

Candida tropicalis OT-65 に対する塩高張が 脂質形成に及ぼす影響

Effect of salt condition on the lipid formation
of *Candida tropicalis* OT-65

小 原 国 彦
玉 置 ミヨ子

筆者等は、さきに大阪周辺の土から炭化水素を唯一の炭素源としてよく資化し得る酵母菌を分離し、これを同定の結果 *Candida tropicalis* に属することを明らかにし、strain を OT-65として報告した。なお本菌は、炭化水素のみならず各種の油をもよく資化するがその状況は油の種類によって大きく異なることから、構成脂肪酸の資化に差異のあることを見出し、報告した¹⁾。本菌の脂肪酸資化に当たってはリノール酸は資化し得ないが²⁾、オレイン酸を最もよく資化し、ステアリン酸、パルミチン酸なども資化する。ブドウ糖も資化はするが、その資化はオレイン酸等にはるか及ばない。しかし、培地にビオチンを添加することによって頗るよく資化するようになる。本菌は、非耐塩性の酵母であるが0.5M-NaCl 溶液の塩環境に於いても、通常培地でみられる増殖の約半量の増殖をみることができ³⁾。そしてこれら塩環境の及ぼす^{4) 5) 6) 7)}阻害は Co-factor の添加によって回復することも報告した。

生体の塩環境にみられる特異的な反応と、そのメカニズムは頗る興味深く、また重要な問題である。これら耐塩機構の究明への学問的な探究は、未だ日が浅く、特に耐塩機構と脂質に関する報告はその数が少ない⁸⁾。本報では、本菌の塩高張培地が細胞内脂質形成に、どのような影響を与えるものであるかを探究すべく、通常培地と塩高張培地の両者でそれぞれ成育の菌体から抽出した脂質の成分を比較検討し、若干の知見を得たので報告する。

試 料

菌体試料は前記の如く、土から分離した *Candida tropicalis* OT-65 を用いた。

実 験 方 法

1. 培 養

Tab. 1 medium

(A) Glucose.....	45.04g	(B) Glucose.....	45.04g
NH ₄ Cl.....	6.6g	NH ₄ Cl	6.6g
KH ₂ PO ₄	2.5g	KH ₂ PO ₄	2.5g
MgSO ₄ -7aq.....	1.0g	MgSO ₄ -7aq.....	1.0g
Biotin	2μg	Biotin.....	2μg
dist. water	1.0ℓ	dist. water	1.0ℓ
		NaCl.....	29.21g

Tab. 1 のA及びB の如き組成の各培地、それぞれ50mlを500ml容肩付きフラスコにとり、移殖後往復動しんとう培養機で1分間120往復で、29℃、48時間培養した。これは本菌のLogarithmic phase が完了し、Stationary phaseに入るところに相当する。

菌体内脂質各種成分が生育の時期によって異なるから本菌は、Stationary phase に入^{9) 10)}ったところを以て分析の対象とした。

2. 菌体の分離

所定の時間培養後、培地を遠沈管にうつし、3500r. p. m. 3分間遠沈の後、上澄液を捨て水を加えて攪拌の後、再び遠沈して直ちに-30℃に凍結して供試用とした。

