

Rhizopus の乳酸醱酵に関する研究 (第1報)

乳酸生成能と醱酵生産物について

蟹江松雄・出来三男

Lactic Acid Formation by a Fungus of the Genus *Rhizopus*:

1. Lactic Acid Formation and Fermentation Products

Matsuo KANIE and Mitsuo DEKI

(Laboratory of Applied Microbiology)

緒 論

WAKSMAN 等¹⁾は *Rhizopus* の乳酸醱酵はヘテロ醱酵型式に従い酒精及び炭酸ガスを副生し乳酸生成率は最高 75% となるべきであるとして次の如き反応式を提出している： $10C_6H_{12}O_6 \rightarrow 15C_3H_6O_3 + 2C_2H_5OH + 11CO_2$ 。これに対して北原等²⁾は中和剤として $BaCO_3$ を使用すると乳酸率が 99% であつたことから $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_6O_3$ なる式で示されるようにその醱酵型式はホモ型であると述べ、細菌或は筋肉の解糖機構と類似の方法で乳酸の生成が行われているのであろうと推論しているが、分解経路に関する実証は行われていない。WAKSMAN 等¹⁾、CARSON 等³⁾は乳酸生成に酸素の重要性を認めており、また坂口等⁴⁾も乳酸生成株を用いて葡萄糖を基質とした場合強力な通気攪拌は乳酸の取得率を高め、酸素の醱酵阻害は認められないと報告している。酸素要求に関するこれらの結果は *Rhizopus* の乳酸醱酵が乳酸菌、もしくは筋肉における解糖機構と全く趣きを異にすることを示唆するものであり、北原等のホモ型式を認めるにしても尙検討の余地のあることを示すものである。以下の実験は *Rhizopus* の乳酸生成能に関する上記のごとき特異性等に吟味検討を加えその醱酵機構についての知見を得ようとの目的で行われた。本報告では葡萄糖からの醱酵生産物、乳酸生成に対する酸素の効果及び阻害剤の影響、各種炭素源からの乳酸生成、ペーパークロマトグラフィーによる醱酵液の有機酸等に関して得られた知見を述べる。

実 験 方 法

菌株 用いられた菌株は各地土壌及び殺類から分離された *Rhizopus* のうち次の増殖培地から乳酸生成能の最も高い株であり、これが分類上の位置は追つて報告せんとするものである。

増殖培地組成 Czapek 培地における KNO_3 を $NH_4H_2PO_4$ で置き換えた培地を用いた。すなわち葡萄糖 5 gm, $NH_4H_2PO_4$ 0.2 gm, K_2HPO_4 0.1 gm, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 gm, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 gm, KCl 0.05 gm, H_2O 100 ml からなる培養液 (pH 5.8) 100 ml を 300 ml 容三角フラスコに入れ、15 lbs 15 分間殺菌し、胞子を接種後、予め殺菌した $CaCO_3$ を 3% 宛添加した。胞子接種量は三角フラスコ一個当り 1 ml (胞子数約 10^6 個) とし、予め麴汁寒天斜面上に培養させたものを無菌水に懸濁して用いた。培養は $30^\circ C$ で行つた。振盪培養は上記のごとく胞子を接種した後、12~15 時間静置培養して発芽させ、その後 $30^\circ C$ で毎分 110 回の往復振盪機にかけて培養した。

乳酸の定量は BARKER 及び SUMMERSON⁵⁾の方法に従い、AKA 光電管比色計を用い S^{76} を濾光板として行つた。糖の定量は HANES 法⁶⁾により、酒精の定量は酸化法⁷⁾を用い、また揮発性有機酸は水蒸気蒸溜液の $N/10$ NaOH による滴定値から醋酸として求めた。

実験結果及び考察

増殖細胞による乳酸生成能

振盪培養及び静置培養における糖消費量、乳酸及び酒精生成量を測定した結果を示すと Table 1 の通りである。

Table 1. Lactic acid formation in growing culture

Condition of cultures	Age of cultures (hrs)	Glucose consumed (mg/20 ml)	Fermentation products				Mycelial weight (mg on dry basis)
			Lactic acid (mg/20 ml)	Lactic acid yields (%)	Alcohol (mg/20 ml)	Volatile acid (mg/20 ml)	
Shaking culture	72	5130	3240	63.1	40.7	trace	332.6
Static culture	96	578	125.2	21.6	—	—	83.0
	120	720	462.0	64.1	—	—	101.9
	132	820	462.8	56.4	—	—	162.8

