

(三崎, 足立, 堀, 寺本) *Bacillus polymyxa* 1 變株の生成する Bacterial Polysaccharide の研究 (第5報) (341)

報 文

Bacillus polymyxa 1 變株の生成する

Bacterial Polysaccharide の研究 (第5報)

Ca-polysaccharide 及び Ca-free polysaccharide の性質

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

近時 polysaccharide の研究は生化學及び細菌學の分野に於て重要な位置を占めその構造¹⁾ 及び分子量等²⁾ に對する知見も數多く報告されている。而し著者等が乳糖培地より得た如き complex polysaccharide に就いては未だ報告に接していない。前報³⁾ に於ては稀鹽酸處理及び SEVAGE の方法を應用する事に依り相當に純度の高い Ca-free の polysaccharide を得たがその粘性は Ca-polysaccharide に比して極めて低い値を示すことが認められた。本報では Ca-polysaccharide と Ca-free の物質について加水分解速度、粘度に對する種々の因子の影響を調べ更に Ca-free の物質については粘度法及び滲透壓法に依りその分子の大きさ等を測定した結果を報告する。

實驗及び實驗結果

I. 酸に依る加水分解

polysaccharide を酸で加水分解する場合同一濃度の酸でも鹽酸に依る時は硫酸に比して分解液の着色が著く還元力が低く顯われる事實を認めたので各濃度の硫酸及び鹽酸を用いて加水分解の經過を調べた。

試料として SEVAGE 法に依り精製した Ca-polysaccharide 及び Ca-free polysaccharide 各210mg (無水物) を精秤し 35ml の各濃度 (1%~10%) の硫酸又は鹽酸を加えて50ml 容の試験管に入れ reflux 下に boiling water bath 中で加熱し適當な時期にその 5 ml を採り BERTRAND 法で還元力を測定し glucose として算出した。その結果は Fig1a, Fig 1b 及び Fig 2a, Fig 2b に示す如くである。

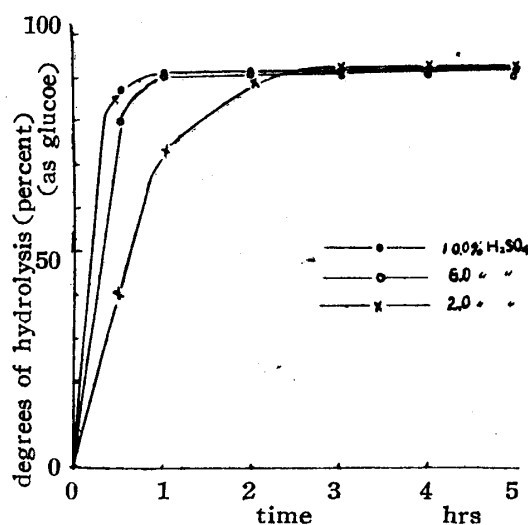


Fig 1a. Hydrolysis rates of Ca-free polysaccharide in various conc. of H_2SO_4

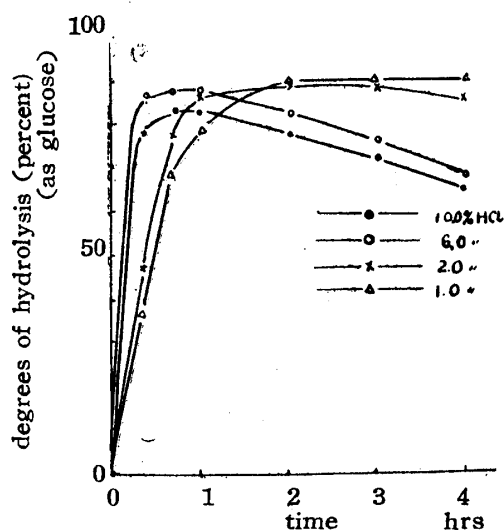


Fig 1b. Hydrolysis rates of Ca-free polysaccharide in various conc. of HCl.

