

[J. Ferment. Technol., Vol.51, No. 9, p. 653~660, 1973]

Bacillus subtilis FT-3 の生産する多糖の構成糖について*

村尾 沢夫・森田 尚文・高原 義之

大阪府立大学農学部農芸化学科

Sugar Component of the Polysaccharide Produced
by *Bacillus subtilis* FT-3

Sawao Murao, Naofumi Morita and Yoshiyuki Takahara

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka

A bacterium, which produces an agar-like gel-forming polysaccharide, was isolated from soil and identified as *Bacillus subtilis* FT-3. The optimum culture medium consisted of 3% glucose, 0.3% NaNO₃, 0.01% yeast extract, and other inorganic salts; the optimum culture conditions as so far tested were 5 days' incubation on a reciprocal shaker at 30°C with 120 rpm. In these conditions, FT-3 polysaccharide was obtained in a yield of 4.5~5.5 g per l of culture broth. The FT-3 polysaccharide (more than 1%) forms a gel when heated in aqueous suspension to 100°C for 5~10 min and cooled to room temperature. The polysaccharide was an acidic one composed of glucose, galactose, fucose, and glucuronic acid in an approximate molar ratio of 2:2:1:1.

緒 言

微生物の生産する多糖については医薬上、並びに食品工業上の観点から種々の興味ある多糖が報告されている。これ等の多糖の中で1~2%濃度で固化するものとしては、*Alcaligenes faecalis* のカードラン、^{1,2)} *Agrobacterium* IFO 13127 の生産する多糖³⁾があるが、加熱により溶解し、冷却により固化するいわゆる寒天様の挙動を示す多糖は、殆んど報告されていないようである。そこで著者らは、加熱により溶解し、室温に放冷すると固化またはゲル化する、いわゆる寒天様の粘性挙動を示す多糖を目的として生産菌の検索を行なった。その結果、一応この目的にかなうと考えられる一菌株を分離することができた。本報では、多糖生産菌の菌学的性質、並びに得られた多糖の均一性、糖組成等について報告する。

実験方法

1. 菌株の分離

(i) 一次スクリーニング 各地の土壌、河水等を分離源とし、加糖ブイオン寒天培地を用いて、30°C、2~5日間平板培養を行なった。生ずる集落の中から粘性を持つものをブイオン斜面培地に釣菌し平板培養法で純化した。

(ii) 二次スクリーニング 一次スクリーニングで得られた分離菌株をグルコース 3%、ポリペプトン 0.5%、肉エキス 0.5%、食塩 0.15%、pH 7.0~7.2の培地に接種し、30°C、3~5日間振盪培養する。この培養液を100°C、5~10分間処理後、室温に放冷してゲル化の認められる菌株を選別した。

2. 多糖生産菌株の培養 予め 30°C、2日間振盪培養した前培養液 1ml を培地 100ml を含む 500ml 容振盪フラスコに接種して、本培養を行なった。振盪培養は、往復振盪機(振幅 7cm、120回/分)を使用した。

3. ペーパークロマトグラフィー ペーパークロマ

* *Bacillus subtilis* FT-3 の生産する多糖に関する研究(第1報)
Studies on the Polysaccharide Produced by
Bacillus subtilis FT-3 (I)

トグラフィー (PPC) は東洋沪紙 No. 51 を用い上昇法で行なった。使用した展開溶媒を以下に示す。

- A 酢酸エチルーピリジーン-酢酸-水 (5 : 5 : 1 : 3)
- B 酢酸エチルーピリジーン-水 (12 : 5 : 4)
- C *n*-ブタノール-ピリジーン-水 (6 : 4 : 3)
- D フェノール-水 (5 : 1)

発色剤は、アニリン水素フタル酸を使用した。

4. **ガスクロマトグラフィー (GLC)** 装置は昇温装置と FID (水素炎イオン検出器) を取り付けした島津 GC-4 A 型ガスクロマトグラフを用い、カラムは直径 3 mm, 長さ 2 m の SE-52 (4% SE-52 on 60~80 mesh Chromosorb W) カラム, キャリアーガスは N₂ ガスを用いた。

