- (5) 松山芳彦, 志村憲助, 副島正美: 農化, 24, 222 (1951).
- (6) T. BERSIN: *Biochem. Z.*, 278, 340 (1935).
- (7) A. K. BALLS: *Nature*, 144, 513 (1939); *J. Biol. Chem.*, 130, 669 (1939).
- (8) T. BERSIN, H. KOSTER: *Z. physiol. Chem.*, 235, 12 (1935).
- (9) H. BORSOOK, E. L. ELLIS: *J. Biol. Chem.*, 117, 237 (1937).
- (10) C. A. MAWSON: *Biochem. J.*, 29, 569 (1935).
- (11) A. K. BALLS: *Science*, 86, 379 (1937); *J. Biol. Chem.*, 130, 669 (1939); etc.
- (12) E. S. GUZMAN BARRON: *Advances in Enzymology*, 11, 201 (1951).
- (13) 稲垣長典: 天然物のビタミンC, 6(1948).
- (14) W. H. HAWORTH: *Ergebnisse der Vitamin und Hormonforschung*, 2, (1939).
- (15) W. H. HAWORTH: *Nature*, 130, 847 (1932).
- (16) J. M. SNELL and A. WEISSBERGER: *J. A. C. S.*, 61, 450 (1939).
- (17) A. K. BALLS: *J. Biol. Chem.*, 130, 669 (1939).
- (18) H. L. FRAENKEL-CONRAT: *J. Biol. Chem.*, 152, 389 (1944).
- (19) 渡辺稔, 岡田邦夫, 森 量夫, 伊藤信夫: 防虫科学, 1, 17 (1952).
- (20) T. POSNER: *Ann.* 336, 85 (1904).
- (21) J. W. PATTERSON and A. LAZAW: *J. Biol. Chem.*, 177, 197 (1949).
- (22) K. H. GUSTAVSON: *Advances in Protein Chemistry*, 5, 411 (1949).
- (23) M. BERGMANN: *Advances in Enzymology*, 2, 49 (1942).
- (24) H. OHLE u. R. WOLTER: *B.*, 63, 843 (1930).
- (25) H. ERADMANN: "Anleitung z. Darst. org. Präparate. Stuttgart" (1894).
- (26) WILLSTÄTTER: *Ber.*, 41, 2580 (1908).
- (27) BLOCK "The determination of the amino acids" (New York) (1940).

Summary

(1) The effects of ascorbic acid and allied substances on papain activity was investigated. Dehydro- and monoacetone derivative of ascorbic acid showed strong inhibitory action, while its osazone had no effect.

(2) Methylene blue showed some inhibitory action for papain activity, but the degree of the action was less than ascorbic acid.

(3) Adrenalin, *o*-quinone, *p*-quinone and quinhidrone were the most strong inhibitors, followed by gallic acid, digallic acid, pyrogallol, pyrocatechine, hydroquinone. Phloroglucine, and resorcin inhibited papain activity, to some degree, but dimethylhydroquinone, guajacol, thymol and nitranilic acid had no effect.

(4) The inhibition of papain activity by the above mentioned inhibitors was regenerated by H_2S .

蔗糖類のアセトン ブタノール醗酵に対する鐵の影響 (第3報)

Bacteriophage 存在する場合ブタノール醗酵菌に対する影響

星 野 一 雄 (協和醗酵工業株式会社防府工場)

昭和 27 年 10 月 27 日 受理

The Influence of Iron for the Acetone-Butanol Fermentation on the Sucrose and Molasses Media. Part 3. The Influence upon the Butanol Fermentation Organisms with Bacteriophage.

