

(J. Ferment. Technol., Vol. 48, No. 2, p. 79~83, 1970)

Acetobacter rancens による酢酸醸酵促進因子に関する研究 (第1報)

土方 康世・高野 光男・照井 堯造

(大阪大学工学部醸酵工学教室)

Studies on Factors to Promote Acetic Acid Fermentation by *Acetobacter rancens* (I)

Yasuyo Hijikata, Mitsuo Takano and Gyozo Terui

(Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka)

Yeast extract (YE) possessed factors to shorten the lag time and to promote alcohol-oxidizing activity in submerged cultures of *Acetobacter rancens*.

These factors were shown to be resistant to a heat treatment at 120°C for 30 minutes with the pH at both 2 and 9 and dialytic through a cellulose membrane made by the Visking Company.

An effective fraction was isolated from YE with 96% (v/v) ethanol. This extract was then precipitated by adding ethyl acetate (YEE).

Another extraction was also effected by pyridine or acetone. The aqueous solution of YEE was treated with acetic acid (0.2 M) and active charcoal to remove impurities; the charcoal treated fraction was designated as the fraction (I), which was further fractionated into two parts by treating it with anion exchange resin Dowex 1X2, namely, the resin-unadsorbable fraction (Ia) and the resin-adsorbable fraction (Id).

The latter was eluted by dilute acetic acid solution.

The effect of these two fractions was relatively low when added singly, but as high as that of the fraction (I) when added in combination, *i.e.* these factors acted synergistically. By the combined use of these factors, acetic acid fermentation in a well-defined medium was promoted remarkably, *i.e.* the lag time was shortened significantly and the acid production rate per cell was considerably enhanced.

The physiological action of these factors seems to be of interest from the viewpoint of efficiency of energy metabolism.

緒 論

酢酸菌のあるものは生長素を要求することが知られている。Rao, Stokes¹⁾らが *Acetobacter rancens*, *A. melanogenum* は合成培地では増殖しないが、酵母自己消化物、肝臓エキスまたはペプトンを与えることにより、増殖を開始することを示した。彼らはその有効因子を追求して、還元糖またはその関連物質であることを明らかにし、かつ、その作用は発育開始にと

ってきわめて有効であることを示した。

Goldman²⁾ は、*A. gluconicum* の場合、酵母自己消化物中の有効区分を追求しているが、その実体はまだ明らかにされていない。

著者ら³⁾ は、*A. rancens* について研究し、既知の微生物生長素の大部分(ビタミンのみならず核酸関連物質、ヘミン化合物、アグマチン、カダベリン、メバロン酸など)を単独または組み合わせて添加しても増殖、醸酵の誘導期が著しく長い、酵母エキス(以下

YE) を添加すると、誘導期短縮に著しい効果のあることを認めた。

さらにこの YE の誘導期短縮効果物質を追求した結果、この物質は単に誘導期を短縮するだけでなく、酢酸菌のエネルギー代謝に対してきわめて著明な作用をすることが判明した。すなわち単位増殖量当りの力源代謝エネルギーを増加せしめる効果を持っている物質であり、酢酸醸酵の収率を高める方向に作用することが分かったので、その有効区分を分画しかつその作用を明らかにすべく研究を進めた。

実験方法

1. 供与菌株 自然界から選択分離した深部培養に適する酢酸菌の中、*A. rancens* の一株⁹⁾ を供与することにした。

2. 培地組成 標準培地および基本培地は Table 1 に示す。この組成は Rao¹⁾ の培地組成を参照した。

Table 1. Composition of basal medium (in 100 ml medium).

Ethanol	5 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g
Casamino acid	0.5 g
(vitamin free)	
Salt solution A*	0.5 ml
Salt solution B**	0.5 ml
Vitamin mixture	
40 μg each of thiamin (B ₁), riboflavin (B ₂)	
nicotinic acid (NA), and Ca-pantothenate,	
80 μg of pyridoxine (B ₆), 10 μg of <i>p</i> -amino-	
benzoic acid (PABA), 1 μg of folic acid,	
0.1 μg of vitamin B ₁₂ , 0.04 μg of biotin, and	
0.5 mg of inositol	
Distilled H ₂ O to make up a vol. of 100 ml	
(adjusted to pH 5.5~6.0).	
*Salt solution A	
KH ₂ PO ₄	50 g
K ₂ HPO ₄	50 g
H ₂ O	500 ml
**Salt solution B	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1 g
HCl, concentrated	1 ml
H ₂ O	500 ml

Composition of standard medium: basal medium containing 1.5% yeast extract.

