



| | |
|------------------|---|
| Title | 青黴の物質代謝に就いて：(1) 培養液の物質代謝と酸化還元電壓 |
| Author(s) | 吉村, 克二; YOSHIMURA, Katsuji |
| Citation | 北海道大學水産學部研究彙報, 2(1), 43-50 |
| Issue Date | 1951-07 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/22698 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 2(1)_P43-50.pdf |



青黴の物質代謝に就いて

(I) 培養液の物質代謝と酸化還元電圧

吉 村 克 二 (水産生物化学教室)

ON THE METABOLISM OF PENICILLIUM

(1) RELATION OF METABOLISM AND OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL IN MEDIA

Katsuji YOSHIMURA

(Faculty of fisheries, Hokkaido University)

The metabolism of *Penicillium chrysogenum* Q-176 and *Penicillium chrysogenum* KN-2326 have been studied for an estimation of substances and the oxidation-reduction potential in various media and in their mycelia.

Q-176 and KN-2326 were inoculated into media (pH 5.4) containing glucose: 30 g., peptone: 5 g., NaNO_3 : 3 g., KH_2PO_4 : 1 g., MgSO_4 : 0.5 g., $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$: 1×10^{-6} g., FeSO_4 : 1×10^{-5} g., and CuSO_4 : 2×10^{-6} g. per aq. dist. 1,000 c.c., and were incubated at 24°C.

The hydrogen-ion concentration and the potency of penicillin were determined in three culture media in which Q-176 and KN-2326 were incubated. Then media were filtrated by Nütz-filter and mycelia were separated from media and washed with aq. dist. Separated mycelia were kept in 60°C dryer to constant weight, and were subjected to extraction of crude fat.

Filtrated media were measured for the volume and determinations made of glucose, total-N, free- NH_3 and oxidation-reduction potential. The values reported in each table were the average results gained from three media.

The results gained were as follows:

(1) In 1~7 days incubation period, oxidation-reduction potential fell in proportion to the taking and accumulating of the sources of energy by the penicillium in media. After 7 days, by the transposition of the constructive matters of the penicillium to media, the oxidation-reduction potential in the media showed the tendency to rise. This transposition was caused by the prevention of the growth and the decomposition of the penicillium. (Fig. 1, Fig. 2, Table 9.)

(2) The curves of the change of glucose and the total-N had the same tendency as the curves of oxidation-reduction potential, but the curves of the change of the amount of the

dried matter of mycelium and the curves of the change of penicillin production showed opposite tendencies. Moreover, the maximum-point of penicillin-production was delayed about 2 days from the maximum-point of the amount of dried matter of mycelium and minimum-point of oxidation-reduction potential. (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 4)

(3) In early incubation period, the production of penicillin increased in parallel with the growth of penicillium, but the maximum-production of penicillin depends upon autodecomposition of penicillium (abnormal metabolism).

(4) The decrease of the amount of the dried matter of mycelium after 7 days seems to have been caused for the reason that the construction of penicillium was produced by autodecomposition transport to media.

(5) During the incubation period, the amount of fat in mycelia changed remarkably (Fig. 5, Fig. 6).

1 緒 言

著者は先に Penicillin 用生産培地の研究として、窒素源としては従来廃棄されて居た魚類煮汁より製造した魚肉エキス及び魚肉を消化した魚肉 Peptone を利用し、炭素源としては廢糖蜜、馬鈴薯澱粉並に之が一部加水分解物を用い Penicillin の生産實驗を行い工業的にも成果を挙げた。更に Penicillin 生産に於ける有用種 *Penicillium chrysogenum* Q-176, *Penicillium chrysogenum* KN-2326 に就いて、其の物質代謝を研究した。

Penicillin の生産に関しては Johnson⁽¹⁾ 氏の如く菌體が徐々に生育する際に最も多く生産するという説、Moyer⁽²⁾ Koffer⁽³⁾ 氏の如く Active growth を必要とし菌蓋重量と平行的關係にあるという説、植村⁽⁴⁾、中野⁽⁵⁾、古橋⁽⁶⁾ 氏の如く菌體物質の自己消化に依り生産されるという説、荻原^(7,8) 氏の如く菌體內、菌體外の双方より行はれるという説等種々であるが、著者は培養液内の物質の消長及び其の酸化還元電壓並びに菌蓋に就いて代謝機構をしらべて見た。

