

〔醸酵工学 第57巻 第1号 31-37. 1979〕

酢酸菌による粘性多糖類の生産およびその性質*

中山 重徳・白川 武志・大西 利男

香川県発酵食品試験場高松分場

Production and some properties of slimy polysaccharide produced by acetic acid bacteria.* NAKAYAMA, S., T. SHIRAKAWA, and T. OHNISHI (*Fermentative Food Experimental Station of Kagawa Prefecture, Takamatsu Branches, 587-1, Gohito-cho, Takamatsu 761*) *Hakkokogaku* 57: 31-37. 1979.

1. A bacterium producing slimy material was isolated from thick leathery pellicles formed in the process of vinegar brewing. The microorganism was identified as *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* from its morphological, physiological and biochemical characteristics.

2. Medium suitable for production of polysaccharide consisted of mannitol 5.0%, K_2HPO_4 0.01%, KH_2PO_4 0.09%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, $FeCl_3$ 0.0005%, and corn steep liquor 0.1% adjusted pH 7.0. The organism was cultured at 30°C for 96 hr with shaking.

3. The viscosity of the polysaccharide solution did not decrease in the presence of high concentration (20%) of sodium chloride and the solution was stable on heat treatment at 60°C for 5 hr.

4. The acid hydrolyzate of the polysaccharide contained only glucose. The IR spectrum of the polysaccharide showed the presence of an acetyl group and suggested the presence of β -glucoside linkages.

これまで四国地方を中心に、食酢醸造に関して一連の研究を行ってきた。¹⁻⁴⁾これらの研究において、醸造上有害ともいえる厚膜生産性酢酸菌の発生することがよく見かけられた。その防止策の検討を行っていたところ、この厚膜生産性酢酸菌の振とう培養を行えば、時間の経過とともに、培養液が粘性を帯び特異な粘性物質を生産することが認められた。今回は、この粘性物質生産菌の分離同定およびその生産のための最適条件を求めるとともに、その物質を単離精製し、その理化学的諸特性を検討したので報告する。

実験材料および方法

粘性物質生産菌の分離 静置発酵法によって食酢醸造を行っている四国4県内各地の醸造工場の食酢醪表面に存在するコンニャク状の厚膜を分離源とし、Yamada ら⁵⁾の方法に準じて、厚膜形成菌を分離した。すなわち、このコンニャク状の厚膜を激しく振とうし、

常法によって平板培養をくり返した。厚膜形成菌は、コロニーが小さく、かつ高く盛り上がっているために、厚膜を形成しない菌とは容易に区別できた。

粘性物質生産菌の同定 分離された厚膜形成菌の菌学的諸特性は、Asai⁶⁾ および Yamada ら⁷⁾の方法に準じて検討した。厚膜形成菌の同定は Asai,⁶⁾ Yamada ら⁵⁾ および Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 第8版⁸⁾によった。

粘性物質生産のための培地 分離した厚膜形成菌の粘性物質生産のための培養条件の検討には、Hoyer-Frateur の培地⁹⁾に準じ、マンニトール3.0%, K_2HPO_4 0.01%, KH_2PO_4 0.09%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, $FeCl_3$ 0.0005%, それにコーン・スティーブ・リカー 0.1%の組成を有し、pH 7.0 に調製された培地を基本培地とした。

粘性物質生産菌の培養方法 分離された粘性物質生産菌の培養条件の検討には、500 ml 容坂口フラスコに基本培地 80 ml を分注し、分離菌の無菌水懸濁液 (OD₆₆₀=0.45) 1.0 ml を接種し、30°C, 120時間、振

* 食酢に関する研究 (第7報)
Studies on Vinegar (VII)

