

5. ペントースの醱酵化学的利用に関する研究

ペントース同化性酵母に就て

辰己 忠次 片桐 英郎

Studies on the Utilization of Pentose by Microbiological Method.

On Pentose-assimilable Yeasts.

Chuji Tatsumi and Hideo Katagiri

In the previous papers ¹⁾ our studies on alcoholization of saccharified solution of cellulose materials by Scholler's method were reported.

Pentose-assimilable yeasts were isolated in spent wash obtained from the saccharified solution of Mulberry-tree added with d-xylose and in an artificial medium containing d-xylose as the only source of carbon.

Among various kinds of materials including corn, waste parts of vegetables, potato, rice hulls, barley straw, rice straw, stablemanure and soil, the most useful strains of yeast No.100, 103 and 107 were isolated from the former three materials respectively, from which better yield was obtained compared with the known yeast *Torula utilis*.

Any noticeable difference was never pointed out on the chemical constituents of yeast cells, therefore these yeasts would be useful for food-stuff.

From the characteristic natures, these yeasts were found to belong to new strains of *Torulopsis* according to Lodder's classification, and we named the yeasts No. 100, 103 and 107 *Torulopsis xylinus* a,b and c respectively.

The spent wash (pH5.5), the distillery waste liquor of the alcohol solution obtained from the saccharified solution of mulberry-tree, contained 2.043g organic matters, 0.633g reducing sugars(as glucose), 0.470g pentose and 0.084g total nitrogen in its 100c.c.

In order to know the availability of these constituents for yeast, experiments were carried out in the spent wash added by Reader's nutrients, with three strains of pentose-assimilable yeast isolated by us and with *Torula utilis* previously acclimatized to pentose. During 120 hour ordinary culture at 30°C, 1/3 parts of reducing sugars including more than 2/3 parts of pentose were consumed. It was pointed out that small amount of organic matters other than sugars was assimilated, and noticeable toxic substance was never detected.

In case of shaking-culture, the amount of sugar remained and the yield of yeast were observed on 12, 18, 24 and 36 hour incubations.

The yield of yeast, especially newly isolated yeast No. 107, attained to a maximum on 24 hour culture, when 41-46%, 30% and 75% yields of yeast were observed as the organic matters, total nitrogen and pentose respectively.

The chemical compositions of the yeast (7-9% ash, 43-47% crude protein thus obtained) were found to be very much the same as the yeast obtained from the spent washes of ordinary wood or pulp waste liquor.

1) Katagiri and Tatsumi: This Bulletin 15, 16, 17, 18 19, and 20.

緒 論

ペントースは遊離状態で存在することは殆どなく、重合してペントザンの形で自然界に広く分布し、主としてヘミセルロースを構成してゐる。木材、稻藁、麦稈、ツンドラ、植物種子或は種皮等に多量に含まれている。此ペントザンは酸によつて容易に加水分解されてペントースになる。従て Scholler 法による木材糖化に於ける糖化液或は糖化液の酒精醱酵蒸溜廢液、亞硫酸パルプ廢液、人絹廢液等には可成りのペントースが含まれて来る。之等のペントースの利用は原料上から又經濟上から重要な意義を持つものである。ペントースの醱酵化学的利用に関してはペントース醱酵と同化の二方面が考えられる。前者に関しては微生物によつて酒精¹⁾、乳酸²⁾、アモトンプタノール³⁾等の有機化合物が生成されることが知られている。前者に関しては普通醱酵工業に利用される *Saccharomyces* 属の酵母にはペントースを同化する力をもつものは殆どないが、*Torula utilis* がよく同化することは Fink, Lechner 等⁴⁾によつて詳細に研究されてゐる。然し我國ではペントースの醱酵化学的利用に関する研究は甚だ少い。著者は纖維質のアルコール化に関する研究⁵⁾に當て糖化液中に含まれてゐるペントースの利用方法として先づペントース同化力の強い酵母の分離を行ひ、其菌学的性質を明かにした。他方該酵母の示すペントースの同化力竝に酵母中の蛋白質、脂肪等の含量を *T. utilis* と比較検討した。

