

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

Studies on the Character and the Utilization of Oil grown Yeast, *Candida tropicalis* OT-65

小原 国彦・玉置 ミヨ子

はじめに

- 1 炭化水素資化性菌の分離
- 2 炭化水素資化性酵母 KY-11 の同定
- 3 *Candida tropicalis* OT-65 の油脂に対する資化
- 4 Glycerin 及び各種脂肪酸の資化
- 5 本菌の二炭素源共存下にみられる拮抗現象
- 6 塩高張が本菌に及ぼす影響
- 7 Co-factor による塩阻害の除去
- 8 炭素源資化に及ぼす GA₃ (Giberellic acid) の影響
- 9 酵母菌体からの蛋白質の抽出, 分離

おわりに

文献

はじめに

人類は出現以来, 大自然の動植物を主な食料としつつ生活し, それは現在も基本的には何ら変わっていない。食料の確保には限られた土地で収穫迄には労力, 月日を要し, しかも時には異常気象による不作, 食料分配の不備, 人口増等々の諸因子により常に安定した食料供給がなされるとは限らず飢餓への恐怖, 苦しみは地球上から消え去っていない。

近年, 炭化水素資化性微生物に関する研究が報告されているが^{1~5)}筆者等は通常の動物性食品, 植物性食品以外に微生物菌体の食料, 微生物からの食品生成こそ飢餓を防ぎ, 蛋白質資源不足の現況を解決し, 人類における未来象をえがく重要な基盤であると考え, 安価なものより得られることを期待して, 変敗油を唯一の炭素源として生育し得る酵母に着眼し, 探し求めていたところ, これを土から分離することができた。そしてその菌を同定し, その培地として海水も利用できるよう期待して, 耐塩性をも検討し, これに対する若干の知見も得た。又, 二炭素源

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

培養にみられる拮抗現象についても検討して培養への条件を探索することにした。更に得られた菌体から蛋白質を抽出分離し、蛋白性食品開発への基礎とすべく計画し、蛋白質も分離した。このように土から分離同定した *Candida tropicalis* OT-65 酵母の諸性状を明きらかにし、変敗油から蛋白質の分離までの一連の研究を進めることができた。今後こそ検討しなければならない要素も多いが、本報では総説として菌の分離から脂質を炭素源として利用し、菌体蛋白を得るまでの経緯をまとめることにした。新しい食品が変敗油からの酵母蛋白として無限に生産され、世の蛋白不足を解消し、更に高度の蛋白性食品づくりに役立つことを念願してやまない。

1 炭化水素資化性菌^{6,7)}の分離

大阪周辺の炭化水素（石油）が常に浸透している車庫内や道路上の土を数種採取し、表1の如き組成をもつ培養基を調製し、図1に示した方法で分離を行なった。つまり 500 ml 肩つきフラスコに培地を 50 ml 分注し、常法の如く 120°C 15分間の高圧蒸気殺菌を行なった中に、

表1 炭化水素資化性微生物分離用培地の組成

	for yeasts & molds	for bacteria
Kerosene	35.0 g	35.0 g
Liquid paraffin	35.0 g	35.0 g
NH ₄ NO ₃	5.0 g	5.0 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g	—
K ₂ HPO ₄	—	2.5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1.0 g	1.0 g
Tween-20	0.5 g	0.5 g
Tap water	1.0 l	1.0 l
pH	5.0	7.0

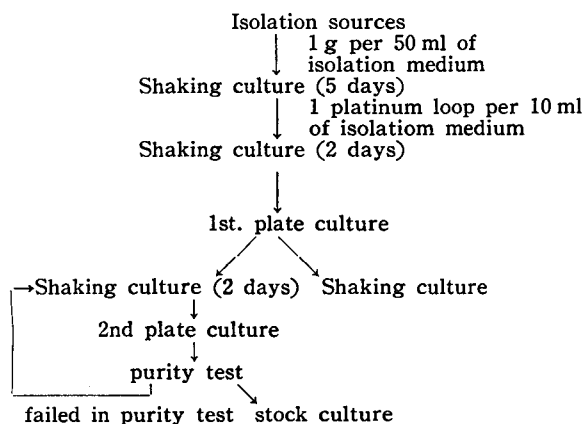


図1 分離の方法

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

土 1 g を投入し、30°C で振とう培養を5日間行い、次に 30 ml 試験管に 10 ml ずつ分注した表 1 の無菌培地中に 1 白全耳を移植し、前同様の条件で 2 日間、振とうの後、表 1 の培地に 2 %寒天を添加し 30 ml 試験管に 15 ml 分注し殺菌した培地を 45°C に溶融した中に、一白全耳移し入れ、2 本 3 本めの試験管に一白金耳ずつ希釈し、各々シャーレーに移し入れ、30°C で固体培養にかけ、数日後、出現した各種コロニーから一白全耳ずつ液体培地 10 ml にそれぞれ移植、2 日間振とう培養の後、再び固体培養にかけて、出現したコロニーについて、先と同様の操作を繰り返し、purity test を経て、表 2 の如き酵母菌とバクテリア数種分離し、最も生育の旺盛な KY-11 株について次にその同定を行なった。

表 2 土から分離した酵母菌及び細菌

酵 母 菌	細 菌
KY-9 (生育すぐれず)	KB-1 (黄色菌体)
KY-10 (生育旺盛ならず)	KB-2 (微赤色菌体)
KY-11 (生育旺盛)	KB-3 (色素なし)

2 炭化水素資化性酵母 KY-11 の同定⁸⁾

前述の如く分離した酵母菌 KY-11 株について vegetative cell の形態、vegetative production の形式、true mycelium・pseudomycelium 形成の有無、糖類の fermentation test 及び assimilation test、硝酸塩の assimilation test 等について^{9,10)}成書を参考に各々次のようにして同定を行なった。

(1) vegetative cell の形態及び vegetative production の形式

表 3 の YM 培地に本菌を 25°C 3 日間培養の後、vegetative cell を検鏡した結果、図 2 の⁽¹⁰⁾2 のような卵形、楕円形がみられた。更に Linder 氏小滴培養法に準じ、単一の細胞体を得、これから出発して vegetative production を顕微鏡観察した結果、budding による形式であると判明した。

表 3 YM 培地 (peptone·yeast extract·malt extract medium)

peptone	5 g
yeast extract	3 g
malt extract	3 g
glucose.....	10 g
dist. water.....	1,000 ml

(2) pseudomycelium, true mycelium 形成の有無

シャーレー中にじ字ガラス棒を入れ、これにスライドガラスを 1～2 枚のせ乾熱殺菌してお

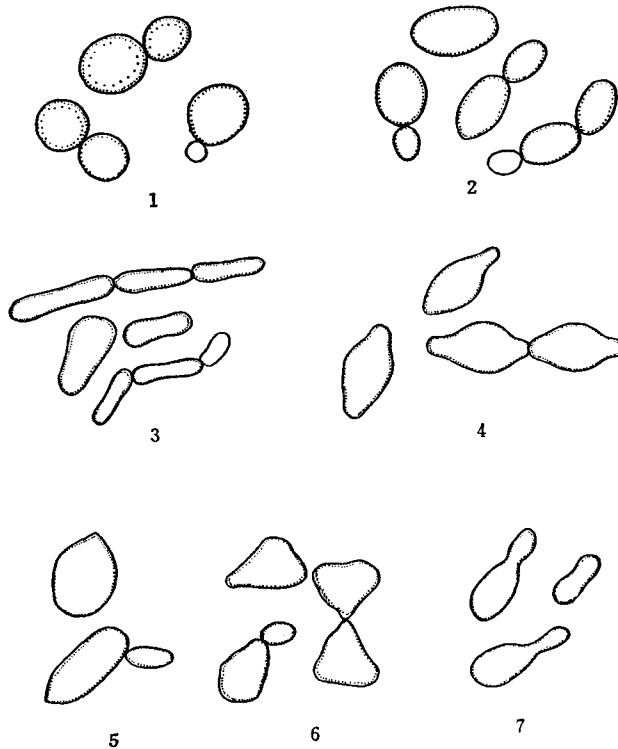


図2 栄養細胞の主な形態

1. 球(円)形, 矩卵形 globose (round), spherical, short-oval: *Saccharomyces*, *Torulopsis* など多くの属
2. 卵形, 楕円形, 長楕円形 oval, ovoid, elliptical, long-oval: *pichia*, *Candida* など多くの属
3. 伸長形, 円筒形, ソーセージ形 elongate, cylindrical, sausage-shaped: *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Candida* などいろいろの属
4. レモン形 lemon-shaped, apiculata: *Saccharomycodes*, *Hanseniaspora*, *Nadsonia*, *Kloeckera* などの属
5. 尖頭楕円形 ogive-shaped: *Dekkera* 属, *Brettanomyces* 属
6. 三角形 triangular: *Trigonopsis* 属
7. ビン形 bottle-shaped, flask-shaped: *Pityrosporum* 属

き, 別に剥皮, 磨細した馬れい薯 100 g を水道水 300 ml 中に 5~7 時間浸漬し, ろ過したろ液 230 ml に Glucose 20 g, Agar 20 g を加え, 更に水を加えて 1 l とし, 高圧蒸気数菌釜で 120°C 15 分間殺菌して得た馬れい薯, グルコース寒天培地の溶解したものをシャーレにとり, 先のスライドガラスを溶解培地中に浸し, 直ちに引き上げ, 元の U 字ガラス棒上におき, 培地の固化をまって, これに本菌を軽く押しつけ, シャーレ中には乾燥防止の為に殺菌水を入れ 20~25°C で 7 日間培養後, 裏面の寒天を除き, 顕微鏡観察した結果図 3 の 3 の如き pseudo-mycellium の形成が認められた。

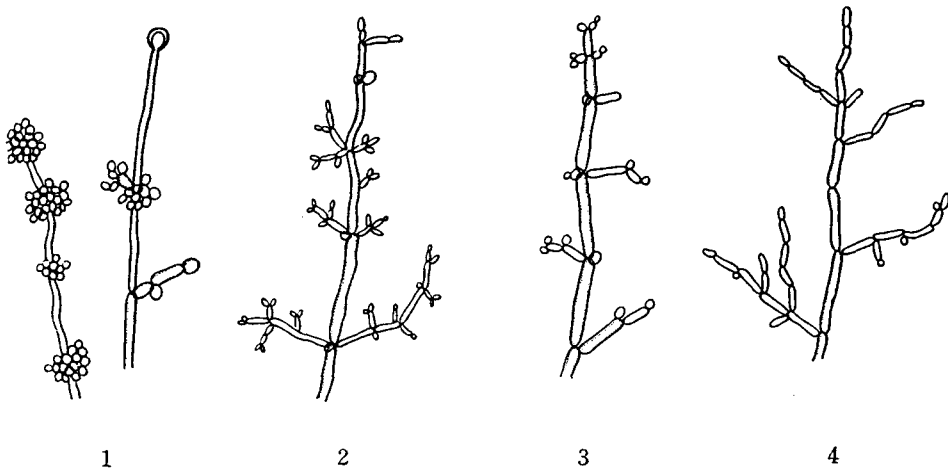


図3 偽菌糸の形態

1. *Mycotorula* 型
2. *Mycotoruloides* 型
3. *Candida* 型
4. *Mycocandida* 型

(3) spore 形成の有無

酵母に於ける胞子の形成は、分類に於いて最も重要な指標の一つである。ascospore 形成をみる為に石膏培地による培養を試みた。つまり、図4の如き石膏ブロックを準備し、煮沸殺菌したものを予め殺菌した大型シャーレーに入れ、殺菌水を石膏ブロックが半ば露出する程度に加えて表4の Miller らの胞子形成用前培地で2~3回前培養し、液体培養の上澄液を流出した残りの菌体を白金耳で石膏上におき 20~25°C で培養した結果、ascospore の形成は認められず、又 ballistospore の形成もみられないことから表5より本菌は無胞子酵母類に属することが判明したが更に表6の *Cryptococcaceae* の分類体系のいずれに属するかについて、実験を行ない genus を決定し、続いて species を決定した。

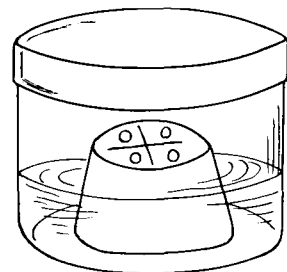


図4 石膏培養法

表4 Miller らの胞子形成用前培養培地

glucose	20 g
yeast extract	10 g
Kcl	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0.5 g
dist. water	1,000 ml

表5 酵母の検索表

A. 子嚢および子嚢胞子を形成する……………	有胞子酵母類 Saccharomycetaceae
B. 小柄上に射出胞子を形成する……………	射出胞子酵母類 Sporobolomycetaceae
C. 子嚢胞子も射出胞子も形成しない……………	無胞子酵母類 Cryptococcaceae

表6 無胞子酵母類 (asporogenous yeasts) の分類体系

Cryptococcaceae	
I Cryptococcoideae	
	1 <i>Cryptococcus</i>
	2 <i>Torulopsis</i>
	3 <i>Pityrosporum</i>
	4 <i>Brettanomyces</i>
	5 <i>Candida</i>
	6 <i>Kloeckera</i>
	7 <i>Trigonopsis</i>
II Trichosporoideae	
	1 <i>Trichosporon</i>
	2 <i>Geotrichum*</i>
III Rhodotoruloideae	
	1 <i>Rhodotorula</i>
	2 <i>Dioszegia</i>

* 酵母として取り扱わず不完全菌類として扱うことが多い。

(4) 糖類の発酵性試験 (sugar fermentation)

11 の水道水に 200 g の压榨パン酵母と少量の卵アルブミンを入れて 120°C で15分殺菌した液を温いうちにくわして得られた清澄な酵母抽出液に glucose, saccharose, maltose, lactose, galactose を各々 2%濃度に, raffinose を 4%濃度になるように加えて調製した培地を Einhorn 管に入れ 120°C で15分間殺菌した液体培地中に本菌を移植し, 25°C で培養, 毎日観察した結果, 1週間以内に glucose, galactose, saccharose, maltose に於いてはガス発生が見られたが, lactose に於いては2週間たってもガスの発生は認められなかった。又 raffinose に於いては, ガス発生の有無は断定し得なかった。

(5) 糖類の資化性試験 (Sugar assimilation)

