

(5) 加熱豚肉より抽出した脂肪及びその残渣部の TBA 値の和は、肉そのものの TBA 値にほぼ同じである。

(6) 加熱豚肉の TBA 反応物質はエーテル、クロロホルム、アルコール等の有機溶媒には余り抽出されず、大部分はトリクロル酢酸に抽出される。

終りに臨み本研究を行うに当り、御懇篤な御指導を賜った東大教授桜井芳人先生に厚く御礼申し上げる。

尚、本報告は著者の一人吉松藤子が東大農学部内地留学中に行なった研究の一部で、1959 年 11 月 1 日宇都宮大学に於ける日本農芸化学会関東支部大会で講演した。

(1) Stuart Patton, Geore W. Kurtz : *J. Dairy Sci.*, 34, 669 (1951).

(2) W. L. Dunkley, W. G. Jennings : *J. Dairy Sci.*, 34, 1064 (1951).

(3) E. W. Turner et al. : *Food Technol.*, 8, 326 (1954).

(4) Margaret J. Tims et al. : *Food Technol.*, 12, 240 (1958).

(5) Russell O. Sinnhuber et al. : *Food Research*, 23, 626 (1958).

(6) 日本油脂化学協会編 : 油脂分析試験法 (理化書院) p. 136.

(7) F. Bernheim, M. L. C. Bernheim, K. M. Wilbur : *J. Biol. Chem.*, 174, 257 (1947).

(8) K. M. Wilbur, F. Bernheim, Shapiro : *Arch Biochem.*, 24, 305 (1949).

好気培養に関する基礎的研究 (第 7 報)*

Asp. niger のグルコン酸醗酵に於ける酸素移動

山田 浩一, 矢野 俊正 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 35 年 3 月 16 日 受 理

緒 言

微生物の液内培養系に於て、酸素が気相から菌体表面まで移動する過程に含まれる諸抵抗に就いては Hixon 等⁽¹⁾, Bartholomew 等⁽²⁾および Wise⁽³⁾ によって最初に紹介されたが、この過程は大きく 2 つに分けて考えることができる。1 は気相から培養液への酸素の溶解で純物理的過程であり、2 は溶解した酸素が菌体表面に達するまでの過程で、これには菌の凝集性、呼吸速度などの生物学的因子が関係している。従来 1 の過程である培養液の酸素吸収速度をいろいろに変えて、それに対する培養系の応答を調べた研究は数多くあるが、2 の過程である菌糸間の酸素移動に関しては若干の研究^(2,4) が報告されているに過ぎない。われわれはこの点に着目して研究を行った結果 2, 3 の知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

(1) 培養系 培養経過の解析を容易にするため、代謝経路の簡単なグルコン酸醗酵を選んだ。使用した培地は第 1 表に示す組成のもの、菌株は *Asp. niger van Tieghem* strain No. 2 IAM 2093 である。本菌によるグルコン酸の生産収率は消費糖に対して 75~95% であった。

第 1 表 培養液組成

(2) 培養装置

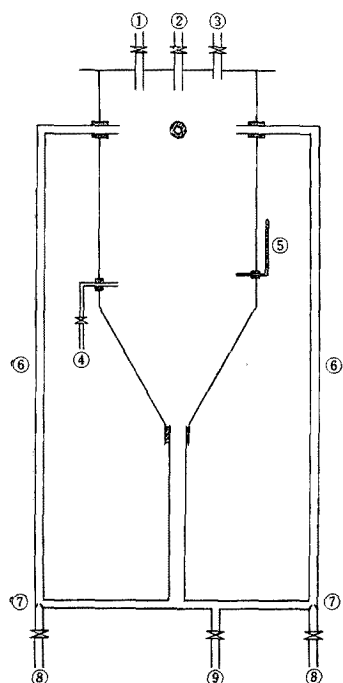
(a) ボルテックス型醗酵槽 : 第 4 報に於て報告した醗酵槽 B (全容 15 l, 仕込量 10 l) の邪魔板をとり除いたもので、空気の吹込みは行わず、攪拌器の回転によって生ずる渦が空気を吸込み、酸素を供給する。液上方には無菌空気を送り、気相の酸素分圧は一定に保たれるようにした。この型式の醗酵槽を使用したのは、ガラス壁や攪拌器に菌体が附着するのを最小限にとめるためである。

