1. 最高耐熱点は成熟度にしたがつてより高くに轉移し
2. 最良の HS 効果のための受熱感度適量は一般に最高耐熱点より低く、これも成熟度にしたがつてより高くにずれ
3. 旺盛に醗酵する細胞群をえるためには、成熟度と受熱量との相関で求められる受熱感度最適点が存し、*Clostridium acetobutylicum* 314 では成熟度については培養中大部分の細胞が遊離胞子になった時が最適で、約半数が clostridia になった時期がこれにつぐことが明かにされた。

終りに御指導を戴いた山崎教授並びに菌株を分譲頂き御意見御鞭撻を戴いた東大坂口教授に深謝する。なお研究費の一部は文部省科学研究費による。

(1) S. C. PRESCOTT, C. G. DUNN : Ind. Microbiol., 320 (1949).	(4) D. R. GODDARD, P. E. SMITH <i>Plant Physiology</i> , 13, 241 (1938).
(2) E. R. WEYER, L. F. RETTGER <i>J. Bact.</i> , 14, 399 (1927).	(5) 本江元吉 : 本誌, 24, 119 (1951).
(3) 土井新次, 山田武雄 : 本誌, 16, 985(1940).	(6) 坂口謹一郎, 天羽幹夫 : 本誌, 25, 104, 140 (1951).

ブ タ ノール 醗 酵 (第 3 報)* 育 成 (その 1)

本 江 元 吉 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭 和 31 年 6 月 18 日 受 理

ブタノール菌株取扱い上の特徴の 1 つは所謂育成である。これらの菌株は環境の酸化還元電位的影響や培地の栄養源の影響に鋭敏に感応する。それは前報⁽¹⁾した胞子の発芽や細胞の生育でだけではなく、醗酵でも醗酵速度の緩急や生成物量比の轉移などとなつて現れる。緩慢醗酵や酸醗酵は典型的なものである。影響因子には培地の緩衝能の不足や醗酵正常化物質の欠減、雑菌やバクテリオファージの汚染、或は種母の生理的不良などがある。このうち種母の状態を良くして醗酵の異常化を避け出来るだけ醗酵速度を増すこと、そのような種母を仕立てること、を育成という。

これらの菌株では強いことと醗酵力が旺盛であることとは必ずしも一致しない。Heat shock (以下 HS と略) して胞子を基にした培養では、醗酵速度は低く粘質物の生成が著しく緩衝能の少い培地で酸醗酵化の傾向がある反面、細胞のブタノール抵抗性は大で糖消費率も高く、所謂強いという表現にあてはまる。一方、これから HS なしに数回移植 (以下移植とは HS しないものの意) した培養では、ブタノール抵抗性は減じて糖消費率がやや低くなる反面、粘質生成は弱まり酸醗酵化の傾向も減少し醗酵速度は高まつて、所謂旺盛な醗酵力を呈する。更に移植を続けると湧き付きは早いが醗酵速度は却つて低くなつて醗酵は緩慢になり時には中絶するなど極端に弱化して行く。このブタノール抵抗性 (糖消費率) と醗酵速度 (糖消費速度) という相反する 2 項を制御均衡させて最適点を主醗酵に求めるのが育成の要点となる。

種母の生理について検せられていたのは⁽²⁻¹⁶⁾、胞子から出発して何回移植した培養を使えばよいかということ、主醗酵直前の培養でどの時期に接種に使えばよいかということとであつた。前者については、澱粉質の醗酵⁽²⁻⁶⁾では 3~7 回、糖質の醗酵^(12,13)では澱粉質培地での移植 4~6 回が適当と報ぜられた。後者については、澱粉質の醗酵で減酸初期を採る多数の説^(4,7-10)に対し最低酸度期の培養接種で醗酵期間が最も短くなることが指摘され⁽¹¹⁾、蔗糖の醗酵でも同様と確められ⁽¹⁶⁾、また玉蜀黍培養での酸化還元電位の低い時期が蔗糖醗酵用接種に良好と報ぜられた⁽¹⁵⁾。奇妙にも移植回数と接種時期との相関で最適点を求めようとする試みは全く行われず、前者では一律に 24 時間毎の移植が行われ、後者では単に主醗酵直前の培養でだけその接種時期の影響が検せられていた。一方、蔗糖醗酵では特殊の育成法が呈示されていた⁽¹⁷⁾。それは緩衝能の少い蔗糖培地での酸醗酵中絶

