

〔醸酵工学 第59巻 第4号 303-309, 1981〕

Bacillus polymyxa の生産する高粘性多糖*

満田伸二郎・宮田 信夫・廣田 哲二・菊池 俊彦

雪印乳業株式会社技術研究所

High-viscosity polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa*. MITSUDA, S., N. MIYATA, T. HIROTA, and T. KIKUCHI (Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co. Ltd., Kawagoe-shi, Saitama 350) Hakkokogaku 59 : 303-309. 1981.

A bacterial strain producing a high-viscosity, agar-like polysaccharide was isolated from soil and identified as *Bacillus polymyxa* no. 458. Fifteen grams of the polysaccharide per liter were produced by the strain after 144 hr of shaking incubation in a mixture of glucose, Polypepton, beef extract and salts. For production of the polysaccharide, the optimum pH was 7.0-7.5 and the optimum temperature was 25-28°C.

The polysaccharide was found to be acidic, and to be composed of glucose, mannose and glucuronic acid in an approximate molar ratio of 7:7:2. The viscosity of the polysaccharide solution at 0.5%, 1.0% and 1.5% was about 1,000 cp, 11,000 cp and 42,000 cp respectively, which was 5-8 times higher than that of locust bean gum. Solutions of more than 0.7% formed an agar-like gel on heating at 90°C for 10 min and cooling to 25°C.

No acute or sub-acute toxicity was found on feeding the polysaccharide to mice.

微生物が細胞外に生産する多糖は既知の天然ガム類あるいは高分子物質にみられない物性や生理的活性を有することから、これを積極的に取得し、食品、医薬品を初め、各種工業製品の素材として利用しようとする研究が多くなされている。¹⁻⁴⁾

われわれも、微生物の生産する新規多糖の取得とその利用を目的に一連の実験を行っているが、今回、土壌より分離した *Bacillus* 属の1菌株の生産する多糖が、その水溶液を加熱後、冷却することにより、寒天様のゲルを形成することを見出した。寒天様の性状を示す微生物多糖に関しては既に村尾ら⁵⁾により報告されているが、今回、取得した多糖の水溶液の粘性は既知の天然ガム類と比し、極めて高い粘性を示すこと、またグルコース、マンノース、グルクロン酸から成る酸性多糖である点において、それとは異なるものであった。

以下、本報では分離菌の菌学的性質、多糖の生産条件、構成糖とその比、粘度特性ならびに毒性試験につ

いて検討した結果を報告する。

実験材料および方法

菌株のスクリーニング 国内各地の土壌を分離源とし、ワックスマン寒天培地⁶⁾を用いて、30°C、3日間平板塗抹培養を行い、生育したコロニーのうち、粘性を呈するものを釣菌し、平板塗抹培養をくりかえして純粋株とした。

ついで、これら分離菌株をグルコース 5%、ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.5%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄・7H₂O 0.1%、CaCO₃ 0.75% (pH 6.8) より成る培地に接種し、30°C、5日間、回転振とう培養 (220 rpm) し、培養液が高い粘性を呈する菌株を選択した。培養ろ液からアセトン沈殿により粗多糖を抽出し、加熱処理、pH および食塩やシュクロースを添加した場合の粘性に及ぼす影響を調べ、寒天様の多糖を生産する1菌株を選択した。

多糖生産菌株の培養 30°C、2日間振とう培養した前培養液 2 ml を上記液体培地 100 ml を含む 500 ml 容エルレンマイヤーフラスコに接種、30°C で回転振と

* 微生物の生産する多糖に関する研究 (第1報)
Studies on the polysaccharide produced by microbes (I)

う培養を行った。

多糖の抽出および精製 菌体その他、不溶性物質を遠心除去した培養上澄に2%のセチルトリメチルアンモニウムクロライド (CTACl) を加え、沈殿および上澄区分につき、それぞれメタノール分別を3度くり返し、沈殿区分の水溶液を透析した後、凍結乾燥し精製多糖を得た。

