Coryneform bacteria strain C-8 の生成する 粘質多糖の 2,3 のレオロジー的性質

田幸正邦*, 永浜伴紀**, 野村男次

(九州大学農学部食糧化学工学科, **鹿児島大学農学部農芸化学科)

昭和 52 年 1 月 21 日 受 理

Some Rheological Properties of the Viscous Polysaccharide Produced by Coryneform Bacteria Strain C-8

By Masakuni TAKO*, Tomonori NAGAHAMA** and Danji NOMURA

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka; ** Department of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima, Japan

A Polysaccharide, which was composed in a ratio of D-mannose : D-galactose : D-glucose : D-glucuronic acid : pyruvic acid = 1 : 1 : 1 : 3 : 1, was produced by coryneform bacteria strain C-8 in a 15-liter jar fermenter. Some rheological properties of the polysaccharide C-8 were investigated.

In both cases of fermentation on D-glucose and soluble starch as carbon sources, about 80% of the above carbohydrates were converted into the polysaccharide C-8 A and B, respectively.

Molecular weight of the polysaccharide C-8 A and B was calculated to be about 250,000 by viscometric method.

At the concentration of 1.0%, the viscosities of both A and B were higher than those of guar gum and locust bean gum. The viscosity of 0.5% solution of the A and B seemed to be essentially independent on pH between 6 and 9, and was insensitive to heating for 30 min at 80°C. However, the solutions decreased in viscosity by addition of salts and acids. Thus, it was obvious that both polysaccharide preparations A and B showed the same rheological properties regardless of their carbon sources, and these properties were characteristic of acidic polysaccharides. (Received January 21, 1977)

* Present address : the same as**

緒 言

Leuconostoc mesenteroides の生成する多糖の医療面での用途が開発されて以来⁽¹⁾, 微生物多糖の基礎あるいは応用的研究が多くなされている。中でも, *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459⁽²⁾ の生成する粘質多糖については, 広範囲にわたる用途開発がすすめられ, 実用にも供せられつつある⁽³⁾。

また, 原田らは *Alkaligenes faecalis* により生成されるサクシノグルカン⁽⁴⁾やカードラン⁽⁵⁾について報告し,

* 現在, 鹿児島大学農学部農芸化学科。

二宮らも *Bacillus polymyxa*⁽⁶⁾ の多糖について報告している。

永浜⁽⁷⁾は, さきに, 九州各地の澱粉工場から粘質多糖生成菌のスクリーニングを行い, その中から澱粉資化性が高く, 高粘性多糖を生成する一菌株 C-8 を分離し, coryneform bacteria であることを報告した。そして, この菌の生成する多糖の化学組成はマンノース : ガラクトース : グルコース : グルクロン酸 : ビルビン酸 = 1 : 1 : 1 : 3 : 1 であることを明らかにした。

本報では, ジャーファーメンターにより C-8 菌株を培養して, この多糖を調製し, その一般的なレオロジー

的性質と, 2, 3 の利用上の特性についてしらべた。

実験材料および方法

C-8 多糖 A および B の調製 Coryneform bacteria strain C-8 を斜面培養(馬鈴薯汁寒天)から 300ml 容三角フラスコ中の液体培地(グルコース 3.0%, 酵母エキス 0.25%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, 100ml) に接種し, 回転振盪機上 (245 rpm), 35°C , 24 時間培養した。これをシードとして上記の三角フラスコ培養の数を増し, ジャーファーマンター用のシードを調製した。本培養には, 15l 容ジャーファーマンター(関東理化学器製)を用いた。培地組成は, 局方グルコースまたは可溶性澱粉 4.0% のほかは種培地と同じで, 培地 10l に対して, シード 500ml を接種した。通気量は 1 vvm, 攪拌速度は 24 時間までは 100 rpm で, その後粘性の増大に伴って 340 rpm に増速した。培地温度は 32°C であった。培養にあたって, はじめに炭酸カルシウム 25g を添加, 24 時間後さらに 50g を追加し, さらに消泡剤として, 市販大豆油 15ml を滴下した。

