

(300)

(外山) *Trichoderma koningi* に依る纖維素分解 (第3報)

Ash of woods	1000	52.6	16.1	68.7	6.4
		51.0	20.5	71.5	6.8
		*51.8	18.3	70.0	6.6
	5000	54.0	17.0	71.0	6.0
		50.0	19.5	69.5	6.2
		*52.0	18.3	70.3	6.1
Control	0	47.8	33.2	81.0	7.4
		59.7	32.3	92.0	7.0
		49.6	35.9	85.5	6.6
		*52.4	33.8	86.2	7.0

*: Mean value

にいたらなかつた。その促進効果の最適濃度 (mg/100g培地) は $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.08, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20, ZnCl_2 6.8 であつた。又 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及び ZnCl_2 は *Conidia* の收量増加にも効果的であつた。

終始御指導と御鞭撻を賜りました所長茶珍博士、恩師京大教授高田博士並びに阪大教授照井博士に深謝致します。尙本研究は昭和28年10月16日日本會議演會において

發表した。

(Neurospora sitophila に關する研究第19報)

文 献

- 1) 黒野, 藤田: 醸造試報, **95**, 31 (昭2). 2) 三輪: 本誌, **11**, 181, 304 (昭8), 3) GILBERT, W. J.: J. Bact., **51**, 731 (1946). 4) KOFFLER, H., KNIGHT S. G. and FRAZIER W. C.: J. Bact., **53**, 115 (1947). 5) MOYER A. T. and COGHILL R. D.: J. Bact., **54**, 161 (1947). 6) SHU, P.: J. Bact., **54**, 161 (1947). 7) 有馬, 田中, 増田: J. Antibiotics, **3**, 493 (昭25). 8) 石井, 宮本: 本誌, **32**, 276 (昭和29) 9) EDWARD G. HIGH and SHERMANN S. WILSON: J. Nutri, **50**, 203 (1953).

(昭和29, 4, 16受理)

Trichoderma koningi に依る纖維素分解 (第3報)

外 山 信 男 (宮崎大學農學部農業化學科)

緒 言

Trichoderma 屬は世界的に分布し土壤特に酸性土壤中に極めて豊富に生存する糸状菌である。該菌は有機物分解力が強く枯死直後の又は衰弱せる植物に繁殖し植物の根部、木材表面、貯藏中の甘藷等に屢々認められる¹⁾。且該菌は *Penicillium* 屬等と並んで典型的な纖維素分解菌^{2) 3)} で土壤の腐植形成の要因ともなつて居る。更に *Trichoderma* 屬糸状菌が諸種植物病原菌に優性な拮抗作用を示し⁴⁾ 病菌を襲いその菌糸に自己の菌糸を密着せしめ病菌の細胞内容物を吸収したり⁵⁾ 一種の有毒物質を分泌して病菌を致死せしめる場合が知られて居る⁶⁾。

該菌の培養液から他の糸状菌に有毒なる物質が分離されて居る⁷⁾ が高等植物にも影響を及ぼす物質も認められて居る⁸⁾。現在 *Trichoderma* 屬は上記の性質の爲種々な植物病原菌に對する生物學的防除に應用されるのみであるが著者は自然界に於ける該菌の生活状態より相當強力なる Cellulase を有すること並びに甘藷表面での生育状況から Amylase をも有することを豫想し既に Cellulase に就ては應用上必要な基礎的事項を報告した⁸⁻¹⁰⁾。

土壤中に最も普通の糸状菌は *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium*, 並びに *Trichoderma* 各屬であるが現在迄農産製造特に醸酵方面には獨り *Trichoderma* 屬が濫用の例を見ない。後記の如く Cuprammonium Rayon 或は無蒸煮澱粉粕より短期間に相當量の Glucose を生ずる該菌の麩抽出濾液の作用を示し該菌の新たな應用の一端と爲し度い。

