then remained unchanged in the dark and in the light. On the contrary, glutamine, which was found only in small amount in the original seeds, increased slowly at the same stage.

About ten free amino acids were detected in both cotyledon and embryo at all stages of germination; aspartic acid, glutamic acid and alanine, which seem to be concerned in, transamination reaction in seedlings, were the most remarkable.

Aspartic acid and glutamic acid, which seem to be closely related to the accumulation of the corresponding amides were found predominantly in embryo and cotyledon respectively.

ペニシリン醗酵に関する研究 (第 5 報)

各種植物油並に脂肪酸のペニシリン生成に及ぼす影響

野口祐一, 荒尾 修, 重藤 稔, 栗原純夫 (協和醗酵工業株式会社富士工場)

昭和 30 年 10 月 29 日 受 理

Studies on Penicillin Fermentation. Part V.

Effects of Vegetable Oils and Fatty Acids on Penicillin Yield.

By Yuichi NOGUCHI, Osamu ARAO, Minoru SIGETO and Sumio KURIHARA

(Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd., Fuji Plant)

緒 言

前報⁽³⁾⁽⁴⁾で著者らは, *Pen. chrysogenum* Q-176 pigmentless saltant を親株とする 1 変異株 H-512 を用い、その炭素源利用に着目し、高単位ペニシリン醗酵を得るには、菌の生理上培養初期に急速に菌を増殖させ、その後徐々に炭素源を feed し半飢餓状態に維持することが必要である事を認めた。

Feed substance としては大豆油がすぐれているが、これは high aeration の条件でのみ認められ、low aeration では効果がなく、一方グルコースは適用範囲が広く、従つて low condition では寧ろ大豆油よりも効果的である。

今回は菌体増殖に、炭素源としてグルコースを澱粉で置換し得るか否か、更に大豆油とグルコースフィーディングの比較、大豆油以外の数種の植物油、脂肪酸の効果に就いて試験したので結果を報告する。

実 験 の 部

1. Starch-CSL 培地に於ける大豆油並にグルコースフィーディングの比較

実 験 方 法

- (i) 菌株 *Pen. chrysogenum* Q-176 pigmentless saltant を親株とする 1 変異株 H-512.
- (ii) 醗酵槽 5 l-Jar fermenter⁽²⁾.
- (iii) 培地 グルコースを澱粉 2.5% で置換する以外は既報⁽³⁾⁽⁴⁾の通りである。
- (iv) 培養条件 通気量は等量 (3 l/min.), 910 r. p. m., 24° で培養し、フェニール醋酸の添加、培養中の殺菌水の補給、pH 調節等は凡て既報⁽³⁾⁽⁴⁾の方法に準ずる。
- (v) 大豆油、グルコースのフィーディング 26 時間目より大豆油は毎時 0.5 cc (0.017%/hr.), グルコースは 30% 溶液を毎時 3 cc (0.03%/hr.) 添加する。但し初期 foaming の激しい時は消泡剤として大豆油を適時添加する。
- (vi) 分析 既報⁽¹⁾の方法に従う。

実 験 結 果 グルコースを澱粉に置換しても、大豆油、グルコースのフィーディングでペニシリンの生成が継続され、而も大豆油がグルコースよりすぐれていることがわかる (第 4 報参照)。

培養状態は澱粉の置換で培地はやや粘稠となり、40 時間の分析結果で澱粉は既に完全に利用されている。30 時間で pH 7.0 に達し、大豆油フィーディングの場合は、40 時間迄に消泡剤として 39 cc の大豆油を添加し、フィーディング時に僅かにアンモニア態窒素をみる。グルコースフィーディングの場合は 38 cc 添加し、醗酵終了時まで更に 9 cc 大豆油を添加する。この場合は培養中にアンモニア態窒素をみない。pH 調節には 10% H₂SO₄ をそれぞれ 110, 90 cc 使用するが 90 時間以降はほとんど調節の必要を認めなかつた。

2. 各種植物油の影響

Starch-CSL 培地の場合：炭素源としてスターチ 3.5% の培地を使用する。26 時間より 88 時間まで 0.03 %/hr, 89 時間より 0.015%/hr. のグルコースフィーディングを行う。植物油としては大豆油, 綿実油, 落花生油, 亜麻仁油, 玉蜀黍油の 5 種類を選び, 同様に 26 時間より毎時 1 cc (0.033%/hr), 89 時間より 0.5 cc (0.017 %/hr.) feed する。その他の条件は凡て前回通りである。

