

甜菜生汁および廃糖蜜模擬培地での *Aspergillus terreus* K26 によるイタコン 酸醸酵における pH の影響

中川允利¹・八城 譲¹・石橋憲一¹・弘中和憲¹

(受理: 1991年11月30日)

Effect of pH on itaconic acid fermentation with modeled beet
thick juice and molasses by *Aspergillus terreus* k26

Mitsutoshi NAKAGAWA, Yuzuru YASHIRO, Ken-ichi ISHIBASHI and
Kazunori HIRONAKA

摘 要

基本培地 (I) に不揮発酸 (II) および揮発酸 (III) を添加して調製した甜菜生汁模擬 TJ (I + II + III) および廃糖蜜模擬 HB (I または I + II) 培地を用い、pH 非制御および制御下でイタコン酸醸酵を行い、次の結果を得た。

1) グルコース模擬培地は緩衝作用が小さいため、初発 pH は無調製でもイタコン酸醸酵による酸の蓄積で培養液の pH は 2 前後の値になる。

pH 制御下の醸酵では、pH 3 の時にイタコン酸蓄積速度 V_i (g/dl/day) 0.97 と酸収率 Y_i (%) 45.7 のピーク値を得た。

2) 甜菜生汁模擬培地 TJ (I + II + III) では、 $pH < 3.5$ および $pH > 8.0$ では胞子が発芽しなかった。

初発 pH 5.0 で V_i 0.82 および Y_i 39.6 を得、pH 4.0 制御下で V_i 0.20 および Y_i 18.2 となった。揮発酸存在下では菌の増殖のために pH を高い値にシフトさせることが必要になった。

3) 廃糖蜜基本 HB (I) および不揮発酸添加培地 HB (I + II) では pH 非制御下で 3 付近にそれぞれ V_i 0.84 および 0.52, Y_i 43.8 および 50.4 が制御下では V_i 0.48 および 0.50, Y_i 26.7 および 36.7 であった。しかし、pH 4.0 の御制御下ではイタコン酸はほとんど蓄積しなかった。

キーワード : イタコン酸醸酵, 甜菜生汁模擬, 甜菜廃糖蜜模擬, 初発 pH, pH 制御

¹ 帯広畜産大学生物資源科学科

¹ Department of Bioresource Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Hokkaido 080, Japan

緒 言

著者らは、多量安価な供給が期待されているイタコン酸を甜菜生汁および廃糖蜜を原料とする *Aspergillus terreus* K26によって製造する研究を行ってきた。

その結果、原料の前処理方法¹⁾とその醗酵成績との関係²⁾を明らかにし、培地中に許容される金属イオンおよび有機酸量³⁾なども明らかにした。

本報告では、イタコン酸醗酵における酸の蓄積およ

び菌体増殖に重大な影響を及ぼす pH を、比較的夾雑物の多い甜菜生汁および廃糖蜜の模擬培地で制御することにより、醗酵成績と関連づけて検討した。

実験方法

使用菌株 *Aspergillus terreus* K26を用いた。

培地 甜菜生汁および廃糖蜜培地は、金属イオン、リンおよび窒素源から成る基本培地 (I) に揮発酸 (II) および揮発酸 (III) を添加して調製され、組成を表 1 に示した。

Table 1. Amounts of some metal ions, P, N and organic acids (ppm) in the modeled media containing 10% glucose

Constituent		Glucose	Thick beet juice	HB molasses
Basal(I)	K	110	1080	5690
	Na	29.0	226	2290
	Ca	36.0	36.0	64.9
	Mg	205	205	205
	Fe	1.10	1.10	3.01
	Mn	0.19	0.30	0.62
	Zn	0.29	0.66	4.00
	Cu	0.05	0.05	0.05
	P	43.0	43.0	43.0
	N	520	637	3130
Non - volatile Acids (II)	Citric	-	36.3	134
	Malic	-	103	274
	Succinic	-	36.6	619
	Lactic	-	1050	9870
	PCA	-	1040	4660
Volatile Acids (III)	Formic	-	57.3	463
	Acetic	-	106	1360
	Propionic	-	ND	65.6
	Isobutyric	-	77.5	359
	Butyric	-	29.1	110

The culture medium was composed of basal medium (I) with or without non - volatile (II) and / or volatile (III) acids. Metal ions, P and N were added as salts such as K_2SO_4 , Na_2SO_4 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $NH_4H_2PO_4$ and NH_4NO_3 . Excess amount of N in T.J, HB compensated by betaine and PCA in (II) and betaine in (III).

