

耐熱性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermofirincolus* n. Sp.

に就て

農學博士 板野新夫

荒川左千代

本研究は既に昭和四年七月より五年一月に亘つて日本農藝化學會誌に第一、二、三及び四報として發表したものであるが茲に纏めて轉載した。

第一報 形態及び培養的研究

(昭和四年十月發行 日本農藝化學會誌 第五卷第十冊 第六十一號發表)

緒言

纖維素の醱酵は自然界に於ける物質循環と極めて密接なる關係を有し之に關與する細菌類の研究は興味ある研究事項に屬する就中耐熱性纖維素醱酵菌の機能は常溫を好適として棲息するものに比しかの堆厩肥の醱酵に見る如く甚だ急激

耐熱性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermofirincolus* n. Sp. に就て

にして且顯著なものである。

耐熱性細菌類に關しては諸種の目的で Morrison 及び Turner,⁽¹⁾ Kröhn,⁽²⁾ Robertson,⁽³⁾ 及び Feiler,⁽⁴⁾ 諸氏の研究報告があるが殊に纖維素醱酵細菌に就き舉ぐれば次の通りである。

高温に於ける纖維素醱酵の現象は既に一八九九年 MacFayden 及び Blaxall⁽⁵⁾ 兩氏に依つて觀察された所であるが一九一二年に至つて Pringsheim^(6,7) 氏の纖維素醱酵産物の生化學的研究 Kroulik⁽⁸⁾ 氏の不純細菌の培養研究等が報告された然るに一九一三年に至つて Langwell 及び Lynn⁽⁹⁾ 兩氏は 65°C を最適としてバルブ（亞硫酸處理）を急激に醱酵し醋酸酪酸乳酸酒精及びメタン瓦斯炭酸瓦斯等を生成する一新種の分離に成功した本菌の興味ある點は扁平培養法にて得た聚落より肉汁寒天傾面培養に移植しても良好な發育を遂げ更に之を纖維素培養基に洗滌移植しても整規の醱酵を營むこと云ふにある今 38°C に於て Glucose agar に生育した細菌の特徴を示す第一表に記載する通である。

又 Khourine⁽¹⁰⁾ 女史は人糞より 35—51°C を適温とする嫌氣性菌 *Bac. Cellulosaе dissolvens* なる新種を特殊の方法で分離した本菌は醋酸少量の酪酸酒精及び炭酸瓦斯水素瓦斯等を生成し鞭毛を缺きグラム陰性であつて纖維素以外の炭水化物を攝取する作用を有しないものであつた。

一九二三年 Neuberg 及び Cohn⁽¹¹⁾ 兩氏は 53—55°C を適温とする多數の纖維素醱酵菌を分離し纖維素醱酵の中間産物として Acetaldehyde 及 Glucose, Cellulose 等の生成するところを證明した一九二四年 Viljoen, Fred 及び Peterson⁽¹²⁾ 諸氏は *Clostridium thermocellum* なる新種を分離した本菌は第一表記載の如き特徴を有して 68°C を好適とし Peptone を有機素源として攝取するものである又供試纖維素(wet pulp)を七〇—九五%醱酵しその醱酵量の五〇—五五%は醋

酸五—二五%は酒精少量の酪酸及炭酸瓦斯並に色素を生成するものである一九二八年 Woodman & Stewart⁽¹³⁾ 兩氏は無機懸蜜素(硫酸アムモニヤ)を窒素源とする新種を分離した本菌はヤー×10.0グラム陽性であつて蛋白質分解作用を行せず Cellulose 以外に Sucrose, Fructose, Glucose, Maltose, Arabinos, Mannite, Inuline, Dextrine 及び Glycerine 等をも醗酵し酸を形成するが瓦斯を發生しない且つ Lactose, Dulcitol, Salicine 等醗酵しないことを認めた又 Coolhaas⁽¹⁴⁾ 氏は 50—55°C を適温とする Bac. thermocellulolyticus なる新種を分離した。

以上略述した所は耐熱性纖維素醗酵菌に關する既往の業績であるが著者等も數年來次に示す如き一耐熱性纖維素分解菌を分離し之が形態培養並に生理學的研究を行ひ茲に新種に屬すべきものなることを確めたのでその結果を報告せんとするものである。

實 驗

一、培養基

本菌の分離並に培養に使用せし培養基は Viljoen, Fred 及び Peterson⁽¹²⁾ 諸氏の記載したものであつて次の如き成分を有するものである。

纖維素培養基成分			
磷酸アムモニヤ曹達	2.0%	炭 酸 石 灰	過剩
酸性磷酸加里	1.0	纖維素(濾紙)	15.0

耐熱性纖維素醗酵菌 *Bacillus thermophilicoides* n. sp. に就て

硫 酸 苦 土	0.3	水 道 水	1000.0c.c.
鹽 化 曹 達	0.1	反 應 (PH)	7.31
入	5.0		

備考 鹽化曹達及び硫酸苦土は 0.3g. の鹽化石灰にて代用し得

以下纖維素培養基とあるのは上記の培養基を意味するものである。

二、分離及び培養

上記の培養基は之を 100c.c. 宛 300c.c. の三角瓶に取り常法にて殺菌し置き有機物を多量に腐熟した庭土を約 10g 投入した而して之を 65°C. の恒温装置内に靜置する時は七一・二時間頃より溷濁を來し一八一・二時間に至るに培養基には氣泡を生じ漸次旺盛になつて來る三〇—三六時間を経るに遂に濾紙片は黃色を呈して液面に懸浮 (Heav) するに至るかくて極度の醗酵を終るに濾紙片は最早原形を留めず雲絮狀に化する五—七日を経れば殘餘の部分は下底に沈降して來るこの部分は寧ろ黃褐色になつてゐる。

本菌の分離は醗酵の旺盛なる四八時間培養のものを殺菌ビベットで 5c.c. 取り新培養基に移植して 65°C. に保温する操作を殆ど四八時間毎に繰り返さなく繰返し遂に顯微鏡下に於て純粹なるまで行つた尙扁平培養で聚落を形成せしめ其形狀を観察して純粹なるや否やを確めた本菌はかく培養を連續するに時に醗酵作用の衰頹するのを認めたがこの際は氣乾堆肥一に清水を五の割に加へオートクレーブで一・五封度壓一・五時間に亘つて浸出せしめた濾液を培養基に五—一〇%添加して菌株を移植するに容易に醗酵力を回復せしむることが出來た。

三、形態學的檢定

本菌の形態學的檢定は事6 American Bacteriologists 公定法⁽¹⁵⁾に従つた其結果は次の通りである。

1 細胞の形態：纖維素培養基に 65°C で二四時間培養した菌株を Indian ink にて染色し精査するのに繁殖形態は長桿狀を呈し兩端鈍圓孤立又は數個接するものがある大さは $3.0-7.5 \times 0.5 \mu$ で普通は $4.2 \times 0.5 \mu$ である(第一圖参照) 又莢膜 (Capsule) を Welch's Glacial acetic acid 染色法で處理するのに薄膜の存在を認めた。

2 胞子の形態：本菌は纖維素培養基に 65°C で培養するこ一週間後では胞子形成は僅少であるが之を濃粉肉汁寒天培養基に培養(65°C)する時は二四時間内に多數の胞子を形成する其胞子母細胞 (Sporangium) を Indian ink 染色法にて處理したものは長桿狀をなし大さ $3.0-4.0 \times 0.5 \mu$ 普通は $3.0 \times 0.5 \mu$ である(第一圖参照)胞子は Carbol-fuchsin の Methylene blue で重染しても單に Carbol-fuchsin を用ひても良く染色する位置は Terminal で形は Ellipsoid である而して其大さは $1.4-1.5 \times 0.3 \mu$ 普通は $1.5 \times 0.3 \mu$ である。

3 運動性：懸滴法で鏡檢すると纖維素培養基で 65°C に二四—四八時間培養したものは良く運動し Broth 又は Nutrient agar に 65°C で四八時間培養したものも同様なることを認めた鞭毛を Gray 氏法⁽¹⁶⁾で染色したが周邊毛 (Peritrichous) で一〇—一四個の周毛を認めた。

4 染色反應：Gram's stain は陽性で二—四日間培養 (65°C) には同様であるが七日間に至るに既に陰性となつた又 Carbol-fuchsin, Gentian violet で染色するに Leffler's methylen blue, Malachite green, Safranin, 及 Roseaniline で染色するより良く染色する。

