ブタノール発酵 (第 32 報)*

サッカロ型ブタノール・リッチ生産菌

Clostridium saccharoperbutylacetonicum

の工業的使用での異常発酵

本江元吉, 村田 晃, 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

ブタノール発酵工業には古くからしばしば異常発酵が起っており, バクテリオファージ(ファージと略)の感染による場合も知られている⁽¹⁾. *Cl. saccharoperbutylacetonicum* Hongo et Nagata N 1-4 菌株も, 工業的に使用して間もなく異常発酵に遭遇した. 検討の結果, 異常化はファージに起因することを確認した. 直ちにファージ耐性菌株を分離して対処したが, この耐性菌株もファージに侵され, 再び分離使用した耐性菌株も再々度ファージに侵された. このような耐性菌株の分離使用とファージ発生という状態は繰り返され, 当初の 1 年間に種母培養でのそれも含めて 12 回にも及んだ. 種々検討の結果, ファージに対する態度を異にする菌株を交換使用することによって安定した操業を確立できた. その次第を報告する.

実験方法

1. 使用菌株 *Cl. saccharoperbutylacetonicum*⁽²⁾ N 1-4 およびそのファージ耐性菌株.
2. 培地 前報⁽³⁾と同じ.
3. 分析 発酵経過の測定法, アセトンやブタノール, エタノールの分析法は前報⁽³⁾と同じ. ファージの証明に用いた濾過器はシャンペラン型 (L₃, L₅, 松風陶器製) とザイツ型 (東洋濾紙製滅菌用フィルター No. 6),

* Butanol Fermentation. Part XXXII. Abnormal Fermentations in the Acetone-butanol Production on a Plant-scale by Use of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

By Motoyoshi HONGO, Akira MURATA, 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

低温遠心分離機は KR-6 PCW 型 (久保田製).

結 果

I. 異常発酵の経過

工業的使用試験で好成績を収めた *Cl. saccharoperbutylacetonicum* N 1-4 菌株は, 直ちに工場現場で使用されてブタノール・リッチの発酵生産が開始された. 当初は安定した発酵が順調に続いたが, 約 40 日後に異常発酵が起った. その経過を第 1 図に示す. すなわち, 異常は 200 kl の主発酵タンクに 18 kl の種母を接種した後約 16 時間目から現われ始め, ブリックス度の減少が次第に緩慢になり, ガス発生は弱まり, 発酵液の対流的な動きも衰え, 検鏡するごとに菌数は減少した. 30 時間後にはブリックス度の減少は停止し, 発酵液には上澄みを生じ, ついに発酵は停止した. 検鏡すると菌は 1 視野 (倍率 600) に 1~2 細胞しか見られなかった. この異常発酵はファージによるそれと類似しており, ファージ汚染が類推された.

第 1 図 異常発酵の経過

培地: 212 kl, 組成は比島産蔗糖蜜 17,500 kg, 塩化アンモニウム (塩安と略) 300 kg, 炭酸カルシウム (炭カルと略) 400 kg. レで 28% アンモニア水を数字量(kl)添加. 温度: 30°.

—●— ブリックス pH

仕込み糖濃度: 4.93 g/100 ml. 対仕込み原糖収率 (収率と略): アセトン 5.4%, ブタノール 17.0%, エタノール 1.0%, 全ソルベント 23.4%. 残糖: 1.31 g/100 ml.

第 2 図 異常発酵無菌濾液添加の影響

培地: 100 ml, 組成は比島産蔗糖蜜 9 g, 塩安 0.2 g, 過リン酸石灰 0.1 g, 炭カル 0.4 g, 仕込み原糖濃度: 5.04 g/100 ml, 温度: 30°.

...x... 濾液 0.1 ml 添加 —●— 対照, 無添加.

II. ファージの証明

上記の異常発酵液についてファージの有無を検討した.

1) 濾過性: 異常発酵液を 4,000 r. p. m. で 10 分間低速遠心分離した上澄を細菌濾過器で濾過し, この濾液 0.1 ml を N 1-4 菌株の糖蜜培地移植 2 回の培養 100 ml に接種時に加え, 経時的にガス出量を測定した. 第 2 図に示すように, 10 時間目にガス発生はほとんど停止し, 以後 30 時間以上にわたってそのままの状態であった. このことは異常発酵液中に濾過性の異常発酵生起因子が含まれていることを示す.

