

報 文

Penicillium, expansum に関する研究 (第1報)

合成培養基に於ける繁殖並に L-Mannit 生産に就て

山川 忠善・岩崎 泰二

(日本醸酵工業株式会社研究室)

(I) 緒 言

Mannit は PROUST 氏発見以來醫藥界に緩下劑, 糖尿病の甘味劑として一部の役割を果たして來たのであるが, これ等は D-mannitにして, L-mannit に於ては近時更に醫藥方面にその利用價值が認識され, 特殊の鎮痛藥として益々重要な地位を占めんとしつつある。

細菌による D-mannit生産に関する報告は種々見られるが L-mannit 生産に関する報文は餘りない様である。都田氏等はパトリン製造中に *Penicillium, expansum* が L-mannit を生産することを発見し之が鎮痛作用あるものと報告してゐる。(註, L-mannit に就ては東京大學にて元素分析にて確む)。

筆者等も L-mannit 生産について検討せんとして以下の實驗を行つて報告せんとするものである。

工業的に細菌を培養して Mannit を製造せんとする際にその培養方式が結果に殆ど決定的な影響を有することは勿論であるが, 菌の繁殖或は Mannit 生産の基質たる培養液の組成成分の適否がそれに劣らず結果に著しい影響を有するであらうことは容易に考へられる處である。筆者等は此の點に關して詳細に検討せんとして研究を進めつつあるので, 茲にその一部を報告することとした。

(II) 實 驗 方 法

各種供試培養液100cc宛を500cc容三角フラスコに入れ常法の如く3回蒸氣殺菌後種菌を接種す。接種には100ccの無菌水にあらかじめ用意せる斜面寒天培養より10白金耳の Spore を懸濁せるものを各1cc宛用ひた培養は24°Cの恒溫室中に行ひ, 發育狀態並に Mannit 生産狀態, pH, 殘糖分, 菌體量等を測定した。尙供試菌種は都田氏より分譲して戴いたものである。即ち *Pen, expansum* を用ひた。

1. 表 示 法

a. 菌糸發育狀態

○全然發育しないもの 一菌糸を認め得る程度 +菌糸の發育液面の半ばに達する程度 ++菌糸の發育培養液の全面を覆ふ程度 卅菌糸綿狀に隆起するを見る程度 卅特に發育旺盛なもの。

b. Mannit 生産狀態

醋酸鉛にて除蛋白し, エーテルにて有機酸を除去せるものを常法にて定量し mg にてあらわす。

c. 殘 糖 分

醋酸鉛にて除蛋白せる濾液についてベルナラン氏法により定量し g% にてあらわす。

(386)

(山川, 岩崎) *Penicillium, exopsum* に関する研究 (第1報)

d. 菌 體 量

培養後菌體を冷水にて2~3回洗滌せるものを壓搾秤量した。

(II) 實 験 結 果

1. CZAPEK 氏培養液使用の場合

1Lの蒸留水に對して Glucose 30g (蔗糖の代用), NaNO_3 3g, KH_2PO_4 1g, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, KCl 0.5g, Fe SO_4 0.019, を加へた。此の培養液の pH は5.4である。培養液を500cc容三角フラスコに各々100cc宛分取し, 常法により3回殺菌後, 種菌を移植し培養して各種測定を行なつた結果は第1表の如くである。

第 1 表

培養基	培養日数	發 育 状 態	pH	サツカ ロメー タ	菌 體 量 g/ フラスコ	濾 液 量 cc/ フラスコ	残 糖 量 %/ 濾液中	濾 液 中 mannit mg/100cc	mannit mg/ 菌體	mannit %/ 菌體	備 考
CZAPEK 氏液	2	++	4.8	3.6	—	—	—	—	—	—	茶褐色の分泌液菌糸上一面に分泌培養液薄紅色發育停止せるものゝ如し
	4	+++	5.0	2.8	—	—	—	—	—	—	
	6	+++ Spore着生	5.2	2.2	6.5	80	0.2	—	6.43	0.09	
	10	+++ Spore一面着生	6.4	1.9	7.0	80	0.064	—	7.52	0.107	
	13	+++ 生育停止せるものゝ如し	6.6	0.8	5.5	80	0.047	—	7.0	0.12	
	15	+++	6.6	0.9	5.5	80	0.043	—	4.4	0.08	
	17	+++	6.2	0.8	5.0	80	0.045	—	3.68	0.07	
	19	+++	5.4	1.0	5.0	84	0.061	—	3.68	0.07	
	21	+++	5.7	0.9	5.0	85	0.068	5.2	2.16	0.04	

