

# エタノール資化性酵母の検索とその培養条件\*

赤木 盛郎・福永 峰子・吉田 弘一\*\*・伊藤 昭文\*\*\*・白上 公久\*\*\*\*

## Screening and Cultural Conditions of Yeasts that Assimilate Ethanol

Morio AKAKI, Mineko FUKUNAGA, Kazuhiro YOSHIDA\*\*,  
Terufumi Ito\*\*\* and Hirohisa SHIRAGAMI\*\*\*\*

Six yeast strains, *Pichia membranaefaciens* No. 304, *Pichia sake* form.  $\alpha$  No. 101, *Pichia farinosa* No. 115, *Pichia farinosa* No. 121, *Candida rugosa* LKB 6111 and yeast No. 62-72, utilizing ethanol as a carbon source were selected from 217 strains of yeast (identified 112 strains, unidentified 105 strains).

These selected strains showed a good growth on the medium containing 2~6 per cent ethanol, 0.1~0.2 per cent urea and 0.1 per cent corn steep liquor. The growth, however, decreased at a concentration of 8 per cent, and was inhibited at a concentration of 10 per cent of added ethanol.

The growth characteristics of the selected six ethanol-assimilating yeast strains were investigated in shaking culture on the ethanol medium containing urea and ammonium sulphate at various proportions. By the addition of 5~20 per cent ammonium sulphate to urea as nitrogen, the growth of these yeasts, except yeast No. 62-72 strain, decreased with the increase of ammonium sulphate concentration. However, the rise of pH was decreased during cultivation and it is shown that the depression of pH protects the culture from bacterial contamination.

Optimal concentration of corn steep liquor as a natural nutrient for yeast growth was between 0.1~0.2 per cent, differing among the strain.

Cell yield from ethanol supplied to the medium reached 73.8 per cent on 1 per cent ethanol medium for *Pichia membranaefaciens* No. 304.

---

\*エタノール資化性酵母に関する研究 (第1報)

\*Studies on Ethanol Assimilating Yeast Part 1. 鈴鹿短期大学

\*\* 松阪大学

\*\*\* 興和株式会社

\*\*\*\* 国税局鑑定官室

## 緒 言

世界的な人口増加にともない、食糧特にタンパク質の不足は早晚到来する問題と予測されている。酵母菌体がタンパク質源として有用なことは古くから認められており、従来酵母培養の炭素源としては主として糖質原料が用いられてきた。しかし、食糧資源の不足と石油化学工業の発展にともない、石油製品であるn-パラフィン、メタノール、エタノール、メタンなどが比較的安価に供給されるようになったため、これらを炭素源として利用することが広く検討されている。<sup>1~8)</sup>

エタノールは酒類として古くから人類になじまれ、飲用され、安全性も高く、また水溶性で取扱いが容易なことなどの利点がある。

すでに著者の一人赤木は1955~1958年、廃資源利用の立場からエタノール<sup>9,10)</sup>、不純物酒精<sup>11~13)</sup>を炭素源とした酵母培養の研究を行ない、*Torula utilis*、分離酵母 *Candida pelliculosa* No. 110を用いて、エタノール0.25~1.0%における菌体収率56~69%をえている。また大<sup>14)</sup>亦らは *Pichia mogi* No. 3を用い3%エタノール濃度で46%の菌体収率をえ、Harada<sup>15)</sup>らは *Hansenula miso* を用い6mlのエタノールから3.4gの菌体をえ、天野<sup>16)</sup>らは *Candida brassica* sp. nov. E-17株をえ、70%以上の高い菌体収率をえたと報告している。

著者らはエタノールを炭素源として酵母菌体を生産する目的でその基礎的研究を行なっている。本報告では先に供試した菌株を含めて、同定酵母、未同定酵母合せて217株からエタノール資化能のすぐれた6菌株を選択し、これらの増殖におよぼす窒素源、天然栄養源およびエタノール濃度の影響などについて検討し、さらに尿素・硫酸アンモニウム混合窒素源培地での培養経過、およびエタノール濃度と菌体収率などを検討した結果について報告する。

## 供試菌株および実験方法

### 1. 供試菌株

本実験に用いた酵母菌株は、同定株112株、未同定株105株、合計217株である。

その内訳は、*Pichia membranaefaciens* 3株、*Pichia sake* 9株、*Pichia farinosa* 16株、*Pichia* sp. 4株、*Hansenula saturnus* 6株、*Hansenula suaveolens* 5株、*Hansenula mrakii* 1株、*Hansenula anomala* 24株、*Hansenula* sp. 14株、*Saccharomyces sake* 4株、*Saccharomyces pretoriensis* 1株、*Saccharomyces* sp. 4株、*Candida utilis* 2株、*Candida tropicalis* 3株、*Candida guilliermondii* 2株、*Candida rugosa* 1株、*Debaryomyces* sp. 4株、*Mycotorula japonica* 3株、*Rhodotorula* sp. 4株、*Petasospora* sp. 2株と、未同定株としては、乳糖資化性酵母5株、キシロース資化性酵母12株、外国土壌からの分離酵母43株、清酒工場からの分離酵母45株である。

