HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Paecilomyces varioti による非糖質炭素源からの L-リンゴ酸醗酵：（第１報）酢酸、プロピオン酸およびエタノールからのリンゴ酸生成能 |
| Author(s) | 高尾, 彰一; 谷田, 昌稔; 桑原, 秀明 |
| Citation | 北海道大学農学部邦文紀要, 11(1), 13-19 |
| Issue Date | 1978-07-28 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/11904 |
| Type | bulletin (article) |
| File Information | 11(1)_p13-19.pdf |

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# *Paecilomyces varioti* による非糖質炭素源からの L-リンゴ酸醗酵

## (第1報) 酢酸，プロピオン酸およびエタノールからのリンゴ酸生成能

高尾彰一・谷田昌稔・桑原秀明
(北海道大学農学部応用菌学教室)

(昭和52年7月11日受理)

# L-Malic Acid Fermentation of Non-sugar Carbon Sources by *Paecilomyces varioti*

## (I) Abilities to produce malic acid from acetate, propionate and ethanol

Shoichi TAKAO, Masatoshi TANIDA and Hideaki KUWABARA
(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

### 緒　言

微生物による炭化水素の代謝に関する基礎的研究は，かなり古くから行われてきたが，1960年代以降，石油鉱工業の著しい発展とも相まって，各種の炭化水素ならびにその関連化合物が，従来の糖質炭素源に代わり得る新しい醗酵原料として盛んに研究されるようになり，菌体蛋白をはじめ種々の有用な代謝産物が得られ，それらの中にはすでに工業的規模で生産されているものも少なくない。

このようないわゆる非糖質炭素源は，食飼料と競合しないという大きな利点を有することから，安価にかつ大量に供給されるものについては，今後も醗酵原料として益々重視されると考えられるが，これまで非糖質炭素源の利用に供されてきた微生物は，大部分が細菌または酵母であり，かびによる有用代謝産物についてはほとんど報告が見られない。

そこで著者らは，多数のかびを対象に各種の非糖質炭素源を用いた新しい醗酵を開発しようとし，当応用菌学教室保有のかび，30属230株を対象に，まず酢酸を炭素源としてそれらの代謝産物を検索したところ，*Paecilomyces varioti* 3株のみが多量のL-リンゴ酸を生成蓄積することを見いだした。

ところで，微生物によるリンゴ酸醗酵については，糖質炭素源についてもその報告は非常に少ない。すなわち片桐ら[1]，阿部ら[2]は *Aspergillus* 属かび，高尾ら[3]，立花ら[4]は担子菌類のリンゴ酸生成をそれぞれ報告しており，さらに佐々木と高尾[5,6]，高尾と堀田[7,8]は2種類の微生物を組合せた転換醗酵または混合培養によって，極めて高収率でリンゴ酸を得ている。一方，非糖質炭素源からの生成については，立花ら[9]が *Shizophyllum commune* を用い，エタノールから9日間の培養で60%の収率を，また古川ら[10]は，高尾らの転換醗酵法を応用し，n-パラフィンを初発基質とし，2種類の酵母を用いて培養14日後55%のリンゴ酸収率を得，佐藤ら[11]が同じくn-パラフィンから，酵母によって直接リンゴ酸を得たとの報告があるに過ぎない。

そこで今回は，*P. varioti* が酢酸から生成した不揮発酸をL-リンゴ酸と同定するとともに，酢酸以外の非糖質炭素源からのリンゴ酸生成能，および若干の生成条件についても検討を加えたので，それらの結果を報告する。

