The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

文　　献

1) JOSEPH G. H., HAVIGHORST C. R.: Food Eng., 24, 87 (1952). 2) KERTESZ Z. I.: "The Pectic Substances" 511 (1951). 3) HINTON C. L.: Ibid, 234. 4) C. P. P. F. 法: Ibid, 485. 5) Ibid 470. 6) Ibid 511. 7) Ibid, 512. 8) Ibid, 162. 9) GRAHAM R. P., SHEPHERD A. D.: Agr. Food Chem., 1, 993 (1953). 10) BAKER G. L.: Food Ind., 6, 305 (1934). 11) 鹽入，萩沼：食研報告，8, 197 (1953). 12) WALLERSTEIN L.: U. S. Pat. 2, 008, 999 (1935).

（昭和29, 5, 10受理）

Bacillus polymyxa 1 變株の生成する Bacterial polysaccharide の研究（第3報）構成糖の確認

三崎　旭・堀　一郎・寺本四郎（大阪大學工學部醱酵工學教室）

緒　　言

一般に Bacterial polysaccharide の構成糖としては葡萄糖，ガラクトース，マンノーズ，グルクロン酸及びアミノ糖が擧げられるが[1] 最近の報告[2)3)] ではラムノーゼも構成糖として存在することが認められている．

前報に於ては乳糖[1),5)]を利用して粘度の大きい polysaccharide を生成する細菌を見出しその培養條件及び菌學性質について報告した．この醱酵液より苛性ソーダを含むアルコールにより分離して得た粗製物質は未だ窒素分等少量の不純物を含むものでありその精製については後報で述べる事として本報では先ず此の粗製物質について加水分解を行い一般化學分析及びペーパー・クロマトグラフイによりアルドヘキソーズ(葡萄糖)及びメチル・ペントース(フコーズ)の2種の還元糖を確認した．同時に含有されるカルシウムが或る種の有機酸鹽として存在するや否やも検討したのでこれらの結果について報告する．

實驗及び實驗結果

I. Polysaccharide の調製

前報と同樣に約5％の局方乳糖，酵母抽出液（2％又は0.5％濃度），0.05％アスパラギン酸ソーダ，0.05％ KH_2PO_4, 0.03％ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05％ KCl より成る培養液100 ml を500 ml 容振盪フラスコに夫々分注して接種と同時に沈降性炭酸カルシウムを加える．inoculum としては *B. polymyxa var. lactoviscosus* を1％乳糖を含む肉汁ペプトン培養（pH 7.0）に24時間培養せるものを用いた．polysaccharide 生產のためには30°C で振盪培養し還元力の完全に消失するまで培養を續けた（所要日數約7日間）．醱酵液にアルコールを加えて20％濃度となし3000 r.p.m で30分遠心分離し可及的に菌體及び殘存カルシウムを除きその上層液を2％苛性ソーダを含む90％アルコール2.5容中に注加攪拌してゴム狀沈澱を得る．これをアルコール及びエーテルで洗つた後鹽化カルシウム上常溫で乾燥したものを試料として用いた．

Table I. Properties of crude Polysaccharide

	water %	ash %		total nitrogen %	reducing power after hydrolysis % (as glucose)
		total ash %	Ca %		
sample A *	11.62	14.38	4.97	0.36	49.9
sample B *	11.11	12.85	4.95	1.21	56.8

* Sample A was obtained in 0.5% yeast-extract medium, and B in 2.0% yeast-extract medium. Both samples were isolated with means of pouring culture-filtrate into 2.5 vol. of 90% ethanol containing 2.0% NaOH.

斯くして得た粗製物質の水分，灰分，窒素分及び加水分解後の還元力を測定した結果は Table I に示す．但し水分測定は105°Cにて乾燥後秤量し，窒素分は semi-micro-Kjeldahl 法に依り，灰分は磁製ルツボ中にて灼熱する事により定量した．

又この灰分殘渣を鹽酸に溶解後蓚酸法によりカルシウムを定量した．還元力の測定には試料150～200 mg を5 ml の2 N 硫酸と共に sealed tube 中にて100°C, 4時間加水分解後 BERTRAND 法にて定量し葡萄糖として算

