アルコール発酵母液を用いた海洋酵母の培養およびその菌学的性質^{*1}東原孝規・福岡誠一・安部敏男
水原一瓢・今田克・平野礼次郎

1982年7月28日受理

Culture of Marine Yeasts Using Alcohol Fermentation Slop and
Its Taxonomic CharacteristicsTakanori HIGASHIHARA,^{*2} Seiichi FUKUOKA,^{*2} Toshio ABE,^{*3}
Ippyo MIZUHARA,^{*3} Osamu IMADA,^{*4} and Reijiro HIRANO^{*5}

Marine yeasts isolated from microbial flocks produced from alcohol fermentation slop (AFS), were an effective food for the rotifer *Brachionus plicatilis*. Large scale cultures of three strains of the isolated yeasts, which are very effective as food, were carried out with a medium containing AFS as the sole source of carbon and energy using a 10-l jar fermentor. The yields of the isolated yeast cells from one liter of culture broth were in the range of 15-24 g (dry cell weight). The dried yeast cells contained crude protein amounting to 33-38%. General compositions, amino acid and fatty acid compositions, and vitamin contents of the cells of the isolated yeasts cultured with AFS were compared with those of bakers' yeast. The results showed that except for crude ash there was no distinct difference to be found between the isolated yeasts and bakers' yeast. Four representative strains of the isolated yeasts were identified as *Torulopsis inconspicua* YU-1, *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* YA-3, *Candida krusei* ZA-3 and *Candida valida* KU-1, respectively.

前報¹⁾で、アルコール発酵母液(母液)を用いた微生物フロック(母液フロック)がシオミズツボムシ *Brachionus plicatilis* (ワムシ)に対して良好な餌料効果を示すことを認め、これら母液フロックから餌料効果を有する海洋酵母を分離し、それらの結果を報告した。

母液フロックおよびこれら分離酵母をワムシの餌料として魚介類の種苗生産現場に適用するには、まずこれら分離酵母の諸性質を知る必要がある。

海洋酵母、パン酵母などの酵母類がワムシ、アルテミアなどの餌料として有効であることは報告されている。²⁻⁴⁾そしてワムシの大量培養には、餌料としてこれらの酵母が海産クロレラと併用して用いられている。^{5,6)}

また、母液からの酵母の生産に関しては家畜の飼料又は核酸原料の生産を目的として、1965年頃から研究がなされ、⁷⁻⁹⁾矢野ら¹⁰⁾および野口¹¹⁾の総説がある。これらによると、飼料酵母等の生産は培養後の廃液処理の問題、低生産性などから実用化には至っていない。

母液からの海洋酵母の生産はみられず、また母液で培養した分離酵母を餌料に用いてワムシの生産をはかる試みは、ほとんどなされていない。¹⁾しかし、最近、川野¹²⁾により、蔗糖蜜、ギャッサバ澱粉の分解物などを原料とする海洋酵母の培養と、この酵母によるワムシおよびチグリオプスの生産が報告されている。

本報では、母液フロック分離酵母のうち、特に母液資化性が強く、餌料効果のすぐれていた3菌株について、シ

^{*1} 発酵母液の再資源化研究-III Studies on the utilization of fermentation slop for aquaculture-III
本研究は、昭和54・55年度科学技術庁特別研究促進調整費による「アルコール発酵母液の再資源化に関する総合研究」の一環として行われた。なお本報告の要旨は、昭和56年度日本水産学会秋季大会(三重)で発表した。

^{*2} 工業技術院微生物工業技術研究所 (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan).

^{*3} 財団法人・クリーン・ジャパン・センター (Clean Japan Center, Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105, Japan).

^{*4} 協和醸酵工業株式会社 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan).

^{*5} 東京大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Yayoi-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan).

^{*6} 北島力: 昭和57年度日本水産学会秋季大会(広島), 講演要旨集, p. 180 (1982).

^{*7} 川野隆嗣, C. M. Jams: 昭和56年度日本水産学会秋季大会(三重), 講演要旨集, p. 87 (1981).

ジャーファーマンターを用いて大量培養を行い、その培養特性を検討し、大量培養で得られた菌体の成分を調べ、さらに代表的な分離酵母4菌株を選び、その菌学的性質を検討したので、これらの結果を報告する。

実験方法

分離酵母のジャーファーマンターによる培養 種培養液には、B-AFSM 培地¹⁾ 90 ml を含む 500 ml 容三角フラスコに、前報¹⁾ の「分離細菌および酵母による母液の資化性」の方法による種培養液 10 ml を接種し、30°C で2日間振盪培養した培養液を用いた。

本培養は、試作したジャーファーマンター（ミツワ理化学工業製）を用いて次のように行った。B-AFSM 培地 6 l（各成分を煮沸・溶解後、全量を 6 l に調製）を 10 l 容発酵槽に加え、120°C で 20 分オートクレーブ滅菌後、前記種培養液 300 ml を接種し、通気量 2 l/6 l・min、攪拌 500 rpm（タービン式）、30°C にて 20~21 時間培養した。

