

〔醸酵工学 第59巻 第6号 501-511. 1981〕

エタノール, 酢酸およびアセトアルデヒドを 炭素源とする *Candida utilis* の培養特性

浦 上 貞 治

三菱瓦斯化学(株)新潟研究所

Cultivation of *Candida utilis* using ethanol, acetic acid or acetaldehyde as carbon source. URAKAMI, T. (Niigata Research Laboratory, Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc., 5, Enoki-cho, Niigata 950) Hakkokogaku 59: 501-511. 1981.

An ethanol-, acetic acid-, and acetaldehyde-utilizing yeast, MG-1, was isolated and identified as *Candida utilis* on the basis of its biological characteristics and coenzyme Q system.

Batch cultures of *C. utilis* MG-1 were carried out with ethanol, acetic acid, or acetaldehyde as a carbon source. Optimum concentrations of substrates were below 0.3 wt% for ethanol, below 0.05 wt% for acetic acid, and below 0.03 wt% for acetaldehyde. Optimum temperature was 36-38°C, and optimum pH was 3.5-4.5 for growth with these substrates.

Continuous cultures of *C. utilis* MG-1 were carried out with ethanol, acetic acid, or acetaldehyde as a carbon source. Cell yield increased slightly with dilution rate up to the practical dilution rate (D_p , hr⁻¹), and the contents of crude protein and nucleic acids also increased, while the content of amino acids remained constant. The contents of crude protein and nucleic acids decreased in parallel with the increase of temperature but the content of amino acids was constant at 28-38°C. At a constant feed concentration of 5-60 grams of ethanol per liter, the D_p was approximately 0.50 hr⁻¹, the cell yield was approximately 80 wt%, and the content of crude protein was approximately 58 wt%. At a constant feed concentration of 10-60 grams of acetic acid per liter, the cell yield was approximately 40 wt%, and the content of crude protein was approximately 59 wt%. The D_p decreased in parallel with the increase of feed concentration of acetic acid, from approximately 0.43 hr⁻¹ at 1.0 wt% of acetic acid to approximately 0.30 hr⁻¹ at 6.0 wt%. At the constant feed concentration of 10 grams per liter of acetaldehyde, the D_p was approximately 0.18 hr⁻¹, the cell yield was approximately 55 wt%, and the content of crude protein was approximately 55 wt%.

The concentration of cells and the productivity of cells increased in parallel with the dilution rate and the feed concentration of the carbon source. At the feed concentration of 6.0 wt% of ethanol, the concentration of cells was approximately 4.8 wt%, and the maximum productivity of cells was approximately 24 g/l·hr. At the constant feed concentration of 6.0 wt% of acetic acid, the concentration of cells was 2.4 wt%, and the maximum productivity of cells was approximately 7 g/l·hr.

Of the three substrates, ethanol was the best for *C. utilis* MG-1 with respect to growth rate, cell yield, oxygen requirement, and heat of fermentation.

微生物菌体生産の炭素源として、生産量、純粋性および水溶性などの点から、メタノール、エタノール、酢酸およびアセトアルデヒドが好ましいと思われる。これらの物質のうち、エタノール、酢酸およびアセトアルデヒドは、従来、糖類を原料とする発酵、あるい

は石油化学によりエチレンから生産されていたが、近年、メタノールからの生産あるいは生産の検討がなされている。^{1,2)}

エタノールを酵母生産の基質として用いた報告は1951年の武富ら³⁾が最初と思われる。その後、十数年

の間報告はみられなかったが、1967年 Hernandez と Johnson⁴⁾ および Johnson,⁵⁾ また1968年 Harada と Hirabayashi,⁶⁾ 大亦ら^{7,8)} および Mor と Fiechter⁹⁾ の報告以来、多くの研究者により報告されている。一方、酢酸を酵母生産の基質として用いた報告は、1961年の小玉¹⁰⁾ の報告が最初と思われる。その後、Sandor ら,¹¹⁾ Macher,^{12,13)} Johnson,^{5,14)} 田淵と阿部¹⁵⁾ および緒方ら¹⁶⁾ により多くの酢酸資化性酵母が報告され、それ以来、多くの研究がみられる。一方、C₂物質としてエタノール、酢酸の他にアセトアルデヒドがあるが、いままでに酵母により資化されたという報告はみられないようである。

エタノール、酢酸資化性酵母として、数多くの菌株が報告されている^{17,18)} が、培養について検討された菌株は意外と少なく、*Candida utilis*,^{4,5,14,19-29)} *Hansenula miso*,⁶⁾ *Saccharomyces cerevisiae*,^{9,30,31)} *Candida tropicalis*,^{32,34)} *Candida methanolica*,³³⁾ *Torulopsis methanolovescens*,³⁸⁾ *Candida intermedia*,³⁴⁾ *Candida lipolytica*,³⁴⁾ *Candida* sp.³⁵⁾ の4属9種のみである。このうち、*Candida utilis*, *Candida methanolica* および *Torulopsis methanolovescens* はエタノール^{4,5,21-29,38)} および酢酸^{4,5,14,19,20,33)} の両基質で検討されているが、*Hansenula miso*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. はエタノールで、また、*Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Candida lipolytica* は酢酸でのみ検討されている。また、完全混合槽での連続培養はエタノールを基質とする *Candida utilis*,²⁵⁾ *Saccharomyces cerevisiae*^{9,30)} および酢酸を基質とする *Candida utilis*^{14,19,20)} が報告され、多段培養槽での連続培養は、エタノールを基質とする *Candida utilis*^{21,22,24,27,29)} が報告されているにすぎない。

著者は1973年以来、日本各地の土壌および水などから多数のエタノールあるいは酢酸資化性酵母を分離した。その分離菌株から、エタノール、酢酸およびアセトアルデヒドを比較的旺盛に資化し、かつ生育温度の高い MG-1 株を選び、その菌学的性質を調べた。さらに、MG-1 株を用いてエタノール、酢酸およびアセトアルデヒドをそれぞれ炭素源とする回分および連続培養を試み、培養特性を検討するとともに、微生物菌体生産用基質としてのこれらの物質の比較を行った。