K. HOSHINO (Kyowa Fermentation Industry Co. Ltd., Hofu Plant)

著者は第1報⁽¹⁾, 第2報⁽²⁾に於てアセトン・ブタノール醗酵醗其の他の分析, 及びフラスコ実験により鉄片及び二価の鉄塩を糖蜜と煮沸することにより醗酵に悪影響を及す阻害物の生成することを示した。このフラスコ実験は bacteriophage の存在しない場合であり, 普通実験中 bacteriophage が侵入, 発生したと思われる現象は先ず経験されないのに反し, 醗酵槽では不可避免的に起りその原因が侵入によるものか, 内部で発生するのかわかり不明である。然しその被害は大きく, 不良醗酵の大半を占めるものであつた。第1報に示した醗酵槽に於けるアセトン収量の低いものも恐らく之に依るものが多いと考えられるが, 醗中の鉄含有量が何れも高い数値を示しているため鉄と共に煮沸して得た培地に bacteriophage を添加した実験を行い, ブタノール醗酵バクテリオファージュに対する鉄の影響を見た。

実 験

菌株、培地、培養、培養時間、分析法は前報に記した。本報に於て使用した菌株は 314 号, KH, T-9, であり Bacteriophage は次の 2 種を使った。

Bacteriophage "a": 1949 年協和醸酵工業防府工場 360 k/ 醸酵槽にて菌株 KH を以て醸酵中 Bacteriophage の現象と認め、その醗をザイツ濾過し、同培地（糖蜜亜麻仁粕培地）と菌株 KH を以て継代今日に至る。それ以前及び戦時中 314 号を以て仕込中しばしば起つた同様の現象は恐らく同じものによると考えられる。菌株 KH, 314 号を犯すも KN, T-9 は不感である。近時やや弱化的傾向があり、添加量と強度を逆に示す事があるが尚 10^{-6} cc (400 cc 培地に対し) 或はそれ以下で充分毒性を示す。

Bacteriophage "c": 1951 年協和醸酵工業防府工場 360 k/ 醸酵槽に於て菌株 T-9 を以て仕込中発生。その醗をザイツ濾過し、T-9 を以て継代今日に至る。作用菌株の範囲広く、314 号, KH, KN, T-9 何れも犯す。

尚 Bacteriophage の強度測定は KUEGER⁽³⁾, GOLD⁽⁴⁾ 及び WATSON 等は Spéctrophotometer を使用し溶菌を読んでいるが、本報では醸酵培地一定量 (400 cc) に Bacteriophage Preparation をフラスコ別に添加し生成するアセトンで比較した。又 Phage Preparation は a, c 共 -10° 乃至 -14° に貯蔵、4~5 日で継代したが、GOLD 等の推奨する -18° が得られず貯蔵中に弱化したと思考される節があり、前後の実験を比較するにやや不適当と考られる憾がある。

実験. 1. 菌株に就て 菌株 314 号, Bacteriophage "a" 及び菌株 T-9, Bacteriophage "c" の両者に就き鉄片と糖蜜とを煮沸した培地を使用して実験した。

Table 1. Difference of Acetone Yield by Strain-No. 314 and Bacteriophage "a" on the Media cooked Molasses and Iron.

k	Bacteriophage "a" added for 400 cc med. (cc)	Med. P		Med. Q		Med. C	
		Acidity	Acetone	Acidity	Acetone	Acidity	Acetone
0	0	5.0	386	4.9	413	3.8	411
1	1	5.0	328	4.4	342	3.6	329
2	10^{-1}	4.6	283	3.8	321	3.6	335
3	10^{-2}	4.6	269	3.8	314	3.6	326
4	10^{-3}	4.8	287	3.6	298	3.6	315
5	10^{-4}	4.8	274	3.4	306	3.4	308
6	10^{-5}	5.3	286	4.0	301	3.1	338
	10^{-6}	5.0	278	4.2	304	3.6	332

Media: Molasses linseed meal media

Fe_2O_3 : P 300 mg/l, Q 160 mg/l, C 30 mg/l

Strain: No. 314 T-X

Table 2. Difference of Acetone Yields by Strain T-9 and Bacteriophage "c" on the Media cooked Molasses and Iron.

