

Bacillus coagulance 의 耐熱性胞子에 關한 研究

(第一報) 生育 · 耐熱性 및 胞子形成에 미치는 培養條件

柳洲鉉 崔奎鳳* 李政治* 尹元榮*

延世大學校 工科大學 食品工學科 · *日東製藥株式會社

Studies on the Thermal Resistant Spore of *Bacillus coagulans*

(Part I Sporulating Conditions of the Thermal Resistant spore)

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

Ju Hyun Yu · Kyu Bong Choi · Jung Chi Lee · Won Young Yun

(Received February 10, 1977)

Abstrac

As a basic study for the application of the spore-bearing lactic acid bacteria to foods, the effects of the sporulating conditions on the growth and sporogenesis were studied. were observed.

The results obtained are as follow.

1. All carbohydrates added to sporulation media except dextrin decreased the sporulation rate and the thermal resistance of spores. Dextrin stimulated the growth, however, there in no effect on the thermal resistance.
2. As nitrogen source, the protein hydrolysates such as peptone, casamino acid were effective to obtain more spores of the increased thermal resistance.
3. Ca^{++} , Mn^{++} , of the metal ions added to casamino acid containing medium validly increased the total growth, sporulation rate and thermal resistance. Its optimum concentration was 40 ppm each.
4. Biotin of vitamines had an effect on the total growth, sporulation and thermal resistance of spores. Its optimum concentration was 30 γ /mL.
5. The resistant spores required the adequate maturation period, more than 36 hours, sufficient aeration, and optimum temperature, 37~45C.

I. 서 론

一般的으로 大部分의 세균은 80°C로 가열하면 死
滅되지만 *Bacillus* 및 *Clostridium* 屬의 어떤 胞子

**日東製藥株式會社 勤務 · 産業大學院

는 100°C 以上 加熱하여도 生存하는 特異한 耐熱性
을 갖고 있다. 이러한 細菌胞子の 耐熱性은 純粹
한 生物學的面에서나 其他分野의 應用面에서도 重
要한 意義를 가지고 있으며 特히 應用面에서는 지
금까지의 醱酵工業 및 食品工業(特히 通조림工業)

에 있어서 殺菌의 目的에서 가장 많은 研究가 行하여져 왔다⁽¹⁻³⁾. 그러나 有孢子 젖산균의 孢子와 같은 有用한 細菌孢子的 利用을 目的으로한 孢子的 耐熱性에 關한 研究 報告는 거의 없었다. 젖산균은 古來로부터 人類와 깊은 關係를 맺어왔으며 特히 Metchnikoff⁽⁵⁾에 依하여 젖산균 醱酵乳가 人間의 健康 및 장수에 크게 공헌 한다는 事實이 주장된 以來 젖산균(*Lactobacillus* 및 *Streptococcus*)은 熱, 酸, 其他 化學藥品等에 對한 耐性이 弱하여 젖산균 製品的의 製造工程 및 流通過程에서 많은 死滅率을 나타내므로 이의 解決이 하나의 큰 問題로 되어있다.

近年에 이르러 Horowitz-Wlassowas⁽⁶⁾, Werkman Anderson⁽⁷⁾, Renco⁽⁸⁾, Nakayama⁽⁹⁾, Nakayama, Yanoshi⁽¹⁰⁾, Kitahara Suzuki⁽¹¹⁾, 等에 依하여 소위 有孢子 젖산균의 分離同定 및 利用에 關한 研究가 活發히 行하여진바 이들 有孢子 젖산균은 젖산醱酵能에서나 腸內 定着發育에서 從來의 젖산균에 比較하여 조금도 손색이 없으며 임상효과도 우수함이 判明되었으며 또한 適當한 培養條件下에서는 多量의 孢자를 얻을 수 있어 이 孢자의 耐熱 耐酸 耐久性을 利用하여 젖산균 製劑의 여러가지 問題點들이 究明됨으로 因하여 앞으로 이의 利用은 多方面으로 더욱擴大 될것으로 기대된다.

特히 食品工業과 製藥工業에 乾燥活性(生存)젖산균을 利用할 경우가 있다. 菌을 乾燥할때 熱에 依하여 死滅되므로 孢자를 形成하는 *Bacillus coagulans*의 菌體生育과 孢子形成 條件및 孢자의 耐熱性變化에 關하여 研究하였다.