## 2. 培地

Table 1, Table 2 に示した培地A, 培地B を基本培地として用いた。

Table 1. Composition of medium A.		Table 2. Composition of medium B.	
Ethanol*	Varied	Ethanol	Varied
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO**	2.0g	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	2.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.16	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.16
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.7	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.7
NaCl	0.5	NaCl	0.5
Yeast extract	0.1	Corn steep liquor	0.1
Distilled water	1000ml	Distilled water	1000ml

\*Ethanol without sterilization was added to the autoclaved medium.

\*\*Urea used as 5% solution with sterilization was added to the autoclaved medium.

## 3. 培養方法

エタノール資化性酵母の選択, 窒素源, 天然栄養源の酵母増殖におよぼす影響, エタノール濃度と酵母増殖の実験では, 培養容器として大型試験管 (30×200mm) を用い, 培地10ml を分注・殺菌後, 25℃, 3日間斜面培地に培養した酵母の懸濁液 0.5ml を接種し, 28℃で振盪培養した。振盪条件は振幅 9.7cm, 振盪数 113回/分とした。

尿素・硫酸アンモニウム混合窒素源での培養, Corn steep liquor 添加量と酵母の増殖, アルコール濃度と菌体収率の実験では, 培養容器として 500ml容振盪フラスコを用い, 培地 50ml を分注, 120℃, 15分殺菌後, 種菌 1ml を接種し, 28℃で振盪培養した。種菌はエタノール 2% の基本培地 50ml に 28℃, 40時間振盪培養し, 遠沈後の菌体を殺菌水で 2回洗浄し, 10~20mg/ml の菌体懸濁液としたものを用いた。振盪条件は振幅 7.0cm, 振盪数 116回/分とした。

## 4. 生育度の測定

生育度は培養液を適宜希釈し, 430nm, 10mmセルにおける吸光度OD で示した。乾燥菌体量は予め測定した検量線から求めた。

## 5. エタノールの定量

エタノールの定量はConway の微量拡散法<sup>17)</sup> を改変した中村の方法<sup>18)</sup> によった。

## 実験結果

### 1. エタノール資化性酵母の選択

培地A (Table 1) のエタノール濃度を 2% および 4% とし, 供試酵母 217株をそれぞれ接種し, 28℃で 2日および 3日間振盪培養し, 生育度を測定してエタノール資化性を比較検討した。

供試酵母 217株中比較的良好な生育をした10菌株の培養結果をTable 3 に示した。

Table 3. Yeast growth of representative strains.

Strain	Ethanol wt %	pH		Growth* (OD at 430 nm)	
		After	After	After	After
		2 days	3 days	2 days	3 days
<i>Pichia membranaefaciens</i> No.304	2	6.1	7.8	0.47	0.57
	4	6.6	5.8	0.51	0.86
<i>Pichia sake</i> form. $\alpha$ No.84	2	8.2	8.5	0.50	0.46
	4	7.6	8.0	0.43	0.58
<i>Pichia sake</i> form. $\alpha$ No.101	2	7.0	7.7	0.49	0.59
	4	5.8	5.0	0.46	0.87
<i>Pichia farinosa</i> No.112	2	4.9	6.9	0.53	0.59
	4	5.0	4.0	0.52	0.76
<i>Pichia farinosa</i> No.115	2	4.8	7.1	0.52	0.60
	4	5.1	5.7	0.56	0.90
<i>Pichia farinosa</i> No.121	2	6.2	6.7	0.60	0.64
	4	6.9	5.5	0.53	0.79
<i>Pichia farinosa</i> No.123	2	6.1	6.8	0.46	0.57
	4	6.7	5.5	0.55	0.80
<i>Hansenula mrakii</i> No.169	2	8.1	8.6	0.52	0.50
	4	7.7	7.9	0.45	0.62
<i>Candida rugosa</i> LKB 6111	2	4.9	6.7	0.52	0.55
	4	4.4	7.3	0.46	0.65
Yeast No.62-72	2	6.3	6.4	0.53	0.48
	4	4.4	6.9	0.44	0.67

\* Growth was indicated as OD of the culture liquid diluted 50-fold with distilled water.