	[g/100 cc]
グルコース	2
CH ₃ COO·NH ₄	0.18
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
Fe(NH ₄)(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.002
MnSO ₄	0.003
CaCO ₃	0.58
pH	5.7

(b) 振盪培養装置 : 第 4 報⁽⁵⁾に於て報告した如く空気の出入口および菌の接種口を取付けた 500 cc 容振盪フラスコ 4 箇を直列に連結したものを 1 単位とし、この 4 単位を並列に振盪機にかけて使用した。各単位には

* Fundamental Studies on the Aerobic Fermentation. Part VII. Oxygen Transfer in Gluconic Acid Fermentation by *Asp. niger*.

By Kōichi YAMADA and Toshimasa YANO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)



第1図 実験用エアリフト型醗酵槽

- ①, ② 培地注入及び菌接種口
③ 空気排出口 ④ サンプルング口
⑤ 温度計 ⑥ 通気管
⑦ ノズル ⑧ 空気吹込口
⑨ 排出口

て通気攪拌あるいは振盪を行い、経時的にサンプルングしてポーラロメトリによって溶存酸素を測定する。培養液の最大酸素吸収速度 $K_a \cdot P_g$ は次式によって求めることができる。

$$K_a \cdot P_g = 2.303 \frac{C_s}{\theta_2 - \theta_1} \log \frac{C_s - C_1}{C_s - C_2}$$

但し K_a : 培養液の酸素吸収速度係数 [mol/min·cc·atm]

P_g : 気相中に於ける酸素分圧 [atm]

C_s : P_g と平衡関係にある培養液中の酸素濃度 [mol/cc]

C_1 : 時間 θ_1 に於ける培養液中の酸素濃度 [mol/cc]

C_2 : 時間 θ_2 に於ける培養液中の酸素濃度 [mol/cc]

各種培養条件下に於ける培養液の最大酸素吸収速度は第2表の如くである。

実験結果

各種培養条件下に於ける培養系の糖消費曲線は第2図および第3図の如くである。培養液の最大酸素吸収速度が小さい場合、培養系の糖消費速度が培養時間と共に小さくなる傾向が認められるが、第4図に示す如く攪拌強度を増すと短時間に急速な糖消費がみられることから、この原因は菌の活性の劣化によるものではないと考えられる。第2~4図から培養系の最大糖消費速度と $K_a \cdot P_g$ とを比較してみると、第5図の如くなる。ここに実線は消費糖が全部グルコン酸に酸化さ

無菌空気を送り、各フラスコ内の空気は絶えず更新されるようにした。仕込液量は 100 cc, 振盪回数は毎分 98 回および 120 回, 振盪機の往復行程は 7 cm である。

(c) 実験室用エアリフト型醗酵槽: 第1図に示す如く槽外に4本のガラス管を設け、ここに空気を吹込むことによって液を循環させ、同時に酸素供給を行うものである。全容 10 l, 仕込液量は 5~7 l である。

(3) 菌の接種および培養: 糸状菌は培養方法によって生育状態が異なり、種々の凝塊を形成することが知られている⁽⁸⁻⁹⁾。本培養系に於ても振盪培養を行うと菌糸の球状凝塊が形成されるので、前培養は行わず直接孢子懸濁液を醗酵槽に接種するか、あるいは 7~8 時間振盪培養し、孢子が発芽する直前に接種する方法をとった。また孢子濃度によって凝塊の出来方が異なる場合も知られているので^(6,10), 孢子濃度は $10^3 \sim 10^4$ /cc になるようほぼ一定に保った。培養温度は 30° に保った。

