

〔醸酵工学 第57巻 第3号 131-140. 1979〕

キチナーゼ生産細菌の分離と酵素の生産条件および性質

内田 泰・光富 勝・大宝 明

佐賀大学農学部農芸化学科

Isolation of a chitinase producing bacterium, culture conditions for enzyme production and properties of the enzymes. UCHIDA, Y., M. MITSUTOMI, and A. OHTAKARA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840) *Hakkokogaku* 57: 131-140. 1979.

Chitinase producing bacteria were isolated on chitin agar plates from seashore muds of the Ariake Sea in the Kyusyu district of Japan. One strain, no. 12, having potent chitinase activity, was identified as belonging to the genus *Vibrio* on the basis of taxonomic characteristics. This strain (*Vibrio* sp. no. 12) produced an inducible chitinase system and the maximum production of chitinase was found at 30°C for 48hr culture in a medium containing 0.2% colloidal chitin, 0.2% glucose, 0.5% yeast extract and 0.5% peptone. The chitinase system consisted of chitinase and chitobiasis, which could be separated from each other by column chromatography on DEAE-Sephadex A-25. It seemed that chitinase decomposed colloidal chitin to chitin-oligosaccharides, then to *N, N*-diacetylchitobiose, which was further hydrolysed to *N*-acetylglucosamine by chitobiasis.

キチナーゼ (EC 3・2・1・14) は微生物に広く分布しているが、酵素の精製はおもに *Streptomyces* 属の放線菌¹⁻⁵⁾ を用いて行われている。著者らのうち大宝^{6,7)} は、さきに *Aspergillus niger* から初めて糸状菌キチナーゼを精製し、酵素の作用機作について詳細に報告した。これに対し、キチンを分解する細菌については多くの報告があり、⁸⁻¹⁷⁾ それらは主に土壌や海泥土などから分離されている。しかし、細菌キチナーゼは、*Serratia marcescens*,¹⁸⁾ *Arthrobacter* sp.,¹⁹⁾ *Cytophaga johnsonii*¹⁶⁾ など部分的精製が試みられたのみで、放線菌や糸状菌の場合のような精製酵素標品はまだ得られていない。

著者らは、細菌を酵素源とした強力な精製キチナーゼを得ることを目的とし、有明海沿岸の海泥土よりキチナーゼ生産細菌の分離を行った。本報では、キチナーゼ生産力の強い1菌株について、その菌学的諸性質、キチナーゼの生産条件およびキチン分解に関与する酵素系を明らかにしたので、それらの結果を報告する。

実験方法

キチナーゼ生産菌の分離および同定法 有明海沿岸より採取した土壌1gを10mlの殺菌水に懸濁し、これより2白金耳を採り、肉エキス1.0%、ペプトン1.0%、グルコース0.5%、NaCl 0.5%からなる培地 (pH7.0) 10mlに接種した。35°Cで18時間振とう培養後、培養液0.1mlをコロイダルキチンを唯一の炭素および窒素源とする分離用平板培地 (コロイダルキチン0.5%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄・7H₂O 0.1%、CaCl₂ 0.03%、寒天1.5%、pH7.0) に加え、37°Cで2~3日間培養した。生じたコロニーのうち、透明帯を生成したものを選択し、常法により純粋分離を行った。分離した菌株は分離用培地と同じ組成の斜面培地に接種し、4°Cで保存した。

キチナーゼ生産菌の菌学的性質は、*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 第8版²⁰⁾ および駒形の好気性細菌の同定²¹⁾により検討し、これに基づき生産菌の同定を行った。

培養方法 分離菌の斜面培地より1白金耳を採り、酵母エキス0.5%、ペプトン0.5%からなる培地10ml

を含む試験管 (1.8×20cm) に接種し、30°Cで24時間培養した。この培養液 1 ml をキチナーゼ生産用基本培地 50ml を含む 200ml 三角フラスコに接種し、30°Cで振とう培養した。キチナーゼ生産用基本培地の組成は、コロイダルキチン0.2%、グルコース0.2%、酵母エキス0.5%およびペプトン1.0%であり、pHは7.0である。キチナーゼ生産条件の検討では、基本培地のうち一成分の濃度を変えた培地を使用した。

基質 キチン (Sigma 社製) を用いて、コロイダルキチンは Jeuniaux の方法²³⁾ により、またグライコールキチンは千手と沖増の方法²⁴⁾ により、それぞれ調製した。粉末キチンとキトサンは生化学工業株式会社、またグライコールキトサンは和光純薬工業株式会社を使用した。N, N-ジアセチルキトビオース (キトビオース)、N, N, N-トリアセチルキトトリオース (キトトリオース) および N, N, N, N-テトラアセチルキトテトラオース (キトテトラオース) は、キチンを塩酸で加水分解し、Berkeley らの方法²⁴⁾ により Sephadex G-25カラムを用いて分離調製した。

