

[J. Ferment. Technol., Vol. 48, No. 11, p. 682~688, 1970]

微生物による粘質多糖類の生産に関する研究

(第2報) *Bacillus* Strain F-573 の多糖類の分離精製と
物性的, 生理的諸性質について

*塩田朝夫・*浅野 修・*寺部寿郎・金子安之・土井新次

(名古屋大学農学部農芸化学教室, *株式会社三和化学研究所)

Studies on the Production of Polysaccharides by a Microorganism

(II) Isolation and Purification of Polysaccharide of *Bacillus*
Strain F-573 and Its Physical and Physiological Properties*Asao Shioda, *Osamu Asano, *Hisao Terabe, Yasuyuki Kaneko
and Shinji Doi(Department of Agricultural Chemistry, Nagoya University, Nagoya;
*Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd., Higashi-ku, Nagoya)

F573 polysaccharide was produced for the purpose of purification in large quantities in a 20 liter jar fermenter. For the extraction and purification of polysaccharide from a culture fluid two methods were tested i.e. the Sevag method and the quaternary ammonium compound method.

As a result, the latter method was shown to be practically adequate in order to isolate the material from complex impurities. In this case, protein was eliminated by the alkali-Cu method during the process. Thereafter, various physical and rheological properties of the purified samples obtained were investigated. Animal tests were also carried out with such polysaccharide preparations.

緒 言

われわれは培養液中に多量の粘性多糖類を生成する *Bacillus* 属細菌, F-573 菌株を発見し, 前報迄に多糖類を生産するための培地組成を決定した¹⁾. 本報ではこの多糖類を培養液より抽出精製する方法を研究し, さらに精製標品の物性的, 生理的性質を明らかにしたので報告する.

従来微生物を培養してその多糖類を分離精製する方法は種々報告されているが, 特に細菌の莢膜多糖類を完全に分離抽出することはかなり困難とされている. われわれは, 本菌の多糖類も同様に莢膜多糖類と考えられるところから, 従来知られているフェノール抽出法, トリクロロ酢酸法などを試みたが, 必ずしも十分な精製が行なえず, 特に大量培養を行なった場合の抽

出処理には困難がみられた. しかし Sevag 法を中心とした方法や陽イオン界面活性剤 cetyl trimethyl ammonium chloride (CTA-Cl) を用いたアルカリ銅法の改良法が, 比較的収率良く精製可能であった. 特に後者の方法は中間工業的な処理法として適当と考えられる.

また本物質精製品の物理的な性質は独特であったが, 基礎動物試験では特異的な変化は観察されなかった.

実 験 方 法

1. 培養方法 前培養は先ずブドウ糖 5.0, 尿素 0.8, ペプトン 0.2, 肉エキス 0.2, 炭酸石灰 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025, 磷酸二加里 0.1% を含む培地を試験管に 6 ml 入れ, 110°C 15 min 殺菌後, F-573 菌を斜面培養より接種し, 30°C 72 hr 往復振盪培養を行なった. その試験管 1 本をブドウ糖 5.0, ペプトン 0.2, 磷酸

二加里 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025% の培地 100 ml を 500 ml 三角フラスコに入れ, 110°C 10 min 殺菌したものに接種し, 30°C 72 hr 回転振盪培養を行なう。次にジャーフェーマンターへの種母をつくるため, この回転振盪培養した液をさらに 500 ml 三角フラスコに 1 本当り 10 ml ずつ接種して, 新たに多数のフラスコを 48~72 hr 培養する。ジャーフェーマンターは 20 l 容で回転振盪培養の場合と同じ培地を 12 l 入れ, 東芝シリコン消泡剤を添加し 110°C 10 min 殺菌後, 約 5% の種母を添加し, 30°C 72 hr の通気攪拌培養を行なった。

2. 多糖類の分離精製法 Sevag 法²⁾と K. Meyer らの方法³⁾, ならびに界面活性剤とアルカリ銅塩を併用した場合には Albrecht らの方法⁴⁾に準じて行なった。