註. 4日迄の分析は菌體が少量のため行はなかつた。尙濾液中の Mannit 量は最後にのみ行つた。

第1表の結果より考察するに菌の繁殖は他に比して最初は非常に良好の様であるけれども10日以後は著しく衰退せるものの如し, これ培養液中の栄養源が缺乏せるものの如し。尙 Mannit が菌の衰退と共に減少せるは濾液中に移行するか自己消化に依り消費されたかは今後の検討を要するものと考へられる。

2. CZAPEK 氏培養液に麥芽エキス10%添加の場合

麥芽汁の調製は1kgの破碎した麥芽に5~6Lの水を加へ徐々に加温し60~63°Cに於て糖化作用を営ましめ, 沃度沃度加里液にて藍色を呈せざる程度にて止め, 煮沸し冷却後濾過せるものを使用, 培養液の pH は5.6糖濃度は14%で其の他栄養源の添加量は前回同様である。實驗結果は第2表の如くである。

第 2 表

培養基	培養日数	發 育 状 態	pH	サツカ ロメー タ	菌 體 量 g/ フラスコ	濾 液 量 cc/ フラスコ	残 糖 量 %/ 濾液中	濾 液 中 Mannit mg/100cc	Mannit mg/ 菌體	Mannit %/ 菌體	備 考
CZAPEK 氏液 +10% Malt エキス	2	+ 周圍より繁殖	5.4	5.1	—	—	—	—	—	—	菌體少量のため分析行はず 無色及び微黄色の分泌液菌糸上に分泌培養液微紅色 發育停止の如し
	4	+ Spore 着生	5.0	4.8	—	—	—	—	—	—	
	6	++ 波状に繁殖	4.8	4.2	7.0	86	2.02	—	15.2	0.21	
	10	+++ Spore一面着生	4.7	3.4	8.0	83	1.642	—	18.12	0.22	
	13	+++	5.8	1.1	9.0	83	0.141	—	21.92	0.24	
	15	+++	6.4	1.1	7.5	84	0.067	—	28.12	0.37	
	17	+++	6.4	1.2	8.5	79	0.052	—	13.56	0.15	
	19	+++	6.6	1.0	10.0	81	0.054	—	16.12	0.16	
	21	+++	6.8	1.0	8.0	81	0.053	7.48	19.64	0.24	

考察: 第1表に比して菌體量は非常に多しその中に含有される Mannit 量も第1表より多いことは Czapek 氏培養基に Malt エキス10%添加せるものが遙かに優良なることが了解される。

3. Czapek 氏培養液に有機N源及び Biose として蛹汁エキス10%添加の場合

蛹汁の調製は1kgの脱脂蛹に10lの水を加へ、30Min 蒸煮濾過せるものを使用、培養液のpHは5.4である。此の培養液は有機態N源及び Biose を補給せるのみにて其の他の栄養源は實驗1と同じ、實驗結果は第3表の如くである。

第 3 表

培養基	培養日数	發育状態	pH	サツカ ロメー タ	菌體量 g/フラスコ	濾液量 cc/フラスコ	残糖量 %/濾液中	濾液中 Mannit mg/菌體	Mannit mg/菌體	Mannit %/菌體	備 考
CZAPEK 氏液 +10% 蛹 汁	2	+	5.0	3.6	—	—	—	—	—	—	菌體少喇のため 分析行はず 無色の分泌液を菌糸 上に水滴状に分泌 發育非常に良好
	4	++ Spore 着生	5.0	3.1	—	—	—	—	—	—	
	6	+++ Spore一面着生	5.2	2.9	8.0	83	0.362	—	5.6	0.07	
	10	+++	5.8	2.7	8.0	83	0.126	—	9.4	0.12	
	13	+++	5.8	0.9	8.0	83	0.027	—	11.2	0.14	
	15	+++	6.4	0.9	7.0	82	0.036	—	14.32	0.2	發育停止の如し
	17	+++	5.8	0.8	9.5	85	0.050	—	12.8	0.13	
	19	+++	5.8	0.9	7.0	82	0.048	—	7.48	0.16	
	21	+++	6.0	1.0	8.0	80	0.046	3.68	7.20	0.09	

第3表より考察するに菌の繁殖状態は他に比して非常に良好である。これは有機態Nを補助栄養源として添加せるための様である。然し乍ら Mannit 含有量が第2表よりも劣つてゐる。之は Mannit の生成量は Org. Nよりも、糖濃度或は Würze 中 Biose が Vitamin B Complex に支配されることを暗示すると考へられる。

4. Czapek 氏液に蛹汁エキス10%, Mannit エキス10%添加の場合

實驗2に於て判明せる如く、補糖によつて Mannit 生産が上昇すると云ふことは畢竟他の糖類より誘導せられしものとの理念に基き實驗せるものにて有機N源及び Biose 源として蛹汁を添加せるもの、此の培養液の初發 pH は5.5で實驗結果は第4表の如くである。

