

不完全菌 *Trichoderma harzianum* の培養ろ液を用いた非晶化キチンからの *N*-アセチル-D-グルコサミンの効率的生産Effective Production of *N*-Acetyl-D-glucosamine from Decrystallized Chitin by Culture Filtrates of *Trichoderma harzianum*

吉田 晋一

Shinichi Yoshida

ヒアルロン酸合成促進能や抗炎症作用などが報告され、機能性甘味料として注目を集めている *N*-アセチル-D-グルコサミンの大量生産方法の開発を目的として、不完全菌 *Trichoderma harzianum* の産生するキチン分解酵素を用いてカニ殻由来のキチンを分解する方法について検討を加えた。まず、種々の炭素源、窒素源を用いて *T. harzianum* により産生されるキチン分解酵素活性の経時変化について検討を加えたところ、炭素源として粉末状キチン、窒素源として硫酸アンモニウムを用いた場合にキチナーゼと *N*-アセチルヘキソサミニダーゼの高い活性が観察された。しかしながら、培養液中に *N*-アセチル-D-グルコサミンの存在は認められず、このことは酵素分解により生成した *N*-アセチル-D-グルコサミンは *T. harzianum* により代謝されたためと考えられた。そこで、菌体を除去した培養ろ液を回収しキチンとの反応を試み、*N*-アセチル-D-グルコサミンの生成量について検討を加えたところ、粉末状のキチンではその生成はほとんど観察されなかったが、あらかじめアルカリ処理により結晶構造を破壊しておいた非晶化キチンは完全に分解され、48 時間以内ではほぼ 100% の収率で目的物へと変換されることが分かった。

*N*-Acetyl-D-glucosamine is one of amino sugars, and is recently reported to stimulate the production of hyaluronan in animal tissues and to possess a unique range of anti-inflammatory activities. In order to develop large-scale production method of *N*-acetyl-D-glucosamine applicable to food industries, hydrolysis of chitin from crab shells by chitinolytic enzymes of deuteromycete *Trichoderma harzianum* was investigated. Incubation of *T. harzianum* with chitin as carbon source and ammonium sulfate as nitrogen source leads to the production of high activity of chitinolytic enzymes, chitinase and *N*-acetylhexosaminidase. However, no *N*-acetyl-D-glucosamine was detected in the culture medium of *T. harzianum*, indicating that the *N*-acetyl-D-glucosamine produced in the medium was metabolized by *T. harzianum*. Therefore, the culture filtrates containing chitinolytic enzymes were collected to remove mycelia of *T. harzianum*, and the incubation with powdered chitin or decrystallized chitin was attempted. Powdered chitin was not hydrolyzed by the culture filtrates of *T. harzianum*, but, decrystallized chitin was completely hydrolyzed to give ca. 100% yield of *N*-acetyl-D-glucosamine within 48 hours.

## 1. はじめに

*N*-アセチル-D-グルコサミンは、カニ殻やエビ殻、昆虫類に含まれるキチンや動物細胞中に含まれるヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などのグルコサミノグリカンを構成しているアミノ基を有する単糖類の一種であり、自然界に広く分布する<sup>1)</sup>。近年、*N*-アセチル-D-グルコサミンの生理

作用に関する研究が広範に行われ、ヒアルロン酸の合成促進効果<sup>2)</sup>や抗炎症作用<sup>3)</sup>などが報告され、健康食品、化粧品原料、機能性甘味料として注目を集めている。*N*-アセチル-D-グルコサミンは、D-グルコサミンを *N*-アセチル化することにより化学的な方法で容易に合成することができるが<sup>4)</sup>、健康食品や機能性甘味料として利用するには食

