そのような好ましくない性質があるかないか試験を行った。即ち上述の如く 6 日間連続デキストランを投与した家兎の血液を最終投与後 7 日及び 14 日後に採り、これから血清を分離し直径 4 mm の小試験管に入れ、注射に用いたデキストラン溶液を上層に加え、両層の境界に濁りが生ずるか否かを観察したが、両デキストラン共に 24 時間後においても何等の反応も見られず、此の反応は陰性と判断された。

(6) 皮膚過敏抗体反応試験：高分子物質の注射により皮膚過敏抗体を生ずる懸念もあるとされているのでこの試験を行った。即ち上述のデキストラン投与家兎の横腹の一部を硫化バリウム澱粉で脱毛し、皮膚を露出させ、此の部分へ注射に用いたデキストラン溶液の 1,000 倍稀釈液 0.1 cc 宛を皮下注射し、24 時間及び 48 時間目に其の部分に赤斑が出来るか否かを観察した。両デキストラン共に此の反応はすべて陰性であった。

III. 要 約

著者等は第 3 報⁽¹⁾に述べた通り調製した clinical size dextran AR-V 及び AR-VI を用いて代用血漿用デキストラン注射液を調製し、ハツカネズミ及び家兎に対して連続 6 日間の投与試験を行い次の結果を得た。

(1) ハツカネズミに対する試験

1 匹に対し 1 日 1 回 0.5 cc 宛静脈注射したが、試験期間中及び終了後も異常なく健康状態は極めて良好であった。

(2) 家兎に対する試験

1 頭に対し 1 日 1 回体重 1 kg 当り 10 cc 宛静注し観察を行ったところ

(i) 健康状態は良好で体重の変化も正常と認められた。

(ii) 発熱性試験では AR-V では最高 0.4° 及び 0.45° の上昇に止り発熱性物質の含有は認められなかったが、AR-VI では 0.5~1.05° の上昇を見た。

(iii) 血球数を測定したところ AR-V では赤血球は僅か乍ら減少の傾向に見え、白血球は殆んど変化せず悪影響は認められなかった。AR-VI では両者ともやや減少の傾向が見られた。

(iv) 赤血球沈降速度を測定したところ AR-V では注射終了後 1 日目で通常の 4~6 倍の値を示したが、4~5 日で元の値に回復した。又 AR-VI では注射終了後 2 日目に 24 時間値で約 2 倍となったが、6 日目には完全に回復した。

(v) 沈降素の生成は認められず、皮膚過敏抗体反応も陰性であった。

終りに臨み発表を許可された武智社長に深謝すると共に、山田繁男、野坂、細見の諸氏に感謝の意を表します。本研究は日本農芸化学会関東支部第 170 回講演会 (昭和 32 年 1 月 26 日) にて発表した。

(1) 滋賀達二、霜 三雄：本誌, 31, 838 (1957)。

(3) J. A. Riddick et al. : *Annal. Chem.*, 26,

(2) G. H. Bixler et al. : *Ind. Eng. Chem.*,

1149 (1954)。

45, 492 (1953)。

埋草熟成化に関する研究 (第 4 報)*

埋草酵母の栄養要求

遠 藤 明 (東北大学農学部)

昭和 32 年 5 月 17 日 受理

緒 言

さきに埋草飼料から分割遠心法により生態的に得た酵母区分について、単離した埋草酵母菌株 (これを単離酵母と名づける) の代謝の型を基準として、産膜性並びに非産膜性酵母群の分布を検討したが、基準とした両種の単離酵母の代謝の型が生育の時期によっては質的な差異を示さなかったために十分に目的を果すことができなかった⁽¹⁾。そこで単離酵母株につきそのビタミン要求を検討した結果、これらの酵母菌株をその基本的要求の差から 4 群に分ち得ること、又これにより産膜性と非産膜性の酵母群をも区別し得ることを認めた。既に伊藤ら⁽²⁾は

* Ensiling Process. Part IV. Nutritional Requirements of Silage Yeast.