表7の a 液の10倍液 0.5 ml 殺菌水 4.5 ml と b 液の100倍液 0.05 ml を試験管に採り, 本菌懸濁液の一滴を加え, 同時に無炭素源対照培地にも同様に接種し, これらを 25°C で2週間培養し, 遠心分離機で菌体を沈デンさせ沈デン物の多少により対照区との間の生育の差を比較した結果, glucose, galactose, saccharose, maltose は資化されたが, raffinose は資化されなかった。

(6) 硝酸塩の資化性試験 (potassium nitrate assimilation)

表7 糖類の資化試験用培地組成

a 液	b 液 (ビタミン溶液)
(NH ₄) ₂ SO ₄0.5%	biotin.....2 μg
KH ₂ PO ₄0.1	Ca-pantothenate400
MgSO ₄ · 7 H ₂ O.....0.05	inositol2,000
CaCl ₂ · 2 H ₂ O0.01	thiamine HCl.....400
NaCl0.01	pyridoxine HCl.....400
carbon source.....0.5	nicotinic acid400
	<i>p</i> -aminobenzoic acid200
	riboflavin.....200
	dist. water10 ml

表8のa液の10倍液 0.5 ml, 殺菌水 4.5 ml と表7のb液の100倍液 0.05 ml を試験管にとり, 本試験とし, 一方, 対照用として表8のa液のKNO₃の代わりに(NH₄)₂SO₄ 0.1%含有の対照培地及び無チッ素培地を準備し, 糖類の資化に於けると全く同様に, 本菌懸濁液を一滴滴加え, 25°C で2~3週間迄培養し, 生育の差異をみた結果, 硝酸塩培地には生育がみられ

表8 硝酸塩資化試験用培地

a 液
glucose1%
KH ₂ PO ₄0.1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O0.05
CaCl ₂ · 2 H ₂ O.....0.01
NaCl.....0.01
KNO ₃ (JIS 特級).....0.078

表9 無孢子酵母類の検索表

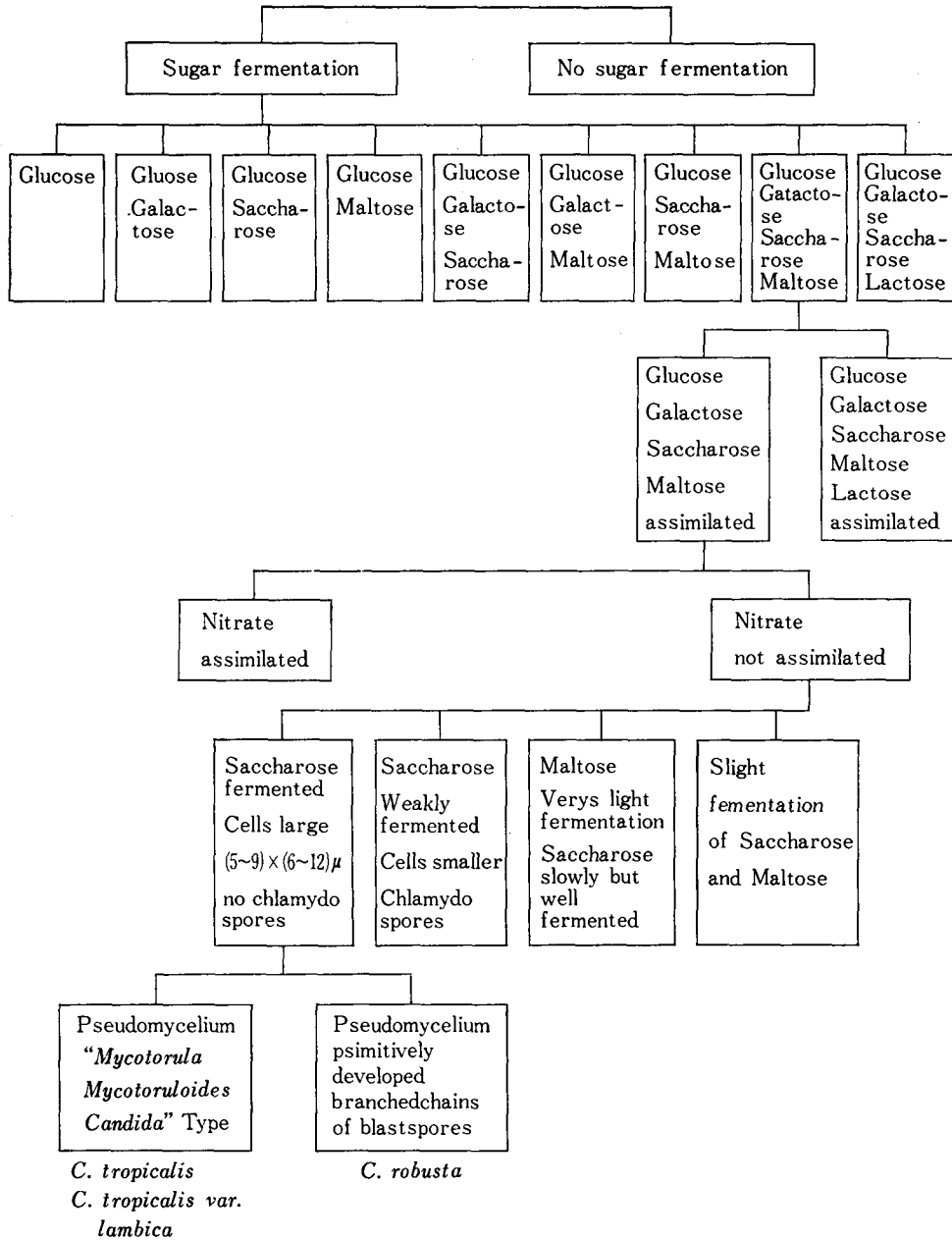
1 a. カロチノイド性色素を生成する..... 2	
① カロチノイド性色素を生成しない..... 3	
2 a. 細胞は直接出芽により増殖..... <i>Rhodotorula</i>	
b. 細胞の出芽は小柄でおこなわれる..... <i>Dioszegia</i>	
3 a. 分裂子を形成する..... 4	
① 分裂子を形成しない..... 5	
4 a. 出芽細胞を有する..... <i>Trichosporon</i>	
b. 出芽細胞を作らない..... <i>Geotricum</i>	
5 a. 細胞はビン形, 極出芽と分裂により増殖..... <i>Pityrosporum</i>	
b. 細胞は三角形または楕円形, 極出芽と多極出芽により増殖..... <i>Trigonopsis</i>	
c. 細胞はレモン形, 両極出芽により増殖..... <i>Kloeckera</i>	
d. 細胞は楕円形, 伸長形, 特に特徴ある尖頭楕円形をなす。強い生酸能がある。 <i>Brettanomyces</i>	
② 細胞は多極出芽により増殖する。球形, 楕円形~伸長形..... 6	
6 ① 常に偽菌糸を形成し菌糸を形成することがある..... <i>Candida</i>	
b. 菌糸, 偽菌糸を形成しない..... 7	
7 a. 細胞は莢膜に覆われ, コロニーは粘稠。澱粉類似物質を生成する..... <i>Cryptococcus</i>	
b. 細胞は莢膜を作らない。澱粉類似物質を生成しない..... <i>Torulopsis</i>	

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

なかった。

以上(1)~(6)迄の実験, 観察結果をもとに表9, 10に照らしあわせた結果 Cryptococcaceae¹⁰⁾に属する *Candida tropicalis* であると判明したので, 発見年代と著者らの頭文字をとって KY-11 株を *Candida tropicalis* OT-65 と名づけた。

表10 *Candida* 属の種の検索表



3 *Candida tropicalis* OT-65 の油脂に対する^{11~13)}資化

(1) 各種油脂炭素源に於ける生育状況

Candida に属する本菌は炭素源として糖類よりもむしろ脂質を資化する傾向が強いことから新鮮なサラダ油, 自動酸化させたサラダ油, 大豆油, 醤油製造時に得られるしょうゆ油, 米ヌカよりエーテル抽出して得た米ヌカ油, 煮取り法により得たいわし油, いかなぎ油等の植物性あるいは動物性の油等を炭素源として加えた表11の培地に本菌を移植, 29°C で72時間振とう培養した本菌の生育状況は表12に示される如く, 植物性油をよく資化し, しかも新鮮な油より以上にやや変敗した油の方が利用しやすい傾向にある。しかし又, イカナゴ油やイワシ油等の魚油を炭素源として用いた培地では, 変敗しやすい不安定な油にも拘らず植物性の変敗油に等しい生育がみられなかった。このように本菌は脂質資化性菌でありながらも全ての油脂を利用するのではなく油の特質によって利用上の差がみられる。本菌が油脂を資化するにあたって,

表11 油脂培地の組成

炭素源 (各種油脂).....	0.25 Mol
NH ₄ NO ₃	6.6 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O.....	1.0 g
Tween-20.....	0.5 g
Distilled water.....	1 l
pH.....	5.0

表12 各種油脂炭素源に於ける生育状況

炭 素 源		菌 体 量 (P.C.V. ml/50cc)		
		0.1	0.2	0.3
植 物 油	しょうゆ油	[Bar chart showing growth at 0.1, 0.2, 0.3] 0.65		
	米 糠 油	[Bar chart showing growth at 0.1, 0.2, 0.3] 0.35		
	変敗サラダ油	[Bar chart showing growth at 0.1, 0.2, 0.3] 0.20		
	新鮮大豆油	[Bar chart showing growth at 0.1, 0.2, 0.3] 0.18		
	新鮮サラダ油	[Bar chart showing growth at 0.1, 0.2, 0.3] 0.15		
魚 油	イワシ油	[Bar chart showing growth at 0.1, 0.2, 0.3] 0.05		
	イカナゴ油	[Bar chart showing growth at 0.1, 0.2, 0.3] 0.01		

どのように利用するものであるかを追究することは興味深い問題である。即ち、油脂そのものを主として利用するものであるのか、あるいは脂肪酸部を利用するものであるのか、もし脂肪酸部を利用するものだとすればどのような脂肪酸をよく利用し、どのような脂肪酸を余り利用しないかなどについて明きらかにする必要がある。そこで先ず各種油脂類のなかで最も生育の盛んであったしょうゆ油についてその源である大豆油と、どのように異なるかを対比しながら、しょうゆ油の性状を探り、本菌生育の条件を探る資料とする為、検討した結果を次項に記する。尚、しょうゆ油に次いで生育のよかった米ヌカ油と、最も生育の悪かったイカナゴ油の特性について詳しく検討した結果は本研究論集第16巻に記した。

(2) しょうゆ油の性状¹⁴⁾

①しょうゆ油と大豆油の一般的性状の比較

炭素源として用いるしょうゆ油は、兵庫県竜野市、丸天醤油株式会社にて、淡口醤油製造時、得られるしょうゆ油を採取直後、受領し、持ち帰って直ちに水洗、脱塩し、常法の如く、エーテル抽出し、エーテル溜去後、供試品となし、大豆油は鳥久製薬株式会社の精製大豆油を購入し、供試品とし、各々、酸価 (A. V.) 過酸化物価 (P. O. V.) ヨーソ価 (I. V.) ケン化価 (S. V.) 及び不ケン化物含有率を求め、それぞれの一般的性状を比較した結果、表13に示される如くである。しょうゆ油は、淡口醤油の原料である丸大豆に由来するものと見做され、大豆油に較べてその酸価が特に大きく醤油製造工程中に如何に大きく酸敗しているかが伺われ、加熱処理、微生物の作用、圧搾空気でモロミを圧搾する場合の空気による自動酸化等と、幾多の要素がからんで大きく変敗していることがわかる。

表13 しょうゆあぶら及び大豆油の各種測定値

項 目	油の種類	
	しょうゆあぶら	大 豆 油
酸 価 A. V.	52.3	0.6
過 酸 化 物 価 P. O. V.	20.1	8.5
ヨ ー ソ 価 I. V.	138.2	129.7
ケ ン 化 価 S. V.	172.6	191.0
不 ケ ン 化 物 量	1.8%	0.6%

②しょうゆ油及び大豆油のカラムクロマトグラフィーによる比較

しょうゆ油及び大豆油はそのまま及び常法の如くケン化して、混合脂肪酸を得、供試品とした。内径 2 cm、長さ 50 cm のカラムクロマトグラフィー用ガラス管にカラムクロマトグラフィー用シリカゲル 20 g を充填し、固定相には20%メタノール、ベンゼン溶液 40 ml を使用し、試料をそれぞれベンゼン 10 ml 石油ベンゼン 10 ml の混合溶液に溶解して注ぎ、石油ベンゼ

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

ン 40 ml, 2%メタノール・ベンゼン 40 ml, エーテル 40~70 ml の順に展開後, 溶出液 5 ml ずつを分取して 0.01 N-NaOH・アルコール溶液にて滴定し, 比較検討した結果は図 5, 6, 7 に示される如く, しょうゆ油は大豆油に較べてモノマーの部分の大部分を占めるほど多くなっており, ダイマーその他の部分は頗る少くなっている。これは前表13にみる如くしょうゆ油と大豆油の一般性状が大きく異なっている内容とよく一致している。

