

[醸酵工学会誌 第70巻 第6号 451-456. 1992]

甜菜生汁および廃糖蜜模擬培地での *Aspergillus terreus* K26 によるイタコン酸発酵

中 川 允 利

帯広畜産大学生物資源化学科
〒080 北海道帯広市稲田町西2線11

(平成4年4月23日受付 平成4年9月4日受理)

Itaconic acid fermentation with modeled beet thick juice and molasses by *Aspergillus terreus* K26. MITSUTOSHI NAKAGAWA (*Department of Bioresource Chemistry, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080*) *Hakkokogaku* 70: 451-456, 1992.

This paper describes itaconic acid fermentation with modeled thick juice (TJ), HA and HB molasses by *Aspergillus terreus* K26. The media consisted of a basal medium (I) containing metal ions, P, N, glucose and betaine with non-volatile (II) and volatile (III) acids. Difference testing was used to determine differences among means. The itaconic acid fermentation in both natural and synthetic media (basal medium (I)+non-volatile (II) and volatile (III) acids) was found to be not-significantly different at $P < 0.05$, as shown by the means of the acid accumulation rate (V_i), and the acid (Y_i) and mycelial weight (Y_m) yields. Fermentation results between modeled basal medium (I) with non-volatile (II) and/or volatile (III) acids compared with modeled glucose are as follows. 1) There was a significant difference in both V_i and Y_i between modeled glucose and modeled TJ (I+II+III) at the 0.1% level. 2) There was no significant difference between modeled glucose and modeled HA (I+II) at the 5% level. 3) In modeled HB (I+II+III), germination did not occur, but a significant difference in V_i ($P < 0.001$) and Y_i ($P < 0.01$) was observed between modeled glucose and HB (I+II). During the fermentation with modeled TJ (I+II+III), non-volatile acids (lactic and pyrrolidone carboxylic) and volatile acids (acetic, iso-butyric, formic and butyric) were consumed, while itatartaric, citric, malic and succinic acids were produced. The concentrations of K, Na, Fe and Zn in mycelia grown in HB (I) were 2-3 times higher than those in glucose during the mid-log phase, but decreased to almost zero level with the Fe concentration a little higher than that of the other metal ions at the stationary phase.

国内産の砂糖生産量(粗糖換算)は1989年948千トンで、その約65%は甜菜糖で占められている。

しかし、甜菜生汁および廃糖蜜を原料としたイタコン酸発酵の例は少なく、Nubel および Ratajak¹⁾ が *A. terreus* あるいは *A. itaconicus* を用い、基質としての炭水化物(グルコース、フラクトースあるいはハイテーストケンモラセス)の10から30%を甜菜糖蜜で代替できることを報告している程度である。

著者は、省資源・省エネルギーの立場から、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ある

いは廃糖蜜を原料とし、*Aspergillus terreus* K26 によって製造する方法を研究してきた。

その結果、原料を前処理²⁾することにより、発酵成績をグルコースを用いた場合と同程度³⁾にまで向上できることを明らかにした。

本報告では、原料中のいかなる成分が、発酵成績に影響を及ぼしているのかを明らかにするため、甜菜生汁および廃糖蜜の模擬培地を調製し検討した。すなわち、甜菜生汁および廃糖蜜を希釈し全糖濃度が10%に対応するように模擬培地を調製する際に、グルコース

および窒素源の一部であるベタイン以外無機成分より成る基本培地 (I) に原料分析値に由来する不揮発酸 (II) および揮発酸 (III) を添加あるいは欠落させた。それらの発酵試験を行い、それぞれの構成成分が発酵成績にどのような寄与をし、また、発酵期間中に変化するかを検討した。

実験方法

使用菌株 *Aspergillus terreus* K26 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、⁴⁾ HA⁵⁾ および HB⁶⁾ 糖蜜 (TJ, HA および HB と略記) を使用した。