實 験 の 部

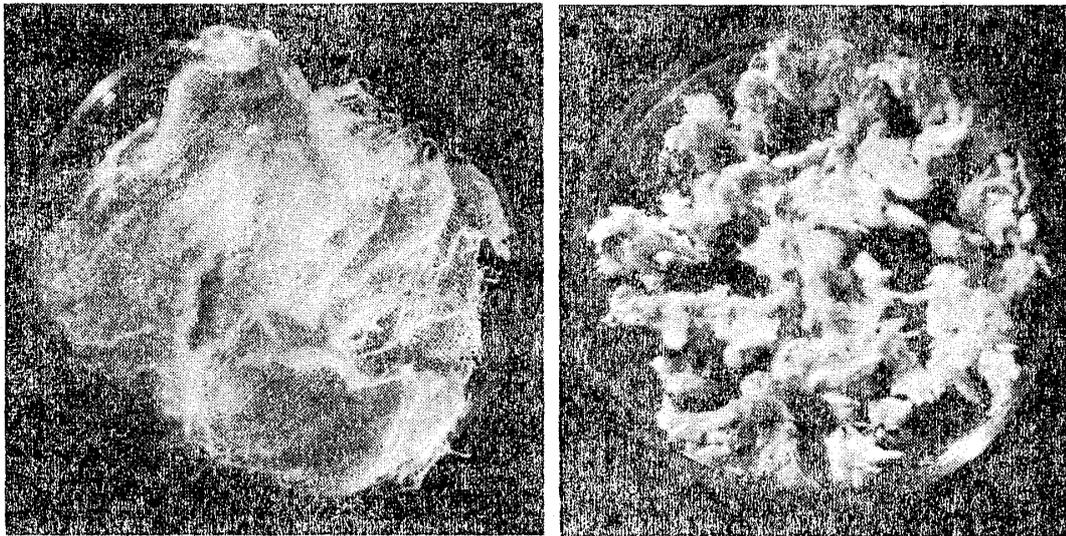
Trichoderma koningi の Cellulase は既報¹⁰⁾ の如くその測定法に於ける濾紙の崩壊度と BERTRAND 氏試薬の還元性(Glucose 生成)に於て甚だ強力なものであるが該酵素の應用上如何なる条件下で最も強力な Cellulase 作用が得られるか、先決問題である。従來の著者の研究に於ては液内培養法を採用したがこれは該法では基質として用いた木綿纖維が該菌に依り微細な纖維屑とされる現象に注目した爲に他ならぬ。しかし従來の經驗に依れ

ば Cellulase 生産の面から見ると液面乃至は固形物上に生育せしめた方が有利かも知れない。

(1) 培養形式と生産される Cellulase の強弱。既報¹⁰⁾のB培地 (pH 5.4) 100ccを500cc三角壺に入れ局方ガーゼ1gを液内に浸漬せしめ (液内培養) 又は針金で吊しガーゼ面を擡げ下端を液に浸し (液面培養) 培養に供した。(Plate 1) 前者では液面に菌體無く培養26日で基質が微細化し (Plate 2) 後者では基質と液面の略々全面が淡綠色綿狀の菌叢に被われ培養26日で基質の下部が非常に弱まり振盪すれば切斷し他の部分は弱まるが原形を保つた。培養は以下全て30°Cで行い培養後 pH は兩法共 4.6 を示した。液面培養では培養後ガーゼを落し室温で3時間浸漬後液内培養と同様濾過し各濾液を100ccに充したものを酵素液とし Cellulase を比較測定した。今回以後濾紙の崩壊性を、振盪による崩壊所要時間 (秒) で示しその際、振盪条件については、再現性を考慮し一様となる様に處置した。(Table 1)



Pl. 1



Pl. 2

Table 1. Influence of Cultural Methods upon Cellulase Activity.

Days of Culture	Cultural Method	Volumes (cc) of Enzyme Solution									Cellulase Unit
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
8	Surface	30*	15	15	10	5	5	5	5	5	20
	Submerged	>60	>60	60	60	60	40	30	25	20	13
16	Surface	15	5	5	2	2	2	2	2	2	25
	Submerged	>60	>60	60	35	25	20	15	10	10	13
26	Surface	15	5	5	2	2	2	2	2	2	17
	Submerged	30	25	15	10	10	5	5	5	5	17
33	Surface	40	15	10	10	10	5	5	2	2	17
	Submerged	50	25	15	10	10	10	5	5	5	14

* Indicates time (in seconds) required for breakdown of filter paper

表示の如く液面培養では崩壊度が著しく大であるが尙崩壊度が同じでも呈色度が相當異なることが認められる。特に注目すべきは液面培養8日間のものでも第1圖の如く氣泡が發生し濾紙の表層を押し上げやがて濾紙面より脱

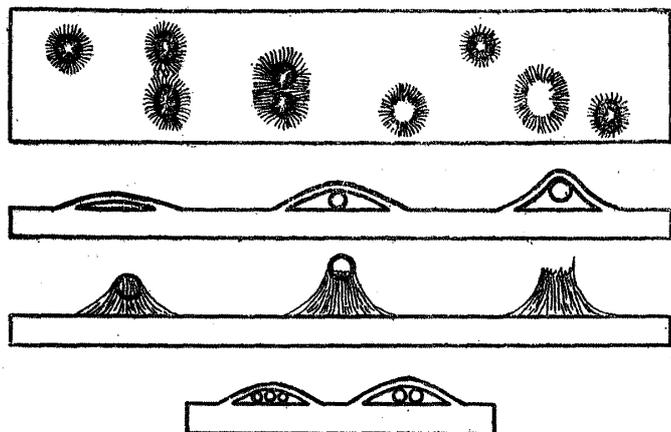
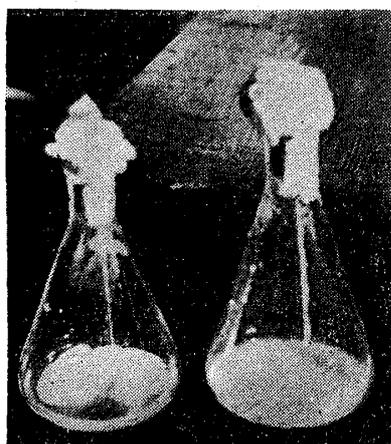


