諭介博士に謹んで感謝の意を表します。

尚, 研究費を文部省自然科学研究費に仰いだ他, 赤外部吸収スペクトルに就いては武田薬品工業研究所並びに新潟大学の浅岡久侯氏の御援助に依った事, 又 eugenol 標品の入手は高砂香料の御厚意に依ったことを記してここに衷心より厚く御礼を申し上げます。

第 6 図 Oryzanol (A) 及び合成 Eugenyl-palmitate (B) の稲熱病菌孢子に対する発芽促進効果

○—○ 対照 □—□ 100 p.p.m. ●—● 10 p.p.m.
△—△ 1 p.p.m. ▲—▲ 0.1 p.p.m.

(1) 河村栄吉, 小野小三郎: 農業及び園芸, 21, 101 (1946).

(2) 小野小三郎: 北陸農業研究, 2 巻 1 号, 57 (1953).

(3) 玉利勤治郎, 加治 順, 小笠原長宏, 菅 正倫: 本誌, 32, 643 (1958).

(4) 玉利勤治郎, 加治 順, 小笠原長宏, 菅 正倫: 本誌, 34, 945 (1960).

アセトン・ブタノール醗酵に関する研究 (第 4 報)*

東大 314 号菌の栄養要求に於ける酢酸の役割

土井新次, 菅間誠之助**, 大島克己***, 田内守和**** (名古屋大学農学部農芸化学教室)

昭和 35 年 6 月 14 日 受理

前報^(1,2)に於いてアセトン・ブタノール菌東大 314 は数種のビタミン, 有機塩基及び無機塩類を含む合成培地でカゼイン塩酸分解物 (以下 CAH と略称) を窒素源としてよく生育し, 且つ正常なソルベント収量をあたえるが, カゼインのアミノ酸組成に準じ作製したアミノ酸混合物では CAH とおきかえることが出来ないこと, 更に CAH の示す活性はその酸性区分 (A, N1 及び N2: 前報⁽²⁾参照) に見出されることを示した. 濾紙及びカラム・クロマトグラフィーによる分析は, この有効区分が多量の Asp, Glu (アミノ酸の略号は前報⁽²⁾に準ず) 及び少量の Ser, Thr, Gly を含むことを示した. われわれはこれらの有効区分をあわせ Hirs, Moore 及び Stein の方法⁽³⁾で調製規模で分離したところたまたま溶出液として使用した酢酸アンモンが有効であることを知った. 一方この菌のアミノ酸要求を酢酸塩と組合わせて再調査した結果, 314 は普通の乳酸菌用完全合成培地⁽⁴⁾に用いられている Glu 量の約 4 倍量を必要とし, 更にこの量は拮抗的に働く他のアミノ酸の存在で増大すること, 又 314 は Glu のみを強く要求するがこの要求は酢酸アンモンにより完全に置換されることがわかった. Glu が生育の制限因子となっている培地では酢酸及び酪酸が集積され, 栄養条件より原因される酸醗酵の 1 型式の存在を示した.

実 験

使用菌株: De Fonbrun 型ミクロマニピュレーターで単孢子分離したアセトン・ブタノール菌東大 314. そ

* Studies on the Acetone-Butanol Fermentation, Part IV. Role of Acetate in the Nutritional Requirements of Acetone-Butanol Producing Bacteria, Strain 314.

By Shinji DOI, Seinosuke SUGAMA, Katsumi OSHIMA and Morikazu TAUCHI (Department of Agricultural Chemistry Faculty of Agriculture, Nagoya University)

** 現在, 国税庁醸造試験所

*** 現在, 愛知県食品工業試験所

**** 現在, 株式会社中野酢店

第1図 完全培地及び不完全培地における生育

—●— 糖消費 —▲— アセトン —□— 混濁度 —○— 全酸度
—○— 菌体蛋白 ——— は完全培地, ---- は不完全培地

* 培養液 1cc あたりの mg. ** 培養液 10cc あたりの N/10 アルカリの cc.