実 験 方 法

酵母の分離 各地より採取した試料よりエタノールあるいは酢酸資化性酵母を検索するため、エタノール 0.5 wt%あるいは酢酸 0.2 wt%を含む分離用培地 (pH 4.5) 20 ml を 100 ml 容三角フラスコに分注し、これに試料を添加し、37°Cで振とう培養による集積培養を2回くり返した。その後、平板培養を行い、得られたコロニーを斜面培地に移し保存した。なお、基本培地として (NH₄)₂SO₄, 3.0 g; KH₂PO₄, 1.5 g; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g; クエン酸鉄, 30 mg; CaCl₂·2H₂O, 30 mg; MnSO₄·7H₂O, 5 mg; CuSO₄·5H₂O, 0.5 mg; 純水 1,000 ml を用いた。平板培地および斜面培地として分離用培地に寒天 2% を添加したものをを用いた。分離した酵母のうち MG-1 株を以下の実験に用いた。

酵母の同定 分離した酵母の分類学的同定は Lodder らの方法¹⁷⁾ および飯塚らの「酵母の分類同定法」³⁶⁾ を参照して行った。なお、発酵性については Durham 法を用い、硝酸塩の資化性については auxanograph 法を用いた。

Coenzyme Q coenzyme Q タイプの決定は Yamada ら³⁷⁾の方法により行った。

フラスコによる回分培養 回分培養用培地 100 ml を含む 1 l 容三角フラスコで 37°Cで振とう (220 rpm) 培養を行った。回分培養の基本培地として分離用培地と同じものを用い、この培地に各炭素源を加えた。

ミニ・ジャーによる回分培養 回分培養用培地 400 ml を含む 1 l 容ミニ・ジャーを用いて 37°C で通気量 0.5 vvm, かくはん数 800 rpm で通気かくはん培養を行った。培養液中の溶存酸素濃度は 4 ppm 以上になるようにした。なお通気により培養液中のエタノールが蒸散したが、それを 400 ml の冷水に2回通すことにより回収した。なおフラスコおよびミニ・ジャーでの回分培養では、本培養と同じ炭素源の回分培養用培地で前培養した培養液 (定常期、炭素源濃度は 100 ppm 以下) を 2%接種した。

連続培養 Table 1 に示した 3 l の培地を含む 10 l 容ジャーフェーマンターを用いて pH 4.0, 通気量 1~3 vvm, かくはん数 1,000~1,500 rpm の条件で連続培養を行った。なお、培養液中の溶存酸素濃度は 2 ppm 以上になるようにした。種々の希釈率で培養を行い、培養液中に基質が痕跡 (100 ppm 以下) 検

Table 1. Composition of media for continuous culture.

Components	Ethanol 0.5 or 1.0 wt%	Ethanol 2.0 wt%	Ethanol 3.0 wt%	Ethanol 4.0 wt%	Ethanol 5.0 wt%	Ethanol 6.0 wt%
	Acetic acid 1.0 or 2.0 wt%	Acetic acid 4.0 wt%	Acetic acid 6.0 wt%			
	Acetaldehyde 1.0 wt%					
C ₂ H ₅ OH*, CH ₃ COOH* or CH ₃ CHO*						
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g	3.0 g	4.5 g	6.0 g	7.5 g	9.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	1.0 g	1.5 g	2.0 g	2.5 g	3.0 g
FeC ₆ H ₅ O ₇ ·7H ₂ O	0.03 g	0.06 g	0.09 g	0.12 g	0.15 g	0.18 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.03 g	0.06 g	0.09 g	0.12 g	0.15 g	0.18 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5 mg	1.0 mg	1.5 mg	2.0 mg	2.5 mg	3.0 mg
Distilled water	1,000 g	1,000 g	1,000 g	1,000 g	1,000 g	1,000 g
(pH)**	(4.0)	(4.0)	(4.0)	(4.0)	(4.0)	(4.0)

* Ethanol, acetic acid and acetaldehyde were aseptically added to the sterilized media.

** pH was adjusted with 1N HCl or 1N NaOH.

出される希釈率を限界の希釈率 (practical dilution rate, D_p , hr⁻¹) とした。

生育度の測定 フラスコおよびミニ・ジャーによる回分培養での生育度の測定は、光電比色計の610nmにおける吸光度を測定して求めた。また培養液の一定量を12,000 rpmで10分間遠心分離し、1回水洗したのち、105℃で24時間乾燥して秤量し、菌体濃度を求めた。また、菌体濃度および消費された基質濃度から菌体収率を求めた。

エタノール、酢酸およびアセトアルデヒドの定量 TCD型ガスクロマトグラフィーにより測定した。

COD (化学的酸素消費量) の定量 培養上澄液中の有機物の量を知るために、重クロム酸カリウムによる酸素消費量をJISの方法⁴³⁾で測定した。この方法では直鎖脂肪酸化合物、芳香族炭化水素、ピリジンなどの還元性窒素化合物はほとんど分解されず、酸素消費量に含まれない。一方、亜硝酸塩、第一鉄塩、硫化物などの還元性無機物の酸化に要する酸素量は、消費量として含まれるという欠点がある。

菌体成分の分析 菌体中の炭素、酸素、水素含量は島津微量定量分析計UM-3B型を用い、窒素含量は島津微量窒素分析計NA1型を用いて求めた。

粗タンパク含量 菌体中のN含量に6.25を乗じた値を粗タンパク含量とした。

アミノ酸分析およびアミノ酸含量 菌体中のアミノ酸のうちトリプトファンはアルデヒド法⁴⁴⁾で測定し、他のアミノ酸は、日立KLA-5型アミノ酸自動分析計で測定した。アミノ酸含量は18種類のアミノ酸の総和で示した。