k	Bacteriophage "c" added for 400 cc med. (cc)	Med. P		Med. Q		Med. C	
		Acidity	Acetone	Acidity	Acetone	Acidity	Acetone
0	0	3.7	362	3.6	347	3.6	380
1	10^{-1}	5.5	12	5.8	100	4.8	349
2	10^{-3}	4.8	6	5.2	187	3.8	361
3	10^{-5}	4.0	2	3.4	342	3.0	351
4	10^{-7}	4.0	85	3.2	360	3.2	377

Media: Molasses linseed meal media

Fe_2O_3 P 255 mg/l, Q 140 mg/l, C 30 mg/l

Strain T-9

B: 培地 400 cc に対し $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g, 28% NH_4OH 0.3 cc

E 培地 400 cc に対し $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, 28% NH_4OH 0.2 cc
硫安 0.93 g

D 培地 400 cc に対し $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.288 g, 28% NH_4OH 0.3 cc

以上何れも糖蜜蒸煮後添加。

M: B と同組成

F: E と同組成

N: D と同組成、何れも糖蜜蒸煮前に添加する。

(a) 供試菌株: 314 T-X

培地: 糖蜜亜麻仁粕培地。鉄含有量

P: 300 mg/l, Q 160 mg/l, C 30 mg/l

(Fe_2O_3 として)。Bacteriophage "a"

添加量: 培地 400 cc に対し

k 0 1 2 3 4 5 6
0 cc 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}

(b) 供試菌株: T-9

培地 同前, P 225 mg/l, Q 140 mg/l,

C 30 mg/l (Fe_2O_3) Bacteriophage "c"

添加量: 培地 400 cc に対し

k 1 2 3 4

0 cc 10^{-1} 10^{-3} 10^{-5} 10^{-7}

是等の結果は第 1 表、第 2 表の如く、共に鉄と煮沸した培地で Bacteriophage の作用が強まる事を示す

実験. 2. 鉄塩の比較 Fe-salts を糖蜜蒸煮の前後に添加したもの及び鉄片と共に煮沸した培地等に於ける bacteriophage によるアセトン収量の比較を行つた。尚培地の一部を変更した。

基本培地は糖蜜亜麻仁粕培地で次の組成をもつ。

糖蜜 33 g, 亜麻仁粕 1.5 g, 炭酸石灰 0.34 g, 硫安 0.28 g, 全量 400 cc

又 P, Q, C の培地を鉄片と糖蜜を煮沸して作る。是等の培地の鉄含有量は分析, 計算より

C : 30 mg/l. P : 434 mg/l. Q : 299 mg/l. B, M: 456 mg/l. D, N, E, F : 315 mg/l (何れも Fe_2O_3 として)

以上鉄以外の諸成分には変化無い。

(c) 供試菌株 : 314 T-X

Table 3. Difference of Acetone Yields by Strain No. 314 and Bacteriophage "a" on various Media

k	Med. C		Med. E		Med. F		Med. M		Med. D		Med. N		Med. P		Med. Q	
	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone
0	3.7	465	4.6	427	4.2	292	5.3	191	3.9	466	3.7	331	4.6	314	4.6	405
1	4.3	259	5.4	203	6.0	101	6.4	80	6.0	190	6.1	114	6.4	127	6.1	136
2	4.6	263	5.8	188	6.3	122	6.4	104	6.0	172	6.3	108	6.8	114	6.2	142
3	4.2	268	6.1	177	6.1	109	6.6	104	6.0	172	7.3	98	7.0	117	6.5	130
4	3.6	308	5.8	201	6.0	152	6.3	106	5.5	205	5.8	159	6.7	119	6.8	96
5	3.5	304	5.8	216	6.4	143	6.3	117	5.4	180	5.1	202	6.4	127	6.5	115
6	4.0	228	6.8	143	6.6	85	6.4	77	5.8	172	6.1	84	6.9	119	6.4	106