*** 培養液 10cc あたりの mgN.

糖の消費率で示してきた。しかし生育を伴わない状態でも糖を醗酵することもありうるので、この点を確めるため生育経過を追って糖消費、蛋白態窒素の増加、混濁度、酸度を CAH 培地及びアミノ酸培地で測定し比較したところ糖の消費は蛋白態窒素の増加を伴い従来のごとく単に糖消費で生育を比較して差支えないことがわかった(第1図)。尚、不完全培地で滴定酸度が大きくなる傾向を示している。

有効区分の IR 4 B 樹脂カラムによる再分割と酢酸の効果： 前報⁽²⁾で用いた Hamdy 等の方法⁽⁶⁾による酸性アミノ酸区分の分割は単に定性的なものであり、各区分の効果を検することは量的に不可能であったので、更に Hirs, Moore 及び Stein の方法⁽⁹⁾で有効区分をアミノ酸として Glu, Asp 及び中性アミノ酸の3区分にわけその効果をしらべた。即ち 200~400 mesh の IR 4 B XE 59 樹脂 200 cc を常法⁽³⁾により 2N 酢酸と処理し H 型となし、洗滌後 pH 5.0 の 0.2 M 酢酸アンモン緩衝液に懸濁、放置、傾瀉後少量の同じ緩衝液と共に径 4cm のカラムにつめ pH 5.0 に緩衝化した後 CAH の有効区分の混合液 5 cc (28 mgN を含有) を添加、0.2 M 酢酸アンモン緩衝液で溶出した。流速毎時 10 cc、総量 1.4 l 流し、溶出液は 10 cc ずつとり、その 0.1 cc につ

第2図 CAH の有効区分の IR 4 B XE 59 樹脂カラムクロマトグラム

第1表 IR 4 B の各区分の活性

培地	糖消費率 %	アセトン生成 mg/cc
CAH 培地	98.0	1.11
アミノ酸培地	85.0	0.52
アミノ酸培地 + F-N	92.3	2.41
+ F-G	97.0	1.61
+ F-A	100.0	1.59

第2表 酢酸添加の効果

培地	糖消費率 %	アセトン生成 mg/cc
アミノ酸培地	62.0	0.33
酢酸添加* アミノ酸培地	99.5	1.69

* 本文参照

の菌学的性質は前報⁽⁵⁾に示した。

培養及び分析： 接種菌液の調製法及び培養方法はすべて前報⁽¹⁾に同じ。使用した基礎培地は前報^(1,2)に記載した。本報でアミノ酸培地と称するものは第2報⁽²⁾のアミノ酸組成表中 A_{mix}, N_{mix}, B_{mix} を窒素源とする合成培地であり、CAH 培地とはカゼイン酸分解物を窒素源とする半合成培地である。分析法は指示のない限り前報⁽¹⁾に準じた。

完全培地及び不完全培地における生育： アセトン・ブタノール菌は生育の時期により酸度が変化し、又溶菌するためその生育度を酸度、混濁度で測定することが出来ないため従来ブドウ

糖の消費率で示してきた。しかし生育を伴わない状態でも糖を醗酵することもありうるので、この点を確めるため生育経過を追って糖消費、蛋白態窒素の増加、混濁度、酸度を CAH 培地及びアミノ酸培地で測定し比較したところ糖の消費は蛋白態窒素の増加を伴い従来のごとく単に糖消費で生育を比較して差支えないことがわかった(第1図)。尚、不完全培地で滴定酸度が大きくなる傾向を示している。

前報⁽²⁾で用いた Hamdy 等の方法⁽⁶⁾による酸性アミノ酸区分の分割は単に定性的なものであり、各区分の効果を検することは量的に不可能であったので、更に Hirs, Moore 及び Stein の方法⁽⁹⁾で有効区分をアミノ酸として Glu, Asp 及び中性アミノ酸の3区分にわけその効果をしらべた。即ち 200~400 mesh の IR 4 B XE 59 樹脂 200 cc を常法⁽³⁾により 2N 酢酸と処理し H 型となし、洗滌後 pH 5.0 の 0.2 M 酢酸アンモン緩衝液に懸濁、放置、傾瀉後少量の同じ緩衝液と共に径 4cm のカラムにつめ pH 5.0 に緩衝化した後 CAH の有効区分の混合液 5 cc (28 mgN を含有) を添加、0.2 M 酢酸アンモン緩衝液で溶出した。流速毎時 10 cc、総量 1.4 l 流し、溶出液は 10 cc ずつとり、その 0.1 cc につ

ケター中に真空で1週間放置後酢酸臭のある状態で各々を 5cc の水にとり、その一定量をアミノ酸培地に加え生育促進効果をしらべたところ予期に反し総ての区分に効果が認められた(第1表)。一方われわれは糖消費がのびない状態では酸度が高く、溶剤の生成がわるいことを認めていたので有効因子は一度生成された酸の還元に関係するものと予想していたので、予め酢酸を添加し培養の pH を低下させた状態で有効区分を添加