基本培地に YE (大五栄養化学 K.K. 製) 1.5% を加えたものが標準培地であり YE 分画区分の効果を調べる場合は、原酵母エキス 1.5% 相当となるように加えた。

また、初発 pH は、4~7 の間では余り結果に変化がなかったので pH 5.5~6.0 に調節した。

3. 菌体量 光電比色計 (Beckman, DB 型) により波長 660 mμ で濁度を測定し標準曲線と比較し菌体量 (mg/ml) を求めた。

4. 酢酸量 主として 0.1 N NaOH の、培地 1 ml 中の滴定酸度 (ml) で表した。なお生成した酸がほとんど、酢酸であることは予備実験の結果明らかであった。

5. その他 カラムクロマトグラフィにおいて流出液のアミノ酸および関連物質はニンヒドリン反応法による発色の後、570 mμ でその吸光を測定し、また、核酸関連物質は 260 mμ の吸光で測定した。

結果および考察

1. YE の効果およびその安定性 基本培地を対照とし、これに YE 1.5% を加えてその効果をみたのが Fig. 1 である。明らかに YE は酢酸菌の増殖と生酸を著しく促進することが分かった。

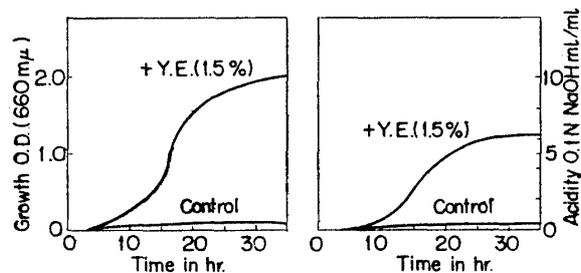


Fig. 1. Effect of yeast extract (YE) upon the growth and acid production by *Acetobacter rancens*.

Control: Basal medium.

YE を H₂SO₄ で pH 2 あるいは Ba(OH)₂ で pH 9 として、それぞれ 120°C 30分保った後、それぞれに相等量の Ba(OH)₂ あるいは H₂SO₄ を添加して沈澱除去し基本培地に添加して生酸性の効果を調べた。Fig. 2 に示したように、いずれの処理によっても、YE の効果が失われていないことが分かった。すなわち、本有効成分は酸、アルカリおよび熱に対して安定であることが示唆された。

2. YE の有効成分の抽出および分画

A. YE 溶媒抽出物の効果 YE をできるだけ少量の水にとかし (pH 5.5), YE と等重量の Hyflo

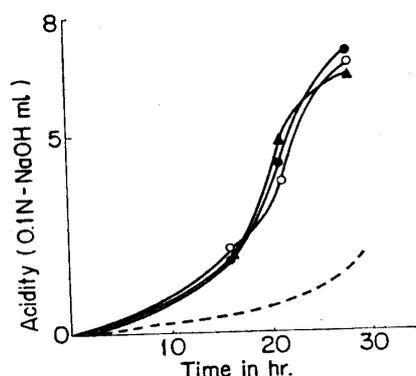


Fig. 2. Effectiveness of heat-treated YE.

Treatment: 120°C, 30min.

—▲— Standard. —●— At pH 2.
—○— At pH 9. ——— Control.

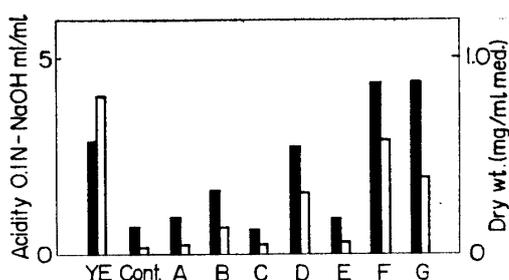


Fig. 3. Extraction of effective factor (from YE) with various solvents.

■ acidity □ growth

A: Ethyl ether B: Ethyl acetate.
C: Chloroform. D: Aceton. E: Benzen.
F: Pyridin. G: Ethanol.