2 實 験 方 法

菌 種 :-

Penicillium chrysogenum Q-176. *Penicillium chrysogenum* KN-2326. 雪印乳業株式会社より入手したものである。

培 地 :-

其の組成は次の如くである。

glucose 30gr, peptone 5gr, NaNO_3 3gr, KH_2PO_4 1gr, MgSO_4 0.5gr, KCl 0.5gr, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{21}$ 1×10^{-6} gr, FeSO_4 1×10^{-5} gr, CuSO_4 2×10^{-6} gr, H_2O 1000c.c., pH 5.1.

容量 300c.c. 容三角フラスコに上記培養液 80c.c. 宛液層 30mm になる様に分注し、常壓にて毎日 30 分、3 日間 Koch 殺菌器にて殺菌を行う。

接種及び培養 :-

Q-176, KN-2326 を夫々パン培養基に接種して親培養を行い、一面に繁殖させた後、一白金耳づつ Q-176, KN-2326 を夫々上記培養液に接種して 24°C の恒温器中で培養する。

試料の採取及び効力検定:-

24 時間毎に Q-176, KN-2326 の各區より培養基 3 箇づつを取り、夫々に就いて水素 ion 濃度を測定し、Cup 法に依り効力検定を行い、後 Nütz 濾過器で培養液を濾過、菌蓋を分離し、濾過液量をはかり、別に菌蓋を良く水洗して 60°C の乾燥器に保ち、菌蓋重量測定及び脂肪抽出に供する。培養濾過液は Glucose (Reducing matter), Total-N, Free-NH₃-N, 酸化還元電壓等の測定に供した。

3 實 驗 結 果

菌 蓋:-

菌蓋を 60°C にて恒量とし重量を測定し、後粉末として Soxhlet 脂肪抽出器で 30 時間 Ether 抽出を行い粗脂肪量を求める。結果は次の如くである (各區とも數値は試料 3 箇の平均である)。

a) 菌 蓋 重 量

Table 1. The weight of dried matter of mycelium (gram)

| Species \ Days | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Q-176 | 0.0307 | 0.0814 | 0.1697 | 0.3020 | 0.4780 | 0.6478 | 0.6971 | 0.5640 | 0.5469 | 0.5316 | 0.5023 | 0.4601 | 0.3641 | 0.1989 |
| KN-2326 | 0.0398 | 0.0904 | 0.1851 | 0.3068 | 0.6150 | 0.8132 | 0.8525 | 0.7327 | 0.7135 | 0.6807 | 0.6182 | 0.5207 | 0.3905 | 0.2393 |

b) 菌蓋の脂肪含量

Table 2. Crude fat in dried mycelium (gram)

| Species \ Days | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Q-176 | 0.0004 | 0.0024 | 0.0053 | 0.0076 | 0.0104 | 0.0046 | 0.0044 | 0.0065 | 0.0103 | 0.0123 | 0.0149 | 0.0177 | 0.0189 | 0.0146 |
| KN-2326 | 0.0012 | 0.0052 | 0.0094 | 0.0130 | 0.0150 | 0.0082 | 0.0077 | 0.0102 | 0.0143 | 0.0180 | 0.0264 | 0.0306 | 0.0285 | 0.0236 |

培養濾液:-

各表の數値は培養基 3 箇の平均であり、培養日數 0 の項は Blank test として菌を接種しなかつたものである。

a) Glucose (Reducing matter): Bertrand 法に依る。

Table 3. Glucose (Reducing matter) in media (gram)

| Species \ Days | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Q-176 | 2.369 | 2.275 | 2.141 | 1.941 | 1.639 | 1.159 | 0.467 | 0.079 | 0.019 | 0.012 | 0.007 | 0.008 | 0.013 | 0.019 | 0.025 |
| KN-2326 | 2.369 | 2.227 | 2.091 | 1.850 | 1.548 | 0.715 | 0.232 | 0.062 | 0.014 | 0.009 | 0.006 | 0.011 | 0.026 | 0.040 | 0.047 |