四、培養上の検定

1 聚落: Nutrient agar 扁平培養 (65°C, 15 時間) の聚落は表面發生で中庸、形態は Circular 其表面は平滑全縁内部組織は鏡檢するに Finely granular をなし灰白色を呈し Flat に隆起する而して深部に生成した聚落は Irregular だ Punctiform, Filamentous の組織をなしてゐる。

2 液體培養: 纖維素培養基 (65°C, 24 時間) 灰白色の皮膜を生じ培養基は強度に潤濁を來して特有の臭氣を放つこの臭氣は鹽して醋酸の臭氣を放つに至る Flocculent の沈澱を生成し其量は多量である接種後七—十二時間にして氣泡を發生し始め二四時間頃より纖維素は漸次黃色を帶び氣泡の發生は愈々旺盛となつて三六時間頃より破壊され四八—六〇時間頃に至るに破壊した纖維素は上面に押上げられ所謂 Head を早するに至る (第二圖参照)

Nutrient broth (65°C, 24 時間): 灰白色の皮膜を生成し液は強度に潤濁を來し臭氣は甚だ強い Viscid on agitation なる沈澱を生ずるが併し微量である。

Glucose broth (65°C, 24 時間): 灰白色の薄膜を生成し潤濁弱く瓦斯は發生しない臭氣を有して沈澱は灰白色 Viscid on agitation で多量に生成する。

3 斜面培養: Nutrient agar (65°C, 24 時間): 發育は Moderate で形狀は Echinate, 表面に濕氣を持つ平滑で Flat の Elevation を呈する Optical は Opaque, Glistening 灰白色を帶びて臭氣を有するその Consistency は Butyriform, 培養基は色を生成しないが併し三日を経るに黃褐色を呈して來る尙凝結水は潤濁してゐる纖維素寒天培養基上のものも殆ど同様である。

4 Gelatin 培養: Gelatin には 20°C では發育しない故に之を 65°C に保温して試験した菌株を移植した培養基は二四時間後取出して冷水中に放置するに液化のまゝ最早固化しないけれども標準のものは再び固化する依つて本菌は Gelatin 液化性なることを認めた。

5 馬鈴薯培養: 65°C に二四時間培養したものは灰白色の濕潤な Glistening に發育するが馬鈴薯は數日後も變色しなかつた液は濁濁する。

五、生理學的檢定

本菌の生理學的作用の檢定は American Bacteriologists 公定法⁽¹⁵⁾ に従つて處理したその結果は次の通りである。

1 Indol 生成: 纖維素培養基又は Broth (65°C) に培養する時は二三日にして Indol 反應を認めた檢定法は Galkowski 氏法及び Gore 氏法を用ひた。

2 硫化水素生成: 纖維素培養基の綿栓挿入に際して醋酸鉛紙を密着して垂下し接種して 65°C に保温するに紙は一四時間にして黒輝色に變じて顯著なる H_2S の發生を示した尙 Broth に於ても同様な結果であつた。

3 Catalase 反應: 本菌が顯著なる Catalase 反應を呈する事は既報⁽¹⁷⁾ に於て詳述した通りである。

4 Acetyl methyl carbinol 生成: 纖維素培養基及び Glucose broth に 65°C 又は 37°C に保温し三日間後 Voges-Proskauer 檢定を試みたが陰性であつた比較の爲に *B. subtilis* 及び *B. mycoides* を供試し 30°C に三日間培養 (Glucose broth) したのに明かに陽性を呈した。

5 牛乳に對する反應: Brom cresol purple 牛乳培養 (65°) 二日にて輕酸性を呈し三日には酸性凝固瓦斯を發生し耐酸性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermoferaculus* n. sp. に就く

て Whey が Extrude 4.0—10.0 日に至る。Peptonization は認められなかつた Litmus milk を六時間にして還元し五日には赤色を呈し来る Methylene blue milk は四時間にして還元を初むる。

6 硝酸還元 : Nitrate broth, Nitrate nutrient agar, 及び硝酸纖維素培養基培養 (55°C) : 二四時間にして亜硝酸を生成する (Griess 反應檢定) 然し五日に至るも瓦斯は發生しない。

7 澱粉加水分解 : Starch agar を Plate して培養 (65°C) 二四時間にして強力なる作用を認めた檢定は沃度液法に依る Clear zone 生成について行つた。

8 炭水化物との關係 : Cellulose 以外に Hemicellulose, Starch, Raffinose, Salicine, Sucrose, Lactose, Maltose, Mannose, Galactose, Fructose, Glucose, Xylose, Arabinose 等をも醱酵する。

9 酸素との關係 : Buchner's 法で檢定するのに Facultative に屬せしめた方が適當の如く考へられる。

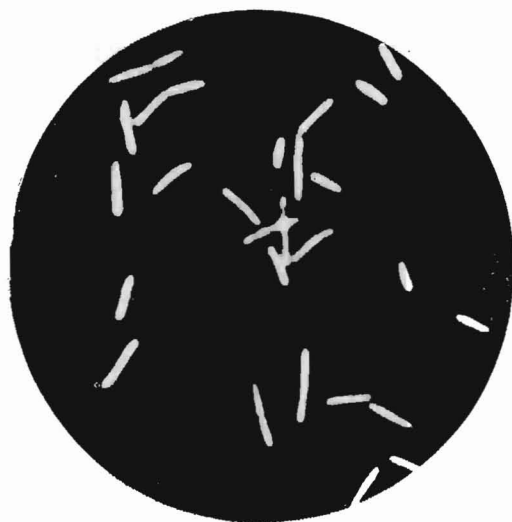
10 死滅温度 : 内徑 7mm. 厚 1mm. 位の硝子管に四八時間培養の菌株 (pH 7.0) を 1cc. 密封して恒温裝置を附した Oil bath (胡麻油) を使用して檢定したその結果 130—132°C で五分間までは生存する事を認めたが八分間に至れば既に死滅する事を知つた。尚 1cc. 中の細菌数は直接顯微鏡法で算定するに 1584 million 内外であつた。

五、類似菌に就て

最近報告せられた耐熱性纖維素醱酵菌に關して殊に本菌と類似すべきものと思惟するものを比較すれば第一表に示す通りである。

第一表 耐熱性纖維素醱酵菌の菌株比較表

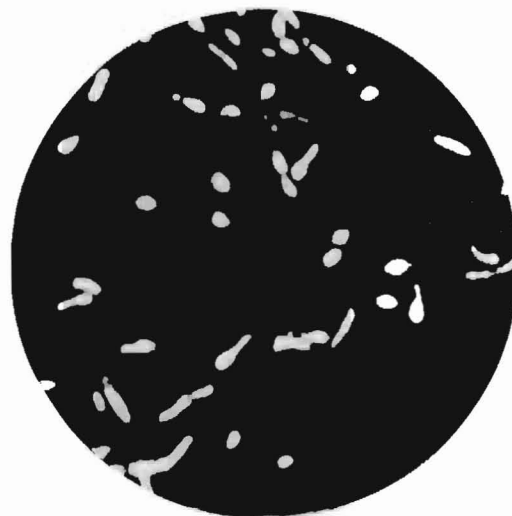
分 離 者	Langwell and Lymn	板 野 荒 川	Viljoen, Fred and Peterson
菌 名	—	Bac. thermofibrincolus	Cl. thermocellum
桿 状 の 大 さ (μ)	4.0×0.4	4.2×0.5	5.11×0.4
胞 子 の 大 さ (μ)	—	1.5×0.9	0.9×0.6
鞭 毛	無	周 毛 陽 性	周 毛 陰 性
グ ラ ム 染 色	陰 性	陽 性	陰 性
肉汁液及び葡萄酒肉汁液	發育—葡萄酒より瓦斯發生	發育—葡萄酒より酸生成瓦斯發生せず、薄膜、流動性の粘質比濃多量	發育—葡萄酒より瓦斯及び酸生成、輪狀皮膜沈澱
肉 汁 寒 天 斜 面	光輝性、濕潤牛酪樣狀	濕潤、半透明の光澤、牛酪樣狀	濕潤、光澤あり牛酪樣狀
肉 汁 寒 天 聚 落	上位、下位共に小形黃色、濕潤發育、馬鈴薯褐變ず	同 前	同 前 (濃粉肉汁寒天)
馬 鈴 薯	5日に酸性凝固精抽出瓦斯還元す	灰白色濕潤發育、馬鈴薯不變	黃色發育、馬鈴薯褐變ず
牛 乳	5日に酸性凝固精抽出瓦斯還元す	3日に酸性凝固精抽出瓦斯還元	3日に輕微酸性凝固乳精抽出瓦斯發生
イ ソ プ ー ル	—	陽 性	陰 性
カ タ ラ ー ゼ	—	陽 性	陽 性
メチロール、アセチロール、カビノール	—	陰 性	陰 性
窒 素 源 (好適)	—	アルブミン*	ペプトン