分析用菌体の調製 培養終了液を大型遠心機にて Max. 2400×g, 15 分間遠心分離した後、等量の 3% 食塩水で 3 回洗浄遠心分離した菌体を分析に供した。

なお菌体成分の化学分析（一般分析、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ビタミン類）は財団法人・日本食品分析センターに依頼した。

菌体収量 前記の洗浄遠心分離菌体から上澄み液を十分に除いた菌体重量を湿重量（wet）とした。乾燥菌体重量（dry）は Table 1 の分析値から求めた。

分離酵母の分類同定 分離酵母の分類学的同定は、LODDER ら¹²⁾ の「The yeasts, a taxonomic study, 2nd ed., 1970」に基づき、WICKERHAM¹³⁾ の「Taxonomy of yeasts」, BARNETT ら¹⁴⁾ の「A guide to identifying and classifying yeasts」, 飯塚・後藤¹⁵⁾ の「酵母の分類同定法」, および後藤・曾根田¹⁶⁾ の「酵母の分類と同定 (1) および (2) (微生物の分類と同定, 長谷川編)」などを参照して行った。

孢子形成能試験は YM agar (Difco 製), V-8 agar¹⁴⁾ (Campbell Soup Company 製の V-8 Vegetable juice を用いて調製), Gorodokowa agar¹²⁾ および Acetate agar¹⁴⁾ を用い、25°C で 3 日培養後、20°C にて 6 週間培養して行った。射出孢子形成能試験は Potato dextrose agar (Difco 製) を用い、25°C, 8 日, スライドガラス法により行った。

糖の発酵性試験では、WICKERHAM¹³⁾ の方法 (28°C, 21~24 日) 又は BARNETT ら¹⁴⁾ の方法 (25°C, 25 日) を用い、Durham 管中のガスの発生を Positive と判定した。

炭素化合物の資化性試験は Yeast nitrogen base

(Difco 製) を用い、25°C, 20~21 日, 液体培養法により行った。Slow utilisation (Table 7) は培養 7~8 日の Optical density (OD, 630 nm) が 0.5 以下であるが、培養 20~21 日で OD 1.0 以上になったものを示す。

硝酸塩の資化性試験は Yeast carbon base (Difco 製) を用い、25°C, 17 日, 液体培養法により行った。

ビタミン要求性試験では、BARNETT ら¹⁴⁾ のビタミン組成と Vitamin free yeast base (Difco 製) を用いて、25°C, 5 日間静置培養後、飯塚・後藤¹⁵⁾ の方法により、OD 630 nm における生育率 (R) を求め、R 80% 以上をビタミン要求性なし、R 15~70% を刺激的要求性とそれぞれ判定した。

生育温度試験は YM broth (Table 5) を用いて 7 日培養後、OD 630 nm を測定した。

Corn meal agar は Difco 製を用いた。なお分類同定用の標準菌株は財団法人・発酵研究所の分離菌株を用いた。

結果

分離酵母のジャーファーマンターによる培養 10 l 容ジャーファーマンターを用いて、前報¹⁾ にて良好な飼料効果を示した酵母 YU-1, YA-3 および ZA-3 菌株の大量培養を試みた。Fig. 1 にその培養経過を示した。

Fig. 1. Time course of culture of isolated yeasts in alcohol fermentation slop.

Cultivation: 6 l of B-AFSM¹⁾ medium/10-l jar fermentor, 30°C, 500 rpm, 2 l/min (air flow).

■: YU-1 strain, ●: YA-3 strain, ▲: ZA-3 strain, ---: DO (dissolved oxygen), μ_{max} of YA-3 strain: 0.46 hr⁻¹.

Table 1. Composition of alcohol fermentation slop and isolated yeasts cells

Composition (% w/w) (dry base)	B-AFS* ¹	YU-1 strain	YA-3 strain	ZA-3 strain	Marine* ² yeast	Bakers* ² yeast
Moisture	50.8	73.3	71.7	70.5		
Crude protein	8.6 (17.5)	8.7 (32.6)	10.3 (36.4)	11.1 (37.6)	(32.1)	(48-63)
Crude fat	4.1 (8.3)	1.1 (4.1)	1.0 (3.5)	1.2 (4.1)	(1.1)	(4-7)
Crude fiber	0	0.1 (0.4)	1.8 (6.4)	1.9 (6.4)		
Crude ash	14.9 (30.3)	8.3 (31.1)	6.0 (21.2)	7.2 (24.4)	(9.8)	(7.0-7.5)
Nitrogen free extract	21.6 (43.9)	8.5 (31.8)	9.2 (32.5)	8.1 (27.5)	(42.1)	

*¹ B-AFS: alcohol fermentation slop.¹⁾ Total sugars of B-AFS (glucose base): 14.4% (dry base).*² Marine yeast ASY-4011 strain and Bakers' yeast¹⁷⁾.

