



Title	ブタノール・アセトン菌による異常醗酵に就て : 大豆粕を過用せる場合の醗酵
Author(s)	友枝, 幹夫; TOMOYEDA, Mikio
Citation	北海道大學農學部邦文紀要, 1(1), 94-102
Issue Date	1951-12-31
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/11503">https://hdl.handle.net/2115/11503</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	1(1)_p94-102.pdf



# ブタノール・アセトン菌による異常醗酵に就て

大豆粕を過用せる場合の醗酵

友 枝 幹 夫

(北海道大學農學部農藝化學教室小幡教授研究室)

## An Abnormal Fermentation by Butyl-Acetone Organism.

Fermentation of medium containing soy bean flake excessively.

MIKIO TOMOYEDA

(Institute of Prof. Obata, Department of Agricultural  
Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.)

### I 緒 言

ブタノール・アセトン醗酵工場に於て、原料中の澱粉又は糖類から正規の醗酵主生産物であるブタノール・アセトン及びエタノールの所謂ソルベントを生ぜずして、中間生産物である醋酸及び酪酸を集積し醗酵が中絶してしまう場合が往々存在する。此の現象を正規の主生産物を順調に生成する正常醗酵に對して異常醗酵時に酸醗酵と稱する。

正常醗酵に於ては醗酵の初期に原料中の澱粉又は糖類から、先づ醋酸及び酪酸が生成されて第1圖3に示す様に培地の滴定酸度が増加するが、醗酵の中期になると之が急激に減少しそれに伴つてソルベントが生成される。(第1表3)之に反して酸醗酵に於ては第1圖1, 2に示す様に醗酵の初期には正常醗酵の場合と同様に滴定酸度が増加するが、一旦増加した滴定酸度は減少する事なく瓦斯の發生は衰え遂には醗酵が中絶し、従つてソルベントも極めて少量しか得られない。(第1表1, 2)

此の現象は實際本醗酵工業としては重大な問題であつて、之が原因竝に對策に就ては古くから多數の研究がある。即ち TAYSEN<sup>1)</sup>, SPEAKMAN<sup>2)</sup>,

FRED<sup>3)4)</sup>, 湯川<sup>5)</sup>, 小田<sup>6)7)8)</sup>の各氏は酸醗酵の行われて居る醗より乳酸菌系統或は其の他の有害細菌を分離して酸醗酵の原因を之等の雜菌の汚染に基くと述べて居る。又 ROBINSON<sup>9)</sup>, SPEAKMAN<sup>10)</sup>, PETERSON<sup>11)</sup>, WEINSTEIN<sup>12)</sup>, 池田<sup>13)</sup>の各氏は炭水化物の種類が酸醗酵に及ぼす影響を検討してイヌリン及び D-ガラクトースを炭素源にした場合に酸醗酵が起ると述べ、片桐氏等<sup>14)</sup>は培地中の緩衝作用の強弱と酸醗酵との關係を論じて居る。又酸醗酵の原因が使用菌の變性に基くと云う小田<sup>15)</sup>, 杉山<sup>16)</sup>氏の結果もあり、その矯正法として HANSEN<sup>17)</sup>氏の特許もある。

以上の諸研究を綜合して酸醗酵の原因を大別すれば次の3種となる。即ち

1. 有害細菌の侵入による。
2. 培地の成分或は性状による。
3. 使用菌の變性による。

著者は醗酵生理學の見地からブタノール・アセトン醗酵を検討してその正常醗酵が必ずしも使用菌自身の最適条件下で行われるとは限らず、寧ろ營養状態の稍不良な場合に行われ、酸醗酵は營養の良好な時にも起る場合がある事を明かにしたので以下その實驗結果を報告する。

## II 実験の部

本実験に使用した醗酵原料は市販の甜菜白糖(純度 99.5%)及びアルコール抽出大豆粕粉末(径 1 mm 以内)(水分 11.6%, 灰分 5.7%, 全窒素 7.6%, 澱粉價 19.4%)であり, 使用菌は *Clostridium acetobutylicum* No. 243 で其の細菌學的性質は既に報告した。<sup>18)</sup>

### (I) 蔗糖溶液に過剰の大豆粕を添加した場合の醗酵

蔗糖溶液に対する栄養補助原料として添加すべき大豆粕の適量は對糖 10-15% で<sup>19)</sup>, 此の場合には正常醗酵を行うが, 前述の目的で大豆粕の添加量を極度に増加して對糖 50, 及び 100% 宛加えて醗酵を行い, 正規の場合と比較した。

