

(三崎, 堀, 松山) *Bacillus polymyxa* 1 變株の生成する Bacterial polysaccharide の研究 (第2報) (191)

- 11) VIRTANEN A.I.: Nature, **158**, 795 (1946). 12) NORD F.F. and VITUCCI J.C.: advances in Enzymol., **8**, 253 (1948). 13) STRAKER R.P., NELSON G.H. and LEVINE M.: J. Agr. Res., **1**, 3 (1942). 14) HAJNY, G.J. GARDNER C.H. and RITTER G.: Ind. Eng. Chem., **43**, 1384 (1951). 15) PETERSON W.H. and SNIESZKO S.: Zent. f. Bakt., II, **88**, 410 (1933). 16) SARLES W.B., FRED E.B., and PETERSON W.H.: ibd, II, **85**, 401 (1932). 17) SCOTT S.W., FRED E.B., and PETERSON W.H.: Ind. Eng. Chem., **22**, 734 (1930). 18) TETRAULT P.A.: Zent. f. Bakt., II, **81**, 28 (1930). 19) 西田: 木材化学工業 P. 468 (昭.21). 20) 前田: 織工試験報, **14**, 1 (1942); 織學誌, **1**, 651 (1945). 21) SCHÖNLEBER K.: BASTFASER 3/4, **13** (1944); J. B. SUMNER: The Enzymes, vol 1, P. 728 (1950). 22) HARVEY J.V.: "Memorandum Report G.B.-90" Philadelphia, U. S. Army Quartermaster General Laboratories, Oct. 12, (1948); R.G.H. SIU: Microbial Decomposition of Cellulose, P.256 (1951). 23) KARRER P.: Kolloid-Z., **52**, 304 (1930). 24) FAUST O., KARRER P., and SCHUBERT P.: Helv. Chem. Acta, **11**, 231 (1928). 25) 宮道: 植物成分研究法, P.193 (昭.10). 26) 著者: 醸協誌, **37**, 812 (昭.17). 27) 著者: 本誌, **27**, 112 (1949). 28) DORÉE C.: Biochem. J., **14**, 709 (1920). 29) KARRER P. et al: Helv. Chem. Acta, **6**, 800 (1923); **7**, 144, 916 (1924); **8**, 245, 797 (1925); **9**, 893 (1926); **11**, 229 (1928); Kolloid-Z., **36**, 91 (1925). 30) THAYSEN A.C., and BUNKER H.J.: "Microbiology of Cellulose, Hemicellulose, Pectin and Gums", P. 363 (1927). 31) HEYES T. F. and HOLDEN H.S.: J. Text. Inst., **32**, T79 (1932). 32) 友田: 工化誌, **35**, 1303 (昭.7). 33) GREATHOUSE G.A.: Text. Res. J. **20**, 227 (1950). 34) REESE, E.T. SIU R.G.H. and LEVINSON H. L.: J. Bact., **59**, 485 (1950). 35) 農藝化学実験書(京大)P.859 (昭.25). 36) 著者: 本誌, **27**, 112 (1949). 37) 八濱, 上代: リグニンの化学, P.219 (昭.22). 38) 右田: 木材化学, P.104 (昭.25). 39) GRUSS J.: Ber. deut. Bot. Ges., **33**, 361 (1920); **41**, 48 (1923). (昭和29.3.12受理)

Bacillus polymyxa 1 變株の生成する Bacterial polysaccharide の研究 (第2報) 菌 學 的 研 究

三 崎 旭・堀 一 郎・松 山 宏 (大阪大學工學部醸酵工學教室)

I. 緒 言

前報¹⁾では著者等が汚水より分離した細菌の1株 S-33 が振盪培養により乳糖より特異的に bacterial polysaccharide を生成する事實を認めその培養條件について考察した。最近 RUTTER and HANSON²⁾ (1953) も *Lactobacillus bulgaricus* の1株が乳糖培地中で生育する時その Cellular polysaccharide がリボース, アラビノース, 葡萄糖及びガラクトースより構成される事を報告しているが此等の事實は乳糖の直接代謝と關聯して興味ある問題であらう。一般に乳糖は好氣的に細菌に依り利用され難い炭水化物であり従つて此の方面の研究も少いが MEYER, E. M.³⁾ (1918), PORTER et al⁴⁾ (1937), NORTON et al⁵⁾ (1924), 及び GREER⁶⁾ (1928) は有胞子細菌たる *Aerobacillus polymyxa-macerans* が乳糖より酸及びガスを生成する事を報告し最近 VAUGHN et al⁷⁾ (1952) はこれらの菌が果汁罐詰を Spoil して往々ゴム性物質を生産する事を報告している。従つて著者等の分離した polysaccharide 生成菌 S-33 が如何なる性質を有するかは該菌の分離學的位置に關聯して興味ある事なので本報では菌學的特性を考察して Bergey's manual of determinative bacteriology (1948) 及び既往の報告と比較した結果を述べる。