これより、3菌株の母液資化性は、前報¹⁾の試験管振盪培養の結果と同様にYA-3菌株が最もすぐれていた。母液固形分濃度9.7% (w/v)の培地を用いた場合、いずれの菌株においても、培養開始後6~12時間で溶存酸素(DO)の消費が盛んとなり、20時間後にはその減少がほとんどみられなかった。またDOの経時変化において2段階の消費パターンがみられた。この現象は発酵槽排気中のO₂、CO₂の経時変化においても認められた。

培養液のpHは試験管振盪培養の結果と同様に、いずれの菌株もpH4.6~4.9から5.4~6.5に上昇した。母液資化性の最も良好であったYA-3菌株の最大比増殖速度(μ_{max})は、Packed cell volume(純菌体量)¹⁾を用いた増殖速度から求めた結果、0.46 hr⁻¹であった。

YU-1, YA-3およびZA-3菌株の菌体収量は培養終了液1 l(B-AFS母液¹⁾ 197 g(dry 96.9 g)/l培地)から、それぞれ56.3 wet g(dry 15.0 g), 83.3 wet g(dry 23.6 g)および73.6 wet g(dry 21.7 g)であった。また原料母液に対する菌体収率は乾物換算で、YU-1菌株15.5% YA-3菌株24.4%およびZA-3菌株22.4%であった。

分離酵母の菌体成分 前記ジャーフェーマンター培養で母液から得られた分離酵母YU-1, YA-3およびZA-3菌株の菌体成分の分析を行った。

一般分析値をTable 1に示した。Table 1のB-AFS(母液)¹⁾は発酵原料に用いた母液の組成で灰分を多く含んでいた。分離酵母の粗蛋白含量は、飼料用酵母として開発された海洋酵母(ASY-4011菌株)¹⁷⁾と比較してほとんど差がみられなかったが、パン酵母¹⁷⁾より若干低い値を示した。また灰分が多くみられたが、これは発酵原料の母液に由来するものと思われる。

アミノ酸組成をTable 2に示した。分離酵母のアミノ酸組成は海洋酵母(ASY-4011菌株)とほとんど差がなく、パン酵母¹⁷⁾に比較して、アルギニン、リジン、

プロリンおよびアスパラギン酸が若干少なく、セリンが多くみられた。

脂肪酸組成をTable 3に示した。分離酵母の脂肪酸組成では、海産クロレラ¹⁸⁾で少ないリノール酸(C_{18:2})およびオレイン酸(C_{18:1})が多く、中でもC_{18:2}が最も多く認められた。この2種の脂肪酸で構成脂肪酸の50~60%を占めた。パン酵母¹⁸⁾ではC_{18:1}が最も多くみられた。また海産魚の必須脂肪酸(EFA)といわれ、海産クロレラに多いエイコサペンタエン酸(C_{20:5})などの ω 3高度不飽和脂肪酸(ω 3 HUFA)¹⁸⁾は、パン酵母と同様に含有しないか、含まれていてもわずかであった。

ビタミン含量をTable 4に示した。分離酵母のビタミン含量は、海洋酵母(ASY-4011菌株)やパン酵母¹⁷⁾と比べて、葉酸が少なく、ビオチンが多くみられたが、その他のビタミン類にはあまり差が認められなかった。またB₁₂は炭化水素酵母より少なかった。

以上より、母液を唯一の有機栄養源として培養した酵母菌体の成分は、これら分離酵母3菌株の間で大きな差はみられなかった。また海洋酵母(ASY-4011菌株)やパン酵母と比較して、灰分が若干多く含まれていたが、その他の成分に特に大きな違いは認められなかった。

分離酵母の分類同定 母液ブロックから分離した酵母8菌株¹⁾は、コロニーの形態により、「YU-1菌株」、「YA-3, AA-3, AA-5菌株」、「ZA-3, AU-6L, YA-2菌株」および「KU-1菌株」の4グループに分けられた。これらのうち、良好な飼料効果を示した代表的な酵母、YU-1, YA-3, ZA-3およびKU-1菌株について、その菌学的性質を検討した。

上記分離酵母4菌株の形態学的、培養的および生理学的性質をTable 5~8に示した。これらの分離酵母はいずれも多極出芽によって増殖し、子嚢胞子を形成せず、細胞は楕円形からときには伸長形ないし円筒形を呈し、射出胞子を形成せず、分裂子を形成せず、テリオスポア

