

# 甜菜生汁および廃糖蜜の *Aspergillus terreus* K 26 による イタコン酸醗酵で許容される金属イオンおよび有機酸量

中川 允利<sup>1</sup>・石橋 憲一<sup>1</sup>・弘中 和憲<sup>1</sup>

(受理：1990年11月30日)

Allowable amounts of metal ions and organic acids in beet  
thick juice and molasses for the normal itaconic acid  
fermentation by *Aspergillus terreus* K 26

Mitsutoshi NAKAGAWA<sup>1</sup>, Ken-ichi ISHIBASHI<sup>1</sup>  
and Kazunori HIRONAKA<sup>1</sup>

## 摘 要

前報<sup>1)2)</sup>までに、HA 糖蜜ではそのままあるいはカチオン交換が、シックジュースおよびHB 糖蜜ではカチオン交換・エーテル抽出あるいは電気透析処理が、正常なイタコン酸醗酵を行なうために必要であることを明らかにした。しかし、カチオン交換処理において金属イオンはグルコース模擬培地で必要とされている濃度以下にまで除去され、また、有機酸はエーテル抽出あるいは電気透析でどの程度除去すべきか不明であった。

そこで、本報では、正常なイタコン酸醗酵が実施できた処理甜菜生汁および廃糖蜜培地あるいはグルコース模擬培地で希釈した培地から、培地中に許容される糖以外の金属イオン、P、N および有機酸量 (ppm) を次のように決めた。

K 304, Na 74.2, Ca 36.6, Mg 205, Fe 2.92, Mn 0.41, Zn 4.07, Cu 0.05, P 43.0, N 2430, クエン酸120, リンゴ酸123, コハク酸242, 乳酸237, ピロリドンカルボン酸480, 蟻酸11.5, 酢酸27.2, プロピオン酸1.31, イソ酪酸15.5および酪酸5.82。

キーワード：イタコン酸醗酵, 金属イオン, 有機酸, 甜菜生汁, 甜菜廃糖蜜

著者らは、より安価な醗酵原料として処理した甜菜生汁および廃糖蜜を対象に、イタコン酸醗酵試験を試みてきた。

正常なイタコン酸醗酵(イタコン酸蓄積速度 Vi 1.0 g/dl/day および対消費糖イタコン酸収率 Yi 50%)を達成するためには、HA 糖蜜ではそのままあるいはカチオン

交換、シックジュースおよびHB 糖蜜ではカチオン交換・エーテル抽出あるいは電気透析が必要であった。

しかし、処理糟地中の金属イオン量が、グルコース模擬培地のレベル以下にまで除去されているものもあり、また、有機酸についてはどのレベルまでの除去が必要か不明であった。

<sup>1</sup> 帯広畜産大学生物資源化学科

<sup>2</sup> Department of Bioresource Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Hokkaido 080, Japan.

そこで、本報では、正常な醗酵成績が達成された処理培地および甜菜生汁およびHB糖蜜のグルコース模擬培地での希釈培地から、培地中に許容し得る金属イオンおよび有機酸量を規定したので報告する。

### 実験方法

**使用菌株** *Aspergillus terreus* K 26 を用いた。

**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。ローマ数字の I はカチオン交換を、III はカチオン交換・エーテル抽出を、および IV は電気透析処理を表わしている。

**培地** TJ と HB はグルコース模擬培地 (G 模擬と略記) で、所定の希釈倍率になるまで希釈した。ただし、グルコース量は全糖として 10% になるように調節した。処理液についても全糖濃度が 10% になるまで純水で希釈し、不足する成分についてはグルコース模擬培地のレベルまで補添した。それぞれの培地は表 1 に示されている。

**培養** 100 ml 肩付フラスコを用い、紫外線で殺菌した培地 20 ml に孢子を接種し、前報と同様<sup>2)</sup>、35°C、140 rpm の往復振盪機で 4 日間培養した。

**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 100°

**Table 1.** Medium composition containing some metal ions, phosphorus, total nitrogen and organic acids (ppm) in 10% total sugar solution resulting in the fermentation with the acid accumulation rate of 1.0 (g/dl/day) and the acid yield 50 (%).

