



## 第7回 微生物による有機酸発酵

星野達雄

玉川大学学術研究所・菌学応用研究センター 〒194-8610 東京都町田市玉川学園 6-1-1

### Microbial production of organic acids

Tatsuo Hoshino

Tamagawa University Research Institute, Mycology & Metabolic Diversity Research Center  
6-1-1 Tamagawa-Gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan

#### 1. はじめに

微生物の一次代謝産物の中には、多種類の有機酸があり、ある種の微生物は多量の有機酸を効率良く生産する能力を有する。その能力を利用して、グルコースなどを出発炭素源として、以下に述べるいくつかの“有機酸発酵”が産業利用されている。また、ビタミンCの合成中間体である2-ケト-L-グルコン酸のように、一次代謝産物ではない糖を基質とした微生物変換を利用した有機酸の生産の実用化も行われている。

有機酸の工業生産の方法としては、石油を出発原料とする有機合成反応によっても安価に合成することができるものがあり、石油化学か発酵か、いずれか製造コストの安いプロセスが工業的に採用されるという状況である。微生物発酵によって工業生産されている有機酸の中で、最も生産量の多い有機酸はクエン酸である。続いて、酢酸、乳酸、グルコン酸、イタコン酸などが大量生産されている(表1)。

有機酸の主な用途は、食品の酸味剤、pH調整剤、メッキ液、バイオポリマー原料、他の有用物質合成の出発原料など、幅広い分野で利用されている。最近では、生分解性や色々な物質特性を示すバイオポリマーの原料としての用途が拡大している。

本稿においては、食用として重要な酢酸、バイオポリマー原料として注目されている乳酸、コハク酸、また、著者らがこれまで研究を行ってきた、ビタミンC合成の重要な中間体である2-ケト-L-グルコン酸、L-酒石酸合成の重要な中間体である5-ケト-D-グルコン

酸発酵について述べたいと思う。

#### 2. 酢酸発酵

酢酸発酵は、エタノールを基質として不完全な酸化により酢酸を生産するプロセスである。1864年L. Pasteurは、酢酸発酵が*Mycoderma aceti*(現在の酢酸菌といわれる細菌の一群)によって起こることを報告している(駒形, 2008)。エタノールを酸化して酢酸を生じる細菌を酢酸菌と総称するが、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition (2001)によれば、現在の分子系統分類から*Acetobacter*科には11の属が記載されている。酢酸菌は、グラム陰性、好気性菌である。酢酸生産能の高い菌は、*Acetobacter*属および*Gluconacetobacter*属に属する。酢酸菌は、図1に示すように、多くの細胞膜結合型の酵素があり、補酵素としてピロロキノリンキノン(PQQ)やフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)が含まれていることが多い。

