

## 酢酸資化性酵母の検索とその培養条件\*

赤木 盛郎・水谷 清寛\*\*・宮原 一明\*\*\*・山田 哲也

## Screening of Yeast Strains Utilizing Acetate and Their Cultural Conditions

Morio AKAKI, Kiyohiro MIZUTANI\*\*, Kazuaki MIYAHARA\*\*\*  
and Tetsuya YAMADA

## 緒 言

蛋白質源としての Single-Cell Protein の生産を目的とした原料については、既に種々の観点より論じられ、そのための炭素源として各種農産物、未利用資源、廃棄物あるいは石油製品等が検討されてきている。著者の一人赤木も、各種廃資源類、未利用資源類からの Single-Cell Protein の生産について報告し、また石油製品関係では、エタノール<sup>1-4)</sup>、炭化水素<sup>5-8)</sup>を炭素源とする酵母の生産について報告している。酢酸はエタノールと並んで我々の日常生活に最も親しみのある有機化合物であり、既に合成酢として使われ、最も心理的抵抗の少ない原料とも言い得るものである。また n-パラフィンと異なり水溶性であるため、菌体からの基質の除去が容易という利点もある。緒方ら<sup>9,10)</sup>は酢酸アンモニウムおよび酢酸を炭素源として、Cama ら<sup>11)</sup>は酢酸ソーダを用いて、池宮ら<sup>12)</sup>は酢酸アンモニウムより、また松浦ら<sup>13)</sup>は酢酸アンモニウムおよび酢酸ソーダを炭素源として酵母の菌体生産について報告している。またその他に酢酸を炭素源とした細菌<sup>14)</sup>、糸状菌<sup>15)</sup>、藻類<sup>16)</sup>の菌体、藻体生産の報告もみられる。さらに優れた菌株を得るため、本研究においては、まず、当研究室保存の酵母352株より、酢酸培地に良好な生育をする菌株の選択を試み、その結果得られた有望株と考えられる菌株について、酢酸を唯一の炭素源とする培地における培養条件を検討したので

ここに報告する。

## 実 験 方 法

## 1. 使用菌株

本実験に用いた菌株は当研究室保存の352株であり、このうち、Table 1 に示すように同定株は113株、未同定株は239株である。

## 2. 使用培地

前培養には Table 2 に示した YM 培地を、本培養には Table 3 に示した基本培地 A を主として用い、その他に炭素源として酢酸アンモニウムの代りに酢酸も使用した。培地の pH 調整は HCl 及び NaOH を使用した。前培養の YM 培地は 100 ml/容三角フラスコに 25 ml、本培養の培地は 500 ml/容瓶口フラスコに 50 ml を分注、殺菌して使用した。

## 3. 培養方法

前培養は各菌の新鮮な斜面培養より YM 培地へ一白金耳接種し、28°C、2日間回転振盪培養を行なった。本培養は培地に前培養液を 0.5 ml/接種し、28°C で往復振盪培養(振巾 7 cm, 160 rpm)を行なった。

## 4. 生育度の測定

生育度は培養後の液を10倍に希釈して、430 nm における吸光度 O. D. で示した。

## 実 験 結 果

## 1. 酢酸資化性酵母の検索

培地 A に供試菌株をそれぞれ接種し、28°C、2日間振盪培養を行ない、酢酸培地における生育度を比較検討した。そのうち比較的良好的な生育が認められた菌株の成績を Table 4 に示した。

すなわち、供試した菌株のうち *Pichia* 属、*Candida* 属、

昭和 58 年 10 月 15 日 受理

\* 酢酸を炭素源とする酵母の生産に関する研究(第1報)

\* Studies on the Production of Yeast from Acetate as a Sole Carbon Source. Part 1.

三重大学農学部

\*\* 現在名古屋市緑保健所生活環境課

\*\*\* 現在株式会社中壱醸造

Table 1. Yeast strains tested.

