Rhizopus 属と酵母の連関作用によるフマル酸発酵から L-リンゴ酸への転換発酵 (第 1 報)

酵母によるフマル酸塩から L-リンゴ酸への転換

佐々木西二, 高尾 彰 一 (北海道大学農学部応用菌学教室)

昭和 40 年 6 月 23 日 受理

Conversion of Fumaric Acid Fermentation to L-Malic Acid Fermentation by the Association of *Rhizopus* and Yeast Part I. Conversion of Fumarate to L-Malate by Yeast

By Yuji SASAKI and Shoichi TAKAO

Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo

When fumaric acid fermentation by the genus *Rhizopus* is associated with another micro-organism which has a high fumarase activity, this fermentation will be converted to L-malic acid fermentation. As a fundamental experiment of this investigation, 23 strains of yeasts belonging to the genera, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* and *Torulopsis*, were tested for their fumarase activities. Several strains indicating the high activity were all film yeasts and *Pichia membranaefaciens*, str. 3130, was found to be the best strain.

When *P. membranaefaciens* was cultured in the media containing Na- or Ca-fumarate (4% as fumaric acid) in still culture for 5 days, malic acid yields in either medium were more than 80% of theoretical value. On the other hand, Ca-fumarate was much more favorable than Na-fumarate as a substrate in shake culture, and the yields of malic acid in the Ca-fumarate-containing media were as high as 85% and nearly 100% after 2 and 5 days, respectively.

These results strongly suggest the possibility that the fumaric acid fermentation may be continuously converted to L-malic acid fermentation when *P. membranaefaciens* is cultured together with the genus *Rhizopus*.

(Received June 23, 1965)

緒 論

自然界においては、微生物は一般に他の各種の微生物と助棲、共棲あるいは拮抗的關係を保ちつつ生存し、時には高等動植物とさえも共存連関してその生活作用を営んでおり、1種類の微生物のみで存在することは極めて稀であるといえよう。一方、古くから経験的に造られてきた味噌、醤油、チーズなどの発酵食品の場合でも、当初は自然に混入した各種の微生物の調和ある共同作用によってそれらの醸造、熟成が達せられたものと考えられる。

しかるに微生物学的研究が進むにつれて、その代謝作用を応用した種々の発酵は、ほとんどすべて1種類の微生物の純粋培養のみを用いて行なわれるようになり、他

の微生物の共存については専ら雑菌汚染の問題としてのみ注目されてきた。それ故、微生物の連関作用を利用した発酵はその例極めて少なく、アルコール発酵工業におけるアミロ法、清酒の醸造、アセトン・ブタノール発酵に対する好気菌の助棲⁽¹⁾などが知られている程度である。しかも前記の単一微生物による発酵生産物のうちには、高い収量が容易に得られるものでもその用途が限られているために、工業的生産の対象とならないものが多い。これらの生産物は時には特定の成分を培地に添加し、または特殊の発酵条件を与えて代謝経路を制御、変更させることにより、異なった代謝産物に導かれるか、あるいは培養液からそのまま取り出した後、化学変化に

よってさらに有用な化合物に変え得る場合もある。

しかしこれらの方法とは別に、微生物の連関作用を応用し、生理学的性質の違った微生物を適当に組合せて作用させることによって、単一種類の菌による発酵を転換させ、最終産物としてよりいっそう利用価値の高い化合物を得ることも可能であると思われる。

以上の考えから、著者らはここに転換発酵の対象の 1 つとしてフマル酸発酵を取り上げた。フマル酸は *Rhizopus* 属のかびによって糖から多量に生成されるにもかかわらず、難水溶性のためもあるてその用途は非常に限られているが、これに対して TCA サイクルの中でこの酸と隣接するリンゴ酸は広汎な用途を持つ重要な有機酸である。しかも単一の微生物によって糖から多量のリンゴ酸を生成させた報告は比較的少なく、片桐、立花⁽²⁾の麴菌変異株、阿部ら⁽³⁾の *Aspergillus parasiticus*, *Asp. flavus*, *Asp. oryzae* 及び立花、塩出⁽⁴⁾による *Schizophyllum commune* を用いた報告などが注目されるに過ぎない。