### 実験方法

#### 1. 供試菌株

酢酸からの代謝産物の検索には，北大応用菌学教室保存のかび30属230株 (Table 1) を用い，その後のリン

**Table 1.** List of Molds Tested.

| Name of Genera | No.* |
|---|---|
| *Absidia* | 1 |
| *Byssochlamys* | 10 |
| *Catenularia* | 1 |
| *Cephalosporium* | 1 |
| *Citromyces* | 1 |
| *Chaetomium* | 1 |
| *Cladosporium* | 2 |
| *Epicoccum* | 1 |
| *Fusarium* | 6 |
| *Gibberella* | 3 |
| *Gliocladium* | 7 |
| *Heterosporium* | 1 |
| *Hyalopus* | 1 |
| *Mortierella* | 1 |
| *Neurospora* | 2 |
| *Nigrospora* | 2 |
| *Oospora* | 1 |
| *Paecilomyces* | 4 |
| *Papularia* | 2 |
| *Penicillium* | 171 |
| *Pestalotiopsis* | 1 |
| *Scopulariopsis* | 1 |
| *Spicaria* | 1 |
| *Sporotrichum* | 1 |
| *Syncephalastrum* | 2 |
| *Tilachlidium* | 1 |
| *Tolura* | 1 |
| *Trichoderma* | 1 |
| *Trichothecium* | 1 |
| *Zygorhynchus* | 1 |

* Number of strain

ゴ酸生成試験には，230株から選択した *Paecilomyces varioti* AHU 8007, 9254, 9417の3株を使用した。

**2. 培地ならびに培養方法**

用いた培地の基本組成は $NH_4NO_3$ 0.05%，$KH_2PO_4$ 0.1%，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%，酵母エキス0.1%，$CaCO_3$ 2%で，炭素源が液体の場合はw/vで3%，有機酸のカルシウム塩を用いたときは遊離の酸として3%となるように添加した。この培地50 mℓを含む500 mℓ容振盪フラスコに，予めポテトグルコース寒天(PGA)で28°C，7日間前培養した菌体を接種し，28°Cで7日間振盪培養した。

**3. 分析方法**

培養液中の有機酸は，ペーパークロマトグラフィー，セルロース薄層クロマトグラフィーおよびBULENら[12]のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分析し，リンゴ酸の定量はGOODBANら[13]の比色法で行った。結晶として得た有機酸の融点はシリコンオイル中で測り，旋光度はHITACHI POB旋光度測定器を用い，KREBSら[14]の方法に準じて測定した。菌体重量は，培地に添加した $CaCO_3$ を2N-塩酸で溶解し，菌体を濾別洗滌し，乾燥後秤量して求めた。

## 実験結果および考察

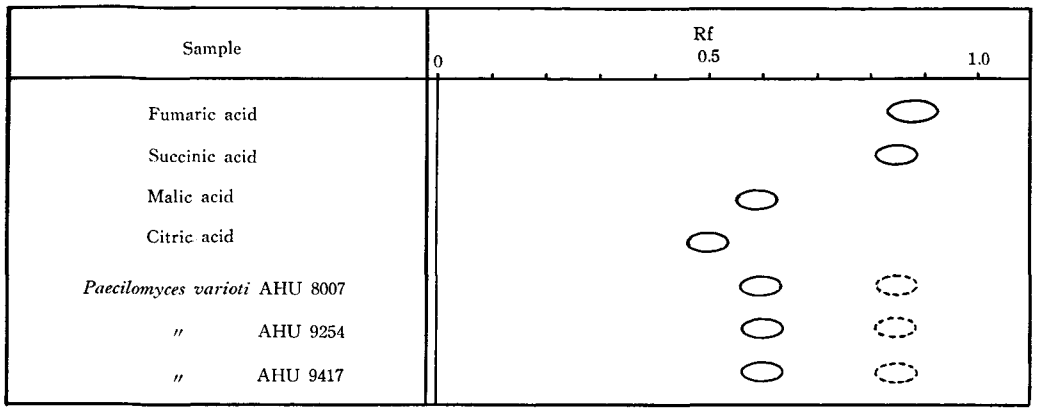
**1. 酢酸からの不揮発酸生成菌株の選択と生成酸の同定**

供試各菌株の培養液中の不揮発酸を検索した結果，10数株にクエン酸，リンゴ酸，コハク酸などに相当する有機酸が検出されたが，Fig. 1の薄層クロマトグラムに示したように，*P. varioti* AHU 8007, 9254, 9417の3株はリンゴ酸に相当する位置に濃いスポットを与え，コハク酸に相当するスポットも検出された。このようなクロマトグラムはペーパークロマトグラフィーでも認められたので，次にシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ったところ，Fig. 2に示したように，この分析でも多量のリンゴ酸の生成とコハク酸の副生が推測された。なおFig. 2は *P. varioti* AHU 9417の結果であるが，他の2株でも同様のクロマトグラムが得られた。そこで次にリンゴ酸の分離，同定を行った。すなわち，これら3株の培養液を硫酸酸性下で連続エーテル抽出したのち，酢酸エチルと石油エーテルでくり返し再結して得られた有機酸の結晶の融点および旋光度は，Table 2に示したようにL-リンゴ酸の文献値とほぼ一致し，他の2株の測定結果もこれと大差なく，従って先の薄層クロマトグラフィー，溶出クロマトグラフィーの結果ともあわせて，*P. varioti* 3株の生成する主要な有機酸はL-リンゴ酸であると同定した。