*: Pyrrolidone-2-carboxylic acid.

ただし、窒素源として520ppm以上存在する甜菜生汁および廃糖蜜ではPCAに由来する窒素分を差し引いた残りをベタインで補添した。

培養 グルコース模擬培地100mlに麦芽寒天培地に着生した *A. terreus* K26の胞子を接種し、35℃、120rpmの往復振盪機で2日間培養した菌糸を、前記模擬培地1.5ℓを含むミニジャー（いわしや製）に移殖し、35℃、pH非制御下および制御下で通気攪拌培養（通気量0.25vvm及び回転数380rpm）を行った。

pHの調製は1N硫酸および1Nアンモニアで行った。

分析 菌体を濾過し、十分水洗後80℃で1夜乾燥し、乾燥菌体重量を求めた。イタコン酸は培養前後の臭素吸収値⁴⁾の増加量より求めた。この値は、サリチル酸を内部標準とするガスクロマトグラフィ⁵⁾から求めた値ともほぼ合致した。

金属元素は湿式灰化後原子吸光法¹⁾、乳酸およびコハク酸はガスクロマトグラフィ⁶⁾で、その他の有機酸は高速液体クロマトグラフィ¹⁾で定量した。

試薬は、和光純薬工業㈱の特級を使用した。

測定値は、二連で行った結果を平均して示した。

結果と考察

培養経過 グルコース模擬（Gと略す）培地によるイタコン酸醱酵の結果を図1に示した。糖の消費、菌体の増殖およびpHの低下が生じ、イタコン酸の蓄積は1日遅れて始まる典型的な経過が示されている。培地pHは対数増殖期間中期よりほぼ2前後になり以後ほぼ一定値となる。

pHと醱酵成績

グルコース模擬培地 夾雑物が少ない粗糖培地⁶⁾と同様にG培地で、初発pHは2.5～6の範囲で醱酵成績に影響を及ぼさない。

しかし、図2よりpH制御下ではpH3がイタコン酸蓄積速度 V_i (g/dl/day) (V_i と略す) 0.97およびイタコン酸収率 (Y_i と略す) 45.7であることがわかり、*Rychteria M.* のpH3.1が最適とする報告⁷⁾とも合致した。

甜菜生汁模擬培地 T J (I+II+III) は揮発酸および揮発酸を含有していることからイタコン酸醱酵が難しい。図3からpH3.5以下およびpH8以上では胞子の発芽が見られなかった。

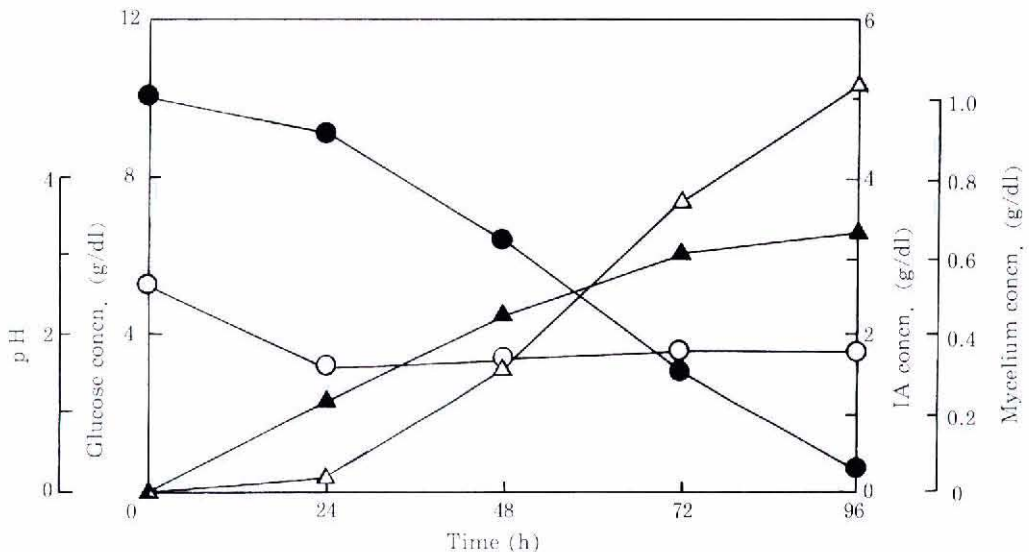


Fig. 1. Course of itaconic acid fermentation with modeled glucose medium under non-controlled pH.
○ : pH, ● : Glucose, △ : Itaconic acid and ▲ : Mycelium concn.

