

〔醸酵工学 第65巻 第3号 169-177. 1987〕

凝集性酵母の育種と育種株の発酵特性

浅野 慎一・久安 智香・山抱 基純・森村 茂
岸本眞希男・木田 建次

株式会社日立造船技術研究所

Construction of flocculating yeasts and characteristics of ethanol fermentation of a constructed strain. SHINICHI ASANO, CHIKA HISAYASU, MOTOZUMI YAMADAKI, SHIGERU MORIMURA, MAKIO KISHIMOTO, and KENJI KIDA (*Hitach Zosen Technical Research Laboratory, Inc., 1-3-22 Sakurajima, Konohana-ku, Osaka 554, Japan*) *Hakkokogaku* 65: 169-177. 1987.

To achieve high ethanol production using molasses as a raw material, we tried to construct flocculating yeasts from non-flocculating yeasts.

An auxotrophic mutant, HM 1, with flocculating ability derived from a non-flocculating yeast, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0224, was hybridized by protoplast fusion with an auxotrophic mutant, HM 2, of another non-flocculating yeast, *S. cerevisiae* EP 1. The fusant HF 1 showed not only good flocculation but also good ethanol production, as much as the parental strains.

About 40% of fusants which showed good flocculation dispersed the flocculation during subcultures. But the flocculation of strains isolated from spores of good flocculating fusants remained stable, and good flocculating strains were isolated from spores of flocculating fusants with a high frequency of 60 to 80%.

To enhance the flocculation of HS 1 which was isolated from spores of HF 1, an auxotrophic mutant, HM 4, of HS 1 was hybridized by protoplast fusion with an auxotrophic mutant, HM 3, of *S. cerevisiae* IFO 1953 which showed excellent flocculation.

To construct good ethanol-tolerant strains, the fusant HF 2 between HM 3 and HM 4 was acclimated by repeating batch fermentation with molasses medium containing 22 w/v% total sugar at 33°C and pH 5.0. The acclimatant HA 2 produced 95 g/l ethanol from molasses medium containing 25 w/v% total sugar at 35°C and pH 5.0.

HA 2 was tested in batch fermentation for the effects of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration, pH, temperature, and initial sugar concentration on ethanol production in molasses medium.

燃料用アルコールのように大量生産を必要とするプロセスを実用化していくためには、生産性および発酵収率の向上は勿論であるが、プロセスの単純化も重要な要素である。凝集性酵母法は、菌体循環法や固定化酵母法などのように固液分離や固定化プロセスを設ける必要がなく、最も単純なプロセスで発酵槽内に酵母を高濃度に保持することができる。そこで前報¹⁾で既に報告したように、燃料用アルコール生産プロセスとして凝集性酵母による連続発酵法を採用し検討した結

果、ラボスケールの連続発酵試験で高いエタノール生産性が容易に得られたが、ベンチスケールの連続発酵試験では凝集性が低下する現象がみられた。また、廃糖蜜を迅速に発酵する非凝集性酵母に比べ、凝集性を有するビール酵母 IFO 2018 株は耐塩性がなく、発酵速度も遅いなどの問題点も明らかになった。

廃糖蜜を用いた凝集性酵母による連続発酵法を確立するためには、廃糖蜜を迅速に発酵し、しかも凝集性が優れた酵母の取得が不可欠である。凝集性酵母の取得方法としては、自然界からのスクリーニングや非凝集性酵母から変異処理、接合およびプロトプラスト融

凝集性酵母によるエタノール生産 (第2報)
Ethanol production by flocculating yeast

合などを用いた凝集性酵母の育種などが考えられる。

本研究では、廃糖蜜を迅速に発酵する非凝集性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0224 株と *S. cerevisiae* EPn 1 株²⁾を用い、Ethyl methane sulfonate による変異処理およびプロトプラスト融合による凝集性酵母の育種を試みた。また、凝集性を強めるために凝集性酵母 *S. cerevisiae* IFO 1953株と再度プロトプラスト融合を行い、さらに得られた融合株にアルコール耐性を付与するために、糖蜜培地を用いた回分発酵を繰り返すことにより馴養を行った。その結果、糖蜜培地による回分発酵試験において非凝集性酵母に比べ発酵速度は少し劣るが、生成エタノール濃度がより高い凝集性酵母を育種することができたので報告する。

実験材料および方法

使用菌株 野生型株の非凝集性酵母として IFO 0224株および EP1 株、凝集性酵母として IFO 1953株

をそれぞれ用いた。これらの親株から変異処理により得た栄養要求性変異株 HM 1 株, HM 2 株, HM 3 株および HM 4 株をプロトプラスト融合に使用した。また、融合株 HF 1 株および HF 2 株をそれぞれ胞子形成させて得た胞子由来株 HS 1 株および HS 2 株を用いて繰り返し回分発酵による馴養を行った (Table 1 参照)。

使用培地 前培養培地として酵母エキス (和光純薬) 10 g/l, ポリペプトン (和光純薬) 20 g/l, グルコース 20 g/l からなる YPD 培地を用いた。回分発酵試験には全糖濃度 (total sugar, 以後 T. S. とする) として 15, 22 および 25 w/v% に調製した無蒸煮の糖蜜培地 (以後、それぞれを T. S. 15, T. S. 22 および T. S. 25% 糖蜜培地とする) を用い、窒素源として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を廃糖蜜重量に対し 1 w/w%, 防腐剤として $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ を 0.2 g/l それぞれ添加した。使用した廃糖蜜はフィリピン産で T. S. 15, T. S. 22 および

Table 1. Strains of *S. cerevisiae* used in this study.