Table 2. Amino acid composition of acid hydrolysates of isolated yeasts

Amino acids (g)* ¹	YU-1 strain	YA-3 strain	ZA-3 strain	Marine* ² yeast	Bakers* ² yeast
Arginine	3.56	3.30	4.05	4.46	6.20
Lysine	5.86	6.12	6.22	5.80	9.29
Histidine	1.95	1.75	1.80	1.66	2.06
Phenylalanine	4.60	4.56	3.96	3.79	5.38
Tyrosine	3.45	3.59	3.33	2.83	3.71
Leucine	7.24	6.31	6.76	5.65	7.65
Isoleucine	5.17	4.47	4.41	3.54	4.33
Methionine	2.07	1.55	1.35	1.46	1.02
Valine	5.63	5.83	4.95	4.02	5.95
Alanine	5.86	5.73	5.50	5.60	5.58
Glycine	4.14	4.37	4.05	4.36	5.35
Proline	3.33	3.30	3.15	4.92	5.38
Glutamic acid	12.30	10.49	11.17	13.50	13.19
Serine	5.17	4.47	4.78	5.10	2.68
Threonine	4.83	4.95	4.78	4.84	5.38
Aspartic acid	9.89	9.03	10.36	9.85	17.65
Tryptophan* ³	1.03	1.17	1.08		
Cystine* ⁴	0.92	0.87	0.99		

*¹ Amino acid g/100 g of crude protein (dry base).*² Marine yeast ASY-4011 strain and Bakers' yeast.¹⁷⁾*³ Microbiological assay.*⁴ Hydrochloric acid hydrolysis after performic acid oxidation.

Table 3. Fatty acid composition of total lipids from isolated yeasts

Fatty acids (%)	YU-1 strain	YA-3 strain	ZA-3 strain	Bakers* ¹ yeast	Marine* ¹ chlorella
C ₁₂	0.3	—	0.4		
C ₁₄	0.4	0.1	0.4	1.1	4.3
C ₁₅	0.3	0.3	0.5		
C ₁₆	21.9	17.0	23.9	11.2	22.5
C _{16:1}	5.7	5.1	7.7	14.2 (ω7)	22.3 (ω7)
C ₁₇	0.2	0.5	0.5		
C _{17:1}	0.5	1.9	0.7		
C ₁₈	5.6	3.8	5.8	8.4	1.0
C _{18:1}	17.8	25.0	19.7	38.0 (ω9)	3.1 (ω9)
C _{18:2}	33.7	34.8	31.2	15.1 (ω6)	3.4 (ω6)
C _{18:3}	8.2	8.1	3.5	6.4 (ω3)	0.1 (ω3)
C _{18:4}	—	—	0.1		
C ₂₀	0.5	0.3	0.6		
C _{20:1}	0.3	0.2	0.3	1.6	0.1
C _{20:3} (ω3)	—	—	0.6		
C _{20:4} (ω6)	—	—	—		4.7
C _{20:4} (ω8)	—	—	0.5		0.1
C _{20:5}	0.8	—	—		31.8 (ω3)
Unidentified fatty acid	3.8	2.9	3.6		

* Reference¹⁸⁾Bakers' yeast: *Saccharomyces cerevisiae* Kyowa (1977).Marine chlorella: *Chlorella minutissima* Nagasaki (May 1976).

を形成せず、澱粉類似物質を生成せず、カロチノイド色素を生産せず、ウレアーゼは陰性であった。YA-3, ZA-3 および KU-1 菌株はいずれも長い仮性菌糸をよく形成した。しかし YU-1 菌株は, *Torulopsis candida* IFO

0728 菌株と同様に, 未発達な仮性菌糸 (長さ 25 μm/2 days, 40~75 μm/7 days, 25°C) しかみられなかった。

以上の菌学的性質を LODDER ら¹²⁾ の *The yeasts, a taxonomic study*, 2nd ed. (1970) と対比した結果,

Table 4. Vitamin content of isolated yeast cells

Vitamins (mg) ^{*1} (dry base)	YU-1 strain	YA-3 strain	ZA-3 strain	Marine ^{*2} yeast	Bakers' ^{*2} yeast
B ₂	2.10	4.52	2.00	1.58	2.5-8.5
B ₆	0.86	2.26	1.36	1.84	1.6-5.6
B ₁₂	0.11 μ g	0.53 μ g	0.14 μ g		(3.01 μ g) ^{*3}
Niacin	14.61	18.59	30.00	41.58	20-70
Inositol	153.56	448.76	342.37	409.22	432
Folic acid	0.01	0.11	0.14	2.85	1.9-18.0
Pantothenic acid	7.53	6.18	6.71	7.40	8-26
Biotin	0.59	0.59	0.34	0.01	0.06-0.18

^{*1} Vitamin, mg/100 g of cells.^{*2} Marine yeast ASY-4011 strain and Bakers' yeast.¹⁷⁾^{*3} Hydrocarbon utilizing yeasts (T. Takata: *Kagaku Kogaku*, 34, 703-712, 1970).

