

Pseudomonas stutzeri によるグルコン酸からの ピルビン酸の生成

森 信寛*・実成和昌*・芳田昌子*・

北本 豊*・市川吉夫*

昭和62年5月30日受付

Pyruvic Acid Production from Gluconic Acid by *Pseudomonas stutzeri*

Nobuhiro MORI*, Kazumasa JITSUNARI*, Masako YOSHIDA*,
Yutaka KITAMOTO* and Yoshio ICHIKAWA*

For the purpose of producing pyruvic acid from gluconic acid, 96 strains of bacteria were tested. *Pseudomonas stutzeri* (IFO 12695) was found to accumulate a large amount of pyruvic acid from gluconic acid in a chemically defined medium supplemented with sub-optimal concentrations of yeast extract for bacterial growth. Ammonium salts were the most favorable for nitrogen sources. Six-day incubation of the bacterium in a medium containing 0.3 g/L of yeast extract produced 12.1 g/L of pyruvic acid, but 3.5 g/L of α -ketoglutaric acid was accumulated as by-product. The effect of yeast extract for pyruvic acid fermentation could be partly replaced by addition of metal ions such as Fe^{2+} and Ca^{2+} into the medium. The maximum yield (10 g/L) of pyruvic acid was attained after 6-day fermentation. However, the by-production of α -ketoglutaric acid was less than 1 g/L.

緒 言

ピルビン酸は生体内において解糖系とトリカルボン酸サイクルの接点に位置する重要な有機酸である。また、チロシン、ドーパ、トリプトファン等のアミノ酸を酵素法により製造する原料としても有用な化合物である。

発酵法によるピルビン酸の生産に関する報告は数多く報告されている。すなわち、内尾ら¹⁰⁾は *Candida lipolytica* の変異株、谷田ら⁹⁾は *Agaricus campestris*、高尾と谷田⁸⁾

は *Shizophyllum commune* でそれぞれグルコースからのピルビン酸の生成を報告している。一方、その他の炭素源を用いた例として、嶋村と吉武⁶⁾は *Corynebacterium* 属のチアミン要求性の菌株によるグルコン酸からの、高尾と谷田⁷⁾は *Corynebacterium* sp.による、和泉ら³⁾は *Acinetobacter* sp.のチアミン要求株による1, 2-プロパンジオールからの、森口⁵⁾は *Debaryomyces coudertii* によるミカン果皮からのピルビン酸生成を報告している。著者らは、グルコン酸資化能を有し、培養ろ液中にピ

* 鳥取大学農学部農林総合科学科資源利用化学講座

* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tottori University

ルビン酸を蓄積する細菌を検索したところ、*Pseudomonas* 属の1菌株が培養液中にピルビン酸を蓄積することを見いだしたので、その蓄積条件について得られた結果を報告する。

材料および実験方法

1. 使用菌株 グルコン酸からピルビン酸などのケト酸を生成する菌株の検索には当研究室保存の細菌を使用した。

2. 培地および培養方法 細菌の培養にはグルコン酸ナトリウム5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%、酵母エキス0.01%の組成の培地(pH7.0)を使用した。ケト酸生成菌の検索に、上記組成の培地5mlを入れた大型試験管で振とう培養を行い、ピルビン酸生成条件の検討は、培地75mlを含む500ml容振とうフラスコで、所定の期間28°Cで振とう培養した。合成培地によるピルビン酸生成条件の検討ではグルコン酸ナトリウム5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%の組成の基礎培地(pH7.0)を用いた。

3. 分析方法 培養液中のケト酸の定量は2,4-ジニトロフェニルヒドラジン誘導体とした後、アルカリ条件下で発色させ定量した。そのペーパークロマトグラフィーは、培養ろ液に2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを加え、生成したヒドラゾンを酢酸エチルで抽出し、3%アンモニア水飽和n-ブタノールで展開した。ピルビン酸は乳酸脱水素酵素²⁾ α-ケトグルタル酸はグルタミン酸脱水素酵素¹⁾、グルコン酸はグルコン酸キナーゼと6-ホスホグルコン酸脱水素酵素⁴⁾による酵素法によりそれぞれ定量した。菌体の生育度は660nmにおける濁度を測定し、別に求めた乾燥重量と濁度の検量線より乾燥菌体重量として表した。

