

# 炭化水素資化性酵母 KY—11 に関する研究

— 塩環境下に於ける炭素源の資化について —

Studies on the nature of Hydrocarbon Utilizing Yeast KY—11

玉 置 ミ ヨ 子  
坂 下 キ ク 子

## 緒 言

著者等は、先に大阪周辺の土から炭化水素を唯一の炭素源として生育する微生物数種を分離し、<sup>1)2)</sup>そのうちの特定 Yeast KY—11 を用いて変敗油を唯一の炭素源として培養したところ著量の増殖を見たので本菌を用いて未利用資源である変敗油を優秀な蛋白源として再利用出来ることの可能性を見出して報告した。<sup>3)4)</sup>なお本菌は同定の結果、*Candida* に属する *Pelliculosa* であることも報告した。<sup>5)</sup>又、本菌を海水に培養して増殖させ得る可能性をも見出して報告し、<sup>6)</sup> 海水に変敗油を流し、これより酵母菌体を得る、いわゆる海水と変敗油からの人造肉実現の可能性を予想している。かかる意味から本菌の塩環境に於ける生育のパターンを究明することは、なかなか意味深いことである。最近微生物の塩環境下に於ける挙動が問題視されようとしている時、KY—11 の塩環境との相関々係を明らかにすべく本研究に着手し、若干の知見を得たので報告する。併せて本菌の Lipase 活生の有無について無塩下に行なったので付記する。

## 実 験 の 部

### I 実 験 方 法

#### (1) 炭化水素資化性菌 KY—11 の分離及び同定

炭化水素資化性酵母 KY—11 の分離方法及びその同定については既報<sup>5)</sup> の如くである。

#### (2) 培養基の調製と菌の培養

第一表の如き各種炭素源及び各種塩類よりなる培地 50ml を 500ml 平底フラスコに分注し、常法の如く殺菌して、KY—11 を Stock culture から無菌的に 3 白金耳移植後、29°C、1 分間 130 往復動の振盪培養機にて培養を行なった。

第 1 表 培 地 組 成

※1) Source of carbon	0.25Mol.
※2) Source of nitrogen	0.05Mol.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> _____	2.5g
MgSO <sub>4</sub> 7aq _____	1.0g
※3) Inorganic Salt _____	0~5.0Mol.
Tap water _____	1.0l
※1) Glucose, Fructose, Maltose, oleic acid, Glycerin	
※2) NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
※3) KCl, LiCl, NaCl etc	

(3) 菌体収量の測定

29°Cで所定の時間、培養の後、培養液を菌体収量測定用遠心沈澱管に移し、3,000R.P.M.で約5分間遠心分離し、supernatantを除去の後、純水を添加し、菌体を十分にSuspendした後、3,500R.P.M.で約10分間遠心分離し、その沈澱量を菌体収量とした。尚、沈澱量0.1mlは乾燥菌体23.5mgに相当することは既報<sup>2)</sup>の通りである。

(4) 水層部 PH の測定

培養液を遠心分離した後得られた supernatant について、常法の如く脂質を除去の後、PHメーターにて水層部の PH を測定した。

(5) Lipase 活性の測定

i. 粗酵素液の調製

第2表の如き培養基に所定の時間培養の後菌体を遠沈除去し、その上澄液を分液ロートにとり、油層を分離した後の水層部のみをとって粗酵素液とした。

第2表 培地組成

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> _____	2.5g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> _____	5.0g
MgSO <sub>4</sub> 7aq _____	1.0g
Olive oil _____	0.25 Mol.
Tap water _____	1.0 l

ii. 試薬

- 緩衡液 … 0.1Mol. リン酸緩衡液 (0.1N-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・0.1N-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1:2)
- 表面活生剤 … 0.2%タウロコール酸ソーダ
- 基質 … 25%オリーブ油ポリビニールアルコール
- 停止液 … アセトン・エタノール 1 : 1
- 滴定液 … 0.05N-NaOH Sol.

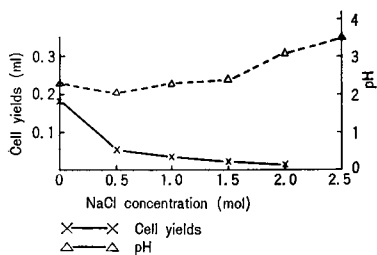
iii. 測定方法

100ml共栓付三角フラスコに緩衡液4ml、表面活性剤2ml、基質5mlを加え、37°Cに2時間作用させた後、停止液20mlを添加後、NaOH溶液にて滴定を行なった。尚、Controlとしては酵素液を100°Cで10分間加熱し、不活性化したものを用いてSampleとすべて同様に行なった。

