

# 炭化水素資化性菌による 変敗油の利用に関する研究

小 原 国 彦  
玉 置 め 子

## 緒 言

石油を、唯一の炭素源として生育する、炭化水素資化性菌の菌体成分を利用する研究は、最近急激に発展しつつあり、あるいは又、資化性菌による炭化水素代謝産物の検討が、され始めている。その微生物については、Zobell<sup>(1)</sup>, Beerstecher<sup>(2)</sup>等の報告をはじめ、更に代謝産物については、Raymond<sup>(3)</sup>, Champagnat<sup>(4)</sup>, Takahashi<sup>(5)</sup>等の報告がみられ、遂次、菌の代謝物質が同定されつつある。一方又、食用油脂の使用によって生ずる変敗油の生成量は、莫大な量と推定されるが、未だその利用法に関する研究は、見当らない。著者等は、大阪周辺の土から、炭化水素資化性菌の分離を試みて数種の酵母と、バクテリアを分離し、そのうちの特定酵母を用いて、変敗油に旺盛な増殖をみた。同時に変敗油に対する挙動をみて、変敗油利用への若干の知見を得たので報告する。

## 実 験 の 部

### I 実験方法

#### 〔1〕炭化水素資化性菌の分離法

石油が、常に浸透している場所等から、各種の土を採取し、第1表、第2表の如き培養基を用い、第1図、第2図の如き方法で、菌を分離しStock cultureとなした。

第1表 The Compositions of Isolation Media For yeasts and molds

Kerosene	35.0g
Liquid Paraffin	35.0g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.0g
Tween-20	0.5g
Tapwater	1.0l
PH	5.0

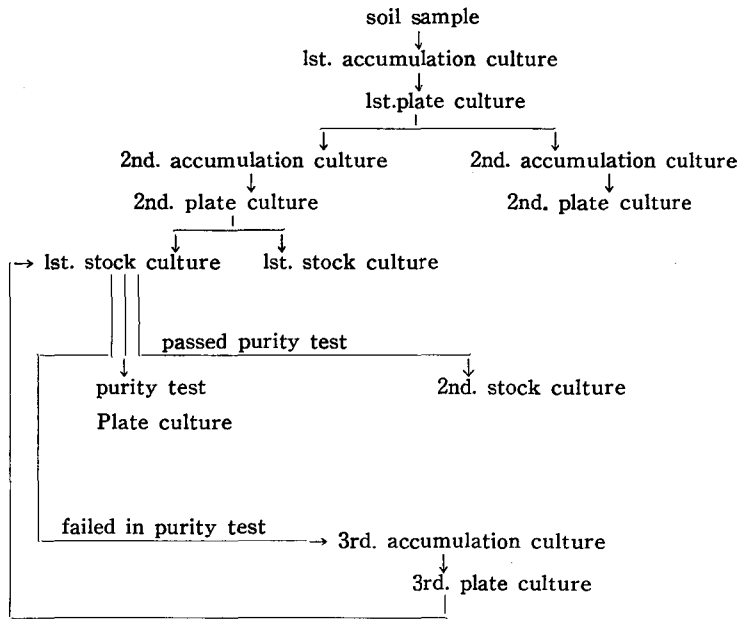
第2表 The Compositions of Medium employed in Isolation For yeasts