なお, 炭素源としてグルコースを用いたときの生成多糖を C-8 多糖 A, 可溶性澱粉を用いたときのものを C-8 多糖 B とした。

培養経過は次のようにしてしらべた。

(i) 粗多糖の収率: 培養液 100g を等量の水で稀釈後, 10,000 rpm, 20 分間遠心分離し, 上澄液に 2 倍量のアセトンを加えて生成する沈澱を濾取, 減圧乾燥して秤量した。収率は炭素源に対する%をもって表わした。

(ii) 還元糖: 培養液について, Somogyi 変法⁽⁶⁾により, グルコース量として算出した。

多糖の分離精製と Na, K, Ca 型の調製

(i) アルコール沈澱法: 培養液に 2 倍量の水を加えて稀釈し, 10,000 rpm で遠心分離の後, 上澄液に等量のアセトンを加えて生ずる沈澱を濾取, 減圧乾燥して粗多糖とした。

精製に際しては, 粗多糖を 0.2% 水溶液として 80°C , 20 分間加熱後, 遠心分離して固形分を除いた。上澄液は Celite 545 層を通して濾過し, さらに Amberlite IR 120 (H^+) で陽イオンを除き, この多糖を H 型とした。

これらを 3 部に分けて, それぞれを 0.1N NaOH, 0.1N KOH, 0.1N $\text{Ca}(\text{OH})_2$ で中和の後, それぞれ約 1.0% の NaCl, KCl, CaCl_2 の存在下で 2 倍量のエタノールにより各塩型の多糖を沈澱させた。これらをさらに適当

量の水に溶解し, エタノールで再沈澱後, 減圧乾燥して Na 型, K 型, Ca 型とした。

粘性, 動的粘弾性の測定には, 特にことわらないかぎり, Na 型多糖を用いた。

(ii) **Cetylpyridinium chloride (CPC) 法**: 前述の Na 型多糖の一部を 0.2% 水溶液とし, これに最終濃度 2.0% となるように CPC を加えた。沈澱した多糖-CPC 複合体を濾取し, 2.0M NaCl 溶液に溶解, 2 倍量のエタノール添加により多糖を回収した。この多糖をさらに水に溶解して透析, 遠心分離の後, 得られた上澄液を Amberlite IR 120 (H^+) で陽イオンを除き, 凍結乾燥して精製多糖とした。この試料は分子量測定に供試した。

対照多糖類の調製 アルギン酸ナトリウム, キサンタンガム, カラゲナン, グアーガムおよびローカストビーンガム(いずれも太陽化学工業)を対照試料とした。

供試にさきだち, それぞれを水に溶解して精製した。すなわち, ローカストビーンガムは 80°C , 15 分間加熱, 他の多糖は室温で水溶液とし, 特にグアーガム, ローカストビーンガムは Celite 545 で濾過後, 2 倍量のエタノールを加えて多糖を回収, 減圧乾燥した。

エマルジョンの調製 300ml 容三角フラスコに水 60g, サラダ油(日清製油) 40g をとり, これに多糖 0.5g を加えて回転振盪機上 (120 rpm) で 30 分間振盪した。

フィルムの調製⁽⁹⁾ 多糖の 1.0% 水溶液を水平においたガラス板上の型枠 ($20 \times 20 \times 0.5$ cm) に流し込み, 24 時間室温で乾燥, さらにデシケーター中に 24 時間おいた後供試した。

粘性および動的粘弾性の測定 測定には, 特にことわらないかぎり同軸二重円筒回転振動型の 3-D-レオメーター(岩本製作所)を用い, みかけの粘性係数 (η_a) はマルグレスの式⁽¹⁰⁾, 動的粘弾性率 (η', G') はマルコビッチの式⁽¹¹⁾により算出した。なお, η_a は 15 rpm, η' および G' は 0.625 Hz で, いずれも 25°C で測定した。