II. 形 態 的 特 性

グラム陽性菌で主として単一に存在するが屢々双狀或は三ヶ連結する。生長細胞は随圓桿狀をなし大きさは $0.3 \sim 0.7 \mu \times 1.5 \sim 2.6 \mu$ 。周生鞭毛に依る運動性を示す。老細胞では細胞の中央部に胞子が認められその大きさは約 $0.1 \mu \sim 0.4 \mu$ である。猶 FRIEDLÄNDER 氏法に依る染色では Capsule の存在は明かでなかつた。

(192) (三崎, 堀, 松山) *Bacillus polymyxa* 1 變株の生成する Bacterial polysaccharide の研究 (第2報)

Ⅲ. 培養的特性

- 1) 魚エキスを、ペプトン寒天培地 (鰹エキス1.0%, ペプトン1.0%, 食鹽0.5%, pH 7.0) でよく生育し聚落は灰白色の不正圓形で隆起し濕潤性の光澤を有す。
- 2) 肉汁ペプトン培養: 30°Cにてよく生育し表面に濕潤性の薄い被膜を形成すると共に底部に綿狀の沈渣を生成す。葡萄糖又は乳糖を含む培地ではガスの發生が顯著である。
- 3) Agarslant: よく生育し臍て Slant 全面を蔽う様になる。猶葡萄糖を含む場合生育速度は加速される。
- 4) 無機合成培地 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{Mg}(\text{SO}_4)_2$ 0.05%, pH 7.0): 發育認めず。
- 5) セラチン穿刺培養: 培養4日目より部分的液化を示し漸次溶膠範圍擴大す。
- 6) 牛乳培地: 30°C, 5日培養でペプトン化は認められるも凝固性は認められず。
- 7) 肉汁寒天穿刺培養: 専ら表面に發育するが穿刺溝部にてもわずかに發育が認められ偏性好氣性なることを示す, 長時間の培養に依りガスを發生す。
- 8) 遠藤氏培地⁹⁾: フクシン赤乳糖寒天培地に培養すると最初の3, 4日は聚落の發生が認められないが以後粘稠性の滴狀に隆起した圓形の聚落が發生し周邊の培地を赤變す。
- 9) 乳糖寒天培地: 上の遠藤氏培地に發育した菌を乳糖1.0%, ペプトン1.0%, 肉エキス1.0%, 食鹽0.5%, アスパラギン酸ソーダ0.05% (pH 7.0) の培地で扁平培養すると24時間で滴狀隆起せる圓形の聚落を發生す。

Ⅳ. 生理的特性

1) 發育溫度: pH 7.0の肉汁ペプトン培地に接種し夫々 25°C, 30°C, 35°C, 48°C の各溫度で培養し混濁狀態より發育を觀察した結果は Table I の如くなる。これより發育最適溫度は30°C~35°C附近と思われ48°Cにては發育認められず。

2) 發育pH: pHを夫々, 3.0, 4.2, 5.0, 5.6, 7.0, 7.6 及び8.8に調整した (何れも殺菌後の pH) 肉汁ペプトン培地で30°Cにて培養すると48時間後 pH 3.0及び8.8では發育が認められず pH 4.2でわずかに發育し pH 5.0~7.6の間では何れも良く繁殖する。而して最適 pH は中性又は微アルカリ性にあることが分つた。

3) 硝酸鹽の還元: KH_2PO_4 1.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2g, NH_4NO_3 0.9g, 葡萄糖15.0g, 蒸留水600ml, pH 7.0の培地で30°C, 3日培養後沃度澱粉生成法及び Griess 氏反應に依る亜硝酸の檢出は陰性であつた。

