によって検定出来るが麴菌はカップ法, 重層法の如き拡散法では阻止環乃至阻止帯を認むる事が困難である。しかるに放線菌の場合, 例えば第 1 報第 5 図⁽¹⁶⁾に示した如くカップ法でも明瞭な結果が得られた。かくの如く麴菌はかなり多くのものが火落菌の発育を抑制する傾向を有しているが, 却って発育を促進する力に圧せられてアッセイの場合これが外面的に現れ非常に変動性を示すのではないかと推定される。

第 1 報及び第 2 報を撰筆するに当り本研究に対し終始御懇篤なる御指導を賜った住木諭介教授に深甚なる謝意を表す。又御指導御鞭撻を賜り御校閲をいただいた坂口謹一郎教授に深謝する。尚又, 東大応微研米原助教授他第六研究室の各位, 第五研究室飯塚助教授, 坂口研究室の田村学造氏, 酒井平一氏, 住木研究室の松山 晃博士には貴重な菌株を賜り又御指示をいただいた。又火落菌については北原覚雄教授並びに金子太吉氏, 阪大寺本四郎教授より貴重な菌株と御指導を賜った。更に阪大理学部奥貫一男教授並びに同研究室稲垣 稔氏には種々実験の御便宜を賜わり, 科研鈴木三郎氏, 武田醸酵研究所佐藤喜吉所長, 緒方浩一博士, 明治乳業小田 信氏よりは貴重なる抗生物質試料を賜わった。これ等の方々に厚く御礼申し上げる。尚終始御鞭撻を賜り本報告の発表を御許可された山邑酒造株式会社々長山邑太左衛門氏, 下田研究所長, 御助言を賜った蔭山醸造部長, 研究に御協力をいただいた水本邦彦氏外, 山邑酒造研究所の各位に深甚なる謝意を表す次第である。

本稿の要は日本農芸化学会昭和 32 年度大会 (昭和 32 年 4 月 9 日) に於て講演した。

(1) 高橋偵造, 鈴木 彰 : 本誌, 8, 1064 (1932).	180 (1954).
(2) 下田忠次郎 : 本誌, 25, 254 (1951).	(11) 寺本四郎, 橋田 度, 大塚親男 : 醸工, 31, 376 (1953).
(3) G. Tamura : <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 2, 431 (1956).	(12) 伊野本美治, 橋田 度, 山本 彰 : 酵工, 29, 204 (1951).
(4) G. Tamura : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 21, 202 (1957).	(13) 塚原寅次, 森島国友 : 醸協誌, 48, 30, 42, 44 (1953).
(5) 北原覚雄, 金子太吉, 後藤 治 : 本誌, 31, 556, 560 (1957).	(14) 中村精二, 国定則行, 城 照雄, 杉田 脩 : 日本農芸化学会昭和 32 年度大会にて講演.
(6) 松山 晃 : 本誌, 28, 418, 422 (1954).	(15) 島田四郎, 杉田 脩, 水本邦彦, 蔭山公雄 : 醸工, 32, 68 (1954).
(7) 高橋偵造 : 醸試報, 12, 1 (1906).	(16) 中村精二, 城照 雄, 国定則行 : 本誌, 32, 450 (1958).
(8) 山崎何恵 : 本誌, 5, 377, 399 (1929).	(17) 中村精二, 城 照雄 : 本誌, 32, 445 (1958).
(9) 大谷義夫 : 北大農紀, 39, 49 (1936); 醸造学, 11, 9, 274, 467, 597 (1933).	
(10) 寺本四郎, 橋田 度, 吉野大資 : 醸工, 32,	

ブ タ ノ ー ル 醸 酵 (第 21 報)*

糖蜜の醸酵 (その 2) 糖蜜醸酵適型菌株の分離

本江元吉, 長田 健 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 32 年 10 月 16 日 受 理

糖蜜の醸酵にワイツマン型のブタノール菌株を用いることが, 技術的にも経済的にも, 適当とは言い難いことは前報した⁽¹⁾。これに適する菌株は, ここ 15 年くらいの間に, 主としてアメリカで, 次々に分離され特許になっている⁽²⁾。しかし, それらについては学術的な報文がなく, 特許記載の名称など様々で, 命名の常識である二名法を無視したものさへある。どの菌株も, ワイツマン型菌株に比べ, 無機態の窒素をよく資化し, したがって糖蜜の醸酵に際して, 有機態窒素は糖蜜中にあるそれだけで足り, 窒素源としては無機態のものを添加するだけでよい。また栄養細胞, 紡錘型細胞, 孢子などが一般にやや大型で, 培養温度は低く 30~34° が適温である。