酢酸発酵は、酸素を消費して基質を酸化することによって有機酸を生成することから、嫌気条件下におけるエネルギー獲得方法としての狭義の発酵と異なり、

表1 微生物発酵によって生産されている有機酸

有機酸	生産量 (トン/年)
酢酸	190,000
乳酸	150,000
イタコン酸	15,000
クエン酸	1,600,000
グルコン酸	87,000

Sauer 2008 から引用

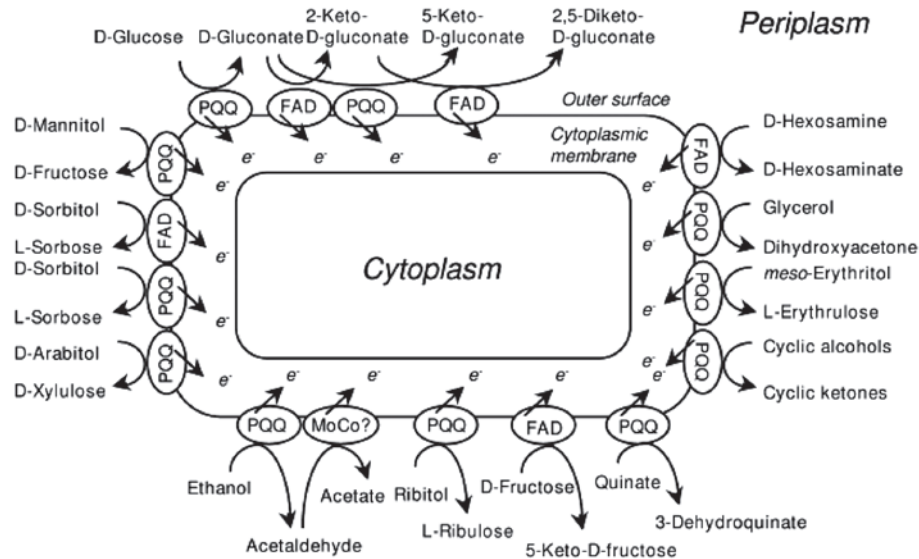


図1 酢酸菌の膜結合型酵素の多様性

Modern Biooxidation, Edited by Schmid R.D. 他, Wiley-VCH, p. 2 から転載.

酸化発酵と呼ばれている。現在では、本発酵に限らず、微生物による有用物質生産プロセスのことを、広義の発酵と呼ぶことが多い。

酢酸発酵の場合、エタノールは膜結合型アルコール脱水素酵素（補酵素はPQQ）によってアセトアルデヒドに変換され、生成したアセトアルデヒドはさらにアルデヒド脱水素酵素（補酵素は未同定）によって酢酸へと変換される。酢酸菌の膜結合型酵素は細胞膜のペリプラズム側に局在するため、発酵プロセスが菌体の外側で完結するので、これらの反応によって得られる発酵生産物の基質に対する回収率が高いのが一般的な特長である。酢酸菌はこの反応によってエネルギーを獲得している。

醸造酢は、穀物、果物、醸造用アルコールなどを原料に作られている。そのほとんどが通気攪拌培養法によって作られているが、一部は、静置培養による表面発酵によっても作られている。通気攪拌培養に用いられる菌としては、5-10%の中酸度深部発酵法には、*A.xylinus*が、10-20%の高酸度深部発酵法には、*Gluconacetobacter europaeus*のような、高濃度酢酸に耐性を示す菌が使われている。本菌は、通常の酢酸菌用寒天培地ではコロニー形成ができず、特殊な重層寒天（6.5%酢酸および2%エタノールを含有するpH 2.9の培地）平板培養によってコロニー形成できると報告されている（Schueller *et al.*, 2000）。そのため、それまで本酢酸菌の純粋培養は不可能であった。なお、

表面発酵での主要酢酸菌は、*A. pasteurianus* が用いられている。

一方、嫌気性菌である *Clostridium thermoaceticum* が、理論的に1モルのグルコースから3モルの酢酸を、1モルのキシロースから2.5モルの酢酸を生産することが報告されている（Andressen *et al.*, 1973; Nomura *et al.*, 1994）。その際、1モルの酢酸は炭酸ガスに由来する。このプロセスは、バイオマスであるセルロースやヘミセルロースを加水分解して得られるグルコースとキシロースを基質として、効率良く酢酸を生産できる可能性がある。酢酸菌は、グルコースなどの糖を直接酢酸にする能力はないため、本プロセスは、新たな酢酸生産プロセスとして興味深い。

### 3. 乳酸発酵

乳酸発酵が乳酸菌によって行われることを報告したのは、L. Pasteurである（1857年）。乳酸発酵の工業化は古く、19世紀の後期である。乳酸菌は6単糖や5単糖を資化するが、生産物が乳酸のみの場合と乳酸、酢酸、エタノールなどを含む場合があり、前者は、工業的な乳酸発酵に利用され、1モルの6単糖を分解して2モルの乳酸を生成する。後者は、生産物に色々な風味を与えることから発酵食品の製造などに利用されている。最近、乳酸の生分解性プラスチック原料としての需要が増大していることから、光学純度の高い、精製度の高い乳酸の大規模な工業生産が行われるよう