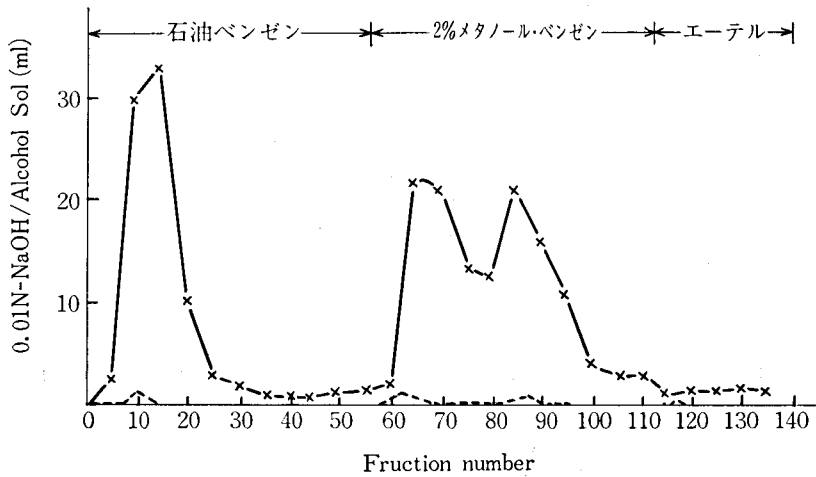


図5 ショウユあぶら及び大豆油に含まれる遊離脂肪酸のカラムクロマトグラム
 ×——× ショウユあぶら ×……× 大豆油

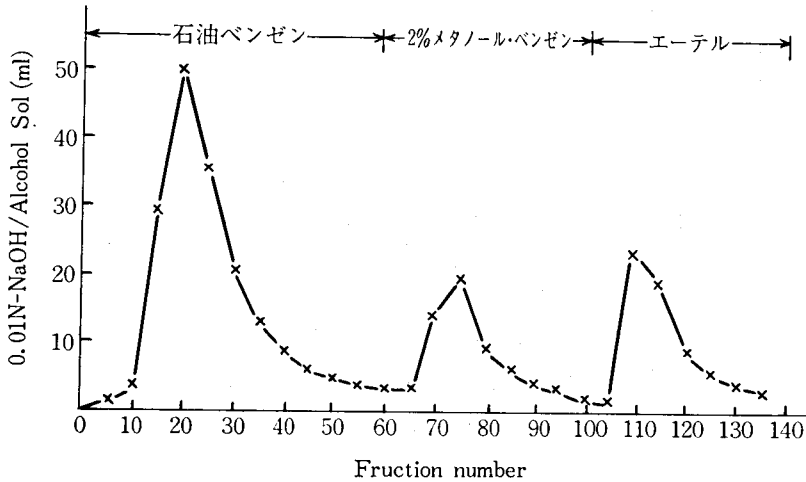


図6 大豆油から得た脂肪酸のカラムクロマトグラム

尚, 移植培養後のしょうゆ油について無移植振とうした対照用のしょうゆ油とを本法によって対比した結果は図8に示される如く, 移植し, 本菌の生育したものはモノマーの部分少量

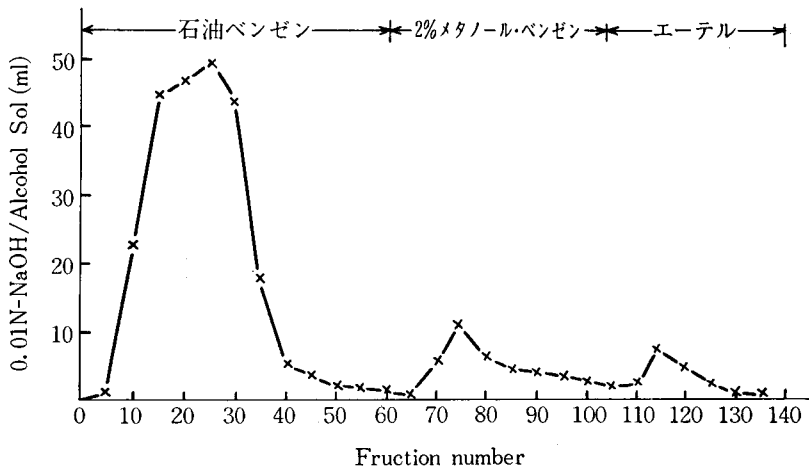


図7 ショウウエブから得た脂肪酸のカラムクロマトグラム

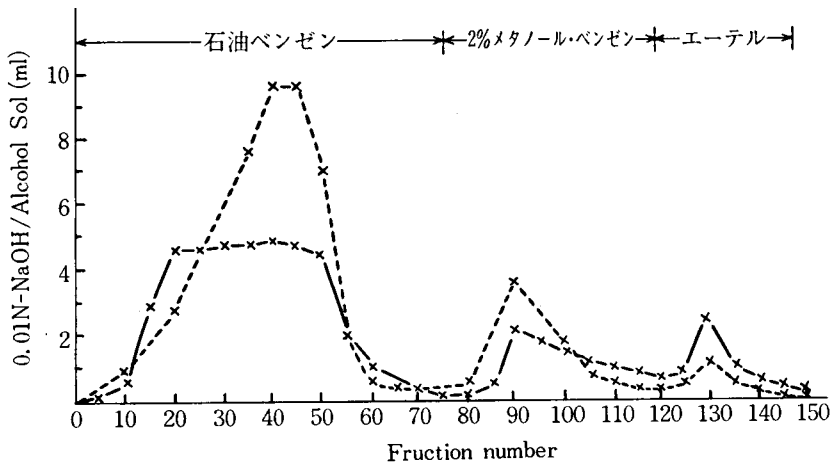


図8 培養後のショウウエブのカラムクロマトグラム

×——× しょうとう培養後のあぶら ×……× 対照用のあぶら

化されていることから本菌は炭素源として主に、しょうゆ油のモノマーの部分を利用しているものと思われる。しかし培養後も、相当量のモノマーが残存しているが、これらモノマーが質的に変化を受けているものかどうかについては脂肪酸の分析が必要となる。

③しょうゆ油及び大豆油のガスクロマトグラフィーによる比較

しょうゆ油及び大豆油からそれぞれ混合脂肪酸を調製後、これを常法の如く、エチルエステル化して供試品とした。ガスクロのカラムはポリエチレンサクシネートを用い、温度は 190°C に設定し、He ガスを使用、流速は 30 ml/min. の条件下で分析、試料は 6 μ l を注入して得られた結果は図 9, 10 に示される如く、しょうゆ油から得た混合脂肪酸エステルでは C₈, C₁₀,

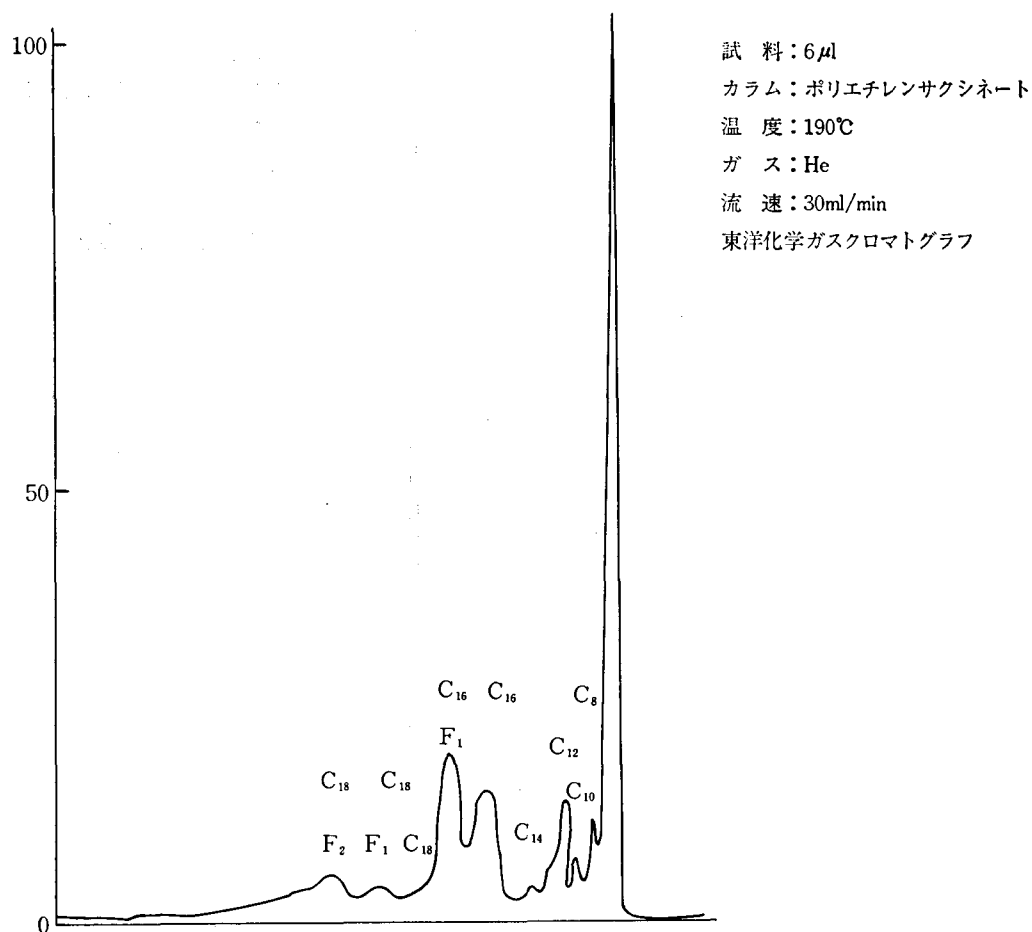


図9 醤油あぶらから得た混合脂肪酸エステルのガスクロマトグラム

C₁₂, C₁₄ の低級脂肪酸の存在が明らかなであり, palmitic acid, palmitoleic acid などの含有率が大きい。これは Linoleic acid が主要部を占め, C₈, C₁₀, C₁₂ 等の低級脂肪酸があまりみられない大豆油と較べて脂肪酸組成が大きく異なっており, 大豆を主な原料として製造する長い熟成期間中に大豆の油が質的に大きく変化していることがうかがえる。

4 Glycerin 及び各種脂肪酸の資化

本菌は炭素源としての各種油脂培地に於ける生育のパターンがそれぞれに異なる理由の一つに, 構成脂肪酸が異なることを挙げる事が出来るかもしれないと前に記したが, Glycerin 及び脂肪酸資化の状況を検討することにした。

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

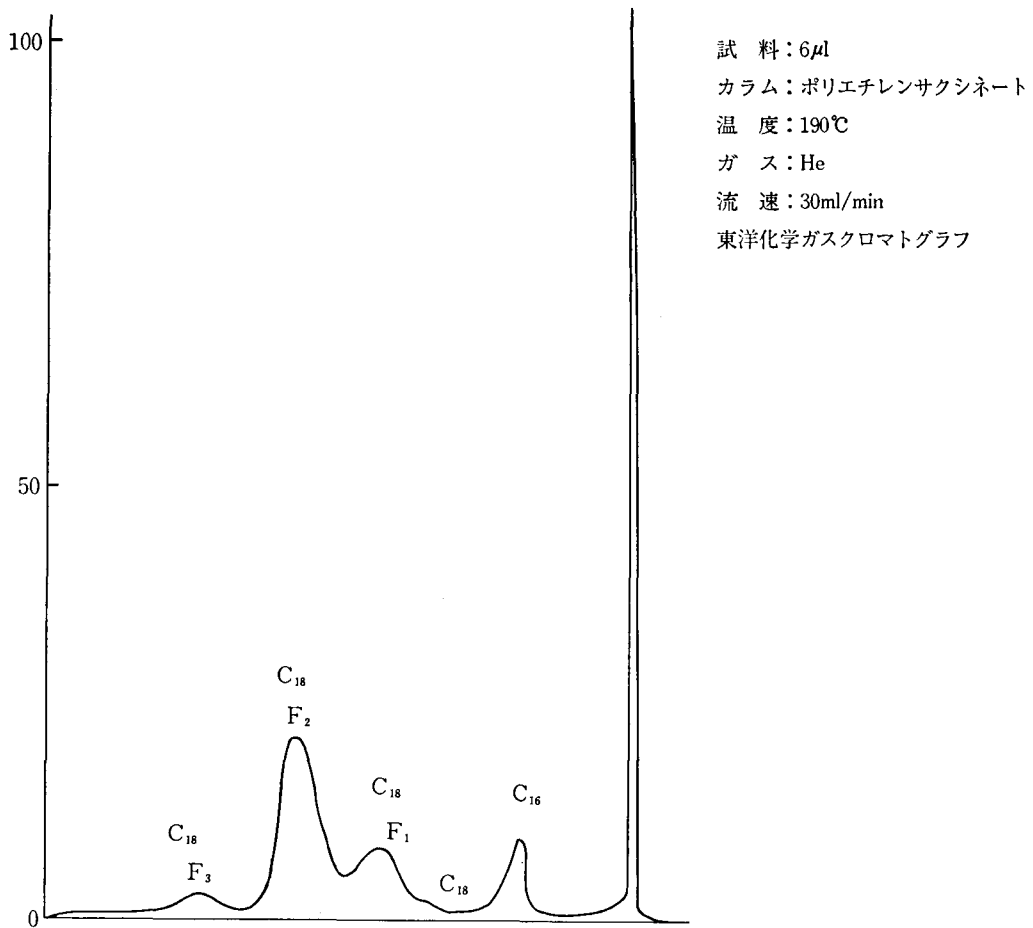


図10 大豆油から得た混合脂肪酸エステルガスクロマトグラム

(1) Glycerin の資化

前記表11の培地に炭素源として glycerin を用いて、本菌を移植し、30 $^{\circ}$ C で培養した結果は図11に示す如くで、glycerin に於ける増殖は微々たるものである。従って各種 glyceride の資化に当っては主としてその構成脂肪酸を用いているものと推測され、構成脂肪酸の質と量によってその glyceride の資化が左右されている面もあると考えられる。

(2) 各種脂肪酸の資化

各種の飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、高級脂肪酸、低級脂肪酸などをそれぞれ炭素源に glycerin に於ける培養と全く同様に本菌を移植、培養し、72時間後に得られた生育状況の結果は図12に示される如く、脂肪酸によってそれぞれ異なった傾向を示している。但しこれは72時間の培養結果であるから成育曲線の異なる各脂肪酸についてこの図から一律に論ずるわけにはいか