3. 物理・化学的性質の測定法 IR スペクトルは, KBr 法により, 粘度の測定はデンマーク Reciprotor 社製 Emila 回転粘度計を使用した。また必要に応じてピペットによる相対粘度の簡易測定法¹⁾も併用した。

4. 基礎動物実験 試験動物はマウス, ラット, モルモットなどを使い, 抗原性試験については体重 300~400g のモルモットに前処置として, 1 日目, 3 日目および 5 日目に精製 F-573 多糖類の水溶液 1 mg/ml の検体を腹腔内注射し, 21 日目に後処置として 1 mg/ml の検体を再注射した。

実験結果と考察

1. 培養 F-573 菌を 20 l 容ジャーフェーマンターで通気攪拌培養を行なった。初発 pH は 7.4 であるが培養 24 hr 頃から下降し次第に一定値に近づき, 60~72 hr ではほとんど同じ値 6.6 を示した。培養 48 hr ではほとんどの糖を消費するが, 醗酵の終了するまでに完全には喰い切らない。培養液の粘性は 48 hr 頃までは時間の経過と共に直線的に増加していくが, その後増加がやや緩慢になり, 72 hr には最高の相対粘度 6.59 に達した。

2. 培養液からの多糖類の分離精製

A. Sevag 法による分離精製 培養液を 10 倍容の蒸留水に希釈して粘度を低下させ, 15,000 rpm で遠心分離し, 菌体ならびに固形物の大部分を除去した後, その上澄液を 50°C で減圧濃縮し, これを約 2 倍容のアセトンまたはメタノール中に注加攪拌すると, 白色繊維状の沈澱が得られる。これをアセトンで洗滌後, 真空乾燥し淡黄色繊維状の乾燥標品を得た。収量は培養液に対して乾物量 11.3 g/l であった。

さらに精製するために前記物質 11.3 g を 1 l の蒸留水に溶解し, イソアミルアルコール・クロロホルム混液 (1:4) 200 ml を加えて室温で 6 hr 振盪後, 遠心分離して最上層液を採り, 同様の操作をあと 5 回繰返して除蛋白を行なった。

さらに微量の核酸と蛋白を除くために, 8% 醋酸亜鉛水溶液 40 ml と 1N 苛性ソーダ 10 ml を加えて 2 hr 振盪し, 15,000 rpm で遠心分離した。この上澄液を減圧濃縮し, 2 倍容アセトンに注加攪拌して白色繊維状の多糖類を得た。これをアセトンで洗滌後, 真空デシケーター中で乾燥して得られた白色繊維状物質の収量は 1.7 g となった。Table 1 にこの分離法を示す。B. 第 4 級アンモニウム塩とアルカリ銅塩による分離精製 陽イオン界面活性剤が酸性多糖類と結合して, これを沈澱せしめる性質を利用する。すなわち菌体を除去していない醗酵液 48 l に第 4 級アンモニウム塩 CTA-Cl (日本油脂 PB-40) を 1.5% の割合で加え攪拌放置すると, 菌体を含む CTA-Cl-多糖類複合体が沈澱してくる。

