一有孢子細菌の生産する高粘性多糖類 (第 1 報)

生産物の確認

二宮英治, 木崎忠重, 花田香一

(明治製糖株式会社研究所)

昭和 42 年 6 月 9 日 受理

High Viscous Polysaccharide Produced by a Spore-forming Bacterium

Part I. Identification of Product

By Eizi NINOMIYA, Tadashige KIZAKI and Kōichi HANADA

Research Institute, Meiji Sugar Mfg. Co., Ltd.

A spore-forming bacterium, strain No. 271, isolated from soil produced an extracellular polysaccharide in a medium containing glucose by shaking culture for 4 days at 30°C. When fermentation was finished, culture fluids had a viscosity as high as 18,000 centipoises and contained about 1.6% of polymer.

A white polymer was recovered from the viscous fermentation broth by precipitation with methanol in the presence of an electrolyte. The aqueous solution of the polymer had a viscosity comparable with that of guar gum, and the viscosity was enhanced still further by the addition of acids, salts and sugars.

The acidic polymer was obtained only from glucose, but the polymer formed from sucrose was the mixture of the acidic and the neutral one. The acidic polymer was composed of glucose, mannose, galactose and glucuronic acid, while the neutral polymer was composed of glucose, mannose, galactose and fructose.

(Received June 9, 1967)

緒 言

砂糖製造工程のマイクロフラを研究中, たまたま, 粘稠なコロニーを形成し振盪培養すると多糖類を生成する *Pullularia* 菌を見出した。これを端緒にその後, 原料糖, 腐敗植物および各地の土壌からグルコースを炭素源とし, 好氣的培養によって高粘性多糖類を生成する菌株を検索した結果, 醗酵終了液の粘度が約 20,000 cp に達する一細菌を見出した。培養液がこのように高粘度になる例は *Xanthomonas* 菌⁽¹⁾, および *Arthrobacter* 菌⁽²⁾ が報告されているにすぎない。この多糖類は比較的高収率で生産されることが判り, さらに微生物多糖類あるいは天然多糖類の文献記載上の性質比較において 2, 3 の特性を有することを認めた。われわれはこの多糖類を天然糊料として, 工業的生産の可能性を研究することを目的とするものであり, まず回収される“native”な多糖類について諸性質を検討することにした。微生物多糖類を食品に利用しようとする場合には, 塩改変などの化学

工程を経ると化学糊料として食品添加物の範疇に属することになる。

実験方法

1. 使用菌株 本実験に用いる菌株は各地の土壌, 輸入原料糖, 腐敗植物から第 1 表の組成を有する基礎寒天培地に粘稠なコロニーを形成した 303 株のうち, 同組成の液体培地に振盪培養して, 最も高粘度になった No. 271 菌株である。この菌株は, 千葉県の土壌から分離したグラム陰性の通性嫌気性桿状細菌で, 運動性を有する。老細胞はほぼ cylindrical な形となり, その中央部に oval ないし oval 長の胞子を形成する。これらの特徴から *Bacillus* 属と考えられる。

第 1 表 基礎培地の組成

グルコース	60 g
ペプトン	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	2 g
CaCO ₃	5 g
Mineral sol'n*	3 ml
(寒 天)	15 g)

蒸溜水に溶かして 1 l にする。

* FeSO₄·7 H₂O, NaCl, MnSO₄·7 H₂O の各 0.2% 溶液。

2. 培養方法 500 ml 容坂口フラスコに基礎培地 100 ml を入れて滅菌後, 1 白金耳量を植菌し, Reciprocal Shaker (振幅 7 cm, 毎分 140 回) により 30°C で振盪培養した。

3. 多糖類の定量 培養液 50 g をビーカーに採取し, 等量の水で希釈後, 加熱 (70~80°C, 10 分間) する。蒸発水分を補正後, 熱時遠心処理 (4,000 rpm, 15 分間) し, その上澄液 50 g に飽和 KCl 溶液数滴とメタノール 50 ml を加えて多糖類を分離沈殿させる。この多糖類を乾燥後, g/dl で表示した。