核酸含量 菌体中の核酸含量はSchneider法⁴⁵⁾で分析し、冷酸可溶分と高分子核酸区分をRNA量として示し、その和を核酸含量とした。

粗灰分 粗灰分の分析は、東大農芸化学科編「実験農芸化学」⁴⁶⁾によった。

維持係数 (maintenance coefficient) 希釈率と単位菌体当たりの基質の消費速度の関係から、維持係数⁴⁷⁾を求めた。

菌体組成および菌体生成反応式 菌体の元素分析および粗灰分含量から菌体組成を求めた。各基質からの菌体生成反応式は、菌体組成および菌体収率からDarlington⁴⁸⁾およびChen⁴⁴⁾の方法により求めた。

炭素収率、酸素要求量および発酵熱 各基質からの菌体生成反応式を用いて理論的に炭素収率、対基質酸素要求量および発酵熱を求めた。なお、菌体の燃焼熱は、Abbottら⁴⁹⁾のavailable electronの当量数を用いる方法で算出した。

試薬 試薬特級のエタノール(99.5 vol %), 試薬特級の酢酸および関東化学規格特級のアセトアルデヒド

(90 vol %) を、酵母の培養の炭素源として用いた。

結 果

分離菌株の同定 自然界より多数のエタノールおよび酢酸資化性酵母を分離した。その分離菌株のうちエタノール、酢酸およびアセトアルデヒドを旺盛に資化し、かつ、生育温度の高い MG-1 株を選び以下の研究に用いた。

本菌株の分類学的性質を Lodder¹⁷⁾らの“The Yeast, A Taxonomic Study (2版)”と対比した結果、多極出芽によって増殖し、射出胞子を形成せず、細胞は楕円形であり子嚢胞子を形成せず、分裂子を形成せず、telispore を形成せず、カロチノイド色素を生産せず、偽菌糸を形成することから *Candida* 属に属する菌株と考えられる。また、D-グルコース、シュークロースおよびラフィノースを発酵し、D-グルコース、シュークロース、マルトース、ラフィノースおよびイヌリンを資化し、メリビオースおよびエリスリトールを資化せず、硝酸塩を資化することから *Candida utilis* と思われた。

1) MG-1と *C. utilis* CBS 621 との対比試験 MG-1と *C. utilis* の基準株である CBS 621 の菌株について形態学および生理学的性質について対比試験したところ、D-グリシトールの資化性のみ異なっていた。しかし、他の性質はすべて一致した。

2) Coenzyme Q MG-1 株と *C. utilis* CBS 621 の coenzyme Q タイプを調べたところ、両菌株とも coenzyme Q₇ を有していた。*C. utilis* の coenzyme Q タイプが Q₇ であることは、Yamada³⁷⁾ により報告されている。

これらの結果より、MG-1 株を *C. utilis* と同定した。

回分培養

1. 酵母の増殖に及ぼす pH の影響 エタノールを 0.5 wt % 含む回分培養用培地を用い、培養 pH を 2.5, 3.5, および 4.5 に調節しながら回分培養を行い、培養 pH の影響を検討した。培養槽として 1 l 容ミニ・ジャーを用い、培養温度は 37°C とした。その結果、pH 3.5~4.5 が最適であり、比増殖速度約 0.5 hr⁻¹、菌体収率約 75%、粗タンパク含量約 55% が得られた。

2. 酵母の増殖に及ぼす各基質濃度の影響 エタノール、酢酸およびアセトアルデヒド濃度の影響をフ

ラスコ培養で調べた。培養温度は 37°C、初発 pH は 4.5 とした。

(1) エタノール 初発エタノール濃度を 0.15~3.0 wt % として培養を行い、培養開始後 9, 15 時間後の生育度を測定した。最適なエタノール濃度は 0.3 wt % 以下であった。

(2) 酢酸 初発酢酸濃度を 0.025~0.8 wt % として培養を行い、培養開始後 12, 18, 22 時間後の生育度を測定した。最適な酢酸濃度は 0.05 wt % 以下であり、酢酸濃度 0.6 wt % 以上では細胞の生育はみられなかった。

(3) アセトアルデヒド 初発アセトアルデヒド濃度を 0.008~0.125 wt % として培養を行い、世代時間および増殖誘導時間を測定した。比増殖速度は、初発アセトアルデヒド濃度 0.008 wt %, 0.016 wt % および 0.03 wt % で約 0.46 hr⁻¹, 0.063 wt % で約 0.28 hr⁻¹ であり、最適なアセトアルデヒド濃度は 0.03 wt % 以下と思われる。一方、アセトアルデヒド濃度 0.125 wt % では細胞の生育はみられなかった。

エタノールを炭素源とする連続培養

供給エタノール濃度 0.5~6.0 wt % (Table 1)、培養温度 28~44°C、培養 pH 4.0 の条件で種々の希釈率で連続培養を行い、菌体濃度、限界の希釈率 (D_b , hr⁻¹)、培養上澄液中のエタノール濃度および COD、菌体収率、粗タンパク含量、アミノ酸含量、核酸含量、粗灰分含量および菌体の生産性などを検討した。

希釈率の影響 菌体収率および各菌体成分含量に及ぼす希釈率の影響について検討した。供給エタノール濃度 0.5 wt %, 培養温度 37°C の連続培養の結果を Fig. 1 に示した。菌体収率は、限界の希釈率 (D_b = 0.50 hr⁻¹) まで、希釈率の増加とともに若干増加する傾向がみられ、その最大値は約 80% であった。粗タンパク含量は希釈率の増加とともに増加し、54~60% と変化した。しかし、アミノ酸含量はほぼ一定で約 47% であった。一方、核酸含量は希釈率の増加とともに増加し、最高 10 wt % であった。希釈率の増加による粗タンパク含量の増加は、核酸含量の増加によるものと思われる。菌体中の粗灰分含量は希釈率の増加とともに若干増加する傾向がみられた。培養上澄液中の COD は希釈率 0.51 hr⁻¹ まで約 200 ppm であったが、希釈率 0.54 hr⁻¹ 以上で増加した。これは残存するエタノールによるものと思われる。また、維持係数 (m) は、0.03 g ethanol/g dry cell・hr と算出された。