そこでこれら3菌株の培養7日後の液中のリンゴ酸量を測定し，添加した酢酸に対するリンゴ酸収率を求めたところ，*P. varioti* 8007株が27.5%，9254株は37.7%，9417株は48.0%と非常に高く，これら3菌株は新しい酢酸からのリンゴ酸醗酵を確立し得る極めて有望なかびであると認められた。

**2. *P. varioti* 3株による各種炭素源からのリンゴ酸生成能**

*P. varioti* 8007, 9254, 9417の3株は，酢酸を単一炭素源として多量のL-リンゴ酸を生成することが明らか




Solvent system (ethyl acetate : acetic acid : water=3 : 1 : 1)

**Fig. 1.** Thin layer chromatogram of organic acids.

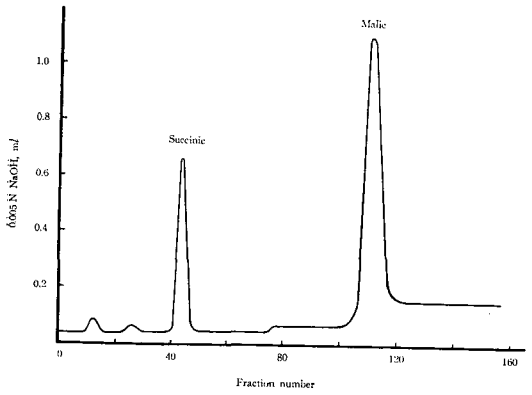



**Fig. 2.** Chromatogram of organic acids produced by *Paecilomyces varioti* AHU 9417.

となったが，酢酸からのリンゴ酸醗酵は全く知られておらず，それ以外の非糖質炭素源についても，先に述べたように多量のリンゴ酸生成はほとんど報告されていない。そこで，これら *P. varioti* 3株について Table 3 に示した9種類の非糖質炭素源およびグルコース（各3%）からのリンゴ酸生成能を調べた。培養条件は先の酢酸の場合と同じである。7日間振盪培養の結果，これらの菌株はプロピオン酸，エタノール，グリセロールからも多量のリンゴ酸を生成し，特に9417株はプロピオン酸から36.6%，8007株と9254株はエタノールからそれぞれ30.1%，36.9%という高い収率を示し，これらの値は，糖質炭素源として一般に用いられているグルコースからの収率よりもむしろ高いものであった。

### 3. 接種法の検討

これまでは PGA 斜面で前培養した試験管1本分の菌体を本培養の接種源としてきたが，生育の旺盛な菌体を接種するならば，リンゴ酸生成がより早まるのではないかと考え，9417株による酢酸からのリンゴ酸生成を対象に，液体振盪培養からの接種を試みた。

用いた培地は，ポテトグルコース培地（PG 培地）と酵母エキス-麦芽エキス-ペプトン培地（YMP 培地）で，PG 培地は馬鈴薯煮汁にグルコース1%と酵母エキス0.1%を加えたもの，YMP 培地はグルコース1%，酵母エキス0.3%，麦芽エキス0.3%，ペプトン0.5%の組成をもつ培地である。前培養は，この培地50 mℓ を含む

**Table 2.** Melting point and optical rotation of malic acid produced by *Paecilomyces varioti* AHU 9417.

| Malic acid preparation | m.p. °C | Final conc. % | Rotation |
|---|---|---|---|
| *P. varioti* AHU 9417 | 99～100 | 0.20 | $[\alpha]_D^{22}=+1356$ |
| L-Malic acid | 100 | 0.25 | $[\alpha]_D^{17}=+1335$* |
| | | 0.125 | $[\alpha]_D^{17}=+1407$* |

* KREBS and EGGLESTON (1943).

