() 2-Keto-guloic acid 5 g を無水メタノール 40 cc に溶解せしめ, ニトロソメチルウリヤと KOH より發生せしめたデアゾメタンを作用させる. 結晶収量 4.9 g, 理論数の 94 %.

(1) 住木, 山中, 岡, 武石 農化, 20, 90 (昭. 19)

Summary

In the synthesis of *l*-ascorbic acid, diacetone-2-keto-guloic acid and 2-keto-guloic acid must be prepared in the first step of its preparation. We consider that, if these compounds of the first step are so stable and change into *l*-ascorbic acid *in vivo*, one of the authors' objects may be attained. So we prepared diacetone-2-keto-guloic acid and 2-keto-guloic acid. In this paper, the methods of preparation of these acids, their salts, and their methyl-esters are described. The results of the feeding experiments with guinea pigs will be published in the next paper.

高温性繊維素分解菌に関する研究 (第 1 報)

培養条件並びに純粋分離に対する知見

山田 浩一, 藤本 義典, 船 田 譲 (東京大学農学部農藝化学教室)

昭和 26 年 1 月 12 日 受理

Studies on the Thermophilic Cellulose-Decomposing Bacteria. Part I.

Some Informations about Cultural Environments and Isolation Techniques.

By Kōichi YAMADA, Yoshinori FUJIMOTO and Yuzuru FUNADA

(Dept., Agr. Chem. Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

好熱性細菌の中で, 特に Cellulolytic bacteria は土壌細菌の一つとして興味あるばかりでなく, 生理學的にも, 且つ又醗酵工業の面からも, 従来注目されてきた. 併し乍ら, 基質が高分子の繊維である上に生育温度が 60°乃至 65°の如き點より, 本菌の研究が非常な困難を伴う事は容易に領けるところである.

この種の菌に対する研究は, その純粋分離並びに生理を主とするものと, 専ら應用方面に重きを置くものとの 2 方面にわたつて行われてきた. 問題を前者に限つてみても幾多の研究が爲されたにも拘らず, McBEE⁽¹⁾⁽²⁾の検討によれば今まで報告された殆んど全ての菌が純粋性に就いて疑わしく, 又 VILJOEN 等⁽³⁾の如く混在菌を繊維素分解菌と誤認した例もあり, なお又最も廣く用いられている SNIESZKO 等⁽⁴⁾の分離法によつて得られた菌も混在菌を避け得なかつた事を指摘している. 共棲説に關しても種々異論があつて⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾未だその歸着を知らないといつた状態である. 著者等は従来報告された分離法の追試検討を行い, 又混在菌として分離した菌が板野等⁽⁷⁾の報告せる菌に極めて類似している事を認めたので茲に報告する.* 尙文部省科學研究費の補助に依つて行つたものである.

實 験 の 部

I. Purified Culture と培養条件

(A) 分離源 菌の分布は可成り廣く, 各種草食動物の糞, 土壤, 堆肥, 溝泥等, 特に草食動物の消化管内を好適とするが如く, 牛, 馬, 山羊糞等には常に見出される.

(B) 集菌培養並びにその淘汰の限界: 試験管内に短冊型にした濾紙を入れ, 培養液は次の如き組成のものを用いた. 即ち, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 又は peptone 0.5 %, K_2HPO_4 0.05 %, KH_2PO_4 0.05 %, MgSO_4 0.03 %, NaCl 0.05 %, pH は 7.0~7.5 とし, CaCO_3 は通常用いず, 60°で培養を行つた.

接種後, 約 6 時間で液は混濁し, 約 30 時間で濾紙片は黄色もしくは黄褐色を示し, 2~3 日で崩れ, 3~5 日で液面に head を形成するに至つて濾紙は最早原形を留めず雲架状を呈し, 炭酸ガス發生はかなり盛で酢酸臭を放つ. 移植は醗酵の最盛時に 1/10 量ずつ行い, その度に 5~10 分間熱處理を施す. 集菌培養は雑菌の淘汰には有效ではあるが此の操作のみでは完全に除き得ず, 27 株の培養に就いて 3 年移植を續けたにも拘らず遂に純粹にはな

* 本研究の内容の大部分は昭和 24 年 4 月 10 日, 日本農藝化学會大會 (東京) にて講演した.

