HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糖よりの沒食子酸醱酵に關する研究 （第１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, 1(4), 398-402
Issue Date	1953-11-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11541
Type	departmental bulletin paper
File Information	1(4)_p398-402.pdf

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 1 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 1)

By

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

緒　論

沒食子酸は自然界に於ては沒食子・五倍子・茶葉・石榴根皮・吐根等に遊離又は多く配糖体タンニンとして存在することが知られ，その用途としては各種醫藥・藥品製造用・染色劑・インクの製造・現像用・皮革作業用等として古くより重要視されているものである。併してこれを製するには，沒食子・五倍子等のタンニン含有物又はこれ等より得たタンニンを，稀酸又は稀アルカリで加水分解して製する化學的方法と，微生物の有する tannase の作用によつてタンニンを加水分解して製する醱酵法の 2 方法が知られている。

このタンニンを微生物的に加水分解して沒食子酸を生成するのが從來のいわゆる沒食子酸醱酵であり，この研究は古く SCHEELE[1] (1786) が五倍子中に沒食子酸を見出したことに端を發している。その後，タンニンから沒食子酸の生成は植物中に含まれる酵素又は酸化によるものであるとの LAROQUE[2),3)] (1841, 1852), ROBIQUET[1)] (1852) の研究の後，VAN TIEGHEM[5)] (1867) が始めてこの醱酵が黴の作用によるものであることを確認した。即ちこの醱酵は *Penicillium glaucum* 及び *Aspergillus niger* によつて起るものであるとし，又黴の發育には空氣の必要であること等に就いても報告している。同様に MÜNTZ[6)] (1877) もこの醱酵は *Pen. glaucum* によることを記している。以上の如くタンニンから沒食子酸の生成は黴の作用によることが明らかとなつて來たが，1900年に至りこの醱酵を司どる黴にはタンニン分解酵素である tannase が含まれており，その tannase の作用によつてタンニンが加水分解され沒食子酸と糖とになることが POTTEVIN[7)], FERNBACH[8)] おのおの別箇の研究によつて明らかとなつた。即ち彼等は *Asp. niger* を用いて實際にタンニン分解酵素 tannase を分離調製の上，種々研究をしたのである。それ以來，FREUDENBERG[9)] (1921), FREUDENBERG 及び VOLLBRECHT[10)] (1921), RHIND 及び SMITH[11)] (1922), NIERENSTEIN[12)] (1922), NIERENSTEIN[13)] (1932), DYCKERHOFF 及び ARMBRUSTER[14)] (1933), TOTH 及び BARSONY[15)] (1943), TOTH[16)] (1944) 等によつて黴の tannase を對照とした多數の研究が報告され，この酵素の各種の性質・條件等が明らかとなつて來た。一方，これ等各種の酵素化學的研究とともに，その後も黴による醱酵を主体とした研究は CALMETTE[17)] (1902), MANEA[18)] (1904), KNUDSON[19)] (1913), 喜多[20)] (1917), RIPPEL 及び KESELING[21)] (1931), NICHOLSON 等[22)] (1931), STAPP 及び BORTELS[23)] (1935), DEYS 及び DIJKMAN[24)] (1937), CHI-LIANG KUO[25)] (1939), KWANG-CHU HSIEH[26)] (1939), WEN-TEH WEI[27)] (1939), SIN-FANG FANG[28)] (1940), 小田等[29)] (1949) 等によつて續けられて來た。この中殊に，CALMETTE は培養液にタンニン分解菌を接種し通氣攪拌による液内

培養で沒食子酸を生成する特許を取り，又 KNUDSON は 23 種の黴を用い，糖添加の影響，好氣的及び嫌氣的條件下に於ける醱酵狀態，tannase 生成の適應性等につき廣汎にこの醱酵を研究しているのが注目される。