供試した菌株のうち *Rhodotorula* 属, キシロズ資化性酵母などの一部の菌株にエタノール資化性の劣るものがあったが, 他のほとんどの菌株はエタノールを炭素源として資化することを認めた。

特に *Pichia* 属では *P. membranaefaciens* No.304, *P. sake* form.  $\alpha$  No.101, *P. farinosa* No.115, *P. farinosa* No.121などが, *Candida* 属では *C. rugosa* LKB 6111 が, また未同定酵母の中では Yeast No.62-72 の6菌株が, 2%または4%エタノール濃度で良好な生育をした。培養後の pH は6前後のものが多かった。

## 2. 窒素源の酵母増殖におよぼす影響

実験1で選択したエタノール資化能の高い酵母3種6菌株を試験菌とした。これらの菌をエタノール2%の培地Aを用い窒素源の種類と濃度が菌の増殖におよぼす影響を検討した。

結果をTable 4およびTable 5に示した。

Table 4. Effect of nitrogen source on the growth of selected yeasts. (1)

Strain	Nitrogen source	%	pH		Growth* (OD)		Ethanol left wt%
			After 2 days	After 3 days	After 2 days	After 3 days	
<i>Pichia membranaefaciens</i> No. 304	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	0.1	4.8	6.1	0.53	0.74	0.00
		0.2	6.1	6.9	0.57	0.74	0.00
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	2.3	2.3	0.37	0.38	0.12
		0.4	2.3	2.3	0.38	0.39	0.13
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1	2.1	2.0	0.32	0.38	0.01
		0.3	2.1	2.1	0.29	0.34	0.01
	NH <sub>4</sub> Cl	0.2	2.0	2.0	0.33	0.42	0.01
		0.4	2.0	2.0	0.33	0.37	0.00
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	2.2	2.1	0.42	0.57	0.00
		0.8	2.5	2.4	0.43	0.62	0.00
<i>Pichia sake</i> form. $\alpha$ No. 101	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	0.1	4.6	5.6	0.43	0.73	0.00
		0.2	6.4	7.2	0.57	0.72	0.00
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	2.2	2.2	0.34	0.43	0.00
		0.4	2.2	2.2	0.36	0.51	0.00
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1	2.0	2.0	0.30	0.38	0.01
		0.3	2.1	2.0	0.26	0.32	0.01
	NH <sub>4</sub> Cl	0.2	2.0	1.9	0.31	0.40	0.01
		0.4	2.0	1.9	0.28	0.33	0.00
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	2.2	2.1	0.36	0.55	0.00
		0.8	2.5	2.3	0.37	0.57	0.00
<i>Pichia farinosa</i> No. 115	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	0.1	4.6	6.7	0.55	0.73	0.00
		0.2	5.6	7.2	0.55	0.70	0.00
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	2.3	2.2	0.33	0.42	0.00
		0.4	2.3	2.2	0.38	0.44	0.00
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1	2.1	2.1	0.26	0.31	0.01
		0.3	2.2	2.1	0.26	0.28	0.00
	NH <sub>4</sub> Cl	0.2	2.1	2.0	0.29	0.33	0.00
		0.4	2.1	2.0	0.29	0.30	0.01
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	2.3	2.2	0.40	0.49	0.00
		0.8	2.5	2.3	0.42	0.58	0.00

\* Growth was indicated as OD at 430 nm of the culture liquid diluted 100-fold with distilled water.

Table 5. Effect of nitrogen source on the growth of selected yeast. (2)

Strain	Nitrogen source	%	pH		Growth* (OD)		Ethanol		
			After	After	After	After	left		
			2 days	3 days	2days	3 days	wt	%	
<i>Pichia farinosa</i> No. 121	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	0.1	5.8	6.3	0.56	0.69	0.00		
		0.2	6.5	6.6	0.54	0.68	0.00		
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	2.4	2.4	0.33	0.49	0.00		
		0.4	2.4	2.3	0.34	0.45	0.00		
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1	2.2	2.1	0.28	0.33	0.00		
		0.3	2.2	2.2	0.26	0.30	0.18		
	NH <sub>4</sub> Cl	0.2	2.1	2.1	0.30	0.35	0.02		
		0.4	2.2	2.1	0.28	0.32	0.04		
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	2.4	2.3	0.39	0.52	0.00		
		0.8	2.7	2.6	0.44	0.54	0.00		
	<i>Candida rugosa</i> LKB 6111	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	0.1	3.5	5.6	0.56	0.61	0.00	
			0.2	4.9	7.3	0.59	0.64	0.00	
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	2.2	2.1	0.43	0.52	0.00	
			0.4	2.2	2.1	0.41	0.52	0.00	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		0.1	2.0	2.0	0.38	0.44	0.00		
		0.3	1.8	1.8	0.40	0.56	0.00		
NH <sub>4</sub> Cl		0.2	1.7	1.7	0.42	0.53	0.00		
		0.4	1.7	1.6	0.39	0.57	0.00		
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.4	2.1	2.0	0.44	0.58	0.00		
		0.8	2.4	2.3	0.47	0.61	0.00		
Yeast No. 62-72		(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	0.1	3.4	5.8	0.50	0.52	0.00	
			0.2	4.9	7.3	0.54	0.48	0.00	
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	2.1	2.2	0.41	0.35	0.00	
			0.4	2.2	2.2	0.46	0.41	0.00	
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1	2.1	2.0	0.39	0.40	0.00		
		0.3	2.0	1.9	0.38	0.51	0.00		
	NH <sub>4</sub> Cl	0.2	1.9	1.8	0.41	0.54	0.01		
		0.4	1.9	1.8	0.37	0.51	0.00		
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	2.3	2.2	0.44	0.52	0.00		
		0.8	2.6	2.6	0.47	0.49	0.00		

\*See Table 4.

