HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糖よりの沒食子酸醱酵に關する研究 （第３報）
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), 36-42
Issue Date	1954-09-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11563
Type	bulletin (article)
File Information	2(1)_p36-42.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 3 報)

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 3)

By

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

緒　論

著者等は先に 319 株にのぼる多數の各種黴を用い，その鹽化鐵呈色物質生成の如何を試驗中，*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，種々の定性確認試驗の結果，この物質は從來微生物による糖からの生成について全く報告を見なかつた沒食子酸であることをほぼ確認し，更にこの物質生成と黴の發育狀態との間に極めて密接且つ特異的關係のあることを認めた[1]。

次いで培養基の炭素源及び窒素源について試驗した結果，炭素源では試驗した 14 種の中，Glucose, Mannose, Sucrose のみがこの物質を生成し，又窒素源では 11 種の中，NH_4NO_3 と Asparagine のみが適しており，且つそれらの最適濃度も極めて限られていることを認めたのである[2]。

更にこれらの試驗において，この鹽化鐵呈色物質を生成する條件下では，培養液の最終 pH が初期 pH に比し幾分上昇するに反し，この物質の生成されない主として窒素濃度の高い場合には，培養最終 pH が逆に甚だしく低下することを認めたので，この第 3 報においてはこれら窒素源を用いた際の培養中の pH の時期的變化を調べた結果を報告すると共に，この醱酵に對する培養液の最適 pH，最適溫度について行つた試驗結果も合せて報告する。

實　驗

實驗 I.　培養液 pH の時期的變化

1.　供試菌株並びに培養基

供試菌株は *Aspergillus* 屬の 1 菌株，本教室培養番號 A. 1030 で，その前培養は從來の報告と同樣 32°C, 7 日間麩に培養したものである。又培養基もこれ迄と同樣であるが，ただ窒素源としてはその種類及び濃度によつて培養最終 pH に著しい差のあるものの中，沒食子酸生成の最適窒素源であり且つ，最終 pH が初期 pH に比し幾分上昇する NH_4NO_3 0.1% と，鹽化鐵呈色反應が全く見られず培養最終 pH が甚しく低下する NH_4NO_3 0.5% 及びこれと相當量の窒素を含む濃度の $(NH_4)_2SO_4$ の 3 種類を用いた。

2.　培養及び試驗方法

培養方法はこれ迄と同じく 150 cc 容三角フラスコに入れた培養液 40 cc に *Aspergillus* A. 1030 を接種し，32°C で 25 日間培養を續け，その間 3, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 25 日目のものにつき，夫々黴の發育狀態，培養液の pH 及び培養液の鹽化鐵呈色反應を調べた。それらの試驗方法も從來と全く同樣である。

3.　實驗結果

結果は第 1 表及び第 1 圖に示した如くであるが，これ等から見て鹽化鐵呈色物質の全く生成さ

Table 1. Change of pH of the Culture Solution during Incubation

N-Source		days							
		3	5	7	9	12	15	20	25
NH_4NO_3 0.1%	surface	—	—	—	+++	++++	++++	++++	++++
	$FeCl_3$	none	"	"	black-brown	deep black-blue	"	"	brown
	pH	4.8	4.0	3.8	5.4	5.4	5.6	5.8	6.0
NH_4NO_3 0.5%	surface	—	—	—	—	—	—	—	—
	$FeCl_3$	none	"	"	"	"	"	"	"
	pH	4.8	4.0	3.8	3.4	3.4	3.2	3.2	3.0
$(NH_4)_2SO_4$ (corresponding with NH_4NO_3 0.5%)	surface	—	—	—	—	—	—	—	—
	$FeCl_3$	none	"	"	"	"	"	"	"
	pH	4.6	2.6	2.2	2.2	2.0	2.0	2.0	1.8