4. 粘度の測定法 東京計器(株)製 BL 型回転粘度計を使用し, 特にことわらないかぎり 30 rpm, 25°C で測定した。

5. 精製多糖類溶液の調製法 精製多糖類を脱塩水を用い, 55°C, 18 時間放置して溶解した。

実験結果

1. 多糖類の生産と回収

1) No. 271 菌株による多糖類の生成経過 本菌株を振盪培養し, その経過を分析して第1図の結果を得た。培養開始後 16 時間目頃より著しく発泡するが, 30 時間目頃より粘度の増加と共に安定する。粘度および多糖類の生産は 90~100 時間目まで増加し, 再び減少の傾向を示した。

2) 多糖類の分離と精製 一般に溶液から多糖類を分離する方法としては, アルコール沈殿法, 塩沈殿法,

第4級アンモニウム塩法などがある。No. 271 菌株が生産する多糖類の場合, 透明な濾液にアルコール類 (メタノール, エタノール, イソプロパノール), 塩類 (硫酸銅, 塩化カルシウム), 第4級アンモニウム塩 (cetyltrimethyl-ammonium bromide: CTAB) を添加すると, 多糖類は糸状に分離, 沈殿していずれの方法も有効であった。CTAB が沈殿剤として有効であることから, われわれはこの多糖類は酸性多糖類であろうと推定した^(3,4)。回収方法には上記の方法の中で最も簡便なメタノール沈殿法を採用することにした。そして沈殿剤として KCl を培養濾液に添加し, その添加量と多糖類の沈殿に必要なメタノールの所要量との関係を検討した結果, 濾液に 1% (w/v) の KCl を添加したときが最も効果的であり, このときのメタノール濃度は 50% (v/v) であった。多糖類が溶液から分離するときのアルコール濃度はその溶液の pH にも関係する。KCl を 0.5% 添加し, 塩酸溶液あるいは苛性ソーダ溶液で pH を 2~10 に各種調整した培養濾液にメタノールを滴下, 攪拌して多糖類が分離したときのメタノール濃度と pH の関係を求めた結果, 溶液の pH が低いほどメタノール添加量は少なくてすむが, pH 3 以下では沈殿がフロック状になり回収が困難である。pH 4 以上では糸状沈殿が形成され, 回収は容易であった。したがって多糖類の分離, 精製を次のように行なった。すなわち, 醗酵終了液を 2 倍量に希釈後, 80°C, 15 分間加熱し, 硅藻土層を通して吸引濾過, 濾液に KCl を 1% 添加してメタノールを等重量加えた。こうして得られた第1次沈殿を再溶解し濾過およびメタノール沈殿を繰返し, 第1次~第3次沈殿の無水物について灰分および全窒素量を定量することにより精製効果を求めた。その結果, 第2次沈殿は第1次沈殿に比べて精製効果が大きい, 第2次沈殿と第3次沈殿の間では殆ど効果が認められず, メタノール沈殿法による精製を 2 回行なえば, それ以上純度の上昇は期待できないことが認められた。以後, メタノール沈殿を 3 回繰返して得られた多糖類を精製試料とする。

2. 構成糖の確認

第2表のように精製試料の加水分解物を処理して, 1) エーテル可溶区分, 2) 酸性糖区分, 3) 中性糖区分に分け各区分について構成糖の検出を試みた。

1) エーテル可溶区分 この区分からエーテルを蒸留し去った後水層部について有機酸の検出を試みたが, その存在は認められなかった。

第1図 振盪培養による経時変化
培地: グルコース含有基礎培地。
培養条件: 坂口フラスコによる振盪培養, 30°C。

第 2 表 精製多糖類の加水分解

2) 酸性糖区分 アルコールにより沈殿した酸性糖の Ba 塩の一部を用い, ナフトレゾルシン反応およびトレンス反応によりウロン酸の存在を確認した。次にこの沈殿約 40 mg をイオン交換樹脂 Dowex-1 (X-8) 酢酸塩型⁽⁵⁾に吸着させ, 0.15 M CH_3COOH を用いて溶出した。別にグルクロン酸, ガラクチュロン酸, マンニuron 酸の各 10 mg について同様に操作し, 各々のウロン