多糖の化学的分析 得られた精製多糖を5%硫酸を用いて加水分解し、ペーパークロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーを行って全構成糖を検索した。ペーパークロマトグラフィーは、*n*-ブタノール：ピリジン：水=6：4：3を展開溶媒として上昇法で行い、硝酸銀、 α -ナフトール、ニンヒドリン試薬をそれぞれ発色剤として用いた。ガスクロマトグラフィーはピリジン存在下で、トリメチルシリル (TMS) 化した試料につき、島津製作所製 GC-3AF を用いて行った。

加水分解液について Dowex-1 (CH_3COO^- 型) を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行い、中性糖画分についてはガスクロマトグラフィーにより、酸性糖画分についてはチオグリコール酸-マンノース-硫酸反応⁷⁾ およびカルバゾール硫酸反応⁷⁾ により構成糖とその比を求めた。

粘度、ゲル強度の測定 精製多糖の所定濃度水溶液につき、粘度は B8H 型回転粘度計 (東京計器製) を用い、ゲル強度はレオメーター (富士理工工業製) を用い、それぞれ 25°C で測定した。

マウスによる急性および亜急性毒性試験 4週令の ICR 系、雄または雌マウスを用い、飼育用粉末飼料 (日本クレア製 CE-2) に粗多糖を一定量混合、成型したものを試験飼料として、所定期間、自由摂取方式で摂食させた。全試験期間を通じて体重増加量、飼料摂取量を求めると共に行動、外観の異常の有無について観察した。飼育期間終了後、剖検すると共に肝臓、脾臓および腎臓を剔出し臓器重量を測定した。また、心臓穿刺により採血し、血糖値 (Ames 社製デキストロスティック試薬) を測定後、常法にしたがって血清を調製し、血清タンパク量 (アタゴ社製血清タンパク計) および肝臓機能の良否を知る指標として、GPT、GOT 活性を中外製薬製ユニキット (ライトマンフランケル百瀬変法) を用いて測定した。

実験結果

分離菌の菌学的性質 本菌の形態学および生理学的性状を Table 1 に示す。本菌は偏性好気性、グラム陽性、直状桿菌で運動性を有し、中央から末端部にかけて内生孢子を形成する。表中に示す諸性状をもとに Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版 (1974)⁸⁾ に従って分類したところ、本菌は *Bacillus* 属に属するものと考えられた。*Bacillus* 属でグルコースから酸とガスを生成するものは少なく、通常、*B. polymyxa* と *B. macerans* に限られる。

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolated strain no. 458.

A. Morphological characteristics	
	rods, 0.8~1.0×3.0~4.0 μm , motile, Gram positive, endospore formed
B. Cultural characteristics	
	Glucose-meat ext. agar : moderate growth, rough, beige, slightly transparent, non-glittering, viscous colony
	Glucose-meat ext. bouillon : moderate growth, no film
C. Physiological characteristics	
	indole production (—), hydrogen sulfide production (—), nitrate reduction (+), citrate utilization (—), ammonium utilization ($\pm$), methylene blue reduction (+), MR reaction (—), ammonium production ($\pm$), gelatin liquefaction (+), urease (—), catalase (+)
Acid and gas production from	
	glucose, sucrose, xylose, mannose, fructose, maltose, raffinose, dextrin, starch, inulin
No acid and no gas production from	
	lactose, galactose, arabinose, trehalose, sorbitol, inositol, glycerin, salicin
Temperature for growth : good growth at 20 to 37°C, optimum at 30°C, no growth at 45°C	

Table 2. Comparison of some characteristics of *B. polymyxa* and *B. macerans*.

