

炭化水素資化性酵母 KY-11 に関する研究

— 同 定 に つ い て —

小 原 国 彦
玉 置 ミヨ子

緒 言

炭化水素を利用する菌について遠くわが国の三好等が報告し¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ Zobell は総説を試みている。近年、この方面の研究が急激に盛んとなり、その報告も数多く見られるようになった。いわゆる石油を食べ物にすることが研究されて、すでにまず動物飼料として実用の域に達している。筆者等は、さきに炭化水素を唯一の炭素源として成育する菌を大阪周辺の土から分離して細菌および酵母菌の各種を得⁶⁾⁷⁾、これらの中の酵母菌 KY-11 を変敗した油脂を唯一の炭素源とする培地に移植したところ著量の増殖をみたので変敗油を栄養的に優秀な酵母菌体として再利用しうることの可能性を見出して報告し⁸⁾⁹⁾、また本菌の各種脂質・各種脂肪酸、グリセリン等々に対する挙動をみ¹⁰⁾¹¹⁾、一方ではまた、本菌が孢子を形成せず Slide culture 上で Pseudomycellium を形成することなどから Cryptococcacea に属する Candida であることを認めて報告した。

本研究ではこれが Candida のいずれに属するものであるかを探すべく Lodder の方法によ¹²⁾って、同定を試み、若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

I 実 験 方 法

本菌が Candida のなんであるかを探索するためにまず糖を発酵するかしないか、するとすればどの糖を発酵するかを調べ、ついで糖を資化するかしないかどのような糖を資化するかについてみた後、窒素を資化するかしないかを調べて検討し、その確認のために Malt extract における生育の状況を調べ、その Pellicle と Sediment および香りの生成と Cell の形状をみ、さらに炭素源として、Ethanol を使用した場合の Pellicle の形成と香りを見、Litmus milk 中の生育および Arbutin の Splitting について調べた。

1. Fermentation

Method

The fermentation of 2% Sugar solutions in yeast extract is tested in Einhorn tubes. The sugars are: glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose and occasionally inulin.

The Einhorn tubes are incubated at 25°C. and observed everyday. If there is no gas production the yeast cells of the sediment are evenly distributed through the tubes by suitable mixing. The final reading is made after ten days. In case of vigorous fermentation a positive result is evident after 2 or 3 days.

A 4% raffinose solution in yeast extract is used for a quantitative test of the fermentation of raffinose in the Van Iterson-Kluyver apparatus.

The time of this experiment is also extended to 10 days at 25°C. In most cases, however, the fermentation is finished after 3 days, and it is checked whether the amount of carbon dioxide formed corresponds either to $\frac{1}{3}$, $\frac{2}{3}$ or complete fermentation of the raffinose.

If the results were doubtful the direct fermentation of melibiose was tasted in a 4% solution in the van Iterson-Kluyver fermentometer.

Media

Yeast extract is prepared in the following way:

200g of baker's yeast is mixed with 1 liter water and some egg albumin, and autoclaved for 15 minutes at 120°C. The mixture is filtered while hot through a folded thick paper (if necessary twice).

Two percent solutions in yeast extract of the sugars to be tasted are made: the Einhorn tubes are filled with these solutions and sterilized for 15 minutes at 120°C.

2. Sugar assimilation

Method

Tubes filled with 5 cc of synthetic mineral medium containing each one of the five sugars tasted (glucose, galactose, saccharose, maltose and lactose) are inoculated with one drop of yeast suspension.

A similarly inoculated blank tube containing the medium without sugars serves for comparison.

The tubes are incubated at 25°C. and observed after 1, 2 and 3 weeks. If there is an undeniable difference in growth between a tube and the blank the result is considered positive.

Media

The liquid medium for the test

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0.5 %
KH_2PO_4	0.1 %
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{aq}$	0.05%
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{aq}$	0.01%
Nacl	0.01%
Sugar	0.5 %

Vitamins

Aten-fold concentrated solution of sugar and minerals in distilled water is Seitz filtered. 0.5 cc of this solution is added under aseptic conditions to 4.5cc sterile water in tubes. 0.05 cc of a hundred-fold concentrated vitamin solution is added.