らなかった。この方法によると桿状菌と球状菌の2種の混在菌を認めたが、球状菌は偏性好気性菌で嫌氣的培養により容易に除き得た。以下繊維素分解菌と桿状の混在菌のみの purified culture に就いて種種の醗酵試験を行った。

(C) 温度と醗酵との関係：種種の温度にて培養を行い、濾紙が崩壊する日数を以て観測を行った。第1表より明らかな如く、最適温度は60~65°で、45~73°の間でも行われる。一般に混在菌の方が生育温度の範囲が廣く、且つ優勢で *Eurithermophilus* に近いが、繊維素分解菌は典型的な *Stenothermophilus* であろうと考えられる。

Table 1. Cellulose Decomposition on the Various Temperature at pH 7.5

Temperature	20°	30°	35°	40°	43°	46°	49°	55°	60°	65°	70°	73°	75°	80°
Decomposition time of cellulose (days)	—	—	—	—	±	6.5	3.5	2.5	2.0	2.0	3.5	6.5	±	—
Velocity ratio of fermentation 1)	—	—	—	—	—	31	57	80	100	100	57	31	—	—
Growth degree after fermentn. {	—	—	—	—	±	+	+	+	+	+	+	+	±	—
Cellulose decomposer	—	—	—	—	±	+	+	+	+	+	+	+	±	—
Contaminant	± ³⁾	+ ³⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—

1) $t = \frac{\text{Decomposition time of cellulose}}{\text{The shortest decomposition time of cellulose}}$

2) Nitrogen source: peptone

3) Duration of incubation: 20 days.

(D) 水素イオン濃度の影響 炭酸石灰無添加の場合には廣域緩衝液として BRITTON 及び ROBINSON の α 溶液の他に pH 5.4~7.9 には $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ を、pH 7.9~8.8 には硼酸-硼砂を用いた。その結果は第2表の如くである。残繊維素は3回水洗し、各回共遠心分離(3000/min.)にて液より分ち、105°, 3時間乾燥して秤量した。炭酸石灰を添加したものは稀鹽酸で処理し、又菌體は誤差の範囲に入るのでその數値を無視した。

Table 2. Cellulose Decomposition on Various pH.

Initial pH		4.0	4.5	4.9	5.3	5.7	6.1	6.5	7.0	7.5	8.0	8.4	8.8	9.2	9.6	10.0	10.5	11.0
No added calcium carbonate	Final pH			—	—	5.8	5.9	6.2	6.1	6.6	6.5	7.0	7.1	7.2	7.4	7.5	—	—
	Decomn. time of cellulose (days)			—	—	11.0	8.5	7.0	2.0 ¹⁾	2.0	2.0	2.5	3.0	4.5	6.5	10.0	—	—
	Vel. ratio of fermentation (1/t×100)			—	—	18	24	29	67	80	100	100	67	44	31	20	—	—
	Cellulose decompd. (%)			—	—	15	>20	30	90 ²⁾	90	<90	<90	<90	<90	<90	80	25	>—
With calcium carbonate	Final pH	—	5.1	5.7	5.8	6.1	5.8	5.9	6.2	6.7	5.8	6.8	6.9	6.5	7.1	9.6	—	—
	Decomn. time of cellulose (days)	—	±	12.0	8.5	6.5	4.5	4.0	3.0	2.5	2.0	2.0	3.0	4.5	6.5	10.0	—	—
	Vel. ratio of fermentation (1/t×100)	—	—	17	24	31	44	50	67	80	100	100	67	44	31	20	—	—
	Cellulose decompd. (%)	—	—	10	>15	30	50	70	80	90	<90	<90	<90	<90	<90	80	25	>—

1) With buffer, 2) No buffer.

最適 pH は緩衝液を用いた場合は7.0~8.0, 用いない場合は8.0~8.4で、その限界は炭酸石灰無添加の時は5.7~10.0, 添加せる場合は4.8~10.0の間で酸性側に範囲が廣く、これは生産される酸性物質の影響が除かれるが爲とみられる。混在菌のみの生育範囲もほぼ同じで温度の場合の如き著しい差異は認められなかった。

(E) 無機鹽と醗酵との関係：標準となるべき培養基 I を定め、これより各成分を省いて無機鹽の影響を検

Table 2. Selection of Inorganic Salt.