Table 5. Morphological properties of isolated yeasts (1)

	YU-1 strain	YA-3 strain	ZA-3 strain	KU-1 strain
Growth in YM broth* (after 3 days at 25°C)				
Shape and size of cell	ovoid, (3-5) × (4-8) μ m	ovoid to cylindrical, (2-4) × (4-15) μ m	ovoid, (3-5) × (4-10) μ m to cylindrical, (3-5) × (11-35) μ m	ovoid to cylindrical, (3.5-5) × (4-11) μ m the cells occur in short chains
Vegetative reproduction (after 7 days at 25°C)	multilateral budding a sediment is formed	multilateral budding a slight ring and sediment are formed	multilateral budding a creeping, thin pellicle and sediment are formed	multilateral budding a slight creeping, thin pellicle and sediment are formed
Growth on YM agar (after 30 days at 17°C, the streak culture)	abundant growth grayish white, glistening, soft, slightly raised, smooth, the margin is entire	abundant growth whitish cream-colored, glistening, soft, slightly raised, smooth, the margin is entire	abundant growth grayish white, dull, soft, slightly raised, smooth, the margin is filamentous	abundant growth grayish white, dull, soft, slightly raised, smooth, the margin is entire to undulate
Slide culture on corn meal agar	a rudimentary pseudomycelium consists of short chains of ovoid cells is formed (40-75 μ m at 7 days)	a pseudomycelium with the blastospores is abundantly formed	a pseudomycelium with clusters of ovoid blastospores is abundantly formed	a pseudomycelium consists of branched chains of ovoid and cylindrical cells is abundantly formed
Formation of arthrospores	not formed	not formed	not formed	not formed
Formation of ascospores	not formed	not formed	not formed	not formed
Formation of ballistospores on slide culture	not formed	not formed	not formed	not formed
Formation of teliospores on corn meal agar	not formed	not formed	not formed	not formed

* YM broth: yeast extract (Difco) 3 g, malt extract (Difco) 3 g, pepton (Difco) 5 g, glucose 10 g, distilled water 1000 ml, pH 5.5.

Table 6. Fermentation of sugars by isolated yeasts

Sugars	YU-1 strain	YA-3 strain	ZA-3 strain	KU-1 strain
D-Glucose	—	+	+	—
Galactose	—	+	—	—
Sucrose	—	+	—	—
Maltose	—	—	—	—
Cellobiose	—	—	—	—
Trehalose	—	+	—	—
Lactose	—	—	—	—
Melibiose	—	—	—	—
Raffinose	—	+	—	—
Melezitose	—	—	—	—
Inulin	N	+	N	N

+: Positive, —: Negative, N: Not tested

YU-1 菌株は *Torulopsis* 属, YA-3, ZA-3 および KU-1 菌株は *Candida* 属に属することが認められた。

さらに, 糖の発酵性 (Table 6), 炭素化合物の資化性 (Table 7) などの生理学的諸性質を検討し, 上記 The yeasts (1970)¹²⁾ に基づき種の検索を行った。

その結果, YU-1 菌株は Glycerol の資化性と生育最高温度 (Fig. 2) が異なっているが他の性質は *T. inconspicua* の記載と, YA-3 菌株は Galactitol の資化性のみ異なり他の性質は *C. guilliermondii* var. *guilliermondii* のそれと, ZA-3 菌株は Citric acid の資化性のみ異なり他の性質は *C. krusei* のそれと, KU-1

Table 7. Assimilation of carbon compounds by isolated yeasts

Carbon compounds	YU-1 strain	YA-3 strain	ZA-3 strain	KU-1 strain
D-Glucose	+	+	+	+
Galactose	—	+	—	—
L-Sorbose	—	S	—	—
Sucrose	—	+	—	—
Maltose	—	+	—	—
Cellobiose	—	+	—	—
Trehalose	—	+	—	—
Lactose	—	—	—	—
Melibiose	—	+	—	—
Raffinose	—	+	—	—
Melezitose	—	+	—	—
Inulin	—	+	—	—
Souble starch	—	—	—	—
D-Xylose	—	+	—	—
L-Arabinose	—	+	—	—
D-Arabinose	—	+	—	—
D-Ribose	—	S	—	—
L-Rhamnose	—	S	—	—
Ethanol	+	+	+	+
Glycerol	—	+	+	—
Erythritol	—	—	—	—
Ribitol	—	+	—	—
Galactitol	—	—	—	—
D-Mannitol	—	+	—	—
D-Glucitol	—	+	—	—
α -Methyl-D-glucoside	—	+	—	—
Salicin	—	+	—	—
DL-Lactic acid	+	S	+	+
Succinic acid	+	+	+	+
Citric acid	—	+	+	—
myo-Inositol	—	—	—	—

+: Positive, —: Negative, S: Slow utilisation.

Table 8. Physiological properties of isolated yeasts

	YU-1 strain	YA-3 strain	ZA-3 strain	KU-1 strain
Assimilation of potassium nitrate	Negative	Negative	Negative	Negative
Growth in vitamin-free medium	Weak growth	Weak growth	Good growth	Weak growth
Vitamin stimulating growth	Biotin Thiamin-HCl Pyridoxine-HCl	Biotin		Biotin Thiamin-HCl Pyridoxine-HCl
Production of starch-like compounds	Negative	Negative	Negative	Negative
Production of carotenoid pigments	Negative	Negative	Negative	Negative
Hydrolysis of urea	Negative	Negative	Negative	Negative
Optimum temperature for growth*	25 to 30°C	25 to 35°C	35 to 40°C	20 to 25°C
Names of species of isolated yeasts	<i>Torulopsis inconspicua</i> Lodder et Kreger-Van Rij	<i>Candida guilliermondii</i> var. <i>guilliermondii</i> (Castellani) Langeron et Guerra	<i>Candida krusei</i> (Cast.) Berkhout	<i>Candida valida</i> (Leberle) Van Uden et Buckley Nov. Comb.