次に之等の新しく分離した酵母を使用して著者の作成した糖化液の酒精醱酵蒸溜廢液による酵母製造を行ひ、廢液中の糖類を初め有機物の同化狀況を検討した。

実 験 之 部

I. 酵母の分離：分離に使つた培養液は桑條の Scholler 法による酸糖化液（著者の所有する装置によつて作成したもの）の酒精醱酵蒸溜廢液（後述する）に d-キシロースを添加したものと d-キシロースのみを糖源とする人工培養液である。即 2.5% の上記糖液 100cc に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g, KH_2PO_4 0.1g, MgSO_4 0.1g, ペプトン 0.05g, オリザンエキス 0.05cc を添加したものである。pH は 4.5 である。分離材料は玉蜀黍、蔬菜屑、堆肥、土壤、稻藁、粃、果物屑、馬鈴薯である。常法に従て液体、平面培養を数回反覆し最後に点滴培養によつて純粹にした。分離酵母の中から優秀なもの玉蜀黍 No.100, 蔬菜屑 No.107, 馬鈴薯 No.100 の 3 種に就て菌学的性質及び同化力を檢した。

Ⅰ. 分離酵母の菌学的性質：酵母 No.100—細胞—麦芽汁 30°, 48 時間培養大部分卵形 $3 \times 5.4\mu$ 伸長形 $(1\sim 2) \times 6\mu$ もある。原形質内容等質半透明、液泡及び粒状体を見る。液体培養—麦芽汁 30°, 1 日混濁、管壁に沿て膜様のもの僅かに生じ 2~3 日相当醱酵し 5 日醱酵終り、7 日透明となる。沈澱酵母やや多量で液面に酵母環を作る。斜面培養—麦芽汁 30°, 5 日暗乳白色（周辺）、乳白色（中央）光沢あつて表面滑かで盛り中央部に條がある。周縁出

入細いが尖らない。穿刺培養—麦芽寒天室温30日穿刺溝にあまり發育しないが穿刺口に良く發育する。巨大聚落—麦芽ゼラチン室温40日火口隆起し繁殖面陥没する（やゝ溶解性ある）径 25~45mm 高さ 4mm. 胞子—石膏上 25° 20日生産を認めない。假菌絲—Talic 法によるも生成を認めない。發育最適温度—30°. 最適 pH—5.0. 死滅温度—70°10分。繁殖法—出芽。カロチン生産—Molish 法によるも生成を認めない。醗酵力—麦芽汁7日 10.64% 酸度2.6.

酵母 No.103—細胞—長楕円形。2.4×6 μ 液体培養—1日混濁、乾燥状の柔い皮膜を生じ、3日まで相当に醗酵する。5日透明となり、液色やや黄味で管壁、表面一様に帯黄の乾燥状の柔い皮膜を作り沈澱酵母多量である。斜面培養—暗乳白色光沢なく表面縮緬状で扁平一面に拡る。周縁出入大きい丸い。穿刺培養—穿刺口に非常によく發育するが穿刺溝には餘り發育しない。巨大聚落—全面白粉を散布した様で繁殖面陥没する（溶解性ある）。胞子及び假菌絲—生成しない。發育最適温度及び pH, 死滅温度、繁殖法—No.100 と同様である。カロチン生産—認めない。醗酵力—28.73%, 酸度4.6

酵母No.107—細胞—大部分伸長形1.8×9 μ 楕円形1.8×3 μ もある。液体培養—1日混濁、管壁に沿って膜様のもを生じ、3日まで相当に醗酵する。5日透明となり、液色やや黄味で表面に光沢ある硬い皮膜を作り沈澱酵母多量である。斜面培養—乳白色小皺（周辺）帯黄乳白色大皺（中央）の粗縮緬状を呈し光沢あつてやゝ盛上る。周縁大きく出入するが光らない。穿刺培養—No.103 と同様。巨大聚落—火口隆起し繁殖面陥没する（溶解性ある）中央帯黄白色周辺乳白色、径 20mm 高さ 2mm. 胞子及び假菌絲—生成しない。發育最適温度及び pH 繁殖法—No.100 と同様である。死滅温度—65°. 10分。カロチン生産—認めない。醗酵力—35.15% 酸度2.6.

