[農化][第 39 卷, 第 1 号, p. 5~9, 1965]

食飼料酵母の菌学的研究*

木原利一郎, 三輪万治 (東洋紡績繊維技術研究所犬山分室)

昭和 39 年 8 月 10 日 受理

緒 言

亜硫酸パルプ廃液を原料とする食飼料酵母の製造に関する研究は、古く第一次大戦中よりドイツにおいて始められ、第二次大戦中にはその企業化に成功したことが報告^(1~4)されている。

本邦においては今次大戦中より木原⁽⁵⁾により亜硫酸パルプ廃液より酵母の製造に関する研究が着手され、続いて戦後新しい通気方式による酵母製造の研究が山田⁽⁶⁾により報告された。

一般に食飼料酵母として使用されている菌種としては *Torula utilis* が著名であるが、ドイツにおいては *Torula pulcherima*, *Monilia candida*, *Candida arborea*, *Mixed torula*, *Oidium lactis*, *Mycotorula lipolytica*, *Hansenula anomala*, *Hansenula suaveolens*, *Candida tropicalis*, *Torula lactosa* など研究の対象にされたことが報告⁽⁴⁾されている。

本邦における研究には 1943 年山口⁽⁷⁾により発表された *Mycotorula japonica* Yamaguchi に属する菌株が亜硫酸パルプ廃液に適した菌株として木原ならびに山田らによって用いられた。著者の一人三輪^(8~11)は、東京大学坂口教室より分譲された *Mycotorula japonica* var. K. H. を用いて、多年亜硫酸パルプ廃液より酵母の製造の研究を行ったところ、本菌は亜硫酸に対する抵抗性が非常に強く、馴養の結果醗酵性糖分を 95% 以上同化する能力をもち、菌体の成分においては *Torula utilis* に劣らない優良な菌株であることを認めた。著者らはその後 50m³ 醗酵槽による中間工業化試験を実施するに至って、培養菌種の把握ならびに優良菌株の選択およびその拡大培養を目的として培養酵母菌の菌学的研究を行い、二、三の知見をえたので報告する。

実験方法および実験結果

I. 培養酵母菌の分離ならびに同定試験

1. 培養菌の分離 50m³ 醗酵槽の培養液より酵母菌の分離は主として Mayer 氏液培地の平板培養により行った。平板培養で生じる肉眼的に異ったコロニーは、一応異った菌種と見なして釣菌し、斜面培養に移した。この菌をさらに数回の平面培養による分離を繰返して純化を行い 114 の分離菌株をえた。これらの菌の斜面培養の特徴により大別したところ 9 つのグループに分けられた。各グループの代表的な 1 菌株を選び出し、計 9 菌株を 50m³ 醗酵槽の培養菌株とした。一方、別の機会に 50m³ 醗酵槽の培養酵母を压榨酵母とした試料をえたので前記と同様の分離操作を行い、平板培養におけるコロニータイプの異った 2 菌株をえた。さらに 50m³ 醗酵槽の培養液より、別の時点において凝集性の著しい 2 菌株を分離した。以上の合計 13 菌株を亜硫酸パルプ廃液に培養されている酵母の代表的な菌株とした。対照の菌株として東京大学坂口教室保存菌株 *Mycotorula japonica*, *Mycotorula japonica* var. K. H. および東京教育大学醗酵学教室保存菌株 *Mycotorula japonica* strain Inuyama の 3 菌株を加え、計 16 菌株について以下の同定試験に供した。同定試験に先立ち 16 菌株のマイクロニプレーターによる単細胞分離を行い純粋な菌株をえた。同定試験は主として Lodder⁽¹²⁾の方法に準じ、一部 Wickerham⁽¹³⁾の方法を採用して行った。

2. 同定試験 菌株の同定は次にかかげる項目について検討した。

A. 形態的性質: 1) 細胞の増殖法および *Pseudomycelium* を形成する傾向 2) 細胞の形および大きさ 3) 孢子形成 4) 斜面培養の特徴。

B. 生理的性質: 1) 皮膜の形成 2) 糖の醗酵性 3) 糖の同化性 4) 硝酸塩の同化性 5) 唯一の炭素源としてエタノールの同化性 6) アルブチンの分解能 7) リトマスミルクに対する反応

以上の同定試験は主として Lodder の “The Yeast”

* Microbiological Studies on Food and Foodder Yeast.