Strain	Phenotype	Spore formation (%)	Degree of flocculation ^a	Remarks
IFO 0224	Wild type	25.6	0	
EP 1	Wild type	27.7	0	strain used in alcohol plants in Philippines
IFO 1953	Wild type	4.17	5	
HM 1	Ade ⁻ , His ⁻	NT ^b	4	mutant derived from IFO 0224
HM 2	Ile ⁻ , Val ⁻	NT	0	mutant derived from EP 1
HM 3	Leu ⁻	NT	5	mutant derived from IFO 1953
HF 1	Wild type	NT	5	fusant between HM 1 and HM 2
HS 1	Wild type	14.3	5	strain isolated from spores of HF 1
HM 4	Ade ⁻	NT	5	mutant derived from HS 1
HF 2	Wild type	NT	5	fusant between HM 3 and HM 4
HS 2	Wild type	13.4	5	strain isolated from spores of HF 2
HA 1	Wild type	NT	5	strain acclimated from HS 1
HA 2	Wild type	43.1	5	strain acclimated from HS 2

^a Degree of flocculation (DF)⁶⁾: DF 5, extremely flocculent; DF 4, very flocculent; DF 3, moderately flocculent; DF 2, weakly flocculent; DF 1, very weakly flocculent; DF 0, non-flocculent.

^b Not tested.

T.S. 25% 糖蜜培地では、それぞれ 280, 410 および 470 g/l の廃糖蜜を添加した。孢子形成培地として酢酸ナトリウム 5 g/l, 寒天 20 g/l からなる培地を用い、YPD 寒天培地として YPD 培地に寒天 20 g/l を添加したものを用いた。最少培地としてはグルコース 20 g/l Yeast nitrogen base w/o amino acids (Difco) 10 g/l, 寒天 20 g/l からなる培地を用いた。プロトプラスト融合実験では、再生培地として酵母エキス 5 g/l, ポリペプトン 10 g/l, グルコース 20 g/l, KCl 45 g/l, 寒天 20 g/l からなる培地を用い、選択培地として最少培地に KCl 45 g/l を添加したものを用いた。また、重層培地として選択培地の寒天 20 g/l を Bacto-agar (Difco) 30 g/l に変えたものを用いた。

Ethyl methane sulfonate による変異処理

供試菌株を孢子形成培地に 1 白金耳塗抹し、30°C で 7 日間培養して孢子を形成させた。得られた子のうを大島、高野³⁾の方法に準じ Ethyl methane sulfonate (以後、EMS とする) で処理した。子のう懸濁液 (10^7 asci/ml) を 5 mg/ml ザイモリアーゼ (Zymolyase 20T, 生化学工業) 溶液で処理後、3 v/v% EMS (関東化学) で 30°C, 2 時間処理した。氷水中で 3 分間超音波処理 (超音波ホモジナイザー, US-150, 7φ チップ, 日本精機) 後、孢子懸濁液を 10^{-2} , 10^{-3} に希釈し YPD 寒天培地に塗抹して 30°C で 48 時間培養した。同寒天培地上に生じたコロニーを最少培地にレプリカし、30°C で 4 日間培養後、非増殖コロニーを選択し、その栄養要求性を調べた。

プロトプラスト融合 2 種類の栄養要求性変異株を用い、有馬、高野⁴⁾の方法に準じプロトプラスト融合を行った。2 種類の栄養要求性変異株をそれぞれ YPD 培地で 30°C, 16 時間振とう培養後、両菌懸濁液 (10^8 cells/ml) を 0.25 mg/ml ザイモリアーゼ溶液で 30°C, 60 分間処理してプロトプラストを調製した。両プロトプラスト懸濁液を等量ずつ混合後、30 w/v% Polyethylene glycol 6000 (キシダ化学) 溶液で 30°C, 15 分間処理した。処理液を 10^{-4} , 10^{-5} および 10^0 , 10^{-1} に希釈し、それぞれ再生培地および選択培地に塗抹後、重層培地で重層した。30°C で 2~4 日間培養し、選択培地に生じたコロニーを融合株として分離した。

孢子由来株の分離 取得した融合株を前述の方法で孢子形成させ、得られた子のうを坂井⁵⁾の方法に準じ熱処理した。子のう懸濁液 (10^7 asci/ml) を 60°C で 20 分間処理後、超音波処理し孢子懸濁液を 10^{-3} , 10^{-4} に希釈して YPD 寒天培地に塗抹した。30°C で 48 時