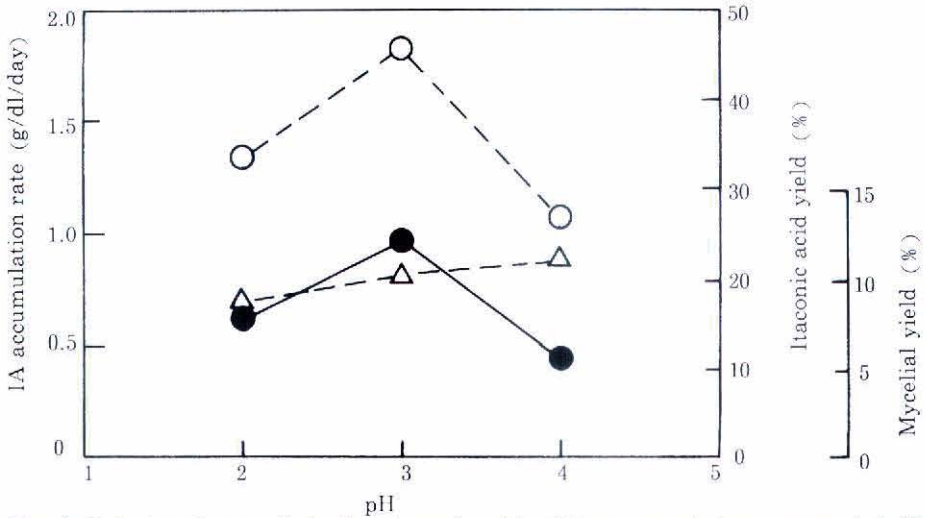


Fig. 2. Relation of controlled pH to itaconic acid (IA) accumulation rate, and yields of IA and mycelia.
 ● ; IA accumulation rate, ○ ; IA and △ ; mycelial yield.

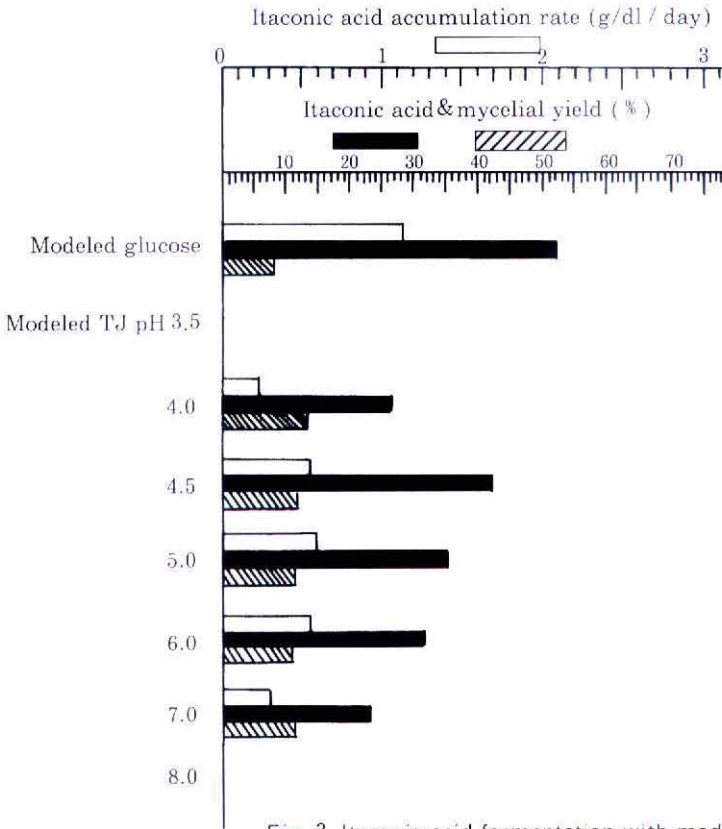


Fig. 3. Itaconic acid fermentation with modeled beet thick juice, TJ (I+II+III) at various initial pH values.