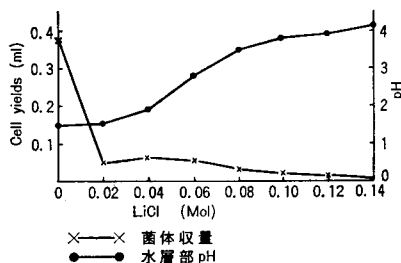
II 実験結果

(1) 塩類各濃度に対するKY-11の増殖状況

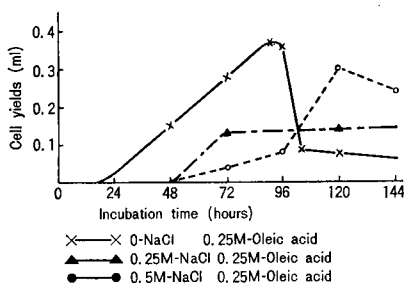
炭素源オレイン酸培地に、NaCl, LiCl を各濃度別に添加し、96時間、培養した結果、その菌体量と水層部 pH との経時的推移は第1, 2図の如くである。又、オレイン酸培地に於ける各濃度別 NaCl 添加による菌体量は第3図の如くである。



第1図 NaCl 各種濃度と菌体収量及び水層部 pH の関係



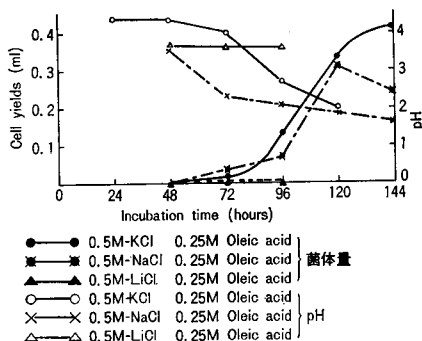
第2図 LiCl 各種濃度と菌体収量及び水層部 pH の関係



第3図 NaCl 各種濃度に於ける菌体量の経時的推移

(2) 定濃度の各種塩類培地に対する成育状況

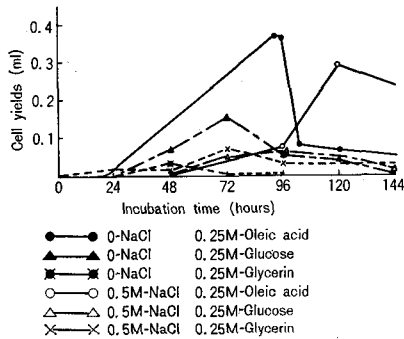
炭素源オレイン酸培地に 0.5Mol. 濃度の NaCl, LiCl, KCl を添加し、24時間毎に経時的に培養した結果は第4図の如くである。



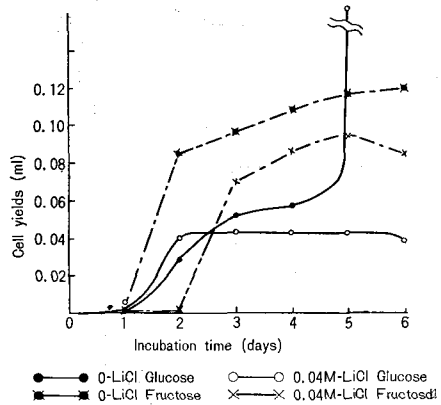
第4図 各種塩類に於ける菌体量及び pH の経時的推移

(3) 塩環境下に於ける各種炭素源の比較

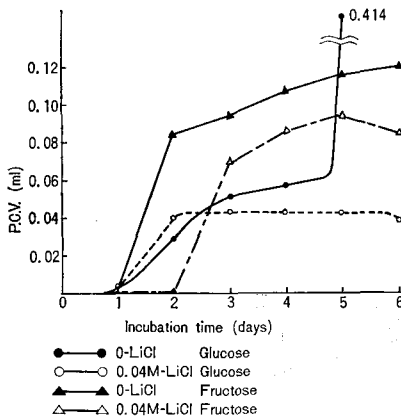
0.25 Mol. 濃度のオレイン酸, ブドー糖, グリセリンの各々炭素源に NaCl を 0.5 Mol. 添加, 及び無添加培地についてそれぞれ培養した結果は第5図の如くである。又, 炭素源として 0.25 Mol. のブドー糖, 果糖及びオレイン酸培地に 0.04 Mol-LiCl を添加した場合の本菌の生育状況に及ぼす LiCl の影響は第6図, 7図, 8図, 9図の如くである。