(1)

Bac. thermofibrincolus n. Sp. 繁殖細胞纖維素培養基に 24 時間培養 (65°C) Indian Ink 染色

× 1,500



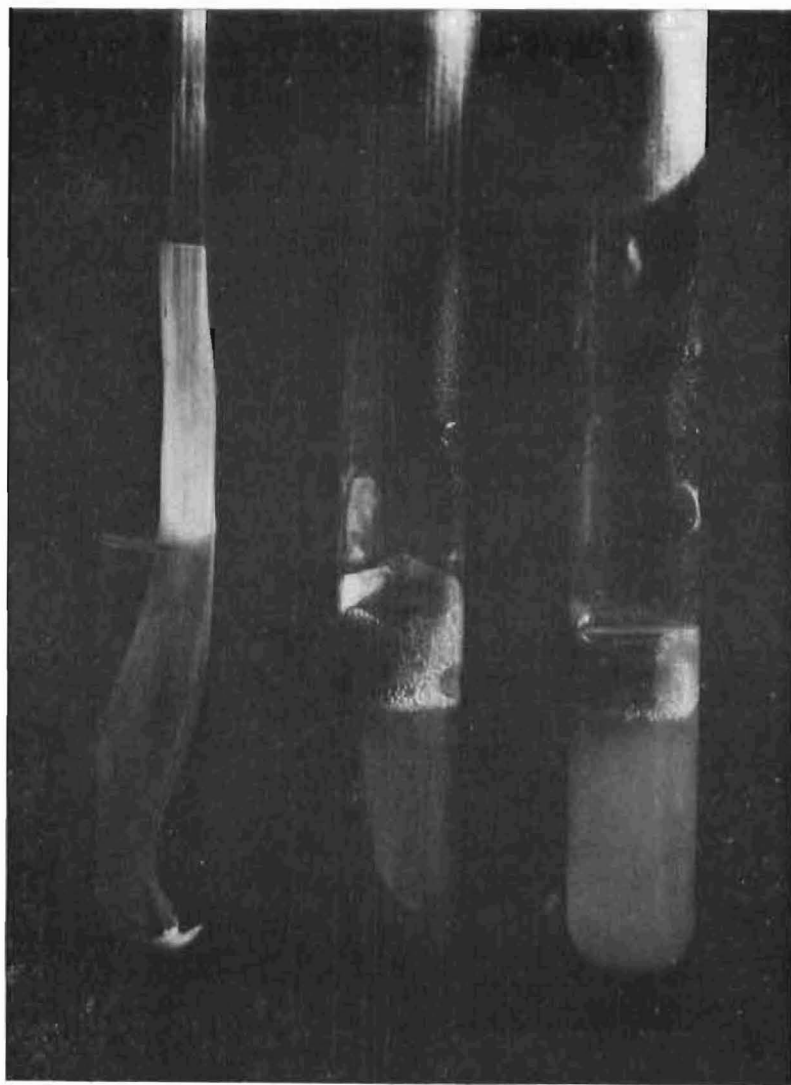
(2)

Bac. thermofibrincolus n. Sp. 孢子及孢子母細胞 Starch agar に 24 時間斜面培養 (65°C) Indian Ink 染色

× 1,500

Photo. Arakawa

第 二 圖



(1)

(2)

(3)

Bac. thermofibrincolus n. Sp. の纖維素醱酵状態

(1) 纖維素培養基(標準)

(2) 同上 48 時間培養 (65°C)

(3) 同上 72 時間培養 (65°C)

Photo. Arakawa

參考文獻

1. L. E. Morrison and F. W. Tanner: Bot. Gaz. **77**, 171 (1924) F. W. Tanner and L. E. Morrison: Jou. Bact. **7**, 343. (1922)
2. V. Kröhn: Ann. Acad. Sci. Finland, Ser. A. **21**, 1. (1924)
3. A. H. Robertson N. Y. (Geneva) Agri. Stat. Tech. Bull., No. 130—131, (1927)
4. W. A. Feiert: Soil. Sci., **23**, 47. (1927)
5. A. MacFayden and F. R. Maxall: Trans. Jenner Inst. of Prev. Med. Ser. **2**, 182. (1899)
- 6, 7. H. Pringsheim: Zeits. f. Phys. Chem., **78**, 266. Centbl. f. Bakt. Abt. II, **38**, 513. (1912)
8. A. Kroulik: Centbl. f. Bakt., Abt. II, **36**, 329. (1912—13)
9. H. Langwell and A. Lyman: Jou. Soc. of Chem. Ind. **42**, 280 T. (1923)
10. Y. Khourvine: Ann. de l'Inst. Pasteur, **37**, 711. (1923)
11. C. Neuberg and R. Cohn: Biochem. Zeitsch., **139**, 527. (1923)
12. J. A. Viljoen, E. B. Fred and W. H. Peterson: Jou. Agri. Sci., **16**, 1, (1926)
13. H. E. Woodman and J. Stewart: Jou. Agri. Sci., **18**, 713. (1928)
14. C. Coolhaas: Centbl. Bakt., Abt. II, Bd. **76**, 38. (1923)
15. Society of American Bacteriologists: Manual Methods for Pure Culture Study of Bacteria, (1923)
16. P. H. H. Gray Jou. Bact.: **12**, 273. (1926)
17. 板野、荒川: 日本農學化會誌 第三卷第三八號、一二二五頁、第三九號一四一六頁、昭和二年) 第四卷第四〇號三四頁 (昭和三年)

第二報 生理的研究

(昭和四年十一月發行 日本農藝化學會誌 第五卷第十一冊 第六十二號發表)

緒 言

著者等は前報⁽¹⁾に於て一耐性纖維素醱酵菌を分離し其形態並に培養試験を行ひ之を他と比較したるに新種に屬すべきものなることを認めたので之に *Bacillus thermofirnicolus* 命名した事を報告した本編は該菌の生理的作用に就きて行ひたる實驗結果で(一)纖維素醱酵ミ温度(二)纖維素醱酵ミ纖維素量(三)纖維素醱酵ミ窒素源(四)纖維素醱酵ミ水素イオン濃度(五)糖類醱酵等に關する事項を報告するものである。

實 驗

一、纖維素醱酵ミ温度ミの關係

所定の纖維素液體培養基⁽¹⁾に菌株を接種し之を 30°C, 38°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 65°C, 70°C, 72°C, 75°C, 80°C の諸温度に於て保温し培養基中の濾紙が正規の醱酵を遂げ得る日数を觀測したるに第一表の如き結果を得た。

第一表 纖維素醱酵と温度との關係

温度 (°C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	速度 ($\frac{1}{t}$)
33—40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.100
50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.260
55—70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.500
72	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.833
75—80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

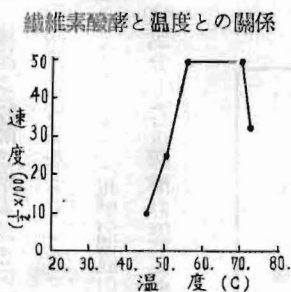
備考 — は醱酵せず + は醱酵 + 乾燥することを示した

第一表に明かなる如く本菌は 40°C 以下及び 75°C 以上では醱酵不能を示し 65°C を以つて最適温度とした今この關係を圖示すれば第一圖の通である。

二、纖維素醱酵と纖維素量との關係

所定の培養基を試験管に 20cc 宛注入し之に濾紙片を秤量して加へ 0.75% 1.50% 2.25% 3.00% 3.75% 4.50% 5.25% を含有する如くなし常法の如く菌株を接種して之を 65°C に保温しその醱酵状態を觀察した其の結果 1.50—2.25% の纖維素量の場合に最も良好にて他は殆ど同一であつた。

第一圖



耐熱性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermofirnicolus* n. sp. に就て

三、纖維素醱酵と窒素源との關係

所定の纖維素培養基より Peptone を除き之に他の窒素源として (Casein, Meat extract (市販品) Egg albumin (Merk 製) Manure extract (堆肥漏液の 10%液) 硫酸アムモニヤ及び硝酸曹達を各 0.5% 量加へ常法に従ひて調製した而して前同様處分した後醱酵状態を観察したのに第二表の如き結果を得た。