#### 実験方法

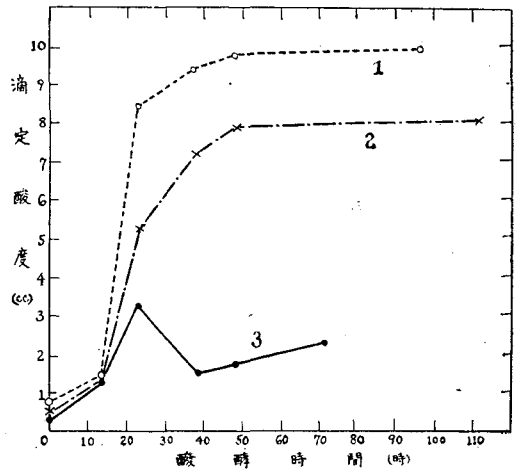
(i) 培地の調製: 縮栓殺菌した 500 cc 容三角フラスコに甜菜白糖 15 g を入れ, 之に大豆粕粉末を夫々 1.5, 7.5 及び 15 g 宛添加し, 井水を 300 cc 宛加えて常法により殺菌を行い 37°C に冷却した。

(ii) 醗酵及び醗酵終了液の分析方法: 243 號菌の孢子を砂培養より 5% 玉蜀黍醗, 3% 蔗糖醗(大豆粕對糖 10% 添加)に順次嫌氣的に 37°C で培養し, 且 24 時間毎に新しい醗に移植して得た前培養を 10 cc 宛培地に接種し, 37°C で醗酵せしめ瓦斯發生の終了を以て醗酵終了と見做し分析に供した。但し場合に依つては醗酵中に培地の一部を無菌的に採り, その供試液に就て同様にして分析を行つた。分析項目中, ブタノール及びエタノールは JOHNSON 法<sup>20)</sup>, 醗酵前後の蔗糖は常法

により鹽酸で試料を轉化後生成した轉化糖を銅液還元法並にその計算表<sup>21)</sup>により定量し蔗糖に換算した。その他の項目は既記の方法<sup>22)</sup>と同様である。尚以下の実験に於ても実験方法は大約同様であるので同一點は記載を省略する。

何れの實驗に於ても, 醗酵液中には供試ブタノール・アセトン菌以外の雜菌の存在を許さぬ爲に, 先づ供試菌は ROSENTHAL 嫌氣平面培養法<sup>23)</sup>により聚落を作つて純粹となしたもより出發し更に供試前培養液及び培地は全く無菌的なものである事, 並びに前培養及び醗酵中の液には雜菌が存在して居ない事を顯微鏡的觀察及び穿刺培養法或は ROSENTHAL 法により確認しつつ實驗を進めた。

實驗結果並に考察: 以上の如くして行つた結果は第 1 表及び第 1 圖に示す如くたとえ大豆粕の



第 1 圖 { 1: 大豆粕對糖 100% 添加醗  
2: " " 50% " "  
3: " " 10% " "

第 1 表

番 號	大豆粕添加量 (對糖 %)	醗酵時間 (時)	PH		酸 度* (cc)		蔗 糖 (g)		ソ ル ベ ン ト 收 量 (g)				糖消費率 (%)	ソルベント生成率 (%)
			前	後	前	後	前	後	ブタノール	アセトン	エタノール	合計		
1	100	96	6.4	4.0	0.6	9.9	5.22	3.83	0.09	0.05	0.03	0.17	26.6	3.4
2	50	111	6.4	4.0	0.4	8.1	4.99	3.45	0.15	0.07	0.06	0.28	30.9	5.8
3	10	71	6.4	4.0	0.05	2.3	4.80	0.19	0.98	0.49	0.20	1.67	96.0	34.9

\* 醗酵液 100 cc を中和するに要する N-NaOH の滴定數であらわした。

\*\* 使用糖量に對するソルベント生成量の比であらわした。

表中の瓦數は液 100 cc 中の値であり, 且つ掲示した數値は夫々 2 箇の並行實驗のものに就て求めた平均値である。以下の各表に對しても同様である。

様な補助原料の種類としては好適なものであつても之を正規の 5-10 倍量を添加した場合には菌による醱酵が酸生成に止り糖消費率低く特にソルベント生成率の低下する事が判明した。

(II) 玉蜀黍醱に大豆粕を添加した場合の醱酵

玉蜀黍はブタノール・アセトン醱酵の原料として好適である事は古くから内外の研究者に依つて立證され、既に工業的にも廣く使用されて居る。著者は此の玉蜀黍醱に補助原料として多量の大豆粕を添加して醱酵を行つた場合にも酸醱酵を起す

事を認めた。即ち玉蜀黍粉末(食用黄色硬粒種を徑 1 mm 以内に粉碎, 水分 11.25%, 灰分 1.47%, 全窒素 1.18%, 澱粉價 71.46%)を 27 g 宛縮栓殺菌した 500 cc 容三角フラスコに入れ、之に第 2 表に示す様に大豆粕粉末を添加し、井水 300 cc を加え、3 kg/cm<sup>2</sup> (143°C) で 30 分間蒸煮殺菌した後菌の前培養を 10 cc 宛接種し前と同様にして醱酵を行つた結果は第 2 表の如くで玉蜀黍單獨の場合には正常醱酵を行うが、之に大豆粕を添加した場合には酸醱酵となり、醱酵が中絶し而もその際に生

