サッカロ型ブタノール菌に就て (第1報)*

新菌株の分離

星野一雄, 石倉秀範, 渡部賢三 (協和醸酵工業株式会社)

昭和 33 年 7 月 10 日 受理

サッカロ型ブタノール菌と呼ばれるものは Beesch⁽¹⁾ 等の所謂 Saccharolytic microorganism 即ち、糖蜜等の蔗糖系培地をよく醸酵するブタノール菌で、比較的低温で糖蜜をよく醸酵すること及びバクテリオファージ耐性等の勝れた性質の為、工場の要求する処となり 1930 以降 McCoy⁽²⁾, Arzberger⁽³⁾ 及び Beesch 等により多くの菌株が分離された。同菌は従来のワイツマン型と同種となって居るが、是等の特性の為多少の分離法改変を必要とする。著者等は 1952 年より協和醸酵工業株式会社防府工場に於てその分離、純化を行い、特に強い二つの菌株を得たので、ここにその諸性質、醸酵性能に就て報告する。

実験材料及び実験方法

主として工場近傍の菜園の大豆、そら豆等荳科植物の根瘤及び根瘤に付着した土壌を使用した。

分離方法は Beesch の方法に準拠した。即ち熱処理、移植、聚落形成、釣菌を適当に行い、30° に培養、純化した。培地は Beesch の推す種々のものを使ったが、馬鈴薯及び糖蜜を可とした。保存には殺菌土壌を使用した。

形態及び生理学的諸性質は Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria (Society of American Bacteriologists, 1950) に依て試験した。アセトン定量は Winkler 法⁽⁴⁾、ブタノール及びエタノールは Johnson 法⁽⁵⁾、糖分測定は Lehmann 法による。

バクテリオファージ耐性試験は著者の一人、星野⁽⁶⁾がワイツマン型菌株に就て行った方法と同一である。

第1表 サッカロ型ブタノール菌

実験結果

2 菌株による糖、アルコール、グルコサイドの醸酵

純化された状態にありと思われる 2 菌株 BN-5 と BS-13 に就て形態学的、生理学的諸性質、培養知見、其他を記述する。

BN-5 BS-13

アラビノーズ	+	+
ラムノーズ	—	—
キシローズ	+	+
葡萄糖	+	+
果糖	+	+
ガラクトーズ	+	+
マンノーズ	+	+
乳糖	+	+
麦芽糖	+	+
メレチノーズ	+	+
澱粉	+	+
イヌリン	+	+
糊精	+	+
グリコゲン	+	+
グリセロール	+	+
エリスリトール	—	—
マニトール	—	—
ソルビトール	—	—
サリシン	+	+
アルファメチルグルコサイド	+	+

+: 黄色 —: 無変化

糖 1%, ポリペプトン 0.5%, 肉エキス 0.3%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1%, Brom Cresol Purple 0.001% を含む培地に継代培養し、第 3 代培養物 7 日後の色調を記す。

I. 形態学的、生理学的性質

(1) 菌株 BN-5: 栄養細胞は平均 $1.0 \times 5.0 \mu$ の大きさをもつ桿菌で鞭毛をもち、増殖の初期には活発に運動する。単菌が多く、連鎖菌は少い。馬鈴薯葡萄糖培地に於ては培養 20 時間で造胞細胞が現われる。造胞細胞は $1.5 \times 6.0 \mu$ 、果粒を含み、生長すれば胞子を抱く。胞子はほぼ中央に位して所謂紡錘形細胞 Clostridia となるが端部に位する撥状細胞 Plectridia も見られる。

細胞は沃度、メチレンブルーに依て染色される。グラム染色は陽性であるが生長するに従い陰性となる。

炭酸ガス中でブイヨン、糖蜜寒天培地上に聚落を作る。聚落はほぼ円形で周辺はなめらか、中央隆起する。光沢をもち多少透明、薄クリーム色である。

グルコース肉エキスベプトン培地、糖蜜硫安炭酸石灰培地で繁殖旺盛、発泡してソルベント臭、酪酸臭を呈する。

玉蜀黍培地ではよく繁殖するがヘッド形成に至らず、上澄となる。

リトマス牛乳は 24 時間で退色されるが、複色し赤色となる。凝固は起らず乳漿を分離しない。

ゼラチンは液化せず、アルブミンも消化しない。

インドール生成、硝酸塩還元共に陰性であるが、VP 反応は陽性であり、アモモニウム塩より硫化水素を発生する。各種糖類に対する反応は第 1 表に示した。

* Studies on the Butanol Formers of Saccharotypes. Part I. The Isolation of Two Strains.

By Kazuo HOSHINO, Hidenori ISHIKURA and Kenzo WATANABE (Kyowa Fermentation Industry Co. Ltd.)