By Akira ENDÔ (Faculty of Agriculture, Tohoku University)

清酒酵母についてその基本的栄養要求の差に基き清酒醗並びに醗における各菌株群の分布を見ているが、埋草酵母についてこの様な方法を適用する場合には産膜性酵母の分泌するビオチン様物質によりビオチン要求の非産膜性酵母群の識別が困難となることを認めた。そのために種々考案して結局培地に呼吸の阻害剤を少量添加することによりこの困難を排除する目的を達することができた。かくして設定した各菌株群の識別を実際の埋草飼料に適用して夫々の酵母菌株群の分布を明らかにし得たのでここに報告する。

実 験 方 法

単離埋草酵母としては青刈玉蜀黍埋草（東北大学農学部川渡農場製）より、麴汁寒天を使用して単離した酵母菌株 40 株を用いた。その中産膜性酵母菌株は 23 株、非産膜性酵母菌株は 17 株である。これらの菌株の各種ビタミンに対する要求性を検討するための基本培地として、葡萄糖 20 g, アスパラギン 1.0 g, 硫安 1.5 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g 及び塩類溶液 1.0 ml にビタミンとしてチアミン 200 γ , ピリドキシン 200 γ , ニコチン酸 200 γ , Ca-pantothenate 200 γ , ビオチン 0.2 γ , イノシット 100 γ を加え純水で 100 ml としたものをを用いた。ここで用いた塩類溶液の組成は次の通である。即ち H_3BO_3 0.1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.04 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.045 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g 及び $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g を純水 100 ml に溶解したものである。尚供試培地の窒素源としては、硫安及びアスパラギンの代りにカゼイン水解物をも使用した。その際、産膜性酵母は試験管を立てたまま振盪して、非産膜性酵母は静置して夫々 30°, 24 時間或は 36 時間培養し、その生育を光電比色計で比濁して生育試験とした。

埋草飼料より酵母区分を直接に得るために前報で適用した分割遠心法を今回も多少改変して用いた。即ち埋草飼料を肉挽器で細切し、その 100 g をとり滅菌水で 5 倍量とし 30 分間振盪したのちに植物破片を除去するためにガーゼで濾過する。この濾液を遠心器にかけ 500 r. p. m. で直ちに廻転を停止して得た沈澱は殆ど植物組織の破片であって、この中には酵母は存在しなかった。従ってその上澄部を 1000 r. p. m., 5 分間更に遠心すれば沈澱と上澄部とに分けることができ、この上澄部は殆どバクテリアよりなる。沈澱部は酵母菌体と植物細胞破片との混合物であってバクテリアは殆ど認めることができない。即ちこの 1000 r. p. m., 5 分間で得られた沈澱部は埋草飼料の酵母区分と見做すことができる。

実 験 成 績

1. 単離埋草酵母のビタミン要求

基本培地を完全培地とし省略法によって供試の単離埋草酵母 40 株のビタミン要求を検索した。かくして認められる基本的ビタミン要求から単離埋草酵母を 4 群に分けることができるが、非産膜性酵母はいずれも共通してビオチンを要求し、産膜性酵母では殆ど供試のビタミン類を要求しないか副次的に要求するに過ぎないことを認めた。これらの菌株を更にその副次的要求をも考慮して類別すると次の如くにまとめられる。

非産膜性酵母： ビオチンを共通して基本的に要求するもの

第 1 群 ビオチンのみを基本的に要求するもの

亜群 1 チアミンを副次的に要求するもの……6 株

亜群 2 pantothenate, イノシットを副次的に要求するもの……1 株

第 2 群 ビオチン, pantothenate を基本的に要求するもの……8 株

第 3 群 ビオチン, チアミン, ピリドキシン, ニコチン酸を基本的に要求するもの……2 株

産膜性酵母： 殆んどビタミン類を要求しないが、副次的にのみ要求するもの

亜群 1 ビタミン類を殆ど要求しないもの……13 株

亜群 2 チアミンを副次的に要求するもの……8 株

亜群 3 イノシットを副次的に要求するもの……2 株

2. 基本的ビタミン要求の差に基き各種菌株群の認定法の設定

基本的ビタミン要求の差から菌株群の分布を検索する方法は既に乳酸菌⁽⁹⁾或は清酒酵母について適用されているが、供試の埋草酵母菌株群の如く微量で有効、且容易に他の物質（例えばアスパラギン等）で置き換え得るビオチンを基本的に要求するものでは果してこの種の方法が可能であるか否かは明らかではない。従ってこの点を検討するために上述の類別で最も多数の菌株を含む菌株群から No. 214 株（第 1 群亜群 1）、No. 39 株（第 2 群）及び No. 32 株（産膜酵母亜群 2）を代表的菌株としてえらび、伊藤らの viable counting による方法を試み

第 1 表 硫安-アスパラギン寒天培地上の集落数
(30°, 40 時間培養)

菌 株	完全 培地	ビオチン 欠除培地	pantothenate 欠除培地	ビタミン 欠除培地
No. 214 (第 1 群)	85	87	86	91
No. 39 (第 2 群)	48	53	0	0
No. 214+No. 39	130	128	90	84
No. 214 (第 1 群)	81	65	78	68
No. 32 (産膜性)	94	90	99	88
No. 214+No. 32	173	176	169	164
No. 39 (第 2 群)	65	62	0	—
No. 32 (産膜性)	67	54	60	—
No. 39+No. 32	124	130	58	—