キチナーゼ活性の測定 0.3%コロイダルキチン 1 ml, 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.6) 2 ml および酵素液 1 ml からなる反応液を 37°C で30分間振とうして反応させ、反応停止後上澄液に生成した N-アセチルグルコサミン量を Reissig らの方法²⁵⁾ で測定した。酵素活性は、1分間に 1 μmole の N-アセチルグルコサミンを生成する酵素量を 1 単位とした。

キチナーゼ生産条件の実験では、上記反応条件で遊離する N-アセチルグルコサミン量 (μg/ml) で活性を表し、また、カラムクロマトグラフィーにおいては、同じ反応条件で生成する全還元糖量を Schales 法²⁶⁾ で測定し、N-アセチルグルコサミン量 (μg/ml) に換算して活性を表した。

キトビアーゼ活性の測定 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かした 3 mM キトビオース 0.3 ml に酵素液 0.3 ml を加え、37°Cで20分間酵素反応を行った。3分間煮沸して反応停止後、反応液から 0.3 ml を分取し、生成した N-アセチルグルコサミン量を測定した。酵素活性は上記反応条件において1分間に 1 μmole のキトビオースを分解する酵素量を 1 単位として表した。

カラムクロマトグラフィー 0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.2) であらかじめ平衡化した DEAE-Sephadex A-25カラム (2.4×45cm) に、同じ緩衝液に透析した

硫酸0.7飽和分画の酵素液 (タンパク量として147mg) を吸着させた。0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.2) でカラムを洗浄した後、同じ緩衝液の 0~0.35M食塩溶液による直線濃度勾配溶出を行った。流速は毎時 60ml で、溶出液は 10ml ずつ分取した。

菌の増殖とタンパク質の定量 菌数は集落計数法により生菌数を測定し、その対数で表示した。タンパク質は、牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry 法の改良法²⁷⁾ により定量した。

実験結果および考察

キチナーゼ生産菌の分離と同定 19地点の試料よりキチナーゼ生産菌を検索した結果、11の分離用平板培地に細菌の生育が認められた。これらの菌株のうち、試料 no. 12 から分離した菌株が特に透明帯生成が顕著であったので、その 1 菌株を純粋分離し、no. 12 菌と仮称した。本菌の電子顕微鏡写真を Fig. 1 に示した。

次に、本菌の分類・同定を行うために菌学的諸性質について検討した。本菌は大きさが 1.0×1.4 μm のグラム陰性の極毛を有する短桿菌で、胞子は形成せず、運動性である。また、本菌はカタラーゼ、オキシダーゼともに陽性であり、37°Cでグルコースを嫌氣的に分解し、酸を生成するが、ガスの生成は見られなかった。2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine (*Vibrio static agent O/129*) により本菌の生育が阻害された。本菌の形態学的、培養学的ならびに生理学的性質は Table 1 に示した。これらの諸性質を検討した結果、本菌は *Vibrio* 属に属するものと判定した。以後キチナーゼ生産菌を *Vibrio* sp. no. 12 と命名する。なお、第1回キチン・キトサン国際会議²⁸⁾ における発表で、

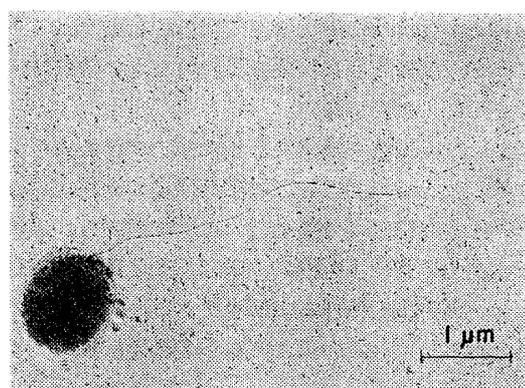


Fig. 1. Electron micrograph of the chitinase producing bacterium, strain no. 12.

Table 1. Microbial characteristics of a chitinase producing bacterium, strain no. 12.