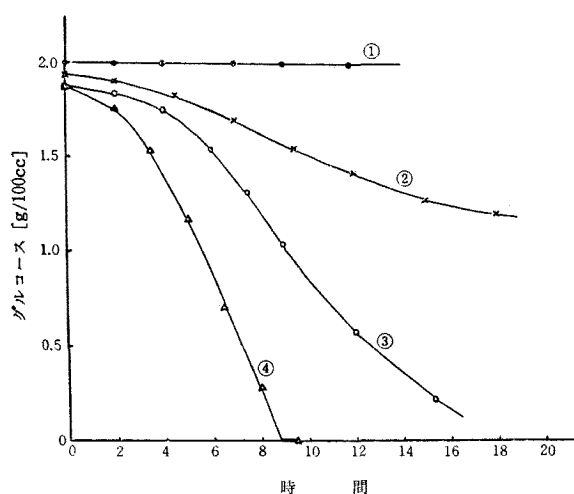
(4) 分析法 培養経過は主として糖の消費速度によって追跡し、必要に応じて酸の生成量および菌体量を測定した。糖の定量は Somogyi 変法, 酸は溶存カルシウムを KMnO_4 による酸化滴定法で定量し、菌体はガラスフィルターにて濾過し、稀塩酸および水で洗滌後真空乾燥して秤量した。

(5) 培養液の最大酸素吸収速度* Bartholomew 等⁽²⁾ および Wise⁽³⁾ の "Gassing out method" にならい、ポーラログラフ法によって測定した。即ち予め窒素ガスで溶存酸素を追い出した培養液につい

第2表 各種培養条件下に於ける培養液の最大酸素吸収速度

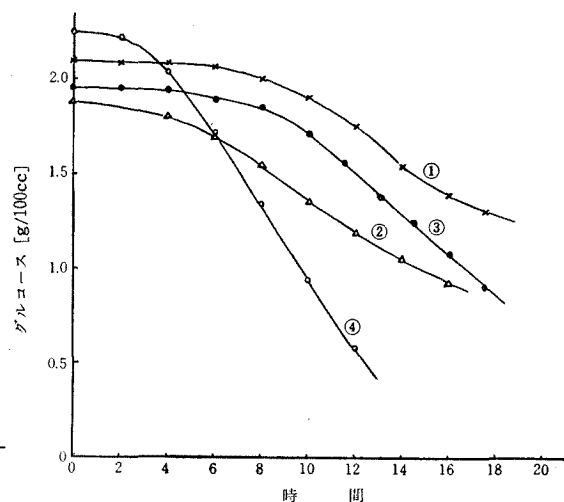
醗酵装置	条 件	$K_a \cdot P_g$ [mol/min·cc]
ボルテックス型 醗酵槽	950 r. p. m.	4.90×10^{-7}
	670	1.49
	570	0.91
	270	0.038
エアリフト型 醗酵槽	20 l/min	2.17
	15	2.01
	12	1.91
	7	1.00
振盪培養装置	98 oscil/min, 100 cc	1.99
	120 100	7.45

* 第4報および第5報に於ては培養液の酸素吸収速度係数 K_a [mol/min·cc·atm] を用いて培養経過の比較を行ったが、本報に於ては便宜上培養液の最大酸素吸収速度 $K_a \cdot P_g$ [mol/min·cc] を使用した。



