

耐熱性纖維素醣酵菌 *Bacillus thermofibrincolus* 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るものであるが茲に總めて轉載した。

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

纖維素の醣酵は自然界に於ける物質循環を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醣酵菌の機能は常温を好適として棲息するものに比しかの堆肥の醣酵に見る如く甚だ急激

耐熱性纖維素醣酵菌 *Bacillus thermofibrincolus* 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 *et al.* Tanner,⁽¹⁾ Kröhn⁽²⁾, Robertson⁽³⁾ 及び Feirer⁽⁴⁾ 諸氏の研究報告があるが殊に纖維素醣酵細菌に就き擧ぐれば次の通りである。

高温に於ける纖維素醣酵の現象は既に一八九九年 MacFayden *et al.* Blaxall⁽⁵⁾ 兩氏に依つて観察された所であるが一九一二年に至つて Pringsheim^{(6), (7)} 氏の纖維素醣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 *et al.* Lyman⁽⁹⁾ 兩氏は 65°C を最適にしてバルブ（亞硫酸處理）を急激に醣酵し醋酸醣乳酸酒精及びメタン瓦斯水素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醣酵を營む云ふにある今 38°C に於て Glucose agar に生育した細菌の特徴を示すと第一表に記載する通である。

又 Khouvime⁽¹⁰⁾ 女史は人糞より 35—51°C を適温とする嫌氣性菌 *Bac. Cellulosae 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った。

一九二二年 Neuberg *et al.* Cohn⁽¹¹⁾ 兩氏は 53—55°C を適温とする多數の纖維素醣酵菌を分離し纖維素醣酵の中間產物 4,4'-Acetaldehyde 及 Glucose, Celllobios 等の生成する事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 65°C を好適と Peptone を有機素源として攝取するものである又供試纖維素(Fruit pulp)を七〇—九五% 酢酵しその醣酵量の五〇—五五% は醋

酸五一—五%は酒精少量の酪酸及炭酸瓦斯水素瓦斯並に色素を生成するものである[一九二八年 Woodman 及 Stewart⁽¹³⁾]。兩氏は無機態窒素（硫酸アムモニヤ）を窒素源とする新種を分離した本菌は $4-7 \times 1.0\mu$ グラム陽性であつて蛋白質分解作用を有せず、Cellulose 以外¹² Sucrose, Fructose, Glucose, Maltose, Arabinoxyl, Mannite, Inulin, Dextrine 及び Glycerine 等をも酸酵し酸を形成するが瓦斯を發生しない且つ Lactose, Dulcite, Salicine を酸酵しないことを認めた又 Coolhaas⁽¹⁴⁾ は $50-55^{\circ}\text{C}$ を適温とする Bac. thermocellulyticus なる新種を分離した。

以上略述した所は耐熱性纖維素酶菌に関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こ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

1' 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				
硫酸アムモニヤ	2.0g.	尿酸	石炭灰	過剰
酸性磷酸加里	1.0	纖維素(滤紙)		15.0

耐熱性纖維素酶菌 *Bacillus thermofibrincolus* n. sp. に就て

硫酸苦土	0.3	水道水	1000.c.c.
鹽化曹達 ヘ・プ・ト・ン	0.1 5.0	反應 (PH)	7.34

備考 鹽化曹達及び鹽酸苦土は 0.3g. の鹽化石灰にて代用し得

以下纖維素培養基のあるのは上記の培養基を意味するものである。

II. 分離及び培養

上記の培養基は之を 100c.c. 宛 200c.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 5g. 投入した而して之を 65°C. の恒温装置内に静置する時は七一一時間頃より漏斗を來し一八一一時間に至るの培養基には氣泡を生じ漸次旺盛になつて来る三〇一二六時間を経るの遂に濾紙片は黃色を呈して液面に懸浮 (Head) するに至るかくて極度の醣酵を終るの濾紙片は最早原形を留めず雲絮状化する五一七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となつてゐる。

本菌の分離は醣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幾回もなく繰返し遂に顯微鏡下に於て純粹と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觀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の時に醣酵作用の衰頗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五一二〇% 添加して菌株を移植するこ容易に醣酵力を回復せしむる事が出來た。

二、形態學的検定

本菌の形態學的検定は専ら 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：纖維素培養基で 65°C で一四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状を呈し兩端鈍圓孤立又は數個接するものがあるが、これは $3.0-7.5 \times 0.5 \mu$ で普通は $4.2 \times 0.5 \mu$ である(第一圖参照)又荚膜(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 で培養するに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)時は一四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⁽¹²⁾で處理したものは長桿状をなし大きさ $3.0-4.0 \times 0.5 \mu$ 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 にて形は Ellipsoid である而して其大きさは $1.4-1.5 \times 0.9 \mu$ 普通は $1.5 \times 0.9 \mu$ である。

3 運動性：懸滴法で鏡檢するに纖維素培養基で 65°C で一四一四八時間培養したものは良く運動し Broth 又は Nutrient agar で 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 $10-14$ 個の周毛を認めた。

4 染色反応：Gram's stain は陽性で一一四日間培養(65°C)では同様であるが七日間乃至より長い間に陰性のなつた又 Carbol-fuchsin, Gentian violet で染色す Loeffler's methylene blue, Malachite green, Saffranin, 及 Roseaniline や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面 \rightarrow Finally granular 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 で Punctiform, Filamentous の組織をなす。

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渦を來して特有の臭氣を放つゝの臭氣は繼て醋酸の臭氣を放つゝ至る Flocculent の沈澱を生成し其量は多量である接種後七—一一時間にして氣泡を發生し始め一四時間頃より纖維素は漸次黄色を帶び氣泡の發生は愈々旺盛となりて二三六時間頃より破壊され四八一六〇時間頃に至るゝ破壊した纖維素は上面に押上げられ所謂 Head を呈するに至る (第一圖参照)