Identified	Number of strain	Unidentified	Number of strain
<i>Saccharomyces</i>	12	Lactose assimilating	5
<i>Debaryomyces</i>	5	Xylose assimilating	12
<i>Pichia</i>	29	from sulfite waste liquor	3
<i>Petasospora</i>	2	stillage	9
<i>Hansenula</i>	48	foreign soil	42
<i>Candida</i>	9	sake brewing factory	18
<i>Mycotorula</i>	3	the others	150
<i>Rhodotorula</i>	5		
Total 352 strains			

Table 2. Composition of YM medium.

Glucose	1.0%
Peptone	0.5
Malt extract	0.3
Yeast extract	0.3
pH	6.0

Table 3. Composition of basal medium A.

CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	1.28(1.0*)%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
Yeast extract	0.01
pH	6.0

\* (% as acetic acid)

*Hansenula* 属の酵母に、また未同定株の中では Stillage より分離した株、外国土壌より分離した株、清酒工場より分離した株に良好な生育をするものがみられた。

これらの菌株の中で、特に生育がすぐれ、また再現性も良かった 2 菌株、*Pichia sake* form.  $\alpha$  No. 84 (以下 *Pichia sake* という) と清酒工場から分離した無孢子酵母の CH-13 株をえらび以後の培養条件の検討を行なった。

## 2. 初発 pH の影響

培地を HCl あるいは NaOH で種々の pH に調整し、24時間振盪培養を行ない生育度を比較した。なお 2 菌株の至適温度は 25~30°C であったので培養温度は 28°C とした。

Fig. 1 に示した結果から明らかなように、至適 pH は

Table 4. Yeast growth of representative strains.

Strain	Growth (OD at 430 nm)
<i>Pichia sake</i> form. $\alpha$ No. 84	0.400
<i>Pichia sake</i> form. $\alpha$ No. 85	0.360
<i>Pichia sake</i> form. $\alpha$ No. 89	0.366
<i>Hansenula murakii</i> No. 169	0.280
<i>Candida utilis</i>	0.366
<i>Candida tropicalis</i> No. 6264	0.339
S-II-3*	0.355
FS-62-73**	0.382
CH-1***	0.300
CH-13***	0.383

Growth was indicated as OD of the culture liquid diluted 10-fold with distilled water.

\* Isolated from stillage.

\*\* Isolated from soil of Brazil.

\*\*\* Isolated from sake brewing factories.

*Pichia sake* は 5.5~6.0、CH-13 株では 6.0 付近であった。

## 3. 窒素源の種類と濃度の影響

培地は基本培地 A の酢酸アンモニウムを酢酸に代え、5 種類の窒素源、硝酸ナトリウム、リン酸一アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウムおよび塩化アンモニウムを窒素濃度で 0.1% にそろえたものを用いた。24時間振盪培養を行ない生育度を比較検討した。結果は Table 5 に示した。すなわち 2 菌株ともリン酸一アンモニウムが窒素源として有効であることがわかった。