一部の実験では, B 型粘度計 (12 rpm, 25°C), キャノン・フェンスケ粘度計(逆流型, 0.65 M NaCl, $37.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$: 144.0 秒)を用いた。

引張強度および伸び率の測定 万能型引張試験機 (UTM-III 型, 東洋測器)を用いた。

その他 水分は 105°C 乾燥による重量減をもって測定し, また窒素はセミマイクロケルダール法によった。

実 験 結 果

C-8 多糖の生成経過

グルコースおよび可溶性澱粉をそれぞれ炭素源に用いた場合の培養経過を Fig. 1 (A) および (B) に示した。いずれの場合も 72 時間で対糖収率約 80% に達した。粘性はグルコース培地においては 96 時間で 153 poise に達し、なお上昇の傾向が見られたが、可溶性澱粉培地では 72 時間で最高値 200 poise に達し、96 時間では 187 poise に減少した。粗多糖としての収量はそれぞれ 250 g および 243 g であった。

精製した Na 型多糖の一般分析値を Table I に示した。

分 子 量

極限粘度から (1) 式にしたがい分子量を求めた。

$$[\eta] = Km \cdot M_w^\alpha \quad (1)$$

$[\eta]$: 極限粘度

Km, α : 定数

M_w : 分子量

Table I. Composition of the Polysaccharide C-8 A and B

	C-8 A	C-8 B
Moisture	6.20%	6.50%
Nitrogen	0.25	0.18
Ash	12.70	12.20

Fig. 1. Time Course of the Polysaccharide Formation by Coryneform Bacteria Strain C-8.

(A) and (B): Glucose and soluble starch were used as carbon source, respectively.

The composition of fermentation media and the methods of analysis were described in text.

○, viscosity; ●, yield of polysaccharide (polysaccharide/carbon source); ⊙, remaining carbon source; Δ, pH.

Fig. 2. Relationship between the Concentration and Reduced Viscosity (η_{sp}/C) of the Polysaccharide C-8 A and B.

Reduced viscosity of a solution in 0.65 M NaCl was measured by Cannon-Fenske viscometer at $37.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

○, polysaccharide C-8 A; ⊙, polysaccharide C-8 B.

本多糖の粘性は後で述べるように NaCl の添加により減少する。しかし 0.3 M 以上の NaCl 濃度ではほぼ一定の粘性を示したので、これらの濃度ではランダムコイル状となっているものと考えられた⁽¹²⁾。一方、本多糖と同様に酸性多糖であるカルボキシメチルアミロース (DS: 0.81) について、Pate^{et al.}^(13,14)は NaCl 添加量の異なる場合の Km, α の変化を詳しくしらべ、0.65 M

NaCl 溶液では $\alpha: 0.5$ となってランダムコイル状を示すことを報告している。そこで、本実験でも 0.65 M NaCl 溶液に C-8 多糖 A および B を溶解し、キャノン・フェンスケ粘度計 ($37.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$) で相対粘度を測定して多糖濃度-還元粘度の関係を求め、Fig. 2 に示した。この図から求められた多糖 A および B の極限粘度 $[\eta]$ は、それぞれ $0.670 \text{ cm}^3/\text{g}$ および $0.677 \text{ cm}^3/\text{g}$ であった。そこで、上記のカルボキシメチルアミロースについて求められている $Km: 1.35 \times 10^{-3}$, $\alpha: 0.5$ を適用して (1) 式から分子量を求めたところ、C-8 多糖 A および B の分子量として

247,000, 251,000 の値が得られた。

多糖の粘性および動的粘弾性

(1) 濃度の影響 : Na 型多糖について粘性濃度との関係をしらべ Fig. 3 に示した。植物性ガムの中で最も粘性が高いとされているグアーガムやローカストビ

Fig. 3. Effect of Polysaccharide Concentration on the Apparent Viscosity of the Polysaccharide C-8 A and B, Guar Gum and Locust Bean Gum.