そこでフマル酸 $\rightleftharpoons$ リンゴ酸の反応に関与するフマラーゼ活性の大なる微生物を、適当な条件の下で *Rhizopus* 属のフマル酸発酵に組合せるならば、この発酵が連続的に転換を受け、最終産物としてフマル酸の代りに著量のリンゴ酸が蓄積されるのではないかと考えられる。

フマラーゼは各種の微生物に広く分布しているが、特に北原、片桐⁽⁵⁾は乳酸菌のフマラーゼを詳細に研究し、その結果をもとにしてその後⁽⁶⁾ *Lactobacillus brevis* を用いフマル酸塩を極めて好収率でリンゴ酸塩に変換し得ると報じている。しかし *Rhizopus* 属の好気的なフマル酸発酵と直接組合せて培養させるためには、一般に micro-aerophile である乳酸菌よりも、好気条件下でよく発育できる微生物を用いる方がいっそう好適であろう。そこで著者らは、各種の酵母の中からフマラーゼ活性の強い菌株を選択し、次いでフマル酸発酵を連続的にリンゴ酸発酵へ転換させるための基礎実験として、フマル酸塩を基質としてリンゴ酸への転換条件を検討したので、それらの結果をここに報告する。

実験方法

1. 供試菌株

北大応用菌学教室保存の酵母のうち、Table I に示した 23 株を発酵転換菌として利用価値の有無を調べた。

2. 培地並びに培養方法

これらの酵母を葡萄糖加用馬鈴薯寒天の斜面培地で

Table I. Conversion of Fumarate to Malate by Yeasts.

Species	Strain No.	Rate of spot size on chromatogram	
		Fumaric	Malic
<i>Candida pelliculosa</i>	3628	±	卅
" <i>robusta</i>	3405	卅	卅
" <i>solani</i>	3604	卅	±
" <i>tropicalis</i>	3071	卅	±
" <i>utilis</i>	3254	卅	—
<i>Debaryomyces nicotianae</i>	3430	卅	卅
<i>Hansenula anomala</i>	3001	±	卅
" "	3002	±	卅
" "	3632	+	卅
" <i>saturnus</i>	3003	卅	卅
" sp.	3006	±	卅
<i>Pichia farinosa</i>	3111	+	卅
" <i>membranaefaciens</i>	3130	±	卅
<i>Rhodotorula glutinis</i>	3454	卅	卅
<i>Saccharomyces bayanus</i>	3202	卅	—
" <i>carlsbergensis</i>	3181	卅	—
" <i>cerevisiae</i>	3112	卅	—
" "	3133	卅	—
" "	3156	卅	—
" <i>chevalieri</i>	3495	卅	—
" <i>delbrueckii</i>	3102	卅	—
" <i>thermantonum</i>	3153	卅	±
<i>Torulopsis candida</i>	3317	卅	卅

30°, 3 日間培養した後、フマラーゼ活性の強い菌株の選択に際しては、フマル酸 4% に相当する Na 塩を添加した馬鈴薯浸出液 (水 1000 ml に馬鈴薯細片 250 g を加え 30 分煮沸後の濾液) 40 ml を含む 150 ml 容三角フラスコに接種、30° で 7 日間静置培養した。なお菌株選択後の実験に供した培地並びに培養条件については各実験項目で記述する。

3. 分析方法

有機酸のペーパークロマトグラフィーは、Na 塩として存在している培養液中の酸をアンバーライト IR-120 で遊離にした後、*n*-ブタノール・蟻酸・水 (4:1.5:1) で展開して行なった。また、カラムクロマトグラフィーはペーパークロマトグラフィーの場合と同様に処理した試料を、Bulen ら⁽⁷⁾の方法に準じて、シリカゲルのカラムでクロロホルムとブタノールの混液を用いて展開、その溶出液 3.3 ml ずつをフェノールレッドを指示薬として 0.005 N-NaOH で滴定し、得られたクロマトグラムの各ピークをフマル酸、リンゴ酸の標準液の結果と比較した。