b) Total-N: Micro-Kjeldahl 法による。

Table 4. Total-N in media (gram)

| Species \ Days | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Q-176 | 0.066 | 0.058 | 0.050 | 0.046 | 0.041 | 0.035 | 0.029 | 0.027 | 0.029 | 0.031 | 0.034 | 0.039 | 0.042 | 0.047 | 0.051 |
| KN-2326 | 0.066 | 0.057 | 0.049 | 0.043 | 0.039 | 0.032 | 0.028 | 0.026 | 0.027 | 0.028 | 0.029 | 0.032 | 0.035 | 0.040 | 0.044 |

c) Free-NH₃-N: Grünhut法に依る。

Table 5. Free-NH₃-N in media (gram)

| Species \ Days | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Q-176 | 0.007 | 0.005 | 0.004 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.007 | 0.010 | 0.015 | 0.019 | 0.024 |
| KN-2326 | 0.007 | 0.005 | 0.004 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.002 | 0.003 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.013 | 0.014 | 0.018 |

d) 酸化還元電圧: 電極としては KCl-飽和甘汞電極を使用し K型 -potentiometer に依り好氣的に行い、各試料は菌を接種せざる培養液即ち Blank test である日数0の培養液の水素ion濃度 (pH = 5.362) に M/15 Na₂HPO₄, M/15K H₂PO₄ 緩衝液で一定に保つ。尚表の数値は水素電極に換算したものである。

Table 6. Eh in media. (volt)

| Species \ Days | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Q-176 | 0.84833 | 0.83490 | 0.82458 | 0.81052 | 0.79923 | 0.78860 | 0.78282 | 0.77800 | 0.77945 | 0.78195 |
| KN-2326 | 0.84833 | 0.82956 | 0.81544 | 0.80493 | 0.79530 | 0.78559 | 0.77855 | 0.77301 | 0.77425 | 0.77601 |

| Species \ Days | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Q-176 | 0.78500 | 0.78296 | 0.77814 | 0.78090 | 0.78255 |
| KN-2326 | 0.78594 | 0.78492 | 0.78174 | 0.78432 | 0.79689 |

(Eh was measured electrometrically on buffered samples (pH 5.362) with M/15 Na₂HPO₄ and M/15 KH₂PO₄)

e) 水素イオン濃度: Blank test 即ち日数0のもののみ Quinhydrin 電極使用 potentiometer で測定し他のものは比色法に依る。

Table 7. pH in media.

| Species \ Days | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Q-176 | 5.3 (5.362)* | 4.5 | 3.6 | 3.7 | 4.6 | 5.6 | 6.1 | 6.7 | 7.2 | 7.3 | 7.6 | 7.9 | 8.2 | 8.4 | 8.5 |
| KN-2326 | 5.3 (5.362)* | 4.7 | 4.2 | 4.3 | 5.1 | 5.9 | 6.7 | 7.3 | 7.4 | 7.5 | 7.8 | 8.1 | 8.3 | 8.5 | 8.8 |

* This value was only measured electrometrically, but other values were measured by colorimeter.

f) 效力検定: 検定菌としては N. R. R. L. 209-p を使用、Cup 法に依る。

Table 8. Potency of penicillin in media. (u./c.c.)

| Species \ Days | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------------|---|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Q-176 | 4 | 8 | 10 | 20 | 40 | 80 | 120 | 150 | 170 | 150 | 140 | 130 | 110 | 80 |
| KN-2326 | 5 | 10 | 20 | 30 | 50 | 110 | 175 | 200 | 220 | 190 | 180 | 160 | 140 | 120 |

Assay : Agar cup method. Test organism : N. R. R. L. 209 p.

4 考 察

第1表～第8表に示せる結果を圖示すると次の第1圖～第6圖の如くであつて、第1圖及び第2圖で明かなる如く、培養 1～7 日間菌蓋の重量は増加を続け、之に伴い酸化還元電壓は下降する。7 日以後は菌蓋重量の減少に伴い、酸化還元電壓は下降を停止し、その後多少上昇の傾向を示す。之は

Fig. 1. Relation of Eh and the changes of substances in media by *P. chrysogenum* Q-176.