II. 實驗材料 및 實驗方法

1. 使用菌株

本 實驗에서 使用한 菌株은 有孢子性 젖산균의 一種으로 Bergy's Manual⁽¹²⁾에 依한 分類上 位置는 *Bacillus coagulans*에 屬한다. 本菌은 10% Glucose를 含有하는 Broth에서 7日 以內에 Homo-lactic acid 醱酵에 依하여 glucose의 98%以上을 젖산으로 醱酵시키며 適當한 好氣條件下에서는 總菌의 90%以上의 孢자를 形成한다. 이 孢자를 遠心分離機로 分離하여 우유에 懸탁해서 冷凍 乾燥시켜 保存하면서 必要할때에 Agar 사면 培地에 옮겨 계대 培養하면서 實驗에 使用하였다.

2. 基礎培地 및 培養方法

孢子形成 基礎培地는 0.5% peptone 水를 使用하

였으며 培地의 pH는 殺菌前 6.5로 調整하였다. 液體 培地를 500ml 진탕 후라스크에 150ml씩 分注, 殺菌, 冷却後에 供試菌 2白金耳 以上을 接種하여 12시간 진탕 培養하고 이 培養液 5ml씩을 150ml의 本培養 試驗培地에 接種하여 40~42시간 다시 진탕배양 하였다. 진탕배양은 모두 45°C 恒溫室에서 왕복진탕기(135stroke/min)를 使用하여 培養하였다.

3. 菌體 懸탁액의 조제

培養終了液 20ml을 遠心分離하여 포집된 菌體를 M/150 phosphate Buffer(PH 7.0)液으로 懸탁시켜 다시 遠心分離하는 과정을 3回反復하여 세척한後 같은 Phosphate Buffer Solution 20ml에 懸탁시킨것을 냉장고(4°C)에 保管하여 試驗에 使用하였다.

4. 菌體量 및 孢子形成率 測定

上記 菌體 懸탁액을 滅菌증류수로 5倍 희석한 後 "Spectronic 20"을 使用하여 660 μ m의 波長에서 O. D.를 測定하여 菌體量으로 하였다. 그리고 同一한 懸탁액을 적당히 희석하여 Olympus 현미경下에서 Hemacytometer의 一區間에 5~10個의 菌數가 분산되게하여 50區間 以上 營養細胞와 孢자의 數를 區分 計測하여 孢子形成率을 計算하였다.

5. 孢자의 耐熱性值 測定

菌體 懸탁액을 M/150 phosphate buffer(pH 7.0)로 적당히 희석하여 90°C에서 5分間 熱處理한 後 plate count method⁽¹³⁾에 依하여 孢子數를 測定하고 희석 菌懸탁액을 100°C에서 10分間 熱處理하여 上記와 같은 方法으로 耐熱性 孢子數를 測定하였다. 여기에서 測定된 孢子數와 耐熱性 孢子數를 下記式에 代入하여 耐熱性值를 求하였다.

即 Thermal Resistan Value (log percentage survivor)

$$T. R. V = \log A/B \times 100$$

A : 100°C에서 10分間 熱處理했을때 孢子數

B : 90°C에서 5分間 熱處理했을때 孢子數

III. 實驗結果 및 考察

1. 炭水化物的 影響

0.5% peptone 水의 基礎培地에 몇가지 種類의 炭水化물을 各各 0.1%씩 添加하여 耐熱性 孢子形成에 미치는 培養條件을 檢討한 結果 Table 1과 같다. 菌의 生育은 glucose, fructose, xylose, maltose, mannitol 等の 添加에 依해 生育이 抑制되

Table 1. Effects of Carbohydrates on Growth, Sporulation and Thermal Resistant Spore of *Bacillus coagulans*.

