〔農化 第 39 卷, 第 7 号, p. 247~251, 1965〕

ブ タ ノ ー ル 発 酵 (第 31 報)*

サッカロ型ブタノール・リッチ生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* の工業的使用試験

本江元吉, 原田良造†*, 赤星恭助†, 長田 健†, 高橋節男†
(九州大学農学部農芸化学教室; †三楽オーシャン株式会社八代工場)

昭和 40 年 3 月 10 日 受 理

サッカロ型ブタノール・リッチ生産菌は McCoy⁽¹⁾, 原田⁽²⁾によって *Cl. madisonii* McCoy が工業的に使用された。McCoy の菌株は「ブタノール/アセトン」の生産比が 4.2:1 で一見ブタノール・リッチであったが, 事実はブタノールやソルベントの仕込み糖に対する収率(以下収率と略)がそれぞれ 21% や 28% で低く, またおそらく異常発酵発生のためと考えられるが⁽³⁾, 短期間で操業が中止された。原田の菌株については次報で言及する。著者らの 2 人によって分離された *Cl. saccharoperbutylacetonicum* Hongo et Nagata⁽⁴⁾ N 1-4 菌株は, 実験室規模でブタノールの収率 25% 以上(通常菌株では約 20%), 全ソルベントの収率 34% 以上(通常菌株では 30~32%) という結果を得たので, 工業的使用試験として, まず 9 kl 仕込み中間工業試験で工業化の諸条件を検し, ついでその結果から判断して 200 kl 仕込み工業試験を試み, 所期の成果を収めることができた。その次第と結果とを報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株 *Cl. saccharoperbutylacetonicum* N-1-4 (第 1 図)。

2. 培地 馬鈴薯ブドウ糖培地 (PG 培地と略): すりおろした生馬鈴薯 150 g, ブドウ糖 10 g, 硫酸アンモニウム (硫安と略) 1 g, 炭酸カルシウム (炭カルと略)

* Butanol Fermentation. Part XXXI. Use of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* on the Plant Scale.

By Motoyoshi HONGO, Ryoza HARADA†, Kyosuke AKABOSHI†, Ken NAGATA† and Setsuo TAKAHASHI† (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka; †Yatsushiro Factory, Sanraku-Ocean Co., Ltd., Yatsushiro)

†* 現在は同社川崎工場

(a)

1 μm

(b)

10 μm

第 1 図 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

(a) 栄養細胞 (b) クロストリジアと孢子

3 g, 井水 1,000 ml.

糖蜜培地 (M 培地と略): 廃糖蜜 (糖含量約 55%) 90 g, 塩化アンモニウム (塩安と略) 1.8 g, 過リン酸石灰 1 g, 炭カル 4 g, 大豆粕 4 g, 井水 1,000 ml.

2 kl 種母用培地 (SM 培地と略): 廃糖蜜 120 kg, 塩安 3.2 kg, 炭カル 4.0 kg, 大豆粕 3.6 kg, 井水 2 kl. 始発 pH を 28% アンモニア水で 5.8~6.0 に調整.

どの培地も 1 kg/cm², 60 分殺菌.

3. 分析 発酵経過は, フラスコではガス発生量, タンクではブリックスの測定により, 同時に pH や酸度を測り, 菌形を検鏡した. 分析は, 糖をマイクロペルトラン法, アセトンを Goodwin 改良の Messinger 法, ブ

タノールとエタノールを Johnson 法で行なった。

結 果

I. 実験室試験

種母の培養は次のように行なった。砂培養 (約 0.5 g) → PG 培地 10 ml [100°, 60 秒熱処理後 15~20 mmHg

に排気し 30° で約 36 時間培養] → 糖濃度 4% の M 培地 [30° で培養, 減酸初期 (ガス出量によって測定⁽⁶⁾)] → 同上 M 培地 [同上] → 同上 M 培地 [同上] → 大豆粕無添加, 各種窒素源, 各種糖濃度の M 培地 [主発酵]。結果の数例を第 1 表に示す。なお, 各種条件の検討は中間工業試験と重複するので省略する。

第 1 表 実験室規模での発酵結果

菌株	原糖濃度 (g/100 ml)	窒素源 (g/100 ml)	発酵温度 (°C)	発酵期間 (時間)	収量 (g/100 ml)	ソ ル ベ ン ト			
						収 率 (%)			
						アセ トン	ブタノ ール	エタノ ール	全ソル ベント
KD (対照)	4.11	硫酸 0.20	30	45	1.333	8.6	22.0	1.8	32.4
N 1-4	4.11	" 0.20	30	45	1.489	8.1	26.0	2.1	36.2
"	4.83	" 0.20	30	65	1.782	7.6	26.6	2.5	36.7
"	5.03	塩安 0.18	30	60	1.857	6.8	27.2	2.9	36.9
"	5.57	" 0.18	30	60	1.916	6.1	26.7	1.6	34.4
"	5.17	液安*	30	72	1.768	5.9	26.1	2.2	34.2
"	5.28	塩安 0.18	35	48	1.711	8.9	22.1	1.4	32.4
"	4.82	" 0.18	28	60	1.639	6.0	27.2	0.8	34.0