3. 脂質の抽出

Fig. 1 の如く、Bligh-dyer 法の改良法によって、凍結細胞からそのまま抽出した。

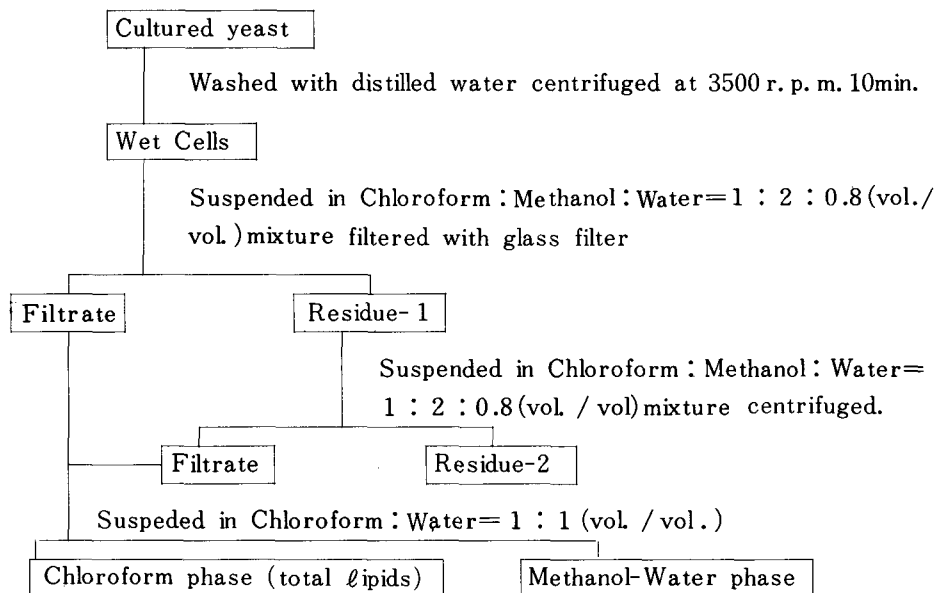


Fig. 1 Procedure for extraction of lipids from yeast cell.

4. 薄層クロマトグラフ

プレートは、merck のSilica gel G を用いた。展開溶液は次の如く総脂質分析用には、石油エーテル：エーテル：酢酸＝80：30：1 を、極性脂質分析用には、クロロホルム：メタノール：アセトン：酢酸：水＝5：1：2：1：0.5を用いた。

なお呈色試薬は次の如くである。

(1) 総脂質には………50%硫酸

(2) リン脂質には……Dittmer-Rester の試薬

[A液] 25N-H₂SO₄ 1000mlに 40.11g のM₂O₃ をゆるやかに沸騰させながら溶解する。

[B液] A液の500mlに1.78gの粉末M₂O₃を加え15分間、ゆっくり沸騰させる。

使用にあたって、A液：B液：水＝1：1：2を混ざる。

このようにして得たSpot について次の二波長クロマトスキャナーに供した。

5. 二波長クロマトスキャナー

島津二波長クロマトスキャナーCS-900形を用いて測定し、測定の条件は次の如くである。

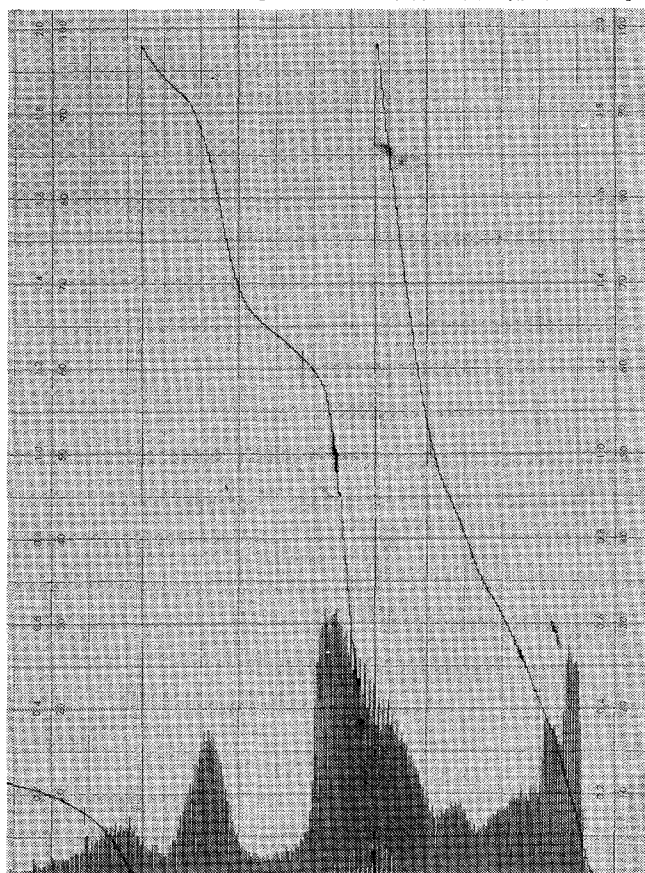
総脂質には50%硫酸を噴霧後150℃に20分間保って発色させFig2に記した如く λ_s , λ_R を決定し、1.25×1.25mm²の光束で、反射ジグザグスキャニング法で求めた。