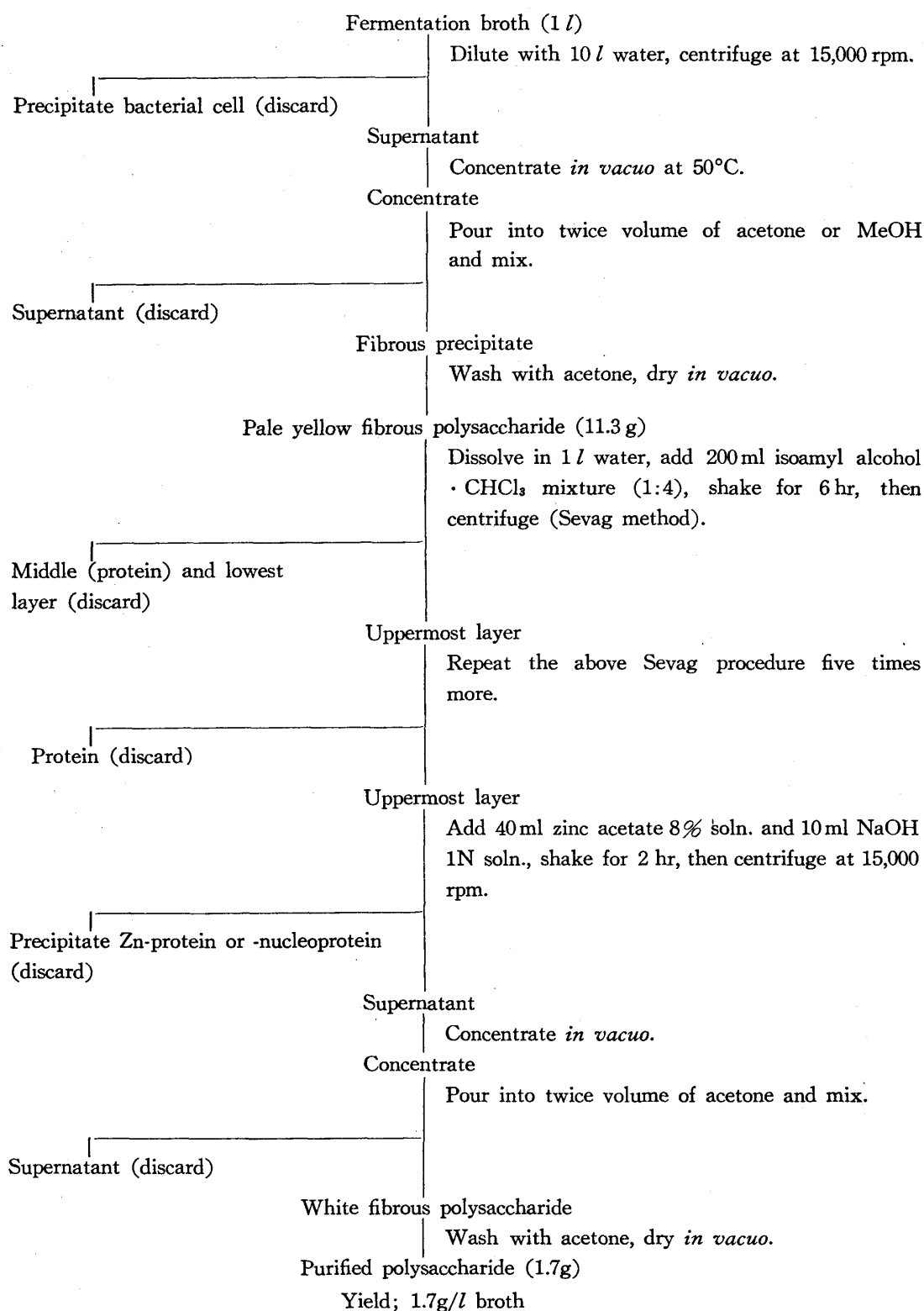
上澄液は捨て, 沈澱を 10% 食塩水溶液 10 l に加え, 攪拌して懸濁液とする。それにメタノール (95%) を等容量加えて CTA-Cl と多糖類を分離させ, 沈澱してくる菌体その他の夾雑物をなお含んでいる多糖類をメタノールで洗滌して CTA-Cl を除去する。次に沈澱を 10% 苛性ソーダ溶液 10 l に溶かし, 2.5% 酢酸第二銅水溶液 10 l を加え 30 min 攪拌する。

次にアセトンを等容量加えて蛋白と多糖類を分離させる。蛋白質は上澄に残り銅-多糖類複合体が沈澱するので, それを布で濾し取り, メタノール・3N 塩酸 (5:1) 中に少量づつ加え, 攪拌して沈澱物中の銅を溶解させ, さらに青色が沈澱物より消えるまでよくメタノール・塩酸で洗滌する⁵⁾。