とう培養（振幅 7.0 cm, 1 分間に120往復）を行った。

粘性物質生産菌の生育度の測定 厚膜形成菌の増殖は、培養液が時間の経過とともに粘度を帯びてくるので培養液を蒸留水にて5倍（重量比）に希釈し、遠心分離（22,000×g）によって菌体を沈殿させ、これを蒸留水に懸濁し、660 nm における吸光度を分光光度計（200-20形、日立製作所）を用いて測定した。なお、OD₆₆₀=0.40 は 0.40 mg/ml の乾燥菌体濃度に相当した。

培養液の粘度の測定 培養液の粘度の測定は、オストワルドの粘度計（no. 4, 内径 1.25 mm）を用いた。培養液を5倍量（重量比）に蒸留水で希釈し、珪そう土をろ過助剤として、吸引ろ過した希釈液を25℃で測定した。

粘性物質の単離と精製 5.0% のマンニトール培地で96時間振とう培養した培養液 2.0 kg を、粘度測定の場合と同様に、水 10 l を加えて希釈し、脱色剤に活性炭、ろ過助剤に珪そう土を用い吸引ろ過した。この操作を数回くり返して、9.7 l のろ液を得て、これに容量比で3倍量のアセトンを加えて析出した白色羊毛状沈殿を蒸留水で十分に洗浄した。得られた粘性物質を常温乾燥させて粗試料として用いた。さらに、精製するには、再び蒸留水で0.01%の溶液に調製し、遠心分離（22,000×g, 20分間）を行った。上澄液をマイクロフィルター（平均孔径 0.45 μm, 富士写真フ

ilm）でろ過後、トリクロール酢酸で除タンパクし、PVA Hollow Fiber Dialyzer（クラレ）を使用して、流量10-15 ml/m²/min, 温度5℃で96時間、水で透析を行った。得られた透析後の試料に3倍量のアセトンを加えて沈殿させ、凍結乾燥の後、分析用の標品として実験に供した。

粘性物質の理化学的性質 溶解性試験は粗試料 0.2 g を 100 ml の種々の溶媒に溶解させて検討した。粘度に対する中性塩、pH の影響は、標品 0.2% 溶液を用い、30℃, 1時間放置後、粘度を測定した。

分光分析 標品の 20 ppm 水溶液を調製し、200-660 nm における吸収スペクトルを分光光度計（200-20形、日立製作所）を用いて求めた。また、標品を KBr 錠剤として、その赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計（225形、日立製作所）を用いて測定した。⁹⁾

呈色反応 糖類に共通な呈色反応であるモーリッシュ反応およびアンスロン硫酸反応で糖類の確認を行った。¹⁰⁾

酸による加水分解と分解物の同定 標品の構成糖の確認試験のため、標品 100 mg を試験管にとり、これに 2 N 硫酸 2.0 ml を加え、試験管を密封した後、沸とう水中で1時間、加水分解を行った。加水分解物に炭酸バリウムを加え中和し、生じた沈殿と残存する炭酸バリウムを遠心分離によって除去し、その上澄液をペーパークロマトグラフィーに供した。¹¹⁾

Table 1. Morphological and physiological characteristics of isolated pellicle-forming bacteria.

Strain	Cell size (μm)	Growth		FeCl ₃ reaction in glucose broth	Viscosity* (cp)
		glutamate agar	mannitol agar		
K-1	0.6-0.7×1.0-1.3	++	+++ ^a	—	8.41
K-2	0.6-0.7×1.0-1.8	++	+++	—	12.55
K-2	0.6-0.7×1.0-2.0	+	+++	—	7.04
M-1	0.6-0.7×1.0-1.5	—	+++	—	4.80
M-2	0.7-0.9×1.8-3.0	—	++	± ^b	9.20

The following characteristics were common for all the five strains.

Cell morphology : rod

Motility : none

Flagellation : none

Pigmentation on glucose-CaCO₃ : none

Reaction in acetate and lactate : alkaline

Oxidation of lactate to carbonate : positive

Assimilation of ammonia nitrogen : negative

Dihydroxyacetone from glycerol : positive

Ubiquinone type : Q-10

Catalase : positive

Gram stain : negative

^a : very active

^b : very weak

* The bacteria were grown for 120 hr at 30℃ in the basal medium. Viscosity was measured with an Ostwald viscometer at 25℃ after dilution (1:5) of culture broth.