著者等も本邦の土壌からこの型の菌株の分離につとめ, 優良と認められる数菌株を得た。本報では, その分離法の要点を示し, ハイテスト糖蜜や廃糖蜜を原料にしたときの実験室規模でのソルベント収量を報ずる。なお同法によって屢々分離されてくるイソプロパノール・ブタノール菌株について併せ報ずる。

* Butanol Fermentation. Part XXI. Fermentation of Molasses. (2) Isolation of Suitable Strains. By Motoyoshi HONGO, Ken NAGATA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

実 験

I. 分離 分離試料は、ワイツマン型菌株と同じ土壌や穀類、植物の葉や花などが特許にあげられているが、この外堆肥、下水や川の泥土、荳科植物の根瘤なども記載されている。著者等の経験では開花期の荳科植物の根瘤に附着する土壌* がよい。

集殖法は、熱処理淘汰と排気下の生育とを繰り返すワイツマン法を、多少変えた諸法が特許に記載されている。主な違いは、培地や熱処理の温度、培養温度にある。培地には、馬鈴薯・グルコース・硫酸アンモニウム（以下硫酸と略）培地や糖蜜・硫酸培地、玉蜀黍・肝臓培地、麦芽汁・アンモニウム塩培地などが記載されているが、馬鈴薯・グルコース・硫酸培地が著者等の場合には良好な結果を示した。その組成はすりおろした生馬鈴薯 25～30%**・グルコース 0.5～1.0%・硫酸 0.1%・炭酸石灰 0.2～0.3%（いずれも対培地%）である。グルコースを糖蜜でおきかえた培地も好結果をもたらした。分離試料を殺菌水中に投じてつきまぜ、その上層液約 0.5 ml を試験管中の上記培地 10 ml にとり、熱処理する。熱処理淘汰の受熱は 63°-30 分、80°-10 分、あるいは 100°-1.5～3 分などと記載されているが、優良菌株が分離される率からみるとその間に大差がない。確実性と手まをとをにらみあわせると 80°-10 分がよい***。デシケーター中で排気して培養する温度はワイツマン型菌株の 37° より低く、一般に 30° にしている。中には 34° で醗酵速度が高くソルベント収率が正常な菌株もあり、夏季の工業的操作での冷却をも考えて、培養温度は 30° と 34～35° と両者を試みたが、優良菌株の分離率は高温の方がずっと劣った****。旺盛な醗酵を認めたもので 3～4 日後開栓検臭してソルベント臭のあるものを選び、検鏡して胞子を確認後、一部を同培地に移植し heat shock して排気下培養する。ワイツマン型菌株の分離では、この淘汰を繰り返していくのであるが、この場合には繰り返しはむしろよくなかった。すぐに醗酵試験して、ソルベント収率が比較的良好なものを平面嫌気培養してコロニー選択をした方がよい結果を示した。

この醗酵試験には次の方法をとった。すなわち、上の 2 回 heat shock して排気下に生育させた培養から 1 日後、糖蜜・硫酸培地〔糖蜜（4～5% 糖濃度）・硫酸 4～5%・炭酸石灰 5～6%・ P_2O_5 0.3%（いずれも対糖%）〕に移植して（heat shock しない）培養し、更に 1 日毎の移植を 2 回繰り返し、それを 4～10 容量%の割合で糖蜜醗（組成は糖蜜培地と同様であるが、糖濃度は 6% 前後）150 ml に接種し醗酵栓を付して醗酵させた。秤量によって醗酵進捗を知り、減量の著しいものについてだけソルベントを定量した（塩析法）。その中でソルベントの対糖収率のかなりよいものをコロニー選択に移した。

平面培養用培地には糖蜜 0.8%・グルコース 2%・ペプトン 0.5%・肉エキス 0.3%・硫酸 0.1%・寒天 2%（いずれも対培地%）組成のものを pH 7.0 に調整して使用した。醗酵試験の結果が比較的良好なものの醗酵試験の移植途中で使った馬鈴薯・グルコース・硫酸培養、あるいは糖蜜・硫酸培養の一部をそれぞれの培地にとって heat shock 後、培養 1 日で盛んに醗酵しているものから、この固体培地にとって平面嫌気培養をした。生成したコロニーをとり、前と同様に移植して、性能（ソルベントの質、量比、収率、醗酵速度、栄養生理、適温など）を検した。第 1 回醗酵試験の結果が比較的良好なものから生成したコロニーのうち、あるものはそれよりずっとよい結果を示し、あるものは悪い結果を示した。良好結果のものは、heat shock と平面嫌気培養とを数回繰り返し一応純粋にした。

