

(590)

## (野口, 荒尾) クエン酸醗酵に関する研究 (第6報)

生醗系と速醗系を比較すると前者には硝酸還元菌, 乳酸菌等の生育が考えられるので私達もこれらとアセトイン系成分の消長との関連性を追求したのであるが, 特別な関係は認められなかつた。

## 要 約

生醗, 山廃醗, 速醗, 高温糖化醗の4種の醗に於て, その醗造経過中のアセトイン系成分の消長を HOOREMAN 氏の比色法によつてしらべた。

ジアセチルは4種の醗に於て何れの経過でも殆んど生成されなかつた ( $0.5\mu\text{g/g}$ 以下)。アセトイン, 2,3-ブチレングリコールは4種共湧付から品温最高時にかけて著しく生成された。生醗, 山廃醗に於てその生成量が比較的に多かつた。

4種の醗に就いて夫々の仕込型式による消長の傾向の相違は認められなかつたがアセトイン, 2,3-ブチレングリコールの消長は他の醗混在微出物に比し酵母の増殖並びにその作用に関連することが最も大きいのではないかと考えられる。

終始御懇切な御指導を賜つた阪大寺本教授及び本報文の発表を許可されたKK本嘉納商店嘉納社長, 御鞭撻を賜つた木暮常務に深謝します。なほ試料採取の便宜を与えられたKK北川本家研究室の方々に深謝します。

## 文 献

- 1) 平: 農化, **2**, 734 (1926).
- 2) 山田 et al.: 醸協, **5**, 41 (1927); 醸試報, **102**, 133 (1929). 山田, 高岸: 醸試報, **122**, 31 (1935); 醸協, **30**, 146, 160 (1935).
- 3) 富安: 本誌, **14**, 19 (1936); 農化, **12**, 1020 (1936); **13**, 1045 (1937).
- 4) 山田 et al.: 醸協, **45**, J, 70 (1950); **46**, J, 63 (1951).
- 5) 下田, 城, 国定: 本誌, **32**, 123 (1954).
- 6) 森, 上田 et al.: 本誌, **38**, 581 (1960).
- 7) 富安: 農化, **13**, 787, 972 (1937).
- 8) HOOREMAN, M.: Anal. Chim. Acta **3**, 606 (1949).
- 9) 寺本, 橋田, 吉野: 本誌, **32**, 180 (1954).
- 10) 蔭山, 杉田: 本誌, **33**, 433 (1955).
- 11) 吉野 et al.: 本誌, **35**, 443 (1957).

(昭和 35, 8, 2 受理)

## クエン酸醗酵に関する研究 (第6報)

数種のクエン酸生産培地に於ける酸生成曲線の比較並びに

メタノールの菌形態及び呼吸に及ぼす影響

野 口 祐 一・荒 尾 修 (協和醗酵工業株式会社)

## 緒 言

クエン酸醗酵に使用する *Asp. niger* は重金属に極めて鋭敏で、而も菌株によりその要求量や抵抗性がかなり相違している。良好なクエン酸生産株でも過剰の夾雑物(主として重金属)を含む培地では菌の生育が旺盛となり、クエン酸の蓄積はほとんどみられない。恐らく糖は水と炭酸ガスに酸化されるものと思われる。必要重金属の量を適当に Control する時にクエン酸の生成がみられるが、これはクエン酸醗酵が正常な菌生育の代謝とは違つた型式の代謝を営むものと解釈して差支えない。合成培地を使用する時の良好なクエン酸醗酵では菌の初期の増殖が遅く、一方糖蜜培地にメタノールを添加する時はクエン酸の生成は著しく増すが、この時も無添加の場合と較べ初期の増殖は遅れる。

数年前、JOHNSON<sup>1)</sup>は Induced mutant によるクエン酸生産の可能性を予想し、Mutant の性質として重金属の要求量が多いために速やかに Metal deficient の状態を齎すか、或は Defective enzyme system によるものか孰れかによるものであらうと述べている。

著者等は今迄に糖蜜培地を使用するクエン酸醗酵の Scale-up の問題について主として検討してきたが<sup>2,3)</sup>、ここでは合成培地と糖蜜培地の酸生成曲線を比較し、両培地に於ける菌の酸素摂取量、メタノールが菌の呼吸並びに形態に及ぼす影響等について検討した結果を報告する。

## 実験方法並びに実験成績

菌株: *Asp. niger* N584.