	<i>B. polymyxa</i> *	<i>B. macerans</i> *	Strain no. 458
Production of acetoin	+	—	+
Production of dihydroxy acetone	+	—	±
Decomposition of casein	+	—	+
Growth in 0.001 % lysozyme	d	—	+

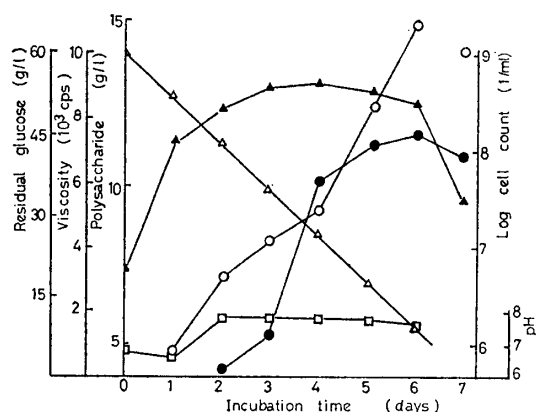
* from Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed.

そこで両菌の鑑別を、Table 2 に示すような諸性状について比較検討した。Bergey's 記載の両菌の性状と照合して、本菌がアセトインを生産する点、カゼインを分解する点で *B. polymyxa* とよく一致し、さらにコロニーの形態、その他の生理学的性状からも、本菌を *B. polymyxa* と同定した。

多糖生産条件 各種予備試験に基づいて、本菌の最適多糖生産培地として以下の組成の培地を設定した。

グルコース 6%, ポリペプトン 0.5%, 肉エキス 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, Na_2SO_4 0.5%, CaCl_2 0.5%, CaCO_3 0.75%, (pH 6.8)。

本培地における多糖生産の経時変化を Fig. 1 に示す。図より明らかなごとく、本菌の生育は培養開始後1日で衰えるが、多糖生産は1日以降、徐々に蓄積、6日目で 15 g/l (対糖収率 25%) に達し、初発6%のグルコースは6日間ではほぼ消費された。また培養液の粘性は3日目以後に、急激に増加し、その後、多糖の蓄積に比例して増加した。

Fig. 1. Time course of the polysaccharide production by *B. polymyxa* no. 458.

○ polysaccharide, ● viscosity, △ residual glucose, ▲ cell count, □ pH

Medium: 6% glucose, 0.5% Polypepton, 0.5% beef extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% Na_2SO_4 , 0.5% CaCl_2 , 0.75% CaCO_3 .

Shaking incubation at 28°C.

なお、多糖生産のための最適培地組成および最適培養条件をまとめると次の通りである。

1) 有機窒素源としてはポリペプトン-肉エキス(各0.5%)の組み合わせが最良であった。また無機窒素源については、単独では多糖生産を認めたものではなく、ポリペプトン0.5%と共存させた場合にのみ、 KNO_3 あるいは NaNO_3 の0.3%添加量で、7~8 g/lの生産が認められた。

しかし、良好な多糖生産はpHが7.0~7.5に維持された場合に得られ、これは原田ら⁹⁾の *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* の変異株による多糖生産において、窒素源の種類よりもpHが大きな因子となるという報告と一致した。

2) 糖源はグルコース、シュクロース、イヌリンで約10 g/lの多糖生産が認められたが、その他では著しく低い生産量であった。

3) 初発グルコース濃度が8%までは多糖生産量は増加するが、その対糖収率は初発濃度3%以上になると減少した。

4) グルコースは予め培地中に添加して滅菌するよりは、別滅菌して培養直前に添加する方が多糖生産量は多かった。

5) 生育最適温度(30°C)と多糖生産最適温度(28°C)とでは若干のずれがあった。

6) 酸素供給条件の多糖生産に与える影響をみるために、500 ml 容フラスコ中の培地液量を変化させ、回転振とう培養(220 rpm)した結果、液量100 ml以下、つまり亜硫酸酸化法で求めた酸素吸収速度に換算して、0.29 mM O_2 /l-min以上で、10 g/l以上の多糖生産が認められた。

多糖の精製 本菌培養液の粘性は極めて高く、10 g/l以上の多糖を生産したものでは流動性がほとんどなく、また60°C以上の加熱処理により、さらに粘性は高くなることから、多糖の抽出、精製にあたっては必要以上の加熱操作をさけた。すなわち、培養液を