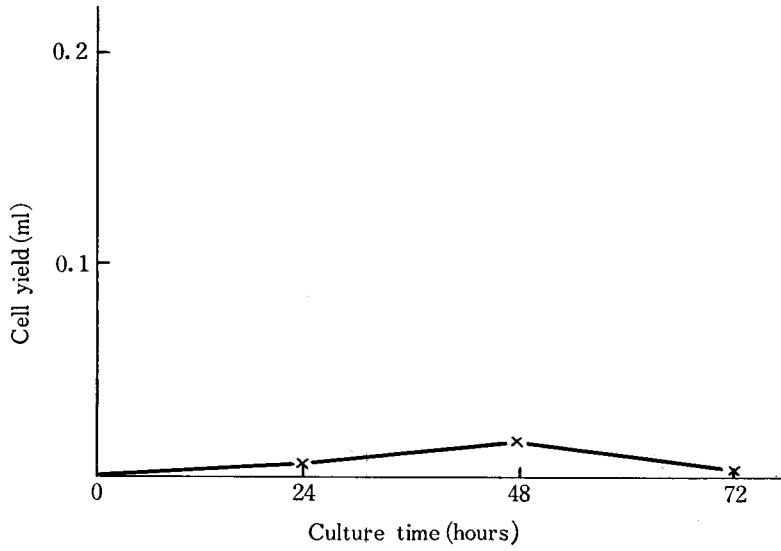


図11 グリセリン培地に於ける菌体収量

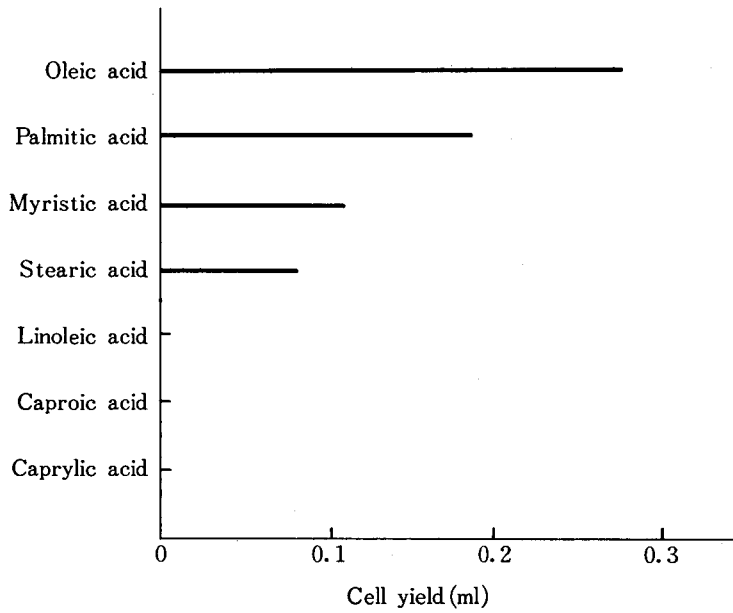


図12 各種脂肪酸培地における KY-11 の菌体収量 (72時間後)

ないが72時間の時点に於いては Oleic acid が最もよく資化され、Palmitic acid, Stearic acid, Myristic acid もよく資化されている。これに対して Linoleic acid, Caproic acid, Caprylic acid に於ては全く増殖がみられない。

高級飽和脂肪酸を資化し、二重結合1つある Oleic acid を資化するが、それ以上に不飽和な

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

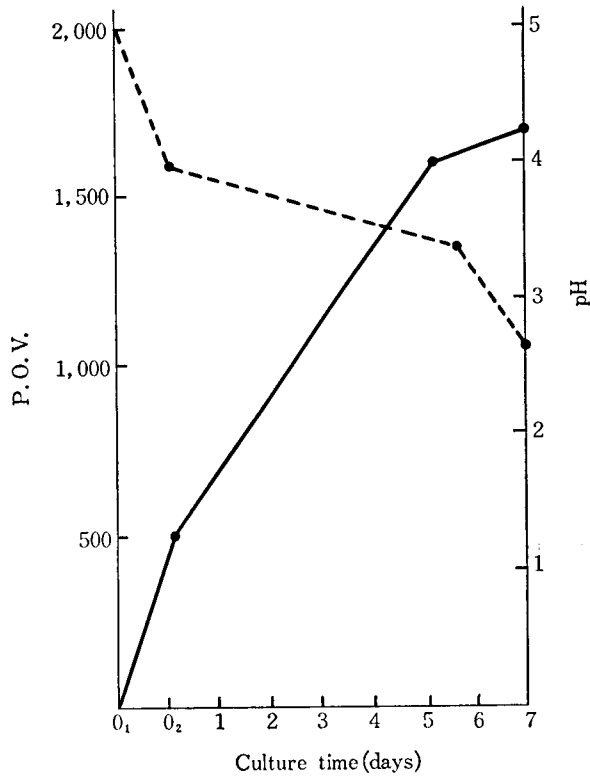


図14 リノール酸培地における培地性状の変化

O₁……培養基調整時

O₂……殺菌直後

×——×
P. O. V.

×……×
pH

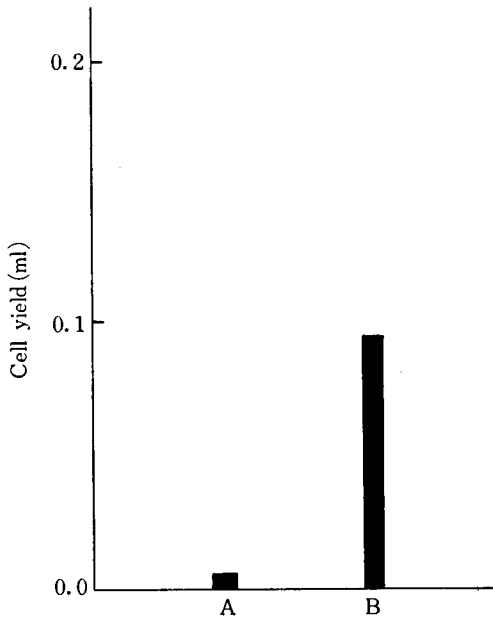


図13 リノール酸及びリノール酸メチルエステル培地に於ける菌体収量(96時間後)

A……リノール酸培地

B……リノール酸メチルエステル培地

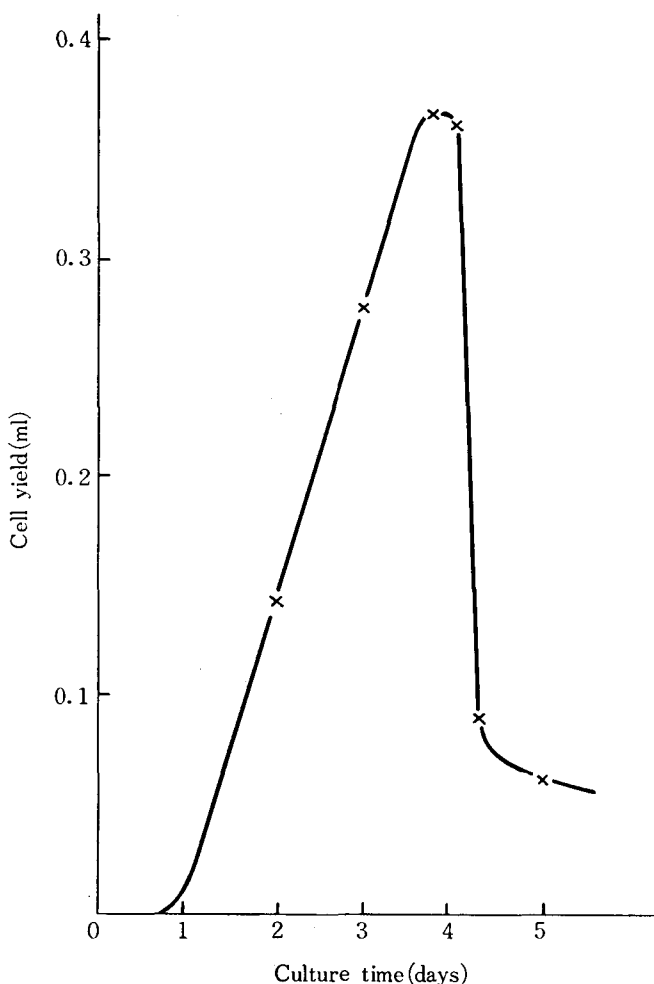


図15 オレイン酸培地における菌体収量

Linoleic acid は資化されないこと、又、飽和であっても、炭素数の少ない Caproic acid や Caprylic acid 等が資化されないことなどは興味深い問題であり、更に資化されないというよりも発育阻害物質として作用すると思われる。

Linoleic acid 培地で全く増殖がみられないにも拘わらず、図13に示されるが如く、Linoleic acid metylester を炭素源にした場合は増殖がみられることから Linoleic acid そのものが資化されにくいのではなく、非常に不安定で培地中で性状が変化しやすく生育阻害をなすものと思われる。事実、図14にみられる如く、過酸化物価の激増と水層部 pH の低下が大きく生育にわざわざしているのではないかと思われるが今迄の研究から本菌は pH 低下に強い耐性をもっていると思倣せるので主原因は過酸化物価の激増にあると推定される。

72時間培養で資化性のみられた脂肪酸三種について24時間毎に菌体収量をみたところ図15に

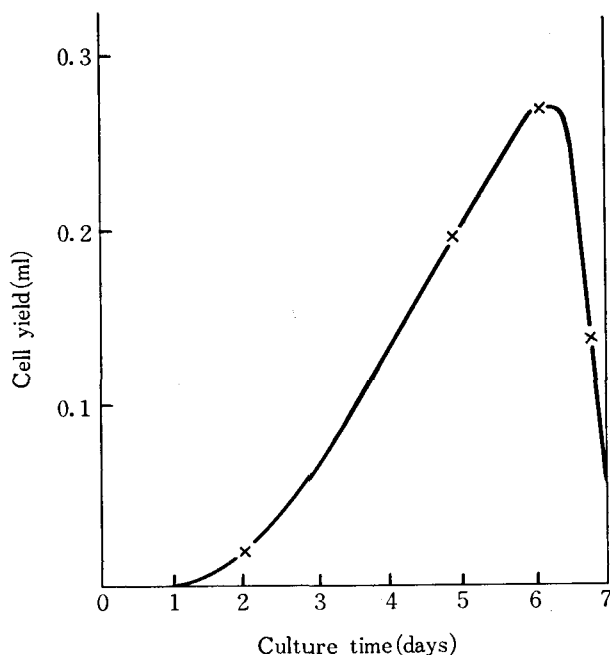


図16 ステアリン酸培地における菌体収量と水層部 pH の推移

示される如く *Oleic acid* に於ては頗るよく資化され、その増殖率も最も旺盛で *Lag phase* は短かく、*Logarithmic phase* に入ってから増殖状況は他にその例をみない。

Stearic acid に於ける資化状況は図16の如くである。*Stearic acid* は常温で固体であるため、そのままでは資化し得なかったが、殺菌直後の高温液状の間に充分振とうして *Emulsion* にしたものはよく資化した。即ち与え方によって資化状況が変わるわけであるが図16では、*Emulsion* として資化させた場合の菌体収量である。*growth curb* は *Oleic acid* の場合と違って *Lag phase* が長びき、その後、緩慢な増殖をおし進めて6日めに最高値がきていることは本菌と *Stearic acid* の特異性を示している。*Palmitic acid* に於ける資化状況は図17に示す如くである。*Palmitic acid* も *Stearic acid* と同様に常温で固体であることから与え方によって本菌の資化状況が異なるので、*Emulsion* にしたものについての生育曲線であるが、菌体量の最高値を比較しても *Oleic acid* は勿論のこと *Stearic acid* よりは資化の状況が悪い。

以上、要約すると、炭素源としての脂肪酸の資化については頗るよく資化されるものと資化されにくいもの、全く資化されず、むしろ阻害剤として作用するもの等があることが明きらかになった。即ち、飽和脂肪酸では *Palmitic acid*, *Stearic acid*, *Myristic acid* 等はよく利用されるが、*Caproic acid*, *Caprylic acid* は資化されず、不飽和脂肪酸では *Oleic acid* が非常によく資化され、その利用度は最高であると見做せる。しかし不飽和度の高い *Linoleic*

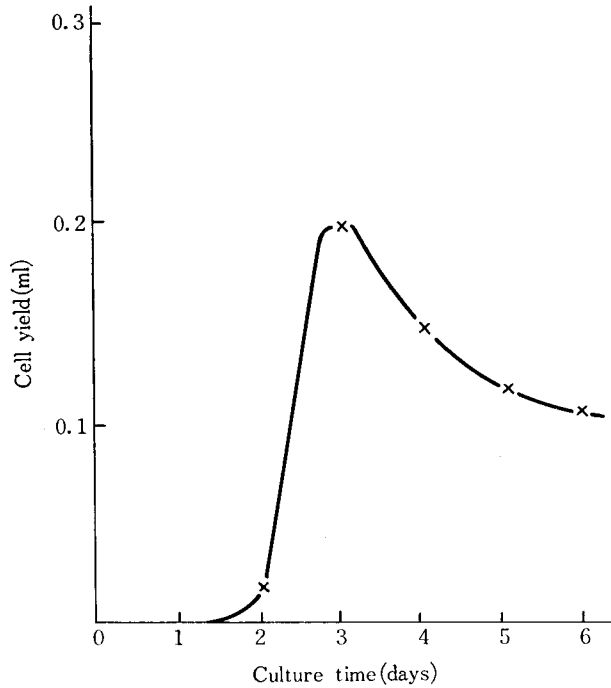


図17 パルミチン酸培地における菌体収量

acid は全く利用されず、むしろ、発育阻害因子とさえ思われる点がある。そしてその理由の一つに高い過酸化価が関与していると推定している。これらの現象は本菌の脂質代謝究明の上に大きな示唆を与えるものと思われる。

尚、参考までに各種脂肪酸以外の炭素源として Glucose, Ethylene glycol, Acetic acid, Butyric acid 等について、上記と同様の培地で炭素源のみを各 0.25 Mol ずつ各々加えて48時間培養した結果、いずれも、十分に資化し得なかったことから本菌は、Glucose よりも Oleic acid をよく資化する脂質資化性菌であるといえる。

5 本菌の二炭素源共存下にみられる拮抗現象

(1) Oleic acid と Linoleic acid 又は Stearic acid の共存下にみられる拮抗現象

① Oleic acid 及び Linoleic acid 共存下の本菌生育状況

前記表11の培地に炭素源として Oleic acid 及び Linoleic acid 0.25 Mol, 混在させた培

表14 Oleic acid, Linoleic acid 共存下に於ける本菌生育の状況

炭素源	菌体量 P. C. V. (ml/50 ml)
Oleic acid	0.155
Linoleic acid	0.040
Oleic acid+Linoleic acid	0.040

養基に、前記同様に72時間振とう培養後の菌体量を測定した結果、表14に示される如く、Oleic acid 嗜好性といわれる本菌であるが、あまり資化しない Linoleic acid との混在時には大きな生育阻害を受けている。

②Oleic acid 及び Stearic acid 共存下の本菌生育の状況

炭素源を Oleic acid 0.25 Mol 及び Linoleic acid 0.25 Mol を混在させ、前記同様に培養し、48時間後、菌体量を測定した結果、表15に示される如く、両者ともにそれぞれ単独によく資化される炭素源であるが、その混在時、むしろ資化劣性の Stearic acid 側に近づく生育を示しておりその相乗効果はみられなかった。