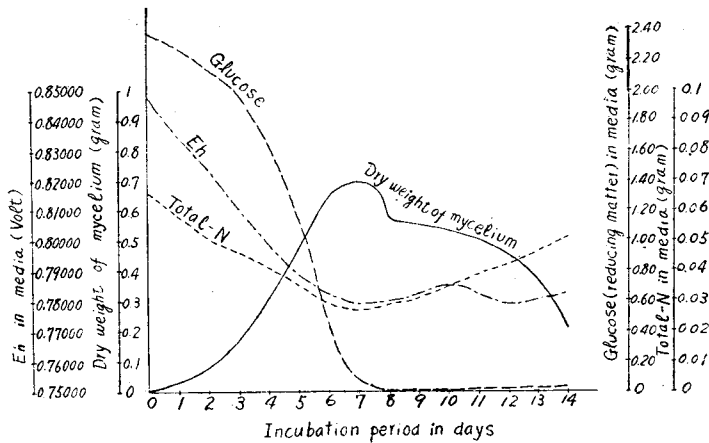
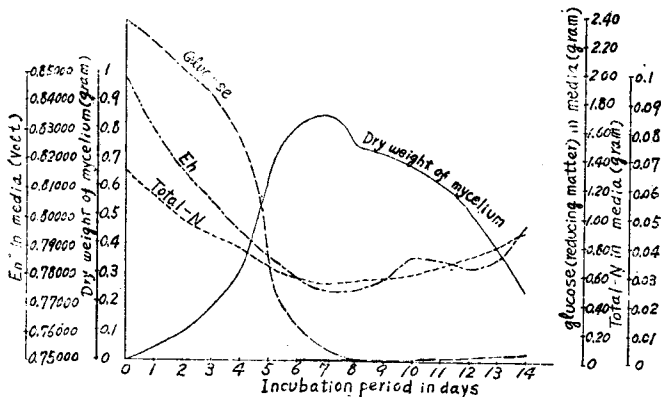


Fig. 2. Relation of Eh and the changes of substances in media by *P. chrysogenum* KN-2326.



1～7 日迄は培養液中の物質は菌に依り分解吸収せられ、電壓は下降するも、菌の發育停止と共に續いて菌體の分解に伴い菌體成分の液中移行に伴い、電壓は上昇の傾向を有するものと思はれる。

今培養液の電壓より其の液の有する Free-energy を次式に依り計算すれば第9表の如くである。

$-\Delta F = n \cdot E \cdot F$ (ΔF = Free energy, n = 電子數, E = 測定電壓, F = Faraday's const.), 即ち $-\Delta F = 2 \times E \times 23.064 \text{ Kcal/mol}$.

即ち1～7日迄は菌は Glucose、含窒素物、其の他の Energy 源を攝取し、之等を蓄積し、其の結果、培養液中の Energy は減少する。7 日以後、培養液中の利用し得る Energy 源の減少に伴い、菌は成長を停止し、菌體の分解に依り菌體成分の液中への移行が初まり Free-energy を増加するものと思はれる。

酸化還元電壓曲線と類似の傾向にあるのは、Glucose 及び

Fig. 3. Relation of the weight of dried matter of mycelium, penicillin and Eh in media on *P. chrysogenum* Q-176.

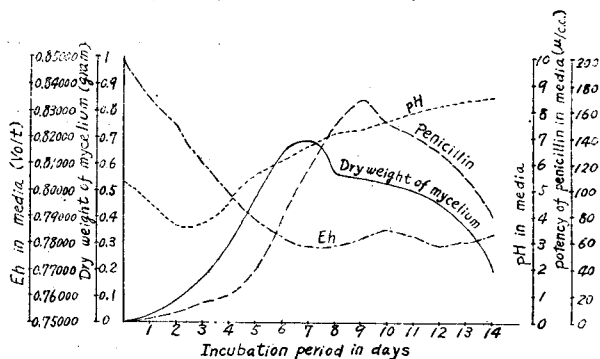


Fig. 4. Relation of the weight of dried matter of mycelium, penicillin and Eh in media on *P. chrysogenum* KN-2326.