Carbohydrates added to basal medium		Final pH	Growth O. D. 660m μ	Sporulation %	Thermal resistance value
None		8.7	0.48	97	1.22
Glucose	0.1%	8.3	0.30	90	0.74
Fructose	0.1	8.3	0.22	86	0.58
Xylose	0.1	8.5	0.40	91	0.35
Maltose	0.1	8.6	0.30	87	0.40
Sucrose	0.1	8.4	0.50	93	0.66
Raffinose	0.1	8.4	0.54	94	0.54
Sorbitol	0.1	8.4	0.54	89	0.84
Mannitol	0.1	8.3	0.24	82	0.99
Dextrin	0.1	8.6	0.60	93	1.21
Inulin	0.1	8.5	0.50	96	0.86
Starch	0.1	8.4	0.46	88	0.64

였고 그외의 種類는 若干의 差가 있었다. 그러나 Dextrin 을 添加한 培地는 보다 增殖이 좋았다. 孢子形成率은 糖類를 添加않았을때 97%이였으나 單糖類와 二糖類의 添加區에서는 오히려 低下하는 傾向을 보였다. 孢子의 耐熱性은 dextrin 을 除外한 單糖類 및 二糖類를 添加한 區는 無添加區와 比較할때 20%以上이나 弱하였다. 大體의으로 젖산균의 젖산 醱酵率이 높은것으로 알려진 單糖類, 二糖類等은 菌의 生育과 增殖 및 孢子形成에 저해를 주었고 또한 形成된 孢子의 耐熱性도 弱화하였다. 그러나 젖산 醱酵率이 낮은 것으로 알려진 Dextrin 은 Embden-Meyerhoff pathway 에 依한 有機酸의 蓄積이 적고 *Bacillus* 屬의 孢子形成에 必須의인 TCA cycle 에서 移行이 容易하여 有機酸에 依한 抑制 作用이⁽¹⁴⁾ 적어지기 때문에 比較 菌의 生育과 孢子形成이 좋았으며 耐熱性도 強하다고 生覺된다.

炭水化合物中 效果가 좋았던 dextrin 의 濃度を 달리한 培地에 各各 培養하여 dextrin 의 濃도와 生育 및 耐熱性的 關係를 研究한 結果는 Fig. 1과 같다.

生育量은 0.1%까지는 濃도가 높시점에 따라 많아졌으나 그以上の 濃度로 增加되면 孢子形成率 및 耐熱性이 현저하게 減少되었다. 이런 結果로보아 dextrin 의 濃度は 0.1%일때 가장 좋았다고 生覺된다.

2. 窒素源의 影響

Dextrin 0.1%, MnSO₄ 20ppm, CaCl₂ 20 ppm 의 培地中에 peptone 을 비롯한 몇가지 窒素源의 影響

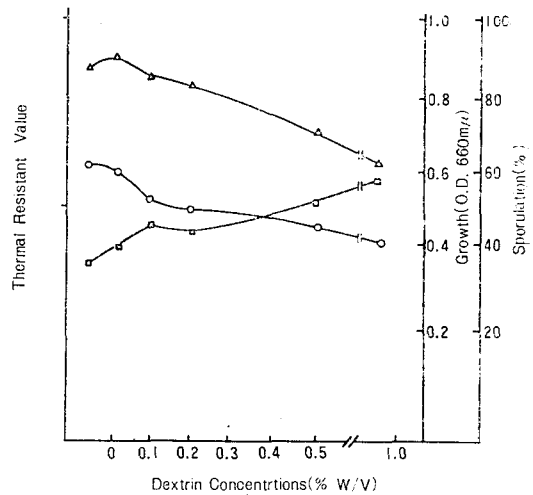


Fig 1. Effects of Dextrin Concentrations of Total Growth, Sporulation, and Thermal Resistant Value.

- : Total growth
- △ : Sporulation
- : Thermal resistance value

을 檢討한 結果 Table 2 와 같다.

