

(10)

(照井・藤原) *B. hydrolyticus* の纖維素に對する舉動研究

- 3) 酸性例では Riboflavin の溶解度は pH の影響を殆んど受けない。(高田研究室報告第 266)

文 献

1) 陳: 本誌 24, 56 (昭24)

2) Kuhn u. Wagner-Jauregg: Abderhalden Handb. biol. Arbeit. V, 3B, Heft 8, 1211 (1937)

The temperature has the important influence on the solubility of riboflavin, such as 50 γ /cc at 7°C, 140 γ /cc at 30°C, 370 γ /cc at 50°C, 1200 γ /cc at 80°C, 2300 γ /cc at 100°C.

pH at acididic side has almost no influence on the solubility of riboflavin.

B. hydrolyticus の纖維素に對する舉動研究

細菌 Hydrolase に關する研究: (第 2 報)

照井 堯 造, 藤 原 博 夫

(大阪大學工學部醱酵工學教室)

I. 緒 言

既報¹⁾の中温好氣性菌 *B. hydrolyticus* n. sp. は纖維素分解能を有するものであるが、典型的纖維素分解菌ではなく、纖維素に對する舉動は、既往諸研究に見るものと少々趣きを異にするものがあり、本文に於ては之に關する二三の實驗を紹介する。云ふまでもなく、菌類に依る纖維素分解の過程は自然界物質循環に於て重要役割を演じ、之が農産、林産及び畜産(草食動物の營養)に至大の關係があり、研究の歴史も古く 1850 年(MITSCHERLICH)に始まり、報文は枚舉に違なき状態であるが、菌學的研究の大部分は WAKSMAN²⁾, THAYSEN 及び BANKER³⁾ の著書に要約されてゐるので茲には贅言を避ける。

好氣性乃至半嫌氣性中温纖維素細菌に就て見るに、その大多數は BERGEY⁴⁾ に於ては 4 種の Genera——*Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Cellulomonas* 及び *Cytophaga*——に入るものであるが、その外に *Vibrio*, *Bacillus*, *Actinomyces* 中にも見出され、近年 FULLER, NORMAN (1943)⁵⁾ は土壤中の代表的好氣性中温纖維素細菌として *Pseudomonas* の 3 品種, *Achromobacter* 及び *Bacillus* の各 1 品種を分離してゐる。*Pseudomonas* に就ては既に大谷⁶⁾ は侵蝕綿布より *P. fibrolysis* HANZAWA et OTANI を分離してゐる。但し BERGEY に於ける *Pseudomonas* を特徴づける水溶性にして、培地中擴散性なる色素(青、綠又は黃綠)生産の記載がない。

何れにせよ之等の細菌に依る纖維素分解の工業的利用價值は、無酸素的分解の場合と異り尙未知數であるが、中温好氣性は工業的取扱の最も容易なる發育條件であり、且つ好氣的發育に於ては基質水解産物の“Desmolysis”に依る浪費の代りに、基質の少量を消費して多量のエネルギーを遊離し、經濟的な發育を遂げしめ得る故に、水解産物の多量を殘留する事が可能であり、此點に着眼すれば、工業的利用の將來性は考慮に値するものとなる。

ウスバタケを使用せる飼料生産に於て、纖維素の 1 部を利用する菌體構成の外に、叙上の趣旨が如何程まで達成せられたかゞ問題である。

本報告に於てはこの非典型的な纖維素細菌の纖維素培養基に於ける舉動——特に associating

organism "*Bacterium megalocellum* n. sp." 並びに之との混合培養の記述を行ひ併せて基質纖維素變化の特徴に就て述べる。

Ⅱ. 補助菌 *Bm. megalocellum* n. sp. に就て

Bs. hydrolyticus (以下 *Bh* と記す) を自然界より分離する際、菌學的に全く純化すれば發育並びに纖維素に対する作用が衰へる事を認めたのであるが、純化前の培養物より酪酸菌と共に表記細菌を分離し得て、後者を *Bh* に會合せしむる時は *Bh* の作用が強化される事を知つた。兩種細菌の關係機構は尙明瞭でない。SANBORN³⁾ は *Cellulomonas folia* と數種細菌との會合に就て研究し、生長素乃至營養的な共棲關係を明かにしてゐる。著者等の場合には嚴密な意味に於ける共棲 (Symbiosis) は疑はしいので取敢へず補助菌として表はす。以下該補助菌の一般的記述を行ふ。

Bacterium megalocellum n. sp.