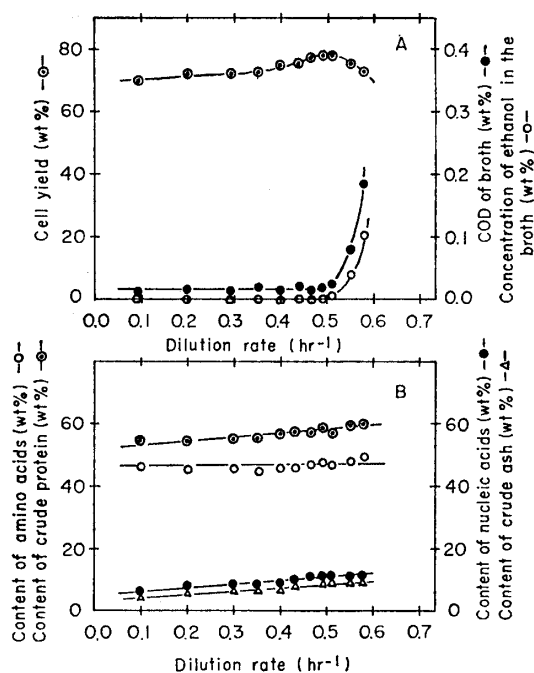


Fig. 1. Continuous culture of *C. utilis* MG-1 with ethanol as carbon source.
(C₂H₅OH : 0.5 wt%, 37°C, pH 4.0)

培養温度の影響 供給エタノール濃度 2 wt%, 培養 pH 4.0, 培養温度 28~44°C で連続培養を行い, 培養温度の影響について検討した. 限界の希釈率 (D_p , hr⁻¹) は, 培養温度 36~38°C で約 0.50 hr⁻¹ であった. この値は回分培養での比増殖速度とほぼ等しい値である. また, 42°C では 0.28 hr⁻¹ と減少し, 44°C では生育しなかった (Fig. 2).

希釈率 0.41 hr⁻¹ の培養における菌体収率, 粗タンパク含量, アミノ酸含量および核酸含量を比較した. 菌体収率は, 32~40°C で最大の値 (約 80%) が得られた. 粗タンパク含量は, 培養温度の上昇とともに減少する傾向がみられた. しかし, アミノ酸含量は 28~38°C でほぼ等しく約 47% であった. 一方, 核酸含量は培養温度の上昇とともに低下し, 28°C で約 13%, 40°C で約 8% であった. 培養温度の上昇による粗タンパク含量の低下は, 核酸含量の低下によるものと思われる.

増殖速度, 菌体収率およびアミノ酸含量の点から, *C. utilis* MG-1 株の最適温度は 36~38°C と思われる.

供給エタノール濃度の影響 供給エタノール濃度 0.5~6.0 wt%, 培養温度 37°C, 培養 pH 4.0 で連続培養を行った. 限界の希釈率 (D_p , hr⁻¹) は, 各供給エタノール濃度でほぼ等しく, 約 0.50 hr⁻¹ であった. また, 菌体収率は, いずれの供給エタノール濃度でも

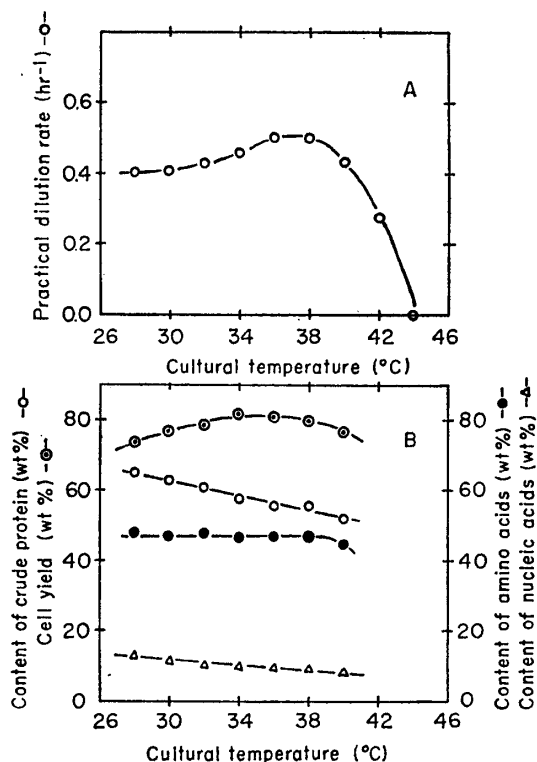


Fig. 2. Effect of cultural temperature on the growth of *C. utilis* MG-1.
(C₂H₅OH : 2.0 wt%, pH 4.0)
B : Dilution rate (hr⁻¹) = 0.41

ほぼ等しく, その最大値は約 75~80% であった. 菌体の生産性は希釈率および供給エタノール濃度に比例して増加し, 供給エタノール濃度 6 wt% の場合, 最高約 24 g/l・hr の値が得られた.

酢酸を炭素源とする連続培養 供給酢酸濃度 1~6 wt% (Table 1), 培養温度 37°C, 培養 pH 4.0 の条件で, 種々の希釈率で連続培養を行い, 菌体濃度, 限界の希釈率 (D_p , hr⁻¹), 培養上澄液中の酢酸濃度および COD, 菌体収率, 粗タンパク含量, アミノ酸含量, 核酸含量, 粗灰分含量および菌体の生産性などを検討した.

希釈率の影響 菌体収率および各菌体成分含量に及ぼす希釈率の影響について検討した. 供給酢酸濃度 1 wt% の培養の結果を Fig. 3 に示した.