要するに分離の要点は、培地と培養温度、及び熱淘汰とコロニー選択とを組み合せた方法にあると言える。

II. 分離菌株のソルベント生成能（糖蜜の種類） 糖蜜醗酵に適する型の菌株による糖蜜からのソルベント収率や各ソルベントの量比は、ワイツマン型菌株によるそれと違って、菌株の相違、糖蜜の種類、蒸溜廃液の使用、液体アンモニアの使用、温度管理などによって違うから、分離した菌株の性能について一概には言えないが、その大略を以下に示すことにする。

糖蜜には大別して、ハイテスト糖蜜（high test molasses または invert molasses）と鹿糖蜜（blackstrap molasses）の二種がある（前者は栽培地で過剰になった甘蔗搾汁を少量の酸の存在で糖濃度約 75～80% にまで

* C. F. Arzberger 氏や星野一雄氏の言に基く、記して感謝する。

** 粕が多すぎて排気下培養でふき上げて綿栓をとばすので、ガーゼで搾濾して粕の半量を除くとよい。

*** このようにして分離した菌株を、工業的操作の際の簡易化を考えて、heat shock を 100°-1.5 分にして検したが、醗酵速度やソルベント収率にはそれほど著しい差が現れなかった。或菌株については速度がややおちて収率が多少ました（次報）。

**** 温度が繁殖や醗酵に及ぼす影響は後報する。

第 1 表 分離菌株による糖蜜酸酵のソルベント収率

菌株	醪組成 (g/100 ml)					醪容量 (ml)	酸酵 温度 (°C)	酸酵 時間 (時)	ソ ル ベ ン ト					量比 A : B : E ^d
	糖 蜜 種類 ^a	糖濃 度	硫 安	過石 ^b	炭石 ^c				収 率 (対原糖%)					
									収量 (g/l)	アセ トン	ブタノ ール	エタノ ール	ソルベ ント	
A 22	bm	5.28	0.3	0.1	0.5	15000	30°	65	16.7	8.2	22.4	1.0	31.6	26:71:3
3142	bm	5.14	0.3	0.1	0.5	15000	30°	60	15.5	8.3	20.1	1.8	30.2	27:67:6
3773	bm	5.60	0.3	0.1	0.5	150	30°	70	17.7	9.4	21.2	1.0	31.6	30:67:3
M 3	bm	6.10	0.3	0.1	0.5	3000	30°	50	18.2	7.5	21.3	1.2	30.0	25:71:4
吉 5	bm 1	6.16	0.3	0.1	0.5	150	30°	48	19.8	10.2	21.2	0.6	32.0	32:66:2
	bm 2	6.10	0.3	0.1	0.5	3000	30°	50	18.9	8.4	22.1	0.6	31.0	27:71:2
AB	bm	5.89	0.2	0.1	0.5	150	34°	24	17.5	9.0	19.5	1.3	29.8	30:66:4
IT	hm	5.81	0.2	0.1	0.5	150	35°	40	18.9	10.3	21.7	0.6	32.6	32:65:2
L 12	hm	6.20	0.2	0.1	0.4	150	30°	55	20.6	9.2	23.6	0.4	33.2	28:71:1
	bm	6.15	0.2	0.1	0.4	150	30°	55	20.1	6.8	25.2	0.6	32.6	21:77:2
NH	hm	6.20	0.2	0.1	0.4	150	30°	57	19.4	9.0	22.1	0.2	31.3	29:70:1
	bm	6.24	0.2	0.1	0.4	150	30°	57	19.6	6.5	24.5	0.3	31.3	21:78.1
KD	hm	6.20	0.2	0.1	0.4	150	30°	55	20.1	9.6	22.6	0.2	32.4	29:70:1
	bm	6.24	0.2	0.1	0.4	150	30°	55	19.5	6.4	24.2	0.6	31.2	20:78:2
(KN ^e)	hm	5.50	0.3	0.1	0.5	150	37°	72	17.4	9.1	20.2	2.3	31.6	29:64:7)