* 炭カル含有培地 31 に 28% アンモニア水を接種前に 1 ml, 最高酸度期に 2 ml 添加。

第 2 表 主発酵へ添加する種母の培養時期の検討

種 母	種母添加時の ブリックス減 (%)	培養期	主 発 酵						
			原糖濃度 (g/100 ml)	発酵期間 (時間)	収量 (g/100 ml)	ソ ル ベ ン ト			
						収 率 (%)			
種母添加時の ブリックス減 (%)	培養期	原糖濃度 (g/100 ml)	発酵期間 (時間)	収量 (g/100 ml)	アセ トン	ブタノ ール	エタノ ール	全ソル ベント	
1.0	減酸初期	5.14	47	1.789	7.3	26.3	1.2	34.8	
0.8	"	5.02	46	1.732	6.3	26.8	1.4	34.5	
1.0	"	4.98	43	1.748	7.6	26.6	0.9	35.1	
1.5	減酸中期	5.08	52	1.748	6.6	26.5	1.3	34.4	
2.2	減酸末期	5.11	56	1.697	6.1	26.1	1.0	33.2	
2.4	"	4.96	55	1.691	7.2	25.8	1.1	34.1	

培地: 9 kl, 組成は腐糖蜜 900 kg, 塩安 16 kg, 過リン酸石灰 10 kg, 炭カル 30 kg。
種母量: 10 v %, 温度: 30°。

第 3 表 種母仕立ての検討

種 母	種母量 (vol. %)	大豆粕 添加量 (g/100 ml)	温度 (°C)	主発酵への 接種時の ブリックス減 (%)	主 発 酵						
					原糖濃度 (g/100 ml)	発酵期間 (時間)	収量 (g/100 ml)	ソ ル ベ ン ト			
								収 率 (%)			
種母量 (vol. %)	大豆粕 添加量 (g/100 ml)	温度 (°C)	主発酵への 接種時の ブリックス減 (%)	原糖濃度 (g/100 ml)	発酵期間 (時間)	収量 (g/100 ml)	アセ トン	ブタノ ール	エタノ ール	全ソル ベント	
0.02	0	30	1.15(36)*	4.97	52	1.570	6.5	24.2	0.9	31.6	
0.02	0	35	1.00(30)*	4.83	42	1.570	7.1	24.1	1.3	32.5	
0.02	0.2	35	1.20(27)*	4.62	45	1.497	7.5	23.7	1.2	32.4	
10	0	30	1.10(22)*	4.73	40	1.564	6.8	25.1	1.2	33.1	
10	0	35	1.20(18)*	4.78	40	1.581	7.2	24.4	1.5	33.1	
10	0.2	35	1.20(15)*	4.87	42	1.665	7.2	25.7	1.3	34.2	

主原料: 比島蜜, 種母培地: 2 kl, SM 培地組成 (ただし大豆粕は表示量)。

主発酵培地: 9 kl, 組成は腐糖蜜 900 kg, 塩安 16 kg, 炭カル 20 kg, 温度: 30°。

* () 内数字は接種後の経過時間。

II. 中間工業試験

9 kl 仕込みタンクを使って, この菌株を工場現場で使用するための下記諸条件を検討した。

A. 種母仕立て 移植の時期については, 第 2 表に示すように, 最高酸度期から減酸初期までに移植するのが良く, 減酸中末期に移植すると発酵経過が長引き収率も多少減少する傾向を示した。移植しつつ漸次に量を増していく場合, 従来のサッカロ型菌株の中には繁殖が速くて, 種母仕立ての途中で 9 kl 培地に 21 接種 (種母量 0.02 v %) という工程を経るものもあった。しかしこの N 1-4 菌株は従来の菌株に比べて繁殖が遅いので, 主発酵に移植できる状態になるまでに時間を要

して操業に支障をきたすおそれもあると考えられた。このため種母仕立てとして, (1) 種母量, (2) 種母培地への大豆粕 (生育促進因子含有) の添加, (3) 発酵適温 (30°) 以上の温度管理, について検討した。諸結果を第 3 表に示す。