糖類の醗酵試験—麦芽寒天培養酵母を使つて Lindner 氏法によつて行つた。其結果は Table 1 である。

Table 1 Fermentable sugars

Strain	No: 100	No. 103	No. 107	T.utilis
Sugar				
Glucose	+	+	+	+
Fructose	+	+	-	+
Mannose	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	-
Sucrose	-	+	+	-
Maltose	+ (slightly)	+	+	+ (slightly)
Lactose	-	-	-	-
Raffinose	-	+	-	+ (slightly)
Xylose	-	-	-	-

窒素の同化及び有機化合物の資化試験—試験試料を含む寒天培養基に劃線培養して其繁殖を観察する。No 100, 103, 107 の3種共にアスパラギン、ペプトン、硫酸アンモニア、硝酸加里に繁殖する。特に No. 100, 107 はアスパラギン、ペプトンに良く、No. 100 は硫酸アンモニアにも良い。此場合糖源は葡萄糖と d-キシロースを夫々使つたが両者の間に差異はなかつた。有機化合物として蔗糖、麦芽糖、グリセリンには3種共に良く繁殖する。酒精には No. 103, 107 は良いが No 100 は不確実である。醋酸には何れも繁殖しない。

■ ペントース同化試験：

(1) 静置培養 培養液はd-キシロースを唯一の糖源とし(1.58%),栄養分としてReader氏培養液の成分とペプトン(0.05%)を添加した。此培養液 50cc に斜面培養から種培養として一白金耳を接種し30° 48時間培養した後、同種培養液 100cc に流入し30° 7日静置培養した。既報⁶⁾の方法によつて培養液から菌体を分離し、糖消費量及び酵母収量を測定した。其結果は Table II である。

Table II Ordinary Culture

Strain	Beginning		After the Cultur		Assimilation of Xylose %	Weight of yeast g/100cc	Yield of yeast calculated from consumed sugar %
	pH	Xylose g/100cc	pH	Xylose g/100cc			
No. 100	5.4	1.580	5.4	0.080	94.42	0.61	40.30
No. 103	5.4	1.580	5.2	0.250	84.21	0.58	43.60
No. 107	5.4	1.580	5.2	0.143	90.93	0.51	35.89
T.utilis	5.4	1.590	5.4	0.176	88.49	0.48	33.43

(2) 振盪培養 培養液は d-キシロース 1.5g (NH₄)₂SO₄ 0.1g, KH₂PO₄ 0.2g, MgSO₄ 0.1g ペプトン 0.05g を水道水 97cc に溶解し、麦芽汁 3cc を加へて 100cc としたもので PH は5.3である。此培養液 300cc を 1l 容平底瓶に詰め綿栓して通常の如く殺菌する別に同種培養液に30° 48時間培養したものを種酵母とし、30mg/100cc.を使用した。既報⁶⁾に於けると同様に振盪培養を行ひ30° で 12, 18, 24, 36時間に於ける残糖量及び酵母収量を測定した。其結果は Table III である。得た酵母の化学的組成は Table IV の通りである。

考察：同化試験の結果から No 100, 103, 107 の3種は何れも T.utilis より繁殖の速い事及び酵母収量の多い事を知つた。特に No. 107 に於て最も優秀な結果を得た。生成された酵母の成分を見るに蛋白質が其半ばを占め、食飼料として利用出来る事を確認した。次に菌学的性質から之等3種の酵母の分類上の位置を判定するに、何れも子嚢を形成しないから所謂酵母類似菌類に属する。Lodder 氏の分類に従えば Torulopsidaceae 科の第一亞科 Torulopsoideae の Torulopsis 属に入るべきものである。此属の糖類の醗酵性から考察すると、No. 100 は T. holmii に、No 103 は T. holmii より更に麦芽糖をも醗酵し、No. 107