Substance	%	Media No.							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5	—	—	—	—	—	—	—	+
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	+	—	+	+	+	+	+	—
KH_2PO_4	0.1	+	+	—	+	+	+	+	—
MgSO_4	0.03	+	+	+	—	+	+	+	+
NaCl	0.05	+	+	+	+	—	+	—	—
CaCl_2	0.01	+	+	+	+	+	—	—	—
Cellulose	1.0	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation		good	none	none	none	good	good	good	good
+ : added		—	—	—	—	—	—	—	—
— : not added.		—	—	—	—	—	—	—	—

討した結果は第3表の如くであつた。

夫々に就いて pH を 6, 7, 8, 9 に調整して培養を行ったところ、I, V, VI, VII 及び VIII は通常の醗酵を示したが(pH 6 が最も不良)、III は移植を重ねる毎に衰えて3回目には全く繊維素の分解がみられず、II, IV では当初から分解されなかった。この事より磷酸、苦土が缺くべからざる事を認め、且つ繊維素の分解に重要な役割をなすものと見做される。

(F) 窒素源の影響：前記の培養基に炭酸石灰を添加し、各窒素源は硫酸アンモニウム 0.5 % の場合を標準に窒素量が同量になる如く添加し Purified culture と Crude culture に就いて検討した。その結果は第 4 表の如くである。醗酵は有機態窒素並びにアンモニア態窒素のもとに可能であり、硝酸態及び亜硝酸態窒素は全く利用されない。又有機態窒素は無機態窒素に比し良好であるが、ペプトン肉汁の如きは雑菌の増殖のみを増す傾向があり、特に Crude culture では著しい。窒素源としては硫酸、尿素、アスパラギン、ペプトンが好適である。

(G) 繊維素量と醗酵との關

係：培養基Ⅶを用い、pH 7.5 とし、炭酸石灰を添加して培養した結果は第 6 表の如きである。添加量が増すに従つて分解率は減少するが、その絶対量は漸増する、この場合他の營養源と關聯がありその量の如何によりかなりの變動がみられる。

(H) 糖類の醗酵に及ぼす影響：培養基に炭酸石灰を加え、葡萄糖を 0.1, 0.25, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5 % を添加し、pH 7.5 にて培養した。0.75 % 程度まではさほど影響はないが、1 % 以上では混在菌の生育が著しく、繊維素の分解は遲滯する。葡萄糖以外にマンノーズ、果糖、キシロース、蔗糖、乳糖、デキストリン、澱粉を用いた場合も同様の結果を得た。

II. 繊維素分解菌の純粹分離に對する培養的知見

上述の如く集積培養を如何程繰り返しても純粹培養は得られない。培養の形態學的性格は SARLES⁽⁸⁾ 等或は MURRAY⁽⁹⁾ のそれと著しく類似している。繊維素分解菌は概ね細型の長桿菌で、混在菌は矢張り桿狀であるがやや幅が廣く大型である。繊維素菌の形態はその兩端は鈍圓、大いさは $0.2 \sim 0.3 \times 2 \sim 6 \mu$ 、孢子形成は terminal でかなり著しく、孢子は橢圓形で $0.6 \times 0.7 \sim 0.8 \mu$ の大きさを持ち、有孢子並びに無孢子細胞共に體內に直列狀に並んだ點狀の顆粒をそなえたものが散見される。繊維素の分解は裂狀に行われ、菌は繊維の長軸に沿つて内部へ浸入してゆく。培養初期には混在菌の生育が盛んで殆んど大部分を占め、分解が初まる頃には有機態窒素を用いた場合 1 種の臭氣を放ち、 E_h は 0 以下になる。混在菌の生育環境は極めて廣く且つ順應性に富むので目的とする菌の分離は非常に困難である。

(A) 稀釋法並びに生育促進物質に就いて：集積培養にて移植の際、確率的に目的とする菌の優勢な稀釋點を見出す爲に接種量を種々の程度に行つたが常に混在菌が優勢で、繊維素分解の生起したものは勿論、分解の起らないものにあつても混在菌が認められた。分解の起る限界は窒素源として peptone を用いた場合、概ね $1/10^0 \sim 1/(2 \times 10^0)$ で、 $1/(2 \times 10^0) \sim 1/(5 \times 10^0)$ の範圍では混在菌のみの生育がみられ、それ以上では最早菌の生育の起らないものが多かつた。高度の稀釋を行つた場合、種々の添加物による影響は第 6 表の如くであるが醗酵を促進するものは混在菌の生育をも同時に良好ならしめる傾向がある。

Table 4. Effect of Nitrogen Source for Cellulose Fermentation.