The concentrated vitamin solution contains.

Biotin	2 μg
Calcium pantothenate	400 "
Inositol	2000 "
Niacin	400 "
P-aminobenzoic acid	200 "
Pyridoxine hydrochloride	400 "
Thiamine hydrochloride	400 "
Riboflavin	200 "
Water	10 cc

3. Assimilation of nitrate

Method

The liquid medium test is used, and they are incubated at 28°C. and observed after 2days.

Medium

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0.5 %
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	0.1 %
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{aq}$	0.05%
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{aq}$	0.01%
NaCl	0.01%
<u>$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$</u>	0.1 %

Vitamins

4. Growth in malt extract.

Tubes filled with 5 cc of a malt extract, and tubes are incubated at 25°C. and observed after 3 days. Malt extract can be prepared in the following way.

1kg of ground malt mixed with 2.6l tap water is warmed under repeated stirring on a waterbath at 45°C, for 3 hours. After this the temperature is raised to 63°C. and this temperature is maintained for one hour. The mixture is filtered through a hair-sieve and the filtered is sterilized for 15 minutes at 120°C. It is then filtered through paper and diluted to a density of 15°Bllg. It is sterilized in the flasks for 15 minutes at 110°C.

5. Ethanol as sole source of carbon

Method

Ethanol to a concentration of 3% is added to a basic medium not containing any other source of carbon. A blank tube without ethanol serves for comparison. Tubes filled with 5cc medium are inoculated with one drop of a yeast suspension and incubated at 25°C.

The results are read after 1 week.

Medium

The basic medium contains: $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 0.1%,

$\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 0.1%, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{aq}$ 0.05% in distilled Water.

It is sterilized in tubes for 15 minutes at 120°C. The 3% ethanol and a drop of sterile yeast extract or of a mixture of vitamins are added after sterilizing.

6. Growth in litmus milk

Method

Tubes containing sterile litmus milk with and without calcium lactate are inoculated and incubated at 25°C.

After 2 or 4 weeks the results are observed.

Medium

Litmus milk is prepared by steaming 10cc fresh skimmed milk in tubes for 30 minutes at 100°C during 3 consecutive days. After sterilizing 1cc of sterile 1% litmus solution and if required, 1cc of a sterile 5% calcium lactate solution are added.

7. Splitting of arbutin

Method

A medium containing 0.5% arbutin in yeast agcer is melted and poured in to a Petri dish into which a drop of $FeCl_3$ solution has been previously brought.

The liquids are throughly mixed. After soliditication the plate is inoculated and incubated at 25°C.

A positive result, a dark brown colored zone around the colonies in the medium, may be observed after 2.4 or 6 day,.

Medium

The medium consists of 5g arbutin, 20g agar in 1l yeast extract. It is sterilized for 15 minutes at 120°C.

I 実験結果

1. Fermentation

各種の糖について発酵試験をした結果、本菌は Glucose, Maltose, Galactose, Saccharose を発酵したが Lactose は発酵しなかった。

