リゾープス属の酸醗酵に関する研究 (第7報) 攪拌通気培養に就て

坂口謹一郎, 古坂 澄石, 高橋 甫 (東京大學農學部農藝化學教室)

昭和 25 年 12 月 28 日 受理

Studies on the Acid Fermentation of *Rhizopus* Species.

Part 7. On the Submerged Fermentation under Aeration

By Kin'ichiro SAKAGUCHI, Chōseki FURUSAKA, and Hajime TAKAHASHI

Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

リゾープス属の深部培養による乳酸の生産については, WARD, LOCKWOOD, TABENKIN, WELLS 等の研究があり⁽¹⁾, 又最近朝井, 相田により生産条件に関する報告⁽²⁾がある. 坂口, 朝井, 本江は第4報に於てリゾープス属中フマル酸生産株, *Rh. G. 34* 及び乳酸生産株, *Rh. G. 36* を用い新に考案した懸垂通気培養法により表面繁殖菌體の通気培養を行つた結果, 短期間に多量の生産物が収得される事, 又乳酸生産株では乳酸の他にフマル酸の副生が見られる事を報告した. 乳酸の如き従来無氣の生産物と考えられていたものが, 通気条件下で多量に集積される事實は酸醗酵の機構上極めて興味ある事實である. 本實驗は前實驗の方法に改良を加え, 分子状酸素の供給を更に充分にするため, 實驗室的攪拌通気培養法を考案し, 十分な通気が酸醗酵, 特に乳酸醗酵を阻害するや否やを再び検討すると共に之により乳酸生産株もフマル酸を生産する事實を再確認する事を目的とした.

實 験 の 部

實驗 1. 對照實驗としての表面培養

培養液: ブドウ糖 12%, 硫酸 0.4%, ペプトン 0.2%, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 各 0.04%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 各 0.004%, 培養液 800 cc を用い, 植付時 CaCO_3 5% を添加した. 培養条件: $26 \sim 28^\circ$ 35日間. 分析方法は第1報に準じて行つた. 分析の結果を第1表に示す.

Table 1. Surface Culture of *Rhizopus*

Organism	Glucose consumed (g)	conversion* (%)	Wt. of the fungus pellicle (g)	Volatile acid calcd. as acetic acid (g)	Ethyl alc. formed (g)	Lactic acid formed (g)	Fumaric acid formed (g)
<i>Rh. G. 34</i>	87.488	97.33	6.60	0.1237	1.604	none	21.192
<i>Rh. G. 36</i>	87.288	97.11	4.75	0.1224	4.812	20.928	none

* The amount of glucose consumed / Initial amount of glucose

實驗 2. *Rh. G. 36* の通気培養胞子を接種した場合

装置の概要 空氣は 1/4 HP の空氣壓縮機を用いて壓力約 2 kg/cm^2 の空氣を長さ 1m, 太さ 2.5 cm の銅管に鐵屑を充した管 (溫度 600°) を通して豫熱した後, 綿濾管, 洗滌瓶を通した後, 中央部に攪拌機を裝置した 1 l 容 3 口フラスコに吹込んだ. 3 口フラスコ内部の空氣壓力は大約水柱 10 cm の壓力に保つた. 通氣量は $4 \sim 5 \text{ l/min.}$ である. 洗滌瓶及培養フラスコは 30° の水槽中に保温した. 培養液の組成: 實驗 1) に同じ. 但し 500 cc 用い, Bilg. 10 度の麦芽汁 10 cc を添加した. 殺菌: 綿濾管, 洗滌瓶, 培養フラスコを接続して 15 lb, 15 分殺菌した. 接種: *Rh. G. 36* の斜面培地に生育したものから白金耳で接種し, 殺菌炭酸石灰と消泡のため殺菌大豆油少量を添加した. 培養: 接種後直ちに通氣を開始し攪拌は接種後 24 時間即ち菌體が多量に發現してから行つた. 攪拌機の回轉数は $800 \sim 1500 \text{ r. p. m.}$ である. 接種後 24 時間迄は糖は減少しないが, 24 時間より 60 時間にかけて糖はほぼ 1 g/h の割合で急速に減少し, pH は殆んど一定で $6.0 \sim 6.2$ であつた.

Table 2. Submerged Culture of *Rhizopus G. 36*

Wt. of the fungus pellicle (g)	Glucose consumed (g)	Conversion* (%)	Volatile acid calcd. as acetic acid (g)	Conversion** (%)	Lactic acid formed (g)	Conversion** (%)	Fumaric acid formed (g)	Conversion** (%)
7.89	33.618	94.12	0.4165	1.23	14.500	43.13	0.2152	0.64

Conversion* The amount of glucose consumed / Initial amt. of glucose.

Conversion** Product / Glucose consumed.