Fig. 1. Foam Emission from Surface of Filter Paper during Enzymic Action.

出する事で該現象は今回の条件では液面培養よりの酵素液を用いた時にのみ生じ且多くは気泡を含んだ儘観察される。発泡は濾紙の上面(濾紙は試験管中に傾斜するが液面に向く側を云う)に大きく数多く出現し裏面には極く小さいのが少数出来るか又は全く出来ない。尙一般に濾紙の下部に多く發生し發泡せる濾紙の崩壊度は大であり液内培養よりの酵素液では全く發生しなかつたがこれはその酵素力が弱い爲と考えられる。ガーゼの代りに塊状の脱脂綿を用い培地にその大部分を浸漬して兩培養法を試みるとやはり同様の結果を得た。(Plate 3a, 3b)



Pl. 3a



Pl. 3b

以上の如く Cellulase 生産の點より液面培養法が適當であるが既報¹⁰⁾並びに後記の如く養法に依れば極めて強力な Cellulase 含有液を得られるので爾後養法を採用した。斯く雖も Cellulase 生産に基質として優秀であるが纖維素のみを基質とせる場合を検討した。

(2) Cellulase 生産に及ぼす培養基質の影響。既報¹⁰⁾にて著者の用いた纖維素は Cellulase に依り Bemberg 人絹 > Viscose 人絹 > 濾紙 > 脱脂綿の順に良く分解したが Cellulase 生産には何れを培養基質として用いれば良いかを調べた。尙炭素源として Glucose と澱粉を用いた場合を附記する。前記培地100ccに表記基質 1gを加え前記同様液内培養した。培養後 pHは培養23日で Bemberg 人絹 (4.4), Viscose 人絹 (5.6), 濾紙 (5.4), 脱脂綿 (4.6) であつた。培養16日で Bemberg 人絹は原形を留めるが弱くなり Viscose 人絹は菌の生育が良好であるに拘らず原形の儘であり濾紙は解體し綿は殆ど解體し培養23日で綿と濾紙は完全に崩壊沈降し Bemberg 人絹も相當に解體するが Viscose 人絹は尙原形を保つた。尙 Bemberg 人絹は培養31日後完全に崩壊し著しく

Table 2. Effect of Substrates upon Cellulase Production.

Days of Culture	Substrates	Volumes (cc) of Enzyme Solution									Cellulase Unit
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
16.	Cotton	>60	40	25	20	15	15	10	5	5	20
	Bemberg Rayon	>60	>60	>60	>60	>60	>60	60	60	60	17
	Filter Paper	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	0
	Viscose Rayon	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	0

23	Cotton	>60	40	20	15	10	10	5	5	5	25
	Bemberg Rayon	>60	>60	>60	>60	>60	>60	60	60	60	20
	Filter Paper	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	0
	Viscose Rayon	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	0
31	Bemberg Rayon	40	25	20	15	10	10	10	5	5	25

減量した。前記通り Cellulase を比較すると (Table 2) 濾紙, Viscose 人絹は著者の方法では測れぬ程弱い酵素力を示し, Bemberg 人絹は始めは崩壊度を殆ど示さぬが相當の呈色度を與え對照の呈色は無いので明に酵素作用に依り糖が出現した爲でありこゝでも崩壊度と呈色度とは必ずしも平行せぬ例が認められた。以上に依り Cellulase 生産に有効な培養基質は最も分解し難い脱脂綿と判明した。又 Cellulase は適應的に生産される様で表示各基質 1g を用い同様培養し Cellulase を測定すると (Table 3) 明かに澱粉と Glucose は崩壊度を示さず

Table 3. Effect of Substrates upon Cellulase Production

Days of Culture	Substrates	Volumes (cc) of Enzyme Solution									Cellulase Unit
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
8	Cotton	>60	>60	60	60	25	20	20	15	10	17
	Starch	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	0
	Glucose	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	0
14	Cotton	60	20	20	10	10	5	5	5	5	25
	Starch	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	0
	Glucose	>60	>60	>60	>60	>60	>60	60>	>60	>60	0