表15 Oleic acid, Stearic acid 共存下に於ける本菌生育状況

炭素源	菌体量 P. C. V. (ml/50 ml)
Oleic acid	0.390
Stearic acid	0.253
Oleic acid+Stearic acid	0.320

③前記以外の二炭素源共存下にみられる拮抗現象

炭素源を Oleic acid 0.25 Mol に Acetic acid その他各種の低級脂肪酸を混在させた培地で48時間培養した場合の菌体生育量は表16に示される如く、いずれも生育の悪い炭素源側並の生育しか示さなかった。即ち、二炭素源共存下には炭素源の利用が拮抗的に行なわれ、相乗効果は全くみられなかった。

表16 Oleic acid, 各種低級脂肪酸共存下は於ける本菌の生育状況

炭素源	菌体量 P. C. V. (ml/50 ml)
Oleic acid+Acetic acid	0.020
Oleic acid+Butyric acid	0.010
Oleic acid+Caproic acid	0
Oleic acid+Caprylic acid	0
Oleic acid+Capric acid	0.015
Oleic acid+Lauric acid	0.093
Oleic acid+Linoleic acid	0.040

(2) Oleic acid, Glucose の二炭素源共存下にみられる拮抗現象

Oleic acid 0.25 Mol, Glucose 0.025 Mol の混在培地に既述の方法で72時間、本菌で培養した後、本菌の生育状況を見、又、Oleic acid (Ole.) 0.2500 Mol+Glucose (Glu.) 0.0250 Mol, Ole. 0.1250 Mol+Glu. 0.1250 Mol, Ole. 0.0250 Mol+Glu. 0.2500 Mol. をそれぞれ混在させて本菌の生育状況を調べ、生育の割合を比較した結果、表17に示される如く、0.25 Mol の Oleic acid の資化は、僅か 0.025 Mol の Glucose の混在により、大きく生育阻害を受けて、Oleic acid のみの場合に較べ約60%の生育を示すのみである。これは本菌が、Oleic acid と

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

Glucose の共存によって炭素源の取り込みに大きな変化を生じたことを予想させる。尚、Oleic acid の量を漸次減少させ、Glucose 濃度を順次上げていった場合も、Glucose の濃度増大につれて、本菌の生育は減少していることから炭素源混在時には、その取り込みに大きな拮抗現象がみられ、資化の悪い炭素源の生育パターンへと傾斜していくことが明きらかである。

表17 Oleic acid, Glucose 共存下に於ける本菌の生育率

炭素源	生育率
Oleic acid (0.25 Mol)+Glucose (0 Mol)	100%
Oleic acid (0.25 Mol)+Glucose (0.025 Mol)	60%
Oleic acid (0.125 Mol)+Glucose (0.125 Mol)	50%
Oleic acid (0 Mol)+Glucose (0.25 Mol)	15%

6 塩高張が本菌に及ぼす影響¹⁵⁾

本菌は非耐塩性の菌であり、塩高張下にも生存、生育し得るならば、現代、未だ解明されていない耐塩機構の解明に至適の存在ともなり、又、海洋酵母づくりへの諸条件解明への手がかりを得る材料ともなし得るなど期待される領域は頗る大きい。一価アルカリイオンへの各種特性、塩の濃度の与える影響などを探索した結果、次のようである。

(1) NaCl など塩類の本菌生育に及ぼす影響

①同濃度に於ける Na⁺, K⁺, Li⁺ 各イオンの影響

NaCl, KCl, LiCl をそれぞれ0.5モル濃度ずつ表18の基本の培地に加えた三種の塩高張培地を調製し、既述の如く、移植、振とう培養を行ない、基本培地に於ける生育状況と比較した結果、図18に示される如く、96時間培養でみた場合、KCl, NaCl は大きく生育を阻害しているが、増殖は続けられている。しかし、同濃度の LiCl 環境下では強烈的な生育阻害を受け、その増殖は認められない。K⁺, Na⁺, Li⁺ は同じく一価金属イオンであるが、本菌の生育に Li⁺ が最も強い阻害を与えている。

表18 Oleic acid 基本培地

Oleic acid	0.25 Mol
NH ₄ NO ₃	6.6 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1.0 g
Tween-20	0.5 g
Distilled water	1 l
pH.....	5.0

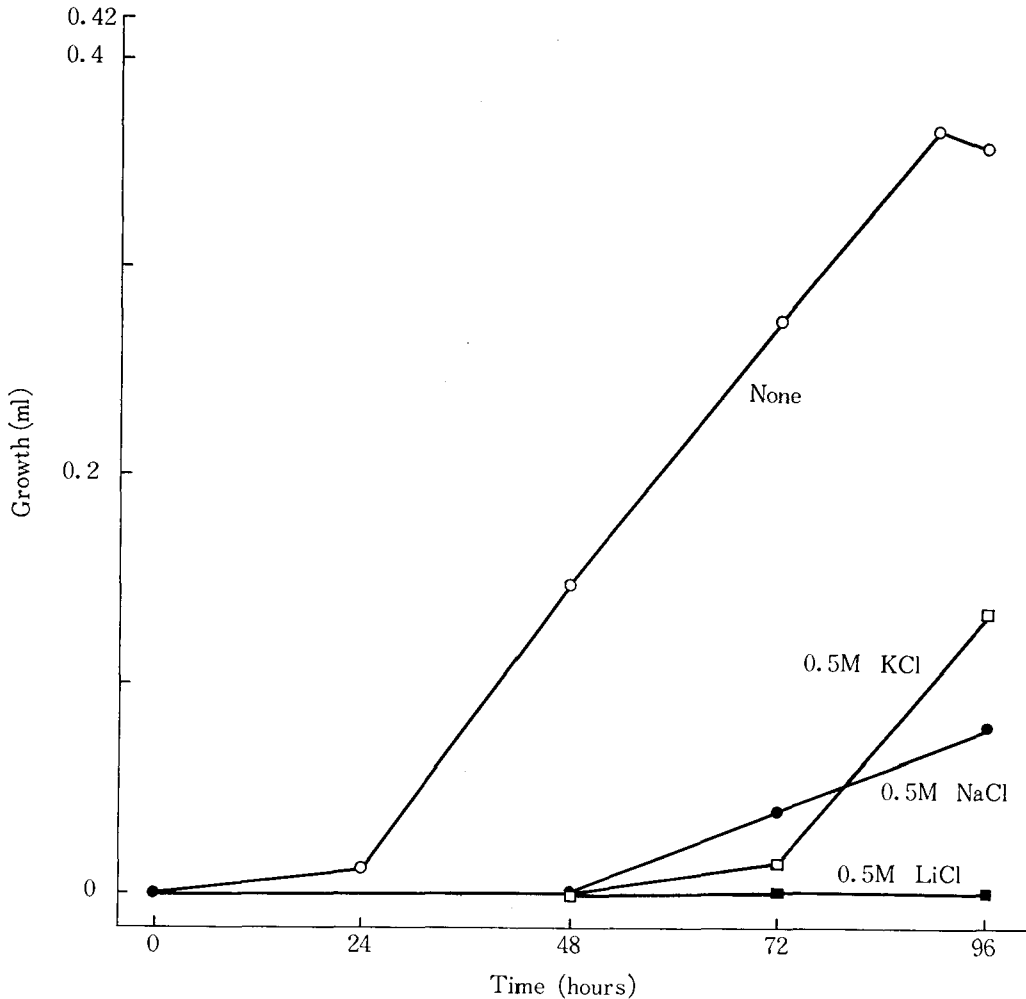


図18 0.5 Mol. の NaCl, LiCl, KCl が本菌の生育に及ぼす影響

②NaCl, LiCl 各濃度が本菌生育に及ぼす影響

炭素源として 0.2 Mol. の Oleic acid 又は Stearic acid を用い、NaCl は 0.2 Mol, 0.3 Mol, 0.4 Mol, 0.5 Mol, 濃度に、LiCl は 0.04 Mol, 0.08 Mol, 0.12 Mol, 0.16 Mol, 0.20 Mol 濃度に調整した培地に移植し、72時間後の本菌生育の状況をみた結果、図 19, 20 に示される如くである。本菌は非耐塩性の菌であって、Oleic acid 培地では NaCl 濃度を高めると顕著な発育阻害を受け、0.2 Mol で約45%の生育を示すのみでそれ以上でも規則的に、より大きな発育阻害を受けており、LiCl 存在下では NaCl の場合より強烈な阻害を受けている。一方、Stearic acid 培地では Oleic acid の場合と全く異なり塩阻害を受けていない。しかし Oleic acid を炭素源として最もよく資化するが、その場合、塩高張の阻害は受けてもよく生存し、増殖も続けていることは、耐塩機構解明の為にも頗る重宝な存在であるとも考えられ

る。塩環境下に於ては Oleic acid 培地で塩阻害を受け、Stearic acid 培地では塩阻害をうけないことが図19と20から明きらかであるが、塩阻害を受ける Oleic acid Type から、塩阻害を受けない Stearic acid Type を誘導できるならばそれ自身が耐塩のメカニズムの解明に役立つことになる。

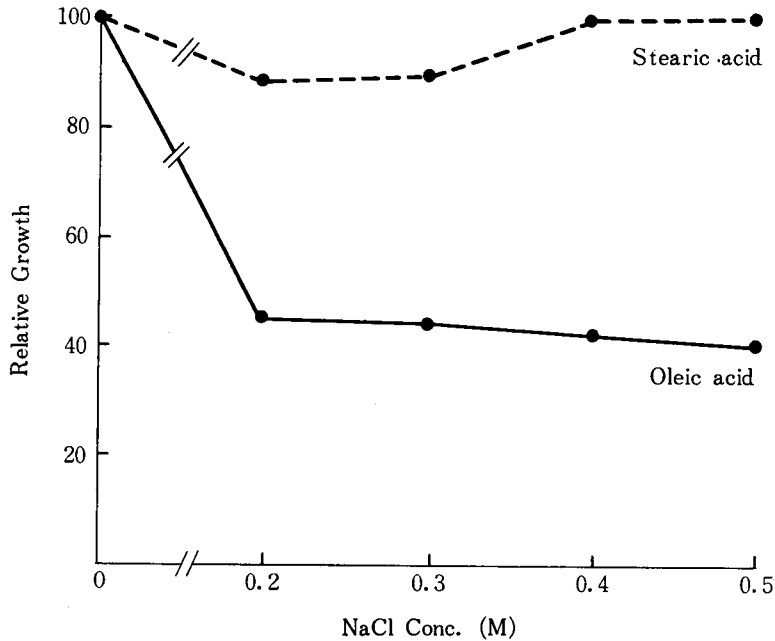


図19 NaCl 濃度が本菌の生育に及ぼす影響

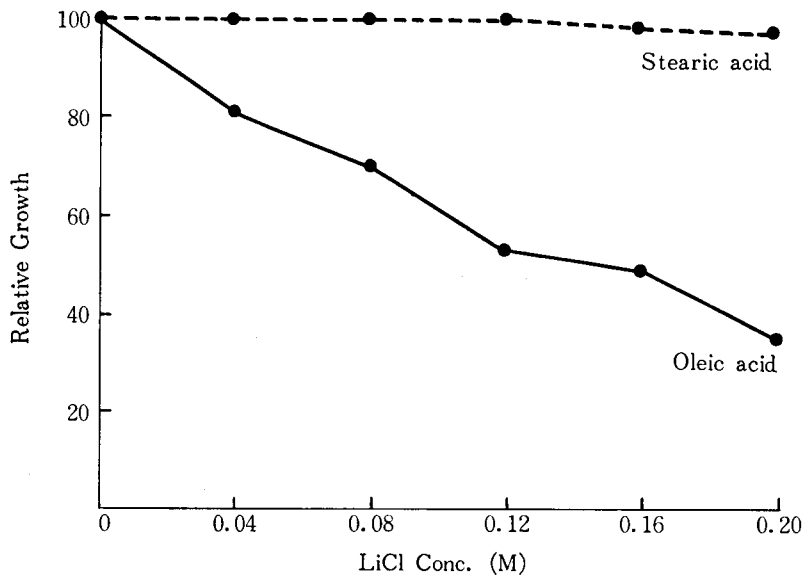


図20 LiCl 濃度が本菌の生育に及ぼす影響

(2) 各種脂肪酸培地での本菌生育に及ぼす NaCl 阻害

炭素源として Caproic acid, Caprylic acid, Nonanoic acid, Capric acid, Lauric acid, Myristic acid, Palmitic acid, Stearic acid をそれぞれ 0.25 Mol に調整し, 0.5 Mol-NaCl の塩高張培地と NaCl-free の基本培地について前記の如く 29°C で48時間振とう培養した結果は表19に示される如く, 飽和脂肪酸である Myristic acid, Palmitic acid, Stearic acid 培地では塩高張による生育阻害は受けないが, 不飽和脂肪酸である Oleic acid 培地では大きく塩阻害を受けている。特に Palmitic acid 培地では塩高張は本菌の脂質資化を Oleic acid Type と Stearic acid Type に読みわけており Oleic acid の資化についてながめた場合, 塩高張下と通常の状態では脂質資化のメカニズムが異なるかも知れないことを示している。

表19 各種脂肪酸培地に於ける食塩高張下の本菌の生育状況

Fatty acid	Carbon atoms	Growth (P. C. V. ml/50 ml)	
		Salt-free	0.5 M-NaCl
Caproic acid	6	0	0
Caprylic acid	8	0	0
Nonanoic acid	9	0.03	0
Capric acid	10	0	0
Lauric acid	12	0	0
Myristic acid	14	0.04	0.04
Palmitic acid	16	0.08	0.17
Stearic acid	18	0.51	0.58
Oleic acid	18	0.78	0.40
Linoleic acid	18	0	0
Linolenic acid	18	0	0

(3) 塩高張が本菌脂質成分に及ぼす影響¹⁴⁾

塩高張下に生育した本菌の脂質組成について Bligh-Dyer 法の改良法により脂質を抽出し, クロマトスキャナー及びガスクロマトグラフで, 通常培地の菌体脂質組成と比較した結果, 表20, 21, 22にみられる如く大きく通常培地のものと異なり, 塩高張の及ぼす影響が, 極性脂質の増大と脂肪酸の不飽和化を促進することが明きらかとなった。

7 Co-factor による塩阻害の除去^{16~18)}

(1) 塩阻害除去に有効な Co-factor

炭素源を Oleic acid とし 0.5 Mol NaCl 高張下に受ける塩阻害を除去する Co-factor として培地に V.B₁₂ を 3×10^{-6} Mol 濃度に, あるいは Betain, Tri-methyl-amin, を 10^{-4} Mol 濃度にそれぞれ塩高張培地に加え, 対照に Co-factor を加えないものと対比しながら培養の