実験結果

分離菌の菌学的諸特性 多数分離された粘性物質生産菌の中で、その培養液が強い粘性を持つ菌、5株が得られた (Table 1). これらの5株の菌は、Table 1に示したように、すべて、グラム陰性の桿菌、非運動性で鞭毛を有しない。また、これらの細菌は酢酸および乳酸を二酸化炭素と水への完全分解系をもち、エタノールより酢酸の形成が顕著であった。これらの分離菌は、マンニトール培地には良く生育するが、グルタミン酸培地にはあまり生育せず、窒素源としての硫酸アンモニウムを資化しなかった。しかし、グルコン酸菌に特徴的なグリセロールよりジヒドロキシアセトンを生じ、フラクトース培地では FeCl_3 反応を行う物質の生成が観察されたが、分離の菌株はすべてグルコース- CaCO_3 培地で、褐色の色素生成は見られなかった。

以上の結果より、ここに分離された5株は厚膜形成菌 *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*⁸⁾ と同定することが妥当であると考えられた。

ここで分離された5株のうち、もっとも高い粘度を示した菌株 K-2 を選定し、以下の実験に供した。

粘性物質の生産に及ぼす炭素源の影響 K-2株を用いて、基本培地中のマンニトールを12種類の炭素源に置きかえて、それぞれの生育度および培養液の粘度に対する影響を調べた。Table 2に示したように、マンニトール、フラクトースおよびソルビトールを用いた時は、グルコースなどの他の炭素源に比べて、良好な生育とともに格段に粘度の高い培養液が得られ、特に、マンニトールが最高の粘度を示した。一方、グルコースでは菌の生育がよいにもかかわらず、培養液の粘度はほとんど上昇しなかった。

粘性物質の生産に及ぼすマンニトールの濃度の影響 基本培地中のマンニトールの濃度を0より10%まで変化させて、培養液の粘度を検討した (Fig. 1)。

マンニトール濃度0より5.0%までは濃度に応じて粘度は上昇したが、6.0%を越えると逆に、急激な低下が見られ、最適濃度は4.0より6.0%の間に存在した。

粘性物質生産に及ぼす培養時間の影響 基本培地中のマンニトールの濃度を5.0%として、K-2株を培養した時の粘度の経時変化を Fig. 2に示す。培養24時間頃より、急激な粘度の上昇が見られ、96時間で最大となり、それ以後は、少し粘度が低下した。また、

Table 2. Effect of carbon sources on viscosity and growth.

Carbon source	Viscosity(cp)	Growth(mg/ml)
D-Xylose	1.00	0.42
L-Arabinose	1.00	0.54
D-Glucose	1.10	4.62
D-Mannose	1.00	0.40
D-Galactose	1.09	0.60
D-Fructose	10.21	5.25
L-Sorbose	1.10	0.72
Sucrose	1.08	0.81
Maltose	1.27	1.86
Glycerol	1.43	2.30
D-Sorbitol	9.32	5.15
D-Dulcitol	1.08	0.72
D-Mannitol	12.55	5.30

Strain K-2 cells were grown for 120 hr at 30°C in the basal medium containing various carbon sources. Viscosity was measured with an Ostwald viscometer at 25°C after dilution (1:5) of broth. Growth of the organism was measured spectrophotometrically (absorbance at 660 nm) and expressed as dry weight (mg/ml).