surface : surface growth
$FeCl_3$: coloration with $FeCl_3$
initial pH : 5.4

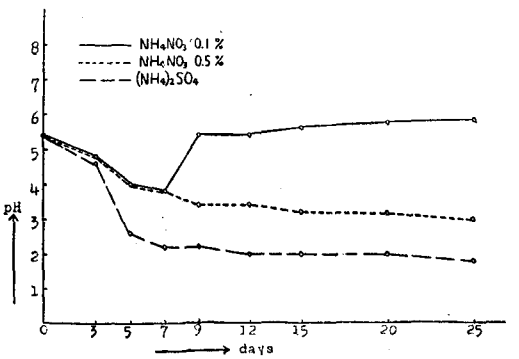

Fig. 1. Change of pH of the Culture Solution during Incubation

れない窒素濃度の高い場合，即ち NH_4NO_3 0.5%，及びこれに相當する窒素濃度の $(NH_4)_2SO_4$ の場合では，pH は培養日數を經ると共に急激に低下し，初期 pH 5.4 に對し NH_4NO_3 では培養最終の 25 日目で 3.0, $(NH_4)_2SO_4$ では 1.8 に迄下つて行くことが見られたのである。

これに對し沒食子酸生成反應の見られる NH_4NO_3 0.1% では培養後 7 日目迄は，NH_4NO_3 0.5% の場合と同様に pH 3.8 迄低下するが，9 日目には急激に上昇して初期 pH 5.4 に戻り以後除々に漸增する傾向が認められた。

この沒食子酸を生成する NH_4NO_3 0.1% の場合の pH の變化と黴の發育狀態，鹽化鐵呈色反應とを比較すると(寫眞 1 及び第 2 表參照), pH の低下する 7 日目迄は黴の發育は液中のみに止り又この間は鹽化鐵による黑青色呈色は全く見られないが，pH が急激に上昇する 7 日目から 9 日目にかけて黴は表面發育を始める樣になり，それ以後は鹽化鐵による呈色が黑青色を示し，即ち pH の上昇點と黴の表面發育及び鹽化鐵による濃黑青色の呈色時期とが極めてよく一致していることが分つたのである。

この pH の急激上昇點 5.4 から 20 日目の 5.8 迄の期間は黴の表面發育は滑らかであり，且つ沒食子酸の反應が引續き認められるが，pH が 6.0 になる 25 日目には表面發育は白色氣菌糸が密生して滑らかでなくなりこの時期になると鹽化鐵呈色反應も褐色に變るのである。

一方 pH の著しく低下する NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ の窒素濃度の高い場合には，25 日目に至るも黴の表面發育は全く見られず液中の發育のみに止まり，又沒食子酸生成反應も全くなかつたのである。

以上の結果から見て黴が表面發育に移ると共に鹽化鐵による黑青色呈色が現われることから，この物質の生成には酸素が極めて重要な役割を果していることが推察され，且つ又鹽化鐵呈色を示す前に培養初期に於て急激な pH の低下を見ることからこの物質生成の前驅物質としてある種の酸