品衛生法に準拠した、多糖類であるキチンの加水分解を行い分解物から分離・精製する方法を検討する必要がある<sup>5)</sup>。

カニ殻から得られるキチンの加水分解には酸を用いる方法と加水分解酵素を用いる方法が挙げられる。酸を用いる方法では、アセチル基も同時に脱離し D-グルコサミンが大量に生成するため、アセチル基が脱離しない反応温度や時間の厳密な調整や分離・精製操作が必要である<sup>6)</sup>。また、工場現場では酸による設備の劣化や酸廃液処理に要するコストが問題となる。一方、キチン加水分解酵素を用いた方法の検討も行われており、キチン分解微生物の検索や分解酵素の生産条件について研究されている。原料となるキチンの高度な結晶性の問題からイカ由来の $\beta$ -キチンを出発原料とする方法が提案されているが<sup>7)</sup>、工業的に採算の合う量の原料確保を考えると、カニやエビ由来の $\alpha$ -キチンを使うのが理想であるが、最終収率は依然として高くない<sup>8)</sup>。

本研究では、シイタケの害菌である不完全菌 *Trichoderma harzianum* に着目し、キチン分解酵素の産生条件について検討を加えた。また、キチンの分解効率を上げるために、アルカリを用いた前処理により得られた非晶化キチンとキチン分解酵素との反応について検討を加えた。

## 2. 実験装置及び実験方法

### 2.1 使用菌株

供試菌株として不完全菌 *Trichoderma harzianum* (菌蕈研究所 TMICC60622) を用いた。

### 2.2 非晶化キチンの調製

絶乾重量で 5.0 g のキチン TC-L (三栄工業 (株) 製) を 125 g の 40%NaOH 水溶液に懸濁させ、室温で時々攪拌しながら 12 時間放置した後、碎水を 375 g 加え、完全に溶解し室温に戻るまでゆっくりと攪拌した。続いて、硫酸を用いて pH を 8.4 に調整した。生成したゲルをろ別後、蒸留水を用いて

洗浄液が中性になるまで徹底的に洗浄した。調製したゲル状の非晶質キチンの一部をはかり取り、110℃の恒温器中で乾燥を行いその含水率を測定した(含水率 92.6%)。調製した試料の X 線回折は、理学電機 (株) 製 X 線回折装置 RINT 2500 を用いて測定した。使用 X 線は CuK $\alpha$  線を用い、管電圧および管電流は 50 kV、300 mA とした。なお、実験にもちいた粉末キチンの含水率は 6% であるが、X 線測定の際、非晶化キチンの測定条件に近づけるため X 線用試料は水を含ませて 75.7% とした。

## 2.3 *Trichoderma harzianum* の培養

### 2.3.1 前培養

D-グルコース (2%)、ポリペプトン (0.5%)、酵母エキス (0.2%)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1%)、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.05%) および寒天 (2%) を含む平面培地に、菌体を 1 白金耳分接種し、30℃で 4 日間培養した。

### 2.3.2 窒素源としてポリペプトンを含む培地での培養

炭素源としてキチン (非晶化、粉末) あるいは D-グルコースを絶乾重量として 0.50 g、ポリペプトン (0.20 g)、酵母エキス (0.01 g)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.07 g)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.03 g)、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.05 g) を含む全量 100 mL の培地に、前培養しておいた菌体をコルクボーラー ( $\phi$  1 cm) で打ち抜いたものを寒天ごと 1 片接種し、120 rpm、30℃で回転しながら培養を行った。培養液から経時的に一部を採取し、メンブランフィルター(0.45  $\mu$ m) を用いてろ過したものを培養ろ液とし、酵素活性測定に用いた。

### 2.3.3 窒素源として硫酸アンモニウムを含む培地での培養

キチン (非晶化、粉末、微粉末 14  $\mu$ m) を絶乾重量として 0.50 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.42 g)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.20 g)、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.69 g)、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.03

g)、Tween 80 (0.02 g)、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.50 mg)、MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.25 mg)、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.14 mg)、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.12 mg) を含む全量 100 mL の培地に 2.3.2 と同様に植菌し、培養を行った。