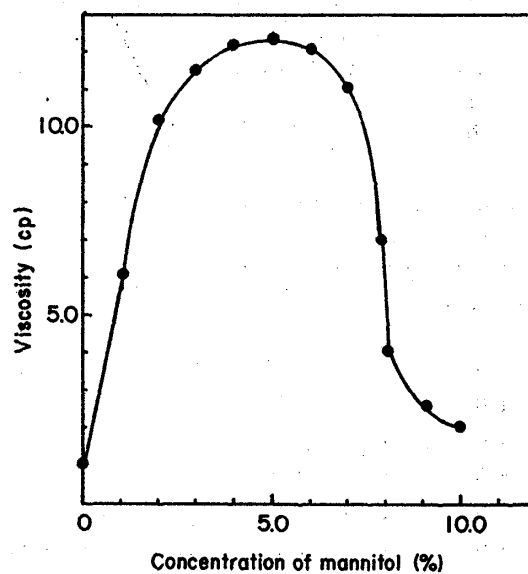


Fig. 1. Effect of mannitol concentration in the basal medium on viscosity of culture broth.

Strain K-2 cells were grown for 120 hr at 30°C in the basal medium.

菌体増殖は72時間で静止期に達した。

粘性物質生産に及ぼす培地の pH および温度の影響
基本培地のマンニトール濃度を5.0%とし、初発 pH を3.0から9.0まで変化させて、30℃で培養した時の

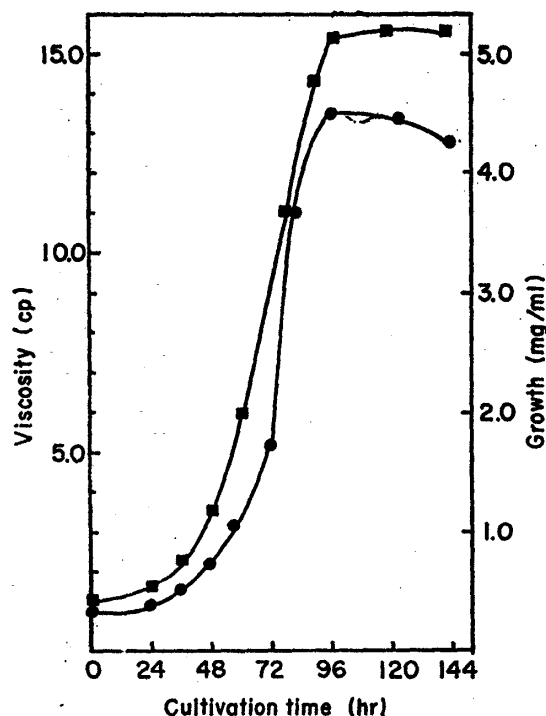


Fig. 2. Change of viscosity with cultivation time.

Strain K-2 cells were grown at 30°C in the basal medium in shaking culture, and viscosity was measured at 25°C after dilution (1:5) of broth.

● : Viscosity, ■ : Growth.

Table 3. Effect of initial pH of culture media on viscosity.

pH values	Viscosity(cp) at cultivation time(hr)				
	0	24	48	72	96
3.0	1.00	1.01	1.01	1.01	1.23
4.0	1.00	1.01	1.65	2.96	3.05
5.0	1.00	1.01	2.05	3.34	4.81
6.0	1.00	1.01	2.05	3.45	7.21
7.0	1.00	1.01	2.06	5.09	12.67
8.0	1.00	1.01	1.16	4.68	7.14
9.0	1.00	1.01	1.10	1.19	1.55

Strain K-2 cells were grown at 30°C in the basal medium. Viscosity was measured with a viscometer at 25°C after dilution (1:5) of broth.

粘度の変化を Table 3 に示す。pH 7.0 で最大の粘度を示し、アルカリ性あるいは酸性に傾くにしたがって、粘度上昇はほとんど見られなかった。また、培養温度25, 30, 35℃における96時間培養では、それぞれの粘度が 8.42, 12.65, 9.85 cp であり、最適温度は30℃であった。

粘性物質生産に及ぼす通気量の影響 500 ml 容の坂口フラスコに培地量 25-125 ml まで変量させて、30℃, 96時間培養を行い、培養液の粘度を比較した (Fig. 3)。培地量 75 ml まではほとんど粘度に変化は見られなかったが、この容量を越えると急激な粘度低下が見出された。

