ブタノール 醗酵 (第 18 報)*

五炭糖の醗酵での Neutral red 添加によるソルベント量比変転

本 江 元 吉 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 32 年 7 月 31 日 受 理

五炭糖のブタノール醗酵は、当初には糖の消費も不十分な異常醗酵とされた⁽¹⁾が、次いで醗酵速度が低くソルベントは少いが正常醗酵であると証せられた⁽²⁾。続いて、アラビノースではアセトンが多く、アセトン:ブタノール:エタノール (以下 A:B:E と略) がグルコースでの 30:60:10 に対し 40:50:10 になると指摘された⁽³⁾。一方、同じ五炭糖のキシロースではグルコースと同じ 30:60:10 であると示された⁽⁴⁾。その後もこの事実は再認されている⁽⁵⁾。

他方、前報⁽⁶⁾したように、グルコースの醗酵に redox dye の Neutral red を添加すると、アセトン生成がブタノール生成に転換される。この dye をこの種の五炭糖の醗酵に用いるとどうなるか、その結果をここに報ずる。

実 験

使用菌株: 単孢子分離によって純粋にした *Clostridium acetobutylicum* 314 株⁽⁷⁾。分析法: 常法 (前報)。

I. 通常醗酵 今までに報ぜられた事実を本菌株について確認するため、常法によって醗酵試験を行った。結果は第 1 表。すなわち従来示されたように、醗酵期間は長く、キシロースではソルベント間の量比はグルコース⁽⁸⁾とほぼ同一であるのに、アラビノースではアセトンが多く 37:47:16 になる。

第 1 表 五炭糖の醗酵

醗酵組成: 糖 5%, 大豆粕 0.5%, Speakman 塩, 接種時に炭酸石灰 0.3%, 150 ml. 種菌: 玉蜀黍培地で heat shock 培養後, 本醗と同組成の培地で行った培養 15 ml. 培養, 醗酵温度: 37°.

基 質		キシロース	アラビノース
醗 酵 期 間 日		10	7
酸 度		4.0	4.1
糖 消 費 率 %		93	97
生 (対消費糖) 成 率 (ソルベント計)	アセトン %	9.3	11.4
	ブタノール %	18.9	14.6
	エタノール %	2.3	4.9
	(ソルベント計) %	(30.5)	(30.9)
	酪酸 %	3.4	1.2
率	酪酸 %	5.1	6.2
	計 %	39.0	38.3
A:B:E		30:62:8	37:47:16

II. 五炭糖活性菌体 実験には炭素収支計算のため生菌体を用いようとするのであるが、既報⁽⁹⁾の方法にしたがって、本菌の大豆粕分解液を窒素源にしグルコースまたは麴汁を炭素源にした培地から得られる菌体が、果してそのまま五炭糖に対して活性であるかどうか疑問である。一面、培地に五炭糖を要するとなると経費がかさみ今後ともこの種の研究に困難が加わる。検討の結果、次のことが明らかになった。すなわち、アラビノース活性菌体については、培地にアラビノースを用いたときと、麴汁を用いたときとでは、取得菌体をアラビノース液に懸垂した直後には前者の方がよい。

が、醗酵経過や終了までの時間をみると、両者にほとんど差がない。キシロース活性菌体については、キシロース液に懸垂して醗酵開始に要する時間はキシロースを単用した培地またはこれと麴汁を併用した培地から取得された生菌体が最も短く、麴汁使用培地からの菌体がこれに次ぎ、グルコースを用いた培地からの菌体が最も長い。以上の点を考慮し、経費の点から培地の炭素源としては麴汁を用いることにした。

III. 生成物量比変転 各種の糖は 3% 前後にし、表示濃度になるように Neutral red M/100 液を加え、この 50 ml に 200 ml の培養から減酸期に取得した生菌体を 2 回洗滌して懸垂し、炭酸石灰 0.1 g を加えて 37° で醗酵させた。操作の詳細は既報⁽⁹⁾。

(1) グルコースの醗酵: 結果は第 2 表。ソルベント収率は多少低いが、これは菌体の還元能が低く炭酸石灰の添加によって酸固定が幾分増したためである。このため対照でのアセトン収率が低く、量比は 24:66:10 で正常の 30:60:10 より多少ずれている。C₂-化合物としてモル%は 195~196 で、生成物のほとんど大部分が定量され、またその全量としては Neutral red を添加しても差違がないことが示されている。Neutral red の添加と増量にしたがって、ブタノールや酪酸が増し、アセトン、酪酸、エタノールが減っている。量比は 12:82:6 までずれている。

* Butanol Fermentation. Part XVIII. Change of Solvent-ratio by Addition of Neutral Red in the Fermentation of Pentose.