第 2 表 サッカロ型菌株による油分収量 (mg/100 ml)

	ブタノール	エタノール	アセトン	消費糖 (グルコースとして)
BN-5	930	82	695	6,420
BS-13	1,180	110	540	6,535

培地: 比島産ブラックストラップ糖蜜 12%, 硫酸 0.3%, 炭酸石灰 0.3%

第 3 表 ブタノール菌 4 菌株のアセトン収量に対するバクテリオファージの影響 (アセトン収量 mg/100 ml)

菌株	T-9	314	BN-5	BS-13
400ml プロスに添加したファージ (ml)				
0	326	307	658	558
Phage (a)	0.1	88	648	575
Phage (c)	0.1	36	686	573

400ml プロスに添加したファージ (ml) 0, 0.1, 0.1
T-9 314 BN-5 BS-13
Phage (a) 0.1 88 648 575
Phage (c) 0.1 36 686 573
コーズ培地に接種, 熱処理後 30° に培養, その 1 ml を糖蜜硫酸石灰培地 10 ml に移植, 培養後本培地 300 ml に 10 ml 宛接種し 72 時間培養後, 生成物を分析した. 結果は第 2 表に示す如く 90% 近い糖消費を示し, 対消費糖 25% 以上のソルベントを得た.

III. バクテリオファージ耐性 サッカロ型ブタノール菌の特徴はワイツマン型に比べバクテリオファージに耐える点にある. ファージに犯されれば醗酵の延引, 菌数の減少等の現象を示し, 概して酸の蓄積, ソルベント収量の低下を来す. 依てアセトン収量を測定して耐性の強弱を測定した. 使用したバクテリオファージは a 及び c, indicator strain は 314 号及び T-9 である.

結果は第 3 表に示す如く両菌株共に indicator に比べアセトン収量多く耐性ありと考えられる.

考 察

サッカロ型ブタノール菌はアセトンブタノール醗酵工業の進展に伴い, 従来のワイツマン型菌に代って要求されたもので, その特徴とする処は安定した糖蜜の醗酵性能とバクテリオファージ耐性であり, ここに報告した 2 菌は夫等の性質をもち, 代表的なサッカロ型菌株と考える.

現在サッカロ型はワイツマン型と共に分類上 *Clostridium acetobutylicum*, McCoy, Fred, Peterson and Hastings の一員となっている (Bergey の Manual of Determinative Bacteriology 第六版による). しかし乍ら形態学的, 生理学的所見は両者間にかなりの相異が見られる. 本実験に示す 2 株の共通性質, ゼラチン及びアルブミンの不溶解性及び菌形の大きな事, 更に玉蜀黍培地及びリトマス牛乳に対する反応は寧ろ *Cl. butyricum* Prazmowski との近親性を示すものである.

著者は以上の考察よりサッカロ型ブタノール菌の地位に就て更に検討を試みるべきであるとする.

要 約

(1) 荳科植物の根瘤及び根瘤に付着した土壤からサッカロ型ブタノール菌と認められるもの 2 菌株を分離し, その性質を明にした.

(2) 諸性質, 培養所見及びバクテリオファージ試験より 2 菌株共サッカロ型の性質をもつことを証明した.

(3) 形態学的及び生理学的所見より, サッカロ型ブタノール菌の分類学上の地位に関し検討を加えた.

本実験を行うに当り御懇切な御指導を賜りました応用微生物研究所前所長坂口謹一郎先生, 所長朝井勇宜先生に深甚なる感謝を捧げます. 又実験に際して種々なる便宜と発表の許可を頂きました協和醗酵工業株式会社取締役社長加藤弁三郎氏に厚く御礼申上ます.

(本報告は昭和 32 年 11 月 30 日, 日本農芸化学会関東支部第 178 回講演会に於て講演した.)

(1) S. C. Beesch : *Ind. Eng. Chem.*, 44-7, 1677 (1952).

(2) E. F. McCoy : *U. S. Pat.*, 2,110,109 (1938).

(3) C. F. Arzberger : *U. S. Pat.*, 2,050,219 (1936).

培養適温は 28~33° であるが, 胞子は 63°, 45 分, 100°, 1 分の加熱に耐える. pH は 5.0~7.0 を適度とする.

(2) 菌株 BS-13 : 栄養細胞は $1.2 \times 4.0 \mu$ の桿菌で, 連鎖菌少く, 造胞細胞は $1.8 \times 5.5 \mu$, Plectridia が多い.

染色及び生理学的所見は大体 BN-5 と同じであるが, 玉蜀黍培地で発泡頗る強く, ヘッドを形成する. 又リトマス牛乳も凝固し, 乳漿を分離する.

培養温度は 28~35° を最適とし, 63°, 45 分, 100°, 1 分の加熱に耐える. 各種糖類に対する反応は第 1 表に示した.

II. 培養所見

両菌株の土壤培養を馬鈴薯, グル

(4) H. Böhme, O. Winkler : *Z. physiol Chem.*, 296, 274 (1954).

(5) N. J. Johnson : *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 4, 20.

(6) 星野一雄 : 本誌, 24, 287 (1950).