菌의 增殖은 窒素源을 全然 添加 않은것과 比較하여 (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄Cl, NaNO₂ 等の 無機鹽類와 aspartic acid, sodium-glutamate, milk casein 을 加한것이 若干 增加하였고 peptone

Table 2. Effect of Nitrogen Source on some Culture Features

40 hrs culture

Component added to basal medium		Final pH	Growth O. D. 660m μ	Sporulation %	Thermal resistant value
None		6.2	0.11	24	1.01
Pepton	0.5%	7.7	0.38	92	1.40
Casamino acid	0.5%	8.2	0.32	80	1.38
Asparaginic acid	0.2%	8.1	0.13	30	1.11
Sodium glutamate	0.2%	7.6	0.16	86	1.21
Milk Casein	0.5%	5.6	0.15	52	0.99
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2%	6.2	0.15	37	1.02
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.2%	5.7	0.16	5	—
NH ₄ Cl	0.2%	6.0	0.14	17	0.97
NaNO ₃	0.2%	6.1	0.16	13	0.84

※ Dextrin ; 0.1%, CaCl₂ ; 20ppm MnSO₄ ; 20ppm Biotin ; 0.03mg/l

과 casamino acid 은 3 倍以上의 増殖을 보였다. (NH₄)₂HPO₄, NH₄Cl, NaNO₃ 등의 添加區는 孢子形成率이 30%未滿이었으나 peptone, casamino acid, sodium glutamate, 添加區는 80%以上으로 좋은 結果를 얻었고 그中 peptone 添加區는 92%까지 孢子를 形成하였다.

孢子耐熱性에 있어서 milk casein (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, NaNO₃ 등은 影響이 없었다. 그외의 peptone, casamino acid, aspartic acid, sodium glutamate 無添加區에 比하여 兪등하게 좋은 耐熱性을 갖고 있었다. Peptone의 濃度를 各各 달리하여 濃度에 關한 檢討를 한 結果는 Fig.2와 같다. 菌의 増殖은 濃度가 높아짐에 따라 増殖하였고 孢子形成率은 濃度에 影響이 없었다. 孢子의 耐熱性은 濃度가 0.1~0.5% 範圍에서는 濃度의 增加에 따라 耐熱性이 強하여 졌으나 그以上에서는 別로 變化가 없으므로 peptone의 濃도는 0.5%로 함이 좋다고 生覺된다.

3. 金屬 ion의 影響

Peptone 0.5%, biotin 0.03mg/l의 培地에 여러 種類의 金屬鹽을 混合하여 菌増殖, 孢子形成率, 耐熱性에 對한 影響을 檢討한 結果는 Table 3과 같다. 菌의 増殖은 Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Co⁺⁺ 등의 ion에 依하여 若干의 影響을 받았으나 Mn⁺⁺ Ca⁺⁺ ion을 함유한 培地에서는 많은 増殖이 있었다. 孢子形成率은 Fe⁺⁺ ion에 依하여 若干 抑制되었고 Mn⁺⁺, Ca⁺⁺ 및 모든 金屬 ion을 添加한 區는 増殖에 미친 效果와 같이 促進시켰으나 그 外의 金屬 ion은 別로 影響을 주지 않았다.

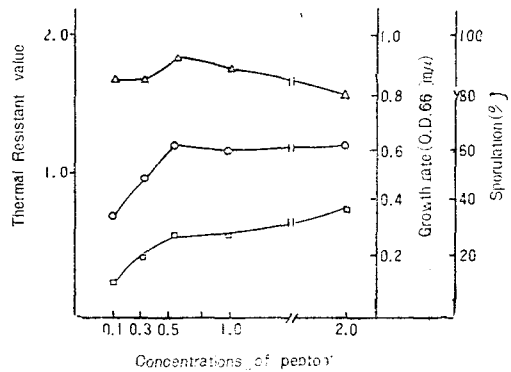


Fig 2. Effect of Pepton Concentrations on The growth Rate, Sporulation and Thermal Resistant Value

- : Thermal resistance
- : Total growth
- △ : Sporulation

Mn⁺⁺ Ca⁺⁺ 및 金屬 ion의 전부를 添加한 區는 無添加區에 比하여 生育·孢子形成時와 같이 耐熱性을 向上시켰고 그 外의 金屬 ion의 添加區는 別로 差가 없다는 結論을 얻었다. 이는 使用한 金屬 ion中 Mn⁺⁺ Ca⁺⁺ ion만이 増殖, 孢子形成, 孢子耐熱性에 共히 좋은 效果를 주었다고 생각된다. 이 結果는 Donnell 등이 合成培地에서 Ca⁺⁺ ion을 除去하면 形成된 孢子의 Ca-dipicolinate의 含量은 營養세포와 같았으며 耐熱性도 크게 떨어진다

Table 3. Effect of Metal Ions on Growth, Sporulation and Thermal Resistance.