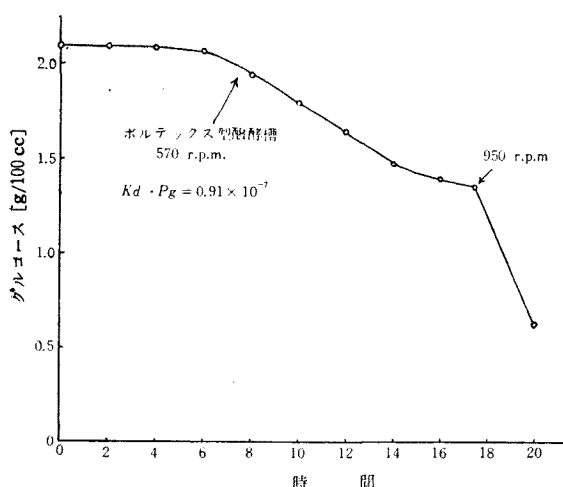
第 2 図 ボルテックス型醗酵槽に於ける培養経過

- ① $K_d \cdot P_0 = 0.038 \times 10^{-7}$ ② $K_d \cdot P_0 = 0.91 \times 10^{-7}$
 ③ " 1.49×10^{-7} ④ " 4.90×10^{-7}

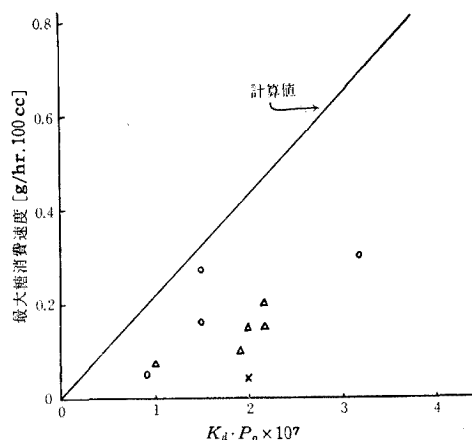


第 3 図 エアリフト型醗酵槽に於ける培養経過

- ① $K_d \cdot P_0 = 1.00 \times 10^{-7}$ ② $K_d \cdot P_0 = 1.91 \times 10^{-7}$
 ③ " 2.01×10^{-7} ④ " 2.17×10^{-7}