▲顯微鏡的所見

無孢子不動性の大型長桿菌で、2%葡萄糖加肉汁ペプトン(前報A液)寒天培養に於ける正常の大きさは $1.8 \times (4.5 \sim 6.2) \mu$ 、端部圓形で概ね單獨、GRAM 陰性である。

▲培養所見

平板培養: A-液寒天に 30°C, 3日間培養せる聚落は淡いクリーム色で粘性不整圓形(徑6~10 mm)であり、概觀的には扁平平滑、全體として1 mm程度基上に隆起し、微細に觀察すれば中央部僅かに突出し周縁に向つて微かな放射狀隆起が走り、周縁には細かな鋸齒狀の出入が認められる。常に Trimethylamine に似た特臭を感知し得る。

劃線培養: 粘性にして淡いクリーム色の發育を示し、平滑である。(A-液寒天)

突刺培養: 表面によく増殖するが突刺線に沿ふ發育も明瞭に認められる。

馬鈴薯切片培養: 明瞭な増殖を認め得ない。

液體培養: A-液によく發育し、溷濁と沈渣とを生じ、皮膜皮輪の形成はない。リトマス牛乳では 30°C, 3日間で少しく褪色を示すのみで他の變化はないが、日數經過と共に酸性を呈し遂に凝固する。リトマス乳清も之に準じ日數經過と共に蛋白凝固を示す。

纖維素培養基: 改變 OMELIANSKY 液(前報¹⁾ 参照、以下B-液と記す)では光澤ある白濁を呈して増殖する。纖維素の侵蝕も起るが、*Bh* 菌に比し遙かに弱い。

▲其他の生理的性質

半嫌氣性菌で、發育適溫は 30°C 附近、最低は 10°C 以下、最高は 37°C 以上にある。最適 pH は 6.8 附近、生長素他給性、Gelatin 液化は陰性、A-液に於て Indol 生成せず、硫化水發生せず、アンモニアの生成を認める。硝酸還元作用は明瞭である。Amylase 生産力は弱く、色素生産も認められない。

代謝基質: Zymohexose 類、蔗糖、麥芽糖、マンニット、澱粉によく發育し、グリセリンでは稍劣る。之等基質より生酸するが醗酵瓦斯の發生は常に陰性であり、乳糖のみは生酸微弱である。又纖維素を單一炭素源とした培養には生育し難く、常に易資化性炭素源の少量が要求せられ、増殖が起れば長期間の後纖維素の侵蝕を認め得る。

▲所在及び分離

堆肥中に見出される。B-液中に、好氣的條件で *Bh* 菌等と混合して集殖せられ、B-液に中溫長期間培養の後、本菌を平板培養の反覆に依て分離する。

▲分類

本菌は Family *Bacteriaceae* に所屬するが、BERGEY⁴⁾ に據れば、Genus *Bacterium* 以外の屬に

(12)

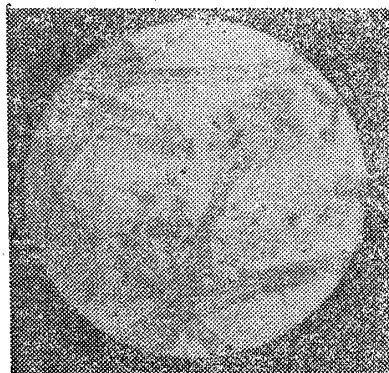
(照井・藤原) *B. hydrolyticus* の繊維素に対する挙動研究

於て該當するものがない。既述の一般標識に於て、著明な特徴として細胞の形状(特に幅)の大きな事と繊維素に対する挙動とを挙げ得る。即ち *Bacterium* 中では幅 1.2μ 以上のものは稀であり、本菌は正常状態に於て 1.8μ を示し、又繊維素に対する作用は弱い乍らも明確に観察し得るもので、之亦 *Bacterium* としては特筆すべき性質である。一般標識と上の2特徴とよりして本菌を1新種と見做し、*Bacterium megalocellum* (以下 *Bm* 菌と記す)と命名する。