菌体収率は, 限界の希釈率 ($D_p = 0.43$ hr⁻¹) まで希釈率の増加とともに若干増加する傾向がみられ, その最大値は約 40% であった. しかし, D_p 以上の希釈率で急激に減少した. 粗タンパク含量は希釈率の増加とともに増加し, 52~59% と変化した. しかし, アミノ酸含量は希釈率 0.16~0.45 hr⁻¹ でほぼ一定であり,

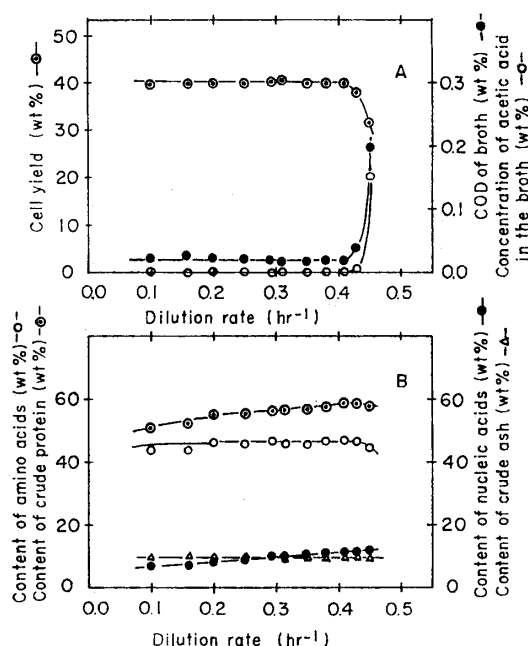


Fig. 3. Continuous culture of *C. utilis* MG-1 with acetic acid as carbon source. (CH_3COOH : 1.0 wt%, 37°C , pH 4.0)

約47%であった。一方、核酸含量は希釈率の増加とともに増加し、希釈率 0.45 hr^{-1} で最大であり、約13%であった。希釈率の増加による粗タンパク含量の増加は、核酸含量の増加によるものと思われる。菌体中の粗灰分含量はほぼ一定で、約10%であった。培養上澄液中の COD は、希釈率 0.43 hr^{-1} 以下で約200~300 ppm を示し、希釈率 0.45 hr^{-1} で急激に増加したが、これは残存する酢酸によるものと思われる。また、維持係数 (m) は、 $0.02 \text{ g acetic acid/g dry cell} \cdot \text{hr}$ と算出された。

供給酢酸濃度の影響 限界の希釈率 (D_b, hr^{-1}) は、供給酢酸濃度の増加とともに減少し、供給酢酸濃度 1 wt % で約 0.43 hr^{-1} 、2 wt % で約 0.38 hr^{-1} 、4 wt % で約 0.32 hr^{-1} 、6 wt % で約 0.30 hr^{-1} であった。菌体収率は、いずれの供給酢酸濃度でもほぼ等しく、その最大値は約40%であった (Fig. 4)。菌体の生産性は各供給酢酸濃度、希釈率に比例して増加したが、その最大値は供給酢酸濃度に比例しては増加しなかった。これは供給酢酸濃度の増加とともに、限界の希釈率 (D_b, hr^{-1}) が低下することによるものである。供給酢酸濃度 6 wt % の場合、最高 $7 \text{ g/l} \cdot \text{hr}$ の値が得られた。

アセトアルデヒドを炭素源とする連続培養 供給アセトアルデヒド濃度 1 wt % (Table 1), 培養温度 37°C , 培養 pH 4.0 で種々の希釈率で連続培養を行っ

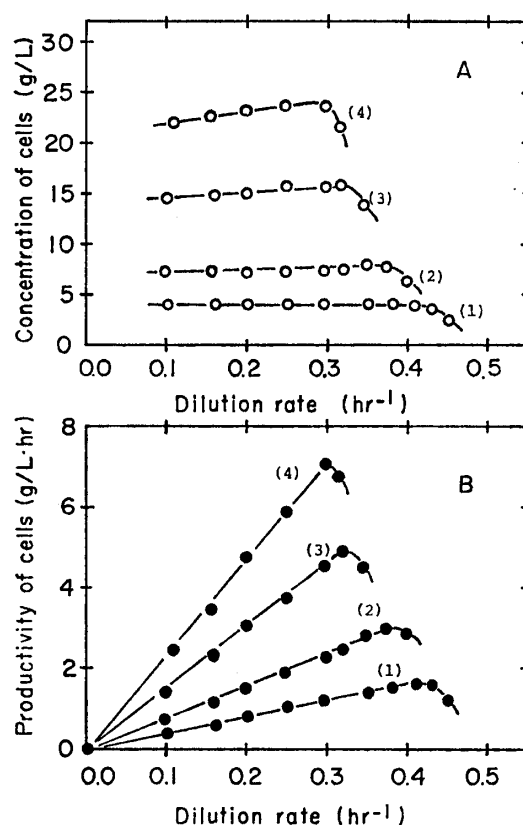


Fig. 4. Concentration and productivity of cells with acetic acid as carbon source. (37°C , pH 4.0)

Concentration of acetic acid :

- (1) 1.0 wt%, (2) 2.0 wt%, (3) 4.0 wt%,
(4) 6.0 wt%

た (Fig. 5)。

希釈率 0.182 hr^{-1} まで培養が可能であったが、希釈率 0.20 hr^{-1} では wash out が起こり培養が不可能であった。この培養上澄液からアセトアルデヒド、エタノールおよび酢酸が検出された。限界の希釈率 (D_b, hr^{-1}) は、回分培養で得られた最大比増殖速度 ($\mu = 0.46 \text{ hr}^{-1}$) に比して著しく低い値である。菌体収率、粗タンパク含量、アミノ酸含量および粗灰分含量とも希釈率 $0.056 \sim 0.156 \text{ hr}^{-1}$ ではほぼ等しく、それぞれ約55%, 約55%, 約47%および約8%であった。一方、核酸含量は希釈率の増加とともに増加する傾向がみられ、最大値は約9%であった。培養上澄液中の COD は、希釈率 0.156 hr^{-1} までは約900~1,000 ppm であったが、希釈率 0.182 hr^{-1} では増大した。これは残存するアセトアルデヒドによるものと思われる。また、維持係数 (m) は、 $0.01 \text{ g acetaldehyde/g dry cell} \cdot \text{hr}$ と算出された。

