

前処理した甜菜生汁および廃糖蜜の *Aspergillus terreus* K 26 によるイタコン酸醗酵

中川 允利¹・石橋 憲一¹・弘中 和憲¹

(受理：1990年11月30日)

Itaconic acid fermentation with pretreated beet thick juice
and molasses by *Aspergillus terreus* K 26

Mitsutoshi NAKAGAWA¹, Ken-ichi ISHIBASHI¹ and Kazunori HIRONAKA¹

摘 要

前処理した甜菜シックジュース、廃糖蜜 HA および HB のイタコン酸醗酵につき検討した。

- (1) シックジュースの未処理では、イタコン酸蓄積速度 (V_i) が 0.35 (g/dl/day) および対消費糖イタコン酸収率 (Y_i) が 34% であった。カチオン交換処理は効果がなく、エーテル抽出処理では V_i が 0.8 に向上した。カチオン交換・エーテル抽出あるいは電気透析処理では、コントロールとしてのグルコース模擬培地の醗酵成績 (V_i 1.25 および Y_i 55) にまで回復した。
- (2) HA 糖蜜の未処理では、速度に若干の低下が認められたが、カチオン交換によりコントロールの値にまで回復した。
- (3) HB 糖蜜の未処理およびカチオン交換処理で菌の生育は認められなかった。エーテル抽出処理のみでは V_i 0.32 および Y_i 19 に留まったが、カチオン交換・エーテル抽出あるいは電気透析処理によりコントロールの値にほぼ匹敵した。

キーワード：イタコン酸醗酵，前処理，甜菜生汁，甜菜廃糖蜜，メチレンコハク酸

イタコン酸のごとき合成樹脂の原料として多量安価な供給が要求されている酸を醗酵法によって製造する場合、甜菜廃糖蜜のような如何に安価な原料を使用できるかが重要な鍵となる。前報¹⁾において、甜菜生汁および廃糖蜜を前処理することによる、イタコン酸醗酵の原料化のための研究を行なった。

本報では、前報¹⁾の処理液を *Aspergillus terreus* K

26 で振盪培養することにより、前処理の効果をイタコン酸蓄積速度 (%/dl/day) および対消費糖イタコン酸収率 (%) などの醗酵成績から比較検討することを可能にした。

実 験 方 法

使用菌株 *Aspergillus terreus* K 26 を用いた。

¹⁾ 帯広畜産大学生物資源化学科

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

Table 1. Medium composition with various carbon sources (g/dl).

Constituent	Glucose-CSL	Modeled glucose*	TJ	HA	HB
Carbon source	10	10	15.9	17.2	17.8
Corn steep liquor	0.2	—	—	—	—
NH ₄ HO ₃	0.3	0.3	—	—	—
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
NH ₄ H ₂ PO ₄	—	0.016	0.015	0.013	0.013
CaCl ₂	—	Other salts**	0.012	0.003	—
CuSO ₄ · 5H ₂ O	—	—	0.02	0.02	0.02
pH adjustment	pH3.5 with HNO ₃ Tap water	pH3.5 with HNO ₃ Deionized water	pH3.5 with H ₂ SO ₄ Tap water	pH3.5 with H ₂ SO ₄ Tap water	pH3.5 with H ₂ SO ₄ Tap water

*The elements of modeled glucose medium were determined from those of inorganic salts, tap water, and CSL of the Glucose-CSL medium as follows (ppm): N520, P43, K110, Na29, Ca36, Mg205, Fe1.1, Mn0.19, Zn0.29 and Cu 0.05.

**Other salts added to modeled glucose-CSL medium in ppm were K₂SO₄ 240, Na₂SO₄ 91, CaCl · 2H₂O 130, FeSO₄ · 7H₂O 5.2, MnCl₂ · 4H₂O 0.7, ZnSO₄ 1.3 and CuSO₄ · 5H₂O 0.2.

Table 2. Amounts of some metal ions, P, N and organic acids in non- or pre-treated beet thick juice medium containing 10% total sugar as glucose (ppm).