なお、燐脂質には Dittmer-Rester 試薬を噴霧発色させ、Fig 3に記した如く λ_s , λ_R を決定し、1.25×1.25mm²の光束で反射ジグザグスキャニング法で求めた。

噴霧は島津CS-900特別付属品(204-21022)を使用した。

実験結果

1. 総脂質のクロマトスキャナーによる解析結果はFig2, 及び Tab. 2の如くである。



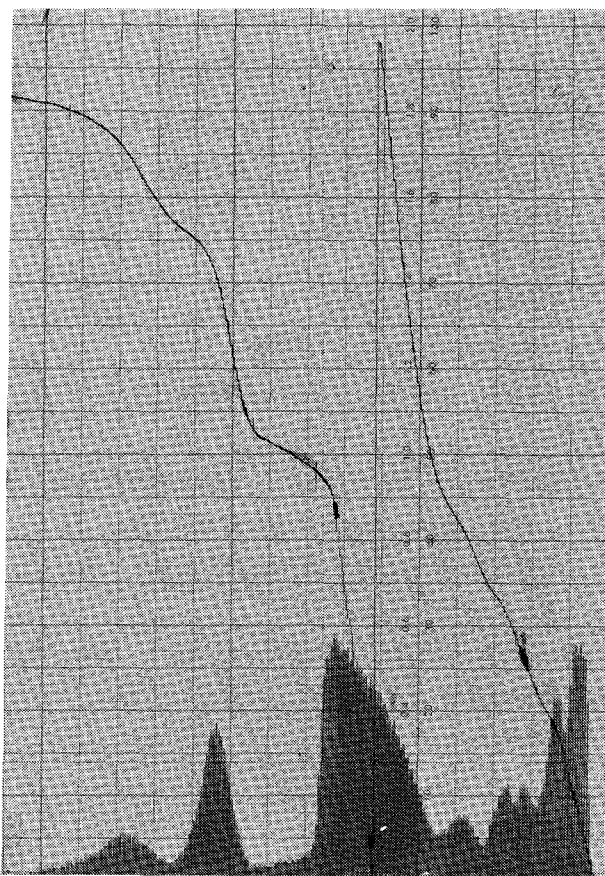


Fig. 2 Chromatograms of total lipids of *Candida tropicalis* OT-65 by Dual-Wavelength Chromato scanner.

Wave length : λ_s 400nm, λ_r 700nm

(A) normal condition

(B) salt condition

Tab. 2 Ratio of each spot in total lipids separated from *Candida tropicalis* OT-65 under normal and salt cation by chromato scanner.

Spot	-Na%	+Na%
Polarlipid	6.2	7.7
Monoglyceride	3.3	4.4
Sterin	4.4	3.6
1.2Diglyceride	3.6	3.5
1.3Diglyceride	9.2	6.9
Fattyacid	55.0	53.8
Triglyceride	12.5	13.0
Sterinester	15.7	7.1