By Motoyoshi HONGO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

第 2 表 グルコースの醗酵での Neutral red 添加によるソルベント量比
変転

実験条件：本文記載

Neutral red 濃度 mM	0	2	6
醗酵 { ガス量 1 日	0.69	0.48	0.23
経過 { g/50ml 2 "	0.75	0.73	0.63
3 "			0.71
酸 度	1.1	1.7	1.3
糖 消 費 率 %	97.6	98.2	98.1
	% ^a M% ^b	% ^a M% ^b	% ^a M% ^b
アセトン	7.4 46.1	4.8 29.9	3.9 24.2
ブタノール	20.4 99.1	21.4 104.1	25.5 124.1
エタノール	3.0 11.9	2.8 11.0	1.9 7.5
(ソルベント計)	(30.8)	(29.0)	(31.3)
酪酸	4.4 17.9	7.4 30.4	6.2 25.3
醋酸	7.1 21.2	6.6 19.8	4.8 14.4
計	42.3 196.2	43.0 195.2	42.3 195.5
A : B : E	24 : 66 : 10	16 : 74 : 10	12 : 82 : 6

a: 消費糖に対する収率。 b: C₂-化合物に換算して消費糖に対して求めたモル%第 3 表 キシロースの醗酵での Neutral red 添加によるソルベント量比
変転

実験条件：本文記載

Neutral red 濃度 mM	0	2	6
醗酵 { ガス量 1 日	0.09	0.12	0.05
経過 { g/50ml 2 "	0.59	0.60	0.48
3 "	0.65	0.66	0.61
酸 度	3.1	2.7	2.3
糖 消 費 率 %	78.8	80.6	91.7
	% ^a M% ^b	% ^a M% ^b	% ^a M% ^b
アセトン	5.6 28.9	3.3 17.0	1.8 9.3
ブタノール	14.7 59.6	16.8 68.2	24.2 97.7
エタノール	1.6 5.5	1.8 5.8	1.5 4.9
(ソルベント計)	(21.9)	(21.9)	(27.5)
酪酸	10.5 35.7	14.6 49.6	11.9 40.7
醋酸	11.0 27.5	7.8 19.4	4.7 11.8
計	43.4 157.2	44.3 160.0	44.1 164.4
A : B : E	26 : 67 : 7	15 : 77 : 8	7 : 88 : 5

a, b: 第 2 表に同じ

第 4 表 アラビノースの醗酵の Neutral red 添加によるソルベント量比
変転

実験条件：本文記載

Neutral red 濃度 mM	0	2	6
醗酵 { ガス量 1 日	0.29	0.31	0.23
経過 { g/50ml 2 "	0.63	0.75	0.60
3 "	0.75		0.72
酸 度	3.2	2.4	2.0
糖 消 費 率 %	94.8	98.3	97.5
	% ^a M% ^b	% ^a M% ^b	% ^a M% ^b
アセトン	7.5 38.9	8.3 42.7	7.1 36.9
ブタノール	14.8 60.0	18.9 76.7	21.3 86.4
エタノール	1.5 4.8	1.4 4.4	2.1 6.9
(ソルベント計)	(23.8)	(28.6)	(30.5)
酪酸	5.4 18.3	3.7 12.6	2.8 9.4
醋酸	13.6 33.9	11.4 28.5	10.2 25.6
計	42.8 155.9	43.7 164.9	43.5 165.2
A : B : E	32 : 62 : 6	29 : 66 : 5	23 : 70 : 7
(ソルベント計)	27.2		32.5
(A : B : E)	32 : 61 : 7		19 : 74 : 7

() 内は他の実験

(2) キシロースの醗酵：結果は第 3 表。ソルベント少く酸が多い。数回繰り返したが、この実験法では常に多酸傾向がある。このためアセトンは対照で既に少い。しかし、Neutral red の添加と増量とによってブタノールと酪酸とが増してアセトンと醋酸とが減る程度はグルコースでよりもっと著しく、ソルベント全量としては増し、量比も 26 : 67 : 7 から 7 : 88 : 5 へと著しくずれる。エタノールはグルコースに比べて少く、Neutral red によっても変化しない。生成物の C₂-化合物として消費糖に対するモル%は dye の添加と増量とによって増している。