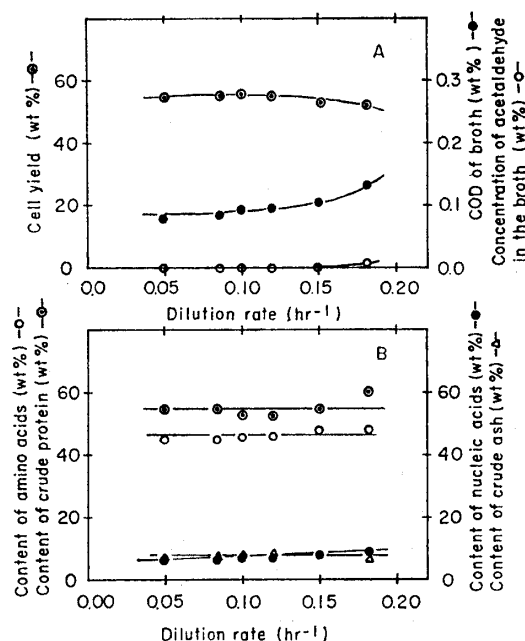


Fig. 5. Continuous culture of *C. utilis* MG-1 with acetaldehyde as carbon source. (CH₃CHO : 1.0 wt %, 37°C, pH 4.0)

***C. utilis* の微生物菌体製造用基質としてのエタノール、酢酸およびアセトアルデヒドの比較** *C. utilis* MG-1 の炭素源としてのエタノール、酢酸およびアセトアルデヒドの比較を増殖速度、菌体収率、アミノ酸含量、アミノ酸組成、炭素収率、酸素要求量および発酵熱の点から行った。

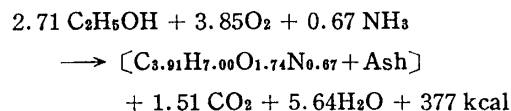
増殖速度、菌体収率、粗タンパク含量、アミノ酸含量、核酸含量および培養上澄液中の有機物含量 各基質を炭素源とした場合の培養結果の比較を、Table 2 に示す。培養上澄液の有機物含量は、菌体当たりの COD (ppm/g・cell) として示した。アミノ酸含量およ

びアミノ酸組成は、いずれの基質でもほぼ等しく、メチオニン以外のアミノ酸組成は FAD(国連食糧農業機構) の規格に合致していた (Table 3)。菌体当たりの培養上澄液中の有機物含量は、エタノール、酢酸ではほぼ等しく、アセトアルデヒドの場合約 2~3 倍の値を示した。増殖速度、菌体収率および培養上澄液中の有機物含量の点から、エタノールが特にすぐれていた。

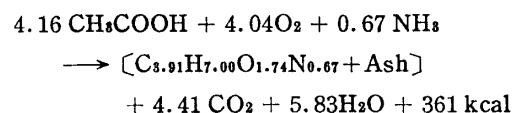
炭素収率、酸素要求量および発酵熱 各基質から菌体生成式を求めるため、*C. utilis* MG-1 株の菌体組成として C_{3.91}H_{7.00}O_{1.74}N_{0.67} + Ash = 100 を用いた。この菌体組成はエタノールを炭素源とし、培養温度 37°C, pH 4.0, 希釈率 0.460 hr⁻¹ で連続培養した菌体の元素分析の結果、(炭素 46.9%, 水素 7.0%, 酸素 27.9%, 窒素 9.3%, 粗灰分 8.9%) から求めたものである。この組成の菌体 100 g の完全燃焼には、4.79 mole の酸素が必要なので、available electron は 19.16 当量となり、この菌体 100 g の燃焼熱は 26.5 × 19.16 = 508 kcal と計算された。

菌体組成、対基質菌体収率および菌体の燃焼熱の値からエタノール、酢酸およびアセトアルデヒドからの菌体の生成式を導いた。

(1) エタノール ($Y_{x/s} \approx 0.80$)



(2) 酢酸 ($Y_{x/s} \approx 0.40$)



(3) アセトアルデヒド ($Y_{x/s} \approx 0.55$)

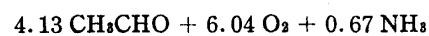


Table 2. Results of continuous culture.

(37°C, pH 4.0)

	Carbon source		
	Ethanol	Acetic acid	Acetaldehyde
Practical dilution rate (hr ⁻¹)	0.50	0.43	0.18
Optimum dilution rate (hr ⁻¹)	0.30~0.50	0.15~0.40	0.05~0.15
Cell yield ($Y_{x/s}$, wt%)	80	40	55
Content of crude protein (wt%)	58	59	55
Content of amino acids (wt%)	47	47	47
Content of nucleic acids (wt%)	~10.5	~11.5	~8.0
COD of broth (ppm/g cell)	30~50	30~50	150~200

Table 3. Composition of cells and of the FAD standard.

Component	Ethanol*		Acetic acid**		Acetaldehyde***		FAD standard
	g/100 g of biomass	g/100 g of protein	g/100 g of biomass	g/100 g of protein	g/100 g of biomass	g/100 g of protein	g/100 g of protein
Crude protein (N×6.25)	57.0		59.0		55.0		
Amino acids	47.0	100.0	47.3	100.0	47.7	100.0	100.0
(Essential amino acids)							
Lysine	3.7	7.9	3.9	8.2	3.4	7.1	4.2
Threonine	2.4	5.1	2.4	5.1	2.6	5.5	2.8
Valine	2.9	6.2	3.0	6.3	3.1	6.5	4.2
Methionine	0.6	1.3	0.6	1.3	0.6	1.3	2.2
Isoleucine	2.4	5.1	3.0	6.3	2.6	5.5	4.2
Leucine	3.6	7.7	3.8	8.0	3.8	8.0	4.8
Phenylalanine	2.2	4.7	2.3	4.9	2.2	4.6	2.8
Tryptophan	0.8	1.7	0.8	1.7	0.8	1.7	1.4
(Non-essential amino acids)							
Alanine	3.2	6.8	2.9	6.1	3.2	6.7	
Arginine	3.0	6.4	3.3	7.0	2.5	5.2	
Aspartic acid	4.5	9.6	4.6	9.7	4.8	10.1	
Cystein	0.4	0.9	0.4	0.8	0.4	0.8	
Glutamic acid	7.7	16.2	7.0	14.9	7.8	16.2	
Glycine	2.5	5.3	2.5	5.3	2.5	5.2	
Histidine	1.1	2.3	1.1	2.3	1.0	2.1	
Proline	2.0	4.3	1.8	3.8	1.9	4.0	
Serine	2.2	4.7	2.2	4.7	2.6	5.5	
Tyrosine	1.8	3.8	1.7	3.6	1.9	4.0	
Nucleic acids	10.2		11.4		8.0		
Crude ash	8.0		10.0		7.8		