	Modeled glucose	TJ/5*	TJ		HA	HB/50**	HB		Modified
			III	IV			III	IV	
K	110	304	110	174	110	222	110	110	304
Na	29.0	68.4	29.0	64.3	29.0	74.2	29.0	65.8	74.2
Ca	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	36.6	36.0	36.0	36.6
Mg	205	205	205	205	205	205	205	205	205
Fe	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10	1.14	1.10	2.92	2.92
Mn	0.19	0.21	0.19	0.19	0.19	0.20	0.19	0.41	0.41
Zn	0.29	0.36	0.29	0.60	0.29	0.36	0.29	4.07	4.07
Cu	0.05	0.05	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	43.0	43.0
N	520	520	520	520	2430	572	520	1030	2430
Citric	—	7.26	12.7	27.4	43.9	2.68	84.7	120	120
Malic	—	20.6	42.0	46.2	47.3	5.48	86.8	123	123
Succinic	—	7.32	8.44	ND	ND	12.4	242	ND	242
Lactic	—	210	ND	31.4	215	197	ND	237	237
PCA**	—	208	115	27.5	ND	93.2	480	391	480
Formic	—	11.5	ND	ND	ND	9.26	ND	ND	11.5
Acetic	—	21.2	ND	ND	ND	27.2	ND	ND	27.2
Propionic	—	ND	ND	ND	ND	1.31	ND	ND	1.31
Isobutyric	—	15.5	ND	ND	ND	7.18	ND	ND	15.5
Butyric	—	5.82	ND	ND	ND	2.20	ND	ND	5.82

\* : 5-fold dilution of TJ with modeled glucose medium containing 10 g total sugar as glucose per 100 ml.

\*\* : 50-fold dilution of HB with modeled glucose medium.

Metal ions in the modeled and modified medium were added as  $K_2SO_4$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $ZnSO_4$  and  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ . Phosphorus as  $NH_4H_2PO_4$  and nitrogen as  $NH_4NO_3$ .

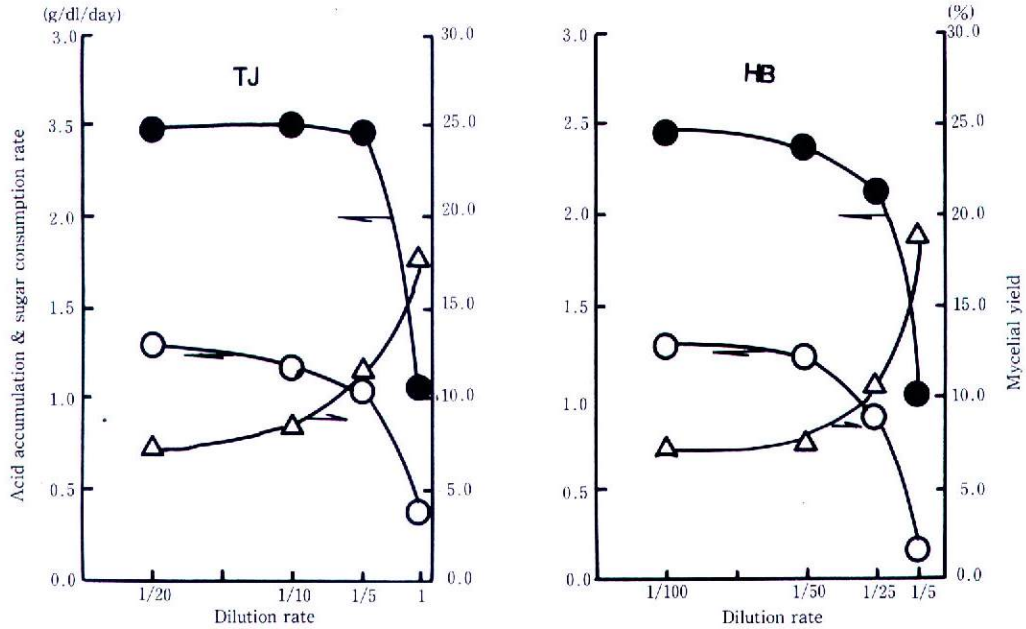


Fig. 1. Effects of dilution of beet thick juice and HB molasses with modeled glucose medium on itaconic acid fermentation.

Fermentation was conducted at 35°C for 4 days in 100 ml flasks containing 20 ml medium on a reciprocal shaker.