得られた白色物質を 5 l の水に懸濁して 2N 苛性ソーダで pH 6.0 に補正し, Dowex-I と Dowex-50 により無機物を除き, 2 倍容のアセトンを加えて攪拌し, 白色繊維状多糖類の沈澱を得た。これを真空乾燥した精製標品は培養液 1 l に対して 3.3 g であった。Table 2 にその分離法を示す。

以上二種の分離精製法を比較検討した結果, 絶対収量は後者の方が良好であった。この事は Sevag 法²⁾は一般に損失が大きいとされていることと一致した。またこの多糖類は培養液中ではいわゆる糊状化に近い状態になっているが, 菌体を物理的に除去するだけでかなり培養液の粘度が低下することから, 菌体の莢膜(この場合は多糖類)が相互に接着していることにより, 外観上粘度を高かめていると考えられる。

Table 1. Procedure for preparation of purified polysaccharide (A).



3. 精製多糖類の物理・化学的および粘弾性的な性質

Sevag 法で精製した標品について物理・化学的性質の検討を行なった。粘弾性的な性質の検討には、今後中間工業的な規模でも実施可能なアルカリ銅法の方がより実的な試料を得られるので、この方法によった

ものを試料にした。

A. 物理・化学的性質 本品は純白色、無味、無臭の無定形物質で、水に溶けて粘稠な溶液を形成し、1%水溶液の pH は 5.5 である。その 0.1% 水溶液の相対粘度は 8.4、極限粘度(濃度 $c = \text{mg/ml}$) は 0.004 である。

Table 2. Procedure for preparation of purified polysaccharide (B).

Fermentation broth (48 l)	
	Add CTA-Cl (PB-40) 720 ml to broth.
Supernatant (discard)	
Polysaccharide CTA-Cl complex and bacterial cell	
	Suspend in 10 l NaCl 10% soln. and add 10 l MeOH (95%).
Supernatant CTA-Cl (discard)	
Crude polysaccharide and bacterial cell (wet 240 g)	
	Dissolve in 10 l NaOH 10% soln. Add 10 l cupric acetate 2.5% soln., then acetone 10 l (-5°C).
Supernatant Cu-protein or -nucleoprotein (discard)	
Cu-polysaccharide complex	
	Drop into 10 l MeOH·3N HCl mixture (5:1).
Supernatant Cu^{++} (discard)	
Cu-free polysaccharide and inorganic material	
	Add 5 l water, adjust pH to 6.0 with 2N NaOH. Treat with Dowex-I and Dowex-50.
Inorganic material	
	Add 10 l acetone.
Polysaccharide	
	Wash with acetone, dry <i>in vacuo</i> .
Purified polysaccharide (156g)	
Yield; 3.3g/l broth	

Lippich の偏光計により測定した比旋光度は $[\alpha]_D^{20} = 0$ (水, $c=0.5$) であり, この多糖類の結合様式は β 結合が優先していると思われる。

Staudinger の式から本物質の平均分子量を求めると約 300,000 であった。

本多糖類はメタノール, エタノール, イソプロピルアルコール, アセトン, エーテル, 醋酸:エーテル (1:1) 混液などの有機溶媒には溶けない。フェーリング・レーマン・ショール法により還元力を示さず, アンスロン試薬を発色せず, またヨード反応も陰性である。元素分析値は C: 37.2, H: 5.74, N: 0.54, 灰分: 12.0%, ハロゲンと S なし, であった。

本物質の IR スペクトルは糖重合体の性質を示す。Fig. 1 では 815 CM^{-1} 附近にわずかながら吸収がみられる, Barker ら⁶⁾ や二宮ら⁷⁾ によれば, 多糖類の IR