Nutrient broth (65°C, 24 時間) ; 灰白色的皮膜を生成し液は強度に渦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) ; 灰白色的薄膜を生成し溷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 Echinulate, 表面に濕氣を持つ平滑で Flat の Elevation を呈す Optical 且 Opaque, Glistening 灰白色を帶びて臭氣を有するもの Consistency は Butyrous, 培養基は色を生成しないが併し一日を経るゝ黄褐色を呈して来る尚凝結水は溷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 は 20°C では發育しない故これを 65°C に保溫して試験した菌株を移植した培養基は 114時間後取出して冷水中に放置するごと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 にて14時間培養したものは灰白色の濕潤な Glistening で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、生理學的検定

本菌の生理學的作用の検定は 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11-13日にして Indol 反応を認めた検定法は Sakowski 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 に保溫するごと紙は 114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った。

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 上 65°C 又は 37°C に保溫し3日間後 Voges- Proskauer 検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 上11日間培養 (Glucose broth) したのに明かに陽性を呈した。

5 牛乳に対する反應 : Brom cresol purple 牛乳培養 (65°C) にて輕酸性を呈し3日には酸性凝固瓦斯を發生し

て Whey が Extrude 400 | ○ 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來。 Methylen blue milk 並回酸脛にして還元を初む。

6 硝酸還元 : Nitrate broth, Nitrate nutrient agar, 及び硝酸纖維素培養基培養 (65°C) ; 114時間にして亞硝酸を生成する (Miesse 反應檢定) 然し蛋白質も瓦斯は發生しない。

7 濃粉加水分解 : Starch agar 及 Plate にて培養 (65°C) ; 114時間にして強力なる作用を認めた検定は沃度液法に依る Clear zone 生成にて行つた。

8 炭水化物の鑑定 : Cellulose 以外の Hemicellulose, Starch, Raffinose, Salicine, Sucrose, Lactose, Maltose, Mannose, Galactose, Fructose, Glucos, Xylose, Arabinose 等を鑑定する。

9 酸素との關係 : Buchner's 法で検定すの属 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 \approx 1mm, 位の硝子管に四八時間培養の菌株 (pH 7.0) を 1c.c. 密封して恒温装置を附した Oil bath (胡麻油) を使用して検定したその結果 $13^{\circ} - 132^{\circ}\text{C}$ や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。尙 1c.c. 中の細菌数は直接顯微鏡法で算定すの 15.84 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醣酵菌に關して殊に本菌と類似すべきものと思惟せるものを比較すれば第一表に示す通りである。

第一表 耐熱性纖維素酶酵母の菌株比較表

分離者	Langwell and Lynn	板野荒川	Viljoen, Fred and Peterson
菌名	—	Bac. thermofibrincolus	Cl. thermocellum
桿状の大きさ(μ)	4.0×0.4	4.2×0.5	5.0×0.4
孢子の大きさ(μ)	—	1.5×0.9	0.9×0.6
胞子の大きさ(μ)	—	周毛性	周毛性
鞭毛性	無	陽性	陰性
ダラム染色	陰性	陽性	陰性
肉汁液及び葡萄糖肉汁液	發育一菌衛糖より瓦斯發生	發育一菌衛糖より酸生成瓦斯發生せず、薄膜、流动性の粘質沈澱多量	發育一菌衛糖より瓦斯及び酸生成、輪狀皮膜沈澱
肉汁寒天斜面	光輝性、温潤牛酪様状	温潤、半透明の光澤、牛酪様状	温潤、光澤あり牛酪様状
肉汁寒天聚落	上位、下位共に小形 黄色、藻類發育、馬鈴薯褐變	同前	同前(藻粉肉汁寒天)
馬鈴薯	5日に酸性凝固消化なしり	灰白色温潤發育、馬鈴薯不變 トマス還元す	黄色發育、馬鈴薯褐變す 3日に酸性凝固精抽出瓦斯發生りトマス還元
牛乳	—	3日に酸性凝固精抽出瓦斯發生	3日に輕微酸性凝固精抽出瓦斯發生
イソードール	—	性	性
カタラーゼ	—	陽性	陽性
メチール、アセチール、 カビノール	—	陰性	陰性
蜜素源(好適)	—	アルブミン*	ペプトン

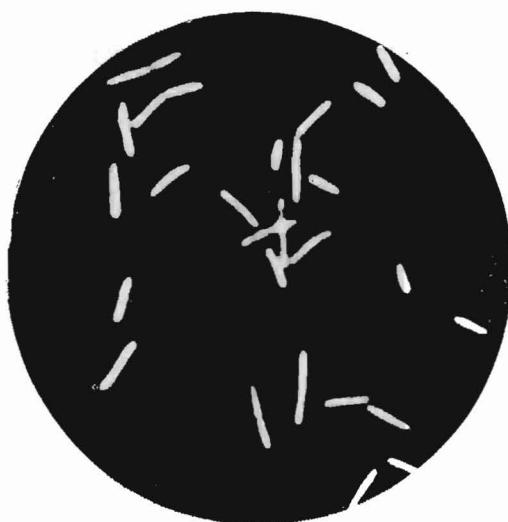
炭水化物 酶 酸	澱粉、ヘミセルローズ、葡 萄糖、キシロース	ヘミセルローズ澱粉ラフィノ ース、燕糖、マルトースマン ノース、ガラクトース、果糖葡萄 糖キシロースアラビノース リシン
		同 前