間培養後、同寒天培地上に生じたコロニーを孢子由来株として分離した。

凝集性の評価 供試菌株を YPD 培地 10 ml に 1 白金耳植菌し、30°C で 16 時間振とう培養後、Gilliland⁶⁾の方法に準じ目視により凝集性の度を調べ、最も凝集性の良いものを Degree of flocculation (以後、DF とする) 5, 非凝集性のものを DF0 として 6 段階で評価した。また、DF5 の菌株間における凝集性の強さを比較するために菌懸濁液をプロテアーゼで処理し、処理後の DF 値を測定した。すなわち DF5 の菌株を YPD 培地 10 ml で同様に培養後、10 分間静置して上澄液 9 ml を除去し、pH 5.5 の 1/30 M リン酸緩衝液 9 ml と 1 mg/ml プロテアーゼ (Pronase E, Sigma) 溶液 1 ml を添加して、30°C で処理し経時的に DF 値を測定した。

回分発酵試験による発酵能の評価 供試菌株を YPD 培地で上述の方法に従い前培養し、培養液 10 ml を T.S. 15% 糖蜜培地 90 ml に植菌後、30°C で前報¹⁾に記載した間欠かく拌による回分発酵試験を行い、24, 48 時間培養後のエタノール濃度を測定し発酵能を評価した。

馴養によるアルコール耐性の付与 上述の回分発酵試験において優れた発酵能を有する菌株を用いて、ジャーフェメンターによる繰り返し回分発酵を行うことにより、アルコール耐性の付与を試みた。繰り返し回分発酵は、空殺菌した 2 l 容ジャーフェメンターに前培養液 100 ml と T.S. 22% 糖蜜培地 900 ml を加え、33°C, 150 rpm の条件で 24 時間培養後、5 分間静置し、上部発酵液 700 ml を引き抜いて新たに T.S. 22% 糖蜜培地 700 ml を加え、同条件で再度回分発酵を行った。10 回同操作を繰り返した後、菌懸濁液を YPD 寒天培地に塗抹し、30°C で 2 日間培養した。同寒天培地上に生じた大きいコロニーを数株分離し、ジャーフェメンターを用いて回分発酵試験を行い、発酵速度および生成エタノール濃度を調べた。回分発酵試験は、前培養液 100 ml を T.S. 25% 糖蜜培地 900 ml に加え、35°C, 150 rpm の条件で 96 時間培養した。

馴養株の発酵特性 繰り返し回分発酵により選択した馴養株の発酵特性を、前述の方法に従いジャーフェメンターを用いて主に 35°C で 60~96 時間回分発酵試験を行い調べた。

1) 窒素源としての硫酸濃度の影響 窒素源として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0, 1.0, 2.5 および 5.0 g/l 含む T.S. 25% 糖蜜培地を用い、経時的にエタノール濃度を測定

し硫酸濃度の影響を調べた。

2) 培地 pH の影響 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/l 含む T. S. 25%糖蜜培地の pH を濃硫酸で4.0, 4.5および5.0 (無添加) に調整し, 各培地を用いて発酵試験を行い経時的にエタノール濃度を測定し, 培地 pH の影響を調べた。

3) 発酵温度の影響 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/l 含む pH 無調整 (pH 5.0) の T.S. 25%糖蜜培地を用いて, 30, 33, 35および 37°C で各々発酵試験を行い経時的にエタノール濃度を測定し, また, 培養24, 96時間後の総菌数および生菌数を測定し発酵温度の影響を調べた。

4) 初発糖濃度の影響 pH 無調整 T.S. 20, 22 および25%糖蜜培地にそれぞれ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を糖蜜重量に対し 0.5 w/w% になるように加え, 各培地を用いて発酵試験を行い経時的にエタノール濃度を測定し, また, 培養24, 48時間後の総菌数および生菌数を測定し, 初発糖濃度の影響を調べた。

分析方法 エタノールおよび全糖濃度の分析は前報¹⁾に記載した方法で行った。総菌数は, 菌懸濁液 1 ml に等量の 1N HCl 溶液を添加して凝集菌体を分散させた後, 無菌水で 10^{-1} , 10^{-2} に希釈し, ヘマチトメーターを用いて計数し求めた。また, 生菌数は菌懸濁液を無菌水で 10^{-4} ~ 10^{-7} に希釈し, YPD 寒天培地に塗抹して 30°C, 2日間培養後, 同寒天培地上に生じたコロニーを計数し求めた。

実験結果および考察

非凝集性酵母からの凝集性酵母の育種 糖蜜を迅速に発酵する非凝集性酵母から凝集性酵母を造成するために, Fig. 1 に示す手順で変異処理およびプロトプラスト融合による育種法を検討した。

