尿酸利用性酵母の選択と培養

大西 博, 宮原るみ子, 園田浩二

(鹿児島大学農学部農芸化学科)

昭和 53 年 2 月 13 日 受 理

Screening and Cultivation of Excellent Uric Acid-Utilizable Yeasts

Hiroshi ONISHI, Rumiko MIYAHARA and Koji SONODA

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University, Kagoshima

As a preliminary examination for production of poultry feed by cultivation of yeasts in poultry waste, screening of excellent uric acid-utilizable yeasts and their cultivation in a medium containing uric acid or poultry feces were examined. A number of yeasts could assimilate uric acid as a sole nitrogen source. Among them, the excellent strains which showed rapid growth and high cell yield such as *Pichia membranaefaciens*, *Pichia miso*, *Hansenula anomala* and *Schizosaccharomyces octosporus* etc. were selected. After 1 day cultivation in 0.1% uric acid medium, maximal cell yield and good uric acid utilization of more than 80% were obtained. A suspension medium of powdered uric acid supported good growth. A simple medium consisted of 1% powdered dry poultry feces and glucose also gave sufficient good growth.

(Received February 13, 1978)

緒 言

n-パラフィン, エタノール, メタノールなどを用いた酵母菌体の量産については多くの研究があり⁽¹⁾, また畜産廃棄物の処理や公害防止の立場からの研究も行われているが^(2,3), 尿酸資化性のすぐれている微生物を培養して, 鶏糞のように尿酸に富む廃棄物を飼料化して活用するための基礎的な研究はない. 鶏糞を乾燥して, 養鶏飼料として再利用して効果があるという報告もあるが^(4~7), 鶏は尿酸を利用できない⁽⁴⁾.

酵母による尿酸の利用性については, DiCarlo ら⁽⁸⁾は *Saccharomyces cerevisiae* は尿酸を利用しないが, *Torula utilis* は利用しうることを指摘し, Roush と Shieh⁽⁹⁾ は *Torulopsis candida* が尿酸を分解することを示し, Larue と Spencer⁽¹⁰⁾ は各種属の酵母によるプリンとピリミジンの利用性について観察し, 多くの酵母が尿酸を利用したことを報告している. その他 uricase の生産に関連して若干の研究がみられるが^(11,12), 菌体量産の立場から優良酵母を選択し, 培養諸条件を検討することは行われていない.

本報では尿酸資化性の優れている酵母菌株の選択と, 鶏糞を利用した若干の培養試験を行ったので報告する.

実 験 方 法

1. 供試酵母 Table I に示す 22 株を供試した.
2. 供試培地 (A) 尿酸培地: 0.1% 尿酸, 1% グルコースを添加した 1.17% Difco yeast carbon base 培地. 尿酸は水に難溶であるので, 培地の調製は Rouf と Lomprey⁽¹³⁾ が好気性細菌の培養に用いた尿酸培地の調製法にしたがって行い, NaOH に溶かし, KH_2PO_4 液で pH 6.6~6.8 に中和した. グルコースと尿酸の濃度は種々変えて用い, 0.2% 濃度以上の尿酸を用いた場合は粉状のまま培地に添加した.

(B) 乾燥鶏糞のアルカリ抽出物培地: 乾燥鶏糞 1g に 0.025N NaOH 100 ml を加えて, 100°C に 10 分間加熱後遠心分離して上澄をとり, さらに汙過して透明な抽出液を得, 10% KH_2PO_4 溶液にて中和し, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01% NaCl を添加した. またこれに適宜グルコースを添加使用した.

(C) 粉末乾燥鶏糞懸濁培地: 1% 乾燥鶏糞粉末の水

Table I. Growth of Yeasts in a Medium Containing Uric Acid as a Sole Nitrogen Source