備考 * アルブミンに対する作用は第二報にて記載する

第一表に比較する如く本菌は他の二種のへの *Cl. thermocellum* の極めて良く類似する然れ共尙精査するに表記の點にて二三重要な差異が認められる此他生化學的作用上特に夫々差異ある點が見出されたが詳細は第二報に譲る。) とする勿論かの *B. cellulose dissolvens*⁽³⁾, Woodman & Stewart⁽¹⁾ 両氏の報告する細菌に差異ある事は容易に認められる依つて著者等は本菌を新種⁽⁴⁾と認める *Bacillus thermofibrincolus* n. Sp. と命名した。) と思ふのである。

摘要

著者は 65° に於て強力に纖維素を醣酵する細菌を純粹に分離し之が形態學的研究培養的研究を行つた結果新種に屬すべきなる事を認めたので之を *Bacillus thermofibrincolus* n. Sp. と命名した尙其生化學的研究醣酵產物等については後報に詳述する筈である。



(1)

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

$\times 1,500$



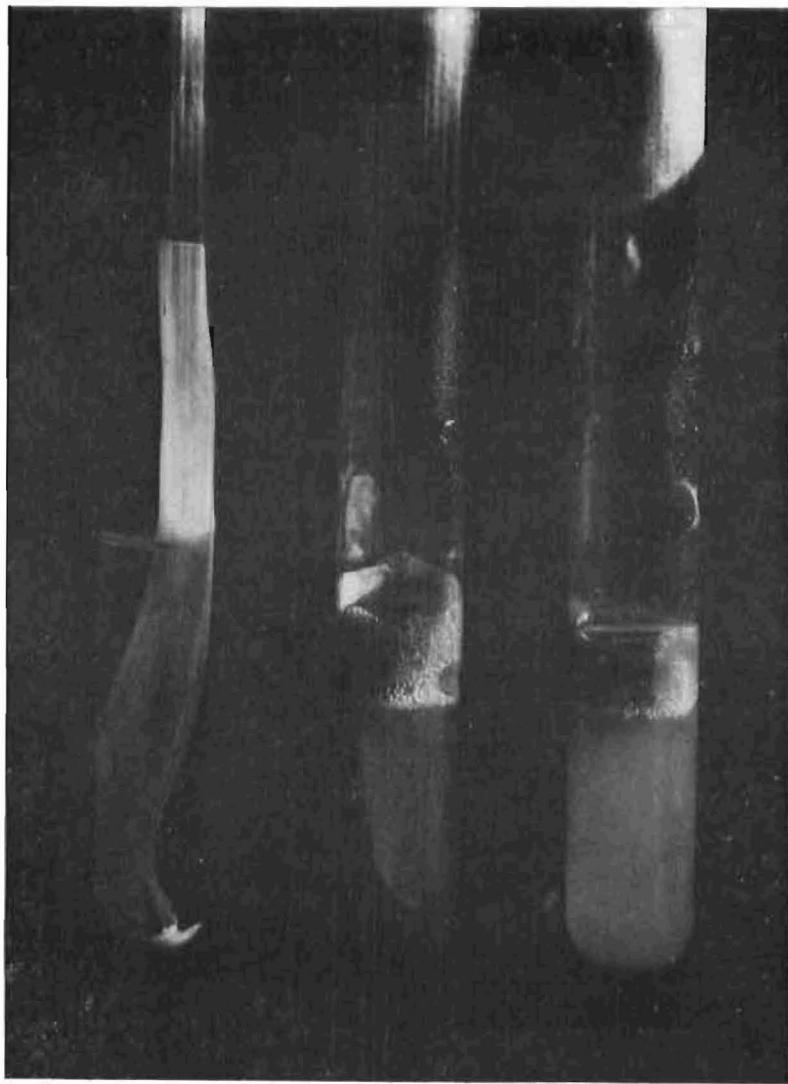
(2)

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

$\times 1,500$

Photo. Arakawa

第二圖



(1)

(2)

(3)

Bac. thermofibrincolus n. Sp. の纖維素醣酵狀態

(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

参考文献

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) Agric. Stat. Tech. Bull., No. 130—131, (1927)
4. W. A. Feirer: Soil. Sci., **23**, 47. (1927)
5. A. MacFayden and F. R. Blaxall: Trans. Jenner Inst. of Prev. Med. Ser. **2**, 182. (1899)
6. H. Pringsheim: Zeits. f. Phys. Chem., **78**, 206; Centbl. f. Bakt. Abt. II, **38**, 513. (1912)
7. A. Kroulik: Centbl. f. Bakt., Abt. II, **36**, 329. (1912—13)
8. H. Langwell and A. Lynn: Jou. Soc. of Chem. Ind. **42**, 280 T. (1923)
9. V. Khouvine: Ann. de l' Inst. Pasteur, **37**, 711. (1925)
10. C. Neuberg and R. Cohn: Biochem. Zeitsch., **133**, 527. (1923)
11. J. A. Viljoen, E. B. Fred and W. H. Peterson: Jou. Agri. Sci., **16**, 1. (1926)
12. H. F. Woodman and J. Stewart: Jou. Agri. Sci., **18**, 713. (1928)
13. C. Coolhaas: Centbl. Bakt., Abt. II, Bd. **76**, 38. (1923)
14. Society of American Bacteriologists: Manual Methods for Pure Culture Study of Bacteria, (1923)
15. P. H. H. Gray: Jou. Bact. **12**, 273. (1926)
16. 板野一荒二：日本農化會誌 第三卷第十八號（1911年）第十九號（1912年）第四卷第四〇號（1914年）（昭和11年）
17. 霉菌性纖維素酶菌 Bacillus thermophilic n. sp. 之研究

第一報 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 第六十二號演表)