Media : Molasses-linseed meal med. contg. iron as follows

P, Q, C : Cooked molasses with iron

Amt. of Iron P 434 mg/l, Q 299 mg/l as Fe_2O_3

C : Control Fe_2O_3 30 mg/l (from molasses)

E : Added with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 315 mg/l as Fe_2O_3 after cooking of molasses

F : Cooked molasses with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 315 mg/l

M : Cooked molasses with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 856 mg/l

D : Added with $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 315 mg/l after cooking of molasses

N : Cooked molasses with $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 315 mg/l

Strain No. 314 T-X

Bacteriophage "a" 添加量 : 400 cc に対し

k : 0 cc, 0 : 1 cc, 1 : 10^{-1} cc, 2 : 10^{-2} cc, 3 : 10^{-3} cc, 4 : 10^{-4} cc, 5 : 10^{-5} cc.

結果は Table 3 の如く bacteriophage に対し鉄の影響はやや複雑である。Phage の存在しない時は2個の鉄塩を糖蜜と煮沸して生ずる阻害物の為時にアセトン収量の低下を見たが, phage の存在する時は鉄自体も多少影響するかに見える。而して M, F, P, Q, N が更に悪いのは鉄と煮沸する為生ずる阻害物の為阻害が重なり更にアセトン量は低下するのであろう。

Table 4. Difference of Acetone Yields by Volume of Inoculum

		I		II		III	
		Acid.	Acetone	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone
Med. C	k	3.7	419	3.6	405	3.8	406
	1	6.2	256	6.2	243	6.2	164
	2	6.9	156	6.5	196	6.0	218
	3	6.9	127	6.7	133	6.7	156
Med. E	k	4.7	411	5.0	382	4.7	357
	1	6.7	201	6.5	162	7.4	135
	2	7.4	147	8.2	128	7.2	145
	3	8.9	113	10.2	50	8.6	44
Med. D	k	4.2	382	4.1	322	4.2	302
	1	6.2	190	7.0	145	7.7	99
	2	7.0	145	7.2	113	7.9	97
	3	9.1	78	8.1	42	8.6	19
Med. F	k	5.3	369	6.7	144	6.7	116
	1	7.9	140	8.2	127	7.9	99
	2	8.2	124	7.9	104	8.2	98
	3	5.7	346	10.1	139	9.6	126
Med. N	k	4.3	414	4.5	347	7.2	131
	1	7.4	158	8.2	121	8.6	83
	2	7.9	136	8.4	116	8.4	102
	3	8.4	88	7.9	44	10.4	44

Media : Molasses linseed meal med. cf. Table 3.

Strain : 314 T-X

Volume of inoculum . I=40 cc, II=20 cc, III=5 cc

罐培地を使用し Phage の存在する場合の鉄の影響を見た。

実験. 3. 接種量 本培地に接種する量の多少による差を実験した。

供試菌株 : 314 T-X

培 地 : C, D, N, E, F

接種量 : I : 40 cc, II : 20 cc, III 5 cc

Bacteriophage "a"

added for 400 cc media

k : 0 cc

1 : 10^{-1} cc

2 : 10^{-2} cc

3 : 10^{-3} cc

接種量の影響は左程著明でなく, 大体実験2の傾向を再認した。寧ろ Phage を添加しない菌自体に対する差が見られる。又 IF_3 はアセトン収率の異状に良好なもので耐性菌の繁殖と考えた (Table 4)。

実験. 4. 聚落による差 前報実験3. Bacteriophage の存在しない時の菌株内の聚落の差を見た上

Table 5. Difference of Acetone Yields by Colonies against Bacteriophage "a" on Media