Hydrocarbon (Kerosene)	20.0g
------------------------	-------

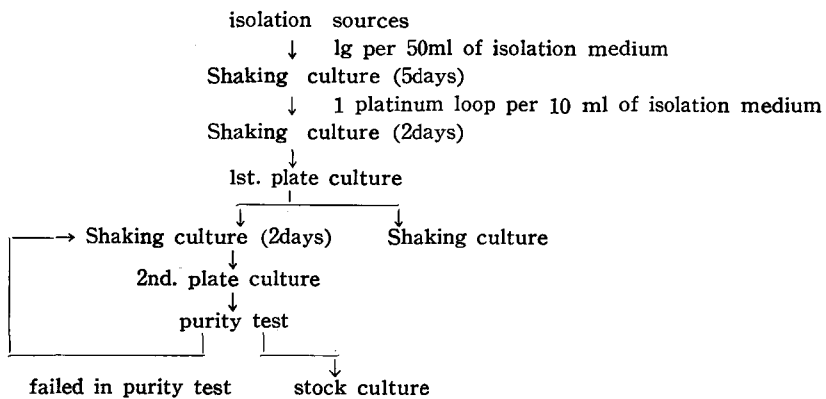
炭化水素資化性菌による変敗油の利用に関する研究

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.7g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.3g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.01g
Ashed yeast extract	0.005g
Tween 20	0.1g
Chloramphenicol	0.02g
Distilled water	1.000ml
PH	5.5

第1図 Method of Isolation



第2図 Method of Isolation



〔2〕 分離した菌の同定

Stock cultureとした各種の菌について、それぞれ、Lodderの分類法<sup>(6)</sup>により同定を試みた。胞子形式の有無は、石膏塊培養法、Gorodokowa 寒天培養法及び、Kleynの培養基を用いる方法によって行なったが、胞子を形成しないことを認めたので、Slide cultureによって、True Mycellium及び、Pseudomycellium形成の有無を見た。

更に細部については、目下同定中である。

〔3〕 変敗油の調整

市販のサラダオイルを、常法の如く通気によって、自動酸化させ試料とした。

〔4〕 酵母菌の培養

培養基50mlを、500mlの肩付きフラスコにとって、常法の如く殺菌し、KY-11（以下これを本菌とよぶ）をストックから1白金耳とって、滅菌水に懸濁し、これを、1白金耳フラスコに移植後、30°Cにてしんとう、または、静置培養をなした。

〔5〕 変敗油培養基の調整と菌の培養

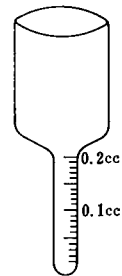
変敗油を前記培養基の炭化水素に代替して添加し、本菌を移植してしんとう培養を行なった。なお、対照用として、自動酸化させないサラダオイルを用いて、全く同様に比べて比較した。

〔6〕 菌体の測定と殊留油脂の抽出

30°Cで所定の時間、しんとう培培の後、50mlの培養基中に増殖した菌体は、1分間3500回転にて10分間、第3図の如き菌体量測定用遠心沈澱管で遠沈し、その沈澱量をVolumeとして読み、それぞれ比較した。菌体重量と容積との関係は乾燥菌体23.5mgが0.1mlを占めていた。菌体遠沈の後、上澄液を分液ロートに移し、エーテルにて数回洗滌し、遠沈管の内に、付着している油脂を完全に溶解し去り、その液を分液ロート内の液と合一した。その後、分液ロート内のエーテル層を分離し、常法の如く、脂肪を抽出し、各種の定量に供した。

菌体量測定用遠心沈澱管

第3図



〔7〕 油脂性状の検討

培養基調製時及び、殺菌後、更に本菌を移植して、対照用には、菌を移植しないで144時間、30°Cにて振盪培養したものにつき、それぞれの培養基から油脂を抽出して試料とした。尚、培養液について、一定時間毎に油脂を抽出して性状の経時的変化をみた。測定は常法の如く、酸価(A.V.)カルボニル価(C.V.)過酸化物価(P.O.V.)について行なった。