実験結果および考察

1. ケト酸生成菌の検索

研究室保存の細菌96株についてその培養液中のケト酸生成を調べたところ、7株がケト酸生成能を有していた(Table 1)。このうち、*Micrococcus* sp. No. 431と*Pseudomonas stutzeri* (IFO 12695)の2株の生成するケト酸をペーパークロマトグラフィーで分析したところ、*Micrococcus* sp. No. 431からはα-ケトグルタル酸が、*P. stutzeri*からはピルビン酸が主に検出された。以上の結果から、*P. stutzeri*をピルビン酸生産菌として選抜し、本菌によるグルコン酸からピルビン酸の生成についてさ

Table 1 KETO ACID PRODUCTION BY VARIOUS BACTERIA

The medium consisted of sodium gluconate 5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% and yeast extract 0.01% (pH 7.0). The culture was carried out at 28°C for 3 days in the test tube (2x 20cm) containing 5ml of the medium with reciprocal shaking. The estimation of keto acid was described in text.

Organism	Keto acid formed (g/L)		
<i>Micrococcus</i> sp. No. 431	AKU 0511	5.17	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	IFO 12695	3.38	
<i>Corynebacterium paurometabolum</i>	IFO 12160	2.65	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	IFO 3820	1.09	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AKU 0300	0.88	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	IFO 13265	0.79	
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	IFO 13258	0.69	

らに検討を加えた。

2. *Pseudomonas stutzeri*のピルビン酸生成条件

a. グルコン酸濃度の影響 グルコン酸ナトリウム濃度を30-150 g/Lの範囲に変えてピルビン酸蓄積に及ぼす影響を検討した (Fig. 1)。その結果、グルコン酸ナト

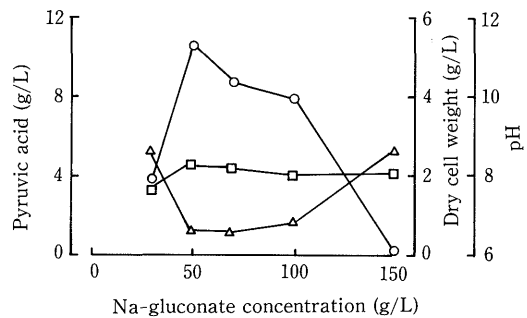


Fig. 1. Effect of Sodium Gluconate Concentration on Pyruvic Acid Production.

The medium consisted of the indicated concentration of sodium gluconate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% and yeast extract 0.01% (pH 7.0). The culture was carried out at 28°C for 6 days in a 500 ml-flask containing 75 ml of the medium with reciprocal shaking.

○, pyruvic acid; □, dry cell weight; △, pH.

Table 2 EFFECT OF VARIOUS NITROGEN SOURCES ON PYRUVIC ACID PRODUCTION

The medium consisted of sodium gluconate 5%, the nitrogen source of the indicated concentration, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% and yeast extract 0.01% (pH 7.0). The other experimental conditions were the same in Fig. 1.

Nitrogen Source (0.10% N)	Pyruvic acid formed (g/L)	Dry cell weight (g/L)
Peptone	0.08	3.7
Casamino acids	0.32	3.1
Urea	1.2	1.2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10.6	2.7
NH_4Cl	10.7	2.2
NH_4NO_3	9.0	2.8
NaNO_3	3.9	3.0

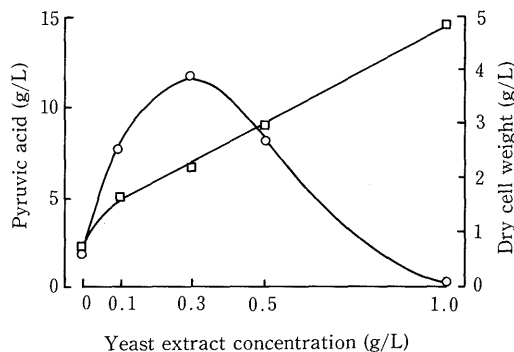


Fig. 2. Effect of Yeast Extract Concentration on the Bacterial Growth and Pyruvic Acid Production.