第 4 図 培養系の糖消費速度に及ぼす攪拌強度の影響

第 5 図 培養系の最大糖消費速度と $K_d \cdot P_0$ との関係

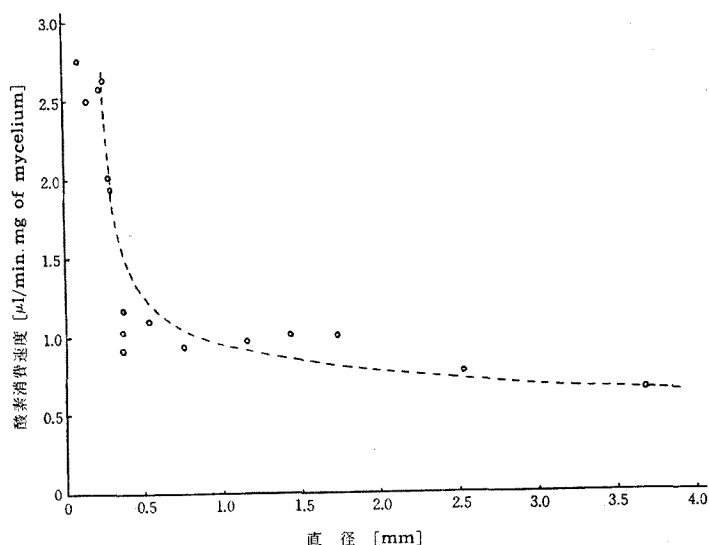
- ボルテックス型醗酵槽 △ エアリフト型醗酵槽
 × 振盪培養装置

れるものとして、培養液の最大酸素吸収速度に対する糖消費速度を計算したものであり、実際の培養結果との差が基だしいことは注目すべきことである。

糸状菌の培養系に於ては、菌の増殖につれて液の性質は非ニュートン性となり、培養液の酸素吸収速度を減少させることが報告されている^(11,12,16)。そこで糖消費速度が小さくなり始めた頃培養を止めて NaN_3 を 10^{-3}M になるように加え、更に 100° 、5 分加熱して菌の呼吸を止め、ポーラログラフ法によって培養液の最大酸素吸収速度を測定してみたが、菌体 $64\text{ mg}/100\text{ cc}$ で酸素吸収速度は $14\sim 18\%$ の減少を示したにすぎなかった。この程度の酸素吸収速度の減少のみからは第 5 図に於ける培養系の糖消費速度の期待値と実験値との差が説明しきれないこと、および糖消費速度が小さくなり始めた頃の溶存酸素を測定してみると (Hixon 等⁽¹⁾ の方法に従ってフェノールで菌の呼吸を止め、ポーラログラフにかける)、かなり酸素が残っている場合があることから、菌糸間の物質移動抵抗は相当大きなものであることが想像される。

第 3 表 *Asp. niger* NRRL 337 用培養液組成

	[g/100cc]
グルコース	2
ペプトン	1
KH_2PO_4	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25
FeCl_3	0.0001
pH	5.6



第6図 凝塊形成による菌の酸素消費速度の減少

抵抗はかなり大きいものであることがわかる。

検 討

菌の分散をよくする1つの因子は攪拌強度であるが、菌の凝集性、培養液組成、その他種々の生物学的因子も関係することが報告されており^(6-9, 13)、問題は必ずしも簡単に解決はできないようである。

一般に微生物の呼吸速度は、溶存酸素濃度が0.5~1.0 p. p. m. 以上では酸素濃度に無関係に一定である^(1, 14, 15)。したがって菌の分散が良好な場合には、菌の呼吸が制限されないためには、培養液中の溶存酸素濃度を0.5~1.0 p. p. m. 以上に保てるような通気攪拌条件が望ましいが、菌が凝塊を形成する場合には、凝塊内に於ける物質移動速度を考慮せねばならない。

解析を容易にするため、次の仮定を設ける。

- (1) 凝塊は球状をなしている。
- (2) 凝塊内に於ては液の流動はない。
- (3) 凝塊内に於ける菌体の密度分布は一様である。
- (4) 菌の酸素消費速度は溶存酸素濃度に無関係に一定である。

今、菌の凝塊内に任意の半径 r の球を考えると、単位時間にこの球内に拡散によって移動してくる酸素量は、Fick の法則により

$$w = 4\pi r^2 D \frac{dc}{dr} \quad \dots\dots\dots (1)$$

但し w : 酸素移動速度 [mol/min]

r : 凝塊内に於ける任意の球の半径 [cm]

D : 凝塊内に於ける酸素の拡散係数 [cm²/min]

c : 半径 r に於ける酸素濃度 [mol/cc]

また、半径 r の球内で単位時間に消費されるべき酸素量は

$$w' = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho_m Q \quad \dots\dots\dots (2)$$

但し w' : 酸素消費速度 [mol/min]

ρ_m : 凝塊内に於ける菌体密度 [mg/cm³]

Q : 菌の酸素消費速度 [mol/min·mg of mycelium]

定常状態に於て菌の酸素消費速度が抑制されないための条件は

$$w = w' \quad \dots\dots\dots (3)$$

そこで高橋等⁽⁸⁾によって典型的な球状凝塊を作ることが報告されている *Asp. niger* NRRL 337 につき、凝塊の大きさと菌の酸素消費速度の減少との関係を調べてみた。即ち第3表に示す組成の培養液に孢子懸濁液を接種して30°, 15時間振盪培養を行い、形成された凝塊を篩によって各種の大きさに分類する。大きさの揃った凝塊を新たな培養液中に分散させ Warburg 検圧計にて凝塊の酸素消費速度係数 [μl/min·mg of mycelium] を測定し、これと凝塊の大きさとの関係をグラフにしたのが第6図である。これによると直径0.3 mmの凝塊はすでに酸素消費を制限されており、菌糸間の物質移動

$$\therefore \frac{dc}{dr} = \frac{\rho_m Q}{3D} r \quad \dots\dots\dots (4)$$

凝塊の中心に於て酸素濃度がちょうど 0 になるとして (4) 式を積分すると,

$$\int_0^{c^*} dc = \int_0^R \frac{\rho_m Q}{3D} r dr \quad \dots\dots\dots (5)$$

$$\therefore c^* = \frac{\rho_m Q}{6D} R^2 \quad \dots\dots\dots (6)$$

但し c^* : 凝塊の表面に於ける酸素濃度 [mol/cc]