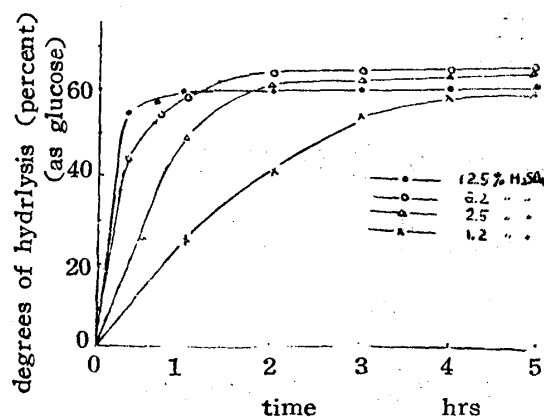
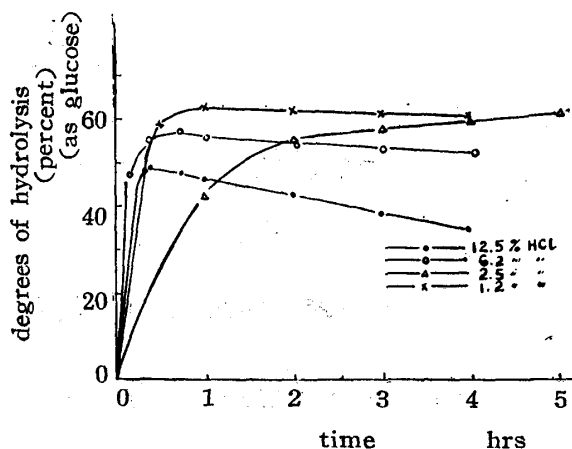
(342) (三崎, 足立, 堀, 寺本) *Bacillus polymyxa* 1 變株の生成する Bacterial Polysaccharide の研究 (第5報)Fig 2a Hydrolysis rates of Ca-polysaccharide in various conc. of H_2SO_4 .

Fig 2b Hydrolysis rates of Ca-polysaccharide in various conc. of HCl.

即ち Ca-polysaccharide, Ca-free 物質の兩者共加水分解経過は同様の傾向を示し鹽酸に依る分解は硫酸のそれに比し著しく舉動を異にし2%以上の濃度では時間と共に分解液の還元力は漸次低下し10%以上の鹽酸では30分後に6%の鹽酸では1時間後に褐色乃至黒褐色を呈した。この事實は polysaccharide の構成糖たるメチルペントース部分が鹽酸に依り methylfurfural に變化する事に起因するものと思われる。猶 Ca-free polysaccharide に於ては完全なる加水分解は2%及び6%濃度の硫酸で4時間で充分であつた。

I. 粘 度

polysaccharide の特性として粘度の大なる事が挙げられるが著者等の polysaccharide ではカルシウムを含む物質は極度に粘性が大であるに反して Ca-free の物質では相當低い粘度を示す事が見出されたのでこの兩者について濃度, pH 及び温度の關係を調べた。使用した粘度計は OSTWALD 型で通常 $20^{\circ}C (\pm 0.1^{\circ}C)$ の恒温槽に於て測定した。

(1) 濃度と粘度の關係

Ca-polysaccharide 及び Ca-free polysaccharide の各濃度の水溶液に就いて相對粘度 η_r を測定した結果は Table I に示す如くであり Ca-free のものは Ca-polysaccharide に比して粘度は著しく低いこれは poly-

Table I. Relative viscosity (η_r) of polysaccharide at various concentrations

a. Ca-polysaccharide (at $20^{\circ}C \pm 0.1^{\circ}C$)						b. Ca-free polysaccharide (at $20^{\circ}C \pm 0.1^{\circ}C$)						
Conc. (%)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	conc. (%)	0.07	0.161	0.281	0.421	0.563	0.702
η_r	2.60	6.47	12.73	32.27	56.03	η_r	1.167	1.411	1.811	2.440	3.125	4.120

saccharide と結合しているカルシウムがその結合を解かれたためと考えられる。この事は又 pH と粘度との關係よりも明かである。

(2) 粘度に及ぼす pH の影響

Ca-polysaccharide は稀鹽酸處理に依り粘度を急激に低下させることが認められたが斯る粘度低下は polysaccharide の構造自體の破壊とは考えられないので Ca-polysaccharide, Ca-free polysaccharide の二つの試料について夫々の pH に於ける粘度を測定した。pH の調整には各 pH に於て同一成分より成る緩衝剤を用いる事がのぞましいが廣い pH 領域に亘る緩衝剤は見當らないので pH 2.0~8.0 に對してはクエン酸ソーダー 磷酸ソーダーを, pH 10.0 に對しては炭酸ソーダー 重炭酸ソーダーより成るものを用いた。試料水溶液 6.0ml に緩衝液 (N/5) 4.0ml を加えて夫々の濃度になる如く試料の濃度を調整し粘度 (比粘度 η_{sp}) を比較した。その結果を Table II に示す。