第二表 纖維素醱酵と窒素源との關係

窒 素 源	培 養 時 間			
	24 時 間	48 時 間	72 時 間	86 時 間
硝 酸 曹 達	—	—	—	培養基澄清
硫酸アムモニヤ	—	—	纖維素黄變瓦斯發生	纖維素崩壞
Casein	—	纖維素黄變瓦斯發生	纖維素崩壞	
Meat ext.	—	同 上	同 上	
Peptone	纖維素黄變瓦斯發生	纖維素崩壞	同 上	
Manure ext.	—	纖維素黄變瓦斯發生	纖維素崩壞	
Egg Albumin	纖維素崩壞			

第二表に明かな如く本菌は硝酸曹達を窒素源として利用せず還元して亞硝酸を生成すべきは前報⁽¹⁾記載の通である而して硫酸アムモニヤは窒素源となり得るがその醱酵は有機態窒素のそれに比較すると遅延する有機態窒素では Egg albumin が最も良好で接種後二四時間内に纖維素が崩壊する次いで Peptone であるが Casein, Meat extract, Manure

extract の効果は殆ど同等であつた。

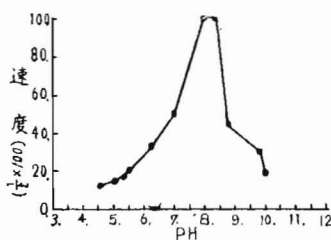
四、纖維素醱酵に水素イオン濃度との關係

所要の水素イオン濃度を有する培養基は豫め二倍濃度の培養基を用意し之に $N/10HCl$ 又は $N/10NaOH$ を夫々適量宛加へ殘量の水を加へて所定濃度の培養基を調製した其 P_H 價は Quinhydrone 法及び H_2 法に依つて測定し所定に従ひ常法に依つて接種し $65^{\circ}C$ に保温して纖維素の醱酵状態を観察したその結果は第三表及び第二圖に示す通である。

第三表 纖維素醱酵に水素イオン濃度との關係

起 始 性	終 期 性	纖維素崩壊		起 始 性	終 期 性	纖維素崩壊	
		所要日數	速 度 ($\frac{1}{t}$)			所要日數	速 度 ($\frac{1}{t}$)
P_H 3.40	—	(Header) 發育せず	—	P_H 7.96	P_H 6.21	1.0	1.000
4.20	—	發育せず	—	8.40	7.10	1.0	1.000
4.60	5.78	8.0	0.125	8.72	5.52	2.3	0.435
4.95	5.81	6.5	0.154	9.88	—	3.3	0.303
5.31	6.35	6.0	0.167	10.14	—	5.0	0.200
5.59	5.85	5.0	0.200	10.80	—	切断せず	—
6.25	5.78	3.0	0.333	11.09	—	發育せず	—
7.16	5.97	2.0	0.500	11.70	—	發育せず	—

第二圖

纖維素醱酵と水素イオン
濃度との關係

始性の酸度高きものは低く起始性のアルカリ性なるものは酸度高くなる傾向を示した。

五、糖類醱酵に関する事項

所定の纖維素培養基より纖維素を除き之に被験糖類を1%加へ更に炭酸石灰有無の二種の培養基を調製した培養基は30°C.入の三角瓶に100cc.宛調製して常法に依り菌株を接種し30°C.に五日間保温した。

醱酵糖類量は残量より算定したが測定法は Stiles, Peterson and Fred⁽³⁾ 法に依つた本法は還元糖の0.1~0.3mgを含有する試料に適用する微量定量法であつて殊に培養基中に於て被分解糖類の定量に案出されたものである尙本法の正確度に就ては既に著者(荒川)⁽⁴⁾の報告した所である。

其他同時に滴定酸度及び水素イオン濃度の變化を測定した結果は第四表に示す通である。

之に依つて見れば本菌の最適水素イオン濃度は $\text{pH} 7.96 \sim 8.40$ であつて $\text{pH} 7.16$ 及び $\text{pH} 8.72$ は之に次いでゐるこの關係を嘗て著者等の報告⁽²⁾した本菌の Catalase の最適水素イオン濃度 $\text{pH} 8.64$ と比較するに極めて近似し興味があると思はれる尙其醱酵能は酸性側で $\text{pH} 4.60$ アルカリ側で $\text{pH} 10.20$ を限界としアルカリ側で稍強き作用を示すが一定限度を経ると急に減少するこゝが知れる又本菌の發育限界 pH 價をみるに $\text{pH} 4.50$ 及び $\text{pH} 11.0$ 附近の様に考へられた尙培養後の pH 價は起

第四表 糖類醱酵と酸の生成

被験糖類	炭酸石灰を含有せぬ培養基			炭酸石灰を含有する培養基	
	Pr	Pr	醱酵量 (%)	0.1 N 鹽基滴定數 (c.c.)	醱酵量 (%)
起 始	終 期				
Xylose	7.04	5.19	33.7	22.5	100
Arabinose	7.11	5.74	41.4	19.0	100
Fructose	7.03	5.38	18.0	22.0	100
Glucose	7.16	5.64	24.1	18.5	100
Maltose	7.20	5.83	26.5	18.0	100
Sucrose	7.27	6.02	15.4	17.0	100
Galactose	7.11	6.08	48.5	16.0	95.2
Lactose	7.22	6.23	33.7	15.5	60.9

上表に明な如く本菌は Galactose 及び Lactose に對して特殊な性質を持つてゐる即ち炭酸石灰を含有せぬ培養基では被験糖類の殆ど半量を五日間に消費するに拘はらず其 pH 價並に滴定酸度は傾酸性的性質に弱い事を示し炭酸石灰を含有する培養基で殊に Lactose は其半量位をしか消費しないこの點は *Cl. thermocellum* の糖類醱酵⁽⁵⁾と極めて良く類似してゐる Peterson, Fred and Marten⁽⁶⁾等は該菌に就て更にこの現象を明かにし Lactose 及び Dextrin の如き Molecular complexity を有するものゝ醱酵は Cellulose に類似し他の Monosaccharides (Galactose を除く)の醱酵

耐熱性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermofibrinolus* n. Sp. に就て

は全く異り Cellulose の醱酵に認められない乳酸を多量に生成することを報告した本菌に就てもこの點は後報に於て述べる筈である。

尙炭酸石灰の含有せぬ培養基では新陳代謝産物として有機酸類が蓄積し本菌の活動を抑制する如く見ゆる又炭酸石灰を含有せぬ場合は培養基は瓦斯を發生しないが含有する時は瓦斯を發生する。

次に本菌を Sugar broth に培養して培養期間内に於ける P_H 價の變化を觀察した培養基は之を American Bacteriologists の標準法 (1) に 1% の Sugar broth として所定の方法で菌株を接種し 65°C の保温器に藏め二日間置き、その水素イオン濃度を Quinhydrone 法で測定したその結果を示せば第五表の通である。

第五表 Sugar broth 中の P_H 價の變化

炭水化物	培 養 日 數									
	起 始	2	4	6	8	10	12	15	17	19
Xylose	P_H 6.56	P_H 5.47	P_H 4.83	P_H 4.51	P_H 4.57	P_H 4.34	P_H 4.20	P_H 4.13	P_H 4.15	P_H 4.06
Arabinose	6.58	5.21	4.65	4.37	4.46	4.31	4.18	4.15	4.08	3.96
Rhamnose	6.77	6.66	6.44	6.09	6.04	5.61	5.43	5.12	5.07	4.93
Glucose	6.75	4.98	4.81	4.67	4.67	4.63	4.55	4.48	4.44	4.41
Galactose	6.89	6.77	7.15	7.18	7.22	8.14	8.31	7.95	7.91	7.06
Mannose	6.96	5.17	5.10	5.02	4.88	4.84	4.67	4.51	4.48	4.48
Fructose	7.03	5.55	4.95	4.96	4.98	4.91	4.88	4.80	4.77	4.47

Sucrose	6.99	6.92	6.68	6.63	6.59	5.59	6.55	6.45	6.39	6.73
Naltose	6.78	4.89	4.88	4.86	4.84	4.83	4.81	4.79	4.84	4.98
Lactose	6.99	6.78	6.65	6.65	6.63	6.61	6.78	7.81	7.51	7.43
Raffinose	7.03	6.82	6.80	6.77	6.58	6.47	5.64	4.95	5.02	5.02
Starch	6.94	6.82	6.57	6.78	4.53	4.44	4.39	4.38	4.37	4.31
Dextrin	6.94	6.45	6.43	6.12	6.97	5.88	5.00	4.98	4.95	5.02
Mannite	7.04	6.83	6.74	6.21	6.21	6.21	6.13	6.15	6.23	7.23
Glycerol	7.03	6.85	6.82	6.87	6.96	6.97	6.91	6.82	6.68	6.68
Salicin	6.87	5.39	5.31	5.31	5.45	5.43	5.43	5.42	5.41	5.41