	TJ				
	0	I	II	III	IV
K	1080	110	829	110	174
Na	226	29.0	96.8	29.0	64.3
Ca	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0
Mg	205	205	205	205	205
Fe	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Mn	0.30	0.19	0.19	0.19	0.19
Zn	0.66	0.29	0.29	0.29	0.60
Cu	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
P	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0
N	637	520	520	520	520
Citric	36.3	29.0	13.7	12.7	27.4
Malic	103	98.1	43.9	42.0	46.2
Succinic	36.6	36.6	8.96	8.44	ND
Lactic	1050	1050	ND**	ND	31.4
PCA*	1040	872	122	115	27.5
Formic	57.3	56.2	ND	ND	ND
Acetic	106	105	ND	ND	ND
Propionic	ND	ND	ND	ND	ND
Isobutyric	77.5	76.1	ND	ND	ND
Butyric	29.1	28.7	ND	ND	ND

Pre-treatment : 0, Non-treatment ; I, Cation exchange ; II, Ether extraction ; III, Cation & ether extraction and IV, Electrodialysis.

* : Pyrrolidone carboxylic acid.

** : Not detected.

Table 3. Amounts of some metal ions, P, N and organic acids in non-or pre-treated beet molasses medium containing 10g total sugar as glucose (ppm).

	HA		HB				
	0	I	0	I	II	III	IV
K	132	110	5690	110	5590	110	110
Na	85.2	29.0	2290	29.0	2120	29.0	65.8
Ca	36.0	36.0	64.9	36.0	36.0	36.0	36.0
Mg	205	205	205	205	205	205	205
Fe	1.10	1.10	3.01	1.10	2.47	1.10	2.92
Mn	0.19	0.19	0.62	0.19	0.63	0.19	0.41
Zn	0.29	0.29	4.00	0.29	4.00	0.29	4.07
Cu	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
P	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0
N	3460	2430	3130	534	1350	520	1030
Citric	49.9	43.9	134	105	79.0	84.7	120
Malic	50.9	47.3	274	247	108	86.8	123
Succinic	ND**	ND	619	523	222	242	ND
Lactic	215	215	9870	4980	109	ND	237
PCA*	ND	ND	4660	3910	1040	480	391
Formic	ND	ND	463	400	45.4	ND	ND
Acetic	ND	ND	1360	1350	6.67	ND	ND
Propionic	ND	ND	65.6	64.4	13.4	ND	ND
Isobutyric	ND	ND	359	352	ND	ND	ND
Butyric	ND	ND	110	108	ND	ND	ND

Pre-treatment: 0, Non-treatment; I, Cation exchange; II, Ether extraction; III, Cation & ether extraction and IV, Electrodialysis.

*: Pyrrolidone carboxylic acid.

** : Not detected.

糖質原料 甜菜生汁および廃糖蜜は、日本甜菜製糖(株)より恵与されたシックジュース、HA および HB 糖蜜 (TJ, HA および HB と略記) を使用した。それぞれの処理液は、ローマ数字で指示された方法 (0, 無処理; I, カチオン交換; II, エーテル抽出; III, カチオン交換・エーテル抽出およびIV, 電気透析) により処理されたものである。

培地 従来用いられているグルコース・コンスチープ培地 (Glucose-CSL) の無機塩濃度、水道水および CSL (コンスチープリカー) の組成から、グルコース模擬培地のグルコース以外の成分元素量 (ppm) は、N 520, P 43, K 110, Na 29, Ca 36, Mg 205, Fe 1.1, Mn 0.19, Zn 0.29 および Cu 0.05 ppm と決められた。

TJ, IIA および HB の培地組成もそれぞれ表 1 に示

した。

TJ の未処理液および処理液を全糖濃度が 10% になるように希釈したとき、栄養源としてグルコース模擬培地のレベルに達していない成分は補添し、表 2 に示した。

HA と HB の未処理液および処理液についても、同様に表 3 に示した。

培養 紫外線で殺菌した培地 20 ml を 100 ml の坂口フラスコにとり、麦芽寒天培地に着生した胞子を白金耳で掻き取り接種した。培養は温度 35°C, 140rpm の往復振盪機で 4 日間行なった。