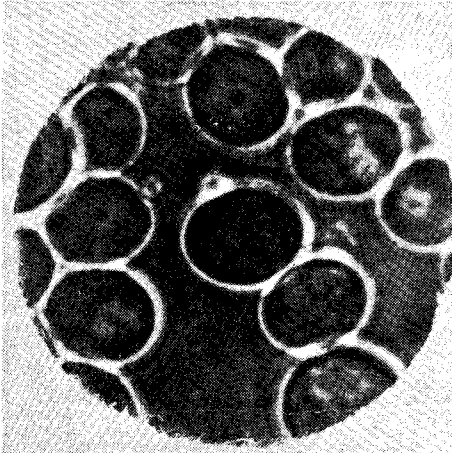
I 実験結果

〔1〕 菌の分離と同定

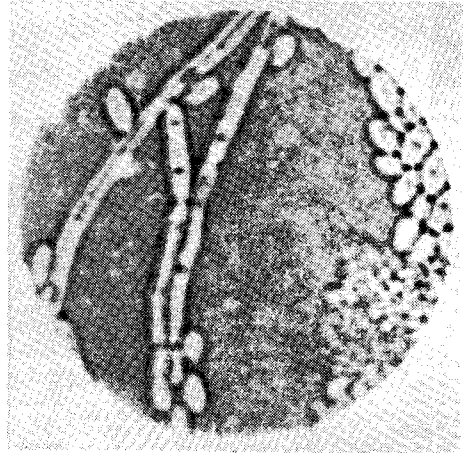
大阪周辺の土から、酵母菌と細菌を分離し、此の度の研究には、酵母菌を用いた。即ち、

数種類の酵母菌を分離し、ストックとするとともに、そのうちの KY-11 を用いて、油脂に対する挙動をみた。KY-11 は第 4 図、第 5 図の如く、胞子の形成を見ず、Slide culture で培

第 4 図 KY-11 の顕微鏡写真



第 5 図 Slide cultureにて培養したKY-11



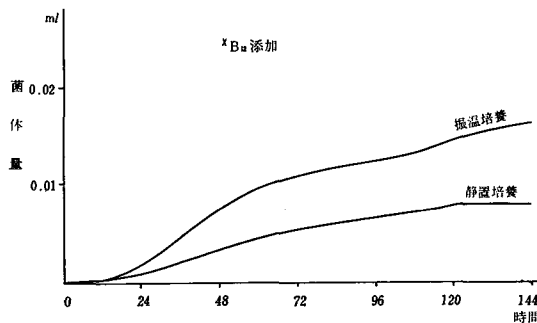
養した結果、第 5 図にその一部分を見る如く、非常に明らかな、Pseudo mycellium と、Truemycellium を形成する等から、*Cryptococcaceae* に属する *Candida* と推定した。更に詳細については、目下同定中である。

〔2〕 炭化水素培地に於ける本菌の成育

本菌を Kerosene 培地に移植して、静置及び振盪培養し、それぞれ24時間毎にとり出して菌

第 6 図

Kerosene培地に於ける静置及びしんとう培養下の菌体収量とビタミンB<sub>12</sub>増加の影響



体を分離し、その収量をみて第 6 図の如き結果を得た。尚、ビタミン B<sub>12</sub> をこの培地に、予め 200r 添加したものについても比較した結果、48 時間目で第 6 図の如く、高収量の結果を得た。

〔3〕 サラダオイルの変敗油及び未変敗油培地に於ける菌体の成育

サラダオイルを自動酸化した変敗油と、未変敗油を炭化水素に代替して添加した培地に、本菌を移植して、経時的に菌体収量を調べ、第 3 表の如き菌体収量を得た。

炭化水素資化性菌による変敗油の利用に関する研究

第3表 変敗油・未変敗油における生育の状況

油と菌体 時間	未変敗油 における菌体量	変敗油 における菌体量
0	0 ml	0 ml
48	0.142 //	0.079 //
96	0.164 //	0.303 //
120	0.302 //	0.245 //
144	0.207 //	0.162 //

〔4〕 培養前後における変敗油性状の変化

培養基調製時及び殺菌後、そして本菌を移殖及び無移殖のまま144時間、しんとう培養した培地の油脂について、各種の値を測定した結果は、第4表、第5表、第6表及び第7図の如くである。

第4表 殺菌前後に於ける油脂の性状

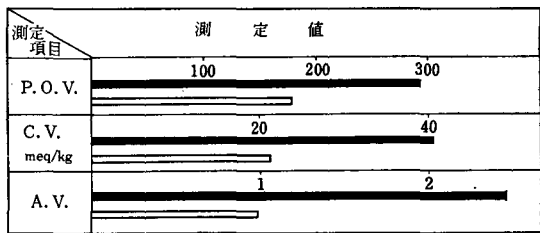
	殺菌前	殺菌後
P.O.V.	9.5	34.5
meq/kg C.V.	3.5	4.0
A.V.	0.19	0.39