## 2.4 酵素活性の測定

### 2.4.1 キチナーゼ活性

キチナーゼ活性は、活性測定の基質としてグリコールキチンを用いる Imoto らの方法により測定した<sup>9)</sup>。0.1%グリコールキチンの 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 1.0 mL に粗酵素液 0.2 mL を加え、37°C で 10 分間反応させた。反応後、あらかじめ調製しておいた Schales の試薬 (0.05%フェリシアン化カリウム 0.5 M 炭酸ナトリウム水溶液) 2.0 mL を加え、15 分間煮沸した。放冷後、420 nm の吸光度を測定した。粗酵素液の代わりに同量の蒸留水を加え同様の反応・測定を行い対照実験とした。対照実験の吸光度値から酵素反応したものの吸光度値を差し引いた値を算出し、この吸光度値と、あらかじめ *N*-アセチル-D-グルコサミンを用いて行った同様の反応から作成しておいた検量線とから酵素活性を計算した。なお、酵素活性の 1 単位は 1 分間あたり 1 μmol の *N*-アセチル-D-グルコサミンを生成するのに必要な酵素量と定義した。

### 2.4.2 *N*-アセチルヘキソサミニダーゼ活性

*β*-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ活性は、*p*-ニトロフェニル 2-アセトアミド-2-デオキシ-*β*-D-グルコピラノシド (*p*NP-GlcAc) を基質として測定した<sup>10)</sup>。光路長 1 cm の石英セルに 0.04 mL の 5 mM *p*NP-GlcNAc 水溶液、0.2 mL の 1 M 酢酸ナトリウム (pH6.0) 水溶液および粗酵素液を最終容量 2.0 mL になるように入れ、経時的に反応生成物である *p*-ニトロフェノールの最大吸収波長である 337 nm の吸光度の増加を経時的に測定した。この波長における分子吸光係数 3,500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> を用いて反応生成物のモル数を計算し、酵素活性を求め

た。なお、酵素活性の 1 単位は 1 分間あたり 1 μmol の *p*-ニトロフェノールを生成するのに必要な酵素量と定義した。

## 2.5 キチンの分解反応

絶乾量として 20 mg のキチン (非晶化キチンあるいは粉末状キチン)、粗酵素液 (キチナーゼ活性として 0.5 U 分、*β*-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ活性として 1.5 U 分) を含む全量 5 mL の 80 mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH6.0) を 37°C で攪拌した。反応開始後、24 時間の時点で同量の酵素液をさらに追加した。経時的に反応液の一部を取り、HPLC を用いて、カラム Shodex NH2P-50-4E、溶出液アセトニトリル/H<sub>2</sub>O=70/30 (v/v)、流速 1 mL/分、カラム温度 40°C で示差屈折検出により反応生成物を分析した。なお、生成物の同定は標品との保持時間の比較により行った。

## 2.6 グラムスケールでのキチンの分解反応

300 mL 容ナス型フラスコに絶乾量として 1 g の非晶化キチン、粗酵素液 (キチナーゼ活性として 13 U、*β*-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ活性として 68 U 分) を入れ、さらに蒸留水を加えて全量 100 mL とした。反応液の pH は調整しなかった。37°C の水浴中で攪拌を行い、経時的に反応液の一部を取り、HPLC を用いて 2.5 と同様に反応生成物を分析した。なお、反応開始後 24 時間目に半分量の酵素液を追加した。反応開始 48 時間後、反応液を 15 分間煮沸し酵素を失活させた。次いで、遠心分離を行い (10,200×g、20 分)、上澄を集め、残渣に蒸留水を加え、同じ条件で再度遠心分離を行った。上澄液を合わせて限外ろ過を行い (アドバンテック UK-10、分子量カット: 10,000)、得られたろ液をさらに凍結乾燥した。得られた粉末にメタノールを加え、不溶分を除去後、減圧濃縮により生成した沈殿を冷メタノールで洗浄しながら別した。

