



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 1/20, 9/42, 9/52 C12P 39/00, C02F 3/34	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/10290 (43) 国際公開日 1994年5月11日 (11.05.94)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/00498 (22) 国際出願日 1993年4月16日(16. 04. 93) (30) 優先権データ 特願平4/315835 1992年10月30日(30. 10. 92) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 合名会社 中村産業 (GOMEI KAISHA NAKAMURA SANGYO)[JP/JP] 〒826 福岡県田川市大字弓削田80番地 Fukuoka, (JP) (72) 発明者;および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 久米 秀(KUME, Shigeru)[JP/JP] 〒813 福岡県福岡市東区御島崎1-14-502 Fukuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 宇井正一, 外(UI, Shoichi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 育和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 KR, US. 添付公開書類 国際調査報告書		
(54) Title : THERMOPHILIC CELLULOSE-DECOMPOSING BACTERIUM AND UTILIZATION THEREOF (54) 発明の名称 好熱性繊維素分解菌及びその利用 (57) Abstract A thermophilic cellulose-decomposing bacterium <i>clostridium thermocellum biovar-SK522</i> (FERM BP-3459) which can solubilize lignin, has the optimum growth temperature of 65 to 72 °C, grows in the temperature range from 40 to 80 °C, and ferments cellulose energetically; <i>Thermus aquaticus biovar-SK542</i> (FERM BP-3382) which is strictly aerobic, has the optimum growth temperature of 72 to 76 °C, grows in a medium of an ordinary concentration in the temperature range from 40 to 82 °C, and produces a thermophilic protease having the optimum working temperature of 75 to 85 °C and the working hydrogen ion concentration (pH) of as wide as 4.0 to 11.3 and a yellow carotenoid pigment; and a mixed culture of the above strains. This culture is useful for treating organic materials containing lignin and/or cellulose for various purposes and for soil conditioning.		

(57) 要約

リグニン可溶化能を有し、生育適温が65~72℃で、40~80℃の温度範囲で生育し、繊維素を旺盛に発酵する好熱性繊維素分解菌クロストリジウム・サーモセルムSK522 (*Clostridium thermocellum* biovar. SK522) (微工研条寄第3459号)、及び絶対好気性、生育適温が72~76℃で、40~82℃の温度範囲で通常濃度の培地に生育し、作用適温75~85℃、作用水素イオン濃度pH= 4.0~11.3の高温性広域作用水素イオン濃度活性のタンパク質分解酵素とカロチノイド系黄色色素を産生するサーマス・アクアティクスSK542 (*Thermus aquaticus* biovar SK542) (微工研条寄第3382号)、並びにこれらの菌株の混合培養物が提供される。この混合培養物は、種々の目的での、リグニン及び/又は繊維素含有有機資材の処理、並びに土壤改良のために有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェッコスロヴァキア	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナファソ	ES	スペイン	LV	ルクセンブルグ	SD	スウェーデン
BG	ブルガリア	FI	フィンランド	LU	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	US	米国
CI	コートジボワール	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド		

明 細 書

好熱性繊維素分解菌及びその利用

技術分野

本発明は好熱性繊維素分解菌及びその利用、特に、土壌改良等農業分野での利用に関する。さらに詳しくは、本発明は、天然リグニンの可溶化、木材その他の難分解性繊維物質、硬タンパク質や余剰汚泥の分解発酵、堆・厩肥の製造、屎尿の分解等バイオマスの腐植熟成化を促進し、土壌の肥沃化、土壌構造の改善に有用な新菌及びその有効な活用の技術に関する。

背景技術

難分解性有機資材または難分解性繊維物質、例えばオガ屑、チップダスト、プレーナー屑、バーク（樹皮）その他木材工業における廃材、モミガラ、イナワラ、ムギワラ等の藁稈類、ダイズ、アズキ、落花生等の豆類の種皮や莢殻、コーヒーかす、落葉、樹皮、ヨシやカヤ等の山野草、それにシイタケの廃ホダ木、その他キノコの廃菌床等の炭素率40～100以上の難分解性の各種植物遺体は、農業その他の産業分野において多量に排出される。

これらを構成している有機成分はきわめて複雑で多種多様であるが、一般にその主要成分は繊維素で約30～75%、次いでリグニンの15～40%で、両者を合わせると45～90%以上で、その大部分を占めている。その次がヘミセルロース7～25%の順で、そして少量ではあるが、タンパク質等の含窒素化合物、各種糖類、有機酸、アルコール類、それに油脂、ワックス、精油等が含まれている。

上記のごとき種々の植物遺体を効率的に分解することができれば、

産業廃棄物の有効利用の上で極めて有利であり、特に処理生成物は有機肥料として有用である。また、上記のごとき種々の植物遺体は土壤に供給されるから、これを効率的に分解することができれば、極めて有利な土壤改良手段となり得る。

植物遺体の多くはリグニン及び繊維素を含有しているから、植物遺体の効率的な分解のためには、リグニン及び繊維素を効率的に可溶化・分解する手段が必要である。しかしながら、従来、微生物や酵素を使った分解剤でリグニンの可溶化、又は繊維素を迅速に分解させることは非常困難とされ、又ケラチン、コラーゲン等の硬タンパク質も酵素作用が受け難い。従って、微生物を使った天然の難分解性有機資材の効果的な可溶化、分解の実用化は今だになされていない。

従って本発明は、従来困難とされていたリグニンを可溶化し、繊維素を旺盛に発酵する新規な菌株、及びこれらの能力を高めた培養混合物、さらにこれらを用いた難分解性物質の分解方法、その応用としての土壤改良法、有機肥料の製造方法、屎尿の脱臭分解方法を提供する。

発明の開示

従って本発明は、リグニン可溶化能を有し、生育適温が65～72℃で、40～80℃の温度範囲で生育し、繊維素を旺盛に発酵する好熱性繊維素分解菌クロストリジウム・サーモセルムSK522(*Clostridium thermocellum* biovar. SK522、微工研条寄第3459号)又はこれと同等の性質を有する株を提供する。

本発明はさらに、絶対好気性、生育適温が72～76℃で、40～82℃の温度範囲で通常濃度の培地に生育し、作用適温75～85℃、作用水素イオン濃度pH = 4.0～11.3の高温性広域作用水素イオン濃度活性

のタンパク質分解酵素とカロチノイド系黄色色素を産生するサーマス・アクアティクスSK542(*Thermus aquaticus* biovar SK542、微工研条寄第3382号)又はこれと同等の性質を有する株を提供する。

本発明はさらに、前記2種類の菌株を混合培養することにより得られる混合培養物を提供する。

本発明はさらに、前記の混合培養物を、リグニンを含有する有機資材に作用させることを特徴とするリグニンの可溶化方法を提供する。

本発明はさらに、前記混合培養物と賦型剤とを含んで成る有機資材分解剤を提供する。

本発明はさらに、前記混合培養物、又は前記有機資材分解剤を土壤に施用することを特徴とする土壤改良方法を提供する。

本発明はさらに、前記混合培養物、又は前記有機資材分解剤を、リグニン及び/又は繊維素を含有する有機資材に作用させることを特徴とする有機肥料の製造方法を提供する。

本発明はさらに、前記混合培養物、又は前記有機資材分解剤を屎尿に作用させることを特徴とする屎尿の脱臭分解方法を提供する。

具体的な説明

まず、本願発明の微生物について説明する。

本発明で使用する微生物は、新菌のSK522菌株及びSK542菌株並びにこれらの同等の性質を有する菌株である。新両菌株の諸性質は下記の通りである。

尚、以下記載の菌学的性質の試験及び分類同定はすべてバージェーズ マニュアル オブ デタミネイティブ バクテリオロジー 第7版(1957)、第8版(1974)及びバージェーズ マニュアル オブ システマテック バクテリオロジー 第1巻(1984)、第2巻

(1986) (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th. Ed. (1957), 8th. Ed. (1974). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 (1984), Vol.2 (1986).) の記載に基づいて行った。

〔 I 〕 SK522菌株

(Clostridium thermocellum biovar SK522、微工研条寄第 3459号、FERM BP-3459)

菌学的性質

随伴菌なしで、単独では生育ができない。しかし、随伴菌は、容易に単離純粋培養されるので、単離した随伴菌を基礎とし、これと共生培養しながら、その諸性質を試験した結果である。

形 態

直桿状、わずかに湾曲するものもある。単独、ときどき2連。
0.3~0.5 × 2.2~4.0 μ。培養が古くなると糸状に伸延し、長連鎖状、長さ 5.7~12.8 μ。周毛、室温懸滴標本では運動性がみられない。末端に楕円、または円形の胞子を形成して細胞を膨張し棍棒状。

グラム陰性。

培養的性質

(1) 平板培養

肉汁寒天、その他一般の常用培地による平板培養には生育しない。しかし、ビルジョンら (Viljoen et al.) の提示する培地テトラール (Tetrault) 円形ろ紙寒天平板培養に随伴菌と黄色斑点状のコロニーを形成するが、本菌単独では作り得ない。

