

[J. Ferment. Technol., Vol. 49, No. 2, p, 85~92, 1971]

微生物によるL(+)酒石酸の生成に関する研究

(第1報) 酒石酸生産菌の分離と同定

山田 浩一・児玉 徹・小幡 孝之・高橋 信博

(東京大学農学部農芸化学科)

Microbial Formation of Tartaric Acid from Glucose

(I) Isolation and Identification of Tartaric Acid Producing Microorganisms

Koichi Yamada, Toru Kodama, Takaji Obata and Nobuhiro Takahashi

(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo)

Isolation of various types of microorganisms distributed in nature was attempted in order to discover tartaric acid producers. Over nine thousand strains were isolated and examined in the ability of producing tartaric acid from glucose, and eight strains of bacteria were found to accumulate tartaric acid in fermentation broth. Those tartaric acid producers were isolated only from mannitol-yeast extract agar media and the habitat of these bacteria was restricted to fruits, especially persimmons.

One of these bacteria, named 2026Y2, was used for further experiments because of its superior productivity of tartaric acid. Five kinds of acids, including tartaric acid, were usually detected in the broth after 6 days' cultivation. Separation of these acids from the fermentation broth was performed by means of ion exchange chromatography followed by silicic acid chromatography. Four of them were purified and identified as L(+)-tartaric, glycolic, 5-ketogluconic and 2-ketogluconic acids. By the presence of these acids, a metabolic pathway was suggested as to the formation of tartaric acid from glucose.

As the results of taxonomical studies on four of these tartaric acid producers, it was confirmed they were all belong to *Gluconobacter suboxydans*, though there were slight differences among them.

緒 言

L(+) 酒石酸は天然産の有機酸として古くからよく知られており、数種の植物ではその存在が確認されている¹⁾が、著量の蓄積が見られるのはブドウ、タマリンドなどの少数の植物の果実中においてのみである。

微生物の代謝生産物として酒石酸が見出だされた例

としては、グルコースを基質として住木の *Aspergillus glaucus* による生成²⁾、Hessler らの *Gibberella saubineti* による生成³⁾ があり、さらに Kamlet の *Acetobacter suboxydans* による製法の特許⁴⁾がある。このほか Kheshgi らは *Acetobacter suboxydans* による 5-ケトグルコン酸発酵の副産物として検出し⁵⁾ 最近では Drawert らが wine yeast による生成を

報じている⁶⁾。グルコース以外の基質では、Bernhauerらがエタノールからの *Aspergillus* sp. による生成⁷⁾を、Lockwoodらが5-ケトグルコン酸からの *Pseudomonas fluoresceus* による生成⁸⁾を報じている。しかしながら、収量の点については Lockwood らの特許を除いては記されていないが、せいぜい検出された程度にすぎない。

一方、天然型酒石酸は種々の用途をもち、需要も増しつつあるが、供給源はブドウ酒製造の際に生成する argol にかぎられているのが現状である。そこで著者らはグルコースを原料としてL(+)酒石酸を醸酵法により生産することを目的として実験を開始した。本報では自然界からの生産菌の分離、有望菌株によって生成される各酸の単離および同定ならびに生産菌の同定について報告する。

実験方法

1. 酒石酸生産菌の分離

A. 微生物の検索 土壌、汚水、植物体などを使用し、常法通り試料を殺菌水に懸濁して Table 1 に示した培地で主として平板培養を行ない、必要に応じて平板培養をくり返して純粋分離を行なった。培養は26°または37°Cで2ないし4日間行なった。

Table 1にあげた培地は大別して4つの観点から選ばれたもので、(1)酒石酸の前駆体になる可能性のある化合物を唯一の炭素源とした培地、(2)酒石酸を唯一の

炭素源とした培地、(3)酸化細菌を選択的に生育させる培地、(4)酒石酸耐性および耐酸性の微生物を選択する培地である。

B. 分離菌の培養方法 500ml 容の振とうフラスコまたは30ml 容の大型試験管を用い、それぞれ50ml、5 ml の培地を使用した。酸生成能の検定に用いた培地は Table 2に示したとおりである。培養温度は26°または37°C、期間は2日ないし6日間である。

Table 2. Medium for acid production.