培地, 培養: 合成培地並びに糖蜜培地を使用した。培養条件は第1報<sup>4)</sup>記載の培養条件と同一条件である。

分析: 第1報記載の方法による。酸素摂取量は Warburg 検圧計を用いて測定した。

#### 実験Ⅰ 合成培地と糖蜜培地のクエン酸酸酵に於ける酸生成曲線の比較

普通クエン酸酸酵に使用される合成培地は Sucrose を炭素源とするものが最も多く、窒素、燐、カリ、マグネシウムの他に微量の鉄、亜鉛等の重金属が含まれる。重金属を過剰に含む時は菌の生育が旺盛となり酸の生成をみない。重金属の量を適当に Control する時は一般に菌の増殖が抑制され酸の蓄積がみられる。従つて良好なクエン酸生産時の菌の代謝は正常な菌生育時の代謝に比較すれば異常な代謝型式の一つとみる事ができる。

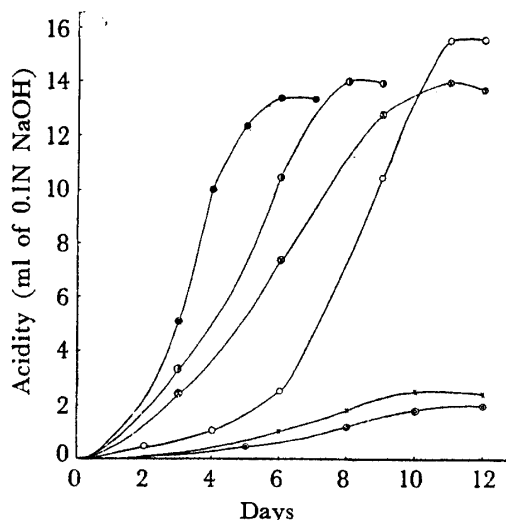


Fig.1. Citric acid production in synthetic and molasses medium.

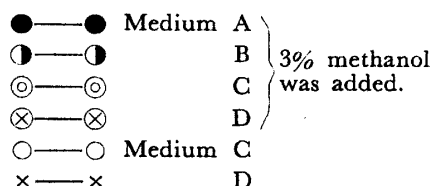


Table 1. Composition of media.

| Constituents                         | Medium   |          |          |          |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
|                                      | A<br>g/l | B<br>g/l | C<br>g/l | D<br>g/l |
| Black strap molasses                 | 250.0    |          |          |          |
| High test* molasses                  |          | 200.0    |          |          |
| Sucrose                              |          |          | 150.0    | 150.0    |
| C.S.L.                               |          |          |          | 1.0(ml)  |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 2.0      | 2.0      | 2.5      | 2.5      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      |          | 2.5      | 2.5      | 2.5      |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O |          |          | 0.25     | 0.25     |
| pH                                   | 5.0      | 5.0      | 4.0      | 4.0      |

\* Sugar content : 75% as glucose.

合成培地並びに糖蜜培地或は微量の C.S.L. を含む合成培地にメタノールを添加した場合酸の生成曲線は Fig. 1 に示す如くである。Table 1 に示す4種類の培地の中合成培地が最高の酸生産を示したが、Black strap molasses medium, High test molasses medium, C.S.L. を含む合成培地にメタノールを添加した場合も同様良好な酸生産を示した。

しかし最高生産量に達する迄の時間はかなり相違し、Black strap molasses, Hightest molasses, 合成培地の順でそれぞれ6, 8, 11日を要した。C.S.L. を含む合成培地も合成培地と同様11日を要したが酸生成開始の時期は遙かに速い。同じ3%メタノール量添加でも Ash の多いもの程酸酵は短時間で終了した。因みに Black strap molasses の灰分量は約5%, High test molasses では1.8%である。

合成培地に微量の C.S.L. を添加したものは必要量以上の金属量を含むために菌の生育だけが盛んとなり、一方メタノール添加合成培地ではメタノールの Toxic effect が強く働き菌の生育は極めて悪く、いずれも酸生産は低調であつた。

#### 実験Ⅱ メタノールの菌形態に及ぼす影響

合成培地並びにメタノール添加糖蜜培地或は C.S.L. 等の夾雑物を含む培地にメタノールを添加する時は、孰れも良好な酸生産を示したが、これらの場合の特徴として菌糸は小さな Pellet を形成する。実験Ⅰで使用した培地の中合成培地と微量の C.S.L. を含む合成培地に菌を培養し44時間後の培養菌糸を顕微鏡で観察した結果は Fig. 2 に示す如くである。C.S.L. を含む培地では菌糸は長く伸びているが、一方この培地にメタノールを添加する時は菌糸は密集して絡みあっている。合成培地に培養した時も同様菌糸は絡み合い非常によく似た形態を呈している事が判つた。

#### 実験Ⅲ 培地の種類と酸素摂取量との関係並びにメタノールの呼吸に及ぼす影響

クエン酸生産培地でも培地の種類により最高生産量に達する迄の時間にはかなりの相違がある事が実験Ⅰで判明した。Table 1 に示す培地の中 Black strap molasses medium, C.S.L. を含む合成培地並びに合成培地の3種