Nitrogen from	Nitrogen source	Added %	Initial pH	Purified culture		Crude culture	
				Degree of cellulose decompn.	Final pH	Degree of cellulose decompn.	Final pH
Ammonium	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	7.8	+++	6.8	+++	6.6
	$\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.5	7.7	+	6.7	++	7.0
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.5	7.4	++	7.0	+	6.8
	$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0	7.5	++	6.8	+	6.9
	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}$	0.23	7.6	+++	6.9	+++	6.4
	$(\text{NH}_4) \cdot \text{Cl}$	0.4	7.5	+	7.0	+	6.8
	$(\text{NH}_4) \cdot \text{H} \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_6$	1.26	7.7	++	6.9	++	6.7
Ammonium + Nitrate	$\text{NH}_4 \cdot \text{NO}_3$	0.3	7.6	—	7.6	—	7.4
Ammonium + Nitrite	$\text{NH}_4 \cdot \text{NO}_2$	0.24	7.6	—	7.6	—	7.4
Nitrate	NaNO_3	0.65	7.7	—	7.7	—	7.7
	KNO_3	0.75	7.8	—	7.8	—	7.7
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.9	7.6	—	7.6	—	7.6
Nitrite	NaNO_2	0.68	7.3	—	7.3	—	7.3
	Asparagin	0.5	7.5	+++	6.5	+++	6.8
Amino or Organic	Aspartic acid	1.05	7.6	++	6.4	++	6.3
	Peptone	0.85	7.4	+++	6.5	+++	6.4
	Albumin	0.5	7.5	++	6.6	+	6.9
	Casein	0.65	7.6	++	6.7	+	6.6
	Peptone-Bouillon		7.7	+	6.6	+	6.6

Table 5. Effect of Cellulose Concentration for its Degradation

Cellulose added Weight % in 100 cc	Cellulose decomposed	
	g/100cc	%
0.5	0.45~0.50	90~100
1.0	0.85~0.95	85~95
1.5	0.93~1.05	60~70
2.0	1.00~1.22	50~61

Table 6. Effect of Various Substances for Cellulose Fermentation

Substance	Substance		Effect
	Total	volume	
Germ-free filtrate of cultivated medium	1/4	±	
Suspension of <i>E. coli</i> (2 days culture in peptone water)	1/6	+	dilution grade 1/10 ⁶
Germ-free filtrate of <i>E. coli</i> suspension	//	+	//
Extract of manure heated at 120°C, 1 hr. (manure 1 : water 5)	//	++	dilution grade
Extract of compost heated at 120°C, 1 hr.	//	++	//
Suspension of <i>Sac. cerevisiae</i> (2 days culture in glucose-peptone water)	//	+	
Germ-free filtrate of <i>Sac. cerevisiae</i> suspension	//	+	
Yeast extract	//	+	
Vitamin B. (<i>Metabolin</i> 5, Takeda)	//	-	
Liver extract	//	+	

++ fairly, + slightly, ± scarcely, - none

(B) 熱処理法: pH 7.5 に保ち, 100° のものはコッホの蒸気殺菌釜にて, 100° 以上の場合は内径 5 mm の硝石管に菌の懸濁液を約 2 cc 封入して目的とする温度に調節した油槽中に懸垂し, 処理後管壁を破つてその 1cc を新しい培養基に移して検定した. その結果は第 7 表の如くである. 熱処理により雑菌は可成り淘汰されるが纖維素發酵もやや低下し, その最盛期が 2 日位遅れる. 検鏡下では菌は異常な伸張或は屈曲をなしているものが多く見出され, 菌塊を形成して抵抗を増しているものもある. 死滅した培養では大部分菌塊をなしており, それ等の間は透明な液のみとなる. 混在菌のみを培養し, 殺菌濾紙で濾過して菌塊を除き去り, 個々の単細胞が浮遊せる状態下で熱処理を行うと第 7 表の如く抵抗力の減退を示す