Table III Shaking Cultur

Period of cultivation	12 hrs		18 hrs		24 hrs		36 hrs			
	Weight of yeast g/100cc	Weight of sugar remain-ed g/100cc	Weight of yeast g/100cc	Weight of Sugar remain-ed g/100cc	Weight of yeast g/100cc	Weight of Sugar remain-ed g/100cc	Weight of yeast g/100cc	Weight of Sugar remain-ed g/100cc	Sugar Consum-ed %	Yield of yeast ca lculated from consumed sugar %
No. 100	0.211	0.980	0.340	0.654	0.522	0.228	0.585	0.215	85.66	45.53
No. 103	0.134	1.354	0.215	1.171	0.446	0.785	0.471	0.329	78.05	40.26
No; 107	0.209	0.928	0.411	0.373	0.569	0.275	0.632	0.242	83.86	50.16
T. Utilis	0.182	1.296	0.385	0.627	0.461	0.243	0.490	0.211	85.93	37.91

Table IV Chemical composition of Yeasts

Strain	Ash %	Grude protein %	Crude fat %
No. 100	5.51	47.62	3.56
No. 103	5.51	49.67	2.83
No. 107	4.83	48.07	2.88
T. utilis	5.82	43.95	3.20

Table V Composition of Spent-Wash

Total Sollid Matters	3.058g/100cc
Ash	1.015
Total organic matters	2.043
Recucing sugars (As glucose)	0.993
Pentose	0.470
Total nitrogen	0.084

は T.colliculse に夫々近縁なものである。且又窒素の同化性、有機化合物の資化性、其他の菌学的性質から No. 100, 103, 107 は別種であると認め、此処に新種として次の如く命名する事とした。

No. 100	Torulopsis xylinus	a
No. 103	"	b
No. 107	"	c

IV. 桑條糖化液の酒精醗酵蒸溜廢液による酵母の製造

(1) 供試廢液 之は既述⁵⁾に於ける桑條の酸糖化液の酒精醗酵液を水蒸氣蒸溜した蒸溜廢液である。沈澱を除去したものの成分は Table V である。

即有機物として約2%含有し、此中には還元糖も残存するから酵母培養原料となし得るが窒素は多少不足するやうに思われる。pH は5.5で適當である。

(2) 廢液中の酵母同化性糖及び阻害物質の有無。培養液は廢液に Reader 氏培養液の成

分とオリザニンエキスを添加したものである。酵母は *T. utilis* を上記培養液に 30°, 48 時間培養して 50mg/100c.c の割合にて、同種培養液 300c.c. (葡萄糖添加 0.3% 及び無添加) に接種し、30° 120時間静置培養を行つた。残糖量及び酵母収量は Table VI の通りである。

Table VI Assimilation of sugars in the spent-wash

Period of Cultivation	Weight of sugar remained g/100cc		Assimilation of sugar %		Weight of Pentose g/100cc		Assimilation of Pentose %		Weight of Yeast g/100cc		Yield of yeast calculated from consumed sugar %	
	Glucose added	none	Glucose added	None	Glucose added	None	Glucose added	None	Glucose added	None	Glucose added	None
hrs 0	0.993 0.300	0.993	—	—	0.470	0.470	—	—	0.050	0.050	—	—
24	0.827	0.875	29.11	11.89	—	—	—	—	0.235	0.088	—	—
72	0.750	0.747	42.00	24.83	—	—	—	—	0.329	0.154	62.43	62.45
120	0.673	0.703	47.91	29.21	0.183	0.195	61.15	58.50	0.383	0.190	61.77	65.22

* Weight of glucose added to 100cc of the spent-wash

以上の結果から廢液の還元糖の約 $\frac{1}{3}$ が酵母によつて同化せられ、此同化性糖中には廢液のペントースの約 $\frac{1}{3}$ が含まれてゐる事竝に葡萄糖の添加に於て之が大部分消費されてゐることから廢液中に甚しい阻害作用を呈するものが存在しない事を知つた。