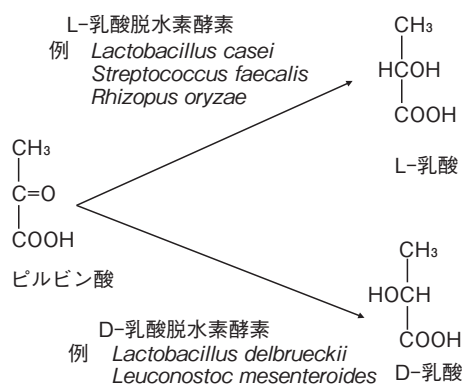


図2 ピルビン酸のL-, D-乳酸への変換反応

になった。この目的のために、L-乳酸およびD-乳酸の生産が行われている。現在は、L-乳酸の需要が中心であるが、世界で約15万トンの乳酸が発酵生産されている (Sauer *et al.*, 2008)。

乳酸は、ピルビン酸を乳酸脱水素酵素によって還元することによって作られるが、L-型またはD-型の乳酸脱水素酵素が触媒することにより、L-乳酸またはD-乳酸が生成する (図2)。

乳酸の発酵菌としては、乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii*、糸状菌 *Rhizopus oryzae* などが使われているが、この他酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia stipitis* なども乳酸を生産することが知られている。

乳酸菌を用いた乳酸発酵では、炭素原としてグルコースを用いることが多い。また、乳酸菌は複雑な栄養要求性があることから、酵母エキスなどの培地成分を使用するため、高純度の乳酸を得るためには、精製工程が複雑となる。乳酸発酵においては、培養中のpHを弱酸性に維持するために、炭酸カルシウムを多量添加し、乳酸を乳酸カルシウムとして培地中に沈澱させることが一般的である。一方、糸状菌 *Rhizopus oryzae* を用いたプロセスは、培地成分がデンプンとわずかな無機塩のみであるため、清澄な発酵液の高光学純度L-乳酸を生産することが知られている。また、発酵中のpHの調整にアンモニアを利用したプロセスが利用されている (谷口・三浦, 2008)。

さらに、乳酸回収工程のいっそうのコストダウンを図るため、低pH発酵、副産物軽減、培地の簡略化など、様々な取り組みが行われている (Sauer *et al.*, 2008)。

#### 4. コハク酸発酵

コハク酸の工業生産は、石油由来の無水マレイン酸

を還元して作られている。その用途は、医薬品、食品や最近では高機能性のポリマー原料として利用されている。これまで、微生物によるコハク酸発酵の研究は古くから行われてきたが、生産コストが見合わないうえに実用化はされていない。

コハク酸は、好气的条件においては、グルコースから解糖系を経てTCAサイクルに入り、イソクエン酸からイソクエン酸リアーゼの作用によって作られるルートが知られている。また、嫌气的条件においては、ピルビン酸またはフォスフォエノールピルビン酸から炭酸固定を行いオキサロ酢酸を生成し、TCAサイクルの逆ルートでリンゴ酸、フマル酸を経てコハク酸を生産させるルートが知られている。最近では、このTCAサイクルの逆ルートを使ったコハク酸生産の方が対糖収率が高いのでプロセス開発の焦点が当てられている (Sauer *et al.*, 2008)。