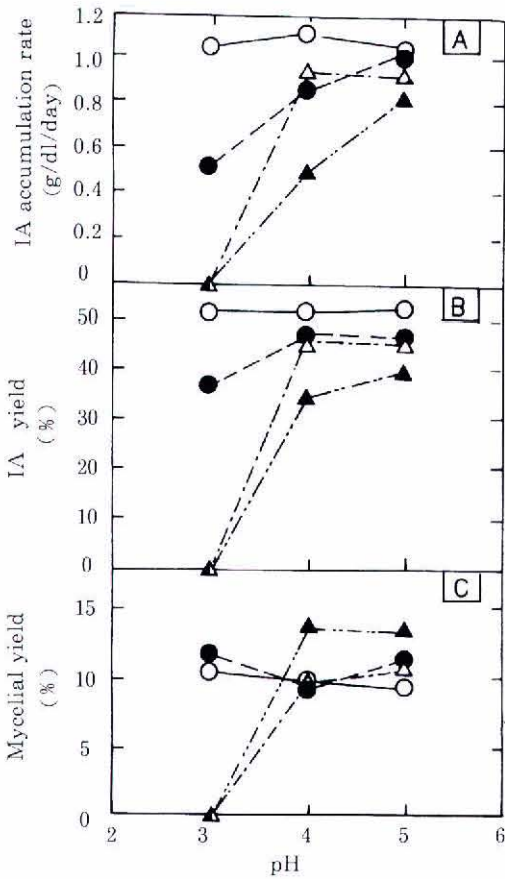


Fig. 4. Relation of initial pH to itaconic acid accumulation rate (A), itaconic acid yield (B) and mycelial yield (C) during the fermentation with TJ basal medium (I) with or without non-volatile (II) and /or volatile (III) acids.
 ○ ; TJ (I), ● ; TJ (I+II), △ TJ (I+III), and ▲ TJ (I+II+III).

初発 pH の効果を図 4 A, B および C に示した。
 TJ (I) では pH 3 ~ 5 は, Vi, Yi および菌体収率 (Y_m と略す) に殆ど影響を及ぼさなかったが, 不揮発酸 (II) および揮発酸 (III) を添加することによって影響を及ぼした。

TJ (I+II+III) に関しては, 図 3 をも参照し, pH 5 付近に適値があり, Vi 0.82 および 39.6 を得た。
 pH 制御の効果を図 5 A, B および C に示した。

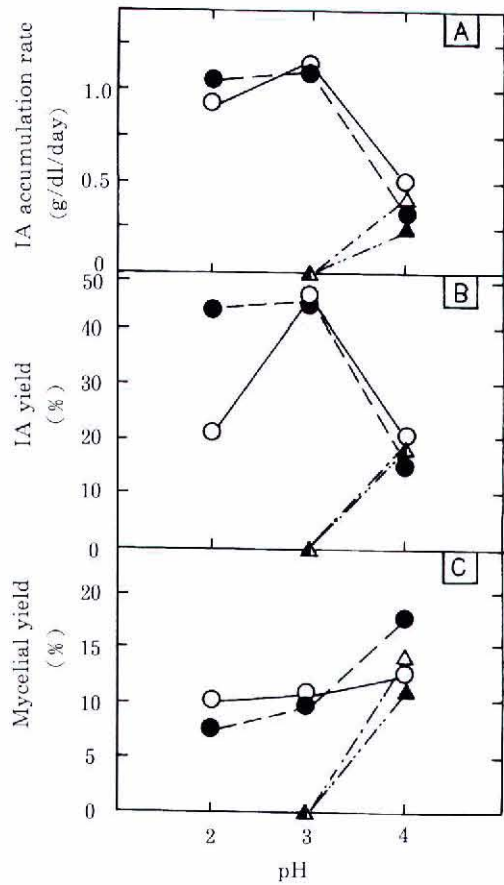


Fig. 5. Relation of controlled pH to itaconic acid accumulation rate (A), itaconic acid yield (B) and mycelial yield (C) during the fermentation with TJ basal medium (I) with or without non-volatile (II) and/or volatile (III) acids.
 ○ ; TJ (I), ● ; TJ (I+II), △ TJ (I+III), and ▲ TJ (I+II+III).