リンゴ酸量は、実験の一部でカラムクロマトグラム上

のリンゴ酸に相当するピークの滴定酸度から求めたほかは、すべて Goodban 及び Stark⁽⁸⁾ の 2,7-naphthalenediol による比色法で測定した。

結 果 及 び 考 察

1. フマラーゼ活性の強い菌株の選択

基質としてフマル酸の Na 塩を添加した培地で 23 株の酵母を 7 日間培養した後、それらの培養液を *n*-ブタノール・蟻酸・水の展開剤でペーパークロマトグラフィーにかけた結果、酵母の種類によっては R_F 0.90 のフマル酸のスポットに対し、 R_F 0.45 の位置にリンゴ酸に相当する顕著なスポットが認められた。Table I は各菌株の培養液のペーパークロマトグラフィーの結果で、十の数で表わしたフマル酸、リンゴ酸のスポットの大きさの程度から、各菌株の有するフマル酸からリンゴ酸への転換能の強さを推測することができる。

酵母のフマラーゼについては、1931 年 Jacobsohn⁽⁹⁾ がその存在を認めて以来、Hirsch⁽¹⁰⁾, Nossal⁽¹¹⁾, Galzy 及び Slonimski⁽¹²⁾, などの報告があるが、彼らが供試した酵母はいずれもパン酵母、ビール酵母など *Saccharomyces cerevisiae* あるいはその類縁種に限られており、その他の酵母としては Hayman 及び Alberty⁽¹³⁾ が用いた *Candida utilis* がみられるのみである。しかるに Table I では、*Saccharomyces* に属する酵母は *Sacch. cerevisiae* のみならずすべてその活性がほとんど見られず、また *C. utilis* についてもリンゴ酸の生成が認められなかった。

これらに対して、フマル酸をリンゴ酸に変える能力が極めて著しいと思われた *Candida pelliculosa* 並びに *Hansenula*, *Pichia* 属の各菌株は、前述の酵母と違っていずれも培養液面に皮膜を形成する非常に好気的な酵母ばかりであることは注目すべき点であろう。因みに楠瀬⁽¹⁴⁾ はフマル酸の定量にパン酵母のフマラーゼを用いようと試みたが、その活性が弱いために使用できなかったと記しており、著者らの結果と考え合せて、従来フマラーゼの研究に用いられてきた *Saccharomyces* 属の酵母は、この酵素を持っても活性は概して弱く、むしろ産膜性の酵母が一般には遙かに強いフマラーゼ活性を有するのではないかと考えられるが、これについては今後の検討に待つこととする。

次にペーパークロマトグラフィーの結果をさらに確かめるために、シリカゲルカラムで各菌株の培養液のカラムクロマトグラフィーを行なった。その結果、ペーパ

Fig. 1. Chromatogram of Acid in the Broth of *Saccharomyces cerevisiae*, 3112.

Fig. 2. Chromatogram of Acid in the Broth of *Pichia membranaefaciens*, 3130.

クロマトグラフィーでリンゴ酸が検出されなかった酵母では、たとえば Fig. 1 に示した *Sacch. cerevisiae*, str. 3112 の場合でも明らかな如く、培地に加えたフマル酸に相当するピークだけが現われた。なお溶出 100 本以後に急に酸度が上昇するのは、この時期にクロホルムとブタノールの混合割合を変えるために、溶剤の処理に用いた硫酸がわずかに溶出してくるためではないかと思われる。一方、先のペーパークロマトグラム上のリンゴ酸のスポットが著しかった菌株では、たとえば Fig. 2 の *Pichia membranaefaciens* のように、基質として添加したフマル酸の大部分がリンゴ酸に変っているものと認められた。そこで先にペーパークロマトグラフィーでフマラーゼ活性が強いと推定された 7 菌株の酵母（リンゴ酸相当のスポットが卅のもの）のリンゴ酸収率を、カラムクロマトグラフィーの滴定酸度から求めたのが Table II である。なおここでリンゴ酸の収率とは、基質のフマル

Table II. Yield of Malic Acid by Some Strains.