呈色度は對照と同じで糖の生成は全く認められぬ。以上の如く脱脂綿が有効であるが澱粉抽出濾液は遙に強力な Cellulase 作用を呈することを認めたので以後の研究には全て澱粉を利用した。而して先づ該澱粉抽出濾液中の Cellulase を分離確認する爲次の實驗を行つた。

(3) Cellulase 粗標品の力價。先づ從來の培養法の場合を示す。培養基質として脱脂綿 1g を用い前回通り 17 日間液内培養せる培地をガーゼで濾過後酒精を 70% に加え室温で 24 時間静置し生じた沈澱を遠心分離しシリカゲル上で乾燥した。該粉末を表示濃度に水に溶し 45°C で力價を測定した。(Table 4)

Table 4. Cellulase Activity of Enzyme Preparation in various Concentrations.

Concentration (%)	Volumes (cc) of Enzyme Solution									Cellulase Unit
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
0.25	>60	>60	>60	>60	>60	60	45	30	30	<11
0.50	>60	50	20	10	5	5	5	5	5	<11
1.00	30	10	10	5	5	5	2	2	2	17
1.40	20	10	5	5	2	2	2	2	2	25
Culture Filtrate	15	5	5	2	2	2	2	2	2	33

Submerged cultured with cotton and enzyme preparation was precipitated by ethanol.

明に粗標品の力價は培地のそれに及ばぬが酵素濃度と力價は並行する。今回は液内培養よりの酵素であるが 0.5 ~ 1.4% に發泡を認めた。次に澱粉法の場合を記す。澱粉 10g, 水 10cc を 500cc 三角嚢に入れ *T. koningi* を一白金耳植え 5~6 日培養し澱粉全面と裏面に純白に菌糸が擴つた時に 2% 食鹽水 100cc を加え澱粉を碎き 3 時間浸出しガーゼで濾過後前記同様酒精で沈澱せしめた。豫期通りこの粗標品は例えば 0.5% で第 4 表の培養濾液の酵素力に匹敵する程強い Cellulase 作用を示したが澱粉抽出濾液のそれよりは若干劣つた。次に澱粉抽出濾液 100cc に表示の如

(304)

(外山) *Trichoderma koningi* に依る纖維素分解 (第3報)

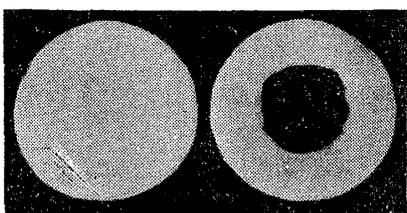
く硫酸を加え(飽和度1は75.4g/100cc) 24時間後濾紙で濾過し濾紙上の褐色沈澱を水に溶し100ccに充し40°Cで力價を測定した。(Table 5)

Table 5. Degree of Saturation with Ammonium Sulfate and Cellulase Activity.

Degree of Saturation	Volumes (cc) of Enzyme Solution									Cellulase Unit	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
0.2	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	>60	60	<11
0.4	>60	15	10	5	2	2	2	2	2	2	33
0.5	10	5	5	2	2	2	2	2	2	2	50
0.6	10	5	2	2	2	2	2	2	2	2	50
0.8	10	2	2	2	2	2	2	2	2	2	50
1.0	10	2	2	2	2	2	2	2	2	2	50

尙今回以後 Toluene の代りに酵素液100ccに對して0.05gの Sodium Pentachlorophenate¹¹⁾ (三井化學) を加え防腐した, 本菌は蒸發性なく Cellulase 作用に無影響で防腐力大なるを確めた. 表示通り飽和度0.5以上は著しい呈色度を, 0.4以上は大なる崩壊度が認められたが発泡は無かつた. 以上の何れの Cellulase 粗標品でもこれを水に糊状に溶し圓形濾紙の中央に適宜塗り乾燥後ペトリ皿中の醋酸鹽緩衝液 (pH 5.0) に40~45°Cで24時間以上浸漬してから皿を振盪すると塗抹部分が崩壊し孔があき煮沸せる粗標品では該効果は全く認められぬ.

