[農化 第 42 卷, 第 7 号, p. 431~434, 1968]

一有孢子細菌の生産する高粘性多糖類 (第 2 報)

物理的性質と構成糖比

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 12 月 25 日 受理

High Viscous Polysaccharide produced by a Spore-forming Bacterium Part II Physical Properties and Constituent Sugar Ratio

By Eizi NINOMIYA, Tadashige KIZAKI and Kôichi HANADA

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

Polysaccharide formed from glucose-containing medium by *Bacillus polymyxa* No. 271 was composed of D-glucose, D-mannose, D-galactose and D-glucuronic acid in a molar ratio of 3:3:1:2. This polymer showed $[\alpha]_D^{25} = +125^\circ$ ($c=0.5$ in water), appeared to have both α - and β -glycosidic linkages in the molecule from the results of infrared analysis, and its molecular weight, determined by the viscosity-measuring method, was found to be approximately 1,300,000. One per cent aqueous solutions of salt-form polysaccharides prepared from the demineralized polysaccharide solution with ion-exchange resins as the K-, Na- and Ca-polysaccharide had a viscosity of 1560 cp, 2120 cp and 6200 cp at a temperature of 25°C, respectively.

(Received December 25, 1967)

緒 言

前報⁽¹⁾では一有孢子細菌が、グルコースからは酸性多糖類のみを、また、シュクロースからは酸性多糖類と中性多糖類の混合物を生産することを述べた。その後、当該菌株の同定を行ない *Bacillus polymyxa* であることを認めたが、*Bacillus polymyxa* は菌株により、あるいは炭素源により相違する多糖類、たとえばグルコースと酸性物質を微量含むマンナン⁽²⁾、レバン⁽³⁾、デキストラン⁽⁴⁾、マンナン⁽⁵⁾、マンノース-グルコース-ウロン酸重合体⁽⁶⁾、ラムノース-ガラクトース-フコース重合体⁽⁷⁾、などを生産することが知られているが、糖組成あるいはその性質についてはあまり報告されていない。著者らは本報において、グルコースから得た酸性多糖類(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)の構成糖モル比と若干の物理的性質について得た知見について報告する。

実験方法

1. 使用菌株 前報で述べた No. 271 菌株を用いるが、この菌株は運動性を有する通性好気性桿状細菌で、

老細胞はほぼ cylindrical な形となり、その中央部に oval ないし ovalong の孢子を形成するなどの形態的性質から *Bacillus* であることを予報した。さらに培養的性質および生理的性質について同定試験^(8,9)を行ない、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957 年)に従って検索したところ、*Bacillus polymyxa* に属するが、グラム染色性は陰性であることが認められた。以後 *Bacillus polymyxa* No. 271 と呼称する。

2. 多糖類の調製 培地(グルコース 60g, ペプトン 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2g, KH_2PO_4 5g, CaCO_3 5g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 微量, 水 1l) に、*Bacillus polymyxa* No. 271 を接種し、30°C, 72 時間振盪培養して得た粘度 17,000 cp の培養液 4l に、2 倍量のメタノールを添加し、沈殿した多糖類を再溶解濾過して 30l に稀釈した。次にイオン交換樹脂 Amberlite IRC-120 (H 型) 300 ml および Kastel A-501 D(OH 型) 600 ml を添加し、60°C で 2.5 時間攪拌して脱塩した。脱塩多糖類の硫酸灰分含量は 0.02% であった。脱塩多糖類溶液に KCl , NaCl , $\text{CaCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 0.5% 添加して各々の特定塩型とし、メタノ

ールを3倍量注加して得た沈殿を脱水乾燥して, K 型, Na 型, Ca 型多糖類を粉末として調整した. 各多糖類の硫酸灰分含量は K 型 10.46%, Na 型 8.56%, Ca 型 8.32% であり, グルクロン酸含量から求めた理論灰分量はそれぞれ 11.01%, 9.17%, 8.82% であり, 分析値にはほぼ一致した. これらの窒素含量は 0.0002% で極めて微量であった.

