Bacillus subtilis No. 5E 菌株により生産されるポリグルタミン酸の分離精製ならびにその化学的諸性質について*

沢 純彦***, 村川武雄**, 村尾沢夫, 大亦正次郎
(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 47 年 7 月 13 日 受 理

Isolation and Purification of Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* No. 5E, and Studies on its Chemical Properties (Polyglutamic Acid Fermentation Part IV)

By Sumihiko SAWA, *** Takeo MURAKAWA, ** Sawao MURAO and Seiji OMATA
Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture

1. Polyglutamic acid (PGA) produced by *Bacillus subtilis* No. 5E was isolated by the precipitation with alcohol (recovery; 80%), and purified as Na-PGA (Na salt of PGA) and H-PGA (acid form of PGA) to the purities above 99%.

2. The purified PGA was found to be composed of both D and L-glutamic acids, and the D/L ratio of glutamic acids was 60:40. The ratio was not varied even when the concentration of manganese ion and other components of the media were changed.

3. The PGA was presumed as γ -PGA based on the negative results for both ninhydrin and biuret reactions.

(Received July 13, 1972)

** Present address: Fujisawa Yakuhin Kogyo Co.

*** Present address: Knorr Foods Co., Ltd.

緒 言

著者らは、さきにポリグルタミン酸（以下 PGA と略す）生産菌の分離検索を行ない、所期の目的にかなう 1 菌株を分離、*Bacillus subtilis* No. 5E と同定した⁽¹⁾。ついで、本菌株による PGA の生産条件について検討を行ない、その最適条件を設定した^(2,3)。

PGA の分離精製法には、すでに硫酸銅を用いた銅塩法^(4,5)およびエタノールによるアルコール沈殿法⁽⁶⁾さらにアルコール沈殿法を改良した R.M. Ward の方法⁽⁶⁾およびなっとう粘質物の分離に応用した藤井の報告⁽⁷⁾がある。

また、分離精製した PGA の諸性質に関する報告は、これの構成成分であるグルタミン酸の光学異性についての研究と、その結合様式についての研究に大別される。

前者については、*Bacillus anthracis* の capsular PGA が D-グルタミン酸のみからなる D-PGA である⁽⁸⁾のに対して、*Bacillus subtilis* に属する菌株により培養液中に生産される PGA は、すべて D および L-グルタミン酸を構成成分とすることが明らかである⁽⁴⁻⁷⁾。後者すなわち PGA の結合様式については、多くの研究結果から明らかなように、微生物起源の PGA は、いずれも γ 結合からなる γ -PGA である。すなわち、M. Bovernick⁽⁴⁾ は PGA がニヒドリッン反応、ビュレット反応ともに陰性であることから、V. Bruckner, J. Kovács らは一連の研究⁽⁹⁻¹²⁾において、Curtius 分解や Hofmann 分解の反応生成物から γ -PGA であることを認め、その他いずれも *Bacillus* 属菌株により生産される PGA は、 γ -PGA であることを証明ないしは裏付ける結果のみが得られている。

本報は分離菌株 *Bacillus subtilis* No. 5E の生産する PGA についての分離精製法、および精製 PGA の化

* ポリグルタミン酸発酵に関する研究（第 4 報）。

** 現在、藤沢薬品工業株式会社。

*** 現在、クノール食品株式会社。

学的諸性質について, 詳細な検討を行なった結果を報ずるものである。

実験方法および結果

1. PGA の分離精製法

前報^(2,3)の方法により生産された PGA の分離に際しては, 既往の文献⁽⁴⁻⁷⁾を参考にして, 銅塩法およびアルコール沈殿法について検討を行なった。

銅塩法は Fig. 1 に示す方法により, PGA の分離を試みた。その結果, 銅塩としての回収率は 90% 以上で, きわめて良好であったにもかかわらず, 銅塩として得た沈殿は, その後に続く種々の操作を丹念にくり返しても, PGA から銅イオンを完全に除去することが非常に困難であり, 銅イオンを含まない純白標品を得るには, 回収率をかなり犠牲にしなければならないこと, および得られた精製標品の水溶液の粘度が, ある程度低下することが明らかとなり, したがって本菌株の場合, この方法は不適当であると考えた。