以上の結果より、*A. aceti* subsp. *xylinum* K-2 株による粘性物質を生産するための最適培養条件は、マンニトール5.0%, K_2HPO_4 0.01%, KH_2PO_4 0.009%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, $FeCl_3$ 0.0005%, コーン・スティーブ・リカー 0.1%, pH 7.0 よりなる培地 75 ml を 500 ml 容の坂口フラスコにて 30℃, 96時間培養することであることがわかった。

粘性物質の物理学的性質 本粘性物質の粗試料は、水、1N 塩酸、1N 硫酸、1N アンモニア水によく溶解するが、メタノール、エタノール、エーテル、アセトン、クロロホルムおよびジオキサンには不溶性であ

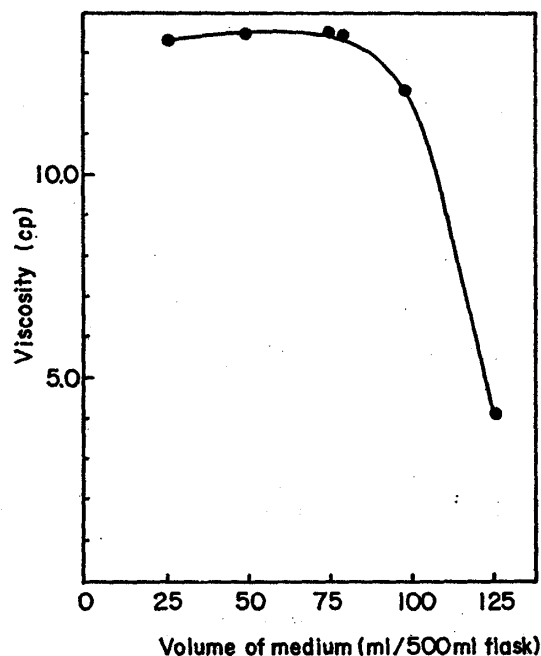


Fig. 3. Effect of working volume in flask culture on viscosity of culture broth.

Strain K-2 cells were grown for 96 hr at 30°C in the basal medium.

ったことから水溶性物質であることが確認された。本物質は、また、中性塩として食塩濃度0-20%と変化させた場合、全領域にわたって一定の粘度を示した。さらに、本物質の粘度に対する pH の影響は、Fig. 4 に示したように、pH 5.0 より pH 11.0 まではほとんど

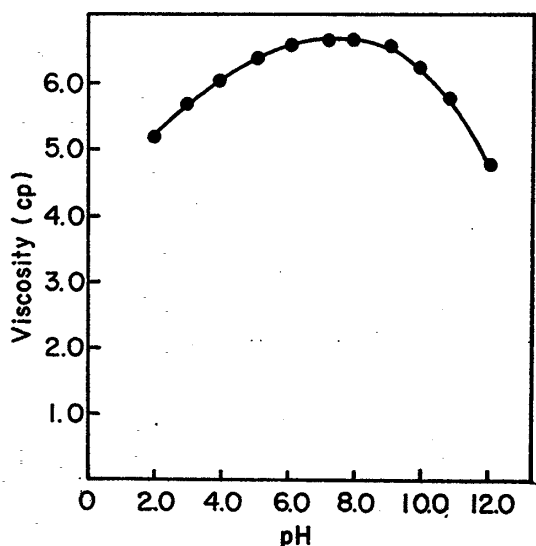


Fig. 4. Effect of pH on viscosity of solution of polysaccharide.

Slimy material (0.2g) was dissolved in 100 ml of water and incubated at various pHs for 60 min at 30°C. Viscosity was measured at 25°C.

Table 4. Effect of temperature on viscosity.