た。即ちその予想としては第 1 群菌株はビ
オチン欠除培地には生育せず、第 2 群菌株
は完全培地にも生育して pantothenate
或はビオチン欠除の両培地には生育しない。
これに反して産膜性酵母はこれら 3 種の何
れの培地にも生育し得ると考えられるから、
これ等 3 種の寒天培地を使用して略々最大
の計数値を示す時間 (通常 40 時間) 後の
出現集落数を読みとれば各群の菌数を算出
し得ることになる。使用した培地は上述の

ビタミン要求の検索の際の基本培地で、これにビタミン除去の寒天 (一度融解後凝固させ純水で数回さらした)
を 2% 加えたが、その組成からビオチン或は pantothenate を省略して夫々のビタミン欠除培地とした。これら
の 3 種の寒天培地につき上述の 3 菌株を単独又は混合接種して 30°, 40 時間後の出現集落数は第 1 表に掲げたが、
予想に反して第 1 群酵母 No. 214 株と産膜性酵母は何れの培地にも生育し得、又第 2 群酵母 No. 39 株は pan-
tothenate 欠除培地には生育し得ないが、ビオチン欠除培地には生育した。従って供試の寒天培地では第 2 群酵
母のみが他の菌株群と識別されるにすぎず、第 1 群酵母と産膜性酵母とは識別されないことになる。これは組成
中のアスパラギンが寒天培地上の如き好気的環境では有効にビオチンと代置し得た結果と考えられる。よってこ
の培地の組成よりアスパラギンを除いて硫安のみを窒素源とする寒天培地を使用した結果第 2 表に示す如く 39
時間後の集落の出現状況は、単独接種の場合にはよく上述の予想と一致したし、又第 2 群酵母 No. 39 株と産膜
酵母 No. 32 株との混合接種に於ても完全培地での集落数と pantothenate 欠除培地上のそれとの差が No. 39
株の予想集落数 (単独接種時の完全培地上の集落数) によく一致した。しかし第 1 群酵母 No. 214 株と産膜性酵

第 2 表 硫安寒天培地上の集落数
(30°, 39 時間培養)

菌 株	完全 培地	ビオチン 欠除培地	pantothenate 欠除培地
No. 214 (第 1 群)	110	0	111
No. 39 (第 2 群)	101	0	0
No. 32 (産膜性)	327	328	317
No. 214+No. 39	228	0	113
No. 214+No. 32	427	378	433
No. 39+No. 32	416	385	361

第 3 表 2×10^{-5} M NaN_3 -硫安寒天培地上の集落数
(30°, 39 時間培養)

実験 1

菌 株	完全 培地	ビオチン 欠除培地	pantothenate 欠除培地
No. 214 (第 1 群)	128	0	110
No. 39 (第 2 群)	106	0	0
No. 32 (産膜性)	320	319	321
No. 214+No. 39	238	0	125
No. 214+No. 32	429	308	456
No. 39+No. 32	418	306	313

実験 2

菌 株	完全 培地	ビオチン 欠除培地	pantothenate 欠除培地
No. 214 (第 1 群)	106	0	102
No. 39 (第 2 群)	100	0	0
No. 32 (産膜性)	113	108	112
No. 214+No. 39+ No. 32	306	117	211

3 菌株混合の各培地上の集落数より得た計算値
No. 214 株 104; No. 39 株 95; No. 32 株 117

母 No. 32 株にあっては完全培地とビオチン欠除培地
との差の集落数は期待される予想数をはるかに下廻り、
この場合では明らかにビオチン欠除培地でも No. 214
株の生育が認められた。従って供試の産膜性酵母 No.
214 株の要求するビオチン又はその代置物質を寒天上
で分泌し、後者の生育を促進したと推定されるが、こ
こに用いた寒天培地では産膜性酵母のビオチン分泌能
を抑制し得ないので培地の改良を種々に試みた結果、
結局硫安のみを窒素源とし、又 2×10^{-5} M の NaN_3
を添加して酵母の生育を多少阻害するように考案した
寒天培地が所期の目的に完全に沿うことができ、且つ
上述の予想をみたすことを見出した。即ちこの種の培
地では 39 時間後に於ても産膜性酵母のビオチン様物
質の前泌は殆ど完全に抑制され第 3 表に掲げる如くビ
オチン要求の No. 214 株と混在していても両者の識
別は明確であり、夫々算出した菌数は予想数とよく一
致した。従ってビオチンの如き微量で有効な生長素因
子についてもこの種の基本的要求の差に基く菌株分布
検索法が成立することも確実である。