4) 硫化水素の生成: 肉汁ペプトン培地にて, 30°C, 2日培養後醋酸鉛法による硫化水素の檢出は陰性であつた。

5) インドールの生成: 肉汁ペプトン培地にて30°C, 3日間培養後茚三酮法によるインドールの檢出は陽性であつた。

6) Acetyl methyl Carbinol の生成: ペプトン0.5%, 葡萄糖0.5%, KH_2PO_4 0.5%, pH 7.0の培地に30°C, 5日培養し Voges-Proskauer 反應に依り Acetyl Methyl carbinol の生成を確認した。

7) エタノールより醋酸の生成: 3.0%及び5.0%のエタノールを含む肉汁ペプトン培地で30°C, 5日培養し第二鹽化鐵反應により醋酸の生成を認めた。

8) 枸橼酸の利用: クエン酸ソーダ2.77g, NaCl 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.0g, K_2HPO_4 1.0g, 寒天20g, 蒸留水1000 mlより成る培地に30°C, 2日培養したが枸橼酸の利用は認められなかつた。

9) Catalase の存在: 肉汁ペプトン培地にて30°C, 5日培養後過酸化水素水を混和することにより酸素ガスの發生を確認した。

Table I. Temperature Relation of Isolated Bacteria No. 33

time (hr) \ temp °C	24	48	72	96
25	+	+	++	++
30	+	++	+++	+++
35	++	++	++	++
48	-	-	-	-

(+ Shows degrees of growth)

Ⅴ. 炭水化物に對する作用

(1) 生 酸 性

炭素源として夫々葡萄糖, ガラクトース, 乳糖 2.0%を含む寒天培地に炭酸カルシウムを添加して扁平培養すると透明且粘稠の聚落の周邊に溶解カルシウムを生成する。葡萄糖では24時間乃至48時間後に認められるがガラ

(三崎, 堀, 松山) *Bacillus polymyxa* 1 變株の生成する Bacterial polysaccharide の研究 (第2報) (193)

イトース及び乳糖では4~5日を要した。

又葡萄糖, ガラクトース, ソルビット, ラムノース各3~5%を炭素源とし酵母エキス2.0%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%を含む培地 (pH 7.0) で液體培養すると上記炭水化物の全てについて1~3日後にブ羅斯のpHは3.6 (ソルビットでは4.2) となり酸酵は停止する。猶酸酵中はガスの發生が旺んであつたがソルビット酸酵液は Fehling 液を還元しなかつたのでソルボースは生成していないと思われる。

次に各, 乳糖, 葡萄糖, ガラクトースを含む上記組成の培地100mlに1.5gの沈降性炭酸カルシウムを添加して30°C, 6日振盪培養した後遠心分離して糖の消費及び溶存カルシウムを測定した結果は Table 2 に示す。

Table II. Fermentation of Sugars by Isolated strain (after 6 days)

Substrate	initial Sugar mg/ml	final Sugar mg/ml	dissolved Ca mg/ml
Glucose	35.2	0.0	1,235
Galactose	46.5	11.6	2,553
Lactose	45.2	15.2	1,925

猶乳糖酸酵液のみが顯著なる粘性を示し葡萄糖, ガラクトースでは粘液とならなかつた。

又, 蔗糖よりの生酸性も認められるがDextran様粘質物は生産されなかつた。

(2) 酸化性

Warburg 検査計により糖に對する酸化性を觀察した結果は Fig 1 の如くなる。菌體は無糖肉エキス, ペプトン培地で24時間, 28°Cにて培養後遠

心分離により集め更に3回水洗した後 N/5 phosphate Duffer (pH 6.8) に懸濁させて用いた。基質として各 $\frac{1}{10}$ mol濃度の葡萄糖, 乳糖, グルコン酸カルシウム0.5 mlを用いた。反應は30°Cにて行い生成した炭酸ガスは苛性カリ溶液にて吸収させた。この結果より各基質に對する酸化能 (QO_2) は次の如き値となる。

QO_2 (glucose): 54.5, QO_2 (galactose); 35.6, QO_2 (lactose); 21.0 QO_2 (Ca-gluconate); 26.5.