つぎに, アルコール沈殿法について検討を行なった。すなわち, Fig. 2 に示す方法に従って粗 PGA を取得した。ただし, GU-II 培地⁽³⁾を用いた場合は, 培養液中にすでに 3% 塩化ナトリウムを含むので, この場合は飽和塩化ナトリウム液 1/10 容の添加は必要でない。この粗 PGA には培養液中の菌体が含まれるが, この菌体量は乾物量として沈殿物の 2~3% であり, いかなる場合も 5% を越えることはなかった。

つぎに, 粗 PGA の精製法を Fig. 3 に示す。アルコー

Fig. 1. Separation of PGA with Cuprous Ion.

ル沈殿法では培養液からの場合も含めて, これをくり返すことにより, 回収率は順次低下する。この対策として, 塩類添加の効果につき検討を行なった。その結果, 塩化ナトリウムを添加することにより, Fig. 4 に示すように, エタノール 65~70% 濃度で大約 80% の回収率を得ることができた。

この場合, 回収率を上げるためにアルコール濃度を増すことは, きょう雑物のとり込みを増すために意味がなかった。

2. PGA の定性試験

1 で得た精製 PGA の 0.1% 水溶液について行なった

Cultured broth

A tenth volume of saturated NaCl solution added, and stirred
Poured into 2 volumes of 90% ethanol, and precipitate is twined around glass stick

Ppt.

Cut off to small pieces, and put into 99% ethanol to dehydrate
Dried *in vacuo*

Crude PGA

Fig. 2. Preparation of Crude PGA with Ethanol.

Crude PGA

Dissolved in 100~120 volumes (w/v) of 3% NaCl solution, and centrifuged at $23,000 \times g$ for 60 min

Sup.

Dialyzed to running tap water for overnight, and then redialyzed to pure water until Cl^- is not detected

A tenth volume of saturated NaCl solution added, and poured into 2 volumes of 90% ethanol

Ppt.

Above procedures are repeated twice

Pure PGA (Na-PGA)

Fig. 3. Preparation of Pure PGA.

Fig. 4. Recoveries of PGA from Ethanol Solution.

(1) NaCl added (final conc. : 3%),
(2) no NaCl added.

Table I. Qualitative Analysis of PGA
A. Color reactions

Reaction name	Reaction
Ninhydrine	—
Biuret	—
Anthrone	—
Molish	—
Fehling	—
Elson-Morgan	—
Naphthoresorcinol	—
Orcine-HCl	—
Diphenylamine	—
Cysteine-H ₂ SO ₄	—

B. Precipitation reactions

Precipitant	Precipitate
Ammonium sulfate	—
Magnesium sulfate	—
Trichloroacetic acid	—
Picric acid	—
Tannic acid	—
Methanol	± *
Ethanol	± *
Copper sulfate	+
Barium acetate	+
Acetone	+
Ether	+
Rivanol	+
Safranine 0	+
Heat treatment (120°C, 30 min)	—

Sample : 0.1% aqueous solution, * turbid.

Table II. Qualitative Analysis of Acid-hydrolysate of PGA

Reaction name	Reaction
Ninhydrine	+
Anthrone	—
Molish	—
Fehling	—
Elson-Morgan	—
Naphthoresorcinol	—

Table III. Quantitative Analysis of Purified PGA (Na-PGA)

	Contents	Recovery
Total nitrogen	9.21%	99.35%
Peptide nitrogen	9.16	98.81
Glutamic acid	91.14	93.60

各種試薬による定性試験の結果を, Table I に示す. また, 同水溶液を 6N-塩酸, 100~105°C, 6時間加水分解したものについての結果を, Table II に示す.