Strains	Growth (Klett-Summerson units)		
	1 day	2 days	3 days
<i>Saccharomyces rouxii</i> N 28	7	27	137
<i>S. rouxii</i> E 7	16	75	450
<i>S. rouxii</i> var. <i>halomembranis</i> A 31	37	420	610
<i>Saccharomyces acidifaciens</i> S 9	16	294	500
<i>S. acidifaciens</i> var. <i>halomembranis</i> H 3	42	410	470
<i>Saccharomyces fragilis</i> ATCC 12424	480	610	610
<i>Pichia membranaefaciens</i> 162300	470	650	650
<i>P. miso</i> ATCC 20210	510	690	690
<i>P. farinosa</i> ATCC 20218	530	710	710
<i>Hansenula anomala</i> NRRL Y 366	480	570	570
<i>H. subpelliculosa</i> H 79	480	650	650
<i>H. subpelliculosa</i> NRRL Y 1683	115	610	610
<i>H. petersonii</i> NRRL Y 3808	450	600	600
<i>Debaryomyces subglobosus</i> PRL RS4	310	640	680
<i>D. hansenii</i> H 70	520	720	710
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i> PRL F 2	530	560	560
<i>Endomycopsis capsularis</i> PRL R 2A	38	375	500
<i>Candida polymorpha</i> ATCC 20213	120	460	690
<i>C. tsukubaensis</i> CBS 6389	160	560	670
<i>Torulopsis famata</i> ATCC 201214	115	640	740
<i>Trichosporon behrendii</i> E 3a	480	580	580
<i>Trichosporon</i> sp.	150	400	500

懸濁液およびこれに5% グルコースを添加した兩培地を用いた。

3. 培養条件 試験管培養では Klett 管に 5.5 ml の培地をとり、振盪フラスコ培養では 500 ml 容肩付フラスコに 80 ml の培地をとり、往復式振盪機上 30°C にて振幅 7.5 cm, 毎分 95 回転で振盪培養した。

4. 生育の測定 未接種培地を対照として Klett-Summerson 比色計 (No. 66 フィルター) を用いて比濁測定した。測定時に、尿酸を溶解させるために特別の処理を必要とした場合は、それぞれ本文中に説明した。なお粉末乾燥鶏糞添加培地の培養では、生菌数を一般酵母用寒天培地を用いて平板培養法により測定した。

5. 尿酸の定量 Rouf と Lomphey⁽¹³⁾ の方法にしたがって培養液を蒸留水で適宜稀釈し、O.D.₂₉₃ を測定した。尿酸無添加の (A) 培地の O.D.₂₉₃ は、ほとんど無視しうる低い値であった。

6. 菌体蛋白の定量 Levine と Cooney⁽¹⁴⁾ がメタノールを原料とする酵母菌体の生産試験に用いた方法に

Fig. 1. Time Course of Growth and Uric Acid Utilization during Cultivation of *Pichia miso*. ○ growth (Klett-Summerson units), ● uric acid (mg/100 ml).

したがって、biuret 法により行った。すなわち、5ml の培養物をとり、遠沈して菌体を集め、2 回蒸留水にて洗浄後水に懸濁して 5 ml とし、その 1 ml に 1N NaOH 4 ml を加えて 100°C に 5 分間加熱し、室温に冷却後 0.15 ml の 25% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を加えて生ずる沈殿を touch mixer で碎いて、室温に 30 分間放置後遠沈して上澄をとり 540 nm にて比色定量した。

実験結果

1. 尿酸利用性の優良酵母の選択

尿酸を単一窒素源とする (A) 培地を用いて、22 株の各種属の酵母を供試して試験管振盪培養を行い、生育速度および生育量の優れている菌株の選択を行った。その結果は Table I に示すように、単一窒素源として尿酸を資化できる酵母は Larue と Spencer⁽¹⁰⁾ の観察結果と同様に多数見出されたが、生育速度には差異がみられた。彼ら⁽¹⁰⁾は生育速度には注目せず、分類学的な立場から培養14日後の尿酸資化性の有無について調べている。われわれの観察では、*Pichia membranaefaciens*, *P. miso*, *P. farinosa*, *Hansenula anomala*, *H. petersonii*, *H. subpelliculosa* H 79, *Schizosacch. octosporus*, *Sacch. fragilis*, *Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon behrendii* は生育が速やかで生育量も多く、*Candida polymorpha*, *C. tsukubaensis*, *Torulopsis famata*, *Debaryomyces subglobosus* では1日後の生育は悪いが、3日後になってかなりよい生育を示した。