第 3 図 酢酸の有効濃度

第 4 図 314 のグルタミン酸及び酢酸アンモンにたいする生育の対応

* 10cc 培地あたりの添加量をしめす ** 前報⁽²⁾の Nmix

てしらべたが、酸性アミノ酸の要求は有効区分が Glu, Asp, Ser, Thr 及び Gly を含むため充分検討出来なかった。しかし Glu を欠いたアミノ酸培地で糖消費率は 50% 以下となり 314 はこのアミノ酸を強く要求することがしられていた。一方酢酸の添加によりアミノ酸培地で完全な糖消費をしめすようになったので酢酸添加のもとでアミノ酸の要求を再調査したところ、Glu を欠いた培地でも酢酸を添加すれば生育は回復することがわかった。又前回の調査で強い要求をしめしたヴァリン、イソロイシンは今回は何等の要求も示さず単孢子分離した菌自体の性質の差によるものか或いは培養法上の誤りによるものか不明であるが、314 はアミノ酸として Glu のみを強く要求する (第 4 図)。即ち 20 mg/cc のブドウ糖を含む合成培地で約 0.2 mgN/cc の Glu が窒素源としてあたえられたとき完全な糖消費を示すがこの量は乳酸菌用の基礎培地に加えられている Glu 量の約 4 倍、従来われわれが用いていた基礎培地中の Glu 量の約 2 倍であり、これまでの培地では Glu が生育の制限因子となっていた可能性がある。更に Glu の要求量は共存する他のアミノ酸、例えば Thr や中性アミノ酸の拮抗作用のためアミノ酸培地では 0.2 mgN/cc 以上に実際は増大しているものと思われ (第 4 図)、ここに Glu を多量に含む CAH の酸性区分の効果があらわれたものと理解される。又カゼインの酸分解物の標品についても Difco のカサミノ酸を窒素源としては最大生育を示さず、この場合酢酸添加の効果があらわれる。即ち酸分解物を調製する過程で溶解度差によるアミノ酸の消失に伴う量的バランスの変化の結果 Glu 含有率が生育の良否を左右したものである。このような所謂 unbalance の培地に酢酸塩を添加することにより生育が促進されることは酢酸が Glu の供給源として働いている可能性を示している。実際 314 は酢酸アンモンのみを唯一つの窒素源として最大生育を示し、窒素量として Glu と略同じ量も要求する (第 4 図)。即ち酢酸塩添加の効果は、この酸が酪酸、ブタノールに還元されることによりブドウ糖の酸化を促進するという見掛上の効果のみならず窒素源として直接生育に使われ、また Glu の給源としてアミノ酸相互の不均衡を是正することにあつたと思われる。酢酸アンモンの他、硫酸及び塩化アンモンが窒素源として使われるかどうかしらべたが、これ等の無機窒素化合物は酢酸アン

すればその効果がより明確になるであろうと考え、アミノ酸培地を酢酸で pH 4.6~4.8 に調節したものに有効区分を添加しその効果をみたところ、アミノ酸培地でも酢酸を添加すれば完全な糖消費を示すことがわかった (第 2 表)。酢酸は乳酸菌のための完全合成培地には予め加えられているが、ブチル細菌の場合これらの菌は酢酸を集積することが知られていたので特に培地に添加されなかったのである。上述の IR 4 B 樹脂カラムの各区分は完全に酢酸アンモンがのぞききれずその効果があらわれたものと考えられる。酢酸の有効濃度は 10^{-1} M の濃度にブドウ糖を含むアミノ酸培地で 10^{-2} M 濃度であった (第 3 図)。314 はチアミンを強く要求するが、アミノ酸培地でこのような酢酸要求を示すことからピルビン酸の代謝が栄養的に欠乏した菌で隘路になっていることも考えられたのでチオクト酸の要求をしらべたが全く効果が認められなかった。この菌はメバロン酸にたいし要求を示さない。