実験結果および考察

1. 多糖類の物理的性質

1) 比旋光度: 常法により 10cm 観測管を用いて測定した比旋光度は, K 型, Na 型, Ca 型多糖類ともに $[\alpha]_D^{25} = +125$ (水, $c=0.5$) であった. この溶液を加水分解すると比旋光度が下がる現象から, この多糖類の結合様式には α -結合が優先していることがわかる.

2) 粘度および推定分子量: オストワルド粘度計を用い脱塩多糖類を 1% NaOH 溶液にとかけて粘度を測定し, η_{sp}/c および $\ln \eta_r/c$ を濃度 c に対してプロットすると直線になったので, $c \rightarrow 0$ に補外して極限粘度 $[\eta] = 4.76$ が得られた. この $[\eta]$ を用いると, Staudinger の式から平均分子量を求めることができる.

Staudinger の式;

$$[\eta] = Km \cdot M^\alpha$$

$[\eta]$: 極限粘度 Km, α ; 定数 M ; 分子量

Km および α については, ある数値を与えねばならぬが, 三崎⁽¹⁰⁾らが, *Bacillus polymyxa* var. *lactoviscosus* の生産する多糖類から求めた実験値 ($Km: 3.08 \times 10^{-6}$, $\alpha: 0.85$) を代入すると平均分子量 1,273,000 が得られ

た. B 型粘度計により測定した各塩型多糖類間の濃度と粘度の関係は第 1 図のごとくであり, 2価イオンの Ca 型は 1価イオンの K 型, Na 型に比べ著しく高粘性である.

3) 吸収スペクトル:

紫外部および可視部には特異な吸収は見当らない.

第 2 図に, KBr 法による赤外吸収スペクトルを示した. 1610cm^{-1} および 1400cm^{-1} の強い吸収は, この多糖類の一構成糖であるグルクロン酸のカルボキシル基が塩型であることを示している.

多糖類の吸収スペクトルには, それを構成する単糖分子間の結合様式が $700 \sim 950\text{cm}^{-1}$ 領域に現われる. 複合多糖類の結合様式と赤外スペクトルの関係を明らかにした事例はないが, グルコース多糖類の吸収と同位置であるとすれば, 915cm^{-1} の吸収は α -結合を, また, 880cm^{-1} の吸収は β -結合の存在を示すものである⁽¹¹⁾. 815cm^{-1} の強い吸収は Barker⁽¹²⁾らが単糖類の赤外吸収スペクトルから求めた α -D-galactopyranose の特異

第 1 図 各塩型多糖類溶液の粘度

BL 型粘度計を用い 30 rpm
25°C で測定した.

第 2 図 K 型多糖類の赤外部吸収スペクトル
KBr 錠剤法による.

吸収帯 ($839\sim 810\text{cm}^{-1}$) に近似しており, 本多糖類のガラクトースは α -型で結合していると考えられる。

種々の天然多糖類の赤外吸収スペクトルを測定してみると, 815cm^{-1} 近辺に吸収を有する多糖類には必ずガラクトースが含まれている (第 3 図)。たとえば, マンノース-ガラクトース重合体であるグア・ガムのガラクトースは α -1, 6 でマンノースに結合しており⁽¹³⁾, ローカストビーン・ガム (ガラクトース, マンノース) のガラクトースは, α -1, 6 でマンノースに結合している⁽¹⁴⁾。また, ガラクトース重合体のカラゲナンにも α -1, 4 結合が認められている⁽¹⁵⁾。カラヤ・ガム (ガラクトース, アラビノース, ガラクチュロン酸), アラビアガム (ガラクトース, アラビノース, ラムノース, グルクロン酸) には 815cm^{-1} 付近に吸収があるが, まだ結合様式は明らかにされていない。タマリンド種子多糖類には, ガラクトースが一構成糖として含まれているが, このガラクトースは β -1, 2 でキシロースに結びついており⁽¹³⁾, 815cm^{-1} には吸収が認められない。グルコース重合体のデキストランおよびプルラリア多糖類には上記吸収帯は存在しない。 α -, および β -結合を共有する多糖類としては, グアガム⁽¹³⁾, タマリンド種子多糖類⁽¹⁵⁾, 寒天 (アガロース)⁽¹³⁾, *Aerobacter aerogenes* A₃ (S₁) が生産する微生物多糖類⁽¹⁶⁾などが報告されている。