また, 加水分解物を pH 3 から 8 に種々調整後, ペーパークロマトグラフィーを行なった結果, 塩基性および酸性の各種展開溶媒において, いずれもグルタミン酸の単一スポットのみが得られた.

これらの結果から, 本精製標品はグルタミン酸のみからなるホモペプチドであると考え. また, これらの結果は培地の種類, その他培養条件のいかにかわからず, 常に一定であった.

3. PGA の純度試験

以上の結果から, 本精製標品はグルタミン酸のみからなる homopolypeptide であると考え, 窒素およびグルタミン酸含量を測定した. 全窒素はマイクロケルダール法により, ペプチド態窒素は M. Bovernick⁽⁴⁾, C. B. Thorne ら⁽⁶⁾ の方法に準じて銅塩として沈殿させたものについて, ミクロケルダール法により, またグルタミン酸は E. W. Yemm and E. C. Cocking の方法⁽¹³⁾ に準じて行なった. それらの結果を, Table III に示す. 用いた標品が, グルタミン酸 1 残基あたり 1 個のナトリウムイオンを含む Na-PGA* ($C_5H_7O_3NNa$)_n 残基分子量を 151.098 として純度を計算すると, 窒素含量では理論値の 99%, グルタミン酸含量では 94% の値を得た.

つぎに, 本標品の高分子としての均一性を確認するために, Spinco model E ultracentrifuge を用いて分析を行なった.

そのシュリーレン光学系により得られた沈降パターンを, Photo. 1 に示す. この写真から明らかなように, 分子量的にもかなり均一性の高い標品であることが証明できた.

4. H-PGA* の調製

以上得られた精製標品が一応 Na-PGA であると考えられることから, つぎに H-PGA ($C_5H_7O_3N$)_n の調製について検討を行なった. この検討は次報の粘性挙動の研究に必要であり, また精製標品の純度をさらに上げる目的もあって行なったものである. その方法を Fig. 5 に示す.

得られた H-PGA を, 水溶液の状態の水酸化ナトリウムで中和して得た Na-PGA と, イオン交換樹脂処理を行なわない Na-PGA との紫外吸収スペクトルを Fig. 6

* PGA を構成するグルタミン酸の α 位のカルボキシル基が, ナトリウムと結合したものを Na-PGA, 遊離のものを H-PGA とした.

Photo. 1. Sedimentation Pattern of Na-PGA.

Sedimentation is right to left in photographs taken at indicated times after reaching 52,000 rpm. PGA concentrations were 0.1 and 0.4% in 10% NaCl solution. The temperature was 25.0°C.

Na-PGA

Dissolved in 3% NaCl solution
Dialyzed to pure water until Cl^- is not detected

Inner solution

Treated with cation-exchange resin (Dowex 50 W $\times$ 4 H-form)
Filtrated

Clear solution

Repeated above procedures
Dialyzed to pure water
Lyophilized
Dehydrated with acetone

H-PGA

Fig. 5. Preparation of H-PGA.

Fig. 6. Absorption Spectra of PGA.
---- Na-PGA, — Na-PGA treated with ion-exchange resins.

に示す。樹脂処理を行なうことにより、透析をくり返しても除き得なかった 240 mμ および 270 mμ 付近に吸収を持つ不純物は、完全に除去された。ただし、この不純物がなんであるかは、まだ確認していない。また、このイオン交換樹脂処理は、Dowex 50 W のほか Amberlite IRA-400 もあわせ用いたが、この点に関して紫外吸収

Table IV. Elementary Analysis of Na-PGA

Element	Found	Calculated for $(\text{C}_5\text{H}_7\text{NNaO}_3)_n$	Percentage of experimental data in theoretical values
C	39.34%	39.746%	99.00%
H	3.97	4.003	99.35
N	9.19	9.270	99.14