3. 埋草飼料に於ける酵母菌株群の分布の検索

最後に上に設定した各菌株群の分布検索を実際の埋
草飼料について適用し得るや否やを検討した。このた
めにはまず試料に附着しているビタミン類やビタミン
生産能のあるバクテリアを完全に除去した酵母区分が

得られねばならないが、分割遠心法がこの目的に沿うことは既に清酒酵母について認められているが埋草飼料にもあてはまるか否かは明らかでない。よってまず予備的に上述の実験から、ビタミン生産能のある他の菌の影響を比較的のうけ難いと考えられる No. 39 株の如き第 2 群酵母と産膜性酵母との分布をこの検索法で求め得られるか否かを試みた。試料としては 135 日間熟成させた青刈玉蜀黍埋草 (1954 年川渡農場製) を用い分割遠心して得られる酵母区分の稀釈懸濁液を硫酸-アスパラギンを窒素源とした完全培地、ビオチン或は pantothenate 欠除の各寒天培地に接種し 30°, 39 時間放置したところ第 4 表に掲げる如く完全培地とビオチン欠除培地には略同数の集落数が出現し、又 pantothenate 欠除培地には集落の出現を見なかった。よって供試の酵母区分は少くとも pantothenate-free の状態であり、又この熟成飼料中には産膜性酵母は殆ど生存せず、その大部分が第 2 群

第 4 表 135 日熟成埋草酵母区分の菌群分布
(硫酸-アスパラギン寒天培地, 30°, 39 時間培養)

完全培地	ビオチン 欠除培地	pantothenate 欠除培地
49	47	0

第 5 表 埋草原料 (禾本科雑草) 酵母区分の菌群の分布
($2 \times 10^{-5}M$ $NaNO_3$ -硫酸寒天培地, 30°, 39 時間培養)

完全培地	ビオチン 欠除培地	pantothenate 欠除培地
147	84	126

計算値 第 1 群 42; 第 2 群 21, 産膜性 84

と、第 5 表にみられる如くビオチン欠除培地に最も少く、 $NaNO_3$ 添加の効果は明らかに認めれた。又供試酵母区分は biotin-free の状態であり、且バクテリア類の混在も殆どなかったの、ここに施行した方法で埋草飼料における基本的栄養要求を異にする酵母菌株群の分布を検索し得ることは確実である。この成績では供試の雑草には産膜性酵母が非産膜性のものよりやや優位に附着し、後者の酵母群では第 1 群の方が第 2 群よりも 2 倍多く存在していた。埋草飼料中のこれらの酵母群の分布の詳細な検索は後報にゆずる。

考 察

埋草の熟成過程で屢々ひきおこされる腐敗は微生物が乳酸を代謝することによって導かれるが特にこれに関与する微生物としては酸性でよく生育し、且 pH 3.5 のような低い pH 値でもよく乳酸を代謝し得る酵母に留意すべきことは既に指摘したところである。これらの埋草飼料酵母は産膜性と非産膜性の 2 群に大別されるが、これら両者は通常の培地上的集落の形態からは見分け難いし、又既報の如く代謝の型による識別も不完全である。しかし両者はビタミン要求の点で決定的に異なるので、これに基き夫々の識別法をここに設定した。この種の識別法は既に清酒醗及び醗について基本的栄養要求の差に基いて類別された諸種の菌株群の識別の際には容易に適用し得たが、ビオチンの如き微量でも有効なビタミンを要求する菌株群の識別に於ては本報でも見られる如く多くの困難を伴った。しかしこの種の困難はでき得るかぎり排除しても斯の如き分布検索法を施行することは生態的見地から見ても重要な意義をもつものと考えられる。即ち Schultz & Atkin⁽⁴⁾ 或は大河内⁽⁵⁾の認めた如くこの種の栄養要求によって酵母は種々の変異種に区分され得るが、生体代謝と密接に関係するビタミン類に対するこれらの酵母群の要求状況の生態的観察、即ちその分布状況を知ることは菌株群の実際の行動への解析に対して重要な手がかりを与えることができるからである。

この分布検索法を実際に施行するに当り、清酒醗或は醗や本報の埋草飼料についても分割遠心法によって分離された酵母区分が重要な役割をなし、これによって始めてこの検索法が実際に適用し得たと云える。ここに報じる検索法によってわれわれは埋草飼料に於ける少くとも 2 種の主要な酵母菌株群、即ち産膜性と非産膜性の両群の分布を正確に知ることができるようになったが、これによってさきに認めた生態的に得られる酵母区分の代謝についてその解析を更に進め得ることは確実である。