* Fig. 2.

Fig. 2. Effect of temperature on growth of isolated yeasts.

Cultivation: 6 ml of YM broth medium (Table 5)/test tube (16.5×165 mm), 7 days.
 ■: YU-1 strain, ●: YA-3 strain, ▲: ZA-3 strain, ○: KU-1 strain.

菌株は Succinic acid の資化性および Pyridoxine の要求性が異なっているが、*C. valida* のそれと、いずれも一致した。

以上より、YU-1 菌株は *Torulopsis inconspicua* LODDER et KREGER-VAN RIJ, YA-3 菌株は *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* (CASTELLANI) LANGERON ET GUERRA, ZA-3 菌株は *Candida krusei* (CAST.) BERKHOUT, および KU-1 菌株は *Candida valida* (LEBERLE) VAN UDEN ET BUCKLEY Nov. Com. と認められた。また YU-1 菌株と KU-1 菌株は仮性菌糸の形成など形態学的性質は異なるが、生理学的性質は生育温度 (Fig. 2) を除いてよく類似していた。

なおビタミン要求性試験の結果を Table 8 に示したが、刺激的ビタミン要求性のものは、YU-1 菌株の Thiamin 欠乏培地 (R 69.5%) を除き、いずれも R15~50% であった。ビタミン要求性のないものは、いずれも R 80% 以上を示した。なお生育温度試験の結果を Fig. 2 に示した。

考 察

分離酵母 3 菌株のジャーファーメンター培養における母液資化能は Table 7 に示したこれら菌株の炭素化合物の資化性とよく対応していた。すなわち、母液資化性の最もすぐれていた *C. guilliermondii* var. *guilliermondii* YA-3 菌株は、種々の糖類、グリセロール、有機酸など多くの炭素化合物を幅広く資化利用できるが、*C. krusei* ZA-3 菌株および *T. inconspicua* YU-1 菌

株はいずれもグルコース以外の糖類の資化性は、試験した糖類の中では認められなかった。

しかし、次で良好であった *C. krusei* ZA-3 菌株はエタノール、グリセロールおよび有機酸の資化性がみられた。さらに *T. inconspicua* YU-1 菌株は、資化性の幅が狭く、グルコース以外はエタノールおよび有機酸である乳酸とコハク酸しか利用されなかった。従って後者の 2 菌株は *C. guilliermondii* var. *guilliermondii* YA-3 菌株と異なり母液成分の非発酵性糖類の利用はあまり期待できず、むしろアルコール発酵の副産物と考えられるグリセロールおよび乳酸等の有機酸^{9,10)}などを主として資化利用しているものと推察された。

また母液資化性の最も良好であった *C. guilliermondii* var. *guilliermondii* YA-3 菌株の μ_{max} は 0.46 hr^{-1} であった。これは増殖速度の高い母液資化性酵母 *Candida utilis* Y-9-2 菌株の μ_{max} 0.66 hr^{-1} ⁹⁾に近い値であった。

C. guilliermondii var. *guilliermondii* YA-3 菌株の菌体収量は 23.6 g/l (乾燥菌体量, DCW) であり、この菌体の粗蛋白含量は 36.4% (Table I) であった。長島ら⁹⁾は優良菌株 *Saccharomyces debrueckii* KY-5551 を用いた回分培養における菌体収量は $10\sim12 \text{ g/l}$ (DCW) で、その菌体の粗蛋白含量は 50% 強と報告している。

前記 *S. debrueckii* KY-5551 菌株の母液培養において、資化性炭素源 3 種の Diauxie (Polyauxie) を認めているが、分離酵母においても DO の経時変化 (Fig. 1) などから Diauxie が推察された。

餌料酵母として開発された海洋酵母の培養には、グルコース、ビタミン類など比較的高価な有機物が使用されている¹⁷⁾。またパン酵母は、現在主として糖蜜を原料として生産されているが、この糖蜜はアルコール発酵の原料にも用いられているものである。

一方、本分離酵母は海水に有機栄養源として母液を加えるのみで生産できる。そしてこの酵母菌体は、前報¹⁾で述べたようにパン酵母よりすぐれた餌料効果を示し、菌体成分はグルコースで培養された海洋酵母やパン酵母のそれと比較して、特に大きな違いはみられなかった。

しかし、本分離酵母はパン酵母と同様に、海産魚の EFA といわれている $C_{20:5}$ などの $\omega 3$ HUFA をほとんど含有していないため、今田ら²⁰⁾によって開発された油脂酵母のごとく、何らかの方法で EFA を補う必要がある。