Ⅱ. 培養上の2,3の性質

一般含糖基に於ては *Bh* は *Bm* よりも遙かに發育旺盛であり、繊維素培養基に混合培養すれば *Bh* は主菌となるが、*Bh* 單獨の場合よりも發育、繊維素の變化共に著明となる。繊維素の状態變化は肉眼的に明瞭であるが、顯微鏡的には圖の如く膨潤脆弱なる状態を示し化學的にも弱く易水解性となる(次項参照)。圖の如き状態は *Bh* 單獨にても、より長期間の培養に依り現はれるものである。

(A)



(B)



寫眞版は *Bh*, *Bm* を B-液 に混合接種し、 30°C に10日間以上培養し脆弱化する濾紙纖維(A)と、無接種にて平行處理せる對照(B)を示す。

以下主として混合培養に於ける2,3の所見を要記する。

a) 繊維素に対する適應

既述の如く、供用細菌は典型的纖維素分解菌ではなく、從てその Cellulase も構質酵素とは考へられない。下記實驗結果より、葡萄糖を炭素源とする累代培養により、纖維素分解能が退化し、又纖維素培養に依りその分解能が増加する。纖維素に少量の葡萄糖を配した培養液では、後者が炭素源として資化容易なる爲め、屢々發育、纖維素分解能共に無糖の場合より良好なることもあるが、馴養培地としては無糖の方が適してゐる。以上の適應的變化は肉眼的に明瞭に識別し得るもので供用細菌の Cellulase は適應酵素と認められる。

實驗例1：下記の稀薄なる培養基を用ひた。供用碎解濾紙は東洋濾紙は製壓濾紙細片を水と煮沸しつゝ解舒したるものである。

培養基	碎解濾紙	葡萄糖	其 他
(1)	0	0.5%	ペプトン0.051%, 硫酸0.047%, KH_2PO_4 0.013%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{aq}$ 0.006%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{aq}$ 0.005%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{aq}$ 0.0003%
(2)	0.5%	0	麥芽根の0.05%硫酸抽出液(原麥芽根として)0.03%
(3)	0.5%	0.2%	

Bh 及び *Bm* 菌の無菌水懸垂を以て接種し、 30°C 附近に於て移植間隔を5日間とする4回の累

第 1 表

試験培養 累代培養基	(2)			(3)		
	2日	6日	9日	2日	6日	9日
(1)	/	3+	3+	/	/	/
		x	2x			
(2)	3+	5+	5+	3+	4+	4+
	2x	4x	5x	2x	4x	5x
(3)	+	4+	4+	2+	4+	4+
	x	2x	2x	x	4x	5x

第 2 表

移植回数	1	2	3	4
培養日数	2	4	3	5
(2)	2+	2+	3+	4+
	(x)	2x	2x	2x
(3)	2+	2+	3+	4+
	x	3x	x	(x)
				3x
				3x
				4x

代培養に於て、(1) に累代培養する事に依て繊維素分解能が明かに退化し、(2)、(3) に累代培養せるものと識別し得る。發育程度を+の數、外觀的な繊維素状態變化の程度を×の數にて示せば第1表の様である。

次に(2)、(3)の累代培養に於ける馴致過程を例示せば第2表の様である(移植間隔5日)。

b) 培養物残存繊維素の稀酸分解恒數及び沃度反應

繊維素培養に於て肉眼的乃至顯微鏡的に認められる基質の状態變化は顯著なものであるが、繊維素絶對量の減少は外觀上殆ど目立たない。2.5%の濾紙繊維素を含有する培養基中20日間までの長期培養に於てその減少率は僅々5%以下である。實驗例2には以上の關係を示した。