○, polysaccharide C-8 A ; ●, polysaccharide C-8 B ; △, guar gum ; ▲, locust bean gum.

Fig. 4. Effect of Polysaccharide Concentration on the Dynamic Viscosity Modulus (η') and Dynamic Elasticity Modulus (G') of the Polysaccharide C-8 A and B, Guar Gum and Locust Bean Gum.

○, polysaccharide C-8 A ; ●, polysaccharide C-8 B ; △, guar gum ; ▲, locust bean gum.

Fig. 5. Effect of Polysaccharide Concentration on the Apparent Viscosity of the Na-, K- and Ca-formed Polysaccharide C-8 B.

○, Na-formed ; ●, K-formed ; ●, Ca-formed.

ーンガムと比較して、1.0% までは C-8 多糖 A, B が高い粘性を示したが、1.5% においては前二者の粘性が急増して、より高い値を示した。

一方、これらの多糖の動的粘弾性をしらべた結果を Fig. 4 (A), (B) に示した。(A) 図は動的粘性率 η' の場合である。1.0% までは C-8 多糖 A, B は対照多糖類とほぼ同じ値を示したが、1.5% においては対照多糖類の η' が急増して、より高い値を示した。(B) 図は動的弾性率 G' を示すもので、C-8 多糖 A, B はグアーガムとローカストビーンガムの間にプロットされた。

(2) Na, K, Ca 型多糖の粘性 : C-8 多糖 B の各塩型の粘性濃度との関係を Fig. 5 に示した。Na 型の粘性が最も高く、次いで K 型, Ca 型の順であった。

Fig. 6. Effect of Heating Temperature on the Apparent Viscosity of the Polysaccharide C-8 A and B.

The 0.5% polysaccharide solutions were treated at the respective temperatures.

○, polysaccharide C-8 A ; ●, polysaccharide C-8 B.

(3) 加熱および温度の影響 : C-8 多糖 A および B の Na 型 0.5% 水溶液のそれぞれを, 各温度 (40, 60, 80, 90°C) で 30 分間加熱処理後, 室温にもどし, 粘性を測定した. Fig. 6 に示すように 80°C 処理までは粘性に大きな影響が見られなかったが, 90°C 処理では粘性が減少した.

一方, 粘性測定における温度の影響を Fig. 7 に示した. C-8 多糖 A, B のいずれも温度上昇にしたがい粘性の減少が見られた.

Fig. 7. Effect of Temperature on the Apparent Viscosity of the Polysaccharide C-8 A and B.

○, polysaccharide C-8 A ; ⊙, polysaccharide C-8 B.

Fig. 8. Effect of pH on the Apparent Viscosity of the Polysaccharide C-8 A and B.

The pH value of the 0.5% polysaccharide solutions was adjusted with 0.1N HCl or NaOH solutions.

○, polysaccharide C-8 A ; ⊙, polysaccharide C-8 B.

(4) pH の影響 : C-8 多糖 A, B の粘性に対する pH の影響をしらべて Fig. 8 に示した. 粘性は pH 6~9 の範囲で安定で, それより酸性およびアルカリ性側では減少した.

(5) 無機塩および有機酸の影響 : C-8 多糖 (B-Na 型) 0.5% 水溶液 (9.5 poise) に NaCl あるいは KCl を添加して粘性の変化をしらべた. いずれの塩の場合も 0.1% 添加で粘性は著しく減少 (NaCl 3.9 poise, KCl 4.2 poise) し, 1.5% 添加ではほぼ一定の値 (NaCl 1.6, KCl 2.0 poise) を示した. CaCl₂ 添加の場合はより著しい粘性の減少を示し, 0.5% 添加で 1.0 poise に達した.

また, クエン酸あるいは酒石酸 1.0% の存在下でも同様に粘性は 1.0 poise に減少した.