試料は, 3% 塩酸メタノールを加え封管後, 80°C, 16時間メタノリシス⁴⁾を行ない, ついで溶媒を除去後, Sweeley ら⁵⁾の方法に準じてトリメチルシリル化 (TMS 化) して GLC の試料とした。

5. **粘度の測定** 試料の粘度は, オストワルド型粘度計 (10秒計) を用い 25°C で測定した。

実験結果

1. **多糖生産菌の分離** 第一次スクリーニングにより分離試料 320点から 250菌株が得られた。これ等の菌株を第二次スクリーニングにより選別した。その結果, 培養液を加熱後, 室温に放冷することによりゲル化が認められる菌株として, ただ一株 FT-3 が得られた。

Table 1. Morphological and cultural properties of the Strain FT-3.

1. Vegetative cells	
form	: rods, not in chains, uniformly stained
motile	: motile by means of peritrichous flagella
size	: 0.3~0.6×1.0~2.0 microns
2. Endospore	: spores, 0.2~0.3×0.7~1.0 microns ellipsoidal to cylindrical, central or paracentral
3. Sporangia	: not definitely swollen
4. Staining characteristics	
gram	: positive
acid fast	: negative
5. Agar slants (24 to 48hr at 30°C, Difco media)	
growth	: moderate
form	: echinulate
consistency	: viscid
chromogenesis	: cream-colored to light brown
6. Agar colonies (24 to 48 hr at 30°C, Difco media)	
form	: circular
surface	: rough
edge	: undulate
elevation of growth	: raised
7. Gelatin stab	
growth	: best at tops
liquefaction	: crateriform to stratiform
8. Glucose agar slant	
growth	: moderate
9. Growth on potato agar slant	: negative
10. Growth in 7% NaCl broth	: moderate
11. Growth on soybean agar slant	: abundant
12. Growth in glucose broth under anaerobic conditions	
growth	: scanty
pH	: 5.5
13. Milk	: slowly peptonized

2. 分離菌 FT-3 の菌学的性質 常法に従い,^{6,7)} FT-3 菌株の菌学的性質を調べた。形態的性質を Table 1, 生理学的性質を Table 2 に示す。この結果を, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 第7版(1957年)に従い, 分類学上の位置を検討した。本菌は好気性の桿菌で, 内生孢子を形成し, グラム染色陽性, 栄養細胞の短径が 0.9ミクロン以下で, 7%食塩肉汁に良く生育し, 硝酸塩を還元し, スターチを資化する, sporangia が明らかにふくれない, 嫌気条件下グルコース培地で殆んど生育がみられなく pH 低下がみられないこと, 大豆寒天培地での生育が良好なこと, 嫌気下アルカリ性の培地で硝酸塩よりガス発生がみられないこと等の性質より *Bacillus subtilis* に属すると考えざるを得ない。ただポテト培地での生育, クエン酸の資化がみられないこと, また菌体外に特徴的な多糖を生産すること等の点で type culture と異なった。Smith ら⁸⁾によるとクエン酸の資化性, ポテト培地での生育の有無は "variation" になりうると記載されているので, この点に着目すれば, *Bacillus subtilis* の変種とも考えられたが, 一応 *Bacillus subtilis* FT-3 と同定した。

3. 多糖生産条件の検討 FT-3 株の多糖の生産条件を検討した。生産される多糖量は, 培養液を蒸留水で4~5倍に希釈して21,000×g, 60分間遠心除菌

後, 上清液に2倍容量のアセトンを加え生ずる多糖の沈澱を集めアセトンで脱水後, 五酸化リン上で真空乾燥し多糖量として求めた。多糖生産条件の検討には, 二次スクリーニング用培地を基本とし種々の炭素源について調べた結果, グルコース, デキストリン, スターチが良好であり, ついでマルトース, ガラクトース, イノシトール, シュクロース, ラクトースの順に生産量は減少した。フラクトース, キシロースでは, 殆んど生産がみられなかった。グルコースの最適濃度は約3%であった。窒素源では, ポリペプトン, 酵母エキス, NaNO₃, KNO₃ 等が良好であり (NH₄)-H₂PO₄, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl 等のアンモニウム態の窒素源では, 多糖の生産は殆んど認められなかった。又, ビオチン, ビタミン類等の微量成分も殆んど効果がなかった。初発 pH は 6.8~7.4 が良好であった。