(592)

(野口, 荒尾) クエン酸酸酵に関する研究 (第6報)

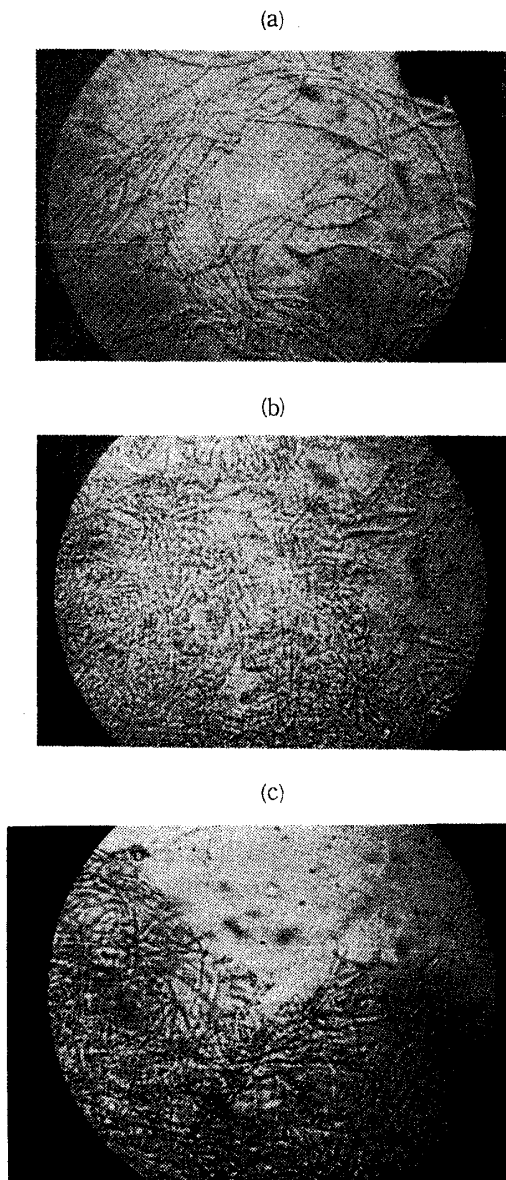


Fig.2. Microscopic photograph of *Asp. niger* N584.

- a : Medium D  
 b : Medium D  
     3% methanol was added.  
 c : Medium C

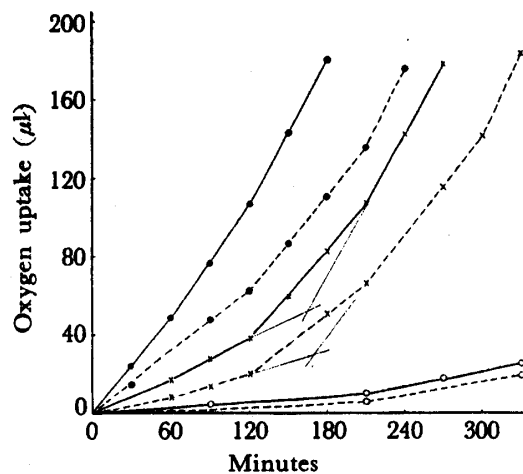


Fig.3. Effect of methanol on oxygen uptake by *Asp. niger*.

- Medium A  
 ○—○ C  
 ×—× D  
 ●- - -● Medium A } 3% methanol  
 ○- - -○ C } was added.  
 ×- - -× D }

類について酸素摂取量を測定した。測定には Warburg 検圧計を使用し、主室に培地 1 ml, 孢子懸濁液 2 ml を入れ、副室には 10% KOH 0.5 ml と濾紙片を入れ 28°C で振盪しながら測定した。Black strap molasses medium は最初より酸素の摂取が旺盛で 150 分後には更に増大する。C.S.L. を含む合成培地は 120 分後に摂取量が増加した。合成培地は極めて低く 210 分迄ほとんど酸素摂取が認められなかった。前二者の培地では Fig. 3 に示す如く、150 乃至 180 分後に勾配が急になるところで孢子が生理的に変化しはじめたものと考えられる。

以上 3 種の培地にメタノールを 3% 添加した時はいずれも酸素摂取がかなり抑制された。酸素摂取の少ない条件で必ずしもクエン酸の生成が促進されるとは云いきれないが、少なくとも同一培地でメタノール添加によりクエン酸の生産が増加する時は、メタノールが酸素摂取をかなり抑制しているものとみて差支ない。但しメタノール添

加の時も無添加と同様時間的には僅かに遅れるが、酸素摂取が 180 分辺りで急に増大している。一方合成培地ではメタノール添加により僅かに抑制されるが、330 分迄は無添加と大差なく酸素摂取は極めて僅かであった。