今此結果を見るに Galactose, Sucrose, Lactose, Mannite, Glycerol 等は P_H 價の變化が少なく殊に Galactose に於ては傾アルカリ性が著しく現はれてゐて前項の成績に一致する其他の糖類では Xylose, Arabinose, Rhamnose, Glucose Mannose, Fructose, Maltose, Starch, Dextrin 等は P_H 價の變化が顯著である就中 Starch, Dextrin 等は其構成に起因するものと思はるるが培養後一週間を経過した頃に P_H 價の變化が顯著に起つてゐることを示した。

總 括

本報に於て記載したる所を總括すれば次の通である。

耐熱性纖維素菌 *Bacillus thermophilus* n. sp. に就て

一、本菌の纖維素醱酵に好適する温度は 65°C であつて $30-40^{\circ}\text{C}$ に於ては一〇日間培養しても醱酵を起さず發育も殆どない又 $75-80^{\circ}\text{C}$ に於ても輕微なる發育は認むるけれども醱酵を起さない。

二、本菌は培養基中に於て醱酵に好適する纖維素量は $1.50-2.25\%$ の時である。

三、本菌の窒素源としては *Pentone* よりも *Egg albumin* の方が好適の如く見ゆる尚硫酸アムモニヤは窒素源となり得るが硝酸曹達はなり得ない。

四、本菌の纖維素醱酵に好適な水素イオン濃度は $\text{pH } 8.0-8.4$ であつてその限界 pH 價は酸性側で $\text{pH } 4.6$ アルカリ側で $\text{pH } 10.2$ である尚本菌の發育限界 pH 價は $\text{pH } 4.5$ 及び 11.0 附近の様に考へられる。

五、本菌は糖類を醱酵するに際して有機酸を多量に生成するので炭酸石灰の含有せぬ培養基では 65°C に五日間保温しても其半量(但し 1% の場合)を消費し得ないが炭酸石灰の存在する時は其全量を消費し且つこの場合は瓦斯を發生する。

併し乍ら *Galactose* 及 *Lactose* の醱酵は全く特殊で有機酸の生成量も少なく炭酸石灰の存在する時も *Lactose* はその $6-1\%$ をしか消費しない。

又 *Sugar broth* (1%) を以つて一六種の糖類其他の含炭素質物を供試し培養中の水素イオン濃度の變化を觀察するに (*Galactose*, *Sucrose*, *Lactose*, *Mannite*, *Glycerol* 等では pH 價の變化少なく *Galactose* に至つては傾アルカリ性を著るしく示した *Xylose*, *Arabinose*, *Rhamnose*, *Glucose*, *Mannose*, *Fructose*, *Maltose*, *Starch*, *Dextrin* 等は pH 價の變化が顯著であつて *Starch*, *Dextrin* 等は一週間後に於て現れるのを見た。

引用文献

1. 板野、荒川：日本農藝化學會誌 第五卷第六〇號 昭和四年
2. 板野、荒川：同上 第四卷第四〇號 三四頁 昭和三年
3. H. R. Stiles, W. H. Peterson and E. B. Fred: *Jou. Bact.* **12**, 427, 1926.
4. 荒川：鳥取農學會誌 第一卷第三號 二八五頁 昭和三年
5. J. A. Viljoen, E. B. Fred and W. H. Peterson: *Jou. Agri. Soc.* **15**, 1, 1926.
6. W. H. Peterson, E. B. Fred and E. A. Marten: *Biol. Chem.* **70**, 309, 1929.
7. Soc. American Bacteriologists, *Manual Methods for Pure Culture Study of Bacteria*, 1923.

第三報 揮發酸及びアルコールの生成に及ぼす條件

緒言

一般耐熱性纖維素醱酵菌の醱酵生産物は第一報⁽¹⁾に於て記載した如く蟻酸、醋酸、酪酸、乳酸及び酒精並に水素瓦斯、炭酸瓦斯及びメタン瓦斯等を以つて主なものとした然共之等有機酸の種類生産量等は培養の條件に依つて支配を受けるのみならず細菌の種類に依つて相違するところは明かである。

耐熱性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermophilus* n. sp. に就て

Cl. thermocellum⁽²⁾ に就て之を見るに本菌は醋酸、酪酸及び痕跡の乳酸並に酒精、炭酸瓦斯、水素瓦斯を生成する而して醋酸の生成には Peptone, Yeast water 等が好適の有機窒素源として攝取されその Peptone 量に就て見れば添加無きものは僅少であり一%のものは最大となる又纖維素量は含有の少量多の時に良好であつた酒精の生成に對する容量及び表面の影響では大型の容器内で醱酵する時は小型容器内の醱酵生成量の倍数にあたる云ふ又培養日數の影響をみるに酒精は三日目醋酸は三—四日目に最大量に達するが酒精は醋酸と異つて時日と共に減量して來る事が報告された凡そかく定量的研究されたものは殆どないので茲に *Bac. thermofirineolus* を供試して揮發酸及びアルコールの生成に及ぼす影響を研究した而してこの揮發酸及びアルコールの生成に關しては續報に於て定性的に檢定して報告する筈であるが目下殆ど醋酸と酒精と見做されてゐるのであるけれ共此處に於ては單に總稱的にかく名付けて用ゆる事とした。

實 驗

培養方法

培養基は次の如き成分を有するものを用ひ常法に従つて殺菌した。

纖維素	2.0g.	炭 灰	過 剩
酸性燐酸加里	1.0	纖維素(濾紙)	15.0
硫酸苦土	0.3	水	1000.0cc.
鹽 化 鈣	0.1	ア ン ト ン	5.0

培養は大型試験管法に依つた大型試験管は 20×120 mm. の大々がある之に上記の培養基を 20 c.c. 宛注射し更に 15×120 mm. の短冊型に切つた濾紙を二枚入れるその量は約 0.30 g. ある接種量は新鮮な菌株を1%の割に接種し 65°C. に保温したこの定温装置はフリースのものを用ひてゐる培養中は随時容器を振盪して沈澱してゐる炭酸石灰を攪拌せしめ傾酸性の培養基を中和せしむるを要す以下特に記載なき時はこの方法にて培養したものを示す。

分析方法

所定の培養後取出して培養基を起始容量に補正し遠心分離して炭酸石灰、纖維素殘物等を沈降せしめた溶液部に就きて下記の方法を用ひて分析した。

揮發酸——Fiedl, Peterson and Davenport⁽³⁾ 氏法を用ひた被驗液 20 c.c. を小型の長頸フラスコに取り之に 20 c.c. の酸性磷酸曹達及び 15 c.c. の八五%磷酸(メルク製)を加へ内容が常に一定量なる様に蒸溜水を滴加しつゝ蒸溜し蒸溜液が最早青色リトマス紙に對して酸性を呈せざるに至るまで (200—250 c.c.) 繼續した而してこの蒸溜液は Phenolphthalein を指示藥として N/10NaOH にて定量し之より醋酸を見做して算定した。

アルコール——Dox and Lamb⁽⁴⁾ 氏法に従つて定量した被驗液は豫め培養基 100 c.c. を取り食鹽を飽和して蒸溜し得た澄明液 (80—100 c.c.) に就て次の如く處理した揮發酸の時に準じ長頸フラスコに被驗液を酸化劑として重クロム酸加里 10 g. 濃硫酸 20 g. を注射し更に Bumping 及び Foaming を防止する爲に Glass bead を二個入れて内容を恒量に保ちつゝ蒸溜し最後の一定蒸溜液が Phenolphthalein を指示藥とし N/10NaOH で滴定した場合 0.5 c.c. 以内に至つた時まで繼續した後計算した尙之等の方法は純粹品に就て標準を査定して置いた。

纖維素酸酵量——温塩酸酒精にて残存纖維素を處理し炭酸石灰、細胞質物、色素等を溶解し豫め秤量した乾燥濾紙に受け塩素の反應なきまで温水、冷水、酒精、エーテル等にて精洗した後恒量になるまで乾燥し起始重量より減じ其差を以つて酸酵量とした。

成 績

一、培養基の容量の變化

65°C の高温で定温装置内に培養するので培養基は著るしく減量を來す Viljoen, Fred and Peterson⁽²⁾ 氏等は lin. coil を以つて培養フラスコを覆ひその蒸發を防止したが本菌の場合は單に棉栓にのみにごめて置いた大型試験管の時の減量を示すに第一表の通りなる。

第一表 培養基の容量の變化

培 養 日 數	容 量 c.c.	減 量 c.c.	一 日 平 均 減 量 c.c.
0	100.0	—	—
1	91.0	9.0	9.0
3	76.0	24.0	8.0
7	54.5	45.5	6.5

備考 五本瓶の平均數より算定した

此等の著しき蒸發を防止するには二重管培養に依るを要する内容 120 c.c. 入の特殊試験管に底部に少量の棉片を置き

水を 30 c.c. 位加へたものゝ内に細菌を接種した大型試験管を挿入して小孔を穿つたコルク栓をする時は 35° に於て四―五日の培養にも可なり蒸發を防止し得る。

二、培養方法の影響

培養基に加へる濾紙を細片とした時短冊型の儘用ひた時及び 30 c.c. のエルレンマイヤー・フラスコ或は試験管で培養したもの並に濾紙の外に α -Cellulose (八九%) を用ひた場合を試験したその成績は第二表の通である。

第二表 揮發酸アルコールの生成及び纖維素醱酵量に及ぼす培養法の影響 (100 c.c.)