TJ は砂糖の製造工程に入る前に貯蔵を兼ねあらかじめ濃縮された生汁²⁾ (全糖濃度62.8%) で、廃糖蜜は糖汁の精製工程の相違により、イオン交換樹脂処理法による場合が HA²⁾ (同58.1%) で、ステップエン法に

よる場合が HB²⁾ (同56.2%) である。

培地 天然培地は TJ, HA および HB の分析値から、全糖濃度が10% (w/v) になるように純水で希釈した。このとき、これらの培地は、天然培地としてのグルコース・コンスチープ培地⁷⁾ (g·dl 水道水⁻¹) [グルコース, 10; NH₄NO₃, 0.3; MgSO₄·7H₂O, 0.2 および CSL 0.2 (pH 3.5)] のコンスチープの灰化物および水道水の組成を模して決められたグルコース模擬培地⁷⁾ (G と略記) の成分元素量 (mg·l⁻¹) [N, 520; P, 43; K, 110; Na, 29; Mg, 205; Ca, 36; Fe, 1.1; Mn, 0.19; Zn, 0.29 および Cu, 0.05] に比較し、不足しているものは補添して調製された。

模擬培地 TJ, HA および HB は、全糖濃度が10% (w/v) の天然培地の分析値を模擬し、G 培地の成分濃度⁷⁾ と比較し、不足しているものは補添し、組成を Table 1 に示した。すなわち、すべての模擬培地に添

Table 1. Amounts of some metallic salts, phosphate, nitrogenous compounds and organic acids (mg·l⁻¹) in each modeled medium containing 10% (w/v) glucose.

Constituent		Modeled media ^a			
		Glucose (G)	Thick beet juice (TJ)	HA molasses (HA)	HB molasses (HB)
Basal (I)	K ₂ SO ₄	245	2400	293	12700
	Na ₂ SO ₄	89.6	699	263	7070
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	132	132	132	238
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2080	2080	2080	2080
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.48	5.48	5.48	15.0
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.68	1.09	0.68	2.23
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.28	2.90	1.28	17.6
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.20	0.20	0.20	0.20
	NH ₄ H ₂ PO ₄	160	160	160	160
	NH ₄ NO ₃	2970	2970	2970	2970
	Betaine	—	—	24600	17600
Non-volatile Acids (II)	Citric	—	36.3	49.9	134
	Malic	—	103	50.9	274
	Succinic	—	36.6	—	619
	Lactic	—	1050	215	9870
	PCA ^b	—	1040	—	4660
Volatile Acids (III)	Formic	—	57.3	—	463
	Acetic	—	106	—	1360
	Propionic	—	—	—	65.6
	Isobutyric	—	77.5	—	359
	Butyric	—	29.1	—	110

^a The synthetic media were made up to 1 l with deionized water and pH adjustment was done by 0.5 M H₂SO₄ and 1.0 M NH₄OH.

^b L-2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid.

加されている10% (w/v) グルコースと窒素源の一部として用いたベタイン以外すべて無機塩より成り立つ基本培地 (I と略記) に不揮発酸 (II と略記) および揮発酸 (III と略記) を添加することにより調製されている。

したがって, TJ, HA および HB 模擬培地はそれぞれ TJ (I + II + III), HA (I + II) および HB (I + II + III) と表され, 基本培地は TJ (I), HA (I) および HB (I) であり, 基本培地に不揮発酸を添加したものは TJ (I + II) および HB (I + II) であり, 揮発酸を添加したものは TJ (I + III) および HB (I + III) となる。

培地の初発 pH⁸⁾ は揮発酸を添加した場合には 0.5 M H₂SO₄ および 1.0 M NH₄OH で 4.5 に, HB (I) および (I + II) では 3.0 に, その他の場合は 4.0 に調製した。

培養 紫外線で一夜殺菌した培地 120 ml を 500 ml 振盪フラスコにとり, 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, ストローク 7 cm 120 cycles/min の往復振盪機で行った。また, 経時的に約 20 ml ずつサンプリングした。