Table 7. Cultural Resistance for Heat

Heating temp.	Dealing time (minutes)	30	45	60	80	100	120	3hrs.	4hrs.
100°	Cellulose fermentation	+	+	+	+	±	±	±	-
	Growth of contaminant	+	+	+	+	+	+	+	±
	Cultured only contaminant	+	+	+	+	+	+	-	-
105°	Dealing time (minutes)	2	3.5	5	7.5	10	12.5	15	20
	Cellulose fermentation	+	+	+	+	+	+	±	-
	Growth of contaminant	+	+	+	+	+	+	+	±
110°	Cellulose fermentation	+	+	+	+	±	±	-	-
	Growth of contaminant	+	+	+	+	+	+	-	-
115°	Cellulose fermentation	+	±	±	-	-	-	-	-
	Growth of contaminant	+	+	+	-	-	-	-	-
120°	Cellulose fermentation	±	±	-	-	-	-	-	-
	Growth of contaminant	+	+	±	-	-	-	-	-

(C) 稀釋及び熱処理法の方法: SNIESZKO⁽⁴⁾ の方法による肉汁ペプトン液に於ては, 混在菌は盛んに増殖するが, 纖維素分解菌のそれが極めて緩慢か或は全く行われぬとの前提の下に, 培養を適宜肉汁ペプトン液に移して熱処理を行い, その間稀釋を併用して纖維素培養基に戻した. 即ち, 兩菌の胞子を含む發酵終了液を肉汁ペプトン液に移して 4~5 時間経ると液はやや混濁を示すが, この時期には既に混在菌の發芽が進んでいると見做される. この時に 100°, 15 分間熱処理を行い, その一部を纖維素培養基及び馬糞, 堆肥のデコクト, 或は新鮮な *Sac. cerevisiae* の懸濁液を添加したものに戻して結果を観察し, 一部は更に肉汁ペプトン液に移して操作を繰り返した. 夫々 4, 5, 6 時間間隔の實驗を行つたが, 纖維素分解の起る限界は概ね 1/10⁴~1/10⁵ 程度で單なる稀釋の時よりも低く, 又回を重ねると稀釋度の高いもの程分解力は弱化して 20~30 日後に初めて分解するものも若干みられた. この方法に依れば混在菌の生育は餘程抑制されるが, 纖維素分解をみずして混在菌のみの混濁を示すものも相當數あり, 又分解を示さないものに混在菌の純粹培養を添加しても所期の目的を果さなかつた. これは肉汁ペプトン液に於ては混在菌が全て營養細胞になつて耐熱性が弱化するに對し, 纖維素分解菌が良好ならざる環境下に芽胞状態になつて混在菌より強度の耐熱性を有するであろうとの假定を裏切るものであつて, 好熱性菌は一般に generation time が短かく, その reproduction が極めて速やかな爲, 顯微鏡下には既に死滅せる ghost form も多く含まれ, 且つ高温性菌の特性から好適な状態下にも胞子の形成は行われる上に, 菌が全て同一 phase の reproduction を示すとは限らないので, 頻りに熱処理を行つても混在菌のみを完全に死滅せしめる事が甚だ困難である.

(D) 嫌氣的状態下に於ける集積培養: 纖維素發酵の最盛時の redox potential は可成り低く, pH 7.5, 60°

にて概ね $E_h = -20 \sim -50$ mv で相當還元的状態にある。通常培養基の E_h は比較的高く $E_h > +200$ mv であるが (ペプトンの方が硫酸の場合よりやや低い), 指示薬として resazurin (0.0001 %) を用いると培養初期に混在菌が増殖し始めるや, E_h は低下して指示薬は脱色され, 繊維素の分解が始まると E_h は 0 以下となる。混在菌のみを繊維素を省いた含ペプトン培養基におくと E_h の低下に従い脱色するが, これを振盪して空気との接觸をはかると直ちにバラ色に着色して培養前近くの E_h まで戻るに反し, 繊維素分解の終了したものではかかる現象はみられず, 液自體が既に緩衝作用をもっている。繊維素分解が始まる直前の状態下でも此の傾向がみられ, 繊維素菌の生育に従つて還元性物質が生産されてゆくものと思われる。以上の見地より菌自體が形成する還元的状態を他の要因によつて與えたならばより醗酵が促進されると考えたが, その結果は寧ろ否定的である。1 mm 以下より 2 cm に至るパラフィン層による液面と氣相との遮斷處理では無處理のものとの差異を認めないが, デシケーター中にて約 20 mm 以下に減壓培養すると相當遲滞し, 又 BUCHNER の二重試験管法により計算量の焦性没食子酸と苛性カリを用いて酸素吸収を行つた場合も著しく低下する。又移植量が $1/10^2$ にも殆んど分解が無く, $1/10^3$ 以上では混在菌の繁殖も認められない。二重試験管法に依り, 移植量を $1/10$ にして約 1.5 年間, 10~25 日の間隔にて培養を続けたが混在菌を完全に除き得なかつた。還元性物質添加による方法は廣く用いられているが, cystein, Na-thioglycolate を以て先に測定した醗酵最盛期の電位において培養を開始したが殆んど分解は起らず, 電位が之より高い程比較的良好なる結果を得た。減壓並びに酸素吸収法に還元性物質或は肝臓片添加を併用して嫌氣的且つ還元状態においた時はなお一層結果は悪く, 全く分解が起らないが, 1 ケ月経て濾紙が崩れる程度で, 移植を行つても最早分解力を消失する。この際混在菌の生育は抑制されるが繊維素菌も活力を失ひ, 馬糞或は堆肥デコクトを添加しても殆んど醗酵力を回復しない。よつて醗酵は facultative の状態下にて良好で, 繊維素の分解は redox potential の低下のみによつて誘致せしめられるとは限らない。