(三崎, 足立, 堀, 寺本) *Bacillus polymyxa* 1 變株の生成する Bacterial Polysaccharide の研究 (第5報) (343)Table II. Effects of pH to specific viscosity* (η_{sp}) (at 20°C $\pm$ 0.1°C)

sample cocnc(%) pH	Ca-polysacch.			Ca-free polysacch.		
	0.2	0.4	0.5	0.2	0.4	0.6
2.0	0.282	1.600	2.639	0.284	0.621	0.972
4.0	1.132	3.580	5.820	0.351	0.608	0.981
6.0	1.361	3.740	5.135	0.447	0.753	1.297
8.0	1.309	2.975	4.410	0.312	0.630	1.008
10.0	1.290	3.410	5.345	0.291	0.608	0.943

* Specific Viscosity: $\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \eta/\eta_0 - 1$

粘度は Ca-polysaccharide と Ca-free の物質では著しい相異が見られるが温度変化に対する挙動は兩者同じ傾向を示し 10°C~70°C の温度範囲では粘性の破壊は見られなかった。

即ち Ca-polysaccharide では各濃度共 pH 6.0 附近で粘度は最大値を示すが pH の低下に従い粘度も低下し pH 2.0 では急激な低下を示している。これに反して Ca-free polysaccharide に於ては pH 2.0~pH 10.0 の間では殆んど變化が認められない。この事は pH 2.0 附近で Ca-polysaccharide に含まれるカルシウムが遊離状態となり Ca-free polysaccharide の構造に近づくことを暗示している。

(3) 温度の影響

各濃度の polysaccharide 水溶液について温度の影響を調べた結果は Fig 3 a, Fig 3 b. に示す。

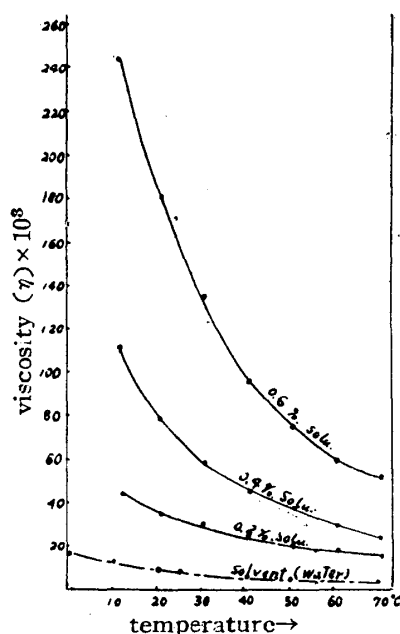


Fig 3 a Effects of temperature to viscosity of Ca-polysacch. (solvent: distill. water)

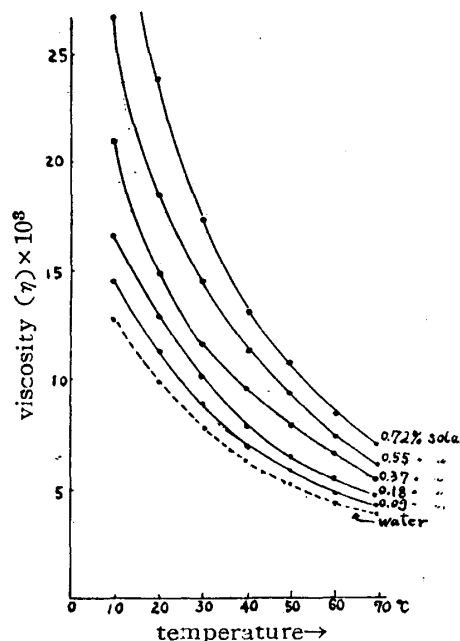


Fig 3 b Effects of temperature to viscosity of Ca-free polysacch. (solvent: distill. water)

II. Ca-free Polysaccharide 分子量の測定

(1) 粘度と分子量の関係

Ca-free polysaccharide の各濃度の水溶液について粘度を測定した結果 STAUDINGER が分岐の少ない鎖状重合体に就いて與えた式

$$[\eta]_{(c)} = K_m P. \quad (C: \text{濃度 g/l. } p: \text{重合度 } K_m: \text{粘度分子量恒数})$$

$$\text{又は } [\eta]_{(Cgm)} = K_m M. \quad (Cgm: \text{濃度 unit mol/l})$$

$$\text{但し極限粘度 } [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_r - 1}{C} \right) = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\ln \eta_r}{C} \right)$$

によく適合する事が分つたので各濃度の場合の粘度を求め濃度を 0 に外挿する事に依り極限粘度を求めた (Fig. 4).

