細胞膜分解による澱粉分離 (その1)*

菌株について

本江元吉, 栗栖敏郎 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 33 年 8 月 2 日 受理

ある種の細菌が生甘藷の切片に働いて細胞膜を分解し澱粉粒を遊離することについては、かなり以前からこの種の操作による澱粉製造の可能性が考えられていたが、最近和田によって研究の端緒が開かれた⁽¹⁾。しかしこの方面の研究は明確ではなく、例えばその菌が何であるかも菌学的によくしらべられていない。というのも、この菌株の純粋分離が困難だったからである。たまたま鹿大の蟹江教授からこの種の菌株の分譲を受けた。この分譲菌株も生甘藷切片に殺菌水を加えた培地中にだけ生育するといわれ、事実加糖肉汁などの普通に使用する培地に接種し、生育してきた培養について生甘藷切片の崩壊を検した結果はことごとく負であった。こんなところに従来純粋分離が困難であった原因が考えられる。それでこの菌株の純粋分離を企て、その結果純粋にできた菌株について菌学的性質を検し、分類上の位置を確かめた。その次第を報告する。

実 験

I. 純粋分離

粗培養を普通の培地に接種すると、嫌氣的にしても汚染菌がもっぱら繁殖してこの生甘藷切片崩壊能（以下甘藷崩壊能と略）をもっている菌の生育が抑えられる。それでいろいろ検索した結果、馬鈴薯汁を主体とする培地を使用することにした。これは馬鈴薯をオロンガネでおろし濾紙で濾過した濾液に寒天 2% を加え（2 kg, 40 分殺菌）、これに Difco の brewer anaerobic agar** (1 kg, 40 分殺菌) を等量加えた培地である。anaerobic agar を加えたのは馬鈴薯汁寒天だけでは生育が必ずしも充分ではないからである。この培地で平面培養を行い、嫌氣的に培養して主じコロニーをとって甘藷崩壊能を検すると、明らかにその性能があり、分離の方法が決った。

一方、分譲を受けた菌株は生甘藷培養をアンプルに封じたもので、当初は 2 日位で生甘藷切片を崩壊したが、15 日前後の放置（室温及び 4°）によって極端に甘藷崩壊能が減少した。性能回復の条件を検したところ、生甘藷切片に殺菌水を加えたもので移植培養をくりかえすことによって性能を強化できた。はじめ甘藷崩壊に 1 週間余りを要した衰弱培養も移植約 10 回で 10 時間前後に短縮できた。この強化粗培養をもとにして上記の方法で平面培養し、コロニーを馬鈴薯汁・グルコース・硫酸アンモニウム・炭酸石灰の培地⁽²⁾にとって培養し、甘藷崩壊

能を検した後平面培養するという操作を 5 回くりかえして純粋にした。なお、実験中にこの菌が耐熱性胞子をつくることがわかったので 80°, 10 分の熱処理淘汰もコロニー分離の間の培養で行った。

このようにして得られた純粋培養について、次の形態的及び生理的諸性質を検した。

II. 菌学的性質

A. 形態（馬鈴薯汁・グルコース・硫酸・炭石の培地, 33°, 排気法による嫌気培養）

栄養細胞（24 時間培養）：端部は丸味ある桿状細胞。単独まれに 2 個連結。2.0~6.0×0.4~0.8 μ, 大部分 4.5×0.6 μ（第 1 図）。

孢子囊細胞（48~72 時間培養）：紡錘形または棍棒形、胞子は細

第 1 図 栄養細胞（24 時間培養）

* Isolation of Starch Granules from Sweet Potato by Decomposing its Tissues with Bacteria.

Part I. On the Strain.