Species	Strain No.	Yield of malic, after 7 days
<i>Candida pelliculosa</i>	3628	57.48%
<i>Hansenula anomala</i>	3001	70.37
" "	3002	85.93
" "	3632	55.40
" sp.	3006	84.09
<i>Pichia farinosa</i>	3111	49.09
" <i>membranaefaciens</i>	3130	86.58

Fig. 3. Conversion of Fumarate to Malate by Three Strains.

○—○ *Pichia membranaefaciens*
 △—△ *Hansenula anomala*
 ×—× *Hansenula sp.*

酸がすべてリンゴ酸に変った場合を 100% として算出したものである。

この表から, *Hansenula anomala*, str. 3002; *Hansenula sp.*, str. 3006 及び *P. membranaefaciens*, str. 3130 の 3 菌株はいずれもリンゴ酸収率 80% 以上で, リンゴ酸への転換能が特に著しいと認められたが, さらにその転換の経過を比較するため, 培養 7 日後まで日を追ってこれら 3 菌株の培養液をカラムクロマトグラフィーにかけ, リンゴ酸生成率を算出したのが Fig. 3 である。図から明らかなように *P. membranaefaciens* は他の 2 菌株に比しフマル酸からリンゴ酸への転換速度が非常に速く, 従って最良の菌株であると判定された。

2. L-リンゴ酸の単離確認

先のペーパークロマトグラフィー及びカラムクロマトグラフィーの結果, フマル酸から変化した有機酸がリンゴ酸であることはすでに推定されているが, これが L-リンゴ酸であることを確認するため, *P. membranaefaciens* の培養液から酸の単離を行なった。すなわちこれまでの実験と同様, 7 日間この酵母を培養した液を硫酸酸性にした後, エーテルで長時間連続抽出し, 抽出された有機酸を酢酸エチルと石油エーテルで繰返し再結した。かくして得られた結晶は融点 98~100° を示し L-リンゴ酸の融点 99~100° (文献値) と一致した。次にこの酸の旋光度を Krebs ら⁽¹⁵⁾の方法に従いモリブデン酸の存在下で測定した。なおこの際, 試料水溶液のリンゴ酸濃度は Goodban ら⁽⁸⁾の 2,7-naphthalenediol を用いる比色法で求めた。その結果, $[\alpha]_D^{20} = +1345$ (濃度 2.34 mg/ml) で, Krebs らの $[\alpha]_D^{17} = +1335$ (濃度 2.50 mg/ml) 及び +1407 (濃度 1.25 mg/ml) とほぼ一致し, 従って酵母によってフマル酸から変化した有機酸は L-リンゴ酸であることが確認された。

3. 振盪培養によるフマル酸からリンゴ酸への転換

先に静置培養で行なった選択試験の結果, フマル酸からリンゴ酸への転換能が著しかった菌株は, すべて産膜性の酵母であった。それ故, よりいっそう好気的な振盪培養を行なえば, これら酵母によるリンゴ酸生成率をさらに増加させ, かつ培養期間も短縮することが可能ではないかと考えられる。そこで Fig. 3 で比較したフマラーゼ活性の強い 3 菌株の酵母を, これまでと同じ組成の培地 10 ml を含む大型試験管に接種し, 往復振盪培養機 (振幅 2 cm, 350 r. p. m.) 上で 5 日間培養した。なおリンゴ酸の定量は以後, Goodban ら⁽⁸⁾の 2,7-naphthalenediol による比色法で行なった。その結果は Table III の如くで, 先の静置培養で最良の菌株として選択された *P. membranaefaciens* は, 振盪培養においても最もすぐれ, その 5 日間培養ですでに静置培養の 7 日間に匹敵する約 88% の最高のリンゴ酸生成率を示すことが分った。

Table III. Conversion of Fumarate to Malate in Shake Culture.