コハク酸発酵の最初の報告は、*Brevibacterium flavum* によるグルタミン酸発酵からの発酵転換が報告されている。グルコースから28.8 g/lの生産性が報告されている (Okada *et al.*, 1961)。グルタミン酸発酵は、通常、ビオチン濃度を低く制限することによって行われるが、ビオチン濃度を高くしたり、または通気量を減少させることなどの変更を行うと、グルタミン酸の蓄積が止まり、コハク酸の生産が顕著になる。このような現象のことを“発酵転換”と呼んでいる (大石ら, 1961)。その後、嫌気性細菌の *Actinobacillus succinogenes* が、グルコースから炭酸固定を行いながら、対糖収率37.7%で110 g/lの生産を示したことが報告された (Guettler *et al.*, 1996)。最近では、メタボリックエンジニアリングを用いた分子育種によるプロセス開発が盛んに行われている。(財)地球環境産業技術研究機構 (RITE) のグループが、グルタミン酸生産菌である *Corynebacterium glutamicum* を利用したユニークなプロセスを発表している (Okino *et al.*, 2008)。本菌の野生株は、嫌気条件下においてグルコースから乳酸とコハク酸を生産することができる。本菌を用いて、メタボリックエンジニアリングにより、乳酸脱水素酵素を欠損させ、さらにピルビン酸炭酸酵素を過剰発現させた株は、グルコースから炭酸イオン存在下で多量のコハク酸を生産した (図3)。このプロセスは、まさにTCAサイクルの逆反応を利用しており、効率が良いため実用化に向けた開発が進んでいる。

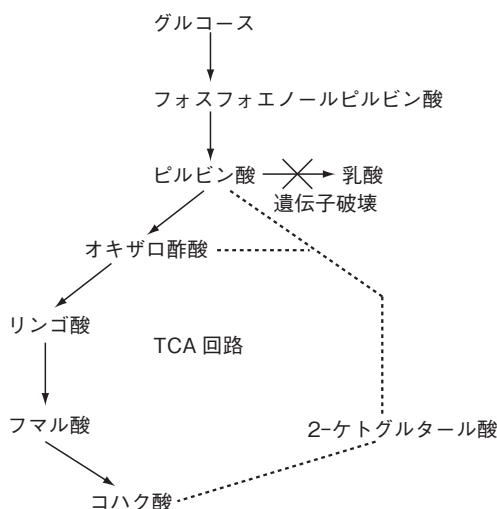


図3 酸素制限下における *Corynebacterium glutamicum* の代謝経路. Okino 2008 Fig. 1 から一部引用.

## 5. 2-ケト-L-グルオン酸

2-ケト-L-グルオン酸は、炭素数6のカルボン酸で、ビタミンC（アスコルビン酸）の工業的生産プロセスにおける直接の前駆体である。現在のビタミンCの世界における生産量は年間、約8万トンといわれているので、ほぼ同じ量の2-ケト-L-グルオン酸が生産されていると考えられる。そのうちの90%が微生物発酵によって生産されている。用いられている微生物は、*Rhodobacter*科に属する *Ketogulonicigenium* 属の *Ketogulonicigenium vulgare* という細菌で、L-ソルボースを基質として2-ケト-L-グルオン酸に効率良く変換する。この菌は、1980年代に中国の微生物学者によって報告された時は、2種類の菌の混合培養物として発見された(Yin *et al.*, 1990)。その後の研究により、L-ソルボースを2-ケト-L-グルオン酸に変換する菌は、*Ketogulonicigenium vulgare* であり、もう一方の菌は、発酵反応には全く関与せず、本菌の生育に必要な成分を *K. vulgare* に供給のみを行っていることが分かった。その後、著者らは、この“生育因子”の同定を試みたが、それは低分子化合物ではないことまでは解明したが、そのものの最終的な同定には至らなかった(未発表)。その他、L-ソルボースを2-ケト-L-グルオン酸に変換する菌として、前出の酢酸菌の仲間である *Gluconobacter* 属の菌や *Pseudogluconobacter* 属の菌が知られている。*Pseudogluconobacter* の属の菌で、*P. saccharoketogenes* は、ユニークな性質を示し、希土類元素を培地中に添加して本菌を培養すると、L-ソルボースからの2-ケト-L-グルオン酸生成収率が著し

く改善されることが報告されている(野上ら, 1989)。

L-ソルボースから2-ケト-L-グルオン酸への変換は、L-ソルボソンを中間体として、2段階の酵素反応で進む。第1段目が、L-ソルボース脱水素酵素、第2段目がL-ソルボソン脱水素酵素によって触媒される。*Gluconobacter* 属から単離された本反応を触媒する酵素は、それぞれ別の酵素であったが、*K. vulgare* から単離された酵素は、両方の反応を触媒する性質を有し、著者らによって、ソルボース/ソルボソン脱水素酵素と命名された(Asakura & Hoshino, 1999)。