The composition of medium was the same as Fig. 1, where yeast extract concentration was varied as indicated.

○, pyruvic acid ; □, dry cell weight.

リウムの50 g/L添加区で菌の生育が最大となり、ピルビン酸蓄積量も最大となった。これより高濃度添加の場合、ピルビン酸蓄積量が減少したが、菌体量には変化がみられなかった。

b. 窒素源の種類の影響 ピルビン酸蓄積における窒素源の効果を調べるため、窒素源として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5

g/Lに相当する窒素量の各種の窒素源を培地に添加して培養した (Table 2)。硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等のアンモニア態の窒素がピルビン酸蓄積に効果があった。尿素は菌体の生育が低下し、ピルビン酸蓄積量も減少していた。ペプトンやカザミノ酸などの有機態窒素では菌体の生育は良好であったが、ピルビン酸の蓄積はほとんど認められなかった。従って、本菌のピルビン酸蓄積に対する窒素源としては、アンモニア態窒素が適当であると考えられる。

c. 酵母エキスの効果 これまでの実験では、微量生育要素として酵母エキス0.01%を培地に添加してきたがここでは培地に添加する酵母エキスの濃度を変えて、菌体の生育とピルビン酸蓄積量の関連を調べた (Fig. 2)。酵母エキス添加量を増加させると菌体の生育は促進された。一方、ピルビン酸の生成量は、酵母エキス濃度が0.3 g/Lまでは増加したが、それ以上では逆に減少した。これらの結果から、酵母エキス中に、本菌の生育を促進する因子が含まれること、また、細菌の生育度とピルビン酸の蓄積に密接な関係があることが示唆された。した

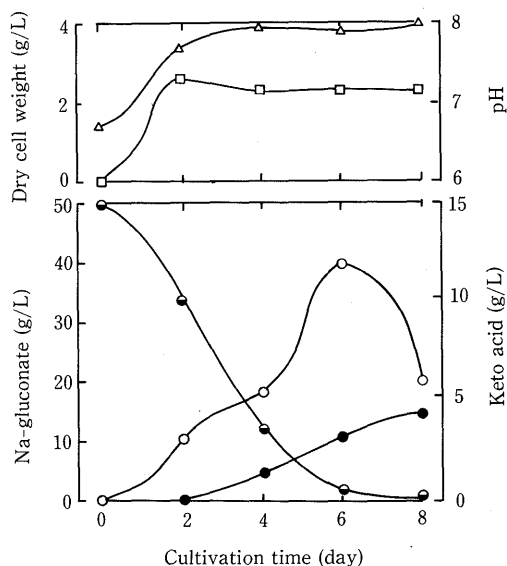


Fig. 3. Time Course of Pyruvic Acid Production by *Pseudomonas stutzeri*.

The bacterium was cultivated at 28°C in a 500ml-flask containing 75 ml of medium, where yeast extract concentration was changed to 0.3%.

○, pyruvic acid ; ●, sodium gluconate ; ●, α -ketoglutaric acid ; □, dry cell weight ; △, pH.