そこで上述のリン酸一アンモニウムを 0.25~3% (窒素として 0.03~0.36%) の濃度で培地に添加し、生育に

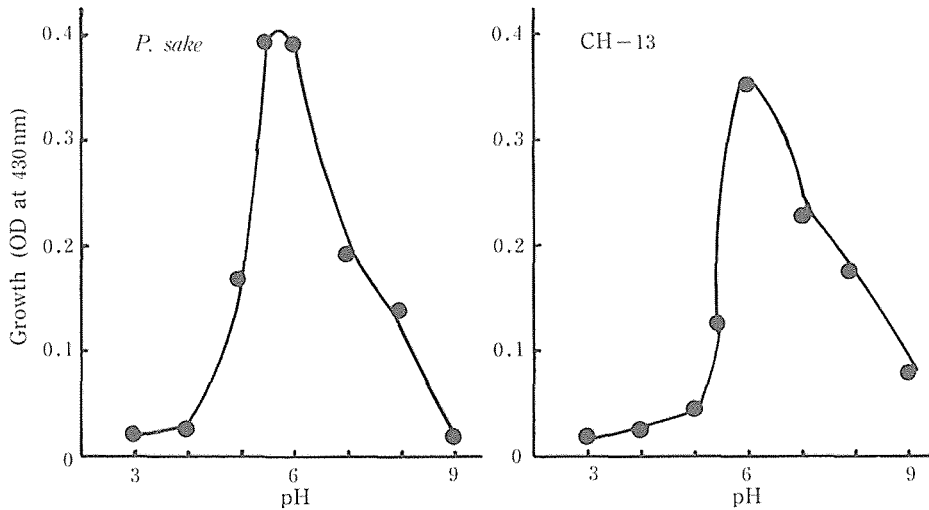


Fig. 1. Effect of initial pH on the yeast growth.

Table 5. Effect of nitrogen source on the yeast growth.

Nitrogen source	Growth (OD at 430 nm)	
	<i>P. sake</i>	CH-13
NaNO <sub>3</sub>	0.290	0.380
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.615	0.505
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.375	0.420
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.415	0.445
NH <sub>4</sub> Cl	0.340	0.410

Growth was indicated as OD of the culture liquid diluted 10-fold with distilled water.

およぼ窒素濃度の影響を調べた。Table 6 から明らかのように2菌株とも最適濃度は0.5~1.0%にあった。これらの結果から、酢酸培地の窒素源としてはリン酸一アンモニウム0.5%が適当であることがわかった。

4. 酢酸濃度の影響

酢酸を用いてその初発濃度を0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%として72時間振盪培養を行ない、生育度を経時的に測定した。

結果は Fig. 2 に示した。すなわち *Pichia sake* では酢酸3%以上で生育阻害がみられたが、4%でも長時間培養することにより生育が認められた。CH-13株では2%で生育の誘導期が長くなり、それ以上の濃度では阻害が認められ4%では、ほとんど生育しなかった。

5. 生育促進物質の添加効果

Table 7 に示した生育促進物質やグルコース等の利用

Table 6. Effect of ammonium phosphate concentration on the yeast growth.

NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)	Growth (OD at 430 nm)	
	<i>P. sake</i>	CH-13
0.25	0.490	0.485
0.5	0.720	0.630
1.0	0.700	0.605
1.5	0.645	0.582
2.0	0.563	0.540
3.0	0.530	0.384

Growth was indicated as OD of the culture liquid diluted 10-fold with distilled water.

されやすい糖類を0.1%の濃度で各々培地 A の酵母エキスとおき代えて培地を調製し、振盪培養を行なった。なお使用したコーンステープリカーの組成は Table 8 に示した。

その結果、一般に無添加のものと比較してこれら添加物の効果が大なり小なり認められた。*Pichia sake* では、コーンステープリカー、麦芽エキス、酵母エキス、グルコースに、CH-13株ではコーンステープリカー、酵母エキス、グルコース、シュクロースに良好な効果があった。そのうち特にコーンステープリカーは2菌株ともに著しい生育促進効果を示した。