なお, 0.1% 尿酸と窒素濃度を等しくした各種窒素源培地, すなわち (A) 培地の 0.1% 尿酸の代りに 0.07% 尿素, 0.16% 硫酸アンモン, 0.27% クエン酸アンモンまたは 0.33% カザミノ酸を添加した各培地に, *P. miso*, *H. anomala* を接種し, 試験管振盪培養して生育を観察した結果, 尿酸培地でもアンモニアやアミノ酸を窒素源とした場合と同様のよい生育を示すことを知った。

2. 生育と尿酸の消費

生育のよかった酵母について (A) 培地を用いてフラスコ振盪培養を行い, 生育と尿酸の消費の経時的变化を観察した。Fig. 1 に *P. miso* の例を示したが, *P. membranaefaciens*, *P. farinosa*, *H. anomala*, *H. subpelliculosa* H 79, *H. petersonii*, *Schiz. octosporus*, *S. fragilis*, *D. hansenii*, *Trich. behrendii* のいずれも同様に速やかに生育し, 1~2 日後には最高のレベルに達し, 尿酸は 1 日後に 80~90% もよく分解消費された。5% グルコース添加の (A) 培地を用いて同様の試験を行ったところ, 同じく生育は良好で尿酸の分解消費も 1 日後に 95% に達したが, 培養液の pH は *P. miso* で 4.6 に低下するなどかなりの低下を認めた。pH が低下すれば, 培地中に溶解していた未利用の尿酸は析出して, 定量時培地の汚過の際に酵母菌体とともに除去されることが予想され, 尿酸が酵母によってこのようによく分解利用されるかどうか疑問なので, この点を吟味検討した。

(A) 培地を HCl で pH 4.6 に調節して 30°C に 1 時間振盪すると, 溶解していた尿酸の 90% は析出して溶液から失われてしまった。他方, 0.1% 濃度の未溶解の尿酸は 0.1 N NaOH 液中に速やかに溶解したので, 5.5 ml の培養に対し 5 N NaOH を 0.11 ml 加えて速やかに touch mixer で攪拌し, もし析出している尿酸があったら溶解させて測定を試みた。アルカリ添加前後の Klett 単位には著しい差異はなく, 添加後の低下は多いものでも 10% 以下にとどまった。この方法による尿酸の定量値は, 10 株の酵母ともにアルカリ無添加時の値と同様に低かったもので, 生育中によく分解されていることが明らかになった。

3. 尿酸濃度の影響

5% グルコース添加の (A) 培地を基本とし, 尿酸濃度を 0.01~1.0% とした各培地を用いて, 生育と尿酸の消費に対する尿酸濃度の影響を調べた。0.01~0.1% 尿酸は培地中に溶解して用い, 0.2~1.0% 尿酸は培地に粉状のまま添加培養した。粉状のまま用いた場合は, 生育の比濁測定と尿酸の定量の際, 5 ml の培養液に 5 N NaOH を 0.1~0.2 ml 添加して速やかに touch mixer にて混合し, 残存している尿酸を溶解させた後に測定した。このアルカリ度にて尿酸は速やかに溶解し, Klett 値に著しい影響のないことを確かめた。*P. membranaefaciens* の培養結果は Fig. 2 に示すとおりで, 0.01% 尿酸では生育が悪いが 0.05~0.1% では生育良好で, 尿酸もよく分解消失した。0.2~1.0% 尿酸を粉状のまま添加した場合も利用してよく生育したが, 3 日培養後も尿酸がかなり未分解のまま残った。

4. 乾燥鶏糞のアルカリ抽出物培地における生育

(B) 培地を用いた培養試験の結果は Fig. 3 に示すように, *P. membranaefaciens* は炭素源無添加の場合は生育も尿酸の消費も悪いが, グルコースの添加により生育が著しく促進され, 尿酸もよく分解消失した。グルコース添加は 1% と 5% 濃度ではほぼ同様の効果が認められた。

5. 尿酸培地培養の酵母菌体の蛋白含量

P. membranaefaciens と *Schiz. octosporus* を 0.1

Fig. 2. Effect of Uric Acid Concentration of Medium on Growth and Uric Acid Utilization of *P. membranaefaciens*. ○ 0.01% uric acid, ● 0.05% uric acid, ▲ 0.1% uric acid, ▲ 0.2% uric acid, □ 0.5% uric acid, ■ 1.0% uric acid — growth (Klett-Summerson units), uric acid (mg/100 ml).