By Riichiro KIHARA and Manji MIWA [Inuyama Branch, Textile Research Institute (Chemical Division), Toyo Spinning Co., Ltd.]

第1表 形態学的性質

菌株番号	由来または菌株名	擬菌糸の形成	細胞の形	細胞の大きさ(μ) (短軸)×(長軸)	斜面培養の表面の特徴	胞子形成
1	50m ³ 酸 酵 槽	faint	oval	(2.2~5)×(4~9.6)	smooth, greyish white	なし
2	"	"	"	(2.4~6)×(5.6~15)	"	"
3	"	"	"	(2~6)×(4~8.4)	"	"
4	"	typical	"	(2.2~4)×(4~12.5)	dull, greyish yellow	"
5	"	"	"	(2~6)×(4~9.6)	"	"
6	"	"	long oval	(2.2~4.4)×(4~11.6)	"	"
7	"	"	oval	(2.2~4.4)×(2.4~8)	"	"
8	"	"	"	(2.2~6.6)×(3.6~12)	"	"
9	"	"	short oval	(3.4~6)×(3.4~8)	"	"
10	圧 搾 酵 母	faint	oval to long oval	(2.6~6)×(4~16.8)	botryoidal, greyishwhite	"
11	"	"	"	(2~6)×(3.6~11)	"	"
12	50m ³ 酸 酵 槽 (凝集性)	atypical	round to oval, or elongate	(2.4~7)×(2.4~13)	dull and tough, entirely folded, yellowish	"
13	"	"	round to short oval	(3.6~6.8)×(4~8)	"	"
14	<i>Mycotorula japonica</i>	"	round to elongate	(2.4~9.4)×(4~26.4)	"	"
15	<i>Mycotorula japonica</i> var. K.H.	"	round to oval	(3~7)×(4.4~23)	"	"
16	<i>Mycotorula japonica</i> strain Inuyama	"	"	(2.4~7.6)×(4~15.8)	"	"

第2表 生 理 的 性 質

菌 株 番 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
皮 膜 の 形 成	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
糖 の 酸 酵 性																
グルコース	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
サッカロース	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
マルトース	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
ガラクトース	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
ラクトース	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ラフィノース	+ ¹ / ₃	+ ¹ / ₃	+ ¹ / ₃	—	—	—	—	—	—	+ ¹ / ₃	+ ¹ / ₃	—	—	—	—	—
キシロース	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
アラビノース	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
糖 の 同 化 性																
グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
サッカロース	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
マルトース	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
ガラクトース	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
ラクトース	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ラフィノース	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
キシロース	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
アラビノース	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
硝酸塩の同化性	+	+	+							+	+					
唯一の炭素源として エタノールの同化性	+	+	+							+	+					
アルブチンの分解能	+	+	+							+	+					
リトマスミルクに 対する反応	○	○	○								○	○				

○印凝固性なし, 青変

(1952 年)に記載された方法に準拠して行ったが、一部においては以下のように改変して試験を行った。

1) *Pseudomycelium* の形成は Potato 培地を用いた slide culture による。

2) 胞子形成は Gorodkova agar および V-8 agar の 2 種の培地を使用した。

3) 斜面培養の特徴は Malt agar を用いた。

4) 糖および硝酸塩の同化は、小試験管による濁度で判定する Wickerham の方法を採用した。

5) エタノールの同化性、アルブチンの分解、リトマスミルクに対する反応は一部の菌株についてのみ実施した。

同定試験の結果は、第 1 表および第 2 表に示すようなものである。形態試験を総合して結論しうるのは供試酵母菌株はいずれも胞子形成能がなく、*Pseudomycelium* の形成が多かれ少なかれ顕著に見られることより無胞子酵母の *Cryptococcaceae* 族に属し、その中でも *Pseudomycelium* の形成を特徴とする *Candida* 属に属する酵母と考えられることである。次に生理的性質を Lodder の “The Yeast” の記載と比較して供試菌を次のように同定した。