NII-Electronic Library Service

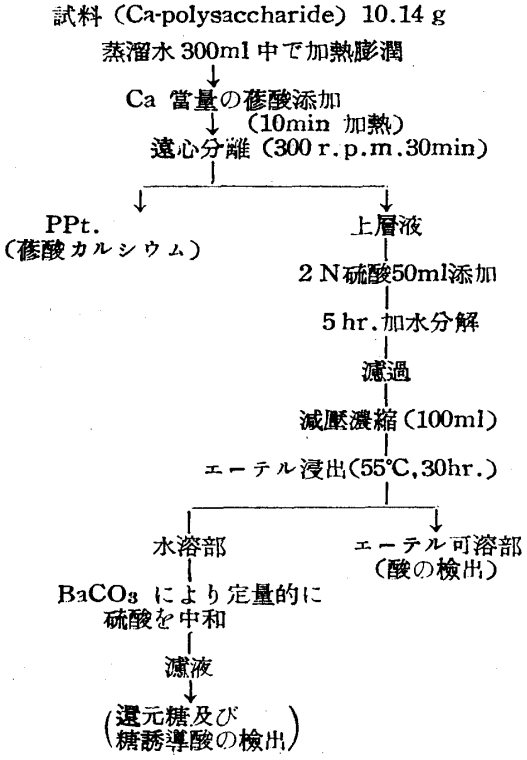
The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

出した.

その結果は Table I に示す如くであり, 水分11～12%で又全灰分はカルシウムが炭酸カルシウムとして測定されと考えると良く一致する. 加水分解に依る還元力は葡萄糖として約50～55%を示すが絶乾量に對しては55～60%となつた. 窒素量は用いた培地の窒素源(酵母液)の濃度に依り著しく異るが酵母液の濃度を大にすると polysaccharide 試料中の窒素量も増加する事より菌體蛋白若くは酵母液中の窒素分が試料の粘稠性とも關聯して混在しているものと考えられる. 猶本物質はカルシウムを含有する事より Ca-polysaccharide と假稱する.

I. Ca-polysaccharide 構成糖の確認

polysaccharide の構成糖を確認するためにはその加水分解物に就て行われるべきであるが本實驗に用いた試料は Table I より明かな如くカルシウムを含むために先ずカルシウムに當量の蓚酸を加えて可及的に之を除去した. 鹽酸に依る加水分解では分解過程中に生成單糖が更に分解されることが認められたので硫酸に依り加水分解した. 猶還元糖の外に有機酸の存在する可能性もあるので次の如き操作を行つた.



即ち試料(水分11.8%, カルシウム 0.43g を含む)10.14g を蒸溜水 300ml 中に加熱膨潤させ更に48時間振盪を行い均一な粘稠液とした後含有カルシウムに當量の蓚酸を含む水溶液を加え湯煎上で加熱 (10分) した後 3000 r.p.m で30分遠心分離して蓚酸カルシウムを除く. 上層液に2N-硫酸50ml を加え reflux 下沸騰水中で5時間加水分解した後濾過してフミン狀物質を除去し濾液を37°Cで減壓濃縮して約100ml となし55°Cで30時間エーテル浸出する (エーテル區分は酸の檢出に用いる). 水溶部の硫酸を炭酸バリウムで定量的に中和し更に 30ml にまで濃縮しこれに炭酸カルシウムを加えた後濾液を活性炭で脱色後減壓濃縮して乾涸に近いシラップ 7.22g を得た.

〔糖の確認檢出〕

上述のシラップを 30ml の溫水にとかしその一部を採りこれにアルコールを加えて60%濃度とし1週間放置するもグルコン酸カルシウム等の結晶の析出を認めず又 β-naphthol 反應も陰性であつたので hexonic acid の存在は認められない. 殘りの水溶液に就て呈色反應, クロマトグラフイー, 及び醗酵試驗に依り構成單糖の確認を行つた.

A. 呈色反應[6]

溶液は MOLISCH and URANSKY の α-naphthol 反應により紫色のリングを生ず.