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

結果を生育レベルで比較した結果は表23に示される如く、塩高張下には、Betain を除いて、Co-factor の効果が現われている。更に chlorella 乾燥菌体を熱湯抽出し、凍結乾燥した粉

表20 塩高張培地及び通常培地に於ける本菌の菌体内脂質成分の比較

Spot	-Na%	+Na%
Polar lipid	6.2	7.7
Monoglyceride	3.3	4.4
Sterin	4.4	3.6
1,2 Diglyceride	3.6	3.5
1,3 Diglyceride	9.2	6.9
Fattyacid	55.0	53.8
Triglyceride	12.5	13.0
Sterinester	5.7	7.1

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

表21 クロマトスキャナーによる塩高張培地及び通常培地に於ける本菌の菌体内リン脂質の比較

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 $\pm 0.02 \sim \pm 0.03$

表22 ガスクロマトグラフィーによる塩高張培地及び通常培地に於ける本菌の菌体内脂肪酸組成の比較

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 $\pm 0.02 \sim \pm 0.04$

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

沫 (Chlorella Extract) についても 300 mg/l 濃度に添加し, 0.5 Mol-NaCl 又は 0.04 Mol-LiCl の塩環境下, Glucose 培地に於て, 本菌の生育に及ぼす Chlorella Extract (C.E.) の効果を濃度シリーズでみた結果は, 図24に示される如く, 25 mg 添加では顕著な塩阻害除去がみられ, 50 mg 添加では LiCl に対しては最高の効果を示している。

表23 Oleic acid 培地に於ける Co-factor 添加による塩阻害除去効果

Add.		-Na		+Na	
		P. C. V.	+CoF./-CoF.	P. C. V.	+CoF./-CoF.
B ₁₂	+	1.444	3.70	0.250	1.24
	-	0.390		0.202	
Be.	+	0.513	1.31	0.210	1.04
	-	0.390		0.202	
Tri.	+	0.538	1.38	0.394	1.95
	-	0.390		0.202	

(2) V.B₁₂ の塩阻害除去に及ぼす効果¹⁵⁾

① 0.5 Mol-NaCl 塩高張下 Oleic acid 資化に及ぼす VB₁₂ の影響

通常の Mineral 培地に炭素源として Oleic acid 0.25 Mol を用いた培地に VB₁₂ を 3×10^{-6} Mol 濃度に添加したものを対照用として NaCl 或いは VB₁₂ を省略したものとの対比に於て用い, 前記同様に 50 ml 注入した培地で48時間培養を行ない本菌の培養状況をみた結果は表24に示される如く, 通常培地, 塩高張培地ともにそれぞれ生育の促進がみられ, 特に通常培地に於てその効果が顕著である。

表24 NaCl 塩高張下 Oleic acid 資化に及ぼす VB₁₂ の影響

Addition of vitamin B ₁₂	Growth	
	Salt-free	0.5 M NaCl
-	0.78	0.40
+	2.89	0.50
Ratio	3.70	1.24

乳酸菌は, 生育の為に VB₁₂ を必要とするが酵母菌に対する Vitamin の作用は未だ解明され尽くしていない。Endomycopsis fibuligera は VB₁₂ を培地に添加すると Yeastlike cell と filamentous cell の総計で示される総生育は阻害され, その内訳は Yeast cell では, 阻害の影響は小さいが, filamentous cell は強烈な生育阻害を受けている。ところが塩高張下に VB₁₂ を加えた場合は, この現象が逆転している。

これは通常培地と塩高張培地に於ては Endomycopsis の細胞の二つの Type の間にこの

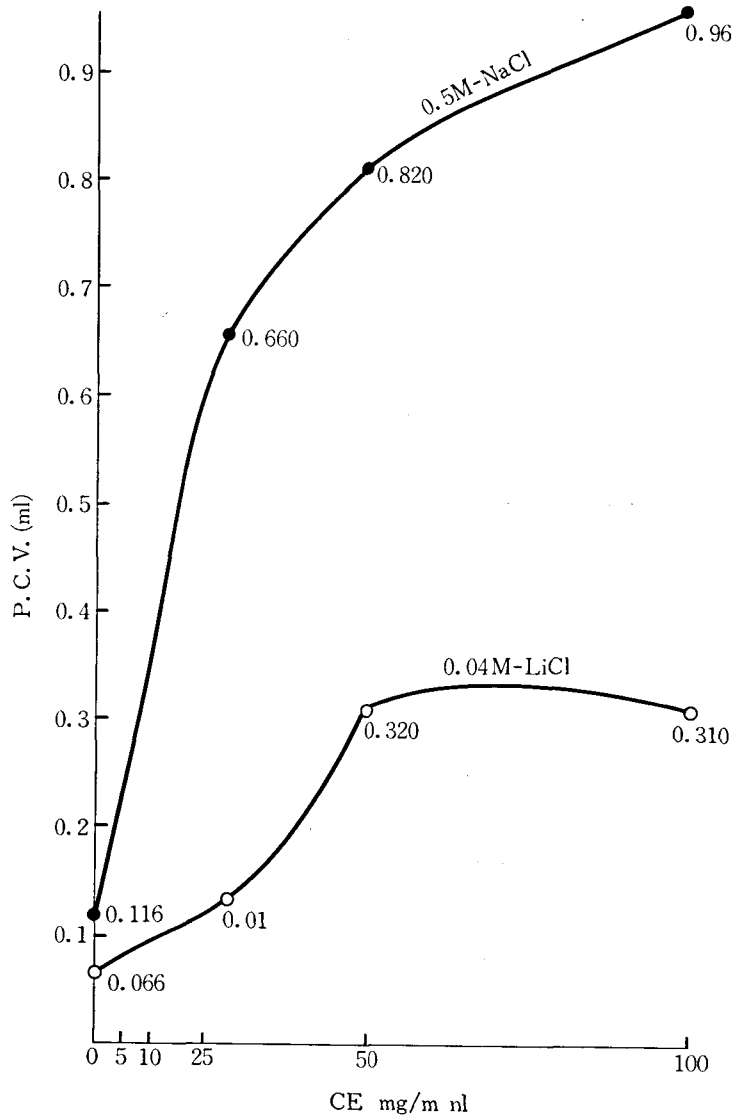


図24 塩環境に於ける CE 添加濃度とその生育効果

Vitamin 利用面で異なったものがあることが示されている。VB₁₂ の面からみると *Endomycopsis* の通常培地に於ける Yeastlike cell は塩高張培地での filamentous cell とが一致していること^{19~20)}になる。このような結果は *Candida albicans* に於ても得られている。Kerwer 等は VB₁₂ が *Candida albicans* の細胞内での S-adenosylmethionine の合成と機能について報告しているが、この^{21~24)}ような諸現象のなかで未だ試みられたことのない脂肪酸を炭素源とする NaCl 高張培地での VB₁₂ の示す挙動は更に興味深いことを示すものと期待される。

② 0.5 Mol-NaCl 塩高張下 Stearic acid 資化に及ぼす VB₁₂ の影響

前記表11の炭素源に Stearic acid 0.25 Mol を用いて全く同様にして本菌の増殖状況をみた結果表25に示される如く通常培地, 塩高張培地ともにそれぞれ成長の促進がみられ, 特に塩高張培地にその生育促進が顕著である。

表25 NaCl 塩高張下 Stearic acid 資化に及ぼす VB₁₂ の影響

Addition of vitamin B ₁₂	Growth	
	Salt-free	0.5 M NaCl
—	0.51	0.58
+	1.04	1.35
Ratio	2.06	2.31

炭素源として Stearic acid を用いた場合は Oleic acid を用いた場合に比して塩高張及び通常の培地でそれぞれ VB₁₂ 添加の影響を異にしている。塩高張下では VB₁₂ は Stearic acid 培地での生育を大きく促進し, 通常培地では VB₁₂ は Oleic acid の資化を大きく促進している。Oleic acid 培地に於ては塩高張は VB₁₂ による生育促進を大きく消去している。これは VB₁₂ が塩高張培地で異なった作用サイトをもつものであり, 異なって要求されることを示すものである。

③ 0.5 Mol-NaCl 塩高張下 Glucose 資化に及ぼす VB₁₂ の影響

前記表11の炭素源に Glucose 0.25 Mol を用いて全く同様にして本菌の増殖状況をみた結果, 表26に示される如く, 通常培地, 塩高張培地ともにそれぞれ生育促進がみられ, 特に塩高張培地に於て, その生育促進が顕著である。しかし, Glucose を炭素源にした培地で, 酵母菌である *Rh. glutinis var. salinaria* は VB₁₂ 添加時, 通常培地では強烈な生育阻害を受けるが, NaCl 添加時ではその生育阻害が完全に除去されることを河原等¹⁹⁾は報告している。このようなことから好塩性酵母である *Rh. glutinis var. salinaria* に対する VB₁₂ の作用は *Endomycopsis* や本菌のように非耐塩性の酵母に対する作用と同じく Glucose 培地に於て全く異なっている。

表26 NaCl 塩高張下 Glucose 資化に及ぼす VB₁₂ の影響

Addition of vitamin B ₁₂	Growth	
	Salt-free	0.5 M NaCl
—	0.08	0.06
+	0.12	0.12
Ratio	1.53	2.00

8 炭素源資化に及ぼす GA₃ (gibberellic acid)^{25~28)} の影響

(1) 本菌の Oleic acid 資化に及ぼす GA₃ の影響

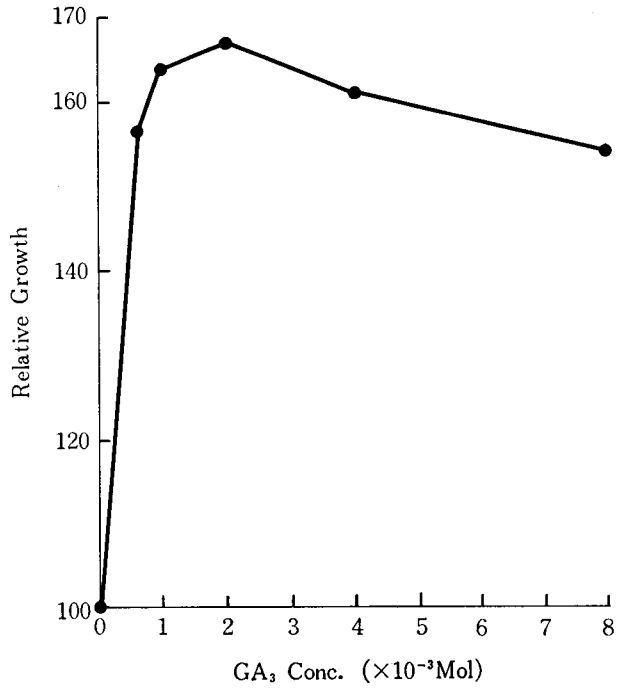


図22 Oleic acid 資化に及ぼす GA₃ 濃度の影響

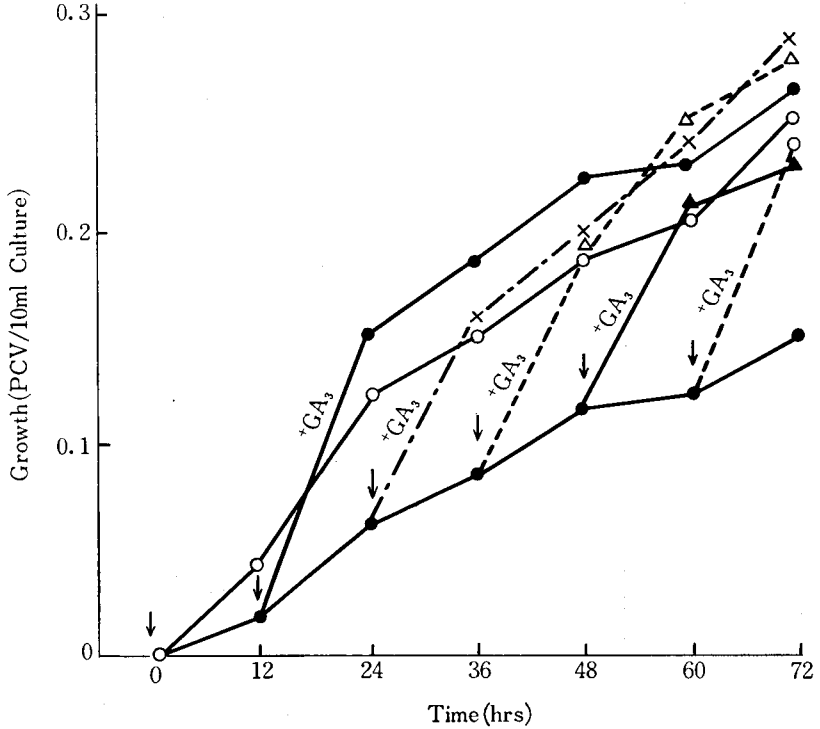


図23 Oleic acid 資化に及ぼす GA₃ の経時的添加の影響

①Oleic acid 資化に及ぼす GA_3 各種濃度の影響

植物ホルモンである GA_3 が脂質資化性酵母の脂質資化にあたって、生育促進に影響をもちかどうかをみるため Oleic acid の 0.25 Mol を炭素源とした通常培地に GA_3 が 0.6×10^{-8} Mol から 8×10^{-8} Mol まで 1×10^{-8} Mol づつ濃度勾配になるよう添加調整し、常法の如く $29^\circ C$ で振とう培養、72時間後の菌体量を測定し、 GA_3 効果をみた結果は図22に示される如く、菌体量は GA_3 濃度に比例して増加し、 2×10^{-8} Mol で最高値を示している。従ってその後の実験では GA_3 は全て 2×10^{-8} Mol で行なった。この濃度は植物ホルモンとして作用させるべく使用する濃度に較べて大きく異なるが、Oleic acid 資化という全く異なる条件であり GA_3 の作用 cite も異なるため当然の結果ではないかと思われる。 GA_3 の作用機構は未だ解明されず、特に脂質資化と GA_3 の作用については今後更に研究されなければならない領域である。

GA_3 の作用機構について、胚乳物質の分解時に Lecichin の合成促進があり、その存在が膜構造の形成促進をともなう行なわれることが認められている^{29~35)}。