* Butanol Fermentation. Part III. A Technique of Inoculum-development Method (1).
By Motoyoshi HONGO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyushu University)

から復活した培養を獲ることを特徴とする法で、更に蔗糖培地で 3~4 回移植 (24 時間毎) して主醱酵に用いられた。

以上の諸法を検討し、移植の時期と代数との相関的な影響を検して、育成技法に指針を得るために、以下の実験を行った。実施当時の特殊事情から基礎実験には糖質として蔗糖を用いたが、この育成概念は単に醱酵期間短縮にだけでなく、糖質のブタノール醱酵工業に起りがちな醱酵の異常化に抗して強壮な種母を仕立てるに当つても、また新菌検索に際して分離菌株の性能試験に当つても、常に深く留意しなければならない処であるので、ここに育成現象の酸化還元電位の考究や糖蜜醱酵での検討をも加えて連報することにした。本報では、先ず従来法の検討及び以後の実験の方法的基礎となるガス出量と酸度変化との関係について報ずる。

実 験

I. 使用菌株

東大 314 及び 179. 両株共 *Clostridium acetobutylicum* (WEIZMANN) MCCOY, FRED, PETERSON et HASTING に属する。前報⁽¹⁾のように前者は純一性の保証されたもの、後者には好気性菌が混在する。

II. 従来諸法の検討

A. 玉蜀黍培地移植法 a. 糖質醱酵の速度に及ぼす影響：実験法と結果は第 1 表に示す。314 株でも同様。

第 1 表 玉蜀黍培地での 24 時間移植が糖質主醱酵の醱酵速度に及ぼす影響
菌株：179, 移植培地：5% 玉蜀黍醱酵、糖質主醱酵；蔗糖 6%, 大豆粕 0.6%, CaCO_3 0.3%, Speakman 塩液, 方法：玉蜀黍醱 37°, 24 時間培養を次代玉蜀黍醱に移植すると同時にその 10 ml を糖質主醱酵 300 ml に接種。醱酵温度：37°, 醱酵経過は発生ガス量により察知。

種母移植回数	発生ガス量 g/300 ml () 内は含量					
	1	2	3	4	5	5 HS*
醱酵期間 (日)	1 1.90	2.40	2.23	2.07	2.19	0.60
	2 3.30(5.20)	3.27(5.67)	3.69(5.92)	4.75(6.82)	5.43(7.62)	2.22(2.82)
	3 2.12(7.32)	2.73(8.40)	2.73(8.65)	3.20(10.02)	2.37(9.99)	4.17(6.99)
	4 2.45(9.77)	2.07(10.47)	1.73(10.38)			2.30(9.29)
	5 0.83(10.60)					1.46(10.75)
ソルベント収率%	33.6	34.6	35.6	36.2	35.0	32.0

* 移植 4 回 48 時間培養を移植して HS

即ち、いずれも正常醱酵、従来示されたように当初 4~5 日を要した醱酵期間は 4~5 回移植で 3 日前後に短縮される。また移植を経るに従つて発生ガス全量はやや減ずるが、これを HS すると期間及

第 2 表 玉蜀黍培地での 24 時間移植が糖質主醱酵の強さに及ぼす影響

菌株：314, 主醱酵糖；蔗糖 12%, 大豆粕 1.2%, CaCO_3 0.3%, Speakman 塩液, 醱酵温度：37°.