緒 論

著者等は前報⁽¹⁾に於て一耐性纖維素醣酵菌を分離し其形態並に培養試験を行ひ之を他の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ある。*Bacillus thermofibrincolus* の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) 纖維素醣酵の温度 (II) 纖維素醣酵の纖維素量 (III) 纖維素醣酵の窒素源 (IV) 纖維素醣酵の水素イオン濃度 (V) 糖類醣酵等に關する事項を報告するものである。

實 驗

1、纖維素醣酵の温度との關係

所定の纖維素液體培養基⁽²⁾に菌株を接種し各 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醣酵を遂げ得る日数を観測したるに第一表の如き結果を得た。

第一表 繊維素醣酵と温度との関係

(醣酵日数(t))	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	速度 $(\frac{1}{t})$
30—40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.100
45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	0.250
50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.500
55—70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.833
72	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
75—80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

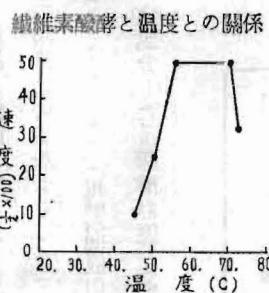
備考 —は酸酵せず 土糞繊維 + 酸酵することを示した

第一表に明かなる如く本菌は 40°C 以下及ぶ 75°C 以上では酸酵不能を示し 65°C を以てて最適温度といった今、の關係を圖示すれば第一圖の通である。

1-1' 繊維素醣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く 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 上保温しその酸酵状態を観察した其の結果 1.50~2.25% の纖維素量の場合に最も良好にて他は殆も同様であった。

第一圖



耐熱性纖維素醣酵菌 *Bacillus thermofibrincolus* n. sp. に就く

III. 細維素酵素の基質との關係

所定の纖維素培養基より Peptone を除いた他の基質源について (Casein, Meat extract (市販品) Egg albumin (Merk 製) Manure extract (堆肥懸液の 10%液) 硫酸アムモニヤ及び硝酸曹達を各 0.5% 量加く常法に従ひて調製した面) にて前同様處分した後酵素状態を観察したのに第1表の如き結果を得た。

第二表 細維素酵素の基質との關係

基 質 源	培 養 時 間					培養基證明
	24 時 間	48 時 間	72 時 間	86 時 間		
硝 酸 曹 達	—	—	—	—	—	細維素黃變瓦斯發生
硫酸アムモニヤ	—	—	—	—	—	細維素黃變瓦斯發生
Casein	—	—	—	—	—	細維素崩壊
Neat ext.	—	同	同	同	上	細維素崩壊
Piptone	—	纖維素崩壊	—	—	—	細維素崩壊
Manure ext.	—	纖維素黃變瓦斯發生	—	—	—	細維素崩壊
Egg Albumin	纖維素崩壊	—	—	—	—	細維素崩壊

第一表に明かなる如く本菌は硝酸曹達を基質源にして利用せり選元して由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基質源なり得るがその酵素は有機態基質のそれと比較するに遅延する有機態基質では Egg albumin が最も良好で接種後一四時間内に纖維素が崩壊する次いで Peptone にも次いで Casein, Meat extract, Manure

extract の効果は殆ど同等であった。

四、纖維素酵素と水素イオン濃度との関係

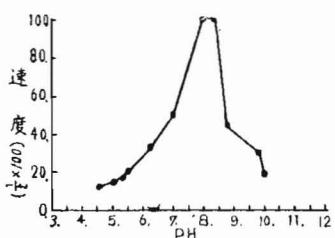
所要の水素イオン濃度を有する培養基は豫め一倍濃度の培養基を用意し $N/2 N/10HCl$ 又は $N/10NaOH$ を夫々適量宛加へ残量の水を加へて所定濃度の培養基を調製した其 P_H 値は Quinhydrone 法及び Hydrogen gas 法に依つて測定し所定に従ひ常法に依つて接種し $65^{\circ}C$ に保温して纖維素の酵素状態を観察したその結果は第三表及び第一圖に示す通りである。

第三表 細胞素酵素と水素イオン濃度との関係

起始性 P_H	終期性 P_H (Heated) 發育せず	纖維素崩壊 所要日數	速 度 $(\frac{1}{t})$	起始性 P_H	終期性 P_H (Heated)	纖維素崩壊 所要日數	速 度 $(\frac{1}{t})$
3.40	—	—	—	7.90	6.21	1.0	1.000
4.20	—	—	—	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	0.201
5.59	5.85	5.0	0.200	10.80	—	—	—
6.25	5.78	3.0	0.333	11.09	—	—	—
7.16	5.97	2.0	0.500	11.70	—	—	—
					切斷せず	—	—
					發育せず	—	—

第二圖

纖維素醣酵と水素イオン濃度との関係



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、糖類醣酵に関する事項

所定の纖維素培養基より纖維素を除き之に被驗糖類を一%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 300c.c. 入の三角瓶に 100c.c. 完調製して常法に依り菌株を接種し 65° に五日間保溫した。

醣酵糖類量は残量より算定したが測定法は Stiles, Pettersen and Fred⁽³⁾ 法に依つた本法は還元糖の 0.1~0.2mg. 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。

第四表 糖類酵酇ニ酸の生成

被試糖類	炭酸石灰を含有せぬ培養基			炭酸石灰を含むる培養基		
	起 始	P _H	終 期	醣 酶 量 (%)	0.1 N 鹼基滴定數 (c.c.)	醣 酶 量 (%)
Xylose	7.04	5.19	33.7	22.5	100	
Arabinose	7.11	5.74	41.4	19.0	100	
Fructose	7.03	5.88	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	6.69	48.5	15.0	95.2	
Lactose	7.22	6.23	35.7	15.5	60.9	