第 2 表

大豆粕添加量 (g)	醱酵時間 (時)	PH		酸度 (cc)		揮發酸 (cc)	全糖 (g)		ソルベント收量 (g)				全糖消費率 (%)	ソルベント生成率 (%)
		前	後	前	後		前	後	ブタノール	アセトン	エタノール	合計		
0	64	5.4	4.2	1.4	2.7	2.3	19.70	1.58	3.94	1.57	0.71	6.22	92.0	31.6
10	64	5.4	4.2	1.7	5.3	4.8	21.29	6.99	2.93	1.21	0.14	4.28	67.2	20.1
15	48	5.5	4.4	1.9	11.2	11.1	22.08	15.45	0.73	0.30	0.12	1.15	30.1	5.2
20	48	5.6	4.4	2.5	11.9	11.6	22.88	16.40	0.76	0.28	0.02	1.06	28.3	4.6
27	48	5.6	4.4	3.1	11.6	11.4	23.99	17.91	0.79	0.27	0.02	1.08	25.3	4.5

表中の瓦数は醱全量中の數値である。

成する酸の大部分は揮發酸である事が判明した。

尙米國に於て補助原料として好んで用いられているグルテンミールを大豆粕の代りに甜菜白糖醱及び玉蜀黍醱に 50-100% (對原料) 添加した場合の結果は省略するが、何れも大豆粕添加と同様に酸醱酵を起す事を認めた。

(III) 蔗糖溶液に大豆粕熱湯抽出液を添加した場合の醱酵

(I), (II) の實驗によつて少量ならば良好な補助原料である大豆粕も之を多量に與えた場合にはソルベント生成に對しては却つて悪影響を及ぼす事が判明した。依つて大豆粕中に酸醱酵を生起せしめる因子の存在する事が考えられる。然らば大豆粕成分の中で醱酵開始前から菌に對して可給態

即ち培地中に可溶性にて存在して居るものが關係するか否かを検討する爲に酸醱酵を起す量の大豆粕粉末を添加する代りに、それに相當する量の大豆粕の熱湯抽出液を添加した場合に酸醱酵を起すか否か、又之と反對に正常醱酵が行われる程度の量の大豆粕の代りにそれに相當する量の大豆粕熱湯抽出液を加えた場合にも正常醱酵が行われるか否かを實驗した。

即ち 5% 甜菜白糖溶液に大豆粕粉末を夫々對糖 10, 50 及び 100% 宛加え、殺菌を爲すと同條件で加熱した後遠心分離により固形物を除去した溶液を 500 cc 容三角フラスコに入れ、殺菌後 (I) と同様にして醱酵を行つた結果は第 3 表に示す如くである。此の結果によれば酸醱酵を起す量 (對糖

第 3 表

番號	大豆粕熱湯抽出液添加量 (粉末相當量) (對糖 %)	醱酵時間 (時)	PH		酸度 (cc)		蔗糖 (g)		ソルベント收量 (g)				糖消費率 (%)	ソルベント生成率 (%)
			前	後	前	後	前	後	ブタノール	アセトン	エタノール	合計		
1	100	87	6.4	4.0	0.6	2.6	5.22	0.51	0.88	0.43	0.18	1.49	90.3	28.6
2	50	87	6.4	4.0	0.4	2.9	4.99	0.85	0.64	0.35	0.16	1.15	82.9	23.1
3	10	96	6.4	4.0	0.05	1.8	4.80	3.42	0.32	0.17	0.03	0.57	28.7	12.0

表中の瓦数は醱酵液 100 cc の値である。

50, 及び 100%) の大豆粕の熱湯抽出液を加えた 1 及び 2 の場合に於ては酸醱酵を起さず相當良好な結果を得た。此の結果より見れば (I) の場合の酸醱酵を起す素因は初めの醱酵液中に溶解して居る物質のみではなくて醱酵中に可溶性になつた物質にも由來すると思われる。

次に正常醱酵を起す量 (對糖 10%) の大豆粕の熱湯抽出液を加えた場合 3 は養分不足なる如く見え醱酵が微弱で不完全な醱酵に終つた。即ち最適條件の醱酵液でも接種時に於ける補助原料中の可溶性物質だけでは不十分で、それが正常醱酵を行う爲には更に不溶分が可給態となる必要のある事が (I) の實驗と照合すれば判明する。

(IV) 蔗糖溶液に大豆粕を添加した醱酵の窒素代謝

前述の様に補助原料大豆粕を用い一方醱酵中に可溶性となる物質により醱酵阻害作用を受けて酸醱酵を起し〔(I)-1, (I)-2〕, 他方正常醱酵を起す

爲に之を必要とする〔(III)-3〕と云う一見相反した様な事實を解明する爲に (I) 及び (III) の場合に於ける醱酵液中の窒素化合物の分離定量を接種後 0, 15, 24, 39, 48 時, 及び醱酵終了時並に醱酵終了後 7 日間 37°C に保つたものの各々に就て Folin 法<sup>24)</sup> により行つた結果は第 4-8 表の如くである。