以上の如く，沒食子酸醱酵に關する研究は數多く報告されているが，併しこれ等は全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つて，これとは全く逆に糖類から微生物の作用により合成的に沒食子酸を生成させることは未だ全くその報告を見ないのである。それ故，若しこの糖類からの沒食子酸生成が確認されるならば，微生物の醱酵生理部門に更に 1 つの新しい分野を拓くことになると考えられる。

著者等はかねてより微生物による種々の醱酵生産物の生成，或いは特定物質の分解程度等を，その微生物の發育狀態と平行して時間的に觀察・測定する簡便法を檢索しその應用の一部として，先ず *Aspergillus* 屬の麴酸生成に就いて試驗し，更にこの測定法で麴酸生成に對する溫度變化の影響を調べ興味ある結果を得た[30]。その後更にこの測定法を用い黴による麴酸生成のみならず，鹽化鐵によつて呈色する種々の物質の生成をも併せて檢索すべく，319 株に及ぶ多數の黴を用い廣汎な試驗を行つたが，その中の 1 株が鹽化鐵により黑青色を呈することを認め，各種定性確認試驗の結果この物質は沒食子酸なることがほぼ確認されたので，ここに第 1 報として報告する。

實　驗

實驗 I.　鹽化鐵呈色物質生成菌株の檢索

1.　供試菌株

本敎室所有の *Aspergillus* 屬 170 株，*Penicillium* 屬 84 株，その他の黴 65 株，計 319 株を用い，試驗培養に接種する爲の前培養としては葡萄糖加用馬鈴薯寒天に 32°C，7 日間試驗管斜面培養したものを用いた。

2.　培養基

試驗に供した培養基は，MAY 等[31] (1931) が麴酸生成に用いたものを幾分變えたもので，その組成は葡萄糖 5%，NH_4NO_3 0.1125%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%，KCl 0.01%，寒天 1.5% である。この他に 1% 殺菌燐酸液 1 cc 宛を豫めシャーレに注入し，次いで上記の培養基を殺菌溶解したもの約 10 cc 宛を流し込み平板固化させる。先の燐酸の添加によつて培養基の pH は 3.6～3.8 となり，麴酸生成に適した可成りの酸性が保たれる。

3.　培養並びに試驗方法

上記培養基を流し込み固化させたシャーレの中央に供試黴の胞子をそれぞれ 1 白金線宛接種し 32°C で培養，7 日及び 13 日間培養のものに就いて黴のコロニーの發育狀態を觀察し，同時に鹽化鐵による呈色物質生成の如何を試驗した。

鹽化鐵呈色の試驗方法は，0.5×2 cm の濾紙片を 5% 鹽化鐵液に浸し，後乾燥殺菌したものを黴の發育コロニーの周邊に置き，5～10 分間內にその濾紙片の呈色の如何を調べる所謂 Paper strip method を用いた。

4.　實驗結果

上記の如く試驗した結果，先ず鹽化鐵によつて赤色の麴酸呈色反應を示したものは，*Aspergillus flavus-oryzae* group 17 株，*Asp. tamarii* 1 株，*Asp. terreus* 1 株，*Asp. effusus* 1 株の計 20 株であり，その他に黃褐色乃至褐色の呈色反應を示すもの數株が認められた。併し，供試菌株中最も特異的な鹽化鐵呈色反應を示したのは *Aspergillus* 屬の 1 株，本敎室培養番號 A. 1030 で，この黴は 7 日並びに 13 日間培養のいずれに於ても，鹽化鐵呈色試驗により極めて濃い黑褐色乃至やや青味を帶びた黑灰色の呈色反應を示すことが認められた。然るにこのような鹽化鐵呈色物質は黴の生產物としてはこれ迄に未だその例を見ないものであり，この特異的生產物の解明は黴の生理化學的面からも興味深い問題と思われる。