第 2 図 イオン交換樹脂による酸性糖区分の溶出図形

イオン交換樹脂: Dowex-1 (X-8) 酢酸塩型
 カラム: 径 14 mm, 高 120 mm
 溶出液: 0.15 M CH_3COOH 溶出速度: 2.5 ml/min
 1 フラクション: 20 ml 発色剤: オルシン
 — 試料加水分解液の酸性糖区分
 既知ウロン酸 (各 10 mg) (1) ガラクチュロン酸
 (2) マンニuron 酸
 (3) グルクロン酸

酸の溶出位置を決定した。それらの結果を第 2 図に示すが, peak ① は樹脂に吸着されなかったオリゴ糖類である。peak ②, ③, ④ のうち peak ④ は既知グルクロン酸の溶出位置と全く一致した。しかし peak ②, ③ についてはこの結果だけでは不明であった。そこで peak ②, ③, ④ に相当する溶出液についてペーパークロマトグラフィーで同定した結果, peak ④ は A solvent (酢酸エチル: ピリジン: 水=8:2:1), B solvent (ベンゼン: *n*-ブタノール: ピリジン: 水=1:5:3:3), C solvent (*n*-ブタノール: エタノール: 水=2:1:1), D solvent (酢酸エチル: 酢酸: 水=3:1:3) を展開液とした場合, 東洋濾紙 No. 51 に対し R_{glucose} として, それぞれ 16.00, 2.17, 1.48, 4.35 の値が得られ, これらの値は標準物質のグルクロン酸に相当した。しかし peak ②, ③ はテイリングがはなはだしく, 同定できなかった。一方, peak ②, ③, ④ に相当する溶出液のナフトレゾルシン呈色では, peak ④ は直ちにウロン酸特有の呈色を示したが, peak ③ は 2~3 時間後に, また peak ② は 1 夜放置後に呈色した。一般にウロン酸が多糖類の構成成分として入っている場合には加水分解に抵抗し, ウロン酸-糖の結合が切れ難いといわれている。peak ②, ③ はグルクロン酸にある種の糖が結合しているために呈色反応に遅れを生じ, ペーパークロマトグラフィーによるスポットでは確認できず, また, 酢酸型アニオン交換樹脂に対しては親和性が弱いために早く溶出されるのであろうと推定される。この推定を裏づけるために, peak ②, ③, ④ に相当する溶出液を加水分解し, ペーパークロマトグラフィーで同定した結果, peak ② からはグルコース, マンノース, グルクロン酸を, peak ③ からはマンノース, グルクロン酸を, また peak ④ からはグルクロン酸のみが検出された。

以上の結果から, われわれはこの多糖類の構成成分であるウロン酸はグルクロン酸であることを認めた。

3) 中性糖区分 中性糖区分に存在する糖を, 前記の展開液を用いてペーパークロマトグラフィーにより同定を試みた。検出された糖は 3 種類で各々の展開液による R_{glucose} は 1.00, 1.33, 0.80 (solvent A), 1.00, 1.07, 0.94 (solvent B), 1.00, 1.06, 0.97 (solvent C), 1.00, 1.20, 0.90 (solvent D) の値であった。これらの R_{glucose} に相当するスポットを既知単糖類と比較した結果, それぞれグルコース, マンノース, ガラクトースに一致した。

3. 多糖類の単一性の確認

精製多糖類が一種類の多糖類であるか否かを CTAB 沈殿法とメタノール分別沈殿法とによって検討した.