(i) ペントースとしての反應

BIAL の orcin 反應: (−)

NEUMANN orcin の反應: (−)

WHEELER and TOLLENS の phloroglucin 反應: (−)

(ii) ケトースとしての反應

SELWANOFF 反應: (−)

ROSENTHALER 反應: (−)

(iii) アルドヘキソースとしての反應

特有なる呈色反應なきため糖酸, 粘液酸反應及び酵母醗酵試驗に依り確認(後述)

(iv) ウロン酸としての反應

naphthoresolucin 反應: (−)

(v) メチルペントースとしての反應

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ROSENTHALER 反應 (アセトン反應: (+)

WIDTSOE and TOLLENS 反應: (+)

大島 and TOLLENS 反應: (+)

MAQUENNE 反應: (+)

(vi) アミノ糖としての反應

ELSON and MORGAN (1933, 1934)[7] の p-dimethylaminobenzaldehyde に依る呈色反應陰性

B. ペーパー・クロマトグラフィーによる確認

Ca-polysaccharide の加水分解液を炭酸バリウムで中和後豫備的にペーパー・クロマトグラフィーを行つた所鮮明な二つのスポットを得たので更に上記の處理をしたシラップに就て行つた,

展開劑: (A) n-butanol—醋酸—水の混合液 (4:1:2)の上層部.

(B) エタノール—メタノール—水 (45:45:10) の混合液[8].

呈色劑: PARTRIDGE (1949)[9]の hydrogen anilinphthalate を用いた.但し phthalic acid の代りに phthalic acid anhydride 1.66g, 蒸溜アニリン 0.93g を100ml の水飽和ブタノールに溶かした新鮮な液を用いた.

展開方法: 60cm×60cmの東洋濾紙 No.50 の下端近く同一線上に等間隔に原點をとり標準糖と共に一次元上昇法で一齊展開を行つた.

Table II. Rf values of standard sugars and hydrolysate
filterpaper: Toyo-Roshi K. K. No. 50(Temp. about 15°C)

developer / sugars	butanol 4, acetic acid 1, water 2	ethanol 45, methanol 45, water 10	coloration
lactose	0.16	0.28	yellow-brown
glucose	0.27～0.30	0.52	brown
galactose	0.26～02.9	0.50	〃
xylose	0.33	0.57	redish-violet
arabinose	0.31	0.55	〃
sorbose	0.31	0.53	brown
rhamnose	0.45～0.46	0.66	brown
hydrolysate	0.27	0.51～0.52	brown
	0.44～0.45	0.65～0.67	〃
hydrolysate (after yeast ferment)	0.45	0.65～0.67	〃

ペーパー・クロマトグラム上の Rf 値は Table II の如くなる.

以上の結果より加水分解物中に2種の還元糖が含まれRfの高いスポットはラムノーズに近い値を示すものであり呈色反應の結果と比べてメチル・ペントースなることは明かである (標準糖としてフコーズは入手出來なかつた). 又 Rf の低い部分 (0.27 in solvent A, 0.51～0.52 in solvent B) は葡萄糖又はガラクトーズと考えられるが加水分解液についてガラクトーズ非醗酵性のパン酵母を作用させた後同様にクロマトグラフィーを行うとヘキソース部分のスポットは完全に消失しメチル・ペントースのスポットのみ顯われた (Table II). この事實よりヘキソーズとして葡萄糖が確認された.

C. 葡萄糖の確認

クロマトグラフィーの結果よりヘキソースの存在を知りこれが酵母に依り醗酵される事を知つたが2種の糖を單離する事は困難であつたのでシラップについて粘液酸及び糖酸生成試驗を行つた.

粘液酸反應: シラップ約500mg に硝酸 (sp.g 1.18) 50ml を加え湯煎上で加熱し ⅓ 容まで濃縮. これを一晝夜放置するも結晶の析出を認めず更に濃縮するも粘液酸の結晶を認めなかつたのでガラクトースは存在しない.

糖酸反應: 上記の液を砂利狀になる迄濃縮した後水 10ml を加え再び濃縮. この操作を2回繰返えして砂利狀となし之に少量の水を加えて溶解した後炭酸カリウムをリトマスに對してアルカリ性になる迄加え次に醋酸酸性とし一夜放置すると酸性糖酸カリ特有の歪方形の面を有する針狀結晶の生成を認めたので葡萄糖の存在を確認した.