上表に明な如く本菌は Galactose 及び Lactose 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試糖類の殆ど半量を五日間に消費するに拘らず其 P_H 値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の點は *Cl. thermocellum* の糖類酵酇⁽⁵⁾ を極めて良く類似している。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 Starch の如き Molecular complexity を有するもの、醣酇⁽⁷⁾ Cellulose と類似の他の Monosaccharides (Galactose を除く) の醣酇

は全く異り Cellulose の酵解を認められないが乳酸を多量に生成するといふを報告した本菌に就てもこの點は後報に於て述べる所である。

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ら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 上培養して培養期間内に於ける P_H 値の變化を観察した培養基は Na_2HPO_4 American Bacteriologists の標準法⁽⁷⁾にて 1% Sugar broth に所定の方法で菌株を接種し 65°C の保溫器に藏め一日間置かし水素イオン濃度を Quinhydrone 法で測定したもの結果を示せば第五表の通である。

第五表 Sugar broth 中の P_H 値の變化

炭水化物	培養日數									
	起始	2	4	6	8	10	12	15	17	19
Xylose	pH 6.56	pH 5.47	pH 4.83	pH 4.51	pH 4.57	pH 4.34	pH 4.20	pH 4.13	pH 4.15	pH 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	4.98	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
Maltose	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	4.33
Dextrin	6.94	6.45	6.43	6.42	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	6.93	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

今此結果を見ると Galactose, Sucrose, Lactose, Mannite, Glycerol 等は P_H 値の變化が少な～缺乏 Galactose は特に傾アルカリ性が著しく現はれてゐる前項の成績と一致する他の糖類では Xylose, Arabinose, Rhamnose, Glucose Mannose, Fructose, Maltose, Starch, Dextrin 等は P_H 値の變化が顯著である就中 Starch, Dextrin 等は其構成上起因するかの問題は認められが培養後一週間を経過した頃は P_H 値の變化が顯著に起つてゐる點が示された。

總 論

本報に於て記載したる所を總括すれば次の通りである。

細菌性纖維素酸酵菌 *Bacillus thermophilic* n. sp. は誠に

一、本菌の纖維素酶に好適する温度は 65°C であつて $30\sim40^{\circ}\text{C}$ に於ては一〇日間培養しても酸酵を起さず發育も殆どない又 $75\sim80^{\circ}\text{C}$ に於ても輕微なる發育は認むるけれど共酸酵を起さない。

二、本菌は培養基中に於て酸酵に好適する纖維素量は $1.50\sim2.25\%$ の時である。
三、本菌の窒素源としては Peptone やのり 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、本菌の纖維素酶に好適な水素イオン濃度は $\text{pH} 8.0\sim8.4$ であつてその限界 pH 値は酸性側で $\text{pH} 4.6$ ヘルカリ側で $\text{pH} 10.2$ である尙本菌の發育限界 pH 値は $\text{pH} 4.5$ 及び 11.0 附近の様に考へられる。

五、本菌は糖類を醸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 に五日間保溫しても其半量（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 の酸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 はその六一%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のと Galactose, Sucrose, Lactose, Mannite, Glycerol 等では pH 値の變化少なく Galactose に至つては極アルカリ性を著しく示した Xylose, Arabinose, Rhamnose, Glucose, Manno, Fructose, Maltose, Starch, Dextrin 等は pH 値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。

引用文獻

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：鳥取農業會議 第一卷第二號 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 挥發酸及びアルコールの生成に及ぼす條件

(昭和五年三月發行 日本農藝化學會誌 第六卷第三冊 第六十六號論表)

緒 論

一般耐熱性纖維素酸酵菌の醸酵生産物は第一報⁽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る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くるのみならず細菌の種類に依つて相違する、これは明かである。

耐熱性纖維素酸酵菌 *Bacillus therモbrioccolus 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 等が好適の有機態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 1% のものは最大となる又纖維素量は含有の少量% 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醸酵する時は小型容器内の醸酵生成量の倍数にあたるゝ云ふ又培養日數の影響をみると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来る事が報告された凡そかく定量的研究されたものは殆らないので茲に *Bac. thermofibrincolus* 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検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ど此處に於ては單に總稱的にかく名付けて用ひる事とした。

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。

木糖アムモニヤ曹達	2.0g.	炭酸石灰	過剰
酸性纖維酸加里	4.0	纖維素(纖紙)	15.0
硫酸苦土	0.3	水道水	1000.0cc.
鹽化曹達	0.1	入ブトン	5.0

培養は大型試験管法に依つた大型試験管は 20×180 m.m. の大きさがあるのに上記の培養基を 20 c.c. 実注加し更に 15×120 m.m. の短冊型に切つた濾紙を一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 . に保溫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隨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と示す。

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以下記の方法を用ひて分析した。

揮發酸——Fred, Peterson and Davenport⁽³⁾ 氏法を用ひた被驗液 50 c.c. を小型の長頸フラスコに取り之に 20 g. の酸性熒光曹達及び 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 $N/10\text{NaOH}$ にて定量し之より醋酸を見倣して算定した。

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 (60 — 70 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剤として重クロム酸カリ 10 g.、濃硫酸 20 g. を注加し更に Bumping 和 Foaming を防止する爲に Glass bead を一個入れて内容を恒量に保ちて蒸溜し最後の一定蒸溜液が Phenolphthalein を指示薬として $N/10\text{NaOH}$ 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と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 Peterson²⁾氏等は tin-foil を以つて培養フラスコを覆ひその蒸餾を防止したが本菌の場合は單に棉栓にのみこりからめて置いた大型試験管の時の減量を示す。第一表の通りなる。

第一表 培養基の容量の變化

培養日数	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 五本宛の平均数より算定した

此等の著しき蒸餾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 20 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 65°C に於て四一五日の培養にも可なり蒸發を防止し得る。

II. 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 300 c.c. のマルレンマイヤー・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一表の通である。

第一表 指發酸アルコールの生成及び纖維素醣酵
量に及ぼす培養法の影響 (100 c.c.)