②Oleic acid 培地に経時的に GA_3 を加えた場合の効果

0.25 Mol の oleic acid を加えた通常培地に72時間培養期間中、12時間毎に GA_3 を 2×10^{-8} Mol 濃度に加えてその効果を本菌の生長レベルでみた結果、図23に示される如く、 GA_3 の添加により顕著な増殖を示した。例えば出発で GA_3 を加えた時、12時間めで Growth level は

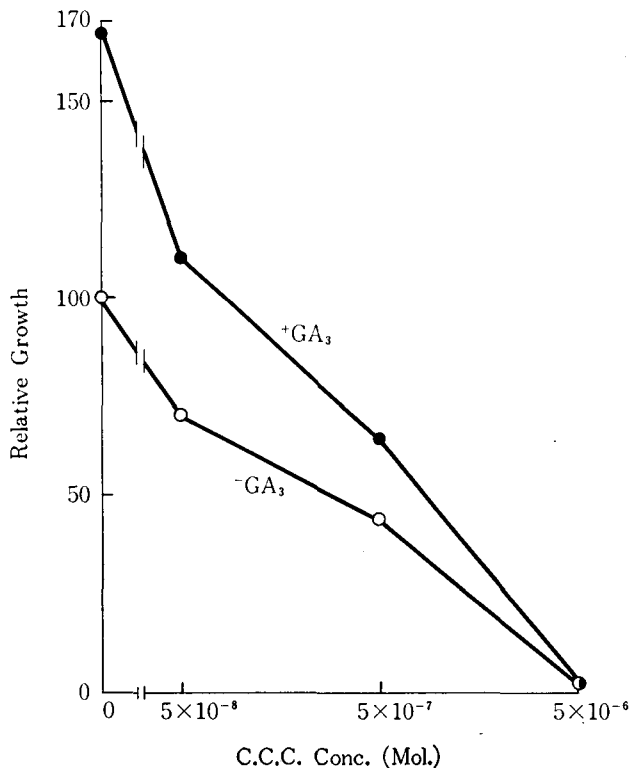


図24 Oleic acid 資化における C.C.C. 阻害除去に対する GA_3 の効果

2倍となり、36時間めに加えると48時間めでは2倍量に増殖している。このように GA_3 添加の影響は全テスト期間を通じて著明である。

③Oleic acid 資化に於ける C.C.C. (2-Chloromethyl-trimethyl-ammonium chloride) 阻害除去に対する GA_3 効果

前記の如き Oleic acid 培地に 2×10^{-8} Mol の GA_3 を加えた培地及び対照用として GA_3 -free の培地を準備し、それぞれに C.C.C. を 5×10^{-8} Mol, 5×10^{-7} Mol 及び 5×10^{-6} Mol の各濃度に加えたものについて、Oleic acid で前培養した後、24時間スターブした本菌を移植し、常法の如く $29^\circ C$ で振とう培養を行ない72時間後にその生育量を比較した結果、図24に示される如く本菌は C.C.C. が 5×10^{-8} Mol 濃度以上で大きな生育阻害を受けるが 5×10^{-8} Mol の場合にも見られる如く GA_3 存在下では本菌への C.C.C. 阻害はそれほど顕著ではない。Stowe 等は CCC が GA_3 効果の阻害剤であると報告している³⁶⁾。

④Oleic acid 資化に於ける L.P.C (Lauryl-pyridinium chloride) 阻害除去に対する GA_3 の効果

前記の如き Oleic acid の培地に 2×10^{-8} Mol の GA_3 を加えたもの及び GA_3 -free のものを準備し、それぞれに L.P.C. を 3×10^{-8} Mol, 3×10^{-7} Mol, 3×10^{-6} Mol の各濃度に加えたものについて前記 C.C.C. の場合と同様に72時間振とう培養した結果は図25に示される如く、

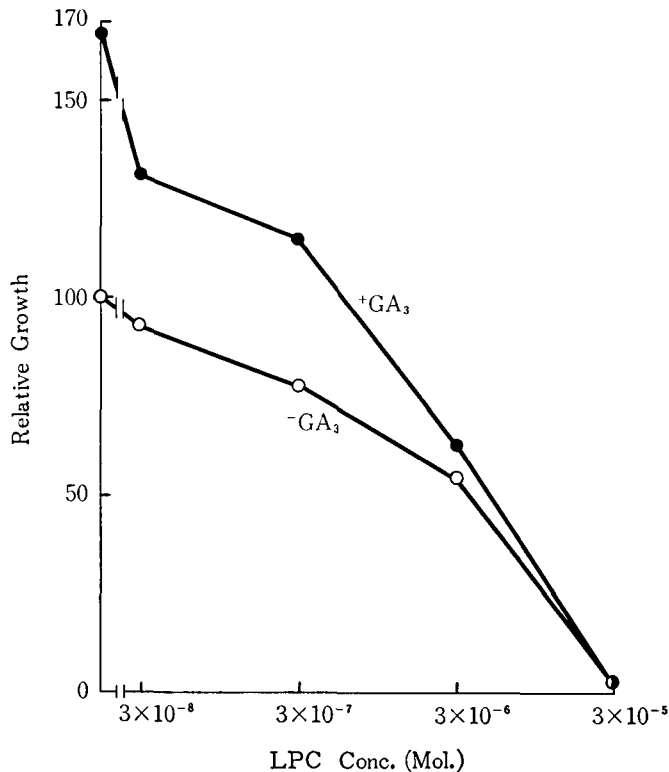


図25 Oleic acid 培地に於ける LPC 阻害除去に効する GA_3 効果

L.P.C. は 3×10^{-8} Mol で C.C.C. の 5×10^{-7} Mol の場合と同様に GA_3 効果に対する阻害作用を示しているが、 GA_3 は明らかに本菌の生育に対する L.P.C. の阻害を軽減している。 GA_3 は L.P.C と結合することによって L.P.C の阻害を軽減しているのではないと思われる。これは C.C.C. 阻害軽減の場合と同様である。Saccharomyces に対する R.D. (Respiratory deficient mutant) の誘導に関して L.P.C. は有力な因子であるが、C.C.C. には R.D. 誘導の効果がなくとされてお^{37, 38)}り、Sacchromyces の R. D. 誘導という点から C.C.C. と L.P.C. は異なった作用サイトを持っているが本菌では C.C.C. と L.P.C. が同じ作用を示すことは注目に値する。 GA_3 作用は Oleic acid 培地中での生育を促進するがこれは選択的に細胞の代謝を増進するそれぞれのサイトでの有用性によるものであろうと推定する。 GA_3 の L.P.C. に対する特異的な効果は C.C.C. と同じ傾向を示し両者の差異は認められなかった。

(2) 本菌の二炭素源資化に於ける GA_3 の効果

①Oleic acid に Glucose を各種濃度に加えた培地にみられる GA_3 の本菌生育への効果

本菌は前述の如く、Oleic acid 嗜好性の菌であるが、炭素源として Glucose をも資化することができ、両者混在培地に於ける本菌の挙動についても前記したが、この系に GA_3 を混在さ

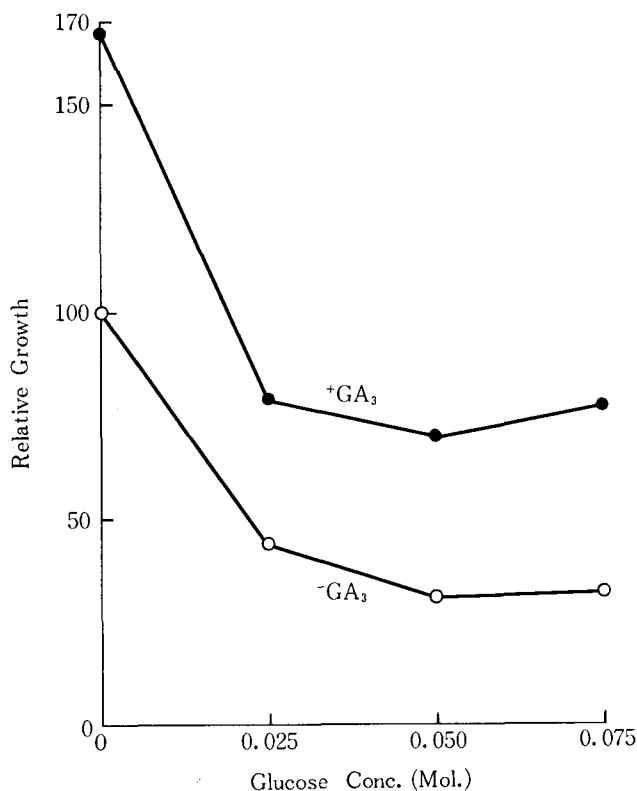


図26 二炭素源資化における GA_3 の効果(1)

せた場合の状況をみるために次のように準備した。即ち 0.25 Mol-Oleic acid 培地に, Glucose をそれぞれ 0.025 Mol, 0.05 Mol, 0.075 Mol になるよう加え, 尚, 対照用として Glucose-free のものも準備し, それらの全てを GA_3 を 2×10^{-3} Mol 濃度に加えたものと, GA_3 -free のものに分けて $29^\circ C$ で72時間振とう培養の後, 生育状況を調べた結果, 図26に見られる如く 0.025 Mol の Glucose 添加で既に Oleic acid の資化を強烈に阻害しており, その傾向は GA_3 の存在とは無関係である。又, 図27にみられる如く, Oleic acid を 0.25 Mol から順次減少させ逆に Glucose を順次増加させ二炭素源の濃度の合計が 0.25 Mol 濃度になるように調製した培地では明らかに Glucose は本菌の Oleic acid 資化を阻害しているが GA_3 は Glucose 共存による阻害を除去する側に作用している。

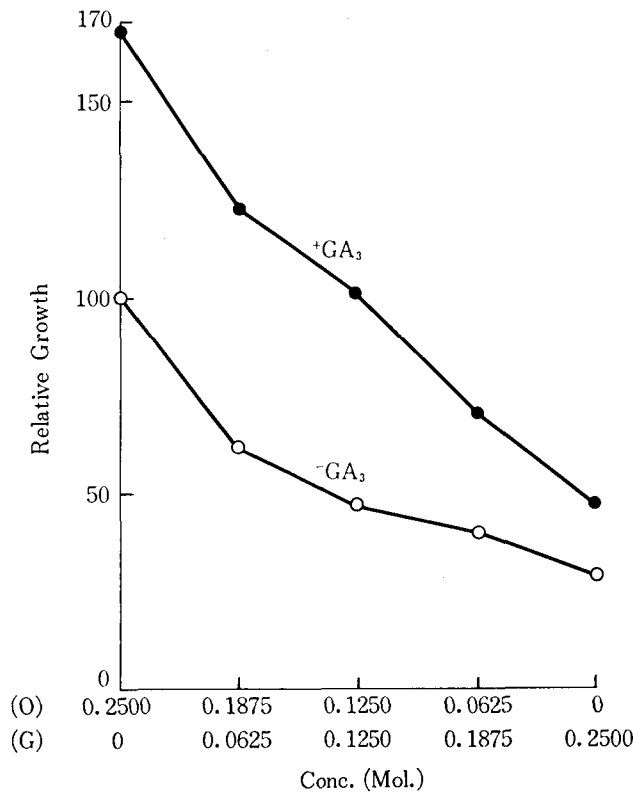


図27 二炭素源資化に於ける GA_3 の効果(Ⅱ)

Oleic acid, Glucose 共にそれぞれ 0.125 Mol 濃度に加えて調製した二炭素源培地で, その炭素源がどのように消費されたかを生長と比較しながら GA_3 有無の両条件下に比較検討した結果, 表27に示される如く, 本菌は Glucose を優先的に利用しており GA_3 の添加は Glucose の資化を大きくおし進める。これはとりもなおさず複数炭素源培地にみられる競争現象における炭素源資化のメカニズムを変化させていると考えられる。

表27 二炭素源培地に於ける GA_3 添加による本菌の増殖率と炭素源の利用状況

Growth and utilized substrates	- GA_3	+ GA_3	+ GA_3 /- GA_3
Relative growth	100	215	2.19
Oleic acid	0.008	0.013	1.63
Glucose	0.063	0.118	1.87
Ratio Glucose/Oleic acid	7.88	9.08	1.15

②Oleic acid, Linoleic acid 混合培地にみられる GA_3 の本菌生育阻害除去効果

前記した常法の培地の炭素源を二炭素源として、Oleic acid 0.25 Mol, Linoleic acid 0.25 Mol を混在させ、更に GA_3 を 2mMol 濃度に添加したものに本菌を移植し、12時間毎に菌体量を測定し、一方、対照用として炭素源を Oleic acid のみとしたもの、Oleic acid に GA_3 を加えたもの、及び Oleic acid, Linoleic acid の混在したもので GA_3 を加えないものについても同様に菌体量を測定し、経時的推移の状況をみた結果図28に示される如く、Oleic acid,