D. フコーズの確認

上述のクロマトグラフィー及び呈色反應よりメチル・ペントースの存在を認めたが次にシラップの中90%アルコール可溶區分について phenylosazone 生成試驗を行つた. 即ち糖約500ml を含むアルコール可性區分と phenylhydrazin 鹽酸鹽 1.0g 及び結晶性醋酸ソーダ 1.5g を水10ml と共に湯煎上で30分加熱すると osazone の析

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

出を認めた．これを濾過後よく水洗した後ベンゼンで着色油脂狀物質を除き水より再結晶しこれを熱水で數回處理後殘渣をピリヂンにとかし次にこのピリヂン溶液に20%の水を加えて生成する結晶を濾別しアルコールより再結晶した．顯微鏡によりこの osazone は明かに glucosazone と異りその融點は 177°C～178°C (補正せず) であつた，又別にシラップを酵母により醗酵させて葡萄糖を除いた後同樣に調製した osazone も M. P. 177°C～178°Cを示した．これはフコーズの osazone (177°C～178°C)[10]に一致しラムノーズのそれ(M.P 191°C)[10]とは明かに異る．

猶標準のフコーズは入手出來なかつたので混融試驗に行い得なかつたが以上の結果より polysaccharide 中に存在するメチル・ペントースはフコーズ (galactomethylose) なる事を確認した．

Ⅲ. カルシウムの存在に就て

先に述べた如く加水分解後にエーテル浸出を行いその水層部について糖誘導酸 (ウロン酸，グルコン酸等) を檢出し得なかつた．それ故 polysaccharide に含まれるカルシウムは acidic polysaccharide の如き結合に依るものとは考えられない．

一方加水分解前にカルシウムを除く目的でそれに當量の蓚酸を加え遠心分離 (3000.r.p.m 30分) により蓚酸カルシウムの沈澱を除いたが上層液は猶酸性を示したがこの酸はエーテル浸出に依りエーテル部へ移動することが確認された．エーテル層よりエーテルを除去すると少量の柱狀結晶が析出したのでこれを水に溶解して特有の檢出反應及びペーパー・クロマトグラフイーにより唯一の酸として蓚酸を確認した．

加えた蓚酸と各フラクションに於て回收された蓚酸の重量關係は Table Ⅲ の如くなる．

Table III. The weight balance of oxalic acid during hydrolysis treatment

fraction	alkali equiv.	calculated as oxaticacid (mg)
oxalic acid added (Ca. equiv)	–	1282
Ca-oxalate preciptated by centrifuge.	–	962
(oxalic acid)	–	(661)
acidity of supernatant after centrifuge*	0.0094	584
acidity of ether fraction*	0.0077	465

* Alkali equivalent was calculated by 1/10 NaOH titration.

この結果より加えられた蓚酸 (1282mg) の中蓚酸カルシウムとして661 mgが回收されるが polysaccharide の水溶液の粘性のために蓚酸の全量は完全に蓚酸カルシウムとして遠心分離に依り除去されない．上層液中に殘存する酸 (0.094當量) の80%はエーテル部へ移行するがこの酸の全てが蓚酸である點よりエーテル層に於て確認された蓚酸は明かに添加された蓚酸の一部である．

從つて以上の結果よりカルシウムと結合するものと考えられた何等の有機酸も確認出來なかつたのでカルシウムは他の結合型式で polysaccharide 中に導入されているものと考えられる．

考察及び要約

(1) 醗酵液より苛性ソーダを含むアルコールに依つて分離された Ca-polysaccharide の加水分解物からその構成糖として葡萄糖及びフコーズ (galactomethylose) の存在を確認した．從來メチル・ペントースを含む polysaccharide は主として植物粘液又は動物組織中に存在するものと考えられていたが最近 bacterial polysaccharide 中にもメチル・ペントースの1種たるラムノーズの存在が報告されている[2),3)]．而しフコーズの存在に就ては未だ報告に接せずこの事は炭素源として比較的代謝され難い乳糖の利用と關聯して興味ある事實であるが乳糖より斯くの如き complex polysaccharide の生成機構に就ては明かでない．

(2) 粗製の polysaccharide 中には相當量の窒素分を含有するがアミノ糖の存在は認められず又培地中の窒素源の濃度に比例して窒素分が增加する事實より培地中のアルコール不溶の窒素物か又は菌體蛋白の夾雜に依るものと考えられる．

(3) 本實驗で用いた試料 (Ca-polysacchride) は恒に約5%のカルシウムを含有するが加水分解物より何等の有機酸も確認出來なかつたが稀鹽酸に依り Ca-free とする場合には著く粘度の低下することが認められるのでカルシウムは單なる夾雜物とは考えられず酸鹽以外の形で polysaccharide と結合するものと思われるので之に

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

就ては更に考察したい.