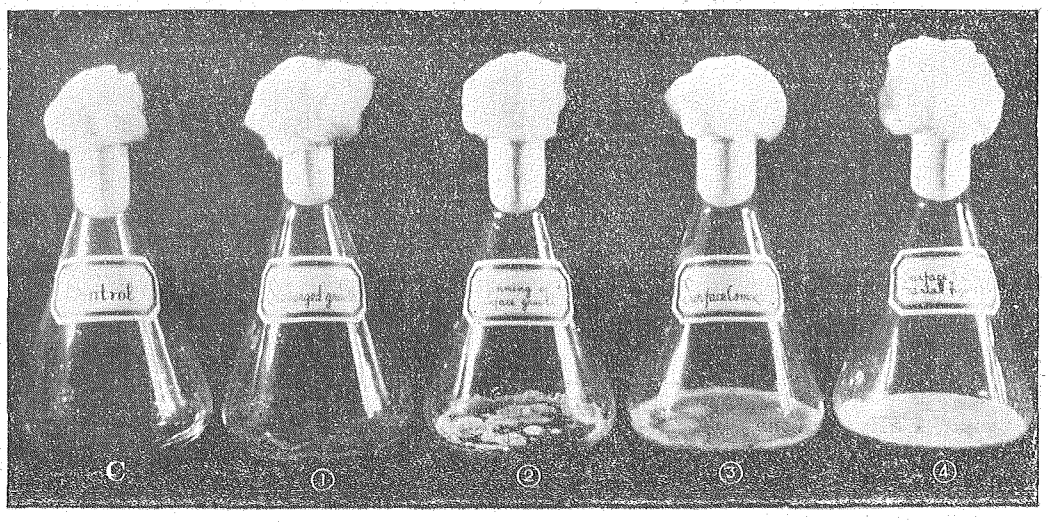

Photo. 1. Growth of the Mold, A. 1030
C: Control (not inoculated)
1: Submerged growth
2: Beginning of surface growth
3: Surface growth (smooth)
4: Surface growth (with aerial hyphae)
(confer Table 2)

Table 2. Relationship between the Growth of A. 1030, the Coloration with $FeCl_3$ and the pH of Culture Solution (with NH_4NO_3 0.1%)

Days	3	5	7	9	12	15	20	25
Growth of A. 1030	submerged growth	"	"	beginning of surface growth	surface growth (smooth)	"	"	surface growth (with aerial hyphae)
Coloration with $FeCl_3$	none	"	"	black-brown	deep black-blue	"	"	brown
pH	4.8	4.0	3.8	5.4	5.4	5.6	5.8	6.0
Photo. No.	1			2	3			4

の生成が必要とされるのではないかとも考えられ，この點については沒食子酸生成機構更には他のフェノール系化合物生成の機構解明の點からも意義深いことと思われるので現在研究中である。

實驗 II. 培養液の最適 pH 試驗

前記の試驗において，培養中に培養液の pH が時期的に極めて變化することから，次に培養液の最適 pH 試驗を行つた。

pH の調整は培養液殺菌後，殺菌鹽酸又は苛性ソーダ液を添加して行い，pH 1.8, 2.4, 3.4, 4.4, 5.4, 5.8, 6.4, 7.0, 8.0 の 9 段階とした。因みにこれまでの各種試驗に用いて來た培養液の pH は 5.4 である。又窒素源は沒食子酸生成に最適の NH_4NO_3

0.1% を用いた。培養並びに試驗方法は前記試驗と全く同樣である。

實驗結果

結果は第3表及び第2圖に示す如くであるが，先ず强酸性側の pH 1.8, 2.4 では黴の發育は液中，表面共に全く見られない。

又中性附近ないしアルカリ性側の pH 6.4, 7.0, 8.0 では鹽化鐵による黑青色呈色は培養 25 日目に至るも見られず，pH 6.4, 7.0 が 15 日目でわずかに淡黑色を呈したに過ぎない。

培養液が鹽化鐵によつて濃黑青色を呈する最適 pH の範圍は pH 4.4 から 5.8 の間であり，pH 3.4 では 25 日目に至つて始めて黑青色呈色反應が見られた。

この最適 pH 試驗においても，その pH の時期的變化，黴の發育狀態及び沒食子酸生成との相

Table 3. Experiment of Optimum pH

pH		days							
		3	5	7	9	12	15	20	25
1.8	surface	—	—	—	—	—	—	—	—
	$FeCl_3$	none	”	”	”	”	”	”	”
	pH	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
2.4	surface	—	—	—	—	—	—	—	—
	$FeCl_3$	none	”	”	”	”	”	”	”
	pH	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
3.4	surface	—	—	—	—	—	—	—	+++
	$FeCl_3$	none	”	”	”	”	”	”	B-bL
	pH	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	2.8	2.8	5.4
4.4	surface	—	—	—	—	++++	++++	++++	++++
	$FeCl_3$	none	”	”	”	d-B-bL	”	”	l-B-bR
	pH	4.4	4.2	4.2	4.2	5.4	5.4	5.4	5.8
5.4	surface	—	—	—	++	++++	++++	++++	++++
	$FeCl_3$	none	”	”	B-bR	d-B-bL	”	”	bR
	pH	4.8	4.0	3.8	5.4	5.4	5.6	5.8	6.0
5.8	surface	—	—	—	++	++++	++++	++++	++++
	$FeCl_3$	none	”	”	B-bR	d-B-bL	”	”	l-B
	pH	5.0	4.4	4.0	5.6	5.6	5.6	5.8	6.0
6.4	surface	—	—	—	+++	++++	++++	++++	++++
	$FeCl_3$	none	”	”	”	”	l-b	”	l-bR
	pH	5.0	4.6	4.0	5.8	5.8	5.8	6.2	6.4
7.0	surface	—	—	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	$FeCl_3$	none	”	”	”	”	l-B	l-bR	”
	pH	5.2	4.6	5.8	5.8	5.8	5.8	7.2	7.4
8.0	surface	—	—	—	++	+++	++++	++++	++++
	$FeCl_3$	none	”	”	”	”	”	”	”
	pH	5.4	5.4	5.4	5.4	5.6	5.6	7.4	7.4

