酵母の有機酸発酵に関する研究 (第5報)

酵母による *n*-パラフィン類からのクエン酸の生産

田淵武士, 田中優行, 田原康孝, 阿部又三

(東京教育大学農学部)

昭和 45 年 6 月 30 日 受理

Studies on Organic Acid Fermentation in Yeasts

Part V. Production of Citric Acid from *n*-Paraffins by Yeasts

By Takeshi TABUCHI, Masayuki TANAKA, Yasutaka TAHARA and Matazo ABE

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education

The fermentative production of citric acid from *n*-paraffins has been studied in detail by the use of *Candida lipolytica* No. 6-20, which was isolated under UV irradiation from the original strain No. 228. The accumulation of citric and *d*-isocitric acids was considerably affected with the kinds of *n*-paraffins as well as with incubation temperatures, composition of media, etc. The concentration of ferric ion in media was found to have a close relations with the accumulation of citric and *d*-isocitric acids, and accordingly, by adjusting adequately the concentration of this ion, the accumulation of citric acid increased remarkably with a decrease in that of *d*-isocitric acid. When the strain was grown in the media composed of *n*-hexadecane or a commercial product of *n*-paraffin mixture (6%), NH_4Cl (0.3%), KH_2PO_4 (0.05%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05%), thiamine hydrochloride (50 $\mu\text{g/l}$), CaCO_3 (8%) and deionized water on a rotary shaker, citric acid was produced in the yields of 140 to 150 per cent on the basis of *n*-paraffins supplied and, at the same time, *d*-isocitric acid was produced in the yields of 20 to 30 per cent.

(Received June 30, 1970)

緒 言

著者ら⁽¹⁻⁴⁾はこれまでに種々の酵母, なかでも *Candida* 属の酵母株が一定の振盪培養条件下で, 糖質からだけでなく, *n*-パラフィン類からもクエン酸を *d*-イソクエン酸とともに生産し, これらを培地中に多量に蓄積するという事実を明らかにした。

さて, 酵母によってクエン酸を発酵生産するに当り, 発酵原料として *n*-パラフィン類を使用するならば, 糖質を用いる場合に比べてクエン酸をさらに有利に生産しうるのではなからうかと考えられる。このような観点から著者らはやや長期にわたってこの面の検討を行なってきた。まず *n*-パラフィン類からクエン酸を多量に生産しうる 1 優良酵母株を選択したのち, この優良株について培養条件を仔細に検討した。その結果, 供試の酵母株

に関するかぎり, クエン酸も *d*-イソクエン酸もともに, *n*-パラフィンの種類によってはもちろん, 培養温度, 培地の組成などによってもかなり動揺することが見出された。なかでも培地中の鉄イオンの濃淡による動揺は著しく, これを適当に調節すると, *d*-イソクエン酸の生産がかなり抑制され, 逆にクエン酸の生産が著しく高まるといふ事実が見出されたが, このような実験結果から, 供試の酵母株について *n*-ヘキサデカンあるいは市販の *n*-パラフィン混合物 6% 仕込みの振盪培養で, クエン酸を原料仕込量当り 140~150% の割合にまで生産させることに成功した。この場合, *d*-イソクエン酸は原料仕込量に対して 20~30% 程度の割合で生産されたが, より優れた菌株を用い, 培養条件についてもさらに改善するならば, 副生する *d*-イソクエン酸の生産量をもっと減少させ得, クエン酸の生産量をそれだけ高めることができ

るものと信じられる。

実験方法

(1) 供試菌株： さきに天然からクエン酸生産性優良株として分離した *Candida lipolytica* No. 228 株⁽¹⁻⁴⁾ に紫外線を照射して得たいくつかの優良株中の 1 株, No. 6-20 株を選んで供試した。

(2) 培養法： 種母培養； どの実験の場合も、培地としては *n*-ヘキサデカン 6%, NH_4Cl 0.4%, KH_2PO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 酵母エキス 0.1% (すべて w/v%) の組成の水道水溶液 25 ml を 300 ml 容襲つき三角フラスコ内に入れ、殺菌後、これに殺菌炭酸カルシウム 1 g を加えたものを用いた。また、培養はこの培地に供試菌株の馬鈴薯-ブドウ糖-寒天斜面培養 4 白金耳をもって接種したのち、26°C のもと 220 rpm の回転式振盪機で 2~3 日間振盪してこれを行なった。