1) CTAB による沈殿 精製多糖類 4 g を 1 l の脱塩水に溶解したのち濾過し, 少量の水に溶かした KCl 5 g を添加したものに, 2% CTAB 溶液を白色沈殿がなくなるまで加えた. 沈殿を回収し KCl 飽和の 90% メタノールで洗浄して CTAB を完全に除去したのち, 脱水乾燥して白色粉末 3.4 g を得た. 一方, 沈殿を回収した後の濾液に KCl 5 g と 2 倍量のメタノールとを添加したが, もはや沈殿は生じなかった. このことより, 培地から回収した精製多糖類は酸性多糖類のみから構成されていることがわかる.

2) メタノールによる分別沈殿 前記同様に調製した試料溶液にメタノールを滴下混合し, 順次生成する沈殿を回収した. 初めて沈殿が生成したときのメタノール濃度は 56.5% (No. 1 フラクション) で, 終了時は 80.3% (No. 9 フラクション) であった. No. 9 フラクションは No. 8 フラクション回収後の母液に KCl 2 g とメタノールを追加して得られた. No. 9 フラクション回収後の母液からは, もはや沈殿は生成しなかった. 各フラクションの収量の合計は 3.32 g で回収率は 83% であるが, これは No. 8 フラクションまでは沈殿助剤を用いなかったために沈殿物中の灰分量が減ったことと, 回収中の損失によるものと考えられる. 各フラクションの多糖類について相対粘度および比旋光度を測定した. 最高相対粘度は 30 (No. 1 フラクション) で, 最低は 17 (No. 9 フラクション) で, このうち相対粘度 26 前後の部分が全体の約 60% を占め, それより高粘度と低粘度の部分がそれぞれ 20% 程度存在する. 比旋光度は +120 (No. 1 フラクション) から +102 (No. 9 フラクション) に漸減する傾向を示した. このように比旋光度および相対粘度はメタノール濃度勾配に従ってほぼ連続的に変化しており, 特定のピークがないのでそれらの差異は分子量の差に基づくものと思われる. 各フラクションの多糖類の構成糖をペーパークロマトグラフィーにより同定した結果, グルコース, マンノース, ガラクトース, グルクロン酸により構成されていることが認められた. 1) および 2) の結果から, われわれは No. 271 菌株によってグルコースから生産された多糖類は一成分系の酸性多糖類であると解釈した.

4. シュクロースを炭素源とした多糖類の構成糖の確認

基礎培地のグルコースをシュクロースに変えて振盪培養し, 粘度 4800 cp の培養液を得た. グルコースを基質に用いた場合に比べて粘度が低いことから, 生産された多糖類 (以後 Gum-S と呼称) は, 1) 構成糖の種類あるいは結合様式の変化したもの, 2) 重合度の低下したもの, 3) デキストランあるいはレバンのような中性多糖類, 4) 2 種以上の多糖類の混合物等ではないかと推察される. 多糖類の生産量は 1.7 g/dl でグルコースを基質にした場合と同程度である. 培養液からメタノール沈殿法によって 3 回精製した Gum-S 5.0 g を脱塩水に溶解し, まず CTAB により沈殿する区分の多糖類を回収し 2.5 g を得た. さらに母液にメタノールを添加して得られた多糖類は 1.8 g であった. したがって, シュクロースを炭素源として生産される多糖類は, 酸性多糖類と中性多糖類の混合物であることがわかる. さらに両多糖類について行なったメタノール分別沈殿により, 両多糖類とも単一の多糖類と見なされる結果が得られた. 構成糖の同定はペーパークロマトグラフィーで行ない, 酸性多糖類の加水分解物からはグルコース, マンノース, ガラクトース, グルクロン酸が, また中性多糖類の加水分解物からはグルコース, マンノース, ガラクトース, フラクトース [フラクトースの R_{glucose} は 1.60 (solvent A), 1.28 (solvent B), 1.09 (solvent C), 1.32 (solvent D)] が検出された. 第 3 表に 2, 3 の物性に関する両多糖類の差異を示す.