Super-Cel を加えた後種々の溶媒により, 96% (v/v) 溶媒抽出を行なった。Fig. 3 に示すようにエタノール, ピリジンなどの抽出物は, YE を加えた標準培地に比べ増殖に対する効果は劣るが, 生酸に対しては著しい効果があった。

なお参考までに抽出残渣についても調べたが, これは原酵母エキスに較べて効果は劣っていた。

B. YE の 96% エタノール抽出時の pH の影響 濃厚な溶液を氷酢酸, アンモニア等で pH 3, 4, 7, 9 として, 96% エタノール抽出を行なった。抽出区分の添加効果は Fig. 4 に示した。

すなわち, それぞれの pH での抽出物の効果の差はさほど大ではなく, とくに, 酸度の最大の時期にはほとんど差がなかった。

YE のエタノール抽出物に酢酸エチルを加えると沈澱が得られるが, この沈澱の中に有効成分のあることが分った (以下この区分を YEE とする)。YEE を得る過程を Fig. 5 に示した。

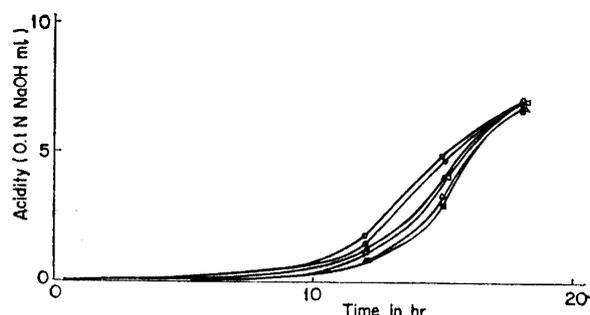


Fig. 4. Effect of ethanol extract obtained from YE at various pH.

●: Standard ○: pH 2.7 ▲: pH 4
△: pH 5.5 ■: pH 7 □: pH 9

Aq. AcOH solution (pH 2.7) of YE (100 g)

Add EtOH to a conc. of 96% (v/v).

EtOH ex. (1)

Remove EtOH by vac. evaporation.

Add EtAc until no more ppt.

Precipitate

Dissolve in water; remove EtAc by vac. evaporation. Add NH₃ to adjust pH to 9; add EtOH to conc. of 96% (v/v).

EtOH ex. (2)

Repeat the procedure applied to EtOH ex.

(1) to obtain EtAc ppt; remove EtAc by vac. evaporation.

YEE (dry weight: 25 g)

Fig. 5. Process for obtaining YEE fraction.

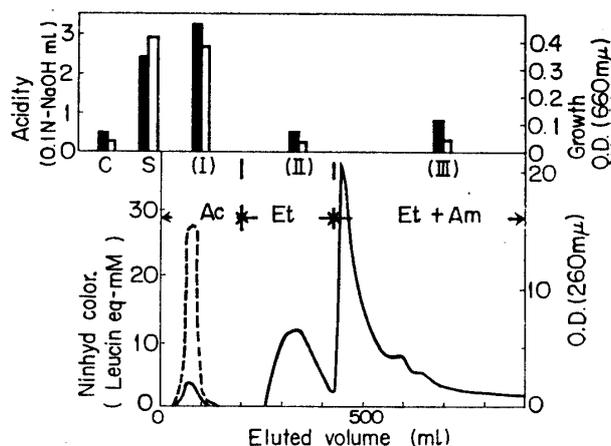


Fig. 6. Active charcoal column-chromatography of YEE. Upper figure indicates the effectiveness of each fraction tested with the basal medium.

■: Acidity □: Growth
C: Control S: Standard
--- Ninhydrin coloration. Ac: 0.2 M Acetic acid.
— O. D. (at 260mμ). Et: 50% Ethanol.
Et+Am: 50% Ethanol+1% ammonia.

C. YEE の活性炭による精製 あらかじめ, 0.2 M 酢酸で処理した活性炭をカラムにつめ YEE 溶液を処理した. 原酵母エキス 1 g 相当量に対して充填容量 8 ml の活性炭を使用し, 流出液の効果を調べた結果を Fig. 6 に示した.

すなわち, 0.2 M 酢酸で流出してくる 260 m μ の小さなピークおよびニンヒドリン反応陽性である区分を I とし, ついで 50% エタノールで流出してくる区分を II とし, さらに 50% エタノール + 1% アンモニアで流出してくる区分を III とすると, I のみが生酸にも増殖にもきわめて有効であることが分かった.

D. 区分 I の陰イオン交換樹脂による精製 区分 I の原酵母エキス 1 g に由来する分量に対し, 充填容量 4 ml の樹脂を用いたカラムクロマトグラフィの結果は, Fig. 7 に示す通りである.

最初に水で流出してくる区分 (非吸着区分) を Ia としやや酢酸濃度を上げて溶出する 260 m μ 吸収ピークを含む区分を Ic とし, さらに酢酸濃度を上げて流出してくる 260 m μ 吸収ピークを含む区分を Id とした. Ia, Ic, Id, の効果を調べたところ各単独では余り明瞭な作用を示さないが, Ia と Id とを併用することにより, I と同じ効果を示すことが分かった. このことから I の有効成分は, 陰イオン交換樹脂非吸着区分 Ia と吸着区分 Id の 2 つの成分に分かれ, Ia と Id は相乗的効果を示した. (Fig. 7, Fig. 8).