d-B-bL : deep black blue, B-bL : black blue,
B-bR : black brown, bR : brown,
l-B-bR : light black brown, l-B : light black,
l-bR : light brown

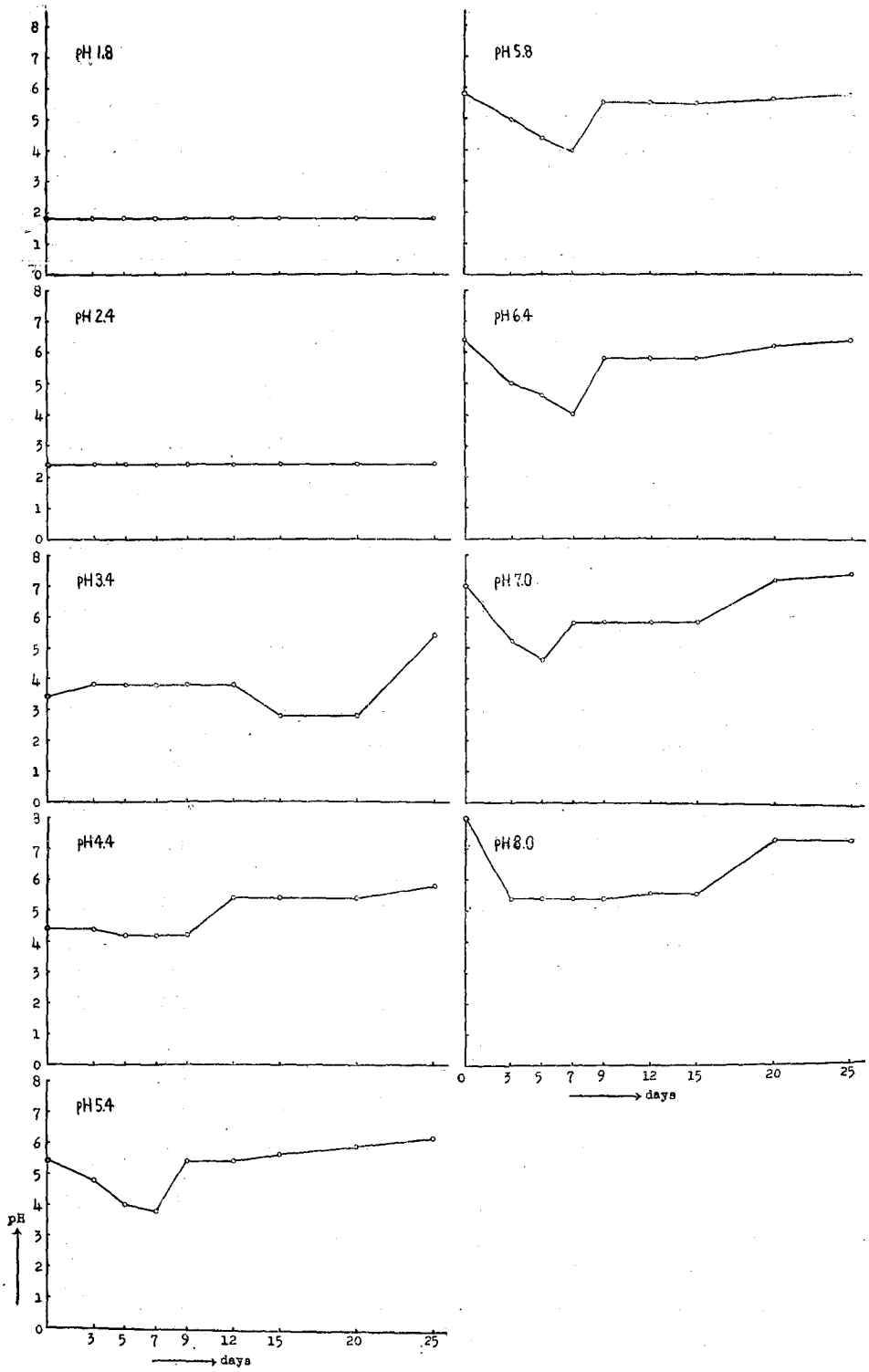

Fig. 2. Change of pH in the Experiment of Optimum pH

互關係を比較すると，鹽化鐵によつて黑青色呈色を示す場合はいずれの場合も先に指摘したと同樣，時期的な特異的關係即ち，黴が液中發育をしている培養初期には pH は低下して行き，この間は鹽化鐵による呈色は見られないが，やがて黴が表面發育を始めると pH は急激に上昇し，それと共に鹽化鐵による黑青色の呈色が現われるという關係が存することを認めたのである。

この關係は最適 pH 範圍の pH 4.4, 5.4, 5.8 においては勿論，25 日目に黑青色呈色を見る pH 3.4 においても，又鹽化鐵によつて 15 日目にわずかに淡黑色を呈する pH 6.4, 7.0 においてさえもその傾向が見られたのである。

實驗 III. 最適溫度試驗

次にこの醱酵に對する適溫試驗を行つた。試驗培養溫度は 27°, 32°, 37°, 40°C の 4 段階とした。その他培養方法，試驗方法等は前記試驗と全く同樣である。

實驗結果

結果は第 4 表及び第 3 圖に示したが，高溫の 37°, 40° では液中においてさえも黴の發育が全く見られず，從つて沒食子酸生成も全く無い。又 27° では黴の液中發育の期間が長く，12 日目迄は表面發育を見ず，又その後表面發育をした場合にも鹽化鐵による黑青色呈色は濃厚でなく，結局，從來用いて來た培養溫度 32° が黴の發育にも，又沒食子酸生成にも最適であることが確められた。