從て著者等の細菌に依る基質變化の重心は繊維素の還元糖への分解よりも寧ろ残存繊維素の状態にあり、恐らく分子を末端の近くより細分する事の代りに、末端基より遙かに遠き結合が水解せられ不溶解の儘ミセルの配列が亂れ水和度を高めた状態で大部分残存するものと考へられる。

此状態變化の定量的表現法として著者等の撰擇したものゝ一つは、残存繊維素の稀酸分解に於ける分解恒數(K)を無接種對照(K_0)と比較表現する事である。實驗例3には種々に處方した繊維素培養に於ける恒數變化率(%)即ち、 $R = 100 \cdot (K - K_0) / K_0$ を示す。以後此方法を残存繊維素法と略稱する。N-硫酸にて煮沸水浴中還流下に分解し、生成還元糖より恒數を求める此方法に依れば、Rは一般に正の可成り大なる値を取る。

濃酸低温分解は本研究には適しない。即ち天然繊維素は溶解後速かに分解せられ Hydratecellulose 以後は除々に分解される事は FREUDENBERG⁹⁾の實驗を批評した ECKENSTAM の研究⁹⁾よりも明かであるが、BUEVSKOI et al.¹⁰⁾が繊維素、水加繊維素等の稀酸分解速度を比較した實驗數値より見て、残存繊維素は濃酸處理繊維素と天然繊維素との中間にある故に、濃酸法では著者等の基質侵蝕効果Rを把握する事が實際上至難と考へられる。

次に實驗例4に於ては、培養物残存繊維素が硫酸に依り沃度反應を示現する際必要なる硫酸濃度を無接種對照との比較に於て求めた。特筆すべき事實は、第1に残存繊維素の沃度反應は對照の青色なるに對し紫色を帯びる事であり、第2に硫酸の呈色限界濃度は、對照よりも遙かに低い事である。之等は凡て繊維素の酵素的な變化に關する前記の考察に符合するものである。尙兩種繊維素の沃度吸著作用に就ては著明な差異を認め難い。

實驗例2：前回よりも濃厚な培養基を用ひ、その液深を3cm前後とし圓錐フラスコに收め、其他の處方は前回に準じ、一定期間後培養物を取り、残存繊維素を濾別しN/10 鹽酸にて洗滌したる後、蒸溜水にて反覆水洗し鹽素イオンを検出せざるに到れば、之を80°Cに乾燥恒量と爲す。供用培養基は次の様である。

培養液(4)：カゼイン水解物(硫酸分解、石灰中和濾液を原カゼインとして)0.1%、硫酸0.47%、生馬鈴薯抽出液(同量の0.05%硫酸にて搗碎抽出せる液)1/100容、 KH_2PO_4 0.125%、 $MgSO_4 \cdot 7aq$ 0.063%、 $CaCl_2 \cdot 2aq$ 0.013%、 $FeSO_4 \cdot 7aq$ 0.003%の液40ccに付1.000gの碎解洗滌したる後乾燥せる濾紙纖維を加へ、更に、0.13%殺菌炭酸石灰を加へる。

第3表は平均的な成績を示すものであつて、相似の培養基にて行つた他の實驗でも5%以上の減少率は未だ得られてゐない。

第 3 表

日 數	5	15	20
纖維素量 (mg)	971	966	956
減少率 (%)	2.9	3.4	4.4

實驗例3：下記の培養基 100cc 宛を 300cc 圓錐フラスコに納め、常法に依り殺菌後30°Cにて、實驗例1に準じて繊維素に馴養せる種母(Bh+Bm)の約5%を以て接種し、15日間同溫度附近に保ち、残存繊維素を分離精製乾燥する事前實驗の如く爲し、その0.5gを精秤し100~250ccの圓錐フラスコに容れ25ccのN-硫酸を加へ煮沸水浴中還流下に一定時間(此實驗では90分)加熱し、直ちに冷却してN-苛性曹達にて中和し全容を100ccに充たし、その濾液又は上澄の一定容を取り、Micro-BERTRAND法にて還元糖量を求めた。