314 の Glu 要求と酢酸アンモンの置換性： 前報⁽²⁾ですでに 314 のアミノ酸要求を有効区分の添加及び未添加の場合につい

モンと置きかわることが出来ないことがわかった (第 4 図)。

完全培地及び不完全培地における醗酵: 以上の実験より CAH 培地とアミノ酸培地との相違は Glu の含有量の相違にもとづくことがわかった。すでに指摘したようにアミノ酸培地では酸を集積するようになる。この酸がもし酢酸でないなら CAH の有効因子は酢酸の生成、即ち恐らくピルビン酸の代謝に関係する可能性も残されるわけであり、そのために Glu 量を制限した不完全培地での醗酵生産物を分析した。これには次のような培地を使用した。(1) 5% 玉蜀黍醗、(2) アミノ酸培地、(3) 培地 (2) より Glu, Thr 以外のアミノ酸をのぞいたもの、(4) 酢酸アンモン培地 (窒素源として 0.58 mgN/cc の酢酸アンモンを含む完全合成培地)。夫々 150 cc の培地に、同じ培地で前培養した培養液 5 cc を接種し 37° で 4 乃至 6 日培養し完全に醗酵が終了した培養の濾液についてアセトン、ブタノール、エタノールを定量し、揮発性、不揮発性酸の分析は培養濾液 100 cc を 30 時間連続エーテル抽出し、エーテル駆除後の抽出残渣を Marvel 及び Rands の方法⁽⁸⁾でシリカゲルカラムを用い分離定量した。この方法では C₄ 以上の揮発酸は分離出来ないが、玉蜀黍醗ですでにこれらの酸を含まぬことが知られていた⁽⁹⁾のでこの点特に考慮しなかった。いずれの培地でも生成される酸は酢酸及び酪酸であり、他に量的にきわめて僅かであるが唯一の不揮発酸として乳酸-コハク酸に相当する位置にピークをあたえるが *p*-ヒドロキシ-ジフェニルによる呈色反応を示さずコハク酸と認められる。これらの酸は玉蜀黍醗のような粗原料を用い

第 3 表 完全及び不完全培地における醗酵

培地	糖消費率 %	終末 pH	全酸度** cc	ブタノール %***	アセトン %***	エタノール %***	酢酸 %***	酪酸 %***
玉 蜀 黍 醗	85.5	3.6	2.44	25.4	9.2	1.1	4.4	4.4
アミノ酸培地	92.2	3.6	3.10	18.2	4.3	2.9	7.5	6.8
Glu-Thr 培地	82.6	3.6	5.26	22.8	4.7	0	13.5	8.0
酢酸アンモン培地	96.4	4.4	2.95	13.6	7.0	3.8	6.4	7.2

* 本文参照 ** 培養液 10cc あたりの N/10 アルカリ cc 数であらわす *** 対消費糖%

た場合は別として糖消費がわるい場合増加する傾向を示す (第 3 表)。このような場合 Glu が生育の制限因子となっており、これを克服するため酢酸を集積し、酢酸をブドウ糖の酸化により再生産するために酢酸は酪

酸、ブタノールへ還元されると考えればこの現象は理解される。

考 察

(1) 314 は Glu を要求するのみでなく、Glu の要求量は拮抗するアミノ酸の共存のもとで増大するためカゼイン組成のアミノ酸混合物の添加量をましても培地中の Glu の絶対量はましてもこれと拮抗するアミノ酸量もまたため生育は促進されず、これが CAH 培地とアミノ酸培地の相違となったのである。

(2) 酢酸は *Clostridium* 属細菌の多くによって普通につくられる酸であるが生理的に重要な作用をもっている。*C. kluyveri* は炭水化物、アミノ酸を代謝しないが無機塩にエタノール及び酵母エキス中の因子即ち酢酸が添加されれば生育し、エタノールは酢酸が存在するとき酪酸、カプロン酸の合成に利用される⁽¹⁰⁾。Gavard 等⁽¹¹⁾は *fructose phosphate dehydrogenase* が β -ketohydrogenase と DPN を介して共転することを酪酸菌で証明し、ブドウ糖の E. M. P. による酸化が酢酸より酪酸の還元と共転することを示した。314 の酢酸塩の要求は直接 Glu の要求にかかわることから Glu の合成、菌体蛋白の合成にこれが使われることは明かであるが、Glu 欠乏培地で酪酸を著しく集積し且つブタノールも生成している (第 3 表) ことから、この菌は酢酸をこれらの化合物に転換することによりブドウ糖の酸化を促進し酢酸を再生産していると考えることが出来る。そのためにはアセト・アセチル CoA の還元反応が行われなければならないが、実際 Glu 欠乏培地ではアセトン生成が少くアセト・アセチル CoA が還元される方向に反応が進んでいることを示している。

(3) 酢酸より Glu の合成の経路については TCA を有しない嫌気性菌で Tomlinson⁽¹²⁾ は *C. kluyveri* をエタノール、酢酸及び CO₂ を唯一の炭素源として培養し菌体の加水分解物より Glu を分離し、酢酸-1-C¹⁴, C¹⁴O₂ を培地に別々に添加した場合の Glu の各炭素の C¹⁴ 含量をしらべ TCA より α -KG をへて合成される経路では説明出来ない新しい合成経路の存在を示した。Barker 等⁽¹³⁾は *C. tetanomorphum* の抽出液で Glu がメサコン酸まで可逆的に分解しこれがピルビン酸と酢酸に解裂することを証明した。314 は直接酢酸より Glu を合成することが出来ると考えられるが、この菌の Glu 合成が如何なる経路で行われているか興味ある問題である。