Fig. 3. Growth and Uric Acid Utilization of *P. membranaefaciens* in Media of Alkaline Extracts of Poultry Feces. ○ poultry feces extracts, ● 5% glucose poultry feces extract, — growth (Klett-Summerson units), uric acid (mg/100 ml).

Table II. Dry Weight and Protein Contents of the Yeast Cells Cultivated in the Medium (A) and (B)

Strain	Medium	Dry cell weight g/100ml	Protein contents per dry cell weight
<i>P. membranaefaciens</i>	A	0.61	42.6%
	B	0.51	43.9%
<i>Schizosacch. octosporus</i>	A	0.60	31.2%
	B	0.53	33.2%

Medium (A) : 0.1% uric acid, 1% glucose, 1.17% Difco yeast carbon base, pH 6.6.

Medium (B) : Poultry feces extracts added with 1% glucose, pH 6.8.

% 尿酸の (A) 培地に 48 時間, および 1% グルコース添加の (B) 培地に 24 時間振盪培養した後, 菌体乾物量と菌体蛋白含量を測定した結果は Table II に示すごとくで, 菌体収量は両菌株とも差はないが蛋白含量は前者が高かった。

6. 粉末乾燥鶏糞懸濁培地における生育

1% グルコース添加 (A) 培地に前培養した *P. membranaefaciens* 培養 0.5 ml を 80 ml の (C) 培地に

接種し振盪培養した結果, グルコース無添加の場合は増殖も尿酸の分解もみられなかったが, 5% グルコースの添加により接種直後 2.5×10^8 /ml の生菌数が 1 日後 0.9×10^9 /ml に増殖し, 2 日後には 1.1×10^9 /ml に達し, 初めに 0.122% 含まれていた尿酸も 1 日後 0.038% に減少し, 2 日後には 0.030% となった。先の実験で, 粉末尿酸添加液体培養で尿酸がよく利用されることを認めたが, 粉末鶏糞懸濁液の培養でも酵母は尿酸をよく利用して, 充分生育することが明らかになった。この際の尿酸の定量には, 培養物 5 ml をとり 5N NaOH を 0.05 ml 加えて, 10 分間沸騰湯煎中にて加熱抽出後遠心分離して上澄をとり, 適宜稀釈して O. D.₂₉₃ を測定した。

考 察

乾燥した養鶏廃棄物を再循環して養鶏に用いることにより公害を軽減しうることが提唱され, それは“recycled nutrient”として経済的な養鶏飼料でもあるという報告があり⁽⁴⁻⁶⁾, また鶏糞中の非蛋白態窒素の主成分である尿酸を分解すれば養鶏飼料として価値が高まるが, この処理によってコスト高になる難点があるといわれている⁽¹⁵⁾。家畜家禽廃棄物を基質とする蛋白生産については, Calvert⁽¹⁶⁾が藻類, 酵母, 糸状菌, 微生物の混合培養などによる方法を綜説し, 酵母は見込みがあるがまだ研究の不足していることを指摘している。

尿酸資化性の優れている酵母を鶏糞に培養して, 菌体蛋白を含む良質の飼料を経済的に生産することは重要な研究課題と考え, 本報では尿酸資化性の優れている酵母の選択と尿酸や鶏糞を用いた液体振盪培養を行った。

Larue と Spencer⁽¹⁰⁾は酵母の分類学的立場から, 各種属の酵母によるプリンとピリミジンの利用性について広範な観察を行い, 多数の酵母が尿酸の資化性を有することを認めているが, 尿酸培地における酵母の生育速度と菌体収量についての報告はない。著者らの今回の選択試験により, 尿酸資化性酵母は多数あったが生育速度と菌体収量に差異のあることが明らかになり, 1~2 日の培養で最高生育に達し, アンモニアやアミノ酸と同等に尿酸をよく資化する酵母として, *P. membranaefaciens*, *P. miso*, *P. farinosa*, *H. anomala*, *H. petersonii*, *H. subpelliculosa* H 79, *Schiz. octosporus*, *S. fragilis*, *D. hansenii*, *Tri. behrendii* を選択した。