種母移植回数	1		5	
	接種後時間		接種後時間	
醱酵経過 (ガス量 g/300 ml)	14	0.57	1.36	
	23	2.84(3.41)	4.32(5.82)	
	39	4.73(8.14)	11.58(17.40)	
	63		2.79(20.19)	
	70	6.49(14.63)		
	90	4.93(19.56)		
醱酵液の分析	113	1.65(21.21)		
	アセトン g/100ml	1.06	1.09	
	ブタノール "	1.44	1.25	
	エタノール "	0.29	0.50	
残糖	0.37		1.14	

びガス量は旧に復する。多数の検討中時には 2 日余りで終了することもあるが常には期待できない。また移植何回目にも最短のものが表われるかは不明で偶発的である。

b. 糖質醱酵の強さに及ぼす影響：玉蜀黍培地で移植 1 回の培養と 5 回の培養とを種母にした蔗糖醱酵の強弱性を比較。差を顕著にするため 12% 糖濃度醱 (300 ml) で行い接種後 14 時間目に活性炭添加。分析は液部についての第 2 表に示す (活性炭添加高糖濃度醱酵は別報)。即ち、移植を経たものは醱酵速度は増すがブタノール抵

第 3 表 糖質培地での 24 時間移植が糖質主醱酵の醱酵速度に及ぼす影響

菌株：314, 主醱酵蔗糖醱；6%, 醱酵温度：37°

種母移植回数	発生ガス量 g/300 ml					
	1	2	3	4	5	6
醱酵期間 (日)	1 2.10	2.03	2.61	1.60	1.63	1.45
	2 2.82(4.92)	4.15(6.18)	4.08(6.69)	5.60(7.20)	5.42(7.05)	5.33(6.78)
	3 2.11(7.03)	2.85(9.03)	2.92(9.61)	2.47(9.67)	2.70(9.75)	3.02(9.30)
	4 1.97(9.00)	1.09(10.12)	0.31(9.91)	0.03(9.70)		
	5 1.22(10.22)					
	6 0.18(10.40)					
ソルベント収率%	32.0	33.5	34.6	35.0	35.0	35.3

抗性は弱く液中生成ブタノール濃度は低く残糖が多くなる。

B. 糖質培地移植法 或基質代謝実験で、同基質含有培地に使用菌株を繰返し移植培養してその基質代謝能を増させ

ようとする所謂馴養は、菌学領域で普通に試みられる処である。検討のため、移植を主醗酵と同一組成の蔗糖培地 10 ml で行つた。結果は第 3 表に示す。この例は最も普通に表れるもので時には 4~6 回移植でも 4 日に及ぶ。179 株でも同様。即ちこの操作では醗酵速度増加の効果は玉蜀黍培地で移植するのと同様或はそれ以下であつて、醗酵期間の短縮は生細胞の移植に基くものであり糖質への馴養の効果が表れるものとは認められない。

C. 特殊育成法 玉蜀黍培地で HS を数回反覆した培養を前記蔗糖醗 (但し CaCO_3 無添加) に接種すると、湧き付いた醗酵は緩衝能不足のためやがて中絶する。これに極少量の CaCO_3 を添加すると再び醗酵し始める。醗酵が旺盛となる時ヘッド部半量液部半量の割に 10 ml を採り、蔗糖醗 300 ml に接種し CaCO_3 1 g を添加、以下 24 時間移植を継続する。結果は第 4 表に示す。179 株でもほぼ同様。即ち、移植 3~5 回で 2~3 日間で醗酵を終了。移植何回目かに 2 日終了が表れるのは多数実験中の約半数。前の A や B 法に比べて醗酵速度増進の