(2) 斜面培養、穿刺培養

シュワイツァー (Schweizer) の試薬処理ろ紙添加ビルジョンら (Viljoen et al.) 培地寒天斜面培養、及び同穿刺培養ともに生育

- | | |
|-------------------------------|---------|
| (4) デンプン加水分解テスト | : 僅かに陽性 |
| (5) ヘミセルロース、キシラン、ペクチンの加水分解テスト | : 陰性 |
| (6) インベルターゼ、マルターゼ | : 陽性 |
| (7) 脂肪分解力テスト | : 陰性 |
| (8) 酸化反応 | |
| ハイドロキノロン反応 | : 陽性 |
| チロシン反応 | : 陰性 |
| (9) 還元作用 | : 陽性 |

2. 生産物試験

(1) 繊維素発酵

発酵率78~91%、繊維素を旺盛に発酵してエタノール、メタノール、アセトアルデヒド、酢酸、乳酸、ギ酸、ラク酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、グルコン酸、グルコース、セロビオース、セロオリゴ糖類、セロデキストリン、多量の炭酸ガス、水素、及び硫化水素等を生成する。

(2) その他の糖、及びアルコールより生酸

グルコース、ショ糖、マルトース、セロビオースより生酸。

(3) ガス発生試験

繊維素より猛烈にガス発生するが、グルコース、ショ糖、マルトース、セロビオースよりガス発生は認められない。

(4) ペプトン水試験

- | | |
|-------|-----------|
| アンモニア | : 僅かに反応あり |
| インドール | : 陽性 |
| スカトール | : 陽性 |
| 硫化水素 | : 陽性 |

(5) 色素生産

通常、カロチノイド黄色色素生産

3. 生育条件

(1) 生育温度

至適温度は65~72℃、温度範囲は40~80℃、40℃以下では生育しない。

(2) 水素イオン濃度

至適水素イオン濃度pH = 6.7~8.0、その範囲は5.6~9.6。

(3) 窒素源

ペプトンが最も優れ、尿素、尿酸、アスパラギン、グルタミン酸ナトリウム等も良好である。アンモニウム塩も良好な無機窒素源となる。

(4) 炭素源

繊維素以外の炭化水素で継代培養を続けると、その生育と発酵力を失う。

(5) 酸素との関係

Eh = 200~-250mV と推定され、嫌気性菌である。

(6) 微量栄養素の要求

ビオチン、ピリドキサミン、ビタミンB₁₂、p-アミノ安息香酸等の微量栄養素を要求する。

4. DNAのG+Cの含有量

G+Cのmol% = 38~40 (T_m) と推定される。

分類学上の位置

生育至適温度65~72℃、温度範囲40~80℃という高温に於いて、旺盛に繊維素を発酵する本SK522菌株に類似するものとして、次のような好熱性繊維素分解菌が上げられる。

クロストリジウム・サーモセルム (Clostridium thermocellum

Viljoen, Fred and Peterson, 1926. : Jour.Agr.Sci.(London), 16, 7(1926).)

クロストリジウム・ディゾルベンス(*C. dissolvens* Bergey et al. 1925、別名 *Bacillus cellulose dessorvens* Khouvine, 1923.: Ann.Inst.Past. 37, 711(1923); Bergey's Manual, 2nd. Ed.(1925) p.344.)

クロストリジウム・セルラシウム(*C. thermocellulaseum* Enebo, 1951. : Bergey's Manual, 7th. Ed.(1957) p.689.)

バチルス・サーモセルロリテックス(*Bacillus thermocellulolyticus* Coolhaas, 1928. : Cent Bakt.I I, 75, 101(1928), 76, 38(1929).)

バチルス・サーモフィブリンコルス(*B.thermofibrincolus* Itano and Arakawa, 1929 : 農化、5, 816, 921(1929); 6, 248, 257 (1930).)

これらの中で、特に次の4つの相違点を除けば形態学的、培養的、生理生化学的試験において本菌株とよく類似する細菌はクロストリジウム・ディゾルベンスである。

(1) 弱又は微弱ではあるが、リグニン可溶化能を有する。

(2) 生育適温65~72℃、生育温度範囲40~80℃、40℃以下では生育しない。

(3) 繊維素を旺盛に発酵するが、ヘミセルロース、キシラン、ペクチン等は発酵しない。

(4) リグニン可溶化能はサーマス属(genus *Thermus*)のある種の細菌によって共生的に顕著に強調され、同時に本菌の繊維素分解力、その他作用機能に対して好影響が与えられる。

しかし現在、バージェーズマニアル(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2(1986) p.1104, p.1141.)において、好熱性分解菌として記載されているものはクロストリジウム・サーモセル

ムのみである。クロストリジウム・ディゾルベンス以下全部当該菌の亜種か変種として取り扱われ、又は研究不完全なものとしてされている。

そこで、本菌株の分類同定は、クロストリジウム・サーモセルムとその菌学的諸性質を比較検討することとし、同時に他の好熱性繊維素分解菌についても対比し、参考とした。

以上のようにして、菌学的諸性質を比較検討した結果を総括すれば、本菌株と公知のクロストリジウム・サーモセルムをはじめ列挙した好熱性繊維素分解菌との特徴的な性状の相違点として、前記の4項目があげられるが、その他各種炭水化物に対する作用、微量栄養素の要求等、色々と数え上げることができるが、特に強調したいことはリグニンに対する問題である。

本菌株がリグニン可溶化能をもち、その可溶化能がサーマス・アクアティックス SK542 (*Thermus aquaticus* biovar SK542) との共生的混合培養によって顕著に増強されることである。これに対して、クロストリジウム・サーモセルムをはじめその他の好熱性繊維素分解菌のリグニンに関する記載 (description) は全く見られない。あったとしても、それは繊維素の分解に対する阻害作用についてである。

斯る理由によって、本菌株のリグニン可溶化能の生理生化学的性質をひとつの根拠として新菌株 (Strain) とし、クロストリジウム・サーモセルム SK522 (*Clostridium thermocellum* biovar SK522) と名称した。

微生物受託番号

本菌株の微生物受託番号は、微工研条寄第3459号 (FERMBP-3459) である。本発明の菌株は、寄託した新菌株を標準的菌株とし、クロストリジウム・サーモセルム (*Clostridium thermocellum* Viljoen,

Fred and Peterson, 1926.) に属する菌種中、リグニン可溶化能を有し、サーマス属 (genus *Thermus* Brock and Freeze 1969) に属するある種の細菌との共生的混合培養によって顕著にリグニン可溶化能を増強することを特徴し、かつ SK522 菌株及び自然並びに人工的変異株を包括する生理生化学的性状による新菌株である。

SK522 菌株のスクリーニング

土壌、海浜汚泥、堆・厩肥、人・家畜糞便を分離源として 55～65℃ で数回濃縮培養を繰り返した後、ビルジョンら (Viljoen et al.) の提示する培地テトラール (Tetrault) 円形ろ紙寒天平板培養等によって定法通り分離する。

培地としてビルジョンら (Viljoen et al.) の提示する塩類組成が適当であるが、必要に応じて微量の無機金属塩類、ビタミン類、生長促進因子、例えば酵母エキス等を添加するとよい。

ビルジョンらの培地

(Viljoen, Fred and Peterson 1926)

ペプトン	5.0 g
炭酸カルシウム	過剰
リン酸アンモニウムナトリウム	2.0 g
酸性リン酸カリウム	1.0 g
硫酸マグネシウム	0.3 g
塩化カルシウム	0.1 g
塩化第二鉄	痕跡
繊維素 (ろ紙)	15.0 g
井水	1000ml

SK522 菌株の有用性

本 SK522 菌株は、もともと旺盛なる繊維素分解菌である。この菌株が弱又は微弱ではあるが、リグニン可溶化能を有することを本発

明者たちが見出し、更にその可溶化能が本菌株とサーマス属(genus *Thermus*)のある種の細菌との共生的混合培養によって顕著に増強されると共に、本菌株の繊維素分解力、その他作用機能にも好影響を与えた。

又、この混合培養の成功は、多種類の難分解性有機資材の分解利用を可能にして、その生産性を向上させ、野積堆肥化法を確実なものにし、好熱性高速分解方式による堆肥の製造法を確立した。

そして、SK522菌株とSK542菌株を主要菌とする健全活性ある土壌微生物フローラの形成は、環境要因の変化に対して有効菌の生育と作用機能を安定させて、土壌病害や連作障害の消滅、克服した。又、土壌や植物の葉面に直接撒布する新技術や尿尿の脱臭分解、硬タンパク質の分解等、新しい次元の微生物利用法の展開が期待される。

(II) SK542菌株

(*Thermus aquaticus* biovar SK542、微工研条寄第3382号、FERM BP-3382)