1) 変異処理による凝集性の発現 非凝集性酵母 IFO 0224株を孢子形成後 EMS で変異処理し, 25株の栄養要求性変異株を得たところ, その1株 HM1 株がアデニンおよびヒスチジン要求性を示すとともに凝集性 (DF 4) を示した。しかし, 回分発酵試験を行ったところ, HM1 株は Table 2 に示すように親株である IFO 0224株 (発酵速度 2.21 g/l・h, 生成エタノール濃度 55.4 g/l) に比べて発酵速度で17%, 生成エタノール濃度で約 7 g/l 低下した。なお, 発酵速度は培養24時間後のエタノール濃度から1時間当たりの平均生成エタノール量を算出した値である。

2) プロトプラスト融合による育種 HM1 株の

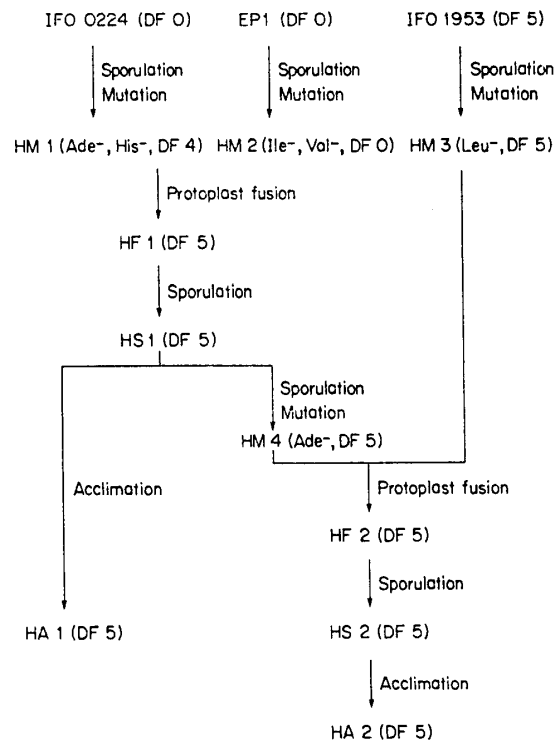


Fig. 1. Pedigree of the strains used.

DF means degree of flocculation (see Table 1).

発酵能を高めるために, Fig. 1 に示したように HM1 株と EP1 株由来の栄養要求性変異株 HM2 株 (Ile⁻, Val⁻, DF0) とのプロトプラスト融合を行い, 取得した22株の融合株を用いて回分発酵試験を行ったところ, Table 2 に示したように, 融合株 HF1 株は両親株である IFO0224 株や EP1 株と比べても発酵速度および生成エタノール濃度において遜色のない値 (それぞれ 2.29 g/l・h, 55.2 g/l) を示し, しかも凝集性が DF5 と HM1 株より優れていた。

凝集性の消失現象と凝集性の安定化 しかし, 融合株 HF1 株を継代培養したところ, 凝集性が低下または消失する現象がみられたので凝集性を安定化させる方法を検討した。

1) 凝集性の消失 22株の融合株の中で DF5 の凝集性を示した18株について YPD 寒天培地を用い継代培養したところ, 7株で凝集性の低下または消失がみられた。その一例を Fig. 2 に示したが, HF1 株は6回の植え継ぎで凝集性が消失した。凝集性遺伝子 *FLO* は染色体上にあり,⁷⁻¹³⁾ また, プロトプラスト融合体の中には両親核がヘテロカリオンの状態で存在するため遺伝的に不安定で, 両親核のどちらか一方が脱落しやすい¹⁴⁾ ことが報告されている。従って, 凝集性

Table 2. Comparison of ethanol production among parental strains, auxotrophic mutants, and fusant.

Strain	Degree of flocculation ^a	Ethanol concn. (g/l)		Fermentation rate ^b (g/l·h)
		24 h	48 h	
IFO 0224	0	53.1	55.4	2.21
EP 1	0	52.8	55.2	2.20
HM 1	4	44.2	48.3	1.84
HM 2	0	49.1	51.1	2.05
HF 1 ^c	5	54.9	55.2	2.29

Ethanol production was tested in a batch culture with molasses per medium containing 15 w/v% total sugar at 30°C and pH 5.0.

^a Degree of flocculation is the same as in Table 1.

^b Fermentation rate is defined as the average value of ethanol produced per hour during 24-h fermentation.

^c HF 1 was one of the fusants between HM 1 and HM 2 (See Fig. 1).

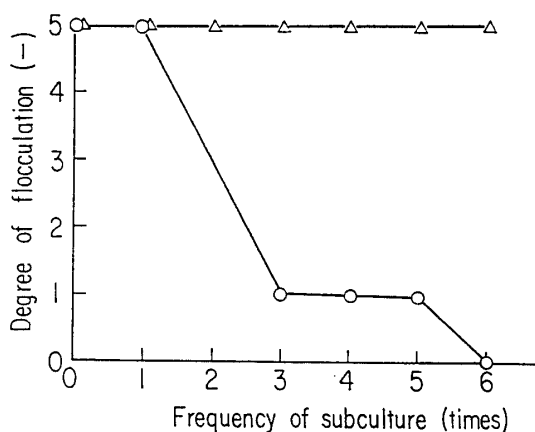


Fig. 2. Comparison of the stability of flocculation between HF 1 and HS 1 during subcultures. HF 1 is one of the fusants constructed by protoplast fusion between HM 1 and HM 2 (see Fig. 1).