處	理	培 日 数	纖維素醱酵量			揮發酸(醋酸)		アルコール(酒精)	
			起始量 g.	醱酵量 g.	%	mg.	%	mg.	%
濾紙細片	フラスコ	8—12	3.00	1.80	60.00	593.13	32.95	165.80	9.21
濾紙懸垂	フラスコ	6—7	3.47	2.73	78.90	637.63	23.36	84.70	3.10
α -Cellulose	フラスコ	3—7	1.83	1.30	79.75	436.10	23.54	140.30	10.79
濾紙短冊型		3—7	1.51	1.22	80.79	309.00	25.33	58.50	4.80

試験管

斯の如く培養するに當つて濾紙は細片として沈澱せしむるよりも寧ろ短冊型のものを懸垂するか又試験管法(第一報第二圖参照)に依る方が良く醱酵する其生成物の成績に就て見るのに纖維素醱酵量は試験管法に於て多きに拘はらず醱

酵生成物は又つてフラスコ法に於て多量に收得することが出来た。

三、培養温度の影響

培養温度の影響に就ては第二報⁽⁵⁾に報告したが此處には更に醱酵生成物に對する關係を定量的に測定した第三表に示す通りの成績を得た。

第三表 揮發酸アルコールの生成量及び纖維素醱酵量に及ぼす培養温度の影響 (100 c.c.)

培養温度 (C)	培 育 日 数	纖 維 素 醱 酵 量		揮 發 酸 (醋酸)		ア ル コ ー ル (酒精)	
		mg.	%	mg.	%	mg.	%
65	4	1.2906	86.52	319.50	24.76	124.43	9.64
50	10	0.8192	54.28	274.50	33.51	98.75	12.05

備考 起始纖維素量は 1.5092 g. であつた

既報⁽⁵⁾の通り本菌の作用は 38.0° に於て旺盛であつて 50.0° では二・五倍の培養日數に至つても纖維素の醱酵量は少ない然しその醱酵生成物の生成量は 50.0° の時が反つて多いこれは細菌に依つて更に消費さるゝ事及び蒸發に起因する所であると思ふ。

四、酸素の影響

第一報⁽¹⁾に記載した通り本菌は Facultative に屬してゐるがその場合に於ける醱酵生成物の生成量に就て測定した

常法二重管法及び Buchner's 氏嫌氣培養法の三種で培養を行ひ 65°C に四日間保温したのに第四表の如き成績であつた

第四表 揮發酸アルコールの生成量及び纖維素の
醗酵量に及ぼす酸素の影響 (100 c.c.)

培 養 狀 態	纖 維 素 醗 酵 量		揮 發 酸 (醋酸)		ア ル コ ー ル (酒精)	
	g.	%	mg.	%	mg.	%
試 験 管 法	1.3298	88.08	282.00	21.21	171.82	12.90
二 重 管 法	1.3200	87.46	273.60	20.73	228.35	17.30
Buchner's 嫌氣法	1.1118	73.67	229.0	20.63	312.51	28.11

備考 起始纖維素量は 1.5082g. であつた

培養狀態に就て見るに好氣的培養の方が纖維素の醗酵量が多いが然し揮發酸の生成量には殆ど差違がない然共アルコールの生成量は Buchner's 嫌氣的培養に依る時は好氣的培養の二倍量に達する生成を見た。

五、ペプトン量の影響

ペプトンを有機態窒素源としてその供給量を〇—二％に種々變化し纖維素醗酵生成物に對する影響を定量した培養溫度は 65°C で四日間培養したその成績は第五表に示す通である。

第五表 揮發酸の生成及び纖維素醗酵量に及ぼす

ペプトン量の影響 (100 c.c.)

耐熱性纖維素醗酵菌 *Bacillus thermophilocolas* n. Sp. に就て

ペプトン量 (%)	纖維素醱酵量		揮發酸	
	g.	%	mg.	(醋酸) %
0.00	0.6830	45.45	78.00	11.52
0.25	1.2450	82.49	2377.0	10.08
0.50	1.2760	84.55	345.67	27.08
1.00	0.3705	24.54	200.70	54.17
2.00	0.2337	15.62	129.60	54.99

備考 起始纖維素量は 1.50% であつた

ペプトン量の 〇・五%の時に纖維素醱酵量に最適の濃度であつて一%に至れば既に醱酵は抑制される事が知れる尚ペプトンを添加せぬ時も殆ど半量の纖維素が醱酵したが之に接種量として一%の菌株を接種したものが更に攝取されしにはあらざるかとも思はれる。

かくペプトン量は多量の時よりも少量の方が纖維素の醱酵には好適であるが揮發酸の生成量はペプトン量に殆ど正比例して増加する事が知れた。

六、纖維素量の影響

第二報⁵⁾に記載した所を定量的に測定してその醱酵生成物に及ぼす影響を研究した纖維素は 〇・七五—一・一五%を變化して供給し 65°C に四日間保温して分析した第六表に示す通の成績を得た。

第六表 揮發酸アルコールの生成量及び纖維素の醗酵量に及ぼす起始纖維素量の影響 (100 c.c.)

起始纖維素量 (%)	纖維素醗酵量		揮發酸 (醋酸)		アルコール (酒精)	
	g.	%	mg.	%	mg.	%
0.75	0.6694	88.71	190.50	28.45	38.09	5.54
1.50	1.1272	74.69	336.00	29.81	52.34	4.64
2.2)	1.7418	76.94	420.80	24.16	132.68	10.55
3.75	1.8404	49.02	487.50	26.36	174.05	9.41
5.15	2.1012	40.55	457.50	21.77	152.03	7.24

纖維素の醗酵量は〇・七五—二・二〇%の如く少量の時に良好であり揮發酸の生成量も殆ど同様の傾向があるがアルコールは寧ろ二・二〇—五・二五%の如く多量の含有の時に多い様に考へられた。

七、窒素源の影響

第二報⁽⁵⁾に於て定性的に報告した所を更に定量的に分析し醗酵生成物の生成量の關係を研究した肉汁エキス (Liebig's) 卵白アルブミン (Merk) (ヤブヤン) (Witte) Casein (Merk) 硫酸アンモニヤ (Merk) 等を各〇・五%の割合にて培養基に加へ之に菌株を接種して 65°C に五日間培養して供試したのに第七表に示す通の成績を得た。

第七表 揮發酸アルコールの生成量及び纖維素の醗酵量に及ぼす窒素源の影響 (100 c.c.)

窒 素 源	纖 維 素 醱 量		揮 發 酸 (醋酸)		ア ル コ ー ル (酒精)	
	g.	%	mg.	%	mg.	%
肉汁エキス	0.7587	50.27	292.83	38.53	57.25	7.81
卵白アルブミン	1.1385	75.14	319.03	28.02	67.15	5.90
ペプトン	1.3478	89.31	310.50	23.04	90.85	6.74
カゼイン	1.1291	74.81	204.00	18.07	60.35	5.34
硫酸アムモニヤ	0.8133	53.89	171.60	21.10	7.20	0.89

備考 粗蛋白質は 1.5092 g. であつた

纖維素醱量に對する好窒素源はペプトンで八五・三二%を示し卵白アルブミン、カゼインは之に次いで各七五%であつた揮發酸の生成量に對する好窒素源は肉汁エキスで二五・五三%卵白アルブミンは之に次で二八・〇二%であつたアルコール生成量に對する好窒素源は肉汁エキスの七・七四%ペプトンの六・七四%は之に次ぐものであつた硫酸アムモニヤの窒素源としては相當の效果を見たがアルコールの生成には殆ど無効の如く考へられた。

八、培養日数の影響

培養日数の影響に關しては殊に炭酸石灰を培養基に加へしものと加へないものとを調製し之に常法に依りて接種し65°Cに保温して分析したその結果は第八表並に第一圖及び第二圖に示す通である。

第八表 揮發酸アルコールの生成量及び纖維素醱量に及ぼす培養日数の影響 (100 c.c.)