Ingredient(g/l)	For bacteria	For fungi
Glucose	50 or 100	50
NH ₄ NO ₃	0 or 2.5	2.5
KH ₂ PO ₄	1.0	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25	0.25
C. S. L.	3.0	3.0
NH ₄ VO ₃	0 or 0.1	0
CaCO ₃	20 or 28	0 or 20
pH	6.0	5.0

a These compounds were sterilized separately.

C. 生成した酸の検出 培養終了液は、Amberlite IR-120 で脱カチオン後、ペーパーまたは薄層クロマトグラフィーにかけて生成酸の検出を行なった。展開溶媒は*n*-ブタノール-酢酸-水(4:1:1)を用い、

Table 1. Composition of isolation media.

Ingredient (g/l)	Isolation medium							
	a)		b)		c)		d)	
	pH 3	pH 7	pH 3	or 7	pH 3	pH 6	pH 3 or 7	pH 3 or 7
Tartaric acid	7							
Ammonium tartrate	10	10						
5-Ketogluconic acid			10					
Gluconic acid					10	10		
Fumaric acid							10	
Maleic acid								10
Mannitol								25
Glucose								30
NH ₄ NO ₃			5		5	5	5	10
KH ₂ PO ₄			5		5	5	5	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.5	2.5	0.25		0.25	0.25	0.25	0.25
CaHPO ₄	5	5						
K ₃ PO ₄	5	5						
FeCl ₃			0.01		0.01			0.01
C. S. L.						3		
Yeast extract								1 or 10

発色試薬としてはメタバナジン酸アンモニウムの飽和水溶液⁹⁾ およびメチルイエローと BPB の混合指示薬¹⁰⁾を使用した。前者は酒石酸に特異的発色を示すとされている発色剤である。

2. 培養液からの酸の単離, 同定

A. 酸の単離 カチオン交換樹脂により培養液中のカチオンを除いたのち, 菌体を遠心分離する。上澄をアニオン交換樹脂 (Dowex 1×8, または Amberlite IRA-402 酢酸型) を通して酸のみを吸着させたのちギ酸で濃度を0.05Nから6Nまで変えて溶出する。2種以上の酸を含むフラクションについてはシリカゲルカラムクロマトグラフィーでクロロホルム-*n*-ブタノール系により分離した。

B. 酸の同定 単離結晶化された酸または塩ないし誘導体について IR スペクトル, 元素分析, 融点測定などを行なって同定した。

3. 菌株の同定 常法により行ない, Bergey's manual¹¹⁾ にしたがって同定したが, 菌名については朝井の命名¹²⁾を採用した。

実験結果および考察

1. 菌の分離 土壌その他合計 2,354 サンプルを分離源としてスクリーニングを行なった。酸生成能テストの被検菌数および見出された酒石酸生産菌数を分離培地別に示すと Table 3 の通りである。これらの菌のうち, 酸性の分離培地で得られたものは主として糸状菌ないし酵母であり, 中性培地で得られたものは主としてバクテリアであったので被検菌の構成はほぼ糸状菌・酵母4に対しバクテリア6であった。結局8株の酒石酸生産菌が得られたが, これらはすべてバクテリアで分離培地はマニトール-酵母エキス培地(培地f)であった。

スクリーニングの結果からみると, Kamlet および Kheshgi らの知見に基いて採用された主として酢酸菌選択用の培地f)のみによって目的の菌が得られ,

酒石酸の前駆体と考えられる化合物を唯一の炭素源とした培地によってはまったく得られていない。植物体内における酒石酸の生成経路についてもまだ定説がないために比較的多くの化合物を前駆体推定物として炭素源に使用したにもかかわらず不成功に終わったが, このことからただちにこれらの化合物が酒石酸の前駆体ではないと言いきるのは妥当ではなく, グルコン酸を唯一の炭素源とする培地および5-ケトグルコン酸を唯一の炭素源とする培地にあらためて酒石酸生成菌を接種したところ生育が見られたばかりでなく, 酒石酸の生成も確認されたことから考えてこれらの化合物は前駆体である可能性が残されている。分離培地別に見ると, 培地c)で最も多種類の微生物が得られ, したがって被検菌の数も多かったが目的とする菌は含まれていなかった。分離源別に見ると, 経験的に知られているように耕地土壌が数, 種類ともに最も多くの微生物を含んでいたが酒石酸生成菌はまったく見出されなかった。これに対し菌の種類の比較的小さい果実, とくに柿の実から上記8株のすべてが見出されたことは興味深い。