又 $\frac{1}{10}$ molの葡萄糖, ガラクトース, 及び乳糖0.2 ml (5 μ l/cup) を用いて酸化を行つたが反應の終點を觀察する事には成功せず結局本菌に依る酸化はグルコン酸, ラクトピオン酸の如き第一次的酸代生産物を経る事なく酸代が行われるか又はこれらの中間物を経てもそれより更に酸代が進むものと考えられる。次に乳糖の酸化と並行して發生する炭酸ガスを direct method⁹⁾ に依り測定すると Fig 2 の如き結果を得る。之より本菌に依る乳

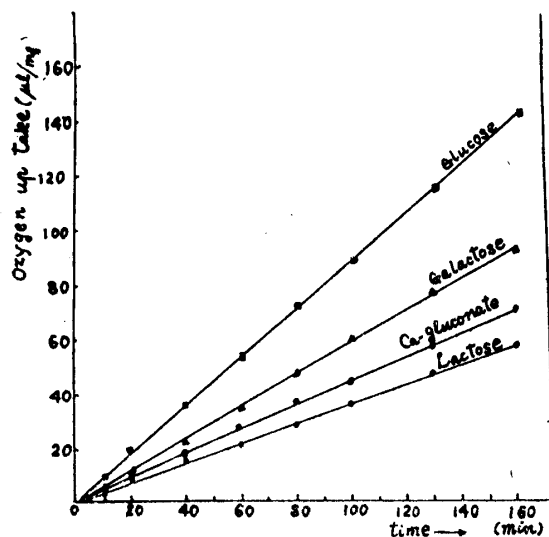


Fig 1. Oxidation of Carbohydrates by isolated S-33 Strain (at 30°C)

Substrate; each 0.5 ml of M/10 Concentration of glucose, galactose, Ca-gluconate and lactate was used

Cell : 0.5ml of cell suspension is poured into 1.0ml of phosphate buffer (pH 6.8)

Each curve indicates the oxygen up take (μ l) per mg of cell (dry weight), and endogenous respiration is subtracted.

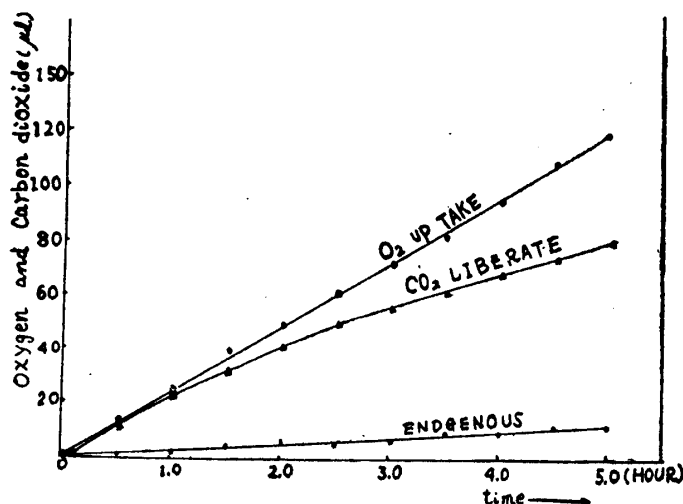


Fig 2. Carbon dioxide Liberation accompanied with Lactose oxidation by S-33 strain (at 30°C)

糖の代謝は單純なる酸化ではなくより複雑なる過程を通るものと思われる。尙この反應は Sodium fluoride によりわずかに, 又 monojod acetic acid により完全に阻害された。

(3) Cellulase の存在: NaNO_3 0.5g, K_2HPO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KCl 0.5g, FeSO_4 0.01g, 蒸溜水1000 mlよりなる培地に良質の濾紙片 (1~2g) を加え7日培養

(194) (三崎, 堀, 松山) *Bacillus polymyxa* 1 變株の生成する Bacterial polysaccharide の研究 (第2報)

し培養液について Fehling 液還元の有無を検したが陰性であつたので Cellulase の存在は認められない。

(4) Lactase の存在: 乳糖約 5% を含む イースト・エキス, 無機鹽添加の培地に少量の炭酸カルシウムを加え 30°C で培養するときは粘性物質を生産し Bafored 反應は陰性であり Lactase の存在は認められない。而し或る條件 (例えば炭酸カルシウムを加えず培養液の pH の著しく低下する場合, 或は磷酸を過剰に添加せる場合等) では酸酵中に單糖への分解も觀察されたのでこれについては更に検討したい。