Component added to basal medium	Final pH	Growth O. D. 660m μ	Sporulation %	Thermal resistance value
None	8.7	0.33	89	1.01
MgSO ₄ 50ppm	8.5	0.35	90	1.01
FeSO ₄ 20ppm	8.4	0.36	83	1.04
MnSO ₄ 20ppm	8.5	0.39	96	1.36
CaCl ₂ 20ppm	8.5	0.41	97	1.41
CuSO ₄ 2ppm	8.4	0.34	88	0.99
ZnSO ₄ 2ppm	8.4	0.34	89	1.01
CuSO ₄ 2ppm	8.5	0.35	90	0.99
All above	8.5	0.40	94	1.38

※ Pepton 0.5%, biotin 0.003mg/l, pH 6.5 for 24 hrs.

報告¹⁵⁾와 一致하였으며 Amaha 및 Ordal等¹⁶⁾의 peptone, yeast, glucose의 混合培地에서 *Bacillus coagulans*를 培養할 때 Mn⁺⁺ Ca⁺⁺ ion이 形成된 胞子의 耐熱性에 크게 영향을 준다는 事實과도 一致하였다. MnSO₄와 CaCl₂를 各 濃도별로 添加했을 때의 胞子의 耐熱性에 關한 結果는 Fig. 3과 같았으며 MnSO₄, CaCl₂ 各 40ppm에서 耐熱性이 좋았다. MnSO₄와 CaCl₂의 混合液을 添加하는 CaCl₂ 單獨보다는 弱하고 Mn⁺⁺ ion보다는 若干 좋았다.

4. Vitamin의 영향

Vitamin은 많은 細菌의 發育에 있어서 絕對的인 生育因子로써 알려져있다. 本實驗에서 使用한 菌株도 yeast extract와 peptone만의 培地에서는 生育 및 胞子形成率이 良好하나 casamino acid만의 培地에서는 生育과 胞子形成率이 좋지 않은 것을 볼때 어떤 種類의 vitamin이 필수적으로 必要하다고 생각되었다. 그러므로 生育胞子 形成胞子의 耐熱性에 영향을 주는 vitamin 種類를 알기 위하여 casamino acid에 Ca⁺⁺, Mn⁺⁺ ion을 添加한 培地에 vitamin을 모두 添加시켜 이 中에서 한가지씩 除外한 vitamin의 種類에 따른 研究 結果는 Table 4와 같다.

Table에서와 같이 biotin이 本菌의 증식에 필수적이며 耐熱性에도 영향을 주었으나 胞子形成率에는 별 영향이 없었다. Biotin의 濃度別 試驗 結果는 Fig. 4에 表示한 것과 같으며 濃度가 30 γ /ml일 때에 增殖과 耐熱性에 가장 효과가 있었으며 胞子形成率은 濃度에 따라서도 영향이 없었다.

5. 培養溫度 및 通氣量의 영향

어떤 種類의 *Bacillus*는 培養溫度가 높을수록 形

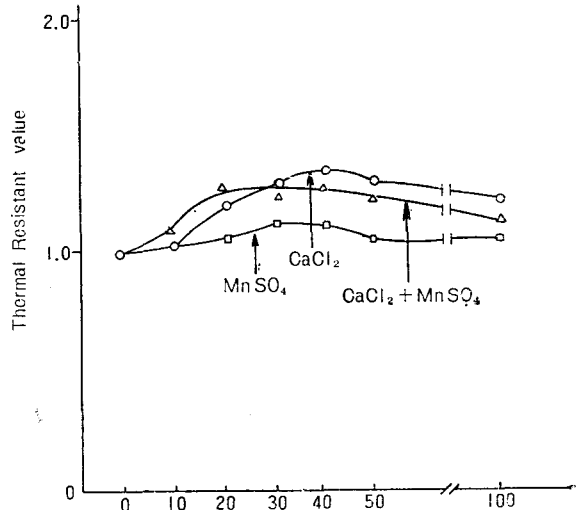


Fig 3. Effect of CaCl₂ and MnSO₄ on the Thermal Resistant Value of *B. coagulans* Spores.