Morphological characteristics	
Form	Short rods, rounded ends
Size	1.0×1.4μm
Motility	Motile
Flagellum	Monotrichous
Gram strain	Negative
Spore	Non-sporulating
Cultural characteristics	
Chitin agar colonies	Circular, smooth, umbilicate, undulate, glistening, semi-translucent, white, moist
Chitin agar slant	Filiform, white, glistening
Yeast-peptone slant	Spreading, pale yellow, glistening
Physiological characteristics	
Catalase	Positive
Oxidase	Positive
Gas from glucose at 37°C	Negative
Nitrate reduction	Positive
Methyl red test	Positive
Bromo cresol purple milk	Acid, peptonization
Gelatin hydrolysis	Positive
Hydrogen sulfide production	Positive
Ammonia production	Positive
Acetylmethylcarbinol production	Negative
Indol production	Positive
Starch hydrolyzation	Positive
O-F test	Fermentation
Acid production from carbohydrates	Glucose, galactose, fructose, lactose, <i>N</i> -acetylglucosamine, arabinose, sucrose and mannitol
	No gas from all carbohydrates
Oxygen demand	Facultative anaerobic
Optimum temperature	30°C
Optimum pH	7.0
Sodium chloride tolerance	7.0 (w/v)%
2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine (0/129, <i>Vibrio</i> static agent)	Sensitive

本菌は *Aeromonas* sp. に属すると推定したが, 2, 4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine に対する感受性から *Vibrio* sp. に属することが明らかとなった。*Aeromonas* sp. と *Vibrio* sp. の細菌は, いずれも

魚類の消化管内のキチナーゼ生産菌として知られている。¹⁴⁾

***Vibrio* sp. no. 12の増殖と酵素生産** キチナーゼ生産菌の増殖と, キチナーゼおよびキトビアーゼの

生産について経時的に調べた。この場合キチナーゼ活性は、コロイダルキチンから生成したオリゴ糖を市販 β -グルコシダーゼで分解し、*N*-アセチルグルコサミンにした後、定量した。その結果は Fig. 2 に示したとおり、菌の増殖は1日目で定常期に達し、pH は培養直後5日付近まで低下し、その後上昇しアルカリ性になった。pH の上昇とともに、まずキチナーゼが培養液中に生成し、2日目に酵素活性は最大に達した。キトビアーゼはキチナーゼよりもほぼ1日遅れて現れ、酵素活性は4日目に最大となり、以後減少した。

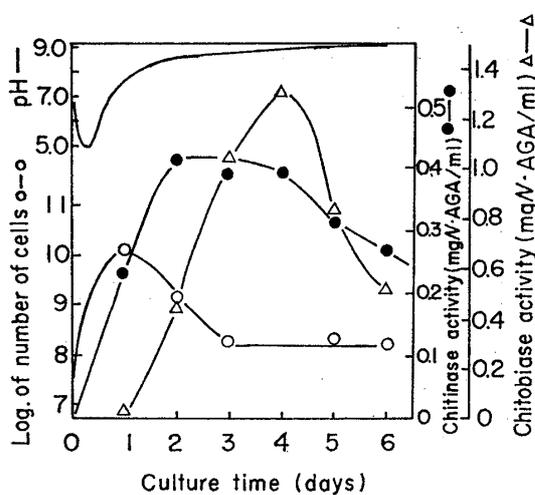


Fig. 2. Time course of cell growth and the production of chitinase and chitobiase. The strain was cultured at 30°C in medium containing 0.2% colloidal chitin, 0.2% glucose, 0.5% yeast extract and 1.0% peptone. The reaction mixture for chitinase assay contained 1ml of 0.5% colloidal chitin, 1ml of 0.1M phosphate buffer, pH 7.6 and 1ml of enzyme solution and was incubated at 37°C for 20min. Chitinase activity was determined by measuring the amount of *N*-acetylglucosamine (*N*-AGA) formed after incubation at 37°C and pH 4.0 for 1hr by the addition of 0.2ml of β -glucosidase (Biodiastase 5mg/ml, Amanoseiyaku Co., Ltd.) to 0.5ml of the supernatant of the chitinase digest. Chitobiase activity was determined by measuring the hydrolysis of *N,N*-diacetylchitobiose in a reaction mixture containing 0.3ml of 3mM chitobiose in 0.05M phosphate buffer, pH 7.6 and 0.3ml of enzyme solution at 37°C for 20min.