次にコーンステープリカーの添加量の影響を調べた。この場合炭素源として酢酸を用いた。

その結果 Fig. 3 に示すように0.1%で充分であった。

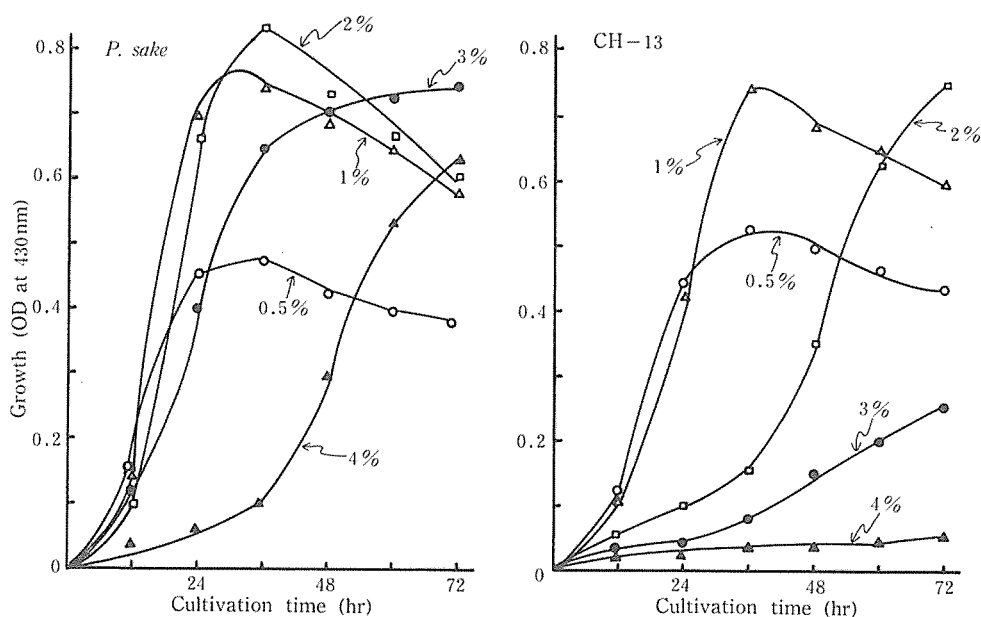


Fig. 2. Effect of initial acetic acid concentration on the yeast growth.

Table 7. Effect of growth stimulating substance on the yeast growth.

Growth stimulating substance	Growth (OD at 430 nm)			
	<i>P. sake</i>		CH-13	
	20 hr	27 hr	18 hr	24 hr
No addition	0.215	0.365	0.195	0.227
Corn steep liquor	0.625	0.660	0.500	0.521
Malt extract	0.650	0.660	0.366	0.387
Yeast extract	0.620	0.630	0.391	0.435
Meat extract	0.400	0.483	0.301	0.370
Polypepton	0.455	0.497	0.280	0.330
Casamino acid	0.412	0.488	0.234	0.320
Vitamin mixture	0.240	0.400	0.202	0.253
Glucose	0.535	0.610	0.288	0.395
Sucrose	0.508	0.545	0.300	0.393

Amount of addition of growth stimulating substance: 0.1%

Growth was indicated as OD of the culture liquid diluted 10-fold with distilled water.

Table 8. Components of corn steep liquor used.

Solid matter	60.0%
Total nitrogen	3.7
Lactic acid	13.0
pH	3.9

これらの結果から、酢酸培地への添加物としては、安価で大量培養に有利なコーンステープリカー0.1%が、

有効であることがわかった。

#### 6. 通気量の影響

500 ml 容坂口フラスコに培地 A をそれぞれ 25 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml ずつ分注, 振盪培養を行ない, その生育度を経時的に測定して通気量の影響を調べた。

結果は Table 9 に示した。

すなわち 2 菌株とも培地量による生育度の差はほとんどみられなかった。この結果は緒方ら<sup>10)</sup>の実験結果と

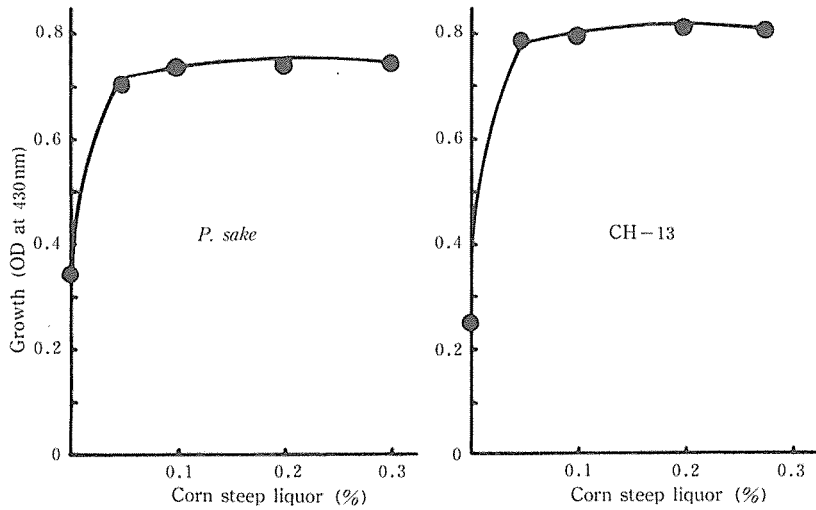


Fig. 3. Effect of corn steep liquor concentration on the yeast growth.