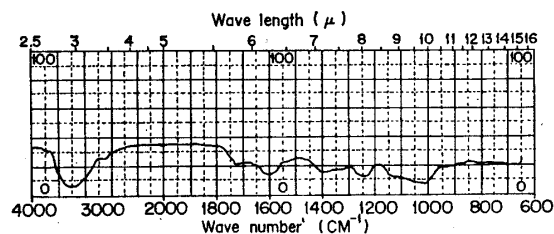


Fig. 1. IR spectrum of polysaccharide of strain F-573. (KBr)

スペクトルにはそれを構成する単糖分子間の結合様式が $700\sim 950\text{ CM}^{-1}$ 領域に現われ, 815 CM^{-1} 近辺に吸収を有する多糖類には必ずガラクトースが含まれているという。Fig. 1 のこの吸収は微弱ではあるが本多糖類がガラクトースを含むことを示している。

本物質の紫外部および可視部吸収スペクトルには何

ら特異的な吸収は見当たらなかった。

B. 精製多糖類の粘弾性 試料は前述のごとく CTA-Cl 法とアルカリ銅法の併用により分離精製したものである。多糖類で粘稠性の高いものには種々の用途が考えられるが、その基礎的データを得るために以下のような検討を行なった。

Fig. 2 は F-573 多糖類とアルギン酸ソーダ、ペクチン、コーンスターチなどのそれぞれの濃度の水溶液における粘性を比較検討したものである。粘度の測定は Emila の回転粘度計により 25°C で行ない、centipoise で表わした。この結果本菌の多糖類はアルギン酸ソーダに近い高度な粘稠性を示しており、いわゆる増粘剤あるいは粘結剤としての利用が考えられる。

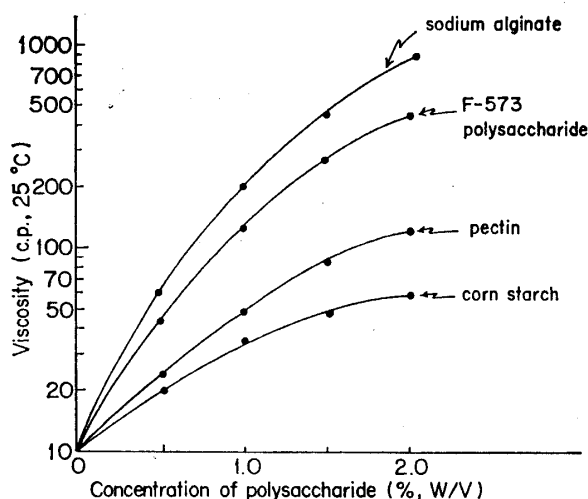


Fig. 2. Effect of concentration on viscosity of polysaccharides of strain F-573 and other kinds. Viscometry was carried out using "Emila" rotary viscometer.

次に温度の本多糖類水溶液の粘性におよぼす影響を種々の多糖類水溶液と共に比較した。測定は Emila 回転粘度計によった。Fig. 3 のように本多糖類の場合には CM セルローズ ナトリウム塩に比べて、温度上昇に伴う粘性降下がやや少ない。このことは細胞保護という役割から莢膜多糖類に共通する性質ではないかと考えられる。

塩類濃度の多糖類水溶液の粘性に与える影響をコーンスターチ水溶液へのそれと比較したものが Fig. 4 である。0.75% の F-573 多糖類溶液および 0.5% のコーンスターチ溶液に CaCl_2 または NaCl を各種濃度に添加し、Emila 回転粘度計で測定した。これらの塩類のいずれの濃度においても、両多糖類の粘性への影響はほとんどみられなかった。