Vibrio sp. no. 12のキチナーゼ生産条件

1. コロイダルキチンの影響 *Vibrio* sp. no. 12のキチナーゼは誘導的に生産されるので、まず酵素生産に対するコロイダルキチンの濃度の影響を検討した。その結果は Fig. 3 に示すとおり、キチナーゼ生産はコロイダルキチン濃度0.2%で最高に達し、それ以上の濃度ではかえって酵素生産が減少した。またコロイダルキチンの濃度にかかわらず、培養2日目にキチナーゼ活性は高い値を示した。

2. グルコースの影響 コロイダルキチン0.2%を含む基本培地で、キチナーゼ生産に及ぼすグルコースの影響を調べた。結果を Fig. 4 に示した。グルコース濃度0.2%でキチナーゼ生産は最高になり、0.3%以上のグルコースで酵素生産は完全に阻害された。

3. 酵母エキスの影響 酵母エキスの濃度を変化さ

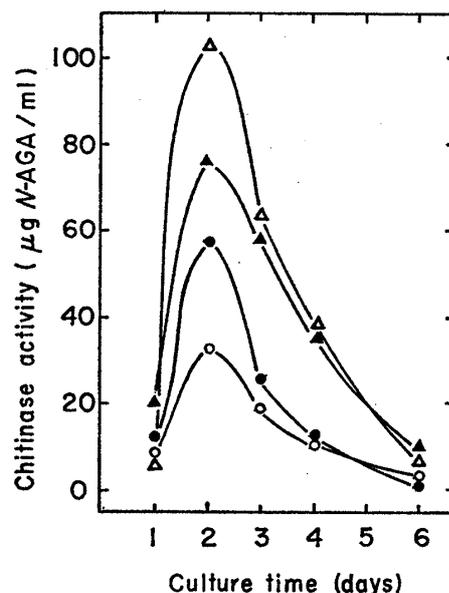


Fig. 3. Effect of colloidal chitin concentrations on chitinase production by *Vibrio* sp. no. 12.

The medium was composed of 0.2% glucose, 0.5% yeast extract, 1.0% peptone, 0.5% NaCl and varying concentrations of colloidal chitin (○—○ 0.05%, ●—● 0.1%, △—△ 0.2%, ▲—▲ 0.3%). The reaction mixture contained 1ml of 0.3% colloidal chitin, 2ml of 0.05M phosphate buffer, pH 7.6 and 1ml of enzyme solution. Chitinase activity was determined by measuring the amount of *N*-acetylglucosamine produced after incubation at 37°C for 30 min.

せ、キチナーゼ生産に対する影響を検討した。その結果は Table 2 に示したとおり、酵素生産には0.2%以上の酵母エキスが必要であった。

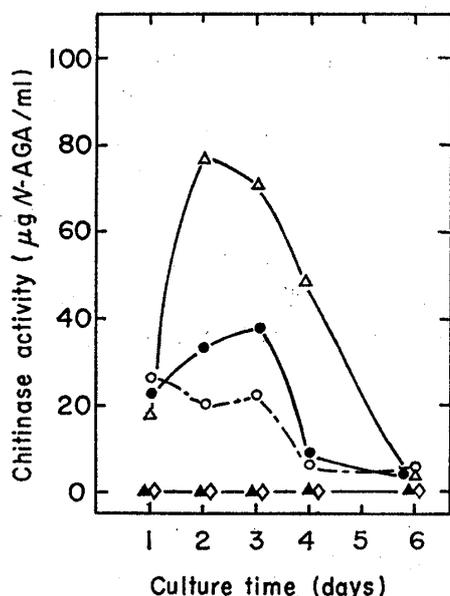


Fig. 4. Effect of glucose concentrations on chitinase production by *Vibrio* sp. no. 12.

The medium was composed of 0.2% colloidal chitin, 0.5% yeast extract, 1% peptone, 0.5% NaCl and varying concentrations of glucose (○—○0.05%, ●—●0.1%, △—△0.2%, ▲—▲0.3%, ◇—◇0.4%).

Table 2. The effect of yeast extract concentrations chitinase production by *Vibrio* sp. no. 12.

Yeast extract (%)	Chitinase activity N-AGA (μg/ml)
0.01	0
0.05	0
0.1	0
0.2	112
0.3	95
0.4	104
0.5	120
1.0	128

The medium was composed of 0.2% colloidal chitin, 0.2% glucose, 0.5% peptone, 0.5% NaCl and varying concentrations of yeast extract.