之等の表で明かである様に何れの場合に於てもブタノール・アセトン菌の蛋白分解酵素により大豆粕中の蛋白質は可溶性となり、更に非蛋白態よりペプチツド態, アミノ態窒素へと加水分解されて行くが, アマイド態窒素の集積量は殆んどないか若くは極めて少量である。此の傾向は PETERSON 氏等の結果<sup>25)26)</sup> と一致する。此の中蛋白の可溶化, 非蛋白化への分解集積は非常に大であるが, ペプチツド態乃至アミノ態迄の分解集積は前二者に比して餘り大でない。此の事實は使用菌により之等の形態の窒素化合物が吸収同化されたとも考えられる。

第 4 表 可溶性全窒素

番 號	醱酵時間 (時)	0		15		24		39		48		醱酵 終了時		終了より 7 日後	
		100 cc 中 (mg)	對全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對全 N (%)
1	100 (粉)	50.1	16.3	89.1	29.0	99.8	32.5	110.5	36.0	114.1	37.1	131.9	42.9	164.7	53.6
2	50 (粉)	25.8	16.8	38.5	25.1	49.0	31.9	59.7	38.8	63.3	41.2	77.5	50.4	90.6	58.9
3	10 (粉)	5.0	16.2	10.3	33.5	12.5	40.6	19.6	63.8	24.1	78.3	27.6	89.9	28.8	93.6
4	100 (抽出液)	50.1	100.0	48.1	96.0	48.1	96.0	41.0	81.8	43.9	87.5	49.2	98.2	49.7	99.2
5	50 (抽出液)	25.8	100.0	25.5	99.0	23.9	92.6	23.2	89.8	24.1	93.3	25.4	98.5	25.1	97.4
6	10 (抽出液)	5.0	100.0	4.6	92.6	4.4	88.6	4.2	84.0	4.1	82.6	4.7	93.2	4.7	93.2

備考: 全窒素 100 cc 中 mg. 1: 307.3, 2: 153.7, 3: 30.7, 4: 50.1, 5: 25.8, 6: 5.0

第 5 表 非蛋白態窒素

番 號	醱酵時間 (時)	0		15		24		39		48		醱酵 終了時		終了より 7 日後	
		100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)
1	100 (粉)	24.7	49.2	42.5	47.7	50.7	50.8	63.8	57.8	73.8	64.7	89.5	67.9	134.6	81.7
2	50 (粉)	12.2	47.4	20.1	52.3	27.6	56.3	29.8	50.0	35.1	55.4	44.8	57.8	63.3	75.4
3	10 (粉)	2.5	50.3	5.3	51.6	9.5	76.2	16.8	85.6	21.4	88.5	25.3	91.7	26.4	91.8
4	100 (抽出液)	24.7	49.2	21.8	45.3	23.1	48.1	28.0	63.2	31.3	71.4	41.4	84.1	45.8	92.1
5	50 (抽出液)	12.2	47.4	13.4	52.6	11.2	46.8	12.4	53.4	15.6	64.9	20.9	82.2	23.8	94.8
6	10 (抽出液)	2.5	50.3	2.5	54.3	3.1	69.0	3.8	88.4	4.0	98.1	4.5	96.8	4.5	96.8

第 6 表 ア ミ ノ 態 窒 素

番 號	大豆粕 添加量 (對糖 %)	0		15		24		39		48		醱 終了時		終了より 7 日後	
		100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)
1	100 (粉)	5.4	10.7	5.6	6.3	7.1	7.1	9.7	8.7	12.6	11.1	14.1	10.7	15.4	9.3
2	50 (粉)	2.8	10.7	2.8	7.2	4.7	9.5	6.9	11.6	8.2	12.9	11.1	14.4	12.8	14.2
3	10 (粉)	0.5	10.4	1.0	9.9	1.5	11.8	3.5	17.8	7.1	29.3	8.4	30.5	9.5	33.2
4	100(抽出液)	5.4	10.7	3.5	7.3	2.2	4.6	5.8	14.0	7.4	16.9	9.8	20.0	13.9	28.0
5	50(抽出液)	2.8	10.7	1.5	5.8	1.8	7.7	3.2	13.9	5.0	20.6	6.8	26.7	7.2	28.6
6	10(抽出液)	0.5	10.4	0.6	11.9	0.6	14.0	0.9	20.3	1.3	32.5	1.5	31.8	2.0	43.4

第 7 表 ペ プ チ ャ ッ ド 態 窒 素

番 號	大豆粕 添加量 (對糖 %)	0		15		24		39		48		醱 終了時		終了より 7 日後	
		100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)
1	100 (粉)	15.3	30.5	10.9	12.2	19.8	19.8	23.6	21.3	25.7	22.5	30.4	23.1	45.9	27.9
2	50 (粉)	7.5	29.1	8.4	21.7	11.2	22.9	14.2	23.8	16.9	26.7	18.5	23.9	21.5	23.7
3	10 (粉)	1.6	31.1	3.6	35.1	4.2	33.4	6.2	31.7	9.5	39.5	13.7	49.4	15.5	53.8
4	100(抽出液)	15.3	30.5	7.6	15.9	9.4	19.5	9.3	22.6	10.6	24.1	13.9	28.3	16.5	33.3
5	50(抽出液)	7.5	29.1	4.0	15.8	5.0	20.8	5.4	23.4	7.1	29.6	10.2	40.1	13.2	52.6
6	10(抽出液)	1.6	31.1	1.7	36.4	1.7	38.2	2.2	52.6	2.5	61.7	3.1	66.5	2.6	54.8