1) Strain No. 1, 2, 3, 10, 11:

Candida utilis (Henneberg) Lodder et van Rij

2) Strain No. 4, 5, 6, 7, 8, 9:

Candida mycoderma (Reess) Lodder et van Rij

3) Strain No. 12, 13, 14, 15, 16:

Candida tropicalis (Cast.) Berkhout

II. 同定菌の菌体収量試験

酵母製造においては菌体の収量が重要な指標となるため、I において同定した *Candida utilis* No. 1, *Candida mycoderma* No. 4, *Candida tropicalis* No. 12 の 3 菌株の代表的 3 菌株について菌体収量試験を行って各菌株の性能を判定した。培地は第 3 表に示すような亜硫酸

第 3 表 培地組成および培養条件

培 地 組 成	
亜硫酸パルプ廃液 (グルコース換算 2% 糖濃度)	
硫酸アンモニウム	0.2 %
塩化カリウム	0.03%
磷酸アンモニウム	0.04%
硫酸マグネシウム	0.01%
イーストエキス	0.05%
培 養 条 件	
pH 4.8, 30° において 16 時間振盪培養	

第 4 表 亜硫酸パルプ廃液培地における各種 *Candida* の生育

菌 種	糖消費率 (%)	対全糖収率 (%)	対消費糖収率 (%)
<i>Candida utilis</i>	65.0	29.3	45.0
<i>Candida mycoderma</i>	49.0	21.2	43.2
<i>Candida tropicalis</i>	77.0	24.7	32.0

酸パルプ廃液培地を用い、30°, 16 時間振盪培養を行って菌体量を目盛遠心沈殿管で測定し、糖分の消費を Somogyi の変法で測定した。培養試験の結果は第 4 表に示すようなものである。

菌体収量は *Candida utilis* が最もよく、次いで *Candida tropicalis*, *Candida mycoderma* の順となっているが、糖消費率は *Candida tropicalis* が最も高く、次いで *Candida utilis*, *Candida mycoderma* の順となり、消費した糖に対する菌体収量 (対消費糖収量) は *Candida utilis* が極めて高く、次いで *Candida mycoderma*, *Candida tropicalis* の順となっており、*Candida utilis* が 3 菌株の中でも極めて優良な菌種であることが認められた。

III. 培養菌種 *Candida utilis* の特性について

50 m³ 醗酵槽において亜硫酸パルプ廃液に培養されている酵母は同定試験の結果、*Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida mycoderma* の 3 菌株が見出されたが、実際の酵母製造においては *Candida tropicalis* は凝集性を示すことで、また *Candida mycoderma* は産膜性を示すことにより常時存在するものではなく、その菌株分布からも主なる培養菌種は *Candida utilis* と結論される。本菌は欧米で認められ広く使用されている *Torula utilis* と同種であるが、かなり長期間亜硫酸パルプ廃液に馴養されていることより、従来より保存されている *Candida utilis* とは何らかの差異をもつ変異菌であることを予想し、種々の検討を進めた。

Candida utilis の供試菌株には I において分離同定された 5 菌株 (strain No. 1, 2, 3, 10, 11) を用い、保存菌株には醗酵研究所保存菌株 5 株、東京教育大学醗酵学教室保存菌株 2 株の合計 7 株を対照として用い、以下の試験を行った。試験は Lodder の “The Yeast” には記載されていないが、Wickerham によって分類の指標として採用されている各種生理的性質のうち、下に掲げる項目について試験を行った。