菌学的性質

形 態

長桿状、 $0.4\sim 0.6 \times 3.0\sim 5.0 \mu$ 。ある条件下、例えば培養が古くなると糸状、長さ $20\sim 130 \mu$ 。

鞭毛なし、室温懸滴標本では運動性がみられない。

内生孢子なし。

グラム陰性。

培養的性質

増殖が活発。ゼネレーションタイムは $20\sim 50$ 分。

(1) 平板培養

3%寒天、 60°C 培養：黄色、比較的緻密、小円形コロニー。

(2) 寒天穿刺培養

表面発育だけ、黄色わずかに拡張。

(3) 液体培養

表面に被膜状に生育（静置培養）。

生理生化学的性質

1. 酵素作用等

(1) タンパク質分解

プロテオリティック酵素 (proteolytic enzymes) : 陽性 (強力)

ゼラチン加水分解 : 陽性

ペプチダーゼ (peptidase) : 陽性

(2) デンプン加水分解 : 僅かに陽性

(3) ペクチン分解 : 陽性 (弱い)

(4) 繊維素分解 : 陰性

(5) リグニン分解 : 陰性

繊維素及びリグニンの分解は共に陰性ではあるが、好熱性繊維素分解菌 SK522菌株との共生的混合培養によって、SK522菌株のリグニン可溶化能を顕著に増強し、同時に繊維素分解力、その他の作用機能にも好影響を与える。

(6) 脂肪分解 : 陰性

(7) インベルターゼ、マルターゼ : 陽性

(8) カタラーゼ、オキシダーゼ反応 : 陽性

(9) 硫化水素生成 : 陽性 (弱い)

(10) 硫酸還元反応 : 陰性

2. 生産物試験

(1) 糖、アルコールより生酸及びガス発生

ガス発生せず。

グルコース、ガラクトース、マルトース、ラクトース、グリセロールより生酸。

(2) インドール、スカトールの生成 : 陰性

(3) 色素生産

黄色色素(カロチノイド系色素、吸光度最大値 450nm、その他 430, 435, 470nmに小さなピークがある)を産生する。しかし、グルコース、その他の糖類を炭素源とする合成培地ではほとんど産生されない。

3. 生育条件

(1) 培地濃度

サーマス属(genus *Thermus*)の細菌は一般に有機物濃度に感受性がある。栄養物は少なく、濃度が低い方がよいといわれている。しかし、本菌株はこれらと趣を異にし、通常の濃度においてもよく生育する。

食塩NaCl 5%以上でも生育する。至適濃度 2.0~3.0%。一般にサーマス属(genus *Thermus*)の細菌は2%以上のNaCl存在下では生育しない。

グルタミン酸ナトリウム3%以上でも生育する。

ショ糖、又はマルトース5%以上でも生育する。

2%ペプトン+1%酵母エキスの存在下でも、その生育が阻害されない。一般にサーマス属(genus *Thermus*)の細菌はトリプトン、酵母エキス濃度、それぞれ0.1%前後が適当で、各々1%以上になると生育しない。

(2) 生育温度

最適温度は72~76℃、生育温度範囲40~82℃、40℃以下では発育できない。

(3) 水素イオン濃度

最適水素イオン濃度 pH = 6.0~10.0。生育水素イオン濃度範囲 pH = 4.0~11.0。

(4) 窒素源

ゼラチン等のタンパク質、グルタミン酸塩、尿素、それに無機窒素源としてアンモニウム塩がよく利用される。

(5) 炭素源

グルコース、ショ糖、マルトース、ガラクトース、セロビオース、ラフィノース、スタキオース、デンプン、グリセロール、酢酸、ラク酸、リンゴ酸、グルタミン酸塩を利用する。

(6) 酸素との関係

絶対好気性。

(7) 微量栄養素の要求

本菌株は微量栄養素の要求が高い。ビオチン、ニコチン酸アミド、チアミン等のビタミン類が要求されるほかに、本菌株の良好な発育には鉄、マンガン、カルシウム等の金属イオンを比較的高濃度に要求する。そして、これらのミネラル量にも敏感である。

(8) 抗生物質に対する感受性

一般のサーマス属 (genus *Thermus*) の細菌と同様に、ペニシリン G、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、その他抗生物質に高い感受性を示す。

4. DNAのG+Cの含有量

G+Cの mol% = 68 (T_m) と推定される。

分類学上の位置

本菌が絶対好気性、生育最適温度72~76%、生育温度範囲40~82℃、40℃以下では生育しない。無孢子、グラム陰性の長桿菌であること等から、その他菌学的諸性質を勘案して、サーマス属 (genus

Thermus Brock and Freege 1967) と同定される。そして、類似するサーマス属(genus *Thermus*) の細菌として、

サーマス・アクアティックス (*Thermus aquaticus* Brock and Freege 1969. : Bergey's Manual(1984) Vol.1, P.337.)

サーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus* Oshima and Imahori 1974. : Int.J.Bacteriol., 24, 102(1974))

サーマス・フラブス (*Thermus Flavus* Saiki, Kimura and Arima 1972. : Agr.Biol.Chem., 36, 2357(1972))

等が上げられるが、現在バーゼーズマニュアル (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1(1984) P.333) のサーマス属(genus *Thermus* Brock and Freeg 1967) に属する細菌種はサーマス・アクアティックス(*Thermus aquaticus* Brock and Freege 1969) だけであり、しかも下記のような既知の菌種中に見出し得ない特徴的な性状を有するので、本菌株をサーマス・アクアティックスの新菌株 (strain) として、サーマス・アクアティックスSK542 (*Thermus aquaticus* biovar SK542) と名称するのが妥当であると結論する。

(1) 好熱性繊維素分解菌 SK522菌株との共生的混合培養によって、そのリグニン可溶化能を顕著に増強する。と同時に繊維素分解力、その他の作用機能にも好影響を与える。

(2) 広域の作用水素イオン濃度と作用温度を有する強いタンパク質分解力を持つ。

(3) 有機物濃度の感受性が、既知のサーマス属(genus *Thermus*) の細菌と異なり、非常に弱く、通常濃度の培地においてもよく生育する。

(4) 微量栄養素の要求が強く、各種ビタミン類及び金属イオンを要求し、それらのミネラル量にも敏感である。

(5) 黄色色素 (カロチノイド系色素、吸光度最大値 450nm、その

他 430, 435, 470nmに小さなピークがある) を産生する。

微生物受託番号

本菌株の微生物受託番号は、微工研条寄第3382号(FERMBP-3382)である。本発明の菌株は、寄託した菌株を標準的菌株とし、サーマス・アクアティックス(*Thermus aquaticus* Brock and Freege 1969)に属する細菌種中、好熱性繊維素分解菌(SK522菌株)との共生的混合培養によって、そのリグニン可溶化能を顕著に増強し、同時に繊維素分解力にも好影響を与えることを特徴とし、かつ SK542菌株及び自然並びに人工的変異株を抱括する生理生化学的性状による新菌株 (strain) である。

SK542菌株のスクリーニング

分離源は九州各地の温泉源及び温泉源付近の土壌、腐植等である。分離試料を55～60℃で前培養した後、定法に従って3%寒天平板培養によって単離する。

分離用培地組成

(カステンホルツの培地 : Castenholz, R.W. ; Bacteriol.Rev.,
33, 467(1969))

ニトリロ三酢酸	100mg
CaSO ₄ · 2H ₂ O	60mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100mg
NaCl	8mg
KNO ₃	103mg
NaNO ₃	689mg
Na ₂ HPO ₄	111mg
FeCl ₃	0.28mg
MnSO ₄ · H ₂ O	2.2mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.5mg
H ₃ BO ₃	0.5mg
CuSO ₄	0.016mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025mg
(イーストエキス	5000mg)
(トリプトン	5000mg)
(シヨ糖	10000mg)
全量 (純水で、pH = ~ 8)	1000ml

注 : () 内の組成は発明者らが改変。

SK542菌株の有用性

本新菌株の有用性は、次の三つの作用機能によって特徴づけられる。

(1) 好熱性繊維素分解菌(SK522菌株)との共生的混合培養によって、該菌のもつリグニン分解能を顕著に増強する。と同時に、その繊維素分解力、その他の作用機能にも好影響を与える。

(2) 広域の作用水素イオン濃度と作用温度を有する強いタンパク質分解力をもつ。

(3) 不溶性、カロチノイド系の黄色色素を産生する。菌体中のこの黄色色素が他の微生物等による分解を受け水溶性の低分子量体のものとなり、植物体に吸収されて、果実の味、色沢、貯蔵性等の果実の品質の向上に役立つ。又、本 SK542菌株菌体を施用すると、これを基質として繁殖する一般の従属栄養微生物や土壌有効菌の増殖を促す。

以上のようなことが、既知のサーマス属(genus *Thermus*)の細菌と異なり有機物濃度の感受性の非常に弱いことと相俟って、自然生態や農耕生態系において、多種類の難分解性繊維物質、硬タンパク質や余剰汚泥、その他広く各種の有機資材を利用できるようになった。