R : 凝塊の半径 [cm]

したがってもし ρ_m が一定ならば, 菌の酸素消費速度が制限されないためには, 培養液中の溶存酸素濃度を凝塊の大きさの 2 乗に比例して増してやらなければならないことになる. このことについては次報で更に詳細に検討を行う.

要 約

(1) *Asp. niger van Tieghem* strain No. 2 IAM 2093 のグルコン酸酸酵について酸酵の律速因子を検討した結果, 本培養系に於ては菌系間の物質移動抵抗が律速因子であるとの結論に達した.

(2) *Asp. niger* NRRL 337 につき, 形成された mold pellet の大きさと菌の酸素消費速度の減少との関係を調べたところ, 直径 0.3 mm 位の凝塊はすでに酸素消費が制限されていることが判明した.

(3) 凝塊が形成された場合の酸素供給について考察を行い, 菌の酸素消費速度が制限されないためには, ほぼ凝塊の大きさの 2 乗に比例して培養液中の酸素濃度を増してやらねばならぬことを示した.

終りに本実験の一部を担当した平山史郎氏, および菌株をいただいた東大応用微生物研究所第 3 研究室に深謝致します.

(本報告は昭和 34 年 4 月, 日本農芸化学会大会で講演したものである.)

- | | |
|---|--|
| (1) A. W. Hixon, E. L. Gaden, Jr. : <i>Ind. Eng. Chem.</i> , 42, 1792 (1950). | 501 (1958). |
| (2) W. H. Bartholomew, E. O. Karow, M. R. Sfat : <i>Ind. Eng. Chem.</i> , 42, 1801 (1950). | (9) P. R. Burkholder, E. W. Sinnott : <i>Am. J. Botany</i> , 32, 424 (1945). |
| (3) W. S. Wise : <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 5, 167 (1951). | (10) 高橋穰二, 山田浩一 : 本誌, 33, 707 (1959). |
| (4) 池野洋一, 酒本博之, 尾崎浅一郎 : 本誌, 29, 635 (1955). | (11) F. H. Deindoerfer, E. L. Gaden, Jr. : <i>Appl. Microbiol.</i> , 3, 253 (1955). |
| (5) 山田浩一, 高橋穰二, 吉村卓也, 矢野俊正 : 本誌, 30, 22 (1956). | (12) M. R. Brierley, R. Steel : <i>Appl. Microbiol.</i> , 7, 57 (1959). |
| (6) L. Camici, G. Sermonti, E. B. Chain : <i>Bull. World Hlth. Org.</i> , 6, 265 (1952). | (13) J. W. Foster : <i>Chemical Activities of Fungi</i> , p. 63, Academic Press Inc. (1949). |
| (7) W. M. Dion, A. Carilli, G. Sermonti, E. B. Chain : <i>Rendiconti Istituto Superiore di Sanità</i> , 17, 187 (1954). | (14) 大橋 実, 種村哲哉, 岡本恒雄, 檜山多可夫, 池田 稔 : イースト工業会技報, 7, 55 (1954). |
| (8) 高橋穰二, 山田浩一, 朝井勇宣 : 本誌, 32, | (15) 菊地敏典, 島田昌司, 田辺 脩 : 酸酵協会誌, 14, 68 (1956). |
| | (16) P. Shu : <i>J. Agr. Food Chem.</i> , 1, 1119 (1953). |