HS 1 is one of the strains isolated from spores of HF 1 (see Fig. 1).

○, HF 1; △, HS 1.

の消失した株は、両親 (HM1 株および HM2 株) 核がシンカリオンではなくヘテロカリオンの状態で存在したため、継代培養を繰り返す間に HM1 株 (DF4) 由来の核が脱落したと推察される。

2) 凝集性の安定化 凝集性が消失する前の HF1 株を孢子形成させて得た DF5 の凝集性を示す孢子由来株14株を用いて同様に継代培養したところ、Fig. 2 に示したように、6 回以上植え継ぎを繰り返しても、すべての株の凝集性は安定に保持されていた。また、それぞれ DF3, DF4 の凝集性を示す融合株 HF3 株および HF4 株を孢子形成させたところ、Table 3 に示すように、それぞれ60および80%の高い頻度で DF5 の株を分離した。これは孢子形成に伴う減数分裂により FLO 遺伝子群⁷⁻¹³⁾の組み換えが起こった結果、DF 値 (表現型) に分離 (segregation) が生じたためと推察される。

融合株 HF1 株, HF3 株および HF4 株を、それぞれ孢子形成させて得た DF5 の孢子由来株14株、12株お

Table 3. Degree of flocculation of strains isolated from spores of fusants.

Strain	Degree of flocculation ^a						Frequency ^b (%)
	0	1	2	3	4	5	
HF 3 ^c	6	1	0	0	1	12	60
HF 4 ^c	0	4	1	0	1	24	80

^a Degree of flocculation is the same as in Table 1.

^b Frequency is defined as the ratio of DF 5 strains to all strains isolated from spores of fusants.

^c HF 3 (DF 3) and HF 4 (DF 4) were fusants between HM 1 and HM 2.

Table 4. Comparison of ethanol production between fusants and strains isolated from spores of fusants.

Strain	Degree of flocculation ^a	Ethanol concn. (g/l)		Fermentation rate ^b (g/l·h)
		24 h	48 h	
HF 1	5	55.2	56.0	2.30
HF 3	3	47.7	48.3	1.99
HF 4	4	43.8	51.5	1.83
HS 1 ^c	5	53.1	57.5	2.21
HS 3 ^c	5	52.8	54.5	2.20
HS 4 ^c	5	52.5	55.3	2.19

Ethanol production was tested as described in Table 2.

^a Degree of flocculation is defined in Table 1.

^b Fermentation rate is defined in Table 2.

^c HS 1, HS 3, and HS 4 were strains isolated from spores of fusants HF 1, HF 3, and HF 4, respectively.

よび24株を用いて回分発酵試験を行い、それぞれ発酵能が優れた HS1 株, HS3 株および HS4 株の結果を Table 4 に示した. Table 4 には HF1 株, HF3 株および HF4 株の回分発酵試験の結果も示したが, HS3 株および HS4 株はそれぞれ HF3 株および HF4 株に比べ、凝集性だけでなく発酵能も向上した. なお, HS1 株, HS3 株および HS4 株は、いずれも野生型株であった.

高凝集性酵母の育種 前報¹⁾で報告した連続発酵期間中における凝集性の低下を防ぐために, HS1 株の凝集性の強化を試みた. DF5 の凝集性を示す保有株を用いてプロテアーゼ処理を行い凝集性の強さを評価したところ, IFO1953 株だけは Fig. 3 に示すように、9 時間プロテアーゼで処理しても DF 値が低下せず、最も凝集性が強い株と推察される. また、前報¹⁾で使用した IFO2018 株 (DF5) は9時間のプロテアーゼ処理で DF 値が2に低下し、同条件で DF 値が3に低下した HS1 株よりも凝集性が弱いと推定される. 上記の結果より, HS1 株の凝集性を強化させるために, HS1 株と IFO1953 株のそれぞれの栄養要求性変異株 HM4 株 (Ade⁻, DF5) および HM3 株 (Leu⁻, DF5) を用いてプロトプラスト融合を行った. DF5の凝集性を示す8株の融合株を用いてプロテアーゼ処理を行ったところ, Fig. 3 に示すように8株とも同一の経時変化を示し、9時間の処理で DF 値が4に低下した. この結果より、8株の融合株の凝集性は IFO1953 株(9時間処理で DF5)と HS1 株(同条件で DF3)の中間の強さであると推察される. この8株の融合株を用

