Dextran に関する研究 (第 1 報) Dextran の調製とその性質*

小林恒夫, 塚野 豊 (東京大學農學部農藝化學教室)

昭和 26 年 5 月 11 日 受理

Studies on Dextran. Part 1. The Preparation and Properties of Dextran.

By Tsuneo KOBAYASHI and Yutaka TSUKANO (Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo)

緒 言 Dextran はある種の細菌が蔗糖に作用して生ずる多糖類で、製糖工業に於ける蔗糖の粘質酸酵の産物として古くから知られていた。1930 年代からその菌株並びに生成した多糖類の構造について研究が行われたが、近時 dextran は代用血漿その他として廣く各方面に利用方法が見出され、注目されるに至つた。蔗糖から dextran の生成は次の式に従つて行われ、これは dextransucrase なる酵素によつて catalyze される^(1,2):

かくして生じた dextran は D-glucose の α -1,6 結合より成つて居り、これに少數の α -1,4 結合が混在して分枝構造をなしているものとされているが^(3,4,5,6)、その構造、性質は菌株及び培養條件によつて幾分異なるものと考えられる^(6,7)。

著者等は澱粉に関する研究に於て、異常結合として存在する少數の α -1,6-glucoside 結合が澱粉の性質に重要な影響を有することを知つたので、この結合の性質を通常の α -1,4-glucoside 結合と比較する目的を以て dextran を取上げ、若干の調査を行つた。本報では豫備的報告としてその調製法その他について簡単に述べる。

實 験 の 部

1. Dextran の調製

菌 株 : Dextran 生産菌として最もよく知られている *Leuconostoc mesenteroides* を用いたが、これにも菌株によつて dextran を作るものと作らぬものがある。最初東大農藝化學科酸酵學教室に於てアミノ酸の微量定量用に用いられている *L. mesenteroides* NRRL B-639 によつて試験した所、これは全く dextran を生成しなかつた。その他本邦では dextran 生成菌の菌株が見當らなかつたので、米國 Cornell 大學の Edward J. HEHRE に依頼して氏の *L. mesenteroides* B と稱する菌の分譲を受け、以後これを使用した。この菌は E. J. HEHRE が過熟バナナより分離したものである⁽⁸⁾。

培養液 : 次のような組成の 10% 蔗糖培地を用いた。蔗糖 100g, K_2HPO_4 5g, NaCl 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6g を蒸留水に溶解し、これに約 10g の乾燥酵母を 50 cc の水と共に 40° に 48 時間自己消化させた後煮沸、濾過して得た酵母抽出液を加え、少量のアルカリで pH を 7.6 に調節した後 1 l にうすめる。菌の growth factors の給源としては種々のものを試験したが、上記の酵母抽出液が最も良好な結果を與えた。

培養法 : JEANES 氏の方法⁽⁷⁾に準じ次の如くに行つた。前記組成の寒天培地に 25° で 24 時間穿刺培養したものから 50 cc の培養液に接種し、これを 30° に於て 24 時間振盪培養する。これを 200 cc の培養液を入れた容量 500 cc の平面培養フラスコに加えて全量を 250 cc となし、25° で 24 時間靜置培養する。更に全量を 1 l のフラスコ中の 750 cc の培養液に加えて 25° にて培養する。培養液は次第に乳白色となり粘稠となり、1 乃至 2 日後飴狀の液となる。pH は 1 日後 4~5 となり、更に 3.5 迄低下する。2 日乃至 7 日後培養を止め、次の如くにして dextran を分離した。

Dextran の分離及び精製 : 培養液に 95% エタノールを加えて攪拌し、容量 20% の濃度とし、遠心分離して菌體等を分離する。液はビーカーに移し、攪拌しつつ更にエタノールを加えて濃度 50% とすると dextran は白色ゴム狀の塊となつて沈澱する。上澄液は傾瀉して除き、沈澱物は 50% エタノールを加えて捏ね、洗滌することを 3 回繰返す。次に之を水と加熱して溶かし、ガラス濾過器で濾過し、再びエタノールを 50% 迄加えて dextran を沈澱させ、前記の方法で洗滌する。この操作を更に 1 回繰返した後無水エタノールで洗い真空乾