分析 菌体をろ別し, 十分水洗後 80°C で一夜乾燥し, 乾燥菌体量を求めた。イタコン酸は培養前後の臭素吸収値⁹⁾の増加量より求めた。この値は, サリチル酸を内部標準¹⁰⁾とするガスクロマトグラフィー³⁾から求めた値とも合致した。

還元糖は Somogyi 法¹¹⁾で, 全窒素はマイクロケルダール法¹²⁾で定量した。

金属元素は湿式灰化後原子吸光法²⁾で, リンは比色法¹³⁾で定量した。

乳酸およびコハク酸はガスクロマトグラフィー²⁾で, その他の有機酸は BTB pH 指示薬の色調の変化を 430 nm で検出する高速液体クロマトグラフィー²⁾で測定した。

試薬は, 和光純薬工業例の特級を使用した。ただし, イタ酒石酸¹⁴⁾は, イタコン酸カルシウムをタングステン酸ナトリウムを触媒として H₂O₂ で酸化後 H 型 Amberlite 200 でカルシウムイオンを交換して調製した。

結果および考察

天然および模擬培地での発酵試験の比較 発酵試験の結果を Fig. 1 に示した。グルコース (G と略記), TJ, HA および HB のそれぞれ天然および模擬培地に

おける 4 回の発酵成績の平均値の差,¹⁵⁾ すなわち, イタコン酸蓄積速度 g·dl⁻¹·d⁻¹ (V_i と略記), 対消費糖イタコン酸収率% (Y_i と略記) および菌体重量収率% (Y_m と略記) に関し, 危険率 5% で有意差は認められなかった。ただし, HB については天然および模擬培地共に胞子の発芽は認められなかった。

G 培地に対する各培地での発酵試験の比較 Fig. 1 より天然培地での V_i, Y_i および Y_m が, 模擬培地で再現された。よって, 基本培地 (I) に不揮発酸 (II) およびあるいは揮発酸 (III) を添加して種々の培地を調製し, 発酵成績 V_i および Y_i および G 培地に対するそれらの平均値の差の検定¹⁵⁾ 結果を Table 2 に示した。

ただし, 模擬培地 HB (I + II + III) および揮発酸添加 HB 基本培地 (I + III) では pH 4.5 で発酵しなかった。

V_i および Y_i について TJ では, 基本培地 (I)

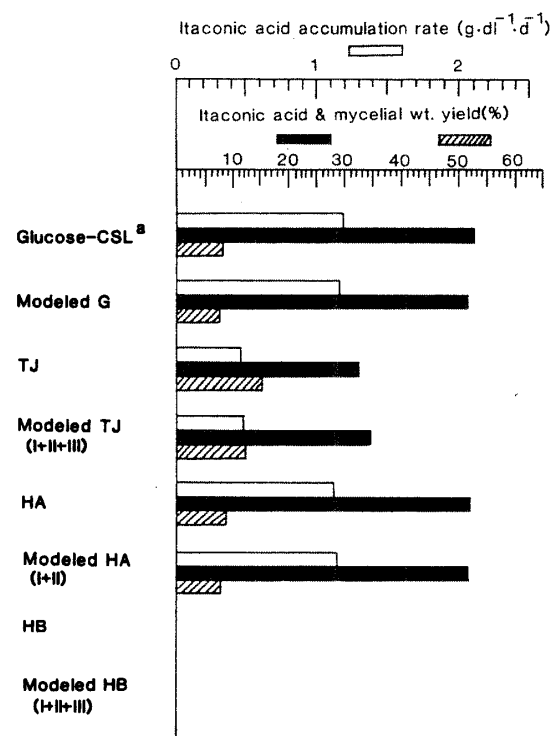


Fig. 1. Itaconic acid fermentation with natural and modeled media. Fermentation was conducted at 35°C in 500 ml flasks containing 120 ml of modeled medium (Table 1, initial pH 4.0 for G and HA (I+II) and 4.5 for TJ (I+II+III) and HB (I+II+III)) for 4 to 6 d on a reciprocal shaker (stroke 7 cm; cycles/min 120). The medium composition of Glucose-CSL, TJ, HA and HB has been shown elsewhere.³⁾

^a Corn steep liquor.