興味あることは，鹽化鐵呈色弱く，且つその時期も遲い 27° の場合においてさえも，32° の場合と同じ傾向の pH の時期的變化との關係が見られることで，液中發育の間に pH は 3.6 に迄低下し，その間鹽化鐵呈色反應は見られないが，表面發育及び沒食子酸の生成反應を見る 15 日目に至つて

Table 4. Experiment of Optimum Temperature

temp.		days 3	5	7	9	12	15	20	25
27°	surface	—	—	—	—	—	++++	++++	++++
	$FeCl_3$	none	"	"	"	"	l-B-bL	B-bL	l-B
	pH	4.2	3.6	3.6	3.6	3.6	5.6	5.6	5.8
32°	surface	—	—	—	++	++++	++++	++++	++++
	$FeCl_3$	none	"	"	B-bR	d-B-bL	"	"	bR
	pH	4.8	4.0	3.8	5.4	5.4	5.6	5.8	6.0
37°	surface	—	—	—	—	—	—	—	—
	$FeCl_3$	none	"	"	"	"	"	"	"
	pH	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
40°	surface	—	—	—	—	—	—	—	—
	$FeCl_3$	none	"	"	"	"	"	"	"
	pH	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4

d-B-bL : deep black blue, B-bL : black blue,
B-bR : black brown, bR : brown,
l-B-bL : light black blue, l-B : light black