50～55℃の温水で7～8倍に希釈後、遠心分離して菌体その他不溶性物質を除いた液に、2% セチルトリメチルアンモニウムクロライドを加え、酸性多糖と中性多糖との分画を試みた。その結果、中性多糖画分は全く得られず、本菌によって生産される多糖は酸性多糖のみであると認められた。得られた酸性多糖画分は3度のメタノール分別後、透析、凍結乾燥を行い、精製多糖として以下の実験に供した。

多糖の化学的および物理化学的性状 精製多糖は淡褐色、無味、無臭であり、冷水にも可溶である。

1) 均一性 精製多糖を0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.3) に0.1% となるように溶解し、分析用超遠心機 (日立製作所製 282型) によって沈降パターン (56,000 rpm, 25℃, 35～85分間) を検討した結果、単一のピークのみが得られたことから、超遠心的には均一な多糖と思われた。

2) 呈色反応 アンスロン反応、ナフトレゾルシン反応、フェノール硫酸反応およびカルバゾール硫酸反応は陽性、ヨード反応、フェーリング反応およびニンヒドリン反応は陰性であることから、アミノ基、アミノ糖を含まず、また還元性を示さない酸性多糖であると思われた。

3) 一般分析 本多糖の一般成分は粗タンパク質 0.149%, 脂質 0.00%, 灰分 6.49% であった。

多糖の構成糖

1) ペーパークロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーによる構成糖の検索 精製多糖を5% 硫酸と共に封管し、100℃ で8時間加水分解した後、炭酸バリウムで中和、ろ液を Amberlite IR-120 で処理したものにつき、ペーパークロマトグラフィーを行った。その結果、本多糖の加水分解液からはグルコース、マンノースおよびウロン酸が検出され、その他の糖は全くみられなかった。

ついで、加水分解液を Dowex-1 カラムに負荷し、溶出区分から中性糖画分を、吸着区分からは0.1 M 酢酸で溶出させて酸性糖画分を得、両画分について構成糖の確認を行った。

まず中性糖画分についてガスクロマトグラフィーを行った結果を Fig. 2 に示す。本図から明らかなように、この画分にはグルコースとマンノースのみが検出され、これらのピークは標準品のそれと全く一致するものであった。

2) ウロン酸の同定 酸性糖画分について、チオグリコール酸-マンノース-硫酸反応を行い、450～570

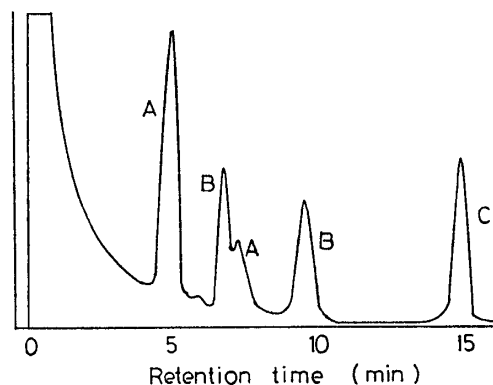


Fig. 2. Gas chromatogram of the neutral fraction of the acid hydrolysate of the polysaccharide. A : mannose, B : glucose, C : inositol as internal standard.

Apparatus : Shimadzu GC-3AF.

Sample : TMS-sugar in pyridine 2 μ l.

Column : stainless steel 3 mm ϕ $\times$ 3 m, 3%

SE-52 chromosorb WAW-DMCS 60～80 mesh.

Detector : hydrogen flame ionization (FID).

Carrier gas : N₂.