以上の基礎実験をもとにして Table 3 の最適培地を設定した。この培地における多糖の生産経過を Fig. 1 に示す。多糖の生産量は培養4~5日で最高となり 4.5~5.5 g/l の粗多糖が得られた。

4. 多糖の分離精製 培養液を蒸留水で4~5倍に希釈して21,000g, 60分間遠心除菌後, 上清液に2倍容量のアセトンを加え粗多糖を得た。つぎにこの粗多糖に蒸留水を加え約0.05%にとかし40,000g, 60

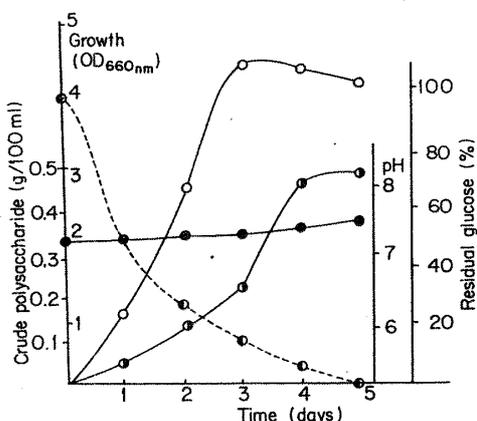
Table 2. Physiological properties of the strain FT-3

A. Hydrolysis of starch	positive
B. Hydrolysis of casein	positive
C. Production of indole	negative
D. Production of H ₂ S	positlve
E. Production of acetyl methyl carbinol	positive
F. Assimilation of citrate	negative
G. Utilization of ammonium salts	positive
H. Reduction of nitrate	positive
I. Reduction of methylene blue	negative
J. Reduction of 2,6 dichlorophenol indophenol	negative
K. Methyl red test	positive
L. Urease activity	negative
M. Catalase activity	positive
N. Reaction to free oxygen	aerobic
O. Production of gas from nitrates under alkaline, anaerobic conditions	negative
P. Fermentation of sugars	
Weakly acid but no gas from xylose, glucose, sucrose, lactose, galactose, mannitol, sorbitol, and inositol.	
No acid and no gas from arabinose, inulin, raffinose, glycerol, methyl-D-glucoside, salicin, and cellulose.	

Table 3. Optimum medium for the production of polysaccharide.

Component	%
Glucose	3
NaNO ₃	0.3
Yeast extract	0.01
KH ₂ PO ₄	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001
MnSO ₄ ·nH ₂ O	0.0005

pH 6.8—7.2

Fig. 1. Time course of polysaccharide formation by *Bacillus subtilis* FT-3.

The medium used was the same as in Table 3. Cultivation was carried out at 30°C on a shaking culture.

Residual sugar was assayed by the method of Nelson-Somogyi.

- , crude polysaccharide ;
○—○, growth ; ●—●, pH ;
○—○, residual glucose.

