河川水から分離された細菌が産生する菌体外多糖類に関する研究^{*1}

河 口 克 己, 天 野 妙 子, 里 見 弘 治

横 山 理 雄, 門 田 元

(昭和 63 年 2 月 8 日受付)

Studies on a Extracellular Polysaccharide Produced by Bacteria Isolated from River Water

Katsumi Kawaguchi,^{*2} Taeko Amano,^{*2} Koji Satomi,^{*2}
Michio Yokoyama,^{*2} and Hajime Kadota^{*3}

In order to find new thickening agents or emulsifiers which possess useful characteristics for food industries, we attempted screening of microorganisms from soli and water. As a result, we found one bacterial strain which produced a large amount of extracellular polysaccharide from Sumida River in Tokyo. The strain was identified as *Klebsiella pneumoniae* in conformity to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984).

The polysaccharide (BS-1) produced by this strain showed higher viscosity than known thickening agents such as xanthan gum, carrageenan and tragacanth gum. The viscosity of 1% (w/v) BS-1 at 20°C reached 7000 cps under the shear rate of 1/S. Besides, BS-1 possessed a good property as an emulsifier. When we made emulsions of O/W=3/7 using several emulsifiers involving BS-1 and observed after 3 days of storage at room temperature, it was found that BS-1 stabilized the emulsion at the concentration of as low as 0.1% (w/v), and that the emulsion kept its creamy smoothness.

生物由来の多糖類は、食品、医薬品をはじめ、各種工業用素材分野で広く利用されている。とくに微生物の産生する多糖類は、培養による安定供給が可能である上に、特異な性質を示すものがあるため、産業的に注目されている。¹⁻⁷⁾

われわれも、食品工業の分野で利用価値の高い新規の多糖類を得ることを目的として、各地の土壌、河川水および湖沼水から多糖類産生微生物の分離とスクリーニングを行ってきた。

今回、隅田川の水試料から多量の多糖類を産生する細菌を得、その同定を行うとともにそれが産生する多糖類について、粘性、pH 安定性、乳化安定性などの諸性質を既存の多糖類と比較し、食品用増粘剤および乳化安定剤として有望な物質であることを見出したので、その結果について報告する。

実 験 方 法

分離源 1983 年 10 月 13 日に勝鬃橋下流約 400 m の隅田川左岸で採取した表層水を分離源とした。

菌株のスクリーニングと培養 スクリーニング用の培地としては、塩田⁸⁾の培地を改変した S-Agar または G-Agar (シュクロースまたはグルコース 5%, BBL トリプチ ケースペプトン 0.35%: K₂HPO₄ 0.4%, MgSO₄·7 H₂O 0.02%, 寒天 1.4%, pH 7.4) を用いた。この培地で 30°C, 2 日間平板塗抹培養を行い、粘性を呈するコロニーから釣菌し、平板塗抹培養を繰り返して純粋分離した。ついで、これら分離菌を S-Agar および G-Agar から寒天を除いた S-Broth および G-Broth 5ml に接種し、30°C で 20 時間前培養した。これを 100 ml の液体培地に全量接種し、30°C, 5 日間 120 rpm で振盪培養を行った。

分離菌株の同定 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1⁹⁾ に基づいて分離菌の同定を試み

^{*1} 本研究の要は 1987 年 4 月、日本水産学会春季大会において発表した。

^{*2} 呉羽化学工業株式会社食品研究所 (Food Science Laboratories, Kureha Chemical Industry Co. Ltd., Hyakunincho, Shinjuku, Tokyo 160, Japan).

^{*3} 近畿大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kinki University, Higashi-osaka, Osaka 577, Japan).