2. 醗酵生産物の単離, 同定 上記8株の生成する酸の一つは種々の展開溶媒, 発色剤を用いたペーパークロマトグラフィーの結果 (Table 4), いずれも酒石酸にほぼ間違いないと思われたが, 8株のうちこの酸を比較的多量に生成している2026Y2株を用いて以後の実験を行なった。

2026Y2株の6日間培養液中には Fig. 1 に示されるように通常5種類の酸が検出される。

アニオン交換樹脂 Amberlite IRA-402 (または Dowex 1) の酢酸型にこれらの酸を吸着させたあと, 濃度勾配をつけたギ酸で溶出されて来る順に酸を Acid I~V と便宜上名づけると, その溶出の様子は Table 5 の通りであった。

Table 3. Numbers of origin and microorganism tested.

	Isolation medium												Total
	a)		b)		c)		d)		e)		f)	g)	
	pH3	pH7	pH3	pH7	pH3	pH6	pH3	pH7	pH3	pH7			
Number of origin used	991	1834	931	1213	1241	1564	230	230	115	115	378	983	
Number of isolates	448	912	524	816	640	2141	40	204	24	391	893	2002	9035
Number of T.A. producer obtained	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8

Table 4. R_f values and color reactions of the fermentation product.

	Tartaric acid	Product
Solvent system	R_f value	
<i>n</i> -BuOH-HCOOH-H ₂ O =4:1:5	0.27	0.26
<i>iso</i> -PrOH- <i>tert</i> -BuOH-Benzyl alc.-H ₂ O:90% HCOOH =50:50:150:50:6	0.32	0.34
<i>n</i> -BuOH-AcOH-H ₂ O =4:1:5	0.37	0.38
<i>n</i> -PrOH-2N-NH ₄ OH=7:3	0.15	0.15
<i>n</i> -BuAc-MeOH-NH ₄ OH-H ₂ O =2:4:1:1	0.24	0.24
EtOH-NH ₄ OH=2:1	0.37	0.38
Reagent	Color developed	
Dimethyl yellow+BPB in 96% Ethanol	Yellow on bluish background	Yellow on bluish background
NH ₄ VO ₃ saturated in water	Brick red	Brick red
<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde in Aceticanhydride	Pink fading to yellow	Pink fading to yellow
K ₄ Fe(CN) ₆ +Ferric ammonium sulfate	Gray-blue	Gray-blue
AgNO ₃	Brown	Brown

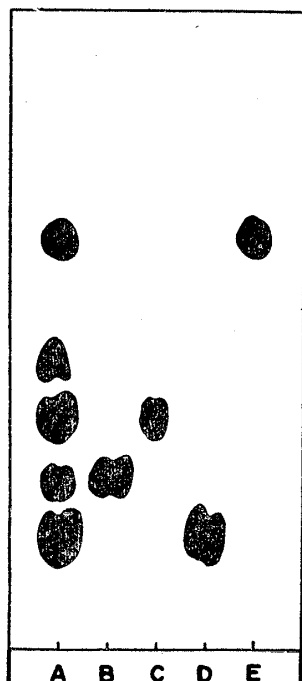


Fig. 1. Paperchromatogram of 6-day fermentation liquid.

Solvent system ; BuOH:AcOH: Water=4:1:1
 A: Broth, B: 5-ketogluconic acid, C: Tartaric acid,
 D: 2-ketogluconic acid, E: Glycolic acid.

Table 5. Separation of acids with Amberlite IRA-402.

Concn. of formic acid	Eluate
0.05 N	Acids I and II
0.1	Acid III
1	Acid IV
2	Acid IV
6	Acid V

Table 6. R_f values and color reactions of Acid I.

Solvent system	Authentic 5-KGA	Product
	R_f value	
<i>n</i> -Butanol-Acetic acid-Water =4:1:1	0.26	0.26
Ethanol-NH ₄ OH =2:1	0.49	0.49
Reagent	Color developed	
Semicarbazide +CH ₃ COONa(in UV)	Blue	Blue
Silver nitrate	Brown	Brown

Table 7. R_f values and melting point of Acid II and its ester.