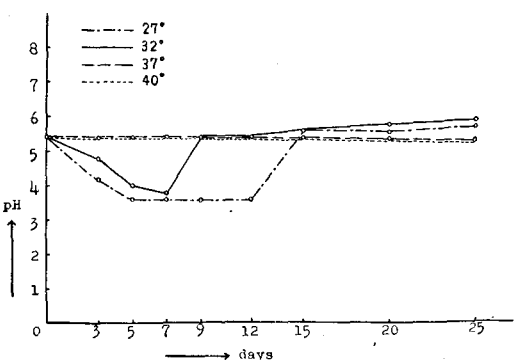

Fig. 3. Change of pH in the Experiment of Optimum Temperature

急激に pH 5.6 に上昇しているのである。

要　括

Aspergillus 屬の1菌株, A. 1030 による糖からの沒食子酸生成について，培養中における pH の時期的變化，最適 pH 及び最適溫度の試驗を行い次の結果を得た。即ち，

糖よりの沒食子酸生成に最適の窒素源である NH_4NO_3 0.1% では，黴が液中發育をしている培養初期には pH は接種時の 5.4 から 3.8 にまで低下し，やがて表面發育に移ると共に pH は急激に上昇して始めの pH 5.4 に返り，それと相まつて鹽化鐵による濃黑青色の呈色が見られる樣になるに對し，窒素濃度の高い NH_4NO_3 0.5%，及びそれと同じ窒素濃度の $(NH_4)_2SO_4$ を用いた場合は，pH は低下する一方で最終 pH は夫々 3.0, 1.8 と極めて酸性となり，培養 25 日に至るも表面發育は全くなく，又鹽化鐵の呈色も全然見られない。

培養液の最適 pH は 1.8 から 8.0 まで9段階について試驗したところ pH 4.4, 5.4, 5.8 の間が最適であつた。

又 27°, 32°, 37°, 40°C についての適溫試驗では 32° が最適であつた。

これらの試驗を通じ，鹽化鐵の呈色が認められる條件下では，いずれの場合も培養液の pH，黴の發育狀態，沒食子酸生成の間に同傾向の密接な時期的相互關係が認められた。

このことから，第2報の炭素源，窒素源の極限された選擇性とも考え合せて，この醱酵が甚だ限定された條件を必要とし，且つ著しく特異な生成過程を經るものであることが推測される。

本研究費の一部は文部省科學研究費（助成研究費）によつた。

文　献

1) 佐々木酉二・高尾彰一：北大農學部邦文紀要. **1**; 398 (1953.)
2) 同　上　：同　上 **2**; 26 (1954.)

Summary

Previously we have mostly confirmed that a strain of *Aspergilli*, A. 1030, produced gallic acid from sugars.

In this paper, we want to report the result of experiments for pH-change of the culture solution during the incubation, optimum pH of the culture media, and optimum temperature. These results are as follows:

1. In the favorable nitrogen source, 0.1% NH_4NO_3, for gallic acid production, pH of the culture solution which initial pH is 5.4, decrease to 3.8 during the early stage of incubation that the mold is in submerged growth, and becoming to surface growth, pH rise again rapidly to initial pH 5.4, and the culture solution is colorated to deep black blue with $FeCl_3$ at the same time.

2. In high concentration of nitrogen sources, namely NH_4NO_3 0.5%, and $(NH_4)_2SO_4$ corresponding with nitrogen concentration of NH_4NO_3 0.5%, pH of the culture solution is always decreased and these final pH are strongly acidic 3.0 and 1.8 respectively.

In these cases, even at 25 days-incubation, the surface growth and $FeCl_3$-coloration is not appeared. (cf. Table 1, 2, Fig. 1, Photo. 1).

3. Optimum pH of the production of gallic acid are 4.4 to 5.8. (cf. Table 3, Fig. 2).

4. Optimum temperature is 32°C, but at 37° and 40°C, there are no growth of the mold at all. At 27°, a rate of gallic acid production is slow, and $FeCl_3$-coloration is not stronger than in the case of 32°. (cf. Table 4, Fig. 3).

5. During these experiments, it was recognized that there are very close relationships between the pH change of the culture solution, the state of mold growth and the production of gallic acid, under the conditions that the $FeCl_3$-coloration of gallic acid is appeared.