Table 1 からわかるように、この菌の酸酵生産物は主として乳酸であつて、その消費糖に対する割合は、振盪培養においても、静置培養でもほぼ等しく 63~64% を示した。ただし静置培養では糖の消費速度が極めて遅いことを知る。揮発性有機酸の生成は殆ど観察されなかつたが酒精が副生された。次に振盪培養における基質濃度と乳酸生成量との関係をしらべた。

Table 2. Lactic acid formation in different concentrations of glucose

Approximate concentrations of glucose (%)	Glucose consumed (mg/20 ml)	Fermentation products				Mycelial weight (mg on dry basis)
		Lactic acid (mg/20 ml)	Lactic acid yields (%)	Alcohol (mg/20 ml)	Volatile acid (mg/20 ml)	
1	1,100	130.8	11.8	2.39	trace	279.0
3	3,120	1,920.0	61.5	3.16	〃	359.0
5	5,130	3,240.0	63.1	40.7	〃	332.6
7	5,510	3,330.0	61.3	42.6	〃	327.9
10	6,120	3,830.0	62.5	43.6	〃	307.4

Table 2 は増殖培地における葡萄糖大略の濃度をそれぞれ表中記載のごとく調整し、72 時間振盪培養した場合の生産物の量を示す。基質濃度 1% では乳酸生成率は著しく低い結果が得られた。これはかびの他の有機酸酸酵の場合にも認められる現象である。葡萄糖 3% 以上の存在のもとでは 72 時間培養により添加された葡萄糖が完全に、もしくはその一部分を残して消費されているが乳酸率はいずれも 62~63% であり、同時に酒精を副生した。フマル酸はいずれの培地からも定性的にその存在を認めた。

洗滌菌体懸濁液による乳酸生成能

増殖培地で 30 時間振盪培養して得られた菌体を無菌的に濾過、殺菌水で数回洗滌し最後にガラス栓で可及的圧搾した。ここに得られた菌体一定量を窒素源を含まない Czapek 培地 20 ml に懸濁、300 ml 容三角フラスコに採り 30°C で振盪培養して乳酸生成量を測定した (Table 3 参照)。糖を含まない培地で同様に振盪した時の乳酸生成量は 100 mg の菌体と 24 時間振盪で 0.69 mg であり、200 mg の菌体と 48 時間、72 時間振盪した時それぞれ 0.72 mg, 0.84 mg であり、Table 3 の数値はこれらの値を差引いたものである。同表から洗滌菌体では 88% の乳酸率が示され、これは WAKSMAN 等の酸酵型式の適用されないことを結論するものである。また Table 3 は糖消費と乳酸生成との間に多少のずれのあることを示す。

Table 3. Lactic acid formation by washed cell suspensions

Weight of pressed cells used (mg/20ml)	Shaking duration (hrs)	Glucose consumed (mg/20 ml)	Fermentation products			
			Lactic acid (mg/20 ml)	Lactic acid yields (%)	Alcohol (mg/20 ml)	Volatile acid (mg/20 ml)
100 (wet)	24	70.0	50.0	70.1	—	—
200 (")	48	387.5	235.7	61.1	3.57	0.60
" (")	72	391.4	356.1	88.4	4.15	0.78

Initial concentration of glucose : 392 mg/20ml.

乳酸生成に対する酸素の重要性

WAKSMAN 等, CARSON 等 及び坂口等は *Rhizopus* の生成する乳酸は好気的な条件でより多く作られることを認めている. 著者等も H₂ 中で洗滌菌体懸濁液を振盪した場合乳酸の生成にどのような影響が見られるかを試験した. すなわちフラスコ内の空気を H₂ で置換, 密栓した状態で振盪した結果を, H₂ と置換せずそのまま密栓振盪した結果と比較すると Table 4 に示す通りである.