第5表 移殖、無移殖下振盪培養による油脂の性状

	移殖振盪 培養液	無菌しんとう 培養液 (対照)
P.O.V.	367.0	597.0
meq/kg C.V.	21.0	41.0
A.V.	0.93	2.42

第7図

菌が作用した結果与えたと見做される油脂性状の変化



第6表

菌が作用した結果油脂に与えた変化

項目	測定値
P.O.V.	230.0
meq/kg C.V.	20.0
A.V.	1.5

〔5〕 培養による変敗油性状の経時的变化

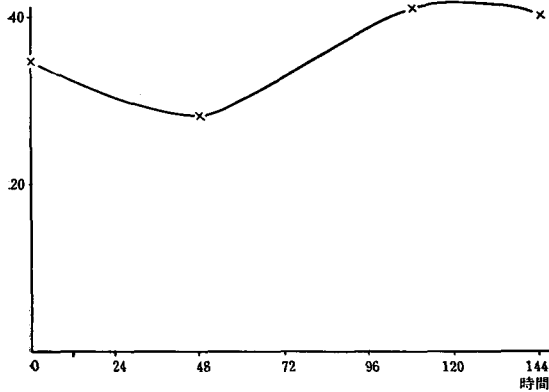
培養開始後、培養基中の油脂を0, 48, 72, 96, 120, 144時間毎にとり出して、その性状につき測定した結果は、第7表及び第8図、第9図の如くである。

第7表 培養基中油脂性状の経時的变化

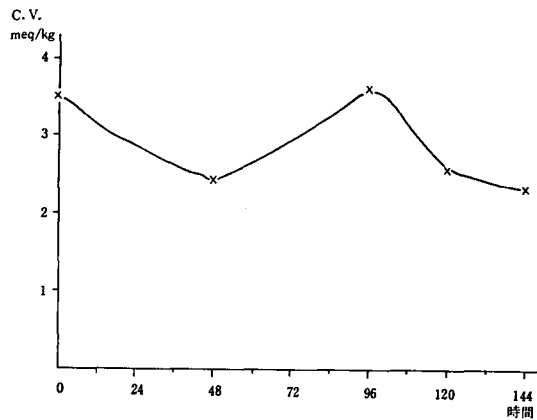
培養時間 測定項目	0	48	96	120	144
P.O.V.	34.5	28.0	30.0	41.0	40.0
meq/kg C.V.	3.5	2.4	3.74	2.69	2.3

炭化水素資化性菌による変敗油の利用に関する研究

第8図 培養基中油脂過酸化物価 (P.O.V) の経時的変化



第9図 培養基中油脂カルボニル価 (C.V.) の経時的変化



考 察

〔1〕 炭化水素資化性菌が、数種類大阪周辺の土から分離されたことは、このような酵母菌、細菌等が、特定の環境にのみ存在するものでなく、いわゆる、どこにも存在し得る可能性を示すものである。なお分離したKY-11がGenus *Candida*に属したことは、高橋、山田等<sup>(7)</sup>の報告と一致するものである。

〔2〕 本菌は Kerosene 培地中で、よく成育するが、成育曲線の型式はよく類似しながら静置培養よりも、しんとう培養のほうがはるかに旺盛な発育をとげているのは、酸素の摂取が容易なためであろうと推定される。なおビタミンB<sub>12</sub>を培地に添加した場合、著明な増殖をみたのは、これが菌体の合成に頗る有効であることを物語っている。本菌が、炭素源としてKeroseneを利用する経路に関しては多くの報告をみるが、今後ますますその代謝産物の究明がなされるべきであると考えている。