* 0.5 wt% ethanol, 37°C, pH 4.0, D=0.476 hr⁻¹** 1.0 wt% acetic acid, 37°C, pH 4.0, D=0.408 hr⁻¹*** 1.0 wt% acetaldehyde, 37°C, pH 4.0, D=0.156 hr⁻¹→ [C_{3.91}H_{7.00}O_{1.74}N_{0.67} + Ash]+ 4.35 CO₂ + 5.77 H₂O + 643 kcal

これらの式より炭素収率, 酸素要求量および発酵熱を理論的に算出した。炭素収率は酢酸, アセトアルデヒドで約47%であったが, エタノールで特に高く, 約72%であった。一方, 酸素要求量はエタノール, 酢酸で約1.2~1.3 g/g・cell であったが, アセトアルデヒドで約1.9 g/g・cell と高い値を示した。また, 発酵熱はエタノール, 酢酸で約3.6~3.8 kcal/g・cell であったが, アセトアルデヒドで約6.4 kcal/g・cell と高い値を示した。酸素要求量および発酵熱の点では, エタ

ノール, 酢酸が好ましく, アセトアルデヒドが特に劣った。また, 炭素収率を加味して考えると, エタノールが特に好ましい基質と思われる (Table 4)。

考 察

Veselov ら⁴⁶⁾ は, 廃糖蜜を炭素源とする *Saccharomyces cerevisiae* の培養において, 培養液中にアセトアルデヒドが生成し, そのアセトアルデヒドが細胞により資化されていることを示している。しかし, アセトアルデヒドのみを炭素源とする培地で酵母が資化す

Table 4. Carbon yield, oxygen requirement, and heat of fermentation when ethanol, acetic acid or acetaldehyde was used as carbon source.

	Carbon source		
	Ethanol	Acetic acid	Acetaldehyde
Carbon yield (wt%)	72	47	47
Oxygen requirement (O ₂ g/g cell)	1.23	1.29	1.93
Heat of fermentation (Kcal/g cell)	3.77	3.61	6.43

るという報告はみられず、本報告が最初と思われる。

連続培養における希釈率と、菌体収率および核酸含量の関係について、Martin ら⁴⁷⁾ および Mor と Fiechter⁹⁾ は菌体収率は希釈率の増加により増加し、ある一定の希釈率以上では再び減少することを、また Mor と Fiechter⁹⁾ は核酸含量は希釈率の増加により増加することを報告している。これらのことは本研究によっても確認された。

分離菌株 *C. utilis* MG-1 株のエタノールを炭素源とする連続培養では、供給エタノール濃度が、0.5～6 wt % でほぼ同一の培養が行われたことから、これ以上の供給濃度でも培養が可能であり、微生物菌体の工業的生産は容易に行えると思われる。一方、酢酸を炭素源とする連続培養では、供給酢酸濃度が増加するにしたがい、限界の希釈率が低下したが、これは、本菌株が酢酸に対して耐性が低いためであり、これは培養槽への培地の供給方法の改良あるいは酢酸に対して耐性の強い酵母を用いることにより解決されるものと思われる。また、アセトアルデヒドを炭素源とした場合も、アセトアルデヒドに対する耐性が非常に低いため、供給濃度の増加により、限界の希釈率がさらに低下し、菌体の生産性が著しく低下すると思われるので、炭素源としてアセトアルデヒドを用いるためには、アセトアルデヒドに対してより耐性のある菌株をスクリーニングする必要があると思われる。

C. utilis MG-1株は、今まで^{4,19,21)}に報告されているエタノールあるいは酢酸資化性酵母よりも、生育温度、生育速度、菌体収率、粗タンパク含量、菌体の生産性の点において優れており、微生物菌体生産用酵母として特に好ましいと思われる。Abbott と Clamen⁴⁸⁾ は、微生物菌体生産において、維持係数(maintenance coefficient)は、経済的に非常に重要であり、この値が小さい菌株が好ましいことを報告し、Edward ら²⁰⁾ は、酢酸を炭素源とした場合の *C. utilis* ATCC 9226 の維持係数は 0.17 g acetic acid/g dry cell·hr であ

ることを報告している。*C. utilis* MG-1のエタノール、酢酸あるいはアセトアルデヒドを炭素源とした場合の維持係数は、約0.01～0.03 g·substrate/g dry cell·hr と低い値であり、この点からも本菌株は、微生物菌体生産用酵母として優れていることがわかる。また、この菌株の炭素源として、生育速度、菌体収率、菌体の生産性、培養上澄液中の有機物含量および理論的に算出した炭素収率、酸素要求量、発酵熱の点から、特にエタノールが優れていた。

要 約

1. 土壌より分離したエタノール、酢酸およびアセトアルデヒド資化性酵母 MG-1 株は形態学的性質、生理学的性質および Coenzyme Q タイプから *Candida utilis* と同定された。
2. エタノールを炭素源とする回分および連続培養を行い、最適 pH および最適温度を検討したところ、最適 pH は3.5～4.5、最適温度は36～38℃であった。
3. 供給エタノール濃度 0.5～6.0 wt % で連続培養を行ったところ、各供給エタノール濃度でほぼ同一の結果——限界の希釈率約 0.50 hr⁻¹、菌体収率約75～80%、粗タンパク含量約57%、アミノ酸含量約47%——を得た。また、菌体の生産性は供給エタノール濃度および希釈率にほぼ比例して増加し、供給エタノール濃度 6 wt % の場合、最高 24 g/l·hr の値が得られた。
4. 供給酢酸濃度 1.0～6.0 wt % で連続培養を行ったところ、限界の希釈率は供給酢酸濃度が増加するにしたがい低下し、供給酢酸濃度 1 wt % で約 0.43 hr⁻¹、6 wt % で約 0.30 hr⁻¹ であった。しかし、菌体収率、粗タンパク含量、アミノ酸含量はいずれの供給濃度でもほぼ等しく、それぞれ約40%、約58%、約47%であった。菌体の生産性は供給酢酸濃度および希釈率の増加に比例して増加したが、その最大値は供給濃度に比例しては増加せず、供給酢酸濃度 6 wt % の場合約 7 g/