(14) (照井・藤原) *B. hydrolyticus* の繊維素に対する挙動研究

還元糖を全部葡萄糖と見做し次式に依り一分子分解恒数 K を求める。

t を分數、繊維素 $1g$ より上の條件にて生成する葡萄糖量を Xg とすれば、

$$K = -\frac{1}{t} \ln \frac{1}{1-0.9x} = -\frac{1}{t} \ln (1-0.9x)$$

無接種にて平行處置せる對照の恒数 K_0 を同様にして求め、既述の方式にて恒数變化率 R を算出する。供用培養基は次の5種である。

培養基(5)*: 濾紙繊維素(前出)2%, 硫酸 0.189%, KH_2PO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7aq$ 0.025%, $CaCl_2 \cdot 2aq$ 0.005%, $FeSO_4 \cdot 7aq$ 0.001%, $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18aq$ 0.007%(水道水)

同 (6): (5)+馬鈴薯抽出液(前出)1/100容。

同 (7): (6)の硫酸量を半減し葡萄糖 0.05% を添加せるもの。

同 (8): (6)の硫酸量を半減せるもの。

同 (9): (5)に於て窒素源を不含とし、葡萄糖 0.1% を含有せしめたるもの。

此無窒素培養液に對しては、*Azotobacter* sp. (新たに分離せるもの)を混合接種し、窒素補給を試みた。

以上の培養基には凡て殺菌後 0.1% の殺菌炭酸石灰を加へた。培養基(5)に於ても發育が起つたのは、前培養に由來する生長素と少量の液存炭素源に依るものと考へられるが、(6)以下の皮膜を形成するものに比し發育稍々劣る。實驗結果は第4表に示す。

第 4 表

培 養 基	$X \times 10^3$	$K \times 10^4$	R
(5)	22.6	2.017	43
(6)	26.8	2.714	93
(7)	25.8	2.605	85
(8)	24.2	2.447	74
(9)	24.4	2.460	75
對 照	14.0	$1.409 = K_0 \times 10^4$	

實驗例4: 培養物殘存纖維素試料は既述の種々なる培養物より採取した試料の混合物であつて、その精製處理方法は前實驗に準じた。先づ無培養對照との沃度吸着力を比較すべく、乾燥物 0.2g 宛を精秤し、N/20 沃度-沃度加里液20cc宛を加へ、よく混合したる後遠心分離し、上澄10ccを取り、N/10 チオ硫酸普達にて滴定した。之より吸着沃度を求めた結果は次の様である。N/10 沃液のcc數にて、殘存纖維素 2.83 cc, 對照 2.73cc。

沃度呈色反應試驗には、試料を N/10 沃度-沃度加里液に1分間浸漬して之を取出し、余分の液を去つて除濕器中乾燥し、18~57%の硫酸液中に投入し呈色を常溫にて觀察した。表中+數にて呈色の強さを示し、5+は呈色完全にして、硫酸濃度を増加しても呈色の増加しないものである。

第5表・沃 度 呈 色 反 應

硫 酸 濃 度 (%)	57.0	47.4	44.2	41.5	39.7	36.0	18.0
對 照 (青色)	5+	5+	3+	2+	+	±	0
殘存纖維素(帶紫)	5+	5+	5+	4+	3+	2+	+

Ⅲ. 考 察 及 び 要 約

Bh 菌の纖維素培養基上の發育を助長する *Bacterium megalocellum* n. sp. はそれ自身微弱乍らも纖維分解能を有し、自然界より Bh を分離する途上に分離されたものであるが、兩者の關係が