Species	Strain No.	Yield of malic, after 5 days
<i>Pichia membranaefaciens</i>	3130	88.13%
<i>Hansenula anomala</i>	3002	9.95
" sp.	3006	69.08

4. 合成培地におけるリンゴ酸への転換

緒論で述べた如く, この研究の目的はフマラーゼ活性の強い酵母によってフマル酸発酵を連続的に転換し, 最終産物としてリンゴ酸を得ることである。従来フマル酸発酵には専ら種々の合成培地が用いられているので, 前述の実験で基本培地として用いてきた馬鈴薯浸出液の代りに, すでに著者ら⁽¹⁶⁾がフマル酸発酵の研究にとり上げた Waksman ら⁽¹⁷⁾の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, FeCl_3 0.002% からなる合成培地を適用し, これに炭素源として糖の代りにフマル酸のみを 4%, これまでの Na 塩のほかに Ca 塩としても添加した。これらの培地に *P. membranaefaciens*, str. 3130 を接種し, 静置, 振盪の両法で 5 日間培養してリンゴ酸への転換の如何を試験した。

その結果は Fig. 4 に示したが, 静置培養ではフマル酸の Na 塩と Ca 塩のリンゴ酸への転換速度はほぼ等しく, 培養 5 日後のリンゴ酸生成率も共に 80% 以上であるのに対し, 振盪培養では Ca 塩が Na 塩より遙かに好適で, 培養 2 日後すでに 85%, 5 日後には 100% 近いリンゴ酸生成率に達した。フマル酸発酵では培地に CaCO_3 を添加し, 生成されたフマル酸を不溶性の Ca 塩として蓄積させるのが常であり, 従って以上の実験結果から, フマル酸発酵に *P. membranaefaciens* の如き酵母を組合せるならば, これをリンゴ酸発酵に転換し得る可能性

Fig. 4. Conversion of Fumarate to Malate in Synthetic Media in Still and Shake Cultures (Fumaric Acid, 4%).

○—○ Shake (Ca-) △—△ Still (Ca-)
●—● Shake (Na-) ▲—▲ Still (Na-)

Fig. 5. Conversion of Fumarate to Malate in Synthetic Media in Still and Shake Cultures (Fumaric Acid, 10%).

○—○ Shake (Ca-) △—△ Still (Ca-)
●—● Shake (Na-) ▲—▲ Still (Na-)

が極めて大きいと考えられる。ことに, フマル酸の Ca 塩を用いた振盪培養がリンゴ酸生成に最も良かったことは, この転換発酵の前段階となる *Rhizopus* 属のフマル酸発酵そのものに対しても好気的条件が好適であることから, 連続的なリンゴ酸への転換発酵を試みる場合非常に好都合であると思われる。

以上の実験では, 基質として加えたフマル酸の濃度はすべて 4% であったが, さらに濃度を高めた場合の転換効果を見るため, フマル酸濃度を 10% として培地に添加した。その他の培養条件は前実験と全く同じである。

その結果は Fig. 5 の如くで, フマル酸濃度 4% の場合に比べ, リンゴ酸生成速度は静置, 振盪培養とも, また Na 塩, Ca 塩いずれにおいてもかなり遅れ, かつ培養終了時のリンゴ酸生成率も低いことが分った。ただし Ca 塩を用いた振盪培養のみは, 培養 5 日間でフマル酸として 4% 添加の時と同様, 100% 近い最高のリンゴ酸生成率を示した。