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolated strain

A. Morphological characteristics	
rods with capsule, $0.7 \sim 0.9 \times 1.0 \sim 2.0 \mu\text{m}$, non-motile, gram negative, non-spore formation	
B. Cultural characteristics	
on S-agar: white, round or irregular, slime production	
C. Physiological characteristics	
catalase (+), oxidase (-), β -galactosidase (+), nitrate reduction (+), indole production (-), pectate degradation (-), fecal coliform test (+), growth at 10°C (-), methyl red test (-), Voges-Proskauer test (+), arginine dihydrolase (-), lysine decarboxylase (+), ornithine decarboxylase (-), gelatin hydrolysis (-), H_2S production (-), urease (+)	
Fermentation of:	
inulin (+), L-sorbose (+), L-arabinose (+), myo-inositol (+), lactose (+), D-mannitol (+), L-rhamnose (+), sucrose (+), D-glucose (+), raffinose (+), D-sorbitol (+), dulcitol (+), D-melizitol (-)	
Utilization of:	
m-hydroxybenzoate (-), citrate (Simmon's) (+), malonate (+), gluconate (+)	
Utilization of organic acids:	
sodium citrate (+), α -tartrate (+), mucate (+)	
Gas from glucose (+)	
Acid from: lactose (+), dulcitol (+), adonitol (-)	

た。

比較のための標準菌株としては, Penicillin Control and Immunology Section, Food and Drug Administration から分譲された *Klebsiella pneumoniae* PCI 602 および理化学研究所微生物系統保存施設から分譲された *K. terrigena* JCM 1687 を用いた。

多糖類の抽出および精製 培養液を水で 2~3 倍に希釈し, 遠心分離して菌体を除去した後, 上清に 2 倍量のエタノールを加えて多糖類を沈殿させた。沈殿した多糖類をエタノールで 2 回洗浄し, アセトンを加えて脱水した後, デシケーター中で乾燥することにより粗多糖類試料を得た。

化学分析用の試料とする場合には, 粗多糖類を蒸留水に完全に溶解させた後, 2 倍量のエタノール添加による再沈殿操作を 3 回繰り返す, 一夜透析を行った後, 凍結乾燥して精製多糖類 (BS-1) とした。

多糖類の性質の試験 Tako *et al.*⁽¹⁰⁾ の上昇ペーパークロマトグラフ法を用いて BS-1 の保水性をキサントガム (東京化成), カラギーナン (東京化成) およびトラガカントガム (関東化学) のそれぞれ 1% (w/v) 水溶液のそれと比較評価した。なお, 使用したカラギーナンは主に κ -タイプからなるが, λ -タイプも若干含まれている。

また, キサントガム, カラギーナン, トラガカントガムおよび BS-1 の各々 1% (w/v) 水溶液について粘度を比較した。粘度の測定には E 型粘度計 (VISCONIC EMD, 東京計器) および循環恒温装置 (VISCO MATE VM 150, 東機産業) を使用し, 攪り速度と温度を変えて比較した。

pH 安定性については, 塩酸または水酸化ナトリウムを用いて pH を調整した蒸留水に, BS-1 を 1% (w/v) 添加して溶解させ, 各 pH における 30°C での粘度を測定し, キサントガムと比較した。

さらに, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0% (w/v) の BS-1 水溶液に, 水と油の比が 7:3 になるようにサラダ油を加えてホモゲナイズした後, 室温に 3 日間放置してエマルジョンの安定性を評価した。比較のため, キサントガム, *Hansenula holstii* Y-2448 を培養して分離したフォスファミンナン, アビスル (旭化成 pH-101), EM-8 (オランダ DMV 社), および EMHV (オランダ DMV 社) など既知の微生物産生多糖類や食品用乳化剤についても同様の実験を行った。

結 果

菌株の同定 本菌の形態学および生理学的性質を Table 1 に示した。

本菌は莢膜を有する非運動性のグラム陰性桿菌で, 表に示した諸性状をもとに *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 に従って分類したところ, *Klebsiella pneumoniae* とよく一致した。また, *K. pneumoniae* PCI 602 および *K. terrigena* JCM 1687 を標準菌株として確認試験を行ったが, 本菌は 10°C で増殖せず, 44.5°C でラクトースからガスを産生し, かつメリジトースを発酵しなかったことから, *K. pneumoniae* であると推定された。

保水性 Table 2 は各種の多糖類の 1% (w/v) 水溶液に濾紙 (東洋 No. 51) を浸し, 上昇クロマトグラフィー

Table 2. Rate of syneresis of polysaccharide BS-1

Polysaccharide	Rate of syneresis (%)
Distilled water	100
Xanthan gum	3.7
Carrageenan	9.6
Tragacanth gum	14.8
BS-1	2.2

Each figure was obtained with 1% (w/v) solution of each polysaccharide.