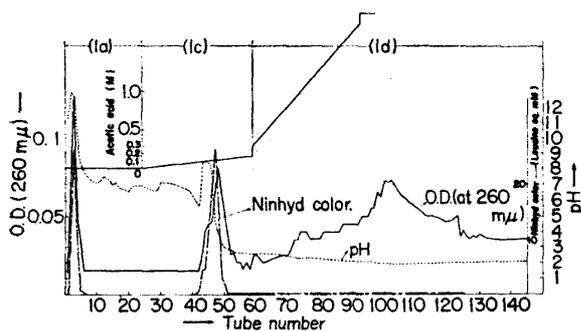


Fig. 7. Column chromatography of fraction I with Dowex 1X2.

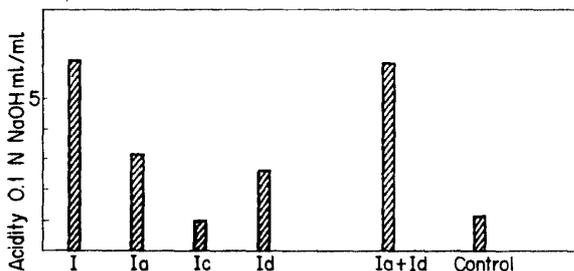


Fig. 8. Synergistic action of the fractions Ia and Id in stimulating acid production.

3. 有効成分の生理的效果における特徴 YE, YE E, I, Ia+Id の各画分について, 増殖と生酸の相対的な比較を Table 2 に示した. いずれの画分も誘導期短縮効果をもつことにおいて共通するが, 増殖と生酸を分けて観察すると, 精製するにつれて増殖に対する効果が減少し生酸に対する効果がますます上昇する傾向がみられた. 生酸促進効果が, 原酵母エキスよりも高められるということは, 増殖有効物質の一部の除去と, 拮抗物質の除去によるものかもしれない. いま, 生酸促進効果を乾燥重量当りで表わすと, YE に対し YEE は 4 倍, I は 10 倍に上っていることが分かった. Ia+Id については, 未だ決定していないが, 倍率がさらに上昇しているものと考えられる.

Table 2. Stimulation by the effective factor of acid-producing activity expressed by P/X.

	YE	Fraction		
		YEE	I	a+d
Growth (X) at 18 hr (mg/ml med.)	0.42	0.41	0.35	0.3
Acidity (P) at 18 hr (0.1 N NaOH ml/ml)	2.3	2.5	2.64	2.67
P/X	5.4	6.1	7.55	8.90
Dry wt. (g)/100 ml med.	1.5	0.38*	0.15*	—

*: Amount obtained from 1.5 g YE.

要 約

A. rancens の深部培養における誘導期短縮ならびに生酸を促進する有効因子を YE から分画した.

その結果, この因子は pH 2 および pH 9 で 120°C 30 分の加熱によっても失活せず, セロファン膜透過性で, エタノール, ピリジン, アセトン等には可溶であり, エタノール抽出液に酢酸エチルを添加することにより沈殿し, 酢酸酸性で適量の活性炭によって不純物を除去した後, 陰イオン交換樹脂非吸着区分 Ia と, 吸着区分の一部 Id とに分画することができた. この両者は各単独では, 効果は余り明瞭ではないが, 併用することにより, 著明な相乗効果を示した. その醸酵誘導期短縮効果は原酵母エキスとほぼ同様であるが, 増殖に対するよりも, 生酸に対する促進作用は, はるかに大であることが, 作用上の特徴として認められた.

したがって, この成分は, 酢酸菌のエネルギー代謝の様相を著しく変化せしめる効果があるものと考えられる.

なお本研究の一部は, 三島海運記念財団の研究奨励金によ

りました。謝意を表します。

文 献

- 1) Raghavendra Rao, M. R. and Stokes, J. L.: *J. Bacteriol.* **65**, 405 (1953).

- 2) Goldman, C. L., Litsky, W., Mandel, M. and Little, N.: *Can. J. Microbiol.*, **4**, 463 (1958).
- 3) 土方, 高田, 照井: 本誌, 投稿中

(昭 44.11.24 受付)