HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糖よりの沒食子酸醱酵に關する研究 : 第２報　炭素源及び窒素源の選擇試驗
Author(s)	佐々木, 酉二; 高尾, 彰一
Citation	北海道大學農學部邦文紀要, 2(1), 26-35
Issue Date	1954-09-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11562
Type	bulletin (article)
File Information	2(1)_p26-35.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

糖よりの沒食子酸醱酵に關する研究

(第2報) 炭素源及び窒素源の選擇試驗

佐々木酉二・高尾彰一
(北海道大學農學部應用菌學教室)

Studies on the Gallic Acid Fermentation from Sugar.

(Part 2) Selective Experiments of C- and N-Sources.

By

YUJI SASAKI and SHOICHI TAKAO
(Institute of Applied Mycology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

緒　論

微生物による從來の沒食子酸醱酵は，タンニン含有液に *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum* 等を培養し，これら黴の有する tannase の作用によつてタンニンを加水分解して沒食子酸を生成させるものであるが，これとは全く逆に糖類から合成的に微生物により沒食子酸を得ることについては未だ報告が見られていない。

著者等は先に，黴による鹽化鐵呈色物質生成の如何について319株にのぼる多數の黴を用い，廣汎な試驗を行つている中に，*Aspergillus* 屬の1菌株，本教室培養番號 A. 1030 の培養液が鹽化鐵によつて濃黑青色を呈することを認めたのであるが，この様な呈色を示す物質は糖類からの黴の生產物としては未だ知られていないので，各種の定性確認試驗を行つた結果，この物質は沒食子酸であることをほぼ確認し，その結果を第1報として發表した[1]。

更に，この物質の生成と黴の發育狀態とが時期的に極めて密接且つ特異的關係のあることについても併せて報告した。即ち黴を液体培養すると始めは液中で發育し，その間は鹽化鐵による呈色はないが，やがて滑かな表面發育に移ると共に鹽化鐵により濃黑青色の呈色を示す様になり，その後培養が古くなり白色氣菌糸が密生するに至るとこの呈色が見られなくなるのである。

この第2報においては，培養液の炭素源及び窒素源について選擇試驗をした所，共に2,3の限定されたもののみがこの物質生成に適していることを認めたのでその結果を取纏めて報告する。

實　驗

實驗 I. 培養液の炭素源試驗

A. 炭素源の選擇試驗

1. 供試菌株

第1報で報告した如く沒食子酸と思われる鹽化鐵呈色物質を生成する *Aspergillus* 屬の1菌株，本教室培養番號 A. 1030 で，32°C, 7日間，麩に培養したものを本試驗の接種用として用いた。

2. 培養基並びに炭素源

基本培養基としては，前報で用いた NH_4NO_3 0.1125%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KCl 0.01% の組成で，この他に培養液の炭素源としてこれ迄は Glucose 5% を用いて來たのであるが，ここでは Glucose の他に，Arabinose, Xylose, Fructose, Mannose, Galactose, Maltose, Sucrose, Lactose, Inulin, Dextrine, Soluble Starch, Starch, Glycerine の計14種を夫々5%濃度で使用した。

3. 培養及び試驗方法

上記の各種炭素源を含んだ培養液を150cc容三角フラスコに40cc宛注入し，殺菌後これに前

記麩に培養した黴 A. 1030 を 2 白金耳宛接種し，32℃に培養，30日間にわたり一定日數毎に發育狀態の觀察，鹽化鐵呈色物質生成の如何を試驗したのである。鹽化鐵呈色試驗は培養液 1 cc をとり，1% 鹽化鐵液 1～5 滴を加えた際の呈色によつた。

4. 實驗結果

結果は第 1 表に示した如くであるが，これ迄の Glucose を用いて行つた試驗において，この黴 A. 1030 は始め液中で發育しある日數たつと表面に發育し始めるのであり，液中に發育している間は如何なる場合でも培養液の鹽化鐵呈色は青色にならず，液內の發育がある程度に達し一旦表面に發育する樣になると，間もなく鹽化鐵呈色が青～黑青色になるという特異な經過を經ることが知られているので，この表に示した發育程度の符號“＋”は表面發育をした場合にのみ與え，全液面にわたり完全に表面發育したものを“卌”で表わし，以下その程度に應じて“＋”の數を定めた。從つて液內における發育が如何に盛でも表面發育を認められないものは“－”で表わした。