Solvent system	Authentic gly- colic acid	Product
	R_f value	
<i>n</i> -Butanol-Acetic acid-Water =4:1:1	0.61	0.61
Phenol-Formic acid -Water=75:1:25	0.29	0.29
Melting point		
p-Bromophenacyl ester	138°C	137°C

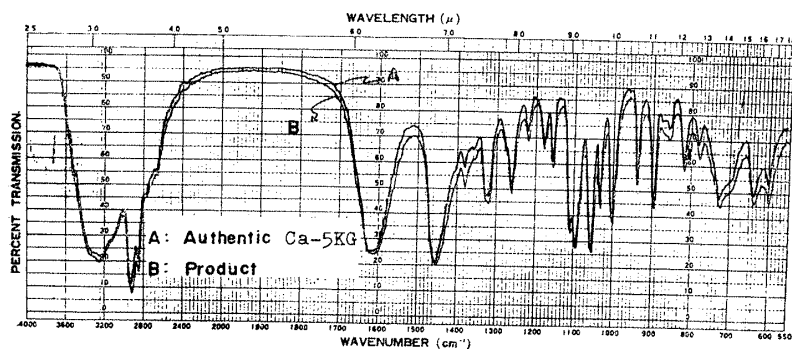


Fig. 2. Infrared spectra of calcium salts of Acid I and 5-ketogluconic acid.

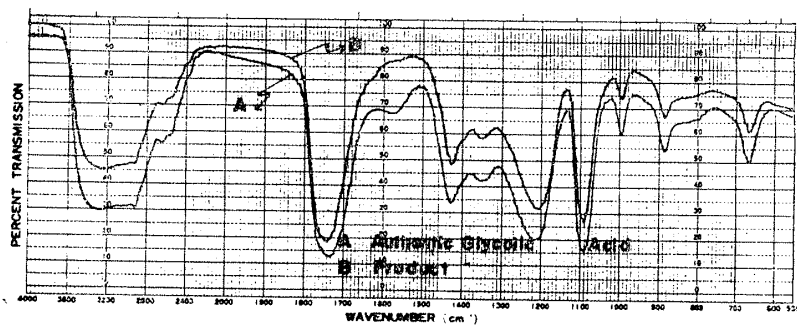


Fig. 3. Infrared spectra of Acid II and glycolic acid.

Acid Iは0.05N ギ酸フラクションを濃縮後, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ の添加によりカルシウム塩として Acid IIおよびIIIから分別沈下によって別けられた. 5-ケトグルコン酸カルシウムと Acid IIのカルシウム塩の IR スペクトルを Fig. 2 に示す. ペーパークロマトグラフィーによって得られた5-ケトグルコン酸 (5-KGA)と Acid Iの R_f 値および発色は Table 6 に示す通りで, これらの結果から Acid Iは5-KGA と同定された.

Acid IIは Acid I~IVの混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ, 25% *n*-ブタノール-75%クロロホルムのフラクションとして純粋に得られた. グリコール酸とともに IR スペクトルを Fig. 3に, R_f 値, 誘導体の融点を Table 7 に示す. これらの結果から Acid IIはグリコール酸と同定された.

Table 8. R_f values and color reactions of Acid III.

	Authentic 2-KGA	Product
Solvent system	R_f value	
<i>n</i> -Butanol—Acetic acid—Water =4:1:1	0.21	0.21
Ethanol— NH_4OH =2:1	0.43	0.42
Reagent	Color developed	
Aniline hydrogen oxalate	Red	Red
<i>p</i> -Anisidine HCl(in UV)	Red	Red
Silver nitrate	Brown	Brown

Table 9. R_f values and color reactions of Acid IV.

	Authentic tartaric acid	Product
Solvent system	R_f value	
<i>n</i> -Butanol—Acetic acid—Water=4:1:1	0.37	0.37
<i>n</i> -Butanol—Formic acid—Water=10:1:5	0.32	0.33
Ethanol— NH_4OH —Water=35:2:13	0.35	0.35
<i>n</i> -Propanol— NH_4OH —Water=6:3:1	0.25	0.24
Reaction	Color developed	
Resorcinol reaction	Red	Red
Gallic acid reaction	Blue	Blue
Silver mirror reaction	Positive	Positive
Fenton's reaction	Violet	Violet
Yashphe's reaction	Violet	Violet