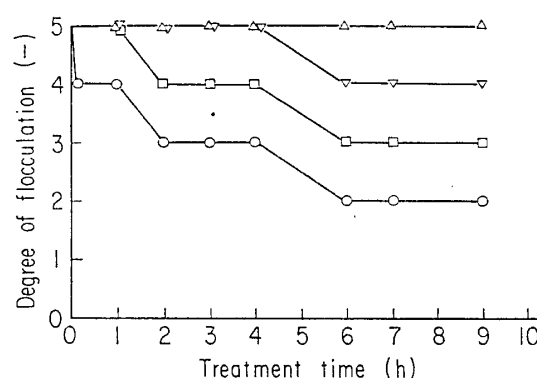


Fig. 3. Reduction of flocculation by treatment with protease. Protease treatment was as follows: 9 ml of 1/30 M phosphate buffer (pH 5.5) and 1 ml of 1 mg/ml protease solution were added to 1 ml of cell suspensions and shaken at 30°C. HF 2 is one of the fusants constructed by protoplast fusion between HM 3 and HM 4 (see Fig. 1). ○, IFO 2018; △, IFO 1953; □, HS 1; ▽, HF 2.

いて回分発酵試験を行い、発酵能が優れた HF2 株 (DF5) を選択した. さらに, HF2 株を孢子形成させて得た31株の孢子由来株の中で発酵能が優れ、強い凝集性を示した HS2 株 (DF5) を選択した (Table 5 参照).

馴養によるアルコール耐性の付与 酵母にアルコール耐性を付与するために、原ら¹⁵⁾は緩衝液にエタノールを添加して培養を繰り返す回分発酵法を検討し、また、Brown, Oliver¹⁶⁾は供給培地にエタノールを添加し、培地中のエタノール濃度を漸次増加させていく連

Table 5. Comparison of ethanol production among parental strains, strains isolated from spores, and acclimated strains.

Strain	Degree of flocculation ^a	Ethanol concn. (g/l)				Fermentation rate ^b (g/l·h)
		24 h	48 h	72 h	96 h	
IFO 0224	0	87.5	87.9	92.8	91.6	3.65
EP 1	0	83.0	84.1	90.5	88.9	3.46
IFO 1953	5	33.4	60.3	78.4	79.1	1.39
HS 1 ^c	5	48.2	76.5	83.3	82.9	2.01
HS 2 ^c	5	51.7	80.2	85.3	86.1	2.15
HA 1 ^d	5	55.2	83.9	87.8	87.9	2.30
HA 2 ^d	5	65.6	87.6	93.5	94.2	2.73

Ethanol production was tested in a batch culture with molasses medium containing 25w/v% total sugar at 35°C and pH 5.0.

^a Degree of flocculation is defined in Table 1.

^b Fermentation rate is defined in Table 2.

^c HS 1 and HS 2 were strains isolated from spores of HF 1 and HF 2, respectively (see Fig. 1).

^d HA 1 and HA 2 were acclimated derivatives of HS 1 and HS 2, respectively (see Fig. 1).

統発酵法を検討している。著者らは HS1 株および HS2 株を用いて、T.S. 22% 糖蜜培地による回分発酵を繰り返して馴養を行い、それぞれ21株、17株の馴養株を分離した。これらの馴養株を用いて回分発酵試験を行い、HS1 株および HS2 株それぞれの馴養株の中で発酵能および凝集性が優れた HA1 株および HA2 株を選択した (Table 5 参照)。

HS1 株および HS2 株と、それぞれの馴養株 HA1 株および HA2 株を用いた T.S. 25% 糖蜜培地による回分発酵試験の結果を Table 5 に示した。これらの4株の中では HA2 株の発酵能が最も優れ、発酵速度 2.73 g/l·h、培養96時間後の生成エタノール濃度 94.2 g/l であった。非凝集性酵母 IFO0224 株および EP1 株に比べ、HA2 株は発酵速度で約20%低い値を示したが、96時間後の生成エタノール濃度では 2~5 g/l 高い値を示した。これは回分馴養により HA2 株にアルコール耐性だけでなく糖蜜培地中の塩濃度に対する耐性が付与されたためと推察される。

馴養株 HA2 株の発酵特性 HA2 株の発酵速度および生成エタノール濃度に及ぼす硫酸濃度、培地 pH、発酵温度および初発糖濃度の影響を調べるため、ジャーフェーマンターを用いて回分発酵試験を行った。

1) 窒素源としての硫酸濃度の影響 HA2 株の発酵能に及ぼす硫酸濃度の影響を調べたところ、発酵速度は (NH₄)₂SO₄ 0, 1.0, 2.5 および 5.0 g/l で、それぞれ 2.50, 2.90, 3.56 および 3.53 g/l·h であった

が、培養58時間後の生成エタノール濃度はすべて 86~89 g/l で、以後生成エタノール濃度に大きな差異はみられなかった。従って、硫酸濃度は生成エタノール濃度よりも発酵速度に影響を及ぼすと判断される。