**Table 3.** L-Malic acid production from various carbon sources by 3 strains of *Paecilomyces varioti* after 7 days.

| Carbon source | *P. varioti*, AHU 8007 | 9254 | 9417 |
|---|---|---|---|
| | Malic acid yield, % | | |
| Formic acid | 0 | 0 | 0 |
| Lactic acid | 0 | 0 | 0 |
| Propionic acid | 1.3 | 7.0 | 36.6 |
| Methanol | 0 | 0 | 0 |
| Ethanol | 30.1 | 36.9 | 2.4 |
| Ethylene glycol | 0 | 0 | 0 |
| Propylene glycol | 0 | 0 | 0 |
| Glycerol | 14.9 | 16.4 | 23.4 |
| n-Paraffin | 0 | 0 | 0 |
| Glucose | 29.6 | 25.5 | 32.3 |

500 mℓ容振盪フラスコに PGA 上の菌体を 2 cm² 接種し，28°C で2日間振盪して行ない，その5 mℓまたは10 mℓを本培養培地に接種した。なおその際，前培養液中のグルコースはほぼ完全に消費されており，その残量は0.2 mg/mℓ程度であった。またこの液中にはリンゴ酸は全く認められなかった。

結果は Fig. 3 に要約して示したが，前培養を液体培養にかえることにより，PG 培地，YMP 培地とも培養3日後にリンゴ酸蓄積量はほぼ最大に達し，PGA からの接種にくらべ，リンゴ酸生成が著しく早まることが明らかとなった。PG 培地，YMP 培地からの接種量についてみると，いずれも5 mℓ接種の方が10 mℓ接種より，リンゴ酸蓄積量が多く，また接種量に対する増殖菌体量も多かった。

以上の結果から，リンゴ酸の最大蓄積量は PGA 5日後をやや下回るが，生成時期が著しく早まる液体振盪培養を前培養とするのが好適と判断し，また YMP, PG 両培地間ではリンゴ酸生成量にほとんど差が見られなかったが，YMP 培地で単位菌体量当りの生成量が多く，かつ培地組成も一定していることから，以後の実験の前培養培地として YMP 培地を選び，その5 mℓを接種することとした。