よつて次にこの物質を大量に生成させ，その定性確認を試みるために液体培養を行つて試驗した。

實驗 II.　*Aspergillus* A. 1030 の液体培養試驗

1.　供試菌株

上記實驗で特異的な鹽化鐵呈色反應を示した *Aspergillus* 屬の 1 菌株，敎室培養番號 A. 1030。こ

の黴は非常に胞子を形成し難いので，以後の液体培養試験には接種用の前培養としては麩に發育させたものを用いた。即ち，300 cc 容三角フラスコに麩 10 g，水 10 cc を入れ殺菌，A. 1030 を接種後 7 日間 32°C に培養のものを液体培養への接種用とした。

2. 培養基

前記平板培養に用いたと同じ組成で寒天を除いたものであるが，唯，燐酸の添加はこの物質生成には殆んど効果のないことが豫備的試験で認められたので，この液体培養の際には燐酸無添加で行つた。それ故培養液の初期 pH は 5.4 であつた。

3. 培養並びに試験方法

500 cc 容三角フラスコに培養液 60 cc を注入し，殺菌後前記麩に 7 日間培養の黴を 3 白金耳宛接種し，32°C に培養，日を追つて鹽化鐵呈色試験を行つた。呈色試験としては培養液 1 cc に 1% 鹽化鐵液を 1 滴滴下し，その際の呈色の如何を觀察した。

4. 實驗結果

先ず液体培養の場合は前記平板培養の時の鹽化鐵呈色と著しく異なり，濃黒青色の呈色を示すことが認められた。又黴の發育狀態と該物質生成との間には時期的に極めて密接且つ特異的な關係のあることが分つた。即ち，液体培養の初期約 8 日間は黴は液中發育のみを行い，液中での發育がある程度盛んになるとやがて表面に發育し始め，以後滑かな表面發育を續けるようになる。併もこの液中の發育の間はいくら培養日數を經ても培養液の鹽化鐵呈色は褐色乃至黒褐色に止るが，一旦表面に發育するようになると呈色は青色となり，やがては非常に濃い黒青色の鹽化鐵呈色を與えるに至る。その後かなりの期間，即ち約 10 日間はこの黒青色呈色が續くが，その間滑らかであつた黴の發育表面が白色氣菌糸で蔽われるようになると鹽化鐵呈色は，もはや黒青色とならず褐色に變るのである。以上の黴の發育狀態と鹽化鐵呈色物質生成との關係を時期的に示すと，第 1 表の如くになる。

Table 1. Relation between the Growth of A. 1030 and the Production of $FeCl_3$-color reactive Substance

Days	2	5	7	9	12	15	20	25	30
Growth of A. 1030	submerged	〃	〃	beginning of surface	surface (smooth)	〃	〃	surface (with aerial hyphae)	〃
Color reaction with $FeCl_3$	none	〃	〃	brown or black-brown	deep black-blue	〃	〃	brown	light brown

以上の結果から見て，この鹽化鐵による黒青色呈色物質は黴の表面發育と共に生成されることから，その生成が酸素と密接な關係にあることが推察される。

實驗 III. *Aspergillus* A. 1030 生成物質の確認試驗

培養液が鹽化鐵によつて黒青色を呈することから，現在迄に知られている各種化合物の記載と照合の結果，この物質は沒食子酸，タンニン酸又はそれ等に近い化合物ではないかと考えられるに至り，更に多數の定性試驗を比較檢討した結果この物質は沒食子酸であろうとの推測を增すに至つたが，この物質の結晶，精製に就いては尙研究進行中であるので，先ず培養液及び精製過程にある濃縮液に就いて沒食子酸の各種定性確認試驗を行つた。その試驗項目及び結果は第 2 表に示す如くである。

この表のうち靑酸加里によるルビー色の呈色反應はタンニン酸やピロガロールと沒食子酸を區別する特異的反應で，靑酸加里によつて呈色したルビー色は漸次消失するが振盪することにより再び呈色して來る極めて敏感な反應であるが，この反應も含めて 1) から 10) までの沒食子酸確認反應は，A. 1030 の培養液又は精製途中の液に對して

Table 2. Confirmative Experiments of Gallic Acid for the Substance produced by the Mold A. 1030