2) 培地 pH の影響 HA2 株の発酵能に及ぼす培地 pH の影響を調べたところ、発酵速度は pH 4.0, 4.5 および 5.0 で、それぞれ 2.07, 2.51 および 3.44 g/l·h であったが、培養48時間後の生成エタノール濃度はすべて 91~95 g/l で、以後生成エタノール濃度に大きな差異はみられなかった。従って、培地 pH も硫酸濃度と同様、発酵速度に影響を及ぼすと判断される。

3) 発酵温度の影響 HA2 株の発酵能に及ぼす発酵温度の影響を調べたところ、発酵速度は 30, 33, 35 および 37°C で、それぞれ 3.45, 3.44, 3.39 および 3.34 g/l·h となり、また培養96時間後の生成エタノール濃度もすべて 95~98 g/l と大きな差異はみられなかった。従って、発酵温度は 30~37°C の範囲では、発酵速度および生成エタノール濃度に大きく影響を与えないと判断される。しかし、Table 6 に示すように、培養24時間後における生菌数は発酵温度が、30, 33, 35 および 37°C と高くなるに従い、それぞれ 2.5×10^8 , 1.9×10^8 , 1.4×10^8 および 1.1×10^8 cells/ml と減少し、また培養96時間後では、すべての発酵温度において生菌数が $1.0 \sim 3.0 \times 10^6$ cells/ml と培養24時間後の値の 1%以下に減少した。従って、回分発酵と違い長期間

Table 6. Effects of temperature on viability of HA 2 during batch fermentation with molasses medium containing 25 w/v% total sugar at pH 5.0.

Temp. (°C)	Total cell number ^a (cells/ml)	Relative ratio (%)	Viable cell number ^b (cells/ml)	Relative ratio (%)
30	2.2×10^8	100	2.5×10^8	100
33	1.7×10^8	77	1.9×10^8	76
35	1.6×10^8	73	1.4×10^8	56
37	1.5×10^8	68	1.1×10^8	44

^a Total cell number after 24-h fermentation.^b Viable cell number after 24-h fermentation.

の運転を行う連続発酵では発酵温度の影響が現れると推察される。

4) 初発糖濃度の影響 HA2 株の発酵能に及ぼす初発糖濃度の影響を調べたところ、発酵速度は T.S. 20, 22 および 25% で、それぞれ 3.09, 3.37 および 3.08 g/l・h であった。また、T.S. 20, 22% では培養後24時間で発酵が終了し、生成エタノール濃度はそれぞれ 74.1, 80.9 g/l となり、T.S. 25% では培養後48時間で発酵が終了し、生成エタノール濃度は 92.8 g/l となった。初発糖濃度に対するエタノール転換率は、発酵終了時で T.S. 20, 22 および 25% においていずれも 0.37 であった。従って、初発糖濃度は T.S. 20~25% の範囲では生成エタノール濃度に影響を与えないと判断される。しかし、Table 7 に示すように、培養24時間後における生菌数は初発糖濃度が T.S. 20, 22 および 25% と高くなるに従い、それぞれ 2.2×10^8 , 2.0×10^8 および 1.3×10^8 cells/ml と減少し、T.S. 25% では T.S. 20% の値の 59% であった。これは Jones と Greenfield¹⁷⁾ が報告しているように、初発糖濃度が高くなると培地の水分活性が低下し、HAZ 株の増殖が阻害されたためと推論される。

以上、廃糖蜜を迅速に発酵する非凝集性酵母から育種した凝集性酵母 HA2 株は、親株である IFO0224

株に比べ発酵速度は少し劣るが、96時間後の生成エタノール濃度は 94.2 g/l と約 3 g/l 高く、優れた発酵能を有していた。しかし、HA2 株は、発酵温度および初発糖濃度が高くなるに従い生存率が低下することから、本菌株による高エタノール濃度 (80 g/l 以上) 下での高温 (35°C 以上) 連続発酵は難しいと考えられる。

要 約

1. 非凝集性酵母 IFO0224 株を孢子形成後 EMS 処理して得た25株の栄養要求性変異株の中で、唯一凝集性を示す HM1 株 (Ade⁻, His⁻, DF4) を選択した。しかし、HM1 株は IFO0224 株に比べて発酵速度で 17%、生成エタノール濃度で約 9 g/l 低下した。

2. HM1 株と非凝集性酵母 EP1 株由来の栄養要求性変異株 HM2 株 (Ile⁻, Val⁻, DF0) をプロトプラスト融合させ、両親株である IFO0224 株や EP1 株と比べても発酵速度および生成エタノール濃度で遜色のない値 (それぞれ 2.29 g/l・h, 55.2 g/l) を示し、しかも DF5 の凝集性を有する融合株 HF1 株を取得した。

3. HF1 株は6回の植え継ぎで凝集性が消失したが、HF1 株の孢子由来株 HS1 株 (DF5) は6回以上植え継ぎを繰り返しても凝集性は安定に保持されていた。また、融合株 HF3 株 (DF3) と HF4 株 (DF4)

Table 7. Effects of initial sugar concentration in molasses media on viability of HA 2 during batch fermentation at 35°C and pH 5.0.