すなわち, 種母量が 0.02 v % と 10 v % とでは繁殖に 12~13 時間の差があり, また培養温度を 35° に上げることによって 4~5 時間, 大豆粕 0.2% 添加でさらに 3~4 時間繁殖が速くなった. このように菌の繁殖を速くして代謝能を盛んにした種母を用いると主発酵での経過や収率も良く, 試験を繰り返して結果に安定性ももたらされることを確認したので, 次の種母仕立て方式を設定した. すなわち, 砂培養約 0.5 g を試験管中の PG 培地 30 ml に加えて 100°, 90 秒熱処理後, 15~20 mmHg 排気下 30° で培養し, 澱粉が液化状になり盛んにガスを発生する状態になったとき (30~36 時間, 菌は桿状で運動旺盛), 全量を M 培地 2 l に接種して 30° で 20~24 時間培養し, ガス出量によって減酸期に入ったことを確認して (菌は桿状で運動旺盛) 2 kl 種母タンクに移植し, 33~35° で培養. 繁殖にしたがい pH は下がり, 約 10 時間後ブリックス減 0.5 前後で約 5.2 になる. この時期に 28% アンモニア水を添加して pH を 5.4~5.6 に上げ, 接種後約 20 時間でブリックス減が 1.0~2.0° に達したとき減酸期に入ったことを確認し (菌は桿状で運動旺盛), 2 分してそれぞれ 9 kl タンク 2 槽の SM 培地に接種. この培養を上記と同様に管理して, 中間工業試験

第 4 表 仕込み糖濃度の検討

仕込み糖濃度 (g/100 ml)	発酵期間 (時間)	収量 (g/100 ml)	ソ ル ベ ン ト			
			収 率 (%)			
			アセ ト ン	ブタノ ール	エタノ ール	全ソル ベント
5.04	48	1.753	8.3	25.6	0.9	34.8
5.31	50	1.677	6.5	24.0	1.1	31.6
5.42	46	1.718	6.8	23.1	1.8	31.7
6.15	63	1.525	7.1	16.4	1.3	24.8

主原料: 比島蜜. 培地: 9 kl, 組成は廃糖蜜 (各仕込み糖濃度に調整), 塩安 16 kg, 炭カル 20 kg, 温度: 30°.

ではその 0.45~0.9 kl を 9 kl の主発酵タンクに, 工業試験ではその全量または 2 槽分全量を 200 kl の主発酵タンクに接種することにした.

B. 主原料 (廃糖蜜)

a) 仕込糖濃度: 第 4 表にも示すとおり, 5% 前後が良く, 5.3% 以上になると収率が低下した.

b) 廃糖蜜の品質: 同地方産の廃糖蜜でも入荷時によって多少の差違が認められるが, 一般に品質は産地によって大別される. 産地別廃糖蜜の品質と発酵成績とを第 5 表に示す. 比較的成績が良いのはタイ蜜で, 発酵期間は 50 時間前後でやや長い, ソルベント収率は 35.7%, ブタノール収率は 26.2% で他の蜜より収率が 1~2% 上回っている. 比較的悪いのは印度蜜で, 発酵期間が 64 時間で長く, ソルベント収率は 31.5% で少い. インドネシア蜜, 比島蜜は普通の成績を示したが, キューバ蜜は多少ブタノール収率が低い. 比較的発酵成績が悪い蜜に対しては, 仕込み糖濃度を低くすることによってある程度対処できた. その結果を第 6 表に示す.

C. 副原料

a) 窒素源: 工業的には硫酸, 塩安, 液体アンモニア

第 6 表 劣質の廃糖蜜に対する低糖濃度仕込みの効果

原糖濃度 (g/100 ml)	発酵期間 (時間)	収量 (g/100 ml)	ソ ル ベ ン ト			
			収 率 (%)			
			アセ ト ン	ブタノ ール	エタノ ール	全ソル ベント
5.18	64	1.610	7.3	23.1	1.1	31.5
5.10	65	1.583	6.4	24.0	1.1	31.5
4.90	64	1.586	6.9	24.3	1.2	32.4
4.78	60	1.561	7.2	24.6	0.9	32.7
4.63	57	1.576	8.0	24.8	1.2	34.0

主原料: 印度蜜. 培地: 9 kl, 組成は廃糖蜜 (各仕込糖濃度に調整), 塩安 16 kg, 炭カル 20 kg, 温度: 30°.