2. 糖 構 成 比

K 型多糖類 5g を 5% H_2SO_4 500 ml に溶解し, 沸騰浴中で 7 時間加水分解した。この条件における加水分解率は 5 時間で平衡になり, その値は Somogyi 変法によりグルコースとして 77.7% であった。次に $\text{Ba}(\text{OH})_2$ および BaCO_3 で中和後, 濾過し, 濾液に 4 倍量のエタ

第 3 図 多糖類の赤外吸収スペクトル

Nujol Mull 法による。

- ① グア・ガム
  - ② ローカストビーン・ガム
  - ③ カラゲナン
  - ④ カラヤ・ガム
  - ⑤ アラビア・ガム
  - ⑥ タマリンド種子多糖類
  - ⑦ デキストラン
  - ⑧ プルラリア多糖類
- ①～⑦は市販品, ⑧は *Pullularia fermentans* を用いグルコースから生産させた多糖類。

ノールを加えてグルクロン酸区分を不溶性の Ba 塩として沈殿させ, 濾液を濃縮して中性糖区分を得た。シラップ状の中性糖区分 10 ml (グルコースとして 1250 mg) を粒状活性炭に吸着させ, まず脱塩水で溶出した。1 フラクションを 20 ml とし Fr. No. 103~275 に連続的に糖を検出したのでこれを集めて, Fraction A とし, Fr. No. 300 で脱塩水から 5% エタノールに切り換え, 2.4 l 用いて溶出したが, この部分には糖を検出なかった。引続き, 10% エタノールに切り換え, Fr. No. 461~565 に微弱ながら連続的に糖を検出したので, これを集めて Fraction B とし, Fr. No. 721 より 20% エタノール 2 l を用いてカラムを洗浄し, これを Fraction C とした。その溶出状態を第 4 図に示す。Fraction A, B, および C

第 4 図 中性糖区分の分離

粒状活性炭: ツルミコール GVA-100
カラム: 径 25 mm, 高 420 mm
溶出速度: 2.5 ml/min
1 フラクション: 20 ml

に存在する還元糖量はグルコースとして各々 1203 mg, 9 mg, 6 mg に相当したので, カーボンカラムの溶出による糖の回収率は 97.44% である。ペーパークロマトグラフィーにより, Fraction A には単糖類 (グルコース, マンノース, ガラクトース) のみであることが認められたが, Fraction B には不明のオリゴ糖 2 種類が検出され, Fraction C には, さらに重合度の高いと思われるオリゴ糖が存在することが認められた。この結果から, Fraction A には単糖類のみが集積しており, それは中性糖区分の 96.2% に相当する量であるので, オリゴ糖類の量を無視して Fraction A から構成糖モル比を求めることができる。そこで Fraction A に含まれている単糖類をイオン交換樹脂 Dowex-1(X-8) 硼酸塩型^(17,18)で分離定量するに先立ち, 標準物質として, グルコース, マンノース, ガラクトース各 10 mg の混合物を上記イオン交換樹脂に吸着させ, まず 0.05 M 硼酸 + 0.004 M 硼酸カリを用いる溶出によりマンノースを分離し, さらに