前記 5 種類の中では Table 2-a に示す如く, 亜麻仁油が最も高い値を示し, 綿実油, 落花生油, 玉蜀黍の間では大差なく大豆油が僅かに低い値を示した。

澱粉 3.5% の使用で, 培地は極めて粘稠, foaming は前回の 17 時間頃に較べると 8 時間程遅れ, 25 時間で漸くみられた。pH の調節は 65 時間以降は必要を認めなかつた。動植物油のペニシリン生成に及ぼす影響に就いては, 報告によつてその内容がかなり相違しているが, これが培養条件と密接に関係している事は既に報告した⁽⁴⁾。Lard oil の stimulating effect⁽⁶⁾ が, 構成成分である脂肪酸或はそのエステルによつて置換し得るところから, 脂肪酸に起因することが証明されているが, 前記植物油も凡て有効成分とみられる不飽和脂肪酸を多く含み, 亜麻仁油の如きは大部分が不飽和脂肪酸で (linoleic 35%, linolenic 25~35%, oleic 10~15%), 特に単位の高い原因もこの点にあると想像されるが, 醗酵後期に高位の不飽和脂肪酸が阻害的に働くという結果 (本報告実験 3 参照) からみると矛盾する。又亜麻仁油の場合, 他のものと比較して特に変つた点はみられなかつた。

Glucose-CSL 培地の場合：炭素源としてグルコース 2.5% 使用する。26 時間よりグルコースを 0.03%/hr. feed し, その上大豆油, 亜麻仁油, 菜種油, 蓖麻子油, 落花生油, 胡麻油をそれぞれ 0.017%/hr. feed する。

亜麻仁油が最も高い値を示し, 次いで落花生油, 蓖麻子油の順である。醗酵経過は胡麻油, 菜種油が消泡効果が少いために, 初期の添加量が多く, 胡麻油では絶えず foaming がみられた。Filtered broth は両者とも少し白濁している。蓖麻子油は大部分が linoleic acid (80~85% を占める) で, 菜種油も erucic acid を多く含むが, oleic, linoleic, linolenic acid と同様, これらの脂肪酸も有効と考えられる。

Glucose, lactose-CSL 培地の場合：炭素源としてグルコース 2.5%, ラクトース 1.0% 使用する。ラクトースが消費される 89 時間以降に前記 5 種の植物油を 0.017%/hr. feed する。それまでに消泡剤として用いる事は前 2 回の実験と同様である。この場合も, やはり亜麻仁油, 落花生油の順に高い値を示し, 胡麻油は消泡効果少く, 醗酵中は又 pH の調節を必要としない。89 時間で残糖約 0.5% (グルコースに換算して) を示し, この値は終了時の 137 時間でも変わらない。アンモニア態窒素も 89 時間で培地 100 cc 中に 44 mg 検出された。菜

種油の場合は途中で異常現象が起り培養を中止した。

3. 各種脂肪酸添加の影響

植物油の添加がペニシリンの生成を stimulate することを認めたが, その中に含まれる脂肪酸の種類, 量比が異なるので直接脂肪酸を添加して比較することにした。脂肪酸として, 特に有効と思われる oleic, linoleic acid の他に, 高位の飽和脂肪酸として palmitic, stearic acid, 低位では caproic, caprylic acid を選んだ。

Surface active agents の選択：脂肪酸添加の場合, 大豆油を消泡剤として使用することは好ましくない。従つて消泡

Fig. 1. Metabolic changes in the fermentations fed soybean oil and glucose. Medium contained 2.5% starch, 6.0% corn steep liquor and the standard salt mixture.

TABLE 1. Effects of Soybean Oil and Glucose Feeding on Penicillin Yield

hrs	Oil Feeding			Glucose Feeding		
	u/cc	Oil added ⁽¹⁾ (cc)	10% H ₂ SO ₄ added ⁽²⁾ (cc)	u/cc	Oil added ⁽²⁾ (cc)	10% H ₂ SO ₄ added (cc)
40	848	39		837	38	
64	1610	51	60	1620	40	
88	3060	63	100	2360		80
112	—	75		—	44	
136	3670	87	110	2975	47	90

(1) Amount of soybean oil added as defoamer and feed substance.

(2) Amount of soybean oil added as defoamer.