1・hrであった。

5. 供給アセトアルデヒド濃度 1 wt % で連続培養を行ったところ、限界の希釈率は約 0.18 hr^{-1} 、菌体収率約55%、粗タンパク含量約55%、アミノ酸含量約47%であった。限界の希釈率は、回分培養で得られた最大の比増殖速度（約 0.46 hr^{-1} ）に比べて著しく低い値であった。

6. *C. utilis* MG-1 株の微生物菌体生産用の炭素源としてのエタノール、酢酸およびアセトアルデヒドの比較を生育速度、菌体収率、培養上澄液中の有機物含量および理論的に算出した炭素収率、酸素要求量発酵熱の点から比較したところ、いずれの点からもエタノールが特に優れていた。

終わりに、本研究の遂行にあたり、ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました岐阜大学工学部倉石迪夫教授（前三菱瓦斯化学新潟研究所長）に心から感謝いたします。

文 献

- 1) 紫垣：石油誌，**20**，388 (1977)。
- 2) 溝呂木：触媒，**19**，90 (1977)。
- 3) 武富，鈴木，田中：工業化学雑誌，**54**，641 (1951)。
- 4) Hernandez, E., Johnson, M. J. : *J. Bacteriol.*, **94**, 996 (1967)。
- 5) Johnson, M. J. : *Science*, **155**, 1515 (1967)。
- 6) Harada, T., Hirabayashi, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1175 (1968)。
- 7) 大亦，村尾，寺島：醸協，**26**，313 (1968)。
- 8) 大亦，村尾，寺島：醸協，**26**，317 (1968)。
- 9) Mor, J., Fiechter, A. : *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 159 (1968)。
- 10) 小玉：醸協，**22**，491 (1964)。
- 11) Sandor, J., Toth, M., Hollo, J. : *Szeszpar*, **14**, 47 (1966)。
- 12) Macher, L. : *Die Alkohol-Industrie*, **79**, 14 (1966)。
- 13) Macher, L. : *Die Alkohol-Industrie*, **79**, 51 (1966)。
- 14) Johnson, M. J. : *J. Bacteriol.*, **94**, 101 (1967)。
- 15) 田淵，阿部：農化，**43**，154 (1969)。
- 16) 緒方，西川，大杉：醸工，**48**，478 (1970)。
- 17) Lodder, J. (ed) : *The Yeasts, A Taxonomic Study, 2nd Ed.*, North-Holland Publ. Co., Amsterdam (1970)。
- 18) Wikerham, L. J., Burton, K. A. : *J. Bacteriol.*, **56**, 363 (1948)。
- 19) Cama, F. J., Edwards, V. H. : *J. Ferment. Technol.*, **48**, 787 (1970)。
- 20) Edwards, V. H., Gottschalk, M. J., Noojin, A. Y., Tuthili III, L. B., Tannahill, A. L. : *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 975 (1970)。
- 21) Goto, S., Kitai, A., Ozaki, A. : *J. Ferment. Technol.*, **51**, 582 (1973)。
- 22) Páca, J., Grégr, V. : *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 539 (1977)。
- 23) Prokop, A., Votruba, T., Sobotka, M., Panos, J. : *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1523 (1978)。
- 24) Páca, J., Grégr, V. : *J. Ferment. Technol.*, **57**, 227 (1979)。
- 25) Lirova, S. A., Andreyeva, E. A. : *Appl. Biochem. Microbiol.*, **15**, 508 (1979)。
- 26) Watteuw, C. M., Armiger, W. B., Ristroph, D. L., Humphrey, A. E. : *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1221 (1979)。
- 27) Páca, J., Grégr, V. : *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1809 (1979)。
- 28) Páca, J., Grégr, V. : *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1827 (1979)。
- 29) Páca, J., Grégr, V. : *Enzyme Microb. Technol.*, **1**, 103 (1979)。
- 30) Nagai, S., Nishizawa, Y., Aiba, S. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 221 (1973)。
- 31) Beker, M. E., Damberg, B. É., Popova, M. V., Auzinya, P. P., Upit, A. A., Krauze, I. Ya. : *Appl. Biochem. Microbiol.*, **13**, 275 (1977)。
- 32) Gallo, M., Azoulay, E. : *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1705 (1975)。
- 33) Goto, S., Okamoto, R., Kuwajima, T. : *J. Ferment. Technol.*, **54**, 213 (1976)。
- 34) Maric, V., Einsele, A., Fiechter, A. : *Eur. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 157 (1979)。
- 35) Matsumura, M., Kobayashi, J. : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 525 (1980)。
- 36) 飯塚，後藤：酵母の分類同定法，東京大学出版会 (1977)。
- 37) Yamada, Y., Kondo, K. : *Proc. II Intern'l Specialized Symp. Yeasts*, Tokyo, 63 (1972)。

- 38) 日本工業規格“工場排水試験法 JISKO 102”, p. 29 (1974).
39) 京大・農・食品工学教室編：食品工学実験書, p. 382, 養堅堂 (1970).
40) Schneider, W. C. : *J. Biol. Chem.*, **164**, 747 (1946).
41) 東大農芸化学科編：実験農芸化学, p. 566, 朝倉書店 (1969).
42) Pirt, S. J. : *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.*, **163**, 224 (1965).
43) Darlington, W. D. : *Biotechnol. Bioeng.*, **6**, 241 (1964).
44) Chen, S. L. : *Nature*, **202**, 1135 (1964).
45) Abott, B. J., Clamen, A. : *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 117 (1973).
46) Veslov, I. Ya., Zahra, M. K., Gadlieva, L. A., Uvarov, I. P. : *Appl. Biochem. Microbiol.*, **10**, 24 (1974).
47) Martin, E. J. : *Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 433 (1966).
- (昭56. 6. 12 受付)