



Title	糖よりの没食子酸醱酵に関する研究 : 第2報 炭素源及び窒素源の選擇試験
Author(s)	佐々木, 酉二; SASAKI, Yuji; 高尾, 彰一 他
Citation	北海道大學農學部邦文紀要, 2(1), 26-35
Issue Date	1954-09-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/11562">https://hdl.handle.net/2115/11562</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	2(1)_p26-35.pdf



# 糖よりの没食子酸醱酵に関する研究

(第2報) 炭素源及び窒素源の選擇試験

佐々木西二・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

微生物による従來の没食子酸醱酵は、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没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没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、廣汎な試験を行つている中に、*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黒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産物としては未だ知られていないので、各種の定性確認試験を行つた結果、この物質は没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<sup>1)</sup>。

更に、この物質の生成と黴の發育状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黒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験をした所、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 験

#### 實驗 I. 培養液の炭素源試験

##### A. 炭素源の選擇試験

##### 1. 供試菌株

第 1 報で報告した如く没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験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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.1125%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{KCl}$  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. 培養及び試験方法

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

記述に培養した菌 A. 1030 を 2 白金耳宛接種し、32°C に培養、30 日間にわたり一定日数毎に發育状態の觀察、鹽化鐵呈色物質生成の如何を試験したのである。鹽化鐵呈色試験は培養液 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 を用いて行つた試験において、この菌 A. 1030 は始め液中で發育しある日数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、液内の發育がある程度に達し一旦表面に發育する様になると、間もなく鹽化鐵呈色が青~黒青色になるという特異な経過を経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“≡”で表わ

し、以下その程度に應じて“+”の数を定めた。従つて液内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黒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黒色を帯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 の場合培養日数と共にその呈色が黒紫色から濃黒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<sub>3</sub>)

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

C-source	days								
	3	5	7	9	12	15	20	25	30
Maltose	— none	— "	— "	### blue	### "	### light black- blue	### light brown	### none	### "
Sucrosé	— 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  $\text{FeCl}_3$  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 media.

## B. Glucose の最適濃度試験

炭素源試験の結果、該物質の生成に最適のも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験を行つた。試験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、試験方法等はすべて前記試験と同様である。

### 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黒青色

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遅く、それに従つて鹽化鐵呈色も遅れることが分つた。

## 實驗 II. 培養液の窒素源試験

### 1. 試験方法

炭素源としては前記試験で最適の 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	### "

試験を行つた。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、これ迄用いて来た  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  の他に、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NaNO}_3$ , Urea, Glycocol, Aspartic acid, Asparagine, Peptone の計 11 種を用い、その濃度は 4 段階即ち、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  の 0.05, 0.1, 0.3, 0.5% を基としてこれらに相当する窒素量を夫々含む様に添加した。因みにこれ迄の試験に用いて来た窒素源濃度は  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.1125% (當試験ではこれに近い 0.1% を使用) である。

培養及び試験方法は従来と同じであるが、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、鹽化鐵により濃黒青色を呈したのは  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  及び Asparagine のみであり、併もその濃度が  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  では従来用いて来た 0.1% に、又 Asparagine では 0.1485% ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  の 0.05 及び 0.1% に相當) では黒青色を呈したが、0.105%, 0.175% ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  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内の發育も全く見られなかつたのである。

$\text{NaNO}_3$ , Peptone, Glycocol は比較的早く液面發育をし、その發育盛であるにも関わらず鹽化

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		+	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	5.4	5.4	0.282
		none	"	"	"	"	"	"	"	"	5.4	5.4	0.282
	0.05	—	—	+	+++	++++	++++	++++	++++	++++	5.4	5.8	0.264
		none	"	"	"	"	light black	"	"	"	5.4	5.8	0.264
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++	+++	5.4	5.8	0.407
		none	"	"	black- brown	deep black- blue	"	"	brown	light brown	5.4	5.8	0.407
	0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.4	2.0	0.488
		none	"	"	"	"	"	"	"	"	5.4	2.0	0.488
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.4	2.0	0.688
		none	"	"	"	"	"	"	"	"	5.4	2.0	0.688
	0.0825	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.6	2.4	0.138
		none	"	"	"	"	"	"	"	"	5.6	2.4	0.138
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1651	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.6	2.0	0.143
		none	"	"	"	"	"	"	"	"	5.6	2.0	0.143
	0.4952	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.4	1.8	0.377
		none	"	"	"	"	"	"	"	"	5.4	1.8	0.377
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.8254	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.4	1.8	0.763
		none	"	"	"	"	"	"	"	"	5.4	1.8	0.763

NH <sub>4</sub> Cl	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 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.0825	— none	— "	— "	— "	### "	### "	### "	### "	### "	5.4	5.0	0.462
	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 <sub>4</sub> OH	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 <sub>4</sub> OH	0.2627	— none	— "	— "	++ "	### light black-brown	### "	### "	### "	### "	7.5	7.6	0.457
	0.4379	— none	— "	— "	— "	— "	— "	— "	— "	— "	8.6	8.2	0.461
NaNO <sub>3</sub>	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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  の 0.3, 0.5%, 及び  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  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. 先に糖から没食子酸を生成することをほぼ確認した *Aspergillus* 属の 1 菌株, A. 1030 につき, 14 種の炭素源を用いてその選擇試験を行った。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験を

した結果, 5% が最もよくそれに次いで 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, 窒素源選擇試験をした結果, 鹽化鐵で濃黒青色を呈するのは  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  と Asparagine のみで, その濃度も極限されていることを認めた。

又, この徴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,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  の 0.3, 0.5% 及び  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  の殆んど濃度が, 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) 佐々木西二・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  $\text{FeCl}_3$ -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  $\text{FeCl}_3$ , 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  $\text{FeCl}_3$  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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and asparagine are available, and moreover their optimum concentrations are strongly limited.

On the other hand, in 0.3 and 0.5 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , and in the almost of the concentrations of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 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).