TJ (I) では, G 培地と同様 pH 3 が Vi および Yi に対し最適となった。

TJ (I+II+III) では pH 3 で菌糸が生育せず, 菌糸の生育を伴う pH 4 に適値が存し, Vi 0.20 および Yi 18.2 を得た。

図 6 A には TJ (I+III) 培地を無菌状態で通気攪拌したとき pH 3 ~ 5 で揮発酸の濃度低下を示したもので, その割合は 15 ~ 20% になった。

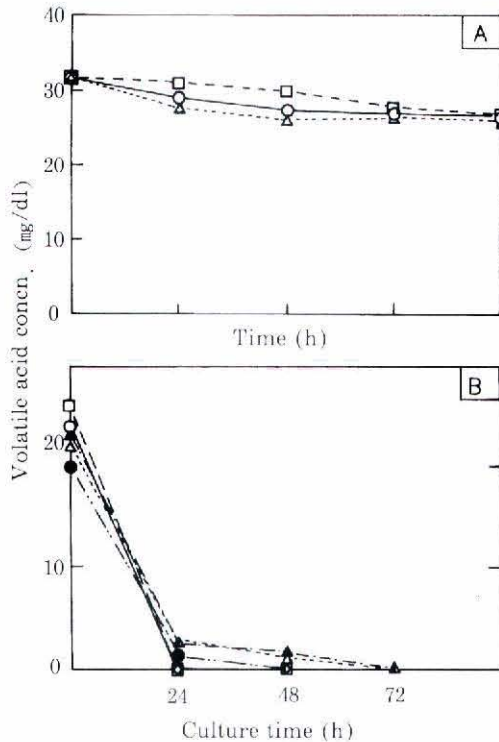


Fig. 6. Changes of total volatile acids (acetic, isobutyric, formic, butyric and propionic) concentration without fermentation (A) and during fermentation with TJ basal medium with volatile acids (B) under controlled and not controlled pH. Initial pH: □; 5.0, ○; 4.0 and △; 3.0. Controlled pH: ○; 4.0 and ▲; 3.0.

図6 Bには培養時の揮発酸の消長を示した。

廃糖蜜模擬培地 初発pHのHB (I) およびHB (I+II) のViおよびYiに対する効果は、図7 AおよびBよりpH 3付近に適値があり、それぞれ、Viでは0.84および0.52, Yiでは43.8および50.4となった。

なお、菌体収率のピークはいずれの培地ともpH 3であった。

pH制御の効果を図8 A, BおよびCに示した。

HB (I) およびHB (I+II) とともにViおよびYiに関しpH 3にピークが存在し、それぞれ、Vi 0.48および0.50, Yi 26.7および36.7を得た。菌体収率に関しHB (I+II) ではpH 4でYmが30%と高く、イタコン酸の蓄積も殆ど見られなかった。

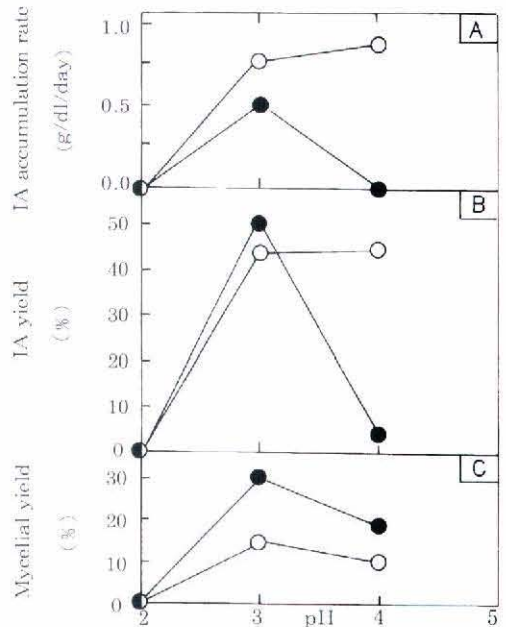


Fig. 7. Relation of initial pH to itaconic acid accumulation rate (A), itaconic acid yield (B) and mycelial yield (C) during the fermentation with HB basal medium (I) and with nonvolatile acids (I+II). ○; HB (I), and ●; HB (I+II)