(3) 振盪培養による酵母製造、使用酵母は *Tolulopsis xylinus* a, b, c, 及び *T. utilis* の4種で廢液に Reader 氏培養液の成分及びオリザニンエキスを添加したものに夫々 30° 48時間培養したものを 40mg/100cc. の割合にて廢液 300cc (其まゝ) に接種し、12, 18, 24, 36時間に於ける残糖量及び酵母収量を測定した。其結果は Table VII の通りである。次に有機物、ペントース及び窒素の同化状況を検討した結果は Table. VIII, IX に、得た酵母の化学的組成は Table X に夫々示す通りである。

Table VII Shaking Culture

Strain	Period of Cultivation									
	12 hrs		18 hrs		24 hrs		36 hrs			
	Weight of yeast g/100c	Weight of sugar remained g/100cc	Weight of yeast g/100cc	Weight of sugar remained g/100cc	Weight of yeast g/100cc	Weight of sugar remained g/100cc	Weight of yeast g/100cc	Weight of sugar remained g/100cc	Assimilation of sugar %	Yield of yeast calculated from consumed sugar %
<i>T. xylinusa</i>	0.085	0.863	0.190	0.781	0.240	0.692	0.267	0.580	41.58	64.63
<i>T. xylinusb</i>	0.135	0.833	0.159	0.817	0.249	0.682	0.253	0.603	39.31	64.82
<i>T. xylinusc</i>	0.200	0.821	0.273	0.755	0.285	0.648	0.271	0.512	49.49	56.26
<i>T. utilis</i>	0.136	0.843	0.229	0.763	0.265	0.636	0.244	0.546	44.98	54.62

Table VII Assimilation of organic matters (after 36hrs culture)

Strain	Solid matter remained g/100cc	Ash remained g/100cc	Organic matter remained g/100cc	Consumed organic matter g/100cc	Yield of yeast calculated from consumed organic matter %	Total nitrogen g/100cc	Consumed nitrogen g/100cc	Assimilation of nitrogen %
T.xylinus a	2.281	0.883	1.398	0.645	41.37	0.058	0.027	31.48
T.xylinus b	2.326	0.802	1.425	0.618	40.91	0.056	0.028	33.49
T.xylinus c	2.366	0.910	1.456	0.587	46.13	0.059	0.025	30.16
T.utilis	2.339	0.857	1.482	0.561	43.49	0.057	0.027	32.07

Table VIII Assimilation of Pentose

Stain	Pentose g/100cc		Assimilation of pentose %
	Beginning	After the culture	
T.xylinus a	0.470	0.111	75.26
T.xylinus b	0.470	0.116	79.85
T.xylinus c	0.470	0.090	76.45
T.utilis	0.470	0.096	79.49

Table IX Chemical Composition of yeasts

Strain	Moisture %	Ash %	Crude Protein %	Vitamin B ₁ r/g
T.xylinus a	7.80	8.70	40.25	6.9
T.xylinus b	8.00	6.90	43.56	10.8
T.xylinus c	7.90	6.80	40.24	8.7
T.utilis	7.95	7.90	39.37	7.8

廃液に於ては通常の培養液に於けるよりも酵母の繁殖が遅延する。糖濃度の少い事と栄養分の不足が原因すると考えられる。糖の消費状況を見ると還元糖の一部は良く同化されるが他部は非常に同化され難い。前者の大部分をペントースが占めている。又同化性物質は糖のみでなく他の有機物も含まれている。之は消費糖に対する酵母収量の高率すぎる事からも思考される。又全窒素は約1/3減少してゐるから酵母によつて利用されたものと考えられる。得た酵母の組成は木材糖化液、亜硫酸廃液培養のものと同等であるが、ビタミン量B₁は甚だ少い。之は廃液中に其素材となる物質の少いためと考えられる。

(4) (NH₄)₂SO₄ 及び KH₂PO₄ 添加の影響：廃液には窒素源、磷酸源の少い事は上記実験から明かである。Table VII に示す通り (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄ を添加し、Torulopsis xylinus a を使用し振盪培養を行つた。濃度1.2% (廃液にキシロース0.2%添加) 18°, 12