第 8 表 ア マ イ ド 態 窒 素

番 號	大豆粕 添加量 (對糖 %)	0		15		24		39		48		醱 終了時		終了より 7 日後	
		100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)	100 cc 中 (mg)	對可溶 性全 N (%)
1	100 (粉)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	1.8	3.2	2.0
2	50 (粉)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.6	1.3	1.5
3	10 (粉)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	1.3	0.4	1.3
4	100(抽出液)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.9	0.9	1.8
5	50(抽出液)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.7	1.3	5.0
6	10(抽出液)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	3.9

而して其の分解の程度は醱酵液中の蛋白質の含量に依り異り其の量のなるものは分解生成物の絶対量も大であるが、蛋白態で残存する量も多くなる。之に反して蛋白質の量の少いものは其の大部分が非蛋白態まで分解されてしまう。且此の分解の傾向は醱酵終了後も引續き行われる事が判明した。即ち該菌による炭水化物の代謝が終了した後も菌の生成した酵素により蛋白質の分解作用

は進行して居る事を確めた。

以上の如く本醱酵の経過中に蛋白質の加水分解作用が強力に進行して居る事實より前記の (I)-1 及び (I)-2 の酸醱酵並に (III)-3 の不完全醱酵と更に正常醱酵等の夫々の原因に就き比較考察するに、前二者に於ける酸醱酵にあつては接種時の可溶性窒素の含量は正常醱酵を行う爲に既に十分量が存在するにも拘らず、醱酵中に分泌された蛋白

分解酵素の作用を受けて可溶性窒素の量が過大となり、菌の生理作用又は醱酵作用に異常を來した事に起因し、又 (I)-3 の正常醱酵の場合に於ては接種時の醱酵液中の可溶性窒素の量は (III)-3 の示す如く不足であるが、醱酵中に之が分解して行き、菌の生理及び醱酵の兩作用に對し適量となつたものと認むべきであろう。

(V) 醱酵經過中に於ける供試菌の形態の變化

正常醱酵及び酸醱酵を行つて居る兩種の醱酵液中に於ける供試ブタノール・アセトン菌の形態を比較するため (I)-1 及び (I)-3 の兩者に就て顯微鏡下に觀察した結果は第 9 表の如く、正常醱酵では多數の報告と同様であるが、酸醱酵では明かな差違が認められた。而して醱酵液中に揮發酸

第 9 表

大豆粕添加量(對糖%)	醱酵時間(時)	19	24	44	72
100		釋狀(1.2-2.0×0.2-0.3 μ) 稀に2箇連鎖	釋狀(1.2-3.0×0.2-0.3 μ) 2箇連鎖せるもの多し	絲狀(1.3-2.2×0.1-0.2 μ)	同左
10		同上	釋狀(1.2-1.7×0.2-0.3 μ) 稀にクロストリヂヤを認む	クロストリヂヤ、遊離胞子を認む	遊離胞子のみを認む

が高濃度に集積する事により該菌は阻害せられ變形するものと解された。

(VI) 酸醱酵を前培養とせる場合の醱酵

酸醱酵を起したものは前述の様に菌の形態に變化を來して居る事が判明したが、一旦此の様になつたものは之を再び正常醱酵を行うべき組成の培地に前培養として接種した場合に如何なる醱酵が行われるかに就て實驗を試みた。即ち (I)-1 と同様な組成の培地で酸醱酵を起させたものを前培養として之を (I)-3 と同じ培地に接種して前同様にして醱酵した。而してその前培養の培養時間は 16, 24, 40, 48 及び 60 時間(醱酵終了時)の 5 種に就て行い、正規の前培養(培養時間: 16 時間)のものと比較した結果は第 10 表の如くであり、此の結果より見れば酸醱酵を前培養としても之を

正常の組成の培地に接種すれば正常醱酵が行われる。即ち (V) に見られる使用菌の變態は一時的なもので恒久的な變化ではない事が判明した。而してソルベント生成率は何れも大同小異であるが、醱酵所要時間は酸醱酵の培養時間が長くなるに従い、長時間を要し緩慢醱酵に陥る事が認められた。

(VII) 大豆粕を過剰に添加した蔗糖溶液に炭酸石灰を加えた場合の醱酵

前述の様に大豆粕を過剰に添加した蔗糖溶液の醱酵に於ては醱酵が酸生成の段階で中断せられ其後のソルベント化が進行せず、醱酵液中に多量の揮發酸が集積される爲に菌が阻害作用を受けて更に其後の糖の醱酵を営み得ぬ様になると思われるので、生成酸を中和する目的で醱酵液に當初或は途中で炭酸石灰を添加して醱酵を行つた。即ち第 11 表に示す如く大豆粕を對糖 100% 添加した 5% 蔗糖溶液に豫め炭酸石灰を對糖 50% 添加したもの(4)と最初は加えないで酸度が増加した時期(接種後 24 時間)に同量の炭酸石灰を添加したもの(5)とを無添加のもの(3)と比較した。尙對照として正常醱酵の醱酵に及ぼす炭酸石灰添加の影響を(1, 2)検討した。之等の培地を前と同様にして醱酵した結果を第 11 表に掲げた。尙此の場合に醱酵中に於ける使用菌の數の變化を夫々の醱酵液に就て THOMAS の血球計を用いて測定した結