その結果は鹽化鐵により濃黑青色を呈するものは Glucose, Mannose, Sucrose の 3 種のみで，その他は Fructose, Maltose, Soluble Starch, Starch の如く青色を呈しても薄く，前者とは比較にならない程である。又，Lactose, Dextrine の如く鹽化鐵による青乃至黑色を帶びた呈色の全くないものもあり，夫々の炭素源によつて非常に差異のあることが認められたが，ただ，Glycerine の場合培養日數と共にその呈色が黑紫色から濃黑綠色に變つて行くことは興味あることである。呈色物質の生成されている期間は Glucose, Mannose が Sucrose よりも長く，結局炭素源としては前 2 者が最適であると考えられる。

Table 1. Selection of C-Source.
(Rate of surface growth and Coloration with $FeCl_3$)

C-source	days								
	3	5	7	9	12	15	20	25	30
None	± none	± ”	± ”	± ”	± ”	± ”	± ”	± ”	± ”
Arabinose	++ none	++ light black	++ black-purple	卌 deep black-brown	卌 ”	卌 black-brown	卌 ”	卌 ”	卌 ”
Xylose	++ none	++ ”	++ light black-brown	卌 light black-blue	卌 black-brown	卌 ”	卌 ”	卌 ”	卌 ”
Glucose	－ none	－ ”	－ ”	卌 black-brown	卌 deep black-blue	卌 ”	卌 ”	卌 brown	卌 light brown
Fructose	－ none	－ ”	－ ”	－ ”	－ ”	卌 light black-blue	卌 light black	卌 ”	卌 ”
Mannose	－ none	－ ”	－ ”	－ ”	卌 deep black-blue	卌 ”	卌 ”	卌 light black	卌 ”
Galactose	± none	++ ”	++ ”	++ ”	++ ”	++ ”	*－ ”	－ ”	－ ”

C-source	days								
	3	5	7	9	12	15	20	25	30
Maltose	− none	− "	− "	++++ blue	++++ "	++++ light black-blue	++++ light brown	++++ none	++++ "
Sucrose	− none	− "	− "	+++ "	++++ deep black-blue	++++ "	++++ light black-blue	++++ "	++++ brown
Lactose	+ none	++ "	+++ "	++++ black-brown	++++ "	++++ brown	++++ "	++++ "	++++ none
Inulin	+++ none	++++ light black-brown	++++ light black	++++ "	++++ "	++++ "	++++ none	++++ "	++++ "
Dextrine	++ none	*− "	+ "	++++ light brown	++++ "	++++ "	++++ "	++++ none	++++ "
Soluble Starch	+++ none	+++ light black	+++ light black-blue	++++ "	++++ "	++++ light brown	++++ "	++++ none	++++ "
Starch	− none	− "	+ "	++++ whitish blue	++++ "	++++ "	++++ light brown	++++ none	++++ "
Glycerine	++ none	++ "	++ black-purple	++ "	++ "	++ deep black-green	++ "	+++ "	+++ "

Notes: In this table, "+, −" indicate a rate of surface growth of the mold.

A black-blue coloration with $FeCl_3$ does not appeared during the submerged growth, but appeared from the stage of surface growth, therefore the submerged growth is represented as "−" even in very vigorous growth.

A perfect surface growth is represented as "++++", and number of "+" is given in proportion to the rate of the surface growth.

* Surface growth sank into the madia.

