



Title	糖よりの没食子酸醱酵に関する研究 (第3報)
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), 36-42
Issue Date	1954-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11563
Type	departmental bulletin paper
File Information	2(1)_p36-42.pdf



糖よりの没食子酸醱酵に関する研究

(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株にのぼる多数の各種菌を用い、その鹽化鐵呈色物質生成の如何を試験中、*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黒青色を呈することを認め、種々の定性確認試験の結果、この物質は従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没食子酸であることをほぼ確認し、更にこの物質生成と菌の發育状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²⁾。

次いで培養基の炭素源及び窒素源について試験した結果、炭素源では試験した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⁾。

更にこれらの試験において、この鹽化鐵呈色物質を生成する条件下では、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、最適温度について行つた試験結果も合せ

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、その前培養は従來の報告と同様 32°C 、7日間連続に培養したものである。又培養基もこれ迄と同様であるが、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、没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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の3種類を用いた。

2. 培養及び試験方法

培養方法はこれ迄と同じく150cc容三角フラスコに入れた培養液40ccに *Aspergillus* A. 1030 を接種し、 32°C で25日間培養を続け、その間3, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 25日目のものにつき、夫々菌の發育状態、培養液のpH及び培養液の鹽化鐵呈色反應を調べた。それらの試験方法も従來と全く同様である。

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 ₄ NO 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 ₄ NO 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) ₂ SO ₄ (corresponding with NH ₄ NO 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

FeCl₃ : coloration with FeCl₃

initial pH: 5.4

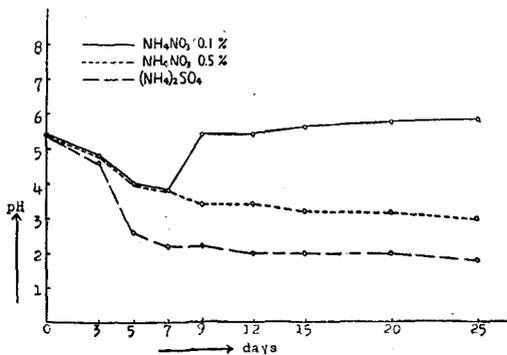


Fig. 1. Change of pH of the Culture Solution during Incubation

れない窒素濃度の高い場合、即ち NH₄NO₃ 0.5%、及びこれに相當する窒素濃度の (NH₄)₂SO₄ の場合では、pH は培養日數を経ると共に急激に低下し、初期 pH 5.4 に對し NH₄NO₃ では培養最終の 25 日目まで 3.0、(NH₄)₂SO₄ では 1.8 に迄下つて行くことが見られたのである。

これに對し没食子酸生成反應の見られる NH₄NO₃ 0.1% では培養後 7 日目迄は、NH₄NO₃ 0.5% の場合と同様に pH 3.8 に低下するが、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増する傾向が認められた。

この没食子酸を生成する NH₄NO₃ 0.1% の場合の pH の變化と黴の發育状態、鹽化鐵呈色反應

とを比較すると(寫眞 1 及び第 2 表参照)、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黒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様になり、それ以後は鹽化鐵による呈色が黒青色を示し、即ち pH の上昇點と黴の表面發育及び鹽化鐵による濃黒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、且つ没食子酸の反應が引き続き認められるが、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 NH₄NO₃、(NH₄)₂SO₄ 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、又没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黒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