話がそれるが、前記のL-ソルボースは、D-ソルビトールを基質として微生物発酵によって作られている。ここで使われる菌は、*Gluconobacter* 属の菌であり、本菌の持つ膜結合型のPQQ依存性ソルビトール脱水素酵素(Sugisawa & Hoshino, 2002)による一段反応である。興味深いことに、このソルビトール脱水素酵素は、非常に広い基質特異性を示し、次の項目で取り上げる5-ケト-D-グルコン酸発酵においても重要な役割を果たしている(Matsushita *et al.*, 2003)。

## 6. 5-ケト-D-グルコン酸発酵

5-ケト-D-グルコン酸は、L-酒石酸の原料として注目されている。L-酒石酸は、現在世界で年間約5万トン生産されている。そのうちの2/3がブドウ果汁からの回収によって生産され、残り1/3が石油化学に由来する無水マレイン酸から酵素反応などを用いた変換反応によって作られている。

L-酒石酸発酵に関する研究は、1970年代に行われた。その当時すでに、*Gluconobacter* 属の菌が選抜されていた。グルコースを基質として発酵を行うが、培地中に遷移金属であるバナジウムが存在すると酒石酸の生産に有効であることが報告されていたが、何故、バナジウムが本発酵に有効であるかは不明であった。その後、研究が進み、現在では、*Gluconobacter* 属の菌は、L-酒石酸の前駆体である5-ケト-D-グルコン酸を生産することはできるが、5-ケト-D-グルコン酸からL-酒石酸への変換は、培地中に存在する金属(バナジウムを含む)による化学的な酸化反応によることが明らかとなった(Klasen *et al.*, 1992)。従って、L-酒石酸のグルコースからの直接発酵プロセスは確立されていないのが現状である。そのかわり、前駆体の5-ケト-D-グルコン酸を微生物によって効率良く生産する研究が行われている。

ほとんどの *Gluconobacter* 属の菌は、グルコースを基質として、リン酸化を経ずに、グルコノ- $\delta$ -ラクト

ンを經由しグルコン酸を生成する。グルコン酸はさらに酸化され、2-ケト-D-グルコン酸と5-ケト-D-グルコン酸を生産する。反応中間体として、グルコン酸が蓄積する。グルコースからグルコノ- $\delta$ -ラクトンへの反応は、膜結合型PQQ依存性のグルコース脱水素酵素が触媒し、2-ケト-D-グルコン酸へはFAD依存性グルコン酸脱水素酵素、5-ケト-D-グルコン酸へは、PQQ依存性グルコン酸脱水素酵素が触媒する。このPQQ依存性グルコン酸脱水素酵素が前項で記載したソルビトール脱水素酵素と同一酵素であることが、明らかとなっている。本菌のFAD依存性グルコン酸脱水素酵素欠損株は、効率良くグルコースから5-ケト-D-グルコン酸を発酵生産することができる (Elfari *et al.*, 2005)。近い将来、本プロセスがL-酒石酸生産プロセスの一部を担う日が来るかもしれない。

## 7. その他

本稿においては、クエン酸およびイタコン酸発酵については割愛させていただいた。クエン酸発酵には、糸状菌 *Aspergillus niger* が古くから使われ、イタコン酸発酵には、*Aspergillus terreus* が工業利用されている。糸状菌も忘れてはならない有機酸発酵菌である。