Initial concn. of total sugar (w/v%)	Total cell number ^a (cells/ml)	Relative ratio (%)	Viable cell number ^a (cells/ml)	Relative ratio (%)
20	2.8×10^8	100	2.2×10^8	100
22	2.4×10^8	86	2.0×10^8	91
25	1.5×10^8	54	1.3×10^8	59

^a Total cell number and viable cell number are defined in Table 6.

を孢子形成させたところ、それぞれ60, 80%の高い頻度で DF5 の株を分離した。

4. HS1 株の凝集性を強化させるために、HS1 株と IFO 1953 株 (DF5) のそれぞれの栄養要求性変異株 HM4 株 (Ade⁻, DF5) および HM3 株 (Leu⁻, DF5) を用いてプロトプラスト融合を行い、HF2 株 (DF5) を選択した。融合株 HF2 株をさらに孢子形成させて凝集性および発酵能が優れた HS2 株 (DF5) を取得した。

5. HS2 株を用いて T.S. 22% 糖蜜培地による回分発酵を10回繰り返して馴養を行い、35°C, T.S. 25% 糖蜜培地による回分発酵試験で培養96時間後に 94.2 g/l のエタノールを生成した馴養株 HA2 株 (DF5) を選択した。

6. HA2 株の発酵特性を調べるために主として T.S. 25% 糖蜜培地を用い、2l 容ジャーフェメンターによる回分発酵試験を行い、次のような結果を得た。1) 窒素源として廃糖蜜重量に対し 0.5 w/v% の (NH₄)₂SO₄ の添加が最適であった。2) 培地 pH は発酵速度に影響を与え、発酵速度は pH 5.0 (3.44 g/l・h) に比べ pH 4.5 で 27%, pH 4.0 で 40% それぞれ低下した。3) 発酵温度は 30~37°C の範囲では発酵速度および生成エタノール濃度に影響を与えなかったが、培養24時間後の生菌数は発酵温度が高くなるに従い減少し、37°C では生菌数が 1.1×10^8 cells/ml と 30°C での生菌数の44%に低下した。4) 初発糖濃度が T.S. 20~25% の範囲では発酵終了時のエタノール転換率はいずれも0.37であったが、培養24時間後の生菌数は初発糖濃度が高くなるに従い減少し、T.S. 25% では生菌数が 1.3×10^8 cells/ml と T.S. 20% での生菌数の59%に低下した。

本研究に關しご指導をいただきました大阪大学工学部醸酵工学科 講師関達治博士に、また、菌株を分与していただきました工業技術院微生物工業技術研究所生物化学工学研究室 前室長 國田頼和博士 (現熊本大学工学部応用化学学科教授)、同室長小林晴己氏、同室栗山

博研究員ならびに關係諸氏に、そして有益なご助言およびご協力をいただきましたサントリー株式会社酒類研究所醸酵工学研究室長松元信也博士ならびに關係諸氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 木田建次, 森村 茂, 志摩宣行, 浅野慎一, 山抱基純, 宮沢俊樹: 醸酵工学, **65**, 27 (1987).
- 2) Kuriyama, H., Seiko, Y., Murakami, T., Kobayashi, H., Sonoda, Y., Silva, H. G. B.: *Report of the Fermentation Research Institute*, **64**, 43 (1985).
- 3) Oshima, T., Takano, I.: *Genetics*, **94**, 841 (1980).
- 4) Arima, K., Takano, I.: *Genetics*, **93**, 1 (1979).
- 5) 坂井拓夫: 発酵と工業, **44**, 238 (1986).
- 6) Gilliland, R. B.: *Wallerstein Lab. Commun.*, **20**, 41 (1957).
- 7) Thorne, R. S.: *Wallerstein Lab. Commun.*, **15**, 201 (1952).
- 8) Lewis, C. W., Johnston, J. R., Martin, P. A.: *J. Inst. Brew.*, **82**, 158 (1976).
- 9) Stewart, G. G., Russell, I.: *Can. J. Microbiol.*, **23**, 441 (1977).
- 10) Russell, I., Stewart, G. G., Reader, H. P., Johnston, J. R., Martin, P. A.: *J. Inst. Brew.*, **86**, 120 (1980).
- 11) Miki, B. L. A., Poon, N. H., James, A. P., Seligy, V. L.: *J. Bacteriol.*, **150**, 878 (1982).
- 12) Miki, B. L. A., Poon, N. H., Seligy, V. L.: *J. Bacteriol.*, **150**, 890 (1982).
- 13) Amri, M. A., Bonaly, R., Duteurtre, B., Moll, M.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 227 (1979).
- 14) 郡家徳郎: 醸協, **79**, 210 (1984).
- 15) 原 昌道, 佐々木雅晴, 小幡孝之, 野白喜久雄: 醸協, **71**, 301 (1976).
- 16) Brown, S. W., Oliver, S. G.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 119 (1982).
- 17) Jones, R. P., Greenfield, P. F.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 29 (1986).

(昭61.9.18受付)