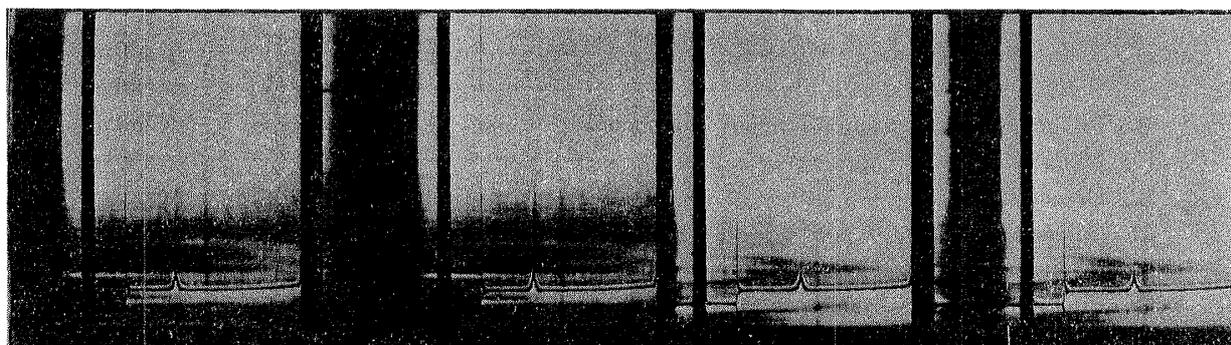


Fig. 2. Sedimentation pattern of FT-3 polysaccharide.

The direction of sedimentation is from left to right. Photographs are shown at 85, 90, 110, and 120 min after attaining a speed of 52,000 rpm. The polysaccharide concentration was 0.1% in borate buffer (pH=9.3, I=0.1). The temperature was 25°C.

分間遠心後, 上清液を集め, 再び 40,000 g で 60 分間遠心除菌後 5% に食塩を加え, 2 倍容量のメタノールを添加して多糖を沈澱させた. この多糖を再び蒸留水にとかし蒸留水に対して透析後 40,000 × g 30 分間遠心分離し上清液中の多糖を凍結乾燥して精製標品を得た. 以下の実験には, この標品を用いた.

5. 精製標品の均一性

(i) 元素分析 本標品の元素分析を柳本製 CH N-corder MT-1 を用い測定した. C=42.03%, H=5.63% で窒素は含まない.

(ii) 超遠心分析 本標品をホウ酸緩衝液 (pH 9.3, I=0.1) に溶解し 0.1% とし, Beckman 製スピコ E 型超遠心分離機を用い, 52,000 rpm, 25°C で分析した. そのシュリーレン光学系の沈降パターンを Fig. 2 に示す. 即ち単一のピークのみが得られ超遠心的にかなり均一な多糖と予想される.

(iii) チゼリウス電気泳動 日立 HTB-2 型チゼリウス電気泳動装置を用い, 多糖 0.2% のホウ酸緩衝液 (pH 9.3, I=0.1) で 6.4 mA, 20°C で測定した. その泳動パターンを Fig. 3 に示す. 即ち単一のピークのみが得られ電気泳動的にもかなり均一な多糖と予想される. なお pH 4.5 の酢酸緩衝液でも同様に単一のピークが得られた.

6. 多糖の構成糖

(i) 呈色反応による検出 試料のアンスロン反応, フェノール硫酸反応等の糖一般の反応は, いずれも陽性, ヨード反応は陰性であった. また加水分解試料ではオルシン反応 (メチルペントース, ウロン酸), カルパーゾール硫酸反応 (ウロン酸) は陽性, Elson Morgan 反応 (アミノ糖), ニンヒドリン反応は陰性であった.

(ii) ペーパークロマトグラフィーによる構成糖

の検出 試料 200mg に 2N H_2SO_4 を 10ml 加え封管後 100°C で加水分解したが、この条件における加水分解率を Nelson-Somogyi 法で検討したところ、3~5 時間で最高となり、それ以上の加水分解では分解することが判明した。そこで加水分解時間は 4 時間とした。この加水分解液に炭酸バリウムを加えて中和する。生じた硫酸バリウムの沈澱と残存した炭酸バリウムを除去後濃縮し、PPC を行なった。1 例として溶媒 A における R_g 値を示すと 127, 100, 90, 36 で、それぞれ対照とした標準単糖の結果より、本多糖はフコース (125), グルコース (100), ガラクトース (90),

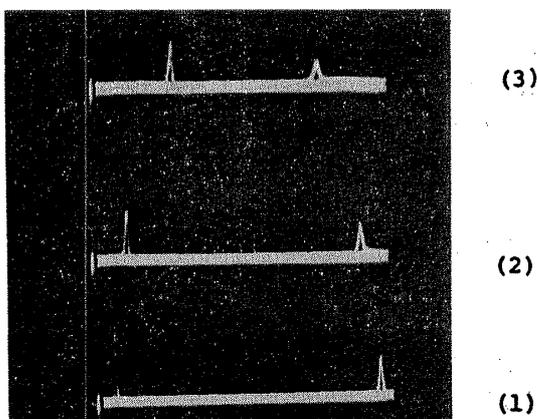


Fig. 3. Electrophoretic pattern of FT-3 polysaccharide.