errors of all data are between $\pm 0.01 \sim \pm 0.03$

2. クロマトスキャナーによるリン脂質の分析結果はFig.3 及びTab.3 の如くである。

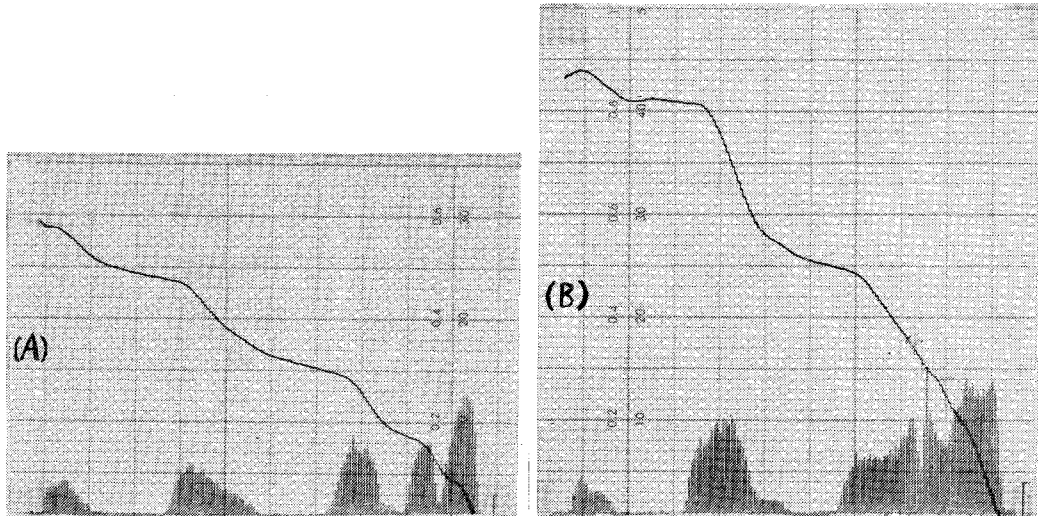


Fig. 3 Chromatograms of phospholipids of *Candida tropicalis* OT-65 by Dual-Wavelength chromato scanner.

wave length : λ_s 650nm. λ_R 400nm.

(A) normal condition

(B) salt condition.

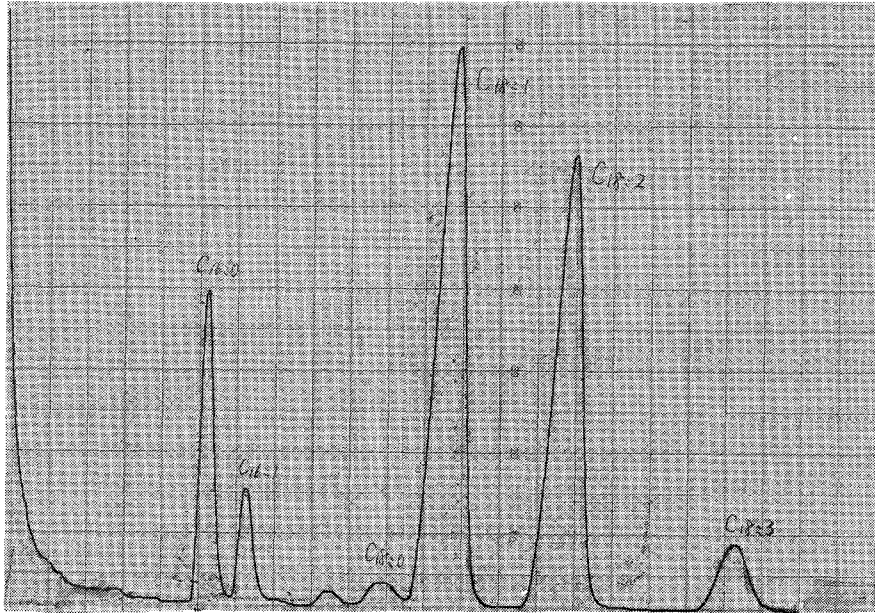
Tab. 3 Ratio of each spot in phospholipids separated from *Candida tropicalis* OT-65 under normal and salt condition by chromato scanner.

Spot	-Na%	+Na%
Phosphatidylinositol	21.6	29.1
Phosphatidylseline	13.7	8.1
Phosphatidylcholine	19.6	20.9
Phosphatidylethanolamine	33.2	34.9
Cardiolipin	11.3	7.0

errors of all data are between $\pm 0.02 \sim \pm 0.03$

3. ガスクロマトグラフによる構成脂肪酸の組成は、Fig.4 Tab.4 の如くである。

Fig. 4 (A)



(B)