(3) アラビノースの醗酵：結果は第 4 表。ソルベント少く酸が多い。このため対照で A : B : E は標準の 40 : 50 : 13 ではなく 32 : 62 : 6 になり、ほぼグルコースでの量比を示している。しかし、これは同一実験条件下のグルコースでの量比に比べると明らかにアセトンが多くブタノールが少い。Neutral red の添加と増量とに伴って、ブタノールは増すがアセトンは減らずむしろ酸が少くなっている。したがって、ソルベント量比変転はグルコースやキシロースほどには著しくない。

IV. 総合結果と考察 上述では単にソルベントについてだけ云々したが、変転の考察に当たってはいうまでもなく酸についても考慮しなければならない。これらも含めて考察のために求めた諸種の計算値を第 5 表に示す。一方、本醗酵の化学機構を簡単に中間生成物の炭素数で表すと、現在のところでは第 1 図

第5表 Neutral red 添加による生成物量比変転を考察するための諸値

基質	Neutral red 濃度 mM	グルコース			キシロース			アラビノース		
		0	2	6	0	2	6	0	2	6
1. ブタノール+酪酸 M% ^a		117	135	149	95	118	138	78	89	96
2. アセトン+酪酸 "		67	50	39	56	36	21	73	71	63
3. 1/2		1.7	2.7	3.9	1.7	3.2	6.6	1.1	1.3	1.5
4. C ₄ -化合物 ^b /C ₂ -化合物		4.9	5.3	7.9	3.8	5.3	8.8	3.0	3.9	4.1
5. ブタノール+酪酸/アセトン		2.5	4.5	6.2	3.3	7.0	15.0	2.0	2.1	2.6
6. ブタノール/酪酸		5.5	3.4	4.9	1.7	1.4	2.4	3.3	6.1	9.2
7. 基質 1 M から生ずる H 数		8	8	8	4	4	4	4	4	4
8. 利用 H 数 ^d		4.8	5.2	5.8	3.3	4.0	4.9	3.3	3.5	3.9
								(3.3)		(4.4) ^c

a: C₂-化合物に換算して消費基質に対して求めた M%。 b: アセトンも C₄-化合物に算入。 c: 他の実験例。
d: 生成物から逆算して消費基質 1 M 当り利用された H 数。

1. 六炭糖

2. 五炭糖

第1図 ブタノール酸酵の化学機構を示す略式

() は高エネルギー結合をもつことを示す。 *₂ これと C₂ または C₂' との間にも②反応が考えられる

のように式化される。

Neutral red の添加とその増量による C₄-系還元物の増加(第5表の1, 第1図の①→⑤→⑥と①→⑤→⑦)はどの糖でも明らかであるが、キシロースではグルコースでよりも著しく、アラビノースではグルコースでほど著しくない。アラビノースではアセトン(①→③→④あるいは②→④)の減少がほとんどみられず、酪酸をその先行体の転移固定部と考えて含量をとっても(2), キシロース, 次いでグルコースで著しい減少がみられるのに、アラビノースではそれほど著しくない。この関係は還元型 C₄-化合物とアセトン+酪酸との比(3)をみると一層明白でキシロース, グルコース, アラビノースの順に変転の率が少くなっている。また Neutral red による 2C₂→C₄(①, ②)の増加を, C₄-化合物/C₂-化合物(4)からみると, これもキシロース, 次いでグルコースでは著しいのにアラビノースではそれほど著しくない。更に, アセトン生成の減少と C₄-系還元物の増加*

を、ブタノール+酪酸/アセトン (5) からみると、これもキシロースでごく著しく、グルコースがこれに次ぎ、アラビノースではそれほど著しくない。これに反して、酪酸生成のブタノール生成への転移を、ブタノール/酪酸 (6) からみると、キシロースでは僅少、グルコースではむしろ減少しているのに、アラビノースでは著しい。つまり、Neutral red によって、キシロースでは、ブタノールと酪酸が増しアセトンと醋酸が減っていて、グルコースでの変転と同じでむしろそれより著しい。ただエタノール生成には変化がない。アラビノースでは、アセトンは減らず、酪酸と醋酸が減ってブタノールが増している。これは、アラビノースではアセトンと醋酸の生成傾向が強く、Neutral red の添加によってもこれを C_4 -還元傾向へ転換できないためと考えられる。アセトンが①→③→④の経路ではなく②→④を経てつくられると考えると、アラビノースでは醋酸が多いので C_4 よりも C_4 を生成する傾向の方が強いわけであって**アセトンが多く、また Neutral red が呈する還元増加は C_4 に対してのみ有効であると考え、この糖ではその C_4 -系還元効果が少なかったことが首肯される。