5. 溶液の性質

グルコースを炭素源として得られた精製多糖類は, 白色粉末で, 無味・無臭である. 冷水に可溶であるが, アルコール, エーテル, アセトン, クロロホルム等の有機

第 3 表 シュクロースを炭素源とした多糖類の分別結果

	分 別 前	分 別 後	
		酸性多糖類	中性多糖類
相対粘度 ($c=0.2$) (25°C)	18.1	25.0	1.0
比旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$	+50.0	+67.0	-1.0
構 成 糖	グルコース	グルコース	グルコース
	マンノース	マンノース	マンノース
	ガラクトース	ガラクトース	ガラクトース
	グルクロン酸 フラクトース	グルクロン酸	フラクトース
混 合 比	—	4	: 3

第 4 表 精製多糖類の組成 (無水物)

灰 分	蛋白質	脂 質	炭水化物 (差引)
10.60%	1.06%	0.00%	88.34%

灰分: AOAC 法による。灰分組成は CaO 12.4%, Fe_2O_3 15.2%, K_2O 71.2%, Na_2O 4.0%。
 蛋白質: セミ・ミクロケルダール法による。(N×6.25) を蛋白質とした。
 脂質: ソックスレー法による。

溶媒には溶けない。水溶液はほぼ中性である。一般組成分析の結果を第 4 表に示す。

1) 濃度と粘度 試料の濃度と粘度の関係を第 3 図に示す。比較のために市販の天然多糖類のうち、最も高粘性のローカストガムおよびグアガムの粘度を併記した。なお、1% 溶液ではチキソトロピックな性質が認められたが、この性質は 0.5% 溶液では弱くなる。

2) 加熱の影響 第 4 図に溶液粘度の加熱に対する動向を粘度の変化率で示した。測定方法は、試料を室温 (20~25°C) で 18 時間攪拌溶解して 1% 溶液を調製後、25°C で粘度を測定し 40°C に 30 分間保ち、直ちに 25°C に冷却して粘度を測定する。このように加熱 (30 分間) → 冷却 (25°C) → 粘度測定を繰返した。60°C 処理以前の粘度上昇は加熱により膨潤したことを示し、それ以降の

第 3 図 濃度と粘度の関係

①: グアガム ②: ローカストガム ③: 試料

第 4 図 溶液の加熱による粘度変化
 精製多糖類の 1% 溶液の粘度 1220 cp を 100 とした。
 各温度で 30 分加熱後、25°C で粘度測定。

粘度低下は加熱による分解と考えられる。

3) pH の影響 0.5% 試料溶液の pH を変え、粘度を測定した結果は第 5 図のごとくである。アルカリ側では粘度は漸減するが酸性側では急激に上昇し、pH 2.3 において最高値 590 cp を示したが、なおも酸性にすると再び低下した。しかし酸性領域での粘度は安定ではない。例えば、0.5% 試料溶液 (95 cp, pH 7.4) にクエン酸を 0.3% 添加すると 420 cp, pH 2.9 になったが、30°C では 14 日後に 270 cp に低下した。70°C では 2 時間後に 50 cp に低下したが、クエン酸無添加の中性溶液では分解は認められなかった。

4) 塩の影響 塩類による粘度変化を第 6 図に示す。供試したすべての塩類により粘度は上昇し、一度変化した粘度はきわめて安定で 20 日後においても粘度低下は認められなかった。

第 5 図 pH と粘度の関係

試料: 0.5% 水溶液, pH 7.2, 95 cp.
 pH 調整には 3% HCl または 3% NaOH 使用。

第 6 図 塩類添加による粘度の変化

試料: 0.5% 溶液 (95 cp)

添加塩類: ① $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ② KCl ③ NaCl ④ NaH_2PO_4