(5) Amylase の存在: 可溶性澱粉 2.0% を含む寒天培地に扁平培養 3 日後その聚落の周邊に Clkar zone を認め更にこれはヨード液に依り呈色したので Amylase の存在を確認した。而し結晶性 dextrin の生成は認められなかつた。

VI. S-33 號菌の類縁關係

以上述べた菌學的性質より 33 號菌はグラム陽性で周生鞭毛を有する小型の短桿菌であり Catalase の存在が認められ Bergey (1948) の分類に従えば *Bacillus* genus に屬する。更に胞子を形成する點及び乳糖を初めガラクトース, 葡萄糖, 澱粉等の炭水化物に作用する事より *Bacillus polymyxa* (Framoski) 或は *Bacillus macerans* (Schaudinger) と類縁關係にあるものと認められる。兩者の差異としては Voges-Prokuer 反應, ラムノーゼ及びソルビットに對する作用 (Porter et al 1937)⁴⁾, 及び最適生育溫度等が擧げられるが Vaughan et al (1952)⁷⁾ に依れば *B. polymyxa* の或る株はラムノーゼ及びソルビットより酸及びガスを生成する事實がある。以上の性質の外 Gelatin の液化性, 結晶デキストリンを生成しない點等より 33 號菌は寧ろ *Bacillus polymyxa* 系統と判斷される。Bergey 記載の *Bacillus polymyxa* と該菌の主なる特徴を比較すると Table III の如くな

Table III. Comparison of the Characteristics between *Bacillus polymyxa* and Isolated strain (S-33)

Characteristics	<i>Bacillus polymyxa</i> (described Bergey)	S-33 strain
Cells	rods; 0.6~1.0 μ × 2.5~6.6 μ single or short chains	rods; 0.3~0.7 μ × 1.5~2.5 μ . single or short chains
Mobility	motile with peritrichous flagella	motile with peritrichous flagella
Gram-strain	variable	positive
Spores	ellipsoidal; central to subterminal	round; central
gelatin stab	slow liquefaction	slow liquefaction
Agar colonies	thin, inconspicuous, spreading over entire plate. round forms and whitish color	thin, inconspicuous, spreading over entire plate, round or irregular forms and brownish white, adhesive. On Endo's medium, the colonies are redish, raised and gummy
Agar slant	on glucose agar, the growth is much aehav, raised and gummy	on bouillon glucose agar, raised and gummy, but on lactose medium, sometimes produced greenish yellow pigment
Broth	uniform to granular turbidity, flocculent to slimy sediment, thin pellicle is formed	turbidity, flocculent sediment is produced, and thin pellicle is formed, opt. pH; 6.8~7.0
Milk	not coagulated, gas usually formed	not coagulated, but peptonized
Reduction of Nitrate	positive	positive
Formation of indol	positive	positive
Hydrolysis of starch	positive, crystalline dextrin are not formed	positive, crystalline dextrin are not formed
Citrate utilization	negative	negative
Voges-prokauer reaction	positive	positive
Utilization of carbohydrates	acid and gas from glucose, galactose, fructose, arabinose maltose, sucrose, lactose, raffinose etc.	acid and gas from glucose, galactose, sucrose, lactose, Sorbose, rhamnose. gum or polysaccharide is formed specifically from lactose
Opt. temp.	about 30°C, no growth at 42°C to 45°C	about 30~35°C. No growth at 48°C.

る。その相異点としては、(1)生長細胞が相當小型で短程に近く、(2)生育 pH 範圍は Bergey 記載の *B. polymyxa* の場合 5.2~6.8 が適當であるが 33 號菌は中性乃至微アルカリ性培地を好む様で pH 8.6 にてもわずかに生育が認められる。(3) *B. polymyxa* は通常炭水化物よりゴム物質を生成すると云われ VAUGHN et al⁷⁾ (1952) に依れば果汁等を腐敗してゴム物質を生成することがあると報告されているが 33 號菌は乳糖のみより特異的に相當高分子のゴム物質(polysaccharide)を生成するが他の糖よりの生産性は認められない。猶本菌は抗生物質(polymyxin)を生産する *B. polymyxa* の株¹⁰⁾とは形態的に多少の差異がある。以上の特徴を検討して著者等は該菌を *Bacillus polymyxa* の 1 變異株と考え *B. polymyxa* var. *lactoviscosus* と命名した。