第 5 図 イオン交換樹脂による Fraction A の分離, 定量

イオン交換樹脂: Dowex-1 (X-8) 硫酸塩型
 カラム: 径 14 mm, 高 120 mm 溶出速度: 1 ml/min
 1 フラクション: 20 ml 糖の定量法: アンスロン比色法 (625 mμ)

0.03 M 硼酸カリを用いる溶出によりガラクトースとグルコースを分離した。アンスロン法で比色定量した結果, 回収率は, グルコース 101.3%, マンノース 97.2%, ガラクトース 98.3% であり, 定量精度は高い。Fraction A の濃縮液 1 ml (グルコースとして約 30 mg に相当) を吸着させたイオン交換樹脂カラムから上記同様に溶出し, 糖を定量してマンノース 13.31 mg, ガラクトース 4.56 mg, グルコース 13.95 mg の値を得た (第 5 図)。これらの糖の重量比と K 型多糖類の硫酸灰分 10.46%, および K 型多糖類を 12% HCl で蒸溜して得られたフルフタルの定量から計算したグルクロン酸含量 18.82 %より, この多糖類の構成糖モル比は, D-グルコース: D-マンノース: D-ガラクトース: D-グルクロン酸=3: 3: 1: 2 であった。

要 約

Bacillus polymyxa No. 211 がグルコース含有培地から生産する多糖類は D-グルコース: D-マンノース: D-ガラクトース: D-グルクロン酸=3: 3: 1: 2 で構成されており, 比旋光度は $[\alpha]_D^{25} = +125$ であった。赤外吸収スペクトルから, この多糖類は, α および β 結合を有していることがうかがわれた。脱塩多糖類について粘度法に

より求めた分子量は約 1,300,000 であった。また, K 型, Na 型, Ca 型多糖類のうちでは Ca 型多糖類の粘度が最も高く, その 1% 水溶液の粘度は各々 1560 cp, 2120 cp および 6200 cp であった。

- (1) 二宮英治, 木崎忠重, 花田香一: 農化, **42**, 178 (1968).
- (2) D. Murphy, C. T. Bishop and G. A. Adams: *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **34**, 1271 (1956).
- (3) D. Murphy: *Canad. J. Chem.*, **30**, 872 (1952).
- (4) K. H. Chao: *Inds. agr. et aliment*, **68**, 13 (1951).
- (5) D. H. Ball and G. A. Adams: *Canad. J. Chem.*, **37**, 1012 (1959).
- (6) W. G. C. Forsyth and D. M. Webley: *Biochem. J.*, **44**, 455 (1949).
- (7) 三崎 旭, 八木佳明, 寺本四郎: 農化, **36**, 25 (1958).
- (8) 飯塚 廣, 瀬戸尚典: 醸協, **20**, 醸酵講座 VII, 14 (1962).
- (9) N. R. Smith, R. E. Gordon and F. E. Clark: *Aerobic Spore-forming Bacteria* (1952).
- (10) 三崎 旭, 石川 浩, 寺本四郎: 醸工, **36**, 320 (1958).
- (11) 千原呉郎: 化学の領域, 増刊 31 号 (南江堂), 63 (1961).
- (12) R. L. Whistler and M. L. Wolfrom: *Method in Carbohydrate Chemistry*, **1**, Academic Press, 1965, p. 548.
- (13) R. L. Whistler: *Industrial Gums*, Academic Press, 1959, p. 331.
- (14) H. Deuel and J. So!ms, H. Neukom: *Chemica*, **8**, 64 (1954).
- (15) P. Kooijman: *Rec. Trav. Chim.*, **80**, 849 (1961), [C. A., **59**, 15364 h (1963)].
- (16) H. E. Conrad, J. R. Bamburg, J. D. Epley and T. J. Kindt: *Biochem.*, **5**, 2808 (1966).
- (17) J. X. Khym: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2399 (1951).
- (18) J. X. Khym: *ibid.*, **74**, 2099 (1952).