### 3. 結果

#### 3.1 *T. harzianum*によるキチン分解酵素の産生

キチンを完全に分解して単糖である *N*-アセチル-D-グルコサミンを得るためには、キチン鎖をランダムに加水分解するエンド型のキチナーゼとある程度分解されたキチン分子鎖を末端から加水分解していくエキソ型の $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼの作用が必要となる。そこで、両酵素が高活性で産生される条件を検討することとした。*T. harzianum* のキチン分解酵素はすでに分離・精製され諸性質について報告がなされているが<sup>11)</sup>、より高い産生条件を見いだすために、培養条件の検討を行った。

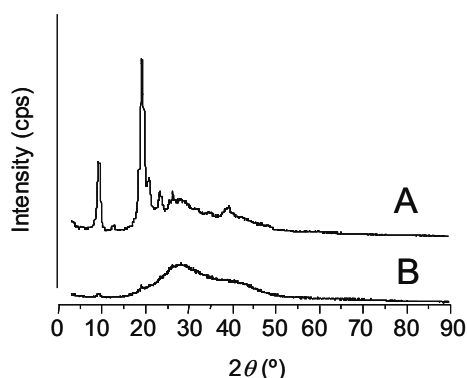


図1 粉末状キチン (A) および非晶化キチン (B) の X 線回折曲線

既報では、炭素源として粉末状のキチンを添加している場合が多いが、キチンは強固な結晶構造を有するために、キチンの性状が酵素の生産性に影響を与えることが予想される。そのため、アルカリで膨潤処理を行った非晶化キチンについても検討を加えた。酵素の生産性を検討するに先立って、アルカリで処理されたキチンの X 線回折実験を行い、粉末状のキチンに比較して、明瞭なピークのないことを確認しておいた (図1)。また、キチンはアルカリ膨潤処理後、定量的に回収することができた。

この非晶化キチンおよび粉末状キチンを単一炭素源とし、さらに窒素源としてペプトンを加えた

培地で培養を行い、キチン分解酵素活性の経時変化を調べた結果を図2に示す。比較のために単一炭素源としてグルコースを用いた結果についても同様に示した。興味あることに、非晶化キチンを加えた場合に $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ活性だけが観察された。

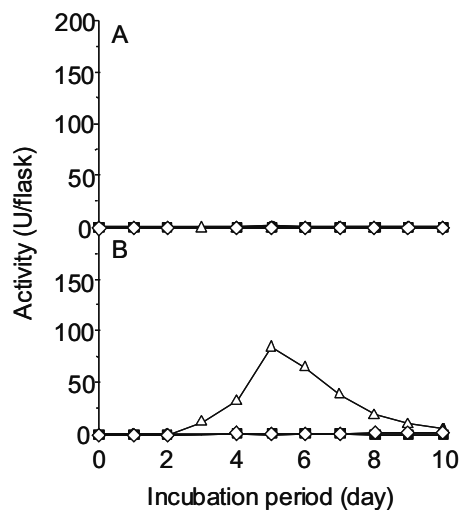


図2 窒素源としてポリペプトン、炭素源としてD-グルコース (-◇-)、粉末状キチン (-■-) または非晶化キチン (-△-) を加えた培地で *T. harzianum* により産生されたキチナーゼ (A) および $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (B) 活性の経時変化

この培養条件では、キチナーゼの産生が観察されなかったために、次に炭素源としてキチンを加えた時の窒素源の影響について調べることにした。窒素源としては、硫酸アンモニウムを用いた。炭素源として加えるキチンの性状の違いについても知見を得るために、粉末状のキチン、非晶化処理をしたキチン、微粉碎化したキチン (14 $\mu$ m) をそれぞれ加えた条件で培養を行った。その結果、窒素源としてポリペプトンを加えた場合と異なり、両酵素の活性が観察され、粉末状のキチンで活性が高い結果となった。ただし、酵素産生に要する日数はポリペプトンの場合よりも長くなった。炭素源として用いるキチンの形状の違いに明瞭な差は認められず、結晶化度が低くても酵素生産性の改善は見られなかった (図3)。