(E) 繊維素寒天培養: SCHWEIZER の試薬による水和繊維素を 1~1.5 %, 寒天濃度を 0.89 %, pH を 7.5~8.0 に調整した溶融繊維素寒天培養基 9 cc に稀釋度が $1/10^3 \sim 1/10^4$ なる如同組成の稀釋液より 1 cc 宛接種して (寒天濃度は 0.8 % となる) シャーレに流し, 固化後更に上層に 3 % の寒天を 0.3~1 cm の厚さに重ねて空氣と遮斷する。これを倒置或はその儘の位置にして殺菌水を入れた無菌罐或はデシケーターに收めて封じ 60° で培養する。Clear zone は約 6~10 日であらわれ, その周邊は黃色を帶び, 未分解部との界面は明確で徐々に四方に擴つてゆく。その菌學的觀察は TETRAULT⁽⁹⁾ のそれと殆んど同じで移植を繰り返しても常に混在菌を認めた。なお水和繊維素の代りに濾紙片を接種した寒天層 (濃度 2 % が好適) と接せしめ, 空氣層と遮斷する寒天層を設けると, やはり濾紙片上に黃色の斑點を得る。此の培養を好氣的に行うと稀釋度が低い場合のみ分解がみられ, 接種した菌量が多い爲明確な clear zone が得られず, 又別個に混在菌の聚落もあらわれる。稀釋度が $1/20$ 以上では clear zone がみられず, MURRAY⁽¹⁰⁾ に従つて濕度を調節しても效果はなかつた。この事より菌量が多く, 且つ活性化している際には好氣的状態でも生育し得る可能性を有していると思ふ。

繊維素の分解は facultative の状態が好適なる事は次の高層培養よりしても明らかである。即ち, 徑 1.5 cm, 長さ約 70 cm の硝子製の長管内に處々を針金で固定した細長い濾紙片を吊るし, 之に菌を接種した寒天培養基 (濃度 1.5~2.0 %) を流し込んで管一杯に充たし, 固化後 60° におく。分解はその深さに拘らず一様に起り, 殆んど選擇的な位置を示さない。寒天中には相當量の酸素が溶存しているとみられるから, 醗酵に必要な程度の酸素は培養基中から補給されるとみられる。猶 *E. coli* の suspension を加えた時は分解がやや良好である。

(F) 藥物による影響: Merck 製 streptomycin (1 mg/1 cc): 700 unit) を用いてその影響をみた。予め 90 unit のものを pH 7.5, 60° においたところ 7 日間経て効力は全く消失した。9 unit までは醗酵に影響はなく, 45 unit では約 3 日, 63 unit では約 4~5 日醗酵が遅れ, 90 unit が限界で, それ以上の unit では streptomycin の効力が消失した後も繊維素の分解は認められず, 馴致培養によるも 100 unit が限度で常に混在菌の方が抵抗力の強い事を認めた。又 penicillin を使用したが同様の結果を得た。高單位のものにおいたものも短期間後にその影響を除くと容易に bacteriostatic の状態を脱したが, 單位の高いもの程發芽能力を妨げる事が著しい。

以上の他に negative method 並びに各種の糖 (葡萄糖, マンノース, 果糖, 蔗糖, 乳糖, デキストリン) による分離を試みたが混在菌のみの存在を認め, 所期の目的を達しなかつた。