(Plate 4) 斯く *T. koningi* の Cellulase が細胞外に分泌され分離し得ることを確め得た. 次に該菌の Amylase



Pl. 4

に就いて検討を試みた. 實驗中脱脂綿を基質として液内培養せる濾液が澱粉糖化作用も有することを認めた. 即ち著者の Cellulase 測定法に於て濾紙の代りにそれと等重量 (0.06g) の甘藷澱粉を各試験管毎に入れ無蒸煮で45°C 3日間作用させた. その結果呈色度は夫々澱粉 (單位33), 濾紙 (單位17) で明に澱粉がよく糖化する. 既報⁶⁾ で *T. koningi* は *Asp. oryzae* に較べて Amylase 作用が劣るとしたが其後の検討に依り既報の條件では確に既報通りの糖化曲線と沃度呈色を得

るが長時間では兩菌株で大差が無いことを知つた. 更に *T. koningi* が甘藷の表面に良く生育して居るのを認めるので若し澱粉と粗纖維とを主成分とする甘藷澱粉粕の糖化に該菌を利用すればその Cellulase 並びに Amylase 作用に依り良好の成績が得られると豫想して以下の實驗を行つた.

(4) *T. koningi* の Amylase に依る無蒸煮澱粉粕の糖化. 500cc三角壺に風乾甘藷澱粉粕 (全糖56.33%, 粗纖維14.34%) を粉碎せるもの20gと水50cc並びに醋酸鹽緩衝液 (pH 5.0) 50ccを入れ—は其儘—は30分間蒸煮後各々に前記と同じ *T. koningi* 抽出濾液100ccを加え40°Cで作用せしめた. 表示の各時間毎に試料を採取し BERTRAND 法で Glucose として生成糖を定量し糖化率を基質の全糖に對する生成糖の割合で示した. (Table 6)

明かに蒸煮した場合に糖化率が良いが無蒸煮でも相當糖化する. 基質を5%にすれば蒸煮した場合2日以後糖化率は100%を超え無蒸煮でも2日で70%, 4日で90%に達する. 甘藷澱粉では蒸煮すれば澱粉粕同様糖化するが無蒸煮では甚だ低い糖化率を示した. 無蒸煮澱粉粕の糖化の場合 *T. koningi* と *Asp. oryzae* とはその Amylase 作用に著しい差があることを第7表に示す.

これは兩菌株を製蘗し (*Asp. oryzae* は3~4日培養) 抽出濾液 100 ccを作り別に兩抽出濾液50cc宛を混合したものを作り, この3種の濾液に夫々前記緩衝液25cc加え1種

Table 6. Saccharification of sweet Potato Pulp.

	Days of Incubation	Reducing Sugar (%)	Saccharification Degree (%)
a	2	1.59	28.2
	4	2.39	42.5
	6	2.86	50.8
	8	3.23	57.3
b	2	4.18	74.2
	4	4.75	84.3
	6	5.18	92.0
	8	5.43	96.5

a.....Unboiled Substrate

b.....Boiled Substrate

Table 7. Saccharification of unboiled Sweet Potato Pulp.

	Days of Incubation	Reducing Sugar (%)	Saccharification Degree (%)
a	2	2.37	42.1
b		1.92	34.1
c		1.15	20.4
a	3	2.77	49.2
b		2.10	37.3
c		1.16	20.6
a	4	3.02	53.6
b		2.37	42.1
c		1.25	22.2

a.....Amylase of *T. koningi*b...Amylase of *T. koningi* and *Asp. oryzae*c...Amylase of *Asp. oryzae*

Table 8. Saccharification of boiled Sweet Potato Pulp.

	Days of Incubation	Reducing Sugar (%)	Saccharification Degree (%)
a	1	2.53	44.9
b		1.93	34.3
a	2	3.48	61.8
b		2.38	42.3
a	3	3.98	70.6
b		2.58	45.8

a.....Amylase of *T. koningi*b.....Amylase of *Asp. oryzae*

より100cc採り500cc三角壺中の澱粉粕10gに加え45°Cで作用せしめた結果である。尚蒸煮しても同様の結果を得た。(Table 8)

該結果は500cc三角壺に澱粉粕20g, 前記緩衝液50cc並びに水50ccを加え30分蒸煮後 *T. koningi* 麴又は *Asp. oryzae* 麴の抽出濾液100ccを加え45°Cで糖化させて得られた。

斯く *T. koningi* の Amylase は *Asp. oryzae* のそれより多量の糖を生成するが一應澱粉粕中の粗纖維の糖化性を考慮に入れるべきである。