The electrophoresis was carried out at 6.4 mA and 20°C. The polysaccharide concentration was 0.2% in borate buffer (pH=9.3, I=0.1).

(1) 0 min (2) 10min
(3) 30 min

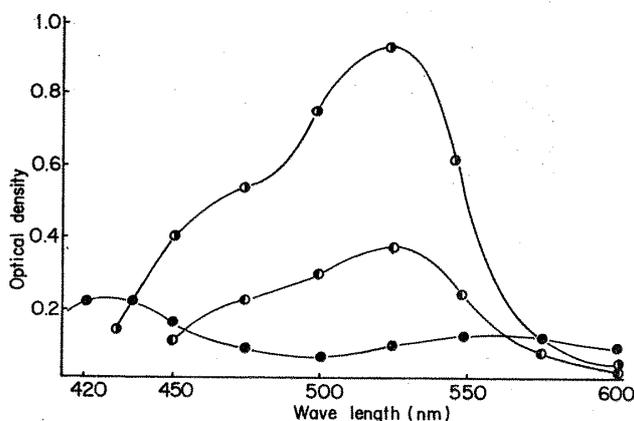


Fig. 4. Absorption spectra of uronic acid by the thioglycolic acid-mannose-sulfuric acid color reaction.

○—○, hydrolyzate of FT-3 polysaccharide ;
□—□, D-glucuronic acid ;
●—●, D-galacturonic acid.

uronidase (36) を含むものと推定された。ここで R_g の値の最も小さいuronidase推定区分は、グルクロン酸か、ガラクトuronidaseかいずれかの判別が困難であり、次の方法で検討した。

(iii) Uronic acidの同定 PPC のuronidase推定区分を蒸留水で溶出し約 100 $\mu\text{g/ml}$ の試料とし、チオグルクロン酸-マンノース-硫酸反応^{9,10}を行なった。Fig. 4 にその吸収スペクトルを示す。試料では明らかにグルクロン酸の特異吸収が認められ構成uronidaseはグルクロン酸と確認された。

(iv) Gas chromatographyによる構成糖の検出 以上の PPC の結果より構成糖は、グルコース、ガラクトース、フコース、グルクロン酸と推定された。さらにこの点を確認するために GLC を行なった。試料として FT-3 多糖のメタノリゼートを用い TMS 化後、GLC を行なった。結果を Fig. 5 に示す。図の各ピーク a, b, c, d は、それぞれ標準糖のフコース、ガラクトース、グルコース、グルクロン酸の相対保持時間によく一致した。

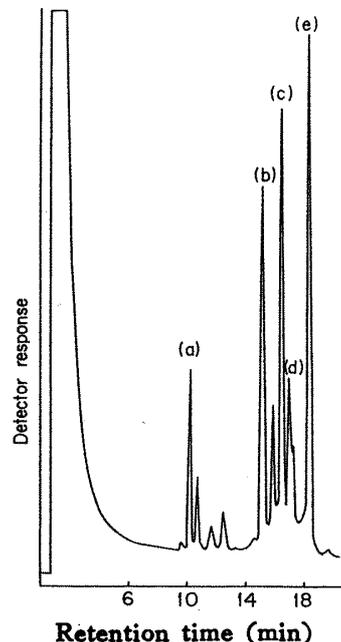


Fig. 5. Gas chromatogram of TMS derivatives of methyl glycosides obtained by methanolysis of FT-3 polysaccharide.