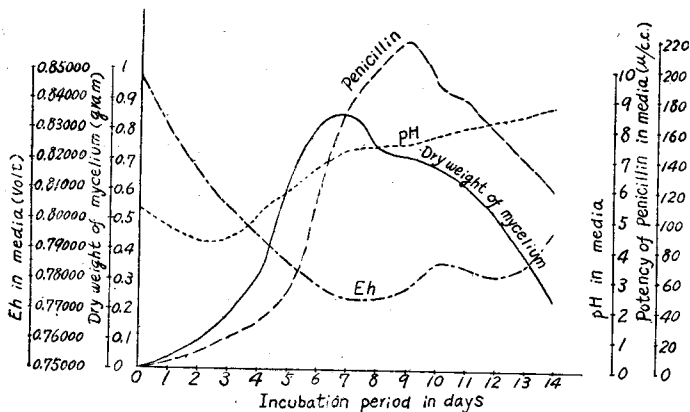


Fig. 5. Relation of the weight of dried matter of mycelium and crude fat on *P. chrysogenum* Q-176.

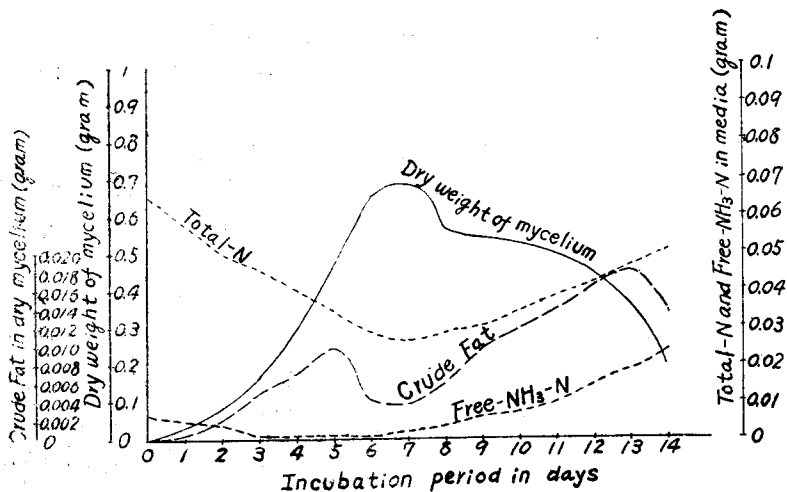
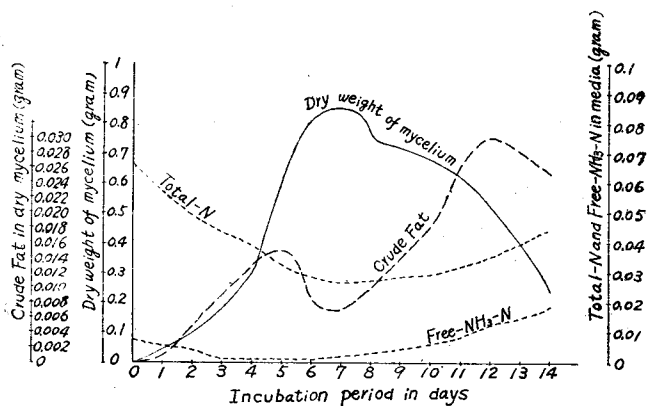


Table 9. ΔF in media (Leal/mol)

| Species | Days | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Q-176 | | 39.131 | 38.512 | 38.036 | 37.387 | 36.866 | 36.376 | 36.109 | 35.887 | 35.954 | 36.069 | 36.210 | 36.116 | 35.894 | 36.021 | 36.097 |
| | | 39.131 | 38.265 | 37.614 | 37.129 | 36.685 | 36.237 | 35.912 | 35.657 | 35.714 | 35.795 | 36.253 | 36.206 | 36.060 | 36.179 | 36.758 |
| KN-2326 | | 39.131 | 38.265 | 37.614 | 37.129 | 36.685 | 36.237 | 35.912 | 35.657 | 35.714 | 35.795 | 36.253 | 36.206 | 36.060 | 36.179 | 36.758 |

Fig. 6. Relation of the weight of dried matter of mycelium and crude fat on *P. chrysogenum* KN-2326.