分析 菌体を濾過し、十分水洗後 80°C で一夜乾燥し、秤量した。還元糖は、試料を 0.2% HCL 溶液としてから 100°C30分間加水分解後、Somogyi²⁾ 法で定量し

た。イタコン酸は培養前後の臭素吸収値³⁾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ー⁴⁾から求めた値とも合致した。

全窒素はマイクロケルダール法⁵⁾、リンは比色法⁶⁾、金属元素は湿式灰化後原子吸光法⁷⁾、乳酸およびコハク酸はガスクロマトグラフィー⁴⁾で、その他の有機酸は高速液体クロマトグラフィー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、二連で行なった結果を平均して示した。

結果と考察

未処理培地での醗酵成績 グルコース、TJ、HA および HB を糖質原料としたときのイタコン酸醗酵の成績を、Fig. 1 に示した。

グルコース模擬培地は、グルコース培地中のグルコース以外の成分をすべて無機栄養源で置き換えたものである。

両培地とも、イタコン酸蓄積速度は 1.25(%/dl/day) (以下 Vi 1.25 と略記) および対消費糖イタコン酸収率 55 (%) (以後 Yi 55 と略記) であった。従って、以後これらの値をグルコース培地あるいはグルコース模擬培地のコントロール値として用いた。

TJ 培地では Vi 0.35 および Yi 34 であった。

HA 培地では、コントロール値に比べて若干速度の低下が認められ、HB 培地では菌の生育が認められなかった。

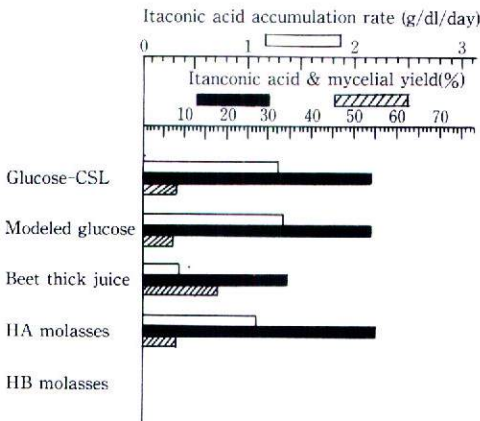


Fig. 1. Itaconic acid fermentation with various carbon sources. Fermentation was conducted at 35°C in 100 ml flasks containing 20 ml of medium shown in Table 1 on reciprocal shaker.

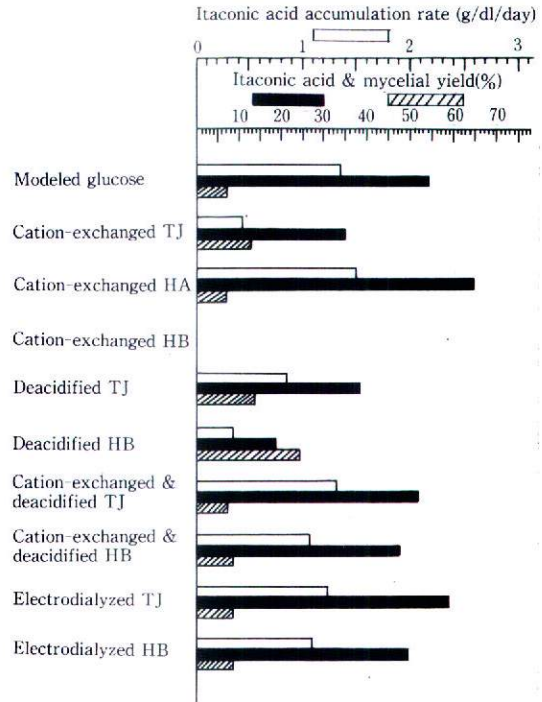


Fig. 2. Effect of various pre-treatments of beet thick juice and molasses on fermentation rate and yield.

The method for fermentation was the same shown in Fig.1. The culture medium indicated in Tables 1, 2 and 3 was adjusted to pH 3.5 with H₂SO₄ and/or NH₄OH.