がって、本菌の生育の適当な抑制条件下で培養することがピルビン酸の高濃度蓄積に対する要件であることが示唆された。

d. ピルビン酸蓄積のタイムコース 酵母エキス添加濃度を0.3g/Lに設定した培地で本菌によるピルビン酸蓄積の経時的変化を Fig. 3 に示した。菌の生育は2日目で最大となり、以後はほとんど変動しなかった。ピルビン酸蓄積は、基質であるグルコン酸がほぼ消費し尽くされる6日目で最大となり、以後急減した。 α -ケトグルタル酸の蓄積も認められ、培養8日目でその蓄積量は4g/Lに達した。培養液のpHは、菌の生育にともなって上昇し、2日目以降はpH 8付近であった。本菌によるピルビン酸蓄積は、弱アルカリ領域が適しているものと思われる。

3. 合成培地によるピルビン酸蓄積条件

前項において、*P. stutzeri* のピルビン酸蓄積には酵母エキス中の未知成分が大きな要因をしめることが示唆された。しかしながら、酵母エキスは天然抽出物であるため、ピルビン酸蓄積の不安定性要因となる可能性がある。また、ピルビン酸蓄積量のさらなる増加を計るため、栄養要求性突然変異株の取得が将来必要となる。そこで本菌の合成培地でのピルビン酸蓄積条件について検討した。

a. 基礎培地によるピルビン酸蓄積 本菌による基礎培地でのピルビン酸蓄積を検討したところ、菌の生育は

前述の酵母エキス添加培地に比較して $\frac{1}{3}$ に低下し、ピルビン酸蓄積量も $\frac{1}{4}$ に低下した。これらの結果から、本菌の生育に対する促進因子が酵母エキス中には存在するが、基礎培地中には欠乏していることが示唆された。

b. チアミンおよびビタミン混合物の添加効果 チアミンは thiaminepyrophosphate として α -ケト酸の酸化的脱炭酸に関与することが知られており、微生物によるピルビン酸生成との関連についていくつかの報告がある^{3,6,7)} また、酵母エキス中にチアミンが比較的多量に含まれていることから、基礎培地にチアミンを添加して、細菌の生育およびピルビン酸の蓄積に対する効果を検討した。チアミン添加量は、酵母エキスの0.3g/Lに含まれる分析値から25 μ g/Lとした。しかし、上記のチアミン添加量では、細菌の生育およびピルビン酸の蓄積にはほとんど影響は認められなかった (Table 3)。つぎに、チアミン以外のビタミンの効果と考えられたので、チアミンを含むビタミン混合物を基礎培地に添加し、その効果を検討したが、菌体の生育、ピルビン酸の蓄積には効果がなかった (Table 3)。

c. 金属塩の添加効果 酵母エキス中には各種の金属塩が含まれているので、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} を基礎培地に添加して培養し、菌体の生育に対する効果を検討した (Table 4)。 Fe^{2+} の添加により菌体の生育が無添加の場合の生育に比べて約7倍に増加した。その他の金属塩の添加では、菌体の生育には効果がなかった。

d. Fe^{2+} 濃度のピルビン酸蓄積への影響 Fe^{2+} が菌体の生育に必須であることが明らかとなったので、基礎培地中の Fe^{2+} の濃度を変化させ培養し、菌体の生育とピルビン酸の蓄積との関連を調べた (Fig. 4)。菌体の生育は Fe^{2+} 添加量に比例して促進されたが、ピルビン酸蓄積は0.2

Table 3 EFFECT OF THIAMINE AND VITAMIN MIXTURE ON THE BACTERIAL GROWTH AND PYRUVIC ACID PRODUCTION

The basal medium consisted of sodium gluconate 5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, KH_2PO_4 0.2% and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% (pH 7.0). The composition of vitamin mixture were as follows ; thiamine·HCl 1mg/L, biotin 20 μ g/L, Ca-pantothenate 1mg/L, nicotinic acid 5mg/L, riboflavin 2mg/L, folic acid 1mg/L, *p*-aminobenzoic acid 1mg/L, choline chloride 50mg/L, pyridoxine·HCl 1mg/L.