處理	培養 日数	纖維素醣酵量		指發酸(醣酵)		アルコール(酒精)		
		起始量 g.	醣酵量 g.	mL.	%	mL.	%	
濾紙細片 フラスコ	8—12	3.00	1.80	60.00	59.13	32.05	165.80	9.21
濾紙懸垂 フラスコ	6—7	3.47	2.73	78.90	637.63	23.95	84.70	3.10
α -Cellulose フラスコ	3—7	1.63	1.30	79.75	436.10	33.54	140.20	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) に依る方が良く醣酵する其生成物の成績に就て見るのに纖維素醣酵量は試験管法に於て多きに拘はらず醣

耐熱性纖維素醣酵菌 *Bacillus thermofibrincolus n. sp.* に就く

酵生成物は又つてフラスコ法に於て多量に收得する事が出來た。

二、培養温度の影響

培養温度の影響に就ては第一報⁽⁵⁾に報告したが此處には更に醣酵成生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 撃發酸アルコールの生成量及び纖維素酵
酵量に及ぼす培養温度の影響 (100 c.c.)

培養温度 (°C)	培養 日 数	纖維素酵量		撃發酸(醋酸)		アルコール(酒精)	
		mg.	%	mg.	%	mg.	%
65	4	1.2906	85.52	319.50	24.76	124.43	9.54
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 mg. であつた

既報⁽⁵⁾の通り本菌の作用は 65°C に於て旺盛であるが 50°C やは 11・5 倍の培養日数に至つても纖維素の酵量は少ない然しその酵生成物の生成量は 50°C の時が反つて多いこれは細菌に依つて更に消費される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 酵素がその場合に於ける酵生成物の生成量に就て測定した

常法、一重管法及び Buchner's 氏嫌氣培養法の三種で培養を行ひ 65°C 12 時間保溫したのに第四表の如き成績であつた。

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

培養状態	纖維素酸酵量 kg.	纖維素酸酵量 %	指發酸(醋酸) mg.	指發酸(醋酸) %	アルコール(酒精) mg.	アルコール(酒精) %
試験管法	1.3298	88.08	282.00	21.21	171.82	12.90
一重管法	1.3200	87.46	273.60	20.73	228.35	17.30
Buchner's 繩集法	1.1118	73.67	229.01	20.63	312.51	28.11

備考 起始纖維素量は 1.5092g. であった

培養状態に就て見むる好氣的培養の方が纖維素の酸酵量は多いが然し指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一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にしてその供給量を〇—1%に種々變化し纖維素酸酵生成物に對する影響を定量した培養温度は 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 指發酸の生成及び纖維素酸酵量に及ぼす
ペプトン量の影響 (100 c.c.)

耐熱性纖維素酸酵菌 *Bacillus thermofibrincolus*, n. sp. と就て

ペプトン量 (%)	纖維素酸酵量 g.	%	揮發酸 mg.	酸(醣酸) %
0.00	0.6850	45.45	78.00	11.52
0.25	1.2450	82.49	237.0	19.18
0.50	1.2760	84.55	345.6	27.08
1.00	0.3705	24.54	200.70	54.17
2.00	0.2357	15.62	129.69	54.99

備考 起點纖維素量は 1.5052g. であった

ペプトン量の〇・五%の時が纖維素酸酵量に最適の濃度であつて 1%に至れば既に酸酵は抑制される事が知れる尙べ
ペプトンを添加せぬ時も殆ど半量の纖維素が酸酵したかに接種量として 1%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らと思はれる。

かくペプトン量は多量の時よりも小量の方が纖維素の酸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

第一報⁽⁵⁾に記載した所を定量的に測定してその酸酵生成物に及ぼす影響を研究した纖維素は〇・七五一五・一五%を
変化して供給し 65°C に四日間保溫して分析した第六表に示す通の成績を得た。

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

起始纖維素量 (%)	纖維素酵解量		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	193.68	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

纖維素の酵解量は〇・七五—一・一〇% の如く小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一・一〇—一・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

第一報⁽⁵⁾に於て定性的に報告した所を更に定量的に分析し酵解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) (マグダラ) (Witte) Casein (Merk) 硫酸アムモニヤ (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 挥發酸アルコールの生成量及び纖維素の酵解量に及ぼす窒素源の影響 (100 c.c.)

窒 素 源	纖維素酸酵量		揮發酸(磷酸)		アルコール(酒精)	
	g.	%	mg.	%	mg.	%
肉汁エキス	0.7557	50.27	292.33	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
硫酸アムモニア	0.8133	63.89	171.60	21.10	7.20	0.89

備考 起始纖維素量は 1.5092 g. であつた。

纖維素酸酵量に對する好窒素源はペプトンで八五・三一%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一五・五三%卵白アルブミンは之に次いで一八・〇一%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アの窒素源としては相當の効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、培養日數の影響

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

第八表 挥發酸アルコールの生成量及び纖維素酸酵量に及ぼす培養日數の影響 (100 c.c.)