(5) *T. koningi* 麴及び *Asp. oryzae* 麴の纖維素分解作用. *Asp. oryzae* の Cellulase は GRASSMANN¹²⁾, FREUDENBERG¹³⁾ 等が認めて居るが著者がその麴抽出濾液を用い45°Cで著者の測定法に依り Cellulase 力を調べると何れの試験管内の濾紙も60秒で數片に分裂し僅かの Cellulase 作用が見られるに過ぎぬ。(かゝる麴抽出液は夾雑物の爲に呈色度は不明瞭になりがちだが崩壊度は明白に認められる) 然るに *T. koningi* 麴の抽出濾液は該濾液1ccでも濾紙を2秒で崩壊せしめ且呈色試薬を完全に脱色せしめ換言すれば酵素單位100に達するの比較すれば *Asp. oryzae* の Cellulase 作用は問題外に微弱であり1%タカヂアスターゼ水溶液も Cellulase 作用は殆ど無い。更に澱粉粕より常法にて粗纖維を分離して兩菌株の麴抽出濾液で夫々糖化せしめたが豫期に反して例えば粗纖維濃度を4%にした場合何れの濾液でも0.5%以下の糖しか生成せず前記の糖化作用は殆ど Amylase のみに依ると判断せざるを得ぬ。以上に依り *T. koningi* は著しい Cellulase 作用並びに無蒸煮澱粉粕を特異的に糖化する Amylase を併有することを確認した。従つて應用上兩酵素の最適作用条件を知る必要がある。

(6) *T. koningi* の Cellulase と Amylase の最適作用条件. 先づ Cellulase に就ては500cc三角壺に、2cc以下の H₂SO₄ 又は NaOH で pH を調節した麴抽出濾液100ccを入れ基質として1g前後の Cuprammonium Rayon (Bemberg) を精秤して加えコルク栓を施し24時間毎に WILLSTÄTTER-SCHUDEL 法で Glucose として定量した。作用温度40°Cで防腐劑0.05%添加の下に行い試料5cc中の糖量を mg で表わした。(Fig. 2)

圖示の如く pH の影響は著しく最適 pH は明に 4.0 である。(既報で濾紙に対しては MC ILVAINE 緩衝液で最適 pH 5.0 であつた)。又 Bemberg 分解率 [(Bemberg 減量/原重量)×100] は pH 2.2 (8.99%), pH 4.0

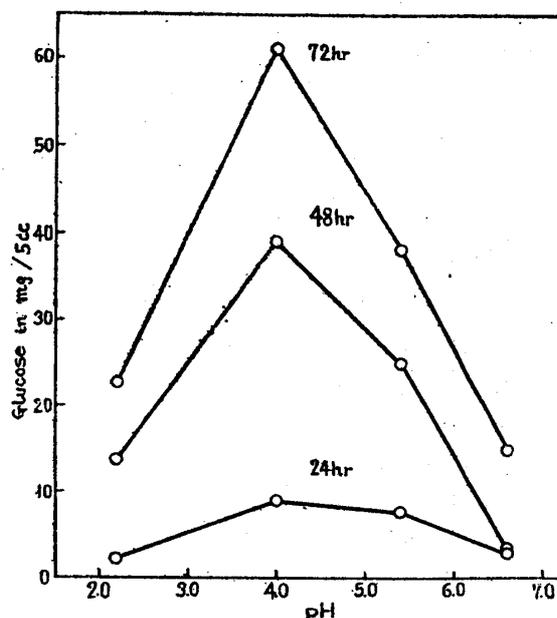
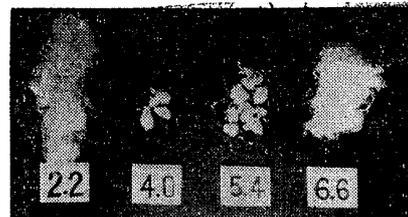


Fig. 2. Influence of Hydrogen-Ion Concentrations upon Cellulase Activity.

(78.3%), pH 5.4 (50.6%), pH 6.6 (0.92%)であつた。(Plate 5) 分解後の Bemberg は pH に依り著しく状態を異にし pH 4.0 は極めて小塊となり纖維状のもの無く非常に脆くなり pH 2.2 と 6.6 とは全く纖維状であるが直ぐ切れる。更に pH を 3.0, 4.0, 4.4, 5.0 にして実験した結果 pH 4.0~4.4 に好適範囲があり pH 4.0 が最適なることを確認した, 次に麩抽出濾液を pH 4.0 に調節して 500cc 三角壺に 100 cc 宛入れ前記同様の実験を各温度で行うと 40~45°C に好適範囲を認め



Pl. 5

最適温度は 45°C でこの温度では基質は 90% 以上分解して殆ど消失し他の各温度の分解率は夫々 30°C (43.9%), 40°C (71.3%), 50°C (18.7%), 55°C (17.2%) で既報の濾紙の場合と同じ結果を得た。興味深いのは好適条件下で液中に 1 mm 前後の殆ど同じ長さの微細な纖維が澤山認められたことで既報⁹⁾ で菌自體の作用に依り綿がやはり 1 mm 前後の纖維層になることを述べたが Cellulase 作用のみで Bemberg が微細になることも判明した。かかる點は分解機轉上何等かの意義を有すると考えられるが詳細は以後の研究で究明したい。次に Amylase の最適条件は 2% 甘藷粉液を糊化後その 50cc に, 各 pH に調節した麩抽出濾液 50cc を加え 40°C で前記同様実験して求めた。(澱粉より生成する糖も Paper chromatograph で Glucose と判つた) (Fig. 3) 圖示の如く Amylase では pH の影響は Cellulase 程著しく無いが pH 4.5~5.5 が好適範囲で最適 pH は 5.0 と推定出来る。更に Amylase の最適温度は pH 5.0 に調節した濾液を用い同様に各温度で実験して 40°C と判明した。この場合も 30~50°C の範囲では著しい影響はなく Amylase は Cellulase に比較して廣い好適条件を有することが認められた。