	Items of Experiment	Reaction	Result
1	$FeCl_3$ (for concentrated solution) ……	black-blue ……	+
2	" (for dilute solution) ……	brown ……	+
3	$FeSO_4$ ……	gradually dark blue ……	+
4	$FeCl_3+NH_4OH$ ……	brown～red-brown ……	+
5	$FeCl_3+K_3[Fe(CN)_6]$ ……	precipitation of Prussian blue ……	+
6	KCN ……	ruby red ……	+
7	$K_3[Fe(CN)_6]+NH_4OH$ ……	cinnabar→brown ……	+
8	$AgNO_3+NH_4OH$ ……	black ……	+
9	basic ……	brown ……	+
10	Picric acid+NH_4OH ……	red-brown→green ……	+
11	Gelatin solution ……	non-precipitation ……	+
12	taste ……	astringent ……	+
13	conc. H_2SO_4 ……	ruby red ……	±
14	I+NaCl ……	purple-red ……	±
15	$NaCO_3$ ……	brown→green ……	−

は全て沒食子酸の標準液と殆んど，又は全く一致した結果を示し，更にゼラチン液を沈澱させないことも沒食子酸と一致し，又濃縮液の味は沒食子酸と同様の澁味を有することも認められた。

唯，濃硫酸によるルビー色の呈色は沒食子酸が結晶又はそれに近い極めて濃い溶液でなければ現われない爲，且つ不純物があると硫酸による着色が強い爲，試驗液ではルビー色の呈色が判然とせず赤褐色となり，又沃度と食鹽による紫赤色の呈色は沒食子酸の標準液に對しても判然とせず，試驗液との比較は困難であつた。標準沒食子酸液と異なつた呈色を示したのは炭酸ソーダによる呈色のみで，これは沒食子酸では褐色から綠色に變化するのに對し，試驗液では綠色にならず褐色の呈色で止まる。この呈色の差異は共存する不純物の影響によるものではないかとも考えられる。

以上の 15 項目の定性確認試驗の結果，沒食子酸の確認反應の判然としない濃硫酸による呈色，並びに沃度と食鹽による呈色の 2 項目及び異なつた呈色を示した炭酸ソーダによる呈色の場合を除いては，全て沒食子酸に對する反應と一致した結果が認められ，これ等から見て *Aspergillus* 屬 A. 1030 の生成する鹽化鐵呈色物質は沒食子酸であるとしてほぼ差支えないものと考える。

要　括

1. *Aspergillus* 屬 170 株，*Penicillium* 屬 84 株，その他の黴 65 株，計 319 株の黴を平板培養し，麹酸その他の鹽化鐵呈色物質を生成する菌株の檢索を行つた。その結果，*Aspergillus* 屬の 20 株の麹酸生成菌株と共に，鹽化鐵によつて黒褐色乃至青味を帶びた黒灰色を呈する物質を生成する *Aspergillus* 屬の 1 菌株，A. 1030 を認めた。

2. この黴を液体培養した際にはその培養液は鹽化鐵により濃黒青色を呈し，且つこの黒青色呈色は，黴が始めの液中發育から滑らかな表面發育に移ると同時に認められ，氣菌糸の發生が盛んになると見られなくなることから，この物質生成と黴の發育狀態とは時期的に極めて密接且つ特異的關係を有することを認めた。