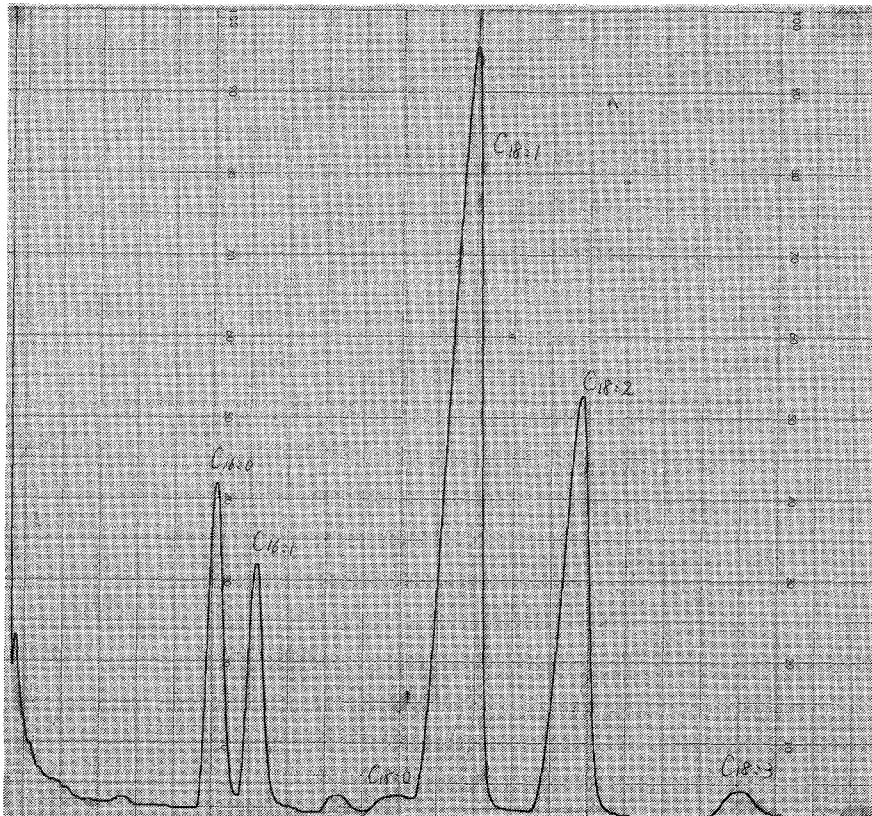


Fig. 4 Gas chromatograms of the fatty acid methylesters separated from the cellular lipid extract of *Candida tropicalis* OT-65.

column : 3 mm×2 m stainless steel tube packed with 25% diethyleneglycolsuccinate.

Temperature : column, 180°C: injection port and detector, 210°C.

carrier gas : He

(A) normal condition

(B) salt condition

Tab. 4 Ratio of each fatty acid separated from cellular lipid extract of *Candida tropicalis* OT-65 under normal and salt condition by gas chromatography.

Fatty Acid	C	-Na %	+Na %	+Na / -Na
Palmitic Acid	C ₁₆ : 0	12.9	11.0	0.9
Palmitoleic Acid	C ₁₆ : 1	4.2	9.8	2.3
Unidentified peak		0.8	0.9	1.1
Stearic Acid	C ₁₈ : 0	1.6	1.2	0.8
Oleic Acid	C ₁₈ : 1	41.5	51.2	1.2
Linoleic Acid	C ₁₈ : 2	33.7	24.0	0.7
Linolenic Acid	C ₁₈ : 3	5.3	1.9	0.4

errors of all data are between $\pm 0.02 \sim \pm 0.04$

考 察

本菌は非耐塩性の好気的な菌であるがこれを塩環境においた場合、その生育は大きく阻害を受けつつも生育は続ける。塩濃度は0.5M-NaCl環境で生育半減を示し LiCl の阻害は更に強烈である。このような性状をもつ本菌を塩環境下に培養し、塩高張による影響をみることは耐塩機構・能動輸送の機構の解明にとって頗る意味深いものと思われる。通常培地で培養した本菌の含有脂質についてみた場合、Tab. 4に見る如く飽和脂肪酸であるステアリン酸とパルミチン

酸がそれぞれ全脂肪酸の1.6%と12.9%を占めていたものが塩高張培地で培養した場合はそれぞれ1.2%と11.0%とに両者とも減少していることは、塩高張が本菌の菌体内脂質生成時、ステアリン酸とパルミチン酸の不飽和化への影響を与えていることが推定される。これは塩高張の Osmotic Stress がこの影響を与えているものなのか、あるいはNa⁺がその影響を与えているものであるのかは、今後の研究に待つべきであるが、いずれにしても塩高張が飽和脂肪酸の不飽和化を促進することが推測される。本実験で通常培地における合成脂質の各脂肪酸含有率は、金子等¹¹⁾の文献とおよそ一致している。なお、全脂質の薄層クロマトグラフによる分析の結果は、Fig.2 と Tab.2に示される如くであるが、原点にとどまった Polar lipidの差をみると、塩高張培地における細胞内脂質は通常培地に於けるものよりも、その含有率が多いことから、塩高張は Polar lipid の生成を促進するものであることが推定される。なお、リン脂質について、両環境下に於ける消長を比較した結果が Tab.3とFig.3 であり、塩高張・通常培地 両者に若干の差が認められるのも意義深い。