第 10 表

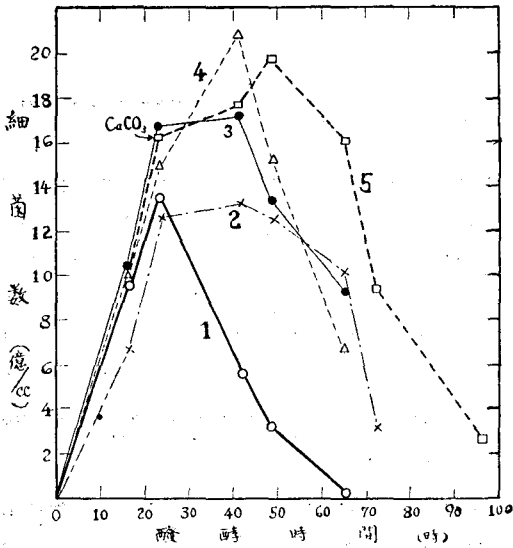
種類	前培養		醱酵時間(時)	糖消費率(%)	ソルベント生成率(%)
	培養時間(時)	醱酵時間(時)			
正常醱酵	16	64	97.0	36.2	
酸醱酵	16	76	97.1	35.4	
酸醱酵	24	66	97.5	36.1	
酸醱酵	40	76	98.2	36.2	
酸醱酵	48	85	90.5	30.4	
酸醱酵	60	88	87.0	29.4	

備考 醱酵前蔗糖: 4.88 g/100 cc

第 11 表

番 號	醱 酵 液		醱 酵 時 間 (時)	揮發酸 收 量 (cc)	糖消費率 (%)	ソルベ ント 生成率 (%)	可 溶 性 N		非 蛋 白 態 N		アミノ態 N	
	大豆粕 添加量 (對糖 %)	炭酸石灰 添加量 (對糖 %)					100 cc 中	對全 N (%)	100 cc 中	對 可 溶性 N (%)	100 cc 中	對 可 溶性 N (%)
1	10	0	65	1.5	97.5	33.0	31.4	87.5	30.5	97.1	12.2	39.1
2	10	50	88	22.2	95.6	11.4	26.0	72.5	22.4	86.2	12.2	47.1
3	100	0	65	9.2	29.1	3.0	174.9	52.2	103.2	59.0	29.5	16.8
4	100	50	65	23.0	96.5	7.2	183.9	54.9	161.5	87.8	49.1	26.7
5	100	50 (中途)	96	14.0	93.6	24.3	179.1	53.6	125.6	70.0	51.6	28.7

備考 醱酵前蔗糖 100 cc 中 ; (1),(2): 4.19 g, (3),(4),(5): 4.90 g.  
全窒素 100 cc 中 ; (1),(2): 33.9 mg, (3),(4),(5): 339.0 mg.



第 2 圖

- 1: 大豆粕對糖 10%                      4: 大豆粕對糖 100% CaCO<sub>3</sub>
- 2: " " 10% CaCO<sub>3</sub>                    5: " " " "
- 3: " " 100%                              (中途添加)

果は第 2 圖の如くである。

第 11 表で明かである様に 2, 4, 5 の如く醱酵液に炭酸石灰を添加した場合には、生成された有機酸は石灰鹽となつて固定されてソルベントの收量は減少するが、過剰の大豆粕を加えた場合でも糖は完全に消費される事が判明した。即ち 4 及び 5 と 3 の炭酸石灰無添加の場合とを比較すれば後者に於て使用菌が少くとも其の生理機能乃至糖よりの酸生成の繼續に對して茲に生成せられた高濃度の有機酸のため阻害作用を受けて居る事は明かで、此の事實は醱酵液に醋酸及び酪酸を添加して其の阻害作用を認めた WYNNE 氏<sup>27)</sup> の實驗結果

と一致する。又大豆蛋白質の分解生産物の量を比較すれば 3, 4, 5 は 1, 2 より大である事は當然であるが、4 及び 5 が 3 に比して多量である事は其の細菌数が第 2 圖に見られる様により大であり、且それが生成酸の阻害作用を受けなかつた結果である事も肯定されよう。