Total-N 曲線であるが、第3圖、第4圖に示す如く、反對の傾向を示すものに菌蓋重量曲線と Penicillin 生産曲線がある。此の内、菌蓋の重量曲線の方は其の最高點が酸化還元電壓曲線の最少にあつて全く反對の傾向をとり、一方 Penicillin 生産曲線の最高點は2日程ずれて居る。即ち Penicillin の生産は初期に於ては菌の發育に伴い、平行的に増すが、必ずしも菌の通常の發育の結果作られるものでなく、最高點に達する時は自己分解に依り生産されるものと思

われる。

菌蓋重量曲線より明かな如く7日目が發育の最高で、7日以後漸次減少するが、之は菌體の異常代謝に依り自己分解が起り培養液中に成分が移行することが其の原因であらう。此の移行成分が如何なるものであるかは今後の研究課題である。

次に菌體の發育と粗脂肪含有量の變化を見るに、第5圖及び第6圖より、接種後5日目迄は菌蓋粗脂肪含量は増加し、以後菌蓋重量の最高點である7日迄減少し、再び菌體重量の減少に拘らず粗脂肪量は12日迄甚だしく増加する。

此の間の粗脂肪の性質は當然差異のあるべき事が豫想され、今後培養期間を通じての菌體內脂肪の性質の差異、並に培養液の組成、培養條件に依る脂肪の消長及び不鹼化物の研究を行う予定である。

5 摘 要

(1) 培養液内の物質の消長と酸化還元電壓並びに菌蓋に就いて *Penicillium chrysogenum* Q-176, *Penicillium chrysogenum* KN-2326 の代謝機構を研究した。

(2) 菌は1~7日迄培養液中の Energy 源を攝取蓄積して發育を続け、之に伴い酸化還元電壓は下降する。7日以後、菌の發育停止と菌體の分解に伴い菌體成分の培養液中への移行に依り酸化還元電壓は上昇の傾向を有す。(Fig. 1, Fig. 2, Table 7)

(3) 培養液中の Glucose 及び Total-N 曲線は酸化還元電壓曲線と類似の傾向を有するも (Fig. 1, Fig. 2) 菌蓋重量曲線と Penicillin 生産曲線は反對の傾向を有し、Penicillin 生産曲線の最高點は菌蓋重量曲線の最高點及び酸化還元電壓曲線の最低點より2日程ずれてゐる。(Fig. 3, Fig. 4)

(4) Penicillin の生産は初期に於ては、菌の發育と平行的に増加するが、最高點に達するときは菌の通常の代謝ではなく自己分解に依り生産されると思われる。

(5) 菌蓋重量の7日以後の減少は菌體の異常代謝により自己分解が起り、菌體成分の培養液中への移行によるものと思われる。

(6) 菌體中の脂肪含量は發育期を通じて著しい差異がある。(Fig. 5, Fig. 6)

終りに臨み本實驗に御協力を賜つた本學部久保周一郎講師に謝意を表すると共に、菌の授與に御快諾下さつた雪印乳業株式會社製藥部半澤工場長に厚く感謝致します。

6 文 献

- (1) E. J. Jarvis, & M. J. Johnson (1947): The role of the constituents of synthetic media for penicillin production. J. Am. Chem. Soc., 69: 3010.
- (2) Moyer, A. J. & R. Cochill (1945): Penicillin VII. Production of penicillin in surface culture: J. Bact., 51 (1): 57~58.
- (3) Koffer, H. R & L. Emerson, D. Perlman & R. H. Buris (1948): Chemical changes in submerged penicillin fermentation: J. Bact., 50: 516~548.
- (4) 植 村 (1948): 酵素とペニシリン、平凡社
- (5) 中 野 (1948): 表面培養に関する研究 (Ⅰ)、pHの緩衝発酵に就いて: Journal of penicillin. Vol. 1, No. 10.
- (6) 古 橋 (1949): ペニシリンの生成機構に関する研究 (Ⅱ): Journal of Antibiotics. Vol. Ⅲ, No. 4.
- (7) 萩 原 (1949): 青黴菌体内のペニシリン: Journal of Antibiotics. Vol. Ⅲ, No. 4.
- (8) 萩 原 (1950): ペニシリンの生成に就いて: Journal of Antibiotics. Vol. Ⅲ, No. 14.

(水産科学研究所業績 第67號)