を実施した際の水の上昇率を、蒸留水のみの場合を 100% として示した結果である。

表から明らかなように、BS-1 は 2.2% ともっとも低い値を示し、カラギーナンやトラガcantガムなどの植物由来の多糖類よりも保水性に優れている。また、同じく微生物の産生する多糖類であるキサンタンガムも 3.7% と低い値を示したが、BS-1 ではそれよりもさらに低く、保水性に優れていることがわかる。

粘度 1% (w/v) の BS-1 とキサンタンガム、カラギーナンおよびトラガcantガムの 20°C における粘度を比較した結果を Fig. 1 に示した。

図に見られるように BS-1 は典型的な非ニュートン流体の挙動を示し、その粘度は測定したすべてのずり速度で他の 3 種の多糖類を上回り、1/s では 7000 cps に達した。

Fig. 1. Viscosity of BS-1, xanthan gum, carrageenan and tragacanth gum as a function of shear rate.

○—○, BS-1; ●—●, xanthan gum; △—△, carrageenan; ▲—▲, tragacanth gum.

The concentration of each solution was 1% (w/v) and the measurements were done at 20°C.

Fig. 2. Changes in viscosity of polysaccharide BS-1 and xanthan gum as a function of temperature.

○—○, BS-1; ●—●, xanthan gum.

The concentration of each solution was 1% (w/v) and shear rate was 3.83/s.

Fig. 3. Effect of pH on viscosity of polysaccharide BS-1.

○—○, BS-1; ●—●, xanthan gum.

The concentration of each solution was 1% (w/v) and shear rate was 3.83/s.

次に、ずり速度を 3.83/s に固定した場合の BS-1 およびキサンタンガムの 1% (w/v) 水溶液について、粘度の温度依存性を調べた。その結果、Fig. 2 に示したように、BS-1 の粘度は低温で高く 10°C では 3300 cps を示したが、温度の上昇に伴って低下し、80°C では 1400 cps であった。これに対してキサンタンガムでは 50°C 付近で粘度が最大となり、2600 cps を示したが、この温度を境に低下し、10°C では 1900 cps、80°C では 1500 cps であった。また、両者を比較すると、35°C 以下では BS-1 の粘度が高く、それ以上ではキサンタンガムが高くなるが、80°C では差がなくなることがわかった。

pH 安定性 BS-1 の 1% (w/v) 水溶液について粘度の pH 安定性をキサンタンガムと比較した結果を Fig. 3 に示した。この図では測定した pH の範囲で得られた粘

Fig. 4. Stability of emulsion prepared with different concentration of polysaccharide BS-1 (A) and xanthan gum (B). The concentration of them were 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0% (w/v) from left to right.

Fig. 5. Comparison of stability of emulsion. From left to right; EM-8, EMHV, avicel, BS-1. The concentration used here was 1% (w/v).

度の最大値を 100% として表わした。図に示したように、BS-1 は pH 7 で最大粘度を示し、pH 5~11 で安定であったが、pH 3 以下の高酸性領域や pH 13 の高アルカリ性領域では粘度が急激に低下した。また、キサンタンガムは pH 5~11 で安定した粘度を示し、pH 3 および 13 では逆に粘度が上昇した。しかし、pH 1 では粘度は急激に減少した。

乳化安定性 BS-1 の添加濃度を 0.05~1.0% (w/v)

Fig. 6. Comparison of stability of emulsion. From left to right; phosphomannan, xanthan gum, BS-1. The concentration used here was 0.1% (w/v).