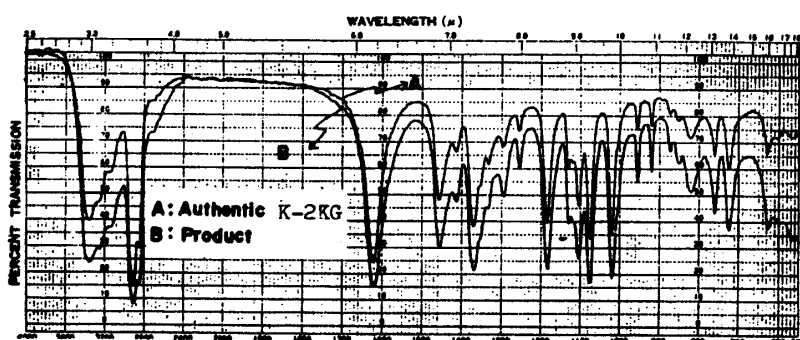


Fig. 4. Infrared spectra of potassium salts of Acid III and 2-ketogluconic acid.

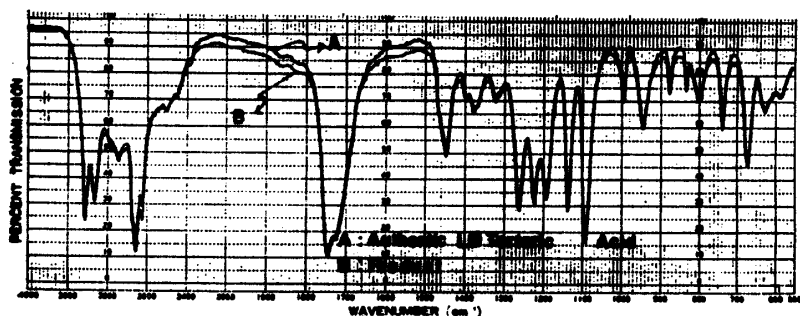


Fig. 5. Infrared spectra of Acid IV and Tartaric acid.

Acid IIIは0.1N ギ酸フラクションを濃縮乾固したのち, 1N K_2CO_3 溶液中で中和しアルコールを加えることによりカリウム塩として結晶する。Fig. 4はAcid IIIのカリウム塩と2-ケトグルコン酸カリウムのIRスペクトルを比較したものである。 R_f 値と発色はTable 8に示した通りで、Acid IIIは2-ケトグルコン酸と同定された。

Acid IVはAcid IIの場合と同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、50% *n*-ブタノール—50%クロロホルムのフラクションとして遊離酸の結晶が得られた。再結晶後、IRスペクトル (Fig. 5), R_f 値および呈色反応 (Table 9)において酒石酸とよく一致し、融点は $167\text{--}169^\circ\text{C}$ (文献 169°C)、元素分析はC: 32.23%, H: 4.03%, O: 63.74% ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ ではC: 32.01%, H: 4.03%, O: 63.96%) で酒石酸と同定された。さらに光学活性を測定

したところ, +12.2° (文献+11.98°) で右旋性酒石酸, すなわち L(+)酒石酸と決定された。

Acid V は 6 N 硝酸で溶出されるが極めて不安定な酸であるため未同定である。安定な形で単離すべく目下検討中である。

Acid V のみは未同定のためその代謝経路上での役割が不明であるが, 同定された 4 種の酸の構造および培養液中での経時的消長, 本菌がグルコン酸から 5-KGA および 2-ケトグルコン酸を, 5-KGA から酒石酸およびグリコール酸を生成することなどから本菌のグルコースから酒石酸の生成経路は Fig. 6 のごとく推定される。

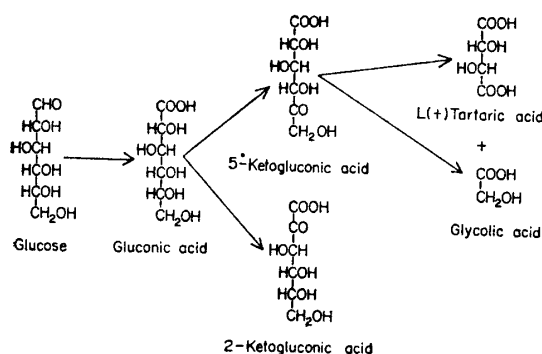


Fig. 6. Proposed pathway of the formation of L(+) tartaric acid from glucose.