なお、第 1 図の 2 に示した五炭糖の $C_5 \rightarrow C_3 + C_2$ 分割は、乳酸菌や大腸菌によるこの糖の醗酵でも普通に採用されている化学機構であるが、ブタノール醗酵ではここに多少の疑問を生ずる。すなわち、これによれば基質 1 モルから水素 4 原子が生ずるわけであるが、生成物から逆算して求めた受容された水素原子は Neutral red 添加によってこれを越えている (7, 8)。炭素についても、 C_2 -化合物に換算した生成物と主炭酸ガス (全炭酸ガスからアセトン生成に伴う炭酸ガスをひいたもの) とのモル比はグルコースでは 1、五炭糖では 2 になるはずであるが、グルコースでの 1 はしばしば確認されているのに反し、五炭糖では 1.4⁽⁹⁾ や 1.25⁽¹⁰⁾ が求められた。また生成物の C_2 -化合物としての消費糖に対するモル%も、グルコースでは理論値 200 に対して 196 を示すのに、五炭糖では理論値 200 に対して 165 前後を示すにすぎない。簡単に生成物の対消費糖収率からみても、理論的にはグルコースの場合の 6/5 に上がるはずであるが、実験ではほぼ同じ収率が示される。これらのことは、 $C_5 \rightarrow C_3 + C_2$ の C_2 が更に水素や炭酸ガスを放って分解すると考えると理解される。一方、この C_2 はアラビノースとキシロースとでは相違し、前者では醋酸を生成し易いものを生ずると推察される。このため、アラビノースではアセトンが多く、これが恐らくアラビノースとキシロースとの溶剤量比の相違の基因であろうと推考される。他面、上の C_2 -化合物に換算した生成物の消費糖に対するモル%は、五炭糖ではグルコースの 165/196、すなわちほぼ 5/6 であって、五炭糖が六炭糖に組みかえられた後に醗酵を受けたとするとちょうど収支があう。こうして五炭糖のブタノール醗酵の化学機構は、アラビノースとキシロースとの生成物量比相違の原因を含めて、興味深い問題点となるが、これについては今後の研究に俟ちたい。

総 括

五炭糖のブタノール醗酵で、Neutral red 添加による C_4 -系還元の増加効果が検せられた。その結果、キシロースではグルコースと同様な効果が更に著しく呈せられてブタノールと酪酸が増えアセトンと醋酸が減るのに (エタノールには変化がない)、アラビノースではアセトンは減らず酪酸と醋酸が減ってブタノールが増すことが認められた。したがってアセトン:ブタノール:エタノールは、キシロースでは 26:67:7 が 7:88:5 にずれるのに、アラビノースでは 32:62:6 が 23:70:7 にずれるにすぎない。揮発酸部も含めた炭素収支に基づいて求めた数値によって、アラビノースでは醋酸生成が多くアセトン生成傾向が強く Neutral red 添加の効果が呈せられ難いことが認められ、その内容が考察された。なお五炭糖のブタノール醗酵の化学機構 ($C_5 \rightarrow C_3 + C_2$, $C_3 \rightarrow C_2 + C_1$, $2C_2 \rightarrow C_4$, $C_4 \rightarrow C_3 + C_1$) について、炭素収支や水素収支に基づく検討が加えられ、疑問が呈せられた。

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。

* 第 1 図の②がアセトン生成と酪酸やブタノール生成との分岐点と普通には考えられている。

** 醋酸を醗酵中の醗に添加するとアセトンが増収されることは従来屢々指摘されている。

(1) G. C. Robinson : *J. Biol. Chem.*, 53, 125 (1922); H. B. Speakman : *J. Biol. Chem.*, 58, 395 (1923).

(2) W. H. Peterson, E. B. Fred, E. G. Schmidt : *J. Biol. Chem.*, 60, 627 (1924);

(3) M. J. Johnson, W. H. Peterson, E. B. Fred :

J. Biol. Chem., 91, 569 (1931).

(4) L. A. Underkofler, L. M. Christensen, E. I. Fulmer : *Ind. Eng. Chem.*, 28, 350 (1936).