培養日数	試験前		第一日		第三日		第七日	
	含炭酸灰 石	無炭酸灰 石	含炭酸灰 石	無炭酸灰 石	含炭酸灰 石	無炭酸灰 石	含炭酸灰 石	無炭酸灰 石
滴定酸度(c.c.) P _H	6.0 7.68	10.5 6.98	8.0 7.34	10.8 7.00	4.0 7.36	18.0 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 (38.71%)	310.50 (32.02%)	61.89 (12.84%)	306.00 (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 (4.07%)	50.25 (6.11%)	12.50 (2.50%)	25.00 (1.88%)	23.00 (3.33%)
繊維素酵酛量 (B) (%)	0.00 (0.00%)	0.0798 (5.29%)	0.0503 (3.33%)	0.9998 (64.28%)	0.4812 (31.88%)	1.3306 (88.17%)	0.6906 (45.76%)	

備考 数字は 100 c.c. 中のものを示し 滴定酸度は N/10 NaOH の所定濃縮温度は 65°C. とした時の P_H 値はキツビドロン法で測定した

上記の成績を見るのに第一回に於て揮發酸が約 20 mg. 生成されたのは含炭酸石灰培養基では醣酵纖維素の一六・一四 11.0% 無炭酸石灰培養基の二八・七七% に相當した第三日に至る。夫々全揮發酸量は増加するが含炭酸石灰培養基では 11.10% 11.0% 無炭酸石灰培養基で一三・一八四% となる第七日に至る。含炭酸石灰培養基は一三・一% に減少し 培養基は一四・七七% に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ちに生成している。次に纖維素酵酛量を見るのに含炭酸石灰培養基では第一日に五・二% の醣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二・二% 第二日が三一・九% 第七日が四五・八% となつて前者と殆ど同じ傾向のものにはあ

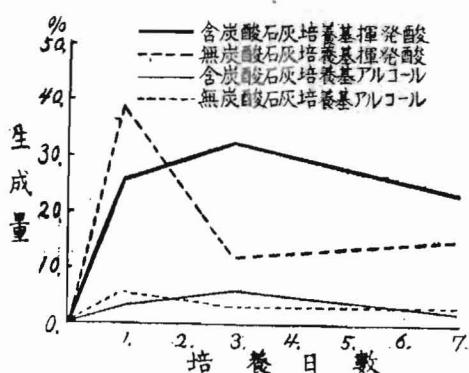
耐熱性纖維素醣酵菌 *Bacillus thermophibrinco's n. sp.* に就て

一一八

るが其醣酵量は約半量にしか過ぎない此等の關係は醣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
ケラ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 P_H 6.1 に變化を示し石灰の存在では中和して

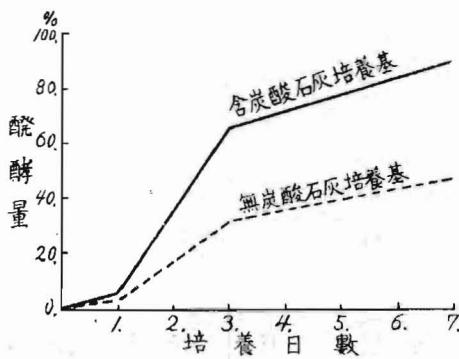
第一圖

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

纖維素の醣酵量に及ぼす培養日數の影響



P_H 7.3 を保持してゐる點よりも推定し得る向の點より Sanborn⁽⁶⁾ 氏の云へる如く纖維素醣酵中の培養基の P_H 値を
知ること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. thermofibrinellus* 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酵酇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じなる。

一、試験管法で 65°C に本菌を培養して置くと培養基は七日間に四五・五%の蒸發をするけれども之を二重管培養によるこ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ご纖維素酵酇量は多いが揮發酸アルコールの生成量は反つてプラスコ培養法が多い尙概括する。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—一八八%を三—七日間に酵酇してその酵酇量の二四—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数を経ても纖維素酵酇量は前者の六二%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、酸素の影響をみると Buchner's 嫌氣培養法に依るご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酵酇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、ペン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酵酇量は〇・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ン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・七九一五・一五%の割合に含量を變化して供試したが醣酵量は〇・七五一一〇%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酵素量に對してペプトン、卵白アルブミン、カゼイン、硫酸アムモニヤ、アルコール生成には肉汁エキス、揮發酸の生成には肉汁エキス、卵白アルブミン、ペプトン、カゼイン、硫酸アムモニヤ、アルコール生成には肉汁エキス、ペプトン、卵白アルブミン、カゼイン、硫酸アムモニヤの如き順序に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られた。

八、培養日數の影響は殊に炭酸石灰を含有する培養基、然るに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酵解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 P_H 値をみると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 *α-Gelulose* 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 日本書誌 第五卷第六十一號 第八百十六頁 (昭和四年)
2. J. A. Viljoen, F. B. Fred and W. H. Peterson: Fou. Agric. Sci., 16, 1 (1926)

3. E. B. Fred, W. H. Peterson and A. Davenport : Jou. Biol. Chem., 39, 347, (1919)
4. A. W. Dox and A. K. Lamb : Jou. Am. Chem., 38, 2561. (1916)

5. 板野 荒川 日本農芸化學會誌 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

(昭和五年二月發行 日本農芸化學會誌 第六卷第三冊 第六十六號發表)

緒 論

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 Bont⁽¹⁾ 氏の研究⁽²⁾ 依るに Glucose が Peptone media 中に於ける時に *Bact. Coli*, *Ps. Pyocyanus*, *B. subtilis*, *C. botulinum* 及び *C. sporogenes* 等を培養するに Amino nitrogen の生成量が増加する從つて或る状態ではこの現象を以つて Protolysis の Approximate index となし得るが Ammonia の生成量では検定され難い點を明にして Sears⁽²⁾ 氏及び Kendal and Bly⁽³⁾ 兩氏の実験を確證し Waksman⁽⁴⁾ 氏及 Berman and Retinger⁽⁵⁾ 兩氏の成績と異なる事を報告した。

然共 Cellulose を Peptone media 中に於けて醣酵せしめたる場合就中耐熱性醣酵菌を用ひたるが如き實驗成績の見當つて依つて本研究を行ひ *Bac. thermofibrincolus*⁽⁶⁾⁽⁷⁾ を以つて Cellulose-peptone media 中に Cellulose を醗酵させその培養基中の窒素の新陳代謝を研究した。