Operating conditions : 4% SE-52 on chromosorb W in a 3 mm \times 200 cm stainless steel column, temperature programmed at 120°C to 180°C at a rate of 4°C/min, hydrogen flame ionization detector, nitrogen carrier gas at 30 ml/min. (a) fucose, (b) galactose, (c) glucose, (d) glucuronic acid, (e) sorbitol (internal standard)

以上の結果より FT-3 多糖は、グルコース、ガラクトース、フコース、グルクロン酸を構成成分とする酸性多糖であることが明らかとなった。

(V) 糖構成比について FT-3 多糖の構成比を決定するにあたり、Fig. 5 のガスクロマトグラムからは、独立したピークの得られないグルクロン酸を除き、フコース、ガラクトース、グルコースの組成を求めた。即ち内部標準法によりソルビトール 100 μg に対する各標準糖 100 μg のメタノリゼートのピークより検量線を求めた。次に FT-3 多糖 450 μg のメタノリゼートから得られる各ピークを検量線より求めたところフコース 69.1 μg 、ガラクトース 150.5 μg 、グルコース 147.5 μg が得られ、そのモル比は、約 1 : 2 : 2 となった。

グルクロン酸の定量には、カルバゾール硫酸改良法¹⁴⁾を用いた。対照として、グルコース、ガラクトース、フコースを 2 : 2 : 1 のモル比で含む溶液にグルクロン酸を 5~25% 添加したものを検量線を求めた。FT-3 多糖 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む試料での発色値を検量線より求めた所、18% なる値が得られた。同様な方法を GLC にも応用して、グルクロン酸含量 20% なる定量値を得た。

以上の結果より、FT-3 多糖は、グルコース、ガラクトース、フコース、グルクロン酸が約 2 : 2 : 1 : 1 のモル比からなる酸性多糖である。

(vi) 多糖の構成成分に及ぼす炭素源の影響 各種炭素源から得られる(培養 5 日間)多糖を試料とし構成糖を GLC 法で測定した。その結果ガラクトース、ラクトース、シュクロース、マルトース、イノシトール等を炭素源とした場合は、グルコースを炭素源とした場合と殆んど変化は見られなかった。ただスターチ、デキストリンの場合は、グルコース、ガラクトース含量がやや高い多糖が得られた。

7. 多糖の物理的性質

(i) 多糖のゲル化 本多糖は、低濃度では水に溶解するが、0.5% 以上になると溶解しにくくなる。多糖に蒸留水を加え 1% とし、100°C、5~10 分間加熱溶解後、室温に放冷すると熱可逆性のゲルを形成する。ゲル化の状態を Fig. 6 に示す。しかしゲルの強さは寒天に比較して、やや弱く表面は、やわらかい。また透析により完全に脱塩されるとゲル形成能は弱くなる。

(ii) 比旋光度 Union 技研製 PM-70 high sensitivity polarimeter を用い、多糖 0.2% ホウ酸緩衝液 (pH 9.3, I = 0.1) の 589 $\text{m}\mu$ での比旋光度

は、25°C、2 cm の観測管を用い測定し $(\alpha)_D^{25} = -17^\circ$ であった。この溶液を加水分解すると比旋光度は上がるので、主構成糖であるグルコース、ガラクトースが D-型と仮定すればこの多糖中の糖残基の結合様式は、 β 結合が優先していると推定される。

(iii) 多糖の濃度と粘度 濃度と粘度の関係は、Fig. 7 に示す。FT-3 多糖水溶液は市販の CMC、スクレロタンより、はるかに高い値を示した。

考 察

Bacillus 属の多糖生産菌には、*Bacillus polymyxa* No. 271¹²⁾、*Bacillus polymyxa* C₃^{13,14)}、*Bacillus strain* F-573¹⁰⁾、*Bacillus polymyxa var. lactoviscosus*¹⁵⁾ 等々が知られている。これら *Bacillus* 属の生産する多糖は、一般に構成糖として、グルコース、ガラクトース等の中性糖、グルクロン酸等のウロン酸を含有することが認められている。著者らの FT-3 多糖もこの点では、これらの *Bacillus* 属の多糖に類似した。しかるに、FT-3 多糖はフコースを含有する