B. Glucose の最適濃度試驗

炭素源試驗の結果，該物質の生成に最適のものの一つとして認められた Glucose について，次にその最適濃度試驗を行つた。試驗に用いた添加糖濃度は，0, 0.3, 0.6, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0% の 8 段階で，培養，試驗方法等はすべて前記試驗と同樣である。

實驗結果

結果は第 2 表に示したが，表で明かな如く Glucose 3%, 5%, 7% 共に鹽化鐵により濃黑青色を呈するが，5% の場合その呈色期間の長いことからこの濃度が最適であるものと思われる。1% では培養 30 日に到るも液面發育はなく他方，7%, 10% でも液面發育が極めて遲く，それに從つて鹽化鐵呈色も遲れることが分つた。

實驗 II. 培養液の窒素源試驗

1. 試驗方法

炭素源としては前記試驗で最適の Glucose 5% を用い，次に各種の窒素源についてその選擇

Table 2. Optimum Concentration of Glucose.

conc. (%)	days 3	5	7	9	12	15	20	25	30
0	± none	± ”	± ”	± ”	± ”	± ”	± ”	± ”	± ”
0.3	− none	− ”	± ”	+ ”	+ ”	+ ”	+ ”	+ ”	+ ”
0.6	− none	− ”	− ”	− ”	− ”	± ”	+ ”	+ ”	+ ”
1.0	− none	− ”	− ”	− ”	− ”	− ”	− ”	− ”	− slightly light black
3.0	− none	− ”	− ”	++ ”	+++ deep black-blue	+++ ”	+++ black-brown	+++ brown	+++ light brown
5.0	− none	− ”	− ”	+++ black-brown	+++ deep black-blue	+++ ”	+++ ”	+++ brown	+++ light brown
7.0	− none	− ”	− ”	− ”	− ”	− ”	+++ deep black-blue	+++ light black-blue	+++ ”
10.0	− none	− ”	− ”	− ”	− ”	− ”	− ”	+++ light black-blue	+++ ”

試驗を行つた。他の培養液組成はこれ迄と全く同じである。

窒素源としては，これ迄用いて來た NH_4NO_3 の他に，$(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, $(NH_4)_2HPO_4$, NH_4OH, $NaNO_3$, Urea, Glycocol, Aspartic acid, Asparagine, Peptone の計 11 種を用い，その濃度は 4 段階即ち，NH_4NO_3 の 0.05, 0.1, 0.3, 0.5% を基としてこれらに相當する窒素量を夫々含む樣に添加した。因みにこれ迄の試驗に用いて來た窒素源濃度は NH_4NO_3 0.1125% (當試驗ではこれに近い 0.1% を使用) である。

培養及び試驗方法は從來と同じであるが，その他に培養終了後の菌体の乾燥重量及び，接種前と培養終了後の pH の測定をも合せて行つた。

2. 實驗結果

結果は第 3 表に示した如く，鹽化鐵により濃黑青色を呈したのは NH_4NO_3 及び Asparagine のみであり，併もその濃度が NH_4NO_3 では從來用いて來た 0.1% に，又 Asparagine では 0.1485% (NH_4NO_3 の 3 %に相當する窒素を含む) に極限されていたことは甚だ興味あることである。又，Urea は 0.017%, 0.035% (夫々 NH_4NO_3 の 0.05 及び 0.1% に相當) では黑青色を呈したが，0.105%, 0.175% (NH_4NO_3 0.3 及び 0.5% に相當) では他の各種窒素源の場合と異り液內の發育も全く見られなかつたのである。

$NaNO_3$, Peptone, Glycocol は比較的早く液面發育をし，その發育盛であるにも關わらず鹽化

Table 3. Selection of N-Source.

N-Source	days / (%)	3	5	7	9	12	15	20	25	30	initial pH	final pH	wt. of mycelium (g)
None		+ none	++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	5.4	5.4	0.282
NH_4NO_3	0.05	− none	− "	+ "	+++ "	+++ "	+++ light black	+++ "	+++ "	+++ "	5.4	5.8	0.264
	0.1	− none	− "	− "	++ black-brown	+++ deep black-blue	+++ "	+++ "	+++ brown	+++ light brown	5.4	5.8	0.407
	0.3	− none	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	5.4	2.0	0.488
	0.5	− none	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	5.4	2.0	0.688
$(NH_4)_2SO_4$	0.0825	− none	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	5.6	2.4	0.138
	0.1651	− none	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	5.6	2.0	0.143
	0.4952	− none	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	5.4	1.8	0.377
	0 8254	− none	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	− "	5.4	1.8	0.763