**4. リンゴ酸醗酵の経時変化とグルコースの添加効果**

*P. varioti* の3株は，Table 2 に示したように酢酸，プロピオン酸，エタノールなどから多量のリンゴ酸を生

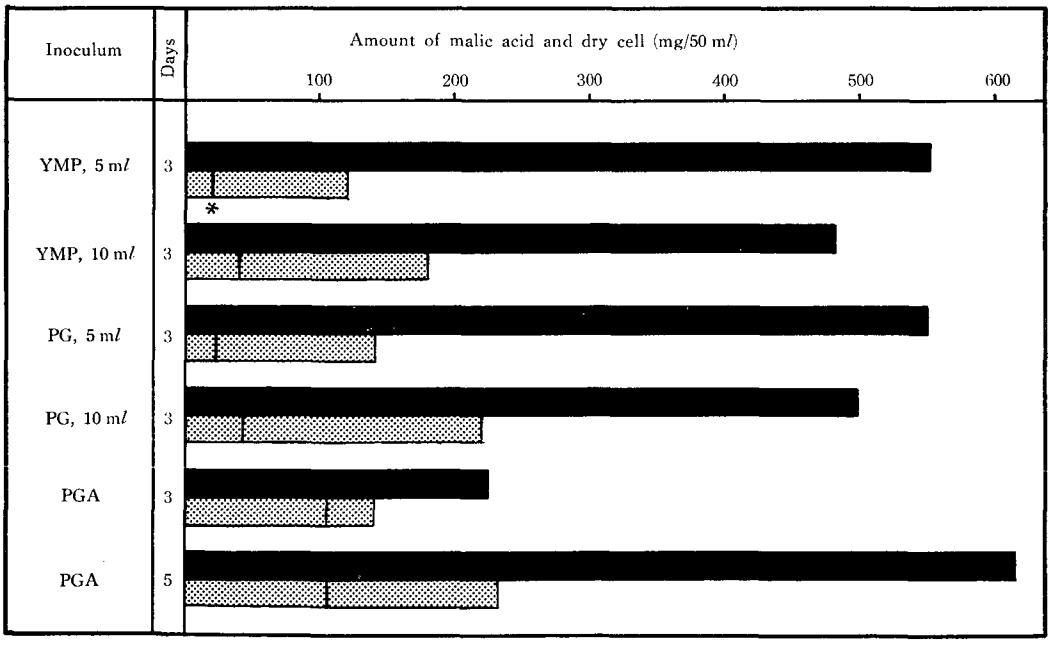



**Fig. 3.** Effect of inoculum on malic acid production by *Paecilomyces varioti* AHU 9417.

malic acid, dry cell weight

* vertical line shows inoculum size

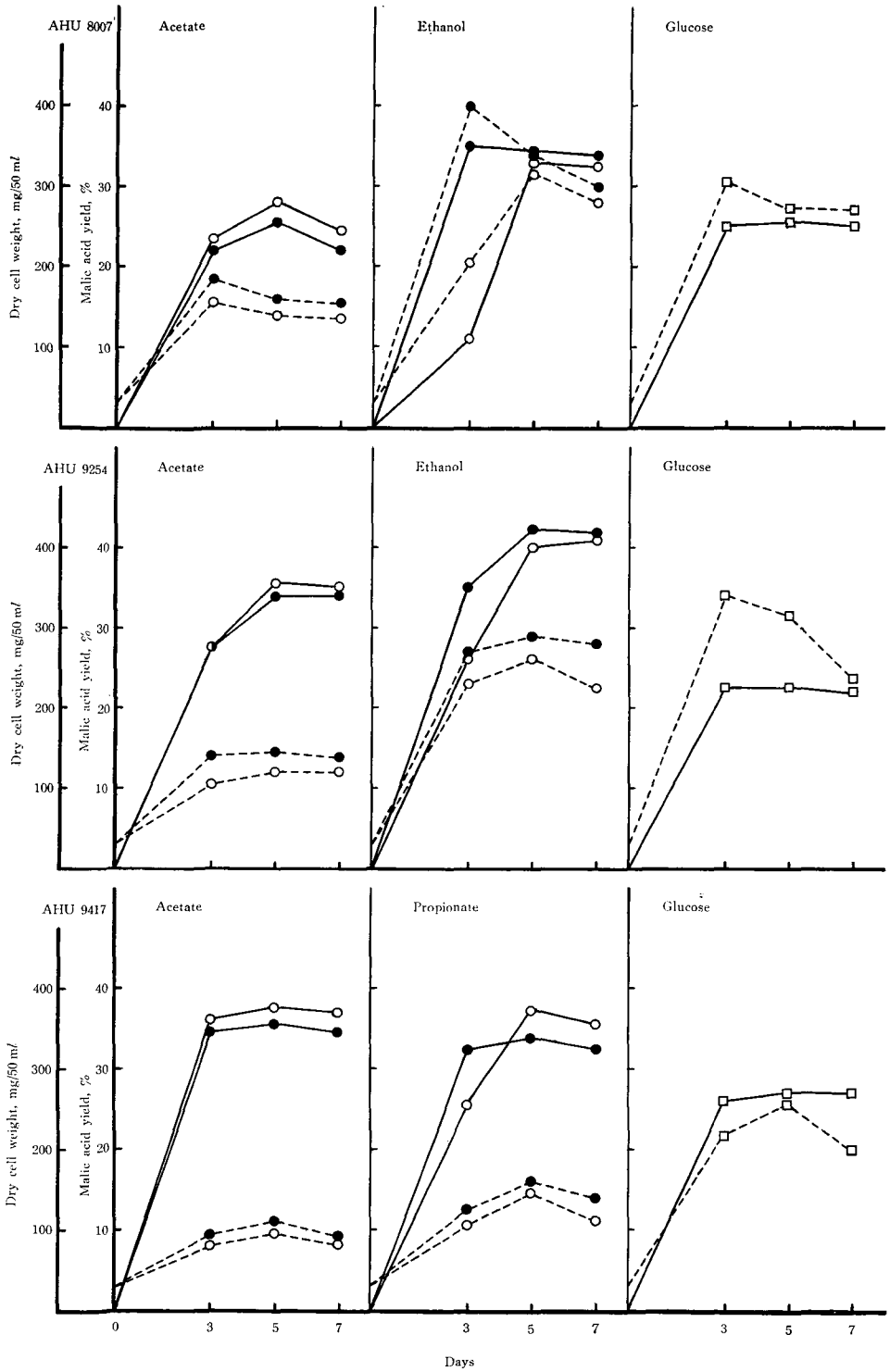



**Fig. 4.** Time course of malic acid fermentation and effect of glucose addition.
○: glucose not added, ●: glucose 0.3% added
——: malic acid yield, ------: dry cell weight