Temperature (°C)	Time (hr)	Viscosity (cp)
60	0	5.83
	1	5.30
	3	5.31
	5	5.23
80	0	5.83
	1	5.07
	3	4.92
	5	4.80
100	0	5.83
	1	3.74
	3	2.52
	5	2.31

Viscosity was measured with an Ostwald viscometer at 25°C. Slimy material (0.2g) was dissolved in 100 ml of water, and the pH of the solution was adjusted to 7.0.

どなく、検討を行った両端の pH でわずかな粘度低下が見出されたに過ぎなかった。

本物質の耐熱性を Table 4 に示した。60°C, 5時間の加熱では粘度低下はほとんどなく、80°C以上の加熱で徐々に粘度低下が観察された。

粘性物質の化学的性質 精製された本粘性物質の 0.01%溶液におけるモーリッシュ反応は赤紫色を呈し、同様にアンスロン硫酸反応は青緑色を呈したことより、本標品は糖類であることが確認された。

また、本標品の硫酸加水分解物を展開剤にブタノール・酢酸・水 (4:1:5) を用い、アニリン・水素フタル酸を発色剤とし、ろ紙には東洋科学産業の no. 1 型を使用時のペーパークロマトグラフィーはクロマトグラフ上で R_f 値 0.45 を与える 1 つのスポットのみが見出され、これは対照として使用した D-グルコースのそれと全く一致し、D-マンノース ($R_f=0.55$), D-フラクトース ($R_f=0.25$), D-ガラクトース ($R_f=0.30$) の位置とは完全に異なることより、本粘性物質はグルコースのみを構成糖とする多糖類であると推定された。本物質の元素分析の結果、C: 41.38%, H: 5.94%, N: 0.00% なる値を得た。6 炭糖 $C_6H_{12}O_6$ の、C: 40.0%, H: 6.7%, 多糖類 $(C_6H_{10}O_5)_n$ の、C: 44.4%, H: 6.2% にはほぼ近い値であったが、正確には一致しなかった。本粘性物質は、可視部には吸収が見られなかったが、275 nm 近辺に弱い吸収が観察された。Fig. 5. に本粘性物質の赤外吸収スペクトルを示した。3,400 cm^{-1} 付近の幅広い吸収は OH 基の O-H 伸縮振動、2,920 cm^{-1} 近辺の小さい吸収は C-H 結合の伸縮振動、1,200-1,000 cm^{-1} の大きな吸収はグリコシド結合のエーテル形酸素および各 OH 基に帰属する C-O の伸縮振動によると思われる。^{12,13)}

以上の吸収帯の他、本物質には 1,725 cm^{-1} に小さい吸収帯が見出され、これはアセチル基の存在を示す。¹³⁾ また、850-900 cm^{-1} の吸収は、 β -グルコサイド結合に帰属すると考えられた。¹³⁻¹⁵⁾