第 5 表 産地別廃糖蜜の品質と発酵成績

産 地	品 質				発 酵 成 績						
	直糖 (%)	全糖 (%)	ブリッ クス (°)	灰分 (%)	原糖 濃度 (g/100 ml)	発酵 期間 (時間)	収量 (g/100 ml)	ソ ル ベ ン ト			
								収 率 (%)			
								アセ ト ン	ブタノ ール	エタノ ール	全ソル ベント
タ イ	17.58	55.38	76.8	4.14	5.06	50	1.806	7.9	26.2	1.6	35.7
インドネシア	23.00	57.32	89.8	7.90	5.03	45	1.705	7.3	25.2	1.4	33.9
比 島	25.51	58.88	86.8	6.60	5.09	41	1.735	7.9	25.3	0.9	34.1
キューバ	18.79	51.37	85.0	7.60	5.00	48	1.690	8.9	23.7	1.2	33.8
印 度	25.20	50.38	87.4	8.60	5.10	64	1.608	6.1	24.4	1.0	31.5

培地: 9 kl, 組成は廃糖蜜 (仕込み糖濃度 5% 前後になるように調整), 塩安 16 kg, 炭カル 20 kg, 温度: 30°.

第2図 窒素源にアンモニア水を使用した発酵経過

培地: 9 kl, 組成は比島産蔗糖蜜 900 kg, レで 28% アンモニア水を数字量 (1) 添加. 温度: 30°.

— ブリックス pH

原糖濃度 4.76 g/100 ml, ソルベント収量 1.556 g/100 ml,

収率 34.2%, ブタノール収率 25.9%, アセトン収率 7.2%,

エタノール収率 1.1%.

(液安と略) が対象になる. 塩安や硫安では窒素の資化につれて残る酸根の中和に炭カルを使用した. ただ硫安の場合には残る硫酸根が発酵や蒸留に悪影響を及ぼすので除外して塩安と液安とを用いることにした. 添加量は一般にアンモニアとして対糖 1.4% が適当とされているが, 蜜の種類によって多少相違し, たとえば比島蜜やインドネシア蜜の一部, タイ蜜の中にはアンモニアとして対糖 1.0~1.2% の添加量で十分なものもあった. 液安使用の場合には, 添加する濃アンモニア水自体が生成酸の中和にも役立つが, 経過に従って間断的に加える必要があり, 操作は複雑になる. 1 例を第2図に示す.

b) リン酸源: 工業的に用いられるのは過リン酸石灰で, 添加量は一般に P_2O_5 として対糖 0.2% が適当とされているが, 添加の適否は蜜の種類によって違い, たとえば, インドネシア蜜や比島蜜, 印度蜜の中には添加によってわきつきが速くなり発酵期間が短縮されるが, ブタノール収率がやや悪くなるものもあり, タイ蜜やキューバ蜜では添加の効果は認められなかった.

D. 温度管理 一般のサッカロ型菌株と同様に, N 1-4 菌株も発酵温度に敏感で, 適温より高くなるとソルベントが減りそのうちのアセトンの割合が増し, 逆に適温よりも低くなると同じくソルベントが多少減ってブタノールの割合がいくらか増す傾向がある (第1表). 一方, 適温の 30° では発酵期間が多少長引くことがあるので, 工場現場で支障をきたすおそれもあるかと考え, 主発酵で 32~35° 管理を試みたところ, 発酵期間は多少短縮されたがブタノール収率が低下した. 特に発酵期間が長引く印度蜜で行なった結果を第7表に示す.

第7表 発酵温度の検討

温度 (°C)	原糖 濃度 (g/100 ml)	発酵 期間 (時間)	収量 (g/100 ml)	ソルベント			
				アセ トン	ブタノ ール	エタノ ール	全ソル ベント
30	4.78	62	1.561	7.0	24.8	0.9	32.7
30	4.90	65	1.586	7.1	24.1	1.2	32.4
30	4.69	60	1.584	7.0	25.2	1.6	33.8
32	4.84	55	1.568	9.6	22.3	0.5	32.4
32	4.99	54	1.587	7.8	22.9	1.1	31.8
32	4.64	52	1.537	8.8	22.9	1.4	33.1

主原料: 印度蜜, 培地: 9 kl, 組成は蔗糖蜜 950 kg, 塩安 16 kg, 炭カル 20 kg. 温度: 表示.

E. pH 管理 種母添加前の始発 pH 調整と発酵中 pH 5.2 前後まで下がったときの調整とを検討した. 始発 pH は炭カルを加えて煮沸する関係で普通 5.6~5.8 になるもので, このまま発酵させてもよいが, 28% アンモニア水を添加して pH 5.9~6.0 まで上げた方がよい結果をもたらした. 発酵中の pH は最高酸度期付近で 5.2 前後まで下がり若干発酵が衰える傾向がある. この時期に窒素源の補給もかねて 28% アンモニア水を添加して, pH 5.4~5.6 に上げると発酵がより旺盛になることが認められた. pH 管理が十分に行なえるならば液安だけを窒素源に使用してもよいが, 普通は塩安を添加しておいてアンモニア水で pH 管理をした方が発酵に安定性があった. 液安使用の場合は, 炭カルを添加しないので pH の変動が激しく, pH 管理が十分でないと菌が弱体化し異常発酵が起りやすかった.