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

題目は研究の先鞭をつけられた和田女史に敬意を表して同題目とした。

** ペプトン、酵母エキス、グルコースなどの外に酸化還元電位を下げるように thioglycollate が入っており、rH indicator の Resazurin も入っている。

胞の中央よりやや一端に偏するか、または端部に存する。8.0~10.0×1.0~1.5 μ 。

孢子 (48~72 時間培養) : 楕円形。1.4~1.8×0.9~1.3 μ 。

運動性 : 若い栄養細胞は活発に運動する。

染色性 (30 時間培養) : グラム染色は陽性、沃度液で青染、両端部が褐色に染るものが多い。

B. 培 養

1. 固体培養 a. 平面培養 (33°) 馬鈴薯汁寒天+Difco's brewer anaerobic agar (等量) (pH 6.6) : 嫌気下 2 日でコロニー生成。4~5 日で表面コロニーは直径 2.0~4.0 mm, 正円形 (後不正円形) 隆起し周辺なめらか、半透明で灰白色、湿潤、光沢、粘性。培養には強いアセトン・ブタノール臭あり。深部コロニーは 1.0~2.0 mm, レンズ形, 灰白色やや不透明。

グルコース (1% 添加) 肉汁寒天 : 嫌気下 4~5 日で 0.5~1.0 mm のコロニー生成, 深部に生じレンズ形で周辺なめらか、小顆粒状組織、粘性、灰白色で光沢あり。培養にはアセトン・ブタノール臭あり。

b. 穿刺培養 (33°) グルコース (1%) 肉汁寒天 : 5 日で穿刺溝にそってごく僅かに繁殖。

グルコース (5%) ペプトン寒天 : 5 日で穿刺溝にそってごく僅かに繁殖。

麴汁 (5° Bllg) 寒天 : 繁殖しない。

馬鈴薯汁寒天 : 24 時間で穿刺溝にそって繁殖し, 3 日で内部各所にガス発生のため亀裂を生じ亀裂面にそってコロニーを生ずる。裂けた寒天はガスのため押し上げられる。

肉汁ゼラチン (20°) : 3 日で穿刺口が小皿状に溶膠 (20 日で溶膠部は大となる)。穿刺溝にそってごく僅かに繁殖。

2. 液体培養 (排気法による嫌気培養, 33°) グルコース (1%) 肉汁 : 馬鈴薯汁グルコース培養から 10 vol. % の種母を接種すると, 24 時間で湧きつき液は濁り発泡する。4 日後発泡やみ液は透明となり白色の沈滓を生ずる。アセトン・ブタノール臭あり。孢子からの正常な繁殖は困難で, 100°, 1.5 分 heat shock すると 48 時間後に至って液は僅かに濁るが発泡はその後とも認められない。

肉汁 : 繁殖しない。

5% とうもろこし醗 : 24 時間で発泡極めて旺盛で醗の上層液はやや透明となる。48 時間で発泡やや衰え醗中の固形物粘質物は液全体に拡がる。72 時間で発泡とまり液は透明となり固形物粘質物は沈降する。

馬鈴薯汁・グルコース・硫酸・炭石培地 : 24 時間で盛んに発泡し上部は黄白色の液となる。48 時間で発泡を続け白い粘質物を中心位置に生ずる。72 時間で発泡衰え液は淡黄色になり馬鈴薯の残渣は沈降する。7 日後強いアセトン・ブタノール臭がある。

牛乳 : 24 時間で盛んに発泡し上面に多くの気泡を生ずる。カゼインは全体にわたって凝固してくる。48 時間でカゼイン凝固量はふえ液は半透明となる。72 時間で液は黄色をおびてくる。7 日後発泡は完全に停止し液は淡黄色透明, 凝固物に変化なし, 14 日後変化なく凝固物のペプトン化はみられない。

リトマス牛乳 : 24 時間で盛んに発泡し上面に多くの気泡を生じ, カゼインは凝固し液は赤褐色となる。48 時間で発泡衰えカゼインの凝固量まし液は半透明となる。6 日後ガスの発生衰え凝固カゼインは赤桃色で液は透明な桃褐色を呈する。

凝固アルブミン (5%)・グルコース (2%)・ペプトン水 : 24 時間で盛んに発泡し凝固アルブミンに変化はみられない。72 時間で発泡続き, 凝固アルブミンは上部が軟化して崩れ気泡上に浮いてくる。7 日後発泡は弱くなり凝固アルブミン上半部は灰褐色となり小さく崩れる。

酵母水 : 僅かに繁殖。

C. 生 理

インドールの生成 : (—), [7 日後 Ehrlich の反応 (—), 北里-Salkowsky の反応 (—)]

硝酸塩還元性 : 痕跡, [Gries 反応亜硝酸 1 日後 (±), 2 日後 (±), 3 日後 (—), 沃度生成法 1 日後, 3 日後, 10 日後ともに (—)]。