成したが，ここではそれらの炭素源について，YMP培地から接種した場合のリンゴ酸醗酵の経時変化を調べた。また炭素源がいずれも通常資化されにくい物質であるため，菌の増殖が遅れ，ひいてはリンゴ酸生成も遅くなる可能性のあることを考慮して，グルコース0.3%を同時に加えた培地でも培養し，その効果を調べた。

結果は一括してFig. 4に示した。いずれの菌株，炭素源についても最大収率は培養3ないし5日後に得られ，それらはTable 2に示した培養7日後の値に匹敵するもので，しかも対照として用いたグルコースからの収率を上回るものであった。一方，グルコースの添加効果をみると，無添加にくらべて菌体増殖はどの場合にもいくぶん促進されたが，リンゴ酸生成に対する効果は各炭素源につき一様ではなかった。すなわち，酢酸培地にグルコースを添加した場合は，3菌株とも無添加での収率をやや下回る傾向がみられたが，プロピオン酸，エタノールを炭素源とした場合には，リンゴ酸生成が早まり，特に8007株のエタノール培養で著しい効果が認められた。また，グルコース添加の有無にかかわらず酢酸，プロピオン酸両培地での菌体量はグルコース培地に比べてかなり低かったが，エタノールを炭素源とした時の菌体量は，グルコースの場合と同等またはそれ以上であり，炭素源によってリンゴ酸量と菌体量との関係が一定ではないことが判った。

以上のように，*P. varioti* の3株は酢酸，エタノール，プロピオン酸などから多量のリンゴ酸を生成することが認められたが，さきにも述べたように，従来，酢酸，プロピオン酸からのリンゴ酸生成は全く知られておらず，とくにプロピオン酸は，その塩類が防黴剤として用いられているほどで，微生物の有用代謝産物としては，著者ら[15]が最近報告した細菌によるピルビン酸生成があるのみである。さらに，エタノールについても3ないし5日という短期間の培養で，これ程多量のリンゴ酸が生成された例は見られない。今後，培養条件などの改善によって収率がさらに高まることも予想され，従って，これらの菌株を醗酵法による非糖質炭素源からのリンゴ酸生産に利用し得る可能性は極めて大きいと考えられる。

## 謝　　辞

本研究を行うに当り協力をいただいた門修，上口尚史の両君に感謝の意を表する。

## 要　　約

1. かびによる非糖質炭素源の利用を目的に，30属230株のかびを酢酸含有培地で振盪培養し，その代謝産物を検索した結果，*Paecilomyces varioti* AHU 8007, 9254および9417の3株が多量のL-リンゴ酸を生成し，コハク酸を副生することを見出した。

2. これらの3株は28°C，7日間の振盪培養で，加えた酢酸に対しそれぞれ27.5, 37.7および48%の収率でリンゴ酸を生成したが，プロピオン酸，エタノール，グリセロール，グルコースからも生成し，とくに9417株はプロピオン酸から36.6%，8007株と9254株はエタノールからそれぞれ30.1%, 36.9%の高い収率を示し，これらは対照として用いたグルコースからの収率よりも高かった。

3. 前培養に寒天斜面培養を用いるよりも，液体振盪培養を用いた方がリンゴ酸醗酵の速度が早かった。

4. いずれの菌株，基質についても，リンゴ酸収率は培養3ないし5日後に最大に達し，さらに，グルコースを培地に0.3%添加することによって，エタノールおよびプロピオン酸からのリンゴ酸生成が早まった。