これらは、クロマトスキャナーの特定波長下での各スポットを%で示し、それを比較したものであるから、その条件に於てのみ一応の比較は可能であるが今後は各 Spot 毎に適正波長を求めて、両環境下での比較を更にくわしく試みたいと思っている。なお、リン脂質ばかりでなく、糖脂質についても検討を加えたい。更に本報では細胞内全脂質の比較を行っているが、細胞膜、リボゾーム等、細胞各分画毎に主としてどの部分での変化が示されているのかを追求することも、今後の問題であると思っている。

要 約

非耐塩性の炭化水素資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 が塩高張下、ブドウ糖培地で合成する脂質を、通常培地でのそれと比較したところC₁₈: 0, C₁₆: 0の不飽和化がおこりC₁₈: 1, C₁₆: 1が多く見出された。なお、極性脂質も通常培地のそれよりも多くなっている。これは塩高張下における脂質合成のパターンが、通常培地のそれと異なっていることを示すものであろう。

本稿を終わるに当たり、終始積極的に努力された戸川成代嬢に深甚の敬意と謝意を表します。

文 献

- 1) Ohara, K., and Tamaki, M. 1974 a. Utilization of oils by a strain of *Candida tropicalis*. Trans. Soai Women's Sr. and Jr. College 22 : 33~42.
- 2) Ohara, K., and Tamaki, M. 1967

- Studies on the utilization of rancid oil by hydrocarbon utilizing yeast.
J. Soai Women's Sr. and Jr. College 14 : 83 ~90
- 3) Ohara, K., Tamaki, M. and Takada, H. 1977
Effect of gibberellic acid on utilization of oleic acid for growth in the presence of linoleic acid by a strain of *Candida tropicalis*.
Trans. Mycol. Soc. Japan, 17 : 445~450
- 4) Ohara, K., Tamaki, M., and Takada, H. 1974b
Utilization of fatty acid by a strain of *Candida* under saline condition with special reference to the either of vitamin B₁₂. Trans. Mycol. Soc. Japan, 15: 91~97
- 5) Ohara, K., Tamaki, M., Kawahara, I. and Takada, H. 1975
Effect of gibberellic acid on the growth of fatty acid utilizable yeast, a strain of *Candida tropicalis*. Trans. Mycol. Soc. Japan, 16 : 247~252
- 6) Yagi, T., Terano, S., Takada, H. and Ohara, K. 1975
Effect of gibberellic acid on the induction of respiratory deficient mutant in yeast.
Trans. Mycol. Soc. Japan 16:36~41
- 7) Takada, H., Ohara, K., Kawahara, T., Tsukada, O. 1971
The growth Promotive Effect of Extract from Saline Cultured *Chlorella* cells on Halophilic Microorganisms.
Proceeding of the 7th international Sea weed Symposium.
- 8) Ikuya Yono, Yoshiya Furukawa and Masamichi Kusunose. 1971
Fatty acid composition of arthro bacter simplex Grown on Hydrocarbons.
Eur. J. Biochem. 23, 220~228.
- 9) Toshihiro Itoh, Hatsue Waki and Hiroshi Kaneko. 1975
Changes of lipid Composition with Growth phase of *Cryptococcus neoformans*.
Agr. Biol. Chem., 39(12), 2365 ~2371
- 10) H. M. JENKIN, E. McMEANS, L. E. ANDERSON, and T. K. YANG. 1976
Phospholipid composition of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* cells in logarithmic and stationary growth phases.
Lipids., 11(9), 694~704
- 11) Hiroshi Kaneko, Masako Hosohara, Masamichi Tanaka, and Toshiro Itoh. 1976
Lipid composition of 30 species of yeast
Lipids., 11(12), 837~844
(本学教授—食品化学)
(本学助手—食品化学)