Medium	Pyruvic acid formed (g/L)	Dry cell weight (g/L)
Basal medium	1.7	0.7
Basal medium with thiamine(25 μ g/L)	1.7	0.8
Basal medium with vitamin mixture	1.8	0.8

Table 4 EFFECT OF VARIOUS METAL SALTS ON THE GROWTH OF *Pseudomonas stutzeri*

The basal medium consisted of sodium gluconate 5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, KH_2PO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% and the indicated metal salt (pH 7.0).

Metal salt (10 mg/L)	Dry cell weight (g/L)
None	0.7
$FeSO_4$	4.9
$MnSO_4$	0.6
$CuSO_4$	0.6
$CaCl_2$	0.8

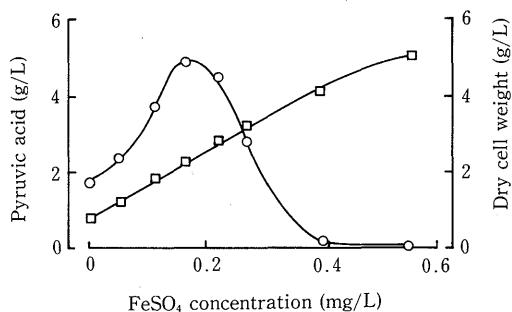


Fig. 4. Effect of Fe²⁺ Concentration on the Bacterial Growth and Pyruvic Acid Production.

The bacterium was cultivated at 28°C for 6 days in a 500 ml-flask containing 75 ml of the basal medium supplemented the indicated concentration of FeSO₄.

○, pyruvic acid ; □, dry cell weight.

mg/L 付近で最大となり、酵母エキスの添加により得られた結果と類似していた。しかし、このピルビン酸蓄積量は、酵母エキス添加により得られたピルビン酸蓄積量の半分程度であった。

e. その他の 2 価金属イオンの添加効果 ピルビン酸生成に Fe²⁺以外の他の金属イオンが不足していることが考えられたので、硫酸第一鉄を0.16mg/L 添加した基礎培地に Ca²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺をそれぞれ添加し、その効果を検討した (Table 5)。CaCl₂の添加によりピルビン酸の生成量が約 2 倍に増加したが、菌体の生育にはほとんど変化がなかった。一方、高尾と谷田は⁶⁾ *S. commune* によるグルコースからのピルビン酸生産において、Mn²⁺の添加によりピルビン酸蓄積量が増加することを報告しているが、

Table 5 EFFECT OF THE ADDITION OF VARIOUS METAL SALT ON PYRUVIC ACID PRODUCTION

The medium consisted of sodium gluconate 5%, (NH₄)₂SO₄ 0.5% KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, FeSO₄ 0.16mg/L (pH 7.0) and the indicated metal salt (pH 7.0).

Metal salt (10 mg/L)	Pyruvic acid formed (g/L)	Dry cell weight (g/L)
None	5.2	2.6
CaCl ₂	9.9	2.8
CuSO ₄	5.5	2.5
MnSO ₄	4.0	2.3

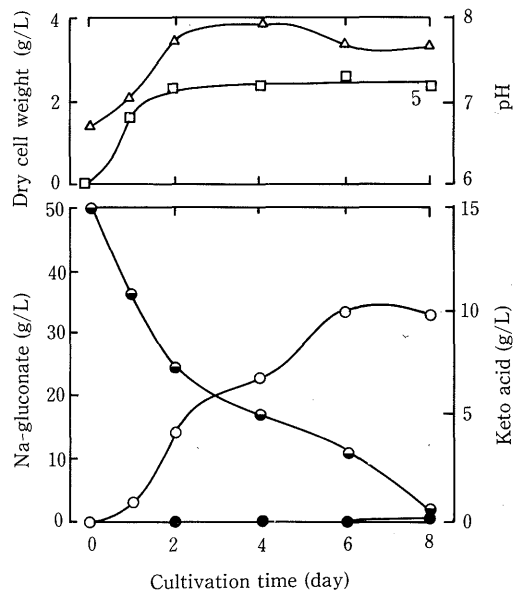


Fig. 5. Time Course of Pyruvic Acid Production in the Synthetic Medium by *Pseudomonas stutzeri*.