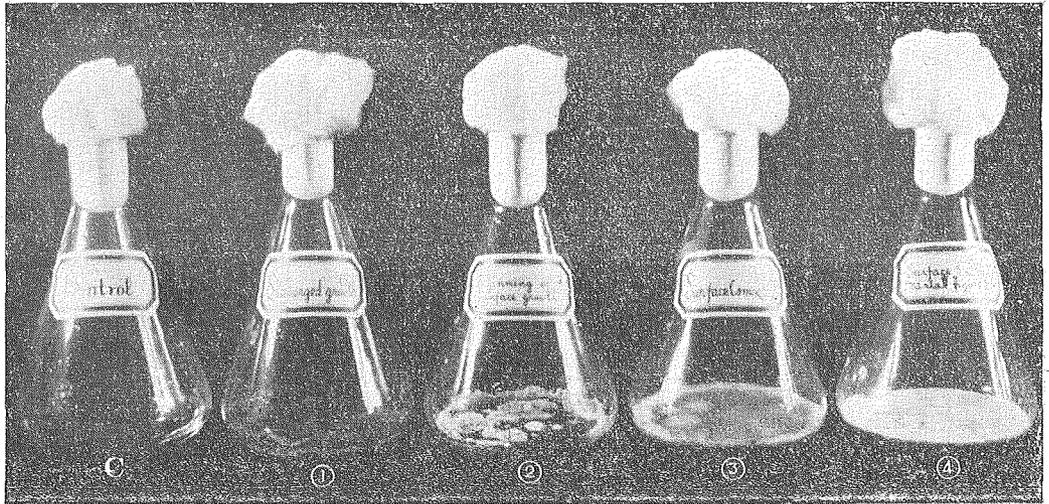


Photo. 1. Growth of the Mold, A. 1030

- 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考えられ、この点については没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点からも意義深いことと思われるので現在研究中である。

実験 II. 培養液の最適 pH 試験

前記の試験において、培養中に培養液の pH

が時期的に極めて変化することから、次に培養液の最適 pH 試験を行った。

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験に用いて来た培養液の pH は 5.4 である。又窒素源は没食子酸生成に最適の NH_4NO_3

0.1%を用いた。培養並びに試験方法は前記試験と全く同様である。

實驗結果

結果は第3表及び第2圖に示す如くであるが、先ず強酸性側のpH 1.8, 2.4では微の發育は液中、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では鹽化鐵による黒青色呈色は培養25日目に

至るも見られず、pH 6.4, 7.0が15日目でわずかに淡黒色を呈したに過ぎない。

培養液が鹽化鐵によつて濃黒青色を呈する最適pHの範囲は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黒青色呈色反應が見られた。