C30分間加水分解後, Somogyi<sup>3)</sup>法で測定した。イタコン酸は, 培養前後の臭素吸収値<sup>4)</sup>の増加量より求め, ガスクロマトグラフィーによる方法<sup>5)</sup>でも確認した。

全窒素はマイクロケルダール法<sup>6)</sup>, リンは比色法<sup>7)</sup>, 金属元素は湿式灰化後原子吸光法<sup>1)</sup>, 乳酸およびコハク酸はガスクロマトグラフィー<sup>8)</sup>で, その他の有機酸は高速液体クロマトグラフィー<sup>1)</sup>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

**TJ および HB の G 模倣による希釈効果** TJ および HB を G 模倣培地で希釈したときの醗酵成績を Fig. 1 に示した。Vi 1.0 および Yi 50 以上の醗酵成績を得るには, TJ では 5 倍および HB では 50 倍以上に希釈することが必要であった。それらの希釈倍率での培地組成を表 1 に示した。希釈倍率が低いときに, 対消費糖菌体収率 Ym (%) が大きくなる傾向にあった。

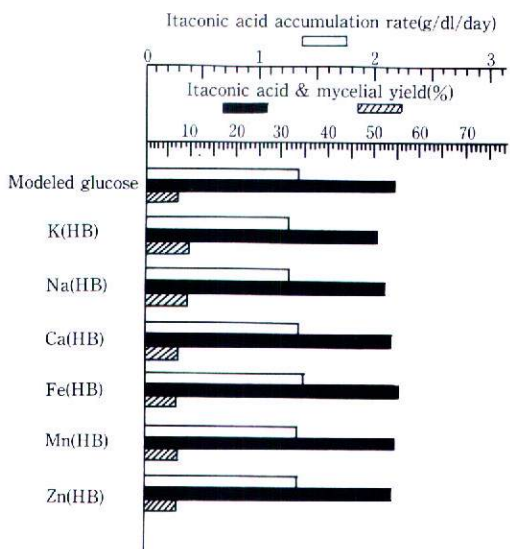
### G 模倣での醗酵成績に及ぼす TJ および HB 単独成分添加の影響

**金属イオン** G 模倣に比し, HB 培地では K が 52, Na 79, Ca 1.8, Fe 2.7, Mn 3.3, Zn 14 倍であった。Fig. 2 より, K および Na が, 醗酵速度を若干低下させ菌体収率を増加させるのが認められた。

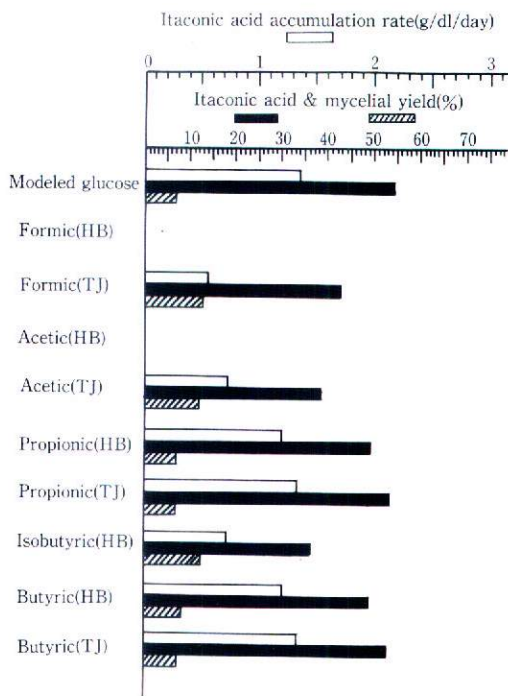
**揮発性有機酸** Fig. 3 より 蟻酸および酢酸は HB レベルの濃度で胞子の発芽が認められず, TJ レベルにおいても Vi がグルコース模倣の約 1/2 に留まった。その他の酸のうち, イソ酪酸が HB レベルで醗酵速度の低下と菌体増殖の促進を招来していた。