a. hm はハイテスト糖蜜, bm は廃糖蜜 (フィリップン産), b. 過燐酸石灰, c. 炭酸石灰, d. アセトン: ブタノール: エタノール,

e. *Cl. kainantoi*, 種母を玉蜀黍培地 (移植 2 回まで) → 糖蜜・大豆粕培地 (移植 3 回目) で仕立てた。

濃縮したもので、この処理によって放置しても蔗糖が晶出しないように転化されている。含まれている糖は転化糖約 50% と蔗糖約 25% とである。後者は濃縮蔗汁から蔗糖の結晶をとった後に残った母液で、平均して糖濃度は約 52% で転化糖が 22%、蔗糖が 30% である。ハイテスト糖蜜の方が糖濃度が高く蛋白含量が少く非酸酵性固形物も少い。廃糖蜜は塩類の含量が多い。分離株中のあるものはこの両者について試験した。

原糖 5.99%

原糖 5.99%	時 間 ソ ル ベ ン ト				収 量 (g/l)
	収 率 (対原糖%)				
	アセ トン	ブタノ ール	エタノ ール	ソルベ ント	
1 原 培 養	8.8	19.0	2.6	30.4	18.2
2 コロニー a	8.8	21.9	2.5	33.2	19.9
3 コロニー b	9.3	21.0	2.5	32.8	19.7

第 1 図 コロニー選択による弱菌株の強化

どの菌株も、砂培養を馬鈴薯・グルコース・硫酸培地にとって 80°-10 分の heat shock をしデシケーター中排気下 30° (菌株によっては 34°) で培養し、1 日後糖蜜・硫酸培地に移植、減酸初期に相当する時期の移植をかさねて、移植 4 回目に酸酵状態を検した。アセトンの分析は Goodwin 改良の Messinger 法、ブタノールとエタノールは Johnson 法。主酸酵醪の組成と結果を第 1 表に示す。A 22, 3142, 3773 は分離を企てた当初のまだ不慣れな頃に分離された菌株で、仕込糖濃度が低く酸酵期間も長い。後はどれも仕込糖濃度は 6% 前後で酸酵期間も短い。KD, NH, L 12 については硫酸濃度 0.2 g/100 ml のときの結果を表示したが、これを 0.3 g/100 ml にすると酸酵期間がもっと短縮される (次報)。ハイテスト糖蜜の方がアセトン・リッチに、廃糖蜜の方がブタノール・リッチにソルベントを生成する傾向がある。また、一概に廃糖蜜といっても産地により蔗糖製造法によって違い、時には表示のような結果が得られずに収率が 28% 前後におちることがあった。こうした場合を検討して対策をたて 50 石中間工業試験にまで及んだが、その次第は報を改めて記載する。AB, IT は他菌株よりも高い酸酵温度の 34~35° でソルベント収率が正常で酸酵期間が短い、ことに前者は 1 日で終了する。もっともそのソルベント収率は多少低い。次報以下に連報する諸結果からみても、一般に酸酵速度が高いとソルベント収率がやや下る傾向がある。また温度を高くするとアセトン・リッチになる傾向を示すが、両株とも他の菌株に比べてアセトンが多い。IT は廃糖蜜では、表示しなかったが、収率が 28% 前後に下る。なお、前報⁽¹⁾の *Cl. kainantoi* もハイテスト糖蜜であれば、種母代に大

第 2 表 分離イソプロパノール菌株によるソルベント収率

菌株	主原料	原糖 (g/100 ml)	残糖 (g/100 ml)	収量 g/l	ソルベント				量比 A : I : B
					収率 (対原糖%)				
					アセ トン	イソプロ パノール	ブタノ ール	ソルベ ント	
B 22	{ 廃糖蜜 グルコース	5.65	0.52	19.1	1.4	8.1	24.2	33.7	4 : 24 : 72
		5.76	0.05	18.6	1.0	9.2	22.1	32.3	3 : 28 : 69
B 21	{ 廃糖蜜 グルコース	5.65	0.81	16.4	1.4	6.8	20.8	29.0	5 : 23 : 72
		5.76	0.04	19.0	1.5	10.1	21.3	32.9	4 : 31 : 65
B 14	{ 蔗糖 廃糖蜜	5.12	0.08	18.0	1.0	9.0	25.2	35.2	3 : 25 : 72
		5.63	0.45	17.3	1.3	8.8	20.6	30.7	4 : 29 : 67