3. 菌株の同定 分離菌株のうち有望と思われる 4 株について菌学的性質を調べた結果は Table 10 に示す通りであった。この表に示された諸性質により, これらの 4 株の間には若干の差異は認められるがすべて *Gluconobacter suboxydans* (*Acetobacter suboxydans*) と同定された。

Ribéreau-Gayon¹³⁾ のブドウ中での酒石酸生成経路の推定および前述の推定生成経路から前駆体として 5-ケトグルコン酸が存在すると考えれば, 一般に 5-ケトグルコン酸生産菌として知られる *Gl. suboxydans* のうちの一部が酒石酸生成を行なうことは不思議ではないと思われる。

要 約

1. 種々の培地を用いて自然界から酒石酸生産菌を検索し, マニトール-酵母エキスを培地で柿から有望菌株を得た。
2. 有望菌株のうちから 2026 Y 2 株を選んでグルコースから生成する酸の同定を行ない, L(+)酒石酸を確認

Table 10. Description of *Gluconobacter suboxydans* 1945Y3, 1993Y1, 2026Y2 and 2026Y3.

Rods, 0.4 to 0.6 by 1.0 to 1.8 microns. Motile with polar flagella. Gram-negative.
Mannitol agar colonies : Circular, smooth, entire, convex, opaque, glistening, pale yellow orange, butyrous.
Mannitol agar slant : Growth moderate, filamentous, glistening, dull orange.
Glutamate agar slant : No growth.
Glucose, ethanol and mannitol are not utilized as the sole carbon source with ammoniacal nitrogen.
Acetate and lactate are not oxidized (Leifson's method).
Dihydroxyacetone is produced from glycerol. Acetic acid is produced from ethanol (Shimwell, Carr and Rhodes' method).
Lactate is not oxidized to carbonate (Shimwell, Carr and Rhodes' method).
FeCl ₃ -positive substance is produced from fructose.
Acid but gas is produced from glycerol, xylose, arabinose, glucose, galactose, fructose, mannose, sucrose (slowly), mannitol (slowly), and ethanol, but no acid from maltose, lactose and melibiose. Acid from sorbose by strains of 1945Y3 and 2026Y3, but not by strains of 1993Y1 and 2026Y2.
Grow well at pH 3.5.
Grow well at 25 to 30°
Catalase : Positive.

するとともに培養液中のグリコール酸, 5-ケトおよび 2-ケトグルコン酸を同定した。

3. 2026 Y 2 株の菌学的諸性質を検討した結果, この菌は *Gluconobacter suboxydans* と同定された。

終りにのぞみ菌株の同定に御協力いただいた東京大学応用微生物研究所駒形和男助教授に深謝いたします。

また本研究の一部は米国農務省の P. L. 480 に基づく研究費によった。

なお本報告の要旨は昭和 43 年度日本農芸化学会大会において講演した。

文 献

- 1) Vickery, H.B., Palmer, J.K.: *J. Biol. Chem.*, **207**, 275 (1954).
- 2) 住木: 農化, **5**, 513 (1929).
- 3) Hessler, L.E., Gortner, R.A.: *J. Biol. Chem.*, **119**, 193 (1937).
- 4) Kamlet, J.: *US Patent*, **2**, 314, 831 (1943).
- 5) Kheshgi, S., Roberts, H.R., Bucek, W.: *Appl.*

- Microbiol.*, **2**, 183 (1954).
- 6) Drawert, F., Rapp, A., Ulrich, W.: *Die Naturwissenschaften*. **52**, 305 (1965), *Vitis*, **5**, 199 (1965).
- 7) Bernhauer, K., Böckl, N. : *Biochem. Zeitsch.*, **253**, 16 (1932).
- 8) Lockwood, L.B., Nelson, G.E.N. : *US patent*, 2, 559, 650 (1951).
- 9) Buch, M.L., Dryden, E.C., Hills, C.H. : *Agr. Food Chem.*, **3**, 960 (1955).
- 10) Hulme, A.C. : *Adv. Appl. Microbiol.*, **3**, 343 (1961).
- 11) Breed, R.S., Murray, E. G. D., Smith, N.R. : *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1957).
- 12) Asai, T. : *Acetic acid bacteria*, Univ, of Tokyo Press, P.42 (1968).
- 13) Ribéreau-Gayon, G. : *Phytochemistry*, **7**, 14 71 (1968).

(昭 45. 10. 27 受付)