Table 9. Effect of aeration on the yeast growth.

Strain	Volume in flask	Growth (OD at 430 nm) after hrs		
		0	18	24
<i>P. sake</i>	25 ml	0.017	0.350	0.390
	50	0.017	0.350	0.395
	75	0.017	0.342	0.400
	100	0.017	0.320	0.400
CH-13	25 ml	0.016	0.225	0.385
	50	0.016	0.245	0.391
	75	0.016	0.240	0.385
	100	0.016	0.240	0.370

Reciprocal shaking culture with 500 ml volume flask.

Growth was indicated as OD of the culture liquid diluted 10-fold with distilled water.

Table 10. Composition of medium B.

CH <sub>3</sub> COOH	1.0%
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
Corn steep liquor	0.1
pH	5.5~6.0

一致し、酢酸を炭素源とする場合には、n-パラフィンの場合<sup>7)</sup>とは異なり、通気量の生育度におよぼす影響は少ないことが明らかとなった。

以上種々検討の結果、培地組成を Table 10 の培地 B のように設定した。

### 考 察

Table 1 に示した同定株113株、未同定株239株について、酢酸培地に良好な生育をする酵母菌株の検索を行った。その結果、*Pichia* 属、*Hansenula* 属、*Candida* 属に、また未同定酵母239株中6株にすぐれた生育をするものが認められた。それらの中でも特に生育の良好であった *Pichia sake* form.  $\alpha$  No. 84 と CH-13 株の2菌株について、培養条件の検討を行なった。CH-13 株は清酒工場より分離した株で無孢子酵母に属し、広い炭素源資化能を有している。

選択した酵母の生育に対する至適 pH は、5.5~6.0 付近の狭い範囲内であった。これらは松浦らの報告によるパン酵母<sup>13)</sup>、麹菌<sup>15)</sup>の酢酸培地における培養の場合と類似した傾向にあった。また Cama ら<sup>11)</sup>が *Candida utilis* について、松浦ら<sup>13)</sup>が *Saccharomyces cerevisiae* について行なったそれぞれの研究報告で指摘しているように、本研究に用いた酵母の場合にも、至適 pH を境として酸性側で生育阻害作用が強くあらわれていることが分かる。一般的にいて酵母の至適 pH は酸性側にあり、本研究で使用した2菌株は YM 培地（炭素源グルコース）では pH 4 においても旺盛な生育をした。この酢酸培地における pH 低下にともなう生育阻害は、今後共検討を要する興味ある問題と考えている。

酢酸濃度の影響についての実験で、*Pichia sake* では初発酢酸濃度3%で、またCH-13株では2%から生育阻害が認められた。このことから菌体収量の向上をはかるには、酢酸濃度を1%程度とし、基質の消費に応じて適宜酢酸を添加してやる Feeding 方式が効果的であると考えられ、また酢酸の Feeding に伴った窒素源の Feeding も重要な問題と考えられる。

コーンステープリカー0.1%の添加で著しい生育促進効果が認められた。これは工業的見地から、大量培養に際して有利と考えられる。

通気量の点では、酢酸1モルを完全燃焼するために必要な酸素量が2モルで、糖の場合の1/3、 $C_{14}$  の  $n$ -パラフィンの1/10ですむことから、酢酸を炭素源とした場合に通気が少なくすむことは明らかであり、この点も大規模での培養の際大きな利点といえよう。