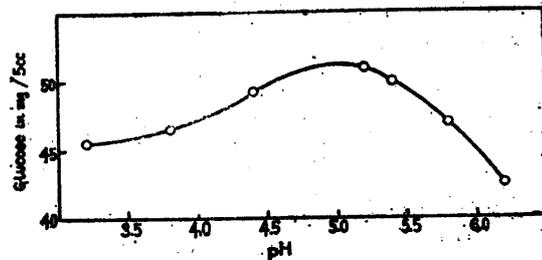


Fig. 3. Influence of Hydrogen-Ion Concentrations upon Amylase Activity, after 72hr

以上より *T. koningi* は纖維素及び澱粉より Glucose を生成するが該菌が生活上如何に Glucose を代謝するかを附記する。

(7) *T. koningi* に依る Glucose 代謝。500cc 三角壺に純 Glucose 5% を含む既報¹⁰⁾ の A 又は B 培地 100cc (pH 5.4) を入れ培養に供した。液面培養法では白色菌蓋が厚く出来て僅に液面より沈み胞子を生ぜず表面は純白平坦であり液内培養法では白色菌糸が液中に充満し胞子は無い。培養後 pH は例えば 22 日後前者で 1.4, 後者で 2.2 と成つた。兩者共芳香のある鮮黄色透明の濾液を與え該液を分析に供した。酒精の生成は當然豫期されるが重クロム酸鹽に依る變色反應は兩濾液共有りヨードフォルム反應は液内培養濾液では直に沈澱を生じ檢鏡後酒精を認め液面培養の夫れでは沈澱無きも明に該反應を得た。

揮發酸の檢出は KENNEDY, BARKER のアンモニウム鹽法¹⁴⁾ と井上, 野田のヒドロキザム酸法¹⁵⁾ とに依り不揮發酸は野村, 高橋¹⁶⁾ に準じ n-Butanol, 醋酸, 水 (4:1:1) を用い Brom Phenol Blue の 0.4% 酒精溶液で呈色せしめる法と醋酸の代りに硝酸を用いる法¹⁷⁾ とに依り行つた。其結果揮發酸は何等檢出し得ず不揮發酸は兩法で全く同じ結果を得たが醋酸を使用せる場合を示す。(Table 9, 10) 該結果は室温 30 ± 2 °C で東洋濾紙 No. 50 を用い上昇法で得たものである。

Table 9. Rf Values of Organic Acids

Organic Acid	Rf
Gluconic Acid	0.06~0.10
Oxalic Acid	0.12~0.19
Tartaric Acid	0.22~0.25
Citric Acid	0.27~0.30
Malic Acid	0.40~0.45
Lactic Acid	0.69~0.71
Succinic Acid	0.74~0.76

Table 10. Qualitative Tests on Organic Acid in Culture Medium.

Substrate	Rf	Corresponding Acid
Glucose	0.13~0.18	Oxalic Acid
	0.36~0.40	Malic Acid
	0.73~0.78	Succinic Acid

檢察の結果何れの培養濾液よりも常に醋酸のみを, 該濾液を濃縮すると常に三種の酸を確認した。只液面培養

濾液を濃縮後展開すると蓴酸が極めて明瞭に現われ他の二酸は極く淡くか又は全く出現しないが液内培養濾液では三種の酸が常に出現した。又 Spot の大きさや色の濃度より蓴酸が最も多く琥珀酸これに次ぎ林檎酸は最も少量で且培養日数の経過と共に蓴酸は益々明瞭に成り林檎酸は認められなくなる。更に液面培養濾液よりの蓴酸の Spot は液内培養濾液よりの夫れより大きく色も濃く且 Rf がやゝ大きい純蓴酸も量に従い同様となり液面培養法では蓴酸がより多く生ずることを知つた。尚液面培養濾液に(培養10日間)鹽化カルシウム液を加え醋酸酸性にすると常温で多量の白沈を生じ該沈澱は鹽酸に可溶で蓴酸が相當量生成するのが認められる。