培養日数に及ぼす培養日数の影響 (100 c.c.)

培養日数 名稱	試 験 前		第 一 日		第 三 日		第 七 日	
	含炭酸灰	無炭酸灰	含炭酸灰	無炭酸灰	含炭酸灰	無炭酸灰	含炭酸灰	無炭酸灰
滴定酸度(c.c.) Pr	6.0 7.68	10.5 6.98	8.0 7.34	10.8 7.00	4.0 7.36	13.0 6.33	3.8 7.34	22.5 6.09
揮發酸(醋酸) mg.	0.00 (0.00%)	0.00 (0.00%)	21.00 (26.32%)	19.50 (38.77%)	310.50 (32.02%)	61.80 (12.84%)	305.07 (23.00%)	102.00 (14.77%)
アルコール (酒精) mg.	0.00 (0.00%)	0.00 (0.00%)	2.50 (3.13%)	2.50 (4.97%)	59.25 (6.11%)	12.50 (2.60%)	25.00 (1.88%)	23.00 (3.33%)
纖維素酸酐量 (g.)	0.00 (0.00%)	0.00 (0.00%)	0.0738 (5.29%)	0.0503 (3.33%)	0.9698 (64.26%)	0.4812 (31.88%)	1.3306 (88.17%)	0.6906 (45.76%)

備考 數字は 10 c.c. 中のものを示し滴定濃度は N/10 NaOH の所定量培養温度は 65°C とした尚 Pr 價はキヤンヒ
 ドロン法で測定した

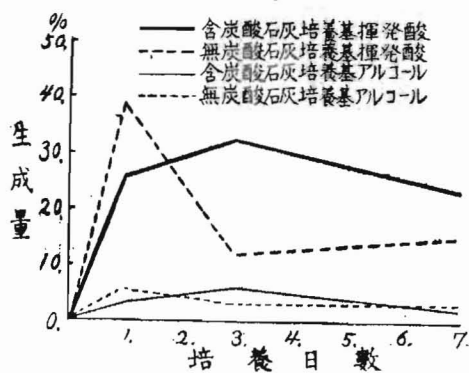
上記の成績を見るのに第一日に於て揮發酸が約 20 mg. 生成されたこれは含炭酸石灰培養基では醱酵纖維素の二六・三
 二%無炭酸石灰培養基の三八・七七%に相當した第三日に至るゝ夫々全揮發酸量は増加するが含炭酸石灰培養基では三
 二・〇二%無炭酸石灰培養基で二一・八四%となる第七日に至るゝ含炭酸石灰培養基は二三%に減少し培養基は一四・七
 七%となつて稍々増加する而してアルコール生成量も亦同様な傾向のものに生成してゐる次に纖維素醱酵量を見るのに
 含炭酸石灰培養基では第一日に五・三%の醱酵が第三日には六四・三%に急激に増加し第七日には八八・二%に達する無
 炭酸石灰培養基では第一日が三・三%第三日が三一・九%第七日が四五・八%となつて前者と同じ傾向のものにはあ

耐熱性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermophilus* n. sp. に就て

るが其醱酵量は約半量にしか過ぎない此等の關係は醱酵生成物が培養基中に堆積して細菌の活動を抑制する故であらうと思ふ即ち本培養基は相當の緩衝力が存在するに拘はらず第七日には pH 6.1 に變化を示し石灰の存在では中和して

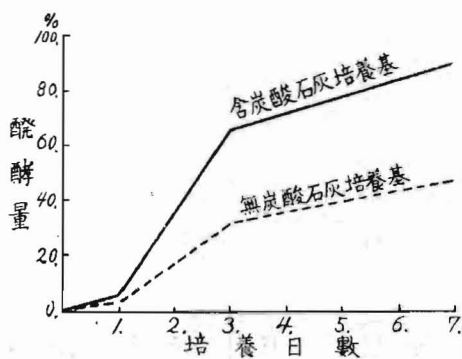
第一圖

揮發酸及びアルコール生成に及ぼす培養日數の影響



第二圖

纖維素の醱酵量に及ぼす培養日數の影響



pH 7.3 に保持してゐる點よりも推定し得る尙いの點より (Sanborn) (6) 氏の云へる如く纖維素醱酵中の培養基の pH 價を知るゝ本菌の生理的作用を推定する事が出来る。

總 括

本研究は *Bac. the-mofibrincolus* を纖維素培養基に接種し 65°C に保温し置きその生成する揮發酸アルコール及び纖維素醱酵量に及ぼす條件に就きて定量的に分析したものであつて今之等の成績を總括すれば凡そ次の通となる。

一、試験管法で 65°C に本菌を培養して置く培養基は七日間に四五・五%の蒸發をするけれ共之を二重管培養に依るを稍防止する事が出来る。

二、培養方法の影響を見るのに試験管法に依る纖維素醱酵量が多いが揮發酸アルコールの生成量は反つてフラスコ培養法が多い尙概括するに本菌は 65°C に於て纖維素を一・五—三・〇%供給する時は其六〇—八八%を三—七日間に醱酵してその醱酵量の二四—三三%に相當する揮發酸(醋酸として)及び三—一二%のアルコール(酒精として)を生成する。

三、培養温度の影響を見るのに 65°C が好適で 50°C ではその二倍の培養日數を経ても纖維素醱酵量は前者の六三%にしか達しない然共生成物の量は寧ろ高い割合を示した。

四、酸素の影響をみるのに *lechner's* 嫌氣培養法に依るに好氣的に常法又は二重管法で培養した時に比較して纖維素醱酵量は少ないが揮發酸の生成量は等しくアルコールの生成量は約二倍に達した。

五、ペプトン量の影響を知る爲めに〇—二%を種々供給したのに纖維素醱酵量は〇・五%の時が好適であつて一般にその含量の少ない場合が良好であつた併し揮發酸の生成はペプトン含有量に比例して増加した。

六、纖維素量の影響を知るために〇・七九—五・一五%の割合に含量を変化して供試したが醱酵量は〇・七五—二・二〇%の時に好適し揮發酸も之に等しき傾向を呈したがアルコール生成量は寧ろ含量の多い場合に高い生成を見た。

七、窒素源の影響は纖維素醱酵量に對してベプトンV卵白アルブミンVカゼインV硫酸アムモニヤV肉汁エキス、揮發酸の生成には肉汁エキスV卵白アルブミンVベプトンVカゼインV硫酸アムモニヤ、アルコール生成には肉汁エキスVベプトンV卵白アルブミンVカゼインV硫酸アムモニヤの如き順序となつた殊に有機態窒素はアルコールの生成に對して必須の如く見えた。

八、培養日數の影響は殊に炭酸石灰を含有する培養基に於て二種に就て分析したが第三日に於て殆ど纖維素の過半量が醱酵され第七日には八八%にも達した又揮發酸アルコールの生成も同様にこの日に最大に達した然共無炭酸石灰培養基では殆どその活動力は半減し能力は大いに抑制されたこの點についてpH價をみるに前者に比較して大いに減じて其生理的作用の標準となり得る事が知れた。

本研究に使用せし *D. Cellulose* は京都帝國大學理學部小松茂博士の御厚意に依つたものである記して深甚なる謝意を表する。

文 献

1. 板野、荒川 日本農藝化學會誌 第五卷第六十一號 第八百十六頁 (昭和四年)
2. J. A. Viljoen, E. B. Fred and W. H. Peterson: Jour. Agri. Sci., 16, 1 (1926)

3. E. R. Frel, W. H. Peterson and A. Davenport : *Jou. Biol. Chem.*, **39**, 347, (1919)
4. A. W. Dex and A. R. Lamb : *Jou. Ame. Chem.*, **38**, 2561, (1916)
5. 板野、荒川 日本農學化學會誌 第五卷 (昭和四年)
6. J. R. Sanborn: *Jou. Bact.*, **12**, 1 (1926)

第四報 培養基中に於ける窒素の新陳代謝

(昭和五年三月發行 日本農學化學會誌 第六卷第三冊 第六十六號發表)