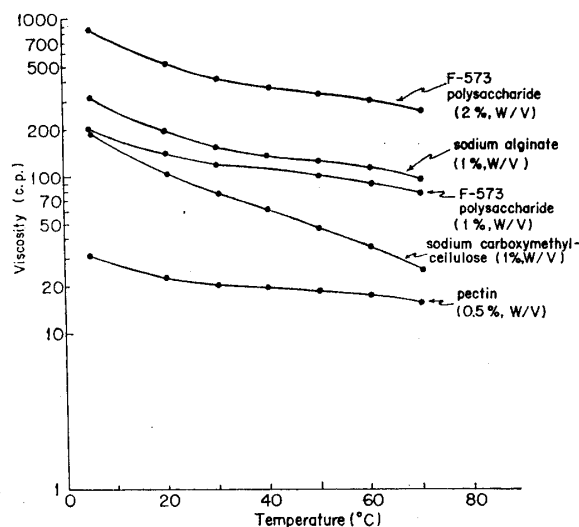


Fig. 3. Effect of temperature on viscosity of polysaccharides of strain F-573 and other kinds. Viscometry was carried out as Fig. 2.

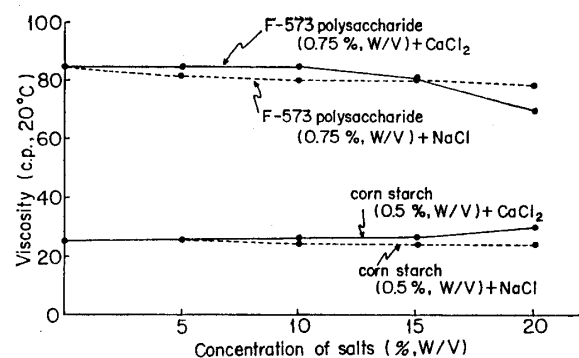


Fig. 4. Effect of salt concentration on viscosity of polysaccharide of strain F-573. Viscometry was carried out as Fig. 2.

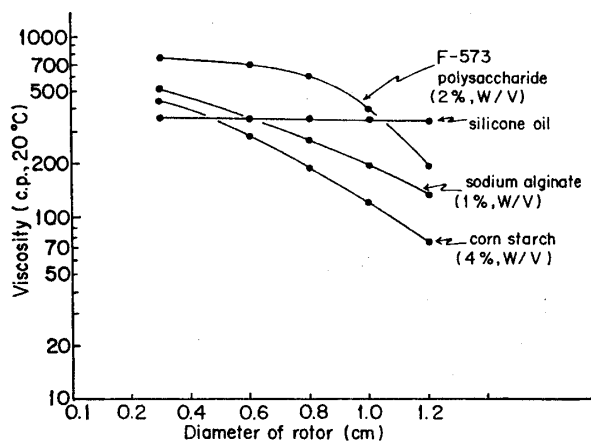


Fig. 5. Rheological characteristics of various polysaccharides with silicone oil as newtonian standard at 20°C.

Viscometry was carried out as Fig. 2.

この結果から本多糖類については耐塩性の増粘剤としての利用が考えられる。

次に Fig. 5 は F-573 多糖類の水溶液が newtonian flow と non newtonian flow のいずれの流動性を示すか、アルギン酸ソーダ、コーンスターチなどの水溶液と共に回転粘度計により検討したものである。標準 newton 性流体としては昭和石油の標準粘度溶液である silicone oil (500 c.p., 20°C) を用いたが、F-573 多糖類は 2% 水溶液で明らかに non newtonian flow の性質を示した。

4. 精製多糖類の基礎動物試験

A. 急性毒性試験

a. 経胃投与による場合 体重 20g のマウス 10 匹に対しマウス用胃ゾンデを用いて投与量 625 mg/kg で行なった。すなわち 25 mg/ml 水溶液を一匹当り 0.5 ml づつ投与したが (本検体は 25 mg/ml 以上の濃度では糊状となり投与困難である.), 何ら認むべき症状を呈さず, 72 hr 後も全く死亡例を認めなかった。