NH_4Cl	0.0668	— none	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	5.6	2.4	0.416
	0.1337	— none	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	5.6	2.0	0.679
	0.401	— none	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	5.6	1.8	0.733
	0.6684	— none	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	5.6	1.8	0.731
$(NH_4)_2HPO_4$	0.0825	— none	— ”	— ”	— ”	++++ ”	++++ ”	++++ ”	++++ ”	++++ ”	5.4	5.0	0.469
	0.1650	— none	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	5.2	2.6	0.340
	0.4950	— none	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	4.8	2.0	0.344
	0.8250	— none	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	— ”	4.6	1.6	0.445
NH_4OH	0.0438	± none	± ”	± ”	++++ ”	++++ light black-brown	++++ ”	++++ black-brown	++++ ”	++++ ”	6.4	6.4	0.420
	0.0876	± none	± ”	± ”	++++ ”	++++ light black-brown	++++ black-brown	++++ ”	++++ ”	++++ ”	6.8	6.8	0.442

Table 3. Selection of N-Source. (Continued)

N-Source	days / (%)	3	5	7	9	12	15	20	25	30	initial pH	final pH	wt. of mycelium (g)
NH_4OH	0.2627	− none	− ,,	− ,,	++ ,,	+++ light black-brown	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	7.5	7.6	0.457
	0.4379	− none	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	8.6	8.2	0.461
$NaNO_3$	0.1062	− none	++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	5.4	7.2	0.302
	0.2124	− none	++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	5.4	8.6	0.317
	0.6372	− none	++ ,,	+++ ,,	+++ black-brown	+++ ,,	+++ none	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	5.4	9.2	0.472
	1.0620	− none	++ ,,	+++ ,,	+++ black-brown	+++ light brown	+++ none	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	5.4	9.2	0.516
Urea	0.0375	+++ none	+++ light black-blue	+++ black blue	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ light black-blue	+++ ,,	5.6	5.6	0.295
	0.0750	+++ none	+++ light yellowish black	+++ light black-brown	+++ light black-blue	+++ ,,	+++ black-blue	+++ ,,	+++ ,,	+++ light black-blue	5.8	5.4	0.560
	0.2250	− none	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	− ,,	6.2	7.2	0

	0.3750	— none	— ,,	— ,,	— ,,	— ,,	— ,,	— ,,	— ,,	— ,,	6.4	7.4	0
Glycocol	0.0938	— none	++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ light black	+++ ,,	5.4	6.8	0.310
	0.1875	— none	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ light black	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	5.4	7.4	0.364
	0.5625	— none	+++ ,,	+++ light black	+++ black-brown	+++ deep black	+++ brown	+++ none	+++ ,,	+++ ,,	5.4	7.4	0.423
	0.9375	++ none	+++ light black-brown	+++ black-brown	+++ deep black-brown	+++ light brown	+++ none	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	5.4	7.4	0.400
Aspartic acid	0.1662	— none	— ,,	— ,,	++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ light black-blue	+++ ,,	3.4	6.4	0.329
	0.3325	— none	— ,,	— ,,	— ,,	+++ light black-blue	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	+++ ,,	3.2	7.2	0.388
	0.9974	— none	— ,,	— ,,	— ,,	— ,,	— ,,	+++ light black-blue	+++ black-blue	+++ ,,	2.5	7.8	0.470
	1.6623	— none	— ,,	— ,,	— ,,	— ,,	— ,,	+++ ,,	+++ black-blue	+++ ,,	2.4	7.8	0.663

Table 3. Selection of N-Source. (Continued)