Table 4. Lactic acid formation by washed cell suspensions under hydrogen gas atmosphere

Condition of cultures	Shaking duration (hrs)	Glucose consumed (mg/20 ml)	Fermentation products				Cell weight after shaking (mg on dry basis)
			Lactic acid (mg/20 ml)	Lactic acid yields (%)	Alcohol (mg/20 ml)	Volatile acid (mg/20 ml)	
Under air	48	380.0	218.6	57.3	4.57	0.72	39.6
	72	391.0	332.4	85.0	4.85	0.96	42.9
Under H ₂ gas	48	274.0	114.3	41.6	4.51	1.58	39.9
	72	285.3	161.0	56.4	4.65	1.26	44.7

Weight of pressed cells used : 200 mg (wet)/20 ml

Initial concentration of glucose : 392 mg/20ml.

空気密栓は 72 時間振盪で 85 % の乳酸率が得られ, これは Table 3 の 88 % にほぼ近い値である. この実験は 300 ml のフラスコに 20 ml の培地を入れたものであり, この条件では空気の供給はほぼ充分であると言える. H₂ を充満させ密栓して振盪した場合には明らかに乳酸生成率は減少した. すなわち *Rhizopus* による乳酸生成には酸素の存在を必須とする部分のあることを示すものである.

乳酸生成に対する砒酸, 亜砒酸, モノ沃度醋酸の影響

砒酸, 亜砒酸, モノ沃度醋酸などの阻害剤は古くから解糖代謝の阻害剤としてその作用点もほぼ明らかにされているものである. 著者等は上記実験で *Rhizopus* の乳酸醱酵は酸素要求に関して,

Table 5. Effect of inhibitors on lactic acid formation by washed cell suspensions

	Inhibitors			
	Monoiodoacetate (10 ⁻³ M)	Arsenite (10 ⁻³ M)	Arsenate (10 ⁻³ M)	Control
Glucose consumed (mg/20 ml)	248.0	192.0	220.0	250.0
Lactic acid formed (mg/20 ml)	102.0	92.6	106.0	112.0
Lactic acid yields (%)	41.1	48.2	48.1	45.1

Weight of pressed cells used : 200 mg (wet)/20 ml

Initial concentration of glucose : 2 %.

乳酸菌もしくは筋肉の解糖作用と趣きを異にする部分のあることを知つたので、*Rhizopus* の洗滌菌体懸濁液に上記阻害剤を添加し24時間振盪して乳酸生成能を測定し阻害剤の影響を観察した。この結果は Table 5 に示した通りである。

Table 5 の乳酸率は 24 時間振盪の結果であるので多少低い値を示す。 $10^{-3}M$ の阻害剤の添加による乳酸生成はモノ沃度醋酸では僅かに阻害的に働いているが、亜硫酸、硫酸では糖消費が多少阻害を受けているにもかかわらず、乳酸生成率は却つて幾分増加している。この結果もこの乳酸醱酵が乳酸菌もしくは筋肉のそれと趣きを異にするものであることを示す。

各種糖類からの乳酸生成

WAKSMAN 等は葡萄糖、澱粉、麦芽糖、果糖からの乳酸生成はほぼ同じ収率で行はれるが、キシロースからの乳酸生成率は、はるかに小さいと述べている。これに対して、北原等はキシロースからもホモ乳酸菌の乳酸率 (60%) が当てはまるものと予想している。そこで著者等も各種糖類からの乳酸生成能を試験した。その結果は Table 6 に示す通りである。

Table 6. Lactic acid formation from several sugars by washed cell suspensions

Substrate (1%)	Shaking duration (hrs)	Sugars consumed (mg/20 ml)	Fermentation products			Cell weight after shaking (mg on dry basis)
			Lactic acid (mg/20 ml)	Lactic acid yields (%)	Alcohol (mg/20 ml)	
Glucose	48	255.0	170.0	66.7	0.97	50.0
	72	257.8	225.3	87.3	1.21	53.3
Xylose	48	85.0	5.9	6.9	0.91	47.2
	72	119.2	6.4	5.3	1.18	48.6
Maltose	48	176.8	140.0	79.1	1.24	51.6
	72	195.4	168.4	85.9	0.45	54.1
Fructose	48	247.6	152.0	61.3	2.14	49.3
	72	249.6	214.0	85.7	0.80	51.8
Soluble starch	48	197.2	118.0	59.8	1.30	50.1
	72	201.2	174.4	86.7	2.35	53.6

Weight of pressed cells used : 200 mg (wet)/20 ml.