The bacterium was cultivated at 28°C in a 500 ml-flask containing 75 ml of the basal medium supplemented FeSO₄ (0.16 mg/L) and CaCl₂ (30 mg/L).

○, pyruvic acid ; ◻, sodium gluconate ; ◻, α-ketoglutaric acid ; ◻, dry cell weight ; △, pH.

本菌では、Mn²⁺や Cu²⁺添加によるピルビン酸蓄積量の増加はほとんど認められなかった。

f. 合成培地でのピルビン酸蓄積のタイムコース 前述した結果から基礎培地に Fe²⁺と Ca²⁺を添加した培地でピルビン酸生成の時間経過を検討した (Fig. 5)。ピルビン酸はグルコン酸の消費にともなって蓄積し、培養 6-8 日目ではほぼ最大となり、酵母エキス添加培地で得られた値の約 80% となった。一方、菌体の生育は、2 日目まで最大となり以後は殆ど変動しなかった。培養ろ液の pH は菌の生育にともなって上昇し、2 日目以降は pH 8 付近となった。嶋村と吉武⁶⁾は *Corynebacterium* の 1 菌株によるグルコン酸からのピルビン酸の生成において、Fe²⁺を 1 ppm 添加することにより、培養 72 時間以後に、ピルビン酸蓄積量の急激な減少と α-ケトグルタル酸の増加を報告している。しかし、上述の合成培地での本菌によるピルビン酸生成においては、ピルビン酸蓄積量の減少も α-ケトグルタル酸の副生もほとんど認められなかった。

摘 要

グルコン酸を資化し培養液中にケト酸を蓄積する細菌を検索したところ、*Pseudomonas stutzeri* (IFO 12695) がピルビン酸を多量に蓄積することが見いだされた。本菌によるピルビン酸の蓄積条件について検討した。窒素源としてはアンモニア態の窒素が良好であった。ピルビン酸の蓄積と菌体の増殖との間に密接な関係があり、酵母エキスに本菌の生育を促進する因子が含まれていることが示唆された。また、0.3 g/Lの酵母エキス添加培地で、6日間の培養で12.1 g/Lのピルビン酸が生成し、 α -ケトグルタル酸の副生がみられた。合成培地によるピルビン酸生成についても検討を加えた。鉄イオンの添加効果は、酵母エキスの添加により得られた結果と同様の結果を示した。 Fe^{2+} と Ca^{2+} の添加により、ピルビン酸生成が増大し、培養6日目で10 g/Lのピルビン酸が生成し、酵母エキス添加時に副生した α -ケトグルタル酸はほとんど生成しなかった。

文 献

- 1) Bergmeyer, H. U. and Bernt, E. : Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed, H. U. Bergmeyer, Academic Press, New York and London (1974) pp. 1577-1580
- 2) Czok, R. and Lamprecht, W. : Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed, H. U. Bergmeyer, Academic Press, New York and London (1974) pp. 1446-1451
- 3) Izumi, Y., Matsumura, Y., Tani, Y. and Yamada, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2673-2679 (1982)
- 4) Mollering, H. and Bergmeyer, H. U. : Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed, H. U. Bergmeyer, Academic Press, New York and London (1974) pp. 1243-1247
- 5) Moriguchi, M. : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 955-961 (1982)
- 6) 嶋村睦夫, 吉武寿一 : 農化, **44**, 195-201 (1970)
- 7) 高尾彰一, 谷田昌稔 : 農化, **51**, 239-244 (1977)
- 8) Takao, S. and Tanida, M. : *J. Ferment. Technol.*, **60**, 277-280 (1982)
- 9) 谷田昌稔, 在原章公, 高尾彰一 : 日農化大会講演要旨集, p. 294 (1981)
- 10) 内尾良輔, 菊池健二, 前屋敷勇, 江井 仁, 広瀬義夫 : 日農化大会講演要旨集, p. 129 (1975)