乳化安定性

O/W タイプの食品の乳化安定剤として, 多糖類の役割が大きい^(15a). 本実験では, キサンタンガム, グアーガム等を対照として C-8 多糖 (A-Na 型) の乳化安定性をしらべた.

各多糖について前記の操作でエマルジョンを形成させた後, それぞれ 10ml ずつ試験管に移しエマルジョンの均一性の時間的推移を観察し, その結果を Table II に示した. C-8 多糖は 48 時間まで均一なエマルジョンを持続し, 72 時間にいたって部分的に水と油に分離してグアーガム, カラゲナン等よりはすぐれた性質を示した. キサンタンガムは 72 時間後も均一なエマルジョンを持続することが観察された.

多糖フィルムの引張強度と伸び率

前記の操作で調製したフィルム (厚さ 0.023 mm) を 2×10cm に切り取り, 万能型引張試験機で C-8 多糖フ

Table II. Results of Emulsion Formation Test of the Polysaccharide C-8 and Some Other Polysaccharides

Polysaccharide	Emulsion (hr)			
	1	24	48	72
Polysaccharide C-8	⦿	⦿	⦿	+
Guar gum	+	—	—	—
Sodium alginate	—	—	—	—
Carrageenan	+	—	—	—
Xanthan gum	⦿	⦿	⦿	⦿

Composition of emulsion : 0.5g polysaccharide, 60g water, 40g salad oil.

⦿ : complete emulsion, + : partially separated emulsion, — : completely separated.

Table III. Test Values of Films

Polysaccharide	Tensile strength (kg/mm ²)	Elongation (%)
Polysaccharide C-8	2.89	14.7
Guar gum	2.59	3.0
Sodium alginate	3.66	9.3
Xanthan gum	1.77	2.4
Waxy starch	1.95	7.0

The preparation method of films was described in text.

Value in the table was represented as the average of 5 test strips.

フィルム (A-Na 型) および対照多糖類のフィルムの引張強度および伸び率を測定し, 5 枚の測定値を平均して Table III に示した. C-8 多糖フィルムの引張強度は 2.89 kg/mm² で, アルギン酸ナトリウムの 3.66 kg/mm² ほど大きくはなかった. しかしながら, C-8 多糖フィルムの伸び率は 14.7% で最も高い値を示した.

考 察

グルコースあるいは可溶性澱粉を炭素源として 15l 容ジャーフェーマンターにより調製した多糖はそれぞれ 250g および 243g の収量で, 対糖収率約 80% であった. 既報⁽¹⁶⁾の粘質多糖生成菌はグルコース資化性菌が多いが, 本菌は澱粉を炭素源とした場合もグルコースの場合と同じように高収量で粘質多糖を生成する特徴をもっている.

アルコール沈澱法により精製したこれらの多糖は, 白色, 繊維状を呈し, 他の多糖類に比較して短時間で水に溶解するなど親水性が強い.

本多糖の粘性は, 濃度 1.0% まではグアーガム, ローカストビーンガムより高く, pH 6~9 で安定で, それより酸性側およびアルカリ性側で減少した. 特に酸性側での粘性の減少が著しく, これは, 本多糖の COO-Na が COO-H^(15b) となり分子間相互作用が減少したことによるものと考えられる. このような性質は, CMC⁽¹⁷⁾, アルギン酸ナトリウム等⁽¹⁸⁾にも見られ, 電解質多糖の特徴である. また, 本多糖は無機塩の添加によっても粘性が減少し, CMC⁽¹⁹⁾, アルギン酸ナトリウム等と同様の性質を示した. これは, 過剰のイオンの存在により, 電氣的遮へい効果⁽²⁰⁾が現われ, 多糖の固定イオン間の相互作用が弱まったことによるものと考えられる.

一方, 本多糖の粘性は加熱処理に対して 80°C まで安定であった.