* 本報の要旨は 1951 年 5 月 3 日 日本農藝化學會學術講演會にて講演した。

燥する。収量は蔗糖 100 g に對して約 20 g である。

2. **Dextran の一般的性質** かくして dextran は白色の粉末又は固い小塊として得られる。無水物中窒素含量は micro-KJELDAHL 法ではかつて 0.01% 程度であり、灰分は 0.1% 以下であつた。冷水には膨潤しつつ徐々に溶けて白濁した粘稠な溶液を興える。33% 抱水クロラル水溶液, formamide には膨潤しつつ溶けてコロイド性溶液となるが、エタノール、アセトン、ピリジン、その他有機溶媒には全く不溶である。右旋性物質であつて $[\alpha]_D$ は約 +200° であるが、溶液が濁っているために正確な値は得られなかつた。又 FEHLING 溶液を還元せず、ヨード反應も呈しない。

稀硫酸と油浴中で 125° に加熱して加水分解すると、定量的に glucose に分解される。加水分解液について SELIWANOFF 反應を利用した ROE の方法⁽⁹⁾で試験して fructose は検出できず、dextran が glucose のみの重合物で、fructose 又はその重合物を含まないことを確めた。

3. **Dextran の分子量及び溶液粘度** Dextran の分子量については從來極めてまちまちの結果が報告されて居り菌株によつて生成する dextran に可成りの差異があるものようである。又同一菌株によつても培養

Table 1. The Mean Molecular Weight and the Intrinsic Viscosity of Dextran.

Dextran Preparation	Intrinsic Viscosity	Mean Molecular Weight
No. 1	0.39	53200
No. 2	0.48	78000
No. 3	0.84	152000
No. 4	0.80	146000
"JEANES"	0.66	43600

The mean molecular weights were determined osmotically using the apparatus of BULL and CURRIE.⁽¹⁰⁾ The aqueous solutions at 30° were used for both measurements.

viscosity) $[\eta]$ を求め、0.39~0.84 の範囲の値を得た。尙米國の Northern Regional Research Laboratory の

Fig. 1. Relationship between the Mean Molecular Weights and the Intrinsic Viscosity of Several Dextran Preparations. Symbols in the figure correspond to those in Table 1. "J" indicates the sample prepared by Dr. A. JEANES.

條件の相違によつて性質の異なるものが得られる。著者等の用いた菌株の生産するものについては從來この種の検討がなされていなかったもので、調製條件のやや異なる4種の試料について滲透壓法による分子量測定を行つた。装置は BULL 及び CURRIE⁽¹⁰⁾ のものを用い、水溶液で 30° にて測定した。そして 1%, 及び 0.5% 溶液について得た値を平均して平均分子量の値とした。その結果は Table 1 の如く 50,000~150,000 の範囲のものであつた。又水溶液の粘度を 30° にて OSTWALD 型粘度計で測り、種々の濃度に於ける測定で得た η_{sp}/c の値を濃度零に外挿して極限粘度数 (KRAEMER⁽¹¹⁾ 等の intrinsic

Allene JEANES が *L. mesenteroides* NRRL B-512 で作つた試料を分與せられたので、比較のために同様に測定を行つた。平均分子量と $[\eta]$ を比較すると、JEANES の試料を除き、大體平行的関係が見られ、STAUDINGER の法則⁽¹²⁾が近似的に成立することが知られる (Fig. 1.)。この法則が成立つとした場合の K_m 恒数はやや値がふれるが平均 1.0×10^{-4} である。又 Fig. 1. の直線から $[\eta]$ と平均分子量の関係を導くと $[\eta] = 0.13 + 4.6 \times 10^{-6} M$ となる。この滲透壓法による平均分子量の値はかなりの誤差を含んでいるが、これらの関係式によつて分子量の大きさを推察することができる。

JEANES の試料だけは粘度-分子量関係が異つており、又粘度測定に於ける $\eta_{sp}/c - C$ の線が他のものと異つた傾斜を示した。著者等の得た試料は、粘度-分子量関係が1つの直線になることから何れも類似した分子の形を有すると考えられるが、JEANES のものはこれとは粒子の形状、従つてその構造に差異があるものと思われる。又上に得た関係式は INGELMAN 等⁽¹³⁾の得た関係と同じ形式のものであるが、その係数をやや異にしている。