Table 6. Chemical components of corn steep liquor.

Solid matter	48.5%
Total sugar	10.3
Total nitrogen	3.0
Lactic acid	7.1
SO <sub>2</sub>	0.07
pH	3.9

未同定株Yeast No.62-72は、尿素、塩化アンモニウム、燐酸一アンモニウムのいずれにもほぼ同様に増殖したが、他の5菌株はいずれも尿素が最適であることがわかった。尿素の濃度は0.1%または0.2%で良好な増殖を示した。尿素が良好な窒素源となるのは培養中のpHの変化も関係していると考えられる。

なお、3日間培養後の残エタノールは尿素を窒素源とした場合はほとんど検出されず良く利用されていることがわかった。

### 3. 天然栄養源の酵母増殖におよぼす影響

エタノール2%を炭素源とした培地Aを用いて天然栄養源の添加効果を、実験1と同じ条件で検討した。天然栄養源の添加量はいずれも0.1%とした。なお、使用したCorn steep liquorの組成はTable 6に示した。

培養結果はTable 7に示した。

すなわち、*Pichia*属の4菌株は、いずれもCorn steep liquor 0.1%添加のものが生育度が高く、菌の増殖に最も良い効果をおよぼすことがわかった。また、*C. rugosa*とYeast No.62-72では肉エキスの効果もすぐれていた。

なお、酵母の増殖に効果のあったCorn steep liquorについては、その添加量の影響についても検討した。すなわち、エタノール2%の基本培地B 50mlを用い、Corn steep liquorの添加量を0.1%、0.01%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20%として振盪培養を行ない、酵母増殖におよぼす影響を経時的にしらべた。

その結果、いずれの菌株もCorn steep liquorを0.1~0.2%添加することにより、明らかに増殖が促進されることが認められた。最適添加量が0.1%の菌株は、*P. membranae-faciens*、*P. farinosa* No.121、Yeast No.62-72の3株で、これより添加量が多くなると増殖は低下した。*P. sake*、*P. farinosa* No115、*C. rugosa*では0.1%以上の添加量ですぐれた増殖をした。

概してこれらの菌株はCorn steep liquorを添加することにより増殖のピークが早められ、36時間前後でピークに達することがわかった。

### 4. エタノール濃度と酵母の増殖

実験3の結果から、Corn steep liquorを添加した培地B (Table 2)を用いて酵母増殖におよぼすエタノール濃度の影響を検討した。菌の生育度は培養液の200倍希釈液のODで示した。

培養結果はTable 8に示した。

Table 7. Effect of nutrients on the growth of selected yeasts.

Strain	Nutrient	Growth* (OD at 430 nm)			
		After 2 days	After 3 days	After 4 days	After 5 days
<i>Pichia membranaefaciens</i> No. 304	None	0.06	0.16	0.19	0.22
	Yeast extract	0.05	0.18	0.20	0.23
	Peptone	0.06	0.21	0.23	0.26
	Meat extract	0.06	0.18	0.25	0.24
	Corn steep liquor	0.08	0.24	0.35	0.37
<i>Pichia sake</i> form. $\alpha$ No. 101	None	0.05	0.13	0.29	0.31
	Yeast extract	0.08	0.21	0.31	0.37
	Peptone	0.04	0.18	0.26	0.31
	Meat extract	0.08	0.24	0.33	0.37
	Corn steep liquor	0.08	0.22	0.41	0.42
<i>Pichia farinosa</i> No. 115	None	0.14	0.31	0.34	0.35
	Yeast extract	0.17	0.31	0.34	0.36
	Peptone	0.18	0.35	0.37	0.34
	Meat extract	0.16	0.30	0.38	0.39
	Corn steep liquor	0.20	0.38	0.41	—
<i>Pichia farinosa</i> No. 121	None	0.15	0.25	0.31	0.32
	Yeast extract	0.15	0.23	0.28	0.30
	Peptone	0.16	0.25	0.32	0.33
	Meat extract	0.15	0.25	0.31	0.33
	Corn steep liquor	0.18	0.29	0.37	0.39
<i>Candida rugosa</i> LKB 6111	None	0.08	0.14	0.19	0.21
	Yeast extract	0.13	0.20	0.24	0.22
	Peptone	0.12	0.20	0.24	0.22
	Meat extract	0.13	0.27	0.28	0.26
	Corn steep liquor	0.16	0.26	0.25	0.25
Yeast No. 62-72	None	0.13	0.21	0.23	—
	Yeast extract	0.18	0.24	0.24	—
	Peptone	0.16	0.23	0.24	—
	Meat extract	0.21	0.29	0.29	—
	Corn steep liquor	0.21	0.28	0.27	—

\*Growth was indicated as OD of the culture liquid diluted 100-fold with distilled water.