またマウスに 30 日間連続投与の場合 (1 日 1 回 100 mg/kg), 特異的な症状は全般に認められなかったが, 7 日目, 11 日目, 21 日目, 28 日目に 1 群 10 匹中 1 匹ずつ死亡した。

b. 静脈注射の場合 Table 3 のようになり死亡数が高まる。一般にこのような多糖類の示す毒性は, デキストラン硫酸や三崎ら⁹⁾の研究にみられるように高分子であるほど大きいといわれている。従って本多糖類を投与する場合には濃度あるいは分子量を適当に低下させることが必要と思われる。

B. 摘出腸管におよぼす作用 モルモット, ラットの摘出腸管で栄養液として Tyrode 液を用い, Magnus 法により検体の腸管におよぼす作用を試験した結果, 本多糖類の腸管への直接作用は全く認められなかった。

またヒスタミン, アセチルコリン, バリウムなどに対する拮抗作用も観察されなかった。

C. 抗原性試験 モルモットに対し実験方法 4 で述べたごとく注射を行ない, 注射直後より動物の状態を観察したが, 何らの反応も認められず, 抗原性を確認し得なかった。

D. 家兎血圧に対する作用 ウレタン麻酔をした家兎の耳静脈を用い, 検体を注射して血圧におよぼす作用を調べたが, ほとんど作用は認められなかった。

E. 鎮痛試験 マウスに対し Haffner 法により鎮痛作用について試験したが, 全くその作用がなかった。

以上の実験結果から薬理効果は確認出来なかったが, しかし静脈注射に対する毒性が強いことから, 今後そ

Table 3. Acute toxicity by intravenous injection of purified F-573 polysaccharide.

I. Mouse

Sample concentration (mg/ml)	Intravenous injection (mg/kg)	* Mortality
1	50	0/5
2	50	0/5
3	50	5/5
5	50	4/5
2	67	5/5
2	100	5/5
3	60	5/5

Mice: dd strain, ♂ ♀ mixture.

II. Rat

Sample concentration (mg/ml)	Intravenous injection (mg/kg)	* Mortality
2	50	0/4
2	80	2/4
2	100	4/4
5	50	0/4
5	75	2/4
5	100	4/4

Rats: Wister strain, ♂ ♀ mixture.

* $\frac{\text{number of dead animals}}{\text{number of animals tested}}$

の点を考慮して精製多糖類の鎖長を適当に切断して再度検討を試みる必要がある。

要 約

1. F-573 菌の ジャーファーメンター による 大量培養を実施し, 多量の粘質多糖類を培地中に生産せしめた。
2. その培養液より多糖類の分離精製法を検討した結果, 陽イオン界面活性剤 (第 4 級アンモニウム塩) とアルカリ銅法の併用による分離精製が, 収量もよく大量処理が容易であった。
3. 本多糖類の物理・化学的性質は特異的で, 粘弾性的な性質は粘稠性が高く, 温度や塩類の粘性に対する影響が少ないから, 増粘剤あるいは粘結剤としての用途が考えられる。
4. 精製標品について基礎動物試験を行なったが, 薬理活性および抗原性は確認されなかった。

本研究に種々のご援助, ご協力を頂いた名古屋大学農学部醸酵化学教室および株式会社三和化学研究所の皆様に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) 塩田, 金子, 土井: 本誌, **47**, 623 (1969).
- 2) 左右田, 江上: 多糖類化学, 298, 共立出版 (1955).
- 3) Meyer, K., Smith, E. M., Dawson, M. H.: *J. Biol. Chem.*, **128**, 319 (1939).
- 4) Albrecht, W. J., Rogovin, S. P., Griffin, E. L.: *Nature*, **194**, 1279 (1962).
- 5) 左右田, 江上: 多糖化学, 10, 共立出版 (1955).
- 6) Whistler R. L., Wolfrom, M. L.: *Method in Carbohydrate Chemistry*, **1**, 548, Academic Press (1965).
- 7) 二宮, 木崎, 花田: 農化, **42**, 431 (1968).
- 8) 三崎, 寺本: 本誌, **36**, 176 (1958).

(昭 44.4.25 受付)