本培養； 目的に応じて種々の組成の養液を用いたが、どの場合も、容器としては種母培養の場合と同様、300 ml 容襲つき三角フラスコを用い、その数個のおおのに養液 25 ml ずつを分注し、殺菌後さらに殺菌した炭酸カルシウムを一定量ずつ加えると同時に、上記の種母培養物 1 ml ずつをもって接種し、これらを種母培養の場合と同じ条件のもとで一定期間振盪培養した。なお、中和剤として炭酸カルシウムを用いるこの本培養では発酵原料としての *n*-パラフィン類を 10%, 12% あるいはそれ以上の濃度で用いることも可能であったが、そのような高濃度仕込みを行なうと、パラフィンの種類によっては培地中に不溶性のクエン酸カルシウムが多量に生成し、培養物の流動性が全体的に著しく低下するとともに発酵速度も次第に低下するので、この本培養でも、パラフィン類は種母培養の場合と同様すべて 6% の濃度で用いた。

(3) 分析方法： クエン酸および *d*-イソクエン酸については前報⁽⁴⁾で設定した方法によって定量し、その他についてもすべてこれまでと同様の方法で実施した。

実験結果

(1) 各種 *n*-パラフィンからクエン酸および *d*-イソクエン酸の生産

供試の *Candida lipolytica* No. 6-20 株は、実施の条件のもとで各種 *n*-パラフィンからクエン酸と *d*-イソクエン酸とを Fig. 1 に示すような状態で生産した。Fig. 1

Fig. 1. Production of Citric and *d*-Isocitric Acids from Different *n*-Paraffins by *Candida lipolytica* No. 6-20.

The strain was grown at 26°C for 6 days in 300 ml indented Erlenmeyer flasks containing each 25 ml of the medium composed of indicated *n*-paraffin (60 g), NH_4Cl (3 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), yeast extract (1 g), CaCO_3 (80 g) and tap water (1 liter) on a rotary shaker (220 rpm).

□ Citric acid ■ *d*-Isocitric acid

から明らかなように、供試の菌株はオクタンにはほとんど生育せず、したがってこれからは酸を生産しなかったが、デカン、ドデカン、テトラデカンおよびヘキサデカンからは酸をほぼこの順に多量に生産するのが認められた。これらの成績に比べるとオクタデカンからのそれは著しく劣っていたが、これはその融点が低く、培養の過程で粒状にかたまってしまったためと解される。

(2) 培養温度とクエン酸ならびに *d*-イソクエン酸の生産との関係

Candida lipolytica は 10°C のもとでもよく生育する、いわゆる中温菌であり、しかも培養温度によって異なった生理作用を示すことが報告されている⁽⁵⁾。そこで供試の *Candida lipolytica* 株が 22, 26 および 30°C の各温度のもとで酸類をそれぞれどのような状態で生産するかをしらべた。その結果、Fig. 2 に示すように、菌体の生育には 30°C が最適であり、酸生産のためには 22 ないし 26°C が、とくに 26°C が最適条件であることが知られた。

(3) 培地の組成とクエン酸ならびに *d*-イソクエン酸の生産との関係

a) 窒素源の濃度との関係： 前報までの結果に徴し、窒素源としては塩化アンモニウムを使用した、その濃

Fig. 2. Relationships between Temperature and Production of Citric and *d*-Isocitric Acids in *Candida lipolytica* No. 6-20.

The strain was grown at the indicated temperature in 300 ml indented Erlenmeyer flasks containing each 25 ml of the medium composed of *n*-hexadecane (60 g), NH_4Cl (3 g), KH_2PO_4 (0.5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), yeast extract (1 g), CaCO_3 (80 g) and tap water (1 liter) on the rotary shaker.

○—○ Citric acid □—□ *d*-Isocitric acid
 △—△ Growth (unit optical density at 580 mμ of culture broth acidified with HCl)

Fig. 3. Relationships between Nitrogen Concentration and Production of Citric and *d*-Isocitric Acids in *Candida lipolytica* No. 6-20.