## 引 用 文 献

1. 片桐英郎・立花　精：麹菌の変異現象 (IV) 変異株によるリンゴ酸醗酵，ビタミン，**6**：674-675. 1953
2. 阿部重雄・斎藤　健・高山健一郎：L-リンゴ酸醗酵に関する研究（第2報）培養条件についての検討，農化，**34**：66-70. 1960
3. SASAKI, Y., and TAKAO, S.: Organic acid production by basidiomycetes. III. Culture conditions for L-malic acid production, *Appl. Microbiol.*, **15**: 373-377. 1967
4. 立花　精：炭酸固定発酵に関する研究（第2報）*Schizophyllum commune* によるL-malic acid 醗酵，醗工，**45**：353-357. 1967
5. 佐々木酉二・高尾彰一：*Rhizopus* 属と酵母の連関作用によるフマル酸醗酵からL-リンゴ酸への転換醗酵（第1報）酵母によるフマル酸塩からのL-リンゴ酸への転換，農化，**39**：436-441. 1965
6. ――――・――――：*Rhizopus* 属と酵母の連関作用によるフマル酸醗酵からL-リンゴ酸への転換醗酵（第2報）静置および振盪培養における *Rhizopus chinensis* と *Pichia membranaefasiens* との組合せ，農化，**40**：190-195. 1966
7. TAKAO, S., and HOTTA, K.: Conversion of fumalic acid fermentation to L-malic acid fermentation by the association of *Rhizopus arrhizus* and *Proteus vulgaris*, *J. Ferment. Technol.*, **54**: 197-204. 1976

8. TAKAO, S., and HOTTA, K.: L-malic acid fermentation by mixed culture of *Rhizopus arrhizus* and *Proteus vulgaris*, *Agric. Biol. Chem.*, **41**: 945-950. 1977
9. TACHIBANA, S., and MURAKAMI, T.: L-malate production from ethanol and calcium carbonate by *Schizophyllum commune*, *J. Ferment. Technol.*, **51**: 858-864. 1973
10. FURUKAWA, T., NAKAHARA, T., and YAMADA, K.: Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. Part XX. Conversion of fumalic acid to L-malic acid by the association of two kind of yeasts, *Agric. Biol. Chem.*, **34**: 1833-1838. 1970
11. SATO, S., NAKAHARA, T., and MINODA, Y.: L-malic acid production from n-paraffins by *Candida brumptii* IFO-0731, *Agric. Biol. Chem.*, **41**: 967-973. 1977
12. BULEN, W. A., VARNER, J. E., and BURRELL, R. C.: Separation of organic acids from plant tissues. Chromatografic technique, *Anal. Chem.*, **24**: 187-190. 1952
13. GOODBAN, A. E., and STARK, J. B.: Rapid method for determination of malic acid, *Anal. Chem.*, **29**: 283-287. 1957
14. KREBS, H. A., and EGGLESTON, L. V.: The effect of citrate on the rotation of the molybdate complexes of malate, citramalate and isocitrate, *Biochem. J.*, **37**: 334-338. 1943
15. 高尾彰一・谷田昌稔： *Corynebacterium* sp. による 1, 2-プロピレングリコールからのピルビン酸生成, 農化, **51**: 239-244. 1977

**Summary**

During the study on the utilization of non-sugar carbon sources by molds, only 3 strains of *Paecilomyces varioti*, AHU 8007, 9254 and 9417 among 230 strains of molds belonging to 30 genera, were found to produce L-malic acid in yields as high as 27.5, 37.7 and 48.0% respectively, from 3% acetic acid (added as Ca-acetate) after 7 days shaking culture. Every strain was recognized to have an ability to produce malic acid from propionate, ethanol, glycerol and glucose as well as acetate. In particular, AHU 9417 produced the acid in high yield of 36.6% from propionate, AHU 9254, 36.9% from ethanol and AHU 8007, 30.1% from ethanol after 7 days (every source, 3%). These yields were higher than those obtained from glucose by corresponding strains. As an inoculum for malic acid fermentation, shaking culture was found to be more favorable than slant culture in regard to the fermentation period necessary to reach a maximum yield. When the time course of malic acid production was surveyed, the maximum yields of the acid from every carbon source by 3 strains were secured after 3 to 5 days. Addition of glucose (0.3%) to ethanol- or propionate-containing medium hastened the acid production, but such an effect was not observed in acetate medium.