因みに, 従来のフマル酸発酵では, 発酵液中に蓄積されるフマル酸濃度は最高約 4~5% (基質の糖濃度 10% としてその 40~50% の収率) であり, 従って今後実際にフマル酸発酵を転換し連続的にリンゴ酸を生成させようとする場合には, 今回の実験の如きフマル酸濃度 10% ということは考えられず, フマル酸として 4% 添加で得られたこれまでの効率より転換結果が, 専らその基礎と

して役立つものと思われる。

要 括

Rhizopus 属かびのフマル酸発酵に、フマラーゼ活性の強い酵母を組合せることによってこの発酵を転換し、最終産物としてフマル酸よりも利用価値の高い L-リンゴ酸を大量に蓄積させようとし、その基礎実験として 23 株の酵母をフマル酸塩を含む培地で培養した結果、フマル酸から L-リンゴ酸への転換能の最もすぐれた菌株として、*Pichia membranaefaciens*, str. 3130 を選択した。なおこの菌株以外にもフマラーゼ活性の著しいもの数株が見出されたが、それらはいずれも産膜性の酵母で、一方 *Saccharomyces* 属の酵母ではほとんどその活性が認められなかった。

フマル酸の Na 塩または Ca 塩を、フマル酸として 4 % の濃度で培地に添加し *P. membranaefaciens* を培養した場合、静置培養ではどちらの塩でもリンゴ酸への転換速度がほぼ等しく、培養 5 日間で共に 80 % 以上のリンゴ酸生成率を示したが、振盪培養では Ca 塩が Na 塩よりも遙かに好適で、培養 2 日後すでに 85 %, 5 日後には 100 % 近いリンゴ酸生成率に達した。これらの結果から、*Rhizopus* 属のフマル酸発酵に *P. membranaefaciens* を組合せて培養するならば、この発酵を連続的に L-リンゴ酸発酵へ転換し得る可能性が大いと考えられる。

本研究を行なうに当り協力をいただいた庄村喬氏に深く感謝の意を表す。また本研究の大要は昭和 39 年 7 月、日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) 佐々木西二, 渋谷嘉正: 応用菌学, **1**, 42(1946); 佐々木西二, 花野芳雄, 門田 元: 同上, **1**, 90 (1946); 佐々木西二, 門田 元: 同上, **2**, 24 (1947).
- (2) 片桐英郎, 立花 精: ビタミン, **6**, 674(1953); 日本特許 234,710 (1957).
- (3) 阿部重雄, 古屋 晃, 斎藤 健, 高山健一郎: 本誌, **33**, 571 (1959); 阿部重雄, 斎藤 健, 高山健一郎: 同上, **34**, 66 (1960).
- (4) S. Tachibana, J. Shiode: VIII th Intern. Congr. Microbiol., Abstrs., Montreal, Canada, p. 67 (1962).
- (5) 北原覚雄, 片桐英郎: 本誌, **14**, 752 (1938).
- (6) K. Kitahara, S. Fukui, M. Misawa: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **6**, 108 (1960).
- (7) W. A. Bulen, J. E. Varner, R. C. Burrell: *Anal. Chem.*, **24**, 187 (1952).
- (8) A. E. Goodban, J. B. Stark: *ibid.*, **29**, 283 (1957).
- (9) K. P. Jacobsohn: *Biochem. Z.*, **234**, 401 (1931).
- (10) H. M. Hirsch: *Biochim. et Biophys. Acta*, **9**, 674 (1952).
- (11) P. M. Nossal: *Biochem. J.*, **50**, 349 (1952).
- (12) P. Galzy, P. P. Slonimski: *Compt. rend.*, **245**, 2556 (1957).
- (13) S. Hayman, R. A. Alberty: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **94**, 812 (1961).
- (14) 楠瀬正道: 蛋白質 核酸 酵素, **1**, 126(1956).
- (15) H. A. Krebs, L. V. Eggleston: *Biochem. J.*, **37**, 334 (1943).
- (16) 佐々木西二, 高尾彰一: 北大農学部紀要, **3**, 70 (1958).
- (17) S. A. Waksman, I. J. Hutchings: *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 545 (1937).