Table 2. Means^a of itaconic acid accumulation rate and the acid yield with modeled medium by *A. terreus* K26.

Medium ^b	Itaconic acid accumulation rate (g·dl ⁻¹ ·d ⁻¹)	Acid yield (%)
G	1.18±0.16	55.3±2.6
TJ (I)	1.01±0.07 ^{ns}	50.8±2.3 ^{ns}
TJ (I+II)	0.85±0.13*	42.3±4.8*
TJ (I+III)	0.69±0.10**	43.8±3.7**
TJ (I+II+III)	0.50±0.08***	34.8±5.0***
HB (I)	0.98±0.13 ^{ns}	45.7±2.0**
HB (I+II)	0.51±0.12***	35.6±6.0**
HA (I)	1.06±0.12 ^{ns}	53.1±1.7 ^{ns}
HA (I+II)	1.16±0.22 ^{ns}	52.2±1.4 ^{ns}

^a Mean±S.D. of 4 determinations of the itaconic acid accumulation rate and the acid yield under the same fermentation conditions as shown in Fig. 1.

^b Abbreviations are shown in Table 1. The fermentation media were composed of the basal medium (I), with or without non-volatile acids (II) and/or volatile acids (III). The initial pH values were 4.0 for G, TJ (I), HA (I) and HA (I+II) and 4.5 for TJ (I+II), TJ (I+III) and TJ (I+II+III) and 3.0 for HB (I) and HB (I+II).

^{ns}, Not significant; *, significant at $p<0.05$; **, significant at $p<0.01$; ***, significant at the $p<0.001$ level compared with modeled glucose medium.

でGに比べ V_i および Y_i 共に危険率5%で有意差が認められなかった。不揮発酸を添加した(I+II)では共に低下し危険率5%で有意差が認められ、揮発酸を添加(I+III)では低下はさらに顕著になり共に危険率1%で有意となった。不揮発酸および揮発酸を同時に添加した模擬培地(I+II+III)では共に危険率0.1%で有意となった。不揮発酸に比べ揮発酸が菌の増殖開始を1日遅らせ蓄積速度の低下にも寄与していた。

HBでは、基本培地(I)は V_i に関しG培地に比べ危険率5%で有意差は認められなかったが、菌が増殖し Y_i については、Gに比し危険率5%で有意差が認められた。不揮発酸を添加した(I+II)では V_i に関し、危険率0.1%で、 Y_i に関しては1%で有意となった。

HAについては(I)および(I+II)共に V_i および Y_i に関しGに対し危険率5%で有意差は認められなかった。

甜菜生汁模擬培地での有機酸の消長 この培地には不揮発酸および揮発酸が含まれており、それらの消

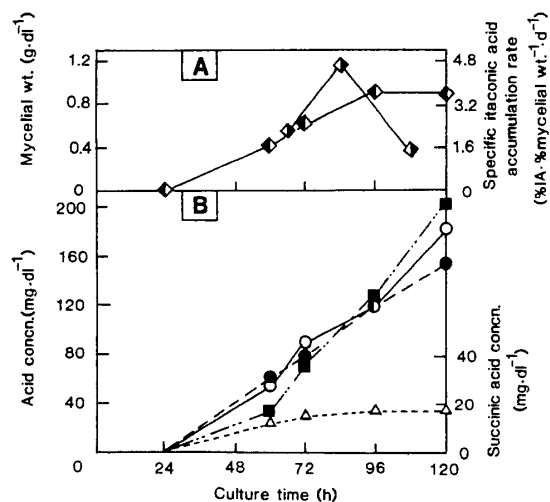


Fig. 2. Changes in the mycelial weight and specific itaconic acid accumulation rate (A) and those of non-volatile acids produced (B) during fermentation with TJ (I). The fermentation conditions were the same as in Fig. 1. Symbols: ◇, specific IA accumulation rate; ◆, mycelium weight; ○, citric acid; ●, malic acid; △, succinic acid; ■, itatartaric acid.