Temperature : 175℃.

nm における吸収スペクトルを求めた。その結果、酸性糖画分の極大吸収は、530 nm にみられ、これはグルクロン酸の標準品と一致した。さらに、塩基性酢酸鉛呈色反応¹⁰⁾の結果より、構成ウロン酸はグルクロン酸のみであると推定した。

以上の結果より、本多糖はグルコース、マンノースおよびグルクロン酸を構成糖とする酸性多糖であるといえる。

糖構成比 Fig. 2 に示したガスクロマトグラムからグルコースとマンノースのモル比を求めた。すなわち、各糖と内部標準としてのイノシトールとの示す面積比から標準曲線を作成し、モル比を求めたところ、グルコース：マンノース=1:0.89～1.14 が得られたことから、両者のモル比は約1:1であると推定された。

ついで、加水分解液中のグルクロン酸量をカルバゾール硫酸改変法⁷⁾によって求めた。この方法を用いたウロン酸定量値は中性糖の存在により影響されることから、予め酵素法 (藤沢薬品製 グルコスタット試薬) で加水分解液中のグルコース量を求め、これに相当するグルコースとさらに等量のマンノースの混合溶液にグルクロン酸を加えたものを用いて検量線を作成した。この検量線により加水分解液中のグルクロン酸量を求めた結果、加水分解液中には 35 μ g/ml のグルコース

が存在し、この時、グルクロン酸量は $9.5 \sim 10.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。これらのことから、本多糖の構成糖比はほぼ、グルコース：マンノース：グルクロン酸 = 35 : 35 : 10 (7 : 7 : 2) であると推定された。しかし、多糖中のグルクロン酸結合部位は加水分解されにくく、¹¹⁾オリゴ糖として残る可能性もあり、実際のグルクロン酸量はこの値よりも若干多いことも考えられる。

多糖の粘性特性 B8H 型回転粘度計で測定した本多糖水溶液の粘度は、回転速度の増加と共に低下してゆく、いわば非ニュートン流動を示した。このことから粘度は、回転数 20 rpm で測定した見掛けの粘度として示すこととした。

1) 濃度の影響 0.4~1.5% 多糖水溶液の粘度を Fig. 3 に示す。本多糖水溶液の粘度は、0.5% で 1,000 cps, 1% で 11,000 cps, 1.5% で 42,000 cps であり、同濃度のローカストビーンガムに比べ、それぞれ 8.4 倍、4.9 倍、4.7 倍という高粘度を示した。また 90°C —10 分間加熱後、冷却することにより粘度はさらに増加し、0.7% 以上の濃度では熱可逆的ゲルを形成した。この時の寒天と比較した相対ゲル強度を Fig. 4 に示す。本多糖の相対ゲル強度は寒天の $1/7 \sim 1/8$ であった。

2) 加熱温度の影響 0.4% 多糖水溶液を $60 \sim 120^\circ\text{C}$ の各温度で 5 分間加熱後、冷却したときの粘度変化を Fig. 5 に示す。粘度は温度の上昇に応じて増

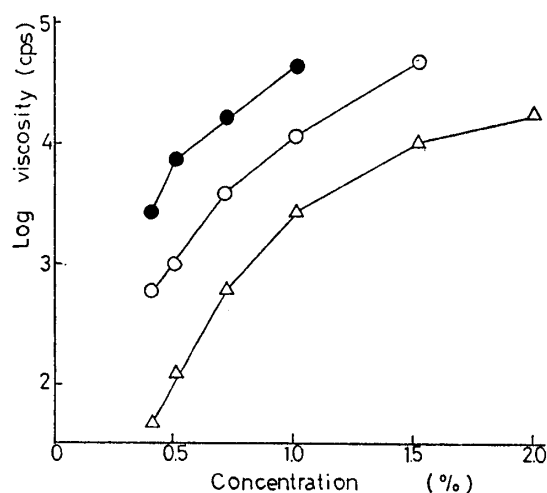


Fig. 3. Viscosity change with concentration of no. 458 polysaccharide and locast bean gum. ○ no. 458 polysaccharide; ● no. 458 polysaccharide, heated at 90°C for 10 min and cooled to 25°C ; △ locast bean gum. Measurement: B8H rotary viscometer at 20 rpm, 25°C .