更にこのことが、生産性向上、土壌病害や連作障害の克服、そして、尿尿の脱臭・分解、土壌又は植物葉面に直接撒布する新技術の開発等、新次元の微生物利用法の発展へと繋がる。

(Ⅲ) SK522菌株と SK542菌株の混合培養物

1. SK522菌株の多量培養物

前記ビルジョンら(Viljoen et al., 1926)の培地を用い嫌気または半嫌气的条件下で、65~70℃、48~60時間培養し、その培養液をもって菌体含有の培養物とする。

2. SK542菌株の多量培養物

前記カステンホルツ(Castenholz, 1969)の培地を用い、通気または振盪等の好气的条件下で、70~75℃、24時間培養し、その培養液をもって培養物とする。

3. SK522菌株と SK542菌株の混合培養物

下記の培地を用い、SK522菌株及びSK542菌株の多量培養物の適

量をそれぞれ接種して、65～70℃、24～36時間培養して、両菌株の混合培養物とする。そして、これを本発明の提示する賦型剤を用いて粉粒体となし、水分を5～7%以下の製品にすると2ヶ年以上の保存に耐える。又、施用直前に両菌株の多量培養物を等量にとってよく混和して、すぐに施用するか、或いは賦型剤を用いて粉粒体に製造しても、その最終製品の品質性能は全くかわらない。

又、下記の共生混合培養用E-培地を以下単にE-培地と称する。

共生混合培養用 E-培地

K_2HPO_4	5kg
$(NH_4)_2SO_4$	2kg
尿素	2kg
ペプトン	5kg
酵母エキス	5kg
ろ紙(繊維素)	15kg
$CaCO_3$	過剰
水(～pH 7.0)	1000 l

4. 両菌株の共生的混合培養のもたらす有用性

共に高温環境という条件下で、絶対好気性のサーマス属(genus *Thermus*)のSK542菌株との共生的混合培養は、嫌気性の好熱性繊維素分解菌SK522菌株単独ではほとんど不可能な天然の難分解性有機資材の分解発酵を顕著に高揚する。

まず、SK542菌株の増殖はSK522菌株の欠除するタンパク分解活性を充補する。しかも、堆・厩肥をはじめ廃木材、都市下水汚泥等の難分解性有機資材の分解発酵は、すべて固体発酵の状態で、かなり通気の良い環境下におかれている。そして、初期の段階におけるSK542菌株の増殖は高温嫌気的環境へと変移せしめ、これによってSK522菌株の自然界での生育が可能となる。

(1) リグニンの可溶化

ここで、特に注目されることは、SK542菌株によってSK522菌株のリグニン可溶化能が顕著に発揮されることです。

難分解性有機資材は、実際には繊維素がリグニン、その他の有機成分と強く結合した状態で存在する。こうした天然のリグノセルロースは繊維素分解力の旺盛なSK522菌株の単独施用ではほとんど分解が不可能である。

リグニンの化学構造は、未だ完全に明らかにされていないが、ベンゼン環に炭素数3つの側鎖を持つフェニルプロパンが基本単位になって、この単位体がパーオキシダーゼによって触媒されるラジカル反応によりランダムに三次元的に重合した高分子化合物である。微生物の分解に対する抵抗がきわめて強く、きわめて分解困難であることは多くの研究者・技術者の認める一致した見解である。

ところが、本願発明で使用するSK522菌株は弱又は微弱ではあるが、リグニンを可溶化する。そして、このリグニン可溶化能が、

SK542菌株と共生的混合培養することによって、たとえば、イナワラリグニンの50%以上が10日前後の短日時において可溶化されるということが、今回、本願発明において、はじめて明らかにされた。

その実際的な施用が本願発明の重要な特徴的態様で、その作用効果は50~80℃以上という高温期段階で発揮され、分解発酵へその腐植化が急速に進行する。

(2) 黄色色素の産生

SK542菌株をはじめ、サーマス属(genus *Thermus*)の産生する黄色色素はカロチノイド系不溶性色素である。菌体中のこの黄色色素が他の微生物等による分解を受け水溶性の低分子量体のものとなり、植物体に吸収され、必要部位に移行し、丁度都合の良い前駆物質となる。すなわち、このような黄色色素が、ほかの溶菌した細胞内容

物や分泌物、それに発酵生産物等とともに根茎葉部位の増大繁茂を促すだけでなく、花芽の形成、着果、果実の肥大等の生殖生長の代謝系に深く関与していることが分子生物学的レベルで行なわれた研究によっても明らかにされ、その応用利用へと発展し、すでに果実の味、色沢、貯蔵性等品質向上に役立っている。

(3) 微生物生態系の混合複合化

また、この黄色色素を含む SK542 菌株の菌体を施用すると、それを基質として繁殖する一般の従属栄養微生物、土壌有効菌等の増殖を促す。さらに重要なことは、自然界の堆肥製造のような現場では、SK522 菌株のような好熱性微生物が、すぐに増殖活性化するわけではない。当初は、一般の常温性従属栄養微生物が増殖し、これらの作用による発酵熱が蓄積されて品温の上昇に役立つものであり、単一菌株の好熱性繊維素分解菌や少数の微生物のみが、天然の難分解性有機資材の腐植化に関与するわけではない。微生物フローラの混合複合化多様化が求められる。さまざまなタイプの有効菌が多く、さらに「エサ（基質）」も適度にあるという複合的内容が望ましい。

こうして、難分解性有機物の高温分解は、SK522 菌株を中心とする細菌フローラがまず形成され、その腐植化過程が単純な構成成分の変化だけでなく、きわめて複雑な微生物フローラの相互作用やその変遷等が、深い関わりをもって最も効率よく進行するのである。

SK522 菌株と SK542 菌株に混合する他の有効菌としては下記のものがある。

(1) ヘミセルロースの分解菌の培養物

ヘミセルロースは繊維素とともに植物体（細胞壁）を形成し、これを構成する糖類によって、キシラン、アラバン、デキストラン、マンナン、ガラクトン等と称せられる。

ヘミセルロース分解菌の培養物は、イナワラキシラン約 1% の濃

度に加えた岩田の培地（1936）を使用し、30～38℃、通性嫌氣的に集殖する。通常、バクテリウム・ブルガトゥス (*Bacterium vulgatus*)、バクテリウム・プロティギオサム (*Bac. prodigiosum*)、バクテリウム・メセンテリクスルバー (*Bac. mesentericus ruber*)、ミクロスピラ・アガーリクェフィセンス (*Microspira agerliquefaciens*) 等の1株又は2株以上の混合培養物が獲得される。

(2) ペクチン物質分解菌の培養物

ペクチン物質を強力に分解する細菌は、好気性のものでは枯草菌群細菌及びエタノール・アセトン菌に、又嫌気性ではラク酸菌に属するものが多い。

本発明では、モリシュの培地 (Molisch 1939) を用い、土壌、堆肥、馬糞、バガスやチョ麻等の腐敗物を分離源として、27～35℃、培養日数3～5日、厚層及び薄層で数回の集殖培養で種菌を獲得する。本発明では、その1株以上の数株の培養物を用いる。

(3) 土壌放線菌の培養物

放線菌 (*Actinomycetales* Buchanan, 1917) の土壌中の働きについて一般的に言うことが難しい。しかし、各種の有機性物質、特に難分解性の繊維素、リグニン等を他の微生物とともに分解し、土壌肥沃のもとになる腐植の生成に重要な働きをしており、又抗生物質の産生を通してのマイクロフローラ・コントロール面で重要な意義をもつことは確かである。

放線菌の培養は、ワックスマンの培地 (Waksman 1919)、分離源に肥沃な土壌、又堆・厩肥を用い強力菌を集殖する。

(4) 土壌糸状菌及び酵母の培養物

土壌糸状菌の最も多く存在する場所は、細菌、放線菌と同様土壌で、土壌中の糸状菌は当然植物根のある耕作土に多く、特に根圏ではその働きも活発である。植物遺体等の有機性物質の分解にあずか

り、土壌の肥沃度に関係する。糸状菌は主として分解の初期段階で活躍していると考えられる。

次に土壌酵母の働きについては不明の点が多い。しかし、土壌中には相当数の酵母菌が存在し、かつその含有する豊富なビタミン類や生育因子をめぐって他微生物との共存共棲や土壌活性等に影響のあることは確かである。

土壌糸状菌や酵母の培養物は、ツアベック・ドックスの培地 (Czapek & Dox, 1910) を用い、土壌或いは堆・厩肥より分離、培養する。

(5) 好熱性バチルス属の培養物

一般に好気性、運動性、内生孢子を有する桿菌で、土壌、葉面、枯草等自然界に広く分布する一群の細菌で、ほとんどの菌株が強い熱抵抗性をもち、55℃以上でも生育できるものが多いことから堆肥製造中の主要な微生物であるという報告もある。又、バシトラシンやバシリシン等の抗菌物質を分泌することが、近年土壌植物病理学の分野で注目されている。このようなことから、本菌群が作物生産に利用しようとする試みが可能で、肥沃な土壌や堆・厩肥等の懸濁液を80℃、10分間、加熱処理して分離源とする。ワックスマンの培地 (Waksman, 1922) を用い、50～60℃、好氣的に本菌群を集殖する。本発明では、これらの菌の単独又は混合培養を用いる。