4. ペプトンの影響 Fig. 5 に示すように、ペプトンは0.5%の濃度の時が最も高いキチナーゼ生産を示し、0.7%、1.0%と濃度が高くなると、酵素生産は減少した。

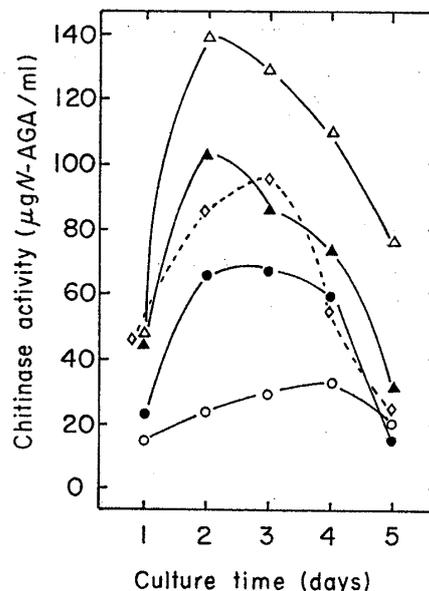


Fig. 5. Effect of peptone concentrations on chitinase production by *Vibrio* sp. no. 12. The medium was composed of 0.2% colloidal chitin, 0.2% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl and varying concentrations of peptone (○—○0%, ●—●0.2%, △—△0.5%, ▲—▲0.7%, ◇—◇1.0%).

Table 3. Effect of chitin and chitin derivatives on chitinase production by *Vibrio* sp. no. 12.

Compound (0.2%)	Chitinase activity N-AGA (μg/ml)
Chitin (Flake)	0
Chitin (Fine powder 1)*	1.8
Chitin (Fine powder 2)*	2.2
Chitin (Fine powder 3)*	7.5
Colloidal chitin	49.2
Glycol chitin	0
Carboxymethyl chitin	1.8
Colloidal chitosan	1.7
Glycol chitosan	0

The composition of media was the same as in Fig. 3. *The size of the particles of chitin was small in order of increasing number as fine powders 1, 2 and 3. The powder chitin was kindly supplied by Dr. M. Takeda, Shimomoseki University of Fisheries.

5. キチンおよびその関連化合物の影響 各種のキチン化合物のキチナーゼ生産に対する影響を培養48時間後に検討し、その結果を Table 3 に示した。コロイダルキチンが酵素生産の最も有効な誘導物質であった。キチンでは、酵素生産はほとんど見られなかったが、ボール・ミルで粉砕したキチン粉末はキチナーゼをわずかではあるが生産し、その粒度が小さくなるに従いキチナーゼ活性は増大した。水溶性のグライコールキチンやカルボキシメチルキチン、または脱アセチル化したキトサン類では、キチナーゼは全くあるいはほとんど生産されなかった。

以上の実験結果から、*Vibrio* sp. no.12 によるキチナーゼ生産は、コロイダルキチン 0.2%、グルコース

0.2%、酵母エキス 0.5%、ペプトン 0.5% からなる培地 (pH 7.0) を用い、30°C で 2 日間振とう培養したとき最大になった。なお本菌を 0.5% の食塩を添加した培地で培養した場合もあるが、食塩の有無はキチナーゼ生産に影響を与えなかった。

Vibrio sp. no. 12 のキチナーゼ系

1. キチナーゼとキトビアーゼの分離 *Vibrio* sp. no. 12 を前記のキチナーゼ生産の最適培地 (コロイダルキチン 0.2%、グルコース 0.2%、酵母エキス 0.5%、ペプトン 0.5%、pH 7.0) を用い、30°C で 2 日間振とう培養し、その培養ろ液 1,000ml を pH 7.2 に調整した後、結晶硫酸を加えて 0.7 飽和とした。遠心分離後、沈殿を 0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 80ml