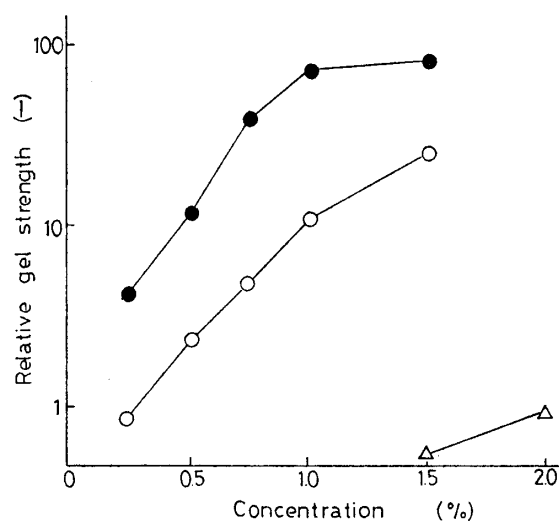


Fig. 4. Comparison of relative gel strengths of no. 458 polysaccharide, agar and locast bean gum. ○ no. 458 polysaccharide, ● agar, △ locast bean gum. Heated at 90°C for 10 min and cooled to 25°C . Measurement: rheometer at 25°C .

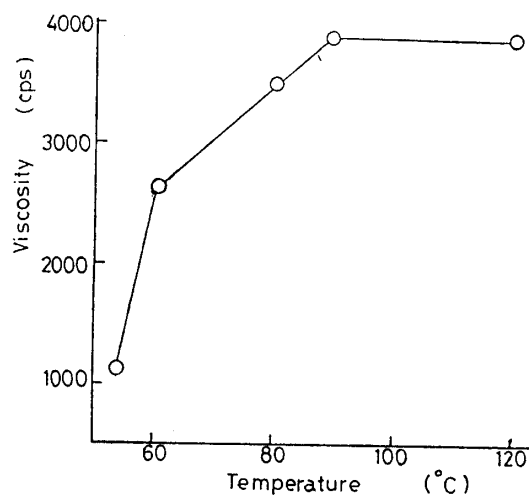


Fig. 5. Effect of heating temperature on the viscosity of the polysaccharide. Polysaccharide: 0.5% solution, heated and cooled to 25°C . Heating time: 5 min.

加し、 90°C で最高に達し、 120°C でもほとんど低下はみられなかった。

3) 加熱時間の影響 0.4% 多糖水溶液を 95°C および 121°C で 5~30 分間加熱後、冷却したときの粘度変化を Fig. 6 に示す。 95°C では加熱 20 分まで粘度は増加しつづけ、30 分の加熱でもかなり高い粘度を維持しているのに対し、 121°C では加熱 5 分までは高い粘

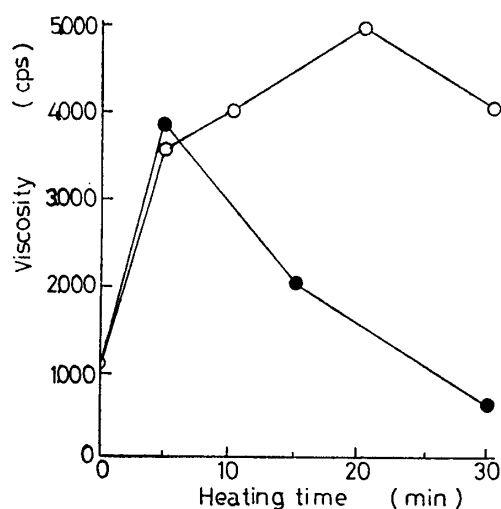


Fig. 6. Effect of heating time on the viscosity of the polysaccharide.

Heating temperature: ○ 90°C; ● 121°C.

Polysaccharide: 0.4% solution, heated and cooled to 25°C.