長を調べた。

基本培地 TJ (I) Fig. 2A より菌体重量 (C_m と略記) は、1日目から4日目迄増加し0.9となり、比イタコン酸蓄積速度 ($V_i \cdot C_m^{-1}$) は3.5日でピーク値4.5に達し、G培地での値に匹敵した。この培地には有

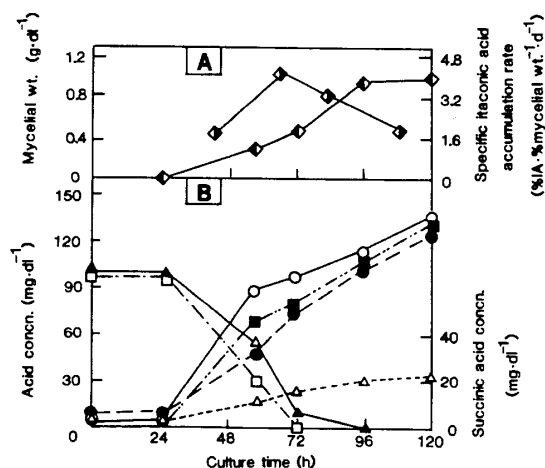


Fig. 3. Changes in the mycelial weight and specific itaconic acid accumulation rate (A) and non-volatile acids (B) during fermentation with TJ (I+II). The fermentation conditions were the same as in Fig. 1. Symbols: ◇, specific IA accumulation rate; ◆, mycelium weight; ▲, lactic acid; △, succinic acid; □, PCA; ■, itatartaric acid; ○, citric acid; ●, malic acid.

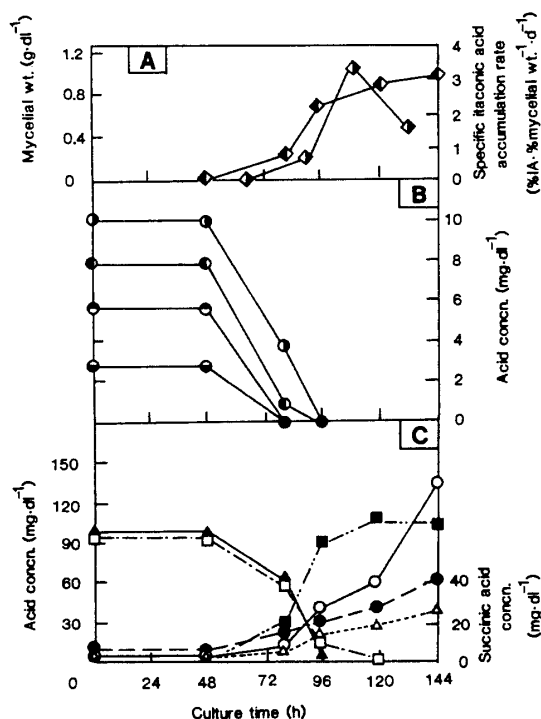


Fig. 4. Changes in the mycelial weight and specific itaconic acid accumulation rate (A), volatile acids (B) and non-volatile acids (C) during fermentation with TJ (I+II+III). The fermentation conditions were the same as in Fig. 1. Symbols: ◇, specific IA accumulation rate; ◊, mycelium weight; ○, acetic acid; ●, isobutyric acid; ◐, formic acid; ◑, butyric acid; ▲, lactic acid; △, succinic acid; □, PCA; ■, itartartaric acid; ○, citric acid; ●, malic acid.

機酸は添加されておらず, Fig. 2B より, それぞれイタ酒石酸200, クエン酸180, リンゴ酸160およびコハク酸17 (mg·dl⁻¹) が副生した.

不揮発酸添加培地 TJ (I+II) Fig. 3A より C_m 値は0.95に達し $V_i \cdot C_m^{-1}$ のピーク値は3.9になった. Fig. 3B より, 培地に添加された不揮発酸のうち乳酸およびピロリドンカルボン酸 (PCA と略記) は資化され, クエン酸, イタ酒石酸, リンゴ酸およびコハク酸が副生した.