(6) 黄色色素産生菌の培養物

細菌の産生する黄色色素はカロチノイド系の色素である。特に完熟堆肥中に数多く存在し、種類も多い。また植物葉面にもよく存在する。これらを分離源とし、通常的肉エキス培地又はペプトン・酵母エキス培地を用い、25～35℃、好氣的条件下で培養、分離する。黄緑色、黄色、黄褐色、紅色等の呈色によって容易に識別され、一般にフラボバクテリウム (Flavobacterium)、クロモバクテリウム

(Chromobacterium)、シュドモナス(Pseudomonas)、セラテラ(Serratia)、光合成細菌(Phototrophic bacteria)等に属する1株又は2株以上の培養物が獲得される。

本発明の有機資材分解剤の賦型剤としては、石灰岩岩粉、ドロマイト岩粉、貝化石粉末、カニシャコ、貝殻等の甲殻・貝殻粉末、炭酸カルシウム、消石灰、パーライト、パーミキュライト、ゼオライト、けいそう土、塩基性岩岩粉、粉碎ピートモス、木炭・くん炭末等の粉粒体があり、これらの一種又は複数種の混合物である。

本発明有機資材分解剤に添加してもよい微量栄養素及び微量ミネラルとしては、ビオチン、ニコチン酸アミド、チアミン、ピリドキサミン、ビタミンB₁₂、バラアミノ安息香酸等のビタミン類、アルギニン、シスチン、グルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン等のアミノ酸類、又、鉄、マンガン、コバルト、カルシウム等の微量ミネラル等がある。以上、これらの賦型剤・微量栄養素及び微量ミネラルは、有効菌・使用目的・土壌環境・風土・気候に応じて適宜選択される。

本発明における有機資材の処理は、前記の種々の有機資材に前記の混合培養物又は前記の有機資材分解剤を添加し、50℃～75℃、好ましくは60℃～65℃の温度で5日～12日、好ましくは7日～14日処理することにより行うことができる。この処理は好氣的又は嫌氣的条件下で、好ましくは好氣的条件下で行う。混合培養物の添加量は処理の目的、処理される有機資材の種類等により異なるが、およそ2～5重量%である。

本発明の土壌改良法は、前記の混合培養物又は前記の有機資材分解剤を土壌に直接施用することにより行うことができる。土壌への添加量は、土壌の種類、有機物の含量等により異なるが、およそ混合

培養物の例えば1000倍希釈したものを 200 L ~ 1000 L / ha、例えば 500 L / haである。

本発明は、有用な新菌 SK522菌株を提供する。又同 SK522菌株と SK542菌株の混合培養物の提供とその有用な利用にある。SK522菌株と SK542菌株の共生的混合培養の相乗的効果は、リグニンの顕著なる可溶化の増強と共に繊維素分解力その他の機能も高揚する。

SK522菌株は旺盛なる繊維素分解力と弱又は微弱なるリグニン可溶化能を有する。

又、SK542菌株は絶対好気性中等度好熱性細菌で、高温性広域作用水素イオン濃度活性の強力なタンパク質分解酵素とカロチノイド系黄色色素を産生する。

なお SK542菌株の産生するタンパク質分解酵素の理化学的性質は次の通りである。

表 1

SK542菌株の産生するタンパク質分解酵素の理化学的性質

性 質 \ 酵 素	プロテアーゼ A	プロテアーゼ B
分子量	39,000~32,000	28,000~23,000
至適pH	9.5~10.0	7.0~7.5
pH作用範囲	8.0~12.0	4.0~9.5
至適温度	75℃	80℃
耐熱性 (20分-50%残存活性)	82℃	87℃
基質特異性	ヘモグロビン、 インシュリン、 カゼイン、 アルブミン	前記の他にケラ チン、 コラーゲン エラスチン
阻害剤	DFP, EDTA	DFP, EDTA
活性化剤	—	—

ゲルろ過、セファディクスG-75による分離。

以上のような理化学的性質をもつ新規酵素と思われるプロテアーゼAとプロテアーゼBの他に、不安定な数種の酵素の複合体である。

また、SK542菌株の産生する色素の理化学的性質は次の通りである。

本菌の産生する黄色色素は、カロチノイド系黄色色素で、水には不溶、次のような溶剤に可溶である。メタノール、エタノール、石油エーテル、ベンジン、アセトン、クロロホルム、アセン+メタノール(7:3)及びアセトン+エタノール(1:1)混液。

また、赤外線吸光度最大値 450nm。その他 430, 435, 470nmに小さなピークがある。

そして、この二つの新菌株の好熱的な共生的混合培養は、各菌株の機能の相加的作用ではなく、相互作用によって生ずる相乗的效果

によるものであり、互いにその機能を高め、強力かつ安定してリグニン、繊維素、タンパク質等の有機成分を迅速かつ強力に分解する。

本発明の混合培養物を有効主成分とすることで有機資材の発酵分解剤を得ることができる。この有機資材の発酵分解剤は、その用途・目的・気候・風土・土壌に応じて SK522 菌株、SK542 菌株の他に有用な微生物を混入すると更にその効果を高め、新しい有用な効果を得ることができる。

本発明の混合培養物は、選択された必須の二種の細菌、好熱性繊維素分解菌 (SK522 菌株) とサーマス属の細菌 (SK542 菌株) の他に、必要に応じて他の微生物を含むことができる。気候・風土・土壌環境条件・栽培植物等に応じて適宜取捨選択し、微生物培養物として加える。

実施例

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲がこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例 1. リグニン可溶化法

1. 種菌： SK522 菌株と SK542 菌株共生的多量混合培養物

SK522 菌株の多量培養物

SK542 菌株の多量培養物

各培養物いずれも本明細書記載通りである。

2. 試料：試験に使用した原材料はイナワラ（梗）で、その分析値は表 2 の通りである。

表 2

イナワラ（粳）の成分組成

脂質	糖類	ヘミセル ロース	繊維素	リグニン	粗タン パク質	C/N
1.3	2.2	15.8	42.7	17.4	3.3	64.1

分析は九大法による。粗タンパク質 = 全N × 6.25

3. 試験方法

1000ml三角フラスコに風乾試料10.0g、E-培地 700ml（ろ紙を除いたもの）注加、常法通り加圧殺菌後、適量の種菌を接種、65℃、20日間培養。蒸発欠減を補い、分析に供する。

4. 結果の表示

$$\text{リグニン可溶化率 (\%)} = \frac{\text{溶解したリグニン重量 (= 供試リグニン重量 - 残存リグニン重量)}}{\text{供試リグニン重量}} \times 100$$

$$\text{繊維素発酵率 (\%)} = \frac{\text{発酵リグニン重量 (= 供試繊維素重量 - 残存繊維素重量)}}{\text{供試繊維素重量}} \times 100$$

5. 試験結果

表 3
試 験 結 果

項 目 \ 経 過	2 日	5 日	10日	12日	15日	20日
リグニン可溶化率(%)						
522菌株 + 542菌株	25.1	37.3	54.7	56.1	60.6	63.7
522菌株	3.4	6.3	7.1	7.0	8.3	8.7
542菌株	—	—	—	—	—	—
繊維素発酵率(%)						
522菌株 + 542菌株	88.2	92.7	91.6	92.5	91.3	92.4
522菌株	10.6	17.6	20.7	22.3	21.8	22.0
542菌株	—	—	—	—	—	—
タンパク質分解率(%)						
522菌株 + 542菌株	48.1	69.0	74.2	72.9	73.6	75.4
522菌株	13.2	17.4	19.5	24.7	25.4	26.3
542菌株	42.3	44.6	46.0	46.3	47.4	47.5

各測定値は3～5実験の平均である。

表3を見ても明らかなように、この522菌株と542菌株の二つの新株の好熱的な共生的混合培養は、それぞれの機能の相加的作用だけでなく、相互作用による相乗的効果によって互いにその機能を高め、イナワラのような天然の難分解性繊維物質を10～12日という短日時で、リグニンの50%以上を可溶化し、繊維素は90%以上、タンパク質は70%以上を強力かつ安定して発酵分解している。522菌株、542菌株それぞれ単独培養とは、顕著な差異がある。

実施例 2. 有機資材の発酵分解剤によるノコクズの発酵

1. 発酵分解剤：SK522菌株とSK542菌株との共生的混合培養物に酵母エキス10% (wt/vol)、ペプトン10% (wt/vol)を添加して発酵分解剤とする。
2. 試料：ノコクズ。樹種杉、樹齢17~20年、木質部を縦引にし、粒子の大きさ 3.0~1.0mm。