III. 混在菌の分離及びその菌學的檢定

繊維素寒天培養にて生じた clear zone より釣菌し、之を稀釋して繊維素を含まないペプトン寒天に扁平培養を行うと24時間以内に灰白色圓形の聚落を得る。聚落は表面のみならず淡黄白色の小粒状となつて内部にもあらわれ、之を高層培養に移しても同様のものを得る。當菌は桿状菌で繊維素分解力は全く無く、菌學的檢定は第8表の如くである。

本菌は板野、荒川兩氏の分離せる *Bac. thermofibrincolus* に極めて類似し、培養状態も殆んど一致する。集積培養のみにては繊維素分離は不可能であり、又 *Bac. thermofibrincolus* に對する繊維素分解菌としての確證を缺き、その準據せる VILJOEN, FRED 及び PETERSON⁽³⁾ の分離せる *Cl. thermocellum* 或は LYMN 及び LANGWELL の分離菌が繊維素分解菌でなくて、混在菌の誤認である事は既に明らかにされたところであり、よつて *Bac. thermofibrincolus* も混在菌ではないかとの疑惑を抱くものである。なお當菌に類似せるものには SNIESZKO 等⁽⁴⁾ が繊維素分解集積培養より分離した混在菌 Type B がある。

終りに臨み御指導を賜はつた朝井教授に深謝す。

- (1) R. H. MCBEE : *J. Bact.*, 56, 653 (1948)
- (2) R. H. MCBEE : *Bact. Rev.*, 14, 51 (1950)
- (3) J. A. VILJOEN, E. B. FRED and W. H. PETERSON : *J. Agr. Sci.*, 16, 1 (1926)
- (4) S. SNIESZKO and N. KIMBALL : *Zentr. Bact.*, II, 88, 393 (1933)
- (5) 小田雅夫, 池原忠一郎, 伊藤祐四 : 醸工雜, 28, 205 (1950)
- (6) L. ENEBO : *Nature*, 163, 805 (1949)
- (7) 板野新夫, 荒川左千代 : 農化, 5, 816, 921 (1929)
- (8) W. B. SARLES, E. B. FRED and W. H. PETERSON : *Zentr. Bakt.*, II, 85, 401 (1931-32)
- (9) P. A. TETRAULT : *Zentr. Bakt.*, II, 81, 28 (1930)
- (10) H. C. MURRAY : *J. Bact.*, 47, 117 (1944)

Summary

Cultural environments for the thermophilic cellulose fermentation were examined as a preliminary experiment for isolation of cellulose decomposer. Various techniques, for example, the enrichment method, the dilution or heating method, the cellulose agar plating and the application of bacteriostatic agents, etc., were used in order to get a pure culture, but some contaminants were always found. Generally, the reproduction time of thermophile was so rapid that it was practically impossible to obtain a perfect result, in spite of the excellent Snieszko's method.

Cellulose fermentation proceeded under reduced condition, and yet addition of a reducing agent or strictly anaerobic incubation spoiled the fermentation.

A contaminant, isolated as a pure culture, was very similar to *Bac. thermofibrincolus* which was reported to be cellulose fermenter without confirmation, so it was doubtful that *Bac. thermofibrincolus* was a cellulose-decomposing bacterium.

Table 8. Morphological and Physiological Characters of a Contaminant.

Spores : Ovoid, 0.9 to 1.2 by 1.5 microns, terminal, sometimes in both ends.

Rods : 0.4 to 0.5 by 2 to 6.5 microns, usually occurring singly, sometimes in pairs or in short chains. Motile with peritrichous flagella at 60°C, but non-motile at room temperature. Gram-positive.

Gelatin : Liquefied at 60°C.

Plain agar surface colonies : usually circular, flat, smooth.

Deep agar colonies : Granular or punctiform, usually whitish although it may be yellowish.

Broth : Turbid.

Indol : Not formed⁽¹⁾

Hydrogen sulfid : Not produced.

Litmus milk : Coagulated, slightly acid.

Catalase is produced.

Potato : Slightly growth, cream-coloured.

Nitrites : Produced from nitrates.

Starch is hydrolyzed forming reducing sugar.

Acids from dextrose, cellobiose, mannose, fructose, xylose, sucrose, lactose, dextrin, inulin, sorbit, ducrit.

Acetylmethyl carbinol : Not produced.

Optimum temperature : 55 to 65°C.

Aerobic, facultative.

- 1) Indole formed slightly by purified culture in cellulose media.