次報では選択された菌株について、菌体収量、菌体成分などを検討した結果を報告する予定である。

### 要 約

1) 研究室保存の352株の酵母菌(同定株113株、未同定株239株)について、酢酸培地における生育について検討した。その結果、特に顕著な生育をする *Pichia sake* form.  $\alpha$  No. 84 および清酒工場より分離した無孢子酵母のCH-13株の2菌株を選択することができた。

2) 選択された菌株について、その生育におよぼすpH、酢酸濃度、窒素源の種類と濃度、生育促進物質、通気量などの影響を検討した。そして次のような培地を設定した。

$CH_3COOH$  1.0%,  $NH_4H_2PO_4$  0.5%,  $KH_2PO_4$  0.1%,  $K_2HPO_4$  0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%, コーンステープ

リカー0.1%, pH 5.5~6.0.

発表にあたり、貴重な菌株を御分譲いただいた小玉健吉博士に感謝します。またコーンステープリカーをいただいた庄野澱粉株式会社にお礼申し上げる。

### 文 献

- 1) 赤木盛郎: 醗工, **32**, 127 (1955)
- 2) 赤木盛郎: 醗工, **33**, 157 (1955)
- 3) 赤木盛郎, 吉田弘一, 伊藤昭文: 三重大農学報, 第57号, 73 (1978)
- 4) 赤木盛郎, 吉田弘一, 白上公久: 三重大農学報, 第60号, 87 (1980)
- 5) 赤木盛郎, 山路 正, 高橋 勲: 昭和44年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 184
- 6) 赤木盛郎, 坪内一夫, 辻井邦世, 谷由美子: 三重大農学報, 第63号, 217 (1981)
- 7) 赤木盛郎, 山路 正, 坪内一夫, 高橋 勲: 三重大農学報, 第66号, 199 (1983)
- 8) 赤木盛郎, 山路 正, 坪内一夫, 江島正之: 三重大農学報, 第67号, 115 (1983)
- 9) OGATA, K., H. NISHIKAWA, and M. OHSUGI: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 977 (1969)
- 10) 緒方浩一, 西川英郎, 大杉匡弘: 醗工, **48**, 478 (1970)
- 11) CAMA, F. J. and V. H. EDWARDS: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 787 (1970)
- 12) 池宮正行, 安見克彦: 醗工, **51**, 761 (1973)
- 13) 松浦慎治, 高橋治男, 真鍋 勝: 醗工, **53**, 658 (1975)
- 14) 上山英夫, 北田牧夫, 富金原孝: 醗工, **51**, 625 (1973)
- 15) 松浦慎治, 高橋治男, 真鍋 勝: 醗工, **51**, 783 (1973)
- 16) ENDO, H., K. NAKAJIMA, R. CHINO and M. SHIROTA: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 9 (1974)

### Summary

We attempted to obtain yeast strains which utilize acetate as a carbon source. In this report, three hundred and fifty-two strains of yeast preserved in our laboratory were employed. These strains included one hundred and thirteen strains of identified yeast, i. e., twenty-nine strains of *Pichia*, forty-eight strains of *Hansenula*, twelve strains of *Saccharomyces*, nine strains of *Candida*, three strains of *Mycotorula*, five strains each of *Rhodotorula* and *Debaryomyces*, and two hundred and thirty-nine strains of unidentified yeast isolated in our laboratory.

Two strains of yeast, *Pichia sake* form.  $\alpha$  No. 84 and CH-13 strain, utilizing acetate as a carbon source, were selected. The latter strain, CH-13, had been isolated from a sake brewing factory, and belongs to asporogenous yeasts.

With these selected yeast strains, cultural conditions fitted for their growth in acetate containing medium were studied, and the following medium for cell production was set up: acetic acid 1%,  $NH_4H_2PO_4$  0.5%,  $KH_2PO_4$  0.1%,  $K_2HPO_4$  0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%, and corn steep liquor 0.1%, pH 5.5-6.0.