Med. C						Med. F							
	K		I		II			K		I		II	
	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone		Acid.	Acetone	Acid.	Acetone	Acid.	Acetone
I	2.9	484	5.1	318	5.4	177	I	5.2	253	5.8	172	5.9	177
II	3.0	418	5.1	200	5.3	210	II	4.9	246	6.0	176	6.0	176
III	5.4	161	6.0	174	5.8	157	III	6.0	100	6.4	168	6.4	147
IV	4.9	354	5.5	195	5.2	194	IV	5.2	214	6.0	149	6.6	144
V	2.7	469	5.6	210	5.0	189	V	5.0	271	5.8	180	6.2	171
VI	3.0	445	5.1	214	5.0	171	VI	5.0	239	5.8	190	5.8	172
VII	5.0	176	6.1	166	6.1	159	VII	6.2	109	6.6	157	6.6	150
VIII	2.9	460	5.0	254	5.4	180	VIII	4.8	247	5.7	205	6.2	131
IX	4.2	316	5.5	204	6.5	158	IX	5.8	152	7.0	109	6.2	142
X	2.4	434	4.8	206	5.1	189	X	5.0	258	6.0	185	6.4	179
XI	5.2	160	6.0	157	6.0	168	XI	6.1	127	6.6	143	6.3	142
XII	5.0	152	6.0	171	5.6	165	XII	6.2	118	6.6	151	6.4	138
314-T	4.5	338	5.6	233	5.6	170	314-T	4.7	205	5.6	190	6.0	168

Strain : No.314 T and its colonies (I-XII).

Media : Molasses linseed meal med. cf. Table 3.

供試菌株 : 314-T

培地 : C, F

Bacteriophage "a" :

added for 400 cc media k : 0 cc. 1 : 10^{-1} cc. 2 : 10^{-4} cc

Bacteriophage の添加により良株は C, F 何れの培地でも収量を減ずるが、劣株は殆ど不感、若くは F の培地でアセトンを増す事は興味深い (Table 5)。

考 察

鉄と糖蜜とを蒸煮する事に依つて生ずる阻害物の為 bacteriophage 単独よりも更にアセトン収量の低下することは明である。この阻害物は phage の無い時も酸酵に悪影響を及ぼす事より直接 phage 生成に与るものではないと考えられる。然し鉄の罐で原料を蒸煮する工場に於てはこの阻害物の phage 増強は阻害物の菌自体に対する悪影響と共に注意すべき事柄である。

著者は前報に於て菌株中の良株と劣株は単に彷徨変異によるものでない事を推測したが、実験 4 に見る如く、Bacteriophage に対しても二者は相異を示し劣株は不感である。之は良株と劣株が遺伝的に相当異なるものである事を示すものと思ふ。

総 括

1. 鉄と糖蜜と共に蒸煮して生ずるブタノール酸酵阻害物は bacteriophage 存在する時も働き、phage 単独の場合に比し更にアセトン収量を低下する。
2. 2 価の鉄塩により阻害物を生じ、bacteriophage の作用を増す
3. ブタノール酸酵菌株中に存する生酸菌は Bacteriophage に不感である。

本実験を行うに当り御懇篤なる御指導を賜りし東京大学農学部教授、農学博士坂口謹一郎先生、並に実験の便宜と援助を与えられた協和酸酵工業社長、工学博士加藤弁三郎氏に深甚なる感謝を捧ぐ。

- (1) 星野一雄 : 農化, 27, 222 (1953).
- (2) 星野一雄 : 農化, 27, 225 (1953).

- (3) KRUEGER : *J. Gen. Physiol.* 13, 557.
- (4) GOLD and WATSON : *J. Bact.*, 59, 13.

Summary

1. The inhibiting substance, produced by cooking molasses with iron lowered the acetone yield with bacteriophage compared with bacteriophage only.
2. The inhibiting substance, produced by cooking molasses with ferrous salt seems to increase the titer of bacteriophage.
3. The high acidity organism in butanol producing strain was not affected by bacteriophage which attacked the high acetone yield organism in the same strain.