成된 胞子의 耐熱性이 보다 強하다는 報告¹⁷⁾가 있지만 *Bacillus*와 *Clostridium*의 大部分은 發育 및 胞子形成의 最適溫度에서 形成된 胞子의 耐熱性이 가장 크다는 報告들^{18,19)}도 있다. 그래서 以上에서 얻은 좋은 效果를 나타내준 物質인 peptone 0.5%, dextrin 0.1%, MnSO₄, CaCl₂, 各 40 ppm, biotin 30 γ /ml을 含有하는 培地를 使用하여 30°, 37°, 45°, 55°, 60°(에서 各 培養하여 生育, 胞子形成率 및 耐熱性을 比較한 結果 Fig. 5와 같았다.

30°C와 55°C에서는 發育이 매우 좋지 않으며 胞子形成率과 耐熱性도 크게 떨어졌으며 60°C에서는 增殖조차 되지 않았다. 37°C와 45°에서는 別로 差異가 없었으나 37°C에서는 增殖이 조금 良好하였고 45°C에서는 耐熱性 및 胞子形成率이 조금 우

Table 4. Effects of Vitamines on Growth, Sporulation and Thermal Resistant

Vitamine omitted from basal medium ¹⁾	final pH	Growth O. D. 660m μ	Sporulation %	Thermal resistan value
None	8.3	0.38	90	0.94
Thiamine HCl	8.4	0.36	90	0.97
Pyridoxine HCl	8.3	0.36	93	0.93
Ca-pantothenate	8.4	0.38	91	0.96
Biotin	7.1	0.12	91	0.81
Nicotinic acid	8.2	0.86	90	0.81
Inositol	8.3	0.34	90	0.91
All Above	7.1	0.12	90	0.78

※ Per liter

Pepton : 5.0g, MnSO₄ 0.01g, CaCl₂ 0.01g, thiamine HCl : 1.0mg, pyridoxine HCl : 2.0mg,
 Ca-pantothenate : 1.0mg, biotin : 0.03mg, nicotinic acid : 2.0mg, Inositol : 100mg.
 PH : 5.0

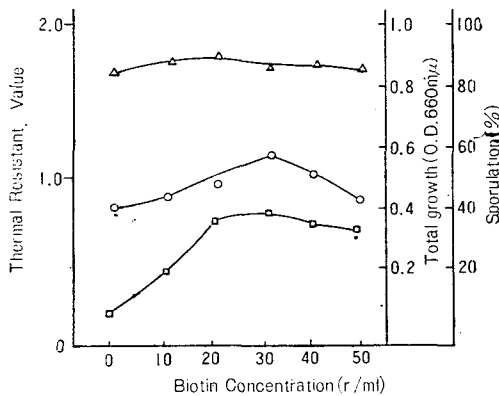


Fig 4. Effect of Biotin Concentrations on Total Growth, Sporulation and Thermal Resistant Value

○ : Thermal resistan
 □ : Total growth
 △ : Sporulation

수한 편이었다.

通氣의 영향을 보기 위하여 一定容量의 500ml 진탕후라스크에 培地量을 各各 다르게 注入하여 진탕 培養하는 方式으로 通氣程度를 調節하여 通氣의 영향을 檢討한 結果 Fig. 6에서 보여주는 바와 같이 生育, 孢子形成率, 耐熱性에 있어서 通氣는 培地量이 적을수록 効果的이었다.

6. 經時的인 効果

以上の 研究 結果로부터 peptone 0.5% dextrin 0.1% CaCl₂, MnSO₄ 各 40ppm, biotin 30r/ml 을

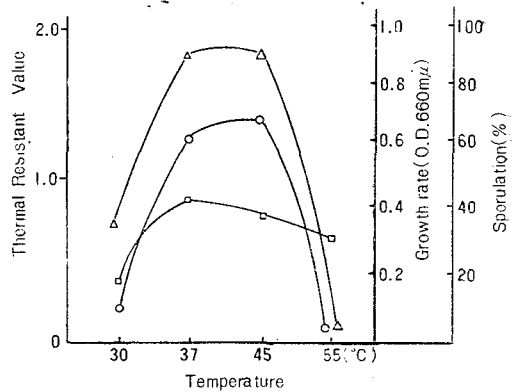


Fig 5. Effect of Growth Temperature on Growth Rate, Sporulation and Thermal Resistant Value of *B. coagulans* Spores.