Table 8. Effect of ethanol concentration on the growth of selected yeasts.

Strain	Ethanol wt %	Growth* (OD at 430 nm)				
		After 2 days	After 3 days	After 4 days	After 5 days	After 7 days
<i>Pichia membranaefaciens</i> No. 304	2	0.15	0.16	0.16		
	4	0.14	0.25	0.28	0.30	
	6	0.03	0.16	0.20	0.26	0.33
	8	0.01	—	0.03	—	0.09
	10	0.01	—	—	—	0.01
<i>Pichia sake</i> form. $\alpha$ No. 101	2	0.15	0.15	0.15		
	4	0.13	0.21	0.25	0.26	
	6	0.03	0.15	0.19	0.24	0.30
	8	0.01	—	0.01	—	0.03
	10	0.01	—	—	—	0.01
<i>Pichia farinosa</i> No. 115	2	0.18	0.14	0.15		
	4	0.17	0.26	0.27	0.28	
	6	0.11	0.17	0.21	0.29	0.34
	8	0.02	0.03	0.05	0.08	0.13
	10	0.01	—	—	—	0.01
<i>Pichia farinosa</i> No. 121	2	0.19	0.19	0.18		
	4	0.18	0.22	0.26	0.30	
	6	0.09	0.13	0.19	0.27	0.34
	8	0.01	—	0.03	0.05	0.11
	10	0.01	—	—	—	0.01
<i>Candida rugosa</i> LKB 6111	2	0.15	0.15	0.15		
	4	0.14	0.24	0.28	0.31	
	6	0.10	0.19	0.24	0.27	0.34
	8	0.02	0.03	0.05	0.08	0.13
	10	0.01	—	—	—	0.01
Yeast No. 62-72	2	0.16	0.16	0.16		
	4	0.14	0.24	0.26	0.30	
	6	0.10	0.17	0.21	0.26	0.33
	8	0.02	—	0.04	0.06	0.13
	10	0.01	—	—	—	0.01

\* Growth was indicated as OD of the culture liquid diluted 200-fold with distilled water.

エタノール濃度 2%では、いずれの菌株も48時間で生育度はピークとなり、菌の増殖が良好であった。またエタノール 4%~6%でもよく増殖した。エタノール 8%では菌の生育が阻害され、10%では7日間培養してもほとんど増殖がみられないことがわかった。なお培養終了時のエタノール残量は表示しなかったが、エタノール 2~6%の培地ではいずれの菌株の場合も検出されず良く利用されていることが認められた。

#### 5. 尿素・硫酸アンモニウム混合窒素源を用いた培地での培養経過

エタノール資化能のすぐれた6菌株の酵母の増殖には、窒素源として尿素が最適であることを認めたが、培養中pHの上昇がみられ、雑菌汚染の恐れがあるため、硫酸アンモニウムを混用した混合窒素源でのpHおよび酵母増殖におよぼす影響を検討した。

すなわち、エタノール 2%の基本培地Bを用い、窒素源の 0.2%尿素中の全窒素のうち、5~20%を硫酸アンモニウムでおきかえた尿素・硫酸アンモニウム混合窒素源を用いて振盪培養を行った。

6菌株の酵母の培養にともなうpHおよび生育度の経過をFig.1に示した。

培養中のpHの変化は菌株、混合窒素源によって異なったが、概して対数増殖期の12~30時間の間に低下し、酵母増殖のピークになる36時間前後の間に上昇する傾向があった。この場合アンモニウム態窒素の割合が高くなるほど対数増殖期のpHが低くなり、20%硫酸アンモニウム混合窒素源培地では、*P. farinosa* No.115がpH 3.3にとどまったが、他の菌株はpH 2.5付近にまで低下した。

その後、pHは上昇したがアンモニウム態窒素の割合の高いほど、その傾向は緩慢で、20%ではほとんどその上昇はみられず、硫酸アンモニウム混用の影響が顕著にみられた。

菌の増殖がピークに達する培養36時間前後のpHを比較すると、尿素のみの場合、*P. sake*および*P. membranaefaciens*は7付近であるが他の4菌株は8付近に達した。これに対してアンモニウム態窒素を5%混用すると、*P. sake*はpH 4.3に、アンモニウム態窒素10%では、*P. farinosa* No. 115および*P. farinosa* No. 121以外の4菌株はpH 4~5にとどまった。すなわち、菌株により多少異なるが、硫酸アンモニウムの混用はpHの上昇を抑制し、雑菌汚染の防止に役立つと考えられる。

一方、菌の増殖はYeast No.62-72の場合、硫酸アンモニウムを混用することにより、やや良くなったが、他の5菌株はいずれも尿素単用のものが最も良く、アンモニウム態窒素の混用割合が大きくなるほど劣る傾向があった。とくに*P. farinosa* No. 115の場合5~10%で大きな差はみられなかったが、20%になると明らかに増殖が抑制されることを認めた。