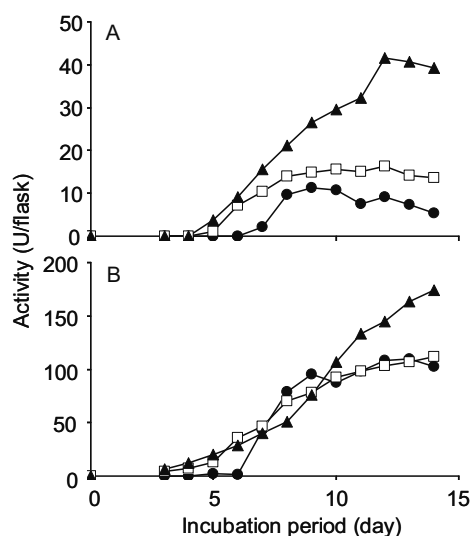


図3 窒素源として硫酸アンモニウム、炭素源として粉末状キチン(▲), 非晶化キチン(□)または微粉末状キチン(●)を加えた培地で *T. harzianum* により産生されたキチナーゼ (A) および  $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (B) 活性の経時変化

### 3.2 培養ろ液によるキチンの分解反応

#### 3.2.1 反応の経時変化

3.1 で述べた、炭素源として粉末状キチン、窒素源として硫酸アンモニウムを加えて培養を行った場合、培養ろ液中にはキチナーゼおよび  $\beta$ -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼの活性は観察されるものの、HPLC による培養ろ液の分析では、*N*-アセチル-D-グルコサミンの存在は観察されなかった(データ省略)。このことは、生成した *N*-アセチル-D-グルコサミンが菌体により代謝されていると推定される。そこで、メンブランフィルター (0.45  $\mu$ m) を用いて培養液から菌体を除去し、得られた培養ろ液を粗酵素液とし、これをあらためてキチンと反応させ、*N*-アセチル-D-グルコサミンの生成について検討することとした。具体的には、非晶化したキチンと粉末状キチンそれぞれを基質として粗酵素液との反応を行い、経時的にサンプリングして *N*-アセチル-D-グルコサミン量を求め、キチン重量に対する収率を計算した。その結果を図

4 に示す。

反応時間の経過とともに収量は増加し、非晶質キチンを出発物質とした場合は、反応開始後 48 時間目の収量がほぼ 100%であり、キチンすべてが *N*-アセチル-D-グルコサミンに変換されていることが分かった。一方、粉末状キチンを出発物質とした場合はその生成がほとんど観察されなかった。

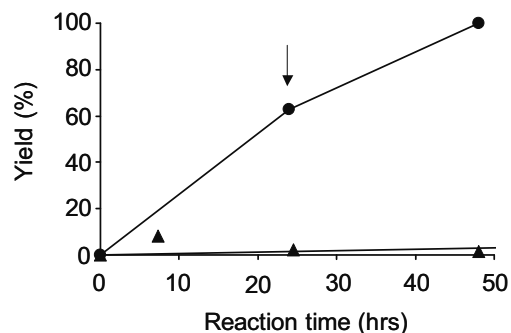


図4 *T. harzianum* 粗酵素液と非晶化キチン(●)または粉末状キチン(▲)との反応による *N*-アセチル-D-グルコサミンの生成. 矢印の時点で酵素を追加した。

#### 3.2.2 スケールアップ実験

絶乾重量として 1 g グラムの非晶化キチンを出発原料として反応を行い、生成した *N*-アセチル-D-グルコサミン量を HPLC で分析した結果、48 時間の反応で 65%の収量であった(データ省略)。これは、3.2.1 における小スケールでの実験の場合より低い値であった。また、この反応液から *N*-アセチル-D-グルコサミンを分離・精製したところ、キチンの重量に対して 58%で回収された。