表 4

ノコクズの成分組成 (乾物当り%)

脂質	糖類	ヘミセル ロース	繊維素	リグニン	粗タン パク質	C/N
2.3	3.3	5.2	58.6	23.6	0.58	559.4

分析は九大法による。粗タンパク質 = 全N × 6.25

3. 試験方法及び結果の表示

1000ml三角フラスコに風乾試料10g、E-培地 700ml (除ろ紙、本明細書第19頁参照) 注加、常法通り加圧殺菌後、適量の発酵分解剤を接種、65℃、20日間培養。蒸発欠減を補い、分析に供する。

その結果により、実施例 1. と同様にしてリグニン可溶化率、繊維素発酵率、タンパク質分解率を算出する。

4. 試験結果

試験結果は表 5 に示される通りである。

表 5
試 験 結 果

項 目 \ 経 過	2 日	5 日	10日	12日	15日	20日
リグニン可溶化率 (%)	23.5	35.1	55.6	57.3	64.0	68.7
繊維素発酵率 (%)	84.3	90.3	92.9	91.5	92.2	91.5
タンパク質分解率 (%)	43.7	54.8	60.7	64.1	68.9	71.5

各測定値は 3 ～ 5 実験の平均である。

二つの新菌株 SK522菌株と SK542菌株の共生的混合培養を主成分とする有機資材の発酵分解剤が、ノコクズのような天然の難分解性繊維物質を10～12日前後で、リグニンの50%以上を可溶化し、繊維素及びタンパク質も SK522菌株単独の場合と同様か、それ以上に強力かつ安定して発酵分解している。

実施例 3. 粉粒状の発酵分解剤と野積堆肥化法

1. 発酵分解剤の製造

そして、本発明の粉粒状の発酵分解剤の製造は、SK522菌株とSK542菌株の多量培養物とともに、微量栄養素と微量ミネラルのある種のものを選択して、石灰岩岩粉等の賦型剤に添加し、よく攪拌混和して製造基準に制定された形状の発酵分解剤とする。原材料の配合の一例は下記の通りで、粉状の製品とする。もし、必要があれば、つなぎ剤等を加え顆粒状とすることもできる。

原材料の配合割合
(賦型剤：石灰岩粉1000kgに対して)

SK522菌株の多量培養物	2kg
SK542菌株の多量培養物	2kg
ビオチン	1g
ビタミンB ₁₂	1g
シスチン	5g
メチオニン	10g
マンガン	10g
コバルト	1g
イーストエキス	100g
けいそう土	50kg

2. 堆肥の製造

スギ材のバークを主原料として、粉状の本発酵分解剤を使用し、従来の野積堆肥化法によって堆肥を製造し、その施用効果をみた。

(1) バークの成分組成

表 6

バークの成分組成 (乾物当り%)

ヘミセルロース	繊維素	リグニン	全窒素	灰分	C/N
11.6	40.5	32.8	0.18	2.3	295

(2) 原材料の配合

バーク (選別篩の目20mm)	1000kg
米ヌカ	250kg
硫 安	2kg
過リン酸石炭 (第2回切り返し時に添加)	20kg
本発酵分解剤	60kg
水 分	約60%

(3) 堆肥の積込み

パーク粉碎物1000kgを使用し、本発酵分解剤、その他をよく混合しながら水分が約60%になるように給水し、180×180cmの木枠の中に積込み、上部をビニールシートで覆った。

(4) 製造経過

積込み作業は5月10日に実施し、切り返し3回、2回目の切り返し時に過リン酸石灰20kgを添加し、7月10日終了する。品温の上昇は速かで、積込み後5日目で61℃に達し、爾後60℃以上を継続する。2回目の切り返し後最高温72℃に達し、暫時次第に品温が低下し、後熟期にはいった。7月10日までの積算温度の算出をすると4,383℃・日となり、単純に平均すると、従来の場合と比較して、1日当たり2.7~3.2℃の温度上昇を示している。また、切り返し時における色の変化をマンセルの色彩図表でみると、表7の通りであった。

表 7

パーク堆肥の熟成に伴う色彩の変化

時 期	測 色 値
1回目切り返し(5月20日)	10YR6/5 (明黄褐)
2回目切り返し(6月5日)	10YR3/5 (暗 褐)
3回目切り返し(6月25日)	10YR3/2 (黒 褐)
2ヶ月後 (7月10日)	10YR2/2 (黒 褐)

(5) 結 果

結果は表8に示される通りである。従来3~6ヶ月以上かかって製造されていたパーク堆肥が60日で可能となった。また、60日間の積算温度4,383℃・日、従来の場合と比較して、1日当たり2.7~3.2℃の品温上昇を示すことになり、熟成に伴う色彩の変化も好結果を示している。以上のようにして、パーク堆肥化に本発酵分解剤の腐

熟効果が充分にあったと考えられる。このことは最終的に製品の分析結果によってもよくわかる。いずれの分析値も日本パーク堆肥協会及び全国パーク堆肥工業会の統一基準値を上まわる優れた結果を示している。

表 8

製品パーク堆肥の分析値

項 目	分析値
水分%	58.6
有機物含有量%	72.4
全N%	1.9
C/N比	24.4
全P ₂ O ₅ %	1.2
全K ₂ O%	0.4
全CaO%	7.3
pH	6.8
CEC	82me / 100g
幼植物テスト	異常を認めない。
腐植度%	31.2
幼植物テスト：二十日ダイコン法による。	
腐植度%：奥田氏法による。	
腐植度 (%) = $\frac{\text{全有機物} - \text{アンモニア水不溶有機物}}{\text{全有機物}} \times 100$	

以下、この共生的混合培養物又はこれを有効主成分とする発酵分解剤の実際の土壌改良の応用例とその効果について説明する。

実施例 4. 発酵分解剤の直接施用による緑・農林業用地の土壌
改善効果 (1)

試験目的：生いなら施用土壌に本発明の発酵分解剤を直接撒布した場合の効果と実用性の検討。

発酵分解剤：以下のような原材料を直ちに混和し、粉状または顆粒状の製品とする。

原材料の配合割合 (賦型剤：石灰岩粉1000kg当り)	
SK522菌株とSK542菌株との混合培養物 (前記〔Ⅲ〕の3.に記載の混合培養物)	4kg
土壌放線菌の培養物 (前記〔Ⅲ〕3.(3)に記載の培養物)	2kg
黄色色素産生菌の培養物 (前記〔Ⅲ〕3.(6)に記載の培養物)	2kg
イーストエキス	200g
微量元素複合物 (Co, B, Cu, Fe, Zn, Mo, Mn)	200g

1. 試験方法

- (1) 試験圃場：大分県宇佐市、黒ぼく土壌
- (2) 供試品種：トマト(強力秀光)
- (3) 播種：1月15日、育苗温室
- (4) 試験区、発酵分解剤および施用量(10a当り)
 - A区：生いなら 1.5t、硫安7kg、発酵分解剤80kg
 - B区：生いなら 1.5t、硫安7kg
 - C区：厩肥 2.0t
 - D区：なし(対照区)

(注) A～C各区とも定植30日前に施用
- (5) 定植：3月20日、2500株/10a(180×50cm-2条)
- (6) 区制：1区10株、2反復

(7) 整枝：5段摘心

2. 試験結果および考察

(1) 第1花房時から低温が続き、全区とも第2花房の着果が悪かった。

(2) 着果および収穫果数は、対照区を除き大差がなかったが、A区(発酵分解剤添加区)が、品質・収量割合とも他区に比較して優れた傾向を示した。総収量で、C区(厩肥区)にやや劣ったものの、上果率では、個数9.7%、重量で18.6%優った。

(3) A区(発酵分解剤添加区)の土壌物理性の変化は、三相分布、その他の調査で、いずれも優れた値を示し、腐植度もB区(硫安区)と比べて、はるかに高かった。

以上の結果から、生育期間中低温で経過したため、第2花房で着果不良がみられたものの、生育も順調であり、収量、品質、土壌物理性の点で優れ、本発明の発酵分解剤の直接施用効果があるものと判断され、本発酵分解剤の実用性が立証される。

3. 主要な試験データ

主要な試験データは表9および表10のとおりである。

表 9

収量調査10株当たり (5月10日~7月15日)

試験区	上果		下果		くず果		合計	
	数	重量	数	重量	数	重量	数	重量
A 区 (発酵分解剤区)	個	g	個	g	個	g	個	g
	158	42,078	72	14,675	57	3,084	287	59,837
B 区 (硫安区)	142	32,170	68	15,046	71	4,600	281	51,816
C 区 (厩肥区)	133	31,055	77	23,940	81	4,978	291	59,973
D 区 (対照区)	140	32,170	60	15,582	63	3,750	263	51,502
合計	573	137,473	277	69,243	272	16,412	1,122	223,128