以上の実験結果よりクエン酸生成酵素の形成は培地の種類により多少の相違はあるが、酸素摂取の抑制される過程で行われるものと考えられる。

#### 要 旨

1. 合成培地或は微量の C.S.L. を含む合成培地並びに糖蜜培地にメタノールを添加するクエン酸酸酵で、これらの酸生成曲線を比較した結果いずれも良好な酸生産を示したが、最高生産量に達する迄の時間には非常な相違がみられ Black strap molasses medium が最も速く、次に High test molasses medium, 合成培地が遅最も

かつた。

2. 合成培地に僅かの C.S.L. を含む培地では酸生産はほとんど認められないが、菌糸の伸びは長く、一方メタノールを添加する時は酸生産が著しく増加し菌糸は密集して絡み合う。合成培地で酸生産の高い時の菌糸も絡み合いその顕微鏡観察による菌糸の形態は極めて類似している。

3. 糖蜜培地、微量の C.S.L. を含む合成培地、合成培地の3種類について孢子の酸素摂取量を測定した結果、糖蜜培地で最も多く、合成培地で最も少なかった。

同一培地でメタノール添加により酸生成が著しく増大する時は、メタノールは菌の酸素摂取を抑制する。

終りに臨みこの報告の発表を許可された協和醗酵工業株式会社加藤社長、終止御鞭撻を賜った渡辺専務、鎌田部長に感謝の意を表します。又本報告の御校閲を戴いた大阪大学照井教授に厚く感謝致します。

### 文 献

- 1) UNDERKOFER, L.A. and HICKEY, R.J.: Industrial Fermentations 2, 439 (1954). 2) 野口: 第2報.  
3) 野口, 荒尾: 第4報. 4) 野口, 阪東: 第1報. (昭和35, 6, 3受理)

## クエン酸醗酵に関する研究 (第7報)

### メタノールの Physiological effect に就いて

野口 祐一・荒尾 修・阪東 良子 (協和醗酵工業株式会社)

### 緒 言

坂口, 馬場<sup>1)</sup>により発見されたメタノールのクエン酸生成促進効果は MOYER により更に発展され、菌株間かなりの相違はあるけれども粗製の葡萄糖、糖蜜等を前処理を施す事なく利用可能ならしめ粗原料の利用範囲を著しく拡大した。しかし、MOYER<sup>2,3)</sup>の報告は糖蜜を原料とする時は表面培養と振盪培養に限られ通気攪拌培養には何等ふれていない。著者等は振盪培養の実験結果に基き、通気攪拌培養で酸生産を行わしめる際に特に注意すべき諸点を明らかにし、その結果対糖収率約60%の成績を収める事ができた。

メタノール効果については、過剰の重金属を含む培地で酸生産を著しく向上させる事<sup>2,3)</sup>以外その Physiological effect について詳細な報告は今日尚見当らない。

糖蜜培地のクエン酸醗酵ではメタノール添加、無添加で外観的にも容易に見分けがつくが、両者の顕微鏡観察による菌糸の形態比較、経時的代謝並びに菌体成分の変動等について検討したので結果を報告する。更に第1<sup>4)</sup>、2報<sup>5)</sup>でメタノール、エタノールの培養液中の残存量と蒸発損失とから、メタノールは菌に利用されないが、エタノールは若干利用されるかもしれない事を報告した。今回 C<sup>14</sup> のメタノール、エタノールを使用しこれら両アルコールが果して菌に利用されるか否かを確認する事ができたので併せて報告したい。

### 実験方法並びに実験成績

菌株: *Asp. niger* N584.

培地、培養: 特に断りなければ第1報記載の方法による。

分析: 酸度、糖、pH等の測定は第1報記載の方法による。エタノール可溶性窒素<sup>6)</sup>は菌体を生理的食塩水でよく洗滌し、乾燥後菌体に70%のエタノールを添加、homogenize し遠心沈澱後同様操作で3回抽出を行なう。このエタノール可溶性部分を減圧下で dry up し、10%イソプロピルアルコールに溶解後 Micro-kjeldahl 法で測定した。熱三塩化酢酸沈澱部及び可溶部の窒素測定<sup>7)</sup>は、菌体を生理的食塩水で充分洗滌し、この Wet mycelium 1 g を遠心沈澱管にとり5%の三塩化酢酸5 ml を加え98°C, 10分間加熱する。再び同様操作を繰返し両部の窒素を Micro-kjeldahl 法で測定する。これらの値はすべて菌体乾物量に換算した。燐の定量は ALLEN 氏法<sup>8)</sup>によった。

#### 実験1 糖蜜培地のクエン酸醗酵でメタノールの菌形態に及ぼす影響

糖蜜培地のクエン酸醗酵ではメタノール添加、無添加でブrossの外観は一見して容易に見分けがつく。即ちメ