2) 伝播性: 上記のようにして新たに異常を起した発酵液の無菌濾液 0.1 ml を採り, 再び新たな培養 100 ml に加え, 生起した異常発酵液の無菌濾液をさらに新培養に加える操作を 5 回繰り返した. その結果, 5 回目の培養でも最初と同程度の強さで異常を呈した. このことは異常発酵生起因子が各回に新たに増加していることを示し, ファージの特性に合致する.

3) 菌株特異性: 異常発酵液の無菌濾液が N 1-4 菌株以外のブタノール菌に対しても異常を起すかどうかを検した. その結果, 手持ちのワイツマン型, サッカロ型の 20 数株に対してまったく異常発酵生起能がないことを認めた. このことはファージの特性である菌株特異性を示す.

4) 耐性菌株の発現: 上記 1) の異常発酵液をさらに培養し続けると, 第 2 図に示すように, 40 時間目頃から再びガス発生が始まり, その後対照と同じようなガス曲線を描いて発酵を終了した. 分析すると, 第 1 表に示すように, 対照と変らないソルベント収率であった. このことはファージ耐性菌株の 2 次的な生育によって発酵が再開され, 耐性菌株の発酵能が親株と同様で衰えていな

第 1 表 無菌濾液添加異常発酵液の再発酵でのソルベント収率

	収 率 (%)			
	全ソルベント	ブタノール	アセトン	エタノール
再 発 酵 液	34.5	26.8	6.0	1.7
対照 (濾液無添加)	34.5	26.9	6.1	1.5

培地, 仕込み原糖濃度, 温度は第 2 図に同じ.

いことを示す.

5) 熱不安定性: 無菌濾液を 80° で 10 分間加熱したものには異常発酵生起能がなかった. これはファージが熱によって不活性化されたためと考えられる.

6) プラーク形成: 改良寒天重層法 (後報) によって検した結果, 無菌濾液の 10 倍希釈ではほとんど完全に溶菌, 10² 倍希釈では菌の網目状生育がみられ, 10³ 倍希釈では約 500 個, 10⁴ 倍希釈では約 50 個, 10⁵ 倍希釈では数個のプラークが認められ, 10⁶ 倍以上の希釈ではプラークが認められなかった. 従って無菌濾液中にはファージ粒子が約 5×10⁶/ml 存することが知られた. また, 生成プラークの 1 つを採り若い菌培養液に加えて 1 夜培養を続け, その上澄について再びプラーク生成を検したところ, 約 10⁶/ml のファージ粒子に相当するプラークが数えられた. このことは生成プラークがファージによることを示す.

以上の 1)~6) の結果によって, 異常発酵液中にはファージが多数存在することが立証され, 異常発酵の生起はファージの汚染増殖が原因であることが明らかになった.

III. ファージ耐性菌株の分離

糖蜜培地で移植 2 回目の培養 100 ml に種菌 10 ml を接種するときに 1 ml のファージ原液を加えて培養し, ファージに侵された培養が 40 時間目頃から再生育して発酵を始め, ガス出量が約 1.5 g/100 ml (全ガス出量の 70%) に達したとき, これを試料にしてコロニーを生成させて単離し, 単コロニー分離をさらに 2 回繰り返して菌株を純粋にするともにファージ付着の可能性をなくし, 分離菌株についてファージ耐性と発酵能とを検した. 耐性菌株 N 1-41 菌株の中間工業試験での発酵成績は第 2 表のとおりで, 親株 N 1-4 菌株に優るとも劣らぬことを確認した. なお, 耐性菌株の分離は, 次項では当初から 1 ml のファージ原液と 1 ml の菌液とを混じてプレートし, 1 日目にまったく溶菌した後に 1~2 日を経

第 2 表 ファージ耐性 N 1-41 菌株の中間工業試験成績

	全ソル ベント	ブタノ ール	アセ トン	エタノ ール
収量 (g/100 ml)	1.815	1.380	0.355	0.080
収 率 (%)	34.9	26.6	6.8	1.5

培地: 9 kl, 組成は比島産蔗糖蜜 950 kg, 塩安 16 kg, 炭カル 20 kg.
仕込み原糖濃度: 5.20 g/100 ml, 温度: 30°, 発酵期間: 53 時間.

て生ずるいくつかのコロニーを単離しても行なった.