著者等の得た dextran の構造の細部は未だ検討されていないが、上記の結果から見て菌株による構造、性質の差はかなり大なるものと考えられる。

4. **Dextran の酵素化學的性質** Dextran は澱粉と同じく α -D-glucose より成る多糖類であるから、澱粉に關係する酵素も或いはこれに作用するのではないかと思つて試験を行つた。B. mesentericus の α -amylase, 甘藷から得た結晶 β -amylase, 酵母の isoamylase を dextran 溶液に加え還元力の出現を測定したが全く分解されなかつた。又 PROEL 及び DAY¹⁴⁾は HASSID 等⁵⁾の得た dextran が馬鈴薯 phosphorylase による CORI-ester から澱粉への合成反應に於て activator になると報告しているが、著者等の得たものは activator とはなり得なかつた。Dextran を鹽酸で少し分解した試料についても同様であつた。この點から見ても菌株によつて生産されるものの性質及び構造がかなり異つてゐることが想像される。

總 括

- 1) *L. mesenteroides* の 1 菌株によつて蔗糖から dextran を調製し、その性質を記述した。
- 2) 滲透壓法による平均分子量は 50000~150000 の程度であり、これと極限粘度數の間に近似的に STAUDINGER の法則の成立つことを示し、又平均分子量と極限粘度數の間の實驗式を導いた。
- 3) 澱粉に關係する 2, 3 の酵素が dextran に作用しないこと、又 dextran は馬鈴薯 phosphorylase の activator となり得ないことを確めた。
- 4) 高分子の性質並びに酵素化學的性質を他の菌株による生産物及び從來の文獻に見られるものと比較し、菌株によつて生産される dextran の性質、構造にかなりの相違のあることを推論した。

終りに本研究に當り御指導を賜つた佐橋佳一教授、丸尾文治助教授に深甚なる感謝の意を表する。又 dextran 生産菌を分與せられた Cornell 大學 E. J. HEHRE 博士、並びに dextran の試料を分與せられた Northern Regional Research Laboratory の A. JEANES 氏の御好意に對し厚く感謝する。

- (1) E. J. HEHRE, J. Y. SUGG : *J. Exptl. Med.*, 75, 339 (1942)
- (2) E. J. HEHRE : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 54, 240 (1943)
- (3) F. L. FOWLER, I. K. BUCKLAND, F. BRAUNS, H. HIBBERT : *Can. J. Research*, B 15, 486 (1937)
- (4) E. C. FAIRHEAD, M. J. HUNTER, H. HIBBERT : *Ibid.*, B 16, 151 (1938)
- (5) W. Z. HASSID, H. A. BARKER : *J. Biol. Chem.*, 134, 163 (1940)
- (6) A. JEANES, N. C. SCHIELTZ, C. A. WILHAM : *Ibid.*, 176, 617 (1948)
- (7) A. JEANES, C. A. WILHAM, J. C. MIERS : *Ibid.*, 176, 603 (1948)
- (8) J. Y. SUGG, E. J. HEHRE : *J. Immunol.*, 43, 119 (1942)
- (9) J. H. ROE : *J. Biol. Chem.*, 107, 15 (1934)
- (10) H. B. BULL, B. T. CURRIE : *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 742 (1946)
- (11) E. O. KRAEMER : *Ind. Eng. Chem.*, 30, 1800 (1938)
- (12) H. STAUDINGER, W. HEUER : *Ber.*, 62, 222 (1930)
- (13) B. INGELMAN, M. S. HALLING : *Arkiv Kemi*, 1, 61 (1949)
- (14) E. C. PROEL, H. G. DAY : *J. Biol. Chem.*, 163, 667 (1946)

Summary

Bacterial dextran was prepared from sucrose by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*, isolated by Dr. E. J. Hehre. The method of preparation and the properties of the product were described.

The mean molecular weight of several preparations was determined osmotically and the values ranging from 50,000 to 150,000 were obtained. The mean molecular weights, M were found to be in a linear relationship with the intrinsic viscosities $[\eta]$. The following equation was derived from these values : $[\eta] = 0.13 + 4.6 \times 10^{-6} M$.

Dextran was not attacked by several starch-splitting enzymes. It did not activate the potato phosphorylase in the starch synthesis.

The differences were pointed out among the properties of the dextran preparations produced by various strains of the organism. It was suggested that the products by various strains differ considerably in their molecular sizes and chemical constitutions.