緒 言

細菌類の培養基中に於ける窒素の新陳代謝は興味ある事項であつて既に多數の研究があるが De Ford⁽¹⁾ 氏の研究に依るに Glucose が Peptone media 中にある時に *Bact. Coli*, *Ps. Pyocyanea*, *B. subtilis*, *C. botulinum* 及び *C. sporogenes* 等を培養せるに Amino nitrogen の生成量が増加する従つて或る状態ではこの現象を以つて Proteolysis の Approximate index となし得るが Ammonia の生成量では検定され難き點を明にして Sears⁽²⁾ 氏及び Kendal and Bly⁽³⁾ 兩氏の實驗を確證し Waksman⁽⁴⁾ 氏及 Herman and Retger⁽⁵⁾ 兩氏の成績と異なる事を報告した。

然共 Cellulose を Peptone media 中に於て醱酵せしめたる場合就中耐熱性醱酵菌を用ひたるが如き實驗成績の見當らざるに依つて本研究を行ひ *Bac. thermophiliculus*⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾ を以つて Cellulose-peptone media 中にて Cellulose を醱酵させその培養基中の窒素の新陳代謝を研究した。

耐熱性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermophiliculus* n. sp. に就て

實 験

供資材料

本菌を前報⁽⁶⁾に記載した如き纖維素液體培養基に移植し 35°C に保温し置き隨時取出して分析に供した接種量は新鮮なる菌株を1%の割合に用ひ培養は大型試験管法に依つた其他一切の注意事項は前報告と同一に處理した。

分析方法

アムモニヤ態窒素——Harper⁽⁹⁾氏の酸化苦土法及び Folin's 氏改良法⁽¹⁰⁾を併用した。

アミノ酸態窒素——アムモニヤを除去したる被検液につき Van Slyke 氏法⁽¹¹⁾に依つて檢定した。

全磷酸——Uranium acetate 法⁽¹²⁾に従つて行つた。

纖維素量——前報⁽⁸⁾所載の方法に従つた。

pH 價——キンヒドロン電極法を用ひた。

細菌數——Breed and Brew 兩氏法⁽¹³⁾に従つて直接鏡檢法に依り檢定した。

成 績

上記の分析方法に依りて得たる結果は第一表に示す通である。

第一表 培養基中に於けるアミノ酸及びアムモニヤ態窒素の變化

培養基 種類	試 験		第 一 日		第 三 日		第 六 日	
	纖維素含 mg.	纖維素無	纖維素含 mg.	纖維素無	纖維素含 mg.	纖維素無	纖維素含 mg.	纖維素無
アミノ酸培養基	16.22	16.22	19.46	19.60	14.35	18.63	16.15	17.11
アミノ酸培養基	10.08	10.08	10.50	13.74	17.68	17.57	21.34	17.67
全 燐 酸	130.20	130.20	130.20	130.20	79.05	120.90	79.05	120.90
纖維素分解量 (0.0%)	0.0	—	14.00 (0.01%)	—	532.70 (37.8%)	—	688.50 (48.1%)	—
細 菌 数	7.6 86400 (4.9355)	7.67 86400 (4.9355)	7.43 2400000 (6.3502)	7.37 480000 (5.6812)	7.40 5760000 (6.7604)	7.91 336000 (3.5263)	7.33 5280000 (6.7226)	8.03 672000 (3.8274)

備考 数字は100 c.c. 中のものを示し無菌数のみは1 c.c. 中のものを示す尚其刺激は對數である

此等の關係を圖示すれば第一圖及び第二圖の如くなる。

第一表及び第一圖に明な如くアミノ酸培養基は纖維素培養基で第一日に 33.3% 増加を示し纖維素の醱酵激烈な第三日に於ては反つて 5.11 mg. 減少を來して第六日には少々増加の傾向を示すけれども纖維素の醱酵には斯の如く可給應窒素の消費さるる事實を判明せしもの認められる尙この際燐酸も少なからず消費することが知れる然共之を纖維素無培養基に就てみるのに第一日は纖維素培養基の夫と全く等しいが其後になるに漸次減少するに至る又燐酸の消費量も顯著でないアミノ酸培養基の變化を見るのに纖維素培養基で第一日には殆ど變化がないが第二日よりは恰も纖維素の醱酵量と正比例して増加して來ることが知れる。

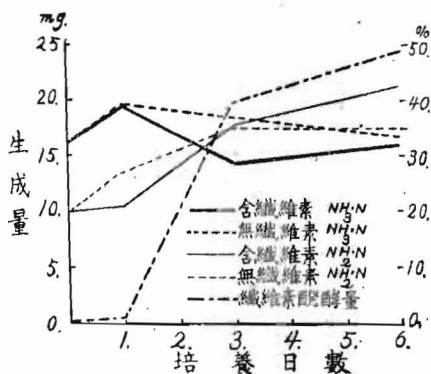
この點は De Bort⁽¹⁾ 氏の實驗に一致してゐて本菌が纖維素を醱酵する時に於ては丁度或種の細菌が D-glucose に對す

耐熱性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermofirincolus* R. S.P. に就て

るが如き作用を呈してアミノ酸窒素の量は、この場合 Proteolysis の Approximate index となり得るものと思はれる
又本菌は Woodman and Stewart (14) 兩氏の分離した耐熱性纖維素醱菌と異つて Proteolytic enzyme の存在する事
を知る從つてこの點は堆肥醱酵中に於ける作用に興味ある暗示を與ふるもの云はねばならぬ又これを纖維素無培養基

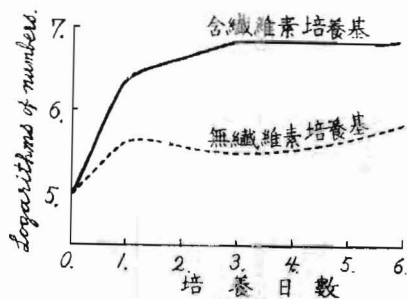
第一圖

培養基中に於けるアミノ酸及びアムモニヤ態窒素並に纖維素醱酵量の變化



第二圖

培養基中に於ける細菌數量の變化



に就て見るのに第三日までは漸次増加するが其後には殆ど變化が起つてをらぬこれはエネルギー源の存否に起因する變化の相違であらう。

次に細菌數の變化をみるのに(第二圖)纖維素含培養基中では纖維素無培養基中に於ける夫れに比較して第一日で五倍第三日で一七倍第六日で八倍の多きに達してをる尙前者では第三日が最大に達し漸減してゐるのに比較して後者では

第三日は反つて最少である然共大體に於て第一日より第六日までには變化のないものと思はれる即ちこの點に於てもエセルギー源に依つて細菌數の著しく増殖する事が知れる。

總 括

本研究は *Bac. thermofibrincolus* を Cellulose-deptone medium に於て 65°C に保温培養して Cellulose の有無の場合に於けるアミノ酸態窒素・アムモニア態窒素・全燐・酸纖維素分解量・エー價及び細菌數等の變化を測定したものである。其結果 De Bord⁽¹⁾ 氏の實驗成績と一致し本菌の場合にもアミノ酸態窒素はアムモニア態窒素と違つて Proteolysis の Approximate index により得る事が認められた従つて本菌は Proteolytic enzyme を有するものと思はれる。

參 考 文 獻

1. G. G. De Bord: Jour. Bact., 8, 7, (1923)
2. H. J. Sears: Jour. Infect. Dis., 19, 105, (1916)
3. A. I. Kendal and R. S. Hy: Jour. Infect. Dis., 30, 236, (1922)
4. S. A. Waksman: Jour. Bact., 5, 1, (1920)
5. N. Berman and L. F. Rettger: Jour. Bact., 3, 389, (1918)
6. 板野、荒川 日本農藝化學會誌 第五卷第六十一號 八百六十六頁 (昭和四年)
7. 板野、荒川 同 上 第五卷

耐熱性纖維素醱酵菌 *Bacillus thermofibrincolus* n. sp. に就て

8. 板野、荒川 同 上 第六卷

9. H. J. Harper: Soil Sci., **18**, 409, (1924)
10. W. H. Peterson, L. M. Pruess and E. B. Fred: Jour. Bact., **15**, 168, (1928)
11. D. D. Van Slyke: Jour. Biol. Chem., **9**, 185, (1911)
12. P. B. Hawk; Pract. Physiol. Chem., (1923),
13. R. S. Breed, and J. D. Brew: New York Agri. Exp. Sta. Tech. Bull. **49**, (1916)
14. H. E. Woodman and J. Stewart: Jour. Agri. Sci., **18**, 713, (1928)