度を示すものの、それ以降、次第に低下し、30分では溶解時の粘度以下になることが認められた。

4) pH の影響 2N 塩酸または水酸化ナトリウムで 0.4% 多糖水溶液の pH を調整し、粘度測定した結果、pH 4~10 の範囲で安定であるが、pH 4 以下で著しく低下することが認められた。

急性および亜急性毒性試験 本多糖の安全性について、ICR 系マウスを用い Table 3 に示す試験要領で急性および亜急性毒性試験を行った。すなわち、急性毒性試験では 1 群 5 匹、6 群に分け、多糖を 0~6% 混合した飼料を 7 日間、亜急性毒性試験では 2% 混合した飼料を 15 匹に 70 日間給与した。

この結果、全期間を通して両試験とも体重増加、飼料摂取量、行動、外観および剖検所見とも対照群に比

して異常はみられなかった。その他、臓器重量比、血清タンパク量、血糖量および GOT, GPT 活性について、得られた測定値の分散分析を行ったが、両試験とも対照群との間に 5% 水準での有意差を認められる項目はなかった。

これらのことから、供試多糖のマウスに対する急性および亜急性毒性はほとんどないものと判断された。

考 察

Bacillus 属の生産する多糖については古くから研究されており、同一菌種でも構造、特性の異なる多糖を生産することが知られている。例えば、今回分離した *B. polymyxa* についても、レバン、¹²⁾ マンナン¹³⁾ を初め、ラクトース培地からラムノースとガラクトースを構成糖とする多糖、¹⁴⁾ またグルコース培地からグルコース、マンノース、ガラクトース、グルクロン酸を構成糖とする高粘性多糖の生産¹⁵⁾ が報告されている。

今回得られた多糖は、グルコース：マンノース：グルクロン酸=7:7:2 から成るものであった。*B. polymyxa* および *B. circulans* が、この 3 種の構成糖からなる多糖を生産することは、既に 1949 年、Forsyth と Webley¹²⁾ によって報告されているが、この時の多糖は寒天培地上に生育したコロニーから抽出したものであり、主として菌学的興味に止まり、またウロン酸の確認も行われていない。

Bacillus 属に限らず、グルコース、マンノースおよびウロン酸から成る微生物由来多糖は比較的少なく、*Serratia marcescens* がグルコース、マンノース、マンズロン酸より成る多糖を生産すること、¹⁶⁾ *Nocardia paraffinica* がブタンを唯一の炭素源としてグルコース、マンノース、ウロン酸から成る多糖を生産するこ

Table 3. Toxicity test of the polysaccharide against ICR mice.

	Acute toxicity	Sub-acute toxicity
Mice (ICR)	4-week-old, females	4-week-old, males
Feeding ratio of the polysaccharide	0, 0.5, 1, 2, 4, 6%	2% all
Feeding scale	5 mice × 6 cages	5 mice × 6 cages
Dosage length	7 days	70 days
Items	body weight, feed intake efficiency, organs weight (kidney, spleen, liver), blood sugar, serum protein, GOT, GPT	

GOT: Glutamic oxaloacetic transaminase.

GPT: Glutamic pyruvic transaminase.

と¹⁷⁾が知られている程度である。

一方、寒天様の特性を有する多糖に関する報告も比較的少なく、*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*¹⁸⁾や *Agrobacterium radiobacter*¹⁹⁾ の生産する β -1,3 グルカン (カードラン) が加熱により不可逆的なゲルを形成するという報告を別にすれば、いわゆる寒天様多糖の生産菌はもっぱら *Bacillus* 属にみられる。村尾らの *B. subtilis* FT-3 株の生産する酸性多糖が 1% 以上で熱可逆性のゲルを形成するという報告⁵⁾ を初め、*B. subtilis* var. *polysaccharolyticum* の多糖が同様な性質を有すること、²⁰⁾ *B. circulans* の生産する多糖が 0.3% 以上で溶解時にゼラチン状を呈する²¹⁾ 等、興味ある現象が報告されている。しかし、今回われわれが取得した多糖は、これらのものと構成糖を異にすると共に溶解時の粘性が著しく高く、しかも 0.7% 以上では、加熱、冷却後に寒天様に固化するという特性を併せもつ等、既報の寒天様多糖とは性格を異にするものであった。多糖のゲル化機構は極めて複雑であり、分子量、分子形態を初め、構成糖および構成糖比もゲル強度に関与しているといわれ、⁵⁾ これらの点からも今回の多糖が既報のものとは異なる特性を示すものと思われる。