Table V. Elementary Analysis of H-PGA

Element	Found	Calculated for $(\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3)_n$	Percentage of experimental data in theoretical values
C	46.14%	46.513%	99.20%
H	5.43	5.465	99.40
N	10.76	10.848	99.27

スペクトルおよび、つぎに挙げる元素分析値にはなんら差は認められなかった。

5. PGA の元素分析結果

前項の樹脂処理を行なった精製標品についての元素分析の結果を、Table IV および Table V に示す。

以上の結果を総合して、得られた精製標品が PGA であることを確認した。

6. PGA 構成グルタミン酸の光学異性

既報の PGA 生産菌では、生産用培地組成によって生産される PGA 中の D-グルタミン酸および L-グルタミン酸の含有比率に変化が生ずることが報告されている。たとえば、*Bacillus subtilis* ATCC 9945 では、 Mn^{2+} の増加にともなって PGA 中の D-グルタミン酸含量が 46% から 86% に増加し⁽¹⁴⁾、また *Bacillus natto* では培地中のアミノ酸の種類で D, L 比に変動が認められる (D-グルタミン酸量 40% → 79%) と報告されている⁽⁷⁾。

そこで、組成の異なる各種の培地で生産された PGA

Table VI. D/L Ratio of Glutamate in PGA

Medium	D-Glu in PGA
GU medium	59%
"	61
" (Mn ²⁺ : 0.1 mg/100 ml)	60
" (" : 5 ")	61
" (" : 40 ")	60
" (" : 80 ")	58
" (" : 100 ")	60
1% Proline medium	61
1% Histidine medium	59
1% Arginine medium	45
3% Glucose+1% glutamate medium	41
Maltose-urea medium	58
Sucrose-urea medium	57
Glycerol-urea medium	60
Fructose-urea medium	63
Xylose-urea medium	61

を Fig. 3 の方法で精製し、得られた精製標品を 6N-塩酸、100~105°C、6 時間加水分解した後、全グルタミン酸を E. W. Yemm and E. C. Cocking の方法⁽¹³⁾により、また L-グルタミン酸を *Escherichia coli* のアセトン乾燥菌体を L-glutamic decarboxylase 標品として用いたワールブルグ検圧法により測定し、両者の差を D-グルタミン酸量とした。

結果を Table VI に示す。この表から明らかなように、本菌株の場合は C. G. Leonard ら⁽¹⁴⁾の場合と異なり、Mn²⁺ 濃度による D/L 比の変動は全く認められず、また培地の糖、アミノ酸組成を変えても、わずかな変動にとどまり、培養条件による D/L 比の大きな変動は認められなかった。

7. D-PGA, L-PGA の分離

本菌株により生産される PGA が、D および L-グルタミン酸を含み、その D/L 比は培養条件を変えても、ほぼ一定であることが明らかとなったが、これら D, L-グルタミン酸が同一 PGA 分子内に混在するのか、D-グルタミン酸のみからなる D-PGA と、L-グルタミン酸のみからなる L-PGA との混合物であるかが問題点として、つぎに考えられる。

一方、先に記した H-PGA の調製に際して、Dowex 50 W 処理で収量がかかなり低下すること、同処理液の pH が 1.9 から 2.1 の間にあること、同処理液がわずかに白濁することなどの事実と、C. B. Thorne ら⁽¹⁵⁾による D-PGA, L-PGA の分離の条件とを考えあわせて種々検討を行なった結果、Fig. 7 の方法を決定した。各分画の

Pure PGA (fraction 2)*

Dissolved in water
Adjusted to pH 2.0 with HCl cooling in ice bath
Stored at 0~3°C for 24~36 hours centrifuged

Sup.

Ppt.

Lyophilized
Dehydrated with acetoneDehydrated with
acetone

D-PGA (fraction 4)**

D, L-PGA (fraction 3)

Fig. 7. Separation of D-PGA from D, L-PGA.