餌料効果の認められた代表的な分離酵母 4 菌株を LODDER ら¹²⁾の The yeasts (1970) に基づき分類同定した結果、それらは *T. inconspicua* (YU-1 菌株), *C. guilliermondii* var. *guilliermondii* (YA-3 菌株), *C. krusei* (ZA-3 菌株) および *C. valida* (KU-1 菌株) であ

ることが認められた。

酵母の分類同定に関する検索書としては、上記 The yeasts (1970) 以後、BARNETT & PANKHRST²¹⁾ の A new key the yeasts (1974) と BARNETT ら¹⁴⁾による A guide to identifying and classifying yeasts (1979) が発表されている。

この後者¹⁴⁾によると、分離酵母 YU-1 菌株は、Glycerol の資化性は異なるが *T. inconspicua*, YA-3 菌株は *Pichia guilliermondii*, ZA-3 菌株は *Pichia kudriavzevii* および KU-1 菌株は Glycerol の資化性と Pyridoxine の要求性は異なるが、*C. valida* にそれぞれ該当した。

The yeasts (1970) では、*C. guilliermondii* は *P. guilliermondii*, *C. krusei* は *P. kudriavzevii* のそれぞれ不完全型であると記載されている。BEECH ら²²⁾および BELIN²³⁾ は、酵母の分類群で対をなす完全型と不完全型は同一のものであり、それはひとつの Unit として扱われるであろうと推察している。このようなことから、最近 BELIN²³⁾ により、酵母のいろいろな属種の完全型と不完全型がまとめられているが、前記属種の酵母もこれらに記載されている。

さて海洋由来の酵母については、MORRIS,^{24,25)} VAN UDEN & FELL²⁶⁾ および FELL²⁷⁾ の総説がある。これらによると、前記分離酵母の属種のものはいずれも海洋環境から分離されている。特に、*C. guilliermondii* は海水から高頻度で分離されている。²⁴⁾ また *Torulopsis* 属および *Candida* 属に属する酵母は沿岸海域の海水で比較的出现頻度が高いといわれている。²⁸⁾

以上より、これら属種の酵母が沿岸の自然海水を用いて形成した母液フロックより分離されたことは理解できる。

海洋酵母が動物プランクトンや稚仔魚の餌料になることはすでに知られている。^{2-4,17)} そして *Candida* 属酵母では *C. tropicalis** が、*Torulopsis* 属酵母では *T. candida* var. *marinae*⁵⁾ (マアジの胃内容物より分離された酵母で、分離当初は *Saccharomyces marinus* と命名¹⁷⁾) が報告されている。

母液資化性酵母は、母液からの菌体生産を目的として、食・飼料用酵母を中心に幅広くスクリーニングされ、*Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces* および *Trichosporon* 属などから優良菌株が得られている。^{7-9,11)} これらの中で、*Candida* 属では *C. arborea*,⁷⁾ *C. tropicalis* (*Mycotorula japonica*),^{7,8)} *C. utilis*,^{7,9)} および *Saccharomyces* 属では *S. delbrueckii*⁹⁾ が実用的な有望菌株とされている。

しかし、前記分離酵母のうち *C. guilliermondii* var.

guilliermondii, *C. valida* および *T. inconspicua* は、これまで報告された母液資化性酵母の属種の中には見当らなかった。

以上より、これら分離酵母は、母液からの菌体収量がすぐれ、菌体成分もパン酵母と大差はなく、ワムシに対する餌料効果も良好であった。従って本分離酵母は、未利用資源の母液から安価且つ大量に供給できる動物プランクトンの餌料として期待できるものである。

しかし、今後本分離酵母を魚介類の種苗生産現場に適用する場合は、最近飼料用微生物蛋白質の安全性評価法の開発等に関するまとめがなされているが、²⁹⁾ このような観点から、栄養価と共に、病原性、変異原性、毒性物質などの安全性等を、さらに検討する必要がある。

要 約

1) ワムシに対して餌料効果の認められた母液フロックから分離した海洋酵母のうち、餌料効果のすぐれていた YU-1, YA-3 および ZA-3 菌株について、ジャーファーメンターを用いて大量培養を行った。その結果、これら3菌株の母液からの菌体収量は培養終了液 1 l (母液 197 g/l 培地) から DCW 15~24 g であった。この菌体の粗蛋白含量は 33~38% であった。菌体収量の最もすぐれていた YA-3 菌株の μ_{max} は 0.46 hr⁻¹ であった。またこれら菌株の母液資化能はそれら菌株の炭素化合物資化性の幅とよく対応していた。

2) 上記培養で得られた3菌株の菌体成分を分析した結果、パン酵母や既知の餌料用海洋酵母と比較して、一般分析値では灰分が若干多く含まれていたが、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ビタミン含量には特に大きな差はみられなかった。しかし、海産魚の必須脂肪酸といわれている ω 3 HUFA は、他の酵母類と同様にほとんど含有していなかった。