## 4. 考察

*N*-アセチル-D-グルコサミンを得るための最も簡単な方法は酸加水分解であるが、この方法では脱アセチル化反応が付随するために、アセチル基の脱離を抑えるための条件設定が必要となる。40℃、12 時間の塩酸加水分解反応 (200g のキチンに対して 1kg の濃塩酸) で収量約 60%の報告があるが、依然として 10%程度の二量体や数%程度の

オリゴマーが残存している<sup>6a)</sup>。酵素を用いた分解反応として、*Nocardia orientalis* の固定化酵素を用いたバイオリクター中で、あらかじめ酸で調製しておいたキチンオリゴ糖の分解を行い、連続して130日間にわたり90%以上の収率で*N*-アセチル-D-グルコサミンを得ているが<sup>8a)</sup>、酵素分解の基質として用いるキチンオリゴ糖の調製段階での出発原料のキチンに対する収量が40%であることを考えると、出発原料のキチンに対する最終収率は3割程度の収率と推定される。

高分子量キチンを出発原料とした酵素反応による分解も試みられている。この場合、キチンの結晶性が高いと酵素との親和性が低くなるために、イカ由来のβ-キチンの利用が検討された。市販のセルラーゼやリパーゼなどの多糖類分解酵素とβ-キチンとの反応では、*Trichoderma viride* のセルラーゼとの37℃、8日間の反応で76%の収量で目的物を得ている<sup>7b)</sup>。β-キチンの*Burkholderia cepacia* のキチン分解酵素による分解では、1日で85%以上の収量を報告している<sup>7c)</sup>。しかしながら、採算の合う原料確保を考えるとβ-キチンの工業的な利用は現実的ではないと考えられる。

一方、カニやエビから抽出されるα-キチンでは、*Aeromonas hydrophila* との反応が報告されており、フレーク状のα-キチンを原料として10日間で77%の収量が報告されている<sup>8b)</sup>。また、別のグループは85%リン酸で膨潤させたα-キチンから*Aeromonas* 属（種は未同定）の粗酵素により5日間で83%の収率を報告している<sup>8c)</sup>。リン酸膨潤キチンの*Trichoderma reesei* および*Cellulomonas* sp. 由来の酵素による分解の報告もあるが、収量は50%程度である<sup>8d)</sup>。

反応効率を上げるためにα-及びβ-キチンの微粉末化を行い、*Burkholderia cepacia*、*Bacillus licheniformis* 由来のキチン分解粗酵素液を用いた結果についても報告されている<sup>8e)</sup>。しかしながら、キチンの微粉末化には多くのエネルギーが必要であり、コストも高く付くことが問題となる。

本研究では、高結晶性のカニ殻由来のα-キチンのアルカリ膨潤処理を行い、このキチンを炭素源とした時の*T. harzianum* によるキチン分解酵素と*N*-アセチル-D-グルコサミンの生成について検討を加えた。本実験の結果から、*T. harzianum* のキチン分解酵素活性は、窒素源の影響を受けることが明らかとなり、硫酸アンモニウムが良好であった。また、炭素源としては非晶化キチンを用いた場合に活性が高くなることが予想されたが、キチンの種類（粉末、非晶化、微粉末化）によらず酵素活性が観察されたため、キチンの結晶性は特に問題とならないと考えられた。当初は、炭素源として加えたキチンの分解により生成した*N*-アセチル-D-グルコサミンの培養液中における存在が期待されたが、予想に反してその存在が観察されなかったため、培養液からの*N*-アセチル-D-グルコサミンの分離・精製は不可能であった。おそらく、菌体により生成した*N*-アセチル-D-グルコサミンが代謝されたものと考えられた。そのため、一旦菌体を除去した酵素液を回収し、この酵素液とキチンとを再度反応させることを検討したところ、高収率で*N*-アセチル-D-グルコサミンを得ることができた。この場合、粉末状キチンよりも非晶化キチンの方が酵素による分解を受けやすく、*N*-アセチル-D-グルコサミンの効率的生産方法のための前処理としてはアルカリ膨潤処理は有効であることが分かった。