分析：表面繁殖実験に準じて行つたが、酒精の定量は行わなかつた。分析結果を第 2 表に示す。

不揮発酸 Ba 鹽の 80 % アルコール不溶部より水難溶の結晶として、フマル酸を分離確認した。

実験 3. *Rh. G. 36* の振盪培養により育成した菌體を用いての通氣攪拌培養。

菌體の育成：内容 2.5 立容の試薬瓶に實驗 1 と同組成の培養液を入れ、之を 60 rev/min の振盪機を用いて振盪し毎分約 200 cc の無菌空氣を送入した。47 時間後菌體を殺菌したガーゼで濾別して之を用いた。

通氣培養装置 實驗 2 に同じ。但し空氣豫熱機を除き水槽の溫度を 32° とし、培養瓶中の溫度を 30° とした。

培養液の組成：ブドウ糖 10 %、 KH_2PO_4 、 KH_2PO_4 各 0.03 %、800 cc を用い、少量の大豆油及び 5 % の CaCO_3 を添加す。接種 前記ガーゼで濾別した菌體を培養瓶に投入、直に通氣、攪拌した。培養経過：接種後 16 時間迄は糖も減少せず、且水素イオン濃度も pH 7.3 迄(初發 pH 6.0)上昇したが、16 時間より 50 時間迄は糖は直線的に減少しその割合は 0.640 g/hr であつた。

Table 3. Secondary Fermentation of *Rh. G. 36*

Wt. of the fungus pellicle (g)	Glucose consumed (g)	Conversion* (%)	Volatile acid calcd. as acetic acid (g)	Conversion** (%)	Lactic acid formed (g)	Conversion** (%)	Fumaric acid formed (g)	Conversion** (%)
4.30	28.02	63.60	0.4638	1.65	16.1427	57.61	0.9033	3.22

Conversion* : The amt. of glucose consumed / Initial amt. of glucose

Conversion** : Product / Glucose consumed

實驗 4. *Rh. G. 34* の振盪培養により育成した菌體を用いての通氣攪拌培養。

菌體の育成装置、培養液の組成：實驗 3 に同じ。培養経過：接種後 20 時間は糖の減少が見られず、水素イオン濃度も pH 7.7 迄上昇し(初發 pH 6.0)たが、20 時間より 64 時間迄緩慢な糖の消費が認められた。(0.194 g/hr の割合で減少した) このように菌體の活性度が非常に弱いため残糖の多いまま培養を終り分析を行つた。結果を第 4 表に示す。

Table 4. Secondary Fermentation of *Rh. G. 34*

Wt. of the fungus pellicle (g)	Glucose consumed (g)	Conversion* (%)	Volatile acid calcd. as acetic acid (g)	Conversion** (%)	Lactic acid formed	Fumaric acid formed (g)	Conversion** (%)
6.40	19.083	38.25	0.1438	0.75	None	3.6315	19.03

Conversion* : The amt. of glucose consumed initial amt. of glucose

Conversion** : Product / Glucose consumed

實驗 5. 通氣振盪培養による *Rh. G. 34* 及び *Rh. G. 36* の混合培養 混合培養を行うに際しては、兩菌株の酸酐相を一致させて同時に酸酐を行わせる事が最も望しいが、本實驗に於ては、兩菌株を同時に接種して(斜面培地より)培養を行つた。装置：實驗 3 の前培養に用いた振盪 1 通氣を行つた。培養液：實驗 1 に同じ。450 cc を用いた。培養経過：12 時間迄は振盪のみで通氣は毎時 1 回 5 分間行い、12 時間以後は絶えず通氣しつつ 60 時間で培養を終る。菌體は 12 時間では僅に 24 時間では著量を生じた。分析結果を第 5 表に示す。

Table 5. Mixed Culture of *Rh. G. 34* and *Rh. G. 36*

Wt. of the fungus pellicle (g)	Glucose consumed (g)	Conversion* (%)	Volatile acid calcd. as acetic acid (g)	Conversion** (%)	Lactic acid (g)	Conversion** (%)	Fumaric acid (g)	Conversion** (%)	Ethyl alcohol (g)	Conversion** (%)
2.70	41.736	93.56	0.1571	0.73	0.6714	1.60	2.9592	7.09	6.360	15.24

Conversion* : The amt. of glucose consumed / Initial amt. of glucose

Conversion** : Products / Glucose consumed

總括 リゾプス属のフマル酸生産種 *Rh. G. 34* 及び乳酸生産種 *Rh. G. 36* を用い、通氣攪拌培養を行い、次の結果を得た。

乳酸生産種は孢子からも、或は既成菌體によるも、強力な攪拌通氣状態に於て、ブドウ糖より著量の乳酸を生産し、且第 4 報に於て已に報告したようにフマル酸の副生が認められた。又乳酸の收得率は、表面培養 < 表面培養菌蓋の通氣培養 < 孢子接種の通氣攪拌培養 < 振盪培養菌體の通氣攪拌培養 の順となり、強力な攪拌及び通氣が酸酐を促進し、全く阻害を起さぬ事を明にした。