(3) Amount of 10% H₂SO₄ added to adjust pH at 7.2 during the fermentation.

TABLE 2 (a). Effects of Vegetable Oils on Penicillin Yield.

hrs.	Soybean oil	Cottonseed oil	Peanut oil	Linseed oil	Corn oil
40	945	1086	1097	1064	1075
65	1651	1770	2063	1890	1922
88	2954	2715	2976	2910	2824
112	2563	2997	3345	3388	2780
136	3258	3497	3519	4083	3649

TABLE 2 (b). Effects of Vegetable Oils on Penicillin Yield.

	Soybean oil	Linseed oil	Rape oil	Castor oil	Peanut oil	Sesame oil
A {Yield ratio ^(a)	1.00	1.30	1.09	1.09	1.21	0.97
{Oil added in 40 hrs. (%) ^(b)	0.7	0.9	1.0	0.6	0.66	1.1
{Total oil added in 136 hrs. (%) ^(b)	2.3	2.6	2.7	2.2	2.2	3.6
B {Yield ratio	1.00	1.38		1.14	1.27	0.67
{Oil added in 40 hrs. (%)	0.9	1.1		0.6	0.8	1.13
{Total oil added in 136 hrs. (%)	2.1	2.4		1.8	1.9	2.70

A: Medium contained glucose 2.5% as carbon-source

B: Medium contained glucose 2.5%, lactose 1.0% as carbon-source

(a) Ratio of yield against that of fermentation added soybean oil

(b) Amount of oil added as defoamer and feed substance (%)

TABLE 3. Effects of Fatty Acids on Penicillin Yield

	Control	Linoleic acid	Oleic acid	Palmitic acid	Stearic acid
41	1097	1017	1072	1017	1108
65	1766	1843	1843	1733	1755
89	1865	1733	1316	2194	1975
113	—	—	1754	1997	2120

Fatty acids mentioned above were added as their soaps.

TABLE 4. Effects of Fatty Acids on Penicillin Yield

	Control ^(a)	Soybean oil	Linoleic acid	Oleic acid	Caproic acid	Caprylic acid
41	887	1010	1073	778	810	690
65	1459	1931	1755	1558	1700	1338
89	1843	2512	2150	2029	2128	1975
113	2040	2896	2216	1986	2391	1854

(a) Control shows the yield of fermentation fed glucose only.

効果のすぐれたもので菌に無害なものを選択する必要
がある。Arcel C, Arcel 83, Span 20, Span 80,
Span 85 の比較で Span 85 を選ぶことにした。Span
85 は Sorbitan trioleate でその影響を全く無視する

ことはできないが、使用量が少

いので以後の実験では影響なき

ものとみなした。

脂肪酸の比較: グルコース

3.5%の CSL 培地を使用する。

26 時間より 0.03%/hr. のグル

コースフィーディングを行った

上で、24 時間置きに脂肪酸 0.3

% を 5 回添加する。Oleic,

linoleic acid は前期、中期には効果がみられるが、後期に於ては効果をみない。Caprylic acid は前期やや阻害
的である。Caproic acid は全期を通じ、特に中期、後期にかけてもかなりの促進作用を認めたが、これは foa-
ming が激しく消泡剤である Span 85 を遙かに多く (他の場合の約 2 倍、0.35%) 添加したことによる原因がある
と思われる。pH の調節は 8 時間毎に必要としたが、90 時間以降 oleic, linoleic acid では pH 7.0 以下とな
るのに反し、caproic, caprylic acid ではこのような現象がみられない。然しいずれにしても大豆油添加 (0.03
%/hr., 総量 2.7% 添加) に比較して効果が少く、グルコースのみのフィーディングの結果と大差ないことから
考えて、脂肪酸直接の添加で植物油のような結果は期待し難い。

NaOH で中和し、0.01%/hr., 総量 0.8% 添加した場合は、oleic, linoleic acid は後期阻害的で pH の低
下を招くことは前実験と同様である。前期ではいずれも阻害作用なく、palmitic, stearic acid は中期から後期
にかけて僅かに効果があるように思われる。

要

約

(1) Glucose-CSL 培地の代りに starch-CSL 培地を使用しても、澱粉利用後に大豆油、グルコースを in-
termittently に少量づつ feed すれば、ペニシリンの生成が継続され、菌の生理上、半飢餓状態に維持するこ
とがペニシリン生成の必要条件であることを認めた。Feed substance として大豆油はグルコースよりもすぐれ
ている。