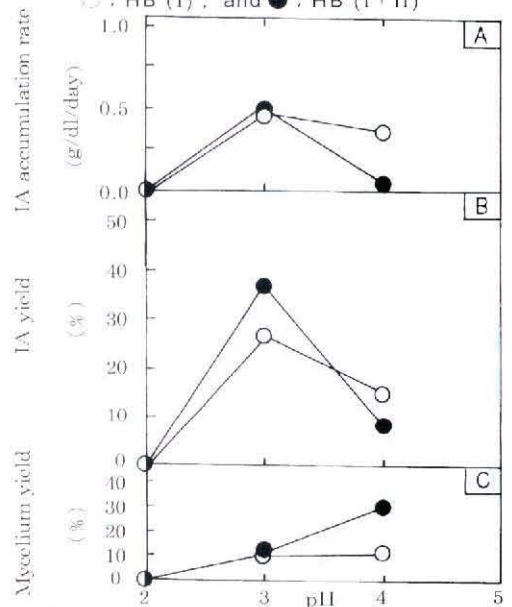


Fig. 8. Relation of controlled pH to itaconic acid accumulation rate (A), itaconic acid yield (B) and mycelial yield (C) during the fermentation with HB basal medium (I) and with nonvolatile acids (I+II). ○; HB (I), and ●; HB (I+II)

以上の知見より、比較的夾雑物の少ないグルコース模倣培地ではイタコン酸蓄積速度は pH 3 が適していたが、甜菜生汁模倣のように不揮発酸および揮発酸を含む培地では菌の増殖をも考慮し、初発あるいは制御 pH を決めることが必要である。

謝 辞

実験の一部を手伝っていただいた、源 政人、今村 明広および大原弘康の諸君に感謝致します。

文 献

- 1) 中川 允利, 上家 一則, 石橋 憲一, 弘中和憲: 帯大研報 I, **17**(1), 7-12 (1990).
- 2) 中川 允利, 石橋 憲一, 弘中和憲: 帯大研報 I, **17**(2), 123-127 (1991).
- 3) 中川 允利, 石橋 憲一, 弘中和憲: 帯大研報 I, **17**(2), 129-133 (1991).
- 4) 小林 達吉, 田淵 武上: " 微の利用工業 (微生物工学講座 5) " 共立 (1956) p. 72.
- 5) TABUCHI, T., SERIZAWA, N.: Agr. Biol. Chem., **39**, 1049-1054 (1975).
- 6) 中川 允利, 中村 以正, 小林 達吉: 醸工, **53**, 294-302 (1975).
- 5) RYCHTETRA, M., JOHN WASE, D.A.: Chem. Tech. Biotechnol., **31**, 509-521 (1981).

Summary

This paper describes itaconic acid fermentation with modeled beet thick juice (TJ) and molasses (HB I and I + II) media by *Aspergillus terreus* k26 under non-controlled and controlled pH conditions.

The results are as follows:

- 1) For modeled glucose medium, initial pH was not significant because upon fermentation, the pH decreased to about 2.0, owing to the medium's low buffer capacity. However, the itaconic acid accumulation rate V_i (g/dl/day) 0.97 and yield Y_i (%) 45.7 reached the peaks at pH 3.0, under controlled condition.
- 2) In the case of modeled thick juice TJ contain-

ing basal medium (I) with non-volatile (II) and volatile (III) acids, under non-controlled condition, at pH < 3.5 and pH > 8.0, germination did not occur.

However, at pH 5.0, mycelial growth was favored, resulting in the rate V_i 0.82 and yield Y_i 39.6.

Under controlled condition at pH 4.0, the fermentation results showed peak values of V_i 0.20 and Y_i 18.2.

- 3) In both modeled HB basal (I) and with non-volatile acids (I + II), the respective rate (V_i) and yield (Y_i) peak values: V_i (0.84 and 0.52) and Y_i (43.8 and 50.4) under non-controlled pH condition; V_i (0.48 and 0.50) and Y_i (26.7 and 36.7) under controlled pH condition, were attained at pH 3.

However, HB (I + II) medium, did not produce any itaconic acid even with a higher mycelial yield at pH 4.0.