以上で蓴酸が最終生産物と看做せる。尚別にアインホルン管で Glucose より炭酸ガスを發生することを知つたが此點に關して HEUKELEKIAN, WAKSMANN¹⁸⁾ に依れば好氣的條件で *T. koningi* に依り分解された纖維素の約55%が炭酸ガスに成り約40%が菌體に成るとの報告がある。さて以上を要約すれば *T. koningi* は纖維素より Glucose を生じこれを代謝して炭酸ガス、酒精、琥珀酸、林檎酸及び最終生産物として蓴酸を與える。既に NORD, VITUCCI¹⁹⁾ は木材腐朽菌の纖維素分解経路の一つとして纖維素→Glucose→酒精→醋酸→琥珀酸→フマル酸→林檎酸→蓴酸なる過程を提示して居るが *T. koningi* も略々同様な代謝経路をたどるのではなからうか。(尚緒論で觸れた如く *T. koningi* は酸性の抗微生物質をも生産する様である⁶⁾)以上本報告に於て著者は *T. koningi* の實際的應用に必要な事項を略々確定し得た様に思われ該菌の Cellulase 並びに Amylase は農産製造上利用する價值ありと確信するに至つた。

總 括

腐生菌 *T. koningi* は強力な Cellulase と無蒸着澱粉粕を良く糖化し得る Amylase とを有することを知り該菌を農産製造上に應用せんとする意圖の下に基礎的條件を求めた。著者の簡易 Cellulase 測定法を用いた結果に依れば

- (1) ガーゼ又は脱脂綿を基質とした液面培養濾液は強力な Cellulase 作用を示し液内培養法では基質が微細化するに拘らず該作用は劣る。
- (2) 培養基質として纖維素の内脱脂綿が Cellulase 生産に有効であり澱粉、Glucose を炭素源とすると Cellulase は生産されぬ。又脱脂綿を用いた場合に Amylase も生産されることを認めた。
- (3) 液内培養濾液又は麩麴抽出濾液より酒精又は硫酸に依り Cellulase 粗標品を分離確認した。尚酵素力強き場合は測定中濾紙面上に發泡が見られた。
- (4) *T. koningi* の Amylase は *Asp. oryzae* の夫れより強力に澱粉粕を分解し特に無蒸着の場合兩者の差が大である。
- (5) *T. koningi* の麩麴抽出濾液は Cellulase 及び Amylase を含有し Bemberg を基質とせる場合 Cellulase の最適 pH は 4.0、最適温度は 45°C で環境條件の影響を鋭敏に受け、Amylase の最適 pH は 5.0、最適温度は 40°C であるか作用好適條件の範圍は Cellulase に比して廣かつた。
- (6) *T. koningi* は纖維素又は澱粉より Glucose を生成し酒精、炭酸ガス、琥珀酸、林檎酸及び終局生産物として蓴酸を生成する。

文 献

- 1) 西門, 大島, 野田: 農學研究, 41, 1 (1953).
- 2) 荒川: 鳥取農學會報, 5, 27 (1934).
- 3) 佐々木, 中根: 應用菌學, 3, 88 (1949).
- 4) MOSTAFA M. A., GAYED S. K.: Nature. 169, 359 (1952).
- 5) 松本: 熱帯農學會誌, 11, 322 (1939).
- 6) 長澤, 川上: 農化, 24, 274 (1951).
- 7) WEINDLING R., EMERSON O. H.: Phytopathology, 26, 1068 (1936).
- 8) 外山: 醱酵工學雜誌, 30, 89 (1952).
- 9) 外山: 醱酵工學雜誌, 30, 409 (1952).
- 10) 外山: 醱酵工學雜誌, 31, 315 (1953).
- 11) ERB, WIS-THOFF et al: J. of Bact., 55, 813 (1948).
- 12) GRASSMANN, W. et al: Ann., 502, 20 (1933)., Ann., 505, 167 (1933).
- 13) FREUDENBERG, K., PLOETZ, T.: Z. Physiol. Chem., 259, 19 (1939).
- 14) KENNEDY, E. P., BARKER, H. A.: Anal. Chem., 23, 1033 (1951).
- 15) 井上, 野田: 農化, 24, 291 (1951).
- 16) 野村, 高橋: 醱酵工學雜誌, 30, 29 (1952).
- 17) 東大農學部: "實驗農藝化學", 朝倉書店, 460 (1952).
- 18) HEUKELEKIAN, H., WAKSMAN, S. A.: J. Biol. Chem., 66, 323 (1925), Cited from Siu, R. G. H. "Microbial Decomposition of Cellulose," Reinhold, New York, 283 (1951).
- 19) NORD F. F., VITUCCI J. C.: "Advances in Enzymology," 8, 274 (1948).