#### 6. エタノール濃度と酵母収率

エタノール 1~6 W/V%を炭素源として加えた基本培地Bで、28℃、20~96時間振盪培養を行なった。

酵母菌体の最高収量をえた培養時間とエタノールに対する酵母収率をTable 9に示した。

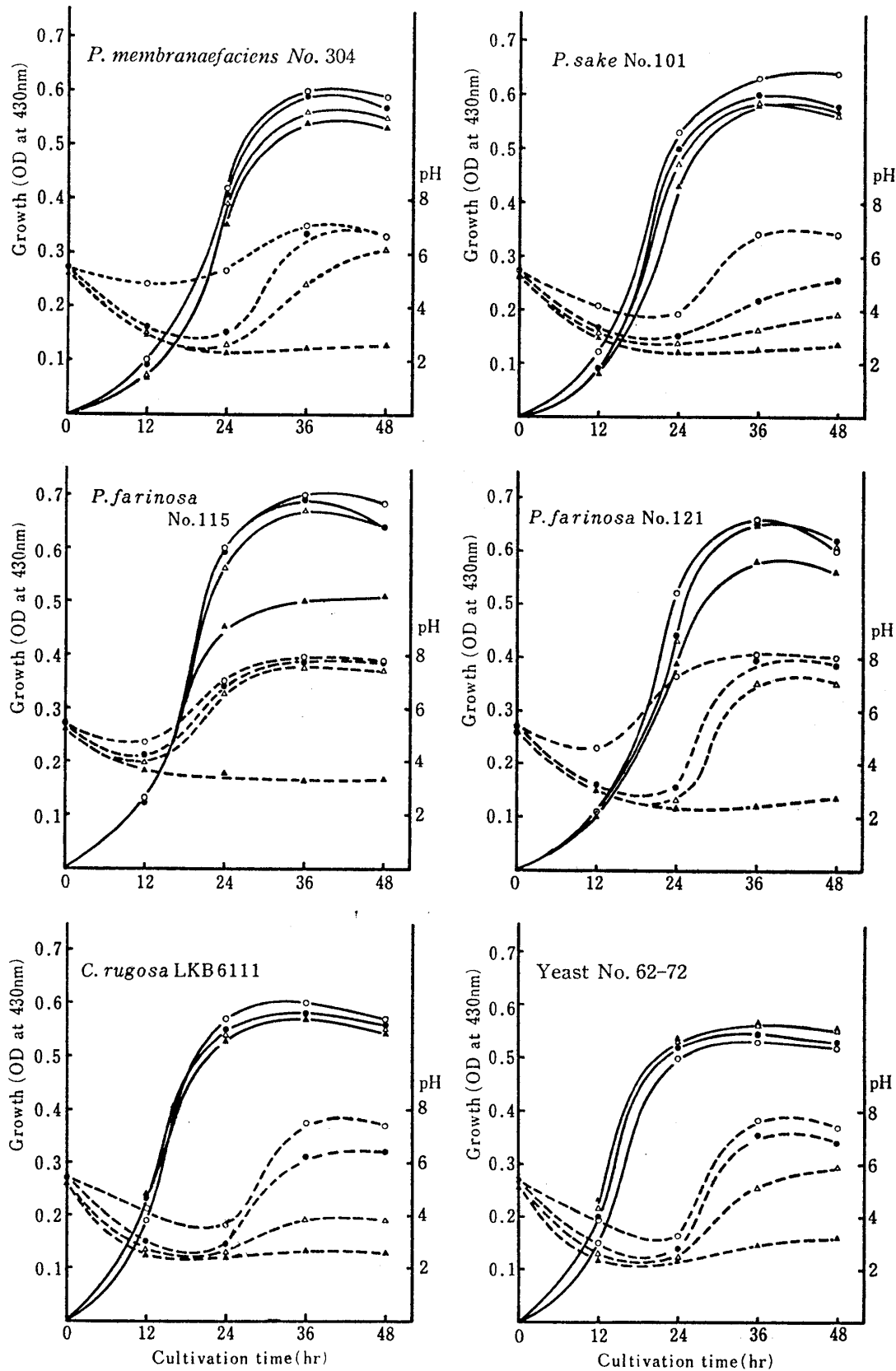


Fig. 1. Effect of nitrogen source mixing urea and ammonium sulphate on yeast growth.

—; Growth ———; pH ○ control (urea 0.2%) ● mixed 5% of ammonium sulphate into urea as nitrogen △ mixed 10% of ammonium sulphate into urea as nitrogen ▲ mixed 20% of ammonium sulphate into urea as nitrogen

Table 9. Ethanol concentration and cell yield .