次に細菌の増殖曲線に就て見るに 1 の場合は SPEAKMAN,<sup>28)</sup> PETERSON<sup>29)</sup> 及び井上<sup>29)</sup> 氏等の報告と一致するが、他は何れも 24 時間後も菌の増殖が繼續され 3 に於ては醱酵中絶後に、2, 4, 5 の場合には残糖の消滅と共に減少する。而して過剰の大豆粕を添加した 3, 4, 5 の場合には 1, 2 の場合に比して細菌数が非常に多い。之は菌に對する栄養分が多い爲と推定出来る。尙各醱酵液中の孢子形成の有無に關しては、顯微鏡によるのみならず、醱酵液の一部を玉蜀黍醱に接種し熱處理後培養した結果 1 及び 5 では非常に多量の孢子形成を認められ、3 では殆んど認められず、他は兩者の中間程度を示した。

(VIII) 正常醱酵と酸醱酵との限界に就て

(I) の實驗に於て 5% 蔗糖溶液に大豆粕を對糖 50-100% 添加すれば酸醱酵を起し、對糖 10% 添加すれば正常醱酵が行われる事が判明した。依つて更に大豆粕を對糖 10-50% の間を 5% の間隔で夫々蔗糖溶液に添加して醱酵を行つた結果は 20% 以下では何れも正常醱酵が、又 30% 以上では總べて酸醱酵が起つた。但し此處に興味ある事は對糖 25% の大豆粕を添加した場合であつて、10 箇の竝行實驗の中、2 割は正常醱酵を、他の 2 割は酸醱酵を起し、残りの全部は緩慢醱酵の後正

規に近いソルベントの収量を得た。此の場合の緩慢醱酵では醱酵の中期迄はその外観及び分析結果が酸醱酵の場合と全く同様であつて、その後瓦斯の發生も止み恰も醱酵が中絶したかの觀があるが此の状態が普通 24-48 時間、稀には 120 時間も経過した後には於て急に旺盛な瓦斯の發生を見、爾後 24-48 時間後に醱酵が完了して正規のソルベント収量に近い數値を得るに至るものである。緩慢醱酵は培地に有害細菌が侵入した場合や、使用菌の變性した場合にも認められるが、本實驗の場合にはその何れにも屬さない事を前と同じ細菌學的検査により確認した。要するに酸醱酵と正常醱酵との限界は大豆粕を對糖 25% 添加した場合にあり、此の場合に屢々緩慢醱酵が認められる。然し乍ら其の生因に就ては明かでない。

## ■ 考 察

緒言に述べた様に酸醱酵を生ずる原因としては種々挙げられて居るが、本報の實驗結果によれば、大豆粕やグルテンミールの様なブタノール・アセトン菌に對して好適な榮養補助原料を過量に與えた場合にも酸醱酵を起すものである事を認めた。此の場合醱酵の初期より既に菌の發育に對する榮養源が十分存在する爲に使用菌の増殖が正常醱酵の場合よりも大となり、從つて該菌の繁殖の結果必然的に代謝生産される有機酸の高濃度集積となりその爲に菌は有害作用を受けて酸生成とソルベント生成との繼續的醱酵機構の中絶を來し、其の結果菌の孢子形成が十分行われぬものと考えられる。

勿論過量に存在する蛋白質及びその分解産物は醱酵液の緩衝力を大にする結果片桐氏等の説<sup>14)</sup>の様に醱酵の中期に於てソルベントの生成に必要な環境 (PH: 4.0-4.4) になるのが妨げられる事も考えられるが、*Aspergillus niger* による枸橼酸醱酵に於ても榮養缺乏状態に於て枸橼酸の収量が良好であると云う BERNHAUER 氏の所説<sup>30)</sup>に兼ねて著者の研究結果<sup>31)</sup>を併せ考える時、ブタノール・アセトン醱酵に於ても之と同様に正常醱酵は榮養源が稍々不十分の時に於て行われる事を示唆して居る。

斯くの如き見地よりせば未熟玉蜀黍や甜菜根頭部搾汁の様な菌の榮養分が炭水化合物量に比して過量に存在する様な天然物醱酵の場合には澱粉や白糖の如き榮養源に乏しい炭水化合物源を加えて榮養分の濃度を低下せしめる方法が却つて得策でないかと思はせられる。

## IV 摘 要

(1) 蔗糖溶液に補助原料として好適な大豆粕或はグルテンミールでも之を過量に與えた場合には異常醱酵特に酸醱酵を起す。玉蜀黍醱酵に於ても同様である。

(2) 大豆粕添加蔗糖溶液の醱酵中に於て菌の分泌する酵素により所含蛋白質は強力に加水分解作用を受ける。而してその分解作用は醱酵終了後にも繼續する。

(3) 大豆粕を過量に添加した蔗糖溶液に於ける酸醱酵生成の素因は菌に對する榮養分が當初の培地中に存する水溶性物質だけで充分であるにも拘らず、醱酵中に更に溶出されて榮養分が過多になつた爲と思考される。

(4) 酸醱酵を起して居るブタノール・アセトン菌の形態は異常を呈するが、それは恆久的な變性ではない。

(5) 大豆粕を過剰に添加した培地に於ける菌の繁殖は正常醱酵に於ける場合よりも大であるが生成有機酸の高濃度集積の爲に該菌の生理機能は阻害せられ、正常なる糖の醱酵は中絶の形となる。然し培地に炭酸石灰を加えると菌の増殖と少くも酸醱酵とが繼續せられて蔗糖は完全に消費されてしまう。