The strain was grown at 26°C for 6 days in 300 ml indented Erlenmeyer flasks containing each 25 ml of the medium composed of *n*-hexadecane (60 g), NH_4Cl (amounts indicated in the figure), KH_2PO_4 (0.5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), yeast extract (1 g), CaCO_3 (80 g) and tap water (1 liter) on the rotary shaker.

○—○ Citric acid
 □—□ *d*-Isocitric acid

度と酸生産との間には Fig. 3 に示すような関係のあることが知られた。すなわち、窒素源の濃度によって酸の生成量が大きく変動すること、および *n*-ヘキサデカン仕込濃度 6% という実施の条件に関する限り、クエン酸も *d*-イソクエン酸ともに塩化アンモニウムの濃度が 0.3% の場合に最も多量に生産されるという事実が見出された。なお、前報のように、発酵原料がブドウ糖の場合にも、窒素源の濃度によって酸生成量は変動するが、その場合の C/N 率は *n*-パラフィンを発酵原料とする本実験の場合のそれと明らかに異なっている。

b) 酸性りん酸カリウムおよび硫酸マグネシウムの各濃度との関係： くりかえし検討した結果、酸性りん酸カリウムの濃度としては 0.05% 付近が、また、硫酸マグネシウムの濃度としては 0.05% から 0.25% までの範囲がクエン酸の生産に最適であることが知られた。なお、これらの結果は前報の発酵原料としてグルコースを用いた場合のそれと、傾向としてはほぼ一致していた。

c) チアミンのクエン酸ならびに *d*-イソクエン酸の生産におよぼす影響： 前記の各実験では、便宜上ビタミン源として酵母エキスを使用了が、供試の酵母株は他の *Candida lipolytica* 株と同様、ビタミンとしてチアミンのみを要求したので、その添加量と酸生成との関係

Fig. 4. Effect of Thiamine Concentration on Production of Citric and *d*-Isocitric Acids in *Candida lipolytica* No. 6-20.

The strain was grown at 26°C for 6 days in 300 ml indented Erlenmeyer flasks containing each 25 ml of the medium composed of *n*-hexadecane (60 g), NH_4Cl (3 g), KH_2PO_4 (0.5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), thiamine hydrochloride (amounts indicated in the figure), CaCO_3 (80 g) and tap water (1 liter) on the rotary shaker.

○—○ Citric acid □—□ *d*-Isocitric acid
●—● α -Ketoglutaric acid

をしらべてみた。その結果, Fig. 4 に示すように, チアミンは培地中に塩酸塩として 1 $\mu\text{g/l}$ 程度添加されてあれば, クエン酸も *d*-イソクエン酸もともに, かなりの量まで生産され, 25 $\mu\text{g/l}$ 以上が添加されてあると, これら両酸は酵母エキスをを用いる場合とほぼ同程度にまで生産されることが知られた。なお, チアミン添加量が 1 $\mu\text{g/l}$ 前後のときはクエン酸だけでなく *d*-イソクエン酸の生成も少ないが, これと並行して少量ながら α -ケトグルタル酸^(4,6)の生成・蓄積する事実が認められた。一方, チアミン添加量が 25 $\mu\text{g/l}$ 以上のときはその 25 倍量も過剰に添加しても, クエン酸ならびに *d*-イソクエン酸の生成に対してほとんど変動をおよぼさないという事実も見出された。

d) 鉄イオンのクエン酸ならびに *d*-イソクエン酸の生産におよぼす影響: 本実験では, イオン交換樹脂を使用する通常の純水製造装置によって水道水から得た, いわゆる脱イオン水をもって調製した培地を使用し, 中和剤としても和光純薬製の特級炭酸カルシウムを使用した。こうしてまず, 重金属塩として鉄, マンガン, 亜鉛および銅の各硫酸塩添加量と酸生成との関係をしらべたところ, 鉄塩の添加量の多少によってクエン酸と *d*-イソクエン酸との生成比が著しく変動するという事実が見

Fig. 5. Effect of Iron on Production of Citric and *d*-Isocitric Acids in *Candida lipolytica* No. 6-20.

The strain was grown at 26°C in 300 ml indented Erlenmeyer flasks containing each 25 ml of the medium composed of *n*-hexadecane (60 g), NH_4Cl (3 g), KH_2PO_4 (0.5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), thiamine hydrochloride (50 $\mu\text{g/l}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (amounts indicated in the figure), CaCO_3 (80 g of guaranteed reagent) and deionized water (1 liter) on the rotary shaker.