Strain	Ethanol concentration W/V %											
	1			2			4			6		
	Culti- vation time hr.	pH	Cell yield %	Culti- vation time hr.	pH	Cell yield %	Culti- vation time hr.	pH	Cell yield %	Culti- vation time hr.	pH	Cell yield %
<i>Pichia membranaefaciens</i> No. 304	20	7.3	73.8	40	8.0	63.0	72	7.0	55.9	96	4.5	44.5
<i>P. sake</i> form. $\alpha$ No. 101	20	7.2	72.6	40	8.1	65.9	72	7.3	61.4	96	4.1	48.5
<i>P. farinosa</i> No. 115	20	7.3	72.0	40	8.0	65.5	48	7.4	61.8	72	4.6	56.4
<i>P. farinosa</i> No. 121	20	7.3	70.0	40	8.3	65.2	48	7.5	56.8	96	5.9	54.7
<i>Candida rugosa</i> LKB 6111	20	6.8	71.0	40	8.1	65.4	48	7.4	61.7	72	3.9	50.4
Yeast No. 62-72	24	6.9	71.4	40	7.7	69.5	48	7.3	63.3	72	6.2	52.3

酵母収率は培地に加えたエタノールに対する乾燥菌体量（種菌接種量を除く）の割合%で示した。

1%エタノール培地ではYeast No. 62-72を除く5菌株は20時間培養で菌体収量はピークになった。酵母収率は*P. membranaefaciens* が73.8%で最も高く、その他の菌株も70%以上で良好であった。

2%エタノール培地ではいずれも40時間培養で菌体収量は最も多く、酵母収率は63.0~69.5%であった。供試菌中ではYeast No. 62-72が高い収率を示した。

4%エタノール培地では48~72時間培養で菌体収量は最も多くなり、酵母収率は55.9~63.3%であった。供試菌中ではYeast No. 62-72が同様に高い収率を示した。

6%エタノール培地では最高菌体収量に達する培養時間はさらに長くなり、収率も低下したが、*P. farinosa* No. 115は72時間培養で収率56.4%で最も良好であった。

なお、培養後の残エタノールはいずれも検出されなかった。

## 考 察

世界の人口の急激な増加は将来の食糧事情、特にタンパク質資源の不足となって現れることが予測され、その打開策の一つとして微生物によるタンパク質の生産が具体化されている<sup>1~8)</sup>。

エチレンから合成されるエタノールが安価にえられるようになり、醸酵原料の対象となりうることから、これを基質とした酵母菌体の生産に関する研究がみなおされてきている<sup>14~16, 19)</sup>。

すでに著者の一人赤木は、<sup>9, 10)</sup> 廃資源利用の見地から、*Torula utilis* など4菌株を用いてエタノール含有培地を用いて検討し、*T. utilis* の場合30~69%の菌体収率をえている。

今回、さらにエタノール資化能の高い菌株をうる目的で、同定株、未同定の分離株など217株を用いて検索した。*T. utilis* よりエタノール資化能が高く、2~6%のエタノール含有培地で良好な増殖をする6菌株の酵母をうることができた。

これらの選択された菌株では、尿素、Corn steep liquor の添加が増殖に好結果を与えるこ

とを認めた。

しかし、窒素源として尿素を用いると培養により液のpHが上昇し、細菌汚染の危険性が生ずるため、硫酸アンモニウムを混用して、酵母の増殖とpHの安定性におよぼす影響を検討した。

硫酸アンモニウムの添加量は、窒素として0.2%尿素の5、10、20%とし、培地に加えた全窒素量は同一になるようにした。結果はFig. 1に示したとおり、硫酸アンモニウムを混用すると尿素単用に比べて、いずれの菌株でも対数増殖期のpHは低下し、またその後の上昇傾向も大きくなるものがみられた。これらのうち最もpHの安定に効果がみられたのは*P. sake*であった。しかし、硫酸アンモニウムを混用すると、概して混用割合が多くなるほど酵母増殖に悪い影響を与える傾向がみられた。ただYeast No.62-72の場合は、pHの変化にかかわらず、尿素単用に比べて硫酸アンモニウム混用のものが僅かではあるが増殖に好影響を与えた。

これらのことは、Yeast No.62-72以外の5菌株の酵母は、エタノールを炭素源とした場合、尿素態窒素がアンモニウム態窒素に比べて菌の増殖のために利用され易いことを示している。

エタノール濃度と酵母収率の結果 (Table 9)から、エタノール1%では*P. membranae-faciens* が73.8%、エタノール2%ではYeast No.62-72が69.5%、エタノール4%ではYeast No.62-72が63.3%、またエタノール6%では*P. farinosa* No.115が56.4%で、それぞれのエタノール濃度でこれらの菌株が最も高い酵母収率を示した。

エタノールからの酵母菌体収率については、実験的な数値<sup>9, 10, 14, 16)</sup>のほかにエネルギー効率<sup>20)</sup>、available electron<sup>21)</sup>、ATP<sup>22)</sup>などの概念にもとづく理論的収率についても検討されている。高橋<sup>23)</sup>はこれらにもとづき、エタノールを基質とした場合の期待しうる最高値の菌体収率は74.0%であるとしている。