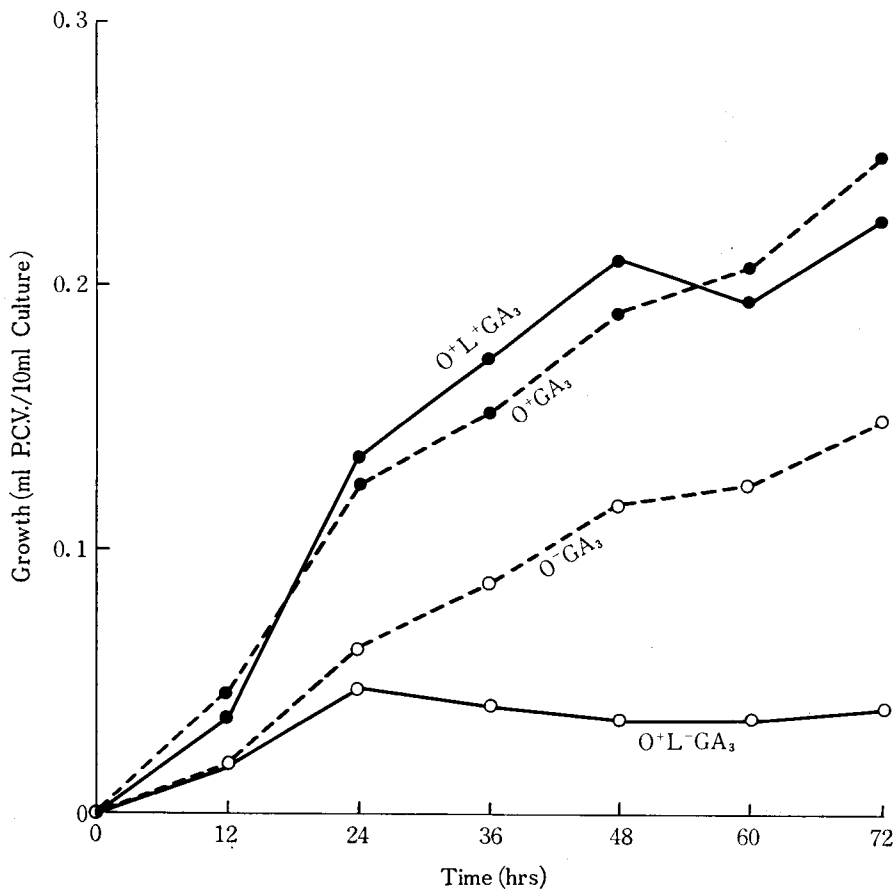


図28 二炭素源培地に於ける GA_3 添加の影響

Linoleic acid 混在による本菌の生育阻害は GA_3 存在下には完全に除去され、更に生育が促進されている。

③Oleic acid に Linoleic acid を各種濃度に加えた場合、C.C.C. 添加による生育阻害と GA_3 の及ぼす影響

炭素源として Oleic acid 0.25 Mol 濃度の上に Linoleic acid を 0.125 Mol, 0.250 Mol, 0.375 Mol, 0.500 Mol, 加えたものを準備し、これに GA_3 を 2×10^{-8} Mol, 及び C.C.C. を 5×10^{-6} Mol 加えたもの及び加えない各培地を調製し、常法の如く培養した結果、図29に示される如く、0.25 Mol の Oleic acid を含んだ培地に Linoleic acid 量を増大させていくと、それにつられて、Linoleic acid の生育に及ぼす阻害効果は増大している。0.5 Mol にもなれば生育はほとんどみられない。ところがこの系に GA_3 を加えると本菌はよく生育している。Oleic acid, Linoleic acid 両炭素源が同じく 0.25 Mol 濃度に与えられた時、 GA_3 の効果は顕著である。二炭素源培地に C.C.C. を加えた場合、本菌の生育は大きく阻害されているが、この培地に GA_3 を加えても同様に大きな阻害がみられる。

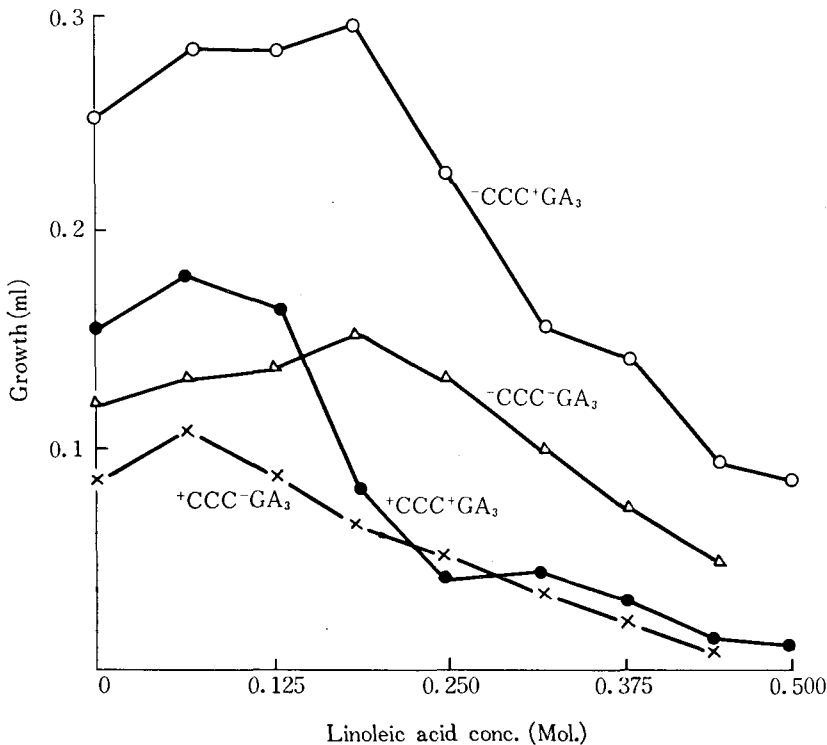


図29 0.25 Mol-Oleic acid 濃度に Linoleic acid を各種濃度に加えた培地に C.C.C. を交互に組み合わせた場合の本菌生育の状況

④Oleic acid, Linoleic acid 混在培地に経時的に GA_3 を加えた場合の生育効果
Oleic acid, Linoleic acid を各々 0.25 Mol ずつ加えた二炭素源混在培地に72時間の培養

期間中, GA_3 をそれぞれ 2×10^{-3} Mol 濃度に12時間毎に加えて, その結果を本菌の生長レベルで調べた結果は図30に示される如く, Linoleic acid の存在は本菌の Oleic acid 資化を阻害するが GA_3 の添加は Oleic acid 資化に対する Linoleic acid 阻害を除去している。

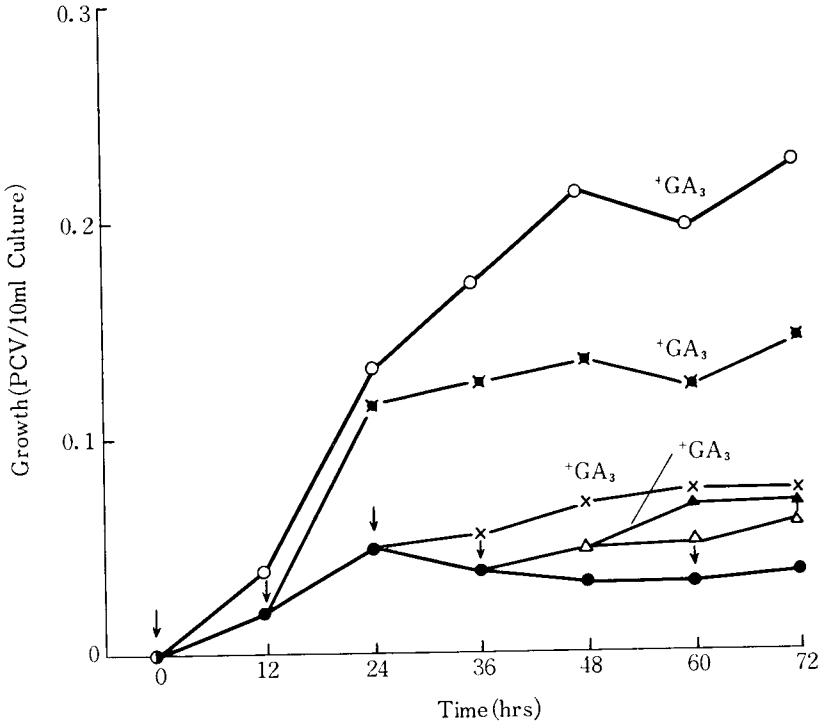


図30 Oleic acid, Linoleic acid 各 0.25 Mol 培地に GA_3 を12時間毎に加え, 72時間培養した場合の本菌の生育曲線

9 酵母菌体から蛋白質の抽出・分離

酵母菌体より蛋白質を分離するに当ってはこれを機械的に破碎の後, 抽出する方法, 尿素による抽出, 酵素処理による抽出法, アルカリ処理による分離法等があるが, これらのうち尿素法^{39,40)}によって抽出分離を行なった。つまり, 0.25 Mol-Oleic acid を炭素源とする表11の基本培地で本菌を72時間しんとう培養し, 分離した酵母菌体を5%の食塩水で洗浄し, 水洗の後, 遠心分離をくり返し, 細胞に附着残留の Oleic acid を除去し供試品となし 10 Mol の尿素液で Wet cell をビーカーに移し, スターラーで2昼夜攪拌抽出後, 遠心分離し, 細胞片の上澄みを採取の後, セロハンに包み, 流水中に浸して3日間透析した。その後, セロハン内の透析済みの液をとり出し, 10%トリクロルサクサンを用いて pH 4~5 に調整し, 一晚, 冷蔵庫に放置, これを1分間3200回転の速度で2分間遠心分離して, 沈殿物を採取した後更に, 減圧乾燥して黄褐色の粉末を得た。本法は研究室内での方法であり, 大量生産の為には破碎抽出法を行

うべきであると考え。土から分離した酵母菌を変敗脂質を炭素源として培養し、その菌体蛋白質を粉末として得ることができたことは、今後、この蛋白質を利用した各種食品開発への出発点に到達することができたことを物語り、無限の期待がかけられることになった。

おわりに

筆者等は土から脂質資化性酵母を分離し、これを *Candida tropicalis* OT-65 と同定した。本菌は変敗油をよく資化し、特に Oleic acid 嗜好性の菌であることが明らかになった。本菌は非耐塩性の菌であるが、0.5 Mol-NaCl 存在下にもよく生育し得ることから水資源の点から海水を利用し、変敗油の存在下に酵母菌体を収獲し得る可能性を見出し、耐塩機構の解明への手がかりを得ることもできた。又、本菌に対する Gibberellic acid の効果を検討し、高等植物に対する作用と異なる作用サイトを持つことも明らかになった。Gibberellic acid は二炭素源混在時、特異的に炭素源の取り込みを促進することも明きらかとなった。このように培養諸条件を解明しつつ酵母菌体から蛋白質の分離も行ない、いよいよ変敗油と海水から蛋白質の採集可能であることを示すことができると共に、未来の食料として各種の食品づくりへの期待が持ち得るようになった。尚、本菌が過酸化脂質生成を抑制し、過酸化物価を下げるという現象を認める研究も行なったがこれは学会に発表の予定である。

本研究を進めるにあたってよく努力し、協力された本学食品学研究室、堀野成代・飯塚都子助手に対し感謝の意を表わす次第である。

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) Champagnant, A and Vernet, C.: Nature, 195, 13 (1963)
- 5) Koichi Yamada, etc.: Agr. Biol. Chem., 27, 391 (1963)
- 6) 小原・玉置: 相愛女子大学・女子短期大学研究論集, 14, 83 (1967)
- 7) 小原・玉置: 相愛女子大学・女子短期大学研究論集, 15, 35 (1968)
- 8) 小原・玉置: 相愛女子大学・女子短期大学研究論集, 17, 25 (1970)
- 9) J. Lodder and N. J. W. Kreger-Van Rij.: The Yeasts, a taxonomic study. Interscience Publicshers Inc., New Yerk (1952) (1984)
- 10) 飯塚 廣・後藤昭二: 酵母の分類同定法, (東京大学出版会) (1969)
- 11) 玉置・吉川: 相愛女子大学・女子短期大学研究論集, 16, 97 (1969)
- 12) 小原: 相愛女子大学・女子短期大学研究論集, 16, 67 (1969)
- 13) Ohara, K. and Tamaki, M.: Trans. Soai Women's Sr. and Jr. College, 22, 33 (1974)

脂質資化性酵母 *Candida tropicalis* OT-65 の性状と利用について

- 14) 小原・玉置：栄養学雑誌, 26, 84 (1968)
- 15) Kunihiro Ohara, Miyoko Tamaki and Hideo Takada: Trans. Mycol. Soc. Japan, 15, 91-97 (1974)
- 16) 高田・東田・小原：日本農芸化学会昭和46年度大会講演要旨集, p. 21, 東京 (1971)
- 17) 高田・玉置・小原：日本農芸化学会昭和47年度大会講演要旨集, p. 203, p. 204, 仙台 (1972)
- 18) 小原・玉置・高田：日本農芸化学会昭和48年度大会講演要旨集, p. 233, p. 234, 東京 (1973)
- 19) Kawahara, T., and H. Takada: Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 39, 49-56 (1973)
- 20) Yagi, T., M. Okuda, and H. Takada: Physiol. and Ecol., Kyoto 13, 75-80 (1965)
- 21) Kerwer, S. S., J. H. Mangum, K. G. Scrimgeour, J. D. Brodie, and F. M. Huennekens: Arch. Biochem. Biophys. 116, 305-318 (1966)
- 22) Lebeault, J., B. Roche, Z. Durnjak, and E. Azoulay: Arch. Microbiol. 72, 140-153 (1970)
- 23) Mardon, D. N., and E. Balish: Can. J. Microbiol. 17, 795-802 (1971)
- 24) Mardon, D. N., A. W. Phillips, and E. Balish: J. Bacteriol. 100, 701-707 (1969)
- 25) Ohara, K. Tamaki, M. and Takada, H.: Trans. Mycol. Soc. Japan, 16, 247-252 (1975)
- 26) Ohara, K. Tamaki, M. and Takada, H.: Trans. Mycol. Soc. Japan, 17, 445-450 (1976)
- 27) 高田英夫・小原国彦・玉置ミヨ子・河原孝義：日本農芸化学会昭和49年度大会講演要旨集 p. 194 東京 (1974)
- 28) 小原国彦・玉置ミヨ子・河原孝義・高田英夫：日本農芸化学会昭和50年度大会講演要旨集 p. 416 札幌 (1975)
- 29) Evins, W. H. and J. E. Vaner: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1631-1633 (1971)
- 30) Johnson, K. D. and H. Kende: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2674-2677 (1971)
- 31) Jones, R. L.: Pl. physiol. 52, 303-308 (1973)
- 32) Marcus, A.: Ann. Rev. Pl. Physiol, 22, 313-336 (1971)
- 33) Wood, A. and L. G. Paleg: Pl. Physiol. 50, 103-108 (1972)
- 34) _____, and _____: Aus. J. Pl. Physiol. 1, 31-40 (1974)
- 35) _____, _____, and T. M. Spotwood: Aut. J. Pl. Physiol. 1, 167-169 (1974)
- 36) Stowe, B. B. and T. Yamaki: Ann. Rev. Pl. physiol. 8, 181-216 (1957)
- 37) Okuda, M., N. Yanagishima and H. Takada: J. Boil. Osaka Univ. 12, 66-67 (1961)
- 38) Yagi, T., Terano, J., Takada, H. and K. Ohara: Trans. Mycol. Soc. Japan 16, 36-41 (1975)
- 39) 満田・河合・壬生・鹿内：栄養と食糧, 17, 342 (1965)
- 40) 芝崎・安川・浅田：食品工誌21(11)545 (1974)