この結果より極限粘度 $[\eta]_{c \rightarrow 0} = 0.227$ を得た。これより分子量を求めるためには K_m が與えられなければなら

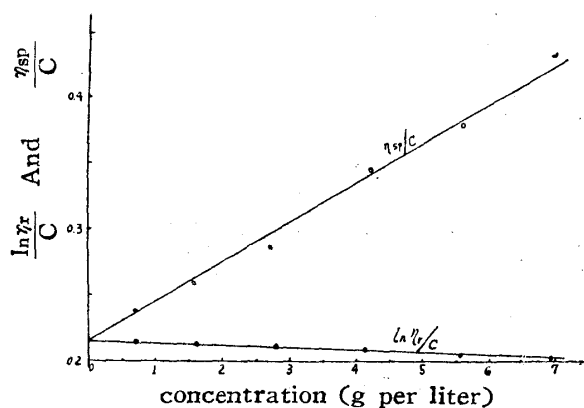
(344) (三崎, 足立, 堀) *Bacillus polymyxa* 1 變株の生成する Bacterial Polysaccharide の研究 (第5報)

Fig 4. Relations between Conc.(C),
 $\frac{1}{C} \ln \frac{\eta_{sp}}{C}$ and $\frac{\eta_{sp}}{C}$ (at $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$)
 Intrinsic viscosity $[\eta] = 0.227$.

の改良型を用い半滲透膜としては市販の Collodion にて sack を作り 25°C の恒温で 30 時間静置して平衡に達せしめた後 (トルエンを indicator とする), 滲透壓を測定して水柱 (cm) で表わした. その結果は Table III に示す.

Table III Osmotic pressure of Ca-free polysaccharide. (at 25°C)

Conc. (C) g/100 ml water	press. (p) cm Osmotic	c/p	Mol. Weight
0.884	2.95	0.296	74,900
0.707	2.68	0.264	66,800
0.592	1.91	0.310	78,400
0.442	0.74	0.294	74,300
0.128	0.47	0.266	67,200

従つて上表に於ける分子量は夫々の濃度に於ける滲透壓よりの Vant Hoff 式から計算した値であるが分子量大體 70,000~75,000 の order にあることが考えられ前述の粘度の結果と一致した値を示す.

考察及び要約

(1) 先に得た精製 Ca-polysaccharide 及び Ca-free polysaccharide を加水分解する際鹽酸では分解液の還元力が漸次減少する傾向があるに反し硫酸ではその事實は認められずこれは構成糖の一成分たるメチル・ペントースが鹽酸に對して不安定で methylfurfural を生成するものと考えられる. 完全なる加水分解は 2~6% 硫酸と共に 4 時間加熱することにより達せられる.

(2) 粘度に對する濃度及び温度の影響については Ca を含む物質と Ca-free の物質とでは著しい粘度差が認められるにも拘らず何れも同様の舉動を示すことより鹽酸處理に依るカルシウムの除去は polysaccharide 自體の構造の破壊を惹起するものでないと考えられる.

一方 Ca-free polysaccharide では pH 2.0~pH 10.0 の範圍に於てその粘性は安定であるが Ca-polysaccharide では酸性部に於て急激に粘性を低下し pH 2.0 附近では特に著しい事が分つた. この事は前報で述べた如く Copper Complex と同様な結合をしていると考えられるカルシウムが pH 2.0 附近で完全に遊離して Ca-free polysaccharide の構造になることを暗示している. 但し單にアルカリ添加に依り pH を中性にするだけでは粘性は回復しない.

(3) Ca-free polysaccharide の水溶液について粘度と濃度の関係は良く STAUDINGER の粘度式に適合することが分り従つて本 polysaccharide は分岐の少い鎖状構造を有するものであると認められその結果分子量は 70,000 order の値となつた. この値は又滲透壓法により算出した値とも大凡一致し, この事より本 polysacch-

ないが澱粉誘導體では $0.4 \sim 1.0 \times 10^{-4}$, セルロース誘導體では $2 \sim 7 \times 10^{-4}$ なる値が與えられて居る. M. G. GEOGHAM et al (1948)⁶⁾ は bacterial levan 及び dextran の K_m として 5×10^{-4} なる數を用いて居るので著者等の polycarbohydride にも $K_m = 5 \times 10^{-4}$ を適用すると重合度 P は 454 となる. polysaccharide の基本分子を假に $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]$ として分子量を算出すると 73548 なる値を得た.