(6) 酸醱酵を起す大豆粕の添加量は對糖 30% 以上であり、25% 添加醱酵は往々にして緩慢醱酵となる。

本研究は文部省科學研究費の補助を仰いだものである。尙本報の要旨は昭和 23 年 4 月 18 日及び昭和 24 年 4 月 10 日の日本農藝化學大會並に昭和 24 年 11 月 11 日の日本農藝化學會北海道支部例會に於て分割發表した。

終りに本研究の遂行に當り種々懇切な御指導を賜つた逸見文雄博士、小幡彌太郎博士、伊藤光治博士の三先生に深甚な感謝の意を表する。

## 引用文獻

- 1) A.C. TAYSEN: J. Inst. Brew., 27, 529 (1929).
- 2) H.B. SPEAKMAN and J.F. PHILLIPS: J. Bact., 10, 183 (1925).
- 3) E.B. FRED, W.H. PETERSON and W.R. CARROL: J. Bact., 10, 97 (1925).
- 4) E.B. FRED, W.H. PETERSON and M. MULVANIA: J. Bact., 11, 323 (1926).
- 5) 湯川, 堀江: 日農化. 15, 609 (昭和14年).
- 6) 小田: 醱酵工學. 26, 317 (昭和23年).
- 7) 小田: 同上. 26, 358 ( " ).
- 8) 小田: 同上. 27, 21 (昭和24年).
- 9) G.C. ROBINSON: J. Biol. Chem., 53, 125 (1922).
- 10) H.B. SPEAKMAN: J. Biol. Chem., 58, 395 (1923).
- 11) W.H. PETERSON, E.B. FRED and E.G. SCHMIDT: J. Biol. Chem., 60, 627 (1924).
- 12) L. WEINSTEIN and L.F. RETTGER: J. Bact., 25, 201 (1933).
- 13) 池田: 日農化. 20, 136 (昭和19年).
- 14) 片桐, 北原, 那須, 中島: 醱酵工學. 22, 295 (昭和19年).
- 15) 小田: 醱酵工學. 21, 324 (昭和18年).
- 16) 杉山, 川野, 長瀬, 井上, 宇野: 醱酵工學. 23, 12 (昭和20年).
- 17) C.T. HANSEN: A.P. 2,085, 428 (1937); C.Z. 1685, II (1937).
- 18) 逸見, 友枝: 日農化. 21, 6 (昭和21年).
- 19) 逸見, 友枝: 同上. 21, 6 (昭和21年).
- 20) M.J. JOHNSON: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 4, 20 (1932).
- 21) 逸見, 友枝: 日農化. 19, 381 (昭和18年).
- 22) 逸見, 友枝: 同上. 19, 559 (昭和18年).
- 23) L. ROSENTHAL: J. Bact., 37, 317 (1937).
- 24) O. FOLIN and H. WU: J. Biol. Chem., 38, 81 (1919).
- 25) W.H. PETERSON, E.B. FRED and B.P. DOMOGALLA: J. Am. Chem. Soc., 46, 2086 (1924).
- 26) W.H. PETERSON and E.B. FRED: Ind. Eng. Chem., 24, 237 (1932).
- 27) A.M. WYNNE: J. Bact., 22, 209 (1931).
- 28) H.B. SPEAKMAN: J. Biol. Chem., 70, 135 (1926).
- 29) 井上: 日農化. 20, 74 (昭和19年).
- 30) K. BERNHAUER und A. IGLAUER: Biochem. Z. 287, 153 (1936).
- 31) 未發表.

## Summary

In sugar media the soy bean flake is one of the most suitable nutrients for the butyl-acetone organism and it is usually added in 10-15% for sugar to the medium. But the sugar medium and also corn mashes containing soy bean flake excessively are fermented abnormally, i. e., in such media the volatile acids are accumulated and then the fermentation is stopped without producing any solvents and consuming sugar completely.

(1) Five per cent sugar media to which the soy bean flake is added in more than 30% for sugar are fermented abnormally, and in the media containing 25% the fermentation is occasionally sluggish.

(2) In this abnormal fermentation the bacteria are different from the normal form, but their transformation is temporary, as they ferment again normally in the usual medium.

(3) During the fermentation of the soy bean flake-sugar medium its protein is hydrolyzed and this hydrolyzation still proceeds continuously after the fermentation.

(4) In sugar medium containing an excessive amount of soy bean flake, the bacteria multiply more than in normal medium, and then their fermentation-activity is inhibited by the volatile acids, their own first metabolic products of sugar, accumulated in higher concentration. But when calcium carbonate is added to the medium, the sugar used is consumed completely because the bacteria are not inhibited by acids.

(5) A cause for the abnormal fermentation in this medium is owing to the soluble amount of the nutrient becoming excessive by the hydrolyzative action of the bacterial enzymes during fermentation.

It may be necessary to make the fermentation normal that the medium be rather poor in nutrients for the butyl-acetone organism.