第 4 表 特殊 育 成 法

菌株: 314 → で移植, 糖: 6% 蔗糖, 大豆粕, 醗酵温度: 37°

種母移植回数	CaCO ₃ 無添加 特殊 醗 酵	発 生 ガ ス 量 g/300 ml				
		1	2	3	4	5
1	1.36	2.03	2.95	4.13	3.70	4.55
2	0.67(2.03) 0.05(2.08)	3.28(5.31)	5.60(8.55)	5.50(9.63)	6.24(9.94)	4.35(8.90)
3	CaCO ₃ 0.4g 添加	2.20(7.21)	1.10(9.65)	0.30(9.93)		1.33(10.28)
4	0.18(2.26)	2.13(9.64)				
5	0.83(3.09)					
6	1.72(4.86)					
ソルベント収率%		35.8	36.0	36.4	35.4	35.8

第 1 図 糖質の醗酵でのガス量と酸度との関係
(a) 醗酵速度の増進していない培養 (玉蜀黍 HS 培養接種)

1: 314 株ガス曲線 3: 179 株ガス曲線
2: 同上 酸度曲線 4: 同上 酸度曲線

第 2 図 糖質の醗酵でのガス量と酸度との関係
(b) 醗酵速度の増進している培養 (移植回数 5 回の玉蜀黍培養接種)

1: 314 株 (移植 5 回) ガス曲線 4: B.G.P. 株 (移植 3 回) 酸度曲線
2: 同上 酸度曲線 5: 179 株 (移植 4 回) ガス曲線
3: B.G.P. 株 (移植 3 回) ガス曲線 6: 同上 酸度曲線

第3図 玉蜀黍の醗酵でのガス量と酸度との関係

玉蜀黍醗度：4.8%（全糖）

1：314 株（移植3回）ガス曲線

2：同 上 酸度曲線

3：179 株（移植4回）ガス曲線

4：同 上 酸度曲線

第5表 糖質の醗酵でのガス量と酸度との関係

(c) 高糖濃度（12%）培養

菌株：314（移植8回）活性炭 17g 添加

培養時間	13	17	20	23	25	46	90
酸 度	4.70	4.30	3.60	2.60	2.20	3.00	3.20
ガス量	2.10	3.11	4.29	5.59	6.45	9.83	20.50

塩液，炭酸石灰の醗を使用。

a. 醗酵速度の増進していない培養：第1図に示す。

b. 醗酵速度の増進している培養：第2図に示す。即ち，正常醗酵する培養では WEIZMANN 型であればその菌株や移植回数（醗酵速度）に無関係にガス量と酸度との間には一定の関係があり，例えば蔗糖 6%濃度で醗 300 ml 当りガス量 2 g 前後が最高酸度期に，6 g 前後が最低酸度期に相当する。

c. 糖濃度の高い培養：第5表に示す。即ち，ガス量と酸度との関係は全く同じに当はまり糖濃度にも無関係である。つまり，醗中の糖量の何分の1が醗酵された時に或一定酸度期が相当するというのではなく，醗の容量に対するガス量（培養の単位容量当りの消費糖量）で酸度期が推定できる。

B. 澱粉質 玉蜀黍醗を使用。第3図に示す。即ち，酸度曲線が糖質でより多少前にずれるが，やはり 2 g/300 ml 足らずが最高酸度期，6 g/300 ml 足らずが最低酸度期である。

効果はより大であるが，それがこの酸醗酵を経る特殊操作にのみ起因するとするには，移植回数の少い培養での醗酵期間が両法に比べて短縮されていないことに不確かさがあり，また移植にヘッド半量液半量の割に種母を採るのは，常の移植に比べると，著しくヘッドが多く種母細胞を極めて多数に接種したことになり，そのために表れた効果とも考えられる。つまり本法の特徴である当初の酸醗酵を経る操作はブタノール生成系の発現と機能とを確実にすることにあるとみられ，その後の醗酵速度の増進はより多量の細胞移植による効果と一応考えられる。然しこの点については再検を要する。本法でも一連の移植の中で何回目かに2日間で醗酵を終るものを得ることを常に期待することは困難であり，また移植何回目に最短醗酵期間のものが表れるかは不明で偶発的である。