これらの酵母は, 0.1% 尿酸培地に 1 日振盪培養するとき尿酸を 80% 以上分解消費することを認め, 液体培

養において 0.05~0.1% 尿酸濃度を最適とし, 0.2% 以上の濃度の尿酸培地では尿酸を未分解のまま残した. 尿酸は水に難溶であり, 0.2% 以上の濃度においては粉状のまま培地に懸濁させて用いたが, このような状態でも酵母はよく尿酸を利用して旺盛に生育した. 乾燥鶏糞の粉末を 1% 濃度に水に懸濁しグルコースを添加した単純な培地でも, よく生育することも認められた.

これらの培養によって得られた酵母菌体の蛋白含量は, *P. membranaefaciens* と *Schiz. octosporus* についてのみ測定したが, 酵母菌体は栄養上も嗜好性上も養鶏飼料としての問題点が種々指摘されており⁽¹⁶⁾, 酵母の選択はそれらの見地からさらに行う必要があると考える.

今回の実験により, 鶏糞そのものが尿酸資化性の優れている酵母の窒素源として利用可能なことが示されたが, 酵母を鶏糞に培養して良質の飼料を経済的に生産する実用的な方法について, 今後種々検討したいと考える.

要 約

鶏糞に酵母を培養して養鶏飼料として再利用するための基礎的な実験を目的として, 尿酸, 鶏糞抽出物および鶏糞自体を窒素源として酵母の液体振盪培養を行い, 生育, 尿酸の消費, 菌体収量を調べ, 鶏糞が酵母の窒素源としてよく利用されることを明らかにした. *Pichia membranaefaciens* など 10 株の尿酸資化性の優れている酵母を選択して, 0.1% 尿酸培地に 30°C, 1 日間振盪培養したとき尿酸の 80% 以上を分解消費して最大生育に達し, また尿酸を粉状のまま懸濁した液体培地でもよく生育した. 乾燥鶏糞粉末を 1% 濃度に水に懸濁し, グルコースを添加しただけの培地にも充分よく生育するこ

とを認めた.

終りに乾燥鶏糞を恵与された本岡豊氏と酵母菌株を分譲いただいた Dr. J. F. T. Spencer に深甚の謝意を表す.

本報の概要は昭和 51 年度日本農芸化学会大会 (京都) で発表した.

- (1) 醗酵協会編: Single cell protein (SCP) の生産と利用, 醗酵協会, 1972, p.1, 4, 21, 64, 86.
- (2) 田中米実, 林田晋策, 本江元吉: 発工, **55**, 134 (1977).
- (3) 逸見良則, 池田 貢, 太田欽幸: 醸工大会講演要旨, 1977, p.180.
- (4) 田名部雄一: 畜産の研究, **26**, 444 (1972).
- (5) 同 上: 同上, **27**, 158 (1973).
- (6) R. Blair: *Federation Proc.*, **33**, 1934 (1974).
- (7) 窪田大作, 安藤幹夫, 山崎昌良, 宮城正至, 中島治実, 原野 修: 家禽会誌, **14**, 240 (1977).
- (8) F. J. DiCarlo, A. S. Schultz and D. K. McManus: *J. Biol. Chem.*, **189**, 151 (1951).
- (9) A. H. Roush and T. R. Shieh: *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 255 (1962).
- (10) T. A. Larue and J. F. T. Spencer: *Can. J. Microbiol.*, **14**, 79 (1968).
- (11) A. H. Roush and A. J. Domnas: *Science*, **124**, 125 (1956).
- (12) K. Itaya, T. Yamamoto and J. Fukumoto: *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1256 (1967).
- (13) M. A. Rouf and R. F. Lomprey, Jr.: *J. Bacteriol.* **96**, 617 (1968).
- (14) D. W. Levine and C. L. Cooney: *Appl. Microbiol.*, **26**, 982 (1973).
- (15) R. Blair: *World's Poult. Sci. J.*, **29**, 189 (1972).
- (16) C. C. Calvert: *Federation Proc.*, **33**, 1938 (1974).