耐熱性纖維素醣酵菌 *Bacillus thermofibrincolus* n. sp. に就く

實驗

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 65°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て Van Slyke 氏法⁽¹¹⁾に依つて検定した。

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。

Pn 檢——キソロドン電極法を用ひた。

細菌數——Breed and Brew ル氏法⁽¹³⁾に従つて直接鏡検法に依り検定した。

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

種類	培養基		試験前		第一日		第三日		第六日	
	纖維素含	纖維素無	纖維素含	纖維素無	纖維素含	纖維素無	纖維素含	纖維素無	纖維素含	纖維素無
アラモニヤミン	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.
アミノ酸態窒素	16.22	16.22	19.46	19.60	14.35	18.53	16.15	17.11		
全 煙 酸	10.08	10.08	10.50	13.74	17.68	17.57	21.34	17.67		
纖維素分解量 T _H	0.0 (0.0%)	—	14.00 (0.01%)	—	532.70 (31.8%)	—	688.50 (48.0%)	—		
細 菌 敷	7.6	7.67	7.43	7.37	7.40	7.91	7.33	8.03		
細 菌 敷	86400 (4.9365)	86400 (4.9365)	240000 (6.3302)	480000 (5.6812)	5760000 (5.5263)	326000 (6.7604)	5280000 (6.7226)	672000 (5.8274)		

備考 數字は 100 c.c. 中のものを示し細菌数のみは 1 c.c. 中のものを示す専其割合は對數である

此等の關係を圖示すれば第一圖及び第二圖の如くなる。

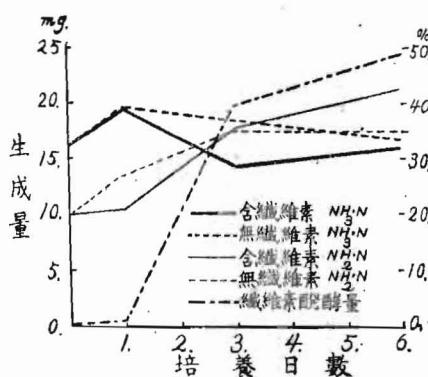
第一表及び第一圖に明な如くアラモニヤミンは纖維素含培養基で第一日 3.22 mg. 増加を示し纖維素の酵解激烈な第三日に於ては反つて 5.11 mg. 減少を來して第六日には少々增加の傾向を示すけれども共要するに纖維素の酵解には斯の如く可給態窒素の消費ある事實を判明せしものと認められる尚この際磷酸も少なからず消費あることが知れる然共これを纖維素無培養基に就てみると第一日は纖維素含培養基の夫々全く等しいが其後になるに漸次減少するに至る又磷酸の消費量も顯著でないアミノ酸態窒素の變化を見るのに纖維素培養基で第一日には殆ど變化がないが第一日よりは恰も纖維素の酵解量と正比例して増加して來ることが知れる。

上の點を De Bord 氏の實驗¹⁾一致してゐる本菌が纖維素を酵解する時に於ては丁度或種の細菌が glucose 1.1 對する耐熱性纖維素酵解菌 *Racillus thermofibrincolus* n. sp. に就く

るが如き作用を呈してアミノ酸態窒素の量は、この場合 Proteolysis の Approximate index となり得るものと思はれる。又本菌は Wordman and Stewart⁽¹⁴⁾ 兩氏の分離した耐熱性纖維素酸酵菌と異つて Proteolytic enzyme の存在する事を知る。従つて、この點は堆肥酸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

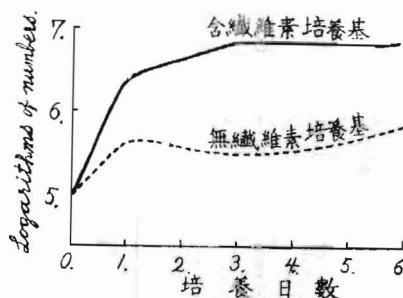
圖

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酸酵量の變化



圖

培養基中に於ける細菌數量の變化



に就て見るので第三日までは漸次増加するが其後には殆ど変化が起つてをらぬ、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。

次に細菌数の変化をみると（第一圖）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さに達してゐ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は變化のないものと思はれる即ちの點に於てもエキ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* 及 *Cellulose-deptone medium* 上於て 65°C に保溫培養し *Cellulose* の有無の場合に於けるアミノ酸態窒素アムモニヤ態窒素全磷酸纖維素分解量 I_{H} 値及び細菌數等の變化を測定したものである。其結果 De Bord⁽²⁾ 氏の實驗成績の一一致し本菌の場合のアミノ酸態窒素はアムモニヤ態窒素と違つて Proteolysis の Approximate index りより得る事が認められた從つて本菌は Proteolytic enzyme を有するものと思はれる。

参考文献

1. G. G. De Bord: Jour. Bact., **3**, 7, (1923)
2. H. J. Sears: Jour. Infect. Dis., **19**, 105, (1916)
3. A. I. Kendal and R. S. Rely: Jour. Infect. Dis., **30**, 239, (1922)
4. S. A. Wakeman: Jour. Bact., **5**, 1, (1920)
5. N. Berman and L. F. Retiger: 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

耐熱性纖維素酸酵菌 *Bacillus thermofibrincolus* n. sp. 之研究

114

8. 塵蟎 荒三 田 土 素長綱
9. H. J. Harper: Soil Sci., **18**, 409, (1924)
10. W. H. Peterson, L. M. Pruess and E. B. Fred: Jou. Bact., **15**, 168, (1923)
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 Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. **49**, (1916).
14. H. E. Woodman and J. Stewart: Jou. Agric. Sci., **18**, 713, (1928)