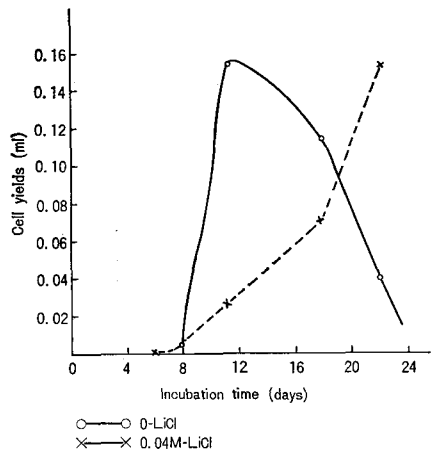
第5図 NaCl 添加の有無による各種炭素源の生育状況



第6図 NaCl 添加の有無による各種糖源の資化状況

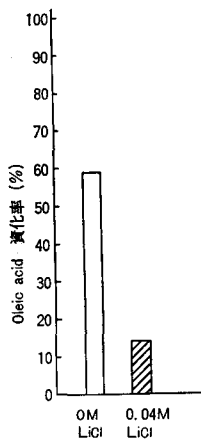


第7図 LiCl 添加の有無による各種糖培地の資化状況



第8図 LiCl 添加の有無によるオレイン酸資化状況

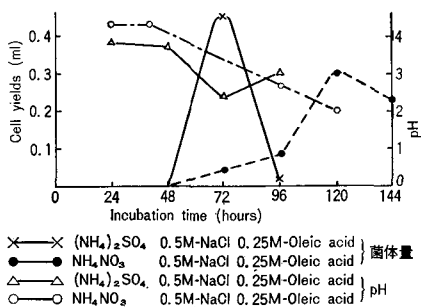
炭化水素資化性酵母KY-11に関する研究



第9図 LiCl の添加の有無によるオレイン酸資化率

(4) 塩環境下に於ける各種N源の資化状況

炭素源オレイン酸に  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  あるいは  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を各々N源として0.05M 濃度用いた培養基に経時的培養を行なった結果は第10図の如くである。



第10図 LiCl 添加の有無による各種培地の資化状況

(5) Lipase 分泌の消長

無塩下に炭素源オリブ油を用いて、24時間、48時間、72時間培養した培養上澄液中に含まれる Lipase の活性を測定した結果は第3表の如くである。

第3表 Lipase 活性

培養時間	0.05N-NaOHSol. 滴定値 (ml)
24時間	0.15
48時間	0.05
72時間	0.00

## 考 察

(1) 塩類添加培地に於ては無添加培地に比して一様に菌体生育の阻害を受けており、その濃度も大きさに比例して、阻害率が高くなっている。又、NaCl, LiCl 両者の濃度別による成育状況は NaCl 0.5Mol. と KCl 0.04 Mol. 濃度の時と一致することから LiCl 阻害率の方が NaCl より10倍以上も大きいことが伺える。

(2) 各種塩類の濃度を 0.5 Mol. の一定にして培養した結果、LiCl の阻害率は 100% であり、NaCl, KCl に於いては phaseが、ややずれる程度で、生育に決定的な打げきを与えるものではない。

(3) 炭素源として、オレイン酸、グリセリン、ブドウ糖を与えた場合、NaCl 添加の有無に拘らずブドウ糖にもましてオレイン酸を最もよく資化し得ることから本菌はオレイン酸嗜好性が強いと見做される。又、NaCl 添加によりオレイン酸、ブドウ糖、グリセリンの各場合と共に phase がずれ lag phase が長びくことは NaCl 培地適応に時間を要する為であろうと思われる。オレイン酸に於ても菌体量の最高値が NaCl 無添加より少いことは、先の実験結果と一致し、当然の結果と思われるが、グリセリンに限って、72時間培養以後逆転現象を起こしている。

(4) N源に於ては  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を $\text{NH}_4\text{NO}_3$  よりよく資化することが明らかであり、いずれの培地に於ても pH が菌体収量に比例して下るのはN源のアルカリ根を利用する為、酸根が蓄積した結果とみられるが、しかし、生酸性物質の代謝がその原因をなしているとも考えられ、目下のところ追求中である。

(5) Lipase の菌体外分泌は認められ、特にこれが 24 時間に於いて最高であるということは、本菌の生育に際して、初発反応で Lipase が分泌されることを物語っている。それは多分、Lipase 分泌によって分解された脂肪酸を資化する為の準備とも見做し得るものである。正確には Acetone あるいは硫酸処理によって Lipase を分離し、性状を追究すべきであるが、本論文の趣旨は生産の有無をみることにあったので粗酵素の状態で測定した。

## 結 び

KY-11はよく炭化水素をも資化するが、特によくオレイン酸を資化し、その資化はNaCl, KCl 0.5 Mol. の存在では生育パターンの phase は、ずれるが決定的な打げきは受けない。0.5 Mol. の NaCl の濃度に耐えることは海水の使用も可能ならしめることを物語っている。しかし、phase がずれることは適応性を得るためと思われるが、更にその詳しいメカニズムに

## 炭化水素資化性酵母KY-11に関する研究

については興味ある問題として将来に期待したい。尚、Lipase が培養当初に分泌されることは脂質資化能をもつ本菌の資化機構究明の上に大いなる示唆を与えるものである。

終りに臨み、本研究を終始、御指導下さいました本学教授、小原国彦先生に深甚並謝意を致しますと共に本研究に御協力いただきました化学研究室助手補木田優美子さんに深謝いたします。

### 文 献

- 1) 小原・玉置：日本家政学会研究発表要旨集，P.22 (1966)
- 2) 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)
- 3) 小原・玉置：栄養学雑誌，26，84 (1968)
- 4) 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)
- 5) 小原・玉置：相愛女子大学・相愛女子短期大学研究論集，17，25 (1970)
- 6) 小原・玉置：日本栄養改善学会第回研究発表抄録集，P. (1969)