○ : Thermal resistance
 □ : Total growth
 △ : Sporulation

含有한 培地로 45°C에서 充分한 好氣條件下에 培養하는 것이 菌의 生育, 孢子形成 및 耐熱性에 가장 좋은 效果를 준다는 結果를 얻었다. 그림으로 이들 最適 培地와 基礎培地를 各各 培養하여 經時的으로 菌의 生育, 孢子形成, 耐熱性을 比較한 結果는 Fig. 7과 같다. 菌의 生育, 孢子形成 및 耐熱性孢子形成은 檢討된 最適培地가 基礎培地보다 우수한 效果를 보여 주었다.

菌의 生育은 培養後 10時間이 되었을때 定常期에 이르게되고, 孢子形成은 24時間에서 最高值가

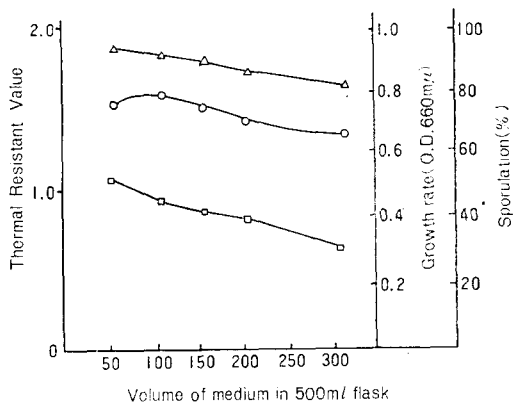
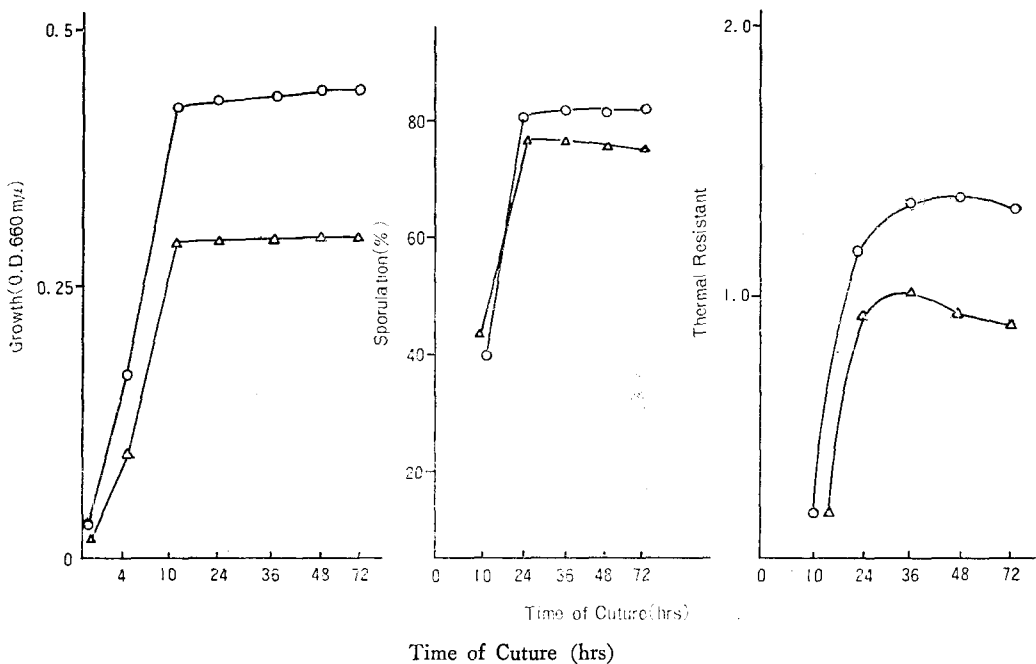


Fig 6. Effect of Aeration on Growth Rate, Sporulation and Thermal Resistant Value of *B. coagulans* Spores.