## 8. おわりに

現在、多くの産業・生活関連製品（燃料、プラスチック製品、衣料など）が、石油化学工業によって作られている。原油を精製（オイルリファイナリー）して得られるエチレンやプロピレン、芳香族化合物などが化学製品の出発原料として使われている。しかし、石油化学が、地球温暖化・環境破壊の原因の一つであることと、近い将来化石資源の枯渇が問題になっており、それに代わる産業の必要性が叫ばれている。その解決策としていわれているのが、バイオマスの有効利用であり、バイオリファイナリーである。2004年8月アメリカのエネルギー省（DOE）は、バイオリファイナリーに使用する基幹物質として12の化合物を選定した (Werpy & Petersen, 2004)。その中には、有機酸（コハク酸、2,5-フルフラールジカルボン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、グルカール酸、イタコン酸、レブリン酸）、アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、ポリオール（グリセロール、ソルビトール、キシリトール）および3-ヒドロキシブチロラクトンが含まれている。これらの化合物は、基幹物質として有用性があり、将来バイオ技術によって大量生産されることが期待されている。ここに書かれている有機酸

のうち、イタコン酸は、すでに商業化されており、コハク酸は、バイオポリマー原料としての開発が盛んに行われている。それ以外の化合物、2,5-フルフラールジカルボン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、グルカール酸、レブロン酸については、現在効率的なバイオによる生産方法は確立されていない。今後の、新規なバイオプロセスの開発に期待したい。

## 文献

- Andressen, J.R., Schaupp, A., Neurauter, C., Brown, A. & Ljungdahl, L.G. 1973. Fermentation of glucose, fructose, and xylose by *Clostridium thermoacetium*: effect of metals on growth yield, enzymes, and the synthesis of acetate from CO<sub>2</sub>. *J. Bacteriol.* **114**: 743-751.
- Asakura, A. & Hoshino, T. 1999. Isolation and characterization of a new quinoprotein dehydrogenase, L-Sorbose/L-Sorbosone dehydrogenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 46-53.
- Elfari, M., Ha, S.-W., Bremus, C., Merfort, M., Khodaverdi, V., Hermann, U., Sahm, H. & Goerisch, H. 2005. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 668-674.
- Guettler, M.V., Jain, M.K. & Rumler, D. 1996. Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants. United States Patent 5,573,931.
- Klasen, R., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. 1992. Incapability of *Gluconobacter oxydans* to produce tartaric acid. *Biotechnology and Bioengineering* **40**: 183-186.
- 駒形和男 2008. コラム「酢酸菌の鞭毛」. 日本微生物資源学会誌 **24**: 147-148.
- Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino, T. & Adachi, O. 2003. 5-Keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in *Gluconobacter* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1959-1966.
- 野上晃雄, 山口高正, 岡 正孝, 白藤英夫 1989. 2-ケト-L-グロン酸の製造法. 日本公開特許公報 昭 64-85088.
- Nomura, Y., Iwahara, M. & Hongo, M. 1994.

- Production of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum* in electro dialysis culture using a fermenter equipped with an electro dialyser. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 427-432.
- Okada, H., Kameyama, I. & Okumura, S. 1961. L-Glutamic acid and succinic acid fermentation by *Brevibacterium flavum* No. 1996. *Amino Acids* **3**: 26-36.
- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M. & Yukawa, H. 2008. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 459-464.
- 大石邦雄, 相田 浩, 浅井勇宣 1961. アミノ酸に関する研究 (第8報) L-グルタミン酸発酵からコハク酸発酵への発酵転換の機作について (その1). *日本農芸化学会誌* **35**: 855-861.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. & Branduardi, P. 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology* **26**: 100-108.
- Schueller, G., Hertel, C. & Hammes, W.P. 2000. *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 2013-2020.
- Sugisawa, T. & Hoshino, T. 2002. Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 57-64.
- 谷口正明, 三浦重信 2008. *Rhizopus oryzae* を用いた L-乳酸の工業生産. *生物工学会誌* **86**: 340-342.
- Werpy, T. & Petersen, G. 2004. Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. <http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>
- Yin, G., Tao, Z., Yan, Z., Ning, W., Wang, C. & Wang, S. 1990. Fermentation process. United States Patent 4,935,359.

(担当編集委員: 高木 忍)