豆粕を加えただけで糖蜜・硫酸をよく醗酵する。もっとも醗酵期間は長くエタノールが多い。

附 1 弱菌株強化のためのコロニー選択

糖蜜醗酵のソルベント収量が下るのは、ファージや生酸菌の汚染による異常の場合は別として、その程度がそれほど大きくないものは、原料糖蜜が違ったためであることが多いが、稀に使用菌株が多少弱化したのが原因である場合がある。対策としてワイツマン型菌株であれば heat shock を重ねるのが常法であるが、糖蜜醗酵適型菌株ではむしろ平面嫌気培養して生成コロニーについて醗酵性能を検して良株を選んだ方がよい結果が得られた。吉 5 株についての 1 例を第 1 図に示す。図には原培養よりよいものだけを示したが悪いものもある。醗酵経過が多少遅れた株の方がブタノール・リッチでソルベント収率もよい結果を示しているが、これは前にも述べたように後報する諸条件の検討の場合も同様であって、このコロニー株の特性であるかどうかは定め難い。またこのような現象が原培養の細胞に起った変異によるものであるかどうか、原培養そのものが平面培養を 7~8 回くりかえしただけで単孢子分離による純粋培養をしていないものであると目下のところでは定め難い。

附 2 イソプロパノール・ブタノール菌株

イソプロパノールは良好なソルベントであり、戦時にはイソプロピルエーテルとして高オクタン価航空燃料の原料になるので、糖蜜を醗酵してこれとブタノールとをつくる菌株^(3,4)は重視された⁽⁴⁾。しかし、イソプロパノールはまたガソリン製造の際に副生され、安価に合成もされるので、平時には実用の面からこれらの菌株は重視されない。上記の分離法によって、アセトン・ブタノール菌株とほとんど同じ程度の確率で、これらのイソプロパノールをつくる諸菌株が分離されてくる。それら分離菌株によるソルベント収率の数例を第 2 表に示す。表示の外に、これらの菌株よりもアセトンが多くイソプロパノールが少い諸菌株も分離され、イソプロパノールを多少つくるアセトン・ブタノール菌株との間に連続的な中間型が存在する。

総 括

無機態の窒素をよく資化し糖蜜の醗酵に適するアセトン・ブタノール菌株を本邦の土壌から分離することを企て、その分離法を検討し、良好な数株を得た。どの菌株も糖濃度 6% 前後の糖蜜・硫酸を醗酵し、ソルベント収率は 30% 以上で、エタノールが少い。多くは 30° が適温であるが、34~35° でも正常醗酵を営む株もあり、後者は醗酵速度が高く 24~40 時間で醗酵を完了する。原料糖蜜のうち、ハイテスト糖蜜はアセトン・リッチな、廃糖蜜はブタノール・リッチなソルベント収量を示す。なお、同様な分離法でイソプロパノール・ブタノール菌株も屢々分離され、得られた数株の性能を示した。

終りに御指導を戴いた山崎教授並びに御助言を戴いた東大坂口教授、三楽武田博士に深謝し数多い試料からの分離に助力を惜しまなかった学生諸君に感謝する。研究費の一部は文部省科学試験研究費による。

(1) 本江元吉：本誌，32，359 (1958)。

(2) R. Arroyo : U. S. Pat., 2,113,471.
2,113,472(1938). C.F. Arzberger : U. S. Pat., 2,050,219(1936). 2,139,108(1938). E.F. McCoy : U. S. Pat., 2,110,109 (1938). 2,398,837(1946). Can. Pat., 433,189(1946). J.G. Woodruff, H.R. Stiles, D.A. Legg : U. S. Pat., 2,089,522 (1937). E.H. Carnarius, W.N. McCutchan : U.S. Pat., 2,139,111 (1938). S.C. Beesch : U.S. Pat., 2,439,791 (1948)。

(3) J.M. Sherman, N.M. Erb : U.S. Pat., 2,017,572(1935). D.A. Legg, H.R. Stiles : U. S. Pat., 2,063,448(1936). S.C. Beesch, D.A. Legg : U.S. Pat., 2,420,998(1947). 朝井勇宜，春田実俊：本誌，19，872(1943)，22，11 (1948). J. Müller : U. S. Pat., 2,123,078, 2,132,039 (1938). A. Izak : U.S. Pat., 1,908,361 (1933). J. F. Loughlin : U. S. Pat., 2,096,377 (1937). 2,219,426 (1940)。

(4) 馬場為二：本誌，19，191 (1943)。