甜菜生汁模擬培地 TJ (I+II+III) Fig. 4A に C_m および $V_i \cdot C_m^{-1}$ を示した. 菌の増殖は1日遅れた2日目から始まり, C_m は約1に $V_i \cdot C_m^{-1}$ のピーク値は3.2となった. Fig. 4B より, 菌の増殖に伴い揮発酸として添加された酢酸, イソ酪酸, ギ酸および酪酸は資化され始めた. 不揮発酸として添加された乳酸およびPCAは揮発酸と同様に資化され, リンゴ酸, クエン酸, コハク酸およびイタコン酸の蓄積に伴ってイタ酒石酸が副生した.

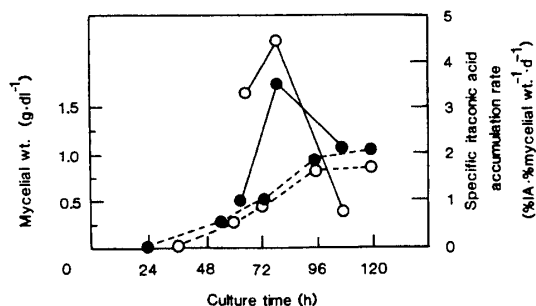


Fig. 5. Changes in mycelial weight and specific itaconic acid accumulation rate during fermentation with modeled glucose and HB (I). Lines: —, specific itaconic acid accumulation rate; ---, weight of mycelia. Symbols: ○, modeled glucose; ●, HB (I).

HB 基本培地 (I) での主な金属イオンの消長 Fig. 5 に G および HB (I) 培地を用いた場合の C_m および $V_i \cdot C_m^{-1}$ を示した. G 培地では C_m 値は約0.8で, $V_i \cdot C_m^{-1}$ 値のピークは4.5となった. HB (I) では C_m 値は1.2に達し, $V_i \cdot C_m^{-1}$ のピーク値は3.5であった. HB (I) は G に比べ, $V_i \cdot C_m^{-1}$ のピーク値は低いが, C_m 値が高いため, V_i に関しては差が認められなかった. Fig. 6, A, B, C および D に, HB (I) 培地中で G 培地に比し, 特に多量に含有されている K50 倍, Na80 倍, Fe3 倍および Zn14 倍について, 培養液中および菌体中の濃度を示した. それぞれの金属は2.5日目の菌体中には, G 培地で生育したものの2~3倍多量に含有されたが, 発酵終期にはその差がほとんどみられなくなった. ただし, Fe の場合は終期でも高めのレベルに保持された.

要 約

甜菜生汁および廃糖蜜模擬培地でのイタコン酸発酵における酸蓄積速度 V_i , 酸収率 Y_i および菌体重量収率 Y_m のそれぞれの平均値は, 天然培地でのそれらの値の平均値との間で差の検定¹⁵⁾を行い, 危険率5%で有意差は認められなかった.

甜菜生汁模擬培地 TJ (I+II+III) の V_i および Y_i の平均値は, グルコース模擬培地でのそれらの平均値と差の検定を行い, 共に危険率0.1%で有意となった.

HA 模擬培地 HA (I+II) では G 培地に対し有意差は危険率5%で認められなかった. HB 模擬培地では胞子の発芽が認められなかった. しかし, 基本培地に不揮発酸を添加した HB (I+II) では V_i に対し, 危険率0.1%で有意であり, Y_i に関しては HB (I)