葡萄糖、麦芽糖、果糖、澱粉からは共に乳酸生成率が大きい (72 時間振盪培養でいずれも 85% 以上) のに反して、キシロースからは僅かしか乳酸を生成しない。これは北原等が予想した醱酵式からは説明されないとこである。

ペーパークロマトグラフィーによる有機酸の検出

種々の濃度の葡萄糖を含む増殖培地で 72 時間振盪培養した後菌体を濾過してその濾液 0.01 ml をそのまま濾紙上にスポットし、また濾紙上の菌体は最初に稀塩酸でついで蒸留水で洗滌した後圧搾、乳鉢で磨碎し、1 N HCl 2 ml で抽出、遠心分離した後、液 0.01 ml を濾紙上にスポットし、いずれも N-ブタノール : 蟻酸 : 水 = 4 : 1 : 1.5 を用い上昇法により展開、乾燥後 0.1% BPB アルコール溶液を噴霧して発色させた。使用した濾紙は東洋濾紙 No. 50 である。いずれの場合でも常に標準品を並行させて展開した。培養液のペーパークロマトグラムは Fig. 1 に示す通りである。

すなわち増殖培養において培地中に生産される有機酸は殆どが乳酸で僅かにフマル酸の小さいスポットが認められるにすぎない。ただし葡萄糖 1% の濃度の培地中ではフマル酸のスポットは認められなかつた。これらの結果はエーテル抽出物についても同様であつた。次に菌体内に検出さ

れた有機酸は Fig. 2 に示す通りである。

菌体内においては蓚酸の強いスポットが認められたがこれについて酒石酸及び僅かながら林檎酸の存在が検出された。洗滌菌体懸濁液を用いた場合には培地中に乳酸のみが、菌体内に蓚酸のみの存在が確認されたことは Fig. 3 から明らかである。

フマル酸の生成に林檎酸及び酒石酸が関係をもつことは広く認められているところであるが Fig. 1~Fig. 3 からこのことが示されている。蓚酸が乳酸生成と関係を持つか否かは今後の検討にまたねばならない。しかしいずれの場合でも醗酵液に見出される酸と菌体内に見出されるそれとは一致しないことを認めた。

総括

著者等の分離した *Rhizopus* によつて次の結果が得られた。

1. この菌株は振盪培養でも静置培養でも葡萄糖から約 63~64% の収量で乳酸を生成する。
2. 洗滌菌体懸濁液では葡萄糖から 88% の収量で乳酸を生成することを知り、従つて WAKSMAN 等の醗酵型式は当てはまらないことを認めた。
3. 好氣的条件は嫌氣的条件よりも乳酸生成を高める。
4. 砒酸、亜砒酸、モノ沃度醋酸等の阻害剤は乳酸生成に対して著しい影響を及ぼさない。
5. 葡萄糖、麦芽糖、果糖、澱粉からはほぼ同じ収量で乳酸を生成するがキシロースからの乳酸生成は極めて少い。この結果は 3, 4 の結果と共にこの乳酸醗酵が乳酸菌や筋肉のそれと分解機構を同じくしないことを示すものである。
6. 増殖培地における醗酵液のペーパークロマトグラムからは乳酸とフマル酸の存在を、また菌体磨碎物のそれからは、林檎酸、酒石酸、蓚酸の存在を確認した。また洗滌菌体懸濁液の振盪培地からは乳酸のみを、またその菌体内には蓚酸のみを検出した。

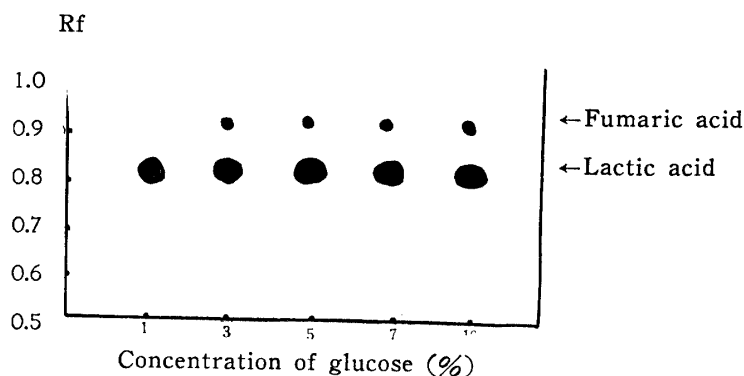


Fig. 1. Paper chromatogram of organic acids in the media of growing culture.