総 括

埋草熟成過程中に主導的な役割を占める酵母菌株群を知る目的で埋草酵母菌株群の栄養要求の差異に基く分布検索法を検討した。

(1) 埋草飼料より単離した酵母菌株をその基本的ビタミン要求より類別した結果 4 群に分けることができ、

産膜性酵母では殆どビタミンを要求せず、非産膜性酵母ではいずれもビオチンを基本的に要求し、そのほか pantothenate, ニコチン酸などを基本的に要求するものが存在する。

(2) 代表的菌株 3 種につき上述のビタミン類を欠除する培地を使用して寒天平板法により各々が識別し得るや否やを検討した結果、ビオチン分泌能のある産膜性酵母が混在する場合には識別上に困難を来すことを認め、硫酸を窒素源とし、且 2×10^{-5} M の NaN_3 を培地に添加した時に各菌株群を完全に識別することができた。

(3) 実際の埋草についてこれより分割遠心法で得られる酵母区分に上述の分布検索法を適用して、充分にその目的をはたし得ることを認めた。

本実験は植村教授をはじめ農業微生物研究室の諸氏、並びに東北大学川渡農場の諸氏の御指導御援助によって成ったものでここに厚く感謝する。

尚本研究の研究費の一部は、昭和 29 年度文部省科学研究助成金に仰いだ。

(本研究の一部は昭和 30 年 2 月、日本農芸化学会東北支部小集会以講演した。)

(1) A. Endô : <i>Tohoku J. Agr. Res.</i> , V, 291 (1955).	<i>J. Gen. Microbiol.</i> , 10, 371 (1954).
(2) 伊藤雄太郎 : 醸酵工学, 33, 421 (1955).	(4) A. S. Schultz, L. Atkin : <i>Arch. Biochem.</i> , 14, 369 (1947).
(3) C. Russell, R. R. Bhandari, T. K. Walker :	(5) 大河内信定 : 本誌, 14, 1479 (1938).

埋草熟成化に関する研究 (第 5 報)*

埋草酵母の分布とその酢酸代謝

遠 藤 明 (東北大学農学部)

昭和 32 年 5 月 17 日 受 理

緒 言

さきに埋草の腐敗に酵母が関与すること並びに埋草より分割遠心法により得た酵母区分に酢酸を酸化しない時期のあることを報告し⁽¹⁾, 又埋草酵母のビタミン要求による分類に基きこれ等酵母群の分布検索法を設定した⁽²⁾. この報告では、埋草熟成過程の各群酵母の分布を、その酵母区分の酢酸、乳酸及び葡萄糖に対する酸化能と対比しつつ検索し、熟成の各時期においていずれの酵母群が優位であるかを検討した。又その酵母区分が酢酸を酸化しない時期をもつことを再び認めたので、埋草酵母各群の代表的菌株を用いて青刈玉蜀黍搾汁に培養しその酸化能を検討した。

実験材料及び方法

実験材料に用いた埋草は 1955 年 9 月川渡農場で青刈玉蜀黍を材料として同農場の塔状サイロに詰込んだものである。この埋草の熟成過程から経時的に得た試料について分割遠心法の適用により既報の分離方法に従って直接に酵母区分を得た。試料は表層より 40~50 cm の深さの部位の埋草飼料 100 g (新鮮量) を調熟の各時期にわたって採取した。

埋草調熟時における酵母分布については上の酵母区分を用いて前に設定した埋草酵母分布検索法によってこれを検索した。すなわち新鮮量 100 g より得られる全酵母区分は洗滌後つねに滅菌純水に懸濁し 20 ml とし、その 1 ml について前報と同様の培地を使用してなんらのビタミン類を必須としない産膜性酵母群、ビオチンのみを必須とする非産膜性群及びビオチンと pantothenate を必須とする同じく非産膜性群のそれぞれの分布を計数した。その際培地としては硫酸 1.5%, アスパラギン 1.0%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% 及びビタミン混合物 (Ca-pantothenate, ビチオン, チアミン, ナイアシン, ビリドキシン, イノシット) よりなる寒天培地を完全培地とし、pantothenate 要求酵母の識別のためにはその pantothenate 欠除培地を、またビオチン要求酵母の判別には完全培地からとくにアスパラギンを除き、さらに 2×10^{-5} M のアジドを添加したビオチン

* Ensiling Process. Part V. The Distribution of the Silage Yeasts and its Metabolic Activities against Acetate.

By Akira ENDÔ (Faculty of Agriculture, Tohoku University)