亜硝酸塩還元性 : (+) [Gries 反応亜硝酸 4 日後 (—)]。

アンモニア生成 : (+)。

硫化水素生成 : ペプトン含有培地からの生成 (+), 亜硫酸の還元による生成 (+), チオ硫酸の還元による生

第1表 炭水化物の醗酵性

炭水化物	ガス	酸度	pH	炭水化物	ガス	酸度	pH
アラビノース	+	2.40	4.7	イヌリン	+	1.20	5.2
ラムノース	—	0.80	6.2	ペクチン	+	2.40	4.9
キシロース	+	1.60	5.1	デキストリン	+	2.00	4.9
グルコース	+	1.60	5.2	グリコーゲン	+	1.60	5.4
フルクトース	+	1.60	5.2	セルロース	±	0.80	6.1
ガラクトース	+	1.90	5.0	グリセロール	—	0.80	6.2
マンノース	+	1.90	5.0	エリスリトール	—	0.80	6.2
ラクトース	+	1.50	5.3	アドニトール	—	0.80	6.2
シュクロース	+	1.30	5.3	マンニトール	+	1.40	5.2
マルトース	+	1.50	5.0	ソルビトール	—	0.80	6.1
トレハロース	+	1.40	5.0	ダルシトール	—	0.80	6.1
セロビオース	+	1.40	5.3	イノシトール	—	0.80	6.2
ラフィノース	+	1.20	5.4	サリシン	+	1.60	5.2
メレジトース	—	0.80	6.1	α-メチル グルコシド	+	1.30	5.4
澱粉	+	1.30	5.3	炭水化物無	—	0.80	6.2

成 (+).

カタラーゼ存在: (—).

色素: 生成しない.

胞子の耐熱性: 72時間培養中
の胞子は馬鈴薯汁・グルコース
培地で 100°, 5 分の加熱に耐え
る.

pH: 最適 5.6~7.3, 繁殖可
能範囲 4.2~8.8.

温度: 最適 33°.

好嫌気性: 偏性嫌気性.

各種炭水化物の醗酵性: Spe-
akman の塩液 (ペプトン 0.5%
添加, pH 6.6) に各種の炭水化

物を 1% 濃度に加えた培地を Einhorn 管につめて使用. これに馬鈴薯汁・グルコース培地で 24 時間培養したものを 2 白金耳接種し, 33° で培養してガスの発生, 5 日目の pH, 酸度 (1 ml 中和に要する N/100 NaOH の ml) を検した. 結果は第1表. すなわち, 醗酵性炭水化物はアラビノース, キシロース, グルコース, フルクトース, ガラクトース, マンノース, ラクトース, シュクロース, マルトース, トレハロース, セロビオース, ラフィノース, 澱粉, イヌリン, ペクチン, デキストリン, グリコーゲン, マンニトール, サリシン, α-メチルグルコシドで, 非醗酵性炭水化物はラムノース, メレジトース, グリセロール, エリスリトール, アドニトール, ソルビトール, ダルシトール, イノシトールである. なおセルロースの醗酵は極めて微弱である.

III. 類 縁

以上の諸性質から Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 6 版 (1948) によって鑑縁を求めると, *Clostridium acetobutylicum* McCoy, Peterson, Fred, Hastings になる. 些細な点では硝酸塩還元性と pectin

第2表 醗酵性能試験に用いた醗の組成

組 成	グルコース肉汁		蔗 糖 醗		麩 糖 蜜 醗		玉 蜀 黍 醗		玉 蜀 黍 硫 安 醗	
	グルコース	6g	蔗 糖	6g	麩 糖 蜜	12g	玉 蜀 黍	5g	玉 蜀 黍	5g
窒 素	肉エキ	1g	硫酸アンモニウム	0.3g	硫酸アンモニウム	0.3g			硫酸アンモニウム	0.3g
塩 類	食 塩	0.5g	大豆 粕	0.3g	大豆 粕	0.3g				
緩 衝 剤	炭酸カルシウム	0.4g	過燐酸石灰	0.1g	過燐酸石灰	0.1g			炭酸カルシウム	0.4g
水道水		100 ml		100 ml		100 ml		100 ml		100 ml