Amounts of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ added: (A) zero, (B) 1 mg/liter, (C) 10 mg/liter.

○—○ Citric acid □—□ *d*-Isocitric acid
●—● Citric acid + *d*-Isocitric acid △—△ Growth (unit optical density)

出された。つぎにこの発見に基づいて硫酸第一鉄(7水塩)添加量を0, 1および10 mg/lとした場合の各培養における培養経過をしらべてみたところ Fig. 5 に示すような結果が得られた。すなわち, どの培養においても生産されるクエン酸と *d*-イソクエン酸との総量に関してはほぼ同じであるにもかかわらず, 培地中の鉄イオン含量をできるだけ少なくした培養においては *d*-イソクエン酸の生産がある程度抑制される半面, クエン酸の生産が大幅に高まり, その結果として培養物 1 ml 当り 85 ~ 90 mg の割合まで蓄積するという事実が見出された。

Fig. 6. Production of Citric and *d*-Isocitric Acids from a Commercial Product of *n*-Paraffin Mixture by *Candida lipolytica* No. 6-20.

The strain was grown at 26°C in 300 ml indented Erlenmeyer flasks containing each 25 ml of the medium composed of a commercial product of *n*-paraffin mixture* (60 g), NH_4Cl (3 g), KH_2PO_4 (0.5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g), thiamine hydrochloride (50 $\mu\text{g/liter}$), CaCO_3 (80 g of guaranteed reagent) and deionized water (1 liter) on the rotary shaker.

* The carbon composition of the *n*-paraffin mixtures was as follows: C_{10} , 0.1; C_{11} , 1.4; C_{12} , 7.9; C_{13} , 47.8; C_{14} , 40.8 and C_{15} , 0.5%.

○—○ Citric acid
□—□ *d*-Isocitric acid
●—● Citric acid + *d*-Isocitric acid
△—△ Growth (unit optical density)

この量は *n*-ヘキサデカン仕込重量に対して 140~150% に相当するが, この事実から, つぎに *n*-ヘキサデカンの代りに, *n*-トリデカン 50% 近くを含有する手持ちの *n*-パラフィン混合物を発酵原料として同じ条件のもとで培養を行なってみた。Fig. 6 は本実験で得られた代表的な 1 例についてとりまとめたものである。すなわち, ここに使用した *n*-パラフィン混合物は別記のような組成のものであったが, 供試の菌株はこれからも *n*-ヘキサデカンからの場合とほぼ同収率でクエン酸を生産することが知られた。

要 約

さきにクエン酸生産性優良株として天然から分離した *Candida lipolytica* No. 228 株から紫外線照射下にて得た 1 優良株について培養条件を検討した。その結果, クエン酸の生産も *d*-イソクエン酸のそれも, とともに発酵原料としての *n*-パラフィンの種類をはじめ, 培養温度, 培地の組成などによってその生産量がかなり動揺すること, とりわけ, 培地中の鉄イオンの濃淡による動揺は著しく, これを適当に調節すると, *d*-イソクエン酸の生産がかなり抑制され, 逆にクエン酸の生産が著しく高まるという事実が見出された。このような実験結果から, 供試の酵母株について *n*-ヘキサデカンあるいは市販の *n*-パラフィン混合物 6% 仕込みの振盪培養で, クエン酸を原料仕込量当り 140~150% の割合にまで生産させることができた。この場合, 同時に *d*-イソクエン酸は原料仕込量に対して 20~30% 程度の割合で生産された。

- (1) M. Abe and T. Tabuchi: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 392 (1968).
- (2) 田淵武士, 田中優行, 阿部又三: 農化, **43**, 154 (1969).
- (3) 阿部又三, 田淵武士, 田中優行: 農化, **44**, 493 (1970).
- (4) 田中優行, 田原康孝, 田淵武士, 阿部又三: 農化, **44**, 499 (1970).
- (5) R. M. Baxter and N. E. Gibbons: *Canad. J. Microbiol.*, **8**, 511 (1962).
- (6) R. Tsugawa, T. Nakase, T. Kobayashi, K. Yamashita and S. Okumura: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 158 (1969).