(4) アセトン・ブタノール菌は培地によって容易に酸を集積するようになることは屢々指摘されていた。古坂⁽¹⁴⁾は 314 が麹汁で培養されると酸醗酵することを認めた。314 の栄養要求は上述のように簡単であり、栄養的に豊富なこれらの天然培地でむしろ酸醗酵する原因は共存する化合物による阻害作用から説明される。314 は

3種のビタミンのみを要求するが不要のビタミンはむしろ生育を抑制する⁽⁹⁾。窒素源として用いられる天然物中の Glu の含有率が生育に最も影響をあたえることは当然予想されるが、玉蜀黍の蛋白質ツェインは 31.3% の Glu を含むが、米の蛋白質オリゼニン⁽¹⁵⁾は 14.5% しか Glu を含まない⁽¹⁵⁾。これらの点は醗酵原料の選択上重要な点と考える。

(5) 従来の基礎培地に加えられた有機塩基は生育の誘導期の長さに関係するが本質的には 314 に要求されない。従って 314 の完全な生育及び正常な醗酵を行わしめうる最少培地は次のようなものである。ブドウ糖 20g/l, 無機塩 (K_2HPO_4 500 mg/l, KH_2PO_4 500 mg/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200 mg/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/l, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 10 mg/l, NaCl 10 mg/l), チアミン塩酸塩 1 mg/l, *p*-アミノ安息香酸 1 mg/l, ビオチン 10 γ /l, グルタミン酸 200 mgN/l (2100 mg/l) あるいは酢酸アンモン 200 mgN/l (1060 mg/l)。

要 約

(1) 314 はアミノ酸としては Glu のみを必要とする。Glu の要求量はこれと拮抗するアミノ酸の存在で増大する。

(2) Glu の要求は完全に酢酸アンモンによって置換されるが無機のアモニウム塩では置換されない。

(3) Glu が制限因子となっている培地で酢酸と酪酸を集積するようになる。栄養条件によって生ずる酸醗酵の機構について考察した。

(4) 314 の生育及び正常醗酵のための最少培地を設定した。

本研究に対し終始御指導賜った東京大学坂口謹一郎名誉教授に深謝する。実験に使用したメヴァロン酸、リボ酸は夫々東京大学田村学造助教授、藤沢薬品工業株式会社酒井平一博士より戴いたものであり、ここに感謝する。

(本報告は昭和 35 年 5 月 28 日、農芸化学会関東支部例会で講演した。)

(1) 土井新次, 菅間誠之助, 清水宗年 : 本誌, 32, 544 (1958).	<i>Chem. Soc.</i> , 72, 2642 (1950).
(2) 土井新次, 菅間誠之助, 横井正芳, 足立 勇 : 本誌, 32, 548 (1958).	(9) 土井新次, 菅間誠之助 : 本誌, 32, 636 (1958).
(3) H. W. Hirs, S. Moore, W. H. Stein : <i>J. Biol. Chem.</i> , 195, 669 (1952).	(10) B. T. Bornstein, H. A. Barker : <i>J. Bacteriol.</i> , 55, 223 (1948); <i>J. Biol. Chem.</i> , 172, 659 (1948).
(4) 田村学造, 角田俊直, 桐村二郎, 宮沢 滋 : 本誌, 26, 464 (1952).	(11) R. Gavard, H. Descourtieux : <i>Compt. rend.</i> , 238, 2572 (1954).
(5) 菅間誠之助, 土井新次 : 本誌, 34, 434 (1960).	(12) N. Tomlinson : <i>J. Biol. Chem.</i> , 209, 605 (1954).
(6) M. K. Hamdy, W. J. Harper, H. H. Weiser : <i>J. Dairy Sci.</i> , 38, 147 (1955).	(13) A. Munch-Petersen, H. A. Barker : <i>J. Biol. Chem.</i> , 230, 649 (1958).
(7) H. Rosen : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 67, 10 (1957).	(14) 古坂澄石 : 未発表
(8) C. S. Marvel, R. D. Rands, Jr. : <i>J. Am.</i>	(15) 蛋白質化学, 共立出版, 1, p. 535 (1954).