このように, グルコースあるいは可溶性澱粉を炭素源として生成した両多糖の粘性挙動は, いずれの場合にもよく一致し, 電解質多糖の特性を示した.

本多糖を乳化剤として用いた場合, 48 時間まで均一なエマルジョンを持続し, エマルジョン形成能にすぐれていた. また, 本多糖フィルムの引張強度はそれほど強くないが, 伸び率においてすぐれた性質を示した.

このような結果から, 本多糖は, 例えばアイスクリーム安定剤や可食性フィルム等, 食品工業への利用が可能と考えられる.

本多糖のレオロジー的性質についてはさらに後報で詳しく検討を行う.

要 約

さきに分離した coryneform bacteria strain C-8 を 15l 容ジャーフェーマンターを用いて, グルコースあるいは可溶性澱粉を炭素源として培養し, 高収率で粘質多糖を調製した.

粘度法により求めた分子量は, 多糖 A (グルコース培地) および多糖 B (可溶性澱粉培地) のいずれも約 250,000 と推定された.

本多糖はグアーガム, ローカストビーンガムに匹敵する高い粘性, 動的粘弾性を示し, 粘性は, pH 6~9 で安定で, 加熱に対して 80°C まで安定であった. しかし, その粘性は, 無機塩, 有機酸等の添加により著しく減少して電解質多糖の特徴を示した.

また, エマルジョン形成能, フィルム特性等もすぐれていた.

終りに, 終始懇切なるご指導ならびに校閲を賜った鹿児島大学蟹江松雄学長に厚く感謝の意を表する.

また, アルギン酸ナトリウム, カラゲナン, キサンタンガム, グアーガム, ローカストビーンガム等を提供していただいた太陽化学工業株式会社に感謝の意を表する.

- (1) A. J. T. Grönwall and B. G. A. Ingelman: *Acta Physiol. Scand.*, 7, 97 (1944).
- (2) S. P. Rogovin, R. F. Anderson and M. C. Cadmus: *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, 3, 51 (1961).
- (3) *Chem. Eng. News*, 41 (10), 44 (1963).
- (4) T. Harada and T. Yoshimura: *Biochem. Biophys. Acta*, 83, 374 (1964).
- (5) T. Harada, M. Masada, K. Fujimori and I.

- Maeda : *Agric. Biol. Chem.* **30**, 196 (1966).
- (6) 二宮英治, 木崎忠重, 花田香一 : 農化, **42**, 178 (1968).
- (7) T. Nagahama, S. Fujimoto and M. Kanie : *Agric. Biol. Chem.* **41**, 9 (1977).
- (8) M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- (9) P. R. Watson, A. Jeanes and C. E. Rist : *J. Appl. Polymer Sci.*, **11** (21), S 12 (1962).
- (10) 中川鶴太郎, 神戸博太郎 : レオロジー, みすず書房, 1970, p. 344.
- (11) H. Markovitz : *J. Appl. Phys.*, **23**, 1070 (1952).
- (12) 中川鶴太郎 : 総合多糖類科学 (上), 講談社, 1973, p. 344.
- (13) J. R. Patel, C. K. Patel and R. D. Patel : *Die Stärke*, **19**, 330 (1967).
- (14) *idem* : *Biopolymer*, **10**, 839 (1971).
- (15 a) 中村亦夫 : 水溶性高分子, 化学工業社, 1973, p. 203.
- (15 b) 同上 : 同上, p. 53.
- (16) 原田篤也 : 醸工, **42**, 644 (1964).
- (17) R. L. Whistler : *Industrial Gum*, Academic Press, 1973, p. 712.
- (18) V. E. Heen : *Kolloid-Z.*, **83**, 204 (1938).
- (19) N. Nishida : *J. Phys. Soc., Japan*, **17**, 531 (1962).
- (20) 中島章夫, 細野正夫 : 高分子の分子物性 (下), 化学同人, 1972, p. 541.
-