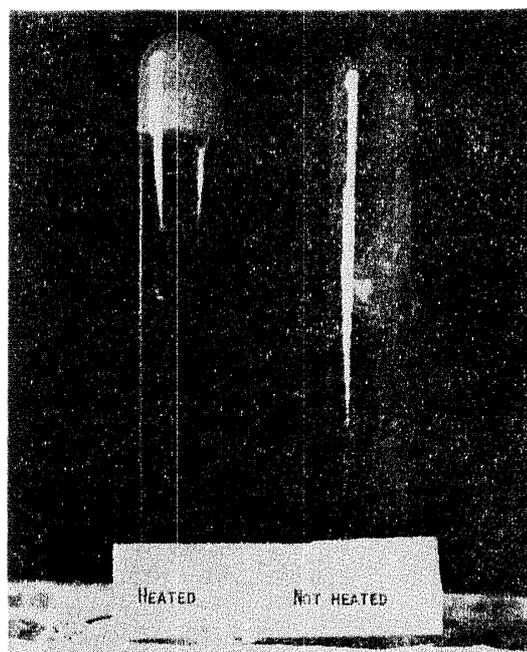


Fig. 6. Photograph of a gel formed by heat treatment.

Three ml of an aqueous suspension of FT-3 polysaccharide (1%) was heated in a test tube for 10 min in a boiling water-bath and cooled to room temperature. After standing for 30 min, the test tube was turned upside down, then the gel formation was tested.

The tube on the left of the photograph was heated; that on the right was not heated (reference).

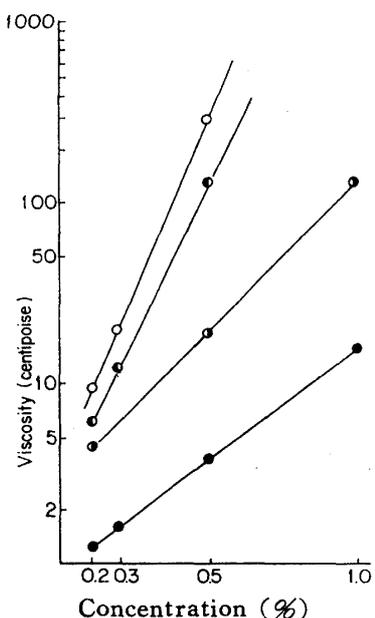


Fig. 7. Viscosity vs. concentration of FT-3 polysaccharide and various gums. Viscometry was carried out at 25°C using an Ostwald viscometer.

- , sclerotium polys. ;
- , CMC ;
- , xanthomonas polys. ;
- , FT-3 polys.

点で既報の *Bacillus* 属の多糖と異なった。フコースを含む多糖は、酵母^{16,17)}糸状菌^{18,19)}に広く認められるが、細菌では比較的その例が少ない。即ちグラム陽性菌では、*Corynebacterium sepedonicum*, *Corynebacterium insidiosum*,²⁰⁾ *Lactobacillus bifidus*²¹⁾に、またグラム陰性菌では腸内菌科^{22~24)}に存在が知られており、*Bacillus* 属の多糖にはフコースの存在は、いまだ知られていないようである。

本多糖は、1%以上で加熱溶解後、放冷すると熱可逆性のゲルを形成する点が特徴のひとつである。本多糖のゲル化の原因については、現段階では明らかでないが、寒天のゲル化は分子量、構成糖の種類とその比率、硫酸基とカルボキシル基等の電解基の組成、分子形態等が影響する²⁵⁾といわれている。ここで、FT-3株をグルコースを炭素源とする代わりに、その重合体であるスターチ、デキストリンを炭素源にすると得られる多糖の構成成分は、グルコースを炭素源とした場合のそれと一致するが、構成比でグルコース、ガラクトース含量がやや高くなり、ゲル形成能も弱くなる。この事実は、多糖の構成成分比がゲル化に大きな関係をもつことを示唆しているものと思われ興味深い。ところで *Bacillus* 属の多糖は、前述の如く数多いが、

ゲル化の見られるものは殆んどなく、僅かに *Bacillus polymyxa* No. 271 の多糖 (glc : gal : man : glc-UA = 3 : 3 : 1 : 2)²⁶⁾が1.5%でゲル化すると報告されているにすぎない。この多糖と本多糖と比較すると、構成糖に於ても、グルクロン酸と他の中性糖との比に於ても差が見られ明らかに異なる多糖と思われる。