本実験でえられた測定値と高橋の推定値を比較すると、エタノール濃度1%培養における*P. membranaefaciens* の場合はほぼ一致している。エタノール濃度2~6%においてはエタノール濃度の高いほど差が大きく、低い菌体収率となった。その原因の一つとして培養中のエタノールの揮散が考えられる。酵母を接種しない場合の本実験でのエタノールの損失率は、24時間の振盪で、エタノール1%のとき3.7%、エタノール5%では5.4%であった。また、48時間振盪では、エタノール5%のとき10%に達することを認めた。これらの損失率を考慮し、実際に酵母によって消費されたエタノールに対する菌体収率はいずれも期待しうる最高値に近づくものと思われる。培養装置や連続培養などの培養方法の検討が期待される。

## 要 約

同定株112株、未同定分離株105株合計217株の酵母を供試菌とし、エタノールを炭素源とする合成培地を用いてエタノール資化性酵母の検索を行なった。エタノール資化性の高い

菌株として、*Pichia membranaefaciens* No.304 , *Pichia sake* form.  $\alpha$  No.101 , *Pichia farinosa* No.115 , *Pichia farinosa* No.121 , *Candida rugosa* LKB6111, Yeast No.62-72の6菌株を選択した。

これら6菌株の酵母増殖におよぼす窒素源、天然栄養源などの影響を検討した。天然栄養源としては、一般にCorn steep liquor がよく、*Candida rugosa*, Yeast No.62-72では肉エキスの添加効果もすぐれていた。Corn steep liquor の添加適量は菌株によって異なり0.1%~0.2%であった。エタノール濃度は2~6%でよく増殖したが、8%では生育が阻害され、10%ではほとんど生育は認められなかった。

尿素・硫酸アンモニウム混合窒素源を用いてエタノール培地で培養を行なった結果、*P. sake* form.  $\alpha$  は硫酸アンモニウム5%混用で、また、*P. membranaefaciens* , *Candida rugosa* およびYeast No.62-72は硫酸アンモニウム10%混用でpHの上昇が抑制され、雑菌の汚染防止に役立つと考えられた。しかし、Yeast No.67-72以外の酵母菌株では硫酸アンモニウムの混用により、酵母の増殖を低下させる傾向があった。

エタノールに対する酵母菌体収率は、エタノール1%培地では*Pichia membranaefaciens* が73.8%で最も高く、エタノール2%および4%培地ではYeast No.62-72がそれぞれ69.5%、63.3%、またエタノール6%培地では*Pichia farinosa* No.115が56.4%で、いずれも良好な結果をえた。

## 文 献

- 1) 武田 勲：醸協, 27, 305 (1969)
- 2) 梶田淑郎：食品工誌, 17, 80 (1970)
- 3) 山内三郎, 上林 明：醸協, 32, 363 (1974)
- 4) 梶田淑郎：醸協, 32, 385 (1974)
- 5) 山田浩一：醸協, 33, 169 (1975)
- 6) 尾崎浅一郎：醸協, 33, 172 (1975)
- 7) 上山英夫, 堀越弘毅：発酵と工業, 34, 851 (1976)
- 8) 梶田淑郎：微生物タンパク質の開発, 講談社, 1981
- 9) 赤木盛郎：醸酸工学, 33, 127 (1955)
- 10) 赤木盛郎：醸酵工学, 33, 157 (1955)
- 11) 赤木盛郎：醸酵工学, 34, 190 (1956)
- 12) 赤木盛郎：醸酵工学, 34, 198 (1956)
- 13) 赤木盛郎：醸酵工学, 36, 101 (1958)
- 14) 大亦正次郎, 村尾沢夫, 寺島 宏：醸協, 26, 313 (1968)
- 15) T. HARADA, T. HIRABAYASHI : *Agric. Biol. Chem.*, 32, 1175 (1986)
- 16) 天野義文, 吉田 治, 加賀美元男：醸酵工学, 53, 264 (1975)
- 17) E. J. CONWAY 著, 石坂音治訳：微量分析及び誤差論, 南江堂, P. 225, 1952
- 18) 中村武次郎：分析化学, 9, 705 (1960)
- 19) J. R. MOR, A. FIECHTER : *Biotech. Bioeng.*, 10, 159 (1968)

- 20) K. GUENTHER : *Biotech. Bioeng.*, **7**, 445 (1965)
- 21) W. MAYBERRY, G. PROCHAZKA and W. PAYNE : *Appl. Microbiol.*, **15**, 1322 (1967)
- 22) T. BAVCHOP and S. ELSPEN : *J. Gen. Microbiol.*, **23**, 457 (1960)
- 23) 高橋穰二 : 石油と微生物, No. 10, P. 41 (1973)