注：下果は裂果、変形果、100g以上、くず果は100g以下。

表 10

収量構成割合

試験区	上果		下果		くず果	
	個数	重量	個数	重量	個数	重量
A 区 (発酵分解剤区)	%	%	%	%	%	%
	55.05	70.35	25.09	24.51	19.86	5.14
B 区 (硫安区)	50.53	62.08	24.20	29.04	25.27	8.88
C 区 (厩肥区)	45.70	51.78	26.46	39.92	27.84	8.30
D 区 (対照区)	53.23	62.46	22.82	30.26	23.95	7.28

実施例 5. 発酵分解剤の直接施用による緑・農林業用地の土壌
改善効果 (2)

試験目的：麦類の栽培に対し、生いなら施用土壌に本発明の発酵分解剤を直接撒布した場合の効果と実用性の検討。

発酵分解剤：以下のような原材料を直ちに混和し、粉状または顆粒状の製品とする。

原材料の配合割合 (賦型剤：ドロマイト岩粉1000kg当り)	
SK522菌株とSK542菌株との混合培養物 (前記〔Ⅲ〕3.に記載の混合培養物)	4kg
黄色色素産生菌の培養物 (前記〔Ⅲ〕3.(6)に記載の培養物)	2kg
イーストエキス	200g
微量元素複合物 (Co, B, Fe, Mn)	200g

1. 試験方法

- (1) 試験圃場：佐賀県神埼郡三田川町
 (2) 供試品種：シロガネコムギ
 (3) 試験区の構成

試験区	生いなら施用量	発酵分解剤撒布量	N成分添加量
A	400kg/10a	80kg/10a	1.6kg/10a
B	400kg/10a	80kg/10a	0.8kg/10a
C	400kg/10a	0kg/10a	1.6kg/10a
D	無施用	無施用	無施用

備考

- (1) 生いならはカッターで5～6cmに切断。
 (2) 耕起前ケイカル80kg/10a施用

2. 耕種概要

- (1) 播種量、播種期：11月9日、8kg/10a

(2) 栽培様式：畦立4条、畦巾150cm、畦幅1条10cm

(3) 施肥量、方法 (kg/10a)

P0	K0	N	元肥	中肥	穂肥	備考
10	14	14	5.6	4.2	4.2	追肥時期 中肥：1月10日 穂肥：3月5日

3. 試験結果および考察

(1) 発芽期は、生いなら施用の各区が無施用区に比べ2日遅れた。また出芽歩合は無施用区が施用区よりも7~11%高かった。

(2) 草丈は、生いなら施用の各区が全般的に低い。茎数および穂数もA区が最も多く、有効茎歩合は本発明の発酵分解剤施用したA、B区が高かった。

(3) 出穂期、成熟期は、各区とも差が認められない。収量は発酵分解剤施用のAおよびB区が穂数増により多収となった。また、品質も各区とも差がなかった。

以上、麦作に生いならを施用すると発芽期が遅れ、出芽歩合が低下し、草丈の初期伸長が抑制される傾向がみられるが、しかし、発酵分解剤を施用し、窒素を生いなら 100kgに対して成分 400gを加用することによって窒素飢餓もおこさず、2月中旬より生育が好転し、増収に繋がる。

従って、生いなら施用の場合、増収対策として、本発明の発酵分解剤の直接撒布はその効果が期待される。

4. 主要な試験データ

主要な試験データは表11および表12である。

表 11
出芽および生育の比較

試験区	発芽期	出芽歩合 %	草丈 (cm)			茎数 (本/m ²)			有効茎 歩合 %
	月/日		2/10	3/1	3/24	2/10	3/1	3/24	
A	12/5	81	10.2	13.5	31.8	232	587	844	70.6
B	12/5	78	10.0	13.2	31.3	195	494	822	71.4
C	12/5	82	10.9	12.9	33.4	214	554	816	65.9
D	12/3	89	11.8	13.6	35.1	200	553	791	66.2

表 12
生育・収量の比較

試験区	出穂期 月/日	成熟期 月/日	稈長 cm	穂長 cm	穂数 本/m ²	わら量 kg/a	子実重 kg/a	収量比 %	11重 g	上麦千 粒量 g	検査 等級
A	4/20	6/2	81	7.9	596	45	43.2	108	812	32.6	1上
B	4/20	6/2	82	8.3	544	45	41.2	103	809	31.6	1上
C	4/20	6/2	82	8.1	538	43	40.7	101	810	32.2	1上
D	4/20	6/2	80	7.7	524	46	40.3	100	806	31.2	1上

実施例 6. 発酵分解剤の直接施用による緑・農林業用地の土壤
改善効果 (3)

試験目的：キュウリのつる割病の発病防止効果

発酵分解剤：以下のような原材料の配合で、粉状または顆粒状の製品とする。

原材料の配合割合 (賦型剤：ドロマイト岩粉1000kg当り)	
SK522菌株とSK542菌株との混合培養物 (前記〔Ⅲ〕3.に記載の混合培養物)	4kg
土壤放線菌の培養物 (前記〔Ⅲ〕3.(3)に記載の培養物)	2kg
黄色色素産生菌の培養物 (前記〔Ⅲ〕3.(6)に記載の培養物)	2kg
イーストエキス	200g
微量要素複合物 (Co, B, Fe, Mn)	200g

1. 試験方法

(1) 供試野菜：キュウリ「あそみどり」

(2) 栽培および処理方法：4月21日、もみがらくん炭に播種する
4月26日 4.5cmポリポット(未汚染土)に鉢植えし、10葉期まで育成した後、5月6日に各処理土(汚染土)をつめた15cmポリポットへ根鉢をくずさないように移植する。

なお、数年間2トン/10aの堆肥を施用した畑地土壤を育苗原土し、この原土をメチルブロマイドで消毒し、表13に示す各資材、肥料を4月21日に混和し、4月28日に各育苗資材用土にフスマ培養菌を容積比で5%混和して汚染土とした。

表 13

添加された各資材、肥料

試験区	摘	要	発酵分解剤 (g/l)	硫安 (g/l)	CDU-S555 (g/l)	過石 (g/l)	硫加 (g/l)	苦土石灰 (g/l)
A-1	発酵分解剤	硫安	3.0	1.5	-	1.8	0.6	0.5
-2	"	CDU-S555 (商標名)	3.0	-	2.0	1.8	0.6	0.5
-3	"	硫安 苦土石灰	3.0	1.5	-	1.8	0.6	3.0
-4	"	CDU-S555 (商標名)	3.0	-	2.0	1.8	0.6	3.0
B-1	硫安		-	1.5	-	1.8	0.6	0.5
-2		CDU-S555 (商標名)	-	-	2.0	1.8	0.6	0.5
-3		硫安 苦土石灰	-	1.5	-	1.8	0.6	3.0
-4		CDU-S555 (商標名)	-	-	2.0	1.8	0.6	3.0

(3) 試験規模：1区20株、反復なし。

2. 試験結果および考察

(1) 発酵分解剤添加区(A-1~A-4)は、無添加区(B-1~B-4)より発病指数および枯死株率が低く、つる割病抑止効果が認められた。なかでも硫安施用区(A-1)およびCDU-S555+苦土石灰施用区(A-4)は試験終了時でも枯死株10%と抑止効果が高く、発病の進展が遅かった。

(2) 生育について結果的にみて、発酵剤添加区(A-1~A-4)がいずれも無添加区(B-1~B-4)より高い。

(3) 特に、発酵分解剤添加区(A-1~A-4)のなかでつる割病抑止効果の高かった硫安施用区(A-1)およびCDU-S555+苦土石灰施用区(A-4)が、他発酵剤添加区(A-2, A-3)および各無添加区(B-1~B-4)よりも優れた結果を示している。

(4) 以上により、発酵分解剤の施用効果は明確であり、特に硫安およびCDU-S555+苦土石灰との組み合わせで高い抑止効果が認められた。

3. 主要な試験データ

主要な試験データは表14および表15のとおりである。

表 14

生育及び用土の化学性

試験区	つる長 (cm)	葉 数	地上部生体量 (g)	pH	EC (m/cm)
A - 1	90.3	11.4	87	6.89	1.05
- 2	82.5	8.7	82	6.64	1.39
- 3	85.6	10.5	84	6.96	1.21
- 4	96.9	11.2	99	7.00	1.32
B - 1	65.2	9.9	49	6.61	1.25
- 2	79.8	7.6	78	6.57	1.12
- 3	77.7	7.4	70	6.83	1.16
- 4	79.0	11.0	67	6.88	1.12

表 15
つる割病の発生状況

試験区	発 病 指 数			枯 死 株 率 (%)		
	5 / 14	5 / 29	6 / 10	5 / 14	5 / 29	6 / 10
A - 1	0	20.5	30.0	0	10.0	10.0
- 2	5.0	26.5	43.8	5.0	20.0	30.0
- 3	5.0	23.0	35.0	5.0	15.0	25.0
- 4	0	16.3	29.4	0	5.0	10.0
B - 1	15.0	25.0	80.0	15.0	15.0	50.0
- 2	0	28.8	50.4	0	15.0	35.0
- 3	0	28.0	48.3	0	15.0	44.0
- 4	0	35.6	55.0	0	5.0	35.0