N-Source	days / (%)	3	5	7	9	12	15	20	25	30	initial pH	final pH	wt. of mycelium (g)
Asparagine	0.0825	− none	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ light black	+++ none	+++ "	+++ "	5.4	6.4	0.352
	0.1650	− none	− "	+++ "	+++ light black	+++ "	+++ "	+++ "	+++ none	+++ "	5.4	7.4	0.360
	0.4950	− none	− "	+++ light black	+++ black-blue	+++ deep black-blue	+++ "	+++ black-brown	+++ none	+++ "	5.4	7.6	0.499
	0.8250	− none	− "	++ light black	+++ "	+++ light black-blue	+++ black-brown	+++ none	+++ "	+++ "	5.4	7.8	0.544
Peptone	0.1591	− none	− "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	5.4	5.6	0.245
	0.3182	− none	− "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ "	5.2	6.0	0.286
	0.9546	− none	− "	+++ "	+++ "	+++ "	+++ light brown	+++ none	+++ "	+++ "	5.0	8.2	0.335
	1.5910	− none	− "	+++ "	+++ "	+++ light brown	+++ deep black-brown	+++ brown	+++ none	+++ "	5.0	8.2	0.503

鐵による黒青色呈色なく，又 NH_4NO_3 の 0.3, 0.5%，及び $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, $(NH_4)_2HPO_4$ が殆んど表面發育をせず液内發育に終始したこと等も特異的現象と考えられる。

更にこれら液中發育のみに終る窒素源の場合は，その培養液の最終 pH が初期 pH より甚しく低下していることも注目すべきことである。

要　括

1. 先に糖から沒食子酸を生成することをほぼ確認した *Aspergillus* 屬の1菌株，A. 1030 につき，14種の炭素源を用いてその選擇試驗を行つた。その結果，Glucose, Mannose, Sucrose のみがその生成に適することを認めた。

更に Glycerine を用いた場合，鹽化鐵による呈色が培養日數と共に黒紫色から濃黒綠色に變化して行くことも認められた。

2. 最適炭素源の一つである Glucose を用い，その濃度を8段階に分けて最適糖濃度試驗をした結果，5% が最もよくそれに次いでは 3%，7% でそれ以外の濃度では鹽化鐵による濃黒青色呈色が殆んど又は全くないことが分つた。

3. 次に11種の窒素源につき各々，4段階の濃度を用い，窒素源選擇試驗をした結果，鹽化鐵で濃黒青色を呈するのは NH_4NO_3 と Asparagine のみで，その濃度も極限されていることを認めた。

又，この黴は培養初期は液中發育をし，やがて液表面の發育に移ると共に鹽化鐵により黒青色呈色が認められるのであるが，NH_4NO_3 の 0.3, 0.5%及び $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, $(NH_4)_2HPO_4$ の殆んどの濃度が，液内の發育のみに終始し，又その場合培養液の最終 pH が初期 pH に比し極めて低下することを認めた。

本研究費の一部は文部省科學研究費（助成研究）によつた。

文　献

1) 佐々木酉二・高尾彰一：北大農學部紀要. 1；398 (1953)

Summary

Previously, during the experiment of production of kojic acid and other $FeCl_3$-colorative substances by various molds (319 strains), we have recognized that a strain of *Aspergilli*, A. 1030, produced a substance which was colorated to deep black-blue with $FeCl_3$, and as a result of many qualitative experiments, we have mostly confirmed that the substance might be the gallic acid.

In this paper, we want to report the results of selective experiments for carbon-and nitrogen-sources in culture media, as follows:

1. Among the fourteen carbon-sources examined, glucose, mannose and sucrose are suitable for the production of this substance. In case of glycerine, the coloration with $FeCl_3$ changes to deep black-green from black purple in proportion to the course of incubation. (cf. Table 1).

2. In the experiment of the optimum concentration for glucose, 5% is the most favorable, and 3 and 7% are next to that, but in other concentrations gallic acid is scarcely produced or none. (cf. Table 2).

3. In the selective experiments for eleven nitrogen sources, only two nitrogen sources, namely NH_4NO_3 and asparagine are available, and moreover their optimum concentrations are strongly limited.

On the other hand, in 0.3 and 0.5 % NH_4NO_3, and in the almost of the concentrations of $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl and $(NH_4)_2HPO_4$, the surface growth does not appeared, but the submerged growth is continued to the last stage of cultures. And in these cases, the final pH of culture solutions are much lower than the each initial pH. (cf. Table 3).