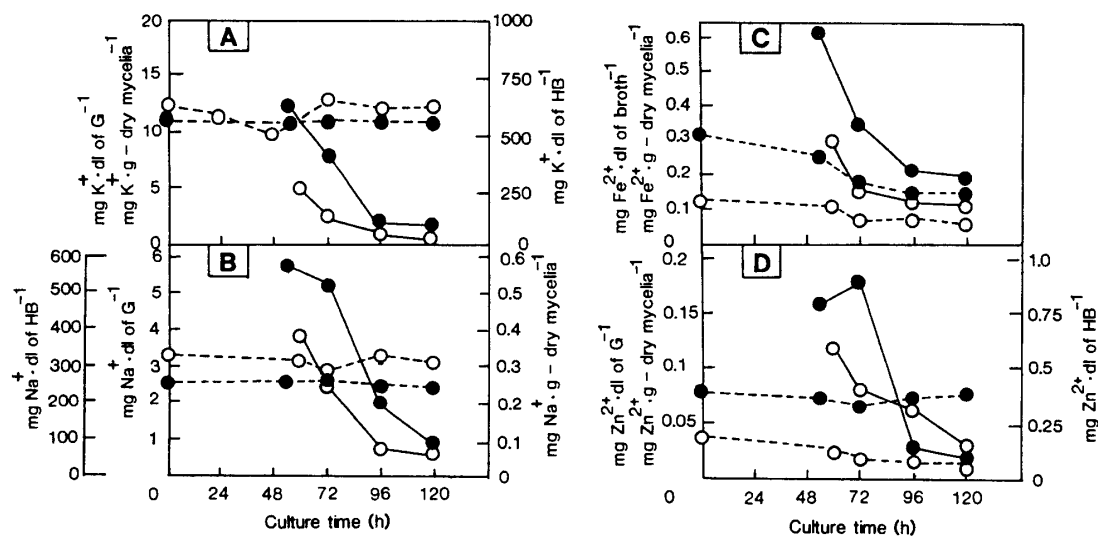


Fig. 6. Changes in the concentrations of some metal ions in both broth and dry mycelia during fermentation with modeled glucose and HB (I). Lines: —, concentration in mycelia; ----, concentration in filtered broth. Symbols: ○, modeled glucose; ●, HB (I).

および HB (I + II) で 1% で有意となった。

TJ 培地に添加した不揮発酸のうち、乳酸および PCA は資化され、リンゴ酸、コハク酸およびクエン酸などがイタ酒石酸と共に副生した。酢酸、イソ酪酸、ギ酸および酪酸などの揮発酸は、菌の増殖開始を 1 日遅らせたが、すべて資化された。

K, Na, Fe および Zn のように HB 基本培地に多量に含有される金属は、菌の増殖と共に菌体に取り込まれ、それらの濃度は、G 培地での場合の 2~3 倍に達したが発酵終期には減少し G 培地と同程度になった。なお、Fe は、平行的に減少し終期においても差がみられた。

文 献

- 1) Mail, M. L.: *Economic Microbiology* (Rose, A. H.) Vol. 2, p. 77-86, Academic Press, New York (1978).
- 2) 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).
- 3) 中川允利, 石橋憲一, 弘中和憲: 帯大研報 I, 17 (2), 123-127 (1991).
- 4) Johnson, J. R.: *Z. Zuckerind.*, 26, 521-524 (1976).
- 5) 及川昭蔵: 化学と生物, 11, 116-117 (1973).
- 6) 及川昭蔵: 北海道栄養食糧学会誌, 12号, 2-6 (1966).
- 7) 中川允利, 中村以正, 小林達吉: 醸工, 53, 294-302 (1975).
- 8) 中川允利, 八代 譲, 石橋憲一, 弘中和憲: 帯大研報 I, 17 (4), 377-383 (1992).
- 9) 田淵武士: 東京教育大学農学部紀要, No. 9, p. 251 (1963).
- 10) Tabuchi, T., Serizawa, N.: *Agr. Biol. Chem.*, 39, 1049-1054 (1975).
- 11) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 160, 361-368 (1945).
- 12) AOAC, "Official Methods of Analysis", 12th ed. p. 927, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. (1975).
- 13) Brenblum, J., Chain, E.: *Biochem. J.*, 32, 295-298 (1938).
- 14) 明石博吉: 化学, 21, 75-76 (1966).
- 15) 日本工業規格, "二つの平均値の差の検定" JIS Z 9049, p. 405-409, 日本規格協会 (1979).