- : Thermal resistance
- : Total growth
- △ : Sporulation

Fig 7. Time Course of Total Growth, Sporulation and Heat Resistant of *Bacillus coagulans*.



- : Culture conditions resulted from the experiments
- △ : Conventional culture conditions.

된다. 그러나 胞子の 耐熱의 最高値는 30時間이 經過後이었다.

定常期는 營養의 高尙상태의 代謝産物에 依한 生育阻害作用等の 나쁜條件下에서 生진다. 그러므로 上記結果로 부터 *Bacillus coagulans*의 胞子形成은 生育이 나쁜條件下에서 잘 되고, 胞子が 形成된다음 胞子は 成熟되어 耐熱性이 強하여진다고 生覺된다. 그리고 工業的으로 乾燥活性菌을 製造할때, 胞子形成 및 耐熱性向上의 最適條件으로 培養할 必要가 있다.

IV. 結 論

有胞子 젖산균의 食品工業의 應用에 對한 基礎 研究로써 *Bacillus coagulans* . 胞子形成 및 胞子の 耐熱性의 最適 條件을 檢討 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

a) 使用한 炭水化物中 dextrin을 除外한 單糖類 및 二糖類는 胞子形成과 胞子の 耐熱性에 阻害를

주었으며 dextrin 은 増殖에는 效果가 있었으나 耐熱性에는 영향이 없었다.

b) 窒素源으로써 無機鹽類는 좋지 않았으며 peptone, casamino acid 같은 蛋白質 分解物이 效果의 이었다.

c) Mn^{++} , Ca^{++} ion 은 生育, 孢子形成, 耐熱性에는 큰 效果가 있었으며 그 最適濃度는 30r/ml였다.

d) Vitamin 中 biotin 이 菌의 生育, 孢子形成, 耐熱性에 큰 效果가 있었으며 그 最適濃度는 30r/ml였다.

e) 培養溫度는 37~45°C에서 效果가 있었으며 通氣를 充分히 할수록 좋았고 培養時間은 36時間 以上으로 하는것이 좋았다.

參 考 文 獻

- (1) Ball, C. C.: *Bull. Natl. Research Council*. 7. Part 1, 37, 76 (1923).
- (2) Baumgartner, J. C.: *J. Bact.* 36, 369 (1938).
- (3) Sognefest, P., Hays, G. L., Wheaton, E. and Benzamin, H. A.: *Food Research*, 13, 400 (1948).
- (4) Anderson, E. E., Esseleu, W. B. and Fellers, C. R.: *Food Research*, 14, 499 (1949).
- (5) Metchnikoff, E.: *Ann. Inst. Pasteur*, 22, 929 (1908).
- (6) Horowitz-Wlassowa, L. M. and N. W. Nowotelnow.: *Zentrabl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Ast II*. 87, 331. (1932).
- (7) Werkman, C. H. and A. A. Anderson.: *Abstr. Bacteriol.* 35, 69 (1938).
- (8) Renco, P.: *Ann. Microbiol.* 2, 109 (1942).
- (9) Nakayama, O.: *The Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamahawa University*. (1960).
- (10) Nakayama, O. and M. Yanoshi.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13, 139 (1967).
- (11) Kitahara, K. and J. Suzuki.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18, 99 (1963).
- (12) Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith N. R.: "Bergey's manual of Determinative Bacteriology" 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore. (1974).
- (13) Postgate J. R.: Academic Press (London). (1971).
- (14) Vinter, V.: "The Bacterial Spore" Academic Press Inc. (London). 87 (1969).
- (15) Donnellan, J. E., Nags, E. H. and Levinson, II. S.: *J. Bact.* 87, 332~336. (1964).
- (16) Amaha, M. and Ordal Z. J.: *J. Bact.* 74, 596 (1957).
- (17) El-Bis, II. M. and Ordal. A. J.: *J. Bact.* 71, 10 (1956).
- (18) Murrell, W. G. and Warth, A. D.: *Am. Soc. Microbiol.*, Ann. Arbor, Michigan, U. S. A. (1965).
- (19) Sugiyama, II.: *J. Bact.* 62, 50 (1951).