロフェノール量とキチナーゼ量との間には良好な直線性が認められた．さらに *Streptomyces griseus*, *Aeromonas hydrophila* など微生物起源の異なるキチナーゼを用いて行ったところ同様の結果が得られ，PNP-GlcNAc$_2$はキチナーゼの優れた測定基質となることが示唆された．

おわりに

近年キチン，キトサンオリゴ糖の有用性が見出され，キチン，キトサンからオリゴ糖を酵素あるいは微生物により生産しようとする試みが盛んとなった．従来の酸加水分解法はキチン，キトサンともにオリゴ糖組成のコントロールが難しく，とくに高重合度のオリゴ糖の収率がきわめて低いものであった．キチンオリゴ糖の生産において，比較的得やすい低重合度のオリゴ糖からキチナーゼ，リゾチームの糖転移反応を用いた高重合度のオリゴ糖の生産法は有力な手段と考えられる．また，この糖転移反応の技術は本稿のリゾチーム活性測定基質（PNP-GlcNAc$_5$）の生産にも適応でき[26]，さまざまな有用物質の生産への応用が期待できる．一方，キトサンオリゴ糖はキトサナーゼにより効率的に生産できた．したがって，これをアセチル化してキチンオリゴ糖を大量に得ることも可能と考えられる．また，このようなオリゴ糖の生産技術の開発とともに用途開発も重要な課題となっている．本稿では食品素材としての特性と酵素活性測定基質の開発について紹介したが，まだ用途開発は途についたばかりである．これからの研究に期待したい．

今後は，経済性を考慮したオリゴ糖の生産技術開発とその用途開発をさらに進めていきたいと考えている．

文　献

1) K. SUZUKI, T. MIKAMI, Y. OKAWA, A. TOKORO, S. SUZUKI and M. SUZUKI : *Carbohydr. Res.*, **151**, 403–408 (1986).
2) D. ROBY, A. GADELLE and A. TOPPAN : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 885–892 (1987).
3) H. HYODO, H. FUJINAMI, E. OKADA and T. MOCHIZUKI : in *Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants*, H. CLIJSTERS *et al.*, eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 229 (1989).
4) D. F. KENDRA and L. A. HADWIGER : *Exp. Mycol.*, **8**, 276–281 (1984).
5) M. BERGMANN and E. SILBERKWEIT : *Chem. Ber.*, **64**, 2436–2440 (1931).
6) L. ZECHMEISTER and G. TÓTH : *Chem. Ber.*, **64**, 2028–2032 (1931).

7) F. ZILLIKEN, G. A. BRAUN, C. S. ROSE and P. GYÖRGY : *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1296-1297 (1955).
8) S. A. BARKER, A. B. FOSTER, M. STACEY and J. M. WEBBER : *J. Chem. Soc.*, 2218-2227 (1958).
9) J. A. RUPLEY : *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 245-255 (1964).
10) C. BOSSO, J. DEFAYE, A. DOMARD and A. GADELLE : *Carbohydr. Res.*, **156**, 57-68 (1986).
11) Y. TAKIGUCHI and K. SHIMAHARA : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1537-1541 (1989).
12) 滝口泰之，島原健三：農化，**63**, 1199-1205 (1989).
13) T. USUI, Y. HAYASHI, F. NANJO, K. SAKAI and Y. ISHIDO : *Biochim. Biophys. Acta*, **923**, 302-309 (1987).
14) F. NANJO, K. SAKAI, M. ISHIKAWA, K. ISOBE and T. USUI : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2189-2195 (1989).
15) T. USUI, H. MATSUI and K. ISOBE : *Carbohydr. Res.*, in press.
16) S. T. HOROWITZ, S. ROSEMAN and H. J. BLUMENTHAL : *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046-5049 (1957).
17) M. IZUME and A. OHTAKARA : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1189-1191 (1987).
18) Y. TSUJISAKA, Y. TOMINAGA and M. IWAI : *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 145-152 (1975).
19) Y. TOMINAGA and Y. TSUJISAKA : *Biochim. Biophys. Acta*, **410**, 145-155 (1975).
20) F. W. BALLARDIE, B. CAPON, M. W. CUTHBERT and W. M. DEARIE : *Bioorg. Chem.*, **6**, 483-509 (1977).
21) T. INABA, T. OHGUSHI, Y. IGA and E. HASEGAWA : *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1597-1603 (1984).
22) H. FUKUDA, T. TANIMOTO and T. YAMAHA : *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3375-3380 (1985).
23) F. NANJO, K. SAKAI, T. USUI, I. TAKAI and Y. ISHIDO : *J. Carbohydr. Chem.*, **7**, 67-82 (1988).
24) F. NANJO, K. SAKAI and T. USUI : *J. Biochem.*, **104**, 255-258 (1988).
25) 押沢 正，横田椅江，福田秀男，谷本 剛，田中彰：医薬品研究，**19**, 943-950 (1988).
26) T. USUI, Y. HAYASHI, F. NANJO and Y. ISHIDO : *Biochim. Biophys. Acta*, **953**, 179-184 (1988).

【質問】 北大農 千葉

リゾチームを用い，重合度2の基質からオリゴ糖を合成する反応において，重合度2の基質が分解され糖転移反応によって重合度3のオリゴ糖が生成される機構を考えておられるようですが，リゾチームのサブサイト親和力から考えても，重合度2あるいは3の基質が分解されて糖転移反応が起こると考えるのは合理的ではないのではないでしょうか．むしろ，初発の反応は縮合反応を考えるべきではないでしょうか．

【答】

リゾチームを用い，ジ-*N*-アセチルキトビオースを基質とした高重合度オリゴ糖の生産の酵素反応において，初発の反応はご指摘のとおり縮合反応と考えていました．ところが，反応初期の生成物を HPLC により経時的に調べてみたところ，まずトリ-*N*-アセチルキトトリオースの生成が認められ，それから，テトラ-*N*-アセチルキトテトラオースの生成が認められ，順次，高級オリゴ糖が生成いたしました．トリ-*N*-アセチルキトトリオースの生成が反応の律速段階となっているように思われました．

縮合反応によって生成したテトラ-*N*-アセチルキトテトラオースの加水分解が早いと考えても，縮合反応が優先して起こっているならば，先にテトラ-*N*-アセチルキトテトラオースの生成が少しでも認められるはずだと考えました．

以上のことから，縮合反応が起こっていることは否定できませんが，糖転移反応によりトリ-*N*-アセチルキトトリオースが生成したと推定した次第です．

(平成2年1月30日受付)