発 病 指 数 =
各 個 体 の 評 点 の 総 和 × 100 / 最 大 階 級 評 点 × 調 査 個 体 数 (20)

評 点 : 0 健 全
1 軽 萎 ち ょ う
2 萎 ち ょ う
3 強 萎 ち ょ う
4 枯 死

産業上の利用可能性

以上のように、本発明によれば有用な新菌 SK522菌株を提供する。又、新菌 SK522と SK542の両菌株の共生的混合培養の成功は、自然生態系や農耕生態系、又工場生産システムにおける微生物フローラの作用システムの次のような利用を可能にし、その実用化を確実なものとした。

(1) 多種類の天然の難分解性有機質の分解利用を可能にし、ただ分解消化するだけでなく、いくつかの有用な物質の生産ができた。

(2) 分解が迅速、安定して、その生産性が向上し、野積堆肥化法

を確実なものにした。

(3) そしてまた、難分解性有機質の複雑な分解工程をできるだけ短時間に一段階で行う好熱性高速分解方式を確立した。

(4) SK522菌株とSK542菌株を主要菌とする健全活性ある強力な土壌微生物フローラの形成は、環境要因の変化に対して有効菌の生育と作用機能を安定させた。

(5) また同時に雑菌や有害菌等の汚染に抵抗性を増強して、土壌病害や連作障害を消滅、克服することができた。

(6) 前項のようにして製造された良質の堆肥、コンポストの施用、又は土壌や植物の葉面に直接施用する撒布技術の開発等は、土壌の物理的性状を改善し、特に緑農地の植物を活性化し、生産性を維持するための地力を増大させることができた。

(7) 尿尿の脱臭分解、又硬タンパク質、余剰汚泥の分解にも有効で、これらを窒素源として難分解性繊維物質を効果的に分解する。

さらに、本発明によれば、本発明の共生的混合培養物によって、よくリグニンを可溶化し、繊維素を分解し、タンパク質を強力に分解することができ、よって土壌中に残留した植物遺体又は土壌に施用された植物遺体及び動物遺体を迅速に発酵分解して腐食化を促進して土壌を肥沃化し、又土壌の構造を良好なものとする。

規則第13規則の2の寄託された微生物への言及

寄託機関：通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託番号及び寄託した日付：

1. 微工研条寄第3382号 1991年5月1日
2. 微工研条寄第3459号 1991年6月18日

請 求 の 範 囲

1. リグニン可溶化能を有し、生育適温が65~72℃で、40~80℃の温度範囲で生育し、繊維素を旺盛に発酵する好熱性繊維素分解菌クロストリジウム・サーモセルムSK522(*Clostridium thermocellum* biovar. SK522)(微工研条寄第3459号)又はこれと同等の性質を有する菌株。

2. 絶対好気性、生育適温が72~76℃で、40~82℃の温度範囲で通常濃度の培地に生育し、作用適温75~85℃、作用水素イオン濃度pH= 4.0~11.3の高温性広域作用水素イオン濃度活性のタンパク質分解酵素とカロチノイド系黄色色素を産生するサーマス・アクアティクスSK542(*Thermus aquaticus* biovar SK542)(微工研条寄第3382号)又はこれと同等の性質を有する株。

3. リグニン可溶化能を有し、生育適温が65~72℃で、40~80℃の温度範囲で生育し、繊維素を旺盛に発酵する好熱性繊維素分解菌クロストリジウム・サーモセルムSK522(*Clostridium thermocellum* biovar. SK522)(微工研条寄第3459号)又はこれと同等の性質を有する株と、絶対好気性、生育適温が72~76℃で、40~82℃の温度範囲で通常濃度の培地に生育し、作用適温75~85℃、作用水素イオン濃度pH= 4.0~11.3の高温性広域作用水素イオン濃度活性のタンパク質分解酵素とカロチノイド系黄色色素を産生するサーマス・アクアティクスSK542(*Thermus aquaticus* biovar SK542)(微工研条寄第3382号)又はこれと同等の性質を有する株との混合培養物。

4. 前記2種類の菌株を60℃以上の温度において共生的混合培養して得たものである、請求項3に記載の混合培養物。

5. 請求項3又は4に記載の混合培養物と賦型剤とを含んで成る有機資材分解剤。

6. 前記微生物株の生育に必要な又は好ましいビタミン、アミノ酸等の微量栄養素及びミネラルの少なくとも1種を含んで成る請求項5に記載の有機資材分解剤。

7. 請求項3もしくは4に記載の混合培養物又は請求項5もしくは6に記載の有機資材分解剤により、リグニン含有有機資材を処理することを特徴とする有機資材の処理方法。

8. 前記処理を60℃以上の温度において行う、請求項7に記載の方法。

9. 前記処理をリグニンの可溶化のために行う、請求項7又は8に記載の方法。

10. 前記処理を屎尿の脱臭分解のために行う、請求項7又は8に記載の方法。

11. 前記処理を有機肥料の製造のために行う、請求項7又は8に記載の方法。

12. 請求項3もしくは4に記載の混合培養物又は請求項5もしくは6に記載の有機資材分解剤を土壤に施用することを特徴とする土壤改良方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/00498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁵ C12N1/20, 9/42, 9/52; C12P39/00; C02F3/34 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl ⁵ C12N1/20, 9/42, 9/52; C12P39/00; C02F3/34 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"Applied and Environmental Microbiology" <u>41</u> , (6) p. 1337-1343 (1981)	1, 3-8
A	"Applied and Environmental Microbiology" <u>43</u> , (5) p. 1125-1132 (1982)	1, 3-8
A	Biotechnology and Bioengineering <u>29</u> , (1) p. 92-100 (1987)	1, 3-8
A	US, A, 4400470 (Wisconsin Alumni Research, Foundation), August 23, 1983 (23. 08. 83), (Family: none)	1, 3-8
A	JP, A, 59-501194 (Institut Pasteur), July 12, 1984 (12. 07. 84), & EP, B, 100254 & FR, B, 2529569 & WO, A, 8400175	1
A	JP, A, 63-216481 (Yotsuba Nyugyo K.K.), September 8, 1988 (08. 09. 88), (Family: none)	2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search July 12, 1993 (12. 07. 93)	Date of mailing of the international search report August 3, 1993 (03. 08. 93)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/00498

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 5-30968 (Yotsuba Nyugyo K.K.), February 9, 1993 (09. 02. 93), (Family: none)	2
A	JP, B2, 61-23994 (Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), June 9, 1986 (09. 06. 86), (Family: none)	2
A	JP, B2, 2-62237 (Yotsuba Nyugyo K.K.), December 25, 1990 (25. 12. 90), (Family: none)	2
A	"Biochemical Journal" <u>221</u> , [2] p. 407-413 (1984)	2
A	"Agricultural and Biological Chemistry" <u>47</u> , [1] p. 25-28 (1983)	2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁸ C12N1/20, 9/42, 9/52; C12P39/00; C02F3/34		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁸ C12N1/20, 9/42, 9/52; C12P39/00; C02F3/34		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS WPI		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	"Applied and Environmental Microbiology" <u>41</u> , (6) p.1337-1343 (1981)	1, 3-8
A	"Applied and Environmental Microbiology" <u>43</u> , (5) p.1125-1132 (1982)	1, 3-8
A	Biotechnology and Bioengineering <u>29</u> , (1) p.92-100 (1987)	1, 3-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献
国際調査を完了した日 12.07.93	国際調査報告の発送日 93.08.93	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 佐伯裕子 ㊟	4 B 7 2 3 6
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, A, 4400470 (Wisconsin Alumni Research Foundation) Aug. 23, 1983 (23. 08. 83) (ファミリーなし)	1, 3-8
A	JP, A, 59-501194 (アンスティテュ・パストウール) 12. 7月. 1984 (12. 07. 84) & EP, B, 100254 & FR, B, 2529569 & WO, A, 8400175	1
A	JP, A, 63-216481 (よつ薬乳業株式会社) 8. 9月. 1988 (08. 09. 88) (ファミリーなし)	2
A	JP, A, 5-30968 (よつ薬乳業株式会社) 9. 2月. 1993 (09. 02. 93) (ファミリーなし)	2
A	JP, B2, 61-23994 (天野製薬株式会社) 9. 6月. 1986 (09. 06. 86) (ファミリーなし)	2
A	JP, B2, 2-62237 (よつ薬乳業株式会社) 25. 12月. 1990 (25. 12. 90) (ファミリーなし)	2
A	"Biochemical Journal" <u>221</u> , [2] p. 407-413 (1984)	2
A	"Agricultural and Biological Chemistry" <u>47</u> , [1] p. 25-28 (1983)	2