* Fraction 2 was repurified from fraction 1 (cf. Table VIII) by the method of ion-exchange resin treatment shown in Fig. 5.

** Fraction 4 was still purified by repeating procedures described above, fraction 5 was obtained slightly.

グルタミン酸の D/L 比は、各分画の酸加水分解物について塩酸除去後、pH を 3.50 に、濃度をグルタミン酸として 0.05% に調整した試料の比旋光度 $[\alpha]_{250\text{m}\mu}^{25^\circ\text{C}}$ を柳本製 recording spectropolarimeter model O. R. D.-185 を用いて、波長を 250 m μ に固定して測定し、これを D-グルタミン酸および L-グルタミン酸の標準試料のそれと比較することにより求めた。

$$[\alpha] = \frac{100 \times A}{c \times l}$$

ただし、 $c=0.05\%$ (pH 3.50), l (dm)=1/2 (5.0 cm), 温度は 25.0°C, 波長は 250 m μ . 感度は $\pm 0.2^\circ$ であった。グルタミン酸の最大吸収は 216 m μ にあるが、測定の精度、再現性の点から 250 m μ の波長を使用した。標準試料による測定の結果を、Table VII に示す。酸加水

Table VII. Optical Activities of Glutamic Acids

Conc. (%)	$[\alpha]_D^*$	$[\alpha]_L^*$
0.01	-240.0	+242.0
0.02	-241.0	+242.0
0.03	-242.0	+242.7
0.04	-241.5	+240.5
0.05	-241.2	+239.6
Average	-241	+241

D, L ratio prepared		$[\alpha]^*$ measured	D, L ratio calculated
D-Glu	L-Glu		
100	0	-241	
0	100	+241	
60	40	-48	59.96
75	25	-120	74.90
50	50	± 0	50.00

* $[\alpha] = \frac{100 \times A}{c \times l}$ $c: 0.05\%$, $l: 1/2 \text{ dm (5 cm)}$, $\lambda: 250 \text{ m}\mu$, at 25°C , sensitivity: $\pm 0.2^\circ$.

Table VIII. D, L Ratio of Glutamic Acids in PGA Prepared by Some Means of Purification

Fraction number*	$[\alpha]_{260m\mu}^{25^\circ C}$ measured	D, L ratio calculated
1	-48	60 : 40
2	-120	75 : 25
3	-24	55 : 45
4	-169	86 : 14
5	-202	92 : 8

* 1: Na-PGA purified by the method shown in Fig. 3, 2: Na-PGA treated with ion-exchange resin shown in Fig. 5, 3: fraction 3 shown in Fig. 7, 4: fraction 4 shown in Fig. 7, 5: fraction 4 treated over again by the method shown in Fig. 7.

分解物の中和に際し生ずる微量の塩化ナトリウムの存在は、この測定条件では全く影響のないことも、あわせて確認した。

Fig. 7 により行なった各分画の D/L 比を、Table VIII に示す。

Fig. 7 の方法を 3 回くり返すことにより、D-グルタミン酸含量が 92% のほぼ D-PGA と考えられる標品を得たが、1 回の精製での回収率が 30~40% であり、この点さらに検討を要すると考える。

8. PGA 構成グルタミン酸の結合様式

既報の PGA は、いずれも γ -ペプチドである^(4,9-12)。本菌株の生産する PGA も、Table I に明らかなように、ニンヒドリン反応およびビュレット反応がいずれも陰性であることから、 γ -ペプチド結合からなる D, L- γ -PGA であると考えられる。

考 察

培養濾液から PGA を分離する方法として、既往の文献では飽和硫酸銅を用いた銅塩法が適用され、純白標品が得られている。また、培養液の除菌も 10,000 $\times g$ 以下の遠心力で、簡単にその効果をあげている。一方、アルコール沈殿法では培養濾液の 8 倍量という、きわめて大量のエタノールを添加して、PGA の沈殿を得ている。