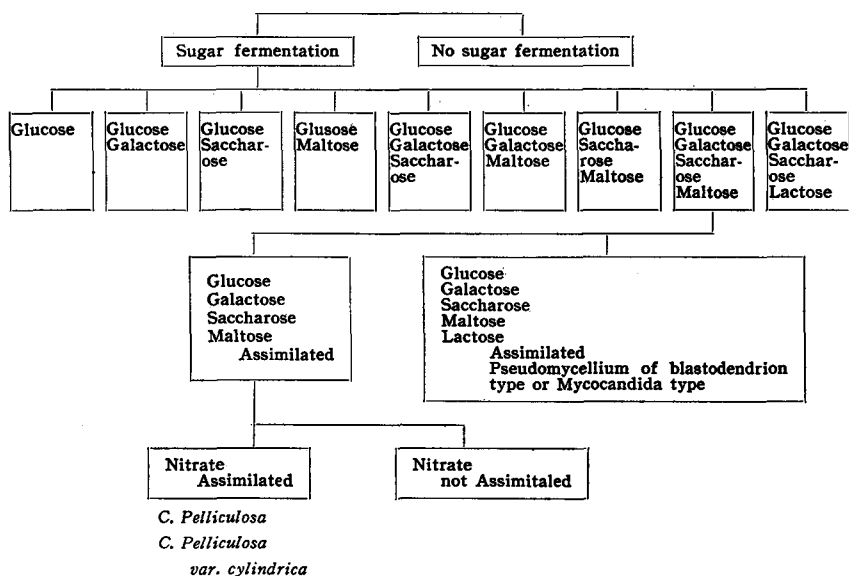
2. Sugar assimilation

各種の糖についてその資化性をみた結果、本菌は Glucose, Maltose, Saccharose をよく資化し、Galactose も弱く資化したが Lactose のみは資化し得なかった。

3. Assimilation of nitrate

窒素の資化についてはよく、無機性の N 源 $(NH_4)_2 SO_4$ を資化し得たので別表の如く。

C. Pelliculosa か C. Pelliculosa var. cylindrica のいずれかであることを認めた。



4. Growth in malt extract

培養の結果 Fig 1, Fig 2 のごとく白く、つやのない、少々しわのある粉状の薄膜と沈殿が

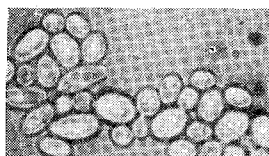


Fig 1 Growth in malt extract.
After 3 days at 25°C
Pellicle



Fig 2 Growth in malt extract
After 3 days at 25°C
Sediment

形成された。そしてこれを検鏡するとそれぞれの細胞は卵円形であるが中には 10μ 前後の非常に長いものもまじっていた。そして 17°C で1カ月間培養した結果やはり沈殿とつやの無いむしろかわいた状態のうすまくが得られた。

5. 炭素源として Ethanol を用いた場合、白くて、つやのないうす膜が形成され、培養後、栓をはずすと明らかに果実臭が認められた。

6. Growth in litmus milk

色は青みがかって液は凝固しなかった。

7. Splitting of arbutin

テストの結果は陽性であった。

考 察

炭化水素資化性酵母として土から分離した本菌が *Cryptococcaceae* に属する *Candida* に属していることは明らかにしたが、そのうちのなにであるかについて Lodder の分類法により、まず発酵試験で Lactose を発酵しないこと、さらに糖の資化試験で Lactose を資化しないことおよび窒素を資化することからこれが *C.pelliculosa* に属するか *C.pelliculosa var. cylindrica* に属するか、そのいずれかであることが明らかとなった。次いでこれら両者の差異を Malt extract における成育についてみた結果が前記のごとく、Pellicle の細胞と sediment の細胞は同形同大であることから、本菌は *Candida Pelliculosa* であると推定した。一般に *Candida* は炭化水素資化能力があるとされているが本菌もやはり *Candida* に属している *Pelliculosa* である点、結果が一致している。しかしこの菌が、変敗油をも資化し、これがいろいろの油脂に対する挙動を異にすることとかグリセリンはあまり資化せず脂肪酸部を主として利用する性質があることなどについてはあまり記されていない。今後は本菌が塩環境下にどのような生育を示すかとか、塩環境が本菌の脂質利用にどのような影響をおよぼすかなどについて探索したく思っている。

文 献

- (1) Zobell, C.E.: *Adv. in Enzymol.*, 10, 443 (1950)
- (2) Beerstecher, E. Jr.: *Petroleum Microbiology*, Elsevier 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) 小原・玉置：日本家政学会第18回総会研究発表要旨集，P 22 (1966)
- (7) 小原・玉置：相愛女子大学・相愛女子短期大学研究論集., 14, 83 (1967)
- (8) 小原・玉置：日本家政学会第19回総会研究発表要旨集，P 12 (1967)
- (9) 小原・玉置：栄養学雑誌., 26, 84 (1968)
- (10) 小原・玉置：相愛女子大学・相愛女子短期大学研究論集., 15, 35 (1968)
- (11) 小原・玉置：第30回日本家政学会関西支部研究発表会講演要旨，P 4 (1968)
- (12) J.Lodder and N. J. W. Kreger-Van Rij (1952)