(1) 種々の炭素源の同化性、(2) 37° における生育、(3) 高滲透圧培地 (NaCl 5%, グルコース 5%) への生育。

第 5 表 各種 *Candida utilis* の比較 (1)

菌 株 番 号	1	2	3	10	11	IFO 396	IFO 576	IFO 619	IFO 626	IFO 639	MAUE 232	NI 7358
各種炭素源の同化性												
ラ ム ノ ー ス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ク エ ン 酸 ソ ー ダ	±	±	±	—	—	±	±	±	±	±	±	±
α-メチルグルコサイド	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ズ ル シ ト ー ル	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
可 溶 性 澱 粉	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
イ ヌ リ ン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
グ リ セ ロ ー ル	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
コ ハ ク 酸 ソ ー ダ	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
イ ノ シ ト ー ル	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ソ ル ビ ト ー ル	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ザ リ シ ン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳 酸 ア ン モ ニ ウ ム	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
メ リ ビ オ ー ス	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
マ ン ニ ト ー ル	+	±	+	±	±	±	±	±	+	±	±	±
マ ン ノ ー ス	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37° における生育	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
高滲透圧培地における生育	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

第 6 表 各種 *Candida utilis* の比較 (2)

菌 株 番 号	1	2	3	10	11	IFO 396
生育 pH 範囲	培地の pH					
	1.0	—	—	—	—	—
	2.0	±	+	+	—	—
	3.0	+	+	+	+	+
	8.0	+	+	+	+	+
	9.0	±	+	+	+	+
亜硫酸 塩耐性	10.0	—	—	+	+	—
	培地の亜硫酸 ソーダの濃度					
	0.1%	±	+	+	+	—
	0.3	±	+	+	±	—
	0.5	—	±	—	±	—

試験結果は第 5 表に示す。この結果より 5 供試菌株は保存菌株と特に異った性質は認められなかった。そこで生理的性質の中でも、供試菌株が亜硫酸パルプ廃液という亜硫酸イオンが存在し、酸度の強い特殊な条件下で培養されていることから、適応的な性質に差異があるか検討した。適応的性質としては亜硫酸イオンに対する耐性および生育 pH の範囲につき、前記 5 供試菌株に保存菌株の 1 株を加えて試験を行った。試験方法は糖類同化試験法に準じ、亜硫酸イオン耐性試験では亜硫酸ソーダを培地に 0.1% ないし 0.5% 添加した培地を作成し、一方、生育 pH 範囲は特に酸性側とアルカリ側の条件の培地を作成して培養試験を行った。試験結果は第 6 表に示すようなもので、供試菌の *Candida utilis* は対照の *Candida utilis* IFO 396 に比較し数倍の亜硫酸イオン耐

性と、上下 1.0 ぐらいの広い生育 pH 範囲をもつことが認められた。

考 察

亜硫酸パルプ廃液を原料とする酵母の製造において使用されている酵母菌を分離同定した結果、主として培養されている菌種は *Candida utilis* であることが認められ、本邦においても工業的規模における培養には欧米で報告されているのと同種に属する菌株が用いられていることは興味深いことである。これは *Candida utilis* が適応性に富み、高収量をあげうる特性をもつためで、以上の二、三の検討においてもその優秀性が十分確認された。従来、亜硫酸パルプ廃液に至適な菌種として報告されている *Mycotorula japonica* は同定試験の結果、Lodder の分類 (1952 年) に従うと *Candida tropicalis* に相当することが確認された。本菌は分離操作時においてすでに著しい凝集性の特徴を有する点で培養菌というよりむしろ混入雑菌の性格をもち、事実工業的な培養においては工程上トラブルを惹起し好ましい菌種とはいえない。収量試験においても対消費糖収率が低く、現象的には糖消費率の高い割に菌体生産があがらないということが起ってくる。

また、*Candida mycoderma* は分離培養時に slant culture の表面の特徴が著しく変化するため、安定した純粋培養菌株がなかなか得にくかったことから、多くの供試菌株が本菌種に属する結果になった。本菌種は *Can-*