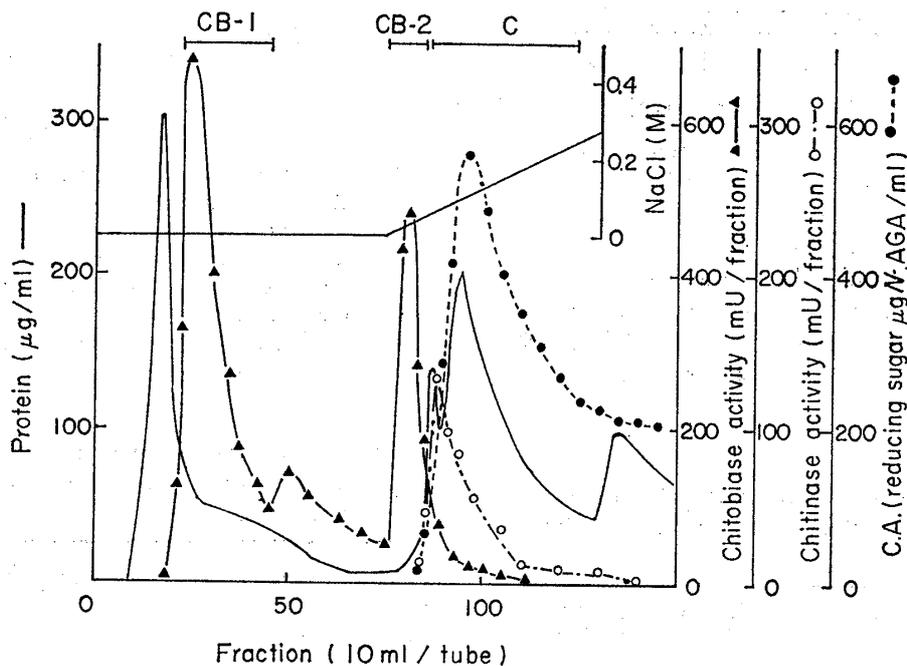


Fig. 6. Column chromatography of the chitinase system on DEAE-Sephadex A-25.

The enzyme (147mg of protein) was applied to a column (2.6×45cm) of DEAE-Sephadex A-25 equilibrated with 0.02M phosphate buffer, pH 7.2. Elution was performed with the same buffer and a linear gradient from 0 to 0.35M NaCl in the same buffer at a flow rate of 60ml/hr. C. A. indicates the chitinase activity determined by measuring the amount of reducing sugar.

Table 4. Activities of the fraction separated by DEAE-Sephadex A-25 column chromatography.

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg)	Chitinase			Chitinase		
			T. A. (mU)	S. A. (mU/mg Protein)	Yield (%)	T. A. (mU)	S. A. (mU/mg protein)	Yield (%)
Original	80	147	31,800	216	100	19,900	135	100
CB-1	230	12	0	0	0	6,760	563	34
CB-2	100	1	140	140	0.4	4,930	4,930	25
C	380	40	2,670	67	8	990	25	5

T. A. ; Total activity, S. A. ; Specific activity.

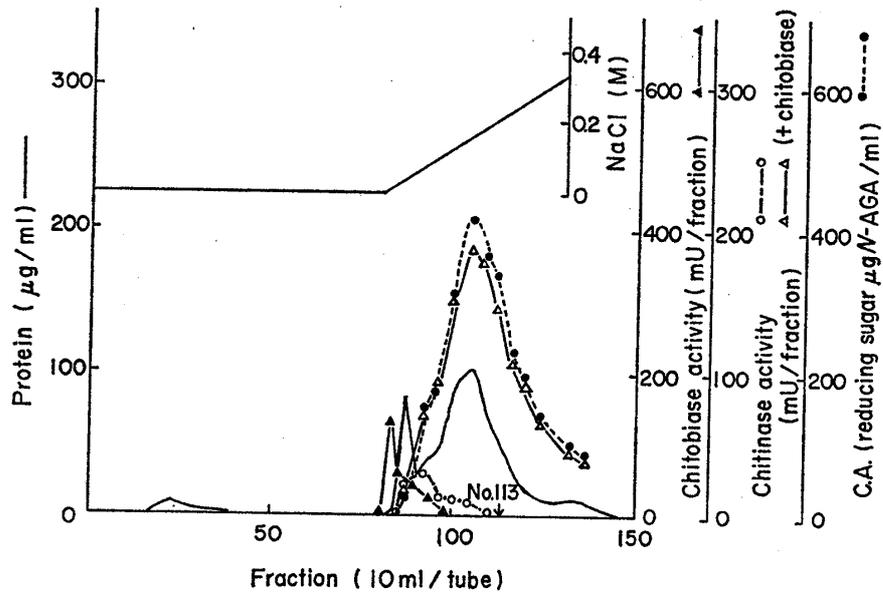


Fig. 7. Rechromatography of chitinase fraction C of Fig. 6 on DEAE-Sephadex A-25.

Chitinase fraction C of Fig. 6 was concentrated by ultrafiltration with an Amicon membrane UM-10 and was chromatographed using the same procedure as in Fig. 6. Chitinase activity in the presence of chitinase was determined by measuring the amount of *N*-acetylglucosamine formed after incubation at 37°C for 1hr by the addition of 0.5ml of chitinase (CB-1, 25mU) to 1.5ml of the supernatant of the chitinase digest.