IV. ファージ耐性菌株の使用とファージ発生との繰り返し

A. ファージ発生繰り返しの経過 工場現場では上記の耐性菌株 N 1-41 菌株を直ちに使用した. しかし 10 日前後で再び N 1-4 菌株でのそれと類似の異常が起り, ファージによると判明した. N 1-41 菌株から再び耐性菌株の分離を試み, 得られた耐性諸菌株のうち N 1-61 と名づけた菌株が中間工業試験で良成績を収め, これを工業的に使用した. この N 1-61 菌株も約 20 日でファージによる異常発酵に再々度遭遇した. 次いで耐性の N 1-79 菌株と N 1-504 菌株とを分離し, 使用した N 1-79 菌株も約 1 か月半安定した発酵が続いた後に第 4 回目のファージに侵された. 耐性菌株として N 1-161 菌株と N 1-431 菌株とを分離し, まず N 1-161 菌株を使用し, 3 か月以上安定した操業が続きファージ汚染による被害も終ったかのように思われた. しかし約 100 日後に第 5 回目のファージに遭遇した. その後耐性 N 1-611 菌株を分離使用したが, この菌株も約 20 日でファージに侵され, ここで次のファージ耐性の優良菌株の分離が困難になり, N 1-161 菌株に出発したこの系統の菌株の使用は一時中止した. そこで前の第 3 回のファージ耐性菌株として N 1-79 菌株の外に分離していた N 1-504 菌株を検したところ, ファージ感受性が N 1-161 系統の耐性菌株と異なることが判明し, この N 1-504 菌株を使用して操業を続けた. なお, N 1-79 菌株から N 1-161 菌株と同時に分離した N 1-431 菌株についても検

討した結果, ファージ感受性に差があることを確認した (詳細次述). N 1-504 菌株が約 20 日間の操業後第 7 回目のファージに侵された後, この N 1-431 菌株を使用して操業に当たった. 以後, それまでのものとまとめて各系統別に第 3 図に示すように, ファージ耐性菌株の分離使用とファージ発生とが繰り返され, 最初 N 1-4 菌株で操業を開始してから約 1 年間に種母代でのそれを含めてファージによる異常発生は 12 回にも及んだ. 異常発酵での各耐性菌株の細胞の状態を, ファージ発生の順に第 3 表に示す.

第 3 表 異常発酵での各耐性菌株の状態

菌株	状 態
N 1-4	菌形が長く伸び, 菌の繁殖が悪くて菌数増加せず, 遅延発酵となる.
N 1-41	明瞭な溶菌現象は認められないが菌数増加せず, 遅延発酵となる.
N 1-61	同 上
N 1-79	同 上
N 1-161	菌数が減り明瞭な溶菌現象が認められ, クロストリジアだけが残し, ガス発生が停止する.
N 1-611	同 上
N 1-504	菌の繁殖が悪く, 運動性が鈍り不動菌が多くなる.
N 1-431	菌の繁殖が悪く, クロストリジアは殖える.
N 1-432	同 上
N 1-435	同 上
N 1-117	同 上
N 1-118	同 上

B. ファージ耐性菌株の変遷

a) 耐性菌株分離経過: ファージ耐性菌株の分離過程で, N 1-61 菌株から分離した N 1-79 菌株と N 1-504 菌株との間にはファージに対する感受性に特異な差が認められた. すなわち, N 1-61 菌株から分離した耐性菌株のうち, 大部分は細胞が屈折変形を呈しやすく集合する傾向を示しフラスコ試験での発酵期間は 44 時間前後でブタノール収率が約 25% であったのに対し, 1~2% の割合で細胞は正常形で弧立し発酵期間が 48 時間前後

第 3 図 ファージ耐性菌株の系統図

数字は N 1 菌株番号, () 内数字はファージ発生の順序, □ 内数字はその左上の菌株での操業開始からファージ発生までの日数.

でやや長く、ブタノール収率が約 26% でやや高い傾向を示す菌株を見いだした。前者を N 1-79 菌株、後者を N 1-504 菌株としたが、その後 N 1-79 菌株を侵すファージが出現して検したところ、N 1-79 菌株が侵されるファージに対して N 1-504 菌株は感受性を示さないことを確認した。同様なことが、N 1-79 菌株から分離した耐性 2 菌株の間にも認められた。すなわち、耐性菌株

第 4 表 耐性菌株とファージとの相互関係

耐性菌株	ファージ											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
N 1-4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
N 1-41	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
N 1-61	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
N 1-79	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
N 1-161	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
N 1-611	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
N 1-621	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N 1-504	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N 1-508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N 1-431	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
N 1-432	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
N 1-435	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
N 1-117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
N 1-118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
N 1-120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ファージは発生順に数字で表わした。