本研究の一部は文部省科學研究費に仰いだ.

(昭和28年4月日本農藝化學會で講演)

文　　献

1) EVANS, T.H. add HIBBERT: Advance in Carbohydrate Chem. vol 4 (1946). 2) SCHMIDT, W.C.: J. Exp. Med. **95**, 105 (1952). 3) SLEIN, M.W. and SCHNELL: J. Biol. Chem. **203**, 837 (1953). 4) 三崎, 堀: 本誌, **32**, 147 (1954). 5) 三崎, 松山, 堀:本誌, (未刊). 6) 三宅等:炭水化物概論 (昭和24年), 化學實驗學(第二部)天然物取扱法Ⅲ, 167 (昭和17年). 7) ELSON and MORGEN: Biochem. J. **27**, 1824 (1933), Ibid. **28**, 988 (1934). 8) STOKES, N. and CAMPBELL: Arch. Biochem. **30**, 121 (1951). 9) PARTRIDGE: Nature **164**, 444 (1949). 10) MICHEEL, F.: Chemie der Zucker u. Polysaccharide p. 68 (1939).

(昭和29, 5, 19受理)

Bacilus polymyxa 1變株の生成する Bacterial Polysaccharide の研究 (第4報) Polysaccharide の精製

三崎　旭・足立陽一・堀　一郎・寺本四郎 (大阪大學工學部醱酵工學教室)

緒　　言

前報[1]では著者等の Polysaccharide の構成糖として葡萄糖, フコーズの二種の還元糖の存在を明かにしたが粗製物質中には猶相當量の窒素物の含有される事を認めた. 一般に Bacterial polysaccharide を純粹な形で得る事は極めて困難であり特に菌體成分として polysaccharide に結合するか又は夾雜する窒素物の除去については從來より種々の方法が試みられているがSTACEY(1943)等[2]に依ると完全なる除蛋白に際しては或程度polysaccharide の分解は避けられないといわれる.

除蛋白の方法として擧げられるものは SEVAGE (1934)[3] に依るクロヽホルム—アミルアルコール抽出法, クロヽホルム—ブタノール抽出法 〔STACEY 1948)〕[4] に依るものか又は mild な酸處理後にペプシン, トリプシン等[5] を用いて蛋白質を水可溶性にした後緩衝液よりの電氣透析, 超遠心法及び分別沈澱法により精製されている樣である. 一方著者等の Crude Ca-polysaccharide の加水分解物よりカルシウムと結合していると考えられた何等の有機酸も確認出來なかつたのでカルシウムは他の形で polysaccharide と結合されているものと推定される. 從つて本報では Ca-polysaccharide よりカルシウムを除き之に SEVAGE 法等を應用して不純物としての窒素分を可及的に除去し比較的純度の高い Ca-free polysaccharide を得るべく實驗を行つたのでその結果を報告する.

實驗及び實驗結果

Ⅰ. Polysaccharide の精製

試料としての crude Ca-polysaccharide は前報の方法に從つて調製したものである (Table 1).

A. SEVAGE 法に依る Ca-Polysaccharide の精製 〔Ca-P. Ss〕.

Crude Ca-polysaccharide 6.35gを蒸溜水7000 ml に常温で徐々に溶解せしめこれを500 ml 容フラスコ3本に分注し夫々にイソアミルアルコール20 ml, クロヽホルム50 ml を加え16時間振盪した後3000 r. p. m で40〜50分遠心分離し上層液を集め更に之にクロロホルム及びイソアミルアルコールを加え再び振盪する. その後同樣にしてこの操作を數回繰返して上層液を集め40°Cで減壓濃縮し200ml となし一夜冷藏後遠心分離を行い上層液を 600 ml の96% エタノール中に注加攪拌して羽毛狀白色沈澱を得た. これをエタノール, エーテルで順次洗滌後 $CaCl_2$ 上で乾燥し白色無定形物質3.313gを得た.

B. Ca-free polysaccharide の精製

Crude Ca-polysaccharide を得るためには稀鹽酸の添加によりカルシウムを水溶性の $CaCl_2$ となした後透析及びイオン交換樹脂に依り無機物を除き更に SEVAGE 法又は pepsin digestion 法により精製した.

(1) Crude Ca-free polysaccharide 〔P. Sc〕 の調製

NII-Electronic Library Service