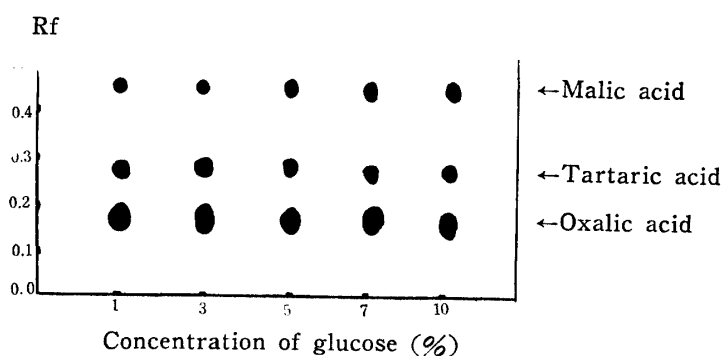


Fig. 2. Paper chromatogram of organic acids in the cells of growing culture.

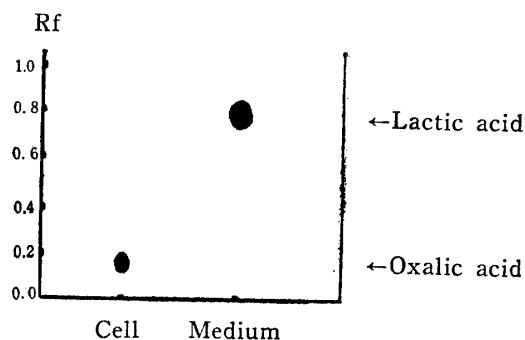


Fig. 3. Paper chromatogram of organic acids in the medium and in the cell shaken for 48 hours using 200 mg of the cells in Table 3.

文 献

- 1) WAKSMAN, S. A. and FOSTER, J. W. : *J. Agr. Res.*, **57**, 873 (1938).
- 2) 北原覚雄, 福井作蔵 : 醸工, **28**, 53 (1950).
- 3) CARSON, S. F., FOSTER, J. W., JEFFERSON, W. E., PHARES, E. F. and ANTHONY, D. S. : *Arch. Biochem.*, **33**, 448 (1951).
- 4) 坂口謹一郎, 古坂澄石, 高橋甫 : 日農化, **25**, 150 (1951).
- 5) BARKER, S. B. and SUMMERSON, W. H. : *J. Biol. Chem.*, **138**, 535 (1941).
- 6) HANES, C. S. : *Biochem. J.*, **23**, 99 (1929).
- 7) FRIEDMAN, T. E. and KLAAS, R. : *J. Biol. Chem.*, **115**, 47 (1936).

R é s u m é

Employing a species of *Rhizopus* isolated by authors, the following facts were observed :

1. This strain produced lactic acid to the extent of 63-64 per cent of glucose consumed in both shaking and static cultures.
2. Since the maximum yield of lactic acid formation reached as high as 88 per cent by washed cell suspension, the Waksman's scheme could not be applied.
3. More lactic acid accumulated under aerobic conditions than under hydrogen gas atmosphere.
4. Effects of the respective addition of arsenate, arsenite and monoiodoacetate on lactic acid formation were found to be little.
5. Almost equal yields of lactic acid were obtained from glucose, maltose, fructose and soluble starch, and a lesser yield, on the other hand, from xylose.
6. The results cited in 3, 4 and 5 indicate that lactic acid by *Rhizopus* is not formed through the same pathway of cleavage as that by lactic acid bacteria and muscle.
7. In the cultured media, the existence of lactic and fumaric acids was detected by means of paper chromatography, and in the cell, malic, tartaric and oxalic acids were pointed out. In the experiment by washed cell suspension, only lactic acid was detected in the medium, and only oxalic acid in the cell.