この最適pH試験においても、そのpHの时期的變化、微の發育状態及び没食子酸生成との相

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

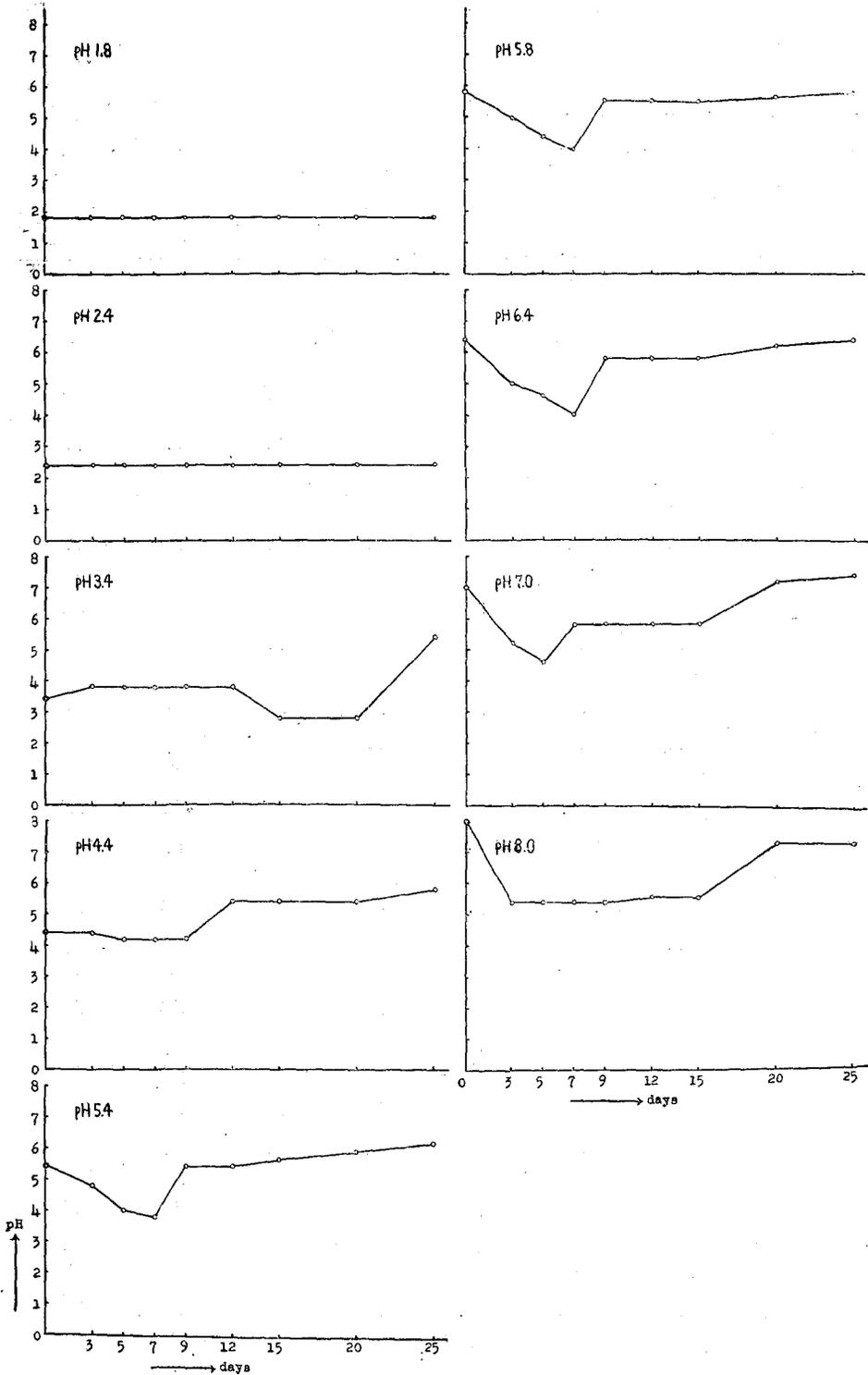


Fig. 2. Change of pH in the Experiment of Optimum pH

互關係を比較すると、鹽化鐵によつて黒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様、時期的な特異的關係即ち、徴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、やがて徴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黒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 日目に黒青色呈色を見る pH 3.4 においても、又鹽化鐵によつて 15 日目にわずか

に淡黒色を呈する 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

次にこの醗酵に對する最適溫度試験を行つた。試験培養溫度は 27°, 32°, 37°, 40°C の 4 段階とした。その他培養方法、試験方法等は前記試験と全く同様である。

實驗結果

結果は第 4 表及び第 3 圖に示したが、高温の 37°, 40° では液中においてさえも徴の發育が全く

Table 4. Experiment of Optimum Temperature

temp.		days							
		3	5	7	9	12	15	20	25
27°	surface	—	—	—	—	—	###	###	###
	FeCl ₃	none	"	"	"	"	1-B-bL	B-bL	1-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,
 1-B-bL: light black blue, 1-B: light black

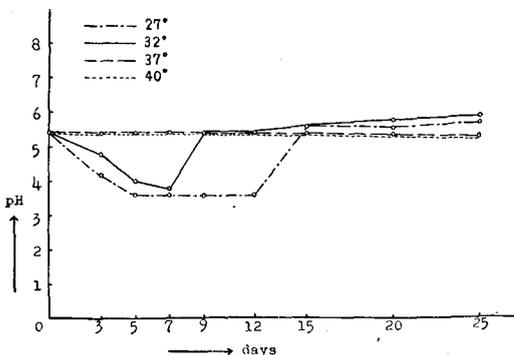


Fig. 3. Change of pH in the Experiment of Optimum Temperature

見られず、従つて没食子酸生成も全く無い。又 27° では徴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黒青色呈色は濃厚でなく、結局、従来用いて來た培養溫度 32° が徴の發育にも、又没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、且つその時期も遅い 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、表面發育及び没食子酸の生成反應を見る 15 日目に至つて

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 による糖からの没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 及び最適温度の試験を行つた結果を得た。即ち,

糖よりの没食子酸生成に最適の窒素源である NH_4NO_3 0.1% では, 菌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黒青色の呈色が見られるようになるに對し, 窒素濃度の高い NH_4NO_3 0.5%, 及びそれと同じ窒素濃度の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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

について試験したところ pH 4.4, 5.4, 5.8 の間が最適であつた。

又 27°, 32°, 37°, 40°C についての適温試験では 32° が最適であつた。

これらの試験を通じ, 鹽化鐵の呈色が認められる条件下では, いずれの場合も培養液の pH, 菌の發育状態, 没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条件を必要とし, 且つ著しく特異な生成過程を経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) 佐々木西二・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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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.