要 約

著者らは、土壤中よりゲル形成能を有する多糖生産菌を分離した。この菌株の分類学上の位置を明らかにし、得られた多糖の均一性、糖組成等について検討し次の結果を得た。

- 1 分離株 No. FT-3 の菌学的諸性質を検討し、*Bacillus subtilis* と同定した。
- 2 多糖の生産条件を検討し、グルコース 3%、NaNO₃ 0.3%、酵母エキス 0.01%、塩類等よりなる最適培地を設定した。この培地での多糖の収量は、4.5~5.5g/lであった。
- 3 FT-3 菌株の生産する多糖は、超遠心的、チゼリウス電気泳動的に均一で、グルコース、ガラクトース、フコース、グルクロン酸が、約 2 : 2 : 1 : 1 のモル比からなる酸性多糖である。
- 4 多糖に蒸留水を加え1%とし、100°C、5~10分間加熱溶解し、室温に放冷すると熱可逆性のゲルを形成する。

本研究の一部は、昭和47年4月、日本農芸化学会大会で報告した。

文 献

- 1) Harada, T., Fujimori, K., Hirose, S., Masada, M. : *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 764 (1966).
- 2) 原田 : 高分子, **16**, 1197 (1967).
- 3) Harada, T. : *Proc. IV IFS : Ferment. Technol. Today* (Terui, G.) p. 603 Soc. Ferment. Technol., Japan, Osaka (1972).
- 4) Sweeley, C. C., Walker, B. : *Anal. Chem.*, **36**, 1461 (1964).
- 5) Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W. W. : *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963).
- 6) Society of American Bacteriologist : *Manual of Microbial Method*, McGraw-Hill Book Co. Inc., New York (1957).
- 7) 東京大学農芸化学教室編 : 実験農芸化学 (上巻), 朝倉書店 (1960).

- 8) Smith, N. R., Gordon, R. E., Clark, F. E. : *Aerobic Sporeforming Bacteria*, U. S. Dept. of Agric. (1952).
- 9) Dische, Z. : *J. Biol. Chem.*, **171**, 725 (1947).
- 10) 塩田, 安田, 金子, 土井 : 醸工誌, **49**, 30 (1971).
- 11) Bitter, T., Muir., H. M. : *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).
- 12) 二宮, 木崎, 花田 : 農化, **42**, 178 (1968).
- 13) Murphy, D. : *Can. J. Chem.*, **30**, 872 (1952).
- 14) Murphy, D., Bishop, C. T., Adams, G. A. : *Canad. J. Biochem. Phys.* **34**, 1271 (1956).
- 15) 三崎, 八木, 寺本 : 醸工誌, **36**, 25 (1958).
- 16) 深川, 山口, 魚谷, 米沢 : 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 270, (1972).
- 17) 深川, 山口, 村尾, 米沢 : 日本農芸化学会関西支部例会第274講演会要旨集, p. 4, (1971).
- 18) Miyazaki, T., Irino, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 2545 (1971).
- 19) Miyazaki, T., Irino, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 330 (1972).
- 20) Spencer, J. F. T., Gorin, P. A. J. : *Can. J. Microbiol.*, **7**, 185 (1961).
- 21) 武谷 : 病原微生物学 (福見, 牛場, 三橋, 山本) p.42, 医学書院 (1968).
- 22) Sapelli, R. V., Goebel, W. F. : *Proc. N. A. S.*, **52**, 265 (1964).
- 23) Wilkinson, J. F., Dudman W. F., Aspinal, G.O. : *Biochem. J.*, **59**, 446 (1955).
- 24) Sutherland, I.W., Wilkinson, J. F. : *Biochem. J.*, **110**, 749 (1968).
- 25) 布施, 後藤 : 農化, **43**, 365 (1969).
- 26) 二宮, 木崎 : 農化, **43**, 552 (1969). (昭48. 3. 28受付)