兩菌株の混合培養に於ては(兩菌株を同時に植付けた場合)フマル酸が乳酸に比較して遙に多量に集積される。

終に臨み高橋慎造先生に深く感謝する。

(昭和 23 年 2 月, 農化東京支部講演)

- (1) G. E. WARD, L. B. LOCKWOOD, B. TABENKIN, P. A. WELLS: *Ind. Eng. Chem.*, 30, 1233 (1938)
- (2) 朝井勇宣, 相田 浩: 農化, 東京支部講演 (1948)
- (3) 坂口謹一郎, 朝井勇宣, 本江元吉: 農化, 19, 222 (1943)

Summary

Rh. G. 36, the lactic acid former, produces a large amount of lactic acid under strong aeration and agitation, and considerable production of fumaric acid along with lactic acid is also confirmed. In the mixed culture of *Rh. G. 36* and *Rh. G. 34* the fumaric acid former, it is found that a larger amount of fumaric acid compared with that of lactic acid is obtained.

低温凍結分離によるセリシンフラクションに就て

大 津 隆, 服 部 雅 子 (郡是製絲株式会社研究所)

昭和 25 年 12 月 13 日 受 理

On the Sericin Fraction by Freezing Isolation in Low Temperature.

By Takashi OTSU and Masako HATORI

(Research Department of Gunze Silk Manufacturing Co., Ltd.)

緒 言

従来セリシンフラクションの問題に關しては幾多の研究があるが、凍結法によるフラクション分離に就ては僅かに金子氏⁽¹⁾の報告を見るのみである。同氏によれば、 -6° 凍結セリシンゾルの融解によつて繊維狀の不可逆凝固を成す部分と、可逆的にコロイド溶液を作る部分に分別せられ、前者はセリシンA、後者はセリシンBから成り、その窒素含量はゾル濃度小なる時に於て各A及びBのそれに類似すると言う。

著者等も亦製絲化學の根本課題たるセリシン性狀探究に凍結法を企圖した。我々の實施した方法は、金子氏の高温凍結法とは異なり低温凍結法であり、同氏の得られし結果とはやや趣を異にした。尙セリシンゾルの乾燥には比較的變性なく物質を乾燥させる事が出来ると言う特徴が買われて、各方面に有効に利用されている所謂凍結乾燥法を應用して若干の成果を得たので、それ等を茲に報告する。

實 験 の 部

本研究に使用した繭層は何れも昭和 23 年晩秋 RC 11 (當研究所育成保存品種)の生繭層である。その 10 粒の平均 1 粒繭層重量は 0.3442 g, 水分含量 11.19%, 總窒素含量 17.44% (對無水物量)であつた。

1. フラクション分離の方法 細切せる生繭層 20 g を内容 3 l の三角フラスコに入れ、蒸溜水 1 l を注加し 100° で 30 分間煮沸し尚温い中に濾紙にて吸引濾過した液は、之を -30° の氷室中で 1 夜放置凍結させる。翌日凍結した物を取り出し室温に放置融解させると繊維狀沈澱を析出する故、之を濾過分別す。濾液は減壓低温 (45°) で濃縮後凍結乾燥すると約 0.3 g の黄褐色の無定形粉末を得。濾別した繊維狀沈澱は再び蒸溜水 500 cc に加熱分散せしめ、その一部を取り凍結乾燥すると全量に換算して約 0.65 g の純白色の繊維部分が得られた。かかる凍結分離法の骨子とする所は、セリシンゾルを凍結によつて完全脱水する場合ゾル中のセリシン粒子はその結合水分子を失ひ、疎水性膠質の性質を示す様になり⁽²⁾、ゾルの凍結を融解するも再び水に分散する事が出来難く常温で融解せる場合には析出するに至る。然しながら最初ゾル中に溶存していた水和性フラクションは融解により再び水中に溶解し去ると考えられる。

2. 凍結分離により得られた二つのフラクションの示す特性 上記の方法により得られた二つのフラクションは物理化學的に特異の性狀を示したので、その特性を表記すれば Table 1 の通りである。之から考えるに水に難溶性フラクションはその窒素含量 16.48%, ビウレット反應紫色、高濃度にて jelly 化能を有するは明らかに繭層セリシン蛋白の一部溶解したものと斷定される。殊にこの様な方法により分別し乾燥されたセリシingleはその溶解度の點に於て變性度少なく且纖維性を喪失しない事は興味がある。(Fig. 1 参照)