以上の結果より、本粘性物質は、グルコースを唯一の構成糖とするセルロース様の多糖類¹⁶⁾、これを構成するグルコースが一部アセチル化されているものと推定される。

考 察

本実験で見出された粘性物質を顕著に生産する菌株は、形態学的諸特性および生理学的諸特性によって、

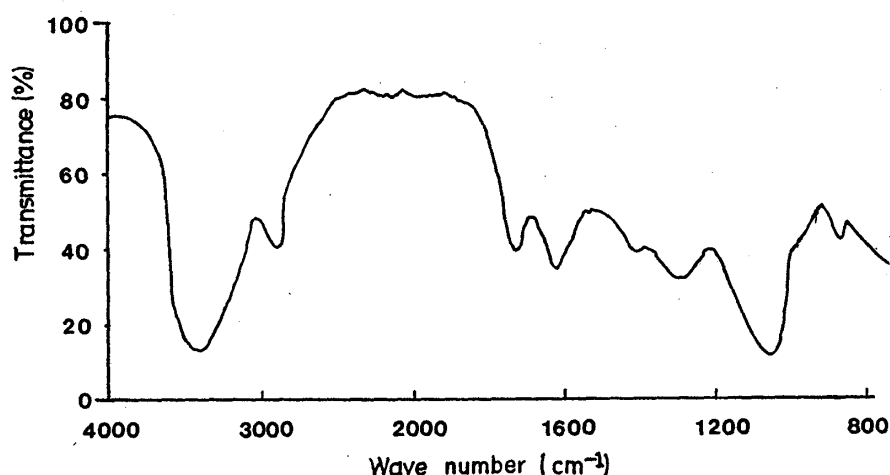


Fig. 5. Infrared absorption spectrum of isolated polysaccharide. The spectrum was recorded on spectrophotometer (Hitachi Model 225) in KBr tablets.

Acetobacter aceti subsp. *xylinum* と同定され、既往の厚膜を形成する酢酸菌と同じで、その範ちゅうに分類されるべき菌であることがわかった。

本研究で取り扱われた水溶性粘性物質の生成条件については、この実験で行った13種類の炭素源のうち、フラクトースおよび糖アルコールが特異的に高い粘性物質を生産させることが見出され、その中でも、マンニトールが最高の粘度を示した。また、これらのフラクトースおよび糖アルコールの場合、菌の生育も良好で、高粘度物質の顕著な生成は、これらの菌の良好な生育に基づくものと考えられる。炭素源をグルコースに置き換えた場合、菌の生育が良好であるにもかかわらず、この高粘性物質の生成は極めて貧弱であった。このことは、グルコースのグルコン酸への顕著な酸化生成にともない、培地の pH の急激な低下に起因するものと考えられる。さらに、炭素源として、糖アルコールの中でもマンニトールが特異的に高い粘性を呈する理由として、Gromet ら¹⁷⁾がセルロース生成について述べているように、本実験の場合でも、マンニトールからフラクトースを経由して、高粘性物質が生成されるものと考えられる。また本菌株は、とくにマンニトールなどの糖アルコールより酸を生成しない点に特徴があり、この酸生成の欠如が、逆に、粘性物質の生成増大へと結びつけられるものと考えられる。

通常の高糖類は無機イオンを含まない水溶液では非常に高い粘度を示すが、食塩などの無機塩類の添加は粘度を急激に低下させたり、pH によっては粘度が急

激に低下することが報告されている。^{14,15)} しかし、ここに報告した粘性多糖類は、これらの点に関して、特異的な性質を示し、*Alcaligenes faecalis* の生成する多糖類のカルシウム塩、¹⁸⁾ *Xanthomonas campestris* の多糖類および *Pullularia pullulans* の多糖類に¹⁹⁾類似した性質である。

食酢醗表面上に厚膜を形成する酢酸菌、*A. aceti* subsp. *xylinum* は静置培養において、コンニャク状ないしマット状で食酢などの液体に容易に溶解しない物質を生産するが、これを振とう培養に移せば、代わって高粘性を生ずる物質を形成し、²⁰⁾これが水溶性多糖類と考えられる。

A. aceti subsp. *xylinum* の静置培養で生成される多糖類については、Hibbert & Barsch,^{21,22)} Aschner & Hestrin²³⁾および Lyne ら²⁴⁾によって、これが β -1,4-グルカン結合をもったポリマーであるとされ、さらに、植物由来のセルロースと同一であるとされている。しかし、これらの菌の振とう培養で生成された多糖類については Schramm & Hestrin²⁵⁾の研究があるに過ぎず、その化学構造は、なお不明である。

ここで報告した *A. aceti* subsp. *xylinum* によって形成された水溶性の粘性物質は、グルコースを唯一の構成糖とするポリマーで、さらに、アセチル基が結合していることが推定された。その正確な化学構造については、現在、研究が進行中であり、次報に発表する予定である。

要 約

1. 食酢醗より特異な粘性物質を生産する細菌が分離され、その形態学的、生理生化学的諸特質を検討した結果、*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* と同定された。