III. 工業試験

A. 種母 中間工業試験でと同様に仕立てた 2 kl 培養を 2 分してそれぞれ 9 kl 種母タンク (培地組成: 蔗糖蜜 600 kg, 塩安 16 kg, 炭カル 20 kg, 大豆粕 18 kg) 2 槽に接種. 接種直後の糖濃度 4.0 g/100 ml. 温度 33~35°. 28% アンモニア水で始発 pH 5.8~6.0 に調整. 8 時間後から菌の繁殖にともない pH が下がり, 発酵が盛んになった pH 5.2 前後で 28% アンモニア水を添加して pH 5.4~5.6 に調整し, 接種後約 20 時間でブリックス減が 1.0 を越えたとき (菌は棒状で運動旺盛) 主発酵に接種した.

B. 主発酵 200 kl 仕込み主発酵の経過と結果とを第3図に示す.

総 括

Clostridium saccharoperbutylacetonicum Hongo et Nagata N 1-4 菌株の工業的使用を試み, 次の結果を

第 3 図 工業試験の発酵経過

培地: 210 kl, 組成は比島産廃糖蜜 18,000 kg, 塩安 300 kg, 炭カル 450 kg. レ でアンモニア水を数字量(kl)添加. 種母量: 10 v %. 温度: 30°. 発酵期間: 55 時間.

—●— ブリックス pH

原糖濃度 5.14 g/100 ml, ソルベント収量 1.760 g/100 ml, 収率 34.2%, アセトン収率 6.9%, ブタノール収率 25.8%, エタノール収率 1.5%.

得た.

I. 9 kl 仕込み中間工業試験

(1) 種母仕立てについては, この菌株の繁殖が遅いため, 種母培地に生育因子を含む大豆粕を 0.2% 添加して 35° 前後で管理し 9 kl タンクへ 10 v % の種菌量を添加することが必要で, これによって安定した主発酵を維持することができた.

(2) 仕込糖濃度は 5% 前後が良く, また主原料である廃糖蜜の品質が発酵に及ぼす影響が大きく, 特に悪い印度蜜では仕込糖濃度を低くすることによって対処できることを明らかにした.

(3) 副原料の窒素源やリン酸源の添加は, 主原料蜜の品質に応じて検討を要し, 窒素源については比島蜜やインドネシア蜜の 1 部, およびタイ蜜の中にはアンモニアとして対糖 1.0~1.2% の添加量で十分なものもあり,

リン酸源については比島蜜やインドネシア蜜, 印度蜜の中には添加によって発酵期間が多少短縮される程度でソルベント収率には効果がないものもあり, タイ蜜やキューバ蜜では添加の効果は全然認められなかった.

(4) 温度管理 (発酵適温の 30° 以上の 32~35°) によって発酵期間を多少短縮できたがブタノール収率は悪くなり, 効果としては認め難かった.

(5) pH 管理については, 発酵盛期での pH の逸脱を管理することによって, 発酵の安定性を増すことができた.

II. 200 kl 仕込み工業試験

中間工業試験の諸結果に基づいて, 仕込み糖濃度 5.14 % で 200 kl 仕込みの工業試験を実施し, 発酵期間 55 時間でソルベント収率 34.2%, ブタノール収率 25.8% の成績を収めることができた.

終りに本菌の工業的使用試験の実施とその結果の発表を許可された三葉オーシャン (株) 社長鈴木三千代氏, 御支援激励をいただいた同社武田義人博士, 取締役八代工場長鈴木二氏, 種々御協力をいただいた八代工場溶剤製造課の諸氏に感謝します. 研究費の 1 部は文部省科学試験研究費による. 併せ記して謝意を表する.

- (1) E. F. McCoy: U. S. Pat. 2,398,837, Can. Pat. 433,189.
- (2) 原田良造: 醸協, 21, 69 (1963).
- (3) E. F. McCoy, L. E. McDaniel, J. C. Sylvester: *J. Bact.*, 47, 443 (1944).
- (4) 本江元吉: 日本特許 284,441, U. S. Pat. 2,945,786, French Pat. 1,265,840, 中華民国 (台湾) 特許 1,566.
- (5) 本江元吉: 本誌, 30, 729 (1956).