3. この鹽化鐵呈色物質の各種定性確認試驗から，この物質は從來糖から微生物によつて生成されたとの報告を全く見ない沒食子酸であることをほぼ確認した。

文 献

1) SCHEELE, K.: *Crell's Chem. Ann.*, **1**; 3 (1786). Cited from KNUDSON, L.: *J. Biol. Chem.*, **14**; 159 (1913).
2) LAROQUE, A.: *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, **39**; 37 (1841). Cited from KNUDSON, L.: ibid.
3) LAROQUE, A.: *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **35**; 221 (1852).
4) ROBIQUET, E.: *J. Pharm.*, **22**; 129 (1852).
5) VAN TIEGHEM, P. E. L.: *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **65**; 1091 (1867).
6) MÜNTZ: *Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch.*, 1773 (1877).
7) POTTEVIN, H.: *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **131**; 1215 (1900).
8) FERNBACH, A.: *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **131**; 1214 (1900).
9) FREUDENBERG, K.: *Z. angew. Chem.*, **34**; 247 (1921).
10) FREUDENBERG, K. and VOLLBRECHT, E.: *Z. Physiol. Chem.*, **116**; 277 (1921).
11) RHIND, D. and SMITH, F. E.: *Biochem. J.*, **16**; 1 (1922).
12) NIERENSTEIN, M.: *Biochem. J.*, **16**; 514 (1922).
13) NIERENSTEIN, M.: *Biochem. J.*, **26**; 1093 (1932).
14) DYCKERHOFF, H. and ARMBRUSTER, R.: *Z. physiol. Chem.*, **219**; 38 (1933).
15) TOTH, G. and BARSONY, G.: *Enzymologia.*, **11**; 19 (1943).
16) TOTH, G.: *Magyar Timar.*, **5**; 1 (1944).
17) CALMETTE: German Patent., 129,164 (1902).
18) MANEA, A.: Sur les acides gallotanniques et digalliques. These, Geneva (1904). Cited from KNUDSON, L.: *J. Biol. Chem.*, **14**; 159 (1913).
19) KNUDSON, L.: *J. Biol. Chem.*, **14**; 159, 185 (1913).
20) 喜多源逸: 工. 化., **20**; 134 (1917).
21) RIPPEL, A. and KESELING, J.: *Arch. Mikrobiol.*, **1**; 60 (1931).
22) NICHOLSON, W. N., NIERENSTEIN, M., POOL, J. C. and PRICE, N. V.: *Biochem. J.*, **25**; 752 (1931).
23) STAPP, C. and BORTELS, H.: *Zent. Bakt. Parasitenk.*, II., **93**; 45 (1935).
24) DEYS, W. B. and DIJKMAN, M. J.: *Proc. Acad. Sci.* Amsterdam., **40**; 518 (1937).
25) CHI-LIANG KUO: *Hwang-Hai.*, **1**; No. 2, 11 (1939).
26) KWANG-CHU HSIEH: *Hwang-Hai.*, **1**; No. 3, 1 (1939).
27) WEN-TEH WEI: *Hwang-Hai.*, **1**; No. 3, 4 (1939).
28) SIN-FANG FANG: *Hwang-Hai.*, **1**; No. 5, 5 (1940).
29) 小田雅夫・池田恭一・谷本正尙: 醱. 工. 誌., **27**; (4), 16 (1949).
30) 佐々木酉二・高尾彰一: 農. 化. 北海道支部講演 (1951).
31) MAY, O. E., MOYER, A. J., WELLS, P. A. and HERRICK, H. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **53**; 774 (1931).

Summary

We have cultured 319 strains of mold (*Aspergillus* 170 strains, *Penicillium* 84 strains, and other molds 65 strains) in petri dishes and selected strains which produced kojic acid and other $FeCl_3$-color reactive substances. The selection was carried out by so called "Paper strip method".

As a result of this experiment, it was recognized that 20 strains of *Aspergilli* showed the kojic acid-color reaction, and was found that a strain of *Aspergillus*, A. 1030, produced a substance becoming the color reaction to black-brown or bluish dark gray with $FeCl_3$.

When this mold was grown in liquid media, its culture solution changes to deep black-blue color with $FeCl_3$. As a result of various qualitative experiments, it was mostly confirmed that this substance might be the gallic acid which has never been reported its production from sugar by molds. (cf. Table 2).

Moreover, it was recognized that the production of this substance has a close and special relation to the growth of the mold relatively. Namely, at first the mold indicates submerged growth, and then the black-blue color reaction with $FeCl_3$ appears in proportion to the development of its smooth surface growth and following to vigorous growth of aerial hyphae this color reaction disappears. (cf. Table 1).