要 約

土壌より分離した多糖生産菌 1 株につき、多糖生産条件、得られた多糖の構成糖およびその比、粘性特性等を調べ、以下の結果を得た。

1. 分離菌は *Bacillus polymyxa* No. 458 と同定した。
2. 本菌はグルコース、ポリペプトン、肉エキス、塩類から成る培地で、28°C、6 日間の振とう培養により、15 g/l の高粘性多糖を生産した。
3. 多糖生産の最適 pH は 7.0~7.5、最適温度は 28°C であった。
4. 本菌株により生産される多糖は、グルコース：マンノース：グルクロン酸=7:7:2 から成ると推定される酸性多糖であった。
5. 本多糖は 0.5% 水溶液で 1,000 cp、1% で 11,000 cp、1.5% で 42,000 cp の粘度をもち、ローカストビーンガムに比べ 5~8 倍の高粘性を示した。
6. 0.7% 以上の多糖水溶液を 90°C、10 分間加熱後、冷却することにより、寒天様の可逆的ゲルが形成された。

7. 本多糖のマウスを用いた急性および亜急性毒性試験では、体重増加率、臓器重量比、血清性状、肝臓機能等に全く異常は認められなかった。

本研究の一部は、1978年11月の日本醸酵工学会大会で発表した。

文 献

- 1) 松田, 小林: 発酵と工業, **36**, 11 (1978).
- 2) 谷口: 発酵と工業, **36**, 22 (1978).
- 3) 原田, 佐藤: 発酵と工業, **36**, 86 (1978).
- 4) 杉本: 発酵と工業, **36**, 98 (1978).
- 5) 村尾, 森田, 高原: 醸工, **51**, 653 (1973).
- 6) 京都大学農学部農芸化学教室編: 新改版農芸化学実験書, 第2巻, 産業図書, 東京 (1957).
- 7) 蛋白質, 核酸, 酵素編集部編: 糖質実験法, 共立出版, 東京 (1968).
- 8) Buchanan, R. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th. Ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974).
- 9) Harada, T., Fujimori, K., Hirose, S., Masada, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 764 (1966).
- 10) 塩田, 安田, 金子, 土井: 醸工, **49**, 30 (1971).
- 11) 三崎: 総合多糖類化学 (上), (原田, 小泉編), p. 105, 講談社, 東京 (1974).
- 12) Forsyth, W. G. C., Webley, D. M.: *Biochemical J.*, **44**, 455 (1949).
- 13) 原田: 総合多糖類化学 (下), (原田, 三崎編), p. 154, 講談社, 東京 (1974).
- 14) 三崎, 石川, 寺本: 醸工, **36**, 320 (1958).
- 15) 木村, 花田: 農化, **42**, 178 (1968).
- 16) 原田: 総合多糖類化学 (下), (原田, 三崎編), p. 152, 講談社, 東京 (1974).
- 17) 杉本, 横尾, 今田: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 138 (1971).
- 18) Harada, T., Masada, M., Fujimori, K., Maeda, I.: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 196 (1966).
- 19) Nakanishi, I., Kimura, K., Kushi, S., Yamazaki, E.: *Carbohydrate Res.*, **32**, 47 (1974).
- 20) 村尾, 塩沢, 橋本, 高原, 光木: 特許公告, 52-12789 (1977).
- 21) 石川, 木村, 鈴木: 特許公告, 52-4635 (1977).

(昭 55. 10. 23 受付)