III. ガス量と酸度との関係

従来の諸法では，どれも移植を時間できめて培養経過の時期には注意が払われていなかった。この種母の生理状態についてはただ主醗酵直前の培養だけに対して滴定酸度或は酸化還元電位を示標として考慮されていた。酸度は測り慣れており工場ではこれによつていたが，実験室では煩雑で秤量ですむガス量測定が便利であつた。然し両者の関係は検討されていなかった。一定関係があれば，行おうとする育成技法検討に実験操作が簡易化されるばかりでなく，実験室での醗酵量の秤量と工場での醗の酸度滴定とが結びつけられるので諸種の操作や推論にもたらされる利点は少くないと考えられた。それで，糖質及び澱粉質の醗の醗酵でこれを検した。

A. 糖 質 蔗糖，大豆粕，Speakman

以上を要するに、正常醗酵であれば糖質でも澱粉質でも醗濃度及び菌株更に移植回数に関係なくガス量と酸度との間に一定関係が認められた。従つて実験室的には簡便な秤量によつて酸度期が察知され、またこの実験室的結果を酸度によつて工場の操作に移すことができることが明かになつた（単位時間当りのガス量と酸度との関係は酸化還元電位との関係を附して後報する）。

総 括

1. ブタノール醗酵の種母仕立てに際して、菌の生理状態に留意して異常化を防止し、互に逆の傾向にある糖消費の率と速度とを制御均衡させて最適点を主醗酵に求めることを育成という。

2. この育成について従来呈示された諸法を検討し、そのいずれもが推測的であることを指摘し、技法についての盲点の 1 つは 2 因子をなす移植回数と移植時期とを結びつけた検討がなかつたことであると示した。

3. 技法検討の利便のため、発生ガス量と滴定酸度との関係を検し、その間に一定関係があり、各酸度期に対応するガス出量は培養容量によつて規制され、菌株、基質、糖濃度及び醗酵速度によつて左右されない（例えば最高酸度期及び最低酸度期は醗 1 l 当りガス出量それぞれ 6.6 g 前後及び 20 g 前後に対応する）ことを明かにした。

終りに御指導を戴いた山崎教授並びに菌株を分譲頂き御意見御鞭撻を戴いた東大坂口教授に深謝する。なお研究費の一部は文部省科学研究費による。

(1) 本江元吉：本誌，24，119 (1951)。	(10) 樋田秀雄，曾和徳雄等：本誌，18，785 (1942)。
(2) H. B. SPEAKMAN：Ind. Eng. Chem., 12, 581 (1920)。	(11) 井上七雄：本誌，20，74 (1944)。
(3) E. R. WEYER, L. F. RETTGER J. Bact., 14, 399 (1927)。	(12) L. A. UNDERKOFER, L. M. CHRISTENSEN, E. I. FULMER：Ind. Eng. Chem., 28, 350 (1936)。
(4) D. A. LEGG：U. S. Pat. 1,668,814(1928)。	(13) 山崎何恵：農化大会講演 (1939)。
(5) 湯川又夫，堀江重美 本誌，15,609(1939)。	(14) H. D. SEN, B. C. JOSHI C. A., 37,6082 (1943)。
(6) C. M. ARTIGAS, A. M. JANÉ C. A., 44, 5060 (1950)。	(15) 星野一雄 本誌，19，405 (1943)。
(7) 土井新次，山田武雄：本誌，16,935(1940)。	(16) 杉山正雄，川野義雄，長瀬俊三郎 醸工，23, 12 (1945)。
(8) 朝井勇宣，小島隆吉，渡辺勇：本誌，17，959 (1941)。	(17) 山崎何恵：九大化学集談会講演 (1942)。
(9) 大谷昌久 本誌，16，985 (1940)。	