2. この粘性物質の生産の最適条件は、マンニトール5.0%, K_2HPO_4 0.01%, KH_2PO_4 0.09%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, $FeCl_3$ 0.0005%, コーン・スィープ・リカー 0.1%, pH 7.0 よりなる培地 75 ml を 500 ml 容坂口フラスコに分注し、30°C, 96時間振とう培養を行うことであり、その場合の粘度は、オストワルドの粘度計を用い、5倍希釈の培養液で 13.7 cp であった。

3. 本粘性物質は水に可溶であるが、メタノールなどの有機溶媒に不溶であった。食塩の添加および pH 5.0-11.0の間ではその粘度は変わらず、60°C, 5時間の加熱でも粘度低下はほとんどなかった。

4. 本粘性物質はモーリッシュ反応、アンスロン硫酸反応ともに陽性であり、また、加水分解生成物には糖としてグルコースのみが見出され、赤外吸収スペクトルではセルロース様の多糖類の吸収帯の他に、アセチル基の存在を示す吸収帯が見出された。これらの結果はアセチル基を含むグルコースよりなる多糖類であることを示唆する。

終わりにのぞみ、終始ご指導賜りました静岡大学農学部山田雄三教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の一部は、中小企業庁による昭和52年度技術開発研究費補助事業によることを記し、この間、貴重なご助言をいただいた工業技術院微生物工業技術研究所高原義昌部長および関係各位に厚くお礼申し上げます。さらに、菌株を分恵下さいました東京農業大学小崎道雄教授、ならびに農林水産省食品総合研究所伊藤寛室長に深謝いたします。

文 献

- 1) 中山：酸協，31，64 (1973)。
- 2) 中山：酸協，31，108 (1973)。
- 3) 中山：酸協，32，393 (1974)。
- 4) 中山：酸協，33，273 (1975)。
- 5) Yamada, Y., Nakazawa, E., Nozaki, A., Kondô, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 22, 285 (1976)。

- 6) Asai, T.: *Acetic Acid Bacteria*, p. 17, University of Tokyo Press, Tokyo (1968)。
- 7) Yamada, Y., Okada, Y., Kondô, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 22, 237 (1976)。
- 8) De Ley, J., Frateur, J.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed. p. 276, The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1966)。
- 9) 小川，田中：化学の領域増刊(赤外)第8集，p. 143, 南江堂，東京 (1957)。
- 10) 京都大学農学部農芸化学教室：農芸化学実験書，p. 676, 産業図書，東京 (1957)。
- 11) 紫田：ペーパークロマトグラフの実際，p. 94, 共立出版，東京 (1964)。
- 12) 江上，西沢：炭水化学，p. 127, 朝倉書店，東京 (1966)。
- 13) 田中，大場，戸田：赤外吸収スペクトル法〔別冊〕別表特性吸収帯表，広川書店，東京 (1971)。
- 14) 江上：多糖生化学，I, p. 102, 共立出版，東京 (1969)。
- 15) 江上：多糖生化学，I, p. 152, 共立出版，東京 (1969)。
- 16) 祖父江：高分子，13, 370 (1964)。
- 17) Gromet, Z., Schramm, M., Hestrin, S.: *Biochem. J.*, 67, 679 (1957)。
- 18) 平田：色材，6, 355 (1976)。
- 19) 原田：化学と生物，6, 717 (1959)。
- 20) Dudman, M. F.: *J. Gen. Microbiol.*, 21, 327 (1959)。
- 21) Hibbert, H., Barsha, J.: *Can. J. Research*, 5, 580 (1931)。
- 22) Hibbert, H., Barsha, J.: *Can. J. Research*, 10, 170 (1934)。
- 23) Aschner, M., Hestrin, S.: *Nature*, 152, 659 (1946)。
- 24) Lyne, R. R., Peat, S., Stacey, M.: *J. Chem. Soc.*, 44, 237 (1940)。
- 25) Schramm, M., Hestrin, S.: *J. Gen. Microbiol.*, 11, 123 (1954)。

(昭53.8.17 受付)