一方、本菌株の培養液は異常に粘稠で、飽和塩化ナトリウム水溶液を添加して粘度を低下させたもの* についても、23,000 $\times g$, 60 分の遠心分離により、はじめて除菌が可能であり、アルコール沈殿を行なうに当たっても、

* 塩化ナトリウム添加による PGA 水溶液の粘度低下の効果については、第 5 報に詳しく記述する。

90% エタノール 2 倍量添加で、90% 以上の PGA を回収することができる。そのほか、銅塩として沈殿させた PGA から、銅イオンの除去がきわめて困難であることなどから考えて、本菌株の生産する PGA は既報の他の PGA と比較して、分子量的にかなりの差があると推定した。事実、第 5 報に記述するように、他の PGA の分子量が 2000~7000、あるいは 125,000~238,000 であると報告されているのに対して、本菌株の PGA の分子量は、約 1,150,000 という値を得た。

つぎに、PGA 構成グルタミン酸の光学異性について、C. B. Thorne 一派による *Bacillus subtilis* ATCC 9945 菌株の場合、明らかに Mn^{2+} による D/L 比の変動が著しいのに対して、本菌株の場合その効果が全く見られないことなど、本菌株による PGA の生成機作は既報の菌株と比較して、かなり異なるものであり、このことは前報^(2,9) で明らかにした PGA 生産条件とも結び合わせて、興味深い問題であると考えられる。

要 約

(1) *Bacillus subtilis* No. 5 E が生産する粘質物の分離精製を行ない、純白の精製標品を得た。収率は 80% であった。

(2) この標品には、D-グルタミン酸と L-グルタミン酸が、60 : 40 の割合で含まれ、この割合は培養条件で、あまり変化しなかった。

(3) 標品の純度は Na-型、H-型のいずれの場合も、99% 以上であった。

(4) この PGA はニンヒドリン反応、ビュレット反応のいずれに対しても陰性であったことから、 γ -ペプチド結合からなる γ -PGA であると考えられる。

(1) 村尾沢夫, 村川武雄, 沢 純彦, 奥村信二, 大亦正次郎: 農化, 43, 595 (1969).

(2) 村尾沢夫, 沢 純彦, 村川武雄, 大亦正次郎: 農化, 45, 118 (1971).

(3) 沢 純彦, 村尾沢夫, 村川武雄, 大亦正次郎: 農化, 45, 124 (1971).

(4) M. Bovarnick: *J. Biol. Chem.*, 145, 415 (1942).

(5) C. B. Thorne, C. G. Gomez, H. E. Noyes and R. D. Housewright: *J. Bacteriol.*, 68, 307 (1954).

(6) R. M. Ward, R. F. Anderson and F. K. Dean: *Biotechnology and Bioengineering*, 5, 41 (1963).

(7) 藤井久雄: 農化, 37, 407 (1963).

- (8) G. Ivanovics and V. Bruckner : *Z. Immunitätsforsch.*, **90**, 304 (1937).
- (9) J. Kovács and V. Bruckner : *J. Chem. Soc.*, **1952**, 4255.
- (10) J. Kovács, V. Bruckner and K. Kovács : *ibid.*, **1953**, 145.
- (11) V. Bruckner, J. Kovács and H. Nagy : *ibid.*, **1953**, 148.
- (12) V. Bruckner, J. Kovács and K. Kovács : *ibid.*, **1953**, 1512.
- (13) E. W. Yemm and E. C. Cocking : *Analyst*, **80**, 209 (1955); *idem* : *Biochem. J.* (London), **58**, xii (1954); 日本化学会編：実験化学講座, 第 23 卷, 1957, p. 126.
- (14) C. G. Leonard, R. D. Housewright and C. B. Thorne : *J. Bacteriol.*, **76**, 499 (1958).
- (15) C. B. Thorne, C. G. Leonard and R. D. Housewright : *J. Biol. Chem.*, **233**, 1109 (1958).