〔3〕 サラダ油の変敗油，未変敗油に於ける成育の差については，第一表に見られる如く，未変敗油の場合，50ml の培養基中120時間で0.302ml に及ぶ最大の菌体収量を得ているが，変敗油に於ては96時間で0.303ml の最大収量を得ている。変敗油培地に於ける最大収量が，未変敗油培地に於けるそれとほぼ等しく，しかも24時間，成育が早い事を見る時，本菌は変敗油を十分利用できるものであり，むしろ未変敗油よりも変敗油の方がかえって利用しやすいものであることを物語っている。即ち利用面の無い変敗油も本菌によって，酵母の菌体として，再利用できるものである可能性を見る事ができる。尚，両者ともピーク後，菌体収量が減少しているのは自己消化によるためであろうと推定される。尚第6図と第3表とを比較すると変敗油培地に於ける成育は，炭化水素培地に於ける成育よりも著明の増殖をみているが，これは変敗油が分子内に酸素原子を含み，Kerosene 等よりも明らかに利用されやすい形にあることから当然のことと思われる。

〔4〕 培養基調製時と殺菌後における油脂の性状を見るに過酸化価 (P.O.V) 及び酸価 (A.V.) における変化は頗る大きく殺菌時加熱による自動酸化のはげしさがうかがわれる。本菌を移殖培養することによる油脂性状の変化を，菌を移殖することなく他は全く同じ条件で処理した。対照の油脂性状と比較した結果，P.O.V. が著しく低下しているのは，酵母菌が過酸化物のサソを消費利用しているためと推定され，A.V. が著しく低下しているのについては，種々の理由が考えられる，すなわち自然酸化によって低級のサクサン，ギサンなどの酸が生成され，これを酵母菌が利用しているのではないかと推定されるとともに，揮発性の酸となって，培地から揮発してゆくのではないかと推定される。

事実，培地からは酸臭が感じられた。さらにまた菌の作用で油脂がアルデヒドその他，酸以外の物質に変わってゆくためではないかとも考えられる。従って，今後その代謝産物についての同定を行うべきであると考えている。C.V. の低下についても，本菌が，かかる物質を利用している為でないかと推定される。すなわち，酵母菌は，油脂のP.O.V., C.V., A.V. を大きく変えて，各種の代謝産物を形成していることが明らかである。

〔5〕 培養による変敗油性状の経時的変化については，しんとう培養による自動酸化の影響と，菌の作用による影響の両者が結果としてあらわれる事になるので，この傾向を酵母菌の生育による影響とのみ見做す事は出来ない。しかし油の性状の絶対値の変化は，P.O.V. に於てもC.V. においても，経時的に減少と増加をくりかえし，カーブが反転している。これは自動酸化によって値が増加したものを酵母菌が利用し，消費して値を下げ，同時に一方ではまたしんとうによる自動酸化でこの値が増加するためではないかと推定される。

## 結 び

炭化水素資化性菌を大阪周辺の土から分離し、これがGenus *Candida* に属するものであることを認めた。本菌が、いわゆる石油を食べ物にする為の菌体利用面で、役立つであろうことは想像にかたくないが、本菌を利用面のない変敗油活用の面から検討した結果、変敗油を炭素源とする培地では著明な増殖を、みることが出来、かかる面から変敗油を酵母菌体として、再利用できることの可能性を認めた。なお本菌の成育によって、油脂がどのように変化するかをみたが、P.O.V., C.V. 等が大きく変化し、殊に、A.V. が低下していくことを認め、本菌が変敗油をタンソ源として生育するにあたっての代謝産物、代謝経路、探索への示唆を得た。培養を終った培養基から、芳香が発生している等から変敗油を酵母菌体として、再び食用化するのみならず更に、その代謝産物の究明と利用に関する研究も今後、行なわれるべきであると思う。

## 文 献

- (1) Zobell, C.E.: Adv. in Enzymol., 10, 443 (1950)
- (2) Beerstecher, E. Jr.: Petroleum Microbiology, Elssevier Press (1954)
- (3) Raymond, R. L. and Davis, J. B.: Personal Communication (1963)
- (4) Champagnat, A and Vernet, C.: Nature, 195, 13 (1963)
- (5) Koichi Yamada, etc.: Agr. Biol. Chem., 27, 391 (1963)
- (6) J. Lodder and N.J.W. Kreger-Van Rij (1952)  
The Yeasts. 51-667, Amsterdam: North Holland Publishing company.
- (7) Joji Takahashi, etc.: Agr. Biol. Chem., 29, 293 (1965)