及び 24 時培養である。

Table II Effect of the addition of Ammonium sulphate and Potassium biphosphate

Run no.	Nitrogen in spent-wash mg/100cc	Nitrogen in ammonium sulphate added mg/100cc	Ammonium sulphate added mg/100cc	Ammonium sulphate added by sugar %	Potassium biphosphate added mg/100cc	Potassium biphosphate added by sugar %	Period of Cultivation			
							12hrs		24hrs	
							Weight of sugar remained g/100cc	Weight of yeast g/100cc	Weight of sugar remained g/100cc	Weight of yeast g/100cc
1	84	—	—	—	—	—	0.927	0.993	0.852	0.210
2	84	105.0	50	5	—	—	0.875	0.182	0.877	0.158
3	84	21.0	100	10	—	—	0.902	0.223	0.852	0.239
4	84	10.5	500	50	—	—	0.877	0.327	0.822	0.354
5	84	21.0	100	10	50	5	0.902	0.287	0.877	0.318
6	84	21.0	100	10	100	10	0.902	0.285	0.852	0.265

(NH₄)₂SO₄ の添加は酵母収量に対して著しく影響して、対糖50%の場合非常に有効である。KH₂PO₄ の添加はそれ程に影響を與えないが、少量の添加は有効である。更に栄養分の影響を検討する必要はあるが、原料が廃液であるから、可及的加工せず利用しようと試みたため、上記の実験範囲を出なかつた。

要 約

(1) 玉蜀黍、野菜屑、馬鈴薯からペントース同化性の強い3種の酵母を分離し、之等の酵母の菌学的性質を明かにし、d-キシロースを唯一の糖源とする培養液で酵母製造を行い、*Torula utilis* 以上の酵母収量を得た。

(2) 之等の3種の酵母を新種と認め、Lodder 氏の分類に従て *Torulopsis xylinus* a, b, c と命名した。

(3) 桑條酸糖化液の酒精蒸溜廃液の可溶成分は全有機物 2.04%、還元糖 0.99%、ペントース 0.47%、全窒素 0.08%で、pH は 5.5 である。

(4) 酵母によつて同化され得る廃液中の還元糖は約1/3でペントースが其2/3以上を占めている。又糖以外の有機物が同化利用されている事も知つた。廃液中には酵母繁殖に甚しく阻害作用を呈するものは存在しないようである。

(5) 廃液の振盪培養による酵母製造に於て *Torulopsis xylinus* a, b, c 3種共に *T. utilis* より優秀である事を認めた。然し通常培養液より繁殖が遅延される。消費された有機物に対する酵母収量は40~46%である。得た酵母の組成は木材糖化液、亜硫酸廃液培養のものとは大差ないが、ビタミン B₁ は非常に少い。

(6) 廢液に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の添加は良い結果をもたらすが、 KH_2PO_4 はあまり影響はない。

以上著者の分離した酵母 *Torulopsis xylinus* a, b, c を使用し、廢液に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加すれば、やや多量の種酸母の添加と培養時間の延引の欠点はあるが、廢液から食飼料酵母製造の可能な事を認めた。

終りに臨み実験に協力した堀野英一、藤井保藏両君の労を感謝する。尙此研究は文部省科学研究費による所が多い事を附記して謝意を表す。

文 献

- 1) Dietrich : Z. f. Spiritusind., **63**. 11 (1940)
- 2) 片桐 : 農化, **10**, 942 (1934)
- 3) Weinstein : J. of Bact., **25**, 201 (1933)
- 4) Fink, Lechner : Biochem. Z., **300** (1938) **301** (1939) **304** (1940)
- 5) 片桐, 辰巳 : 本誌 **15** (1946), **16** (1947), **17** (1949), **18** (1949), **19** (1949), **20** (1950)
- 6) 片桐, 辰巳 : 本誌 **20** (1950)
- 7) Lodder : Die anaskosporogenen Hefen (1938)

(昭和25年6月21日受理)