終りに臨み御指導を頂いた恩師寺本教授に深謝致します。猶本研究の一部は文部省科學研究費に仰いだ(本研究の一部は昭和 28 年 4 月日本農藝化學大會にて發表済)

文 献

- 1) 三崎, 堀: 本誌 (未刊) (1954).
- 2) RUTTER W. J. and HANSEN R. G.: J. Biol. Chem. **202**, 311 (1953).
- 3) MEYER E. M.: J. Bact. **3**, 9 (1918).
- 4) PORTER, P. et al: Ibid. **33**, 163 (1937).
- 5) NORTON, et al: Am. J. Pub. Health **14**, 1019 (1924).
- 6) GREER, J. Inf. Disease **42**, 501 (1928).
- 7) VAUGHN, R. H. et al: Food. Research **17**, 560 (1952).
- 8) 宮地: 應用微菌學, (實施篇), p.161 (昭和 24 年).
- 9) UMBREIT W. W. et al: Manometric Techniques and Tissue metabolism p.17 (1951).
- 10) 阿倍, 有馬等: J. antibiotics **4**, 16 (1951).

(昭和 29, 8, 13 受理)

訂正 前號 150 頁 Table IV に於ける最下行の左より 2 番目の値 0.055 は 0.0055 の誤りにつき訂正致します。

微生物の生産する抗菌性物質 (第5報) 放線菌の生産する抗微生物物質 (其の1)

田 口 久 治 (大阪大學工學部發酵工學教室)

緒 論

從來放線菌の生産する抗菌性物質に關しては其の對象とするところが所謂病原細菌に限られて居たが最近農藥、食品防腐をも含めた目的をもつて米國に於て放線菌の生産する抗微生物物質の研究が行われ、Antimycin¹⁾, Fungicidin²⁾, Fradycin³⁾, Actidion⁴⁾ 等が單離された。本邦に於ても相磯⁵⁾ が Mycelin, 細谷^{6,7)} が Rotaventin, 梅澤⁸⁾ 等が Moldin, Phaeofacin, 平⁹⁾ が Microcin, 若木¹⁰⁻¹²⁾ 等が Chromin, Cacaomycetin を夫々單離している。筆者も放線菌の中には各種細菌及び黴に對して有効な株が特異的に廣く分布する事より推して食品類の防腐、人類及び動植物病原糸狀菌の發育繁殖の抑制に使用し得る抗微生物物質を得る目的で、本研究を開始した。相磯¹³⁾ は抗黴性を有する放線菌は比較的抗細菌力が弱い事を述べているが、Grisein 生産菌の菌體から Actidion が、又 Reticulin 生産菌の菌體から Rotaventin なる抗微生物物質が單離された事に鑑み、筆者が分離した抗細菌性を有する放線菌の保存菌株を第一次撰擇の對象として抗黴力を有する菌株を撰擇した。之等の中 195 號菌は濾液及び菌體の兩者から夫々抽出可能な抗微生物物質を生産し、現在迄の研究では新抗微生物物質と考えられるので此處に其の菌學的性狀、生産條件、抽出方法、理化學的性質更に濾液及び菌體から得た抗微生物物質の異同に就いて判明せる結果を報告する。

抗黴性放線菌の撰擇

保存菌株の中グラム陽性及びグラム陰性菌に有効な菌株 30 株並びにグラム陽性菌にのみ有効な菌株 97 株に就いてその抗黴性を檢した。第一次撰擇として抗黴性有無の檢査は Czapek 寒天培地上に放線菌を接種し 27°C に培養後 4 日目に濃度調整せる *Penicillium chrysogenum* 及び *Aspergillus niger* の孢子懸濁液を噴霧し 24 時間 27°C に培養し其の發育阻止距離を測定した。此の結果グラム陰陽兩菌に有効な菌株から 6 株、グラム陽性菌に有効な菌株から 2 株、計 8 株の抗黴力を有する菌株を得た。之等 8 株の放線菌に就き BROCK & WICK 改變培地 A, 澱粉 1%, ペプトン 0.5%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.2%, FeSO₄ · 7H₂O 0.001% の培地 B, 葡萄糖添加ブイオン培地 C の三種類を使用し振盪培養で 4 日間培養し *Aspergillus niger* を對象菌として Czapek 液體培地 (pH 6.8) を使用して稀釋法によつて抗黴力の生産を檢した。此の第二次撰擇の結果は第 1 表に掲示する。