(5) L. A. Underkofler, J. E. Hunter Jr. : *Ind. Eng. Chem.*, 30, 480 (1938); 池田庸之助 :

- 本誌, 20, 136 (1944).
 (6) 本江元吉: 本誌, 31, 731, 735, 811, 816 (1957).
 (7) 本江元吉: 本誌, 24, 119 (1951).
 (8) 本江元吉: 本誌, 31, 615, 618 (1957).
 (9) 本江元吉: 本誌, 31, 548, 552 (1957).
 (10) J. B. Van der Lek: "Onderzoekingen over de Butylalkoholgisting", Thesis, Technische Hoogeschool, Delft (1930).

ブタノール醗酵 (第 19 報)*

Clostridium acetobutylicum の核酸

本江元吉, 今村満敏 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 32 年 7 月 31 日 受理

微生物の核酸については、酵母の核酸が研究されている外、*Penicillium glaucum*, *Aspergillus oryzae*, 結核菌、肺炎双球菌、*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* などの核酸が分離されている。しかし、いわゆる醗酵細菌のそれについての研究は一般に少く、ブタノール菌の核酸に関する報告はまだこれをみない。それで *Clostridium acetobutylicum* の菌体から核酸を分離し、酵母のリボ核酸 (以下 RNA と略) と比較しつつ、これを分析した。その結果をここに報ずる。

実 験

I. 菌体の取得

使用菌株: 単孢子分離によって純粋にした *Clostridium acetobutylicum* 314⁽¹⁾。菌体の取得: 既報⁽²⁾。実験の都合上、取得水洗した菌体を更に 95% エタノールで数回洗滌した後、陶土板上に塗抹して硫酸上で減圧乾燥し、乾燥菌体として貯蔵した。乾燥菌体約 100 g を得るのにほぼ大豆粕 2.5 kg, 麴 12.5 kg (培地 901) を要した。

II. 核酸の抽出及び精製 本報の場合は、酵母 RNA との成分の比較が目的であるため、操作の便宜も考え併せて、食塩水による直接抽出法⁽³⁾を試みた。すなわち、前記乾燥菌体に 95% エタノールを加え逆流冷却器をつけて湯煎上で 2 時間煮沸した後濾過し、菌体を 37° で通風乾燥した。得られたエタノール処理菌体 100 g に 10% 食塩水 1 l を加え、昼間は室温でしばしば攪拌しつつ、夜間は 65° の定温器中において、6 日間抽出した。抽出液を布及び濾紙を用いて濾過し (この濾過はかなり困難)、濾液 (635 ml) に塩酸 (1:1) 9 ml を加え (この時 pH は 1.2) 激しく攪拌して核酸を沈殿させた。3 時間静置後遠心分離し、50% エタノールで塩素イオンのなくなるまで洗滌した。次いで 95% エタノールを加えて 1 夜放置した後沈殿を分離し、無水エタノール、エーテルで洗滌し、硫酸上で乾燥して粗製核酸を得た。これは淡黄褐色の粉末で、ビウレット反応は陰性、ペントース核酸反応を有する。収量は原乾燥菌体の 4.3% であった。

この粗製核酸を次のようにして精製した。すなわち、その 1.5 g を遠心管中にとり、10% 醋酸ソーダ 37.5 ml を加えて加温しつつ溶解し、不溶物を遠心除去する。上澄液に 99% エタノール 7.5 ml を加えた後、塩酸 (1:1) を pH 1.6~2.0 になるように加える。沈殿する核酸を遠心分離し、前と同様に 50% エタノールで数回、無水エタノール、エーテルで各 1 回洗滌した後、硫酸上で乾燥した。こうして淡黄色の粉末 1.32 g を得た。収量 88%。この製品はシステイン硫酸反応陰性であるからデソオキシペントース核酸を含まず、RNA であると考えられる。またその窒素 (試料の分解には硫酸と過酸化水素を使用⁽⁴⁾) と磷⁽⁵⁾の含有量を定量すると、窒素 13.9%、磷 8.11% で、窒素: 磷は 1.72 であり、したがってほぼ純粋な製品と認められる。

なお、比較に用いた酵母 RNA は、Fischer 製酵母 RNA を上と同様にして精製したもので、システイン硫酸反応陰性、窒素 13.9%、磷 8.29%、窒素: 磷は 1.68 である。

III. 塩基成分の確認と定量 核酸試料を加水分解して paper chromatography を行い、spot の R_F 値とその抽出液の吸収極大波長とによって塩基成分を同定し、次に各抽出成分の吸収極大波長での吸光係数を測定することによって定量を行った。

* Butanol Fermentation. Part XIX. Chromatographic Studies of Nucleic Acid in *Clostridium acetobutylicum*.

By Motoyoshi HONGO, Mitsutoshi IMAMURA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)