の範囲で変化させて水:油=7:3 のエマルジョンを作り、室温に 3 日間放置後、その安定性を調べた。その結果、BS-1 は 0.1% (w/v) 以上の添加濃度でエマルジョンを安定させることが明らかになった (Fig. 4 A)。

同様の実験をキサンタンガムで行ったが、この場合、エマルジョンの安定化には 0.5% (w/v) 以上の添加濃度が必要であることがわかった (Fig. 4 B)。また、乳化剤として食品に用いられている EM-8, EMHV およびアビセルと BS-1 をそれぞれ 1% (w/v) 添加した場合の乳化安定性を比較した結果、Fig. 5 に示したように BS-1 は他の 3 種の乳化剤よりも優れた安定性を持つことが明らかになった。

次に、BS-1 と同様に微生物産生多糖類であるフォスフォマンナン (*Hansenula holstii* Y-2448) およびキサンタンガム (*Xanthomonas campestris* NRRL B-1459) の 0.1% (w/v) における乳化安定性を比較した。その結果、BS-1 は均一なエマルジョンを維持していたが、キサンタンガムでは水と油が分離しており、フォスフォマンナンでは乳化がほとんど認められなかった (Fig. 6)。

考 察

多糖類 BS-1 を産生する微生物は、同定の結果 *Klebsiella pneumoniae* であると推定されたが、*Klebsiella* 属の細菌が菌体外にスライムを形成することは古くから知

られている。¹³⁾ *Klebsiella* 属には多数の血清学的タイプを持った種が包含されており、それぞれ免疫学的に異なった多糖類を菌体外に産生する。¹³⁻¹⁴⁾ ところが、これらの多糖類を応用の観点から調べた研究は少ない。

今回得られた BS-1 は無味無臭の白色粉末で、水に溶解させると強い粘稠性をもった透明な溶液となる。その粘度は、20°C においては同濃度のキサンタンガムを上回ったが、35°C 以上になるとキサンタンガムより低くなった。しかし、BS-1 の粘度は 80°C の高温条件に置かれても温度を下げると可逆的に復帰するため、常温で用いる場合には食品等の増粘剤として優れていると思われる。

また、BS-1 は保水性にも富み、キサンタンガムのそれをしのぐ結果が得られた。さらに、乳化安定性にも優れ、0.1% (w/v) というわずかな添加量で水/油=7/3 のエマルジョンを安定させた。微生物由来の界面活性物質(バイオサーファクタント)にていては多くの研究がなされており、1) 糖脂質系、2) アシルペプチド系、3) リン脂質系、4) 脂肪酸系、5) 高分子系などに分類されている。¹⁵⁾ BS-1 は 5) の範疇に入るものと思われるが、乳化安定性のメカニズムについては今後の課題である。

文 献

- 1) 中村 敏: 油化学, **34**, 865-871 (1985).
- 2) R. M. Weiner, R. R. Colwell, R. N. Jarman, D. C. Stein, C. C. Somerville, and D. B. Bonar: *Biotechnol.*, **3**, 899-902 (1985).
- 3) P. A. Sandford, I. W. Cottrell, and D. J. Pettitt: *Pure and Appl. Chem.*, **56**, 879-892 (1984).
- 4) P. L. Chang and T. F. Yen: *Appl. Environmental Microbiol.*, **47**, 544-550 (1984).
- 5) J. H. Bennett: *J. SMPTE*, **80**, 569-570 (1971).
- 6) 奥谷康一: 日水誌, **42**, 367-370 (1976).
- 7) K. Okutani: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **43**, 323-328 (1977).
- 8) 塩田朝夫, 浅野 修, 寺部寿郎, 金子安之, 土井新次: 発酵工学会誌, **47**, 623-630 (1969).
- 9) P. Baumann, A. L. Furniss, and J. V. Lee: in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (ed. by N. R. Krieg and J. G. Holt), Vol. 1, Williams & Wilkins, U.S.A., 1984, pp. 461-465.
- 10) M. Tako, S. Nakamura, and T. Nagahama: *Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus*, **29**, 79-85 (1982).
- 11) J. F. Wilkinson, W. F. Dudman, and G. O. Aspinall: *Biochem. J.*, **59**, 446-451 (1955).
- 12) W. F. Dudman and J. F. Wilkinson: *Biochem. J.*, **62**, 289-295 (1956).
- 13) W. Nimmich: *Z. Med. Microbiol. U. Immunol.*, **154**, 117-131 (1968).
- 14) W. Nimmich: *Acta Biol. Med. Germ.*, **26**, 397-403 (1971).
- 15) 井上恵雄: バイオインダストリー, **2**, 605-617 (1985).