而して Fig. 4 に示した濃度と粘度の関係より本 polysaccharide は大體に於て分岐の少い鎖状構造を有するものと考えられる.

(2) 滲透壓と分子量の關係

osmometer としては最も簡単な型の H. B. Bull (1941)⁶⁾ の type の BULL and CURIE (1948)⁷⁾

濃度 (c) と (c/p) は直線關係よりやゝず

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{RT}{M} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{p}{c} = \frac{253,000}{M}$$

濃度 g/100ml) を用いて分子量を算出することが出来なかつた. これは猶夾雜する灰分等の微量の不純物或は溶媒 (水) との間の會合現象等に起因するものと思われる.

aride はフコース, 葡萄糖約450より構成される鎖状重合体なる事が分つた.

(昭和26年4月日本農藝化学大会にて発表)

文 献

- 1) EVENS. T. H and HIBBERT: Advance in Carbohydrate Chem 4 (1946). 2) GREENWOOD, C.T.: Advance in Carbohydrate chem. 7 (1952). 3) 三崎, 足立, 堀: 本誌, (未刊). 4) STAUDINGER, H: Die Hochmolekularen Organischen Verbindungen (1932). 5) GEOGHAN. M. J. and BRIAN: Biochem J., 43, 5 (1948). 6) BULL. H.B.: J. Biol Chem., 137, 143 (1941). 7) BULL, H.B. and CURRIE, B.R: J. Am. Chem. Soc. 68, 742 (1946). (昭和29, 5, 19受理)

リンゴ加工に関する研究 (第12報)

液内培養法による糸状菌ペクチン分解酵素の生産 (Ⅲ)

藤井義紹・芦澤 長・手嶋睦子・植村定治郎 (東北大学農学部)

緒 論

さきに主として葡萄糖-ペプトンを使用して液内培養法による糸状菌ペクチン分解酵素の生産条件を検索したが¹⁾. その際麩糠法で該酵素生産の強力菌株としてえらんだ *Asp. niger* No. 55が液内培養用菌株として不適当であるとした. 併し實際製造に使用し得る麩及び玉蜀黍のような自然培養基を用いた場合にはこの菌株でも比較的に高位の酵素蓄積を液内培養法で示したので, その培養条件を検討した成績をここに報告する.

実験方法

a. 供試菌株: *Asp. niger* No. 55

b. ペクチン分解酵素能の測定: 前報に準じ粘度低下法により酵素能を測定したが, 但しその酵素力は下記のように粘度変化の百分率で示した. 即ち2%ペクチン(犬印製)溶液5ml, pH3.5のクエン酸緩衝液(M/5)2mlを粘度計にとつて温度平衡に達せしめた後に酵素液1ml, 蒸留水2ml(何れも測定温度と同温度のもの)を加えて40°Cで一定時間作用させ, そのまま粘度降下を測定したが, 酵素力 At (作用時間 t 分) は次式で求めた²⁾.

$$At = \frac{Vo - Vt}{Vo - Vs} \times 100$$

Vo: Pectin soln. + inactivated enzyme

Vt: Pectin soln. + active enzyme

Vs: Distilled water

c. 培養液の分析: pH の測定はキンヒドラ電極法に, 又糖分, N分の定量は夫々 BERTRAND 法, KJE LDAHL 法によつた.

d. 培養基: 玉蜀黍に麩を加えたものを主に用いた. 麩以外に米糠, 蛹粕, 大豆粕等をも使用して試験したが, 麩が最もよい成績を示したので主としてこれをN源的に取扱つて使用した. これに前報所載の無機鹽類を加えて基本培養基とし, ペクチン物質添加試験にはリンゴ粕を以つてこれに當てた. 供試の玉蜀黍, 麩, リンゴ粕の主成分は次の如し.

Table 1. Sugar and nitrogen contents of the raw materials for the pectic enzyme production.

	Total sugars (%)	Total nitrogen (%)	Water
Corn	53.3	1.27	14.0
Wheat bran	32.1	2.51	12.7
Pomace	25.5	0.59	18.7

これらの原料の濃度は最高2.0%まで培養基に使用した.

e. 培養方法: 液内培養法としては振盪培養法によつた. 500ml容培養瓶に培養液75mlをとり, 振幅7cm, 廻轉數150rpmで振盪した. 又通氣攪拌培養法を行つた場合は通氣管及び攪拌機を具備した1/容丸底三頸培養瓶か或はス

テインレス製の三頸の藍附の圓筒形ガラス瓶(約2l)容を使用した. 前者の装置の通氣管は先端部に數個の噴出