3) 餌料効果を示した代表的な分離酵母4菌株の菌学的性質を検討した結果、YA-3 菌株は *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*, ZA-3 菌株は *Candida krusei*, KU-1 菌株は *Candida valida* および YU-1 菌株は *Torulopsis inconspicua* であることが認められた。これらのうち、前2者は特に母液資化性が強く、且つすぐれた餌料効果を示した。

4) 以上より、本分離酵母は、未利用資源の母液から、安価・大量に且つ安定して供給できる動物プランクトンの餌料として期待できる。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導を賜った東京大学海洋研究所多賀信夫教授、また実験にご協力いただいた協和醸酵工業株式会社土浦工場関口良三氏、並びにジヤ

* 川野隆嗣, C. M. JAMS: 昭和 56 年度日本水産学会秋季大会 (三重), 講演要集, p. 87 (1981).

ーファーマンターの試作およびその培養にご協力いただいた当研究所応用技術部村上利雄技官に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 東原孝規・福岡誠一・安部敏男・水原一瓢・今田克・平野礼次郎: 日水誌, **49**, 1001-1013 (1983).
- 2) 島谷 周・金沢昭夫・柏田研一: 鹿児島大学水産学部紀要, **16**, 34-39 (1967).
- 3) 川野隆嗣: 水産増殖, **15**, 59-65 (1968).
- 4) 代田昭彦: 水産餌料生物学, 恒星社厚生閣, 東京, 1975, pp. 403-493.
- 5) 古川一郎・日高勝義: 日プ報, **20**, 61-71 (1973).
- 6) H. HIRATA: *Mem. Fac. Fish., Kagoshima*, **23**, 163-172 (1974).
- 7) 松尾次雄・石川不二夫・山中正美・小西 敬: 醸酵協会誌, **23**, 320-324, 331 (1965).
- 8) 手塚隆久: 工業用水, No. 109, 76-83 (1967).
- 9) 長島 実・植田浩行・犬塚恵一・鈴木武夫: イースト工業会技術懇談会発表報告記録, No. 47, 19-23 (1978).
- 10) 矢野 武・堀井和男・尾崎浅一郎: 醸酵協会誌, **27**, 135-164 (1969).
- 11) 野口貞夫: 発酵と工業, **39**, 700-707 (1981).
- 12) J. LODDER (ed.): *The Yeasts, a taxonomic study*, 2nd ed., North-Holland Publishing Co., Amsterdam-London, 1970.
- 13) L. J. WICKERHAM: *Taxonomy of Yeasts* (Technical Bulletin No. 1029), United States Department of Agriculture, Washington, 1951.
- 14) J. A. BARNETT, R. W. PAYNE, and D. YARROW: *A Guide to Identifying and Classifying Yeasts*, Cambridge University Press, Cambridge, 1979.
- 15) 飯塚 廣・後藤昭二: 酵母の分類同定法, 第3版, 東京大学出版会, 東京, 1980.
- 16) 後藤昭二・曾根田正己: 酵母の分類と同定 (1), (2) (微生物の分類と同定, 長谷川武治編), 東京大学出版会, 東京, 1975, pp. 67-137.
- 17) 大沢岳義・川野隆嗣: 海洋開発, **4**, 80-87 (1971).
- 18) 渡辺 武・北島 力・荒川敏久・福所邦彦・藤田矢郎: 日水誌, **44**, 1109-1114 (1978).
- 19) 亀高正夫・日野常男: 発酵と工業, **35**, 110-123 (1977).
- 20) 今田 克・影山百合明・渡辺 武・北島 力・藤田矢郎・米 康夫: 日水誌, **45**, 955-959 (1979).
- 21) J. A. BARNETT and R. J. PANKHRST (ed.): *A New Key to the Yeasts*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1974.
- 22) F. W. BEECH, R. R. DAVENPORT, R. W. GOSWELL, and J. K. BURNETT: in "Identification Methods for Microbiologists. Part B" (ed. by B. M. GIBBS and D. A. SHAPTON), Society for Applied Bacteriology Technical Series. No. 2, Academic Press, London, 1968, pp. 151-175.
- 23) J. M. BELIN: *Can. J. Microbiol.*, **27**, 1235-1251 (1981).
- 24) E. O. MORRIS: *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **6**, 201-230 (1968).
- 25) E. O. MORRIS: *J. Appl. Bact.*, **38**, 211-223 (1975).
- 26) N. VAN UDEN and J. W. FELL: in "Advances in the Microbiology of the Sea" (ed. by M. DROOP and E. J. F. WOOD), Academic Press, New York, 1968, pp. 167-201.
- 27) J. W. FELL: in "Recent Advance in Aquatic Mycology" (ed. by E. B. G. JONES), Paul Elek (Scientific Book) Ltd, London, 1976, pp. 93-124.
- 28) 山縣 敬・藤田藤樹夫: 醸酵工学, **55**, 107-114 (1977).
- 29) 藤巻正生: 発酵と工業, **40**, 435-441 (1982).