(2) 各種植物油 (大豆油、綿実油、落花生油、亜麻仁油、玉蜀黍油、蓖麻子油、胡麻油) の intermittent
なフィーディングでは、亜麻仁油が最も効果的で 4083 単位を示し、落花生油がこれに次ぎ、他は大差ないが胡
麻油は消泡に多量を要し、これが原因してか効果は少なかった。

(3) 脂肪酸の比較では、低位の飽和脂肪酸である caprylic acid は初期に阻害がみられ、培養が進むにつ

れて減少する。高位の不飽和脂肪酸である oleic, linoleic acid は初期に効果がみられるが、後期に pH の低下を招き、Na 塩として添加する時には阻害の程度もはげしい。一方飽和脂肪酸の palmitic, stearic acid は Na 塩として添加したが醗酵の全期を通じ阻害作用を認めず、促進作用がみられた。Caproic acid ではかなりの効果をみたが、これは培養中に foaming がはげしく、消泡剤の span 85 を多量に添加した事にも原因があると思われる。

終りに本研究の発表を許可された社長加藤辨三郎博士、並に研究に終始御懇篤なる御指導と御助言を与えられた渡辺製造兼研究開発部長、鎌田富士工場長、東京研究所主任研究員木下祝郎博士に感謝致します。本研究の要旨は昭和 30 年 9 月日本農芸化学会関東支部会に於て発表した。

(1) 野口祐一, 他 : 農化, 29, 505 (1955).

(4) 野口祐一, 他 : 農化, 30, 45 (1956).

(2) 野口祐一, 他 : 農化, 29, 511 (1955).

(5) M. C. GOLDSCHMIDT and H. KOFFLER :

(3) 野口祐一, 他 : 農化, 29, 707 (1955).

Ind. Eng. Chem., 42, 1829 (1950).

Summary

1. The glucose of medium used in penicillin fermentation can be replaced by starch. After starch utilization, intermittent additions of soybean oil or glucose were observed to be effective to increase the penicillin yield.

2. The effects of some vegetable oils (soybean, cottonseed, peanut, linseed, corn, rape, castor, sesame oil) on penicillin fermentation were studied. These oils except sesame oil afforded good yields and above all, linseed oil gave the best, 4083 units per cc being formed in 137 hours.

3. The effects of fatty acids and soaps were studied. Caprylic acid inhibits the penicillin formation in earlier stage, but the influence decreases as fermentation proceeds. Oleic and linoleic acid stimulate the penicillin formation in earlier stage. When oleic, linoleic, palmitic, or stearic acid was added as its soap, the unsaturated acids inhibit the old culture, although the saturated acids have no toxicity throughout the fermentation. In case of caproic acid, the higher yield was obtained, but it may be partly due to abundant usage of antifoam agent, Span 85.

微生物によるグリセリン代謝機構に関する研究 (第 5 報)

酵母によるグリセリン酸化機構について (1)

大塚 謙一, 増田 博 (山梨大学醗酵研究所)

昭和 30 年 11 月 7 日 受理

Studies on the Mechanism of Glycerol-Metabolism by Microbes. Part V.

On the Mechanism of Glycerol-Oxidation by Yeasts (1).

By Ken-ichi OTSUKA and Hiroshi MASUDA

(Research Institute of Fermentation, Yamanashi Univ.)

緒 言

著者等は第 4 報⁽¹⁾に於て、各種酵母のグリセリン培地に対する繁殖能並びにグリセリンを基質とした場合の酸素吸収能を比較検討した結果、サッカロミセス型は繁殖並びに酸化能を示さず、産膜酵母型は両方の能力を示すことを明らかにした。そこで酵母の醗酵ではグリセリンが種源より生成されるものなのに何故サッカロミセス型酵母がグリセリンを酸化出来ないかの問題、及びグリセリンを酸化出来る産膜酵母はいかなる機構でグリセリン酸化を行うのかの問題について検討したのでここに報告する。

実 験 の 部

供試菌株並びに試験菌体の調製 : 東大農芸化学科坂口教室より分譲を受け、本研究所保存の菌株を用い、サッカロミセス型として *Saccharomyces saké* (SH 6-5)、産膜酵母型として *Hansenula anomala* (W-7) を供試した。