5) 糖の影響 粘度に及ぼす糖類の影響は、塩類を添加した場合ほどの急激な粘度変化はない。0.5% 試料溶液 (150 cp) にグルコース、シュクロース、ラクトース等を 30% 添加した場合、粘度はそれぞれ 240 cp, 265 cp, 295 cp に上昇した。各糖類の 30% 溶液の粘度は 2 cp 以下なので、試料溶液の粘度上昇は単に糖類粘度の付加的なものではないことがわかる。

考 察

グルコースを炭素源として、グルコース-マンノース-ガラクトース-グルクロン酸よりなる複合多糖類を生産する No. 271 菌株は、その形態的特徴から *Bacillus* 属と思われるが、*Bacillus* 属の細菌によって生産される多糖類に関する既報の文献において、前記のごとき多糖類を生産する菌株は報告されていない。このような構成糖に近い微生物多糖類としては Murphy ら^(6,7)が *Bacillus polymyxa* C₃ (2) をシュクロース含有培地に静置培養して、レバンとグルコース-マンノース-ガラクトース-ウロナイド重合体の混合物を得ているが、ウロン酸の種類については言及していない。No. 271 菌株によりシュクロース

を炭素源として得られた多糖類は、グルコース-マンノース-ガラクトース-フラクトース重合体と、グルコース-マンノース-ガラクトース-グルクロン酸重合体の混合物であり、Murphy らが得た生産物とは異なるものである。われわれは本報では“native”な多糖類の特徴を知るために、特定塩型への改変を行なわないで実験を行なったが、その水溶液は天然多糖類中最も高粘性のローカストガム、グアガムなどに匹敵する粘度を有している。

要 約

グルコース含有培地中で、高粘性の水溶性多糖類を生産する一有胞子細菌 No. 271 菌株を土壌から分離し、振盪培養したときの醗酵経過および生産された多糖類について次の諸点を明らかにした。

(1) 多糖類の生成は培養 92 時間目に最高に達し、グルコースを炭素源に用いた場合の収量は 1.6 g/dl、培養液の粘度は 19,000 cp であった。また、シュクロースを炭素源に用いた場合はそれぞれ 1.7 g/dl、4800 cp であった。

(2) グルコースを基質として生産された多糖類は、グルコース、マンノース、ガラクトース、グルクロン酸を構成糖とする酸性多糖類であり、シュクロースを基質として生産された多糖類は上記の酸性多糖類とグルコース、マンノース、ガラクトース、フラクトースを構成糖とする中性多糖類の混合物である。

(3) グルコースを基質として生産された多糖類をメタノール沈殿法により精製した試料は、白色、無味、無臭であり、灰分 11%、蛋白質 1% を含有する。これを水に溶かすと中性の高粘性溶液となり、粘度は天然多糖類のグアガムに匹敵し、さらに有機酸類、塩類、糖類を添加することによりその粘度は増強される。熱に対しては中性では安定であるが、酸性側では不安定である。

終りに臨み、マンニユロン酸を分与いただいた北海道衛生研究所技官井上勝弘博士、および本研究に協力いただいた井深久子氏に深謝いたします。

- (1) S. P. Rogovin, R. F. Anderson and M. C. Cadmus : *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.*, **3**, 51 (1961).
- (2) M. C. Cadmus, H. Gasdorf, A. A. Lagoda, R. F. Anderson and R. W. Jackson : *Appl. Microbiol.*, **10**, 153 (1962).
- (3) J. E. Scott : "Method in Carbohydrate Chemistry", Vol. 5, Academic Press, 1965, p. 38.

- (4) J. E. Scott : "Methods of Biochemical Analysis", Vol. 8, Interscience Publishers, 1960, p. 38.
- (5) J. X. Khym and D. G. Doherty : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3199 (1952).
- (6) D. Murphy : *Canad. J. Chem.*, **30**, 872(1952).
- (7) D. Murphy, C. T. Bishop and G. A. Adams : *Canad. J. Biochem. Phys.*, **34**, 1271 (1956).
-