第3表 各種醗の醗酵試験

	グルコー ス肉汁	蔗糖醗	麩糖蜜醗	玉蜀黍醗	玉蜀黍 硫安醗
原 糖	g/100 ml	5.67*	5.81**	6.19**	3.57**
醗 酵 期 間	日	4	5	3	4(未終了)
糖 消 費 率	%	94.7	95.1	86.4	66.1
pH		6.0	5.9	6.0	5.8
酸 度		1.63	1.58	1.67	1.60
アセトン	g/l	7.21	7.95	7.94	—
ブタノール	〃	10.13	9.84	9.52	—
エタノール	〃	1.08	0.91	1.43	—
ソルベント	〃	18.42	18.70	18.89	—
アセトン	%***	13.6	14.4	14.9	—
ブタノール	〃	18.7	17.8	17.8	—
エタノール	〃	3.2	1.6	2.7	—
ソルベント	〃	35.5	33.8	35.4	—

* グルコースとして

** 転化糖として

*** 対消費糖収率

の醗酵性で異なっている. しか
し, これらはこの菌種に属する
諸菌株で普通にみられる相違で
ある. つまり生甘諸切片を崩壊
する菌はアセトン・ブタノール
菌であった訳である.

IV. 醗酵性能

つぎにこの菌株のソルベント
生成能を検した. 醗には第2表
に示す組成のものを用いた. 馬
鈴薯汁・グルコース培地で heat
shock 培養後, 同培地で2回,

第 2 図 生甘藷切片崩壊

結果は第 2 図に示すように、強性能で衰えていなかった。したがってこの菌株はもはや常に植えかえを要する生甘藷・殺菌水培養のアンブールというような不安定で汚染菌の入った粗培養の状態では保存する必要はなく、純粋で安定な砂培養として保存できる。なお、V の試験に供した他の諸菌株は甘藷崩壊能を強化する移植操作をそれほど経ていない点に多少の疑問を残していたものであるが、この孢子保存の砂培養から heat shock 培養したものが生甘藷で移植しないでもすぐに強い甘藷崩壊能を示す点から、この種の疑問はなくなる。

総 括

殺菌水中の生甘藷の切片を崩壊して澱粉粒を遊離する細菌株は、従来性能低下を防ぐため一週間前後で移植する必要があり、また生甘藷切片・殺菌水という培地にしか生えないとされていたため純粋分離ができなかった。培地検索の末、馬鈴薯汁寒天に Difco's brewer anaerobic agar を等量加えた培地を使用することによって、この菌株を純粋に分離できた。ついで菌学的諸性質を検した結果、*Clostridium acetobutylicum* に属し Weizmann 型に近いことを確かめ、菌株番号を S1 とした。保存には砂培養でよく数か月保存で生甘藷崩壊能は低下しなかった。なお手持ちの他のブタノール菌数十株について検したが、生甘藷崩壊能はほとんど認められなかった。

終りに菌株の分譲を頂いた鹿大蟹江教授に深謝する。

(1) 和田 水：日本農芸化学会大会(昭 32)に講演発表の予定であったが、都合により中止

された。

(2) 本江元吉、長田 健：本誌, 32, 454(1958).

主醗と同じ組成の醗で 1 回移植した種菌を 10 vol % 量接種して 33° で醗酵させた結果は第 3 表。つまり Weizmann 型と同じくらのエタノールをつくるが、アセトンが多く、また硫酸をよく利用する点で違っている。この菌株番号を S1 とし、*Clostridium acetobutylicum* S1 とする。

V. 他のブタノール菌の生甘藷切片崩壊能

生甘藷崩壊能をもつ菌株がブタノール菌であったから、他のブタノール菌も同様の甘藷崩壊能をもちはいないかと考えられるので、教室保存の Weizmann 型ブタノール諸菌株や Saccharo 型ブタノール諸菌株、イソプロパノール諸菌株についてこの性能を検した。そのうち Weizmann 型の *Clostridium acetobutylicum* 314-48 株にごく微弱にこの性能が認められたにすぎなかった。つまりこの性能はこの S1 菌株特有のものと認められた。

VI. 保 存

この S1 株は孢子をつくる *Cl. acetobutylicum* としまったので、常法にしたがいこれを砂培養にして保存してみた。今までに数か月を経たこの砂培養を馬鈴薯汁・グルコース培地に加えて heat shock し、生育してきた培養をとって甘藷崩壊能を検した