+: ファージ増殖し異常発酵生起 - : ファージ増殖せず正常発酵

第 5 表 ファージ耐性菌株の発酵結果

耐性菌株	発酵 期間 (時間)	リベント収率 (%)			
		アセ トン	ブタノ ール	エタノ ール	全ソル ベント
N 1-4	43	7.2	26.1	1.3	34.6
N 1-41	42	7.5	25.9	1.1	34.5
N 1-61	43	7.3	25.3	1.1	33.7
N 1-79	44	7.3	24.7	1.3	33.3
N 1-161	44	8.0	24.5	1.1	33.6
N 1-611	43	8.6	24.4	0.8	33.8
N 1-621	43	8.4	24.5	1.0	33.9
N 1-504	48	6.0	26.0	1.4	33.4
N 1-508	48	6.3	25.9	1.2	33.4
N 1-431	33	7.9	24.6	0.9	33.4
N 1-432	36	7.8	24.2	1.2	33.2
N 1-435	35	8.6	23.9	1.2	33.7
N 1-117	33	8.1	24.1	1.1	33.3
N 1-118	32	8.3	24.1	1.1	33.5
N 1-120	33	8.2	24.3	1.1	33.6

培地: 1,800 ml, 組成は比島産蔗糖蜜 180 g, 塩安 2.88 g (0.16 g/100 ml), 炭カル 3.6 g (0.2 g/100 ml), 仕込み原糖濃度: 5.02 g/100 ml, 温度: 30°.

として細胞が屈折変形集合しやすい N 1-161 菌株を分離し、1~2% の割合で細胞は孤立や 2 連で発酵期間が 33 時間前後で短く N 1-161 菌株を侵すファージに侵されない N 1-431 菌株を分離した。以後これらは違った 3 系統として耐性菌株の分離が続けられた。なお、このような特異的な耐性菌株はこれらのほかには分離することができなかった。各耐性菌株とファージとの相互関係を第 4 表に示す。

b) 耐性菌株の発酵能の変遷: 各ファージ耐性菌株の発酵結果には、第 5 表に示すように各系統別に特性が認められる。すなわち、N 1-504 系統菌株はブタノール収率が他菌株のそれをやや上回っており、N 1-431 系統菌株では発酵期間の短縮が見られる。しかし全般的には耐性菌株分離過程が進むにつれてブタノール収率は多少減少する傾向が認められる。

V. 菌株の交換使用

ファージ発生の繰返しはファージの宿主域変異によると推察された。この種のファージ変異を防ぐため、たまたま N 1-4 菌株のファージ耐性菌株のうちに分離されたファージに対する態度が違う 3 系統の菌株 (N 1-120, N 1-621, N 1-508) に、原田によって分離された *Cl. madisonii* に属する菌株⁽⁴⁾も含めて、短期間 (約 1 週間) ごとに適宜に菌株を交換して使用することを企てた。この対処によって、以後の操業は安定し順調な発酵を続けることができた。

総 括

(1) *Cl. saccharoperbutylacetonicum* Hongo et Nagata N 1-4 菌株の工業的使用で発生した異常発酵の原因がファージであることを確認した。

(2) 以後の操業でファージ耐性菌株の分離使用とファージによる発酵の異常化とは繰り返され、種母培養でのそれも含めて年間 12 回の多くに及んだ。

(3) 耐性菌株の分離に際して、ある 2 耐性菌株からはそれぞれ主として得られた耐性菌株のほかにファージに対する態度が違う耐性菌株が 1~2% という少ない割合で分離され、結局ファージに対する態度が違う 3 系統として以後の耐性株の分離が続けた。

(4) 各耐性菌株の発酵成績には系統別に特異性が見られ、また一般に耐性度が進むにつれてブタノール収率が多少低下する傾向が見られた。

(5) これらの系統の違うファージ耐性菌株を短期間で交換使用することによって、ファージによる被害を防

ぎ安定した操業を続けることができるようになった。

終りに度重なる異常発酵にかかわらず本菌の工業的使用試験の続行とその結果の発表とを許可された三楽オーシャン(株)社長鈴木三千代氏, 御支援御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。研究費の一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) J.C. Sylvester : Thesis of Univ. of Wisconsin (1943) ; W. Gold, D.W. Watson : *J. Bact.*, **59**, 13, 17 (1950) ; 木下ら ; 本誌, **26**, 104(1952) ; 本誌, **29**, 433, 477, 481, 487, 955 (1955).
- (2) 本江元吉 : 日本特許 284, 441, U. S. Pat. 2, 945, 786 ; French Pat. 1, 265, 840.
- (3) 本江元吉, 原田良造, 赤星恭助, 長田 健, 高橋節男 : 本誌, **39**, 247 (1965).
- (4) 原田良造 : 酸協, **21**, 69 (1963).