Candida utilis に比べて培養液内分布は極めて少なく、工程中に産膜酵母の生育する場所を一部観察することなどから、この工程に起因する混入菌種であろうと思われる、*Candida tropicalis* のようにキシロースの同化性などの *Candida utilis* と共通した亜硫酸パルプ廃液への適応性に起因して、*Candida utilis* に随伴して混入してくる菌種とはやや異なるものと考えられる。いずれにしても亜硫酸パルプ廃液を原料とする酵母の連続培養をワルドホッフ型醗酵槽を使用して長期間、大規模に行ってきた間に *Candida utilis* が *Mycotorula japonica* (*Candida tropicalis*) と漸次交替し、主な培養菌となったと同時に、従来至適菌種であった *Mycotorula japonica* (*Candida tropicalis*) は、凝集性の著しい菌株のみが残存し、従って混入雑菌的な存在に変化したと考えられる。これは通常の醗酵工業と異った開放培養方式を採用していること、生育した酵母菌体の一部を種菌に再使用してきたことなどに起因すると思われる。なお現在の培養菌である *Candida utilis* (No. 1, 2, 3, 10, 11) はその生理的性質は在来の保存菌株とほとんど差がないが、適応的性質にかなりの差異を見出した点で一種の変異株とも考えられる。

要 約

亜硫酸パルプ廃液を原料とする酵母製造に使用されている酵母菌の菌学的研究を行い、次の諸事実を認めた。

- (1) 主なる培養菌種は *Candida utilis* である。
- (2) 従来亜硫酸パルプ廃液に最も適した菌種 *Mycotorula japonica* Yamaguchi (1943) は、Lodder の分類 (1952 年) では *Candida tropicalis* に相当し、工業的規模ではその凝集性のため、適当な菌種とはいえない。
- (3) そのほかに *Candida mycoderma* の存在を認め

た。

- (4) 菌体収量は *Candida utilis* が最もよく、ついで *Candida tropicalis*, *Candida mycoderma* の順になっている。

- (5) 分離した *Candida utilis* は在来の保存菌株とほとんど差異はないが、適応的性質にかなりの差異を認めた。

本研究に当り種々御教示御指導をいただきました坂口謹一郎先生ならびに飯塚 廣先生に厚く御礼申し上げると共に、発表を御許可くださいました東洋紡績繊維技術研究所森本佐一所長に感謝いたします。

(本報告の要旨は昭和 36 年 4 月、日本農芸化学会大会において講演発表を行った。)

- (1) H. Fink, R. Lechner, E. Heinisch : *Biochem. Z.*, **283**, 71 (1935).
- (2) H. Fink, R. Lechner : *ibid.*, **286**, 83 (1936).
- (3) H. Fink, F. Just : *ibid.*, **300**, 84 (1938).
- (4) J. E. Seaman, E. G. Locke, G. K. Dickerman : *Paper Trade Journal*, **40**, 1220 (1948).
- (5) 木原芳次郎, 佐藤友太郎, 山口徳一郎 : 本誌, **22**, 45 (1948).
- (6) 山田浩一, 伊藤多賀司, 小山 昂, 半田幸彦 : 本誌, **25**, 173 (1953).
- (7) 山口和夫 : 本誌, **19**, 800 (1943).
- (8) 三輪万治 : 醗酵工学, **34**, 87 (1956).
- (9) 三輪万治 : 微生物工学講座, **4**(酵母利用工業), 共立出版, p. 328 (1957).
- (10) 三輪万治 : 本誌, **32**, A 144 (1958).
- (11) 三輪万治 : 醗酵工学, **37**, 559 (1959).
- (12) J. Lodder, N. J. W. Kreger-van Rij : "The Yeast, a Taxonomic Study" (1952).
- (13) L. J. Wickerham : "Technical Bulletin", No. 1029 (1951).