また、収率の点から見ると、本法はアルカリ処理の段階での収量低下がほとんどなく（ほぼ定量的に回収される）、しかも酵素反応時の収量も高いことから（100%）、結果的に高い最終収率が見込める。また、使用する微生物や薬品も特殊なものでないことを考えると実用化に向けては有望であると考えられる。ただし、スケールアップした場合の反応性の低下、さらにはキチン分解酵素生産のための*T. harzianum* の培養時間が長いことが問題であるために、今後はこの点について検討をする必要がある。

## 5. おわりに

酵素生産のための培養時間の短縮について、さらに検討する必要がある。また、スケールアップに伴う収量の低下が見られるために、反応効率を上げるための工夫が必要であると考えられる。さらに、キチンの分解は行うが *N*-アセチル-D-グルコサミンを代謝しない微生物を用いることができれば、より効率的な生産が期待される。

## 謝辞

本研究のために、*T. harzianum* (TMICC60622) を快く提供して頂いた、菌蕈研究所（鳥取市）の皆様へ感謝いたします。また、キチン TC-L を提供頂きました、甲陽ケミカル株式会社に感謝致します。

## 文献

- 1) 又平芳春、三澤義知、坂井和男；*グルコサミン研究* **3**, p. 60-67, (2007).
- 2) A. Breborowicz, M. Kuzlan-Pawlaczyk, K. Wieczorowska-Tobis, J. Wisniewska, P. Tam, I. French, G. Wu; *Adv. Peritoneal Dialysis*, **14**, p. 31-35 (1998).
- 3) A. R. Shikhman, K. Kuhn, N. Alaaeddine, M. Lotz; *J. Immunol*, **166**, p. 5155-5160 (2001).
- 4) Y. Inouye, K. Onodera, S. Kitaoka, S. Hirano; *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, p. 4722-4724 (1956).
- 5) 厚生省生活衛生局食品化学課編；食品衛生法改正に伴う既存添加物名簿関係法令通知集、既存添加物名簿収載品目リスト， p. 2 (1995).
- 6) a)坂井和男、In キチン・キトサン・ハンドブック、キチン・キトサン研究会編、技報堂出版、pp. 209-216 (1995). b) J. A. Rupley; *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, p. 245-255 (1964).
- 7) a) M. Sukwattanasinitt, H. Zhu, H. Sashiwa, S. Aiba; *Carbohydr. Res.*, **337**, p. 133-137 (2002), b) H. Sashiwa, S. Fijishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, S. Aiba; *Chem. Lett.*, **30**, p. 308-309 (2001).
- 8) a) K. Sakai, T. Uchiyama, Y. Matahira, F. Nanjo; *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, p. 168-172 (1991), b) H. Sashiwa, S. Fijishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, K. Hiraga, K. Oda, S. Aiba; *Carbohydr. Res.*, **337**, p. 761-763 (2002), c) J. H. Kuk, W. J. Jung, G. H. Jo, Y. C. Kim, K. Y. Kim, R. D. Park; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, p. 384-389 (2005), d) 公開特許公報；特開2007-97466, e) R. Pichyangkura, S. Kudan, K. Kuttiyawong, M. Sukwattanasinitt; *Carbohydr. Res.*, **337**, p. 557-559 (2002).
- 9) T. Imoto and K. Yagishita, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, p. 1154-1156 (1971).
- 10) C. Dziadik-Turner, D. Koga, M. S. Mai and K. J. Kramer, *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, p. 546-560 (1981).
- 11) a) K. Koga, Y. Iwamoto, H. Sakamoto, K. Hatano, M. Sano, I. Kato; *Agric. Biol. Chem.*, **55**, p. 2817-2823 (1991), b) C. J. Ulhoa, J. F. Peberdy; *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, p. 236-240 (1992).