処理培地での醗酵成績 各処理培地での醗酵成績を Fig. 2 に示した。

カチオン交換した TJ は、未処理に比べ菌の増殖が促進されたが、醗酵成績には殆ど差が認められなかった。HA のカチオン交換は、コントロールに比べ醗酵成績に若干の増加が認められた。HB のカチオン交換では菌の生育は認められなかった。

TJ をエーテル抽出処理して脱酸した場合には Vi 0.8 および Yi 40 に向上した。

HB を同様に脱酸した場合には Vi 0.32 および Yi 19 であった。

TJ および HB とも、カチオン交換およびエーテル抽出処理あるいは電気透析処理により脱塩した場合にはコントロール (Vi 1.25 および Yi 55) にほぼ匹敵する醗酵成績が得られた。

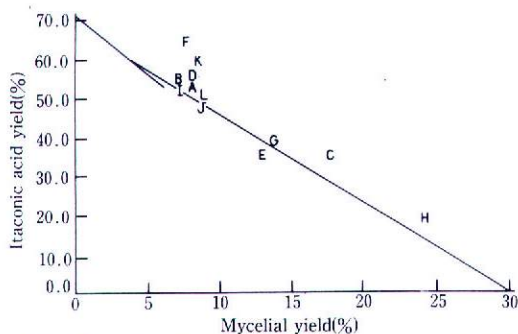


Fig. 3. Correlation between itaconic acid yield and mycelial yield based on consumed sugar.

- A. Glucose-CSL
- B. Modeled glucose
- C. TJ
- D. HA
- E. Cation-exchanged TJ
- F. Cation-exchanged HA
- G. Deacidified TJ
- H. Deacidified HB
- I. Cation-exchanged & deacidified TJ
- J. Cation-exchanged & deacidified HB
- K. Electrodialyzed TJ
- L. Electrodialyzed HB

収率について 菌の生育が認められた末あるいは処理液について対消費糖菌体収率% (Y_m と略記) と Y_i の関係を Fig. 3 に示した。

図中折線は、現在までに得られたグルコース培地での Y_m と Y_i の関係⁷⁾ を示したものである。カチオン交換した HA および電気透析した TJ に顕著な Y_i の向上が認められた。

以上の結果より、TJ および HB ではカチオン交換・エーテル抽出あるいは電気透析による脱塩が、また、HA ではそのままあるいはカチオン交換による脱アルカリ金属が醗酵成績をグルコース模擬培地にまで向上させるのに必要であった。

謝 辞

原料を恵与してくださいました日本甜菜製糖㈱総合研究所 増田昭芳所長に深謝致します。

実験の一部を手伝っていただいた、大内田謙および門脇伸一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) SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem., 160, 61-68 (1945).
- 3) 小林達吉, 田淵武士: “菌の利用工業 (微生物工学講座 5)”, 共立 (1956) P. 72.
- 4) TABUCHI, T., SERIZAWA, N.: Agr. Biol. Chem., 39, 1049-1054 (1975).
- 5) AOAC, “Official Methods of Analysis”, 12th ed. p 927, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. (1975).
- 6) BERENBLUM, J., CHAIN, E.: Biochem. J., 32, 295-298 (1938).
- 7) 中村以正: 東京教育大学農学部紀要, No. 15, (1969) P. 33.

Summary

This paper describes itaconic fermentation with pretreated beet thick juice and molasses by *Aspergillus terreus* K 26.

(1) With non-treated beet thick juice, the acid accumulation rate V_i was 0.35 (g/dl/day) and the acid yield from the sugar consumed Y_i was 34%. Cation-exchanged thick juice did not show any advantages in the rate and yield compared with the non-treated one. On the other hand, the deacidified juice through ether extraction increased the rate V_i to 0.8. The demineralized juice through cation exchange and ether extraction or electro dialysis gave the same rate and yield as those in glucose (V_i 1.25 and Y_i 55).

(2) With non-treated HA molasses, only a slight decrease in the rate was recognized, but through cation exchange of it the rate recovered to the level of glucose easily.

(3) In the case of non-treated and cation-exchanged HB molasses, the germination of spores of *A. terreus* K 26 was not recognized. Deacidification through ether extraction resulted in V_i 0.32 and Y_i 19. But the demineralized HB molasses through cation exchange and ether extraction or electro dialysis brought the same rate and yield as glucose.

帯大研報 I, 17 (1991): 123~127.