第 4 表

培養基	培養日数	發育状態	pH	サツカ ロメー タ	菌體量 g/フラスコ	濾液量 cc/フラスコ	残糖量 %/濾液中	濾液中 Mannit mg/10cc	Mannit mg/菌體	Mannit %/菌體	備 考
CZAPEK 氏液 +10% 麥芽汁+ 10%蛹汁	2	+ 周壁に繁殖	4.8	4.8	—	—	—	—	—	—	外面的に見た發育 は餘り良好ならず 微黄色の液を菌糸 上に分泌
	4	+	4.6	4.3	—	—	—	—	—	—	
	6	++ Spore 着生	4.4	3.7	8.0	79	1.32	—	23.82	0.26	
	10	+++ Spore一面着生	4.5	2.7	8.0	79	1.048	—	28.76	0.35	
	13	+++	6.2	1.0	11.0	90	0.105	—	21.92	0.19	
	15	+++	6.0	1.0	10.0	79	0.068	—	38.76	0.38	殘液中に Monnit なし
	17	+++	6.6	0.7	8.5	80	0.061	—	38.12	0.44	
	19	+++	6.6	0.9	8.5	82	0.056	—	31.92	0.37	
	21	+++	6.6	0.9	8.5	80	0.050	0	28.88	0.33	

第4表より考察するに、外面的なる菌の繁殖は餘り良好の様ではないけれ共、結果に於ては、菌體 Mannit 量とも他の實驗に比して良好の様である。この培養基の特色は21日間培養せるも濾液中に Mannit が移出されざると云ふことは畢竟培養基中に生育に必要な栄養素が充分に存するものと考へられる。

(388) (北原, 久留島, 阿部) 絲狀菌類の Diastase 組成に関する研究 (第7報)

以上4實驗に就て述べたが, *Penicillium, expansum* の Mannit 生産は夫々の培養條件によりかなりの差異のあることは判明せる處であり, *Penicillium, expansum* の最適培養條件を決定し, 之について比較すべきではあるが, 今實驗に於ては便宜上以上の培養條件に就て比較選擇を行つた. 尙培養4日迄の分析は菌體少量のためいづれも行はず濾液中の Mannit 量は最後にのみ行つた.

(Ⅲ) 總 括

1. *Pen, expansum* の繁殖並に L-Mannit 生産の良好なる培養基は CZAPEK 液に蛹汁10%麥芽汁10%添加のものである.
2. 培養基中の糖濃度が Mannit 生産に相當影響する如く考察される.
3. 培養基中に *Pen, expansum* の生育に必要な栄養素が缺乏せる場合には菌體中の Mannit が濾液中に移出する如く考へられる.
4. 糖濃度高きもの程 Mannit 生産多し, これ畢竟 Mannit は他の糖類より誘導せられて生成されるものと考へられる.

終りに臨み終始御指導を戴いた橘谷社長高田研究課長に對し深甚の謝意を表します.

参 考 文 献

- 1) 武居: 炭水化物化學.
- 2) 台灣醱酵研究會編: 醱酵工業便覽.

絲狀菌類の Diastase 組成に関する研究 (第7報)

Asp. cinnamomeus SHIEMANN の γ -Amylase 及び
耐酸性 α -Amylaseに就て

北原 覺 雄, 久留島通俊, 阿部 卓 二
(京大食糧科學研究所)

前報¹⁾に於て黑麴菌類及び同系統の諸菌種の綜合糖化曲線を比較した所, *Asp. carbonarius*, *A. cinnamomeus* 及び *A. atropurpureus* の3種が, 一般糸狀菌類と著しく異つた酵素組成を持つ "*Asp. awamori* sp." と類似の曲線を示すことを見たので之等を *Carbonarius* 群として他群と區別することを提唱したのであるが, 果して之等の菌種がデアスターゼ組成に於ても類似するか否かは綜合糖化曲線から直ちに判定することは出来ない. 本報に於てはこの點を明かにする目的で行つた實驗結果を記載する.

I γ -Amylase の存否に就て

上記3種の菌を以て常法により麴麴を調製し, その1gを5ccの1%食鹽水を以て37°Cに2.5時間保持抽出した酵素原液及びこれを γ -Amylase の單離條件たる pH=7.5, 60°C, 15分の前處理を行つた處理酵素液に就て夫々の酵素力を測定した.

第1表 γ -Amylase 存否の判別

反應液の組成:

- | | | | | |
|-----|---|--------|---|-----------------------|
| (1) | 2%可溶性澱粉液25cc + m/5醋酸緩衝液(pH=5.0)5cc + 原酵素液10.7cc | 水9.3cc | | |
| (2) | " | + | " | + 處理酵素液20cc(原酵素液量に對應) |