に溶解し、同じ緩衝液に透析した。透析液は培養ろ液の81%のキチナーゼと73%のキトビアーゼを含有して

いた。両酵素の分離を DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーによって行った結果を Fig. 6 に

示した。

キチナーゼは0.1~0.2M食塩濃度の範囲で溶出されたが、最初の酵素活性のわずか8%しか回収されなかった。しかし、キチナーゼ活性を全還元糖量より測定すると、酵素は0.1M以上の食塩濃度で幅広く溶出された。この画分をキチナーゼ画分Cとした。

キトビアーゼ活性は三つのピークとして溶出された。カラムに吸着されずに溶出されたキトビアーゼの主画分をCB-1、0.1M以下の食塩で溶出されたキトビアーゼ画分をCB-2とした。両酵素の活性収率と比活性をTable 4に示した。CB-1はキチナーゼ活性が全く混在しなかったが、CB-2は比活性が非常に高くなったにもかかわらず、少量のキチナーゼ活性が認められた。

次に、キチナーゼ画分Cは少量のキトビアーゼ活性が混在しているのでAmicon社製限外ろ過装置(Diaflo membrane filter UM-10)を用い濃縮し、前と同じ方法によりDEAE-Sephadex A-25カラムで再クロマトグラフィーを行った。Fig. 7に示すように、画分Cからキトビアーゼ活性を完全に除くことはできず、キトビアーゼ活性が減少するにつれて、キチナーゼ活性も低下した。しかし、キトビアーゼ画分CB-1を添加してキチナーゼ活性を測定すると、全還元糖量で表示したキチナーゼ活性とはほぼ類似した測定値になった。すなわち、少量のキトビアーゼが存在するとき、N-アセチルグルコサミンの定量によるキチナーゼ活性の測定が可能である。これはコロイダルキチンのN-

アセチルグルコサミンへの分解には、キチナーゼとキトビアーゼが必要であることを物語っている。

以上の実験結果から *Vibrio* sp. no. 12 のキチナーゼ系は、DEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーにより、キチナーゼとキトビアーゼに分離することができた。しかし、DEAE-celluloseを用いた場合には、キトビアーゼは溶出したが、キチナーゼはDEAE-celluloseに強く吸着し、食塩濃度を0.5Mに上げて溶出しなかった。細菌のキチナーゼについての従来の報告で、Morisseyら¹⁹⁾はDEAE-celluloseを用いて *Arthrobacter* sp. のキチナーゼの精製を、MonrealとReese¹⁸⁾はDEAE-Sephadexを用いて *Serratia marcescens* のキチナーゼの精製をそれぞれ試みているが、いずれも収量の低下が著しかった。両報告とも、キトビアーゼ活性は測定されていないので、収量の低下がキトビアーゼの分離に起因するかどうかは明らかでない。

2. キチナーゼとキトビアーゼの作用 キチナーゼとキトビアーゼのキチンおよびキチンオリゴ糖に対する作用を調べた結果を、Table 5に示した。キトビアーゼを含まないキチナーゼ (Fig. 7のno. 113画分) とキトビアーゼ (CB-1) 単独では、コロイダルキチンからN-アセチルグルコサミンを生成しないが、両酵素を同時に作用させると、N-アセチルグルコサミンを生成した。キチナーゼはキトビオースを分解しないが、キトトリオースやキトテトラオースに作用して、N-アセチルグルコサミンを生成した。また、キトビ

Table 5. Decomposition of various substrates by chitinase, chitobiase and chitinase plus chitobiase.

Substrate	N-Acetylglucosamine formed (μg)		
	Chitinase	Chitobiase	Chitinase + Chitobiase
Chitobiose	0	262	143
Chitotriose	38	105	74
Chitotetraose	11	79	138
Colloidal chitin	0	0	92

For the decomposition of chitin-oligosaccharides, the reaction mixture containing 0.5ml (500 μg) of a substrate in 0.05M phosphate buffer, pH 7.6 and 0.5ml of enzyme solution was incubated at 37°C for 30min. For the decomposition of chitin, the reaction mixture containing 0.5ml (1,500 μg) of colloidal chitin, 1ml of 0.05M phosphate buffer, pH 7.6 and 0.5ml of enzyme solution was incubated at 37°C for 30min. CB-1 containing 20mU of chitobiase activity was used as chitobiase and fraction no.113 in Fig. 7, as chitinase. For the combined action of the two enzymes, one-half the amount of each of the enzymes was used.