**不揮発性有機酸** Fig. 4 より, 不揮発性有機酸のうち, コハク酸が Vi および Yi の若干の低下をもたらした。乳酸は炭素源として利用され Yi 増加に寄与しているものと推定された。

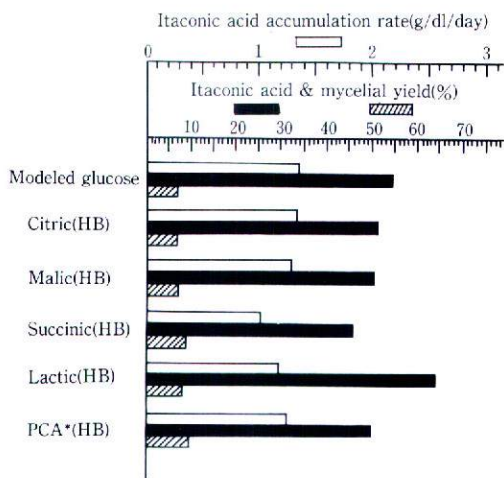
**金属イオン, P, N および有機酸の培地中での許容量** イタコン酸醗酵成績 (Vi 1.0 および Yi 50) を達成できた HA カチオン交換および TJ および HB のカチオン



**Fig. 2.** Effect of metal ion in modeled glucose medium on itaconic acid fermentation. HB means the same metal ion concentration contained in HB medium. The method for fermentation was the same shown in Fig. 1.

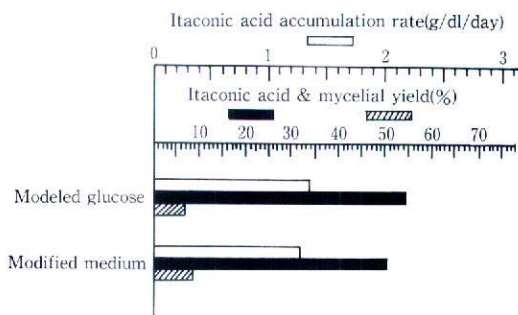


**Fig. 3.** Effect of volatile organic acid in modeled glucose medium on itaconic acid fermentation. HB means the same concentration contained in HB medium. TJ means that in TJ medium. The method for fermentation was the same shown in Fig. 1.



**Fig. 4.** Effect of non-volatile acid in modeled glucose medium on itaconic acid fermentation. HB means the same concentration contained in HB medium. The method for fermentation was the same shown in Fig. 1.

\* : Pyrrolidone carboxylic acid.



**Fig. 5.** Itaconic acid fermentation with modified medium. The constituent of modified medium is shown in Table 1. The method of fermentation was the same shown in Fig. 1.

交換・エーテル抽出あるいは電気透析処理液<sup>2)</sup>と T J および HB の G 模擬による 5 倍および 50 倍希釈培地を、表 1 に示した。

各培地成分から最大値を選び、改変培地を調製し、培養を行なった。Fig. 5 に示したように、イタコン酸蓄積速度 1.3 (%/dl/day) および対消費糖イタコン酸収率 50 (%) とほとんどグズコース模擬培地に匹敵し得た。

従って、正常なイタコン酸醗酵を行なうために培地中に許容される、金属イオン、P, N および有機酸量は、改変培地の濃度をもって規定できた。

## 謝 辞

原料を恵与してくださいました日本甜菜製糖(株)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、加藤英巳および吉田直史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), 21-25 (1991).
- 3) SOMOGYI, M.: J. Biol. Chem., **160**, 61-68 (1945).
- 4) 田淵武士: 東京教育大学農学部紀要, No. 9, (1963) P. 251.
- 5) TABUCHI, T., SERIZAWA, N.: Agr. Biol. Chem., **39**, 1049-1054 (1975).
- 6) AOAC, "Official Methods of Analysis", 12th ed. p. 927, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. (1975).
- 7) BERENBLUM, J., CHAIN, E.: Biochem. J., **32**, 295-298 (1938).

## Summary

The previous report described that the normal itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus* K 26 was attained with non- or cation-exchanged HA molasses and cation exchanged and deacidified beet thick juice and HB molasses.

However, metal ions through cation exchange were removed far less than the required concentration in modeled glucose medium.

In addition, the allowable organic acid concentration in the medium removed through ether extraction or electro dialysis was not clear.

As the result of this investigation, it was defined that the allowable concentration of metal ions, P, N and organic acids in the medium using the above mentioned media and the diluted beet thick juice and HB molasses with the modeled glucose medium resulted in the normal fermentation.

The concentration in 10% glucose solution (ppm) was K 304, Na 74.2, Ca 36.6, Mg 205, Fe 2.92, Mn 0.41, Zn 4.07, Cu 0.05, P 43.0, N 2430, citric 120, malic 123, succinic 242, lacte 237, pyrrolidone carboxylic 480, formic 11.5, acetic 27.2, propionic 1.31, isobutyric 15.5 and butyric 5.82.