* アルミニウム鹽の増殖促進効果は近藤、川井兩學士の豫備實驗に於て確かめられたものである。

眞の共棲 (Symbiosis) であるか否かは不明であり, Association の原理に就ては今後の研究に俟たねばならぬ。

之等細菌は何れも纖維素分解菌として典型的なものではなく, 纖維素を單一炭素源と爲し難い事は纖維素減少量(實驗例2)より考へて明かであり, 初期増殖に於て他種溶存炭素源(例へばペプトンは C-N-源として)が必要である。加之纖維質無添加培養の繼續依りその分解能が速かに減退し逆に適應的に強化する事も可能であるが, 孰れにしても該細菌の生活にとつて, Cellulase の生産は全く第2義的なものゝ様である。從來, 細菌に依る纖維素分解作用の研究には, 概ね典型的又は之に近い纖維素細菌が供用されて居り, 報文も枚舉に遑なき多數であるが, 之と對蹠的な意味に於て, 本報告に於ける培養系の纖維素に對する舉動研究は別個の新しい事實を提供する事が豫期される。事實著者等の培養系に於ては濾紙纖維素に對する作用は從來の諸研究に見るものと異り, 低分子化合物への分解は僅少であり, 基質の大部分は不溶の盡殘存する。殘存纖維素の肉眼的及び顯微鏡的所見は明かに狀態變化を指示し, 該變化を既述の理由に依り量的に表示する方法として撰ばれた稀酸分解に於ける速度恒數の變化率 R は, 正の充分に大なる値を示し, 殘存纖維素は化學的にも明かに脆弱化せる事が指示された (R の最大値として今日迄に 93% が得られた)。沃度反應上の諸性質も如上の消息を物語るもので, 呈色に必要な硫酸濃度は無培養對照より遙かに低く, 且つ色調は對照の青色に對し紫色を帯びる。

斯くて本培養系に於て作用する Cellulase は, 既知の PRINGSHEIM¹¹⁾, KARRER¹²⁾, GRASSMANN¹³⁾ 其他の取扱つたものと相違し, 恰も澱粉に對し Dextrinogen- 及び Saccharogenamylase が存在するが如く, Cellulase に於ても還元糖生成型に對し高分子分解産物を生成する別個の型が存在する事が想定される。事實, 1946年, 照井及び協働者(卒業研究學生を含む)は, 之に相當する新しい型の Cellulase を *B. hydrolyticus* の生體外に抽分分離し, 還元糖生成微小にして R を更に増加する實驗に成功してゐる。その詳細は後報に譲るが, 自己消化と水抽出に依り容易に達成し得るものであり, 茲に簡単に豫報して置く。此種細菌の作用に依り脆弱化せる纖維質は他種の一般纖維素菌の基質として, より容易に利用される事が推定せられ, 自然界に於て Symbiosis, Metabiosis を含む菌類の多元的な Association の一環として, 本研究に於ける纖維素分解型式が輕少ならざる役割を演ずるものと考察される。

本研究實驗の1部は工學士近藤清氏の御助力に依るものである。

文 献

- 1) 照井, 藤原: 本誌 26, (5) 147 (昭23).
- 2) Waksman: Principles of Soil Microbiology (1927).
- 3) Thaysen, Banker: The Microbiology of Cellulose etc. (Oxford Univ., 1927).
- 4) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 5th Ed.
- 5) Fuller, Norman: J. Bact., 46, (3) 273 (1943).
- 6) 大谷: 醸造學 7, 24 (昭4).
- 7) Sanborn: J. Bact., 12, 343 (1926).
- 8) Freudenberg, Blomqvist: Ber. Chem. Ges., 68, (II) 2070 (1935).
- 9) Eckenstam: Ber. Chem. Ges., 69, (I) 553 (1936).
- 10) Buevskoi, Vedeneeva: J. Appl. Chem. (U.S.S.R.) 13, 1649; 1660 (1940); Chem. Abstr., 35, 4193; 4194 (1941).
- 11) Pringsheim: Z. physiol. Chem., 78, 266 (1912).
- 12) Karrer, Illing: Helv. Chem. Acta, 8, 245 (1925); Karrer et al. 同上 8, 797 (1925); 11, 229 (1928).
- 13) Grassmann, Rubenbauer: Münch. med. Wochenschr., 78, 1817 (1931); Grassmann, Zechmeister, Toth, Stadler: Ann., 503, 167 (1933); Grassmann, Stadler, Bendet: 同上, 502, 20 (1933).