アーゼはキトビオースを分解するのみでなく、キトトリオースとキトテトラオースに作用し、キチナーゼの場合よりも速やかに *N*-アセチルグルコサミンを生成した。

これらの実験結果より、*Vibrio* sp. no. 12 のキチナーゼ系は他の微生物起源のキチナーゼ系と同様に、キチナーゼとキトビアーゼの二つの酵素からなり、キチナーゼはキチン内部のグルコシド結合を分解し、恐らくはキトオリゴ糖類を生成し、キトビアーゼはキトビオースあるいはキトオリゴ糖類を分解して *N*-アセチルグルコサミンを生成すると考えられる。本菌のキチナーゼとキトビアーゼの分離、精製および酵素的性質に関しては、続報で報告する予定である。

要 約

1) 有明海の家泥土より、コロイダルキチンを唯一の炭素および窒素源として利用できるキチナーゼ生産細菌を分離した。分離菌は、電子顕微鏡写真および菌学的諸性質より、*Vibrio* 属と同定され、*Vibrio* sp. no. 12 と命名された。

2) *Vibrio* sp. no. 12 をコロイダルキチンを含む培地を用い、30°Cで振とう培養したとき、キチナーゼ活性は2日目に、キトビアーゼ活性は4日目に最大に達した。

3) 本菌によるキチナーゼ生産は、コロイダルキチン0.2%、グルコース0.2%、酵母エキス0.5%、ペプトン0.5%からなる培地 (pH 7.0) を用い、30°Cで2日間振とう培養したとき最大になった。

4) 本菌のキチナーゼ系は、キチナーゼとキトビアーゼからなり、それらは DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーによりほぼ分離できた。キチナーゼはコロイダルキチンを分解するが、キトビオースを分解せず、キトビアーゼはキチンオリゴ糖を分解し、キチンの *N*-アセチルグルコサミンへの分解には、キチナーゼとともにキトビアーゼが必要であった。

終わりにのぞみ、本実験にご協力いただいた井口亨晴氏に深謝します。

文 献

- 1) Berger, L. R., Reynolds, D. M. : *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 522 (1958).
- 2) Jeuniaux, C. : *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, **67**, 597 (1959).
- 3) Skujins, J., Pukite, A., Maclaren, A. D. : *Enzymologia*, **39**, 353 (1970).
- 4) Ohtakara, A. : *Bull. Hiroshima Women Univ.*, **6**, 1 (1971).
- 5) Tominaga, Y., Tsujisaka, Y. : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2325 (1976).
- 6) Ohtakara, A. : *Agric. Biol. Chem.*, **25**, 54 (1961).
- 7) Ohtakara, A. : *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 30 (1962).
- 8) Stanier, R. Y. : *J. Bacteriol.*, **53**, 297 (1947).
- 9) Cambell Jr., L. L., Williams, O. B. : *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 894 (1951).
- 10) Veldkamp, H. : *Nature*, **169**, 500 (1952).
- 11) Gehring, F. : *Zentr. Bakt. Parasitenk. Abt II*, **108**, 232 (1954).
- 12) Clark, P. H., Tracey, M. V. : *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 188 (1956).
- 13) Brisou, J., Tysset, C., de Rautlin de La Roy, Y., Curcier, R., Moreau, R. : *Ann. de L'Inst. Pasteur*, **106**, 469 (1964).
- 14) Okutani, K. : *Bull. Misaki Marine Biol. Inst.*, Kyoto Univ., No. 10. 1 (1966).
- 15) Billy, C. : *Ann. de L'Inst. Pasteur*, **116**, 75 (1969).
- 16) Sundarraj, N., Bhat, J. V. : *Arch. Microbiol.*, **85**, 159 (1972).
- 17) Timmis, K., Hobbs, G., Berkeley, R. C. W. : *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1284 (1974).
- 18) Monreal, J., Reese, E. T. : *Can. J. Microbiol.*, **15**, 689 (1969).
- 19) Morissey, R. F., Dugan, E. P., Koths, J. S. : *Soil Biol. Biochem.*, **8**, 23 (1976).
- 20) Buchanan, R. E., Gibbons, N. E. (eds.) : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 Ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974).
- 21) 駒形 : 化学と生物, **10**, 332 (1972).
- 22) Jeuniaux, C. : *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, **66**, 408 (1958).
- 23) 千手, 沖増 : 農化, **23**, 432 (1950).
- 24) Berkeley, R. C. W. : *Anal. Biochem.*, **46**, 687 (1972).

- 25) Reissig, R. L., Strominger, J. L., Leloir, L. F. : *J. Biol. Chem.*, **217**, 959 (1955).
- 26) Schales, O., Schales, S. S. : *Anal. Biochem.*, **8**, 285 (1945).
- 27) Hartree, E. F. : *Anal. Biochem.*, **48**, 422 (1972).
- 28) Ohtakara, A., Uchida, Y., Mitsutomi, M. : *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan* (Muzzarelli, R. A. A., Pariser, E. R.), p. 587, MIT Sea Grant Program, Massachusetts (1978).

(昭53. 11. 29受付)